

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0133205 (43) 공개일자 2013년12월06일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)		(71) 출원인 제넨테크, 인크. 미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우스 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
(21) 출원번호 10-2013-7014711		(72) 발명자 아트왈, 자스빈더
(22) 출원일자(국제) 2011년11월09일 심사청구일자 없음		미국 94080 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
(85) 번역문제출일자 2013년06월07일		청, 융메이
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/059964		미국 94080 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
(87) 국제공개번호 WO 2012/064836 국제공개일자 2012년05월18일		(뒷면에 계속)
(30) 우선권주장 61/418,310 2010년11월30일 미국(US) (뒷면에 계속)		(74) 대리인 위혜숙, 양영준
전체 청구항 수 : 총 73 항		
(54) 발명의 명칭 신경계 질환 면역요법을 위한 방법 및 조성물		

(57) 요약

본 발명은 특정 신경 단백질에 대한 항체 및 그의 사용 방법을 제공한다.

(72) 발명자

추이, 세실리아 페이 츠

미국 94080 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 디엔
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

래저러스, 로버트 에이.

미국 94080 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 디엔
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

왕, 웨이뤄

미국 94080 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 디엔
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

왓츠, 라이언 제이.

미국 94080 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 디엔
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

우, 옌

미국 94080 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 디엔
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

장, 잉난

미국 94080 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 디엔
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

(30) 우선권주장

61/418,850 2010년12월01일 미국(US)

61/426,425 2010년12월22일 미국(US)

61/456,642 2010년11월10일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

BACE1에 결합하며, BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하는 단리된 항체 또는 그의 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, BACE1의 활성 부위에 결합하는 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, BACE1의 엑소사이트(exosite)에 결합하는 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 서열 7-19, 22-26, 28-30, 35-47, 56-79 및 118-122로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하며, 여기서 HVR-H1은 아미노산 서열 $GFX_{30}FX_{31}X_{32}X_{33}X_{34}IH$ (서열 45) (여기서, $X_{30}=N$ 또는 T 이고; $X_{31}=S, L$ 또는 Y 이고; $X_{32}=G$ 또는 Y 이고; $X_{33}=Y$ 또는 S 이고; $X_{34}=A, G$ 또는 S 임)를 포함하고; HVR-H2는 아미노산 서열 $X_{35}X_{36}ISPX_{37}X_{38}GX_{39}TX_{40}YADSVKG$ (서열 46) (여기서, $X_{35}=A$ 또는 G 이고; $X_{36}=W$ 또는 S 이고; $X_{37}=A$ 또는 Y 이고; $X_{38}=G$ 또는 S 이고; $X_{39}=S$ 또는 Y 이고; $X_{40}=D$ 또는 S 임)를 포함하고; HVR-H3은 아미노산 서열 $X_{41}PX_{42}X_{43}X_{44}X_{45}X_{46}X_{47}MDY$ (서열 47) (여기서, $X_{41}=Q$ 또는 G 이고; $X_{42}=T$ 또는 F 이고; $X_{43}=H$ 또는 S 이고; $X_{44}=Y$ 또는 P 이고; $X_{45}=Y$ 또는 W 이고; $X_{46}=Y$ 또는 V 이고; X_{47} 은 임의로 서열 $YAKGYKA$ (서열 48)를 포함함)를 포함하는 것인 항체.

청구항 6

제1항에 있어서, HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하며, 여기서 HVR-H1은 아미노산 서열 $GX_{71}X_{72}X_{73}X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}IH$ (서열 120) (여기서, $X_{71}=F$ 또는 Y 이고; $X_{72}=F, N$ 또는 T 이고; $X_{73}=F$ 또는 Y 이고; $X_{74}=L, Q, I, S$ 또는 Y 이고; $X_{75}=G$ 또는 Y 이고; $X_{76}=Y$ 또는 S 이고; $X_{77}=A, G$ 또는 S 임)를 포함하고; HVR-H2는 아미노산 서열 $X_{78}X_{79}ISPX_{80}X_{81}GX_{82}X_{83}X_{84}YADSVKG$ (서열 121) (여기서, $X_{78}=A$ 또는 G 이고; $X_{79}=W$ 또는 S 이고; $X_{80}=A, S, Q$ 또는 Y 이고; $X_{81}=G$ 또는 S 이고; $X_{82}=S, K, L$ 또는 Y 이고; $X_{83}=T$ 또는 Y 이고; $X_{84}=D$ 또는 S 임)를 포함하고; HVR-H3은 아미노산 서열 $X_{85}PX_{86}X_{87}X_{88}X_{89}X_{90}X_{91}MDY$ (서열 122) (여기서, $X_{85}=Q$ 또는 G 이고; $X_{86}=T$ 또는 F 이고; $X_{87}=H, Y$ 또는 S 이고; $X_{88}=Y$ 또는 P 이고; $X_{89}=Y$ 또는 W 이고; $X_{90}=Y$ 또는 V 이고; X_{91} 은 임의로 서열 $YAKGYKA$ (서열 48)를 포함함)를 포함하는 것인 항체.

청구항 7

제1항에 있어서, HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하며, 여기서 HVR-H1은 아미노산 서열 $GX_{53}X_{54}X_{55}X_{56}GYGIH$ (서열 68) (여기서, $X_{53}=F$ 또는 Y 이고; $X_{54}=T$ 또는 F 이고; $X_{55}=F$ 또는 Y 이고; $X_{56}=L, Q$ 또는 I 임)를 포함하고, HVR-H2는 아미노산 서열 $GWISPX_{57}X_{58}GX_{59}X_{60}DYADSVKG$ (서열 69) (여기서, $X_{57}=A, S$ 또는 Q 이고; $X_{58}=G$ 또는 S 이고; $X_{59}=S, K$ 또는 L 이고; $X_{60}=T$ 또는 Y 임)를 포함하고, HVR-H3 서열은 아미노산 서열 $GPFX_{61}PWVMDY$ (서열 70) (여기서, $X_{61}=S$ 또는 Y 임) 또는 서열 79의 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체.

청구항 8

제5항에 있어서, 아미노산 서열 $GFTFX_{13}GYX_{14}IH$ (서열 26) (여기서, $X_{13}=S$ 또는 L 이고, $X_{14}=A$ 또는 G 임)를 포함하

는 HVR-H1 서열을 포함하는 항체.

청구항 9

제6항에 있어서, 서열 22, 서열 23, 서열 28 및 서열 71-73으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1 서열을 포함하는 항체.

청구항 10

제6항에 있어서, 서열 24, 서열 29 및 서열 74-78로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2 서열을 포함하는 항체.

청구항 11

제6항에 있어서, 서열 25, 서열 30 및 서열 79로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3 서열을 포함하는 항체.

청구항 12

제6항에 있어서, 도 1(b)에서 클론 YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29 및 YW412.8.51에 대해 제시된 것들 또는 도 24(a)-(c)에서 클론에 대해 제시된 것들에 상응하는 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3 서열을 포함하는 항체.

청구항 13

제6항에 있어서, 도 2(b)에서 클론 Fab12, LC6, LC9 및 LC10에 대해 제시된 것들에 상응하는 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3 서열을 포함하는 항체.

청구항 14

제6항에 있어서, 서열 22 또는 23의 HVR-H1 서열, 서열 24의 HVR-H2 서열 및 서열 25의 HVR-H3 서열을 포함하는 항체.

청구항 15

제14항에 있어서, HVR-H1 서열이 서열 23인 항체.

청구항 16

제6항에 있어서, 서열 28의 HVR-H1 서열, 서열 29의 HVR-H2 서열 및 서열 30의 HVR-H3 서열을 포함하는 항체.

청구항 17

제6항에 있어서, 서열 20, 21, 27 및 80-98로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH 쇄를 포함하는 항체.

청구항 18

제16항에 있어서, VH 쇄 아미노산 서열이 서열 21인 항체.

청구항 19

제1항에 있어서, HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3의 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하며, 여기서 HVR-L1은 아미노산 서열 RASQX₁₇VX₁₈X₁₉X₂₀X₂₁A (서열 42) (여기서, X₁₇=S, D 또는 V이고; X₁₈=S 또는 A이고; X₁₉=S, T 또는 N이고; X₂₀=A 또는 S이고; X₂₁=V 또는 L임)를 포함하고, HVR-L2는 아미노산 서열 X₂₂ASX₂₃LYS (서열 43) (여기서, X₂₂=S, W, Y 또는 L이고; X₂₃=F, S 또는 W임)를 포함하고, HVR-L3은 아미노산 서열 QQX₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉T (서열 44) (여기서, X₂₄=S, F, G, D 또는 Y이고; X₂₅=Y, P, S 또는 A이고; X₂₆=Y, T 또는 N이고; X₂₇=T, Y, D 또는 S이고; X₂₈=P 또는 L이고; X₂₉=F, P 또는 T임)를 포함하는 것인 항체.

청구항 20

제1항에 있어서, HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3의 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하며, 여기서 HVR-L1은 아미노산 서열 RASQX₁₇VX₁₈X₁₉X₂₀X₂₁A (서열 42) (여기서, X₁₇=S, D 또는 V이고; X₁₈=S 또는 A이고; X₁₉=S, T 또는 N이고; X₂₀=A 또는 S이고; X₂₁=V 또는 L임)를 포함하고, HVR-L2는 아미노산 서열 X₆₂ASX₆₃X₆₄YX₆₅ (서열 118) (여기서, X₆₂=S, W, Y, F 또는 L이고; X₆₃=F, S, Y 또는 W이고; X₆₄=L 또는 R이고; X₆₅=S, P, R, K 또는 W임)를 포함하고, HVR-L3은 아미노산 서열 QQX₆₆X₆₇X₆₈X₆₉X₇₀X₇₁T (서열 119) (여기서, X₆₆=S, F, G, D 또는 Y이고; X₆₇=Y, P, S 또는 A이고; X₆₈=Y, T 또는 N이고; X₆₉=T, Y, D 또는 S이고; X₇₀=P, Q, S, K 또는 L이고; X₇₁=F, P 또는 T임)를 포함하는 것인 항체.

청구항 21

제1항에 있어서, HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하며, 여기서 HVR-L1은 아미노산 서열 RASQX₁VX₂X₃X₄X₅A (서열 17) (여기서, X₁=D 또는 V이고; X₂=S 또는 A이고; X₃=T 또는 N이고; X₄=S 또는 A이고; X₅=V 또는 L임)를 포함하고, HVR-L2는 아미노산 서열 X₄₈ASX₄₉X₅₀YX₅₁ (서열 56) (여기서, X₄₈=S 또는 F이고; X₄₉=F 또는 Y이고; X₅₀=L 또는 R이고; X₅₁=S, P, R, K 또는 W임)을 포함하고, HVR-L3은 아미노산 서열 QQFPTYX₅₂PT (서열 57) (여기서, X₅₂=L, Q, S 또는 K임)를 포함하는 것인 항체.

청구항 22

제17항에 있어서, 아미노산 서열 RASQX₁VX₂X₃X₄X₅A (서열 17) (여기서, X₁=D 또는 V이고; X₂=S 또는 A이고; X₃=T 또는 N이고; X₄=S 또는 A이고; X₅=V 또는 L임)를 포함하는 HVR-L1 서열을 포함하는 항체.

청구항 23

제19항에 있어서, 아미노산 서열 X₆ASFLYS (서열 18) 또는 X₁₅ASX₁₆LYS (서열 41) (여기서, X₆=S 또는 L이고; X₁₅=S, W 또는 Y이고; X₁₆=S 또는 W임)를 포함하는 HVR-L2 서열을 포함하는 항체.

청구항 24

제19항에 있어서, 아미노산 서열 QQX₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂T (서열 19) (여기서, X₇=S, F, G, D 또는 Y이고; X₈=Y, P, S, 또는 A이고; X₉=T 또는 N이고; X₁₀=T, Y, D 또는 S이고; X₁₁=P 또는 L이고; X₁₂=P 또는 T임)를 포함하는 HVR-L3 서열을 포함하는 항체.

청구항 25

제19항에 있어서, 서열 7, 서열 8 또는 서열 35로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1 서열을 포함하는 항체.

청구항 26

제20항에 있어서, 서열 9, 서열 10, 서열 36-39 및 서열 58-64로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2 서열을 포함하는 항체.

청구항 27

제20항에 있어서, 서열 11-16, 서열 40 및 서열 65-67로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3 서열을 포함하는 항체.

청구항 28

제20항에 있어서, 도 1(a)에서 클론 YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29 및 YW412.8.51에 대해 제시된 것들 또는 도 23(a)-(c)에서 클론에 대해 제시된 것들에 상응하는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 서열을 포함하는 항체.

청구항 29

제20항에 있어서, 도 2(a)에서 클론 Fab12, LC6, LC9 및 LC10에 대해 제시된 것들에 상응하는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 서열을 포함하는 항체.

청구항 30

제20항에 있어서, 서열 7 또는 서열 8의 HVR-L1 서열; 서열 9 또는 서열 10의 HVR-L2 서열 및 서열 11-16으로 이루어진 군으로부터 선택된 HVR-L3 서열을 포함하는 항체.

청구항 31

제30항에 있어서, HVR-L1 서열이 서열 7이고, HVR-L2 서열이 서열 9이고, HVR-L3 서열이 서열 12인 항체.

청구항 32

제20항에 있어서, 서열 35의 HVR-L1 서열; 서열 36-39로 이루어진 군으로부터 선택된 HVR-L2 서열 및 서열 40의 HVR-L3 서열을 포함하는 항체.

청구항 33

제20항에 있어서, 서열 1-6, 31-34 및 99-117로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL 쇄 서열을 포함하는 항체.

청구항 34

제33항에 있어서, VL 쇄 아미노산 서열이 서열 2인 항체.

청구항 35

제15항에 있어서, 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2 및 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 추가로 포함하는 항체.

청구항 36

제34항에 있어서, 서열 21의 아미노산 서열을 포함하는 VH 쇄를 추가로 포함하는 항체.

청구항 37

서열 49의 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRP; 332 GLN; 335 THR 및 378 ASP로 이루어진 군으로부터 선택된 BACE1의 아미노산 잔기 중 하나 이상을 포함하는 에피토프에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 단편.

청구항 38

제37항에 있어서, 에피토프가 서열 49의 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRP; 332 GLN; 335 THR 및 378 ASP를 포함하는 것인 항체.

청구항 39

서열 49의 아미노산 315-318; 서열 49의 아미노산 331-335; 서열 49의 아미노산 370-381; 및 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 BACE1의 하나 이상의 아미노산 영역을 포함하는 에피토프에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 단편.

청구항 40

제39항에 있어서, 에피토프가 서열 49의 아미노산 315-318, 331-335 및 370-381을 포함하는 것인 항체.

청구항 41

BACE1의 에피토프에 결합하며, 결합시에 BACE1의 P6 및 P7 부위의 구조에서 입체형태 변화를 일으키는 단리된

항체 또는 그의 단편.

청구항 42

BACE1의 에피토프에 결합하며, 결합시에 서열 49의 아미노산 218-231이 랜덤 루프 구조를 채택하도록 유도하는 단리된 항체 또는 그의 단편.

청구항 43

제37항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, BACE1의 활성을 감소시키거나 억제하는 항체.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 모노클로날 항체인 항체.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 인간, 인간화 또는 키메라 항체인 항체.

청구항 46

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 단편인 항체.

청구항 47

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 전장 IgG1 항체인 항체.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 항체를 코딩하는 단리된 핵산.

청구항 49

제48항의 핵산을 포함하는 숙주 세포.

청구항 50

항체가 생산되도록 제49항의 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 항체의 생산 방법.

청구항 51

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 항체 및 세포독성제를 포함하는 면역접합체.

청구항 52

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 제제.

청구항 53

신경계 질환 또는 장애를 갖는 개체에게 유효량의 제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체를 치료하는 방법.

청구항 54

신경계 질환 또는 장애를 앓고 있거나 또는 이에 걸릴 위험이 있는 개체에게 유효량의 제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 신경계 질환 또는 장애를 앓고 있거나 또는 이에 걸릴 위험이 있는 환자에서 아밀로이드 플라크를 감소시키는 방법.

청구항 55

신경계 질환 또는 장애를 앓고 있거나 또는 이것이 발병할 위험이 있는 개체에게 유효량의 제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 신경계 질환 또는 장애를 앓고 있거나 또는 이것이 발병할 위험이 있는 환자에서 아밀로이드 플라크 형성을 억제하는 방법.

청구항 56

제53항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 신경계 질환 또는 장애가 알츠하이머병 (AD), 외상성 뇌 손상, 졸중, 녹내장, 치매, 근육 이영양증 (MD), 다발성 경화증 (MS), 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 낭성 섬유증, 엔젤만 증후군, 리들 증후군, 파제트병, 외상성 뇌 손상, 루이 소체 질환, 척수회백질염후 증후군, 샤이-드래거 증후군, 올리브뇌교소뇌 위축, 파킨슨병, 다계통 위축, 선조체흑질 변성, 핵상 마비, 소 해면상 뇌병증, 스크래피, 크로이츠펔트-야콥 증후군, 쿠루병, 게르스트만-스트라우슬러-샤잉커병, 만성 소모성 질환, 치명적 가족성 불면증, 연수 마비, 운동 뉴런 질환, 카나반병, 헌팅톤병, 뉴런 세로이드-리포푸신증, 알렉산더병, 투렛 증후군, 벤케스 킨키 헤어 증후군, 코케인 증후군, 할리보르텐-스파츠 증후군, 라포라병, 레트 증후군, 간렌즈 핵 변성, 레쉬-니한 증후군, 및 운베리히트-룬트보르크 증후군, 픽병 및 척수소뇌성 운동실조로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 신경계 질환 또는 장애가 알츠하이머병, 졸중, 외상성 뇌 손상 및 녹내장으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 58

환자에게 유효량의 제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 아밀로이드- β ($A\beta$) 단백질을 감소시키는 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 환자가 신경계 질환 또는 장애를 앓고 있거나 또는 이에 걸릴 위험이 있는 것인 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 신경계 질환 또는 장애가 알츠하이머병, 졸중, 외상성 뇌 손상 및 녹내장으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 61

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 항체와 환자로부터 분리된 생물학적 샘플을 BACE1 폴리펩티드에 대한 상기 항체의 결합에 적합한 조건 하에 접촉시키는 것, 및 상기 항체와 BACE1 폴리펩티드 사이에 복합체가 형성되는지의 여부를 검출하는 것을 포함하는, 환자에서 신경계 질환 또는 장애를 진단하는 방법.

청구항 62

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 항체와 환자로부터 분리된 생물학적 샘플을 BACE1 폴리펩티드에 대한 상기 항체의 결합에 적합한 조건 하에 접촉시키는 것, 및 상기 항체와 BACE1 폴리펩티드 사이에 복합체가 형성되는지의 여부를 검출하는 것을 포함하며, 여기서 상기 항체와 BACE1 사이의 복합체의 존재는 환자가 항-BACE1 항체를 사용하는 요법에 적격임을 나타내는 것인, 환자가 항-BACE1 항체를 사용하는 요법에 적격인지의 여부를 결정하는 방법.

청구항 63

제61항 또는 제62항에 있어서, 생물학적 샘플이 혈청, 혈장, 타액, 위 분비물, 점액, 뇌척수액, 림프액, 뉴런 조직, 뇌 조직, 심장 조직 또는 혈관 조직으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 64

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 의약으로 사용하기 위한 항체.

청구항 65

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 알츠하이머병 (AD), 외상성 뇌 손상, 졸중, 녹내장, 치매, 근육 이영양증 (MD), 다발성 경화증 (MS), 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 낭성 섬유증, 엔젤만 증후군, 리들 증후군, 파제트병, 외상성 뇌 손상, 루이 소체 질환, 척수회백질염후 증후군, 샤이-드래거 증후군, 올리브뇌교소뇌 위축,

파킨슨병, 다계통 위축, 선조체흑질 변성, 핵상 마비, 소 해면상 뇌병증, 스크래피, 크로이츠펔트-야콥 증후군, 쿠루병, 게르스트만-스트라우슬러-샤잉커병, 만성 소모성 질환, 치명적 가족성 불면증, 연수 마비, 운동 뉴런 질환, 카나반병, 헌팅톤병, 뉴런 세로이드-리포푸신증, 알렉산더병, 투렛 증후군, 멘케스 킨키 헤어 증후군, 코 케인 증후군, 할러보르텐-스파츠 증후군, 라포라병, 레트 증후군, 간렌즈핵 변성, 레쉬-니한 증후군, 및 운베리히트-룬트보르크 증후군, 픽병 및 척수소뇌성 운동실조로 이루어진 군으로부터 선택된 신경계 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 항체.

청구항 66

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 아밀로이드- β ($A\beta$) 단백질 생산을 감소시키고/거나 억제하는 데 사용하기 위한 항체.

청구항 67

의약의 제조에 있어서 제1항 내지 제47항 중 어느 한 항의 항체의 용도.

청구항 68

제67항에 있어서, 의약이 알츠하이머병 (AD), 외상성 뇌 손상, 졸중, 녹내장, 치매, 근육 이영양증 (MD), 다발성 경화증 (MS), 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 낭성 섬유증, 엔젤만 증후군, 리들 증후군, 파제트병, 외상성 뇌 손상, 루이 소체 질환, 척수회백질염후 증후군, 사이-드래거 증후군, 올리브뇌교소뇌 위축, 파킨슨병, 다계통 위축, 선조체흑질 변성, 핵상 마비, 소 해면상 뇌병증, 스크래피, 크로이츠펔트-야콥 증후군, 쿠루병, 게르스트만-스트라우슬러-샤잉커병, 만성 소모성 질환, 치명적 가족성 불면증, 연수 마비, 운동 뉴런 질환, 카나반병, 헌팅톤병, 뉴런 세로이드-리포푸신증, 알렉산더병, 투렛 증후군, 멘케스 킨키 헤어 증후군, 코케인 증후군, 할러보르텐-스파츠 증후군, 라포라병, 레트 증후군, 간렌즈핵 변성, 레쉬-니한 증후군, 및 운베리히트-룬트보르크 증후군, 픽병 및 척수소뇌성 운동실조로 이루어진 군으로부터 선택된 신경계 장애의 치료를 위한 것인 용도.

청구항 69

제67항에 있어서, 의약이 아밀로이드- β ($A\beta$) 단백질 생산을 감소시키고/거나 억제하기 위한 것인 용도.

청구항 70

서열 49의 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRP; 332 GLN; 335 THR 및 378 ASP로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산에 상응하는 BACE1의 아미노산 잔기 중 하나 이상을 포함하는, 항체 또는 그의 단편에 의해 특이적으로 인식되는 BACE1 에피토프.

청구항 71

제70항에 있어서, 서열 49의 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRP; 332 GLN; 335 THR 및 378 ASP에 상응하는 아미노산을 포함하는 BACE1 에피토프.

청구항 72

서열 49의 아미노산 315-318; 서열 40의 아미노산 331-335; 서열 49의 아미노산 370-381; 및 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 BACE1의 하나 이상의 아미노산 영역을 포함하는, 항체 또는 그의 단편에 의해 특이적으로 인식되는 BACE1 에피토프.

청구항 73

제72항에 있어서, 서열 49의 아미노산 315-318, 331-335 및 370-381을 포함하는 BACE1 에피토프.

명세서

기술 분야

관련 출원

본원은 2010년 11월 10일에 출원된 미국 가출원 번호 61/456,642, 2010년 11월 30일에 출원된 미국 가출원 번호

61/418,310, 2010년 12월 1일에 출원된 미국 가출원 번호 61/418,850, 및 2010년 12월 22일에 출원된 미국 가출원 번호 61/426,425를 우선권 주장하며, 이들은 모두 그의 전체내용이 본원에 참고로 포함된다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 본 발명은 일반적으로, 예를 들어 BACE1 활성을 억제하거나 감소시키는 BACE1 길항제인 항체, 및 이러한 항체를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 추가 실시양태는 다양한 신경계 질환 또는 장애를 치료하고 진단하는 방법 뿐만 아니라 환자에서 APP 및/또는 A β 폴리펩티드를 감소시키는 방법을 포함한다.

배경 기술

[0005] 아밀로이드증은 단일 질환 실체가 아니라, 하나 이상의 기관 또는 신체 계통에 축적되는 아밀로이드로 지칭되는 왁스질 전분-유사 단백질의 세포외 조직 침착물을 특징으로 하는, 다양한 군의 진행성 질환 과정이다. 아밀로이드 침착물이 축적됨에 따라, 이는 기관 또는 신체 계통의 정상적인 기능을 방해하기 시작한다. 15가지 이상의 다양한 유형의 아밀로이드증이 존재한다. 주요 형태는 알려져 있는 전조증상이 없는 원발성 아밀로이드증, 일부 다른 상태에 후속하는 속발성 아밀로이드증, 및 유전성 아밀로이드증이다.

[0006] 다수의 노화 질환들이 아밀로이드-유사 단백질을 바탕으로 하거나 이와 연관되어 있으며, 부분적으로 질환의 발병기전은 물론 진행에 기여하는 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 물질의 세포외 침착물의 축적을 특징으로 한다. 이러한 질환은 신경계 장애, 예컨대 알츠하이머병 (AD), 루이 소체 치매, 다운 증후군, 아밀로이드증을 수반한 유전성 뇌출혈 (네덜란드형); 광 파킨슨-치매 복합증을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 아밀로이드-유사 단백질을 바탕으로 하거나 그와 연관되어 있는 다른 질환은 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증, 크로이츠펠트 야콥병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, ALS (근위축성 측삭 경화증), 성인 발병 당뇨병, 노인성 심장 아밀로이드증, 내분비 중양, 및 황반 변성을 포함한 기타의 것들이다.

[0007] 폴리펩티드 β -아밀로이드 (A β)는 알츠하이머병 (AD)의 발병기전에서 중추적 역할을 수행할 수 있다. 문헌 [Vassar et al., J. Neurosci. 29:12787-12794 (2009)]. CNS에서의 A β 폴리펩티드 축적은 시냅스 기능장애, 축삭 변성 및 뉴런 사멸을 일으킨다. AD 환자의 뇌는 우세한 신경병리학적 병변의 특징적인 병리상태, 예컨대 신경원섬유 엉킴 (NFT) 및 아밀로이드-풍부 노인성 플라크를 보여준다. 아밀로이드 플라크의 주요 성분은 A β 이다. 이러한 병변은 중추 신경계 (CNS) 뉴런의 집단의 대량 손실과 연관되고, 그의 진행은 AD와 연관된 임상적 치매를 수반한다.

[0008] A β 은 전구체 단백질의 단백질분해 생성물인 베타 아밀로이드 전구체 단백질 (β -APP 또는 APP)이다. APP는 유형-I 막형 단백질이고, 이는 2가지 프로테아제, β - 및 γ -세크레타제에 의해 순차적으로 절단된다. β -부위 아밀로이드 전구체 단백질 절단 효소 1 (BACE1)로 공지된 β -세크레타제는 우선 APP를 절단하여 A β 의 N-말단을 노출시킴으로써 C99로 공지된 막 결합된 단편을 생산한다. 문헌 [Vassar et al., J. Neurosci., 29:12787-12794 (2009) 및 UniProtKB/Swiss-Prot Entry P56817 (BACE1_HUMAN)]. γ -세크레타제는 이어서 C99를 절단하여 성숙 A β 폴리펩티드를 생산할 수 있다. 38개 아미노산 내지 43개 아미노산 길이의 이종 C 말단을 갖는 A β 가 생산된다. A β 의 42개 아미노산 형태 (A β_{42})는 A β 의 원섬유성 형태이고, 다운 증후군을 갖는 환자에서 과다 생산되며, AD의 초기 발병기전에서 소정의 역할을 수행하는 것으로 제안되었다. 문헌 [Vassar et al., J. Neurosci. 29:12787-12794 (2009)]. 이에 따라, BACE1은 그의 억제가 APP 및 A β 생산을 억제할 수도 있기 때문에 치료 표적이 되었다.

[0009] 실제로, BACE1 녹아웃 마우스 (BACE1^{-/-})는 뇌 A β 를 생산하지 않으며, 이는 BACE1이 뇌에서 A β 생산을 담당하는 주요 (유일하지 않다면) 효소라는 것을 확인한다. 문헌 [Roberds et al., Human Mol. Genetics 10:1317-1324 (2001)]. 또한, AD 모델에서 BACE1 녹아웃 마우스는 아밀로이드 플라크를 형성하지 않으며; 인지 결핍 및 콜린성 기능장애가 또한 회복된다. 문헌 [McConlogue et al., J. Biol. Chem. 282: 26326-26334 (2007); Ohno et al., Neuron 41: 27-33 (2004); 및 Laird et al., J. Neurosci. 25:11693-11709 (2005)]. 추가로, BACE1 이중접합 녹아웃 마우스는 플라크 형성이 감소하였으며, 이는 BACE1 활성의 완전한 억제가 플라크 감소에 필요하지 않다는 것을 나타낸다. 문헌 [McConlogue et al., J. Biol. Chem. 282: 26326-26334 (2007)].

[0010] 최근에, APP는 카스파제-의존성 뉴런 세포체 사멸 및 축삭 가지치기를 일으키는 사멸 수용체 6 (DR6)에 대한 리간드인 것으로 밝혀졌다. 문헌 [Nikolaev et al., Nature 457: 981-989 (2009)]. 또한, BACE1 화합물 억제제는 축삭 및 세포체의 변성을 손상시켰다. 상기 문헌. 이러한 결과는 APP가 DR6 결합을 통해 AD에 기여할 수 있는 모델을 가리킨다.

[0011] 신경계 질환 및 장애, 예컨대 AD를 갖는 환자에서 APP 및 Aβ 생산을 감소시키는데 효과적인 BACE1의 치료 억제제를 갖는 것이 유익할 것이다. 본원에 제공된 본 발명은 이러한 억제제 (다양한 방법에 있어서 그의 용도 포함)에 관한 것이다.

[0012] 특허 출원 및 공보를 포함한 본원에 인용된 모든 참고문헌은 그의 전체내용이 참고로 포함된다.

발명의 내용

[0013] 개요

[0014] 본 발명은 BACE1 길항제 항체 및 그의 사용 방법을 제공한다. 구체적으로, 항체는 BACE1의 활성을 억제하거나 감소시킨다.

[0015] 한 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제한다. 특히, 항체는 BACE1의 활성 부위 또는 BACE1의 엑소사이트(exosite)에 결합한다.

[0016] 또 다른 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하며, 서열 7-19, 22-26, 28-30, 35-47, 56-79 및 118-122로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다.

[0017] 추가 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하며, 여기서 HVR-H1은 아미노산 서열 GFX₃₀FX₃₁X₃₂X₃₃X₃₄IH (서열 45) (여기서, X₃₀=N 또는 T이고; X₃₁=S, L 또는 Y이고; X₃₂=G 또는 Y이고; X₃₃=Y 또는 S이고; X₃₄=A, G 또는 S임)를 포함하고; HVR-H2는 아미노산 서열 X₃₅X₃₆ISPX₃₇X₃₈GX₃₉TX₄₀YADSVKG (서열 46) (여기서, X₃₅=A 또는 G이고; X₃₆=W 또는 S이고; X₃₇=A 또는 Y이고; X₃₈=G 또는 S이고; X₃₉=S 또는 Y이고; X₄₀=D 또는 S임)를 포함하고; HVR-H3은 아미노산 서열 X₄₁PX₄₂X₄₃X₄₄X₄₅X₄₆MDY (서열 47) (여기서, X₄₁=Q 또는 G이고; X₄₂=T 또는 F이고; X₄₃=H 또는 S; X₄₄=Y 또는 P이고; X₄₅=Y 또는 W이고; X₄₆=Y 또는 V이고; X₄₇은 임의로 서열 YAKGYKA (서열 48)를 포함함)를 포함한다. 대안적으로, 항체는 아미노산 서열 GFTFX₁₃GYX₁₄IH (서열 26) (여기서, X₁₃=S 또는 L이고, X₁₄=A 또는 G임); 또는 서열 22; 서열 23; 및 서열 28로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1 서열을 포함한다.

[0018] 추가 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하며, 여기서 HVR-H1은 아미노산 서열 GX₇₁X₇₂X₇₃X₇₄X₇₅X₇₆X₇₇IH (서열 120) (여기서, X₇₁=F 또는 Y이고; X₇₂=F, N 또는 T이고; X₇₃=F 또는 Y이고; X₇₄=L, Q, I, S 또는 Y이고; X₇₅=G 또는 Y이고; X₇₆=Y 또는 S이고; X₇₇=A, G 또는 S임)를 포함하고; HVR-H2는 아미노산 서열 X₇₈X₇₉ISPX₈₀X₈₁GX₈₂X₈₃X₈₄YADSVKG (서열 121) (여기서, X₇₈=A 또는 G이고; X₇₉=W 또는 S이고; X₈₀=A, S, Q 또는 Y이고; X₈₁=G 또는 S이고; X₈₂=S, K, L 또는 Y이고; X₈₃=T 또는 Y이고; X₈₄=D 또는 S임)를 포함하고; HVR-H3은 아미노산 서열 X₈₅PX₈₆X₈₇X₈₈X₈₉X₉₀X₉₁MDY (서열 122) (여기서, X₈₅=Q 또는 G이고; X₈₆=T 또는 F이고; X₈₇=H, Y 또는 S이고; X₈₈=Y 또는 P이고; X₈₉=Y 또는 W이고; X₉₀=Y 또는 V이고; X₉₁은 임의로 서열 YAKGYKA (서열 48)를 포함함)를 포함한다. 대안적으로, 항체는 아미노산 서열 GX₅₃X₅₄X₅₅X₅₆GYGIH (서열 68) (여기서, X₅₃=F 또는 Y이고; X₅₄=T 또는 F이고; X₅₅=F 또는 Y이고; X₅₆=L, Q 또는 I임); 또는 서열 71-73으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1 서열을 포함한다. 대안적으로, 항체는 아미노산 서열 GWISPX₅₇X₅₈GX₅₉X₆₀DYADSVKG (서열 69) (여기서, X₅₇=A, S 또는 Q이고; X₅₈=G 또는 S이고; X₅₉=S, K 또는 L이고; X₆₀=T 또는 Y임); 또는 서열 74-78로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2 서열을 포함한다. 대안적으로, 항체는 아미노산 서열 GPFX₆₁PWVMDY (서열 70) (여기서, X₆₁=S 또는 Y임); 또는 서열 79의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3 서열을 포함한다.

[0019] 한 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, 서열 22, 서열 23, 서열 28 및 서열 71-73으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1 서열을 포함한다.

- [0020] 한 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, 서열 24, 서열 29 및 서열 74-78로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2 서열을 포함한다.
- [0021] 또 다른 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, 서열 25, 서열 30 및 서열 79로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3 서열을 포함한다.
- [0022] 한 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, 도 1(b)에서 클론 YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29 및 YW412.8.51에 대해 제시된 것들 또는 도 2(b)에서 클론 Fab12, LC6, LC9 및 LC10에 대해 제시된 것들 또는 도 24a-c에 제시된 클론에 상응하는 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3 서열을 포함한다.
- [0023] 한 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, 서열 22 또는 23의 HVR-H1 서열, 서열 24의 HVR-H2 서열 및 서열 25의 HVR-H3 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, 서열 23의 HVR-H1 서열, 서열 24의 HVR-H2 서열 및 서열 25의 HVR-H3 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, 서열 28의 HVR-H1 서열, 서열 29의 HVR-H2 서열 및 서열 30의 HVR-H3 서열을 포함한다.
- [0024] 한 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, 서열 71-73으로부터 선택된 HVR-H1 서열, 서열 74-78로부터 선택된 HVR-H2 서열 및 서열 79로부터 선택된 HVR-H3 서열을 포함한다.
- [0025] 한 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, 서열 20, 21, 27 및 80-98로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 가변 중쇄(VH)를 포함한다. 한 측면에서, 항체는 서열 21의 VH 쇄 아미노산 서열을 포함한다.
- [0026] 또 다른 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3의 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하며, 여기서 HVR-L1은 아미노산 서열 RASQX₁₇VX₁₈X₁₉X₂₀X₂₁A (서열 42) (여기서, X₁₇=S, D 또는 V이고; X₁₈=S 또는 A이고; X₁₉=S, T 또는 N이고; X₂₀=A 또는 S이고; X₂₁=V 또는 L임)를 포함하고, HVR-L2는 아미노산 서열 X₂₂ASX₂₃LYS (서열 43) (여기서, X₂₂=S, W, Y 또는 L이고; X₂₃=F, S 또는 W임)를 포함하고, HVR-L3은 아미노산 서열 QQX₂₄X₂₅X₂₆A₂₇X₂₈X₂₉T (서열 44) (여기서, X₂₄=S, F, G, D 또는 Y이고; X₂₅=Y, P, S 또는 A이고; X₂₆=Y, T 또는 N이고; X₂₇=T, Y, D 또는 S이고; X₂₈=P 또는 L이고; X₂₉=F, P 또는 T임)를 포함한다.
- [0027] 또 다른 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3의 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하며, 여기서 HVR-L1은 아미노산 서열 RASQX₁₇VX₁₈X₁₉X₂₀X₂₁A (서열 42) (여기서, X₁₇=S, D 또는 V이고; X₁₈=S 또는 A이고; X₁₉=S, T 또는 N이고; X₂₀=A 또는 S이고; X₂₁=V 또는 L임)를 포함하고, HVR-L2는 아미노산 서열 X₆₂ASX₆₃X₆₄YX₆₅ (서열 118) (여기서, X₆₂=S, W, Y, F 또는 L이고; X₆₃=F, S, Y 또는 W이고; X₆₄=L 또는 R이고; X₆₅=S, P, R, K 또는 W임)를 포함하고, HVR-L3은 아미노산 서열 QQX₆₆X₆₇X₆₈X₆₉X₇₀X₇₁T (서열 119) (여기서, X₆₆=S, F, G, D 또는 Y이고; X₆₇=Y, P, S 또는 A이고; X₆₈=Y, T 또는 N이고; X₆₉=T, Y, D 또는 S이고; X₇₀=P, Q, S, K 또는 L이고; X₇₁=F, P 또는 T임)를 포함한다.
- [0028] 특정 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, 아미노산 서열 RASQX₁VX₂X₃X₄X₅A (서열 17) (여기서, X₁=D 또는 V이고; X₂=S 또는 A이고; X₃=T 또는 N이고; X₄=S 또는 A이고; X₅=V 또는 L임) 또는 서열 7, 서열 8 또는 서열 35로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1 서열을 포함한다.
- [0029] 한 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시

키거나 억제하고, 아미노산 서열 X_6 ASFLYS (서열 18) (여기서, X_6 =S 또는 L임) 또는 X_{15} ASX X_{16} LYS (서열 41) (여기서, X_{15} =S, W 또는 Y이고, X_{16} =S 또는 W임) 또는 서열 9, 서열 10 및 서열 36-39로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2 서열을 포함한다.

[0030] 한 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, 아미노산 서열 QQX X_7 X X_8 X X_9 X X_{10} X X_{11} X X_{12} T (서열 19) (여기서, X_7 =S, F, G, D 또는 Y이고; X_8 =Y, P, S, 또는 A이고; X_9 =T 또는 N이고; X_{10} =T, Y, D 또는 S이고; X_{11} =P 또는 L이고; X_{12} =P 또는 T임) 또는 서열 11-16 및 서열 40으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3 서열을 포함한다.

[0031] 특정 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, 아미노산 서열 RASQX X_1 VX X_2 X X_3 X X_4 X X_5 A (서열 17) (여기서, X_1 =D 또는 V이고; X_2 =S 또는 A이고; X_3 =T 또는 N이고; X_4 =S 또는 A이고; X_5 =V 또는 L임) 또는 서열 7로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1 서열을 포함한다.

[0032] 한 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, 아미노산 서열 X_{48} ASX X_{49} X X_{50} YX X_{51} (서열 56) (여기서, X_{48} =S 또는 F이고; X_{49} =F 또는 Y이고; X_{50} =L 또는 R이고; X_{51} =S, P, R, K 또는 W임) 또는 서열 58-64로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2 서열을 포함한다.

[0033] 한 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, 아미노산 서열 QQFPTYX X_{52} PT (서열 57) (여기서, X_{52} =L, Q, S 또는 K임) 또는 서열 65-67로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3 서열을 포함한다.

[0034] 한 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, 도 1(a)에서 클론 YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29 및 YW412.8.51에 대해 제시된 것들 또는 도 2(a)에서 클론 Fab12, LC6, LC9 및 LC10에 대해 제시된 것들 또는 도 23a-c에서 클론에 대해 제시된 것들에 상응하는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 서열을 포함한다.

[0035] 한 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, 서열 7 또는 서열 8의 HVR-L1 서열; 서열 9, 서열 10 또는 서열 58-64로 이루어진 군으로부터 선택된 HVR-L2 서열; 서열 11-16 및 65-67로 이루어진 군으로부터 선택된 HVR-L3 서열을 포함한다. 또 다른 측면에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, 서열 7의 HVR-L1 서열, 서열 9의 HVR-L2 서열 및 서열 12의 HVR-L3 서열을 포함한다.

[0036] 추가 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, 서열 7, 서열 8 또는 서열 35의 HVR-L1 서열을 포함한다.

[0037] 추가 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, 서열 9-10, 36-39 또는 58-64의 HVR-L2 서열을 포함한다.

[0038] 추가 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, 서열 11-16, 40 또는 65-67의 HVR-L3 서열을 포함한다.

[0039] 또 다른 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, 서열 1-6, 31-34 및 99-117로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 가변 경쇄 (VL) 서열을 포함한다. 한 측면에서, VL 쇄 아미노산 서열은 서열 2이다.

[0040] 추가 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, 서열 23의 HVR-H1 서열, 서열 24의 HVR-H2 서열, 서열 25의 HVR-H3 서열, 서열 7의 HVR-L1, 서열 9의 HVR-L2 및 서열 12의 HVR-L3을 포함한다.

[0041] 한 실시양태에서, BACE1에 결합하는 단리된 항체가 제공되며, 여기서 항체는 BACE1 폴리펩티드의 활성을 감소시키거나 억제하고, 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 VL 쇄 및 서열 21의 아미노산 서열을 포함하는 VH 쇄를 포함한다.

[0042] 또 다른 실시양태에서, 서열 49의 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRP; 332 GLN; 335 THR;

및 378 ASP로 이루어진 군으로부터 선택된 BACE1의 아미노산 잔기 중 하나 이상을 포함하는 에피토프에 결합하는 단리된 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 49의 아미노산: 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRP; 332 GLN; 335 THR; 및 378 ASP를 포함하는 BACE1의 에피토프에 결합한다.

[0043] 다른 실시양태에서, 항체는 서열 49의 아미노산 315-318; 서열 49의 아미노산 331-335; 서열 49의 아미노산 370-381; 및 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 BACE1의 하나 이상의 아미노산 영역을 포함하는 BACE1의 에피토프에 결합한다. 한 실시양태에서, 항체는 서열 49의 아미노산 315-318, 331-335 및 370-381을 포함하는 BACE1의 에피토프에 결합한다.

[0044] 또 다른 실시양태에서 항체는 결합시에 BACE1의 P6 및 P7 부위의 구조에서 입체형태 변화를 일으키는 BACE1의 에피토프에 결합한다. 추가 실시양태에서, 항체는 서열 49의 아미노산 218-231이 랜덤 루프 구조를 채택하도록 유도하는 BACE1의 에피토프에 결합한다.

[0045] 본 발명의 항체는 임의의 수의 형태일 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체일 수 있다. 다른 측면에서 본 발명의 항체는 전장 항체 또는 그의 단편 (예를 들어, 항원 결합 성분을 포함하는 단편)이다. 본 발명의 다른 측면에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 또 다른 측면에서, 본 발명의 항체는 작용제 또는 모이어티, 예를 들어 세포독성제에 연결되거나 접합되어 면역접합체를 생성할 수 있다.

[0046] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 제제가 제공된다. 추가 실시양태에서 본 발명의 항체를 코딩하는 단리된 핵산 뿐만 아니라 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터가 제공된다. 또 다른 측면에서, 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포 뿐만 아니라, 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 항체의 생산에 적합한 조건 하에 배양하는 것을 포함하는 본 발명의 항체의 생산 방법이 제공된다.

[0047] 또 다른 실시양태에서, 신경계 질환 또는 장애를 갖는 개체에게 유효량의 본 발명의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체의 치료 방법이 제공된다.

[0048] 추가 실시양태에서, 신경계 질환 또는 장애를 앓고 있거나 또는 이에 걸릴 위험이 있는 개체에게 유효량의 본 발명의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 신경계 질환 또는 장애를 앓고 있거나 또는 이에 걸릴 위험이 있는 환자에서 아밀로이드 플라크를 감소시키거나 또는 아밀로이드 플라크 형성을 억제하는 방법이 제공된다.

[0049] 한 실시양태에서, 환자에게 유효량의 본 발명의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 A β 단백질을 감소시키는 방법이 제공된다. 한 측면에서, 환자는 신경계 질환 또는 장애를 앓고 있거나 또는 이에 걸릴 위험이 있다.

[0050] 또 다른 실시양태에서, 환자에게 유효량의 본 발명의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 축삭 변성을 억제하는 방법이 제공된다.

[0051] 추가 실시양태에서, 본 발명의 항체와 환자로부터 단리된 생물학적 샘플을 BACE1 폴리펩티드에 대한 상기 항체의 결합에 적합한 조건 하에 접촉시키는 것 및 항체와 BACE1 폴리펩티드 사이에 복합체가 형성되는지의 여부를 검출하는 것을 포함하는, 환자에서 신경계 질환 또는 장애를 진단하는 방법이 제공된다.

[0052] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체와 환자로부터 단리된 생물학적 샘플을 BACE1 폴리펩티드에 대한 상기 항체의 결합에 적합한 조건 하에 접촉시키는 것 및 항체와 BACE1 폴리펩티드 사이에 복합체가 형성되는지의 여부를 검출하는 것을 포함하며, 여기서 항체와 BACE1 사이의 복합체의 존재는 환자가 항-BACE1 항체를 사용하는 요법에 적격임을 나타내는 것인, 환자가 항-BACE1 항체를 사용하는 요법에 적격인지의 여부를 결정하는 방법이 제공된다. 한 측면에서 환자는 신경계 질환 또는 장애를 앓고 있거나 또는 이에 걸릴 위험이 있다.

[0053] 한 측면에서, 신경계 질환 또는 상태의 진단에 사용될 수 있는 생물학적 샘플; 또는 BACE1 항체를 사용하는 치료에 대한 환자의 반응성을 예상하거나 또는 환자의 적격성을 결정하기 위한 생물학적 샘플은 유체, 예컨대 혈청, 혈장, 타액, 위 분비물, 점액, 뇌척수액, 림프액 등, 또는 유기체로부터 수득한 조직 또는 세포 샘플, 예컨대 뉴런, 뇌, 심장 또는 혈관 조직을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0054] 본 발명의 방법의 한 측면에서, 환자는 포유동물이다. 또 다른 측면에서, 환자는 인간이다. 또 다른 측면에서, 신경계 질환 또는 장애는 알츠하이머병 (AD), 외상성 뇌 손상, 졸중, 녹내장, 치매, 근육 이영양증 (MD), 다발성 경화증 (MS), 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 남성 성염증, 엔젤만 증후군, 리들 증후군, 파제트병, 외상성 뇌 손상, 루이 소체 질환, 척수회백질염후 증후군, 샤이-드래거 증후군, 올리브뇌교소뇌 위축, 파킨슨병, 다계통 위축, 선조체흑질 변성, 핵상 마비, 소 해면상 뇌병증, 스크래피, 크로이츠펔트-야콥 증후군,

쿠루병, 게르스트만-스트라우슬러-샤잉커병, 만성 소모성 질환, 치명적 가족성 불면증, 연수 마비, 운동 뉴런 질환, 카나반병, 헌팅톤병, 뉴런 세로이드-리포푸신증, 알렉산더병, 투렛 증후군, 멘케스 킨키 헤어 증후군, 코 케인 증후군, 할러보르텐-스파츠 증후군, 라포라병, 레트 증후군, 간렌즈핵 변성, 레쉬-니한 증후군, 및 운베리 히트-룬트보르크 증후군, 치매 (픽병 및 척수소뇌성 운동실조를 포함하나 이에 제한되지는 않음)로 이루어진 군 으로부터 선택된다. 한 측면에서, 신경계 질환 또는 장애는 알츠하이머병이다.

[0055] 한 실시양태에서, 항체 또는 그의 단편에 의해 특이적으로 인식되며, 서열 49의 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRY; 332 GLN; 335 THR; 및 378 ASP로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산에 상응하는 BACE1의 아미노산 잔기 중 하나 이상을 포함하는 BACE1 에피토프가 제공된다. 한 측면에서, BACE1 에피토프는 서열 49의 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRY; 332 GLN; 335 THR; 및 378 ASP에 상응하는 아미노산을 포함한다.

[0056] 한 실시양태에서, 항체 또는 그의 단편에 의해 특이적으로 인식되며, 서열 49의 아미노산 315-318; 서열 49의 아미노산 331-335; 서열 49의 아미노산 370-381; 및 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 BACE1의 하나 이상의 아미노산 영역을 포함하는 BACE1 에피토프가 제공된다. 한 측면에서, BACE1 에피토프는 서열 49의 아미노산 315-318, 331-335 및 370-381을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1a-1b는 실시예 1(A)에 기재된 바와 같은 천연 다양성 파지 디스플레이 라이브러리의 나이트 분류로부터 수득한 클론 YW412.8 및 YW412.8의 친화도 성숙 형태의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 도시한다. 도 1a는 경쇄 서열 정렬을 도시한다. 도 1b는 중쇄 서열 정렬을 도시한다. 도 1a 및 1b 둘 다에서, 각각의 클론에 대한 HVR 서열은 박스 영역으로 나타내며, 첫번째 박스는 HVR-L1 (서열 7 및 8 - 도 1a) 또는 HVR-H1 (서열 22 및 23 - 도 1b)을 나타내고, 두번째 박스는 HVR-L2 (서열 9 및 10 - 도 1a) 또는 HVR-H2 (서열 24 - 도 1b)를 나타내고, 세번째 박스는 HVR-L3 (서열 11-16 - 도 1a) 또는 HVR-H3 (서열 25 - 도 1b)을 나타낸다.

도 2a-2b는 실시예 1(B)에 기재된 바와 같은 합성 다양성 파지 디스플레이 라이브러리의 나이트 분류로부터 수득한 클론 Fab 12 및 Fab 12의 친화도 성숙 형태의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 도시한다. 도 2a는 경쇄 서열 정렬을 도시한다. 도 2b는 중쇄 서열 정렬을 도시한다. 도 2a 및 2b 둘 다에서, 각각의 클론에 대한 HVR은 박스 영역으로 나타내며, 첫번째 박스는 HVR-L1 (서열 35 - 도 2a) 또는 HVR-H1 (서열 28 - 도 2b)을 나타내고, 두번째 박스는 HVR-L2 (서열 36-39 - 도 2a) 또는 HVR-H2 (서열 29 - 도 2b)를 나타내고, 세번째 박스는 HVR-L3 (서열 40 - 도 2a) 또는 HVR-H3 (서열 30 - 도 2b)을 나타낸다.

도 3a 및 3b는 실시예 1(B)에 기재된 바와 같은 합성 다양성 파지 디스플레이 라이브러리로부터 단리된 경쇄 및 중쇄 Fab로부터의 HVR 또는 CDR 서열을 도시한다. 넘버링은 문헌 [Kabat et al.]의 명명법에 따른다. 도 3a는 나타나는 순서대로 모두 각각 "CDRL1" 서열을 서열 133으로, "CDRL2" 서열을 서열 134로, "CDRL3" 서열을 서열 135-144, 141, 및 145-152로, "CDRH1" 서열을 서열 153-159, 158, 160-161, 159, 158, 162, 161 및 163-167로 개시한다. 도 3b는 나타나는 순서대로 모두 각각 "CDRH2" 서열을 서열 168-177, 174, 171, 178-182, 177 및 183으로, "CDRH3" 서열을 서열 184-202로 개시한다.

도 4는 천연 다양성 및 합성 다양성 파지 디스플레이 라이브러리로부터 확인된 다양한 클론에 의한 BACE1의 억제제를 보여주는 그래프를 제공한다. 클론을 실시예 1(A)에 기재된 바와 같이 균일 시간-분해 형광 (HTRF) 검정에서 BACE1 억제에 대해 시험하였다. 모든 YW 시리즈 항체는, YW 434.6 항체를 제외하고 (이는 320 nM의 농도에서 시험됨), 500 nM의 농도로 사용하였다. 항체 12.IgG, 14.IgG LC6.IgG, LC9.IgG, LC10.IgG 및 LC11.IgG를 1 μ M 농도에서 시험하였다.

도 5는 실시예 1(B)에 기재된 바와 같은 합성 다양성 파지 디스플레이 라이브러리로부터 확인된 항-BACE1 Fab의 존재 하에 HTRF 검정에서 BACE1의 활성을 보여주는 그래프이다. 선은 BACE1 및 기질 (PBS 대조군)의 존재 하의 100% 활성 (0% 억제) 및 BACE1의 부재 하의 100% 억제에 해당한다.

도 6은 실시예 1(B)에 기재된 바와 같은 친화도 성숙 항-BACE1 Fab의 CDR 또는 HVR 서열을 도시한다. 넘버링은 문헌 [Kabat et al.]의 명명법에 따른다. 경쟁 ELISA 비는 실시예 1(B)에 기재된 바와 같은 1-지점 경쟁 ELISA 검정에서 용액 중 경쟁자로서의 20 nM BACE1의 부재 또는 존재 하의 ELISA 신호의 비이다. 도 6은 나타나는 순서대로 모두 각각 "CDRL1" 서열을 서열 133, 133, 133, 133, 133 및 203으로, "CDRL2" 서열을 서열 134, 134 및 204-207로, "CDRL3" 서열을 서열 208-209, 145, 145 및 145-146으로, "CDRH1" 서열을 서열 157, 157, 158, 158, 158 및 162로, "CDRH2" 서열을 서열 172, 172, 171, 171, 171 및 178로, "CDRH3" 서열을 서열

188, 188, 195, 195 및 195-196으로 개시한다.

도 7a-7c는 실시예 1(B)에 기재된 바와 같은 친화도 성숙 항-BACE 클론을 사용한 경쟁적 ELISA 검정으로부터의 데이터를 보여주는 그래프를 함유한다. Fab-디스플레이 파지와 플레이트 상에 고정화된 BACE1 사이의 결합을 용액 중 BACE1의 일련의 희석액에서 경쟁시켰다. 도 7a, 7b 및 7c는 부모 및 상응하는 친화도 성숙 항체에 대한 경쟁 곡선을 도시한다.

도 8a-8c는 실시예 1(B)에 기재된 바와 같은 HTRF 효소 검정에서 항-BACE1 Fab로의 BACE1의 억제력을 보여주는 그래프를 도시한다. 개별 항-BACE1 클론에 대한 정제된 Fab의 억제 활성을 HTRF 효소 검정에서 측정하였다. OM99-2 (칼바이오켄(CalBiochem)®, 카탈로그 #496000)는 BACE1에 대한 합성 펩티드 억제제이고, 양성 대조군으로 사용되었다. 도 8a, 8b 및 8c는 부모 및 상응하는 친화도 성숙 유도체에 대한 억제 곡선이다. OM99-2에 대한 IC₅₀은 이 검정에서 11nM이었다.

도 9a는 실시예 2(B)에 기재된 바와 같은 HTRF 검정에서 BACE1에 대한 증진된 감수성을 갖는 긴 펩티드 기질 (좌측 패널) 또는 FRET 검정에서 BACE1에 대한 증진된 감수성을 갖는 짧은 펩티드 기질 (우측 패널)을 이용하여 인간 재조합 BACE1의 시험관내 효소 활성에 대한 친화도 성숙 YW412.8.31 항-BACE1 항체의 영향을 보여주는 그래프를 제공한다. OM99-2 (칼바이오켄®, 카탈로그 #496000), BACE1의 합성 펩티드 억제제, β-세크레타제 억제제 IV (칼바이오켄®, 카탈로그 #565788), BACE1의 소분자 억제제 (BACE1 SMI) 및 BACE1에 결합하지 않는 IgG 항체를 대조군으로 사용하였다. 도 9bi 및 9bii는 또한 실시예 2(B)에 기재된 바와 같이 YW412.8.31, 또는 대조군 IgG 항체의 존재 하에 BACE1에 대한 증진된 감수성을 갖는 짧은 펩티드 기질에 대한 인간 재조합 BACE1 세포외 도메인, 인간 재조합 BACE2 세포외 도메인 또는 카텝신 D 세포외 도메인의 시험관내 효소 활성을 보여주는 그래프를 제공한다.

도 10은 실시예 2(C)에 기재된 바와 같이 293-HEK 세포에서 재조합 아밀로이드 전구체 단백질 (APP)의 처리에 대해 다양한 항-BACE1 항체 (LC6, LC9, YW412.8, YW412.8.30, YW412.8.31 및 YW412.8.51)를 사용하여 수행한 실험과 결과를 도시한다. BACE1에 결합하지 않는 IgG 항체 (졸레어(Xolair)®)를 대조군으로 사용하였다.

도 11a-11d는 실시예 2(C)에 기재된 바와 같이 재조합 또는 내인성 아밀로이드 전구체 단백질 (APP)의 처리에 대한 YW412.8.31 항-BACE1 항체의 효과를 설명하는 그래프를 제공한다. 도 11a는 야생형 인간 APP를 안정하게 발현하는 293-HEK 세포를 사용하는 실험으로부터의 결과를 보여준다. BACE1 SMI는 대조군으로 사용된 소분자 BACE1 억제제이다 (화합물 8e - 문헌 [Charrier et al., J. Med. Chem. 51:3313-3317 (2008)]). 도 11b는 야생형 CD1 마우스로부터 배양된 E13.5 후근 신경절 뉴런을 사용하는 실험으로부터의 결과를 보여준다. 추가의 실험은 야생형 CD1 마우스로부터의 E16.5 피질 뉴런 (도 11c) 및 E16.5 배양된 해마 뉴런 (도 11d)의 배양물을 사용하여 수행하였다.

도 12a-12c는 실시예 2(D)에 기재된 바와 같은 일차 마우스 뉴런으로의 YW412.8.31 항-BACE1 항체 흡수의 영향을 제공한다. 도 12a는 뉴런에서 세포내 소포로의 YW412.8.31 항-BACE1 항체의 내재화를 보여준다. 배아 피질 뉴런을 지시된 시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 결합된 YW412.8.31을 α-인간-알렉사(Alexa) 568을 사용하여 표면 (비-투과된) 또는 내부 (투과된) 세포 구역 상에서 검출하였다. 신호의 대부분이 내재화되었다. 내재화된 YW412.8.31은 소포 구역: 초기 엔도솜 (TfR); 트랜스-골지망 (VAMP4) 및 리소솜 (LAMP1)에 대해 지시된 마커와의 공동-염색에 의해 아세포 구역에 국재화되었다. 스케일 막대=65 μm (상부) 및 20 μm (하부). 도 12b는 도면에 나타난 바와 같이 2가지 상이한 온도 및 3가지 상이한 시점에서 E13.5 후근 신경절 (DRG) 뉴런으로의 항-BACE1 항체의 흡수를 보여준다. 세포를 투과시켜 세포내 BACE1 항체를 표지하였다. 오직 외부에서 결합된 YW412.8.31 항-BACE1 항체는 비-투과된 세포에서 표지된다. 도 12(c)는 BACE1-발현 또는 BACE1 녹아웃 마우스로부터의 YW412.8.31 항-BACE1 항체의 E16.5 피질 뉴런으로의 흡수를 보여준다.

도 13은 YW412.8 항체-BACE1 항체의 그 자체, 또 다른 항-BACE1 항체 (LC6), 활성-부위 BACE1 결합 펩티드 (OM99-2 (칼바이오켄®, 카탈로그 #496000)) 및 엑소사이트 BACE1 결합 펩티드 (BMS1) (문헌 [Kornacker et al., Biochemistry 44:11567-11572 (2005)]의 펩티드 1)와의 경쟁적 결합을 비교하는, 실시예 3(A)로부터의 ELISA 결과의 그래프 표현을 제공한다.

도 14는 실시예 3(B)에 기재된 바와 같이 인간 BACE1 세포외 도메인과 공동-결정화된 Fab YW412.8.31의 2.8 Å 구조의 다양한 사진을 보여준다. Fab는 BACE1-억제 특성을 갖는 특정 펩티드와 상호작용하는 것으로 알려진 또 다른 엑소사이트와 부분적으로 중첩되는, 세크레타제 활성 부위 말단의 BACE1 엑소사이트에 결합한다.

도 15는 Fab YW412.8.31의 인간 BACE1 세포외 도메인과의 상호작용의 확대도를 제공한다. BACE1은 표면도로 나

타내고, Fab는 리본으로 나타낸다. 점선 표면은 BACE1 에피토프를 나타낸다.

도 16a 및 16b는 야생형 마우스에서 $A\beta_{1-40}$ 수준에 대한 BACE1의 기여를 조사하는 실험의 결과를 보여준다. BACE1+/+ 대 BACE1-/- 마우스에서 $A\beta_{1-40}$ 수준을 조사하였다. 마우스에게 실시예 4에 기재된 바와 같이 대조군 IgG 항체 또는 항-BACE YW412.8.31 항체의 단일 용량을 투여하였다. 도 16a는 마우스에서 $A\beta_{1-40}$ 생산에 대한 BACE1의 기여를 조사하는 유전자 연구의 결과를 보여준다. BACE1 녹아웃 마우스 (BACE1-/-)에서 관찰된 $A\beta_{1-40}$ 의 수준은 BACE1의 특정 억제제가 어떻게 야생형 마우스에서 $A\beta_{1-40}$ 생산을 변경하는지에 대한 대조군을 제공한다. 도 16b는 투여 24 또는 48시간 후에 혈장 및 CNS (피질)에서의 $A\beta_{1-40}$ 생산에 대한 대조군 IgG 또는 항-BACE1 YW412.8.31 (50 mg/kg) 투여의 효과를 보여준다. 대조군 IgG 또는 항-BACE1 항체의 단일 용량 (50 mg/kg)을 C57Bl/6 마우스에게 IV 주사에 의해 전달하였다. 24 또는 48시간 후에, 혈장 및 뇌 샘플을 수확하여 $A\beta_{1-40}$ 을 분석하였다. 혈장 $A\beta_{1-40}$ 은 35% (24시간에)만큼 감소하고, 피질 $A\beta_{1-40}$ 은 약 20%만큼 감소한다. 플롯팅된 값은 평균 ($\pm$ SEM) (* $p < 0.01$; ** $p < 0.001$)이다.

도 17a-17b는 실시예 4에 기재된 생체내 YW412.8.31 항-BACE1 항체 실험의 결과를 제공한다. 도 17a는 비히클 대조군 처리와 비교하여 2가지 상이한 농도에서 YW412.8.31 항-BACE1 항체로 처리된 마우스의 혈장 및 해마에서 관찰된 $A\beta_{1-40}$ 수준의 플롯을 보여준다. 도 17b는 개별 약동학 대 약역학 관독의 플롯이며, YW412.8.31 항-BACE1 항체에 대한 이 마우스 모델에 PK/PD 관련성이 존재한다는 것을 나타낸다.

도 18a 및 18b는 hAPP-트랜스제닉 마우스에게 YW412.8.31 항-BACE1 항체를 전신 투여하거나 (패널 a, 비교를 위해 다시 그래프로 작성한 도 17a에 기재된 바와 동일한 실험) 또는 연속 ICV 주입에 의해 투여한 (패널 b) 실험으로부터의 비교를 보여준다. 도 18a에서, 동물에게 비히클 또는 항-BACE1 항체 (30 또는 100 mg/kg)를 IP 주사 (3 용량 @ Q4D)에 의해 투여하였다. 마지막 투여 2시간 후에, 혈장 및 뇌 샘플을 수확하여 $A\beta_{1-40}$ 및 $A\beta_{1-42}$ 를 분석하였다. 혈장 $A\beta_{1-40}$ 및 $A\beta_{1-42}$ 는 30 및 100 mg/kg 항-BACE1 항체 둘 다에서 약 30% 대조군 수준까지 감소하였다. 해마 $A\beta_{1-40}$ 및 $A\beta_{1-42}$ 는 고용량의 항-BACE1 (100 mg/kg)에 의해 감소하였고(13-22%), 피질 $A\beta_{1-40}$ 및 $A\beta_{1-42}$ 는 감소하는 경향을 나타내었다 (12-18%). 도 18b에서, 대조군 IgG 또는 항-BACE1 항체를 7일 동안 편측 ICV 주입에 의해 전달하였다. 두 용량에서 $A\beta_{1-40}$ 및 $A\beta_{1-42}$ 의 지속적인 감소가 피질 (15-23%) 및 해마 (15-20%)에서 관찰되었다. 패널 c는 전신 대 ICV 전달 후에 뇌에서의 항-BACE1 항체의 수준을 보여준다. 플롯팅된 값은 평균 ($\pm$ SEM) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$)이다.

도 19a 및 19b는 BALB/C 마우스에게 IV 주사를 통해 전달된 YW412.8.31 항-BACE1 (1 또는 10 mg/kg)의 단일 투여의 PK 분석을 보여준다 (도 19a). 혈청 PK를 투여후 21일까지 분석하였다. 2가지 별도의 PK 검정이 이용되었다: 혈청에서 모든 항-BACE1 (총 mAb)을 검출하기 위한 검정, 및 혈청에서 오직 미결합 항-BACE1 (유리 mAb)를 검출하기 위한 검정. BACE1+/+, BACE1+/- 및 BACE1-/- 마우스에서의 단일 투여의 PK 분석은 초기 연구에서 관찰된 비-선형성을 확인하고, 증진된 제거가 실제로 표적-매개된다는 것을 나타낸다 (도 19b).

도 20a 및 20b는 대조군 IgG 또는 YW412.8.31 항-BACE1 항체 (30 mg/kg)를 IV 전달에 의해 투여한 시노물구스 원숭이의 PK 분석을 보여준다. 원숭이 혈청 (도 20a) 및 CSF 샘플 (도 20b)에서 총 항-BACE1 또는 대조군 항체 농도를 실시예 5에 기재된 바와 같이 원숭이-흡착된 염소 항-인간 IgG 폴리클로날 항체 (베틸(Bethyl), 텍사스 주 몽고메리)를 사용하여 측정하였다.

도 21a-21d는 시노물구스 원숭이에게 대조군 IgG 또는 항-BACE1 항체 YW412.8.31을 IV 전달에 의해 투여한 실시예 5에 기재된 바와 같은 실험의 결과이다. 파선은 개별 동물에 대한 데이터를 보여주고, 실선은 군 평균을 보여준다. 혈장 및 CSF를 투여 7일전, 2일전 및 직전에 샘플링하여 각각의 개별 원숭이에서 $A\beta_{1-40}$ 기준선 수준에 대한 평균 값을 설정하였다. 혈장 $A\beta_{1-40}$ (도 21a) 및 CSF $A\beta_{1-40}$ (도 21b)을 다양한 시점에 측정하였다. 기준선 혈장 (도 21c) 및 CSF (도 21d) $A\beta_{1-40}$ 의 동물 사이의 가변성을 또한 나타낸다.

도 22a 및 22b는 야생형 마우스에서 YW412.8.31의 전신 투여 후의 $A\beta$ 생산을 도시한다. 도 22a는 C57Bl/6J 마우스에게 IP 주사에 의해 투여된 대조군 IgG 또는 YW412.8.31 (100 mg/kg)의 단일 투여 후의 $A\beta_{1-40}$ 생산을 보여주는 그래프이다. 4시간 후에, 혈장 및 뇌 샘플을 수확하여 $A\beta_{1-40}$ 을 분석하였다. 혈장 $A\beta_{1-40}$ 은 48%만큼 감소하지만, 전뇌 $A\beta_{1-40}$ 은 이 패러다임에서는 감소하지 않는다. 도 22b는 각각 4일 간격의 3회의 IP 주사

에 의한 대조군 IgG 또는 YW412.8.31 (30 또는 100 mg/kg) 투여 후의 $A\beta_{1-40}$ 생산을 보여주는 그래프이다. 마지막 투여 4시간 후에, 혈장 및 뇌 샘플을 수확하여 $A\beta_{1-40}$ 을 분석하였다. 혈장 $A\beta_{1-40}$ 은 50-53%만큼 감소하는 반면, 뇌 $A\beta_{1-40}$ 은 30 mg/kg에서의 투여에 의해 감소하지 않으나, 100 mg/kg에서 투여하였을 때 42%만큼 감소한다. 플롯팅된 값은 평균 ($\pm$ SEM) (* $p < 0.0001$)이다.

도 23a-23c는 클론 YW412.8.31 및 YW412.8.31의 친화도 성숙 형태의 경쇄 아미노산 서열을 도시한다. 도 23a-23c는 완전한 경쇄 서열 정렬을 도시한다. 각각의 클론에 대한 HVR 서열을 박스 영역으로 나타내며, 첫번째 박스는 HVR-L1 (서열 7 - 도 23a)을 나타내고, 두번째 박스는 HVR-L2 (서열 9 및 58-64 - 도 23b)를 나타내고, 세번째 박스는 HVR-L3 (서열 12 및 66-67 - 도 23c)을 나타낸다.

도 24a-24c는 클론 YW412.8.31 및 YW412.8.31의 친화도 성숙 형태의 중쇄 아미노산 서열을 도시한다. 도 24a-24c는 완전한 중쇄 서열 정렬을 도시한다. 각각의 클론에 대한 HVR 서열을 박스 영역으로 나타내며, 첫번째 박스는 HVR-H1 (서열 24 및 71-73 - 도 24a)을 나타내고, 두번째 박스는 HVR-H2 (서열 24 및 74-78 - 도 24b)를 나타내고, 세번째 박스는 HVR-H3 (서열 25 및 79 - 도 24c)을 나타낸다.

도 25a 및 b는 실시예 6에 기재된 바와 같은 HTRF 검정에서 YW412.8.31 및 친화도 성숙 클론으로의 BACE1의 억제력을 보여주는 그래프를 도시한다. 클론 YW412.8.31.3S; YW412.8.31.9S; YW412.8.31.25S; YW412.8.31.58S; YW412.8.31.53; YW412.8.31.69; YW412.8.31.77; YW412.8.31.81S 및 YW412.8.31.89S가 BACE1의 프로테아제 활성을 억제하는 능력을 시험하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 정의

본원의 목적을 위해 "수용자 인간 프레임워크"는 하기 정의되는 바와 같이 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 유래된 경쇄 가변 도메인 (VL) 프레임워크 또는 중쇄 가변 도메인 (VH) 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크"로부터 유래된" 수용자 인간 프레임워크는 그의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 아미노산 변화의 수는 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 또는 2개 이하이다. 일부 실시양태에서, VL 수용자 인간 프레임워크는 VL 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열과 서열이 동일하다.

"친화도"는 분자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총합의 강도를 지칭한다. 달리 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 바와 같이 "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원들 (예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 내인성 결합 친화도를 지칭한다. 분자 X의 그의 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수 (K_d)로 표시될 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 방법을 포함하는 당업계에 공지된 통상의 방법으로 측정할 수 있다. 결합 친화도 측정을 위한 구체적인 예시적 및 대표적 실시양태를 하기 기재한다.

"친화도 성숙" 항체는 항원에 대한 항체의 친화도를 개선하는 변형을 갖지 않는 부모 항체에 비해 하나 이상의 추가변 영역 (HVR) 내의 하나 이상의 변형을 갖는 항체를 지칭한다.

용어 "항-베타-세크레타제 항체", "항-BACE1 항체", "베타-세크레타제에 결합하는 항체" 및 "BACE1에 결합하는 항체"는 항체가 BACE1을 표적화하는데 있어 진단제 및/또는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도로 BACE1에 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 한 실시양태에서, 관련되지 않은 비-BACE1 단백질에의 항-BACE1 항체의 결합의 정도는 예를 들어 방사성면역검정 (RIA)에 의해 측정된 바와 같이 BACE1에의 상기 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 실시양태에서, BACE1에 결합하는 항체는 $\leq 1 \mu M$, $\leq 100 nM$, $\leq 10 nM$, $\leq 1 nM$, $\leq 0.1 nM$, $\leq 0.01 nM$ 또는 $\leq 0.001 nM$ (예를 들어, $10^{-8} M$ 이하, 예를 들어 $10^{-8} M$ 내지 $10^{-13} M$, 예를 들어 $10^{-9} M$ 내지 $10^{-13} M$)의 해리 상수 (K_d)를 갖는다. 특정 실시양태에서, 항-BACE1 항체는 상이한 종으로부터의 BACE1 및 이소형들 사이에 보존된 BACE1의 에피토프에 결합한다.

본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 원하는 항원-결합 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함하나 이에 제한되지는

않는 다양한 항체 구조를 포함한다.

- [0064] "항체 단편"은 무손상 항체가 결합하는 항원에 결합하는 무손상 항체의 일부를 포함하는, 무손상 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 디아바디; 선형 항체; 단일-쇄 항체 분자 (예를 들어, scFv); 및 항체 단편들로 형성된 다중특이적 항체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0065] 참조 항체로서 "동일한 에피토프에 결합하는 항체"는 경쟁 검정에서 참조 항체가 그의 항원에 결합하는 것을 50% 이상 차단하는 항체, 및 반대로 경쟁 검정에서 항체가 그의 항원에 결합하는 것을 50% 이상 차단하는 참조 항체를 지칭한다. 예시적인 경쟁 검정이 본원에 제공된다.
- [0066] 용어 "키메라" 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정한 공급원 또는 종으로부터 유래된 반면, 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지가 다른 공급원 또는 종으로부터 유래된 항체를 지칭한다.
- [0067] 항체의 "클래스"는 그의 중쇄가 보유하는 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 지칭한다. 5가지 주요 클래스의 항체: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 서브클래스 (이소형), 예를 들어 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂로 추가로 분류될 수 있다. 상이한 클래스의 이뮤노글로불린에 반응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α, δ, ε, γ 및 μ로 지칭된다.
- [0068] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "세포독성제"는 세포 기능의 억제 또는 저해 및/또는 세포 사멸 또는 파괴를 유발하는 물질을 지칭한다. 세포독성제는 방사성 동위원소 (예를 들어, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹², 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제 또는 약물 (예를 들어, 메토타렉세이트, 아드리아미신, 빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 다른 삽입제); 성장 억제제; 효소 및 그의 단편, 예컨대 뉴클레오티드분해 효소; 항생제; 독소, 예컨대 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 소분자 독소 또는 효소 활성 독소 (그의 단편 및/또는 변이체 포함); 및 하기 개시되는 다양한 항종양제 또는 항암제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0069] "이펙터 기능"은 항체 이소형에 따라 달라지는, 항체의 Fc 영역에 기인하는 생물학적 활성을 지칭한다. 항체 이펙터 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화를 포함한다.
- [0070] 작용제, 예를 들어 제약 제제의 "유효량"은 필요한 투여량에서 필요한 기간 동안 원하는 치료 또는 예방 결과를 달성하기에 유효한 양을 지칭한다.
- [0071] 본원에서 용어 "Fc 영역"은 불변 영역의 적어도 일부를 함유하는 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하기 위해 사용된다. 상기 용어는 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 Cys226, 또는 Pro230으로부터 중쇄의 카르복실-말단으로 신장된다. 그러나, Fc 영역의 C-말단 리신 (Lys447)은 존재할 수 있거나 존재하지 않을 수 있다. 본원에서 달리 명시되지 않는 한, Fc 영역 또는 불변 영역 내의 아미노산 잔기의 넘버링은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991]에 기재된 바와 같이 EU 인덱스로도 지칭되는 EU 넘버링 시스템에 따른다.
- [0072] "프레임워크" 또는 "FR"은 초가변 영역 (HVR) 잔기 이외의 다른 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 하기 FR 도메인으로 이루어진다: FR1, FR2, FR3 및 FR4. 따라서, HVR 및 FR 서열은 일반적으로 VH (또는 VL)에서 하기 순서로 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.
- [0073] 용어 "전장 항체", "무손상 항체" 및 "전체 항체"는 본원에서 교환가능하게 사용되며, 천연 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖거나 또는 본원에서 정의된 바와 같은 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 지칭한다.
- [0074] 용어 "숙주 세포", "숙주 세포주" 및 "숙주 세포 배양물"은 교환가능하게 사용되고, 외인성 핵산이 도입된 세포 (이러한 세포의 자손 포함)를 지칭한다. 숙주 세포는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"를 포함하며, 이는 일차 형질전환된 세포 및 계대배양 횟수와 관계없이 그로부터 유래된 자손을 포함한다. 자손은 부모 세포와 핵산 함량이 완전히 동일하지 않을 수 있으나, 돌연변이를 함유할 수 있다. 본래 형질전환된 세포에 대해 스크리닝 또는 선택되는 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 자손이 본원에 포함된다.
- [0075] "인간 항체"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생산된 항체의 아미노산 서열에 반응하는 아미노산 서열을 보유하

나, 또는 인간 항체 레퍼토리 또는 다른 인간 항체-코딩 서열을 이용하여 비-인간 공급원으로부터 유래된 항체이다. 인간 항체의 이러한 정의에서 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 명확하게 배제된다.

[0076] "인간 컨센서스 프레임워크"는 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택시에 가장 흔히 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 서열의 선택은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터 행한다. 일반적으로, 서열의 하위군은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3]에서와 같은 하위군이다. 한 실시양태에서, VL의 경우에 하위군은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같은 하위군 카파 I이다. 한 실시양태에서, VH의 경우에 하위군은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같은 하위군 III이다.

[0077] "인간화" 항체는 비-인간 HVR로부터의 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터의 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 인간화 항체는 실질적으로 1개 이상, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 HVR (예를 들어, CDR)은 비-인간 항체의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 항체의 것에 상응한다. 인간화 항체는 임의로 인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 항체, 예를 들어 비-인간 항체의 "인간화 형태"는 인간화를 거친 항체를 지칭한다.

[0078] 본원에 사용된 용어 "초가변 영역" 또는 "HVR"은 서열이 초가변성이고/거나 구조적으로 한정된 루프 ("초가변 루프")를 형성하는 항체 가변 도메인의 각각의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 천연 4-쇄 항체는 6개의 HVR; VH 내의 3개 (H1, H2, H3) 및 VL 내의 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. HVR은 일반적으로 초가변 루프로부터의 및/또는 "상보성 결정 영역" (CDR)으로부터의 아미노산 잔기를 포함하며, 후자는 서열 가변성이 가장 높고/거나 항원 인식과 관련된다. 예시적인 초가변 루프는 아미노산 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3)에서 발생한다. (문헌 [Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)].) 예시적인 CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3)은 L1의 아미노산 잔기 24-34, L2의 50-56, L3의 89-97, H1의 31-35B, H2의 50-65 및 H3의 95-102에서 발생한다. (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)].) VH 내의 CDR1을 제외하고는, CDR은 일반적으로 초가변 루프를 형성하는 아미노산 잔기를 포함한다. CDR은 또한 항원에 접촉하는 잔기인 "특이성 결정 잔기" 또는 "SDR"을 포함한다. SDR은 단축-CDR, 또는 a-CDR로 지칭되는 CDR의 영역 내에 함유된다. 예시적인 a-CDR (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 및 a-CDR-H3)은 L1의 아미노산 잔기 31-34, L2의 50-55, L3의 89-96, H1의 31-35B, H2의 50-58 및 H3의 95-102에서 발생한다. (문헌 [Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)] 참조.) 달리 나타내지 않는 한, HVR 잔기 및 가변 도메인에서의 다른 잔기 (예를 들어, FR 잔기)는 본원에서 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 넘버링된다.

[0079] "면역접합체"는 세포독성제를 포함하나 이에 제한되지는 않는 하나 이상의 이중 분자(들)에 접합된 항체이다.

[0080] "개체" 또는 "대상체"는 포유동물이다. 포유동물은 가축 (예를 들어, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류 (예를 들어, 인간 및 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이), 토끼 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 개체 또는 대상체는 인간이다.

[0081] "단리된" 항체는 그의 천연 환경의 성분에서 분리된 것이다. 일부 실시양태에서, 항체는 예를 들어 전기영동 (예를 들어, SDS-PAGE, 등전 포커싱 (IEF), 모세관 전기영동) 또는 크로마토그래피 (예를 들어, 이온 교환 또는 역상 HPLC)에 의해 결정된 바와 같이 95% 또는 99% 초과 순도로 정제한다. 항체 순도의 평가 방법의 검토를 위해, 예를 들어 문헌 [Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)]을 참조한다.

[0082] "단리된" 핵산은 그의 천연 환경의 성분으로부터 분리된 핵산 분자를 지칭한다. 단리된 핵산은 핵산 분자를 통상적으로 함유하는 세포에 함유되는 핵산 분자를 포함하지만, 핵산 분자는 염색체 외에 또는 그의 천연 염색체 위치와 상이한 염색체 위치에 존재한다.

[0083] "항-BACE1 항체를 코딩하는 단리된 핵산"은 항체 중쇄 및 경쇄 (또는 그의 단편)를 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 (단일 벡터 또는 별도의 벡터 내의 이러한 분자(들) 및 숙주 세포에서 하나 이상의 위치에 존재하는 이러한 핵산 분자(들) 포함)를 지칭한다.

[0084] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하기 위해 사용되고, 즉 이러한 집단을 구성하는 개별 항체는 일반적으로 소량으로 존재할 수도 있는, 예를 들

어 자연 발생 돌연변이를 포함하거나 모노클로날 항체 제제의 생산 동안 생성되는 가능한 변이체 항체를 제외하고는 동일하고/하거나, 동일한 에피토프에 결합한다. 전형적으로 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 반대로, 모노클로날 항체 제제의 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대해 지시된다. 따라서, 수식어 "모노클로날"은 항체의 실질적으로 균질한 집단으로부터 얻은 항체의 특성을 나타내고, 임의의 특정한 방법에 의한 항체 생산을 필요로 하는 것으로서 간주되지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파지-디스플레이 방법, 및 인간 이뮤노글로불린 로커스의 전부 또는 일부를 함유하는 트랜스제닉 동물을 이용하는 방법을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 기술에 의해 제조할 수 있고, 이러한 방법 및 모노클로날 항체를 제조하기 위한 다른 예시적인 방법이 본원에 기재된다.

[0085] "네이키드 항체"는 이중 모이어티 (예를 들어, 세포독성 모이어티) 또는 방사성표지에 접합되지 않은 항체를 지칭한다. 네이키드 항체는 제약 제제에 존재할 수 있다.

[0086] "천연 항체"는 변화하는 구조를 갖는 자연 발생 이뮤노글로불린 분자를 지칭한다. 예를 들어, 천연 IgG 항체는 디슬피드-결합된 2개의 동일한 경쇄 및 2개의 동일한 중쇄로 이루어진 약 150,000 달톤의 이중사량체 당단백질이다. N-말단으로부터 C-말단으로, 각각의 중쇄는 가변 영역 (VH) (또한 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인으로 지칭됨)에 이어 3개의 불변 도메인 (CH1, CH2 및 CH3)을 갖는다. 유사하게, N-말단으로부터 C-말단으로, 각각의 경쇄는 가변 영역 (VL) (또한 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인으로 지칭됨)에 이어 불변 경쇄 (CL) 도메인을 갖는다. 항체의 경쇄는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기반으로, 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 지칭되는 2가지 유형 중 하나로 할당될 수 있다.

[0087] 용어 "포장 삽입물"은 적응증, 용법, 투여량, 투여, 조합 요법, 금기사항, 및/또는 이러한 치료 제품의 사용에 대한 경고에 대한 정보를 함유하는, 치료 제품의 상업용 패키지에 통상적으로 포함되는 설명서를 지칭하기 위해 사용된다.

[0088] 참조 폴리펩티드 서열에 대한 "아미노산 서열 동일성 퍼센트(%)"는 서열을 정렬시키고 필요한 경우에는 최대 서열 동일성 퍼센트 달성을 위해 갭을 도입한 후 임의의 보존적 치환을 서열 동일성의 일부로 간주하지 않으면서 참조 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 아미노산 서열 동일성 퍼센트를 결정하기 위한 정렬은 당업계 기술 범위 내의 다양한 방법, 예를 들어 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 메갈린(Megalign) (DNASTAR) 소프트웨어를 이용하여 달성할 수 있다. 당업자는 비교할 전장 서열에 대한 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 서열 정렬에 적절한 파라미터를 정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적상, 아미노산 서열 동일성 % 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 이용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크, 인크.(Genentech, Inc.) 소유로서, 소스 코드는 미국 저작권청 (20559 워싱턴 디.씨.)에 사용자 문서로 제출되어 있고, 미국 저작권 등록 번호 TXU510087로 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 제넨테크, 인크. (캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코)를 통해 공개적으로 이용가능하거나, 소스 코드로부터 컴파일링될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX V4.0D를 포함하여 UNIX 운영 시스템에서 사용되도록 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되어 있으며 변하지 않는다.

[0089] ALIGN-2가 아미노산 서열 비교를 위해 사용되는 상황에서, 주어진 아미노산 서열 B에, 주어진 아미노산 서열 B와, 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대한 주어진 아미노산 서열 A의 아미노산 서열 동일성 % (대안적으로, 주어진 아미노산 서열 B에, 주어진 아미노산 서열 B와, 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대해 특정 아미노산 서열 동일성 %를 갖거나 또는 이를 포함하는 주어진 아미노산 서열 A라는 어구로 기재될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다:

[0090] X/Y 의 분율 $\times 100$

[0091] 여기서, X는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의한 A 및 B의 프로그램 정렬시에 상기 프로그램에 의해 동일한 매치로 스코어링된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B의 아미노산 잔기의 전체 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우에는 B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성 %가 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성 %와 동일하지 않을 것임을 이해할 것이다. 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 아미노산 서열 동일성 % 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 이용하여 상기 단락에 기재한 바와 같이 수득한다.

[0092] 용어 "제약 제제"는 그 안에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적일도록 하는 형태로 존재하며, 제제가

투여될 대상체에게 허용되지 않는 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다.

[0093] "제약상 허용되는 담체"는 대상체에게 비독성인, 활성 성분 이외의 다른 제약 제제 내의 성분을 지칭한다. 제약상 허용되는 담체는 완충제, 부형제, 안정화제 또는 보존제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0094] 본원에 사용된 용어 "BACE1"은 달리 나타내지 않는 한 포유동물, 예컨대 영장류 (예를 들어, 인간) 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)를 포함하는 임의의 척추동물 공급원으로부터의 임의의 천연 베타-세크레타제 1 (또한, β -부위 아밀로이드 전구체 단백질 절단 효소 1, 막-회합된 아스파르트산 프로테아제 2, 메마신 2, 아스파르트산 프로테아제 2 또는 Asp2로 지칭됨)을 지칭한다. 이 용어는 "전장" 비처리된 BACE1 뿐만 아니라 세포에서 처리로부터 생성되는 임의의 형태의 BACE1을 포함한다. 이 용어는 또한 BACE1의 자연 발생 변이체, 예를 들어 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포함한다. 예시적인 BACE1 폴리펩티드의 아미노산 서열은 하기 서열 49로 제시되며, 이는 문헌 [Vassar et al., Science 286:735-741 (1999)] (그의 전체내용이 본원에 참고로 포함됨)에 보고된 바와 같은 인간 BACE1, 이소형 A에 대한 서열이다.

```
MAQALPWLLWWMGAGVLPAGHTQHGIRLPLRSLGGAPLGLRLPRETDEEPEEPGR
RGSFVEMVDNLRGKSGQGYVEMTVGSPQTLNVLVDGTSSNFAVGAAPHPFLHRY
YQRQLSSTYRDLRKGVYVPYTQGKWEGLGTDLVSIHPGNVTVRANIAAITESDKF
FINGSNWEIGLGLAYAEIARPDSDLPPFFDSLQKTHVPNLFSLQLCGAGFPLNQSEVL
ASVGGSMIIGGIDHSYTGSLWYTPIRREWYVEIIVRVEINGQDLKMDCKEYNYDKS
IVDSGTTNLRPLPKKVFEAAVKSIAASSTEKFPDGFVLGEQLVCWQAGTTPWNIFPVI
SLYLMGEVTNQSFRTILPQQYLRPVEDVATSDDDCYKFAISQSSGTVMGAVIMEGF
YVVFDRARKRIGFAVSACHVHDEFRTAAVEGPFVTLDMEDCGYNIPQTDESTLMTIA
YVMAAICALFMLPLCLMVCQWCCLRLRQHQHDDFADDISLLK (서열 49)
```

[0095]

[0096] 이소형 B, C 및 D를 포함하는 인간 BACE1의 여러 다른 이소형이 존재한다. 문헌 [UniProtKB/Swiss-Prot Entry P56817] (그의 전체내용이 본원에 참고로 포함됨)을 참조한다. 이소형 B는 서열 50으로 제시되고, 아미노산 190-214가 없다는 점 (즉, 서열 49의 아미노산 190-214가 결실됨)에서 이소형 A (서열 49)와 상이하다. 이소형 C는 서열 51로 제시되고, 아미노산 146-189가 없다는 점 (즉, 서열 49의 아미노산 146-189가 결실됨)에서 이소형 A (서열 49)와 상이하다. 이소형 D는 서열 52로 제시되고, 아미노산 146-189 및 190-214가 없다는 점 (즉, 서열 49의 아미노산 146-189 및 190-214가 결실됨)에서 이소형 A (서열 49)와 상이하다.

[0097] 본원에 사용된 "치료" (및 "치료하다" 또는 "치료하는"과 같은 그의 문법적 변형)는 치료되는 개체의 자연적 과정을 변경시키려는 임상적 개입을 지칭하고, 임상 병리상태의 예방을 위해 또는 그 과정 동안 수행될 수 있다. 바람직한 치료 효과는 질환의 발생 또는 재발 예방, 증상의 완화, 질환의 임의의 직접 또는 간접적인 병리학적 결과의 축소, 전이의 예방, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 개선 또는 호전, 및 차도 또는 개선된 예후를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 질환의 발생을 지연시키거나 또는 질환의 진행을 느리게 하기 위해 사용된다.

[0098] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 항원에의 결합에 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 (각각 VH 및 VL)은 일반적으로 유사한 구조를 갖고, 각각의 도메인은 4개의 보존된 프레임워크 영역 (FR) 및 3개의 초가변 영역 (HVR)을 포함한다. (예를 들어, 문헌 [Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)] 참조.) 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원-결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 또한, 특정한 항원에 결합하는 항체는 각각 상보성 VL 또는 VH 도메인의 라이브러리를 스크리닝하기 위해 항원에 결합하는 항체로부터의 VH 또는 VL 도메인을 사용하여 분리할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991)]을 참조한다.

[0099] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "백터"는 그 백터가 연결된 또 다른 핵산을 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 상기 용어는 자기-복제 핵산 구조로서의 백터 뿐만 아니라 백터가 그 내부로 도입된 숙주 세포의 게놈 내로 통합되는 백터를 포함한다. 특정 백터는 그 백터가 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 백터는 본원에서 "발현 백터"로 지칭된다.

[0100] 용어 "신경계 장애" 또는 "신경계 질환"은 포유동물에서 중추 및/또는 말초 신경계의 질환 또는 장애를 지칭하거나 기재한다. 신경계 장애의 예는 하기 목록의 질환 및 장애를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 신경병증 장애는 부적절한 또는 비제어된 신경 신호전달 또는 그의 결핍을 특징으로 하는 신경계의 질환 또는 이상이고,

만성 통증 (예를 들어, 침해수용성 통증 (암-관련 통증을 비롯하여 신체 조직에 대한 손상에 의해 야기되는 통증), 신경병증성 통증 (신경, 척수, 또는 뇌의 이상에 의해 야기되는 통증), 및 심인성 통증 (전적으로 또는 대부분 심리 장애에 관련됨), 두통, 편두통, 신경병증, 및 종종 상기 신경병증 장애에 수반되는 증상 및 증후군, 예컨대 현기증 또는 오심을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 아밀로이드증은 속발성 아밀로이드증, 연령-관련 아밀로이드증, 알츠하이머병 (AD), 경도 인지 장애 (MCI), 루이 소체 치매, 다운 증후군, 아밀로이드증을 수반한 유전성 뇌 출혈 (네덜란드형); 광 파킨슨-치매 복합증, 뇌 아밀로이드 혈관병증, 헌팅턴병, 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증; 크로이츠펠트 야콥병, 파킨슨병, 전염성 해면상 뇌병증, HIV-관련 치매, 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 봉입체 근염 (IBM), 및 베타-아밀로이드 침착과 관련된 안구 질환 (즉, 황반 변성, 드루젠-관련 시신경병증, 및 백내장)을 포함하나 이에 제한되지는 않는, CNS 내의 세포의 단백질성 침착물과 연관된 일군의 질환 및 장애이다. CNS의 암은 하나 이상의 CNS 세포 (즉, 신경 세포)의 이상 증식을 특징으로 하고, 신경교종, 다형성 교모세포종, 수막종, 성상세포종, 청신경종, 연골종, 피지교종, 수모세포종, 신경절교종, 슈반세포종, 신경섬유종, 신경모세포종, 및 경막외, 수질내 또는 경막내 종양을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 안구 질환 또는 장애는 본원의 목적을 위해 BBB에 적용되는 CNS 기관으로 간주되는 눈의 질환 또는 장애이다. 안구 질환 또는 장애는 공막, 각막, 홍채 및 섬모체의 장애 (즉, 공막염, 각막염, 각막 궤양, 각막 찰과상, 설맹, 광각막염, 타이거슨 표재성 점상 각막병증, 각막 신생혈관화, 푸크스 이영양증, 원추각막, 건성 각결막염, 홍채염 및 포도막염), 수정체 장애 (즉, 백내장), 맥락막 및 망막의 장애 (즉, 망막 박리, 망막층간분리, 고혈압성 망막병증, 당뇨병성 망막병증, 망막병증, 미숙아 망막병증, 연령-관련 황반 변성, 황반 변성 (습성 또는 건성), 망막전막, 색소성 망막염 및 황반 부종), 녹내장, 부유물, 시신경 및 시각 경로의 장애 (즉, 레버 유전성 시신경병증 및 시신경 유두 드루젠), 안구 근육/양안 운동 조절/굴절의 장애 (즉, 사시, 안근불완전 마비, 진행성 외안근마비, 내사시, 외사시, 원시, 근시, 난시, 굴절부동시, 노안 및 안근마비), 시각 장애 및 실명 (즉, 약시, 레버 선천성 흑암시, 암점, 색맹, 완전색맹, 야맹증, 실명, 강변 실명증 및 소안염/결손증), 충혈안, 아가일 로버트슨 동공, 각막진균증, 안구건조증 및 무홍채증을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. CNS의 바이러스 또는 미생물 감염은 급성 또는 만성일 수 있는 수막염, 뇌염, 척수염, 혈관염 및 농양을 포함하나 이에 제한되지는 않는 CNS 병리생리상태를 야기하는 바이러스 (즉, 인플루엔자, HIV, 폴리오바이러스, 풍진), 박테리아 (즉, 네이세리아 (Neisseria) 종, 스트렙토코쿠스 (Streptococcus) 종, 슈도모나스 (Pseudomonas) 종, 프로테우스 (Proteus) 종, 이. 콜라이 (E. coli), 에스. 아우레우스 (S. aureus), 뉴모코쿠스 (Pneumococcus) 종, 메닝고코쿠스 (Meningococcus) 종, 헤모필루스 (Haemophilus) 종, 및 미코박테리움 투베르쿨로시스 (Mycobacterium tuberculosis)) 및 다른 미생물, 예컨대 진균 (즉, 효모, 크립토코쿠스 네오포르만스 (Cryptococcus neoformans), 기생충 (즉, 톡소플라스마 곤디이 (toxoplasma gondii)) 또는 아메바에 의한 감염을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. CNS의 염증은 물리적 손상 (즉, 사고, 수술, 뇌 외상, 척수 손상, 뇌진탕으로 인한) 또는 CNS의 하나 이상의 다른 질환 또는 장애 (즉, 농양, 암, 바이러스 또는 미생물 감염)로 인한 또는 이와 관련된 손상일 수 있는 CNS에 대한 손상에 의해 야기되는 염증이다. 본원에 사용된 CNS의 허혈은 뇌의 이상 혈류 또는 혈관 거동 또는 그의 원인에 관련된 일군의 장애를 지칭하고, 초점성 뇌 허혈, 전뇌 허혈, 졸중 (즉, 지주막하 출혈 및 뇌내 출혈), 및 동맥류를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 신경변성 질환은 CNS 내의 신경 세포 기능 상실 또는 사멸과 연관된 일군의 질환 및 장애이고, 부신백질이영양증, 알렉산더병, 알퍼병, 근위축성 측삭 경화증, 운동실조 모세혈관확장증, 배튼병, 코케인 증후군, 피질기저 변성, 아밀로이드증에 의해 야기되거나 이와 연관된 변성, 프리드라이히 운동실조, 전두측두엽 변성, 케네디병, 다계통 위축, 다발성 경화증, 원발성 측삭 경화증, 진행성 핵상 마비, 척수성 근육 위축, 횡단성 척수염, 레프슈병, 및 척수소뇌성 운동실조를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. CNS의 발작 질환 및 장애는 CNS에서의 부적절한 및/또는 비정상적인 전기 전도를 수반하고, 간질 (즉, 실신 발작, 무긴장 발작, 양성 롤란딕 간질, 소발작, 간대성 발작, 복합 부분 발작, 전두엽 간질, 열성 발작, 영아 연축, 소아 근간대성 간질, 소아 결신 간질, 레녹스-가스토 증후군, 란다우-클레프너 증후군, 드라베 증후군, 오타하라 증후군, 웨스트 증후군, 근간대성 발작, 미토콘드리아 장애, 진행성 근간대성 간질, 심인성 발작, 반사 간질, 라스무센 증후군, 단순 부분 발작, 속발성 전신 발작, 측두엽 간질, 긴장간대성 발작, 긴장성 발작, 정신운동 발작, 변연계 간질, 부분 발병 발작, 전신 발병 발작, 간질지속 상태, 복부 간질, 무운동성 발작, 자율성 발작, 양측성 근간대성 대발작, 월경성 간질, 적하 발작, 정서적 발작, 초점성 발작, 홍소 발작, 잦은 발작, 라포르병, 운동 발작, 다초점성 발작, 야간 발작, 감광성 발작, 가성 발작, 감각 발작, 비정형적 발작, 실반 발작, 금단 발작, 및 시각 반사 발작)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 행동 장애는 이 장애를 앓고 있는 대상체의 일부에서의 이상 행동을 특징으로 하는 CNS의 장애이고, 수면 장애 (즉, 불면증, 사건수면, 야경증, 일주기 리듬 수면 장애 및 기면증), 기분 장애 (즉, 우울증, 자살성 우울증, 불안, 만성 정동 장애, 공포증, 공황 발작, 강박 장애, 주의력 결핍 과잉행동 장애 (ADHD), 주의력 결핍 장애 (ADD), 만성 피로 증후군, 광장공포증, 외상후 스트레스 장애, 양극성 장애), 섭식 장애 (즉, 식욕부진

또는 폭식증), 정신병, 발달 행동 장애 (즉, 자폐증, 레트 증후군, 아스퍼거 증후군), 인격 장애 및 정신병적 장애 (즉, 정신분열증, 망상 장애 등)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 리소솜 축적 장애는 일부 경우에 CNS와 연관되거나 CNS-특이적 증상을 갖는 대사 장애이고; 이러한 장애는 테이-삭스병, 고셔병, 파브리병, 점액 다당류증 (유형 I, II, III, IV, V, VI 및 VII), 글리코겐 축적 질환, GM1-강글리오시드증, 이염성 백질이영양증, 파버병, 카나반 백질이영양증, 및 뉴런 세로이드 리포푸신증 유형 1 및 2, 니만-픽병, 폼페병, 및 크라베병을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

II. 조성물 및 방법

한 측면에서, 본 발명은 부분적으로 BACE1에 결합하여, BACE1 활성을 감소시키고/거나 억제하는 항체를 기반으로 한다. 특정 실시양태에서, BACE1의 활성 부위 또는 엑소사이트에 결합하는 항체가 제공된다.

A. 예시적인 항-BACE1 항체

한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 22, 23, 26, 28, 45, 68, 71, 72, 73 또는 120의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 24, 29, 46, 69, 74, 75, 76, 77, 78 또는 121의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 25, 30, 47, 70, 79 또는 122의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 7, 8, 17, 35 또는 42의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 9, 10, 18, 36-39, 41, 43, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 또는 118의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 11-16, 19, 40, 44, 57, 65, 66, 67 또는 119의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함하는 항-BACE1 항체를 제공한다.

한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 22, 23, 26, 28, 45, 68, 71-73 또는 120의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 24, 29, 46, 69, 74-78 또는 121의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 25, 30, 47, 70, 79 또는 122의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개 또는 모든 3개의 VH HVR 서열을 포함하는 항체를 제공한다.

한 실시양태에서, 항체는 아미노산 서열 서열 22 또는 서열 23 또는 서열 28 또는 서열 71 또는 서열 72 또는 서열 73을 포함하는 HVR-H1을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 아미노산 서열 서열 24 또는 서열 29 또는 서열 74 또는 서열 75 또는 서열 76 또는 서열 77 또는 서열 78을 포함하는 HVR-H2를 포함한다. 추가 실시양태에서, 항체는 아미노산 서열 서열 25 또는 서열 30 또는 서열 79를 포함하는 HVR-H3을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 아미노산 서열 서열 28을 포함하는 HVR-H1을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 아미노산 서열 서열 29를 포함하는 HVR-H2를 포함한다. 추가 실시양태에서, 항체는 아미노산 서열 서열 30을 포함하는 HVR-H3을 포함한다.

또 다른 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 22의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다. 추가 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 28의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 30의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다. 추가 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 74의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 75의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 71의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 72의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 76의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 77의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 79의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 73의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 78의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다.

또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 7, 8, 17, 35 및 42의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 9, 10, 18, 36-39, 41, 43, 56, 58-64 또는 118의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 11-16, 19, 40,

44, 57, 65-67 또는 119의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개 또는 모든 3개의 VL HVR 서열을 포함하는 항체를 제공한다.

[0109] 한 실시양태에서, 항체는 아미노산 서열 서열 7 또는 서열 8을 포함하는 HVR-L1을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 아미노산 서열 서열 9 또는 서열 10 또는 서열 58 또는 서열 59 또는 서열 60 또는 서열 61 또는 서열 62 또는 서열 63 또는 서열 64를 포함하는 HVR-L2를 포함한다. 추가 실시양태에서, 항체는 서열 11 또는 서열 12 또는 서열 13 또는 서열 14 또는 서열 15 또는 서열 16 또는 서열 65 또는 서열 66 또는 서열 67의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 아미노산 서열 서열 35를 포함하는 HVR-L1을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 서열 36-39로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2를 포함한다. 추가 실시양태에서, 항체는 아미노산 서열 서열 40을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.

[0110] 또 다른 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 추가 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 35의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 36의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 40의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 35의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 40의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 35의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 40의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 35의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 40의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.

[0111] 또 다른 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 58의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 59의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 66의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 67의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 60의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 67의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 59의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 66의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 67의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 63의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하거나, 또는 항체는 (a) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.

[0112] 또 다른 측면에서, 본 발명의 항체는 (a) (i) 서열 22, 23, 26, 28, 45, 68, 71-73 또는 120으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열 24, 29, 46, 69, 74-78 또는 121로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2 및 (iii) 서열 25, 30, 47, 70, 79 또는 122로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개 또는 모든 3개의 VH HVR 서열을 포함하는 VH 도메인; 및 (b) (i) 서

열 7, 8, 17, 35 또는 42로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열 9, 10, 18, 36-39, 41, 43, 56, 58-64 또는 118로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (c) 서열 11-16, 19, 40, 44, 57, 65-67 또는 119로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개 또는 모든 3개의 VL HVR 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0113] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 12로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체를 제공한다.

[0114] 특정 실시양태에서, 항체는 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하며, 여기서 HVR-H1은 아미노산 서열 $\text{GFY}_{30}\text{FX}_{31}\text{X}_{32}\text{X}_{33}\text{X}_{34}\text{IH}$ (서열 45) (여기서, $\text{X}_{30}=\text{N}$ 또는 T 이고; $\text{X}_{31}=\text{S}$, L 또는 Y 이고; $\text{X}_{32}=\text{G}$ 또는 Y 이고; $\text{X}_{33}=\text{Y}$ 또는 S 이고; $\text{X}_{34}=\text{A}$, G 또는 S 임)를 포함하고; HVR-H2는 아미노산 서열 $\text{X}_{35}\text{X}_{36}\text{ISPX}_{37}\text{X}_{38}\text{GX}_{39}\text{TX}_{40}\text{YADSVKG}$ (서열 46) (여기서, $\text{X}_{35}=\text{A}$ 또는 G 이고; $\text{X}_{36}=\text{W}$ 또는 S 이고; $\text{X}_{37}=\text{A}$ 또는 Y 이고; $\text{X}_{38}=\text{G}$ 또는 S 이고; $\text{X}_{39}=\text{S}$ 또는 Y 이고; $\text{X}_{40}=\text{D}$ 또는 S 임)를 포함하고; HVR-H3은 서열 $\text{X}_{41}\text{PX}_{42}\text{X}_{43}\text{X}_{44}\text{X}_{45}\text{X}_{46}\text{X}_{47}\text{MDY}$ (서열 47) (여기서, $\text{X}_{41}=\text{Q}$ 또는 G 이고; $\text{X}_{42}=\text{T}$ 또는 F 이고; $\text{X}_{43}=\text{H}$ 또는 S 이고; $\text{X}_{44}=\text{Y}$ 또는 P 이고; $\text{X}_{45}=\text{Y}$ 또는 W 이고; $\text{X}_{46}=\text{Y}$ 또는 V 이고, X_{47} 은 임의로 서열 YAKGYKA (서열 48)를 포함함)를 포함한다.

[0115] 특정 실시양태에서, 항체는 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하며, 여기서 HVR-H1은 아미노산 서열 $\text{GX}_{71}\text{X}_{72}\text{X}_{73}\text{X}_{74}\text{X}_{75}\text{X}_{76}\text{X}_{77}\text{IH}$ (서열 120) (여기서, $\text{X}_{71}=\text{F}$ 또는 Y 이고; $\text{X}_{72}=\text{F}$, N 또는 T 이고; $\text{X}_{73}=\text{F}$ 또는 Y 이고; $\text{X}_{74}=\text{L}$, Q , I , S 또는 Y 이고; $\text{X}_{75}=\text{G}$ 또는 Y 이고; $\text{X}_{76}=\text{Y}$ 또는 S 이고; $\text{X}_{77}=\text{A}$, G 또는 S 임)를 포함하고; HVR-H2는 아미노산 서열 $\text{X}_{78}\text{X}_{79}\text{ISPX}_{80}\text{X}_{81}\text{GX}_{82}\text{X}_{83}\text{X}_{84}\text{YADSVKG}$ (서열 121) (여기서, $\text{X}_{78}=\text{A}$ 또는 G 이고; $\text{X}_{79}=\text{W}$ 또는 S 이고; $\text{X}_{80}=\text{A}$, S , Q 또는 Y 이고; $\text{X}_{81}=\text{G}$ 또는 S 이고; $\text{X}_{82}=\text{S}$, K , L 또는 Y 이고; $\text{X}_{83}=\text{T}$ 또는 Y 이고; $\text{X}_{84}=\text{D}$ 또는 S 임)를 포함하고; HVR-H3은 아미노산 서열 $\text{X}_{85}\text{PX}_{86}\text{X}_{87}\text{X}_{88}\text{X}_{89}\text{X}_{90}\text{MDY}$ (서열 122) (여기서, $\text{X}_{85}=\text{Q}$ 또는 G 이고; $\text{X}_{86}=\text{T}$ 또는 F 이고; $\text{X}_{87}=\text{H}$, Y 또는 S 이고; $\text{X}_{88}=\text{Y}$ 또는 P 이고; $\text{X}_{89}=\text{Y}$ 또는 W 이고; $\text{X}_{90}=\text{Y}$ 또는 V 이고, X_{91} 은 임의로 서열 YAKGYKA (서열 48)를 포함함)를 포함한다.

[0116] 특정 실시양태에서, 항체는 HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하며, 여기서 HVR-L1은 아미노산 서열 $\text{RASQX}_{17}\text{VX}_{18}\text{X}_{19}\text{X}_{20}\text{X}_{21}\text{A}$ (서열 42) (여기서, $\text{X}_{17}=\text{S}$, D 또는 V 이고; $\text{X}_{18}=\text{S}$ 또는 A 이고; $\text{X}_{19}=\text{S}$, T 또는 N 이고; $\text{X}_{20}=\text{A}$ 또는 S 이고; $\text{X}_{21}=\text{V}$ 또는 L 임)를 포함하고, HVR-L2는 아미노산 서열 $\text{X}_{22}\text{ASX}_{23}\text{LYS}$ (서열 43) (여기서, $\text{X}_{22}=\text{S}$, W , Y 또는 L 이고; $\text{X}_{23}=\text{F}$, S 또는 W 임)를 포함하고, HVR-L3은 아미노산 서열 $\text{QQX}_{24}\text{X}_{25}\text{X}_{26}\text{X}_{27}\text{X}_{28}\text{X}_{29}\text{T}$ (서열 44) (여기서, $\text{X}_{24}=\text{S}$, F , G , D 또는 Y 이고; $\text{X}_{25}=\text{Y}$, P , S 또는 A 이고; $\text{X}_{26}=\text{Y}$, T 또는 N 이고; $\text{X}_{27}=\text{T}$, Y , D 또는 S 이고; $\text{X}_{28}=\text{P}$ 또는 L 이고; $\text{X}_{29}=\text{F}$, P 또는 T 임)를 포함한다.

[0117] 특정 실시양태에서, 항체는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3의 군으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하며, 여기서 HVR-L1은 아미노산 서열 $\text{RASQX}_{17}\text{VX}_{18}\text{X}_{19}\text{X}_{20}\text{X}_{21}\text{A}$ (서열 42) (여기서, $\text{X}_{17}=\text{S}$, D 또는 V 이고; $\text{X}_{18}=\text{S}$ 또는 A 이고; $\text{X}_{19}=\text{S}$, T 또는 N 이고; $\text{X}_{20}=\text{A}$ 또는 S 이고; $\text{X}_{21}=\text{V}$ 또는 L 임)를 포함하고, HVR-L2는 아미노산 서열 $\text{X}_{62}\text{ASX}_{63}\text{X}_{64}\text{YX}_{65}$ (서열 118) (여기서, $\text{X}_{62}=\text{S}$, W , Y , F 또는 L 이고; $\text{X}_{63}=\text{F}$, S , Y 또는 W 이고; $\text{X}_{64}=\text{L}$ 또는 R 이고; $\text{X}_{65}=\text{S}$, P , R , K 또는 W 임)를 포함하고, HVR-L3은 아미노산 서열 $\text{QQX}_{66}\text{X}_{67}\text{X}_{68}\text{X}_{69}\text{X}_{70}\text{X}_{71}\text{T}$ (서열 119) (여기서, $\text{X}_{66}=\text{S}$, F , G , D 또는 Y 이고; $\text{X}_{67}=\text{Y}$, P , S 또는 A 이고; $\text{X}_{68}=\text{Y}$, T 또는 N 이고; $\text{X}_{69}=\text{T}$, Y , D 또는 S 이고; $\text{X}_{70}=\text{P}$, Q , S , K 또는 L 이고; $\text{X}_{71}=\text{F}$, P 또는 T 임)를 포함한다.

[0118] 특정 실시양태에서, 항체는 HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하며, 여기서 HVR-L1은 아미노산 서열 $\text{RASQX}_1\text{VX}_2\text{X}_3\text{X}_4\text{X}_5\text{A}$ (서열 17) (여기서, $\text{X}_1=\text{D}$ 또는 V 이고; $\text{X}_2=\text{S}$ 또는 A 이고; $\text{X}_3=\text{T}$ 또는 N 이고; $\text{X}_4=\text{S}$ 또는 A 이고; $\text{X}_5=\text{V}$ 또는 L 임)를 포함하고, HVR-L2는 아미노산 서열 X_6ASFLYS (서열 18) (여기서, $\text{X}_6=\text{S}$ 또는 L 임)를 포함하고, HVR-L3은 아미노산 서열 $\text{QQX}_7\text{X}_8\text{X}_9\text{X}_{10}\text{X}_{11}\text{X}_{12}\text{T}$ (서열 19) (여기서, $\text{X}_7=\text{S}$, F , G , D 또는 Y 이고; $\text{X}_8=\text{Y}$, P , S , 또는 A 이고; $\text{X}_9=\text{T}$ 또는 N 이고; $\text{X}_{10}=\text{T}$, Y , D 또는 S 이고; $\text{X}_{11}=\text{P}$ 또는 L 이고; $\text{X}_{12}=\text{P}$ 또는 T 임)를 포함

한다.

- [0119] 특정 실시양태에서, 항체는 HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하며, 여기서 HVR-L1은 아미노산 서열 RASQX₁VX₂X₃X₄X₅A (서열 17) (여기서, X₁=D 또는 V이고; X₂=S 또는 A이고; X₃=T 또는 N이고; X₄=S 또는 A이고; X₅=V 또는 L임)를 포함하고, HVR-L2는 아미노산 서열 X₄₈ASX₄₉X₅₀YX₅₁ (서열 56) (여기서, X₄₈=S 또는 F이고; X₄₉=F 또는 Y이고; X₅₀=L 또는 R이고; X₅₁=S, P, R, K 또는 W임)을 포함하고, HVR-L3은 아미노산 서열 QQFPTYX₅₂PT (서열 57) (여기서, X₅₂=L, Q, S 또는 K임)를 포함한다.
- [0120] 특정 실시양태에서, 항체는 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하며, 여기서 HVR-H1은 아미노산 서열 GFTFX₁₃GYX₁₄IH (서열 26) (여기서, X₁₃=S 또는 L이고, X₁₄=A 또는 G임)를 포함하고, HVR-H2는 아미노산 서열 GWISPAGGSTDYADSVKG (서열 24)를 포함하고, HVR-H3은 아미노산 서열 GPFSPWVMDY (서열 25)를 포함한다.
- [0121] 특정 실시양태에서, 항체는 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하며, 여기서 HVR-H1은 아미노산 서열 GX₅₃X₅₄X₅₅X₅₆GYGIH (서열 68) (여기서, X₅₃=F 또는 Y이고; X₅₄=T 또는 F이고; X₅₅=F 또는 Y이고; X₅₆=L, Q 또는 I임)를 포함하고, HVR-H2는 아미노산 서열 GWISPX₅₇X₅₈GX₅₉X₆₀DYADSVKG (서열 69) (여기서, X₅₇=A, S 또는 Q이고; X₅₈=G 또는 S이고; X₅₉=S, K 또는 L이고; X₆₀=T 또는 Y임)를 포함하고, HVR-H3 서열은 아미노산 서열 GPFX₆₁PWVMDY (서열 70) (여기서, X₆₁=S 또는 Y임)를 포함한다.
- [0122] 특정 실시양태에서, 항체는 HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3으로부터 선택된 하나 이상의 서열을 포함하며, 여기서 HVR-L1은 아미노산 서열 RASQSVSSAVA (서열 35)를 포함하고, HVR-L2는 아미노산 서열 X₁₅ASX₁₆LYS (서열 41) (여기서, X₁₅=S, W 또는 Y이고, X₁₆=S 또는 W임)를 포함하고, HVR-L3은 아미노산 서열 QQYSYSPFT (서열 40)를 포함한다.
- [0123] 특정 실시양태에서, 상기 제공된 바와 같은 항-BACE1 항체의 임의의 하나 이상의 아미노산은 하기 HVR 위치에서 치환된다:
- [0124] HVR-H1 (서열 26)에서: 위치 5 및 8;
- [0125] HVR-L1 (서열 17)에서: 위치 5, 7, 8, 9 및 10;
- [0126] HVR-L2 (서열 18)에서: 위치 1 또는 HVR-L2 (서열 41) 위치 1 및 4; 및
- [0127] HVR-L3 (서열 19)에서: 위치 3, 4, 5, 6, 7 및 8.
- [0128] 특정 실시양태에서, 치환은 본원에 제공된 바와 같은 보존적 치환이다. 특정 실시양태에서, 하기 치환 중 임의의 하나 이상은 임의의 조합으로 만들어질 수 있다:
- [0129] HVR-H1 (서열 26)에서: 위치 5에서의 세린 또는 류신 및 위치 8에서의 알라닌 또는 글리신;
- [0130] HVR-L1 (서열 17)에서: 위치 5에서의 아스파르트산 또는 발린; 위치 7에서의 세린 또는 알라닌; 위치 8에서의 트레오닌 또는 아스파라긴; 위치 9에서의 세린 또는 알라닌 및 위치 10에서의 발린 또는 류신;
- [0131] HVR-L2 (서열 18)에서: 위치 1에서의 세린 또는 류신 또는 HVR-L2 (서열 41) 위치 1에서의 세린, 티로신 또는 트립토판 또는 위치 4에서의 티로신, 세린 또는 트립토판; 및
- [0132] HVR-L3 (서열 19)에서: 위치 3에서의 세린, 페닐알라닌, 글리신, 아스파르트산 또는 티로신; 위치 4에서의 티로신 또는 프롤린, 위치 5에서의 세린, 알라닌, 트레오닌 또는 아스파라긴; 위치 6에서의 티로신, 트레오닌, 아스파르트산 또는 세린, 위치 7에서의 아스파르트산, 세린, 프롤린 또는 류신 및 위치 8에서의 프롤린 또는 트레오닌.
- [0133] 특정 실시양태에서, 치환은 본원에 제공된 바와 같은 보존적 치환이다. 특정 실시양태에서, 하기 치환 중 임의의 하나 이상은 임의의 조합으로 만들어질 수 있다:
- [0134] HVR-H1 (서열 26)에서: S5L 및 A8G;
- [0135] HVR-L1 (서열 17)에서: D5V; S7A; T8N; S9A 및 V10L;

- [0136] HVR-L2 (서열 18)에서: S1L 또는 HVR-L2 (서열 41) 위치 S1W 또는 Y 및 S4W; 및
- [0137] HVR-L3 (서열 19)에서: 위치 S3F, G, D 또는 Y1; Y4P, S 또는 A; T5N; T6Y, D 또는 S; P7L 및 P8T.
- [0138] 특정 실시양태에서, 상기 제공된 바와 같은 항-BACE1 항체의 임의의 하나 이상의 아미노산은 하기 HVR 위치에서 치환된다:
- [0139] HVR-H1 (서열 120)에서: 위치 2, 3, 5, 6, 7 및 8;
- [0140] HVR-H2 (서열 121)에서: 위치 1, 2, 6, 7, 9, 10 및 11;
- [0141] HVR-H3 (서열 122)에서 위치 1, 3, 4, 5, 6, 7 및 8
- [0142] HVR-L1 (서열 42)에서: 위치 5, 7, 8, 9 및 10;
- [0143] HVR-L2 (서열 118)에서: 위치 1, 4, 5 및 7; 및
- [0144] HVR-L3 (서열 119)에서: 위치 3, 4, 5, 6, 7 및 8.
- [0145] 특정 실시양태에서, 치환은 본원에 제공된 바와 같은 보존적 치환이다.
- [0146] 상기 치환의 가능한 조합은 상기 기재된 바와 같은 서열 42-47 및 118-122의 컨센서스 서열에 포함된다.
- [0147] 임의의 상기 실시양태에서, 항-BACE1 항체는 인간화된다. 한 실시양태에서, 항-BACE1 항체는 임의의 상기 실시양태에서와 같은 HVR을 포함하고, 추가로 수용자 인간 프레임워크, 예를 들어 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항-BACE1 항체는 임의의 상기 실시양태에서와 같은 HVR을 포함하고, 서열 1-6, 20, 21, 27, 31-34, 80-98 및 99-117의 FR1, FR2, FR3 또는 FR4 서열을 포함하는 VH 또는 VL을 추가로 포함한다.
- [0148] 또 다른 측면에서, 항-BACE1 항체는 서열 20, 21, 27 및 80-98로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인 (VH) 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 VH 서열은 참조 서열과 비교하여 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 포함하지만, 그 서열을 포함하는 항-BACE1 항체는 BACE1에 결합하고/거나 BACE1 활성을 억제하거나 감소시키는 능력을 유지한다. 특정 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 20, 21, 27 및 80-98에서 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 항-BACE1 항체는 서열 20, 21, 27 또는 80-98의 VH 서열을 포함한다 (이들 서열의 번역후 변형 포함). 특정한 실시양태에서, VH는 (a) 서열 22, 23, 26, 28, 45, 68, 71, 72, 73 또는 120의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 24, 29, 46, 69, 74, 75, 76, 77, 78 또는 121의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열 25, 30, 47, 70, 79 또는 122의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다.
- [0149] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 도 1(b), 2(b) 및 24(a)에서의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 도 1(b), 2(b) 및 24(b)에서의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 도 1(b), 2(b) 및 24(c)에서의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 도 1(a), 2(a) 및 23(a)에서의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 도 1(a), 2(a) 및 23(b)에서의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 도 1(a) 및 2(a) 및 23(c)에서의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함하는 항-BACE1 항체를 제공한다.
- [0150] 또 다른 측면에서, 항-BACE1 항체가 제공되며, 여기서 항체는 서열 1-6, 31-34 및 99-117로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열은 참조 서열과 비교하여 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-BACE1 항체는 BACE1에 결합하고/거나 BACE1 활성을 억제하거나 감소시키는 능력을 유지한다. 특정 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 1-6, 31-34 및 99-117에서 치환, 삽입 및/또는 결실되었다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 항-BACE1 항체는 서열 1-6, 31-34 또는 99-117의 VL 서열을 포함한다 (이들 서열의 번역후 변형 포함). 특정한 실시양태에서, VL은 (a) 서열 7, 8, 17, 35 또는 42의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 9, 10, 18, 36-39, 41, 43 및 56, 58-64 또는 118의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 11-16, 19, 40, 44, 57, 65, 66, 67 또는 119의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개

의 HVR을 포함한다.

- [0151] 또 다른 측면에서, 항-BACE1 항체가 제공되며, 여기서 항체는 상기 제공된 임의의 실시양태와 같은 VH 및 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VL을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 각각 서열 21 및 서열 2의 VH 및 VL 서열을 포함한다 (이들 서열의 번역후 변형 포함).
- [0152] 추가 측면에서, 본 발명은 본원에 제공된 항-BACE1 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 제공한다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 서열 20, 21, 27 및 80-98로부터 선택된 VH 서열 및 서열 1-6, 31-34 및 99-117로부터 선택된 VL 서열을 포함하는 항-BACE1 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 각각 서열 21 및 서열 2의 VH 및 VL 서열을 포함하는 항-BACE1 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다.
- [0153] 특정 실시양태에서, 서열 49의 아미노산 314 SER, 316 GLU, 317 LYS, 318 PHE, 319 PRO, 327 GLN, 328 LEU, 329 VAL, 330 CYS, 331 TRP, 332 GLN, 333 ALA, 335 THR, 337 PRO, 340 ILE, 375 THR, 378 ASP, 380 CYS, 426 PHE에 상응하는 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개의 아미노산(들)을 포함하는 BACE1 내의 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다.
- [0154] 특정 실시양태에서, 서열 49의 아미노산 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRP; 332 GLN; 335 THR; 및 378 ASP에 상응하는 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개의 아미노산(들)을 포함하는 BACE1 내의 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다. 다른 실시양태에서 입체형태적 에피토프는 서열 49의 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRP; 332 GLN; 335 THR; 및 378 ASP에 상응하는 아미노산을 포함한다. BACE1 에피토프에서 확인된 아미노산이 인간 BACE1 이소형 A의 서열에 상응한다는 것이 이해될 것이다. 그러나, 기재된 BACE1 입체형태적 에피토프는 또한 BACE1의 다른 변이체 및 이소형에서 상응하는 아미노산을 포함하고, 에피토프는 특정된 잔기 이외의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0155] 특정 실시양태에서, 서열 49의 아미노산 315-318; 서열 49의 아미노산 331-335; 서열 49의 아미노산 370-381; 또는 그의 임의의 조합에 상응하는 적어도 1개, 적어도 2개 또는 적어도 3개의 BACE1의 아미노산 영역(들)을 포함하는 BACE1 내의 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다. 한 실시양태에서, 항체는 서열 49의 아미노산 315-318, 331-335 및 370-381을 포함하는 BACE1의 에피토프에 결합한다.
- [0156] 또 다른 실시양태에서, 항체가 결합하지 않은 BACE1과 비교하여 결합시에 BACE1의 P6 및/또는 P7 부위 (문헌 [Turner et al., Biochemistry 44:105-112 (2005)])에서 입체형태 변화를 일으키는 BACE1 내의 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다. 추가 실시양태에서, BACE1의 서열 49의 아미노산 218-231이 랜덤 루프 구조를 채택하도록 유도하는 BACE1의 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다. BACE1의 서열 49의 아미노산 218-231은 기질 결합된 복합체에서 α -나선 구조로 존재한다.
- [0157] 또 다른 실시양태에서, 도 14 및 15에 나타내고 BACE1 및 항-BACE1 항체, YW412.8.31의 결정 구조 (실시예 3(B))에 기재된 바와 같은 BACE1 내의 부위에 결합하는 항체가 제공된다.
- [0158] 다른 실시양태에서, BACE1 내의 엑소사이트에 결합하는 항체가 제공된다. 한 실시양태에서, BACE1 내의 엑소사이트는 문헌 [Kornacker et al., Biochem. 44:11567-11573 (2005)]에 의해 확인된 것과 동일한 엑소사이트이다. 한 실시양태에서, BACE1에 대한 결합에 대해 문헌 [Kornacker et al., Biochem. 44:11567-11573 (2005)] (그의 전체내용이 본원에 참고로 포함됨)에서 확인된 펩티드 (즉, 펩티드 1, 2, 3, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 2-12, 3-12, 4-12, 5-12, 6-12, 7-12, 8-12, 9-12, 10-12, 4, 5, 6, 5-10, 5-9, Y5A, P6A, Y7A, F8A, I9A, P10A 및 L11A)와 경쟁하는 항체가 제공된다.
- [0159] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 항-BACE1 항체와 결합에 대해 경쟁하는 (예를 들어, 동일한 에피토프에 결합하는) 항체가 제공된다.
- [0160] 본 발명의 추가 측면에서, 임의의 상기 실시양태에 따른 항-BACE1 항체는 키메라, 인간화 또는 인간 항체를 포함하는 모노클로날 항체이다. 한 실시양태에서, 항-BACE1 항체는 항체 단편, 예를 들어, Fv, Fab, Fab', scFv, 디아바디 또는 F(ab')₂ 단편이다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 전장 항체, 예를 들어 무손상 IgG1 항체, 또는 본원에 정의된 바와 같은 다른 항체 클래스 또는 이소형이다.
- [0161] 추가 측면에서, 임의의 상기 실시양태에 따른 항-BACE1 항체는 하기 섹션 1-7에 기재된 바와 같은 임의의 특징으로 단독으로 또는 조합하여 포함할 수 있다:

[0162] 1. 항체 친화도

[0163] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$ 또는 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (예를 들어, 10^{-8} M 이하, 예를 들어 10^{-8} M 내지 10^{-13} M , 예를 들어 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수 (K_d)를 갖는다.

[0164] 한 실시양태에서, K_d 는 하기 검정에 기재된 바와 같이 관심 항체의 Fab 버전 및 그의 항원을 사용하여 수행된 방사성표지된 항원 결합 검정 (RIA)에 의해 측정된다. 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화도는 비표지 항원의 적정 시리즈의 존재 하에 Fab를 최소 농도의 (^{125}I)-표지 항원과 평형화시킨 다음, 결합된 항원을 항-Fab 항체-코팅된 플레이트로 포획함으로써 측정된다 (예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)] 참조). 검정 조건을 확립하기 위해, 마이크로타이터(MICROTITER)[®] 멀티-웰 플레이트 (써모 사이언티픽(Thermo Scientific))를 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중의 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 포획 항-Fab 항체 (카펠 랩스(Cappel Labs))로 밤새 코팅한 후, PBS 중의 2% (w/v) 소 혈청 알부민으로 2 내지 5시간 동안 실온 (대략 23°C)에서 차단하였다. 비-흡착 플레이트 (눈크(Nunc) #269620)에서는 100 pM 또는 26 pM [^{125}I]-항원을 관심 Fab의 연속 희석물과 혼합한다 (예를 들어, 문헌 [Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)]의 항-VEGF 항체, Fab-12의 평가와 일치함). 이어서, 관심 Fab를 밤새 인큐베이션하지만, 평형에 도달하는 것을 확실하게 하기 위해 더 오랜 시간 (예를 들어, 약 65시간) 동안 계속 인큐베이션할 수 있다. 이후에, 혼합물을 포획 플레이트로 옮겨 실온에서 (예를 들어, 1시간 동안) 인큐베이션한다. 이어서, 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중의 0.1% 폴리소르베이트 20 (트윈(TWEEN)-20[®])으로 8회 세척하였다. 플레이트를 건조시킬 때, 150 μl /웰의 섬광제 (마이크로싯-20(MICROSCINT-20)[™]; 팩커드(Packard))를 첨가하고, 플레이트를 탑카운트(TOPCOUNT)[™] 감마 계수기 (팩커드)로 10분 동안 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각 Fab의 농도를 선택하여 경쟁 결합 검정에 사용한다.

[0165] 또 다른 실시양태에 따르면, K_d 는 예를 들어 약 10의 반응 단위 (RU)로 고정화된 항원 CM5 칩을 사용하여 25°C에서 비아코어(BIACORE)[®]-2000 또는 비아코어[®]-3000 (비아코어, 인크.(BIAcore, Inc.), 뉴저지주 피스카타웨이)을 사용하는 표면 플라즈몬 공명 검정을 사용하여 측정된다. 간략하게, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어, 인크.)을 공급업체의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 5 $\mu\text{g/ml}$ (약 0.2 μM)로 희석한 후에 커플링된 단백질 대략 10 반응 단위 (RU)가 달성되도록 5 μl /분의 유량으로 주사한다. 항원 주사 후, 미반응 기를 차단하기 위해 1 M 에탄올아민을 주입한다. 동역학적 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석물 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 μl /분의 유량으로 25°C에서 0.05% 폴리소르베이트 20 (트윈-20[™]) 계면활성제를 갖는 PBS (PBST) 내에 주사한다. 간단한 일-대-일 랭뮤어 결합 모델 (비아코어[®] 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 이용하여 회합 및 해리 센서그램을 동시에 피팅시켜 회합률 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})을 계산한다. 평형 해리 상수 (K_d)는 k_{off}/k_{on} 의 비로 계산한다. 예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)]을 참조한다. 상기 표면-플라즈몬 공명 검정에 의한 회합률이 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 을 초과하는 경우, 회합률은 분광측정계, 예컨대 정지-유동 설치 분광광도계 (아비브 인스트루먼트(Aviv Instruments)) 또는 교반 큐벳이 장착된 8000-시리즈 SLM-아민코(SLM-AMINCO)[™] 분광광도계 (써모스펙트로닉(ThermoSpectronic))에서 측정할 때 증가하는 농도의 항원의 존재 하에 PBS (pH 7.2) 중 20 nM의 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25°C에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm, 방출 = 340 nm, 16 nm 통과 대역)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 쉐핑 기술을 이용하여 결정할 수 있다.

[0166] 2. 항체 단편

[0167] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 항체 단편이다. 항체 단편은 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv 및 scFv 단편, 및 하기 기재된 다른 단편을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 항체 단편의 검토를 위해, 문헌 [Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003)]을 참조한다. scFv 단편의 검토를 위해, 예를 들어, 문헌 [Pluckthuen, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994)]; 또한 WO 93/16185; 및 미국 특허 번호 5,571,894 및 5,587,458을 참조한다. 셀비지 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하고 증가된 생체내 반감기를 갖는 Fab 및

F(ab')₂ 단편의 논의에 대해, 미국 특허 번호 5,869,046을 참조한다.

[0168] 디아바디는 2가 또는 이중특이적일 수 있는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 항체 단편이다. 예를 들어, EP 404,097; WO 1993/01161; 문헌 [Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); 및 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)]을 참조한다. 트리아바디 및 테트라바디는 또한 문헌 [Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)]에 기재되어 있다.

[0169] 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정 실시양태에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체이다 (도만티스, 인크.(Domantis, Inc.), 매사추세츠주 윌섬; 예를 들어 미국 특허 번호 6,248,516 B1 참조).

[0170] 항체 단편은 본원에 기재된 바와 같은 무손상 항체의 단백질분해적 소화 뿐만 아니라 재조합 숙주 세포 (예를 들어, 이. 콜라이 또는 파지)에 의한 생산을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0171] 3. 키메라 및 인간화 항체

[0172] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 키메라 항체이다. 특정 키메라 항체는 예를 들어 미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)]에 기재되어 있다. 한 예에서, 키메라 항체는 비-인간 가변 영역 (예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼 또는 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이로부터 유래된 가변 영역) 및 인간 불변 영역을 포함한다. 추가의 예에서, 키메라 항체는 클래스 또는 서브클래스가 부모 항체의 것으로부터 변화된 "클래스 스위칭" 항체이다. 키메라 항체는 그의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0173] 특정 실시양태에서, 키메라 항체는 인간화 항체이다. 전형적으로, 비-인간 항체는 부모 비-인간 항체의 특이성 및 친화도를 유지하면서 인간에 대한 면역원성이 감소하도록 인간화된다. 일반적으로, 인간화 항체는 HVR, 예를 들어 CDR (또는 그의 일부)이 비-인간 항체로부터 유래되고, FR (또는 그의 일부)이 인간 항체 서열로부터 유래된 하나 이상의 가변 도메인을 포함한다. 인간화 항체는 또한 임의로 인간 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체의 일부 FR 잔기는, 예를 들어 항체 특이성 또는 친화도를 복원 하거나 또는 향상시키기 위해, 비-인간 항체 (예를 들어, HVR 잔기가 유래된 항체)로부터의 상응하는 잔기로 치환된다.

[0174] 인간화 항체 및 그의 제조 방법은 예를 들어 문헌 [Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)]에서 검토되었고, 예를 들어 문헌 [Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)]; 미국 특허 번호 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321, 및 7,087,409; [Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005)] (SDR (a-CDR) 그래프팅 기재); [Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991)] ("리서페이싱" 기재); [Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005)] ("FR 서플링" 기재); 및 [Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005) 및 Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000)] (FR 서플링에 대한 "가이드 선택" 접근법 기재)에 추가로 기재되어 있다.

[0175] 인간화에 사용될 수 있는 인간 프레임워크 영역은 "최적-적합" 방법을 사용하여 선택된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Sims et al. J. Immunol. 151:2296 (1993)] 참조); 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 특정한 하위군의 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); 및 Presta et al. J. Immunol., 151:2623 (1993)] 참조); 인간 성숙 (체세포 성숙) 프레임워크 영역 또는 인간 배선 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)] 참조); 및 FR 라이브러리 스크리닝으로부터 유래된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) 및 Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)] 참조)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0176] 4. 인간 항체

[0177] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 다양한 당업계의 공지된 기술을 이용하여 생성될 수 있다. 인간 항체는 일반적으로 문헌 [van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) 및 Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008)]에 기재되어 있다.

[0178] 인간 항체는 항원 접종에 반응하여 인간 가변 영역을 갖는 무손상 인간 항체 또는 무손상 항체를 생산하도록 변형된 트랜스제닉 동물에게 면역원을 투여하여 제조할 수 있다. 이러한 동물은 전형적으로 내인성 이뮤노글로불

린 로커스를 대체하거나 또는 염색체외에 존재하거나 동물의 염색체로 무작위적으로 통합된 인간 이뮤노글로불린 로커스의 전부 또는 일부를 함유한다. 이러한 트랜스제닉 마우스에서, 내인성 이뮤노글로불린 로커스는 일반적으로 불활성화된다. 트랜스제닉 동물로부터 인간 항체를 수득하는 방법의 검토를 위해, 문헌 [Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005)]을 참조한다. 또한, 예를 들어 미국 특허 번호 6,075,181 및 6,150,584 (제노마우스(XENOMOUSE)TM 기술 기재); 미국 특허 번호 5,770,429 (HuMab® 기술 기재); 미국 특허 번호 7,041,870 (K-M 마우스(K-M MOUSE)® 기술 기재), 및 미국 특허 출원 공보 번호 US 2007/0061900 (벨로시마우스(VelociMouse)® 기술 기재)을 참조한다. 이러한 동물에 의해 생성된 무손상 항체로부터의 인간 가변 영역은 예를 들어 상이한 인간 불변 영역과 조합시켜 추가로 변형될 수 있다.

[0179] 인간 항체는 또한 하이브리도마-기반 방법에 의해 제조될 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 생산을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이중골수종 세포주가 기재되어 있다. (예를 들어, 문헌 [Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 및 Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991)] 참조.) 또한, 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체가 문헌 [Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)]에 기재되어 있다. 추가의 방법은, 예를 들어 미국 특허 번호 7,189,826 (하이브리도마 세포주로부터의 모노클로날 인간 IgM 항체 생산 기재) 및 문헌 [Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006)] (인간-인간 하이브리도마 기재)에 기재된 것을 포함한다. 인간 하이브리도마 기술 (트리오마(Trioma) 기술)은 또한 문헌 [Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) 및 Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005)]에 기재되어 있다.

[0180] 인간 항체는 또한 인간-유래 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열을 단리하여 생성될 수 있다. 이어서, 이러한 가변 도메인 서열은 바람직한 인간 불변 도메인과 조합될 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선택하기 위한 기술은 하기 기재된다.

[0181] 5. 라이브러리-유래 항체

[0182] 본 발명의 항체는 원하는 활성을 갖는 항체에 대해 조합 라이브러리를 스크리닝하여 단리될 수 있다. 예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하고, 원하는 결합 특성을 갖는 항체에 대하여 이러한 라이브러리를 스크리닝하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 이러한 방법은 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)]에서 검토되고, 예를 들어 문헌 [McCafferty et al., Nature 348:552-554; Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); 및 Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004)]에 추가로 기재되어 있다.

[0183] 특정 파지 디스플레이 방법에서, VH 및 VL 유전자의 레퍼토리는 개별적으로 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 클로닝되고, 파지 라이브러리에 무작위적으로 재조합되며, 이는 이어서 문헌 [Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이 항원-결합 파지에 대해 스크리닝될 수 있다. 파지는 전형적으로 항체 단편을 단일-쇄 Fv (scFv) 단편 또는 Fab 단편으로 디스플레이한다. 면역화된 공급원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 구축할 필요 없이 면역원에 대한 고-친화도 항체를 제공한다. 대안적으로, 나이브 레퍼토리를 클로닝 (예를 들어, 인간으로부터)하여, 문헌 [Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993)]에 기재된 바와 같이 어떠한 면역화도 없이 광범위한 비-자기 및 또한 자기 항원에 대한 항체의 단일 공급원을 제공할 수 있다. 최종적으로, 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이, 줄기 세포로부터의 재배열되지 않은 V-유전자 절편을 클로닝하고, 고도로 가변성인 CDR3 영역을 코딩하고 시험관내 재배열이 달성되도록 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용함으로써, 나이브 라이브러리를 또한 합성적으로 제조할 수 있다. 인간 항체 파지 라이브러리를 기재하고 있는 특허 공보는 예를 들어 미국 특허 번호 5,750,373, 및 미국 특허 공보 번호 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 및 2009/0002360을 포함한다.

[0184] 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 또는 항체 단편은 본원에서 인간 항체 또는 인간 항체 단편으로 여겨진다.

[0185] **6. 다중특이적 항체**

[0186] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체이다. 다중특이적 항체는 2개 이상의 상이한 부위에 대해 결합 특이성을 갖는 모노클로날 항체이다. 특정 실시양태에서, 결합 특이성 중 하나는 BACE1에 대한 것이고, 다른 하나는 임의의 다른 항원에 대한 것이다. 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 BACE1의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이적 항체는 또한 BACE1을 발현하는 세포에 세포독성제를 위치시키는데 사용될 수 있다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편으로서 제조될 수 있다.

[0187] 다중특이적 항체를 제조하기 위한 기술은 상이한 특이성을 갖는 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 재조합 공-발현 (문헌 [Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983)], WO 93/08829, 및 [Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)] 참조), 및 "노브-인-홀(knob-in-hole)" 조작 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,731,168 참조)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 다중특이적 항체는 또한 항체 Fc-이중이량체 분자를 제조하기 위한 정전기 스티어링 효과의 조작 (WO 2009/089004A1); 2개 이상의 항체 또는 단편의 가교 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,676,980, 및 문헌 [Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)] 참조); 이중특이적 항체를 생산하기 위한 류신 지퍼의 사용 (예를 들어, 문헌 [Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)] 참조); 이중특이적 항체 단편의 제조를 위한 "디아바디" 기술의 사용 (예를 들어, 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)] 참조); 및 단일-쇄 Fv (sFv) 이량체의 사용 (예를 들어, 문헌 [Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)] 참조); 및 예를 들어 문헌 [Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)]에 기재된 바와 같은 삼중특이적 항체의 제조에 의해 제조될 수 있다

[0188] "옥토퍼스 항체"를 포함하여, 3개 이상의 기능적 항원 결합 부위를 갖는 조작된 항체가 또한 본원에 포함된다 (예를 들어, US 2006/0025576A1 참조).

[0189] 본원의 항체 또는 단편은 또한 BACE1 뿐만 아니라 또 다른 상이한 항원에 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 "이중 작용 FAb" 또는 "DAF"를 포함한다 (예를 들어, US 2008/0069820 참조).

[0190] **7. 항체 변이체**

[0191] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체의 아미노산 서열 변이체가 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선하는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 적절한 변경을 도입하거나 펩티드 합성에 의해 제조할 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구축물이 원하는 특성, 예를 들어 항원-결합을 보유하도록, 최종 구축물에 도달하기 위해 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 이루어질 수 있다.

[0192] **a) 치환, 삽입 및 결실 변이체**

[0193] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 항체 변이체가 제공된다. 치환 돌연변이유발을 위한 관심 부위는 HVR 및 FR을 포함한다. 보존적 치환은 "보존적 치환"의 표제 하에 표 1에 제시된다. 보다 더 실질적인 변화는 "예시적인 치환"의 표제 하의 표 1에 아미노산 측쇄 클래스에 관하여 하기 추가로 기재된 바와 같이 제공된다. 아미노산 치환은 관심 항체에 도입되고, 생성물은 원하는 활성, 예를 들어 유지/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대해 스크리닝될 수 있다.

표 1

본래 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

[0194]

[0195] 아미노산은 공통적인 측쇄 특성에 따라 분류될 수 있다:

[0196] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0197] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0198] (3) 산성: Asp, Glu;

[0199] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

[0200] (5) 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;

[0201] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0202] 비-보존적 치환은 이들 클래스 중의 하나의 구성원을 또 다른 클래스로 교환하는 것을 수반할 것이다.

[0203] 치환 변이체의 한 가지 유형은 부모 항체 (예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 하나 이상의 추가변 영역 잔기를 치환하는 것을 포함한다. 일반적으로, 추가 연구를 위해 선택된 생성된 변이체(들)는 부모 항체에 비해 특정 생물학적 특성 (예를 들어, 상승된 친화도, 감소된 면역원성)의 변형 (예를 들어, 개선)을 가질 것이고/거나 부모 항체의 특정 생물학적 특성을 실질적으로 유지할 것이다. 예시적인 치환 변이체는 예를 들어 본원에 기재된 것과 같은 파지 디스플레이-기반 친화도 성숙 기술을 이용하여 편리하게 생성될 수 있는 친화도 성숙 항체이다. 간략하게, 하나 이상의 HVR 잔기가 돌연변이화되고, 변이체 항체가 파지 상에 디스플레이되고, 특정한 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝된다.

[0204] 변경 (예를 들어, 치환)은 예를 들어 항체 친화도를 개선하기 위해 HVR에서 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스팟", 즉 체세포 성숙 과정 (예를 들어, 문헌 [Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008) 참조], 및/또는 SDR (a-CDR) 동안 결합 친화도에 대해 시험된 생성된 변이체 VH 또는 VL로 높은 빈도에서 돌연변이화를 수행하는 코돈에 의해 코딩되는 잔기에서 이루어질 수 있다. 이차 라이브러리로부터의 구축 및 재선택에 의한 친화도 성숙은 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001))]에 기재되어 있다. 친화도 성숙의 일부 실시양태에서, 다양성은 임의의 다양한 방법 (예를 들어, 오류-유발 PCR, 쇠 서폴링, 또는 올리고뉴클레오타이드-지시된 돌연변이유발)에 의한 성숙을 위해 선택된 가변 유전자로 도입된다. 이어서, 이차 라이브러리를 생성한다. 이

어서, 원하는 친화도를 갖는 임의의 항체 변이체를 확인하게 위해 라이브러리를 스크리닝한다. 다양성을 도입하는 다른 방법은 HVR-유도된 접근법과 연관되며, 여기서 여러 HVR 잔기 (예를 들어, 한 번에 4 내지 6개 잔기)가 무작위화된다. 항원 결합과 연관된 HVR 잔기는 예를 들어 알려진 스캐닝 돌연변이유발 또는 모델링을 이용하여 구체적으로 확인될 수 있다. 특히, CDR-H3 및 CDR-L3이 종종 표적화된다.

[0205] 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 이러한 변경이 항원에 결합하는 항체의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한, 하나 이상의 HVR 내에서 일어날 수 있다. 예를 들어, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경 (예를 들어, 본원에 제공된 바와 같은 보존적 치환)이 HVR에서 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스팟" 또는 SDR의 외부일 수 있다. 상기에서 제공된 변이체 VH 및 VL 서열의 특정 실시양태에서, 각각의 HVR은 변경되지 않거나, 또는 1, 2 또는 3개 이하의 아미노산 치환을 함유한다.

[0206] 문헌 [Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085]에 기재된 바와 같이, 돌연변이유발을 위해 표적화될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역의 확인에 유용한 방법은 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"이라고 지칭된다. 이 방법에서, 잔기 또는 표적 잔기들의 군이 확인되고 (예를 들어, 하전된 잔기, 예컨대 Arg, Asp, His, Lys 및 Glu), 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체되어 항체와 항원과의 상호작용에 영향을 미치는지의 여부를 결정한다. 추가의 치환은 초기 치환에 대한 기능적 감수성을 입증하는 아미노산 위치에 도입될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 항체와 항원 사이의 접촉점을 확인하기 위해 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하는 것이 유익할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 이웃하는 잔기는 치환을 위한 후보로 표적화되거나 또는 제거될 수 있다. 변이체는 그들이 원하는 특성을 함유하는지의 여부를 결정하기 위해 스크리닝될 수 있다.

[0207] 아미노산 서열 삽입은 길이 범위가 1개의 잔기 내지 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 아미노 - 및/또는 카르복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다수 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 효소 (예를 들어, ADEPT의 경우) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드가 상기 항체의 N- 또는 C-말단에 융합된 것을 포함한다.

[0208] b) 글리코실화 변이체

[0209] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 항체가 글리코실화되는 정도를 증가시키거나 감소시키도록 변경된다. 항체에 대한 글리코실화 부위의 부가 또는 결실은 하나 이상의 글리코실화 부위가 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성될 수 있다.

[0210] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생산된 천연 항체는 전형적으로 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에의 N-연결에 의해 일반적으로 부착되는 분지형 이중안테나 올리고사카라이드를 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997)]을 참조한다. 올리고사카라이드는 다양한 탄수화물, 예를 들어 만노스, N-아세틸 글루코사민 (GlcNAc), 갈락토스 및 시알산 뿐만 아니라 이중안테나 올리고사카라이드 구조의 "줄기" 내의 GlcNAc에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 내의 올리고사카라이드의 변형은 특정 개선된 특성을 갖는 항체 변이체를 제조하기 위해 이루어질 수 있다.

[0211] 한 실시양태에서, Fc 영역에 (직접 또는 간접적으로) 부착된 푸코스가 결핍된 탄수화물 구조를 갖는 항체 변이체가 제공된다. 예를 들어, 이러한 항체에서 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 푸코스의 양은 예를 들어 WO 2008/077546에 기재된 바와 같이 MALDI-TOF 질량 분광측정법에 의해 측정된 Asn 297에 부착된 모든 당구조물 (예를 들어, 복합체, 하이브리드 및 고만노스 구조물)의 합에 비해 Asn297에서 당 쇄 내의 푸코스의 평균적인 양을 계산하여 결정된다. Asn297은 Fc 영역의 약 위치 297 (Fc 영역 잔기의 Eu 넘버링)에 위치한 아스파라긴 잔기를 나타내지만; Asn297은 또한 항체의 부가적 서열 변이에 의해 위치 297의 약 ± 3 아미노산 상류 또는 하류, 즉 위치 294와 300 사이에 위치할 수 있다. 이러한 푸코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공보 번호 US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (교와 핫코 고교 캄파니 리미티드(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))을 참조한다. "탈푸코실화" 또는 "푸코스-결핍" 항체 변이체에 대한 문헌의 예는 하기를 포함한다: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; 문헌 [Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)]. 탈푸코실화 항체를 생산할 수 있는 세포주의 예는 단백질 푸코실

화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 (문헌 [Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)]; 미국 특허 출원 번호 US 2003/0157108 A1 (Presta, L); 및 WO 2004/056312 A1 (Adams et al., 특히 실시예 11)), 및 녹아웃 세포주, 예컨대 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8, 녹아웃 CHO 세포 (예를 들어, 문헌 [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006)]; 및 WO2003/085107 참조)를 포함한다.

[0212] 이등분된 올리고사카라이드를 갖는 항체 변이체가 추가로 제공되는데, 예를 들어 항체의 Fc 영역에 부착된 이중 안테나 올리고사카라이드가 GlcNAc에 의해 이등분된다. 이러한 항체 변이체는 푸코실화가 감소될 수 있고/거나 ADCC 기능이 개선될 수 있다. 이러한 항체 변이체의 예가, 예를 들어 WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); 미국 특허 번호 6,602,684 (Umana et al.); 및 US 2005/0123546 (Umana et al.)에 기재되어 있다. Fc 영역에 부착된 올리고사카라이드 내에 1개 이상의 갈락토스 잔기를 갖는 항체 변이체가 또한 제공된다. 이러한 항체 변이체는 개선된 CDC 기능을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체는 예를 들어 WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); 및 WO 1999/22764 (Raju, S.)에 기재되어 있다.

[0213] c) Fc 영역 변이체

[0214] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 변형이 본원에 제공된 항체의 Fc 영역에 도입되어 Fc 영역 변이체가 생성될 수 있다. Fc 영역 변이체는 하나 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형 (예를 들어, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0215] 특정 실시양태에서, 본 발명은 모든 이펙터 기능은 아니지만, 몇몇 이펙터 기능을 보유하고 있으므로, 생체내에서의 항체의 반감기가 중요하긴 하지만 특정의 이펙터 기능 (예컨대 보체 및 ADCC)이 불필요하거나 해로운 많은 적용 분야에 대한 바람직한 후보가 되는 항체 변이체를 고려한다. CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정을 수행할 수 있다. 예를 들어, 항체에 FcγR 결합이 결핍되어 있지만 (따라서, 아마도 ADCC 활성이 결핍된 것임), FcRn 결합 능력은 보유하고 있는 것을 확인하기 위해서 Fc 수용체 (FcR) 결합 검정을 수행할 수 있다. ADCC를 매개하는 일차 세포인 NK 세포는 FcγRIII만을 발현하는 반면에, 단핵구는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII를 발현한다. 조혈 세포 상에서의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)]의 페이지 464, 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 검정의 비제한적 예가 미국 특허 번호 미국 특허 번호 5,500,362 (예를 들어, 문헌 [Hellstrom, I. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986) 및 Hellstrom, I et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985)] 참조); 5,821,337 (문헌 [Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)] 참조)에 기재되어 있다. 대안적으로, 비-방사성 검정 방법을 이용할 수 있다 (예를 들어, 유동 세포측정법을 위한 액티(ACTI)TM 비-방사성 세포독성 검정 (셀테크놀로지, 인크.(CellTechnology, Inc.), 캘리포니아주 마운틴 뷰); 및 사이토독스(CytoTox) 96[®] 비-방사성 세포독성 검정 (프로메가(Promega), 위스콘신주 매디슨) 참조). 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 자연 킬러(NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다. 또한, C1q 결합 검정을 수행하여, 항체가 C1q에 결합할 수 없고, 따라서 CDC 활성이 결핍되었는지를 확인할 수 있다. 예를 들어, WO 2006/029879 및 WO 2005/100402의 C1q 및 C3c 결합 ELISA를 참조한다. 보체 활성화를 평가하기 위해 CDC 검정을 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); 및 Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)] 참조). FcRn 결합 및 생체내 제거율/반감기 결정은 또한 당업계에 공지된 방법을 이용하여 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Petkova, S.B. et al., Intl. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)] 참조).

[0216] 감소된 이펙터 기능을 갖는 항체는 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중 하나 이상의 치환을 갖는 것을 포함한다 (미국 특허 번호 6,737,056). 이러한 Fc 돌연변이체는 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 329 중 2개 이상에 치환을 갖는 Fc 돌연변이체 (잔기 265 및 297의 알라닌으로의 치환을 갖는, 소위 "DANA" Fc 돌연변이체 포함)를 포함한다 (미국 특허 번호 7,332,581).

[0217] FcR에 대해 개선되거나 또는 감소된 결합을 갖는 특정 항체 변이체가 기재된다. (예를 들어, 미국 특허 번호 6,737,056; WO 2004/056312, 및 문헌 [Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)] 참조.)

[0218] 특정 실시양태에서, 항체 변이체는 ADCC를 개선하는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc 영역의 위치

298, 333 및/또는 334 (잔기의 EU 넘버링)에서의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다.

[0219] 일부 실시양태에서, 예를 들어 미국 특허 번호 6,194,551, WO 99/51642, 및 문헌 [Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)]에 기재된 바와 같이, 변경된 (즉, 개선된 또는 감소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 나타내는 변경들이 Fc 영역에서 만들어진다.

[0220] 증가된 반감기, 및 모체 IgG를 태아에게 전달하는 것을 담당하는 신생아 Fc 수용체 (FcRn) (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) 및 Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)]에의 개선된 결합을 갖는 항체가 US2005/0014934A1 (Hinton et al.)에 기재되어 있다. 이들 항체는 FcRn에의 Fc 영역의 결합을 개선하는 하나 이상의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 이러한 Fc 변이체는 Fc 영역 잔기: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434 중 하나 이상에서의 치환, 예를 들어 Fc 영역 잔기 434의 치환을 갖는 것을 포함한다 (미국 특허 번호 7,371,826).

[0221] Fc 영역 변이체의 다른 예에 관해서는 또한 문헌 [Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 번호 5,648,260; 미국 특허 번호 5,624,821; 및 WO 94/29351을 참조한다.

[0222] d) 시스테인 조작된 항체 변이체

[0223] 특정 실시양태에서, 항체의 하나 이상의 잔기를 시스테인 잔기로 치환시킨 시스테인 조작된 항체, 예를 들어 "티오MAb"를 제조하는 것이 바람직할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 이와 같이 치환된 잔기는 항체의 접근가능한 부위에서 일어난다. 이들 잔기를 시스테인으로 치환함으로써 반응성 티올기가 항체의 접근가능한 부위에 배치되게 되고, 이것을 이용하여 항체를 본원에 추가로 기재한 바와 같이 다른 모이어티, 예컨대 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티에 접합시켜 면역접합체를 생성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 임의의 하나 이상의 하기 잔기가 시스테인으로 치환될 수 있다: 경쇄의 V205 (카바트 넘버링); 중쇄의 A118 (EU 넘버링); 및 중쇄 Fc 영역의 S400 (EU 넘버링). 시스테인 조작된 항체는, 예를 들어 미국 특허 번호 7,521,541에 기재된 바와 같이 생성될 수 있다.

[0224] e) 항체 유도체

[0225] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 당업계에 공지되고 쉽게 입수가 가능한 추가의 비단백질성 잔기를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 수용성 중합체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 수용성 중합체의 비제한적 예는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 랜덤 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 (예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알콜, 및 그의 혼합물을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드가 물에서의 안정성으로 인해 제조에 이점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량을 가질 수 있고, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 변할 수 있고, 1개를 초과하는 중합체가 부착될 경우, 중합체들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 개선된 항체의 특정한 특성 또는 기능, 항체 유도체가 규정된 조건 하에 요법에서 사용될 것인지의 여부 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 고려사항을 기반으로 결정될 수 있다.

[0226] 또 다른 실시양태에서, 항체, 및 방사선 노출에 의해 선택적으로 가열될 수 있는 비단백질성 모이어티의 접합체가 제공된다. 한 실시양태에서, 비단백질성 모이어티는 탄소 나노튜브이다 (문헌 [Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)]). 방사선은 임의의 파장일 수 있고, 통상적인 세포에는 해를 끼치지 않지만 항체-비단백질성 모이어티에 근접한 세포는 사멸시키는 온도로 비단백질성 모이어티를 가열하는 파장을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0227] B. 제조 방법 및 조성물

[0228] 항체는 제조 방법 및 조성물을 이용하여, 예를 들어 미국 특허 번호 4,816,567에 기재된 바와 같이 생산할 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 항-BACE1 항체를 코딩하는 단리된 핵산이 제공된다. 이러한 핵산은 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 VH를 포함하는 아미노산 서열 (예를 들어, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄)을 코딩할 수 있다. 추가 실시양태에서, 이러한 핵산을 포함하는 하나 이상의 벡터 (예를 들어, 발현 벡터)가 제공된다. 추가 실시양태에서, 이러한 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 이러한 한 실시양태에서, 숙주 세포는 (1) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을

코딩하는 핵산을 포함하는 벡터, 또는 (2) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 제 1 벡터 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 제2 벡터를 포함한다 (예를 들어, 이들로 형질감염됨). 한 실시양태에서, 숙주 세포는 진핵, 예를 들어 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 림프성 세포 (예를 들어, YO, NSO, Sp20 세포)이다. 한 실시양태에서, 상기에 제공된 바와 같은 항-BACE1 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 항체의 발현에 적합한 조건 하에 배양하는 것, 및 숙주 세포 (또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 상기 항체를 임의로 회수하는 것을 포함하는 항-BACE1 항체를 제조하는 방법이 제공된다.

[0229] 항-BACE1 항체의 재조합 생산을 위해, 예를 들어 상기 기재된 바와 같은 항체를 코딩하는 핵산을 단리하고, 추가의 클로닝 및/또는 숙주 세포에서의 발현을 위해 하나 이상의 벡터에 삽입한다. 이러한 핵산은 통상적인 절차를 이용하여 용이하게 단리하고 서열분석할 수 있다 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하는 것에 의함).

[0230] 항체-코딩 벡터의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 본원에 기재된 원핵 또는 진핵 세포를 포함한다. 예를 들어, 특히 글리코실화 및 Fc 이펙터 기능이 필요하지 않을 경우, 항체를 박테리아에서 생산할 수 있다. 박테리아에서의 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현에 대해서는, 예를 들어 미국 특허 번호 5,648,237, 5,789,199 및 5,840,523을 참조한다. (또한, 이. 콜라이에서의 항체 단편의 발현이 기재되어 있는 문헌 [Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254] 참조.) 발현 후에, 가용성 분획에서 박테리아 세포 페이스트로부터 항체를 단리할 수 있고, 추가로 정제할 수 있다.

[0231] 원핵생물 뿐만 아니라, 진핵 미생물, 예컨대 글리코실화 경로가 "인간화"되어 항체를 부분적으로 또는 전체적으로 인간 글리코실화 패턴으로 생산되게 하는, 진균 및 효모 균주를 비롯한 사상 진균 또는 효모가 항체-코딩 벡터의 클로닝 또는 숙주 발현에 적합하다. 문헌 [Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004), 및 Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)]을 참조한다.

[0232] 글리코실화 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 또한 다세포 유기체 (무척추동물 및 척추동물)로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 다수의 바칼로바이러스 균주가 곤충 세포와 함께, 특히 스포도프테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*) 세포를 형질감염시키는데 사용될 수 있는 것으로 확인되어 있다.

[0233] 식물 세포 배양물을 또한 숙주로서 이용할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 및 6,417,429 (트랜스제닉 식물에서 항체를 생산하기 위한 플랜티바디스(PLANTIBODIES)TM 기술을 기재함)를 참조한다.

[0234] 척추동물 세포를 또한 숙주로서 이용할 수 있다. 예를 들어, 현탁액 중에서 성장시키는데 적합한 포유동물 세포주가 유용할 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7); 인간 배아 신장 세포주 (예를 들어, 문헌 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]에 기재된 바와 같은 293 또는 293 세포); 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK); 마우스 세르톨리 세포 (예를 들어, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]에 기재된 바와 같은 TM4 세포); 원숭이 신장 세포 (CV1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA); 개 신장 세포 (MDCK); 버팔로 래트 간 세포 (BRL 3A); 인간 폐 세포 (W138); 인간 간 세포 (Hep G2); 마우스 유방 종양 (MMT 060562); 예를 들어 문헌 [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]에 기재된 바와 같은 TRI 세포; MRC 5 세포; 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, 예를 들어 DHFR⁻ CHO 세포 (문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 및 골수종 세포주, 예컨대 YO, NSO 및 Sp2/0을 포함한다. 항체 생산에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주의 검토를 위해, 예를 들어 문헌 [Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)]을 참조한다.

[0235] C. 검정

[0236] 본원에 제공된 항-BACE1 항체는 당업계에 공지된 다양한 검정에 의해 확인되거나, 스크리닝되거나, 또는 그의 물리적/화학적 특성 및/또는 생물학적 활성에 대해 특성화될 수 있다.

[0237] 1. 결합 검정 및 기타 검정

[0238] 한 측면에서, 본 발명의 항체를 예를 들어 ELISA, 웨스턴 블롯 등과 같은 공지된 방법으로 그의 항원 결합 활성

에 대해 시험한다.

- [0239] 또 다른 측면에서, 경쟁 검정은 BACE1에 대한 결합에 대해 본원에 기재된 임의의 항체 또는 Fab, 예를 들어 YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29, YW412.8.51, Fab12, LC6, LC9, LC10과 경쟁하는 항체를 확인하는데 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 경쟁 항체는 본원에 기재된 임의의 항체 또는 Fab, 예를 들어 YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29, YW412.8.51, Fab12, LC6, LC9, LC10에 의해 결합된 동일한 에피토프 (예를 들어, 선형 또는 입체형태적 에피토프)에 결합한다. 항체가 결합하는 에피토프를 맵핑하는 상세한 예시적인 방법은 문헌 [Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)]에 제공된다.
- [0240] 예시적인 경쟁 검정에서, 고정화된 BACE1을 BACE1에 결합하는 제1 표지된 항체 (예를 들어, YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29, YW412.8.51, Fab12, LC6, LC9, LC10) 및 BACE1에 대한 결합에 대해 제1 항체와 경쟁하는 능력에 대해 시험할 제2 표지된 항체를 포함하는 용액 중에서 인큐베이션한다. 제2 항체는 하이브리도마 상청액에 존재할 수 있다. 대조군으로서, 고정화된 BACE1을 제1 표지된 항체를 포함하고 제2 비표지된 항체를 포함하지 않는 용액에서 인큐베이션한다. BACE1에 대한 제1 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 인큐베이션한 후에, 잉여량의 미결합 항체를 제거하고, 고정화된 BACE1과 회합된 표지의 양을 측정한다. 고정화된 BACE1과 회합된 표지의 양이 대조 샘플과 비교하여 시험 샘플에서 실질적으로 감소된 경우에, 이것은 제2 항체가 BACE1에 대한 결합에 대해 제1 항체와 경쟁한다는 것을 나타낸다. 문헌 [Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)]을 참조한다.
- [0241] **2. 활성 검정**
- [0242] 한 측면에서, 생물학적 활성을 갖는 그의 항-BACE1 항체를 확인하기 위한 검정이 제공된다. 생물학적 활성은 예를 들어 BACE1 아스파르트릴 프로테아제 활성의 억제 또는 감소; 또는 BACE1에 의한 APP 절단의 억제 또는 감소; 또는 A β 생산의 억제 또는 감소를 포함할 수 있다. 생체내 및/또는 시험관내에서 이러한 생물학적 활성을 갖는 항체가 또한 제공된다.
- [0243] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 이러한 생물학적 활성에 대해 시험된다. 예를 들어, BACE1 프로테아제 활성은 합성 기질 펩티드를 사용하여 실시예 1 및 2(B)에 상세히 기재된 바와 같은 균일 시간-분해 형광 HTRF 검정 또는 마이크로유체 모세관 전기영동 (MCE) 검정에서 시험될 수 있다.
- [0244] 간략하게, 균일 시간-분해 형광 (HTRF) 검정은 아밀로이드 전구체 단백질 BACE1 절단 부위 펩티드를 사용하여 BACE1 아스파르트릴 프로테아제 활성을 측정하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, Bi27 펩티드 (비오틴-KTEEISEVNLDSEFRHDSGYEVHHQKL (서열 53), 아메리칸 펩타이드 캄파니(American Peptide Company)))를 384-웰 플레이트 (프록시플레이트(Proxiplate)TM, 퍼킨-엘머(Perkin-Elmer))에서 BACE 반응 완충제 (50 mM 아세트산나트륨 pH 4.4 및 0.1% CHAPS) 중의 항-BACE 항체와 미리 인큐베이션한 BACE1과 혼합한다. 단백질분해 반응 혼합물을 주위 온도에서 75분 동안 인큐베이션하고, 검출 완충제 (200 mM 트리스 pH 8.0, 20 mM EDTA, 0.1% BSA, 및 0.8M KF) 중에 2 nM 스트렙타비딘-D2 및 유로프 크립테이트로 표지된 150 nM의 항-아밀로이드 베타 항체를 함유하는 5 μ L HTRF 검출 혼합물을 첨가하여 켄칭하였다. 최종 반응 혼합물을 주위 온도에서 60분 동안 인큐베이션하고, TR-FRET 신호를 320 nm의 여기 파장 및 615 및 665 nm의 방출 파장에서 엔비전 멀티라벨 플레이트 판독기(EnVision Multilabel Plate Reader)TM (퍼킨-엘머)를 이용하여 측정한다.
- [0245] MCE 검정 반응은 인간 BACE1 (세포외 도메인), 아밀로이드 전구체 단백질 베타 세크레타제 활성 부위 펩티드 (FAM-KTEEISEVNLDSEFRWKK-CONH₂ (서열 55)), 50 mM NaOAc pH 4.4 및 0.1% CHAPS를 함유하는 표준 효소 반응 (효소에 대한 기질 및 4x 화합물을 첨가하여 개시됨)에서 수행할 수 있다. 주위에서 60분 동안 인큐베이션한 후에, 각각의 반응에서 생성물 및 기질을 LC3000® 상에서 분석되는 12-시퍼 마이크로유체 칩 (둘 다, 캘리퍼 라이프 사이언시스(Caliper Life Sciences))을 이용하여 분리한다. 생성물 및 기질의 분리는 전압 및 압력을 제조업체의 최적화 소프트웨어를 이용하여 선택함으로써 최적화된다. 기질 전환은 HTS 웰 분석기 소프트웨어 (캘리퍼 라이프 사이언시스)를 이용하여 전기영동도로부터 계산된다.
- [0246] 또한, BACE1 프로테아제 활성은 BACE1 기질, 예컨대 APP를 발현하는 세포주에서, 또는 실시예 2(C) 및 4에 기재된 바와 같이 BACE1 기질, 예컨대 인간 APP를 발현하는 트랜스제닉 마우스에서 생체내 시험될 수 있다.
- [0247] 추가로, BACE1 프로테아제 활성은 동물 모델에서 항-BACE1 항체를 사용하여 시험할 수 있다. 예를 들어, 다양

한 신경계 질환 및 장애의 동물 모델 및 이러한 모델과 연관된 병리학적 과정을 조사하기 위한 관련 기술은 당 업계에서 용이하게 이용가능하다. 다양한 신경계 장애의 동물 모델은 비-재조합 및 재조합 (트랜스제닉) 동물들 다를 포함한다. 비-재조합 동물 모델은 예를 들어 설치류, 예를 들어 뮤린 모델을 포함한다. 이러한 모델은 표준 기술, 예를 들어 피하 주사, 꼬리 정맥 주사, 비장 이식, 복강내 이식, 및 심피막 하 이식을 이용하여 세포를 동계 마우스 내로 도입함으로써 생성시킬 수 있다. 생체내 모델은 줄중/뇌 허혈의 모델, 신경변성 질환의 생체내 모델, 예컨대 파킨슨병의 마우스 모델; 알츠하이머병의 마우스 모델; 근위축성 측삭 경화증의 마우스 모델; 척수성 근육 위축의 마우스 모델; 국소 및 전뇌 허혈의 마우스/랫트 모델, 예를 들어, 총경 동맥 폐쇄 또는 중대뇌 동맥 폐쇄 모델; 또는 생체외 전체 배아 배양을 포함한다. 한 비제한적인 예로서, 알츠하이머병에 대한 다수의 당업계에 공지된 마우스 모델이 존재한다 (예를 들어, 문헌 [Rakover et al., Neurodegener. Dis. (2007); 4(5): 392-402; Mouri et al., FASEB J. (2007) Jul;21 (9): 2135-48; Minkeviciene et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. (2004) Nov; 311 (2): 677-82 및 Yuede et al., Behav Pharmacol. (2007) Sep; 18 (5-6): 347-63] 참조). 다양한 검정을 당업계에 공지되고 문헌에 기재되어 있는 시험관내 또는 생체내 검정 포맷으로 수행할 수 있다. 또한, 다양한 상기 동물 모델은 상업적인 판매자, 예컨대 잭슨 래보라토리 (Jackson Laboratory)로부터 이용가능하다. 추가적 동물 모델 검정은 실시예 4 및 5에 기재되어 있다.

[0248] D. 면역접합체

[0249] 본 발명은 또한 하나 이상의 세포독성제, 예컨대 화학요법제 또는 약물, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 단백질 독소, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소 또는 그의 단편) 또는 방사성 동위원소에 접합된 본원의 항-BACE1 항체를 포함하는 면역접합체를 제공한다.

[0250] 한 실시양태에서, 면역접합체는 항체가 메이탄시노이드 (미국 특허 번호 5,208,020, 5,416,064 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1 참조); 아우리스타틴, 예컨대 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF (MMAE 및 MMAF) (미국 특허 번호 5,635,483 및 5,780,588, 및 7,498,298 참조); 돌라스타틴; 칼리케아미신 또는 그의 유도체 (미국 특허 번호 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 및 5,877,296; 문헌 [Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993); 및 Lode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)] 참조); 안트라시클린, 예컨대 다우노마이신 또는 독소루비신 (문헌 [Kratz et al., Current Med. Chem. 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006); Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005); Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002); King et al., J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002)]; 및 미국 특허 번호 6,630,579); 메토티렉세이트; 빈데신; 탁산, 예컨대 도세탁셀, 파클리탁셀, 라로탁셀, 테세탁셀 및 오르타탁셀; 트리코테센; 및 CC1065를 포함하지만 이에 제한되지는 않은 하나 이상 약물에 접합된 항체-약물 접합체 (ADC)이다.

[0251] 또 다른 실시양태에서, 면역접합체는 효소 활성 독소 또는 그의 단편 (디프테리아 A쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A쇄 (슈도모나스 아에루기노사 (Pseudomonas aeruginosa)로부터 유래됨), 리신 A쇄, 아브린 A쇄, 모데신 A쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이 (Aleurites fordii) 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나 (Phytolaca americana) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 (momordica charantia) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 (sapaonaria officinalis) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트리토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함하나 이에 제한되지는 않음)에 접합된 본원에 기재된 항체를 포함한다.

[0252] 또 다른 실시양태에서, 면역접합체는 방사성접합체를 형성하기 위해 방사성 원자에 접합된 본원에 기재된 바와 같은 항체를 포함한다. 다양한 방사성 동위원소가 방사성접합체의 생산을 위해 이용가능하다. 그 예는 At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹², 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 방사성접합체는 검출용으로 사용되는 경우에 신티그래피 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어 tc99m 또는 I123을 포함하거나, 핵자기 공명 (NMR) 영상화 (자기 공명 영상화, mri로도 공지됨)용 스핀 표지, 예컨대 다시 아이오딘-123, 아이오딘-131, 인듐-111, 플루오린-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망가니즈 또는 철을 포함할 수 있다.

[0253] 항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 이관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대, 디메틸 아디프이미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예컨대, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대, 비스 (p-아지도 벤조일) 헥사디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이

트 (예컨대, 톨루엔 2,6-다이소시아네이트) 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌 트리 아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 항체에 방사성뉴클레오티드를 접합시키기 위한 예시적인 킬레이트화제이다. WO94/11026을 참조한다. 링커는 세포에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정성 링커, 펩티다제-감수성 링커, 광분해성 링커, 디메틸 링커 또는 디술피드-함유 링커 (문헌 [Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992)]; 미국 특허 번호 5,208,020)가 사용될 수 있다.

[0254] 본원의 면역접합체 또는 ADC는 상업적으로 입수가 가능한 (예를 들어, 피어스 바이오테크놀로지, 인크.(Pierce Biotechnology, Inc.; 미국 일리노이주 록포드)로부터의) 가교-링커 시약 (BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술포-EMCS, 술포-GMBS, 술포-KMUS, 술포-MBS, 술포-SIAB, 술포-SMCC 및 술포-SMPB, 및 SVSB (숙신이미달-(4-비닐술포)벤조에이트)를 포함하나 이에 제한되지는 않음)으로 제조된 이러한 접합체를 명백하게 고려하나 이에 제한되지는 않는다.

[0255] E. 진단 및 검출을 위한 방법 및 조성물

[0256] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 임의의 항-BACE1 항체는 생물학적 샘플에서 BACE1의 존재를 검출하는데 유용하다. 본원에 사용된 용어 "검출하는"은 정량적 또는 정성적 검출을 포함한다. 특정 실시양태에서, 생물학적 샘플은 세포 또는 조직, 예컨대 혈청, 혈장, 타액, 위 분비물, 점액, 뇌척수액, 림프액, 뉴런 조직, 뇌 조직, 심장 조직 또는 혈관 조직을 포함한다.

[0257] 한 실시양태에서, 진단 또는 검출 방법에 사용하기 위한 항-BACE1 항체가 제공된다. 추가 측면에서, 생물학적 샘플에서 BACE1의 존재를 검출하는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 방법은 본원에 기재된 바와 같은 항-BACE1 항체와 생물학적 샘플을 BACE1에 대한 항-BACE1 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 접촉시키는 것, 및 항-BACE1 항체와 BACE1 사이에 복합체가 형성되는지의 여부를 검출하는 것을 포함한다. 이러한 방법은 시험관내 또는 생체내 방법일 수 있다. 한 실시양태에서, 항-BACE1 항체는 예를 들어 BACE1이 환자의 선택을 위한 바이오마커인 경우에 항-BACE1 항체를 사용하는 요법에 적절한 대상체를 선택하는데 사용된다.

[0258] 본 발명의 항체를 사용하여 진단될 수 있는 예시적인 장애는 신경변성 질환 (루이 소체 질환, 척수회백질염후 증후군, 샤이-드래거 증후군, 올리브뇌교소뇌 위축, 파킨슨병, 다계통 위축, 선조체흑질 변성, 타우병증 (알츠하이머병 및 핵상 마비를 포함하나 이에 제한되지는 않음), 프리온 질환 (소 해면상 뇌병증, 스크래피, 크로이츠펠트-야콥 증후군, 쿠루병, 게르스트만-스트라우슬러-샤잉커병, 만성 소모성 질환 및 치명적 가족성 불면증을 포함하나 이에 제한되지는 않음), 졸중, 근육 이영양증, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 엔젤만 증후군, 리들 증후군, 파제트 증후군, 외상성 뇌 손상, 연수 마비, 운동 뉴런 질환을 포함하나 이에 제한되지는 않음) 및 신경계 이중변성 장애 (카나반병, 헌팅턴병, 뉴런 세로이드-리포푸신증, 알렉산더병, 투렛 증후군, 멘케스 킨키 헤어 증후군, 코케인 증후군, 할러보르텐-스파츠 증후군, 라포라병, 레트 증후군, 간렌스택 변성, 레쉬-니한 증후군, 및 운베리히트-룬트보르크 증후군을 포함하나 이에 제한되지는 않음)), 치매 (픽병 및 척수소뇌성 운동실조를 포함하나 이에 제한되지는 않음)를 포함한다.

[0259] 특정 실시양태에서, 표지된 항-BACE1 항체가 제공된다. 표지는 직접적으로 검출되는 표지 또는 모이어티 (예컨대, 형광, 발색, 전자-밀집, 화학발광 및 방사성 표지) 뿐만 아니라 간접적으로, 예를 들어 효소적 반응 또는 분자 상호작용을 통해 검출되는 모이어티, 예컨대 효소 또는 리간드를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 예시적인 표지는 방사성동위원소 ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H 및 ^{131}I , 형광단, 예컨대 희토류 킬레이트 또는 플루오레세인 및 그의 유도체, 로다민 및 그의 유도체, 단실, 움벨리페론, 또는 루시페라제, 예를 들어 반딧불이 루시페라제 및 박테리아 루시페라제 (미국 특허 번호 4,737,456), 루시페린, 2,3-디히드로프탈라진디온, 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP), 알칼리성 포스파타제, β -갈락토시다제, 글루코아밀라제, 리소자임, 사카라이드 옥시다제, 예를 들어 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제, 및 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제, 염료 전구체를 산화시키기 위해 과산화수소를 사용하는 효소, 예컨대 HRP, 락토퍼옥시다제, 또는 마이크로퍼옥시다제와 커플링된 헤테로시클릭 옥시다제, 예컨대 우리카제 및 크산틴 옥시다제, 비오틴/아비딘, 스핀 표지, 박테리오파지 표지, 안정한 자유 라디칼 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0260] F. 제약 제제

[0261] 본원에 기재된 바와 같은 항-BACE1 항체의 제약 제제는 원하는 정도의 순도를 갖는 상기 항체를 하나 이상의 임의의 제약상 허용되는 담체 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.

(1980)])와 혼합하여 동결건조 제제 또는 수용액의 형태로 제조한다. 제약상 허용되는 담체는 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 기타 유기 산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제 (예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐 피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 기타 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염 형성 반대이온, 예컨대 나트륨; 금속 착체 (예를 들어, Zn-단백질 착체); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본원에서 예시적인 제약상 허용되는 담체는 간질성 약물 분산액 작용제, 예컨대 가용성 중성-활성 히알루로니다제 당단백질 (sHASEGP), 예를 들어 인간 가용성 PH-20 히알루로니다제 당단백질, 예컨대 rHuPH20 (힐레넥스(HYLENEX)[®], 백스터 인터내셔널, 인크.(Baxter International, Inc.))을 추가로 포함한다. rHuPH20을 포함하는, 특정 예시적인 sHASEGP 및 사용 방법은 미국 특허 공보 번호 2005/0260186 및 2006/0104968에 기재되어 있다. 한 측면에서, sHASEGP는 하나 이상의 추가의 글리코사미노글리카나제, 예컨대 콘드로이티나제와 조합된다.

[0262] 예시적인 동결건조 항체 제제는 미국 특허 번호 6,267,958에 기재되어 있다. 수성 항체 제제는 미국 특허 번호 6,171,586 및 W02006/044908에 기재된 것을 포함하고, 후자의 제제는 히스티딘-아세테이트 완충제를 포함한다.

[0263] 또한, 본원에서 제제는 치료되는 특정한 적응증에 필요한 하나 초과와 활성 성분, 바람직하게는 서로 유래한 영향을 주지 않는 보완적 활성을 갖는 것을 함유할 수 있다. 이러한 활성 성분은 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다.

[0264] 활성 성분은 예를 들어 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로구체, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐)에서 또는 마크로에멀전에서 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조되는 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에 봉입될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0265] 지속-방출 제제를 제조할 수 있다. 지속-방출 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 이 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다.

[0266] 생체내 투여에 사용되는 제제는 일반적으로 멸균된다. 멸균은 예를 들어 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성할 수 있다.

[0267] G. 치료 방법 및 조성물

[0268] 본원에 제공된 임의의 항-BACE1 항체는 치료 방법에 사용될 수 있다.

[0269] 한 측면에서, 의약으로 사용하기 위한 항-BACE1 항체가 제공된다. 추가 측면에서, 신경계 질환 또는 장애 (예를 들어, AD)를 치료하는데 사용하기 위한 항-BACE1 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 치료 방법에 사용하기 위한 항-BACE1 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 신경계 질환 또는 장애를 갖는 개체에게 유효량의 항-BACE1 항체를 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 항-BACE1 항체를 제공한다. 한 이러한 실시양태에서, 방법은 개체에게 유효량의 하나 이상의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 추가 실시양태에서, 본 발명은 신경계 질환 또는 장애 (예를 들어, AD)에 걸릴 위험이 있거나 또는 이를 앓고 있는 환자에서 아밀로이드 플라크 형성을 감소시키거나 억제하는데 사용하기 위한 항-BACE1 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 개체에게 유효량의 항-BACE1 항체를 투여하는 것을 포함하는 개체에서 Aβ 생산을 감소시키거나 억제하는 방법에 사용하기 위한 항-BACE1 항체를 제공한다. 임의의 상기 실시양태에 따른 "개체"는 바람직하게는 인간이다. 특정 측면에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 항-BACE1 항체는 BACE1 활성을 감소시키거나 억제한다. 예를 들어, 항-BACE1 항체는 APP를 절단하는 BACE1의 능력을 감소시키거나 억제한다.

[0270] 추가 측면에서, 본 발명은 의약의 제조 또는 제제화에 있어서 항-BACE1 항체의 용도를 제공한다. 한 실시양태에서, 의약은 신경계 질환 또는 장애의 치료를 위한 것이다. 추가 실시양태에서, 의약은 신경계 질환 또는 장애를 갖는 개체에게 유효량의 의약을 투여하는 것을 포함하는, 신경계 질환 또는 장애의 치료 방법에 사용하기

위한 것이다. 한 이러한 실시양태에서, 방법은 예를 들어 유효량의 하기 기재된 바와 같은 하나 이상의 추가의 치료제를 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 추가 실시양태에서, 의약은 BACE1 활성을 억제하기 위한 것이다. 추가 실시양태에서, 의약은 개체에게 유효량의 의약을 투여하여 A β 생산 또는 플라크 형성을 억제하는 것을 포함하는, 개체에서 A β 생산 또는 플라크 형성을 억제하는 방법에서 사용하기 위한 것이다. 임의의 상기 실시양태에 따른 "개체"는 인간일 수 있다.

[0271] 추가 측면에서, 본 발명은 알츠하이머병을 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 방법은 AD를 갖는 개체에게 유효량의 항-BACE1 항체를 투여하는 것을 포함한다. 한 이러한 실시양태에서, 방법은 개체에게 유효량의 하나 이상의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 임의의 상기 실시양태에 따른 "개체"는 인간일 수 있다.

[0272] 추가 측면에서, 본 발명은 예를 들어 임의의 상기 치료 방법에 사용하기 위한, 본원에 제공된 임의의 항-BACE1 항체를 포함하는 제약 제제를 제공한다. 한 실시양태에서, 제약 제제는 본원에 제공된 임의의 항-BACE1 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제약 제제는 본원에 제공된 임의의 항-BACE1 항체 및 예를 들어 하기 기재된 바와 같은 하나 이상의 추가의 치료제를 포함한다.

[0273] 본 발명의 항체는 요법에서 단독으로 또는 다른 작용제와 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 하나 이상의 추가의 치료제와 공동-투여될 수 있다.

[0274] 상기 언급된 이러한 조합 요법은 조합 투여 (여기서 2종 이상의 치료제가 동일한 또는 별도의 제제에 포함됨), 및 개별 투여를 포함하고, 이 경우에 본 발명의 항체의 투여는 추가의 치료제 및/또는 아주반트의 투여 전에, 그와 동시에 및/또는 그 후에 수행될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 방사선 요법과 조합되어 사용될 수도 있다.

[0275] 본 발명의 항체 (및 임의의 추가의 치료제)는 비경구, 폐내 및 비강내를 포함하여 임의의 적합한 수단에 의해 투여될 수 있고, 원하는 경우에 국부 치료를 위해 병변내 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 투여는 임의의 적합한 경로, 예를 들어 부분적으로는 투여가 단기적인지 장기적인지에 따라 정맥내 또는 피하 주사와 같은 주사에 의해 수행될 수 있다. 단일 투여 또는 다양한 시점에 걸친 다중 투여, 볼루스 투여 및 펄스 주입을 비롯한 (이에 제한되지는 않음) 다양한 투여 스케줄이 본원에서 고려된다.

[0276] 본 발명의 특정 실시양태는 혈액-뇌 장벽을 가로지르는 항체 또는 그의 단편을 제공한다. 특정 신경변성 질환은 혈액-뇌 장벽 투과성의 증가와 연관되어 있어서, 항체 또는 그의 활성 단편이 용이하게 뇌로 도입될 수 있다. 혈액-뇌 장벽이 무손상으로 유지되는 경우, 물리적 방법, 지질-기반 방법, 및 수용체 및 채널-기반 방법을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 혈액-뇌 장벽을 가로질러 분자를 수송하기 위한 여러 접근법이 당업계에 공지되어 있다.

[0277] 혈액-뇌 장벽을 가로질러 항체 또는 그의 단편을 수송하는 물리적 방법은 완전히 혈액-뇌 장벽을 우회하는 것, 또는 혈액-뇌 장벽에 개구부를 생성시키는 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 우회법은 뇌로의 직접 주사 (예를 들어 문헌 [Papanastassiou et al., Gene Therapy 9: 398-406 (2002)] 참조), 및 뇌에 전달 장치를 이식하는 것 (예를 들어 문헌 [Gill et al., Nature Med. 9: 589-595 (2003)]; 및 글리아텔 웨이퍼스(Gliadel Wafers)TM, 길드포드 파마슈티칼(Guildford Pharmaceutical) 참조)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 장벽 내 개구부의 생성 방법에는 초음파 (예를 들어, 미국 특허 공보 번호 2002/0038086 참조), 삼투압 (예를 들어, 고장성 만니톨의 투여에 의함 (문헌 [Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N.Y. (1989)]), 예를 들어 브라디키닌 또는 투과화제 A-7에 의한 투과화 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,112,596, 5,268,164, 5,506,206 및 5,686,416 참조), 및 항체를 코딩하는 유전자를 함유하는 벡터에 의한, 혈액-뇌 장벽을 가로지르는 뉴런의 형질감염 (예를 들어, 미국 특허 공보 번호 2003/0083299 참조)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0278] 혈액-뇌 장벽을 가로질러 항체 또는 그의 단편을 수송하는 지질-기반 방법은 혈액-뇌 장벽의 혈관 내피 상의 수용체에 결합하는 항체 결합 단편에 커플링되는 리포솜 내에 항체 또는 그의 활성 단편을 캡슐화하는 것 (예를 들어 미국 특허 출원 공보 번호 20020025313 참조), 및 저-밀도 지단백질 입자 (예를 들어 미국 특허 출원 공보 번호 20040204354 참조) 또는 아포지단백질 E (예를 들어 미국 특허 출원 공보 번호 20040131692 참조)에서 항체 또는 그의 활성 단편을 코팅하는 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0279] 본 발명의 항체는 우수한 의료 행위와 일치하는 방식으로 제제화되고 투약되고 투여될 것이다. 이와 관련하여

고려할 인자는 치료할 특정한 장애, 치료할 특정한 포유동물, 개별 환자의 임상적 상태, 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄링, 및 진료의에게 공지된 다른 인자를 포함한다. 항체는 반드시 그럴 필요는 없지만, 임의로 해당 장애를 예방 또는 치료하는데 현재 사용되는 하나 이상의 작용제와 함께 제제화된다. 이러한 다른 작용제의 유효량은 제제 내에 존재하는 항체의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 다른 인자에 따라 달라진다. 이는 일반적으로 상기 기재된 바와 동일한 투여량 및 투여 경로로, 또는 본원에 기재된 투여량의 약 1 내지 99%로, 또는 실험적으로/임상적으로 적절한 것으로 결정된 임의의 투여량 및 경로에 의해 사용된다.

[0280] 질환의 예방 또는 치료를 위해, 본 발명의 항체의 적절한 투여량 (단독으로, 또는 하나 이상의 다른 추가의 치료제와 조합하여 사용되는 경우)은 치료할 질환의 유형, 항체의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 항체가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지의 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 및 담당의의 판단에 따라 달라질 것이다. 항체는 한번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 적합하게 투여된다. 질환의 유형 및 중증도에 따라, 예를 들어 1회 이상의 개별 투여에 의해서든 아니면 연속 주입에 의해서든 상관없이, 약 1 μ g/kg 내지 15 mg/kg (예를 들어, 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg)의 항체가 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량일 수 있다. 한 가지 전형적인 1일 투여량은 상기 언급된 인자에 따라 약 1 μ g/kg 내지 100 mg/kg 또는 그 초과 범위일 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복 투여의 경우, 치료는 일반적으로 상태에 따라 질환 증상의 원하는 저해가 일어날 때까지 지속될 것이다. 한 예시적인 항체 투여량은 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 범위일 것이다. 따라서, 약 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg 또는 10 mg/kg (또는 그의 임의의 조합) 중 하나 이상의 용량이 환자에게 투여될 수 있다. 이러한 용량은 간헐적으로, 예를 들어 매주 또는 매 3주마다 투여될 수 있다 (예를 들어, 약 2회 내지 약 20회, 또는 예를 들어 약 6회 용량의 항체가 환자에게 제공되도록 투여됨). 보다 높은 초기 부하 용량을 투여한 후, 1회 이상의 보다 낮은 용량을 투여할 수 있다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통상의 기술 및 검정에 의해 용이하게 모니터링된다.

[0281] 임의의 상기 제제 또는 치료 방법은 항-BACE1 항체 대신에 또는 이에 더하여 본 발명의 면역접합체를 이용하여 수행될 수 있는 것으로 이해된다.

[0282] H. 제조품

[0283] 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기 기재된 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질을 함유하는 제조품이 제공된다. 제조품은 용기, 및 용기 상에 있거나 용기와 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 시린지, IV 용액 백 등을 포함한다. 용기는 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 용기는 조성물 자체를 수용하거나 또는 상기 조성물을 상태의 치료, 예방 및/또는 진단에 유효한 또 다른 조성물과 조합하여 수용하며, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 정맥 주사액 백 또는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 바이알일 수 있음). 조성물 내의 하나 이상의 활성제는 본 발명의 항체이다. 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물이 선택된 상태를 치료하는데 사용된다는 것을 나타낸다. 또한, 제조품은 (a) 그 내부에, 본 발명의 항체를 포함하는 조성물을 함유하는 제1 용기; 및 (b) 그 내부에, 추가의 세포독성제 또는 다른 치료제를 포함하는 조성물을 함유하는 제2 용기를 포함할 수 있다. 본 발명의 이러한 실시양태에서의 제조품은, 조성물이 특정한 상태를 치료하기 위해 사용될 수 있음을 나타내는 포장 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 제조품은 제약상 허용되는 완충제, 예컨대 정박 테리아 주사용수 (BWF), 포스페이트-완충 염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 (또는 제3) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 이는 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 시린지를 포함하여, 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0284] 임의의 상기 제조품이 항-BACE1 항체 대신에 또는 이에 더하여 본 발명의 면역접합체를 포함할 수 있는 것으로 이해된다.

[0285] III. 실시예

[0286] 하기는 본 발명의 방법 및 조성물의 예이다. 상기 제공된 일반적 설명에 기초하여 다양한 다른 실시양태를 실시할 수 있음이 이해된다.

[0287] 실시예 1: 항-BACE1 항체의 생성 및 특성화

[0288] BACE1에 특이적으로 결합하는 항체는 인간 BACE1 세포의 도메인, 서열 49의 아미노산 1-457에 대해 2가지 상이한 유형의 파지 디스플레이 항체 라이브러리 (하나는 천연 다양성 (VH 및 VH/VL)을 갖고, 다른 것은 특정한 아미노산 세트 (YSGX)로 인위적으로 제한된 특정 CDR 영역에서 다양성을 가짐)를 패닝함으로써 생성하였다.

[0289] A. 항-BACE-1 항체를 확인하기 위한 천연 다양성 라이브러리 분류 및 스크리닝

[0290] 항-BACE1 클론을 디스플레이하는 파지의 선택

[0291] 비오틴일화 인간 BACE-1 (서열 49의 1-457)을 라이브러리 분류를 위한 항원으로 사용하였다. 천연 다양성 파지 라이브러리는 교대식 뉴트라비딘/스트렙타비딘 플레이트 상에서 미리 포획된 비오틴일화 BACE-1에 대해 5개 라운드 분류를 수행하였다. 분류의 제1 라운드에서, 눈크 96 웰 맥시소르프(Maxisorp) 이뮤노플레이트를 우선 10 μ g/mL 뉴트라비딘 (피셔 사이언티픽(Fisher Scientific), #21125)으로 코팅하고, 파지 차단 완충제 PBST (포스페이트-완충 염수 (PBS) 및 1% (w/v) 소 혈청 알부민 (BSA) 및 0.05% (v/v) 트윈 20)로 밤새 차단하였다. 우선, 10 μ g/mL 비오틴일화 BACE-1을 30분 동안 이뮤노플레이트 상에서 포획하였다. 파지 차단 완충제 PBST로 미리 차단된 항체 파지 라이브러리 VH (예를 들어, 문헌 [Lee et al., J. Immunol. Meth. 284:119-132 (2004)] 참조) 및 VH/VL (문헌 [Liang et al., J. Mol. Biol. 366: 815-829 (2007)] 참조)를 플레이트에 순차적으로 첨가하고, 실온에서 밤새 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBT (0.05% 트윈 20을 갖는 PBS)로 다음날 10x 세척하고, 결합된 파지를 30분 동안 1 mL 50 mM HCl 및 500 mM NaCl로 용리하고, 600 μ L의 1 M 트리스 염기 (pH 8.0)로 중화하였다. 회수된 파지를 이. 콜라이 XL-1 블루 세포에서 증폭시켰다. 이후의 선택 라운드 동안, 증식된 파지 라이브러리를 우선 PBST/BSA에서 50 μ L의 다이나비즈(Dynabeads)® 마이원(MyOne)TM 스트렙타비딘 T1 (인비트로젠(Invitrogen), # 65601)와 미리 흡착시키고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 뉴트라비딘에 결합된 파지 입자를 다이나비즈®를 제거하면서 파지 원액으로부터 빼내었다. 이어서, 미결합 파지를 스트렙타비딘 플레이트 상에 디스플레이된 BACE-1 항원에 첨가하였고, 인큐베이션 시간을 2-3시간으로 감소시켰다. 플레이트 세정의 엄격도를 점차 증가시켰다.

[0292] 5 라운드의 패닝 후에, 유의한 풍부화가 관찰되었다. VH 및 VH/VL 라이브러리 분류로부터 96개 클론을 골라내어 이들이 인간 BACE-1에 특이적으로 결합하는지의 여부를 결정하였다. 이들 클론의 가변 영역을 PCR 서열분석하여 특징적인 서열 클론을 확인하였다. 인간 BACE-1에 백그라운드에 비해 적어도 5x로 결합한 42개의 특징적인 파지 항체를 선택하고, 시험관내 세포 검정에서 평가하기 위해 전장 IgG로 재구성하였다.

[0293] 관심 클론을 개별 클론의 V_L 및 V_H 영역을 각각 LPG3 및 LPG4 벡터로 클로닝하여 IgG로 재구성하고, 포유동물 CHO 세포에서 일시적으로 발현시키고, 단백질 A 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.

[0294] 항-BACE1 억제 클론의 선택

[0295] BACE1은 통상적으로 세포의 표면에 가까운 그의 막횡단 도메인 근처의 지점에서 아밀로이드 전구체 단백질을 절단하는 아스파르트 프로테아제이다. 이에 따라, 상기 확인된 항체가 특정 BACE1 기질 상에서 BACE1 단백질분해 활성을 조절하는 능력을 균일 시간-분해 형광 (HTRF) 검정을 이용하여 시험관내에서 평가하였다.

[0296] HTRF 검정은 다음과 같이 수행하였다. 2 마이크로리터의 375 nM Bi27 (비오틴-KTEEISEVNLDAEFRHDSGYEVHHQKL (서열 53), 아메리칸 펩타이드 캄파니)) (BACE1 절단에 대한 감도를 증가시키는 치환을 보유하는 아밀로이드 전구체 단백질 BACE1 절단 부위 펩티드)을 384-웰 플레이트 (프로시플레이트TM, 퍼킨-엘머)에서 BACE 반응 완충제 (50 mM 아세트산나트륨 pH 4.4 및 0.1% CHAPS) 중에 항-BACE 항체와 미리 인큐베이션된 3 μ L의 125 nM BACE1 과 합하였다. 단백질분해 반응 혼합물을 75분 동안 주위 온도에서 인큐베이션하고, 검출 완충제 (200 mM 트리스 pH 8.0, 20 mM EDTA, 0.1% BSA 및 0.8M KF) 중에 2 nM 스트렙타비딘-D2 및 유로퓸 크립테이트로 표지된 150 nM의 6E10 항-아밀로이드 베타 항체 (코반스(Covance), 캘리포니아주 에모리빌)를 함유하는 5 μ L HTRF 검출 혼합물을 첨가하여 켄칭하였다. 최종 반응 혼합물을 60분 동안 주위 온도에 인큐베이션하고, TR-FRET 신호를 320 nm의 여기 파장 및 615 및 665 nm의 방출 파장에서 엔비전 멀티라벨 플레이트 판독기TM (퍼킨-엘머)를 이용하여 측정하였다. BACE1 효소가 결핍된 반응 (0 BACE) 및 항-BACE1 항체 결핍을 함유하는 반응 (PBS (100% BACE1 활성)을 대조군으로 이용하였다.

[0297] 천연 다양성 라이브러리로부터 확인된 시험된 42개의 항체 중에서, BACE1의 가장 우수한 억제제인 YW412.8을 친화도 성숙을 위해 선택하였다. 도 4를 참조한다.

[0298] 항-BACE1 억제 클론의 친화도 성숙

[0299] YW412.8 항체의 친화도 성숙을 위해 라이브러리를 다음과 같이 구축하였다. 파지미드 pW0703 (모든 CDR-L3 위치에 정지 코돈 (TAA)을 함유하며 M13 박테리오파지의 표면 상에 1가 Fab를 디스플레이하는, 파지미드 pV0350-2b로부터 유래됨 (문헌 [Lee et al., J. Mol. Biol. 340, 1073-1093 (2004)]))을 친화도 성숙을 위한 천연 다

양성 라이브러리로부터의 관심 클론의 중쇄 가변 도메인 (VH)을 이식하기 위한 라이브러리 주형으로 제공하였다. 하드 및 소프트 무작위화 전략 둘 다를 친화도 성숙에 이용하였다. 하드 무작위화의 경우에, 3개 경쇄 CDR의 선택된 위치를 갖는 1개의 경쇄 라이브러리를 천연 인간 항체를 모방하도록 설계된 아미노산을 이용하여 무작위화하였으며, 설계된 DNA 축증성은 문헌 [Lee et al. (J. Mol. Biol. 340, 1073-1093 (2004))]에 기재된 바와 같다. 소프트 무작위화의 경우에, CDR-L3의 위치 91-94 및 96, CDR-H1의 28-31 및 34-35, CDR-H2의 50, 52 및 53-58, CDR-H3의 95-99 및 100A에서의 잔기를 표적화하였고; CDR 루프의 2가지 상이한 조합, L3/H1/H2 및 L3/H3을 무작위화를 위해 선택하였다. 선택된 위치에서 대략 50%의 돌연변이 비율을 도입하는 소프트 무작위화 조건을 달성하기 위해, 돌연변이유발 DNA를 야생형 뉴클레오타이드를 선호하는 염기의 70-10-10-10 혼합물로 합성하였다 (문헌 [Gallop et al., J. Med. Chem. 37:1233-1251 (1994)]).

[0300] 친화도 개선된 Fab의 선택을 다음과 같이 수행하였다. 친화도 개선 파지 라이브러리에 대해 제1 라운드를 위한 플레이트 분류를 수행한 후에 4 또는 5 라운드의 용액 분류를 수행하였다. 플레이트 분류의 제1 라운드에서, 라이브러리를 실온에서 2시간 동안 1% BSA 및 0.05% 트윈 20 중 약 2 OD/ml 파지 유입량으로 뉴트라비딘 코팅된 플레이트 (눈크 맥시소프 플레이트)에 의해 포획된 10 μ g/ml 비오틴화 표적 (BACE1)에 대해 분류하였다. 플레이트 분류의 제1 라운드 후에, 선택의 엄격도를 증가시키기 위해 용액 분류를 수행하였다. 용액 분류에서, 플레이트 분류의 제1 라운드로부터 증식시킨 1 OD/ml 파지를 실온에서 30분 동안 1% 슈퍼블록 (피어스 바이오테크놀로지) 및 0.05% 트윈 20을 함유하는 100 μ l 완충제에서 100 nM 비오틴화 표적 단백질 (농도는 부모 클론 파지 IC₅₀ 값을 기반으로 함)과 인큐베이션하였다. 혼합물을 1% 슈퍼블록으로 추가로 10x 희석하고, 100 μ l/웰을 비오틴화 표적이 파지에 결합하도록 부드럽게 진탕시키면서 실온에서 15분 동안 뉴트라비딘-코팅된 웰 (5 μ g/ml)에 적용하였다. 웰을 PBS 및 0.05% 트윈 20으로 10회 세척하였다. 백그라운드 결합을 결정하기 위해, 비오틴화되지 않은 표적을 갖는 파지를 함유하는 대조군 웰을 뉴트라비딘-코팅된 플레이트 상에 포획하였다. 결합된 파지를 20분 동안 0.1 N HCl로 용리하고, 1/10 부피의 1 M 트리스 pH 11에 의해 중화하고, 적정하고, 다음 라운드를 위해 증식시켰다. 다음에, 용액 분류의 2 초과 라운드를 선택 엄격도를 증가시키면서 함께 수행하였다. 제1 라운드는 100 nM으로부터 5 nM까지 비오틴화 표적 단백질 농도의 감소에 의한 회합물 선택을 위한 것이었다. 제2 라운드는 실온에서 보다 약한 결합체의 경쟁을 제거하기 위해 과량의 비-비오틴화 표적 단백질 (100배 초과)의 첨가에 의한 해리를 선택을 위한 것이었다. 또한, 파지 유입량을 감소시켜 (0.1~0.5 OD/ml) 백그라운드 파지 결합을 낮췄다.

[0301] 콜로니를 제4 라운드 스크린으로부터 골라내고, 96-웰 플레이트 (팔콘(Falcon))에서 50 μ g/ml 카르베니실린 및 1E10/ml K07 파지를 갖는 150 μ l/웰의 2YT 배지에서 밤새 37°C에서 성장시켰다. 동일한 플레이트로부터, XL-1 감염된 부모 파지의 콜로니를 대조군으로 골라내었다. 96-웰 눈크 맥시소프 플레이트를 밤새 4°C에서 또는 2시간 동안 실온에서 PBS 중 100 μ l/웰 뉴트라비딘 (2 μ g/ml)으로 코팅하였다. 플레이트를 30분 동안 65 μ l의 1% BSA로, 또 다른 30분 동안 40 μ l의 1% 트윈 20으로 차단한 후에 비오틴화 표적 단백질 (2 μ g/ml)을 첨가하고, 실온에 15분 동안 인큐베이션하였다.

[0302] 파지 상청액을 10 nM 표적 단백질을 갖거나 갖지 않는 ELISA (효소 결합 면역흡착 검정) 완충제 (0.5% BSA, 0.05% 트윈20을 갖는 PBS) 중에 100 μ l 총 부피로 1:10 희석하고, 단일 스팟 경쟁 검정에 사용하기 위해 F 플레이트 (눈크)에서 1시간 이상 실온에서 인큐베이션하였다. 표적 단백질을 갖거나 갖지 않는 75 μ l의 혼합물을 뉴트라비딘-코팅된 플레이트에 의해 포획된 표적 단백질에 나란히 전달하였다. 플레이트를 15분 동안 부드럽게 진탕시켜 미결합 파지를 뉴트라비딘-포획된 표적 단백질에 포획되도록 하였다. 플레이트를 PBS-0.05% 트윈 20으로 5회 이상 세척하였다. 결합을 ELISA 완충제 (1:5000) 중 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)-접합된 항-M13 항체를 첨가하여 정량화하고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS-0.05% 트윈 20으로 5회 이상 세척하였다. 다음에, 100 μ l/웰의 1:1 비의 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB) 퍼옥시다제 기질 및 퍼옥시다제 용액 B (H₂O₂) (키르케가드-페리 래보라토리즈(Kirkegaard-Perry Laboratories) (메릴랜드주 게이더스버그))를 웰에 첨가하고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 100 μ l 1 M 인산 (H₃PO₄)을 각각의 웰에 첨가하여 반응을 정지시키고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 각 웰에서 황색의 OD (광학 밀도)를 450 nm에서 표준 ELISA 플레이트 판독기를 이용하여 결정하였다. OD 감소 (%)를 하기 식으로 계산하였다:

[0303] OD_{450nm} 감소 (%) = [(경쟁자를 갖는 웰의 OD_{450nm}) / (경쟁자를 갖지 않는 웰의 OD_{450nm})]*100.

[0304] 부모 파지 (100%)의 웰의 OD_{450nm} 감소 (%)와 비교하여, 인간 및 무린 표적 둘 다에 대해 50%보다 낮은 OD_{450nm} 감소 (%)를 갖는 클론을 서열 분석을 위해 골라내었다. 파지 제조를 위해 특징적인 클론을 선택하여 부모 클론과

의 비교에 의해 표적에 대한 결합 친화도 (파지 IC_{50})를 결정하였다. 대부분의 친화도-개선된 클론을 항체 생산 및 비아코어를 이용하는 표면 플라즈몬 공명에 의한 추가의 결합 동역학 분석 및 다른 시험관내 또는 생체내 검정을 위해 인간 IgG1로 재구성하였다.

[0305] 천연 다양성 파지 라이브러리로부터 선택된, YW412.8의 경쇄 및 중쇄 HVR 영역의 서열을 도 1(a) 및 1(b)에 나타낸다. 추가로, YW412.8 항체의 친화도 성숙으로부터 수득한 5개의 항체를 또한 서열분석하고, 경쇄 및 중쇄 HVR 서열을 또한 도 1(a) 및 1(b)에 나타낸다. 이러한 항체에서 가변성을 나타내는 경쇄 HVR 영역의 컨센서스 아미노산 서열은 HVR-L1: Arg Ala Ser Gln X_1 Val X_2 X_3 X_4 X_5 Ala (서열 17) (여기서, X_1 은 아스파르트산 및 발린으로부터 선택되고, X_2 는 세린 및 알라닌으로부터 선택되고, X_3 은 트레오닌 및 아스파라긴으로부터 선택되고, X_4 는 알라닌 및 세린으로부터 선택되고, X_5 는 발린 및 류신으로부터 선택됨); HVR-L2: X_6 Ala Ser Phe Leu Tyr Ser (서열 18) (여기서, X_6 은 세린 및 류신으로부터 선택됨); HVR-L3: Gln Gln X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11} X_{12} Thr (서열 19) (여기서, X_7 은 세린, 페닐알라닌, 글리신, 아스파르트산 및 티로신으로부터 선택되고, X_8 은 티로신, 프롤린, 세린 및 알라닌으로부터 선택되고, X_9 는 트레오닌 및 아스파라긴으로부터 선택되고, X_{10} 은 트레오닌, 티로신, 아스파르트산 및 세린으로부터 선택되고, X_{11} 은 프롤린 및 류신으로부터 선택되고, X_{12} 는 프롤린 및 트레오닌으로부터 선택됨)이었다. 오직 중쇄 추가변 영역 H1이 이러한 항체 사이에서 가변성을 나타내었으며, 그 영역에 대한 컨센서스 서열은 HVR-H1: Gly Phe Thr Phe X_{13} Gly Tyr X_{14} Ile His (서열 26) (여기서, X_{13} 은 세린 및 류신으로부터 선택되고, X_{14} 는 알라닌 및 글리신으로부터 선택됨)이었다.

[0306] B. 항-BACE-1 항체를 확인하기 위한 합성 다양성 라이브러리 분류 및 스크리닝

[0307] 상보성 결정 영역 (CDR)에서 제한된 화학적 다양성을 갖는 최소화 합성 항체 라이브러리를 구축하였으며, 이는 이전에 문헌 [Fellouse, F.A. et al. J. Mol. Biol. 373: 924-940 (2007)]에 기재된 바와 같이 다양한 단백질에 대해 고친화도 항체 결합체를 수득하는데 효과적인 것으로 밝혀졌다. YSGX 라이브러리 명명된 합성 다양성 라이브러리를 이용하여 용액 분류에 의해 BACE1에 대한 억제 항체를 조사하였다. 결합을 위한 패닝을 아래 기재된 바와 같은 5 라운드에서 수행하였다.

[0308] YSGX 라이브러리 명명된 일차 분류를 위한 라이브러리를 Fab-파지 디스플레이를 위한 파지미드 (pF1359)를 이용하여 이전에 기재된 바와 같이 구축하였다 (문헌 [Fellouse, F.A. et al., J. Mol. Biol. 373: 924-940 (2007)]에서의 라이브러리 D). 라이브러리의 다양성은 약 2×10^{10} 이었다.

[0309] 친화도 성숙을 위해, 모든 3개 CDRL을 일차 분류로부터 유래된 선택된 클론에 대해 고정된 CDRH로 무작위화하였다. 무작위화를 위해 3가지 유형의 올리고뉴클레오티드를 사용하였다. 유형 I은 오직 Tyr 및 Ser을 코딩하는 축중성 코돈 TMC를 사용한다. 유형 II는 Tyr, Ser, Gly 및 Trp에 대한 코돈을 등몰비로 함유하는 맞춤형 삼량체 포스포리아미다이트 믹스를 사용한다. 유형 III은 하기 몰비로 10개의 아미노산 잔기를 코딩하는 삼량체 포스포리아미다이트 믹스를 사용한다: Tyr (30%), Ser (15%), Gly (15%), Trp (10%) 및 Phe, Leu, His, Asp, Pro, Ala, 각각 5%. 본래 주형 상의 KpnI 부위가 돌연변이유발시에 침묵하도록 CDR-L3에 사용된 올리고뉴클레오티드에 돌연변이를 도입하였다. 길이 변화는 CDR-L1의 경우에 3 내지 10개 아미노산, CDR-L2의 경우에 7개 아미노산, 및 CDR-L3의 경우에 2-10개 아미노산이었다. 올리고뉴클레오티드의 최종 세트를 만드는데 적절하게 올리고뉴클레오티드를 함께 모으고, 즉 하나의 유형 내에서 다양한 길이를 갖는 모든 L1, L2 및 L3 올리고뉴클레오티드를 혼합한 후에 각각 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3에 대한 올리고뉴클레오티드 세트로서 모든 3가지 유형을 함께 혼합한다. 쿤켈(Kunkel) 돌연변이유발을 이용하여 모든 CDR-LC 위치를 대체하였다. 쿤켈 돌연변이유발 (문헌 [Kunkel, T.A. et al., Methods Enzymol. 154: 367-382 (1987)]) 후에, DNA를 정제하고, 37 °C에서 3시간 동안 KpnI으로 처리하여 주형 DNA를 소화시켰다. 이어서, 정제된 DNA에 대해 라이브러리 구축을 위한 전기전공을 수행하였다.

[0310] 항-BACE1 클론을 디스플레이하는 파지의 선택

[0311] 비오틴화 인간 BACE-1 (서열 49의 1-457)을 라이브러리 분류를 위한 항원으로 사용하였다. 패닝의 제1 라운드에서, 20 µg의 비오틴화 BACE1을 1×10^{13} pfu/ml의 농도의 라이브러리 1 ml와 4 °C에서 1.5시간 동안 인큐베이션하였다. 표적에 결합된 파지를 차단 완충제 (PBS, 0.5%(w/v) 소 혈청 알부민)로 이전에 차단된 200 µl 다이아비즈® 마이윈 스트렙타비딘으로 15분 동안 포획하였다. 결합된 파지를 0.1 M HCl로 용리하고, 바로 1

M 트리스 염기로 중화하였다. 용리된 파지를 이전에 기재된 바와 같이 표준 프로토콜에 따라 증폭시켰다 (문헌 [Sidhu, S.S. et al. Methods Enzymol. 328: 333-363 (2000)]). 제2 라운드는 400 μ l의 증폭된 파지와 인큐베이션된 10 μ g의 비오틴화 BACE1을 사용하여 제1 라운드와 동일하게 수행하였다. 모든 이후의 라운드에서, 2 μ g 비오틴화 BACE1을 400 μ l의 증폭된 파지와 인큐베이션하였다. 비오틴화 BACE1에 결합된 파지를 뉴트라비딘 또는 스트렙타비딘으로 (라운드 사이에 교대로) 이전에 코팅되고 차단 완충제로 차단된 맥시소르프 이뮤노플레이트 (눈크)를 이용하여 15분 동안 포획하였다.

[0312] 5 라운드의 선택 후에, 96-웰 포맷으로 성장시킨 개별 클론으로부터 파지를 생산하고, 배양 상청액을 파지 스팟 ELISA에 사용하기 위해 포스페이트-완충 염수 (PBS), 0.5% (w/v) 소 혈청 알부민 (BSA) (시그마-알드리치 (Sigma-Aldrich), 미주리주 세인트 루이스), 0.1% (v/v) 트윈 20 (시그마-알드리치) (PBT 완충제) 중에 3배 희석하였다. 희석된 파지 상청액을 뉴트라비딘-코팅된 384-웰 맥시소르프 이뮤노플레이트 (눈크) 상에 고정화된 비오틴화 BACE1과 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS, 0.05% (v/v) 트윈 20 (PT 완충제)로 6회 세척하고, 양고추냉이 퍼옥시다제/항-M13 항체 접합체 (PBT 완충제 중 1:5000 희석) (지이 헬스케어(GE Healthcare))와 30분 인큐베이션하였다. 플레이트를 PT 완충제로 6회 및 PBS로 2회 세척하고, 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘/ H_2O_2 퍼옥시다제 기질 (키르케가드-페리 래보러토리즈)로 15분 동안 발색시키고, 1.0 M H_3PO_4 로 켄칭하고, 흡광도를 450 nm에서 분광광도측정법으로 판독하였다.

[0313] **항-BACE1 억제 클론의 선택**

[0314] YSGX 라이브러리의 패닝으로부터 BACE1에 결합한 18개의 특징적인 클론을 확인하였다. 도 3을 참조한다. 이러한 클론에 상응하는 Fab 단백질을 다음과 같이 정제하였다. 정지 코돈을 Fab를 코딩하는 파지미드 상의 중쇄와 유전자 3 사이에 도입하였다. 생성된 파지미드를 이. 콜라이 균주 34B8로 형질전환시켰다. 단일 콜로니를 50 μ g/ml의 카르베니실린이 보충된 30 ml LB 배지에서 밤새 37°C에서 성장시켰다. 밤샘 배양물 (5 ml)을 카르베니실린 (50 μ g/ml)이 보충된 완전한 C.R.A.P. 배지 500 ml에 접종하고, 24시간 동안 30°C에서 성장시켰다. Fab 단백질을 표준 방법에 의해 단백질을 A 아가로스 비드를 이용하여 정제하였다.

[0315] 정제된 Fab를 상기 기재된 바와 같이 HTRF 효소 활성 검정을 이용하여 BACE1에 대한 억제 활성에 대해 스크리닝 하였다. Fab 2, 5, 8, 12, 14 및 19는 BACE1의 억제제로서 확인되었고, Fab 23은 활성화제로서 확인되었다. 도 5를 참조한다.

[0316] Fab 2, 5, 8, 12, 14 및 19는 그의 결합 에피토프를 결정하기 위해 추가로 특성화되었다. 모든 6개의 항체에 대한 정제된 Fab의 패널을 이용하여 하기 기재된 바와 같이 파지 경쟁 ELISA에서 플레이트-포획된 BACE1에 결합된 개별 Fab-디스플레이 파지와 경쟁시켰다.

[0317] 선택된 클론의 단일 콜로니 (XL1 블루 세포내)를 골라내고, 50 μ g/ml 카르베니실린, 10 μ g/ml 테트라시클린 및 M13K07이 보충된 1 ml 2YT 브로쓰에서 2시간 동안 37°C에서 성장시켰다. 카나마이신 (25 μ g/ml)을 배양물에 첨가하고, 6시간 동안 계속 성장시켰다. 배양물을 50 μ g/ml 카르베니실린 및 25 μ g/ml 카나마이신이 보충된 30 ml 2YT 브로쓰로 옮기고, 밤새 37°C에서 성장시켰다. 파지를 이전에 기재된 바와 같이 수확하고 정제하였다 (문헌 [Sidhu, S.S. et al. Methods Enzymol. 328: 333-363 (2000)]). 정제된 Fab-디스플레이 파지를 PBT 완충제에서 연속적으로 희석하고, 플레이트 상에 고정화된 BACE1에 대한 결합에 대해 시험하였다. 포화 신호의 80%를 제공하는 고정된 파지 농도를 이후의 경쟁 ELISA를 위해 선택하였다. 고정된, 준-포화 Fab-디스플레이 파지를 BACE1의 일련의 희석액과 1시간 동안 인큐베이션하여 경쟁을 수행한 후에, BACE1-고정화된 플레이트에 15분 동안 옮겨 미결합 파지를 포획하였다. 이어서, 플레이트를 8회 세척하고, 결합된 파지를 항-M13-HRP에 의해 검출하였다.

[0318] 정제된 Fab 5는 파지-디스플레이된 Fab 8 및 12에 대한 BACE1의 결합과 경쟁하였으나, Fab 2, 14 및 19에 대해서는 그렇지 않았다. 이 데이터와 일치하게, 정제된 Fab 8은 파지-디스플레이된 Fab 5 및 12와 경쟁하였다. 이들 데이터는 함께, Fab 5, 8 및 12가 BACE1 상의 동일한 또는 중첩되는 에피토프에 결합한다는 것을 나타낸다. Fab 14 및 19는 또한 이들 정제된 Fab 중 어느 하나가 Fab 14- 및 19-디스플레이 파지 중 어느 하나와 경쟁한다는 사실을 기반으로 서로 경쟁하였다. 이는 이들 2가지 항체가 동일한 또는 중첩되는 에피토프 (Fab 5, 8 및 12에 대한 것(들)과는 상이함)에 결합한다는 것을 제안한다. 파지 ELISA 검정에서, Fab 2-디스플레이 파지는 Fab 2 그 자체를 포함하는 임의의 정제된 Fab 단백질에 의해 경쟁을 제거할 수 없었으며, 이는 Fab 2와 BACE1 사이의 결합이 비-특이적이었음을 제안한다. 따라서, Fab 2는 친화도 성숙을 위한 후보로서 제외되었다.

[0319] **항-BACE1 억제 클론의 친화도 성숙**

[0320] 초기 패닝 과정에 의해 수득한 부모 억제 항체의 결합 친화도를 개선하기 위해, Fab 5, 8, 12, 14 및 19의 모든 3개의 CDR-LC를 무작위화한 새로운 파지 라이브러리를 설계하였다. 이러한 5개의 항체는 그의 상이한 에피토프를 기반으로 2개의 하위군으로 분류하였다 - 군 1로서 Fab 5, 8 및 12 및 군 2로서 Fab 14 및 19. 개별 클론을 위한 단일 가닥 DNA (ssDNA)를 라이브러리 구축을 위한 주형으로서 정제하였다. 군 1의 ssDNA 주형을 친화도 성숙 라이브러리 1 (LC-lib1로서 설계됨)을 위해 함께 모으고, 군 2를 라이브러리 2 (LC-lib2)을 위해 모았다. 화학적 다양성은 분자 인식에 대한 천연 아미노산의 기능적 용량을 기반으로 무작위화 CDR 내에서 한정되었다. 문헌 [Birtalan, S. et al. Mol Biosyst. 6:1186-1194 (2010)]을 참조한다. 최소화 다양성 (Tyr 및 Ser 이원 코돈), 반-최소화 다양성 (Tyr, Ser, Gly 및 Trp 삼원 코돈) 및 관련된 10개의 아미노산을 갖는 추가의 다양성을 고친화도를 달성하기 위해 혼합하였다. 2개의 친화도 성숙 라이브러리, LC-lib1 및 LC-lib2를 상기 기재된 바와 같이 모든 3개의 CDR-LC를 동시에 무작위화하기 위해 올리고뉴클레오타이드 풀의 동일한 세트를 이용하여 구축하였다. 친화도 성숙을 위해, 모든 3개의 CDR-LC (상보성 결정 영역 - 경쇄)는 일차 분류로부터 유래된 선택된 클론에 대해 고정된 CDR-HC (상보성 결정 영역 - 중쇄)로 무작위화하였다.

[0321] 초기에 수득한 항체의 친화도 성숙에 대한 라이브러리의 스크리닝을 상기 기재된 바와 유사하게 수행하였다. 라이브러리를 3 라운드를 위한 용액에서 비오틴화 BACE1로 분류하여 결합에서 100배 초과를 풍부화를 유발하였다. 라운드 1에서, 2 μ g의 비오틴-BACE1을 파지-디스플레이된 Fab 라이브러리와 인큐베이션하였다. 라운드 2 및 3에서, 20 nM 및 5 nM 비오틴화 BACE1을 각각 증폭된 파지와 인큐베이션하였다. 각각의 2개의 라이브러리로부터의 클론 (96)을 1-지점 경쟁 ELISA에서 스크리닝하였으며, 20 nM의 BACE1을 용액 중에서 사용하여 하기 기재된 바와 같은 플레이트-고정화된 BACE1에 대한 결합으로부터 파지 입자를 경쟁시켰다.

[0322] BACE1로 고정화된 플레이트를 이전에 2 μ g/ml의 뉴트라비딘으로 4°C에서 밤새 코팅하고, 차단 완충제로 차단한 384-웰 맥시소프트 이뮤노플레이트를 사용하여 15분 동안 2 μ g/ml 비오틴화 BACE1을 포획함으로써 제조하였다. 96-웰 포맷으로 성장시킨 개별 클론으로부터의 배양 상청액을 PBT 완충제에서 20배 희석하고, 20 nM BACE1의 존재 또는 부재 하에 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 혼합물을 고정화된 BACE1이 있는 플레이트로 옮기고, 15분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PT 완충제에 의해 6회 세척하고, 결합된 파지를 상기 기재된 바와 같이 항-M13-HRP에 의해 검출하였다. 용액 중 BACE1의 부재 또는 존재 하의 웰로부터의 ELISA 신호 사이의 비는 클론의 친화도를 나타내며, 여기서 보다 높은 비는 보다 높은 친화도를 나타낸다.

[0323] LC-lib1로부터의 5개의 클론은 BACE1의 존재 하의 웰로부터의 ELISA 신호에 대한 BACE1의 부재 하의 웰로부터의 ELISA 신호 사이에 >4의 비를 가졌으며, LC-lib2로부터의 1개의 클론은 비 > 3을 가졌다. LC4 및 11로 명명된 2개의 클론은 Fab5로부터; 3개의 클론, LC6, LC9 및 LC10은 Fab 12로부터, LC40은 Fab14로부터 유래되었다 (도 6).

[0324] 이들 6개 클론의 친화도를 추정하기 위해, 파지 경쟁 ELISA를 상기 기재된 바와 같이 수행하였고, IC₅₀ 값을 결정하였다 (도 7). IC₅₀ 값은 칼레이다그래프(Kaleidagraph) (시너지 소프트웨어(Synergy Software))를 이용하여 마퀴트(Marquardt) (문헌 [Marquardt, D. W. SIAM J. Appl. Math. 11: 431-441 (1963)])에 의해 개발된 4-파라미터 로지스틱 방정식에 데이터를 피팅하여 결정하고, 하기 표 2에 나타낸다.

표 2

FabID	IC50 nM	친화도 개선 배수
Fab5*	20.7 $\pm$ 9.5	1
LC4	0.46 $\pm$ 0.07	45
LC11	0.88 $\pm$ 0.14	24
Fab12*	45.3 $\pm$ 31	1
LC9	0.12 $\pm$ 0.02	378
LC10	0.12 $\pm$ 0.01	378
LC6	0.12 $\pm$ 0.02	156
Fab14*	14.3 $\pm$ 2.5	1
LC40	4.7 $\pm$ 0.7	3

*부모

[0325]

[0326] 모든 LC 클론은 실제로 그의 각각의 부모와 비교하여 개선된 친화도를 나타내었다. 주목할만하게, CDR-L2로의

2개의 Trp 잔기의 도입은 Fab 12 유도체의 친화도를 부모보다 100배 넘게 개선하였다.

[0327] 6개 클론의 Fab 단백질을 상기 기재된 바와 같이 정제하고, HTRF 효소 활성 검정을 수행하였다. OM99-2 (칼바 이오켄®, 카탈로그 #496000) (BACE1의 펩티드 억제제)를 대조군으로 사용하였다. 부모로서 Fab 5를 갖는 항체의 경우에, Fab LC 4는 유의한 개선된 억제를 나타내는 반면, LC11은 억제 활성을 상실하였다. LC 40 (Fab14로부터의 유도체)이 또한 그의 억제 활성을 상실하였다. Fab 12의 친화도 개선된 유도체, Fab LC 6, LC 9 및 LC10은 일반적으로 그의 억제 활성에서 대략 20배 개선을 나타내었다 (도 8). 이러한 검정을 기반으로, Fab LC 6이 가장 우수한 억제제였으며, 효소 활성의 거의 100% 억제를 나타낸 반면, 다른 Fab는 대략 60-70%의 억제 정도를 갖는 부분적 억제제였다 (도 8). 시험된 다양한 Fab에 대한 IC₅₀ 값을 하기 표 3에 나타낸다. IC₅₀ OM99-2는 이 검정에서 11nM이었다.

표 3

Fab ID	IC ₅₀ (nM)
Fab5*	130
LC4	480
LC11	n.d.
Fab12*	n.d.
LC9	140
LC10	180
LC6	160
Fab14*	740
LC40	n.d.
*부모	

[0328]

[0329] Fab12의 경쇄 및 중쇄 HVR 영역의 서열을 도 2(a) 및 2(b)에 나타낸다. Fab 12의 친화도 성숙에 의해 생산된 3개의 항체의 경쇄 및 중쇄 HVR 서열을 또한 도 2(a) 및 2(b)에 나타낸다. 오직 경쇄 HVR-L2가 이들 항체에서 가변성을 나타내었다: HVR-L2: X₁₅ Ala Ser X₁₆ Leu Tyr Ser (서열 41) (여기서, X₁₅는 세린, 트립토판 및 티로신으로부터 선택되고, X₁₆은 세린 및 트립토판으로부터 선택됨). 각각의 3개 중쇄 HVR 영역은 4개의 항체에서 동일하였다.

[0330] Fab를 다음과 같이 다른 적용에 사용하기 위한 IgG 항체로서 클로닝하였다. 선택된 Fab의 경쇄 및 중쇄의 가변 도메인을 293T 세포 또는 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포에서 일시적인 IgG 발현을 위해 인간 경쇄 또는 중쇄 (인간 IgG1) 불변 도메인을 갖는 pRK5-기반 플라스미드로 클로닝하였다. IgG 단백질을 표준 방법에 의해 단백질 A 아가로스 비드를 사용하여 정제하였다.

[0331] 실시예 2: 항-BACE1 항체의 추가의 특성화

[0332] 상기 기재된 바와 같이 항체를 BACE1 상에서의 기능 및 에피토프 결합과 관련하여 확인하였다. 부모 및 친화도 성숙 항체를 하기 기재된 검정을 이용하여 추가로 특성화하였다.

[0333] A. 결합 동역학

[0334] YW412.8.31의 결합 동역학을 평가하였다. 간략하게, 항-BACE1 IgG의 결합 친화도를 비아코어™-3000 기기를 이용하여 표면 플라즈몬 공명 (SPR)에 의해 측정하였다. YW412.8.31 항-BACE1 인간 IgG를 CM5 바이오센서 칩 상에 코팅된 마우스 항-인간 Fc 항체 (지이 헬스케어, cat# BR-1008-39)에 의해 포획하여 대략 100 반응 단위 (RU)를 달성하였다. 동역학 측정을 위해, 인간 BACE1 ECD 또는 뮤린 BACE1 ECD (아미노산 1-457)의 2배 연속 희석액 (0.98 nM 내지 125 nM)을 PBT 완충제 (0.05% 트윈 20을 갖는 PBS) 중에 25℃에서 30 μl/분의 유량으로 주사하였다. 회합률 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})을 간단한 일-대-일 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델 (비아코어™ 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 이용하여 계산하였다. 평형 해리 상수 (K_D)를 비 k_{off}/k_{on}로서 계산하였다. pH 7.0에서 YW412.8.31 결합의 결과를 표 4에 나타낸다.

표 4

비아코어™에 의해 측정된 항-BACE1 항체에 대한 결합 동역학 값

항체	BACE1의 유형	$K_{ON} (M^{-1}S^{-1})$	$K_{OFF} (S^{-1})$	$K_D (M)$
YW412.8.31	인간	1.1×10^5	3.1×10^{-4}	2.9×10^{-9}
		1.05×10^5	1.39×10^{-4}	1.32×10^{-9}
YW412.8.31	마우스	1.4×10^5	2.9×10^{-4}	2.1×10^{-9}
		1.01×10^5	1.41×10^{-4}	1.4×10^{-9}
YW412.8.31	기니 피그	1.0×10^5	2.7×10^{-4}	2.6×10^{-9}

[0335]

[0336]

BACE1에 대한 YW412.8.31의 결합을 pH 7.0 및 5.0 둘 다에서 확인하였다. 이는 BACE1이 아마도 세포내이입 소포 및/또는 트랜스-골지망에서 산성 pH에서 최적으로 활성이기 때문에 중요하다.

[0337]

B. 시험관내 억제 검증

[0338]

추가로, 항체가 특정 BACE 기질 상에서 BACE1 단백질분해 활성을 조절하는 능력을 2가지 활성을 검정을 이용하여 시험관내에서 평가하였다: BACE1의 인간 재조합 세포의 도메인을 사용하는 HTRF 검증 및 마이크로유체 모세관 전기영동 (MCE) 검증.

[0339]

친화도 성숙 YW412.8.31 항-BACE1 항체를 실시예 1에 기재된 바와 같이 HTRF 검증에서 시험하였다. BACE1의 활성 펩티드 억제제, OM99-2 (칼바이오캡®, 카탈로그 # 496000), BACE1의 소분자 억제제 (β -세크레타제 억제제 IV, 칼바이오캡®, 카탈로그 #5657688) 및 BACE1에 결합하지 않는 IgG 항체를 대조군으로 사용하였다. 도 9 (패널 a) (긴 펩티드)를 참조한다. 추가로, 짧은 FRET 펩티드 (Rh-EVNLDAEFK-퀀처 (서열 54), 인비트로젠)를 사용하는 반응을 또한 HTRF 반응과 동일하게 수행하였다. 대조 반응으로부터 생성된 형광 생성물을 545 nm의 여기 파장 및 585 nm의 방출 파장에서 상기 기재된 바와 같이 측정하였다. 수득한 데이터를 그래프패드 프리즘 5(GraphPad Prism 5)™ (캘리포니아주 라졸라)를 이용하여 분석하였다. 도 9 (패널 a) (짧은 펩티드)를 참조한다.

[0340]

MCE 검증 반응을 384-웰 마이크로플레이트에서 웰당 20 μ L의 최종 부피로 수행하였다. 12 nM 인간 BACE1 세포외 도메인, 1 mM 아밀로이드 전구체 단백질 베타 세크레타제 활성 부위 펩티드 (FAM-KTEEISEVNLDAEFRWKK-CONH₂ (서열 55)), 50 mM NaOAc pH 4.4 및 0.1% CHAPS를 함유하는 표준 효소 반응은 10 μ L 2X 기질을 5 μ L의 4x 효소 및 5 mL의 4x 화합물에 첨가하여 개시하였다. 동일한 반응 조건을 인간 BACE2 효소의 세포외 도메인 (5 nM) 및 카텡신 D의 세포외 도메인 (6 nM, 칼바이오캡®)에 이용하였다. 주변 온도에서 60분 동안 인큐베이션한 후에, 각각의 반응에서 생성물 및 기질을 LC3000® 상에서 분석되는 12-시퍼 마이크로유체 칩 (둘 다, 캘리포니아 라이프 사이언시스)을 이용하여 분리하였다. 생성물 및 기질의 분리는 제조업체의 최적화 소프트웨어를 이용하여 전압 및 압력을 선택함으로써 최적화하였다. 분리 완충제는 100 mM HEPES pH 7.2, 0.015% Brij-35, 0.1% 코팅 시약 #3, 10 mM EDTA 및 5% DMSO를 함유하였다. 분리 조건은 -500V의 하류 전압, -2250V의 상류 전압 및 -1.2 psi의 스크리닝 압력을 이용하였다. 생성물 및 기질 형광을 488 nm의 파장에서 여기시키고, 530 nm의 파장에서 검출하였다. 기질 전환은 HTS 웰 분석기 소프트웨어 (캘리포니아 라이프 사이언시스)를 이용하여 전기영동도로부터 계산하였다.

[0341]

YW412.8.31 항체를 사용한 HTRF 및 MCE 검증으로부터의 결과를 도 9에 나타낸다. 긴 펩티드 검증에서 이 항체의 관찰된 IC₅₀은 1.7 nM이고, 최대 억제는 77%에 도달하였다. 추가로, YW412.8.31 항체는 짧은 펩티드 검증에서 17 nM의 IC₅₀을 가졌다. 또한, YW412.8.31 항-BACE1 항체는 마이크로유체 모세관 전기영동 검증에서 BACE1 활성을 80 pM의 IC₅₀으로 억제하였고, 인간 BACE2 또는 카텡신 D (리소솜 아르파르틸 프로테아제)를 억제하지 않았다. YW412.8.31 항체의 SPR 분석은 또한 항체가 BACE2 (BACE1에 가장 고도로 관련된 프로테아제)에 결합하지 않는다는 것을 확인하였다. 이들 데이터는 함께 YW412.8.31 항체가 강력하고 선택적인 BACE1 길항제라는 것을 나타낸다. 이 항체의 추가의 특성화를 그의 기능을 보다 잘 이해하기 위해 수행하였다.

[0342]

C. 세포-기반 억제 검증

- [0343] APP 처리시에 항-BACE1 항체의 관찰된 시험관내 억제 작용이 또한 세포 내용물에 존재하는지의 여부를 결정하기 위해, 생체내 연구를 수행하였다. 야생형 인간 아밀로이드 전구체 단백질을 안정하게 발현하는 293-HEK 세포에서 항체가 $A\beta_{1-40}$ 생산을 억제하는 능력을 다음과 같이 평가하였다. 293-APP^{WT} 세포를 밤새 3×10^4 개 세포/웰의 밀도로 96-웰 플레이트에 시딩하였다. 항-BACE1 항체 또는 대조군 IgG1 항체를 함유하는 새로운 배지 (DMEM + 10% FBS) 50 μ l를 세포와 24시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 트리스클릭 소분자 BACE1 억제제 (BACE1 SMI)를 또한 대조군으로 사용하였다 ((화합물 8e - 문헌 [Charrier, N. et al. J. Med. Chem. 51:3313-3317 (2008)]). 세포 배지를 수확하고, $A\beta_{1-40}$ HTRF® 검정 (시스바이오(CisBio))을 제조업체의 지시에 따라 사용하여 $A\beta_{1-40}$ 의 존재에 대해 검정하였다. $A\beta_{1-40}$ 값을 셀타이터-글로(CellTiter-Glo) 발광 세포 생존율 검정 (프로메가)을 이용하여 결정된 바와 같이 세포 생존율에 대해 정규화하였다. 실험을 3회 이상 수행하였고, 각각의 실험에서 각각의 지점을 2벌식으로 반복하였다. 데이터를 4-파라미터 비-선형 회귀 곡선-핏팅 프로그램 (칼레이다그래프, 시너지 소프트웨어)을 이용하여 플롯팅하였다.
- [0344] 유사한 실험을 또한 마우스로부터 단리된 후근 신경절, 피질 뉴런 및 해마 뉴런에서 수행하였다. 간략하게, 해리된 뉴런 배양물을 E13.5 후근 신경절 (DRG), E16.5 피질 뉴런 및 E16.5 해마 뉴런으로부터 제조하였다. 뉴런을 시험관내에서 5일 동안 성장시켰다. YW412.8.31 항-BACE 항체 또는 대조군 IgG1을 함유하는 새로운 배지를 뉴런과 24시간 동안 인큐베이션하였다. 배지를 수확하고, MSD® 설치류/인간 (4G8) $A\beta_{40}$ 초고감도 키트를 제조업체의 지시에 따라 이용하여 $A\beta_{40}$ 의 존재에 대해 검정하였다. $A\beta_{40}$ 값을 셀타이터-글로 발광 세포 생존율 검정 (프로메가)을 이용하여 결정된 바와 같이 세포 생존율에 대해 정규화하였다. 실험을 3회 이상 수행하였고, 각각의 지점을 2벌식으로 반복하였다. 데이터를 4-파라미터 비-선형 회귀 곡선-핏팅 프로그램 (칼레이다그래프, 시너지 소프트웨어)을 이용하여 플롯팅하였다.
- [0345] 시험된 모든 항-BACE1 항체 (LC6, LC9, YW412.8, YW412.8.30, YW412.8.31 및 YW412.8.51)는 비-BACE1 IgG 항체 억제제 (졸레어®)와 비교하여 APP-발현 293 세포에서 $A\beta_{1-40}$ 생산을 억제하였다. 도 10을 참조한다.
- [0346] 도 11에 나타난 바와 같이, YW412.8.31 항-BACE1 항체는 APP-발현 293 세포에서 $A\beta_{1-40}$ 생산을 BACE1 SMI 대조군과 유사한 정도로 억제하였다 (17 nM의 IC₅₀ 및 약 90%의 최대 감소). 유사한 결과를 DRG 뉴런에서 수득하였다 (YW412.8.31의 최고 농도에서 $A\beta_{40}$ 생산의 약 50% 감소, 및 8.4 nM의 IC₅₀). YW412.8.31 항-BACE1 항체는 또한 피질 및 해마 뉴런에서 $A\beta_{40}$ 생산을 2.3-2.6 nM의 IC₅₀으로 억제하였다. 이러한 발견은 항-BACE1 항체가 시험관내에서 이전에 관찰된 바와 같이 세포 상에서 유사하게 기능한다는 것을 나타낸다. 또한, YW412.8.31 항체는 CNS의 뉴런에서 가장 우수한 효능을 나타내는 것으로 보인다.
- [0347] **D. 항-BACE1 항체의 세포내 국재화**
- [0348] BACE1은 세포내에서, 특히 골지에서 발현되는 것으로 알려져 있다. YW412.8.31이 세포내 환경에서 BACE1과 상호작용하는지 아닌지의 여부를 확인하기 위해, 내재화 연구를 수행하였다. 한 세트의 뉴런 배양물을 E13.5 후근 신경절 (DRG) 체외이식편으로부터 제조하고, 제2 세트의 뉴런 배양물을 BACE1 +/+ 또는 BACE1 -/- 마우스로부터의 E16.5 해리된 피질 뉴런으로부터 제조하고, 37°C에서 각각 24 또는 72시간 동안 배양하였다. 0.5 μ M YW412.8.31 항-BACE1 항체를 함유하는 배지를 30분 내지 2시간의 기간 동안 배양물에 첨가하고, 4°C 또는 37°C에서 인큐베이션하였다. 미결합 항체를 처리 후에 PBS로 완전히 세척하였다. 배양물을 4% 파라포름알데히드로 실온에서 20분 동안 고정시키고, 선택된 샘플을 또한 0.1% 트리톤 X-100으로 투과시켰다. 결합된 과자를 이차 알렉사 568-접합된 항-인간 IgG1 항체 (몰레큘라 프로브스(Molecular Probes))를 제조업체의 지시에 따라 이용하여 검출하였다.
- [0349] 항체 신호의 대부분은 고온 샘플에서 내재화되는 것으로 밝혀졌다. 도 12(b)에서 볼 수 있는 바와 같이, BACE1은 37°C에서 세포를 이차 항체로의 YW412.8.31 항-BACE1 항체의 검출을 허용하도록 투과시켰을 때 DRG 축삭의 세포내에서 검출될 수 있다. 반대로, DRG를 내재화 방지를 위해 4°C에서 저온 인큐베이션하거나 또는 세포를 YW412.8.31의 세포내 검출을 허용하기 위해 투과시키지 않았을 때, 매우 적은 BACE1이 세포 표면에서 검출되었다. 항체의 뉴런으로의 내재화는 이것이 오직 BACE1 +/+ 동물로부터의 피질 뉴런에서만 검출가능하고, BACE1 -/- 동물로부터의 뉴런에서는 검출가능하지 않으므로 BACE1 결합에 의존하였다 (도 12(c)의 중심 및 우측 패널 비교).
- [0350] 추가로, 마우스 피질 뉴런을 YW412.8.31 항-BACE1 항체 또는 대조군 IgG의 존재 하에 10분 또는 3시간 동안 배

양하고, 그 후에 항체를 면역염색에 의해 검출하였다. 뉴런 배양물을 E15.5 해리된 피질 뉴런으로부터 제조하고, 14 DIV 동안 배양하였다. 1 μ M YW412.8.31을 함유하는 배지를 10분 내지 3시간 동안 배양물에 첨가하고, 37°C에서 인큐베이션하였다. 미결합 항체를 처리 후에 HBSS로 완전히 세척하였다. 배양물을 2% 파라포름알데히드로 10분 동안 RT에서 고정시킨 후에, 0.1% 트리톤 X-100으로 투과시키거나 그렇지 않았다. 결합된 파지를 알렉사 568-접합된 항-인간 IgG1 이차 항체 (몰레큘라 프로브스)를 사용하여 검출하였다. YW412.8.31 국제화를 비-투과된 세포에서 분석하여 세포 표면 상에 얼마나 많이 결합하였는지 조사하였을 뿐만 아니라 투과된 세포에서 분석하여 얼마나 많은 항체가 내재화되었는지 조사하였다. 검출된 항체 신호의 대부분이 세포내에 국제화되었고, 세포 표면 상에서는 항체 염색이 거의 관찰되지 않았다 (도 12(a)). 내재화는 YW412.8.31 처리후 단지 10분만에 분명해졌으며, 이는 항체가 초기 엔도솜에 의해 활발하게 흡수된다는 것을 제안한다. 많은 YW412.8.31 신호가 반점을 나타내었으며, 이는 이것이 소포 내에 함유되었을 가능성을 나타낸다.

[0351] YW412.8.31이 국제화되는 하위세포 구역을 보다 잘 확인하기 위해, 본 발명자들은 상이한 소포 구역: 초기 엔도솜 (트랜스페린 수용체, TfR), 트랜스-골지망 (TGN) (VAMP4) 및 리소솜 (LAMP1)의 마커와 공동-염색하였다. 세포를 항-TfR (노부스(Novus), Cat#NB100-64979), 항-VAMP4 (노부스, Cat#NB300-533) 또는 항-LAMP1 (BD 파밍겐 (BD Pharmingen), Cat#553792)로 공동-염색하였다. YW412.8.31 면역반응성은 초기 엔도솜 및 TGN에 대한 마커와 공동-국제화되었으나, 리소솜은 그렇지 않았다 (도 12(a)). 이러한 패턴은 BACE1이 활성인 구역으로의 항체 국제화와 일치한다.

[0352] 실시예 3: 항-BACE1 항체 결합 부위 특성화

[0353] 인간 BACE1에 대한 특정 항-BACE1 항체의 결합 부위를 확인하기 위해 추가의 연구를 수행하였다. 한 세트의 실험에서, BACE1 (hBACE1)에 대한 항체의 결합을 공지된 활성 부위 또는 엑소사이트 BACE1 결합 펩티드의 존재 또는 부재 하에 평가하여 어느 항체가 경쟁적 결합을 입증하는지 결정하였다. 제2 세트의 실험에서, 항-BACE1 Fab를 인간 BACE1 세포의 도메인과 공동-결정화시켜 3차원 결합 부위를 결정하였다.

[0354] A. 경쟁적 결합

[0355] 본 발명의 항-BACE1 항체의 BACE1에 대한 결합 부위를 결정하는 간접적인 방법으로서, 경쟁적 ELISA를 수행하였다. 간략하게, 항체 YW412.8 IgG (1 μ g/ml)를 눈크 96 웰 맥시소르프 이뮤노플레이트 상에 밤새 4°C에서 코팅하고, 실온에서 1시간 동안 차단 완충제 PBST (PBS 및 1%BSA 및 0.05% 트윈 20)로 차단하였다. 항-BACE1 항체 YW412.8 또는 hBACE1 결합 펩티드의 일련의 희석액을 미리 결정된 양의 비오티닐화 hBACE1과 인큐베이션하고, 실온에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 일련의 희석액을 YW412.8-코팅된 플레이트에 첨가하고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이후에, 플레이트를 세척 완충제 (0.05% T-20을 갖는 PBS)로 세척하고, 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)로 표지된 스트렙타비딘을 30분 동안 실온에서 첨가하여 발색시켰다. 이어서, 플레이트를 세척하고, 테트라메틸벤지딘 (TMB) 기질로 발색시켰다. 포획된 비오티닐화 hBACE1에 대한 HRP-접합된 스트렙타비딘 결합을 표준 기술을 이용하여 630 nm의 파장에서 측정하였다.

[0356] 상기 경쟁 ELISA 검정에 사용되는 비오티닐화 표적 단백질의 최적의 농도를 결정하기 위해, 상기 기재된 바와 같이 눈크 96 웰 맥시소르프 이뮤노플레이트를 코팅하고, 차단하였다. 비오티닐화 표적의 일련의 희석액을 항체-코팅된 플레이트와 30분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 이어서, 플레이트를 PBST로 세척한 후에, 양고추냉이 퍼옥시다제 접합된 스트렙타비딘과 30분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 결합 신호의 검출은 상기 기재된 바와 같았다. 데이터를 4-파라미터 비-선형 회귀 곡선-핏팅 프로그램 (칼레이다그래프, 시너지 소프트웨어)을 이용하여 플롯팅하였다. 비오티닐화 hBACE1의 준-포화 농도를 곡선 핏팅으로부터 결정하고, 상기로부터의 경쟁 ELISA에 적용하였다.

[0357] 예상한 바와 같이, YW412.8는 hBACE1에 대한 결합에 대해 그 자신과 경쟁하였다 (도 13). YW412.8과 활성 부위 억제제 펩티드 OM99-2 (칼바이오켄®, 카탈로그 #496000) 사이에서는 경쟁이 관찰되지 않았다. 경쟁은 LC6 및 YW412.8 항-BACE1 항체 및 공지된 엑소사이트 결합 펩티드, BMS1 (문헌 [Kornacker et al., Biochemistry 44:11567-11572 (2005)]로부터의 펩티드 1) 사이에서 관찰되었다. 조합하여, 이들 결과는 YW412.8이 APP 절단을 위한 BACE1 활성 부위와 상이한 BACE1 엑소사이트에서 결합한다는 것을 제안한다. 도 13에서 곡선의 형태는 YW412.8, LC6 및 BMS1이 BACE1 상에 중첩되는 결합 부위를 가질 수 있다는 것을 제안한다.

[0358] B. 결정 구조

[0359] YW412.8 항체의 BACE1과의 상호작용을 보다 잘 이해하기 위해, YW412.8.31 Fab를 인간 재조합 BACE1 세포의 도메인의 세포외 도메인과 공동-결정화시켰다.

[0360] **단백질 발현 및 정제**

[0361] BACE1 (서열 49의 아미노산 57-453)의 단백질 발현 및 정제. C-말단 His6 태그를 갖는 DNA (서열 210)를 블루 헤론(Blue Heron)에 의해 합성하고, pET29a(+) 벡터 (노바젠(Novagen))에 클로닝하고, BL21(DE3) 세포 (인비트로젠)로 형질전환시켰다. 발현은 1mM 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노시드 (IPTG) 유도를 이용하여 4시간 동안 37℃에서 수행하였다. 세포를 마이크로플루이다이저로 용해시키고, 봉입체 (BACE1 함유)를 분리하고, TE (10 mM 트리스 pH8.0 및 1 mM 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA)) 완충제로 2회 세척하였다. 단백질을 가용화를 2시간 동안 실온에서 7.5 M 우레아, 100 mM AMPSO pH 10.8 및 100mM β-메르캅토에탄올 (BME)을 사용하여 수행한 후에 12,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하였다. 이어서, 상청액을 7.5 M 우레아, 100 mM AMPSO pH 10.8로 희석하여 약 1.5-2.0의 OD₂₈₀을 달성하였다. 단백질 재폴딩은 우선 가용화된 BACE1을 차가운 물에 1:20 희석한 후에 샘플을 4℃에서 3주 동안 부드럽게 교반하여 재폴딩이 일어나도록 허용함으로써 수행하였다. 재폴딩된 BACE1의 정제는 3개의 칼럼 크로마토그래피 단계를 포함하였다. 첫째, BACE1을 20 mM 트리스 pH 8.0 및 0.4 M 우레아로 미리-평형화시킨 50 ml Q 세파로스 패스트 플로우(Fast Flow) (지이 헬스케어) 칼럼에 로딩하고, 0-0.5 M NaCl의 염 구배로 용리하였다. 최대 분획을 모으고, 20 mM 트리스 pH 8.0 완충제로 5배 희석하고, SourceTM15Q 칼럼 (지이 헬스케어)에 로딩하였다. 0-0.3 M NaCl의 구배를 이용하여 BACE1을 용리하였다. BACE1 단백질을 함유하는 분획을 모으고, 농축하고, 추가로 25 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl 중 슈퍼덱스 (Superdex)TM S75 칼럼 (지이 헬스케어) 상에서 정제하였다.

[0362] YW412.8.31 Fab를 이. 콜라이에서 발현시키고, 세포 페이스트를 PBS, 25 mM EDTA 및 1 mM PMSF에 녹였다. 혼합물을 균질화하고, 마이크로플루이다이저를 통해 2회 통과시키고, 12,000 rpm에서 60분 동안 원심분리하였다. 이어서, 상청액을 단백질 G 칼럼에 5 ml/분으로 로딩하였다. 칼럼을 기준선까지 PBS로 세척하고, 단백질을 0.58% 아세트산으로 용리하였다. YW412.8.31 Fab를 함유하는 분획을 모으고, 20 mM MES, pH 5.5로 평형화시킨 SP-세파로스 칼럼에 로딩하고, Fab를 0 내지 0.25 M NaCl의 염 구배로 용리하였다. Fab를 추가로 25 mM Hepes pH 7.5 및 150 mM NaCl 중 슈퍼덱스TM S75 칼럼 상에서 정제하였다.

[0363] **결정화**

[0364] 정제된 BACE1 단백질 (서열 49의 아미노산 57 내지 453)을 정제된 YW412.8.31 Fab와 1:1.5 몰비 (과량의 Fab)로 혼합하였다. 복합체를 얼음 상에서 1시간 동안 인큐베이션하고, S200 26/60 겔 여과 칼럼 (지이 헬스케어) 상에서 정제하여 이를 잉여량의 Fab로부터 분리하였다. 이어서, 복합체를 15 mg/ml로 농축하였다. 결정화는 20% PEG 4000, 0.1M 트리스 pH 8.5 및 0.2M 아세트산나트륨을 함유하는 1μl의 웰 용액과 혼합된 1μl의 BACE1/Fab 복합체 용액을 사용하여 점적 증기 확산 방법에 의해 수행하였다. 이어서, 결정화 점적물을 19℃에서 인큐베이션하였다. 결정은 4일 후에 나타났으며, 2일 동안 더 계속 성장하였다. 이어서, 결정을 수확하고, 모액 및 20% 글리세롤을 함유하는 동결-보호 용액에서 급속 냉동시켰다.

[0365] **데이터 수집 및 구조 결정**

[0366] 회절 데이터를 스탠포드 싱크로트론 방사선 시설(Stanford Synchrotron Radiation Facility; SSRL) 빔 라인 7-1에서 단색 X선 빔 (12658.4eV)을 이용하여 수집하였다. X선 검출 장치는 결정으로부터 430 mm 떨어져 위치한 ADSC 양자-315 CCD 검출기였다. 회전 방법을 프레임당 0.5° 진동 및 180°의 전체 웨지 크기에서 완전한 데이터 세트의 수집을 위해 단결정에 적용하였다. 이어서, 데이터에 색인을 달고, 통합하고, 프로그램 HKL2000® (HLK 리서치, 인크.(HLK Research, Inc.))을 이용하여 스케일링하였다.

[0367] 구조는 프로그램 페이저(Phaser)로 분자 대체 (MR) 방법을 이용하여 해석하였다 (문헌 [Read, R.J., Acta Cryst. D57:1373-1382 (2000)]). 매튜스(Matthews) 계수 계산 결과는 각각의 비대칭 단위가 하나의 BACE1/Fab 복합체 및 48% 용매로 구성되었다는 것을 나타내었다. 따라서 MR 계산은 Fab의 N- 및 C-도메인, 및 BACE1 세포 외 도메인을 포함하는 3개 서브유닛의 한 세트를 검색하도록 지시하였다. N- 및 C-말단 Fab 도메인을 개별적으로 검색하여 가요성 엘보우 각도를 허용하였다. Fab 서브유닛의 검색 모델은 HGFA/Fab 복합체 (PDB 코드: 2ROL, 문헌 [Wu, Y. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:19784-19789 (2007)])의 결정 구조로부터 유래되었다. BACE1의 검색 모델은 공개된 BACE1 구조 PDB 코드: 1FKN (문헌 [Hong, L. et al. Science 290:150-153 (2000)])으로부터의 것이다. 유의한 입체형태 변화는 BACE1/Fab 인터페이스에서 일어난다. 수동적 재건은 프로그램 COOT (결정학적 대상체-배향 툴킷(Crystallographic Object-Orientation Toolkit))로 수행하였다 (문헌 [Emsley & Cowtan, Acta. Cryst. D60:2126-2132 (2004)]). 구조 정밀화는 0.221의 최종 R 인자 및 0.274의

R_{free} 를 달성하기 위해 최대 가능도 표적 기능을 이용하여 프로그램 REFMAC5 (문헌 [Murshudov, G.N., et al., Acta Cryst. D53:240-255 (1997)]) 및 PHENIX (통합된 엑스탈로그래피에 대한 파이썬-기반 계층적 환경 (Python-based Hierarchical Environment for Integrated Xtallography)) (문헌 [Adams, P.D. et al. Acta. Cryst. D66:213-221 (2010)])로 반복 수행하였다. 구조 정밀화 통계치는 표 5에 나타난다.

표 5

결정학 데이터 통계

데이터 수집	
공간군	P2 ₁
단위 셀	a=46.1Å, b=75.5Å, c=112.0Å, a=90° b=99.8° c=90°
해상도	30 – 2.8Å
반사의 총 수	64939
완전성	97.9% (84.4%) ²
중복성	3.5 (2.5)
I/σ	10.8(2.0)
R _{sym} ¹	0.112 (0.366)
정밀화	
해상도 범위	30-2.8Å
R _{cryst} ³ / R _{free} ⁴	0.221/0.274
자유 R 테스트 세트 크기	관찰된 반사의 5%
비-수소 원자	6324
물 분자	94
평균 B, 전체	37.3
단백질	37.6
물	29.7
r.m.s.d 결합 길이	0.003Å
r.m.s.d. 각도	0.705°

¹R_{sym} = $\sum |I_{hi} - I_h| / \sum I_{hi}$, 여기서 I_{hi} 는 반사 h 의 i 번째 대칭-관련 관찰의 스케일링된 강도이고, I_h 는 평균 값이다.

²괄호 안의 값은 (1.97 – 1.90Å)인 최고 해상도 셀의 것이다.

³R_{cryst} = $\sum |F_{oh} - F_{ch}| / \sum F_{oh}$, 여기서 F_{oh} 및 F_{ch} 는 반사 h 에 대해 관찰된 및 계산된 구조 인자 진폭이다.

⁴R_{free}의 값은 정밀화에 포함되지 않은 5% 무작위 선택된 반사에 대해 계산된다.

[0368]

[0369]

결정을 회절시키고, 구조를 2.8Å 해상도에서 정밀화하였다. 복합체에서 BACE1의 전체 구조는 잔기 중 96% (373/385)의 Cα 원자 위치에서 0.63Å RMSD로 정렬될 수 있는 그의 유리 형태와 매우 유사하다 (문헌 [Hong et al., Science 290:150-153 (2000)]). YW412.8.31 Fab는 BACE1 분자 표면 상에서 약 840Å²의 표면적을 덮고, 활성 부위의 근처에서 결합하지 않는다. 에피토프는 3차원 공간에서 가까이 위치한, 문헌 [Hong et al. (Science 290:150-153 (2000))]에서 루프 C (전장 BACE1의 아미노산 315-318), D (전장 BACE1의 아미노산 331-335) 및 F (전장 BACE1의 아미노산 370-381)로서 언급된 구조적 요소를 포함한다. 추가로, YW412.8.31 결합 부위에 있는 또는 그 근처에 있는 BACE1의 부분은 입체형태 변화를 취하였고, 강한 결합과 일치하는 0.71의 형태 상보성 스코어를 나타내었다. 항체 유도된 입체형태 변화가 세크레타제 활성의 알로스테릭 억제에 기여하는 것으로 생각된다.

[0370]

Fab는 BACE1 결합 펩티드의 패널에 대한 결합 부위로서 이전에 확인된 엑소사이트와 부분적으로 중첩되는, 아밀로이드 전구체 단백질에 대한 BACE1의 활성 부위 말단의 엑소사이트에 결합하였다 (문헌 [Kornacker et al., Biochemistry 44:11567-11572 (2005)]) (도 14). 중쇄 및 경쇄가 둘 다 상호작용에 관여한다 (도 15). BACE1 에피토프 영역이 고온 인자에 의해 나타낸 바와 같이 보다 동적인 유리 형태와 달리, 항체-결합된 구조는 세크레타제의 P6 및 P7 부위를 변형시킨 특징적인 입체형태에서 안정화된다 (문헌 [Turner et al., Biochemistry 44:105-112 (2005)]). 기질-결합된 복합체에서 α-나선 구조를 채택한, 이들 부위에 인접한 아미노산 218-231 (서열 49의 AGFPLNQSEVLASV (서열 126) (문헌 [Lin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:1456-1460 (2000)]에서 잔기 157-170 (아미노산 넘버링은 BACE1의 성숙한 프로테아제 도메인에서 시작함))은 항체 복합체

에서 랜덤 루프가 되었으며, 이는 아마도 APP가 촉매 적격 방식으로 BACE1 촉매 클레프트에 도달하는 것을 방해함으로써 APP 단백질분해 절단에 부정적인 영향을 미친다. 구조적 에피토프는 결정 구조에서 YW412.8.31 Fab의 임의의 부분으로부터 4 옹스트롬 거리 내에 위치한 하나 이상의 원자를 함유하는 BACE1의 아미노산 잔기를 포함한다. 하기 표 6에서 Fab 경쇄 잔기는 쇠 L에 속하고, Fab 중쇄 잔기는 쇠 H에 속한다. BACE1 아미노산에 대한 잔기 넘버링은 BACE1의 전장 서열 (서열 49)을 기반으로 한다. Fab 아미노산에 대한 잔기 넘버링은 카바트 넘버링 방식을 기반으로 한다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991]).

표 6

YW412.8.31-BACE1 결합 인터페이스에 위치한 잔기

BACE1 잔기	Fab 잔기
314 SER	H 26 GLY
316 GLU	H 27 PHE
317 LYS	H 28 THR
318 PHE	H 30 LEU
319 PRO	H 31 GLY
327 GLN	H 32 TYR
328 LEU	H 53 ALA
329 VAL	H 58 ASP
330 CYS	H 94 ARG
331 TRP	H 96 PRO
332 GLN	H 97 PHE
333 ALA	H 98 SER
335 THR	H 99 PRO
337 PRO	H 100 TRP
340 ILE	
375 THR	L 49 TYR
378 ASP	L 53 PHE
380 CYS	L 55 TYR
426 PHE	L 56 SER
	L 94 TYR

[0371]

[0372]

상세한 원자 상호작용은 극성 상호작용의 반 데르 발스(van der Waals) 접촉 형태이다. 극성 상호작용은 수소 결합 및 염 가교를 포함한다. 하기 표 7은 BACE1과 YW412.8.31 Fab 사이의 쌍별 극성 상호작용의 목록을 포함한다. Fab 경쇄 잔기는 쇠 L에 속하고, Fab 중쇄 잔기는 쇠 H에 속한다. BACE1 아미노산에 대한 잔기 넘버링은 BACE1의 전장 서열 (서열 49)을 기반으로 한다. Fab 아미노산에 대한 잔기 넘버링은 카바트 넘버링 스킴을 기반으로 한다.

표 7

BACE1과 YW412.8.31 Fab 사이의 쌍별 극성 상호작용

BACE1 잔기---Fab 잔기
314 SER---H 98 SER
317 LYS---H 58 ASP
327 GLN---H 53 ALA
330 CYS---H 31 GLY
331 TRP---H 98 SER
331 TRP---H 32 TYR
332 GLN---H 32 TYR
378 ASP---H 32 TYR
316 GLU---L 94 TYR
332 GLN---L 55 TYR
335 THR---L 49 TYR

[0373]

[0374]

하기 나타낸 바와 같이, YW412.8.31 항체 BACE1 에피토프에서 아미노산 조성은 BACE2 및 카텡신 D에서의 상응하는 영역 사이에서 잘 보존되지 않았다. YW412.8.31 항체에 대한 에피토프에서 이러한 아미노산 차이는 항체가 BACE1에 대해 매우 선택적이라는 관찰과 일치한다. 넘버링은 BACE1의 전장 서열 (서열 49)을 기반으로 한다. BACE2 및 카텡신 D의 서열을 이들의 각각의 결정 구조를 기반으로 BACE1에 정렬시켰다. YW412.8.31 BACE1 에피토프 내의 잔기는 박스 표시하였다.

```

      312      322      332      372
BACE1 *** ASPTKEKFDG FWLGEQLVCW QAKHFWNI *** DVATGDLCT *** 서열 123 & 130
BACE2 *** ASLIFEESDG FNTGSQIACW TNEETPWSY *** NGAGLNTCT *** 서열 124 & 131
CatD *** ~~~~VPLTQG EYW~~~IPCE KVET~~~~~L *** SQAG~KTLCL *** 서열 125 & 132
  
```

[0375]

[0376]

실시예 4: 생체내 특성화 - 마우스

[0377]

생체내에서 YW412.8.31의 효과를 평가하였다. BACE1-특이적 억제제가 달성할 수 있는 최대 $A\beta_{1-40}$ 감소를 확립하기 위해, BACE1+/+ 대조군과 비교하여 BACE1-/- 마우스의 혈장 및 뇌에서의 $A\beta_{1-40}$ 생산에 대한 BACE1의 기여를 조사하였다. BACE1-/- 마우스에서 혈장 $A\beta_{1-40}$ 신호는 45%만큼 감소하였고, 뇌 $A\beta_{1-40}$ 신호는 80%만큼 감소하였다 (도 16, 패널 a). 이러한 결과는 BACE1이 실제로 뇌에서 주요 β -세크레타제이지만, 주변부에서는 BACE1이 오직 부분적 $A\beta_{1-40}$ 생산을 설명하며 나머지는 또 다른 β -세크레타제로부터 기인한다는 것을 나타낸다.

[0378]

$A\beta$ 생산에 대한 BACE1의 기여의 이해로, 항-BACE1 항체 YW412.8.31이 hAPP 트랜스제닉 및 야생형 마우스에서 아밀로이드생성 프로세스를 조절하는 능력을 평가하였다.

[0379]

hAPP 트랜스제닉 마우스

[0380]

간략하게, 5-개월령 인간 APP-발현 마우스를 총 3회 용량에 대해 4일마다 (즉, 제1일, 제5일 및 제9일) 복강 내 주사에 의해 30 mg/kg 또는 100 mg/kg YW412.8.31 항체 또는 비히클로 처리하였다. 동물을 최종 투여 2시간 후에 안락사시켰다. 혈청, 혈장 및 뇌를 수확하고 처리하였다. 혈장, 피질 및 해마를 아밀로이드 베타 ($A\beta$) ELISA 시험 키트를 제조업체의 지침 (더 제네틱스 캄파니(The Genetics Company))에 따라 이용하여 가용성 $A\beta_{1-40}$ 및 $A\beta_{1-42}$ 의 수준에 대해 분석하였다. 약동학 분석을 혈청 및 뇌 균질물 상에서 수행하였다.

[0381]

결과는 혈장 $A\beta_{1-40}$ 및 $A\beta_{1-42}$ 수준이 30 mg/kg 및 100 mg/kg YW412.8.31 항체 투여 수준 둘 다에서 대조군 수준의 대략 30%까지 감소하였다는 것을 보여주었다 (도 17(a), 상부 패널 및 도 18, 패널 a). 그러나, 하기 논의된 야생형 마우스에서 관찰된 것과 대조적으로, 뇌에서의 $A\beta_{1-40}$ 및 $A\beta_{1-42}$ 의 수준이 YW412.8.31 항체의 100 mg/kg 용량 수준에서 오직 15-22%만큼 감소하였다 (도 17(a), 하부 패널 및 도 18, 패널 a). 처리된 동물의 뇌에서 YW412.8.31 항체의 농도는 용량-의존성 방식으로 증가하였고, 이 때 30 mg/kg-처리된 동물의 뇌에서의 항체의 관찰된 농도는 4.8 ± 3.6 nM이고, 100 mg/kg-처리된 동물의 뇌에서의 항체의 관찰된 농도는 14.0 ± 9.3

nM이었으며, 이는 항체의 보다 높은 복강내-투여된 용량이 실제로 뇌에서 관찰된 항체의 보다 높은 용량으로 해석된다는 것을 확인한다. 개별 약동학 대 약역학 관독의 플롯팅은 이 모델에서 이 항체에 대해 PK/PD 관련성이 존재한다는 것을 제안하였다 (도 17(b)).

[0382] 또한 YW412.8.31 항-BACE1 항체를 연속적 ICV 주입에 의해 hAPP 트랜스제닉 마우스 뇌로 전신 또는 직접 전달하는 유사한 실험을 수행하였다. ICV 전달의 경우에, 항체를 편측 이식된 알젯(Alzet) 삼투 미니펌프 (모델 2001)를 통해 7일 동안 연속적으로 전달하였다. 전달된 YW412.8.31 항체의 양은 0.041 mg/일 (저용량) 또는 0.41 mg/일 (고용량)이었으며; 0.33 mg/일 대조군 IgG를 대조군에 전달하였다. 안락사시에, 혈장, 피질 및 해마를 수확하고, 제조업체의 지시에 따라 ELISA (더 제네틱스 캄파니)에 의해 가용성 A β ₁₋₄₀ 및 A β ₁₋₄₂의 수준에 대해 분석하였다.

[0383] 하기 표 8은 전신 전달에 의해 30 mg/kg 또는 100 mg/kg으로 투여된 마우스 또는 ICV 전달에 의해 0.041 mg/일 및 0.41 mg/일로 투여된 마우스의 뇌에서 YW412.8.31 항체의 농도를 보여준다.

표 8

	용량	뇌에서의 항체 농도 (μ G/G)	뇌에서의 항체 농도 (NM)
전신 전달	30 mg/kg	0.7	4.8
	100 mg/kg	2.1	14
ICV 전달	저 (0.041 mg/일)	13-25	87-167
	고 (0.41 mg/일)	110-305	733-2003

[0384]

[0385] 그러나, 주입 후에 뇌에서의 항체의 높은 수준에도 불구하고, A β 감소는 15-23%로 중간 정도였고, 전신 전달에서 관찰된 감소와 유사하였다 (도 18, 패널 b). 이러한 관찰은 고용량 전신 주사가 hAPP 트랜스제닉 마우스에서 A β 수준을 감소시킬 수 있으나, 감소는 중간 정도라고 제안한다. hAPP 트랜스제닉 마우스에서 감소된 효능은 뇌에서의 높은 농도 (전신 전달 후의 혈정에서의 농도와 등가임)가 A β 생산을 추가로 감소시키지 않았기 때문에 동물 모델의 결과일 것으로 여겨진다. 또한, hAPP 트랜스제닉 마우스의 뇌에서의 감소는 야생형 마우스에서 관찰되고 하기 기재된 것과 비교하여 중간 정도이다. 따라서, 트랜스제닉 hAPP 마우스는 생체내에서 항-BACE1 효과를 연구하는데 이상적이지 않을 수 있다. 또한 알츠하이머 환자 집단의 압도적 대다수가 야생형 APP 대립유전자를 보유하므로 야생형 마우스가 질환 관점에서 항체 효능을 위해 보다 적절한 모델이다.

[0386] 야생형 마우스

[0387] 항-BACE1 항체 YW412.8.31이 아밀로이드생성 프로세스를 조절하는 능력을 또한 야생형 마우스에서 평가하였다. 간략하게, 실험을 상기 기재된 바와 같이 수행하였다. 대조군 IgG 항체 또는 YW412.8.31 항-BACE1 항체 (50 mg/kg)의 단일 용량을 정맥내 (IV) 주사에 의해 야생형 마우스에 전신 전달하였다. 24 또는 48시간 후에, 혈장 및 뇌 샘플을 수확하고, A β ₁₋₄₀ 수준을 분석하였다. 혈장 및 뇌에서 총 마우스 A β ₁₋₄₀의 농도를 총 항-BACE1 항체 농도를 측정하기 위한 하기 기재된 유사한 절차에 따라 샌드위치 ELISA를 이용하여 결정하였다. 간략하게, A β ₁₋₄₀의 C 말단에 특이적인 토끼 폴리클로날 항체 (밀리포어(Millipore), 매사추세츠주 베드포드)를 플레이트 상에 코팅하고, 비오틴닐화 항-마우스 A β 모노클로날 항체 M3.2 (코반스, 매사추세츠주 데드햄)를 검출에 사용하였다. 검정은 혈장에서 1.96 pg/ml 및 뇌에서 39.1 pg/g의 정량화 값의 하한치를 가졌다. 도 16, 패널 b에 나타난 바와 같이, 혈장 A β ₁₋₄₀은 35%만큼 감소하였고, 피질 A β ₁₋₄₀은 20%만큼 감소하였다.

[0388] 100 mg/kg의 YW412.8.31, 또는 대조군 IgG를 전신 투여하는, 야생형 C57Bl/6J 마우스를 사용한 추가의 실험을 수행하였다. 단일 복강내 (IP) 주사 4시간 후에 처리된 동물의 혈장 및 전뇌 둘 다에서 A β ₁₋₄₀의 수준을 결정하였다. 심장 천공에 의해 동물로부터 혈액을 수집하여 혈장을 분리하였다. PBS 관류 후에, 뇌를 수확하고, 하나의 반뇌로부터의 전뇌를 PK 완충제 (PBS 중 1% NP-40, 로슈(Roche) 완전 프로테아제 억제제 포함)에서 제조한 반면, 다른 반뇌로부터의 전뇌를 5M GuHCL, 50mM 트리스 pH 8.0에서 균질화하고, A β ₁₋₄₀ 분석을 위해 카세인 차단 완충제 (PBS 중 0.25% 카세인/0.05% 나트륨 아지드, 20 μ g/ml 아프로티닌/5mM EDTA, pH 8.0/10 μ g/ml 류

펩틴)에서 추가로 회석하였다.

- [0389] 도 22, 패널 a에 나타난 바와 같이, 100 mg/kg 용량은 혈장 $A\beta_{1-40}$ 을 대조군 수준의 약 50%까지 및 이전에 기재된 BACE1 녹아웃 수준과 유사하게 감소시킬 수 있었다. 그러나, 투여 4시간 후에 전뇌 $A\beta_{1-40}$ 에서는 변화가 검출되지 않았다. 이러한 이른 시점은 YW412.8.31을 투여한 후에 뇌에서의 효과를 관찰하기에는 너무 일렀다. 뇌에서 감소된 $A\beta$ 를 관찰하기 위해서는 투여 후에 보다 긴 시간이 필요할 수 있는데, 이는 특히 $A\beta$ 의 감소가 상기 기재된 야생형 마우스에서 24시간에 보다 낮은 용량 (50 mg/kg)에서 관찰되기 때문이다. 혈청에서 YW412.8.31 농도는 투여후 4시간까지 매우 높았다 ($1040 \pm 140 \mu\text{g/mL}$ ($6.9 \pm 0.9 \mu\text{M}$)). 뇌에서 YW412.8.31 농도는 $0.7 \pm 0.4 \mu\text{g/g}$ ($4.7 \pm 2.7 \text{ nM}$)으로 훨씬 낮았으며, 이는 혈청에서의 농도의 약 0.07%를 나타내고, CNS로의 항체의 예측된 0.1% 정상 상태 침투에 거의 근접하다 (문헌 [Reiber and Felgenhauer, Clin. Chim. Acta. 163:319-328 (1987)]). 중요하게, 뇌에서 달성된 항체 농도, $4.7 \pm 2.7 \text{ nM}$ 은 이전에 관찰된 세포 IC_{50} 에 가깝다 (도 11). 따라서, 항-BACE1 항체는 BACE1 녹아웃 마우스에서 관찰된 수준까지 떨어진 혈장 $A\beta_{1-40}$ 의 감소에 의해 입증된 바와 같이 생체내에서 매우 효과적이다. 그러나, 단일 전신 투여는 마우스로의 투여후 4시간까지 뇌 감소를 일으키지 않았으며, 이는 대부분 시점이 어떠한 효과를 관찰하기에는 너무 이르기 때문일 수 있다.
- [0390] 반복된 투여를 통해 상승된 뇌 항체 수준의 효과를 결정하기 위해 추가의 실험을 수행하였다. YW412.8.31 항체, 또는 대조군 IgG를 총 3회 용량에 대해 4일마다 30 또는 100 mg/kg으로 IP 투여하였다. 이 연구에서, 마지막 투여 4시간 후에 처리된 동물의 혈장 및 전뇌 둘 다에서 $A\beta_{1-40}$ 의 수준을 측정하였다. 다시, 30 및 100 mg/kg 둘 다에서의 다중-투여에 따라 혈장 $A\beta_{1-40}$ 수준의 약 50% 감소가 관찰되었다 (도 22, 패널 b). 두드리지게, 항-BACE1의 고용량에서 전뇌 $A\beta_{1-40}$ 의 42% 감소가 관찰되었으나, 저용량에서는 감소가 관찰되지 않았다. 혈청에서 YW412.8.31 항체 농도는 480 ± 210 및 $1500 \pm 440 \mu\text{g/mL}$ 이었고, 뇌에서의 농도는 각각 4일마다 주어진 30 및 100 mg/kg에서의 투여 후에 $0.9 \pm 0.6 \mu\text{g/g}$ ($5.9 \pm 4.3 \text{ nM}$) 및 $3.0 \pm 1.6 \mu\text{g/g}$ ($20 \pm 10 \text{ nM}$)이었다. 따라서, 예측된 바와 같이, 뇌에서 보다 높은 항체 수준은 $A\beta$ 수준의 꾸준한 감소로 이어진다. 주목할만하게, 100 mg/kg 용량과 비교하여 30 mg/kg 용량에서 말초 $A\beta$ 수준의 차이가 없었으며, 이는 30 mg/kg에서 최대 말초 역제가 달성되고, 이에 따라 단순히 감소하는 말초 $A\beta$ 수준은 뇌 수준을 감소시키기에 충분하지 않다는 것을 제안한다.
- [0391] 추가로, PK 데이터를 야생형 및 BACE1 녹아웃 마우스에서 YW412.8.31 항-BACE1 항체로의 투여 후에 획득하였다. 도 19를 참조한다. 항-BACE1의 단일 용량 (1 또는 10 mg/kg)을 IV 주사를 통해 BALB/C 마우스에 전달하였다. 혈청 PK를 투여후 21일까지 분석하였다.
- [0392] 마우스 혈청 및 뇌 샘플에서 총 항-BACE1 항체 농도를 다음과 같이 측정하였다. 마우스 혈청 및 뇌 샘플에서 항체 농도를 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA)을 이용하여 측정하였다. 눈크 384 웰 맥시소르프 플레이트 (뉴저지주 뉴튼)를 당나귀 항-인간 IgG, Fc 단편 특이적 폴리클로날 항체의 $F(ab')_2$ 단편 (잭슨 이뮤노리서치 (Jackson ImmunoResearch), 펜실베이니아주 웨스트 그로브)으로 밤새 4°C 에서 코팅하였다. 플레이트를 0.5% 소 혈청 알부민 (BSA)을 함유하는 포스페이트-완충 염수 (PBS)로 다음날 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 각각의 항체 (대조군 IgG 및 항-BACE1)를 표준으로 사용하여 각각의 항체 농도를 정량화하였다. 플레이트를 0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS로 마이크로플레이트 세척기 (바이오-텍 인스트루먼트즈, 인크.(Bio-Tek Instruments, Inc.), 버몬트주 위누스키)를 이용하여 세척한 후에, 0.5% BSA, 0.35 M NaCl, 0.25% CHAPS, 5 mM EDTA, 0.05% 트윈 20 및 15 ppm 프로클린을 함유하는 PBS에 희석한 표준물 및 샘플을 부드럽게 교반하면서 실온에서 2시간 동안 플레이트 상에서 인큐베이션하였다. 결합된 항체를 양고추냉이 퍼옥시다제-접합된 $F(ab')_2$ 염소 항-인간 IgG, Fc 특이적 폴리클로날 항체 (잭슨 이뮤노리서치)로 검출하였다. 최종적으로, 플레이트를 기질 3,3',5,5'-테트라메틸 베지딘 (TMB) (KPL, 인크.(KPL, Inc.), 메릴랜드주 게이더스버그)을 이용하여 발색시켰다. 흡광도를 멀티스칸 어센트(Multiskan Ascent) 판독기 (썬도 사이언티픽, 뉴햄프셔주 허드슨) 상에서 630 nm에서 참조하면서 450 nm의 파장에서 측정하였다. 농도를 4-파라미터 비-선형 회귀 프로그램을 이용하여 표준 곡선으로부터 결정하였다. 검정은 혈청에서 3.12 ng/ml 및 뇌에서 15.6 ng/g의 정량화 값의 하한치 (LLOQ)를 가졌다.
- [0393] 마우스에서 유리 YW412.8.31 항체 농도를 검출을 위해 코트로서 BACE1 ECD 및 항-인간 IgG, Fc 특이적 항체 (잭슨 이뮤노리서치)를 사용하여 상기 기재된 유사한 절차에 따라 검출하였다. 유리 항-BACE1 마우스 ELISA는 혈청에서 0.626 ng/ml 및 뇌에서 3.13 ng/g의 LLOQ 값을 가졌다.

- [0394] 2가지 개별 PK 검정을 이용하였다: 혈청에서 모든 YW412.8.31 (총 mAb)을 검출하기 위한 검정, 및 혈청에서 오직 미결합 YW412.8.31 (유리 mAb)을 검출하기 위한 검정. 관찰된 PK 동역학은 비-선형이었으며, YW412.8.31 농도가 < 10 µg/mL인 샘플에 대한 총 대 유리 mAb 값의 차이는 표적-매개 제거를 제안한다. 도 19, 패널 a를 참조한다. 또한, 총 mAb와 미결합 mAb 사이의 차이는 혈청에서 YW412.8.31 중 일부가 가용성 BACE1에 결합할 수 있다는 것을 나타낸다. BACE1+/+, BACE1+/- 및 BACE1-/- 마우스에서 단일 용량 PK 분석은 초기 연구에서 관찰된 비-선형성을 확인하고, 증진된 제거가 실제로 표적-매개된 것임을 나타낸다. BACE1-/- 마우스는 선형 PK를 보여준다. 도 19 (패널 b)를 참조한다.
- [0395] **실시예 5: 생체내 특성화 - 원숭이**
- [0396] 시노몰구스 원숭이에게 IV 전달에 의해 대조군 IgG 또는 YW412.8.31 항-BACE1 항체 (30 mg/kg)를 투여하였다. 혈장 및 CSF를 투여 7일 전까지 샘플링하여 개별 동물에서 각각 평균 기준선 $A\beta_{1-40}$ 수준을 설정한 후에 투여 후 다양한 시점에서 설정하였다. 원숭이 혈청 및 CSF 샘플에서 전체 항-BACE1 또는 대조군 항체 농도를 코트 및 검출 둘 다로서 원숭이-흡착된 염소 항-인간 IgG 폴리클로날 항체 (베틸, 텍사스주 몽고메리)를 사용하여 측정하였다 (도 20). 원숭이에서 유리 항-BACE1 항체 농도를 코트로서 BACE1 ECD를 사용하고 검출을 위해 원숭이-흡착된 염소 항-인간 IgG 항체 (베틸)를 사용하여 결정하였다. 총 및 유리 항-BACE1 원숭이 검정은 둘 다 혈청 또는 CSF에서 6.25 ng/mL의 LLOQ 값을 가졌다. PK는 원숭이에서 투여된 IgG에 대해 예상된 바와 같으며, 예측된 노출을 보여준다.
- [0397] 시험된 시노몰구스 원숭이로부터의 혈장 및 CSF에서 $A\beta_{1-40}$ 수준을 또한 결정하였다. 간략하게, 혈장에서 총 시노 $A\beta_{1-40}$ 의 농도를 MSD MA6000 인간 (6E10) A베타 키트 (Cat#K111BVE-2, 메조 스케일 디아그노스틱스(Meso Scale Diagnostics))를 제조업체의 지시에 따라 이용하여 결정하였다. $A\beta_{1-40}$ 의 C 말단에 특이적인 포획 항체를 플레이트 상에 미리 코팅하고, 술포-태그 항-A β 모노클로날 항체 6E10을 검출에 사용하였다. 검정은 혈장에서 49.4 pg/mL의 정량화 값의 하한치를 가졌다. CSF에서 총 시노 $A\beta_{1-40}$ 의 농도를 샌드위치 ELISA를 이용하여 결정하였다. $A\beta_{1-40}$ 의 C 말단에 특이적인 토끼 폴리클로날 항체 (cat#AB5737, 밀리포어, 매사추세츠주 베드포드)를 플레이트 상에 코팅하고, 비오틴화 항-A β 모노클로날 항체 6E10 (Cat#SIG-39340, 코반스, 매사추세츠주 데드햄)을 검출에 사용하였다. 검정은 CSF에서 15.6 pg/mL의 정량화 값의 하한치를 가졌다.
- [0398] 도 21 (패널 a)에 나타난 바와 같이, 혈장 $A\beta_{1-40}$ 수준이 모든 개체에 걸쳐 기준선의 약 50% 감소하였다. $A\beta$ 의 50% 최대 혈장 감소가 7일 관찰 기간 전반에 걸쳐 유지되었다. YW412.8.31 항-BACE1 항체에 대한 혈청 농도-시간 프로파일은 대조군 IgG 항체에 대해 관찰된 것과 유사한 것으로 나타났으며, 이는 동역학이 선형 범위에서 투여된 전형적인 IgG와 유사하다는 것을 제안한다 (도 20, 패널 a). 약 800 µg/mL의 최대 혈청 항체 농도가 투여 15분 후에 제1 샘플 수집 시간에 관찰되었으며, 투여 후 7일까지 232 µg/mL로 떨어졌다. 주목할만하게, 투여 후에 특정된 모든 시점에서, YW412.8.31의 혈청 농도는 세포 IC_{50} 을 초과하였다 (약 2.5nM, 도 11 참조).
- [0399] 도 21 (패널 b)에 나타난 바와 같은 CSF $A\beta_{1-40}$ 수준은 가변적이더라도 투여 1 및 3일 후에 50%까지의 감소를 나타낸 후에 투여 7일 후에 다시 기준선 $A\beta$ 로 돌아가려는 경향을 나타내었다. 기준선 혈장 및 CSF 수준에서의 가변성을 도 21 (패널 c 및 d)에 나타낸다. 기준선 혈장 수준은 동물들 사이에서 매우 균일한 반면, CSF $A\beta_{1-40}$ 수준은 매우 가변적이었다. 따라서, 모든 $A\beta_{1-40}$ 측정을 각각의 개별 원숭이에 대해 기준선에 대해 정규화하였다.
- [0400] 이들 데이터는 원숭이에서 YW412.8.31의 단일 용량이 혈장 및 CSF $A\beta$ 수준을 유의하게 감소시킨다는 것을 보여준다. CSF에서, 0.2-0.3 µg/mL의 YW412.8.31 농도가 이 기간에 걸쳐 관찰되었으며, 이는 약 2nM로 해석된다 (도 20, 패널 b). 이 데이터로부터, YW412.8.31의 뇌 농도가 유사한 범위에 있는 것으로 추정된다. PK 및 PD 데이터를 비교하여, 이들 결과는 혈장에서 약물 노출이 7일 윈도우 상에서 $A\beta$ 생산을 최대로 억제하는데 충분한 반면 CSF에서의 약물 농도가 세포 IC_{50} 에 가깝고, 시험된 용량 수준 (30 mg/kg)에서 일시적으로 뇌에서의 $A\beta$ 수준을 감소시킨다는 것을 보여준다. 요약하여, 이들 데이터는 전신 투여된 항-BACE1이 비-인간 영장류에서 CSF $A\beta$ 측정에 의해 결정된 바와 같이 뇌에서 BACE1 활성을 감소시킬 수 있다는 강력한 증거를 제공한다.
- [0401] **실시예 6: YW412.8.31 항체의 친화도 성숙**

- [0402] YW412.8.31 항체를 이전에 기재된 결정 구조에 의해 제공된 구조 데이터에 의해 안내된 바와 같이 친화도 성숙시켰다. BACE1과 접촉한 항체 잔기를 YW412.8.31 항체의 친화도를 증진시키기 위해 돌려변이시켰다. 이러한 전략에 의해 생산된 친화도 성숙 클론을 YW412.8.31xS로 명명하였다. YW412.8.31 친화도 성숙 클론을 또한 이전에 기재된 바와 같이 모든 CDR의 소프트 무작위화 표적화를 통해 생산하고, YW412.8.31x로 명명하였다. BACE1에 결합한 클론에 대한 중쇄 가변 서열 및 경쇄 가변 서열을 도 23 (a) - (c) 및 24 (a) - (c)에 도시한다.
- [0403] BACE1에 결합한 클론을 실시예 2C에서 이전에 기재된 바와 같은 세포-기반 HTRF 검정에서 BACE1 프로테아제 억제에 대해 시험하였다. 검정의 결과를 도 25a 및 25b에 도시한다. 도 25b는 지시된 농도에서 다양한 친화도 성숙 항-BACE1 항체로 24시간 동안 처리된 일차 피질 뉴런으로부터 $A\beta_{1-40}$ 생산 (pg/ml)의 결과를 보여준다. 시험된 항체 중 몇몇은 YW412.8.31에서 관찰된 것과 유사한 수준에서 BACE1을 억제하였다.
- [0404] 상기 본 발명이 이해를 명확하게 하고자 하는 목적으로 예시 및 실시예로서 어느 정도 상세하게 기재되었지만, 상기 설명 및 실시예가 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본원에 인용된 모든 특허 및 과학 문헌의 개시내용은 그의 전문이 명백하게 참조로 포함된다.

도면

도면 1a

카바트# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

카바트-CDR L1
코티아-CDR L1

제출 - CDR L1

YW412.5	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	N	V	Q	D	V	S	T	A	V	A	N	V	Q	
YW412.8.31	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	D	V	S	T	A	V	A	N	V	Q	D	V	S	T	A	V	A	N	V	Q
YW412.8.30	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	D	V	S	T	A	V	A	N	V	Q	D	V	S	T	A	V	A	N	V	Q
YW412.8.2	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	D	V	S	T	A	V	A	N	V	Q	D	V	S	T	A	V	A	N	V	Q
YW412.8.29	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	D	V	S	T	A	V	A	N	V	Q	D	V	S	T	A	V	A	N	V	Q
YW412.8.31	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	D	V	S	T	A	V	A	N	V	Q	D	V	S	T	A	V	A	N	V	Q

카바트 - CDR L2

코티아-CDR L2

점측 - CDR L2

카바트#	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108												
YW4128.31	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	E	S	G	S	G	T	F	T	L	E	T	S	S	L	Q	P
YW4128.30	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	E	S	G	S	G	T	F	T	L	E	T	S	S	L	Q	P
YW4128.2	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	E	S	G	S	G	T	F	T	L	E	T	S	S	L	Q	P
YW4128.9	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	E	S	G	S	G	T	F	T	L	E	T	S	S	L	Q	P
YW4128.51	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	E	S	G	S	G	T	F	T	L	E	T	S	S	L	Q	P

카타트 - CDR13

코티아 - CDR L3

REF - CDR13

YM4128.81	E D F A T Y Y C	Q Q S Y T P P P	T F F G Q G	T K V E	I K R R	서원2
YM4128.31	E D F A T Y Y C	Q Q Q F P T Y L P P	T F F G Q G	T K V E	I K R R	서원3
YM4128.30	E D F A T Y Y C	Q Q Q G Y M T P P P	T F F G Q G	T K V E	I K R R	서원3
YM4128.2	E D F A T Y Y C	Q Q S S T D P P P P	T F F G Q G	T K V E	I K R R	서원4
YM4128.29	E D F A T Y Y C	Q Q D A T S P P P P	T F F G Q G	T K V E	I K R R	서원5
YM4128.51	E D F A T Y Y C	Q Q Q Y A T D P P P	T F F G Q G	T K V E	I K R R	서원6

카바트# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

카바트-CDR L1
코티아-CDR L1

접속-CDR L1

Fab12 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S V S S A V A W Y Q
LC6 IgG D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S V S S A V A W Y Q
LC9 IgG D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S V S S A V A W Y Q
LC10 IgG D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S V S S A V A W Y Q

카바트# 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

카바트-CDR L2
코티아-CDR L2

접속-CDR L2

Fab12 Q K P G K A P K L L I Y S A S S L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
LC6 IgG Q K P G K A P K L L I S W A S W L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
LC9 IgG Q K P G K A P K L L I W Y A S W L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
LC10 IgG Q K P G K A P K L L I W A S S L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P

카바트# 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

카바트-CDR L3
코티아-CDR L3

접속-CDR L3

Fab12 E D F A T Y Y C Q Q Y S Y S P F T F G Q G T K V E I K R (서열 31)
LC6 IgG E D F A T Y Y C Q Q Y S Y S P F T F G Q G T K V E I K R (서열 32)
LC9 IgG E D F A T Y Y C Q Q Y S Y S P F T F G Q G T K V E I K R (서열 33)
LC10 IgG E D F A T Y Y C Q Q Y S Y S P F T F G Q G T K V E I K R (서열 34)

도면2a

카바트# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40

카바트 - CDR H1

코티아 - CDR H1

접속 - CDR H1

Fab12 E I S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N F Y Y S S I H M V R Q A A
LC6 IgG E I S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N F Y Y S S I H M V R Q A A
LC9 IgG E I S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N F Y Y S S I H M V R Q A A
LC10 IgG E I S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N F Y Y S S I H M V R Q A A

카바트# 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 A B C 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78

카바트 - CDR H2

코티아 - CDR H2

접속 - CDR H2

Fab12 P G X G L E W V A S I S P Y S G Y T S Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
LC6 IgG P G X G L E W V A S I S P Y S G Y T S Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
LC9 IgG P G X G L E W V A S I S P Y S G Y T S Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
LC10 IgG P G X G L E W V A S I S P Y S G Y T S Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A

카바트# 79 80 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F G H K 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113

카바트 - CDR H3

코티아 - CDR H3

접속 - CDR H3

Fab12 Y L Q M N S L R A A E D T A V Y Y C A R Q P T H Y Y Y Y A K G Y K A M D Y W G Q G T L V T V S S S 27
LC6 IgG Y L Q M N S L R A A E D T A V Y Y C A R Q P T H Y Y Y Y A K G Y K A M D Y W G Q G T L V T V S S S 27
LC9 IgG Y L Q M N S L R A A E D T A V Y Y C A R Q P T H Y Y Y Y A K G Y K A M D Y W G Q G T L V T V S S S 27
LC10 IgG Y L Q M N S L R A A E D T A V Y Y C A R Q P T H Y Y Y Y A K G Y K A M D Y W G Q G T L V T V S S S 27

서열

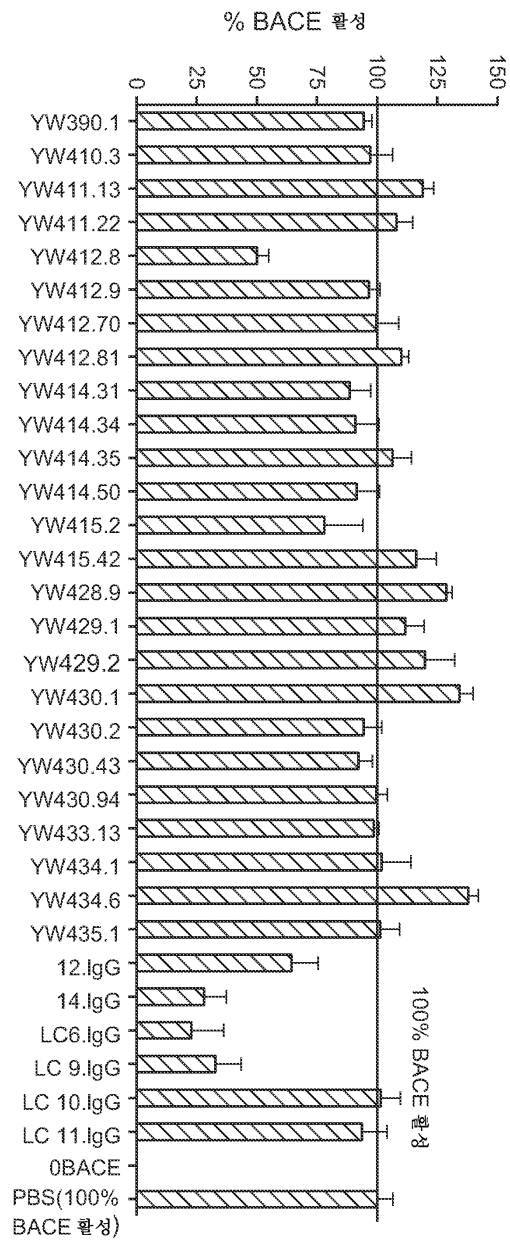
도면2b

도면3a

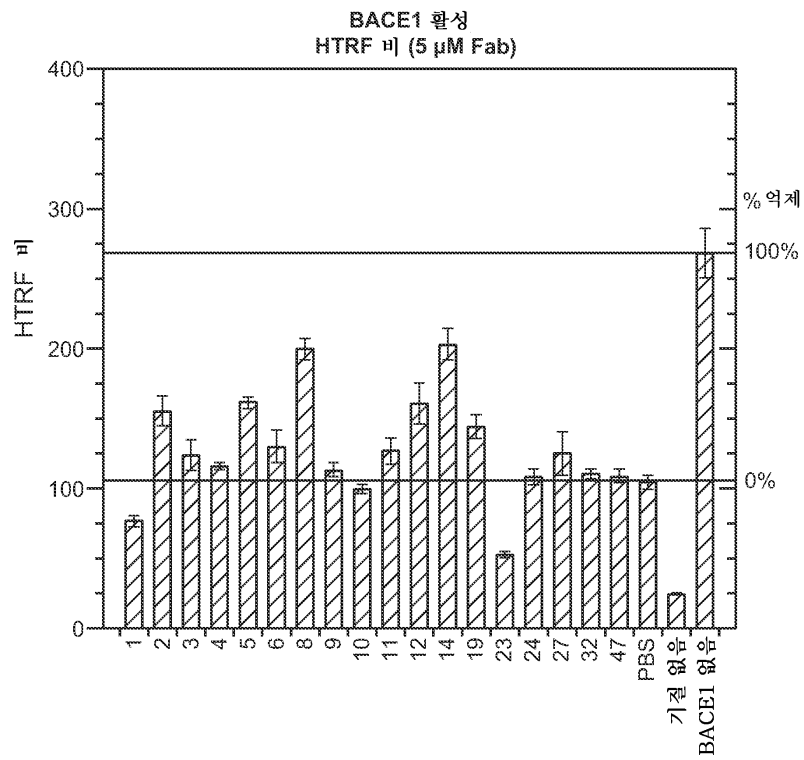
CDRL1					CDRL2					CDRL3										CDRH1					FabID
28	29	30	31	32	33	40	50	51	52	53	91	92	93	94	94a	94b	95	96	28	29	30	31	32	33	
S	V	S	S	A	V	Y	S	A	S	S	S	S	S	S	Y	S	P	F	F	Y	S	S	Y	I	Fab1
S	V	S	S	A	V	Y	S	A	S	S	S	S	S	S	Y	S	P	I	I	Y	Y	S	S	M	Fab2
S	V	S	S	A	V	Y	S	A	S	S	S	S	S	S	Y	S	L	F	F	Y	Y	Y	S	M	Fab3
S	V	S	S	A	V	Y	S	A	S	S	S	S	S	S	Y	S	I	I	I	Y	S	Y	S	M	Fab4
S	V	S	S	A	V	Y	S	A	S	S	S	S	S	S	Y	S	L	F	L	S	Y	S	Y	I	Fab5
S	V	S	S	A	V	Y	S	A	S	S	S	S	S	S	Y	S	L	F	F	S	Y	S	S	I	Fab6
S	V	S	S	A	V	Y	S	A	S	S	S	S	S	S	Y	S	L	V	F	S	S	Y	S	I	Fab7
S	V	S	S	A	V	Y	S	A	S	S	S	S	S	S	Y	S	P	I	F	S	S	Y	S	I	Fab8
S	V	S	S	A	V	Y	S	A	S	S	S	S	S	S	Y	S	P	I	F	Y	Y	S	S	I	Fab9
S	V	S	S	A	V	Y	S	A	S	S	S	S	S	S	Y	S	L	I	V	S	Y	Y	Y	M	Fab10
S	V	S	S	A	V	Y	S	A	S	S	S	S	S	S	Y	S	P	I	F	S	S	S	Y	I	Fab11
S	V	S	S	A	V	Y	S	A	S	S	S	S	S	S	Y	S	P	I	F	Y	Y	S	S	I	Fab12
S	V	S	S	A	V	Y	S	A	S	S	S	S	S	S	Y	S	P	I	V	S	S	S	S	M	Fab14
S	V	S	S	A	V	Y	S	A	S	S	S	S	S	S	Y	S	P	I	V	S	S	S	Y	M	Fab19
S	V	S	S	A	V	Y	S	A	S	S	S	S	S	S	Y	S	L	V	F	Y	Y	S	Y	M	Fab23
S	V	S	S	A	V	Y	S	A	S	S	S	S	S	S	Y	S	P	F	F	Y	S	Y	S	M	Fab24
S	V	S	S	A	V	Y	S	A	S	S	S	S	S	S	Y	S	P	V	L	Y	Y	S	S	I	Fab27
S	V	S	S	A	V	Y	S	A	S	S	S	S	S	S	Y	S	L	L	V	S	S	S	Y	I	Fab32
S	V	S	S	A	V	Y	S	A	S	S	S	S	S	S	Y	S	L	L	L	V	S	S	Y	I	Fab47

	CDRH2	CDRH3	FabID
50	S		Fab1
51	I		Fab2
52	S		Fab3
52a	P		Fab4
53	S		Fab5
54	S		Fab6
55	S		Fab7
56	S		Fab8
57	T		Fab9
58	Y		Fab10
94	R	S	Fab11
95	D	G	Fab12
96	N	S	Fab19
97	A	Y	Fab23
98	Y	Y	Fab24
99	K	I	Fab27
100	I	S	Fab32
100a	S	G	Fab47
100b	G	F	
100c	Y	E	
100d	E	L	
100e	L	M	
100f	Y	Y	
100g	Y	E	
100h	Y	A	
100i	Y	A	
101	D	D	

도면4



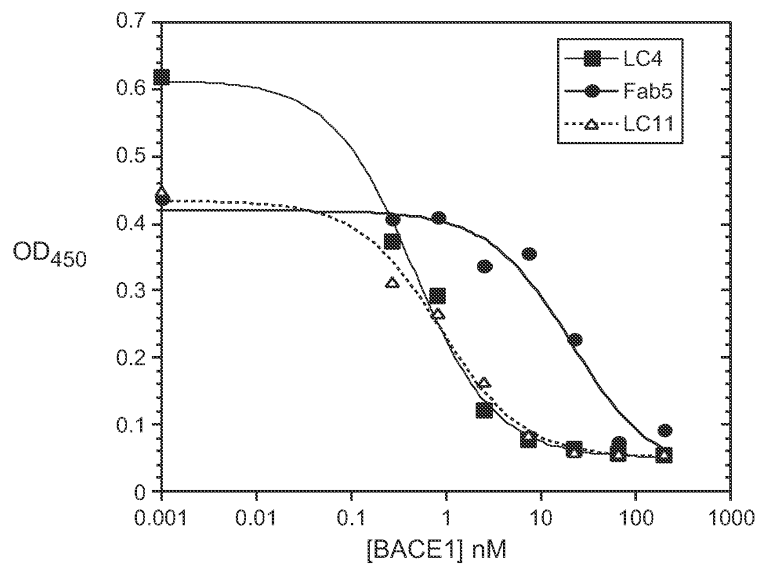
도면5



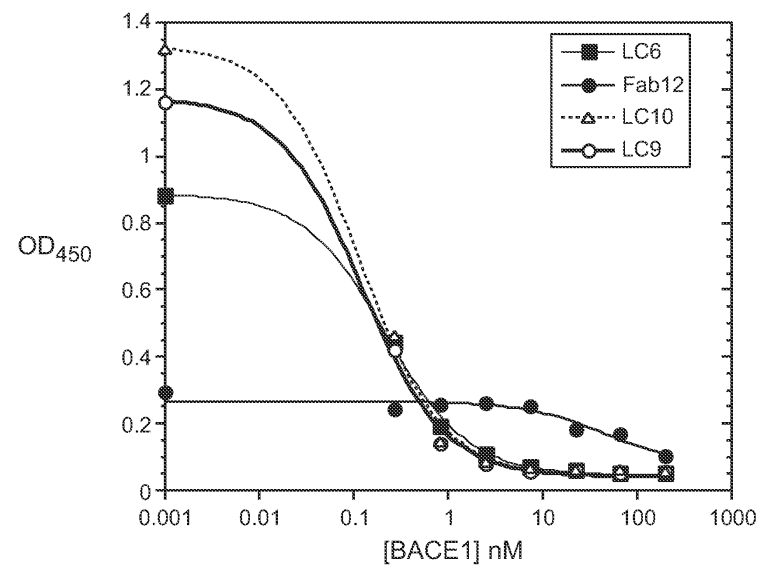
도면6

[illegible]

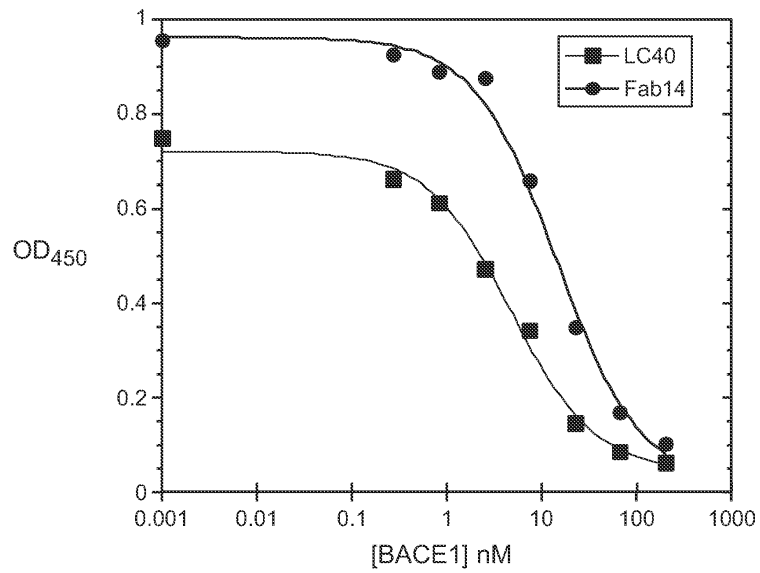
도면7a



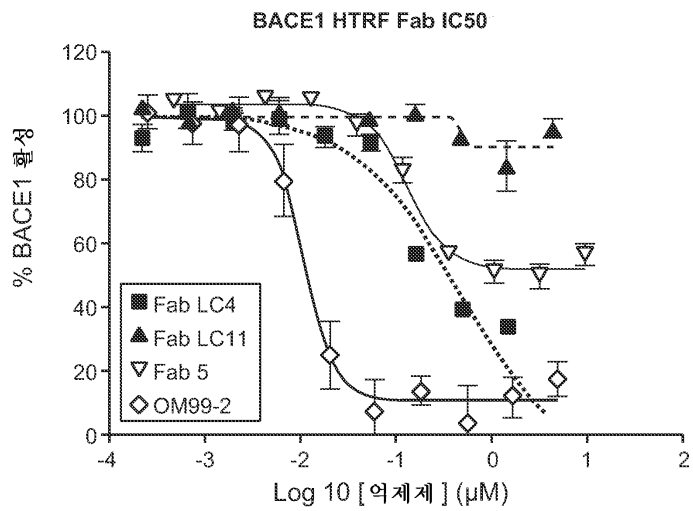
도면7b



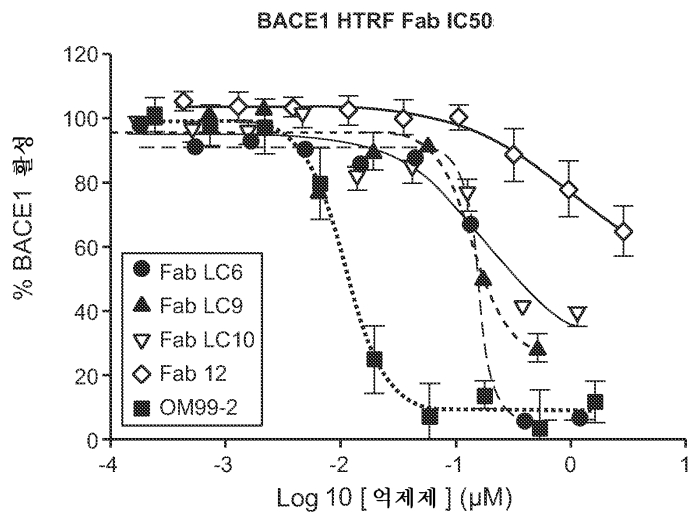
도면7c



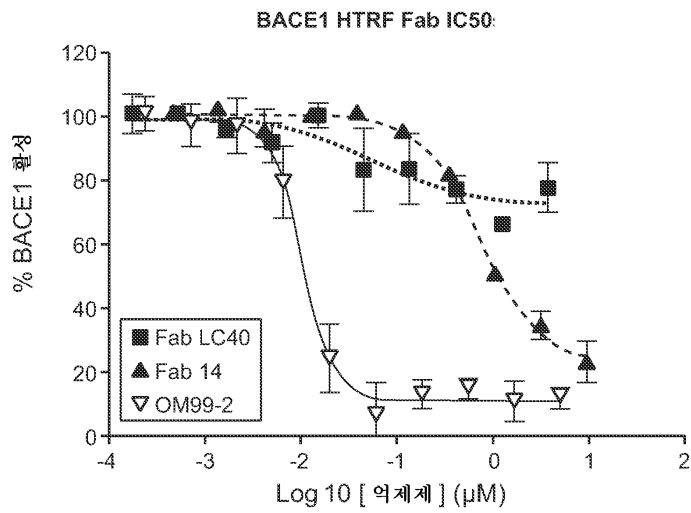
도면8a



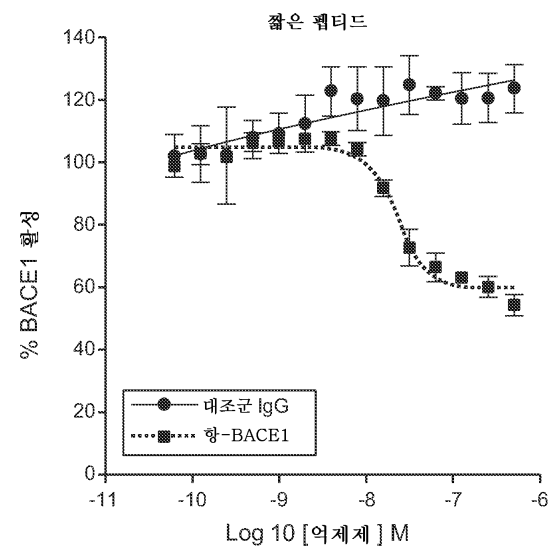
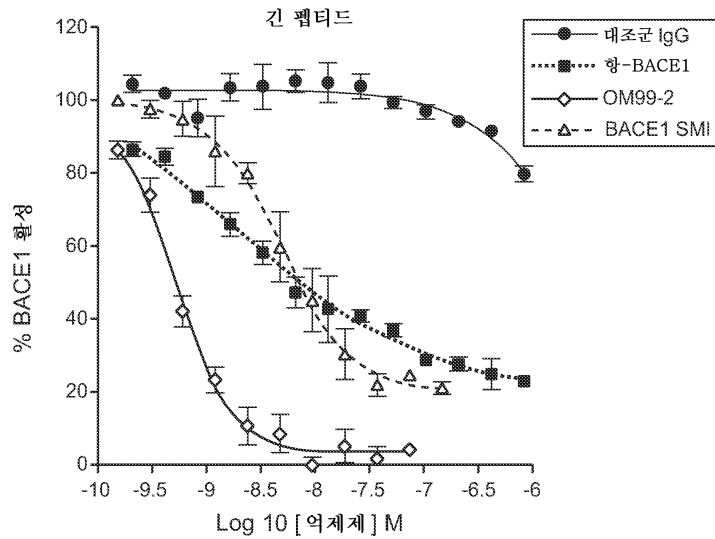
도면8b



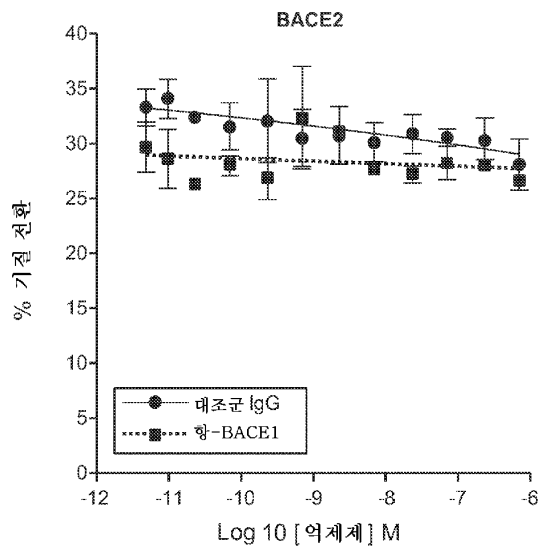
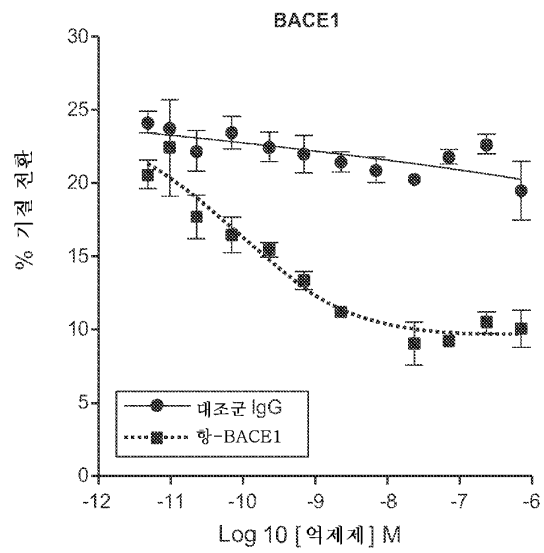
도면8c



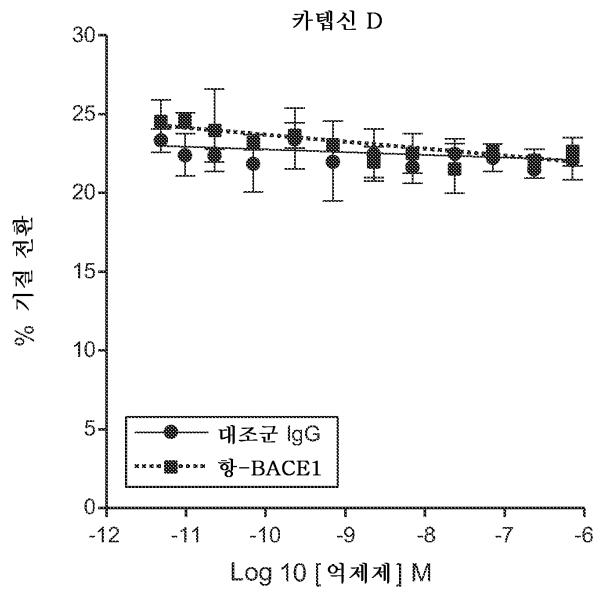
도면9a



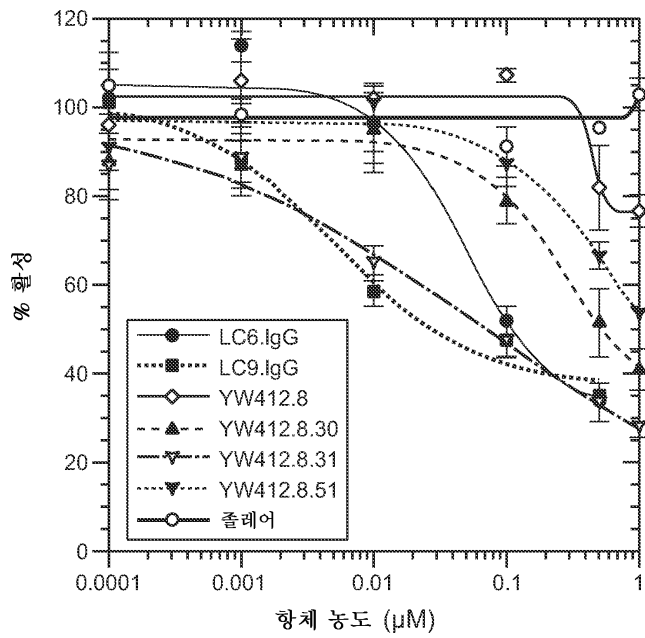
도면9bi



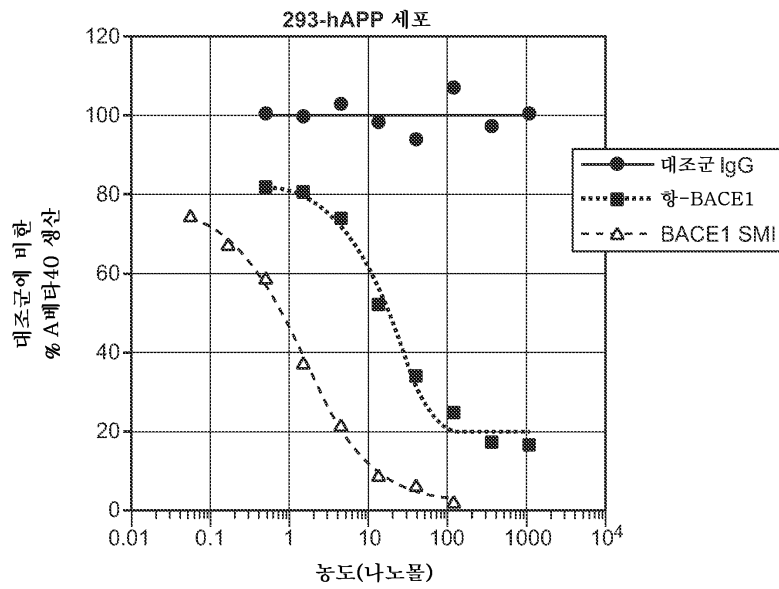
도면9bii



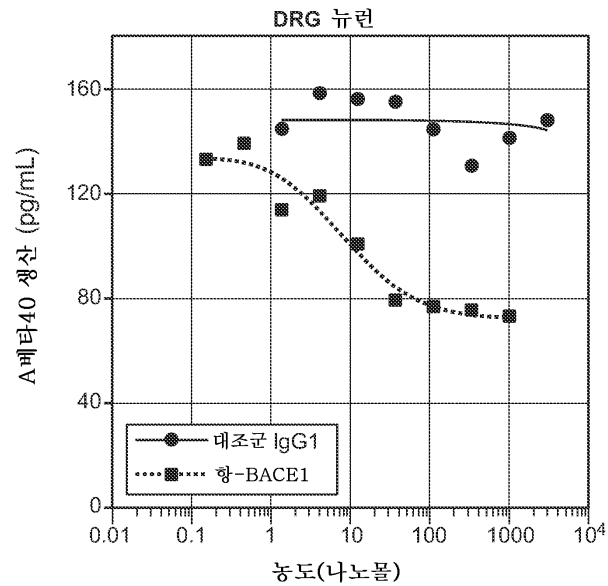
도면10



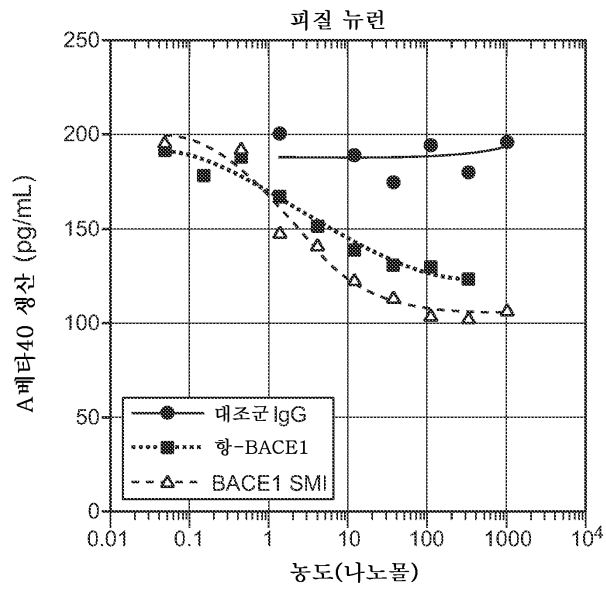
도면11a



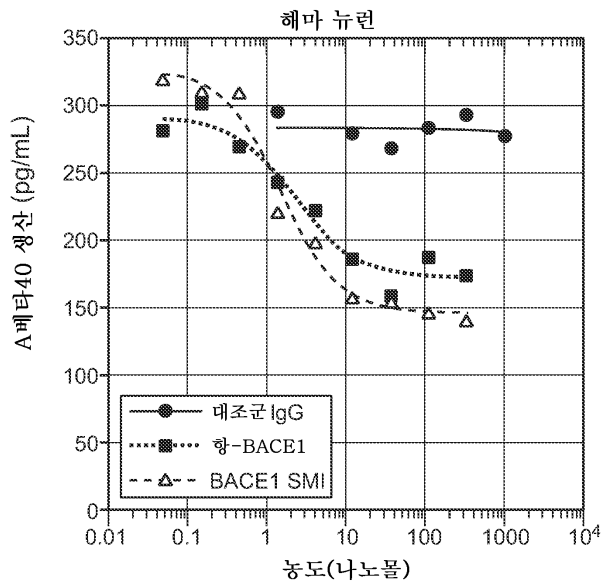
도면11b



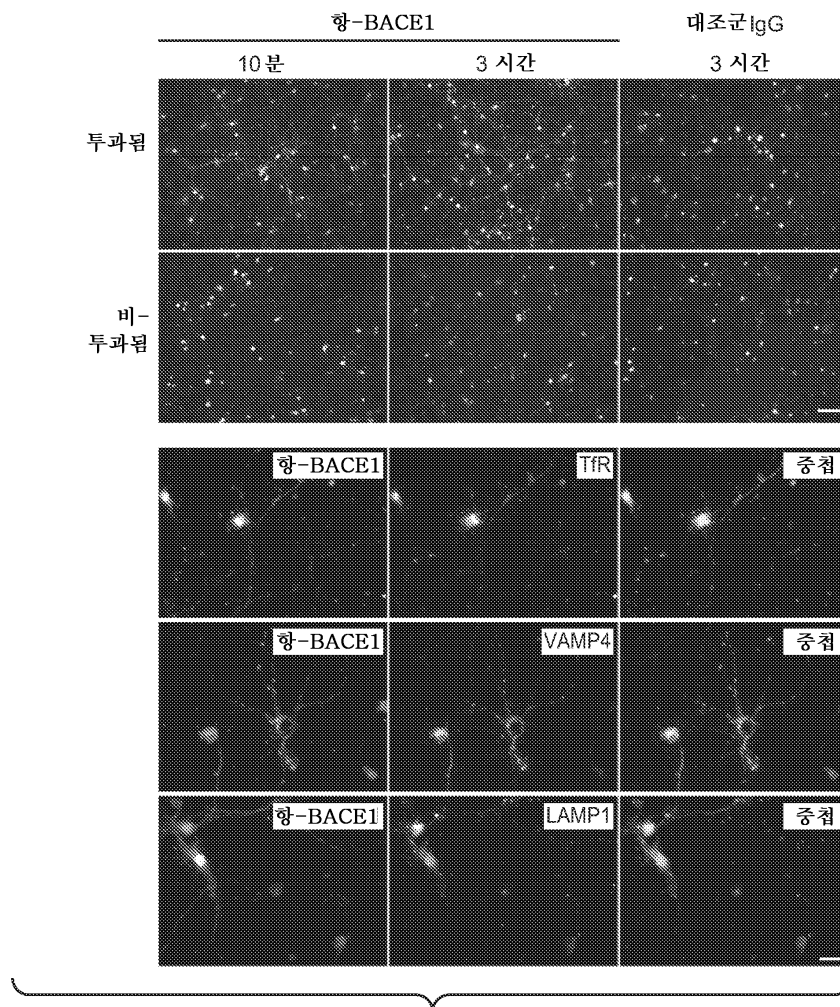
도면11c



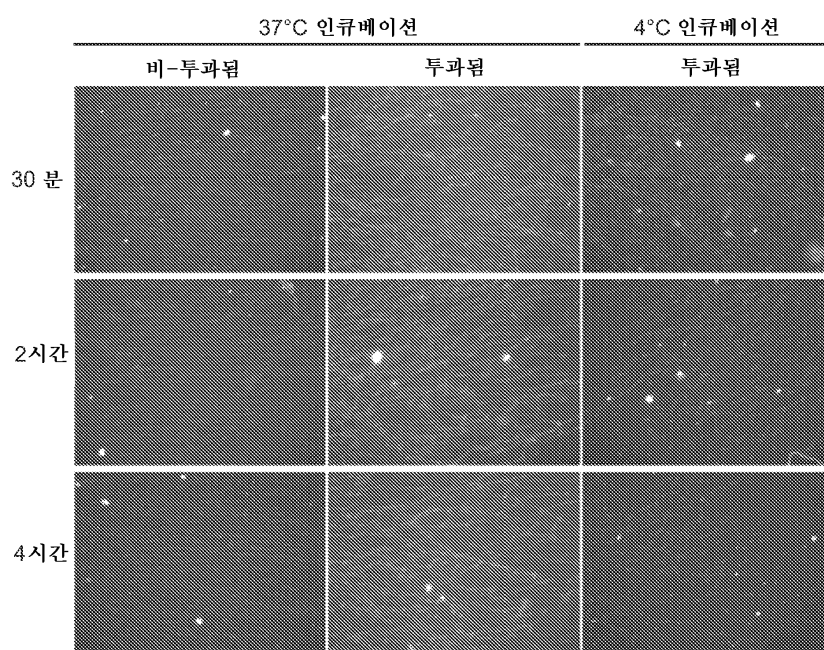
도면11d



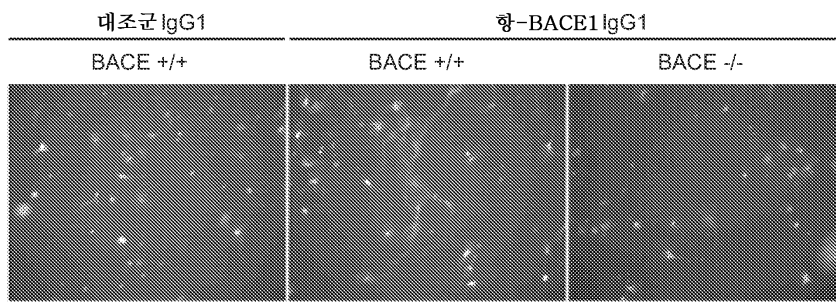
도면12a



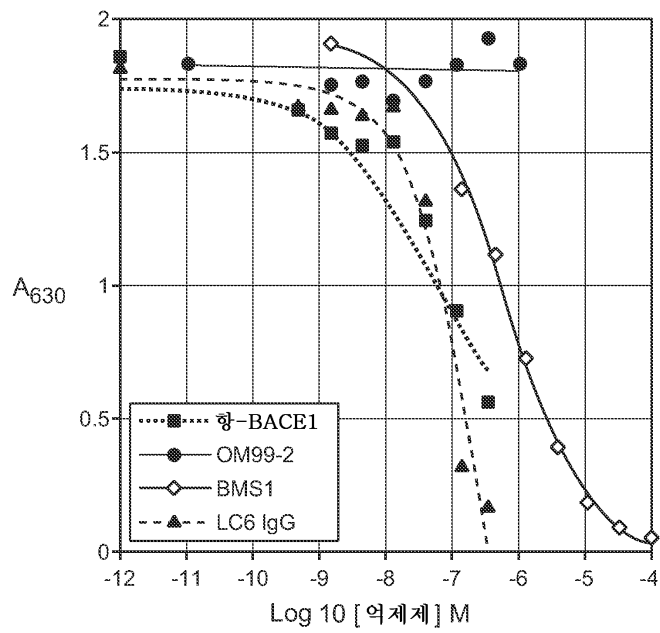
도면12b



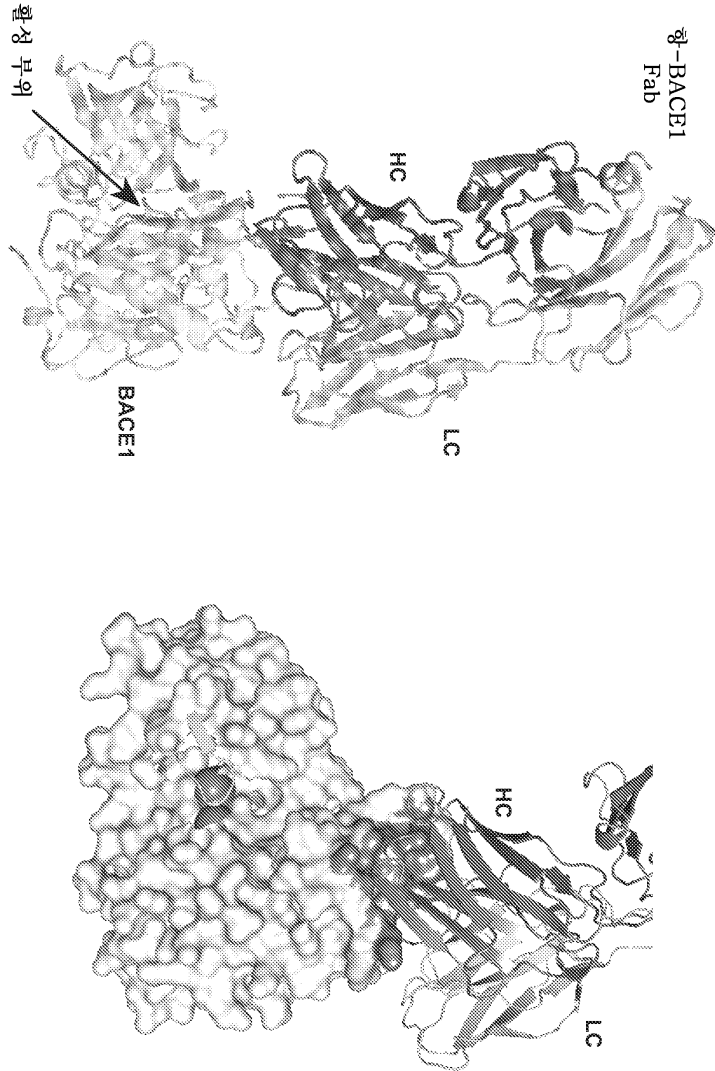
도면12c



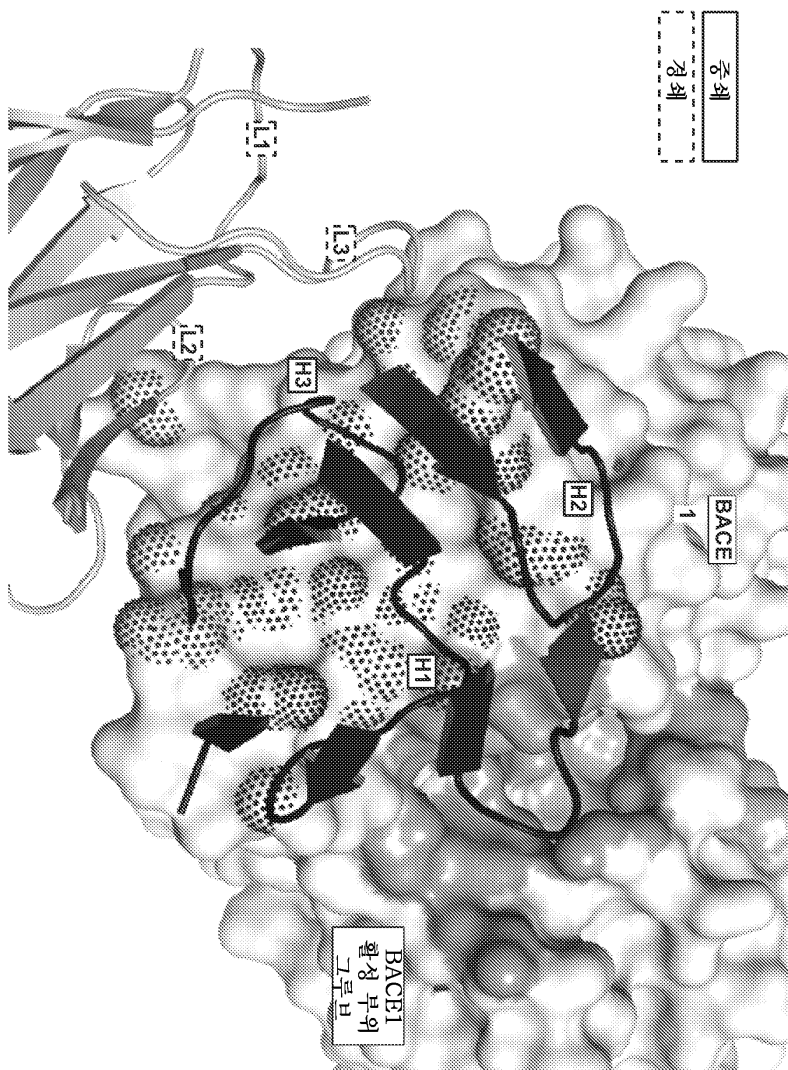
도면13



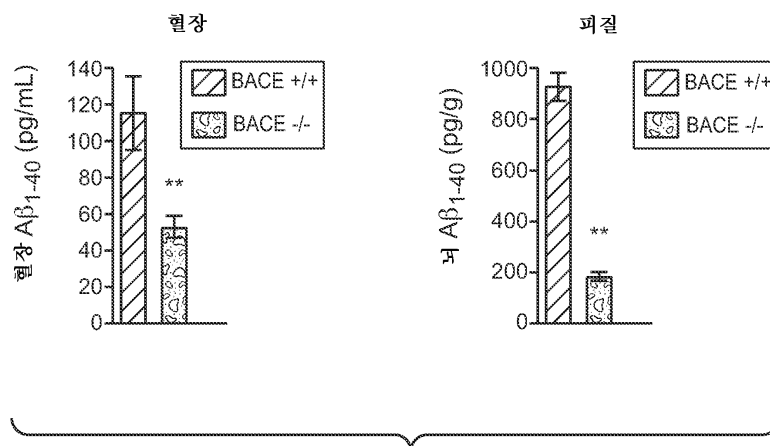
도면14



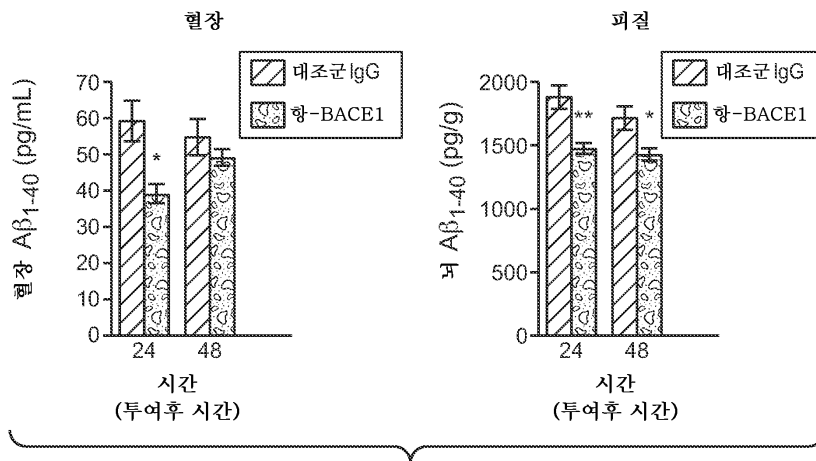
도면15



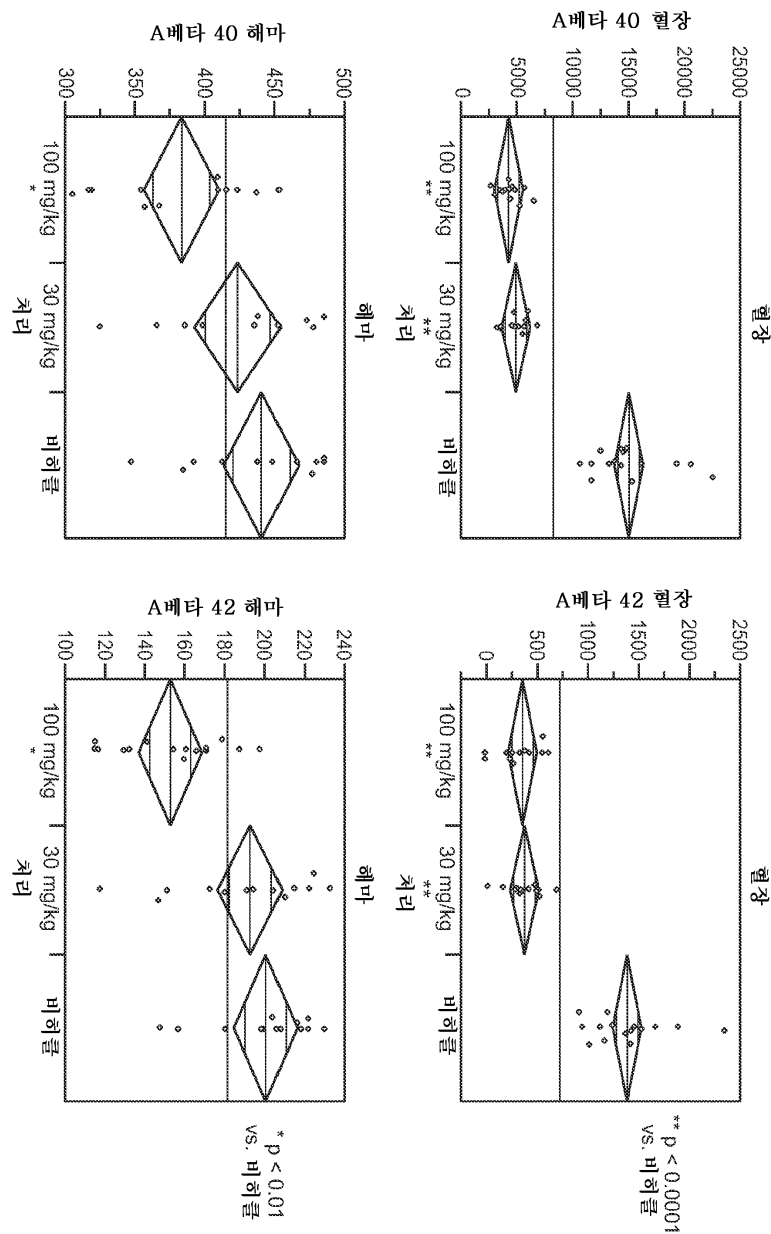
도면16a



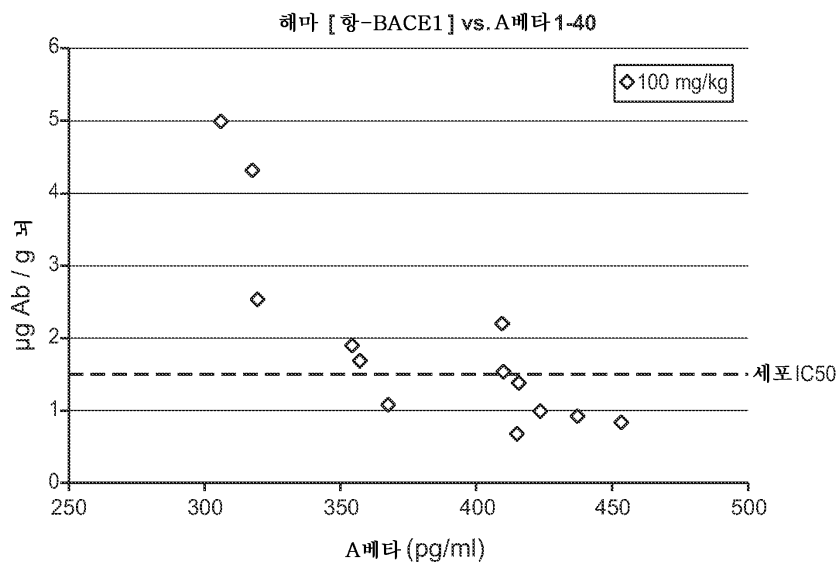
도면16b



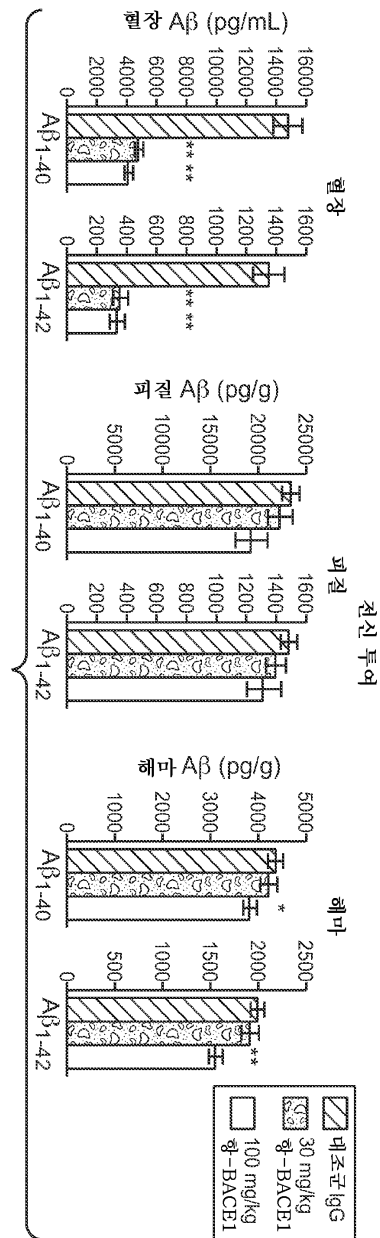
도면17a



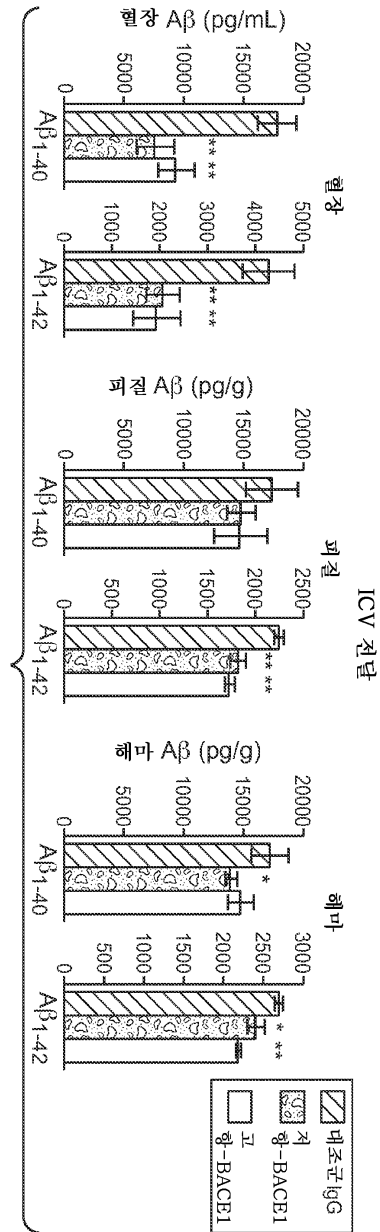
도면17b



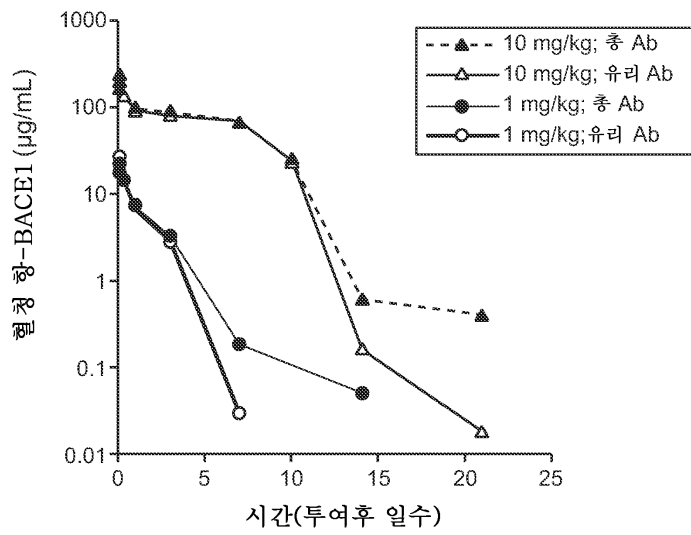
도면18a



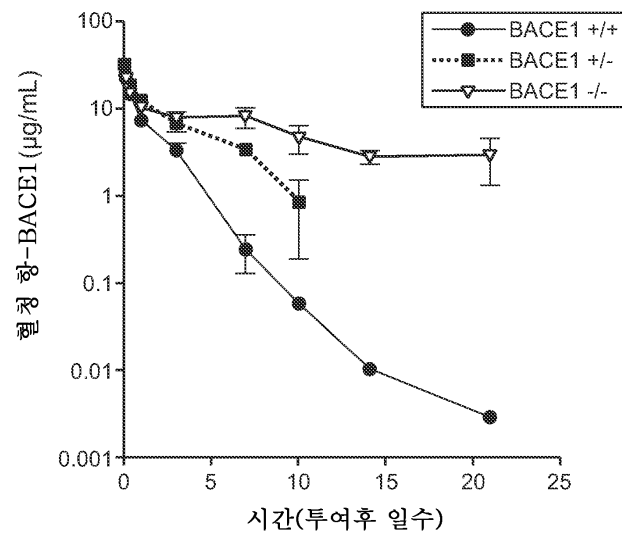
도면18b



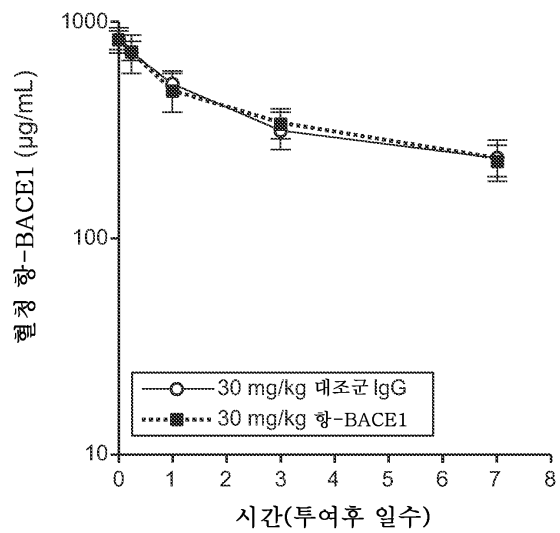
도면19a



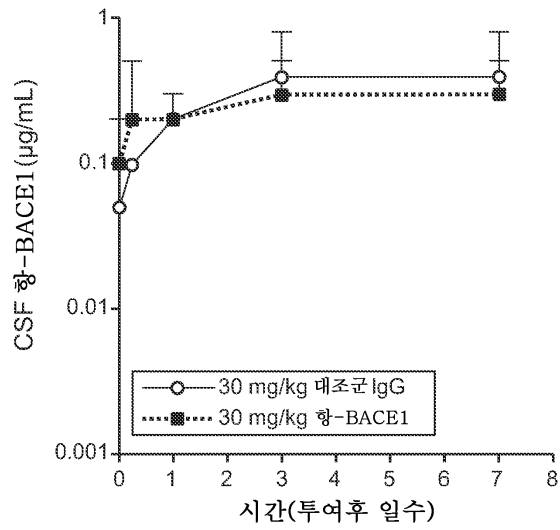
도면19b



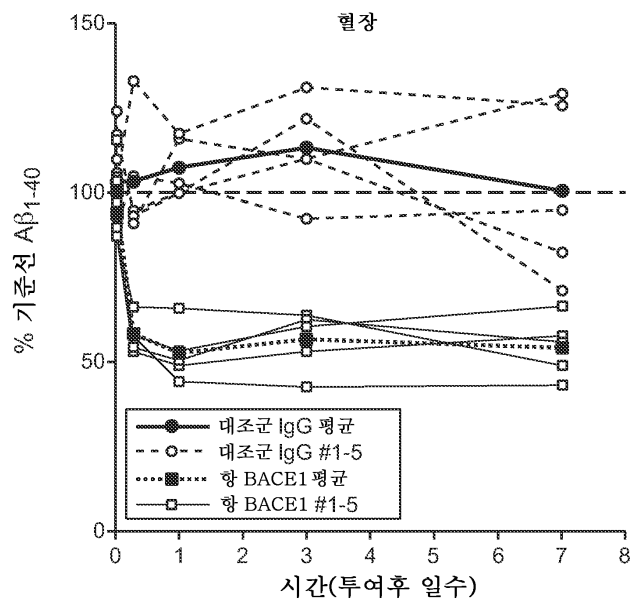
도면20a



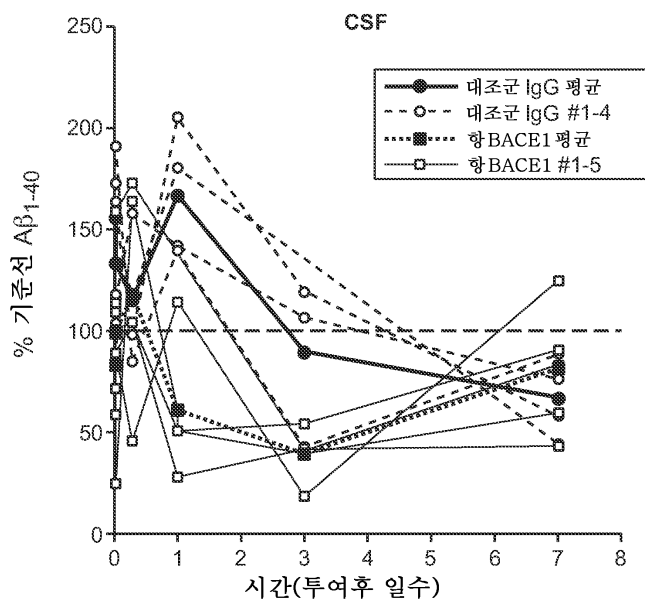
도면20b



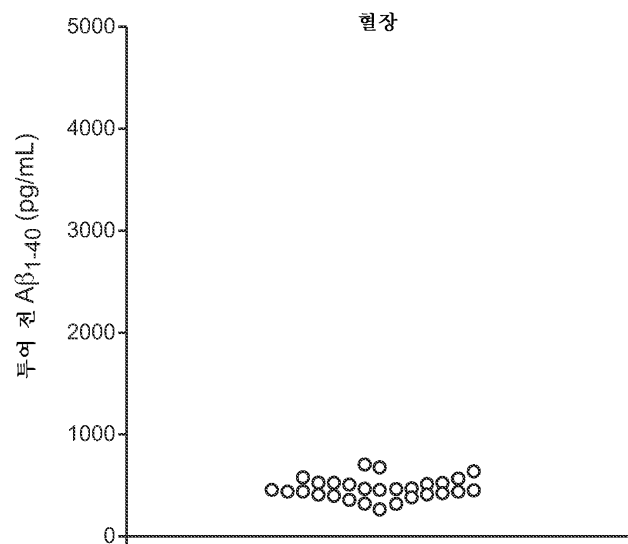
도면21a



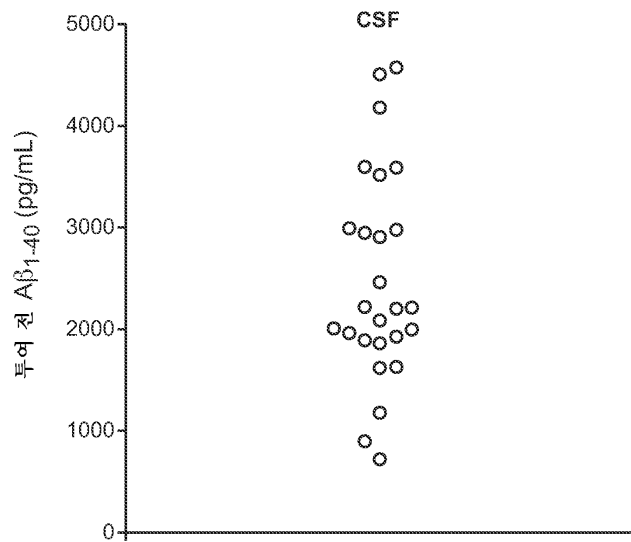
도면21b



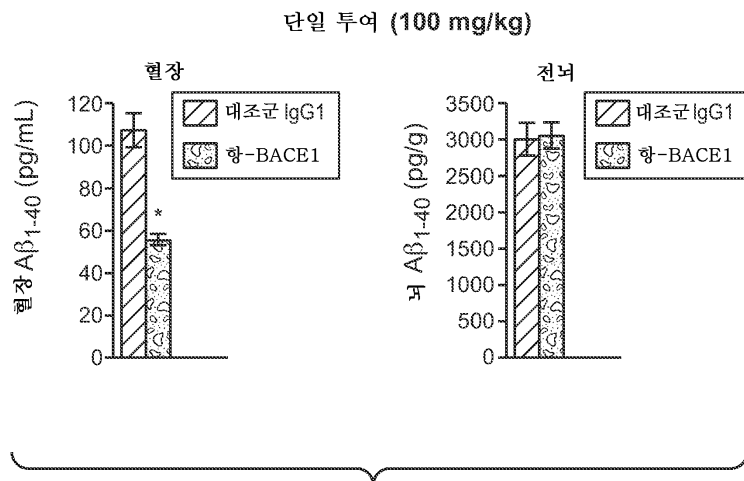
도면21c



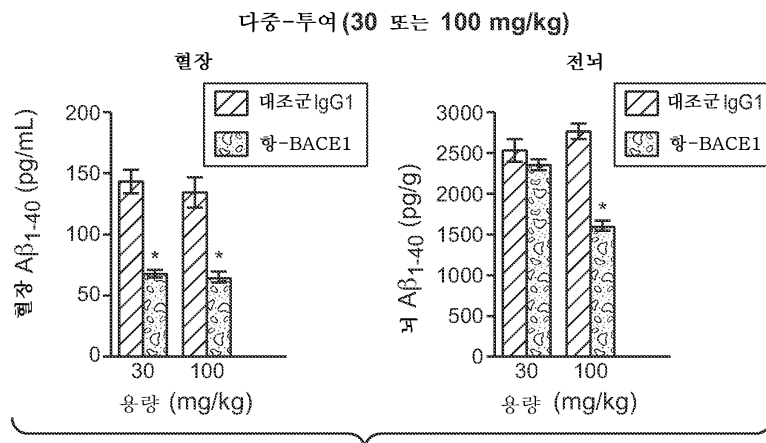
도면21d



도면22a



도면22b



도면23a

카버트 #

123456789101112131415161718192021222324252627A B C D E F 28293031323334353637

카버트 - CDR L1

코티어 - CDR L1

정추 - CDR L1

YW412.8.31	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q C R A S Q
YW412.8.31.41S	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q C R A S Q
YW412.8.31.28BS	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q C R A S Q
YW412.8.31.81S	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q C R A S Q
YW412.8.31.6S	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q C R A S Q
YW412.8.31.75S	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q C R A S Q
YW412.8.31.9S	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q C R A S Q
YW412.8.31.65S	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q C R A S Q
YW412.8.31.36S	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q C R A S Q
YW412.8.31.55S	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q C R A S Q
YW412.8.31.58S	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q C R A S Q
YW412.8.31.25S	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q C R A S Q
YW412.8.31.33S	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q C R A S Q
YW412.8.31.89S	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q C R A S Q
YW412.8.31.5AS	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q C R A S Q
YW412.8.31.71S	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q C R A S Q
YW412.8.31.51	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q C R A S Q
YW412.8.31.53	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q C R A S Q
YW412.8.31.69	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q C R A S Q
YW412.8.31.77	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q C R A S Q

도면23b

[illegible]

도면23c

카바트#		카바트-CDRL3		코타아-CDRL3		접속-CDRL3	
81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108							
YY412.8.31	E D F A T Y Y C Q Q F P T Y L P T F G Q G T K V E I K R (서열 2)	YY412.8.31.41S	E D F A T Y Y C Q Q F P T Y L P T F G Q G T K V E I K R (서열 99)	YY412.8.31.25BS	E D F A T Y Y C Q Q F P T Y L P T F G Q G T K V E I K R (서열 100)	YY412.8.31.81S	E D F A T Y Y C Q Q F P T Y L P T F G Q G T K V E I K R (서열 101)
YY412.8.31.6S	E D F A T Y Y C Q Q F P T Y L P T F G Q G T K V E I K R (서열 102)	YY412.8.31.75S	E D F A T Y Y C Q Q F P T Y L P T F G Q G T K V E I K R (서열 103)	YY412.8.31.9S	E D F A T Y Y C Q Q F P T Y L P T F G Q G T K V E I K R (서열 104)	YY412.8.31.65S	E D F A T Y Y C Q Q F P T Y L P T F G Q G T K V E I K R (서열 105)
YY412.8.31.65S	E D F A T Y Y C Q Q F P T Y L P T F G Q G T K V E I K R (서열 106)	YY412.8.31.86S	E D F A T Y Y C Q Q F P T Y L P T F G Q G T K V E I K R (서열 107)	YY412.8.31.55S	E D F A T Y Y C Q Q F P T Y L P T F G Q G T K V E I K R (서열 108)	YY412.8.31.25S	E D F A T Y Y C Q Q F P T Y L P T F G Q G T K V E I K R (서열 109)
YY412.8.31.3S	E D F A T Y Y C Q Q F P T Y L P T F G Q G T K V E I K R (서열 110)	YY412.8.31.89S	E D F A T Y Y C Q Q F P T Y L P T F G Q G T K V E I K R (서열 111)	YY412.8.31.54S	E D F A T Y Y C Q Q F P T Y L P T F G Q G T K V E I K R (서열 112)	YY412.8.31.71S	E D F A T Y Y C Q Q F P T Y L P T F G Q G T K V E I K R (서열 113)
YY412.8.31.51	E D F A T Y Y C Q Q F P T Y L P T F G Q G T K V E I K R (서열 114)	YY412.8.31.53	E D F A T Y Y C Q Q F P T Y L P T F G Q G T K V E I K R (서열 115)	YY412.8.31.69	E D F A T Y Y C Q Q F P T Y L P T F G Q G T K V E I K R (서열 116)	YY412.8.31.77	E D F A T Y Y C Q Q F P T Y L P T F G Q G T K V E I K R (서열 117)

도면24a

카바트-#

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40

카바트-CDR H1

코티아-CDR H1

절측-CDR H1

YW412.8.31

YW412.8.31.41S

YW412.8.31.25BS

YW412.8.31.81S

YW412.8.31.65S

YW412.8.31.15S

YW412.8.31.9S

YW412.8.31.66S

YW412.8.31.86S

YW412.8.31.55S

YW412.8.31.56S

YW412.8.31.25S

YW412.8.31.35S

YW412.8.31.86S

YW412.8.31.54S

YW412.8.31.51

YW412.8.31.53

YW412.8.31.71S	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A	A	A
YW412.8.31.51	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A	A	A
YW412.8.31.53	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A	A	A
YW412.8.31.69	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A	A	A
YW412.8.31.77	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	L	G	Y	G	I	H	W	V	R	Q	A	A	A

카바트# 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 A B C 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78

카바트 - CDR H2

코티아 - CDR H2

접속 - CDR H2

YMA128.31	P G K G L E W V G M I S P	A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YMA128.31.41S	P G K G L E W V G M I S P	S G G S T D Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A
YMA128.31.25BS	P G K G L E W V G M I S P	Q G G S T D Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A
YMA128.31.81S	P G K G L E W V G M I S P	A G G S T D Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A
YMA128.31.6S	P G K G L E W V G M I S P	A G G S T D Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A
YMA128.31.75S	P G K G L E W V G M I S P	A G G S T D Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A
YMA128.31.9S	P G K G L E W V G M I S P	A G G S T D Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A
YMA128.31.66S	P G K G L E W V G M I S P	A G G S T D Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A
YMA128.31.86S	P G K G L E W V G M I S P	A G G S T D Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A
YMA128.31.55S	P G K G L E W V G M I S P	A G G S T D Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A
YMA128.31.58S	P G K G L E W V G M I S P	A G G S T D Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A
YMA128.31.25S	P G K G L E W V G M I S P	A G G S T D Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A
YMA128.31.3S	P G K G L E W V G M I S P	A G G S T D Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A
YMA128.31.89S	P G K G L E W V G M I S P	A G G K T D Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A
YMA128.31.54S	P G K G L E W V G M I S P	A G G S T D Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A
YMA128.31.71S	P G K G L E W V G M I S P	A G G S T D Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A
YMA128.31.51	P G K G L E W V G M I S P	A G G L Y D Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A
YMA128.31.53	P G K G L E W V G M I S P	S G G S T D Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A
YMA128.31.69	P G K G L E W V G M I S P	A G G S T D Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A
YMA128.31.77	P G K G L E W V G M I S P	A G G S T D Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A

도면24b

도면24c

카바트#

79 80 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F G H K 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113

카바트 - CDR H3

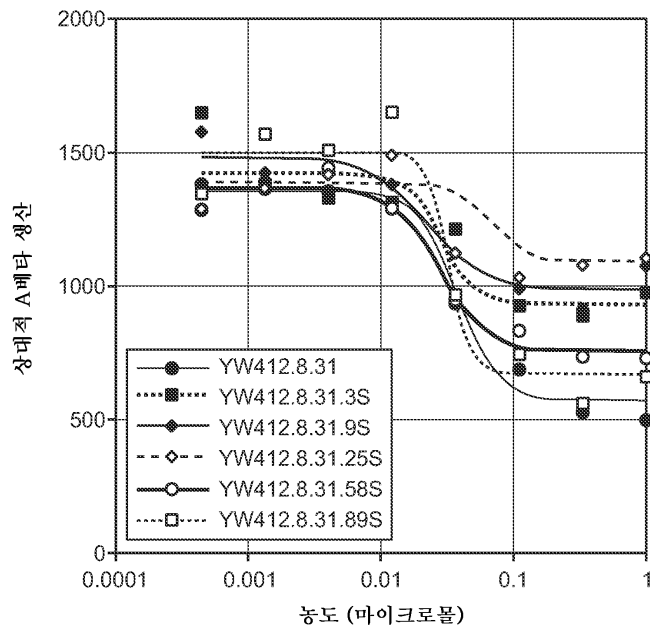
코티아 - CDR H3

접속 - CDR H3

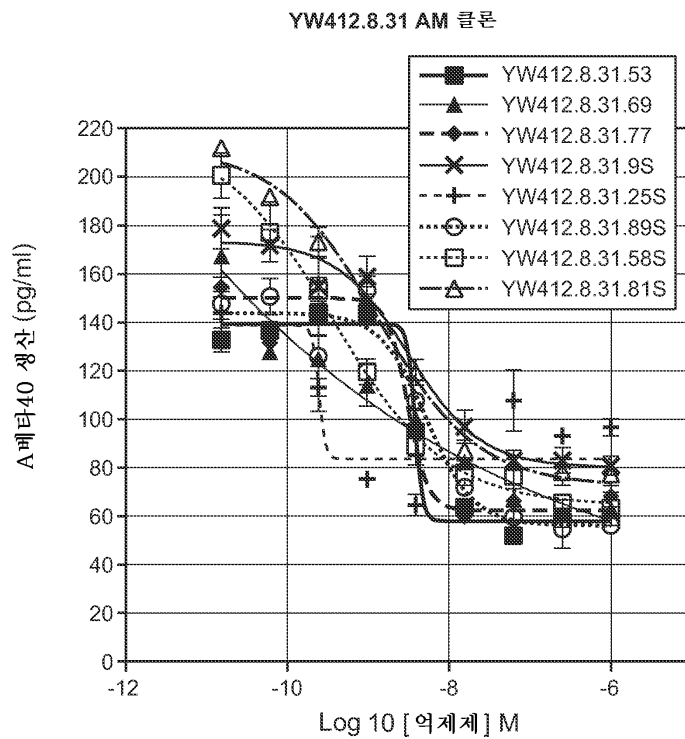
서열

YM412831	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	N	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	21
YM412831.41S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	N	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	80
YM412831.26BS	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	N	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	81
YM412831.81S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	N	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	82
YM412831.6S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	N	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	83
YM412831.75S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	N	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	84
YM412831.9S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	N	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	85
YM412831.65S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	N	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	86
YM412831.86S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	N	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	87
YM412831.56S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	N	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	88
YM412831.58S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	N	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	89
YM412831.25S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	N	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	90
YM412831.3S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	N	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	91
YM412831.88S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	N	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	92
YM412831.54S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	N	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	93
YM412831.71S	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	N	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	94
YM412831.51	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	N	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	95
YM412831.53	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	N	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	96
YM412831.69	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	N	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	97
YM412831.77	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	I	C	A	R	G	P	F	S	P	W	V	M	D	Y	N	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	98

도면25a



도면25b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC. ET AL.

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR NEURAL DISEASE IMMUNOTHERAPY

<130> P4453R1-WO

<140><141><150> 61/426,425

<151> 2010-12-22
 <150> 61/418,850
 <151> 2010-12-01
 <150> 61/418,310
 <151> 2010-11-30
 <150> 61/456,642
 <151> 2010-11-10
 <160> 210
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 1
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 2
 <211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 3

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Asn Asp Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 4

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Thr Asp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 5
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 5
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Val Val Ala Asn Ser
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Leu Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Ala Thr Ser Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 6
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 6
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Thr Asp Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 7

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 8

Arg Ala Ser Gln Val Val Ala Asn Ser Leu Ala
 1 5 10

<210> 9

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 9
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5
 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 10
 Leu Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5
 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 11
 Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 12

Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro Thr

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 13

Gln Gln Gly Tyr Asn Asp Pro Pro Thr

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 14

Gln Gln Ser Ser Thr Asp Pro Thr Thr

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 15

Gln Gln Asp Ala Thr Ser Pro Pro Thr

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 16

Gln Gln Tyr Ala Thr Asp Pro Pro Thr

1 5

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic consensus sequence"

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> /replace="Val"

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference

with respect to the annotations for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="Ala"

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Asn"

<220><221> VARIANT

<222> (9)..(9)
 <223> /replace="Ala"
 <220><221> VARIANT
 <222> (10)..(10)
 <223> /replace="Leu"
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(10)
 <223> /note="Residues given in the sequence have no preference
 with respect to those in the annotations for said positions"
 <400> 17
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ser Val Ala

1 5 10
 <210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 consensus sequence"
 <220><221> VARIANT
 <222> (1)..(1)
 <223> /replace="Leu"
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> /note="Residue given in the sequence has no preference
 with respect to the annotations for said position"
 <400> 18
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

```

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        consensus sequence"
<220><221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> /replace="Phe" or "Gly" or "Asp" or "Tyr"
<220><221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> /replace="Pro" or "Ser" or "Ala"
<220><221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> /replace="Asn"
<220><221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> /replace="Tyr" or "Asp" or "Ser"
<220><221> VARIANT
<222> (7)..(7)

<223> /replace="Leu"
<220><221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> /replace="Thr"
<220><221> misc_feature
<222> (3)..(8)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
        with respect to those in the annotations for said positions"
<400> 19
Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1           5
<210> 20
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

```

polypeptide"

<400> 20

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 21

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 21

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr
 20 25 30
 Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 22
 Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala Ile His
 1 5 10

<210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 23
 Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr Gly Ile His
 1 5 10

<
 210> 24
 <211> 18

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 24
 Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Gly

<210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 25
 Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr

1 5 10
 <210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 consensus sequence"
 <220><221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 <223> /replace="Leu"
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> /note="Residue given in the sequence has no preference
 with respect to the annotations for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Gly"

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
with respect to the annotations for said position"

<400> 26

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala Ile His

1 5 10

<210> 27

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 27

Glu Ile Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

1 5 10 15

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe

20 25 30

Tyr Tyr Ser Ser Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

35 40 45

Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala

50 55 60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn

65 70 75 80

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Pro Thr His Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Lys Gly

100 105 110

Tyr Lys Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 28

Gly Phe Asn Phe Tyr Tyr Ser Ser Ile His

1 5 10

<210> 29

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 29

Ala Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 30

Gln Pro Thr His Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala Met Asp

1 5 10 15

Tyr

<210> 31

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 31

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 32

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 32

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Ser Trp Ala Ser Trp Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 33

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 33

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Trp Tyr Ala Ser Trp Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 34

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 34

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Trp Trp Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

```

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      peptide"
<400> 35
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala Val Ala
1           5           10
<210> 36
<211
> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      peptide"
<400> 36
Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser
1           5
<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      peptide"
<400> 37
Trp Ala Ser Trp Leu Tyr Ser
1           5
<210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      peptide"

```

<400> 38

Tyr Ala Ser Trp Leu Tyr Ser

1 5

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 39

Trp Ala Ser Ser Leu Tyr Ser

1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 40

Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe Thr

1 5

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus sequence"

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Trp" or "Tyr"

<220><221> misc_feature

```

<222> (1)..(1)
<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
        with respect to the annotations for said position"
<220
><221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> /replace="Trp"
<220><221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
        with respect to the annotations for said position"
<400> 41
Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser
1           5
<210> 42
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        consensus sequence"
<220><221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> /replace="Asp" or "Val"

<220><221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
        with respect to the annotations for said position"
<220><221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> /replace="Ala"
<220><221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> /replace="Thr" or "Asn"

```

```

<220><221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> /replace="Ser"
<220><221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> /replace="Leu"
<220><221> misc_feature
<222> (7)..(10)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

        with respect to those in the annotations for said positions"
<400> 42
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala Val Ala
1           5           10
<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        consensus sequence"
<220><221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> /replace="Trp" or "Tyr" or "Leu"
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> /note="Residue given in the sequence has no preference

        with respect to the annotations for said position"
<220><221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> /replace="Ser" or "Trp"
<220><221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> /note="Residue given in the sequence has no preference

```

with respect to the annotations for said position"

<400> 43

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus sequence"

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="Phe" or "Gly" or "Asp" or "Tyr"

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> /replace="Pro" or "Ser" or "Ala"

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> /replace="Thr" or "Asn"

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> /replace="Tyr" or "Asp" or "Ser"

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="Leu"

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Pro" or "Thr"

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(8)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 44

Gln Gln Ser Tyr Tyr Thr Pro Phe Thr

1 5

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus sequence"

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="Thr "

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
with respect to the annotations for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> /replace="Leu" or "Tyr"

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> /replace="Tyr"

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="Ser"

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Gly" or "Ser"

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(8)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 45

Gly Phe Asn Phe Ser Gly Tyr Ala Ile His

1 5 10

<210> 46

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus sequence"

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Gly"

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /replace="Ser"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223>

/replace="Tyr"

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="Ser"

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> /replace="Tyr"

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
with respect to the annotations for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (11)..(11)

<223> /replace="Ser"

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
with respect to the annotations for said position"

<400> 46

Ala Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 47

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus sequence"

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Gly"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
with respect to the annotations for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="Phe"

<220><221> VARIANT

```

<222> (4)..(4)
<223> /replace="Ser"
<220><221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> /replace="Pro"
<220><221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> /replace="Trp"
<220><221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223>
  /replace="Val"
<220><221> VARIANT
<222> (8)..(14)
<223> /replace=" "
<220><221> misc_feature
<222> (3)..(14)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
      with respect to those in the annotations for said positions"
<220><221> misc_feature
<222> (8)..(14)
<223> /note="When present, this region is present in its entirety"
<400> 47
Gln Pro Thr His Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala Met Asp
1           5           10          15

Tyr

<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      peptide"

```

<400> 48

Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala

1 5

<210> 49

<211> 501

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Met Ala Gln Ala Leu Pro Trp Leu Leu Leu Trp Met Gly Ala Gly Val

1 5 10 15

Leu Pro Ala His Gly Thr Gln His Gly Ile Arg Leu Pro Leu Arg Ser

20 25 30

Gly Leu Gly Gly Ala Pro Leu Gly Leu Arg Leu Pro Arg Glu Thr Asp

35 40 45

Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe Val Glu Met Val

50 55 60

Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Val Glu Met Thr

65 70 75 80

Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr Leu Asn Ile Leu Val Asp Thr Gly Ser

85 90 95

Ser Asn Phe Ala Val Gly Ala Ala Pro His Pro Phe Leu His Arg Tyr

100 105 110

Tyr Gln Arg Gln Leu Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Leu Arg Lys Gly Val

115 120 125

Tyr Val Pro Tyr Thr Gln Gly Lys Trp Glu Gly Glu Leu Gly Thr Asp

130 135 140

Leu Val Ser Ile Pro His Gly Pro Asn Val Thr Val Arg Ala Asn Ile

145 150 155 160

Ala Ala Ile Thr Glu Ser Asp Lys Phe Phe Ile Asn Gly Ser Asn Trp

165 170 175

Glu Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Ala Glu Ile Ala Arg Pro Asp Asp

180 185 190

Ser Leu Glu Pro Phe Phe Asp Ser Leu Val Lys Gln Thr His Val Pro
195 200 205

Asn Leu Phe Ser Leu Gln Leu Cys Gly Ala Gly Phe Pro Leu Asn Gln
210 215 220

Ser Glu Val Leu Ala Ser Val Gly Gly Ser Met Ile Ile Gly Gly Ile
225 230 235 240

Asp His Ser Leu Tyr Thr Gly Ser Leu Trp Tyr Thr Pro Ile Arg Arg
245 250 255

Glu Trp Tyr Tyr Glu Val Ile Ile Val Arg Val Glu Ile Asn Gly Gln
260 265 270

Asp Leu Lys Met Asp Cys Lys Glu Tyr Asn Tyr Asp Lys Ser Ile Val
275 280 285

Asp Ser Gly Thr Thr Asn Leu Arg Leu Pro Lys Lys Val Phe Glu Ala
290 295 300

Ala Val Lys Ser Ile Lys Ala Ala Ser Ser Thr Glu Lys Phe Pro Asp
305 310 315 320

Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln Leu Val Cys Trp Gln Ala Gly Thr Thr
325 330 335

Pro Trp Asn Ile Phe Pro Val Ile Ser Leu Tyr Leu Met Gly Glu Val
340 345 350

Thr Asn Gln Ser Phe Arg Ile Thr Ile Leu Pro Gln Gln Tyr Leu Arg
355 360 365

Pro Val Glu Asp Val Ala Thr Ser Gln Asp Asp Cys Tyr Lys Phe Ala
370 375 380

Ile Ser Gln Ser Ser Thr Gly Thr Val Met Gly Ala Val Ile Met Glu
385 390 395 400

Gly Phe Tyr Val Val Phe Asp Arg Ala Arg Lys Arg Ile Gly Phe Ala
405 410 415

Val Ser Ala Cys His Val His Asp Glu Phe Arg Thr Ala Ala Val Glu
420 425 430

Gly Pro Phe Val Thr Leu Asp Met Glu Asp Cys Gly Tyr Asn Ile Pro

435 440 445
 Gln Thr Asp Glu Ser Thr Leu Met Thr Ile Ala Tyr Val Met Ala Ala
 450 455 460
 Ile Cys Ala Leu Phe Met Leu Pro Leu Cys Leu Met Val Cys Gln Trp
 465 470 475 480

 Cys Cys Leu Arg Cys Leu Arg Gln Gln His Asp Asp Phe Ala Asp Asp
 485 490 495
 Ile Ser Leu Leu Lys
 500
 <210> 50
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 50
 Met Ala Gln Ala Leu Pro Trp Leu Leu Leu Trp Met Gly Ala Gly Val
 1 5 10 15
 Leu Pro Ala His Gly Thr Gln His Gly Ile Arg Leu Pro Leu Arg Ser
 20 25 30
 Gly Leu Gly Gly Ala Pro Leu Gly Leu Arg Leu Pro Arg Glu Thr Asp

 35 40 45
 Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe Val Glu Met Val
 50 55 60
 Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Val Glu Met Thr
 65 70 75 80
 Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr Leu Asn Ile Leu Val Asp Thr Gly Ser
 85 90 95
 Ser Asn Phe Ala Val Gly Ala Ala Pro His Pro Phe Leu His Arg Tyr

 100 105 110
 Tyr Gln Arg Gln Leu Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Leu Arg Lys Gly Val
 115 120 125
 Tyr Val Pro Tyr Thr Gln Gly Lys Trp Glu Gly Glu Leu Gly Thr Asp
 130 135 140

Leu Val Ser Ile Pro His Gly Pro Asn Val Thr Val Arg Ala Asn Ile
 145 150 155 160
 Ala Ala Ile Thr Glu Ser Asp Lys Phe Phe Ile Asn Gly Ser Asn Trp

 165 170 175
 Glu Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Ala Glu Ile Ala Arg Leu Cys Gly
 180 185 190
 Ala Gly Phe Pro Leu Asn Gln Ser Glu Val Leu Ala Ser Val Gly Gly
 195 200 205
 Ser Met Ile Ile Gly Gly Ile Asp His Ser Leu Tyr Thr Gly Ser Leu
 210 215 220
 Trp Tyr Thr Pro Ile Arg Arg Glu Trp Tyr Tyr Glu Val Ile Ile Val

 225 230 235 240
 Arg Val Glu Ile Asn Gly Gln Asp Leu Lys Met Asp Cys Lys Glu Tyr
 245 250 255
 Asn Tyr Asp Lys Ser Ile Val Asp Ser Gly Thr Thr Asn Leu Arg Leu
 260 265 270
 Pro Lys Lys Val Phe Glu Ala Ala Val Lys Ser Ile Lys Ala Ala Ser
 275 280 285
 Ser Thr Glu Lys Phe Pro Asp Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln Leu Val

 290 295 300
 Cys Trp Gln Ala Gly Thr Thr Pro Trp Asn Ile Phe Pro Val Ile Ser
 305 310 315 320
 Leu Tyr Leu Met Gly Glu Val Thr Asn Gln Ser Phe Arg Ile Thr Ile
 325 330 335
 Leu Pro Gln Gln Tyr Leu Arg Pro Val Glu Asp Val Ala Thr Ser Gln
 340 345 350
 Asp Asp Cys Tyr Lys Phe Ala Ile Ser Gln Ser Ser Thr Gly Thr Val

 355 360 365
 Met Gly Ala Val Ile Met Glu Gly Phe Tyr Val Val Phe Asp Arg Ala
 370 375 380
 Arg Lys Arg Ile Gly Phe Ala Val Ser Ala Cys His Val His Asp Glu

385 390 395 400
 Phe Arg Thr Ala Ala Val Glu Gly Pro Phe Val Thr Leu Asp Met Glu
 405 410 415
 Asp Cys Gly Tyr Asn Ile Pro Gln Thr Asp Glu Ser Thr Leu Met Thr

 420 425 430
 Ile Ala Tyr Val Met Ala Ala Ile Cys Ala Leu Phe Met Leu Pro Leu
 435 440 445
 Cys Leu Met Val Cys Gln Trp Cys Cys Leu Arg Cys Leu Arg Gln Gln
 450 455 460
 His Asp Asp Phe Ala Asp Asp Ile Ser Leu Leu Lys
 465 470 475
 <210> 51
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 51
 Met Ala Gln Ala Leu Pro Trp Leu Leu Leu Trp Met Gly Ala Gly Val

 1 5 10 15
 Leu Pro Ala His Gly Thr Gln His Gly Ile Arg Leu Pro Leu Arg Ser
 20 25 30
 Gly Leu Gly Gly Ala Pro Leu Gly Leu Arg Leu Pro Arg Glu Thr Asp
 35 40 45
 Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe Val Glu Met Val
 50 55 60
 Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Val Glu Met Thr

 65 70 75 80
 Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr Leu Asn Ile Leu Val Asp Thr Gly Ser
 85 90 95
 Ser Asn Phe Ala Val Gly Ala Ala Pro His Pro Phe Leu His Arg Tyr
 100 105 110
 Tyr Gln Arg Gln Leu Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Leu Arg Lys Gly Val
 115 120 125

Tyr Val Pro Tyr Thr Gln Gly Lys Trp Glu Gly Glu Leu Gly Thr Asp

130 135 140

Leu Pro Asp Asp Ser Leu Glu Pro Phe Phe Asp Ser Leu Val Lys Gln

145 150 155 160

Thr His Val Pro Asn Leu Phe Ser Leu Gln Leu Cys Gly Ala Gly Phe

165 170 175

Pro Leu Asn Gln Ser Glu Val Leu Ala Ser Val Gly Gly Ser Met Ile

180 185 190

Ile Gly Gly Ile Asp His Ser Leu Tyr Thr Gly Ser Leu Trp Tyr Thr

195 200 205

Pro Ile Arg Arg Glu Trp Tyr Tyr Glu Val Ile Ile Val Arg Val Glu

210 215 220

Ile Asn Gly Gln Asp Leu Lys Met Asp Cys Lys Glu Tyr Asn Tyr Asp

225 230 235 240

Lys Ser Ile Val Asp Ser Gly Thr Thr Asn Leu Arg Leu Pro Lys Lys

245 250 255

Val Phe Glu Ala Ala Val Lys Ser Ile Lys Ala Ala Ser Ser Thr Glu

260 265 270

Lys Phe Pro Asp Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln Leu Val Cys Trp Gln

275 280 285

Ala Gly Thr Thr Pro Trp Asn Ile Phe Pro Val Ile Ser Leu Tyr Leu

290 295 300

Met Gly Glu Val Thr Asn Gln Ser Phe Arg Ile Thr Ile Leu Pro Gln

305 310 315 320

Gln Tyr Leu Arg Pro Val Glu Asp Val Ala Thr Ser Gln Asp Asp Cys

325 330 335

Tyr Lys Phe Ala Ile Ser Gln Ser Ser Thr Gly Thr Val Met Gly Ala

340 345 350

Val Ile Met Glu Gly Phe Tyr Val Val Phe Asp Arg Ala Arg Lys Arg

355 360 365

Ile Gly Phe Ala Val Ser Ala Cys His Val His Asp Glu Phe Arg Thr

370 375 380
Ala Ala Val Glu Gly Pro Phe Val Thr Leu Asp Met Glu Asp Cys Gly
385 390 395 400
Tyr Asn Ile Pro Gln Thr Asp Glu Ser Thr Leu Met Thr Ile Ala Tyr
405 410 415
Val Met Ala Ala Ile Cys Ala Leu Phe Met Leu Pro Leu Cys Leu Met
420 425 430
Val Cys Gln Trp Cys Cys Leu Arg Cys Leu Arg Gln Gln His Asp Asp
435 440 445
Phe Ala Asp Asp Ile Ser Leu Leu Lys
450 455

<210> 52

<211> 432

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Met Ala Gln Ala Leu Pro Trp Leu Leu Leu Trp Met Gly Ala Gly Val
1 5 10 15
Leu Pro Ala His Gly Thr Gln His Gly Ile Arg Leu Pro Leu Arg Ser
20 25 30
Gly Leu Gly Gly Ala Pro Leu Gly Leu Arg Leu Pro Arg Glu Thr Asp
35 40 45
Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe Val Glu Met Val

50 55 60
Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Val Glu Met Thr
65 70 75 80
Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr Leu Asn Ile Leu Val Asp Thr Gly Ser
85 90 95
Ser Asn Phe Ala Val Gly Ala Ala Pro His Pro Phe Leu His Arg Tyr
100 105 110
Tyr Gln Arg Gln Leu Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Leu Arg Lys Gly Val

115 120 125
 Tyr Val Pro Tyr Thr Gln Gly Lys Trp Glu Gly Glu Leu Gly Thr Asp
 130 135 140
 Leu Leu Cys Gly Ala Gly Phe Pro Leu Asn Gln Ser Glu Val Leu Ala
 145 150 155 160
 Ser Val Gly Gly Ser Met Ile Ile Gly Gly Ile Asp His Ser Leu Tyr
 165 170 175
 Thr Gly Ser Leu Trp Tyr Thr Pro Ile Arg Arg Glu Trp Tyr Tyr Glu

 180 185 190
 Val Ile Ile Val Arg Val Glu Ile Asn Gly Gln Asp Leu Lys Met Asp
 195 200 205
 Cys Lys Glu Tyr Asn Tyr Asp Lys Ser Ile Val Asp Ser Gly Thr Thr
 210 215 220
 Asn Leu Arg Leu Pro Lys Lys Val Phe Glu Ala Ala Val Lys Ser Ile
 225 230 235 240
 Lys Ala Ala Ser Ser Thr Glu Lys Phe Pro Asp Gly Phe Trp Leu Gly

 245 250 255
 Glu Gln Leu Val Cys Trp Gln Ala Gly Thr Thr Pro Trp Asn Ile Phe
 260 265 270
 Pro Val Ile Ser Leu Tyr Leu Met Gly Glu Val Thr Asn Gln Ser Phe
 275 280 285
 Arg Ile Thr Ile Leu Pro Gln Gln Tyr Leu Arg Pro Val Glu Asp Val
 290 295 300
 Ala Thr Ser Gln Asp Asp Cys Tyr Lys Phe Ala Ile Ser Gln Ser Ser

 305 310 315 320
 Thr Gly Thr Val Met Gly Ala Val Ile Met Glu Gly Phe Tyr Val Val
 325 330 335
 Phe Asp Arg Ala Arg Lys Arg Ile Gly Phe Ala Val Ser Ala Cys His
 340 345 350
 Val His Asp Glu Phe Arg Thr Ala Ala Val Glu Gly Pro Phe Val Thr
 355 360 365

Leu Asp Met Glu Asp Cys Gly Tyr Asn Ile Pro Gln Thr Asp Glu Ser

370

375

380

Thr Leu Met Thr Ile Ala Tyr Val Met Ala Ala Ile Cys Ala Leu Phe

385

390

395

400

Met Leu Pro Leu Cys Leu Met Val Cys Gln Trp Cys Cys Leu Arg Cys

405

410

415

Leu Arg Gln Gln His Asp Asp Phe Ala Asp Asp Ile Ser Leu Leu Lys

420

425

430

<210> 53

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<220><221> source

<223> /note="N-term biotin"

<400> 53

Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Asn Leu Asp Ala Glu Phe Arg His

1

5

10

15

Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu

20

25

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<220><221> source

<223> /note="N-term Rh"

<220><221> source

<223> /note="C-term quencher"

<400> 54

Glu Val Asn Leu Asp Ala Glu Phe Lys

1 5

<210> 55

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> source

<223> /note="N-term FAM"

<220><221> source

<223> /note="C-term CONH2"

<400> 55

Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Asn Leu Asp Ala Glu Phe Arg Trp

1 5 10 15

Lys Lys

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic consensus sequence"

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Phe"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference with respect to the annotations for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> /replace="Tyr"

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="Pro" or "Arg" or "Lys" or "Trp"

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
with respect to the annotations for said position"

<400> 56

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus sequence"

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="Gln" or "Ser" or "Lys"

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference"

with respect to the annotations for said position"

<400> 57

Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro Thr

1 5

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 58

Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Ser

1 5

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 59

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Pro

1 5

<210> 60

<

211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 60

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Arg

1 5

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 61

Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Lys

1 5

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 62

Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Trp

1 5

<210> 63

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 63

Phe Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"
 <400> 64
 Phe Ala Ser Phe Arg Tyr Ser
 1 5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 65
 Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Gln Pro Thr
 1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 66
 Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Ser Pro Thr

1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

```

        peptide"
<400> 67
Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Lys Pro Thr
1             5
<210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        consensus sequence"
<220><221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> /replace="Tyr"

<220><221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> /replace="Phe"
<220><221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> /replace="Tyr"
<220><221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> /replace="Gln" or "Ile"
<220><221> misc_feature
<222> (2)..(5)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
        with respect to those in the annotations for said positions"
<400> 68
Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr Gly Ile His
1             5             10
<210> 69
<211> 18
<212> PRT

```

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus sequence"

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> /replace="Ser" or "Gln"

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="Ser"

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> /replace="Lys" or "Leu"

<220><221> VARIANT

<222>

(10)..(10)

<223> /replace="Tyr"

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 69

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 70

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

```

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

        consensus sequence"
<220><221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> /replace="Tyr"
<220><221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
        with respect to the annotations for said position"
<400> 70
Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr
1           5           10
<210> 71
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400>
> 71
Gly Phe Phe Phe Gln Gly Tyr Gly Ile His
1           5           10
<210> 72
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 72
Gly Phe Phe Phe Leu Gly Tyr Gly Ile His
1           5           10

```

<210> 73
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400>
 73
 Gly Tyr Thr Tyr Ile Gly Tyr Gly Ile His
 1 5 10

<210> 74
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 74
 Gly Trp Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Gly

<210> 75
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 75
 Gly Trp Ile Ser Pro Gln Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Gly

<210> 76

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 76

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Lys Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 77

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 77

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Leu Tyr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 78

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 78

Gly Trp Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 79

Gly Pro Phe Tyr Pro Trp Val Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 80

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400>

> 80

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr

20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100

105

110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 81

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 81

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr

20

25

30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Gly Trp Ile Ser Pro Gln Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100

105

110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 82

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 82

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr

20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 83

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 83

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Phe Phe Gln Gly Tyr

20 25 30
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 84

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 84

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr

20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 85

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 85

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Phe Phe Leu Gly Tyr

20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 86

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 86

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 87

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 87

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr

20 25 30
 Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115
 <210> 88
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 88
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr
 20 25 30
 Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 89

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 89

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr

20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 90

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 90

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Phe Phe Leu Gly Tyr

20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 91

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 91

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Phe Phe Leu Gly Tyr

20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 92

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 92

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr

20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Lys Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 93

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 93

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr

20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 94

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 94

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 95

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 95

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr

20 25 30
 Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Leu Tyr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Pro Phe Tyr Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 96

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 96

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Tyr Ile Gly Tyr
 20 25 30
 Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 97

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 97

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr

20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 98

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 98

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr

20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 99

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 99

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105
<210> 100
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 100

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 101

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 101

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 102

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 102

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 103

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 103

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Gln Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 104

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 104

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 105

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 105

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

 100 105
 <210> 106
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 106
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Ser Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 107

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 107

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Lys Pro

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 108

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 108

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Lys Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 109

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 109

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Lys Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Gln Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 110

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 110

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 111

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 111

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Ser Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 112

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 112

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Ser Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 113

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 113

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Trp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Lys Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 114

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 114

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 115

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 115

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 116

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 116

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20

25

30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Phe Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 117

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 117

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Phe Ala Ser Phe Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 118

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic consensus sequence"

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Trp" or "Tyr" or "Phe" or "Leu"

```

<220><221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
        with respect to the annotations for said position"
<220><221> VARIANT
<222> (4)..(4)

<223> /replace="Ser" or "Tyr" or "Trp"
<220><221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> /replace="Arg"
<220><221> misc_feature
<222> (4)..(5)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
        with respect to those in the annotations for said positions"
<220><221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> /replace="Pro" or "Arg" or "Lys" or "Trp"
<220><221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
        with respect to the annotations for said position"

<400> 118
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1          5
<210> 119
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        consensus sequence"
<220><221> VARIANT
<222> (3)..(3)

```

```

<223> /replace="Phe" or "Gly" or "Asp" or "Tyr"
<220><221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> /replace="Pro" or "Ser" or "Ala"
<220><221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> /replace="Thr" or "Asn"
<220><221> VARIANT
<222> (6)..(6)

<223> /replace="Tyr" or "Asp" or "Ser"
<220><221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> /replace="Gln" or "Ser" or "Lys" or "Leu"
<220><221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> /replace="Pro" or "Thr"
<220><221> misc_feature
<222> (3)..(8)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
        with respect to those in the annotations for said positions"
<400> 119
Gln Gln Ser Tyr Tyr Thr Pro Phe Thr
1           5
<210> 120
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        consensus sequence"
<220><221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> /replace="Tyr"

```

```

<220><221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> /replace="Asn" or "Thr"
<220><221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> /replace="Tyr"
<220><221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> /replace="Gln" or "Ile" or "Ser" or "Tyr"
<220><221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> /replace="Tyr"
<220><221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> /replace="Ser"
<220
><221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> /replace="Gly" or "Ser"
<220><221> misc_feature
<222> (2)..(8)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
        with respect to those in the annotations for said positions"
<400> 120
Gly Phe Phe Phe Leu Gly Tyr Ala Ile His
1           5           10
<210> 121
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        consensus sequence"
<
220><221> VARIANT

```

```

<222> (1)..(1)
<223> /replace="Gly"
<220><221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> /replace="Ser"
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
        with respect to those in the annotations for said positions"
<220><221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> /replace="Ser" or "Gln" or "Tyr"
<220><221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> /replace="Ser"
<220><221> misc_feature
<222> (6)..(7)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

        with respect to those in the annotations for said positions"
<220><221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> /replace="Lys" or "Leu" or "Tyr"
<220><221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> /replace="Tyr"
<220><221> VARIANT
<222> (11)..(11)
<223> /replace="Ser"
<220><221> misc_feature
<222> (9)..(11)
<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
        with respect to those in the annotations for said positions"
<400> 121

```

Ala Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 122

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus sequence"

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Gly"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
with respect to the annotations for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="Phe"

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> /replace="Tyr" or "Ser"

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> /replace="Pro"

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> /replace="Trp"

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="Val"

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(14)

<223> /replace=" "

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(14)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(14)

<223> /note="When present, this region is present in its entirety"

<400> 122

Gln Pro Thr His Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala Met Asp

1 5 10 15

Tyr

<210> 123

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

Ala Ser Ser Thr Glu Lys Phe Pro Asp Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln

1 5 10 15

Leu Val Cys Trp Gln Ala Gly Thr Thr Pro Trp Asn Ile Phe

20 25 30

<210> 124

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

Ala Ser Leu Ile Pro Glu Phe Ser Asp Gly Phe Trp Thr Gly Ser Gln

1 5 10 15

Leu Ala Cys Trp Thr Asn Ser Glu Thr Pro Trp Ser Tyr Phe

20 25 30

<210> 125

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Val Pro Leu Thr Gln Gly Glu Tyr Met Ile Pro Cys Glu Lys Val Ser

1 5 10 15

Thr Leu

<210> 126

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

Ala Gly Phe Pro Leu Asn Gln Ser Glu Val Leu Ala Ser Val

1 5 10

<210> 127

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 127

Glu Lys Phe Pro

1

<210> 128

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 128

Gln Leu Val Cys Trp Gln Ala

1 5

<210> 129

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 129

Pro Phe Ser Pro Trp

1 5

<210> 130

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

Asp Val Ala Thr Ser Gln Asp Asp Cys Tyr

1 5 10

<210> 131

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 131

Met Gly Ala Gly Leu Asn Tyr Glu Cys Tyr

1 5 10

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 132

Ser Gln Ala Gly Lys Thr Leu Cys Leu

1 5

<210> 133
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 133
 Ser Val Ser Ser Ala Val
 1 5

<210> 134
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 134
 Tyr Ser Ala Ser Ser
 1 5

<210> 135
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 135
 Tyr Ser Ser Ser Tyr Ser Pro Val
 1 5

<210> 136
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 136

Ser Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Pro Leu

1 5

<210> 137

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 137

Ser Tyr Ser Tyr Ser Leu Ile

1 5

<210> 138

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 138

Ser Ser Ser Ser Leu Phe

1 5

<210> 139

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 139

Tyr Tyr Tyr Ser Leu Phe

1 5

<210> 140

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 140

Ser Tyr Tyr Ser Tyr Ser Leu Val

1 5

<210> 141

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 141

Ser Tyr Ser Tyr Ser Ser Pro Ile

1 5

<210> 142

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 142

Ser Ser Ser Ser Tyr Ser Pro Leu

1 5

<210> 143

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 143

Ser Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Ile

1 5

<210> 144

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 144

Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Val

1 5

<210> 145

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 145

Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe

1 5

<210> 146

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 146

Tyr Ser Tyr Ser Tyr Ser Pro Ile

1 5

<210> 147

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 147

Tyr Ser Tyr Tyr Ser Leu Phe

1 5

<210> 148

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 148

Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Val

1 5

<210> 149

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 149

Ser Tyr Tyr Tyr Ser Pro Phe

1 5

<210> 150

<211

> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 150

Ser Tyr Ser Tyr Pro Val

1 5

<210> 151

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 151

Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Leu Leu

1 5

<210> 152

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 152

Ser Tyr Tyr Tyr Pro Leu

1 5

<210> 153

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 153

Phe Tyr Ser Ser Tyr Ile

1 5

<210> 154

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 154

Ile Tyr Tyr Ser Ser Met

1 5

<210> 155

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 155

Phe Tyr Tyr Tyr Ser Met

1 5

<210> 156

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 156

Ile Tyr Ser Tyr Ser Met

1 5

<210> 157

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 157

Leu Ser Tyr Ser Tyr Ile

1 5

<210> 158

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 158

Phe Tyr Tyr Ser Ser Ile

1 5

<210> 159

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 159

Phe Ser Ser Tyr Tyr Ile

1 5

<210> 160

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 160

Val Ser Tyr Tyr Tyr Ile

1 5

<210> 161

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 161

Val Ser Ser Ser Tyr Met

1 5

<210> 162

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 162

Val Ser Ser Ser Ser Met

1 5

<210> 163

<211> 6

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 163
 Phe Tyr Tyr Ser Tyr Met
 1 5

<210> 164
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 164
 Phe Tyr Ser Tyr Ser Met
 1 5

<210> 165
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 165
 Leu Tyr Tyr Ser Ser Ile
 1 5

<210> 166
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<
 220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 166

Val Ser Ser Ser Tyr Ile

1 5

<210> 167

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 167

Val Tyr Tyr Ser Tyr Met

1 5

<210> 168

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 168

Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Ser Ser Thr Tyr

1 5 10

<210> 169

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 169

Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr

1 5 10

<210> 170

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 170

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr

1 5 10

<210> 171

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 171

Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser

1 5 10

<210> 172

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 172

Ser Ile Tyr Ser Ser Tyr Gly Ser Thr Tyr

1 5 10

<210> 173

<211> 10

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 173
 Tyr Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Ser Thr Ser
 1 5 10

<210> 174

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 174
 Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser
 1 5 10

<210> 175

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 175
 Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Ser Thr Ser
 1 5 10

<210> 176

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 176

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr

1 5 10

<210> 177

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 177

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Ser Thr Tyr

1 5 10

<210> 178

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 178

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Ser Ser Thr Ser

1 5 10

<210> 179

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 179

Tyr Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr

1 5 10

<210> 180

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 180

Ser Ile Tyr Ser Ser Ser Gly Tyr Thr Ser

1 5 10

<210> 181

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 181

Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Ser Tyr Thr Tyr

1 5 10

<210> 182

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 182

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser

1 5 10

<210> 183

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 183
 Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Ser Ser Thr Tyr
 1 5 10

<210> 184

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 184
 Arg Ser Ser Ser Tyr Lys Ile Ser Gly Tyr Glu Leu Met Tyr Tyr Glu
 1 5 10 15
 Tyr Ala Met Asp
 20

<210> 185

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 185
 Arg Asp Gly Met Tyr Tyr Arg Gly Phe Asp
 1 5 10

<210> 186

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 186

Arg Asn Ser Tyr Gly Tyr Arg Ala Leu Asp

1 5 10

<210> 187

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 187

Arg Ala Tyr Ser Met Tyr Pro Trp Asn Val Gly Phe Asp

1 5 10

<210> 188

<211> 18

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 188

Arg Ser Tyr His His Ser Asp Lys Tyr Tyr Tyr Ala Trp Ser Tyr Ala

1 5 10 15

Leu Asp

<210> 189

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 189

Arg Gly Gly Tyr Trp Tyr Tyr Phe Tyr Asp Gly Gly Ile Asp

1 5 10

<210> 190

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 190

Arg Lys Ser Asn Arg Tyr Ser Arg Val Tyr Phe Gly Met Asp

1 5 10

<210> 191

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400>

> 191

Arg Ile Gly Ser Tyr Phe Tyr Tyr Tyr Gly Tyr Asn Val His Tyr Asn

1 5 10 15

Gly Met Asp

<210> 192

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 192

Arg Tyr Gly Tyr Ser Gly Lys Gly Phe Asp

1 5 10

<210> 193

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223>

> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 193

Arg Pro Asn Arg Tyr Gly Leu Val Gly Ser Gly Leu Asp

1 5 10

<210> 194

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 194

Arg Lys Ser Asn Arg Tyr Ser Arg Val Ser Phe Gly Met Asp

1 5 10

<210> 195

<211> 17

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 195

Arg Gln Pro Thr His Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala Met

1 5 10 15

Asp

<210> 196

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 196

Arg Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Gly Ile Asp

1 5 10

<210> 197

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 197

Arg Tyr Ser Tyr Tyr Trp Leu Ala Leu Asp

1 5 10

<210> 198

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 198

Arg Tyr Ser Asp Tyr Tyr Tyr Phe Phe Pro Ser Tyr Val Tyr Gly Gly

1 5 10 15

Ala Met Asp

<210> 199

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 199

Arg Glu Ser Phe Tyr Tyr Thr Asn Tyr Ala Phe Asp

1 5 10

<210> 200

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 200

Arg Tyr Phe Trp Ser Tyr Asn Ser Phe Ala Gln Ser Phe Trp Ala Met

1 5 10 15

Asp

<210> 201

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 201

Arg Ser Gln Thr Thr Asp Tyr Leu Gly Phe Tyr Ile Ser Tyr Thr Gly

1 5 10 15

Ala Leu Asp

<210> 202

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 202

Arg Tyr Gly Phe Tyr Tyr Ser Tyr Glu Tyr Ala Phe Asp

1 5 10

<210> 203

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 203

Tyr Ser Tyr Ser Tyr Ser Val

1 5

<210> 204

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 204

Ser Trp Ala Ser Trp

1 5

<210> 205

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 205

Trp Tyr Ala Ser Trp

1 5

<210> 206

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 206

Trp Trp Ala Ser Ser

1 5

<210>

207

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 207

Ser Tyr Ala Ser Tyr

1 5

<210> 208

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 208
 Tyr Ser Tyr Ser Leu Leu
 1 5

<210> 209

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 209

Tyr Tyr Pro Leu

1

<210> 210

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 6xHis tag"

<400> 210

His His His His His His

1 5