(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년12월26일
(11) 등록번호 10-1098109
(24) 등록일자 2011년12월16일

(51) Int. Cl.
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2004-7014307
(22) 출원일자(국제출원일자) 2003년03월13일
심사청구일자 2008년03월10일
(85) 번역문제출일자 2004년09월11일
(65) 공개번호 10-2004-0095281
(43) 공개일자 2004년11월12일
(86) 국제출원번호 PCT/US2003/008048
(87) 국제공개번호 WO 2003/100033
국제공개일자 2003년12월04일
(30) 우선권주장
60/364,991 2002년03월13일 미국(US)
60/426,286 2002년11월13일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Biochem. Biophys. Res. Commun.*
EP0719859 A1
US20010056076 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
더 리전츠 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아
미국 캘리포니아주 94607 오클랜드 프랭클린 스트리트 1111 12층
바이오겐 아이덱 엠에이 인코포레이티드
미국 매사추세츠 02142 캠브리지 캠브리지 센터 14
(72) 발명자
바이올렛트셸리아엠
미국 메사추세츠주 02420 렉싱톤 사이몬즈 로드 91
웨인렙폴에이치
미국 메사추세츠주 01810 앤도버 브룬드렛 애비뉴 18
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김성기

전체 청구항 수 : 총 69 항 심사관 : 문동현

(54) 항αvβ6 항체

(57) 요 약

M.96에 특이적으로 결합하는 모노클론 항체. 또한, 이 항체를 006 매개 질환에 걸려 있거나 걸릴 위험성이 있는 포유동물을 치료하거나 또는 %Q 매개 질환을 진단하는데 사용하는 방법도 포함한다.

(72) 발명자

사이먼케네스제이

미국 메사츄세츠주 02141 캠브리지 윈저 스트리트 454

셰퍼드딘

미국 캘리포니아주 94610 오클랜드 허버트 로드 1006

레온다이안알

미국 메사츄세츠주 01890 윈체스터 유진 드라이브 24

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 다른 α_V 인테그린 또는 비특이성 인테그린에 결합하지 않고 $\alpha_V\beta_6$에 특이적으로 결합하고;

(b) 10D5의 IC_{50} 값 보다 더 작은 IC_{50} 값으로 잠복기 관련 펩타이드(LAP)에 대한 $\alpha_V\beta_6$의 결합을 저해하며;

(c) 가용성 $\alpha_V\beta_6$ 에 대한 양이온 의존성 결합에서 Ca^{2+}/Mg^{2+} 및 Mn^{2+} 의 사용 사이에 차이가 없는 양이온 의존 방식 또는 양이온 비의존 방식으로 $\alpha_V\beta_6$ 에 결합하는

$\alpha_V\beta_6$ 차단 항체인 모노클론 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체는 하이브리도마 6.1A8 (ATCC 기탁번호 PTA-3647)에 의해 생산되는 항체와 동일한 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체는 하이브리도마 6.3G9 (ATCC 기탁번호 PTA-3649)에 의해 생산되는 항체와 동일한 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항체는 하이브리도마 6.8G6 (ATCC 기탁번호 PTA-3645)에 의해 생산되는 항체와 동일한 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항체는 하이브리도마 6.2B1 (ATCC 기탁번호 PTA-3646)에 의해 생산되는 항체와 동일한 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 항체는 하이브리도마 7.1G10 (ATCC 기탁번호 PTA-3898)에 의해 생산되는 항체와 동일한 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 항체는 하이브리도마 7.7G5 (ATCC 기탁번호 PTA-3899)에 의해 생산되는 항체와 동일한 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 항체는 하이브리도마 7.1C5 (ATCC 기탁번호 PTA-3900)에 의해 생산되는 항체와 동일한 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 항체와 $\alpha_V\beta_6$ 간의 결합은 2가 양이온 비의존성인 것인 모노클론 항체.

청구항 12

제1항에 있어서, 중쇄 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3은 각각 서열번호 1, 4 및 7의 서열로 구성되고, 경쇄 CDR 1, 2 및 3은 각각 서열번호 10, 13 및 15의 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 13

제1항에 있어서, 중쇄 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3은 각각 서열번호 3, 5 및 8의 서열로 구성되고, 경쇄 CDR 1, 2 및 3은 각각 서열번호 11, 14 및 17의 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 14

제1항에 있어서, 중쇄 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3은 각각 서열번호 3, 6 및 9의 서열로 구성되고, 경쇄 CDR 1, 2 및 3은 각각 서열번호 12, 14 및 18의 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 15

제1항에 있어서, 중쇄 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3은 각각 서열번호 2, 46 및 47의 서열로 구성되고, 경쇄 CDR 1, 2 및 3은 각각 서열번호 48, 13 및 16의 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 16

제1항에 있어서, 중쇄 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3은 서열번호 49, 51 및 53의 서열로 구성되고, 경쇄 CDR 1, 2 및 3은 각각 서열번호 55, 57 및 59의 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 17

제1항에 있어서, 중쇄 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3은 각각 서열번호 50, 52 및 54의 서열로 구성되고, 경쇄 CDR 1, 2 및 3은 각각 서열번호 56, 58 및 60의 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 18

제1항에 있어서, 서열번호 19 내지 36 또는 서열번호 61 및 62 중 어느 하나의 중쇄 가변 도메인 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 19

제1항에 있어서, 서열번호 19의 중쇄 가변 도메인 서열과 서열번호 37의 경쇄 가변 도메인 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 20

제1항에 있어서, 서열번호 20 또는 21의 중쇄 가변 도메인 서열과 서열번호 38의 경쇄 가변 도메인 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 21

제1항에 있어서, 서열번호 22의 중쇄 가변 도메인 서열과 서열번호 43의 경쇄 가변 도메인 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 22

제1항에 있어서, 서열번호 23의 중쇄 가변 도메인 서열과 서열번호 44의 경쇄 가변 도메인 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 23

제1항에 있어서, 서열번호 24의 중쇄 가변 도메인 서열과 서열번호 45의 경쇄 가변 도메인 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 24

제1항에 있어서, 서열번호 25 또는 26의 중쇄 가변 도메인 서열과 서열번호 42의 경쇄 가변 도메인 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 25

제1항에 있어서, 서열번호 27, 28 또는 29의 중쇄 가변 도메인 서열과 서열번호 39의 경쇄 가변 도메인 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 26

제1항에 있어서, 서열번호 34 또는 35의 중쇄 가변 도메인 서열과 서열번호 40의 경쇄 가변 도메인 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 27

제1항에 있어서, 서열번호 36의 중쇄 가변 도메인 서열과 서열번호 41의 경쇄 가변 도메인 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 28

제1항에 있어서, 서열번호 61의 중쇄 가변 도메인 서열과 서열번호 63의 경쇄 가변 도메인 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 29

제1항에 있어서, 서열번호 62의 중쇄 가변 도메인 서열과 서열번호 64의 경쇄 가변 도메인 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 30

삭제

청구항 31

제1항에 있어서, 하이브리도마 6.2A1 (ATCC 기탁번호 PTA-3896)에 의해 생산되는 항체와 동일한 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 32

제1항에 있어서, 하이브리도마 6.2E5 (ATCC 기탁번호 PTA-3897)에 의해 생산되는 항체와 동일한 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드 서열로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 33

제1항 내지 제8항, 제11항 내지 제29항, 제31항 또는 제32항 중 어느 한 항에 기재된 항체와 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 포유동물에서 $\alpha_V\beta_6$ 에 의해 매개되는 질환을 예방하거나 치료하기 위한 조성물로서, 상기 질환이 섬유증, 건선, 암, 알포트 증후군 및 급성 폐손상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 항체는 세포독성제와 접합되는 것인 조성물.

청구항 35

제33항에 있어서, 상기 항체는 양이온 의존성 항체인 것인 조성물.

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

제33항에 있어서, 상기 섬유증은 피부경화증, 흉터형성, 간 섬유증, 신장 섬유증, 또는 폐 섬유증인 것인 조성물.

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

제33항에 있어서, 상기 암은 상피암인 것인 조성물.

청구항 43

제33항에 있어서, 상기 암은 구강, 피부, 경부, 난소, 인두, 후두, 식도, 폐, 유방, 신장 또는 직장결장 암인 것인 조성물.

청구항 44

삭제

청구항 45

제1항 내지 제8항, 제11항 내지 제29항, 제31항 또는 제32항 중 어느 한 항에 기재된 항체와 포유동물 유래의 조직 시편을 접촉시키는 것을 포함하는, 상기 조직 시편에서 $\alpha_V\beta_6$을 검출하는 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 항체는 6.2A1 (ATCC 기탁번호 PTA 3896) 및 6.2E5(ATCC 기탁번호 PTA 3897)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 47

하이브리도마 6.1A8 (ATCC 기탁번호 PTA-3647)의 세포.

청구항 48

하이브리도마 6.2B10 (ATCC 기탁번호 PTA-3648)의 세포.

청구항 49

하이브리도마 6.3G9 (ATCC 기탁번호 PTA-3649)의 세포.

청구항 50

하이브리도마 6.8G6 (ATCC 기탁번호 PTA-3645)의 세포.

청구항 51

하이브리도마 6.2B1 (ATCC 기탁번호 PTA-3646)의 세포.

청구항 52

하이브리도마 6.2A1 (ATCC 기탁번호 PTA-3896)의 세포.

청구항 53

하이브리도마 6.2E5 (ATCC 기탁번호 PTA-3897)의 세포.

청구항 54

하이브리도마 7.1G10 (ATCC 기탁번호 PTA-3898)의 세포.

청구항 55

하이브리도마 7.7G5 (ATCC 기탁번호 PTA-3899)의 세포.

청구항 56

하이브리도마 7.1C5 (ATCC 기탁번호 PTA-3900)의 세포.

청구항 57

삭제

청구항 58

제1항에 있어서, 서열번호 19 내지 45 및 서열번호 61 내지 64 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 모노클론 항체.

청구항 59

제1항에 있어서, 하이브리도마 6.2B10 (ATCC 기탁번호 PTA-3648)에 의해 생산되는 항체와 동일한 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드 서열로 구성되는 모노클론 항체.

청구항 60

제1항에 있어서, 상기 항체는 중쇄 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3과 경쇄 CDR 1, 2 및 3을 포함하고, 이때 중쇄 CDR 1, 2 및 3은 각각 서열번호 3, 6 및 9의 서열로 구성되고, 경쇄 CDR 1, 2 및 3은 각각 서열번호 12, 14 및 18로 구성되는 것인 모노클론 항체.

청구항 61

제1항에 있어서, 상기 항체는 가용성 $\alpha_V\beta_6$에 결합하나, β_6서브유닛에는 결합하지 않는 것인 모노클론 항체.

청구항 62

제1항에 있어서, 상기 항체는 TGF-β의 활성화를 방지하는 것인 모노클론 항체.

청구항 63

제11항에 있어서, 상기 항체는 중쇄 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3과 경쇄 CDR 1, 2 및 3을 포함하고, 이때 상기 항체는 $\alpha_V\beta_6$에 대한 결합에 대해 6.8G6 (ATCC 기탁번호 PTA-3645)과 경쟁하고, 경쇄의 CDR3 내에 FXY 모티프를 함유하는 것인 모노클론 항체.

청구항 64

제1항에 있어서, 상기 항체는 글리코실화를 위한 위치인 아미노산 잔기에서 돌연변이를 보유하여 글리코실화 부위가 제거된 것인 모노클론 항체.

청구항 65

하이브리도마 6.1A8 (ATCC 기탁번호 PTA-3647)에 의해 생성된 항체.

청구항 66

하이브리도마 6.2B10 (ATCC 기탁번호 PTA-3648)에 의해 생성된 항체.

청구항 67

하이브리도마 6.3G9 (ATCC 기탁번호 PTA-3649)에 의해 생성된 항체.

청구항 68

하이브리도마 6.8G6 (ATCC 기탁번호 PTA-3645)에 의해 생성된 항체.

청구항 69

하이브리도마 6.2B1 (ATCC 기탁번호 PTA-3646)에 의해 생성된 항체.

청구항 70

하이브리도마 6.2A1 (ATCC 기탁번호 PTA-3896)에 의해 생성된 항체.

청구항 71

하이브리도마 6.2E5 (ATCC 기탁번호 PTA-3897)에 의해 생성된 항체.

청구항 72

하이브리도마 7.1G10 (ATCC 기탁번호 PTA-3898)에 의해 생성된 항체.

청구항 73

하이브리도마 7.7G5 (ATCC 기탁번호 PTA-3899)에 의해 생성된 항체.

청구항 74

하이브리도마 7.1C5 (ATCC 기탁번호 PTA-3900)에 의해 생성된 항체.

청구항 75

제58항 내지 제74항 중 어느 한 항에 기재된 항체와 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 포유동물에서 $\alpha_V\beta_6$ 에 의해 매개되는 질환을 예방하거나 치료하기 위한 조성물물로서, 상기 질환이 섬유증, 건선, 암, 알포트 증후군 및 급성 폐손상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 76

삭제

청구항 77

제75항에 있어서, 상기 섬유증은 피부경화증, 흉터형성, 간 섬유증, 신장 섬유증, 또는 폐 섬유증인 것인 조성물.

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

제75항에 있어서, 상기 암은 상피암인 것인 조성물.

청구항 81

제75항에 있어서, 상기 암은 구강, 피부, 경부, 난소, 인두, 후두, 식도, 폐, 유방, 신장 또는 직장결장 암인 것인 조성물.

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

제58항 내지 제74항 중 어느 한 항에 기재된 항체와 포유동물 유래의 조직 시편을 접촉시키는 것을 포함하는, 상기 조직 시편에서 $\alpha_V\beta_6$을 검출하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 일반적으로 분자생물학 분야에 관한 것이고, 구체적으로 $\alpha_V\beta_6$인테그린에 대한 항체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인테그린(integrin)은 세포-세포 유착 및 세포-기질 부착을 매개하는 세포 표면 수용체의 상과(superfamily)이다. 이 단백질은 부착기구(anchorage) 뿐만 아니라 발생과 조직 손상 동안의 세포 증식, 이동 및 분화의 시그널을 제공하는 것으로 알려져 있다. 인테그린은 또한 세포 역분화 및 침입에 관여하였는데, 특히 세포가 자신의 특정 형태를 상실하고 전이성 암 세포로 되기 시작할 때 그런 작용을 나타내었다.

[0003] 인테그린은 2개의 비공유결합된 서브유닛 α와 β로 이루어진 6량체 단백질이다. 인테그린의 결합 특이성은 약 8개의 다른 β쇄와 약 18개의 다른 α쇄의 조합으로 나타나는 것이다. $\alpha_V\beta_6$ 인테그린은 피브로넥틴, 테나신, 비트로넥틴 및 최근 확인된 잠복기 관련 펩타이드인, 전구체 TGF-β 단백질의 일부로서 합성된 278개 아미노산 펩타이드 "LAP"(Munger et al., Cell 96(3):319-328(1999))을 비롯한 다수의 리간드에 결합할 수 있다. LAP는 분비되는 동안 N-말단 펩타이드로서 TGF-β의 성숙 형태로부터 절단되지만 잠복 상태를 유지하기 위하여 TGF-β와 비공유결합 상태를 유지한다. 이러한 복합체는 TGF-β 수용체에 결합할 수 없고, 따라서 생물학적 비활성이다. $\alpha_V\beta_6$ 인테그린은 LAP에 함유된 RGD 모티프에 직접 결합하여 LAP를 방출시키고 TGF-β를 활성화시킨다. LAP에 대한 $\alpha_V\beta_6$ 의 결합은 TGF-β의 활성 상태로의 전환에 중요한 역할을 하는 것으로서, 그 결합의 차단은 TGF-β의 $\alpha_V\beta_6$ 매개 활성화 및 이와 관련된 섬유증 병리상태를 저해할 수 있을 것이다.

발명의 상세한 설명

[0004] 발명의 개요

[0005] 본 발명은 $\alpha_V\beta_6$에 대한 높은 친화성 항체의 발견과 특성분석에 관한 것으로서, 구체적으로 이러한 항체의 상보성 결정 영역(CDR)에 존재하는 주요 아미노산 잔기의 동정과 분석에 관한 것이다.

[0006] 본 발명은 (a) $\alpha_V\beta_6$에 특이적으로 결합하고; (b) LAP, 피브로넥틴, 비트로넥틴 및 테나신과 같은 리간드에 대한 $\alpha_V\beta_6$의 결합 10D5(국제 특허출원 공개번호 WO99/07405)의 IC_{50}값 보다 더 작은 IC_{50} 값으로 저해하며; (c) TGF-β의 활성화를 차단하고; (d) $\alpha_V\beta_6$에 대한 결합 특이성을 제공하는 CDR 내의 특정 아미노산 서열(예, 도 7A 및 도 7B에 제시된 서열)을 함유하고; (e) β_6 서브유닛에 특이적으로 결합하며; 및/또는 (f) 파라핀 매립 조직의 면역염색과 같은 면역염색 절차에서 $\alpha_V\beta_6$을 인식하는 모노클론 항체를 포함한다.

[0007] $\alpha_V\beta_6$에 결합하는 항체는 생물물리학적으로 다른 클래스와 서브클래스로 분류할 수 있는 것으로 관찰되었다. 제1 클래스의 항체는 $\alpha_V\beta_6$에 대한 리간드(예, LAP)의 결합을 차단하는 특성을 나타내는 것이다(차단제). 이 클래스의 항체는 추가로 양이온 의존적 차단제와 양이온 비의존적 차단제의 서브클래스로 분류할 수 있다. 양이온 의존적 차단제의 일부는 아르기닌-글리신-아스파테이트(RGD) 펩타이드 서열을 함유하는 반면, 양이온 비의존적 차단제는 RGD 서열을 함유하지 않는다. 제2 클래스의 항체는 $\alpha_V\beta_6$에 대한 결합성은 나타내지만 리간드에 대한 $\alpha_V\beta_6$의 결합을 차단하지는 못한다(비차단제).

[0008] 따라서, 본 발명의 일부 구체예에서 본 발명의 일부 항체는 $\alpha_V\beta_6$에 대한 결합이 2가 양이온 의존성이고 다른 일부 항체는 2가 양이온 비의존성이다. 양이온의 예는 Ca^{2+}, Mg^{2+} 및 Mn^{2+}이다.

[0009] 일부 구체예에서, 항체는 하이브리도마 6.1A8, 6.3G9, 6.8G6, 6.2B1, 6.2B10, 6.2A1, 6.2E5, 7.1G10, 7.7G5 또는 7.1C5에 의해 생성되는 항체와 동일한 중쇄와 경쇄 폴리펩타이드 서열을 포함하는 것이다.

[0010] 일부 구체예에서, 항체는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3이 각각 본질적으로(즉, 일부 보존적 변화를 제외한) 서열번호 1, 4 및 7의 서열로 이루어진 중쇄 및/또는 CDR 1, 2 및 3이 각각 본질적으로 서열번호 10, 13 및 15의 서열로 이루어진 경쇄를 포함하는 것이다.

[0011] 일부 구체예에서, 항체는 CDR 1, 2 및 3이 각각 본질적으로 서열번호 3, 5 및 8의 서열로 이루어진 중쇄 및/또는 CDR 1, 2 및 3이 각각 본질적으로 서열번호 11, 14 및 17의 서열로 이루어진 경쇄를 포함하는 것이다.

[0012] 일부 구체예에서, 항체는 CDR 1, 2 및 3이 각각 본질적으로 서열번호 3, 6 및 9의 서열로 이루어진 중쇄 및/또는 CDR 1, 2 및 3이 각각 본질적으로 서열번호 12, 14 및 18의 서열로 이루어진 경쇄를 포함하는 것이다.

[0013] 일부 구체예에서, 항체는 CDR 1, 2 및 3이 각각 본질적으로 서열번호 2, 46 및 47의 서열로 이루어진 중쇄 및/또는 CDR 1, 2 및 3이 각각 본질적으로 서열번호 48, 13 및 16의 서열로 이루어진 경쇄를 포함하는 것이다.

[0014] 일부 구체예에서, 항체는 CDR 1, 2 및 3이 각각 본질적으로 서열번호 49, 51 및 53의 서열로 이루어진 중쇄 및/또는 CDR 1, 2 및 3이 각각 본질적으로 서열번호 55, 57 및 59의 서열로 이루어진 경쇄를 포함하는 것이다.

[0015] 일부 구체예에서, 항체는 CDR 1, 2 및 3이 각각 본질적으로 서열번호 50, 52 및 54의 서열로 이루어진 중쇄 및/또는 CDR 1, 2 및 3이 각각 본질적으로 서열번호 56, 58 및 60의 서열로 이루어진 경쇄를 포함하는 것이다.

[0016] 일부 구체예에서, 항체는 서열번호 19 내지 36 및 61과 62 중 어느 하나의 중쇄 가변 도메인 서열을 포함하는 것이다.

[0017] 일부 구체예에서, 항체는 다음과 같은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 서열을 각각 포함하는 것이다:

[0018] (1) 서열번호 19 및 37;

[0019] (2) 서열번호 20 또는 21, 및 서열번호 38;

[0020] (3) 서열번호 22 및 43;

[0021] (4) 서열번호 23 및 44;

[0022] (5) 서열번호 24 및 45;

[0023] (6) 서열번호 25 또는 26 및 서열번호 42;

[0024] (7) 서열번호 27, 28 또는 29 및 서열번호 39;

[0025] (8) 서열번호 34 또는 35 및 서열번호 40;

[0026] (9) 서열번호 36 및 41;

[0027] (10) 서열번호 61 및 63; 또는

[0028] (11) 서열번호 62 및 64.

[0029] 일부 구체예에서, 항체는 $\alpha_V\beta_6$에 특이적으로 결합하지만 잠복기 관련 펩타이드(LAP)에 대한 $\alpha_V\beta_6$의 결합을

저해하지 않는 것이다. 이러한 항체의 적어도 일부는 파라핀 매립 조직 절편에서 $\alpha_V\beta_6$ 에 결합할 수 있고, 이에 따라 진단용으로 사용할 수 있다. 이러한 항체의 예로는 6.2A1 및 6.2E5가 있다.

[0030] 또한, 본 발명은 전술한 항체 중 임의의 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 포함한다.

[0031] 본 발명은 또한 본 발명의 1 이상의 항체와 약학적으로 허용 가능한 담체를 함유하는 조성물을 포함한다. 이러한 조성물의 일부에서 항체는 독소 또는 방사선핵종과 같은 세포독성제(즉, 세포의 생육 및/또는 기능을 손상시키는 제제)에 접합된다. 이 조성물 중의 항체는 양이온 의존성 항체일 수 있다. 이 조성물은 $\alpha_V\beta_6$ 매개 질환에 걸려 있거나 걸릴 위험이 있는 피검체(예, 인간과 같은 포유동물)에게 질병의 치료(예, 경감, 완화, 감소, 예방, 개시 지연)를 위해 투여할 수 있다. 이러한 질환의 예로는 섬유증(예, 피부경화증, 흉터형성, 간섬유증, 폐섬유증 및 신장섬유증); 건선; 암(예, 상피암; 구강, 피부, 경부, 난소, 인두, 후두, 식도, 폐, 유방, 신장 또는 직장결장암); 알포트증(Alport's Syndrome); 폐, 간, 신장 및 다른 장기의 급성 및 만성 손상; 폐, 간, 신장 및 다른 내부 기관의 경색증이 있으며, 이에 국한되는 것은 아니다. 이러한 질환에 걸릴 위험성은 유전적 소인; 흡연과 알코올중독과 같은 특정 생활양식; 석면과 같은 환경 오염제에 대한 노출; 당뇨병, 간염 바이러스 간염(예, C형 간염 바이러스 감염), 자가면역 질환과 같은 생리적 증상; 및 방사선요법과 같은 의학적 치료로부터 초래되는 것일 수 있다.

[0032] 본 발명은 또한 포유동물(예, 인간) 유래의 조직 샘플을 본 발명의 항체, 예컨대 6.2A1 및 6.2E5와 접촉시키는 것을 포함하여, 상기 조직 샘플 내의 $\alpha_V\beta_6$를 검출하는 방법을 포함한다.

[0033] 또한, 본 발명은 하이브리도마 6.1A8, 6.2B10, 6.3G9, 6.8G6, 6.2B1, 6.2A1, 6.2E5, 7.2G10, 7.7G5 및 7.1C5 세포; 서열번호 19 내지 45와 61 내지 64 중 어느 하나에 기재된 암호 서열을 함유하는 분리된 핵산; 서열번호 19 내지 45와 61 내지 64 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 함유하는 분리된 폴리펩타이드를 포함한다.

[0034] 본 발명의 항체는 완전 항체, 예컨대 2개의 중쇄와 2개의 경쇄를 함유하는 항체, 또는 완전 항체의 항원 결합 단편, 예컨대 Fab 단편, Fab' 단편, $F(ab')_2$ 단편 또는 F(v) 단편을 의미한다. 본 발명의 항체는 뮤린 항체 또는 이의 동족체이거나, 또는 완전 인간 항체일 수 있다. 본 발명의 항체는 인간화된 항체, 키메라 항체 또는 일본쇄 항체일 수 있다. 본 발명의 항체는 면역글로불린의 경쇄가 카파형 또는 람다형일 수 있는 임의의 이소타입 및 서브타입 항체, 예컨대 IgA(예, IgA1 및 IgA2), IgG(예, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4), IgE, IgD, IgM일 수 있다.

[0035] 일부 구체예에서, 본 발명의 항체는 이 항체의 작동기 기능(예, Fc 수용체 또는 보체 인자에 결합하는 항체의 성질)이 항체의 항원 결합성에 영향을 미침이 없이 변화되도록 중쇄의 1 이상(예컨대, 2, 3, 4, 5 또는 6)의 특정 위치에 돌연변이(예, 결실, 치환 또는 첨가)를 함유할 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 항체는 글리코실화 부위가 제거되도록 글리코실화 부위인 아미노산 잔기에 돌연변이를 포함할 수 있다. 이러한 항체는 항원 결합 친화성을 유지하면서 임상적으로 유리한 효과기 기능 또는 다른 불필요한 기능은 감소된 것일 수 있다. 글리코실화 부위의 돌연변이는 또한 공정 진행(예, 단백질 발현 및 정제)에 유리할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 중쇄 또는 경쇄는 친화성 또는 잠복성을 증가시키는 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0036] 융합체 #6과 융합체 #7 하이브리도마 중 몇 가지는 부다페스트 조약하에 미국 모식균 배양수집소("ATCC"; 미국 버지니아주 20108, 마나사스 P.O.Box 1549)에 기탁하였다. 하이브리도마 클론 6.1A8, 6.2B10, 6.3G9, 6.8G6 및 6.2B1은 각각 2001년 8월 16일에 기탁번호 ATCC PTA-3647, -3648, -3649, -3645 및 -3646로 기탁되어 있다. 하이브리도마 클론 6.2A1, 6.2E5, 7.1G10, 7.7G5 및 7.1G5는 2001년 12월 5일에 각각 기탁번호 ATCC PTA-3896, -3897, -3898, -3899 및 -3900으로 기탁되어 있다. (하기 표 1 참조).

[0037] 본 발명의 항체는 LAP 및 피브로넥틴과 같은 리간드에 대한 $\alpha_V\beta_6$ 의 결합에 의해 매개되는 모든 임상적으로 바람직하지 않은 증상이나 질환(본 명세서에 기술한 바와 같은)을 치료하는데 유용하다. 이 항체는 종래 공지된 $\alpha_V\beta_6$ 항체보다 리간드에 결합시 양이온 의존성이나 비의존성 및 보다 높은 친화성이나 결합성을 통해 보다 강력한 효과를 나타낼 수 있다.

[0038] 본 발명의 항체, 특히 차단제가 사용되는 치료적 용도 외에도, 본 발명의 비차단제 클래스에 속하는 항체는 진단용으로서, 예컨대 항원 포획 분석법, 효소 결합된 면역흡착성 분석법(ELISA), 면역조직화학 등에 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 다른 특징과 장점은 이하 상세한 설명, 도면 및 청구의 범위를 통해 분명하게 나타날 것이다.

실 시 예

[0097] 다음 실시예는 본 발명의 방법과 재료를 예시하기 위한 것이다. 따라서, 당업자에게 자명한 항체 기술분야에서 일반적으로 사용되는 기술된 조건과 매개변수의 적당한 변형과 수정은 본 발명의 취지와 범위 내에 속하는 것이다.

[0098] 다음 실시예에서, β_6-/- 마우스의 제조는 문헌[Huang et al., J.Cell Biol. 133:921(1996)]에 기술된 바와 같이 수행하였다. 재조합체 인간 LAP는 R&D 시스템즈(Minneapolis, MN)로부터 구입하였다. 항체 10D5는 케미콘(Temecula, CA)으로부터 구입하였다. L230 하이브리도마는 ATCC에서 구입하고 분비 항체는 포화 배양액의 상청액으로부터 고정된 단백질 A 상의 친화성 크로마토그래피로 정제하였다. 항체의 이소타입성은 ISOSTRIP 키트(Roche Diagnostics)를 사용하여 제조자의 지시에 따라 수행하였다. β_6 형질감염된 SW480 세포주는 문헌[Weinacker et al., J.Biol.Chem. 269:6940-6948(1994)]에 기술된 바와 같이 제조하였다.

[0099] 실시예 1: β_6 형질감염된 안정한 세포주의 제조

[0100] β_6 형질감염된 NIH 3T3 및 FDC-P1 세포는 전장의 뮤린 β6 cDNA와 네오마이신 선택성 마커를 함유하는 DNA 작제물을 모세포주에 전기침투시켜 제조하였다. G418을 함유하는 배양액에서 세포를 14일 동안 계대배양한 다음 형광 활성화 세포분류법(FACS)으로 최고 수준의 표면 β_6를 발현하는 세포를 분리하여 안정하게 형질감염된 세포를 선발하였다. 형질감염된 FDC-P1 세포는 1.5g/L 중탄산나트륨, 4.5g/L 글루코스, 1.0mM 피루브산나트륨, 10% FBS, 2.5% 마우스 IL-3 배양 보충물 및 1.5mg/ml 활성 G418을 함유하고 4mM L-글루타민이 보충된 DMEM에서 배양하였다. 형질감염된 NIH 3T3 세포는 10% FBS, 2mM L-글루타민, 페니실린/스트렙토마이신 및 1mg/ml 활성 G418이 보충된 DMEM에서 배양하였다.

[0101] 실시예 2: 인간 가용성 $\alpha_V\beta_6$ 의 정제

[0102] $\alpha_V\beta_6$ 단백질은 대부분 바이나케르(Weinacker, 상기문헌설명참조)에 기술된 바와 같이 정제하였다. hs$\alpha_V\beta_6$를 발현하는 CHO 세포주를 배양하고 수득되는 상청액을 원심분리로 수거하였다. 항α_V항체 L230을 사용하여 친화성 크로마토그래피로 인테그린을 정제하였다. 정제된 L230을 CNBr-활성화 세파로스 4B(Sigma)에 4.8mg항체/수지ml의 비율로 가교결합시켰다. 이 L230 친화성 컬럼 위에 $\alpha_V\beta_6$ 상청액을 0.5mg 항체/수지ml의 비율로 충전하고, 이 컬럼을 각각 10 컬럼 부피량의 (1) 50mM Tris-Cl, pH 7.5, 1M NaCl, 1mM $MgCl_2$; (2) 50mM Tris-Cl, pH 7.5, 50mM NaCl, 1mM $MgCl_2$; (3) 10mM Na_3PO_4, pH 7.0으로 세척하였다. Hs$\alpha_V\beta_6$ 는 100mM 글리신, pH 2.5으로 용출시켜 1:10 부피의 1M Na_3PO_4, pH 8.0에 담아두었다. 단백질을 인산염 완충 식염수(PBS)을 여러번 교체하여 투석하고 -20℃에 보관하였다.

[0103] 실시예 3: β_6-/- 마우스의 면역화

[0104] β_6-/- 마우스는 총 200㎕ 부피 중에 1:1의 부피비로 완전 프로인트 보조제에 유화시킨 정제된 재조합체 인간 $\alpha_V\beta_6$ 25㎍을 복강내(IP) 주사하여 면역화하였다. 또는, 1mg/ml $CaCl_2$와 1mg/ml $MgCl_2$이 보충된 PBS 100㎕에 재현탁시킨 $4x10^6$ β_6-형질감염된 NIH 3T3 세포를 IP 주사하여 β_6-/- 마우스를 면역화한 다음, 주사 인접 부위에 100㎕ CFA를 주사하였다. 1차 면역화 후 2주 및 4주가 경과한 다음에 상기 마우스를 CFA 대신에 불완전 프로인트 보조제를 사용한 것을 제외하고는 상기와 동일한 시약으로 유사하게 추가항원자극하였다. 최종 추가항원자극 후 7일이 경과한 날에 마우스로부터 혈액을 채집하고, 정제된 재조합체 인간 $\alpha_V\beta_6$ 또는 β_6-형질감염된 세포에 대하여 혈청을 결합시켜 항β_6 역가를 측정하였다. 정제된 재조합체 인간 $\alpha_V\beta_6$으로 면역화한 마우스의 경우에는 3개월간 마우스를 휴식시킨 뒤, 동일 항원을 ImmunEasy(Qiagen)와 혼합하여 재면역화하였다. 하이브리도마 융합을 위한 비장을 분리하기 3일 전에 정제된 재조합체 인간 $\alpha_V\beta_6$ 단백질 12.5㎍을 복강내와 정맥내 주사를 통해 투여하여 마우스를 면역화하였다. 융합 시행일에 동물을 죽이고 비장을 꺼내어 단세포 현탁액으로 분리시켰다. 비장세포를 약물 선택가능한 세포 융합 파트너와의 융합에 의해 무한증식화하였다.

[0105] 실시예 4: 하이브리도마의 선발

[0106] β_6-/- 마우스의 면역화를 통해 2 그룹의 항체를 제조하였다. 항체 1세트는 가용성 인간 절두형 $\alpha_V\beta_6$ (융합체 #6)을 이용한 면역화를 통해 제조하였고, 다른 1세트는 뮤린 β_6-형질감염된 NIH 3T3 세포(융합체 #7)를 이용한 면역화를 통해 제조하였다. 항 $\alpha_V\beta_6$ 항체의 선발은 하기 기술되는 바와 같이 세포에 근거한 결합 및 기능 분석과 무세포 결합 및 기능 분석을 이용하여 수행하였다. 양성 클론의 1차 선발은 정제한 hs $\alpha_V\beta_6$ 및 β_6 형질감염된 인간 및 뮤린 세포(대조군으로서 형질감염되지 않은 세포)에 대한 결합성에 근거하였다. 선발한 클론을 증식시키고 최종 배양물을 세포 포획 분석으로 β_6 형질감염된 세포와 형질감염되지 않은 세포에 대한 결합성에 대하여 재평가하였다(실시예 5b, 하기 내용 참조)(도 1A와 도 1B에 도시한 대표적 예, 여기서, 각각 융합체 6과 융합체 7을 의미하는 mAb의 접두사 "6" 또는 "7"은 삭제하였다; 하기 표 2 참조). 일부 항체는 β6 형질감염된 세포에 우선적으로 결합하는 반면 다른 항체는 형질감염 세포와 비형질감염 세포 모두에 결합하였으며, 이것은 항체의 일부 서브세트만이 β_6에 대해 우선성이 있음을 시사한다(도 1A 및 도 1B). 추가 선발은 비오틴화된 hs $\alpha_V\beta_6$ 및 β6 형질감염된 뮤린 세포의 LAP에 대한 결합을 차단하는 항체의 성질에 근거하여 수행하였다. 선발한 클론은 FACS를 사용하여 서브클로닝하고 사용할 때까지 동결 보관하였다.

[0107] 모노클론 항체는 형질감염되지 않은 모세포에는 결합하지 않고 β_6 형질감염된 세포에 결합하는 성질에 근거한 $\alpha_V\beta_6$ 에 대한 결합 특이성을 통해 선발하였다. 추가로, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_8$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_V\beta_1$, 또는 $\alpha_5\beta_1$를 발현하는 세포주에 대한 결합성 결여에 근거하여 다른 인테그린 또는 비특이적 인테그린(즉, RGD 함유 리간드에 결합하는 비 α_V 인테그린)을 제외한 $\alpha_V\beta_6$ 의 특이적 결합제로서 모노클론 항체를 확인하였다. 이 항체를 비형질감염성 JY, K562, SW480, NIH3T3 및 FDCP1 세포주 뿐만 아니라 안정하게 형질감염된 세포에 유입시켰다.

[0108] ATCC에 기탁한 일부 항체를 하기 표 1에 기술한다.

표 1

기탁된 하이브리도마

하이브리도마 클론	ATCC 번호	기탁일
6.1A8	PTA-3647	2001년 8월 16일
6.2B10	PTA-3648	2001년 8월 16일
6.3G9	PTA-3649	2001년 8월 16일
6.8G6	PTA-3645	2001년 8월 16일
6.2B1	PTA-3646	2001년 8월 16일
6.2A1	PTA-3896	2001년 12월 5일
6.2E5	PTA-3897	2001년 12월 5일
7.1G10	PTA-3898	2001년 12월 5일
7.7G5	PTA-3899	2001년 12월 5일
7.1C5	PTA-3900	2001년 12월 5일

[0109]

[0110] 실시예 5: 선발 분석 및 특성분석

[0111] a. $\alpha_V\beta_6$ ELISA

[0112] 96웰 미량역가 평판(Corning COSTAR EASY-WASH)에 5㎍/ml hs $\alpha_V\beta_6$를 50㎕/웰씩 4℃에서 하룻밤동안 코팅하였다. 평판을 자동 평판 세척기를 사용하여 세척 완충액(PBS 중의 0.1% TWEEN-20)으로 4회 세척하였다. 그 다음, 비특이적 결합을 차단하기 위하여 TBS 중의 3% BSA 180㎕/웰을 첨가하고 25℃에서 항온처리하였다. 평판을 전술한 바와 같이 세척하고 하이브리도마 상청액(선발 분석용) 또는 정제 항체(특성분석용)를 1mg/ml BSA, 1mM $CaCl_2$ 및 1mM $MgCl_2$를 함유하는 TBS로 희석한 희석액을 첨가하였다(50㎕/웰). 평판을 25℃에서 1시간 동안 항온처리하고, 세척한 뒤 퍼옥사이드 접합된 염소 항마우스 IgG+A+M 항체(Cappel) 50㎕/웰과 1시간동안 항온처

리하였다. 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB)을 사용하여 결합된 항체를 검출하였다. 결합율은 450nm에서 측정한 흡광도로 나타내었다.

[0113] b. 세포 포획 분석

[0114] 96웰 미량역가 평판에 2차 항체(당나귀 항마우스 IgG(Jackson Immunoresearch); 50mM 중탄산나트륨 pH 9.2에 희석한 5㎍/ml)를 50㎕/웰씩 4℃에서 하룻밤동안 코팅하였다. 평판을 분석 완충액(RPMI+2% BSA) 100㎕/웰로 2회 세척한 다음 37℃에서 1시간 동안 분석완충액 100㎕/웰로 차단하였다. FDC-P1 세포 및 β_6 형질감염된 FDC-P1 세포의 경우에는, 2차 항체(다른 세포 종류에서는 생략됨)가 비특정 Fc 수용체에 결합하는 정도를 감소시키기 위하여 평판을 실온에서 10분 동안 항마우스 Ig(Jackson ImmunoResearch; 20㎍/ml)으로 차단하였다. 평판을 차단시키는 동안, 세포는 분석 완충액 중의 2μM 형광 염료(Calcein-AM, Molecular Probes)를 이용하여 $5x10^6$ 세포/ml에 표지를 부착하였다. 세포는 37℃ 수조에서 15분 동안 부드럽게 진탕하여 분석 완충액 중의 염료와 항온처리한 다음, 원심분리하여 수거한 뒤, 분석 완충액 중에 $5x10^6$세포/ml의 농도로 재현탁하였다. 차단 단계 이후, 평판을 가볍게 쳐서 완충액을 버린 다음, 상청액이나 정제된 항체 25㎕를 평판 웰마다 첨가하였다. 37℃에서 15분간 항온처리한 후, 표지된 세포 25㎕/웰를 첨가하고, 평판을 37℃에서 1시간 동안 항온처리하였다. 이 평판을 분석 완충액(100㎕/웰)으로 3 내지 5회 세척하고, 평판 상에 포획된 세포에 의해 방출되는 형광도를 기록하였다. 결합율은 최종 세척 단계 이전(즉, 첨가된 총 세포)의 형광도와 세척 후(즉, 결합된 세포)의 형광도를 비교하여 측정하였다.

[0115] c. FACS

[0116] 트립신처리하여 세포를 수거한 후, PBS로 1회 세척한 다음 FACS 완충액(1X PBS, 2% FBS, 0.1% NaN_3, 1mM $CaCl_2$ 및 1mM $MgCl_2$)에 재현탁시켰다. $0.2x10^5$ 세포를 빙상의 총 100㎕ 부피의 하이브리도마 상청액 함유 FACS 완충액에서 1시간 동안 항온처리하였다. 항온처리 후, 세포를 빙냉한 FACS 완충액으로 2회 세척하고, 5㎍/ml 당나귀 항마우스 IgG PE(Jackson ImmunoResearch)를 함유하는 FACS 완충액 100㎕에 재현탁시키고 빙상에서 30분 동안 항온처리하였다. 그 다음, 세포를 빙냉한 FACS 완충액으로 2회 세척하고 FACS 완충액 200㎕에 재현탁시켰다. PE 표지된 2차 항체의 결합율은 유동세포계수기로 모니터하였다.

[0117] d. LAP에 대한 비오틴-hs $\alpha_V\beta_6$ 의 결합성

[0118] 96웰 미량역가 평판(Corning COSTAR EASY-WASH)에 0.3㎍/ml 재조합체 인간 LAP(R&D Systems, Cat. #246-LP)-PBS 희석물(50㎕/웰)을 4℃에서 하룻밤동안 코팅하였다. 코팅 용액을 제거한 후, 평판을 3% BSA/TBS 180㎕/웰로 25℃에서 1시간 동안 차단하였다. 별도의 96웰 둥근바닥 평판에서 2X스톡(1mg/ml BSA를 함유하는 TBS 중의 0.5㎍/ml(1.25nM) 비오틴-$\alpha_V\beta_6$, 2mM $CaCl_2$, 및 2mM $MgCl_2$) 60㎕/웰을 2X 스톡의 하이브리도마 상청액(선발용) 또는 정제된 항체(1mg/ml BSA를 함유하는 TBS 중의 항체) 60㎕/웰와 혼합하고 25℃에서 1시간 동안 항온배양하였다. LAP 코팅된 평판을 자동 평판 세척기로 세척 완충액(PBS 중의 0.1% TWEEN-20)으로 4회 세척한 후, 이 평판에 항체-$\alpha_V\beta_6$ 혼합물 100㎕를 주입하고 25℃에서 1시간 동안 항온처리하였다. 이 평판을 전술한 바와 같이 세척하고 1:1000 희석율의 엑스트라비딘-호스래디쉬 퍼옥시다제 접합체(Sigma)-TBS(1mg/ml BSA) 50㎕/웰와 25℃에서 1시간 동안 항온처리하였다. TMB 기질을 사용하여 결합 단백질을 측정하였다.

[0119] e. LAP에 대한 β_6-FDC-P1 세포의 부착

[0120] 96웰 미량역가 평판에 50mM 중탄산나트륨 pH 9.2 중에 희석시킨 재조합체 인간 LAP(R&D Systems) 0.5㎍/ml을 50㎕/ml 씩 4℃에서 하룻밤동안 코팅하였다. 이 평판을 PBS(100㎕/웰)로 2회 세척하고 PBS 중의 1% BSA(100㎕/웰)로 25℃에서 1시간 동안 차단시켰다. 이 평판을 분석 완충액(TBS 완전 용액 + 1mM $CaCl_2$ 및 1mM $MgCl_2$) 100㎕/웰로 2회 세척하였다. 그 다음, 평판의 각 웰에 하이브리도마 상청액(또는 정제된 항체) 25㎕와 β_6-FDC-P1 세포($5x10^6$세포/ml, 전술한 바와 같이 Calcein AM으로 표지한 것) 25㎕를 첨가하였다. 이 평판을 25℃에서 1시간 동안 항온처리한 다음, 분석 완충액(100㎕/웰)으로 4 내지 6회 세척하였다. 평판에 포획된 세포에서 방출되는 형광도를 기록하였다. 결합율은 최종 세척 단계 이전(즉, 첨가된 총 세포)의 형광도 시그널과 세척 후(즉, 결합된 세포)의 형광도 시그널을 비교하여 측정하였다.

[0121] f. TGF-β 생물검정법

[0122] 본 발명에서 사용한 TGF-β 생물검정법은 문헌[Abe et al., Anal.Biochem. 216:276-284(1994)]에 기술된 밍크(Mink) 폐 상피세포(MLEC) PAI-1 루시퍼라제 공배양물 분석법의 변법으로서, β_6-형질감염된 세포를 리포터 세포와 공배양하여 $\alpha_V\beta_6$ 에 의한 TGF-β의 활성화를 모니터하였다(Munger, 상기문헌참조). 이것은 플라스미노겐 활성인자 저해제-1(PAI-1)의 발현을 유도하는 성질에 기초한 TGF-β의 정량적 생물검정법이다. 이 분석법에서 MLEC 세포는 개똥벌레 루시퍼라제 리포터 유전자에 융합된 절두형 PAI-1 프로모터를 함유하는 발현 작제물로 안정하게 형질감염된다. 형질감염된 MLEC 세포를 활성 TGF-β(0.2 내지 >30pM)에 노출시킨 결과 세포 용해물의 루시퍼라제 활성이 용량 의존적 방식으로 증가하는 것으로 나타났다.

[0123] 이 분석법을 수행하기 위하여, TMLC(밍크 폐 상피세포주 Mv1Lu) 세포를 PAI-1 루시퍼라제 작제물로 형질감염시켰다. 형질감염된 세포를 L-Gln, Pen/Strep 및 200㎍/ml G418을 보충한 DMEM + 10% FBS에서 증식시켰다. 인테그린 β_6 작제물로 형질감염된 SW480 세포("β_6-SW480" 또는 "SW480 β_6" 세포)는 L-Gln과 Pen/Strep이 보충된 DMEM+10% FBS에서 증식시켰다. PBS+5mM EDTA를 이용하여 플라스크로부터 세포를 수거하여 PBS+0.5% BSA로 세척한 뒤, 혈구계수기로 계수한 다음 96웰 평판에 평판배양하였다. SW480-β_6 세포는 세척 완충액 중에 $4x10^4$ 세포/웰로 평판배양하였다. 모노클론 항체를 DMEM(무혈청)에 희석한 다음, SW480-β6 세포에 첨가하고 실온에서 20분 동안 예비항온처리하였다. TMLC 세포를 그 다음 $2x10^4$ 세포/웰이 총 100㎕ 부피가 되게 첨가하였다. 이 평판을 가습된 CO_2 농축 항온배양기에서 20시간 동안 항온처리하였다. 평판의 상청액은 버리고 PBS+1mM Ca^{2+} 및 1mM Mg^{2+} 100㎕를 재보충하였다. 평판 중의 세포를 그 다음 용균시킨 후, 루시퍼라제 활성 수준을 백열광형 반응 키트 Packard LUCLITE(#6016911)와 TROPIX 미량평판 발광계로 측정하였다.

[0124] 실시예 6: 항체 정제

[0125] 융합체 #6(접두사 "6"으로 나타냄) 유래의 하이브리도마 클론 8개와 융합체 #7(접두사 "7"로 나타냄) 유래의 하이브리도마 클론 14개를 선발하여 추가로 용량을 증가시켜 배양하고 특성분석하였다(표 2).

[0126] 각 하이브리도마의 소량 배양물(150ml)을 제조하고 상청액을 원심분리로 수거하였다. 이 상청액으로부터 프로테인 A 친화성 크로마토그래피를 사용하여 항체를 정제하였다. IgG_{2a} 이소타입 항체의 정제에는 프로테인 A 세파로스 4 Fast Flow(Amersham Pharmacia Biotech, AB, Uppsala, Sweden)(침전 베드 부피 1ml) 상에 직접 상청액을 충전하였다. 컬럼을 PBS로 세척한 후, 25mM 인산, 100mM NaCl, pH 2.8을 사용하여 1:20 부피의 0.5M Na_3PO_4, pH 8.6 중으로 용출시켰다. 뮤린 IgG_1 항체의 정제에는, 상청액을 충전하기 전에 1.5M 글리신, 3M NaCl, pH 8.9로 조정하고, 용출에 앞서 컬럼을 25mM Na_3PO_4, 3M NaCl, pH 8.6으로 세척하였다. 이러한 정제물을 본 명세서에 기술한 시험관내 생화학적 특성분석에 사용하였다.

표 2

하이브리도마 클론의 특성규명

클론명	클론번호	이소타입	차단물질*
6.1A8	2	IgG2a	Y
6.2B10	10	IgG2a	Y
6.3G9	25	IgG1	Y
6.4B4	30	IgG1	N
6.6B5	46	IgG1	N
6.8B4	55	IgG1	N
6.8G6	56	IgG1	Y
6.2B1	85	IgG1	Y
7.1C5	2	IgG2a	Y
7.1G10	5	IgG2a	Y
7.2A1	6	IgG2a	Y
7.2F5	11	IgG2a	Y
7.2H2	12	IgG2a	Y
7.4A3	17	IgG2a	Y
7.7G5	32	IgG1	Y
7.8H12	39	IgG2a	Y
7.9D4	40	IgG2a	N
7.9G8	41	IgG2a	Y
7.9H5	43	IgG2a	Y
7.10D7	44	IgG2a	Y
7.10H2	46	IgG2a	Y

*: 차단물질이란, αvβ6가 LAP에 결합하는 것을 차단하는 항체로서 정의되는 것이며, 이는 정제된 hsαvβ6 또는 β6-발현 세포에 대한 리간드의 결합을 차단함으로써 측정된다.

[0127]

[0128] 동물 모델에 사용하는 경우, 하이브리도마 클론은 최대 2L 배지까지 용량 증가시키고 Lifecell Culture Bags-PL732(Nexell, Cat.No. R4R2113)에서 4주 동안 증식시켰다. 이 하이브리도마 유래의 항체를 전술한 바와 같은 단백질 A 친화성 크로마토그래피로 1차 정제한 후, Q 세파로스(Amersham Pharmacia) 이온 교환 단계로 정제하였다. 단백질 A 크로마토그래피 단계 유래의 용출물을 2M Tris 염기로 pH 8.6으로 조정한 뒤, 물로 10배 희석한 다음, 10mM Na_3PO_4, 25mM NaCl, pH 8.6으로 평형화시킨 Q 세파로스 컬럼(20mg 단백질/수지 ml) 상에 충전하였다. 이 컬럼을 5 컬럼 부피의 평형 완충액으로 세척하고, 결합된 단백질은 25mM Na_3PO_4, 150mM NaCl, pH 7.2로 용출시켰다. 용출된 단백질은 멸균 여과(0.45㎛)하고 사용할 때까지 -70℃에 보관하였다.

[0129] 실시예 7: 정제된 항체의 특성분석

[0130] 정제된 항체를 (1) hs $\alpha_V\beta_6$ 에 대한 결합성, (2) β_6-형질감염된 SW480 및 FDC-P1 세포에 대한 결합성, (3) LAP에 대한 비오틴-$\alpha_V\beta_6$ 의 결합 저해성, (4) β_6-형질감염된 FDC-P1 세포의 LAP에 대한 결합 저해성 및(5) MLEC 분석(상기 참조)에서 $\alpha_V\beta_6$ 매개된 TGF-β 활성화의 차단성에 대하여 정량적으로 특성분석하였다. 이러한 각 분석에서 상대적 효능은 공지된 $\alpha_V\beta_6$ 항체 10D5(Huang et al., J.Cell Sci. 111:2189(1998))의 효능과 비교하고, 몇몇 경우에는 항-α_V 항체 L230의 효능과 비교하였다. 융합체 #7 항체의 특성분석에는 융합체 #6 항

체 6.8G6를 양성 대조군으로 사용하였다.

[0131] 1mM Ca^{2+} 및 1mM Mg^{2+}의 존재하에 수행한 1차 결합 실험(실시예 5a, 상기 참조)에서는 대부분의 정제된 항체가 hs$\alpha_V\beta_6$ 에 결합하는 것으로 나타났다(도 2A 및 도 2B). 그러나, 예상과 달리 10D5 및 클론 7.2F5 및 7.2D7에서는 결합성이 관찰되지 않았다. 후속 실험을 통해 10D5(도 3E), 7.2F5 및 7.10D7의 결합성은 Ca^{2+}/Mg^{2+}에 의해 단지 미약하게 지지되는 반면 1mM $MnCl_2$에 의해서는 훨씬 더 강하게 지지된다는 사실을 확인하였다. 신규 클론 중 3개(6.1A8(도 3A), 7.7G5 및 6.8G6(도 3C))는 2가 양이온의 필요성을 나타내며, Ca^{2+}/Mg^{2+} 상태와 Mn^{2+} 결합 상태 사이의 차이를 나타내지 않았다.

[0132] 나머지 클론들은 2가 양이온의 필요성을 나타내지 않아서, 10mM EDTA의 존재하에서 항원에 결합할 수 있었다(도 3B, 3D 및 3F). β_6형질감염된 NIH 3T3 세포 또는 SW480 세포에 대한 항체 결합성의 FACS 분석 결과는 유사한 패턴을 보여주었고, 단 10D5는 이와 관련하여 Ca^{2+}/Mg^{2+} 및 Mn^{2+} 상태에서 동등한 결합성을 보였다. 가용성 $\alpha_V\beta_6$에 대한 결합에 필요한 조건은 단백질 형태 또는 결합성 효과의 차이로 인하여 세포 표면에 발현된 $\alpha_V\beta_6$ 에 대한 결합에 필요한 조건과 다를 수 있다.

[0133] 이러한 결과는 이 그룹에 포함된 β_6-차단 항체가 적어도 3가지 이상의 다른 부류로 존재한다는 것을 암시한다. 제1 부류(10D5)는 Ca^{2+}/Mg^{2+} 상태와 Mn^{2+} 상태 사이에 차이가 있는 것이고, 제2 부류(6.1A8, 7.7G5 및 6.8G6 포함)는 Ca^{2+}/Mg^{2+} 및 Mn^{2+} 상태 사이에 차이가 없이 양이온을 필요로 하는 부류이고, 제3 부류(항α_V항체 L230, 6.2B10, 6.3G9(도 3B) 및 6.2B1(도 3D), 7.1C5 및 7.1G10 포함)는 양이온 비의존성인 부류이다.

[0134] 정제된 항체는 그 다음 $\alpha_V\beta_6$ -LAP 상호작용의 저해성에 대하여 평가하였다. 실시예 5d(상기 참조)의 무세포 분석에서 항체 6.1A8, 6.2B1, 6.3G9 및 6.8G6은 10D5 보다 낮은 IC_{50} 값을 나타냈다(도 4A; 표 3). 6.2B10은 보다 높은 IC_{50}을 나타냈으나, 여전히 완전한 저해성을 나타냈다(도 4A). 6.4B4는 단지 부분적인 저해성을 나타낸 반면, 6.6B5 및 6.8B4는 저해성을 나타내지 않았다(도 4A). 이와 동일한 분석 시스템을 사용했을 때, 항체 7.1C5, 7.1G10, 7.2A1, 7.4A3, 7.7G5, 7.9G8, 7.9H5 및 7.10H2는 10D5 보다 낮은 IC_{50}을 나타냈다(도 4A; 표 3). 항체 7.2F5, 7.2H2 및 7.8H12는 거의 동일하거나 또는 보다 높은 IC_{50} 값을 나타냈으나, 여전히 완전한 저해성을 보여주었다(도 4B).

[0135] 실시예 5e(상기 참조)에서 기술한 세포 분석에서는, 정제된 단백질 상에서 보다 세포 상에서 효능이 훨씬 떨어지는 6.1A8, 6.2B10 및 7.9D4를 제외하고는 유사한 경향이 관찰되었다(도 5A 내지 5E; 표 3).

[0136] 종합해보면, 이러한 결과들은 본 연구를 통해 인간 및 뮤린 $\alpha_V\beta_6$ 와 LAP의 상호작용을 특이적으로 저해하는 항체가 성공적으로 제조되었음을 시사한다. 이 항체들 중 일부는 높은 친화성(겉보기 Kd's ≥0.3nM, 유동세포계수기로 측정 시)으로 $\alpha_V\beta_6$ 에 결합하고, LAP에 대한 β_6-형질감염된 세포의 결합성을 IC_{50} 0.05nM(8ng/ml) 이상으로 저해하였으며, TGF-β1의 $\alpha_V\beta_6$ 매개 활성화를 IC_{50} 0.58nM(87ng/ml) 이상으로 차단하였다.

[0137] 마지막으로, 정제된 항체는 PAI-1/루시퍼라제 리포터 유전자 분석으로 $\alpha_V\beta_6$ 매개의 TGF-β 활성화를 차단하는 성질에 대하여 평가하였다(실시예 5f, 상기 참조). 또 다시, 6.3G9, 6.8G6, 6.2B1, 7.1G10 및 7.7G5는 10D5 보다 낮은 IC_{50} 값으로 $\alpha_V\beta_6$ 매개의 TGF-β 활성화를 저해할 수 있었고, 나머지 항체는 이 분석에서 효능이 유의적으로 떨어지는 것으로 나타났다(도 6A 및 도 6B; 표 3). 따라서, $\alpha_V\beta_6$ 의 LAP와의 상호작용을 차단하는 성질은 시험관내에서 TGF-β의 활성화를 저해하는 성질과 상관관계가 있다.

표 3

하이브리도마 클론의 특성규명

클론명	클론 번호	αvβ6-결합 ELISA EC50 (ng/ml)	$\alpha_v\beta_6$-LAP 차단 IC50 (ng/ml)	FDCP1-LAP 차단 IC50 (ng/ml)	PAI-1 루시퍼라제 IC50 (ng/ml)
6.2B1	**85**	**34.7**	**225**	**8**	**87**
6.3G9	**25**	**76.7**	**271**	**17**	**375**
6.8G6	**56**	**17.5**	**169**	**23**	**312**
10D5	**-**	**-**	**605**	**50**	**2070**
6.1A8	2	3.7	179	2520	~40,000
6.2B10	10	78.9	1950	>30,000	>40,000
6.4B4	30	25.4	>50,000	>30,000	>40,000
6.6B5	46	17.1	>50,000	>30,000	>40,000
6.8B4	55	94.4	>50,000	>30,000	>40,000
L230	**-**	**27.1**	**229**	**n.t.****	**n.t.**
7.1G10	**5**	**4.2**	**113**	**30**	**250**
7.7G5	**32**	**13.0**	**155**	**51**	**700**
7.1C5	**2**	**2.5***	**80***	**83**	**n.t.**
7.2A1	**6**	**5***	**300***	**101**	**n.t.**
10D5	**-**	**43***	**377**	**n.t.**	**2,000**
7.4A3	17	5.7	204	67	3,500
7.10H2	46	6.6	254	63	3,500
7.2H2	12	9.3	370	106	5,500
7.9H5	43	7.3	230	55	7,000
7.9G8	41	6.2	264	284	>20,000
7.8H12	39	46.0	1140	969	>20,000
7.2F5	11	>5000	529	1490	>20,000
7.9D4	40	1.7	불완전	>10,000	>20,000
7.10D7	44	>5000	3000*	1120	n.t.

*: 각각의 실험으로부터 얻어진 데이터

**: 테스트되지 않음

***: 표 3에 요약된 모든 실험들은 **1 Mm Ca^{2+}**와 **1 Mm Mg^{2+}**의 존재하에 수행됨

****: 굵은글씨로 나타낸 항체는 선행 기술의 항체인 10D5 및 L230으로서, αvβ6에 대한 억제 효능이 특히 높은 신규의 항체임

[0138]

[0139] 다음으로, 가용성 $\alpha_V\beta_6$ 에 대한 6.3G9 및 6.8G6의 용액 친화성을 동력학 배제 분석법(KinExA)으로 측정하였다. 일련의 가용성 인테그린 희석물($1x10^{-8}$M 내지 $2.4x10^{-12}$M)을 $1x10^{-10}$M의 항체와 3시간 동안 항온배양하였다. 이 시료를 그 다음 KinExA 기구(SapidyneInstruments, Inc., Boise, Idaho)를 사용하여 인테그린이 코팅된 폴리메틸메타크릴레이트 비드를 통해 통과시켰다. 6.8G6의 경우에는 1mM $CaCl_2$와 1mM $MgCl_2$를 배양 및 분석 완충액에 첨가하였다. 결합 항체와 유리 항체의 양은 Cy5-표지된 항마우스 2차 항체를 사용하여 측정하였다. KinExA 소프트웨어를 사용하여 2차 곡선 적용(fitting)을 통해 각 상호작용의 해리 상수(K_d)를 수득하였다. 이 방법으로 측정한 Kd들은 6.3G9는 15.6pM이고 6.8G6는 22.8pM이었다(도 9A 및 도 9B). 따라서, 이 항체들은 모두 $\alpha_V\beta_6$ 에 대해 매우 높은 친화성을 갖고 있다.

[0140] 본 발명에서는 인테그린의 "활성화된" 상태를 인식하는 항$\alpha_V\beta_6$ 항체 부류를 추가로 확인하였다. 여기에는 2가지 강력한 활성 상태의 $\alpha_V\beta_6$ 가 존재하였다. 제1 상태의 활성화된 인테그린은 그 리간드에 대한 더 높은 친화성을 갖는 인테그린을 나타낸다. 이 활성화 상태에 특이적인 항체는 1mM $MnCl_2$와 같은 활성화 양이온의 존재하에 인테그린에 대한 향상된 결합성을 나타냈다. 유동세포계수기를 이용하여 1mM $MnCl_2$ 및 1mM $MgCl_2$(비활성화 양

이온)에서의 결합성 정도를 비교한 결과, 본원에 기술된 $\alpha_V\beta_6$ 항체 중 일부(6.1A8 및 6.6B5 포함)는 $MnCl_2$의 존재하에 유의적으로 향상된 결합성을 보여주었다.

[0141] $\alpha_V\beta_6$ 의 제2 활성화 상태에서 인테그린은 전술한 바와 같이 잠재된 TGF-β를 활성화시킬 수 있다. 절두형 $\alpha_V\beta_6$를 발현하는 세포주(SW480(β6-770T))를 제조하였다. 이 세포주는 LAP에 결합할 수 있으나 TMLC 루시퍼라제 분석(Munger et al., 상기 참조)에서 TGF-β를 활성화시킬 수 없었다. 따라서, 770T 절두형 형질감염된 세포가 아닌 전장의 β6 형질감염된 SW480 세포에 결합하는 항체는 TGF-β를 활성화시킬 수 있는 $\alpha_V\beta_6$ 형태에 특이적이었다. 항체 7.8B3 및 7.8C9는 이러한 기준을 충족시켰다.

[0142] 실시예 8: 항체 경쟁 시험에 의한 에피토프 맵핑

[0143] ELISA 판에서 비오틴화된 $\alpha_V\beta_6$ 에 대한 결합성에 대해 정제한 모노클론 항체를 6.8G6와의 경쟁을 통해 검사했다. 구체적으로 설명하면, ELISA 판에 6.8G6을 코팅하고 각각 1mM Ca^{2+}와 Mg^{2+}를 함유하는 완충액을 이용하여 경쟁 항체와 비오틴화된 $\alpha_V\beta_6$ 의 혼합물을 첨가하였다. 결합된 인테그린을 엑스트라비딘-HRP 접합체를 이용하여 측정하였고, 경쟁 항체의 결합 차단성에 대해 점수를 매겼다. 6.2B10(약한 차단제)을 제외한 모든 콘센서스 차단제(표 2)는 다양한 정도로 6.8G6과 경쟁할 수 있는 것으로 관찰되었다(표 4). 이 데이터는 이러한 콘센서스 차단제가 6.8G6과 동일하거나 중복된 에피토프에 결합한다는 것을 입증한다.

표 4

항체 경쟁에 의한 에피토프 맵핑

클론	공통 차단물질?	6.8G6와의 경쟁
6.2A1	N	-
6.4B4	N	-
6.6B5	N	-
6.8B4	N	-
7.9D4	Y/N	-
10D5	Y	++
L230	Y	++
6.1A8	Y	++
6.2B10	Y (약)	-
6.3G9	Y	+
6.8G6	Y	++
6.2B1	Y	++
7.1C5	Y	+++
7.1G10	Y	+++
7.2A1	Y	++
7.2F5	Y	++
7.2H2	Y	++
7.4A3	Y	++
7.7G5	Y	++
7.8H12	Y	++
7.9G8	Y	++
7.9H5	Y	++
7.10D7	Y	+
7.10H2	Y	++

[0144]

[0145] 정제한 모노클론 항체는 ELISA에서 $\alpha_V\beta_6$ 에 대한 결합성을 비오틴화된 6.3G9 또는 비오틴화된 6.8G6와의 경쟁성 분석으로 검사하였다. 이 분석에서는 ELISA 판에 비표지된 $\alpha_V\beta_6$를 코팅하고, 각각 1mM의 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 를 함유하는 완충액을 이용하여 경쟁 항체와 비오틴화된 항체의 혼합물을 첨가하였다. 결합된 비오틴화된 항체는 뉴트라비딘-HRP 접합체를 이용하여 측정하였다. 검사 결과는 대부분의 강력한 차단성 항체(예, 6.2B1, 7.1C5 및 7.1G10)가 $\alpha_V\beta_6$ 에 대한 결합에 있어서 6.3G9 및 6.8G6 모두와 경쟁하는 것으로 관찰되었다(표 4.1, 도 10A 및 도 10B). 항체 6.1A8 및 7.7G5는 보다 약한 경쟁성을 보여주었는데, 이것은 $\alpha_V\beta_6$ 에 대한 보다 낮은 친화성 때문인 것으로 추정된다. 비차단성 항체 또는 항-α_V항체 L230은 이 분석에서 6.3G9 및 6.8G6과의 경쟁성을 전혀 보여주지 않았다. 이러한 결과는 $\alpha_V\beta_6$ 특이적 차단 항체가 $\alpha_V\beta_6$ 상의 동일하거나 중복된 에피토프에 결합한다는 것을 시사하였다.

표 4-1

항체 경쟁에 의한 에피토프 맵핑

클론	공통 차단물질?	바이오틴화된 6.8G6와의 경쟁	바이오틴화된 6.3G9와의 경쟁
6.3G9	Y	+++	+++
6.2B1	Y	+++	+++
6.8G6	Y	+++	++
7.1C5	Y	+++	+++
7.1G10	Y	+++	+++
7.7G5	Y	++	+
6.1A8	Y	++	+
6.2A1	N	-	-
6.2E5	N	-	-
6.2G2	N	-	-
6.4B4	N	-	-
7.8B3	N	-	-
7.8C9	N	-	-
L230	Y	-	-

[0146]

[0147] 실시예 9: CDR 서열분석

[0148] 정제된 모노클론 항체 일부의 cDNA를 분리하여 콜리간 외 다수의 서적(Coligan et al.(eds.), Current Protocols in Immunology, Wiley, Media, PA(2001))에 기술된 표준 기법을 사용하여 서열분석하였다. 추론된 아미노산 서열은 도 7A 및 도 7B에 도시한 바와 같다.

[0149] 높은 친화성 결합제인 6.8G6, 6.1A8, 6.2B1, 6.3G9 및 6.2A1 및 비차단제 6.2G2의 중쇄 CDR의 아미노산 서열은 다음과 같이 비교하였다(점선은 갭을 나타낸다).

CDR1

6.8G6 SYTFTDYAMH (서열 번호:1)
6.1A8 SYTFTDYTMH (서열 번호:2)
6.2B1 GFTFSRYVMS (서열 번호 :3)
6.3G9 GFTFSRYVMS (서열 번호:3)
6.2A1 GYDFNNDLIE (서열 번호:49)
6.2G2 GYAFTNYLIE (서열 번호:50)

CDR2

6.8G6 VISTYYGNTNYNQKFKG (서열 번호:4)
6.1A8 VIDTYYGKTNYNQKFEG (서열 번호:46)
6.2B1 SISSG-GSTYYPDSVKG (서열 번호:5)
6.3G9 SISSG-GRMYYPDTVKG (서열 번호:6)
6.2A1 VINPGSGRTNYNEKFKG (서열 번호:51)
6.2G2 VISPGSGIINYNEKFKG (서열 번호:52)

CDR3

6.8G6 GGLRRGDRPSLRYAMDY (서열 번호:7)
6.1A8 GGFRRGDRPSLRYAMDS (서열 번호:47)
6.2B1 GAIYDG-----YYVFAY (서열 번호:8)
6.3G9 GSIYDG-----YYVFPY (서열 번호:9)
6.2A1 IYYGPH-----SYAMDY (서열 번호:53)
6.2G2 ID-YSG-----PYAVDD (서열 번호:54)

[0150]

[0151] 서열번호 7(SEQ ID NO:7)에서 진한글씨의 "R"(12번째 잔기)은 다형성화시키면 예컨대 Q일 수 있음을 나타낸다.

[0152] 이와 같은 4가지의 높은 친화성 결합제 및 비차단제 6.2G2의 경쇄 CDR의 아미노산 서열을 비교한 결과 다음과 같다.

	CDR1	
6.8G6	RASQSVSTSS-YSYMY	(서열 번호:10)
6.1A8	RASQSVSIST-YSYIH	(서열 번호:48)
6.2B1	SASSSVSSS----YLY	(서열 번호:11)
6.3G9	SANSSVSSS----YLY	(서열 번호:12)
6.2A1	KASLDVRTAVA	(서열 번호:55)
6.2G2	KASQAVNTAVA	(서열 번호:56)
	CDR2	
6.8G6	YASNLES	(서열 번호:13)
6.1A8	YASNLES	(서열 번호:13)
6.2B1	STSNLAS	(서열 번호:14)
6.3G9	STSNLAS	(서열 번호 14)
6.2A1	SASYRYT	(서열 번호:57)
6.2G2	SASYQYT	(서열 번호:58)
	CDR3	
6.8G6	QHNWEIPFT	(서열 번호:15)
6.1A8	QHSWEIPYT	(서열 번회16)
6.2B1	HQWSSYPPT	(서열 번호:17)
6.3G9	HQWSTYPPT	(서열 번호:18)
6.2A1	QQHYGIPWT	(서열 번호:59)
6.2G2	QHHYGVPWT	(서열 번호:60)

[0153]

[0154] 도 7A 및 도 7B에 도시한 바와 같이 2가 양이온 의존성 부류에 속하는 mAb(예, 6.1A8 및 6.8G6)는 CDR 내에서 매우 유사한 아미노산 서열을 함유하지만 2가 양이온 비의존성 mAb(예, 6.2B1 및 6.3G9)는 그 CDR에서 다른 세트의 모티프를 함유하는 것으로 보인다.

[0155] 항 $\alpha_V\beta_6$ 모노클론 항체의 효능과 특이성은 미묘하게 다른 아미노산 잔기에 의해 좌우될 수 있다. 6.1A8 및 6.8G6의 경우에, 가변 도메인의 아미노산 서열은 중쇄에 10개의 아미노산 차이(이 중 3개는 보존적 치환)와 경쇄에 11개의 아미노산 차이를 포함하는 매우 유사한 것이었다. 하지만, 이 항체들은 시험관내 분석에서 약 100배의 활성 차를 보였다. 상기 아미노산 차이는 폴리펩타이드 사슬의 가변 도메인에 분산되어 있고 이 잔기들은 단독으로 작용하거나 항체 효능에 영향을 미치는 동일 사슬이나 파트너 사슬 상의 잔기와 상승적으로 작용할 수 있다. 중쇄에서는 7개의 잔기가 $\alpha_V\beta_6$ 에 밀접해 있을 수 있도록 위치하거나 $\alpha_V\beta_6$ 에 대한 결합에 활성적인 역할을 하도록 위치해 있다.

[0156] RGD 모티프는 다양한 인테그린 결합 단백질(리간드)에서 발견된다. 이 모티프는 인테그린의 결합 포켓에 직접 접촉하여 인테그린과의 상호작용을 매개하는 것으로 관찰되었다. RGD 자체는 인테그린 결합 단백질에서 상당히 일반적인 것이기 때문에, 이 모티프 외측에 위치한 인접 잔기가 인테그린-리간드 상호작용에 결합 특이성을 부여하는 역할을 해야 한다. 6.1A8 및 6.8G6에서 이러한 하나의 인접 잔기는 중쇄의 CDR3에 위치한 101번 위치이다. 이 아미노산 잔기는 RGD 모티프에 인접해 있고, 항원 인식 부위에 위치하여 결합 효능과 특이성에 기여한다.

[0157] 6.1A8 및 6.8G6의 동일한 중쇄 CDR에 존재하는 다른 상이한 잔기로는 위치 33(CDR1); 위치 52, 57 및 65(CDR2); 및 위치 115(CDR3)의 잔기가 있다. 이 중쇄 내의 또 다른 차이는 N-말단 부근에 있는 프레임워크 1 내의 위치 4의 잔기이다. 이 잔기는 결정학 모델에서 항체의 CDR에 밀접하게 포개어지는 것으로 추정되어 $\alpha_V\beta_6$ 결합에 중요한 역할을 하는 것일 수 있다. 6.1A8과 6.8G6의 나머지 3개의 차이는 위치 20(프레임워크 1), 44(프레임워크 2) 및 82(프레임워크 3)에서의 보존적 차이이다.

[0158] 양이온 비의존성 항체의 아미노산 서열 역시 고도의 상동성을 보인다. 이 서열은 2가지 부류로 나눌 수 있는데, 즉 RGD 함유 항체 6.8G6과 경쟁하는 부류(즉, 6.2B1, 6.3G9, 7.10H2, 7.9H5, 7.1C5, 7.1G10 및 7.4A3)와 경쟁하지 않는 부류(즉, 6.2A1, 6.2B10 및 6.4B4)이다. 6.8G6 함유 부유는 중쇄의 CDR3에 FXY 모티프를 함유하고 비경쟁 부류는 그 모티프를 함유하지 않는다. 이러한 차이는 FXY 모티프가 $\alpha_V\beta_6$ 에 대한 양이온 비의존성 결합을 매개하는데 중요한 역할을 함을 암시한다. 또한, 이 FXY를 함유하는 항체 부류는 RGD 결합 포켓과 중복되지만 상이한 $\alpha_V\beta_6$ 상의 에피토프에도 결합할 가능성이 보인다. 항체 6.2B10과 6.4B4는 FXY 모티프를 함유하지 않

는 불량한 $\alpha_V\beta_6$ 차단제이다. 이 항체들은 $\alpha_V\beta_6$ I-도메인 유사 부분에 결합하는 것으로 관찰되었고, 이것은 항 $\alpha_V\beta_6$ 항체가 결합하는 또 다른 에피토프를 의미한다. 흥미로운 것은, 모노클론 항체 6.2A1은 양이온 비의존성 부류에 속하지만, 다른 양이온 비의존성 mAb 처럼 RGD 서열을 함유하지 않는다.

[0159] 모노클론 항체 7.7G5는 양이온 의존성 부류에 속한다. 하지만, 7.7G5의 경쇄 서열은 양이온 비의존성인 I-도메인 결합 항체 6.2B10과 높은 상동성을 보인다. 7.7G5의 중쇄 역시 CDR1에서 양이온 비의존성 항체와 유사하다. 그러나, 그 CDR2와 CDR3은 양이온 의존성 부류의 잔기와 더욱 유사하다. 이러한 관찰은 특정 CDR이 항체에 대한 특이성을 부여한다는 사실을 암시한다. 이것은 중쇄 CDR3에서 특히 두드러지는데, 이것은 항체의 이 부분에서 고도의 가변성이 나타나기 때문인 것으로 추정된다. 실제로, 3개의 양이온 의존성 항체 중 2개와 9개의 양이온 비의존성 항체 중 7개는 $\alpha_V\beta_6$ 인식에 중요한 역할을 할 것 같은 중쇄 CDR3 서열을 포함한다. 특히, 7.7G5에는 RGD 모티프가 결여되어 있지만 그 중쇄 CDR2에 XGD 모티프를 함유하고 있다. 이 XGD 모티프는 RGD와 유사한 방식으로 작용하여 7.7G5에 결합 친화성/특이성을 부여하는 것으로 추정된다.

[0160] 이상 설명드린 서열 관찰과 추정은 특이적 결합성을 부여하는 특정 가변 영역의 아미노산 서열의 이론적 기본 디자인을 제공한다.

[0161] 실시예 10: 진단 항체

[0162] 파라핀 매립 조직 절편이나 다른 조직 시편에서 $\alpha_V\beta_6$ 발현을 검출할 수 있는 항체는 진단학에 유용하게 사용될 수 있다. 이 진단 수단은 예컨대 암이나 섬유증과 같은 징후를 나타내는 조직 절편에서 상승조절된 $\alpha_V\beta_6$를 검출하는데 사용할 수 있다.

[0163] 파라핀 매립 조직에서 $\alpha_V\beta_6$를 검출하는 항체를 확인하기 위하여, 먼저 HPLC 정제된 β_6 서브유닛에 결합하는 항체 패널을 선발하였다. 이 서브유닛에 결합하는 항체는 선형 펩타이드 에피토프를 인식할 수 있을 것으로 추정되며, 따라서 파라핀 매립 조직에서 성공할 가능성이 더 높을 것으로 예상하였다. 정제된 β_6 서브유닛에 대한 결합성은 $\alpha_V\beta_6$ 결합성 측정에 대해서 기술한 것(상기 참조)과 동일한 ELISA 판을 사용하여 분석하였는데, 단 $\alpha_V\beta_6$ 단백질 대신에 정제된 β_6 인테그린을 판 상에 고정시켰다. 이 방법을 사용하여 정제된 $\alpha_V\beta_6$ 단백질과 정제된 β_6 서브유닛에 모두 결합할 수 있는 다수의 융합체 6 항체를 확인하였다. 하기 표 5 참조. 클론명에서 접두사 "6"은 생략하였다.

표 5-1

정제된 αvβ6 또는 정제된 β6에 대한 항체 결합

클론명	αvβ6에 대한 결합	HPLC-정제된 β6 유닛으로의 결합 여부
1A1	+	6
1A8	+	-
1A11	+	+
1E1	+	+
1E6	+	+
1H10	+/-	-
2A1	+	+
2A10	-	-
2B8	-	-
2B10	+	-
2C4	+	+
2C7	+	+
2E5	+	+
2G3	+	-
3A6	+	-
3B1	+	-
3B2	+	+
3B11	+	+
3C2	+	+
3D5	+	-
3D10	+	+
3F1	+	-
3G3	-	-
3G5	+	-
3G9	+	-
3H2	+	-
3H11	+	-
4A4	+/-	+

[0164]

표 5-2

[0165]

클론명	αvβ6에 대한 결합	HPLC-정제된 β6 유닛으로의 결합 여부
4B2	+	-
4B4	+	-
4B10	+	-
4D2	+	-
4E4	+	+
4G3	+	-
4G4	+	+
4H4	+	+
4H12	+	-
5A2	+	-
5B6	+	+
5D6	+	+
5D8	-	-
5G9	+	+
5G10	+	+
5H3	+	+
6B1	+	+
6B5	+	+
6C4	+	-
6D12	+	+
6E6	+	-
6E10	+	-
6G3	+/-	-
7C7	+	+
7E5	+	-
7F8	+	-
8B4	+	+
8G6	+	-
9B5	+	+
9B7	+	+
9B9	+	-
9B10	+	-
9D11	+	+
9E12	+	+
9F5	+	+
9F7	-	-
9G1	+	-
9H11	+	-
10A2	+	-
10A3	+/-	-
10A4	+	-
10A8	+	-

표 5-3

클론명	αvβ6에 대한 결합	HPLC-정제된 β6 유닛으로의 결합 여부
10A9	+	-
10B10	+	-
10D3	+	-
10D11	+	-
10E4	+	+
10F1	+	-
10F12	+	-
10G1	+	-
10G2	-	-
10H11	+	+
1A7	+	-
1D6	+	-
1D9	+	-
1F6	+	-
2B1	+	-
2D9	+	+
2G2	+	+
3D9	+	+
3E5	+	-
4C12	+	-
4E6	+	+
4G5	+	-
5A3	+	-
5B3	+	-
5B8	+	+
5B9	+	-
5F7	+	-
6C10	+	+
6D8	+	-
6F4	+	-
6G9	+	-
6H8	+	+
6H9	+	-
7A5	+	+
7A11	+	-
7E6	+	+
7G9	-	+
7H3	+	-
9A2	-	-
9A3	+	+
9A4	-	-
9A9	+	-

[0166]

표 5-4

클론명	αvβ6에 대한 결합	HPLC-정제된 β6 유닛으로의 결합 여부
9D2	-	-
9D3	-	-
9E4	-	-
9F1	+	-
9F12	-	-
9G11	-	-
10B5	+	-
10B7	+	-
10B9	+/-	-
10C5	+/-	-
10C7	+/-	-
10D6	+/-	-
10E12	+/-	-
10F7	-	-

[0167]

[0168] 전술한 바와 같이, 일부 항체는 정제된 β_6 서브유닛에 결합하였다. 이 항체는 변성된 $\alpha_V\beta_6$ 에 결합할 가능성

이 높아서 파라핀 매립 조직 절편에서 $\alpha_V\beta_6$를 검출하는데 유용하게 사용될 수 있다. 다른 항체는 β_6 서브유닛에는 결합하지 않고 가용성 $\alpha_V\beta_6$ 에만 결합하였다. 이러한 2가지 타입의 항체를 사용하여 변성된 파라핀 매립 β_6 형질감염된 SW480 세포와 형질감염되지 않은 모세포를 염색하였고, 그 검사결과는 표 6에 제시하였다.

[0169] 파라핀 매립 조직 또는 세포를 염색하기 위하여, 시편의 슬라이드를 먼저 다음과 같은 용액[(1) 크실렌, 5분, 2회; (2) 100% 에탄올, 2분, 2회; (3) 95% 에탄올, 2분, 2회; (4) 50% 에탄올, 2분, 1회; (5) 증류수, 2분, 1회]에서 항온처리하여 파라핀을 제거하였다. 그 다음, 이 슬라이드를 메탄올 200ml과 30% H_2O_2 3ml을 함유하는 용액에서 15분 동안 항온처리하여 내인성 퍼옥시다제를 차단시켰다. PBS로 2회 각각 2분씩 세척하였다. 슬라이드 상의 파라필 절편은 그 다음 펩신(Zymed 00-3009)으로 5분 동안 37℃에서 노출하였다. 이 슬라이드를 다시 PBS로 각각 2분씩 2회 세척하였다. 다시, 이 슬라이드를 실온에서 각각 10분씩 아비딘과 비오틴(Vector SP-2001; Vector Laboratories, Burlingame, CA)으로 차단시켰으며, 각 항온처리 사이에 전술한 바와 같이 세척하였다. 차단 용액을 제거한 후, 슬라이드에 PBS/0.1% BSA 중의 1차 항체(하이브리도마 배양 상청액) 희석액을 적용하고 4℃에서 하룻밤동안 항온처리하였다.

[0170] 다음날, 슬라이드를 전술한 바와 같이 PBS로 세척하였다. 한편, 아비딘-비오틴 복합체-호스래디쉬 퍼옥시다제 용액(ABC 시약)을 다음과 같이 제조하였다: PBS 1ml를 벡터 키트 PK-6102의 용액 A 20㎕(1:50)와 용액 B 20㎕(1:50)와 혼합하고, 이 혼합물을 사용하기 전에 실온에서 30분 동안 항온처리하였다. 이 시간 동안 슬라이드는 벡터 키트 유래의 항마우스-비오틴화된 항체(1:200) 및 15㎕/ml 정상 혈청과 실온에서 30분 동안 항온처리하였다. 이 슬라이드를 PBS 각 2ml로 2회 세척하였다. 그 다음, 전술한 ABC 시약을 슬라이드에 적용하고 실온에서 30분 동안 항온처리하였다. 이 슬라이드를 전술한 바와 같이 다시 세척하였다. 그 다음, 기질(Vector SK-4100)인 100㎕의 DAB(3,3'-디아미노벤지딘)를 슬라이드에 적용하고 실온에서 5분 동안 항온처리하였다. DAB는 다음과 같이 제조하였다: H_2O 5ml에 완충액 모용액 2방울을 첨가하고 잘 혼합한다; 그 다음 DAB 모용액 4방울을 첨가하고 잘 혼합한다; 그 다음 H_2O_2 용액 2방울을 첨가하고 잘 혼합한다. 그 다음, 슬라이드를 2분 동안 흐르는 물로 세척하였다. 그 다음, 모든 슬라이드의 DAB 시그널을 다음과 같이 향상시켰다: 파라핀 절편을 0.05M 중탄산나트륨, pH 9.6으로 10분 동안 세척한다; 과량의 완충액을 찍어낸다; DAB 향상 용액을 15초간 적용한다; 그 다음 반응 종결을 위해 물로 1분동안 빠르게 세척한다. 이 슬라이드를 그 다음 메이어(Mayer)의 헤마톡실린(핵 대비염색약)으로 1분 동안 염색하였다. 이 슬라이드를 1분 동안 흐르는 물로 세척한 다음, 헤마톡실린이 청변화하도록 1분 동안 PBS에 침지시켰다. 이 슬라이드를 다시 흐르는 물에 1분 동안 세척한 뒤, 다음과 같이 탈수 및 세정하였다: (1) 95% 에탄올에 1분씩 2회 침지; (2) 100% 에탄올에 1분씩 2회 침지; (3) 크실렌에 2분씩 2회 침지. 그 다음 퍼마운트를 이용하여 슬라이드에 커버슬립을 적용하였다.

[0171] 그 결과, 정제된 β_6 서브유닛에 결합할 수 있는 융합체 6 항체 1A1, 2C3, 3B2, 3B11, 5D6, 5G9, 5H3, 6D12, 7C7, 9B5, 9B7, 9D11, 9F5, 10E4, 10H11, 6H8, 7A5, 7G9, 9A3, 2A1, 2E5, 4E4, 8B4, 2G2 및 4E6(표 5)은 모두 파라핀 매립 β_6 형질감염된 SW480 세포를 강하게 염색한 반면, 형질감염되지 않은 모세포는 염색하지 못했다(표 6).

표 6-1

파라핀 매립된 SW480 세포에 대한 항체 결합

ID#	클론명	SW480/β6+에 대한 결합	SW480에 대한 결합
1	1A1	+++	-
2	1A8	+	+
3	1A11	++	-
4	1E1	+	-
5	1E6	++	+
7	2A1	+++	-
10	2B10	-	-
11	2C4	+++	-
12	2C7	-	-
13	2E5	+++	-
17	3B2	+++	-
18	3B11	++	-
25	3G9	-	-
30	4B4	+	+
33	4E4	+++	-
35	4G4	-	-
36	4H4	+++	-
39	5B6	+	-
40	5D6	+++	-
42	5G9	+++	-
43	5G10	-	-
44	5H3	+++	-
46	6B5	-	-
48	6D12	+++	-
52	7C7	++	-
54	7F8	-	-
55	8B4	+++	-
56	8G6	-	-
57	9B5	++	-
58	9B7	++	-
61	9D11	++	-
62	9E12	+	-
63	9F5	++	-
68	10A3	-	-
75	10E4	+++	-
80	10H11	++	-
85	2B1	+	+
87	2G2	+++	-
91	4E6	+++	-
95	5B8	-	-

[0172]

표 6-2

ID#	클론명	SW480/β6+에 대한 결합	SW480에 대한 결합
98	6C10	+	-
102	6H8	++	-
104	7A5	+++	-
107	7G9	+++	-
110	9A3	+++	-

[0173]

[0174] 실시예 11: 암 진단

[0175] $\alpha_V\beta_6$ 는 일반적으로 건강한 성숙한 조직에서 무시할정도의 소량으로 발현된다. 하지만, $\alpha_V\beta_6$ 발현은 손상, 섬유증 및 암에서는 상승조절된다[예, Thomas et al. J.Invest.Dermatology 117:67-73(2001); Brunton et al., Neoplasia 3:215-226(2001); Agrez et al., Int.J.Cancer 81:90-97(1999); Breuss, J.Cell Science 108:2241-2251(1995)]. 따라서, 파라핀 매립 조직에서 발현된 $\alpha_V\beta_6$ 에 특이적으로 결합하는 항체는 섬유증, 암 및 $\alpha_V\beta_6$ 가 상승조절되는 기타 다른 질환을 진단하기 위해 $\alpha_V\beta_6$ 발현을 검출하는 표준 면역조직화학 기술에 사용할 수 있다.

[0176] 전술한 바와 같이, 본 발명의 특정 항체는 HPLC 정제된 β_6 인테그린과 파라핀 매립 및 고정된 β_6 형질감염된 세포에 결합한다. 이 항체들은 또한 면역염색시 대표적인 편평세포암 및 유방암 조직에 결합하는 것으로 관찰되었다. 예컨대, 도 8에는 모노클론 항체 6.2A1을 이용한 파라핀 매립된 유방암 및 편평세포암의 염색성을 비교하여 보여주었다. 따라서, 이러한 신규 항체들은 진단 수단으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0177] 실시예 12: 알포트증 마우스 중에서의 항 $\alpha_V\beta_6$ 차단성 mAb의 효과

[0178] 신장섬유증의 생체내 모델로서 콜라겐 4A3(COL4A3) 녹아웃(알포트) 마우스를 제조하여 약리학적 제제(상기 참조)의 치료 효과를 검사하는데 사용하였다. 본 실시예에서는 알포트 마우스에서 mAb 6.8G6(양이온 의존성) 및 6.3G9(양이온 비의존성)를 검사하여 이 항체들이 7주령의 알포트 마우스에서 일반적으로 관찰되는 섬유증을 저해할 수 있는지를 측정하였다. 이미 입증한 바와 같이, 이 두 항체들은 LAP에 대한 $\alpha_V\beta_6$ 결합을 저해하고 생물검정법에서 TGF-β의 활성화를 저해하는 것으로 관찰되었다. 음성 대조군으로는 항체 1E6을 사용하였다.

[0179] 3주령의 알포트 마우스에게 다음과 같은 항체 중 하나를 1주에 3회씩 복강내 주사로 투여하였다: (1) 6.8G6, 4mg/kg(마우스 7마리); (2) 6.3G9, 4mg/kg(마우스 4마리); 및 (3) 1E6, 1mg/kg(마우스 6마리). 주사는 4주간 연속하여 시행했다. 그 다음 마우스를 죽이고 그 신장을 회수했다.

[0180] 이 신장의 파라핀 매립 절편을 전술한 바와 같이 제조한 다음, 신장 섬유증의 근육모세포 및 기질 침착에 대한 마커인 평활근 액틴을 검출하는 염색을 시행하였다. 그 결과, 1E6으로 처리된 마우스와 비교했을 때 mAb 6.8G6 또는 6.3G9으로 처리된 알포트 마우스의 신장 간질 및 사구체 영역 모두에서 평활근 액틴 염색의 유의적인 감소가 관찰되었다.

[0181] 도 11A 및 도 11B는 알포트 신장의 사구체 및 간질 영역에서의 평활근 액틴 염색의 점 플롯을 도시한 것이다. 이 도면은 음성 대조군 1E6-처리된 마우스와 비교했을 때 6.8G6 및 6.3G9으로 처리한 알포트 마우스의 신장에서 유의적으로 감소된 평활근 액틴 염색성을 보여주었다.

[0182] 실시예 13: 항 $\alpha_V\beta_6$ mAb의 편측 요관 폐색 유도성 신장경화증에 대한 예방 효과

[0183] 신장 섬유증이 진행되는 다른 마우스 모델을 사용하여 6.8G6과 6.3G9의 항섬유증 효능을 검사하였다. 이 마우스 모델에서는 이 동물의 요관을 결찰하여 편측 요관 폐색(UUO)을 만들었다. UUO는 폐색되지 않은 신장이 비교적 정상적인 신기능을 유지할 수 있기 때문에 마우스에 대해 가까운 장래의 신부전을 유도함이 없이 진행성 신장경화증을 일으킨다. 폐색된 신장은 빠르게 완전 섬유증을 일으키는 반면, 폐색되지 않은 신장은 적응성 비대를 일으킨다.

[0184] 본 연구에서는 UUO에 의해 유도된 신장 섬유증에 대한 항 $\alpha_V\beta_6$ 처리의 영향을 형태계측학적으로 정량하였다. 8 내지 12주령의 수컷이고 바이러스 항원이 없는 25.5±0.2g 중량의 C57BL 마우스(Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME)를 사용하였다. 이 마우스들은 본 연구에 앞서 7일 동안 수용해두었다. 이 마우스에게 수용 기간과 실험 기간 동안 방사선조사된 표준 마우스 식사와 멸균수는 무한으로 공급하였다. 동물의 건강 검진의 하나로서 체중을 때때로 측정하였다. 그 결과, 연령에 맞는 수술하지 않은 마우스는 2주간의 연구 기간 동안 약 10%의 체중 증가를 보였다. UUO 마우스는 2일까지는 약 9%의 체중이 감소하였으나 14일까지 감소된 체중을 점차 회복하였다. 이러한 체중 변화의 패턴은 치료적 처리와 무관하게 나타났다.

[0185] 신장 섬유증을 유도하기 위해, 케타민:크실라진(100:10 mg/kg s.c.) 마취하에 중앙선 좌측의 개복술을 통해 좌측 요관을 무균적으로 분리하였다. 신장의 하부극 정도의 요관을 2개의 단단한 폐색용 6-0 명주 묶음실로 묶고, 묶음실 사이의 요관을 절단하였다. 복벽은 4-0 비크릴(Vicryl) 봉합사로 봉합하고 피부는 4-0 나일론으로 봉합하였다. 보온 패드 상에서 동물을 회복시키고 0일과 1일째 부프레노르펜 0.5mg/kg을 1일에 2회씩 피하 주사하였다. 이 절차는 문헌[Ma et al., Kidney Int. 53(4):937-944(1998)]에 기술된 방법은 변형시킨 것이다.

[0186] 마우스는 다음과 같은 실험 그룹으로 나누었다:

[0187]

그룹	처리	용량(mg/kg,i.p.)	n*
1	6.8G6(양이온 의존성 항 $\alpha_V\beta_6$ mAb)	4	9
2	6.3G9(양이온 비의존성 항 $\alpha_V\beta_6$ mAb)	4	8
3	1E6(음성 대조군 mAb)	4	10
4	PBS 매개체 대조군	(100㎕)	8

5	시술하지 않은 무처리 대조군	--	8
* 동물수			

[0188] 그룹 5의 동물을 제외한 모든 동물에게는 수술 전날부터 시작하여 1주에 2회씩 투여하였다.

[0189] 결찰 후 10일이 경과하면 동물을 이산화탄소로 안락사시키고 해부하였다. UUO 마우스에서는 신우와 요관이 눈에 띄게 팽창해 있었고 폐색 묶음 위에 유체가 가득차 있었다. 팽창 정도와 남은 신장 조직 질량의 정도는 처리 그룹 마다 달랐다. 그룹 2는 음성 대조군의 팽창 정도의 약 1/2 정도를 나타냈다. 결찰된 신장은 색이 엷어져 있었다. 반대측 신장은 밝은 적색이고 약 1/3까지 확장되어 있었다.

[0190] 그 다음, 동물의 양쪽 신장(결찰된 좌측과 결찰되지 않은 우측)은 분리하여, 신우 중간을 횡으로 가로질러 절단하였다. 각 신장의 1/2은 고정 조직 염색을 위해 10% 중성 완충성 포르말린에 집어 넣었다. 각 신장의 나머지 1/2은 면역조직화학적 염색을 위해 15% 슈크로스에 넣은 다음, 30% 슈크로스에 넣었다.

[0191] 포르말린 고정된 신장 절편은 섬유증의 마커인 근육섬유모세포(평활근 액틴)에 대해 면역염색하였다. 표준 조명 조건과 디지털 카메라 노출 조절을 사용하여 영상을 포착하고, 배경 수정 후, 거리 표준값에 대해 대응시켰다. 정량을 위해 각 동물의 좌측 신장 절편 전체를 포괄하는 연속 시야 영상을 확보하였다.

[0192] 평활근 액틴은 측정된 시야에서 총 조직 면적의 비율(%)로 나타내었다. 이것은 신장유두를 제외한 상기 절편의 모든 피질 및 속질 조직을 포함하였다.

[0193] 결론적으로, 6.3G9와 6.8G6으로 처리된 마우스는 섬유증의 유의적인 감소를 나타낸다.

[0194] 실시예 14: 블레오마이신 유도된 마우스의 폐섬유증에 대한 항 $\alpha_v\beta_6$ 차단성 mAb의 효과

[0195] 블레오마이신에 의해 유도된 폐섬유증의 마우스는 폐섬유증의 생체내 모델로서 제조하여 약리학적 제제의 치료 효과를 검사하는데 사용하였다. 염증은 일반적으로 블레오마이신 처리 후 5 내지 15일이 경과한 다음 분명하게 나타났다. 129 계통의 마우스에서 폐섬유증의 정도는 블레오마이신 처리 후 60일까지 점진적으로 증가하였다. 기질 축적은 보통 약 15일째 검출가능한 정도가 된다. 본 실시예에서는 블레오마이신 유도성 폐섬유증을 가진 마우스에게 mAb 6.3G9를 4mg/kg/용량의 농도로 0일째부터 또는 15일째부터 1주에 3회씩 복강내 주사하였다. 폐섬유증은 블레오마이신의 1회 기관내 투여량을 식염수 50$\mu\ell$ 중에 0.03유닛/kg의 농도로 투여하여 0일째 유도하였다. 30일째 동물을 죽인 다음, 폐섬유증의 정도를 측정하였다. 항체 1E6은 음성 대조군으로 사용하였다.

[0196] 각 동물로부터 폐를 회수하여 폐 콜라겐 침착의 지표로서 히드록시프롤린 함량을 측정하였다(상기 인용된 문헌인 Munger et al.에 기술된 바와 같이 측정함). 도 15A에 도시한 바와 같이, 0일째부터 6.3G9의 처리는 폐 히드록시프롤린 함량의 블레오마이신 유도성 증가를 유의적으로 저해하였다. 중요한 것은, 6.3G9 처리가 콜라겐 침착이 이미 시작된 시점인 블레오마이신 투여 후 15일째부터 시작되는 경우에도 최소한 효과적이라는 점이다.

[0197] 또한, 연장된 블레오마이신 유도성 섬유증 프로토콜(60일간 지속)에서 보다 실질적인 정도의 폐섬유증을 저해하는데 있어서 6.3G9, 양이온 의존성 6.8G6 및 비차단성 항체 6.4B4의 효과를 조사하였다. 이를 위해, 블레오마이신 투여 후 15일째부터 항체 처리를 시작하였다(15일). 60일째 폐를 회수하여 히드록시프롤린 함량을 측정하였다. 도 15C에 도시한 바와 같이, 6.8G6의 처리는 블레오마이신 유도성 섬유증을 유의적으로 저해하였다(블레오마이신과 식염수 처리된 동물과 비교했을 때 히드록시프롤린 함량의 70% 이상의 감소). 또한 6.3G9 처리도 예방 차원의 경향을 보였으나, 통계적 유효값에는 이르지 못하는 결과를 보였다(도 15C).

[0198] 결론적으로, 양이온 의존성 및 양이온 비의존성 항 $\alpha_v\beta_6$ 차단성 mAb는 블레오마이신 처리된 마우스에서 나타나는 폐섬유증을 감소시켰다. 또한, 이러한 개입은 항체 처리가 섬유증의 최초 개시 이후가 돼서도 개시되지 않은 경우에도 효과적이었다.

[0199] 실시예 15: 인간 건선 환부에서의 $\alpha_v\beta_6$ 의 상승조절

[0200] $\alpha_v\beta_6$ 가 건선에 관련이 있는지를 알아보기 위하여, 5명의 건선 환자와 4명의 정상인에게서 채취한 환부 및 비환부 피부 생검을 가지고 $\alpha_v\beta_6$ 발현을 조사하였다. mAb 6.2A1 면역염색을 사용하여 건선 환자와 정상 대조군의 비환부 피부와 비교하여, 건선 환부에서의 $\alpha_v\beta_6$ 발현의 유의적인 증가를 관찰하였다. 즉, 건선 환부에서의 α_v

β_6 의 상승조절은 항 $\alpha_V\beta_6$ 항체를 진단용 및 치료용으로 사용할 수 있음을 암시한다.

[0201] 실시예 16: 담관계 질환이 있는 마우스 및 인간의 간에서의 $\alpha_V\beta_6$의 상승조절

[0202] 이미 논의한 바와 같이, $\alpha_V\beta_6$ 발현은 조직 손상에 연관성을 갖고 있다. 본 연구에서는 담관계 질환에 의해 손상된 마우스 및 인간의 간을 가지고 $\alpha_V\beta_6$의 발현에 대하여 조사하였다.

[0203] 마우스의 간 손상은 담관의 결찰에 의해 유도하였다.[예컨대, George et al., PNAS 96:12719-24(1999); George et al., Am J Pathol 156:115-24(2000) 참조]. mAb 6.2G2를 사용했을 때, 담관 결찰 이후 9일, 14일 및 16일째 $\alpha_V\beta_6$ 발현이 유의적으로 상승함을 관찰하였다.

[0204] 이와 마찬가지로, 담관계 질환에 걸린 환자의 인간 간 절편은 mAb 6.2G2를 사용하여 면역조직화학적으로 측정했을 때 $\alpha_V\beta_6$ 의 상승조절된 발현을 나타내었다. $\alpha_V\beta_6$ 의 상승 발현은 예컨대 급성 담즙정체 질환이 있는 44세 남성, 이식 후 급성 담즙관 폐색이 있는 59세 남성, 담도 폐쇄증이 있는 22세 남성 및 만성 담관 폐색증이 있는 24세 남성에게서 채취한 간 시편에서 관찰되었다.

[0205] 요약하면, 본 발명의 신규 항 $\alpha_V\beta_6$ 항체는 간 질환의 진단용 및 치료용 수단으로서 유용하다.

[0206] 실시예 17: 각종 인간암에서의 $\alpha_V\beta_6$ 의 상승조절

[0207] 인테그린 $\alpha_V\beta_6$는 일반적으로 건강한 성숙 조직에서 무시할 정도의 소량으로 발현된다. 항체 6.2A1과 본 명세서에 일반적으로 기술된 방법을 사용하여 각종 인간 종양 조직에서의 $\alpha_V\beta_6$ 발현을 관찰하였다. 그 결과, $\alpha_V\beta_6$ 인테그린 발현은 여러 가지 인간 상피 암에서 유의적으로 상승조절되는 것을 확인하였다. 주목할 점은 면역조직학적 검사 결과 $\alpha_V\beta_6$ 가 대부분의 상피암에 존재하는 종양 섬의 말단에서 특히 현저하게 발현되는 것으로 확인되었다. 상피암세포에서의 $\alpha_V\beta_6$의 발현을 보다 상세히 연구하기 위하여 SW480β_6 세포(상기 참조)와 더불어 Detroit 562세포(인두 암종) 및 SCC-14 세포(혀 편평세포 암종)를 6.3G9 및 6.4B4로 염색하고 유동세포계수기로 분석하였다.

[0208] 도 12의 우측 그래프는 형광성 활성화 세포 분류법(FACS)에서 확인되는 6.3G9 결합성으로 표시한 바와 같은 여러 종양 세포주에서의 $\alpha_V\beta_6$ 발현율을 도시한 것이다. 흑색 피크는 6.3G9 결합율을 나타내고 백색 피크는 2차 mAb 단독의 기본 결합율을 나타낸다. 도 12의 좌측에 선 그래프는 6.3G9 또는 6.4B4의 농도 증가에 따른 LAP 리간드에 대한 종양 세포주의 결합 저해율을 도시한 것이다. 6.4B4는 LAP에 대한 $\alpha_V\beta_6$ 결합에 있어서 6.3G9(Detroit 562에 대해서는 >10배 IC_{50} , SW480β6에 대해서는 >30배 IC_{50}, SCC-14에 대해서는 >100배 IC_{50})에 비해 효능이 유의적으로 적은 저해제였다. 이 결과는 6.3G9이 강한 차단성 mAb이고 6.4B4가 약한 차단성 mAb임을 나타내는 앞선 시험관내 실험 결과와 일치하는 것이다. 이러한 결과는 또한 Detroit 이종이식편 모델에서 6.4B4의 미약한 저해 활성과 일치하기도 한다(도 14B). 도 13은 각종 항 $\alpha_V\beta_6$ mAb에 의해 나타나는 LAP에 대한 종양 세포주 결합성의 상대적 저해율을 도시한 것이다. 6.3G9과 6.8G6은 동등한 저해 활성(모든 이전 데이터 결과와 일치함)을 보이는 반면 6.4B4는 LAP에 대한 $\alpha_V\beta_6$ 결합의 저해제로서 유의적으로 적은 효능을 보였다.

[0209] 실시예 18: 인간 종양 이종이식편 모델에서의 항 $\alpha_V\beta_6$ 차단성 mAb의 효과

[0210] 인간 종양 이종이식편을 이식한 면역결손성 마우스(예, 누드 마우스 및 SCID 마우스)를 유용한 생체내 모델 시스템으로서 제조하여 항암제의 치료 효과를 검사하였다(예, van Weerden et al., Prostate 43(4): 263-71(2000); Bankert et al., Front Biosci 7: c44-62(2002)). 즉, 본 발명의 차단성 항 $\alpha_V\beta_6$ 모노클론 항체를 이종이식편 모델에서 종양 증식의 저해성에 대하여 생체내 검사하였다. 본 실험에서는 암성 인간 인두세포(Detroit 562 세포주) 이종이식편을 이식한 무흉선 누드 마우스 암컷에서 나타나는 종양 증식을 일부 신규 $\alpha_V\beta_6$ 항체가 저해하는 성질을 검사하였다.

[0211] 이 실험을 위해, Detroit 562 세포(ATCC)를 2mM L-글루타민이 보충된 최소 필수영양 배지(Eagle)와 1.5g/L 중탄산나트륨, 0.1mM 비필수 아미노산 및 1.0mM 피루브산 나트륨, 및 10% 태내 송아지 혈청은 첨가하고 항생제는 첨가하지 않은 Earle' BSS에서 시험관내 계대시켰다. 약 $5x10^6$세포/0.2ml 배지(혈청 무첨가)를 누드 마우스의

우측 옆구리로 피하 주입하였다. 3 내지 4일 후, 종양 크기를 측정하기 시작하여 종양이 약 5mm(길이)x5mm(너비)가 될 때까지 계속하였다. 이 마우스를 무작위로 선발하여 시험 항체 또는 대조용 용액을 1일째 복강내 주사하고, 그 다음 33일 동안 1주에 3회씩 주사하였다. 시험 항체와 대조용 용액은 다음과 같다: (1) 6.3G9, 1mg/kg, 마우스 10마리; (2) 6.3G9, 4mg/kg, 마우스 10마리; (3) 6.3G9, 10mg/kg, 마우스 10마리; (4) 6.4B4, 1mg/kg, 마우스 10마리; (5) 6.4B4, 4mg/kg, 마우스 10마리; (6) 6.4B4, 10mg/kg, 마우스 10마리; 및 (7) 매개체 대조군(PBS), 0.2ml/마우스, 마우스 30마리. 또한, 화학치료제 대조군으로서 시스 플래티늄 2mg/kg을 마우스 10마리에게 피하 주사하였다. 시스 플래티늄 주사는 1일째와 그 다음 총 6일 동안 2일에 한번씩 시행하였다. 마지막 33일째, 동물의 체중과 종양 크기를 측정하고 $\alpha_V\beta_6$ 발현은 면역조직학적으로 검사하고 혈청의 항 $\alpha_V\beta_6$ 농도를 측정하였다.

[0212] 면역조직학적 염색 결과, 이식된 종양 세포는 생체내에서 $\alpha_V\beta_6$를 다량 발현하였다. 또한, 종양 중량 측정 결과, 차단성 mAb 6.3G9는 시험된 3가지 농도 모두에서 종양 증식을 효과적으로 저해하는 것으로 관찰되었다(도 14A). 이에 반해, 약한 차단성의 mAb 6.4B4는 종양 증식을 저해하지 않았다(도 14B).

[0213] 요약하면, 차단성 항체는 처리된 마우스에서 40 내지 50%까지 종양 증식을 저해한다. 이에 반해, 약차단성 항 $\alpha_V\beta_6$ 항체는 종양 증식을 저해하지 못한다.

[0214] 실시예 19: $\alpha_V\beta_6$ 항체 내재화

[0215] 세포에 내재화된 항체는 암과 같은 특정 임상적 증상에 유리한데, 그 이유는 이 항체를 독소, 방사성활성 화합물 또는 다른 항암제와 접합시켜 암세포를 선택적 표적으로 하여 증식을 저해할 수 있기 때문이다. 따라서, 항 $\alpha_V\beta_6$ 항체의 내재화 성질을 SW480β6(상기 참조)과 SCC-14 세포에서 연구하였다.

[0216] 세포를 1:5로 분할하여 4개의 방으로 이루어진 유리 슬라이드 상에 놓고 37℃, 5% CO_2하에 하룻밤동안 항온배양하였다. 다음날, mAb 6.8G6, 6.1A8, 6.3G9, 7.1C5, 6.4B4, 10D5 및 8B3을 최종 농도가 20㎍/ml이 되게 희석하였다. 이 mAb 또는 배지 단독물을 적당한 웰에 첨가하였다. 0h에서부터 48h까지 내재화를 시간별로 측정하였다. 측정된 시간은 0분, 5분, 10분 및 30분과, 1시간, 4시간, 24시간 및 48시간이었다. 음성 대조군으로는 2차 항체(항뮤린-Alexa 594)를 첨가하였다. 각 측정 시간 때마다 항체를 제거하고 세포층을 완충액으로 세척하여 내재화를 정지시켰다. 밀배아 어글루티닌-알렉사-488(Wheat Germ Agglutinin-Alexa-488)을 첨가하여 18℃에서 20분 동안 항온처리하여 세포의 외측 말단을 녹색 형광성으로 염색하였다. 세포를 세척한 후, Cytofix/Cytoperm 용액을 첨가하여 18℃에서 20분 동안 항온처리하여 세포를 고정시키고 투과성으로 만들었다. 이 세포를 다시 세척한 뒤, 2차 항마우스-알렉사 594(적색 형광성)를 첨가하여 18℃에서 20분 동안 항온처리함으로써 결합되거나 내재화된 뮤린 $\alpha_V\beta_6$ 항체를 표지하였다. 그 다음, 세포를 세척하고 2% 파라포름알데하이드를 첨가하여 고정시킨 뒤 공초점 현미경으로 검사하였다. 라이쯔 플랜-아포크로마틱(Leitz Plan-Apochromatic) 63x(1.32 구경 수, 오일 침지형) 대물렌즈(Leica)로 2x 디지털 줌하에 영상을 촬영하였다. 각 사진 틀은 모든 조건하에서 내재화가 관찰된 세포의 중앙 구역 중의 단일 광학 단편을 나타낸다. 핵에서는 염색이 관찰되지 않았다.

[0217] 내재화는 6.8G6 및 6.1A8과 같은 양이온 의존성 mAb(RGD를 함유하는 리간드 모방체)에서 관찰되었다. 그러나, 6.3G9, 7.1C5 및 6.4B4와 같은 양이온 비의존성 mAb에서는 내재화가 전혀 관찰되지 않았다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1A 및 도 1B는 각종 항 $\alpha_V\beta_6$ 모노클론 항체("mAb")가 β_6 형질감염된 FDC-P1 세포(대조군은 형질감염되지 않은 세포)에 결합하는 성질을 측정하는 세포 포획 분석의 결과를 보여주는 막대그래프이다.

[0041] 도 2A는 각종 정제된 항 $\alpha_V\beta_6$ "융합체 6" 모노클론 항체가 가용성 재조합체 인간 $\alpha_V\beta_6$ ("hs $\alpha_V\beta_6$ ")에 결합하는 성질을 측정한 ELISA 분석 결과를 보여주는 그래프이다. 주석의 숫자는 클론 번호를 나타낸다. 각 클론 번호에 대해서는 표 2에 설명되어 있다.

[0042] 도 2B는 각종 정제된 항 $\alpha_V\beta_6$ "융합체 7" 모노클론 항체가 가용성 재조합체 hs $\alpha_V\beta_6$ 에 결합하는 성질을 측정한 ELISA 분석 결과를 보여주는 그래프이다. 이 항체는 β_6-/- 마우스를 β_6 로 형질감염된 NIH 3T3 세포로 면역화하여 수득하였다(융합체 #7).

[0043] 도 3A 내지 도 3F는 각종 항$\alpha_V\beta_6$ 모노클론 항체가 hs$\alpha_V\beta_6$ 에 결합하는데 있어서 다양한 양이온 의존성을 보여주는 그래프이다.

[0044] 도 4A 및 도 4B는 융합체 #6과 융합체 #7 모노클론 항체 각각이 LAP에 대한 비오틴-hs$\alpha_V\beta_6$ 의 결합을 저해함을 보여주는 그래프이다.

[0045] 도 5A 내지 도 5E는 전형적인 본 발명의 모노클론 항체가 LAP에 대한 β6 형질감염된 FDC-P1 세포의 결합을 저해함을 보여주는 그래프이다. 도 5A 및 도 5B는 융합체 #6 항체에 의한 결과를 도시한 것이다. 도 5C 내지 도 5E는 융합체 #7 항체로부터 수득되는 결과를 도시한 것이다.

[0046] 도 6A 및 도 6B는 융합체 #6과 융합체 #7 항체 각각이 TGF-β활성화를 모니터하는 PAI-1 루시퍼라제 리포터 유전자 분석에서 $\alpha_V\beta_6$ 에 의해 매개되는 TGF-β의 활성화를 저해함을 보여주는 그래프이다.

[0047] 도 7A는 $\alpha_V\beta_6$ 모노클론 항체 6.1A8, 6.8G6(서브클론 A 및 B), 7.7G5, 6.2B1, 6.3G9, 6.2B10(서브클론 A 및 B), 6.2G2, 6.2A1, 6.4B4(서브클론 A, B 및 C), 7.10H2, 7.9H5, 7.4A3(서브클론 A 및 B), 7.1C5(서브클론 A 및 B) 및 7.1G10의 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열을 도시한 것이다. 항체 6.1A8, 6.8G6 및 7.7G5는 $\alpha_V\beta_6$ 에 대한 결합에 있어서 양이온 의존성인 반면, 항체 6.2B1, 6.2A1, 6.3G9, 6.2B10, 6.4B4, 7.1C5 및 7.1G10은 양이온 비의존성(하기 참조)이다. 괄호안의 숫자는 아미노산 잔기의 위치를 나타낸다. CDR은 큰 박스로 표시한 것이고, 이태리체 아미노산을 함유하는 작은 박스는 특정 항체가 각종 클론들로 나타나는 다형성을 보여주는 것이다.

[0048] 도 7B는 $\alpha_V\beta_6$ 모노클론 항체 6.1A8, 6.8G6, 6.4B4, 6.2A1, 7.1C5, 7.1G10, 6.2B10, 7.7G5, 6.2B1 및 6.3G9의 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열을 도시한 것이다.

[0049] 도 8은 유방암 및 인간 편평세포 암종의 조직 절판들에서 나타나는 $\alpha_V\beta_6$ 의 발현을 보여주는 산란도이다. 정상인의 조직은 무시할 정도의 $\alpha_V\beta_6$ 발현수준만을 나타낸다.

[0050] 도 9A 및 도 9B는 가용성 $\alpha_V\beta_6$ 에 대한 2가지 항$\alpha_V\beta_6$ 항체, 6.8G6과 6.3G9 각각의 용액 결합 친화성을 나타내는 2차 곡선 그래프이다.

[0051] 도 10A 및 도 10B는 $\alpha_V\beta_6$ 에 대한 결합시 비오틴화된 6.3G9 및 비오틴화된 6.8G6과 각각 경쟁하는 정제된 모노클론 항체의 성질을 입증하는 막대그래프이다.

[0052] 도 11은 항$\alpha_V\beta_6$ mAb 처리한 UUO 동물 유래의 신장에서 나타나는 평활근 액틴 염색율을 보여주는 막대그래프이다.

[0053] 도 12는 FACS 분석에 의한 종양 세포주에서의 $\alpha_V\beta_6$ 발현(도면 우측)과 LAP 리간드에 대한 종양 세포주 결합을 저해하는 mAb 6.3G9 및 6.4B4의 효과(도면의 좌측)를 도시한 것이다.

[0054] 도 13은 LAP 리간드에 대한 3가지 종양 세포주의 결합을 저해하는 항$\alpha_V\beta_6$ mAb 6.3G9, 6.8G6 및 6.4B4의 저해 효과를 입증하는 막대그래프이다.

[0055] 도 14A 및 도 14B는 피하 이식된 디트로이드(Detroit) 562 세포로부터 발생한 종양에 영향을 미치는 33일간의 연구 기간동안에 나타나는 항$\alpha_V\beta_6$ mAb 6.3G9 및 6.4B4 각각의 효과를 보여주는 그래프이다.

[0056] 도 15 내지 도 15C는 블레오마이신에 의해 유도된 폐섬유증에 미치는 항$\alpha_V\beta_6$ mAb의 효과를 보여주는 그래프이다. (A) 6.3G9 mAb를 이용한 항체 처리를 블레오마이신 투여일인 0일째부터 시작하여 30일 동안 모니터하였다; (B) 6.3G9 mAb를 이용한 항체 처리는 블레오마이신을 처리한 지 15일이 경과한 후부터 시작하여 30일 동안 모니터하였다; (C) 6.3G9, 6.8G6 및 6.4B4 mAb는 블레오마이신 처리 후 15일이 경과한 후부터 시작하여 60일 동안 모니터하였다. 도 15A 및 도 15B에서, 좌측의 막대그래프는 히드록시프롤린㎍/폐을 나타내는 반면, 우측의 막대그래프는 식염수 처리된 마우스(블레오마이신 무처리)과 비교한 히드록시프롤린의 증가율을 나타낸다. 도 15C의 그래프는 폐 마다 나타나는 히드록시프롤린의 함량을 보여준다.

[0057] 발명의 상세한 설명

[0058] 본 발명은 인테그린 $\alpha_V\beta_6$ 에 특이적인 항체 클래스 및 서브클래스를 특징으로 한다. 이 항체의 적어도 하나의 클래스(차단제)는 $\alpha_V\beta_6$ 의 LAP에 대한 결합을 차단하거나 TGF-β의 활성화를 저해할 수 있다.

[0059] 이하에서는 본 발명의 항체를 제조하는 다양한 방법에 대해 설명할 것이다. 하지만, 본 명세서에 구체적으로 기술되지는 않지만 당해 기술분야에 공지된 방법들도 본 발명의 범위에 속하는 것이다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 파지 디스플레이식 항체 라이브러리, 예컨대 문헌[Smith, Science 228:1315-7(1985); 미국 특허 제5,565,332호, 제5,733,743호, 제6,291,650호 및 제6,303,313호에 기술된 방법을 사용하여 확인할 수도 있다. 또한, 본 발명의 항체는 본 명세서에서 확인된 중쇄와 이종 경쇄, 예컨대 파지 디스플레이 기법에 의해 확인된 경쇄를 커플링하여 제조할 수 있다.

[0060] 비인간 하이브리도마 항체

[0061] 본 발명의 모노클론 항체는 공지의 하이브리도마 기법으로 제조할 수 있다. 이를 위해, β_6 -/- 동물(예, 마우스, 래트 또는 래빗)을 정제 또는 미정제 $\alpha_V\beta_6$ 제조물, α_V, β_6 또는 이 두 항원을 모두 암호화하는 cDNA 작제물로 형질감염시킨 세포, 구성적으로 $\alpha_V\beta_6$를 발현하는 세포 등으로 면역화하였다. 항원은 정제 단백질, 세포상에 발현된 단백질, 단백질 단편 또는 이의 펩타이드로서, 또는 나출형 DNA나 상기 단백질, 단백질 단편 또는 펩타이드를 암호화하는 바이러스 벡터로서 전달할 수 있다. 그 다음, 면역화된 동물의 혈청을 항 $\alpha_V\beta_6$ 항체의 존재에 대하여 시험한다. 시험 양성인 동물로부터 B 세포를 분리하고, 이 B 세포를 가지고 하이브리도마를 제조한다.

[0062] 이 하이브리도마에 의해 분비되는 항체를 가지고 이 항체의 $\alpha_V\beta_6$ 에 특이적으로 결합하는 성질(즉, 형질감염되지 않은 모세포가 아닌 β_6 형질감염된 세포에 결합하는 성질)과 임의의 다른 바람직한 성질, 예컨대 공지의 항 $\alpha_V\beta_6$ 항체 10D5에 비하여 더 작은 IC_{50} 값을 나타내는 LAP와 $\alpha_V\beta_6$ 간의 결합 저해성(또는 비차단제인 경우에는 비저해성) 또는 TGF-β활성화 저해성에 대하여 선발한다.

[0063] 이 선발 분석에서 시험 양성인 하이브리도마 세포는 세포가 배양액내로 모노클론 항체를 분비할 수 있게 하는 조건하에 영양배지에서 배양한다. 그 다음, 조정된 하이브리도마 배양 상청액을 수거하여, 그 상청액에 함유된 항체를 정제한다. 또는, 하이브리도마 세포를 면역화하지 않은 동물(예, 마우스)의 복강에 주사하여 목적 항체를 생산하기도 한다. 이 하이브리도마 세포는 복강에서 증식하여 항체를 분비하고, 분비된 항체는 복수로 축적된다. 이 항체는 그 다음 주사기를 이용하여 복강에서 복수를 빼내어 회수할 수 있다.

[0064] 모노클론 항체는 바람직한 하이브리도마로부터 항체 암호성 cDNA를 분리하고 이 cDNA로 포유동물 숙주 세포(예, CHO 또는 NSO 세포)를 형질감염시킨 뒤, 이 형질감염된 숙주 세포를 배양한 다음 이 배양액으로부터 항체를 회수하여 제조할 수 있다.

[0065] 키메라 항체

[0066] 본 발명의 모노클론 항체는 또한 동족의 하이브리도마(예, 뮤린, 래트 또는 래빗) 항체를 유전자조작하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 동족 항체를 재조합 DNA 기법으로, 즉 중쇄 및/또는 경쇄의 경첩부(hinge) 및/또는 불변부 영역 일부 또는 전체를 다른 종(예, 인간)의 해당 항체 성분으로 치환시켜 변화시킬 수 있다. 일반적으로, 유전자조작된 항체의 가변 도메인은 동족 항체의 가변 도메인과 동일하거나 실질적으로 동일한 것이다. 이와 같이 유전자조작된 항체는 키메라 항체라고 부르며, 상기 경첩부 및/또는 불변부 영역이 유래된 종(예, 인간)의 개체에게 투여했을 때 동족 항체 보다 항원성이 적다. 키메라 항체를 제조하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다.

[0067] 본 발명에 포함되는 키메라 항체는 서열번호 19 내지 26 중 어느 한 서열과 동일한(또는 실질적으로 동일한) 서열을 가진 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열번호 37 내지 45 중 어느 한 서열과 동일한(또는 실질적으로 동일한) 서열을 가진 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0068] 바람직한 인간의 불변부 영역으로는 IgG1 및 IgG4에서 유래하는 것이 있다.

[0069] 완전 인간 항체

[0070] 본 발명의 모노클론 항체에는 또한 완전 인간 항체도 포함된다. 이 항체는 문헌[Boerner et al., J.Immunol. 146:86-95(1991)]에 기술된 바와 같은 시험관내 초회항원자극된 인간 비장세포를 사용하거나, 또는 예컨대 미국

특허 제6,300,064호에 기술된 바와 같은 파지 디스플레이식 항체 라이브러리를 사용하여 제조할 수 있다.

[0071] 다른 몇몇 완전 인간 항체의 제조방법으로는 불활성 내인성 Ig좌를 보유하고 재배열되지 않은 인간 항체 중쇄와 경쇄 유전자와 비교하여 돌연변이성인 인간을 제외한 동물의 사용을 포함한다. 이러한 돌연변이성 동물은 $\alpha_V\beta_6$로 면역화할 수 있고, 이로부터 유래되는 B 세포를 이용하여 하이브리도마를 만든다. 이 방법은 예컨대 인간 Ig 미니유전자좌를 함유하는 돌연변이 마우스에 관한 각종 진팜/메다렉스[GenPharm/Medarex(Palo Alto, CA)] 간행물/특허(예컨대, Lonberg, 미국 특허 제5,789,650호); 제노마우스(XENOMICE)에 관한 각종 아브제닉스[Abgenix(Fremont, CA)] 간행물/특허(예컨대, Kucherlapati, 미국 특허 제6,075,181호, 제6,150,584호 및 제6,162,963호; Green et al., Nature Genetics 7:13-21(1994); 및 Mendez et al., 15(2):146-56(1997)); "트랜소믹(transomic)" 마우스에 관한 각종 기린[Kirin(일본)] 간행물/특허(예, EP 843,961 및 Tomizuka et al., Nature Genetics 16:133-1443(1997))에 기술되어 있다.

[0072] 인간화된 항체

[0073] 본 발명의 모노클론 항체는 다른 종에서 유래하는 동족 항$\alpha_V\beta_6$ 항체의 인간화된 형태를 포함하기도 한다. 인간화된 항체는 항원 결합에 필요하지 않은 인간의 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄 아미노산 일부 또는 전부(예컨대, 불변 영역 및 가변 도메인의 프레임워크 영역)를 동족의 비인간 항체의 경쇄 또는 중쇄 유래의 대응 아미노산으로 치환시키는데 사용하여 재조합 DNA 기술로 생산하는 항체이다. 예를 들면, 제공된 항원에 대한 뮤린 항체의 인간화된 형태는 중쇄 및 경쇄 모두에 (1) 인간 항체의 불변 영역; (2) 인간 항체의 가변 도메인 유래의 프레임워크 영역; 및 (3) 뮤린 항체의 CDR을 보유한다. 필요한 경우, 인간 프레임워크 영역내의 1 이상의 잔기를 뮤린 항체의 대응하는 위치에 있는 잔기로 변화시켜 인간화된 항체의 항원에 대한 결합 친화성을 보존시킬 수 있다. 이러한 변화를 때로 "역돌연변이"라고 부른다. 인간화된 항체는 일반적으로 키메라 항체에 비해 인체 내에서 면역 반응을 유발시킬 가능성이 적은데, 이것은 전자가 비인간 성분을 훨씬 적게 함유하기 때문이다.

[0074] 인간화된 항체를 제조하는 방법에 대해서는 문헌[예, Winter EP 239 400; Jones et al., Nature 321:522-525(1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327(1988); Verhoeyen et al., Science 239: 1534-1536(1988); Queen et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:10029(1989); 미국 특허 제6,180,370호; 및 Orlan야 et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:3833(1989)]에 기술되어 있다. 일반적으로, 뮤린(또는 다른 인간을 제외한 동물) CDR을 인간 항체에 이식하는 방법은 다음과 같다. 하이브리도마로부터 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 암호화하는 cDNA를 분리한다. CDR을 포함하는 가변 도메인의 DNA 서열을 서열분석으로 결정한다. CDR을 암호화하는 DNA를 인간 항체 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인 암호 서열의 대응 영역으로 부위 지향성 돌연변이유발법으로 이동시킨다. 그 다음, 필요한 이소타입의 인간 불변 영역 유전자 단편(예, CH에 대해서는 γ1, CL에 대해서는 k)을 첨가한다. 인간화된 중쇄 및 경쇄 유전자를 포유동물 숙주 세포(예, CHO 또는 NSO 세포)에서 공동발현시켜 가용성 인간화된 항체를 수득한다. 종종, 항체의 대량 생산을 용이하게 하기 위하여 항체 발현 세포를 함유하는 생물반응기에서 상기 인간화된 항체를 생산하거나 또는 젖 중에 항체를 발현하는 돌연변이 포유동물(예, 염소, 소 또는 양)을 제조하는 것이 바람직할 수도 있다(예컨대, 미국 특허 제5,827,690호 참조).

[0075] 때로, CDR을 인간의 프레임워크에 직접 전달하면 최종적으로 산출되는 항체의 항원 결합 친화성이 상실되기도 한다. 이것은 몇몇 동족 항체 중에서, 프레임워크 영역 중의 특정 아미노산이 CDR과 반응하여 항체의 총 항원 결합 친화성에 영향을 미치기 때문이다. 이러한 경우에는, 동족 항체의 항원 결합 활성을 유지시키기 위하여 수용체 항체의 프레임워크 영역에 "역돌연변이"(전술한 설명 참조)를 도입하는 것이 불가결할 것이다.

[0076] 역돌연변이를 도입하는 일반적인 시도는 당해 기술분야에 공지되어 있다. 그 예로서, 퀸 외 다수[Queen et al. (상기 문헌 참조)], 코 외 다수(Co et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 88:2869-2873(1991) 및 WO 90/07861(Protein Design Labs Inc.)은 주요 2단계를 포함하는 시도에 대해 설명하고 있다. 제1 단계로서, 컴퓨터 분석으로 동족 뮤린 항체의 V 영역 프레임워크와 단백질 서열 상동성이 최상인 인간 V 프레임워크 영역을 선택한다. 그 다음, 뮤린 V 영역의 3차 구조를 컴퓨터로 모델링하여 뮤린 CDR과 상호작용할 가능성이 있는 프레임워크 아미노산 잔기를 가시화하고, 이 뮤린의 아미노산 잔기를 상동성인 인간 프레임워크 위에 적층시킨다.

[0077] 이러한 2단계 시도에서, 인간화된 항체의 디자인에는 몇 가지 기준이 있다. 첫 번째 기준은 다수의 인간 항체 중의 콘센서스 프레임워크를 사용하거나 또는 비인간 공급체 면역글로불린과 일반적으로 상동성인 특정 인간 면역글로불린 유래의 프레임워크를 인간 수용체로서 사용하는 것이다. 두 번째 기준은 프레임워크의 특정 잔기에서 공급체 잔기가 인간 서열에 일반적인 것이고 인간 수용체 잔기가 특이한 것이라면 수용체 아미노산 보다는 공급체 아미노산을 사용하는 것이다. 세 번째 기준은 CDR 옆에 인접하는 아미노산 잔기를 수용체 보다 공급체의

프레임워크 아미노산 잔기를 사용하는 것이다.

[0078] 또한, 다른 시도로서 문헌[예컨대, Tempest, Biotechnology 9: 266-271(1991)]에 기술된 방법을 사용할 수 있다. 이 시도에서는 근본적으로 마우스 잔기를 도입하지 않고, CDR 이식(grafting)을 위해 NEWM 및 REI의 각 중쇄 및 경쇄에서 유래하는 V 영역의 프레임워크를 사용하는 것이다. 이러한 시도의 장점은 NEWM 및 REI 가변 영역의 3차원 구조가 X선 결정학을 통해 공지되어 있고, 따라서 CDR과 V 영역 프레임워크 잔기 사이의 특정 상호작용을 쉽게 모델링할 수 있다는 점이다.

[0079] 다른 부(moiety)

[0080] 본 발명의 모노클론 항체는 필요한 기능에 영향을 미치는 다른 부를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체에 의해 표적화된 세포를 사멸시키기 위한 독소부(예컨대, 파상풍독소 또는 리신) 또는 방사성핵종(예, ^{111}In 또는 ^{90}Y)을 포함할 수 있다(예컨대, 미국 특허 제6,307,026호). 또한, 분리 또는 검출의 용이함을 위한 부(예컨대, 바이오틴, 형광성 부, 방사성 부, 히스티딘 태그 또는 다른 펩타이드 태그)를 포함할 수 있다. 또한, 혈청 반감기를 연장시킬 수 있는 부, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 부를 포함할 수도 있다.

[0081] 질병 증상 및 동물 모델

[0082] 본 발명의 항체는 $\alpha_V\beta_6$ 매개 질환의 예방을 비롯한 치료에 유용하다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 TGF-β의 활성화를 차단하거나 또는 $\alpha_V\beta_6$ 의 다른 임의의 리간드, 예컨대 피브로넥틴, 비트로넥틴 및 테나신 등에 대한 결합을 차단하여 섬유증(예컨대, 폐섬유증, 급성 폐섬유증, 신장 섬유증, 간섬유증, 알포트증 및 피부경화증)을 치료하는데 사용할 수 있다. 이 시도의 신규성으로는, (1) TGF-β의 그 수용체에 대한 결합성 보다는 TGF-β의 활성화를 차단한다는 점, (2) TGF-β를 전신 보다는 국소적(즉, $\alpha_V\beta_6$ 상승조절 부위)으로 저해할 수 있다는 점, 및 (3) $\alpha_V\beta_6$ 의 그 리간드에 대한 결합을 저해한다는 점을 포함한다. 이러한 섬유증 질환이나 증상 이외에, 본 발명의 항체는 암이나 암 전이(종양 성장 및 침입 포함), 특히 상피암을 치료하는 데에도 유용하다. 상피암의 세부종류로는 편평세포암종, 예컨대 두경부, 구강, 유방, 폐, 전립선, 경부, 인두, 결장, 췌장 및 난소의 암들을 포함한다. 신규 $\alpha_V\beta_6$ 모노클론 항체를 이용한 본 연구를 통해 본 발명자들은 $\alpha_V\beta_6$ 가 다양한 상피암, 특히 종양의 선두 말단에서 다량 발현된다는 것을 입증하였다. 따라서, 본 발명의 신규 항체는 $\alpha_V\beta_6$ 매개의 다른 모든 질환, 예컨대 건선 등에도 사용할 수 있다.

[0083] 이러한 증상을 앓고 있는 인간 및 동물 피검체 모두에 대하여 본 발명의 치료방법은 효과적이다. 본 발명이 적용가능한 동물 피검체는 애완동물이나 영리 목적으로 기르는 가축 및 집 동물 모두를 포함한다. 그 예로는 개, 고양이, 소, 말, 양, 돼지 및 염소가 있다.

[0084] 본 발명의 항체가 나타내는 효능은 각종 동물 모델에서 테스트할 수 있다. 폐섬유증의 마우스 모델로는 블레오마이신 유도성 폐섬유증(Pittet et al., J.Clin.Invest. 107(12):1537-1544(2001); Munger et al., 상기 문헌 설명 참조) 및 방사 유도성 폐섬유증(Franko et al., Rad.Res. 140:347-355(1994))을 포함한다. 블레오마이신 처리된 마우스에서 $\alpha_V\beta_6$ 의 발현은 폐의 상피 폐포 세포에서 증가한다. 그러나, β_6 녹아웃(knockout) 마우스는 블레오마이신 유도성 손상 및 섬유증으로부터 보호된다.

[0085] 신장섬유증의 마우스 모델로는 COL4A3 -/- 마우스(예, Cosgrove et al., Amer.J.Path. 157:1649-1659(2000)), 아드리아마이신 유도성 손상을 입힌 마우스(Wang et al., Kidney International 58:1797-1804(2000); Deman et al., Nephrol Dial Transplant 16:147-150(2001)), db/db 마우스(Ziyadeh et al., PNAS USA 97:8015-8020(2000)) 및 편측요관폐색이 있는 마우스(Fogo et al., Lab Investigation 81:189A(2001); 및 Fogo et al., Journal of the American Society of Nephrology 12:819A(2001))가 있다. 이러한 모델 전체의 마우스는 신부전으로 진행할 수 있는 신장 손상과 섬유증을 일으킨다. $\alpha_V\beta_6$ 는 COL4A3 -/-마우스, 아드리아마이신 처리된 마우스 및 편측요관폐색이 있는 마우스의 신장 상행세관 및 하행세관의 내막에서 상승조절된다. $\alpha_V\beta_6$ 발현은 또한 각종 신장 손상 모델에서 증가할 것으로 보인다.

[0086] 또한, 항$\alpha_V\beta_6$ 모노클론 항체의 종양 증식, 진행 및 전이 저해성 역시 표준 생체내 종양 증식 및 전이 모델과 같은 동물 모델에서 테스트할 수 있다. [예컨대, Rockwell et al., J.Natl.Cancer Inst. 49:735(1972); Guy et al., Mol.Cell Biol. 12:954(1992); Wyckoff et al., Cancer Res. 60:2504(2000); 및 Oft et al., Curr.

Biol. 8:1243(1998)참조]. 암에 존재하는 주요 $\alpha_V\beta_6$ 리간드로는 전이에 관여하는 TGF-β, 피브로넥틴 및 비트로넥틴을 포함한다.

[0087] 본 발명의 치료방법의 효능은 유용한 다수의 진단 수단, 예컨대 물리적 조사, 혈액 검사, 단백뇨 측정, 크레아티닌 농도 및 크레아티닌 청소율 검사, 폐 기능 검사, 혈장 우레아 질소(BUN) 농도, 흉터형성 또는 섬유증 병변의 관찰 및 점수평가법, 콜라겐, 평활근 액틴 및 피브로넥틴과 같은 세포외 기질의 침착, 신장 기능 검사, 초음파, 자기공명영상(MRI) 및 CT 스캔 등으로 측정할 수 있다.

[0088] 약학적 조성물

[0089] 본 발명의 약학적 조성물은 1종 또는 그 이상의 본 발명의 항체 또는 이의 약학적 허용성 유도체를 경우에 따라 임의의 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 함유한다. 본 명세서에 사용된 "담체"라는 용어는 공지의 허용성 보조제 및 매개체를 포함한다.

[0090] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 멸균 주사성 제제 형태, 예컨대 멸균 주사성 수성 또는 유성 현탁액일 수 있다. 이러한 현탁액은 적당한 분산제, 습윤제 및 현탁화제를 이용하여 당해 기술분야에 공지된 기법에 따라 제조할 수 있다.

[0091] 본 발명의 약학적 조성물은 필요에 따라 경구, 국소, 정맥내, 피하, 복강내, 근육내, 골수내, 골절내, 윤활막내, 복장내, 경막내, 간내 또는 두개내 투여하거나 또는 염증 부위 또는 종양 증식 부위에만 국소적으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 예를 들어, 분무기, 무수 분말 흡입기 또는 계량 흡입기를 이용하여 흡입 투여할 수도 있다.

[0092] 본 발명의 항체가 목적한 효과를 달성하는데 유효한 투여량 및 용량 속도는 다양한 요인, 예컨대 치료할 질환의 성질, 피검체의 체격, 치료 목표, 사용된 세부적인 약학적 조성물 및 치료 담당의의 판단에 따라 달라질 것이다. 본 발명의 활성 성분 화합물은 약 0.001 내지 약 100mg/체중kg/일, 예컨대 약 0.1 내지 약 50mg/체중kg/일 범위의 투여량이 유용하다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 약 0.01mg/체중kg/일 내지 약 20mg/체중kg/일 범위, 예컨대 약 0.1mg/체중kg/일 내지 약 10mg/체중kg/일 범위의 용량을 매일에서부터 14일의 간격으로 투여할 수 있다. 다른 구체예에서, 항체는 복강으로 투여하는 경우에 약 0.3 내지 1mg/체중kg/일 범위의 용량으로 투여한다. 또 다른 구체예에서, 항체는 정맥내로 투여하는 경우에 약 5 내지 12.5mg/체중kg 범위의 용량으로 투여한다. 또 다른 구체예에서, 항체 조성물은 혈장내 항체 농도를 적어도 1mg/ml로 제공하기에 효과적인 양으로 투여한다.

[0093] 진단 방법

[0094] 본 발명의 항체는 $\alpha_V\beta_6$ 발현 농도의 변화와 관련있는 질환 증상을 진단하는데 사용할 수 있다. 피검체의 조직 시편, 예컨대 조직 생검, 체액 시료 또는 세척액(예, 폐포 세척액)을 항원 포획 측정, ELISA, 면역조직화학분석 등에서 본 발명의 항체를 이용하여 검사할 수 있다. 정상 개체의 조직 시편은 대조군으로 사용한다.

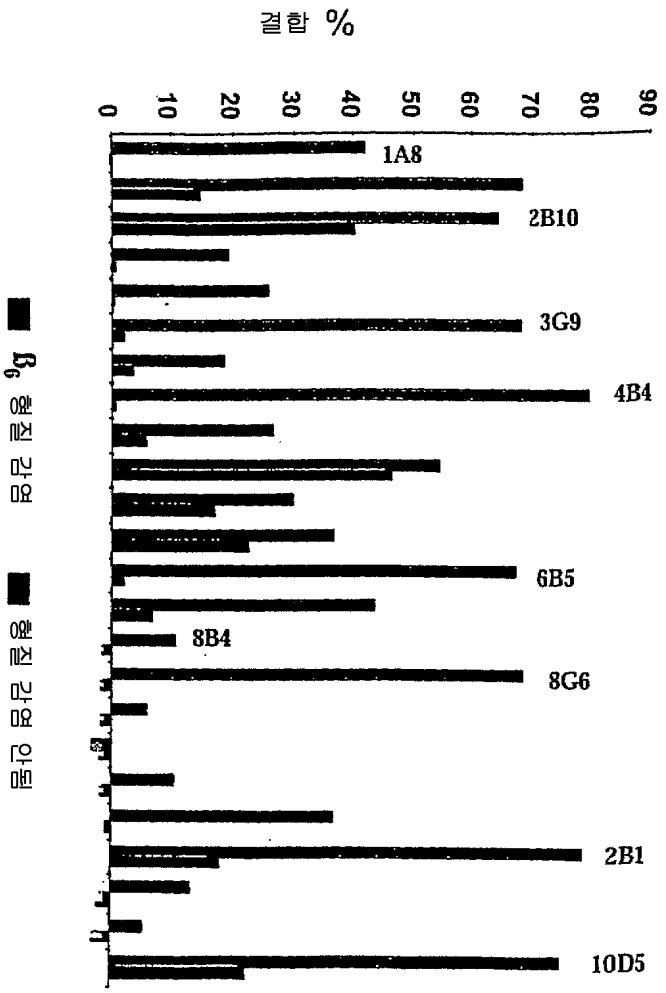
[0095] 본 발명은 별다른 표시가 없다면 당해 기술분야에 속하는 통상적인 세포 생물학, 세포 배양, 분자생물학, 미생물학, 재조합 DNA, 단백질 화학 및 면역학 기술을 이용하여 수행할 수 있다.[예컨대, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition(Sambrook et al., Eds.) 1989; Oligonucleotide Synthesis, (M.J.Gait, Ed.), 1984; 미국 특허 제4,683,195호(Mullis et al.); Nucleic Acid Hybridization, (B.D. Hames and S.J. Higgins), 1984; Transcription and Translation(B.D.Hames and S.J.Higgins), 1984; Culture of Animal Cells(R.I.Freshney,Ed.), 1987; Immobilized Cells and Enzymes, IRL Press, 1986; A Practical Guide to Molecular Cloning(B.Perbal), 1984; Methods in Enzymology, Volumes 154 and 155(Wu et al., Eds.), Academic Press, New York; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.H. Miller and M.P.Calos, Eds.), 1987; Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology(Mayer and Walker, Eds.), 1987; Handbook of Experiment Immunology, Volumes I-IV(D.M. Weir and C.C. Blackwell, Eds.), 1986; Manipulating the Mouse Embryo, 1986 참조].

[0096] 별다른 표시가 없는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 당해 기술분야의 통상적인 기술을 가진 자가 일반적으로 이해하는 것과 같은 의미를 갖는 것이다. 이하에 방법과 재료를 예시적으로 기술하였으나, 본 명세서에 기술된 것과 유사하거나 동등한 방법과 재료도 또한 본 발명의 수행에 사용할 수 있다. 본 명세서에 언급한 모든 간행물 및 다른 문헌들은 그 전체 내용이 참고인용된 것이다. 대립되는 경우, 정의를 비롯한 본 명세서가 기준이 될 것이다. 따라서, 재료, 방법 및 실시예는 단지 예시용으로서, 제한

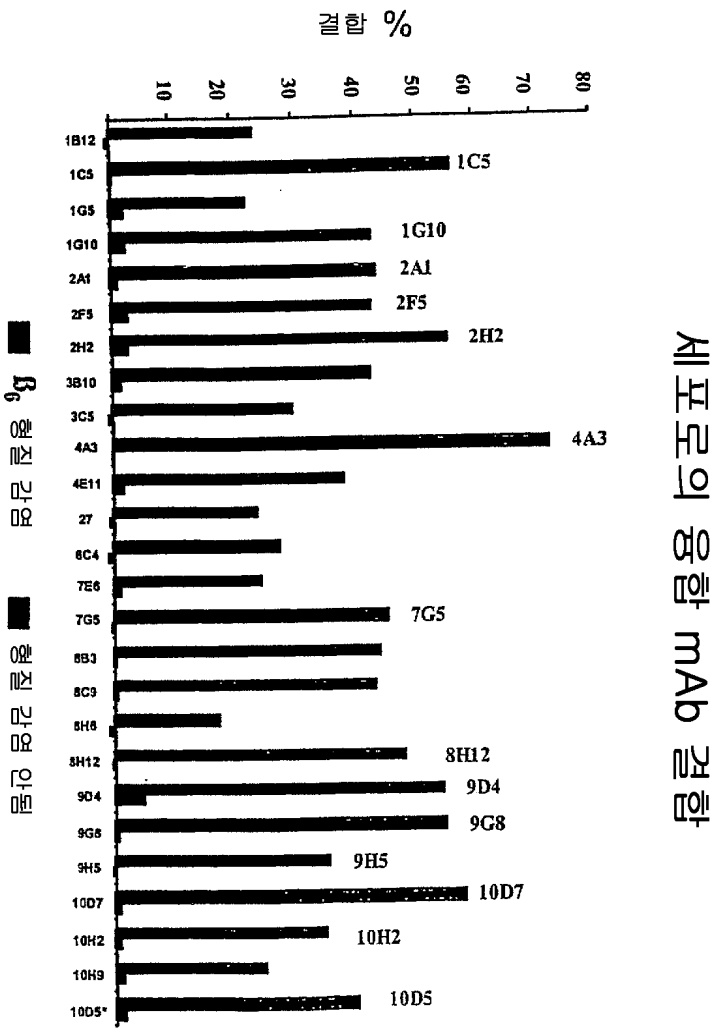
하는 것으로 간주되어서는 안된다. 본 명세서를 통해 사용된 "포함한다" 또는 그 변형어, "포함하는" 등은 기술한 정수 또는 정수 그룹을 포괄하는 것이지만 임의의 다른 정수 또는정수 그룹을 배제하는 것은 아니다.

도면

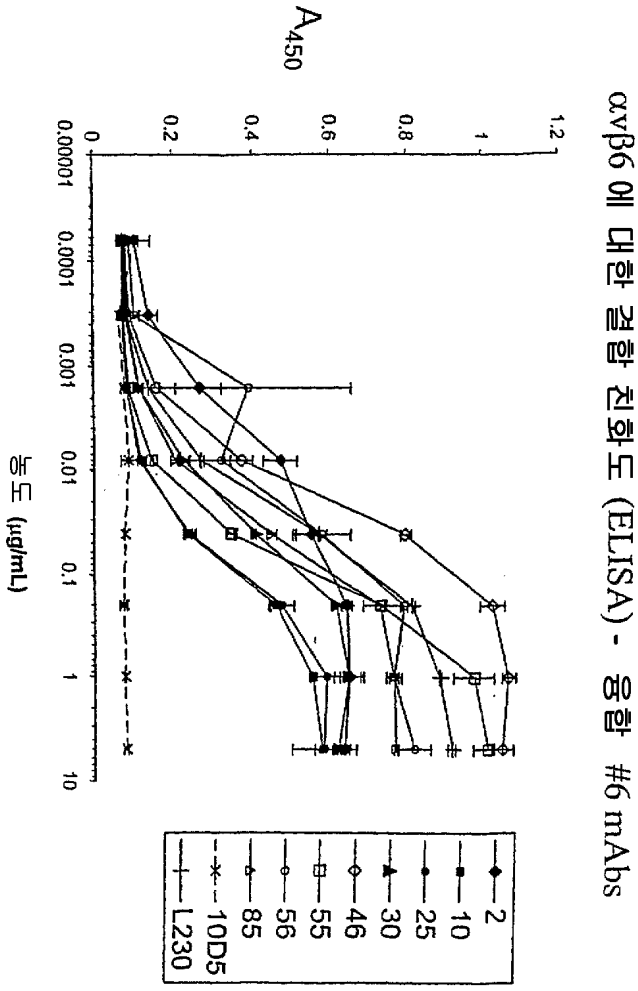
도면1a



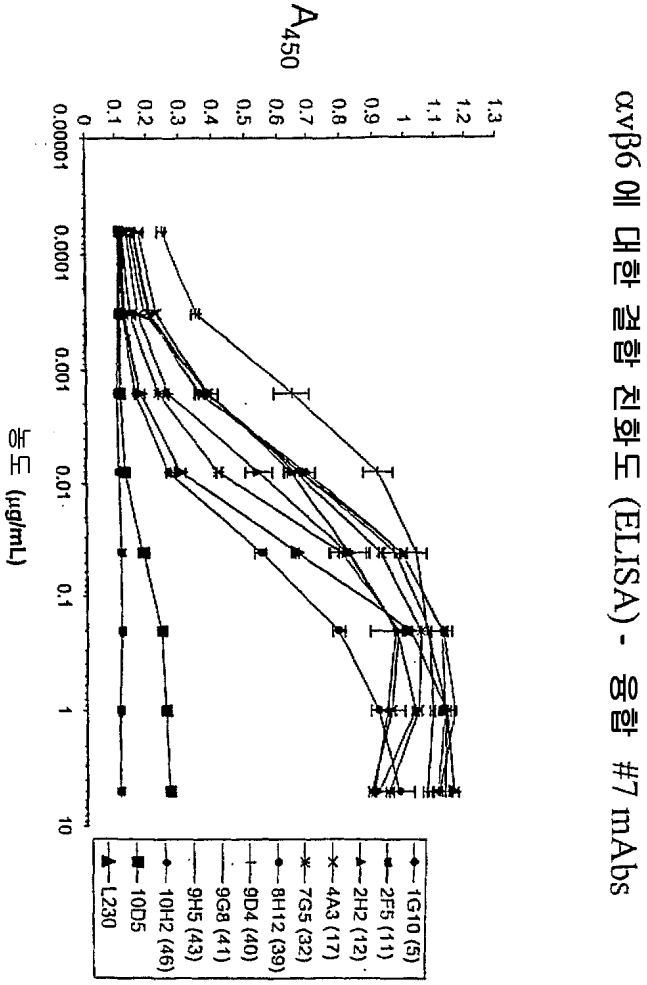
도면1b


결합 %
10
20
30
40
50
60
70
80
1B12
1C5
1G5
1G10
2A1
2F5
2H2
3B10
3C5
4A3
4E11
27
6C4
7E6
7G5
8B3
8C9
8H6
8H12
9D4
9G8
9H5
10D7
10H2
10H9
10D5*
1C5
1G10
2A1
2F5
2H2
4A3
7G5
8H12
9D4
9G8
9H5
10D7
10H2
10D5
β6 융합 감염
융합 감염 안됨
세포로의 융합 mAb 결합

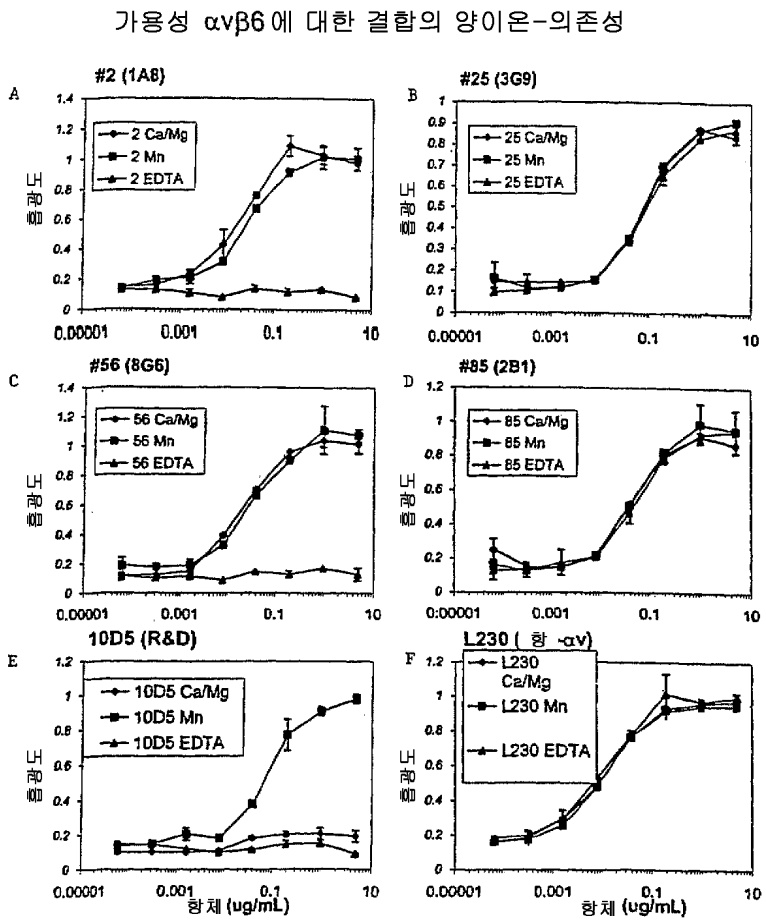
도면2a


αvβ6 에 대한 결합 친화도 (ELISA) - 융합 #6 mAbs
A450
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
농도 (μg/mL)
2
10
25
30
46
55
56
85
10D5
L230

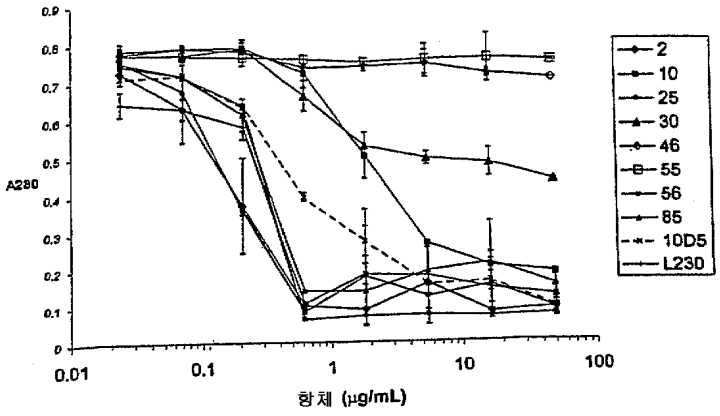
도면2b


αvβ6 에 대한 결합 친화도 (ELISA) - 융합 #7 mAbs
A450
농도 (μg/mL)
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1
1.1
1.2
1.3
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
1G10 (5)
2F5 (11)
2H2 (12)
4A3 (17)
7G5 (32)
8H12 (39)
9D4 (40)
9G8 (41)
9H5 (43)
10H2 (46)
10D5
L230

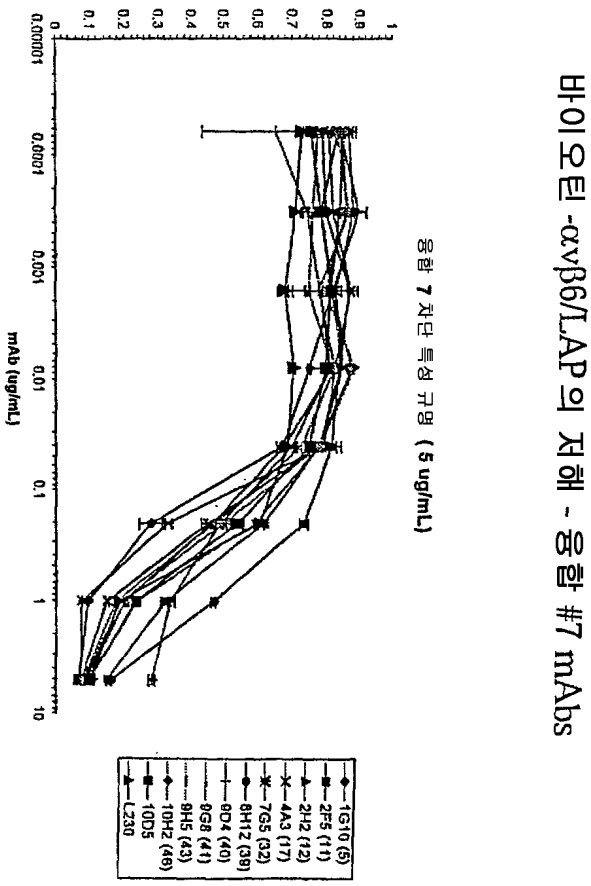
도면3


가용성 αvβ6에 대한 결합의 양이온-의존성
#2 (1A8)
2 Ca/Mg
2 Mn
2 EDTA
#25 (3G9)
25 Ca/Mg
25 Mn
25 EDTA
#56 (8G6)
56 Ca/Mg
56 Mn
56 EDTA
#85 (2B1)
85 Ca/Mg
85 Mn
85 EDTA
10D5 (R&D)
10D5 Ca/Mg
10D5 Mn
10D5 EDTA
L230 (항 -αv)
L230 Ca/Mg
L230 Mn
L230 EDTA
흡광도
항체 (ug/mL)

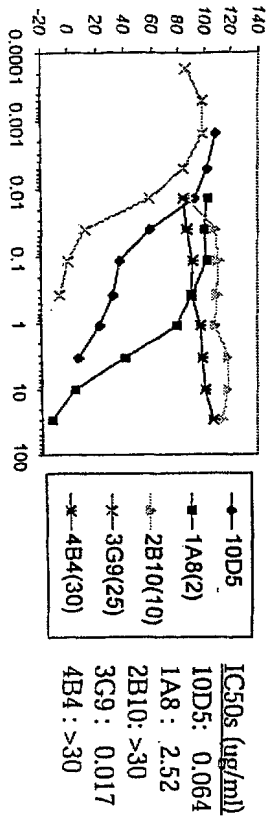
도면4a


A280
항체 (μg/mL)
2
10
25
30
46
55
56
85
10D5
L230

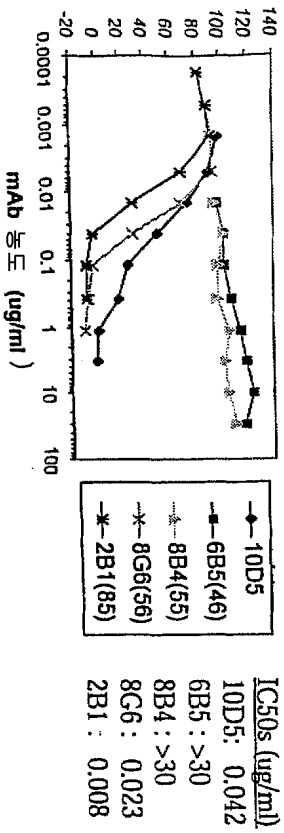
도면4b


바이오틴-αvβ6/LAP의 저해 - 융합 #7 mAbs
융합 7 차단 특성 규명 (5 ug/mL)
mAb (ug/mL)
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1
1G10 (5)
2F5 (11)
2H2 (12)
4A3 (17)
7G5 (32)
8H12 (39)
8D4 (40)
8G8 (41)
9H5 (43)
10H2 (46)
10D5
L230

도면5a

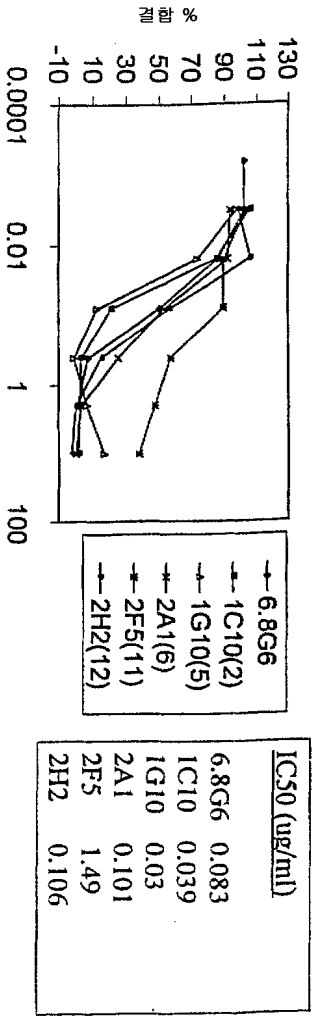

β6(FDC-P1)의 LAP로의 부착 - 융합 #6 mAbs
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
10D5
1A8(2)
2B10(10)
3G9(25)
4B4(30)
IC50s (ug/ml)
10D5: 0.064
1A8 : 2.52
2B10: >30
3G9 : 0.017
4B4 : >30

도면5b

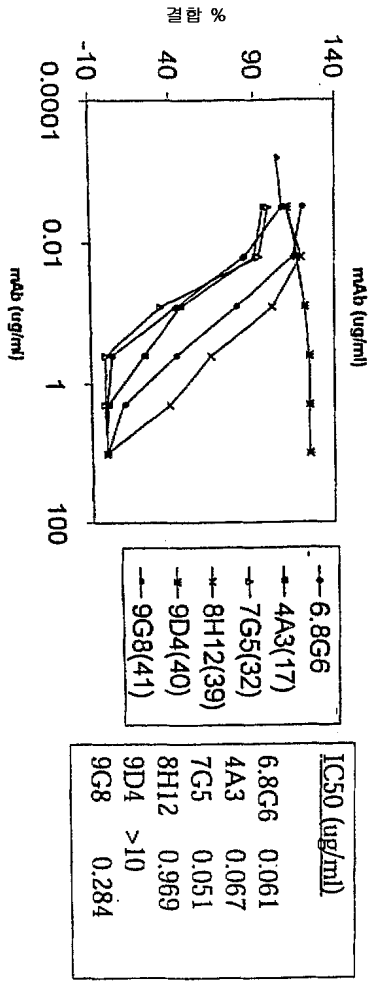


IC50s (ug/ml)
10D5: 0.042
6B5 : >30
8B4 : >30
8G6 : 0.023
2B1 : 0.008

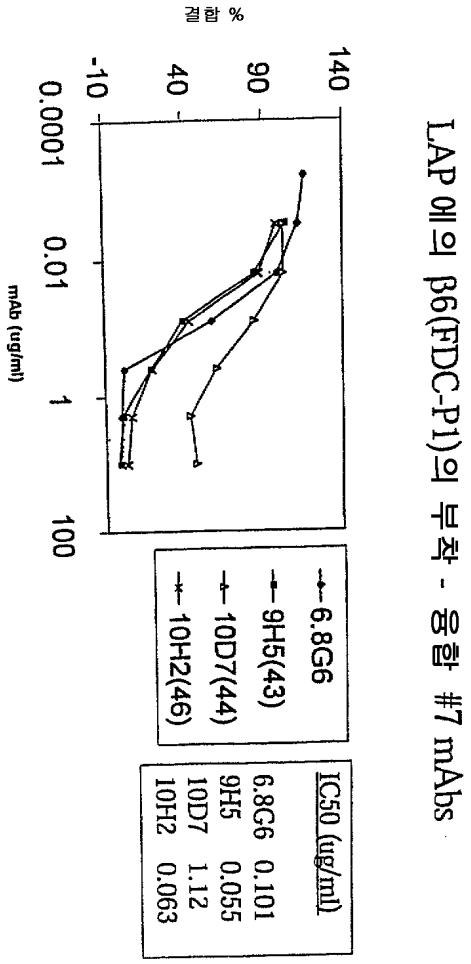
도면5c


LAP 에의 β6(FDC-P1)의 부착 - 융합 #7 mAbs
결합 %
130
110
90
70
50
30
10
-10
0.0001
0.01
1
100
6.8G6
1C10(2)
1G10(5)
2A1(6)
2F5(11)
2H2(12)
IC50 (ug/ml)
6.8G6 0.083
1C10 0.039
1G10 0.03
2A1 0.101
2F5 1.49
2H2 0.106

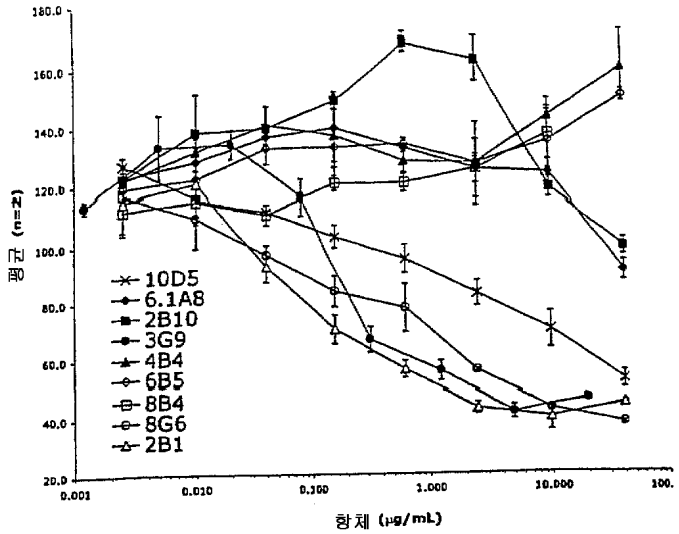
도면5d


결합 %
140
90
40
-10
0.0001
0.01
1
100
mAb (ug/ml)
mAb (ug/ml)
6.8G6
4A3(17)
7G5(32)
8H12(39)
9D4(40)
9G8(41)
IC50 (ug/ml)
6.8G6 0.061
4A3 0.067
7G5 0.051
8H12 0.969
9D4 >10
9G8 0.284

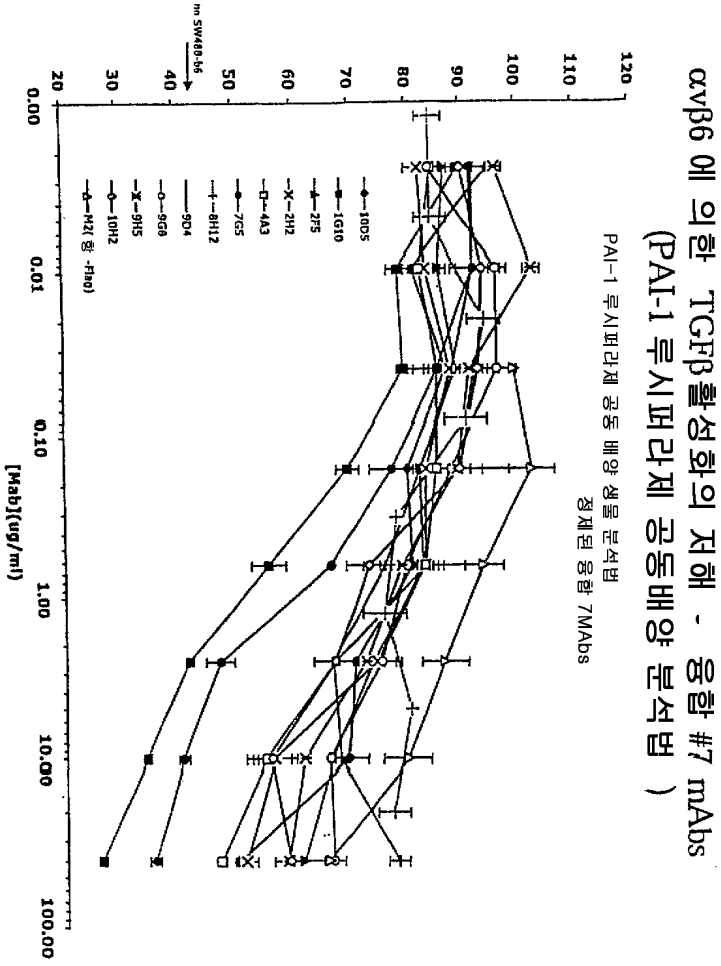
도면5e


LAP 에의 β6(FDC-P1)의 부착 - 융합 #7 mAbs
결합 %
140
90
40
-10
0.0001
0.01
1
100
mAb (ug/ml)
6.8G6
9H5(43)
10D7(44)
10H2(46)
IC50 (ug/ml)
6.8G6 0.101
9H5 0.055
10D7 1.12
10H2 0.063

도면6a


평균 (Z=n)
항체 (μg/mL)
10D5
6.1A8
2B10
3G9
4B4
6B5
8B4
8G6
2B1

도면6b

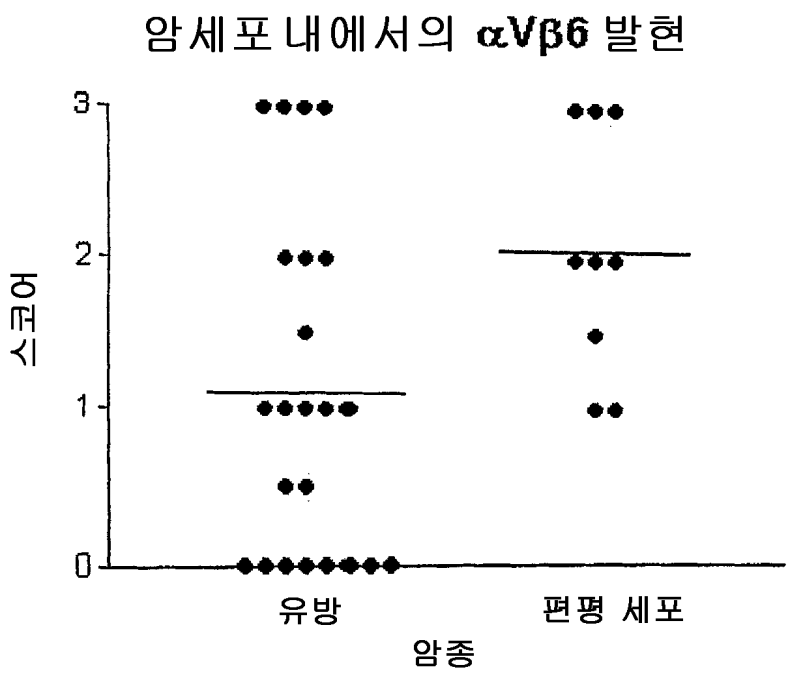

αvβ6 에 의한 TGFβ활성화의 저해 - 융합 #7 mAbs
(PAI-1 루시퍼라제 공동배양 분석법)
PAI-1 루시퍼라제 공동 배양 생물 분석법
정제된 융합 7MAbs
nm SW480-luc
[Mab](ug/ml)
0.00
0.01
0.10
1.00
10.00
100.00
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
10D5
1G10
2F5
2H2
4A3
7G5
8H12
9D4
9G8
9H5
10H2
M2(항 -Flag)

도면7a

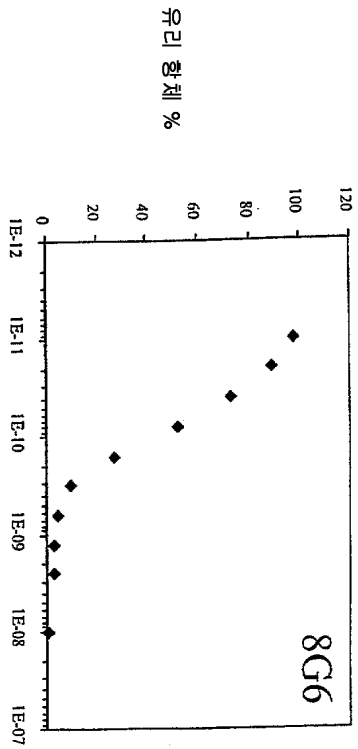
도면7b

6.1A8 (1) DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSIST-YSYIHWFQQKPGQPPKLIKYASN LESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYC
6.8G6 (1) DIVLTQSPASLAVSLGQRAIISCRASQSVSTSS-YSYMYWYQQKPGQSPKFIKYASN LESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYC
6.4B4 (1) DVVMTQTPRSLPVSLGDQASMSCRSSQSLKHSNGDTYLHWYLQKPGQSPNLIYKVSN RFSGVPDRFSGSGSGTEFTFKISRVEAEDLGVYFC
6.2A1 (1) DIVMTQSHKFMSTVVGDRVSITCKASLDVR-----TAVAWYQQKPGQSPKLIYSASYR YTGVPDRFTGSGSGTDFTFNIRSVQAEDLAVYYC
6.2G2 (1) DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSVTCKASQAVN-----TAVAWYQQKPGQSPKLIYSASYQ YTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC
7.1C5 (1) DIQMTQSPSSLSASLGERVNLTCRASQEISG-----YLSWLQQKPDGTIKRLIYAAST LDSGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDFGDYYC
7.1G10 (1) DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEISG-----YLSWLQQKPDGSIKRLIYAAST LDSGVPKRFSGSRSGADYSLTISSLESEDFADYYC
6.2B10 (1) QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVS-----YMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSK LASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAVDAATYYC
7.7G5 (1) QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVS-----YMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSK LASGVPTRFSGSGSGTSYSLTINSMEAEDAATYYC
6.2B1 (1) QIVLTQSPAIMSASPGEKVTLTCSASSSVSS---YLYWYQQKPGSSPKLWIYSTSN LASRVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAASYFC
6.3G9 (1) QIVLTQSPAIMSASPGEKVTLTCSANSSVSS---YLYWYQQKSGSSPKLWIYSTSN LASGVPVRFSGSGSGTSFSLTISSMEAEDAASYFC
6.1A8 (93) QHSWEIPYTFGGGTKVEIK 서열 번호:37
6.8G6 (93) QHNWEIPFTFGGGTKLEIK 서열 번호:38
6.4B4 (94) SQSTHVPYTFGGGTRLEIK 서열 번호:39
6.2A1 (89) QQHYGIPWTFGGGTKLEIK 서열 번호:63
6.2G2 (89) QHHYGVPWTFGGGTKLEIK 서열 번호:64
7.1C5 (89) LQYASYPYTFGGGAKLEIK 서열 번호:40
7.1G10 (89) LQYATYPYTFGGGTKLEIK 서열 번호:41
6.2B10 (88) QQWTSNPFTFGSGTKLGIK 서열 번호:42
7.7G5 (88) QQWSSHPPTFGAGTKLELK 서열 번호:43
6.2B1 (90) HQWSSYPPTFGGGTKLEIK 서열 번호:44
6.3G9 (90) HQWSTYPPTFGGGTKLEIK 서열 번호:45

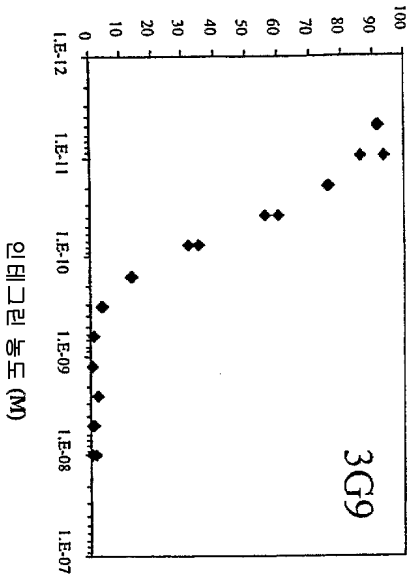
도면8


암세포 내에서의 αVβ6 발현
스코어
3
2
1
0
유방
편평 세포
암종

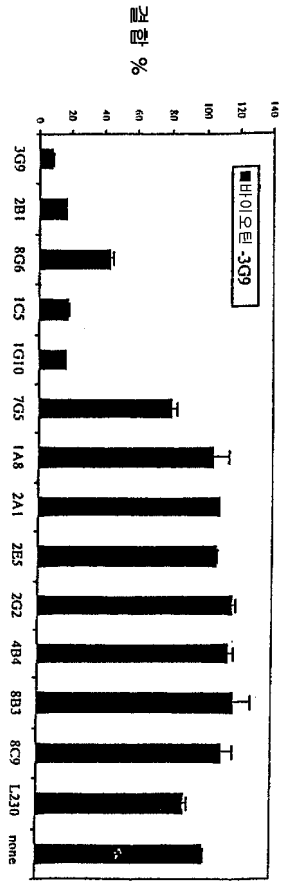
도면9a


유리 항체 %
0
20
40
60
80
100
120
1E-12
1E-11
1E-10
1E-09
1E-08
1E-07
8G6

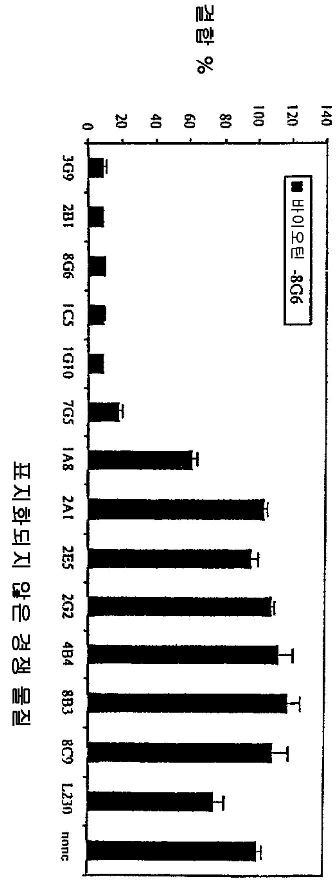
도면9b


유리 항체 %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1.E-12
1.E-11
1.E-10
1.E-09
1.E-08
1.E-07
인테그린 농도 (M)
3G9

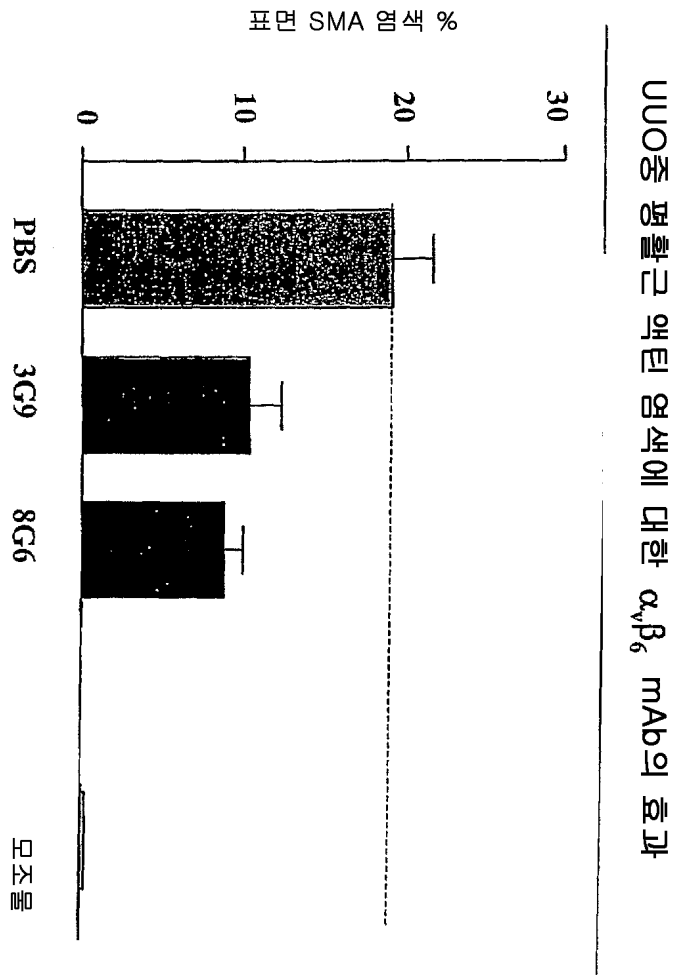
도면10a


결합 %
0
20
40
60
80
100
120
140
바이오틴-3G9
3G9
2B1
8G6
1C5
1G10
7G5
1A8
2A1
2E5
2G2
4B4
8B3
8C9
L230
none

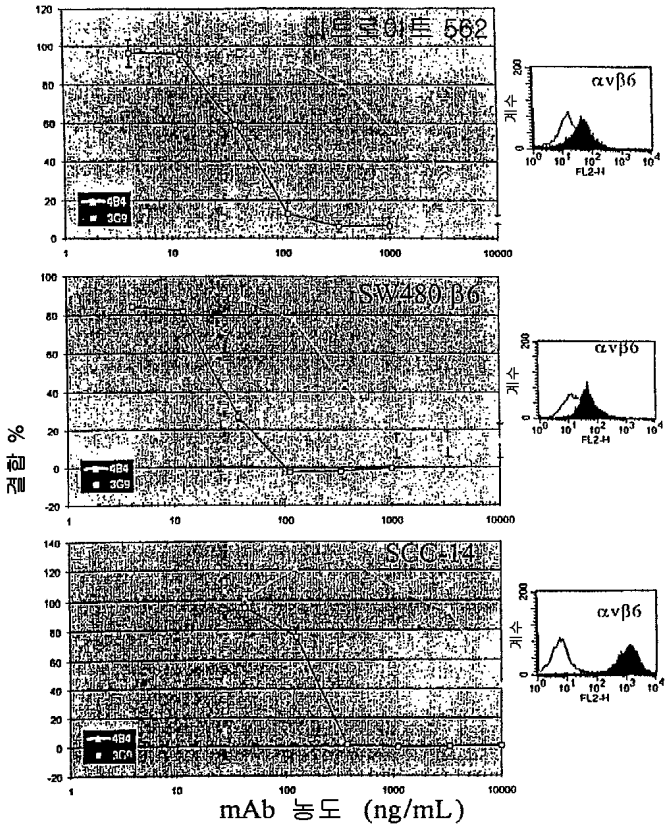
도면10b


결합 %
0
20
40
60
80
100
120
140
바이오틴 -8G6
3G9
2B1
8G6
1C5
1G10
7G5
1A8
2A1
2E5
2G2
4B4
8B3
8C9
L230
nonc
표지화되지 않은 경쟁 물질

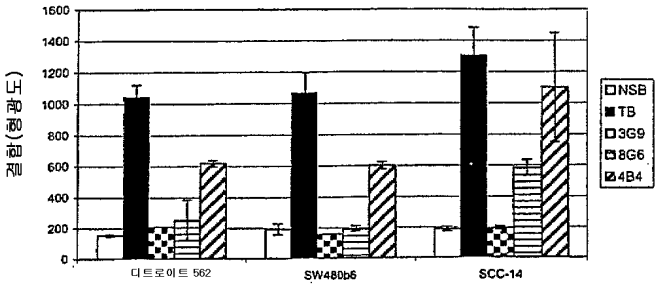
도면11


UUO중 평활근 액틴 염색에 대한 $\alpha_v\beta_6$ mAb의 효과
표면 SMA 염색 %
0
10
20
30
PBS
3G9
8G6
모조물

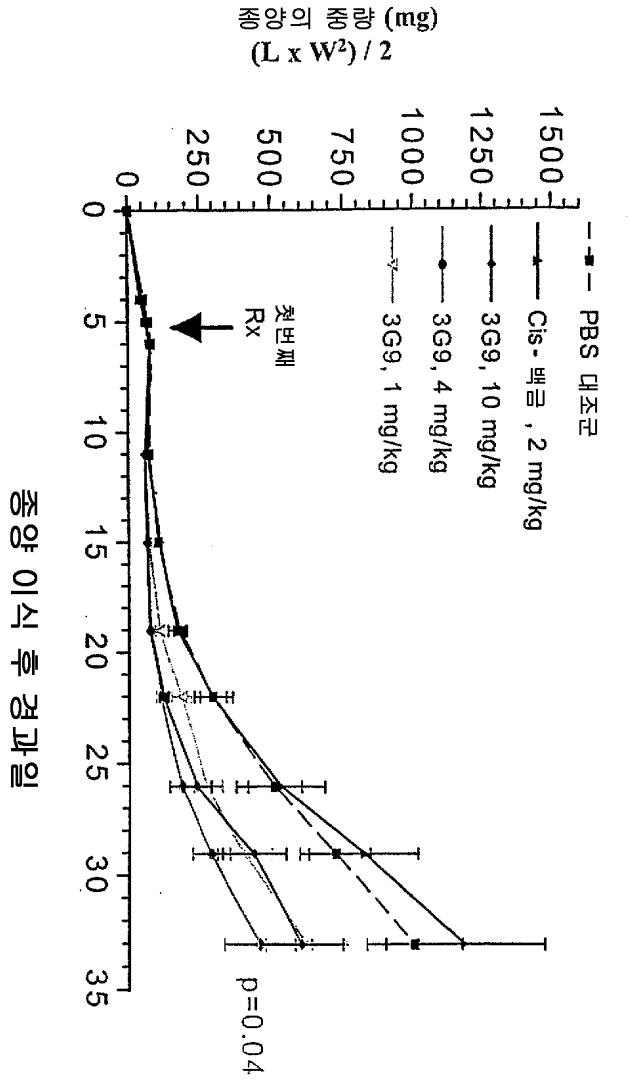
도면12


디트로이트 562
αvβ6
계수
FL2-H
SW480 β6
SCC-14
4B4
3G9
결합 %
mAb 농도 (ng/mL)

도면13

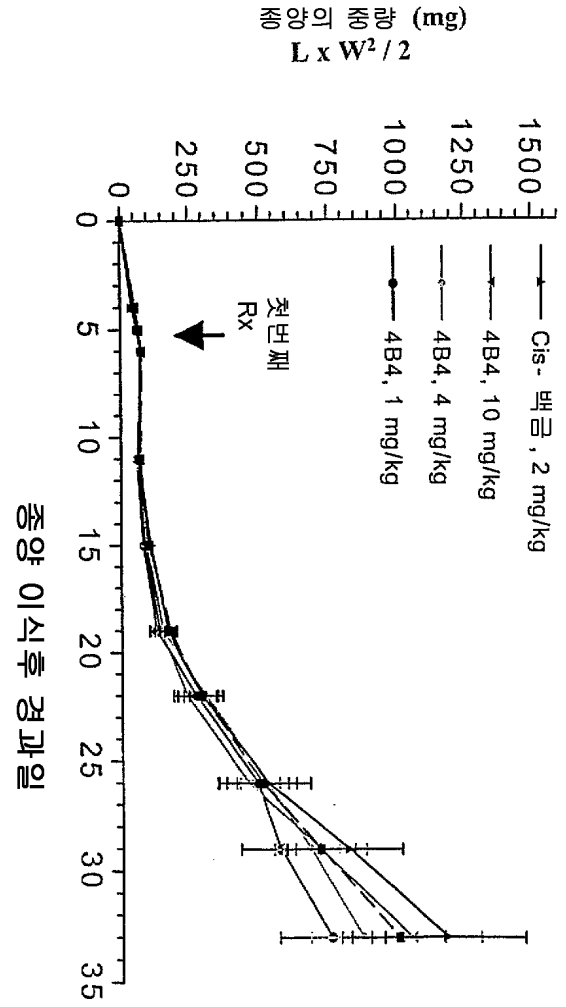

결합(형광도)
NSB
TB
3G9
8G6
4B4
디트로이트 562
SW480b6
SCC-14

도면14a



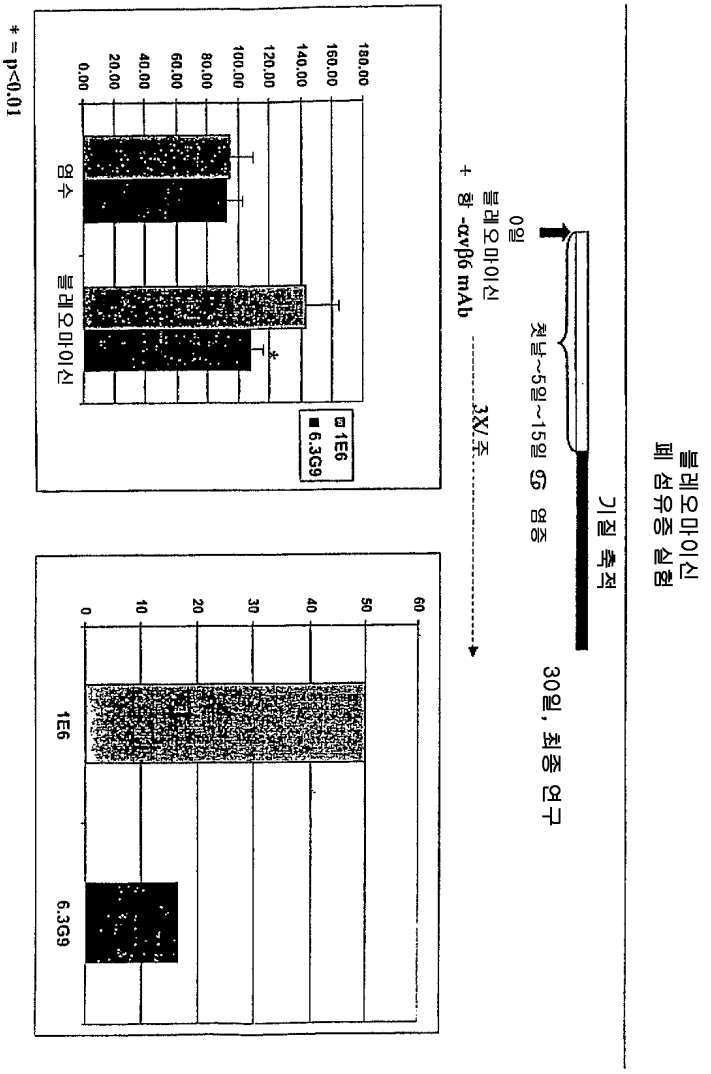
피하 이식된 디트로이트 562, 인간 인두 암종 세포주의, 3G9를 사용하는 **avß6** mAb 요법에 대한 반응

도면14b

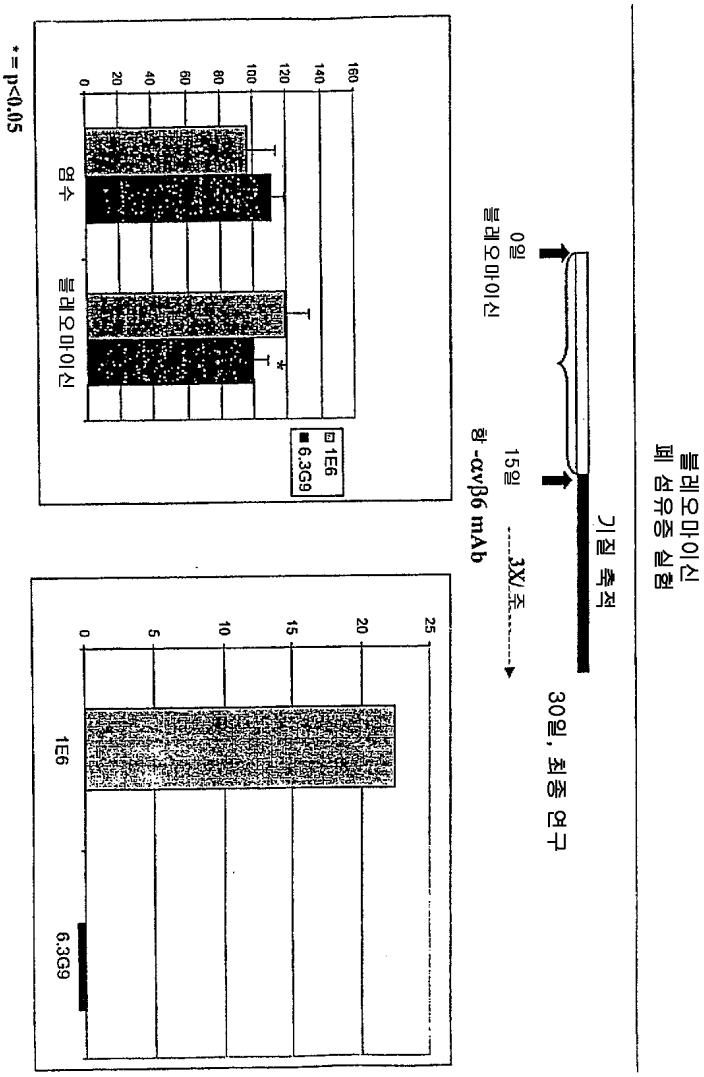


피하 이식된 디트로이트 562, 인간 인두 암종 세포주의, 4B4를 사용하는 **avß6** mAb 요법에 대한 반응

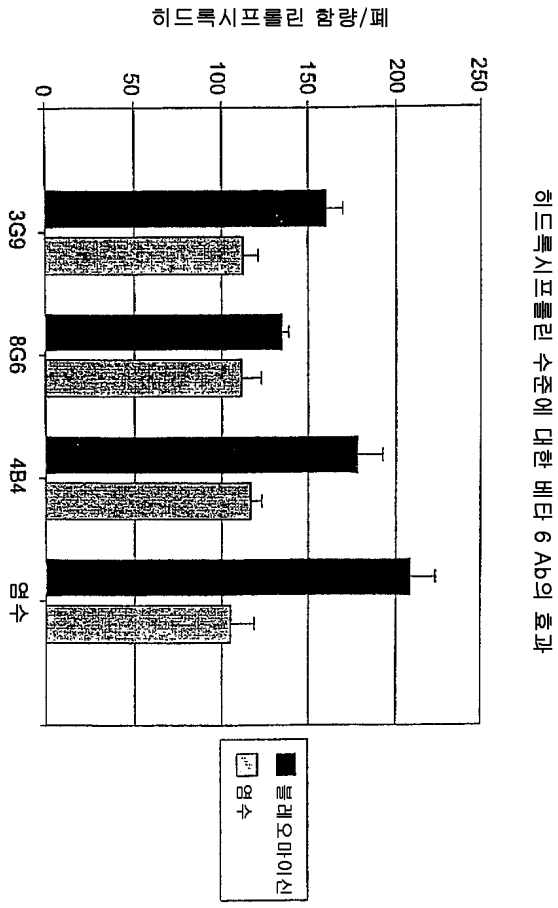
도면15a


블레오마이신
폐 섬유증 실험
기질 축적
첫날~5일~15일 ip 염증
30일, 최종 연구
0일
블레오마이신
+ 항 -αvβ6 mAb
3X/주
염수
블레오마이신
1E6
6.3G9
* = p<0.01
1E6
6.3G9

도면15b


블레오마이신
폐 섬유증 실험
기질 측적
0일
블레오마이신
15일
항-αvβ6 mAb
3X/주
30일, 최종 연구
160
140
120
100
80
60
40
20
0
염수
블레오마이신
1E6
6.3G9
* = p<0.05
25
20
15
10
5
0
1E6
6.3G9

도면15c



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> BIOGEN, INC.
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

<120> ANTI-ALPHA-V BETA-6 ANTIBODIES

<130> A136PCT

<140> PCT/US03/08048
<141> 2003-03-13

<150> 60/364,991
<151> 2002-03-13

<150> 60/426,286

<151> 2002-11-13

<160> 64

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1
Ser Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala Met His
1 5 10

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Ser Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met His
1 5 10

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Val Met Ser
1 5 10

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

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

<210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Ser Ile Ser Ser Gly Gly Arg Met Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)
<223> Arg or Gln

<400> 7
Gly Gly Leu Arg Arg Gly Asp Arg Pro Ser Leu Xaa Tyr Ala Met Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 8
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Gly Ala Ile Tyr Asp Gly Tyr Tyr Val Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Gly Ser Ile Tyr Asp Gly Tyr Tyr Val Phe Pro Tyr
1 5 10

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr Met Tyr
1 5 10 15

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr
1 5 10

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
Ser Ala Asn Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr
1 5 10

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13
Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15
Gln His Asn Trp Glu Ile Pro Phe Thr
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Tyr Thr
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17
His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr

1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18
His Gln Trp Ser Thr Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 19
<211> 126
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19
Gln Val Gln Phe Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Gly Ser Ser Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Leu Ser His Ala Lys Thr Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Asp Thr Tyr Tyr Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Glu Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Phe Arg Arg Gly Asp Arg Pro Ser Leu Arg Tyr Ala
100 105 110

Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 20
<211> 126
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Ser Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Lys Leu Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Leu Arg Arg Gly Asp Arg Pro Ser Leu Arg Tyr Ala
100 105 110

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

<210> 21
<211> 126
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Ser Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Ala Met His Trp Val Lys Leu Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Leu Arg Arg Gly Asp Arg Pro Ser Leu Gln Tyr Ala
100 105 110

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

<210> 22
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Met Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Lys Pro Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Met Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val His
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Arg Tyr Gly Thr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 23
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly 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 Arg Tyr
20 25 30

Val Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala 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 Ala
85 90 95

Arg Gly Ala Ile Tyr Asp Gly Tyr Tyr Val Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 24
<211> 120

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24
Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly 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 Arg Tyr
20 25 30

Val Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Arg Met Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala 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 Ala
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 25
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

```
         35                  40                  45

Gly Met Ile His Pro Ser Ile Ser Glu Thr Arg Leu Asn Pro Lys Phe
     50                  55                  60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Val Tyr
 65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Tyr Leu Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Gly Ser Asp Cys Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 26
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Gly Pro Gly Thr
  1               5                  10                  15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
             20                  25                  30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
         35                  40                  45

Gly Met Ile His Pro Ser Ile Ser Glu Thr Arg Leu Asn Pro Lys Phe
     50                  55                  60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Val Tyr
 65                  70                  75                  80

Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
                 85                  90                  95
```

Ala Arg Tyr Leu Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Val Leu Met Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Asn Leu Pro Gly Thr Arg Asn Asn Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
50 55 60

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

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

Arg Glu Ala Leu Gly Gly Asp Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 28
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Val Leu Met Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Asn Leu Pro Gly Thr Arg Asn Asn Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
50 55 60

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

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

Arg Glu Ala Leu Gly Gly Asp Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 29
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Val Leu Met Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Asp Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Asn Leu Pro Gly Thr Arg Asn Asn Tyr Asn Glu Asn Phe Lys

50 55 60

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

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

Arg Glu Ala Leu Gly Gly Asp Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 30
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Val Leu Ser Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
        115

<210> 31
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
  1   5   10   15

Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
             20   25   30

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
     50   55   60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65   70   75   80

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

Ala Arg His Val Leu Ser Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100   105   110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
        115

<210> 32
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Arg Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
  1   5   10   15

Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Val Leu Ser Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 33
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Arg Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Glu Lys Phe
50 55 60

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

65 70 75 80

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

Ala Arg His Val Leu Ser Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 34
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34
Gln Leu Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro
1 5 10 15

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

Ser Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Leu Asn Thr Lys Tyr Asn Glu
50 55 60

Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr
65 70 75 80

Val Tyr Met Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg His Glu Leu Asn Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 35
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Glu Lys Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Pro Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Glu Leu Asn Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 36
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

20 25 30

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

Gly Trp Leu Tyr Pro Gly Lys Ile Asn Thr Arg Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Ile Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Val Leu Asn Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 37
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Thr Tyr Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
85 90 95

Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 38
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Ser Tyr Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

Lys Phe Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Trp
85 90 95

Glu Ile Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 39
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Arg Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Met Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Lys His Ser
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Phe Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 40
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Asn Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
35 40 45

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

Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser

65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Ala Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 41
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Ser Ile Lys Arg Leu Ile
35 40 45

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

Ser Arg Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 42
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
             20                  25                  30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Arg Arg Trp Ile Tyr
         35                  40                  45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
     50                  55                  60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Val
 65                  70                  75                  80

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

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Gly Ile Lys
            100                 105
```

<210> 43
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
             20                  25                  30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
         35                  40                  45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly Ser
     50                  55                  60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Met Glu Ala Glu
 65                  70                  75                  80
```

```
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser His Pro Pro Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
            100                 105
```

<210> 44
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

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

Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
             20                  25                  30

Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
         35                  40                  45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Arg Val Pro Ala Arg Phe Ser
     50                  55                  60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65                  70                  75                  80

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

Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 45
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

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

```
  1               5                  10                  15

Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Asn Ser Ser Val Ser Ser Ser
             20                  25                  30

Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
         35                  40                  45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65                  70                  75                  80

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

Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 46
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

```
Val Ile Asp Thr Tyr Tyr Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Glu
  1               5                  10                  15

Gly
```

<210> 47
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

```
Gly Gly Phe Arg Arg Gly Asp Arg Pro Ser Leu Arg Tyr Ala Met Asp
  1               5                  10                  15
```

Ser

<210> 48
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ile Ser Thr Tyr Ser Tyr Ile His
1 5 10 15

<210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49
Gly Tyr Asp Phe Asn Asn Asp Leu Ile Glu
1 5 10

<210> 50
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50
Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu
1 5 10

<210> 51
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51
Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 52
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52
Val Ile Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 53
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53
Ile Tyr Tyr Gly Pro His Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54
Ile Asp Tyr Ser Gly Pro Tyr Ala Val Asp Asp
1 5 10

<210> 55
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55
Lys Ala Ser Leu Asp Val Arg Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 56
<211> 11

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56
Lys Ala Ser Gln Ala Val Asn Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57
Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58
Ser Ala Ser Tyr Gln Tyr Thr
1 5

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59
Gln Gln His Tyr Gly Ile Pro Trp Thr
1 5

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60
Gln His His Tyr Gly Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 61
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ala Ile Asp Tyr Ser Gly Pro Tyr Ala Val Asp Asp Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 62
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Asn Asn Asp

20 25 30

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

Ala Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Met Ile Tyr Tyr Gly Pro His Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 63
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Val Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Leu Asp Val Arg Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Asn Ile Arg Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Gly Ile Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 64
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ala Val Asn Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Gly Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Val Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105