



(19) 대한민국특허청(KR)  
 (12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년01월04일  
 (11) 등록번호 10-1935088  
 (24) 등록일자 2018년12월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07K 16/30* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)  
 (52) CPC특허분류  
*C07K 16/30* (2013.01)  
*A61K 39/0011* (2018.08)  
 (21) 출원번호 10-2015-7006420  
 (22) 출원일자(국제) 2013년03월15일  
 심사청구일자 2018년03월14일  
 (85) 번역문제출일자 2015년03월12일  
 (65) 공개번호 10-2015-0046111  
 (43) 공개일자 2015년04월29일  
 (86) 국제출원번호 PCT/US2013/032572  
 (87) 국제공개번호 WO 2014/031174  
 국제공개일자 2014년02월27일  
 (30) 우선권주장  
 61/693,230 2012년08월24일 미국(US)  
 (뒷면에 계속)  
 (56) 선행기술조사문현  
 WO2012097313 A2

(73) 특허권자  
 더 리젠크스 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아  
 미국 캘리포니아주 94607-5200 오크랜드 5층 프랭  
 클린 스트리트 1111  
 (72) 발명자  
 킵스 토마스 제임스  
 미국 92130 캘리포니아주 샌 디에고 카미니토 멘  
 디올라 13175  
 유 지안  
 미국 92122 캘리포니아주 샌 디에고 아파트먼트  
 303 리본 드라이브 3383  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
 김진희, 김태홍

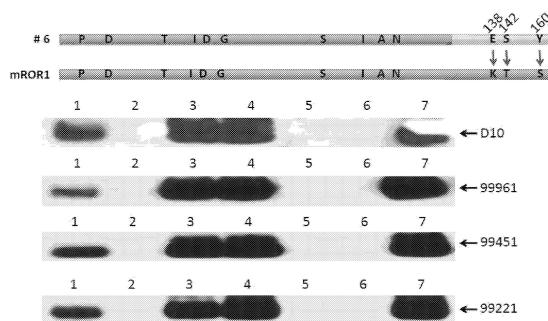
전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 김영수

(54) 발명의 명칭 ROR1 암을 치료하고 전이를 저해하는데 이용을 위한 항체와 백신

**(57) 요약****발명의 요약**

본 발명은 항-ROR1 항체 또는 항원 결합 단편, ROR1 결합 웨티드 및 ROR1 백신을 이용하여 전이를 저해하는 제약 학적 조성물과 방법에 관계한다.

**대 표 도**

(52) CPC특허분류

*A61K 39/395* (2013.01)

*A61K 2039/505* (2013.01)

(72) 발명자

**쿠이 빙**

미국 92126 캘리포니아주 샌 디에고 유닛 8 컴퍼스  
포인트 드라이브 노스 11681

**챈 리구양**

미국 92130 캘리포니아주 샌 디에고 산 브루노 코  
브 12552

**위드호프 조지**

미국 92121 캘리포니아주 샌 디에고 시크리스트 뷰  
로드 5911

**프루사크 찰스**

미국 92130 캘리포니아주 샌 디에고 토레이 힐 레  
인 3905

(30) 우선권주장

61/709,055 2012년10월02일 미국(US)

61/709,803 2012년10월04일 미국(US)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

인간화 중쇄 가변 영역 및 인간화 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항-ROR1 항체로서,  
상기 인간화 중쇄 가변 영역은 서열 번호:27, 서열 번호:28 및 서열 번호:29에 개시된 서열을 포함하고;  
상기 인간화 경쇄 가변 영역은 서열 번호:30, 서열 번호:31 및 서열 번호:32에 개시된 서열을 포함하는, 단리된  
항-ROR1 항체.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 항체는 hROR-1의 아미노산 130-160에 결합하는 것인 단리된 항체.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 항체는 hROR-1에 결합을 위해 ROR1 아미노산 138이 글루탐산일 것을 필요로 하는 것인 단리된  
항체.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 항체는 500 pM 내지 6 nM의 결합 친화성을 갖는 것인 단리된 항체.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 결합 친화성은 800 pM인 단리된 항체.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 항체는 전이를 저해하는 것인 단리된 항체.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 항체는 인간, 인간화 또는 키메라 항체인 단리된 항체.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 항체는 치료제에 접합된 것인 단리된 항체.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 상기 인간화 중쇄 가변 영역은 서열 번호:5에 개시된 서열을 포함하고;  
상기 인간화 경쇄 가변 영역은 서열 번호:7에 개시된 서열을 포함하는, 단리된 항-ROR1 항체.

#### 청구항 10

삭제

#### 청구항 11

삭제

#### 청구항 12

삭제

#### 청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

#### [0001] 관련된 출원 데이터

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에, 2012년 8월 24일자 제출된 U.S. 특허 출원 번호 61/693,230, 2012년 10월 2일자 제출된 U.S. 특허 출원 번호 61/709,055 및 2012년 10월 4일자 제출된 U.S. 특허 출원 번호 61/709,803에 우선권을 주장하고, 이들의 전체 내용은 본원에서 참조로서 편입된다.

#### [0003] 서열 목록

[0004] 첨부된 서열 목록에서 자료는 본원에 전체적으로 참조로서 편입된다. "ST-UCSD3820-1WO\_ST25.txt"로 명명된 첨부된 파일은 2013년 3월 14일자에 창출되었고 33 Kb이다. 상기 파일은 윈도우즈 OS를 이용하는 컴퓨터에서 마이크로소프트 워드를 이용하여 접근될 수 있다.

#### [0005] 보조금 정보

[0006] 본 발명은 국립보건원 및 DR1-01430 캘리포니아 재생의학연구소에 의해 수여된 P01-CA081534 및 R37-CA049870 하에 정부 지원을 받아 만들어졌다. 정부는 본 발명에서 일정한 권리를 갖는다.

#### [0007] 발명의 분야

[0008] 본 발명은 일반적으로, 수용체 티로신 키나아제-유사 고아 수용체 1 항체와 백신뿐만 아니라 전이를 저해하기 위한 방법에 관계한다.

## 배경 기술

#### [0009] 배경 정보

[0010] 암은 관상 질환에 뒤이은, 인간 죽음의 두 번째 선도적인 원인이다. 전 세계적으로, 수백만 명의 사람들이 매년 암으로 사망한다. 미국에서만, 암은 연간 오십만 명을 훨씬 넘는 사람들의 사망을 유발하고, 연간 대략 1.4 백만 건의 새로운 사례가 진단된다. 심장병으로 인한 사망은 유의미하게 감소하고 있는 반면, 암에 기인한 사망은 전반적으로 증가하고 있다. 수용체 티로신 키나아제 (RTKs)는 세포 분화, 증식, 이주, 혈관형성, 그리고 생존에서 결정적인 역할을 한다. 수용체 티로신 키나아제-유사 고아 수용체 1 (ROR1)은 ROR 아파에 속하고, 그리고 면역글로불린 (Ig)-유사, 프리즐드, 그리고 크링글 도메인을 내포하는 세포외 도메인을 갖는 진화적으로-보존된 유형 I 막 단백질이다. ROR1-결함성 생쥐는 골격과 비뇨생식기계 내에 다양한 표현형적 결함뿐만 아니라 출생후 성장 지연을 전시한다. ROR1은 배아형성 동안 및 다양한 상이한 암에 의해 발현되지만, 정상적인 산후 조직에 의해 발현되지 않고, 그리고 종양-배아 표면 항원인 것으로 고려될 수 있다. 기능적 데이터는 ROR1이 악성 세포의 생존을 증진하는 비정준 WNT-신호전달에서 기능할 수 있다는 것을 암시한다. 더욱 최근 연구는 비정준 WNT 신호전달이 유방암 전이의 기저-유사 및 다른 아형에서 주요한 역할을 한다는 것을 보여주었다. ROR1 인간 유방암의 발현은 또한, AKT-CREB 경로의 활성화 및 증강된 종양-세포 성장과 연관된다.

[0011] 수용체-티로신 키나아제 유사 고아 수용체 1 (ROR1)은 보존된 배아 단백질인데, 이것의 발현은 포유동물에서 배아 발달 동안 점진적으로 감소한다. 세포외 도메인을 포함하는 무손상 단백질은 정상적인, 성체 포유동물 조직에서 유의미하게 발현되는 것으로 보이지 않는다. 특히, 연구는 정상적인, 비암성 B 세포를 비롯한 정상적인 성체 인간 조직의 세포 표면 상에서 ROR1의 유의미한 발현을 확인하지 못하였다 (Baker et al., Clin. Cancer Res., 14:396 (2008); DaneshManesh et al., Int. J. Cancer, 123:1190 (2008) 및 Fukuda et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 105:3047 (2008)). 하지만, ROR1은 악성 B-세포 (B-CLL) 및 외투 세포 림프종 (MCL)의 세포 표면 상에서 발현된다. 또한, ROR1은 버킷 림프종, 신장 세포 암종, 결장암 및 유방암을 비롯한 일정한 다른 암 세포주에서 발현되는 것으로 보고되었다 (U.S. 특허 출원 2007/02075110). 이런 이유로, ROR1은 이들 암에 대한 선별적인 마커인 것으로 고려될 수 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

## [0012] 발명의 요약

본 발명은 암 세포 성장과 전이를 저해할 수 있는 ROR1에 대한 항체를 제공한다. 본 발명은 ROR1에 대한 항체, ROR1 결합 웨티드 및 ROR1 웨티드 백신을 제공한다. 항-ROR1 항체 또는 이들의 항원 결합 단편, ROR1 항체 면역 접합체, ROR1 웨티드 백신 또는 ROR1 결합 웨티드를 이용하여 전이를 저해하기 위한 조성물과 방법이 더욱 제공된다. 한 구체예에서, 본 발명은 항체 99961과 동일한 결합 특이성을 갖는 단리된 항-인간 ROR1 항체를 제공한다. 한 양상에서, 항체는 인간 ROR-1 (hROR1)의 CRD 도메인과 인접하는 Ig-유사 도메인에 결합한다. 추가의 양상에서, 항체는 hROR-1의 아미노산 42-160에 지도화하는 에피토프에 결합한다. 추가의 양상에서, 항체는 hROR-1의 아미노산 130-160에 지도화하는 에피토프에 결합한다. 다른 양상에서, 항체는 결합하기 위한 hROR-1의 위치 138에서 글루탐산의 존재를 필요로 한다.

[0014] 추가의 구체예에서, 본 발명은 서열 번호:1, 서열 번호:5, 서열 번호:9, 서열 번호:13 및 서열 번호:17로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변 영역, 그리고 서열 번호:3, 서열 번호:7, 서열 번호:11, 서열 번호:15 및 서열 번호:19로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항-인간 ROR1 항체를 제공한다. 한 양상에서, 항체의 중쇄 가변 영역은 서열 번호:5이고, 그리고 경쇄 가변 영역은 서열 번호:7이다.

[0015] 한 구체예에서, 본 발명은 서열 번호:27, 서열 번호:28, 서열 번호:29, 서열 번호:33, 서열 번호:34 및 서열 번호:35로 구성된 군에서 선택되는 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성된 중쇄 가변 영역, 그리고 서열 번호:30, 서열 번호:31, 서열 번호:32, 서열 번호:36, 서열 번호:37 및 서열 번호:38로 구성된 군에서 선택되는 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성된 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항-인간 ROR1 항체를 제공한다. 한 양상에서, CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성된 중쇄 가변 영역은 서열 번호:27, 서열 번호:28 및 서열 번호:29로 구성되고, 그리고 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성된 경쇄 가변 영역은 서열 번호:30, 서열 번호:31 및 서열 번호:32으로 구성된 군에서 선택된다.

[0016] 추가의 구체예에서, 본 발명은 41 nM보다 큰 결합 친화성을 갖는 항-인간 ROR-1 항체를 제공한다. 한 양상에서, 항체 결합 친화성은 약 500 pM 및 약 6 nM 사이이다. 한 양상에서, 항체 결합 친화성은 약 800 pM이다.

[0017] 한 양상에서, 항체는 99961 또는 항체 99961.1, 99961.2, 99961.3 또는 99961.4를 비롯한 이의 인간화 형태이다. 다른 양상에서, 항체는 전이를 저해한다. 추가의 양상에서, 항체는 세포 이주를 내재화하고 저해한다. 추가의 양상에서, 항체는 비멘틴, snail1/2, 또는 ZEB를 내재화하고 하향조정한다. 바람직한 양상에서, 항체는 인간, 인간화, 또는 키메라이다.

[0018] 다른 구체예에서, 본 발명은 ROR1에 대한 항체 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 제약학적 제제를 제공한다.

[0019] 추가 구체예는 ROR1에 대한 항체를 인코딩하는 단리된 핵산을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 hROR1에 대한 항체를 인코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 추가의 구체예에서, 본 발명은 hROR1에 대한 항체를 인코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 추가의 구체예에서, 본 발명은 항-인간 ROR1 항체를 생산하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 항체를 생산하는 조건 하에 숙주 세포를 배양하고, 이후 임의선택적으로, 상기 항체를 회수하는 것을 포함한다.

[0020] 한 구체예에서, 본 발명은 ROR-1 발현 세포에 대항하는 백신을 제공하고, 상기 백신은 항체 D10의 ROR-1 결합 영역에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 단리된 또는 합성적으로 생산된 웨티드의 제약학적으로 허용되는 조성물을 포함한다. 한 양상에서, 항체 D10의 ROR-1 결합 영역의 아미노산 서열은 VATNGKEVVSSTGVLFVKFGPC이다. 추가의 양상에서, 항체 D10의 ROR-1 결합 영역의 아미노산 서열은 EVVSSTGVLFVKFGPC이다. 다른 양상에서, ROR-1 발현 세포는 암 세포이다. 추가의 양상에서, 암 세포는 B 세포 백혈병, 림프종, CLL, AML, B-ALL, T-ALL, 난소, 결장, 폐, 피부, 췌장, 고환, 방광, 자궁, 전립선, 또는 부신암이다.

[0021] 다른 구체예에서, 본 발명은 VATNGKEVVSSTGVLFVKFGPC에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 ROR1 결합 웨티드 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 백신을 제공한다. 한 양상에서, 웨티드는 포유류이다. 추가의 양상에서, ROR1 결합 웨티드는 키메라 및/또는 인간, 생쥐, 쥐, 돼지, 소, 영장류, 고양이, 개, 토끼, 염소, 닭 또는 곰 기원이다. 다른 양상에서, 백신은 면역원성 어쥬번트를 더욱 포함한다. 추가의 양상에서, 어쥬번트는 결합 웨티드에 접합된 면역원성 담체 모이어티이다. 한 양상에서, 결합 웨티드의 아미노산 서열은 VATNGKEVVSSTGVLFVKFGPC이다. 다른 양상에서, 면역원성 담체 모이어티는 담체 웨티드, 예를 들면, 키홀 림펫 혜모시아닌 (KLH), 소 혈청 알부민 (BSA), 난백알부민, 알루미늄 수산화물 또는 다른 제약학적으로 허용되는 면

역 어쥬번트이다. 제약학적으로 허용되는 면역 어쥬번트의 실례는 Methods in Molecular Medicine, Vol. 42: Vaccine adjuvants: Preparation, Methods and Research Protocols; D. T. O'Hagan에 의해 편집됨; Humana Press Inc., Totowa NJ and European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Proprietary Medicinal Products, Guidelines on Adjuvants in Vaccines, London 2004에서 발견될 수 있다.

[0022] 다른 구체예에서, 본 발명은 EVSSTGVLFVKGPC에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 ROR1 결합 웨티드 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 백신을 제공한다. 추가의 양상에서, ROR1 결합 웨티드는 키메라 및/또는 인간, 생쥐, 쥐, 돼지, 소, 영장류, 고양이, 개, 토끼, 염소, 닭 또는 곰 기원이다. 추가의 양상에서, 어쥬번트는 결합 웨티드에 접합된 면역원성 담체 모이어티이다. 한 양상에서, 결합 웨티드의 아미노산 서열은 VATNGKEVVSSTGVLFVKGPC이다. 다른 양상에서, 면역원성 담체 모이어티는 담체 웨티드, 예를 들면, 키홀 림펫 혜모시아닌 (KLH), 소 혈청 알부민 (BSA) 난백알부민, 알루미늄 수산화물 또는 다른 제약학적으로 허용되는 면역 어쥬번트이다. 제약학적으로 허용되는 면역 어쥬번트의 실례는 Methods in Molecular Medicine, Vol. 42: Vaccine adjuvants: Preparation, Methods and Research Protocols; D. T. O'Hagan에 의해 편집됨; Humana Press Inc., Totowa NJ and European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Proprietary Medicinal Products, Guidelines on Adjuvants in Vaccines, London 2004에서 발견될 수 있다.

[0023] 추가의 구체예에서, 본 발명은 VATNGKEVVSSTGVLFVKGPC에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 ROR1 결합 웨티드 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 백신을 포함하는 제약학적 제제를 제공한다.

[0024] 추가의 구체예에서, 본 발명은 EVSSTGVLFVKGPC에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 ROR1 결합 웨티드 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 백신을 포함하는 제약학적 제제를 제공한다.

[0025] 한 구체예에서, 본 발명은 서열 번호:25 및 서열 번호:26으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 ROR1 결합 웨티드를 제공한다. 한 양상에서, 웨티드는 VATNGKEVVSSTGVLFVKGPC에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다. 다른 양상에서, 웨티드는 EVSSTGVLFVKGPC에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 웨티드 서열을 갖는다. 다른 양상에서, 결합 웨티드는 포유류이다. 추가의 양상에서, 결합 웨티드는 키메라 및/또는 인간, 생쥐, 쥐, 돼지, 소, 영장류, 고양이, 개, 토끼, 염소, 닭 또는 곰 기원이다.

[0026] 한 구체예에서, 본 발명은 서열 번호:25 및 서열 번호:26로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 ROR1 결합 웨티드 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 제약학적 제제를 제공한다.

[0027] 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 번호:25 및 서열 번호:26의 아미노산 서열을 포함하는 ROR1 결합 웨티드를 인코딩하는 단리된 핵산을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 번호:25 및 서열 번호:26의 아미노산 서열을 포함하는 ROR1 결합 웨티드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 추가의 구체예에서, 본 발명은 서열 번호:25 및 서열 번호:26의 아미노산 서열을 포함하는 ROR1 결합 웨티드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 추가의 구체예에서, 본 발명은 결합 웨티드를 생산하는 조건 하에 서열 번호:25 및 서열 번호:26의 아미노산 서열을 포함하는 ROR1 결합 웨티드를 인코딩하는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 웨티드를 생산하는 방법을 제공한다. 한 양상에서, 웨티드를 생산하는 방법은 결합 웨티드를 회수하는 것을 더욱 포함한다.

[0028] 한 구체예에서, 본 발명은 ROR-1 발현 암의 전이를 억제하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 단일클론 항체 99961의 결합 특이성을 갖는 항체, 항체 D10의 ROR-1 결합 영역에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 웨티드로 구성된 백신 또는 VATNGKEVVSSTGVLFVKGPC에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 ROR-1 결합 웨티드를 투여함으로써 종양 세포의 상피-배엽간 전이를 파괴하는 것을 포함한다. 한 양상에서, ROR-1 발현 암은 B 세포 백혈병, 림프종, CLL, AML, B-ALL, T-ALL, 난소, 결장, 폐, 피부, 췌장, 고환, 방광, 자궁, 전립선, 또는 부신 암이다.

[0029] 한 구체예에서, 본 발명은 ROR-1 발현 암의 전이를 억제하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 단일클론 항체 99961의 결합 특이성을 갖는 항체, 항체 D10의 ROR-1 결합 영역에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 웨티드로 구성된 백신 또는 EVSSTGVLFVKGPC에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 ROR-1 결합 웨티드를 투여함으로써 종양 세포의 상피-배엽간 전이를 파괴하는 것을 포함한다. 한 양상에서, ROR-1 발현 암은 B 세포 백혈병, 림프종, CLL, AML, B-ALL, T-ALL, 난소, 결장, 폐, 피부, 췌장, 고환, 방광, 자궁, 전립선, 또는 부신 암이다.

[0030] 추가의 구체예에서, 본 발명은 개체에서 암을 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 단일클론 항체 99961의 결합 특이성을 갖는 항체, 항체 D10의 ROR-1 결합 영역에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미-

노산 서열을 갖는 웨티드로 구성된 백신 또는 VATNGKEVVSSTGVLFVKGPC에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 ROR-1 결합 웨티드를 개체에 투여하는 것을 포함한다. 한 양상에서, 암은 B 세포 백혈병, 림프종, CLL, AML, B-ALL, T-ALL, 난소, 결장, 폐, 피부, 췌장, 고환, 방광, 자궁, 전립선, 또는 부신 암이다.

[0031] 추가의 구체예에서, 본 발명은 개체에서 암을 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 단일를 론 항체 99961의 결합 특이성을 갖는 항체, 항체 D10의 ROR-1 결합 영역에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 웨티드로 구성된 백신 또는 EVVSSTGVLFVKGPC에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 ROR-1 결합 웨티드를 개체에 투여하는 것을 포함한다. 한 양상에서, 암은 B 세포 백혈병, 림프종, CLL, AML, B-ALL, T-ALL, 난소, 결장, 폐, 피부, 췌장, 고환, 방광, 자궁, 전립선, 또는 부신 암이다.

## 도면의 간단한 설명

### 도면의 간단한 설명

도면 1은 유방암에서 ROR1의 높은-수준 발현이 더욱 짙은 전이없는 생존 및 EMT 유전자 서명과 연관된다는 것을 보여준다. (A) 그래프는 PubMed GEO 데이터베이스 (GSE2603, GSE5327, GSE2034, 그리고 GSE12276)를 통해 사용한 공개된 데이터로부터 유래되었다. Kaplan-Meier 곡선은 전반적인 전이없는 생존에 대한 ROR1 발현의 예측적 충격을 묘사한다. 각 분석을 위해, 582 사례가 삼분위로 격리되었는데, ROR1H로 지정된 군은 가장 높은 수준의 ROR1 mRNA를 갖는 종양을 앓는 1/3의 환자를 나타내고, 그리고 ROR1L로 지정된 군은 가장 낮은 수준의 ROR1 mRNA를 갖는 암을 앓는 1/3의 환자를 나타낸다. ROR1 mRNA의 중간 발현을 갖는 종양을 앓는 1/3의 환자는 ROR1M으로서 지정되었다. 전이없는 생존은 Kaplan-Meier 분석에 의해 결정되었고, 그리고 통계학적 차이는 로그 순위 검증에 의해 결정되었다. 각 범주에서 환자의 숫자, 전체 전이성 이벤트, 그리고 상응하는 P 값 (카이제곱 검증)은 포함된 표에서 도시된다. (B) 환자로부터 단리된 원발성 유방암 세포에서, ROR1 (위쪽), EMT-관련된 유전자 (Snail-1 및 Snail-2를 인코딩하는 SNAI1 및 SNAI2, ZEB-1을 인코딩하는 ZEB1, 비멘틴을 인코딩하는 VIM, N-카드헤린을 인코딩하는 CDH2, E-카드헤린을 인코딩하는 CDH1, ZO-1을 인코딩하는 TJP1, ZO-3을 인코딩하는 TJP3, CK-19를 인코딩하는 KRT19, 또는 클라우딘 3을 인코딩하는 CLDN3의 발현을 보여주는 열 지도. (C) ROR1-siRNA 또는 CTRL-siRNA로 처리된 MDA-MB-231 (왼쪽), HS-578T (중앙), BT549 (오른쪽) 세포로부터 단리된 EMT-관련된 유전자의 발현을 보여주는 열 지도. (D) 위쪽에 표시된 바와 같이, CTRL-shRNA 또는 ROR1-shRNA로 형질감염된 MDA-MB-231, HS-578T, 또는 BT549 (아래쪽에 표시된 바와 같이)의 단백질 용해물의 면역블롯. 면역블롯은 왼쪽에 지시된 단백질에 특이적인 항체로 탐침되었다. (E) 위쪽에 표시된 바와 같이, 대조 백터 또는 ROR1-발현 백터로 형질감염된 MCF7의 단백질 용해물의 면역블롯. 면역블롯은 왼쪽에 지시된 단백질에 특이적인 항체로 탐침되었다.

도면 2는 유방암 세포주에 의한 ROR1의 발현이 EMT의 특질 및 더욱 높은 전이 잠재력과 연관된다는 것을 보여준다. (A) 위쪽에 표시된 바와 같이, CTRL-shRNA 또는 ROR1-shRNA로 형질감염된 MDA-MB-231, HS-578T, 또는 BT549 (왼쪽에 표시된 바와 같이)의 형태학적 변화 (40x). (B) CK-19, E-카드헤린, 또는 비멘틴의 발현은 63x 배율 하에 CTRL-shRNA 또는 ROR1-shRNA로 형질감염된 MDA-MB-231 세포에서 면역형광 염색에 의해 검출되었다. (C) 대조 백터 또는 ROR1-발현 백터 (위쪽에 표시된 바와 같이)로 형질감염된 MCF7 세포의 형태학적 변화 (40x). (D) CK-19, E-카드헤린, 또는 비멘틴의 발현은 대조 백터 또는 ROR1-발현 백터로 형질감염된 MCF7 세포의 면역형광 염색에 의해 검출되었다 (63x 배율). (E) CTRL-shRNA (흑색) 또는 ROR1-shRNA (백색)로 형질감염된 MDA-MB-231, HS-578T, 또는 BT549에서 세포 이주 (왼쪽 히스토그램) 또는 침입 (오른쪽 히스토그램)에 대한 검정. 모든 데이터는 CTRL-shRNA로 형질감염된 세포의 결과에 대해 정규화되었는데, 이들은 부모 세포주에 대해 언급된 결과와 상이하지 않았다. 결과는 각 검사 군에 대한 평균 값 ( $\pm$  SEM) ( $n =$  검사 군마다 3). (F) 세포-이주 (위쪽) 또는 침입 (아래쪽)에 대한 검정에서 CTRL-shRNA-형질감염된 MDA-MB-231 (왼쪽 패널) 또는 ROR1-shRNA-형질감염된 MDA-MB-231 (오른쪽 패널)의 대표적인 현미경사진. 데이터는 평균  $\pm$  SEM으로서 도시된다; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, CTRL-shRNA 군과 비교하여.

도면 3은 ROR1 침묵이 유방 패드 이종이식 후 유방암 전이를 감소시킨다는 것을 보여준다. (A) 연구의 I기 또는 II기를 묘사하는 다이어그램. (B) I 기 동안 시간 (일)의 흐름에서 종양 체적. (C) 각 군으로부터 절제된 종양의 중량. (D) 각 군의 원발성 종양의 탈체 광전자 플럭스. (E-F) II 기 동안 각 생쥐의 생체내 (e) 폐 광전자 플럭스 또는 (f) 간 광전자 플럭스는 각 생쥐에 대한 원발성 종양 광전자 플럭스로 정규화되었다. 각 군의 정규화된 폐와 간 광전자 플럭스를 묘사하는 히스토그램. (G) 각 군의 II 기 동안 생체내 폐 광전자 플럭스. (H) 수평 막대는 각 군에 대한 21 일자에 생쥐의 평균 탈체 폐 광전자 플럭스를 지시한다 (왼쪽). 오른쪽에는 각 군으

로부터 제거된 폐의 대표적인 생물발광 이미지가 있다. (I) 히스토그램은 각 군에 대한 폐-중량-지수를 나타낸다. (J) 대표적인 H&E-염색된 폐 절편. (K) 수평 막대는 각 군에 대한 21 일자에 생쥐의 평균 탈체 간 광전자 플럭스를 지시한다 (왼쪽). 오른쪽에는 각 군의 21 일자에 제거된 간의 대표적인 생물발광-이미지가 있다. (L) 각 군에 대한 주사된 생쥐의 21 일자에 간의 대표적인 H&E-염색된 절편. 데이터는 평균 ± SEM으로서 도시된다. 데이터는 평균 ± SEM으로서 도시된다; P>0.05는 유의하지 않은 것으로 고려된다 (N.S.), \*P< 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, CTRL-shRNA 군과 비교하여.

도면 4는 ROR1 침목이 생체내에서 MDA-MB-231 세포의 실험적 폐 전이와 뼈 전이를 감소시킨다는 것을 보여준다. A)  $5 \times 10^5$  CTRL-shRNA-형질감염된 또는 ROR1-shRNA-형질감염된 세포로 i.v. 주입된 생쥐의 Kaplan-Meier 생존 곡선 (로그 순위 검증에 의해 P<0.001). (B) 주입 이후에 시간의 흐름에서 각 군의 생체내 폐 광전자 플럭스 (왼쪽). 각 군으로부터 생쥐의 대표적인 생물발광 이미지는 오른쪽에 묘사된다. (C-E) (c) 3 일자, (d) 21 일자, 그리고 (e) 28 일자에 폐의 대표적인 H&E-염색된 절편. (F) 아래쪽 히스토그램은 각 군에 대한 28 일자에 탈체 폐 GFP 광전자 플럭스를 제공한다. 28 일자에 제거된 폐의 대표적인 생물발광 이미지. (G) 28 일자에 각 군으로부터 폐-중량-지수 (아래쪽). 각 군의 폐 (위쪽)의 대표적인 사진. (H)  $1 \times 10^5$  CTRL-shRNA-형질감염된 또는 ROR1-shRNA-형질감염된 세포로 i.c. 주입된 생쥐의 Kaplan-Meier 생존 곡선 (로그 순위 검증에 의해 P = 0.0017). (I) i.c. 종양 주입 이후에 생쥐의 대표적인 생물발광 이미지. 백색 상자는 (j)에서 제공된 생물발광 데이터가 획득된 구역을 규정한다. (J) 히스토그램은 각 군의 정규화된 생체내 뼈 광전자 플럭스를 제공한다. (K) 21 일자에 각 군의 추출된 골반 뼈의 탈체 뼈 광전자 플럭스. 추출된 골반 뼈의 대표적인 생물발광 이미지는 오른쪽에 묘사된다. (L) 각 군으로부터 생쥐의 대표적인 H&E-염색된 조직학적 뼈 절편. 생쥐 카툰은 참고자료 (30)로부터 변형된다. 데이터는 평균 ± SEM으로서 도시된다 \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, CTRL-shRNA 군과 비교하여.

도면 5는 항-ROR1 항체가 생체내에서 MDA-MB-231 세포의 폐 전이를 감소시킨다는 것을 보여준다. (A) D10 mAb은 ROR1의 내재화를 유발한다. MDA-MB-231 세포는 대조-IgG-Alexa647 (적색), 또는 D10-Alexa647로 얼음 위에서 30 분 동안 염색되고, 그리고 이후, 유세포분석법에 앞서 얼음 위에서 유지되거나 (청색) 또는 1 시간 동안 37 °C로 이전되었다 (오렌지). (B) 37°C에서 1 시간 배양 전후에 D10-염색된 (녹색) MDA-MB-231 세포의 공초점 현미경검사. (C) MDA-MB-231 세포는 생존력에서 손실 없이, 플루오로크롬-표지화된, 비-교차 차단 항-ROR1로 염색에 앞서 24 시간 동안 대조 IgG (IgG) 또는 D10와 함께 또는 이것 없이 (-) 처리되었다. 처리된 세포의 평균 형광 강도 (MFI)가 도시된다 (일원 변량분석에 의해 \*\*\*P<0.001). (D) D10 또는 대조 IgG로 1, 4, 또는 24 시간 처리 전 (0 시간) 또는 후에 MDA-MB-231로부터 제조된 용해물의 비멘틴 (위쪽) 또는 β-액틴 (아래쪽)에 대해 탐침된 대표적인 면역블롯. 비멘틴 대 β-액틴 띠-강도의 비율은 하기에 제공된다. (E) 대조 IgG (IgG) 또는 항-ROR1 (ROR1)을 이용한 MDA-MB-231 세포-용해물의 면역침전물은 비멘틴 (위쪽) 또는 ROR1 (아래쪽)에 특이적인 항체로 탐침된 면역블롯 분석에 이용되었다. (F) 히스토그램은 D10 또는 대조 IgG로 1 시간 동안 전처리된 이주된 MDA-MB-231 세포의 숫자를 제공한다. (G) 왼쪽, 생체내 폐 광전자 플럭스를 묘사하는 히스토그램. 오른쪽, 폐의 대표적인 H&E-염색된 절편. (H) 그래프는 정규화된 생체내 폐 광전자 플럭스를 묘사한다. (I) IgG (위쪽) 또는 D10 (아래쪽)로 처리된 종양 주입된 생쥐의 대표적인 생물발광 이미지. (J) 히스토그램은 폐-중량-지수를 묘사한다. (K) 폐의 대표적인 H&E-염색된 절편. 데이터는 평균 ± SEM으로서 도시된다; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, IgG 군과 비교하여.

도면 6은 ROR1 항체 D10의 에피토프를 지도화하는데 이용된 키메라 구조체를 보여준다. 구조체의 밝은 부분은 생쥐이고, 그리고 더욱 어두운 부분은 인간이다.

도면 7은 D10 항체에 대한 에피토프 지도화를 묘사하는데, 이것은 생쥐 ROR1 단백질과 반응하지 않는다. 생쥐 또는 인간 ROR1 단백질은 아미노산 위치 138, 142, 또는 160에서 상이한 아미노산 잔기를 갖는다; 인간 ROR1 단백질은 이들 위치에서 아미노산 잔기 E, S, 또는 Y를 갖는 반면, 생쥐 ROR1 단백질은 아미노산 위치 138, 142, 또는 160에서 각각, 아미노산 잔기 K, T, 또는 S를 갖는다. 이들 위치에서만 생쥐 또는 인간 아미노산 잔기를 갖는 재조합 인간 ROR1 단백질이 산출되었다. 이들 재조합 단백질은 비-변성 폴리아크릴아미드 겔에서 분리되고, 그리고 이후 나일론에 이전되었는데, 이것은 D10 mAb로 탐침되었다. 이러한 도면에서 볼 수 있는 바와 같이, D10은 재조합 단백질 1, 3, 4와 7과 반응하지만, 2, 5, 또는 6과는 반응하지 않는데, 이들은 아래 범례에서 설명된다. 주목할 점은 인간 ROR1 단백질의 위치 138에서 인간 아미노산 잔기 E의 위치 138에서 생쥐 아

미노산 잔기 T로 치환이 D10 결합을 제거한다는 것이다.

도면 8은 항-인간 ROR1 항체 4A5에 대한 에피토프 지도화를 보여준다. 생쥐 또는 인간 ROR1 단백질은 아미노산 위치 88, 105, 109, 또는 111에서 상이한 아미노산 잔기를 갖는다; 인간 ROR1 단백질은 이들 위치에서 아미노산 잔기 T, L, S, 또는 I를 갖는 반면, 생쥐 ROR1 단백질은 아미노산 위치 88, 105, 109, 또는 111에서 각각, 아미노산 잔기 S, I, A, 또는 N을 갖는다. 이들 위치에서만 생쥐 또는 인간 아미노산 잔기를 갖는 재조합 인간 ROR1 단백질이 산출되었다. 이들 재조합 단백질은 비-변성 폴리아크릴아미드 겔에서 분리되고, 그리고 이후 나일론에 이전되었는데, 이것은 4A5 mAb로 탐침되었다. 이러한 도면에서 볼 수 있는 바와 같이, 4A5는 재조합 단백질 1, 2, 3, 또는 5에 결합할 수 있었지만, 4에 결합하지 못하였다. 재조합 단백질 4는 인간 ROR1 단백질에서 발견되는 아미노산 잔기 I 대신에 위치 111에서 생쥐 아미노산 잔기 N을 제외하고, 인간 ROR1 단백질이었다.

도면 9는 항-인간 ROR1 항체 D10이 유방암 세포의 전이를 저해한다는 것을 증명한다. A-B. D10 단일클론 항체는 ROR1 수용체 내재화를 용이하게 한다. C. 24 시간 항-ROR1 항체 D10 처리는 MDA-MB-231 세포에서 ROR1 표면 발현을 감소시킨다. D. ROR1은 유방암 MDA-MB-231 세포에서 비멘틴과 복합체를 형성한다. E. D10 항체 처리는 시험관내에서 비멘틴 발현을 감소시킬 수 있었다. F. 항-인간 ROR1 항체는 시험관내에서 유방암 이주를 감소시킨다. G. D10 단일클론 항체는 MDA-MB-231 유방암 초기 단계 (2 일) 폐 전이를 저해한다. H. D10 단일클론 항체는 MDA-MB-231 유방암 폐 전이를 저해한다. I. 5E5 MDA-MB-231 세포가 주입된 대표적인 생쥐는 배측 위치에서 도시된다. J. 항-인간 ROR1 항체 처리는 MDA-MB-231-보유 생쥐의 폐 중량을 감소시켰다. K. 항-ROR1 항체 처리 후 MDA-MB-231-보유 생쥐로부터 대표적인 폐 H&E 조직학. 오차 막대는 SEM을 표시한다; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; 비대칭 양쪽 스튜던트 t-검증에 기초됨.

도면 10은 mAb D10, 99451, 99961, 또는 99221에 의해 인식된 ROR1 에피토프에 대하여 산출된 높은 친화성 항체를 묘사한다. 생쥐 또는 인간 ROR1 단백질은 아미노산 위치 138, 142, 또는 160에서 상이한 아미노산 잔기를 갖는다; 인간 ROR1 단백질은 이들 위치에서 아미노산 잔기 E, S, 또는 Y를 갖는 반면, 생쥐 ROR1 단백질은 아미노산 위치 138, 142, 또는 160에서 각각, 아미노산 잔기 K, T, 또는 S를 갖는다. 이들 위치에서만 생쥐 또는 인간 아미노산 잔기를 갖는 재조합 인간 ROR1 단백질이 산출되었다. 이들 재조합 단백질은 비-변성 폴리아크릴아미드 겔에서 분리되고, 그리고 이후 나일론에 이전되었는데, 이것은 왼쪽 가장자리에 표시된 바와 같이, 3개의 mAb, 99451, 99961, 또는 99221 각각으로 탐침되었다. 이러한 도면에서 볼 수 있는 바와 같이, 이들 항체 각각은 재조합 단백질 2, 4, 5, 그리고 8와 반응하지만, 2, 3, 6, 또는 7과는 반응하지 않는데, 이들은 아래 범례에서 설명된다. 주목할 점은 인간 ROR1 단백질의 위치 138에서 인간 아미노산 잔기 E의 위치 138에서 생쥐 아미노산 잔기 T로 치환이 99451, 99961, 또는 99221의 결합을 제거한다는 것이다.

도면 11은 야생형 또는 재조합 ROR1 단백질에 대한 항체 D10 또는 99961의 결합 활성을 묘사한다. 인간 또는 키메라 ROR1 단백질을 인코딩하는 벡터는 293 세포 내로 형질감염되었다. 이것은 재조합 인간-생쥐 키메라 ROR1 단백질의 생산을 허용하였는데, 이것은 이후, 상이한 항-ROR1 mAb로 면역블롯 분석을 위해 비-변성 PAGE 겔 (오른쪽) 또는 SDS-PAGE 겔 (왼쪽)에서 크기 분리될 수 있었다. 이들 결과는 D10과 99961 항체 둘 모두 Ig-유사 도메인의 C-말단에서 동일한 영역에 결합하고, 그리고 D10과 99961이 변성된 조건과 선천적 조건 둘 모두 하에 ROR1에 결합할 수 있다는 것을 지시한다. 주목할 점은 D10과 99961이 13을 제외하고 모든 재조합 단백질에 결합한다는 것이다. #13 키메라 단백질은 도면 6에서 설명된 바와 같다. 전체 인간 세포와 도메인은 어느 한쪽 겔의 왼쪽 끝 레인에서 제공된다.

도면 12는 항-인간 ROR1 항체 99961의 특성화를 보여준다. A, B. 99961 항체는 유전자도입 생쥐에서 CLL 이식을 차단할 수 있었다. C. 99961 항체는 D10 항체보다 대략 50x 큰 결합 친화성을 갖는다.

도면 13은 인간 제대혈 재구성된 면역 결합성 생쥐에서 CLL 세포에 대항하여 99961의 비활성도를 보여준다. A. 99961 항체는 CLL 세포의 >90%를 제거한다. B, C. 99961 항체는 정상적인 B 또는 T 세포 발달에 대한 효과가 없다.

도면 14는 ROR+ 원발성 AML에서 99961의 비활성도를 보여준다.

도면 15는 99961에 의해 인식된 에피토프가 정상적인 조혈 줄기 또는 선조체 세포에 의해 발현되지 않는다는 것을 보여준다.

도면 16은 99961이 정상적인 성체 조직과 교차 반응하지 않는다는 것을 보여준다.

도면 17은 면역 결합성 생쥐에서 99961에 대한 PK 연구를 보여준다.

도면 18은 ROR1 웨티드 백신의 설계를 예시한다. 3개의 상이한 항체 에피토프가 웨티드 A19, R22와 K19를 만드는데 이용되었다. 인간 (위쪽) 또는 생쥐 (아래쪽) ROR1에 상응하는 막대 위에, A19, R22, 또는 K19로 표지화된 막대가 있다. 이들 막대는 ROR1 세포의 도메인 내에 이를 웨티드, A19, R22, 또는 K19의 위치를 설명한다.

도면 19는 KLH를 웨티드에 접합하는데 이용된 방법을 보여준다.

도면 20은 웨티드 R22의 웨티드 설계를 보여준다. KLH에 접합하는데 이용되는 웨티드의 C-말단에 하나의 시스테인이 첨가되었다.

도면 21은 D10과 99961은 R22 웨티드에 결합하는 반면, 4A5는 그렇지 못하다는 것을 보여준다.

도면 22는 BALB/c 생쥐의 R22 면역화를 위한 면역화 계획을 보여준다.

도면 23은 R22 유도된 ROR1 항체가 ROR1에서 결합하는 에피토프의 면역블롯 분석을 보여준다.

도면 24는 C57BL/6 생쥐에서 R22-KLH에 대한 면역화 계획을 보여준다.

도면 25는 4°C 또는 37°C에서 1 시간 동안 항-R22-KLH 항혈청과 함께 배양되고, 그리고 이후 ROR1 발현의 FACS 분석에 앞서 열음 위에서 30 분 동안 아이소타입-대조-Alexa647-라벨 항체, 또는 4A5-Alexa647 접합체로 대비염색된 ROR1-양성 MDA-MB-231 유방암 세포의 FACS 분석을 보여준다. 이들 결과는 유전자도입 생쥐로부터 항-ROR1 혈청이 37°C에서 ROR1 수용체 내재화를 유도하지만, 4°C에서는 그렇지 못하다는 것을 보여주었다.

도면 26은 R22-KLH로 면역화된 유전자도입 생쥐로부터 항-ROR1 혈청이 시험관내에서 유방암 이주를 저해한다는 것을 보여준다.

도면 27은 C57BL/6 생쥐에서 R-22-KLH에 대한 면역화 계획을 보여준다.

도면 28은 도면 18에서 설명된 3개의 웨티드 중에서 임의의 하나의 KLH 접합체로 면역화된 생쥐의 항혈청의 적정 곡선을 보여준다. ELISA를 통해 사정될 때 인간 ROR1 단백질로 코팅된 폴리스티렌 평판에 항혈청 결합이 묘사된다.

도면 29는 EW36, JeKo-1, 또는 CLL 세포의 FACS 분석을 보여준다. 본 연구를 위해, R22-KLH로 면역화된 생쥐로부터 항혈청의 희석은 4°C에서 20 분 동안 이들 세포와 함께 배양되었다. 이들 세포는 이후 세척되고, 그리고 이후 유세포분석법에 의한 검출을 위해 플루오로크롬과 접합된 염소 항-생쥐 Ig로 표지화되었다. 개방성 히스토그램은 세포를 R22-KLH 항혈청과 함께 먼저 배양하지 않으면서 염소 항-생쥐 Ig로 염색된 세포이다. 음영된 히스토그램은 항-R22-KLH 항혈청과 함께 먼저 배양된 세포의 형광이다. 이들 세포의 형광에서 증가는 표면에 결합된 생쥐 항-ROR1 항체에 기인하고, 이들은 이후, 염소 항-생쥐 Ig로 검출되었다. 이들 생쥐의 전-면역화 항혈청 또는 KLH로 면역화된 생쥐의 항혈청은 이들 세포에 결합하지 않았다.

도면 30 - 범례에서 표시된 세포는 세척되고, 그리고 둥근 바닥 96-웰 평판 (Corning Costar) 내에 RPMI/10% FBS에서 웰마다  $5 \times 10^5$  세포로  $25 \mu l$ 에서 도말되었다. 희석된 항혈청 ( $25 \mu l$ ) 및 아기 토끼 보체의  $25 \mu l$ 의 1:5 희석액이 웰마다 첨가되었다. D10 mAb는 양성 대조로서 이용되었다. 모든 조건은 삼중으로 수행되었다. 평판은 37°C에서 4 시간 동안 배양되었고, 그리고 세포는 DiOC6/PI 염색 및 유세포 계측 분석에 의해 생존력에 대해 즉시 정량되었다. 본 연구는 D10 또는 R22-KLH 웨티드에 대하여 산출된 항혈청이 인간 ROR1을 보유하는 세포의 보체-매개된 용해를 주도할 수 있었다는 것을 지시한다. ROR1을 보유하지 않는 세포는 사멸되지 않았다 (제시되지 않음).

도면 31은 C57BL/6 생쥐에 대한 첫 번째 R22-KLH 면역화 계획을 보여준다. 이러한 웨티드는 키홀 립펫 혈모시아닌 (KLH)과 접합되고, 그리고 이후 상기 예시된 계획에 따라 C57BL/6 생쥐를 면역화시키는데 이용되었다. KLH 또는 R22-KLH의 첫 번째 주사는 완전한 프로인드 어쥬번트 (CFA)에 있었다. 두 번째 및 차후 주사는 불완전 프로인드 어쥬번트 (IFA)에 있었다. 이를 동물은 자주색 화살표로 표시된 일자에 채혈되었다. 첫 번째 주사의 일자 후 44 일에, C57BL/6 생쥐는 또한 B-세포 특정한 프로모터/인핸서 (E-C  $\mu$ )의 제어 하에, T-세포-백혈병 1 (TCL1 유전자)에 대해 또한 유전자도입된 인간 ROR1-유전자도입 C57BL/6 생쥐에서 기원된 인간-ROR1-발현 CLL로 공격되었다. 이러한 백혈병은 인간 CLL과 유사하고 인간 표면 ROR1을 발현한다.

도면 32는 R22-KLH로 면역화의 결과를 보여준다. A. R22-KLH로 면역화된 생쥐와 대비하여 KLH로 면역화된 생쥐로부터 대표적인 비장. B. C57BL/6 생쥐에서 ROR1 웨티드 R22-KLH로 면역화에 의한 ROR1+ CLL의 이식의 저해.

도면 33은 C57BL/6 생쥐에서 R22-KLH에 대한 두 번째 면역화 계획을 보여준다.

도면 34는 R22 펩티드로 면역화의 결과를 보여준다. A. KLH로 면역화된 생쥐 및 R22-KLH로 면역화된 생쥐로부터 비장. B. C57BL/6 생쥐에서 R22-KLH로 면역화 이후에 ROR1+ CLL의 이식의 저해.

도면 35는 B220 (y-축) 또는 ROR1 (x-축)에 특이적인 플루오로크롬-접합된 mAb를 이용하여, KLH (위쪽 열) 또는 R22-KLH (아래쪽 열)로 면역화된 C57BL/6 생쥐로부터 비장세포의 FACS 분석이다. 이들 세포를 염색하는데 이용된 mAb는 R22-KLH에 의해 유도된 항체보다 ROR1의 비-교차 차단 애피토프에 결합한다. 상자는 백혈병 세포가 검출되는 구역의 윤곽을 그린다. 주목할 점은 R22-KLH 백신으로 면역화된 생쥐의 비장에서 있다 하더라도 훨씬 적은 백혈병 세포가 존재한다는 것이다.

도면 36은 ROR1+ CLL 세포에서 ROR1의 FACS 분석인데, 이것은 ROR1이 C57BL/6 생쥐에서 R22-KLH로 면역화 후 하향조정된다는 것을 지시한다.

도면 37은 KLH 또는 R22-KLH로 면역화된 생쥐에서 존재하는 CD8+ T 세포의 FACS 분석이다. A. R22로 면역화는 CD8+ T 세포의 숫자에서 증가를 유발하는데, 이것은 KLH로 면역화된 생쥐에서 부재하였다. 아래쪽 패널은 KLH, 또는 R22-KLH로 75 일 전에 최초 면역화된 생쥐의 비장으로부터 CD8 + T 세포의 백분율을 보여준다.

도면 38은 ROR1 유전자도입 생쥐의 R22-KLH 면역화를 위한 면역화 계획을 보여준다.

도면 39는 ROR1-Tg 생쥐에서 ROR1 펩티드 R22로 면역화에 의한 ROR+ CLL 이식의 저해의 FACS 분석이다.

도면 40은 ROR1 유전자도입 생쥐에서 R22-KLH로 면역화의 결과를 보여준다. ROR1+ CLL는 ROR1 유전자도입 생쥐에서 R22-KLH로 면역화 이후에 저해되었다.

도면 41은 ROR1+ CLL 세포에서 ROR1의 FACS 분석인데, 이것은 ROR1이 ROR1 유전자도입 생쥐에서 R22-KLH로 면역화 후 하향조정된다는 것을 지시한다.

도면 42는 KLH 또는 R22-KLH로 면역화된 ROR1-Tg 생쥐에서 존재하는 CD3+ T 림프구의 FACS 분석이다. 패널 A는 R22-KLH로 면역화가 T 림프구의 증식을 유발한다는 것을 보여준다. 패널 B는 75 일자에 생쥐의 비장으로부터 수확된 CD3+ T 림프구의 백분율을 보여준다.

도면 43은 KLH 또는 R22-KLH로 면역화된 생쥐에서 존재하는 CD4+ T 세포의 FACS 분석이다. 패널 A는 R22-KLH로 면역화가 CD4+ T 세포의 숫자에서 증가를 유발한다는 것을 보여주는데, 이것은 KLH로 면역화된 생쥐에서 검출되지 않았다. 패널 B는 75 일자에 생쥐의 비장으로부터 수확된 CD4 + T 세포의 백분율을 보여준다.

도면 44는 KLH 또는 R22-KLH로 면역화된 생쥐에서 존재하는 CD8+ T 세포의 FACS 분석이다. 패널 A는 R22-KLH로 면역화가 CD8+ T 세포의 숫자에서 증가를 유발한다는 것을 보여주는데, 이것은 KLH로 면역화된 생쥐에서 검출되지 않았다. 패널 B는 75 일자에 생쥐의 비장으로부터 수확된 CD8 + T 세포의 백분율을 보여준다.

도면 45는 유방암에서 ROR1의 높은-수준 발현이 더욱 짧은 폐, 뼈 및 뇌 전이없는 생존과 연관된다는 것을 보여준다. 그래프는 PubMed GEO 데이터베이스 (GSE2603, GSE5327, GSE2034, 그리고 GSE12276)를 통해 사용한 공개된 데이터로부터 유래되었다. Kaplan-Meier 곡선은 (A) 폐 전이없는 생존, (B) 뼈 전이없는 생존, 또는 (C) 뇌 전이없는 생존에 대한 ROR1 발현의 예측적 충격을 묘사한다. 각 분석을 위해, 582 사례가 삼분위로 격리되었는데, ROR1H로 지정된 군은 가장 높은 수준의 ROR1 mRNA를 갖는 종양을 앓는 1/3의 환자를 나타내고, 그리고 ROR1L로 지정된 군은 가장 낮은 수준의 ROR1 mRNA를 갖는 암을 앓는 1/3의 환자를 나타낸다. ROR1 mRNA의 중간 발현을 갖는 종양을 앓는 1/3의 환자는 ROR1M으로서 지정되었다. 전이없는 생존은 Kaplan-Meier 분석에 의해 결정되었고, 그리고 통계학적 차이는 로그 순위 검증에 의해 결정되었다. 각 범주에서 환자의 숫자, 전체 전이성 이벤트, 그리고 상응하는 P 값 (카이제곱 검증)은 포함된 표에서 도시된다.

도면 46은 유방암에서 ROR1의 높은-수준 발현이 더욱 짧은 전이없는 생존과 연관되고, 그리고 그들의 ER, PR 및 HER2 상태로부터 독립된다는 것을 보여준다. 유방 선암종을 앓는 582명 환자의 코호트가 생존 분석에서 포함되었다. (A) ERNeg ( $n = 242$ ) 및 ER+ ( $n = 325$ ) 유방암 환자 (왼쪽 패널), PRNeg ( $n = 274$ ) 및 PR+ ( $n = 271$ ) 유방암 환자 (중심 패널), 그리고 HER2Neg ( $n = 404$ ) 및 HER2+ ( $n = 106$ ) 유방암 환자 (오른쪽 패널)의 악성 세포의 ROR1 mRNA 발현의 수준의 비교. 결과는 평균  $\pm$  SEM이다. p 값은 스튜던트 t-검증에 의해 결정되었다. (B) 전반적인-전이없는 생존에 대한 ER 상태의 예측적 충격 (로그 순위 검증에 의해  $P = 0.13$ ). (C) 전반적인-전이없는 생존에 대한 ER 상태 및 ROR1 mRNA 발현의 예측적 충격 (로그 순위 검증에 의해  $P < 0.0001$ ). (D) 전반적인-전이없는 생존에서 PR 상태 (로그 순위 검증에 의해  $P = 0.0007$ ). (E) 전반적인 전이없는 생존에 대한 PR 상태 및 ROR1 mRNA 발현의 예측적 충격 (로그 순위 검증에 의해  $P < 0.0001$ ). (F) 전반적인-전이없는 생존에서 HER2 상태 (로그 순위 검증에 의해  $P = 0.16$ ). (G) 전반적인 전이없는 생존에 대한 HER2 상태 및 ROR1 mRNA 발

현의 예측적 충격 (로그 순위 검증에 의해  $P < 0.0001$ ).

도면 47은 유방암 세포주에 의한 ROR1의 발현이 EMT의 특질과 연관된다는 것을 보여준다. (A) CTRL-shRNA 또는 ROR1-shRNA로 형질감염된 MDA-MB-231로부터 용해물의 면역불亂은 왼쪽에 표시된 바와 같이, ROR1 (위쪽) 또는  $\beta$ -액틴 (아래쪽)에 특이적인 항체로 탐침되었다. (B) 삼중 표본에서 qRT-PCR을 통해 검출될 때, VIM 및 KRT19의 평균량 ( $\pm$  SEM). 데이터는 평균  $\pm$  SEM으로서 도시된다; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , CTRL-shRNA 군과 비교하여.

도면 48은 ROR1을 침묵시키는 것이 CXCR4의 발현을 감소시킨다는 것을 보여준다. (A) 히스토그램은 각 히스토그램의 아래쪽에 표시된 바와 같이, CTRL-shRNA2 또는 ROR1-shRNA2로 형질감염된 MDA-MB-231의 삼중 표본에서 qRT-PCR을 통해 검출된 CXCR4 mRNA의 양을 지시한다. (B) 각각 항-CXCR4-APC mAb 또는 아이소타입-대조 mAb (음영된 히스토그램)로 염색된 ROR1-shRNA2 (녹색선을 갖는 개방성 히스토그램) 또는 CTRL-shRNA2 (청색선을 갖는 개방성 히스토그램) 형질도입된 MDA-MB-231 세포의 대표적인 유세포분석법 형광 히스토그램. (C) 세포는 아래쪽 챔버에 200 ng/ml의 최종 농도로 첨가된 CXCL12에 대한 화학주성을 조사하기 위해, BD Matrigel™ 없이 트랜스웰의 위쪽 챔버 내로 과종되었다. 37°C에서 6 시간 동안 이주된 세포는 10x 배율 하에 계수되었다. 이를 히스토그램은 각각, 히스토그램의 아래쪽에 표시된 바와 같이 CNTL-shRNA 또는 ROR1-shRNA로 형질감염된 MDA-MB-231 세포로 과종된 3개의 챔버 각각에서 이주된 세포의 숫자를 제공한다. 결과는 3가지 독립된 실험을 대표한다. 데이터는 평균  $\pm$  SEM으로서 도시된다; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , CTRL-shRNA 군과 비교하여.

도면 49는 ROR1을 침묵시키는 것이 EMT 유전자 발현을 조절한다는 것을 보여준다. 히스토그램은 CTRL-siRNA 또는 ROR1-siRNA로 형질감염된 MDA-MB-231(A), HS578T(B), 그리고 BT549(C)의 삼중 표본에서 qRT-PCR을 통해 검출된, 각 히스토그램의 아래쪽에 표시된 바와 같이 다양한 유전자의 상대적 mRNA 양을 지시한다. 결과는 2가지 독립된 실험을 대표한다. 데이터는 평균  $\pm$  SEM으로서 도시된다; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , CTRL-siRNA 군과 비교하여.

도면 50은 ROR1을 침묵시키는 것이 주입의 부위에서 정위 이종이식편의 중간 후기-성장 저해, 하지만 실험적 폐전이의 강한 저해를 유발한다는 것을 보여준다. (A) RAG-/-γc-/- 생쥐는 CTRL-shRNA-형질감염된 또는 ROR1-shRNA-형질감염된 MDA-MB-231의 피하 (s.c.) 또는 정맥내 (i.v.) 주입이 제공되었다. 각 생쥐의 주입된 유방 지방체에서 원발성 종양 또는 폐의 생물발광 광전자 플러스는 종양의 주입 이후에 첫 번째 계량에 대해 검출된 광전자 플러스에 대하여 정규화되었다 (100은 초기 계량의 일자에 검출된 광전자 플러스의 100%를 나타낸다) (위쪽 패널). 위쪽 3개의 그래프는  $1 \times 10^6$  (왼쪽),  $5 \times 10^5$  (중심), 또는  $2.5 \times 10^5$  (오른쪽) 표시된 세포의 s.c. 주입이 제공된 생쥐의 유방 지방체의 정규화된 생물발광 광전자 플러스를 묘사한다. 아래쪽 그래프는  $1 \times 10^6$  (왼쪽),  $5 \times 10^5$  (중심), 또는  $2.5 \times 10^5$  (오른쪽) 표시된 세포의 i.v. 주입이 제공된 생쥐의 폐의 정규화된 생물발광 광전자 플러스를 제공한다. (주의: 아래쪽 왼쪽 그래프는  $1 \times 10^6$  표시된 세포의 i.v. 주입이 제공된 생쥐의 폐의 실제 평균 생물발광 광전자 플러스를 묘사한다. (B) 히스토그램은 CTRL-shRNA-형질감염된 (흑색) 또는 ROR1-shRNA-형질감염된 MDA-MB-231 (회색) 또는 세포 없음 (백색)이 i.v. 주입된 21 일자에 각 군의 생쥐 ( $n=5-8$ )에 대한 폐-중량-지수를 묘사한다. P 값은 일원 변량분석에 의해 결정되었다. (C) 21 일자에 각 군으로부터 생쥐의 대표적인 폐의 H&E-염색된 절편. 데이터는 평균  $\pm$  SEM으로서 도시된다; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , CTRL-shRNA 군과 비교하여.

도면 51은 실험적 전이성 초점의 면역조직화학을 보여준다. RAG-/-γc-/- 생쥐는  $5 \times 10^5$  CTRL-shRNA-형질감염된 MDA-MB-231 (위쪽 패널) 또는 ROR1-shRNA-형질감염된 MDA-MB-231 (아래쪽 패널)의 정맥내 (i.v.) 주입이 제공되었다. (A) 폐의 절편은 21 일자에 안락사된 동물로부터 제조되었다. ROR1-shRNA-형질감염된 세포가 주입된 생쥐의 폐는 극소수의 전이성 초점을 가졌는데, 이들은 면역조직화학 분석을 위해 확인되었다. 절편은 Ki67+, CK-19, 또는 비멘틴에 특이적인 mAb, 또는 말단 데옥시뉴클레오티딜 전달효소 dUTP 틈 단부 표지화 (Tunne1)로 염색되었다. (40x 배율). (B) (a)에서처럼 폐의 절편은 포스포-AKT (위쪽 패널) 또는 포스포-CREB (오른쪽 패널)에 특이적인 mAb로 염색되었다 (40x 배율).

도면 52는 ROR1을 침묵시키는 것이 MDA-MB-231 유래된 세포주 LM2-4175 및 BoM-1833의 폐 전이와 뼈 전이를 생체내에서 감소시킨다는 것을 보여준다. (A) LM2-4175 세포가 폐로 우선적으로 전이하고, 그리고 BoM-1833 세포

가 뼈로 우선적으로 전이한다는 것을 보여주는 계통도. LM2-4175 및 BoM-1833에서 ROR1 발현을 보여주는 유세포 분석법 분석. 생쥐 카툰은 참고문헌 (Cancer Cell, 2009;1:67-78)으로부터 변형된다 (B-C). ROR1-shRNA2를 이용하여, LM2-4175 및 BoM-1833에서 ROR1 침묵 효율을 보여주는 유세포분석법 분석. (D) 생쥐는 2x105 CTRL-shRNA-형질감염된 또는 ROR1-shRNA-형질감염된 LM2-4175 세포의 i.v. 주입이 각각 제공되었다. 왼쪽, 각 군의 대표적인 생물발광 이미지; 오른쪽, 각 군의 정규화된 생체내 폐 광전자 플럭스. (E) 2x105 표시된 LM2-4175 세포가 i.v. 주입된 생쥐의 Kaplan-Meier 생존 곡선 (로그 순위 검증에 의해  $P < 0.0001$ ). (F) 21 일자에 각 군의 폐-중량-지수 (아래쪽). 각 군의 폐의 대표적인 사진 (위쪽). (G) 21 일자에 각 군의 탈체 폐 GFP 광전자 플럭스 (아래쪽). 각 군의 뼈의 대표적인 사진 (위쪽). (H) 21 일자에 폐의 대표적인 H&E-염색된 조직학적 절편. (I) 생쥐는 1x105 CTRL-shRNA-형질감염된 또는 ROR1-shRNA-형질감염된 BoM-1833 세포의 i.c. 주입이 각각 제공되었다. 위쪽, 각 군의 대표적인 생물발광 이미지; 아래쪽, 각 군의 정규화된 생체내 뼈 광전자 플럭스. (J) 21 일자에 대표적인 뼈 탈체 광전자 플럭스 및 뼈의 H&E-염색된 조직학적 절편. (K) 21 일자에 대표적인 간 탈체 광전자 플럭스 및 간의 H&E-염색된 조직학적 절편. 데이터는 평균  $\pm$  SEM으로서 도시된다; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , CTRL-shRNA 군과 비교하여.

도면 53은 ROR1을 침묵시키는 것이 HS-578T 및 BT549의 이주를 시험관내에서 저해한다는 것을 보여준다. 데이터는 평균  $\pm$  SEM으로서 도시된다; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 대조 IgG로 처리된 세포와 비교하여.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033]

#### 발명의 상세한 설명

[0034]

본 발명은 항-ROR1 항체 또는 이들의 항원 결합 단편, ROR1 항체 면역접합체, ROR1 웨პ티드 백신 또는 ROR1 결합 웨პ티드를 이용하여 전이를 저해하는 조성물과 방법의 중요한 발견에 관계한다.

[0035]

본 발명의 조성물과 방법을 설명하기에 앞서, 본 발명은 설명된 특정 조성물, 방법과 실험 조건에 한정되지 않는 것으로 이해되는데, 그 이유는 이런 조성물, 방법과 조건이 변할 수 있기 때문이다. 또한, 본원에서 이용된 용어는 단지 특정 구체예를 설명하는 것을 목적으로 하고 제한하는 것으로 의도되지 않는 것으로 이해되는데, 그 이유는 본 발명의 범위가 첨부된 특허청구범위에 의해서만 한정될 것이기 때문이다.

[0036]

본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서 이용된 바와 같이, 단수 형태 ("a", "an" 및 "the")는 문맥에서 달리 지시되지 않으면, 복수 지시대상을 포함한다. 따라서, 예로서, "방법"에 대한 언급은 본 개시 등등을 읽어본 후 당업자에게 명백해지는, 본원에서 설명된 유형의 하나 또는 그 이상의 방법, 및/또는 단계를 포함한다.

[0037]

달리 정의되지 않으면, 본원에서 이용된 모든 기술 용어와 과학 용어는 본 발명이 속하는 당해 분야의 평균적 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 비록 본원에서 설명된 것들과 유사하거나 동등한 임의의 방법과 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에 이용될 수 있지만, 바람직한 방법과 재료가 하기에 설명된다.

[0038]

ROR1

[0039]

출원인은 무수한 암 세포주와 표본에서 전장 ROR1의 발현을 이전에 발견하였지만, 비-백혈병 환자 또는 정상적인 성체 공여자의 혈액 또는 비장 림프구를 비롯한 다른 조직에서는 발견하지 못하였고, 그리고 또한 전장 인간 ROR1에 대한 생쥐 항혈청을 산출하였다. Fukuda et al., Blood: ASH Annual Meeting Abstracts 2004 104, Abstract 772 (2004) (본원에서 전체적으로 참조로서 편입됨). ROR1에 대한 폴리웨პ티드 및 코딩 서열은 다른 곳에서 보고되었고, 그리고 이러한 참고문헌에 의해 본원에서 또한 통합된다 (가령, 수탁 번호 NP\_005003.1 및 NM\_005012.1을 참조한다). Wnt5a 단백질을 발현하는 암 세포, 예를 들면, CLL 세포는 ROR1에 결합할 뿐만 아니라 결과로서 부여된 생존 이점을 갖는다. 본 발명은 이런 이유로, 암 세포에서 ROR1 발현의 특이성을 활용하여 암을 치료하거나 예방하는 수단을 제공한다.

[0040]

ROR1 발현은 아폽토시스에 대한 저항을 증강하는 암 세포 성장을 증진하는 것으로 밝혀졌다. 실시예에 나타나 있는 바와 같이, ROR1의 발현은 상피-배엽간 전이 (EMT)와 연관하고, 이것은 배아형성 및 암 전이 동안 일어난다. ROR1의 높은-수준 발현은 유방 선암종을 앓는 환자에서 재발과 전이의 증강된 속도와 연관한다. 전이-경향성 유방-암 세포주에서 ROR1을 침묵시키는 것은 EMT-연관된 단백질 (가령, 비멘틴, Snail-1/2, 그리고 ZEB)의 발현을 약화시키고, 상피 시토케라틴 및 밀착 결합 단백질 (가령, CK-19 및 ZO-1)의 발현을 증강시키고, 그리고 이들의 이주/침입 능력과 전이 잠재력을 손상시켰다. ROR1에 특이적인 mAb인 D10으로 MDA-MB-231의 처리는 비멘

틴 (이것은 ROR1과 연관한다)을 하향조정하여 암-세포 이주를 저해한다. MDA-MB-231로 이식된 면역 결합성 생쥐에 D10의 투여는 종양 전이를 유의미하게 저해한다.

#### [0041] 항체

일정한 구체예는 인간 ROR1 단백질에 대한 면역펩티드를 포함한다. 본원에서 설명된 면역글로불린 펩티드, 또는 항체는 ROR1 단백질에 결합하는 것으로 도시된다. ROR1 결합 활성을 특이적이다; ROR1에 항체의 관찰된 결합은 비특이적 시약에 의해 실제적으로 차단되지 않는다. 이들 ROR1 특이적 항체는 ROR1 세포 및 정상적인 세포를 식별하는데 이용될 수 있다. ROR1 특이적 항체는 ROR-1 암에 대한 요법 후 반응을 결정하고 전이를 저해하기 위해, ROR1 암에 대항하는 면역요법에서 이용될 수 있다. 이런 면역펩티드는 당분야에 공지된 다양한 수단에서 마련될 수 있다.

[0043] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 항체는 모든 유형의 항체 및 항체 단편, 예를 들면, 다중클론, 단일클론, 그리고 과지 전시 방법에 의해 생산될 것들을 포괄한다. 특히 본 발명의 바람직한 항체는 ROR1에 대한 상대적으로 높은 정도의 친화성을 갖는 항체이다. 일정한 구체예에서, 이들 항체는 ROR1에 대한 약  $Kd < 10^{-8}$  M의 친화성을 전시한다.

[0044] "실제적으로 정제된"은 일반적으로, 항체가 비-정제된, 예를 들면, 선천적 상태 또는 환경에서 연관되는 다른 세포 성분이 본질적으로 없는 조성물을 지칭한다. 정제된 항체는 일반적으로 동질 상태에 있고, 하지만 건조한 상태에 있거나 또는 수용액에 있을 수 있다. 순도 및 균질성은 분석화학 기술, 예를 들면, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 전형적으로 결정된다.

[0045] 실제적으로 정제된 ROR-1-특이적 항체는 제약학적 담체, 부형제, 어쥬번트, 완충액, 흡수 증강제, 안정제, 보존제, 어쥬번트 또는 다른 보조 성분과 함께 항체의 혼합 또는 제제에 앞서 제조물에서 존재하는 모든 고분자 중의 80% 이상을 통상적으로 포함할 것이다. 더욱 전형적으로, 항체는 정제된 제조물에서 존재하는 모든 단백질의 90% 이상을 나타내도록 정제된다. 특정한 구체예에서, 항체는 95%보다 큰 순도로 정제되거나 또는 다른 고분자 종류가 전통적인 기술에 의해 검출되지 않는 본질적으로 동질성일 수 있다.

[0046] 면역글로불린 펩티드는 예로서, 다중클론 항체, 단일클론 항체, 그리고 항체 단편을 포함한다. 다음은 실시예에서 이용된 것들에 기능적으로 동등한 유사한 친화성과 특이성을 갖는 다른 적합한 면역글로불린 펩티드를 만들기 위해 당업자에 의해 이용될 수 있는 방법을 통한, 면역글로불린 펩티드, 구체적으로 ROR1 항체의 산출을 설명한다.

#### [0047] 다중클론 항체

[0048] 다중클론 항체는 다양한 온혈 동물, 예를 들면, 말, 소, 다양한 가금, 토끼, 생쥐, 또는 쥐로부터 당업자에 의해 쉽게 산출될 수 있다. 간단히 말하면, ROR1 항원은 어쥬번트, 예를 들면, 프로인드 완전한 또는 불완전 어쥬번트로 복강내, 근육내, 안구내, 또는 피하 주사를 통해 동물을 면역화시키는데 활용된다. 여러 부스터 면역화 이후에, 혈청의 표본이 수집되고 ROR1에 대한 반응성에 대해 조사된다. 특히 바람직한 다중클론 항혈청은 배경 보다 최소한 3배 큰, 이들 검정 중에서 한 가지에서 신호를 제공할 것이다. 일단 동물의 역가가 ROR1에 대한 반응성의 면에서 고원부에 도달하면, 더욱 대량의 항혈청이 주 1회 출혈에 의해, 또는 동물을 방혈함으로써 쉽게 획득될 수 있다.

#### [0049] 단일클론 항체

[0050] 단일클론 항체 (mAb) 기술은 ROR1에 대한 mAb를 획득하는데 이용될 수 있다. 간단히 말하면, 하이브리도마는 인간 ROR1 항원으로 면역화된 생쥐로부터 비장 세포를 이용하여 생산된다. 각 면역화된 생쥐의 비장 세포는 예로서, Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol., 73:3-46 (1981)의 폴리에틸렌 글리콜 융합 방법을 이용하여, 생쥐 골수종 Sp 2/0 세포와 융합된다. 하이브리도마의 성장, HAT 배지에서 선별, 항원에 대항하는 클론의 클로닝과 스크리닝은 표준 방법 (Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol., 73:3-46 (1981))을 이용하여 수행된다.

[0051] HAT-선별된 클론은 Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol., 73:3-46 (1981)에 의해 설명된 바와 같이 복수에서 대량의 mAb를 생산하기 위해 생쥐 내로 주사되고, 이들은 단백질 A 칼럼 크로마토그래피 (BioRad, Hercules, Calif.)를 이용하여 정제될 수 있다. mAb는 그들의 (a) ROR-1에 대한 특이성, (b) 높은 결합 친화성, (c) 아이소타입, 그리고 (d) 안정성에 기초하여 선별된다.

- [0052] mAb는 웨스턴 블로팅 (Koren, E. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 876:91-100 (1986)) 및 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA) (Koren, E. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 876:91-100 (1986))을 비롯한 다양한 표준 기술 중에서 한 가지를 이용하여, 스크리닝되거나 또는 ROR1 특이성에 대해 조사될 수 있다.
- [0053] 인간화 항체
- [0054] 생쥐 항체의 인간화 형태는 비-인간 항체의 CDR 영역을 재조합 DNA 기술에 의해 인간 불변 영역에 연결함으로써 산출될 수 있다 (가령, 각각 참조로서 편입된 Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033, 1989 및 WO 90/07861을 참조한다). 인간 항체는 파지 전시 방법을 이용하여 획득될 수 있다 (가령, Dower et al., WO 91/17271; McCafferty et al., WO 92/01047을 참조한다). 이들 방법에서, 파지의 라이브러리가 생산되는데, 여기서 구성원은 그들의 외측 표면 상에서 상이한 항체를 전시한다. 항체는 통상적으로, Fv 또는 Fab 단편으로서 전시된다. 원하는 특이성을 갖는 파지 전시 항체는 친화성 농축에 의해 선별될 수 있다.
- [0055] 항체 단편
- [0056] 특정 적용을 위한 mAb의 기능적 단편을 생산하고 이용하는 것이 바람직할 수 있다. 전형적인 IgG 분자의 널리 공지된 염기성 구조는 2개의 동일한 가벼운 폴리펩티드 사슬 (약 220개 아미노산을 내포) 및 2개의 동일한 무거운 폴리펩티드 사슬 (약 440개 아미노산을 내포)로 구성되는 대략 150,000 내지 200,000 달톤의 대칭적인 사합체성 Y-모양 분자이다. 중쇄는 최소한 하나의 이황화 결합을 통해 서로에 연결된다. 각 경쇄는 이황화 연쇄에 의해 인접한 중쇄에 연결된다. 항원 결합 부위 또는 도메인은 Y-모양 항체 분자의 각 팔에 위치되고, 그리고 이황화 연결된 경쇄와 중쇄의 각 쌍의 아미노 말단 영역 사이에 형성된다. 경쇄와 중쇄의 이들 아미노 말단 영역은 대략 그들의 첫 번째 110개 아미노 말단 아미노산으로 구성되고, 그리고 경쇄와 중쇄의 가변 영역으로 알려져 있다.
- [0057] 이에 더하여, 경쇄와 중쇄의 가변 영역 내에, 상보성 결정 영역 (CDRs)으로 알려져 있는 아미노산 서열의 스트레치를 내포하는 조가변 영역이 있다. CDR은 에피토프로 불리는 항원 분자 상에 한 특정 부위에 대한 항체의 특이성을 책임진다. 따라서, 전형적인 IgG 분자는 각 항원 결합 부위가 각 항원 분자의 특정한 에피토프에 결합할 수 있기 때문에 2개의 항원 분자에 결합할 수 있다는 점에서, 이가이다. 경쇄와 중쇄의 카르복시 말단 영역은 다른 항체 분자의 것들과 유사하거나 동일하고 불변 영역으로 불린다. 특정 항체의 중쇄의 불변 영역의 아미노산 서열은 항체의 부류가 무엇인지, 예를 들면, IgG, IgD, IgE, IgA 또는 IgM인지를 규정한다. 항체의 일부 부류는 다가 항원-결합 배열에서 서로와 연관된 2개 또는 그 이상의 동일한 항체를 내포한다.
- [0058] ROR-1에 결합하는 mAb의 Fab와  $F(ab')_2$  단편이 전체 mAb 대신에 이용될 수 있다. Fab와  $F(ab')_2$  단편이 무손상 항체 분자보다 작기 때문에, 전체 항체 분자가 이용될 때보다 더욱 많은 항원-결합 도메인이 가용하다. 파파인으로 전형적인 IgG 분자의 단백분해 개열은 이황화 연쇄를 통해 인접한 중쇄의 아미노 말단 부분에 연결된 무손상 경쇄를 내포하는 Fab 단편으로 불리는 2개의 별개의 항원 결합 단편을 생산하는 것으로 알려져 있다. 파파인-소화된 면역글로불린 분자의 나머지 부분은 Fc 단편으로 알려져 있고, 그리고 무손상으로 남겨지고 이황화 결합을 통해 연결된 항체의 카르복시 말단 부분으로 구성된다. 항체가 펩신으로 소화되면,  $F(ab')_2$  단편으로 알려져 있는 단편이 생산되는데, 이것은 Fc 영역을 결여하지만 인접한 경쇄와 중쇄 사이에 이황화 결합 (Fab 단편으로서) 및 또한, 인접한 중쇄의 나머지 부분 사이에 이황화 연쇄에 의해 묶인 양쪽 항원-결합 도메인을 내포한다 (*Handbook of Experimental Immunology*. Vol 1: *Immunochemistry*, Weir, D. M., Editor, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1986)).
- [0059] 단일 사슬 Fv 단편 (ScFvs 또는 ScFv 항체)으로 알려져 있는 단일 사슬 항원-결합 폴리펩티드인 재조합 면역글로불린 펩티드의 생산과 선별을 허용하는 재조합 DNA 방법이 개발되었다. 게다가, ScFv는 이합화되어 디아바디를 생산할 수 있다. ScFv는 관심되는 특정한 에피토프에 결합하고, 그리고 예로서, Lowman et al. (1991) *Biochemistry*, 30, 10832-10838; Clackson et al. (1991) *Nature* 352, 624-628; and Cwirla et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6378-6382에서 설명된 바와 같이, 다양한 재조합 세균 파지-기초된 방법 중에서 한 가지를 이용하여 생산될 수 있다. 이들 방법은 통상적으로, 유전적으로 변경된 실모양의 파지, 예를 들면, 재조합 M13 또는 fd 파지를 생산하는 것에 기초되는데, 이들은 파지 입자의 표면 상에서, 융합 단백질의 아미노 말단 영역으로서 항원-결합 ScFv 항체 및 융합 단백질의 카르복시 말단 영역으로서 마이너 파지 외피 단백질 g3p를 내포하는 재조합 융합 단백질을 전시한다. 이런 재조합 파지는 널리 공지된 파지 방법을 이용하여 쉽게 성장되고 단리될 수 있다. 게다가, 무손상 파지 입자는 통상적으로, 파지 입자로부터 ScFv를 단리할 필요 없이, 그들의 표면 상에서 항원-결합 ScFv의 존재 (전시)에 대해 직접적으로 스크리닝될 수 있다.

[0060]

ScFv를 생산하기 위해, ROR1 항원을 표적으로 하기 위한 mAb를 생산하는 하이브리도마로부터 단리된 mRNA로부터 cDNA를 최초 생산하는데 표준 역전사효소 프로토콜이 이용된다. mAb의 중쇄와 경쇄의 가변 영역을 인코딩하는 cDNA 분자는 이후, 생쥐 면역글로불린 무거운 및 가벼운 가변 영역에 대한 한 세트의 프라이머를 이용한 표준 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 방법에 의해 증폭될 수 있다 (Clackson (1991) *Nature*, 352, 624-628). mAb 중쇄와 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 증폭된 cDNA는 이후, 재조합 ScFv DNA 분자를 산출하기 위해 킹커 올리고뉴클레오티드와 뮤인다. ScFv DNA는 g3p으로 불리는 마이너 외피 단백질을 인코딩하는 파지 유전자의 5' 영역 내로 증폭된 cDNA 서열을 융합하도록 설계된 실모양의 파지 플라스미드 내로 결찰된다. 대장균 (*Escherichia coli*) 세균 세포는 이후, 재조합 파지 플라스미드로 형질전환되고, 그리고 실모양의 파지가 성장되고 수확된다. 원하는 재조합 파지는 마이너 외피 단백질의 아미노 말단 영역에 융합된 항원-결합 도메인을 전시한다. 이런 "전시 파지"는 이후, 예로서, 항원에 결합할 수 있는 ScFv 항체 단백질을 내포하는 이를 파지 입자를 흡착하기 위해, "패닝 (panning)" (참조: Parmley and Smith (1989) *Adv. Exp. Biol.* 251, 215-218; Cwirla et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6378-6382)으로 알려져 있는 방법을 이용하여 고정된 항원 위에 통과될 수 있다. 항원-결합 파지 입자는 이후, 표준 파지 감염 방법에 의해 증폭될 수 있고, 그리고 증폭된 재조합 파지 개체군은 항원-결합 능력에 대해 다시 한 번 선별될 수 있다. 항원-결합 능력에 대한 이런 연속적인 라운드의 선별, 그 이후에 증폭은 재조합 파지 상에 전시된 ScFv에서 증강된 항원-결합 능력에 대해 선별한다. 증가된 항원-결합 친화성에 대한 선별은 더욱 단단한 결합 활성을 필요로 하는 결합이 발생하는 조건을 조정함으로써 만들어질 수 있다.

[0061]

증강된 항원-결합 활성에 대해 선별하는 다른 방법은 ScFv의 결합 도메인을 인코딩하는 cDNA 내에 뉴클레오티드 서열을 변경하고, 그리고 재조합 파지 개체군을 항원-결합 활성에 대한 연속적인 라운드의 선별 및 증폭에 종속시키는 것이다 (참조: Lowman et al. (1991) *Biochemistry* 30, 10832-10838; and Cwirla et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6378-6382).

[0062]

일단 ScFv가 선별되면, 재조합 ROR1 항체는 대장균 (*E. coli*) 균주 HB2151과 함께 적절한 벡터를 이용하여 자유로운 형태로 생산될 수 있다. 이들 세균은 ScFv를 파지 성분이 없는 가용성 형태로 실질적으로 분비한다 (Hoogenboom et al. (1991) *Nucl. Acids Res.* 19, 4133-4137). HB2151 세균 배양 배지로부터 가용성 ScFv의 정제는 고형 지지체, 예를 들면, AFFIGEL™ (BioRad, Hercules, Calif.)에 고정된 항원 분자를 이용한 친화성 크로마토그래피에 의해 달성될 수 있다.

[0063]

재조합 항체 기술에서 다른 발달은 ScFv의 이합체와 사합체로의 중합화에 의한 결합의 더욱 향상, 예를 들면, 증가된 항원항체결합력의 가능성을 증명한다 (참조: Holliger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6444-6448).

[0064]

ScFv가 Fab 또는  $F(ab')_2$  단편보다 훨씬 작은 분자이기 때문에, 이들은 고형 지지체 물질 상에 고정될 때, 전체 항체,  $F(ab')_2$ , 또는 Fab 단편을 이용하여 가능한 것보다 표면적의 단위당 항원 결합 부위의 훨씬 높은 밀도를 획득하는데 이용될 수 있다. 게다가, 재조합 항체 기술은 하이브리도마와 비교하여 항체의 더욱 안정된 유전자 공급원을 제공한다. 재조합 항체는 또한, 표준 세균 파지 생산 방법을 이용하여 더욱 빠르게 및 경제적으로 생산될 수 있다.

[0065]

본 발명의 항체 또는 이들의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체에는 다중클론, 단일클론, 다중특이적, 인간, 인간화, 영장류화, 또는 키메라 항체, 단일 사슬 항체, 애피토프-결합 단편, 예를 들면, Fab, Fab' 및  $F(ab')_{sub.2}$ , Fd, Fv, 단일 사슬 Fv (scFv), 단일 사슬 항체, 이황화-연결된 Fv (sdFv), VL 또는 VH 도메인을 포함하는 단편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생산된 단편, 그리고 항-이디오타입 (항-Id) 항체 (예로서, 본원에서 개시된 ROR1 항체에 대한 항-Id 항체 포함)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. ScFv 분자는 당분야에서 알려져 있고, 그리고 예로서, U.S. 특허 번호 5,892,019에서 설명된다. 본 발명의 면역글로불린 또는 항체 분자는 면역글로불린 분자의 임의의 유형 (가령, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, 그리고 IgY), 부류 (가령, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 하위부류일 수 있다. 인간 ROR1에 대한 scFv의 실례는 서열 번호:21, 서열 번호:22, 서열 번호:23 및 서열 번호:24를 포함한다.

[0066]

단일 사슬 항체를 비롯한 항체 단편은 단독으로 또는 다음 중에서 전체 또는 부분과 합동으로 가변 영역(들)을 포함할 수 있다: 헌지 영역, CH1, CH2, 그리고 CH3 도메인. 가변 영역(들)과 헌지 영역, CH1, CH2, 그리고 CH3 도메인의 임의의 조합을 또한 포함하는 항원-결합 단편 역시 본 발명 내에 포함된다. 본 발명의 항체 또는 이들의 면역특이적 단편은 조류 및 포유동물을 비롯한 임의의 동물 기원으로부터 유래될 수 있다. 바람직하게는, 항체는 인간, 뮤린, 당나귀, 토끼, 염소, 기니 피그, 낙타, 라마, 말, 또는 닭 항체이다. 다른 구체예에서, 가변

영역은 기원에서 콘드릭토이드일 수 있다 (가령, 상어로부터). 본원에서 이용된 바와 같이, "인간" 항체는 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 갖는 항체를 포함하고, 그리고 아래에서 및 예로서, U.S. 특허 번호 5,939,598 (Kucherlapati et al)에 의해 설명된 바와 같이, 인간 면역글로불린 라이브러리로부터 또는 하나 또는 그 이상의 인간 면역글로불린에 대해 유전자도입되고 내인성 면역글로불린을 발현하지 않는 동물로부터 단리된 항체를 포함한다.

#### [0067] 재조합 항체 생산

본원에서 설명된 항체를 재조합적으로 생산하기 위해, 불변 영역에 임의선택적으로 연결된 경쇄와 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산은 발현 벡터 내로 삽입된다. 경쇄와 중쇄는 동일하거나 상이한 발현 벡터에서 클로닝될 수 있다. 예로서, 서열 번호: 1-5의 중쇄와 경쇄가 본 발명에 따라 이용될 수 있다. 본원에서 전체적으로 참조로서 편입된 U.S. 특허 번호 6,287,569 (Kipps et al.)의 교시, 그리고 본원에서 제공된 방법은 본 발명의 백신을 창출하기 위해 당업자에 의해 쉽게 적합될 수 있다. 항체 사슬을 인코딩하는 DNA 분절은 항체 사슬의 발현을 담보하는 발현 벡터(들)에서 제어 서열에 작동가능하게 연결된다. 이런 제어 서열은 신호 서열, 프로모터, 인핸서, 그리고 전사 종결 서열을 포함할 수 있다.

발현 벡터는 전형적으로, 숙주 생명체에서 예외적으로 또는 숙주 염색체의 필수적인 부분으로서 복제가능하다. 대장균 (*E. coli*)은 본 발명의 항체를 발현하는데 특히 유용한 한 가지 원핵생물 숙주이다. 이용하기 적합한 다른 미생물 숙주에는 바실러스, 예를 들면, 바실러스 서브틸러스 (*Bacillus subtilis*), 그리고 다른 장내세균, 예를 들면, 살모넬라 (*Salmonella*), 세라티아 (*Serratia*), 그리고 다양한 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 종이 포함된다. 이들 원핵 숙주에서, 숙주 세포와 양립성인 발현 제어 서열 (가령, 복제 기점) 및 조절 서열, 예를 들면, 락토오스 프로모터 시스템, 트립토판 (trp) 프로모터 시스템, 베타 락탐아제 프로모터 시스템, 또는 과자 람다로부터 프로모터 시스템을 전형적으로 내포하는 발현 벡터 역시 만들어질 수 있다. 다른 미생물, 예를 들면, 효모 역시 발현에 이용될 수도 있다. 사카로미세스 (*Saccharomyces*)가 바람직한 숙주 인데, 적합한 벡터는 3-포스포글리세린산 키나아제 또는 다른 해당효소, 그리고 원하는 대로 복제 기점, 종결 서열 등을 비롯하여, 발현 제어 서열, 예를 들면, 프로모터를 갖는다. 본 발명의 항체를 발현하고 생산하는데 포유류 조직 세포 배양 역시 이용될 수 있다 (가령, Winnacker, From Genes to Clones VCH Publishers, N.Y., 1987을 참조한다). 진핵 세포가 바람직한데, 그 이유는 무손상 항체를 분비할 수 있는 다수의 적합한 숙주 세포 주가 개발되었기 때문이다. 본 발명의 면역글로불린을 인코딩하는 핵산을 발현하는데 바람직한 적합한 숙주 세포에는 다음이 포함된다: SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 라인 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 라인; 아기 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 중국 햄스터 난소-세포 (CHO); 생쥐 세르톨리 세포; 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL 1587); 인간 경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 베팔로 쥐 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 생쥐 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); 및 TRI 세포.

관심되는 폴리뉴클레오티드 서열 (가령, 중쇄와 경쇄 인코딩 서열 및 발현 제어 서열)을 내포하는 벡터는 숙주 세포 내로 이전될 수 있다. 염화칼슘 형질감염은 원핵 세포에 대해 통상적으로 활용되는 반면, 인산칼슘 처리 또는 전기천공은 다른 세포 숙주에 이용될 수 있다 (가령, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, 2nd ed., 1989를 참조한다). 중쇄와 경쇄가 별개의 발현 벡터 상에 클로닝될 때, 이들 벡터는 무손상 면역글로불린의 발현 및 어셈블리를 획득하기 위해 공동형질감염된다. 재조합 DNA의 도입 후, 면역글로불린 산물을 발현하는 세포주는 세포 선별된다. 안정되게 발현할 수 있는 세포주가 바람직하다 (즉, 세포주의 50회 계대 후 줄어들지 않은 수준의 발현).

일단 발현되면, 본 발명의 전체 항체, 이들의 이합체, 개별 경쇄와 중쇄, 또는 다른 면역글로불린 형태는 황산 암모늄 침전, 친화성 칼럼, 칼럼 크로마토그래피, 젤 전기영동 등을 비롯한 당분야의 표준 절차에 따라 정제될 수 있다 (가령, Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y., 1982를 참조한다). 최소한 약 90 내지 95% 균질성의 실제적으로 순수한 면역글로불린이 바람직하고, 그리고 98 내지 99% 또는 그 이상 균질성이 가장 바람직하다.

#### [0072] 복수의 특이적 항체, 항체 면역접합체 및 융합 분자

본 발명의 ROR1 항체 또는 이들의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 "다중특이적", 예를 들면, 이중특이적, 삼중특이적 또는 더욱 큰 다중특이적일 수 있는데, 이것은 본 발명의 항체가 하나 또는 그 이상의 상이한 항원 (가령, 단백질) 상에 존재하는 2개 또는 그 이상의 상이한 에피토프를 동시에 인식하는 및 이들에

결합한다는 것을 의미한다. 따라서, ROR1 항체가 "단일특이적" 또는 "다중특이적", 예를 들면, "이중특이적"인지의 여부는 결합 폴리펩티드가 반응하는 상이한 에피토프의 숫자를 지칭한다. 다중특이적 항체는 본원에서 설명된 표적 폴리펩티드의 상이한 에피토프에 대해 특이적일 수 있고 또는 표적 폴리펩티드뿐만 아니라 이종유래 에피토프, 예를 들면, 이종유래 폴리펩티드 또는 고형 지지체 물질에 대해 특이적일 수 있다.

[0074] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "원자가"는 ROR1 항체, 결합 폴리펩티드 또는 항체에서 존재하는 잠재력 결합 도메인, 예를 들면, 항원 결합 도메인의 숫자를 지칭한다. 각 결합 도메인은 하나의 에피토프에 특이적으로 결합한다. ROR1 항체, 결합 폴리펩티드 또는 항체가 하나 이상의 결합 도메인을 포함할 때, 각 결합 도메인은 "이가 단일특이적"으로 명명된 2개의 결합 도메인을 갖는 항체의 경우에 동일한 에피토프에 또는 "이가 이중특이적"으로 명명된 2개의 결합 도메인을 갖는 항체의 경우에 상이한 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 항체는 또한, 각 특이성에 대해 이중특이적 및 이가일 수 있다 ("이중특이적 사가 항체"로 명명됨). 다른 구체예에서, 사가 미니바디 또는 도메인 결실된 항체가 만들어질 수 있다.

[0075] 이중특이적 이가 항체, 그리고 이들을 만드는 방법은 예로서 U.S. 특허 번호 5,731,168; 5,807,706; 5,821,333; 및 U.S. 출원 공개 번호 2003/020734 및 2002/0155537에서 설명되고, 이들 모두의 개시는 본원에서 참조로서 편입된다. 이중특이적 사가 항체, 그리고 이들을 만드는 방법은 예로서, WO 02/096948 및 WO 00/44788에서 설명되는데, 이들 둘 모두의 개시는 본원에서 참조로서 편입된다. 일반적으로, PCT 공보 WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt et al., J. Immunol. 147:60-69 (1991); U.S. 특허 번호 4,474,893; 4,714,681; 4,925,648; 5,573,920; 5,601,819; Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992)를 참조한다.

[0076] 본 발명은 다중특이적 ROR1 항체를 포함한다. 예로서, 이중특이적 항체는 2개의 scFv 항체 단편으로 구성되고, 이들 둘 모두 ROR1에 결합한다. scFv 항체 단편은 ROR1 상에서 동일하거나 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 추가 실례로서, 다중특이적 항체는 디아바디일 수 있는데, 이것은 서열 번호:1, 서열 번호:5, 서열 번호:9, 서열 번호: 13, 서열 번호:17, 서열 번호:39 또는 서열 번호:42로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호:3, 서열 번호:7, 서열 번호:11, 서열 번호: 15, 서열 번호:19, 서열 번호:41 또는 서열 번호:45로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체의 에피토프에 결합한다.

[0077] 본 발명은 융합 단백질까지 더욱 확장한다. 융합 단백질은 예로서, 최소한 하나의 표적 결합 부위를 갖는 면역 글로불린 항원-결합 도메인, 그리고 최소한 하나의 이종유래 부분, 다시 말하면, 이것이 자연에서 자연적으로 연결되지 않는 부분을 포함하는 키메라 분자이다. 아미노산 서열은 융합 폴리펩티드에서 합쳐지는 별개의 단백질에서 정상적으로 존재할 수 있고 또는 이들은 동일한 단백질에 정상적으로 존재하지만 융합 폴리펩티드 내에 새로운 배열에 배치된다. 융합 단백질은 예로서, 화학적 합성에 의해, 또는 펩티드 영역이 원하는 관계에서 인코딩되는 폴리뉴클레오티드를 창출하고 번역함으로써 창출될 수 있다.

[0078] 본 발명의 ROR1 항체, 또는 이들의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 게다가, N- 또는 C-말단에서 이종유래 폴리펩티드에 재조합적으로 융합되거나 또는 폴리펩티드 또는 다른 조성물에 화학적으로 접합될 수 있다 (공유와 비-공유 접합 포함). 예로서, ROR1-특이적 항체는 검출 검정에서 라벨로서 유용한 문자 및 작동체 문자, 예를 들면, 이종유래 폴리펩티드, 약물, 방사성핵종, 또는 독소에 재조합적으로 융합되거나 또는 접합될 수 있다. 가령, PCT 공보 WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; U.S. 특허 번호 5,314,995; 및 EP 396,387을 참조한다. 본 발명의 방사성표지화된 ROR1 항체가 특히 유용할 것이지만, 항체 약물 접합체 (ADCs)는 여전히 개발의 여지가 있다.

[0079] 본 발명의 ROR1 항체, 또는 이들의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 예로서, 공유 부착이 항체가 ROR1에 결합하는 것을 예방하지 않도록 항체에 임의의 유형의 문자의 공유 부착에 의해 변형된 유도체를 포함한다. 예로서, 하지만 제한 없이, 항체 유도체는 예로서, 당화, 아세틸화, 폐길화, 포스필화, 인산화, 아미드화, 공지된 보호/차단 기에 의한 유도체화, 단백분해 개열, 세포 리간드 또는 다른 단백질에 연쇄 등에 의해 변형된 항체를 포함한다. 임의의 무수한 화학적 변형은 특정한 화학적 개열, 아세틸화, 포르밀화, 튜니카마이신의 대사성 합성 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 공지된 기술에 의해 수행될 수 있다. 부가적으로, 유도체는 하나 또는 그 이상의 비고전적 아미노산을 내포할 수 있다.

[0080] 본 발명의 ROR1 항체, 또는 이들의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 펩티드 결합 또는 변형된 펩티드 결합, 즉, 펩티드 동배체에 의해 서로에 결합된 아미노산으로 구성될 수 있고, 그리고 20가지 유전자-인코딩된 아미노산 이외에 아미노산을 내포할 수 있다. ROR1-특이적 항체는 자연 과정, 예를 들면, 번역후 처리에 의해, 또는 당분야에서 널리 공지된 화학적 변형 기술에 의해 변형될 수 있다. 이런 변형은 기본 텍스트 및 더욱 상세한

단행본에서뿐만 아니라 방대한 연구 문헌에서 충분히 설명된다. 변형은 웨티드 중추, 아미노산 측쇄 및 아미노 또는 카르복실 말단을 비롯한 ROR1-특이적 항체에서 어디든지, 또는 탄수화물과 같은 모이어티 상에서 일어날 수 있다. 동일한 유형의 변형은 소정의 ROR1-특이적 항체 내에 여러 부위에서 동일한 또는 변하는 정도로 존재할 수 있는 것으로 인지될 것이다.

[0081] 본 발명은 또한, ROR1 항체, 또는 이들의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체, 그리고 이종유래 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 항체가 융합되는 이종유래 폴리펩티드는 기능에 유용할 수 있고 또는 ROR1 폴리펩티드 발현 세포를 표적으로 하는데 유용하다. 한 구체예에서, 본 발명의 융합 단백질은 본 발명의 항체의 VH 영역 중에서 임의의 하나 또는 그 이상의 아미노산 서열 또는 본 발명의 항체 또는 이의 단편 또는 변이체의 VL 영역 중에서 임의의 하나 또는 그 이상의 아미노산 서열, 그리고 이종유래 폴리펩티드 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0082] 다른 구체예에서, 본원에서 개시된 치료 방법에서 이용을 위한 융합 단백질은 ROR1-특이적 항체, 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체의 서열 번호:27, 서열 번호: 28 및 서열 번호:29로 구성된 군에서 선택되는 VH-CDR 중에서 임의의 1개, 2개, 3개의 아미노산 서열, 또는 ROR1-특이적 항체, 또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체의 서열 번호:30, 서열 번호:31 및 서열 번호:32로 구성된 군에서 선택되는 VL-CDR 중에서 임의의 1개, 2개, 3개의 아미노산 서열, 그리고 이종유래 폴리펩티드 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 한 구체예에서, 융합 단백질은 본 발명의 ROR1-특이적 항체, 또는 이의 단편, 유도체, 또는 변이체의 VH-CDR3의 아미노산 서열, 그리고 이종유래 폴리펩티드 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하고, 상기 융합 단백질은 ROR1의 최소한 하나의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 다른 구체예에서, 융합 단백질은 본 발명의 ROR1-특이적 항체의 최소한 하나의 VH 영역의 아미노산 서열 및 본 발명의 ROR1-특이적 항체 또는 이의 단편, 유도체 또는 변이체의 최소한 하나의 VL 영역의 아미노산 서열, 그리고 이종유래 폴리펩티드 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 바람직하게는, 융합 단백질의 VH와 VL 영역은 ROR1의 최소한 하나의 에피토프에 특이적으로 결합하는 단일 공급원 항체 (또는 scFv 또는 Fab 단편)에 상응한다. 또 다른 구체예에서, 본원에서 개시된 진단적 및 치료적 방법에서 이용을 위한 융합 단백질은 ROR1-특이적 항체의 VH CDR 중에서 임의의 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 아미노산 서열 및 ROR1-특이적 항체, 또는 이의 단편 또는 변이체의 VL CDR 중에서 임의의 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 아미노산 서열, 그리고 이종유래 폴리펩티드 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 바람직하게는, VH-CDR(들) 또는 VL-CDR(들) 중에서 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 또는 그 이상은 본 발명의 단일 공급원 항체 (또는 scFv 또는 Fab 단편)에 상응한다. 이를 융합 단백질을 인코딩하는 핵산 분자 역시 본 발명에 의해 포함된다.

[0083] 융합 단백질은 당분야에서 널리 공지된 방법을 이용하여 제조될 수 있다 (예로서, U.S. 특허 번호 5,116,964 및 5,225,538을 참조한다). 융합이 만들어지는 정확한 부위는 융합 단백질의 분비 또는 결합 특징을 최적화하기 위해 실험적으로 선별될 수 있다. 융합 단백질을 인코딩하는 DNA는 이후, 발현을 위해 숙주 세포 내로 형질감염된다.

[0084] 본 발명은 특히 바람직한 항-인간 ROR1 항체; 즉, 항체 99961과 동일한 결합 특이성을 갖는 단리된 항-ROR1 항체를 제공한다. 한 양상에서, 항체는 ROR1의 CRD 도메인과 인접하는 Ig-유사 도메인에 결합한다. 추가의 양상에서, 항체는 hROR1의 아미노산 42-160에 결합한다. 추가의 양상에서, 항체는 ROR-1의 아미노산 130-160에 결합한다. 다른 양상에서, 항체는 결합을 위해 hROR1의 위치 138에서 글루탐산이 존재하는 것을 필요로 한다.

[0085] 추가의 구체예에서, 본 발명은 서열 번호:1, 서열 번호:5, 서열 번호:9, 서열 번호:13 및 서열 번호:17로 구성된 군에서 선택되는 중쇄 가변 영역, 그리고 서열 번호:3, 서열 번호:7, 서열 번호:11, 서열 번호:15 및 서열 번호:19로 구성된 군에서 선택되는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항-ROR1 항체를 제공한다. 한 양상에서, 항체의 중쇄 가변 영역은 서열 번호:5이고, 그리고 경쇄 가변 영역은 서열 번호:7이다.

[0086] 한 구체예에서, 본 발명은 서열 번호:27, 서열 번호:28, 서열 번호:29, 서열 번호:33, 서열 번호:34 및 서열 번호:35로 구성된 군에서 선택되는 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성된 중쇄 가변 영역, 그리고 서열 번호:30, 서열 번호:31, 서열 번호:32, 서열 번호:36, 서열 번호:37 및 서열 번호:38로 구성된 군에서 선택되는 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성된 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항-인간 ROR1 항체를 제공한다. 한 양상에서, CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성된 중쇄 가변 영역은 서열 번호:27, 서열 번호:28 및 서열 번호:29로 구성되고, 그리고 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성된 경쇄 가변 영역은 서열 번호:30, 서열 번호:31 및 서열 번호:32으로 구성된 군에서 선택된다.

[0087] 추가의 구체예에서, 본 발명은 41 nM보다 큰 결합 친화성을 갖는 항-인간 ROR-1 항체를 제공한다. 한 양상에서, 항체 결합 친화성은 약 500 pM 및 약 6 nM 사이이다. 한 양상에서, 항체 결합 친화성은 약 800 pM이다.

- [0088] 다른 양상에서, 항체는 전이를 저해한다. 추가의 양상에서, 항체는 세포 이주를 내재화하고 저해한다. 추가의 양상에서, 항체는 비멘틴, snail1/2 또는 ZEB를 내재화하고 하향조정한다. 다른 양상에서, 항체는 인간, 인간화 또는 키메라이다. 한 양상에서, 항체는 99961, 99961.1, 99961.2, 99961.3 또는 99961.4이다. 바람직한 양상에서, 항체는 99961.1이다.
- [0089] 본 발명의 한 구체예는 ROR1에 대한 항체 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 제약학적 제제를 제공한다. 추가의 구체예에서, 본 발명은 ROR1에 대한 항체를 인코딩하는 단리된 핵산을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 ROR1에 대한 항체를 인코딩하는 핵산에 따른 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 추가의 구체예에서, 본 발명은 ROR1에 대한 항체를 인코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 추가의 구체예에서, 본 발명은 항체를 생산하는 조건 하에 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 항-ROR1 항체를 생산하는 방법을 제공한다. 한 양상에서, 항체를 생산하는 방법은 항체를 회수하는 것을 더욱 포함한다.
- [0090] 실시예에 나타나 있는 바와 같이, 항-ROR1 항체 D10은 생쥐와 인간 CLL 이식을 저해하고, 보체-의존성 세포독성을 주도할 수 있고, 백혈병 부담에서 유의미한 감소를 유도하고, 그리고 유방암 세포의 폐와 뼈로의 전이를 차단한다.
- [0091] D10은 생물학적 활성을 갖는 것으로 밝혀진 반면, 다른 공지된 항-ROR1 항체 (가령, 4A5 및 K19)는 4A5가 ROR1에 대한 훨씬 높은 결합 친화성을 가짐에도 불구하고 생물학적 활성을 전시하지 않는다. 항체 4A5는 D10과 상이한 에피토프에 결합하는 것으로 밝혀졌다. 또한, 암이 ROR+인 암 환자의 부분집합에서 ROR1에 대한 항혈청이 생산되는 것으로 밝혀졌다. 환자의 추가 부분집합은 Wnt5a 활성을 저해하는 항체를 만들고, 따라서 모든 ROR1 항체가 생물학적 활성을 갖는 것은 아니라는 결론을 야기한다.
- [0092] 실시예에서 더욱 설명된 바와 같이, 에피토프 지도화는 D10과 4A5의 에피토프를 결정하기 위해 수행되었다. 이들 연구는 D10이 ROR1 상에서 CRD에 인접한 Ig 유사 도메인의 C-말단에서 에피토프에 결합한다는 것을 결정하였다. 4A5에 대한 에피토프는 또한, Ig 유사 도메인에 지도화되었지만, 도메인의 아미노 말단에 더욱 가까웠다. 이들 조사 결과는 D10과 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 ROR1 생물학적 활성을 저해할 것인 반면, 다른 곳에 결합하는 항체는 그렇지 않을 수도 있다는 결론을 야기하였다.
- [0093] 실시예에 나타나 있는 바와 같이, 높은 친화성 항체, 즉, 99961은 높은 친화성 재조합 항체에 대해 선별하기 위해 D10 에피토프를 이용하여 유래되었다. 선별된 항체 중에서 한 가지, 99961은 D10보다 ROR1에 대한 훨씬 높은 결합 친화성을 갖는다. 99961 항체는 D10보다 50x 더욱 큰 결합 친화성을 갖는다, 다시 말하면, 41 nM과 대비하여 800 pM. 부가적으로, 99961은 인간화되어 4가지 상이한 항체를 산출하였다. 실험은 99961이 D10과 동일한 에피토프를 갖는다는 것을 확증하였다. 실험은 이러한 에피토프가 정상적인 조혈 줄기 및 선조체 세포 상에서 발현되지 않는다는 것을 확증하였다. 게다가, 99961은 정상적인 성체 조직과 교차 반응하지 않는다. 이러한 항체는 또한, CLL 세포에 대항하는 활성, ROR+ 원발성 AML에서 활성 및 ROR1 내재화의 유도를 증명하였다.
- [0094] 백신
- [0095] 부가적으로, 본 발명은 단리된 또는 합성적으로 생산된 ROR1 결합 웹티드의 제약학적으로 허용되는 조성물로 구성되는, 개체에서 암의 치료 또는 예방 또는 전이의 저해를 위한 백신을 제공한다. 본 발명은 또한, D10의 ROR-1 결합 영역에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 ROR1 결합 웹티드를 제공한다. 추가의 양상에서, 본 발명은 D10의 결합 영역에 최소한 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 ROR1 결합 웹티드를 제공한다. 한 양상에서, D10의 결합 영역은 VATNGKEVVSSTGVLFVKFGPC이다. 추가의 양상에서, D10의 결합 영역은 EVVSSTGVLFVKFGPC이다. 한 양상에서, D10 결합 영역은 최소한 22개 아미노산이다. 추가의 양상에서, D10 결합 영역은 최소한 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22개 아미노산이다.
- [0096] 본 발명은 또한, 질환, 예를 들면, 림프종, 예를 들면, ROR1의 발현을 수반하는 CLL에 대항하여 ROR1 결합 웹티드 백신의 용도를 제공한다. 정상적인 성체 조직이 ROR-1을 발현하는 것으로 보이지 않기 때문에, 이것은 활성 면역 요법에서 표적화될 수 있는 종양-특이적 항원을 나타낸다. 예로서, ROR1의 수준은 동물에서 ROR1 및 이의 발현의 효과에 대항하여 보호적 또는 치료적 면역 반응을 산출하는 ROR1 결합 웹티드 백신의 치료 효과량을 환자에 투여함으로써 하향조절될 수 있다. 백신은 웹티드를 포함할 수 있다. 이런 웹티드를 이용하는 방법은 백신에서 이용 및 ROR1에 대한 항체를 산출하는 것을 포함한다. ROR1 결합 웹티드는 또한, 면역 어쥬번트를 포함할 수 있다. 면역보강제는 결합 웹티드에 접합된 면역원성 담체 모이어티일 수 있다. 한 양상에서, 면역원성 담체 모이어티는 웹티드이다. 백신에 대한 적합한 담체의 실례는 면역원성 어쥬번트를 더욱 포함한다. 추가의 양상에서, 어쥬번트는 결합 웹티드에 접합된 면역원성 담체 모이어티이다. 면역원성 담체 모이어티는 담체 웹티드, 예

를 들면, 키홀 림펫 혜모시아닌 (KLH), 소 혈청 알부민 (BSA), 난백알부민, 알루미늄 수산화물 또는 다른 제약학적으로 허용되는 면역 어쥬번트일 수 있다. 제약학적으로 허용되는 면역 어쥬번트의 실례는 Methods in Molecular Medicine, Vol. 42: Vaccine adjuvants: Preparation, Methods and Research Protocols; D. T. O'Hagan에 의해 편집됨; Humana Press Inc., Totowa NJ and European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Proprietary Medicinal Products, Guidelines on Adjuvants in Vaccines, London 2004에서 발견될 수 있다. 전형적으로, 백신 조성물은 또한, 제약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함할 것이다.

[0097] 한 구체예에서, 본 발명은 ROR-1 발현 세포에 대항하는 백신을 제공하고, 상기 백신은 항체 D10의 ROR-1 결합 영역에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 단리된 또는 합성적으로 생산된 웨티드의 제약학적으로 허용되는 조성물을 포함한다. 한 양상에서, 백신에서 항체 D10의 ROR-1 결합 영역의 아미노산 서열은 VATNGKEVVSSTGVLFVKGPC이다. 추가의 양상에서, 백신에서 항체 D10의 ROR-1 결합 영역의 아미노산 서열은 EVVSSTGVLFVKGPC이다. 다른 양상에서, ROR1 발현 세포는 암 세포이다. 추가의 양상에서, 암 세포는 B 세포 백혈병, 램프종, CLL, AML, B-ALL, T-ALL, 난소, 결장, 폐, 피부, 췌장, 고환, 방광, 자궁, 전립선, 또는 부신암으로부터 유래된다.

[0098] 다른 구체예에서, 본 발명은 VATNGKEVVSSTGVLFVKGPC에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 ROR1 결합 웨티드 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 백신을 제공한다. 한 양상에서, 웨티드는 포유류이다. 추가의 양상에서, 웨티드는 키메라 및/또는 인간, 생쥐, 쥐, 돼지, 소, 영장류, 고양이, 개, 토끼, 염소, 닭 또는 곰 기원이다. 다른 양상에서, 백신은 면역원성 어쥬번트를 더욱 포함한다. 추가의 양상에서, 어쥬번트는 결합 웨티드에 접합된 면역원성 담체 웨티드이다. 한 양상에서, 결합 웨티드의 아미노산 서열은 VATNGKEVVSSTGVLFVKGPC이다. 다른 양상에서, 면역원성 담체 웨티드는 키홀 림펫 혜모시아닌 (KLH)이다. 백신은 면역원성 어쥬번트를 더욱 포함한다. 추가의 양상에서, 어쥬번트는 결합 웨티드에 접합된 면역원성 담체 모이어티이다. 한 양상에서, 결합 웨티드의 아미노산 서열은 VATNGKEVVSSTGVLFVKGPC이다. 면역원성 담체 모이어티는 담체 웨티드, 예를 들면, 키홀 림펫 혜모시아닌 (KLH), 소 혈청 알부민 (BSA), 난백알부민, 알루미늄 수산화물 또는 다른 제약학적으로 허용되는 면역 어쥬번트일 수 있다. 제약학적으로 허용되는 면역 어쥬번트의 실례는 Methods in Molecular Medicine, Vol. 42: Vaccine adjuvants: Preparation, Methods and Research Protocols; D. T. O'Hagan에 의해 편집됨; Humana Press Inc., Totowa NJ and European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Proprietary Medicinal Products, Guidelines on Adjuvants in Vaccines, London 2004에서 발견될 수 있다.

[0099] 다른 구체예에서, 본 발명은 EVVSSTGVLFVKGPC에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 ROR1 결합 웨티드 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 백신을 제공한다. 한 양상에서, 웨티드는 포유류이다. 추가의 양상에서, 웨티드는 키메라 및/또는 인간, 생쥐, 쥐, 돼지, 소, 영장류, 고양이, 개, 토끼, 염소, 닭 또는 곰 기원이다. 다른 양상에서, 백신은 면역원성 어쥬번트를 더욱 포함한다. 추가의 양상에서, 어쥬번트는 결합 웨티드에 접합된 면역원성 담체 웨티드이다. 한 양상에서, 결합 웨티드의 아미노산 서열은 EVVSSTGVLFVKGPC이다. 면역원성 담체 모이어티는 담체 웨티드, 예를 들면, 키홀 림펫 혜모시아닌 (KLH), 소 혈청 알부민 (BSA) 난백알부민, 알루미늄 수산화물 또는 다른 제약학적으로 허용되는 면역 어쥬번트일 수 있다. 제약학적으로 허용되는 면역 어쥬번트의 실례는 Methods in Molecular Medicine, Vol. 42: Vaccine adjuvants: Preparation, Methods and Research Protocols; D. T. O'Hagan에 의해 편집됨; Humana Press Inc., Totowa NJ and European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Proprietary Medicinal Products, Guidelines on Adjuvants in Vaccines, London 2004에서 발견될 수 있다.

[0100] 추가의 구체예에서, 본 발명은 VATNGKEVVSSTGVLFVKGPC에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 ROR1 결합 웨티드 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 백신을 포함하는 제약학적 제제를 제공한다.

[0101] 추가의 구체예에서, 본 발명은 EVVSSTGVLFVKGPC에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 ROR1 결합 웨티드 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 백신을 포함하는 제약학적 제제를 제공한다.

[0102] 실시예에 나타나 있는 바와 같이, 웨티드 백신은 도면 18에 나타나 있는 바와 같이 개발되었다. ROR1 항체 D10, 4A5 및 K19의 에피토프에 기초하여 3개의 웨티드가 이용되었다. 동물은 이들 3개의 웨티드로 면역화되었다. 3개의 웨티드 모두 ROR1 항혈청의 생산을 유도하였다. 이들 결과는 R22 웨티드로 면역화가 최대 항체 역ガ를 생산한다는 것을 증명한다. 실시예에서 지시된 바와 같이, ROR1 항혈청은 ROR1에 결합하고, 백혈병 부담을 감소시키고, ROR1 내재화를 유도하고, 보체 의존성 세포독성을 매개하고, 유방암 세포 이주를 저해하고, 그리고 ROR+ 백

혈병 세포의 이식을 저해한다. 따라서, 본 발명은 환자를 ROR1에 대하여 면역화시켜, 이주하고 전이하는 ROR+ 암 세포의 능력을 저해하는 항체의 유도를 가능하게 하는 방법을 제공한다.

#### [0103] ROR1 결합 웨티드

한 구체예에서, 본 발명은 서열 번호:25 및 서열 번호:26으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 ROR1 결합 웨티드를 제공한다. 한 양상에서, 웨티드는 VATNGKEVVSSTGVLFGPC에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다. 다른 양상에서, 웨티드는 EVVSSTGVLFGPC에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 웨티드 서열을 갖는다. 다른 양상에서, 결합 웨티드는 포유류이다. 추가의 양상에서, 결합 웨티드는 키메라 및/또는 인간, 생쥐, 쥐, 돼지, 소, 영장류, 고양이, 개, 토끼, 염소, 닭 또는 곱기원이다.

한 구체예에서, 본 발명은 서열 번호:25 및 서열 번호:26으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 ROR1 결합 웨티드 및 제약학적으로 허용되는 단체를 포함하는 제약학적 제제를 제공한다.

다른 구체예에서, 본 발명은 서열 번호:25 및 서열 번호:26의 아미노산 서열을 포함하는 ROR1 결합 웨티드를 인코딩하는 단리된 핵산을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 서열 번호:25 및 서열 번호:26의 아미노산 서열을 포함하는 ROR1 결합 웨티드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 추가의 구체예에서, 본 발명은 서열 번호:25 및 서열 번호:26의 아미노산 서열을 포함하는 ROR1 결합 웨티드를 인코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 추가의 구체예에서, 본 발명은 결합 웨티드를 생산하는 조건 하에 서열 번호:25 및 서열 번호:26의 아미노산 서열을 포함하는 ROR1 결합 웨티드를 인코딩하는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 웨티드를 생산하는 방법을 제공한다. 한 양상에서, 웨티드를 생산하는 방법은 결합 웨티드를 회수하는 것을 더욱 포함한다.

#### [0107] 전이의 억제

한 구체예에서, 본 발명은 ROR-1 발현 암의 전이를 억제하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 단일클론 항체 99961의 결합 특이성을 갖는 항체, 항체 D10의 ROR-1 결합 영역에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 웨티드로 구성된 백신, VATNGKEVVSSTGVLFGPC에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 ROR-1 결합 웨티드 또는 EVVSSTGVLFGPC에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 ROR-1 결합 웨티드를 투여함으로써 종양 세포의 상피-배엽간 전이를 과피하는 것을 포함한다. 한 양상에서, ROR-1 발현 암은 B 세포 백혈병, 림프종, CLL, AML, B-ALL, T-ALL, 난소, 결장, 폐, 피부, 췌장, 고환, 방광, 자궁, 전립선, 또는 부신 암이다.

[0109] 이들 실례는 ROR1 항체, 결합 웨티드 및 백신이 ROR+ 암 세포가 이주하거나 또는 전이하는 것을 저해하는 능력을 갖는다는 증거를 제공한다.

#### [0110] 치료

본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "치료한다" 또는 "치료"는 치료적 처치 및 예방적 또는 방지적 조치 둘 모두를 지칭하고, 여기서 목적은 바람직하지 않은 생리학적 변화 또는 장애, 예를 들면, 암의 발달 또는 확산을 예방하거나 또는 둔화시키는 (줄이는) 것이다. 유익한 또는 원하는 임상적 결과에는 겸출할 수 있는 또는 겸출할 수 없는 지에 상관없이, 증상의 경감, 질환의 정도의 감소, 질환의 안정된 (즉, 악화되지 않은) 상태, 질환 진행의 지연 또는 늦춤, 질환 상태의 개선 또는 완화, 그리고 관해 (부분적인 또는 전체적인)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. "치료"는 또한, 치료를 받지 않는 경우에 예상된 생존과 비교하여 생존을 연장하는 것을 의미할 수 있다. 치료가 필요한 대상에는 질환 또는 장애를 이미 앓고 있는 대상뿐만 아니라 질환 또는 장애에 걸리기 쉬운 대상 또는 질환 또는 장애가 예방되어야 하는 대상이 포함된다.

[0112] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "암" 또는 "암 세포" 또는 "ROR1 발현 암" 또는 "ROR1 발현 암 세포"는 악성 또는 양성인 지에 상관없이, 모든 형질전환된 세포와 조직 및 모든 암성 세포와 조직을 비롯하여, 모든 신생물 세포 성장과 증식을 지칭한다. 암에는 양성 또는 악성인 지에 상관없이, 전립선, 결장, 배, 뼈, 유방, 소화계, 간, 췌장, 복막, 내분비선 (부신, 부갑상선, 뇌하수체, 고환, 난소, 흉선, 갑상선), 눈, 머리와 목, 신경 (중추와 말초), 림프계, 골반, 피부, 연조직, 비장, 흉부, 그리고 비뇨생식계에 위치된 신생물이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 이런 신생물은 일정한 구체예에서, ROR1을 발현하거나, 과다발현하거나, 또는 비정상적으로 발현한다.

[0113] 암에는 또한, B 세포 백혈병, 림프종, CLL, AML, B-ALL, T-ALL, 난소, 결장, 폐, 피부, 췌장, 고환, 방광, 자궁, 전립선, 그리고 부신 암이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

- [0114] 본원에서 설명된 항-ROR1 항체, ROR1 결합 웨티드 및 ROR1 백신은 개체에서 ROR1 암을 치료 또는 예방하거나 또는 ROR1 암 세포의 전이를 저해하는데 이용될 수 있다.
- [0115] 항체
- [0116] 일정한 치료적 구체예에서, 선별된 항체는 전형적으로, 항-ROR1 항체일 것이고, 이것은 단독으로, 또는 하나 또는 그 이상의 조합 치료제와 합동으로, 또는 이것에 접합되어 투여될 수 있다. 본원에서 설명된 항체가 치료제로서 단독으로 투여될 때, 이들은 개체에서 다양한 기전에 의해 유익한 효과를 발휘할 수 있다. 일정한 구체예에서, hROR-1에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체는 정제되고, 그리고 hROR-1의 하나 또는 그 이상의 형태를 중화시키거나, hROR-1의 하나 또는 그 이상의 활성을 차단하거나, 또는 hROR-1과 다른 생체분자의 하나 또는 그 이상의 형태의 상호작용을 차단 또는 저해하기 위해 환자에 투여된다.
- [0117] 본 발명의 면역치료적 시약은 인간화 항체를 포함할 수 있고, 그리고 치료적 이용을 위해 추가 활성 또는 비활성 성분, 예를 들면, 전통적인 제약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제, 예를 들면, 면역원성 어쥬번트, 그리고 임의선택적으로, 부가적 또는 조합적으로 활성제, 예를 들면, 항신생물 약물과 합동될 수 있다.
- [0118] 다른 구체예에서, 본원에서 설명된 치료적 항체는 조합 치료제, 예를 들면, 방사성핵종, 분화 유도인자, 약물, 또는 독소와 동격으로 투여되거나, 이것과 공동조제되거나, 또는 이것에 연계된다 (가령, 공유적으로 결합된다). <sup>90</sup>Y, <sup>123</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, 그리고 <sup>211</sup>At를 비롯한 다양한 공지된 방사성핵종이 이용될 수 있다. 이런 조합 치료 제제와 방법에서 이용을 위한 유용한 약물에는 메토트렉사트, 그리고 피리미딘과 푸린 유사체가 포함된다. 적합한 분화 유도인자에는 포르볼 에스테르 및 부티르산이 포함된다. 적합한 독소에는 리신, 아브린, 디프테리아 독소, 콜레라 독소, 젤로닌, 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 외독소, 시겔라 (*Shigella*) 독소, 그리고 미국 자리공 항바이러스 단백질이 포함된다. 이들 조합 치료제는 직접적으로 또는 간접적으로 (가령, 링커 기를 거쳐) 항-ROR1 항체에 연계될 수 있다. 작용제 및 항체 사이에 직접적인 반응은 각각이 다른 것과 반응할 수 있는 치환기를 소유할 때 가능하다. 예로서, 한쪽에서 친핵성 기, 예를 들면, 아미노 또는 술피드릴 기는 다른 쪽에서 카르보닐-내포 기, 예를 들면, 무수물 또는 산 할로겐화물과 반응하거나, 또는 우수한 이탈 기 (가령, 할로겐화물)을 내포하는 알킬 기와 반응할 수 있다. 대안으로, 결합 능력의 간섭을 방지하기 위해, 항체를 조합 치료제로부터 떼어놓는 스페이서로서 링커 기를 거쳐 조합 치료제 및 항체를 연계하는 것이 바람직할 수 있다. 링커 기는 또한, 작용제 또는 항체 상에서 치환기의 화학적 반응성을 증가시키고, 그리고 따라서, 커플링 효율을 증가시키는 역할을 할 수 있다. 호모-와 혜테로-기능 둘 모두의 다양한 이중기능성 또는 다기능성 시약 (가령, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill의 카탈로그에서 설명된 것들)이 링커 기로서 이용될 수 있다는 것은 당업자에게 더욱 명백할 것이다. 커플링은 예로서, 아미노 기, 카르복실 기, 술피드릴 기 또는 산화된 탄수화물 잔기를 통해 영향을 받을 수 있다.
- [0119] 하나 이상의 작용제를 항-ROR1 항체에 연계하는 것이 또한 바람직할 수 있다. 한 구체예에서, 작용제의 복수의 분자가 하나의 항체 분자에 연계된다. 다른 구체예에서, 하나 이상의 유형의 작용제가 하나의 항체에 연계될 수 있다. 특정 구체예에 상관없이, 하나 이상의 작용제와의 면역접합체가 다양한 방식으로 제조될 수 있다. 예로서, 하나 이상의 작용제가 항체 분자에 직접적으로 연계될 수 있고, 또는 부착을 위한 복수의 부위를 제공하는 링커가 이용될 수 있다. 대안으로, 담체가 이용될 수 있다.
- [0120] 항체 및 면역접합체에 대한 다양한 투여 루트가 이용될 수 있다. 전형적으로, 투여는 정맥내, 근육내, 또는 피하이다.
- [0121] 항체/면역접합체의 정화한 분량이 이용된 항체, 항원 밀도, 그리고 항체의 청소율과 같은 인자에 따라 변할 것이라는 것은 명백할 것이다. 항-ROR1 작용제의 안전한 효과량은 예로서, 바람직하지 않은 부작용을 최소화하면서 환자에서 원하는 치료적 효과를 유발하는 양이다. 일반적으로, 치료 효과량은 하나 또는 그 이상의 사이토킨의 생산을 증진하고 및/또는 보체-매개된 또는 항체-의존성 세포 세포독성을 유발하는데 충분한 양이다. 투약 섭생은 치료되는 질환의 정화한 성격, 질환의 심각도, 환자의 연령 및 전반적인 신체 상태 등과 같은 인자에 기초하여, 숙련된 임상의에 의해 결정될 것이다.
- [0122] 추가의 구체예에서, 본 발명은 개체에서 암을 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 단일클론 항체 99961의 결합 특이성을 갖는 항체, 항체 D10의 인간 ROR-1 결합 영역에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 웨티드로 구성된 백신, VATNGKEVVSSTGVLFKFGPC에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 ROR-1 결합 웨티드 또는 EVVSSTGVLFKFGPC에 최소한 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 ROR-1 결합 웨티드를 개체에 투여하는 것을 포함한다. 한 양상에서, 암은 B 세포 백혈병, 림프종, CLL,

AML, B-ALL, T-ALL, 난소, 결장, 폐, 피부, 췌장, 고환, 방광, 자궁, 전립선, 또는 부신 암이다.

[0123] ROR1을 표적으로 함으로써 전이의 저해.

[0124] 신체의 본래 부위로부터 멀리 떨어진 구역으로 신생물 세포의 확산은 암-관련된 죽음의 90%를 책임진다. 전이성 과정은 멀리 떨어진 장기까지 원발성 종양 세포의 물리적 전치 및 차후 집락형성을 포함한다. 일부 불량한-예측적 유전자 서명은 일부 원발성 종양에서 세포가 전이의 성향이 있다는 것을 암시한다. 하지만, 전이의 분자와 세포 결정인자에 관한 이해가 제한되고, 그리고 종양 세포가 이러한 이벤트를 겪는 과정이 거의 알려져 있지 않다. 최근 관심은 상피-배엽간 전이 (EMT)로 불리는 세포-생물학적 프로그램에 집중되었는데, 이것은 현재, 종양 진행, 운동성의 획득, 침입성, 전이, 그리고 자기-재생 특성에서 두드러지게 행동하는 것으로 고려된다.

[0125] EMT는 침입-전이 연쇄 반응의 단계 중에서 대부분을 달성하는데 필요한 생물학적 특성을 신생물 상피 세포에 부여한다. 정상적인 발달 및 암 전이 둘 모두에서, EMT는 상피 세포가 그들의 미세환경으로부터 받는 맥락 신호에 의해 조절되는 것으로 보인다. 배아 형태형성 및 상처 치유에 관련된 복수의 경로의 이용을 통해, 암 세포는 침입과 전이를 할 수 있게 하는 속성을 부수적으로 획득할 수 있다.

[0126] 요법 후 암의 전이 또는 재발을 설명할 수 있는 암 줄기 세포 (CSC)를 규정하는 노력은 다양한 종양 내에 CSC의 하나 또는 그 이상의 아개체군과 연관된 다양한 특성을 확인하였다. 이들 연구의 일부는 EMT에서 세포의 표현형적 특징의 획득이 비-CSC가 CSC-유사 상태로 들어가도록 유도할 수 있다는 것을 발견하였다. 이런 이유로, EMT를 아마도 겪은 전이성 암 세포는 CSC 표현형을 전시하고, 그리고 순환에서 생존, 멀리 떨어진 장기로 혈관외유출, 혈관형성 및 전이성 부위에서 통제되지 않은 성장을 증진하는 침습성 성질을 획득할 수 있다.

[0127] 실시예에서 더욱 상술된 바와 같이, 암 세포에서 ROR1의 높은-수준 발현은 더욱 높은 비율의 재발된 및/또는 전이성 질환과 연관된다. 실시예 1에서 설명된, 유방의 선암종을 앓는 환자에서 ROR1 발현과 침묵의 효과는 전이를 저해하는 발명의 실시를 예증한다. 나타나 있는 바와 같이, 전이-경향성 유방암 세포주에서 ROR1 발현을 침묵시키는 것은 EMT와 연관된 표현형적 특질을 역전시키고 시험관내와 생체내에서 이주, 침입과 전이를 손상시킨다. 게다가, ROR1에 특이적인 발명 항체는 이종이식된 면역 결합성 생쥐 내로 인간 유방암 세포의 전이를 저해한다. 이들 연구는 유방암 전이에 대한 이전에 알려지지 않은 경로를 확인하고 ROR1을 암 치료를 위한 유망한 표적으로서 검증한다. 낮은 ROR1 발현 수준은 더욱 긴 전이없는 생존과 상관되었고, 그리고 더욱 중요하게는, 항-ROR1 항체로 ROR1의 치료적 표적화는 유방암 전이 발달을 저해할 수 있다.

[0128] 전이는 암 세포의 원발성 위치로부터 신체의 다른 부분으로의 확산이다. 일단 암이 전이성이 되면, 이것은 수술 또는 방사선 요법에 의해 효과적으로 치료될 수 없다. 게다가, 암 환자의 사망률의 우세한 원인이 전이이다. 수용체 티로신 키나아제 (RTKs)는 분화, 증식, 이주, 혈관형성 및 생존을 비롯한 많은 세포 과정에서 결정적인 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 비록 ROR2가 흑색종과 전립선암 세포 전이를 조장하는 것으로 밝혀지긴 했지만, 공격적 및 비공격적 유방암 세포주 사이에 ROR2 발현에서 유의미한 차이가 없다. 하지만, ROR1의 발현은 공격적 유방암 세포주와 강한 상관을 갖는다.

[0129] 본 발명이 작용 기전에 관하여 이론에 의해 국한되지 않지만, ROR1이 유방암 전이에 연루된 단백질, 예를 들면, Snai1-1, Snai1-2, TCF8/ZEB, CK-19, 비멘틴, CXCR4를 인코딩하는 유전자를 활성화시킨다는 것은 주목할 만하다. AKT는 최근에, EMT, 아폽토시스에 저항 및 혈관형성을 비롯하여, 전이의 기능과 관련되는 것으로 보고되었다. 실시예에서 증명된 바와 같이, ROR1은 AKT 활성을 상향조절하고, 그리고 항-ROR1 항체 D10에 MDA-MB-231 세포의 노출은 p-AKT 활성을 감소시켰다. 이들 데이터는 ROR1-조절된 AKT 활성화의 저해가 D10이 항종양 효과를 발휘하는 한 가지 기전일 수도 있다는 것을 암시한다.

[0130] 유방암 전이에 대하여, 특히 유전자 발현 서명을 이용하여, 원발성 유방 종양에서 ROR1의 발현이 빠, 폐, 그리고 뇌 전이를 비롯한 유방암 전이와 연관되는 것으로 밝혀졌다. 분석된 582개 사례 사이에서, 재발율은 ROR1 낮은 군에서 37%와 비교하여 ROR1 높은 군에서 55%이었다. 중요하게는, 이러한 재발율은 ROR1 75번째-100번째 군에서 63%까지 증가하였다. ROR1 발현은 또한, ER-, PR-, 그리고 Her2-를 비롯한 임상적으로 공격적 유방암 종양 표지자와 강하게 상관되었다. 비록 유방암 T-시기에 기초하여 이들 군 사이에 통계학적으로 유의한 차이가 없었지만, ROR1 높은 환자의 백분율이 T1과 T4 시기 각각에서 51%에서 77%로 증가하였다. 장기 특이적 전이 (유방암에서 폐 또는 뼈로)는 본 발명에 따른 ROR1 녹다운에 의해 유의미하게 저해되었다. 이들 데이터는 ROR1이 일정한 폐와 뼈 특이적 유전자, 예를 들면, CXCR4를 조절할 수 있다는 것을 암시한다.

[0131] 인간 케모킨은 19개의 상이한 G 단백질-연계된 케모킨 수용체에 결합하는 48개 리간드의 상과로 구성된다. 전이성 종양 세포는 케모킨 수용체-매개된 세포 이주 고속도로를 '장악'할 수 있는 것으로 가정되었다. 유방암 종양

세포는 CXCR4를 포함하는 선별된 케모킨 수용체를 발현한다. 본 발명에 따른 CXCL12-CXCR4 축의 저해는 세포주 MDA-MB 231의 폐로의 생체내 전이를 차단할 수 있다. ROR1에 대해 침묵된 MDA-MB-231 세포는 부모 MDA-MB-231 또는 CTRL-shRNA로 형질감염된 MDA-MB-231보다 CXCR4의 더욱 낮은 발현을 가졌다.

[0132] 유전자 발현 분석을 이용하여, ROR1의 발현은 또한, 폐 (도면 1B), 뼈 (도면 1C), 그리고 뇌 (도면 1D) 전이와 연관된 것으로 밝혀졌다. 위험 비율 분석에 기초하여, ROR1은 ER, PR 및 HER2보다 전반적인, 뼈, 그리고 폐 전이의 훨씬 우수한 예측자인 것으로 결정되었다. ROR1은 또한, ER과 ROR1 상태에 의한 유방암 환자 전반적인 재발의 전반적인 재발율에 기초하여 전이-관련된 예측자 유전자일 수 있다. 비록 전이없는 생존의 초기 단계에서 ER+와 ER- 사례 사이에 일부 차이가 있긴 했지만, ROR1 낮은 사례와 ROR1 높은 사례는 전이없는 생존의 후기 단계에서만 유의미한 차이를 가졌다. 따라서, 본 발명은 전이를 저해하고 환자 생존을 향상시키는 통로를 제공한다.

[0133] 일반적으로, 투여된 ROR1 항체, ROR1 항체 성분, 결합 웨티드 백신 조성물, 이들의 면역접합체 및 융합 단백질의 용량은 환자의 연령, 체중, 신장, 성별, 전반적인 의학적 상태 및 이전 병력과 같은 인자에 따라 변할 것이다. 전형적으로, 수용자에게 약 1 ng/kg 내지 20 mg/kg (작용제의 양/환자의 체중)의 범위에 있는 용량의 항체 성분, 백신, 면역접합체 또는 융합 단백질을 제공하는 것이 바람직하고, 하지만 상황에 따라서 더욱 낮은 또는 더욱 높은 용량 역시 투여될 수 있다.

[0134] 환자에 항체, 항체 성분, 백신, 면역접합체 또는 융합 단백질의 투여는 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 피하, 흉강내, 척수강내, 국부 카테터를 통한 관류, 또는 직접적인 병소내 주사일 수 있다. 치료적 단백질, 웨티드 또는 접합체를 주사에 의해 투여할 때, 투여는 연속적 주입에 의해 또는 단일 또는 복수의 일시 주사에 의해 이루어질 수 있다.

[0135] 당업자는 정맥내 주사가 급속히 분포하는 항체에서 순환의 철저함으로 인해 유용한 투여 방식을 제공한다는 것을 인식한다. 정맥내 투여는 하지만, 맥관구조와 내피하 매트릭스의 내피 세포를 포함하는 맥관 장벽에 의한 한계에 종속된다. 여전히, 맥관 장벽은 고형 종양에 의한 치료적 항체의 흡수에 대한 더욱 주목할 만한 문제점이다. 림프종은 상대적으로 높은 혈류 속도를 갖고, 효과적인 항체 전달에 기여한다. 림프관내 투여 루트, 예를 들면, 피하 또는 근육내 주사, 또는 림프관의 삽관술 역시 림프종을 치료하는 유용한 수단을 제공한다.

[0136] 바람직하게는, ROR1 항체, 결합 웨티드, 이들의 면역접합체 및 융합 단백질은 1회, 또는 반복적으로, 비경구 제공된 낮은 단백질 분량, 예를 들면, 복용당 20 내지 3000 밀리그램 단백질로 투여된다. 대안으로, 투여는 복용당 100 내지 300 밀리그램 단백질, 또는 복용당 300 내지 1000 밀리그램 단백질, 복용당 1000 내지 2000 밀리그램 단백질의 분량에 있다.

[0137] 본 발명은 또한, 치료 방법을 예기하는데, 여기서 ROR1 항체 성분은 방사성표지화되거나 또는 방사성표지화된 면역접합체 또는 융합 단백질 투여로 보충되었다. 한 번이어서, ROR1 항체는 저분량 방사성표지화된 ROR1 항체 또는 단편으로서 또는 이들과 함께 투여된다. 대안으로서, ROR1 항체는 저분량 방사성표지화된 ROR1-사이토킨 면역접합체와 함께 투여될 수 있다. 당업자는 제약학적으로 허용되는 방사성표지화 분자 및 이들의 적절한 투약 수준에 익숙할 것이다. 참고로, "저분량"의 <sup>131</sup>I-표지화된 면역접합체를 고려하고, 여기서 바람직한 용량은 15 내지 40 mCi의 범위에 있고, 반면 가장 바람직한 범위는 20 내지 30 mCi이다. 대조적으로, <sup>90</sup>Y-표지화된 면역접합체의 바람직한 용량은 10 내지 30 mCi의 범위에 있고, 반면 가장 바람직한 범위는 10 내지 20 mCi이다.

[0138] 본 발명은 모든 양상에서 다음 실시예에서 더욱 예시된다. 이를 실시예는 하지만, 발명의 범위를 한정하지 않고, 이것은 첨부된 청구항에 의해 규정된다.

[0139] 실시예 1

[0140] ROR1은 유방 선암종에서 초기 전이성 재발과 연관된다

[0141] 582명 환자의 합동된 코호트에서 환자로부터 단리된 유방암 세포에 관한 GEO 데이터베이스에서 전사체 데이터는 규문되었다. 이들 사례의 대략 2/3 (582건 중에서 426건)는 수술의 시기에 국소 림프절에서 검출가능한 암을 갖지 않았고, 그리고 보조 요법이 투여되지 않았다. 나머지 사례는 국소 림프절에서 검출가능한 질환을 가졌고, 그리고 어쥬번트 호르몬 요법 및/또는 화학요법을 받았다. 582 사례 사이에서, 46%는 재발하였고 (n=270), 그리고 22.1 개월의 중앙 전이없는 생존 기간을 가졌다. 환자는 ROR1의 상대적 암-세포 발현에 기초하여 3가지 군으로 격리되었다. ROR1 mRNA 발현 (ROR1<sub>H</sub>)의 위쪽-세 번째 수준을 갖는 종양을 앓는 환자는 ROR1의 더욱 낮은-세

번체-수준 ( $ROR1_L$ ) 또는 중간-수준 ( $ROR1_M$ ) 발현을 갖는 종양을 앓는 환자보다 훨씬 전이없는 생존을 가졌다 ( $p < 0.0001$ ; 도면 1A). 장기 부위에 의한 전이없는 생존이 조사되었다.  $ROR1_H$  종양을 앓는 환자는  $ROR1_L$  또는  $ROR1_M$  유방암을 앓는 환자보다 폐 ( $p = 0.002$ ; 도면 45A), 뼈 ( $p=0.004$ ; 도면 45B), 또는 뇌 ( $p=0.04$ ; 도면 45C)로 더욱 높은 비율의 전이를 갖는 것으로 밝혀졌다.  $ROR1_H$  암은  $ROR1_L$  또는  $ROR1_M$ 을 갖는 암보다, 우호적인 예측적 특질, 예를 들면, 에스트로겐/프로게스테론 수용체 또는 HER2을 갖는 종양의 훨씬 낮은 비율을 가졌다.

[0142]  $ROR1$ 의 높은-수준 발현은 또한, 더욱 짧은 전이없는 생존을 예측하는데 있어서 독립된 인자로서 수행하였다.  $ROR1_H$  종양을 앓는 환자는 ER, PR, 또는 HER2 상태와 상관없이,  $ROR1_{L/M}$  종양을 앓는 환자보다 더욱 높은 비율의 전이, 초기 재발, 그리고 더욱 불량한 생존을 가졌다 (도면 46). 게다가, 유방암에서 EMT 유전자 서명에 대한 GSE2034, GSE2603, GSE5327과 GSE12276 어레이 데이터의 규문은  $ROR1_L$  종양이  $ROR1_H$  종양보다 상피 세포와 연관된 유전자, 예를 들면, CDH1 (E-카드헤린을 인코딩), TJP1 (Z01을 인코딩), 그리고 TJP3 (Z03을 인코딩)의 훨씬 높은 발현 수준, 하지만 중간엽 세포와 연관된 유전자, 예를 들면, SNAI1 (Snail-1을 인코딩), SNAI2 (Snail-2를 인코딩), CDH2 (N-카드헤린을 인코딩) 또는 VIM (비멘틴을 인코딩)의 더욱 낮은 발현-수준을 갖는다는 것을 드러냈다 (도면 1B).

[0143] 실시예 2

[0144]  $ROR1+$  유방-암 세포주

[0145] 6개의 기저-유형 유방암 세포주 및 8개의 내강-유형 유방암 세포주를 비롯하여,  $ROR1$ 의 14개 상이한 유방-암 상피 세포주 발현이 조사되었다.  $ROR1$ 의 발현 수준은  $ROR1$ 을 일반적으로 발현하지 않은 내강-유형 유방-암 세포주에서 수준에 비하여 기저-유형 유방암 세포주에서 훨씬 커졌다. 게다가,  $ROR1$ 의 상대적 발현-수준은 공격적 종양 표현형, 예를 들면, 삼중 음성 ER<sup>Neg</sup>PR<sup>Neg</sup>HER2/Neu<sup>Neg</sup>, 그리고 시험관내에서 높은-수준 이주와 침입 능력과 상관되었다.

[0146]  $ROR1$ 은 2개의 상이한  $ROR1$  서열 중에서 어느 한쪽을 표적으로 하는 짧은 해어핀 RNA (shRNAs)를 이용하여 고도로-침습성, 기저-유형 유방암 세포주 (가령, MDA-MB-231)에서 침목되었다.  $ROR1$  단백질의 발현은 대조 shRNA (CTRL-shRNA)로 형질감염된 세포와 대조적으로,  $ROR1$ -shRNA1 또는  $ROR1$ -shRNA2로 형질감염된 세포에서 저해되었다 (도면 47A). CTRL-shRNA 또는  $ROR1$ -shRNA로 형질감염된 MDA-MB-231 (GEO 수탁: GSE31631) 사이에 유전자-발현 차이에 대한 어레이 데이터의 규문은  $ROR1$ 에 대해 침목된 세포가 부모 MDA-MB-231 또는 CTRL-shRNA로 형질감염된 MDA-MB-231보다 더욱 높은 발현-수준의 KRT19 (CK19를 인코딩), 더욱 낮은 발현-수준의 CXCR4와 VIM을 갖는다는 것을 드러냈다. 이들 조사 결과는 qRT-PCR에 의해 확증되었다 (도면 47B, 도면 48A). 유세포분석법 분석 역시 CXCR4의 세포 표면 발현이  $ROR1$ 에 대해 침목된 세포에서 더욱 낮다는 것을 증명하였다 (도면 48B).

[0147] EMT의 조절에서  $ROR1$ 의 잠재적 역할을 사정하기 위해, CTRL-shRNA 또는  $ROR1$ -shRNA로 처리된 세포에서 EMT-연관된 마커에 대해 조사하였다. 3가지 상이한, 기저-유형 유방-암 세포주 (MDA-MB-231, HS-578T, 또는 BT549) 중에서 어느 한쪽에서  $ROR1$ -siRNA 또는  $ROR1$ -shRNA1/2로  $ROR1$ 의 발현을 억제하는 것은 EMT와 연관된 mRNA 및/또는 인코딩된 단백질 (가령, 비멘틴, Snail-1/2, 그리고 ZEB1)의 발현을 약화시켰다. 반대로,  $ROR1$ 을 침목시키는 것은 mRNA 및 인코딩된 상피 시토케라틴 (가령, CK-19)의 발현을 증가시켰다. 비록 조사된 3 세포주 중에서 한 가지에서 ZO-1을 인코딩하는 TJP1 mRNA에서 유의미한 변화가 없었지만,  $ROR1$ 에 대해 침목된 세포는 이러한 밀착 결합 단백질의 더욱 높은 발현 수준을 가졌는데, 이것은 ZO-1이 전사후 조절 하에 있을지도 모른다는 것을 암시하였다 (도면 1C-D 및 도면 49). 최종적으로,  $ROR1$ 을 발현하는  $ROR1$ -음성 MCF7 세포의 형질감염은 상피 단백질 (가령, E-카드헤린 및 CK19)의 발현을 감소시키고, 그리고 EMT 전사 인자, 예를 들면, Snail/2의 발현을 증가시켰다 (도면 1E).

[0148] 배양 동안, MDA-MB-231, HS-578T, 또는 BT549 세포는 성상 형태를 전형적으로 전시하였는데, 이것은 시험관내에서 중간엽 세포의 것과 유사하다. 하지만,  $ROR1$ -shRNA로 형질감염 이후에, 이들 세포는 더욱 구형 형태를 취하였는데, 이것은 상피 세포의 것과 유사하였다 (도면 2A). CTRL-shRNA로 이들 세포의 형질감염은 이런 변화를 유도하지 않았다. 게다가, 면역형광 염색은  $ROR1$ -shRNA로 형질감염이 MDA-MB-231 세포가 중간 수준의 E-카드헤린 및 더욱 높은 수준의 CK-19를 발현하도록 유도하지만, 비멘틴의 발현을 감소시킨다는 것을 드러냈다 (도면 2B). HS-578T 또는 BT549 세포에 대해 유사한 결과가 또한 관찰되었다. 다른 한편, 처리되지 않은 세포 또는 대조 벡터로 형질감염된 세포와 비교하여,  $ROR1$ -음성 MCF7 세포는 중간엽 세포에 대한 형태적 유사성을 발달시키고, 그리고  $ROR1$ 을 발현하도록 형질감염될 때, 상피 마커 (가령, CK19 및 E-카드헤린)의 감소된 발현 및 간엽성 마커,

예를 들면, 비멘틴의 증가된 발현을 가졌다. 게다가, ROR1에 대해 침묵된 세포는 CTRL-shRNA로 처리된 세포의 것과 비교하여 더욱 낮은 이주/침입 능력을 가졌다 (도면 2E와 F). 또한, CXCL12를 향한 화학주성은 ROR1에 대해 침묵된 세포에서 유의미하게 감소되는 것으로 밝혀졌다 (도면 4G). ROR1-shRNA1 또는 ROR1-shRNA2로 침묵된 세포를 이용하여 사실상 동일한 결과가 획득되었다. 집합적으로, 이들 결과는 ROR1의 발현이 EMT 및 종양 전이에 기여할 수 있다는 것을 지시한다.

[0149] 실시예 3

[0150] ROR1을 침묵시키는 것은 정위 폐 전이를 저해한다

[0151] 세포 배양

[0152] 유방암 세포주 MDA-MB-231, HS-578T, BT549, MDA-MB-415, MDA-MB-435s, MDA-MB-436, MDA-MB-157, MDA-MB-134, MCF7, BT-474, MDA-MB-453, SKBR3, MDA-MB-330, 그리고 BT-483은 American Type Culture Collection (ATCC)으로부터 획득되고, 그리고 이전에 설명된 바와 같이 유지되었다 (Neve et al. Cancer Cell, 10:515 (2006)).

[0153] ROR1-녹다운

[0154] ROR1의 녹다운은 이전에 설명된 바와 같이, 서열 5' -TCC GGA TTG GAA TTC CCA TG-3' (shRNA1), 그리고 5' - CTT TAC TAG GAG ACG CCA ATA-3' (shRNA2)을 표적으로 함으로써 달성되었다 (Zhang, S. Et al., Cancer Cell, 16:67 (2009)). 비특이적 shRNA 대조는 서열 5' - AGC GGA CTA AGT CCA TTG C-3' 을 표적으로 함으로써 창출되었다. VirapowerTM 렌티바이러스 발현 시스템 (Invitrogen)은 제조업체의 지시에 따라 shRNA를 발현하는데 이용되었다. ROR1-shRNA1과 CTRL-shRNA1 구조체는 또한, 적색 형광 단백질 (RFP)을 인코딩하였다. ROR1-shRNA1과 CTRL-shRNA1 구조체에 대한 올리고뉴클레오티드가 합성되었고 (Integrated DNA Technologies) 및 RFP-pLKO.1 벡터 내로 삽입되었다. ROR1-shRNA2 및 CTRL-shRNA2 구조체는 Open Biosystems (Rockford, IL)로부터 구입되었다. 유방암 세포주의 감염을 위한 바이러스 입자는 293-FT 포장 세포주의 형질감염에 의해 획득되고, 그리고 형질감염후 48과 72 시간에 세포 상층액으로부터 수집되었다. 상층액은 바이러스 입자를 농축하기 위해 여과되고 43,000 x g에서 원심분리되었는데, 이들은 하룻밤 동안 5 µg/ml 폴리브렌의 존재에서 하위 함유성 배양액을 감염시키는데 이용되었다.

[0155] 형질감염후 24 시간에, 세포는 2 µg/ml 퓨로마이신으로 선별되었다. 녹다운 세포는 항-ROR1 mAb (4A5)를 이용한 유세포분석법에 의해 분류되었다. shRNA1 또는 shRNA2를 안정되게 발현하는 분류된 세포는 각각, ROR1-shRNA1 또는 ROR1-shRNA2로 지정되었다. 세브클로닝 없이 세포 분류후 첫 10 세대에서 획득된, 녹다운 세포의 모아진 개체군은 생체내 실험을 위한 rag-/-γ-/- 생쥐 내로 주사되었다. ROR1의 녹다운의 효율은 역전사 (qRT-PCR) Sybr 녹색 유전자 발현 검정 (Applied Biosystem), 또는 웨스턴 면역블롯 분석 (항-ROR1 항체, S4102, Cell Signaling)과 함께 정량적 PCR에 의해 확증되었다. β2-마이크로글로불린 및 액틴은 각각, qRT-PCR 및 웨스턴 블로트를 위한 내인성 대조로서 이용되었다.

[0156] 트랜스웰 이주와 침입 검정

[0157] 암 세포는 성장 인자 없이 0.2% 소 태아 혈청 (FBS)으로 보충된 Dulbecco의 변형된 Eagle 배지에서 하룻밤 동안 조건화되었다. 그 다음날, 세포는 트립신처리되고 성장 인자 없이 0.2% FBS DMEM 배지에서 재현탁되었다. 종양 세포는 이주 검정의 경우에 웰마다 25,000 세포의 밀도에서 트랜스웰 삽입물 (3 µM 구멍 크기, BD Falcon) 내로 또는 웰마다 50,000 세포의 밀도에서 매트리겔-코팅된, 성장-인자-감소된, 침입 챔버 (8 µM 구멍 크기, BD Biosciences) 내로 파종되었다. 웰은 인산염 완충된 식염수 (PBS)로 세척되고, 그리고 이주 검정의 경우에 6 시간 후 또는 침입 검정의 경우에 22 시간 후 4% 파라포름알데히드로 고정되었다. 각 삽입물의 첨단 쪽에서 세포는 찰과에 의해 제거되었다. 막의 기저 쪽으로 이주한 세포는 염색되고 Nikon 도립현미경으로 가시화되었다.

[0158] mRNA와 단백질 발현의 분석

[0159] 전체 RNA는 RNeasy 키트 (Qiagen)를 이용하여 정제되고, 그리고 2 µg의 각 표본이 높은-능력 cDNA 역전사 키트 (ABI)를 이용하여 cDNA를 산출하는데 이용되었다. 각 cDNA는 ABI 7500 빠른 실시간 PCR 시스템 (Applied Biosystem)을 이용하여 삼중으로 분석되었다. 단백질 발현 수준은 항-ROR1 (Cell Signaling) 및 항-β-액틴 항체 (Cell Signaling)를 이용하여, 단백질분해효소 저해제 (Roche)를 내포하는 용해 완충액 (20 mM HEPES (pH 7.9), 25% 글리세롤, 0.5 N NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.5 mM 디티오프레이톨, 그리고 0.1% 데옥시콜레이트)에서 세포 용해물 (40-60 µg)을 이용한 면역블롯 분석에 의해 사정되었다.

[0160] 유세포분석법

[0161] 유방암 세포는 염색되거나 또는 유세포분석법에 의해 풀 분류되었다. 세포는 세척되고, PBS 용액에 담긴 2% 소혈청 알부민 (BSA) (Sigma)에서 재현탁되고, 그리고 제조업자의 프로토콜에 따라 Alex488-접합된 항체 (클론 4A5 또는 클론 D10) 또는 Alex488-접합된 IgG2b 또는 IgG2a 아이소타입 대조를 이용하여 ROR1 발현에 대해 염색되었다. 유세포분석법 데이터는 FACSCalibur 세포계산기 (BD Biosciences)를 이용하여 수집되고 FlowJo 소프트웨어를 이용하여 분석되었다.

[0162] 면역형광과 면역조직화학 분석

[0163] 생쥐 폐는 4% 파라포름알데히드로 고정되고 조직병리학적 검사를 위해 파라핀에서 포매되거나 또는 OCT에서 동결되었다. 조직 절편 ( $5\text{ }\mu\text{m}$  두께)이 제조되고 혈마록실린 & 에오신 (H&E) 또는 p-AKT (Ser473, D9E, Cell Signaling), p-CreB (Ser133, 87G3, Cell Signaling), CK-19 (RCK108, Dako), 또는 비멘틴 (D21H3, Cell Signaling) 원발성 항체로 염색되었다. 이미지는 Delta Vision 현미경을 이용하여 수집되고 SPOT 소프트웨어로 처리되었다.

[0164] 전이의 분석

[0165] 암컷 Rag<sup>-/-</sup>γ<sup>-/-</sup> 생쥐는 부모 MDA-MB-231 ROR1-shRNA1 세포의 풀 (군 1), 그리고 부모 MDA-MB-231에 대한 대조 shRNA 세포 (군 2)가 주입되었다. 세포는  $100\text{ }\mu\text{l}$  PBS (군 1-2의 경우에  $5 \times 10^5$ ; 군 3-4의 경우에  $2 \times 10^5$ )에서 외측 꼬리 정맥을 통해 정맥내 주입되거나 또는  $100\text{ }\mu\text{l}$  PBS (군 5-6의  $1 \times 10^5$ )에서 심장내 주사에 의해 투여되었다. 비침습적 생물발광 영상화가 IVIS 200 영상화 시스템에 의해 주 1회 수행되었다. 이전에 죽거나 또는 병든 것으로 나타나지 않은 모든 생쥐는 주사 후 3-4 주에 안락사되고, 그리고 그들의 폐가 제거되고 10% 포르말린에서 고정되었다.

[0166] 유방 폐드 이종이식편의 생체내 전이에 대한 ROR1의 효과를 조사하기 위해, 유방암 종양은 오른쪽 복부 유선의 두 번째 지방체 구역 내로  $100\text{ }\mu\text{l}$ 의 단일-세포 혼탁액 ( $1 \times 10^6$  생존가능한 세포/생쥐)을 피하 주입함으로써 8-주령 암컷 Rag<sup>-/-</sup>γ<sup>-/-</sup> 생쥐에서 유도되었다. 종양 크기가 3 일 마다 계량되었다. 종양은 종양 체적이  $300\text{mm}^3$ 에 도달할 때 제거되었다. 유방암 전이에서 항-ROR1 단일클론 항체의 치료적 효과를 조사하기 위해, 유방암 종양은  $100\text{ }\mu\text{l}$ 의 단일-세포 혼탁액 ( $5 \times 10^5$  세포/생쥐)의 정맥내 주입을 통해 8-주령 암컷 Rag<sup>-/-</sup>γ<sup>-/-</sup> 생쥐에서 유도되었다. 생쥐 IgG 또는 항-ROR1 mAb는 주 1회 정맥내 주사되었다. 비침습적 생물발광 영상화가 주 1회 수행되었다. 이종이식편의 확립 후 5 주에, 생쥐는 회생되고 폐가 제거되고 10% 포르말린에서 고정되었다.

[0167] Oncomine 유전자 발현 데이터 분석

[0168] Pubmed GEO 데이터베이스 (GEO2603, GSE5327, GSE2034 및 GSE12276)로부터 582명 환자의 마이크로어레이 데이터세트가 편집되었다. 이들 데이터세트는 로그2에 의해 변환되고, 그리고 각 마이크로어레이에는 모든 프로브의 중앙에 중심되었다. 각 환자에 대해, 전이없는 생존은 수술 및 전이의 진단 사이에 시간 간격으로서 규정되었다. 인간 조직에서 ROR1 mRNA 발현의 상대적 수준은 공개된 유전자 발현 데이터 세트의 Oncomine Cancer Microarray 데이터베이스 분석 ([www.oncomine.org](http://www.oncomine.org))에 의해 결정되었다. 데이터는 로그-2-변환되었고, 중앙은 0으로 설정되고 s.d.는 1로 설정되었다.

[0169] 통계학적 분석. Kaplan-Meier 곡선 사이에 비교는 로그 순위 검사를 이용하여 수행되었다. 데이터는 평균 ± 평균의 표준 오차 (SEM)로서 표시된다. 비대칭 스튜던트 t 검증은 달리 지시되지 않으면, 두 군을 비교하는데 이용되었다.  $p<0.05$ 는 통계학적으로 유의한 것으로 고려되었다.

[0170] 전이없는 생존을 예측하는데 있어서 ROR1의 성과는 Cox 비례적 위험 회귀 모델로 다변량 분석에 의해 분석되었다. 각 공변량의 위험 비율 및 이의 95% 신뢰 구간이 보고된다. P-값은 정규 분포에 기초하여 계산되고, 귀무 가설 (위험 비율 = 1, 즉, 예측적 유의성 없음)이 참일 확률을 사정한다.

[0171] CTRL-shRNA-형질감염된 세포의 전이 잠재력은 정위 모델에서 루시페라아제/GFP-발현 벡터를 이용하여 안정되게 형질감염된 ROR1-shRNA-형질감염된 MDA-MB-231 세포와 비교되었다 (도면 3A). 면역 결합성 RAG<sup>-/-</sup>γ<sup>c/-</sup> 생쥐의 피하 유방 지방-폐드 내로  $2.5-10 \times 10^5$  세포의 주입은 주사의 부위에서 원발성 종양을 산출하였는데, 이들은 생물발광을 통해 모니터링될 수 있었다. 사전 연구에서 지적된 바와 같이, 최소한  $1 \times 10^6$  세포의 주입 후 3

또는 그 이상 주까지 ROR1-shRNA-형질감염된 세포와 대비하여 CTRL-shRNA-형질감염된 세포의 주입으로부터 발생한 중앙의 생물발광에서 진행성 증가에서 유의미한 차이가 관찰되지 않았다. '자발성' 암 전이의 비율에서 차이를 조사하기 위해,  $1 \times 10^6$  세포의 주입으로부터 기인하는 원발성 종양은 그들이 300mm<sup>3</sup>의 부피에 도달했을 때 외과적으로 제거되었다 (점선, 도면 3B). 상이한 성장을 때문에, 원발성 종양의 세포-주입에서부터 외과 제거까지 일자의 중앙 숫자는 동등한 숫자의 CTRL-shRNA-형질감염된 세포를 받은 생쥐 ( $31 \pm 0.5$  일)보다 ROR1에 대해 침묵된 세포가 주입된 생쥐 ( $40 \pm 2.5$  일)의 경우에 훨씬 커다 (도면 3B). 제거된 원발성 종양은 유사한 부피, 중량, 그리고 탈체 생물발광을 가졌다 (도면 3, C 내지 E). 원발성 종양의 제거 이후에, 생물발광을 통해 전이성 질환이 모니터링되었다. CTRL-shRNA-형질감염된 세포가 주입된 동물은 원발성 종양이 절제되는 추후 시점에서 ROR1에 대해 침묵된 세포가 이식된 생쥐보다 원발성 종양 절제의 시기에 폐 또는 간에서 훨씬 큰 생물발광을 가졌다 (도면 3, E와 F). ROR1에 대해 침묵된 세포가 주입된 동물은 CTRL-shRNA-형질감염된 세포가 주입된 생쥐의 것에 비하여 폐 생물발광에서 덜 검출가능한 증가를 가졌다 (도면 3G). 이를 동물은 폐 (도면 3, H 내지 J) 및 간 (도면 3, K와 L)의 탈체 생물발광, 크기, 그리고 조직학을 조사하기 위해 그들의 원발성 종양이 절제된 후 21 일자에 희생되었다. CTRL-shRNA-형질감염된 세포가 주입된 생쥐의 제거된 폐와 간은 ROR1-침묵된 세포가 주입된 생쥐의 것들보다 훨씬 생물발광과 중량을 가졌다. 게다가, CTRL-shRNA-형질감염된 세포가 주입된 생쥐의 폐와 간은 ROR1-침묵된 세포가 주입된 생쥐에서 보편적으로 광범위한 전이성 질환을 가졌는데, 이것은 ROR1-침묵된 세포가 주입된 생쥐의 조직에서 관찰되지 않았다 (도면 3, J와 L).

[0172] 실시예 4

[0173] ROR1을 침묵시키는 것은 실험적 폐와 뼈 전이를 저해한다

[0174] ROR1-shRNA 또는 CTRL-shRNA 형질감염된 MDA-MB-231 세포는 정맥 또는 동맥혈 내로 주입된 세포의 전이 잠재력에서 차이를 평가하기 위해 정맥내 ( $5 \times 10^5$  세포) 또는 심장내 ( $1 \times 10^5$  세포) 주사를 통해 6-주령 Rag<sup>-/-</sup> γ<sup>-/-</sup> 생쥐에 투여되었다. 외측 꼬리 정맥 내로 CTRL-shRNA-형질감염된 세포를 받은 모든 동물은 폐 전이로 인해 주사 후 32 일 이내에 죽었다. 동등한 숫자의 ROR1-shRNA-형질감염된 세포가 꼬리 정맥 내로 주입된 동물은 훨씬 길게 생존하였다 (도면 4A). CTRL-shRNA-형질감염된 세포가 주입된 동물은 ROR1에 대해 침묵된 세포가 주입된 생쥐보다, 21 일자와 또는 28 일자에 각각, 폐에서 19-배 또는 60-배 큰 생물발광을 가졌다 (도면 4B). 또한, 다른 실험에서 전이성 질환에 대해 폐를 조사하기 위해 다양한 시점에서 동물을 희생시켰다. 미성숙 전이성 초점은 CTRL-shRNA-형질감염된 세포의 주입 후 3 일 자에 쉽게 검출되는 반면, ROR1-침묵된 세포가 주입된 동물의 폐에서는 심지어 추후 시점에서도, 있다 하더라도 극소수의 전이성 초점만 검출될 수 있었다 (도면 4C-E). 게다가, CTRL-shRNA-형질감염된 세포가 주입된 생쥐로부터 제거된 폐는 ROR1-침묵된 세포가 주입된 생쥐의 폐보다 훨씬 큰 탈체 생물발광과 중앙 중량 (21 일과 28 일자에 각각, 3-배 및 6-배)을 가졌다 (도면 4F-G, 데이터 제시되지 않음). CTRL-shRNA-형질감염된 세포가 주입된 동물에서 발달된 전이성 초점은 또한, 더욱 높은 수준의 CK-19 및 더욱 낮은 수준의 비멘틴을 대신 발현하는 ROR1-침묵된 세포가 주입된 생쥐에서 검출된 극소수 전이성 초점보다 더욱 높은 수준의 포스포-AKT와 포스포-CREB를 발현하고, 그리고 더욱 높은 비율의 증식 세포를 가졌다 (도면 4H).

[0175] 왼쪽 심실 내로  $1 \times 10^5$  세포의 주입 이후에 전이성 질환에 대해 또한 조사하였다. CTRL-shRNA-형질감염된 세포를 받은 모든 생쥐는 이러한 주사 후 30 일 이내에 죽은 반면, ROR1-침묵된 세포가 주입된 동물은 훨씬 길게 생존하였다 (도면 4H). CTRL-shRNA-형질감염된 세포가 주입된 생쥐는 실제적인 대퇴/골반-구역 생물발광을 발생시켰는데, 이것은 ROR1에 대해 침묵된 종양 세포가 주입된 생쥐에서 검출되지 않았다 (도면 4, I와 J). 동물은 21 일자에 희생되고, 그리고 CTRL-shRNA-형질감염된 세포가 주입된 생쥐의 단리된 대퇴/골반 뼈는 광범위한 골수 전이 (도면 4L)에 기인한 높은 생물발광 (도면 4 K)을 갖는 것으로 밝혀졌는데, 이것은 ROR1에 대해 침묵된 세포가 주입된 생쥐에서 명백하지 않았다.

[0176] 최근 연구는 상이한 조직-부위가 순환하는 암 세포에 의한 전이의 확립을 위한 상이한 요건을 부과한다는 것을 발견하였다. 상이한 조직 향성을 갖는 인간 유방암 세포주 BoM1833과 LM2-4175가 MDA-MB-231로부터 선별되었다. BoM-1833은 뼈로 우선적으로 전이하고, 그리고 LM2-4175는 폐로 우선적으로 전이한다. 이를 세포주 각각은 ROR1의 발현을 유지하는 것으로 밝혀졌다 (도면 5A). ROR1-shRNA2로 각 세포주의 형질감염은 ROR1의 발현을 침묵시키고 (도면 5B와 C), 6-주령 RAG-/- γ c/- 생쥐 내로  $2 \times 10^5$  LM2-4175의 정맥내 주사 또는  $1 \times 10^5$  BoM-1833의 심장내 주사 이후에, 장기-특이적 전이의 ROR1-의존성을 조사하는 것을 가능하게 하였다. ROR1에 대해 침묵된 LM2-4175가 주입된 생쥐는 CTRL-shRNA-형질감염된 LM2-4175가 주입된 생쥐보다 폐 생물발광에서 훨씬 낮은 중앙

증가 및 훨씬 긴 중간 생존을 가졌다 (도면 5D 및 E). 이들 관찰과 일치하게, ROR1-침묵된 LM2-4175의 주입 후 21 일자에 단리된 생쥐의 폐는 CTRL-shRNA-형질감염된 LM2-4175가 주입된 생쥐보다 훨씬 낮은 중앙 중량, 탈체 생물발광, 그리고 더욱 적고 더욱 작은 전이성 초점을 가졌다 (도면 5F 내지 H). 유사하게, ROR1에 대해 침묵된 BoM-1833이 주사된 생쥐는 동등한 숫자의 CTRL-shRNA-형질감염된 BoM-1833이 주사된 생쥐보다 골격 생물발광에서 훨씬 낮은 증가를 가졌다 (도면 5I와 J). 게다가, 심장내 주사 후 21 일자에 희생된 동물의 부검은 뼈 또는 간에서 있다 하더라도 극소수의 검출가능한 전이성 초점을 드러냈다. 이것은 CTRL-shRNA-형질감염된 BoM-1833이 주입된 동물에서 이들 부위 각각에서 검출된 광범위한 전이성 질환과 현저한 대조를 이루었다 (도면 5J와 K).

[0177] 실시예 5

[0178] 항-ROR1 항체는 암 전이를 저해한다

[0179] ROR1의 세포외 도메인에 특이적인 단일클론 항체 (mAb)가 산출되었고, 그리고 D10으로 지정된 것은 37°C에서 표면 ROR1의 급속한 하향조정을 유도할 수 있었다 (도면 5A). D10으로 MDA-MB-231의 처리는 공초점 혈미경검사에 의해 사정될 때, ROR1 내재화를 유발하였다 (도면 5B). 이것은 ROR1의 상이한, 비-교차 차단 에피토프에 특이적인 상이한 mAb를 이용한 유세포분석법에 의해 사정될 때, 표면 ROR1의 유의미한 감소를 유발하였다 (도면 5C). D10으로 MDA-MB-231의 처리는 또한, 세포질 비멘틴의 발현을 감소시켰는데 (도면 5D), 이것은 공동-면역-침전 연구에서 ROR1에 결합되었다 (도면 5E). D10으로 처리는 또한, 시험관내에서 MDA-MB-231의 이주와 침입 능력을 유의미하게 저해하였다 (도면 5F와 G). D10은 또한, 다른 ROR1+ 암 세포주 (가령, HS-578T 및 BT549)의 이주/침입 능력을 저해할 수 있었다 (도면 9).

[0180] D10은 RAG-/- γc-/- 생쥐의 꼬리 정맥 내로 주입된 MDA-MB-231의 침입과 전이의 저해에 대해 사정되었다.  $5 \times 10^5$  세포의 주사 이후에, 이들 생쥐는 5 mg/kg에서 대조 IgG 또는 D10의 정맥내 주사가 제공되고, 그리고 이후, 3 일 후 희생되었다. D10이 제공된 동물로부터 폐의 탈체 생물발광은 대조 IgG로 처리된 동물의 것보다 훨씬 낮았다 (도면 5H). 게다가, 대조 IgG를 받은 동물의 폐는 복수의 전이성 초점을 가졌는데, 이들은 D10으로 처리된 생쥐에서 검출되지 않았다. 다른 실험에서, 각 생쥐는  $5 \times 10^5$  MDA-MB-231의 정맥내 주사를 받았고, 그리고 이후, 5 mg/kg에서 대조 IgG 또는 D10의 정맥내 주사가 주 3회 제공되었다. D10으로 처리된 생쥐는 대조 IgG가 제공된 생쥐보다 훨씬 적은 폐 생물발광을 발생시켰다 (도면 5, I와 J). 35 일자에 희생될 때, D10으로 처리된 생쥐의 폐는 대조 IgG가 제공된 동물의 폐보다 훨씬 낮은 중량 (도면 5 K) 및 더욱 적은 전이성 초점 (도면 5L)을 가졌다. 집합적으로, 이들 데이터는 D10이 면역 결합성 생쥐에서 전이를 저해할 수 있다는 것을 지시한다.

[0181] 결론적으로, ROR1은 유방암 전이를 막개할 수 있고, 그리고 ROR1의 치료적 표적화는 유방암 전이 발생을 자연스럽게 저해할 수 있는 것으로 본원에서 증명된다. 비록 배아 줄기 세포가 검출가능한 ROR1 단백질을 발현하고, 그리고 ROR1의 손실이 ROR2-결합성 생쥐에서 심장과 골격 비정상을 증강할 수 있긴 하지만, 주요 성체 조직은 혀장과 지방 조직에서 낮은 수준을 제외하고, ROR1 단백질을 드물게 발현하고, ROR1 암 특이성을 갖는 본 발명의 항체 및 이들의 이용 방법을 제공한다.

[0182] 실시예 6

[0183] ROR1 높은 친화성 항체

[0184] 앞서 설명된, ROR1 항체 D10에서 에피토프 연구가 수행되었다.

[0185] ROR1을 하향조정하고, 비멘틴의 발현에서 감소를 달성하고, 그리고 시험관내에서 암-세포 이주 (전이를 형성하는 암의 능력의 우수한 대리 마커)를 저해할 수 있는 D10에 의해 인식된 에피토프(들)을 지도화하기 위해 인간과 생쥐 ROR1의 스트레치를 갖는 일련의 키메라 단백질이 산출되었다. 관련되는 ROR1의 유일한 영역은 ROR1의 아미노 말단에 있는 Ig-유사 도메인이다. 각 구조체는 키메라 Ig-유사 도메인 및 인간 CRD과 크링글 도메인 (생쥐 부분은 밝고, 인간 부분은 어둡다)을 내포한다. 단지 Ig-유사 도메인만 여기에 도시된다 (도면 6). 이들 구조체는 자유 형식 293 세포에서 발현되었다. 배양 배지는 면역불록에 이용되고, 그리고 정제된 단백질은 ELISA에 이용되었다. D10 mAb 항-ROR1이 인간 ROR1을 인식하지만 생쥐 ROR1을 인식하지 못하기 때문에, 이들 구조체가 결합할 수 있거나 또는 결합할 수 없는 지의 발견은 D10에 의해 인식된 에피토프를 지도화하는데 도움을 줄 수 있었다. 이들 결과는 항체 D10이 CRD 도메인에 인접한 Ig 유사 도메인의 C-말단에서 ROR1에 결합한다는 것을 지시한다 (도면 7). 도면 8은 ROR1 항체 4A5에 대한 에피토프의 지도화를 보여준다. 지시된 바와 같이, 4A5 에피토프는 D10 에피토프와 상이하다.

[0186] 전술한 바와 같이, 항-ROR1 항체, 즉, D10은 생체내에서 MDA-MB-231 세포의 폐 전이를 저해할 수 있다. D10 단

일클론 항체는 ROR1 수용체 내재화를 용이하게 한다 (도면 9 A,B). MDA-MB-231 세포는 열음 위에서 30 분 동안 이소-Alex647, 또는 D10-Alex647로 염색되었다. 염색된 세포는 이후, 2가지 분획물로 분리되었다. 한 분획물은 열음 위에서 1 시간 동안 유지되고, 그리고 다른 분획물은 15 분, 30 분 동안 37°C로 이전되었다. 24 시간 항-ROR1 항체 D10 처리는 MDA-MB-231 세포에서 ROR1 표면 발현을 감소시킨다 (도면 9C). ROR1은 유방암 MDA-MB-231 세포에서 비멘틴과 복합체를 형성한다 (도면 9D). 시험관내 D10 항체 처리는 비멘틴 발현을 감소시킬 수 있었다 (도면 9E). 항-ROR1 항체는 시험관내에서 유방암 이주를 감소시킨다 (도면 9F). D10 단일클론 항체는 MDA-MB-231 유방암 초기 단계 (2 일) 폐 전이를 저해한다 (도면 9G). D10 단일클론 항체는 MDA-MB-231 유방암 폐 전 이를 저해한다 (도면 9H). 이종이식편 생쥐는 1 일자에 200 mg 항-ROR1 항체, 그리고 3, 7, 14, 그리고 21 일자에 100 mg 항-ROR1 항체가 정맥내(i.v.) 주사되었다. MDA-MB-231 보유 생쥐의 폐로부터 정규화된 광전자 플러스가 도시된다. 5E5 MDA-MB-231 세포가 주입된 대표적인 생쥐는 배측 위치에서 도시된다 (도면 9I). 항-ROR1 항체 처리는 MDA-MB-231-보유 생쥐의 폐 중량을 감소시켰다 (도면 9J). 항-ROR1 항체 처리 후 MDA-MB-231-보유 생쥐로부터 대표적인 폐 H&E 조직학 (도면 9 K). 오차 막대는 SEM을 표시한다; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01; 비대칭 양쪽 스튜던트 t-검증에 기초됨.

[0187]

도면 6에서 묘사된 구조체는 높은 친화성 재조합 항체를 선별하는데 이용되었다. 선천적 웨스턴은 또한, 3개의 인간화 D10-유사 mAb 모두 D10과 동일한 애피토프를 표적으로 하고, 그리고 인간 ROR1에 결합을 위해 아미노산 138을 필요로 한다는 것을 지시하였다 (도면 10). 인간과 키메라 ROR1-ex 구조체는 293 세포 내로 형질감염되었다. 이것은 상이한 항-ROR1 mAb로 면역블롯 분석을 위한 비-변성 PAGE 겔 또는 SDS PAGE 겔에서 크기 분리될 수 있는 재조합 인간-생쥐 키메라 ROR1 단백질의 생산을 허용하였다. 이들 결과는 D10과 99961 항체 둘 모두 Ig-유사 도메인의 C-말단에서 동일한 영역에 결합하고, 그리고 D10과 99961이 변성된 조건과 선천적 조건 둘 모두 하에 ROR1에 결합할 수 있다는 것을 지시한다. 완전한 인간 세포의 도메인은 어느 한쪽 겔의 왼쪽 끝 레인에서 제공된다 (도면 11). 항체 99961은 D10보다 ROR1에 대한 50x 높은 결합 친화성 및 D10보다 많이 감소된 백혈병 부담을 갖는다 (도면 12). 99961 항체는 인간화되어 99961.1, 99961.2, 99961.3 및 99961.4로 지정된 4가지 항체를 생산하였다.

[0188]

ROR1 항체 99961의 특성화

[0189]

인간 제대혈 재구성된 면역 결합성 생쥐에서 CLL 세포에 대항하여 99961의 비활성도를 증명하기 위한 검정이 수행되었다. 인간 면역계를 발달시키기 위해 인간 제대혈 (CB) 세포로 재구성된 Rag-/-γ-/- 생쥐는 새로운 또는 동결된 CLL PBMC가 i.p. 주사되었다. 그 다음날, 이들 생쥐는 1 mg/kg 99961 또는 D10 또는 대조 mIgG가 i.v. 제공되었다. 7 일 후, 복강으로부터 CLL PBMC 세포가 수확되고 유세포분석법에 의해 분석되었다 (도면 13A). 상기 데이터는 99961이 CLL 세포의 >90%를 제거하고, 그리고 정상적인 인간 B 또는 T 세포 발달에 대한 효과가 없다는 것을 지시한다 (도면 13B, C).

[0190]

ROR+ 원발성 AML에서 99961의 비활성도를 증명하기 위한 연구가 또한 수행되었다. 이들 결과는 99961이 원발성 집락의 생존 및 이차성 집락의 자가 재생 능력을 감소시킨다는 것을 지시한다 (도면 14).

[0191]

99961 mAb의 애피토프 지도화는 이러한 애피토프가 다양한 암에서만 발현되고, 그리고 제대혈 세포 또는 성체 인간과 선조체 세포 또는 태아 간으로부터 유래된 줄기 세포에서 발현되지 않는다는 것을 증명하였다 (도면 15). 또한, 99961은 백혈병 세포에 결합하지만 정상적인 성체 조직과 교차 반응하지 않는 것으로 밝혀졌다 (도면 16). 40개 림프종으로부터 절편을 갖는 림프종 다중-조직 어레이가 Lifescan Biosciences (LS-SLYCA5)로부터 획득되고, Ab9991이 악성 세포에 결합되는 5가지 사례를 가졌다. 복수의 상이한 정상적인 조직으로부터 절편을 갖는 Biomax (FDA999)로부터 정상적인 다중-조직 어레이에는 99961과 결합하는 특정한 구역 없음을 보여주었다. 면역조직화학은 DAKO (Carpenteria, CA)로부터 높은 pH 완충액으로 열 유도된 항원 회수를 이용하여 수행되고, 그 이후에 비오티닐 티라마이드 증폭 (DAKO로부터 CSA 키트)을 이용한 증강이 수행되었다.

[0192]

99961의 PK 연구는 Rag-/-γ-/- 생쥐에 iv 주사된 1 mg/생쥐 항체로 수행되었다. 혈액은 상이한 시점에서 채취되고, 그리고 혈장에서 99961 mAb의 수준은 ELISA에 의해 계량되었다. 이들 결과는 항체 반감기가 11.4 일이고, 부피가 1.18 mL (47 mL/kg)이고, 그리고 청소율이 0.072 mL/일 (0.12 mL/시간/kg)이라는 것을 지시하는데, 이들 모두 다른 거대 분자 및 임상적으로 활용된 항체와 일치한다 (도면 17).

[0193]

실시예 7

[0194]

ROR1 캡티드 백신

[0195]

앞서 논의된 바와 같이, D10은 ROR1의 CRD 도메인에 인접한 Ig-유사 도메인의 카르복시 말단에서 결합하는 것으로

로 밝혀졌다. 항체 4A5는 Ig-유사 도메인 내에 상이한 에피토프에 결합하고 생물학적 활성을 결여한다. 이들 mAb의 에피토프는 키메라 ROR1-ex 및 인간과 생쥐 ROR1 사이에 상이한 아미노산의 부위-돌연변이에 의해 확증되었다. D10, 4A5 및 다른 ROR1 항체가 결합하는 ROR1의 세포외 도메인에 상응하는 웨티드, A19, R22 및 K19가 작제되었다. A19 웨티드는 4A5 mAb에 의해 인식된 에피토프에 상응한다; R22 웨티드는 D10 mAb, 99961 mAb (즉, VATNGKEVVSSTGVLFVKGPC), 그리고 인간화 99961 mAb에 의해 인식된 에피토프에 상응한다; 그리고 K19 웨티드는 ROR1에 특이적인 다른 mAb에 의해 인식되는 크링글 도메인 내에 영역에 상응한다 (도면 18). 이들 3개의 웨티드는 어쥬번트 완전한 프로인드 어쥬번트 (CFA) 또는 불완전 프로인드 어쥬번트 (IFA)에서 면역화를 위해 키홀 림 펫 헤모시아닌 (KLH)과 C-말단에서 각각 접합되었다. 시스테인 (C)가 C-말단에서 부가되고 MBS로 KLH에 접합을 위해 이용되었다 (도면 20). 접합 반응은 도면 19에서 묘사된다. 접합된 웨티드는 D10과 99961에 결합하는 것으로 나타났다 (도면 21). C57BL/6 및 유전자도입 생쥐는 접합된 웨티드로 면역화되었다. 항체 역가는 면역화 후 4 주에 수집되었다. R22-KLH 백신은 C57BL/6 생쥐 또는 ROR1-Tg 생쥐에서 항-ROR1 항혈청의 가장 높은 역가를 유도하였다 (도면 28). 이러한 실험은 D10 에피토프의 16개 아미노산 웨티드, R16으로 반복되었는데, 이것 역시, 비록 역가가 일반적으로 R22-KLH에 의해 유도된 것들보다 더욱 낮긴 하지만 (데이터 제시되지 않음), 인간 ROR1 단백질과 반응하는 항체를 유도하였다.

[0196]

R22-KLH 백신에 의해 유도된 항-ROR1 항체는 EW36, JeKo-1, 또는 CLL 세포 상에 존재하는 표면 ROR1에 결합하는 것으로 나타났다 (도면 29). 본 연구를 위해, R22-KLH로 면역화된 생쥐로부터 항혈청의 희석액이 4°C에서 20 분 동안 이들 세포와 함께 배양되었다. 이들 세포는 이후, 세척되고, 그리고 이후, 유세포분석법에 의한 검출을 위해 플루오로크롬과 접합된 염소 항-생쥐 Ig로 표지화되었다. 개방성 히스토그램은 세포를 R22-KLH 항혈청과 함께 먼저 배양하지 않으면서 염소 항-생쥐 Ig로 염색된 이들 세포이다. 음영된 히스토그램은 먼저, 항-R22-KLH 항혈청과 함께 배양된 세포의 형광이다. 이들 세포의 형광에서 증가는 표면에 결합된 생쥐 항-ROR1 항체에 기인하는데, 이들은 이후, 염소 항-생쥐 Ig로 검출되었다. 이들 생쥐의 전-면역화 항혈청 또는 KLH로 면역화된 생쥐의 항혈청은 이들 세포에 결합하지 않았다 (도면 29).

[0197]

R22-KLH 유도된 항혈청은 보체 의존성 세포독성에 대해 조사되었다. EW36, JeKo-1, CLL-1 및 CLL-2 세포는 세척되고, 그리고 둥근 바닥 96-웰 평판 (Corning Costar) 내에 RPMI/10% FBS에서 웰마다  $5 \times 10^5$  세포로  $25 \mu\text{l}$ 에서 도말되었다. 희석된 항혈청 ( $25 \mu\text{l}$ ) 및  $25 \mu\text{l}$ 의 아기 토끼 보체의 1:5 희석액이 웰마다 첨가되었다. D10 mAb가 양성 대조로서 이용되었다. 모든 조건은 삼중으로 수행되었다. 평판은 37°C에서 4 시간 동안 배양되었고, 그리고 세포는 DiOC6/PI 염색 및 유세포 계측 분석에 의해 생존력에 대해 즉시 정량되었다. 본 연구는 D10 또는 R22 웨티드에 대하여 산출된 항혈청이 인간 ROR1을 보유하는 세포의 보체-매개된 용해를 주도할 수 있었다는 것을 지시한다 (도면 30). ROR1을 보유하지 않는 세포는 사멸되지 않았다.

[0198]

R22-KLH에 의해 유도된 이들 항체의 Ig 하위부류가 조사되었다. 이를 위해, 인간 ROR1로 코팅된 평판을 이용한 ELISA가 이용되었고, 이들은 이후, 희석된 항혈청과 함께 배양되고, 세척되고, 그리고 이후, x 축에서 표시된 바와 같이, IgG 하위부류 각각에 특이적인 효소-접합된 이차성 항체를 이용하여 검출되었다. 이들 결과는 IgG1, IgG2a, IgG2b 및 IgG3 모두 변하는 정도에서 유도된다는 것을 보여주었다. IgG2a, IgG2b 및 IgG3은 Th1 프로필과 연관되고, 그리고 IgG1은 Th2 프로필과 연관된다. 이들 결과는 Th1과 Th2 CD4+ T 보조 세포 둘 모두 예방접종 후 활성화된다는 것을 지시한다.

[0199]

R22-KLH는 도면 31에 나타나 있는 바와 같이 C57BL/6 생쥐를 면역화하는데 이용되었다. KLH 또는 R22-KLH 웨티드의 첫 번째 주사는 CFA에 있었다. 두 번째 및 차후 주사는 IFA에 있었다. 이들 동물은 자주색 화살표로 표시된 일자에 채혈되었다. 첫 번째 주사의 일자 후 44 일에, C57BL/6 생쥐는 인간 ROR1-유전자도입 생쥐에서 기원된 인간-ROR1-발현 CLL 세포로 공격되었다. 이러한 생쥐는 T-세포-백혈병 1 (TCL1 유전자)에 대해 유전자도입이었다. 양쪽 도입유전자는 B-세포 특정한 프로모터/인핸서 (E-C $\mu$ )의 제어 하에 있다. 이러한 백혈병은 인간 CLL과 유사하고 인간 표면 ROR1을 발현한다.

[0200]

수집된 항혈청은 R22-KLH로 면역화된 생쥐에서 백혈병 세포 부담에서 유의미한 감소를 산출하지만, KLH로 면역화된 생쥐에서는 그렇지 않았다. (도면 32).

[0201]

C57BL/6 생쥐

[0202]

R22-KLH는 도면 33에 나타나 있는 바와 같은 개요에 따라 C57BL/6 생쥐를 면역화시키는데 이용되었다. KLH 또는 R22-KLH 웨티드의 첫 번째 주사는 CFA에 있었다. 두 번째 및 차후 주사는 IFA에 있었다. 이들 동물은 자주색 화살표로 표시된 일자에 채혈되었다. 첫 번째 주사의 일자 후 44 일에, C57BL/6 생쥐는 인간 ROR1-유전자도입 생쥐에서 기원된 인간-ROR1-발현 CLL 세포로 공격되었고, 상기 생쥐는 또한, T-세포-백혈병 1 (TCL1 유전자)에 대

해 유전자도입이었다. 양쪽 도입유전자는 B-세포 특정한 프로모터/인핸서 ( $E-C\mu$ )의 제어 하에 있다. 이러한 백혈병은 인간 CLL과 유사하고 인간 표면 ROR1을 발현한다.

[0203] 인간 ROR1에 대한 항체 반응은 42 일자에 R22-KLH로 면역화된 생쥐에서 관찰되지만, KLH로 면역화된 생쥐에서는 관찰되지 않았다. R22-KLH로 면역화된 4마리 생쥐 모두 재조합 인간 ROR1 단백질의 세포외 도메인으로 코팅된 평판을 이용한 ELISA를 통해 검출될 때 인간 ROR1에 대한 높은-역가 항체를 산출하였다. 이들 데이터는 R22-KLH 웨티드로 면역화가 ROR1에 대한 자기관용을 깨뜨릴 수 있다는 것을 지시하고, 이것은 이들 ROR1-Tg 생쥐의 모든 B 세포에서 발현된다. R22-KLH 웨티드가 제공된 이들 생쥐로부터 비장은 대조 동물과 유사하게 남아있었지만, KLH 생쥐는 훨씬 큰 비장을 가졌다 (도면 34).

[0204] CD5 또는 ROR1에 특이적인 플루오로크롬-접합된 mAb를 이용하여, KLH 또는 R22-KLH로 면역화된 C57BL/6 생쥐로부터 비장세포의 유세포분석법. 이를 세포를 염색하는데 이용된 mAb는 R22-KLH에 의해 유도된 ROR1의 비-교차 차단 애피토프에 결합한다. 주목할 점은 R22-KLH 백신으로 면역화된 생쥐의 비장에서 있다 하더라도 훨씬 적은 백혈병 세포가 있다는 것이다 (도면 39).

[0205]  $1 \times 10^5$  인간-ROR1+ CLL 세포와 함께 30 일 전에 R22-KLH 웨티드가 주사된 C57BL/6 생쥐의 비장에서 발견된 백혈병 세포의 총수는 KLH가 주사된 생쥐의 비장보다 훨씬 낮았다. 비장당 백혈병 세포의 숫자는 비장세포 개체군에서 백혈병 세포의 퍼센트 (유세포분석법에 의해 사정됨)를 비장으로부터 수확된 비장세포의 숫자에 의해 증배 함으로써 도출되었다 (도면 34).

[0206] KLH 또는 R22-KLH로 면역화된 생쥐의 비장에서 CD8+ 세포의 숫자는 유세포분석법에 의해 결정되었다. R22-KLH로 면역화 이후에, CD8 T 세포에서 극적인 증가가 있었는데, 이들은 KLH로 면역화된 생쥐에서 증가되지 않았다. 아래쪽 열은 75 일자에 생쥐의 비장으로부터 수확된 CD8 T 세포의 절대 숫자를 지시한다 (도면 37).

[0207] C57BL/6 ROR1 유전자도입 생쥐

[0208] 유전자도입 생쥐는 도면 38에 나타나 있는 바와 같이 R22-KLH 또는 KLH가 주사되었다. 이를 생쥐는 B-세포 특정한 프로모터/인핸서 ( $E-C\mu$ ) 하에 인간 ROR1에 대해 유전자도입이다. KLH 또는 R22-KLH 웨티드의 첫 번째 주사는 CFA에 있었다. 두 번째 및 차후 주사는 IFA에 있었다. 이를 동물은 자주색 화살표로 표시된 일자에 채혈되었다. 첫 번째 주사의 일자 후 44 일에, C57BL/6 생쥐는 ROR1-Tg 생쥐에서 기원된 인간-ROR1-발현 CLL 세포로 공격되었고, 상기 생쥐는 또한, T-세포-백혈병 1 (TCL1 유전자)에 대해 유전자도입이었다. 양쪽 도입유전자는 B-세포 특정한 프로모터/인핸서 ( $E-C\mu$ )의 제어 하에 있다. 따라서 이들 ROR1-Tg 생쥐는 인간 ROR1을 발현하는 B 세포를 갖는다. 이를 결과는 R22-KLH 웨티드가 ROR1을 발현하는 생쥐에서 항-ROR1 보호 면역성을 유도하고, 따라서 자기관용을 깨뜨릴 수 있다는 것을 증명한다.

[0209] 인간 ROR1에 대한 항체 반응은 42 일자에 R22-KLH로 면역화된 ROR1-Tg 생쥐에서 관찰되지만, KLH로 면역화된 생쥐에서는 관찰되지 않았다. R22-KLH로 면역화된 4마리 생쥐 모두 재조합 인간 ROR1 단백질의 세포외 도메인으로 코팅된 평판을 이용한 ELISA를 통해 검출될 때 인간 ROR1에 대한 높은-역가 항체를 산출하였다. 유세포분석법에 의한 추가 분석은 KLH로 면역화된 생쥐보다 R22-KLH 백신으로 면역화된 생쥐의 비장에서 있다 하더라도 더욱 적은 백혈병 세포가 있다는 것을 증명하였다 (도면 40). FACs 분석 역시 ROR1이 R22-KLH로 면역화된 생쥐에서 하향조절되지만 KLH로 면역화된 생쥐에서는 그렇지 않다는 것을 보여주었다. R22-KLH로 면역화된 생쥐로부터 비장은 KLH로 면역화된 생쥐와 비교하여 훨씬 적은 백혈병 세포를 가졌다. C57BL/6 생쥐에서처럼, R22-웨티드-KLH로 면역화는 CD8 T 세포에서 극적인 증가를 야기하였는데, 이것은 KLH로 면역화된 생쥐에서 증가되지 않았다 (도면 39). 유사한 결과는 CD4+ T 세포 (도면 43) 및 CD3+ T 세포 (도면 42)에서 관찰되었다.

[0210] BALB/c 생쥐

[0211] BALB/c 생쥐는 도면 22에 나타나 있는 바와 같이 KLH 또는 R22-KLH로 면역화되었다. 이를 위해, KLH 또는 KLH-접합된 웨티드 각각이 어쥬번트 (CFA 또는 IFA)와 함께 유제로 형성되었다. CFA는 첫 번째 면역화에 이용되고, 그리고 IFA는 차후 부스트에 이용되었다. 출혈 및 웨티드 주사 일자가 지시된다.

[0212] R22-KLH 유도된 항-ROR1 항체 수준은 ELISA에 의해 결정되었다. 정제된 ROR1-세포외 도메인이 96-웰 평판에 코팅되고 개별 출혈 일자로부터 지시된 회석 횟수에서 항혈청과 함께 배양되었다. ELISA 결과는 항-ROR1 항체의 농도가 시간의 흐름에서 면역화된 BALB/c 생쥐에서 유도된다는 것을 지시하였다. 면역화에 앞서 수집된 이들 동물로부터 혈청은 심지어 낮은 혈청 회석에서도, ROR1 단백질과 반응하지 않았다.

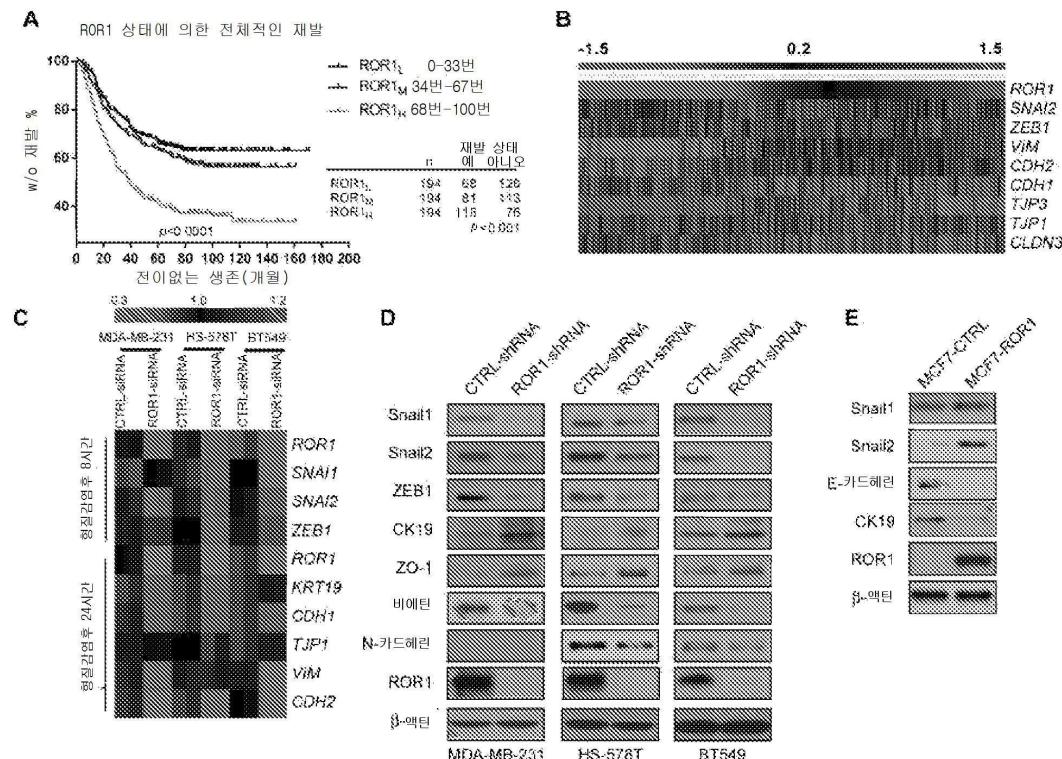
[0213] 면역블롯 분석은 또한, BALB/c 생쥐의 R22-KLH 면역화에 의해 산출된 항-ROR1 항체가 D10과 동일한 애피토프 특

이성을 갖는 항-ROR1 항체를 생산한다는 것을 지시하였다 (도면 23). 이에 더하여, 항혈청은 또한 생쥐 단백질과 반응하는 것으로 보인다.

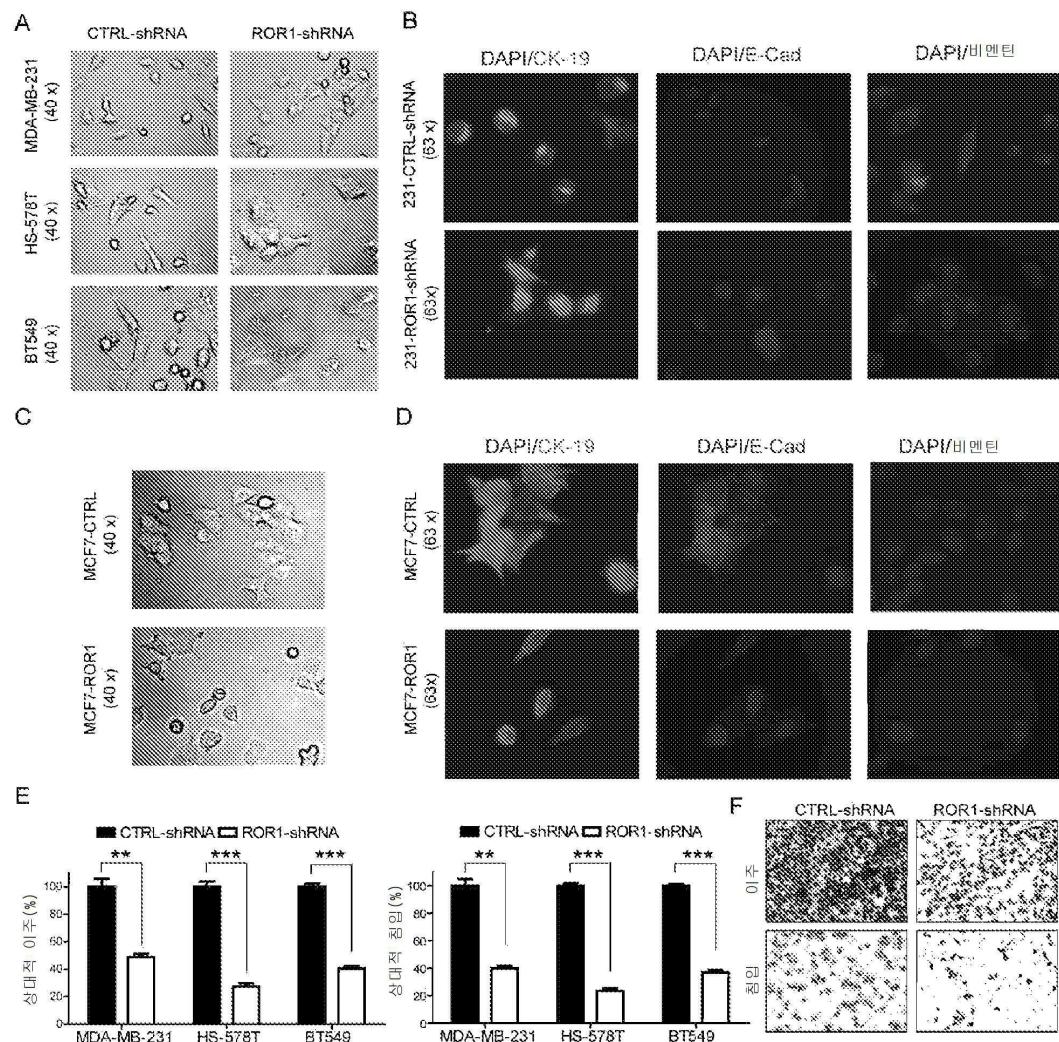
- [0214] FACS 분석은 세포의 표면 상에서 ROR1에 대한 R22-KLH 면역화된 BALB/c 생쥐로부터 항혈청의 결합을 확증하였다.
- [0215] 유전자도입 생쥐 II
- [0216] 유전자도입 생쥐는 도면 24에 나타나 있는 바와 같이 KLH 또는 R22-KLH로 면역화되었다. KLH 접합된 펩티드는 어쥬번트 (CFA 또는 IFA)와 혼합되었다. CFA는 첫 번째 면역화에 이용되고, 그리고 IFA는 다음 부스트에 이용되었다. ELISA 결과는 항-ROR1 항체의 농도가 시간의 흐름에서 R22-KLH 면역화된 ROR1 유전자도입 생쥐에서 유도 된다는 것을 지시하였다. FACS 분석은 세포의 표면 상에서 ROR1에 대한 R22-KLH 면역화된 ROR1 유전자도입 생쥐로부터 항혈청의 결합을 확증하였다.
- [0217] R22-KLH 면역화된 생쥐로부터 항혈청은 ROR1 수용체 내재화 능력에 대해 조사되었다. MDA-MB-231 세포는 4°C 또는 37°C에서 1 시간 동안 유전자도입 생쥐로부터 항혈청과 함께 배양되고, 그리고 이후, ROR1 발현의 FACS 분석에 앞서 얼음 위에서 30 분 동안 아이소타입-Alexa647, 또는 4A5-Alexa647로 염색되었다. 이들 결과는 R22-KLH로 면역화된 유전자도입 생쥐로부터 항-ROR1 혈청이 ROR1 수용체 내재화를 유도한다는 것을 보여주었다 (도면 25).
- [0218] R22-KLH 면역화된 생쥐로부터 항혈청은 유방암 이주에서 그들의 영향을 결정하기 위해 조사되었다. 이주된 세포는 1 시간의 항혈청 처리, 그리고 이후, 37°C에서 16 시간의 배양 후 10x 배율 하에 관찰되었다. 결과는 평균 ± s.e.m이다. n=3. \*\* p < 0.01. 이들 결과는 유전자도입 생쥐로부터 항-ROR1 혈청이 시험관내에서 유방암 이주를 감소시킬 수 있다는 것을 지시하였다 (도면 26).

## 도면

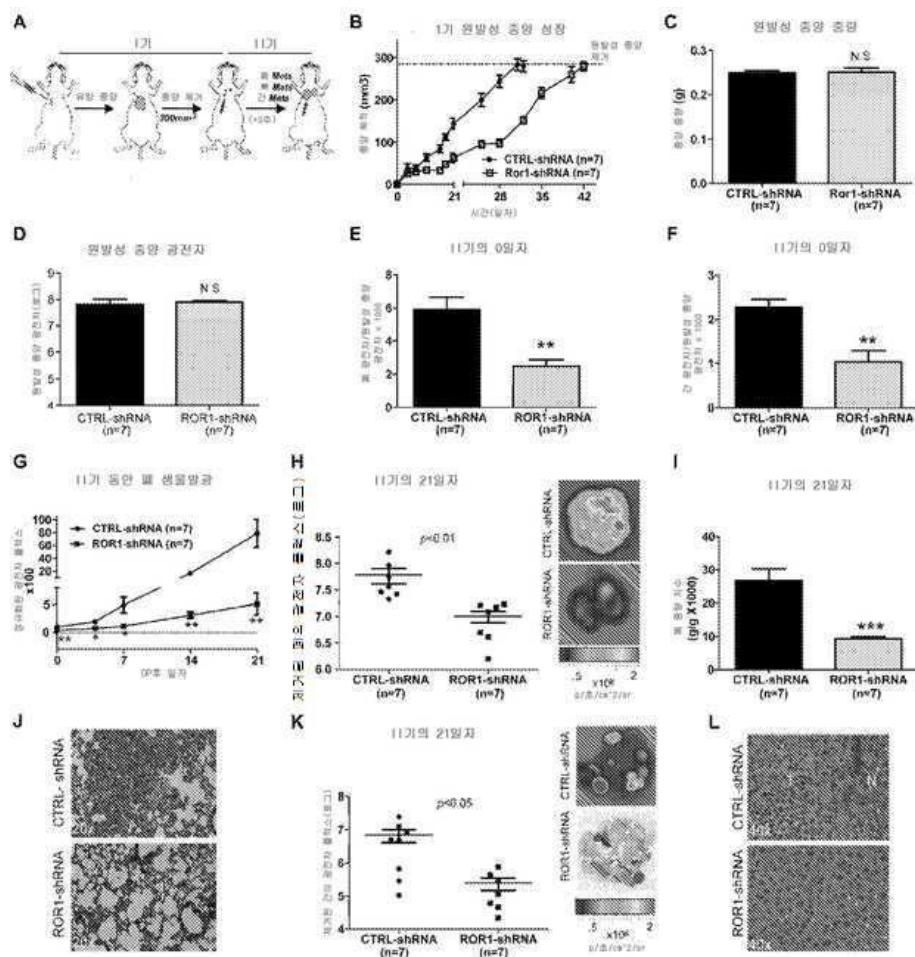
### 도면1



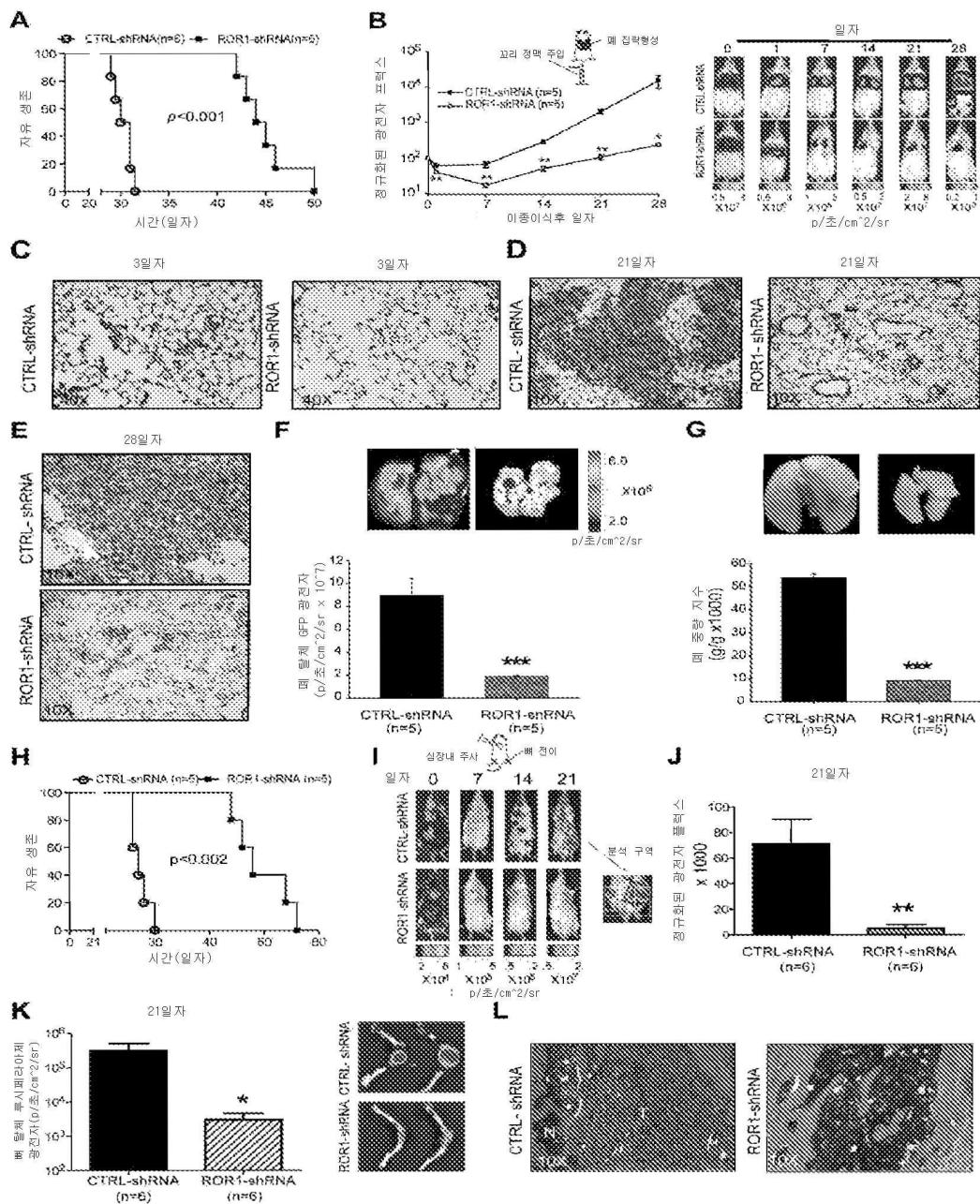
## 도면2



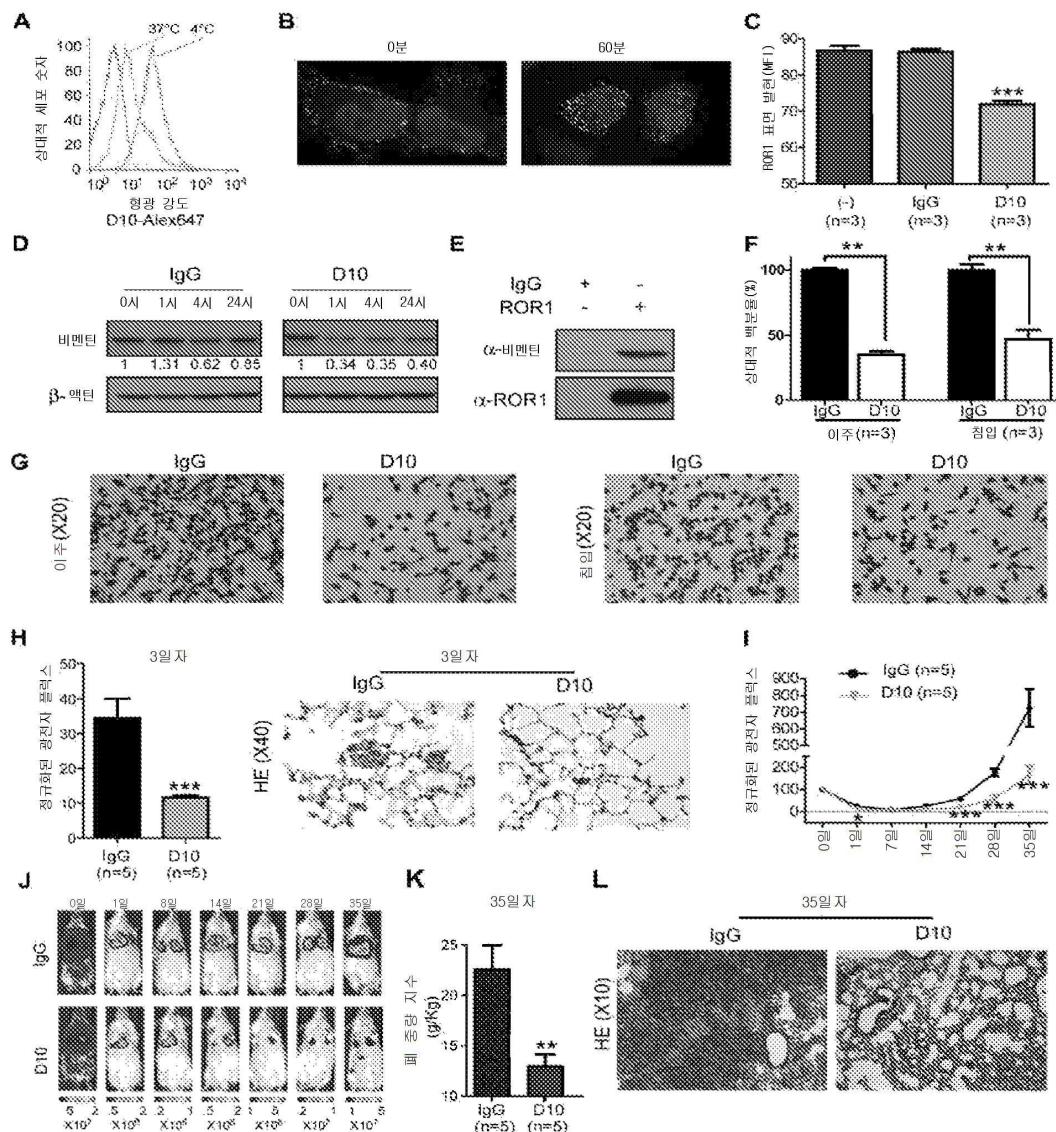
도면3



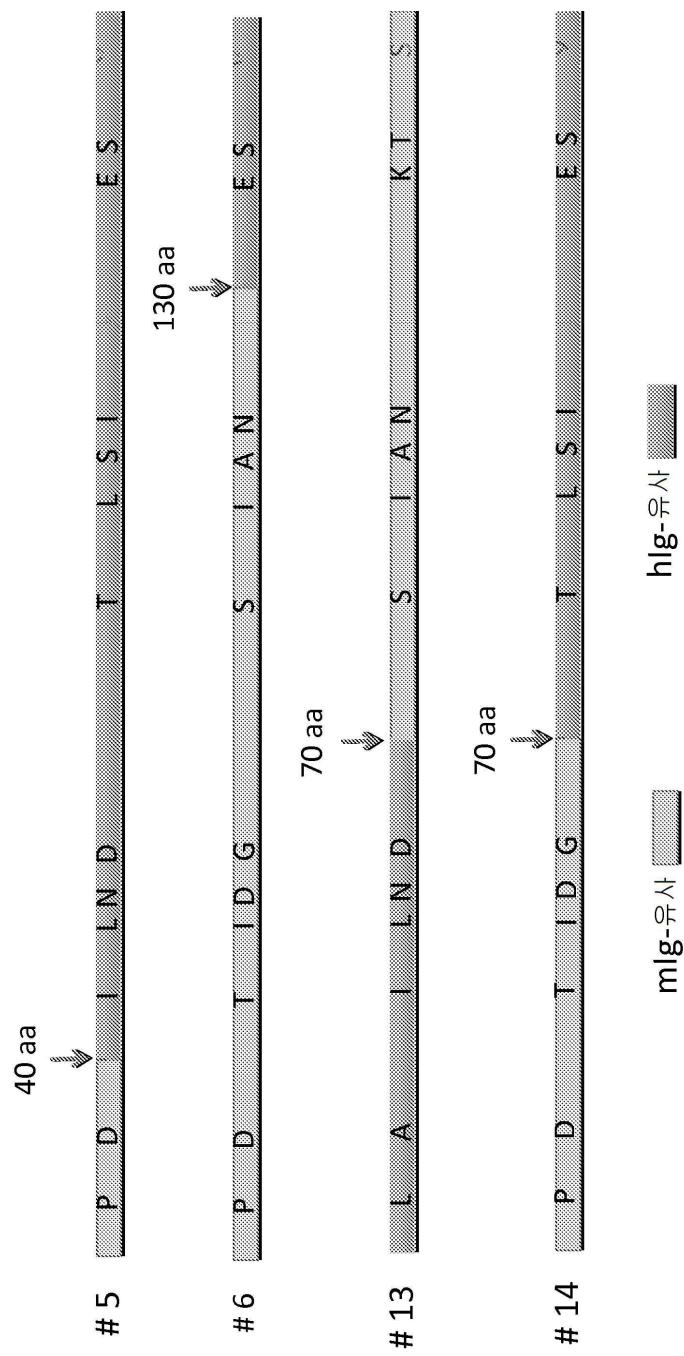
## 도면4



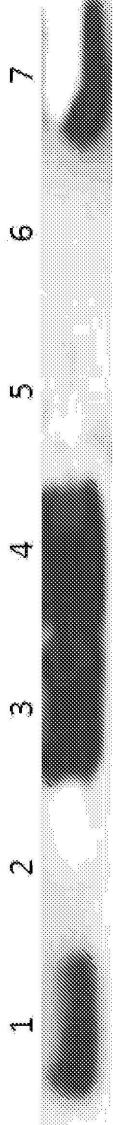
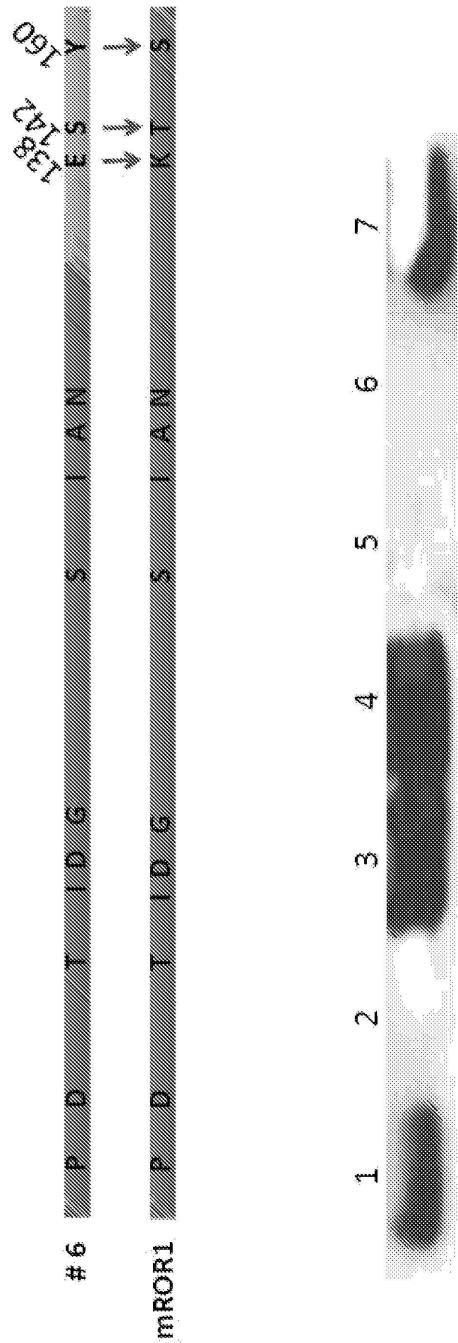
## 도면5



## 도면6

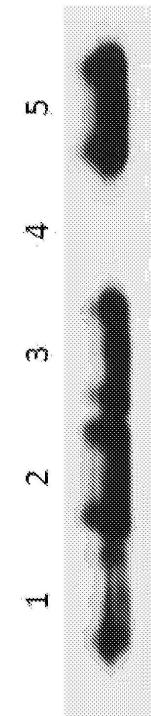
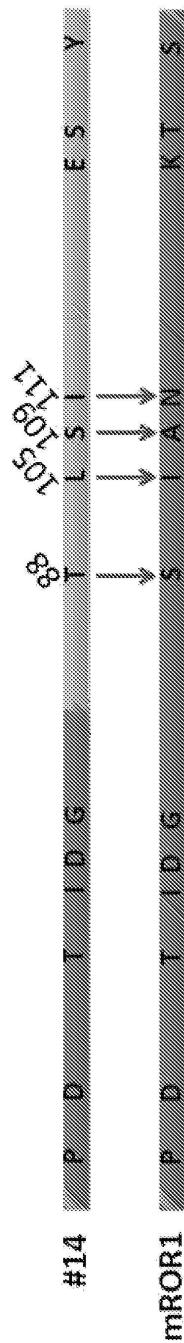


도면7



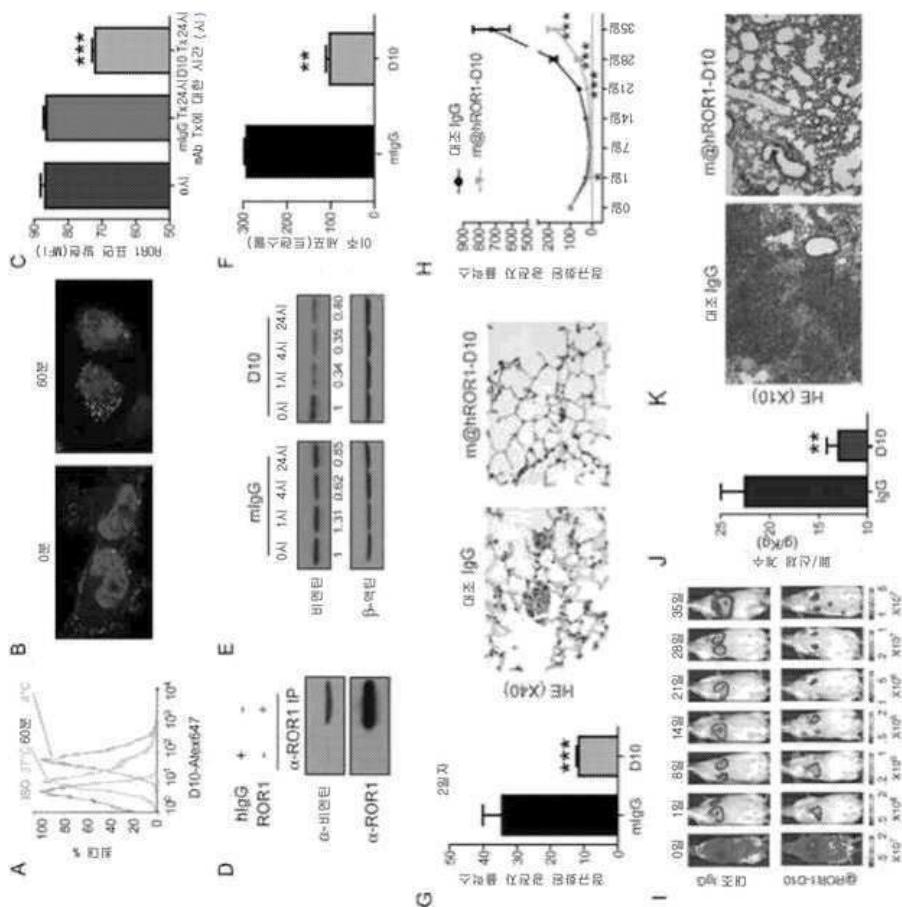
1. **HuROR1**
2. E→K @138을 갖는 HuROR1
3. S→T @142을 갖는 HuROR1
4. Y→S @160을 갖는 HuROR1
5. E→K @138 & S→T @142을 갖는 HuROR1
6. E→K @138 & Y→S @160을 갖는 HuROR1
7. S→T @142 & Y→S @160을 갖는 HuROR1

## 도면8

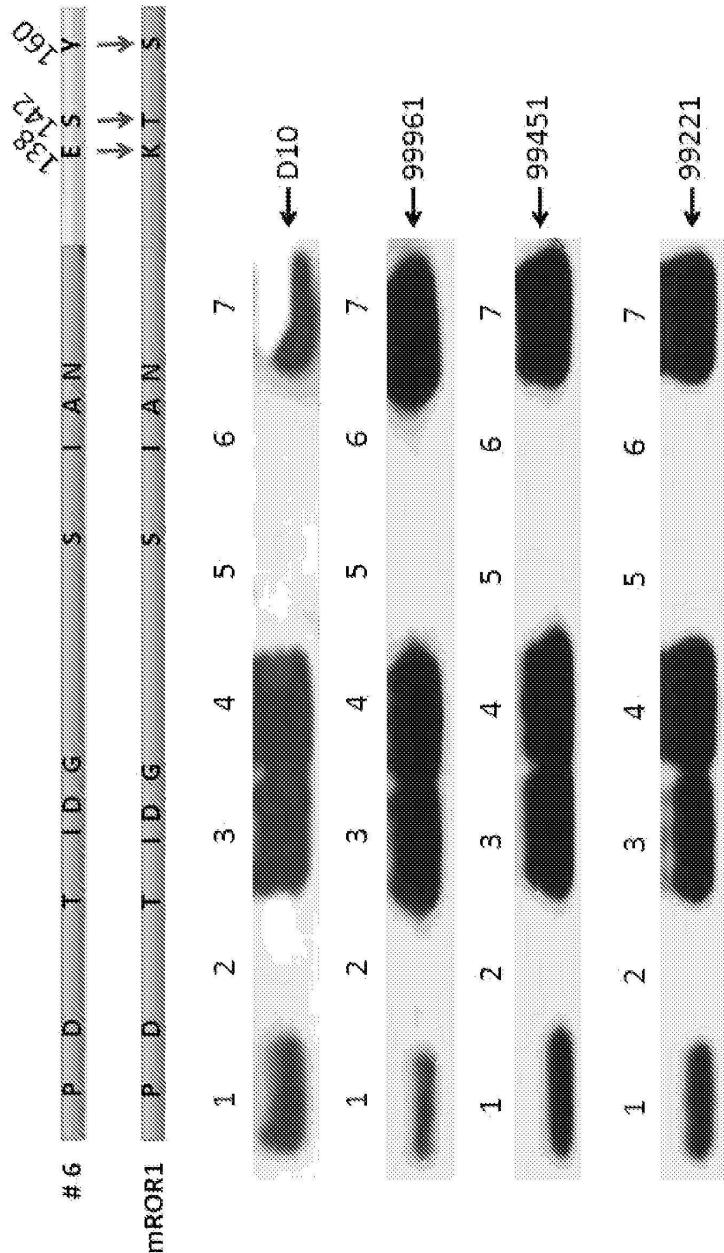


1. T→S @88을 갖는 HUROR1
2. L→I @105를 갖는 HUROR1
3. S→@109를 갖는 HUROR1
4. I→N @111을 갖는 HUROR1
5. HUROR1

## 도면9

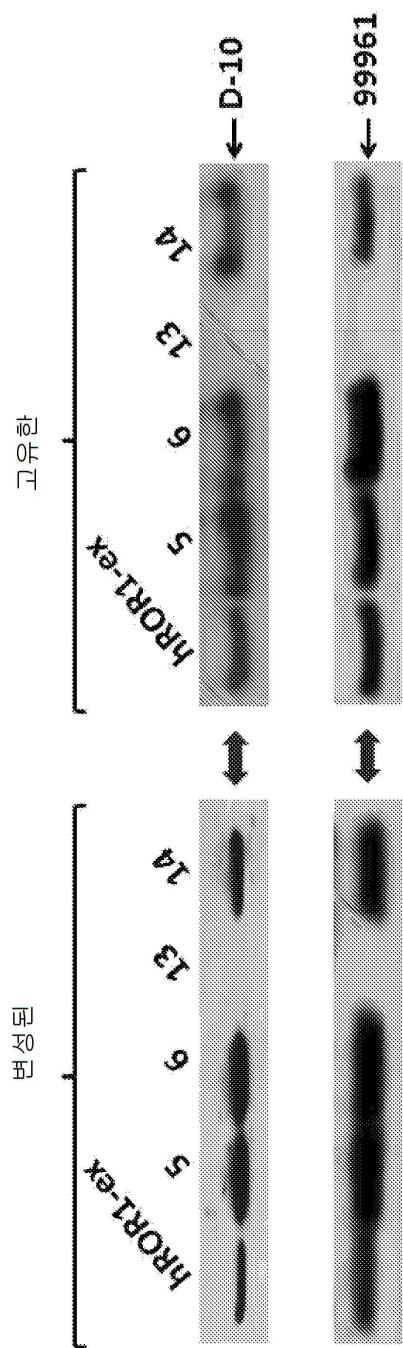


## 도면10

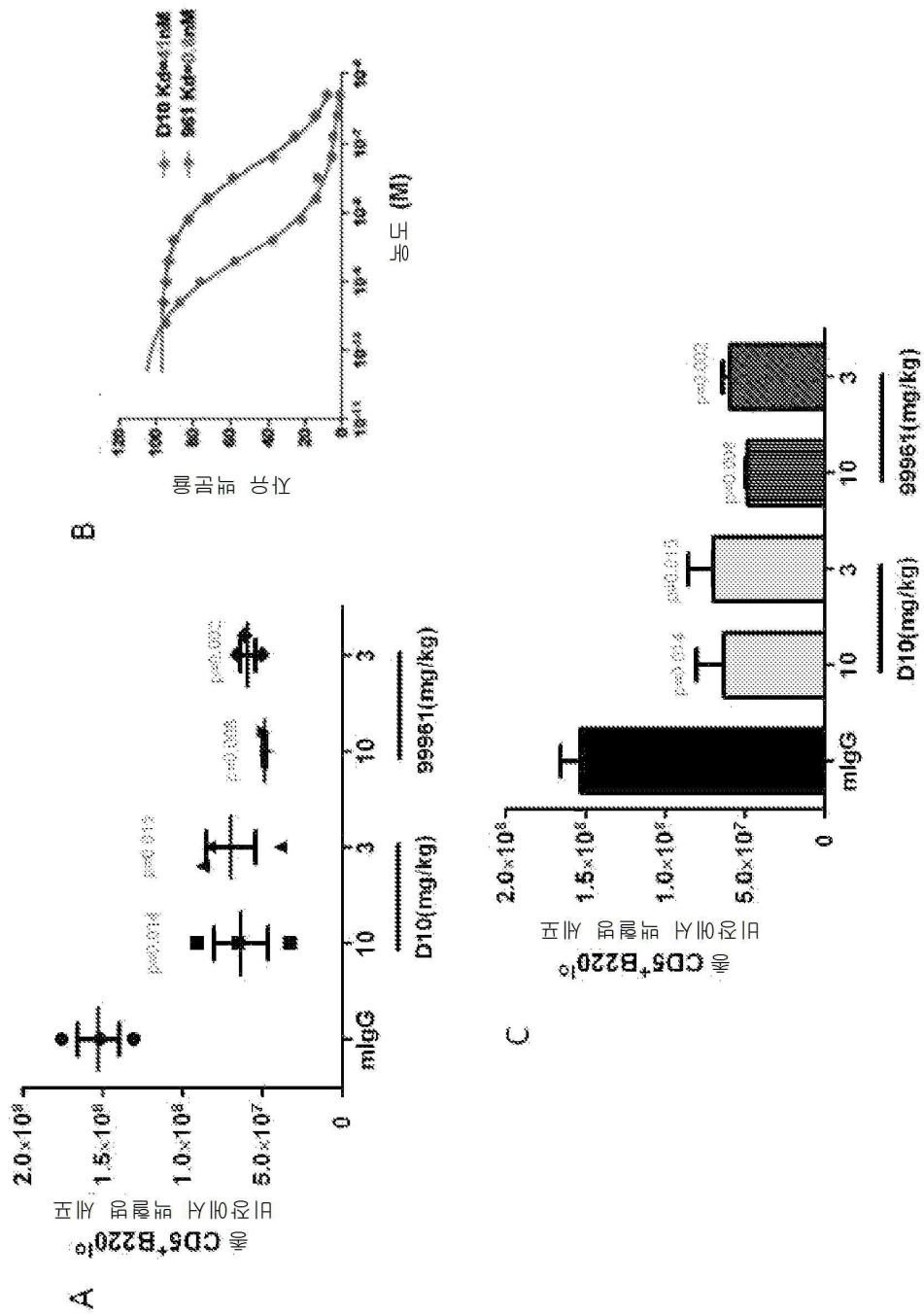


1. HuROR1
2. E→K @138을 갖는 HuROR1
3. S→T @142을 갖는 HuROR1
4. Y→S @160을 갖는 HuROR1
5. E→K @138 & S→T @142를 갖는 HuROR1
6. E→K @138 & Y→S @160을 갖는 HuROR1
7. S→T @142 & Y→S @160을 갖는 HuROR1

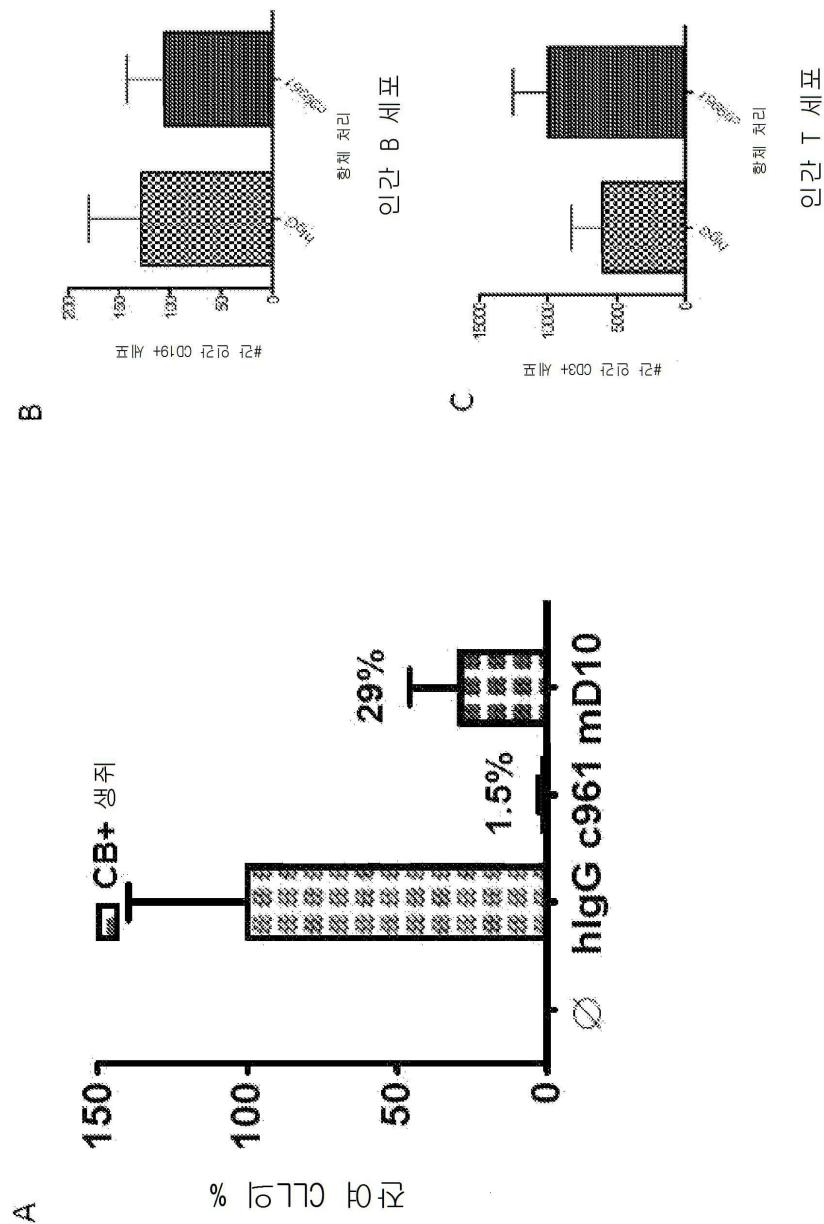
도면11



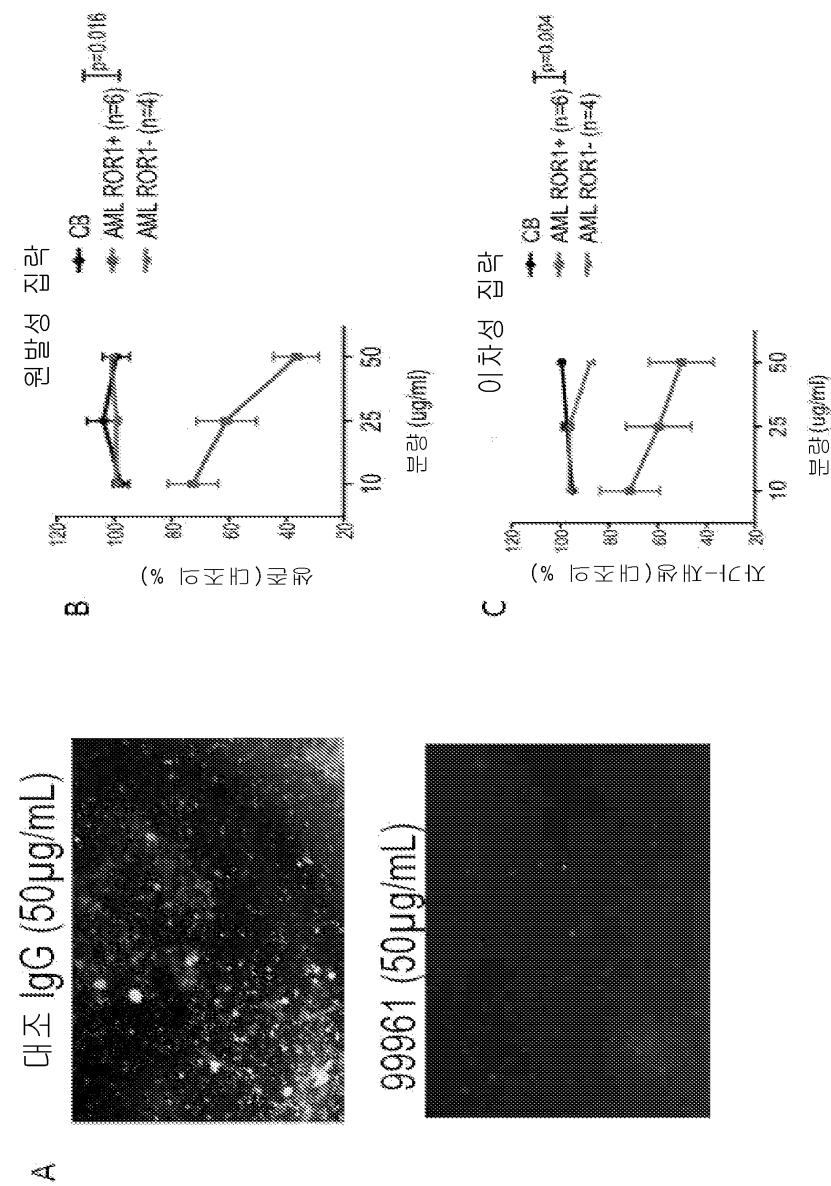
## 도면12



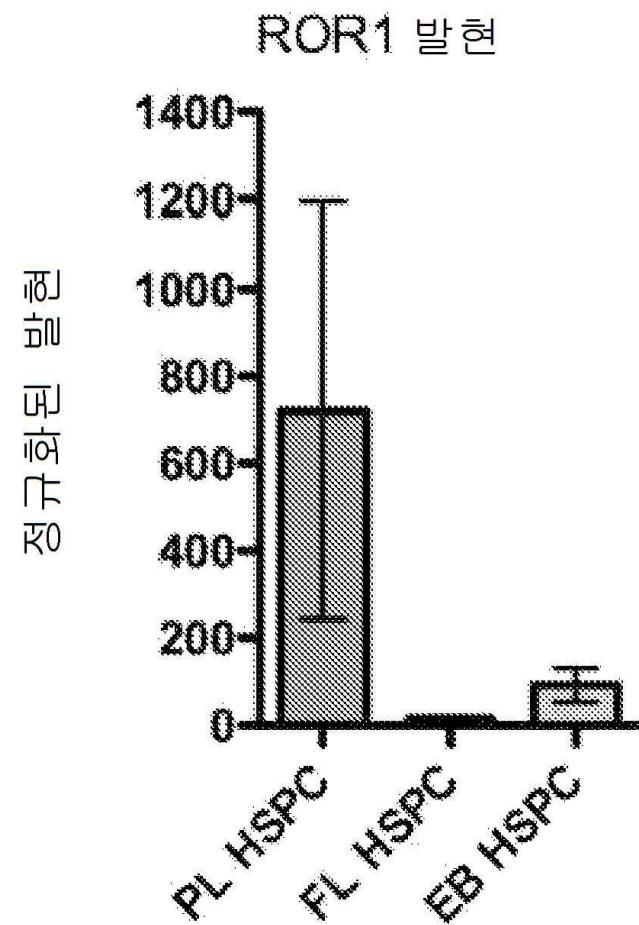
도면13



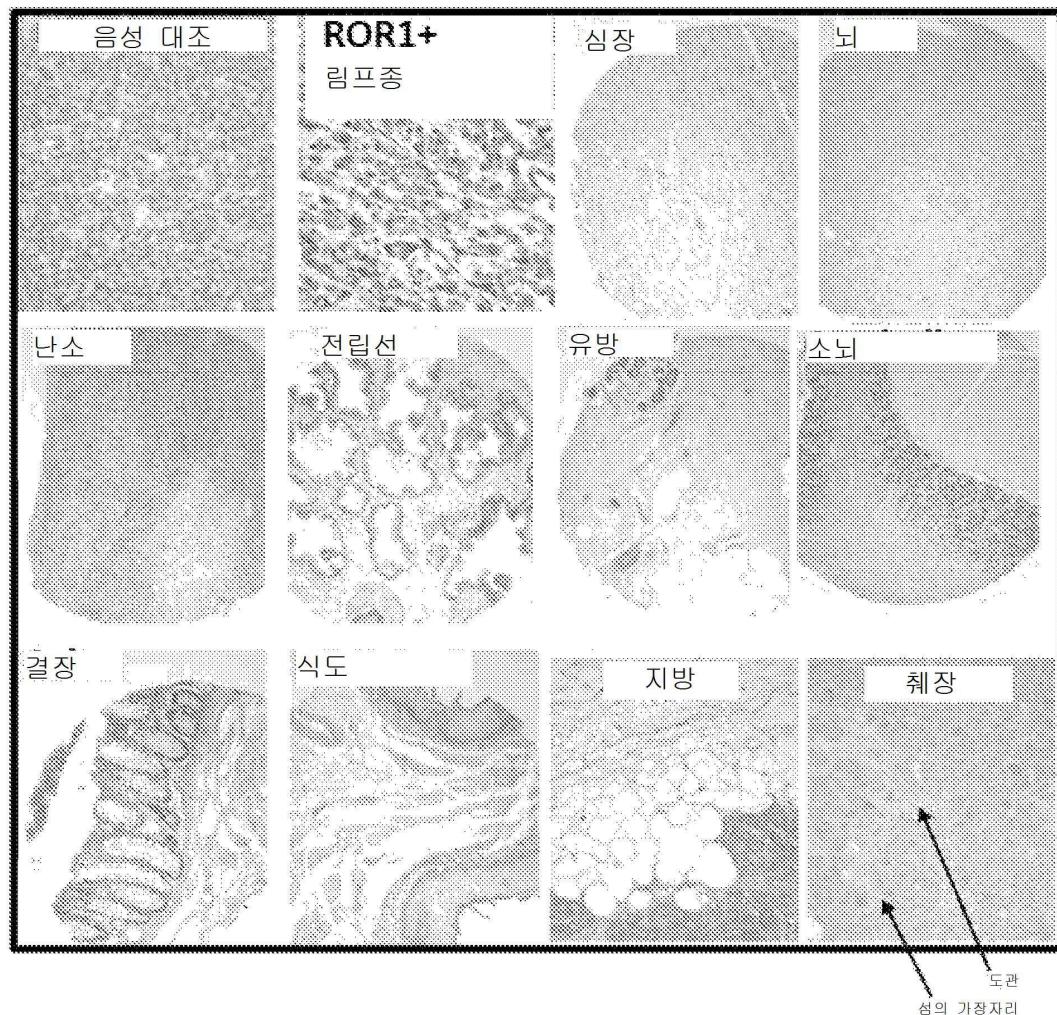
도면14



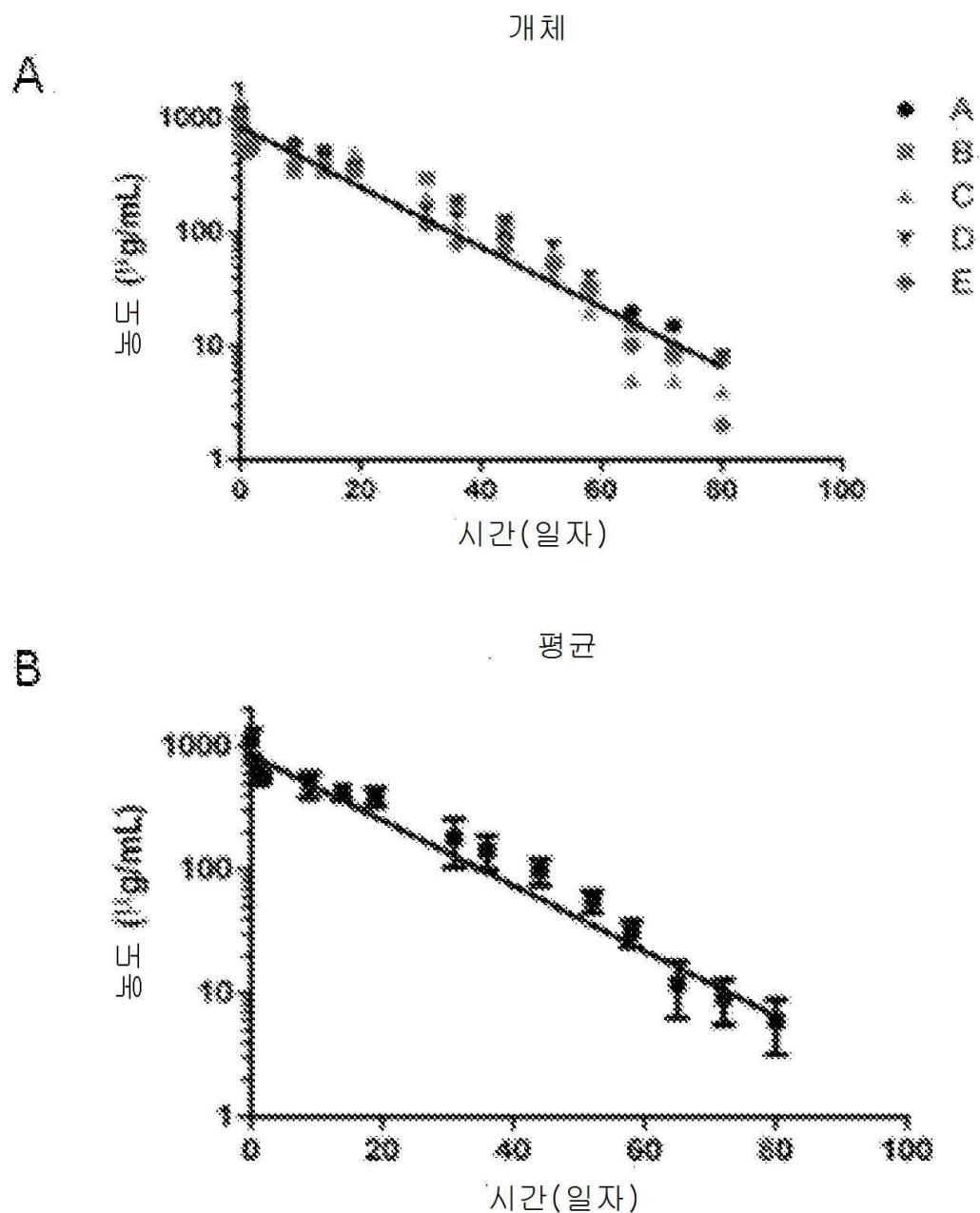
도면15



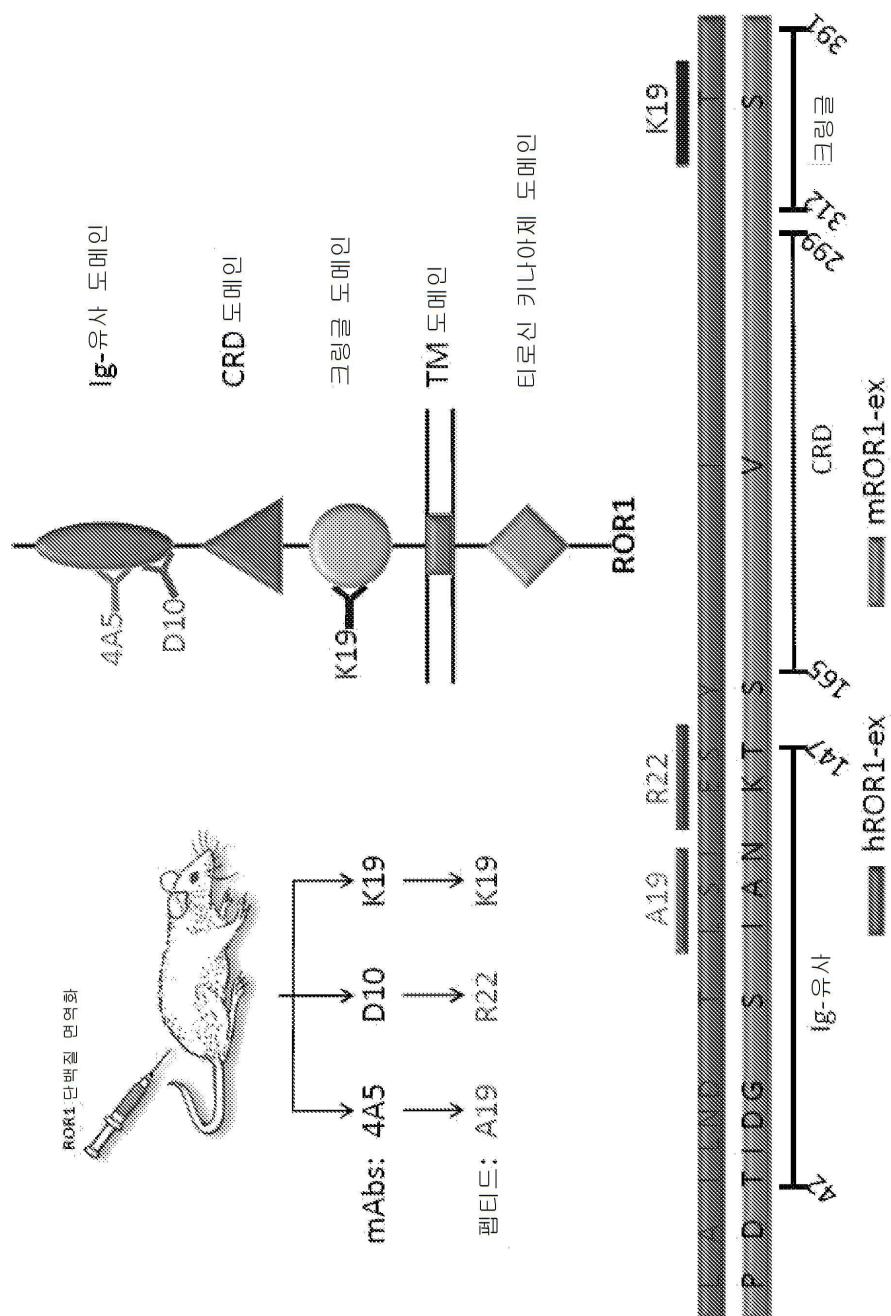
도면16



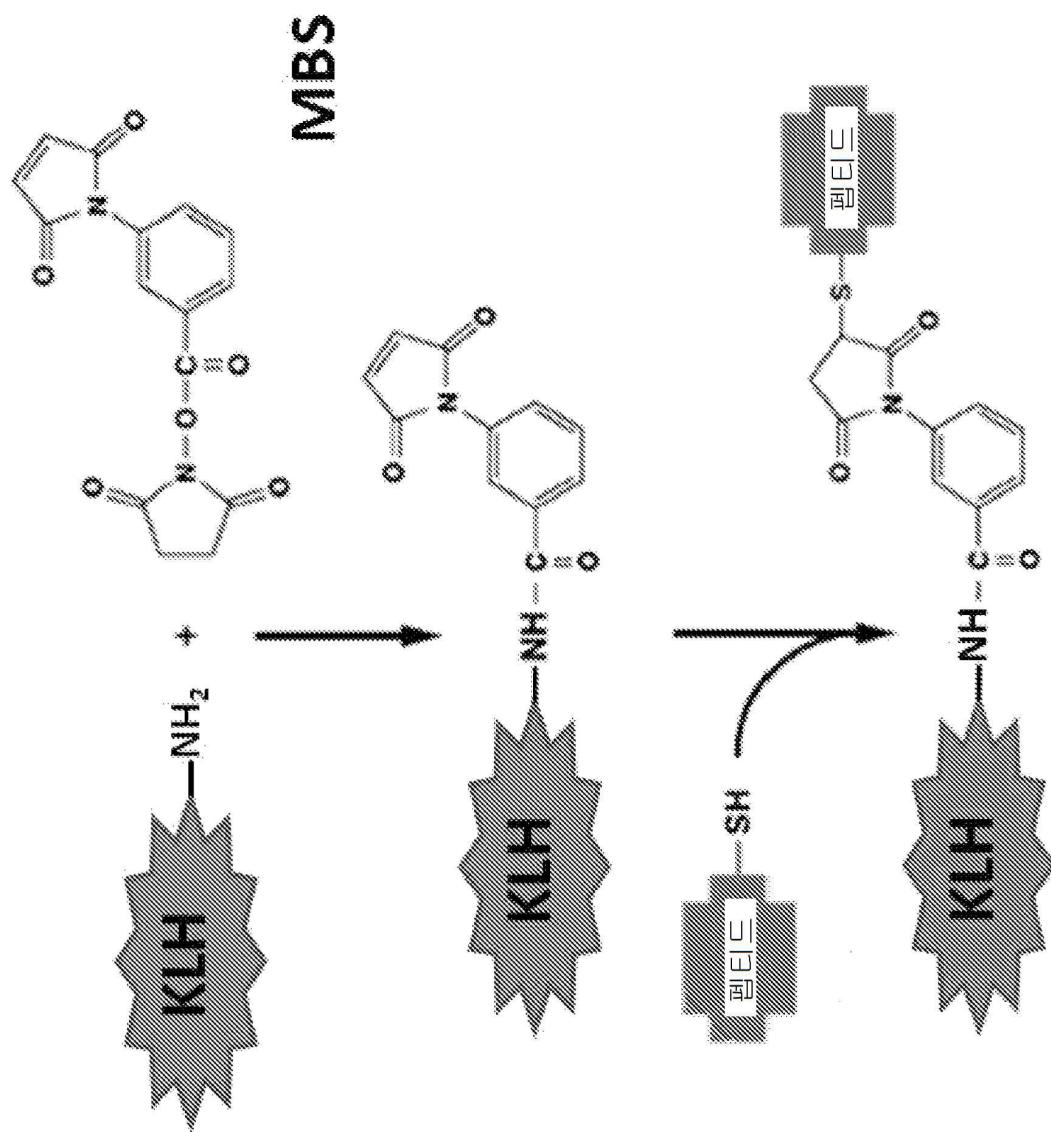
## 도면17



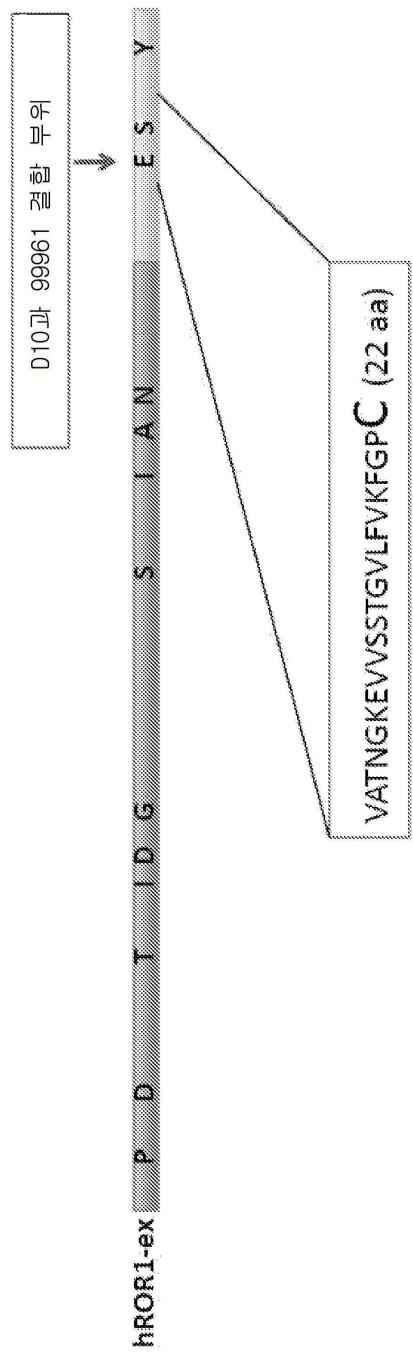
도면18



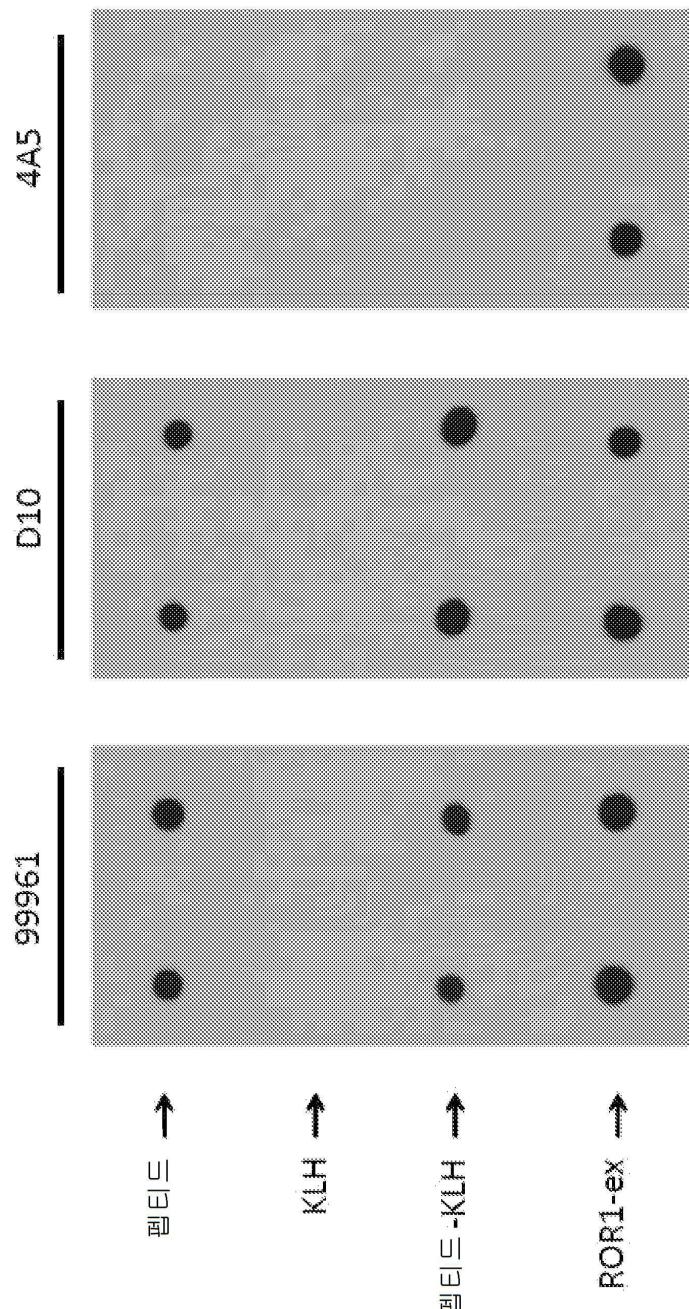
도면19



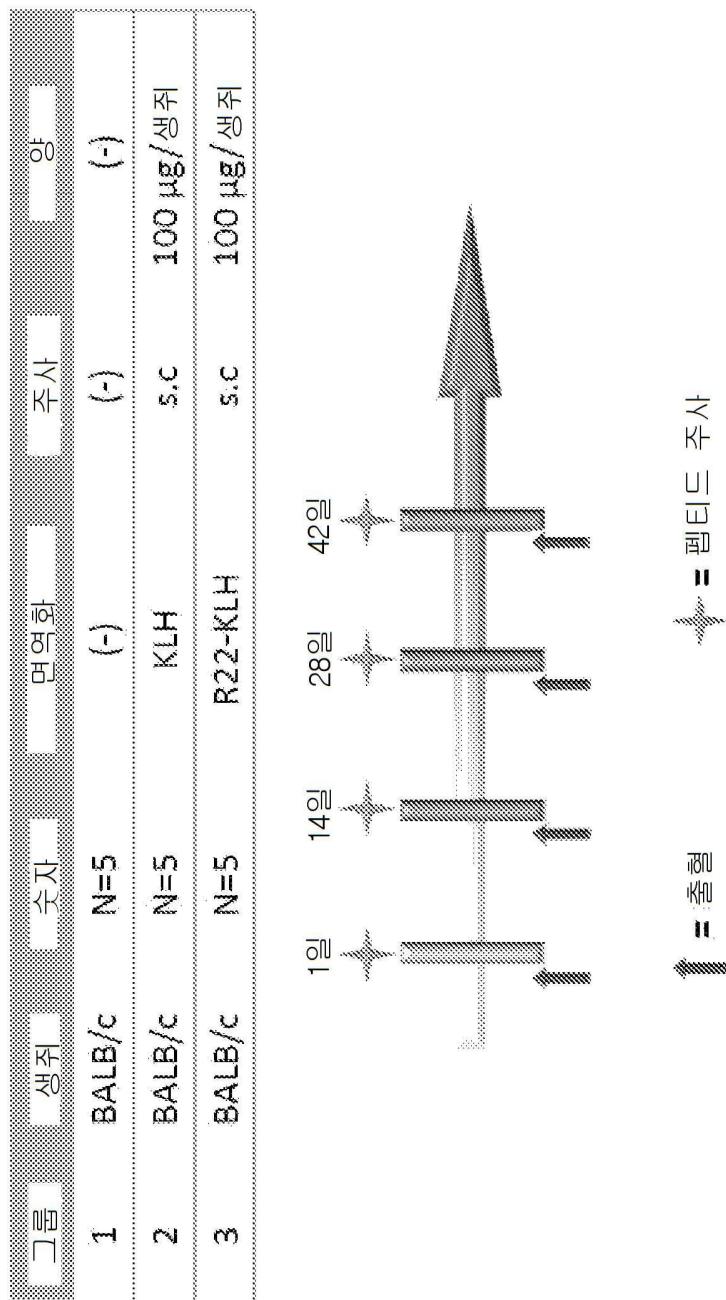
도면20



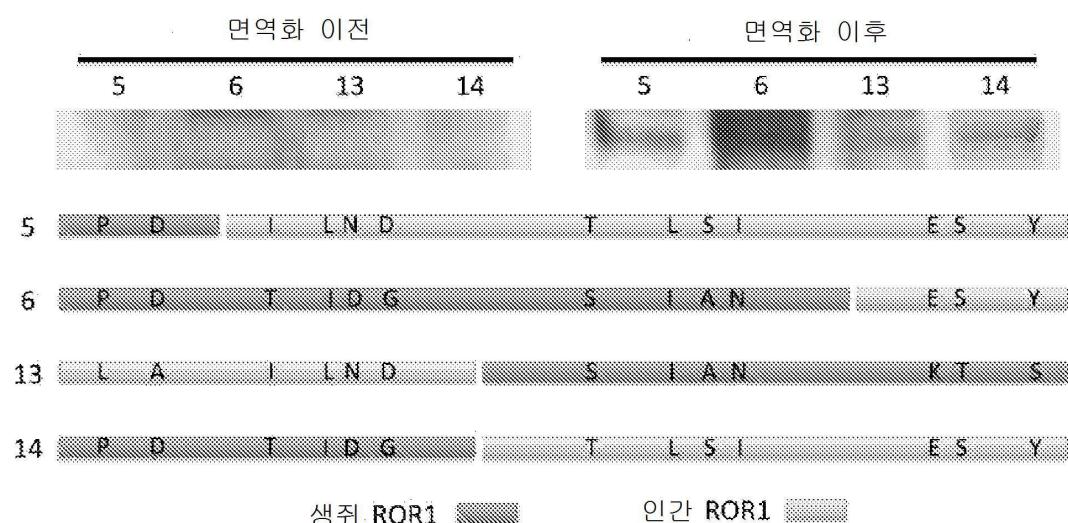
도면21



도면22

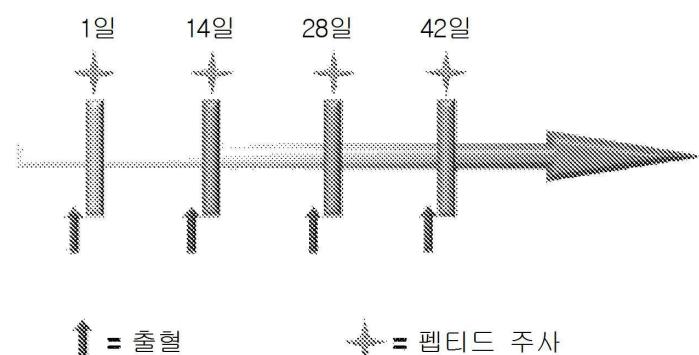


도면23

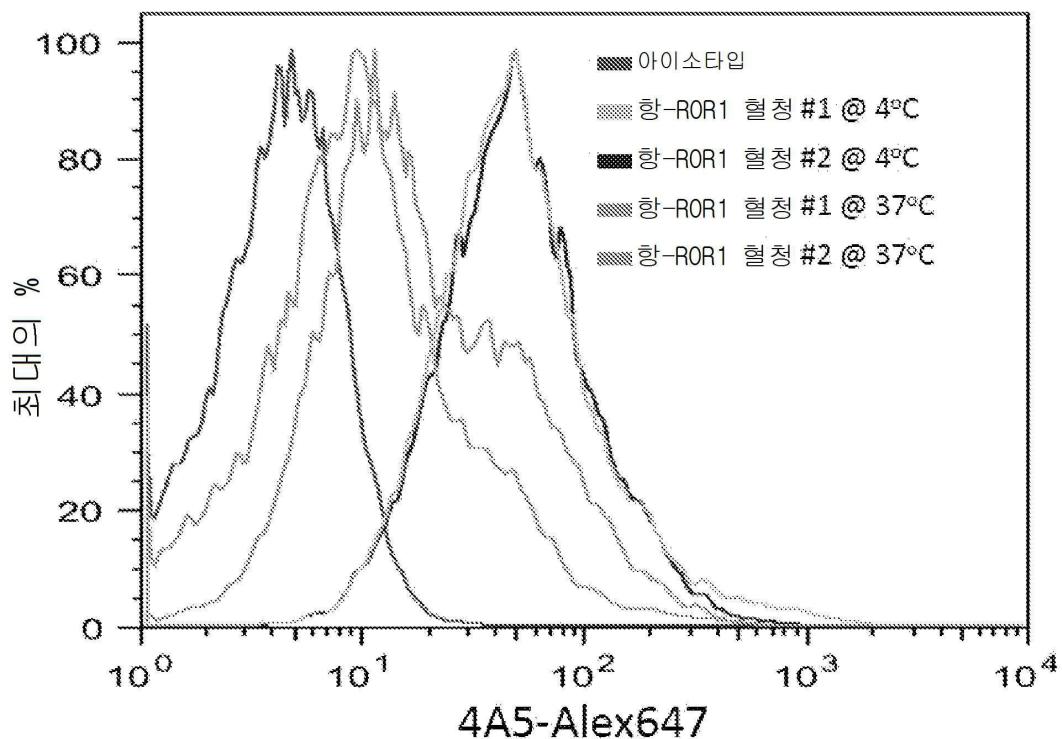


도면24

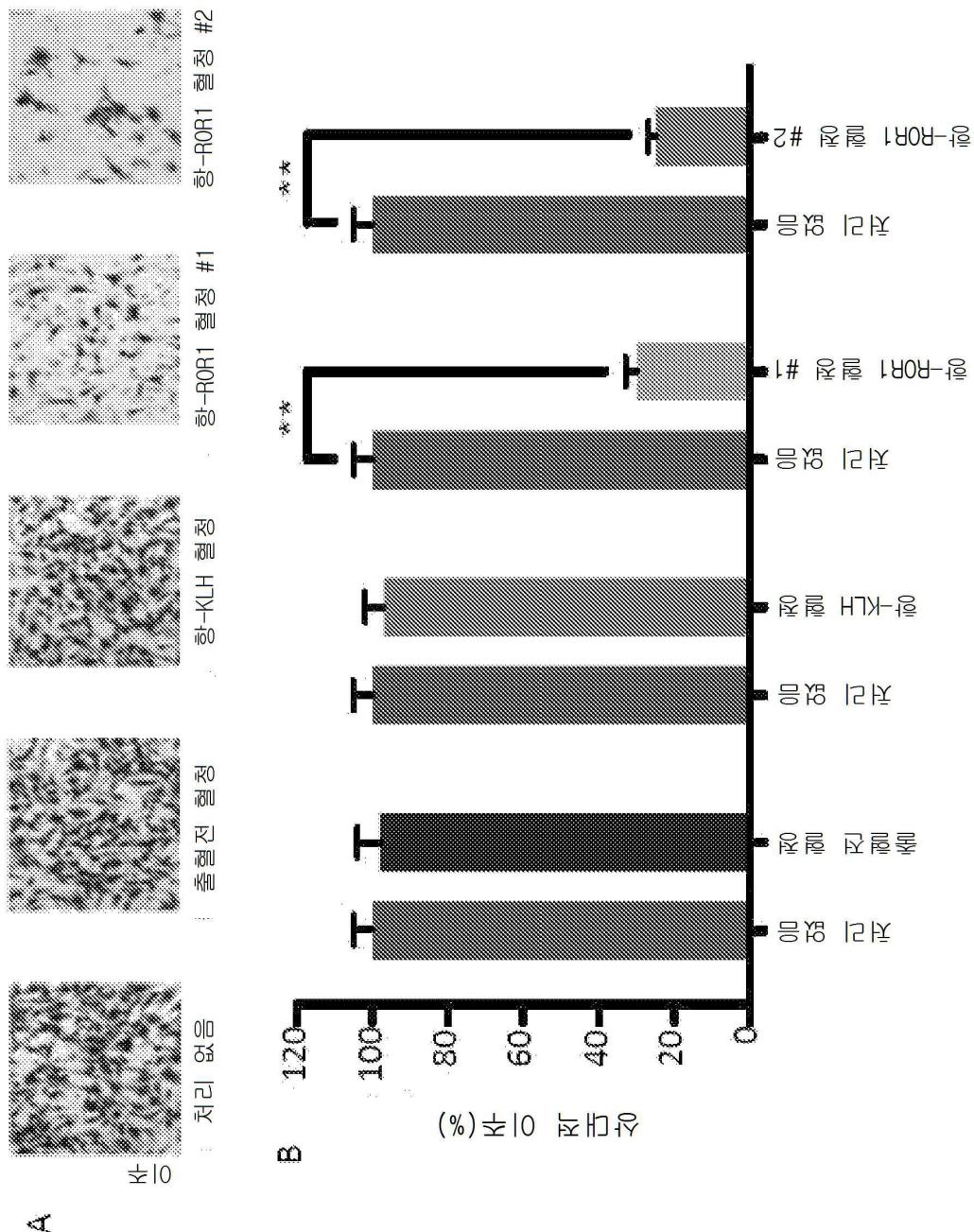
그룹	생쥐	수자	면역화	주사	양
1	C57BL/6	N=8	(-)	(-)	(-)
2	C57BL/6	N=8	KLH	s.c	100 µg/생쥐
3	C57BL/6	N=8	R22-KLH	s.c	100 µg/생쥐



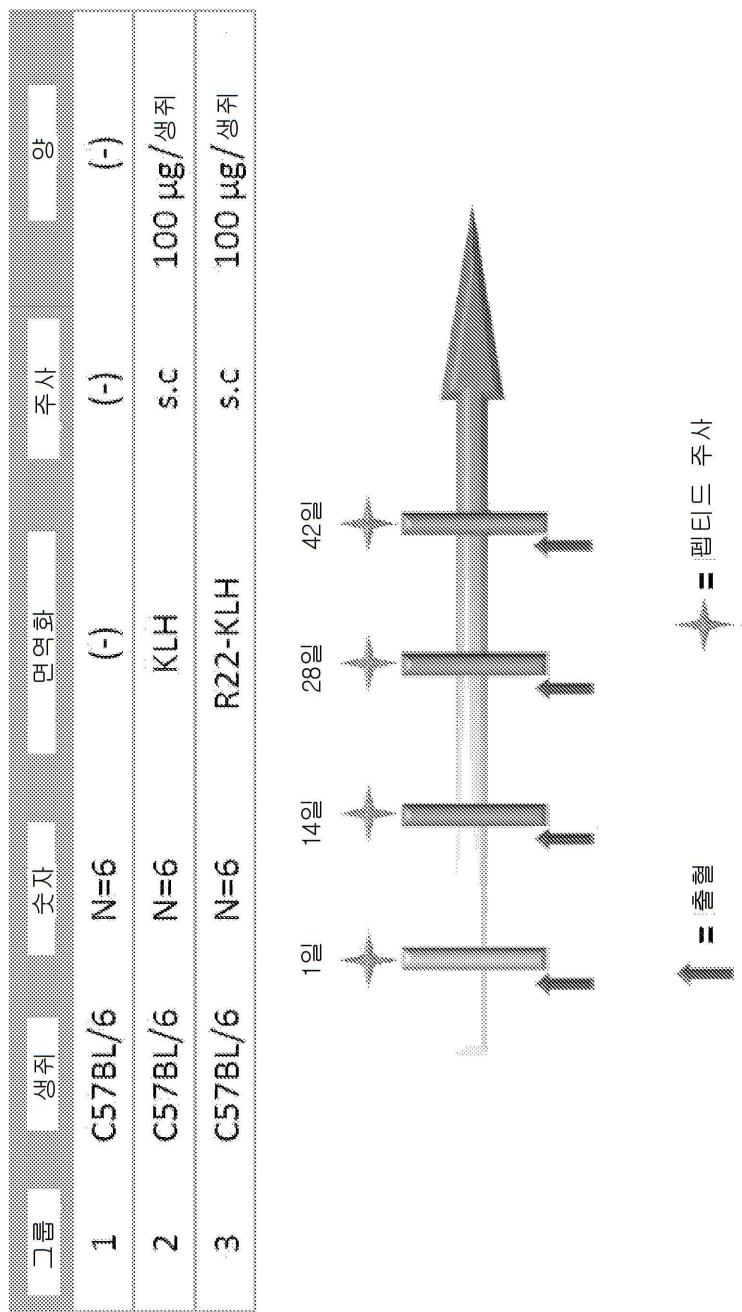
## 도면25



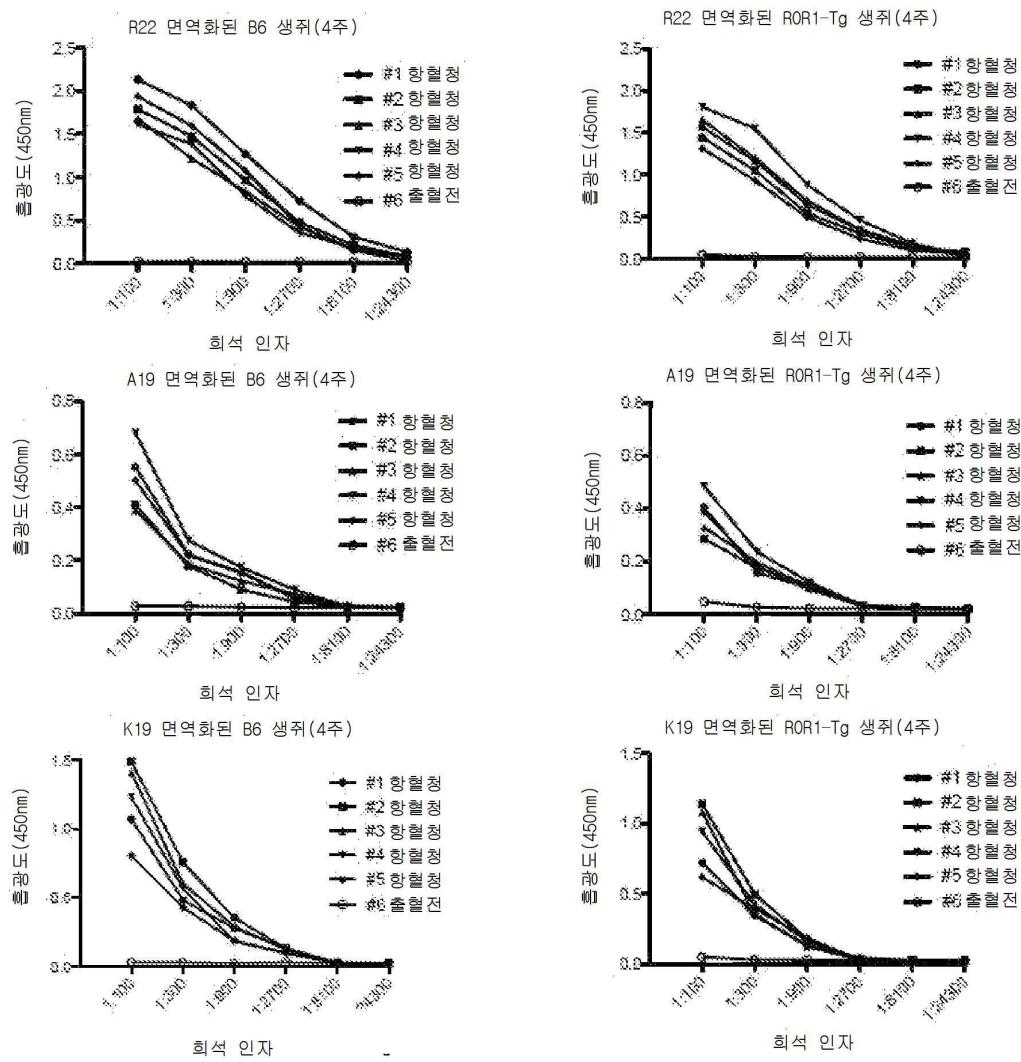
## 도면26



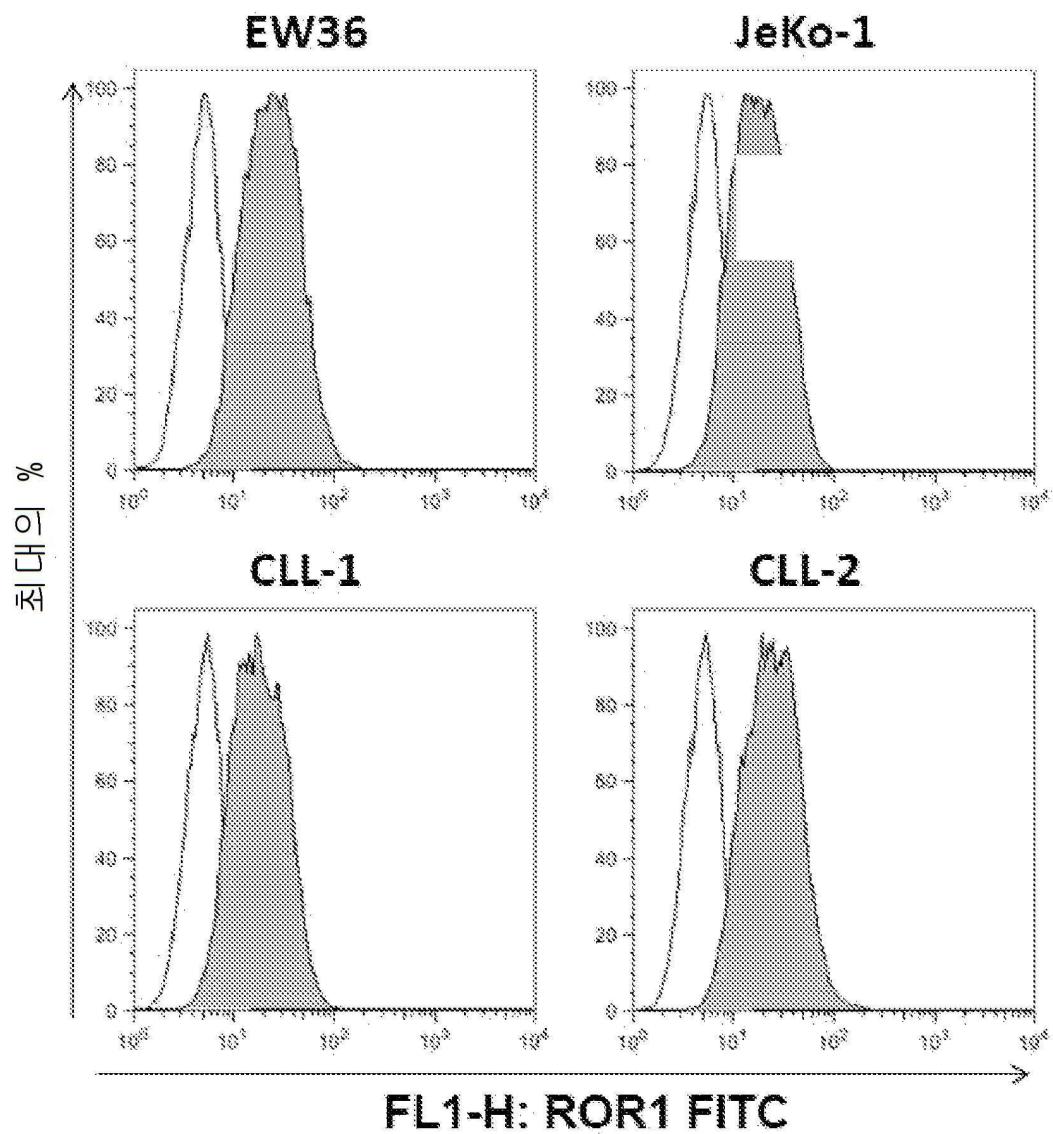
## 도면27



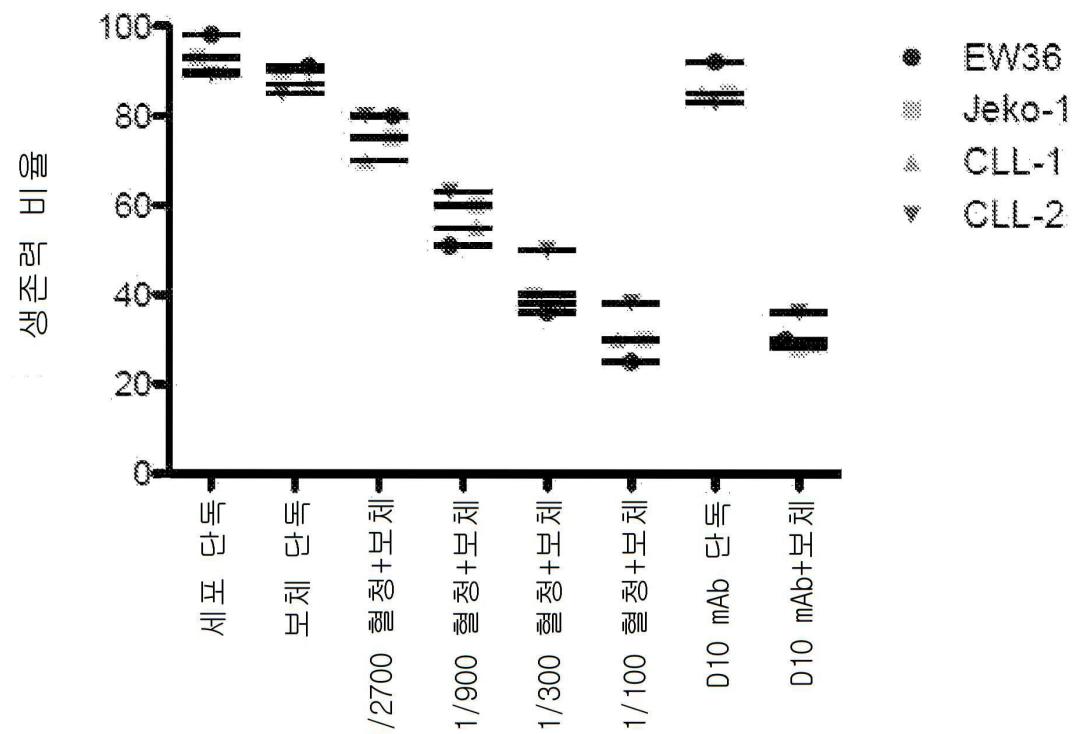
## 도면28



도면29

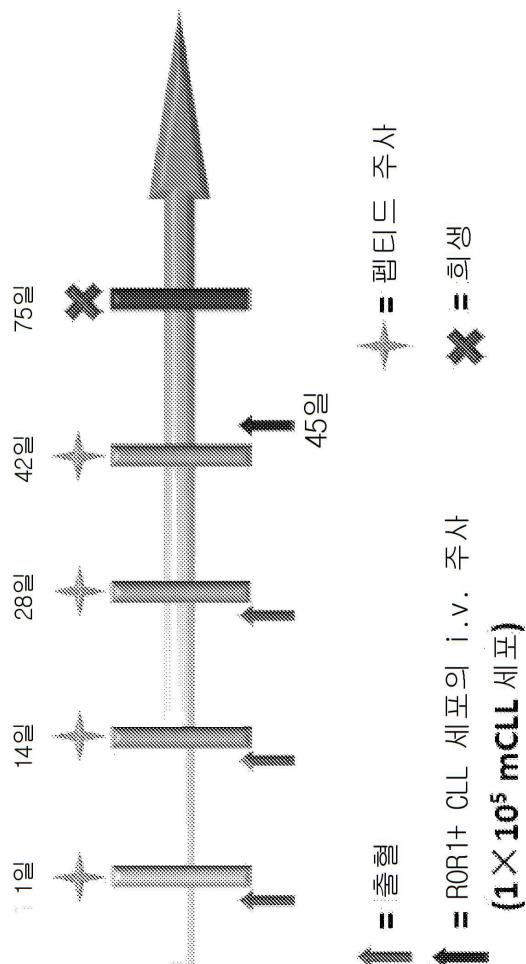


도면30

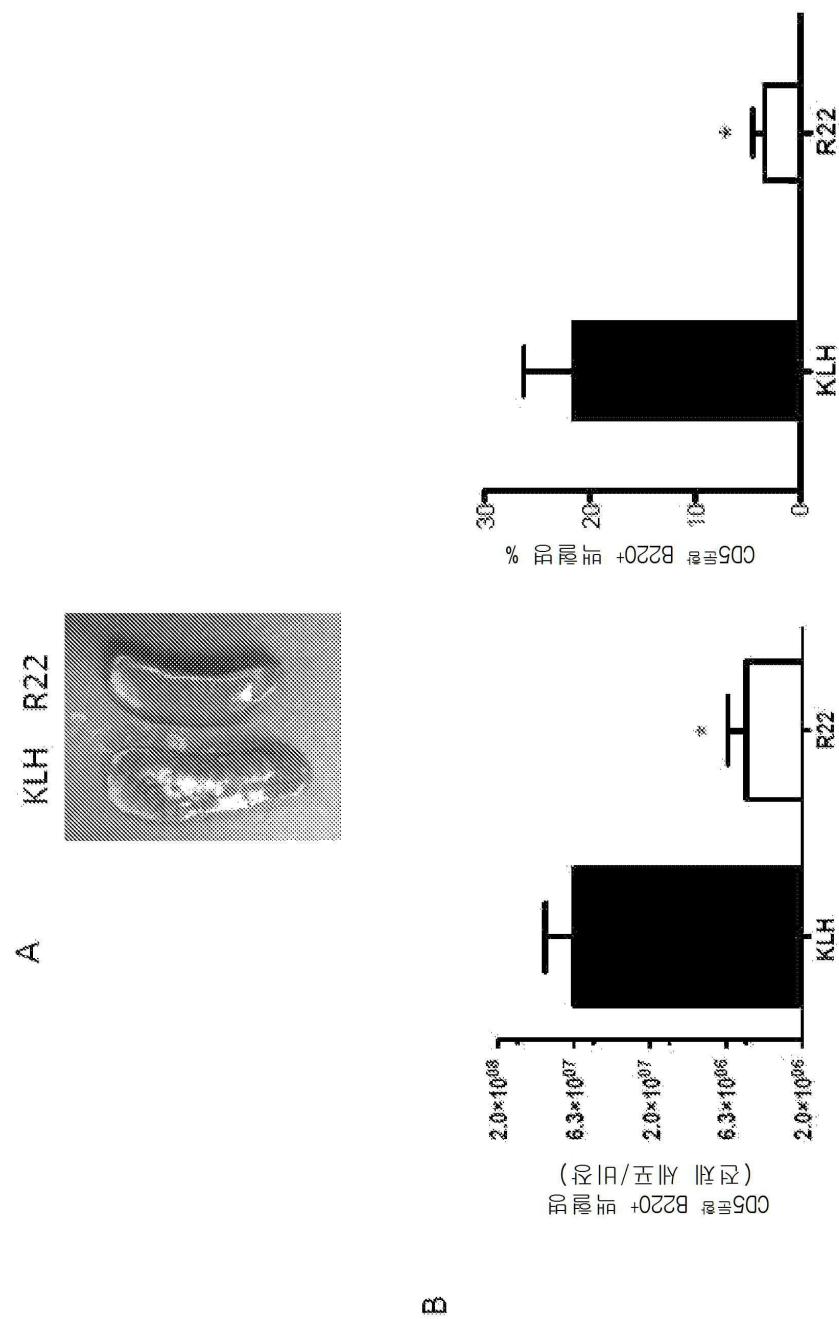


## 도면31

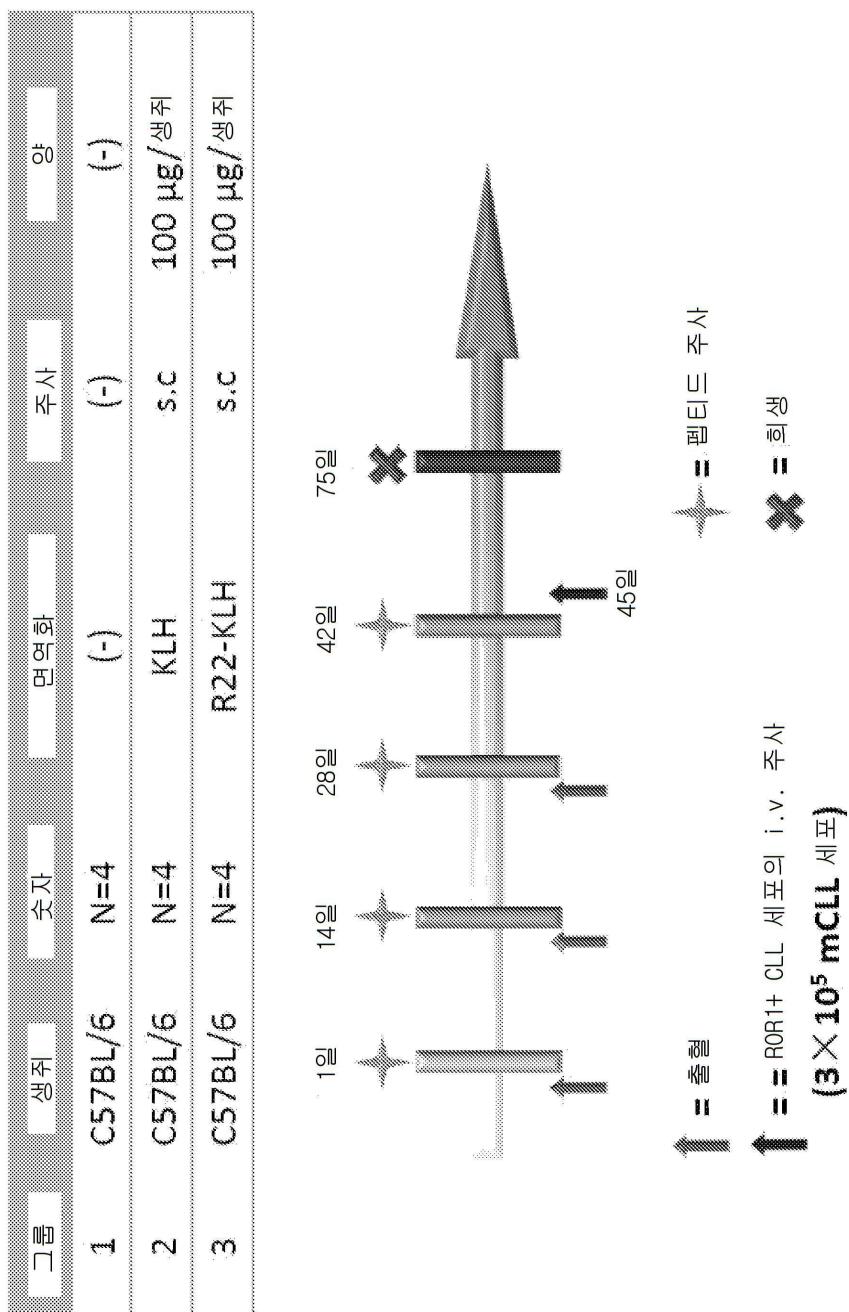
그룹	생주	수거	면역화	주사	양
1	C57BL/6	N=6	(-)	(-)	(-)
2	C57BL/6	N=6	KLH	S.C	100 μg/생주
3	C57BL/6	N=6	R22-KLH	S.C	100 μg/생주



도면32

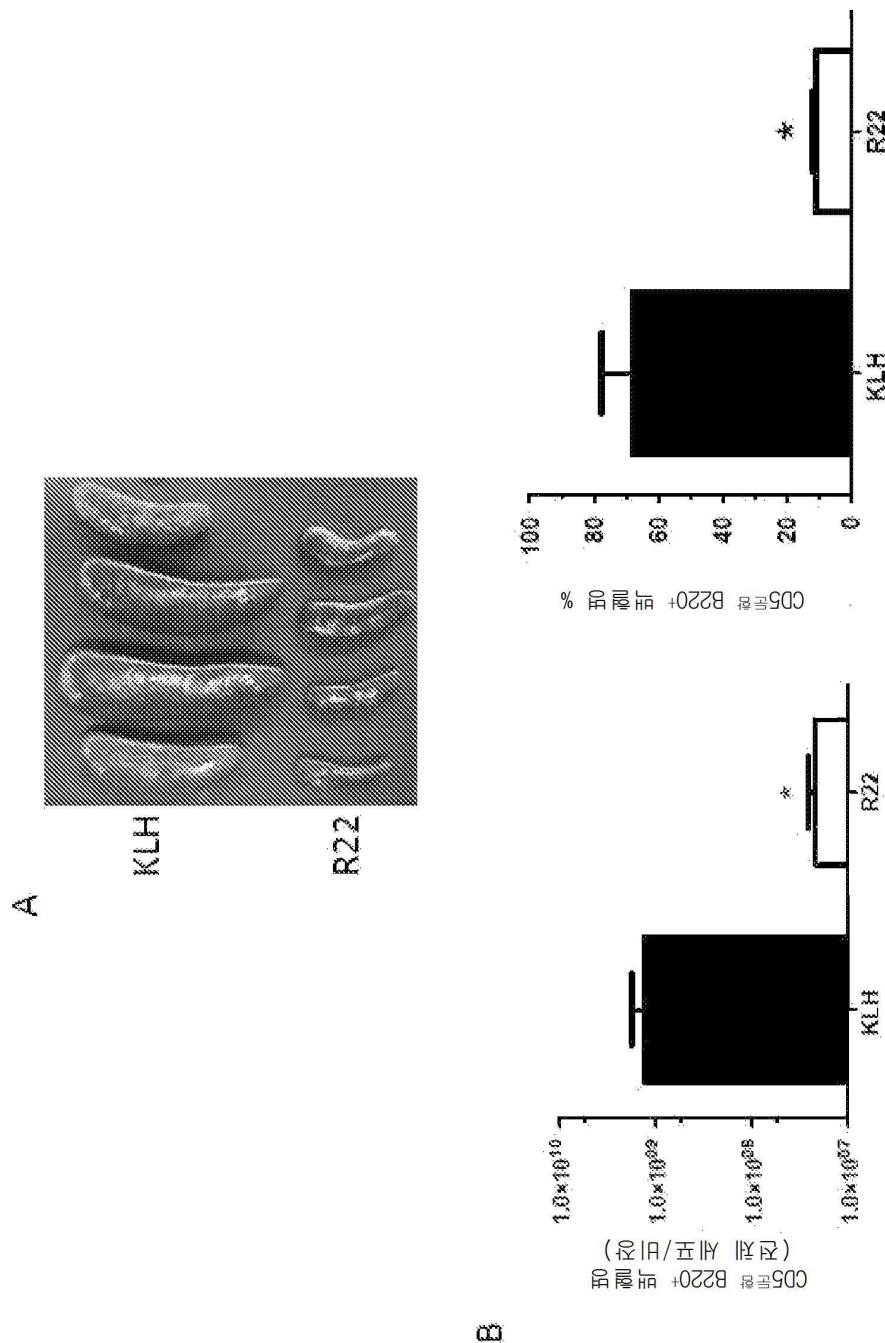


도면33

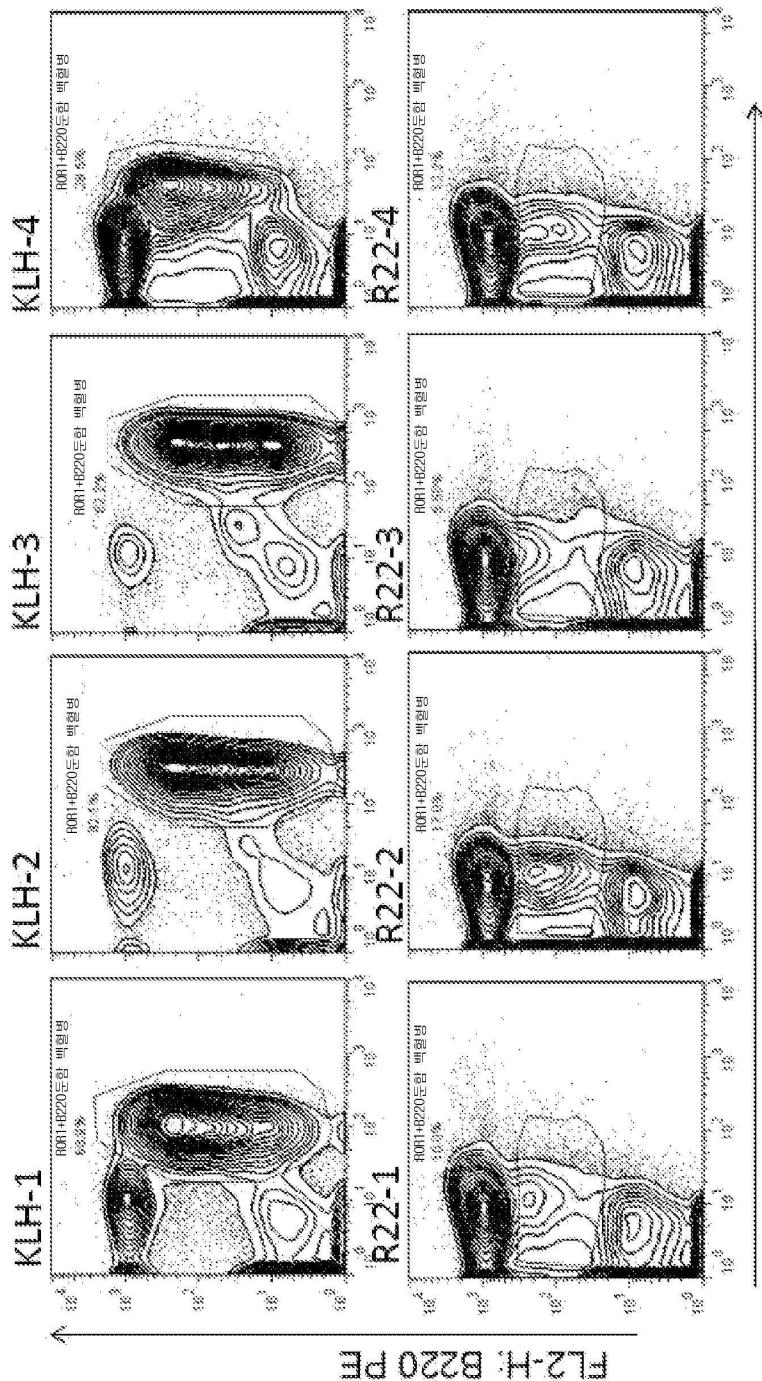


## 도면34

C57BL/6 생쥐에서 R22 예방접종에 의한 ROR1+ 백혈병의  
이식의 저해



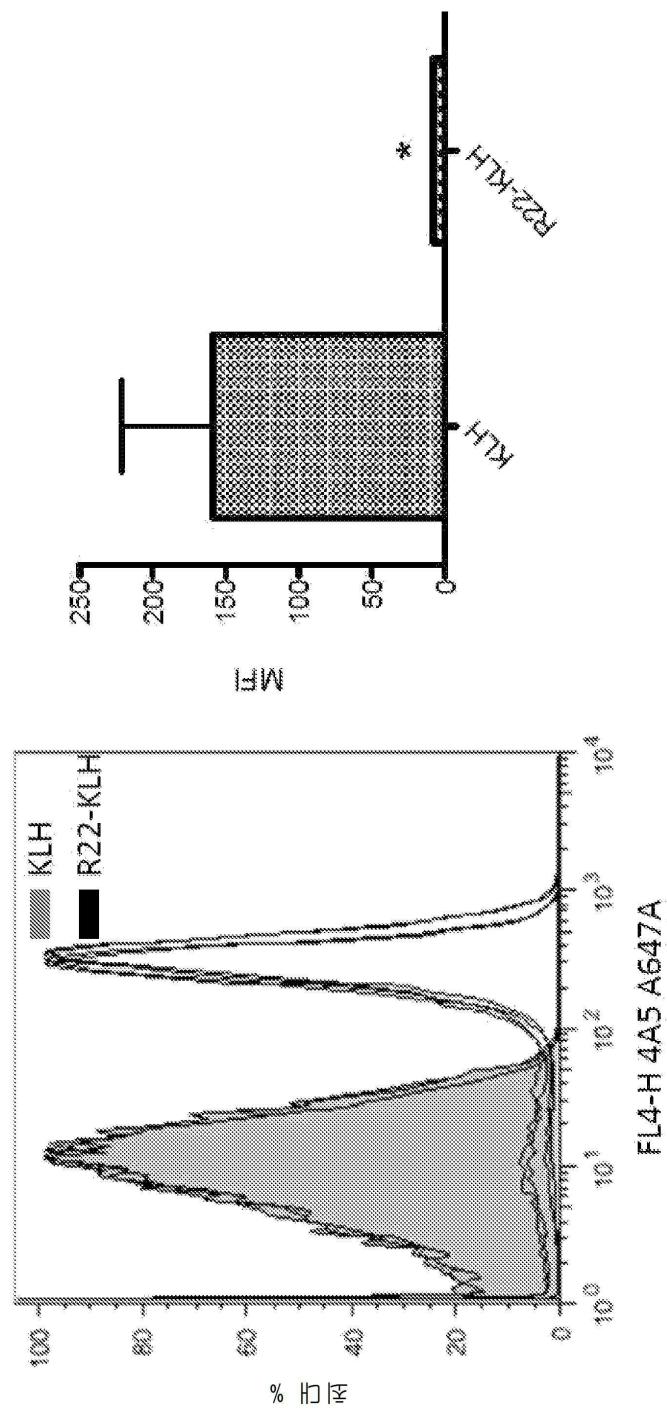
## 도면35



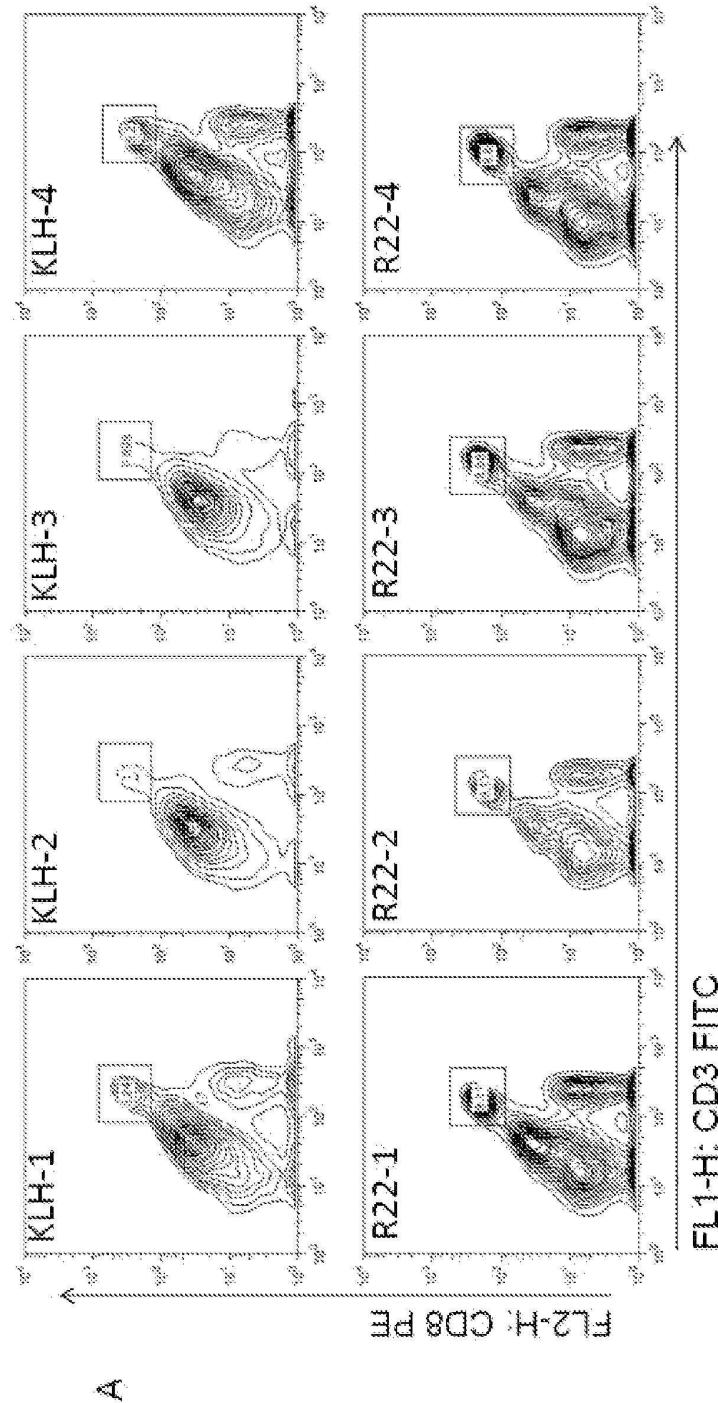
FL4-H: ROR1 A647

도면36

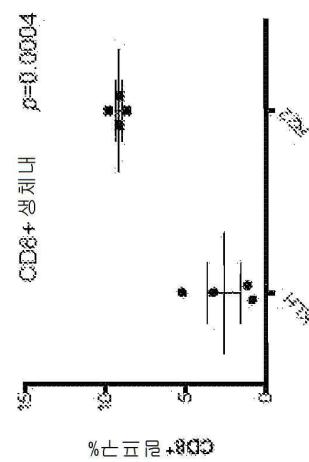
R22로 면역화된 WT B6 생쥐에서 ROR1의 항향조작



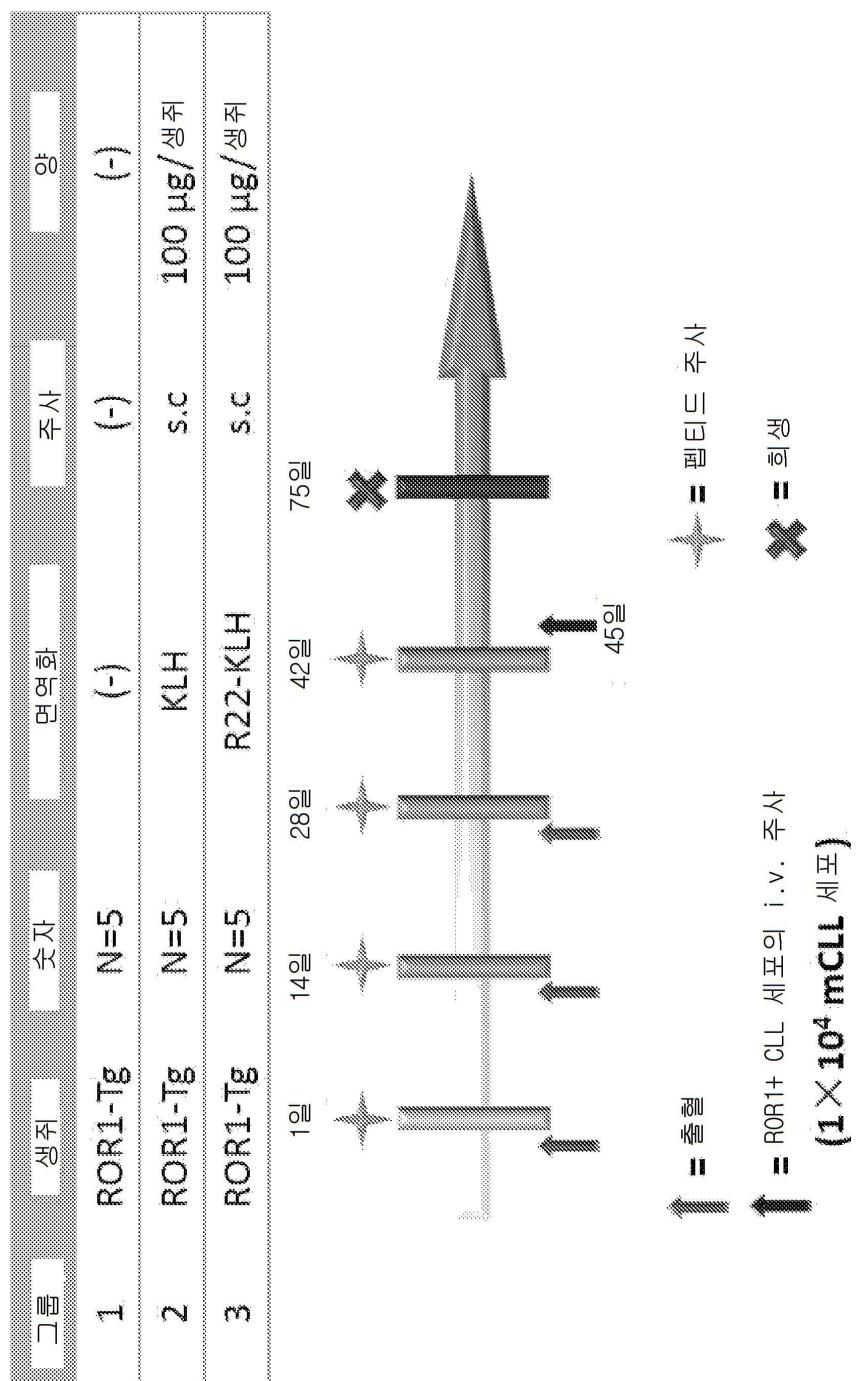
도면37



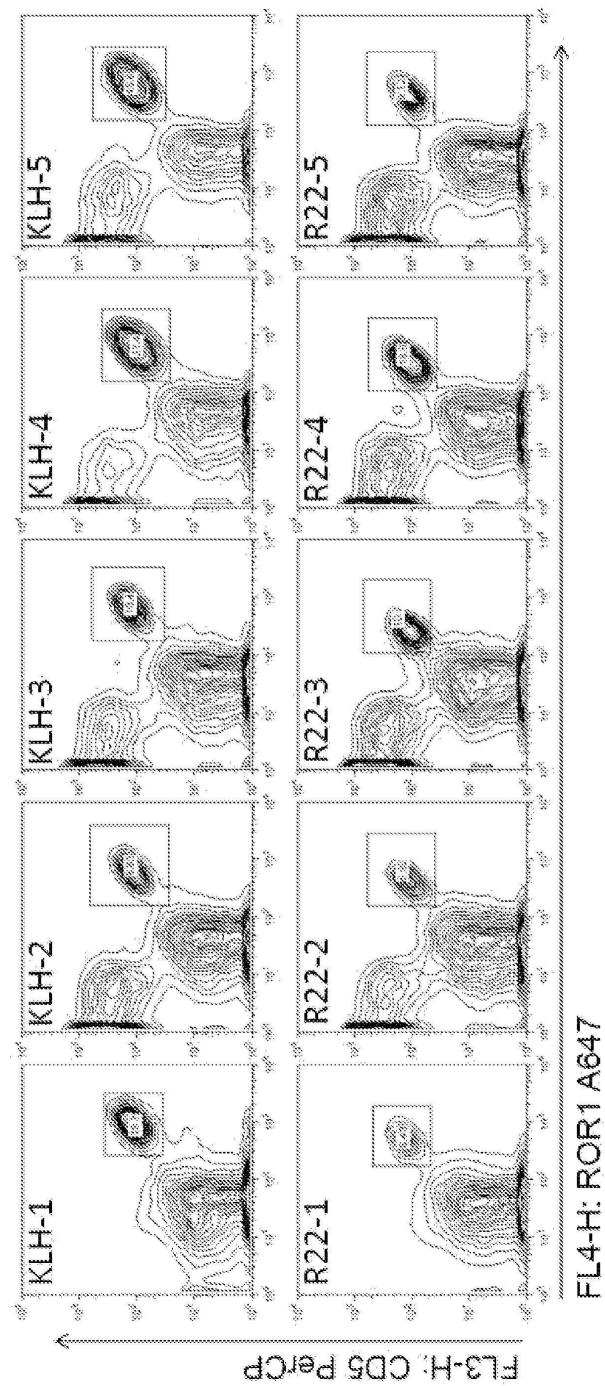
FL1-H: CD3 FITC

**B**

## 도면38

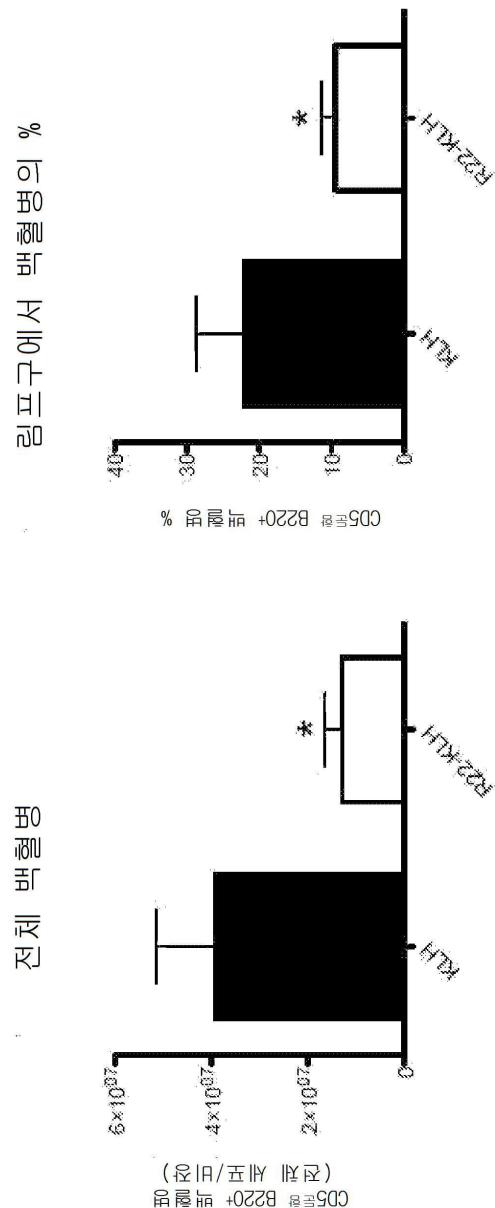


도면39



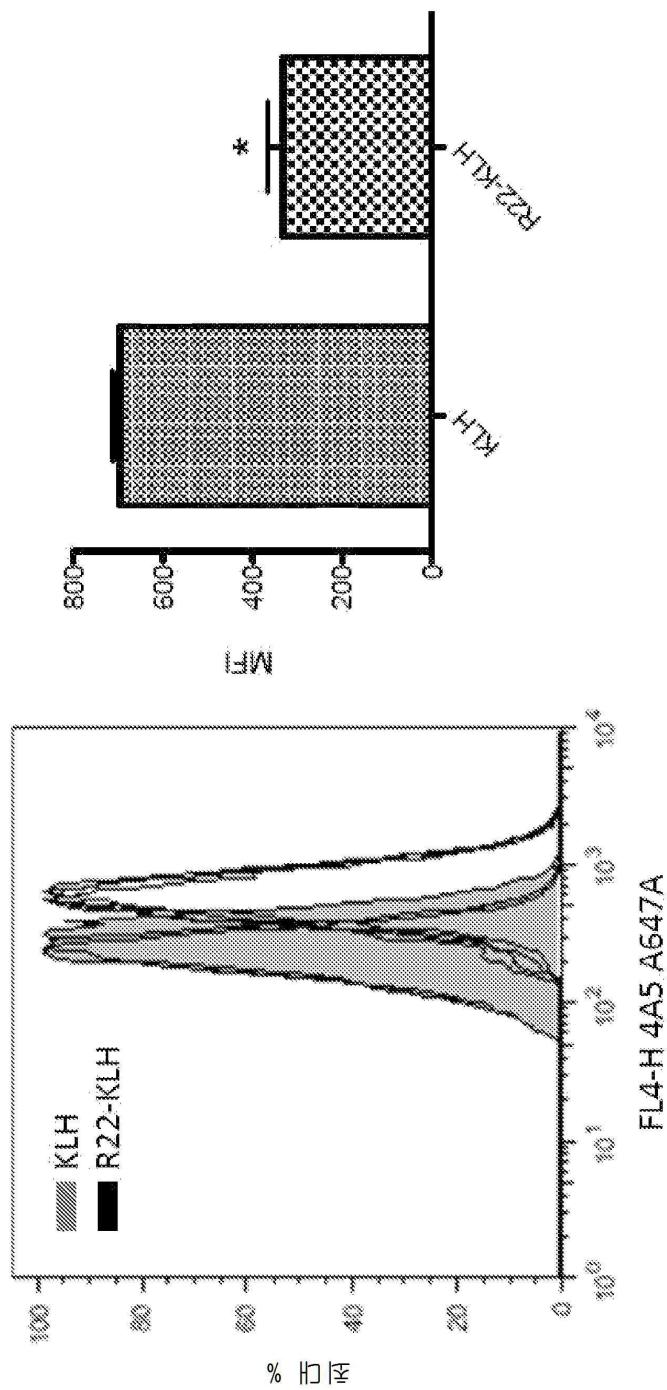
## 도면40

ROR1-Tg 생쥐에서 R22 예방접종에 의한  
ROR1+ 백혈병의 이식의 저해

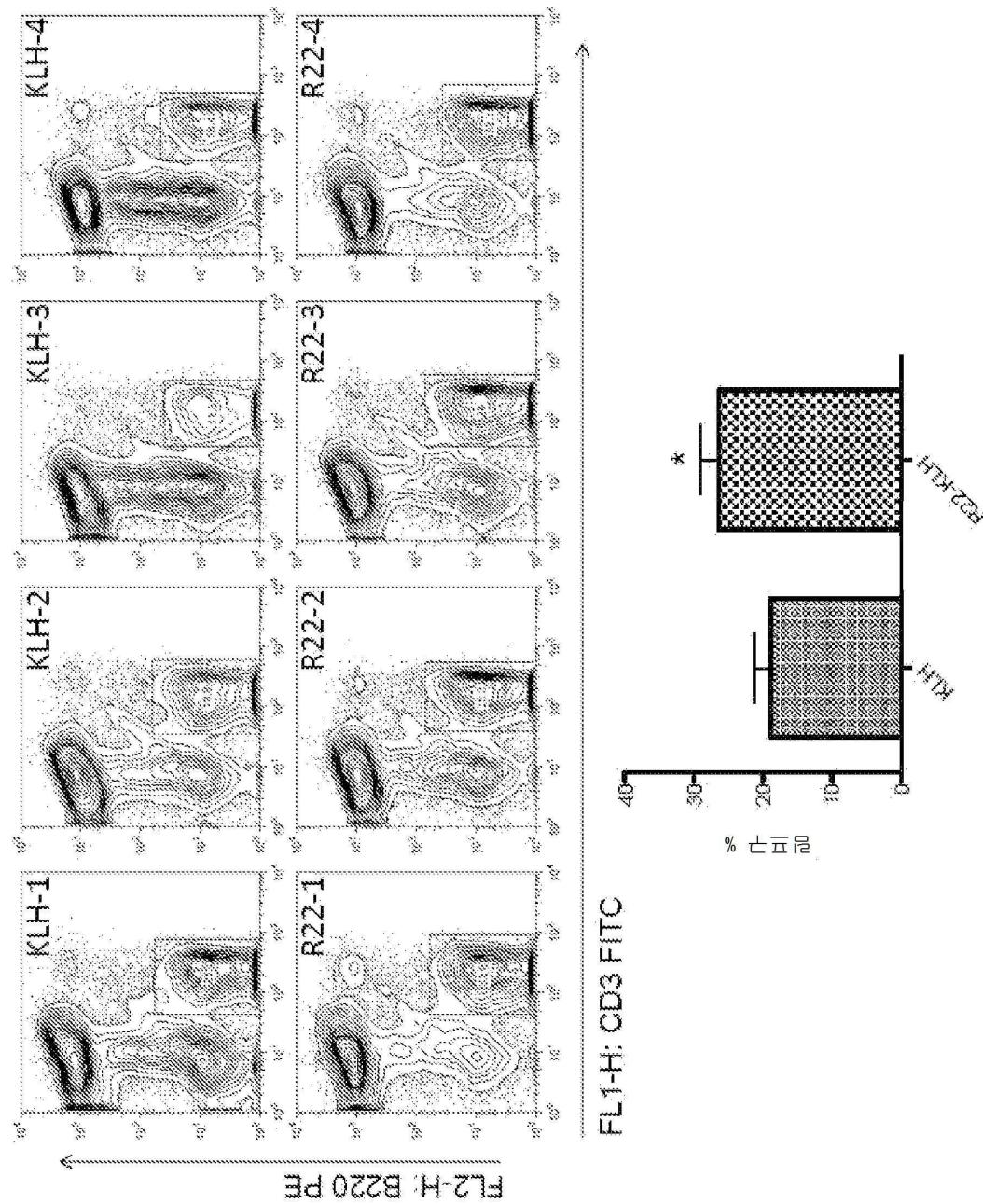


도면41

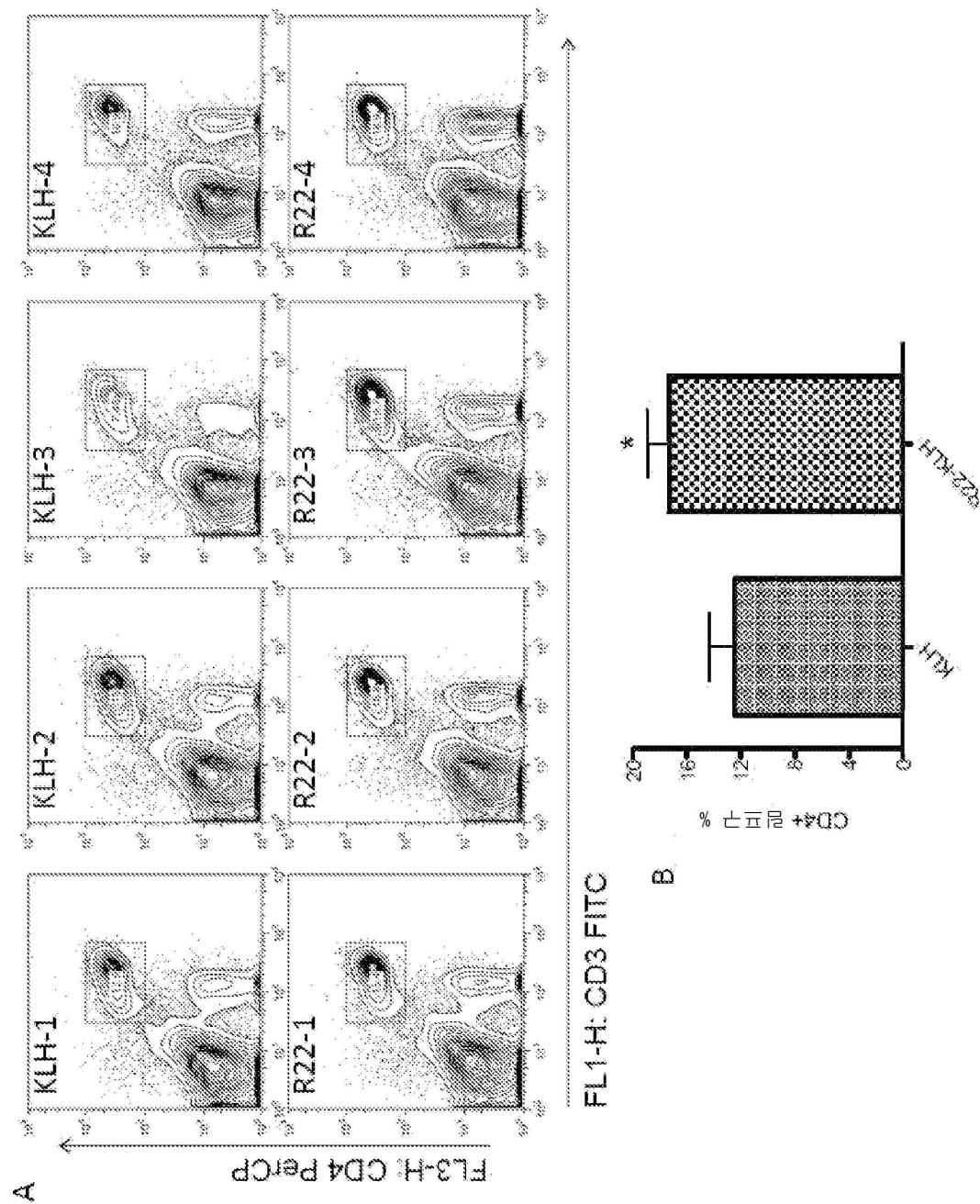
R22로 면역화된 ROR1-Tg 생쥐에서 ROR1의 항原조직



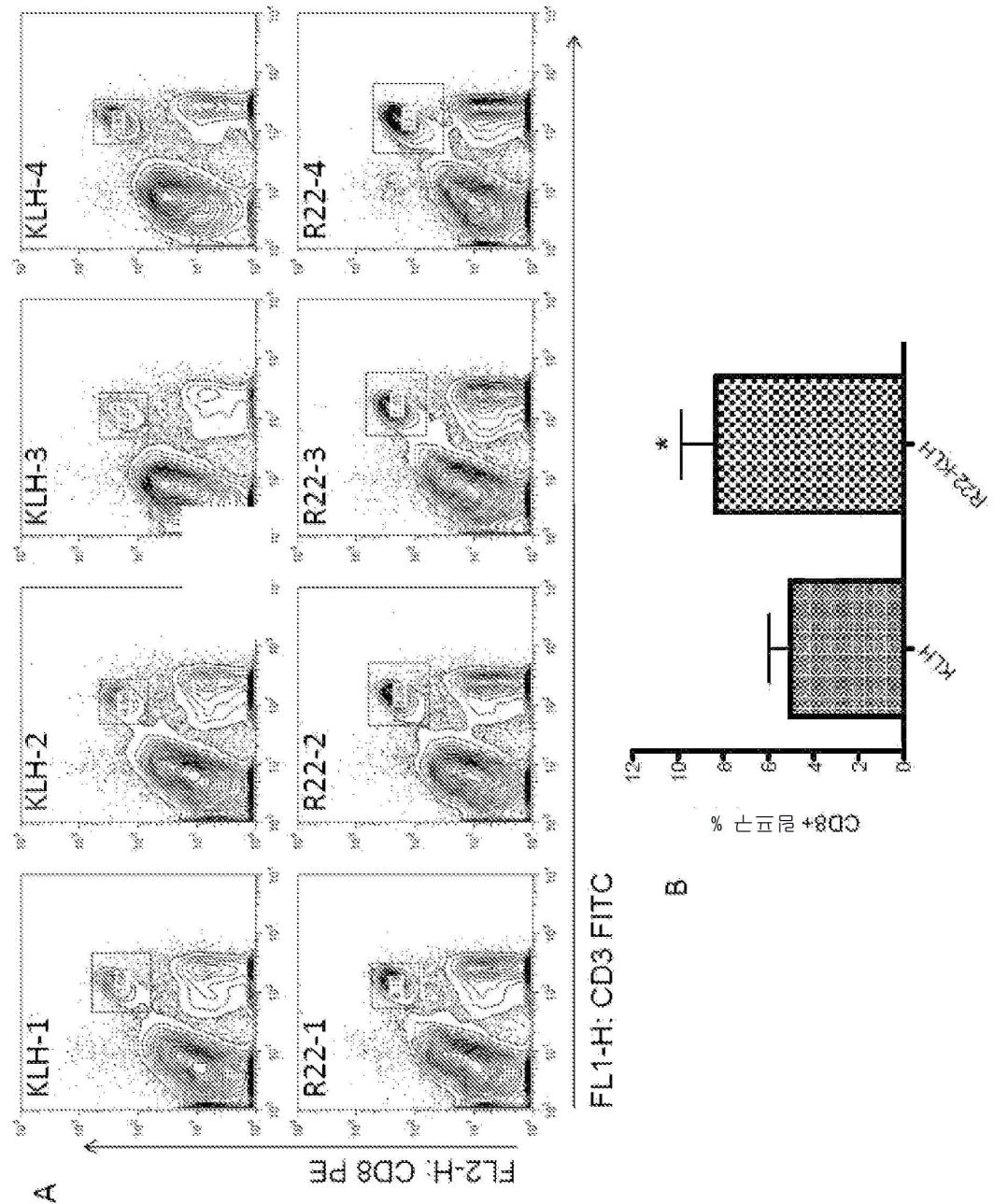
도면42



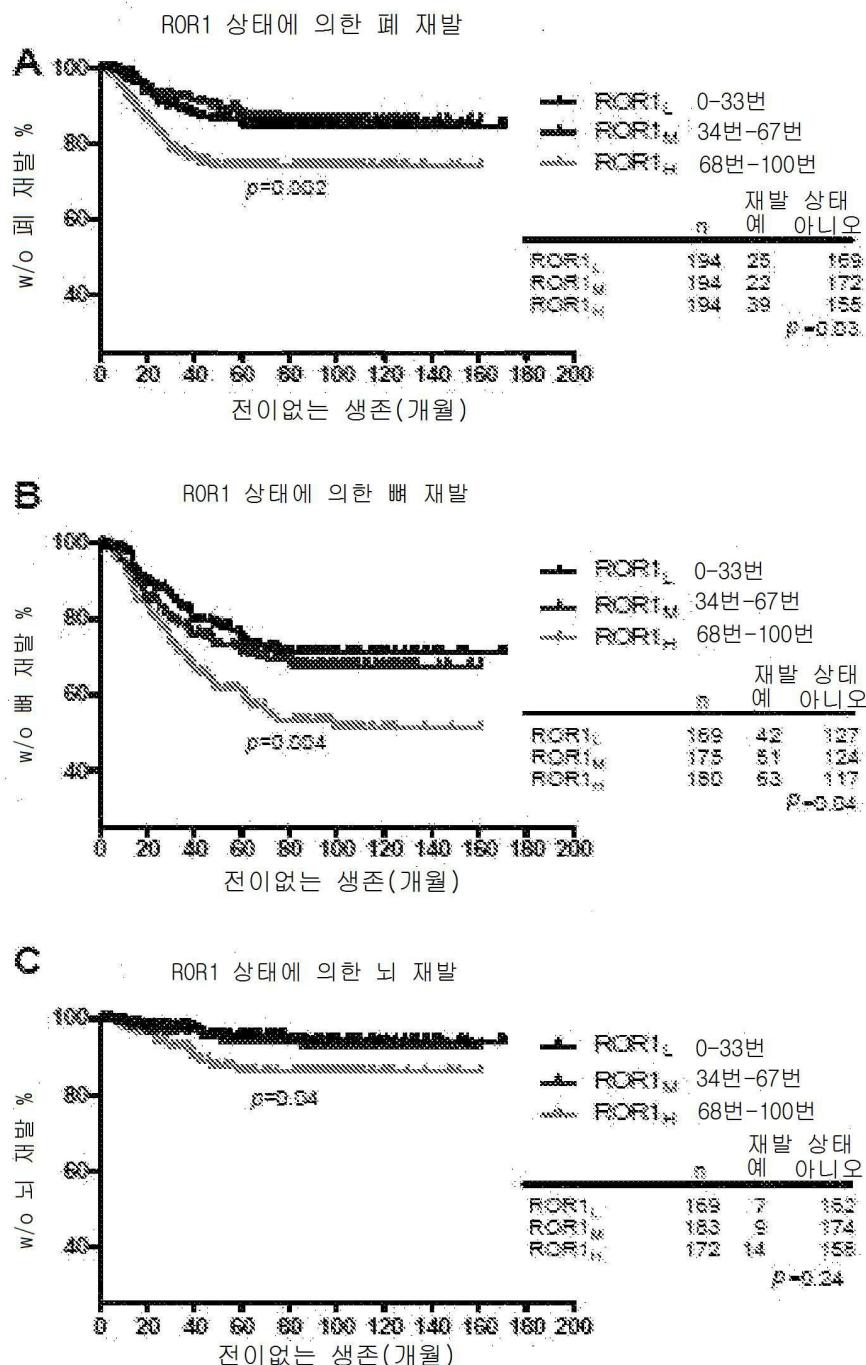
도면43



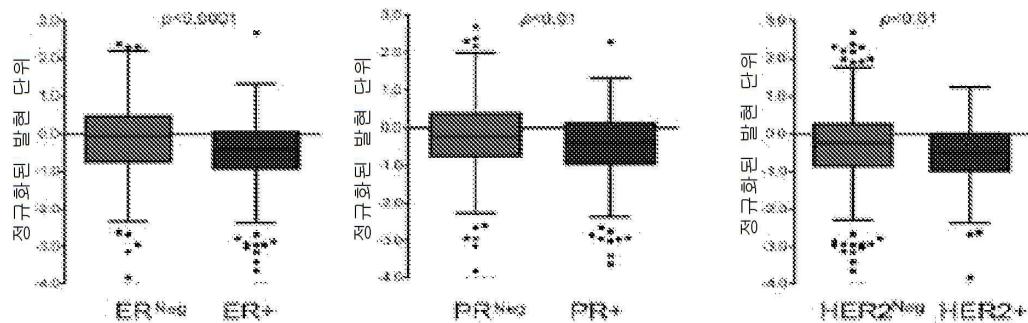
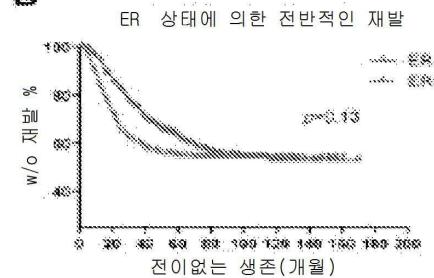
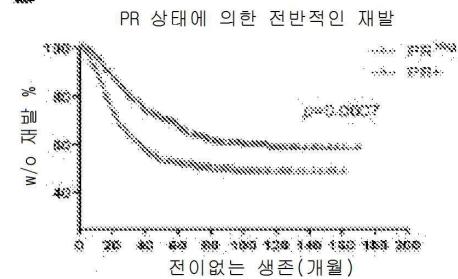
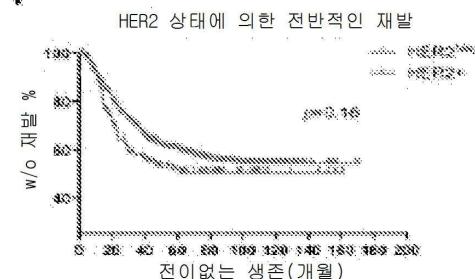
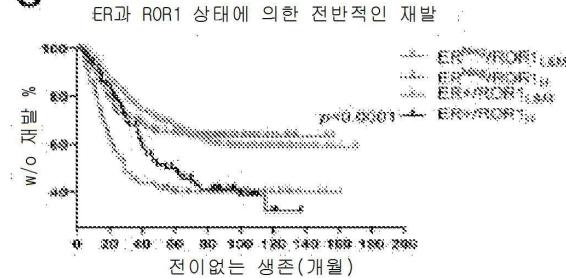
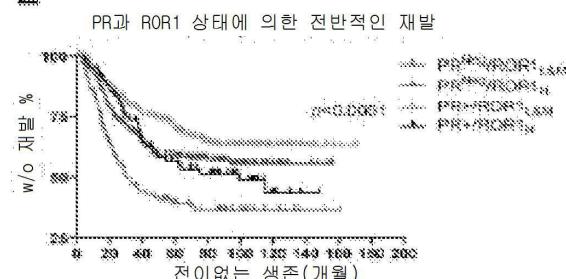
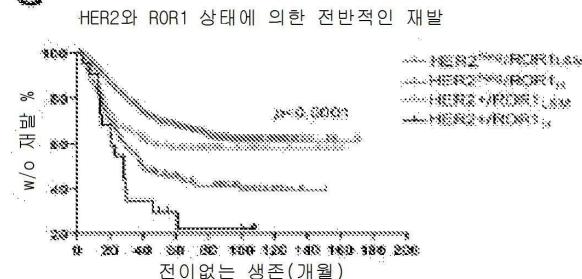
## 도면44



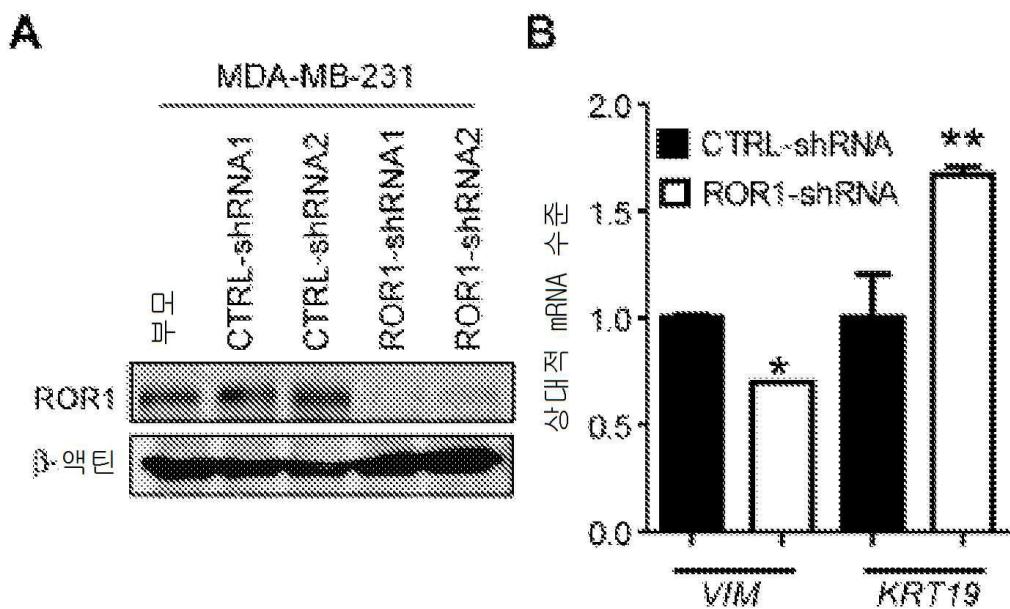
## 도면45



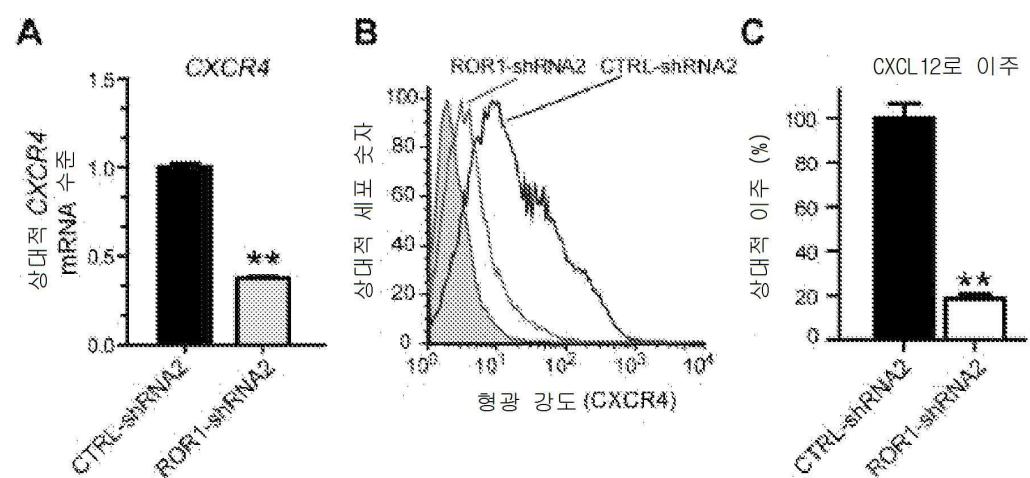
## 도면46

**A****B****D****F****C****E****G**

## 도면47



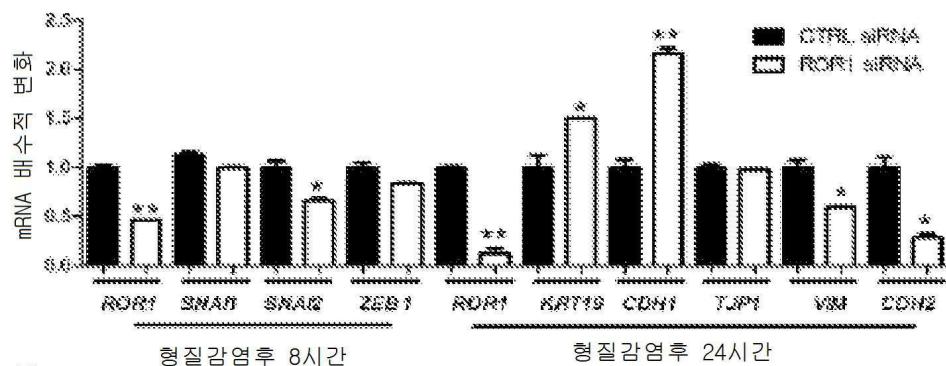
## 도면48



## 도면49

**A**

MDA-MB-231

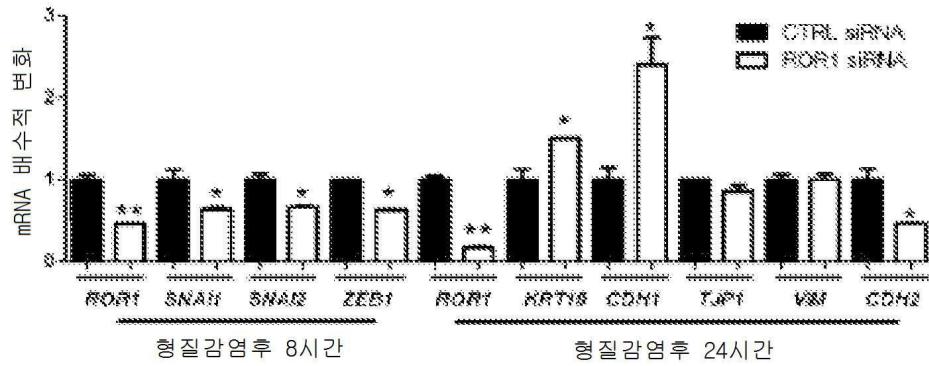


형질감염후 8시간

형질감염후 24시간

**B**

HS-578T

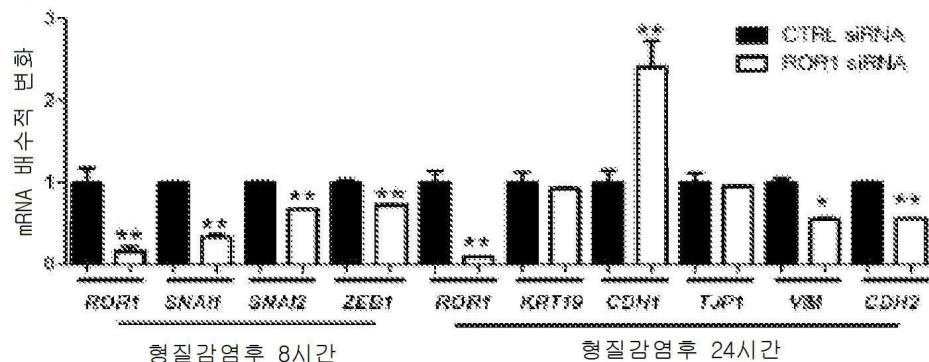


형질감염후 8시간

형질감염후 24시간

**C**

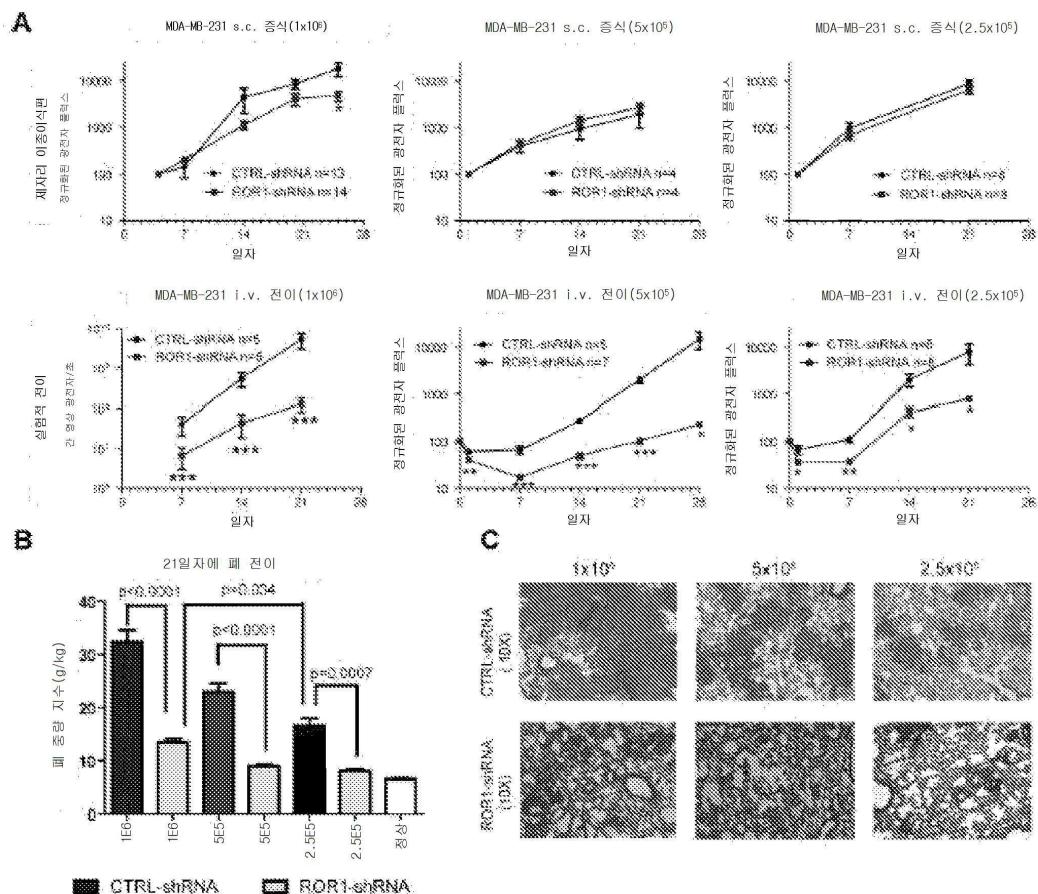
BT549



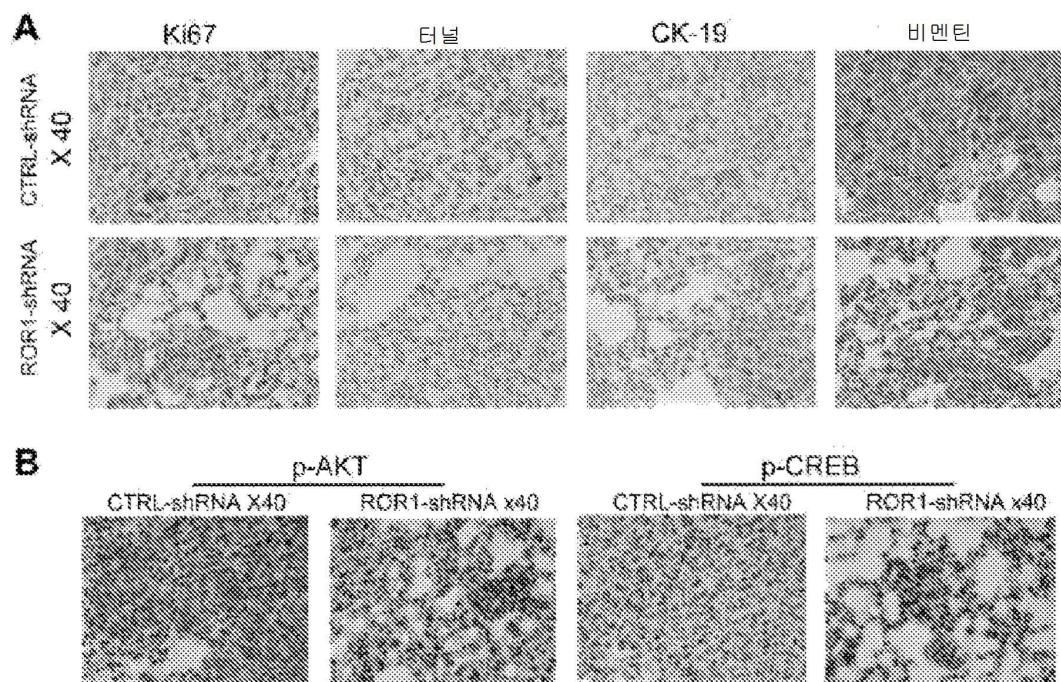
형질감염후 8시간

형질감염후 24시간

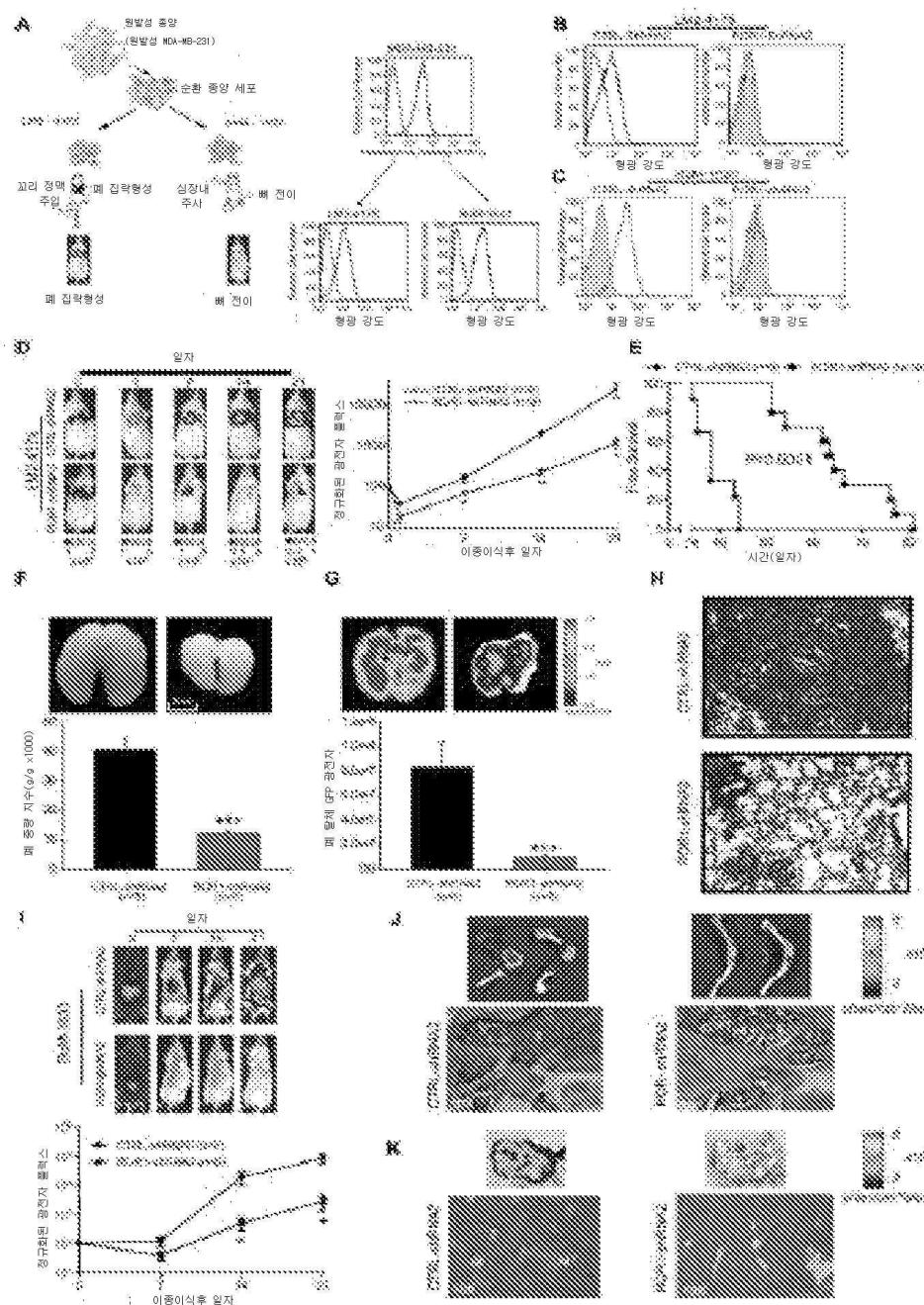
## 도면50



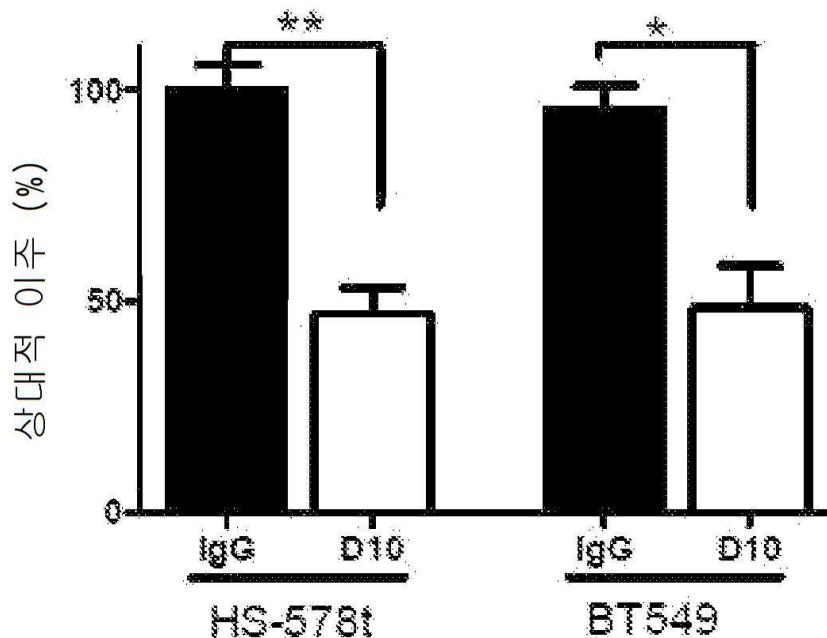
## 도면51



도면52



도면53



## 서열목록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Kipps, Thomas J.

Yu, Jian

Cui, Bing

Chen, Liguang

Widhopf, George

Prussak, Charles

&lt;120&gt; ANTIBODIES AND VACCINES FOR USE IN TREATING ROR1 CANCERS AND

INHIBITING METASTASIS

&lt;130&gt; ST-UCSD3820-1W0

&lt;150&gt; US 61/709,803

&lt;151&gt; 2012-10-04

&lt;150&gt; US 61/693,230

&lt;151&gt; 2012-08-24

&lt;160&gt; 46

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial mouse

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 1

Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr

20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Thr Leu

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 348

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 2

gagatccagc tgcagcagtc tggacctgtc ctggtaagc ctggggcttc agtgaaggtt	60
tcttgcaagg cttctggta tgcattcaact gcctacaaca tacactgggt gagacagagc	120
catggaaagc gccttgagt gattggatct ttgatcctt acgatggtg tagtagttac	180
aaccagaagt tcaaggacaa agccacattg actgttagaca aatcttccac cacagcctac	240
atgcatactca acagcctgac atctgaggac tctgcagtc attactgtgc aagggggtgg	300

tactactttg actactgggg ccacgggacc actctcacag ttcctca 348

<210> 3

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

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

1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Arg Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 4

<211> 324

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 4

gacgtccaga taaccaggc tccatctt cttgctgcat ctctggaga aaccattact 60

attaattgca gggcaagtaa gagcatttagc aaatatttg cctggtatca agagaaacct 120

gggaaaacta ataagctcct tatctactct ggatccactt tgcaatctgg aattccatca 180

agattcaggg gcagtggatc tggtacagat ttcaactctca ccatcagtag cctggagcct 240

gaagatttg caatgttata ctgtcaacag catgtgaat cccgtacac gttcgagag 300

gggaccaagc tggaaataaa acgg 324

<210> 5

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val

65 70 75 80

Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 348

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 6

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggta tgcattcaact gcctacaaca tacactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggttct ttgatcctt acatggtg tagtagttac 180

aaccagaagt tcaaggacag actcaccatc tccaaggaca cctccaaaaa ccaggtggtc 240

cttacaatga ccaacatgga ccctgtggac acagccacgt attactgtgc aagagggtgg 300

tactactttg actactgggg ccacggaacc ctggtcaccc tctcctca 348

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 7

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 8

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 8

gatattgtga tgacccagac tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60

atctcctgca gggcaagtaa gaggattagc aaatatttag cctggtagcca gcagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctct catctattct ggatccactt tgcaatctgg gatcccacct 180

cgattcagtgc acggcggtta tggaacagat ttaccctca caattaataa catagaatct 240

gaggatgctg catattactt ctgtcaacag catgtgaat cccgtacac gttcggcag 300



aaccagaagt tcaaggacag actcaccatc tccaggaca cctccaaaaa ccaggtggtc 240  
 cttacaatga ccaacatgga ccctgtggac acagccacgt attactgtgc aagagggtgg 300  
 tactacttg actactgggg ccacggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 11

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 12

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgccccgtca cccttggaca gccggcctcc 60  
 atctcctgca gggcaagtaa gaggcattagc aaatatttag cctggtatca gcagaaaacca 120  
 gggaaagctc ctaagctct gatctattct ggatccactt tgcaatctgg gatcccacct 180

cgattcagtgcacgggta tggaacagat ttaccctca caattaataa catagaatct 240  
 gaggatgctcatattactt ctgtcaacag catgatgaat cccgtacac gttcgccgag 300  
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321  
 <210> 13  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic construct  
 <400> 13  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr  
 20 25 30  
 Asn Ile His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val  
 65 70 75 80  
 Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115  
 <210> 14  
 <211> 348  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic construct  
 <400> 14  
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtaaagc cttcacagac cctgtccctc 60  
 acctgcactg tctctggta tgcattcaact gcctacaaca tacactggat ccgccagccc 120

ccagggagg ggctggagt gattggttt tttgatcct acgtggtag tagtagttac	180			
aaccagaagt tcaaggacag actcaccatc tccaaggaca cctccaaaaa ccaggtggtc	240			
cttacaatga ccaacatgga ccctgtggac acagccacgt attactgtgc aagagggtgg	300			
tactacttg actactgggg cacggacc ctggcaccc tctcctca	348			
<210> 15				
<211> 107				
<212> PRT				
<213> Artificial Sequence				
<220><223> Synthetic construct				
<400> 15				
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly				
1	5	10	15	
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr				
		20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile				
35	40	45		
Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly				
50	55	60		
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser				
65	70	75	80	
Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr				
		85	90	95
Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys				
		100	105	
<210> 16				
<211> 321				
<212> DNA				
<213> Artificial Sequence				
<220><223> Synthetic construct				
<400> 16				
gatattgtga tgaccagac tccactctcc ctgccccgtca cccctggaga gccggcctcc		60		
atctcctgca gggcaagtaa gaggcattagc aaatatttag cctggtagcca gcagaaacct		120		

ggccaggctc ccaggctct catctattct ggatccactt tgcaatctgg gatcccacct  
cgattcagtgcagcggta tgaaacagat ttaccctca caattaataa catagaatct 180  
240

gaggatgctg catattactt ctgtcaacag catgtgaat cccgtacac gttcgccgag 300  
gggaccaagg tgaaatcaa a 321

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Ile His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val

65 70 75 80

Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 348

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 18

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtaagc cttcacagac cctgtccctc 60  
 acctgcactg tctctggta tgcattcaact gcctacaaca tacactggat ccgccagccc 120  
 ccagggagg ggctggagtg gattggttct ttgatcctt acgatggtg tagtagttac 180

aaccagaagt tcaaggacag actcaccatc tccaaggaca cctccaaaaa ccaggtggtc 240  
 cttacaatga ccaacatgga ccctgtggac acagccacgt attactgtgc aagagggtgg 300  
 tactacttg actactgggg ccacggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 19

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 20

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca ccctggaca gccggctcc	60
atctcctgca gggcaagtaa gagcatttagc aaatatttag cctggtatca gcagaaacca	120
gggaaagctc ctaagctcct gatctattct ggatccactt tgcaatctgg gatcccacct	180
cgattcagtgc agcggta tggaacagat tttaccctca caattaataa catagaatct	240

gaggatgctg catattactt ctgtcaacag catgtgaat cccgtacac gttcggcgag	300
gggaccaagg tgaaatcaa a	321

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 252

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 21

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

1 5 10 15

Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly

100 105 110

Ser Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser

115 120 125

Thr Lys Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly

130 135 140

Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala

165	170	175
-----	-----	-----

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly

180	185	190
-----	-----	-----

Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys

195	200	205
-----	-----	-----

Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro

210	215	220
-----	-----	-----

Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Tyr Trp Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

245	250
-----	-----

<210> 22

<211> 753

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 22

gatattgtga tgacccagac tccactctcc ctggccgtca cccctggaga gccggcctcc	60
atctcctgca gggcaagtaa gagcatttagc aaatatttag cctggtagcca gcagaaacct	120
ggccaggctc ccaggctct catctattct ggatccactt tgcaatctgg gatcccacct	180

cgattcagtgc acggcggtta tggaacagat tttaccctca caattaataa catagaatct	240
gaggatgctg catattactt ctgtcaacag catgtgaat cccgtacac gttcgccgag	300
gggaccaagg tgaaatcaa aggtgggtgt ggttagcggtt ccaccttgg atccggcaag	360
cccgatctg gcgaggatc caccaaggcc ggaggaggag gaagttaggt gcagctgcag	420
gagtcgggcc caggactggtt gaagccttca cagaccctgt ccctcacctg cactgtctct	480
gttatgcat tcactgccta caacatacac tgggtgcgac aggcccctgg acaaggcctt	540
gagtgatgg ttcttttga tccttacgtt ggtggtagta gttacaacca gaagttaag	600

gacagactca ccatctccaa ggacacctcc aaaaaccagg tggccttac aatgaccaac	660
atggaccctg tggacacagc cacgtattac tgtcaagag ggtggacta ctttactac	720

tggggccacg gaaccctggc caccgtctcc tca 753  
<210> 23  
<211> 251  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Synthetic construct  
<400> 23

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr  
20 25 30

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

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser  
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser  
100 105 110

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr  
115 120 125

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro  
130 135 140

Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser  
145 150 155 160

Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro  
165 170 175

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly  
180 185 190

Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp

195                    200                    205  
 Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Thr Asp Pro Val

210                    215                    220  
 Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
 225                    230                    235                    240

Trp Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

245                    250

<210> 24

<211> 753

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 24

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc	60
atctccttgca gggcaagtaa gagcatttagc aaatatttag cctggtatca gcagaaaacca	120

gggaaagctc ctaagctcct gatctattct ggatccactt tgcaatctgg gatcccacct	180
cgattcagtgc acggcggta tggAACAGAT ttaccctca caattaataa catagaatct	240
gaggatgctg catattactt ctgtcaacag catgtgaat cccgtacac gttcgccgag	300
gggaccaagg tggAAATCAA aggtgggtt ggtacggct ccacctctgg atccggcaag	360
cccgatctg cgcaggggatc caccaaggcc ggaggaggag gaagtcaagg gcagctgcag	420
gagtcgggcc caggactggtaa gaagccttca cagaccctgt ccctcacctg cactgtctct	480
gtttatgcat tcactgccta caacatacac tgggtgcgac aggcccctgg acaaggcctt	540

gagttggatgg gttttttgttgc tccttacgtt ggtggtagta gttacaacca gaaggttcaag	600
gacagactca ccatctccaa ggacacctcc aaaaaccagg tggcccttac aatgaccaac	660
atggaccctg tggacacagc cacgtattac tgtcaagag ggtggtacta ctttgactac	720
tggggccacg gaaccctggt caccgtctcc tca	753

<210> 25

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 25

Val Ala Thr Asn Gly Lys Glu Val Val Ser Ser Thr Gly Val Leu Phe

1 5 10 15

Val Lys Phe Gly Pro Cys

20

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 26

Glu Val Val Ser Ser Thr Gly Val Leu Phe Val Lys Phe Gly Pro Cys

1 5 10 15

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 27

Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr Asn

1 5

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 28

Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly Ser

1 5

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

&lt;400&gt; 29

Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 30

Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

1 5

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 31

Ser Gly Ser

1

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 32

Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr

1 5

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 33

Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 34  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Synthetic construct  
<400> 34  
Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
1               5               10               15  
Lys Asp

<210> 35  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Synthetic construct  
<400> 35  
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly  
1               5               10               15  
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

20

<210> 36  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Synthetic construct  
<400> 36  
Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr  
1               5               10  
<210> 37  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 37

Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly

1 5 10

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt;

&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic construct

&lt;400&gt; 38

Cys Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys

1 5 10 15

Val Glu Ile Lys

20

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 39

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Leu Leu

65 70 75 80

Lys Met Thr Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Arg Gly Ser Ser Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100	105	110	
Val Thr Val Ser Ser			
115			
<210> 40			
<211> 351			
<212> DNA			
<213> Mus musculus			
<400> 40			
caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagac tctgtccatc			60
acttgcactg tctctgggtt ttcattaacc agttatggtg tacactgggt tcgccagcct			120
ccagggaaagg gcttggagtg gctggagta atatggctg gtggattcac aaattataat			180
tcggctctca agtccagact gagcatcagc aaagacaact ccaagagcca agttcttta			240
aaaatgacca gtctgcaaac tgatgacaca gccatgtact actgtgccag gagaggtagt			300
tcctattcta tggactattt gggtaagga acctcagtca ccgtctcctc a			351
<210> 41			
<211> 106			
<212> PRT			
<213> Mus musculus			
<400> 41			
Glu Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Thr Ala Ala Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Gln Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Asn Val Ser Tyr Ile			
20	25	30	
His Trp Tyr Gln Gln Arg Ser Gly Thr Ser Pro Arg Pro Trp Ile Tyr			
35	40	45	
Glu Ile Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser			
50	55	60	
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu			
65	70	75	80
Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Tyr Pro Leu Ile Thr			
85	90	95	
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gln			

100 105

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 318

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 42

```

gaaattgtgc tctctcagtc tccagccatc acagctgcat ctctggcca aaaggcacc       60
atcacctgca gtgccagttc aaatgttaat tacatccact ggtaccagca gaggtcaggc      120
acctccccca gaccatggat ttatgaaata tccaaactgg ctctggagt cccagttcgc      180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctttaac tcttcacaa tcagcagcat ggaggctgaa      240
gatgctgcca ttatttatttgc tagcagtgg aattatcctc ttatcacgtt cggctcgaaa      300
acaaagtgg aaatacaa                                         318

```

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 43

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ile Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Arg Asn Ile Leu Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Gly

85 90 95

Arg Tyr Asp Tyr Asp Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 44  
<211> 357  
<212> DNA  
<213> Mus musculus  
<400> 44

```
gaagtgaaac tggtgagtc tgggggaggc tttagtgaagc ctggagggtc cctgaaaactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacttcagt agctatgcc a tgtttgggt tcgcaggatt      120
ccagagaaga ggcggagggt ggtcgcattt attagtcgt gtggtaaccac ctactatcca      180
gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg tcaggaacat cctgtacctg      240
caaatgagca gctgagggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtggaag atatgattac      300
gacgggtact atgcaatgga ctactgggt caaggaacct cagtcaccgt ctcctca      357
```

<210> 45  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<400> 45

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Pro Asp Ile Asn Ser Tyr

20	25	30
----	----	----

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

Gly Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Tyr

65	70	75	80
----	----	----	----

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr

85	90	95
----	----	----

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys

100	105
-----	-----

<210> 46

&lt;211&gt; 322

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 46

gacatcaaga tgaccaggc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtca 60

atcacttgca aggcgagtc ggacattaat agctattaa gctggttcca gcagaaacca 120

ggaaatctc ctaagaccct gatctatcg tcaaacagat tgggtatgg ggtccatca 180

aggttcagtgcgggtggatc tggcaagat tattctctca ccatcaacag cctggagat 240

gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag tatgtataat ttccgtacac gttcgaggg 300

gggaccaagc tgaaatgaa ac 322