



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0097913
 (43) 공개일자 2011년08월31일

(51) Int. Cl.

C07K 16/46 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7014926

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년12월04일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2011년06월28일

(86) 국제출원번호 PCT/US2009/066815

(87) 국제공개번호 WO 2010/065882

국제공개일자 2010년06월10일

(30) 우선권주장

61/200,877 2008년12월04일 미국(US)

61/212,071 2009년04월07일 미국(US)

(71) 출원인

아보트 러보러터리즈

미국 일리노이주 60064-6008 아보트 파크 아보트
 파크 로드 100 디파트먼트 377 빌딩 에이피6
 에이-1

(72) 발명자

제이콥 클라리사 지.

미국 일리노이주 60030 그레이스레이크 아멜리아
 코트 820

우 청빈

미국 매사추세츠주 01545 슈루즈버리 프로스펙트
 스트리트 386

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장준

전체 청구항 수 : 총 75 항

(54) 이원 가변 도메인 면역글로불린 및 이의 용도

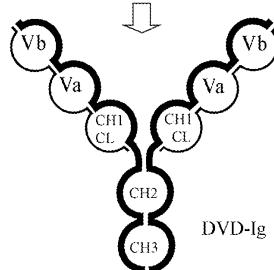
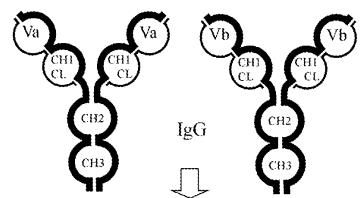
(57) 요 약

본 발명은 조작된 다가 및 다중특이적인 결합 단백질, 이의 제조 방법, 및 구체적으로는 질병의 예방, 진단 및/ 또는 치료시 이들의 용도에 관한 것이다.

대 표 도

도 1

A



B

| | |
|---------|---|
| DVD1-Ig | 5' [VHb] - [VHb] - [CH1(Fe)(HC)] - 3' |
| | 5' [VL α] - [VL β] - [HC κ] - 3' |
| DVD2-Ig | 5' [VHb] - [VHb] - [CH1(Fe)(HC)] - 3' |
| | 5' [VL α] - [VL β] - [HC κ] - 3' |
| 3D12.E3 | 5' [VHb] - [VHb] - [CH1(Fe)(HC)] - 3' |
| 키메라 | 5' [VL α] - [HC κ] - 3' |
| 13F5.G5 | 5' [VHb] - [VHb] - [CH1(Fe)(HC)] - 3' |
| 키메라 | 5' [VL β] - [HC κ] - 3' |

(72) 발명자

월터 칼 에이.

미국 일리노이주 60085 워키건 웨스트 포레스트 애비뉴 4458

가유르 타릭

미국 매사추세츠주 01746 홀리스턴 워싱턴 스트리트 1014

특허청구의 범위

청구항 1

폴리펩타이드 쇄를 포함하는 결합 단백질로서, 상기 폴리펩타이드 쇄는 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ 을 포함하고, 여기서

$VD1$ 은 제1 중쇄 가변 도메인이고;

$VD2$ 는 제2 중쇄 가변 도메인이고;

C 는 중쇄 불변 도메인이고;

$X1$ 은 링커이고, 단, $X1$ 이 $CH1$ 은 아니고;

$X2$ 는 Fc 영역이고;

$(X1)_n$ 은 $(X1)_0$ 또는 $(X1)_1$ 이고;

$(X2)_n$ 은 $(X2)_0$ 또는 $(X2)_1$ 이고;

상기 중쇄는 분해 부위를 포함하는, 결합 단백질.

청구항 2

폴리펩타이드 쇄를 포함하는 결합 단백질로서, 상기 폴리펩타이드 쇄는 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ 을 포함하고, 여기서

$VD1$ 은 제1 경쇄 가변 도메인이고;

$VD2$ 는 제2 경쇄 가변 도메인이고;

C 는 경쇄 불변 도메인이고;

$X1$ 은 링커이고, 단, $X1$ 이 $CH1$ 은 아니고;

$X2$ 는 Fc 영역을 포함하지 않고;

$(X1)_n$ 은 $(X1)_0$ 또는 $(X1)_1$ 이고;

$(X2)_n$ 은 $(X2)_0$ 또는 $(X2)_1$ 이고;

상기 경쇄는 분해 부위를 포함하는, 결합 단백질.

청구항 3

제1 및 제2 폴리펩타이드 쇄를 포함하는 결합 단백질로서, 상기 제1 폴리펩타이드 쇄는 제1 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ 을 포함하고, 여기서

$VD1$ 은 제1 중쇄 가변 도메인이고;

$VD2$ 는 제2 중쇄 가변 도메인이고;

C 는 중쇄 불변 도메인이고;

$X1$ 은 링커이고, 단, $X1$ 이 $CH1$ 은 아니고;

$X2$ 는 Fc 영역이고;

상기 제2 폴리펩타이드 쇄는 제2 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ 을 포함하고, 여기서

$VD1$ 은 제1 경쇄 가변 도메인이고;

$VD2$ 는 제2 경쇄 가변 도메인이고;

C 는 경쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고, 단, X1이 CH1은 아니고;

X2는 Fc 영역을 포함하지 않고;

(X1)n은 (X1)0 또는 (X1)1이고;

(X2)n은 (X2)0 또는 (X2)1이며,

상기 중쇄 및 경쇄 중 적어도 하나는 분해 부위를 포함하는, 결합 단백질.

청구항 4

4개의 폴리펩타이드 쇄를 포함하는, 2개의 항원에 결합할 수 있는 결합 단백질로서, 여기서, 2개의 폴리펩타이드 쇄는 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n을 포함하고, 여기서

VD1은 제1 중쇄 가변 도메인이고;

VD2는 제2 중쇄 가변 도메인이고;

C는 중쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고, 단, X1이 CH1은 아니고;

X2는 Fc 영역이고;

2개의 폴리펩타이드 쇄는 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n을 포함하고, 여기서

VD1은 제1 경쇄 가변 도메인이고;

VD2는 제2 경쇄 가변 도메인이고;

C는 경쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고, 단, X1이 CH1은 아니고;

X2는 Fc 영역을 포함하지 않고;

(X1)n은 (X1)0 또는 (X1)1이고;

(X2)n은 (X2)0 또는 (X2)1이고;

상기 중쇄 및 경쇄 중의 적어도 하나는 분해 부위를 포함하는, 결합 단백질.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, n이 0인, 결합 단백질.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, X1 또는 X2가 서열번호 1 내지 62, TVA, 및 AS로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열인, 결합 단백질.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질이 분해가능하여 상기 VD1 및 VD2 중의 적어도 하나에 대한 결합이 향상되는, 결합 단백질.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질이 엔테로키나제, 트롬빈, 프리시션(PreScission), 담배 식각 바이러스 프로테아제(Tobacco Etch Virus protease: TEV), 및 조직 플라스미노겐 활성화인자(tPA) + 프롤린으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 효소 또는 제제에 의해 분해되는, 결합 단백질.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질이 아연-의존성 엔도펩티다제, 매트릭스 메탈로

프로테이나제(MMP), 세랄라이신, 아스타신, 아다말라이신, MMP-1; MMP-2; MMP-3; MMP-7; MMP-8; MMP-9; MMP-10; MMP-11; MMP-12; MMP-13; MMP-14; MMP-15; MMP-16; MMP-17; MMP-18; MMP-19; MMP-20; MMP-21; MMP-22; MMP-23A; MMP-23B; MMP-24; MMP-25; MMP-26; MMP-27; MMP-28; 디스인테그린 및 메탈로프로테이나제(ADAM); ADAM17; ADAMTS1; ADAM1; ADAM10; ADAM8; ADAMTS4; ADAMTS13; ADAM12; ADAM15; ADAM9; ADAMTS5; ADAM33; ADAM11; ADAM2; ADAMTS2; ADAMTS9; ADAMTS3; ADAMTS7; ADAM22; ADAM28; ADAMTS12; ADAM19; ADAMTS8; ADAM29; ADAM23; ADAM3A; ADAM18; ADAMTS6; ADAM7; ADAMDES1; ADAM20; ADAM6; ADAM21; ADAM3B; ADAMTSL3; ADAMTSL4; ADAM30; ADAMTS20; ADAMTSL2; 카스파제; 카스파제 1-12, 카스파제 14; 카텝신; 카텝신 G; 카텝신 B; 카텝신 D; 카텝신 L1; 카텝신 C; 카텝신 K; 카텝신 S; 카텝신 H; 카텝신 A; 카텝신 E; 카텝신 L; 카텝신 Z; 카텝신 F; 카텝신 G-유사 2; 카텝신 L-유사 1; 카텝신 W; 카텝신 L-유사 2; 카텝신 L-유사 3; 카텝신 L-유사 4; 카텝신 L-유사 5; 카텝신 L-유사 6; 카텝신 L-유사 7; 카텝신 O; 칼파인; 칼파인 3; 칼파인 10; 칼파인 1(mu/1) 대형 서브유닛; 칼파인, 소형 서브유닛 1; 칼파인 2, (mu/1); 대형 서브유닛; 칼파인 9; 칼파인 11; 칼파인 5; 칼파인 6; 칼파인 13; 칼파인 8; 칼파인, 소형 서브유닛 2; 칼파인 15; 칼파인 12; 칼파인 7; 및 칼파인 8로 이루어진 그룹 중에서 선택된 효소 또는 제제에 의해 분해되는, 결합 단백질.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 분해 부위가 적어도 하나의 VD1과 VD2 사이에 존재하는, 결합 단백질.

청구항 11

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 분해 부위가 적어도 하나의 링커내에 존재하는, 결합 단백질.

청구항 12

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 VD1 또는 VD2 중의 적어도 하나가, 상기 VD1과 VD2 사이에서 분해가 일어날 때까지 이의 표적에 결합하지 않는, 결합 단백질.

청구항 13

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질의 링커가 효소에 의해 선택적으로 분해된, 결합 단백질.

청구항 14

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질의 링커가 제조 과정 동안 효소에 의해 선택적으로 분해된, 결합 단백질.

청구항 15

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질의 링커가, DVD-Ig가 적어도 하나의 표적에 근접한 경우 효소에 의해 선택적으로 분해된, 결합 단백질.

청구항 16

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질이, 상기 DVD-Ig가 적어도 하나의 표적에 결합하는 경우 효소에 의해 선택적으로 분해되는, 결합 단백질.

청구항 17

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 영역이 천연 서열 Fc 영역 및 변이 서열 Fc 영역으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 결합 단백질.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 Fc 영역이 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, 및 IgD로부터의 Fc 영역으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 결합 단백질.

청구항 19

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질이 표면 플라스몬 공명에 의해 측정시 적어도 약 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$; 적어도 약 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$; 적어도 약 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$; 적어도 약 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$; 및 적어도 약 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 상기 하나 이상의 표적에 대한 온 속도 상수(on rate constant: Kon)를 갖는, 결합 단백질.

청구항 20

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질이 표면 플라스몬 공명에 의해 측정시 최대 약 10^{-3} s^{-1} ; 최대 약 10^{-4} s^{-1} ; 최대 약 10^{-5} s^{-1} ; 및 최대 약 10^{-6} s^{-1} 로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 상기 하나 이상의 표적에 대한 오프 속도 상수(off rate constant: Koff)를 갖는, 결합 단백질.

청구항 21

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질이 최대 약 10^{-7} M ; 최대 약 10^{-8} M ; 최대 약 10^{-9} M ; 최대 약 10^{-10} M ; 최대 약 10^{-11} M ; 최대 약 10^{-12} M ; 및 최대 10^{-13} M 로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 상기 하나 이상의 표적에 대한 해리 상수(K_D)를 갖는, 결합 단백질.

청구항 22

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 따른 결합 단백질을 포함하고, 면역부착 분자, 영상화제, 치료제 및 세포독성제로 이루어진 그룹 중에서 선택된 제제를 추가로 포함하는, 결합 단백질 접합체.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 제제가 방사성표지, 효소, 형광 표지, 발광 표지, 생물발광 표지, 자성 표지 및 바이오틴으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 영상화제인, 결합 단백질 접합체.

청구항 24

제22항에 있어서, 상기 영상화제가 ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , 및 ^{153}Sm 으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 방사성표지인, 결합 단백질 접합체.

청구항 25

제22항에 있어서, 상기 제제가 항대사제, 알킬화제, 항생제, 성장 인자, 사이토킨, 항-헬관형성제, 항-유사분열제, 안트라사이클린, 독소 및 아폽토시스제로 이루어진 그룹 중에서 선택된 치료제 또는 세포독성제인, 결합 단백질 접합체.

청구항 26

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질이 결정화된 결합 단백질인, 결합 단백질.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 결정이, 무담체 약제학적 제어 방출 결정인, 결합 단백질.

청구항 28

제1항 내지 제11항 중의 어느 한 항에 따른 결합 단백질 아미노산 서열을 암호화하는 분리된 핵산.

청구항 29

제18항에 따른 분리된 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 벡터가 pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, pcDNA3.1 TOPO, pEF6 TOPO 및 pBJ로 이루-

어진 그룹 중에서 선택되는, 벡터.

청구항 31

제29항에 따른 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 숙주 세포가 원핵 세포인, 숙주 세포.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 숙주 세포가 이. 콜라이(*E. Coli*)인, 숙주 세포.

청구항 34

제31항에 있어서, 상기 숙주 세포가 진핵 세포인, 숙주 세포.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 진핵 세포가 원생생물 세포, 동물 세포, 식물 세포 및 진균 세포로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 숙주 세포.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 동물 세포가 포유동물 세포, 조류 세포, 및 곤충 세포로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 숙주 세포.

청구항 37

제34항에 있어서, 상기 숙주 세포가 CHO 세포인, 숙주 세포.

청구항 38

제34항에 있어서, 상기 숙주 세포가 COS인, 숙주 세포.

청구항 39

제34항에 있어서, 상기 숙주 세포가 효모 세포인, 숙주 세포.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 효모 세포가 사카로마이세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*)인, 숙주 세포.

청구항 41

제36항에 있어서, 상기 숙주 세포가 곤충 Sf9 세포인, 숙주 세포.

청구항 42

제31항 내지 제41항 중의 어느 한 항에 따른 숙주 세포를 상기 결합 단백질을 생산하기에 충분한 조건하에 배양 배지 중에서 배양함을 포함하는, 결합 단백질의 생산 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 생산된 상기 결합 단백질의 50% 내지 75%가 이중 특이적인 4가 결합 단백질인, 방법.

청구항 44

제42항에 있어서, 생산된 상기 결합 단백질의 75% 내지 90%가 이중 특이적인 4가 결합 단백질인, 방법.

청구항 45

제42항에 있어서, 생산된 상기 결합 단백질의 90% 내지 95%가 이중 특이적인 4가 결합 단백질인, 방법.

청구항 46

제42항의 방법에 따라 생산된 단백질.

청구항 47

제1항 내지 제27항 중의 어느 한 항에 따른 결합 단백질, 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 48

제47항에 있어서, 적어도 하나의 추가의 치료제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 추가의 치료제가 치료제, 영상화제, 세포독성제, 혈관형성 억제제, 키나제 억제제, 공동-자극 분자 차단제, 부착 분자 차단제, 항-사이토킨 항체 또는 이의 기능적 단편, 메토트렉세이트, 사이클로스포린, 라파마이신, FK506, 검출가능한 표지 또는 리포터, TNF 길항제, 항류미티스제, 근육 이완제, 마취약, 비-스테로이드성 소염 약물(NSAID), 진통제, 마취제, 진정제, 국소 마취제, 신경근 차단제, 항미생물제, 항건선제, 코르티코스테로이드, 동화작용 스테로이드, 에리트로포이에틴, 면역화, 면역글로불린, 면역억제제, 성장호르몬, 호르몬 대체 약물, 방사약제, 항우울증제, 항정신병제, 자극제, 천식 약물, 베타 작용제, 흡입된 스테로이드, 에피네프린 또는 유사체, 사이토킨, 및 사이토킨 길항제로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 50

제1항 내지 제27항 중의 어느 한 항에 따른 결합 단백질을 대상체에게 투여함으로써 치료를 달성하는, 질병 또는 장애에 대해 대상체를 치료하는 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 장애가 류마티스 관절염, 골관절염, 소아 만성 관절염, 패혈성 관절염, 라임 관절염(Lyme arthritis), 건선 관절염, 반응성 관절염, 척추관절병, 전신홍반루푸스, 크론병(Crohn's disease), 궤양성 대장염, 염증성 장질환, 인슐린 의존성 진성당뇨병, 갑상선염, 천식, 알레르기병, 건선, 피부염 피부경화증, 이식편 대 숙주병, 기관 이식 거부, 기관 이식과 관련된 급성 또는 만성 면역병, 사르코이드증, 죽상경화증, 파종 혈관내 응고, 가와사키병(Kawasaki's disease), 그레이브스병(Grave's disease), 신증후군, 만성피로증후군, 베게너 육아증증, 헤노호-쇤라인 자색반(Henoch-Schoenlein purpura), 신장의 혼미경적 혈관염, 만성 활성 간염, 포도막염, 패혈성 쇼크, 독성 쇼크 증후군, 패혈 증후군, 악액질, 감염성 장애, 기생충병, 후천성 면역결핍증후군, 급성 횡단 척수염, 헌팅تون 무도병(Huntington's chorea), 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 뇌졸중, 원반쓸개판경화증, 용혈 빈혈, 악성암, 심장부전, 심근경색, 애디슨병(Addison's disease), 산발 다선성 기능이상(sporadic polyglandular deficiency) 제I형 및 다선성 기능이상 제II형, 슈미트 증후군(Schmidt's syndrome), 성인(급성) 호흡곤란증후군, 탈모증, 원형탈모증, 혈청음성 관절병증, 관절병증, 라이터병(Reiter's disease), 건선 관절병증, 궤양성 대장염 관절병증, 장병원성 윤활막염, 클라미디아, 예르시니아 및 살모넬라 관련 관절병증, 척추관절병증, 죽종병(atheromatous disease)/동맥경화증, 아토피성 알레르기, 자가면역 수포성 장애, 보통천포창, 낙엽천포창, 유사천포창, 선형 IgA 질병, 자가면역용혈빈혈, 콤스(Coombs) 양성 용혈빈혈, 후천성 악성빈혈, 소아 악성빈혈, 근통성 뇌염/로얄 프리병(Royal Free Disease), 만성 점막피부칸디다증, 거세포동맥염, 원발성 경화간염, 잠재성 자가면역 간염, 후천성 면역결핍병 증후군, 후천성 면역결핍성 관련 병, B형 간염, C형 간염, 일반적인 변화된 면역결핍증(일반적인 가변 저감마글로불린혈증), 확장된 심근병, 여성 불임, 난소 기능상실, 조기 성숙 난소 기능상실, 섬유화 폐병, 잠재성 섬유화 폐병, 염증후 간질성 폐병, 간질성 폐렴, 연결조직병 관련 간질 폐병, 혼합된 연결조직병 관련 폐병, 전신경화증 관련 간질 폐병, 류마티스 관절염 관련 간질 폐병, 전신홍반루푸스 관련 폐병, 피부근염/다발근육염 관련 폐병, 쇼그렌병 관련 폐병, 강직척추염 관련 폐병, 혈관병성 확산 폐병, 혈철증 관련 폐병, 약물-유도된 간질 폐병, 섬유증, 방사선 섬유증, 폐쇄세기관지염, 만성 호산구 폐렴, 립프구 침윤성 폐병, 감염후 간질성 폐 장애, 통풍관절염, 자가면역 간염, 제1형 자가면역 간염(일반적인 자가면역 또는 낭창양 간염), 제2형 자가면역 간염(항-LKM 항체 간염), 자가면역 매개된 저혈당, 흑색가시세포증이 있는 B

형 인슐린 내성, 부갑상선저하증, 기관 이식과 관련된 급성 면역병, 기관 이식과 관련된 만성 면역병, 골관절염, 원발 경화성 담관염, 제1형 건선, 제2형 건선, 특발성 백혈구감소증, 자가면성 호중구백혈구감소증, 신장병 NOS, 사구체신염, 신장의 현미경적 혈관염, 라임병, 원반모양홍반루푸스, 특발성 남성 불임 또는 NOS, 정자 자가면역, 다발경화증(모든 아형), 교감눈염증, 연결조직병에 대해 2차적인 폐 고혈압, 군파스춰 증후군(Goodpasture's syndrome), 결절다발동맥염의 폐증상, 급성 류마티스염, 류마티스 척추염, 스틸병(Still's disease), 전신경화증, 쇼그伦 증후군(Sjogren's syndrome), 다카야스병(Takayasu's disease)/동맥염, 자가면역성 저혈소판자색반, 특발성 저혈소판자색반, 자가면역 갑상선병, 갑상선파다증, 갑상선종 자가면역 갑상선기능저하증[하시모토병(Hashimoto's disease)], 위축성 자가면역 갑상선기능저하증, 원발성 점액수종, 수정체성 포도막염, 원발성 혈관염, 백반증 급성 간병, 만성 간병, 알코올성 간경화증, 알코올-유도된 간 손상, 담즙정체(choleosatatis), 특이 간병, 약물-유도된 간병, 비-알코올성 지방간염, 알레르기 및 천식, B군 스트렙토코커스(GBS) 감염, 정신장애(예: 우울증 및 전신분열병), Th2형 및 Th1형 매개된 질병, 급성 및 만성 통증(통증의 상이한 형태), 및 폐암, 유방암, 위암, 방광암, 결장암, 췌장암, 난소암, 전립선암 및 직장암과 같은 암 및 혈액암(백혈병 및 림프종), 아베타리포프로테미아(Abetalipoproteinemia), 말단청색증, 급성 및 만성 기생충병 또는 감염성 과정, 급성 백혈병, 급성 림프모구백혈병(ALL), 급성 골수백혈병(AML), 급성 또는 만성 세균 감염, 급성 췌장염, 급성 신장 부전, 선암종, 이소성 심방박동, AIDS 치매 합병증, 알코올-유도된 간염, 알레르기 결막염, 알레르기 접촉성 피부염, 알레르기성 비염, 동종이식 거부, 알파-1-안티트립신 결핍증, 근육위축 측삭경화증, 빈혈, 협심증, 척수전각 세포 변성, 항 cd3 치료요법, 항인지질증후군, 항-수용체 과감작반응, 대동맥 및 말초동맥류, 대동맥박리, 동맥성 고혈압, 동맥경화증, 동정맥루(arteriovenous fistula), 실조, 심방세동(지속되거나 발작성), 심방조동, 방실차단, B 세포 림프종, 골 이식거부, 골수 이식(BMT) 거부, 다발갈래차단, 버킷립프종(Burkitt's lymphoma), 화상, 심장부정맥, 심장 스턴 증후군(cardiac stun syndrome), 심장 종양, 심근병증, 심폐우회술 염증 반응, 연골 이식 거부, 대뇌 피질변성, 대뇌 장애, 혼돈된 또는 다소성 심방빈맥(chaotic or multifocal atrial tachycardia), 화학치료요법 관련 장애, 만성 골수세포 백혈병(CML), 만성 알코올중독, 만성 염증병리학, 만성 림프구백혈병(CLL), 만성 폐쇄성 폐병(COPD), 만성 살리실레이트 중독, 직장결장 암종, 울혈성 심장기능상실, 결막염, 접촉성 피부염, 폐심장, 관상동맥병, 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease), 배양 음성 폐혈증(culture negative sepsis), 낭성 섬유증, 사이토kin 치료요법 관련 장애, 권투선수 치매, 말이집탈락병, 텅기출혈혈, 피부염, 피부과 상태(dermatologic condition), 당뇨병, 진성당뇨병, 당뇨병 성 죽상경화판 질병, 미만성 루이소체병, 확장형 울혈성 심근병증, 기저핵 장애, 중년 다운증후군(Down's Syndrome), CNS 도파민 수용체를 차단하는 약물에 의해 유도된 약물-유도된 운동장애, 약물 민감성, 습진, 뇌척수염, 심내막염, 내분비병, 후두개염, 엔슈타인-바르 바이러스 감염, 홍색사지통증, 추체외로 및 대뇌 장애, 가족성 혈구포식세포 림프조직구증(familial hematophagocytic lymphohistiocytosis), 태아 흉선 이식거부, 프리드라이히 운동실조증(Friedreich's ataxia), 기능적 말초동맥장애, 진균성 폐혈증, 가스파저, 위궤양, 사구체신장염, 임의의 기관 또는 조직의 이식 거부, 그람 음성 폐혈증, 그람 양성 폐혈증, 세포내 기관으로 인한 육아종, 텔세포백혈병, 할러보르덴-슈파츠병(Hallervorden-Spatz disease), 하시모토 갑상선염(hashimoto's thyroiditis), 견초열, 심장 이식거부, 혈색소침착증, 혈액투석, 용혈요독증후군/혈전용해성 저혈소판자색반병, 출혈, (A)형 간염, 히스다발 부정맥(His bundle arrhythmias), HIV 감염/HIV 신경병증, 호지킨병(Hodgkin's disease), 운동과다장애(hyperkinetic movement disorder), 과민반응(hypersensitivity reaction), 과민성 폐렴, 고혈압, 운동저하 장애(hypokinetic movement disorder), 시상하부-뇌하수체-부신축 평가(hypothalamic-pituitary-adrenal axis evaluation), 특발성 애디슨병, 특발성 폐 섬유증, 항체 매개된 세포독성, 무력증, 유아성 척수성 근육위축, 대동맥의 염증, 인플루엔자 a, 이온화 조사 노출(ionizing radiation exposure), 홍채섬모채염/포도막염/시신경염, 허혈-재관류 손상(ischemia-reperfusion injury), 허혈성 뇌졸중, 소아 류마티스관절염, 소아척수근육위축증, 카포시 육종(Kaposi's sarcoma), 신장 이식거부, 레기오넬라, 리슈만편모충증, 나병, 피질척수계의 병변, 지방부종, 간 이식거부, 림프부종, 말라리아, 악성 림프종, 악성 조직구증, 악성 흑색종, 수막염, 수막구균혈증, 대사성/특발성 질병, 편두통, 미토콘드리아 다중시스템 장애, 혼합된 연결조직병, 모노클로날 감마글로불린혈증, 다발골수종, 다발계통 변성(multiple systems degenerations)[멘셀 테제린-토마스 시-드래거(Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager) 및 마카도-조셉(Machado-Joseph)], 중증근육무력증, 마이코박테리움 아비움 인트라셀룰라레(mycobacterium avium intracellulare), 결핵균, 골수형성이상증후군, 심근경색, 심근허혈성 장애, 비인두암종, 신생아 만성폐병, 신장염, 신장증, 신경변성병, 신경성(I) 근육위축, 호중구감소성 열(neutropenic fever), 비-호지킨 림프종, 복부 대동맥 및 이의 분지의 폐색, 폐쇄성 동맥장애, okt3 치료요법, 고환염/부고환염, 고환염/정관절제 복구술(vasectomy reversal procedure), 장기비대, 골다공증, 췌장 이식거부, 췌장 암종, 부종양 증후군/악성 고칼슘혈증(hypercalcemia of malignancy), 부갑상선 이식거부, 골반염 장애, 연중비염, 심낭장애, 말초죽상경화성 장애, 말초혈관 장애, 복막염, 악성 빈혈, 폐포자충폐

염, 폐렴, POEMS 증후군(다발신경염, 장기비대, 내분비병, 모노클로날 gammopathy, 및 피부 변화 증후군), 관류후 증후군, 펌프후 증후군(post pump syndrome), MI후 심장절개 증후군, 자간전증, 진행핵상마비, 원발폐고혈압증, 조사 치료요법, 레이노 현상 및 질병, 레이노 장애(Raynoud's disease), 레프슐병(Refsum's disease), 정규의 협소 QRS 빈맥(regular narrow QRS tachycardia), 신장혈관고혈압, 재판류 손상, 제한심근병, 육종, 공피증, 노년무도병, 루이소체 치매(Senile Dementia of Lewy body type), 혈청음성 관절병증, 쇼크, 낫적혈구빈혈, 피부 동종이식 거부, 피부 변화 증후군, 소장 이식거부, 고형 종양, 특이적인 부정맥, 척수 운동실조, 척수소뇌변성, 스트렙토코커스성 근염, 소뇌의 구조적 병변, 아급성 경화범뇌염, 실신, 심혈관계의 매독, 전신아나필락시스, 전신 염증반응 증후군, 전신적으로 발병된 청소년성 관절염(systemic onset juvenile rheumatoid arthritis), T-세포 또는 FAB ALL, 모세혈관확장증, 폐쇄성 혈관혈전증, 저혈소판증, 독성, 이식술, 외상/출혈, 제III형 과민반응, 제IV형 과민증, 불안정 협심증, 요독증, 요로성폐혈증, 두드러기, 판막성심장병, 정맥류, 혈관염, 정맥 장애, 정맥 혈전증, 심실세동, 바이러스 및 진균 감염, 활성 뇌염/무균수막염, 활성-관련 적혈구포식성 증후군(vital-associated hemophagocytic syndrome), 베르니케-코르사코프 증후군(Wernicke-Lorsakoff syndrome), 월슨병(Wilson's disease), 임의의 기관 또는 조직의 이종이식 거부, 급성 관상 증후군(acute coronary syndrome), 급성특발다발신경염, 급성 염증성 탈수초다발성신경병증, 급성 허혈, 성인 스틸병(adult Still's disease), 원형탈모증, 과민증(anaphylaxis), 항-인지질항체 증후군, 재생불량빈혈, 동맥경화증, 아토 피습진, 아토피 피부염, 자가면역 피부염, 스트렙토코커스 감염 관련 자가면역 장애, 자가면역장병증, 자가면역 청력장애, 자가면역 램프세포증식증후군(ALPS), 자가면역 심근염, 자가면역 조기성숙 난소 기능상실, 안전염, 기관지확장증, 물집유사천포창, 심혈관병, 과국적 항인지질증후군, 복강장애, 경추증, 만성 허혈, 흉터유사천포창, 다발경화증 위험이 있는 임상적으로 분리된 증후군(cis), 결막염, 유아 발병 정신장애, 만성 폐쇄성 폐병(COPD), 눈물주머니염, 피부근육염, 당뇨망막병증, 진성당뇨병, 추간판탈출증, 추간판헤르니아, 약물 유도된 면역 용혈빈혈, 심내막염, 자궁내막증, 안구내염, 공막바깥염, 다형홍반, 심한 다형홍반(erythema multiforme major), 임신성 유사천포창(gestational pemphigoid), 길랑-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome: GBS), 건초열, 휴즈 증후군(Hughes syndrome), 특발성 파킨슨병, 특발성 간질 폐렴, IgE-매개된 알레르기, 면역용혈성빈혈, 봉입체 근염, 감염성 안구염증병, 염증성 말이집탈락병, 염증성 심장병, 염증성 신장병, IPF/UIP, 홍채염, 각막염, 건성각막결막염, 쿠스마울병(Kussmaul disease) 또는 쿠스마울-마이어병(Kussmaul-Meier disease), 랭드리 마비(Landry's paralysis), 랑게르란스세포조직구증, 그물울혈반, 원반황반변성, 혈미경다발혈관염, 베크테레브병(morbus bechterev), 운동신경장애, 점막 유천포창, 다발성 기관부전, 중증근육무력증, 골수형성이상증후군, 심근염, 신경뿌리장애, 신경병증, 비-A형 비-B형 간염, 시신경염, 뼈용해, 난소암, 소수관절형 JRA, 말초동맥폐색병(PAOD), 말초혈관병(PVD), 말초동맥병(PAD), 정맥염, 결절다발동맥염(또는 결절동맥주위염), 다발연골염, 류마티스성다발성근육통, 백모증, 다관절 JRA, 다내분비선 결핍성 증후군(polyendocrine deficiency syndrome), 다발근육염, 류마티스성 다발성 근육통(PMR), 펌프후 증후군(post-pump syndrome), 원발 파킨슨병(primary Parkinsonism), 전립선암 및 직장암 및 조혈성 악성종양(백혈병 및 램프종), 전립선염, 적혈구계 무형성증, 원발성 아드레닌부족증(primary adrenal sufficiency), 재발성 시신경척수염(recurrent neuromyelitis optica), 재협착, 류마티스성 심장병, 사포(sapho)(윤활막염, 여드름, 농포증, 뼈과다증, 및 낭성 섬유뼈염), 공피증, 이차성 아밀로이드증, 쇼크성 폐, 공막염, 영동뼈신경통, 이차 부신기능 부전, 실리콘 관련 연결조직병, 스네돈-윌킨슨 피부염(sneddon-wilkinson dermatosis), 강직 척추염, 스티븐스-존슨 증후군(Stevens-Johnson syndrome: SJS), 전신염증성 반응 증후군, 측두동맥염, 톡소플라스마성 망막염(toxoplasmic retinitis), 독성표피괴사용해, 횡단척수염, TRAPS(종양 괴사 인자 수용체, 제1형 알레르기 반응, 제II형 당뇨병, 두드러기, 일반적인 간질폐렴(UIP), 혈관염, 봄철결막염, 바이러스성 망막염, 보크트-고야나기-하라다 증후군(Vogt-Koyanagi-Harada syndrome: VKH syndrome), 습윤 황반변성, 상처 치유, 예르시니아 및 살모넬라 관련 관절병으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 방법.

청구항 52

제50항에 있어서, 상기 대상체에게 투여함이 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 동맥내, 기관지내, 복부내, 낭내, 연골내, 강내(intracavitory), 복강내(intracelial), 소뇌내, 뇌심실내, 대장내, 자궁경부내, 위내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심장주위내, 복강내, 흉막내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척수내, 윤활막내, 내흉내, 자궁내, 방광내, 일시, 질내, 직장내, 구강내, 설하, 비강내 및 경피 중에서 선택된 적어도 하나의 방식으로 수행되는, 방법.

청구항 53

2개의 항원에 결합할 수 있는 이원 가변 면역글로불린을 생성하는 방법으로서,

- a) 제1 항원에 결합할 수 있는 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부를 수득하는 단계;
- b) 제2 항원에 결합할 수 있는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부를 수득하는 단계;
- c) VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n을 포함하는 제1 및 제3 폴리펩타이드 쇄를 작제하는 단계로서, 여기서

VD1은 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고;

VD2는 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이며;

C는 중쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이며, 단, X1이 CH1은 아니고,

X2는 Fc 영역이며;

(X1)n은 (X1)0 또는 (X1)1이고;

(X2)n은 (X2)0 또는 (X2)1인 단계;

- d) VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n을 포함하는 제2 및 제4 폴리펩타이드 쇄를 작제하는 단계로서, 여기서

VD1은 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고;

VD2는 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이며;

C는 경쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이며, 단, X1이 CH1은 아니고,

X2는 Fc 영역을 포함하지 않으며;

(X1)n은 (X1)0 또는 (X1)1이고;

(X2)n은 (X2)0 또는 (X2)1인 단계; 및

- e) 상기 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리펩타이드 쇄를 발현시킴으로써, 상기 제1 및 상기 제2 항원에 결합할 수 있는 이원 가변 도메인 면역글로불린이 생성되도록 하는 단계로서, 상기 중쇄 및 경쇄 중의 적어도 하나는 분해 부위를 포함하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 Fc 영역이 천연 서열 Fc 영역 및 변이 서열 Fc 영역으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 방법.

청구항 55

제53항에 있어서, 상기 Fc 영역이 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, 및 IgD부터의 Fc 영역으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 방법.

청구항 56

바람직한 특성을 가진, 2개의 항원에 결합할 수 있는 이원 가변 면역글로불린을 생성하는 방법으로서,

- a) 제1 항원에 결합할 수 있고 이원 가변 도메인 면역글로불린에 의해 나타나는 적어도 하나의 바람직한 특성을 지닐 수 있는 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부를 수득하는 단계;

- b) 제2 항원에 결합할 수 있고 이원 가변 도메인 면역글로불린에 의해 나타나는 적어도 하나의 바람직한 특성을 지닐 수 있는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부를 수득하는 단계;

- c) VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n을 포함하는 제1 및 제3 폴리펩타이드 쇄를 작제하는 단계로서, 여기서

VD1은 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고;

VD2는 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이며;

C는 중쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이며, 단, X1이 CH1은 아니고;

X2는 Fc 영역이고;

(X1)_n은 (X1)₀ 또는 (X1)₁이며;

(X2)_n은 (X2)₀ 또는 (X2)₁인 단계;

d) VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n을 포함하는 제2 및 제4 폴리펩타이드 쇄를 작제하는 단계로서, 여기서

VD1은 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고;

VD2는 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이며;

C는 경쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이며, 단, X1이 CH1은 아니고;

X2는 Fc 영역을 포함하지 않으며;

(X1)_n은 (X1)₀ 또는 (X1)₁이고;

(X2)_n은 (X2)₀ 또는 (X2)₁인 단계; 및

e) 상기 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리펩타이드 쇄를 발현시킴으로써, 바람직한 특성을 가진, 상기 제1 및 제2 항원에 결합할 수 있는 이원 가변 도메인 면역글로불린이 생성되도록 하는 단계로서, 상기 중쇄 및 경쇄 중의 적어도 하나는 분해 부위를 포함하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 57

제3항 또는 제4항에 따른 결합 단백질의 특성을 개선시키는 방법으로서, 상기 방법은

(a) 변경 전 상기 결합 단백질의 특성을 측정하는 단계;

(b) 상기 중쇄 및/또는 경쇄의 (X1)₁의 길이 및/또는 서열을 변경시킴으로써, 변경된 중쇄 및/또는 경쇄를 제공하는 단계; 및

(c) 상기 변경된 중쇄 및 경쇄를 포함하는 변경된 결합 단백질의 개선된 특성을 측정하는 단계로서, 상기 중쇄 및 경쇄 중의 적어도 하나는 분해 부위를 포함하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 58

제3항 또는 제4항에 따른 결합 단백질의 특성을 개선시키는 방법으로서, 상기 방법은

(a) 변경 전 상기 결합 단백질의 특성을 측정하는 단계;

(b) 상기 제1 및 제2 폴리펩타이드 쇄를 변경하여 VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n이 VD2-(X1)_n-VD1-C-(X2)_n으로 변화되도록 함으로써, 변경된 중쇄 및 경쇄를 제공하는 단계; 및

(c) 상기 변경된 중쇄 및 경쇄를 포함하는 변경된 결합 단백질의 개선된 특성을 측정하는 단계로서, 상기 경쇄 및 중쇄 중의 적어도 하나는 분해 부위를 포함하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 59

제3항 또는 제4항에 따른 결합 단백질의 특성을 개선시키는 방법으로서, 상기 방법은

(a) 변경 전 상기 결합 단백질의 특성을 측정하는 단계;

- (b) 상기 제1 및/또는 제2 폴리펩타이드 쇄를 변경하여 상기 중쇄 및/또는 경쇄의 VD1 또는 VD2 중의 단지 하나의 서열이 변화되도록 하는 단계; 및
 (c) 상기 변경된 중쇄 및 경쇄를 포함하는 변경된 결합 단백질의 특성을 측정하는 단계로서, 상기 중쇄 및 경쇄 중의 적어도 하나가 분해 부위를 포함하는 단계
 를 포함하는, 방법.

청구항 60

제57항 내지 제59항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 특성이 표적 항원에 대한 결합, 숙주 세포로부터의 발현 수율, 시험관내 반감기, 생체내 반감기, 안정성, 가용성, 친화성, 결합활성 및 개선된 효과기 기능으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 방법.

청구항 61

제57항에 있어서, 상기 변경된 중쇄의 링커의 길이가 증가되는, 방법.

청구항 62

제57항에 있어서, 상기 변경된 중쇄의 링커의 길이가 감소되는, 방법.

청구항 63

제57항에 있어서, 상기 변경된 경쇄의 링커의 길이가 증가되는, 방법.

청구항 64

제57항에 있어서, 상기 변경된 경쇄의 링커의 길이가 감소되는, 방법.

청구항 65

제65항에 있어서, 상기 분해 부위가 적어도 하나의 VD1과 VD2 사이에 있는, 방법.

청구항 66

제65항에 있어서, 상기 분해 부위가 적어도 하나의 링커내에 있는, 방법.

청구항 67

제58항 내지 제66항 중의 어느 한 항에 따른 결합 단백질을 대상체에게 투여함으로써 치료를 달성하는, 질병 또는 장애에 대해 대상체를 치료하는 방법.

청구항 68

제67항에 있어서, VD1 또는 VD2 중의 적어도 하나가, 상기 결합 단백질이 분해될 때까지 이의 표적에 결합하지 않는, 방법.

청구항 69

제67항에 있어서, 상기 VD2가, 상기 결합 단백질이 분해될 때까지 이의 표적에 결합하지 않는, 방법.

청구항 70

제67항에 있어서, 상기 VD1이, 상기 결합 단백질이 분해되는 경우 방출되는, 방법.

청구항 71

제67항에 있어서, 상기 VD1이, 상기 VD2가 이의 표적에 결합할 때 방출되는, 방법.

청구항 72

폴리펩타이드 쇄를 포함하는 결합 단백질로서, 상기 폴리펩타이드 쇄는 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ 을 포함하고, 여

기서

VD1은 제1 중쇄 가변 도메인이고;

VD2는 제2 중쇄 가변 도메인이고;

C는 중쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고, 단, X1이 CH1은 아니고;

X2는 Fc 영역이고;

(X1)n은 (X1)0 또는 (X1)1이고;

(X2)n은 (X2)0 또는 (X2)1이고;

상기 VD1 및 VD2 중쇄 가변 도메인은 서열번호 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 및 78로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 73

폴리펩타이드 쇄를 포함하는 결합 단백질로서, 상기 폴리펩타이드 쇄는 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n을 포함하고, 여기서

VD1은 제1 경쇄 가변 도메인이고;

VD2는 제2 경쇄 가변 도메인이고;

C는 경쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고, 단, X1이 CH1은 아니고;

X2는 Fc 영역을 포함하지 않고;

(X1)n은 (X1)0 또는 (X1)1이고;

(X2)n은 (X2)0 또는 (X2)1이고;

상기 VD1 및 VD2 경쇄 가변 도메인은 서열번호 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 및 79로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 74

제1 및 제2 폴리펩타이드 쇄를 포함하는 결합 단백질로서, 상기 제1 폴리펩타이드 쇄는 제1 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n을 포함하고, 여기서

VD1은 제1 중쇄 가변 도메인이고;

VD2는 제2 중쇄 가변 도메인이고;

C는 중쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고, 단, X1이 CH1은 아니고;

X2는 Fc 영역이고;

상기 제2 폴리펩타이드 쇄는 제2 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n을 포함하고, 여기서

VD1은 제1 경쇄 가변 도메인이고;

VD2는 제2 경쇄 가변 도메인이고;

C는 경쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고, 단, X1이 CH1은 아니고;

X2는 Fc 영역을 포함하지 않고;

(X1)_n은 (X1)0 또는 (X1)1이고;

(X2)_n은 (X2)0 또는 (X2)1이고;

상기 VD1 및 VD2 중쇄 가변 도메인은 서열번호 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 및 78로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VD1 및 VD2 경쇄 가변 도메인은 서열번호 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 및 79로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 75

4개의 폴리펩타이드 쇄를 포함하는, 2개의 항원에 결합할 수 있는 결합 단백질로서, 2개의 폴리펩타이드 쇄는 VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n을 포함하고, 여기서

VD1은 제1 중쇄 가변 도메인이고;

VD2는 제2 중쇄 가변 도메인이고;

C는 중쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고, 단, X1이 CH1은 아니고;

X2는 Fc 영역이고;

2개의 폴리펩타이드 쇄는 VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n을 포함하고, 여기서

VD1은 제1 경쇄 가변 도메인이고;

VD2는 제2 경쇄 가변 도메인이고;

C는 경쇄 불변 도메인이고;

X1은 링커이고, 단, X1이 CH1은 아니고;

X2는 Fc 영역을 포함하지 않고;

(X1)_n은 (X1)0 또는 (X1)1이고;

(X2)_n은 (X2)0 또는 (X2)1이고;

상기 VD1 및 VD2 중쇄 가변 도메인은 서열번호 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 및 78로 이루어진 그룹 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VD1 및 VD2 경쇄 가변 도메인은 서열번호 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 및 79로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질.

명세서

기술 분야

[0001]

관련 출원에 대한 참조

[0002]

본 출원은 2008년 12월 4일자로 출원된 미국 임시특허원 제61/200,877호 및 2009년 4월 7일자로 출원된 미국 임시특허원 제61/212,071호에 대한 우선권을 청구하는 정규 특허원이며, 이들 문헌들의 내용은 본원에서 참조로 인용된다.

[0003]

발명의 분야

[0004]

본 발명은 다가 및 다중특이성 결합 단백질, 이의 제조방법, 및 구체적으로는 급성 및 만성 염증성 질병, 암 및 기타 질병의 진단, 예방 및/또는 치료에서의 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0005]

2개 이상의 항원에 결합할 수 있는 다중특이성 항체와 같은 조작된 단백질은 당해 분야에 공지되어 있다. 이러한 다중특이성 결합 단백질은 세포 융합, 화학적 결합, 또는 재조합 DNA 기술을 사용하여 생성할 수 있다.

[0006]

이특이성 항체는 이특이성 항체의 목적하는 특이성을 갖는 쥐 모노클로날 항체(mAb)를 발현하는 2개의 상이한 하이브리도마 세포주의 체세포 융합을 기본으로 한 쿼드로마 기술(quadroma technology)[참조: Milstein, C.

and A.C. Cuollo (1983) *Nature* 305(5934):537-40]을 사용하여 생산하여 왔다. 수득한 하이브리드-하이브리도마(또는 퀘드로마) 세포주 내의 2개의 상이한 면역글로불린(Ig) 중쇄 및 경쇄의 임의의 쌍형성으로 인하여, 10개 이하의 상이한 Ig 종이 발생되며, 이중 단지 하나가 기능적 이특이성 항체이다. 잘못 쌍을 이룬 부산물, 및 상당히 감소된 생산 수율의 존재는 정교한 정제 과정이 필요하다는 것을 의미한다.

[0007] 이특이성 항체는 또한 2개의 상이한 mAb의 화학적 결합에 의해 생산될 수 있다(참조: Staerz, U.D., et al. (1985) *Nature* 314(6012): 628-31). 이러한 접근법은 균질한 제조를 생성하지 않는다. 다른 접근법은 2개의 상이한 mAb 또는 작은 항체 단편의 화학적 결합을 사용해 왔다[참조: Brennan, M., et al. (1985) *Science* 229(4708): 81-3].

[0008] 이특이성 항체를 생산하기 위해 사용된 또 다른 방법은 2개의 모 항체를 이종-이작용성 가교결합제와 커플링시키는 것이지만, 수득한 이특이성 항체는, 가교결합제와 모 항체와의 반응이 부위-지시되지 않기 때문에 상당한 분자 불균일성으로 고생한다. 이특이성 항체의 더 균질한 제제를 수득하기 위하여, 2개의 상이한 Fab 단편을 부위-지시된 방법으로 이의 헌지 시스테인 잔기에서 화학적으로 가교결합시켜 왔다[참조: Glennie, MJ., et al. (1987) *J. Immunol.* 139(7): 2367-75]. 그러나, 이 방법은 완전한 IgG 분자가 아니라 Fab'2 단편을 생성한다.

[0009] 다양한 기타 재조합 이특이성 항체 형태가 개발되어 왔다[참조: Kriangkum, J., et al. (2001) *Biomol. Eng.* 18(2): 31-40]. 이들 중에서, 직렬 단일쇄 Fv 분자 및 디아바디(diabody), 및 이의 각종 유도체가 가장 광범위하게 사용되었다. 일상적으로, 이들 분자의 작제는 상이한 항원을 인지하는 2개의 단일쇄 Fv(scFv) 단편으로부터 출발한다[참조: Economides, A.N., et al. (2003) *Nat. Med.* 9(1): 47-52]. 직렬 scFv 분자(taFv)는 2개의 scFv 분자를 추가의 웨პ타이드 링커와 단순 연결하는 간단한 형식을 나타낸다. 이들 직렬 scFv 분자내 존재하는 2개의 scFv 단편은 별개의 폴딩 실체(folding entity)를 형성한다. 각종 링커를 사용하여 2개의 scFv 단편 및 길이가 63개 이하의 잔기인 링커를 연결할 수 있다[참조: Nakanishi, K., et al. (2001) *Ann. Rev. Immunol.* 19: 423-74]. 모 scFv 단편이 세균내에서 가용성 형태로 일반적으로 발현될 수 있지만, 직렬 scFv 분자가 세균내에서 불용성 응집체를 형성하는 것이 흔히 관측된다. 따라서, 재폴딩 프로토콜 또는 포유동물 발현 시스템의 사용을 일상적으로 적용하여 가용성 직렬 scFv 분자를 생산한다. 최근 연구에서, CD28 및 흑색종-관련 프로테오글리칸에 대해 지시된 직렬 scFv의 유전자삽입 토키 및 소에 의한 생체내 발현이 보고되었다[참조: Gracie, J.A., et al. (1999) *J. Clin. Invest.* 104(10): 1393-401]. 당해 작제물에서, 2개의 scFv 분자는 CH11 링커에 의해 연결되었으며 이특이적 항체의 100 mg/L 이하의 혈청 농도가 발견되었다. 도메인 차수의 변화를 포함하거나 길이 또는 굴곡성이 변화하는 중간 크기의 링커를 사용한 다양한 방법을 사용하여 세균내에서 가용성 발현을 허용하였다. 본 발명에 이르러 몇가지 연구는 매우 짧은 Alaa3 링커 또는 긴 글리신/세린이 풍부한 링커를 사용하여 세균내에서 가용성 직렬 scFv 분자의 발현을 보고하였다[참조: Leung, B. P., et al. (2000) *J. Immunol.* 164(12): 6495-502; Ito, A., et al. (2003) *J. Immunol.* 170(9): 4802-9; Karni, A., et al. (2002) *J. Neuroimmunol.* 125(1-2): 134-40]. 다른 연구에서, 길이가 3 또는 6개 잔기인 임의추출된 중간크기 링커를 함유하는 직렬 scFv 래퍼토리의 파아지 디스플레이(phage display)를 사용하여 세균내에서 가용성이고 활성인 형태로 생산되는 분자들이 풍부해지도록 하였다. 당해 시도는, 6개의 아미노산 잔기 링커를 갖는 직렬 scFv 분자의 분리를 초래하였다[참조: Arndt, M. and J. Krauss (2003) *Methods Mol. Biol.* 207: 305-21]. 당해 링커 서열은 직렬 scFv 분자의 가용성 발현에 대한 일반적인 해결책을 나타내는지는 명확하지 않다. 그럼에도 불구하고, 당해 연구는, 지시된 돌연변이유발과 함께 직렬 scFv 분자의 파아지 디스플레이가 세균내에서 활성형으로 발현될 수 있는, 이들 분자를 풍부하게 할 강력한 도구임을 입증하였다.

[0010] 이특이적 디아바디(Db)는 발현용 디아바디 형식을 이용한다. 디아바디는 VH 및 VL 도메인을 연결시키는 링커의 길이를 대략 5개의 잔기까지 감소시킴으로써 scFv 단편으로부터 생산한다[참조: Peipp, M. and T. Valerius (2002) *Biochem. Soc. Trans.* 30(4): 507-11]. 링커 크기의 이러한 감소는 VH 및 VL 도메인의 교차 쌍형성에 의해 2개의 폴리웹타이드 쇄의 이량체화를 촉진한다. 이특이적 디아바디는 동일한 세포내에 구조 VHA-VLB 및 VHB-VLA(VH-VL 임체구조), 또는 VLA-VHB 및 VLB-VHA(VL-VH 임체구조)를 갖는 2개의 폴리웹타이드 쇄를 발현시킴으로써 생산된다. 매우 다양한 상이한 이특이적 디아바디가 과거에 생산되어 왔으며, 이들 대부분은 세균속에서 가용성 형태로 발현된다. 그러나, 최근 비교 연구는, 가변 도메인의 영향이 활성 결합 부위의 발현 및 형성에 영향을 줄 수 있음을 입증한다[참조: Mack, M. et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92(15): 7021-5]. 그럼에도 불구하고, 세균속에서 가용성 발현은 직렬 scFv 분자보다 중요한 장점을 나타낸다. 그러나, 2개의 상이한 폴리웹타이드 쇄는 단일 세포내에서 발현되므로, 불활성 동종이량체가 활성의 이종이량체와 함께 생산될 수 있다. 이는 이특이적 디아바디의 등종 제제를 수득하기 위한 추가의 정제 단계의 시행을 필요로 한다. 이특이적 디아바디를 생성시키기 위한 하나의 시도는 놉-인투-홀(knob-into-hole) 디아바디의 생

산이다[참조: Holliger, P., T. Prospero, and G. Winter (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 90(14): 6444-8. 18]. 당해 시도는 HER2 및 CD3에 대해 지시된 이특이적 항체에 대해 입증되었다. 대형 높은 Val137을 Phe로 교환하고 Leu45를 Trp로 교환함으로써 VH 도메인내로 도입되었고 상보성 훌은 항-HER2 또는 항-CD3 가변 도메인내에서 Phe98을 Met로 돌연변이시키고 Tyr87을 Ala로 돌연변이시킴으로써 VL 도메인내에서 생산되었다. 이러한 시도를 사용함으로써, 이특이적 디아바디의 생산은 모 디아바디에 의한 72%로부터 높-인투-홀 디아바디에 의해 90% 이상까지 증가시킬 수 있다. 중요하게도, 생산 수율은 이러한 돌연변이의 결과로 단지 약간 감소하였다. 그러나, 항원-결합 활성을 있어서의 감소가 몇개의 분석된 작제물에서 관측되었다. 따라서, 이러한 오히려 정교한 시도는 변경되지 않은 결합 활성을 가진 이종이량체 분자를 생산하는 돌연변이를 확인하기 위한 다양한 작제물의 분석을 필요로 한다. 또한, 이러한 시도는 불변 영역에서 면역글로불린 서열의 돌연변이적 변형을 필요로 하므로, 항체 서열의 비-고유 및 비-천연 형태를 생성하며, 이는 증가된 면역원성, 생체내 안정성에 있어서의 불량, 및 또한 바람직하지 않는 약력학을 초래할 수 있다.

[0011] 단일쇄 디아바디(scDb)는 이특이적 디아바디-유사 분자의 형성을 개선시키기 위한 대안적인 방법을 나타낸다[참조: Holliger, P. and G. Winter (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45(3-4): 128-30; Wu, A.M., et al. (1996) Immunotechnology 2(1): p. 21-36]. 이특이적 단일쇄 디아바디는 2개의 디아바디-형성 폴리펩타이드 쇄를 길이가 대략 15개 아미노산 잔기인 추가의 중간 링커와 연결함으로써 생산된다. 결과적으로, 단량체성 단일쇄 디아바디(50-60 kDa)에 상응하는 분자량을 갖는 모든 분자는 이특이적이다. 몇몇 연구는, 이특이적인 단일쇄 디아바디가 단량체로서 존재하는 정제된 분자의 대부분과 함께 존재하는 가용성 및 활성 형태로 세균속에서 발현됨을 입증하고 있다[참조: Holliger, P. and G. Winter (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45(3-4): 128-30; Wu, A.M., et al. (1996) Immunotechnol. 2(1): 21-36; Pluckthun, A. and P. Pack (1997) Immunotechnol. 3(2): 83-105; Ridgway, J.B., et al. (1996) Protein Engin. 9(7): 617-21]. 따라서, 단일쇄 디아바디는 직렬 scFv(모든 단량체는 이특이적이다) 및 디아바디(세균 속에서 가용성 발현)의 장점이 합해져 있다.

[0012] 보다 최근에, 디아바디를 Fc에 융합시켜 디-디아바디라고 명명되는 보다 Ig-유사한 분자를 생성하였다[참조: Lu, D., et al. (2004) J. Biol. Chem. 279(4): 2856-65]. 또한, IgG의 중쇄내 2개의 Fab 반복물을 포함하고 4개의 항원 분자에 결합할 수 있는 다가 항체 작제물이 기술되어 있다[참조: WO 0177342A1, 및 Miller, K., et al. (2003) J. Immunol. 170(9): 4854-61].

[0013] 당해 분야에는 2개 이상의 항원에 결합할 수 있는 개선된 다가 결합 단백질이 요구되고 있다. 미국 특허원 제 11/507,050호는 이원 가변 도메인 면역글로불린(DVD-Ig™)이라고 부르는, 2개 이상의 항원에 고 친화성으로 결합할 수 있는 신규한 계열의 결합 단백질을 제공한다. 본 발명은 또한 2개 이상의 항원에 결합할 수 있는 신규한 결합 단백질을 제공한다.

발명의 내용

[0014] 본 발명은 2개 이상의 항원에 결합할 수 있는 다가 결합 단백질에 관한 것이다. 본 발명은 2개 이상의 항원에 고 친화성으로 결합할 수 있는 신규 계열의 결합 단백질을 제공한다.

[0015] 하나의 양태에서, 본 발명은 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 가변 도메인이고, VD2는 제2 가변 도메인이며, C는 불변 도메인이고, X1은 아미노산 또는 폴리펩타이드를 나타내고, X2는 Fc 영역을 나타내며, n은 0 또는 1이다]를 포함하는 폴리펩타이드 쇄를 포함하는 결합 단백질을 제공한다. 하나의 양태에서, 결합 단백질 내의 VD1 및 VD2는 중쇄 가변 도메인이다. 다른 양태에서, 중쇄 가변 도메인은 쥐 중쇄 가변 도메인, 사람 중쇄 가변 도메인, CDR 이식된 중쇄 가변 도메인, 및 사람화된 중쇄 가변 도메인으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 또 다른 양태에서, VD1 및 VD2는 동일한 항원에 결합할 수 있다. 다른 양태에서, VD1 및 VD2는 상이한 항원에 결합할 수 있다. 또 다른 양태에서, C는 중쇄 불변 도메인이다. 예를 들면, X1은 링커이고, 단, X1이 CH1은 아니다.

[0016] 예를 들면, X1은 AKTPKLEEGESEAR(서열번호 1); AKTPKLEEGESEARV(서열번호 2); AKTPKLGG(서열번호 3); SAKTPKLGG(서열번호 4); SAKTP(서열번호 5); RADAAP(서열번호 6); RADAAPTVS(서열번호 7); RADAAAAGGPGS(서열번호 8); RADAAAA(G₄S)₄(서열번호 9), SAKTPKLEEGESEARV(서열번호 10); ADAAP(서열번호 11); ADAAPTVSIFPP(서열번호 12); TVAAP(서열번호 13); TVAAPSVFIFPP(서열번호 14); QPKAAP(서열번호 15); QPKAAPSVTLPFPP(서열번호 16); AKTTPP(서열번호 17); AKTTPPSVTPLAP(서열번호 18); AKTTAP(서열번호 19); AKTTAPSVYPLAP(서열번호 20); ASTKGP(서열번호 21); ASTKGPSVFPLAP(서열번호 22), GGGGSGGGSGGGS(서열번호 23);

GENKVEYAPALMALS(서열번호 24); GPAKELTPLKEAKVS(서열번호 25); GHEAAVMQVQYPAS(서열번호 26); GGGGGGGP(서열번호 27); GGGGGGGP(서열번호 28); PAPNLLGGP(서열번호 29); PNLLGGP(서열번호 30); GGGGGGP(서열번호 31); PAPELLGGP(서열번호 32); PTISPAPNLLGGP(서열번호 33); TVAADDKSVFIVPP(서열번호 34); TVDDDDKAAP(서열번호 35); LVPRGSAAP(서열번호 36); ASDDDDK GGP(서열번호 37); ALVPR GSGP(서열번호 38); ASTDDDK SVFPLAP(서열번호 39); TVALVPR GSVFIFPP(서열번호 40); ASTLVPR GSVFPLAP(서열번호 41); TVAADDK SVFIVPP(서열번호 42); ASTDDDK SVFPLAP(서열번호 43); LEVLFQ GP(서열번호 44); TVAALEVLFQ GPAP(서열번호 45); ASTLEVLFQ GPLAP(서열번호 46); PAPLEVLFQ GP(서열번호 47); TAENLYFQ GAP(서열번호 48); AENLYFQ GA(서열번호 49); PGPFGRSAGGP(서열번호 50); PGPFGR SAGG(서열번호 51); PQRGR SAG(서열번호 52); PHYGR SGG(서열번호 53); GPFGR SAGP(서열번호 54); GDDDDK GGP(서열번호 55); AGDDDDK GGP(서열번호 56); GGDDDDK GGP(서열번호 57); AS; TVA; ASTK(서열번호 58); ASTKGPSV(서열번호 59); ASTKGPSVFP(서열번호 60); TVAAPSV(서열번호 61), 및 TVAAPSIFI(서열번호 62)로 이루어진 그룹 중에서 선택된 링커이다. 하나의 양태에서, X2는 Fc 영역이다. 다른 양태에서, X2는 변이 Fc 영역이다.

[0017]

하나의 양태에서, 본원에 기재된 결합 단백질은 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 중쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 중쇄 가변 도메인이며, C는 중쇄 불변 도메인이고, X1은 링커이며, 단, X1이 CH1은 아니고, X2는 Fc 영역이다]을 포함하는 폴리펩타이드 쇄를 포함한다.

[0018]

하나의 양태에서, 결합 단백질내 VD1 및 VD2는 경쇄 가변 도메인이다. 하나의 양태에서, 경쇄 가변 도메인은 쥐 경쇄 가변 도메인, 사람 경쇄 가변 도메인, CDR 이식된 경쇄 가변 도메인, 및 사람화된 경쇄 가변 도메인으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 하나의 양태에서, VD1 및 VD2는 동일한 항원에 결합할 수 있다. 다른 양태에서, VD1 및 VD2는 상이한 항원에 결합할 수 있다. 하나의 양태에서, C는 경쇄 불변 도메인이다. 다른 양태에서, X1은 링커이고, 단, X1이 CL1은 아니다.

[0019]

하나의 양태에서, X1은 AKTPKLEEGEFSEAR(서열번호 1); AKTPKLEEGEF SEARV(서열번호 2); AKTPKLGG(서열번호 3); SAKTPKLG(서열번호 4); SAKTP(서열번호 5); RADAAP(서열번호 6); RADAAPT(서열번호 7); RADAAAAGGPGS(서열번호 8); RADAAA(G₄S)₄(서열번호 9), SAKTPKLEEGEFSEARV(서열번호 10); ADAAP(서열번호 11); ADAAPTVSIFPP(서열번호 12); TVAAP(서열번호 13); TVAAPSIFI(서열번호 14); QPKAAP(서열번호 15); QPKAAPSVTLFPP(서열번호 16); AKTTPP(서열번호 17); AKTTPSVTPLAP(서열번호 18); AKTTAP(서열번호 19); AKTTAPSVP(서열번호 20); ASTKGP(서열번호 21); ASTKGPSVFP(서열번호 22), GGGGSGGGSGGGGS(서열번호 23); GENKVEYAPALMALS(서열번호 24); GPAKELTPLKEAKVS(서열번호 25); GHEAAVMQVQYPAS(서열번호 26); GGGGGGGP(서열번호 27); GGGGGGGP(서열번호 28); PAPNLLGGP(서열번호 29); PNLLGGP(서열번호 30); GGGGGP(서열번호 31); PAPELLGGP(서열번호 32); PTISPAPNLLGGP(서열번호 33); TVAADDKSVFIVPP(서열번호 34); TVDDDDKAAP(서열번호 35); LVPRGSAAP(서열번호 36); ASDDDDK GGP(서열번호 37); ALVPR GSGP(서열번호 38); ASTDDDK SVFPLAP(서열번호 39); TVALVPR GSVFIFPP(서열번호 40); ASTLVPR GSVFPLAP(서열번호 41); TVAADDK SVFIVPP(서열번호 42); ASTDDDK SVFPLAP(서열번호 43); LEVLFQ GP(서열번호 44); TVAALEVLFQ GPAP(서열번호 45); ASTLEVLFQ GPLAP(서열번호 46); PAPLEVLFQ GP(서열번호 47); TAENLYFQ GAP(서열번호 48); AENLYFQ GA(서열번호 49); PGPFGR SAGGP(서열번호 50); PGPFGR SAGG(서열번호 51); PQRGR SAG(서열번호 52); PHYGR SGG(서열번호 53); GPFGR SAGP(서열번호 54); GDDDDK GGP(서열번호 55); AGDDDDK GGP(서열번호 56); GGDDDDK GGP(서열번호 57); AS; TVA; ASTK(서열번호 58); ASTKGPSV(서열번호 59); ASTKGPSVFP(서열번호 60); TVAAPSV(서열번호 61), 및 TVAAPSIFI(서열번호 62)로 이루어진 그룹 중에서 선택된 링커이다.

[0020]

하나의 양태에서, 결합 단백질은 X2를 포함하지 않는다.

[0021]

하나의 양태에서, 가변 중쇄 및 가변 경쇄 둘다는 동일한 링커를 포함한다. 다른 양태에서, 가변 중쇄 및 가변 경쇄는 상이한 링커를 포함한다. 다른 양태에서, 가변 중쇄 및 가변 경쇄 둘다는 짧은(약 6개 아미노산) 링커를 포함한다. 다른 양태에서, 가변 중쇄 및 가변 경쇄 둘다는 긴(6개 이상의 아미노산) 링커를 포함한다. 다른 양태에서, 가변 중쇄는 긴 링커를 포함하고 가변 경쇄는 긴 링커를 포함한다. 다른 양태에서, 가변 중쇄는 긴 링커를 포함하고 가변 경쇄는 짧은 링커를 포함한다.

[0022]

하나의 양태에서, 본원에 기재된 결합 단백질은 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 경쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 경쇄 가변 도메인이며, C는 경쇄 불변 도메인이고, X1은 링커이며, 단, X1이 CH1은 아니고, X2는 Fc 영역을 포함하지 않는다]을 포함하는 폴리펩타이드 쇄를 포함한다.

[0023]

다른 양태에서, 본 발명은 2개의 폴리펩타이드 쇄를 포함하는 결합 단백질을 제공하며, 여기서, 상기 제1 폴리펩타이드 쇄는 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 중쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 중쇄 가변 도메인이고,

며, C는 중쇄 불변 도메인이고, X1은 링커이며, 단, X1이 CH1은 아니고, X2는 Fc 영역이다]을 포함하고; 상기 제2 폴리펩타이드 쇄는 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 경쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 경쇄 가변 도메인이고, C는 경쇄 불변 도메인이고, X1은 링커이며, 단, X1이 CH1은 아니고, X2는 Fc 영역을 포함하지 않는다]을 포함한다. 특정 양태에서, 이원 가변 도메인(DVD) 결합 단백질은 4개의 폴리펩타이드 쇄를 포함하며, 여기서, 제1 2개의 폴리펩타이드 쇄는 각각 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 중쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 중쇄 가변 도메인이고, C는 중쇄 불변 도메인이고, X1은 링커이며, 단, X1이 CH1은 아니고, X2는 Fc 영역이다]을 포함하고; 제2 2개의 폴리펩타이드 쇄는 각각 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 경쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 경쇄 가변 도메인이고, C는 경쇄 불변 도메인이고, X1은 링커이며, 단, X1이 CH1은 아니고, X2는 Fc 영역을 포함하지 않는다]을 포함한다. 이러한 이원 가변 도메인(DVD) 단백질은 4개의 항원 결합부를 갖는다.

[0024] 또 다른 양태에서, 본원에 기재된 결합 단백질은 하나 이상의 표적에 결합할 수 있다. 하나의 양태에서, 표적은 사이토킨, 세포 표면 단백질, 효소 및 수용체로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 다른 양태에서, 결합 단백질은 하나 이상의 표적의 생물학적 기능을 조절할 수 있다. 다른 양태에서, 결합 단백질은 하나 이상의 표적을 중화시킬 수 있다. 본 발명의 결합 단백질은 램포킨, 모노킨, 폴리펩타이드 호르몬, 수용체 또는 종양 마커로 이루어진 그룹 중에서 선택된 사이토킨에 결합할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 DVD-Ig는 VEGF, NRP1, SOST, 및 TNF 중의 2개 이상에 결합할 수 있다[참조: 또한 표 4]. 특정 양태에서, 결합 단백질은 VEGF 및 NRP1; 및 TNF 및 SOST로 이루어진 그룹 중에서 선택된 표적의 쌍에 결합할 수 있다.

[0025] 하나의 양태에서, NRP1(서열 1) 및 VEGF(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 84의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 85의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0026] 제2 양태에서, NRP1(서열 1) 및 VEGF(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 86의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 87의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0027] 제3 양태에서, NRP1(서열 1) 및 VEGF(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 88의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 89의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0028] 제4 양태에서, NRP1(서열 1) 및 VEGF(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 90의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 91의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0029] 제5 양태에서, NRP1(서열 1) 및 VEGF(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 92의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 93의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0030] 하나의 양태에서, SOST 및 TNF(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 94의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 95의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0031] 제2 양태에서, SOST 및 TNF(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 96의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 97의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0032] 제3 양태에서, SOST 및 TNF(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 98의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 99의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0033] 제4 양태에서, SOST 및 TNF(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 100의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 101의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0034] 제5 양태에서, SOST 및 TNF(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 102의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 103의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0035] 제6 양태에서, SOST 및 TNF(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 104의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 105의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0036] 제7 양태에서, SOST 및 TNF(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 106의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 107의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0037] 제8 양태에서, SOST 및 TNF(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 108의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 109의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0038] 제9 양태에서, SOST 및 TNF(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 110의 DVD 중쇄 아미노산 서열

및 서열번호 111의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0039] 제10 양태에서, SOST 및 TNF(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 112의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 113의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0040] 제11 양태에서, SOST 및 TNF(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 114의 DVD 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 115의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0041] 하나의 양태에서, TNF(서열 3) 및 IL-13(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 116 내지 122 중 어느 하나의 DVD 중쇄 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 양태에서, TNF(서열 3) 및 IL-13(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 123 내지 128 중의 어느 하나의의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 서열번호 116 내지 122의 임의의 중쇄는 서열번호 123 내지 128의 임의의 경쇄에 결합하여 본 발명의 DVD-Ig를 제조할 수 있다.

[0042] 하나의 양태에서, TNF(서열 2) 및 IL-13(서열 2)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 129 내지 130 중 어느 하나의 DVD 중쇄 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 양태에서, TNF(서열 3) 및 IL-13(서열 1)에 결합할 수 있는 결합 단백질은 서열번호 131 및 132 중 어느 하나의 DVD 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 서열번호 129 내지 130의 임의의 중쇄는 서열번호 131 및 132의 임의의 경쇄와 결합하여 본 발명의 DVD-Ig를 제조할 수 있다.

[0043] 또 다른 양태에서, 본 발명은 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득한 제1 중쇄 가변 도메인이고; VD2는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득한 제2 중쇄 가변 도메인이며; C는 중쇄 불변 도메인이고; (X1)n은 링커이며, 단, (X1)n이 CH1은 아니고, 여기서, 상기 (X1)n은 존재하거나 부재하며; (X2)n은 Fc 영역이고, 여기서, 당해 (X2)n은 존재하거나 부재한다]를 포함하는 폴리펩타이드 쇄를 포함하는 결합 단백질을 제공한다.

[0044] 또 다른 양태에서, 본 발명은 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득한 제1 경쇄 가변 도메인이고; VD2는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이며; C는 경쇄 불변 도메인이고; (X1)n은 링커이며, 단, (X1)n이 CH1은 아니며, 여기서, 상기 (X1)n은 존재하거나 부재하고; (X2)n은 Fc 영역을 포함하지 않으며, 여기서, 당해 (X2)n은 존재하거나 부재한다. 하나의 양태에서, (X2)n은 결합 단백질로부터 부재한다.

[0045] 또 다른 양태에서, 본 발명의 결합 단백질은 제1 및 제2 폴리펩타이드 쇄를 포함하며, 여기서 상기 제1 폴리펩타이드 쇄는 제1 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고; VD2는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이며; C는 중쇄 불변 도메인이고; (X1)n은 링커이고, 단, (X1)n이 CH1은 아니며, 여기서, 상기 (X1)n은 존재하거나 부재하고; (X2)n은 Fc 영역이며, 여기서, 당해 (X2)n은 존재하거나 부재한다]를 포함하고; 여기서, 상기 제2 폴리펩타이드 쇄는 제2 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고; VD2는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이며; C는 경쇄 불변 도메인이고; (X1)n은 링커이며, 단, (X1)n이 CH1은 아니고, 여기서, 당해 (X1)n은 존재하거나 부재하며; (X2)n은 Fc 영역을 포함하지 않고, 여기서, 당해 (X2)n은 존재하거나 부재한다]를 포함한다. 다른 양태에서, 결합 단백질은 2개의 제1 폴리펩타이드 쇄 및 2개의 제2 폴리펩타이드 쇄를 포함한다. 또 다른 양태에서, (X2)n은 제2 폴리펩타이드가 부재한다. 또 다른 양태에서, 제1 폴리펩타이드내 Fc 영역은, 존재하는 경우, 천연의 서열 Fc 영역 및 변이 서열 Fc 영역으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 또 다른 양태에서, Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, 및 IgD로부터의 Fc 영역으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

[0046] 또 다른 양태에서, 본 발명의 결합 단백질은 4개의 폴리펩타이드 쇄를 포함하는 2개의 항원에 결합할 수 있는 DVD-Ig이며, 여기서, 제1 및 제3 폴리펩타이드 쇄는 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득한 제1 중쇄 가변 도메인이고; VD2는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득한 제2 중쇄 가변 도메인이며; C는 중쇄 불변 도메인이고; (X1)n은 링커이며, 단, (X1)n이 CH1은 아니고, 여기서, 상기 (X1)n은 존재하거나 부재하며; (X2)n은 Fc 영역이고, 여기서, 상기 (X2)n은 존재하거나 부재한다]를 포함하고; 제2 및 제4 폴리펩타이드 쇄는 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득한 제1 경쇄 가변 도메인이고; VD2는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이며; C는 경쇄 불변 도메인이고; (X1)n은 링커이며, 단, (X1)n이 CH1은 아니고, 여기서, 상기 (X1)n은 존재하거나 부재하고; (X2)n은 Fc 영역을 포함하지 않으며, 여기서, 상기 (X2)n은 존재하거나 부재한다]를 포함한다.

[0047]

본 발명은 모 항체를 예비선택함으로써 DVD-Ig 결합 단백질을 제조하는 방법을 제공한다. 하나의 양태에서, 2개의 항원에 결합할 수 있는 이원 가변 도메인 면역글로불린은 a) 제1 항원에 결합할 수 있는 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부를 수득하는 단계; b) 제2 항원에 결합할 수 있는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부를 수득하는 단계; c) VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고; VD2는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이며; C는 중쇄 불변 도메인이고; (X1)n은 링커이며, 단, (X1)n이 CH1은 아니고, 여기서, 상기 (X1)n은 존재하거나 부재하고; (X2)n은 Fc 영역이며, 여기서, 상기 (X2)n은 존재하거나 부재한다]의 제1 및 제3 폴리펩타이드 쇄를 작제하는 단계; d) VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고; VD2는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 2 경쇄 가변 도메인이며; C는 경쇄 불변 도메인이고; (X1)n은 링커이며, 단, (X1)n이 CH1은 아니고, 여기서, 상기 (X1)n은 존재하거나 부재하며; (X2)n은 Fc 영역을 포함하지 않으며, 여기서, 상기 (X2)n은 존재하거나 부재한다]를 포함하는 제2 및 제4 폴리펩타이드 쇄를 작제하는 단계; e) 상기 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리펩타이드 쇄를 발현시킴으로써 상기 제1 및 상기 제2 항원에 결합할 수 있는 이원 가변 도메인 면역글로불린을 생성하는 단계를 포함한다.

[0048]

또 다른 양태에서, 본 발명은 a) 제1 항원에 결합할 수 있고 이원 가변 도메인 면역글로불린에 의해 나타나는 적어도 하나의 바람직한 특성을 지닐 수 있는 제1 항체 또는 이의 항원 결합부를 수득하는 단계; b) 제2 항원에 결합할 수 있고 이원 가변 도메인 면역글로불린에 의해 나타나는 적어도 하나의 바람직한 특성을 지닐 수 있는 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부를 수득하는 단계; c) VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 중쇄 가변 도메인이고; VD2는 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 중쇄 가변 도메인이며; C는 중쇄 불변 도메인이고; (X1)n은 링커이며, 단, (X1)n이 CH1은 아니고, 여기서, 상기 (X1)n은 존재하거나 부재하며; (X2)n은 Fc 영역이고, 여기서, 상기 (X2)n은 존재하거나 부재한다]를 포함하는 제1 및 제3 폴리펩타이드 쇄를 작제하는 단계; d) VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n[여기서, VD1은 상기 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제1 경쇄 가변 도메인이고; VD2는 상기 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된 제2 경쇄 가변 도메인이며; C는 경쇄 불변 도메인이고; (X1)n은 링커이며, 단, (X1)n이 CH1은 아니고, 여기서, 상기 (X1)n은 존재하거나 부재하며; (X2)n은 Fc 영역을 포함하지 않으며, 여기서, 상기 (X2)n은 존재하거나 부재한다]를 포함하는 제2 및 제4 폴리펩타이드 쇄를 작제하는 단계; e) 상기 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리펩타이드 쇄를 발현시킴으로써, 바람직한 특성을 가진 상기 제1 및 제2 항원에 결합할 수 있는 이원 가변 도메인 면역글로불린이 생성되도록 하는 단계를 포함하여, 바람직한 특성을 가진, 2개의 항원에 결합할 수 있는 이원 가변 도메인 면역글로불린을 생성하는 방법을 제공한다.

[0049]

하나의 양태에서, 본원에 기재된 제1 및 제2 폴리펩타이드 쇄의 VDI는 동일한 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된다. 다른 양태에서, 본원에 기재된 제1 및 제2 폴리펩타이드 쇄의 VDI는 상이한 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된다. 다른 양태에서, 본원에 기재된 제1 및 제2 폴리펩타이드 쇄의 VD2는 동일한 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된다. 다른 양태에서, 본원에 기재된 제1 및 제2 폴리펩타이드 쇄의 VD2는 상이한 모 항체 또는 이의 항원 결합부로부터 수득된다.

[0050]

하나의 양태에서, 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부, 및 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부는 동일한 항체이다. 다른 양태에서, 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부, 및 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부는 상이한 항체이다.

[0051]

하나의 양태에서, 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부는 제1 항원에 결합하고 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부는 제2 항원에 결합한다. 특정 양태에서, 제1 및 제2 항원은 동일한 항원이다. 다른 양태에서, 모 항체는 동일한 항원상의 상이한 에피토프에 결합한다. 다른 양태에서, 제1 및 제2 항원은 상이한 항원이다. 다른 양태에서, 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부는, 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 제2 항원에 결합하는 효능과 상이한 효능으로 제1 항원에 결합한다. 또 다른 양태에서, 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부는, 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부가 제2 항원에 결합하는 친화성과는 상이한 친화성으로 제1 항원에 결합한다.

[0052]

다른 양태에서, 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부, 및 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부는 사람 항체, CDR 이식된 항체, 사람화된 항체로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 하나의 양태에서, 항원 결합부는 Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, 헌지 영역에서 이황화물 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 이가 단편; VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; 항체의 단일 아암(arm), dAb 단편, 분리된 상보성 결정 영역(CDR), 단일쇄 항체, 및 디아바디로 이루어진 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

[0053]

다른 양태에서, 본 발명의 결합 단백질은 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부, 또는 제2 모 항체 또는 이의 항

원 결합부에 의해 나타나는 적어도 하나의 바람직한 특성을 지닌다. 달리는, 제1 모 항체 또는 이의 항원 결합부 및 제2 모 항체 또는 이의 항원 결합부는, 이원 가변 도메인 면역글로불린이 나타나는 적어도 하나의 바람직한 특성을 지닌다. 하나의 양태에서, 바람직한 특성은 하나 이상의 항체 매개변수 중에서 선택된다. 다른 양태에서, 항체 매개변수는 항원 특이성, 항원에 대한 친화성, 효능, 생물학적 기능, 에피토프 인식, 안정성, 가용성, 생산 효능, 면역원성, 약력학, 생이용성, 조직 교차반응성, 및 이종상동성(orthologous) 항원 결합으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 하나의 양태에서, 결합 단백질은 다가이다. 다른 양태에서, 결합 단백질은 다투이성이다. 본원에 기술된 다가 및/또는 다투이성 결합 단백질은 치료학적 관점에서 특히 바람직한 특성을 갖는다. 예를 들어, 다가 및/또는 다투이성 결합 단백질은 (1) 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 의한 이가 항체보다 더 빠르게 내부화(되고/되거나 이화)되고/되거나; (2) 작용제 항체이고/이거나; (3) 다가 항체가 결합할 수 있는 항원을 발현하는 세포의 세포 사멸 및/또는 아폽토시스를 유도할 수 있다. 다가 및 또는 다투이적 결합 단백질의 적어도 하나의 항원 결합 특성을 제공하는 "모 항체"는, 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 의해 내부화(및/또는 이화)되고/되거나; 작용제일 수 있고, 세포 사멸-유도 및/또는 아폽토시스-유도 항체일 수 있는 것일 수 있으며, 본원에 기술된 바와 같은 다가 및 또는 다투이적인 결합 단백질은 하나 이상의 상기 특성에 있어 개선점(들)을 나타낼 수 있다. 또한, 모 항체는 특정의 하나 이상의 상기 특성을 결여할 수 있지만, 본원에 기술된 바와 같이 다가 결합 단백질로서 작용되는 경우 상기 특성을 지닐 수 있다.

[0054] 다른 양태에서, 본 발명의 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명으로 측정시 약 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 이상; 약 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 이상; 약 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 이상; 약 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 이상; 및 약 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 이상으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 표적에 대한 온 속도(on rate) 상수(Kon)를 가진다. 하나의 양태에서, 본 발명의 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명으로 측정시 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 내지 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$; $10^3 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 내지 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$; $10^4 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 내지 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$; 또는 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 내지 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 의 하나 이상의 표적에 대한 온 속도 상수(Kon)를 가진다.

[0055] 다른 양태에서, 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명으로 측정시 약 10^{-3} s^{-1} 이하; 약 10^{-4} s^{-1} 이하; 약 10^{-5} s^{-1} 이하; 및 약 10^{-6} s^{-1} 이하로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 표적에 대한 오프 속도(off rate) 상수(Koff)를 가진다. 하나의 양태에서, 본 발명의 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명으로 측정시 10^{-3} s^{-1} 내지 10^{-4} s^{-1} ; 10^{-4} s^{-1} 내지 10^{-5} s^{-1} ; 또는 10^{-5} s^{-1} 내지 10^{-6} s^{-1} 로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 표적에 대한 오프 속도 상수(Koff)를 가진다.

[0056] 다른 양태에서, 결합 단백질 약 10^{-7} M 이하; 약 10^{-8} M 이하; 약 10^{-9} M 이하; 약 10^{-10} M 이하; 약 10^{-11} M 이하; 약 10^{-12} M 이하; 및 약 10^{-13} M 이하로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 표적에 대한 해리 상수(K_D)를 갖는다. 하나의 양태에서, 본 발명의 결합 단백질은 이의 표적에 대해 10^{-7} M 내지 10^{-8} M ; 10^{-8} M 내지 10^{-9} M ; 10^{-9} M 내지 10^{-10} M ; 10^{-10} M 내지 10^{-11} M ; 10^{-11} M 내지 10^{-12} M ; 또는 10^{-12} M 내지 10^{-13} M 으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 표적에 대한 해리 상수(K_D)를 갖는다.

[0057] 다른 양태에서, 본원에 기술된 결합 단백질은 면역부착 분자, 영상화제, 치료제 및 세포독성제로 이루어진 그룹 중에서 선택된 제제를 추가로 포함하는 접합체이다. 하나의 양태에서, 영상화제는 방사성표지, 효소, 형광 표지, 발광 표지, 생물발광 표지, 자성 표지 및 바이오텐으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 다른 양태에서, 영상화제는 ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , 및 ^{153}Sm 으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 방사성표지이다. 또 다른 양태에서, 치료제 또는 세포독성제는 항대사제, 알킬화제, 항생제, 성장 인자, 사이토킨, 항-혈관형성제, 항-유사분열제, 안트라사이클린, 독소 및 아폽토시스제로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

[0058] 다른 양태에서, 본원에 기술된 결합 단백질은 결정화된 결합 단백질이며 결정으로 존재한다. 하나의 양태에서, 결정은 무당체가 약제학적 제어 방출 결정이다. 또 다른 양태에서, 결정화된 결합 단백질은 상기 결합 단백질의 가용성 대응물보다 생체내에서 보다 긴 반감기를 갖는다. 또 다른 양태에서, 결정화된 결합 단백질은 생물학적 활성을 보유한다.

[0059] 다른 양태에서, 본원에 기술된 결합 단백질은 글리코실화된다. 예를 들면, 글리코실화는 사람 글리코실화 패턴이다. 글리코실화는 사람 글리코실화 패턴이다.

[0060] 본 발명의 하나의 양상을 본원에 기재된 결합 단백질들 중 어느 하나를 암호화하는 분리된 핵산에 관한 것이다.

추가의 양태는 본원에 기재된 분리된 핵산을 포함하는 벡터를 제공하며, 여기서, 상기 벡터는 pcDNA; pTT(참조; Durocher et al., Nucleic Acids Research 2002, Vol 30, No.2); pTT3(추가의 다중 클로닝 부위를 갖는 pTT); pEFBOS[참조: Mizushima, S. and Nagata, S., (1990) Nucleic acids Research Vol 18, No. 17]; pBV; pJV; pcDNA3.1 TOPO, pEF6 TOPO 및 pBJ로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 하나의 양태에서, 벡터는 미국 특허원 제61/021,282호에 기재되어 있다.

[0061] 다른 양상에서, 숙주 세포는 본원에 기재된 벡터로 형질전환된다. 하나의 양태에서, 숙주 세포는 원핵 세포이다. 다른 양태에서, 숙주 세포는 이. 콜라이(E. Coli)이다. 관련 양태에서, 숙주 세포는 진핵 세포이다. 다른 양태에서, 진핵 세포는 원생생물 세포, 동물 세포, 식물 세포 및 진균 세포로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 또 다른 양태에서, 숙주 세포는 CHO, COS; NSO, SP2, PER.C6를 포함하나, 이에 한정되지 않는 포유동물 세포 또는, 사카로마이세스 세레비지아에(Saccharomyces cerevisiae)와 같은 진균 세포; 또는 Sf9와 같은 곤충 세포로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

[0062] 하나의 양태에서, 예를 들면, 상이한 특이성을 가진 2개 이상의 DVD-Ig는 단일 재조합 숙주 세포에서 생산된다. 예를 들면, 항체의 혼합물의 발현은 Oligoconomics™[제조원: 메루스 비. 브이(Merus B.V.), 네덜란드 소재]라고 일컬어져 왔다(참조: 미국 특허 제7,262,028호; 및 제7,429,486호).

[0063] 본 발명의 다른 양상은 본원에 기술된 임의의 숙주 세포를 결합 단백질을 생산하기에 충분한 조건하에 배양 배지 중에서 배양함을 포함하여 본원에 기재된 결합 단백질을 생산하는 방법을 제공한다. 하나의 양태에서, 당해 방법으로 생산된 결합 단백질 중 50% 내지 75%는 이중 특이적인 4가 결합 단백질이다. 특정 양태에서, 당해 방법으로 생산된 결합 단백질 중 75% 내지 90%는 이중 특이적인 4가 결합 단백질이다. 특정 양태에서, 생산된 결합 단백질의 90% 내지 95%는 이중 특이적인 4가 결합 단백질이다.

[0064] 하나의 양태는 본원에 기재된 결정화된 결합 단백질, 및 성분, 및 적어도 하나의 중합체성 담체를 다시 포함하는 제형을 포함한다. 예를 들면, 중합체성 담체는 폴리(아크릴산), 폴리(시아노아크릴레이트), 폴리(아미노산), 폴리(무수물), 폴리(펩시펩타이드), 폴리(에스테르), 폴리(락트산), 폴리(락트-코-글리콜산) 또는 PLGA, 폴리(b-하이드록시부티레이트), 폴리(카프롤اكتون), 폴리(디옥사논); 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리((하이드록시프로필)메타크릴아미드, 폴리[(오가노)포스파젠], 폴리(오르토 에스테르), 폴리(비닐 알코올), 폴리(비닐피롤리돈), 말레산 무수물-알킬 비닐 에테르 공중합체, 폴루로닉 폴리올, 알부민, 알기네이트, 셀룰로즈 및 셀룰로즈 유도체, 콜라겐, 피브린, 젤라틴, 하이알루론산, 올리고사카라이드, 글리카미노글리칸, 황산염화된 다당류, 이의 배합물 및 공중합체로 이루어진 그룹 중에서 선택된 중합체이다. 예를 들면, 성분은 알부민, 슈크로즈, 트레할로즈, 락ти톨, 젤라틴, 하이드록시프로필-β-사이클로텍스트린, 메톡시폴리에틸렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 다른 양태는 포유동물에게 유효량의 본원에 기재된 조성물을 투여하는 단계를 포함하여, 포유동물을 치료하는 방법을 제공한다.

[0065] 본 발명은 또한 본원에 기재된 바와 같은 결합 단백질, 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 추가의 양태에서, 약제학적 조성물은 장애를 치료하기 위한 적어도 하나의 치료제를 포함한다. 예를 들면, 추가의 제제는 치료제, 영상화제, 세포독성제, 혈관형성 억제제[항-VEGF 항체 또는 VEGF-트랩(trap)을 포함하나 이에 한정되지 않음], 키나제 억제제(KDR 및 TIE-2 억제제를 포함하나 이에 한정되지 않음), 공동-자극 분자 차단제(항-B7.1, 항-B7.2, CTLA4-Ig, 항-CD20을 포함하나, 이에 한정되지 않음), 부착 분자 차단제(항-LFA-1 항체, 항-E/L 셀렉틴 항체, 소 분자 억제제를 포함하나, 이에 한정되지 않음), 항-사이토킨 항체 또는 이의 기능적 단편(항-IL-18, 항-TNF, 및 항-IL-6/사이토킨 수용체 항체를 포함하나, 이에 한정되지 않음), 메토트렉세이트, 사이클로스포린, 라파마이신, FK506, 검출가능한 표지 또는 리포터, TNF 길항제, 항류미티스제, 근육 이완제, 마취약, 비-스테로이드성 소염 약물(NSAID), 진통제, 마취제, 진정제, 국소 마취제, 신경근 차단제, 항미생물제, 항건선제, 코르티코스테로이드, 동화작용 스테로이드, 에리트로포이에틴, 면역화, 면역글로불린, 면역억제제, 성장 호르몬, 호르몬 대체 약물, 방사약제, 항우울증제, 항정신병제, 자극제, 천식 약물, 베타 작용제, 흡입된 스테로이드, 에피네프린 또는 유사체, 사이토킨, 및 사이토킨 길항제로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

[0066] 또 다른 양상에서, 본 발명은, 사람 대상체에게 본원에 기재된 결합 단백질을 투여함으로써 사람 대상체에서 표적 또는 표적들의 활성이 억제되고 하나 이상의 증상이 완화되거나 치료가 달성되도록 하는, 본원에 기재된 결합 단백질에 의해 결합될 수 있는 표적, 또는 표적들이 유해한 장애로 고생하는 사람을 치료하는 방법을 제공한다. 예를 들면, 장애는 관절염, 골관절염, 소아 만성 관절염, 패혈성 관절염, 라임 관절염(Lyme arthritis), 건선 관절염, 반응성 관절염, 척추관절병, 전신홍반루푸스, 크론병(Crohn's disease), 궤양성 대장염, 염증성

장질환, 인슐린 의존성 진성당뇨병, 갑상선염, 천식, 알레르기병, 건선, 피부염 피부경화증, 이식편 대 숙주병, 기관 이식 거부, 기관 이식과 관련된 급성 또는 만성 면역병, 사르코이드증, 죽상경화증, 파종 혈관내 응고, 가와사키병(Kawasaki's disease), 그레이브스병(Grave's disease), 신증후군, 만성피로증후군, 베게너 육아종증, 헤노호-쇤라인 자색반(Henoch-Schoenlein purpura), 심장의 현미경적 혈관염, 만성 활성 간염, 포도막염, 패혈성 쇼크, 독성 쇼크 증후군, 패혈증후군, 악액질, 감염성 장애, 기생충병, 후천성 면역결핍증후군, 급성 횡단 척수염, 헌팅تون 무도병(Huntington's chorea), 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 뇌졸중, 원반쓸개관간경화증, 용혈 빈혈, 악성암, 심장부전, 심근경색, 애디슨병(Addison's disease), 산발 다선성 기능이상(sporadic polyglandular deficiency) 제I형 및 다선성 기능이상 제II형, 슈미트 증후군(Schmidt's syndrome), 성인(급성) 호흡곤란증후군, 탈모증, 원형탈모증, 혈청음성 관절병증, 관절병증, 라이터병(Reiter's disease), 건선 관절병증, 케양성 대장염 관절병증, 장병원성 유행막염, 클라미디아, 예르시니아 및 살모넬라 관련 관절병증, 척추관절병증, 죽종병(atheromatous disease)/동맥경화증, 아토피성 알레르기, 자가면역 수포성 장애, 보통천포창, 낙엽천포창, 유사천포창, 선형 IgA 질병, 자가면역용혈빈혈, 쿰스(Coombs) 양성 용혈빈혈, 후천성 악성빈혈, 소아 악성빈혈, 근통성 뇌염/로얄 프리병(Royal Free Disease), 만성 점막피부칸디다증, 거세포동맥염, 원발성 경화간염, 잠재성 자가면역 간염, 후천성 면역결핍증(일반적인 가변 저감마글로불린혈증), 확장된 심근병, 여성 불임, 난소 기능상실, 조기 성숙 난소 기능상실, 섬유화 폐병, 잠재성 섬유화 폐병, 염증 후 간질성 폐병, 간질성 폐렴, 연결조직병 관련 간질 폐병, 혼합된 연결조직병 관련 폐병, 전신경화증 관련 간질 폐병, 류미티스 관절염 관련 간질 폐병, 전신흥반루푸스 관련 폐병, 피부근염/다발근육염 관련 폐병, 쇼그렌 병 관련 폐병, 강직척추염 관련 폐병, 혈관병성 확산 폐병, 혈뇨증 관련 폐병, 약물-유도된 간질 폐병, 섬유증, 방사선 섬유증, 폐쇄세기관지염, 만성 호산구 폐렴, 림프구 침윤성 폐병, 감염 후 간질성 폐 장애, 통풍관절염, 자가면역 간염, 제1형 자가면역 간염(일반적인 자가면역 또는 낭창양 간염), 제2형 자가면역 간염(항-LKM 항체 간염), 자가면역 매개된 저혈당, 흑색가시세포증이 있는 B형 인슐린 내성, 부갑상선저하증, 기관 이식과 관련된 급성 면역병, 기관 이식과 관련된 만성 면역병, 골관절염, 원발 경화성 담관염, 제1형 건선, 제2형 건선, 특발성 백혈구감소증, 자가면성 호중구백혈구감소증, 신장병 NOS, 사구체신염, 심장의 현미경적 혈관염, 라임병, 원반모양홍반루푸스, 특발성 남성 불임 또는 NOS, 정자 자가면역, 다발경화증(모든 아형), 교감눈염증, 연결조직 병에 대해 2차적인 폐 고혈압, 굳파스춰 증후군(Goodpasture's syndrome), 결절다발동맥염의 폐증상, 급성 류미티스열, 류마티스 척추염, 스틸병(Still's disease), 전신경화증, 쇼그伦 증후군, 다카야스병(Takayasu's disease)/동맥염, 자가면역성 저혈소판자색반, 특발성 저혈소판자색반, 자가면역 갑상선병, 갑상선과증, 갑상선종 자가면역 갑상선기능저하증[하시모토병(Hashimoto's disease)], 위축성 자가면역 갑상선기능저하증, 원발성 점액수증, 수정체성 포도막염, 원발성 혈관염, 백반증 급성 간병, 만성 간병, 알코올성 간경화증, 알코올-유도된 간 손상, 담즙정체(choleosatatis), 특이 간병, 약물-유도된 간병, 비-알코올성 지방간염, 알레르기 및 천식, B군 스트렙토코커스(GBS) 감염, 정신장애(예: 우울증 및 전신분열병), Th2형 및 Th1형 매개된 질병, 급성 및 만성 통증(통증의 상이한 형태), 및 폐암, 유방암, 위암, 방광암, 결장암, 췌장암, 난소암, 전립선암 및 직장암과 같은 암 및 혈액암(백혈병 및 림프종), 아베타리포프로테이아(Abetalipoproteinemia), 말단청색증, 급성 및 만성 기생충병 또는 감염성 과정, 급성 백혈병, 급성 림프모구백혈병(ALL), 급성 골수백혈병(AML), 급성 또는 만성 세균 감염, 급성 췌장염, 급성 신장 부전, 선암종, 이소성 심방박동, AIDS 치매 합병증, 알코올-유도된 간염, 알레르기 결막염, 알레르기 접촉성 피부염, 알레르기성 비염, 동종이식 거부, 알파-1-안티트립신 결핍증, 근육위축 축삭경화증, 빈혈, 협심증, 척수전각 세포 변성, 항 cd3 치료요법, 항인지질증후군, 항-수용체 과감작 반응, 대동맥 및 말초 동맥류, 대동맥박리, 동맥성 고혈압, 동맥경화증, 동정맥루(arteriovenous fistula), 실조, 심방세동(지속되거나 발작성), 심방조동, 방설차단, B 세포 림프종, 골 이식거부, 골수 이식(BMT) 거부, 다발갈래차단, 버킷림프종(Burkitt's lymphoma), 화상, 심장부정맥, 심장 스턴 증후군(cardiac stun syndrome), 심장 종양, 심근병증, 심폐우회술 염증 반응, 연골 이식 거부, 대뇌 피질변성, 대뇌 장애, 혼돈된 또는 다소성 심방빈맥(chaotic or multifocal atrial tachycardia), 화학치료요법 관련 장애, 만성 골수세포 백혈병(CML), 만성 알코올중독, 만성 염증병리학, 만성 림프구백혈병(PLL), 만성 폐쇄성 폐병(COPD), 만성 살리실레이트 중독, 직장결장 암종, 울혈성 심장기능상실, 결막염, 접촉성 피부염, 폐심장, 관상동맥병, 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease), 배양 음성 폐혈증(culture negative sepsis), 낭성 섬유증, 사이토kin 치료요법 관련 장애, 권투선수치매, 말이집털락병, 뎅기출혈병, 피부염, 피부과 상태(dermatologic condition), 당뇨병, 진성당뇨병, 당뇨병성 죽상경화관 질병, 미만성 루이소체병, 확장형 울혈성 심근병증, 기저핵 장애, 중년 다운 증후군(Down's Syndrome), CNS 도파민 수용체를 차단하는 약물에 의해 유도된 약물-유도된 운동장애, 약물 민감성, 습진, 뇌척수염, 심내막염, 내분비병, 후두개염, 앰뷸타인-바르 바이러스 감염, 홍색사지통증, 추체외로 및 대뇌 장애, 가족성 혈구포식세포 림프조직구증(familial hematophagocytic lymphohistiocytosis), 태아 흉선

이식거부, 프리드라이히 운동실조증(Friedreich's ataxia), 기능적 말초동맥장애, 진균성 패혈증, 위궤양, 가스괴저, 사구체신장염, 임의의 기관 또는 조직의 이식 거부, 그람 음성 패혈증, 그람 양성 패혈증, 세포내 기관으로 인한 육아종, 텔세포백혈병, 할러보르덴-슈파츠병(Hallervorden-Spatz disease), 하시모토 갑상선염(hashimoto's thyroditis), 건초열, 심장 이식거부, 혈색소침착증, 혈액투석, 용혈요독증후군/혈전용해성 저혈소판자색반병, 출혈, (A)형 간염, 히스다발 부정맥(His bundle arrhythmias), HIV 감염/HIV 신경병증, 호지킨병(Hodgkin's disease), 운동과다장애(hyperkinetic movement disorder), 과민반응(hypersensitivity reaction), 과민증, 과민성 패렴, 고혈압, 운동저하 장애(hypokinetic movement disorder), 시상하부-뇌하수체-부신축 평가(hypothalamic-pituitary-adrenal axis evaluation), 특발성 애디슨병, 특발성 폐 섬유증, 항체 매개된 세포독성, 무력증, 유아성 척수성 근육위축, 대동맥의 염증, 인플루엔자 a, 이온화 조사 노출(ionizing radiation exposure), 홍채섬모채염/포도막염/시신경염, 허혈-재관류 손상(ischemia-reperfusion injury), 허혈성 뇌졸중, 소아 류마티스관절염, 소아척수근육위축증, 카포시 육종(Kaposi's sarcoma), 신장 이식거부, 레기오넬라, 리슈만편모충증, 나병, 피질척수계의 병변, 지방부종, 간 이식거부, 림프부종, 말라리아, 악성 림프종, 악성 조직구증, 악성 흑색종, 수막염, 수막구균혈증, 대사성/특발성 질병, 편두통, 미토콘드리아 다중시스템장애, 혼합된 연결조직병, 모노클로날 감마글로불린혈증, 다발골수종, 다발계통 변성(multiple systems degenerations)[멘셀 데제린-토마스 시-드래거(Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager) 및 마카도-조셉(Machado-Joseph)], 중증근육무력증, 마이코박테리움 아비움 인트라셀룰라레(mycobacterium avium intracellulare), 결핵균, 골수형성이상증후군, 심근경색, 심근허혈성 장애, 비인두암종, 신생아 만성폐병, 신장염, 신장증, 신경변성병, 신경성(I) 근육위축, 호중구감소성 열(neutropenic fever), 비-호지킨 림프종, 복부 대동맥 및 이의 분지의 폐색, 폐쇄성 동맥장애, okt3 치료요법, 고환염/부고환염, 고환염/정관절제 복구술(vasectomy reversal procedure), 장기비대, 골다공증, 췌장 이식거부, 췌장 암종, 부종양 증후군/악성 고칼슘혈증(hypercalcemia of malignancy), 부갑상선 이식거부, 골반염 장애, 연중비염, 심낭장애, 말초죽상경화성 장애, 말초혈관 장애, 복막염, 악성 빈혈, 폐포자충폐염, 폐렴, POEMS 증후군(다발신경염, 장기비대, 내분비병, 모노클로날 감마병증, 및 피부 변화 증후군), 관류후 증후군, 펌프후 증후군(post pump syndrome), MI후 심장절개 증후군, 자간전증, 진행핵상마비, 원발폐고혈압증, 조사 치료요법, 레이노 현상 및 질병, 레이노 장애(Raynoud's disease), 레프슘병(Refsum's disease), 정규의 협소 QRS 빈맥(regular narrow QRS tachycardia), 신장혈관고혈압, 재관류 손상, 제한심근병, 육종, 공피증, 노년무도병, 루이소체 치매(Senile Dementia of Lewy body type), 혈청음성 관절병증, 쇼크, 낫적혈구빈혈, 피부 동종이식 거부, 피부 변화 증후군, 소장 이식거부, 고형 종양, 특이적인 부정맥, 척수 운동실조, 척수소뇌변성, 스트렙토코커스성 근염, 소뇌의 구조적 병변, 아급성 경화범뇌염, 실신, 심혈관계의 매독, 전신아나필락시스, 전신 염증반응 증후군, 전신적으로 발병된 청소년성 관절염(systemic onset juvenile rheumatoid arthritis), T-세포 또는 FAB ALL, 모세혈관화장증, 폐쇄성 혈관혈전염, 저혈소판증, 독성, 이식술, 외상/출혈, 제III형 과민반응, 제IV형 과민증, 불안정 협심증, 요독증, 요로성폐혈증, 두드러기, 판막성심장병, 정맥류, 혈관염, 정맥 장애, 정맥 혈전증, 심실세동, 바이러스 및 진균 감염, 활성 뇌염/무균수막염, 활성-관련 적혈구포식성 증후군(vital-associated hemaphagocytic syndrome), 베르니케-코르사코프 증후군(Wernicke-Lorsakoff syndrome), 윌슨병(Wilson's disease), 임의의 기관 또는 조직의 이종이식 거부, 급성 관상 증후군(acute coronary syndrome), 급성특발다발신경염, 급성 염증성 탈수초다발성신경병증, 급성 허혈, 성인 스틸병(adult Still's disease), 원형탈모증, 과민증(anaphylaxis), 항-인지질항체 증후군, 재생불량빈혈, 동맥경화증, 아토피 피부염, 자가면역 피부염, 스트렙토코커스 감염 관련 자가면역 장애, 자가면역장병증, 자가면역 청력장애, 자가면역 림프세포증식증후군(ALPS), 자가면역 심근염, 자가면역 조기성숙 난소 기능상실, 안건염, 기관지확장증, 물집유사천포창, 심혈관병, 파국적 항인지질증후군, 복강장애, 경추증, 만성 허혈, 흉터유사천포창, 다발경화증 위험이 있는 임상적으로 분리된 증후군(cis), 결막염, 유아 발병 정신장애, 만성 폐쇄성 폐병(COPD), 눈물주머니염, 피부근육염, 당뇨망막병증, 진성당뇨병, 추간판탈출증, 추간판헤르니아, 약물 유도된 면역 용혈빈혈, 심내막염, 자궁내막증, 안구내염, 공막바깥염, 다형홍반, 심한 다형홍반(erythema multiforme major), 임신성 유사천포창(gestational pemphigoid), 길랑-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome: GBS), 건초열, 휴즈 증후군(Hughes syndrome), 특발성 파킨슨병, 특발성 간질 폐렴, IgE-매개된 알레르기, 면역용혈성빈혈, 봉입체 근염, 감염성 안구염증병, 염증성 말이집탈락병, 염증성 심장병, 염증성 신장병, IPF/UIP, 홍채염, 각막염, 건성각막결막염, 쿠스마울병(Kussmaul disease) 또는 쿠스마울-마이어병(Kussmaul-Meier disease), 랜드리 마비(Landry's paralysis), 랑게르한스세포조직구증, 그물울혈반, 원반황반변성, 현미경다발혈관염, 베크테레브병(morbus bechterev), 운동신경장애, 점막 유천포창, 다발성 기관부전, 중증근육무력증, 골수형성이상증후군, 심근염, 신경뿌리장애, 신경병증, 비-A형 비-B형 간염, 시신경염, 뼈용해, 난소암, 소수관질형 JRA, 말초동맥폐색병(PAOD), 말초혈관병(PVD), 말초동맥병(PAD), 정맥염, 결절다발동맥염(또는 결절동맥주위염), 다발연골염, 류마티스성다발성근육통, 백모증, 다관절 JRA, 다내분비선 결핍

성 증후군(polyendocrine deficiency syndrome), 다발근육염, 류마티스성 다발성 근육통(PMR), 펌프후 증후군(post-pump syndrome), 원발 파킨슨병(primary Parkinsonism), 전립선암 및 직장암 및 조혈성 악성종양(백혈병 및 림프종), 전립선염, 적혈구계 무형성증, 원발성 아드레닌부족증(primary adreninsufficiency), 재발성 시신경척수염(recurrent neuromyelitis optica), 재협착, 류마티스성 심장병, 사포(sapho)(윤활막염, 여드름, 농포증, 뼈파다증, 및 낭성 섬유뼈염), 공피증, 이차성 아밀로이드증, 쇼크성 폐, 공막염, 엉덩뼈신경통, 이차 부신기능부전, 실리콘 관련 연결조직병, 스네돈-윌킨슨 피부염(sneddon-wilkinson dermatosis), 강직 척추염, 스티븐스-존슨 증후군(Stevens-Johnson syndrome: SJS), 전신염증성 반응 증후군, 측두동맥염, 톨소플라스마성 망막염(toxoplasmic retinitis), 독성표피괴사용해, 횡단척수염, TRAPS(종양 괴사 인자 수용체, 제1형 알레르기 반응, 제II형 당뇨병, 두드러기, 일반적인 간질폐렴(UIP), 혈관염, 봄철결막염, 바이러스성 망막염, 보크트-고야나기-하라다 증후군(Vogt-Koyanagi-Harada syndrome: VKH syndrome), 습윤 황반변성, 상처 치유, 예르시니아 및 살모넬라 관련 관절병으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

[0067]

하나의 양태에서, 본 발명의 조성물 및 방법으로 치료 또는 진단될 수 있는 질병은, 원발성 또는 대사성 암, 예를 들면, 유방, 결장, 직장, 폐, 구인두, 하인두, 식도, 위, 췌장, 간, 담석 및 담즙관, 소장, 뇨관(신장, 방광 및 요로상피 포함), 여성 생식기관(자궁경부, 자궁 및 난소, 및 또한 융모막암종 및 임신영양막병 포함), 남성 생식기관(전립선, 정낭, 고환 및 정자세포 종양 포함), 내분비선(갑상선, 부신 및 뇌하수체 포함), 및 피부, 및 또한 혈관종, 흑색종, 육종[골 및 연조직으로부터 발생한 것 및 카포시 육종(Kaposi's sarcoma) 포함], 뇌, 신경, 눈 및 뇌척수막의 종양[별아교세포종, 신경아교종, 교종, 망막모세포종, 신경종, 신경모세포종, 슈반세포종, 및 수막종 포함], 백혈병과 같은 조혈성 악성종양으로부터 유발된 고형 종양, 및 림프종(호지킨 및 비-호지킨 림프종 포함)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0068]

하나의 양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 단독으로 또는 방사치료요법 및/또는 다른 화학치료제와 함께 사용되는 경우 암을 치료하거나 본원에 기술된 종양으로부터의 전이를 예방하는데 사용된다.

[0069]

다른 양상에서, 본 발명은 본원의 앞에서 기술된 결합 단백질 중 어느 하나를 본원에 논의된 제2 제제의 투여 전, 투여와 동시에 또는 투여 후에 투여하는 단계를 포함하여, 장애로 고생하는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 특정 양태에서, 제2 제제는 부데노시드, 상피 성장인자, 코르티코스테로이드, 사이클로스포린, 세파살라진, 아미노살리실레이트, 6-머캅토퓨린, 아자티오프린, 메트로니다졸, 리폭시제나제 억제제, 메살라민, 올살라진, 발살라지드, 항산화제, 트롬복산 억제제, IL-1 수용체 길항제, 항-IL-1 β mAb, 항-IL-6 또는 IL-6 수용체 mAb, 성장 인자, 엘라스타제 억제제, 피리디닐-이미다졸 화합물, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-23, EMAP-II, GM-CSF, FGF, 및 PDGF의 항체 또는 작용제, CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 또는 이들의 리간드의 항체, 메토트렉세이트, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 마이코페놀레이트 모페틸, 레플루노마이드, NSAID, 이부프로펜, 코르티코스테로이드, 프레드니솔론, 포스포디에스테라제 억제제, 아데노신 작용제, 항트롬보티제, 보체 억제제(complement inhibitor), 아드레날린성 제제, IRAK, NIK, IKK, p38, MAP 키나제 억제제 억제제, IL-1 β 전환효소 억제제, TNF α 전환 효소 억제제, T-세포 시그널링 억제제, 메탈로프로테이나제 억제제, 세파살라진, 아자티오프린, 6-머캅토퓨린, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 가용성 사이토kin 수용체, 가용성 p55 TNF 수용체, 가용성 p75 TNF 수용체, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, 소염성 사이토kin, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 및 TGF β 로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

[0070]

특정 양태에서, 본원에 기재된 약제학적 조성물은 환자에게 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 동맥내, 기관지내, 복부내, 낭내, 연골내, 강내(intracavitory), 복강내(intracelial), 소뇌내, 뇌심실내, 대장내, 자궁경부내, 위내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심장주위내, 복강내, 흉막내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척수내, 윤활막내, 내흉내, 자궁내, 방광내, 일시, 질내, 직장내, 구강내, 설하, 비강내 및 경피 중에서 선택된 적어도 하나의 방식으로 투여된다.

[0071]

본 발명의 하나의 양상은 본 발명의 적어도 하나의 결합 단백질에 대한 적어도 하나의 항-이디오타입(anti-idiotype) 항체를 제공하는 것이다. 항-이디오타입 항체는 본 발명의 결합 단백질내로 혼입될 수 있는 중쇄 또는 경쇄의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR) 또는 이의 리간드 결합 부위, 중쇄 또는 경쇄 가변 영역, 중쇄 또는 경쇄 불변 영역, 골격 영역, 또는 이의 임의의 부위와 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 면역글로불린 분자의 적어도 일부를 포함하는 분자를 함유하는 임의의 단백질 또는 웹타이드를 포함한다.

[0072]

다른 양상에서, 본 발명은 (a) 변경 전 결합 단백질의 특성을 측정하는 단계; (a) 중쇄 및/또는 경쇄 치료요법의 (X1)₁의 길이 및/또는 서열을 변경시킴으로써 변경된 중쇄 및/또는 경쇄를 제공하는 단계; 및 (b) 변경된 중

쇄 및 경쇄를 포함하는 변경된 결합 단백질의 개선된 특성을 측정하는 단계를 포함하여, 본 발명의 결합 단백질의 특성을 개선시키는 방법을 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은 (a) 변경 전 결합 단백질의 특성을 측정하는 단계; (c) 제1 및 제2 폴리펩타이드 쇄를 변경하여 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n이 VD2-(X1)n-VD1-C-(X2)n으로 변화되도록 함으로써, 변경된 중쇄 및 경쇄를 제공하는 단계; 및 (d) 변경된 중쇄 및 경쇄를 포함하는 변경된 결합 단백질의 개선된 특성을 측정하는 단계를 포함하여, 본 발명의 결합 단백질의 특성을 개선시키는 방법을 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은 (a) 변경 전 결합 단백질의 특성을 측정하는 단계; (b) 제1 및/또는 제2 폴리펩타이드 쇄를 변경하여 중쇄 및/또는 경쇄의 VD1 또는 VD2 중 단지 하나의 서열이 변화되도록 하는 단계; 및 (c) 변경된 중쇄 및 경쇄를 포함하는 변경된 결합 단백질의 특성을 측정하는 단계를 포함하여, 본 발명의 결합 단백질의 특성을 개선시키는 방법을 제공한다. 상기 특성은 표적 항원에 대한 결합, 숙주 세포로부터의 발현 수율, 시험관내 반감기, 생체내 반감기, 안정성, 가용성, 친화성, 결합활성 및 개선된 효과기 기능으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

[0073] 하나의 양태에서, 변경된 중쇄의 링커의 길이는 증가된다. 다른 양태에서, 변경된 중쇄의 링커의 길이는 감소된다.

[0074] 하나의 양태에서, 변경된 경쇄의 링커의 길이는 증가된다. 다른 양태에서, 변경된 경쇄의 링커의 길이는 감소된다.

[0075] 본 발명의 방법 및 조성물의 또 다른 양태에서, 변경된 중쇄 및/또는 경쇄는 분해 부위를 포함한다. 하나의 양태에서, 분해 부위는 적어도 하나의 VD1 및 VD2 사이에 존재한다. 다른 양태에서, 분해 부위는 적어도 하나의 링커이다. 하나의 양태에서, 중쇄 및/또는 경쇄는 엔테로키나제, 트롬빈, 프리시전(PreScission), 담배 식각바이러스 프로테아제(Tobacco Etch Virus protease: TEV), 및 조직 플라스미노겐 활성화인자(tPA) + 프롤린으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 효소 또는 제제에 의해 분해된다. 다른 양태에서, 결합 단백질은 아연-의존성 엔도펩티다제, 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP), 세라라이신, 아스타신, 아다말리신, MMP-1; MMP-2; MMP-3; MMP-7; MMP-8; MMP-9; MMP-10; MMP-11; MMP-12; MMP-13; MMP-14; MMP-15; MMP-16; MMP-17; MMP-18; MMP-19; MMP-20; MMP-21; MMP-22; MMP-23A; MMP-23B; MMP-24; MMP-25; MMP-26; MMP-27; MMP-28; 디스인테그린 및 메탈로프로테이나제(ADAM); ADAM17; ADAMTS1; ADAM1; ADAM10; ADAM8; ADAMTS4; ADAMTS13; ADAM12; ADAM15; ADAM9; ADAMTS5; ADAM33; ADAM11; ADAM2; ADAMTS2; ADAMTS9; ADAMTS3; ADAMTS7; ADAM22; ADAM28; ADAMTS12; ADAM19; ADAMTS8; ADAM29; ADAM23; ADAM3A; ADAM18; ADAMTS6; ADAM7; ADAMDES1; ADAM20; ADAM6; ADAM21; ADAM3B; ADAMTS3; ADAMTSL4; ADAM30; ADAMTS20; ADAMTSL2; 카스파제; 카스파제 1-12, 카스파제 14; 카텝신; 카텝신 G; 카텝신 B; 카텝신 D; 카텝신 L1; 카텝신 C; 카텝신 K; 카텝신 S; 카텝신 H; 카텝신 A; 카텝신 E; 카텝신 L; 카텝신 Z; 카텝신 F; 카텝신 G-유사 2; 카텝신 L-유사 1; 카텝신 W; 카텝신 L-유사 2; 카텝신 L-유사 3; 카텝신 L-유사 4; 카텝신 L-유사 5; 카텝신 L-유사 6; 카텝신 L-유사 7; 카텝신 O; 칼파인; 칼파인 3; 칼파인 10; 칼파인 1(mu/1) 대형 서브유닛; 칼파인, 소형 서브유닛 1; 칼파인 2, (mu/1); 대형 서브유닛; 칼파인 9; 칼파인 11; 칼파인 5; 칼파인 6; 칼파인 13; 칼파인 8; 칼파인, 소형 서브유닛 2; 칼파인 15; 칼파인 12; 칼파인 7; 및 칼파인 8로 이루어진 그룹 중에서 선택된 효소 또는 제제에 의해 분해된다.

[0076] 하나의 양태에서, 적어도 하나의 VD1 또는 VD2는, VD1와 VD2 사이에 분해가 일어날 때까지 이의 표적에 결합하지 않는다. 다른 양태에서, 결합 단백질의 링커는 효소에 의해 선택적으로 분해된다. 다른 양태에서, 결합 단백질의 링커는 제조 과정 동안 효소에 의해 선택적으로 분해된다. 다른 양태에서, 결합 단백질의 링커는, DVD-Ig가 적어도 하나의 표적에 근접한 경우 효소에 의해 선택적으로 분해된다. 다른 양태에서, 결합 단백질은, DVD-Ig가 적어도 하나의 표적에 결합하는 경우, 효소에 의해 선택적으로 분해된다.

[0077] 다른 양상에서, 본 발명은 대상체에게 본 발명의 결합 단백질을 투여함으로써 치료가 달성되도록 하여 질병 또는 장애에 대해 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 하나의 양태에서, VD1 또는 VD2 중의 적어도 하나는, 결합 단백질이 분해될 때까지 이의 표적에 결합하지 않는다. 다른 양태에서, VD2는, 결합 단백질이 분해될 때까지 이의 표적에 결합하지 않는다. 다른 양태에서, VD1은, 결합 단백질이 분해될 때까지 방출된다. 다른 양태에서, VD1은, VD2가 이의 표적에 결합할 때 방출된다.

도면의 간단한 설명

[0078] 도 1a는 이원 가변 도메인(DVD)-Ig 작제물의 개략도이며 2개의 모 항체로부터 DVD-Ig의 생성 전략을 나타낸다.

도 1b는 작제물 DVD1-Ig, DVD2-Ig, 및 2개의 키메라 일-특이적인 항체의 개략도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0079]

본 발명은 2개 이상의 항원에 결합할 수 있는 다가 및/또는 다중특이적인 결합 단백질에 관한 것이다. 구체적으로는, 본 발명은 이원 가변 도메인 면역글로불린(DVD-Ig), 및 이의 약제학적 조성물, 및 또한 이러한 DVD-Ig를 제조하기 위한 핵산, 재조합 발현 벡터 및 숙주 세포에 관한 것이다. 실험관내 또는 생체내에서 특이적인 항원을 검출하기 위해 본 발명의 DVD-Ig를 사용하는 방법이 또한 본 발명에 포함된다.

[0080]

본원에서 달리 정의하지 않는 한, 본 발명과 함께 사용된 과학적 및 기술적 용어들은 당해 분야의 통상의 숙련가에게 일반적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 그러나, 용어들의 의미 및 범위는, 어떠한 이후 불명료한 경우에도 명백하여야 하며, 본원에 제공된 용어들은 어떠한 사전적 또는 고유의 정의를 초과한다. 또한, 내용이 요구하지 않는 한, 단수 용어는 다수를 포함하며 다수 용어는 단수를 포함한다. 본 명세서에서, "또는"의 사용은 달리 제시하지 않는 한, "및/또는"을 의미한다. 또한, 용어 "포함하는" 및 "포함하다" 및 "포함된"을 포함하는 다른 형태의 사용은 제한되지 않는다. 또한, "요소" 또는 "성분"과 같은 용어는 달리 구체적으로 제시하지 않는 한, 하나의 유닛 및, 하나 이상의 서브유닛을 포함하는 요소 및 성분을 포함하는 요소 및 성분 둘다를 포함한다.

[0081]

일반적으로, 본원에 기술된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질 및 핵산 화학 및 하이브리드화의 기술과 관련하여 사용된 명명법 및 당해 기술은 잘 알려져 있는 것들이며, 당해 분야에서 일반적으로 사용된다. 본 발명의 방법 및 기술은 달리 나타내지 않는 한 본 명세서 전체에서 인용되고 논의된 각종의 일반적이고 보다 특정한 참고 문헌에 기술된 바와 같이 일반적으로 당해 분야에 의해 공지된 통상의 방법에 따라 수행된다. 효소적 반응 및 정제 기술은 당해 분야에서 일반적으로 달성되거나 본원에 기술된 바와 같이 제조업자의 명세에 따라 수행된다. 본원에 기술된 분석 화학, 합성 유기 화학, 및 의학적 및 약제 화학의 실험실 공정 및 기술과 관련하여 사용된 명명법은 당해 분야에 의해 공지되어 있으며 당해 분야에서 일반적으로 사용된다. 표준 기술은 화학 합성, 화학 분석, 약제 제조, 제형 및 전달, 및 환자의 치료에 사용된다.

[0082]

본 발명은 보다 용이하게 이해될 수 있으며 선택된 용어들은 하기 정의된다.

[0083]

본원에 사용된 용어 "폴리펩타이드"는 아미노산의 임의의 중합체 쇄를 말한다. 용어 "펩타이드" 및 "단백질"은 용어 폴리펩타이드와 상호교환적으로 사용되며 또한 아미노산의 중합체성 쇄를 말한다. 용어 "폴리펩타이드"는 천연 또는 인공 단백질, 단백질 단편 및, 단백질 서열의 폴리펩타이드 유사체를 말한다. 폴리펩타이드는 단량체성 또는 중합체성일 수 있다. 본원의 "폴리펩타이드"의 사용은 내용에서 달리 반박하지 않는 한, 폴리펩타이드 및 단편 및 이의 변이체(변이체의 단편 포함)을 포함하는 것으로 의도된다. 항원성 폴리펩타이드의 경우, 폴리펩타이드의 단편은 임의로 폴리펩타이드의 적어도 하나의 연속성 또는 비선형 에피토프를 함유한다. 적어도 하나의 에피토프 단편의 정밀한 경계는 당해 분야의 통상의 기술을 사용하여 확인할 수 있다. 단편은 약 5개의 연속된 아미노산, 예를 들면, 적어도 약 10개의 연속된 아미노산, 적어도 약 15개의 연속된 아미노산, 또는 적어도 약 20개의 연속된 아미노산을 포함한다. 폴리펩타이드의 변이체는 본원에 기술되어 있다.

[0084]

용어 "분리된 단백질" 또는 "분리된 폴리펩타이드"는 이의 기원 또는 변화의 공급원 면에서 이의 천연 상태로 이와 동반하는 천연적으로 관련된 성분과 연합되지 않고; 상이한 종으로부터 세포에 의해 발현되거나; 천연적으로 존재하지 않는 단백질 또는 폴리펩타이드이다. 따라서, 화학적으로 합성되거나 이것이 천연적으로 기원하는 세포와는 상이한 세포 시스템에서 합성된 폴리펩타이드는 천연적으로 관련된 성분으로부터 분리될 것이다. 단백질은 또한 당해 분야에 의해 공지된 단백질 정제 기술을 사용하는 분리에 의해 천연적으로 관련된 성분들을 실질적으로 유리시킬 수 있다.

[0085]

본원에 사용된 용어 "회수하는"은 예를 들면, 당해 분야에 의해 공지된 단백질 정제 기술을 사용하는 분리에 의해 천연적으로 관련된 성분들이 실질적으로 유리된 폴리펩타이드와 같은 화학 종이 되도록 하는 공정을 말한다.

[0086]

본원에 사용된 "생물학적 활성"은 분자의 임의의 하나 이상의 고유한 생물학적 특성(생체내에서 발견되는 바와 같이 천연적으로 존재하거나, 재조합 수단에 의해 제공되거나 가능한 것에 상관없이)을 말한다. 생물학적 특성은 결합 수용체; 세포 증식의 유도, 세포 성장의 억제, 다른 사이토킨의 유도, 아폽토시스의 유도, 및 효소적 활성을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 생물학적 활성은 또한 Ig 분자의 활성을 포함한다.

[0087]

항체, 단백질 또는, 제2 화학 종을 가진 웨타이드의 상호작용과 관련하여, 본원에 사용된 용어 "특이적인 결합" 또는 "특이적으로 결합하는"은, 상호작용이 화학적 종 상의 특정 구조(예를 들면, 항원 결정인자 또는 에피토프)의 존재에 의존하는, 예를 들면, 항체가 일반적으로 단백질에 대해서보다 특정 단백질 구조를 인식하여 결합하는 것을 의미한다. 항체가 에피토프 "A"에 대해 특이적인 경우, 표지된 "A" 및 항체를 함유하는 반응

에서 에피토프 A(또는 유리된, 표지되지 않은 A)를 함유하는 분자의 존재는 항체에 결합된 표지된 A의 양을 감소시킬 것이다.

[0088] 본원에 사용된 용어 "항체"는 광범위하게는 4개의 폴리펩타이드 쇄, 2개의 중(H)쇄 및 2개의 경(L)쇄, 또는 이의 기능적 단편, 돌연변이체, 변이체 또는 유도체로 구성되고, Ig 분자의 필수적인 에피토프 결합 특징을 보유한 특정의 면역글로불린 (Ig) 분자를 말한다. 이러한 돌연변이체, 변이체, 또는 유도체 항체 형식은 당해 분야에 공지되어 있다. 이의 비제한적 양태는 하기 논의된다.

[0089] 완전한 길이의 항체에서, 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서 HCVR 또는 VH로 약칭) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 LCVR 또는 VL로 약칭) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인, CL로 구성된다. VH 및 VL 영역은 또한 골격 영역(FR)으로 명명된 보다 더 보존된 영역과 함께 산재된, 상보성 결정 영역(CDR)으로 명명된 초가변성 영역으로 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 아미노-말단으로부터 카복시-말단까지 다음 순서로 정렬된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 면역글로불린 분자는 임의의 유형(예를 들면, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 부류(예를 들면, IgG1, IgG2, IgG 3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 아부류일 수 있다.

[0090] 용어 "Fc 영역"은 완전한 항체의 파파인 분해로 생성될 수 있는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는데 사용된다. Fc 영역은 천연의 서열 Fc 영역 또는 변이 Fc 영역일 수 있다. 면역글로불린의 Fc 영역은 일반적으로 2개의 불변 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하며, 임의로 CH4 도메인을 포함한다. 항체 효과기 기능을 변경시키기 위한 Fc 부위내 아미노산 잔기의 치환은 당해 분야에 공지되어 있다(참조; Winter, et al. 미국 특허 5,648,260 및 5,624,821). 항체의 Fc 부위는 몇개의 중요한 효과기 기능, 예를 들면, 항체 및 항원-항체 복합체의 사이토킨 유도, ADCC, 포식작용, 보체 의존성 세포독성(CDC) 및 반감기/제거율을 중재한다. 일부 경우에, 효과기 기능은 치료학적 항체의 경우 바람직하지만 다른 경우 불필요하거나 또는 심지어 치료학적 대상체에 따라 유해할 수 있다. 특정의 사람 IgG 동형, 특히 IgG1 및 IgG3은 FcγR 및 보체 C1q 각각에 대한 결합을 통해 ADCC 및 CDC를 중재한다. 신생 Fc 수용체(FcRn)는 항체의 순환 반감기를 결정하는 중요한 성분이다. 또 다른 양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기는 항체의 불변 영역, 예를 들면, 항체의 Fc 영역내에서 치환됨으로써 항체의 효과기 기능이 변경된다. 면역글로불린의 2개의 동일한 중쇄의 이량체화는 CH3 도메인의 이량체화에 의해 매개되며 힌지 영역내 이황화물 결합에 의해 안정화된다(참조: Huber et al. Nature; 264: 415-20; Thies et al. 1999 J Mol Biol; 293: 67-79). 중쇄-중쇄 이황화물 결합을 방지하기 위한 힌지 영역내 시스테인 잔기의 돌연변이는 CH3 도메인의 이량체화를 탈안정화시킬 것이다. CH3 이량체화에 관여하는 잔기는 확인되어 있다(참조: Dall' Acqua 1998 Biochemistry 37: 9266-73). 따라서, 1가 반(half)-Ig를 생성하는 것이 가능하다. 흥미롭게도, 이들 1가 반 Ig 분자는 IgG 및 IgA 소부류 둘다의 경우 천연적으로 발견되었다(참조: Seligman 1978 Ann Immunol 129: 855-70; Biewenga et al 1983 Clin Exp Immunol 51: 395-400). FcRn:Ig Fc 영역의 화학량론은 2:1로 측정되었고(참조: West et al .2000 Biochemistry 39: 9698-708), 반 Fc는 FcRn 결합을 매개하기에 충분하다(참조: Kim et al 1994 Eur J Immunol; 24: 542-548). CH3 이량체화에 중요한 잔기는 CH3 b 쉬트 구조의 내부 계면상에 위치하므로 CH3 도메인의 이량체화를 파괴하기 위한 돌연변이는 이의 FcRn 결합에 보다 큰 부작용을 가지지 않을 수 있는 반면, FcRn 결합에 관여하는 영역은 CH2-CH3 도메인의 외부 계면상에 위치한다. 그러나, 반 Ig 분자는 정규 항체의 것보다 이의 보다 더 작은 크기로 인하여 조직 침투에 있어 특정의 장점을 가질 수 있다. 하나의 양태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기는 본 발명의 결합 단백질의 불변 영역, 예를 들면, Fc 영역내에서 치환됨으로써, 중쇄의 이량체화가 파괴되어 반 DVD Ig 분자가 생성된다. IgG의 소염 활성을 IgG Fc 단편의 N-결합된 글리칸의 시알릴화에 완전하게 의존적이다. 소염 활성을 위한 상세한 글리칸 요건을 측정함으로써, 적절한 IgG1 Fc 단편을 생성시킴으로써 완전한 재조합체, 효능이 크게 향상된 시알릴화된 IgG1 Fc를 생성하였다[참조: Anthony, R.M., et al. (2008) Science 320:373-376].

[0091] 본원에 사용된 용어 항체의 "항원-결합부"(또는 단순히 "항체 일부")는 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유한 항체의 하나 이상의 단편을 말한다. 항체의 항원-결합 작용은 완전한 길이의 항체의 단편에 의해 수행될 수 있음이 밝혀졌다. 이러한 항체 양태는 또한 2개 이상의 상이한 항원에 특이적으로 결합하는, 이특이적인, 이중 특이적인, 또는 다중-특이적인 형식일 수 있다. 용어 항체의 "항원-결합부"에 포함된 결합 단편의 예는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인, Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 이황화물 결합에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인, F(ab')₂ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암(arm)의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (v) 단일 가변 도메인을 포함하는 dAb 단편[참조: 본원에 참조로 인용된, Ward et al, (1989) Nature 341:544-546, Winter et al., PCT 공보 제WO

90/05144 A1호]; 및 (vi) 분리된 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 또한, Fv 단편, VL 및 VH의 2개의 도메인이 별개의 유전자에 의해 암호화되지만, 이들은 재조합 방법을 사용하여, 이들을 결합시킴으로써 이들을 VL 및 VH 영역이 쌍을 이루어 1가 분자를 형성하는 단일 단백질 쇄[또한 단일쇄 Fv(scFv); 참조: 예를 들면, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; 및 Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883]로 제조되도록 하는 합성 링커에 의해 결합시킬 수 있다. 이러한 단일쇄 항체는 또한 용어 항체의 "항원-결합부"에 포함되는 것으로 의도된다. 디아바디와 같은, 단일쇄 항체의 다른 형태 또한 포함된다. 디아바디는, VH 및 VL 도메인이 단일 폴리펩타이드 쇄 상에서, 그러나 너무 짧아서 동일한 쇄 상의 2개의 도메인 사이에 쌍을 이루도록 함으로써 도메인이 다른 쇄의 상보성 도메인과 쌍을 이루도록 하고 2개의 항원 부위를 생성하는 링커를 사용하여 발현되는 2가의 이특이적 항체이다[참조: 예를 들면, Holliger, P., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, RJ., et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123]. 이러한 항체 결합부는 당해 분야에 공지되어 있다[참조: Kontermann and Dubel eds., *Antibodies Engineering* (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5)]. 또한, 단일쇄 항체는 또한 상보성 경쇄 폴리펩타이드와 함께 항원 결합 영역의 쌍을 형성하는 직렬 Fv 분절(VH-CH1-VH-CH1)의 쌍을 포함하는 "선형 항체"를 포함한다 [참조: Zapata et al. *Protein Eng.* 8(10):1057-1062(1995); 및 미국 특허 5,641,870].

[0092] 용어 "다가 결합 단백질"은 본 명세서 전체에서 2개 이상의 결합 부위를 포함하는 결합 단백질을 나타내는데 사용된다. 하나의 양태에서, 다가 결합 단백질은 3개 이상의 항원 결합부를 가지도록 조작되며, 일반적으로 천연적으로 존재하는 항체가 아니다. 용어 "다중특이적인 결합 단백질"은 2개 이상의 관련되거나 관련되지 않은 표적에 결합할 수 있는 결합 단백질을 말한다. 본 발명의 이원 가변 도메인(DVD) 결합 단백질은 2개 이상의 항원 결합부를 포함하며 4가 또는 다가 결합 단백질이다. DVD는 일특이적, 즉, 하나의 항원에 결합할 수 있거나, 다 특이적, 즉 2개 이상의 항원에 결합할 수 있다. 2개의 중쇄 DVD 폴리펩타이드 및 2개의 경쇄 DVD 폴리펩타이드를 포함하는 DVD 결합 단백질은 DVD-Ig로 언급된다. DVD-Ig의 각각의 반은 중쇄 DVD 폴리펩타이드, 및 경쇄 DVD 폴리펩타이드, 및 2개의 항원 결합부를 포함한다. 각각의 결합 부위는 항원 결합부당 항원 결합에 관여하는 총 6개의 CDR과 함께 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0093] 본원에 사용된 용어 "이특이적항체"는 쿼드로마 기술(quadroma technology)[참조: Milstein, C. and A.C. Cuello, *Nature*, 1983. 305(5934): p. 537-40]에 의해, 2개의 상이한 모노클로날 항체의 화학적 접합에 의해 [참조: Staerz, U.D., et al., *Nature*, 1985. 314(6012): p. 628-31], 또는 Fc 영역내 돌연변이를 도입하는 놈-인투-홀 또는 유사한 시도에 의해[참조: Holliger, P., T. Prospero, and G. Winter, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(14): p. 6444-8.18], 단지 하나만이 기능적 이특이적 항체인 다수의 상이한 면역글로불린 종을 수득함으로써 생성된 완전한 길이의 항체를 말한다. 분자 기능에 의해, 이특이적 항체는 이의 2개의 결합 아암 중 하나(HC/LC의 하나의 쌍) 상의 하나의 항원(또는 에피토프)에 결합하며, 이의 제2 아암 상의 상이한 항원(또는 에피토프)(HC/LC의 상이한 쌍)에 결합한다. 이러한 정의에 의해, 이특이적 항체는 2개의 명백한 항원 결합 아암(특이성 및 CDR 서열 둘다에서)을 가지며, 이것이 결합하는 각각의 항원에 대하여 1가이다.

[0094] 본원에 사용된 용어 "이중-특이적인 항체"는 이의 2개의 결합 아암 중 각각(HC/LC의 쌍)내 2개의 상이한 항원 (또는 에피토프)에 결합할 수 있는 완전한 길이의 항체를 말한다(참조: PCT 공보 WO 02/02773). 따라서, 이중-특이적인 결합 단백질은 동일한 특이성 및 동일한 CDR 서열을 지닌 2개의 동일한 항원 결합 아암을 가지며, 이것이 결합하는 각각의 항원에 대해 2가이다.

[0095] 결합 단백질의 "기능적 항원 결합부"는 표적 항원에 결합할 수 있는 것이다. 항원 결합부의 항원 결합 친화성은, 항원 결합부가 기원하는 모 항체와 같이 필수적으로 강력하지 않지만, 항원에 결합하는 능력은 항원에 결합하는 항체를 평가하기 위해 공지된 각종 방법 중 어느 하나를 사용하여 측정 가능하여야 한다. 또한, 본원의 다가 항체의 항원 결합부 각각의 항원 결합 친화성은 정량적으로 동일할 필요가 없다.

[0096] 용어 "사이토kin"은 세포내 매개인자로서 다른 세포 집단 상에서 작용하는, 하나의 세포 집단에 의해 방출된 단백질에 대한 일반적인 용어이다. 이러한 사이토kin의 예는 림포킨, 모노킨, 및 일반적인 폴리펩타이드 호르몬이다. 사이토kin 중에서 사람 성장 호르몬, N-메티오닐 사람 성장 호르몬, 및 소 성장 호르몬과 같은 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 렐락신; 프로렐락신; 난포 자극(FSH), 갑상선 자극 호르몬(TSH), 및 황체 호르몬(LH)과 같은 당단백질 호르몬; 간 성장 인자; 섬유모세포 성장 인자; 프롤락틴; 태반락토겐; 종양 괴사 인자-알파 및 -베타; 뮬러관(mullerian)-억제 물질; 마우스 고나도트로핀-관련 웨პ타이드; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자; 인테그린; 트롬보포이에틴(TPO); NGF-알파와 같은 신경 성장 인자; 혈소판-성장 인자; 태반 성장 인자; TGF-알파 및 TGF-베타와 같은 형질전환 성장 인자(TGF); 인슐린-유사 성장 인자-1 및 -11; 에리트로포이에틴(EPO); 골유도 인자; 인터페론-알파, -베타 및 -감마와 같은 인터페론; 대식세포-

CSF(M-CSF)와 같은 콜로니 자극 인자(CSF); 과립구 대식세포-CSF (GM-CSF); 및 과립구-CSF(G-CSF); 인터류킨 (IL)-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-33과 같은 인터류킨(IL); TNF-알파 또는 TNF-베타와 같은 중양 괴사 인자; 및 LIF 및 키트 리간드(KL)를 포함하는 기타 폴리펩타이드 인자이다. 본원에 사용된 용어 사이토kin은 천연 공급원 또는 재조합 세포 배양물 및 천연의 서열 사이토kin의 생물학적으로 활성인 등량체로부터의 단백질을 포함한다.

[0097]

용어 "링커"는 펩타이드 결합에 의해 연결된 2개 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 폴리펩타이드를 나타내며 하나 이상의 항원 결합부를 연결시키기 위해 사용된다. 이러한 링커 폴리펩타이드는 당해 분야에 익히 공지되어 있다[참조: 예를 들면, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, RJ., et al. (1994) Structure 2:1121-1123]. 예시적인 링커는 AKTPPKLEEGESEAR(서열번호 1); AKTPPKLEEGESEAR(서열번호 2); AKTPKLGG(서열번호 3); SAKTPKLGG(서열번호 4); SAKTP(서열번호 5); RADAAP(서열번호 6); RADAAPTVS(서열번호 7); RADAAAAGGPGS(서열번호 8); RADAAAA(G₄S)₄(서열번호 9), SAKTPKLEEGESEARV(서열번호 10); ADAAP(서열번호 11); ADAAPTVSIFPP(서열번호 12); TVAAP(서열번호 13); TVAAPSIFPP(서열번호 14); QPKAAP(서열번호 15); QPKAAPSVTLPFP(서열번호 16); AKTPP(서열번호 17); AKTTPPSVTPLAP(서열번호 18); AKTTAP(서열번호 19); AKTTAPSVYPLAP(서열번호 20); ASTKGP(서열번호 21); ASTKGPSVFPLAP(서열번호 22), GGGGSGGGSGGGGS(서열번호 23); GENKVEYAPALMALS(서열번호 24); GPAKEELTPLKEAKVS(서열번호 25); GHEAAVMQVQYPAS(서열번호 26); GGGGGGGP(서열번호 27); GGGGGGGGP(서열번호 28); PAPNLLGGP(서열번호 29); PNLLGGP(서열번호 30); GGGGGGP(서열번호 31); PAPELLGGP(서열번호 32); PTISPAPNLLGGP(서열번호 33); TVAADDKSVFIVPP(서열번호 34); TVD-DDKAAP(서열번호 35); LVPRGSAAP(서열번호 36); ASDDDDK GGP(서열번호 37); ALVPR GSGP(서열번호 38); ASTDDDDK SVFPLAP(서열번호 39); TVALVPR GSVFIFPP(서열번호 40); ASTLVPR GSVFPLAP(서열번호 41); TVAADDK SVFIVPP(서열번호 42); ASTDDDK SVFPLAP(서열번호 43); LEVLQ GP(서열번호 44); TVAALEVLFQ GPAP(서열번호 45); ASTLEVLFQ GPLAP(서열번호 46); PAPLEVLQ GP(서열번호 47); TAENLYFQ GAP(서열번호 48); AENLYFQ GA(서열번호 49); PGPFGR SAGGP(서열번호 50); PGPFGR SAGG(서열번호 51); PQRGR SAG(서열번호 52); PHYGR SGG(서열번호 53); GPFGR SAGP(서열번호 54); GDDDDK GGP(서열번호 55); AGDDDDK GGP(서열번호 56); GGDDDDK GGP(서열번호 57); AS; TVA; ASTK(서열번호 58); ASTKGPSV(서열번호 59); ASTKGPSVFP(서열번호 60); TVAAPS(서열번호 61), TVAAPSIFI(서열번호 62)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0098]

일부 예에서, DVD-Ig 구성(architecture), 특히 VL1-VL2 및 VH1-VH2를 연결하는 링커는 내부(C 말단) 도메인에 대한 리간드 결합에 있어 구속을 부과할 수 있다. 하나의 양태에서, DVD-Ig는 효소에 의해 분해될 수 있어서 이러한 구속을 완화하거나 제거한다. 하나의 양태에서, DVD-Ig는 적어도 하나의 중쇄 및 경쇄의 VD1(VH1, VL1) 및 VD2(VH2, VL2) 도메인 사이에서 효소에 의해 분해될 수 있다. 하나의 양태에서, 분해가능한 링커는 중쇄 및 경쇄 중의 적어도 하나의 VD1 및 VD2 도메인을 결합한다. 하나의 양태에서, DVD-Ig는 엔테로키나제, 트롬빈, 프리시션(PreScission), 담배 식각 바이러스 프로테아제(TEV), 및 조직 플라스미노겐 활성화인자(tPA) + 프롤린에 의해 분해된다.

[0099]

하나의 양태에서, DVD-Ig의 외부 가변 도메인(N 말단)과 내부 가변 도메인(C 말단) 사이의 분해가능한 링커, 또는 VH1-VH2 또는 VL1-VL2 연결을 통한 DVD-Ig의 내부 가변 도메인에 대한 외부 가변 도메인의 단일쇄(링커가 없는 VH/VL) 부착을 시험하여 이러한 잠재적인 구속을 극복하려고 시도하였다. 내부 도메인 결합은 또한 링커 길이로 조절할 수 있다. VH1-VH2 및 VL1-VL2 링커는 CH1/CL로부터 기원한 서열, IgG의 헌지 영역, 및 글리신-세린 반복물과 같은 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 대안적인 링커를 제공하면 (1) DVD-Ig에 대한 내부 항원 결합부에 대한 완전한 항원 친화성을 회복할 수 있고; (2) DVD-Ig의 내부 항원 결합부의 친화성을 조절할 수 있으며; (3) 작용 부위에서 DVD-Ig의 내부 항원 결합부를 활성화시키고; (4) 항원에 대한 DVD-Ig의 결합활성을 증가시키고/시키거나; (5) Fv 단위로서 외부 가변 도메인을 방출할 수 있다.

[0100]

외부 도메인 Fv의 부착은 다수의 방법으로 달성한다. 첫째로, 프로테아제 분해 부위를 링커의 서열내로 조작한다. 이는 DVD-Ig의 내부 또는 외부 가변 도메인을 연결하는 중쇄 또는 경쇄 링커 중 하나 또는 둘다에서 수행된다. 프로테아제 분해 서열은 임의의 수의 프로테아제 분해 서열(참조: 예를 들면, 표 1, 2, 5, 6, 및 실시예 2.3)로부터 선택된다. 이상적으로, 프로테아제는 특정 서열에서 분해하도록 선택되며, DVD-Ig에서 다른 부위를 용이하게 분해하지 않는다. 프로테아제 분해 서열을 함유하는 DVD-Ig 작제물은 제조 과정 자체에서 분해되거나, 선택된 프로테아제가 표적화된 세포 유형에 의해 발현되는 경우, DVD-Ig는 표적화된 조직에서 또는 다른 내인성 프로테아제에 의해 분해된다. 이에 의해 DVD-Ig는 의도된 치료학적 부위에서 활성화되는 전구 약물로 고려된다. 또한, 이러한 메카니즘은, DVD-Ig가 표적화된 치료학적 부위에서 활성화될 때까지 내부 결합

부위에서 특정 항원 결합 친화성을 차폐하도록 한다. 본 발명의 조성물 및 방법에 대한 다른 장점은 부위-특이적인 방식으로 특정 표적화된 항원에 대한 친화성을 증가시키는 능력이다. 이는 다음 방식으로 결합활성을 통해 달성된다. DVD-Ig가 동일한 항원에서 2개의 상이한 에피토프에 결합하는 항원 결합 도메인을 함유하는 경우, 이에 대한 외부 가변 도메인의 증가된 굴곡성으로 동일한 항원에 대해 2회 - 그러나 상이한 위치에서 - 결합함으로써 결합활성을 통해 특정 항원에 대한 명백한 친화성을 증가시키는 것이 가능하다. 부위-특이적인 방식으로 친화성(결합활성에 의해)을 증가시키기 위해 2개의 명백한 항원(동일한 세포 또는 2개의 상이한 세포)을 표적화하는 분해가능한 링커를 가진 DVD-Ig를 또한 설계할 수 있다. 예를 들어, 목적한 2개의 항원을 종양에서 동시에, 그러나 정상 세포에서 개별적으로 발현시킬 수 있다. 따라서, 증가된 결합활성을 갖는 종양 세포상에서 2개의 DVD-Ig 도메인의 결합은 종양 결합 특이성을 증가시키고 정상 세포에서 DVD-Ig 부작용(독성)을 감소시킬 것이다. 또한, 중쇄와 경쇄 사이의 이황화물 결합, 또는 외부 가변 도메인의 VH 및 VL내 특이적인 돌연변이를 조작하여 생체내에서 이들의 연결능을 유지할 수 있을 것으로 예전된다. 일부 경우에, 동일한 분해 기술을 사용하여 DVD-Ig로부터 전체의 외부 Fv를 분해함으로써 유리된 Fv 및 IgG를 수득하는 것이 유리하다. Fv 분해는 외부 도메인에 대한 표적의 결합 전 또는 후에 발생할 수 있다.

표 1

VL1 – VL2 또는 VH1 – VH2 링커내 프로테아제 분해 부위(캡으로 나타냄)를 지닌 링커의 예

| 중쇄 링커 (VH1 – VH2) | 서열 번호 | 경쇄 링커 (VL1 – VL2) | 서열 번호 | 설명 |
|-------------------|-------|-------------------|-------|--------------------------------|
| ASTKGP | 21 | TVDDDDK AAP | 35 | 짧은 HC 링커; EK 분해가능한 LC 링커 |
| ASDDDDK GGP | 37 | TVAAP | 13 | EK 분해가능한 HC 링커; 짧은 IC 링커 |
| ASTKGP | 21 | LVPR GSAAP | 36 | 짧은 HC 링커; 트롬빈 분해가능한 LC 링커 |
| ALVPR GSGP | 38 | TVAAP | 13 | 트롬빈 분해가능한 HC 링커; 짧은 LC 링커 |
| ASTKGP | 21 | TVAADDDK SVFIVPP | 34 | 짧은 HC 링커; EK 분해가능한 보다 긴 LC 링커 |
| ASTDDDDK SVFPLAP | 39 | TVAAP | 13 | EK 분해가능한 보다 긴 HC 링커; 짧은 LC 링커 |
| ASTKGP | 21 | TVALVPR GSVFIFPP | 40 | 짧은 HC 링커; 트롬빈 분해가능한 보다 긴 LC 링커 |
| ASTLVPR GSVFPLAP | 41 | TVAAP | 3 | 트롬빈 분해가능한 보다 긴 HC 링커; 짧은 LC 링커 |
| ASTKGPSVFP LAP | 22 | TVDDDDK AAP | 35 | 긴 HC 링커; EK 분해가능한 LC 링커 |
| ASDDDDK GGP | 37 | TVAAPSVFIFPP | 14 | EK 분해가능한 HC 링커; 긴 LC 링커 |
| ASTKGPSVFP LAP | 22 | LVPR GSAAP | 36 | 긴 HC 링커; 트롬빈 분해가능한 LC 링커 |
| ALVPR GSGP | 38 | TVAAPSVFIFPP | 14 | 트롬빈 분해가능한 HC 링커; 긴 LC 링커 |
| ASTKGPSVFP LAP | 22 | TVAADDDK SVFIVPP | 34 | 긴 HC 링커; EK 분해가능한 보다 긴 LC 링커 |
| ASTDDDK SVFPLAP | 43 | TVAAPSVFIFPP | 14 | EK 분해가능한 보다 긴 HC 링커; 긴 LC 링커 |
| ASTKGPSVFP LAP | 22 | TVALVPR GSVFIFPP | 40 | 긴 HC 링커; 트롬빈 분해가능한 보다 긴 LC 링커 |
| ASTLVPR GSVFPLAP | 41 | TVAAPSVFIFPP | 14 | 트롬빈 분해가능한 보다 긴 HC 링커; 긴 LC 링커 |
| ASTKGP | 21 | LEVLFQ GP | 44 | 짧은 HC 링커; 절단전 분해가능한 LC 링커 |
| LEVLFQ GP | 44 | TVAAP | 13 | 절단전 분해가능한 HC 링커; 짧은 LC 링커 |
| ASTKGP | 21 | TVAALEVLFQ GPAP | 45 | 짧은 HC 링커; 절단전 분해가능한 보다 긴 LC |
| ASTLEVLFQ GPLAP | 46 | TVAAP | 3 | 절단전 분해가능한 보다 긴 HC 링커; 짧은 LC 링커 |
| ASTKGPSVFP LAP | 22 | LEVLFQ GP | 44 | 긴 HC 링커; 절단전 분해가능한 LC 링커 |
| LEVLFQ GP | 44 | TVAAPSVFIFPP | 14 | 절단전 분해가능한 HC 링커; 긴 LC 링커 |
| ASTKGPSVFP LAP | 22 | TVAALEVLFQ GPAP | 45 | 긴 HC 링커; 절단전 분해가능한 보다 긴 LC 링커 |
| ASTLEVLFQ GPLAP | 46 | TVAAPSVFIFPP | 14 | 절단전 분해가능한 보다 긴 HC 링커; 긴 LC 링커 |
| PAPLEVLFQ GP | 47 | | | 힌지를 기초로 한 절단전 분해가능한 보다 긴 HC 링커 |
| | | PAPLEVLFQ GP | 47 | 힌지를 기초로 한 절단전 분해가능한 보다 긴 LC 링커 |

| | | | | |
|------------|----|--------------|----|--|
| ASTKGP | 21 | TAENLYFQ GAP | 48 | 짧은 HC 링커; TEV 분해가능한 LC 링커 |
| AENLYFQ GA | 49 | TVAAPSVFIFPP | 14 | 보다 짧은 TEV 분해가능한 HC 링커; 긴 LC 링커 |
| AENLYFQ GA | 49 | PAPNLLGGP | 29 | 힌지(9)를 기초로 하는 보다 짧은 TEV 분해가능한 HC 링커; 긴 LC 링커 |

[0102]

표 2

VH1-VH2 및 VL1-VL2 쇄 링커 둘다에서 프로테아제 분해 부위(캡으로 나타냄)를 지닌 링커의 예

| 증쇄 (VH1 – VH2) | 서열 번호 | 경쇄 (VL1 – VL2) | 서열 번호 | 코멘트 |
|----------------|-------|-------------------|-------|--|
| ASDDDDK GGP | 37 | TVALVPR GSVFIFPP | 40 | 보다 짧은 EK 분해가능한 HC 링커; 보다 긴 트롬빈 분해가능한 LC 링커 |
| LEVLFQ GP | | TVAADDDDK SVFIVPP | 34 | 보다 짧은 절단전 분해가능한 HC 링커; 보다 긴 EK 분해가능한 LC 링커 |
| ALVPR GSGP | 38 | TVAALEVLFQ GPAP | 45 | 보다 짧은 트롬빈 분해가능한 HC 링커; 보다 긴 절단전 분해가능한 LC 링커 |
| LEVLFQ GP | 44 | TAENLYFQ GAP | 48 | 보다 짧은 절단전 분해가능한 HC 링커; 보다 긴 TEV 분해가능한 LC 링커 |
| AENLYFQ GA | 49 | TVAADDDDK SVFIVPP | 34 | 보다 짧은 TEV 분해가능한 HC 링커; 보다 긴 EK 분해가능한 LC 링커 |
| PGPFGR SAGGP | 50 | | | 조직 플라스미노겐 활성인자(tPA) + 힌지-유사 서열에 가장 근접한 프롤린 |
| | | PGPFGR SAGGP | 50 | tPA + 힌지-유사 서열에 가장 근접한 프롤린 |
| PGPFGR SAGG | 51 | | | tPA + 힌지 - 는 HC 또는 LC 링커에 사용될 수 있다 |
| PQRGR SAG | 52 | | | tPA + 힌지 - 는 HC 또는 LC 링커에 사용될 수 있다 |
| PHYGR SGG | 53 | | | tPA + 힌지 - 는 HC 또는 LC 링커에 사용될 수 있다 |
| GPFGR SAGP | 54 | | | tPA + 힌지 - 는 HC 또는 LC 링커에 사용될 수 있다 |
| GDDDDK GGP | 55 | | | EK - 짧은 링커는 HC 또는 LC 링커에 사용될 수 있다 |
| AGDDDDK GGP | 56 | | | EK - 짧은 링커는 HC 또는 LC 링커에 사용될 수 있다 |
| GGDDDDK GGP | 57 | | | EK - 짧은 링커는 HC 또는 LC 링커에 사용될 수 있다 |

[0103]

[0104] 분해 부위의 도입이 링커의 삽입에 의해 달성될 수 있지만, 분해 부위를 단백질내로 삽입하기 위한 다른 방법이 당해 분야에 익히 공지되어 있다. 다수의 프로테아제 표적 부위 중 어느 하나를 본 발명의 조성물 및 방법에 따라 DVD-Ig내로 도입하여 DVD-Ig를 선택한 효소에 의해 및/또는 바람직한 부위 및 시기(예를 들면, 신체의 특정 위치 또는 시기의 제조 과정 동안)에 분해되도록 할 수 있다.

[0105]

본 발명의 실시에 유용한 효소는 당해 분야에서 광범위하며 익히 공지되어 있다[참조: Barrett, D., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. (2004) Handbook of Proteolytic Enzymes, Academic Press; Rawlings, N., Morton, F., Barrett, A. (2006) Nucleic Acid Research 34, database issue, D270-D272; International Proteolysis Society (IPS) websites <http://www.protease.org/index.html> 및 <http://www.protease.org/blog.html>; Merops (database of all proteases) website <http://merops.sanger.ac.uk/>; <http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/>].

[0106]

하나의 양태에서, DVD-Ig는 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP), 세랄라이신, 아스타신, 아다말라이신과 같은 아연-의존성 엔도펩티다제의 계열인 메트진킨 상과의 프로테아제에 의해 분해된다. MMP는 세포 및 조직을 둘러싸는 세포외 매트릭스를 분해할 수 있으므로 조직 분해에서 역할을 하며 다수의 질병 상태를 치유한다. 암에서, MMP는 암 세포 증식 및 전이를 가능하도록 하는 암 세포 주변의 세포외 매트릭스를 분해한다. 다른 특이적인

MMP는 상이한 조직 유형 또는 병리학적 과정에서 발현되므로 관절염, 조직 치유, 간경화, 혈관형성, 전이 및 형태발생과 같은 조직 또는 질병 상태와 관련된 질병에 대한 조직 특이적인 프로테아제로 고려된다. 이들 효소에 대한 분해 모티프(motif)는 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들면, MMP에 의해 분해된 모티프/서열에 대해서는 Turk, B.E. et al. (2001) *Nature Biotechnology* 19:661-667의 표 1, 4A, 4B, 및 4D를 참조한다. 예시적인 MMP는, 예를 들면, MMP-1; MMP-2; MMP-3; MMP-7; MMP-8; MMP-9; MMP-10; MMP-11; MMP-12; MMP-13; MMP-14; MMP-15; MMP-16; MMP-17; MMP-18; MMP-19; MMP-20; MMP-21; MMP-22; MMP-23A; MMP-23B; MMP-24; MMP-25; MMP-26; MMP-27; 및 MMP-28을 포함한다.

[0107] 하나의 양태에서, DVD-Ig는 디스인테그린 및 메탈로프로테이나제(ADAM)에 의해 분해된다. 예를 들면, ADAM-17(또는 TACE)은 TNF-알파 전환 효소이다. ADAM 프로테이나제는 세포-세포 상호작용, 및 단백질 엑토도메인 제거(ectodomain shedding)(예를 들면, 이들을 활성화시키기 위한 다른 중요한 세포 표면 단백질의 일부를 분해제거)에 중요하다. 예를 들면, HER-2는 ADAM-10에 의해 분해되는 경우 활성화되어 세포 증식을 초래한다. ADAM-10은 또한 N-카드헤린의 분해를 통해 아교모세포종 세포 이주에 역할을 하는 것으로 현재 인식되어 있다. 예를 들면, J Neuroscience (2009); 29 (14): 4605-15 (2009) 및 Cancer Biol Ther. (2006) Jun; 5(6):657-64를 참조한다. 예를 들면, HER-2는 ADAM-10에 의해 분해되며, 이는 아교모세포종 세포 이주에 역할을 한다. 예를 들면, 이들 2개의 효소에 의해 분해된 모티프/서열에 대해서는 Caescu, C.I. et al. (2009) *Biochem J.* 424:79-88을 참조한다. 예시적인 ADAM은 예를 들면, ADAM17; ADAMTS1; ADAM1; ADAM10; ADAM8; ADAMTS4; ADAMTS13; ADAM12; ADAM15; ADAM9; ADAMTS5; ADAM33; ADAM11; ADAM2; ADAMTS2; ADAMTS9; ADAMTS3; ADAMTS7; ADAM22; ADAM28; ADAMTS12; ADAM19; ADAMTS8; ADAM29; ADAM23; ADAM3A; ADAM18; ADAMTS6; ADAM7; ADAMDES1; ADAM20; ADAM6; ADAM21; ADAM3B; ADAMTSL3; ADAMTSL4; ADAM30; ADAMTS20; 및 ADAMTSL2를 포함한다.

[0108] 하나의 양태에서, DVD-Ig는 아폽토시스, 괴사 및 염증에서 중요한 역할을 하는 시스테인 프로테아제의 계열인 카스파제(시스테인-아스파르틱 프로테아제)에 의해 분해된다. 일부 카스파제는 또한 사이토킨의 성숙을 필요로 한다. 예시적인 카스파제는 예를 들면, 카스파제 1-12, 및 14를 포함한다.

[0109] 하나의 양태에서, DVD-Ig는 카텝신에 의해 분해된다. 카텝신은 포유동물 세포 전환, 예를 들면, 신생물, 전이, 골 재흡수; 염증, 변성 관절병에서 역할을 담당한다. 예시적인 카텝신은 예를 들면, 카텝신 G; 카텝신 B; 카텝신 D; 카텝신 L1; 카텝신 C; 카텝신 K; 카텝신 S; 카텝신 H; 카텝신 A; 카텝신 E; 카텝신 L; 카텝신 Z; 카텝신 F; 카텝신 G-유사 2; 카텝신 L-유사 1; 카텝신 W; 카텝신 L-유사 2; 카텝신 L-유사 3; 카텝신 L-유사 4; 카텝신 L-유사 5; 카텝신 L-유사 6; 카텝신 L-유사 7; 또는 카텝신 O를 포함한다.

[0110] 하나의 양태에서, DVD-Ig는 칼파인에 의해 분해된다. 칼파인은 세포 주기, 신경 기능 및 기억, 및 혈관 및 응고에 중요한 역할을 하는 칼슘 활성화된 시스테인 프로테아제이다. 예시적인 칼파인은 예를 들면, 칼파인 3; 칼파인 10; 칼파인 1 (μ u/1) 대형 서브유닛; 칼파인, 소형 서브유닛 1; 칼파인 2, (μ u/1); 대형 서브유닛; 칼파인 9; 칼파인 11; 칼파인 5; 칼파인 13; 칼파인 8; 칼파인, 소형 서브유닛 2; 칼파인 15; 칼파인 12; 칼파인 7; 또는 칼파인 8을 포함한다.

[0111] 용어 "면역글로불린 불변 도메인"은 종체 또는 경체 불변 도메인을 말한다. 사람 IgG 종체 및 경체 불변 도메인 아미노산 서열은 당해 분야에 공지되어 있다.

[0112] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체" 또는 "mAb"는 실질적으로 동종인 항체의 집단으로부터 수득된 항체, 즉, 미량으로 존재할 수 있는 가능한 천연적으로 존재하는 돌연변이를 제외하고 동일한 집단을 포함하는 개개의 항체를 말한다. 모노클로날 항체는 시그널 항체에 대해 지시되는 고도로 특이적이다. 또한, 대표적으로 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 대조적으로, 각각의 mAb는 항원에서 단일 결정인자에 대해 지시된다. 조절제 "모노클로날"은 어떠한 특정 방법에 의한 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 고려되지 않는다.

[0113] 본원에 사용된 용어 "사람 항체"는 사람 배선(germline) 면역글로불린 서열로부터 기원한 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 본 발명의 사람 항체는 예를 들면, CDR 및 특히 CDR3내에서 사람 배선 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기(예를 들면, 시험관내 무작위적인 또는 부위-특이적인 돌연변이유발에 의해 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에 사용된 용어 "사람 항체"는, 마우스와 같은 다른 포유동물 종의 배선으로부터 기원한 CDR 서열이 사람 골격 서열상에 이식된 항체를 포함하는 것으로 의도되지 않는다.

[0114] 본원에 사용된 용어 "재조합 사람 항체"는 숙주 세포내로 형질감염된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 항체

(하기 II C 단락에 추가로 기술됨), 재조합 조합 사람 항체 라이브러리로부터 분리한 항체[참조: Hoogenboom H.R. (1997) TIB Tech. 15:62-70; Azzazy H., and Highsmith W.E. (2002) Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo J.V., and Lerrick J.W. (2002) BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom H., and Chames P. (2000) Immunology Today 21 :371-378], 사람 면역글로불린 유전자에 대해 유전자삽입된 동물(예를 들면, 마우스)로부터 분리된 항체[참조: Taylor, L. D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A. and Green L.L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Little M. et al. (2000) Immunology Today 21 :364-370] 또는 다른 DNA 서열에 대한 사람 면역글로불린 유전자 서열의 스플라이싱을 포함하는 어떠한 다른 수단으로 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 또는 분리된 항체와 같이, 재조합 수단으로 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 또는 분리된 모든 사람 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 이러한 재조합 사람 항체는 사람 배선 면역글로불린 서열로부터 기원한 가변 및 불변 영역을 갖는다. 그러나, 특정 양태에서, 이러한 재조합 사람 항체는 시험관내 돌연변이유발(또는 사람 Ig 서열에 대해 유전자삽입성인 동물이 사용된 경우, 생체내 체세포 돌연변이유발)에 적용되므로, 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은, 사람 배선 VH 및 VL 서열로부터 기원하고 이와 관련되지만, 생체내에서 사람 항체 배선 레퍼토리내에 천연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0115] "친화성 성숙된" 항체는 변형(들)을 갖지 않는 모 항체와 비교하여, 항원에 대한 항체의 친화성에 있어서 개선된 하나 이상의 CDR내 하나 이상의 변형이 있는 항체이다. 예시적인 친화성 성숙된 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 친화성 또는 심지어 피코몰 친화성을 가질 것이다. 친화성 성숙된 항체는 당해 분야에 공지된 과정으로 생산된다. 문헌[참조: Marks et al. BiolTechnology 10:779-783 (1992)]은 VH 및 VL 도메인 셔플링(shuffling)에 의한 친화성 성숙을 기술하고 있다. CDR 및/또는 골격 잔기의 무작위적 돌연변이유발은 문헌[참조: Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91 :3809-3813 (1994); Schier et al. Gene 169:147- 155 (1995); Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); Hawkins et al, J. Mol. Biol 226:889-896 (1992)]에 기술되어 있으며 미국 특허 제US 6914128 B1호에 기술된 바와 같이 활성을 향상시키는 아미노산 잔기를 지닌 선택적인 돌연변이유발 위치, 접촉 또는 초돌연변이 위치에서 선택적인 돌연변이이다.

[0116] 용어 "키메라 항체"는, 하나의 종으로부터의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열 및 다른 종으로부터의 불변 영역 서열을 포함하는 항체, 예를 들면, 사람 불변 영역에 연결된 쥐 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 갖는 항체를 포함하는 항체를 말한다.

[0117] 용어 "CDR-이식된 항체"는 하나의 종으로부터의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하지만, VH 및/또는 VL의 CDR 영역의 하나 이상의 서열이 다른 종의 CDR 서열로 치환된 항체, 예를 들면, 하나 이상의 쥐 CDR(예를 들면, CDR 3)이 사람 CDR 서열로 치환된 쥐 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 갖는 항체를 말한다.

[0118] 용어 "사람화된 항체"는 비-사람 종(예를 들면, 마우스)으로부터 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하지만, VH 및/또는 VL 서열의 적어도 하나의 부위가 더 "사람-유사"하게 되도록, 즉 사람 배선 가변 서열과 더 유사하게 되도록 변경된 항체를 말한다. 사람화된 항체의 하나의 유형은 CDR-이식된 항체이며, 여기서, 사람 CDR 서열은 비-사람 VH 및 VL 서열내로 도입되어 상응하는 비사람 CDR 서열로 대체된다. 또한, "사람화된 항체"는 목적한 항원에 면역특이적으로 결합하며 실질적으로 사람 항체의 아미노산 서열을 갖는 골격(FR) 영역 및 실질적으로 비-사람 항체의 아미노산 서열을 갖는 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 항체 또는 이의 변이체, 유도체, 유사체 또는 단편이다. CDR과 관련하여 본원에 사용된 용어 "실질적으로"는 비-사람 항체 CDR의 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR을 말한다. 사람화된 항체는, 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역이 비-사람 면역글로불린(즉, 공여체 항체)의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 골격 영역이 사람 면역글로불린 컨센서스 서열의 것인 적어도 하나의, 및 전형적으로 2개의, 가변 도메인(Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) 중 실질적으로 모두를 포함한다. 하나의 양태에서, 사람화된 항체는 또한 전형적으로 사람 면역글로불린의 것인 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 하나의 부위를 포함한다. 일부 양태에서, 사람화된 항체는 경쇄 및 적어도 중쇄의 가변 영역 둘다를 함유한다. 항체는 또한 중쇄의 CH1, 힌지, CH2, CH3, 및 CH4 영역을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 사람화된 항체는 단지 사람화된 경쇄를 함유한다. 일부 양태에서, 사람화된 항체는 단지 사람화된 중쇄를 함유한다. 구체적인 양태에서, 사람화된 항체는 단지 경쇄 및/또는 사람화된 중쇄의 사람화된 가변 도메인을 함유한다.

[0119] 용어 "카밧 번호매김(Kabat numbering)", "카밧 정의(Kabat definition)" 및 "카밧 표지화(Kabat labeling)"는

본원에서 상호교환적으로 사용된다. 당해 분야에서 인식되는 이들 용어는 항체 또는 이의 항원 결합부의 중쇄 및 경쇄 가변 영역내 다른 아미노산 잔기보다 더 가변성(즉, 초가변성)인 아미노산 잔기를 번호매김하는 시스템을 말한다[참조: Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. ScL 190:382-391 and, Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health 및 Human Services, NIH 공보 No. 91-3242]. 중쇄 가변 영역의 경우, 초가변 영역은 CDR1의 경우 31 내지 35번 아미노산 위치, CDR2의 경우 50 내지 65번 아미노산 위치, 및 CDR3의 경우 95 내지 102번 아미노산 위치의 범위이다. 경쇄 가변 영역의 경우, 초가변 영역은 CDR1의 경우 24 내지 34번 아미노산 위치, CDR2의 경우 50 내지 56번 아미노산 위치, 및 CDR3의 경우 89 내지 97번 아미노산 위치의 범위이다.

[0120] 본원에 사용된 "CDR"은 항체 가변 서열내 상보성 결정 영역을 말한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 각각에는 3개의 CDR이 존재하며, 이는 각각의 가변 영역에 대해 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 지정되어 있다. 본원에 사용된 용어 "CDR 세트"는 항원에 결합할 수 있는 단일 가변 영역내에서 존재하는 3개의 CDR의 그룹을 말한다. 이들 CDR의 정확한 경계는 상이한 시스템에 따라 상이하게 정의되어 왔다. 카밧(Kabat)이 기술한 시스템[참조: Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) 및 (1991))]은 항체의 어떠한 가변 영역에 적용 가능한 명확한 잔기 번호매김 시스템을 제공할 뿐 아니라, 3개의 CDR을 정의하는 정확한 잔기 경계도 제공한다. 이들 CDR은 카밧 CDR로 언급될 수 있다. 초티아(Chothia) 및 공동 연구자[참조: Chothia &Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) 및 Chothia et al., Nature 342:877-883 (1989)]는, 카밧 CDR내 특정의 소-부분이 아미노산 서열 수준에서 큰 다양성을 가짐에도 불구하고 거의 동일한 펩타이드 골격 구조를 채택한다는 것을 발견하였다. 이들 소-부분은 L1, L2 및 L3 또는 H1, H2 및 H3로 지정되었으며, 여기서, "L" 및 "H"는 경쇄 및 중쇄 영역 각각을 지정한다. 이들 영역은 초티아 CDR로 언급될 수 있으며, 이는 카밧 CDR과 오버랩되는 경계를 갖는다. 카밧 CDR과의 오버랩된 CDR을 정의하는 다른 경계는 파들란(Padlan)[참조: FASEB J. 9:133-139 (1995) 및 MacCallum (J Mol Biol 262(5):732-45 (1996))에 의해 기술되어 있다. 또 다른 CDR 경계 정의는 본원의 시스템중 하나에 엄격하게 따르지 않을 수 있지만, 그럼에도 불구하고, 특정 잔기 또는 잔기의 그룹 또는 심지어 전체 CDR이 항원 결합에 상당히 영향을 주지 않는다는 실험적 발견 또는 예측의 측면에서 짚아지거나 길어질 수 있지만, 카밧 CDR과 오버랩될 것이다. 본원에 사용된 방법은, 특정의 양태가 카밧 또는 초티아 정의된 CDR을 사용하지만, 이들 시스템 중 어느 것에 따라 정의된 CDR을 이용할 수 있다.

[0121] 본원에 사용된 용어 "골격" 또는 "골격 서열"은 CDR이 제외된 가변 영역의 나머지 서열을 말한다. CDR 서열의 정확한 정의는 상이한 시스템에 의해 측정될 수 있으므로, 골격 서열의 의미는 상응하게 상이한 해석에 속한다. 6개의 CDR(경쇄의 CDR-L1, -L2, 및 -L3 및, 중쇄의 CDR-H1, -H2, 및 -H3)는 또한 경쇄 및 중쇄상의 골격 영역을 각각의 쇄 상에서 4개의 소-영역(FR1, FR2, FR3 및 FR4)로 나누며, 여기서, CDR1은 FR1와 FR2 사이에, CDR2는 FR2와 FR3 사이에, 및 CDR3은 FR3과 FR4 사이에 위치한다. FR1, FR2, FR3 또는 FR4와 같은 특정 소-영역을 규정하지 않고도, 다른 사람에 의해 언급된 골격 영역은 단일의 천연적으로 존재하는 면역글로불린 쇄의 가변 영역내 합해진 FR을 나타낸다. 본원에 사용된 FR은 4개의 소-영역 중 하나를 나타내고, FR은 골격 영역을 구성하는 4개의 소-영역 중 2개 이상을 나타낸다.

[0122] 본원에 사용된 용어 "배선 항체 유전" 또는 "유전자 단편"은 특정 면역글로불린의 발현을 위한 유전적 재배열 및 돌연변이를 초래하는 성숙 과정을 겪지 않는 비-립프구 세포에 의해 암호화된 면역글로불린 서열을 말한다 [참조: 예를 들면, Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., Adv Exp Med Biol. 484:13-30 (2001)]. 본 발명의 각종 양태에 의해 제공된 장점들 중 하나는, 배선 항체 유전자가 종에서 개개의 특징적인 필수 아미노산 서열 구조를 보존하기 위한 성숙한 항체 유전자보다 더 유사함으로써 상기 종에서 치료학적으로 사용되는 경우 외부 공급원으로부터에서와 같이 인식되지 않을 것이라는 인식으로부터 기인한다.

[0123] 본원에 사용된 용어 "중화"는, 결합 단백질이 항원에 특이적으로 결합하는 경우 항원의 생물학적 활성을 반작용하는 것을 말한다. 하나의 양태에서, 중화 결합 단백질은 사이토kin에 결합하여 이의 생물학적 활성을 약 20%, 40%, 60%, 80%, 85% 또는 그 이상 감소시킨다.

[0124] 용어 "활성"은 2개 이상의 항원에 대한 DVD-Ig의 결합 특이성 및 친화성과 같은 활성을 포함한다.

[0125] 용어 "에피토프"는 면역글로불린 또는 T-세포 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 풀리펩타이드 결정인자를 포함한다. 특정 양태에서, 에피토프 결정인자는 아미노산, 당 층쇄, 포스포릴, 또는 셀포닐과 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면 그룹화를 포함하며, 특정 양태에서, 특이적인 3차원 구조적 특징 및/또는 특이적인

하전 특징을 가질 수 있다. 에피토프는 항체에 의해 결합된 항원의 영역이다. 특정 양태에서, 항체는, 이것이 단백질 및/또는 거대분자의 복합체 혼합물 속에서 이의 표적 항원을 인지하는 경우 항원에 특이적으로 결합하는 것으로 일컬어 진다. 항체는, 항체가 교차경쟁(하나는 다른 것의 결합 또는 조절 효과를 방지한다)하는 경우 "동일한 에피토프에 결합하는" 것으로 일컬어진다. 또한, 에피토프의 구조적 정의(오버랩핑, 유사한, 동일한)는 정보적이지만 기능적 정의가 구조적(결합) 및 기능적(조절, 경쟁) 매개변수를 포함하는 경우, 흔히 더 관련이 있다.

[0126] 본원에 사용된 용어 "표면 플라스몬 공명"은 예를 들면, BIACore®

시스템[제조원: 비아코어 인터내셔널 아베(BIACore International AB), 지이 헬쓰케어 캄파니(GE Healthcare company), 스웨덴 업살라 및 미국 뉴저지주 피츠카타웨이 소재]을 사용하여 바이오센서 매트릭스내에서 단백질 농도에 있어서의 변경을 검출함으로써 실시간 생특이적인 상호작용을 분석하도록 하는 광학 현상을 말한다. 추가의 설명에 대해서는 문헌[참조: Jonsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jonsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131; 및 Johnson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277]을 참조한다.

[0127] 본원에 사용된 용어 "Kon"은 당해 분야에 공지된 바와 같이, 예를 들면, 항체/항원 복합체를 형성하기 위해 항체에 대한 결합 단백질(예를 들면, 항체)의 연합에 대한 온 속도 상수를 말한다. "Kon"은 또한 본원에서 상호교환적으로 사용된 용어 "연합 속도 상수" 또는 "ka"로 공지되어 있다. 이의 표적 항원에 대한 항체의 결합률 또는 항체와 항원 사이의 복합체 형성률을 나타내는 상기 값은 또한 하기 식으로 나타낸다:

항체 ("Ab") + 항원 ("Ag") $\xrightarrow{\text{ }} \text{Ab-Ag}$.

[0129] 본원에 사용된 용어 " K_{off} "는 당해 분야에 공지된 바와 같이, 예를 들면, 항체/항원 복합체로부터 결합 단백질(예를 들면, 항체)의 해리에 대한 오프 속도(off rate) 상수, 또는 "해리 속도 상수"를 말하는 것으로 의도된다. 상기 값은 하기 식으로 나타낸 바와 같이 이의 표적 항원으로부터 항체의 해리를 또는 시간에 걸친 Ab-Ag 복합체의 유리 항체 및 항원으로의 분리를 나타낸다:

$\text{Ab} + \text{Ag} \xleftarrow{\text{ }} \text{Ab-Ag}$.

[0131] 본원에 사용된 용어 " K_D "는 "평형해리 상수"를 말하며, 평형시 역가 측정으로 수득되거나 해리 속도 상수(k_{off})를 연합 속도 상수(k_{on})로 나눔으로써 수득된 값을 말한다. 연합 속도 상수, 해리 속도 상수 및 평형 해리 상수는 항원에 대한 항체의 결합 친화성을 나타내는데 사용된다. 연합 속도 및 해리 속도 상수를 측정하는 방법은 당해 분야에 익히 공지되어 있다. 형광성-계 기술을 사용하여 평형시 생리학적 완충제내 시료를 시험하기 위한 고 민감성 및 능력을 제공한다. BIACore®

(생분자 상호작용 분석) 검정과 같은 다른 실험적 시도 및 장치를 사용할 수 있다[예를 들면, 비아코어 인터내셔널 아베 및 지이 헬쓰케어 캄파니(스웨덴 업살라 소재)로부터 이용가능한 장치]를 사용할 수 있다. 또한, 사피다인 인스트루먼츠(Sapidyne Instruments)(Boise, Idaho)를 또한 사용할 수 있다.

[0132] "표지" 및 "검출가능한 표지"는 항체 또는 분석물과 같은 특이적인 결합 파트너에 부착하여, 예를 들면, 검출가능한 항체 및 분석물과 같은 특이적인 결합 쌍의 구성원, 및 특이적인 결합 파트너, 예를 들면, 항체 또는 분석물 사이에서 반응하도록 하는 잔기를 의미하며, 이러한 표지된 것을 "검출가능하게 표지된"이라고 언급한다. 따라서, 본원에 사용된 용어 "표지된 결합 단백질"은 결합 단백질의 확인을 제공하는 혼입된 표지를 지닌 단백질을 말한다. 하나의 양태에서, 표지는 가시적인 또는 장치 수단, 예를 들면, 방사성표지된 아미노산의 혼입 또는 표식된 아비딘(예를 들면, 광학적 또는 비색계 방법으로 검출할 수 있는 형광성 마커 또는 효소적 활성을 함유하는 스트렙타비딘)으로 검출할 수 있는 바이오티닐 잔기의 폴리펩타이드에 대한 부착에 의해 검출가능한 시그널을 생산할 수 있는 검출가능한 마커이다. 폴리펩타이드에 대한 표지의 예는 방사선동위원소 또는 방사핵종(예를 들면, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , 또는 ^{153}Sm); 색소원, 형광 표지(예를 들면, FITC, 로다민, 란타나이드 포스포르), 효소 표지(예를 들면, 서양고추냉이 페옥시다제, 루시퍼라제, 알칼리성 포스파타제), 화학발광 마커; 바이오티닐 그룹; 제2 수용체[예를 들면, 류신 지퍼 쌍 서열(leucine zipper pair sequence), 제2 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그]에 의해 인식된 소정의 폴리펩타이드 에피토프; 및 가돌리늄 키클레이트와 같은 자기 제제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 면역검정을 위해 일반적으로 사용된 표지의 대표적인 예는 광을 생산하는 잔기, 예를 들면, 아크리디늄 화합물, 및 형광성을 생산하

는 잔기, 예를 들면, 플루오레세인을 포함한다. 다른 표지는 본원에 기술되어 있다. 이와 관련하여, 잔기 자체는 검출가능하게 표지되지 않지만, 또 다른 잔기와 반응시 검출가능하게 될 수 있다. "검출가능하게 표지된"의 사용은 검출가능한 표지화 후자 유형을 포함하는 것으로 의도된다.

[0133] 용어 "접합체"는 제2 화학 잔기, 예를 들면, 치료제 또는 세포독성제에 화학적으로 결합된 항체와 같은 결합 단백질을 말한다. 용어 "제제"는 본원에서 화학적 화합물, 생물학적 거대분자, 또는 생물학적 물질로부터 제조된 추출물의 혼합물을 나타내기 위해 사용된다. 하나의 양태에서, 치료제 또는 세포독성제는 페르투씨스 독소, 탁 솔, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빙크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 디하이드록시 안트라신 디온, 메톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 케트라카인, 리도카인, 프로프라놀ول 및 푸로마이신, 및 이의 유사체 또는 동족체를 나타낸기 위해 사용된다. 면역검정 측면에서 사용되는 경우, 접합체 항체는 검출 항체로서 사용된 검출가능하게 표지된 항체일 수 있다.

[0134] 본원에 사용된 용어 "결정" 및 "결정화된"은 결정의 형태로 존재하는 결합 단백질(예를 들면, 항체), 또는 이의 항원 결합부를 말한다. 결정은 물질의 고체 상태의 하나의 형태이며, 무정형 고체 상태 또는 액체 결정성 상태와 같은 다른 형태와는 구별된다. 결정은 규칙적이고, 반복적인, 원자, 이온, 분자(예를 들면, 항체와 같은 단백질), 또는 분자 조립체(예를 들면, 항원/항체 복합체)의 3차원 배열로 구성된다. 이들 3차원 배열은 당해 분야에서 잘 이해되는 특정 수학적 관계에 따라 배열된다. 결정내에서 반복되는 근본 단위 또는 구성 블럭은 비대칭 단위로 불린다. 제공된, 잘 정의된 결정학적 대칭에 따른 배열내 비대칭 단위의 반복은 결정의 "단위 셀"를 제공한다. 모든 3차원내 규칙적인 해독에 의한 단위 셀의 반복은 결정을 제공한다[참조: Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ed., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999)].

[0135] 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드의 어떠한 형태의 변형된 형태인, 2개 이상의 뉴클레오타이드의 중합체성 형태를 의미한다. 당해 용어는 DNA의 일본쇄 및 이본쇄 형태를 포함한다.

[0136] 용어 "분리된 폴리뉴클레오타이드"는 이의 기원에 의해, "분리된 폴리뉴클레오타이드"가 천연에서 발견된 폴리뉴클레오타이드 모두 또는 일부와 연합되지 않으며; 천연적으로 결합되지 않는 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결되거나; 보다 큰 서열의 일부로서 천연적으로 존재하지 않는, 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, 게놈성, cDNA, 또는 합성 기원의, 또는 이의 일부 조합)을 의미할 수 있다.

[0137] 용어 "벡터"는 이것이 결합된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 말하는 것으로 의도된다. 벡터의 하나의 유형은, 추가의 DNA 분절이 연결될 수 있는 원형의 이본쇄 DNA 루프를 말하는 "플라스미드"이다. 벡터의 다른 유형은 바이러스 벡터이며, 여기서, 추가의 DNA 분절은 바이러스 게놈내로 연결될 수 있다. 특정의 벡터는 이들이 도입되는 숙주 세포내에서 자가 복제할 수 있다(예를 들면, 세균 복제 오리진을 갖는 세균 벡터 및 에피좀 포유동물 벡터). 다른 벡터(예를 들면, 비-에피좀 포유동물 벡터)는 숙주 세포내로 도입시 숙주 세포의 게놈내로 통합될 수 있으며, 이에 의해 숙주 게놈을 따라 복제된다. 또한, 특정의 벡터는, 이들이 작동적으로 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터"(또는 단순히 "발현 벡터")로 언급된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 이용되는 발현 벡터는 흔히 플라스미드의 형태이다. 본명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는, 플라스미드가 벡터의 가장 일반적으로 사용된 형태이므로 상호교환적으로 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 동일한 기능을 제공하는 바이러스 벡터(예를 들면, 복제 결합 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스)와 같은 이러한 발현 벡터의 다른 형태를 포함하는 것으로 의도된다.

[0138] 용어 "작동적으로 결합된"은, 기술된 성분들이 이들의 의도된 방식으로 작용하도록 허용하는 관계에 있는 병치를 말한다. 암호화 서열에 "작동적으로 연결된" 조절 서열은, 암호화 서열의 발현이 조절 서열에 적합한 조건 하에서 달성되도록 하는 방식으로 연결된다. "작동적으로 결합된" 서열은 목적 유전자와 연속적인 발현 조절 서열 및 목적 유전자를 조절하도록 트랜스 위치로 또는 떨어져서 작용하는 발현 조절 서열 둘다를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "발현 조절 서열"은, 이들이 연결된 암호화 서열의 발현 및 프로세싱을 달성하는데 필수적인 폴리뉴클레오타이드 서열을 말한다. 발현 조절 서열은 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 스플라이싱 및 폴리아데닐화 시그날과 같은 효과적인 RNA 프로세싱 시그날; 세포질성 mRNA를 안정화시키는 서열; 해독 효능을 향상시키는 서열[즉, 코작 컨센서스 서열(Kozak consensur sequence)]; 단백질 안정성을 향상시키는 서열; 및 경우에 따라, 단백질 분비를 향상시키는 서열을 포함한다. 이러한 조절 서열의 특성은 숙주

유기체에 따라 상이하며; 원핵 세포에서, 이러한 조절 서열은 일반적으로 프로모터, 리보솜 결합 부위 및 전사 종결 서열을 포함하며; 진핵세포에서 일반적으로 이러한 조절 서열은 프로모터 및 전사 종결 서열을 포함한다. 용어 "조절 서열"은, 이의 존재가 발현 및 프로세싱에 필수적인 성분을 포함하는 것으로 의도되고, 또한 이의 존재가 장점인 추가의 성분, 예를 들면, 리더 서열 및 융합 파트너 서열을 포함할 수 있다.

[0139] "형질전환"은, 외인성 DNA를 숙주 세포로 도입시키는 임의의 과정을 말한다. 형질전환은 당해 분야에 의해 공지된 각종 방법을 사용하여 천연 또는 인공 조건하에서 일어날 수 있다. 형질전환은 외부 혼산 서열을 원핵 또는 진핵 숙주 세포로 삽입시키는 임의의 공지된 방법에 의존할 수 있다. 당해 방법은 형질전환되는 숙주 세포를 기준으로 선택되며, 바이러스 감염, 전기천공(electroporation), 지질감염(lipofection) 및 입자충격(particle bombardment)을 포함하나, 이에 한정되지 않을 수 있다. 이러한 "형질감염된" 세포는, 삽입된 DNA가 자가적으로 복제하는 플라스미드로서 또는 숙주 염색체의 일부로서 복제할 수 있는 안정하게 형질전환된 세포를 포함한다. 이들은 또한 제한된 기간 동안 삽입된 DNA 또는 RNA를 일시적으로 발현하는 세포를 포함한다.

[0140] 용어 "재조합 숙주 세포"(또는 단순히 "숙주 세포")는 외인성 DNA가 도입된 세포를 말하는 것으로 의도된다. 이러한 용어는 특정 대상체 세포뿐 아니라, 이러한 세포의 후대세포를 말하는 것으로 의도된다. 특정의 변형이 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인하여 후대 세대에서 일어날 수 있으므로, 이러한 후대세포는 사실상 모 세포와 동일하지 않을 수 있으나, 여전히 본원에 사용된 용어 "숙주 세포"의 영역내에 포함된다. 하나의 양태에서, 숙주 세포는 특정 생명체로부터 선택된 원핵 및 진핵 세포를 포함한다. 다른 양태에서, 진핵 세포는 원생생물, 진균, 식물 및 동물 세포를 포함한다. 다른 양태에서, 숙주 세포는 원핵 세포주 이. 콜라이; 포유동물 세포주 CHO, HEK 293, COS, NS0, SP2 및 PER.C6; 곤충 세포주 Sf9; 및 진균 세포 사카로마이세스 세레비지아(Saccharomyces cerevisiae)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0141] 표준 기술을 재조합 DNA, 올리고뉴클레오타이드 합성 및 조직 배양 및 형질전환(예를 들면, 전기천공, 지질감염)을 위해 사용할 수 있다. 효소적 반응 및 정제 기술은 제조업자의 명세에 따라 또는 당해 분야에서 일반적으로 달성된 바와 같이 또는 본원에 기술된 바와 같이 수행할 수 있다. 앞서의 기술 및 과정은 일반적으로 당해 분야에 의해 공지되고 본 명세서 전체에서 인용되고 논의된 다양한 일반적이고 보다 상세한 참조문헌에 기술된 바와 같은 통상의 방법에 따라 일반적으로 수행될 수 있다. 예를 들면, 본원에 특정 목적을 위해 참조로 인용된 Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)을 참조한다.

[0142] 당해 분야에 공지된 "유전자삽입 유기체"는 삽입유전자를 함유하는 세포를 갖는 유기체를 말하며, 여기서, 유기체(또는 유기체의 조상)내로 도입된 삽입유전자는 유기체내에서 천연적으로 발현되지 않는 폴리펩타이드를 발현한다. "삽입유전자"는, 삽입유전자성 유기체가 삽입유전자성 유기체의 하나 이상의 세포 유형 또는 조직내에서 암호화된 유전자 생성물의 발현을 지시하도록 개발된 세포의 계놈내로 안정하게 및 작동적으로 통합된 DNA 작제물이다.

[0143] 용어 "조절하다(regulate; modulate)"는 상호교환적으로 사용되며, 본원에 사용된 것으로서, 목적 분자의 활성(예를 들면, 사이토킨의 생물학적 활성)에 있어서의 변화 또는 변경을 말한다. 조절은 목적 분자의 특정 활성 또는 기능의 크기에 있어서의 증가 또는 감소일 수 있다. 분자의 예시적인 활성 및 기능은 결합 특성, 효소 활성, 세포 수용체 활성화 및 시그널 전달을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0144] 상응하게, 용어 "조절인자"는 목적 분자의 활성 또는 기능(예를 들면, 사이토킨의 생물학적 활성)을 변화시키거나 변경시킬 수 있는 화합물이다. 예를 들면, 조절인자는 조절인자의 부재하에서 관측된 활성 또는 기능의 크기와 비교하여 분자의 특정 활성 또는 기능의 크기에 있어서의 증가 또는 감소를 유발할 수 있다. 특정 양태에서, 조절인자는 분자의 적어도 하나의 활성 또는 기능의 크기를 감소시키는 억제제이다. 예시적인 억제제는 단백질, 펩타이드, 항체, 펩티바디, 탄수화물 또는 소 유기 분자를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 펩티바디(peptibody)는 예를 들면, 제WO 01/83525호에 기술되어 있다.

[0145] 용어 "작용제"는 목적한 분자와 접촉시 작용제의 부재하에서 관측된 활성 또는 기능의 크기와 비교하여 분자의 특정 활성 또는 기능의 크기에 있어 증가를 유발하는 조절인자를 말한다. 목적한 특정 작용제는 폴리펩타이드, 혼산, 탄수화물, 또는 항원에 결합하는 임의의 다른 분자를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0146] 용어 "길항제" 또는 "억제제"는 목적한 분자와 접촉하는 경우 작용제의 부재하에서 관측된 활성 또는 기능의 크기와 비교하여 분자의 특정 활성 또는 기능의 크기에 있어서 감소를 유발하는 조절인자를 말한다. 목적한 특정 작용제는 항원의 생물학적 또는 면역학적 활성을 차단하거나 조절하는 것들을 포함한다. 항원의 길항제 및 억

제제는 항원에 결합하는 단백질, 핵산, 탄수화물, 또는 임의의 다른 분자를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0147] 본원에 사용된 용어 "유효량"은 장애 또는 하나 이상의 이의 증상의 중증도 및/또는 지속기간을 감소시키거나 완화시키거나, 장애의 악화를 방지하고, 장애의 회복을 유발하거나, 장애와 관련된 하나 이상의 증상의 재발, 발달, 발병 또는 진행을 방지하거나, 장애를 검출하거나, 또는 다른 치료제(예를 들면, 예방제 또는 치료제)의 예방학적 또는 치료학적 효과(들)을 향상시키거나 개선시키기에 충분한 치료요법의 양을 말한다.

[0148] "환자" 및 "대상체"는 본원에서 영장류(예를 들면, 사람, 원숭이 및 침팬지), 비-영장류(예를 들면, 소, 돼지, 낙타, 라마, 말, 염소, 토끼, 양, 햄스터, 기니아 피그, 고양이, 개, 토끼, 마우스, 고래), 조류(예를 들면, 오리 또는 거위) 및 상어를 포함하는 포유동물과 같은 동물을 언급하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다. 바람직하게는, 환자 또는 대상체는 질병, 장애 또는 상태에 대해 치료하거나 평가되는 사람, 질병, 장애 또는 상태의 위험에 처해있는 사람, 질병, 장애 또는 상태를 가진 사람, 및/또는 질병, 장애 또는 상태가 치료되는 사람이다.

[0149] 본원에 사용된 용어 "시료"는 최광의로 사용된다. 본원에 사용된 "생물학적 시료"는 살아있는 것 또는 앞서 살고있는 것으로부터의 물질의 임의의 양을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 살아있는 것은 사람, 마우스, 래트, 원숭이, 개, 토끼 및 기타 동물을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 물질은 혈액(예를 들면, 전혈), 혈장, 혈청, 뇨, 양수, 활액, 내피 세포, 백혈구, 단핵구, 다른 세포, 기관 조직, 골수, 림프절 및 비장을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0150] "성분," "성분들" 및 "적어도 하나의 성분"은 일반적으로 본원에 기술된 방법 및 당해 분야에 공지된 다른 방법에 따라, 환자 뇌, 혈청 또는 혈장 샘플과 같은 시험 시료의 검정을 위한 키트내에 포함될 수 있는, 포획 항체, 검출 또는 접합 항체, 대조군, 교정기(calibrator), 일련의 교정기, 선택성 패널, 용기, 완충제, 희석제, 염, 효소, 효소용 보조-인자, 검출 시약, 예비처리 시약/용액, 기질(예를 들면, 용액으로서), 정지 용액 등을 말한다. 따라서, 본 기재내용의 측면에서, "적어도 하나의 성분", "성분", 및 "성분들"은 항-분석물(예를 들면, 항-폴리펩타이드) 항체에 결합시키는 것과 같이, 고체 지지체 상에 임의로 고정된, 폴리펩타이드와 같은 분석물을 포함하는 조성물과 같은, 상기한 폴리펩타이드 또는 기타 분석물을 포함할 수 있다. 일부 성분들은 용액 중에 있거나 검정에서 사용하기 위한 재구성용으로 동결건조시킬 수 있다.

[0151] "대조군"은 분석물("음성 대조군")이 아니거나 분석물("양성 대조군")을 함유하는 것으로 공지된 조성물을 말한다. 양성 대조군은 공지된 농도의 분석물을 포함할 수 있다. "대조군", "양성 대조군" 및 "교정기"는 분석물의 공지된 농도를 포함하는 조성물을 언급하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다. "양성 대조군"은 검정 수행 특성을 확립하기 위해 사용될 수 있으며 시약(예를 들면, 분석물)의 통합의 유용한 지시인자이다.

[0152] "예정된 컷오프(predetermined cutoff)" 및 "예정된 수준"은 일반적으로 예정된 컷오프/수준에 대한 검정 결과와 비교함으로써 진단/예측/치료 효능 결과를 평가하기 위해 사용된 검정 컷오프 값은 면역검정의 특성(예를 들면, 사용된 항체 등)에 따라 변할 수 있다. 또한, 본 기재내용을 기초로 하는 다른 면역검정의 것에 대한 면역검정-특이적인 컷오프 값은 수득하기 위한 다른 면역 검정을 위해 본원의 기재내용을 채택하는 것은 당해 분야의 통상의 기술내에 있다. 예정된 컷오프/수준의 정밀한 값이 검정들 사이에서 변할 수 있지만, 본원에 기술한 바와 같은 상관관계(존재할 경우)는 일반적으로 적용가능하여야 한다.

[0153] "예비처리 시약", 예를 들면, 본원에 기술된 진단 검정에 사용된 바와 같은, 분해, 침전 및/또는 가용화 시약은 시험 시료내에 존재하는 특정의 특정의 세포를 용해하고/하거나 임의의 분해물을 가용화하는 것이다. 예비처리는 본원에 추가로 기술된 모든 시료에 필수적인 것은 아니다. 다른 것들 중에서, 분석물(예를 들면, 목적한 폴리펩타이드)의 가용화는 시료 속에 존재하는 임의의 내인성 결합 단백질로부터의 분석물의 방출을 내포할 수 있다. 예비처리 시약은 동종(분리 단계가 요구되지 않음)이거나 이종(분리 단계가 요구됨)일 수 있다. 이종 예비처리 시약을 사용하여 검정의 다음 단계를 진행시키기 전에 시험 시료로부터 임의의 침전된 분석물 결합 단백질을 제거한다.

[0154] 본원에 기술된 면역검정 및 키트와 관련하여 "품질 조절 시약"은 교정기, 대조군 및 민감성 패널을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. "교정기" 또는 "표준물" 예를 들면, 다수와 같이, 하나 이상은 전형적으로 항체 또는 분석물과 같은 분석물의 농도의 내삽을 위한 교정(표준) 곡선을 확립하기 위해 사용된다. 달리는, 예정된 양성

/음성 컷오프 근처의 단일 교정기를 사용할 수 있다. 다수의 교정기[즉, 하나 이상의 교정기 또는 변화하는 양의 교정기(들)]를 "민감성 패널"을 포함하도록 함께 사용할 수 있다.

[0155] "위험"은 현재 또는 미래의 어느 시점에 발생하는 특정 현상의 가능성 또는 확률을 말한다. "위험 계층화(risk stratification)"는, 담당의가 환자를 특정 질병, 장애 또는 상태로 진행될 낮은, 중간의, 높은 또는 최고로 높은 위험으로 분류하도록 하는 공지된 임상 위험 인자의 배열을 말한다.

[0156] 특이적인 결합 쌍[예를 들면, 항원(또는 이의 단편) 및 항체(또는 이의 항원적으로 반응성인 단편)]의 구성원들 사이의 상호작용과 관련하여 "특이적인" 및 "특이성"은 상호작용의 선택적인 반응성을 말한다. 어구 "~에 특이적으로 결합하는" 및 유사한 어구는 분석물(또는 이의 단편)에 특이적으로 결합하고 다른 실체에는 특이적으로 결합하지 않는 항체(또는 이의 항원적으로 반응성인 단편)의 능력을 말한다.

[0157] "특이적인 결합 파트너"는 특정 결합 쌍의 구성원이다. 특정 결합 쌍은 화학적 또는 물리적 수단을 통해 서로에 대해 특이적으로 결합하는 2개의 상이한 분자를 포함한다. 따라서, 일반적인 면역검정의 항원 및 항체 특이적인 결합 쌍 외에, 다른 특이적인 결합 쌍은 바이오틴 및 아비딘(또는 스트렙타비딘), 탄수화물 및 레시틴, 상보성 뉴클레오타이드 서열, 효과기 및 수용체 분자, 보조인자 및 효소, 효소 억제제 및 효소 등을 포함할 수 있다. 또한, 특이적인 결합 쌍은 원래의 특이적인 결합 구성원의 유사체, 예를 들면, 분석물-유사체인 구성원을 포함할 수 있다. 면역반응성의 특이적인 결합 구성원은 분리되거나 재조합적으로 생산되는 것에 상관없이, 모노클로날 및 폴리클로날 항체, 및 이의 복합체, 단편 및 변이체(변이체의 단편 포함)을 포함하는 항원, 항원 단편 및 항체를 포함한다.

[0158] 본원에 사용된 "변이체"는 아미노산의 추가(예를 들면, 삽입), 결실 또는 보존적 치환에 의해 아미노산 서열내에서 제공된 폴리펩타이드(예를 들면, IL-18, BNP, NGAL 또는 HIV 폴리펩타이드 또는 항-폴리펩타이드 항체)와는 상이하지만, 제공된 폴리펩타이드의 생물학적 활성을 보유하는(예를 들면, 변이 IL-18은 IL-18에 대한 결합에 대해 항-IL-18 항체와 경쟁할 수 있다) 폴리펩타이드를 의미한다. 아미노산의 보존적 치환, 즉, 아미노산을 유사한 특성(예를 들면, 친수성 및 하전된 영역의 정도 및 분포)을 지닌 상이한 아미노산으로 교체하는 것은 당해 분야에서 약간의 변화를 전형적으로 포함하는 것으로 인식된다. 이러한 약간의 변화는 부분적으로는 당해 분야에서 이해되는 바와 같이[참조: 예를 들면, Kyte et al., J. Mol. Biol. 157: 105-132 (1982)], 아미노산의 수치 지표(hydropathic index)를 고려함으로써 확인할 수 있다. 아미노산의 수치 지표는 이의 친수성 및 전하에 대한 고려를 기초로 한다. 유사한 수치 지표의 아미노산이 치환될 수 있고 여전히 단백질 기능을 보유한다는 것은 당해 분야에 공지되어 있다. 하나의 측면에서, ±2의 수치 지표를 갖는 아미노산이 치환된다. 아미노산의 친수성을 또한 사용하여 생물학적 기능을 보유하는 단백질을 생성할 수 있는 치환을 나타낼 수 있다. 웨პ타이드의 측면에서 아미노산의 친수성의 고려는 항원성 및 면역원성과 관련되는 것으로 보고된(참조: 예를 들면, 본원에 참조로 인용된 미국 특허 제4,554,101호) 유용한 척도인, 웨პ타이드의 최대 국소 평균 친수성의 계산을 허용한다. 유사한 친수성 값을 갖는 아미노산의 치환은 당해 분야에서 이해되는 바와 같이, 생물학적 활성, 예를 들면, 면역원성을 보유하는 웨პ타이드를 생성할 수 있다. 하나의 측면에서, 치환은 서로 ±2 이내의 친수성 값을 갖는 아미노산을 사용하여 수행된다. 아미노산의 소수성 지표 및 친수성 값 둘다 아미노산의 특정 측쇄에 의해 영향받는다. 이러한 관측과 일치하여, 생물학적 기능에 적합한 아미노산 치환은 아미노산의 상대적인 유사성, 및 특히 소수성, 친수성, 전하, 크기 및 기타 특성에 의해 나타난 바와 같이, 이를 아미노산의 측쇄에 의존하는 것으로 이해된다. "변이체"는 또한 단백질분해, 포스포릴화, 또는 다른 해독후 변형에 의해서와 같이 차등적으로 프로세싱되지만, 여전히 이의 생물학적 활성 또는 항원 반응성, 예를 들면, IL-18에 결합하는 능력을 보유한 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 기술하기 위해 사용될 수 있다. 본원의 "변이체"의 사용은 내용에 달리 모순되지 않는 한 변이체의 단편을 포함하는 것으로 의도된다.

I. DVD 결합 단백질의 생성

[0160] 본 발명은 하나 이상의 표적에 결합할 수 있는 이원 가변 도메인 결합 단백질 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 하나의 양태에서, 결합 단백질은 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n(여기서, VD1은 제1 가변 도메인이고, VD2는 제2 가변 도메인이며, C는 불변 도메인이고, X1은 아미노산 또는 폴리펩타이드이고, X2는 Fc 영역이며 n은 0 또는 1이다)를 포함하는 폴리펩타이드 쇄를 포함한다. 본 발명의 결합 단백질은 각종 기술을 사용하여 생성할 수 있다. 본 발명은 발현 벡터, 숙주 세포 및 결합 단백질을 생성하는 방법을 제공한다.

A. 모 모노클로날 항체의 생성

[0162] DVD 결합 단백질의 가변 도메인은 목적한 항원에 결합할 수 있는 폴리클로날 및 mAb를 포함하는 모 항체로부터

수득할 수 있다. 이러한 항체는 자연적으로 존재하거나 재조합 기술에 의해 생성할 수 있다.

[0163]

MAb는 하이브리도마, 재조합 및 파아지 디스플레이 기술, 또는 이의 조합의 사용을 포함하는 당해 분야에 공지된 광범위한 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들면, mAb는 당해 분야에 공지되고, 예를 들면, 문헌[참조: Harow et al., *Antibody: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., in: *Monoclonal Antibody and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)(상기 문헌은 이의 전문이 참조로 인용되어 있다)]에 교시된 하이브리도마 기술을 사용하여 생산할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 진핵, 원핵 또는 파아지 클론을 포함하는 단일 클론으로부터 기원한 항체를 말하며, 이것을 생산하는 방법을 언급하지 않는다. 하이브리도마는 하기 실시예 1에서 논의한 바와 같이 선택하고 클로닝하며, 로버스트(robust) 하이브리도마 성장, 고 항체 생산 및 바람직한 항체 특성에 대해 추가로 스크리닝된다. 하이브리도마는 생체내 동계 동물, 면역계를 결여한 동물, 예를 들면, 누드 마우스(nude mice)내에서 또는 시험관내 세포 배양물내에서 배양하여 확장할 수 있다. 하이브리도마를 선택하고, 클로닝하며 확장하는 방법은 당해 분야의 숙련가에게 익히 공지되어 있다. 특정 양태에서, 하이브리도마는 마우스 하이브리도마이다. 다른 양태에서, 하이브리도마는 래트, 양, 돼지, 염소, 소 또는 말과 같은 비-사람, 비-마우스 종에서 생산된다. 다른 양태에서, 하이브리도마는 사람 하이브리도마이며, 여기서, 사람 비-분비성 흑색종은 특정 항원에 결합할 수 있는 항체를 발현하는 사람 세포와 융합된다.

[0164]

재조합 mAb는 또한 미국 특허 제5,627,052호, PCT 공보 제WO 92/02551호 및 문헌[참조: Babcock, J.S. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848]에 기술된, 선택된 림프구 항체 방법(SLAM)과 같이 당해 분야에서 언급된 과정을 사용하여 단일의, 분리된 림프구로부터 생성된다. 당해 방법에서, 목적한 항체를 분비하는 단일 세포, 예를 들면, 면역화된 동물을로부터 기원한 림프구를 확인하고, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 cDNA를 역전사효소-PCR에 의해 세포로부터 구출하고 이후에, 이를 가변 영역을 COS 또는 CHO 세포와 같은 포유동물 숙주세포내에서 적절한 면역글로불린 불변 영역(예를 들면, 사람 불변 영역)과 관련하여 발현시킬 수 있다. 생체내에서 선택된 림프구로부터 기원한, 증폭된 면역글로불린 서열로 형질감염된 숙주 세포를 이후에, 예를 들면, 목적한 항원에 대해 항체를 발현하는 세포를 분리하기 위해 형질감염된 세포를 패닝(panning)함으로써 시험관내에서 추가로 분석 및 선택할 수 있다. 또한, 증폭된 면역글로불린 서열은 예를 들면, PCT 공보 제WO 97/29131호 및 PCT 공보 제WO 00/56772호에 기술된 것과 같은 시험관내 친화성 성숙화 방법에 의해 시험관내에서 조작할 수 있다.

[0165]

모노클로날 항체는 또한 사람 면역글로불린 유전자자리의 일부 또는 모두를 포함하는 비-사람 동물을 목적 항원으로 면역화시킴으로써 생산된다. 하나의 양태에서, 비-사람 동물은 XENOMOUSE 유전자삽입 마우스, 즉, 사람 면역글로불린 유전자자리의 큰 단편을 포함하고 마우스 항체 생산에 있어 결함이 있는 조작된 마우스 계통이다 [참조: 예를 들면, Green et al. *Nature Genetics* 7:13-21 (1994) 및 미국 특허 제5,916,771호, 제5,939,598호, 제5,985,615호, 제5,998,209호, 제6,075,181호, 제6,091,001호, 제6,114,598호 및 제6,130,364호]. 또한 1991년 7월 25일자로 공개된 제WO 91/10741호, 1994년 2월 3일자로 공개된 제WO 94/02602호, 둘다 1996년 10월 31일자로 공개된 제WO 96/34096호 및 제WO 96/33735호, 1998년 4월 23일자로 공개된 제WO 98/16654호, 1998년 6월 11일자로 공개된 제WO 98/24893호, 1998년 11월 12일자로 공개된 제WO 98/50433호, 1999년 9월 10일자로 공개된 제WO 99/45031호, 1999년 10월 21일자로 공개된 제WO 99/53049호, 2000년 2월 24일자로 공개된 제WO 00 09560호 및 2000년 6월 29일자로 공개된 제WO 00/037504호를 참조한다. XENOMOUSE 유전자삽입 마우스는 완전한 사람 항체의 성인-유사 사람 레퍼토리를 생산하며 항원-특이적인 사람 모노클로날 항체를 생성한다. XENOMOUSE 유전자삽입 마우스는 사람 중쇄 유전자 위치 및 x 경쇄 유전자 위치의 메가염기 크기의 배선 입체구조 YAC 단편의 도입을 통해 사람 항체 레퍼토리 중 대략 80%를 함유한다[참조: 이의 기재내용이 본원에 참조로 인용된, Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green and Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495 (1998)].

[0166]

시험관내 방법을 또한 사용하여 모 항체를 제조할 수 있으며, 여기서, 항체 라이브러리를 스크리닝하여 바람직한 결합 특이성을 갖는 항체를 확인한다. 이러한 재조합 항체 라이브러리를 스크리닝하는 방법은 당해 분야에 익히 공지되어 있으며 예를 들면, 라드너(Ladner) 등의 미국 특허 제5,223,409호; 캉(Kang) 등의 PCT 공보 제WO 92/18619호; 도워(Dower) 등의 PCT 공보 제WO 91/17271호; 윈터(Winter) 등의 PCT 공보 제WO 92/20791호; 마크랜드(Markland) 등의 PCT 공보 제WO 92/15679호; 브레이틀링(Breitling) 등의 PCT 공보 제WO 93/01288호; 맥카퍼티(McCafferty) 등의 PCT 공보 제WO 92/01047호; 게라드(Garrard) 등의 PCT 공보 제WO 92/09690호; 문헌[참조: Fuchs et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay et al. (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse et al. (1989) *Science* 246:1275-1281; McCafferty et al., *Nature* (1990) 348:552-554; Griffiths et

al. (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226:889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Gram et al. (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; 및 Barbas et al. (1991) PNAS 88:7978-7982, 미국 특허공개공보 제20030186374호, 및 PCT 공보 제WO 97/29131호에 기술된 방법을 포함하고, 상기 각각의 내용은 본원에 참조로 인용된다.

[0167]

본 발명의 모 항체는 또한 당해 분야에 공지된 각종의 파아지 디스플레이 방법을 사용하여 생성시킬 수 있다. 파아지 디스플레이 방법에서, 기능성 항체 도메인은 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 수반하는 파아지 입자의 표면에서 나타난다. 특히, 이러한 파아지를 이용하여 레퍼토리 또는 조합 항체 라이브러리(예를 들면, 사람 또는 쥐)로부터 발현된 항원-결합 도메인을 나타낼 수 있다. 목적한 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 발현하는 파아지를 선택하거나 예를 들면, 고체 표면 또는 비드에 결합되거나 포획된 항원 또는 표지된 항원을 사용하여 항원으로 선택하거나 확인할 수 있다. 당해 방법에 사용된 파아지는 대표적으로 파아지 유전자 III 또는 유전자 VIII 단백질에 재조합적으로 융합된 Fab, Fv 또는 이황화물 안정화된 Fv 항체 도메인을 지닌 파아지로부터 발현된 fd 및 M13 결합 도메인을 포함하는 필라멘트 파아지(filamentous phage)이다. 본 발명의 항체를 제조하는데 사용될 수 있는 파아지 디스플레이 방법의 예는, 각각 이의 전문이 참조로 본원에 인용된 문헌[참조: Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic et al., Gene 187 9-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology 57:191-280 (1994); PCT 특허원 제PCT/GB91/01134호; PCT 공보 WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; 및 미국 특허 제5,698,426호; 제5,223,409호; 제5,403,484호; 제5,580,717호; 제5,427,908호; 제5,750,753호; 제5,821,047호; 제5,571,698호; 제5,427,908호; 제5,516,637호; 제5,780,225호; 제5,658,727호; 제5,733,743호 및 제5,969,108호]에 기술된 것들을 포함한다.

[0168]

본원에 참조로 기술된 것으로서, 파아지 선택 후, 파아지로부터의 항체 암호화 영역을 분리하여 사람 항체 또는 임의의 다른 바람직한 항원 결합 단편을 포함하는 전체 항체를 생성하는데 사용하여, 예를 들면, 하기 상세히 기술된 바와 같이, 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모 및 세균을 포함하는 임의의 바람직한 세포내에서 발현시킬 수 있다. 예를 들면, Fab, Fab' 및 $F(ab')_2$ 단편을 재조합적으로 생산하기 위한 기술을 문헌[참조: PCT 공보 제WO 92/22324호; Mullinax et al., BioTechniques 12(6):864-869 (1992); 및 Sawai et al., AJRI 34:26-34 (1995); 및 Better et al., Science 240:1041-1043 (1988)](상기 문헌은, 이의 전문이 본 원에 참조로 인용되어 있다)에 기술된 것과 같은 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 이용할 수 있다. 단일쇄 Fv 및 항체를 생산하기 위해 사용될 수 있는 기술의 예는 문헌[참조: 미국 특허 제4,946,778호 및 제5,258,498 호; Huston et al., Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Shu et al., PNAS 90:7995-7999 (1993); 및 Skerra et al., Science 240:1038-1040 (1988)]에 기술되어 있다.

[0169]

파아지 디스플레이에 의한 재조합 항체 라이브러리의 스크리닝에 대한 대안으로, 거대 조합 라이브러리를 스크리닝하기 위해 당해 분야에 공지된 다른 방법을 모 항체의 확인에 적용할 수 있다. 하나의 유형의 대안 발현 시스템은, 재조합 항체 라이브러리를 문헌[참조: Szostak 및 Roberts의 PCT 공보 제WO 98/31700호, 및 in Roberts, R. W. and Szostak, J. W. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12297-12302]에 기술된 바와 같이, RNA-단백질 융합체로서 발현하는 것이다. 당해 시스템에서, 공유결합성 융합은 mRNA와 3' 말단에서 푸로 마이신, 웨타이드 수용체 항생제를 수반하는 합성 mRNA의 시험관내 해독에 의해 암호화하는 웨타이드 또는 단백질 사이에서 생성된다. 따라서, 특이적인 mRNA가 암호화된 웨타이드 또는 단백질, 예를 들면, 이중 특이성 항원에 대한 항체 또는 이의 부위의 결합과 같은, 항체 또는 이의 부위의 특성을 기초로 하여 mRNA(예를 들면, 조합 라이브러리)의 복합체 혼합물로부터 농축시킬 수 있다. 이러한 라이브러리의 스크리닝으로부터 회수된 항체, 또는 이의 부위를 암호화하는 핵산 서열은 본원에 기술된 바와 같은 재조합 수단에 의해 발현될 수 있으며(예를 들면, 포유동물 숙주 세포내에서), 또한, 돌연변이를 원래의 선택된 서열(들)내로 도입시키는 mRNA-웨타이드 융합체의 추가의 스크리닝 라운드에 의해, 또는 본원에 기술된 바와 같은 재조합 항체의 시험관내 친화성 성숙을 위한 다른 방법에 의해 추가의 친화성 성숙에 적용시킬 수 있다.

[0170]

다른 시도에서, 모 항체는 또한 당해 분야에 공지된 효모 디스플레이 방법을 사용하여 생성시킬 수 있다. 효모 디스플레이 방법에서, 유전적 방법을 사용하여 효모 세포벽에 대한 항체 도메인을 묶고 이를 효모의 표면에 발현시킨다. 특히, 이러한 효모를 이용하여 레퍼토리 또는 조합 항체 라이브러리(예를 들면, 사람 또는 쥐)로부터 발현된 항원-결합 도메인을 나타낼 수 있다. 모 항체를 제조하는데 사용할 수 있는 효모 디스플레이 방법의 예는 본원에 참조로 인용된 위트럽(Wittrup) 등의 미국 특허 제6,699,658호에 기술된 것들을 포함한다.

[0171]

본원에 기술된 항체는 CDR 이식되고 사람화된 모 항체를 생성하기 위해 추가로 변형시킬 수 있다. CDR 이식된 모 항체는 사람 항체로부터의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하며, 여기서 V_H 및/또는 V_L의 CDR 영역 중 하나 이상은 목적한 항원에 결합할 수 있는 쥐 항체의 CDR 서열로 치환된다. 임의의 사람 항체로부터의 골격 서열은 CDR 이식용 주형으로 제공될 수 있다. 그러나, 이러한 골격으로의 치환은 흔히 항원에 대한 결합 친화성의 일부 손실을 초래한다. 보다 동종인 사람 항체는 원래의 쥐 항체에 대한 것이며, 쥐 CDR을 사람 골격과 결합하는 것이 친화성을 감소시킬 수 있는 CDR내 뒤틀림을 도입시킬 가능성은 거의 없다. 따라서, 하나의 양태에서, CDR로부터 떨어진 쥐 가변 골격을 치환시키기 위해 선택된 사람 가변 골격은 쥐 항원 가변 영역 골격과 적어도 65% 서열 상동성을 갖는다. 하나의 양태에서, CDR로부터 떨어진 사람 및 쥐 가변 영역은 적어도 70% 서열 상동성을 갖는다. 특정 양태에서, CDR과 떨어진 사람 및 쥐 가변 영역은 적어도 75% 서열 상동성을 갖는다. 다른 양태에서, CDR로부터 떨어진 사람 및 쥐 가변 영역은 적어도 80% 서열 상동성을 갖는다. 이러한 항체를 생산하는 방법(참조: 제EP 239,400호; PCT 공보 제WO 91/09967호; 미국 특허 제5,225,539호; 제5,530,101호; 및 제5,585,089호), 베니어링(veneering) 또는 재포장(resurfacing) 방법[참조: 제EP 592,106호; 제EP 519,596호; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska et al., PNAS 91 :969-973 (1994)], 및 쇄 셔플링(chain shuffling)(미국 특허 제5,565,352호); 및 항-이디오타입 항체를 생산하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다.

[0172]

사람화된 항체는 비-사람 종으로부터의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR) 및 사람 면역글로불린 분자로부터의 골격 영역을 갖는 바람직한 항원에 결합하는 비-사람 종 항체로부터의 항체 분자이다. 공지된 사람 Ig 서열은 예를 들면, [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez-](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/) /query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sClquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7m-ikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immuno-logy.html; www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html; www.biotech.ul.edu/.about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhito-/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ul.edu/.about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximt1.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP-Start.html; baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html; antobody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/.about.honegger/AHOsem-inar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.Uk/.about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7h-umanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr_products.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983)(이들 각각은 본원에 참조로 인용된다)에 기재되어 있다. 이러한 수입된 서열을 사용하여 당해 분야에 공지된 바와 같이, 면역원성을 감소시키거나, 또는 결합, 친화성, 온-속도(on-rate), 오프-속도(off-rate), 결합활성, 특이성, 반감기 또는 어떠한 다른 적합한 특성을 감소시키거나, 향상시키거나 또는 변형시킬 수 있다.

[0173]

사람 골격 영역내 골격 잔기는 CDR 공여체 항체로부터의 상응하는 잔기로 치환시킴으로써 항원 결합을 변경, 예를 들면, 개선시킬 수 있다. 이들 골격 치환은 당해 분야에 익히 공지된 방법, 예를 들면, CDR 및 골격 잔기의 상호작용을 모델링함으로써 특정 위치에서 특정한 골격 잔기를 확인하기 위해 항원 결합 및 서열 비교에 중요한 골격 잔기를 확인한다[참조: 이의 전문이 본원에 참조로 인용된, 예를 들면, Queen et al., 미국 특허 제5,585,089호; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)]. 3차원 면역글로불린 모델은 일반적으로 이용가능하며 당해 분야의 숙련가에게 친숙하다. 선택된 후보물 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 형태 구조를 설명하고 나타내는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이러한 디스플레이의 검사는 후보물 면역글로불린 서열의 기능화에 있어서 잔기의 유사한 역할의 분석, 즉, 후보물 면역글로불린의 이의 항원에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석을 허용한다. 이러한 방식으로, FR 잔기를 컨센서스 및 중요한 서열로부터 선택하여 결합시킴으로써, 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화성과 같은 바람직한 항체 특성을 달성한다. 일반적으로, CDR 잔기는 직접적

으로 및 가장 실질적으로 항원 결합에 영향을 미치는데 포함된다. 항체는 문헌[참조: 내부에 인용된 참조문헌을 포함하여, 각각 전체가 본원에 참조로 인용된, Jones et al., Nature 321 :522 (1986); Verhoeven et al., Science 239:1534 (1988)), Sims et al., J. Immunol. 151 : 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151 :2623 (1993), Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., PNAS 91 :969-973 (1994); PCT 공보 WO 91/09967호, PCT/US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, EP 592,106; EP 519,596, EP 239,400, 미국 특허 5,565,332, 5,723,323, 5,976,862, 5,824,514, 5,817,483, 5814476, 5763192, 5723323, 5,766886, 5,714,352, 6,204,023, 6,180,370, 5,693,762, 5,530,101, 5,585,089, 5,225,539; 4,816,567]에 기술된 것들과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는, 당해 분야에 공지된 각종 기술을 사용하여 사람화할 수 있다.

[0174]

B. 모노클로날 항체의 선택을 위한 기준

[0175]

본 발명의 양태는 DVD-Ig 분자내에서 바람직한 하나 이상의 특성을 가진 모 항체를 선택하는 것에 관한 것이다. 하나의 양태에서, 바람직한 특성은 하나 이상의 항체 매개변수로부터 선택된다. 다른 양태에서, 항체 매개변수는 항원 특이성, 항원에 대한 친화성, 효능, 생물학적 기능, 에피토프 인식, 안정성, 가용성, 생산 효율, 면역 원성, 약력학, 생이용성, 조직 교차 반응성 및 이종상동성 항원 결합으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

[0176]

B1. 항원에 대한 친화성

[0177]

치료학적 mAb의 바람직한 친화성은 항원의 특성, 및 바람직한 치료학적 종말점(end-point)에 의존적일 수 있다. 하나의 양태에서, 모노클로날 항체는, 이러한 상호작용이 일반적으로 고 친화성 상호작용(예를 들면, <pM 내지 <nM 범위)이므로 사이토킨-사이토킨 수용체 상호작용을 차단하는 경우 보다 높은 친화성($K_d = 0.01$ 내지 0.50 pM)을 갖는다. 이러한 예에서, 표적에 대한 mAb 친화성은 이의 수용체에 대한 사이토킨(리간드)의 친화성과 동일하거나 더 우수하여야 한다. 다른 한편, 보다 적은 친화성(>nM 범위)을 갖는 mAb는 예를 들면, 잠재적으로 순환하는 병원성 단백질, 예를 들면, A- β 아밀로이드의 순환하는 종을 봉쇄하고 제거하기 위해 결합하는 모노클로날 항체를 제거하는데 있어서 치료학적으로 효과적일 수 있다. 다른 예에서, 부위-지시된 돌연변이유발에 의한 또는 mAb를 사용함에 의한 존재하는 고 친화성 mAb의 친화성을 감소시키는 것을 사용하여 잠재적인 부작용을 피할 수 있는데, 예를 들면, 고 친화성 mAb는 이의 의도된 표적의 모두를 봉쇄하고/중화함으로써 표적화된 단백질의 기능(들)을 완전히 고갈/제거할 수 있다. 당해 시나리오에서, 저 친화성 mAb는 질병 증상(병리학적 또는 과-생산된 수준)에 관여할 수 있는 표적의 분획을 봉쇄/중화함으로써 표적의 분획이 이의 정상적인 생리학적 기능(들)을 수행하는 것을 지속하도록 할 수 있다. 따라서, K_d 를 감소시켜 투여량을 조절하고/하거나 부작용을 감소시키는 것이 가능할 수 있다. 모 mAb의 친화성은 바람직한 치료학적 결과를 달성하기 위해 세포 표면 분자를 적절히 표적화하는데 중요한 역할을 할 수 있다. 예를 들어, 표적이 고 밀도로 암 세포 상에서 및 저 밀도로 정상 세포상에서 발현되는 경우, 보다 낮은 친화성 mAb는 정상 세포보다 종양 세포상에서 보다 큰 수의 표적에 결합하여 ADCC 또는 CDC를 통해 종양 세포 제거를 초래하므로, 치료학적으로 바람직한 효과를 가질 수 있다. 따라서, 바람직한 친화성을 갖는 mAb를 선택하는 것은 가용성 및 표면 표적 둘다와 관련될 수 있다.

[0178]

이의 리간드와의 상호작용시 수용체를 통한 시그널링은 수용체-리간드 상호작용의 친화성에 의존적일 수 있다. 유사하게, 표면 수용체에 대한 mAb의 친화성은 세포내 시그널링의 특성 및 mAb가 작용제 또는 길항체 시그널을 전달할 수 있는지의 여부를 측정할 수 있다. mAb-매개된 시그널링의 친화성-기준 특성은 이의 부작용 프로파일의 영향을 가질 수 있다. 따라서, 치료학적 모노클로날 항체의 바람직한 친화성 및 바람직한 기능을 시험관내 및 생체내 시험에 의해 조심스럽게 측정할 필요가 있다.

[0179]

결합 단백질(예를 들면, 항체)의 바람직한 K_d 는 바람직한 치료학적 결과에 따라 실험적으로 측정할 수 있다. 하나의 양태에서, 동일한 항원에 대해 DVD-Ig의 바람직한 친화성과 동일하거나 보다 우수한 특정 항원에 대한 친화성(K_d)를 갖는 모 항체를 선택한다. 항원 결합 친화성 및 역학은 비아코어 또는 다른 유사한 기술로 평가한다. 하나의 양태에서, 각각의 모 항체는 약 10^{-7} M 이하; 약 10^{-8} M 이하; 약 10^{-9} M 이하; 약 10^{-10} M 이하; 약 10^{-11} M 이하; 약 10^{-12} M 이하; 및 10^{-13} M 이하로 이루어진 그룹 중에서 선택된 이의 항원에 대한 해리 상수를 갖는다. VD1이 수득된 제1 모 항체 및 VD2가 수득된 제2 모 항체는 각각의 항원에 대해 유사하거나 상이한 친화성(K_p)을 가질 수 있다. 각각의 모 항체는 표면 플라스몬 공명에 의해 측정시 약 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 이상; 약 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 이상; 약 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 이상; 약 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 이상; 및 약 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 이상으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 항원에 대한 온

속도 상수(Kon)를 갖는다. VD1이 수득된 제1 모 항체 및 VD2가 수득된 제2 모 항체는 각각의 항원에 대해 동일하거나 상이한 온 속도 상수(Kon)를 가질 수 있다. 하나의 양태에서, 각각의 모 항체는 표면 플라스몬 공명으로 측정시 약 10^{-3} s^{-1} 이하; 약 10^{-4} s^{-1} 이하; 약 10^{-5} s^{-1} ; 및 약 10^{-6} s^{-1} 이하로 이루어진 그룹 중에서 선택된 항원에 대한 오프 속도 상수(Koff)을 가진다. VD1이 수득된 제1 모 항체 및 VD2가 수득된 제2 모 항체는 각각의 항원에 대해 유사하거나 상이한 오프 속도 상수(Koff)를 갖는다.

[0180] B2. 효능

모 모노클로날 항체의 바람직한 친화성/효능은 바람직한 치료학적 결과에 의존할 것이다. 예를 들어, 수용체-리간드(R-L) 상호작용의 경우, 친화성(kd)은 R-L kd(pM 범위)와 동일하거나 이보다 우수하다. 병원성의 순환하는 단백질의 단순한 제거, 예를 들면, 각종의 순환하는 A- β 웨타이드의 제거를 위해서는, kd가 nM 범위로 낮을 수 있다. 또한, kd는, 표적이 동일한 에피토프, 예를 들면, A β 올리고머내 mAb 표적화 형태의 에피토프의 다중 카페를 발현하는지의 여부에 의존할 것이다.

VD1 및 VD2가 동일한 항원, 그러나 명백한 에피토프에 결합하는 경우, DVD-Ig는 동일한 항원에 대한 4개의 결합부위를 함유함으로써 결합활성 및 이에 따라 DVD-Ig의 겉보기 kd를 증가시킬 것이다. 하나의 양태에서, DVD-Ig에서 바람직한 것과 동일하거나 이보다 낮은 kd를 가진 모 항체를 선택한다. 모 mAb의 친화성 고려는 또한, DVD-Ig가 4개 이상의 동일한 항원 결합부(즉, 단일 mAb로부터의 DVD-Ig)를 함유하는지의 여부에 의존할 수 있다. 이 경우에, 겉보기 kd는 결합활성으로 인해 mAb보다 더 클 수 있다. 이러한 DVD-Ig를 표면 수용체를 교차-결합시키는데 사용할 수 있고, 중화 효능을 증가시킬 수 있으며, 병리학적 단백질 등의 제거를 향상시킬 수 있다.

하나의 양태에서, 동일한 항원에 대해 DVD-Ig의 바람직한 중화 효능과 동일하거나 이보다 더 우수한 특이적인 항원에 대한 중화 효능을 가진 모 항체를 선택한다. 중화 효능은, 적절한 유형의 세포가 표적 자극에 대해 반응하여 측정가능한 시그널(즉, 증식 또는 사이토킨 생산)을 생산하고, mAb에 의한 표적 중화가 투여량-의존적인 방식으로 시그널을 감소시킬 수 있는 표적-의존성 생검정으로 평가할 수 있다.

[0184] B3. 생물학적 기능

모노클로날 항체는 잠재적으로 몇 가지 기능을 수행할 수 있다. 이들 기능들 중 일부는 표 3에 열거되어 있다. 이들 기능은 시험관내 검정(예를 들면, 세포-계 및 생화학적 검정) 및 생체내 동물 모델 둘다로 평가할 수 있다.

표 3

치료학적 항체에 대한 일부 잠재적인 적용

| 표적(부류) | 작용 메커니즘(표적) |
|--------------------|---|
| 가용성 (사이토킨, 기타) | 활성의 중화(예를 들면, 사이토킨) 제거율의 향상(예를 들면, A β 올리고머) 반감기의 증가(예를 들면, GLP1) |
| 세포 표면 (수용체, 기타) | 작용제(예를 들면, GLP1R; EPO R; 등) 길항체(예를 들면, 인테그린; 등) 세포독성 (CD 20; 등) |
| 단백질 침착물 | 제거율/분해 향상(예를 들면, A β 플라크, 아밀로이드 침착물) |

[0186]

표 3에서 본원의 실시예에 기술된 명백한 기능을 가진 MAb를 선택하여 목적한 치료학적 결과를 달성할 수 있다. 이후에, 2개 이상의 선택된 모 모노클로날 항체를 DVD-Ig 형식으로 사용하여 단일 DVD-Ig 분자에서 2개의 명백한 기능을 달성할 수 있다. 예를 들면, DVD-Ig는 특이적인 사이토킨의 기능을 중화시키는 모 mAb를 선택하고 병리학적 단백질의 제거를 향상시키는 모 mAb를 선택함으로써 생성시킬 수 있다. 유사하게, 본 발명자들은 2개의 세포 표면 수용체를 인식하는 2개의 모 모노클로날 항체, 즉 하나의 수용체상에서 작용제 기능을 가진 하나의 mAb 및 상이한 수용체상에서 길항체 기능을 가진 다른 mAb를 선택할 수 있다. 명백한 기능을 가진 이들 2개의 선택된 모노클로날 항체 각각을 사용하여 단일 분자내 선택된 모노클로날 항체의 2개의 명백한 기능(작용제

및 길항체)을 지닐 단일 DVD-Ig 분자를 제작할 수 있다. 유사하게, 각각의 수용체 리간드(예를 들면, EGF 및 IGF)의 결합을 각각 차단하는 세포 표면 수용체에 대한 2개의 길항체성 모노클로날 항체를 DVD-Ig 형식으로 사용할 수 있다. 역으로, 길항체성 항-수용체 mAb(예를 들면, 항-EGFR) 및 중화 항-가용성 중재인자(예를 들면, 항-IGF1/2) mAb를 선택하여 DVD-Ig를 제조할 수 있다.

[0188] B4. 에피토프 인식:

단백질의 상이한 영역은 상이한 기능을 수행할 수 있다. 예를 들면, 사이토킨의 특이적인 영역은 사이토킨 수용체와 상호작용하여 수용체 활성화를 초래하는 반면, 단백질의 다른 영역은 사이토킨을 안정화하는데 필요할 수 있다. 당해 예에서, 사이토킨상의 수용체 상호작용 영역(들)에 특이적으로 결합하는 mAb를 선택함으로써 사이토킨-수용체 상호작용을 차단할 수 있다. 일부 경우에, 예를 들면, 다수의 리간드를 결합하는 특정의 케모킨 수용체, 단지 하나의 리간드와 상호작용하는 에피토프(케모킨 수용체 상의 영역)에 결합하는 mAb를 선택할 수 있다. 다른 예에서, 모노클로날 항체는 단백질의 생리학적 기능에 직접 관여하지 않는 표적상의 에피토프에 결합할 수 있지만, 이들 영역에 대한 mAb의 결합은 생리학적 기능을 방해(업체장애)하거나 단백질의 형태를 변경시킴으로써 단백질이 기능할 수 없도록 한다(리간드가 결합할 수 없도록 수용체 형태를 변경시키는 다수 리간드를 가진 수용체에 대한 mAb). 이의 수용체에 대한 사이토킨의 결합을 차단하지 않지만 시그널 전달을 차단하는 항-사이토킨 모노클로날 항체를 또한 확인하였다(예를 들면, 125-2H, 항-IL-18 mAb).

[0189] [0190] 에피토프 및 mAb 기능의 예는 수용체-리간드(R-L) 상호작용(R-상호작용 부위를 결합하는 중화 mAb)의 차단; R-결합이 감소되거나 없도록 하는 입체 장애를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 수용체 결합 부위 이외의 부위에서 표적을 결합할 수 있지만, 여전히 구조적 변화를 유도함으로써 표적의 수용체 결합 및 기능을 방해하고 R에 대해 결합하는 기능(예를 들면, Xolair)을 제거함으로써 시그널링(125-2H)을 차단한다.

[0191] 하나의 양태에서, 모 mAb는 최대 효능에 대한 적절한 에피토프를 표적화하는데 필요하다. 이러한 에피토프는 DVD-Ig에서 보존되어야 한다. mAb의 결합 에피토프는 공동-결정학(co-crystallography), mAb-항원 복합체의 제한된 단백분석 및 질량 분광계 템파이드 맵핑(참조: Legros V. et al 2000 Protein Sci. 9:1002-10), 파아지 디스플레이된 템파이드 라이브러리(참조: O'Connor KH et al 2005 J Immunol Methods. 299:21-35), 및 돌연변이유발(참조: Wu C. et al. 2003 J Immunol 170:5571-7)를 포함하는, 몇가지 시도로 측정할 수 있다.

[0192] B5. 물리화학적 및 약제학적 특성:

[0193] 항체를 사용한 치료학적 치료는 흔히 고 투여량, 흔히 몇몇 mg/kg(대표적으로 거대 분자량의 결과로서 질량 기준의 저 효능에 기인함)의 투여를 필요로 한다. 환자 순응도를 수용하고 만성 장애 치료요법 및 외래환자 치료에 적절히 초점을 맞추기 위해, 치료학적 mAb의 피하(s.c.) 또는 근육내(i.m.) 투여가 바람직하다. 예를 들면, s.c. 투여를 위한 최대의 바람직한 용적은 약 1.0 mL이므로, >100 mg/mL의 농도가 투여량당 주사의 수를 제한하기 위해 바람직하다. 하나의 양태에서, 치료학적 항체는 1회 투여량으로 투여된다. 그러나, 이러한 제형의 개발은 단백질-단백질 상호작용(예를 들면, 면역원성 위험을 잠재적으로 증가시키는 응집)에 의해 및 프로세싱 및 전달 동안 제한(예를 들면, 점도)에 의해 구속된다. 결과적으로, 임상적 효능 및 관련된 발달 구속에 요구되는 다량은 고-투여량 투약방식에 있어서 항체 제형 및 s.c. 투여의 효능의 완전한 이용을 제한한다. 단백질 분자 및 단백질 용액의 물리화학적 및 약제학적 특성, 예를 들면, 안정성, 가용성 및 점도 특징이 최대로 중요하다는 것은 명백하다.

[0194] B5.1. 안정성

[0195] "안정한" 항체 제형은, 제형내 항체가 필수적으로 저장시 이의 물리적 안정성 및/또는 화학적 안정성 및/또는 생물학적 안정성을 보유하는 것이다. 안정성은 선택된 기간 동안 선택된 온도에서 측정할 수 있다. 하나의 양태에서, 제형중 항체는 실온(약 30°C) 또는 또는 40°C에서 적어도 1개월 동안 안정하고/하거나 약 2 내지 8°C에서 적어도 1년 동안 내지 적어도 2년 동안 안정하다. 또한, 하나의 양태에서, 제형은 이후 "동결/해동 주기"로 언급되는, 제형의 동결(예를 들면, -70°C 이하) 및 해동 후 안정하다. 다른 실시예에서, "안정한" 제형은, 단백질의 약 10% 미만 및 약 5% 미만이 제형 속에 응집체로서 존재하는 것일 수 있다.

[0196] 다양한 온도에서 연장된 기간 동안 시험관내에서 안정한 DVD-Ig가 바람직하다. 이는 승온, 예를 들면, 40°C에서 2 내지 4주 동안 시험관내에서 안정한 모 mAb를 신속하게 스크리닝함으로써 달성하고 이후 안정성을 평가할 수 있다. 2 내지 8°C에서 저장하는 동안, 단백질은 적어도 12개월 동안, 예를 들면, 적어도 24 개월 동안 안정성을 나타낸다. 안정성(단량체성, 완전한 분자의 %)은 양이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, SDS-PAGE, 및 또한 생물활성 시험과 같은 각종 기술을 사용하여 평가할 수 있다. 공유결합성

및 형태적 변형을 분석하기 위해 사용될 수 있는 분석 기술의 보다 총괄적인 목록은 문헌[참조: Jones, A. J. S. (1993) Analytical methods for the assessment of protein formulations and delivery systems. In: Cleland, J. L.; Langer, R., editors. Formulation and delivery of peptides 및 proteins, 1st edition, Washington, ACS, pg. 22-45; 및 Pearlman, R.; Nguyen, T. FL(1990) Analysis of protein drugs. In: Lee, V. H., editor. Peptide and protein drug delivery, 1st edition, New York, Marcel Dekker, Inc., pg. 247-301]을 참조한다.

[0197] 이질성 및 응집체 형성: 항체의 안정성은, 제형이 응집체로서 존재하는 GMP 항체 물질이 약 10% 미만, 및 약 5% 미만, 다른 양태에서 약 2% 미만, 또는 하나의 양태에서 0.5% 내지 1.5%의 범위 이내를 나타낼 수 있는 것일 수 있다. 크기 배제 크로마토그래피는 단백질 응집체의 검출시 민감하고, 재생적이며 매우 강력한 방법이다.

[0198] 낮은 응집체 수준 외에도, 하나의 양태에서, 항체는 화학적으로 안정하여야 한다. 화학적 안정성은 이온 교환 크로마토그래피(예를 들면, 양이온 또는 음이온 교환 크로마토그래피), 소수성 상호작용 크로마토그래피, 또는 등전점 포커싱 또는 모세관 전기영동과 같은 다른 방법에 의해 측정할 수 있다. 예를 들면, 항체의 화학적 안정성은 2 내지 8°C에서 적어도 12개월 저장 후, 양이온 교환 크로마토그래피에서 저장 시험 전 항체 용액과 비교하여, 변형되지 않은 항체를 나타내는 피크가 20% 이상, 하나의 양태에서 10% 이상 또는 다른 양태에서, 5% 이상 증가하지 않는 것이다.

[0199] 하나의 양태에서, 모 항체는 구조적 통합성; 정확한 이황화물 결합 형성 및 정확한 폴딩: 항체의 제2 또는 제3 구조에 있어서의 변화에 기인한 화학적 안정성을 나타낸다. 예를 들어, 항체의 활성에 의해 나타나는 안정성은, 2 내지 8°C에서 적어도 12개월 저장 후 항체의 활성이 저장 시험 전 항체 용액과 비교하여 50% 이상, 하나의 양태에서, 30% 이상, 또는 심지어 10% 이상 또는 하나의 양태에서 5% 또는 1% 이상 감소하지 않는 것일 수 있다. 적합한 항원-결합 검정을 사용하여 항체 활성을 측정할 수 있다.

B5.2. 가용성

[0201] mAb의 "가용성"은 정확하게 폴딩된, 단량체성 IgG의 생산과 상호 관련된다. 따라서, IgG의 가용성은 HPLC로 평가할 수 있다. 예를 들면, 가용성(단량체성) IgG는 HPLC 크로마토그래피에서 단일 피크를 생성할 것이지만, 불용성(예를 들면, 다량체성 및 응집된)은 다수의 피크를 생성할 것이다. 따라서, 당해 분야의 숙련가는 통상적인 HPLC 기술을 사용하여 IgG의 가용성의 증가 또는 감소를 검출할 수 있을 것이다. 가용성을 분석하기 위해 사용할 수 있는 분석 기술의 보다 총괄적인 목록에 대해서는 문헌[참조: Jones, A. G. Dep. Chem. Biochem. Eng., Univ. Coll. London, London, UK. Editor(s): Shamlou, P. Ayazi. Process. Solid-Liq. Suspensions (1993), 93-117. Publisher: Butterworth-Heinemann, Oxford, UK and Pearlman, Rodney; Nguyen, Tue H, Advances in Parenteral Sciences (1990), 4 (Pept. Protein Drug Delivery), 247-301]을 참조한다. 치료학적 mAb의 가용성은 적절한 투여에 흔히 요구되는 고 농도로 제형화하는데 있어 중요하다. 본원에서 요약한 바와 같이, >100 mg/mL의 가용성이 충분한 항체 투여를 수용하는데 요구될 수 있다. 예를 들면, 항체 가용성은 조기 조사 단계에서 약 5 mg/mL 이상, 하나의 양태에서, 진전된 방법 과학 단계에서 약 25 mg/mL 이상, 또는 하나의 양태에서, 약 100 mg/mL 이상, 또는 하나의 양태에서, 약 150 mg/mL 이상일 수 있다. 단백질 분자의 고유 특성이 단백질 용액의 물리-화학적 특성, 예를 들면, 안정성, 가용성, 점성에 중요함을 당해 분야의 숙련가에게 명백하다. 그러나, 당해 분야의 숙련가는 최종 단백질 제형의 특징에 유리하게 영향을 미치기 위해 첨가제로서 사용될 수 있는 광범위한 부형제가 존재함을 인식할 것이다. 이들 부형제는 (i) 액체 용매, 보조용매(예를 들면, 에탄올과 같은 알코올); (ii) 완충제(예를 들면, 포스페이트, 아세테이트, 시트레이트, 아미노산 완충제); (iii) 당 또는 당 알코올(예를 들면, 슈크로즈, 트레할로즈, 프럭토즈, 라파노즈, 만니톨, 소르비톨, 텍스트란); (iv) 표면활성제(예를 들면, 폴리소르베이트 20, 40, 60, 80, 폴록사마); (v) 등장성 개질제(예를 들면, NaCl과 같은 염, 당, 당 알코올); 및 (vi) 기타(예를 들면, 방부제, 퀼레이트제, 항산화제, 퀼레이팅 물질(예를 들면, EDTA), 생분해가능한 중합체, 담체 분자(예를 들면, HSA, PEG)를 포함할 수 있다.

[0202] 점도는 항체 제조 및 항체 가공(예를 들면, 여과작용/한외여과), 충전-마무리 공정(fill-finish process)(펌핑 측면, 여과 측면) 및 전달 측면(주사가능성, 정교한 장치 전달)과 관련하여 매우 중요한 매개인자이다. 저 점도는 보다 높은 농도의 항체의 액체 용액이 가능하도록 한다. 이는 동일한 투여량이 보다 적은 용적으로 투여될 수 있도록 한다. 소 주사 용적은 주사 감각시 더 적은 통증의 이점을 지니며, 용액은 필수적으로 환자에서 주사시 통증을 감소시키기 위해 등장성일 필요가 없다. 항체 용액의 점도는, 100(1/s)의 전단 속도(shear rate)에서 항체 용액 점도가 200 mPa s 미만, 하나의 양태에서, 125 mPa s 미만, 다른 양태에서, 70 mPa s 미만, 및 또 다른 양태에서 25 mPa s 미만 또는 심지어 10 mPa s 미만일 수 있다.

[0203]

B 5.3. 생산 효율

[0204]

차이니즈 햄스터 난소 세포(CHO)와 같은 포유동물 세포내에서 효율적으로 발현되는 DVD-Ig의 생성은 하나의 양태에서 자체가 포유동물 세포내에서 효율적으로 발현되는 2개의 모 모노클로날 항체를 필요로 할 것이다. 안정한 포유동물 세포주(즉, CHO)로부터의 생산 수율은 약 0.5g/L 초과, 하나의 양태에서, 약 1g/L 초과, 및 다른 양태에서, 약 2 내지 5 g/L 이상의 범위이어야 한다(참조: Kipriyanov SM, Little M. 1999 Mol Biotechnol. 12:173-201; Carroll S, Al-Rubeai M. 2004 Expert Opin Biol Ther. 4:1821-9).

[0205]

포유동물 세포내에서 항체 및 Ig 융합 단백질의 생산은 몇가지 인자에 의해 영향받는다. 강력한 프로모터, 인핸서 및 선택 마커의 혼입을 통한 발현 벡터의 조작은 통합된 벡터 카페로부터 목적 유전자의 전사를 최대화할 수 있다. 고 수준의 유전자 전사를 위해 허용되는 벡터 통합 부위의 확인은 벡터로부터 단백질 발현을 증강시킬 수 있다[참조: Wurm et al, 2004, Nature Biotechnology, 2004, Vol/Iss/Pg. 22/11 (1393-1398)]. 또한, 생산 수준은 항체 중쇄 및 경쇄의 비와 단백질 조립 및 분비의 과정 동안 각종 단계에 의해 영향받는다(참조: Jiang et al. 2006, Biotechnology Progress, Jan-Feb 2006, vol. 22, no. 1, p. 313-8).

[0206]

B 6. 면역원성

[0207]

치료학적 mAb의 투여는 면역 반응(즉, 치료학적 mAb에 대해 지시된 내인성 항체의 형성)의 특정한 발생을 초래할 수 있다. 면역원성을 유도할 수 있는 잠재적인 성분들은 모 모노클로날 항체의 선택 동안 분석하여야 하며, 이러한 위험을 감소시키는 단계는 DVD-Ig 자체 전 모 모노클로날 항체를 최적화시킬 수 있다. 마우스-기원한 항체는 환자내에서 고 면역원성이 밝혀졌다. 마우스 가변성 및 사람 불변 영역으로 구성된 키메라 항체의 생성은 치료학적 항체의 면역원성을 감소시키기 위한 타당한 다음 단계를 나타낸다(참조: Morrison and Schlom, 1990). 달리는, 면역원성은 문헌(참조: Riechmann et al., 1988)에 치료학적 항체에 대하여 기술된 바와 같이, 쥐 CDR 서열을 사람 항체 골격내로 형질감염(재성형/CDR 이식/사람화)시킴으로써 감소시킬 수 있다. 다른 방법은 "재표면화(resurfacing)" 또는 "베니어링(veneering)"으로 언급되며, 설치류 가변 경쇄 및 중쇄 도메인으로부터 출발하여, 표면-접근성 골격 아미노산만이 사람의 것으로 변경되는 반면, CDR 및 숨겨진 아미노산은 모 설치류 항체로부터 잔존한다(참조: Roguska et al., 1996). 전체 CDR의 이식화 대신, 사람화의 다른 유형에서, 하나의 기술은 항체의 이의 표적에 대한 결합에 관여하는 CDR 잔기의 소세트로서 정의된 "특이성-결정 영역"(SDR)만 이식한다. 이는 항체-표적 복합체의 이용가능한 3-차원 구조의 분석 또는 표적과 상호작용하는 것을 측정하기 위한 항체 CDR 잔기의 돌연변이성 분석을 통한 SDR의 확인을 필요로 한다. 달리는, 완전한 사람 항체는 쥐, 키메라 또는 사람화된 항체와 비교하여 감소된 면역원성을 가질 수 있다.

[0208]

치료학적 항체의 면역원성을 감소시키기 위한 다른 시도는 면역원성인 것으로 예측되는 특정의 특이적인 서열의 제거이다. 하나의 시도에서, 제1 세대 생물체를 사람에서 시험하여 허용가능하지 않게 면역원성을 발견한 후, B-세포 에피토프를 맵핑한 후 변경시켜 면역 검출을 피할 수 있다. 다른 시도는 잠재적인 T-세포 에피토프를 예측하여 제거하는 방법을 사용한다. 컴퓨터처리된 방법을 개발하여 MHC 단백질에 결합하는 효능을 가진 생물학적 치료제의 웹타이드 서열을 스캐닝하고 확인하였다(참조: Desmet et al., 2005). 달리는, 사람 수지상 세포-계 방법을 사용하여 잠재적인 단백질 알레르기항원에서 CD4⁺ T-세포 에피토프를 확인할 수 있다[참조: Stickler et al., 2005; S. L. Morrison and J. Schlom, Important Adv. Oncol. (1990), pp. 3-18; Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. and Winter, G. "Reshaping human antibodies for therapy" Nature (1988) 332: 323-327; Roguska-M-A, Pedersen-J-T, Henry-A-H, Searle-S-M, Roja-C-M, Avery-B, Hoffee-M, Cook-S, Lambert-J-M, Blattler-W-A, Rees-A-R, Guild-B-C. A comparison of two murine mAbs humanized by CDR-grafting and variable domain resurfacing. Protein engineering, {Protein-Eng}, 1996, vol. 9, p. 895-904; Kashmiri-Syed-V-S, De-Pascalis-Roberto, Gonzales-Noreen-R, Schlom-Jeffrey. SDR grafting--a new approach to antibody humanization. Methods (San Diego Calif), {Methods}, May 2005, vol. 36, no. 1, p. 25-34; Desmet-Johan, Meersseman-Geert, Boutonnet-Nathalie, Pletinckx-Jurgen, De-Clercq-Krista, Debulpaepe-Maja, Braeckman-Tessa, Lasters-Ignace. Anchor profiles of HLA-specific peptides: analysis by a novel affinity scoring method and experimental validation. Proteins, 2005, vol. 58, p. 53-69; Stickler-M-M, Estell-D-A, Harding-F-A. CD4+ T-cell epitope determination using unexposed human donor peripheral blood mononuclear cells. Journal of immunotherapy 2000, vol. 23, p. 654-60].

[0209]

B7. 생체내 효능

[0210]

바람직한 생체내 효능을 가진 DVD-Ig 분자를 생성하기 위하여, 조합으로 제공하는 경우 유사하게 바람직한 생체

내 효능을 가진 mAb를 생성하고 선택하는 것이 중요하다. 그러나, 일부 예에서, DVD-Ig는 2개의 별개의 mAb의 조합으로 달성할 수 없는 생체내 효능을 나타낼 수 있다. 예를 들어, DVD-Ig는 2개의 별개의 mAb의 조합으로 달성할 수 없는 활성을 초래하는 매우 근접한 2개의 표적을 가지고 올 수 있다. 추가의 바람직한 생물학적 기능은 본원의 단락 B3에 기술되어 있다. DVD-Ig 분자내에서 바람직한 특성을 갖는 모 항체는 약력학 t½; 조직 분포; 세포 표면 표적에 대한 가용성; 및 표적 농도-가용성/밀도-표면과 같은 인자를 기초로 선택할 수 있다.

[0211] B8. 생체내 조직 분포

바람직한 생체내 조직 분포를 갖는 DVD-Ig 분자를 생성하기 위해, 하나의 양태에서, 유사한 바람직한 생체내 조직 분포 프로파일을 갖는 모 mAb를 선택할 수 있다. 달리는, 이중-특이적인 표적화 전략의 메카니즘을 기초로 하여, 이는, 평소에는 조합으로 제공되는 경우 유사하게 바람직한 생체내 조직 분포를 가진 모 mAb를 선택하기 위해 요구되지 않을 수 있다. 예를 들어, DVD-Ig의 경우에, 하나의 결합 성분은 특이적인 부위에 대해 DVD-Ig를 표적화함으로써 동일한 표적 부위에 대해 제2 결합 성분을 가져온다. 예를 들어, DVD-Ig의 하나의 결합 특이성은 표적 췌장(섬 세포)을 표적화할 수 있으며 다른 특이성은 GLP1을 췌장으로 가져와서 인슐린을 유도할 수 있다.

[0213] B9. 동형:

동형, 효과기 기능 및 순환 반감기를 포함하나, 이에 한정되지 않는 바람직한 특성을 가진 DVD-Ig 분자를 생성하기 위해, 하나의 양태에서, 치료학적 유용성 및 바람직한 치료학적 종결-점(end-point)에 따라 적절한 Fc-효과기 기능을 지닌 모 mAb를 선택한다. 일부가 몇가지 소-유형을 가지고 이들이 항체 분자의 효과기 기능을 측정하는 5개의 주요 중쇄 부류 또는 동형이 존재한다. 이를 효과기 기능은 항체 분자의 힌지 영역, CH2 및 CH3 도메인내 잔기에 작용한다. 그러나, 항체 분자의 다른 부위에서 잔기는 또한 효과기 기능에 있어 효과를 가질 수 있다. 힌지 영역 Fc-효과기 기능은 (i) 항체-의존성 세포 세포독성, (ii) 보체(C1q) 결합, 활성화 및 보체-의존성 세포독성(CDC), (iii) 항원-항체 복합체의 포식작용/제거, 및 (iv) 일부 예에서 사이토kin 방출을 포함한다. 항체 분자의 이러한 Fc-효과기 기능은 Fc-영역과 부류-특이적인 세포 표면 수용체의 세트의 상호작용을 통해 매개된다. IgG1 동형의 항체는 가장 활성인 반면 IgG2 및 IgG4는 효과기 기능이 최소이거나 없다. IgG 항체의 효과기 기능은 3개의 구조적으로 동종인 세포 Fc 수용체 유형(및 아-유형)(FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII)과의 상호작용을 통해 매개된다. IgG1의 이러한 효과기 기능은 FcγR 및 C1q 결합에 요구되는 보다 적은 힌지 영역(예를 들면, L234A, L235A)에서 특정 아미노산 잔기의 돌연변이에 의해 제거될 수 있다. Fc 영역, 특히 CH2-CH3 도메인내 아미노산 잔기는 또한 항체 분자의 순환 반감기를 측정한다. 당해 Fc 기능은 산성 라이소좀으로부터 일반적인 순환으로의 항체 분자의 재순환에 관여하는 신생 Fc 수용체(FcRn)에 대한 Fc-영역의 결합을 통해 매개된다.

[0215] mAb가 활성이거나 비활성 동형인지의 여부는 항체에 대한 바람직한 치료학적 종말점에 의존할 것이다. 동형 및 바람직한 치료학적 결과의 사용의 일부 예는 하기 열거한다:

[0216] a) 바람직한 종결점이 가용성 사이토킨의 기능적 중화인 경우, 불활성 동형을 사용할 수 있고;

[0217] b) 바람직한 결과가 병리학적 단백질의 제거인 경우, 활성 동형을 사용할 수 있으며;

[0218] c) 바람직한 결과가 단백질 응집체의 제거인 경우, 활성 동형을 사용할 수 있고;

[0219] d) 바람직한 결과가 표면 수용체를 길항하기 위한 경우, 불활성화 동형을 사용하며(Tysabri, IgG4; OKT3, 돌연변이된 IgG1);

[0220] e) 바람직한 결과가 표적 세포를 제거하기 위한 경우, 활성 동형이 사용되고[헤르셉틴, IgG1(및 효과기 기능이 향상됨)];

[0221] f) 바람직한 결과가 CNS로 도입하지 않고 순환으로부터 단백질을 제거하기 위한 경우, IgM 동형을 사용할 수 있다(예를 들면, 순환하는 Ab 웹타이드 종의 제거). 모 mAb의 Fc 효과기 기능은 당해 분야에 익히 공지된 각종 시험관내 방법으로 측정할 수 있다.

[0222] 논의된 바와 같이, 동형의 선택 및 이에 의한 효과기 기능은 바람직한 치료학적 종말점에 좌우될 것이다. 순환하는 표적의 단순한 중화, 예를 들면 수용체-리간드 상호작용의 차단이 요구되는 경우에, 효과기 기능이 요구되지 않을 수 있다. 이러한 예에서, 효과기 기능을 제거하는 항체의 Fc-영역내 동형 또는 돌연변이가 바람직하다. 표적 세포의 제거가 치료학적 종말점인 다른 예에서, 예를 들면 효과기 기능을 향상시키는 Fc-영역내 종양 세포, 동형 또는 돌연변이의 제거 또는 탈포코실화가 바람직하다(참조: Presta GL, Adv. Drug

Delivery Rev. 58:640-656, 2006; Satoh M., Iida S., Shitara K. Expert Opinion Biol. Ther. 6:1161-1173, 2006). 유사하게, 치료학적 용도에 따라서, 항체 분자의 순환 반감기는 Fc 영역내 특이적인 돌연변이를 도입시켜 항체-FcRn 상호작용을 조절함으로써 감소시키고 연장할 수 있다[참조: Dall'Acqua WF, Kiener PA, Wu H. J. Biol. Chem. 281 :23514-23524, 2006; Petkova SB., Akilesh S., Sproule TJ. et al. Internal Immunol. 18:1759-1769, 2006; Vaccaro C, Bawdon R., Wanjie S et al. PNAS 103:18709-18714, 2007].

[0223] 정상의 치료학적 mAb의 상이한 효과기 기능에 영향을 미치는 각종 잔기에서의 공지된 정보가 DVD-Ig의 확인을 필요로 할 수 있다. DVD-Ig 형식에서, 모노클로날 항체 효과기의 조절을 위해 확인된 것들 외에, 추가의(상이한) Fc-영역 잔기가 중요할 수 있다는 것이 가능할 수 있다.

[0224] 총괄적으로, Fc-효과기 기능(동형)에 대한 결정이 최종 DVD-Ig 형식에서 중요할 것이라는 결정은 질병 처방, 치료학적 표적, 바람직한 치료학적 종결점 및 안정성의 고려에 의존할 것이다. 하기 열거된 것은

[0225] o IgG1 - 동종이형: G1mz

[0226] o IgG1 돌연변이체 - A234, A235

[0227] o IgG2 - 동종이형: G2m(n-)

[0228] o 카파 - Km3

[0229] o 람다를 포함하나 이에 한정되지 않는 예시적인 적절한 중쇄 및 경쇄 불변 영역이다.

[0230] Fc 수용체 및 C1q 연구: 세포막상에서 어떠한 과발현된 표적에 대한 항체 복합체화에 의한 원치않는 항체-의존성 세포-매개된 세포독성(ADCC) 및 보체-의존성 세포독성(CDC)의 가능성은 (예를 들면, L234A, L235A) 헌지-영역 돌연변이에 의해 제거될 수 있다. mAb의 IgG1 헌지 영역내에 존재하는, 이들 치환된 아미노산은, FcgR 결합이 IgG1 헌지 영역 상의 오버랩핑된 부위내에서 일어나는 것으로 고려되므로, 사람 Fc 수용체(FcRn이 아닌)에 대한 mAb의 제거된 결합을 초래하는 것으로 예측된다. mAb의 이러한 특징은 야생형 IgG를 함유하는 항체보다 개선된 안정성 프로파일로 이끌 수 있다. 사람 Fc 수용체에 대한 mAb의 결합은 세포주(예를 들면, THP-1, K562) 및 FcgRIIb(또는 다른 FcgR)를 발현하는 조작된 CHO 세포주를 사용한 유동 세포분석 실험으로 측정할 수 있다. IgG1 대조군 모노클로날 항체와 비교하여, mAb는 FcgRI 및 FcgRIIa에 대해 감소된 결합을 나타내지만 FcgRIIb에 대한 결합은 영향받지 않는다. 항원/IgG 면역 복합체에 의한 C1q의 결합 및 활성화는 후속적인 염증 및/또는 면역조절 반응과의 일반적인 보체 캐스케이드를 개시한다. IgG 상에서 C1q 결합 부위는 IgG 헌지 영역 내 잔기에 국재화된다. 증가되는 농도의 mAb에 대한 C1q 결합은 C1q ELISA에 의해 평가되었다. 당해 결과는, mAb가 야생형 조절 IgG1의 결합과 비교하여 예측되는 것으로서 C1q에 결합할 수 없음을 입증한다. 총괄하여, L234A, L235A 헌지 영역 돌연변이는 FcgRI, FcgRIIa 및 C1q에 대한 mAb의 결합을 폐지하지 않지만, mAb와 FcgRIIb의 상호작용에 영향을 미치지 않는다. 당해 데이터는, 생체내에서, 돌연변이 Fc를 지닌 mAb가 억제성 FcgRIIb와 정상적으로 상호작용하지만 활성화 FcgRI 및 FcgRIIa 수용체 또는 C1q와 상호작용하는데 실패할 것임을 제안한다.

[0231] 사람 FcRn 결합: 신생 수용체(FcRn)는 태반을 통과하는 IgG의 수송 및 IgG 분자의 대사성 반감기를 조절하는데 관여한다. 항체의 최종 반감기를 증가시켜 효능을 개선시키거나, 투여량 또는 투여 횟수를 감소시키거나, 또는 표적에 대한 국재화를 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 달리는, 역전을 수행하기 위해, 즉, 전체 항체 노출을 감소시키기 위해 항체의 최종 반감기를 감소시키거나 표적-대-비-표적 결합 비를 개선시키는 것이 유리할 수 있다. IgG와 이의 구제(salvage) 수용체 사이의 상호작용을 조절하기 위해, FcRn은 IgG의 최종 반감기를 증가시키거나 감소시키는 방법을 제공한다. IgG를 포함하는, 순환시 단백질은 혈관 내피의 것들과 같은 특정 세포에 의해 미세음세포작용을 통해 액체상 속에서 흡수된다. IgG는 약산성 조건(pH 6.0 내지 6.5) 하에서 엔도솜 내 FcRn에 결합할 수 있으며 세포 표면에 재순환할 수 있고, 여기서, 이는 거의 중성 조건(pH 7.0-7.4)하에 방출된다. FcRn80, 16, 17 상에서 Fc-영역-결합 부위의 맵핑은, 종에 걸쳐 보존된 2개의 히스티딘 잔기, His310 및 His435가 이의 상호작용의 pH 의존성에 관여함을 나타내었다. 파아지-디스플레이 기술을 사용하여, FcRn에 대한 결합을 증가시키고 마우스 IgG의 반감기를 연장하는 마우스 Fc-영역 돌연변이를 확인하였다[참조: Victor, G. et al.; Nature Biotechnology (1997), 15(7), 637-640]. pH 6.0에서 FcRn에 대한 사람 IgG의 결합 친화성을 증가시키지만, pH 7.4에서는 그렇지 않은 Fc-영역 돌연변이를 또한 확인하였다[참조: Dall'Acqua William F, et al., Journal of Immunology (2002), 169(9), 5171-80]. 또한, 하나의 경우에서, 결합(27배 이하)에서 유사한 pH-의존적 증가가 리서스(rhesus) FcRn에서 관측되었으며, 이는 또 IgG와 비교하여 리서스 원숭이에서 혈청 반감기를 2배 증가시켰다[참조: Hinton, Paul R. et al., Journal of Biological Chemistry (2004),

279(8), 6213-6216]. 이러한 발견은, Fc 영역과 FcRn의 상호작용을 조절함으로써 항체 치료제의 혈장 반감기를 연장시키는 것이 용이함을 나타낸다. 역으로, FcRn과의 상호작용을 약화시키는 Fc-영역 돌연변이는 항체 반감기를 감소시킬 수 있다.

[0232] B.10 약력학(PK):

바람직한 약력학적 프로파일을 갖는 DVD-Ig 분자를 생성시키기 위해서, 하나의 양태에서, 유사하게 바람직한 약력학적 프로파일을 갖는 모 mAb를 선택한다. 하나의 고려는, 모노클로날 항체에 대한 면역원성 반응(즉, HAHA, 사람 항-사람 항체 반응; HACA, 사람 항-키메라 항체 반응)이 또한 이들 치료제의 약력학을 복잡하게 한다는 것이다. 하나의 양태에서, 면역원성이 최소이거나 없는 모노클로날 항체를 DVD-Ig 분자를 제작하는데 사용함으로써 수득되는 DVD-Ig는 또한 면역원성이 최소이거나 없을 것이다. mAb의 PK를 결정하는 인자들 중 일부는 mAb의 고유의 특성(VH 아미노산 서열); 면역원성; FcRn 결합 및 Fc 기능을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0234] 선택된 모 모노클로날 항체의 PK 프로파일은, 설치류에서 PK 프로파일이 사이노몰거스 원숭이 및 사람에서 모노클로날 항체의 PK 프로파일과 관련(또는 밀접하게 예측)되므로, 설치류에서 용이하게 측정될 수 있다. PK 프로파일은 실시예 단락 1.2.2.3.A에 기술된 바와 같이 측정한다.

[0235] 바람직한 PK 특징(및 본원에 논의한 바와 같은 다른 바람직한 특성)을 가진 모 모노클로날 항체를 선택한 후, DVD-Ig를 제작한다. DVD-Ig 분자는 2개의 모 모노클로날 항체로부터 2개의 항원-결합 도메인을 함유하므로, DVD-Ig의 PK 특성이 또한 평가된다. 따라서, DVD-Ig의 PK 특성을 측정하면서, 2개의 모 모노클로날 항체로부터 기원한 항원-결합 도메인 둘다의 작용성을 기초로 PK 프로파일을 측정하는 PK 검정을 사용할 수 있다. DVD-Ig의 PK 프로파일은 실시예 1.2.2.3.A에 기술한 바와 같이 측정할 수 있다. DVD-Ig의 PK 프로파일에 영향을 미칠 수 있는 추가의 인자는 항원-결합 도메인(CDR) 배향; 링커 크기; 및 Fc/FcRn 상호작용을 포함한다. 모 항체의 PK 특성은 흡수, 분포, 대사 및 분비의 매개변수를 평가함으로써 평가할 수 있다.

[0236] **흡수:** 기금까지, 치료학적 모노클로날 항체의 투여는 비경구 경로(예를 들면, 정맥내[IV], 피하[SC], 또는 근육내[IM])를 통한다. 사이질 공간으로부터 SC 또는 IM 투여 후 mAb의 전신계 순환내로의 흡수는 주로 림프 경로를 통한다. 포화가능한, 예비전신계적, 단백질분해성 분해는 혈관외 투여 후 가변성의 절대적인 생이용성을 초래할 수 있다. 일반적으로, 모노클로날 항체의 증가하는 투여량을 사용한 절대적인 생이용성에 있어서의 증가는 보다 높은 투여량에서 포화된 단백질분해능에 기인하여 관측될 수 있다. mAb에 대한 흡수 과정은, 림프액이 혈관계내로 서서히 배수되므로 일반적으로 매우 느리며, 흡수 기간은 수시간 내지 수일에 걸쳐일어날 수 있다. SC 투여 후 모노클로날 항체의 절대적인 생이용성은 일반적으로 50% 내지 100%의 범위이다.

[0237] **분포:** IV 투여에 이어, 모노클로날 항체는 급속한 분포 상으로 개시한 후 느린 제거 상이 이어지는, 일반적으로 이상 혈청(또는 혈장) 농도-시간 프로파일을 따른다. 일반적으로, 이중지수 약력학적 모델(biexponential pharmacokinetic model)은 이러한 종류의 약력학적 프로파일을 가장 잘 기술하고 있다. mAb에 대한 중심 구획(V_c)에 있어서 분포 용적은 일반적으로 혈장 용적(2 내지 3 리터)과 동일하거나 약간 더 높다. 혈청(혈장) 농도 대 시간 프로파일에서 명백한 이상 패턴(biphasic pattern)은, 혈청(혈장) 농도-시간 곡선의 분포 상이 긴 흡수 부위에 의해 차폐되므로, IM 및 SC와 같은 다른 비경구 투여로 명백하지 않을 수 있다. 물리화학적 특성, 부위-특이적인 및 표적-기원한 수용체 매개된 흡수, 조직의 결합능, 및 mAb 투여량을 포함하는 많은 인자들은 mAb의 생분포에 영향을 미칠 수 있다. 이러한 인자들 중 일부는 mAb에 대한 생분포에 있어 비선형성(nonlinearity)에 기여할 수 있다.

[0238] **대사 및 배출:** 분자 크기로 인하여, 완전한 모노클로날 항체는 신장을 통해 뇌로 배출되지 않는다. 이들은 주로 대사(예를 들면, 이화작용)에 의해 불활성화된다. IgG-계 치료학적 모노클로날 항체의 경우, 반감기는 통상적으로 수시간 또는 1 내지 2일 내지 20일에 걸친 범위이다. mAb의 제거는 FcRn 수용체에 대한 친화성, mAb의 면역원성, mAb의 글리코실화도, 단백질 분해에 대한 mAb의 민감성, 및 수용체-매개된 제거를 포함하나, 이에 한정되지 않는 많은 인자에 의해 영향받을 수 있다.

[0239] B.11 사람 및 톡스(tox) 종에서 조직 교차-반응성 패턴:

[0240] 동일한 염색 패턴은, 잠재적인 사람 독성을 톡스 종에서 평가할 수 있음을 제안한다. 톡스 종은, 관련되지 않는 독성이 연구되어 있는 동물이다.

[0241] 개개 항체를 2가지 기준에 부합하도록 선택한다. (1) 항체 표적의 공지된 발현에 적합한 조직 염색. (2) 동일한 기관으로부터의 사람과 톡스 종 조직 사이의 유사한 염색 패턴.

- [0242] 기준 1: 면역화 및/또는 항체 선택은 통상적으로 재조합 또는 합성된 항원(단백질, 탄수화물 또는 기타 분자)를 사용한다. 천연의 대응물에 대한 결합 및 관련되지 않은 항원에 대한 역스크리닝은 흔히 치료학적 항체에 대한 스크리닝 칼때기(funnel)의 일부이다. 그러나, 다수의 항원에 대한 스크리닝은 흔히 실제적이지 않다. 따라서, 모든 주요 기관으로부터의 사람 조직을 사용한 조직 교차-반응성 연구를 제공하여 어떠한 관련되지 않은 항원에 대한 항체의 원치않는 결합을 제외시킨다.
- [0243] 기준 2: 사람 및 톡스 종 조직(사이노몰거스 원숭이, 개, 가능하게는 설치류 및 기타, 동일한 36 또는 37개 조직이 사람 연구에서와 같이 시험된다)을 사용한 비교 조직 교차 반응성 연구는 톡스 종의 선택을 가치있게 하는데 도움을 준다. 동결된 조직 단면에 있어서 대표적인 조직 교차-반응성 연구에서 치료학적 항체는 공지된 항원에 대한 예측된 결합 및/또는 특정한 낮은 수준의 상호작용을 기준으로 한 조직에 대한 보다 적은 정도의 결합에 대한 예측된 결합(비특이적인 결합, 유사한 항원에 대한 낮은 수준의 결합, 낮은 수준 전하에 기초한 상호작용 등)을 입증할 수 있다. 어떠한 경우에도, 대부분의 관련된 독소 동물 종은 사람 및 동물 조직에 결합하는 최고 높은 정도의 일치성을 가진 것이다.
- [0244] 조직 교차 반응성 연구는 적절한 조절 가이드라인[예를 들면, EC CPMP guideline III/5271/94 "Production and quality control of mAbs" 및 1997 US FDA/CBER "Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use"]에 따른다. 부검 또는 생검시 수득한 사람 조직의 동결단면($5\text{ }\mu\text{m}$)을 고정시키고 대물 렌즈 위에서 견조시켰다. 조직 단편의 페옥시다제 염색을 아비딘-바이오틴 시스템을 사용하여 수행하였다[참조: FDA's Guidance "Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use ". Relevant references include Clarke J 2004, Boon L. 2002a, Boon L 2002b, Ryan A 1999].
- [0245] 조직 교차 반응성 연구는 흔히 2개 단계로 수행되며, 제1 단계는 한 사람 공여자로부터의 32개 이하의 조직(전형적으로 부신, 위장관, 전립선, 방광, 심장, 골격근, 혈액 세포, 신장, 피부, 골수, 간, 척수, 유방, 폐, 비장, 소뇌, 림프절, 고환, 대뇌피질, 난소, 흉선, 결장, 췌장, 갑상선, 내피, 부갑상선, 요관, 눈, 뇌하수체, 자궁, 자궁관 및 태반)의 동결단면을 포함한다. 제2 단계에서 완전한 교차 반응성 연구는 3명의 관련되지 않은 성인으로부터의 38개 조직(부신, 혈액, 혈관, 골수, 소뇌, 대뇌, 자궁경부, 식도, 눈, 심장, 신장, 대장, 간, 폐, 림프절, 유방 유선, 난소, 난관, 췌장, 부갑상선, 말초신경, 뇌하수체, 태반, 전립선, 침샘, 피부, 소장, 척수, 비장, 위, 획문근, 고환, 흉선, 갑상선, 편도, 요관, 방광 및 자궁 포함)으로 수행한다. 연구는 전형적으로 최소 2회 투여 수준으로 수행한다.
- [0246] 치료학적 항체(즉, 시험 제품) 및 동형 매치된 대조군 항체를 아비딘-바이오틴 복합체(ABC) 검출을 위해 바이오틴화할 수 있거나; 다른 검출 방법은 FITC(또는 달리는) 표지된 시험 제품에 대한 3차 항체 검출, 또는 표지되지 않은 시험 제품에 대한 표지된 항-사람 IgG와의 예비복합체화반응을 포함할 수 있다.
- [0247] 요약하면, 부검 또는 생검으로 수득한 사람 조직의 동결단면(약 $5\text{ }\mu\text{m}$)을 대물 렌즈에 고정시키고 견조시킨다. 조직 단면의 페옥시다제 염색을 아비딘-바이오틴 시스템을 사용하여 수행한다. 첫째로(예비복합체화반응 검출 시스템의 경우), 시험 제품을 제2 바이오틴화된 항-사람 IgG와 함께 항온처리하여 면역 복합체로 발달시킨다. 2 내지 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 의 시험 제품의 농도에서 면역 복합체를 대물렌즈의 조직 단면에 가한 후, 조직 단편을 30분 동안 아비딘-바이오틴-페옥시다제 키트를 사용하여 반응시켰다. 후속적으로, 페옥시다제 반응의 기질인 DAB (3,3'-디아미노벤자린)을 4분 동안 조직 염색에 적용시켰다. 항원-세파로즈 비드를 양성 대조군 조직 단면으로 사용한다.
- [0248] 어떠한 특이적인 염색도 문제의 표적 항원의 공지된 발현을 기초로 한 예측된(예를 들면, 항원 발현과 일치) 또는 예측되지 않은 반응성이 되도록 판단한다. 특이적으로 판단된 어떠한 염색도 강도 및 빈도에 대해 점수를 매긴다. 항원 또는 혈청 경쟁 또는 차단 연구는 또한 관측된 염색이 특이적인지 또는 비특이적인지를 측정하는데 도움을 줄 수 있다.
- [0249] 2개의 선택된 항체가 선택 기준 - 적절한 조직 염색, 사람과 동물 특이적인 조직 사이의 매칭 염색 - 을 충족하는 것으로 밝혀진 경우, 이를 DVD-Ig 생성을 위해 선택할 수 있다.
- [0250] 조직 교차 반응성 연구는 최종 DVD-Ig 작제물로 반복하여야 하지만, 이를 연구는 본원에 요약한 바와 동일한 프로토콜을 따르며, 어떠한 결합도 2개의 모 항체 중 어느 것으로부터 기원할 수 있고, 어떠한 설명되지 않은 결합도 복합체 항원 경쟁 연구로 확인할 필요가 있기 때문에, 이들은 평가하기가 보다 더 복잡하다.
- [0251] 2개의 모 항체를 (1) 예측되지 않은 조직 교차 반응성 발견의 결여 및 (2) 상응하는 사람과 동물 종 조

직 사이의 조직 교차 반응성 발견의 적절한 유사성에 대해 선택하는 경우, DVD-Ig와 같은 다중특이적인 분자를 사용한 조직 교차반응성 연구의 복잡한 작업이 매우 단순화되는 것이 매우 명백하다.

B.12 특이성 및 선택성

바람직한 특이성 및 선택성을 갖는 DVD-Ig 분자를 생성시키기 위해서는, 유사하게 바람직한 특이성 및 선택성 프로파일을 가진 모 mAb를 생성하고 선택하는 것이 요구된다.

DVD-Ig를 사용한 특이성 및 선택성에 대한 결합 연구는 2개의 각각의 항원에 대한 것인, 4개 이상의 결합 부위로 인하여 복잡할 수 있다. 요약하면, ELISA, BIACore, KinExA를 사용한 결합 연구 또는 DVD-Ig와의 다른 상호 작용 연구는 DVD-Ig 분자에 대한 1개, 2개 이상의 항원의 결합을 모니터링하는 것이 요구된다. BIACore 기술은 다중 항원의 순차적인, 독립적 결합을 해결할 수 있지만, ELISA를 포함하는 보다 일반적인 방법 또는 KinExA와 같은 보다 현대적인 기술은 이를 해결할 수 없다. 따라서, 각각의 모 항체의 주의깊은 특성화가 중요하다. 각각의 개개 항체를 특이성에 대해 특성화한 후, DVD-Ig 분자내 개개의 결합 부위의 특이성 보유의 확인은 크게 단순화된다.

2개의 모 항체를 DVD-Ig내로 결합시키기 전에 특이성에 대해 선택하는 경우 DVD-Ig이 특이성을 측정하는 복잡한 작업이 매우 단순화된다는 것은 매우 명백하다.

항원-항체 상호작용 연구는 ELISA(효소 결합된 면역흡착 검정), 질량 분광법, 화학 교차 연결, 광 스캐터링을 사용한 SEC, 평형 투석, 겔 침투, 한외여과, 겔 크로마토그래피, 거대 존 분석 SEC, 미세분취용 초원심분리(침강 평형), 분광법, 적정 미세열량측정법(titration microcalorimetry), 침강 평형(분석적 초원심분리), 침강 속도(분석 원심분리에서), 표면 플라스몬 공명(BIACore 포함)을 포함하는, 많은 일반적인 단백질 단백질 상호작용 연구를 포함하는 각종 형태를 취할 수 있다. 관련 참조 문헌은 문헌[참조: "Current Protocols in Protein Science", John E. Coligan, Ben M. Dunn, David W. Speicher, Paul T. Wingfield (eds.) Volume 3, chapters 19 and 20, published by John Wiley & Sons Inc., 및 이에 포함된 문헌 및 "Current Protocols in Immunology", John E. Coligan, Barbara E. Bierer, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (eds.) published by John Wiley & Sons Inc 및 이에 포함된 관련 문헌]을 포함한다.

전혈에서 사이토kin 방출: mAb와 사람 혈액 세포의 상호작용은 사이토kin 방출 검정에 의해 시험할 수 있다[참조: Wing, M. G. Therapeutic Immunology (1995), 2(4), 183-190; "Current Protocols in Pharmacology", S. J. Enna, Michael Williams, John W. Ferkany, Terry Kenakin, Paul Moser, (eds.) published by John Wiley & Sons Inc; Madhusudan, S. Clinical Cancer Research (2004), 10(19), 6528-6534; Cox, J. Methods (2006), 38(4), 274-282; Choi, I. European Journal of Immunology (2001), 31(1), 94-106]. 요약하면, 각종 농도의 mAb를 사람 전혈과 24시간 동안 항온처리한다. 시험한 농도는 환자에서 대표적인 혈액 수준을 모사하는 최종 농도를 포함한 광범위를 포함한다(100 ng/ml 내지 100 µg/ml를 포함하나, 이에 한정되지 않는다). 항온처리에 이어서, 상청액 및 세포 분해물을 IL-1R α , TNF- α , IL-1b, IL-6 및 IL-8의 존재에 대해 분석하였다. mAb에 대해 생성된 사이토kin 농도 프로파일을 음성 사람 IgG 대조군 및 양성 LPS 또는 PHA 대조군에 의해 생산된 프로파일과 비교하였다. 세포 상청액 및 세포 분해물 둘다로부터 mAb에 의해 나타낸 사이토kin 프로파일을 대조군 사람 IgG와 비교할 수 있었다. 하나의 양태에서, 모노클로날 항체는 염증성 사이토kin을 자발적으로 방출하기 위해 사람 혈액 세포와 상호작용하지 않는다.

DVD-Ig에 대한 사이토kin 방출 연구는 각각 2개가 각각의 항원에 대한 것인, 4개 이상의 결합 부위로 인해 복잡하다. 요약하면, 본원에 기술된 사이토kin 방출 연구는 전혈 또는 다른 세포 시스템에서 전체 DVD-Ig 분자의 효과를 측정하지만, 분자의 어느 부위가 사이토kin 방출을 유발하는지를 해결할 수 있다. 사이토kin 방출이 검출되면, 일부 공동-정제 세포 성분이 자체로 사이토kin 방출을 유발할 수 있으므로, DVD-Ig 제제의 순도를 확인하여야 한다. 순도가 목적이 아닌 경우, DVD-Ig의 단편화(Fc 부분의 제거, 결합 부위의 분리 등을 포함하나, 이에 한정되지 않음), 결합 부위 돌연변이유발 또는 다른 방법이 어떠한 관측도 디컨볼루트(deconvolute)하기 위해 사용할 필요가 있을 수 있다. 2개의 모 항체를 DVD-Ig와 결합시키기 전에 사이토kin 방출의 결여에 대해 선택하는 경우 이러한 복잡한 수행이 크게 단순화된다는 것은 명백하다.

B.13 독성학적 연구를 위한 다른 종에 대한 교차 반응성:

하나의 양태에서, 개개의 항체를 적절한 톡스 종, 예를 들면, 사이노몰거스 원숭이에 대해 충분한 교차-반응성으로 선택하였다. 모 항체는 이종상동성 종 표적(즉, 사이노몰거스 원숭이)에 결합시켜 적절한 반응(조절, 중화, 활성화)을 유발하는데 요구된다. 하나의 양태에서, 이종상동성 종 표적에 대한 교차-반응성(친화성/효능)

은 사람 표적의 10배 이내이어야 한다. 실제로, 모 항체를 마우스, 래트, 개, 원숭이(및 다른 비-사람 영장류)를 포함하는 다수의 종, 및 질병 모델 종(즉, 천식 모델용 양)에 대해 평가한다. 모 모노클로날 항체로부터의 톡스 종에 대한 허용되는 교차-반응성을 동일한 종에서 DVD-Ig-Ig의 추가의 독성학 연구를 허용한다. 이러한 이유로, 2개의 모 모노클로날 항체는 일반적인 톡스 종에 대해 허용되는 교차-반응성을 가짐으로써 동일한 종에서 DVD-Ig의 독성학 연구를 허용하여야 한다.

[0261] 모 mAb는 특이적인 표적에 결합할 수 있고 당해 분야에 익히 공지된 각종의 mAb로부터 선택될 수 있다. 이들은 항-TNF 항체(미국 특허 제 6,258,562호), 항-IL-12 및/또는 항-IL-12p40 항체(미국 특허 제6,914,128호); 항-IL-18항체(미국 특허원 제2005/0147610 A1호), 항-C5, 항-CBL, 항-CD147, 항-gp120, 항-VLA-4, 항-CD11a, 항-CD18, 항-VEGF, 항-CD40L, 항-CD-40 (예를 들면, WO2007124299 참조) 항-Id, 항-ICAM-1, 항-CXCL13, 항-CD2, 항-EGFR, 항-TGF-베타 2, 항-HGF, 항-cMet, 항-DLL-4, 항-NPR1, 항-PLGF, 항-ErbB3, 항-E-셀렉틴, 항-Fact VII, 항-Her2/neu, 항-F gp, 항-CD11/18, 항-CD14, 항-ICAM-3, 항-RON, 항-SOST, 항-CD-19, 항-CD80(예를 들면, WO2003039486 참조), 항-CD4, 항-CD3, 항-CD23, 항-베타2-인테그린, 항-알파4베타7, 항-CD52, 항-HLA DR, 항-CD22(예를 들면, 미국 특허 제5,789,554호 참조), 항-CD20, 항-MIF, 항-CD64 (FcR), 항-TCR 알파 베타, 항-CD2, 항-Hep B, 항-CA 125, 항-EpCAM, 항-gp120, 항-CMV, 항-gpIIbIIIa, 항-IgE, 항-CD25, 항-CD33, 항-HLA, 항-IGF1,2, 항-IGFR, 항-VNR인테그린, 항-IL-1알파, 항-IL-1베타, 항-IL-1 수용체, 항-IL-2 수용체, 항-IL-4, 항-IL-4 수용체, 항-IL5, 항-IL-5 수용체, 항-IL-6, 항-IL-8, 항-IL-9, 항-IL-13, 항-IL-13 수용체, 항-IL-17, 및 항-IL-23[참조: Presta LG. 2005 Selection, design, and engineering of therapeutic antibodies J Allergy Clin Immunol. 116:731-6 및 <http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/antibodies.html>]를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0262] 모 mAb는 또한 임상 시험, 또는 임상 용도를 위한 개발에서 사용하기 위해 승인된 다양한 치료학적 항체로부터 선택될 수 있다. 이러한 치료학적 항체는 리툭시마브(Rituxan®)

, IDEC/Genentech/Roche)[참조: 예를 들면, 미국 특허 제5,736,137호], 비-호지킨 림프종 치료용으로 승인된 키메라 항-CD20항체; HuMax-CD20, 현재 젠마브(Genmab)에 의해 개발중인 항-CD20, 미국 특허 제5,500,362호에 기술된 항-CD20 항체, AME-133[제조원: 어플라이드 몰레큘러 에볼루션(Applied Molecular Evolution)], hA20 [제조원: 이뮤노메딕스, 인코포레이티드(Immunomedics, Inc.)], HumaLYM[제조원: 인트라셀(Intracel)], 및 PR070769("면역글로불린 변이체 및 이의 용도라는 명칭의 PCT/US2003/040426), 트라스투주마브[Herceptin®

, 제조원: 제넨테크(Genentech)[참조: 예를 들면 미국 특허 제5,677,171호], 유방암 치료용으로 승인된 사람화된 항-Her2/neu항체; 현재 제넨테크에 의해 개발중인 페르투주마브(rhuMab-2C4, Omnitarg®

); 미국 특허 제4,753,894호에 기술된 항-Her2 항체; 세툭시마브[Erbitux®

, 제조원: 임클론(Imclone)](미국 특허 제4,943,533호; PCT WO 96/40210), 각종 암을 위한 임상 시험에서 키메라 항-EGFR항체; 현재 아브게닉스-이뮤네스-암젠(Abgenix-Immunex-Amgen)에 의해 개발중인 ABX-EGF(미국 특허 제6,235,883호); 현재 젠마브에 의해 개발중인 HuMax-EGFr(미국 특허원 일련번호 제10/172,317호); 425, EMD55900, EMD62000, 및 EMD72000[제조원: 머크 케이지에이에이(Merck KGaA)][참조: 미국 특허 제5,558,864호; Murthy et al. 1987, Arch Biochem Biophys. 252(2):549-60; Rodeck et al., 1987, J Cell Biochem. 35(4):315-20; Kettleborough et al., 1991, protein Eng. 4(7):773-83]; ICR62[제조원: 인스티튜트 오브 캔서리서치(Institute of Cancer Research)][참조: PCT WO 95/20045; Modjtahedi et al., 1993, J. Cell Biophys. 1993, 22(1-3):129-46; Modjtahedi et al., 1993, Br J Cancer. 1993, 67(2):247-53; Modjtahedi et al., 1996, Br J Cancer, 73(2):228-35; Modjtahedi et al., 2003, Int J Cancer, 105(2):273-80); TheraCIM hR3[제조원: 와이엠 바이오사이언시스(YM Biosciences), 캐나다 및 센트로 데 이뮤놀로지아 몰레큘러(Canada and Centro de Immunologia Molecular), 쿠바[미국 특허 제5,891,996호; 미국 특허 제6,506,883호; Mateo et al., 1997, Immunotechnology, 3(1):71-81]; mAb-806[제조원: 루드빅 인스티튜트 포 캔서리서치(Ludwig Institute for Cancer Research), 메모리알 슬로안-케터링(Memorial Sloan-Kettering)][참조: Jungbluth et al. 2003, Proc Natl Acad Sci USA. 100(2):639-44]; KSB-102[케이에스 바이오메딕스(KS Biomedix)]; MR1-I[제조원: 이박스(IVAX), 내셔널 캔서리서 인스티튜트(National Cancer Institute)](PCT WO 0162931A2); 및 SC100[제조원: 스캔셀(Scancell)](PCT WO 01/88138); 알렙투주마브[Campath®

, 제조원: 밀레늄(Millenium)], 현재 B-세포 만성 림프세포 백혈병 치료용으로 승인된 사람화된 mAb; 무로모나

브-CD3(Orthoclone OKT3®)

), 오르토 바이오텍(Ortho Biotech)/존슨 앤드 존슨(Johnson & Johnson)에 의해 개발중인 항-CD3 항체, 이브리투모마브 티옥세탄(Zevalin®)

), 아이디이씨(IDEC)/쉐링 아게(Schering AG)에 의해 개발된 항-CD20 항체, 켐투주마브 오조가미신(Mylotarg®)

), 셀테크(Celldtech)/와이어쓰(Wyeth)에 의해 개발된 항-CD33(p67 단백질) 항체, 알레파셉트(Amevive®)

), 바이오젠에 의해 개발된 항-LFA-3 Fc 융합체, 세노코르(Centocor)/릴리(Lilly)에 의해 개발된 아브黠시마브(ReoPro®)

), 노바티스(Novartis)에 의해 개발된 바실릭시마브(Simulect®)

), 메디뮨(Medimmune)에 의해 개발된 팔리비주마브(Synagis®)

), 인플릭시마브(Remicade®)

), 센토코르(Centocor)에 의해 개발된 항-TNF알파 항체, 아달리무마브(Humira®)

), 애보트(Abbott)에 의해 개발된 항-TNF알파 항체, Humicade®

, 셀테크(Celldtech)에 의해 개발된 항-TNF알파 항체, 골리무마브(CNTO-148), 센토코르(Centocor)에 의해 개발된 완전한 사람 TNF 항체, 에타네르셉트(Enbrel®)

), 이뮤넥스/암젠에 의해 개발된 p75 TNF 수용체 Fc 융합체, 레네르셉트, 로슈(Roche)에 의해 앞서 개발된 p55TNF 수용체 Fc 융합체, ABX-CBL, 아브게닉스에 의해 개발중인 항-CD147 항체, ABX-IL8, 아브게닉스에 의해 개발중인 항-IL8 항체, ABX-MA1, 아브게닉스에 의해 개발중인 항-MUC18 항체, 펜투모마브(R1549, 90Y-muHMGFI), 안티소마(Antisoma)에 의해 개발중인 항-MUC1, 테렉스(R1550), 안티소마에 의해 개발중인 항-MUC1 항체, 안티소마에 의해 개발중인 AngioMab(AS 1405), 안티소마에 의해 개발중인 HuBC-I, 안티소마에 의해 개발중인 티오플라틴(AS 1407), Antegren®

(나탈리주마브), 바이오젠(Biogen)에 의해 개발중인 항-알파-4-베타-1 (VLA-4) 및 알파-4-베타-7 항체, VLA-1 mAb, 바이오젠에 의해 개발중인 항-VLA-1 인테그린 항체, LTBR mAb, 바이오젠에 의해 개발중인 항-림프독소 베타 수용체(LTBR) 항체, CAT-152, 캠브릿지 안티바디 테크놀로지(Cambridge Antibody Technology)에 의해 개발중인 항-TGF-β2 항체, ABT 874(J695), 애보트(Abbott)에 의해 개발중인 항-IL-12 p40 항체, CAT-192, 캠브릿지 안티바디 테크놀로지에 의해 개발중인 항-에오탁신1 항체, 캠브릿지 안티바디 테크놀로지 및 휴먼 게놈 사이언시즈 인코포레이티드(Human Genome Sciences Inc.)에 의해 개발중인 LymphoStat-β®

항-Blys 항체, TRAIL-RIMAb, 캠브릿지 안티바디 테크놀로지 및 휴먼 게놈 사이언시즈 인코포레이티드에 의해 개발중인 항-TRAIL-R1 항체, Avastin®

베바기주마브, rhuMAb-VEGF), 제넨테크에 의해 개발된 항-VEGF 항체, 제넨테크에 의해 개발중인 항-HER 수용체 계열 항체, 항-조직인자(ATF), 제넨테크에 의해 개발중인 항-조직인자 항체, Xolair®

(오말리주마브), 제넨테크에 의해 개발중인 항-IgE 항체, Raptiva®

(에팔리주마브), 제넨테크 및 크소마(Xoma)에 의해 개발중인 항-CD11a 항체, 제넨테크 및 밀레니엄 파마슈티칼즈(Millenium Pharmaceuticals)에 의해 개발중인 MLN-02 항체(앞서 LDP-02), HuMax CD4, 젠마브에 의해 개발중인 항-CD4 항체, HuMax-IL15, 젠마브 및 암젠에 의해 개발중인 항-IL15 항체, 젠마브 및 메다렉스(Medarex)에 의해 개발중인 HuMax-Inflam, 젠마브 및 데다렉스(Medarex) 및 옥스포드 지코사이언시스(Oxford GcoSciences)에 의해 개발중인 HuMax-암, 항-헤파라나제 I 항체, 젠마브 및 암젠에 의해 개발중인 HuMax-림프종, 젠마브에 의해 개발중인 HuMax-TAC, IDEC-131, 및 아이디이씨 파마슈티칼스(IDEC Pharmaceuticals)에 의해 개발중인 항-CD40L 항체, IDEC-151(클레놀릭시마브), 아이디이씨 파마슈티칼스에 의해 개발중인 항-CD4 항체, 아이디이씨 파

마스티칼스에 의해 개발중인 IDEC-114, 항-CD80 항체, 아이디이씨 파마스티칼스에 의해 개발중인 IDEC-152, 항-CD23, 아이디이씨 파마스티칼스에 의해 개발중인 항-대식세포 이루 인자(MIF) 항체, 임클론(Imclone)에 의해 개발중인 BEC2, 항-이디오타입 항체, IMC-1C11, 임클론에 의해 개발중인 항-KDR 항체, DC101, DC101, 임클론에 의해 개발중인 항-f1k-1 항체, 임클론에 의해 개발중인 항-VE 카드해린 항체, CEA-Cide®

(라베티주마브), 이뮤노메딕스(Immunomedics)에 의해 개발중인 항-암배아 항원(CEA) 항체, LymphoCide®

(에프라투주마브), 이뮤노메딕스에 의해 개발중인 항-CD22 항체, 이뮤노메딕스에 의해 개발중인 AFP-Cide, 이뮤노메딕스에 의해 개발중인 마이렐로마시드, 이뮤노메딕스에 의해 개발중인 르코시드, 이뮤노메딕스에 의해 개발중인 프로스타시드, 메다렉스(Medarex)에 의해 개발중인 MDX-010, 메다렉스에 의해 개발중인 항-CTLA4 항체, MDX-060, 메다렉스에 의해 개발중인 항-CD30 항체, 메다렉스에 의해 개발중인 MDX-070, 메다렉스에 의해 개발중인 MDX-018, Osidem®

(IDM-I), 및 메다렉스에 의해 개발중인 항-Her2 항체 및 면역-설계된 분자, HuMa®

-CD4, 메다렉스 및 젠마브에 의해 개발중인 항-CD4 항체, HuMax-IL15, 메다렉스 및 젠마브에 의해 개발중인 항-IL15 항체, CNT0148, 메다렉스 및 센토코르(Centocor)/제이앤드제이(J&J)에 의해 개발중인 항-TNF α 항체, CNT0 1275, 센토코르/제이앤드제이에 의해 개발중인 항-사이토킨 항체, MOR101 및 MOR102, 모포시스(MorphoSys)에 의해 개발중인 항-세포간 부착 분자-1 (ICAM-1)(CD54) 항체, MOR201, 모포시스에 의해 개발중인 항-섬유모세포 성장 인자 수용체 3(FGFR-3) 항체, Nuvion®

(비실리주마브), 프로테인 디자인 랩스(Protein Design Labs)에 의해 개발된 항-CD3 항체, HuZAF®

, 프로테인 디자인 랩스에 의해 개발된 항-감마 인터페론 항체, 프로테인 디자인 랩스에 의해 개발된 항-α 5β 1 인테그린, 프로테인 디자인 랩스에 의해 개발된 항-IL-12, ING-1, 크소마에 의해 개발중인 항-Ep-CAM 항체, 제넨테크 및 노바티스(Novartis)에 의해 개발된 Xolair®

(오말리주마브) 사람화된 항-IgE 항체, 및 MLN01, 크소마에 의해 개발중인 항-베타2 인테그린항체를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 당해 단락에서 본원에 인용된 참조문헌 전부는 본원에서 참조로 분명히 인용된다. 다른 양태에서, 치료제는 KRN330[제조원: 기린(Kirin)]; huA33 항체[A33, 제조원: 루드빅 인스티튜트 포 캔서 리서치(Ludwig Institute for Cancer Research)]; CNT0 95(알파 V 인테그린, 제조원: 센토코어); MEDI-522 (알파 Vβ 3 인테그린, 제조원: 메드이뮨); 볼로키시마브(알파 Vβ 1 인테그린, 제조원: 바이오젠(Biogen)/피디엘(PDL)); 사람 mAb 216[B 세포 글리코실화된 애피토프, 제조원: 엔씨아이(NCI)]; BiTE MT1 03(이특이적 CD19 x CD3, 제조원: 메드이뮨); 4G7xH22[이특이적 BcellxFc 감마R1, 제조원: 메다렉스(Medarex)/머크 케이지에이(Merck KGa)]; rM28(이특이적 CD28 x MAPG, 유럽 특허 제EP1444268호); MDX447(EMD 82633)(이특이적 CD64 x EGFR, 제조원: 메데렉스); 카투막소마브(레모바브)[이특이적 EpCAM x 항-CD3, 제조원: 트리온(Trion)/프레스(Fres)]; 에르투막소마브[이특이적 HER2/CD3, 프레세니우스 바이오테크(Fresenius Biotech)]; 오래고보마브[제조원: 오바렉스(OvaRex)][CA-125, 제조원: 비렉스(ViRexx)]; Rencarex®

(WX G250)[카보닉 안하이드라제 IX, 제조원: 윌렉스(Wilex)]; CNT0 888(CCL2, 제조원: 센토코어); TRC105[CD105(엔도글린), 제조원: 트라콘(Tracon)]; BMS-663513 [CD137 작용제, 제조원: 브리스톨 마이어스 스퀴브(Bristol Myers Squibb)]; MDX-1342[CD19, 메다렉스(Medarex)]; 시플리주마브(MEDI-507)[(CD2, 메드이뮨(Medimmune)]; 오파투무마브(Humax-CD20)[(CD20, 제조원: 젠마브(Genmab)]; 리툭시마브(리툭산)(CD20, 제넨테크); 벨투주마브(hA20)(CD20, 제조원: 이뮤노메딕스(Immunomedics); 업라투주마브(CD22, 제조원: 암젠); 루밀릭시마브(IDEC 152)(CD23, 제조원: 바이오젠); 무로모나브-CD3[CD3, 제조원: 오르토(Ortho)]; HuM291[CD3 fc 수용체, 피디엘 바이오파마(PDL Biopharma)]; HeFi-1, CD30, NCI); MDX-060[CD30, 제조원: 메다렉스(Medarex); MDX-1401(CD30, 제조원: 메다렉스); SGN-30[CD30, 시애틀 제넨틱스(Seattle Genetics); SGN-33(런투주마브)(CD33, 제조원: 시애틀 제넨틱스); 자놀리무마브(HuMax-CD4)(CD4, 제조원: 젠마브); HCD122 (CD40, 제조원: 노바티스); SGN-40(CD40, 제조원: 씨애틀 네넨틱스); 캄페쓰1h(알램투주마브)(CD52, 제조원: 젠자임); MDX-1411(CD70, 제조원: 메다렉스); hLL1 (EPB-1)(CD74.38, 제조원: 이뮤노메딕스); 갈릭시마브(IDE- 144)(CD80, 제조원: 바이오젠); MT293(TRC093/D93)[분해된 콜라겐, 제조원: 트라콘(Tracon)]; HuLuc63 (CS1, 제조원: 피디엘 파마); 이필리무마브(MDX-010)(CTLA4, 제조원: 브리스톨 마이어스 스퀴브); 트레멜리무마브(티실리무마브, CP-675,2)[(CTLA4, 제조원: 화이자(Pfizer)]; HGS-ETR1(메파투무마브)[DR4 TRAIL-R1 작용제, 제조원: 휴먼 게

놈 사이언스(Human Genome Science)/글락소 스미쓰 클라인(Glaxo Smith Kline)]; AMG-655(DR5, 제조원: 암젠); 아포마브(DR5, 제조원: 제넨테크); CS-1008[DR5, 제조원: 다이이치 산쿄(Daiichi Sankyo)]; HGS-ETR2(렉사투무마브)(DR5 TRAIL-R2 작용제, HGS); 세톡시마브(에르비黠스)[EGFR, 제조원: 임클론(Imclone)]; IMC-11F8, (EGFR, 제조원: 임클론); 나모투주마브[EGFR, 제조원: 와이엠 바이오(YM Bio)]; 파니투무마브(벡타빅스)(EGFR, 제조원: 암젠); 잘루투무마브(HuMaxEGFr)(EGFR, 제조원: 젠마브); CDX-110[EGFRvIII, 제조원: 아반트 이뮨노테라퓨틱스(AVANT Immunotherapeutics)]; 아데카투무마브(MT201)(에프캄, 제조원: 머크); 에드레콜로마브(파노렉스, 17-1A)(에프캄, 제조원: 글락소/센토코어); MORAb-003[플레이트 수용체 a, 제조원: 모르포테크(Morphotech)]; KW-2871[강글리오사이드 CD3, 제조원: 교와(Kyowa)]; MORAb-009(GP-9, 제조원: 모르포테크); CDX-1307(MDX-1307)(hCGb, 제조원: 셀덱스(Celldex)]; 트라스투주마브(헤르셉틴)(HER2, 제조원: 셀덱스); 페르투주마브(rhuMAb 2C4)(HER2(DI), 제조원: 제넨테크); 아폴리주마브(HLA-DR 베타 쇄, 제조원: 피디엘 파마); AMG-479(IGF-IR, 제조원: 암젠); 항-IGF-1R R1507 (IGF1-R, 제조원: 로슈); CP 751871(IGF1-R, 제조원: 화이자); IMC-A12(IGF1-R, 제조원: 임클론); BIIB022(IGF-1R, 제조원: 바이오젠); Mik-베타-1[IL-2Rb(CD122), 제조원: 호프만 라로슈(Hoffman LaRoche)]; CNTO 328(IL6, 제조원: 센토코어); 항-KIR (1-7F9)(킬러 세포 Ig-유사 수용체(KIR), 제조원: 노보); Hu3S193[르위스(y), 제조원: 와이어쓰(Wyeth), 루드빅 인스티튜트 오브 캔서리서치(Ludwig Institute of Cancer Research)]; hCBE-11(LTBR, 제조원: 바이오젠); HuHMFG1 (MUC1, 안티소마/NCI); RAV12[N-결합된 탄수화물 애피토프, 제조원: 레이븐(Raven)]; CAL(부갑상선 호르몬-관련 단백질(PTH-rP), 제조원: 캘리포니아대(University of California)]; CT-011[PD1, 제조원: 큐어테크(CureTech)]; MDX-1106(하나의 4538)[PD1, 제조원: 메다렉스(Medarex)/오노(Ono)]; MAb CT-011(PD1, 제조원: 큐어테크); IMC-3G3(PDGFRa, 제조원: 임클론); 바비톡시마브[포스파티딜세린, 제조원: 페레그린(Peregrine)]; huJ591[PSMA, 제조원: 코넬 리서치 파운데이션(Cornell Research Foundation)]; muJ591(PSMA, 제조원: 코넬 리서치 파운데이션); GC 1008(TGFb(pan) 억제제 (IgG4), 제조원: 젠자임); 인플릭시마브(래미케이드)(TNF α , 제조원: 센토코어); A27.15[트랜스페린 수용체, 살크 인스티튜트(Salk Institute), INSERN WO 2005/111082]; E2.3(트랜스페린 수용체, 제조원: 살크 인스티튜트); 베바시주마브(아바스틴)(VEGF, 제조원: 제넨테크); HuMV833[VEGF, 츠쿠바 리서치 랩(Tsukuba Research Lab)-WO/2000/034337, 제조원: 유니버시티 오브 텍사스(University of Texas)]; IMC-118F1(VEGFR1, 제조원: 임클론); IMC-1121(VEGFR2, 제조원: 임클론)을 포함한다.

B. DVD 분자의 작용:

[0263] 이원 가변 도메인 면역글로불린(DVD-Ig) 분자를 설계하여 2개의 상이한 모 모노클로날 항체로부터 2개의 상이한 경쇄 가변 도메인(VL)이 나란히 직접 또는 짧은 링커를 통해 재조합 DNA 기술로 연결된 후, 경쇄 불변 도메인에 의해 연결되도록 한다. 유사하게, 중쇄는 나란히 연결된 2개의 상이한 중쇄 가변 도메인(VH)에 이어, 불변 도메인 CH1 및 Fc 영역을 포함한다(도 1A).

[0264] 가변 도메인은 본원에 기술된 방법들 중 어느 하나에 의해 생성된 모 항체로부터 재조합 DNA 기술을 사용하여 수득할 수 있다. 하나의 양태에서, 가변 도메인은 쥐 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인이다. 다른 양태에서, 가변 도메인은 CDR 이식된 또는 사람화된 가변 중쇄 또는 경쇄 도메인이다. 하나의 양태에서, 가변 도메인은 사람 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인이다.

[0265] 하나의 양태에서 제1 및 제2 가변 도메인은 재조합 DNA 기술을 사용하여 서로 직접 연결된다. 다른 양태에서, 가변 도메인은 링커 서열을 통해 연결된다. 하나의 양태에서, 2개의 가변 도메인이 연결된다. 3개 이상의 가변 도메인은 또한 직접 또는 링커 서열을 통해 연결될 수 있다. 가변 도메인은 동일한 항원에 결합될 수 있거나 상이한 항원에 결합될 수 있다. 본 발명의 DVD 분자는 하나의 면역글로불린 가변 도메인 및 하나의 비-면역글로불린 가변 도메인, 예를 들면, 수용체의 리간드 결합 도메인, 효소의 활성 도메인을 포함할 수 있다. DVD 분자는 또한 2개 이상의 비-Ig 도메인을 포함할 수 있다.

[0266] 링커 서열은 단일 아미노산 또는 폴리펩타이드 서열일 수 있다. 하나의 양태에서, 링커 서열은 AKTPPKLEEGEFSEAR(서열번호 1); AKTPPKLEEGEFSEARV(서열번호 2); AKTPKLGG(서열번호 3); SAKTPKLGG(서열번호 4); SAKTTP(서열번호 5); RADAAP(서열번호 6); RADAAPTVS(서열번호 7); RADAAAAGGPGS(서열번호 8); RADAAAA(G4S)4(서열번호 9), SAKTPKLEEGEF SEARV(서열번호 10); ADAAP(서열번호 11); ADAAPTVSIFPP(서열번호 12); TVAAP(서열번호 13); TVAAPSIFPP(서열번호 14); QPKAAP(서열번호 15); QPKAAPSVTLFPP(서열번호 16); AKTTPP(서열번호 17); AKTTPPSVTPLAP(서열번호 18); AKTTAP(서열번호 19); AKTTAPSVYPLAP(서열번호 20); ASTKGP(서열번호 21); ASTKGPSVFPLAP(서열번호 22), GGGGSGGGGGGGGS(서열번호 23); GENKVEYAPALMALS(서열번호 24); GPAKELTPLKEAKVS(서열번호 25); GHEAAVMQVQYPAS(서열번호 26); GGGGGGGP(서열번호 27); GGGGGGGGP(서열번호 28); PAPNLLGGP(서열번호 29); PNLLGGP(서열번호 30); GGGGGGGP(서열번호 31); PAPELLGGP(서열번호 32);

PTISPAPNLGGP(서열번호 33); TVAADDKSVFIVPP(서열번호 34); TVDDDKAAP(서열번호 35); LVPRGSAAP(서열번호 36); ASDDDDK GGP(서열번호 37); ALVPR GSGP(서열번호 38); ASTDDDK SVFPLAP(서열번호 39); TVALVPR GSVFIFPP(서열번호 40); ASTLVPR GSVFPLAP(서열번호 41); TVAADDK SVFIVPP(서열번호 42); ASTDDDK SVFPLAP(서열번호 43); LEVLFQ GP(서열번호 44); TVAALEVLFQ GPAP(서열번호 45); ASTLEVLFQ GPLAP(서열번호 46); PAPLEVLFQ GP(서열번호 47); TAENLYFQ GAP(서열번호 48); AENLYFQ GA(서열번호 49); PGPFGRSAGGP(서열번호 50); PGPFGR SAGG(서열번호 51); PQRGR SAG(서열번호 52); PHYGR SGG(서열번호 53); GPFGR SAGP(서열번호 54); GDDDDK GGP(서열번호 55); AGDDDDK GGP(서열번호 56); GGDDDDK GGP(서열번호 57); AS; TVA; ASTK(서열번호 58); ASTKGPSV(서열번호 59); ASTKGPSVFP(서열번호 60); TVAAPS(서열번호 61), 및 TVAAPS(서열번호 62)로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 링커 서열의 선택은 몇가지 Fab 분자의 결정 구조 분석을 기초로 한다. Fab 또는 항체 분자 구조내 가변 도메인과 CH1/CL 불변 도메인 사이에는 천연의 굴곡성 연결이 존재한다. 당해 천연 연결은 V 도메인의 C-말단으로부터의 4 내지 6개 잔기 및 CL/CH1 도메인의 N-말단으로부터의 4 내지 6개의 잔기에 의해 분포된 대략 10 내지 12개의 아미노산 잔기를 포함한다. 본 발명의 DVD Ig는 DVD-Ig의 경쇄 및 중쇄 각각내 링커로서 CL 또는 CH1의 N-말단 5 및 6개 아미노산 잔기, 또는 11 및 12개 아미노산 잔기를 사용하여 생성하였다. CL 또는 CH1 도메인의 N-말단 잔기, 특히 처음 5 및 6개 아미노산 잔기는 강력한 2차 구조의 부재 하에서 루프 형태를 채택하므로, 2개의 가변 도메인 사이에서 굴곡성 링커로 작용할 수 있다. CL 또는 CH1 도메인의 N-말단 잔기는, 이들이 Ig 서열의 일부이므로, 가변 도메인의 천연적인 연장부이므로, 링커 및 연결부로부터 잠재적으로 발생하는 어떠한 면역원성도 큰 정도로 최소화한다.

[0268]

다른 링커 서열은 CL/CH1 도메인의 모든 잔기가 아닌, CL/CH1 도메인의 임의의 길이의 임의의 서열; 예를 들면, CL/CH1 도메인의 처음 5개 내지 12개 아미노산 잔기를 포함할 수 있으며; 경쇄 링커는 CK 또는 C λ 로부터 기원할 수 있고; 중쇄 링커는 C γ 1, C γ 2, C γ 3, C γ 4, C α 1, C α 2, C δ , C ϵ , 및 C μ 를 포함하는 임의의 동형의 CH1으로부터 기원할 수 있다. 링커 서열은 또한 Ig-유사 단백질(예: TCR, FcR, KIR); G/S계 서열(예: G4S 반복물; 서열번호 63); 한지 영역-기원한 서열; 및 다른 단백질로부터의 다른 천연 서열로부터 기원할 수 있다.

[0269]

하나의 양태에서, 불변 도메인은 재조합 DNA 기술을 사용하여 2개의 연결된 가변 도메인에 연결된다. 하나의 양태에서, 연결된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 서열은 중쇄 불변 도메인에 연결되며, 연결된 경쇄 가변 도메인을 포함하는 서열은 경쇄 불변 도메인에 연결된다. 하나의 양태에서, 불변 도메인은 각각 사람 중쇄 불변 도메인 및 사람 경쇄 불변 도메인이다. 하나의 양태에서, DVD 중쇄는 또한 Fc 영역에 연결된다. Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역, 또는 변이 Fc 영역일 수 있다. 다른 양태에서, Fc 영역은 사람 Fc 영역이다. 다른 양태에서, Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, 또는 IgD로부터의 Fc 영역을 포함한다.

[0270]

다른 양태에서, 2개의 중쇄 DVD 폴리펩타이드 및 2개의 경쇄 DVD 폴리펩타이드는 결합하여 DVD-Ig 분자를 형성 한다. 표 4는 질병, 예를 들면, 암을 치료하는데 유용한 표적에 대한 예시적인 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열을 열거한다. 하나의 양태에서, 본 발명은 어떠한 배향으로도 표 4에 열거된 VH 및/또는 VL 영역 중 적어도 2개를 포함하는 DVD를 제공한다.

표 4

DVD-Ig를 생성하기 위한 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열의 목록

| 서열 번호 | ABT 고유 번호 | 단백질 영역 | 서열 |
|----------|--------------|----------------------|---|
| | | | 1234567890123456789012345678901234567890 |
| 64 | AB014VH | VH VEGF (서열 1) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQA PGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAY LQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWFDWVGQGTLVT VSS |
| 65 | AB014VL | VL VEGF (서열 1) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCSASQDISNYLNWYQQKP GKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQP EDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR |
| 66 | AB016VH | VH NRP1 (서열 1) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSEPISWVRQA PGKGLEWVSSITGKNGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCARWGKKVYGMDWVGQGTLVTVSS |
| 67 | AB016VL | VL NRP1 (서열 1) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQSISSYLAWYQQKP GKAPKLLIYGASSRASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQP EDFATYYCQQYMSVPITFGQGTKVEIKR |
| 68 | AB017VH | VH TNF (서열 1) | EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQA PGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWVGQGTLVTVS S |
| 69 | AB017VL | VL TNF (서열 1) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQGIRNYLAWYQQKP GKAPKLLIYAASLTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQP EDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKR |
| 70 | AB050VH | VH SOST | EVQLQQSGPELMKGASVKMSCKASGYTFTDYNMHWMKQN QGKSLEWIGEINPNSGGSGYNQFKGKATLTVDKSSSTAY MELRSITSEDSAVYYCARLGYYGNYEDWYFDVVGAGTTVT VSS |
| 71 | AB050VL | VL SOST | DLQMTQTSSLSASLGDRVTTITCRASQDISNYLNWYQQKP DGTVKLLIFYTSTLQSGVPSRFSGSGSGTNYSLTITNLEQ DDAATYFCQQGDTLPYTFGGGKLEIKR |
| 72 | AB229VH | VH TNF (D2E7) (서열 2) | EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQA PGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWVGQGTLVTVS S |

[0271]

| 서열 번호 | ABT 고유 번호 | 단백질 영역 | 서열 |
|----------|--------------|-----------------------------------|---|
| | | | 1234567890123456789012345678901234567890 |
| 73 | AB229VI | VL TNF (D2E7) (서열 2) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKP GKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDVATYYCARYNRAPYTFGQGTKVEIKR |
| 74 | AB230VH | VH TNF (D2E7.1) (서열 3) | EVQLVESGGGLVQPGRSRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQA PGKGLEWVSAITWNNSGHIDYADSVEGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLAEDTAVYYCAKVAYLSTASSLDYWQGTLVTS S |
| 75 | AB230VL | VL TNF (D2E7.1) (서열 3) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKP GKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDVATYYCARYNRAPYTFGQGTKVEIKR |
| 76 | AB231VH | VH IL-13 (13C5.5) (서열 1) | EVTLRESGPGLVKPTQTLTLCYLGFSLSTSMDGVWDWIR QPPGKGLEWLAHIWWDDVKRYNPALKSRLTISKDTSKNQV VLKLTSVDPVDTATYYCARTVSSGYIYYYAMDYWGQGTLVT VSS |
| 77 | AB231VL | VL IL-13 (13C5.5) (서열 1) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQDIRNYLNWYQQKP GKAPKLLIYFTSKLHSQGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQP EDIATYYCQQGNTLPLTFGGGTKEIKR |
| 78 | AB232VH | VH IL-13 (13C5.5L3F) (서열 2) | EVTLRESGPGLVKPTQTLTLCYLGFSLSTSMDGVWDWIR QPPGKGLEWLAHIWWDDVKRYNPALKSRLTISKDTSKNQV VLKLTSVDPVDTATYYCARTVSSGYIYYYAMDYWGQGTLVT VSS |
| 79 | AB232VL | VL IL-13 (13C5.5L3F) (서열 2) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQDIRNYLNWYQQKP GKAPKLLIYFTSKLHSQGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQP EDIATYYCQQGLTPPLTFGGGTKEIKR |

[0272]

[0273] 특이적인 표적에 결합할 수 있는 특이적인 DVD-Ig 분자 및 이의 제조방법에 대한 상세한 기술은 하기 실시예 단락에서 제공한다.

[0274]

C. DVD 단백질의 생산

[0275]

본 발명의 결합 단백질은 당해 분야에 공지된 다수의 기술 중 어느 것에 의해서도 생산될 수 있다. 예를 들면, 숙주 세포로부터의 발현, 여기서, DVD 중쇄 및 DVD 경쇄를 암호화하는 발현 벡터(들)은 숙주 세포내로 표준 기술에 의해 형질감염된다. 용어 "형질감염"의 각종 형태는 외인성 DNA를 원핵 또는 진핵 숙주 세포내로 도입시키기 위해 일반적으로 사용된 광범위한 기술, 예를 들면, 전기천공, 칼슘-포스페이트 침전, DEAE-텍스트란 형질감염 등을 포함하는 것으로 의도된다. 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 본 발명의 DVD 단백질을 발현하는 것이 가능하지만, DVD 단백질은 진핵 세포, 예를 들면, 포유동물 숙주 세포내에서 발현되며, 그 이유는, 진핵 세포(특히 포유동물 세포)가 적절하게 풀딩되고 면역학적으로 활성인 DVD 단백질을 조립하고 분비하기 위해 원핵 세포보다 더 유사하기 때문이다.

[0276]

본 발명의 재조합 항체를 발현하기 위한 예시적인 포유동물 숙주 세포는 차이니즈 햄스터 난소 세포(CHO 세포) [예를 들면, 문헌: R.J. Kaufman and P.A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621에 기술된 바와 같이, DHFR 선택가능한 마커와 함께 사용된, 문헌: Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci USA 77:4216-4220에 기술된 바와 같은 dhfr-CHO 세포 포함], NSO 흑색종 세포, COS 세포, SP2 및 PER.C6 세포를 포함한다. DVD 단백질을 암호화하는 재조합 발현 벡터가 포유동물 숙주 세포내로 도입되는 경우, DVD 단백질은 숙주 세포를 숙주 세포내에서 DVD 단백질을 발현시키거나 DVD 단백질을 숙주 세포가 성장하는 배양 배지내로 분비하기에 충분한 기간 동안 배양함으로써 생산한다. DVD 단백질은 표준 단백질 정제 방법을 사용하여 배양 배지로부터 회수될 수 있다.

[0277]

본 발명의 DVD 단백질의 재조합 발현을 위한 예시적인 시스템에서, DVD 중쇄 및 DVD 경쇄 둘다를 암호화하는 재조합 발현 벡터를 칼슘-매개된 형질감염에 의해 dhfr- CHO 세포내로 도입한다. 재조합 발현 벡터내에서, DVD 중쇄 및 경쇄 유전자 각각은 CMV 인핸서/AdMLP 프로모터 조절 성분에 작동적으로 연결되어 유전자의 높은 수준의 유전자의 전사를 구동한다. 재조합 발현 벡터는 또한 메토트렉세이트 선택/증폭을 사용하여 벡터로 형질감염시킨 CHO 세포의 선택을 허용하는, DHFR 유전자를 수반한다. 선택된 형질감염체 숙주 세포를 배양하여 DVD 중쇄 및 경쇄의 발현을 허용하고 완전한 DVD 단백질을 배양 배지로부터 회수한다. 표준 분자 생물학 기술을 사

용하여 재조합 발현 벡터를 제조하고, 숙주 세포를 형질감염시키고, 형질감염체, 배양 숙주 세포에 대해 선택하고 배양 배지로부터 DVD 단백질을 회수한다. 추가로, 본 발명은, 본 발명의 숙주 세포를 본 발명의 DVD 단백질이 합성될 때까지 적합한 배양 배지 중에서 배양함으로써 본 발명의 DVD 단백질을 합성하는 방법을 제공한다. 당해 방법은 배양 배지로부터 DVD 단백질을 분리하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0278] DVD-Ig의 중요한 특징은, 이것이 통상의 항체와 유사한 방식으로 생산되고 정제될 수 있다는 것이다. DVD-Ig의 생산은 특정 종류의 화학적 변형 또는 불변 영역의 어떠한 서열 변형없이, 바람직한 이중-특이적인 활성을 가진 균질한, 단일의 주요 생산물을 생성한다. "이-특이적인", "다중-특이적인", 및 "다중-특이적인 다가"의 완전한 길이의 결합 단백질을 생성하기 위한 다른 앞서 기술된 방법은 단일의 주요 생산물을 초래하지 않지만 대신 조립된 불활성의 모노-특이적인, 다중-특이적인, 다가의 완전한 길이의 결합 단백질, 및 상이한 결합 부위의 조합과 함께 다가의 완전한 길이의 결합 단백질을 초래한다. 예로서, 밀러(Miller) 및 프레스타(Presta)(PCT 공보 제WO2001/077342(A1)호)에 기술된 설계를 기초로 하여, 중쇄 및 경쇄의 16개의 가능한 조합이 존재한다. 결과적으로, 단백질의 단지 6.25%만이 다른 15개의 가능한 조합과 비교하여 단일의 주요 생성물 또는 단일의 주요 생성물로서가 아닌 바람직한 활성형일 수 있다. 대규모 제조에 전형적으로 사용된, 표준 크로마토그래피 기술을 사용한 단백질의 불활성 및 부분적으로 활성인 형태로부터의 단백질의 바람직한, 완전한 활성 형의 분리는 이제 입증될 것이다.

[0279] 놀랍게도, 본 발명의 "이중-특이적인 다가의 완전한 길이의 결합 단백질"의 설계는 바람직한 "이중-특이적인 다가의 완전한 길이의 결합 단백질"에 주로 조립하는 이원 가변 도메인 중쇄 및 이원 가변 도메인 경쇄를 초래한다.

[0280] 조립된 및 발현된 이원 가변 도메인 면역글로불린 분자의 적어도 50%, 적어도 75% 및 적어도 90%는 바람직한 이중-특이적인 4가 단백질이다. 본 발명의 당해 측면은 특히 본 발명의 상업적인 유용성을 특히 향상시킨다. 따라서, 본 발명은 단일 세포내에서 이원 가변 도메인 경쇄 및 이원 가변 도메인 중쇄를 발현함으로써 "이중-특이적인 4가의 완전한 길이의 결합 단백질"을 초래하는 방법을 포함한다.

[0281] 본 발명은 단일 세포내에서 이원 가변 도메인 경쇄 및 이원 가변 도메인 중쇄를 발현시켜 "이중-특이적인 4가의 완전한 길이의 결합 단백질"의 "주요 생성물"을 초래하는 방법을 제공하며, 여기서, "주요 생성물"은 이원 가변 도메인 경쇄 및 이원 가변 도메인 중쇄를 포함하는 모든 조립된 단백질의 50% 이상이다.

[0282] 본 발명은 단일 세포내에서 이원 가변 도메인 경쇄 및 이원 가변 도메인 중쇄를 발현시켜 "이중-특이적인 4가의 완전한 길이의 결합 단백질"의 단일의 "주요 생성물"을 초래하는 방법을 제공하며, 여기서, "주요 생성물"은 이원 가변 도메인 경쇄 및 이원 가변 도메인 중쇄를 포함하는 모든 조립된 단백질의 75% 이상이다.

[0283] 본 발명은 단일 세포내에서 이원 가변 도메인 경쇄 및 이원 가변 도메인 중쇄를 발현시켜 "이중-특이적인 4가의 완전한 길이의 결합 단백질"의 단일의 "주요 생성물"을 초래하는 방법을 제공하며, 여기서, "주요 생성물"은 이원 가변 도메인 경쇄 및 이원 가변 도메인 중쇄를 포함하는 모든 조립된 단백질의 90% 이상이다.

II. 유도체화된 DVD 결합 단백질:

[0285] 하나의 양태는 표지된 결합 단백질을 제공하며, 여기서, 본 발명의 결합 단백질은 유도체화되거나 다른 기능성 분자(예를 들면, 다른 웨타이드 또는 단백질)에 연결된다. 예를 들면, 본 발명의 표지된 결합 단백질은 본 발명의 결합 단백질을 화학적 커플링, 유전적 융합, 비공유결합성 연합 등에 의해 다른 항체(예를 들면, 이특이적인 항체 또는 디아바디), 검출가능한 제제, 세포독성제, 약제, 및/또는 결합 단백질의 다른 분자(예를 들면, 스트렙타비딘 코어 영역 또는 폴리히스티딘 태그)와의 연합을 중재할 수 있는 단백질 또는 웨타이드와 같은 하나 이상의 다른 분자 실체에 기능적으로 연결시킴으로써 유도될 수 있다.

[0286] 본 발명의 결합 단백질이 유도체화될 수 있는 유용한 검출가능한 제제는 형광성 화합물을 포함한다. 예시적인 형광 검출가능한 제제는 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 5-디메틸아민-1-나프탈렌설 포닐 클로라이드, 피코에리트린 등을 포함한다. 결합 단백질은 또한 검출가능한 효소, 예를 들면, 알칼리성 포스파타제, 서양고추냉이 페옥시다제, 글루코즈 옥시다제 등으로 유도체화시킬 수 있다. 결합 단백질을 검출가능한 효소로 유도체화하는 경우, 효소를 사용하여 검출가능한 반응 생성물을 생산하는 추가의 시약을 가함으로써 검출된다. 예를 들어, 검출가능한 제제인 서양고추냉이 페옥시다제가 존재하는 경우, 과산화수소 및 디아미노벤자린의 첨가는 착색된 반응 생성물을 초래하며, 이는 검출가능하다. 결합 단백질은 또한 바이오틴으로 유도체화되며, 아비딘 또는 스트렙타비딘 결합의 간접적인 측정을 통해 검출될 수 있다.

[0287] 본 발명의 다른 양태는 결정화된 결합 단백질 및, 이러한 결정을 포함하는 제형 및 조성물을 제공한다. 하나의

양태에서, 결정화된 결합 단백질은 결합 단백질의 가용성 대응물보다 생체내에서 반감기가 더 길다. 다른 양태에서, 결합 단백질은 결정화 후 생물학적 활성을 보유한다.

[0288] 본 발명의 결정화된 결합 단백질은 당해 분야에 공지되고 본원에 참조로 인용된 WO 02072636에 기술된 방법에 따라 생산할 수 있다.

[0289] 본 발명의 다른 양태는 글리코실화된 결합 단백질을 제공하며, 여기서, 항체 또는 이의 항원-결합부는 하나 이상의 탄수화물 잔기를 포함한다. 초기 생체내 단백질 생산은 해독후 변형으로 알려진, 추가의 프로세싱을 겪을 수 있다. 특히, 당(글리코실) 잔기는 글리코실화로서 공지된 공정인, 효소적으로 가해진다. 공유결합적으로 연결된 올리고사카라이드 측쇄를 지닌 수득되는 단백질은 글리코실화된 단백질 또는 당단백질로 공지되어 있다. 항체는 Fc 도메인, 및 가변 도메인내에 하나 이상의 탄수화물 잔기를 지닌 당단백질이다. Fc 도메인내 탄수화물 잔기는 항체의 항원 결합 또는 반감기의 최소 효과와 함께, Fc 도메인의 작용기 효과에 있어 중요한 효과를 갖는다[참조: R. Jefferis, Biotechnol. Prog. 21 (2005), pp. 11-16]. 대조적으로, 가변 도메인의 글리코실화는 항체의 항원 결합 활성에 대한 효과를 가질 수 있다. 가변 도메인내 글리코실화는 입체 장애에 기인하는, 항체 결합 친화성에 있어서 음성 효과를 가질 수 있거나[참조: Co, M.S., et al., Mol. Immunol. (1993) 30:1361- 1367], 항원에 대한 증가된 친화성을 초래할 수 있다[참조: Wallick, S.C., et al., Exp. Med. (1988) 168:1099-1109; Wright, A., et al., EMBO J. (1991) 10:2717 2723].

[0290] 본 발명의 하나의 양상은, 결합 단백질의 O- 또는 N-연결된 글리코실화 부위가 돌연변이된 글리코실화 부위 돌연변이체를 생성하는 것에 관한 것이다. 당해 분야의 숙련가는 익히 공지된 표준 기술을 사용하여 이러한 돌연변이체를 생성할 수 있다. 생물학적 활성을 보유하지만 증가되거나 감소된 결합 활성을 갖는 글리코실화 부위 돌연변이체는 본 발명의 다른 목적이다.

[0291] 또 다른 양태에서, 본 발명의 항체 또는 항원-결합 부분의 글리코실화는 변형된다. 예를 들면, 아글리코실화된 항체(즉, 글리코실화를 결여한 항체)를 제조할 수 있다. 글리코실화는 예를 들면, 항원에 대한 항체의 친화성이 증가되도록 변경될 수 있다. 이러한 탄수화물 글리코실화 변형은, 예를 들면, 항체 서열내 글리코실화의 하나 이상의 부위를 변경함으로써 달성할 수 있다. 예를 들면, 하나 이상의 아미노산 치환을 달성하여 하나 이상의 가변 영역 글리코실화 부위를 제거함으로써 당해 부위에서 글리코실화를 제거할 수 있다. 이러한 아글리코실화는 항원에 대한 항체의 친화성을 증가시킬 수 있다. 이러한 시도는, 이를 각각의 전문이 본원에 참조로 인용된 PCT 공보 제WO2003016466A2, 및 미국 특허 제5,714,350호 및 제6,350,861호에 추가로 상세히 기술되어 있다.

[0292] 추가로 또는 달리는, 푸코실 잔기의 양이 감소된 하이포푸코실화 항체[참조: Kanda, Yutaka et al., Journal of Biotechnology (2007), 130(3), 300-310.] 또는 증가된 이등분 GlcNAc 구조를 갖는 항체와 같은, 변형된 유형의 글리코실화를 갖는, 본 발명의 변형된 결합 단백질을 제조할 수 있다. 이러한 변경된 글리코실화 패턴은 항체의 ADCC 능력을 증가시키는 것으로 입증되었다. 이러한 탄수화물 변형은 예를 들면, 변경된 글리코실화 기구를 가진 숙주 세포내에서 항체를 발현시킴으로써 달성할 수 있다. 변경된 글리코실화 기구를 가진 세포는 당해 분야에 기술되어 있으며 본 발명의 재조합 항체를 발현함으로써 글리코실화가 변경된 항체를 생산하는 숙주 세포로서 사용할 수 있다[참조: 예를 들면, 이를 각각의 전문이 본원에 참조로 인용된 Shields, R. L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1, 및 또한 유럽 특허 제EP 1,176,195호; PCT 공보 WO 03/035835; WO 99/54342 80].

[0293] 단백질 글리코실화는 목적 단백질의 아미노산 서열, 및 또한 단백질이 발현되는 숙주 세포에 의존한다. 상이한 유기체는 상이한 글리코실화 효소(예를 들면, 글리코실트랜스퍼라제 및 글리코시다제)를 생산할 수 있으며 이용 가능한 상이한 기질(뉴클레오타이드 당)을 가진다. 이러한 인자로 인하여, 단백질 글리코실화 패턴, 및 글리코실 잔기의 조성물은, 특정 단백질이 발현되는 숙주 시스템에 의존하여 상이할 수 있다. 본 발명에 유용한 글리코실 잔기는 글루코즈, 갈락토즈, 만노즈, 푸코즈, n-아세틸글루코사민 및 시알산을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 하나의 양태에서, 글리코실화된 결합 단백질은 글리코실 잔기를 포함함으로써 글리코실화 패턴은 사람이다.

[0294] 상이한 단백질 글리코실화가 상이한 단백질 특성을 초래할 수 있다는 것은 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 예를 들어, 효모와 같은 미생물 숙주에서 생산되고, 효모 내인성 경로를 이용하여 글리코실화된 치료학적 단백질의 효능은 CHO 세포주와 같은 포유동물 세포내에서 발현된 동일한 단백질의 것과 비교하여 감소될 수 있다. 이러한 당단백질은 또한 사람에서 면역원성일 수 있으며 투여 후 생체내에서 감소된 반감기를 나타낸다. 사람 및 기타 동물에서 특이적인 수용체는 특이적인 글리코실 잔기를 인식할 수 있으며 혈류로부터 단백질의 신

속한 제거를 촉진한다. 다른 역효과는 단백질 폴딩, 가용성, 프로테아제에 대한 민감성, 트래피킹(trafficking), 수송, 구획화(compartmentalization), 선택, 다른 단백질 또는 인자에 의한 인식, 항원성, 또는 알레르기항원성에 있어서의 변화를 포함할 수 있다. 따라서, 숙련가는 글리코실화의 특이적인 조성 및 패턴, 예를 들면, 사람 세포 또는 의도된 대상체 동물의 종-특이적인 세포내에서 생산된 것과 동일하거나 적어도 유사한 글리코실화 조성 및 패턴을 갖는 치료학적 단백질을 선택할 수 있다.

[0295]

숙주 세포의 발현과는 상이한 글리코실화 단백질의 발현은 이종 글리코실화 효소를 발현시키기 위해 숙주 세포를 유전적으로 변형시킴으로써 달성할 수 있다. 당해 분야에 공지된 기술을 사용하여, 숙련가는 사람 단백질 글리코실화를 나타내는 항체 또는 항원-결합부를 생성할 수 있다. 예를 들면, 효모 균주를 유전적으로 변형시켜 비-천연적으로 발생하는 글리코실화 효소를 발현함으로써 이들 효모 균주에서 생산된 글리코실화된 단백질(당단백질)은 동물 세포, 특히 사람 세포의 것과 동일한 단백질 글리코실화를 나타낸다(참조: 미국 특허원 제20040018590호 및 제20020137134호 및 PCT 공보 제WO2005100584 A2호).

[0296]

결합 단백질 외에, 본 발명은 본 발명의 또한 이러한 결합 단백질에 대해 특이적인 항-이디오타입(항-Id) 항체에 관한 것이다. 항-Id 항체는, 다른 항체의 항원-결합 영역과 일반적으로 연관된 유일한 결정인자를 인지하는 항체이다. 항-Id는 동물을 결합 단백질 또는 이의 CDR 함유 영역으로 면역화시켜 제조할 수 있다. 면역화된 동물은 면역화 항체의 이디오타입 결정인자를 인지하여 반응하며 항-Id 항체를 생산할 것이다. DVD-Ig 분자내로 흔입된 2개 이상의 모 항체에 대한 항-이디오타입 항체를 생성하고; 당해 분야에 의해 인식된 방법(예를 들면, BIACore, ELISA)에 의해 결합 연구를 확인함으로써 각각의 모 항체의 이디오타입에 대해 특이적인 항-이디오타입에 대해 특이적인 항-이디오타입 항체가 또한 DVD-Ig의 측면에서 이디오타입(예를 들면, 항원 결합부)을 인지하는지를 입증하는 것이 보다 용이할 수 있음을 명백하다. DVD-Ig의 2개 이상의 항원 결합부 각각에 대해 특이적인 항-이디오타입 항체는 환자 혈청 속에서 사람 DVD-Ig의 DVD-Ig 농도를 측정하기 위한 이상적인 시약을 제공하며; DVD-Ig 농도 검정은 고체 상(예를 들면, BIACore 칩, ELISA 플레이트 등) 위에 피복되고, 세정 완충액으로 세정되고, 혈청 시료와 함께 항온처리하고, 다른 세정 단계 및 최종적으로 다들 항원 결합부에 대한 다른 항-이디오타입 항체와 함께 항온처리하고, 결합 반응의 정량을 위해 효소로 자체 표지된 제1 항원 결합 영역에 대한 항체를 사용한 "샌드위치 검정 ELISA 형식"을 사용하여 확립할 수 있다. 하나의 양태에서, 2개 이상의 상이한 결합 부위를 갖는 DVD-Ig의 경우, 2개의 최외측 결합 부위(불변 영역으로부터 가장 먼 및 근접한)에 대한 항-이디오타입 항체는 사람 혈청 속에서 DVD-Ig 농도를 측정하는데 도움을 줄 뿐 아니라, 생체내 분자의 통합성도 기록할 것이다. 각각의 항-Id 항체는 또한 또 다른 동물에서 면역 반응을 유도하기 위한 "면역원"으로서 사용됨으로써 소위 항-항-Id 항체를 생산할 수 있다.

[0297]

또한, 목적 단백질이 각종 글리코실화 효소를 발현하기 위해 유전적으로 조작된 숙주 세포의 라이브러리를 사용하여 발현됨으로써, 라이브러리의 다수의 숙주 세포가 변이 글리코실화 패턴을 갖는 목적한 단백질을 생산할 수 있음을 당해 분야의 숙련가에게 명백할 것이다. 이후에, 숙련가는 특정한 신규 글리코실화 패턴을 갖는 목적한 단백질을 선택하여 분리할 수 있다. 하나의 양태에서, 특별히 선택된 신규 글리코실화 패턴을 갖는 단백질은 향상되거나 변경된 생물학적 특성을 나타낸다.

[0298]

III. DVD-Ig의 용도

[0299]

2개 이상의 항원에 결합하는 이들의 능력의 제공으로, 본 발명의 결합 단백질은 효소 결합된 면역흡착 검정(ELISA), 방사면역검정(RIA) 또는 조직 면역조직화학과 같은 통상의 면역검정을 사용하여, 항원(예를 들면, 혈청 또는 혈장과 같은 생물학적 시료내에서)을 검출할 수 있다. DVD-Ig는 검출가능한 물질로 직접 또는 간접적으로 표지됨으로써 결합되거나 결합되지 않은 항체의 검출을 촉진한다. 적합한 검출가능한 물질은 각종 효소, 보결분자단, 형광성 물질, 발광 물질 및 방사성 물질을 포함한다. 적합한 효소의 예는 서양고추냉이 페옥시다제, 알칼리성 포스파타제, β -갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스테라제를 포함하며; 적합한 보결분자단의 예는 스트렙타비딘/바이오틴 및 아비딘/바이오틴을 포함하고; 적합한 형광성 물질의 예는 웜벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린을 포함하며; 발광 물질의 예는 루미놀을 포함하고; 적합한 방사성 물질의 예는 ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , 또는 ^{153}Sm 을 포함한다.

[0300]

하나의 양태에서, 본 발명의 결합 단백질은 시험관내 및 생체내 둘다에서 항원의 활성을 중화시킬 수 있다. 따라서, 이러한 DVD-Ig는 예를 들면, 본 발명의 결합 단백질이 교차 반응하는 항원을 갖는 다른 포유동물 대상체 또는 사람 대상체에서 항원을 함유하는 세포 배양물 속에서 항원 활성을 억제하는데 사용할 수 있다. 다른 양태에서, 본 발명은, 항원 활성이 유해한 질병 또는 장애로 고생하는 대상체에서 항원 활성을 감소시키기 위한

방법을 제공한다. 본 발명의 결합 단백질은 치료학적 목적을 위해 사람 대상체에게 투여될 수 있다.

[0301] 본원에 사용된 용어 "항원 활성이 유해한 장애"는, 장애로 고생하는 대상체에서 항원의 존재가 장애의 병리생리학 또는 장애의 악화에 기여하는 인자에 관여하는 것으로 예측되는 것으로 입증된 질병 및 다른 장애를 포함하는 것으로 의도된다. 따라서, 항원 활성이 유해한 장애는, 항원 활성의 감소가 증상 및/또는 장애의 진행을 완화시키는 것으로 예측되는 장애이다. 이러한 장애는 예를 들면, 장애로 고생하는 대상체의 생물학적 유체 속에서 항원의 농도의 증가(예를 들면, 대상체의 혈청, 혈장, 활액 등에서 항원의 농도의 증가)에 의해 입증될 수 있다. 본 발명의 결합 단백질로 치료될 수 있는 장애의 비-제한적인 예는 하기에 및 본 발명의 항체의 약제학적 조성물에 관한 단락에서 논의된 장애를 포함한다.

[0302] 본 발명의 DVD-Ig는 하나의 항원 또는 다수의 항원에 결합할 수 있다. 이러한 항원은 본원에 참고로 인용된 다음 데이터베이스에 열거된 표적을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이를 표적 데이터베이스는 다음 목록을 포함한다:

[0303] 치료학적 표적(<http://xin.cz3.nus.edu.sg/group/cjtt/ttd.asp>);

[0304] 사이토킨 및 사이토킨 수용체(<http://www.cytoxinewebfacts.com/>, <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi>, 및 http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/cgf/CGF_Database/cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/indexR.html);

[0305] 케모카인(<http://cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/CK/Chemokine.html>);

[0306] 케모카인 수용체 및 GPCR(<http://csp.medic.kumamoto-u.ac.jp/CSP/receptor.html>, <http://www.gpcr.org/7tm/>);

[0307] 후각 수용체(<http://senselab.med.yale.edu/senselab/ORDB/default.asp>);

[0308] 수용체(<http://www.iuphar-db.org/iuphar-rd/list/index.htm>);

[0309] 암 표적(<http://cgcd.hgc.jp/cgi-bin/input.cgi>);

[0310] 강력한 항체 표적으로서 분비된 단백질(<http://spd.cbi.pku.edu.cn/>);

[0311] 단백질 키나제(<http://spd.cbi.pku.edu.cn/>), 및

[0312] 사람 CD 마커(http://content.labvelocity.com/tools/6/1226/CD_table_final_locked.pdf) 및 (Zola H, 2005 CD molecules 2005: human cell differentiation molecules Blood, 106:3123-6).

[0313] DVD-Ig는 효능/안전성을 향상시키고/시키거나 환자 적용범위를 증가시키기 위해 2개의 상이한 표적을 동시 차단하기 위한 치료제로서 유용하다. 이러한 표적은 가용성 표적(TNF) 및 세포 표면 수용체 표적(VEGFR 및 EGFR)을 포함할 수 있다. 또한, 종양세포와 암 치료요법을 위한 T 세포(Her2 및 CD3) 사이에, 또는 자가반응성 세포와 자가면역 질병 또는 이식을 위한 작용기 세포 사이에, 또는 임의의 표적 세포와 어떠한 제공된 질병에서 질병-유발 세포를 제거하기 위한 작용기 세포 사이에 재지시된 세포독성을 유도하는데 사용할 수 있다.

[0314] 또한, DVD-Ig가 동일한 수용체 상의 2개의 상이한 에피토프를 표적화하기 위해 설계되는 경우 이를 사용하여 수용체 클러스터링 및 활성화를 개시할 수 있다. 이는 기능적 및 길향적 항-GPCR 치료제를 제조하는데 유리할 수 있다. 이 경우에, DVD-Ig를 사용하여 클러스터링/시그널링(2개의 세포 표면 분자) 또는 시그널링(하나의 분자 상에)을 위한 하나의 세포 상에 2개의 상이한 에피토프(루프 영역 및 세포외 도메인 둘다에서 에피토프를 포함)를 표적화하는데 사용할 수 있다. 유사하게, DVD-Ig 분자는 CTLA-4 연결, 및 CTLA-4 세포외 도메인의 2개의 상이한 에피토프(또는 동일한 에피토프의 2개 카피)를 표적화함으로써 음성 시그널을 개시하여 면역 반응의 하향 조절을 초래하도록 설계할 수 있다. CTLA-4는 다수의 면역학적 장애의 치료학적 치료용의 임상적으로 가치 있는 표적이다. CTLA-4/B7 상호작용은 세포 주기 진행, IL-2 생산, 및 활성화 후 T 세포의 증식을 약화시킴으로써 T 세포 활성화를 음성적으로 조절하며, CTLA-4(CD152) 관여는 T 세포 활성화를 하향-조절하고 면역 내성의 유도를 촉진할 수 있다. 그러나, CTLA-4의 기능적 항체 관여에 의해 T 세포 활성화를 약화시키는 전략은, CTLA-4 활성화가 연결을 필요로 하므로 성공적이지 않다. CTLA-4/B7의 분자 상호작용은 결정 구조 분석(참조: Stamper 2001 Nature 410:608)에 의해 입증되는 바와 같이, "스크류드 지퍼(skewed zipper)"내에 있다. 그러나, 항-CTLA-4 mAb를 포함하는, 현재 유용한 CTLA-4 결합 시약 중 어느 것도 연결 특성을 가지지 않는다. 이러한 문제에 초점을 맞추는 몇가지 시도가 있어왔다. 하나의 경우에는, 세포 막-결합된 단일쇄 항체를 생성하고, 마우스에서 동종이게 거부를 상당히 억제하였다(참조: Hwang 2002 JI 169:633). 별개의 경우에, CTLA-4에 대한 인공 APC 표면-연결된 단일쇄 항체를 생성하여 T 세포 반응을 약화시키는 것을 입증하였다(참조: Griffin 2000 JI 164:4433). 둘다의 경우에서, CTLA-4 연결은 인공 시스템에서 밀접하게 국재화된 구성원-결합된 항체에 의

해 달성되었다. 이들 실험이 CTLA-4 음성 시그널링을 개시함으로써 면역 하향-조절에 대한 개념증명을 제공하지만, 이들 보고서에서 사용된 시약은 치료학적 용도로 적합하지 않다. 이러한 목적 달성을 위해, CTLA-4 연결은, CTLA-4 세포의 도메인의 2개의 상이한 에피토프(또는 동일한 에피토프의 2개 카피)를 표적화하는 DVD-Ig 분자를 사용하여 달성할 수 있다. 이유는, 대략 150 내지 170Å의 IgG의 2개의 결합 부위에 걸친 거리가 CTLA-4의 활성적인 연결(2개의 CTLA-4 동종이랑체 사이에 30 내지 50Å)을 위해서는 너무 멀다는 것이다. 그러나, DVD-Ig(하나의 아암) 상에서 2개의 결합 부위들 사이의 거리는 또한 30 내지 50Å의 범위로 매우 짧아서, CTLA-4의 적절한 연결을 허용한다.

[0315] 유사하게, DVD-Ig는 세포 표면 수용체 복합체(예를 들면, IL-12R 알파 및 베타)의 2개의 상이한 구성원을 표적화 할 수 있다. 또한, DVD-Ig는 CR1 및 가용성 단백질/병원체를 표적화하여 표적 가용성 단백질/병원체의 신속한 제거를 시작할 수 있다.

[0316] 또한, 본 발명의 DVD-Ig는 세포내 전달(내부화 수용체 및 세포내 분자를 표적화함), 뇌내로 전달(트랜스페린 수용체 및 혈액-뇌 장벽을 횡단하기 위한 CNS 질병 매개인자를 표적화함)을 포함하는, 조직-특이적인 전달(국소 PK를 향상시켜 보다 높은 효능 및/또는 보다 낮은 독성을 위한 조직 마커 및 질병 매개인자를 표적화함)을 위해 사용할 수 있다. DVD-Ig는 또한 항원의 비-중화 에피토프에 대한 결합을 통해 특이적인 위치로 항원을 전달하고 또한 항원의 반감기를 증가시키기 위한 담체 단백질로서 제공될 수 있다. 또한, DVD-Ig는 환자내로 이식된 의학 장치에 물리적으로 연결되거나 이러한 의학 장치를 표적화하도록 설계될 수 있다[참조: Burke, Sandra E.; Kuntz, Richard E.; Schwartz, Lewis B., Zotarolimus eluting stents. Advanced Drug Delivery Reviews (2006), 58(3), 437-446; Surface coatings for biological activation and functionalization of medical devices, Hildebrand, H. F.; Blanchemain, N.; Mayer, G.; Chai, F.; Lefebvre, M.; Boschin, F., Surface and Coatings Technology (2006), 200(22-23), 6318-6324; Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis, Wu, Peng; Grainger, David W., Biomaterials (2006), 27(11), 2450-2467; Mediation of the Cytokine network in the implantation of orthopedic devices., Marques, A. P.; Hunt, J. A.; Reis, Rui L., Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine (2005), 377-397]. 요약하면, 의학 이식물의 부위로 적절한 유형의 세포를 지시하는 것은 정상 조직 기능을 치유하고 회복하는 것을 촉진할 수 있다. 달리는, 장치에 커플링되거나 표적화된 DVD에 의한 장치 삽입시 방출된, 매개인자(사이토킨을 포함하나, 이에 한정되지 않음)의 억제가 또한 제공된다. 예를 들어, 스텐트(stent)는 중재 심장학에서 차단된 동맥을 깨끗하게 하고 심장 근육으로 혈액의 흐름을 개선시키기 위해 수년 동안 사용되어 왔다. 그러나, 일반적인 베어(bare) 금속 스텐트는 일부 환자에서 재협착(치료된 부위에서 동맥의 재-협소화)를 유발하는 것으로 알려져 있으며 혈액 응고를 초래할 수 있다. 최근에, 혈액 전체를 순환하는 내피 선조 세포(EPC)를 포획함으로써 발생하는 혈액 응고를 방지하고 재협착을 감소시킨 항-CD34 항체 피복된 스텐트가 기술되어 왔다. 내피 세포는 혈관 내부에서 혈액이 부드럽게 유동하도록 하는 세포이다. EPC는 치유를 촉진할 뿐 아니라 스텐트의 사용과 관련된 앞서의 합병증인 재협착 및 혈관 응고를 방지하는 부드러운 충을 형성하는 스텐트의 단단한 표면에 부착한다[참조: Aojo et al. 2005 J Am Coll Cardiol. 45(10):1574-9]. 스텐트가 요구되는 환자에 대한 개선된 결과 외에, 심혈관 우회로 수술을 필요로 하는 환자의 경우 합병증이 또한 존재한다. 예를 들면, 항-EPC 항체로 피복된 인공 혈관 통로(인공 동맥)은 우회로 수술 이식체를 위해 환자의 다리 또는 팔로부터 동맥을 사용할 필요성을 제거할 수 있다. 이는 수술 및 마취 시간을 감소시킴으로써, 궁극적으로 관상 수술 사망을 감소시킬 것이다. DVD-Ig는 세포 표면 마커(예를 들면, CD34) 및 또한 세포 보충을 촉진시키기 위해 이식된 장치상에 피복된 단백질(또는 단백질, 지질 및 다당류를 포함하나, 이에 한정되지 않는 임의의 종류의 에피토프)에 결합하는 방식으로 설계된다. 이러한 시도는 또한 일반적으로 다른 의학 장치에 적용될 수 있다. 달리는, DVD-Ig는 의학 장치상에 피복되고 이식되어 장치로부터 모든 DVD가 방출되는 경우(또는 이미 로딩된 DVD-Ig의 노화 및 변성을 포함하는, 추가의 새로운 DVD-Ig를 필요로 할 수 있는 어떠한 다른 요구), 장치는 새로운 DVD-Ig를 환자에게 전신 투여에 의해 재로딩할 수 있으며, 여기서, DVD-Ig는 하나의 결합 부위 세포를 가진 목적한 표적[사이토킨, 세포 표면 마커(예: CD34)] 및 다른 것을 지닌 장치(단백질; 지질, 다당류 및 중합체를 포함하나, 이에 한정되지 않는 임의의 종류의 에피토프 포함)에 피복된 표적에 결합하도록 설계된다. 당해 기술은 피복된 이식체의 유용성을 확장시키는 장점을 갖는다.

A. 각종 질병에서 DVD-Ig의 용도

[0317] 본 발명의 DVD-Ig 분자는 또한 각종 질병을 치료하기 위한 치료학적 분자로서 유용하다. 이러한 DVD 분자는 특정 질병에 포함된 하나 이상의 표적에 결합할 수 있다. 각종 질병에서 이러한 표적의 예는 하기 기술되어 있다.

[0319] 1. 사람 자가면역 및 염증 반응

[0320] 많은 단백질이 일반적으로 자가면역 및 염증 반응에 관여하며, 다음을 포함한다: C5, CCL1(1-309), CCL11(에오팩신), CCL13(mcp-4), CCL15(MIP-Id), CCL16(HCC-4), CCL17(TARC), CCL18(PARC), CCL19, CCL2(mcp-1), CCL20(MIP-3a), CCL21(MIP-2), CCL23(MPIF-1), CCL24(MPIF-2/에오팩신-2), CCL25(TECK), CCL26, CCL3(MIP-Ia), CCL4(MIP-Ib), CCL5(RANTES), CCL7(mcp-3), CCL8(mcp-2), CXCL1, CXCL10(IP-10), CXCL11(I-TAC/IP-9), CXCL12(SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL2, CXCL3, CXCL5(ENA-78/LIX), CXCL6(GCP-2), CXCL9, IL13, IL8, CCL13(mcp-4), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CX3CR1, IL8RA, XCR1(CCXCR1), IFNA2, IL10, IL13, IL17C, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9, IL22, IL5, IL8, IL9, LTA, LTB, MIF, SCYE1(내피 단핵구-활성화 사이토킨), SPP1, TNF, TNFSF5, IFNA2, IL10RA, IL10RB, IL13, IL13RA1, IL5RA, IL9, IL9R, ABCF1, BCL6, C3, C4A, CEBPB, CRP, ICEBERG, IL1R1, IL1RN, IL8RB, LTB4R, TOLLIP, FADD, IRAKI, IRAK2, MYD88, NCK2, TNF α IP3, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF5, TRAF6, ACVR1, ACVR1B, ACVR2, ACVR2B, ACVRL1, CD28, CD3E, CD3G, CD3Z, CD69, CD80, CD86, CNR1, CTLA4, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, FCGR3A, GPR44, HAVCR2, OPRD1, P2RX7, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, BLR1, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CX3CL1, CX3CR1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCR4, GPR2, SCYE1, SDF2, XCL1, XCL2, XCR1, AMH, AMHR2, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2, C19orf10 (IL27w), CER1, CSF1, CSF2, CSF3, DKFZp451J0118, FGF2, GFI1, IFNA1, IFNB1, IFNG, IGF1, IL1A, IL1B, IL1R1, IL1R2, IL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3, IL4, IL4R, IL5, IL5RA, IL6, IL6R, IL6ST, IL7, IL8, IL8RA, IL8RB, IL9, IL9R, IL10, IL10RA, IL10RB, IL11, IL11RA, IL12A, IL12B, IL12RB1, IL12RB2, IL13, IL13RA1, IL13RA2, IL15, IL15RA, IL16, IL17, IL17R, IL18, IL18R1, IL19, IL20, KITLG, LEP, LTA, LTB, LTB4R, LTB4R2, LTBR, MIF, NPPB, PDGFB, TBX21, TDGF1, TGFA, TGFB1, TGFB1I1, TGFB2, TGFB3, TGFB1I, TGFB1, TGFB2, TGFB3, THL1, TNF, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF7, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFRSF11A, TNFRSF21, TNFSF4, TNFSF5, TNFSF6, TNFSF11, VEGF, ZFPM2, 및 RNF110(ZNF144). 하나의 양상에서, 본원에 열거된 하나 이상의 표적에 결합할 수 있는 DVD-Ig가 제공된다.

[0321] 2. 천식

[0322] 알레르기 천식은 호중구증가증, 배상세포 화생(goblet cell metaplasia), 내피 세포 변경, 기도 과다반응(AHR), 및 Th2 및 Th1 사이토킨 발현, 및 또한 상승된 혈청 IgE 수준의 존재에 의해 특징화된다. 기도 염증은 T 세포, B 세포, 호중구, 비만세포 및 대식세포와 같은 염증 세포, 및 또한 사이토킨 및 케모킨을 포함하는 이들의 분비된 매개인자의 복잡한 상호작용을 포함하는, 천식의 병리학의 근본을 이루는 주요 인자임이 현재 광범위하게 수용되고 있다. 코르티코스테로이드는 오늘날 천식에 대한 가장 중요한 소염 치료이나, 이들의 작용 메카니즘은 비-특이적이며 안전성 관심은 특히 소아 환자 집단에서 존재한다. 따라서, 보다 특이적이고 표적화된 치료요법 개발의 이유가 된다. 마우스에서 IL-13은 호산구 염증과는 별도로, AHR, 점액 과다분비 및 기도 섬유증을 포함하는, 천식의 많은 특징들을 모사한다는 증거가 증가하고 있다[참조: Finotto et al., International Immunology (2005), 17(8), 993-1007; Padilla et al., Journal of Immunology (2005), 174(12), 8097-8105].

[0323] IL-13은 천식과 관련된 병리학적 반응을 유발하는데 있어서 중심적인 역할로서 관련되어 있다. 폐에서 IL-13의 효과를 감소시키기 위한 항-IL-13 mAb 치료요법의 개발은 천식에 대한 신규 치료로서 상당한 약속을 제공하는 존재하는 새로운 시도이다. 그러나, 차등적인 면역학적 경로의 다른 매개인자 또한 천식 발병기전에 관여하며, IL-13 외에 이들 매개인자의 차단은 추가의 치료학적 이점을 제공할 수 있다. 이러한 표적 쌍은 IL-13 및 염증 촉진성 사이토킨, 예를 들면, 종양 괴사 인자- α (TNF- α)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. TNF- α 는 천식에서 염증 반응을 증폭시킬 수 있으며 질병 중증도와 관련될 수 있다[참조: McDonnell, et al., Progress in Respiratory Research (2001), 31(New Drugs for Asthma, Allergy and COPD), 247-250.]. 이는, IL-13 및 TNF- α 둘다를 차단하는 것이 특히 심각한 기도 질병에 있어 유리한 효과를 가질 수 있음을 제안한다. 다른 양태에서, 본 발명의 DVD-Ig는 표적 IL-13 및 TNF α 에 결합하며 천식 치료용으로 사용된다.

[0324] 염증 및 AHR 둘다가 평가될 수 있는, OVA-유도된 천식 마우스 모델과 같은 동물 모델은 당해 분야에 공지되어 있으며 천식을 치료하기 위한 각종 DVD-Ig 분자의 능력을 측정하기 위해 사용될 수 있다. 천식을 연구하기 위한 동물 모델은 문헌[참조: Coffman, et al., Journal of Experimental Medicine (2005), 201(12), 1875-1879; Lloyd, et al., Advances in Immunology (2001), 77, 263-295; Boyce et al., Journal of Experimental Medicine (2005), 201(12), 1869-1873; 및 Snibson, et al., Journal of the British Society for Allergy

and Clinical Immunology (2005), 35(2), 146-52]에 기재되어 있다. 이들 표적 쌍 특이적인 시험의 통상적인 안전성 평가 외에, 면역억제의 정도에 대한 특정 시험이 가장 우수한 표적 쌍을 선택하는 데 있어 이유가 되고 도움이 될 수 있다[참조: Luster et al., Toxicology (1994), 92(1-3), 229-43; Descotes, et al., Developments in biological standardization (1992), 77 99-102; Hart et al., Journal of Allergy and Clinical Immunology (2001), 108(2), 250-257].

[0325] 본원에 기재된 이유를 근거로 하고 효능 및 안전성에 대한 동일한 평가 모델을 사용하여, DVD-Ig 분자가 결합하여 천식을 치료하는데 유용할 수 있는 표적의 다른 쌍을 측정할 수 있다. 하나의 양태에서, 이러한 표적은, IL-1베타가 또한 천식에서 염증 반응에 관련되어 있기 때문에, IL-13 및 IL-1베타; IL-13 및 IL-9; IL-13 및 IL-4; IL-13 및 IL-5; IL-13 및 IL-25; IL-13 및 TARC; IL-13 및 MDC; IL-13 및 MIF; IL-13 및 TGF- β ; IL-13 및 LHR 작용제; IL-13 및 CL25; IL-13 및 SPRR2a; IL-13 및 SPRR2b; 및 IL-13 및 ADAM8과 같은, 염증에 포함되는 IL-13 및 사이토킨을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명은 또한 CSF1(MCSF), CSF2(GM-CSF), CSF3(GCSF), FGF2, IFNA1, IFNB1, IFNG, 히스타민 및 히스타민 수용체, IL1A, IL1B, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12A, IL12B, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18, IL19, KITLG, PDGFB, IL2RA, IL4R, IL5RA, IL8RA, IL8RB, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL18R1, TSLP, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22, CCL24, CX3CL1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, XCL1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CX3CR1, GPR2, XCR1, FOS, GATA3, JAK1, JAK3, STAT6, TBX21, TGFB1, TNF, TNFSF6, YY1, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, LTB4R, TB4R2, LTBR, 및 키티나제로 이루어진 그룹 중에서 선택된 천식에 관련된 하나 이상의 표적에 결합할 수 있는 DVD-Ig를 제공한다.

3. 류마티스 관절염

[0326] 전신계 질병인, 류마티스 관절염(RA)은 관절의 윤활막내 만성 염증 반응을 특징으로 하며 관절곁 골의 연골의 변성 및 친무름과 관련되어 있다. TNF, 케모킨, 및 성장 인자를 포함하는 많은 염증촉진성 사이토킨은 질병이 있는 관절내에서 발현된다. 항-TNF 항체 또는 sTNFR 융합 단백질의 RA 마우스 모델에 대한 전신 투여는 소염 및 관절 보호성인 것으로 밝혀졌다. RA 환자에서 TNF의 활성이 정맥내 투여된 인플릭시마브[참조: Harriman G, Harper LK, Schaible TF. 1999 Summary of clinical trials in rheumatoid arthritis using infliximab, an anti-TNFalpha treatment. Ann Rheum Dis 58 Suppl 1:I61-4], 즉, 키메라 항-TNF mAb로 차단된 임상 시험은, TNF가 IL-6, IL-8, MCP-1, 및 VEGF 생산, 면역 및 염증 세포의 관절내로의 보충, 혈관 형성, 및 매트릭스 메탈로프로테이나제-1 및 -3의 혈액 수준의 감소를 조절한다는 증거를 제공한다. 류마티스 관절염에서 염증 경로의 보다 우수한 이해는 류마티스 관절염에 관여된 다른 치료학적 표적의 확인을 가져왔다. 인터류킨-6 길항제[추가이(Chugai), 로슈(Roche)에 의해 개발된 IL-6 수용체 항체 MRA(참조: Nishimoto, Norihiro et al., Arthritis & Rheumatism (2004), 50(6), 1761-1769), CTLA4Ig(참조: abatacept, Genovese Mc et al 2005 Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition. N Engl J Med. 353:1114-23.), 및 항-B 세포 치료요법(리툭시마브, 참조: Okamoto H, Kamatani N. 2004 Rituximab for rheumatoid arthritis. N Engl J Med. 351 :1909)과 같은 촉망되는 치료는 이미 지난 수년에 걸쳐 무작위적으로 조절된 시도에서 시험되어 왔다. 인터류킨-15[치료학적 항체 HuMax-IL_15, AMG 714 참조: Baslund, Bo et al., Arthritis & Rheumatism (2005), 52(9), 2686-2692], 인터류킨-17, 및 인터류킨-18을 포함하는 다른 사이토킨이 확인되었으며 동물 모델에서 유리한 것으로 밝혀졌고, 이들 제제의 임상 시험은 현재 진행중에 있다. 항-TNF 및 다른 매개인자를 합한 이중-특이적인 항체 치료요법은 임상 효능 및/또는 환자 적용범위를 향상시키는데 있어서 큰 잠재력을 갖는다. 예를 들면, TNF 및 VEGF 둘다를 차단하는 것은, 둘다 RA의 병태생리학에 관여된, 염증 및 혈관형성을 강력하게 근절할 수 있다. TNF 및 IL-18; TNF 및 IL-12; TNF 및 IL-23; TNF 및 IL-1베타; TNF 및 MIF; TNF 및 IL-17; TNF 및 IL-15, TNF 및 SOST를 포함하나, 이에 한정되지 않는, RA에 포함된 표적의 다른 쌍을 특이적인 DVD Ig를 사용하여 차단하는 것이 또한 고려된다. 이들 표적 쌍의 통상적인 안전성 평가 외에, 면역억제의 정도에 대한 특이적인 시험은 가장 우수한 표적 쌍을 선택하는 이유가 되고 도움이 될 수 있다[참조: Luster et al., Toxicology (1994), 92(1-3), 229-43; Descotes, et al., Developments in biological standardization (1992), 77 99-102; Hart et al., Journal of Allergy and Clinical Immunology (2001), 108(2), 250-257]. DVD Ig 분자가 류마티스 관절염의 치료에 유용할 여부는 콜라겐-유도된 관절염 마우스 모델과 같은 전-임상 동물 RA 모델을 사용하여 평가할 수 있다. 다른 유용한 모델이 또한 당해 분야에 공지되어 있다[참조: Brand DD., Comp Med. (2005) 55(2):114-22]. 사람 및 마우스 상동체에 대한 모 항체의 교차-반응성(예를 들면, 사람 및 마우스 TNF, 사람 및 마우스 IL-15에 대한 반응성 등)을 기초로 하여, 마우스 CIA 모델내 확인 연구를 "매치된 대리 항체(matched surrogate antibody)" 기원한 DVD-Ig 분자를 사용하여 수행할 수 있으며; 요약하면, 2개(또는 이상)의 마우스 표적 특이적인 항체를 기초로 한 DVD-Ig는 사람 DVD-Ig 작

제물에 사용된 모 사람 또는 사람화된 항체의 특성(유사한 친화성, 유사한 중화 효능, 유사한 반감기 등)에 대해 가능한 정도로 매치될 수 있다.

[0328] 4. SLE

SLE의 면역병리학적 특징은 고글로불린혈증, 자가항체 생산 및 면역복합체 형성을 초래하는, 폴리클로날 B 세포 활성화이다. 근본적인 비정상은 일반화된 T 세포 조절곤란으로 인하여 T 세포가 금지된 B 세포 클론을 제어하는데 실패하는 것으로 여겨진다. 또한, B 및 T-세포의 상호작용은 IL-10 및 또한 제2 시그널을 개시하는 CD40 및 CD40L, B7 및 CD28 및 CTLA-4과 같은 공동-자극 분자와 같은 몇가지 사이토kin에 의해 촉진된다. 이러한 상호작용은 면역 복합체 및 아폽토시스 물질의 손상된 포식세포 제거와 함께 면역 반응을 수득되는 조직 손상과 함께 영속화한다. 다음 표적이 SLE에 관여할 수 있으며 치료학적 중재를 위한 DVD-Ig 시도에 강력하게 사용될 수 있다: B 세포 표적화된 치료요법: CD-20, CD-22, CD-19, CD28, CD4, CD80, HLA-DRA, IL10, IL2, IL4, TNFRSF5, TNFRSF6, TNFSF5, TNFSF6, BLR1, HDAC4, HDAC5, HDAC7A, HDAC9, ICOSL, IGBP1, MS4A1, RGS1, SLA2, CD81, IFNB1, IL10, TNFRSF5, TNFRSF7, TNFSF5, AICDA, BLNK, GALNAC4S-6ST, HDAC4, HDAC5, HDAC7A, HDAC9, IL10, IL11, IL4, INHA, INHBA, KLF6, TNFRSF7, CD28, CD38, CD69, CD80, CD83, CD86, DPP4, FCER2, IL2RA, TNFRSF8, TNFSF7, CD24, CD37, CD40, CD72, CD74, CD79A, CD79B, CR2, IL1R2, ITGA2, ITGA3, MS4A1, ST6GAL1, CD1C, CHST10, HLA-A, HLA-DRA, 및 NT5E; 공동-자극 시그널: CTLA4 또는 B7.1/B7.2; B 세포 생존의 억제: BIyS, BAFF; 보체 불활성화: C5; 사이토kin 조절: 주요 원리는 특정 조직에서 전체 생물학적 반응이 염증촉진 또는 소염 사이토kin의 국부적 수준 사이의 균형의 결과라는 것이다[참조: Sfikakis PP et al 2005 Curr Opin Rheumatol 17:550-7]. SLE는 혈청 IL-4, IL-6, IL-10에 있어서의 입증된 상승과 함께 Th-2 기원한 질병인 것으로 고려된다. IL-4, IL-6, IL-10, IFN- α , 및 TNF- α 로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 표적에 결합할 수 있는 DVD Ig가 또한 고려된다. 본원에 논의된 표적의 조합은 다수의 루푸스 전임상 모델에서 시험될 수 있는 SLE에 대한 치료학적 효능을 향상시킬 것이다[참조: Peng SL (2004) Methods Mol Med.; 102:227-72]. 사람 및 마우스 상동체에 대한 모 항체의 교차-반응성(예를 들면, 사람 및 마우스 CD20, 사람 및 마우스 인터페론 알파에 대한 반응성 등)을 기초로 하여, 마우스 루푸스 모델에서 타당성 연구를 "매치된 대리 항체" 기원한 DVD-Ig 분자를 사용하여 수행할 수 있으며; 요약하면, 2개(또는 그 이상)의 마우스 표적 특이적인 항체를 기초로 한 DVD-Ig를 사람 DVD-Ig 작제를 위해 사용된 모 사람 또는 사람화된 항체의 특징(유사한 친화성, 유사한 중화 효능, 유사한 반감기 등)에 대해 가능한 정도로 매치시킬 수 있다.

[0330] 5. 다발 경화증

다발경화증(MS)은 주로 알려지지 않은 병인을 지닌 복잡한 사람 자가면역-유형 질병이다. 신경계 전체에서 수초 염기성 단백질(MBP)의 면역학적 파괴는 다발경화증의 주요 병인이다. MS는 CD4+ 및 CD8+ T 세포에 의한 침윤을 포함하는 복합 병인 및 중추신경계내 반응의 질병이다. 사이토kin, 반응성 질소 종 및 공동자극 분자의 CNS내 발현은 모두 MS에 기술되어 있다. 중요한 고려대상은 자가면역성의 발달에 기여하는 면역학적 메카니즘이다. 특히, 항원 발현, 사이토kin 및 백혈구 상호작용, 및 Th1 및 Th2 세포와 같은 다른 T-세포를 균형을 맞추고/조절하는 것을 돋는 조절성 T-세포는 치료학적 표적 확인을 위한 중요한 분야이다.

[0332] IL-12는 APC에 의해 생산된 염증촉진성 사이토kin이며 Th1 작용기 세포의 분화를 촉진한다. IL-12는 MS 환자 및 EAE에 걸린 동물의 병변의 발달시 생산된다. 앞서, IL-12 경로에 있어서의 방해는 설치류에서 EAE를 효과적으로 방지하며 항-IL-12 mAb를 사용한 IL-12p40의 생체내 중화는 일반적인 마모셋(marmoset)에서 수초-유도된 EAE 모델에서 유리한 효과를 가진 것으로 밝혀졌다.

[0333] TWEAK는 세포 유형에 의존하여 염증촉진성, 증식성 또는 아폽토시스적 효과를 갖는, 중추 신경계(CNS)내에서 구성적으로 발현되는 TNF 계열의 구성원이다. 이의 수용체인, Fn14는 CNS내에서 내피 세포, 반응성 별아교세포 및 신경세포에 의해 발현된다. TWEAK 및 Fn14 mRNA 발현은 실험적 자가면역 뇌척수염(EAE) 동안 척수내에서 증가된다. C57BL/6 마우스내 수초 회소돌기아교세포 당단백질(MOG) 유도된 EAE에서 항-TWEAK 항체 치료는, 마우스를 프라이밍 단계 이후 처리하는 경우 질병 중증도 및 백혈구 침윤의 감소를 초래하였다.

[0334] 본 발명의 하나의 양상은 IL-12, TWEAK, IL-23, CXCL13, CD40, CD40L, IL-18, VEGF, VLA-4, TNF, CD45RB, CD200, IFN감마, GM-CSF, FGF, C5, CD52, 및 CCR2로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상, 예를 들면 2개의 표적에 결합할 수 있는 DVD Ig 분자에 관한 것이다. 하나의 양태는 MS의 치료에 유리한 치료제로서 이중-특이적인 항-IL-12/TWEAK DVD Ig를 포함한다.

[0335] MS를 치료하기 위한 DVD 분자의 유용성을 평가하기 위한 몇가진 동물 모델은 당해 분야에 공지되어 있다[참조:

Steinman L, et al., (2005) Trends Immunol. 26(11):565-71; Lublin FD., et al., (1985) Springer Semin Immunopathol.8(3):197-208; Genain CP, et al., (1997) J Mol Med. 75(3):187-97; Tuohy VK, et al., (1999) J Exp Med. 189(7): 1033-42; Owens T, et al., (1995) Neurol Clin.13(1):51-73; 및 't Hart BA, et al., (2005) J Immunol 175(7):4761-8]. 사람 및 마우스 상동체에 대한 모 항체의 교차-반응성(예를 들면, 사람 및 마우스 IL-12, 사람 및 마우스 TWEAK에 대한 반응성 등)을 기초로 하여, 마우스 EAE 모델내 확인 연구를 "매치된 대리 항체" 기원한 DVD-Ig 분자를 사용하여 수행할 수 있으며; 요약하면, 2개(또는 이상)의 마우스 표적 특이적인 항체를 기초로 한 DVD-Ig는 사람 DVD-Ig 작제물에 사용된 모 사람 또는 사람화된 항체의 특성(유사한 친화성, 유사한 중화 효능, 유사한 반감기 등)에 대해 가능한 정도로 매치될 수 있다. 동일한 개념을 다른 비-설치류 종인 동물 모델에 적용하며, 여기서, "매치된 대리 항체" 기원한 DVD-Ig는 예측된 약리학 및 가능한 안정성 연구를 위해 선택할 수 있다. 이들 표적 쌍의 통상적인 안전성 평가 외에, 면역억제의 정도에 대한 특이적인 시험은 가장 우수한 표적 쌍을 선택하는 이유가 될 수 있고 이를 도울 수 있다[참조: Luster et al., Toxicology (1994), 92(1-3), 229-43; Descotes, et al., Developments in biological standardization (1992), 77 99-102; Jones R. 2000 Rovelizumab (ICOS Corp). IDrugs.3(4):442-6].

[0336] 6. 패혈증

[0337] 패혈증의 병태생리학은 그람-음성 유기체(지다당류 [LPS], 지질 A, 내독소) 및 그람-양성 유기체(지질타이코산, 펩티도글리칸)의 외부 막 성분에 의해 개시된다. 이들 외막 성분은 단핵세포의 표면에서 CD14 수용체에 결합할 수 있다. 최근 기술된 톨(toll)-유사 수용체로 인하여, 이후에 시그널은 세포로 전달되어, 염증촉진성 사이토킨 중앙 괴사 인자-알파(TNF-알파) 및 인터류킨-1(IL-1)의 궁극적인 생산을 초래한다. 압도적인 염증 및 면역 반응은 패혈성 쇼크의 필수적인 특징이며 조직 손상, 다수 기관 기능부전 및, 패혈증에 의해 유발된 사망의 발병기전에 있어서 중심적인 부분을 담당한다. 사이토킨, 특히 중앙 괴사 인자(TNF) 및 인터류킨(IL-1)은 패혈성 쇼크의 중요한 매개인자인 것으로 밝혀졌다. 이들 사이토킨은 조직에서 직접적인 독성 효과를 가지며; 이들은 또한 포스포리파제 A2를 활성화한다. 이들 및 다른 효과는 혈소판-활성화 인자의 증가된 농축, 산화질소 신타제 활성의 촉진, 호중구에 의한 조직 침윤의 촉진 및, 호중구 활성의 촉진을 초래한다.

[0338] 패혈증 및 패혈성 쇼크의 치료에는 임상적인 의문점이 있으며, 염증 반응을 목표로 한 생물학적 반응 조절제(즉, 항-TNF, 항-MIF)를 사용한 최근의 예측되는 시도는 단지 보통의 임상적인 이점을 나타낸다. 최근에, 관심은 면역 억제의 동반 기간을 역전시키는 것을 목표로 하는 치료요법으로 이동되었다. 실험 동물 및 중요하게는 질병이 있는 환자에서의 연구는, 림프 기관 및 일부 실질 조직의 증가된 아폽토시스가 면역 억제, 에너지 및 기관계 기능부전에 기여하는 것이 입증되었다. 패혈증후군 동안, 림프구 아폽토시스는 IL-2의 부재에 의해 또는 글루코코르티코이드, 그랜자임 또는 소위 '사멸' 사이토킨: 중앙 괴사 인자 알파 또는 Fas 리간드의 방출에 의해 개시될 수 있다. 아폽토시스는 세포질성 및/또는 미토콘드리아성 카스파제의 자가-활성화를 통해 진행하며, 이는 Bcl-2 계열의 아폽토시스-촉진 및 항-아폽토시스 구성원에 의해 영향받을 수 있다. 실험적 동물에서, 아폽토시스의 억제제를 사용한 치료가 림프구 아폽토시스를 방지할 수 있을 뿐 아니라, 이는 또한 결과를 개선시킬 수 있다. 항-아폽토시스제를 사용한 임상 시험이 이의 투여 및 조직 표적화와 관련된 기술적 곤란성에 대부분 기인하는 것과는 거리가 있지만, 림프구 아폽토시스의 억제는 패혈성 환자에 대한 매력적인 치료학적 표적을 나타낸다. 유사하게, 염증성 매개인자 및 아폽토시스성 매개인자 둘다를 표적화하는 이중-특이적인 제제는 부가된 이점을 가질 수 있다. 본 발명의 하나의 양상은 패혈증에 관여된 하나 이상의 표적, 하나의 양태에서, TNF, IL-1, MIF, IL-6, IL-8, IL-18, IL-12, IL-23, FasL, LPS, 톨-유사 수용체, TLR-4, 조직 인자, MIP-2, ADORA2A, CASP1, CASP4, IL-10, IL-1 β , NFKB1, PROC, TNFRSF1A, CSF3, CCR3, IL1RN, MIF5 NFKB1, PTAFR, TLR2, TLR4, GPR44, HMOX1, 미드킨, IRAKI, NFKB2, SERPINA1, SERPINE1, 및 TREM1으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 2개의 표적에 결합할 수 있는 DVD Ig에 관한 것이다. 패혈증에 대한 이러한 DVD Ig의 효능은 당해 분야에 공지된 전임상 동물에서 평가될 수 있다[참조: Buras JA, et al., (2005) Nat Rev Drug Discov. 4(10):854-65 and Calandra T, et al., (2000) Nat Med. 6(2): 164-70].

[0339] 7. 신경학적 장애

[0340] 7.1. 신경변성 병

[0341] 만성 신경변성 병은 일반적으로 신경세포 기능의 진행적인 손실(신경세포 사멸, 탈수초화), 운동성 손실 및 기억력 상실을 특징으로 하는 노화-의존성 질병이다. 만성 신경변성 병(예를 들면, 알츠하이머병 질병)의 근본적인 메카니즘의 드러나는 지식은 복잡한 병인을 나타내며 각종 인자들, 예를 들면, 나이, 당뇨 상태, 아밀로이드 생산 및 다양체화, 수용체 RAGE(AGE에 대한 수용체)에 결합하는 진전된 당화-최종 생성물(AGE)의 촉진, 증가된

뇌 산화 스트레스, 감소된 대뇌 혈류, 염증성 사이토킨 및 케모킨의 방출을 포함하는 신경염증, 신경 기능장애 및 미세아교세포 활성화가 이들의 발달 및 진행에 기여하는 것으로 인식되어 있다. 따라서, 이들 만성 신경변성병은 다수의 세포 유형과 매개인자 사이의 복잡한 상호작용을 나타낸다. 이러한 질병에 대한 치료 전략은 제한되어 있으며 비-특이적인 소염제(예를 들면, 코르티코스테로이드, COX 억제제) 또는 신경세포 손실 및/또는 시냅스 기능을 방지하는 제제를 사용하여 염증 과정을 차단하는 것을 주로 구성한다. 이들 치료는 질병 진행을 중지하지 못한다. 최근 연구는, 가용성 A-b 펩타이드(A-b 올리고머 형태를 포함)에 대한 항체와 같은 보다 표적화된 치료요법은 질병 진행을 중지하는데 도움을 줄 수 없을 뿐 아니라 기억을 또한 유지하는데도 도움을 줄 수 있다. 이러한 예비 관측은, 하나 이상의 질병 매개인자(예를 들면, A-b 및, TNF와 같은 염증촉진성 사이토킨)를 표적화하는 특이적인 치료요법이 단일 질병 메카니즘(예를 들면, 가용성 A-b 단독)을 표적화하는 것으로 판측된 것보다 만성 신경변성 병에 대해 심지어 더 우수한 치료학적 효능을 제공할 수 있다[참조: CE. Shepherd, et al., Neurobiol Aging. 2005 Oct 24; Nelson RB., Curr Pharm Des. 2005;11:3335; William L. Klein.; Neurochem Int. 2002; 41:345; Michelle C Janelsins, et al., J Neuroinflammation. 2005; 2:23; Solomon B., Curr Alzheimer Res. 2004; 1:149; Igor Klyubin, et al., Nat Med. 2005;11:556-61; Arancio O, et al., EMBO Journal (2004) 1-10; Bornemann KD, et al., Am J Pathol. 2001;158:63; Deane R, et al., Nat Med. 2003;9:907-13; 및 Eliezer Masliah, et al., Neuron. 2005;46:857].

[0342] 본 발명의 DVD-Ig 분자는 알츠하이머 병과 같은 만성 신경변성 병에 관여된 하나 이상의 표적에 결합할 수 있다. 이러한 표적은 AD 병태생리학, 예를 들면, AGE (S100 A, 암포테린), 염증촉진성 사이토킨(예를 들면, IL-1), 케모카인(예를 들면, MCP 1), 신경 재생을 억제하는 분자(예를 들면, Nogo, RGM A), 신경돌기 성장을 향상시키는 분자(뉴트로트로핀)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. DVD-Ig 분자의 효능은 아밀로이드 전구체 단백질 또는 RACE를 과-발현하고 알츠하이머병-유사 증후군이 진전된 유전자삽입 마우스와 같은 전-임상 동물 모델에서 확인할 수 있다. 또한, DVD-Ig 분자를 작제하여 동물 모델에서 효능에 대해 시험할 수 있으며 가장 우수한 치료학적 DVD-Ig를 사람 환자를 시험하기 위해 선택할 수 있다. DVD-Ig 분자는 또한 파킨슨병과 같은 다른 신경변성 병의 치료에 사용될 수 있다. 알파-시뉴클레인(Synuclein)은 파킨슨 병리학에 관여한다. 알파-시뉴클레인 및, TNF, IL-1, MCP-I와 같은 염증성 매개인자를 표적화할 수 있는 DVD-Ig는 파킨슨병에 대해 효과적인 치료요법을 입증할 수 있으며 본 발명에서 고려된다.

7.2 신경 변성 및 척수 손상

[0343] 병리학적 메카니즘의 지식에 있어서의 증가에도 불구하고, 척수 손상(SCI)은 여전히 파괴적인 상태이며 고도의 의학적 필요성을 특징으로 하는 의학적 정후를 나타낸다. 대부분의 척수 손상은 타박 또는 압박 손상이며, 주요 손상은, 대개 초기 손상을 악화시키는 2차 손상 메카니즘(염증 매개인자, 예를 들면, 사이토킨 및 케모킨) 이후에 수반되어 병변 부위의 상당한 확장, 종종 10배 이상의 확장을 초래한다. SCI에 있어서 이들 주요 및 2차 메카니즘은 다른 수단, 예를 들면, 뇌졸중에 의해 유발된 뇌 손상에서의 것과 매우 유사하다. 만족할만한 치료는 존재하지 않으며, 고 투여량의 메틸프레드니솔론(MP)의 구강내 주사만이 손상 후 8시간의 짧은 허용시간 내에 단지 사용되는 치료요법이다. 그러나, 당해 치료는 어떠한 상당한 기능적 회복도 유발하지 않으면서 2차 손상을 방지하는 것에만 의도된다. 이는 후속적인 감염 및 심각한 조직병리학적 근육 변화를 가진 면역억제와 유사한 명백한 효능의 결여 및 심각한 부작용에 대해 매우 중요하다. 내인성 재생능을 자극하지만 치료 원리 및 약물 후보물을 약속하는 어떠한 다른 약물, 생물제 또는 소 분자도 최근 면년 동안 SCI의 동물 모델에서 효능이 입증되어 있지 않다. 대부분의 경우에, 사람 SCI에 있어서 기능적 회복의 결여는 병변 부위에서, 반흔 조직내에서, 수초내에서 및 손상-관련 세포 상에서 신경돌기 성장을 억제하는 인자들에 의해 유발된다. 이러한 인자는 수초-관련 단백질 NogoA, OMgp 및 MAG, RGM A, 반흔-관련 CSPG(콘드리오틴 설레이트 프로테오글리칸) 및 반응성 별아교세포(일부 세마포린 및 에피린)이다. 그러나, 병변 부위에서 성장 억제 분자 뿐 아니라, 뉴트로트로핀, 라미닌, L1 및 기타와 같은 신경돌기 성장 자극 인자도 발견되지 않는다. 신경돌기 성장 억제 및 성장 촉진 분자 전체는, 억제성 영향의 감소가 성장 억제로부터 성장 촉진으로의 균형을 이동시킬 수 있으므로, NogoA 또는 RGM A와 같은 단일 인자를 차단하는 것이 설치류 SCI 모델에서 상당한 기능적 회복을 초래함을 설명 할 수 있다. 그러나, 단일 신경돌기 증식 억제 분자를 차단하여 판측된 회복은 완전하지 않다. 2개의 신경돌기 증식 억제 분자, 예를 들면, Nogo 및 RGM A를 차단하거나, 신경돌기 증식 억제 분자를 차단하고 신경돌기 증식 양상 분자 예를 들면, Nogo 및 호중구의 기능을 향상시키거나, 또는 신경돌기 증식 억제 분자, 예를 들면, Nogo 및 염증촉진성 분자 예를 들면, TNF를 차단하는 것이 바람직할 수 있다[참조: McGee AW, et al., Trends Neurosci. 2003; 26:193; Marco Domeniconi, et al., J Neurol Sci. 2005;233:43; Milan Makwanal, et al., FEBS J. 2005;272:2628; Barry J. Dickson, Science. 2002;298:1959; Felicia Yu Hsuan Teng, et al., J Neurosci Res. 2005;79:273; Tara Karnezis, et al., Nature Neuroscience 2004; 7, 736; Gang Xu, et al.,

J. Neurochem. 2004; 91; 1018].

[0345]

하나의 양상에서, NgR 및 RGM A; NogoA 및 RGM A; MAG 및 RGM A; OMgp 및 RGM A; RGM A 및 RGM B; CSPG 및 RGM A; 아그레칸, 미드킨, 뉴로칸, 베르시칸, 포스파칸, Te38 및 TNF- α ; 수지상 세포 및 액손 성장(sprouting)을 촉진하는 항체와 결합된 A β 글로불로마-특이적인 항체와 같은 표적 쌍에 결합할 수 있는 DVD-Ig가 제공된다. 수지상 세포 병리학은 AD의 매우 조기의 신호이며 NOGO A가 수지상 세포 성장을 제한한다는 것은 공지되어 있다. 이러한 유형의 ab를 임의의 SCI-후보물(수초-단백질) Ab와 결합시킬 수 있다. 다른 DVD-Ig 표적은 NgR-p75, NgR-Troy, NgR-Nogo66 (Nogo), NgR-Lingo, Lingo-Troy, Lingo-p75, MAG 또는 Ompg의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 또한, 표적은 또한 신경돌기의 억제에 관여된 임의의 매개인자, 가용성 또는 세포 표면, 예를 들면, Nogo, Ompg, MAG, RGM A, 세마포린, 에프린, 가용성 A-b, 염증촉진성 사이토킨(예를 들면, IL-1), 케모킨(예를 들면, MIP 1a), 신경 재생을 억제하는 분자를 포함한다. 항-nogo/항-RGM A 또는 유사한 DVD-Ig 분자의 효능을 척수 손상의 전-임상 동물 모델에서 확인할 수 있다. 또한, 이들 DVD-Ig 분자를 자체하여 동물 모델에서 효능에 대해 시험할 수 있으며, 가장 우수한 치료학적 DVD-Ig를 사람 환자에서 선택할 수 있다. 또한, 단일 수용체, 예를 들면, 3개의 리간드 Nogo, Ompg, 및 MAG에 결합하는 Nogo 수용체, A-b 및 S100 A에 결합하는 RACE 상에서 2개의 명백한 리간드 결합 부위를 표적화하는 DVD-Ig 분자를 자체할 수 있다. 또한, 신경돌기 증식 억제제, 예를 들면, nogo 및 nogo 수용체는 또한 다발경화증과 같은 면역학적 질병에서 신경 재생을 방지하는 역할을 한다. nogo-nogo 수용체 상호작용의 억제는 다발경화증의 동물 모델에서 회복을 향상시키는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 하나의 면역 매개인자, 예를 들면, IL-12와 같은 사이토킨 및 신경돌기 증식 억제제 분자, 예를 들면, nogo 또는 RGM의 기능을 차단할 수 있는 DVD-Ig 분자는 면역 또는 신경돌기 증식 억제제 분자 단독을 차단하는 것보다 더 빠르고 우수한 효능을 제공할 수 있다.

[0346]

8. 종양학적 장애

[0347]

모노클로날 항체 치료요법은 암에 대해 중요한 치료학적 양식으로 대두되었다(참조: von Mehren M, et al 2003 Monoclonal antibody therapy for cancer. Annu Rev Med.;54:343-69). 항체는 아폽토시스, 재지시된 세포독성을 유도하거나, 리간드-수용체 상호작용을 방해하거나, 신생물 표현형에 중요한 단백질의 발현을 방지함으로써 항종양 효과를 발휘할 수 있다. 또한, 항체는 종양-관련 혈관화의 형성과 같은 활력 구조를 교란시키는, 종양 미세환경의 성분들을 표적화할 수 있다. 항체는 또한, 이의 리간드가 내피 성장 인자 수용체와 같은 성장 인자인 표적 수용체일 수 있다. 따라서, 항체는 표적화된 종양 세포에 대한 결합으로부터 세포 성장을 자극하는 천연 리간드를 억제한다. 달리는, 항체는 항-이디오타입 네트워크, 보체-매개된 세포독성, 또는 항체-의존성 세포 세포독성(ADCC)을 유도할 수 있다. 2개의 별개의 종양 매개인자를 표적화하는 이중-특이적인 항체의 사용은 모노-특이적인 치료요법과 비교하여 추가의 이점을 제공할 것이다. 종양학적 질병을 치료하기 위한 다음의 표적의 쌍에 결합할 수 있는 DVD-Ig가 또한 고려된다: IGF1 및 IGF2; IGF1/2 및 HER-2; VEGFR 및 EGFR; CD20 및 CD3; CD138 및 CD20; CD38 및 CD20; CD38 및 CD138; CD40 및 CD20; CD138 및 CD40; CD38 및 CD40; CD-20 및 CD-19; CD-20 및 EGFR; CD-20 및 CD-80; CD-20 및 CD-22; CD-3 및 HER-2; CD-3 및 CD-19; EGFR 및 HER-2; EGFR 및 CD-3; EGFR 및 IGF1,2; EGFR 및 IGF1R; EGFR 및 RON; EGFR 및 HGF; EGFR 및 c-MET; HER-2 및 IGF 1,2; HER-2 및 IGF1R; RON 및 HGF; VEGF 및 EGFR; VEGF 및 HER-2; VEGF 및 CD-20; VEGF 및 IGF 1,2; VEGF 및 DLL4; VEGF 및 HGF; VEGF 및 RON; VEGF 및 NRP1; CD20 및 CD3; VEGF 및 PLGF; DLL4 및 PLGF; ErbB3 및 EGFR; HGF 및 ErbB3, HER-2 및 ErbB3; c-Met 및 ErbB3; HER-2 및 HER-2; 및 TNF 및 SOST.

[0348]

다른 양태에서, 본 발명의 DVD는 VEGF 및 포스파티딜세린; VEGF 및 ErbB3; VEGF 및 PLGF; VEGF 및 ROBO4; VEGF 및 BSG2; VEGF 및 CDP1; VEGF 및 ANPEP; VEGF 및 c-MET; HER-2 및 ERB3; HER-2 및 BSG2; HER-2 및 CDP1; HER-2 및 ANPEP; EGFR 및 CD64; EGFR 및 BSG2; EGFR 및 CDP1; EGFR 및 ANPEP; IGF1R 및 PDGFR; IGF1R 및 VEGF; IGF1R 및 CD20; CD20 및 CD74; CD20 및 CD30; CD20 및 DR4; CD20 및 VEGFR2; CD20 및 CD52; CD20 및 CD4; HGF 및 c-MET; HGF 및 NRP1; HGF 및 포스파티딜세린; ErbB3 및 IGF1R; ErbB3 및 IGF1,2; c-Met 및 Her-2; c-Met 및 NRP1; c-Met 및 IGF1R; IGF1,2 및 PDGFR; IGF1,2 및 CD20; IGF1,2 및 IGF1R; IGF2 및 EGFR; IGF2 및 HER2; IGF2 및 CD20; IGF2 및 VEGF; IGF2 및 IGF1R; IGF1 및 IGF2; PDGFRa 및 VEGFR2; PDGFRa 및 PLGF; PDGFRa 및 VEGF; PDGFRa 및 c-Met; PDGFRa 및 EGFR; PDGFRb 및 VEGFR2; PDGFRb 및 c-Met; PDGFRb 및 EGFR; RON 및 c-Met; RON 및 MTSP1; RON 및 MSP; RON 및 CDP1; VGF1 및 PLGF; VGF1 및 RON; VGF1 및 EGFR; VEGFR2 및 PLGF; VEGFR2 및 NRP1; VEGFR2 및 RON; VEGFR2 및 DLL4; VEGFR2 및 EGFR; VEGFR2 및 ROBO4; VEGFR2 및 CD55; LPA 및 S1P; EPHB2 및 RON; CTLA4 및 VEGF; CD3 및 EPCAM; CD40 및 IL6; CD40 및 IGF; CD40 및 CD56; CD40 및 CD70; CD40 및 VEGFR1; CD40 및 DR5; CD40 및 DR4; CD40 및 APRIL; CD40 및 BCMA; CD40 및 RANKL; CD28 및 MAPG; CD80 및 CD40; CD80 및 CD30; CD80 및 CD33; CD80 및 CD74; CD80 및 CD2; CD80 및 CD3;

CD80 및 CD19; CD80 및 CD4; CD80 및 CD52; CD80 및 VEGF; CD80 및 DR5; CD80 및 VEGFR2; CD22 및 CD20; CD22 및 CD80; CD22 및 CD40; CD22 및 CD23; CD22 및 CD33; CD22 및 CD74; CD22 및 CD19; CD22 및 DR5; CD22 및 DR4; CD22 및 VEGF; CD22 및 CD52; CD30 및 CD20; CD30 및 CD22; CD30 및 CD23; CD30 및 CD40; CD30 및 VEGF; CD30 및 CD74; CD30 및 CD19; CD30 및 DR5; CD30 및 DR4; CD30 및 VEGFR2; CD30 및 CD52; CD30 및 CD4; CD138 및 RANKL; CD33 및 FTL3; CD33 및 VEGF; CD33 및 VEGFR2; CD33 및 CD44; CD33 및 DR4; CD33 및 DR5; DR4 및 CD137; DR4 및 IGF1,2; DR4 및 IGF1R; DR4 및 DR5; DR5 및 CD40; DR5 및 CD137; DR5 및 CD20; DR5 및 EGFR; DR5 및 IGF1,2; DR5 및 IGFR, DR5 및 HER-2, EGFR 및 DLL4; 및 TNF 및 SOST에 결합할 수 있다. 다른 표적 조합은 EGF/erb-2/erb-3 계열의 하나 이상의 구성원을 포함한다. DVD Ig가 결합할 수 있는 종양학적 병에 관여된 다른 표적(하나 이상)은 다음으로 이루어진 것들로부터 선택된 것들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다: CD52, CD20, CD19, CD3, CD4, CD8, BMP6, IL12A, IL1A, IL1B, IL2, IL24, INHA, TNF, TNFSF10, BMP6, EGF, FGF1, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF2, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, GRP, IGF1, IGF2, IL12A, IL1A, IL1B, IL2, INHA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, VEGF, CDK2, FGF10, FGF18, FGF2, FGF4, FGF7, IGF1R, IL2, BCL2, CD164, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, CDKN3, GNRH1, IGFBP6, IL1A, IL1B, ODZ1, PAWR, PLG, TGFB1I1, AR, BRCA1, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK9, E2F1, EGFR, ENO1, ERBB2, ESR1, ESR2, IGFBP3, IGFBP6, IL2, INSL4, MYC, NOX5, NR6A1, PAP, PCNA, PRKCQ, PRKD1, PRL, TP53, FGF22, FGF23, FGF9, IGFBP3, IL2, INHA, KLK6, TP53, CHGB, GNRH1, IGF1, IGF2, INHA, INSL3, INSL4, PRL, KLK6, SHBG, NR1D1, NR1H3, NR1I3, NR2F6, NR4A3, ESR1, ESR2, NR0B1, NR0B2, NR1D2, NR1H2, NR1H4, NR1I2, NR2C1, NR2C2, NR2E1, NR2E3, NR2F1, NR2F2, NR3C1, NR3C2, NR4A1, NR4A2, NR5A1, NR5A2, NR6A1, PGR, RARB, FGF1, FGF2, FGF6, KLK3, KRT1, APOC1, BRCA1, CHGA, CHGB, CLU, COL1A1, COL6A1, EGF, ERBB2, ERK8, FGF1, FGF10, FGF11, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF2, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, GNRH1, IGF1, IGF2, IGFBP3, IGFBP6, IL12A, IL1A, IL1B, IL2, IL24, INHA, INSL3, INSL4, KLK10, KLK12, KLK13, KLK14, KLK15, KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK9, MMP2, MMP9, MSMB, NTN4, ODZ1, PAP, PLAU, PRL, PSAP, SERPINA3, SHBG, TGFA, TIMP3, CD44, CDH1, CDH10, CDH19, CDH20, CDH7, CDH9, CDH1, CDH10, CDH13, CDH18, CDH19, CDH20, CDH7, CDH8, CDH9, ROBO2, CD44, ILK, ITGA1, APC, CD164, COL6A1, MTSS1, PAP, TGFB1I1, AGR2, AIG1, AKAP1, AKAP2, CANT1, CAV1, CDH12, CLDN3, CLN3, CYB5, CYC1, DAB2IP, DES, DNCL1, ELAC2, ENO2, ENO3, FASN, FLJ12584, FLJ25530, GAGEB1, GAGEC1, GGT1, GSTP1, HIP1, HUMCYT2A, IL29, K6HF, KAI1, KRT2A, MIB1, PART1, PATE, PCA3, PIAS2, PIK3CG, PPID, PR1, PSCA, SLC2A2, SLC33A1, SLC43A1, STEAP, STEAP2, TPM1, TPM2, TRPC6, ANGPT1, ANGPT2, ANPEP, ECGF1, EREG, FGF1, FGF2, FIGF, FLT1, JAG1, KDR, LAMA5, NRP1, NRP2, PGF, PLXDC1, STAB1, VEGF, VEGFC, ANGPTL3, BAI1, COL4A3, IL8, LAMA5, NRP1, NRP2, STAB1, ANGPTL4, PECAM1, PF4, PROK2, SERPINF1, TNF α IP2, CCL11, CCL2, CXCL1, CXCL10, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL9, IFNA1, IFNB1, IFNG, IL1B, IL6, MDK, EDG1, EFNA1, EFNA3, EFNB2, EGF, EPHB4, FGFR3, HGF, IGF1, ITGB3, PDGFA, TEK, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFBR1, CCL2, CDH5, COL18A1, EDG1, ENG, ITGAV, ITGB3, THBS1, THBS2, BAD, BAG1, BCL2, CCNA1, CCNA2, CCND1, CCNE1, CCNE2, CDH1(E-카드헤린), CDKN1B(p27Kip1), CDKN2A(p16INK4a), COL6A1, CTNNB1 (b-카테닌), CTSB(카텝신 B), ERBB2(Her-2), ESR1, ESR2, F3(TF), FOSL1(FRA-1), GATA3, GSN(겔솔린), IGFBP2, IL2RA, IL6, IL6R, IL6ST(당단백질 130), ITGA6(a6 인테그린), JUN, KLK5, KRT19, MAP2K7 (c-Jun), MKI67 (Ki-67), NGFB (NGF), NGFR, NME1 (NM23A), PGR, PLAU (uPA), PTEN, SERPINB5 (maspin), SERPINE1 (PAI-1), TGFA, THBS1(트롬보스포딘-1), TIE(Tie-1), TNFRSF6(Fas), TNFSF6(FasL), TOP2A(토포이소머라제 Iia), TP53, AZGP1(아연-a-당단백질), BPAG1(플렉틴), CDKN1A (p21Wap1/Cip1), CLDN7(클라우딘-7), CLU(클러스 테린), ERBB2(Her-2), FGF1, FLRT1 (피브로넥틴), GABRP(GABAa), GNAS1, ID2, ITGA6(a6 인테그린), ITGB4 (b4 인테그린), KLF5(GC Box BP), KRT19(케라틴 19), KRTHB6(모발-특이적인 제II형 케라틴), MACMARCKS, MT3(메탈로티오네린-III), MUC1(뮤신), PTGS2 (COX-2), RAC2 (p21Rac2), S100A2, SCGB1D2(리포필린 B), SCGB2A1(맘마글로빈 2), SCGB2A2(맘마글로빈 1), SPRR1B(Spr1), THBS1, THBS2, THBS4, 및 TNF α IP2(B94), RON, c-Met, CD64, DLL4, PLGF, CTLA4, 포스파티딜세린, ROBO4, CD80, CD22, CD40, CD23, CD28, CD80, CD55, CD38, CD70, CD74, CD30, CD138, CD56, CD33, CD2, CD137, DR4, DR5, RANKL, VEGFR2, PDGFR, VEGFR1, MTSP1, MSP, EPHB2, EPHA1, EPHA2, EpCAM, PGE2, NKG2D, LPA, SIP, APRIL, BCMA, MAPG, FLT3, PDGFR알파, PDGFR베타, ROR1, PSMA, PSCA, SCD1, 및 CD59.

IV. 약제학적 조성물

본 발명은 또한 본 발명의 결합 단백질 및 약제학적으로 허용되는 단체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 결합 단백질을 포함하는 약제학적 조성물은 장애를 진단, 검출 또는 모니터링하거나, 장

[0349]

IV. 약제학적 조성물

본 발명은 또한 본 발명의 결합 단백질 및 약제학적으로 허용되는 단체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 결합 단백질을 포함하는 약제학적 조성물은 장애를 진단, 검출 또는 모니터링하거나, 장

[0350]

애 또는 하나 이상의 이의 증상을 예방, 치료, 조절 또는 완화시키고/시키거나 조사하는데 있어 사용되지만 이에 한정되지 않는다. 구체적인 양태에서, 이러한 조성물은 본 발명의 하나 이상의 결합 단백질을 포함한다. 다른 양태에서, 약제학적 조성물을 본 발명의 하나 이상의 결합 단백질 및, 장애를 치료하기 위한 본 발명의 결합 단백질 이외에 하나 이상의 예방학적 또는 치료학적 제제를 포함한다. 하나의 양태에서, 예방학적 또는 치료학적 제제는 장애 또는 하나 이상의 이의 증상을 예방, 치료, 조절 또는 완화시키는데 유용하거나, 사용되거나, 현재 사용되는 것으로 공지되어 있다. 이들 양태에 따라서, 조성물은 또한 담체, 희석제 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다.

[0351] 본 발명의 결합 단백질은 대상체에게 투여하기에 적합한 약제학적 조성물내로 혼입될 수 있다. 전형적으로, 약제학적 조성물은 본 발명의 결합 단백질 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본원에 사용된 "약제학적으로 허용되는 담체"는 생리학적으로 적합한 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 피복제, 항세균제, 항진균제, 등장성 제제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 약제학적으로 허용되는 담체의 예는 하나 이상의 물, 염수, 포스페이트 완충된 염수, 텍스트로즈, 글리세롤, 에탄올 등 및 이의 배합물을 포함한다. 일부 양태에서, 등장성 제제, 예를 들면, 당, 만니톨, 소르비톨과 같은 다가알코올, 또는 염화나트륨이 조성물 속에 포함된다. 약제학적으로 허용되는 담체는 또한 항체 또는 항체 일부의 저장수명 또는 효능을 향상시키는, 습윤제, 유화제, 방부제, 또는 완충제와 같은 소량의 보조물질을 포함할 수 있다.

[0352] 각종 전달 시스템이 공지되어 있으며 본 발명의 하나 이상의 항체 또는 본 발명의 하나 이상의 항체와 장애 또는 하나 이상의 이의 증상을 예방하거나, 조절하거나, 치료하거나 완화하는데 유용한 예방제 또는 치료제의 배합물, 예를 들면, 리포좀내 캡슐화, 미세캡슐, 항체 또는 항체 단편을 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체-매개된 세포내이입[참조: 예를 들면, Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)], 레트로바이러스 또는 기타 벡터의 일부로서 핵산의 작제물 등을 투여하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 예방제 또는 치료제의 투여방법은 비경구 투여(예를 들면, 피내, 근육내, 복강내, 정맥내 및 피하), 경막외 투여, 종양내 투여 및 점막내 투여(예를 들면, 비강내 및 경구 경로)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 예를 들면, 흡입기 또는 분무기, 및 분무화제를 사용한 제형의 사용에 의한 폐 투여를 사용할 수 있다(참조: 예를 들면, 미국 특허 제6,019,968호; 제5,985,320호; 제5,985,309호; 제5,934,272호; 제5,874,064호; 제5,855,913호; 제5,290,540호; 및 제4,880,078호; 및 PCT 공보 WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; 및 WO 99/66903, 이들 각각은 이의 전문이 참조로 본원에 인용된다). 하나의 양태에서, 본 발명의 결합 단백질, 병용 치료요법 또는 본 발명의 조성물은 Alkermes AIR®

폐 약물 전달 기술[제조원: 알케메스, 인코포레이티드(Alkermes, Inc.), 메사추세츠주 캠브릿지 소재]을 사용하여 투여된다. 특정 양태에서, 본 발명의 예방제 또는 치료제는 근육내, 정맥내, 종양내, 경구, 비강내, 폐 또는 피하 투여된다. 예방제 또는 치료제는 임의의 편리한 경로, 예를 들면, 주입 또는 구강내 주사에 의해, 내피 또는 점막피부 내면(예를 들면, 경구 점막, 직장 및 장내 점막 등)에 의해 투여될 수 있으며 다른 생물학적으로 활성인 제제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신계 또는 국소일 수 있다.

[0353] 하나의 양태에서, 항체-커플링된 탄소 나노튜브(CNT)의 시험관내 종양 세포에 대한 특이적인 결합에 이어 근적 외선(near-infrared: NIR) 광을 사용한 고 특이적인 절제를 사용하여 종양 세포를 표적화할 수 있다. 예를 들면, 바이오틱닐화된 극성 지질을 사용하여 하나 이상의 종양 항원(예를 들면, CD22)에 대해 지시된 1개 또는 2개의 상이한 뉴트랄라이트 아비딘-유도체화된 DVD-Ig에 부착된 안정하고, 생적합성이며, 비세포독성인 CNT 분산제를 제조할 수 있다[참조: Chakravarty, P. et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:8697-8702].

[0354] 특정 양태에서, 본 발명의 예방제 또는 치료제는 치료가 요구되는 부위에 국소 투여하는 것이 바람직할 수 있으며; 이는 예를 들면, 국소 주입에 의해, 주사에 의해, 또는 이식물의 수단에 의해 달성할 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 상기 이식물은 시알라스틱 막, 중합체, 섬유성 매트릭스(예를 들면, Tissuel®

) 또는 콜라겐 매트릭스와 같은 막 및 매트릭스를 포함하는 다공성 또는 비-다공성 물질이다. 하나의 양태에서, 유효량의 본 발명의 길항제의 하나 이상의 항체는 장애 또는 이의 증상을 예방, 치료, 조절 및/또는 완화시키기 위해 대상체에게 영향받은 부위로 국소 투여된다. 다른 양태에서, 본 발명의 하나 이상의 항체의 유효량은 장애 또는 이의 하나 이상의 증상을 예방, 치료, 조절 및/또는 완화시키기 위해 대상체에게 본 발명의 결합 화합물 외에 하나 이상의 치료제(예를 들면, 하나 이상의 예방제 또는 치료제)의 유효량과 함께 영향받은 부위에 국소 투여된다.

[0355] 다른 양태에서, 예방제 또는 치료제는 제어 방출 시스템 또는 서방성 시스템으로 전달될 수 있다. 하나의 양태

에서, 펌프를 사용하여 제어 또는 서방성 방출을 달성할 수 있다[참조: Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574]. 다른 양태에서, 중합체 물질을 사용하여 본 발명의 치료제의 제어 또는 서방성 방출을 달성할 수 있다[참조: 예를 들면, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Press., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; 또한 Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105]; 미국 특허 제5,679,377호; 미국 특허 제5, 916,597호; 미국 특허 제5,912,015호; 미국 특허 제5,989,463호; 미국 특허 제5,128,326호; PCT 공보 WO 99/15154; 및 PCT 공보 WO 99/20253 참조]. 서방성 제형에 사용된 중합체의 예는 폴리(2-하이드록시에틸 메타크릴레이트), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(아크릴산), 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트), 폴리(메타크릴산), 폴리글리콜라이드(PLG), 폴리안하이드라이드, 폴리(N-비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알코올), 폴리아크릴아미드, 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리락타이드(PLA), 폴리(락타이드-코-글리콜라이드)(PLGA), 및 폴리오르토에스테르를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 하나의 양태에서, 서방성 제형에 사용된 중합체는 불활성의, 누출가능한 분순물이 없고, 저장시 안정하며, 멸균되어 있고, 생분해성이다. 또 다른 양태에서, 제어 또는 서방성 방출 시스템은 예방 또는 치료 표적에 근접하여 위치함으로써 전신계 투여의 분획만을 요구한다[참조: 예를 들면, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)].

[0356]

제어 방출 시스템은 문헌[참조: Langer (1990, Science 249:1527-1533)]에서 참조로 논의된다. 당해 분야의 숙련가에게 공지된 임의의 기술을 사용하여 본 발명의 하나 이상의 치료제를 포함하는 서방성 제형을 생산할 수 있다[참조: 예를 들면, 미국 특허 제4,526, 938호, PCT 공보 WO 91/05548, PCT 공보 WO 96/20698, Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long- Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, 및 Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized monoclonal antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759- 760, 이들 각각은, 이들의 전문이 본원에 참조로 인용되어 있다].

[0357]

구체적인 양태에서, 본 발명의 조성물이 예방제 또는 치료제를 암호화하는 핵산인 경우, 핵산은 이를 적절한 핵산 발현 벡터의 일부로서 삭제하고 이를 투여함으로써 이것이 예를 들면, 레트로바이러스 벡터의 사용에 의해 (참조: 미국 특허 제4,980,286호), 또는 직접적인 주사에 의해, 또는 미세입자 충격의 사용에 의해[예를 들면, 유전자 총(gene gun); 제조원: 바이오리스틱(Biolistic), 듀퐁(Dupont)], 지질 또는 세포-표면 수용체 또는 형질감염제를 사용한 피복에 의해 또는 이를 핵내로 도입되는 것으로 공지된 호메오박스-유사(homeobox-like) 웨타이드에 연결하여 투여함에 의해 세포내로 되도록 함으로써 생체내에서 투여되어 이의 암호화된 예방 또는 치료제의 발현을 촉진할 수 있다(참조: 예를 들면, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868). 달리는, 핵산은 세포내로 도입되고 상동 재조합에 의해 발현용 숙주 세포 DNA내에서 혼입될 수 있다.

[0358]

본 발명의 약제학적 조성물은 이의 의도된 투여 경로에 적합하도록 제형화된다. 투여 경로의 예는 비경구, 예를 들면, 정맥내, 피내, 피하, 경구, 비강내(예를 들면, 흡입), 경피(예를 들면, 국소), 경점막 및 직장 투여를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특정 양태에서, 조성물은 사람에게 정맥내, 피하, 근육내, 경구, 비강내 또는 국소 투여에 적합한 약제학적 조성물로서 통상적인 과정에 따라 제형화된다. 전형적으로, 정맥내 투여용 조성물은 멸균 등장성 수성 완충액 중 용액이다. 필요에 따라, 조성물은 또한 주사 부위에서 통증을 완화시키는 리그노카인과 같은 국소 마취제 및 안정화제를 포함할 수 있다.

[0359]

본 발명의 조성물이 국소 투여되는 경우, 조성물은 연고제, 크림제, 경피 패치제, 로션제, 젤제, 삼푸제, 분무제, 에어로졸제, 액제, 유제의 형태 또는 당해 분야의 숙련가에게 익히 공지된 다른 형태로 제형화될 수 있다[참조: 예를 들면, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)]. 하나의 양태에서, 분무가능하지 않은 국소 용량형의 경우, 국소 적용에 적합하고 물보다 높은 역학적 점도를 가진 담체 또는 하나 이상의 부형제를 포함하는 점성 내지 반-고체 또는 고체 형을 사용하였다. 적합한 제형은 경우에 따라 예를 들면, 삼투압과 같은 각종 특성에 영향을 미치기 위한 보조제(예를 들면, 방부제, 안정화제, 습윤제, 완충제 또는 염)와 혼합되거나 멸균된, 액제, 혼탁제, 유제, 크림제, 연고제, 산제, 연고(salve) 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 다른 적합한 국소 용량

형은 분무가능한 에어로졸 제제를 포함하며, 여기서, 하나의 양태에서, 활성 성분은 고체 또는 액체 불활성 담체와 함께 가압된 휘발물(예를 들면, 프레온과 같은 가스성 분사제)와의 혼합물로 또는 스퀴즈 병(squeeze bottle)에 포장된다. 습윤제 또는 보습제를 또한 경우에 따라, 약제학적 조성물 및 용량형에 가할 수 있다. 이러한 추가의 성분의 예는 당해 분야에 익히 공지되어 있다.

[0360] 본 발명의 방법이 조성물의 비강내 투여를 포함하는 경우, 조성물은 에어로졸형, 분무, 연무 또는 점적 형태로 제형화될 수 있다. 특히, 본 발명에 따라 사용하기 위한 예방제 또는 치료제는 편리하게는 가압된 팩 또는 분무기로부터 적합한 분사제(예를 들면, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 가스)의 사용으로 에어로졸 분무 표시의 형태로 편리하게 전달될 수 있다. 가압된 에어로졸의 경우에, 용량 단위는 벨프를 제공하여 계량된 양을 전달함으로써 측정할 수 있다. 흡입기 또는 취입기에서 사용하기 위한 카트리지(예를 들면, 젤라틴으로 구성됨)를 화합물 및, 락토즈 또는 전분과 같은 적합한 분말 기재의 분말 혼합물을 함유하도록 제형화할 수 있다.

[0361] 본 발명의 방법이 경구 투여를 포함하는 경우, 조성물은 정제, 카害羞, 젤캡(gelgap), 액제, 혼탁제 등의 형태로 경구 제형화될 수 있다. 정제 또는 카害羞은 결합제(예를 들면, 예비젤라틴화된 옥수수 전분, 폴리비닐파리돈, 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로즈); 충전제(예를 들면, 락토즈, 미세결정성 셀룰로즈 또는 인산수소칼슘); 윤활제(예를 들면, 스테아르산마그네슘, 활석 또는 실리카); 붕해제(예를 들면, 감자 전분 또는 나트륨 전분 글리콜레이트); 또는 습윤제(예를 들면, 나트륨 라우릴 설페이트)와 같은 약제학적으로 허용되는 부형제와 함께 통상적인 수단으로 제조할 수 있다. 정제는 당해 분야에 공지된 방법으로 피복할 수 있다. 경구 투여용 액체 제제는 액제, 시럽제 또는 혼탁제의 형태를 취할 수 있으나, 이에 제한되지 않거나, 이들은 사용전 물 또는 다른 적합한 비히클로 구성하기 위한 건조 생성물로서 제공될 수 있다. 이러한 액체 제제는 혼탁화제(예를 들면, 소르비톨 시럽, 셀룰로즈 유도체 또는 수소화된 식용 지방); 유화제(예를 들면, 레시틴 또는 아카시아); 비-수성 비히클(예를 들면, 아몬드 오일, 오일성 에스테르, 에틸 알코올 또는 분획화된 야채 오일); 및 방부제(예를 들면, 메틸 또는 프로필-p-하이드록시벤조에이트 또는 소르브산)과 같은 약제학적으로 허용되는 첨가제와 함께 편리한 수단으로 제조할 수 있다. 당해 제제는 또한 적절하게는 완충제 염, 풍미제, 착색제 및 감미제를 함유할 수 있다. 경구 투여용 제제는 예방제 또는 치료제(들)의 서방출, 제어 방출 또는 지연 방출을 위해 적합하게 제형화될 수 있다.

[0362] 본 발명의 방법은 예를 들면, 흡입기 또는 분무기를 사용하여, 에어로졸화제와 함께 제형화된 조성물의 폐 투여를 포함할 수 있다[참조: 이들 각각의 전문이 본원에 참조로 인용된, 미국 특허 제6,019,968호; 제5,985,320호; 제5,985,309호; 제5,934,272호; 제5,874,064호; 제5,855,913호; 제5,290,540호; 및 제4,880,078호; 및 PCT 공보 WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; 및 WO 99/66903]. 특정 양태에서, 본 발명의 결합 단백질, 병용 치료요법 및/또는 본 발명의 조성물은 Alkermes AIR®

폐 약물 전달 기술(제조원: 알케르메스, 인코포레이티드, 메사추세츠주 캠브릿지 소재)을 사용하여 투여된다.

[0363] 본 발명의 방법은 주사에 의해(예를 들면, 구강내 주사 또는 연속 주입에 의해) 비경구 투여하기 위해 제형화된 조성물의 투여를 포함할 수 있다. 주사용 제형은 첨가된 방부제와 함께 단위 용량형(예를 들면, 앰플 또는 다중투여량 용기)으로 제공될 수 있다. 조성물은 오일성 또는 수성 비히클중 혼탁제, 액제 또는 유제의 형태를 취할 수 있으며, 혼탁화제, 안정화제 및/또는 분산화제와 같은 제형화제를 함유할 수 있다. 달리는, 활성 성분은 사용 전에 적합한 비히클(예를 들면, 멸균 발열원이 없는 물)과 함께 구성하기 위한 분말 형태일 수 있다.

[0364] 본 발명의 방법은 데포트(depot) 제제로서 제형화된 조성물의 투여를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 장기간 작용하는 제형은 이식(예를 들면, 피하 또는 근육내) 또는 근육내 주사에 의해 투여할 수 있다. 따라서, 예를 들면, 조성물은 적합한 중합체성 또는 소수성 물질(예를 들면, 허용되는 오일 중 유제) 또는 이온 교환 수지와 함께, 또는 난용성 유도체(예를 들면, 난용성 염)으로서 제형화할 수 있다.

[0365] 본 발명의 방법은 중성 또는 염 형태로 제형화된 조성물의 투여를 포함한다. 약제학적으로 허용되는 염은 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 등으로부터 기원한 것과 같은 음이온과 함께 형성된 것들 및 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 철, 수산화물, 이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아민, 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 기원한 것들과 같은 양이온과 함께 형성된 것들을 포함한다.

[0366] 일반적으로, 조성물의 성분들은 활성제의 양을 나타내는 사세(sachette) 또는 앰플과 같은 밀봉 용기 속에, 예를 들면, 무수 동결건조된 분말 또는 물이 없는 농축물로서 단위 용량형 속에 별개로 공급되거나 함께 혼합된다. 투여 유형이 주입인 경우, 조성물은 멸균 약제학적 등급의 물 또는 염수를 함유하는 주입 병을 사용

하여 분배시킬 수 있다. 투여 유형이 주사에 의한 경우, 주사용 멸균수 또는 염수의 앰플을 제공하여 성분들이 투여 전에 혼합될 수 있도록 할 수 있다.

[0367] 특히, 본 발명은 또한 본 발명의 예방제, 치료제, 또는 약제학적 조성물 중 하나 이상이 제제의 양을 나타내는 사세 또는 앰플과 같은 밀봉 용기 속에 포장된다. 하나의 양태에서, 본 발명의 하나 이상의 예방제, 치료제, 또는 약제학적 조성물은 밀봉 용기 속에 무수 멸균 동결건조된 분말 또는 물이 없는 농축물로서 제공되며 대상체에게 투여하기 위한 적절한 농도로 재구성(예를 들면, 물 또는 염수를 사용하여)할 수 있다. 하나의 양태에서, 본 발명의 하나 이상의 예방제, 치료제 또는 약제학적 조성물은 밀봉시킨 용기 속에 무수 멸균 동결건조된 분말로서 적어도 5 mg, 적어도 10 mg, 적어도 15 mg, 적어도 25 mg, 적어도 35 mg, 적어도 45 mg, 적어도 50 mg, 적어도 75 mg, 또는 적어도 100 mg의 단위 용량으로 공급된다. 본 발명의 동결건조된 예방제, 치료제 또는 약제학적 조성물은 2 내지 8°C 사이에서 이의 원래의 용기 속에 저장되어야 하며, 본 발명의 예방제, 치료제 또는 약제학적 조성물은 재구성된 후 1주내, 예를 들면, 5일내, 72시간내, 48시간내, 24시간내, 12시간내, 6시간내, 5시간내, 3시간, 또는 1시간내 투여될 수 있다. 다른 양태에서, 본 발명의 예방제 또는 치료제 또는 약제학적 조성물은 제제의 양 및 농도를 나타내는 밀봉시킨 용기 속에 액체 형태로 공급된다. 하나의 양태에서, 투여된 조성물의 액체 형태는 밀봉시킨 용기 속에 적어도 0.25 mg/ml, 적어도 0.5 mg/ml, 적어도 1 mg/ml, 적어도 2.5 mg/ml, 적어도 5 mg/ml, 적어도 8 mg/ml, 적어도 10 mg/ml, 적어도 15 mg/kg, 적어도 25 mg/ml, 적어도 50 mg/ml, 적어도 75 mg/ml 또는 적어도 100 mg/ml으로 공급된다. 액체형은 이의 원래의 용기 속에 2 내지 8°C 사이에서 저장하여야 한다.

[0368] 본 발명의 결합 단백질은 비경구 투여에 적합한 약제학적 조성물내에 혼입될 수 있다. 하나의 양태에서, 항체 또는 항체-부위는 0.1 내지 250 mg/ml의 결합 단백질을 함유하는 주사가능한 용액으로서 제조될 것이다. 주사가능한 용액은 플린트(flint) 또는 앰버 바이알(amber vial), 앰플 또는 예비-충전된 주사기의 액체 또는 동결건조된 용량형으로 구성될 수 있다. 완충제는 pH 5.0 내지 7.0(최적으로는 pH 6.0)에서 L-히스티딘(1 내지 50 mM), 최적으로는 5 내지 10mM일 수 있다. 다른 적합한 완충제는 석신산나트륨, 시트르산나트륨, 인산나트륨 또는 인산칼륨을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 염화나트륨을 사용하여 0 내지 300 mM(액체 용량형을 위한 최적으로 150 mM)의 농도에서 용액의 독성을 조절할 수 있다. 동결보호제, 원칙적으로 0 내지 10%의 슈크로즈(최적으로 0.5 내지 1.0%)를 동결건조된 용량형을 위해 포함시킬 수 있다. 다른 적합한 동결보호제는 트레할로즈 및 락토즈를 포함한다. 증량제(bulking agent)는 동결건조된 용량형을 위해, 원칙적으로 1 내지 10% 만니톨(최적으로 2 내지 4%)을 포함할 수 있다. 안정화제, 원칙적으로 1 내지 50mM L-메티오닌(최적으로 5 내지 10mM)을 액체 및 동결건조된 용량형 둘다에 사용할 수 있다. 다른 적합한 증량제는 글리신을 포함하며, 아르기닌은 0 내지 0.05% 폴리소르베이트-80(최적으로 0.005 내지 0.01%)으로서 포함될 수 있다. 추가의 표면활성제는 폴리소르베이트 20 및 BRIJ 표면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 비경구 투여용의 주사가능한 용액으로서 제조된 본 발명의 결합 단백질을 포함하는 약제학적 조성물은 또한 치료학적 단백질(예를 들면, 항체)의 흡수 또는 분산을 증가시키기 위해 사용된 것들과 같은 보조제로서 유용한 제제를 추가로 포함할 수 있다. 특히 유용한 보조제는 하이알루로니다제, 예를 들면, Hylenex®

(재조합 사람 하이알루로니다제)이다. 주사가능한 용액 중 하이알루로니다제의 첨가는 비경구 투여, 특히 피하 투여 후 사람 생이용성을 개선시킨다. 이는 또한 통증 및 불편함이 거의 없이, 최소한의 주사 부위 반응을 발생시키면서 보다 큰 주사 부위 용적(즉, 1ml 이상)을 허용한다(참조: 본원에 참조로 인용된 WO2004078140, 및 US2006104968).

[0369] 본 발명의 조성물은 각종 형태일 수 있다. 이들은 예를 들면, 액체 액제(예를 들면, 주사가능하고 주입가능한 액제), 분산제 또는 혼탁제, 정제, 환제, 산제, 리포좀 및 좌제와 같은 액체, 반-고체 및 고체 용량형을 포함한다. 선택된 형태는 투여 및 치료학적 적용의 의도된 유형에 의존한다. 대표적인 조성물은 주사가능하거나 주입가능한 액제, 예를 들면 다른 항체를 사용한 사람의 수동적 면역화에 사용된 것들과 유사한 조성물의 형태이다. 선택된 투여 유형은 비경구(예를 들면, 정맥내, 피하, 복강내, 근육내)이다. 하나의 양태에서, 항체는 정맥내 주입 또는 주사에 의해 투여된다. 다른 양태에서, 항체는 근육내 또는 피하 주사에 의해 투여된다.

[0370] 치료학적 조성물은 대표적으로 멸균되어야 하며 제조 및 저장 조건하에서 안정하여야 한다. 조성물은 액제, 미세유제, 분산제, 리포좀 또는, 고 약물 농도에 적합한 다른 정돈된 구조로서 제형화될 수 있다. 멸균 주사가능한 액제는 활성 화합물(즉, 항체 또는 항체 일부)를 적절한 용매 속에 요구되는 양으로, 필요에 따라 본원에 열거된 성분들 중 하나 또는 배합물과 함께 혼입시킨 후 여과된 멸균시킴으로써 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산제는 활성 화합물을 염기성 분산 매질 및 본원에 열거된 것들로부터 요구되는 다른 성분들을 함유하는 멸균

비히클내로 혼입시켜 제조한다. 멀균 주사가능한 액제의 제조를 위한 멀균된, 동결건조된 분말의 경우에, 제조 방법은 활성 성분 및 이의 앞서 멀균-여과된 용액으로부터 임의의 추가의 바람직한 성분의 분말을 수득하는 전 공 건조 및 분무-건조이다. 액제의 적절한 유동성은 예를 들면, 레시틴과 같은 피복물을 사용하고, 분산체의 경우에 요구된 입자 크기를 유지하고, 표면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다. 주사가능한 조성물의 연장된 흡수는 조성물 속에서 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들면, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 포함시킴으로써 달성할 수 있다.

[0371] 본 발명의 결합 단백질은 하나의 양태에서, 많은 치료학적 적용의 경우, 투여 경로/유형이 피하 주사, 정맥내 주사 또는 주입이지만, 당해 분야에 공지된 각종 방법으로 투여할 수 있다. 숙련가에게 인식되는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 투여 방식은 목적한 결과에 따라 변할 것이다. 특정 양태에서, 활성 화합물은 이식물, 경피 패취 및 미세캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 제어 방출 제형과 같은 신속한 방출에 대해 화합물을 보호할 담체를 사용하여 제조될 수 있다. 생분해가능한, 생적합성 중합체, 예를 들면, 에틸렌 비닐 아세테이트, 다무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산을 사용할 수 있다. 이러한 제형을 제조하기 위한 많은 방법이 특허되어 있거나 일반적으로 당해 분야에 공지되어 있다[참조: 예를 들면, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978].

[0372] 특정 양태에서, 본 발명의 결합 단백질은, 예를 들면, 불활성 희석제 또는 흡수가능한 식용 담체와 함께 경구 투여될 수 있다. 화합물(및 경우에 따라, 다른 성분)은 또한 정제로 압착되거나 대상체의 식이내로 직접 혼입된 경질 또는 연질 셀 젤라틴 캡슐 속에 봉입될 수 있다. 경구 치료학적 투여의 경우, 화합물은 부형제와 함께 혼입되어 식용가능한 정제, 구강내 정제, 트로키제, 캡슐제, 엘리서르제, 혼탁제, 시럽제, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물을 비경구 투여의 다른 방식으로 투여하기 위해서는, 화합물을 물질로 피복하거나 화합물을 물질과 함께 공동-투여함으로써 이의 불활성화를 방지하는 것이 필수적일 수 있다.

[0373] 보충 활성 화합물은 또한 조성물내로 혼입될 수 있다. 특정 양태에서, 본 발명의 결합 단백질은 본 발명의 결합 단백질로 장애를 치료하는데 유용한 하나 이상의 추가의 치료제와 함께 공동투여된다. 예를 들어, 본 발명의 결합 단백질은 다른 표적(예를 들면, 다른 사이토킨과 결합하거나 세포 표면 분자와 결합하는 항체)를 결합하는 하나 이상의 추가의 항체와 함께 공동제형화되고/되거나 공동투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 하나 이상의 항체는 앞서의 치료제 2개 이상과 함께 사용될 수 있다. 이러한 병용 치료요법은 투여된 치료제의 보다 적은 용량을 유리하게 이용할 수 있으므로, 각종 단독치료요법과 관련된 가능한 독성 또는 합병증을 피할 수 있다.

[0374] 특정 양태에서, 결합 화합물은 당해 분야에 공지된 반감기 연장 비히클에 연결된다. 이러한 비히클은 Fc 도메인, 폴리에틸렌 글리콜 및 텍스트란을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 비히클은 예를 들면, 특정 목적을 위해 본원에 참조로 인용된 미국 특허원 09/428,082호 및 공개된 PCT 특허원 WO 99/25044에 기술되어 있다.

[0375] 구체적인 양태에서, 본 발명의 결합 단백질을 암호화하는 핵산 서열 또는 본 발명의 다른 예방제 또는 치료제는 유전자 치료요법의 방법으로 장애 또는 이의 하나 이상의 증상을 치료하거나, 예방하거나, 조절하거나 완화시키기 위해 투여된다. 유전자 치료요법은 대상체에게 발현되거나 발현가능한 핵산을 투여함으로써 수행된 치료요법을 말한다. 본 발명의 당해 양태에서, 핵산은 이들의 암호화된 항체 또는 예방학적 또는 치료학적 효과를 매개하는 본 발명의 예방제 또는 치료제를 생산한다.

[0376] 당해 분야에 이용가능한 유전자 치료요법의 방법 중 어느 것도 본 발명에 따라서 사용할 수 있다. 유전자 치료요법의 방법의 일반적인 고찰을 위해 문헌[참조: Goldspiel et al., 1993, Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, Science 260:926- 932 (1993); 및 Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIBTECH 11(5):155-215]을 참조한다. 사용될 수 있는 재조합 DNA 기술의 당해 분야에 일반적으로 공지된 방법은 문헌[참조: Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); 및 Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)]에 기술되어 있다. 유전자 치료요법의 각종 방법의 상세한 기술은 본원에 참조로 인용된 제US20050042664 A1호에 기재되어 있다.

[0377] 본 발명의 결합 단백질은, 결합 단백질에 의해 인지되는 표적이 유해한 각종 질병을 치료하는데 유용하다. 이러한 질병은 다음을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 류마티스 관절염, 콜관절염, 소아 만성 관절염, 패혈성 관절염, 라임 관절염, 건선 관절염, 반응성 관절염, 척추관절병, 전신홍반루푸스, 크론병, 궤양성 대장염, 염증

성 장질환, 인슐린 의존성 진성당뇨병, 갑상선염, 천식, 알레르기병, 건선, 피부염 피부경화증, 이식편 대 숙주 병, 기관 이식 거부, 기관 이식과 관련된 급성 또는 만성 면역병, 사르코이드증, 죽상경화증, 파종 혈관내 응고, 가와사키병, 그레이브스병, 신증후군, 만성피로증후군, 베게너 육아종증, 헤노호-쇤라인 자색반, 신장의 현미경적 혈관염, 만성 활성 간염, 포도막염, 패혈성 쇼크, 독성 쇼크 증후군, 패혈증후군, 악액질, 감염성 장애, 기생충병, 후천성 면역결핍증후군, 급성 횡단 척수염, 헌팅تون 무도병, 파킨슨병, 알츠하이머병, 뇌출중, 원반쓸개관경화증, 용혈 빈혈, 악성암, 심장부전, 심근경색, 애디슨병, 산발 다선성 기능이상 제I형 및 다선성 기능이상 제II형, 슈미트 증후군, 성인(급성) 호흡곤란증후군, 탈모증, 원형탈모증, 혈청음성 관절병증, 관절병증, 라이터병, 건선 관절병증, 궤양성 대장염 관절병증, 장병원성 유행막염, 클라미디아, 예르시니아 및 살모넬라 관련 관절병증, 척추관절병증, 죽종병/동맥경화증, 아토피성 알레르기, 자가면역 수포성 장애, 보통천포창, 낙엽천포창, 유사천포창, 선형 IgA 질병, 자가면역용혈빈혈, 쿰스 양성 용혈빈혈, 후천성 악성빈혈, 소아 악성빈혈, 근통성 뇌염/로얄 프리병, 만성 점막피부칸디다증, 거세포동맥염, 원발성 경화간염, 잠재성 자가면역 간염, 후천성 면역결핍병 증후군, 후천성 면역결핍성 관련 병, B형 간염, C형 간염, 일반적인 변화된 면역결핍증(일반적인 가변 저감마글로불린혈증), 확장된 심근병, 여성 불임, 난소 기능상실, 조기 성숙 난소 기능상실, 섬유화 폐병, 잠재성 섬유화 폐병, 염증후 간질성 폐병, 간질성 폐렴, 연결조직병 관련 간질 폐병, 혼합된 연결조직병 관련 폐병, 전신경화증 관련 간질 폐병, 류마티스 관절염 관련 간질 폐병, 전신흉반루푸스 관련 폐병, 피부근염/다발근육염 관련 폐병, 쇼그렌병 관련 폐병, 강직척추염 관련 폐병, 혈관병성 확산 폐병, 혈철증 관련 폐병, 약물-유도된 간질 폐병, 섬유증, 방사선 섬유증, 폐쇄세기관지염, 만성 호산구 폐렴, 림프구 침윤성 폐병, 통풍관절염, 자가면역 간염, 제1형 자가면역 간염(일반적인 자가면역 또는 낭창양 간염), 제2형 자가면역 간염(항-LKM 항체 간염), 자가면역 매개된 저혈당, 흑색가시세포증이 있는 B형 인슐린 내성, 부갑상선 저하증, 기관 이식과 관련된 급성 면역병, 기관 이식과 관련된 만성 면역병, 골관절염, 원발 경화성 담관염, 제1형 건선, 제2형 건선, 특발성 백혈구감소증, 자가면성 호중구백혈구감소증, 신장병 NOS, 사구체신염, 신장의 현미경적 혈관염, 라임병, 원반모양홍반루푸스, 특발성 남성 불임 또는 NOS, 정자 자가면역, 다발경화증(모든 아형), 교감눈염증, 연결조직병에 대해 2차적인 폐 고혈압, 군파스춰 증후군, 결절다발동맥염의 폐증상, 급성 류마티스열, 류마티스 척추염, 스틸병(Still's disease), 전신경화증, 쇼그伦 증후군, 다카야스병(Takayasu's disease)/동맥염, 자가면역성 저혈소판자색반, 특발성 저혈소판자색반, 자가면역 갑상선병, 갑상선과다증, 갑상선종 자가면역 갑상선기능저하증[하시모토병(Hashimoto's disease)], 위축성 자가면역 갑상선기능저하증, 원발성 점액수종, 수정체성 포도막염, 원발성 혈관염, 백반증 급성 간병, 만성 간병, 알코올성 간경화증, 알코올-유도된 간 손상, 담즙정체(choleosatatis), 특이 간병, 약물-유도된 간병, 비-알코올성 지방간염, 알레르기 및 천식, B군 스트렙토코커스(GBS) 감염, 정신장애(예: 우울증 및 전신분열병), Th2형 및 Th1형 매개된 질병, 급성 및 만성 통증(통증의 상이한 형태), 및 폐암, 유방암, 위암, 방광암, 결장암, 췌장암, 난소암, 전립선암 및 직장암과 같은 암 및 혈액암(백혈병 및 림프종), 아베타리포프로테미아, 말단청색증, 급성 및 만성 기생충병 또는 감염성 과정, 급성 백혈병, 급성 림프모구백혈병(ALL), 급성 골수백혈병(AML), 급성 또는 만성 세균 감염, 급성 췌장염, 급성 신장 부전, 선암종, 이소성 심방박동, AIDS 치매 합병증, 알코올-유도된 간염, 알레르기 결막염, 알레르기 접촉성 피부염, 알레르기성 비염, 동종이식 거부, 알파-1-안티트립신 결핍증, 근육위축 측삭경화증, 빈혈, 협심증, 척수전각 세포 변성, 항 cd3 치료요법, 항인지질증후군, 항-수용체 과감작반응, 대동맥 및 말초동맥류, 대동맥박리, 동맥성 고혈압, 동맥경화증, 동정맥류, 실조, 심방세동(지속되거나 발작성), 심방조동, 방설차단, B 세포 림프종, 골 이식거부, 골수 이식(BMT) 거부, 다발갈래차단, 베켓림프종(Burkitt's lymphoma), 화상, 심장부정맥, 심장 스턴 증후군(cardiac stun syndrome), 심장 종양, 심근병증, 심폐우회술 염증 반응, 연골 이식 거부, 대뇌 피질변성, 대뇌 장애, 혼돈된 또는 다소성 심방빈맥, 화학치료요법 관련 장애, 만성 골수세포 백혈병(CML), 만성 알코올중독, 만성 염증병리학, 만성 림프구백혈병(CLL), 만성 폐쇄성 폐병(COPD), 만성 살리실레이트 중독, 직장결장 암종, 울혈성 심장기능상실, 결막염, 접촉성 피부염, 폐심장, 판상동맥병, 크로이츠펠트-야콥병, 배양 음성 패혈증(culture negative sepsis), 낭성 섬유증, 사이토kin 치료요법 관련 장애, 권투선수치매, 말이집탈락병, 뎅기출혈증, 피부염, 피부과 상태(dermatologic condition), 당뇨병, 진성당뇨병, 당뇨병성 죽상경화판 질병, 미만성 루이소체병, 확장형 울혈성 심근병증, 기저핵 장애, 중년 다운증후군(Down's Syndrome), CNS 도파민 수용체를 차단하는 약물에 의해 유도된 약물-유도된 운동장애, 약물 민감성, 습진, 뇌척수염, 심내막염, 내분비병, 후두개염, 엔슈타인-바르 바이러스 감염, 홍색사지통증, 추체외로 및 대뇌 장애, 가족성 혈구포식세포 림프조직구증, 태아 흉선 이식거부, 프리드라이히 운동실조증, 기능적 말초동맥장애, 진균성 패혈증, 위궤양, 가스괴저, 사구체신장염, 임의의 기관 또는 조직의 이식 거부, 그람 음성 패혈증, 그람 양성 패혈증, 세포내 기관으로 인한 육아종, 텔세포백혈병, 할러보르텐-슈파츠병, 하시모토 갑상선염, 건초열, 심장 이식거부, 혈색소침착증, 혈액투석, 용혈요독증후군/혈전용해성 저혈소판자색반병, 출혈, (A)형 간염, 히스다발부정맥, HIV 감염/HIV 신경병증, 호지킨병, 운동과다장애, 과민반응, 과민증, 과민성 폐렴, 고혈압, 운동저하

장애, 시상하부-뇌하수체-부신축 평가, 특발성 애디슨병, 특발성 폐 섬유증, 항체 매개된 세포독성, 무력증, 유아성 척수성 근육위축, 대동맥의 염증, 인플루엔자 a, 이온화 조사 노출, 홍채섬모채염/포도막염/시신경염, 허혈-재판류 손상, 허혈성 뇌졸중, 소아 류마티스관절염, 소아척수근육위축증, 카포시 육종, 신장 이식거부, 래기 오넬라, 리슈만편모충증, 나병, 피질척수계의 병변, 지방부종, 간 이식거부, 림프부종, 말라리아, 악성 림프종, 악성 조직구증, 악성 흑색종, 수막염, 수막구균혈증, 대사성/특발성 질병, 편두통, 미토콘드리아 다중시스템 장애, 혼합된 연결조직병, 모노클로날 감마글로불린혈증, 다발골수종, 다발계통 변성[멘델 테제린-토마스 시-드래거 및 마카도-조셉], 중증근육무력증, 마이코박테리움 아비움 인트라셀룰라레, 결핵균, 골수형성이상증후군, 심근경색, 심근허혈성 장애, 비인두암종, 신생아 만성폐병, 신장염, 신장증, 신경변성병, 신경성(I) 근육위축, 호중구감소성 열, 비-호지킨 림프종, 복부 대동맥 및 이의 분지의 폐색, 폐쇄성 동맥장애, okt3 치료요법, 고환염/부고환염, 고환염/정관절제 복구술, 장기비대, 골다공증, 췌장 이식거부, 췌장 암종, 부종양 증후군/악성 고칼슘혈증, 부갑상선 이식거부, 골반염 장애, 연증비염, 심낭장애, 말초죽상경화성 장애, 말초혈관 장애, 복막염, 악성 빈혈, 폐포자충폐염, 폐렴, POEMS 증후군(다발신경염, 장기비대, 내분비병, 모노클로날 감마병증, 및 피부 변화 증후군), 관류후 증후군, 펌프후 증후군, MI후 심장절개 증후군, 자간전증, 진행핵상마비, 원발폐고혈압증, 방사치료요법, 레이노 현상 및 질병, 레이노 장애, 레프슐병, 정규의 협소 QRS 빈맥, 신장혈관고혈압, 재판류 손상, 제한심근병, 육종, 공피증, 노년무도병, 루이소체 치매, 혈청음성 관절병증, 쇼크, 낫적혈구빈혈, 피부 동종이식 거부, 피부 변화 증후군, 소장 이식거부, 고형 종양, 특이적인 부정맥, 척수운동실조, 척수소뇌변성, 스트렙토코커스성 근염, 소뇌의 구조적 병변, 아급성 경화범뇌염, 실신, 심혈관계의 매독, 전신아나필락시스, 전신 염증반응 증후군, 전신적으로 발생된 청소년성 관절염, T-세포 또는 FAB ALL, 모세혈관확장증, 폐쇄성 혈관혈전염, 저혈소판증, 독성, 이식술, 외상/출혈, 제III형 과민반응, 제IV형 과민증, 불안정 협심증, 요독증, 요로성폐혈증, 두드러기, 판막성심장병, 정맥류, 혈관염, 정맥 장애, 정맥 혈전증, 심실세동, 바이러스 및 진균 감염, 활성 뇌염/무균수막염, 활성-관련 적혈구포식성 증후군, 베르니케-코르사코프 증후군, 월슨병, 임의의 기관 또는 조직의 이종이식 거부(참조: Peritt et al. PCT 공보 제WO2002097048A2호, Leonard et al., PCT 공보 제WO9524918 A1호, 및 Salfeld et al., PCT 공보 제WO00/56772A1호).

[0378]

본 발명의 결합 단백질은 자가면역병, 특히 류마티스 관절염, 척추염, 알레르기, 자가면역 당뇨병, 자가면역 포도막염을 포함하는, 염증과 관련된 것들을 치료하는데 사용될 수 있다. 하나의 양태에서, 본 발명의 결합 단백질 또는 이의 항원-결합부는 류마티스 관절염, 크론병, 다발경화증, 인슐린 의존성 진성당뇨병 및 건선을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0379]

하나의 양태에서, 본 발명의 조성을 및 방법으로 치료 또는 진단될 수 있는 질병은, 원발성 및 대사성 암, 예를 들면, 유방, 결장, 직장, 폐, 구인두, 하인두, 식도, 위, 췌장, 간, 담석 및 담즙관, 소장, 뇨관(신장, 방광 및 요로상피 포함), 여성 생기기관(자궁경부, 자궁 및 난소, 및 응모막암종 및 임신영양막병 포함), 남성 생식기관(전립선, 정낭, 고환 및 정자세포 종양 포함), 내분비선(갑상선, 부신 및 뇌하수체 포함), 및 피부, 및 혈관종, 흑색종, 육종[골 및 연조직으로부터 발생한 것 및 카포시 육종 포함], 뇌, 신경, 눈 및 뇌척수막의 종양[별아교세포종, 신경아교종, 교종, 망막모세포종, 신경종, 신경모세포종, 슈반세포종, 및 수막종 포함], 백혈병과 같이 조혈성 악성종양으로부터 유발된 고형 종양, 및 림프종(호지킨 및 비호지킨 림프종 포함)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0380]

하나의 양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 단독으로 또는 방사치료요법 및/또는 다른 화학치료제와 함께 사용되는 경우 암을 치료하거나 본원에 기술된 종양으로부터 전이를 예방하는데 사용된다.

[0381]

본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 항신생물제, 방사치료요법, DNA 알킬화제, 시스플라틴, 카르보플라틴, 헝-투불린제, 파클리탁셀, 도세탁셀, 탁솔, 독소루비신, 켐시타빈, 켐자르, 안트라사이클린, 아드리아마이신, 토포이소머라제 I 억제제, 토포이소머라제 II 억제제, 5-플루오로우라실(5-FU), 류코보린, 이리노테칸, 수용체 타이로신 키나제 억제제(예를 들면, 에를로티니브, 게피티니브), COX-2 억제제(예를 들면, 셀레콕시브), 키나제 억제제 및 siRNA를 포함하나, 이에 한정되지 않는 제제와 합해질 수 있다.

[0382]

본 발명의 결합 단백질은 또한 각종 질병의 치료에 유용한 하나 이상의 추가의 제제와 함께 투여될 수 있다.

[0383]

본 발명의 결합 단백질은 이러한 질병을 치료하기 위해 단독으로 또는 함께 사용될 수 있다. 결합 단백질은 단독으로 또는 추가의 제제, 예를 들면, 치료제와 함께 사용될 수 있다는 것을 이해하여야 하며, 상기 추가의 제제는 이의 의도된 목적을 위해 숙련가에 의해 선택된다. 예를 들어, 추가의 제제는 본 발명의 항체에 의해 치료되는 질병 또는 상태를 치료하는데 유용한 것으로 당해 분야에서 인식된 치료제일 수 있다. 추가의 제제는 또한 치료학적 조성을 유리하게 기여하는 제제, 예를 들면, 조성을의 점도에 영향을 미치는 제제일 수 있다.

- [0384] 본 발명에 포함되는 병용물이 이의 의도된 목적에 유용한 병용물임은 충분히 이해되어야 한다. 하기 설정된 제제는 이러한 목적을 위한 예시이며 제한하는 것으로 의도되어서는 안된다. 본 발명의 일부인 병용물은 본 발명의 항체 및 하기 목록으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 제제일 수 있다. 병용물은 또한 하나 이상의 추가의 제제, 예를 들면, 병용물이 형성된 조성물이 이의 의도된 기능을 수행할 수 있도록 존재하는 경우 2개 또는 3개의 추가의 제제를 포함할 수 있다.
- [0385] 자가면역 및 염증병을 치료하기 위한 병용물은 이부프로펜과 같은 약물을 포함하는 NSAIDS로 또한 언급된 비-스테로이드성 소염제(들)이다. 다른 병용물은 프레드니솔론을 포함하는 코르티코스테로이드이며; 스테로이드 사용의 익히 공지된 부작용은 환자를 본 발명의 DVD Ig와 함께 치료하는 경우 요구되는 스테로이드 투여량을 줄임으로써 감소시키거나 심지어 제거할 수 있다. 본 발명의 항체 또는 항체 일부와 합해질 수 있는 류마티스 관절 염용 치료제의 비-제한적 예는 다음을 포함한다: 사이토킨 억제성 소염 약물(들)(CSAID); 기타 사람 사이토킨에 대한 항체 또는 이의 길항제 또는 성장 인자, 예를 들면, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21, IL-23, 인터페론, EMAP-II, GM-CSF, FGF, 및 PDGF. 본 발명의 결합 단백질, 또는 이의 항원 결합부는 CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80(B7.1), CD86(B7.2), CD90, CTLA 또는 CD154(gp39 또는 CD40L)를 포함하는 이들의 리간드와 같은 세포 표면 분자에 대한 항체와 병용될 수 있다.
- [0386] 치료제들의 병용물은 상이한 시점에서 자가면역 및 후속적인 염증 캐스케이드(cascade)를 방해할 수 있으며; 예에는 키메라, 사람화된 또는 사람 TNF 항체, ADALIMUMAB(PCT 공보 제WO 97/29131호), CA2(RemicadeTM), CDP 571, 및 가용성 p55 또는 p75 TNF 수용체, 이의 유도체, (p75TNFR1gG(EnbrelTM) 또는 p55TNFR1gG (레네르셉트), 및 또한 TNF α 전환 효소(TACE) 억제제를 포함하며; 유사하게 IL-1 억제제(인터류킨-1-전환 효소 억제제, IL-1RA 등)가 동일한 이유로 효과적일 수 있다. 다른 병용물은 인터류킨 11을 포함한다. 또 다른 병용물은 IL-12 기능과 병행하여, 의존하여 또는 이와 함께 작용할 수 있는 자가면역 반응의 주요 작용자를 포함하며; 특히 IL-18 항체 또는 가용성 IL-18 수용체, 또는 IL-18 결합 단백질을 포함하는 IL-18 길항제이다. IL-12 및 IL-18은 오버랩되지만 명백한 기능 및 길항제의 병용 둘다가 가장 효과적일 수 있음을 밝혀져 있다. 또 다른 병용물은 비-고갈성 항-CD4 억제제이다. 또 다른 병용물은 항체, 가용성 수용체 또는 길항제성 리간드를 포함하는 공동-자극 경로 CD80 (B7.1) 또는 CD86(B7.2)의 길항제를 포함한다.
- [0387] 본 발명의 결합 단백질은 메토트렉세이트, 6-MP, 아자티오프린, 살파살라진, 올살라진, 클로로퀴닌/하이드록시클로로퀸, 페니실아민, 아우로티오말레이트(근육내 및 경구), 아자티오프린, 콜히친, 코르티코스테로이드(경구, 흡입 및 국소 주사), 베타-2-아드레노수용체 작용제(살부타몰, 테르부탈린, 살메테랄), 크산틴(테오필린, 아미노필린), 크로모글리케이트, 네도크로밀, 케토티펩, 이프라트로피움 및 옥시트로피운, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 마이코페놀레이트 포페틸, 레플루노미드, NSAID, 예를 들면, 이부프로펜, 프레드니솔론과 같은 코르티코스테로이드, 포스포디에스테라제 억제제, 아데노신 작용제, 항트롬빈제, 보체 억제제, 아드레날린 성 제제, TNF-α 또는 IL-1(예를 들면, IRAK, NIK, IKK, p38 또는 MAP 키나제 억제제), IL-1β 전환 효소 억제제, TNF α 전환 효소(TACE) 억제제, 키나제 억제제와 같은 T-세포 시그널린 억제제, 메틸로프로테이나제 억제제, 살파살라진, 아지티오프린, 6-머캅토푸린, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 가용성 사이토킨 수용체 및 이의 유도체[예를 들면, 가용성 p55 또는 p75 TNF 수용체 및 유도체 p75TNFR1gG(EnbrelTM) 및 p55TNFR1gG(레네르셉트)), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R], 소염성 사이토킨(예를 들면, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 및 TGF β), 셀렉콕시브, 엽산, 하이드록시클로로퀸, 살페이트, 로페콕시브, 에타네르셉트, 인플릭시마브, 나프록센, 발데콕시브, 살파살라진, 메틸프레드니솔론, 멜록시캄, 메틸프로드니솔론 아세테이트, 금 나트륨 티오말레이트, 아스피린, 트리암시놀론 아세토나이드, 프로폭시펜 나프실레이트/아파프, 폴레이트, 나부메톤, 디클로페낙, 피록시캄, 에토돌락, 디클로페낙 나트륨, 옥사프로진, 옥시코돈 hcl, 하이드로코돈 비타르트레이트/아파프, 디클로페낙 나트륨/미소프로스톨, 웬타닐, 아날гин라, 사람 재조합체, 트라마돌 hcl, 살살레이트, 슬린닥, 시아노코발라민/fa/피리독신, 아세트아미노펜, 알렌드로네이트 나트륨, 프레드니솔론, 모르핀 살페이트, 리도카인 하이드로클로라이드, 인도메타신, 글루코사민 살프/콘드로이틴, 아미트립틸린 hcl, 살파디아진, 옥시코돈 hcl/아세트아미노펜, 올로파타딘 hcl, 미소프로스톨, 나프록센 나트륨, 오피프라졸, 사이클로포스파미드, 리툭시마브, IL-1 TRAP, MRA, CTLA4-IG, IL-18 BP, 항-IL-18, 항-IL15, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740, 로플루밀라스트, IC-485, CDC-801, 및 메소프립과 같은 제제와 혼합될 수 있다. 병용물은 메토트렉세이트 또는 레플루노마이드를 포함하며 중간 또는 심각한 류마티스 관절염의 경우에는 사이클로스포린을 포함한다.
- [0388] 류마티스 관절염을 치료하기 위해 결합 단백질과 함께 사용될 수 있는 비제한적인 추가의 제제는 다음을 포함하

나, 이에 한정되지 않는다: 비스테로이드성 소염 약물(들)(NSAID); 사이토킨 억제성 소염 약물(들)(CSAID); CDP-571/BAY-10-3356(사람화된 항-TNF α 항체; 제조원: 셀테크(Celtech)/바이엘(Bayer)); cA2/인플럭시마브(키메라 항-TNF α 항체; 제조원: 센토코어(Centocor)); 75 kdTNFR-IgG/에타네르셉트(75 kd TNF 수용체-IgG 융합 단백질; 제조원: 이뮤넥스(Immunex); 참조: 예를 들면, *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996) Vol. 44, 235A); 55 kdTNF-IgG (55 kd TNF 수용체-IgG 융합 단백질; 제조원: 호프만-라로슈(Hoffmann-LaRoche)); IDEC-CE9.1/SB 210396(비-고갈 영장류화된 항-CD4 항체; IDEC/SmithKline; 참조: 예를 들면, *Arthritis & Rheumatism* (1995) Vol. 38, S185); DAB 486-IL-2 및/또는 DAB 389-IL-2(IL-2 융합 단백질; 제조원: 세라젠(Seragen); 참조: 예를 들면, *Arthritis & Rheumatism* (1993) Vol. 36, 1223); 항-Tac(사람화된 항-IL-2Ra; 제조원: 프로테인 디자인 랩스(Protein Design Labs)/로슈(Roche)); IL-4(소염성 사이토킨; 제조원: 디엔에이엑스(DNAX)/쉐링(Schering)); IL-10(SCH 52000; 재조합 IL-10, 소염성 사이토킨; 제조원: 디엔에이엑스(쉐링)); IL-4; IL-10 및/또는 IL-4 작용제(예를 들면, 작용제 항체); IL-1RA(IL-1 수용체 길항제; 제조원: 시너겐(Synergen)/암젠(Amgen)); 아나킨라(Kineret®)

제조원: 암젠); TNF-bp/s-TNF (가용성 TNF 결합 단백질; 참조: 예를 들면, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S284; *Amer. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology* (1995) Vol. 268, pp. 37-42); R973401(포스포디에스테라제 제IV형 억제제; 참조: 예를 들면, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S282); MK-966(COX-2 억제제; 참조: 예를 들면, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S81); 일로프로스트(참조: 예를 들면, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S82); 메토트렉세이트; 탈리도마이드(참조: 예를 들면, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S282) 및 탈리도마이드-관련 약물(예를 들면, 셀젠); 레플루노마이드(소염성 및 사이토킨 억제제; 참조: 예를 들면, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S131; *Inflammation Research* (1996) Vol. 45, pp. 103-107); 트라넥삼산(플라스미노겐 활성화 억제제; 참조: 예를 들면, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S284); T-614(사이토킨 억제제; 참조: 예를 들면, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S282); 프로스타글란딘 E1 (참조: 예를 들면, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S282); Tenidap (비-스테로이드성 소염 약물; 참조: 예를 들면, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S280); 나프록센(비스테로이드성 소염 약물; 참조: 예를 들면, *Neuro Report* (1996) Vol. 7, pp. 1209-1213); 멜록시캄(비-스테로이드성 소염 약물); 이부프로펜(비스테로이드성 소염 약물); 피록시캄(비스테로이드성 소염 약물); 디클로페낙(비스테로이드성 소염 약물); 인도메타신(비스테로이드성 소염 약물); 설파살라진(참조: 예를 들면, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S281); 아자티오프린(참조: 예를 들면, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S281); ICE 억제제(효소 인터류킨-1b 전환 효소의 억제제); zap-70 및/또는 lck 억제제(타이로신 키나제 zap-70 또는 lck의 억제제); VEGF 억제제 및/또는 VEGF-R 억제제(혈관 내피 세포 성장 인자 또는 혈관 내피 세포 성장 인자 수용체의 억제제; 혈관형성 억제제); 코르티코스테로이드 소염 약물(예를 들면, SB203580); TNF-전환효소 억제제; 항-IL-12 항체; 항-IL-18 항체; 인터류킨-11(참조: 예를 들면, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S296); 인터류킨-13(참조: 예를 들면, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S308); 인터류킨 -17 억제제(참조: 예를 들면, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S120); 금; 폐니실라민; 클로로퀸; 클로람부실; 하이드록시클로로퀸; 사이클로스포린; 사이클로포스파미드; 총 럼프구자극; 항-흉선세포 글루불린; 항-CD4 항체; CD5-독소; 경구-투여된 펩타이드 및 콜라겐; 로벤자리트 이나트륨; 사이토킨 조절제(CRA) HP228 및 HP466[제조원: 휴텐 파마슈티칼즈, 인코포레이티드(Houghten Pharmaceuticals, Inc.)]; ICAM-1 안티센스 포스포로티오에이트 올리고-데옥시뉴클레오타이드[ISIS 2302; 제조원: 아이시스 파마슈티칼스, 인코포레이티드(Isis Pharmaceuticals, Inc.)]; 가용성 보체 수용체 1[TP10; 제조원: 티 셀 사이언시스, 인코포레이티드(T Cell Sciences, Inc.)]; 프레드니손; 오르고테인; 글리코사미노글리칸 폴리설페이트; 미노사이클린; 항-IL2R 항체; 해양 및 식물 지질[어류 및 식물 종자 지방산; 참조: 예를 들면, DeLuca et al. (1995) *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 21:759-777]; 아우라노핀; 페닐부타존; 메틸로페남산; 플루페남산; 정맥내 면역 글로불린; 질레우톤; 아자리빈; 마이코페놀산(RS-61443); 타크롤리무스(FK-506); 시롤리무스(라파마이신); 아미프릴로즈(테라페틴); 클라드리빈(2-클로로데옥시아데노신); 메토트렉세이트; bcl-2 억제제[참조: Bruncko, Milan et al., *Journal of Medicinal Chemistry* (2007), 50(4), 641-662]; 항바이러스 및 면역조절제.

[0389] 하나의 양태에서, 결합 단백질 또는 이의 항원-결합부는 류미티스 관절염 치료용의 다음 제제중 하나와 함께 투여된다: KDR의 소 분자 억제제, Tie-2의 소 분자 억제제; 메토트렉세이트; 프레드니손; 셀레콕시브; 엽산; 하이

드록시클로로퀸; 설페이트; 로페록시브; 에타네르셉트; 인플릭시마브; 레플루노마이드; 나프록센, 발데록시브; 설파살라진; 메틸프레드니솔론; 이부프로펜; 멜록시캄; 메틸프로드니솔론 아세테이트; 금 나트륨 티오말레이트; 아스피린; 아자티오프린; 트리암시놀론 아세토나이드; 프로폭시펜 나프실레이트/apap; 플레이트; 나부메톤; 디클로페낙; 피록시캄; 에토독락; 나트륨/미소프로스톨; 웬타닐; 아나킨라, 사람 재조합체; 트라마돌 hcl; 살살레이트; 설린닥; 시아노코발라민/fa/피리독신; 아세트아미노펜; 알렌드로네이트 나트륨; 프레드니솔론; 모르핀 설페이트; 리도카인 하이드로클로라이드; 인도메타신; 글루코사민 설페이트/ 콘드로이틴; 사이클로스포린; 아미트립틸린 hcl; 설파디아진; 옥시코돈 hcl/아세트아미노펜; 올로파타딘 hcl; 미소프로스톨; 나프록센 나트륨; 오메프라졸; 마이코페놀레이트 모페틸; 사이클로포스파미드; 리툭시마브; IL-1 TRAP; MRA; CTLA4-IG; IL-18 BP; IL-12/23; 항-IL 18; 항-IL 15; BIRB-796; SCIO-469; VX-702; AMG-548; VX-740; 로플루밀라스트; IC-485; CDC-801; 및 메소프람.

[0390]

본 발명의 결합 단백질이 합해질 수 있는 염증성 장질환에 대한 치료제의 비-제한적 예는 다음을 포함한다: 부데노사이드; 상피 성장 인자; 코르티코스테로이드; 사이클로스포린, 설파살라진; 아미노살리실레이트; 6-머캅토퓨린; 아자티오프린; 메트로니다졸; 리폭시게나제 억제제; 메살라민; 올살라진; 베살라지드; 항산화제; 트롬복산 억제제; IL-1 수용체 길항제; 항-IL-1 β mAb; 항-IL-6 mAb; 성장 인자; 엘라스타제 억제제; 피리디닐-이미다졸 화합물; 다른 사람 사이토kin 또는 성장 인자에 대한 항체 또는 이의 길항제, 예를 들면, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, 및 PDGF. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90와 같은 세포 표면 분자에 대한 항체 또는 이들의 리간드와 합해질 수 있다. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 또한 메토트렉세이트, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 미코페놀레이트 모페틸, 레플루노마이드, NSAID, 예를 들면, 이부프로펜, 프레드니솔론과 같은 코르티코스테로이드, 포스포디에스테라제 억제제, 아데노신 작용제, 항혈소판제, 보체 억제제, 아드레날린성 제제, TNF α 또는 IL-1(예를 들면, IRAK, NIK, IKK, p38 또는 MAP 키나제 억제제)와 같은 염증촉진성 사이토kin에 의한 시그널링을 방해하는 제제, IL-1 β 전환 효소 억제제, TNF α 전환 효소 억제제, 키나제 억제제와 같은 T-세포 시그널링 억제제, 메탈로프로테이나제 억제제, 설파살라진, 아자티오프린, 6-머캅토푸린, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 가용성 사이토kin 수용체 및 이의 유도체(예를 들면, 가용성 p55 또는 p75 TNF 수용체, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) 및 소염 사이토kin(예를 들면, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 및 TGF β) 및 bcl-2 억제제.

[0391]

결합 단백질이 합해질 수 있는 크론병용 치료제의 예는 다음을 포함한다: TNF 길항제, 예를 들면, 항-TNF 항체, ADALIMUMAB (PCT 공보 제WO 97/29131호; HUMIRA), CA2(REMICADE), CDP 571, TNFR-Ig 작제물, (p75TNFR IgG(ENBREL) 및 p55TNFR IgG(레네르셉트)) 억제제 및 PDE4 억제제. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 코르티코스테로이드, 예를 들면, 부데노사이드 및 텍사메타손과 합해질 수 있다. 본 발명의 결합 단백질 또는 이의 항원 결합부는 또한 설파살라진, 5-아미노살리실산 및 올살라진과 같은 제제, 및 IL-1과 같은 염증촉진성 사이토kin의 합성 또는 작용을 방해하는 제제, 예를 들면, IL-1 β 전환 효소 억제제 및 IL-1ra와 합해질 수 있다. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 또한 T 세포 시그널링 억제제, 예를 들면, 타이로신 키나제 억제제 6-머캅토푸린과 합해질 수 있다. 본 발명의 결합 단백질 또는 이의 항원 결합부는 IL-11과 합해질 수 있다. 본 발명의 결합 단백질, 또는 이의 항원 결합부는 메살라민, 프레드니손, 아자티오프린, 머캅토푸린, 인플릭시마브, 메틸프로드니솔론 나트륨 석시네이트, 디페녹실레이트/아트롭 설페이트, 로페라미드 하이드로클로라이드, 메토트렉세이트, 오메프라졸, 폴레이트, 시프로플록사신/헥스트로즈-물, 하이드로코돈 비타르트레이트/아파프, 테트라사이클린 하이드로클로라이드, 플루오시노나이드, 메트로니다졸, 티메로살/봉산, 콜레스티란/슈크로즈, 시프로플록사신 하이드로클로라이드, 사이오시아민 설페이트, 메페리딘 하이드로클로라이드, 미다졸람 하이드로클로라이드, 옥시코돈 hcl/아세트아미노펜, 프로메타진 하이드로클로라이드, 인산나트륨, 설파메톡사졸/트리메토프림, 셀레콕시브, 폴리카브로필, 프로폭시펜 나프실레이트, 하이드로코르티손, 다가비타민, 발살라지드 이나트륨, 코데인 포스페이트/apap, 콜레세벨람 hcl, 시아노코발라민, 엽산, 레보플록사신, 메틸프레드니솔론, 나탈리주마브 및 인터페론-감마와 합해질 수 있다.

[0392]

본 발명의 결합 단백질이 합해질 수 있는 다발경화증용 치료제의 비-제한적 예는 다음을 포함한다: 코르티코스테로이드; 프레드니솔론; 메틸프레드니솔론; 아자티오프린; 사이클로포스파미드; 사이클로스포린; 메토트렉세이트; 4-아미노피리딘; 티자니딘; 인터페론- β 1a[아보넥스; 제조원: 바이오겐(Biogen)]; 인터페론-b1b [베타세론; 제조원: 카론(Chiron)/베를렉스(Berlex); 인터페론 a-n3](제조원: 인터페론 사이언시스(Interferon Sciences)/후지모토(Fujimoto), 인터페론- α [제조원: 알파 바저만(Alfa Wassermann)/존슨 존슨(J&J)], 인터페론 β 1A-IF [제조원: 세로노(Serono)/인할 씨라퓨틱스(Inhale Therapeutics)], 폐그인터페론 α 2b[제조원: 엔존(Enzon)/쉐링-플라우(Schering-Plough)], 공중합체 1(Cop-1; 코팍손; 제조원: 테바 파마슈티칼 인더스트리스,

인코포레이티드(Teva Pharmaceutical Industries, Inc.)]; 하이퍼바릭 산소; 정맥내 면역글로불린; 클라브리빈; 다른 사람 사이토킨에 대한 항체 또는 이의 길항제 또는 성장 인자 및 이들의 수용체, 예를 들면, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-23, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, 및 PDGF. 본 발명의 결합 단백질은 CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90와 같은 세포 표면 분자에 대한 항체 또는 이들의 리간드와 합해질 수 있다. 본 발명의 결합 단백질은 또한 메토트렉세이트, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 마이코페놀레이트 모페틸, 레플루노마이드, NSAID, 예를 들면, 이부프로펜, 프레드니솔론과 같은 코르티코스테로이드, 포스포디에스테라제 억제제, 아데노신 작용제, 항혈전제, 보체 억제제, 아드레날린제, TNF α 또는 IL-1(예를 들면, IRAK, NIK, IKK, p38 또는 MAP 키나제 억제제)과 같이 염증촉진성 사이토킨에 의한 시그널링을 방해하는 제제, IL-1 β 전환 효소 억제제, TACE 억제제, 키나제 억제제와 같은 T-세포 시그널링 억제제, 메탈로프로테이나제 억제제, 설파살라진, 아자티오프린, 6-머캅토 퓨린, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 가용성 사이토킨 수용체 및 이의 유도체(예를 들면, 가용성 p55 또는 p75 TNF 수용체, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), 소염 사이토킨(예를 들면, IL-4, IL-10, IL-13 및 TGF β) 및 bcl-2 억제제.

[0393] 본 발명의 결합 단백질이 합해질 수 있는 다발경화증용 치료제의 예는 인터페론- β , 예를 들면, IFN β 1a 및 IFN β 1b; 콜라제, 코르티코스테로이드, 카스파제 억제제, 예를 들면, 카스파제-1의 억제제, IL-1 억제제, TNF 억제제, 및 CD40 리간드 및 CD80에 대한 항체를 포함한다.

[0394] 본 발명의 결합 단백질은 또한 알젠투주마브, 드로나비놀, 유니메드, 다클리주마브, 미톡산트론, 크살리프로덴 하이드로클로라이드, 팜프리딘, 글라티라며 아세테이트, 나탈리주마브, 신나비돌, a-이뮤노kin NNS03, ABR-215062, AnergiX.MS, 케모킨 수용체 길항제, BBR-2778, 칼라구알린, CPI-1189, LEM(리포좀 봉입된 미톡산트론), THC.CBD(카날비노이드 작용제) MBP-8298, 메소프람(PDE4 억제제), MNA-715, 항-IL-6 수용체 항체, 뉴로박스, 피르페니돈 알로트랩 1258(RDP-1258), sTNF-R1, 탈람파넬, 테리플루노미드, TGF-베타2, 티플리모타이드, VLA-4 길항제(예를 들면, TR-14035, VLA4 울트라할러(Ultrahaler), 안테그란(Antegran)-ELAN/제조원: 바이오젠), 인터페론 감마 길항제, IL-4 작용제.

[0395] 본 발명의 결합 단백질이 합해질 수 있는 협심증용 치료제의 비제한적 예는 다음을 포함한다: 아스피린, 니트로글리세린, 이소소르비드 모노니트레이트, 메토프롤롤 석시네이트, 아테놀롤, 메토프롤롤 타르트레이트, 암로디핀 베실레이트, 딜티아셈 하이드로클로라이드, 이소소르바이드 디니트레이트, 클로로피도그렐 비설페이트, 니페디핀, 아토르바스타틴 칼슘, 염화칼륨, 푸로세미드, 심바스타틴, 베라파밀 hcl, 디곡신, 프로프라놀롤 하이드로클로라이드, 카르베딜롤, 리시노프릴, 스피로놀락톤, 하이드로클로로티아지드, 에닐라프릴 말레이트, 나돌롤, 라미프릴, 에녹사파린 나트륨, 헤파린 나트륨, 발사르탄, 소탈롤 하이드로클로라이드, 페노피브레이트, 에제티미베, 부메타니드, 로사르탄 칼륨, 리시노프릴/하이드로클로로티아지드, 웰로디핀, 캡토프릴, 비소프롤롤 푸마레이트.

[0396] 본 발명의 결합 단백질이 병용될 수 있는 강직성 척추염용 치료제의 비제한적 예는 다음을 포함한다: 이부프로펜, 디클로페낙 및 미소프로스톨, 나프록센, 멜록시캄, 인도메타신, 디클로페낙, 셀레콕시브, 로페콕시브, 설파살라진, 메토트렉세이트, 아자티오프린, 미노사이클린, 프레드니손, 에타네르셉트, 인플릭시마브.

[0397] 본 발명의 결합 단백질이 병용될 수 있는 천식용 치료제의 비제한적 예는 다음을 포함한다: 알부테롤, 살메테롤/플루티카손, 몬텔루카스트 나트륨, 플루티카손 프로피오네이트, 부데소니드, 프레드니손, 살메테롤 크시나포 에이트, 레발부테롤 hcl, 알부테롤 설페이트/이프라트로피움, 프레드니솔론 나트륨 포스페이트, 트리암시놀론 아세토나이드, 베클로메타손 디프로피오네이트, 이프라트로피움 브로마이드, 아지트로마이신, 피르부테롤 아세테이트, 프레드니솔론, 무수 테오필린, 메틸프레드니솔론 나트륨 석시네이트, 클라리트로마이신, 차피클루카스트, 포르모테롤 푸마레이트, 인플루엔자 바이러스 백신, 메틸프레드니솔론, 아목시실린 삼수화물, 플루니솔리드, 알레르기 주사, 크로몰린 나트륨, 펙소페나딘 하이드로클로라이드, 플루니솔리드/멘톨, 아목시실린/클라부날네이트, 레보플록사신, 흡입기 보조 장치, 구아이페네신, 텍사메타손 나트륨 포스페이트, 목시플록사신 hcl, 독시사이클린 하이클레이트, 구아이페네신/d-메토르판, p-에페드린/cod/클로르페니르, 가티플록사신, 세티리진 하이드로클로라이드, 모네타손 푸로에이트, 살메테롤 크시나포에이트, 벤조나테이트, 세팔렉신, pe/하이드로코돈/클로르페니르, 세티리진 hcl/슈도페드, 페닐에프린/cod/프로메타진, 코데인/프로메타진, 세프프로질, 텍사메타손, 구아이페네신/슈도에페드린, 클로르페니라민/하이드로코돈, 네도크로밀 나트륨, 테르부탈린 설페이트, 에피네프린, 메틸프레드니솔론, 메타프로테레놀 설페이트.

[0398] 본 발명의 결합 단백질이 병용될 수 있는 COPD용 치료제의 비제한적 예는 다음을 포함한다: 알부테롤 설페이트

/이프라트로피움, 이프라트로피움 브로마이드, 살메테롤/플루티카손, 알부테롤, 살메테롤 크시나포에이트, 플루티카손 프로피오네이트, 프레드니손, 무수 테오필린, 메틸프레드니솔론 나트륨 석시네이트, 몬텔루카스트 나트륨, 부테소니드, 포르모테롤 푸마레이트, 트리암시놀론아세토나이드, 레보플록사신, 구아이페네신, 아지트로마이신, 베클로메타손 디프로피오네이트, 레발부테롤 hcl, 플루니솔리드, 세프트리악손 나트륨, 아목시실린 삼수화물, 가티플록사신, 자피를루카스트, 아목시실린/클라불라네이트, 플루니솔리드/멘톨, 클로로페니라민/하이드로코돈, 메타프로테레놀 설페이트, 메틸프레드니솔론, 모메타손 푸로에이트, p-에페드린/cod/클로르페니르, 피르부테롤 아세테이트, p-에페드린/로라타딘, 테르부탈린 설페이트, 티오프로피움 브로마이드, (R,R)-포르모테롤, TgAAT, 실로밀라스트, 로플루밀라스트.

[0399] 본 발명의 결합 단백질이 병용될 수 있는 HCV용 치료제의 비-제한적 예는 다음을 포함한다: 인터페론-알파-2a, 인터페론-알파-2b, 인터페론-알파 con1, 인터페론-알파-n1, 폐길화된 인터페론-알파-2a, 폐길화된 인터페론-알파-2b, 리바비린, 페그인터페론 알파-2b + 리바비린, 우르소데옥시콜산, 글리시리직산, 티말파신, 막사민, VX-497 및 다음 표적을 사용한 중재를 통해 치료하기 위해 사용된 임의의 화합물: HCV 폴리머라제, HCV 프로테아제, HCV 헬리카제, HCV IRES(내부 리보솜 도입 부위).

[0400] 본 발명의 결합 단백질이 병용될 수 있는 특발성 폐 섬유증용 치료제의 비-제한적 예는 다음을 포함한다: 프레드니손, 아자티오프린, 알부테롤, 콜히친, 알부테롤 설페이트, 디곡신, 감마 인터페론, 메틸프레드니솔론 sod succ, 로라제팜, 푸로세미드, 리시노프릴, 니트로글리세린, 스피로놀락톤, 사이클로포스파미드, 이프라트로피움 브로마이드, 악티노마이신 d, 알테플라제, 플루티카손 프로피오네이트, 레보플록사신, 메타프로테레놀 설페이트, 모르핀 설페이트, 옥시코돈 hcl, 염화칼륨, 트리암시놀론아세토나이드, 무수 타크롤리무스, 칼슘, 인터페론-알파, 메토트렉세이트, 마이코페놀레이트 모페틸, 인터페론-감마-1β.

[0401] 본 발명의 결합 단백질이 병용될 수 있는 심근경색용 치료제의 비-제한적 예는 다음을 포함한다: 아스피린, 니트로글리세린, 메토프롤롤 타르트레이트, 에녹사파린 나트륨, 헤파린 나트륨, 클로로피도그렐 비설페이트, 카르베딜롤, 아테놀롤, 모르핀 설페이트, 메토프롤롤 석시네이트, 와르파린 나트륨, 리시노프릴, 이소소르비드 모노니트레이트, 디곡신, 푸로세미드, 심바스타틴, 라미프릴, 테넥스플라제, 에날라프릴 말레이트, 토르세미드, 레타바제, 로사르탄 칼륨, 퀴나프릴 hcl/mag carb, 부메타니드, 알테플라제, 에날라프릴라트, 아미도다론 하이드로클로라이드, 티로피반 hcl m-하이드레이트, 딜티아젬 하이드로클로라이드, 카토프릴, 이브제사르탄, 밸사르탄, 프로프라놀롤 하이드로클로라이드, 포시노프릴 나트륨, 리도카인 하이드로클로라이드, 에프티피바타이드, 세파졸린 나트륨, 아트로핀 설페이트, 아미노카프로익산, 스피로놀락톤, 인터페론, 소탈롤 하이드로클로라이드, 염화칼륨, 도쿠세이트 나트륨, 도부타민 hcl, 알프라졸람, 프라바스타틴 나트륨, 아토르바스타틴 칼슘, 미다졸람 하이드로클로라이드, 메페리딘 하이드로클로라이드, 이소소르바이드 디니트레이트, 에피네프린, 도파민 하이드로클로라이드, 비발리루딘, 로수바스타틴, 에제티미베/심바스타틴, 아바시미베, 카리포라이드.

[0402] 본 발명의 결합 단백질이 병용될 수 있는 건선용 치료제의 비-제한적 예는 다음을 포함한다: KDR의 소 분자 억제제, Tie-2의 소 분자 억제제, 칼시포트리엔, 클로베타솔 프로피오네이트, 트리암시놀론아세토나이드, 할로베타솔 프로피오네이트, 타자로텐, 메토트렉세이트, 플루옥시노나이드, 베타메타손 디프로프 아구멘티드 (betamethasone diprop augmented), 플루옥시놀론 아세토나이드, 아시트레틴, 타르 샴푸, 베타메타손 발러레이트, 모메타손 푸로에이트, 케토코나졸, 프라목신/플루옥시놀론, 프라목신/플루옥시놀론, 하이드로코르티손 발러레이트, 플루란드레놀라이드, 우레아, 베타메타손 발러레이트, 플루란드레놀라이드, 우레아, 베타메타손, 클로베타솔 프로피오네이트/에몰, 플루티카손 프로피오네이트, 아지트로마이신, 하이드로코르티손, 습윤화제형, 엽산, 테소나이드, 피메크롤리무스, 콜타르, 디플로라손 디아세테이트, 에타네르셉트 폴레이트, 락트산, 메톡살렌, hc/비스무쓰 수브갈/즈녹스/레소르, 메틸프레드니솔론 아세테이트, 프레드니손, 광차단제, 할시노나이드, 살리실산, 안트랄린, 클로코르틀론 피발레이트, 석탄 추출물, 콜타르/살리실산 추출물, 콜타르/살리실산, 콜타르/살리실산/황, 테속시메타손, 디아제팜, 플루오시노나이드/진정수(emollient), 광오일/캐스터오일/na lact, 광오일/땅콩 오일, 석유/이소프로필 미리스테이트, 소랄렌, 살리실산, 비누/트리브롬실란, 티메로살/붕산, 셀레콕시브, 인플릭시마브, 사이클로스포린, 알레파셉트, 에팔리주마브, 타크롤리무스, 피메크롤리무스, PUVA, UVB, 설파살라진.

[0403] 본 발명의 결합 단백질이 병용될 수 있는 건선 관절염용 치료제의 비-제한적 예는 다음을 포함한다: 메토트렉세이트, 에타네르셉트, 로페콕시브, 셀레콕시브, 엽산, 설파살라진, 나프록센, 레플루노마이드, 메틸프레드니솔론 아세테이트, 인도메타신, 하이드록시클로로퀸 설페이트, 프레드니손, 슬린닥, 베타메타손 디프로프 아구멘티드, 인플릭시마브, 메토트렉세이트, 폴레이트, 트리암시놀론아세토나이드, 디클로페낙, 디메틸설폐사이드, 피록시캄, 디클로페낙 나트륨, 케토프로펜, 멜록시캄, 메틸프레드니솔론, 나부메톤, 톨메틴 나트륨, 칼시포트리

엔, 사이클로스포린, 디클로페낙 나트륨/미소프로스톨, 플루오시노나이드, 글루코사민 설페이트, 금 나트륨 티오마레이트, 하이드로코돈, 비타르트레이트/apap, 이부프로펜, 리세드로네이트 나트륨, 설파디아진, 티오구아닌, 발데콕시브, 알레파셉트, 에팔리주마브 및 bcl-2 억제제.

[0404] 본 발명의 결합 단백질이 병용될 수 있는 재협착용 치료제의 비-제한적 예는 다음을 포함한다: 시롤리무스, 파클리탁셀, 에베롤리무스, 타크롤리무스, 조타롤리무스, 아세트아미노펜.

[0405] 본 발명의 결합 단백질이 병용될 수 있는 쥐골신경통용 치료제의 비-제한적 예는 다음을 포함한다: 하이드로코돈 비타르트레이트/apap, 로페록시브, 사이클로벤자프린 hcl, 메틸프레드니솔론, 나프록센, 이부프로펜, 옥시코돈 hcl/아세트아미노펜, 셀레콕시브, 발데콕시브, 메틸프레드니솔론 아세테이트, 프레드니손, 코데인 포스페이트/apap, 트라마돌 hcl/아세트아미노펜, 메탁살론, 멜록시캄, 메토카르바몰, 리도카인 하이드로클로라이드, 디클로페낙 나트륨, 가바펜틴, 텍사메타손, 카리소프로돌, 케토톨락, 트로메타민, 인도메타신, 아세트아미노펜, 디아제팜, 나부메톤, 옥시코돈 hcl, 티자니딘 hcl, 디클로페낙 나트륨/미소프로스톨, 프로폭시펜 나프실레이트/apap, asa/옥시코드/옥시코돈 ter, 이부프로펜/하이드로코돈 bit, 트라마돌 hcl, 에토돌락, 프로폭시펜 hcl, 아미트리피탈린 hcl, 카리소프로돌/코데인 phos/asa, 모르핀 설페이트, 다가비타민, 나프록센 나트륨, 오르페나드린 시트레이트, 테마제팜.

[0406] 본 발명의 결합 단백질이 병용될 수 있는 SLE(루푸스)용 치료제의 예는 다음을 포함한다: NSAIDS, 예를 들면, 디클로페낙, 나프록센, 이부프로펜, 피록시캄, 인도메타신; COX2 억제제, 예를 들면, 셀레콕시브, 로페록시브, 발데콕시브; 항-말라리아, 예를 들면, 하이드록시클로로퀸; 스테로이드, 예를 들면, 프레드니손, 프레드니솔론, 부데소나이드, 텍사메타손; 사이토톡식, 예를 들면, 아자티오프린, 사이클로포스파미드, 마이코페놀레이트 모페틸, 메토트렉세이트; PDE4의 억제제 또는 퓨린 합성 억제제, 예를 들면, 셀셉트. 본 발명의 결합 단백질은 또한 설파살라진, 5-아미노살리실산, 올살라진, 이무란 및 IL-1과 같은 염증촉진성 사이토킨의 합성, 생산 또는 작용을 방해하는 제제, 예를 들면, IL-1 β 전환 효소 억제제 및 IL-1ra와 같은 카스파제 억제제와 병용될 수 있다. 본 발명의 결합 단백질은 또한 T 세포 시그널링 억제제, 예를 들면, 타이로신 키나제 억제제; 또는 T 세포 활성화 분자를 표적하는 분자, 예를 들면, CTLA-4-IgG 또는 항-B7 계열 항체, 항-PD-1 계열 항체와 병용될 수 있다. 본 발명의 결합 단백질은 IL-11 또는 항-사이토킨 항체, 예를 들면, 포노톨리주마브(항-IFNg 항체), 또는 항-수용체 항체, 예를 들면, 항-IL-6 수용체 항체 및 B-세포 표면 분자에 대한 항체와 병용될 수 있다. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 또한 LJP 394(아베티무스), B-세포를 고갈시키거나 불활성화시키는 제제, 예를 들면, 리툭시마브(항-CD20 항체), 림포스타트-B (항-B1yS 항체), TNF 길항제, 예를 들면, 항-TNF 항체, 아달리무마브(PCT 공보 제WO 97/29131호; HUMIRA), CA2(REMICADE), CDP 571, TNFR-Ig 작제물, (p75TNFRIGG (ENBREL) 및 p55TNFRIGG (레네르셉트)) 및 유전자삽입 마우스에서 bcl-2 과발현은 루푸스 유사 표현형을 유발하는 것으로 입증되었으므로[참조: Marquina, Regina et al., Journal of Immunology (2004), 172(11), 7177-7185], 억제는 치료 효과를 가지는 것으로 예측되기 때문에, bcl-2와 함께 사용될 수 있다.

[0407] 본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명의 결합 단백질의 "치료학적 유효량" 또는 "예방학적 유효량"을 포함할 수 있다. "치료학적 유효량"은 목적한 치료학적 결과를 달성하는데 필요한 용량 및 기간에서 효과적인 양을 말한다. 결합 단백질의 치료학적 유효량은 당해 분야의 숙련가에 의해 측정될 수 있으며, 개인의 질병 상태, 연령 및 체중, 및 개인에서 바람직한 반응을 유발하기 위한 결합 단백질의 능력과 같은 인자에 따라 변할 수 있다. 치료학적 유효량은 또한, 항체 또는 항체 일부의 임의의 독성 또는 유해한 효과보다 치료학적으로 유익한 효과가 더 큰 양이다. "예방학적 유효량"은 바람직한 예방학적 결과를 달성하는데 요구되는 용량 및 기간에서 효과적인 양을 말한다. 전형적으로, 예방학적 투여량은 질병의 단계 이전 또는 초기 단계에 대상체에서 사용되므로, 예방학적 유효량은 치료학적 유효량 미만일 것이다.

[0408] 용량 요법은 최적의 바람직한 반응(예를 들면, 치료학적 또는 예방학적 반응)을 제공하기 위해 조절될 수 있다. 예를 들어, 단일 일시투여로 투여할 수 있거나, 수개로 분할된 투여량을 시간에 걸쳐 투여할 수 있거나 투여량을 치료학적 상황에 의해 나타나는 것으로서 비례적으로 감소하거나 증가할 수 있다. 투여의 용이성 및 용량의 균일성을 위해 용량 단위 형으로 비경구 제형을 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본원에 사용된 용량형은 치료될 포유동물 대상체에 대한 일원화된 용량으로 적합한 물리적으로 별개인 단위를 말하며; 각각의 단위는 요구되는 약제학적 담체와 함께 바람직한 치료학적 효과를 생산하기 위해 계산된 활성 화합물의 예정된 양을 함유한다. 본 발명의 용량 단위 형에 대한 명세는 (a) 활성 화합물 및 달성되는 특정 치료학적 또는 예방학적 효과의 독특한 특징, 및 (b) 개인에서 중증도의 치료를 위한 이러한 활성 화합물을 화합하는 당해 분야에 있어서 고유의 제한에 의해 해석되며 이에 직접적으로 의존한다.

[0409] 본 발명의 결합 단백질의 치료학적 또는 예방학적 유효량에 대한 예시적인, 비-제한적 범위는 0.1 내지 20 mg/kg, 예를 들면, 1 내지 10 mg/kg이다. 용량 값은 완화시키고자 하는 상태의 유형 및 중증도에 따라 변할 수 있음을 인지하여야 한다. 또한, 임의의 특정 대상체의 경우, 특정 용량 요법이 개인의 요구도 및 조성물을 투여하거나 투여를 관리하는 사람의 전문적인 판단에 따라 시간에 걸쳐 조절되어야 하며, 본원에 설정된 용량 범위는 단지 예시이고 청구된 조성물의 범위 또는 실시를 제한하는 것으로 의도되지 않음을 이해하여야 한다.

[0410] 당해 분야의 숙련가에게는, 본원에 기술된 본 발명의 방법의 다른 적합한 변형 및 변경이 명백하며 본 발명의 범위 또는 본원에 기술된 양태로부터 벗어남이 없이 적합한 등가물을 사용하여 제조할 수 있음이 명백할 것이다. 지금까지 본 발명을 상세히 기술하였으며, 본 발명을 단지 예시하기 위한 목적으로 포함되며 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는 다음 실시예를 참조로 본 발명이 보다 잘 이해될 것이다.

V. 진단

[0412] 본원의 기재내용은 또한 진단 적용을 제공한다. 이는 하기에 설명된다.

I. 검정 방법

[0414] 본 기재내용은 또한 본원에 기재된 적어도 하나의 DVD-Ig를 사용하여 시험 시료 중에서 분석물(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 측정하는 방법을 제공한다. 당해 분야에 공지된 것으로서 임의의 적합한 검정을 당해 방법에서 사용할 수 있다. 예는 샌드위치 면역검정[예를 들면, 모노클로날, 폴리클로날 및/또는 DVD-Ig 샌드위치 면역 검정) 또는 이의 변형(예를 들면, 모노클로날/DVD-Ig, DVD-Ig/폴리클로날 등), 예를 들면, 방사동위원소 검출[방사면역검정(RIA)] 및 효소 검출[효소 면역검정(EIA) 또는 효소-연결된 면역흡착 검정(ELISA) (예를 들면, 퀸티킨(Quantikine) ELISA 검정, 제조원: 알랜드디 시스템스, 미네소타주 미네아폴리스 소재], 경쟁적 억제 면역검정(예를 들면, 전방 및 후방), 형광성 편광 면역검정(FPIA), 효소 증식 면역검정 기술(enzyme multiplied immunoassay technique: EMIT), 생물발광 공명 에너지 전달(BRET), 및 동종 화학발광 검정 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. SELDI-계 면역검정에서, 목적한 분석물(또는 이의 단편)에 특이적으로 결합하는 포획 시약은 예비-활성화된 단백질 칩 어레이와 같은 질량 분광법 프로브의 표면에 부착된다. 이후에, 분석물(또는 이의 단편)은 바이오칩상에 특이적으로 포획되고, 포획된 분석물(또는 이의 단편)은 질량 분광법에 의해 검출된다. 달리는, 분석물(또는 이의 단편)은 포획 시약으로부터 용출시켜 일반적인 MALDI(매트릭스-보조된 레이저 탈착/이온화) 또는 SELDI에 의해 검출된다. 화학발광 미세입자 면역검정, 특히 ARCHITECT®

자동화된 분석기[제조원: 애보트 래보러토리즈(Abbott Laboratories), 일리노이주 애보트 파크 소재]를 사용하는 것은 바람직한 면역검정의 하나의 예이다.

[0415] 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 DVD-Ig를 면역진단 시약으로서 및/또는 분석물 면역검정 키트에서 사용하는 경우, 뇨, 혈액, 혈청 및 혈장, 및 다른 생체 유액을 수집하고, 취급하며 가공하기 위한 당해 분야에 익히 공지된 방법은 본 기재내용의 실시에 사용된다. 시험 시료는 추가로 항체, 항원, 합텐, 호르몬, 약물, 효소, 수용체, 단백질, 웨타이드, 폴리웨타이드, 올리고뉴클레오타이드 및/또는 폴리뉴클레오타이드와 같은 목적한 분석물 외에 추가의 잔기를 포함할 수 있다. 예를 들면, 시료는 대상체로부터 수득한 전혈 시료일 수 있다. 시험 시료, 특히 전혈을 본원에 기술된 바와 같이 면역검정 전에, 예를 들면, 예비처리 시약을 사용하여 처리하는 것이 필수적이거나 바람직할 수 있다. 예비처리가 필수적이지 않은 경우(예를 들어, 대부분의 뇨 시료인 경우)에도, 예비처리를 임의로 수행할 수 있다(예를 들면, 상업적 플랫폼상에 계획의 일부로서).

[0416] 예비처리 시약은 본 발명의 면역검정 및 키트와 함께 사용하기에 적절한 임의의 시약일 수 있다. 예비처리는 임의로 (a) 하나 이상의 용매(예를 들면, 메탄올 및 에틸렌 글리콜) 및 임의로 염, (b) 하나 이상의 용매 및 염, 및 임의로 세제, (c) 세제, 또는 (d) 세제 및 염을 포함한다. 예비처리 시약은 당해 분야에 공지되어 있으며, 이러한 예비처리는 예를 들면, 문헌(참조: 예를 들면, Yatscoff et al., Abbott TDx Monoclonal Antibody Assay Evaluated for Measuring Cyclosporine in Whole Blood, Clin. Chem. 36: 1969-1973 (1990), 및 Wallemacq et al., Evaluation of the New AxSYM Cyclosporine Assay: Comparison with TDx Monoclonal Whole Blood and EMIT Cyclosporine Assays, Clin. Chem. 45: 432-435 (1999)]에 기술되고/되거나 시판되는, Abbott TDx, AxSYM®

및 ARCHITECT®

분석기(제조원: 애보트 래보러토리즈, 일리노이주 애보트 파크 소재) 상에서 검정하기 위해 사용된 바와 같이

사용될 수 있다. 또한, 예비처리는 애보트의 미국 특허 제5,135,875호, 유럽 특허 공보 제0 471 293호, 2006년 12월 29일자로 출원된 미국 임시특허원 제60/878,017호, 및 미국 공개특허공보 제2008/0020401호(이의 전문이 예비처리에 관한 이의 교시를 위해 참조로 인용됨)에 기술된 바와 같이 수행할 수 있다. 예비처리 시약은 이종 제제 또는 동종 제제일 수 있다.

[0417] 이종 예비처리 시약을 사용하여, 예비처리 시약은 시료 속에 존재하는 분석물 결합 단백질(예를 들면, 분석물 또는 이의 단편에 결합할 수 있는 단백질)을 촉발한다. 이러한 예비처리 단계는 침전된 분석물 결합 단백질로부터 예비처리 시약을 시료에 첨가함으로써 형성된 혼합물의 상청액을 분리하여 임의의 분석물 결합 단백질을 제거함을 포함한다. 이러한 검정에서, 임의의 결합 단백질이 부재하는 혼합물의 상청액을 향체 포획 단계에 직접 진행되는 검정에서 사용한다.

[0418] 이종 예비처리 시약을 사용하는 경우 이러한 분리 단계는 존재하지 않는다. 시험 시료 및 예비처리 시약의 전체 혼합물은 표지된 항-분석물 항체(또는 이의 항원적으로 반응성인 단편)와 같은 분석물(또는 이의 단편)에 대한 표지된 특이적인 결합 파트너와 접촉된다. 이러한 검정에 사용된 예비처리 시약은 대표적으로 예비처리된 시험 시료 혼합물 속에서 제1 특이적인 결합 파트너에 의해 포획 전에 또는 동안에 희석된다. 이러한 희석에도 불구하고, 특정량의 예비처리 시약은 여전히 포획동안 시험 시료 혼합물 속에 존재(또는 잔존)한다. 본 발명에 따르면, 표지된 특이적인 결합 파트너는 DVD-Ig(또는 이의 단편, 변이체 또는 변이체의 단편)일 수 있다.

[0419] 이종 형식에서, 시험 시료를 대상체로부터 수득한 후, 제1 혼합물을 제조한다. 혼합물은 분석물(또는 이의 단편)에 대해 평가되는 시험 시료 및 제1 특이적인 결합 파트너를 함유하며, 여기서, 제1 특이적인 결합 파트너 및 시험 시료 속에 함유된 임의의 분석물은 제1 특이적인 결합 파트너-분석물 복합체를 형성한다. 바람직하게는, 제1 특이적인 결합 파트너는 항-분석물 항체 또는 이의 단편이다. 제1 특이적인 결합 파트너는 본원에 기술된 바와 같은 DVD-Ig(또는 이의 단편, 변이체, 또는 변이체의 단편)일 수 있다. 시험 시료 및 제1 특이적인 결합 파트너를 가하여 혼합물을 형성시키는 순서는 중요하지 않다. 바람직하게는, 제1 특이적인 결합 파트너는 고체 상에 고정화된다. 면역검정(제1 특이적인 결합 파트너 및, 임의로, 제1 특이적인 결합 파트너의 경우)에 사용된 고체 상은 자성 입자, 비드, 시험관, 미세역가 플레이트, 큐벳(cuvette), 막, 스캐폴딩 분자, 필름, 여과지, 디스크 및 칩과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 당해 분야에 공지된 어떠한 고체 상일 수 있다.

[0420] 제1 특이적인 결합 파트너-분석물 복합체를 함유하는 혼합물이 형성된 후, 임의의 결합하지 않은 분석물을 당해 분야에 공지된 특정의 기술을 사용하여 복합체로부터 제거한다. 예를 들면, 결합되지 않은 분석물은 세척에 의해 제거할 수 있다. 그러나, 바람직하게는, 제1 특이적인 결합 파트너가 시험 시료 속에 존재하는 과량의 임의의 분석물 속에 존재함으로써, 시험 시료 속에 존재하는 모든 분석물이 제1 특이적인 결합 파트너에 의해 결합되도록 한다.

[0421] 임의의 결합되지 않은 분석물을 제거한 후, 제2 특이적인 결합 파트너를 혼합물에 가하여 제1 특이적인 결합 파트너-분석물-제2 특이적인 결합 파트너 복합체를 형성한다. 제2 특이적인 결합 파트너는 바람직하게는 제1 특이적인 결합 파트너에 의해 결합된 분석물 상에 에피토프와는 상이한 분석물상의 에피토프에 결합한 항-분석물 항체이다. 더욱이, 또한 바람직하게는, 제2 특이적인 결합 파트너는 위에 기술된 바와 같이 검출가능한 표지로 표지되거나 이를 함유한다. 제2 특이적인 결합 파트너는 본원에 기술된 바와 같은 DVD-Ig(또는 이의 단편, 변이체, 또는 변이체의 단편)일 수 있다.

[0422] 당해 분야에 공지된 임의의 적합한 검출가능한 표지를 사용할 수 있다. 예를 들면, 검출가능한 표지는 방사성 표지(예를 들면, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, 및 ³³P), 효소 표지(예를 들면, 서양고추냉이 페옥시다제, 알칼리성 페옥시다제, 글루코즈 6-포스페이트 데하이드로제나제 등), 화학발광 표지(예를 들면, 아크리디늄 에스테르, 티오에스테르 또는 셀론아미드; 루미놀, 이소루미놀, 페난트리디늄 에스테르 등), 형광 표지[예를 들면, 플루오로레세인(예를 들면, 5-플루오로레세인, 6-카복시플루오레세인, 3'-6-카복시플루오레세인, 5(6)-카복시플루오레세인, 6-헥사클로로-플루오레세인, 6-테트라클로로플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트 등)], 로다민, 피코빌리단백질, R-피코에리트린, 양자 점(quantum dot)(예를 들면, 황화아연-캡핑된 카드뮴 셀레나이드), 온도계 표지, 또는 면역-폴리머라제 연쇄 반응 표지일 수 있다. 표지에의 도입, 표지 공정 및 표지의 검출은 문헌[참조: Polak and Van Noorden, Introduction to Immunocytochemistry, 2nd ed., Springer Verlag, N.Y. (1997), 및 in Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (1996), 이는 오레곤주 유겐에 소재하는 몰레큘러 프로브, 인포포레이티드(Molecular Probes, Inc.)에서 발표한 합해진 핸드북 및 카탈로그이다]에서 발견된다. 형광 표지는 FPIA(참조: 이의 전문이 본원에 참조로 인용된, 예를 들면, 미국 특허 제5,593,896호, 제5,573,904호, 제5,496,925호, 제5,359,093호, 및 제5,352,803호)에서 사용될 수 있다. 아크리디늄 화합

물은 동종 또는 이종 화학발광 검정에서 검출가능한 표지로서 사용될 수 있다[참조: 예를 들면, Adamczyk et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 16: 1324-1328 (2006); Adamczyk et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 4: 2313-2317 (2004); Adamczyk et al., Biorg. Med. Chem. Lett. 14: 3917-3921 (2004); 및 Adamczyk et al., Org. Lett. 5: 3779-3782 (2003)].

[0423] 바람직한 아크리디늄 화합물은 아크리디늄-9-카복사미드이다. 아크리디늄 9-카복사미드를 제조하는 방법은 문헌[참조: Mattingly, J. Biolumin. Chemilumin. 6: 107-114 (1991); Adamczyk et al., J. Org. Chem. 63: 5636-5639 (1998); Adamczyk et al., Tetrahedron 55: 10899-10914 (1999); Adamczyk et al., Org. Lett. 1: 779-781 (1999); Adamczyk et al., Bioconjugate Chem. 11: 714-724 (2000); Mattingly et al., In Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications; Dyke, K. V. Ed.; CRC Press: Boca Raton, pp. 77-105 (2002); Adamczyk et al., Org. Lett. 5: 3779-3782 (2003); 및 미국 특허 제5,468,646호, 제5,543,524호 및 제5,783,699호(이들 각각은 본원에 이에 관한 이의 교시에 대해 이의 전문이 참조로 인용되어 있다)]에 기술되어 있다. 다른 바람직한 아크리디늄 화합물은 아크리디늄-9-카복실레이트 아릴 에스테르이다. 아크리디늄-9-카복실레이트 아릴 에스테르의 예는 10-메틸-9-(페녹시카보닐)아크리디늄 플루오로설포네이트[카이만 케미칼(Cayman Chemical)에서 시판, 미주리주 앤 아르보 소재]이다. 아크리디늄 9-카복실레이트 아릴 에스테르를 제조하는 방법은 문헌[참조: McCapra et al., Photochem. Photobiol. 4: 1111-21 (1965); Razavi et al., Luminescence 15: 245-249 (2000); Razavi et al., Luminescence 15: 239-244 (2000); 및 미국 특허 제5,241,070호(이들 각각은 이에 관한 이의 교시에 대해 전문이 참조로 본원에 인용되어 있다)]에 기술되어 있다. 아크리디늄-9-카복실레이트 아릴 에스테르 및 이의 용도의 추가의 세부사항은 제US 2008-0248493호에 기술되어 있다.

[0424] 화학발광 검정(예를 들면, 상기에 기술된 바와 같은 아크리디늄 또는 다른 화학발광제)는 문헌[참조: Adamczyk et al., Anal. Chim. Acta 579(1): 61-67 (2006)]에 기술된 방법에 따라 수행할 수 있다. 임의의 적합한 검정 형식을 사용할 수 있지만, 마이크로플레이트 화학발광제[Mithras LB-940, 제조원: 베르톨드 테크놀로지스 유.에스.에이. 엘엘씨(Berthold Technologies U.S.A., LLC), 테네시주 오크 런지 소재]는 소 용적의 다수의 시료를 신속하게 검정할 수 있도록 한다.

[0425] 시험 시료 및 특이적인 결합 파트너(들)을 가하여 화학발광 검정을 위한 혼합물을 형성하는 순서는 중요하지 않다. 제1 특이적인 결합 파트너가 아크리디늄 화합물과 같은 화학발광제로 검출가능하게 표지되는 경우, 검출가능하게 표지된 제1 특이적인 결합 파트너-분석물 복합체가 형성된다. 달리는, 제2 특이적인 결합 파트너가 아크리디늄 화합물과 같은 화학발광제로 검출가능하게 표지되는 경우, 검출가능하게 표지된 제1 특이적인 결합 파트너-분석물-제2 특이적인 결합 파트너 복합체가 형성된다. 임의의 결합되지 않은 특이적인 결합 파트너는, 표지되거나 표지되지 않은 것에 상관없이, 세척과 같은 당해 분야에 공지된 특정의 기술을 사용하여 혼합물로부터 제거할 수 있다.

[0426] 과산화수소는 반응계내에서 혼합물 속에서 생성되거나 위에서 기술한 아크리디늄 화합물의 첨가 전에, 이와 동시에, 또는 이후에 혼합물(예를 들면, 하나 이상의 완충제인 과산화수소 또는 과산화수소를 함유하는 것으로 공지된 다른 용액의 공급원)에 공급될 수 있다. 과산화수소는 반응계내에서 당해 분야의 숙련가에게 명백한 다수의 방법으로 생성될 수 있다.

[0427] 적어도 하나의 염기성 용액을 시료에 동시에 또는 연속 첨가하면, 검출가능한 시그널, 즉, 분석물의 존재의 지표인, 화학발광 시그널이 생성된다. 염기성 용액은 적어도 하나의 염기를 함유하고, pH가 10 이상, 바람직하게는 12 이상이다. 염기성 용액의 예는 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화칼슘, 수산화암모늄, 수산화마그네슘, 탄산나트륨, 중탄산나트륨, 수산화칼슘, 탄산칼슘, 및 중탄산칼슘을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 시료에 가해진 염기성 용액의 양은 염기성 용액의 농도에 의존한다. 사용된 염기성 용액의 농도를 기초로 하여, 당해 분야의 숙련가는 시료에 가해질 염기성 용액의 양을 용이하게 측정할 수 있다.

[0428] 생성된 화학발광 시그널은 당해 분야의 숙련가에게 공지된 통상의 기술을 사용하여 검출할 수 있다. 생성된 시그널의 강도를 기초로 하여, 시료 중 분석물의 양을 정량할 수 있다. 구체적으로는, 시료중 분석물의 양은 생성된 시그널의 강도에 비례한다. 존재하는 분석물의 양은 분석물에 대한 표준 곡선에 대해 생성된 광의 양을 비교하거나 참조 표준물에 대한 비교에 의해 정량할 수 있다. 표준 곡선은 질량 분광법, 중량분석 방법 및 당해 분야에 공지된 기타 기술에 의해 분석물의 공지된 농도의 용액 또는 일련 희석물을 사용하여 생성시킬 수 있다. 상기가 화학발광제로서 아크리디늄 화합물의 사용을 강조하여 기술하고 있지만, 당해 분야의 숙련가는 다른 화학발광제의 사용에 대해 당해 기술을 용이하게 변경시킬 수 있다.

[0429]

분석물 면역검정은 일반적으로 샌드위치 형식과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는, 당해 분야에 공지된 임의의 형식을 사용하여 수행할 수 있다. 구체적으로는, 하나의 면역검정 형식에서, 적어도 2개의 항체를 사용하여 사람 분석물과 같은 분석물, 또는 이의 단편을 시료 속에서 분리하여 정량한다. 보다 구체적으로는, 적어도 2개의 항체를 "샌드위치"로 언급되는, 면역 복합체를 형성하는 분석물(또는 이의 단편)상의 상이한 에피토프에 결합한다. 일반적으로, 면역검정에서 하나 이상의 항체를 사용하여 시험 시료중 분석물(또는 이의 단편)을 포획할 수 있으며(이들 항체는흔히 "포획" 항체 또는 "포획" 항체들로 언급된다), 하나 이상의 항체를 사용하여 샌드위치에 대해 검출가능한(즉, 정량가능한) 표지에 결합할 수 있다(이들 항체는흔히 "검출 항체", "검출 항체들", "접합체" 또는 "접합체들"로 언급된다). 따라서, 샌드위치 면역검정 형식 단락에서, 본원에 기술된 바와 같은 DVD-Ig(또는 이의 단편, 변이체, 또는 변이체의 단편)은 포획 항체, 검출 항체, 또는 이들 둘다로 사용될 수 있다. 예를 들면, 분석물(또는 이의 단편) 상에서 제1 에피토프에 결합할 수 있는 도메인을 갖는 하나의 DVD-Ig는 포획 항체로서 사용될 수 있고/있거나 분석물(또는 이의 단편) 상에서 제2 에피토프에 결합할 수 있는 다른 DVD-Ig는 검출 항체로서 사용될 수 있다. 이와 관련하여, 분석물(또는 이의 단편) 상의 제1 에피토프에 결합할 수 있는 제1 도메인 및 분석물(또는 이의 단편) 상의 제1 에피토프에 결합할 수 있는 제2 도메인을 갖는 DVD-Ig를 포획 항체 및/또는 검출 항체로서 사용할 수 있다. 달리는, 제1 분석물(또는 이의 단편) 상의 제2 에피토프에 결합할 수 있는 제1 도메인 및 제2 분석물(또는 이의 단편) 상의 에피토프에 결합할 수 있는 제2 도메인을 갖는 하나의 DVD-Ig를 포획 항체 및/또는 검출 항체로 사용하여 2개 이상의 분석물을 검출하고, 임의로 정량할 수 있다. 분석물이 시료 속에 호모머성(homomeric) 또는 혜테로머성(heteromeric)일 수 있는, 단량체 형태 및 이량체/다량체 형태와 같은 하나 이상의 형태로 존재할 수 있는 경우에서조차, 단량체 형태상에만 노출되는 에피토프에 결합할 수 있는 도메인을 갖는 하나의 DVD-Ig 및 이량체/다량체 형태의 상이한 부분상의 에피토프에 결합할 수 있는 도메인을 갖는 다른 DVD-Ig는 포획 항체 및/또는 검출 항체로서 사용될 수 있으며, 이에 의해 제공된 분석물의 상이한 형태의 검출, 및 임의의 정량화를 가능하도록 한다. 또한, 단일의 DVD-Ig내에서 및/또는 DVD-Ig들 사이에서 차등적인 친화성을 갖는 DVD-Ig를 사용하는 것은 결합활성 장점을 제공할 수 있다. 본원에 기술된 바와 같은 면역검정의 단락에서, DVD-Ig의 구조내에 하나 이상의 링커를 혼입시키는 것이 일반적으로 도움이 되거나 바람직할 수 있다. 존재하는 경우, 최적으로 링커는 내부 도메인에 의한 에피토프의 결합 및 외부 도메인에 의한 다른 에피토프의 결합을 가능하도록 하기에 충분한 길이 및 구조적 굴곡성이어야 한다. 이와 관련하여, DVD-Ig가 2개의 상이한 분석물에 결합하고 하나의 분석물이 다른 것보다 더 큰 경우, 바람직하게는 보다 큰 분석물이 외부 도메인에 의해 결합된다.

[0430]

일반적으로 말하면, 분석물(또는 이의 단편)에 대해 시험되는 시료(예를 들면, 분석물을 함유하는 것으로 예측되는)를 적어도 하나의 포획 항체(또는 항체들) 및 적어도 하나의 검출 항체(이는 제2 검출 항체 또는 제3 검출 항체 또는 심지어 성공적으로 번호매겨진 항체, 예를 들면, 포획 및/또는 검출 항체가 다수의 항체를 포함하는 경우에서와 같이)와 동시에 또는 연속적으로 및 어떠한 순서로도 접촉시킬 수 있다. 예를 들면, 시험 시료를 우선 적어도 하나의 포획 항체와 접촉시킨 후(후속적으로) 적어도 하나의 검출 항체와 접촉시킬 수 있다. 달리는, 시험 시료를 우선 적어도 하나의 검출 항체와 접촉시킨 후 적어도 하나의 포획 항체와 연속적으로 접촉시킬 수 있다. 또 다른 대안으로서, 시험 시료를 포획 항체 및 검출 항체와 동시 접촉시킬 수 있다.

[0431]

샌드위치 검정 형식에서, 분석물(또는 이의 단편)을 함유하는 것으로 예측되는 시료를 우선 적어도 하나의 포획 항체와 제1 항체/분석물 복합체의 형성을 허용하는 조건하에 접촉시킨다. 하나 이상의 포획 항체를 사용하는 경우, 2개 이상의 포획 항체를 포함하는 제1 포획 항체/분석물 복합체가 형성된다. 샌드위치 검정에서, 항체, 즉, 바람직하게는 적어도 하나의 포획 항체는 시료 속에 예측되는 분석물(또는 이의 단편)의 최대 양을 초과하는 몰량으로 사용된다. 예를 들면, 완충제(예를 들면 미세입자 함유 완충제) mL당 약 5 μ g 내지 약 1mg의 항체를 사용할 수 있다.

[0432]

단지 하나의 항체에 의한 결합이 요구되므로 소 분석물을 측정하기 위해 흔히 사용되는 경쟁적 억제 면역검정은 순차적이고 일반적인 형식을 포함한다. 순차적인 경쟁적 억제 면역검정에서, 목적한 분석물에 대한 포획 항체는 미세역가 플레이트 또는 다른 고체 지지체의 웰 상에 피복된다. 목적한 분석물을 함유하는 시료를 웰에 가하는 경우, 목적한 분석물은 포획 항체에 결합한다. 세척 후, 공지된 양의 표지된[예를 들면, 바이오틴 또는 서양고추냉이 퍼옥시다제(HRP)] 분석물을 웰에 가한다. 효소 표지에 대한 기질은 시그날을 생성하는데 필수적이다. HRP에 대해 적합한 기질의 예는 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB)이다. 세척한 후, 표지된 분석물에 의해 생성된 시그날을 측정하며 이는 시료 중 분석물의 양에 대해 반비례한다. 일반적인 경쟁적 억제 면역검정에서, 목적한 분석물에 대한 항체는 고체 지지체(예를 들면, 미세역가 플레이트의 웰) 상에 피복시킨다. 그러나, 순차적인 경쟁적 억제 면역검정과는 달리, 시료 및 표지된 분석물을 웰에 동시에 가한다. 시료중 임의의 분석

물은 포획 항체에 대한 결합에 대해 표지된 분석물과 경쟁한다. 세척 후, 표지된 분석물에 의해 생성된 시그널을 측정하며 이는 시료중 분석물의 양에 반비례한다.

[0433] 임의로, 시험 시료를 적어도 하나의 포획 항체(예를 들면, 제1 포획 항체)와 접촉시키기 전에, 적어도 하나의 포획 항체를 시험 시료로부터 제1 항체/분석물(또는 이의 단편) 복합체의 분리를 촉진시키는 고체 지지체와 결합시킬 수 있다. 포획 항체가 결합하는 기질은 시료로부터 포획 항체-분석물 복합체의 분리를 촉진시키는 임의의 적합한 고체 지지체 또는 고체 상일 수 있다.

[0434] 예는 미세역가 플레이트, 시험관, 다공성 젤(예를 들면, 실리카 젤, 아가로즈, 텍스트란 또는 젤라틴), 중합체 성 필름(예를 들면, 폴리아크릴아미드), 비드(예를 들면, 폴리스티렌 비드 또는 자성 비드), 여과기/막의 스트립(예를 들면, 니트로셀룰로즈 또는 나일론), 미세입자[예를 들면, 라텍스 입자, 자기화할 수 있는 미세입자(예를 들면, 산화철 또는 산화크롬 공극 및 동종- 또는 이종-중합체성 피복물을 가지며 직경이 약 1 내지 10마이크론인 미세입자]와 같은 플레이트의 웰을 포함한다. 기질은 항원에 결합하기에 적합한 표면 친화성 및 충분한 다공성을 지님으로써 검출 항체에 의해 수용되도록 하는 적합한 다공성 물질을 포함할 수 있다. 수화된 상태의 젤라틴성 물질이 사용될 수 있지만, 미세다공성 물질이 일반적으로 바람직하다. 이러한 다공성 물질은 바람직하게는, 두께가 약 0.01 내지 약 0.5 mm, 바람직하게는 약 0.1 mm인 쉬트 형태이다. 공극 크기가 약간 변할 수 있지만, 바람직하게는 공극 크기는 약 0.025 내지 약 15 마이크론, 보다 바람직하게는 약 0.15 내지 약 15 마이크론이다. 이러한 기질의 표면은 기질에 대한 항체의 공유 결합을 유발하는 화학적 과정에 의해 활성화될 수 있다. 일반적으로 기질에 대한 항원 또는 항체의 소수성 힘을 통한 흡수에 의한 비가역적 결합이 초래되며; 달리는 화학 커플링제 또는 다른 수단을 사용하여 항체를 기질에 공유결합으로 결합시킬 수 있으며, 단, 이러한 결합은 분석물에 결합하기 위한 항체의 능력을 방해하지 않는다. 달리는, 항체는 앞서 스트렙타비딘(예를 들면, DYNAL®

자성 비드, 제조원: 인비트로겐, 캘리포니아주 칼스바드 소재) 또는 바이오틴[예를 들면, Power-BindTM-SA-MP 스트렙타비딘-피복된 미세입자(제조원: 세라딘(Seradyn), 인디애나주 인디아나폴리스 소재) 또는 항-종-특이적인 모노클로날 항체로 앞서 피복된 미세입자와 결합시킬 수 있다. 경우에 따라, 기질을 유도체화시켜 항체상의 각종 작용 그룹과 반응하도록 할 수 있다. 이러한 유도체화는 특정의 커플링제의 사용을 필요로 하며, 이의 예는 말레산 무수물, N-하이드록시선헬리미드 및 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 경우에 따라, 이의 각각이 분석물(들)에 대해 특이적인 항체(또는 이의 단편)과 같은 하나 이상의 포획 시약을 고체상에 상이한 물리적 또는 다를 수 있는 위치[예를 들면, 바이오칩 어레이에서와 같이 (참조: 미국 특허 제6,225,047호; 국제 특허원 공보 제WO 99/51773호; 미국 특허 제6,329,209호; 국제 특허원 공보 제WO 00/56934호, 및 미국 특허 제5,242,828호)]에서 고체 상에 부착시킬 수 있다. 포획 시약이 고체 지지체로서 질량 분광법 프로브에 부착되는 경우, 프로브에 결합된 분석물의 양은 레이저 탈착 이온화 질량 분광법으로 검출할 수 있다. 달리는, 단일 컬럼을 하나 이상의 포획 시약으로 유도체화시킨 상이한 비드로 충전시킴으로써 단일 위치에서 분석물을 포획할 수 있다[참조: 항체-기원한, 비드-계 기술, 예를 들면, 루미넥스(텍사스주 오스틴 소재)의 xMAP 기술].

[0435] 분석물(또는 이의 단편)에 대해 분석되는 시험 시료를 적어도 하나의 포획 항체(예를 들면, 제1 포획 항체)와 접촉시킨 후, 혼합물을 항온처리하여 제1 항체(또는 다중 항체)-분석물(또는 이의 단편) 복합체가 형성되도록 한다. 항온처리를 pH 약 4.5 내지 약 10.0에서, 약 2°C 내지 약 45°C의 온도로, 및 적어도 약 1분 내지 약 18시간, 바람직하게는 약 1 내지 약 24분, 가장 바람직하게는 약 4 내지 약 18분의 기간 동안 수행할 수 있다. 본원에 기술된 면역검정은 하나의 단계(시험 시료, 적어도 하나의 포획 항체 및 적어도 하나의 검출 항체를 모두 연속적으로 또는 동시에 반응 용기에 가함을 의미함) 또는 하나 이상의 단계, 예를 들면, 2 단계, 3 단계 등으로 수행할 수 있다.

[0436] (제1 또는 다중) 포획 항체/분석물(또는 이의 단편) 복합체가 형성된 후, 복합체를 이후에 적어도 하나의 검출 항체와 항체/분석물(또는 이의 단편/제2 검출 항체 복합체)의 형성을 허용하는 조건하에 접촉시킨다. "제2" 항체(예를 들면, 제2 검출 항체)로서 명확성을 위해 캡션되는(captioned) 동안, 실제로, 다수의 항체가 포획 및/또는 검출에 사용되는 경우, 적어도 하나의 검출 항체는 면역검정에 사용된 제2, 제3, 제4 등의 항체일 수 있다. 포획 항체/분석물(또는 이의 단편) 복합체를 하나 이상의 검출 항체와 접촉시키는 경우, (제1 또는 다중) 포획 항체/분석물(또는 이의 단편)/(다중) 검출 항체 복합체가 형성된다. 포획 항체(예를 들면, 제1 포획 항체)를 사용하면서, 적어도 하나의(예를 들면, 제2 특정의 후속적인) 검출 항체를 포획 항체/분석물(또는 이의 단편) 복합체와 접촉시키는 경우, 위에서 기술한 것과 동일한 조건하에서 항온처리 기간이 (제1 또는

다중) 포획 항체/분석물(또는 이의 단편)/(제2 또는 다중) 검출 항체 복합체의 형성에 요구된다. 바람직하게는, 적어도 하나의 검출 항체는 검출가능한 표지를 함유한다. 검출가능한 비드를 적어도 하나의 검출 항체(예를 들면, 제2 검출 항체)에 (제1 또는 다중) 포획 항체/분석물(또는 이의 단편)/(제2 또는 다중) 검출 항체 복합체의 형성 이전에, 이와 동시에 또는 이후에 결합시킬 수 있다. 당해 분야에 공지된 임의의 검출 가능한 표지를 사용할 수 있다[참조: 위에서 논의한 것으로서, 문헌: Polak and Van Noorden (1997) and Haugland (1996)].

[0437] 검출가능한 표지는 항체에 직접 또는 커플링제를 통해 결합시킬 수 있다. 사용될 수 있는 커플링제의 예는 시그마-알드리히(미주리주 세인트 루이스 소재)에서 시판되는 EDAC (1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드, 하이드로클로라이드)이다. 사용될 수 있는 다른 커플링제는 당해 분야에 공지되어 있다. 검출가능한 표지를 항체에 결합시키는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 또한, CPSP-아크리디늄 에스테르(즉, 9-[N-토실-N-(3-카복시프로필)]-10-(3-설포프로필)아크리디늄 카복스아미드) 또는 SPSP-아크리디늄 에스테르(즉, N10-(3-설포프로필)-N-(3-설포프로필)-아크리디늄-9-카복스아미드)와 같은 항체에 대한 검출가능한 표지의 커플링을 촉진시키는 말단 그룹을 이미 함유하는 많은 검출가능한 표지를 입수하거나 합성할 수 있다.

[0438] (제1 또는 다중) 포획 항체/분석물/(제2 또는 다중) 검출 항체 복합체는 표지의 정량화 전에 시험 시료의 나머지로부터 분리될 수 있지만 반드시 분리해야하는 것은 아니다. 예를 들어, 적어도 하나의 포획 항체(예를 들면, 제1 포획 항체)를 웰 또는 비드와 같은 고체 지지체에 결합시키는 경우, 분리는 고체 지지체와의 접촉으로부터 유액(시험 시료의)을 제거함으로써 달성할 수 있다. 달리는, 적어도 하나의 제1 포획 항체를 고체 지지체에 결합시키는 경우, 이는 분석물-함유 시료 및 적어도 하나의 제2 검출 항체와 동시에 접촉시켜 제1 (다중) 항체/분석물/제2 (다중) 항체 복합체를 형성시킨 후, 고체 지지체와의 접촉으로부터 유액(시험 시료)을 제거할 수 있다. 적어도 하나의 제1 포획 항체가 고체 지지체에 결합되지 않는 경우, (제1 또는 다중) 포획 항체/분석물/(제2 또는 다중) 검출 항체 복합체는 표지의 양의 정량화를 위한 시험 시료로부터 제거되어서는 안된다.

[0439] 표지된 포획 항체/분석물/검출 항체 복합체(예를 들면, 제1 포획 항체/분석물/제2 검출 항체 복합체)가 형성된 후, 복합체내 표지의 양을 당해 분야에 공지된 기술을 사용하여 정량한다. 예를 들면, 효소적 표지가 사용되는 경우, 표지된 복합체는 색상의 발색과 같은 정량가능한 반응을 생성하는 표지에 대한 기질과 반응한다. 표지가 방사성 표지인 경우, 표지는 신틸레이션 계수기와 같은 적절한 수단을 사용하여 정량한다. 표지가 형광 표지인 경우, 표지는 하나의 색상의 광(이는 "여기 광장"으로 공지되어 있다)을 지닌 표지로 자극시키고 자극에 대한 반응시 표지에 의해 방사된 다른 색상(이는 "방사 광장"으로 공지되어 있다)을 검출함으로써 정량화한다. 표지가 화학발광 표지인 경우, 표지는 광도계, x-선 필름, 고속 사진 필름, CCD 카메라 등을 사용하거나 가시적으로 방사된 광을 검출함으로써 정량화한다. 복합체 중 표지의 양이 정량화되면, 시험 시료 중 분석물 또는 이의 단편의 농도를 공지된 농도의 분석물 또는 이의 단편의 일련 회석을 사용하여 생성된 표준 곡선을 사용하는 것과 같은 적절한 수단으로 측정한다. 분석물 또는 이의 단편의 일련의 회석을 사용하는 것 외에, 표준 곡선을 중량적으로, 질량 분광계에 의해 및 당해 분야에 공지된 다른 기술에 의해 생성시킬 수 있다.

0440 ARCHITECT®

분석기를 사용하는 화학발광성 미세입자 검정에서, 접합체 회석물 pH는 약 6.0 +/- 0.2일 수 있으며, 미세입자 피복 완충제는 약 실온(즉, 약 17 내지 약 27°C)에서 유지될 수 있고, 미세입자 피복 완충제 pH는 약 6.5 +/- 0.2일 수 있고, 미세입자 회석물 pH는 약 7.8 +/- 0.2일 수 있다. 바람직하게는 고체는 약 0.2% 미만, 예를 들면, 약 0.15% 미만, 약 0.14% 미만, 약 0.13% 미만, 약 0.12% 미만, 또는 약 0.11% 미만, 예를 들면, 약 0.10%이다.

[0441] FPIA는 경쟁적 결합 면역검정 원리를 기초로 한다. 형광성으로 표지된 화합물은, 선형 편광된 광으로 여기되는 경우, 이의 회전율에 반비례하는 편광화도를 가진 형광을 방사할 것이다. 형광 표지된 트레이서-항체 복합체를 선형 편광된 광으로 여기시키는 경우, 형광단이 광이 흡수되는 시간과 광이 방사되는 시간 사이의 회전으로부터 구속되므로, 방사된 광은 고도로 편광되어 잔존한다. "유리된" 트레이서 화합물(즉, 항체에 결합하지 않은 화합물)이 선형 편광된 광에 의해 여기되는 경우, 이의 회전은 경쟁적인 결합 면역검정에서 생산된 상응하는 트레이서-항체 접합체보다 더 빠르다. FPIA는 특정한 취급 및 처리를 요구하는 방사성 물질이 존재하지 않으므로 RIA보다 더 유리하다. 또한, FPIA는 용이하고 신속하게 수행될 수 있는 동종 검정이다.

[0442] 상기 측면에서, 시험 시료중에서 분석물(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도를 측정하는 방법이 제공된다. 당해 방법은 (i)(i') 분석물에 결합할 수 있는 적어도 하나의 항체, 항체의 단편, 분석물에 결합할 수 있는 항체의 변이체, 분석물에 결합할 수 있는 항체의 변이체의 단편, 및 분석물에 결합할 수 있는 DVD-Ig(또는 이의

단편, 변이체 또는 변이체의 단편), 및 (ii') 적어도 하나의 검출가능한 표지를 사용하고 (ii) 시험 시료 중 분석물(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도의 직접적인 또는 간접적인 지표로서 검출가능한 표지에 의해 생성된 시그날을 대조군 또는 교정기내 분석물(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도의 직접적인 또는 간접적인 지표로서 생성된 시그날과 비교함을 포함하는 검정에 의해 분석물(또는 이의 단편)에 대해 시험 시료를 검정함을 포함한다. 교정기는 임의로 일련의 교정기의 일부이며, 여기서, 각각의 교정기는 분석물의 농도에 의해 다른 교정기와는 상이하다.

[0443] 상기 방법은 (i) 시험 시료를 분석물에 결합할 수 있는 항체, 항체의 단편, 분석물에 결합할 수 있는 항체의 변이체, 분석물에 결합할 수 있는 항체의 변이체의 단편, 분석물에 결합할 수 있는 DVD-Ig(또는 이의 단편, 변이체, 또는 변이체의 단편)로 이루어진 그룹 중에서 선택된 분석물(또는 이의 단편)에 대한 적어도 하나의 제1 특이적인 결합 파트너와 접촉시켜 제1 특이적인 결합 파트너/분석물(또는 이의 단편) 복합체를 형성하는 단계, (ii) 제1 특이적인 결합 파트너/분석물(또는 이의 단편) 복합체를 검출가능하게 표지된 항-분석물 항체, 분석물에 결합할 수 있는 항-분석물 항체의 검출가능하게 표지된 단편, 분석물에 결합할 수 있는 항-분석물 항체의 검출가능하게 표지된 변이체, 분석물에 결합할 수 있는 항-분석물 항체의 변이체의 검출가능하게 표지된 단편, 및 검출가능하게 표지된 DVD-Ig(또는 이의 단편, 변이체, 또는 변이체의 단편)으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 분석물에 대한 적어도 하나의 제2 특이적인 결합 파트너/분석물(또는 이의 단편)/제2 특이적인 결합 파트너 복합체를 형성시키는 단계, 및 (iii) 단계 (ii)에서 형성된 제1 특이적인 결합 파트너/분석물(또는 이의 단편)/제2 특이적인 결합 파트너 복합체내 검출가능한 표지에 의해 생성된 시그날을 검출하거나 측정함으로써 시험 시료내 분석물의 존재, 양 또는 농도를 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 분석물(또는 이의 단편)에 대한 적어도 하나의 제1 특이적인 결합 파트너 및/또는 분석물(또는 이의 단편)에 대한 적어도 하나의 제2 특이적인 결합 파트너가 본원에 기술된 바와 같은 DVD-Ig(또는 이의 단편, 변이체 또는 변이체의 단편)인 방법이 바람직할 수 있다.

[0444] 달리는, 상기 방법은 시험 시료를 분석물에 결합할 수 있는 항체, 항체의 단편, 분석물에 결합할 수 있는 항체의 변이체, 분석물에 결합할 수 있는 항체의 변이체의 단편, 및 DVD-Ig(또는 이의 단편, 변이체, 또는 변이체의 단편)로 이루어진 그룹 중에서 선택된 분석물(또는 이의 단편)에 대한 적어도 하나의 제1 특이적인 결합 파트너와 접촉시키고, 동시에 또는 연속적으로, 어떠한 순서로도, 시험 시료를 적어도 하나의 제1 특이적인 결합 파트너에 대한 결합에 대해 분석물(또는 이의 단편)과 경쟁할 수 있고, 검출가능하게 표지된 분석물, 제1 특이적인 결합 파트너에 결합할 수 있는 분석물의 검출가능하게 표지된 단편, 제1 특이적인 결합 파트너에 결합할 수 있는 분석물의 검출가능하게 표지된 변이체, 및 제1 특이적인 결합 파트너에 결합할 수 있는 분석물 변이체의 검출가능하게 표지된 단편으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 적어도 하나의 제2 특이적인 결합 파트너와 접촉시킴을 포함할 수 있다. 시험 시료속에 존재하는 임의의 분석물(또는 이의 단편) 및 적어도 하나의 제2 특이적인 결합 파트너는 각각 서로 경쟁하여 제1 특이적인 결합 파트너/분석물(또는 이의 단편) 복합체 및 제1 특이적인 결합 파트너/제2 특이적인 결합 파트너 복합체 각각을 형성한다. 상기 방법은 또한 단계 (ii)에서 형성된 제1 특이적인 결합 파트너/제2 특이적인 결합 파트너 복합체내 검출가능한 표지에 의해 생성된 시그날을 검출하거나 측정함으로써 시험 시료내 분석물의 존재, 양 또는 농도를 측정함을 추가로 포함하며, 여기서, 제1 특이적인 결합 파트너/제2 특이적인 결합 파트너 복합체내 검출가능한 표지에 의해 생성된 시그날은 시험 시료내 분석물의 양 또는 농도에 반비례한다.

[0445] 상기 방법은, 또한 시험 시료가 수득되는 환자의 치료학적/예방학적 치료의 효능을 진단하거나, 예측하거나 평가함을 포함할 수 있다. 상기 방법이 시험 시료를 수득한 환자의 치료학적/예방학적 치료의 효능을 평가함을 추가로 포함하는 경우, 상기 방법은 임의로 또한 효능을 개선시키기 위해 요구되는 환자의 치료학적/예방학적 치료를 변형시킴을 포함한다. 상기 방법은 자동화 시스템 또는 반-자동 시스템에서 사용하기 위해 변경시킬 수 있다.

[0446] 검정 방법(및 이를 위한 키트)과 관련하여, 문헌에 기술된 바와 같이 시판되는 항-분석물 항체 또는 항-분석물의 생산 방법을 사용하는 것이 또한 가능하다. 각종 항체의 상업적인 공급업자는 산타 크루즈 바이오테크놀로지 인코포레이티드(Santa Cruz Biotechnology Inc., 캘리포니아주 산타 크루즈 소재), 젠웨이 바이오테크, 인코포레이티드(GenWay Biotech, Inc., 캘리포니아주 샌 디에고 소재), 및 알앤드디 시스템스(RDS; 미네소타주 미네아폴리스 소재)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0447] 일반적으로, 예정된 수준은 분석물 또는 이의 단편에 대해 시험 시료를 검정하는 경우, 예를 들면 질병 또는 질병에 걸릴 위험성을 검출하기 위해 수득된 결과를 평가하기 위한 벤치마크로서 사용할 수 있다. 일반적으로, 이러한 비교에 있어서, 예정된 수준은 충분한 시간 및 적절한 조건하에 특정 검정을 수행함으로써 분석물 존재,

양 또는 농도의 질병, 장애 또는 상태의 특정 단계 또는 종점과의 또는 특정한 임상 지표와의 연결 또는 연합이 이루어지도록 함으로써 수득된다. 대표적으로, 예정된 수준은 참조 대상체(또는 대상체의 집단)의 검정으로 수득된다. 측정된 분석물은 이의 단편, 이의 분해 산물 및/또는 이의 효소적 분해 생성물을 포함할 수 있다.

[0448] 특히, 질병 예측 및/또는 치료를 모니터링하기 위해 사용된 것으로서 예정된 수준과 관련하여, 분석물 또는 이의 단편의 양 또는 농도는 "변하지 않거나", "양호하게"(또는 "양호하게 변경")되거나, "불량하게"(또는 "불량하게 변경")될 수 있다. "상승된" 또는 "증가된"은 대표적이거나 정상인 수준 또는 범위(예를 들면, 예정된 수준)보다 높거나, 다른 참조 수준 또는 범위(예를 들면, 앞서의 또는 기본 시료)보다 높은 시험 시료내 양 또는 농도를 말한다. 용어 "저하된" 또는 "감소된"은 대표적이거나 정상인 수준 또는 범위(예를 들면, 예정된 수준)보다 낮거나, 또는 다른 참조 수준 또는 범위(예를 들면, 앞서의 또는 기본 시료)보다 낮은 시험 시료내 양 또는 농도를 말한다. 용어 "변경된"은 대표적이거나 정상인 수준 또는 범위(예를 들면, 예정된 수준) 또는 다른 참조 수준 또는 범위(예를 들면, 앞서의 또는 기본 시료)에 걸쳐 변경된 시료내의 양 또는 농도를 말한다.

[0449] 분석물에 대한 대표적이거나 정상인 수준 또는 범위는 표준 실시에 따라 정의된다. 일부 예에서 분석물의 수준은 매우 낮을 것이므로, 소위 변경된 수준 또는 변경은, 실험적 오차 또는 시료 변화에 의해 설명될 수 없는, 대표적이거나 정상인 수준 또는 범위, 또는 참조 수준 또는 범위와 비교하여 특정의 전체 변화가 있는 경우 발생하는 것으로 고려될 수 있다. 따라서, 특정 시료내에서 측정된 수준은 소위 정상 대상체로부터의 유사한 시료에서 측정된 수준 또는 수준의 범위와 비교될 것이다. 이와 관련하여, "정상 대상체"는 예를 들면, 검출가능한 질병이 없는 개인이며, "정상"(때때로 "대조군"으로 명명됨) 환자 또는 집단은 예를 들면, 각각 검출가능한 질병을 나타내지 않는 것(들)이다. 또한, 분석물이 사람 집단 대부분에서 높은 수준으로 통상적으로 발견되는 경우, "정상 대상체"는 분석물의 실질적으로 검출가능하게 증가되거나 상승된 양 또는 농도가 없는 개인으로 고려될 수 있으며, "정상"(때때로 "대조군"으로 명명됨) 환자 또는 집단은 분석물의 실질적으로 검출가능한 증가되거나 상승된 양 또는 농도를 나타내지 않는 것(들)이다. "외관상 정상인 대상체"는, 분석물이 아직 또는 현재 평가되지 않는 것이다. 분석물의 수준은, 분석물이 정상적으로 검출되지 않지만(예를 들어, 정상 수준이 0이거나 정상 집단의 약 25 내지 약 75%의 범위내), 시험 시료내에서 검출되는 경우, 및 분석물이 시험 시료 속에 정상 수준보다 높게 존재하는 경우 "상승된"으로 일컬어진다. 따라서, 특히, 상기 기재내용은 특정 질병, 장애 또는 상태를 가지거나 가질 위험이 있는 대상체에 대해 스크리닝하는 방법을 제공한다. 당해 검정 방법은 또한 다른 마커 등의 검정을 포함할 수 있다.

[0450] 따라서, 본원에 기술된 방법은, 또한 대상체가 언급된 질병, 장애 또는 상태를 가지고 있는지 또는 이로 진행될 위험이 있는지를 측정하는데 사용될 수 있다. 구체적으로는, 이러한 방법은

[0451] (a) 대상체로부터의 시험 시료내에서 분석물(또는 이의 단편)의 농도 또는 양을 측정하는 단계(예를 들면, 본원에 기술된 방법 또는 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여); 및

[0452] (b) 단계 (a)에서 측정된 분석물(또는 이의 단편)의 농도 또는 양을 예정된 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있으며, 여기서, 단계 (a)에서 측정된 분석물의 농도 또는 양이 예정된 수준과 관련하여 양호한 경우, 대상체는 언급된 질병, 장애 또는 상태에 걸리거나 걸릴 위험성이 없는 것으로 측정된다. 그러나, 단계 (a)에서 측정된 분석물의 농도 또는 양이 예정된 수준과 관련하여 양호하지 않은 경우, 대상체는 언급된 질병, 장애 또는 상태에 걸리거나 걸릴 위험이 있는 것으로 측정된다.

[0453] 또한, 본원에는 대상체에서 질병의 예후를 모니터링하는 방법이 제공된다. 임의로 당해 방법은:

[0454] (a) 대상체로부터의 시험 시료내에서 분석물의 농도 또는 양을 측정하는 단계;

[0455] (b) 대상체로부터의 나중의 시험 시료내에서 분석물의 농도 또는 양을 측정하는 단계; 및

[0456] (c) 단계 (b)에서 측정한 분석물의 농도 또는 양을 단계 (a)에서 측정한 분석물의 농도 또는 양과 비교하는 단계를 포함하며, 여기서, 단계 (b)에서 측정한 농도 또는 양이 단계 (a)에서 측정한 분석물의 농도 또는 양과 비교하여 변하지 않거나 양호하지 않은 경우, 대상체내 질병은 지속되거나, 진행성이거나 악화된 것으로 측정된다. 대조적으로, 단계 (b)에서 측정된 것으로서 분석물의 농도 또는 양이 단계 (a)에서 측정한 분석물의 농도 또는 양과 비교하여 양호한 경우, 대상체에서 질병은 중단되거나, 회복되거나 개선된 것으로 측정된다.

[0457] 임의로, 상기 방법은 또한, 단계 (b)에서 측정한 분석물의 농도 또는 양을 예를 들면, 예정된 수준과 비교함을 포함한다. 또한, 임의로 상기 방법은, 상기 비교가 예를 들면, 단계 (b)에서 측정한 분석물의 농도 또는 양이 예정된 수준과 관련하여 불량하게 변경된 것으로 나타내는 경우, 대상체를 하나 이상의 약제학적 조성물로 일정

기간 동안 치료하는 것을 포함한다.

[0458] 또한, 상기 방법은 하나 이상의 약제학적 조성물을 사용하여 치료받은 대상체에서 치료를 모니터링하기 위해 사용될 수 있다. 구체적으로는, 상기 방법은 대상체에게 하나 이상의 약제학적 조성물을 투여하기 전에 대상체로부터의 제1 시험 시료를 제공하는 단계를 포함한다. 다음, 대상체로부터의 제1 시험 시료내 분석물의 농도 또는 양을 측정한다(예를 들면, 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여). 분석물의 농도 또는 양을 측정한 후, 임의로 분석물의 농도 또는 양을 예정된 수준과 비교한다. 제1 시험 시료내에서 측정된 것으로서 분석물의 농도 또는 양이 예정된 수준보다 낮은 경우, 대상체를 하나 이상의 약제학적 조성물로 치료하지 않는다. 그러나, 제1 시험 시료내에서 측정된 분석물의 농도 또는 양이 예정된 수준보다 높은 경우, 대상체를 하나 이상의 약제학적 조성물로 일정 기간 동안 치료한다. 대상체가 하나 이상의 약제학적 조성물로 치료되는 기간은 당해 분야의 숙련가에 의해 측정될 수 있다(예를 들면, 상기 기간은 약 7일 내지 약 2년, 바람직하게는 약 14일 내지 약 1년이다).

[0459] 하나 이상의 약제학적 조성물을 사용한 치료 과정 동안, 제2 및 후속적인 시험 시료를 대상체로부터 수득한다. 시험 시료 및 상기 시험 시료가 대상체로부터 수득된 시기는 중요하지 않다. 예를 들어, 제2 시험 시료는, 대상체에게 하나 이상의 약제학적 조성물을 처음 투여한 후 7일 째에 수득할 수 있으며, 제3 시험 시료는 대상체에게 하나 이상의 약제학적 조성물을 처음 투여한 후 2주째에 수득할 수 있으며, 제4 시험 시료는, 대상체에게 하나 이상의 약제학적 조성물을 처음 투여한 후 3주째에 수득할 수 있으며, 제5의 시험 시료는 대상체에게 하나 이상의 약제학적 조성물을 처음 투여한 후 4주 째에 수득할 수 있다.

[0460] 각각의 제2 또는 후속적인 시험 시료를 대상체로부터 수득한 후, 분석물의 농도 또는 양을 제2 시험 시료에서 측정하거나 후속적인 시험 시료를 측정한다(예를 들면, 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여). 이후에, 각각의 제2 및 후속적인 시험 시료에서 측정된 분석물의 농도 또는 양을 제1 시험 시료에서 측정한 것으로서 분석물의 농도 또는 양과 비교한다(예를 들면, 원래 시험 시료를 예정된 수준과 임의로 비교하였다). 단계 (c)에서 측정한 분석물의 농도 또는 양이, 단계 (a)에서 측정한 분석물의 농도 또는 양과 비교하여 양호한 경우, 대상체에서 질병은 중지되거나, 회복되거나 개선된 것으로 측정되며, 대상체에게 단계 (b)의 약제학적 조성물을 계속 투여한다. 그러나, 단계 (c)에서 측정한 농도 또는 양이 단계 (a)에서 측정한 농도 또는 양과 비교하여 불량한 경우, 대상체에서 질병은 지속되거나, 진행되거나 악화된 것으로 측정되며, 대상체에게 단계 (b)에서 대상체에게 투여된 하나 이상의 약제학적 조성물의 고 농도로 치료하거나 대상체에게 단계 (b)에서 대상체에게 투여된 하나 이상의 약제학적 조성물과는 상이한 하나 이상의 약제학적 조성물을 투여할 수 있다. 구체적으로는, 대상체를 상기 대상체의 분석물 수준을 감소시키거나 저하시키기 위해 대상체에게 앞서 제공한 하나 이상의 약제학적 조성물과는 상이한 하나 이상의 약제학적 조성물로 치료한다.

[0461] 일반적으로, 반복된 시험이 수행될 수 있는(예를 들면, 질병 진행 및/또는 치료에 대한 반응을 모니터링하는) 검정의 경우, 제2 또는 후속적인 시험 시료는, 제1 시험 시료가 대상체로부터 수득된 후 일정 시기에 수득한다. 구체적으로는, 대상체로부터의 제2 시험 시료는 제1 시험 시료를 대상체로부터 수득한 후 수분, 수시간, 수일, 수주 또는 수년째에 수득할 수 있다. 예를 들면, 제2 시험 시료는, 대상체로부터 제1 시험 시료를 수득한 후 약 1분, 약 5분, 약 10분, 약 15분, 약 30분, 약 45분, 약 60분, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간, 약 8시간, 약 9시간, 약 10시간, 약 11시간, 약 12시간, 약 13시간, 약 14시간, 약 15시간, 약 16시간, 약 17시간, 약 18시간, 약 19시간, 약 20시간, 약 21시간, 약 22시간, 약 23시간, 약 24시간, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 약 8주, 약 9주, 약 10주, 약 11주, 약 12주, 약 13주, 약 14주, 약 15주, 약 16주, 약 17주, 약 18주, 약 19주, 약 20주, 약 21주, 약 22주, 약 23주, 약 24주, 약 25주, 약 26주, 약 27주, 약 28주, 약 29주, 약 30주, 약 31주, 약 32주, 약 33주, 약 34주, 약 35주, 약 36주, 약 37주, 약 38주, 약 39주, 약 40주, 약 41주, 약 42주, 약 43주, 약 44주, 약 45주, 약 46주, 약 47주, 약 48주, 약 49주, 약 50주, 약 51주, 약 52주, 약 1.5년, 약 2년, 약 2.5년, 약 3.0년, 약 3.5년, 약 4.0년, 약 4.5년, 약 5.0년, 약 5.5.년, 약 6.0년, 약 6.5년, 약 7.0년, 약 7.5년, 약 8.0년, 약 8.5년, 약 9.0년, 약 9.5년 또는 약 10.0년째에 대상체로부터 수득할 수 있다.

[0462] 질병 진행을 모니터링하는데 사용하는 경우, 상기 검정을 사용하여 급성 상태로 고생하는 대상체에서 질병의 진행을 모니터링할 수 있다. 중요한 보호 상태로 또한 공지된 급성 상태는 예를 들면, 심혈관계 또는 분비계를 포함하는 급성의 생명을 위협하는 질병 또는 다른 중요 의학 상태를 말한다. 통상적으로, 중요한 보호 상태는 병원 치료시 위급한 의학적 시술이 요구되는 조건(응급실, 중환자실, 외상 치료 전문 센터, 또는 다른 응급 보호 환경을 포함하나, 이에 한정되지 않는다) 또는 의료보조원 또는 다른 분야-기준 의료팀에 의한 투여를 필요로 하는 상태를 말한다. 중요한 보호 상태의 경우, 반복적인 모니터링이 일반적으로 보다 짧은 시간 간격, 즉,

수분, 수시간 또는 수일(예를 들면, 약 1분, 약 5분, 약 10분, 약 15분, 약 30분, 약 45분, 약 60분, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간, 약 8시간, 약 9시간, 약 10시간, 약 11시간, 약 12시간, 약 13시간, 약 14시간, 약 15시간, 약 16시간, 약 17시간, 약 18시간, 약 19시간, 약 20시간, 약 21시간, 약 22시간, 약 23시간, 약 24시간, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일 또는 약 7일)내에 수행되며, 유사하게 초기 검정은 일반적으로 보다 짧은 시간간격, 예를 들면, 질병 또는 상태가 발병한지 약 수분, 수시간 또는 수일내에 수행된다.

[0463] 검정을 또한 사용하여 만성 또는 비-급성 상태로 고생하는 환자에서 질병의 진행을 모니터링할 수 있다. 중요하지 않은 보호 또는 비-급성 상태는 예를 들면, 심혈관 및/또는 분비계를 포함하는 급성의, 생명을 위협하는 질병 또는 다른 중요한 의학 상태 이외의 상태를 말한다. 대표적으로, 비-급성 상태는 보다 긴 기간 또는 만성 기간의 것을 포함한다. 비-급성 상태의 경우, 반복되는 모니터링은 일반적으로 보다 긴 시간간격, 예를 들면, 수시간, 수일, 수주, 수개월, 또는 수년(예를 들면, 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간, 약 8시간, 약 9시간, 약 10시간, 약 11시간, 약 12시간, 약 13시간, 약 14시간, 약 15시간, 약 16시간, 약 17시간, 약 18시간, 약 19시간, 약 20시간, 약 21시간, 약 22시간, 약 23시간, 약 24시간, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 약 8주, 약 9주, 약 10주, 약 11주, 약 12주, 약 13주, 약 14주, 약 15주, 약 16주, 약 17주, 약 18주, 약 19주, 약 20주, 약 21주, 약 22주, 약 23주, 약 24주, 약 25주, 약 26주, 약 27주, 약 28주, 약 29주, 약 30주, 약 31주, 약 32주, 약 33주, 약 34주, 약 35주, 약 36주, 약 37주, 약 38주, 약 39주, 약 40주, 약 41주, 약 42주, 약 43주, 약 44주, 약 45주, 약 46주, 약 47주, 약 48주, 약 49주, 약 50주, 약 51주, 약 52주, 약 1.5년, 약 2년, 약 2.5년, 약 3.0년, 약 3.5년, 약 4.0년, 약 4.5년, 약 5.0년, 약 5.5년, 약 6.0년, 약 6.5년, 약 7.0년, 약 7.5년, 약 8.0년, 약 8.5년, 약 9.0년, 약 9.5년 또는 약 10.0년)으로 수행되며, 유사하게 초기 검정은 일반적으로 보다 긴 시간간격, 예를 들면, 질병 또는 상태가 발병한 지 약 수시간, 수일, 수개월 또는 수년내에 수행된다.

[0464] 또한, 상기 검정은, 뇨, 혈청 또는 혈장과 같은 하나의 공급원으로부터 수득하는 대상체로부터 수득한 제1 시험 시료를 사용하여 수행할 수 있다. 임의로, 이후에, 상기 검정을 대상체로부터 수득한 제2 시험 시료를 사용하여 반복할 수 있으며, 여기서, 제2 시험 시료는 다른 공급원으로부터 수득된다. 예를 들면, 제1 시험 시료를 뇨로부터 수득한 경우, 제2 시험 시료는 혈청 또는 혈장으로부터 수득될 수 있다. 제1 시험 시료 및 제2 시험 시료를 사용한 검정으로부터 수득한 결과는 비교할 수 있다. 당해 비교를 또한 사용하여 대상체내 질병 또는 상태의 단계를 평가할 수 있다.

[0465] 더욱이, 본 기재내용은 또한, 언급된 질병, 장애 또는 상태로 고생하거나 이에 걸린 것으로 진단된 대상체가 치료로부터 유리할 것인지를 측정하는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 기재내용은 분석물 동반 진단 방법 및 생성물에 관한 것이다. 따라서, 본원에 기술된 "대상체에서 질병의 치료를 모니터링"하는 방법은 최적으로 또한 치료요법에 대한 후보를 선택하거나 확인하는 것을 포함할 수 있다.

[0466] 따라서, 특정 양태에서, 본 기재내용은 또한, 언급된 질병, 장애 또는 상태에 있거나, 이에 걸릴 위험이 있는 대상체가 치료요법에 대한 후보인지를 측정하는 방법을 제공한다. 일반적으로, 대상체는 언급된 질병, 장애 또는 상태의 일부 증상을 경험한 사람 또는 언급된 질병, 장애 또는 상태를 가지거나, 이에 걸릴 위험이 있는 것으로 실질적으로 진단된 사람, 및/또는 본원에 기술된 것으로서, 분석물 또는 이의 단편의 불량한 농도 또는 양을 나타내는 사람이다.

[0467] 상기 방법은 임의로 본원에 기술된 검정을 포함하며, 여기서, 분석물은 하나 이상의 약제학적 조성물(예를 들면, 특히 분석물을 포함하는 작용 메카니즘에 관련된 약제)을 사용하거나, 면역억제 치료요법을 사용하거나, 또는 면역흡수 치료요법에 의해 대상체를 치료하기 전 및 후에 평가되거나, 분석물은 이러한 치료 이후 평가되며 분석물의 농도 또는 양은 예정된 수준에 대해 비교된다. 치료 후 관측된 분석물의 불량한 농도 또는 양은, 대상체가 추가의 또는 연속된 치료를 받는 것으로부터 유리하지 않을 것임을 입증하는 반면, 치료 후 수득된 분석물의 양호한 농도 또는 양은, 대상체가 추가의 또는 연속된 치료를 제공받는 것으로부터 유리할 것임을 입증한다. 이러한 확인은 임상 연구의 관리 및 개선된 환자 보호의 제공을 보조한다.

[0468] 본원에 논의된 것으로서, 언급된 질병, 장애 또는 상태를 평가하기 위해 사용된 경우 본원의 특정한 양태가 유리할 수 있지만, 검정 및 키트를 사용하여 다른 질병, 장애 및 상태에서 분석물을 평가할 수 있음을 말할 필요가 없다. 검정 방법은 또한 다른 마커 등의 검정을 또한 포함할 수 있다.

[0469] 검정 방법은 제공된 질병, 장애 또는 상태를 완화시키는 화합물을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들면,

분석물을 발현하는 세포를 후보물 화합물과 접촉시킬 수 있다. 화합물과 접촉된 세포내 분석물의 발현 수준은 본원에 기술된 검정 방법을 사용하여 대조군 세포내에서의 것과 비교할 수 있다.

[0470] II. 키트

[0471] 시험 시료를 시험 시료내 분석물(또는 이의 단편)의 존재, 양 또는 농도에 대해 검정하기 위한 키트가 또한 제공된다. 당해 키트는 시험 시료를 분석물(또는 이의 단편)에 대해 검정하기 위한 적어도 하나의 성분 및 시험 시료를 분석물(또는 이의 단편)에 대해 검정하기 위한 지침을 포함한다. 시험 시료를 분석물(또는 이의 단편)에 대해 검정하기 위한 적어도 하나의 성분은 고체 상에 임의로 고정된 항-분석물 DVD-Ig(또는 이의 단편, 변이체, 또는 변이체의 단편)을 포함하는 조성물을 포함할 수 있다.

[0472] 상기 키트는 시험 시료를 분석물에 대해 면역검정, 예를 들면, 화학발광성 미세입자 면역검정에 의해 검정하기 위한 적어도 하나의 성분, 및 시험 시료를 면역검정, 예를 들면, 화학발광성 미세입자 면역검정에 의해 분석물에 대해 평가하기 위한 지침을 포함할 수 있다. 예를 들면, 키트는 분석물에 대한 적어도 하나의 특이적인 결합 파트너, 예를 들면, 항-분석물, 모노클로날/폴리클로날 항체(또는 분석물에 결합할 수 있는 이의 단편, 분석물에 결합할 수 있는 이의 변이체 또는 분석물에 결합할 수 있는 변이체의 단편) 또는 항-분석물 DVD-Ig(또는 이의 단편, 변이체 또는 변이체의 단편)을 포함할 수 있으며, 이를 어느 것도 검출가능하게 표지될 수 있다. 달리는 또는 추가로, 상기 키트는 시험 시료 속에서 항-분석물, 모노클로날/폴리클로날 항체(또는 분석물과 결합할 수 있는 이의 단편, 분석물과 결합할 수 있는 이의 변이체, 또는 분석물과 결합할 수 있는 변이체의 단편) 또는 항-분석물 DVD-Ig(또는 이의 단편, 변이체, 또는 변이체의 단편)에 대한 결합에 대해 분석물과 경쟁할 수 있는 검출가능하게 표지된 분석물(또는 항-분석물에 결합할 수 있는 이의 단편, 모노클로날/폴리클로날 항체 또는 항-분석물 DVD-Ig(또는 이의 단편, 변이체, 또는 변이체의 단편))을 포함할 수 있으며, 이를 중 어느 것도 고체 지지체상에 고정될 수 있다. 상기 키트는 교정기 또는 대조군, 예를 들면, 분리되거나 정제된 분석물을 포함할 수 있다. 상기 키트는 검정을 수행하기 위한 적어도 하나의 용기(예를 들면, 제1 특이적인 결합 파트너로 미리 회복될 수 있는, 예를 들면, 관, 미세역가 플레이트 또는 스트립), 및/또는 검정 완충제 또는 세척 완충제와 같은 완충제를 포함할 수 있으며, 이를 중 어느 것도 농축된 용액, 검출가능한 표지(예를 들면, 효소적 표지)에 대한 기질 용액 또는 정지 용액으로 제공될 수 있다. 바람직하게는, 상기 키트는 검정을 수행하는데 필수적인, 모든 성분, 즉, 시약, 표준물, 완충제, 희석제 등을 포함한다. 지침은 서면 형태 또는 디스크, CD, DVD 등과 같은 컴퓨터-판독가능한 형태일 수 있다.

[0473] 항-분석물 항체 또는 항-분석물 DVD-Ig와 같은 임의의 항체 또는 트레이서는 본원에 기술된 바와 같은 검출가능한 표지, 예를 들면, 형광단, 방사성 잔기, 효소, 바이오틴/아비딘 표지, 발색단, 화학발광 표지 등을 혼입할 수 있거나, 키트는 검출가능한 표지화를 수행하기 위한 시약을 포함할 수 있다. 항체, 교정기 및/또는 대조군은 별개의 용기 속에 제공되거나 적절한 검정 형식, 예를 들면, 미세역가 플레이트내로 예비-분산될 수 있다.

[0474] 임의로, 키트는 품질 조절 성분(예를 들면, 감도 패널, 교정기 및 양성 대조군)을 포함한다. 품질 조절 시약의 제조는 당해 분야에 익히 공지되어 있으며 각종의 면역 진단 생성물에 대한 삽입 쉬트상에 기술되어 있다. 감도 패널 구성원은 검정 수행능 특성을 확립하기 위해 임의로 사용되며, 또한 임의로 면역검정 키트 시약의 통합성 및 검정의 표준화의 유용한 지시인자이다.

[0475] 상기 키트는 또한 임의로 진단 검정을 수행하거나 완충제, 염, 효소, 효소 보조인자, 효소 기질, 검출 시약 등과 같은 품질 조절 평가를 촉진하는데 요구되는 다른 시약을 포함할 수 있다. 시험 시료를 분리 및/또는 처리하기 위한 완충제 및 용액과 같은 다른 성분(예를 들면 예비처리 시약)도 또한 키트내에 포함될 수 있다. 상기 키트는 또한 하나 이상의 다른 대조군을 포함한다. 키트의 하나 이상의 성분은 동결건조될 수 있으며, 여기서, 키트는 또한 동결건조된 성분들의 재구성에 적합한 시약을 추가로 포함할 수 있다.

[0476] 키트의 각종 성분은 임의로 경우에 따라 적합한 용기, 예를 들면, 미세역가 플레이트내에 제공된다. 키트는 또한 시료를 유지하거나 저장하기 위한 용기(예를 들면, 높 시료를 위한 용기 또는 카트리지)를 포함한다. 경우에 따라, 키트는 임의로 또한 반응 용기, 혼합 용기 및 시약 또는 시험 시료의 제조를 촉진시키는 기타 성분을 함유할 수 있다. 키트는 또한 주사기, 피펫, 핀셋, 계량 스푼 등과 같은 시험 시료를 수득하는데 보조하는 하나 이상의 장치를 포함할 수 있다.

[0477] 검출가능한 시료가 적어도 하나의 아크리디늄 화합물인 경우, 키트는 적어도 하나의 아크리디늄-9-카복실아미드, 적어도 하나의 아크리디늄-9-카복실레이트 아릴 에스테르, 또는 이의 임의의 조합물을 포함할 수 있다. 검출가능한 표지가 적어도 하나의 아크리디늄 화합물인 경우, 키트는 또한 과산화수소

공급원, 예를 들면, 완충제, 용액 및/또는 적어도 하나의 염기성 용액을 포함할 수 있다. 경우에 따라, 키트는 자성 입자, 비드, 시험관, 미세역가 플레이트, 큐벳, 막, 스캐폴딩 분자, 필름, 여과지, 디스크 또는 칩과 같은 고체 상을 함유할 수 있다.

[0478] III. 키트 및 방법의 변경

키트(또는 이의 성분), 및 시험 시료내 분석물의 존재, 양 또는 농도를 본원에 기술된 바와 같은 면역검정과 같은 검정으로 측정하는 방법은 예를 들면, 미국 특허 제5,089,424호 및 제5,006,309호에 기술된 바와 같이, 및 예를 들면, 애보트 래보러토리즈(일리노이주 애보트 파크 소재)에 의해 ARCHITECT®

로 시판되는 바와 같이, 각종의 자동화 및 반-자동화 시스템에서 사용하기 위해 변경할 수 있다.

비-자동화 시스템(예를 들면, ELISA)와 비교한 것으로서, 자동화 또는 반-자동화 시스템 사이의 차이점 중 일부는, 제1 특이적인 결합 파트너(예를 들면, 항-분석물, 모노클로날/폴리클로날 항체(또는 이의 단편, 이의 변이체, 또는 이의 변이체의 단편) 또는 항-분석물 DVD-Ig(또는 이의 단편, 이의 변이체 또는 이의 변이체의 단편)이 부착된 기질; 어떠한 방식으로도, 샌드위치 형성 및 영향받을 수 있는 분석물 반응성, 및 포획의 길이 및 시기, 검출 및/또는 임의의 세척 단계를 포함한다. ELISA와 같은 비-자동화 형식은 시료 및 포획 시약을 사용한 상대적으로 보다 긴 항온처리 시간(예를 들면, 약 2시간)을 필요로 할 수 있는 반면, 자동화 또는 반-자동화 형식(예를 들면, ARCHITECT®

, 제조원: 애보트 래보러토리즈)은 비교적 보다 짧은 항온처리 시간(예를 들면, ARCHITECT®

의 경우 대략 18분)을 가질 수 있다. 유사하게, ELISA와 같은 비-자동화 형식은 접합체 시약과 같은 검출 항체를 비교적 보다 긴 항온처리 시간(예를 들면, 약 2시간) 동안 항온처리할 수 있지만, 자동화 또는 반-자동화 형식(예를 들면, ARCHITECT®

)은 비교적 보다 짧은 항온처리 시간(예를 들면, ARCHITECT®

의 경우 약 4분)을 가질 수 있다.

[0481] 애보트 래보러토리즈로부터 이용가능한 다른 플랫폼은 AxSYM®

, IMx®

(참조: 예를 들면, 본원에 이의 전문이 참조로 인용된 미국 특허 제5,294,404호), PRISM®

, EIA(비드), 및 Quantum™ II, 및 다른 플랫폼을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 검정, 키트 및 키트 성분은 다른 형식, 예를 들면, 전기화학적 또는 다른 수동-유지되거나 보호 시점(point-of-care) 검정 시스템 상에서 사용할 수 있다. 본 기재내용은 예를 들면, 샌드위치 면역검정을 수행하는 시판되는 애보트 보호 시점(Abbott Point of Care)(i-STAT®

, 제조원: 애보트 래보러토리즈) 전기화학적 면역검정 시스템에 적용가능하다. 면역센서 및 단일-사용 시험 장치에서 이들의 제조 및 작동 방법은 예를 들면, 미국 특허 제5,063,081호, 미국 특허 공개 공보 제2003/0170881호, 미국 특허 공개 공보 제2004/0018577호, 미국 특허 공개 공보 제2005/0054078호 및 미국 특허 공개 공보 제2006/0160164호에 기술되어 있으며, 이들은 이의 전문이 이에 관한 이들의 교시를 위해 참조로 인용된다.

[0482] 특히, I-STAT®

시스템에 대한 분석물 검정의 변경과 관련하여, 다음 배열이 바람직하다: 미세제작된 규소 칩을 금 환경 작업 전극 및 은-염화은 참조 전극의 쌍으로 제조한다. 작업 전극 중 하나에, 고정된 항-분석물, 모노클로날/폴리클로날 항체(또는 이의 단편, 이의 변이체, 또는 이의 변이체의 단편) 또는 항-분석물 DVD-Ig(또는 이의 단편, 이의 변이체, 또는 이의 변이체의 단편)을 전극 위에서 패턴화된 폴리비닐 알코올의 중합체 피막에 부착시킨다. 당해 칩을 I-STAT®

카트릿지내로 면역검정에 적합한 유동체 형식으로 조립한다. 카트릿지의 시료-보유 챔버의 벽의 한 부위에는, 검출가능하게 표지될 수 있는, 항-분석물, 모노클로날/폴리클로날 항체(또는 분석물에 결합할 수 있는 이의 단

편, 이의 변이체, 또는 이의 변이체의 단편) 또는 항-분석물 DVD-Ig(또는 분석물에 결합할 수 있는 이의 단편, 이의 변이체, 또는 이의 변이체의 단편)과 같은 분석물에 대한 특이적인 결합 파트너를 포함하는 층이 존재한다. 카트릿지의 유동 파우치내에는 p-아미노페놀 포스페이트를 포함하는 수성 시약이 존재한다.

[0483] 작동시, 분석물을 함유하는 것으로 예측되는 시료를 시험 카트릿지의 보유 챔버에 가하고, 카트릿지를 I-STAT® 판독기내로 삽입한다. 분석물에 대한 특이적인 결합 파트너를 시료내로 용해한 후, 카트릿지내 펌프 성분은 시료를 칩을 함유하는 도관내로 힘을 가한다. 여기서, 이는 진동하면서 샌드위치의 형성을 촉진한다. 검정의 마지막 두번째 단계에서, 유액에 과우치 밖으로 및 도관내로 힘을 가하여 시료를 칩으로부터 폐기 챔버내로 세척한다. 검정의 최종 단계에서, 알칼리성 포스파타제 표지는 p-아미노페놀 포스페이트와 반응하여 포스페이트 그룹을 분해하고 유리된 p-아미노페놀이 작업 전극에서 전기화학적으로 산화되도록 한다. 측정된 전류를 기초로 하여, 판독기는 탑재된 알고리즘 및 공장에서 측정된 교정 곡선의 수단으로 시료내 분석물의 양을 계산할 수 있다.

[0484] 본원에서 기술한 방법 및 키트가 필수적으로 면역검정을 수행하기 위한 다른 시약 및 방법을 포함하는 것은 말할 필요가 없다. 예를 들면, 당해 분야에 공지되고/되거나 용이하게 제조되거나 예를 들면, 접합체 희석제, 미세입자 희석제, 및/또는 교정기 희석제로서 세척을 위해 최적화되어 사용될 수 있는 각종 완충제가 포함된다. 예시적인 접합체 희석제는 특정의 키트(제조원: 애보트 래보러토리즈, 일리노이주 애보트 파크 소재)에서 사용되고 2-(N-모르폴리노)에탄설풀산(MES), 염, 단백질 차단제, 항미생물제, 및 세제를 함유하는 ARCHITECT®

접합체 희석제이다. 예시적인 교정기 희석제는 MES, 기타 염, 단백질 차단제, 항미생물제를 함유하는 완충제를 포함하는 특정의 키트(제조원: 애보트 래보러토리즈, 일리노이주 애보트 파크 소재)에서 사용된 ARCHITECT®

사람 교정기 희석제이다. 또한, 2008년 12월 31일자로 출원된 미국 특허원 제61/142,048호에 기술된 바와 같이, 개선된 시그널 생성은 예를 들면, I-Stat 카트릿지 형식에서, 시그널 증폭기로서 시그널 항체에 연결된 핵산 서열을 사용하여 수득할 수 있다.

0485] 실시예

0486] 실시예 1: DVD-Ig의 설계, 작제 및 분석

0487] 실시예 1.1: 분해가능한 링커를 사용한 DVD-Ig의 단백분해성 분해

[0488] 엔테로키나제-분해된 DVD699(DVD699-C로 나타냄) 및 DVD701(DVD701-C로 나타냄)의 단백질 시료를 다음과 같이 생성하였다. 1.1 mg/ml에서 180 μl의 정제된 DVD-Ig를 20 μl의 10X 엔테로키나제-분해 완충제[500mM 트리스-HCl(pH 8.0), 10mM CaCl₂, 1% 트윈-20]와 함하였다. 당해 혼합물에, 5 U/mg의 EKMax(제조원: 인비트로겐, 제품 번호 E180-01)를 가하고, 혼합물을 실온에서 2일 동안 항온처리하였다. 모든 경쇄가 프로세싱되어 조작된 부위에서 완료됨을 입증하기 위해, 시료(환원 및 비-환원)을 SDS-PAGE 상에서 분해 전 및 후에 전개시키고, 환원 시료 속에 더 이상의 약 36 kDa 랜드(즉, 완전한 경쇄)가 존재하지 않고 대신 분해된 LC-단편으로 예측되는 것에 상응하는 약 24 kDa 및 약 12 kDa 랜드가 존재하는 경우 반응이 완료된 것으로 고려하였다. 12 kDa 단편이 여전히 분해 후 DVD-Ig 분자와 연합하는지를 입증하기 위해, 혼합물을 단백질-A 컬럼 위에서 추가로 정제하고, 12 kDa(및 24 kDa) 단백질 단편의 존재를 SDS-PAGE(환원된 시료의)로 확인하였다.

[0489] 트롬빈-분해된 DVD700(DVD700-C로 나타냄)의 단백질 시료를, 5U/mg의 트롬빈[제조원: 지이 헬쓰케어(GE Healthcare), 제품번호 27-0846-01]을 사용하는 것을 제외하고는, 유사한 방식으로 생성하였다.

표 5

NRP1 – VEGF DVD – Ig를 작제하는데 사용된 링커

| DVD-Ig 번호 | N-말단 가변 도메인 (VD) | C-말단 가변 도메인 (VD) | 중쇄 링커 서열 | 서열 번호 | 경쇄 링커 서열 | 서열 번호 |
|-----------|------------------|------------------|-----------|-------|---------------|-------|
| DVD050 | NRP1 | VEGF | ASTKGP | 21 | TVAAP | 13 |
| DVD695 | NRP1 | VEGF | ASTKGP | 21 | TVDDDDKAAP | 35 |
| DVD695-C | NRP1 | VEGF | ASTKGP | 21 | TVDDDDK / AAP | 35 |
| DVD696 | NRP1 | VEGF | ASTKGP | 21 | LVPRGSAAP | 36 |
| DVD696-C | NRP1 | VEGF | ASTKGP | 21 | LVPR / GSAAP | 36 |
| DVD697 | NRP1 | VEGF | GGGGGGGP | 27 | GGGGGGP | 31 |
| DVD698 | NRP1 | VEGF | GGGGGGGGP | 28 | GGGGGGGP | 27 |

[0490]

[0491] "-C"는, 조작된 경쇄 링커가 트롬빈(DVD700-C) 또는 엔테로키나제(DVD699-C, DVD701-C)로 처리되었음을 나타낸다.

표 6

SOST - TNF DVD-Ig를 작제하는데 사용된 링커

| DVD-Ig ID | N-말단 가변 도메인 (VD) | C-말단 가변 도메인 (VD) | 중쇄 링커 서열 | 서열 번호 | 경쇄 링커 서열 | 서열 번호 |
|-----------|------------------|------------------|-------------------|-------|------------------------|-------|
| DVD278 | SOST | TNF | ASTKGP | 21 | TVAAP | 13 |
| DVD699 | SOST | TNF | ASTKGP | 21 | TVDDDDKAAP | 35 |
| DVD699-C | SOST | TNF | ASTKGP | 21 | TVDDDDK / AAP | 35 |
| DVD700 | SOST | TNF | ASTKGP | 21 | LVPRGSAAP | 36 |
| DVD700-C | SOST | TNF | ASTKGP | 21 | LVPR / GSAAP | 36 |
| DVD701 | SOST | TNF | ASTKGPSVFPL AP | 22 | TVAADDDDKSV FIVPP | 34 |
| DVD701-C | SOST | TNF | ASTKGPSVFPL AP | 22 | TVAADDDDK / SVFIVPP | 4 |
| DVD702 | SOST | TNF | GGGGGGGP | 27 | GGGGGGP | 31 |
| DVD703 | SOST | TNF | GGGGGGGGP | 28 | GGGGGGGP | 27 |
| DVD704 | SOST | TNF | PAPNLLGGP | 29 | PAPNLLGGP | 29 |
| DVD705 | SOST | TNF | PAPNLLGGP | 29 | PAPELLGGP | 32 |
| DVD706 | SOST | TNF | PNLLGGP | 30 | PAPNLLGGP | 29 |
| DVD707 | SOST | TNF | PAPNLLGGP | 29 | PTISPAPNLLGGP | 33 |
| DVD708 | SOST | TNF | PNLLGGP | 30 | PTISPAPNLLGGP | 33 |

[0492]

[0493] "-C"는, 조작된 경쇄 링커가 트롬빈(DVD700-C) 또는 엔테로키나제(DVD699-C, DVD701-C)로 처리되었음을 나타낸다.

실시예 1.2: 모 항체 및 DVD-Ig를 확인하고 특성화하기 위해 사용된 검정

[0495] 다음 검정을 실시예 전체에서 사용하여 달리 나타내지 않는 한 모 항체 및 DVD-Ig를 확인하고 특성화한다.

실시예 1.2.1: 모 항체 및 DVD-Ig의 이들의 표적 항원(들)에 대한 결합 및 친화성을 측정하기 위해 사용된 검정**실시예 1.2.1.A: 직접 결합 ELISA**

[0498] 목적한 표적 항원에 결합하는 항체에 대해 스크리닝하기 위한 효소 결합된 면역흡착 검정을 다음과 같이 수행하였다. 고 결합 ELISA 플레이트[제조원: 코닝 코스타(Corning Costar) 제품번호 3369, 메사추세츠주 악톤 소재]를 100mL/웰의 10mg/mL의 목적한 표적 항원(제조원: 알앤드디 시스템스, 미네소타주 미네아폴리스) 또는 바람직한 표적 항원 세포의 도메인/FC 융합 단백질(제조원: 알앤드디 시스템스, 미네소타주 미네아폴리스) 또는 모노클로날 마우스 항-폴리히스티딘 항체(제조원: 알앤드디 시스템스 # MAB050, 미네소타주 미네아폴리스 소재)로 포스페이트 완충된 염수[10X PBS, 제조원: 애보트 바이오리서치 센터(Abbott Bioresearch Center),

Media Prep# MPS-073, 메사추세츠주 우스터 소재) 속에서 밤새 4°C에서 피복하였다. 플레이트를 0.02% 트윈 20을 함유하는 PBS로 4회 세척하였다. 300 mL/웰의 차단 용액(탈지분유, 각종 소매업자, PBS 중 2%로 희석)을 1/2시간 동안 실온에서 가하여 플레이트를 차단시켰다. 플레이트를 0.02% 트윈 20을 함유하는 PBS로 차단한 후 4회 세척하였다.

[0499] 달리는, 100 μl/웰의 10 mg/ml의 히스티딘(His) 태그된 바람직한 표적 항원(제조원: 알앤드디 시스템스, 미네소타주 미네아폴리스)을 위에서 기술한 바와 같이 모노클로날 마우스 항-폴리히스티딘 항체로 피복시킨 ELISA 플레이트에 가하고 1시간 동안 실온에서 항온처리하였다. 웰을 0.02% 트윈 20을 함유하는 PBS로 4회 세척하였다.

[0500] 위에서 기술한 바와 같이 차단 용액 속에 희석시킨 100 μl의 항체 또는 DVD-Ig 제제를 위에서 기술한 바와 같은 목적한 표적 항원 플레이트 또는 목적한 표적 항원/FC 융합체 플레이트 또는 항-폴리히스티딘 항체/His 태그된 바람직한 표적 항원 플레이트에 가하고 1시간 동안 실온에서 항온처리하였다. 웰을 0.02% 트윈 20을 함유하는 PBS로 4회 세척한다.

[0501] 100 μl의 10ng/mL 염소 항-사람 IgG-FC 특이적인 HRP 접합된 항체[제조원: 서던 바이오텍(Southern Biotech) # 2040-05, 앨라바마주 버밍햄 소재]를 바람직한 표적 항원 플레이트 또는 항-폴리히스티딘 항체/히스티딘 태그된 바람직한 표적 항원 플레이트의 각각의 웰에 가하였다. 달리는, 100 μl의 10 ng/mL 염소 항-사람 IgG-카파 경쇄 특이적인 HRP 접합된 항체[제조원: 서던 바이오텍 # 2060-05 앨라바마주 버밍햄 소재]를 바람직한 표적 항원/FC 융합체 플레이트의 각각의 웰에 가하고 1시간 동안 실온에서 항온처리하였다. 플레이트를 0.02% 트윈 20을 함유하는 PBS로 4회 세척하였다.

[0502] 100 μl의 향상된 TMB 용액[제조원: 네오젠 코포레이션(Neogen Corp.) #308177, K Blue, 켄터키주 렉싱تون 소재]을 각각의 웰에 가하고 10분 동안 실온에서 항온처리하였다. 50 mL의 1N 황산을 가하여 반응을 중지시켰다. 플레이트를 450 nm의 과장에서 분광광도법으로 판독하였다.

[0503] 표 7은 NRP1/VEGF 직접 결합 검정에 사용된 항원의 목록을 함유한다.

[0504] 표 8은 NRP1/VEGF 직접 결합 ELISA 검정에서 시험된 항체 및 DVD-Ig 작제물에 대한 EC50을 nM로 나타낸 결합 데이터를 함유한다.

[0505] 직접 결합 ELISA에서, 결합은 때때로 관측되지 않았으며, 아마도, 플라스틱 표면에 피복된 경우 표적 항원상의 항체 결합 부위가 "차폐"되거나 항원이 "왜곡"되기 때문인 것 같다. 이의 표적에 결합하는 DVD-Ig의 불능은 또한 직접 결합 ELISA 형식에 의해 DVD-Ig에 부과된 입체적 제한에 기인할 수 있다. 직접 결합 ELISA 형식에 결합하지 않은 모 항체 및 DVD-Ig는 FACS, Biacore 또는 생검정과 같은 다른 ELISA 형식에서 표적 항원에 결합하였다. DVD-Ig의 비-결합은 또한 앞서 나타낸 바와 같이, DVD-Ig의 2개의 가변 도메인 사이의 링커 길이를 조절함으로써 회복되었다.

표 7

직접 결합 ELISA에 사용된 항원

| 검정 | 항원 | 판매원 지정명 | 판매원 | 제품번호 |
|------|------|---------------------|-----|-------------|
| NRP1 | NRP1 | 뉴로필린-1 Npn-1-His 태그 | R&D | 3870-N1-025 |
| VEGF | VEGF | VEGF 1-165 aa | R&D | 293-VE-010 |

[0506]

표 8

각종 서열, 배향 및 링커 조합을 가진 4개의 DVD 작제물의 NRP1 및 VEGF 직접 결합 ELISA

| DVD-Ig 번호 | N-말단 VD 서열 번호 | N-말단 VD EC50 (nM) | N-말단 참조 항체 번호 | N-말단 참조 항체 EC50 (nM) | HC 링커 | LC 링커 | C-말단 VD 서열 번호 | C-말단 VD EC50 (nM) | C-말단 참조 항체 번호 | C-말단 참조 항체 EC50 (nM) |
|-----------|---------------|-------------------|---------------|----------------------|-------|-------------|---------------|-------------------|---------------|----------------------|
| DVD695 | NRP1 (서열 1) | 0.32 | AB016 | 0.28 | HG-짧은 | LK-(EK)-짧은 | VEGF (서열 1) | 0.37 | AB014 | 0.45 |
| DVD696 | NRP1 (서열 1) | 0.28 | AB016 | 0.28 | HG-짧은 | LK-(THR)-짧은 | VEGF (서열 1) | 0.33 | AB014 | 0.45 |
| DVD697 | NRP1 (서열 1) | 0.27 | AB016 | 0.28 | H-7GP | L-6GP | VEGF (서열 1) | 0.42 | AB014 | 0.45 |
| DVD698 | NRP1 (서열 1) | 0.30 | AB016 | 0.28 | H-8GP | L-7GP | VEGF (서열 1) | 0.35 | AB014 | 0.45 |

[0507]

[0508] 모든 DVD-Ig 작제물의 결합은 유지되었으며 모 항체의 것과 비교가능하였다. DVD-Ig 작제물 DVD695, DVD696, DVD697, 및 DVD698의 모든 N-말단 및 C-말단 가변 도메인은 이들의 표적 항원에 모 항체와 유사한 고 친화성으로 결합하였다.

[0509]

표 9는 SOST/TNF 직접 결합 검정에 사용된 항원의 목록을 함유한다.

[0510]

표 10은 SOST/TNF 직접 결합 ELISA 검정에서 시험한 항체 및 DVD-Ig 작제물에 대한 EC50을 nM로 나타낸 결합 데이터를 함유한다.

표 9

직접 결합 ELISA에 사용된 항원

| 검정 | 항원 | 판매원 지정명 | 판매원 | 제품번호 |
|--------------|--------------|-----------------------|-----|------------|
| SOST | SOST | SOST/His | R&D | 210-TA |
| TNF α | TNF α | TNF α /TNFSF1A | R&D | 293-VE-010 |

[0511]

표 10

각종 서열, 배향 및 링커 조합을 지닌 9개의 DVD 작제물의 SOST 및 TNFa 직접 결합 ELISA

| DVD-Ig 번호 | N-말단 VD 서열 번호 | N-말단 VD EC50 (nM) | N-말단 침조 항체 번호 | N-말단 침조 항체 EC50 (nM) | HC 링커 | LC 링커 | C-말단 VD 서열 번호 | C-말단 VD EC50 (nM) | C-말단 침조 항체 번호 | C-말단 침조 항체 EC50 (nM) |
|-----------|---------------|-------------------|---------------|----------------------|-------|-------------|---------------|-------------------|---------------|----------------------|
| DVD699 | SOST (서열 2) | 0.33 | AB050 | 0.30 | HG-짧은 | LK-(EK)-짧은 | TNFa | 17.76 | AB017 | 0.14 |
| DVD700 | SOST (서열 2) | 0.26 | AB050 | 0.30 | HG-짧은 | LK-(THR)-짧은 | TNFa | 7.76 | AB017 | 0.14 |
| DVD702 | SOST (서열 2) | 2.44 | AB050 | 0.30 | H-7GP | L-6GP | TNFa | 12.43 | AB017 | 0.14 |
| DVD703 | SOST (서열 2) | 0.32 | AB050 | 0.30 | H-8GP | L-7GP | TNFa | 6.91 | AB017 | 0.14 |
| DVD704 | SOST (서열 2) | 0.44 | AB050 | 0.30 | HH-긴 | LH-N-짧은 | TNFa | 2.92 | AB017 | 0.14 |
| DVD705 | SOST (서열 2) | 0.18 | AB050 | 0.30 | HH-긴 | LH-E-짧은 | TNFa | 3.33 | AB017 | 0.14 |
| DVD706 | SOST (서열 2) | 0.42 | AB050 | 0.37 | HH-짧은 | LH-N-짧은 | TNFa | 6.50 | AB017 | 0.14 |
| DVD707 | SOST (서열 2) | 0.4 | AB050 | 0.37 | HH-긴 | LH-긴 | TNFa | 3.09 | AB017 | 0.14 |
| DVD708 | SOST (서열 2) | 0.57 | AB050 | 0.37 | HH-짧은 | LH-긴 | TNFa | 3.60 | AB017 | 0.14 |

[0512]

[0513] 모든 DVD-Ig 작제물의 결합은 유지되었다. DVD-Ig 작제물 DVD699, DVD700, DVD702, DVD703, DVD704, DVD705, DVD706, DVD707, DVD708의 모든 N-말단 및 C-말단 가변 도메인은 모두 항체와 유사한 고 친화성으로 이들의 표적 항원에 결합하였다.

[0514]

실시예 1.2.1.B: BIACORE 기술을 사용한 친화성 측정

[0515]

BIACORE 검정[공급원: 비아코어, 인코포레이티드(Biacore, Inc.) 뉴저지주 피츠카타웨이 소재]은 온-속도(on-rate) 및 오프-속도(off-rate) 상수의 역학적 측정으로 항체 또는 DVD-Ig의 친화성을 측정한다. 표적 항원(예를 들면, 정제된 제조합 표적 항원)에 대한 항체 또는 DVD-Ig의 결합은 Biacore®

1000 또는 3000 장치(Biacore®)

AB, 스웨덴 업살라 소재)로 전개 HBS-EP(10 mM HEPES [pH 7.4], 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 및 0.005% 표면활성제 P20)를 25°C에서 사용하는 표면 플라스몬 공명-계 측정으로 측정한다. 모든 화학물질은 Biacore®

AB(스웨덴 업살라 소재) 또는 달리는 교재에 기술된 바와 같은 상이한 공급원으로부터 수득한다. 예를 들면, 약 5000 RU의 염소 항-마우스 IgG, (Fcγ), 10 mM 아세트산나트륨(pH 4.5) 속에 희석시킨 단편 특이적인 폴리클로날 항체[제조원: 피어스 바이오테크놀로지 인코포레이티드(Pierce Biotechnology Inc), 일리노이주 록포드 소재]를 제조업자의 지시 및 공정에 따라 25 μg/ml에서 표준 아민 커플링 키트를 사용하여 CM5 연구 등급 바이오센서 칩을 따라 직접 고정화시킨다. 바이오센서 표면상의 반응하지 않은 잔기는 에탄올아민으로 차단된다. 플로우셀(flowcell1) 2 및 4내 변형된 카복시메틸 텍스트란 표면을 반응 표면으로 사용한다. 플로우 셀 1 및 3에서 염소 항-마우스 IgG의 부재하에 변형되지 않은 카복시메틸 텍스트란을 참조 표면으로 사용한다. 역학적 분석을 위해, 1:1 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델로부터 기원한 속도 방정식을 모든 8개의 주입[글로벌 피트 분석(global fit analysis) 사용]의 연합 및 해리 상에 대해 Biaevaluation 4.0.1 소프트웨어를 사용하여 동시에 핏팅한다. 정제된 항체 또는 DVD-Ig를 염소 항-마우스 IgG 특이적인 반응 표면을 따라 포획하기 위한 HEPES-완충된 염수 속에 희석한다. 리간드(25 μg/ml)로서 포획될 항체 또는 DVD-Ig를 반응 매트릭스에 걸쳐 5 μl/분의 유동 속도로 주입한다. 연합 및 해리 속도 상수, $k_{on}(\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$ 및 $k_{off}(\text{s}^{-1})$ 을 25 μl/분의 연속된 유동 속도하에 측정한다. 속도 상수는 10 내지 200 nM 범위의 상이한 항원 농도에서 역학적 결합 측정을 수행함으로써 유도된다. 항체 또는 DVD-Ig와 표적 항원 사이의 반응의 평형 해리 상수(M)를 이후에 식 $K_D = k_{off}/k_{on}$ 에 의해 역학적 속도 상수로부터 계산한다. 결합은 시간의 함수로 기록하고 역학 속도 상수를 계산한다. 당해 검정에서

$10^6 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 와 같이 빠른 온-속도 및 10^{-6} s^{-1} 와 같이 느린 오프-속도를 측정할 수 있다.

표 11

SOST 및 TNF DVD-Ig의 BIACORE 분석

| 모 항원 또는 DVD-Ig ID | N-말단 가변 도메인 (VD) | C-말단 가변 도메인 (VD) | k_{on} (M-1s-1) | k_{off} (s-1) | K_D (M) |
|----------------------|------------------------|------------------------|----------------------|--------------------|--------------|
| AB017 | TNF | | 1.28E+06 | 1.58E-04 | 1.23E-10 |
| DVD278 | SOST | TNF | 1.74E+04 | 2.26E-04 | 1.30E-08 |
| DVD699 | SOST | TNF | 4.70E+04 | 2.39E-04 | 5.09E-09 |
| DVD699-C | SOST | TNF | 3.71E+05 | 1.95E-04 | 5.26E-10 |
| DVD700 | SOST | TNF | 5.62E+04 | 2.00E-04 | 3.56E-09 |
| DVD700-C | SOST | TNF | 3.64E+05 | 1.90E-04 | 5.22E-10 |
| DVD701 | SOST | TNF | 2.41E+05 | 1.97E-04 | 8.17E-10 |
| DVD701-C | SOST | TNF | 4.45E+05 | 1.79E-04 | 4.02E-10 |
| DVD702 | SOST | TNF | 3.14E+04 | 2.13E-04 | 6.78E-09 |
| DVD703 | SOST | TNF | 5.11E+04 | 1.93E-04 | 3.78E-09 |
| DVD704 | SOST | TNF | 2.11E+05 | 1.90E-04 | 9.00E-10 |
| DVD705 | SOST | TNF | 1.73E+05 | 2.01E-04 | 1.16E-09 |
| DVD706 | SOST | TNF | 8.40E+04 | 2.05E-04 | 2.44E-09 |
| DVD707 | SOST | TNF | 2.57E+05 | 1.85E-04 | 7.20E-10 |
| DVD708 | SOST | TNF | 1.56E+05 | 1.84E-04 | 1.18E-09 |

[0516]

주목: "-C"는, 조작된 경쇄 링커가 트롬빈(DVD700-C) 또는 엔테로키나제(DVD699-C, DVD701-C)로 처리됨을 나타낸다.

[0517]

트롬빈(DVD 700-C) 또는 엔테로키나제(DVD699-C, DVD701C)에 의한 경쇄 링커의 분해는 분해되지 않은 링커 DVD278 및 DVD699의 내부 도메인 TNF 결합에 대해 비교한 TNF에 대한 내부 도메인 결합을 개선시켰다. DVD-Ig 704 및 DVD-Ig 707로부터 기원한 링커는 내부 도메인 결합을 개선시켰다.

[0518]

실시예 1.2.2: 모 항체 및 DVD-Ig의 기능적 활성을 측정하기 위해 사용된 검정

[0519]

실시예 1.2.2.A: 사이토kin 생검정

[0520]

표적 사이토킨 또는 항-성장 인자 생물활성을 억제하거나 중화하기 위한 항-사이토킨 또는 항-성장인자 서열을 함유하는 항-사이토킨 또는 항-성장 인자 모 항체 또는 DVD-Ig의 능력을 항체 또는 DVD-Ig의 억제 효능을 측정함으로써 분석한다. 예를 들면, IL-4 매개된 IgE 생산을 억제하는 항-IL-4 항체의 능력을 사용할 수 있다. 예를 들면, 사람 나이브 B 세포를 말초 혈액, 연막 각각으로부터 피콜-파크 밀도 원심분리(Ficoll-paque density centrifugation)에 이어, 사람 sIgD FITC 표지된 염소 F(ab)₂ 항체에 대해 특이적인 MACS 비드[제조원: 밀테니 바이오테크(Miltenyi Biotec), 독일 베르기슈 글라트바흐 소재]]에 이어 항-FITC MACS 비드를 사용한 자기 분리에 의해 분리한다. 자기적으로 분류된 나이브 B 세포를 XV15 속에서 3×10^5 세포/ml로 조절하고 100 $\mu\text{l}/96$ -웰 플레이트의 웰로 5% CO₂의 존재하에 37°C에서 10일의 배양 동안 PBS 충전된 웰로 둘러싸인 플레이트의 중심내 6 x 6 배열로 플레이팅한다. 하나의 플레이트 각각은 시험할 항체당으로 제조하며, 유도되지 않은 및 유도된 대조군 및, 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 개시하여 50 μl 의 4회 농축된 예비-희석물 속에 가해진 29 ng/ml의 최종 농도로 3 배 희석시켜 이동시키는 5배 반복물의 각각 3개의 웰로 이루어진다. IgE 생산을 유도하기 위하여, 각각 50 μl 중 20 ng/ml에서 rhIL-4 및 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 농도에서 항-CD40 모노클로날 항체(제조원: 노바르티스, 스위스 바젤 소재)를 각각의 웰에 가하고, IgE 농도를 표준 샌드위치 ELISA 방법에 의해 배양 기간의 종료시 측정한다.

[0521]

실시예 1.2.2.B: 사이토kin 방출 검정

[0522]

사이토킨 방출을 유발하는 모 항체 또는 DVD-Ig의 능력을 분석한다. 말초 혈액을 3명의 건강한 공여자로부터 정맥천자에 의해 헤파린처리된 진공채혈관내로 채혈한다. 전혈을 RPMI-1640 배지로 1:5로 희석시키고 24-웰 조직 배양 플레이트 속에 0.5 mL/웰에서 둔다. 항-사이토킨 항체(예를 들면, 항-IL-4)를 RPMI-1640으로 희석시키고 플레이트 속에 0.5 mL/웰로 두어 200, 100, 50, 10, 및 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 최종 농도를 수득한다. 배양 플레이트내 전혈의 최종 희석은 1:10이다. LPS 및 PHA를 가하여 웰을 사이토킨 방출을 위한 양성 대조군으로서 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 최종 농도에서 웰을 분리한다. 폴리클로날 사람 IgG를 음성 대조군 항체로 사용한다. 실험을 2회 수행한다. 플레이트를 37°C에서 5% CO₂로 항온처리한다. 24시간 후 웰의 내용물을 시험관으로 이전시키고 5분

동안 1200 rpm에서 회전시킨다. 무세포 상청액을 수집하고 사이토킨 분석을 위해 동결시킨다. 플레이트 상 및 판내에 잔류하는 세포를 0.5 mL의 용해 용액으로 용해하고, -20°C에 두고 해동시킨다. 0.5 mL의 배지를 가하고 (무세포 상청액 시료와 동일한 수준으로 용적을 맞춤) 세포 제체를 수집하고 사이토킨 검정을 위해 동결시킨다. 무세포 상청액 및 세포 용해물을 ELISA에 의해 사이토킨 수준, 예를 들면, IL-8, IL-6, IL-1 β , IL-1RA, 또는 TNF- α 의 수준에 대해 검정한다.

[0524] 실시예 1.2.2.C: 사이토킨 교차-반응 연구

다른 사이토킨과 교차 반응하는 목적한 사이토킨(들)에 대해 지시된 항-사이토kin 모 항체 또는 DVD-Ig의 능력을 분석한다. 모 항체 또는 DVD-Ig를 비아코어 바이오센서 매트릭스 상에 고정시킨다. 항-사람 Fc mAb를 유리 아민 그룹을 통해 텍스트란 매트릭스 상의 카복실 그룹을 100mM N-하이드록시석신이미드(NHS) 및 400mM N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카보디이미드 하이드로클로라이드(EDC)로 먼저 활성화시켜 상기 매트릭스에 공유결합적으로 연결시킨다. pH4.5의 아세트산나트륨 중에 희석시킨 25 μ g/mL의 농도에서 대략 50 μ L의 각각의 항체 또는 DVD-Ig 제제를 활성화된 바이오센서를 따라 주사하고 단백질 상의 유리 아민을 활성화된 카복실 그룹에 직접 결합시킨다. 전형적으로, 5000 공명 단위(RU)가 고정된다. 반응하지 않은 매트릭스 EDC-에스테르를 1M 에탄올아민을 주사하여 탈활성화시킨다. 제2 유동 세포는 표준 아민 커플링 키트를 사용하는 사람 IgG1/K을 고정시킴으로써 표준 참조물로서 제조한다. SPR 측정을 CM 바이오센서 칩을 사용하여 수행한다. 바이오센서 표면상에서 분석될 모든 항원을 0.01% P20을 함유하는 HBS-EP 전개 완충액 속에서 희석시킨다.

사이토킨 결합 특이성을 시험하기 위하여, 과량의 목적한 사이토킨(100nM, 예를 들면, 가용성 재조합 사람)을 항-사이토킨 모 항체 또는 DVD-Ig 고정된 바이오센서 표면(5분 접촉 시간)에 따라 주입한다. 목적한 사이토킨을 주입하기 전 및 직후, HBS-EP 완충액 만이 각각의 유동 셀을 통해 유동한다. 기본선 및 사이토킨 주입의 완료 후 약 30초째에 상응하는 시점 사이의 시그널에 있어서의 전체 차이를 취하여 최종 결합 값을 나타낸다. 다시, 반응을 공명 단위로 측정한다. 바이오센서 매트릭스를 다음 시료를 주사하기 전에 10mM HCl을 사용하여 재생시키며 여기서, 결합 현상이 관측되고, 기타의 경우 전개 완충액을 매트릭스 위에 주사하였다. 사람 사이토킨(예를 들면, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-22, IL-23, IL-27, TNF- α , TNF- β , 및 IFN- γ)를 또한 고정된 마우스 IgG1/K 참조 표면 위에 동시 주입하여 어떠한 비특이적인 결합 배경도 기록한다. 참조물 및 반응 표면을 제조함으로써, 비아코어는 굴절율 변화 및 주입 노이즈의 대부분을 제거하기 위해 반응 표면 데이터로부터 참조 표면 데이터를 자동적으로 감할 수 있다. 따라서, 항-사이토킨 항체 또는 DVD-Ig 결합 반응에 기여하는 진실한 결합 반응을 확인할 수 있다.

목적한 사이토킨을 고정화된 항-사이토킨 항체에 걸쳐 주사하는 경우, 상당한 결합이 관측된다. 10mM HCl 재생은 모든 비-공유결합적으로 연합된 단백질을 제거한다. 센서그램(sensorgram)의 시험은, 가용성 사이토킨에 대한 고정화된 항-사이토킨 항체 또는 DVD-Ig 결합이 강력하고 견고함을 나타낸다. 목적한 사이토킨을 사용한 예측된 결과를 확인한 후, 나머지 재조합 사람 사이토킨의 패널을 각각의 항체 또는 DVD-Ig에 대해 별도로 시험한다. 각각의 주사 주기에 대해 항-사이토킨 항체 또는 DVD-Ig 결합하거나 결합하지 않은 사이토킨의 양을 기록한다. 3개의 독립된 실험으로부터의 결과를 사용하여 각각의 항체 또는 DVD-Ig의 특이성 프로파일을 측정한다. 목적한 사이토킨에 대해 예측된 결합을 갖고 다른 어떠한 사이토킨에 대해 결합하지 않는 항체 또는 DVD-Ig를 선택한다.

[0528] 실시예 1.2.2.D: 조직 교차 반응성

조직 교차 반응성 연구를 하기 기술한 바와 같이 32개 조직의 동결단면을 포함하는 제1 단계, 38개 이하의 조직을 포함하는 제2 단계, 및 하기 기술한 바와 같이 3개의 관련되지 않은 성인으로부터의 추가의 조직을 포함하는 제3 단계의 3개 단계로 수행한다.

단계 1: 사람 조직(1명의 사람 공여자로부터 부검 또는 생검에 의해 수득된 32개 조직(전형적으로: 부신, 위장관, 전립선, 방광, 심장, 골격근, 혈액 세포, 신장, 피부, 골수, 간, 척추, 유방, 폐, 비장, 소뇌, 림프절, 고환, 대뇌 피질, 난소, 흉선, 결장, 췌장, 갑상선, 내피, 부갑상선, 요관, 눈, 뇌하수체, 자궁, 난관 및 태반)의 동결단면(약 5 μ m)을 고정시키고 대물렌즈 상에 건조시킨다. 조직 단면의 페옥시다제 염색을 아비딘-바이오틴 시스템을 사용하여 수행한다.

단계 2: 사람 조직 38개 조직(3명의 관련되지 않은 성인으로부터 부검 또는 생검에 의해 수득한 부신, 혈액, 혈관, 골수, 소뇌, 대뇌, 자궁경부, 식도, 눈, 심장, 신장, 대장, 간, 폐, 림프절, 유방 유선, 난소, 난관, 췌

장, 부갑상선, 말초 신경, 뇌하수체, 태반, 전립선, 침샘, 피부, 소장, 척추, 비장, 위, 횡문근, 고환, 흉선, 갑상선, 편도, 요관, 뇌 방광, 및 자궁)의 동결단면(약 5 μm)을 고정시키고 대물렌즈 상에 건조시킨다. 조직 단면의 페옥시다제 염색을 아비딘-바이오틴 시스템을 사용하여 수행한다.

[0532] 단계 3: 사이노몰거스 원숭이 조직[3마리의 관련되지 않은 성숙한 원숭이로부터 부검 또는 생검에 의해 수득된 38개 조직(부신, 혈액, 혈관, 골수, 소뇌, 대뇌, 자궁경부, 식도, 눈, 심장, 신장, 대장, 간, 폐, 럼프절, 유방 유선, 난소, 난관, 췌장, 부갑상선, 말초 신경, 뇌하수체, 태반, 전립선, 침샘, 피부, 소장, 척추, 비장, 위, 횡문근, 고환, 흉선, 갑상선, 편도, 요관, 뇌방광, 및 자궁 포함)]의 동결단면(약 5 μm)을 고정시키고 대물렌즈 상에 건조시킨다. 조직 단면의 페옥시다제 염색을 아비딘-바이오틴 시스템을 사용하여 수행한다.

[0533] 항체 또는 DVD-Ig를 제2 바이오틴화된 항-사람 IgG와 함께 항온처리하고 면역 복합체로 발달시킨다. 2 및 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 항체 또는 DVD-Ig의 최종 농도에서 면역 복합체를 대물 렌즈상의 조직 단면에 가한 후 조직 단면을 아비딘-바이오틴-페옥시다제 키트를 사용하여 30분 동안 반응시킨다. 후속적으로, DAB(3,3'-디아미노벤자린), 페옥시다제 반응에 대한 기질을 4분 동안 조직 염색을 위해 적용시킨다. 항원-세파로즈 비드를 양성 대조군 조직 단면으로서 사용한다. 표적 항원 및 사람 혈청 차단 연구를 추가의 대조군으로서 제공한다. 2 및 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 항체 또는 DVD-Ig의 최종 농도에서 면역 복합체를 표적 항원(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 최종 농도) 또는 사람 혈청(10%의 최종 농도)과 함께 30분 동안 예비-항온처리한 후 대물 렌즈상의 조직 단면에 가한 후 조직 단면을 30분 동안 아비딘-바이오틴-페옥시다제 키트와 반응시킨다. 후속적으로, 페옥시다제 반응용 기질인, DAB(3,3'-디아미노벤자린)을 4분 동안 조직 염색을 위해 가한다.

[0534] 어떠한 특정의 염색도 문제의 표적 항원의 공지된 발현을 기초로 하여 예측된(예를 들면, 항원 발현과 일치하는) 또는 예측되지 않는 반응성이 있는 것으로 판단된다. 단계 2(사람 조직)와 단계 3(사이노몰거스 원숭이 조직) 사이의 조직 염색은 유사하거나 상이한 것으로 판단된다.

실시예 1.2.2.E: 시험관내에서 모 항체 또는 DVD-Ig 항체의 살종양 효과

[0536] 종양 세포상의 표적 항원에 결합하는 모 항체 또는 DVD-Ig를 살종양 활성에 대해 분석할 수 있다. 요약하면, 모 항체 또는 DVD-Ig를 D-PBS-BSA(0.1% BSA가 들어있는 둘베코 포스페이트 완충된 염수) 속에 희석시키고 사람 종양 세포에 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 내지 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 최종 농도에서 가하였다. 플레이트를 37°C에서 습윤화된, 5% CO₂ 대기 속에서 3일 동안 항온처리한다. 각각의 웰내 살아있는 세포의 수를 제조업자의 지시[프로메가(Promega), 위스콘신주 매디슨 소재]에 따라 MTS 시약을 사용하여 정량화하여 종양 성장 억제 퍼센트를 측정한다. 항체 처리되지 않은 웰을 0% 억제의 대조군으로 사용한 반면 세포가 없는 웰은 100% 억제를 나타내는 것으로 고려한다.

[0537] 아폽토시스 평가를 위해, 카스파제-3 활성화를 다음 프로토콜로 측정한다: 96 웰 플레이트 속에서 항체-처리된 세포를 120 μl 의 1x 용해 완충제[1.67mM 헤페스(Hepes), pH 7.4, 7mM KC1, 0.83mM MgCl₂, 0.11mM EDTA, 0.11mM EGTA, 0.57% CHAPS, 1mM DTT, 1x 프로테아제 억제제 칙테일 정제; EDTA 무함유; 제조원: 로슈 파마슈티칼스 (Roche Pharmaceuticals), 뉴저지주 너틀리 소재] 속에서 실온으로 20분 동안 진탕시키면서 측정한다. 세포 용해 후, 80 μl 의 카스파제-3 반응 완충제[48mM 헤페스, pH 7.5, 252mM 슈크로즈, 0.1% CHAPS, 4mM DTT, 및 20 μM Ac-DEVD-AMC 기질; 제조원: 바이오몰 리서치 랩스, 인코포레이티드(Biomol Research Labs, Inc.), 펜실바니아 플라يم마우쓰 미팅 소재]를 가하고 플레이트를 2시간 동안 37°C에서 항온처리한다. 플레이트를 1420 VICTOR 다중표지 계수기(Multilabel Counter)[제조원: 퍼킨 엘머 라이프 사이언시즈(Perkin Elmer Life Sciences), 일리노이주 다우너스 그로브 소재] 상에서 다음 세팅을 사용하여 판독한다: 여기(excitation) = 360/40, 방사 = 460/40. 동형 항체 대조군-처리된 세포에 대해 항체-처리된 세포로부터의 형광성 단위의 증가는 아폽토시스의 지표이다.

실시예 1.2.2.F: 시험관내에서 항체 또는 DVD-Ig에 의한 수용체 활성화의 억제

[0539] 세포 수용체 또는 이들의 리간드에 결합하는 모 항체 또는 DVD-Ig를 수용체 활성화의 억제에 대해 시험할 수 있다. D-PBS-BSA(0.1% BSA가 들어있는 둘베코 포스페이트 완충된 염수) 속에 희석된 모 항체 또는 DVD-Ig를 사람 암종 세포에 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 내지 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 최종 농도로 가한다. 플레이트를 37°C에서 습윤화된, 5% CO₂ 대기 속에서 1시간 동안 항온처리하였다. 성장 인자(예를 들면, IGF1 또는 IGF2)를 1 내지 100 ng/mL의 농도에서 세포에 5 내지 15분 동안 가하여 수용체(예를 들면, IGF1R) 자가포스포릴화를 자극한다. 항체 처리되지 않은 웰을 0% 억제의 대조군으로 사용하는 한편, 성장 인자 자극이 없는 웰을 100% 억제를 나타내는 것으로 고려된다. 세포 용해물을 세포 추출 완충제(10 mM 트리스, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 1 mM 나트륨 오르토바나레이트, 1% 트리톤 X-100, 10% 글리세롤, 0.1% SDS, 및 프로테아제 억제제 칙테일)과 함께 항

온처리함으로써 제조한다. 당해 세포 용해물 중 포스포-IGF1R을 앤드디 시스템(미네소타주 미네아폴리스 소재)으로부터 구입한 특이적인 ELISA 키트를 사용하여 측정한다.

[0540] 실시예 1.2.2.G: 사람 암종 이종이식체(피하 옆구리, 정위 또는 자발적인 전이)의 성장에 미치는 자체 또는 화학치료요법과 병용된 항-종양 세포 항원 항체 또는 DVD-Ig의 효능

사람 암 세포를 조직 배양 플라스크 속에서 99% 생존능까지, 85% 합치율로 시험관내 성장시킨다. SCID 암컷 또는 수컷 마우스[제조원: 찰스 리버스 랩스(Charles Rivers Labs), 메사추세츠주 월밍تون 소재]를 19 내지 25 그램에서 귀에 태그하고 면도한다. 이후에, 마우스를 우측 옆구리에 1×10^6 사람 종양 세포(1:1 매트리겔)로 연구 0일째에 피하 접종한다. 사람 IgG 대조군 항체 또는 DVD-Ig의 투여(IP, QD, 3x/주) 및/또는 화학치료요법을, 마우스의 크기가 평균 종양 용적이 대략 200 내지 320 mm³인 마우스의 그룹으로 일치된 후 개시한다. 종양을 캘리퍼의 쌍으로 종양 세포 주사한지 대략 10일 째부터 개시하여 주당 2회 측정한다. 종양 용적에 있어서의 감소를 단지 비히를 또는 동형 대조군 mAb를 제공받은 동물에서 종양에 대해 항체 또는 DVD-Ig 단독 또는 화학치료요법과 병용하여 처리한 마우스에서 관찰한다.

[0542] 실시예 1.2.2.H: 유동 세포분석법에 의해 평가된 사람 종양 세포주의 표면에 대한 모노클로날 항체의 결합

목적한 세포-표면 항원 또는 사람 종양 세포주를 과발현하는 안정한 세포주를 조직 배양 플라스크로부터 수거하고 5% 테아 송아지 혈청(PBS/FCS)을 함유하는 포스페이트 완충된 염수 속에 재현탁시킨다. 염색 전에, 사람 종양 세포를 빙상에서 100 μl의 사람 IgG과 함께 5 μg/mL로 PBS/FCS 속에서 항온처리하였다. 1 내지 5×10^5 세포를 항체 또는 DVD-Ig(1 내지 2 μg/mL)과 함께 PBS/FCS 속에서 30 내지 60분 동안 빙상에서 항온처리하였다. 세포를 2회 세척하고 100 μl의 F(ab')₂ 염소 항 사람 IgG, Fc γ-피코에리트린(PBS/BSA 중 1:200 희석)[제조원: 잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch), 펜실바이너 웨스트 그로브 소재, 제품번호 #109-116-170]을 가하였다. 빙상에서 30분 항온처리한 후, 세포를 2회 세척하고 PBS/FCS 속에 재현탁시켰다. 형광성을 벡톤 디킨슨 FACSCalibur[제조원: 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson), 캘리포니아주 샌 조세 소재]를 사용하여 측정하였다.

[0544] 실시예 1.3: 목적한 사람 항원에 대한 모노클로날 항체의 생성

목적한 사람 항원 및 이의 변이체에 결합하여 이를 중화시킬 수 있는 모 마우스 mAb는 다음과 같이 수득한다:

[0546] 실시예 1.3.A: 목적한 사람 항원을 사용한 마우스의 면역화

완전 프로인트 보조제(Freund's adjuvant) 또는 이뮤노이지 보조제(Immunoeasy adjuvant)[제조원: 큐아젠(Qiagen), 캘리포니아주 발렌시아 소재]와 혼합된 20 μg의 재조합 정제된 사람 항원(예를 들면, IGF1,2)를 5마리의 6 내지 8주령의 Balb/C, 5마리의 C57B/6 마우스, 및 5마리의 AJ 마우스내로 1일째에 피하 주사한다. 24, 38, 및 49일 째에, 불완전 프로인트 보조제 또는 이뮤노이지 보조제와 혼합된 20 μg의 재조합 정제된 사람 항원 변이체를 동일한 마우스에게 피하 주사한다. 84일 또는 112일 또는 144일째에, 마우스에게 1 μg의 목적한 재조합 정제된 사람 항원을 정맥내 주사한다.

[0548] 실시예 1.3. B: 하이브리도마의 생성

실시예 1.3.A에 기술된 면역화된 마우스로부터 수득한 비장세포를 SP2/0-Ag- 14 세포와 5:1의 비율로 문현[참조: Kohler, G. and Milstein (1975) Nature, 256:495]에 기술된 확립된 방법에 따라 융합시켜 하이브리도마를 생성한다. 융합 생성물을 아자세린 및 하이포크산틴을 함유하는 선택 배지 중에 96-웰 플레이트 속에서 2.5×10^6 비장 세포/웰의 밀도로 플레이팅한다. 주입후 7 내지 10일 째에, 혼미경적 하이브리도마 콜로니를 판측한다. 하이브리도마 콜로니를 함유하는 각각의 웰로부터의 상청액을 목적한 항원에 대한 항체의 존재에 대해 ELISA로 시험하였다(실시예 1.3.A에 기술된 바와 같음). 이후에, 항원-특이적인 활성을 나타내는 상청액을 활성(실시예 1.2.2의 검정에서 기술한 바와 같음), 예를 들면, 실시예 1.2.2.A에 기술된 것과 같은 생검정에서 목적한 항원을 중화시키는 능력에 대해 시험한다.

[0550] 실시예 1.3.C: 목적한 사람 표적 항원에 대한 모노클로날 항체의 확인 및 특성화

[0551] 실시예 1.3.C.1: 모노클로날 항체 중화 활성의 분석

하이브리도마 상청액을 실시예 1.3.A 및 1.3.B에 따라 생성되어 목적 항원에 결합하고, 또한 목적 항원의 변이체("항원 변이체")에 결합할 수 있는 모 항체의 존재에 대해 검정한다. 이후에, 검정 둘다에서 양성인 항체를 갖는 상청액을 이들의 항원 중화 효능에 대해, 예를 들면, 실시예 1.2.2.A의 사이토kin 생검정에서 시험하였다.

생검정에서, 1000pM 미만, 하나의 양태에서, 100pM 미만의 IC₅₀ 값을 갖는 항체를 생산하는 하이브리도마를 규모를 확대하여 제한 회석으로 클로닝한다. 하이브리도마 세포는 10% 저 IgG 태아 소 혈청[제조원: 하이클론(Hyclone) #SH30151, 유타주 로간 소재]을 함유하는 배지로 확장시켰다. 평균, 250 mL의 각각의 하이브리도마 상청액(클론 집단으로부터 기원함)을 수거하고, 농축시키며 문헌[참조: Harlow, E. and Lane, D. 1988 "Antibodies: A Laboratory Manual"]에 기술된 바와 같이 단백질 A 친화성 크로마토그래피로 정제한다. 이의 표적 항원의 활성을 억제하는 정제된 mAb의 능력을 예를 들면, 실시예 1.2.2.A에 기술된 바와 같은 사이토kin 생검정을 사용하여 측정한다.

[0553] 실시예 1.3.C.2: 목적한 사이노몰거스 표적 항원에 대한 모노클로날 항체 교차-반응성 분석

본원에 기술된 선택된 mAb가 목적한 사이노몰거스 항원을 인지하는지를 측정하기 위해, BIACORE 분석을 본원(실시예 1.2.1.B)에 기술된 바와 같이 재조합 사이노몰거스 표적 항원을 사용하여 수행한다. 또한, 목적한 재조합 사이노몰거스 항원에 대한 mAb의 중화 효능을 또한 사이토kin 생검정(실시예 1.2.2.A)에서 측정할 수 있다. 우수한 사이노 교차-반응성(하나의 양태에서, 사람 항원에 대해 5배 반응성 이내)을 갖는 MAb를 추가의 특성화를 위해 선택한다.

[0555] 실시예 1.3.D: 각각의 쥐 항-사람 모노클로날 항체에 대한 가변 영역의 아미노산 서열의 결정

cDNA의 분리, 재조합 항-사람 마우스 mAb의 발현 및 특성화를 다음과 같이 수행한다. 각각의 아미노산 서열 측정을 위해, 대략 1×10^6 하이브리도마 세포를 원심분리로 분리하고 트리졸[제조원: 기브코 비알엘(Gibco BRL)/인비트로겐, 캘리포니아주 칼스바드 소재]을 사용하여 총 RNA를 분리하기 위해 제조업자의 지시에 따라 프로세싱한다. 총 RNA를 제1쇄 DNA 합성에 슈퍼스크립트 제1쇄 합성 시스템(제조원: 인비트로겐, 캘리포니아주 칼스바드 소재)을 사용하여 제조업자의 지시에 따라 적용시킨다. 올리고(dT)를 사용하여 폴리(A)+ RNA에 대해 선택하기 위한 제1쇄 합성을 프라이밍한다. 제1쇄 cDNA 생성물을 이후에 쥐 면역글로불린 가변 영역의 증폭을 위해 설계된 프라이머[Ig-Primer Sets, 제조원: 노바겐(Novagen), 위스콘신주 매디슨 소재]를 사용하여 PCR로 증폭시킨다. PCR 생성물을 아가로즈 젤 상에서 분리하고, 절단하며, 정제한 후, TOPO 클로닝 키트를 사용하여 pCR2.1-TOPO 벡터(제조원: 인비트로겐, 캘리포니아주 칼스바드 소재)내로 서브클로닝하고 TOP10 화학 적격 이. 콜라이(E. coli)(제조원: 인비트로겐, 캘리포니아주 칼스바드 소재)내로 형질전환한다. 콜로니 PCR을 형질전환체상에서 수행하여 삽입체를 함유하는 클론을 확인한다. 플라스미드 DNA를 삽입체를 함유하는 클론으로부터 QIAprep Miniprep kit[제조원: 퀄아젠(Qiagen), 캘리포니아주 발렌시아 소재]를 사용하여 분리한다. 플라스미드내 삽입체를 양쪽 쇄 상에서 서열분석하여 M13 정방향 및 M13 역방향 프라이머[제조원: 페르멘타스 라이프 사이언스(Fermentas Life Sciences), 메릴랜드주 하노버 소재]를 사용하여 가변 경쇄 또는 가변 중쇄 DNA 서열을 측정한다. mAb의 가변 중쇄 및 가변 경쇄 서열을 확인한다. 하나의 양태에서, 다음 단계 진행(사람화)을 위한 선도 mAb의 패널에 대한 선택 기준은 다음을 포함한다:

- 항체는 CH2에서 표준인 것을 제외하고는 어떠한 N-결합된 글리코실화 부위(NXS)도 함유하지 않는다.
- 항체는 모든 항체내 정상 시스테인 외에 어떠한 여분의 시스테인도 함유하지 않는다.
- 항체 서열은 VH 및 VL에 대한 가장 근접한 사람 배선 서열과 정렬되며 임의의 특이 아미노산은 다른 천연의 사람 항체내에서 발생에 대해 점검하여야 한다.
- N-말단 글루타민(Q)은 항체의 활성을 영향을 미치지 않는 경우 글루탐산(E)으로 변화된다. 이는 Q의 폐환으로 인한 이종성을 감소시킬 것이다.
- 효율적인 시그널 서열 분해는 질량 분광법으로 확인한다. 이는 COS 세포 또는 293 세포 물질을 사용하여 수행할 수 있다.
- 단백질 서열은 활성의 손실을 초래할 수 있는 Asn의 탈아미드화의 위험에 대해 점검된다
- 항체는 낮은 수준의 응집을 갖는다.
- 항체는, 가용성이 >5-10 mg/ml(조사 단계에서); >25 mg/ml이다.
- 항체는 동적 광 산란(Dynamic Light Scattering)(DLS)에 의해 정상 크기(5-6 nm)를 갖는다.
- 항체는 낮은 전하 이질성을 갖는다.
- 항체는 사이토kin 방출을 결여하고 있다(참조: 실시예 1.2.2.B)

[0568] · 항체는 의도된 사이토kin에 대해 특이성을 갖는다(참조: 실시예 1.2.2.C)

[0569] · 항체는 예측되지 않은 조직 교차 반응성을 결여하고 있다(참조: 실시예 1.2.2.D)

[0570] · 항체는 사람과 사이노몰거스 조직 교차 반응성 사이에 유사성을 갖는다(참조: 실시예 1.2.2.D)

실시예 1.3.2: 재조합 사람화된 모 항체

실시예 1.3.2.1: 재조합 키메라 항 사람 모 항체의 작제 및 발현

[0573] 쥐 항-사람 모 mAb의 중쇄 불변 영역을 암호화하는 DNA를 세균내에서 상동 재조합에 의한 2개의 헌지-영역 아미노산 돌연변이를 함유하는 사람 IgG1 불변 영역을 암호화하는 cDNA 단편으로 치환한다. 이들 돌연변이는 234번 (EU 번호매김) 위치에서 류신을 알라닌으로 치환시키고 235번 위치에서 류신을 알라닌으로 치환시킨다(참조: Lund et al., 1991, J. Immunol., 147:2657). 이들 항체 각각의 경쇄 불변 영역을 사람 카파 불변 영역으로 치환한다. 완전한 길이의 키메라 항체를, COS 세포내에서 pBOS 발현 플라스미드내로 키메라 중쇄 및 경쇄 cDNA를 공동-형질감염시킴으로써 일시적으로 발현시킨다(참조: Mizushima and Nagata, Nucleic Acids Research 1990, Vol 18, pg 5322). 재조합 키메라 항체를 함유하는 세포 상청액을 단백질 A 세파로즈 크로마토그래피로 정제하고 결합된 항체를 산 완충제를 첨가하여 용출시킨다. 항체를 중화시키고 PBS내로 투석한다.

[0574] 키메라 mAb를 암호화하는 중쇄 cDNA를 이의 키메라 경쇄 cDNA(둘다 pBOS 백터내에 연결된다)로 공동-형질감염시킨다. 재조합 키메라 항체를 함유하는 세포 상청액을 단백질 A 세파로즈 크로마토그래피로 정제하고 결합된 항체를 산 완충제를 첨가하여 용출시킨다. 항체를 중화시키고 PBS내로 투석시킨다.

[0575] 이후에, 정제된 키메라 항-사람 모 mAb를 실시예 1.2.1.B 및 1.2.2.B에 기술된 바와 같이, 결합하는 이들의 능력(Biacore에 의해) 및 기능적 활성, 예를 들면, IgE의 사이토kin 유도된 생산을 억제하는 이들의 능력에 대해 시험한다. 모 하이브리도마 mAb의 활성을 유지하는 키메라 mAb를 추가의 개발을 위해 선택한다.

실시예 1.3.2.2: 사람화된 항 사람 모 항체의 작제 및 발현

실시예 1.3.2.2.A: 사람 항체 골격의 선택

[0576] 각각의 쥐 가변 중쇄 및 가변 경쇄 유전자 서열을 Vector NTI 소프트웨어를 사용하여 44개의 사람 면역글로불린 배선 가변 중쇄 또는 46개의 가변 경쇄 서열(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/retrieveig.html>.의 NCBI Ig Blast 웹사이트로부터 기원)에 대해 별도로 정렬한다.

[0579] 사람화는 아미노산 서열 상동성, CDR 클러스터 분석, 발현된 사람 항체의 사용 빈도, 및 사람 항체의 결정 구조에 있어서 이용가능한 정보를 기초로 한다. 항체 결합, VH-VL 쌍, 및 다른 인자에 있어서의 가능한 효과를 고려하여, 쥐 잔기를 사람 잔기로 돌연변이시키며, 여기서, 쥐 및 사람 골격 잔기는 약간의 예외와 함께 상이하다. 추가의 사람화 전략을 고도의 상동성, 즉, 쥐 항체 가변 영역의 실제 아미노산 서열에 대한 서열 유사성을 지닌, 사람 배선 항체 서열 또는 이의 아그룹의 분석을 기초로 설계한다.

[0580] 상동성 모델링을 사용하여 항체 결합 부위, CDR의 구조에 대해 중요한 것으로 예측되는 쥐 항체 서열에 대해 고유한 잔기를 확인한다. 상동성 모델링은, 적절한 3차원 배위가 단백질에 대해 생성되는 컴퓨터화된 방법이다. 초기 배위 및 이들의 추가의 개선을 위한 안내의 공급원은 제2 단백질, 즉, 3차원 배위가 알려져 있고 이의 서열이 제1 단백질의 서열과 관련되어 있는 참조 단백질이다. 2개의 단백질의 서열 사이의 관계를 사용하여 참조 단백질 및 배위가 요구되는 단백질인 표적 단백질 사이의 상응성을 생성한다. 참조 및 표적 단백질의 주요 서열은 참조 단백질로부터 표적 단백질로 직접 이전된 2개의 단백질의 동일한 부위와 함께 정렬된다. 예를 들면, 잔기 돌연변이, 삽입 또는 결실로부터, 2개의 단백질의 미스매치된 부위에 대한 배위를 유전 구조 주형으로부터 작제하고 에너지를 개선하여 이미 이전된 모델 배위의 일치성을 보증한다. 이런 컴퓨터화된 단백질 구조를 또한 개선하거나, 모델링 연구에 직접 사용할 수 있다. 모델 구조의 품질은 참조 및 표적 단백질이 관련되는 경쟁의 정확성 및 서열 정렬이 작제되는 정밀성에 의해 결정된다.

[0581] 쥐 mAb의 경우, BLAST 검색 및 육안 관찰의 조합을 사용하여 적합한 참조 서열을 확인한다. 참조 및 표적 아미노산 서열 사이의 25%의 서열 동일성은 상동성 모델링 시험을 시도하는데 최소로 필수적인 것으로 고려된다. 서열 정렬을 수동으로 작성하고 모델 배위를 프로그램 자칼(Jackal)[참조: Petrey, D. et al. (2003) Proteins 53 (Suppl. 6): 430-435]을 사용하여 생성한다.

[0582] 선택된 항체의 쥐 및 사람 골격 영역의 주요 서열은 상당한 동일성을 공유한다. 상이한 잔기 부위는 쥐 항체의 관측된 결합 효능을 유지하기 위해 사람화된 서열내 쥐 잔기의 혼입을 위한 후보물이다. 사람과 쥐 서열 사이

에 상이한 골격 잔기의 목록은 수동으로 작성한다. 표 12는 당해 연구를 위해 선택한 골격 서열을 나타낸다.

표 12

사람 IgG 중쇄 불변 도메인 및 경쇄 불변 도메인의 서열

| 단백질 | 서열 번호 | 서열 |
|------------------|-------|---|
| | | 12345678901234567890123456789012345678901 |
| 야생형 hIgG1 불변 영역 | 80 | ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWVN NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGQTYYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSV FLFPPKPDKTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGVYPSPDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVVLSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK |
| 돌연변이 hIgG1 불변 영역 | 81 | ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWVN NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGQTYYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSV FLFPPKPDKTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGVYPSPDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVVLSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK |
| Ig 카파 불변 영역 | 82 | TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCNNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLTSKADYEKHK VYACEVTTHOGLSSPVTKSFNRGEC |
| Ig 람다 불변 영역 | 83 | QPKAAPSVTLLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYSLTPEQWKSRR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS |

[0583] 제공된 골격 잔기가 항체의 결합 특성에 영향을 미치는 것에 대한 경향성은 CDR 잔기에 대한 이의 근접성에 의존한다. 따라서, 모델 구조를 사용하여, 쥐와 사람 서열 사이에 상이한 잔기를 CDR내 임의의 원자로부터의 이들의 거리에 따라 등급을 매긴다. 임의의 CDR 원자의 4.5Å내에 속하는 잔기들을 가장 중요한 것으로 확인하고 사람화된 항체에서 쥐 잔기의 보유(즉, 역 돌연변이)용 후보물로 권장한다.

[0584] 인 실리코(*in silico*) 작제된 사람화된 항체를 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 작제한다. 각각의 가변 영역 cDNA의 경우, 각각 60 내지 80개 뉴클레오타이드의 6개 올리고뉴클레오타이드를 설계하여 각각의 올리고뉴클레오타이드의 5' 및/또는 3' 말단에서 20개 뉴클레오타이드에 의해 서로 오버랩되도록 한다. 어닐링 반응에서, 모든 6개의 올리고뉴클레오타이드를 합하고, 비등시키며, dNTP의 존재하에 어닐링한다. DNA 폴리머라제 I, 거대(클레노우) 단편[제조원: 뉴 잉글랜드 바이로랩스(New England Biolabs) #M0210, 매사추세츠주 베버리 소재]을 가하여 오버랩핑 올리고뉴클레오타이드 사이에 대략 40bp 캡을 충전시킨다. PCR을 수행하여 변형된 pBOS 벡터[참조: Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res. 18: 17]내에서 다수의 클로닝 부위에 대해 상보성인 오버행 서열을 함유하는 2개의 최외곽 프라이머를 사용하여 전체 가변 영역을 증폭시킨다. 각각의 cDNA 조립으로부터 기원한 PCR 생성물을 아가로즈 젤 상에서 분리하고 예측된 가변 영역 cDNA 크기에 상응하는 밴드를 잘라내어 정제한다. 가변 중쇄 영역을 세균내 상동 재조합에 의해 2개의 헌지-영역 아미노산 돌연변이를 함유하는 사람 IgG1 불변 영역을 암호화하는 cDNA 단편상에 프레임내(*in-frame*) 삽입한다. 이들 돌연변이는 234번 위치(EU 번호매김)에서 류신의 알라닌으로의 변화 및 235번 위치에서 류신의 알라닌으로의 변화이다[참조: Lund et al. (1991) J. Immunol. 147:2657]. 가변 경쇄 영역을 상동 재조합에 의해 사람 카파 불변 영역으로 프레임내 삽입한다. 세균 콜로니를 분리하고 플라스미드 DNA를 추출한다. cDNA 삽입물을 이들의 전체에 대해 서열분석한다. 각각의 항체에 상응하는 정확한 사람화된 중쇄 및 경쇄를 COS 세포내로 공동-형질감염시켜 완전한 길이의 사람화된 항-사람 항체를 일시적으로 생산한다. 재조합 키메라 항체를 함유하는 세포 상청액을 단백질 A 세파로즈 크로마토그래피로 정제하고 결합된 항체를 산 완충제를 가하여 용출시킨다. 항체를 중화시키고 PBS내로 투석한다.

실시예 1.3.2.3: 사람화된 항체의 특성화

[0585] 기능적 활성을 억제하는 정제된 사람화된 항체의 능력을 예를 들면, 실시예 1.2.2.A에 기술된 바와 같은 사이토킨 생검정을 사용하여 측정한다. 재조합 사람 항원에 대한 사람화된 항체의 결합 친화성을 표면 플라스몬 공명(Biacore®)

) 측정법을 사용하여 실시예 1.2.1.B에 기술된 바와 같이 측정한다. 생검정으로부터의 IC₅₀ 값 및 사람화된 항체의 친화성을 등급을 매긴다. 모 하이브리도마 mAb의 활성을 완전히 유지하는 사람화된 mAb를 추가의 개발을 위한 후보물로 선택한다. 상위 2 및 3개의 가장 양호한 사람화된 mAb를 추가로 특성화한다.

[0588] 실시예 1.3.2.3.A: 사람화된 항체의 약력학적 분석

약력학적 연구를 스플라그-다울리 래트(Sprague-Dawley rat) 및 사이노몰거스 원숭이에서 수행한다. 수컷 및 암컷 래트 및 사이노몰거스 원숭이에게 단일 투여량의 4mg/kg mAb를 정맥내 또는 피하 투여하고 시료를 항원 포획 ELISA를 사용하여 분석하고, 약력학적 매개변수를 비구획화 분석(noncompartmental analysis)으로 측정한다. 요약하면, ELISA 플레이트를 염소 항-바이오틴 항체(5 mg/ml, 4°C, 밤새)로 피복하고, 슈퍼블록(Superblock, 제조원: 피어스)로 차단하고 바이오틴화된 사람 항원과 함께 50 ng/ml에서 10% 슈퍼블록 TTBS 속에서 실온으로 2시간 동안 항온처리한다. 혈청 시료를 일련 희석(0.5% 혈청, TTBS 중 10% 슈퍼블록)시키고 플레이트상에서 30분 동안 실온으로 항온처리한다. 검출을 HRP-표지된 염소 항 사람 항체로 수행하고 농도를 4 매개변수 논리학적 피트(logistic fit)를 사용한 표준 곡선의 도움으로 측정한다. 약역학적 매개변수에 대한 값을 비-구획화 모델에 의해 WinNonlin 소프트웨어[제조원: 파사이트 코포레이션(Pharsight Corporation), 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재]를 사용하여 측정한다. 우수한 약역학적 프로파일(T1/2은 8 내지 13일 또는 그 이상이며, 낮은 제거율 및 탁월한 생이용성 50 내지 100%를 가진다)을 지닌 사람화된 mAb를 선택한다.

[0589] 실시예 1.3.2.3.B: 사람화된 모노클로날 항체의 물리화학적 및 시험관내 안정성 분석

[0591] 크기 배제 크로마토그래피

항체를 물을 사용하여 2.5 mg/mL로 희석하고 20 mL를 시마즈(Shimadzu) HPLC 시스템 상에서 TSK 겔 G3000 SWXL 컬럼[제조원: 토소 바이오사이언스(Tosoh Bioscience), 제품번호 k5539-05k]을 사용하여 분석한다. 시료를 컬럼으로부터 211 mM 황산나트륨, 92 mM 인산나트륨, pH 7.0으로 0.3 mL/분의 유동 속도에서 용출시킨다. HPLC 시스템 작동 조건은 다음과 같다:

[0593] i) 동상: 211 mM Na₂SO₄, 92 mM Na₂HPO₄*7H₂O, pH 7.0

[0594] 구배: 동용매

[0595] 유동 속도: 0.3 mL/분

[0596] 검출기 파장: 280 nm

[0597] 자동시료기 냉각기 온도: 4°C

[0598] 컬럼 오븐 온도: 주위 온도

[0599] 전개 시간: 50분

[0600] 표 13 및 14는 상기 프로토콜에 의해 측정된 단량체(예측된 분자량의 응집되지 않은 단백질) 퍼센트로서 나타낸 모 항체 및 DVD-Ig 작제물의 순도 데이터를 함유한다.

표 13

크기 배제 크로마토그래피로 측정한 DVD-Ig 작제물의 순도 (NRP1, VEGF)

| 모 항체 또는 DVD-Ig 번호 | N-말단 가변 도메인 (VD) | C-말단 가변 도메인 (VD) | % 단량체(순도) |
|----------------------|---------------------------|------------------------|-----------|
| DVD695 | NRP1 | VEGF | 96.8 |
| DVD696 | NRP1 | VEGF | 98.6 |

[0601]

[0602] DVD695 및 DVD696은 탁월한 SEC 프로파일 >90% 단량체를 나타내었다. 당해 DVD-Ig 프로파일은 모 항체에 대해 관측된 것과 유사하다.

표 14

크기 배제 크로마토그래피로 측정한 DVD-Ig 작제물의 순도 (SOST, TNF)

| 모 항체 또는 DVD-Ig 번호 | N-말단 가변 도메인 (VD) | C-말단 가변 도메인 (VD) | % 단량체(순도) |
|----------------------|---------------------------|------------------------|-----------|
| DVD699 | SOST | TNF | 94.0 |
| DVD700 | SOST | TNF | 93.2 |
| DVD701 | SOST | TNF | 91.9 |

[0603]

[0604] DVD699, DVD700 및 DVD701은 >90% 단량체를 나타내는 대부분의 DVD-Ig를 지닌 탁월한 SEC 프로파일을 나타내었다. 당해 DVD-Ig 프로파일은 모 항체에 대해 판측된 것과 유사하다.

[0605]

SDS-PAGE

[0606]

항체를 나트륨 도데실 살레이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 의해 환원 및 비-환원 조건하에서 분석한다. 아달리무마브 로트 AFP04C를 대조군으로 사용한다. 환원 조건을 위해, 시료를 100mM DTT가 들어있는 2X 트리스 글리신 SDS-PAGE 시료 완충액(제조원: 인비트로겐, 제품번호 LC2676, 로트 번호 1323208)과 1:1 혼합하고, 60°C에서 30분 동안 가열한다. 비-환원 조건을 위해, 시료를 시료 완충액과 1:1 혼합하고 100°C에서 5분 동안 가열한다. 환원 시료(10 mg/레인)을 12% 예비주조 트리스-글리신 겔(제조원: 인비트로겐, 제품번호 EC6005box, 로트 번호 6111021) 상에 로딩하고 비-환원 시료(10mg/레인)을 8% 내지 16% 예비-주조 트리스-글리신 겔(제조원: 인비트로겐, 제품번호 EC6045box, 로트 번호 6111021) 상에 로딩한다. 씨블루 플러스(SeeBlue Plus) 2(제조원: 인비트로겐, 제품번호 LC5925, 로트번호 1351542)를 분자량 마커로 사용한다. 겔을 엑스셀 슈어록 미니 셀 겔 박스(XCell SureLock mini cell gel box)(제조원: 인비트로겐, 제품번호 EI0001)내에서 전개시키고 단백질을 75 볼트에 최초로 적용시켜 시료를 겔 내에 쌓아둔 후, 염료 앞쪽이 겔의 바닥에 도달할 때까지 125의 일정한 볼트에 적용시켜 분리한다. 사용된 전개 완충제는 10X 트리스 글리신 SDS 완충제[제조원: 에이비씨(ABC), MPS-79-080106]로부터 제조된 1X 트리스 글리신 SDS 완충제이다. 겔을 콜로이드성 블루 염색(제조원: 인비트로겐 제품번호 46-7015, 46-7016)으로 밤새 염색하고 배경이 깨끗해질 때까지 밀리-큐(Milli-Q) 물로 탈색한다. 이후에, 염색된 겔을 Epson Expression 스캐너(모델 1680, S/N DASX003641)를 사용하여 스캐닝 한다.

[0607]

침강 속도 분석

[0608]

항체를 3개의 표준 2-섹터 탄소 에폰 센터피스(two-sector carbon epon centerpiece) 각각의 시료 챔버내로 로딩한다. 이를 센터피스는, 광로 길이(optical path length)가 1.2cm이고 사파이어 윈도우로 제조되었다. PBS를 참조 완충제로 사용하고 각각의 챔버는 140 μ L를 함유한다. 모든 시료를 4-홀 (AN-60Ti) 로터를 사용하여 벡크만 프로테옴랩(Beckman ProteomeLab) XL-I 분석 한외원심분리(일련번호 PL106C01) 내에서 동시에 시험한다.

[0609]

전개 조건을 프로그램화하고 원심분리 조절을 프로테옴랩(v5.6)을 사용하여 수행한다. 시료 및 로터가 분석 전 1시간 동안 열적으로 평형화되도록 한다(20.0 ± 0.1°C). 적절한 세포 로딩의 확인은 3000 rpm에서 수행하고 단일 스캔을 각각의 셀에 대해 기록한다. 침강 속도 조건은 다음과 같다:

[0610]

시료 셀 용적: 420 mL

[0611]

참조 셀 용적: 420 mL

[0612]

온도: 20°C

[0613]

로터 속도: 35,000 rpm

[0614]

시간: 8:00 시간

[0615]

UV 파장: 280 nm

[0616]

방사상 단계 크기: 0.003 cm

[0617]

데이터 수집: 시그널 평균없이 단계당 1회의 데이터 시점

[0618]

총 스캔 수: 100

[0619] 완전한 항체의 LC-MS 분자량 측정

완전한 항체의 분자량을 LC-MS로 분석한다. 각각의 항체를 물로 대략 1 mg/mL로 희석한다. 단백질 마이크로트랩[제조원: 미크롬 바이오리소스, 인코포레이티드(Michrom Bioresources, Inc), 제품번호 004/25109/03]이 장착된 1100 HPLC[제조원: 아질런트(Agilent)] 시스템을 사용하여 5 mg의 시료를 탈염시키고 API Qstar pulsar i 질량 분광계(제조원: 어플라이드 바이오시스템스)내로 도입한다. 짧은 구배를 사용하여 시료를 용출시킨다. 구배를 이동상 A(HPLC 물 중 0.08% FA, 0.02% TFA) 및 이동상 B(아세토니트릴 중 0.08% FA 및 0.02% TFA)를 사용하여 50 mL/분의 유동 속도에서 이동시킨다. 질량 분광계를 4.5 kvolt의 분무전압에서 2000 내지 3500 질량 대 전하 비의 스캔 범위를 사용하여 작동시킨다.

[0621] 항체 경쇄 및 중쇄의 LC-MS 분자량 측정

항체 경쇄(LC), 중쇄(HC) 및 탈글리코실화된 HC의 분자량 측정을 LC-MS로 분석한다. 항체를 물을 사용하여 1 mg/mL로 희석시키고 시료를 10 mM의 최종 농도의 DTT를 사용하여 30분 동안 37°C에서 LC 및 HC로 환원시킨다. 항체를 탈글리코실화하기 위해, 100 mg의 항체를 2 mL의 PNGase F, 5 mL의 10% N-옥틸글루코시드와 함께 총 100mL의 용적으로 밤새 37°C에서 항온처리한다. 탈글리코실화한 후, 시료를 10 mM DTT의 최종 농도로 30분 동안 37°C에서 환원시킨다. C4 컬럼[제조원: 바이탁(Vydac), 제품번호 214TP5115, S/N 060206537204069]이 장착된 아질런트 1100 HPLC 시스템을 사용하여 시료(5 mg)를 탈염시키고 API Qstar pulsar i 질량 분광계(제조원: 어플라이드 바이오시스템스)내로 도입한다. 짧은 구배를 사용하여 시료를 용출시킨다. 구배를 이동상 A(HPLC 물 중 0.08% FA, 0.02% TFA) 및 이동상 B(아세토니트릴 중 0.08% FA 및 0.02% TFA)를 사용하여 50 mL/분의 유동 속도에서 전개시킨다. 질량 분광계를 4.5 kvolt의 분무전압에서 800 내지 3500 질량 대 전하 비의 스캔 범위를 사용하여 작동시킨다.

[0623] 펩타이드 맵핑

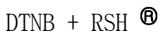
항체를 실온에서 15분 동안 75 mM 중탄산암모늄 중 6M 구아니딘 하이드로클로라이드의 최종 농도를 사용하여 변성시킨다. 변성된 시료를 10 mM DTT의 최종 농도로 37°C에서 60분 동안 환원시키고, 이어서 50 mM 요오도아세트산(IAA)을 사용하여 암실에서 37°C로 30분 동안 알킬화시킨다. 알킬화에 이어서, 시료를 밤새 4 리터의 10 mM 중탄산암모늄에 대해 4°C에서 투석한다. 투석된 시료를 1 mg/mL로 10 mM 중탄산암모늄, pH 7.8을 사용하여 희석시키고 100 mg의 항체를 트립신(제조원: 프로메가, 제품번호 V5111) 또는 Lys-C(제조원: 로슈, 제품번호 11 047 825 001)을 사용하여 1:20(w/w)의 트립신/Lys-C:항체 비에서 37°C로 4시간 동안 분해한다. 분해물을 1 mL의 1N HCl로 켄칭시킨다. 질량 분광계 측정을 이용한 펩타이드 맵핑을 위해, 40 mL의 분해물을 역상 고성능 액체 크로마토그래피 (RPHPLC)에 의해 C18 컬럼(제조원: 바이탁 제품번호 218TP51, S/N NE9606 10.3.5) 상에서 아질런트 1100 HPLC 시스템을 사용하여 분리한다. 펩타이드 분리물을 이동상 A(HPLC 등급 물 중 0.02% TFA, 0.08% FA) 및 이동상 B(아세토니트릴 중 0.02% TFA 및 0.08% FA)를 사용하여 50 mL/분의 유동 속도에서 전개시킨다. API Qstar Pulsar i 질량 분광계를 양성 모드로 4.5 kvolt의 분무전압 및 800 내지 2500 질량 대 전하 비의 스캔 범위를 사용하여 작동시킨다.

[0625] 이황화물 결합 맵핑

항체를 변성시키기 위해, 100 mL의 항체를 300 mL의 8M 구아니딘 HCl과 100 mM 중탄산암모늄 속에서 혼합한다. pH를 점검하여 이것이 7 내지 8 사이에 있도록 보증하고 시료를 15분 동안 실온에서 6M 구아니딘 HCl의 최종 농도로 변성시킨다. 변성된 시료의 일부(100 mL)를 600 mL의 밀리-큐 물로 희석시켜 1M의 최종 구아니딘-HCl 농도를 수득한다. 시료(220 mg)를 트립신(제조원: 프로메가, 제품번호 V5111, 로트번호 22265901) 또는 Lys-C(제조원: 로슈, 제품번호 11047825001, 로트번호 12808000)을 1:50 트립신 또는 1:50 Lys-C: 항체(w/w)비(4.4 mg 효소: 220 mg 시료)를 사용하여 37°C에서 대략 16시간 동안 분해한다. 추가로 5 mg의 트립신 또는 Lys-C를 시료에 가하고 분해가 추가로 2시간 동안 37°C에서 진행되도록 한다. 1 mL의 TFA를 각각의 시료에 가하여 분해를 중지시킨다. 분해된 시료를 RPHPLC에 의해 C18 컬럼(제조원: 바이탁 제품번호 218TP51 S/N NE020630-4-1A)을 사용하여 아질런트 HPLC 시스템 상에서 분리한다. 분리물을 이동상 A(HPLC 등급 물 중 0.02% TFA 및 0.08% FA) 및 이동상 B(아세토니트릴 중 0.02% TFA 및 0.08% FA)를 50 mL/분의 유동 속도에서 사용하는 펩타이드 맵핑에 사용된 것과 동일한 구배로 전개시킨다. HPLC 작동 조건은 펩타이드 맵핑에 사용된 것과 동일하다. API QSTAR Pulsar i 질량 분광계를 양성 모드로 4.5 kvolt 분무전압 및 800 내지 2500 질량 대 전하 비의 스캔 범위를 사용하여 작동시킨다. 이황화물 결합을 펩타이드의 관측된 MW와 이황화물 결합에 의해 결합된 트립신 또는 Lys-C 펩타이드의 예측된 MW와 매칭시켜 지정한다.

[0627] 유리 설프하이드릴 측정

[0628] 항체내 유리 시스테인을 정량화하기 위해 사용된 방법은 엘만 시약, 5,5'-디티오-비스(2-니트로벤조산)(DTNB)과 설프하이드릴 그룹(SH)의 반응을 기초로 하며, 당해 반응으로 특징적인 발색단 생성물, 5-티오-(2-니트로벤조산)(TNB)이 생성된다. 당해 반응은 하기 식으로 예시된다:



[0630] TNB-의 흡광도는 412 nm에서 Cary 50 분광광도계를 사용하여 측정한다. 흡광 곡선은 유리 SH 표준으로서 2 머캅토에탄올(b-ME)을 사용하여 플롯팅하며 단백질내 유리 설프하이드릴 그룹의 농도는 시료의 412nm에서의 흡광도로부터 측정한다.

[0631] b-ME 표준 스톡은 14.2M b-ME를 HPLC 등급 물로 0.142 mM의 최종 농도로 일련 희석시켜 제조한다. 이후에, 각각의 농도에서 표준물을 3개 제조한다. 항체를 아미콘 울트라 10,000 MWCO 원심분리 여과기[제조원: 밀리포어(Millipore, 제품번호 UFC801096, 로트번호 L3KN5251)]를 사용하여 10 mg/mL로 농축시키고 완충제를 아달리무마브(5.57 mM 인산나트륨 일염기성, 8.69 mM 인산나트륨 이염기성, 106.69 mM NaCl, 1.07 mM 시트르산나트륨, 6.45 mM 시트르산, 66.68 mM 만니톨, pH 5.2, 0.1% (w/v) 트윈)에 대해 사용된 제형 완충액으로 변화시킨다. 시료를 진탕기 속에서 실온으로 20분 동안 혼합한다. 이후에, 180 mL의 100 mM 트리스 완충액, pH 8.1을 각각의 시료 및 표준물에 가한 후 10 mM 포스페이트 완충제, pH 8.1 중 300mL의 2 mM DTNB를 가한다. 완전 혼합한 후, 시료 및 표준물을 412 nm에서의 흡광에 대해 Cary 50 분광광도계로 측정한다. 표준 곡선은 유리 SH 및 b-ME 표준물의 OD₄₁₂ nm의 양을 플롯팅함으로써 수득한다. 시료의 유리 SH 함량은 블랭크를 감한 후의 당해 곡선을 기초로 계산한다.

[0632] 약한 양이온 교환 크로마토그래피

[0633] 항체를 10 mM 인산나트륨, pH 6.0을 사용하여 1 mg/mL로 희석한다. 전하 이질성을 WCX-10 ProPac 분석 컬럼 [제조원: 디오넥스(Dionex), 제품번호 054993, S/N 02722]이 장착된 시마즈(Shimadzu) HPLC 시스템을 사용하여 분석한다. 시료를 컬럼 상에 80% 이동상 A(10 mM 인산나트륨, pH 6.0) 및 20% 이동상 B(10 mM 인산나트륨, 500 mM NaCl, pH 6.0) 속에서 로딩하고 1.0 mL/분의 유동 속도로 용출시킨다.

[0634] 올리고사카라이드 프로파일링

[0635] 항체의 PNGase F 처리후 방출된 올리고사카라이드를 2-아미노벤즈아미드(2-AB) 표지 시약으로 유도체화한다. 형광성-표지된 올리고사카라이드를 정상상 고성능 액체 크로마토그래피(NPHPLC)로 분리하고 상이한 형태의 올리고사카라이드를 공지된 표준물과 보유 시간 비교를 기초로 하여 특성화한다.

[0636] 항체를 우선 PNGaseF로 분해하여 중쇄의 Fc 부위로부터 N-결합된 올리고사카라이드를 분해한다. 항체(200 mg)를 500 mL의 에펜도르프 관 속에 2 mL의 PNGase F 및 3 mL의 10% N-옥틸글루코사이드와 함께 둔다. 포스페이트 완충된 염수를 가하여 최종 용적이 60 mL가 되도록 한다. 시료를 밤새 37°C에서 700 RPM으로 설정된 에펜도르프 열혼합기 내에서 항온처리한다. 아달리무맙 로트 AFP04C를 또한 대조군으로서 PNGase F를 사용하여 분해한다.

[0637] PNGase F 처리 후, 시료를 95°C에서 5분 동안 750 RPM으로 설정된 에펜도르프 열혼합기 속에서 항온처리하여 단백질을 침전시킨 후, 시료를 에펜도르프 원심분리기에 2분 동안 10,000 RPM에서 두어 침전된 단백질을 회전 침전시킨다. 올리고사카라이드를 함유하는 상청액을 500 mL 에펜도르프 관으로 이전시키고 스피드-백(speed-vac) 속에 65°C로 건조시킨다.

[0638] 올리고사카라이드를 2AB로 프로자임(Prozyme)에서 시판하는 2AB 표지화 키트(제품번호 GKK-404, 로트번호 132026)를 사용하여 표지한다. 표지 시약은 제조업자의 지시에 따라 제조한다. 아세트산(150 mL, 키트내에 제공)을 DMSO 바이알(키트내에 제공)에 가하고 용액을 수회 상하로 페펫팅하여 혼합한다. 아세트산/DMSO 혼합물(100 mL)을 2-AB 염료의 바이알(사용 직전)에 이전시키고 염료가 완전 용해될 때까지 혼합한다. 이후에, 염료 용액을 환원제 바이알(키트내에 제공)에 가하고 잘 혼합한다(표지화 시약). 표지화 시약(5 mL)을 각각의 건조된 올리고사카라이드 시료 바이알에 가하고, 완전 혼합한다. 반응 바이알을 65°C 및 700 내지 800 RPM으로 설정된 에펜도르프 열혼합기 속에서 반응 2시간 동안 둈다.

[0639] 표지화 반응 후, 과량의 형광성 염료를 프로자임으로부터의 클리코클린 S 카트릿지(GlycoClean S Cartridge)(제

품번호 GKI-4726)를 사용하여 제거한다. 시료를 가하기 전에, 카트릿지를 1 mL의 밀리-큐 물에 이어 1 mL의 30% 아세트산 용액으로 5회 세척한다. 시료를 가하기 직전에, 1 mL의 아세토니트릴[제조원: 버딕 앤드 잭슨(Burdick and Jackson), 제품번호 AH015-4]을 카트릿지에 가한다.

[0640] 모든 아세토니트릴이 카트릿지를 통과한 후, 시료를 새로이 세척한 디스크의 중심에 플로팅하여 디스크 상에 10분 동안 흡착되도록 한다. 디스크를 1 mL의 아세토니트릴에 이어 1 mL의 96% 아세토니트릴로 5회 세척한다. 카트릿지를 1.5 mL 에펜도르프 관 위에 두고 2-AB 표지된 올리고사카라이드를 밀리 큐 물로 3회(각각의 회당 400 mL) 용출시킨다.

[0641] 올리고사카라이드를 시마즈 HPLC 시스템에 연결된 Glycosep N HPLC(제품번호 GKI-4728) 컬럼을 사용하여 분리한다. 시마즈 HPLC 시스템은 시스템 조절기, 가스방출기(degasser), 이원 펌프(binary pump), 시료 냉각기가 장착된 자동시료채취기(autosampler), 및 형광 검출기로 이루어진다.

승온에서 안정성

[0643] 항체의 완충제는 아미콘 올트라 원심분리 여과기를 사용하는 5.57 mM 인산나트륨 일염기성, 8.69 mM 인산나트륨 이염기성, 106.69 mM NaCl, 1.07 mM 시트르산나트륨, 6.45 mM 시트르산, 66.68 mM 만니톨, 0.1% (w/v) 트윈, pH 5.2; 또는 10 mM 히스티딘, 10 mM 메티오닌, 4% 만니톨, pH 5.9이다. 항체의 최종 농도를 적절한 완충제로 2 mg/mL로 조절한다. 이후에 항체 용액을 여과기 멸균하고, 0.25 mL의 분취량을 멸균 조건하에서 제조한다. 분취량을 -80°C, 5°C, 25°C, 또는 40°C에서 1, 2 또는 3주 동안 둔다. 항온처리 기간의 말기에, 시료를 크기 배제 크로마토그래피 및 SDS-PAGE로 분석한다.

[0644] 안정성 시료를 SDS-PAGE로 환원 및 비-환원 조건 둘다에서 분석한다. 사용된 과정은 본원에 기술된 것과 동일하다. 겔을 밤새 콜로이드성 청색 염색(인비트로겐 제품번호 46-7015, 46-7016)으로 염색하고 밀리-큐 물을 사용하여 배경이 깨끗해질 때까지 탈염시킨다. 이후에, 염색된 겔을 Epson Expression 스캐너(모델 1680, S/N DASX003641)을 사용하여 스캐닝한다. 보다 더 민감성으로 하기 위해, 동일한 겔을 은 염색 키트[제조원: Owl Scientific]를 사용하여 은 염색하며 제조업자가 제공한 권장된 공정을 사용한다.

실시예 1.3.2.3.C: 사람 암종 이종이식체의 성장에 미치는 단독 또는 화학치료법과의 병용에 의한 사람화된 모노클로날 항체의 효능

[0646] 사람 암 세포를 시험관내에서 99% 생존능, 85% 합치성으로 조직 배양 플라스크 속에서 성장시킨다. 19 내지 25g의 SCID 암컷 또는 수컷 마우스(제조원: 찰스 리버스 랙스)를 귀에 태그를 붙이고 면도한다. 이후에, 마우스의 우측 옆구리에 0.2 mL의 2×10^6 사람 종양 세포[1:1 매트리겔(matrigel)]을 연구 0일째에 피하 접종한다. 비히클(PBS), 사람화된 항체 및/또는 화학치료법의 투여(IP, Q3D/주)를 마우스가 약 150 내지 200 mm³의 평균 종양 용적을 갖는 마우스의 별개의 우리로 매치되는 크기가 된 후 개시한다. 종양을 캘리퍼의 쌍으로 대략 접종 10일 경부터 개시하여 주당 2회 측정하고 종양 용적을 식 $V = L \times W^2 / 2$ (V : 용적, mm³; L : 길이, mm; W : 폭, mm)에 따라 계산한다. 종양 용적에 있어서의 감소는 mAb 단독 또는 비히클 또는 동형 대조군 mAb를 제공받은 동물에서 종양에 대한 화학치료법과 함께 처리한 동물에서 관측된다.

실시예 1.3.2.3.D: FACS 계 재지시된 세포독성(rCTL) 검정

[0648] 사람 CD3+ T 세포를 앞서 동결 분리시킨 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 음성 선택 농축 컬럼(제조원: 알앤드 디 시스템스, 미네소타주 미네아폴리스 소재; 제품번호 HTCC-525)에 의해 분리하였다. T 세포를 D-PBS(제조원: 인비트로겐, 캘리포니아주 칼스바드 소재) 중 10mg/mL 항-CD3 (OKT-3, 제조원: 이바이오사이언스, 인코포레이티드, 캘리포니아주 샌 디에고 소재) 및 2mg/mL 항-CD28(CD28.2, 제조원: 이바이오사이언스, 인코포레이티드, 캘리포니아주 샌 디에고 소재)로 피복된 플라스크[vent cap, 제조원: 코닝(Corning), 메사추세츠주 악톤 소재] 속에서 4일 동안 자극하고 L-글루타민, 55mM a-ME, Pen/Strep, 10% FBS이 들어있는 완전 RPMI 1640 배지(인비트로겐, 캘리포니아주 칼스바드 소재) 중 30U/mL IL-2(제조원: 로슈) 속에서 배양한다. 이후에, T 세포를 검정에 사용하기 전에 밤새 30U/mL IL-2 속에 둔다. DoHH2 또는 라지(Raji) 표적 세포를 PKH26[제조원: 시그마-알드리히(Sigma-Aldrich), 미주리주 세인트 루이스 소재]로 제조업자의 지시에 따라서 표지한다. L-글루타민 및 10% FBS[제조원: 하이클론(Hyclone), 유타주 로간 소재]를 함유하는 RPMI 1640 배지(페놀 부재, 인비트로겐, 캘리포니아주 칼스바드 소재)를 rCTL 검정 전체에서 사용하였다[참조: Dreier et al. (2002) Int J Cancer 100:690].

[0649] 효과기 T 세포(E) 및 표적(T)을 10^5 및 10^4 세포/웰의 최종 세포 농도에서 96-웰 플레이트(코스타 #3799, 메사

추세즈주 악톤 소재) 속에서 각각 플레이팅하여 10:1의 E:T 비를 수득한다. DVD-Ig 분자를 회석시켜 농도-의존 성 적정 곡선을 수득한다. 밤새 항온처리한 후, 세포를 펠릿화하고 D-PBS로 1회 세척한 후 D-PBS 중 0.1% BSA (제조원: 인비트로겐, 캘리포니아주 칼스바드 소재), 0.1% 나트륨 아지드 및 0.5mg/mL 요오드화프로파움(BD)을 함유하는 FACS 완충제 속에 재현탁시킨다. FACS 데이터를 FACS Canto II 머신(제조원: 벡톤 디킨슨, 캘리포니아주 샌 조세 소재) 상에 수집하고 플로우조(Flowjo)[제조원: 트리스타(TreeStar)] 속에서 분석한다. 총 표적(대조군, 비처리)의 퍼센트로 나눈 DVD-Ig 처리된 시료내 살아있는 표적의 퍼센트를 계산하여 특이적인 용해율을 측정한다. IC50을 프리즘(Prism)[제조원: 그라파드(Graphpad)]에서 계산한다.

[0650] CD3/CD19 DVD-Ig(AB 서열 ID, AB002 + AB006; 실시예 2.7)를 종양 세포 사멸에 대해 재지시된 독성 검정에서 시험하였다. 당해 DVD-Ig는 IC50 = 5.0 pM의 시험관내 종양 사멸을 나타내었으며 CD3/CD20 DVD-Ig을 또한 재지시된 독성에 대해 시험하였고 IC50 = 325pM의 시험관내 종양 사멸을 나타내었다. 당해 CD3/CD20 DVD-Ig의 서열은 미국 특허원 제20070071675호에 기재되었다.

실시예 1.4: DVD-Ig의 생성

[0652] 2개의 항원에 결합할 수 있는 DVD-Ig 분자를 본원에 기술된 바와 같이 선택한 2개의 모 모노클로날 항체, 즉, 사람 항원 A에 대한 것, 및 사람 항원 B에 대한 것을 사용하여 작제한다.

실시예 1.4.1: 2개의 링커 길이를 갖는 DVD-Ig의 생성

[0654] ADCC/CDC 효과기 기능을 제거하기 위해 234번 및 235번에서 돌연변이를 갖는 $\gamma 1$ Fc를 함유하는 불변 영역을 사용한다. 각각 2개의 상이한 도메인 배향으로, 짧은 링커를 가진 2개 및 긴 링커를 가진 2개의, 4개의 상이한 항-A/B DVD-Ig 작제물을 생성한다: V_A-V_B-C 및 V_B-V_A-C (참조: 표 15). 사람 C1/Ck 또는 CH1 도메인의 N-말단 서열로부터 기원한 링커 서열은 다음과 같다:

[0655] DVDA B 작제물의 경우:

경쇄(항-A가 λ 를 가지는 경우): 짧은 링커: QPKAAP(서열번호 15); 긴 링커: QPKAAPS VTLFPP(서열번호 16)

[0657] 경쇄(항-A가 κ 를 가지는 경우): 짧은 링커: TVAAP (서열번호 13); 긴 링커: TVAAPS VIFPP (서열번호 14)

[0658] 중쇄($\gamma 1$): 짧은 링커: ASTKGP(서열번호 21); 긴 링커: ASTKGPSV FPLAP (서열번호 22)

[0659] DVDBA 작제물의 경우:

경쇄(항-B가 λ 를 가지는 경우): 짧은 링커: QPKAAP (서열번호 15); 긴 링커: QPKAAPS VTLFPP (서열번호 16)

[0661] 경쇄(항-B가 κ 를 가지는 경우): 짧은 링커: TVAAP (서열번호 13); 긴 링커: TVAAPS VIFPP (서열번호 14)

[0662] 중쇄 ($\gamma 1$): 짧은 링커: ASTKGP (서열번호 21); 긴 링커: ASTKGPSV FPLAP (서열번호 22)

[0663] 중쇄 및 경쇄 작제물을 pBOS 발현 벡터내로 서브클로닝시키고 COS 세포내에서 발현시킨 후, 단백질 A 크로마토그래피로 정제한다. 정제된 물질을 SDS-PAGE 및 SEC 분석에 적용한다.

[0664] 하기 표 15는 각각의 항-A/B DVD-Ig 단백질을 발현하는데 사용된 중쇄 및 경쇄 작제물을 기술한다.

표 15

항-A/B DVD-Ig 작제물

| DVD-Ig 단백질 | 중쇄 작제물 | 경쇄 작제물 |
|------------|-------------|------------|
| DVDABSL | DVDABHC-SL | DVDABLC-SL |
| DVDABLL | DVDABHC-LL | DVDABLC-LL |
| DVDBASL | DVDBAH C-SL | DVDBALC-SL |
| DVDBALL | DVDBAH C-LL | DVDBALC-LL |

[0665]

[0666] 실시예 1.4.2: DVDAHSL 및 DVDAHLL에 대한 DNA 작제물의 분자 클로닝

[0667] 중쇄 작제물 DVDAHBC-LL 및 DVDAHBC-SL을 생성시키기 위해, A 항체의 VH 도메인을 특이적인 프라이머(3' 프라이머는 각각 SL/LL 작제물을 위한 짧은/긴 선형 서열을 함유한다)를 사용하여 PCR 증폭시킨 한편; B 항체의 VH 도메인은 특이적인 프라이머(5' 프라이머는 각각 SL/LL 작제물에 대한 짧은/긴 선형 서열을 함유한다)를 사용하여 증폭시킨다. PCR 반응 둘다를 표준 PCR 기술 및 공정에 따라 수행한다. 2개의 PCR 생성물을 겔-정제하고, 후속적인 오버랩핑 PCR 반응을 위한 오버랩핑 주형으로서 함께 사용한다. 오버랩핑 PCR 생성물을 Srf I 및 Sal I 이중 분해된 pBOS-hC_y 1,z non-a 포유동물 발현 벡터(제조원: 애보트)내로 표준 상동 재조합 시도를 사용하여 서브클로닝한다.

[0668] 경쇄 작제물 DVDAHLC-LL 및 DVDAHLC-SL을 생성시키기 위하여, A 항체의 VL 도메인을 특이적인 프라이머(3' 프라이머는 각각 SL/LL 작제물을 위한 짧은/긴 선형 서열을 함유한다)를 사용하여 PCR 증폭시킨 반면; B 항체의 VL 도메인은 특이적인 프라이머(5' 프라이머는 각각 SL/LL 작제물에 대한 짧은/긴 선형 서열을 함유한다)를 사용하여 증폭시킨다. PCR 반응 둘다를 표준 PCR 기술 및 공정에 따라 수행한다. 2개의 PCR 생성물을 겔-정제하고, 후속적인 오버랩핑 PCR 반응을 위한 오버랩핑 주형으로서 함께 사용한다. 오버랩핑 PCR 생성물을 Srf I 및 Not I 이중 분해된 pBOS-hCk 포유동물 발현 벡터(제조원: 애보트)내로 표준 상동 재조합 시도를 사용하여 서브클로닝한다. 유사한 시도를 사용하여 하기 기술된 바와 같이, DVDBASL 및 DVDBALL을 생성한다.

[0669] 실시예 1.4.3: DVDBASL 및 DVDBALL에 대한 DNA 작제물의 분자 클로닝

[0670] 중쇄 작제물 DVDBAHC-LL 및 DVDBAHC-SL을 생성시키기 위하여, B 항체의 VH 도메인을 특이적인 프라이머(3' 프라이머는 각각 SL/LL 작제물을 위한 짧은/긴 선형 서열을 함유한다)를 사용하여 PCR 증폭시킨 반면; A 항체의 VH 도메인은 특이적인 프라이머(5' 프라이머는 각각 SL/LL 작제물에 대한 짧은/긴 선형 서열을 함유한다)를 사용하여 증폭시킨다. PCR 반응 둘다를 표준 PCR 기술 및 공정에 따라 수행한다. 2개의 PCR 생성물을 겔-정제하고, 표준 PCR 조건을 사용하는 후속적인 오버랩핑 PCR 반응을 위한 오버랩핑 주형으로서 함께 사용한다. 오버랩핑 PCR 생성물을 Srf I 및 Sal I 이중 분해된 pBOS-hC_y 1,z non-a 포유동물 발현 벡터(제조원: 애보트)내로 표준 상동 재조합 시도를 사용하여 서브클로닝한다.

[0671] 경쇄 작제물 DVDBALC-LL 및 DVDBALC-SL을 생성시키기 위하여, B 항체의 VL 도메인을 특이적인 프라이머(3' 프라이머는 각각 SL/LL 작제물을 위한 짧은/긴 선형 서열을 함유한다)를 사용하여 PCR 증폭시킨 반면; A 항체의 VL 도메인은 특이적인 프라이머(5' 프라이머는 각각 SL/LL 작제물에 대한 짧은/긴 선형 서열을 함유한다)를 사용하여 증폭시킨다. PCR 반응 둘다를 표준 PCR 기술 및 공정에 따라 수행한다. 2개의 PCR 생성물을 겔-정제하고, 후속적인 오버랩핑 PCR 반응을 위한 오버랩핑 주형으로서 함께 사용한다. 오버랩핑 PCR 생성물을 Srf I 및 Not I 이중 분해된 pBOS-hCk 포유동물 발현 벡터(제조원: 애보트)내로 표준 상동 재조합 시도를 사용하여 서브클로닝한다.

[0672] 실시예 1.4.4: 추가의 DVD-Ig의 작제 및 발현

[0673] 실시예 1.4.4.1: DVD-Ig 벡터 작제물의 제조

[0674] DVD-Ig내로 혼입시키기 위한 특이적인 항원 또는 이의 예피토프를 인지하는 특이적인 항체에 대한 모 항체의 아미노산 서열을 위에서 기술한 바와 같이 하이브리도마의 제조에 의해 수득하거나 공지된 항체 단백질 또는 핵산을 서열분석함으로써 수득할 수 있다. 또한, 공지된 서열을 문헌으로부터 수득할 수 있다. 서열을 사용하여 표준 DNA 합성 또는 증폭 기술을 사용하고 목적한 항체 단편을 발현 벡터내로 세포내 발현을 위해 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 조립함으로써 핵산을 합성할 수 있다.

[0675] 예를 들면, 핵산 코돈은 아미노산 서열로부터 결정하고 올리고뉴클레오타이드 DNA는 미국 위싱턴주 보텔에 소재하는 블루 헤론 바이오테크놀로지, 인코포레이티드(Blue Heron Biotechnology, Inc.)(www.blueheronbio.com)에 의해 합성되었다. 올리고뉴클레오타이드를 300 내지 2,000개 염기쌍 이본쇄 DNA 단편내로 조립하고, 플라스미드 벡터내로 클로닝하며 서열을 입증하였다. 클로닝된 단편을 효소 방법을 사용하여 조립함으로써 완전한 유전자를 수득하고 발현 벡터내로 서브클로닝하였다(참조: 7,306,914; 7,297,541; 7,279,159; 7,150,969; 20080115243; 20080102475; 20080081379; 20080075690; 20080063780; 20080050506; 20080038777; 20080022422; 20070289033; 20070287170; 20070254338; 20070243194; 20070225227; 20070207171; 20070150976; 20070135620; 20070128190; 20070104722; 20070092484; 20070037196; 20070028321; 20060172404; 20060162026; 20060153791; 20030215458; 20030157643).

[0676] pHybE 벡터(미국 특허원 제61/021,282호)의 그룹을 모 항체 및 DVD-Ig 클로닝에 사용하였다. pJP183로부터 기원한 V1; pHybE-hCgl_z,non-a V2를 야생형 불변 영역을 지닌 항체 및 DVD 중쇄의 클로닝을 위해 사용하였다. pJP191로부터 기원한 V2; pHybE-hCk V2를 사용하여 카파 불변 영역을 지닌 항체 및 DVD 경쇄의 클로닝에 사용하였다. pJP192로부터 기원한 V3; pHybE-hC1 V2를 람다 불변 영역을 지닌 항체 및 DVD 경쇄를 클로닝하는데 사용하였다. 람다 시그날 펩타이드 및 카파 불변 영역으로 조립된 V4를 람다 카파 하이브리드 V 도메인을 지닌 DVD 경쇄를 클로닝하는데 사용하였다. 카파 시그날 펩타이드 및 람다 불변 영역으로 조립된 V5를 카파-람다 하이브리드 V 도메인을 지닌 DVD 경쇄를 클로닝하는데 사용하였다. pJP183으로부터 기원한 V7; pHybE-hCgl_z,non-a V2를 (234, 235 AA) 돌연변이 불변 영역을 지닌 항체 및 DVD 중쇄의 클로닝에 사용하였다.

[0677] 표 16을 참조로, 다수의 벡터를 모 항체 및 DVD-Ig VH 및 VL 쇄의 클로닝에 사용하였다.

표 16

모 항체 및 DVD-Ig를 클로닝하는데 사용된 벡터

| 번호 | 중쇄 벡터 | 경쇄 벡터 |
|----------|-------|-------|
| DVD050 | V1 | V2 |
| DVD695 | V1 | V2 |
| DVD695-C | V1 | V2 |
| DVD696 | V1 | V2 |
| DVD696-C | V1 | V2 |
| DVD697 | V1 | V2 |
| DVD698 | V1 | V2 |
| DVD278 | V1 | V2 |
| DVD699 | V1 | V2 |
| DVD699-C | V1 | V2 |
| DVD700 | V1 | V2 |
| DVD700-C | V1 | V2 |
| DVD701 | V1 | V2 |
| DVD701-C | V1 | V2 |
| DVD702 | V1 | V2 |
| DVD703 | V1 | V2 |
| DVD704 | V1 | V2 |
| DVD705 | V1 | V2 |
| DVD706 | V1 | V2 |
| DVD707 | V1 | V2 |
| DVD708 | V1 | V2 |

[0678]

실시예 1.4.4.2: 293 세포내에서 형질감염 및 발현

[0680] DVD-Ig 벡터 작제물을 DVD-Ig 단백질의 생산을 위해 293 세포내로 형질감염시킨다. 사용된 293 일시적인 형질감염 과정은 문헌[참조: Durocher et al. (2002) Nucleic Acids Res. 30(2):E9 및 Pham et al. (2005) Biotech. Bioengineering 90(3):332-44]에 발표된 방법의 변형이다. 형질감염에 사용된 시약은 다음을 포함한다:

[0681] · 1회용 에를렌마이어 플라스크(Erlenmeyer flask) 내에서 130rpm, 37°C 및 5% CO₂로 설정된 습윤된 항온처리기 세트 속에서 배양된 HEK 293-6E 세포(EBNA1을 안정하게 발현하는 사람 배아 신장 세포주; 내셔널 리서치 카운실 카나다(National Research Council Canada)에서 입수).

[0682] · 배양 배지: 프리스타일(FreeStyle) 293 발현 배지(인비트로겐 12338-018) 및 25 μg/mL의 게네티신(G418)(인비트로겐 10131-027) 및 0.1% 플루로닉 F-68 (인비트로겐 24040-032).

[0683] · 형질감염 배지: 프리스타일 293 발현 배지 및 10 mM HEPES(인비트로겐 15630-080).

[0684] · 폴리에틸렌이민(PEI) 스톡: 선형의 25kDa PEI[제조원: 폴리사이언시즈(Polysciences)]를 사용하여 제조하고 -15°C 미만에 저장한 1 mg/mL의 멸균 스톡 용액, pH 7.0.

[0685] · 트립톤 공급물 배지: 프리스타일 293 발현 배지 중 트립톤 N1[제조원: 오가노테크니에(Organotechnie), 19554)의 5% w/v 멸균 스톡

[0686] 형질감염용 세포 제조: 형질감염하기 약 2 내지 4시간 전에, HEK 293-6E 세포를 원심분리로 수거하고 배양 배지

중에서 약 1백만개의 생존 세포/mL의 세포 밀도에서 재현탁시킨다. 각각의 형질감염을 위해, 40 mL의 세포 혼탁액을 1회용의 250mL의 에를렌마이어 플라스크내로 이전시키고 2 내지 4시간 동안 항온처리한다.

[0687] **형질감염:** 형질감염 배지 및 PEI 스톡을 실온(RT)으로 예비가온시켰다. 각각의 형질감염을 위해, 25 µg의 플라스미드 DNA 및 50 µg의 폴리에틸렌아민(PEI)을 5 mL의 형질감염 배지와 합하고 15 내지 20분 동안 실온에서 항온처리하여 DNA:PEI 복합체가 형성되도록 하였다. BR3-Ig 형질감염을 위해, 25 µg의 BR3-Ig 플라스미드를 형질감염당 사용한다. 각각 5-mL DNA:PEI 복합체 혼합물을 앞서 제조한 40-mL의 배양물에 가하고 130 rpm, 37°C 및 5% CO₂로 설정된 습윤화된 항온처리기로 옮겼다. 20 내지 28시간 후, 5 mL의 트립톤 공급물 배지를 각각의 형질감염에 가하고 배양을 6일 동안 지속한다.

[0688] 표 17 및 18은 293 세포에서 리터당 밀리그램으로 나타낸 모 항체 또는 DVD-Ig에 대한 수율 데이터를 함유한다.

표 17

293 세포에서 모 항체 및 DVD-Ig 작제물의 일시적인 발현 수율(NRP1, VEGF)

| 모 항체 또는 DVD-Ig 번호 | N-말단 가변 도메인 (VD) | C-말단 가변 도메인 (VD) | 발현 수율 (mg/L) |
|----------------------|---------------------------|------------------------|--------------|
| AB014 | VEGF | | 52.4 |
| AB016 | NRP1 | | 114.6 |
| DVD050 | NRP1 | VEGF | 27.2 |
| DVD695 | NRP1 | VEGF | 19.2 |
| DVD696 | NRP1 | VEGF | 19.6 |
| DVD697 | NRP1 | VEGF | 13.0 |
| DVD698 | NRP1 | VEGF | 13.8 |

[0689] [0690] 상이한 링커를 가진 모든 DVD-Ig는 HEK293 세포내에서 잘 발현된다.

표 18

293 세포에서 모 항체 및 DVD-Ig 작제물의 일시적인 발현 수율(SOST, TNF)

| 모 항체 또는 DVD-Ig 번호 | N-말단 가변 도메인 (VD) | C-말단 가변 도메인 (VD) | 발현 수율 (mg/L) |
|----------------------|---------------------------|------------------------|--------------|
| AB017 | TNF | | 52.4 |
| AB050 | SOST | | 77.8 |
| DVD278 | SOST | TNF | 58.8 |
| DVD699 | SOST | TNF | 56.0 |
| DVD700 | SOST | TNF | 42.0 |
| DVD701 | SOST | TNF | 25.0 |
| DVD702 | SOST | TNF | 35.2 |
| DVD703 | SOST | TNF | 45.0 |
| DVD704 | SOST | TNF | 24.4 |
| DVD705 | SOST | TNF | 55.0 |
| DVD706 | SOST | TNF | 51.0 |
| DVD707 | SOST | TNF | 44.2 |
| DVD708 | SOST | TNF | 43.8 |

[0691] [0692] 상이한 링커를 가진 모든 DVD-Ig는 HEK293 세포내에서 잘 발현된다. DVD-Ig 수율은 모 항체의 것과 유사하다.

실시예 1.4.5: A/B DVD Ig의 특성화 및 선도 선택

[0694] 항-A/B DVD-Ig의 결합 친화성을 Biacore 상에서 단백질 A 및 단백질 B에 대해 분석한다. DVD-Ig의 4가 특성은 Biacore 상에서 다수의 결합 연구로 시험한다. 한편, 단백질 A 및 단백질 B에 대한 DVD-Ig의 중화 효능은 본원에 기술된 바와 같이 각각 생검정으로 평가한다. 원래의 모 mAb의 친화성 및 효능을 가장 잘 보유하는 DVD-Ig 분자를 각각의 mAb에 대해 본원에 기술된 바와 같이 깊은 물리화학적 및 생-분석학적(래트 PK) 특성화를 위해 선택한다. 분석물의 수집을 기초로 하여, 최종 선도 DVD-Ig를 CHO 안정성 세포주 발달로 진전시키고, CHO-기원

한 물질을 사이노몰거스 원숭이에서 안정성, 약력학적 및 효능 연구, 및 수행 활성에 사용한다.

[0695] **실시예 2.0: 항-TNF/IL-13 DVD-Ig의 생성 및 특성화**

[0696] **실시예 2.1: TNF 및 IL-13에 대한 모노클로날 항체(mAb)의 생성**

[0697] TNF 및 IL-13에 결합할 수 있는 DVD-Ig 분자를 모 mAb의 2개의 쌍, 즉, D2E7.1(항-TNF) 및 13C5.5(항-IL-13)인 제1 쌍, 및 D2E7(항-TNF) 및 13C5.5L3F(항-IL-13)인 제2 쌍을 사용하여 제작한다. 2개의 항-TNF 항체 D2E7 및 D2E7.1은 앞서 공개되어 있다(미국 특허 제7,541,031호). 2개의 항-IL-13 항체 13C5.5 및 13C5.5L3F는 앞서 공개되어 있다(미국 특허 공보 제US20080171014호). 4개의 항체에 대한 가변 도메인 아미노산 서열은 표 42 및 43에 나타낸다.

[0698] **실시예 2.2: TNF 및 IL-13에 대한 모노클로날 항체의 생산 및 특성화**

[0699] 4개의 모노클로날 항체를 포유동물 세포내에서 각각의 mAb의 중쇄 및 경쇄 작제물을 공동-발현시켜 생산하고, 단백질 A 크로마토그래피로 정제하였다. 정제된 mAb의 조성 및 순도를 환원 및 비-환원 조건 둘다에서 SDS-PAGE로 분석하였다. 정제된 단백질은 다음 검정으로 특성화하였다:

[0700] **실시예 2.2.A: 항-TNF 및 항-IL-13 Mab에 대한 질량 분광분석법 및 SEC 분석**

[0701] Mab의 경쇄 및 중쇄의 분자량(MW)을 측정하기 위해, 10 μL의 Mab(0.8 μg/μL)를 1.0M DTT 용액(5 μL)으로 환원시켰다. PLRP-S, 8u, 4000A, 및 1x150 mm 단백질 컬럼[제조원: 미크롬 바이오리서치(Michrom BioResource), 매사추세츠주 오번 소재]을 사용하여 Mab의 중쇄 및 경쇄를 분리하였다. 아질린트 HP1100 모세관 HPLC(제조원: 아질린트 테크놀로지스 인코포레이티드, 캘리포니아주 팔로 알토 소재)을 질량 분광계 QSTAR(어플라이드 바이오시스템스, 캘리포니아주 포스터 시티 소재)와 함께 사용하였다. 밸코 밸브를 10분에 설정하여 시료를 탈염시키기 위해 폐기물로부터 MS로의 유동을 스위치한다. 완충제 A는 0.02% TFA, 0.08% FA, 0.1% ACN 및 99.8% HPLC-H₂O이었다. 완충제 B는 0.02% TFA, 0.08% FA, 0.1% HPLC-H₂O, 및 99.8% ACN을 함유하였다. HPLC 유동 속도는 50 μL/분이었고, 시료 주입 용적은 8.0 mL이었다. 컬럼 오븐의 온도를 60°C에서 설정하고, 분리 구배는 5% B로 5분; 5% B 내지 65% B로 35분; 65% B 내지 95% B로 다른 5분, 및 95% B 내지 5% B로 5분이었다. TOFMS 스캔은 800 내지 2500 amu이고, 주기는 3600이었다. 완전한 길이의 Mab의 MW를 측정하기 위하여, 단백질 마이크로트랩 카트리지(제조원: 미크롬 바이오리서치, 매사추세츠주 오번 소재)를 시료를 탈염하는데 사용하였다. HPLC 구배는 5% B로 5분; 5% B 내지 95% B로 1분; 및 95% B 내지 5% B로 다른 4분이었다. QSTAR TOFMS 스캔은 2000 내지 3500 amu이었고, 주기는 899이었다. 모든 MS 원 데이터를 Analyst QS 소프트웨어(제조원: 어플라이드 바이오시스템스)로 분석하였다. Mab의 SEC 분석을 위해, PBS 중 정제된 MAb 및 키메라 Ab를 슈퍼로즈 6 10/300 G2, 300 x 10 mm 컬럼[제조원: 아머삼 바이오사이언스(Amersham Bioscience), 뉴저지주 피츠카타웨이 소재] 상에 적용하였다. HPLC 장치, 모델 10A(제조원: 시마즈, 메릴랜드주 콜롬비아 소재)를 SEC에 대해 사용하였다. 모든 단백질을 UV 검출기를 사용하여 280 nm 및 214 nm에서 측정하였다. 용출은 0.5 mL/분의 유동 속도에서 등용매성이었다. 안정성 연구를 위해, PBS 중 0.2 내지 0.4 mg/ml 농도 범위의 시료를 -80°C 내지 25°C 사이의 3회의 동결-해동 주기를 수행하고, 4°C, 25°C 또는 40°C에서 4주 및 8주 동안 항온처리한 후 SEC 분석하였다.

[0702] **실시예 2.2.B: 항-TNF 및 항-IL-13 Mab의 항원 결합 친화성의 측정**

[0703] rhTNF α 및 rhIL-13에 대한 mAb 결합의 역학을 표면 플라스몬 공명에 기초한 측정에 의해 Biacore 3000 장치(제조원: 비아코어 아베, 스웨덴 업살라 소재)로 HBS-EP (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 및 0.005% 표면활성제 P20)을 사용하여 25°C에서 측정하였다. 모든 화학물질은 비아코어 아베(스웨덴 업살라 소재)로부터 입수하거나 본원에 기술된 다른 공급업체로부터 입수하였다. 10 mM 아세트산나트륨(pH 4.5) 속에 희석시킨 약 5000 RU의 염소 항-사람 IgG Fc γ 단편 특이적인 폴리클로날 항체(제조원: 피어스 바이오테크놀로지 인코포레이티드, 일리노이주 록포드 소재)를 CM5 연구 등급 바이오센스 칩을 따라 표준 아민 커플링 키트를 사용하여 제조업자의 지시 및 공정에 따라 25 mg/ml에서 직접 고정시켰다. 바이오센서 표면상의 반응하지 않은 잔기를 에탄올아민으로 차단하였다. 유동셀 2 및 4내 변형된 카복시메틸 텍스트란 표면을 반응 표면으로 사용하였다. 유동 셀 1 및 3내 염소 항-사람 IgG가 없는 변형되지 않은 카복시메틸 텍스트란을 참조 표면으로 사용하였다. 역학적 분석을 위해, 1:1 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델로부터 기원한 속도 방적식을 Bioevaluation 4.0.1 소프트웨어를 사용하여 모든 10개의 주입물(글로벌 피트 분석 사용)의 연합 및 해리 상에 대해 동시에 팟팅하였다. 정제된 mAb 시료를 HEPES-완충된 염수 속에 염소 항-사람 IgG Fc 특이적인 반응 표면에 걸쳐 포획을

위해 희석시키고 반응 매트릭스 위에 5 ml/분의 유동 속도로 주입하였다. 연합 및 해리 속도 상수, $k_{on}(M^{-1} s^{-1})$ 및 $k_{off}(s^{-1})$ 을 25 ml/분의 연속적인 유동 속도하에 측정하였다. 속도 상수는 1.25 내지 1000 nM 범위의 10개의 상이한 항원 농도에서 역학적 결합 측정에 의해 기원하였다. mAb와 항원 사이의 반응의 평형 해리 상수(M)를 다음 식에 의해 역학적 속도 상수로부터 계산하였다: $KD = k_{off}/k_{on}$. 항원 시료의 분취량을 또한 블랭크 참조물 및 반응 CM 표면 위에 동시에 주입하여 특정의 비특이적인 결합 배경을 기록하고 감함으로써 굴절률 변화 및 주입 노이즈의 대부분을 제거하였다. 표면을 10 mM 글리신(pH 1.5)을 5 ml/분의 유동 속도로 2회 연속하여 25ml 주입하여 재생시켰다. 표면에 고정된 항-Fc 항체는 완전히 재생되며 12 주기에 걸쳐 이의 완전한 포획 능력을 보유하였다. 포획된 mAb-항원 복합체의 겉보기 입체화학을 다음 식을 사용하여 포획 결합 조건(정체-상 평형)하에 계산하였다:

$$\text{화학량론} = \frac{\text{항원 반응 (RU)}}{\text{mAb MW}} \times \frac{\text{mAb 반응 (RU)}}{\text{항원 MW}}$$

[0704] 실시예 2.2.C: 항-TNF 및 항-IL-13 Mab의 생물학적 활성의 측정

[0705] 이들 4개의 항체의 이들의 항원에 대한 결합 역학 매개변수를 표 19에 나타낸다.

[0706] 실시예 2.2.C.1: L929 생검정에 의한 항-TNF Mab의 생물학적 활성의 측정

[0707] 항-TNF/IL-13 DVD-Ig 단백질의 생물학적 활성을 L929(항-TNF의 경우) 및 A549(항-IL-13의 경우) 생검정을 사용하여 측정하였다.

[0708] 실시예 2.2.C.1.1: L929 생검정에 의한 항-TNF Mab의 생물학적 활성의 측정

[0709] 사람 재조합 TNF α (rhTNF α)는 18 내지 24시간의 항온처리 기간 후 쥐 L929 세포에 대해 세포 세포독성을 유발한다. 사람 항-hTNF α 항체를 L929 검정에서 rhTNF α 및 세포와 항체를 공동항온처리함으로써 다음과 같이 평가하였다. 100 μl 의 항-hTNF α Ab를 함유하는 96-웰 미세역가 플레이트를 10% 태아 소 혈청(FBS)을 함유하는 RPMI 배지를 사용하여 플레이트를 1/3로 2회 일련 희석하였다. 50 마이크로리터의 rhTNF α 를 각각의 시료 웰 속에 500 pg/ml의 최종 농도로 가하였다. 이후에, 플레이트를 30분 동안 실온에서 항온처리하였다. 50 μl 의 TNF α -민감성 L929 마우스 섬유모세포 세포를 1 $\mu g/ml$ 악티노마이신-D를 포함하여, 웨당 5×10^4 세포의 최종 농도로 가하였다. 대조군은 배지 및 세포와 rhTNF α 및 세포를 포함하였다. 이들 대조군, 및 2 ng/ml 내지 8.2 pg/ml 범위의 TNF α 표준 곡선을 사용하여 검정의 품질을 측정하고 중화 윈도우(window of neutralization)를 제공하였다. 이후에, 플레이트를 밤새(18 내지 24시간) 37°C에서 5% CO₂ 속에서 항온처리하였다. 100 마이크로리터의 배지를 각각의 웰로부터 제거하고, PBS 중 50 μl 의 5 mg/ml 3,(4,4-디메틸티아졸-2-일)2,5-디페닐-테트라졸륨 브로마이드(MTT; 시그마 케니칼 코포레이션으로부터 시판, 미주리주 세인트 루이스 소재)를 가하였다. 이후에, 플레이트를 4시간 동안 37°C에서 항온처리하였다. 이후에, 50마이크로리터의 20% 나트륨 도데실 살피아트(SDS)를 각각의 웰에 가하고 플레이트를 밤새 37°C에서 항온처리하였다. 570/630 nm에서 광학 밀도를 측정하고, 곡선을 각각의 시료에 대해 플로팅하고 IC₅₀을 표준 방법으로 측정하였다.

[0710] 실시예 2.2.C.2: A549 생검정에 의한 항-IL-13 Mab의 생물학적 활성의 측정

[0711] A-549 세포에 의해 TARC(CCL-17)의 사람 IL-13 유도된 생산을 억제하는 항-사람 IL-13의 능력을 다음과 같이 분석하였다. A-549 세포를 1일째에 RPMI 성장 배지(10% FBS 포함) 속에 96-웰 플레이트(2E5 세포/웰)내에 접종하였다. 2일째에, 배지를 400ng/ml rhTNF(100ml/웰)을 함유하는 새로운 RPMI 성장 배지로 교체하였다. 한편, 각종 농도의 면역화된 마우스 혈청, 쥐 하이브리도마 상청액 또는 정제된 항-사람 IL-13 항체를 1시간 동안 37°C에서 10 ng/ml 정제된 돌연변이 사람 IL-13 또는 IL-13 변이체와 함께 100mL RPMI 완전 배지 중에서 미세역가 플레이트(U-바닥, 96-웰, 코스타 제조원) 속에서 예비항온처리하였다. 항체 및 재조합 정제된 사람 IL-13 혼합물을 TNF-처리된 A-549 세포에 200ml/웰(최종 IL-13 및 TNF 농도는 각각 5ng/ml 및 200ng/ml이었다)의 최종 용적으로 가하고(100ml/웰), 18시간 동안 37°C에서 항온처리하였다. 항온처리 후, 150mL의 무세포 상청액을 각각의 웰로부터 제거하고 생산된 사람 TARC의 수준을 사람 TARC ELISA(제조원: 알앤디 시스템스 제품번호DDN00)로 측정하였다. IL-13 길항제의 중화 효능은 각각의 데이터 점에 대한 평균 TARC 값 및 GraphPad Prism 소프트웨어로 측정한 IC₅₀ 값을 기초로 계산하였다. 2개의 항-IL-13 mAb의 중화 효능은 표 19에 나타낸다.

표 19

항-TNF 및 항-IL-13 모노클로날 항체의 특성화

| mAb | 특이성 | K_D (nM) | IC₅₀ (nM) |
|------------|------------|---------------------------|-----------------------------|
| D2E7 | TNF | 0.04 | 0.08 |
| D2E7.1 | TNF | 0.05 | 0.05 |
| 13C5.5 | IL-13 | 0.15 | 0.20 |
| 13C5.5L3F | IL-13 | 0.24 | 0.31 |

[0712]

[0713] 실시예 2.3: 항-TNF/IL-13 이원 가변 도메인 면역글로불린(DVD-Ig)의 작제

TNF 및 IL-13에 결합할 수 있는 DVD-Ig 분자를 모 mAb의 2개의 쌍, 즉, D2E7.1(항-TNF)와 13C5.5(항-IL-13)을 가진 제1 쌍, 및 D2E7(항-TNF)와 13C5.5L3F (항-IL-13)인, 제2 쌍을 작제하였다. ADCC/CDC 효능기 기능을 제거하기 위해 234번 및 235번에 돌연변이가 있는 갑마 Fc를 함유하는 불변 영역을 사용하였다. 몇개의 상이한 항-TNF/IL-13 DVD-Ig 작제물을 모두 V_{TNF}-V_{IL-13}-C의 배향으로 각종 링커를 사용하여 생성시켰다. VL내에서 0 내지 12 범위 및 VH내에서 0 내지 13 범위의 각종 링커 길이를 갖는 DVD-Ig 중쇄 및 경쇄를 작제하여 LC 및 HC 각각에 대한 임의의 링커 길이를 시험하였다. 사람 C1/Ck 또는 CH1 도메인의 N-말단 서열로부터 기원한 링커 서열은 다음과 같다:

[0715] 중쇄 링커(식별자 병기):

[0716] AS (HC2),

[0717] ASTK(HC4)(서열번호 58),

[0718] ASTKGP(HC6)(서열번호 21),

[0719] ASTKGPSV(HC8)(서열번호 59),

[0720] ASTKGPSVFP(HC10)(서열번호 60), 및

[0721] ASTKGPSVFPLAP (HC13)(서열번호 22)

[0722] 경쇄 링커(식별자 병기):

[0723] TVA(LC3),

[0724] TVAAP(LC5)(서열번호 13),

[0725] TVAAPS(LC7)(서열번호 61),

[0726] TVAAPSFI(LC9)(서열번호 62), 및

[0727] TVAAPSFIGP(LC12)(서열번호 14)

DVD-Ig의 중쇄 작제물을 생성시키기 위해, D2E7.1 또는 D2E7의 VH 도메인을 특이적인 프라이머(3' 프라이머는 적절한 링커 서열을 함유한다)를 사용하여 PCR 증폭시키는 반면; 13C5.5 또는 13C5.5L3F의 VH 도메인은 특이적인 프라이머(5' 프라이머는 적절한 링커 서열을 함유한다)로 증폭시켰다. PCR 반응 둘다를 표준 PCR 기술 및 공정에 따라 수행하였다. 2개의 PCR 생성물을 젤-정제하고, 후속적인 오버랩핑 PCR 반응을 위한 오버랩핑 주형으로 함께 사용하였다. 오버랩핑 PCR 생성물을 Srf I 및 Sal I 이중 분해된 pBOS-hCgl_z non-a 포유동물 발현 벡터(제조원: 애보트)내로 표준 상동 재조합 시도를 사용함으로써 서브클로닝시켰다.

[0729] DVD-Ig의 경쇄 작제물을 생성하기 위해, D2E7.1 또는 D2E7의 VL 도메인을 특이적인 프라이머(3' 프라이머는 적절한 링커 서열을 함유한다)를 사용하여 PCR 증폭시키는 반면; 13C5.5 또는 13C5.5L3F의 VL 도메인은 특이적인 프라이머(5' 프라이머는 적절한 링커 서열을 함유한다)를 사용하여 증폭시켰다. PCR 반응 둘다를 표준 PCR 기술 및 과정에 따라 수행하였다. 2개의 PCR 생성물을 젤-정제하고, 후속적인 오버랩핑 PCR 반응을 위한 오버랩핑 주형으로서 표준 PCR 조건하에 함께 사용하였다. 오버랩핑 PCR 생성물을 Srf I 및 Not I 이중 분해된 pBOS-hCk 포유동물 발현 벡터(제조원: 애보트)내로 표준 상동 재조합 시도를 사용하여 서브클로닝하였다.

[0730] D2E7.1(항-TNF) 및 13C5.5(항-IL-13) 모노클로날 항체로부터 생성된 항-hTNF/IL-13 DVD-Ig 단백질의 VH 및 VL

의 아미노산 서열을 표 42에 나타낸다. D2E7 (항-TNF) 및 13C5.5L3F(항-IL-13) 모노클로날 항체로부터 생성된 항-hTNF/IL-13 DVD-Ig 단백질의 VH 및 VL의 아미노산 서열을 표 43에 나타낸다. 모든 중쇄 및 경쇄 작제물은 돌연변이 hIgG1 불변 영역 및 Ig 카파 불변 영역을 함유하였으며(표 12) pBOS 발현 벡터내로 서브클로닝하고 COS 세포내에서 발현시킨 후, 단백질 A 크로마토그래피로 정제하였다. 정제된 물질을 SDS-PAGE 및 SEC 분석에 적용한다.

[0731] 또한, 각종의 링커 크기를 갖는 중쇄 및 경쇄를 매트릭스(표 20 및 21)에서 나타낸 바와 같이 쌍을 이루어 당해 mAb 쌍에 대한 링커 선택의 최적의 조합을 확인하였다.

실시예 2.4: 항-TNF/IL-13 DVD-Ig의 발현 및 정제

[0733] 각각의 작제물의 중쇄 및 경쇄를 포유동물 발현 벡터내로 각각 서브클로닝하고 서열분석하여 정확성을 보증한다. 각각의 작제물의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 플라스미드를 사람 배아 신장 293 세포[아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection), 베지니아주 마나사스 소재]내에 일시적으로 발현시켰다. 세포 배양 배지를 일시적인 형질감염 72시간 후 수거하고 항체를 단백질 A 크로마토그래피(제조원: 피어스, 일리노이주 록포드 소재)를 사용하여 제조업자의 지시에 따라 정제하였다. Ab를 SDS-PAGE로 분석하고 A280 및 BCA(제조원: 피어스, 일리노이주 록포드 소재)로 정량화하였다. 표 20은, 상이한 D2E7.1-13C5.5 DVD-Ig 분자가 중쇄 및 경쇄 작제물의 상이한 쌍을 공동-발현시킴에 의해 생성되었음을 나타내며, 여기서, 상이한 길이의 각종 링커를 HC 및 LC 둘다에서 사용하여 모든 가능한 조합으로 쌍을 이루었다. 유사하게, 상이한 D2E7-13C5.5L3F DVD-Ig 분자를 중쇄 및 경쇄 작제물의 상이한 쌍을 공동-발현시킴에 의해 생성하였으며, 여기서, 상이한 길이의 2개 링커를 HC 및 LC 둘다에 사용하여 모든 가능한 조합으로 쌍을 이루었다(표 21).

표 20

중쇄 및 경쇄의 상이한 쌍의 공동-발현에 의한 상이한 D2E7.1-13C5.5 DVD-Ig 단백질의
생성

| 작제물 | 링커 길이 | D2E7.1-13C5.5 경쇄 | | | | | |
|---------------------|-------------|------------------|---------|---------|---------|---------|----------|
| | | LC0 | LC3 | LC5 | LC7 | LC9 | LC12 |
| D2E7.1-13C5.5 중쇄 | HC0 | LC0HC0 | LC3HC0 | LC5HC0 | LC7HC0 | LC9HC0 | LC12HC0 |
| | HC2 | LC0HC2 | LC3HC2 | LC5HC2 | LC7HC2 | LC9HC2 | LC12HC2 |
| | HC4 | LC0HC4 | LC3HC4 | LC5HC4 | LC7HC4 | LC9HC4 | LC12HC4 |
| | HC6 | LC0HC6 | LC3HC6 | LC5HC6 | LC7HC6 | LC9HC6 | LC12HC6 |
| | HC8 | LC0HC8 | LC3HC8 | LC5HC8 | LC7HC8 | LC9HC8 | LC12HC8 |
| | HC10 | LC0HC10 | LC3HC10 | LC5HC10 | LC7HC10 | LC9HC10 | LC12HC10 |
| | HC13 | LC0HC13 | LC3HC13 | LC5HC13 | LC7HC13 | LC9HC13 | LC12HC13 |

표 21

중쇄 및 경쇄의 상이한 쌍의 공동-발현에 의한 상이한 D2E7-13C5.5L3F DVD-Ig 단백질의
생성

| 작제물 | 링커 길이 | D2E7-13C5.5L3F 경쇄 | |
|-------------------|-------------|-------------------|----------|
| | | LC5 | LC12 |
| D2E7-13C5.5L3F 중쇄 | HC6 | LC5HC6 | LC12HC6 |
| | HC13 | LC5HC13 | LC12HC13 |

[0735]

실시예 2.5: 항-TNF/IL-13 DVD-Ig의 질량분광법 및 SEC 분석

[0737] DVD-Ig의 경쇄 및 중쇄의 분자량(MW)을 측정하기 위해, 10 μL의 DVD-Ig(0.8 μg/μL)를 1.0M DTT 용액(5 μL)으로 환원시켰다. PLRP-S, 8u, 4000A, 및 1x150 mm 단백질 컬럼(제조원: 미크롬 바이오리서치, 매사추세츠주

오번 소재)을 사용하여 DVD-Ig의 중쇄 및 경쇄를 분리하였다. 아질런트 HP1100 모세관 HPLC(제조원: 아질런트 테크놀로지스 인코포레이티드, 캘리포니아주 팔로 알토 소재)을 질량 분광계 QSTAR(제조원: 어플라이드 바이오 시스템스, 캘리포니아주 포스터 시티 소재)와 함께 사용하였다. 밸코 밸브를 10분에 설정하여 시료를 탈염시키기 위해 폐기물로부터 MS로 유동을 스위치하였다. 완충제 A는 0.02% TFA, 0.08% FA, 0.1% ACN 및 99.8% HPLC-H₂O이었다. 완충제 B는 0.02% TFA, 0.08% FA, 0.1% HPLC-H₂O, 및 99.8% ACN을 함유하였다. HPLC 유동 속도는 50 μL/분이었고, 시료 주입 용적은 8.0 mL이었다. 컬럼 오븐의 온도를 60°C에서 설정하고, 분리 구배는 5% B로 5분; 5% B 내지 65% B로 35분; 65% B 내지 95% B로 다른 5분, 및 95% B 내지 5% B로 5분이었다. TOFMS 스캔은 800 내지 2500 amu이고, 주기는 3600이었다. 완전한 길이의 DVD-Ig의 MW를 측정하기 위하여, 단백질 마이크로 트랩 카트리지(제조원: 미크롬 바이오리서치, 메사추세츠주 오번 소재)를 시료를 탈염하는데 사용하였다. HPLC 구배는 5% B로 5분; 5% B 내지 95% B로 1분; 및 95% B 내지 5% B로 다른 4분이었다. QSTAR TOFMS 스캔은 2000 내지 3500 amu이고, 주기는 899이었다. 모든 MS 원 데이터를 Analyst QS 소프트웨어(제조원: 어플라이드 바이오시스템스)로 분석하였다. DVD-Ig의 SEC 분석을 위해, PBS 중 정제된 DVD-Ig 및 키메라 Ab를 슈퍼로즈 6 10/300 G2, 300 x 10 mm 컬럼(제조원: 아머삼 바이오사이언스, 뉴저지주 피츠카타웨이 소재) 상에 적용하였다. HPLC 장치, 모델 10A(제조원: 시마즈, 메릴랜드주 클룸비아 소재)를 SEC에 대해 사용하였다. 모든 단백질을 UV 검출기를 사용하여 280 nm 및 214 nm에서 측정하였다. 용출은 0.5 mL/분의 유동 속도에서 등용 매성이었다. 안정성 연구를 위해, PBS 중 0.2 내지 0.4 mg/ml 농도 범위의 시료를 -80°C 내지 25°C의 3회의 동결-해동 주기를 수행하고, 4°C, 25°C 또는 40°C에서 4주 및 8주 동안 항온처리한 후 SEC 분석하였다.

[0738] DVD-Ig 및 키메라 Ab를 단백질 A 크로마토그래피로 정제하였다. 정제 수율(3 내지 5mg/L)은 각각의 단백질에 대해 발현 배지의 hIgG 정량과 일치하였다. 정제된 DVD-Ig 및 키메라 Ab의 조성 및 순도를 환원 및 비-환원 조건하에서 SAS-PAGE로 분석하였다. 비-환원 조건에서, 4개의 단백질 각각은 단일 밴드로 이주하였다. DVD-Ig 단백질은 예측한 바와 같이, 키메라 Ab보다 큰 M.W.를 나타내었다. 비-환원 조건에서, 4개의 단백질 각각은 2 개의 밴드 즉, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄를 수득하였다. 다시, DVD-Ig의 중쇄 및 경쇄는 키메라 Ab의 것보다 크기가 더 커졌다. SDS-PAGE는, 각각의 DVD-Ig가 단일 종으로 발현되며, 중쇄 및 경쇄가 효율적으로 쌍을 이루어 IgG-유사 분자를 형성함을 나타내었다. 중쇄 및 경쇄의 크기 및 2개의 DVD-Ig 분자의 완전한 길이의 단백질은 아미노산 서열을 기초로 이들의 계산된 분자량과 일치한다.

[0739] DVD-Ig의 정확한 분자량을 측정하기 위하여, 분자 분광법을 사용하였다. 경쇄, 중쇄 및 완전한 길이의 단백질을 포함하는 각각의 DVD-Ig의 실험적으로 측정된 분자량은 예측된 값과 우수하게 일치하였다. 용액속에서 DVD-Ig의 물리학적 특성을 추가로 연구하기 위해, 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 사용하여 큰 단량체 특성을 나타낸 각각의 단백질을 분석하였다.

실시예 2.6: ELISA에 의한 항-TNF/IL-13 DVD-Ig의 IL-13 결합 활성의 측정

[0741] 모든 DVD-Ig의 결합 활성을 이들의 항-IL-13 활성에 대해 고 처리량 ELISA로 우선 특성화하거나 스크리닝하였다. 바이오틱스화된 사람 IL-13을 항-바이오틴 폴리클로날 항체 피복된 ELISA 플레이트 상에 고정시켰다. DVD-Ig를 각종 농도로 적정하고 IL-13-포획된 플레이트에 가한 후 1시간 동안 27°C에서 항온처리하였다. 세척한 후, 결합된 DVD-Ig 단백질을 HRP-접합된 염소 항-사람 폴리클로날 항체로 검출하였다. 우수한 결합 특성을 나타낸 DVD-Ig 단백질을 TNF 및 IL-13 둘다에 대해 Biacore로 역학적 결합 친화성 및 세포-계 생검정으로 중화 효능에 대해 추가로 시험하였다.

실시예 2.7: Biacore에 의한 항-TNF/IL-13 DVD-Ig의 항원 결합 친화성의 측정

[0743] rhTNF α 및 rhIL-13에 대한 DVD-Ig 결합의 역학을 표면 플라스몬 공명에 기초한 측정에 의해 Biacore 3000 장치(제조원: 비아코어 아베, 스웨덴 업살라 소재)로 HBS-EP(10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 및 0.005% 표면활성제 P20)을 사용하여 25°C에서 측정하였다. 모든 화합물들은 비아코어 아베(스웨덴 업살라 소재)로부터 입수하거나 본원에 기술된 다른 공급업체로부터 입수하였다. 10 mM 아세트산나트륨(pH 4.5) 속에 희석시킨 약 5000 RU의 염소 항-사람 IgG Fc γ 단편 특이적인 폴리클로날 항체(제조원: 피어스 바이오텍놀로지 인코포레이티드, 일리노이주 록포드 소재)를 CM5 연구 등급 바이오센서 칩을 따라 표준 아민 커플링 시약을 사용하여 제조업자의 지시 및 공정에 따라 25 mg/ml에서 직접 고정시켰다. 바이오센서 표면상의 반응하지 않은 잔기를 에탄올아민으로 차단하였다. 유동셀 2 및 4내 변형된 카복시메틸 텍스트란 표면을 반응 표면으로 사용하였다. 유동 셀 1 및 3내 염소 항-사람 IgG가 없는 변형되지 않은 카복시메틸 텍스트란을 참조 표면으로 사용하였다. 역학적 분석을 위해, 1:1 랭듀어 결합 모델로부터 기원한 속도 방적식을 Bioevaluation 4.0.1 소프트웨어를 사용하여 모든 10개의 주입물(글로벌 피트 분석 사용)의 연합 및 해리 상에 대해 동시에 팟팅하였다.

정제된 DVD-Ig 시료를 HEPES-완충된 염수 속에 염소 항-사람 IgG Fc 특이적인 반응 표면에 걸쳐 포획을 위해 희석시키고 반응 매트릭스 위에 5 ml/분의 유동 속도로 주입하였다. 연합 및 해리 속도 상수, $k_{on}(M^{-1}s^{-1})$ 및 $k_{off}(s^{-1})$ 을 25 ml/분의 연속적인 유동 속도하에 측정하였다. 속도 상수는 1.25 내지 1000 nM 범위의 10개의 상이한 항원 농도에서 역학적 결합 측정에 의해 기원하였다. 다음에, DVD-Ig와 항원 사이의 반응의 평형 해리 상수(M)를 다음 식에 의해 역학적 속도 상수로부터 계산하였다: $KD = k_{off}/k_{on}$. 항원 시료의 분취량을 또한 블랭크 참조물 및 반응 CM 표면위에 동시에 주입하여 특정의 비특이적인 결합 배경을 기록하고 감함으로써 굴절률 변화 및 주입 노이즈의 대부분을 제거하였다. 표면을 10 mM 글리신(pH 1.5)을 5 ml/분의 유동 속도로 2회 연속 하여 25ml 주입하여 재생시켰다. 표면에 고정된 항-Fc 항체는 완전히 재생되며 12 주기에 걸쳐 이의 완전한 포획 능력을 보유하였다. 포획된 DVD-Ig-항원 복합체의 겉보기 입체화학을 다음 식을 사용하여 포획 결합 조건(정체-상 평형)하에 계산하였다:

$$\text{화학량률} = \frac{\text{항원 반응 (RU)}}{\text{DVD 반응 (RU)}} \times \frac{\text{DVD-Ig MW}}{\text{항원 MW}}$$

[0744]

[0745] Biacore 분석은, 시험한 모든 DVD-Ig가 TNF 및 IL-13 둘다에 대한 결합을 나타냄을 입증하였다. TNF 및 IL-13에 대한 모든 DVD-Ig의 결합 친화성 매개변수는 표 22 및 23에 나타낸다.

표 22

IL-13 및 TNF에 대한 D2E7.1-13C5.5 DVD-Ig 분자의 결합 친화성

| D2E7.1-13C5.5 DVD-Ig | ELISA에 의한 IL-13에 대한 결합 (ED ₅₀ , nM) | Biacore에 의한 IL-13에 대한 K _d (nM) | Biacore에 의한 TNF에 대한 K _d (nM) |
|----------------------|--|---|---|
| LC0HC0 | | | |
| LC0HC2 | 0.035 | | |
| LC0HC4 | 0.04 | | |
| LC0HC6 | 0.04 | 0.351 | 0.081 |
| LC0HC8 | 0.22 | | |
| LC0HC10 | 0.68 | | |
| LC0HC13 | 0.04 | 0.571 | 0.321 |
| LC3HC0 | 0.014 | 0.147 | 0.279 |
| LC3HC2 | 0.34 | | |
| LC3HC4 | 5.42 | | |
| LC3HC6 | 2.25 | | |
| LC3HC8 | 0.16 | | |
| LC3HC10 | 0.38 | | |
| LC3HC13 | 0.035 | | |
| LC5HC0 | 0.049 | 0.640 | 0.156 |
| LC5HC2 | 0.93 | | |
| LC5HC4 | 0.68 | | |
| LC5HC6 | 0.31 | 0.139 | 0.134 |
| LC5HC8 | 0.36 | | |
| LC5HC10 | 0.31 | | |
| LC5HC13 | 0.043 | 0.538 | 0.067 |
| LC7HC0 | 0.07 | | |
| LC7HC2 | 0.058 | | |
| LC7HC4 | 0.042 | | |
| LC7HC6 | 0.069 | | |
| LC7HC8 | 0.038 | | |
| LC7HC10 | 0.032 | | |
| LC7HC13 | 0.019 | 0.567 | 0.051 |
| LC9HC0 | 0.057 | | |
| LC9HC2 | 0.041 | | |
| LC9HC4 | 0.024 | 0.615 | 0.142 |
| LC9HC6 | 0.03 | 0.743 | 0.098 |
| LC9HC8 | 0.027 | | |

[0746]

| D2E7.1-13C5.5 DVD-Ig | ELISA에 의한 IL-13에 대한 결합 (ED ₅₀ , nM) | Biacore에 의한 IL-13에 대한 K _d (nM) | Biacore에 의한 TNF에 대한 K _d (nM) |
|----------------------|--|---|---|
| LC9HC10 | 0.069 | | |
| LC9HC13 | 0.089 | | |
| LC12HC0 | 0.024 | 0.199 | 0.197 |
| LC12HC2 | 0.02 | | |
| LC12HC4 | 0.019 | | |
| LC12HC6 | 0.030 | 0.235 | 0.059 |
| LC12HC8 | 0.057 | | |
| LC12HC10 | 0.044 | | |
| LC12HC13 | 0.016 | 0.442 | 0.069 |

[0747]

표 23**IL-13 및 TNF에 대한 D2E7-13C5.5L3F DVD-Ig 분자의 결합 친화성**

| D2E7-13C5.5L3F DVD-Ig | Biacore에 의한 IL-13에 대한 K_D (nM) | Biacore에 의한 TNF에 대한 K_D (nM) |
|-----------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| LC5HC6 | 1.23 | 0.030 |
| LC5HC13 | 0.474 | 0.014 |
| LC12HC6 | 0.402 | 0.008 |
| LC12HC13 | | |

[0748]

실시예 2.7: 항-TNF/IL-13 DVD-Ig의 생물학적 활성을 측정

[0749] 항-TNF/IL-13 DVD-Ig 단백질의 생물학적 활성을 L929(항-TNF의 경우) 및 A549(항-IL-13의 경우) 생검정을 사용하여 측정하였다.

[0750] 표 24 및 25에 나타낸 바와 같이, 시험한 모든 DVD-Ig는 TNF 및 IL-13을 중화시킬 수 있었다.

표 24

IL-13 및 TNF에 대한 D2E7.1-13C5.5 DVD-Ig 분자의 중화 활성

| D2E7.1-13C5.5 DVD-Ig | A549 생검정에 의한 항-IL-13 활성 (IC ₅₀ , nM) | L929 생검정에 의한 항-TNF 활성 (IC ₅₀ , nM) |
|----------------------|---|---|
| LC0HC0 | | |
| LC0HC2 | 5.32 | 0.362 |
| LC0HC4 | 7.66 | 0.575 |
| LC0HC6 | 4.76 | 0.529 |
| LC0HC8 | | |
| LC0HC10 | | |
| LC0HC13 | 3.82 | 0.616 |
| LC3HC0 | 2.51 | 1.63 |
| LC3HC2 | | |
| LC3HC4 | | |
| LC3HC6 | | |
| LC3HC8 | | |
| LC3HC10 | | |
| LC3HC13 | | |
| LC5HC0 | 4.26 | 0.063 |
| LC5HC2 | | |
| LC5HC4 | | |
| LC5HC6 | 4.29 | 0.67 |
| LC5HC8 | | |
| LC5HC10 | | |
| LC5HC13 | 0.691 | 0.372 |
| LC7HC0 | | |
| LC7HC2 | | |
| LC7HC4 | | |
| LC7HC6 | | |
| LC7HC8 | | |
| LC7HC10 | | |
| LC7HC13 | 0.80 | 0.052 |
| LC9HC0 | | |
| LC9HC2 | | |
| LC9HC4 | 3.10 | 0.250 |
| LC9HC6 | 2.38 | 0.178 |
| LC9HC8 | | |

[0752]

| D2E7.1-13C5.5 DVD-Ig | A549 생검정에 의한 항-IL-13 활성 (IC ₅₀ , nM) | L929 생검정에 의한 항-TNF 활성 (IC ₅₀ , nM) |
|----------------------|---|---|
| LC9HC10 | | |
| LC9HC13 | | |
| LC12HC0 | 1.62 | 0.063 |
| LC12HC2 | 1.03 | 0.065 |
| LC12HC4 | 0.99 | 0.073 |
| LC12HC6 | 0.666 | 0.208 |
| LC12HC8 | | |
| LC12HC10 | | |
| LC12HC13 | 0.89 | 0.063 |

[0753]

표 25

IL-13 및 TNF에 대한 D2E7-13C5.5L3F DVD-Ig 분자의 중화 활성

| D2E7-13C5.5L3F DVD-Ig | A549 생검정에 의한 항-IL-13 활성 (IC ₅₀ , nM) | L929 생검정에 의한 항-TNF 활성 (IC ₅₀ , nM) |
|-----------------------|---|---|
| LC5HC6 | 1.84 | 0.095 |
| LC5HC13 | 0.34 | 0.032 |
| LC12HC6 | 0.52 | 0.028 |
| LC12HC13 | | |

[0754]

실시예 3: 이원 가변 도메인 면역글로불린(DVD-Ig)의 생성 및 특성화

공지된 아미노산 서열을 가진 모 항체를 사용하는 이원 가변 도메인 면역글로불린(DVD-Ig)을 DVD-Ig 가변 중쇄 및 DVD-Ig 가변 경쇄 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 단편을 합성하고 당해 단편을 실시예 1.4.4.1에 따라 pHybC-D2 백터내로 클로닝함으로써 생성하였다. DVD-Ig 작제물을 클로닝하고 실시예 1.4.4.2에 기술된 바와 같이 293 세포내에서 발현시켰다. DVD-Ig 단백질을 표준 방법에 따라 정제하였다. 기능적 특성을 실시예 1.2.1 및 1.2.2에 기술된 방법에 따라 측정하였다.

[0755] 본 발명의 DVD-Ig에 대한 DVD-Ig VH 및 VL 쇄를 하기 제공한다.

실시예 3.1: 링커 세트 1을 가진 NRP1(서열 1) 및 VEGF(서열 1) DVD-Ig의 생성

표 26

| 서열 번호 | DVD 가변 도메인 명칭 | 외부 가변 도메인 명칭 | 내부 가변 도메인 명칭 | 서열 |
|-------|---------------|--------------|--------------|--|
| 84 | DVD050H | AB016VH | AB014VH | 12345678901234567890123456789012345 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSEPI WVRQAPGKGLEWVSSITGKNGYTYYADSVVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGKKVY MDVWCQGTIVTVSS ASTKG EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGYTFTNYGMNWRQAPGKGLEWVGW INTYGEPTYAADFRRFTPSLDTSKSTAYLQMNS LRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGTIVT VSS |
| 85 | DVD050L | AB016VL | AB014VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLA WYQQKPGKAPKLLIYGASSRASGVPSRSFGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQYMSVPITFCQQTKVE IKR TVAA PDQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVWPWT FGQQGTTKVEIKR |

[0759]

실시예 3.2: 링커 세트 2를 가진 NRP1(서열 1) 및 VEGF(서열 1) DVD-Ig의 생성

표 27

| 서열 번호 | DVD 가변 도메인 명칭 | 외부 가변 도메인 명칭 | 내부 가변 도메인 명칭 | 서열 |
|-------|---------------|--------------|--------------|--|
| 86 | DVD695H | AB016VH | AB014VH | 12345678901234567890123456789012345 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSEPI WVRQAPGKGLEWVSSITGKNGYTYYADSVVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGKKVY MDVWCQGTIVTVSS ASTKG EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGYTFTNYGMNWRQAPGKGLEWVGW INTYGEPTYADEFRRFTPSLDTSKSTAYLQMNS LRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGTIVT VSS |
| 87 | DVD695L | AB016VL | AB014VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLA WYQQKPGKAPKLLIYGASSRASGVPSRSFGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQYMSVPITFCQQTKVE IKR TVDODDKA PDQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CSASODISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSG VPSRSFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYS TVPWTGQGTKEIKR |

[0761]

실시예 3.3: 링커 세트 3을 가진 NRP1(서열 1) 및 VEGF (서열 1) DVD-Ig의 생성

표 28

| 서열 번호 | DVD 가변 도메인 명칭 | 외부 가변 도메인 명칭 | 내부 가변 도메인 명칭 | 서열 |
|----------|------------------------|-----------------------|-----------------------|---|
| 88 | DVD696H | AB016VH | AB014VH | 12345678901234567890123456789012345 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSEPI WVRQAPGKGLLEWVSSITGKNGYIYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGKKVY MDVWQGQTLTVTIVSS ASTKGPEVQLVESGGGLVQPG GSRLSCAASGYTFTNYGMNWRQAPGKGLEWVG INTYTGEPYAADEFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNS LRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWWFDVWGQGT VSS |
| 89 | DVD696L | AB016VL | AB014VL | 12345678901234567890123456789012345 DIQMTQSPSSLASAVGDRVITTCRASQSISYLA WYQKPGKAPKLLIYGASSRASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQYMSVPITFCQGT IKR LVPGRGSAAPD IQMTQSPSSLASAVGDRVIT SASQDISNYLNWYQKPGKAPKVLITYFTSSLHS PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQY VPWTFGQGT KVEIKR |

[0763]

실시예 3.4: 링커 세트 4를 가진 NRP1(서열 1) 및 VEGF(서열 1) DVD-Ig의 생성

표 29

| 서열 번호 | DVD 가변 도메인 명칭 | 외부 가변 도메인 명칭 | 내부 가변 도메인 명칭 | 서열 |
|----------|------------------------|-----------------------|-----------------------|---|
| 90 | DVD697H | AB016VH | AB014VH | 12345678901234567890123456789012345 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSEPI WVRQAPGKGLLEWVSSITGKNGYIYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGKKVY MDVWQGQTLTVTIVSS GGGGGGGP EVQLVESGGGLVQ PGGSRLSCAASGYTFTNYGMNWRQAPGKGLEWV GWINTYTGEPYAADEFKRRFTFSLDTSKSTAYLQM NSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWWFDVWGQGT VIVSS |
| 91 | DVD697L | AB016VL | AB014VL | 12345678901234567890123456789012345 DIQMTQSPSSLASAVGDRVITTCRASQSISYLA WYQKPGKAPKLLIYGASSRASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQYMSVPITFCQGT IKR GGGGGGP DIQMTQSPSSLASAVGDRVIT SODISNYLNWYQKPGKAPKVLITYFTSSLHS PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQY WTFGQGT KVEIKR |

[0765]

실시예 3.5: 링커 세트 5를 가진 NRP1(서열 1) 및 VEGFR(서열 1) DVD-Ig의 생성

표 30

| 서열 번호 | DVD 가변 도메인 명칭 | 외부 가변 도메인 명칭 | 내부 가변 도메인 명칭 | 서열 |
|----------|------------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| 92 | DVD698H | AB016VH | AB014VH | 12345678901234567890123456789012345 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSEPI WVRQAPGKGLLEWVSSITGKNGYIYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGKKVY MDVWQGQTLTVTIVSS GGGGGGGP EVQLVESGGGLV QPGGSRLSCAASGYTFTNYGMNWRQAPGKGLEW GWINTYTGEPYAADEFKRRFTFSLDTSKSTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWWFDVWGQGT LTVSS |
| 93 | DVD698L | AB016VL | AB014VL | 12345678901234567890123456789012345 DIQMTQSPSSLASAVGDRVITTCRASQSISYLA WYQKPGKAPKLLIYGASSRASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQYMSVPITFCQGT IKR GGGGGGP DIQMTQSPSSLASAVGDRVIT SASQDISNYLNWYQKPGKAPKVLITYFTSSLHS PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQY WTFGQGT KVEIKR |

[0767]

실시예 3.6: 링커 세트 1을 가진 SOST 및 TNF(서열 1) DVD-Ig의 생성

표 31

| 서열 번호 | DVD 가변 도메인 명칭 | 외부 가변 도메인 명칭 | 내부 가변 도메인 명칭 | 서열 |
|----------|------------------------|-----------------------|-----------------------|---|
| 94 | DVD278H | AB050VH | AB017VH | 12345678901234567890123456789012345 EVQLQQSGPELMKPGASVKMSCKASGYTFTDYNMH WMKQNQGKSLEWIGEINPNSSGGSGYNQKFKGKATL TVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARLGYYGNY EDWYFDVGAGTTVTVSS ASTKGP EVQLVESCGGL VQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHHWVRQAPGKGLE WVAITWNSGHIDYADSVEGRTFISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWQGTL VTVSS |
| 95 | DVD278L | AB050VL | AB017VL | DLQMTQTTSSLSASLGDRVТИSCRASQDISNYLNW YQQKPDGTVKLLIFYTSTLQSGVPSPRFSGSGSGTN YSLTITNLÉQDDAATYFCQOGDTLPYTFGGGTKE IKR TVAAP DIQMTQSPESSLASAVGDRVITICRASQ GIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYT FGQGTKEIKR |

[0769]

실시예 3.7: 링커 세트 2를 가진 SOST 및 TNF DVD-Ig의 생성

표 32

| 서열 번호 | DVD 가변 도메인 명칭 | 외부 가변 도메인 명칭 | 내부 가변 도메인 명칭 | 서열 |
|----------|------------------------|-----------------------|-----------------------|---|
| 96 | DVD699H | AB050VH | AB017VH | 12345678901234567890123456789012345 EVQLQQSGPELMKPGASVKMSCKASGYTFTDYNMH WMKQNQGKSLEWIGEINPNSSGGSGYNQKFKGKATL TVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARLGYYGNY EDWYFDVGAGTTVTVSS ASTKGP EVQLVESCGGL VQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHHWVRQAPGKGLE WVAITWNSGHIDYADSVEGRTFISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWQGTL VTVSS |
| 97 | DVD699L | AB050VL | AB017VL | DLQMTQTTSSLSASLGDRVТИSCRASQDISNYLNW YQQKPDGTVKLLIFYTSTLQSGVPSPRFSGSGSGTN YSLTITNLÉQDDAATYFCQOGDTLPYTFGGGTKE IKR TVDKKAAPIQMTQSPESSLASAVGDRVITITCRASQ GIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRF PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNR APYTFGQGTKEIKR |

[0771]

실시예 3.8: 링커 세트 3을 가진 SOST 및 TNF DVD-Ig의 생성

표 33

| 서열 번호 | DVD 가변 도메인 명칭 | 외부 가변 도메인 명칭 | 내부 가변 도메인 명칭 | 서열 |
|----------|------------------------|-----------------------|-----------------------|---|
| 98 | DVD700H | AB050VH | AB017VH | 12345678901234567890123456789012345 EVQLQQSGPELMKPGASVKMSCKASGYTFTDYNMH WMKQNQGKSLEWIGEINPNSSGGSGYNQKFKGKATL TVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARLGYYGNY EDWYFDVGAGTTVTVSS ASTKGP EVQLVESCGGL VQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHHWVRQAPGKGLE WVAITWNSGHIDYADSVEGRTFISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWQGTL VTVSS |
| 99 | DVD700L | AB050VL | AB017VL | DLQMTQTTSSLSASLGDRVТИSCRASQDISNYLNW YQQKPDGTVKLLIFYTSTLQSGVPSPRFSGSGSGTN YSLTITNLÉQDDAATYFCQOGDTLPYTFGGGTKE IKR IVPRGSAAPIQMTQSPESSLASAVGDRVITITCRASQ GIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNR APYTFGQGTKEIKR |

[0773]

실시예 3.9: 링커 세트 4를 가진 SOST 및 TNF DVD-Ig의 생성

표 34

| 서열 번호 | DVD 가변 도메인 명칭 | 외부 가변 도메인 명칭 | 내부 가변 도메인 명칭 | 서열 |
|----------|------------------------|-----------------------|-----------------------|---|
| 100 | DVD701H | AB050VH | AB017VH | 12345678901234567890123456789012345 EVQLQQSGPELMKPGASVKMSCKASGYFTTDYNMHW WMKQNQGKSLLEWIGEINPNSSGGSGYQKFKGKATL TVDKSSSTAYMELRSLSITSEDAVYYCARLGYYGNY EDWYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPEVQL VESGGGLVQPGRSRLSCAASGFTFDYAMHWWVRQAF APGKGLEWSA1TWNSGHIDYADSVEGRFTISRDN AKNSLYLQMSLRAEDTAVYYCAKSYLSTASSLD YWQGQTLVTVSS |
| 101 | DVD701L | AB050VL | AB017VL | DLQMTQTSSLSASLGDRVITISCRASQDISNYLNW YQQKPDGTVKLLIFYTSTLQSGVPSRFSGSGSGTN YSLTITNLEQDDAATYFCQGGDTLPYTFFGGTKLE IKR TVAADDKSVFIVPP DIQMTQSPSSLSASVG DRVITTCRASGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAA STLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATY YCQRYNRAPTFGQGTTKVEIKR |

[0775]

[0776] 실시예 3.10: 링커 세트 5를 가진 SOST 및 TNF DVD-Ig의 생성

표 35

| 서열 번호 | DVD 가변 도메인 명칭 | 외부 가변 도메인 명칭 | 내부 가변 도메인 명칭 | 서열 |
|----------|------------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| 102 | DVD702H | AB050VH | AB017VH | 12345678901234567890123456789012345 EVQLQQSGPELMKPGASVKMSCKASGYFTTDYNMHW WMKQNQGKSLLEWIGEINPNSSGGSGYQKFKGKATL TVDKSSSTAYMELRSLSITSEDAVYYCARLGYYGNY EDWYFDVWGAGTTVTVSS GGGGGGGG EVQLVESGG GLVQPGRSRLSCAASGFTFDYAMHWWVRQAF LEWWSA1TWNSGHIDYADSVEGRFTISRDN YLQMSLRAEDTAVYYCAKSYLSTASSLDYWQGQ TLVTVSS |
| 103 | DVD702L | AB050VL | AB017VL | DLQMTQTSSLSASLGDRVITISCRASQDISNYLNW YQQKPDGTVKLLIFYTSTLQSGVPSRFSGSGSGTN YSLTITNLEQDDAATYFCQGGDTLPYTFFGGTKLE IKR GGGGGGGG DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCR SOGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRA PYTFGQGTTKVEIKR |

[0777]

[0778] 실시예 3.11: 링커 세트 6을 가진 SOST 및 TNF DVD-Ig의 생성

표 36

| 서열 번호 | DVD 가변 도메인 명칭 | 외부 가변 도메인 명칭 | 내부 가변 도메인 명칭 | 서열 |
|----------|------------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| 104 | DVD703H | AB050VH | AB017VH | 12345678901234567890123456789012345 EVQLQQSGPELMKPGASVKMSCKASGYFTTDYNMHW WMKQNQGKSLLEWIGEINPNSSGGSGYQKFKGKATL TVDKSSSTAYMELRSLSITSEDAVYYCARLGYYGNY EDWYFDVWGAGTTVTVSS GGGGGGGG EVQLVESGG GLVQPGRSRLSCAASGFTFDYAMHWWVRQAF LEWWSA1TWNSGHIDYADSVEGRFTISRDN YLQMSLRAEDTAVYYCAKSYLSTASSLDYWQGQ TLVTVSS |
| 105 | DVD703L | AB050VL | AB017VL | DLQMTQTSSLSASLGDRVITISCRASQDISNYLNW YQQKPDGTVKLLIFYTSTLQSGVPSRFSGSGSGTN YSLTITNLEQDDAATYFCQGGDTLPYTFFGGTKLE IKR GGGGGGGG DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCR ASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRA PYTFGQGTTKVEIKR |

[0779]

[0780] 실시예 3.12: 링커 세트 7을 가진 SOST 및 TNF DVD-Ig의 생성

표 37

| 서열 번호 | DVD 가변 도메인 명칭 | 외부 가변 도메인 명칭 | 내부 가변 도메인 명칭 | 서열 |
|----------|------------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| 106 | DVD704H | AB050VH | AB017VH | 12345678901234567890123456789012345 |
| 107 | DVD704L | AB050VL | AB017VL | DLQMTQTSSLSASLGDRVТИCRASQDISNYLNW YQQKPDGTVKLLIFYTSTLQSGVPSRFSGSGSGTN YSLTTINLEQDDAATYFCQGGDTLPYTFFGGTKLE IKR PAPNLLGGP DIQMTQSPSSLASAVGDRVТИC RASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGV PSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNR APYTFGQGKTVKEIKR GTLVTVSS |

[0781]

실시예 3.13: 링커 세트 8을 가진 SOST 및 TNF DVD-Ig의 생성

표 38

| 서열 번호 | DVD 가변 도메인 명칭 | 외부 가변 도메인 명칭 | 내부 가변 도메인 명칭 | 서열 |
|----------|------------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| 108 | DVD705H | AB050VH | AB017VH | 12345678901234567890123456789012345 |
| 109 | DVD705L | AB050VL | AB017VL | DLQMTQTSSLSASLGDRVТИCRASQDISNYLNW YQQKPDGTVKLLIFYTSTLQSGVPSRFSGSGSGTN YSLTTINLEQDDAATYFCQGGDTLPYTFFGGTKLE IKR PAPELLGGP DIQMTQSPSSLASAVGDRVТИC RASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGV PSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNR APYTFGQGKTVKEIKR GTLVTVSS |

[0783]

실시예 3.14: 링커 세트 9를 가진 SOST 및 TNF DVD-Ig의 생성

표 39

| 서열 번호 | DVD 가변 도메인 명칭 | 외부 가변 도메인 명칭 | 내부 가변 도메인 명칭 | 서열 |
|----------|------------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| 110 | DVD706H | AB050VH | AB017VH | 12345678901234567890123456789012345 |
| 111 | DVD706L | AB050VL | AB017VL | DLQMTQTSSLSASLGDRVТИCRASQDISNYLNW YQQKPDGTVKLLIFYTSTLQSGVPSRFSGSGSGTN YSLTTINLEQDDAATYFCQGGDTLPYTFFGGTKLE IKR PAPNLLGGP DIQMTQSPSSLASAVGDRVТИC RASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGV PSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNR APYTFGQGKTVKEIKR GTLVTVSS |

[0785]

실시예 3.15: 링커 세트 10을 가진 SOST 및 TNF DVD-Ig의 생성

표 40

| 서열 번호 | DVD 가변 도메인 명칭 | 외부 가변 도메인 명칭 | 내부 가변 도메인 명칭 | 서열 |
|----------|------------------------|-----------------------|-----------------------|---|
| 112 | DVD707H | AB050VH | AB017VH | 12345678901234567890123456789012345 EVQLQQSGPELMKPGASVKMSCKASGYTFTDYNMHW WKQNQGKSLIEWIGEINPNSGGSGYQKFKGKATL TVDKSSSTAYMELRSLSITSEDAVYYCARLGYYGNY EDWYFDVWGAGTTVTVSS PAPNLLGGP EVQLVESG GGLVQPGRSRLSCAASGFTFDDYAMHWRQAPGK GLEWWSAITWNSGHIDYADSVEGRTFISRDNAKNS LYLQMNSSLRAEDTAVYYCAKVSYLTASSLDYWGWQ GILTVTSS |
| 113 | DVD707L | AB050VL | AB017VL | DLQMTQTSSLSASLGDRVТИCRASQDISNYLNW YQQKPDGTVKLLIFYFTSTLQSGVPSRFSGSGSGTN YSLTTTNEQDDAATYFCQGGDTLPYTFGGTKLE IKR PAPNLLGGP DIQMTQSPSSLSASVCDRV ТИCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLIIYAASTL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQ RYNRAPYTFGQGTTKVEIKR |

[0787]

실시예 3.16: 링커 세트 11을 가진 SOST 및 TNF DVD-Ig의 생성

표 41

| 서열 번호 | DVD 가변 도메인 명칭 | 외부 가변 도메인 명칭 | 내부 가변 도메인 명칭 | 서열 |
|----------|------------------------|-----------------------|-----------------------|---|
| 114 | DVD708H | AB050VH | AB017VH | 12345678901234567890123456789012345 EVQLQQSGPELMKPGASVKMSCKASGYTFTDYNMHW WKQNQGKSLIEWIGEINPNSGGSGYQKFKGKATL TVDKSSSTAYMELRSLSITSEDAVYYCARLGYYGNY EDWYFDVWGAGTTVTVSSPNL LGGP EVQLVESG GGLVQPGRSRLSCAASGFTFDDYAMHWRQAPGKGL EWWSAITWNSGHIDYADSVEGRTFISRDNAKNSLY LYLQMNSSLRAEDTAVYYCAKVSYLTASSLDYWGWQGT LVTVSS |
| 115 | DVD708L | AB050VL | AB017VL | DLQMTQTSSLSASLGDRVТИCRASQDISNYLNW YQQKPDGTVKLLIFYFTSTLQSGVPSRFSGSGSGTN YSLTTTNEQDDAATYFCQGGDTLPYTFGGTKLE IKR PAPNLLGGP DIQMTQSPSSLSASVCDRV ТИCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLIIYAASTL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQ RYNRAPYTFGQGTTKVEIKR |

[0789]

실시예 3.17: TNF(서열 3 - D2E7.1) 및 IL-13(서열 1 - 13C5.5) DVD-Ig 중쇄 및 경쇄의 생성

표 42

| 서열 번호 | 기술어 | 외부 가변 도메인 명칭 | 내부 가변 도메인 명칭 | 서열 |
|----------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| 116 | D2E7.1-13C5.5 (HC0) VH | AB230VH | AB231VH | 123456789012345678901234567890123456 EVQLVESGGGLVQPGRSRLRLSCAASGFTFDDYAMHW VRQAPGKGLEWWSAITWNSGHIDYADSVGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDDTAVYYCAKVAYLSTASSL DYWGQGTIVTVSS AS EVTIRESGPGLVKPTQTLTCT LYGFSLSTSMDGVWDWIRQPPGKLEWLAHIWWDDV RYNPALKSRLTISKDTSKNQVVLKLTSDVPDVATY YCARTVSSGYIYYAMDYWGQGTIVTVSS |
| 117 | D2E7.1-13C5.5 (HC2) VH | AB230VH | AB231VH | EVQLVESGGGLVQPGRSRLRLSCAASGFTFDDYAMHW VRQAPGKGLEWWSAITWNSGHIDYADSVGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDDTAVYYCAKVAYLSTASSL DYWGQGTIVTVSS AS TKEVTIRESGPGLVKPTQTLT CTLYGFSLSTSMDGVWDWIRQPPGKLEWLAHIWWDD VKRYNPALKSRLTISKDTSKNQVVLKLTSDVPDVATY TCYTVCARTVSSGYIYYAMDYWGQGTIVTVSS |
| 118 | D2E7.1-13C5.5 (HC4) VH | AB230VH | AB231VH | EVQLVESGGGLVQPGRSRLRLSCAASGFTFDDYAMHW VRQAPGKGLEWWSAITWNSGHIDYADSVGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDDTAVYYCAKVAYLSTASSL DYWGQGTIVTVSS AS TKEVTIRESGPGLVKPTQTLT LTCTLYGFSLSTSMDGVWDWIRQPPGKLEWLAHIWWDD DDVKRYNPALKSRLTISKDTSKNQVVLKLTSDVPDV ATYCATVSSGYIYYAMDYWGQGTIVTVSS |
| 119 | D2E7.1-13C5.5 (HC6) VH | AB230VH | AB231VH | EVQLVESGGGLVQPGRSRLRLSCAASGFTFDDYAMHW VRQAPGKGLEWWSAITWNSGHIDYADSVGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDDTAVYYCAKVAYLSTASSL DYWGQGTIVTVSS AS TKEGP E VTIRESGPGLVKPTQ LTCTLYGFSLSTSMDGVWDWIRQPPGKLEWLAHIWWDD VKRYNPALKSRLTISKDTSKNQVVLKLTSDVPDV ATYCATVSSGYIYYAMDYWGQGTIVTVSS |
| 120 | D2E7.1-13C5.5 (HC8) VH | AB230VH | AB231VH | EVQLVESGGGLVQPGRSRLRLSCAASGFTFDDYAMHW VRQAPGKGLEWWSAITWNSGHIDYADSVGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDDTAVYYCAKVAYLSTASSL DYWGQGTIVTVSS AS TKEGP S EVTLRESGPGLVKPT QTLTCTLYGFSLSTSMDGVWDWIRQPPGKLEWLAHIWWDD VKRYNPALKSRLTISKDTSKNQVVLKLTSDVPDV ATYCATVSSGYIYYAMDYWGQGTIVTVSS |
| 121 | D2E7.1-13C5.5 (HC10) VH | AB230VH | AB231VH | EVQLVESGGGLVQPGRSRLRLSCAASGFTFDDYAMHW VRQAPGKGLEWWSAITWNSGHIDYADSVGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDDTAVYYCAKVAYLSTASSL DYWGQGTIVTVSS AS TKEGP S V F L A EVTLRESGP GLVKPTQTLTCTLYGFSLSTSMDGVWDWIRQPPGKLEW LAHIWWDDVKRYNPALKSRLTISKDTSKNQVVLKLT SDVPDVATYCATVSSGYIYYAMDYWGQGTIVTVSS |
| 122 | D2E7.1-13C5.5 (HC13) VH | AB230VH | AB231VH | EVQLVESGGGLVQPGRSRLRLSCAASGFTFDDYAMHW VRQAPGKGLEWWSAITWNSGHIDYADSVGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDDTAVYYCAKVAYLSTASSL DYWGQGTIVTVSS AS TKEGP S V F L A EVTLRESGP GLVKPTQTLTCTLYGFSLSTSMDGVWDWIRQPPGK LEWLAHIWWDDVKRYNPALKSRLTISKDTSKNQVVL KLTSDVPDVATYCATVSSGYIYYAMDYWGQGTIVTVSS |
| 123 | D2E7.1-13C5.5 (LC0) VL | AB230VL | AB231VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIIRNYLAWY QQKPGKAPKLLIIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDATYCARYNRAPYTFGGQTKEVIEKR DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQDIIRNYLNWY QQKPGKAPKLLIFYTSLKHLHSGVPSRFSGSGSGTDYT LTISLQPEDIATYCCQGNTLPLTFGGGTKEVIEKR |

[0791]

[0792]

[0793]

豆 43

[0794]

[0795]

豆 44

| 서열 번호 | 베타 명칭 | 뉴클레오티드 서열 |
|-------|-------|---|
| 133 | v1 | 1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901 GCGTGCACCAAGGGGCCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGC ACCTCTGGGGCACAGGGGCCCTGGGTGCGCTGGTAAGGACTACTTCCC GAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGGCCCTGACCAGCGCGTGAC ACCTCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACCTCCCTACGGCT GTGACCGTGGCTTCCAGCACGGTCTGGGACCCAGACCTACATCTGCAAGTG AATCACAAGCCCAGCACACCAAGGTGGACAGAAAGTTGAGCCAAATCT TGTGACAAACACTCACACATGCCAACCGTGGCCAGCACCTGAACCTCTGGG GGACCGTCAGTCTTCCCTTCCCCCCCCAAACCCAAGGACACCTCATGATC TCCCCGGACCCCTGAGGTACATCGGTGGTGGACGGTACGGACAGAAC CCTGAGGTCAAGTTCACCTGGTACGTGGACGGCTGGAGGTGCAATAATGCC AAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAAACAGCAGCTACGGCTGGTCAGC GTCTCTACGGCTCTGACCCAGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACAATGTC AAGGTCTCCAAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA GCCAAAGGGCAGCCCGGAGAACCCACAGGTGACACTCCGGCCCCATCCCG GAGGGAGTACCCCCAGAACCCAGGTGACGGTGAACCTGGCCCTTAC TATCCAGGGACATCGCGGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCGAGAAC |

[0796]

[0797]

[0798]

| 서열 번호 | 베타 명칭 | 뉴클레오파이드 서열 |
|-------|-------|--|
| | | 123456789012345678901234567890123456789012345678901 GGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTGGAGTACGTCGTC TTAGGTTGGGGGAGGGTTTATGCGATGGAGTTCACACTGAGTG GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGA ATTGCCCCCTTTTGAGTTGGATCTGTTATTCTCAAGCCTCAGACAGT GGTCAAAGTTTTCTTCATTCAAGGTGCGAGGAATTCTTAGAG ATCCCTCGACCTCGAGATCATTGTGCCGGCGCACCATGGAGTTGG CTGAGCTGGCTTCTGTGCGATTAAAAGGTGTCAGTGC |
| 134 | V2 | ACGTTGGCTGCCACCATCTGCTTCATCTCCGCCATCTGATGAGCAGTTG AAATCTGAACTCCTCTGTGTGCTGCTGATAAATTAACCTATCCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTC CAGGAGAGTGTCAACAGCAGGAGCAAGGGACAGCACCTACAGCCTCAGC AGCACCTCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACAGAGAACACAAAGCTACGCC TGCAGAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTGCCGTACAAGAGCTTCAAC AGGGAGAGTGTGAGCGCCGCTGAGGGCGCAAGGCCGATCCCCCGA CCTGACACTCTGCCATAATAAGAAAATTATTTCATTGCAATAGTGTGTT GGAATTTTGTGCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGCAATCATT TGGCGAGATCCTCGGAGATCTTAGCTAGGAGATCGATCCCCGCCCG ACGAACAAACCTGACTACGACATCTGCCCTTCTCCGGGGCAAGTGC ATGTAATCCCTTCAGTTGGTGGTACAACATTGCCACTGGGCTGTCCA CATGTGACAGCAGGGGACCAAACAAAAGGGGTTCTCTGACTGTAGTTG ACATCCTTATAATGGATGTGCACATTGCCAACACTGAGTGGCTTCATC CTGGAGCAGACTTTGAGCTGTGAGCTGCAACACAAATTGCCATTATGT GTACTCTTGGCTGAAGCTTCAACCAATGCTGGGGACATGACCTCCC AGGGCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCATCAGAGGGGCC TGTGAGCTACCGATAAGCGGACCTCAAGAGGCATTAGCAATAGTGT ATAAGGCCCTTGTAAACCTAAACGGTAGCATATGCTCCGGGTAGT AGTATATACTATCCAGACTAACCTAATTCAATAGCATATGTTACCAACG GGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAGGGCTTAAGGAACAGC GATACTCCACCCATGAGCTGTCAGGTTTATTACATGGGTAGGA TTCAGGAGGTAGTGAACCATTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAAGATC AAGGAGCGGCACTGAACTCTCTGAACTTTGCTTCTCATCTCC TCGTTAGCTAATAGATAACTGCTGAGTTGTAAGCTAAGGTGTATGT GAGGTGCTGAAACAAAGGTTCAAGGTGACGCCAGAATAAATTGG CGGGGGTTCAAGTGGCATTGCTATGACACCAATTACCTCACA ACCCCTGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATCTT TAACAATAGAAATCATGGGTGGGACAAGCCGTAAGACTGGATGCCA TCTCACAGAATTATGGCTATGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATG TACTGGGTTAAAGATGTCTCCAGGGCAGGGACAAAGACAGGTGAA TGTGTTACACTTATGTGAAACAGGGAAAGAGAGTGGACGCCGACAGC AGGGACTTCAACTGGTTCTAAACACCCCGAAAAATTAAACGGGCTCC ACGCCAATGGGCCATAAAACAAAGTGGCCTCTTGTGAA TTGGAGTGGGGCACGCGTCAGCCCCACACGCCCTGGGTTGG ACTGAAATAAGGGTAAATAGCTGCTGATTGTAACCCCGCTAACAC TCGGTCAAACACTTGCCACAAAACCACTAATGCCACCCGGGAATAC CTGCATAAGTAGGTGGCGGGCAAGATAGGGCGCATTGCGCATCTG GAGGACAAATTACACACTTGCCCTGAGGCCAAGCACAGGGTTGG TCCATATTACAGGAGTCCGTAGAGCACGGTGGCTAATGTCATGG GTAGCATATACTACCAAAATATGCGATAGCATATGCTAATCTATA TCTGGGTAGCATAGGCTATCTAATCTGCTATGCTATGCTATCC TAATCTATCTGGGTAGTATGCTATGCTATCTCTAATTATCTGGGTAG AGGCTCTTAATCTATCTGGTAGCATATGCTAATCTCTAATCTATA GGTAGTATGCTATCTAATGCTATGCTATCTCTAATTATCTGGGTAG TAGAGATTAGGGTAGTATGCTATCTCTAATTATCTGGGTAG CTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCTCTAATCTATCTGGGTAG ATATGCTATCTCTAATCTATCTGGGTAGCATAGGCTATCTCTAATCTATA CTGGGTAGCATATGCTATCTCTAATCTGGGTAGTATATGCTATCC ATTATATATCTGGGTAGCATAGGCTATCTCTAATCTATCTGGGTAG TGCTATCTCTAATCTATCTGGGTAGTATATGCTATCTCTAATCTGTATCC GGTAGCATATGCTATCTCATGATAAGCATGAGAATTCTTCTG |

[0799]

| 서열 번호 | 베타 명칭 | 뉴클레오파이드 서열 |
|-------|-------|---|
| | | 123456789012345678901234567890123456789012345678901 AAGACGAAAGGGCCTCGTGTACGCCCTTTTATAGGTTAATGTCATGAT ATAATGGTTCTAGCGTCAGGGACTTTCCGGGAATGCGCGG AACCCATTGGTTATTTCTAAATACATCAAAATGTATCCGCTCAT GAGACAATAACCCGTATAATGCTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTAT GAGTATTCAACATTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTGCGGCATTG CCTCCTGTTTGCTCACCCAGAACGCTGGTAAAGTAAAGATGCTGA AGATCAGTGGGTCACCGAGTGGGTACATCGAACCTGAACAGCGG TAAGATCCTGAGAGTTTCGCCCGAAGAACGTTCCAATGATGAGCAC TTTAAAGTCTGCTATGTGCGCGGTTATCCCTGTTGACGCCGGCA AGAGCAACTGGGTCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTGA CTCACAGTCACAGAAAAGCATCTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATT ATGCACTGCTGCCATAACATGAGTGATAACACTGCCGCAACTTACTCT GACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTGCACAAACATGGG GGATCATGTAACTCGCCTGATCGTGGGAAACGGAGCTGAATGAACGCCAT ACCAAACGAGCGGTGACACCAGATGCCGCTCAGCAATGCCAAACAGTT GCCAAACTATTAACTGGCAGACTACTTACTCTAGCTCCGGCAACAAATT AATGAACTGGATGGAGGGATAAAAGTTGCAGGACCACTCTGGCTCGGC CCTCCGGCTGGCTGGTTATGCTGATAAAATGGAGCCGTGAGCGTGG GTCTCGCGGTATCTGAGCACTGGGCCAGATGCTGAACCCCTCCCGTAT CGTAGTTACTCTACGACAGCTGGGAGCTATGGATGAACGAAATAG ACAGATCGCTGAGATAGGTGCTCACTGATTAAGCATTGTAACTGTCAGA CCAAGTTACTCATATACTTTAGATTGATTTAAACTCATTTAAATT TAAAGGATCTAGGTGAAGATCCCTTGTATAATCTCATGACAAAATCCC TTAACGTGAGTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCTGAGAAAAGATCAA AGGATCTCTGAGATCCTTCTGCGCTAATGCTGCTGCAAAC AAAAAAACCCCGTACCCAGGGGTGTTGCTGCCGATCAAGAGCTACC AACTTTCCGAAGGTAACTGGCTCAGCAGAGGGCAGATAACCAAAATAC TGTCTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACACTCAAGAACCTGTAGC ACCGCTACATACCTCGCTCGTAACTGTTACAGTGGCTGCCAG TGGCATAAGTCTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGA TAAGGGCGACGGCTGGGCTAACGGGGGGTTGCTGCCACACGCCACCTT GGAGCGAACGACCTACACCGAAGTACCTACAGCGTGAGCTATGAGA AAGGCCACCGCTCCGAAGGGAGAACGGCGACAGGTATCGGTAACCGG CAGGGTGGAAACAGGAGAGCGCACAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCG GTATTTATAGTCTGCGGTTGCCACCTGACTTGAGCTGATT TTTGTGATGCTCGTCAAGGGGGCGAGCTATGAAAACGCCAGCAACGC GGCTTACGGCTTCTGGCTTACGGTTCGCTGGCTTGTGCTCACATGTTCTT TCCCTGGTTATCCCCGATTGCTGATAACCGTATTACGGCTTGTAGTG AGCTGATAACCGCTGCCGACCGAACGACCGAGCCAGCGAGCTAGTGAG CGAGGAAGCGGAAGAGGCCAATACGCCAACCGCTTCCCGCGCTTG GCCGATTATTAAAGCAGCTGGCACGACAGGTTCCGACTGAAAGCGGG CAGTGAGCGCAACGCAATTATGTAAGTTAGCTCACTTACCGACCCCCA GGCTTACCTTATGCTCCGGCTCGTGGCTTGTGAAATTGAGCGG ATAACAAATTCCACAGGAAACAGTATGACCATGATTGCCAAAGCTCTA GCTAGAGGTGAGTCCCTCCCAGCAGGAGCAAGTATGCCAAAGCATC TCAATTAGTCAGCAACCATGTCGCTCCGCCCCCTAACCTGCCCATCCGCC TAACTCCGCCAGTCCGCCATTCCGCCCATGGCTACTAATT TTATTTATCAGAGGCCAGGCCCTGGCTCTGAGCTATTCAAGAAGT AGTGAGGAGGCTTTGGAGGGCTAGGCTTTGCAAAAGCTTGTGAAAG ATGGATAAGTTAAACAGAGAGGAATCTTGCACTAATGGACCTTCTA GGCTTGAAGAGGTGGGAATTGGCTCCGGTCCCCCTACTGGGAGAGCG CACATGCCACAGTCCCGAGAAGTTGGGGAGGGTGGCAATTGAAAC CGGTCTAGAGAAGGTGGCGGGGTAACCTGGAAAGTGTGCTGTA CTGGCTCCGCCCTTCCCGAGGGGGAGACCGTATAAGTGCAGT AGTCGCCGTGAACGTTTTCGCAACGGGTTGCCGAGAACACAGGT AAGTCCGCTGTGTTCCCGGGGCTGGCTTACGGGTATGGCC TGGCTGCCATTGAAATTCTCCACCTGGCTGAGTACGTGATTCTGATCC CGAGCTTCGGGTTGAGATGGTGGGAGAGTTCGAGGCCCTGGCCTAAGG AGCCCTTCGCCCTGCTGCTTGAAGTGGTGGGAGAGTTCGAGGCCCTGGCCTGGCCTGGGCCCG |

[0800]

[0801]

[0802]

[0803]

| 서열 번호 | 백터 명칭 | 뉴클레오파이드 서열 1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901 |
|-------|-------|--|
| | | AGCGGACTCCACTGGTTGTCTTAACACCCCCGAAAAATTAAACGGGGCTCC ACGCCAATGGGGCCCATAAACAAAAGACAAGTGGCCACTTTTTTGAAA TTGGAGTGGGGCACGGCTACGGCCACACGGCCCTCGGGTTGG ACTGAAAATAAGGGTGTATAACTTGCTGATTGTAAACCCGCTAACAC TCGGTAAACCAACTTGCCCACAAACACTAATGGCACCCGGGAATAC CTCCATAAGTAGGTGGCGGGCAAGATAGGGGCCATTGCTGCCATCTG GAGGACAAATTACACACACTTGCGCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGTGG TCCTCATATTACAGGGCTGAGGAGACAGGTGGCTAATGTGGCATGG GTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCTAACTATA TCTGGTAGCATAGGTATCCTAATCTATCTGGTAGCATATGCTATCC TAATCTATCTGGTAGTATACTGCTATCTAAATTATCTGGTAGCAT AGGCTATCTAATCTATCTGGTAGCATATGCTATCTAACTCTATCT GGTAGTATATGCTATCTAACTCTGATCTGGTAGCATATGCTATCTAA TAGAGATTAGGGTAGTATGCTATCTAAATTATCTGGTAGCATATA CTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCTAACTCTATCTGGTAGC ATATGCTATCTAACTATCTGGTAGCATAGGCTATCTAACTCTAT CTGGTAGCATATGCTATCTAACTCTATCTGGTAGTATGCTATCT AATTATATCTGGTAGCATAGGCTATCTAACTCTATCTGGTAGCATA TGCTATCTAACTCTATCTGGTAGTATGCTATCTAACTGTATCTGG GGTAGCATATGCTATCTCATGATAAGCTGTCACCATGAGAAATTCTTG AAGACGAAAGGGCTCGTAGCATACGCTTATTTTATAGGTTAATGCTATG AATATGTTCTAGACCTCAGGTCAGGCACATTGGGGAAATGTGGCG AACCCCTATTGTTATTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCAT GAGACAATAACCCGTATAATGCTAAATAATATGAAAAAGGAAGTAT GAGTATTCAACATTCCGTGTCGCCCTATTCCCTTTTGCAGGCAATT CCTCCCTGGCTACCCGAAACGCTGTAAGGATTTCTGCTATCTGG AGATCAGTGGGTGACAGAGTGGGTACATGCACTGGATCTAACAGCG TAAGATCTTGAGGTTTCGCCCCAGAGACGTTTCCAATGATGAGCAC TTTAAAGTCTGCTATGTCGGCGGTATTATCCGTGTTGACGCCGCA AGAGCAACTCGTCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTGGTAGTA CTCACAGTACAGAAAAGCATCTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATT ATCCAGTGGCTCATACCATGAGTATAACACTGCCAACACTTCT GACAACGATCGGAGGACCGAAGGGCTAACCGCTTTGCAACATGGG GGATCATGTAACTCGCCTGATGTTGGAAACGGAGCTGAATGAAGCCAT ACCAACGACGAGCTGACACACGATGCCCTGCAACCAATGGAACAAACGTT GCCAAACTTAACTGGCAACTACTTACTCTAGCTTCCGGCAACAATT AATAGACTGGATGAAGGGATAAAGTTGAGGACCACTTCTGCGCTCGC CCTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAATCTGGAGCCGGTGAGCGTG GTCTCGGGTATCATTCAGCACTGGGCCAGATGTTAAGGCCCTCCGGT CGTAGTTATCTACAGGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAG ACAGATGCTGAGTAGGTGCTCACTGATAAGCATGGTAACTGTCAGA CCAGTTTACTCATATACCTTGTAGATTAAACTTCTTTAAATT TAAAGGATCTAGGTGAAAGATCTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCC TTAACCTGAGTTCTGGCTTACGGGAGCTGAGCCGAGACCCGTAAGAAAAGATCAA AGGATCTCTTGAGATCTTTCTGGCTTAATCTGCTGTTGCAAC AAAAAAACACCGTACAGCGGGTTGTTGCGGATCAAGAGCTACC AACTCTTCCGAAGGTAACCTGGCTCAGCAGAGCGCAGATACCAAAATAC TGTCTCTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTCTAAGAACTCTG ACCGCTACATACCTCGCTGCTAATCTGTTACAGTGGCTGCTGCCAG TGGCGATAAGTCGCTCTACCGGGTGGGACTCAAGACGATAGTACCGGA TAAGGCGCAGCGGTGGGTGAACAGGGGGGTTCTGCAACACAGCCAGCTT GGAGCGAACGACTCACCGCAACTGAGATACTACAGCGTAGCTGAG AACGGCACGCTCCCGAAGGGAGAAAGGGCGACAGGTATCCGTAAGCG CAGGGTGGAAACAGGAGAGCGCAGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCCTG GTATCTTATAGCTGCTGGGTTTCCCACTCTGACTTGAGCGTCGATT TTTGTGATGCTGTCAGGGGGGGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGC GGCTTTTACGGTTCTGGCTTGTGGCTTTCGCTCACATGTTCT TCTCGGTTATCCCTGATTCTGGATAACCGTATACCGCTTGTGAGTG AGCTGATAACCGCTGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAG |

[0804]

[0805]

[0806]

[0807]

[0808]

[0809]

[0810]

본 발명은 문자 생물학 및 약물 전달 분야에 익히 공지된 이들의 전체 기술을 참조로 인용한다. 이를 기술은 하기 문헌에 기술된 기술을 포함하나, 이에 한정되지 않는다:

Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993);
 Ausubel, F.M. et al. eds., Short Protocols In Molecular Biology (4th Ed. 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X).
Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984);
 Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999);
 Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, pp. 115-138 (1984);
 Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981);
 Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988);
 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991);
 Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242;
 Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag, New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).
 Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990);
 Lu and Weiner eds., Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis (2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X).
Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974);

[0812]

Old, R.W. & S.B. Primrose, Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V.2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4).
 Sambrook, J. et al. eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6).
Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978
 Winnacker, E.L. From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, NY (translated by Horst Ibelgaufits). 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4).
 J Neuroscience 29 (14): 4605-15 (2009) -- for glioblastoma
 and Cancer Biol Ther. 2006 Jun; 5(6):657-64. for Her2

[0813]

문현의 인용

[0815]

본 명세서 전체에 인용될 수 있는 모든 인용된 문현(문현 참조, 특허, 특허원 및 웹사이트 포함)의 내용은 이에 인용된 참조문현과 같이, 본원에 이의 전문이 참조로 분명히 인용된다. 본 발명의 실시는 달리 나타내지 않는 한, 당해 분야에 익히 공지된 면역학, 분자생물학 및 세포 생물학의 통상의 기술을 사용할 것이다.

[0816]

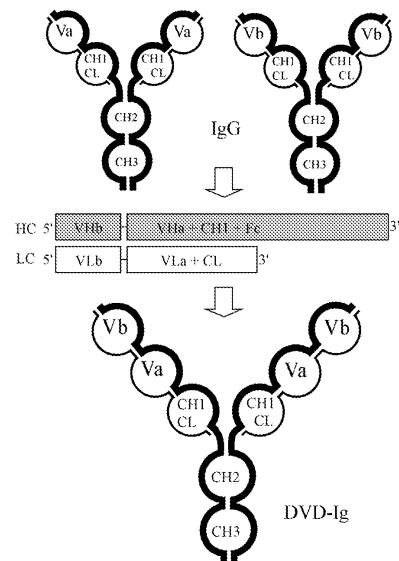
등가물

[0817]

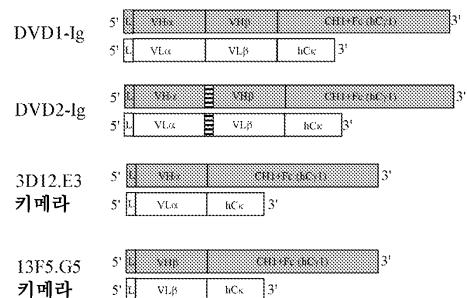
본 발명은 이의 취지 또는 필수적인 특징을 벗어남이 없이 다른 특정 형태로 구현될 수 있다. 따라서, 앞서의 양태들은 본원에 기술된 본 발명을 제한하는 것이 아니라 모든 측면을 예시하는 것으로 고려되어야 한다. 따라서, 본 발명의 범위는 앞서의 기술에 의해서라기 보다는 첨부된 특허청구범위에 의해 나타내며, 따라서, 특허청 구범위의 등가의 의미 및 범위내에 있는 모든 변화는 본원에 포함되는 것으로 의도된다.

도면

도면1a



도면1b



서 열 목록

- <110> Abbott Laboratories
- <120> Dual variable domain immunoglobulins and uses thereof
- <130> 9769W001
- <150> US 61/200,877
- <151> 2008-12-04
- <150> US 61/212,071
- <151> 2009-04-07
- <160> 138
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 16
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 1

Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg

1 5 10 15

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 2

Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg

1 5 10 15

Val

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 3

Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly

1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 4

Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly

1 5 10

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 5

Ser Ala Lys Thr Thr Pro

1 5

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 6

Arg Ala Asp Ala Ala Pro

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 7

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser

1 5

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 8

Arg Ala Asp Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ser
 1 5 10

<210> 9

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 9

Arg Ala Asp Ala Ala Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 20 25

<210> 10

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400>

> 10

Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala

1 5 10 15

Arg Val

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 11

Ala Asp Ala Ala Pro

1 5
<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
<400> 12
Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro

1 5 10
<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
<400> 13
Thr Val Ala Ala Pro

1 5
<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
<400> 14

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

1 5 10
<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 15

Gln Pro Lys Ala Ala Pro

1 5

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 16

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro

1 5 10

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 17

Ala Lys Thr Thr Pro Pro

1 5

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 18

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Thr Pro Leu Ala Pro

1 5 10

<210> 19

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 19

Ala Lys Thr Thr Ala Pro

1 5

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 20

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro

1 5 10

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 21

Ala Ser Thr Lys Gly Pro

1 5

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 22

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro

1 5 10

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 23

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 24

Gly Glu Asn Lys Val Glu Tyr Ala Pro Ala Leu Met Ala Leu Ser

1 5 10 15

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 25

Gly Pro Ala Lys Glu Leu Thr Pro Leu Lys Glu Ala Lys Val Ser

1 5 10 15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 26

Gly His Glu Ala Ala Ala Val Met Gln Val Gln Tyr Pro Ala Ser

1 5 10 15

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 27

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Pro

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 28

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Pro

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 29

Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro

1 5

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 30

Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro

1 5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 31

Gly Gly Gly Gly Gly Pro

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 32

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

1 5

<210> 33

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 33

Pro Thr Ile Ser Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro

1 5 10

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 34

Thr Val Ala Ala Asp Asp Asp Lys Ser Val Phe Ile Val Pro Pro

1 5 10 15

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 35

Thr Val Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ala Pro

1 5 10

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 36

Leu Val Pro Arg Gly Ser Ala Ala Pro

1 5

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 37

Ala Ser Asp Asp Asp Lys Gly Gly Pro

1 5 10

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 38

Ala Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Pro

1 5

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 39

Ala Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro

1 5 10 15

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 40

Thr Val Ala Leu Val Pro Arg Gly Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

1 5 10 15

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 41

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

1 5 10 15

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 42

Thr Val Ala Ala Asp Asp Lys Ser Val Phe Ile Val Pro Pro

1 5 10 15

<210> 43

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 43

Ala Ser Thr Asp Asp Lys Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro

1 5 10

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 44

Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro

1 5

<210> 45

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 45

Thr Val Ala Ala Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Ala Pro

1 5 10

<210> 46

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 46

Ala Ser Thr Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Leu Ala Pro

1 5 10

<210> 47

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 47

Pro Ala Pro Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro

1 5 10

<210> 48

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 48

Thr Ala Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ala Pro

1 5 10

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 49

Ala Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ala

1 5

<

210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 50

Pro Gly Pro Phe Gly Arg Ser Ala Gly Gly Pro

1 5 10

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 51

Pro Gly Pro Phe Gly Arg Ser Ala Gly Gly

1 5 10

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 52

Pro Gln Arg Gly Arg Ser Ala Gly

1 5

<210> 53

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 53

Pro His Tyr Gly Arg Ser Gly Gly

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 54

Gly Pro Phe Gly Arg Ser Ala Gly Pro

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 55

Gly Asp Asp Asp Asp Lys Gly Gly Pro

1 5

<210> 56

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 56

Ala Gly Asp Asp Asp Lys Gly Gly Pro

1 5 10

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 57

Gly Gly Asp Asp Asp Lys Gly Gly Pro

1 5 10

<210> 58

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 58

Ala Ser Thr Lys

1

<210> 59

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 59

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

1 5
<210> 60
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
<400> 60
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
1 5 10
<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
<400> 61
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
1 5

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
<400> 62
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
1 5
<210> 63
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 63

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 64

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 64

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe

50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser 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 Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 65

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 65

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 Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His 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 Thr Val Pro Trp

85 90 95

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

100 105

<210> 66

<211

> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 66

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Glu

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Thr Gly Asn Gly Tyr Thr Tyr 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 Trp Gly Lys Lys Val Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly | | | |
| | 100 | 105 | 110 |

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 67

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 67

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 Ile Ser Ser Tyr

20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala 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 Met Ser Val Pro Ile

85 90 95

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

100

105

<210> 68

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

polypeptide

<400> 68

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 69

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 69

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 Gly Ile Arg Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln 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 | Val | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Arg | Tyr | Asn | Arg | Ala | Pro | Tyr |
| 85 | | | 90 | | | 95 | | | | | | | | | |

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

| | | |
|-----|-----|--|
| 100 | 105 | |
|-----|-----|--|

<210> 70

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 70

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala

| | | | | |
|---|---|----|----|--|
| 1 | 5 | 10 | 15 | |
|---|---|----|----|--|

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

| | | | |
|----|----|----|--|
| 20 | 25 | 30 | |
|----|----|----|--|

Asn Met His Trp Met Lys Gln Asn Gln Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

| | | | |
|----|----|----|--|
| 35 | 40 | 45 | |
|----|----|----|--|

Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

| | | | |
|----|----|----|--|
| 50 | 55 | 60 | |
|----|----|----|--|

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

| | | | | |
|----|----|----|----|--|
| 65 | 70 | 75 | 80 | |
|----|----|----|----|--|

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

| | | | |
|----|----|----|--|
| 85 | 90 | 95 | |
|----|----|----|--|

Ala Arg Leu Gly Tyr Tyr Asn Tyr Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Val

| | | | |
|-----|-----|-----|--|
| 100 | 105 | 110 | |
|-----|-----|-----|--|

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

| | | |
|-----|-----|--|
| 115 | 120 | |
|-----|-----|--|

<210> 71

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 71

Asp Leu Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Phe Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asn Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 72

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 72

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu 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 Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 73

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 73

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 Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105
 <210> 74

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 74

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Arg |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 5 | | | | | | | | | | 10 | | | 15 | |

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

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Val |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 35 | | | 40 | | | | | | | 45 | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Ala | Ile | Thr | Trp | Asn | Ser | Gly | His | Ile | Asp | Tyr | Ala | Asp | Ser | Val |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 50 | | | 55 | | | | | | 60 | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ala | Lys | Asn | Ser | Leu | 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 | Lys | Val | Ala | Tyr | Leu | Ser | Thr | Ala | Ser | Ser | Leu | Asp | Tyr | Trp | Gly |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 100 | | | 105 | | | | | | 110 | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|--|--|
| Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 115 | | 120 | | | | | | | | | | | | |

<210> 75

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 75

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 Gly Ile Arg Asn Tyr

20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 76

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 76

Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

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

Asp Met Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Lys Leu Thr Ser Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Thr Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 77

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 77

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 Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Phe Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 78

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400

> 78

Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Thr Gln

1 5 10 15

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

Asp Met Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Lys Leu Thr Ser Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Thr Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 79

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 79

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 Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30

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

Phe Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Leu Thr Pro Pro Leu

| | | |
|---|-----|-----|
| 85 | 90 | 95 |
| Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg | | |
| 100 | 105 | |
| <210> 80 | | |
| <211 | | |
| > 330 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Homo sapiens | | |
| <400> 80 | | |
| Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr | | |
| 20 | 25 | 30 |
| Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser | | |
| 35 | 40 | 45 |
| Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser | | |
| 50 | 55 | 60 |
| Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu | | |

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

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

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys | | | |
| 325 | 330 | | |

<210> 81

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 81

| | | | |
|---|----|----|----|
| Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr | | | |
| 20 | 25 | 30 | |

| | | | |
|---|----|----|--|
| Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser | | | |
| 35 | 40 | 45 | |

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

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

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

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

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 290 | 295 | 300 | |
| Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys | | | |
| | 325 | 330 | |
| <210> 82 | | | |
| <211> 106 | | | |
| <212> PRT | | | |
| <213> Homo sapiens | | | |
| <400> 82 | | | |
| Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr | | | |
| 20 | 25 | 30 | |
| Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser | | | |
| 35 | 40 | 45 | |
| Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr | | | |
| 50 | 55 | 60 | |
| Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro | | | |
| 85 | 90 | 95 | |
| Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys | | | |
| 100 | 105 | | |
| <210> 83 | | | |
| <211> 105 | | | |
| <212> PRT | | | |
| <213> Homo sapiens | | | |
| <400> 83 | | | |
| Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe | | | |

20 25 30

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

35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys

50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser

65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu

85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100 105

<210> 84

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 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 Ser Phe Ser Ser Glu

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Thr Gly Lys Asn Gly Tyr Thr Tyr 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 Trp Gly Lys Lys Val Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 100 | 105 | 110 | |
| Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu Val Gln | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile | | | |

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

| | | | |
|---------------------------------|-----|-----|-----|
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser | | | |
| 245 | | | |

<210> 85

<211> 221

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 85

| | | | |
|---|----|----|----|
| 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 Ile Ser Ser Tyr | | | |
| 20 | 25 | 30 | |

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

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala 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 Met Ser Val Pro Ile
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 115 120 125
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
 130 135 140
 Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu
 145 150 155 160

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

<210>

86

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 86

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Glu

| | | |
|---|-----|-----|
| 20 | 25 | 30 |
| Pro Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Trp Val | | |
| 35 | 40 | 45 |
| Ser Ser Ile Thr Gly Lys Asn Gly Tyr Thr Tyr 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 |
| Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Ala Arg Trp Gly Lys Val Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu Val Gln | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser | | |
| 245 | | |
| <210> 87 | | |
| <211> 226 | | |

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 87

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 Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala 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 80Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Met Ser Val Pro Ile
85 90 95

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

100 105 110

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

Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val

165 170 175

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
180 185 190Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
195 200 205

Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

| | | |
|--|-----|-----|
| 210 | 215 | 220 |
| Lys Arg | | |
| 225 | | |
| <210> 88 | | |
| <211> 248 | | |
| <212> | | |
| > PRT | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220><223> 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 |
| Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Glu | | |
| 20 | 25 | 30 |
| Pro Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val | | |
| 35 | 40 | 45 |
| Ser Ser Ile Thr Gly Asn Gly Tyr Thr Tyr 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 |
| Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Ala Arg Trp Gly Lys Lys Val Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu Val Gln | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile | | |

| | | |
|-----|-----|-----|
| 165 | 170 | 175 |
|-----|-----|-----|

Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg

| | | |
|-----|-----|-----|
| 180 | 185 | 190 |
|-----|-----|-----|

Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met

| | | |
|-----|-----|-----|
| 195 | 200 | 205 |
|-----|-----|-----|

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr

| | | |
|-----|-----|-----|
| 210 | 215 | 220 |
|-----|-----|-----|

Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln

| | | | |
|-----|-----|-----|-----|
| 225 | 230 | 235 | 240 |
|-----|-----|-----|-----|

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

| | | |
|-----|-----|-----|
| 245 | 250 | 255 |
|-----|-----|-----|

<210> 89

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 89

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 Ile Ser Ser Tyr

| | | |
|----|----|----|
| 20 | 25 | 30 |
|----|----|----|

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

| | | |
|----|----|----|
| 35 | 40 | 45 |
|----|----|----|

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala 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 Met Ser Val Pro Ile

| | | |
|----|----|----|
| 85 | 90 | 95 |
|----|----|----|

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

| | | |
|---|-----|-----|
| 100 | 105 | 110 |
| Gly Ser Ala Ala Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Pro Lys Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro | | 160 |

| | | |
|---|-----|-----|
| 165 | 170 | 175 |
| Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Arg | | |
| 225 | | |
| <210> 90 | | |
| <211> 250 | | |
| <212> PRT | | |

| | | | |
|--|----|----|----|
| <213> Artificial Sequence | | | |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide | | | |
| <400> 90 | | | |
| Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Glu | | | |
| 20 | 25 | 30 | |
| Pro Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val | | | |
| 35 | 40 | 45 | |

| | | |
|---|----|----|
| Ser Ser Ile Thr Gly Asn Gly Tyr Thr Tyr 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 Trp Gly Lys Val Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250

<210> 91

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 91

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 Ile Ser Ser Tyr | | | |
| 20 | 25 | 30 | |
| Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile | | | |
| | | | |
| 35 | 40 | 45 | |
| Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala 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 Met Ser Val Pro Ile | | | |
| 85 | 90 | 95 | |
| Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly | | | |
| | | | |
| 100 | 105 | 110 | |
| Gly Gly Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg | | | |
| | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| <210> 92 | | | |
| <211> 251 | | | |
| <212> PRT | | | |
| <213> Artificial Sequence | | | |

<220><223> 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 Ser Phe Ser Ser Glu

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Thr Gly Lys Asn Gly Tyr Thr Tyr 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 Trp Gly Lys Lys Val Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

165 170 175

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe

180 185 190

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr

195 200 205

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

210 215 220

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val

225 230 235 240

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

245 250

<210> 93

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 93

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 Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala 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 Met Ser Val Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
115 120 125

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp
130 135 140

Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
145 150 155 160

Lys Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser

165 170 175

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

<210> 94

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 94

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Met His Trp Met Lys Gln Asn Gln Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Val

100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly

115 120 125

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

| | | |
|---|-----|-----|
| 130 | 135 | 140 |
| Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser | | |
| 180 | 185 | 190 |

| | | |
|---|-----|-----|
| Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser | | |
| 245 | 250 | |
| <210> 95 | | |
| <211> 221 | | |
| <212> PRT | | |

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

| | | | |
|---|----|----|----|
| Asp Leu Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr | | | |
| 20 | 25 | 30 | |
| Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile | | | |
| 35 | 40 | 45 | |

| | | | |
|---|----|----|----|
| Phe Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly | | | |
| 50 | 55 | 60 | |
| Ser Gly Ser Gly Thr Asn Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser

165 170 175

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

180 185 190

Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro

195 200 205

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

210 215 220

<210> 96

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 96

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Met His Trp Met Lys Gln Asn Gln Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|-------------------------------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 50 | 55 | 60 | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lys | Gly | Lys | Ala | Thr | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Ser | Ser | Thr | Ala | Tyr |
| 65 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Met | Glu | Leu | Arg | Ser | Leu | Thr | Ser | Glu | Asp | Ser | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |
| | 85 | | | | | | | 90 | | | | | | | 95 |
| Ala | Arg | Leu | Gly | Tyr | Tyr | Gly | Asn | Tyr | Glu | Asp | Trp | Tyr | Phe | Asp | Val |
| | 100 | | | | | | | 105 | | | | | | | 110 |
| Trp | Gly | Ala | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly |
| | 115 | | | | | | | 120 | | | | | | | 125 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pro | Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly |
| | 130 | | | | | | | 135 | | | | | | | 140 |
| Arg | Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Asp | Asp |
| 145 | | | | | | | | 150 | | | | | | | 155 |
| Tyr | Ala | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp |
| | 165 | | | | | | | 170 | | | | | | | 175 |
| Val | Ser | Ala | Ile | Thr | Trp | Asn | Ser | Gly | His | Ile | Asp | Tyr | Ala | Asp | Ser |
| | 180 | | | | | | | 185 | | | | | | | 190 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Val | Glu | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ala | Lys | Asn | Ser | Leu |
| | 195 | | | | | | | 200 | | | | | | | 205 |
| Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr |
| | 210 | | | | | | | 215 | | | | | | | 220 |
| Cys | Ala | Lys | Val | Ser | Tyr | Leu | Ser | Thr | Ala | Ser | Ser | Leu | Asp | Tyr | Trp |
| 225 | | | | | | | | 230 | | | | | | | 240 |
| Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | | | | | | |
| | 245 | | | | | | | 250 | | | | | | | |
| <210> | 97 | | | | | | | | | | | | | | |
| <211> | 226 | | | | | | | | | | | | | | |
| <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| <213> | Artificial Sequence | | | | | | | | | | | | | | |
| <220><223> | Description of Artificial Sequence: | Synthetic | | | | | | | | | | | | | |
| polypeptide | | | | | | | | | | | | | | | |

<400> 97

Asp Leu Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Phe Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asn Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Asp Asp

100 105 110

Asp Asp Lys Ala Ala Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

115 120 125

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

130 135 140

Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

145 150 155 160

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val

165 170 175

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

180 185 190

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

195 200 205

Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

210 215 220

Lys Arg

225

<210> 98

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 98

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Met His Trp Met Lys Gln Asn Gln Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Val

100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser

180 185 190

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

| | | |
|---|-----|-----|
| 195 | 200 | 205 |
| Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser | | |
| 245 | 250 | |

<210> 99
<211> 225
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
<400> 99

| | | |
|---|----|----|
| Asp Leu Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr | | |
| 20 | 25 | 30 |
| Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile | | |
| 35 | 40 | 45 |

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

| | | |
|---|-----|-----|
| Gly Ser Ala Ala Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln | | |
| 130 | 135 | 140 |

Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 145 150 155 160
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro
 165 170 175

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 180 185 190

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr
 195 200 205

Asn Arg Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 210 215 220

Arg

225

<210> 100

<211> 257

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 100

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Met Lys Gln Asn Gln Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Gly Tyr Tyr Asn Tyr Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Val

| | | |
|---|-----|-----|
| 100 | 105 | 110 |
| Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly | | |
| 115 | 120 | 125 |

| | | |
|---|-----|-----|
| Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly | | |
| 180 | 185 | 190 |

| | | |
|---|-----|-----|
| His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser | | |
| 245 | 250 | 255 |

Ser

<210> 101
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 101
Asp Leu Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Ile

35 40 45

Phe Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asn Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Asp Asp Asp Asp Lys Ser Val Phe Ile Val Pro Pro Asp Ile Gln Met

115 120 125

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr

130 135 140

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr

145 150 155 160

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser

165 170 175

Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly

180 185 190

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala

195 200 205

Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln

210 215 220

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

225 230

<210> 102

<211> 252

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 102

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Met His Trp Met Lys Gln Asn Gln Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Val

100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

165 170 175

Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp

225 230 235 240

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

245 250

<210> 103

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 103

Asp Leu Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Phe Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asn Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

145 150 155 160

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg

165 170 175

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg
 195 200 205
 Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 210 215 220
<210> 104
<211> 253
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
<400> 104
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Met Lys Gln Asn Gln Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

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

115 120 125
 Gly Gly Gly Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val
 130 135 140
 Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr

145 150 155 160
 Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 165 170 175
 Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr

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

 245 250
<210> 105
<211> 224
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<400> 105
Asp Leu Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ile Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

145 150 155 160

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser

165 170 175

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

180 185 190

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

195 200 205

Arg Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

210 215 220

<210> 106

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 106

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Met His Trp Met Lys Gln Asn Gln Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Pro Ala Pro Asn Leu
 115 120 125
 Leu Gly Gly Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val
 130 135 140
 Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 145 150 155 160
 Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 165 170 175
 Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr
 180 185 190
 Ala Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
 195 200 205
 Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 210 215 220
 Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu
 225 230 235 240
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250
 <210> 107
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 107
 Asp Leu Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr | | | |
| 20 | 25 | 30 | |
| Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile | | | |
| | | | |
| 35 | 40 | 45 | |
| Phe Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly | | | |
| 50 | 55 | 60 | |
| Ser Gly Ser Gly Thr Asn Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asp Thr Leu Pro Tyr | | | |
| 85 | 90 | 95 | |
| Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Pro Ala Pro Asn | | | |
| | | | |
| 100 | 105 | 110 | |
| Leu Leu Gly Gly Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro | | | |
| | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| Asn Arg Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Arg | | | |
| 225 | | | |
| <210> 108 | | | |
| <211> 253 | | | |

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 108

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Met His Trp Met Lys Gln Asn Gln Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Val

100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Pro Ala Pro Asn Leu

115 120 125

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

130 135 140

Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr

145 150 155 160

Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly

165 170 175

Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 210 215 220
 Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu
 225 230 235 240

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250
 <210> 109
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 109
 Asp Leu Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Pro Ala Pro Glu
 100 105 110
 Leu Leu Gly Gly Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 115 120 125
 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
 130 135 140
 Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala

145 150 155 160

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

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

Asn Arg Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

Arg

225

<210> 110

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 110

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Met His Trp Met Lys Gln Asn Gln Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Val

| | | |
|--|-----|-----|
| 100 | 105 | 110 |
| | | |
| Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Pro Asn Leu Leu Gly | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Gly Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu | | |
| 165 | 170 | 175 |
| | | |
| Trp Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Tyr Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser | | |
| 245 | 250 | |
| <210> 111 | | |
| <211> 225 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide | | |
| <400> 111 | | |
| Asp Leu Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr | | |
| 20 | 25 | 30 |
| | | |
| Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile | | |

35 40 45

Phe Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asn Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Pro Ala Pro Asn

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala

145 150 155 160

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro

165 170 175

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

180 185 190

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

195 200 205

Asn Arg Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

210 215 220

Arg

225

<210> 112

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 112

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Met Lys Gln Asn Gln Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Pro Ala Pro Asn Leu
 115 120 125

Leu Gly Gly Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val
 130 135 140

Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 145 150 155 160

Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 165 170 175

Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr
 180 185 190

Ala Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
 195 200 205

Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu
 225 230 235 240

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

245 250

<210> 113

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 113

Asp Leu Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Phe Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asn Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Pro Thr Ile Ser

100 105 110

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

115 120 125

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

130 135 140

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys

145 150 155 160

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln

165 170 175

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

180 185 190

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr
 195 200 205
 Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 210 215 220

Val Glu Ile Lys Arg

225

<210> 114

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 114

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Met Lys Gln Asn Gln Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Val

100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Pro Asn Leu Leu Gly
 115 120 125

Gly Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro
 130 135 140

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

145 150 155 160

Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu Glu

165 170 175

Trp Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Tyr Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr

225 230 235 240

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

245 250

<210> 115

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 115

Asp Leu Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Phe Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asn Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

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

| | | | |
|--|-----|-----|-----|
| 85 | 90 | 95 | |
| Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Pro Thr Ile Ser | | | |
| 100 | 105 | 110 | |
| Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys | | | |
| | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys | | | |
| | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Val Glu Ile Lys Arg | | | |
| 225 | | | |
| <210> 116 | | | |
| <211> 244 | | | |
| <212> PRT | | | |
| <213> Artificial Sequence | | | |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide | | | |
| <400> 116 | | | |
| Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr | | | |
| 20 | 25 | 30 | |
| | | | |
| Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val | | | |
| 35 | 40 | 45 | |

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

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu 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 Lys Val Ala Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser
 115 120 125

Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr
 130 135 140

Leu Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Asp Met Gly Val Asp Trp Ile
 145 150 155 160

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp
 165 170 175

Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile
 180 185 190

Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Lys Leu Thr Ser Val
 195 200 205

Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Ser Ser
 210 215 220

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 225 230 235 240

Thr Val Ser Ser

<210> 117

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 117

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Glu Val Thr Leu Arg

115 120 125

Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr

130 135 140

Cys Thr Leu Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Asp Met Gly Val Asp

145 150 155 160

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

165 170 175

Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu

180 185 190

Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Lys Leu Thr

195 200 205

Ser Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val

210 215 220

Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 118

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 118

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

| | | | |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|----|----|

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

| | | |
|----|----|----|
| 20 | 25 | 30 |
|----|----|----|

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

| | | |
|----|----|----|
| 35 | 40 | 45 |
|----|----|----|

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val

| | | |
|----|----|----|
| 50 | 55 | 60 |
|----|----|----|

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

| | | |
|-----|-----|-----|
| 100 | 105 | 110 |
|-----|-----|-----|

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Glu Val Thr

| | | |
|-----|-----|-----|
| 115 | 120 | 125 |
|-----|-----|-----|

Leu Arg Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr

| | | |
|-----|-----|-----|
| 130 | 135 | 140 |
|-----|-----|-----|

Leu Thr Cys Thr Leu Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Asp Met Gly

| | | | |
|-----|-----|-----|-----|
| 145 | 150 | 155 | 160 |
|-----|-----|-----|-----|

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

| | | |
|-----|-----|-----|
| 165 | 170 | 175 |
|-----|-----|-----|

His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser

180 185 190
 Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Lys
 195 200 205

 Leu Thr Ser Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
 210 215 220
 Thr Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 225 230 235 240
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245
<210> 119
<211> 250
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
<400> 119
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu 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 Lys Val Ala Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu
 115 120 125

Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr

| | | |
|---|-----|-----|
| 130 | 135 | 140 |
| Leu Thr Leu Thr Cys Thr Leu Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Asp | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Met Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val | | |

| | | |
|---|-----|-----|
| 195 | 200 | 205 |
| Leu Lys Leu Thr Ser Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Ala Arg Thr Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser | | |
| 245 | 250 | |

<210> 120

<211> 252

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 120

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

| | | | |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|----|----|

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

| | | |
|----|----|----|
| 20 | 25 | 30 |
|----|----|----|

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

| | | |
|----|----|----|
| 35 | 40 | 45 |
|----|----|----|

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val

| | | |
|----|----|----|
| 50 | 55 | 60 |
|----|----|----|

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu 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 Lys Val Ala Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

 Val Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Thr
 130 135 140
 Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Leu Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Thr
 145 150 155 160
 Ser Asp Met Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 165 170 175
 Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro
 180 185 190

 Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 195 200 205
 Val Val Leu Lys Leu Thr Ser Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr
 210 215 220
 Tyr Cys Ala Arg Thr Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Met Asp
 225 230 235 240
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250
 <210> 121
 <211
 > 254
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 121
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr | | | |
| 20 | 25 | 30 | |
| Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val | | | |
| 35 | 40 | 45 | |
| Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val | | | |
| 50 | 55 | 60 | |
| Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu 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 Lys Val Ala Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly | | | |
| 100 | 105 | 110 | |
| Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| Val Phe Pro Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Leu Tyr Gly Phe Ser Leu | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Ser Thr Ser Asp Met Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| Asn Gln Val Val Leu Lys Leu Thr Ser Val Asp Pro Val Asp Thr Ala | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser | | | |
| 245 | 250 | | |

<210> 122

<211> 257

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 122

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

1 5 10 15

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

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

35 40 45

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

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95Ala Lys Val Ala Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125Val Phe Pro Leu Ala Pro Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Gly
130 135 140Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Leu Tyr Gly
145 150 155 160Phe Ser Leu Ser Thr Ser Asp Met Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro
165 170 175Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val
180 185 190

Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp

195 200 205

Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Lys Leu Thr Ser Val Asp Pro Val

210 215 220

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Ser Ser Gly Tyr Ile

225 230 235 240

Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

245 250 255

Ser

<210> 123

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 123

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 Gly Ile Arg Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr

85 90 95

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

100 105 110

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr

115 120 125

Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr

130 135 140

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Thr Ser

145 150 155 160

Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly

165 170 175

Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala

180 185 190

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly

195 200 205

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

210 215

<210> 124

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 124

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 Gly Ile Arg Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu

130 135 140

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Phe

145 150 155 160

Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser

165 170 175

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu

180 185 190

Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu Thr

195 200 205

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

210 215

<210> 125

<211> 221

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 125

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 Gly Ile Arg Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 115 120 125

Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn
 130 135 140
 Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
 145 150 155 160
 Ile Phe Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 165 170 175
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 180 185 190

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
 195 200 205

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

210 215 220

<210> 126

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 126

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 Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30

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

| | | |
|--|-----|-----|
| 35 | 40 | 45 |
| Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln 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 |
| Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Pro Ser Val Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Leu Leu Ile Phe Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg | | |
| 210 | 215 | 220 |
| <210> 127 | | |
| <211> 225 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide | | |
| <400> 127 | | |
| 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 Gly Ile Arg Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr

85 90 95

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

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu

115 120 125

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

130 135 140

Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala

145 150 155 160

Pro Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro

165 170 175

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile

180 185 190

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly

195 200 205

Asn Thr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

210 215 220

Arg

225

<210> 128

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 128

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 Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
85 90 95Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
115 120 125Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg
130 135 140Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
145 150 155 160Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser
165 170 175Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr
180 185 190Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
195 200 205Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val
210 215 220

Glu Ile Lys Arg
 225
<210> 129
<211> 250
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 129
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

| | | | |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|----|----|

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

| | | |
|----|----|----|
| 20 | 25 | 30 |
|----|----|----|

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

| | | |
|----|----|----|
| 35 | 40 | 45 |
|----|----|----|

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val

| | | |
|----|----|----|
| 50 | 55 | 60 |
|----|----|----|

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

| | | |
|-----|-----|-----|
| 100 | 105 | 110 |
|-----|-----|-----|

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu

| | | |
|-----|-----|-----|
| 115 | 120 | 125 |
|-----|-----|-----|

Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr

| | | |
|-----|-----|-----|
| 130 | 135 | 140 |
|-----|-----|-----|

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Leu Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Asp

| | | | |
|-----|-----|-----|-----|
| 145 | 150 | 155 | 160 |
|-----|-----|-----|-----|

Met Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

| | | |
|-----|-----|-----|
| 165 | 170 | 175 |
|-----|-----|-----|

Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu

180 185 190

Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val

195 200 205

Leu Lys Leu Thr Ser Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

210 215 220

Ala Arg Thr Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp

225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

245 250

<210> 130

<211> 257

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 130

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

| | | |
|---|-----|-----|
| 115 | 120 | 125 |
| Val Phe Pro Leu Ala Pro Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Gly | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Leu Tyr Gly | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Phe Ser Leu Ser Thr Ser Asp Met Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro | | |
| 165 | 170 | 175 |
| | | |
| Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Lys Leu Thr Ser Val Asp Pro Val | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Ser Ser Gly Tyr Ile | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Ser | | |

<210> 131

<211> 221

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 131

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 Gly Ile Arg Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu

145 150 155 160

Ile Phe Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser

165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln

180 185 190

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Leu Thr Pro Pro

195 200 205

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

210 215 220

<210>

132

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 132

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 Gly Ile Arg Asn Tyr

| | | |
|---|-----|-----|
| 20 | 25 | 30 |
| Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile | | |
| 35 | 40 | 45 |
| Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln 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 |
| Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Gln Gln Gly Leu Thr Pro Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Glu Ile Lys Arg | | |
| 225 | | |
| <210> 133 | | |
| <211> 7185 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Artificial Sequence | | |

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 133

| | | | | | | |
|------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|------|
| gcgtcgacca | agggccatc | ggtctcccc | ctggcaccc | cctccaagag | cacctctgg | 60 |
| ggcacagcgg | ccctggctg | cctggtaag | gactacttc | ccgaaccgg | gacggtgtcg | 120 |
| tggacttcg | gcgcctgac | cagcggcgt | cacacttcc | cggctgtcct | acagtctca | 180 |
| ggactctact | ccctcagcag | cgtggtgacc | gtgcctcca | gcagcttggg | caccaggacc | 240 |
| tacatctgca | acgtgaatca | caagcccagc | aacaccaagg | tggacaagaa | agttgagccc | 300 |
| aaatcttgt | acaaaactca | cacatgccc | ccgtgccag | cacctaact | cctgggggga | 360 |
| ccgtcagtct | tcctttccc | cccaaaaccc | aaggacaccc | tcatgatctc | ccggaccct | 420 |
| | | | | | | |
| gaggtcacat | gcgtggtggt | ggacgtgagc | cacgaagacc | ctgaggtcaa | gttcaactgg | 480 |
| tacgtggacg | gcgtggaggt | gcataatgcc | aagacaaagc | cgcgggagga | gcagtacaac | 540 |
| agcacgtacc | gtgtggtcag | cgtcctcacc | gtcctgcacc | aggactggct | aatggcaag | 600 |
| gagtacaagt | gcaaggtctc | caacaaagcc | ctcccagccc | ccatcgagaa | aaccatctcc | 660 |
| aaagccaaag | ggcagcccg | agaaccacag | gtgtacaccc | tgcggccatc | ccgcgaggag | 720 |
| atgaccaaga | accaggtcag | cctgacctgc | ctggtaaag | gttttatcc | cagcgacatc | 780 |
| gccgtggagt | gggagagcaa | tggcagccg | gagaacaact | acaagaccac | gcctccgtg | 840 |
| | | | | | | |
| ctggactccg | acggctcctt | cttcctctac | agcaagctca | ccgtggacaa | gagcagggtgg | 900 |
| cagcagggga | acgtttctc | atgctccgt | atgcatgagg | ctctgcacaa | ccactacacg | 960 |
| cagaagagcc | tctccctgtc | tccggtaaa | tgagcggccg | ctcgaggccg | gcaaggccgg | 1020 |
| atcccccgac | ctcgacctct | ggctaataaa | ggaaatttat | tttcatgtca | atagtgtgtt | 1080 |
| ggaatttttt | gtgtctctca | ctcggaaagga | catatgggag | ggcaaatcat | ttggtcgaga | 1140 |
| tccctcgag | atctctagct | agaggatcga | tcccccggcc | ggacgaacta | aacctgacta | 1200 |
| cgacatctct | gccccttctt | cgcggggcag | tgcgtat | ccttcagtt | ggttgtaca | 1260 |
| | | | | | | |
| acttgccaac | tggccctgt | tccacatgt | acacgggggg | ggaccaaaca | caaagggtt | 1320 |
| ctctgactgt | agtgcacatc | cttataatg | gatgtgcaca | tttgcaca | ctgagtggt | 1380 |
| ttcatcctgg | agcagacttt | gcagtctgt | gactgcaaca | caacatgcc | tttatgtgt | 1440 |
| actcttggct | gaagctctta | caccaatgt | gggggacatg | tacctccag | ggcccccagga | 1500 |
| agactacggg | aggctacacc | aacgtcaatc | agagggcct | gtgtagctac | cgataagcgg | 1560 |
| accctcaaga | ggcatttagc | aatagtgtt | ataggccccc | cttgttaacc | ctaaacgggt | 1620 |

| | |
|--|------|
| agcatatgct tccgggttag tagtatatac tatccagact aaccctaatt caatagcata | 1680 |
| | |
| tgttaccaa cgggaagcat atgctatcga attaggta gtaaaagggt cctaaggaac | 1740 |
| agcgatatct cccacccat gagctgtcac ggtttattt acatgggtc aggattccac | 1800 |
| gaggtagtg aaccattta gtcacaaggg cagtggctga agatcaagga gcggcagtg | 1860 |
| aactctctg aatcttcgc tgcttctca ttctcttcg tttagctaat agaataactg | 1920 |
| ctgagttgt aacagtaagg tgtatgtgag gtgctcgaaa acaaggttc aggtgacgcc | 1980 |
| cccagaataa aatttgacg gggggttcag tggtggcatt gtgctatgac accaataaa | 2040 |
| ccctcacaaa cccctggc aataaatact agttaggaa taaaacattc tgaatatctt | 2100 |
| | |
| taacaataga aatccatggg gtgggacaa gccgtaaaga ctggatgtcc atctcacacg | 2160 |
| aatttatggc tatggcaac acataatct agtcaatat gatactggg ttattaagat | 2220 |
| gtgtcccagg cagggacaa gacaggtgaa ccatgttgc acactctatt tgtaacaagg | 2280 |
| gaaagagag tggacgcccga cagcagcggc ctccacttgt tgtctctaac accccgaaa | 2340 |
| attaaacggg gctccacgcc aatggggccc ataaacaaag acaagtggcc actcttttt | 2400 |
| ttgaaattgt ggagtgggg cacgcgtcag cccccacacg ccgcctgcg gtttggact | 2460 |
| gtaaaataag ggtgtataaa cttggctgat tgtaaccccg ctaaccactg cggtcaaacc | 2520 |
| | |
| acttgccac aaaaccacta atggcacccc gggaaatacc tgcataagta ggtggcggg | 2580 |
| ccaagatagg ggcgcattt ctgcgatctg gaggacaat tacacacact tgcgcctgag | 2640 |
| cgcacaggcac agggtttttg gtcctcatat tcacgaggtc gctgagagca cggtggctaa | 2700 |
| atgtgcccattt ggttagcata tactacccaa atatctggat agcatatgct atcctaattct | 2760 |
| atatctgggtt agcataggct atcctaattct atatctgggtt agcatatgct atcctaattct | 2820 |
| atatctgggtt agtataatgct atcctaattttt atatctgggtt agcataggct atcctaattct | 2880 |
| atatctgggtt agcatatgct atcctaattct atatctgggtt agtataatgct atcctaattct | 2940 |
| | |
| gtatccgggtt agcatatgct atcctaattttt agattagggtt agtataatgct atcctaattttt | 3000 |
| atatctgggtt agcatataactt acccaaataat ctggatagca tatgctatcc taatcttat | 3060 |
| ctgggttagca tatgctatcc taatcttat ctgggttagca taggctatcc taatcttat | 3120 |
| ctgggttagca tatgctatcc taatcttat ctgggttagta tatgctatcc taatcttat | 3180 |
| ctgggttagca taggctatcc taatcttat ctgggttagca tatgctatcc taatcttat | 3240 |
| ctgggttagta tatgctatcc taatctgtat ccgggttagca tatgctatcc tcatgataag | 3300 |
| ctgtcaaaca tgagaattttt cttgaagacg aaagggcctc gtgatacgcc tattttata | 3360 |

| | |
|---|------|
| ggtaatgtc atgataataa tggttctta gacgtcagg ggcactttc gggaaatgt | 3420 |
| gcgcggaacc cctatttgc tattttcta aatacatca aatatgtatc cgctcatgag | 3480 |
| acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaagg aagagtatga gtattcaaca | 3540 |
| tttccgtgtc gcccttattc ctttttgc ggcatttgc ctccctgtt ttgctcaccc | 3600 |
| agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttt ggtgcacgag tgggttacat | 3660 |
| cgaactggat ctcaacagcg gtaagatct tgagagttt cgccccgaag aacgtttcc | 3720 |
| aatgatgagc actttaaag ttctgctatg tggcgcggta ttatccgtg ttgacgcgg | 3780 |
| | |
| gcaagagcaa ctggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggtt agtactcacc | 3840 |
| agtacagaa aagcatctt cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccc | 3900 |
| aaccatgagt gataaacactg cggccaactt acttctgaca acgatcgagg gaccgaagga | 3960 |
| gctaaccgct ttttgacaca acatggggga tcatgtact cgccttgc tttgggaacc | 4020 |
| ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg cagcaatggc | 4080 |
| aacaacgtt cgc当地actat taactggcga actacttact cttagctccc ggcaacaatt | 4140 |
| aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccatt ctgcgcctgg ccctccggc | 4200 |
| | |
| tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtagcgt gggctcgcg gtatcattgc | 4260 |
| agcaactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgttagtt atctacacga cggggagtca | 4320 |
| ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca | 4380 |
| ttggtaactg tcagaccaag tttactcata tatacttttag attgatttaa aacttcattt | 4440 |
| ttaatttaaa aggatctagg tgaagatctt ttttataat ctcatgacca aaatccctta | 4500 |
| acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttttg | 4560 |
| agatcctttt ttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaaca aaaaaaccac cgctaccagc | 4620 |
| | |
| ggtggttgtt ttgcggatc aagagctacc aactttttt ccgaaggtaa ctggcttcag | 4680 |
| cagagcgcag ataccaaata ctgttcttct agttagcgt tagttaggcc accacttcaa | 4740 |
| gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaattt ctgttaccag tggctgtgc | 4800 |
| cagtggcgt aagtctgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc | 4860 |
| gcagcggcgt ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta | 4920 |
| caccgaactg agataacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcctt ccgaaggag | 4980 |
| aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcgaaaca ggagagcgca cgagggagct | 5040 |
| | |
| tccaggggaa aacgcctggc atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttgc | 5100 |
| gcgtcgattt ttgtgtatgc cgtcaggggg gcccggccata tggaaaaacg ccagcaacgc | 5160 |
| ggcctttta cggttcctgg cttttgctg gcctttgct cacatgttct ttcctgcgtt | 5220 |

| | |
|---|------|
| atccctgat tctgtggata accgtattac cgccctttag tgagctgata ccgctcgccg | 5280 |
| cagccgaacg accgagcgcgca gcgagtca gaggcaggaa gccggaaagagc gcccaatacg | 5340 |
| caaaccgcct ctccccgcgc gttggccat tcattaatgc agctggcacg acaggttcc | 5400 |
| cgactggaaa gccccggactg agcgcaacgc aattaatgtg agttagctca ctcatiagc | 5460 |
| | |
| accccaggct ttacactta tgcttcggc tcgtatgtg tgtggatttg tgagcggata | 5520 |
| acaatttcac acaggaaaca gctatgacca tgattacgcc aagctctagc tagaggtcga | 5580 |
| gtccctcccc agcaggcaga agtatgc当地 gcatgc当地 caattagtca gcaaccatag | 5640 |
| tcccgccccct aactccgccc atcccgcccc taactccgccc cagttccgccc catttccgc | 5700 |
| cccatggctg actaattttt tttatting cagaggccga ggccgc当地 gcctc当地 | 5760 |
| tattccagaa gtagtgagga ggcttttg gaggcctagg ctttgcaaa aagcttgca | 5820 |
| aagatggata aagtttaaa cagagaggaa tctttcagc taatggacct tctaggtt | 5880 |
| | |
| gaaaggagtg ggaattggct ccgggtgc当地 tcagtgccgca gagcgc当地 cgcccacagt | 5940 |
| ccccgagaag ttgggggag gggtcgccaa ttgaaccgg gcctagagaa ggtggc当地 | 6000 |
| gttaactgg gaaagtgtat tcgtgtactg gctccgc当地 tttccgagg gtgggggaga | 6060 |
| accgtatata agtgc当地 tag tcgccc当地 cgttttt当地 cgcaacggg ttgccc当地 | 6120 |
| aacacaggtt agtgc当地 tagt gtttcccg cggcctggc ctcttacgg gttatggccc | 6180 |
| ttgc当地gc当地 tgaattactt ccacctggct gcagtaatgc attcttgc当地 cc当地gatctcg | 6240 |
| ggttggaaat gggtgggaga gttcgaggcc ttgc当地taa ggagccctt cgc当地gtgc | 6300 |
| | |
| tttagtttag gc当地ggc当地 ggc当地ctgggg cc当地ccgctg cgaatctgg ggc当地ctcg | 6360 |
| cgccctgtctc gctgctt当地tgc ataagtctct agccattaa aatttttagt gacctgtgc | 6420 |
| gacgtttt当地 ttctggcaag atagttt当地tgc aaatgc当地ggc caagatctgc acactggat | 6480 |
| ttc当地gtttt当地 gggccglocal gggccgacgg ggccctglocal tccagc当地ca catgttccg | 6540 |
| gaggccggcc ctgc当地gc当地 ggccaccgag aatcggacgg gggtagtctc aagctggccg | 6600 |
| gcctgtctc gtc当地ctggcc tc当地ggccgc当地 gtgtatcgcc cc当地ctgggg cggcaaggct | 6660 |
| ggccctgtcg gc当地ccgatgg cgtgagc当地ga aagatggccg ctccccc当地ccctgctgg | 6720 |
| | |
| gagctcaaaa tggaggacgc ggccctcgcc agagcggccg ggtgagtc当地 ccacacaag | 6780 |
| gaaaaggcc ttccgtctc cagccgtcg ttc当地atgtgc tccacggat accggcc | 6840 |
| gtccaggc当地 ctgc当地ttgt tctcgatgtt ttggaggatgc tgc当地ttagt gttgggggaa | 6900 |
| ggggttttat gc当地atggatg ttccccc当地acac tggatgggtg gagactgaag tt当地ggcc | 6960 |
| ttggcactt当地 atgtaattt当地 ctttggat tgc当地ttt当地tggat ctttggatcat | 7020 |
| tctcaaggct cagacagtg gg tcaaaat ttttcttcca tttcaggatgc cgtgaggat | 7080 |

tctctagaga tccctcgacc tcgagatcca ttgtgcccgg ggcgcaccat ggagtttggg 7140

ctgagctggc ttttcttgt cgcgattta aaaggtgtcc agtgc 7185

<210> 134

<211> 6521

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 134

acggtggtcg caccatctgt ctccatcttc ccgcctatctg atgagcgtt gaaatcttgg 60

actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120

aagggtggata acggccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180

aaggacagca cctacagcct cagcgcacc ctgacgctga gcaaaggaga ctacgagaaa 240

cacaaagtct acgcctgcga agtccccat cagggcctga gctcgccgt cacaaagagc 300

ttcaacaggg gagagtgttg agcggccgct cgaggccggc aaggccggat ccccccgacct 360

cgacctctgg ctaataaaagg aaattttattt tcattgcaat agtgtgttgg aattttttgt 420

gtctctact cggaaggaca tatggaggg caaatcattt ggtcgagatc cctcgagat 480

ctcttagctag aggatcgatc cccgccccgg acgaactaaa cctgactacg acatctctgc 540

cccttcttcg cggggcagtg catgtaatcc cttagttgg ttggtacaac ttgccaactg 600

ggccctgttc cactatgtgac acgggggggg accaaacaca aagggttct ctgactgtag 660

ttgacatcct tataaatggat tggtcacatt tgccaaacact gagttggcttt catccctggag 720

cagactttgc agtctgtgga ctgcaacaca acattgcctt tatgtgtaac tcttggctga 780

agcttcttaca ccaatgtgg gggacatgtt cctcccgaggg gcccaggaaag actacgggaa 840

gctacaccaa cgtcaatcag aggggcctgt gtagctaccg ataaggcgac cctcaagagg 900

gcattagcaa tagtgttat aaggccccct tgttaaccct aaacgggtag catatgcttc 960

ccgggtagta gatatatacta tccagactaa ccctaattca atagcatatg ttacccaacg 1020

ggaaggcatat gctatcgaat tagggtagt aaaagggtcc taaggaacag cgatatctcc 1080

caccccatga gctgtcacgg ttttatttac atggggtcag gattccacga gggtagtcaa 1140

ccattttagt cacaaggcgtggctgaag atcaaggcgc gggcagtgaa ctctcctgaa 1200

tcttcgcctg ctttttcatt ctccctcggt tagctaata gataactgct gagtttgtaa 1260

cagt aagg t g tat gt gaggt gct cggaaaac aaggt tt cag gt gacgcccc cagaat aaaa 1320

| | |
|--|------|
| tttggacggg gggtcagtg gtggcattgt gctatgacac caatataacc ctcacaaacc | 1380 |
| ccttggcaa taaaactatg tgttaggaatg aaacattctg aatatctta acaatagaaa | 1440 |
| tccatgggtt gggacaaggc cgtaaagact ggatgtccat ctcacacgaa tttatggcta | 1500 |
| | |
| tggcaaacat ataattctat tgcaatatga tactgggtt attaagatgt gtcccaggca | 1560 |
| gggaccaaga caggtgaacc atgttgttac actctatgg taacaagggg aaagagagt | 1620 |
| gacccgaca gcagcgact ccactgggtt tctctaacac cccgaaaat taaacgggc | 1680 |
| tccacgcaa tggggccat aaacaaagac aagtggcac tctttttt gaaattgtgg | 1740 |
| agtggggca cgctcagcc cccacacgccc gccctgcggg tttggactgt aaaataaggg | 1800 |
| tgtataact tggctgattt taacccgct aaccactgct gtcaaaccac ttgcccaaa | 1860 |
| aaccactaat ggacccccgg ggaataacctg cataagtagg tggcgggccc aagatagggg | 1920 |
| | |
| cgcgattgct gcgatctgga ggacaaatta cacacacttg cgccctgagcg ccaagcacag | 1980 |
| gttttgttggt cctcatattt acgaggtcgc tgagagcacg gtggctaat gttccatgg | 2040 |
| gtagcatata ctacccaaat atctggatag catatgctat ctaatctat atctggtag | 2100 |
| cataggctat ctaatctat atctggtag catatgctat ctaatctat atctggtag | 2160 |
| tatatgctat ctaatttt atctggtag cataggctat ctaatctat atctggtag | 2220 |
| catatgctat ctaatctat atctggtag tatatgctat ctaatctgt atccggtag | 2280 |
| catatgctat ctaatagag attaggtag tatatgctat ctaatttt atctggtag | 2340 |
| | |
| catatactac ccaaataatct ggatagcata tgctatccta atctatatct ggtagcata | 2400 |
| tgctatccta atctatatct ggtagcata ggctatccta atctatatct ggtagcata | 2460 |
| tgctatccta atctatatct ggtagtata tgctatccta atttatatct ggtagcata | 2520 |
| ggctatccta atctatatct ggtagcata tgctatccta atctatatct ggtagtata | 2580 |
| tgctatccta atctgtatcc ggtagcata tgctatcctc atgataagct gtcaaacatg | 2640 |
| agaatttct tgaagacgaa agggcctcgat gatacgccta ttttatagg ttaatgtcat | 2700 |
| gataataatg gttcttaga cgtcaggtgg cactttcg ggaaatgtgc gcgaaacccc | 2760 |
| | |
| tatttgttta ttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg | 2820 |
| ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtagatgat attcaacatt tccgtgtcgc | 2880 |
| ccttattccc tttttgcgg cattttgcct tcctgtttt gtcacccag aaacgctggt | 2940 |
| gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg gttacatcg aactggatct | 3000 |
| caacagcggt aagatccttg agagtttcg cccgaaagaa cgttttccaa tcatgagcac | 3060 |
| ttttaaagtt ctgtatgtg gcgccgttatt atcccggtt gacgcccggc aagagcaact | 3120 |

| | |
|--|------|
| cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga cttggtag tactcaccag tcacagaaaa | 3180 |
| | |
| gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga | 3240 |
| taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac gatcgaggca ccgaaggagc taaccgttt | 3300 |
| tttgacaaac atggggatc atgtaactcg cttgtatcg tggaaaccgg agctaatga | 3360 |
| agccatacca aacgacgacg gtgacaccac gatgcctgca gcaatggcaa caacgttgcg | 3420 |
| caaactatta actggcgaac tacttactt agcttccgg caacaattaa tagactggat | 3480 |
| ggaggcggat aaagttgcag gaccactct ggcgtcgcc ctccggctg gctggtttat | 3540 |
| tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgccgt atcattgcag cactggggcc | 3600 |
| | |
| agatggtaag ccctccgta tcgttagttt ctacacgacg gggagtcagg caactatgga | 3660 |
| tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctactg attaagcatt ggtactgtc | 3720 |
| agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgattnaaa cttcatttt aattttaaag | 3780 |
| gatctaggtg aagatccccc ttgataatct catgaccaaa atccctaacc gtgagtttc | 3840 |
| gttccactga ggcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttctttag atccctttt | 3900 |
| tctgcgcgta atctgctgtc tgcaaacaaa aaaaccaccc ctaccagcgg tggttttttt | 3960 |
| gccggatcaa gagctaccaa ctctttcc gaaggtaact ggccctcagca gagcgcagat | 4020 |
| | |
| accaaatact gttttcttag tgtagccgtc gtttagccac cacttcaaga actctgtac | 4080 |
| accgcctaca tacctcgctc tgctaatctt gttaccatgt gctgctgcca gtggcgataa | 4140 |
| gtcggtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggcgg | 4200 |
| ctgaacgggg gttcgtgca cacagccag cttggagcga acgacctaca ccgaacttag | 4260 |
| atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggccggacag | 4320 |
| gtatccggtt agccggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagttc cagggggaaa | 4380 |
| cgcctggat cttatagtc ctgtcggtt tcgccccctc tgactttagc gtcgatcccc | 4440 |
| | |
| gtgatgctcg tcagggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg ccttttac | 4500 |
| gttctggcc ttttgcgtc cttttgtca catgttctt cctgcgttat cccctgatcc | 4560 |
| tgtggataac cgtattaccg ctttgatgt agctgatacc gctgcccgc gccaacgcac | 4620 |
| cgagcgcagc gagtcgtga gcgaggaaagc ggaagagcgc ccaatacgc aaccgcctt | 4680 |
| ccccgcgcgt tggccgattc attaatgcag ctggcacgc aggtttcccg actggaaagc | 4740 |
| gggcagttag cgcaacgcata ttaatgttag ttagctact cattaggcac cccaggctt | 4800 |
| acactttatg ctccggctc gtatgttg tgaaattgtg agcggataac aattcacac | 4860 |

| | |
|---|------|
| aggaaacagc tatgaccatg attacccaa gctctagcta gaggtcgagt ccctccccag | 4920 |
| caggcagaag tatcaaagc atgcatacattttttagtcgaccaccatagtc cggccctaa | 4980 |
| ctccggccat cccggcccta actccgccc gttccgccc ttctccgccc catggctgac | 5040 |
| taattttttt tatttatgca gaggccgagg ccgcctcgcc ctctgagcta ttccagaagt | 5100 |
| agtgaggagg ctttttgga ggccttaggttttgcaaaaa gctttgcaaa gatggataaa | 5160 |
| gttttaaca gagaggaatc ttgcagcta atggacccatc taggtcttga aaggagtgg | 5220 |
| aattggctcc ggtggccgtc agtggcaga gcgcacatcg cccacagtcc ccgagaagtt | 5280 |
| | |
| ggggggaggg gtccggcaattt gaaccgggtgc ctagagaagg tggcgccggg taaaactggga | 5340 |
| aagtgtatgtc gtgtactggc tccgcctttt tcccgaggtt gggggagaac cgtatataag | 5400 |
| tgcagtagtc gccgtgaacg ttcttttcg caacgggtt gccgccagaa cacaggttaag | 5460 |
| tgccgtgtgt gttcccgcg ggcctggcctt cttaacgggt tatggccctt gcgtgccttg | 5520 |
| aattacttcc acctggctgc agtacgtat tcttgatccc gagcttcggg ttggaaagtgg | 5580 |
| gtggagagttc tgaggccctt ggccttaagg agcccttcg cctcgtgctt gagttgaggc | 5640 |
| ctggccctggg cgctggggcc gccgcgtgcg aatctggtgg caccctcgcg cctgtctcgc | 5700 |
| | |
| tgcttcgat aagtctctag ccatttaaaa ttttgatga cctgctgcga cgctttttt | 5760 |
| ctggcaagat agtcttgtaa atgcgggcca agatctgcac actggatattt cggtttttgg | 5820 |
| ggccgcgggc ggcacgggg cccgtgcgtc ccagcgcaca tggcgccgaa ggcggggcct | 5880 |
| gcaagcgcgg ccaccgagaa tggacgggg gtatctcaa gctggccggc ctgcctgtt | 5940 |
| gcctggcctc ggcggccgt gtatcgcccc gccctggcg gcaaggctgg cccggcgc | 6000 |
| accagttgcg tgaggcgaaa gatggccgtt tccggccctt gtcgcaggaa gctcaaaatg | 6060 |
| gaggacgcgg cgctcgaggag agcgggcggg tgagtcaccc acacaagga aaaggccctt | 6120 |
| | |
| tccgtcctca gccgtcgctt catgtgactc cacggagtac cgggcggcgt ccaggcacct | 6180 |
| cgattagttc tcgagctttt ggagtacgtc gtcttaggt tggggggagg ggttttatgc | 6240 |
| gatggagttt ccccacactg agtgggtgaa gactgaagtt aggccagctt ggcacttgc | 6300 |
| gtaattctcc ttggaaatttgc ttcttccatt tcaggtgtcg tgaggaattc tctagagatc | 6360 |
| gacagtggtt caaagttttt ttcttccatt tcaggtgtcg tgaggaattc tctagagatc | 6420 |
| cctcgacccattt gtcggccggc gcaccatgga catgcgcgtg cccggccagc | 6480 |
| tgctggccctt gctgctgctg tggttccccgg gctcgatgc | 6521 |

<210> 135

<211> 6513

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 135

| | |
|---|------|
| caacccaagg ctgccccctc ggtcaactctg ttcccgccct cctctgagga gcttcaagcc | 60 |
| aacaaggcca cactggtgtg tctcataagt gacttctacc cgggagccgt gacagtggcc | 120 |
| tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg ggagtggaga ccaccacacc ctccaaacaa | 180 |
| agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac ctgagcctga cgccctgagca gtggaagtcc | 240 |
| cacagaagct acagctgccca ggtcacgcat gaagggagca ccgtggagaa gacagtggcc | 300 |
| | |
| cctacagaat gttcatgagc ggccgctcgaa ggccggcaag gccggatccc ccgacctcgaa | 360 |
| cctctggcta ataaaggaaa ttatatttca ttgcaatagt gtgttgaaat tttttgtgtc | 420 |
| tctcactcgg aaggacatat gggagggcaa atcatttggt cgagatccct cggagatctc | 480 |
| tagcttagagg atcgatcccc gccccggacg aactaaacct gactacgaca tctctgcccc | 540 |
| ttcttcgcgg ggcagtgcataatccctt cagttggtgatgtacaacttg ccaactggc | 600 |
| cctgttccac atgtgacacg gggggggacc aaacacaaaag gggttctctg actgttagtt | 660 |
| acatccttat aaatggatgt gcacatttgc caacactgag tggcttcat cctggagcag | 720 |
| | |
| actttgcagt ctgtggactg caacacaaca ttgcctttat gtgttaactct tggctgaagc | 780 |
| tcttacacca atgctggggg acatgtacctt cccaggggccc caggaagact acgggaggct | 840 |
| acaccaacgt caatcagagg ggcctgtgtaa gctaccgata aegggaccct caagaggc | 900 |
| ttagcaatag ttttataag gccccctgt taaccctaaa cgggttagcat atgcttcccg | 960 |
| ggtagtagta tatactatcc agactaaccc taattcaata gcatatgtta cccaaacgggaa | 1020 |
| agcatatgct atcgaattag gtttagtaaa agggtctaa ggaacagcga tatctccac | 1080 |
| cccatgagct gtcacggttt tatttacatg gggtcaggat tccacgaggg tagtgaacca | 1140 |
| | |
| tttagtcac aagggcagtg gctgaagatc aaggagcggg cagtgaactc tcctgaatct | 1200 |
| tgcctgtttt cttcattctc cttcggttag ctaatagaat aactgctgag ttgtgaacag | 1260 |
| taaggtgtat gtgaggtgt cggaaaacaag gtttcaggtg acggcccccag aataaaattt | 1320 |
| ggacgggggg ttcatgtgtc gcatgtgtat atgacaccaa tataaccctc acaaaccct | 1380 |
| tggcaataa atactagtgt aggaatgaaa cattctgaat atcttaaca atagaatcc | 1440 |
| atgggtggg gacaagccgt aaagactgga tgtccatctc acacgaattt atggctatgg | 1500 |
| gcaacacata atccttagtgc aatatgatac tgggttatt aagatgtgtc ccaggcagg | 1560 |
| | |
| accaagacag gtgaaccatg ttgttacact ctattgtaa caagggaaaa gagagtggac | 1620 |

| | |
|---|------|
| gccgacagca gcggactcca ctgggtgtct ctaacacccc cgaaaattaa acggggctcc | 1680 |
| acgc当地gg gcccataaa caaagacaag tggcactct ttttttggaa attgtggagt | 1740 |
| ggggcacgc gttagcccc acacggccct ctgcggttt ggactgtaaa ataagggtgt | 1800 |
| aataacttgg ctgatgtaa ccccgtaac cactgggtc aaaccactig cccacaaaac | 1860 |
| cactaatggc accccggga atacctgcat aagtaggtgg gcgggccaag atagggcgc | 1920 |
| gattgctgct atctggagga caaattacac acacttgccct ctgagcgcca agcacagggt | 1980 |
| | |
| tgttgtcct catattcacg aggtcgctga gagcacgggt ggctaatgtt gccatggta | 2040 |
| gc当地atactt cccaaatatac tggatagcat atgctatcct aatctatatac tggtagcat | 2100 |
| aggctatcct aatctatatac tggtagcat atgctatcct aatctatatac tggtagtat | 2160 |
| atgctatcct aatttatatac tggtagcat aggctatcct aatctatatac tggtagcat | 2220 |
| atgctatcct aatctatatac tggtagtat atgctatcct aatctgtatc cggtagcat | 2280 |
| atgctatcct aatagagatt agggtagtat atgctatcct aatttatatac tggtagcat | 2340 |
| atactaccca aatatctgga tagcatatgc tatcctaatac tatatctggg tagcatatgc | 2400 |
| | |
| tatcctaatac tatactggg tagcataggg tatcctaatac tatactggg tagcatatgc | 2460 |
| tatcctaatac tatactggg tagtatatgc tatcctaatt tatactggg tagcataggg | 2520 |
| tatcctaatac tatactggg tagcatatgc tatcctaatac tatactggg tagtatatgc | 2580 |
| tatcctaatac tgtagccggg tagcatatgc tatcctcatg ataagctgtc aaacatgaga | 2640 |
| atttcttga agacgaaagg gcctcgat acgcatttt ttataggtta atgtcatgat | 2700 |
| aataatggtt tcttagacgt caggtggcac tttcgggaa aatgtgcgcg gaaccctat | 2760 |
| ttgttttattt ttcttaatac attcaaataat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata | 2820 |
| | |
| aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttc gtgtgccct | 2880 |
| tattcccttt ttgcggcat ttgccttcc tggtttgtct cacccagaaa cgctgggtgaa | 2940 |
| agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtggt tacatcgaa tggatctcaa | 3000 |
| cagcggtaaat cccttggaa gtttgcggcc cgaagaacgt ttccatga tgagacttt | 3060 |
| taaaggcttg ctatgtggcg cggattttatc ccgtgttgac gccggcaag agcaactcg | 3120 |
| tcgcccata cactattctc agaatgactt ggttggatc tcaccagtca cagaaaagca | 3180 |
| tcttacggat ggcatacgacag taagagaatt atgcagtgtt gccataacca tgagtataa | 3240 |
| | |
| cactgcggcc aacttacttc tgacaacgt cggaggacgg aaggagctaa ccgtttttt | 3300 |
| gcacaacatg gggatcatg taactcgct tgatcggttgg gaaccggagc tgaatgaagc | 3360 |
| cataccaaac gacgagcgtg acaccacgt gcctgcagca atggcaacaa cggtgcgaa | 3420 |
| actattaact ggcgaactac ttactctgc ttccggcaa caattaatag actggatgga | 3480 |

ggcgataaa gttgcaggac cacttctgct ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc 3540
tgataaatct ggagccgtg agcgtggtc tcgcgtatc attgcagcac tggggccaga 3600
tggtaagccc tccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga 3660

acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctcactgatt aagcatttgt aactgtcaga 3720
ccaagttac tcatatatatac tttagattga tttaaaactt cattttaat ttaaaaggat 3780
ctaggtgaag atccttttgc ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agtttcgtt 3840
ccactgagcg tcagaccccg tagaaaaagat caaaggatct tctttagatc cttttttct 3900
gcgcgtatac tgctgcttc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcggtgg tttgtttgcc 3960
ggatcaagag ctaccaactc ttttccgaa ggtaactggc tttagcagag cgccagataacc 4020
aaatactgtt cttctagtgt agccgtagtt agggcaccac ttcaagaact ctgttagcacc 4080

gcctacatac ctcgctctgc taatccgtt accagtggct gctgccagtgc gcgataagtc 4140
gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg 4200
aacggggggt tcgtgcacac agccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata 4260
cctacagcgt gagctatgag aaagcgcac gcttccgaa gggagaaagg cgacaggtt 4320
tccgtaagc ggcagggtcg gaacaggaga ggcacgagg gagcttccag gggaaacgc 4380
ctggtatctt tatagtctcg tcgggttgc ccacctctga cttgagcgtc gatTTTGTG 4440
atgtcgtaa ggggggggaa gcctatggaa aaacgcgcac aacgcggcct tttacgggt 4500

cctggcctt tgctggcctt ttgctcacat gttcttcct gcgttatccc ctgattctgt 4560
ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga 4620
gcccgcgcgag tcagtgagcg aggaagcgaa agagcgcaccc atacgcaaac cgcctctccc 4680
cgccgcgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgcacagg ttcccgact gggaaacgcgg 4740
cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagttt gctcactcat taggcaccccc aggcttia 4800
ctttatgctt ccggctcgta tgggtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg 4860
aaacagctat gaccatgatt acgccaagct ctagctagag gtgcgttccc tccccagcag 4920

gcagaagttt gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccg cccctaactc 4980
cgcccatccc gcccctaact ccgcgcgcgtt ccgcgcattc tccgcgcctt ggctgactaa 5040
ttttttttat ttatgcagag gccgaggccg cctggccctc tgagctattc cagaagttt 5100
gaggaggctt tttggaggc ctaggtttt gcaaaaagct ttgcaaaatggataaaatgtt 5160
ttaaacagag aggaatctt gcagctaatg gaccttctag gtctgaaag gagtgggaat 5220
tggctccgtt gcccgtcgtt gggcagagcg cacatcgccc acagtcggccg agaagttggg 5280

| | |
|--|------|
| gggaggggtc ggcaattgaa ccgggccta gagaaggtag cgccggtaa actggaaag | 5340 |
|--|------|

| | |
|--|------|
| tgatgtcgta tactggctcc gcctttcc cgagggtgg ggagaaccgt atataagtgc | 5400 |
| agtagtcgcc gtgaacgttc ttttgc当地 cgggttgcc gccagaacac aggttaagtgc | 5460 |
| cgtgtgttgt tcccgggc ctggcttta tacgggttat ggccctgct gccttgaat | 5520 |
| tacttccacc tggctcagt acgtgattct tgatcccgag ctgggttg gaagtgggtg | 5580 |
| ggagagttcg aggcttgc当地 ctaaggagc cccttc当地 cgtcttgag ttgaggcctg | 5640 |
| gcctggcgc当地 tggggccgc当地 gcgtgc当地 ctgggtgc当地 ctgc当地 gtctcgctgc | 5700 |
| tttcgataag tctctagcca tttaaaaattt ttgatgaccc gctgc当地 acgc tttttctg | 5760 |

| | |
|---|------|
| gcaagatagt ctgttaatg cggccaaga tctgc当地 acact ggtattcgg ttttggc当地 | 5820 |
| cgcggcggc当地 gacggggccc当地 gtgc当地 tccca ggc当地 cacatgt tcggc当地 gaggc当地 gggc当地 ctgc当地 | 5880 |
| agcgc当地 gcca cc当地 gagaatcg gacggggta gtctcaagct ggccggc当地 ctctggtgc当地 | 5940 |
| tggc当地 ctgc当地 cc当地 cggc当地 gtta tgc当地 cccgc当地 ctggc当地 ggcc当地 aggtggc当地 ggtc当地 ggacc当地 | 6000 |
| agttgc当地 tga gcgaaagat ggccg当地 tcc local cgccctgct gcaggagct caaaatggag | 6060 |
| gacgc当地 ggc当地 tc当地 gggagagc ggc当地 gggta gtc当地 acccaca caaaggaaaa ggc当地 cttcc当地 | 6120 |
| gtc当地 ctcc当地 gagcc当地 gtc当地 gcttcat gt当地 actccac ggagtaaccgg ggc当地 ctcc当地 ggc当地 acctc当地 ga | 6180 |

| | |
|--|------|
| ttagttctcg agctttgga gtacgtcgta tttagttgg gggaggggt tttatgc当地 | 6240 |
| ggagtttccc cacactgagt gggtaggagac tgaagttagg ccagcttggc acttgatgta | 6300 |
| atttc当地 ctttgc当地 aatttgc当地 cccccc当地 tt当地 tt当地 gagtttgc当地 tt当地 catttctca agc当地 ctcc当地 gagac | 6360 |
| agtggtaa agt当地 ttttcc ttccatttca ggtgtcgta ggaattctct agagatccct | 6420 |
| cgacctcgag atccatttgccccc当地 accatgactt ggacccact ccttcc当地 | 6480 |
| accctccccc当地 tccactgc当地 ac agaagctt当地 tc当地 | 6513 |

<210> 136

<211> 6515

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 136

| | |
|---|-----|
| acgggtggctg caccatctgt cttcatcttc cc当地 catctg atgaggc当地 gtt gaaatctgga | 60 |
| actgc当地 ctgc当地 ttgtgtgc当地 ct gctgaaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagttgg | 120 |
| aagggtggata acgc当地 ctcc当地 aatc当地 ggtaac tccc当地 aggaga gttc当地 acagaga gcaggacagc | 180 |

| | |
|---|------|
| aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaaggaga ctacgagaaa | 240 |
| cacaaggatct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgta cacaaggac | 300 |
| ttcaacaggg gagagtgttg agcggccgct cgaggccggc aaggccggat ccccccacct | 360 |
| | |
| cgacctctgg ctaataaagg aaatttattt tcattgcaat agtgtgttg aatttttgt | 420 |
| gtctctact cgaaaggaca tatgggaggg caaatcattt ggtcgagatc cctcgagat | 480 |
| ctcttagctag aggatecgatc cccggcccg acgaactaaa cctgactacg acatctctgc | 540 |
| cccttcttcg cggggcagtg catgtaatcc cttcagttgg ttgttacaac ttgccaactg | 600 |
| ggccctgttc cacatgtgac acgggggggg accaaacaca aagggttct ctgactgtag | 660 |
| ttgacatcct tataaatgga tgtgcacatt tgccaacact gagtggtttt catctggag | 720 |
| cagactttgc agtctgtgga ctgcaacaca acattgcctt tatgtgtaac tcttggctga | 780 |
| | |
| agctcttaca ccaatgctgg gggacatgta cctcccaggg gcccaggaag actacggag | 840 |
| gctacaccaa cgtcaatcag aggggcctgt gtagctaccg ataagcggac cctcaagagg | 900 |
| gcattagcaa tagtgttat aaggccccct tggtaaccct aaacggtag catatgtttc | 960 |
| ccggtagta gtatatacta tccagactaa ccctaattca atagcatatg ttacccaacg | 1020 |
| ggaagcatat gctatgaat tagggttagt aaaagggtcc taaggaacag cgatatctcc | 1080 |
| caccccatga gctgtcacgg ttttatttac atgggtcag gattccacga gggtagtgaa | 1140 |
| ccattttagt cacaaggcga gtggctgaag atcaaggagc gggcagtgaa ctctcctgaa | 1200 |
| | |
| tcttcgcctg ctcttcatt ctccttcgtt tagctaatacg aataactgct gagttgtgaa | 1260 |
| cagtaagggt tatgtgaggt gctcgaaaac aaggtttagt gtgacgcccc cagaataaaa | 1320 |
| tttggacggg gggttcagtg gtggcattgt gctatgacac caatataacc ctcacaaacc | 1380 |
| ccttggcaa taaatactag tgttaggaatg aaacattctg aatatctta acaatagaaa | 1440 |
| tccatgggtt gggacaagc cgtaaagact ggatgtccat ctcacacgaa tttatggcta | 1500 |
| tggcaacac ataatcttag tgcaaatatga tactgggtt attaagatgt gtcccaggca | 1560 |
| gggaccaaga caggtgaacc atgttggtagt actctatttg taacaagggg aaagagatg | 1620 |
| | |
| gacgccgaca gcagcggact ccactgggtt tctctaacac cccgaaaaat taaacggggc | 1680 |
| tccacgccaa tggggcccat aaacaaagac aagtggccac tctttttt gaaattgtgg | 1740 |
| agtggggca cgcgtcagcc cccacacgccc gcccctgcgggt tttggactgt aaaataaggg | 1800 |
| tgttaataact tggctgattt taaccccgct aaccactgctg gtcacaccat ttgcccacaa | 1860 |
| aaccactaat ggcaccccg ggaataacctg cataagttagg tggcggggcc aagatagggg | 1920 |
| cgcgattgtc gcgatctgga ggacaaatttacacacttg cgcctgagcg ccaagcacag | 1980 |

| | |
|--|------|
| ggttgggt cctcatattc acgaggtcg ttagacgcgt gtggctaat gttccatgg | 2040 |
| | |
| gtagcatata ctacccaaat atctggatag catatgctat ctaatctat atctggtag | 2100 |
| cataggctat ctaatctat atctggtag catatgctat ctaatctat atctggtag | 2160 |
| tatatgctat ctaatttat atctggtag cataggctat ctaatctat atctggtag | 2220 |
| catatgctat ctaatctat atctggtag tatatgctat ctaatctgt atccggtag | 2280 |
| catatgctat ctaatagag attaggtag tatatgctat ctaatttat atctggtag | 2340 |
| catatactac ccaaataatct ggatagcata tgctatccta atctatatct ggtagcata | 2400 |
| tgctatccta atctatatct ggtagcata ggctatccta atctatatct ggtagcata | 2460 |
| | |
| tgctatccta atctatatct ggtagtata tgctatccta atttatatct ggtagcata | 2520 |
| ggctatccta atctatatct ggtagcata tgctatccta atctatatct ggtagtata | 2580 |
| tgctatccta atctgtatcc ggtagcata tgctatcctc atgataagct gtcaaacatg | 2640 |
| agaattttct tgaagacgaa agggcctgt gatacccta ttttatagg ttaatgtcat | 2700 |
| gataataatg gttcttaga cgtcaggtgg cactttcgg ggaaatgtgc gcggAACCC | 2760 |
| tatttgtta ttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg | 2820 |
| ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtagttagt attcaacatt tcgtgtcg | 2880 |
| | |
| ccttattccc tttttgcgg catttcgcct tcctgtttt gtcacccag aaacgctgg | 2940 |
| gaaagtaaaa gaigctgaag atcagttggg tgcacgagt gttacatcg aactggatct | 3000 |
| caacagcgtt aagatccttgc agatttcg cccgaagaa cgtttccaa tggatgac | 3060 |
| ttttaaagtt ctgctatgtg ggcggattt atccgtt gacgccggc aagagcaact | 3120 |
| cggtcgcgc atacactatt ctcagaatga cttgggttag tactcaccag tcacagaaaa | 3180 |
| gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctccataa ccatgagtga | 3240 |
| taacactgctt gccaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgttt | 3300 |
| | |
| tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg cttgtatgt tggaaaccgg agctgaatga | 3360 |
| agccatacca aacgacgacg gtcacaccac gatgcgtcgca gcaatggcaa caacgttgcg | 3420 |
| caaactatta actggcgaac tacttactct agcttccgg caacaattaa tagactggat | 3480 |
| ggaggcggat aaagttgcag gaccactct ggcgtcgcc ctccggctg gctggttat | 3540 |
| tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgccgtt atcattgcag cactggggcc | 3600 |
| agatggtaag ccctcccgta tcgtatgtt ctacacgacg gggagtccagg caactatgg | 3660 |
| tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctactg attaagcatt ggtactgtc | 3720 |

| | |
|---|------|
| agaccaagtt tactcatata tacttagat tgatttaaaa cttcatttt aatttaaaag | 3780 |
| gatctaggta aagatccctt ttgataatct catgaccaa atccctaac gtgagtttc | 3840 |
| gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttt | 3900 |
| tctgcgcta atcigctgct tgcaaaca aaaaccaccg ctaccagcgg tggttigtt | 3960 |
| gccgatcaa gagctaccaa ctctttcc gaaggtact ggttcagca gagcgcagat | 4020 |
| accaaatact gttttctag tgttagccgt a tagccac cactcaaga actctgtac | 4080 |
| accgcctaca tacctcgctc tgctaattct gttaccagt gctgctgcca gtggcgataa | 4140 |
| | |
| gtcggtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggcggg | 4200 |
| ctgaacgggg ggttcgtgca cacagccag ctggagcga acgacctaca ccgaactgag | 4260 |
| atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggccgacag | 4320 |
| gtatccgta aegggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagctc cagggggaaa | 4380 |
| cgcctggat cttatagtc ctgtcggtt tcgccccctc tgacttgagc gtcgatttt | 4440 |
| gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg ccttttacg | 4500 |
| gttcctggcc ttttgcgtgc ctttgctca catgttctt cctgcgttat cccctgattc | 4560 |
| | |
| tgtggataac cgatttaccg ctttgagtg agctgatacc gtcgcccga gccgaacgac | 4620 |
| cgagcgcage gagtcatgta gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct | 4680 |
| ccccgcgcgt tggccgattc attaatgcag ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc | 4740 |
| gggcagttag cgcaacgc当地 ttaatgttag tttagctact cattaggcac cccaggctt | 4800 |
| acactttatg ctccggctc gtagtttgtagtggaaatttgtagcggataac aatttcacac | 4860 |
| aggaaacagc tatgaccatg attacgcca gctctagcta gaggtcgagt ccctccccag | 4920 |
| caggcagaag tatgcaaagc atgcatactca attagtcagc aaccatagtc ccgccccataa | 4980 |
| | |
| ctccgc当地 cccgc当地 actccgc当地 gttccgc当地 ttctccgc当地 catggctgac | 5040 |
| taattttttt tatattgca gaggccgagg ccgc当地ccgctc ctctgagctt ttccagaagt | 5100 |
| agtgaggagg ct当地tttggaa ggc当地taggtt tttgcaaaaa gctttgcaaa gatggataaa | 5160 |
| gttttaaca gagaggaatc ttgc当地gcta atggacctc taggtcttga aaggagtgaaa | 5220 |
| aattggctcc ggtgcccgtc agtggcaga ggc当地cacatcg cccacagtcc ccgagaagtt | 5280 |
| ggggggaggg gtc当地ggcaattt gaaaccgggtc ctagagaagg tggc当地gggg taaactggaa | 5340 |
| aagtgatgtc gtgtactggc tccgc当地ttt tcccgagggtt gggggagaac cgtatataag | 5400 |
| | |
| tgcaatgtac ggc当地gtgaacg ttcttttgc caacgggtt gccgccc当地 gaggttaag | 5460 |
| tgccgtgtt ggttccgc当地 ggc当地ctggctt ct当地tacgggt tatggccctt gctgcttgc当地 | 5520 |
| aattactcc acctggctgc agtacgtat tcttgc当地ccc gagttc当地ggg ttggaaagtgg | 5580 |

| | |
|---|------|
| gtgggagagt tcgaggcctt gcgcttaagg agcccattcg ctcgtgctt gagttggc | 5640 |
| ctggcctggg cgctggggcc gccgcgtcg aatctggtgg cacttcgac cctgtctcg | 5700 |
| tgcttcgat aagtctctag ccatttaaaa tttttagatga cctgctgcga cgcttttt | 5760 |
| ctggcaagat agtcttgtaa atgcgggcca agatctgcac actggatattt cgtttttgg | 5820 |

| | |
|---|------|
| ggccgcgggc ggcgacgggg cccgtgcgtc ccagcgcaca tgttcggcga ggcggggcct | 5880 |
| gcgagcgcgg ccaccgagaa tcggacgggg gtagtctcaa gctggccggc ctgctctgg | 5940 |
| gcctggcctc gcgcgcgcgt gtatgcffff gcccggcgtt gcaaggctgg cccggcggc | 6000 |
| accagttgcg tgagcggaaa gatggccgt tccggccct gctgcaggaa gctaaaaatg | 6060 |
| gaggacgcgg cgctcgggag agcggcggg tgagtcaccc acacaaggaa aaaggcctt | 6120 |
| tccgtcctca gccgtcgctt catgtgactc cacggagttc cggcgcgtt ccaggcacct | 6180 |
| cgattagttc tcgagctttt ggagtaatgc gtcttaggt tggggggagg ggttttatgc | 6240 |

| | |
|---|------|
| gatggagttt ccccacactg agtgggtgga gactgaagtt aggcagctt ggcacttgat | 6300 |
| gttaattctcc ttgaaatttg cccttttga gtttggatct tggttcattt tcaaggctca | 6360 |
| gacagtggtt caaatttttt ttcttccatt tcaggtgtcg tgaggaattt tctagagatc | 6420 |
| cctcgaccc gagatccatt gtgcccggc gcaccatgac ttggacccca ctcccttcc | 6480 |
| tcacccttctt cctccactgc acaggaagct tatcg | 6515 |

<210> 137

<211> 6519

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 137

| | |
|---|-----|
| caacccaagg ctgccccctc ggtcaactctg ttcccgccct cctctgagga gcttcaagcc | 60 |
| aacaaggcca cactgggtgt tctcataagt gacttctacc cgggagccgt gacagtggcc | 120 |
| tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg ggagtggaga ccaccacacc ctccaaacaa | 180 |
| agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac ctgagcctga cgcctgagca gtggaaagtcc | 240 |
| cacagaagct acagctgccca ggtcacgcat gaagggagca ccgtggagaa gacagtggcc | 300 |
| cctacagaat gttcatgagc ggccgctcgaa ggccggcaag gcccggatccc ccggacctcg | 360 |
| cctctggcta ataaaggaaa ttatattca ttgcaatagt gtgttggaaat ttttgtgtc | 420 |

| | |
|--|-----|
| tctcaactcgaa aggacatat gggaggccaa atcattttgtt cgagatccctt cggagatctc | 480 |
|--|-----|

| | |
|--|------|
| tagctagagg atcgatcccc gccccggacg aactaaacct gactacgaca tctctgccccc | 540 |
| ttcttcgcgg ggcagtgcataaatccctt cagttgggttg gtacaacttg ccaactgggc | 600 |
| cctgttccac atgtgacacg gggggggacc aaacacaaag gggttctctg actgttagtt | 660 |
| acatccttat aaatggatgt gcacatttgc caacactgag tggcttcat cctggagcag | 720 |
| actttgcagt ctgtggactg caacacaaca ttgccttat gtgttaactct tggctgaagc | 780 |
| tcttacacca atgtggggg acatgtacct cccaggggcc caggaagact acggaggct | 840 |
| | |
| acaccaacgt caatcagagg ggcctgtgtta gctaccgata agcggaccct caagaggca | 900 |
| ttagcaatag tggtaataag gcccccttgt taaccctaaa cggtagcat atgctcccg | 960 |
| gttagtagta tatactatcc agactaaccc taatcaata gcatatgtta cccaacggga | 1020 |
| agcatatgct atcgaattag ggttagtaaa agggtctaa ggaacagcga tatctccac | 1080 |
| cccatgagct gtcacggttt tatttacatg gggtaggat tccacgaggg tagtgaacca | 1140 |
| tttttagtcac aagggcagtg gctgaagatc aaggagcggg cagtgaactc tcctgaatct | 1200 |
| tcgcctgctt ctcatctc ctgcgttag ctaatagaat aactgtgag ttgtgaacag | 1260 |
| | |
| taaggtgtat gtgaggtgt cgaaaacaag gtttcaggtg acgccccag aataaaattt | 1320 |
| ggacgggggg ttcagtggtg gcattgtgt atgacaccaa tataaccctc acaaaccct | 1380 |
| tggcaataa atactagtgt aggaatgaaa cattctgaat atcttaaca atagaatcc | 1440 |
| atgggtggg gacaagccgt aaagactgga tgtccatctc acacgaattt atggctatgg | 1500 |
| gcaacacata atcctagtgc aatatgatac tgggttatt aagatgtgtc ccaggcaggg | 1560 |
| accaagacag gtgaaccatg ttgttacact ctattgtaa caagggaaa gagagtggac | 1620 |
| gcccacagca gccgactcca ctgggtgtct ctaacacccc cgaaaattaa acggggctcc | 1680 |
| | |
| acgc当地gg gcccataaa caaagacaag tggccactct tttttgaa attgtggagt | 1740 |
| ggggcacgc gtcagcccc acacgcccgc ctgcggttt ggactgtaaa ataagggtgt | 1800 |
| aataacttgg ctgattgtaa ccccgtaac cactgcggc aaaccacttg cccacaaaac | 1860 |
| cactaatggc accccggga atacctgcata aagttaggtgg gcccccaag atagggcgc | 1920 |
| gattgctgca atctggagga caaattacac acacttgccgc ctgagcgcac agcacagggt | 1980 |
| tgttggctt catattcactg aggtcgctga gagcacgggt ggctaatgtt gccatggta | 2040 |
| gcatatacta cccaaatatac tggatagcat atgctatcct aatctatatac tggtagcat | 2100 |
| | |
| aggctatcct aatctatatac tggtagcat atgctatcct aatctatatac tggtagtat | 2160 |
| atgctatcct aatctatatac tggtagcat aggtatcct aatctatatac tggtagcat | 2220 |
| atgctatcct aatctatatac tggtagtat atgctatcct aatctgtatac cggtagcat | 2280 |
| atgctatcct aatagagatt aggttagtat atgctatcct aatctatatac tggtagcat | 2340 |

| | |
|---|------|
| atactaccca aatatctgga tagcatatgc tattctaatac tatatactggg tagcatatgc | 2400 |
| tattctaatac tatatactggg tagcataggc tattctaatac tatatactggg tagcatatgc | 2460 |
| tattctaatac tatatactggg tagtatatac tattctaatt tatatactggg tagcataggc | 2520 |
| | |
| tattctaatac tatatactggg tagcatatgc tattctaatac tatatactggg tagtatatac | 2580 |
| tattctaatac tgtagccgg tagcatatgc tattctatg ataagctgtc aaacatgaga | 2640 |
| attttcttga agacgaaagg gcctcgat acgcctattt ttataggtta atgtcatgt | 2700 |
| aataatggtt tcttagacgt caggtggcac ttttcggga aatgtgcgcg gaaccctat | 2760 |
| ttgtttattt ttctaaatac attcaaatac gtatccgtc atgagacaat aaccctgata | 2820 |
| aatgctcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacattcc gtgtccct | 2880 |
| tattccctt ttgcggcat ttgcctcc tgtttgct cacccagaaa cgctggtaa | 2940 |
| | |
| agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa | 3000 |
| cagcgtaag atccttgaga gtttcgccc cgaagaacgt ttccatga tgagcactt | 3060 |
| taaagttctg ctatgtggcg cggattatc ccgtgttgc gcccggcaag agcaactcg | 3120 |
| tcgccccata cactattctc agaatgactt ggtagtgc tcaccagtca cagaaaagca | 3180 |
| tcttacggat ggcacatgacag taagagaatt atgcagtgtc gccataacca tgagtgataa | 3240 |
| cactgccccaa acttacttc tgacaacgtat cggaggaccg aaggagctaa ccgttttt | 3300 |
| gcacaacatg ggggatcatg taactcgct tgatcggttgg gaaccggagc tgaatgaagc | 3360 |
| | |
| cataccaaac gacgagcgtg acaccacgt gcctgcagca atggcaacaa cgttgcgca | 3420 |
| actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccgccaa caattaatag actggatgga | 3480 |
| ggcgataaa gttgcaggac cacttctgcg ctgcggccctt ccggctggct gtttattgc | 3540 |
| tgataaatct ggagccggtg agcgtggtc tcgcgttac attgcacgc tggggccaga | 3600 |
| tggtaagccc tcccgatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga | 3660 |
| acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctcaatgtt aagcatgtt aactgtcaga | 3720 |
| ccaagtttac tcataatatac tttagattga tttaaaactt cattttaat ttaaaaggat | 3780 |
| | |
| ctaggtaag atccttttg ataatctcat gaccaaaatc ctttaacgtg agtttcgtt | 3840 |
| ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct | 3900 |
| gcgcgtatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtgg tttgtttgcc | 3960 |
| ggatcaagag ctaccaactc ttttccgaa ggttaactggc tttagcagag cgcagatacc | 4020 |
| aaatactgtt ctcttagtgt agccgttagtt aggccaccac ttcaagaact ctgttagcacc | 4080 |
| gcctacatac ctcgtctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc | 4140 |

| | |
|---|------|
| gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg | 4200 |
| | |
| aacgggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata | 4260 |
| cctacagcgta gagctatgaa aagcgccac gcttccgaa gggagaaagg cgacaggta | 4320 |
| tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttcag gggaaacgc | 4380 |
| ctggtatctt tatagtctcg tcgggttcg ccacctctga cttgagcgta gattttgt | 4440 |
| atgctcgta gggggcggaa gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct tttacggtt | 4500 |
| cctggcctt tgctggcctt ttgctcacat gttcttcct gcgttatccc ctgattctgt | 4560 |
| ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga | 4620 |
| | |
| gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcggaa agagcgccta atacgcaaac cgccctctccc | 4680 |
| cgcgcgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg ttcccact ggaaagcggg | 4740 |
| cagtgagcgc aacgaatta atgtgagta gctcaactcat taggcacccc aggcttaca | 4800 |
| ctttatgctt ccggctcgta ttttgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg | 4860 |
| aaacagctat gaccatgatt acgccaagct ctagctagag gtcgagtc tccccagcag | 4920 |
| gcagaagtagt gcaaaggcatg catctcaatt agtcagcaac catagccccg cccctaactc | 4980 |
| cgcccatccc gccctaact ccgcccagtt ccgcattc tccgccccat ggctgactaa | 5040 |
| | |
| tttttttat ttatgcagag gccgaggccg cctcgccctc ttagctattc cagaagttagt | 5100 |
| gaggaggctt tttggggcctt ctaggcattt gcaaaaagct ttgcaagat ggataaagtt | 5160 |
| ttaaacagag aggaatctt gcagctaattt gacattcttagt gtcttggaaag gagtgaaat | 5220 |
| tggctccgtt gccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg agaagttggg | 5280 |
| gggaggggtc ggcatttgcctt ccgggtgcata gagaagggtgg cgccggtaa actggaaag | 5340 |
| tgtatgtcgta tactggctcc gccttttcc cgagggtgg ggagaaccgt atataagtgc | 5400 |
| agtatgtcgcc gtgaacgttc ttttcgaa cgggttgcc gccagaacac aggtaaatgc | 5460 |
| | |
| cgtgtgtggt tcccgccggc ctggccttt tacgggttat ggcccttgcg tgccttgc | 5520 |
| tacttccacc tggtgcagt acgtgattt tgcattccgag ctgggttg gaagtgggtg | 5580 |
| ggagagttcg aggcccttgcg cttaggagc ccattcgct cgtgttgat ttgaggcctg | 5640 |
| gcctggcgcc tggggccgcg cggtgcgaat ctgggtggac ctgcgcct gtctcgctgc | 5700 |
| tttcgataag tctctagcca tttaaaattt ttgatgaccc gctgcgacgc ttttttctg | 5760 |
| gcaagatagt ctgtaaatg cggccaaga tctgcacact ggtattcgg tttttgggc | 5820 |
| cgcggccggc gacggggccc gtgcgtccca gcgcacatgt tcggcgaggc gggccctgcg | 5880 |

| | |
|---|------|
| agcgcggcca ccgagaatcg gacggggta gtctcaagct ggccggcctg ctctgggcc | 5940 |
| tggcctcgcg ccgcgtgtc tcgccccgc ctggcggca aggctggccc ggtcgccacc | 6000 |
| agtgcgtga gcggaaagat ggccgcttc cggccctgct gcagggagct caaaatggag | 6060 |
| gacgcggcgc tcgggagac gggcgggtga gtcaccaca caaaggaaaa gggccittcc | 6120 |
| gtcctcagcc gtcgttcat gtgactccac ggagtaccgg ggcgcgtcca ggcacctcga | 6180 |
| ttagttctcg agcttttggta gtacgtcgtc ttttagttgg ggggagggggt ttatgcgt | 6240 |
| ggagttccc cacactgagt gggtggagac tgaagttagg ccagcttggc acttgatgt | 6300 |

| | |
|--|------|
| attcccttg gaatttgcctt tttttagtt tggatcttgg ttcattctca agcctcagac | 6360 |
| agtggtaaa agttttttc ttccatttca ggtgtcgta ggaattctct agagatccct | 6420 |
| cgacctcgag atccatttgtc cccggcgcc accatggaca tgccgtgcc cgccagctg | 6480 |
| ctggcctgc tgctgtgtc gttcccccggc tcgcgtatc | 6519 |

<210> 138

<211> 7185

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 138

| | |
|--|----|
| gcgtcgacca agggccatc ggtttcccc ctggcacccct cctccaagag cacccttggg | 60 |
|--|----|

| | |
|--|-----|
| ggcacagcgg ccctggctg cctggtaag gactacttc cegaaccgt gacgggtgtcg | 120 |
| tggaactcgag gcgcctgac cagcggcgtg cacaccccttcc cggctgtcct acagtctca | 180 |
| ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgcctcca gcagcttggg caccctgacc | 240 |
| tacatctgca acgtaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc | 300 |
| aaatcttgcg acaaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc cgccggggga | 360 |
| ccgtcagtct tcctttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct | 420 |
| gaggtcacat gcgtgggtgtt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtaa gttcaactgg | 480 |

| | |
|---|-----|
| tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgccggagga gcagtacaac | 540 |
| agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag | 600 |
| gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc | 660 |
| aaagccaaag ggcagcccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgcgaggag | 720 |
| atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtaaaag gcttctatcc cagcgacatc | 780 |
| gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccgtg | 840 |

| | |
|--|------|
| ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtgg | 900 |
| | |
| cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcattgagg ctctgcacaa ccactacacg | 960 |
| cagaagagcc tctccctgtc tccggtaaa tgagcggccg ctgcaggccg gcaaggccgg | 1020 |
| atcccccgac ctgcacctct ggctaataaa ggaaatttat ttcatgtca atagtgtgtt | 1080 |
| gaaattttt gtgtctctca ctgcgaagga catatggag ggcaaatcat ttggtcgaga | 1140 |
| tccctcgag atctctagct agaggatcga tcccccccc ggacgaacta aacctgacta | 1200 |
| cgacatctct gcccttctt cgcgccccag tgcatgtaat ccctcagtt ggttggtaca | 1260 |
| acttgccaac tggccctgt tccacatgtg acacgggggg ggaccaaaca caaagggtt | 1320 |
| | |
| ctctgactgt agttgacatc cttataaatg gatgtgcaca tttgccaaca ctgagtggt | 1380 |
| ttcatctgg agcagacttt gcagtctgt gactgcaaca caacatgcc tttatgtta | 1440 |
| actctggct gaagcttta caccaatgtt gggggacatg tacctccag gggcccagga | 1500 |
| agactacggg aggctacacc aacgtcaatc agagggcct gtgtactac cgataagcgg | 1560 |
| accctcaaga gggcattagc aatagtgtt ataaggcccc ctgttaacc ctaaacgggt | 1620 |
| agcatatgtt tccggtag tagtatatac tatccagact aaccctaatt caatagcata | 1680 |
| tgttacccaa cggaagcat atgctatcga attagggtt gtaaaagggt cctaaggAAC | 1740 |
| | |
| agcgatatct cccacccat gagctgtcac ggtttattt acatgggtc aggattccac | 1800 |
| gagggtagtg aaccattttta gtcacaaggg cagtgctga agatcaagga gcggcagt | 1860 |
| aactctctg aatcttcgccc tgcttctca ttctccttcg tttagctaat agaataactg | 1920 |
| ctgagttgtt aacagtaagg tgtatgttag gtgctcgaaa acaaggtttcc aggtgaccc | 1980 |
| cccgaaataa aatttggacg gggggttcag tggcgttacc gtgctatgac accaataaa | 2040 |
| ccctcacaaa cccctggc aataaataact agtgttagaa tggaaacattc tgaatatctt | 2100 |
| taacaataga aatccatggg gtggggacaa ggcgtaaaga ctggatgtcc atctcacacg | 2160 |
| | |
| aatttatggc tatggcaac acataatcct agtgcataat gatactgggg ttattaagat | 2220 |
| gtgtcccagg cagggaccaa gacaggtgaa ccatgttgc acactctatt tgtaacaagg | 2280 |
| ggaaagagag tggacgccga cagcagcgga ctccactgg tgcgtctaa accccccaaa | 2340 |
| attaaacggg gctccacgcc aatggggccc ataaacaaag acaagtggcc acttttttt | 2400 |
| ttgaaattgt ggagtggggg cacgcgtcag ccccccacacg ccggccctgcg gtttggact | 2460 |
| gtaaaataag ggtgtataaa cttggctgtat tgtaaccccg ctaaccactg cggtaaaacc | 2520 |
| acttgcccac aaaaccacta atggcacccc gggaaatacc tgcataagta ggtggccggg | 2580 |

| | |
|---|------|
| ccaagatagg ggcgcgattt ctgcgatctg gaggacaaat tacacacact tgcgcctgag | 2640 |
| cgcgaagcac agggttgtt gtccatata tcacgaggc gctgagagca cggggctta | 2700 |
| atgtgccat gggtagcata tactaccaa atatctggat agcatatgt atcctaattct | 2760 |
| atatctgggt agcataggct atcctaattct atatctgggt agcatatgt atcctaattct | 2820 |
| atatctgggt agtatatgt atcctaatttt atatctgggt agcataggct atcctaattct | 2880 |
| atatctgggt agcatatgt atcctaattct atatctgggt agtatatgt atcctaattct | 2940 |
| gtatccgggt agcatatgt atcctaataag agattagggt agtatatgt atcctaatttt | 3000 |
| | |
| atatctgggt agcatataact acccaaataat ctggatagca tatgctatcc taatctatat | 3060 |
| ctggtagca tatgctatcc taatctatat ctggtagca taggctatcc taatctatat | 3120 |
| ctggtagca tatgctatcc taatctatat ctggtagta tatgctatcc taatttatat | 3180 |
| ctggtagca taggctatcc taatctatat ctggtagca tatgctatcc taatctatat | 3240 |
| ctggtagta tatgctatcc taatctgtat ccggtagca tatgctatcc tcatgataag | 3300 |
| ctgtcaaaca tgagaatttt cttgaagacg aaaggccctc gtatacgcc tattttata | 3360 |
| ggttaatgtc atgataataa tggttctta gacgtcaggt ggcactttc gggaaatgt | 3420 |
| | |
| gcgcgaaacc cctatttgtt tattttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag | 3480 |
| acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaagg aagagtatga gtattcaaca | 3540 |
| tttccgtgtc gcccttattc ctttttgc ggcattttgc ctccctgttt ttgctcaccc | 3600 |
| agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgtga agatcagttt ggtgcacgag tggttacat | 3660 |
| cgaactggat ctcaacagcg gtaagatct tgagagttt cgcggcaag aacgtttcc | 3720 |
| aatatgtgagc acttttaag ttctgctatg tggcgccgtt ttatccgtt ttgacgcccgg | 3780 |
| gcaagagcaa ctccgtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggtt agtactcacc | 3840 |
| | |
| agtccacagaa aagcatctt cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat | 3900 |
| aaccatgagt gataacactg cggccaaactt acttcgtaca acgatggag gaccgaagga | 3960 |
| gctaacggct ttttgccaca acatggggta tcatgtact cgccttgc gttggaaacc | 4020 |
| ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg cagcaatggc | 4080 |
| aacaacgtt cgcacactat taactggcgta actacttact ctagttccc ggcaacaatt | 4140 |
| aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccatt ctgcgctcgcc cccttccggc | 4200 |
| tggctggtt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggctcgcg gtatcatgtc | 4260 |
| | |
| agcaactgggg ccagatggta agccctcccg tattcgatgtt atctacacga cggggagtca | 4320 |
| ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca | 4380 |
| ttggtaactg tcagaccaag ttactcata tatactttat attgatttaa aacttcattt | 4440 |

ttaattnaaa aggatctagg tgaagatcct tttgataat ctcatgacca aaatcccta 4500
acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatttcttg 4560
agatcctttt ttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc 4620
ggtgttgtt ttgccggatc aagagctacc aactctttt ccgaaggtaa ctggcttcag 4680

| | |
|--|------|
| cagagcgcgac ataccaaata ctgttcttct agtgttagccg tagttaggcc accacttcaa | 4740 |
| gaactctgtat gcaccgccta cataacctcg tctgctaatac ctgttaccag tggctgctgc | 4800 |
| cagtggcgtat aagtctgttc ttacgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc | 4860 |
| gcagcggctcg ggctgaacgg ggggtcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta | 4920 |
| caccgaactg agataacctac agcgtgagct atgagaaaagc gccacgccttc ccgaagggag | 4980 |
| aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgc a cgagggagct | 5040 |
| tccagggggaa aacgccttgtt atctttatag tcctgtcggtt tcgcacc tctgacttga | 5100 |

| | |
|---|------|
| gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc | 5160 |
| ggcctttta cggttccgg cctttgctg gcctttgct cacatgttct ttcctgcgtt | 5220 |
| atccccctgat tctgtggata accgtattac cgccttgag tgagctgata ccgctcgccg | 5280 |
| cagccgaacg accgagcgca gcgagtcatg gagcgaggaa gcggaagagc gcccaatacg | 5340 |
| caaaccgcct ctcccccgcg gttggccgat tcattaatgc agctggcacg acaggttcc | 5400 |
| cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc aattaatgtg agtttagctca ctcatttaggc | 5460 |
| accccaggtt ttacacttta tgcttccggc tcgtatgtt tggttggaaattt tgagcgat | 5520 |

| | |
|--|------|
| acaatttcac acaggaaaca gctatgacca tgattacgcc aagctctagc tagaggtcga | 5580 |
| gtccctcccc agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcatct caattagtca gcaaccatag | 5640 |
| tcccgccccct aactccgccc atccggcccc taactccgccc cagttccgccc cattctccgc | 5700 |
| cccatggctg actaattttt ttatattatg cagaggccga ggccgcctcg gcctctgagc | 5760 |
| tattccagaa gtatgtgagga ggcttttttg gaggcctagg ctttgc当地 aagctttgca | 5820 |
| aagatggata aagtttaaaa cagagaggaa tctttgcagc taatggacct tcttaggtctt | 5880 |
| gaaaggagtg ggaattttggct ccgggtggcccg tcagtggcga gagcgcacat cgccccacagt | 5940 |

| | |
|--|------|
| ccccgagaag ttggggggag gggtcgcaaa ttgaaccggc gcctagagaa ggtggcgccgg | 6000 |
| ggtaaactgg gaaagtgtatcg tgcgtactg gctccgcctt ttcccggagg gtgggggaga | 6060 |
| accgttatata agtgcagtag tcgcccgtgaa cgttctttt cgcaacgggt ttgccgcag | 6120 |
| aacacaggtta agtgcgcgtgt gtgggtcccg cgggcctggc ctcttacgg gttatggccc | 6180 |
| ttgcgtgcct tgaattactt ccacctggct gcagtcgtt attcttgcattt ccgagcttcg | 6240 |
| ggtttggaaat ggggtgggaga gttcgaggcc ttgcgtttaa ggagccccctt cgcctcgatc | 6300 |

| | |
|--|------|
| ttgagtttag gcctggcctg ggccgtgggg ccgcgcgtg cgaatcttgtt ggcacccctcg | 6360 |
| | |
| cgcctgtctc gctgcttcg ataagtctct agccattaa aattttgat gaccgtgc | 6420 |
| gacgctttt ttctggcaag atagtcttgt aaatgcgggc caagatctgc acactggat | 6480 |
| ttcggtttt gggccgcgg gcggcgacgg ggcccgtgcg tccagcgca catttcgcc | 6540 |
| gaggcggggc ctgcgagcgc gccaccggag aatcgacgg gggtagtctc aagctggcc | 6600 |
| gcctgtctg gtgcctggcc tcgcgcgcgtt gtgtatcgcc ccgcctggc cgccaaggct | 6660 |
| ggcccggtcg gcaccagttt cgtgagcgg aagatggccg ctccccggcc ctgctgcagg | 6720 |
| gagctcaaaa tggaggacgc ggccgtcgaa agagcggcgg ggtgagtcac ccacacaaag | 6780 |
| | |
| gaaaagggcc ttccgtctt cagccgtcg ttcatgtgac tccacggagt accggcc | 6840 |
| gtccaggcac ctgcattttt tctcgagttt ttggagtacg tcgtcttag gttgggggaa | 6900 |
| ggggttttat gcgtggagt ttccccacac tgagtgggtg gagactgaag ttaggccac | 6960 |
| ttggcacttg atgttaattt ctttggattt tgccctttt gagttggat cttggttcat | 7020 |
| tctcaaggct cagacagtgg ttcaaagttt ttttccca tttcagggtt cgtgaggaat | 7080 |
| tctctagaga tccctcgacc tcgagatcca ttgtccccgg gcgcaccat ggagttggg | 7140 |
| ctgagctggc ttttcttgtt cgcgattttaa aaggtgtcc agtgc | 7185 |