



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년03월17일
 (11) 등록번호 10-1368596
 (24) 등록일자 2014년02월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2009-7003942
 (22) 출원일자(국제) 2007년08월17일
 심사청구일자 2011년10월17일
 (85) 번역문제출일자 2009년02월25일
 (65) 공개번호 10-2009-0054968
 (43) 공개일자 2009년06월01일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2007/076160
 (87) 국제공개번호 WO 2008/022295
 국제공개일자 2008년02월21일
 (30) 우선권주장
 60/838,648 2006년08월18일 미국(US)
 60/946,360 2007년06월26일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 J. Biological chemistry. 2001, Vol. 276, No. 27, pp. 24760-24766
 J. Biological chemistry. 2001, Vol. 276, No. 44, pp. 41086-41094
 전체 청구항 수 : 총 21 항

(73) 특허권자
조마 테크놀로지 리미티드
 미국 94710 캘리포니아주 버클리 세븐쓰 스트리트 2910 조마 (유에스) 엘엘씨 씨/오
노바르티스 아게
 스위스 바젤 씨에이치-4056 리크트스트라세 35
 (72) 발명자
베딩거 대니얼
 미국 95687 캘리포니아 바카빌 로빈 서클 451
다미아노 제이슨
 미국 94662-8097 캘리포니아 에머리빌 포스트 오 피스 박스 8097 노바르티스 아게 인터렉츠크얼 프티 퍼티 알-338
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
김성기, 김진희

심사관 : 이미옥

(54) 발명의 명칭 **PRLR 특이적 항체 및 그 용도**

(57) 요약

PRLR 특이적 항체, 그러한 항체를 함유하는 제약 조성물, 제약 조성물을 함유하는 키트 및 암의 예방 및 치료 방법이 제공된다.

(72) 발명자

루크만 모하메드

미국 94662-8097 캘리포니아 에머리빌 포스트 오피스 박스 8097 노바르티스 아게 인터랙츄얼 프로퍼티 알-338

마사트 린다

미국 94610 캘리포니아 오클랜드 #310 마리포사 애비뉴 612

미르자 아머

미국 94118 캘리포니아 샌 프란시스코 식스 애비뉴 271

노넷 제네비브

미국 94708 캘리포니아 버클리 그리즐리 피크 블러바드 739

특허청구의 범위

청구항 1

10^{-6} M 이하의 평형 해리 상수(K_D)로 서열 번호 2의 PRLR의 세포의 도메인에 결합하며, (a) 서열 번호 88의 아미노산 서열의 24~38번 위치, 54~60번 위치 및 93~101번 위치에 제시된 상보성 결정 영역(CDR) 및 (b) 서열 번호 90의 31~35번 위치, 50~66번 위치 및 99~113번 위치에 제시된 CDR을 포함하는 단리된 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 가공 항체, 인간 항체, 단일쇄 항체 또는 항체 단편인 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 인간 항체 서열의 불변 영역 및 인간 항체 서열의 하나 이상의 중쇄 및 경쇄 가변 골격구조 영역을 포함하는 것인 항체.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 인간 항체 서열이 개별 인간 서열, 인간 공통 서열, 개별 인간 생식세포 서열 또는 인간 공통 생식세포 서열인 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 중쇄 불변 영역이 변형된 또는 비변형된 IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, 이들의 단편 또는 이들의 조합인 항체.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 중쇄 불변 영역이 변형된 또는 비변형된 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4인 항체.

청구항 7

제1항에 있어서, PRLR에 대해 10^{-7} M, 10^{-8} M 또는 10^{-9} M 이하의 평형 해리 상수(K_D)를 갖는 것인 항체.

청구항 8

제1항에 있어서, 경쇄 불변 영역이 변형된 또는 비변형된 람다 경쇄 불변 영역, 카파 경쇄 불변 영역, 이들의 단편 또는 이들의 조합인 항체.

청구항 9

제1항에 있어서, PRLR 세포내 인산화를 억제하는 것인 항체.

청구항 10

제1항에 있어서, Stat5 인산화의 유도를 억제하는 것인 항체.

청구항 11

제1항에 있어서, 유방암 세포의 증식을 억제하는 것인 항체.

청구항 12

제1항에 있어서, 다른 진단제 또는 치료제에 접합된 것인 항체.

청구항 13

제1항에 있어서, 95 중량% 이상의 균질도로 정제된 것인 항체.

청구항 14

제13항의 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 유방암, 전립선암 및 림프종 치료용 제약 조성물.

청구항 15

용기 내에 포장된, 치료 유효량의 제1항의 항체를 포함하는 키트로서, 제2의 치료제를 포함하고, 용기에 부착되거나 용기와 함께 포장된, 용기의 내용물을 표시하고 용기의 내용물을 유방암을 치료하기 위해 사용하는 것에 관한 지침 또는 지시사항을 제공하는 라벨을 추가로 포함하는 키트.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 용기가 바이알(vial) 또는 바틀(bottle) 또는 사전 충전형 주사기인 키트.

청구항 17

서열 번호 88의 경쇄 가변 아미노산 서열 및 서열 번호 90의 중쇄 가변 아미노산 서열을 포함하는, PRLR의 세포 외 도메인에 결합하는 단리된 항체.

청구항 18

제1항에 있어서, 쥐과동물 PRLR의 세포외 도메인에 대한 평형 해리 상수(K_D)의 1/10,000~1/15,000 이하의 K_D 로 인간 PRLR의 세포외 도메인에 결합하는 것인 항체.

청구항 19

제1항에 있어서, 인간 PRLR의 세포외 도메인, 쥐과동물 PRLR의 세포외 도메인 및 래트 PRLR의 세포외 도메인에 결합하는 것인 항체.

청구항 20

제19항에 있어서, 10^{-6} M 이하의 평형 해리 상수(K_D)로 쥐과동물 및 래트 PRLR의 세포외 도메인에 결합하는 것인 항체.

청구항 21

제20항에 있어서, 서열 번호 88의 경쇄 가변 아미노산 서열 및 서열 번호 90의 중쇄 가변 아미노산 서열을 포함하는 항체가 결합하는 것과 동일한 에피토프에 결합하는 것인 항체.

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

명세서

기술분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 미국 가특허출원 제60/946,360호(2007년 6월 26일 출원) 및 미국 가특허출원 제60/838,648호(2006년 8월 18일 출원)에 대한 우선권을 주장한다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 발명은 PRLR 특이적 항체를 투여함으로써 암을 예방 및 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 암은 미국에서 두 번째 사망 원인이다. "암"이라는 용어가 유방, 전립선, 폐, 결장, 췌장 등의 많은 다른 유형의 암을 지칭하는 것이기는 하지만, 각 유형의 암은 표현형 및 유전자 수준에서 상이하다. 조절되지 않은 성장이라는 암의 특징은 하나 이상의 유전자의 발현이 돌연변이로 인해 비정상적으로 조절되고, 세포 성장이 더 이상 조절될 수 없을 때 나타난다.

[0006] 유전자는 종종 암 유전자 및 종양 억제 유전자라는 두 부류로 분류된다. 암 유전자는 그의 정상적 기능이 특수한 조건하에서만 세포 성장을 촉진하는 것인 유전자이다. 암 유전자는 돌연변이가 일어났을 때 그와 같은 조절 기능을 상실하여 어느 조건하에서든 성장을 촉진한다. 그러나, 암이 성공적이기 위해서는 종양 억제 유전자에서도 반드시 돌연변이가 일어나야 한다는 것이 밝혀졌다. 종양 억제 유전자의 정상적 기능은 세포 성장을 정지시키는 것이다. 종양 억제 유전자의 예는 p53, p16, p21 및 APC를 포함하며, 이들 모두는 정상적으로 작용하는 경

우, 세포가 조절할 수 없을 정도로 분열하고 성장하는 것을 막는다. 종양 억제 유전자가 변이되거나 상실될 때, 세포 성장의 정지 기능도 상실되어 세포는 아무런 저항없이 성장하게 된다.

- [0007] 프롤락틴 수용체(PRLR)는 단일막-스패닝 클래스 1 사이토카인 수용체로서, 사이토카인 슈퍼패밀리 구성원에 대한 수용체, 예컨대, IL2, IL3, IL4, IL6, IL7, 에리쓰로포이에틴 및 GM-CSF 수용체에 유사하다. PRLR은 세포 성장, 분화, 발달, 락테이트화 및 생식을 포함하는 여러 생물학적 기능에 관여한다. PRLR은 고유의 티로신 키나제 활성화는 없으며, 리간드 결합은 수용체 이량체화, Jak2의 교차-인산화 및 하류 시그널링에 이르게 한다. 인간 프롤락틴 수용체 cDNA는 간암 및 유방암 라이브러리로부터 처음으로 단리되었다(Boutin, J.- M. et al., *Molec. Endocr.* 3: 1455-1461, 1989). 뉴클레오티드 서열은 래트 간 PRL 수용체보다 훨씬 긴 세포질 도메인을 갖는 598개 아미노산의 성숙 단백질을 예상케하였다. 프롤락틴 수용체 유전자는 5;13-p12으로 맵핑된, 성장 호르몬 수용체 유전자와 같은 염색체 영역에 존재한다(Arden, K. C. et al. *Cytogenet. Cell Gene* 53: 161-165, 1990; Arden, K.C. et al., (Abstract) *AM. J. Hum. Genet.* 45 (suppl.): A129 only, 1989). 성장 호르몬도 또한 프롤락틴 수용체에 결합하여 수용체를 활성화시킨다.
- [0008] 인간 PRLR 유전자의 계놈 구조가 결정되었다(Hu, Z.- Z. et al., *J. Clin. Endocr. Metab.* 84: 1153-1156, 1999). PRLR 유전자의 5'-비번역 영역은 2개의 선택적 제1 엑손, 즉, 래트 및 마우스 E13의 인간 대응체인 E13, 및 E1N으로 지칭되는 신규한 인간형의 선택적 제1 엑손을 함유한다. 5'-비번역 영역은 또한 통상의 비코딩 엑손 2 및 엑손 3의 일부를 함유하는데, 이는 번역 개시 코돈을 함유한다. E13 및 E1N 엑손은 각각 800개 염기쌍 이내이다. 이들 두 개의 엑손은 인간 유방 조직, 유방암 세포, 생식선 및 간에서 발견된다. 전체적으로, E13을 함유하는 전사물이 대부분의 조직에서 우세하다. PRLR 유전자 생성물은 엑손 3 내지 10에 의해 코딩되며, 이중 엑손 10은 세포내 도메인의 대부분을 코딩한다. E13 및 E1N 엑손은 각각 선택적 프로모터 PIII 및 PN에 의해 전사된다. PIII 프로모터는 설치류 프로모터에 있는 것과 동일한 Sp1 및 C/EBP 요소를 함유하며, 래트 및 마우스 중 영역 -480/-106에 81% 유사하다. PN 프로모터는 ETS 패밀리 단백질에 대한 추정적 결합 부위 및 핵 수용체를 위한 반-부위를 함유한다.
- [0009] PRLR은 그들의 세포질 도메인의 길이에서 차이가 나는 다수의 상이한 동형체(isoform)로 존재한다. 4 개의 PRLR mRNA 동형체(L, I, SIa, 및 SIb)가 인간 피하 복강내 지방 조직 및 유방 지방 조직에서 밝혀졌다(Ling, C. et al., *J. Clin. Endocr. Metab.* 88: 1804-1808, 2003). 또한, 면역블롯 분석을 통하여 인간 피하 복강 지방 조직 및 유방 지방 조직에서 L-PRLR 및 I-PRLR 단백질 발현이 검출되었다. PRL은 대조군과 비교할 때 인간 지방 조직에서 리포프로테인 리파제 활성을 감소시켰다. 링(Ling) 등은 이와 같은 결과가 기능적 PRLR을 통해 인간 지방 조직에서 LPL 활성을 감소시키는 PRL의 직접적인 효과를 증명하는 것이며, LPL이 락테이트화 중에 이와 같은 방식으로 조절될 수도 있다는 것을 암시하는 것이라고 시사하였다. 래트에 있어서 이들 PRLR 동형체의 기능은 밝혀진 바 있다(Perrot-Appianat, M. et al., *Molec. Endocr.* 11: 1020-1032, 1997). 알려진 긴 형태(591개 아미노산)의 것과 마찬가지로, 세포질 도메인의 198개 아미노산이 결여된 Nb2 형도 락테이트 생산 시그널을 전달할 수 있다. 이와는 대조적으로, 세포질 도메인의 291개 아미노산이 결여된 짧은 형태는 불활성이다. 짧은 형태의 기능을 긴 형태 및 짧은 형태를 코트랜스펙션한 후 검사하였다. 결과는, 짧은 형태가 불활성 헤테로이량체 형성을 통해 우성-음성 억제제로 작용함으로써 결과적으로 제이너스(Janus) 키나제 2 활성을 억제하는 것으로 나타났다. 페롯-애플라넷(Perrot-Appianat) 등은 PRLR의 헤테로이량체화가 PRL 전사를 양성적으로 또는 음성적으로 활성화시킬 수 있음을 시사하였다.
- [0010] 최근의 보고는 인간 유방암 및 전립선암 조직에서 PRLR이 과다발현됨을 시사한 바 있다(Li et al., *Cancer Res.*, 64:4774-4782, 2004; Gill et al., *J Clin Pathol.*, 54:956-960, 2001; Touraine et al., *J Clin Endocrinol Metab.*, 83:667-674, 1998). 리(Li) 등은 54%의 전립선암 표본에서 Stat5 활성화 및 PRLR 발현이 높은 조직학적 등급과 관련이 있음을 보고하였다(Li et al., 상기 문헌). 다른 보고는 일차 유방암 표본이 콜로니 형성 분석에서 PRL에 대해 반응성이며, 혈장 PRL 농도가 유방암 위험과 상관이 있음을 시사하였다(Tworoger et al., *Cancer Res.*, 64:6814-6819, 2004; Tworoger et al., *Cancer Res.*, 66:2476-2482, 2006). 또 다른 보고는 PRL 트랜스제닉 마우스가 악성 유선 암종 또는 전립선 비대를 발달시켰음을 나타냈다(Wennbo et al., *J Clin Invest.*, 100:2744-2751, 1997; Wennbo et al., *Endocrinology*, 138:4410-4415, 1997).
- [0011] PRLR 모노클로날 항체는 마우스에서 유선 종양의 발발을 감소시켰다(Sissom et al., *Am. J. Pathol.* 133:589-595, 1988). 또한, PRL 길항제(S179D 변이PRL)는 시험관 내에서 인간 전립선 암종 세포주인 DU-145의 증식을 억제하였고, 생체내에서 DU-145 유도 종양을 억제하였다(Xu et al., *Cancer Res.*, 61:6098-6104, 2001).
- [0012] 따라서, 위와 같은 암에서 PRLR 및 그의 역할을 조절하는 조성물 및 방법을 찾아낼 필요가 있다. 본 발명은 이

들 뿐만 아니라 다른 중요한 필요를 충족시키는 것에 관한 것이다.

발명의 상세한 설명

[발명의 개요]

[0013]

[0014]

PRLR에 대한 뉴클레오티드 서열은 서열 번호 1에 나타나 있고, 아미노산 서열은 서열 번호 2에 나타나 있다. 세포의 도메인(ECD)은 서열 번호 2의 아미노산 25 내지 234로 구성되며, 이는 두 개의 주요 도메인, 즉 S1(아미노산 25 내지 122) 및 S2(아미노산 123 내지 234)로 나뉠 수 있다. PRLR의 다수의 다른 동형체가 확인되었다: 긴 형태(L), 중간 형태(I), ΔS1, 불활성 가용성 형태(PRLBP), 및 불활성 짧은 형태인 S1a 및 S1b. 각 동형체 내에 함유된 엑손 및 뉴클레오티드 영역은 도 1에 도시되어 있다. 예시적 실시태양에서, 본 발명은 S1 도메인 및(또는) S2 도메인에 결합하는 항체에 관한 것이다. S2 도메인에 결합하는 항체는 모든 활성 동형체를 표적으로 할 수 있다. 본 발명은 또한 하나의 동형체에 특이적으로 결합하지만 다른 동형체에는 결합하지 않는(예컨대, 중간 형태에는 결합하지만 S1a 또는 S1b에는 결합하지 않는) 항체, 또는 활성 동형체(긴 형태, 중간 형태 및 ΔS1)에는 결합하지만 불활성 동형체(S1a 및 S1b)에는 결합하지 않는 항체에 관한 것이다.

[0015]

본 발명의 물질 및 방법은 당 분야의 상기한 바와 같은 또한 다른 관련된 필요를 충족시킨다.

[0016]

하나의 실시태양에서, PRLR의 세포의 도메인과 10^{-6} M 이하의 평형 해리 상수(K_D)로 결합하며, PRLR에의 결합에 대해 항체 chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 또는 XHA.06.907 중 어느 하나와 75%를 초과하는 정도로 경쟁하는 항체가 제공된다. " 10^{-6} M 이하의 평형 해리 상수(K_D)"란 평형 해리 상수가, 예컨대, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M 또는 10^{-12} M(즉, 10^{-6} M보다 낮은 숫자)인 것을 의미한다. 또 다른 실시태양에서, 항체는 항체 chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 또는 XHA.06.907 중 어느 하나와 동일한 PRLR 에피토프에 결합한다.

[0017]

또 다른 실시태양에서, 상기한 바와 같은 항체는 항체 chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 또는 XHA.06.907 중 어느 하나의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 CDR을 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 상기한 항체는 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 가공 항체(human engineered antibody), 인간 항체, 단일쇄 항체 또는 항체 단편이다. 또 다른 실시태양에서, 상기한 바와 같은 항체로서 CDR 내 하나 이상의 아미노산이 다른 항-PRLR 항체의 상응하는 CDR의 상응하는 잔기로 치환된 항체가 제공된다. 예시적 실시태양에서, 상기한 바와 같은 항체로서, chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 또는 XHA.06.907로 구성되는 군에서 선택되는 항체로부터의 CDR 내 하나 이상의 아미노산이 다른 항-PRLR 항체의 상응하는 CDR의 상응하는 잔기로 치환된 항체가 제공된다. 또 다른 예시적 실시태양에서, 상기한 바와 같은 항체로서, chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2,

he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 또는 XHA.06.907로 구성되는 군에서 선택되는 항체로부터의 CDR 내 하나 이상의 아미노산이, chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 또는 XHA.06.907로 구성되는 군에서 선택되는 다른 항체의 상응하는 CDR의 상응하는 잔기로 치환된 항체가 제공된다. 또 다른 실시태양에서, 상기한 바와 같은 항체로서, CDR 내 하나 또는 두 개의 아미노산이 변형된 항체가 포함된다.

[0018] 본 발명의 또 다른 실시태양에서, 상기한 바와 같은 항체로서, 항체 chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 또는 XHA.06.907의 경쇄 또는 중쇄 가변 영역에 대하여 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보유하는 항체가 제공된다.

[0019] 또 다른 실시태양에서, 상기 항체는 인간 항체 서열의 불변 영역 및 인간 항체 서열의 하나 이상의 중쇄 및 경쇄 가변 골격구조 영역을 포함한다. 본 발명의 또 다른 실시태양에서, 상기한 바와 같은 항체로서, 인간 항체 서열이 개별 인간 서열, 인간 공통 서열(human consensus sequence), 개별 인간 생식세포 서열 또는 인간 공통 생식세포 서열인 항체가 제공된다.

[0020] 또 다른 실시태양에서, 상기한 바와 같은 항체로서, 중쇄 불변 영역이 변형 또는 비변형된 IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, 이들의 단편 또는 이들의 조합인 항체가 제공된다. 또 다른 실시태양에서, 상기한 바와 같은 항체로서, 중쇄 불변 영역이 변형 또는 비변형된 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4인 항체가 제공된다. 또 다른 실시태양에서, 상기한 바와 같은 항체로서, PRLR에 대한 평형 해리 상수가 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} 또는 10^{-9} M 이하인 항체가 제공된다. 다른 실시태양에서, CDR 내에 보존적 치환을 포함하는 상기한 바와 같은 항체가 제공된다. 또 다른 실시태양에서, 상기한 바와 같은 항체로서, 저위험 및 중간 위험 잔기에서 보존적 또는 비보존적 변형을 포함하는 항체가 제공된다. 다른 실시태양에서, 상기한 바와 같은 항체로서, 경쇄 불변 영역이 변형 또는 비변형된 람다 경쇄 불변 영역, 카파 경쇄 불변 영역, 그의 단편 또는 조합인 항체가 제공된다.

[0021] 또 다른 실시태양에서, 상기한 바와 같은 항체로서, PRLR 이량체화를 억제하고, PRLR 세포내 인산화를 억제하고, MAPK 인산화의 유도를 억제하고, Stat5 인산화의 유도를 억제하고, AKT 인산화의 유도를 억제하고(거나) PRL의 PRLR에의 결합을 억제하는 항체가 제공된다.

[0022] 다른 실시태양에서, 상기한 바와 같은 항체는 추가로 VEGF 생산 및(또는) 혈관신생을 억제한다.

[0023] 또 다른 실시태양에서, 상기한 바와 같은 항체로서, 암 세포의 증식을 억제하는 항체가 제공된다. 다른 실시태양에서, 항체는 유방, 전립선 또는 폐 암 세포의 증식을 억제한다.

[0024] 암에 더하여, 본 발명의 다른 실시태양에서는, 자가면역 및 염증성 질환 또는 질병의 예방 및 치료를 위한 상기한 바와 같은 항체를 제공한다. 항체는 특히 자가면역 및(또는) 염증 성분을 포함하는 질환을 예방, 완화 또는 치료하는 데 특히 유용하다. 이들 질환은 자가면역 및 염증성 질환으로서, 전신성 홍반성 낭창(SLE), 원판상 루프스, 루프스 신염, 유육종증, 비제한적으로 소아 관절염, 류마티스 관절염, 건선 관절염, 라이터 증후군, 강직성 척추염 및 통풍성 관절염을 포함하는 염증성 관절염, 기관 또는 조직 이식의 거부 반응, 초급성, 급성 또는 만성 거부 반응 및(또는) 이식편 대 숙주 질환, 다발성 경화증, 과다 IgE 증후군, 결절성 다발동맥염, 원발성 담즙성 경화증, 염증성 장 질환, 크론병, 셀리악병(글루텐-민감성 장질환), 자가면역 간염, 악성 빈혈, 자가면역 용혈성 빈혈, 건선, 피부경화증, 중증 근무력증, 자가면역 혈소판감소 자반증, 자가면역 갑상선염, 그레이브 병, 하시모토(Hashimoto) 갑상선염, 면역 복합 질환, 만성피로 면역이상 증후군(CFIDS), 다발성 근염 및 피부근

염, 한냉 글로불린혈증, 혈전용해증, 심근증, 심상성 천포창, 폐 간질 섬유증, 타입 I 및 타입 II 당뇨병, 타입 1, 2, 3 및 4 지연형 과민반응, 알러지 또는 알러지성 질환, 치료 단백질에 대한 원하거나 의도되지 않은 면역 반응, 천식, 처그-스트라우스(Churg-Strauss) 증후군(알러지성 육아종증), 아토피성 피부염, 알러지성 및 자극성 접촉 피부염, 두드러기, IgE 매개 알러지, 죽상동맥경화증, 혈관염, 특발성 염증성 근질환, 용혈성 질환, 알츠하이머병, 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증 등을 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0025] 또 다른 실시태양에서, 상기한 바와 같은 항체로서, 다른 진단제 또는 치료제에 접합된 항체가 제공된다.

[0026] 다른 실시태양에서, PRLR의 ECD를 포함하는 폴리펩티드를, 항체 chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 및 XHA.06.907의 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 CDR을 포함하는 후보 항체와 접촉시키는 단계; 상기 폴리펩티드에 대한 상기 후보 항체의 결합 친화도를 검출하는 단계; 및 10^{-6} M 이하의 평형 해리 상수가 검출되는 경우, 상기 후보 항체를 암 치료에 유용한 항체로서 확인하는 단계를 포함하는, 암 치료에 유용한 PRLR 단백질의 세포외 도메인에 대한 항체를 스크리닝하는 방법이 제공된다.

[0027] 또 다른 실시태양에서, 항체 chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 및 XHA.06.907의 CDR 내 1개 또는 2개의 아미노산에 변형을 포함하는 후보 항체를 제조하는 단계; PRLR의 ECD를 포함하는 폴리펩티드를 상기 후보 항체와 접촉시키는 단계; 상기 폴리펩티드에 대한 상기 후보 항체의 결합 친화도를 검출하는 단계; 및 10^{-6} M 이하의 평형 해리 상수가 검출되는 경우, 상기 후보 항체를 암 치료에 유용한 항체로서 확인하는 단계를 포함하는, 항체를 체계적으로 변경하여 암 치료에 유용한 PRLR 단백질의 세포외 도메인에 대한 항체를 스크리닝하는 방법이 제공된다.

[0028] 다른 실시태양에서, 유방, 폐 또는 전립선 암 세포를, 항체 chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 및 XHA.06.907의 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 CDR을 포함하는 후보 항체, 또는 하나 이상의 CDR 내에 1개 또는 2개 아미노산의 변형을 포함하는 항체와 접촉시키는 단계; 상기 세포의 증식 또는 생존을 검출하는 단계; 및 세포 증식 또는 생존의 감소가 검출되는 경우, 상기 후보 항체를 암 치료에 유용한 항체로서 확인하는 단계를 포함하는, 암 치료에 유용한 PRLR 단백질의 세포외 도메인에 대한 항체를 스크리닝하는 방법이 제공된다.

[0029] 다른 실시태양에서, 상기 항체를 0, I, II, III, IV 또는 V기 암 환자를 포함하는 암을 앓고 있는 피험체에 치료 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 상기 피험체에서 암을 치료하는 방법이 제공된다. 관련 실시태양에서, 암은 유방암, 폐암 또는 전립선암이다. 또 다른 실시태양에서, 제2의 치료제가 투여된다. 예시적 실시태양에서, 제2의 치료제는 독소루비신, 다우노루비신, 또는 다른 안트라사이클린 또는 토포이소머라제 억제제이다. 또 다른 실시태양에서, 언급한 토포이소머라제 중 어느 하나가 chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3 또는 he.06.275-4와 함께 투여된다. 다른 실시태양에서, 피험체는 방사선 요법 또는 외과 수술로 더 치료된다. 본 발명의 또 다른 실시태양에서, 피험체는 PRLR 발현 및 HER2-neu 발현에 대해 양성이며, 상기 제2의 치료제는 항-Her2-neu 항체이다. 관련 실시태양에서, 피험체는 PRLR 발현 및 ER 발현에 대해 양성이며, 상기 제2의 치료제는 항-ER 항체이다. 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 암의 치료에 사용하는 것을 포함하여 의학에 사용하기 위한 항체를 제공한다. 다른 실시태양에서, 본 발명은 본 발명 항체의 암 치료용 의학의 제조에 있어서의 용도를 제공한다. 의학은 환자에 제2의 치료제 및(또는) 방사선 요법과 병행하여 투여될 수 있다.

- [0030] 본 발명의 또 다른 실시태양에서, 방사선 핵종 또는 다른 독소에 접합된 상기 항체를 투여하는 단계를 포함하는, PRLR을 발현하는 종양 세포를 표적화(targeting)하는 방법이 제공된다. 또 다른 실시태양에서, 피험체는 포유동물이다. 또 다른 실시태양에서, 피험체는 인간이다.
- [0031] 본 발명의 다른 실시태양에서, 상기 항체의 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자가 제공된다. 다른 실시태양에서, 조절 제어 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터가 제공된다. 또 다른 실시태양에서, 상기한 벡터 또는 상기한 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.
- [0032] 또 다른 실시태양에서, 숙주 세포를 적절한 조건하에 배양하는 단계 및 상기 항체를 회수하는 단계를 포함하는, 상기 숙주 세포를 사용하여 항체를 생산하는 방법이 제공된다. 또 다른 실시태양에서, 상기한 방법에 따라 생산된 항체가 제공된다.
- [0033] 본 발명의 다른 실시태양에서, 상기한 바와 같은 항체로서, 95 중량% 이상의 균질도로 정제된 항체가 제공된다. 또 다른 실시태양에서, 상기 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이 제공된다.
- [0034] 또 다른 실시태양에서, 용기 내에 포장된 치료 유효량의 본 발명 항체를 포함하는 전술한 항체를 포함하고, 경우에 따라 제2의 치료제를 포함하며, 추가로 용기에 부착되거나 용기와 함께 포장된, 용기의 내용물을 표시하고 용기 내용물을 암 치료에 사용하는 것에 관한 지침 및/또는 지시사항을 제공하는 라벨을 포함하는 키트가 제공된다. 다른 실시태양에서, 용기가 바이알(vial) 또는 바틀(bottle) 또는 사전 충전형 주사기인 키트가 제공된다.
- [0035] 본 발명의 다른 실시태양에서, 서열 번호 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 82, 84, 86, 88, 91, 95 및 96으로 구성되는 군에서 선택되는 가변 경쇄 아미노산 서열을 포함하는, PRLR의 세포의 도메인에 결합하는 항체가 제공된다. 또 다른 실시태양에서, 서열 번호 20, 2, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 83, 85, 87, 89, 90, 93, 94, 97 및 98로 구성되는 군에서 선택되는 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는, PRLR의 세포의 도메인에 결합하는 항체가 제공된다. 다른 실시태양에서, 서열 번호 88의 가변 경쇄 아미노산 서열 및 서열 번호 89의 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는, PRLR의 세포의 도메인에 결합하는 항체가 제공된다. 또 다른 실시태양에서, 서열 번호 88의 가변 경쇄 아미노산 서열 및 서열 번호 90의 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는, PRLR의 세포의 도메인에 결합하는 항체가 제공된다.
- [0036] 또 다른 실시태양에서, 서열 번호 91의 가변 경쇄 아미노산 서열 및 서열 번호 93의 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는, PRLR의 세포의 도메인에 결합하는 항체가 제공된다. 또 다른 실시태양에서, 서열 번호 91의 가변 경쇄 아미노산 서열 및 서열 번호 94의 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는, PRLR의 세포의 도메인에 결합하는 항체가 제공된다. 또 다른 실시태양에서, 서열 번호 92의 가변 경쇄 아미노산 서열 및 서열 번호 93의 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는, PRLR의 세포의 도메인에 결합하는 항체가 제공된다. 또 다른 실시태양에서, 서열 번호 92의 가변 경쇄 아미노산 서열 및 서열 번호 94의 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는, PRLR의 세포의 도메인에 결합하는 항체가 제공된다.
- [0037] 또 다른 실시태양에서, 서열 번호 95의 가변 경쇄 아미노산 서열 및 서열 번호 97의 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는, PRLR의 세포의 도메인에 결합하는 항체가 제공된다. 또 다른 실시태양에서, 서열 번호 95의 가변 경쇄 아미노산 서열 및 서열 번호 98의 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는, PRLR의 세포의 도메인에 결합하는 항체가 제공된다. 또 다른 실시태양에서, 서열 번호 96의 가변 경쇄 아미노산 서열 및 서열 번호 97의 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는, PRLR의 세포의 도메인에 결합하는 항체가 제공된다. 또 다른 실시태양에서, 서열 번호 96의 가변 경쇄 아미노산 서열 및 서열 번호 98의 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는, PRLR의 세포의 도메인에 결합하는 항체가 제공된다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 실시태양에서, 쥐과 동물(murine) PRLR의 세포의 도메인보다 적어도 10 내지 25,000배, 100 내지 20,000배, 1,000 내지 18,000배, 5,000 내지 17,000배, 8,000 내지 16,000배, 10,000 내지 15,000배, 12,000 내지 15,000배, 또는 13,000 내지 14,000배 더 낮은 평형 해리 상수(K_D)로 인간 PRLR의 세포의 도메인에 결합하는 항체가 제공된다. 관련 실시태양에서 상기 항체는 he.06.275-4와 동일한 에피토포에 결합한다. 또 다른 실시태양에서, 인간 PRLR의 세포의 도메인, 쥐과 동물 PRLR의 세포의 도메인 및 래트 PRLR의 세포의 도메인에 결합하는 항체가 제공된다. 관련 실시태양에서, 인간, 쥐과 동물 및 래트 PRLR의 세포의 도메인에 10^{-6} M 이

하의 평형 해리 상수(K_D)로 결합하는 항체가 제공된다. 관련 실시태양에서, he.06.642-2와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다.

- [0039] 또 다른 실시태양에서, 상기 방법은 또한, 예컨대, (a) 피험체로부터 샘플을 얻는 단계; 및 (b) 상기 샘플을 PRLR, Jak2, Mapk, Stat5, Erk1/2 및/또는 Akt의 인산화 수준에 대해 분석하는 단계(상기 PRLR, Jak2, Mapk, Stat5, Erk1/2 및/또는 Akt의 인산화 수준은 항-PRLR 항체를 사용하는 치료의 필요성을 나타냄)를 수행하여 항-PRLR 항체를 사용한 치료가 필요한 피험체를 확인하는 데 사용될 수 있다. 또 다른 실시태양에서, (a) 암 치료제로 치료를 개시하기 전에 제1 샘플을 PRLR의 인산화 수준에 대해 분석하는 단계; 및 (b) 암 치료제로 치료를 개시한 후 제2 샘플을 분석하는 단계(상기 암 치료제로 치료를 개시한 후 인산화된 PRLR 수준이 감소한 것은 환자가 치료 유효량의 암 치료제를 투여받고 있음을 나타냄)를 포함하는, 암을 앓고 있는 피험체에서 암 치료를 모니터링하는 방법이 제공된다. 관련 실시태양에서, 암 치료법은 상기 실시태양 중 어느 한 항에 따른 항체이다.
- [0040] [도면의 간단한 설명]
- [0041] 도 1은 PRLR의 여러 동형체에 있어서 유전자 배열 및 엑손을 도시한 것이다.
- [0042] 도 2, 3 및 4는 선택된 PRLR 특이적 항체가 pERK1/2 인산화에 미치는 효과를 도시하고 있다[mAb 1167은 대조군 쥐과 동물 항-PRLR 모노클로날 항체임; R&D Systems, 카탈로그 번호 MAB 1167]
- [0043] 도 5는 PRLR 특이적 항체가 PRL-반응성 종양 세포주의 증식에 미치는 효과를 도시하고 있다.
- [0044] 도 6은 PRLR 특이적 항체가 PRLR 세포내 인산화에 미치는 효과를 도시하고 있다.
- [0045] 도 7A 내지 7C는 pERK 분석에서 80%를 초과한 억제율을 나타낸, 항체 XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239의 VH 및 VL 아미노산 서열 및 CDR 위치(밑줄)를 나타낸 것이다.
- [0046] 도 8은 항체 XPA.06.145의 VH 및 VL 아미노산 서열을 나타낸 것이다.
- [0047] 도 9는 항체 XHA.06.983, XHA.06.275, 및 XHA.06.642의 리더 및 VH 및 VL 뉴클레오티드 서열을 나타낸 것이다.
- [0048] 도 10은 항체 XHA.06.983, XHA.06.275, 및 XHA.06.642의 VH 및 VL 아미노산 서열을 나타낸 것이다(CDR은 밑줄).
- [0049] 도 11은 키메라 항-PRLR mAb chXHA.06.642, chXHA.06.275 및 chXHA.06.983이 BaF/PRLR 세포의 증식 및 생존을 강력하게 억제하는 것을 보여준다. KLH-G1은 비 특이적 이소타입 매칭된 대조군 항체이다. 오른쪽 패널은 상응하는 마우스 mAb의 IC₅₀ 값을 나타낸다.
- [0050] 도 12는 키메라 항-PRLR mAb가 T47D 세포에서 STAT5 시그널링을 억제하는 것을 보여준다. 세포를 1 μ g/ml mAb로 30분 전에 예비처리하고, 50 ng/ml PRL로 자극하였다. 용해물을 PRLR의 포스포타이로신 잔기 546 및 611에 특이적인 항체를 사용하여 포스포로-PRLR의 존재에 대해 분석하였다.
- [0051] 도 13은 인간 가공(Human Engineered)TM 항체가 pERK1/2 인산화에 미치는 효과를 보여준다.
- [0052] 도 14는 키메라 항-PRLR mAb에 의해 매개된 ADCC를 나타낸다. T47D-T2 세포를 칼세인-AM으로 표지한 후, mAb(1 μ g/ml) 및 정제된 인간 NK 세포를 이펙터-대-표적 비율 10:1로 가하였다. 4 시간 동안 인큐베이션한 후, 상등액으로 칼세인-AM 방출을 측정하였다. 항-KLH 항체 및 헤르셉틴을 각각 음성 및 양성 대조군으로 사용하였다. % 특이적 용해를 (실험 방출 - 자발 방출)/(최대 방출 - 자발 방출) X 100으로 계산하였다.
- [0053] 도 15는 항-PRLR mAb가 병용 연구에서 세포독성 약물과 상승작용하는 것을 나타낸다. 독소루비신(위쪽 패널)과 시스플라틴(아래쪽 패널)을 항-KLH 대조군 Ab, 항-PRLR mAb chXHA.06.642 또는 항-PRLR mAb chXHA.06.275(모두 1 μ g/ml)과 함께 투여하였다.
- [0054] 도 16은 인간 가공TM mAb가 STAT5 인산화 분석에서 항-PRLR 기능적 특성을 보유하는 것을 보여준다. T47D 세포를 1 또는 10 μ g/ml mAb와 함께 인큐베이션한 후, 추가로 30분 동안 PRL(50 ng/ml)로 처리하거나 처리하지 않았다.

- [0055] 도 17A 및 17B는 인간화 항-PRLR 항체 후보가 PRL 의존적 BaF3/PRLR 세포의 성장을 강력히 억제하는 것을 보여준다. BaF3/PRLR 세포를 PRL(50 ng/ml)의 존재하에 48 시간 동안 항-KLH 대조군 항체(맨 위쪽의 선), 키메라 항체 또는 인간 가공™ 버전과 함께 성장시켰다. EC50 값을 곡선 핏트의 비-선형 회귀 분석을 이용하여 계산하였다.
- [0056] 도 18A 및 18B는 chXHA.06.642 처리된 동물의 Nb2-C11 종양에서 p-STAT5의 억제를 보여준다. 피하 Nb2-C11 종양이 있는 흉선이 없는 마우스에 chXHA.06.642 또는 KLH 대조군 IgG1 mAb를 복강내 주사하였다. 2일 후에 oPRL을 20 µg 볼러스 복강내 주사로 투여하였다. 대조군 동물에는 염수를 주사하였다. 2일 후에 oPRL을 20 µg 볼러스 복강내 주사로 투여하고, 40 분 후에 종양을 수거하여 p-STAT5에 대해서 면역블롯 또는 IHC로 평가하였다. 도 18A는 80 µg의 Tyr694 p-STAT5의 웨스턴 블롯을, 도 18B는 Tyr694 p-STAT5의 IHC를 나타낸다.
- [0057] 도 19A 및 19B는 chXHA.06.642가 두 상이한 연구에서 SCID 마우스 내 Nb2-C11 래트 림프종 모델에서 효과가 있음을 보여준다.
- [0058] 도 20A 및 20B는 chXHA.06.642가 SCID 마우스 내 수립된 Nb2-C11 래트 림프종 종양을 퇴행시키는 것을 보여준다. 도 20A는 종양 부피를, 도 20B는 조건부 생존을 나타낸다.
- [0059] 도 21A 및 21B는 oPRL을 복강내 볼러스 주사하는 것이 p-STAT5를 유도하고, chXHA.06.642로 처리하는 것이 T47D 인간 유방 이종이식물에서 p-STAT5 유도를 억제하는 것을 보여준다. chXHA.06.642 또는 KLH 대박막 IgG1을 성장을 유지하기 위해 0.18 mg/일 에스트라디올(E₂) 펠릿을 이식한, T47D 종양이 있는 면역손상된 마우스에 복강내 주사하였다. 2일 후에 oPRL을 20 µg 볼러스 복강내 주사로 투여하고, 40 분 후에 T47D 종양을 수거하여 p-STAT5에 대해서 면역블롯 또는 IHC로 평가하였다. 도 21A는 80 µg의 Tyr694 p-STAT5의 웨스턴 블롯을, 도 21B는 Tyr694 p-STAT5의 IHC를 나타낸다.
- [0060] [상세한 설명]
- [0061] 본 발명은 PRLR 특이적 항체, 그와 같은 항체를 포함하는 제약 조성물, 그와 같은 항체 및 제약 조성물을 제조하는 방법, 및 그 제약 조성물 및 화합물을 사용하여 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 항체는 PRLR에 결합하고(거나) PRLR의 이량체화를 억제하고(거나) PRLR 세포내 인산화를 억제하고(거나) PRLR 하류 시그널링을, 예컨대, Jak2, Mapk, Stat5, Erk1/2 및(또는) Akt의 인산화를 통해 억제하고, 암 또는 종양과 관련된 세포 증식을 억제하는 바람직한 생물학적 활성을 가질 수 있다. 이와 같이, PRLR 활성화를 그의 인산화를 검출하거나, 다른 하류 시그널링 파트너, 예컨대, Jak2, Stat5, Erk1/2 및(또는) Akt의 인산화 상태를 평가하여 직접 분석할 수 있다. 따라서, 하류 시그널링 경로 분석은 항-PRLR 항체를 필요로 하는 환자를 찾거나 항-PRLR 항체로 치료된 환자를 모니터링하는 데 사용될 수 있다.
- [0062] 본 발명에 따른 항체는 다른 한편으로는 (또는 추가적으로) 암 세포 상에 발현된 PRLR에 결합하는 바람직한 생물학적 활성을 가짐으로써 암 세포를 표적으로하여 세포독성 치료를 하는 데 사용할 수 있다.
- [0063] 본 발명은 또한 PRLR 유전자 또는 유전자 생성물 또는 그의 변이체의 길항제 또는 작용제를 찾기 위한 스크리닝 분석에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 PRLR 유전자 또는 유전자 생성물 또는 그의 변이체의 길항제 또는 작용제를 찾는 방법, 및 상기 길항제 또는 작용제의 본 명세서에 기재된 바와 같은 암의 치료 또는 예방용 용도에 관한 것이다. 추가로, 본 발명은 PRLR 유전자에 의해 코딩되는 핵산 분자, 폴리펩티드, 유전자 생성물의 길항제 또는 작용제를, 비제한적으로는 폐, 유방 및 전립선의 암과 같이, PRLR의 비정상적 발현 또는 활성을 특징으로 하는 질환을 스크리닝, 진단, 예방 및(또는) 치료하는 데 사용하는 것에 관한 것이다.
- [0064] 시험관내 분석에서 높은 친화도 및 강도를 갖는 것으로 측정된 몇몇 바람직한 쥐과 동물 또는 키메라 항체는 스테르닉카(Studnicka) 등의 인간 가공(Human Engineering™) 방법으로 인간에서보다 덜 면역원성이 되도록 변형된다. 간단히 말해서, 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 표면 노출된 아미노산 잔기를 항원 결합 또는 단백질 폴딩에 역효과를 내지 않을 것으로 결정된 위치에서 인간 잔기로 변형하는 한편, 인간 환경과 관련하여 그의 면역원성을 감소시키는 것이다. 변형된 중쇄 및(또는) 경쇄 가변 영역을 함유하는 합성 유전자를 제작하여 인간 γ 중쇄 및(또는) 카파 경쇄 불변 영역에 연결시킨다. 어느 인간 중쇄 및 경쇄 불변 영역을 인간 가공™ 항체 가변 영역과 함께 사용하여도 무방하다. 인간 중쇄 및 경쇄 유전자를 포유동물 세포 내로 도입하고, 생성된 재조합 면역글로불린 생성물을 얻어 특성화한다.
- [0065] 본 발명에 따른 항체의 예는 chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141,

XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 및 XHA.06.907을 포함한다. 다음의 항체 분비 하이브리도마가 미국 표준 균주 보존 기관[American Type Culture Collection(ATCC), 미국 20110-2209 버지니아주 매너사스 유니버시티 블러바드 10801]에 부다페스트 조약 규정에 따라 2006년 8월 17일에 기탁되었다.

하이브리도마 명칭	ATCC 기탁 번호
XHA.06.567	PTA-7794
XHA.06.642	PTA-7795
XHA.06.983	PTA-7796
XHA.06.275	PTA-7797
XHA.06.189	PTA-7798
XHA.06.907	PTA-7799

[0066]

본 발명을 보다 완전히 이해하는 데 도움이 되도록 이하 용어의 정의를 설명한다.

[0067]

일반적 정의

[0068]

본 명세서에서, 표적 항원인 인간 "PRLR"은 서열 번호 2와 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 인간 폴리펩티드, 그의 친연 대립 유전자 및(또는) 스플라이스 변이체를 이르는 것이다. 본 명세서 "PRLR의 ECD"란 PRLR의 세포외 부분으로서, 서열 번호 2의 아미노산 서열의 25 내지 234이다.

[0069]

본 명세서에서 "종양"이란 악성 또는 양성을 불문하고 모든 신생 세포 성장 및 증식, 및 모든 전암성 또는 암성 세포 및 조직을 이르는 것이다.

[0070]

용어 "암" 및 "암성"이란 포유동물의 생리학 적 상태로서, 전형적으로는 조절되지 않은 세포 성장을 특징으로하는 상태를 의미한다. 암은, 예를 들어, 유방암, 결장암, 신장암, 간암, 폐암, 림프암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 자궁암, 자궁경부암 또는 피부암을 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0071]

"치료"란 질환의 진전을 막거나 병적 상태를 변화시키려는 의도로 중간에 개입하는 행위를 이른다. 따라서, "치료"란 치유를 위한 치료 및 예방 또는 방지 수단을 모두 의미한다. 치료를 필요로 하는 피험체는 이미 발병되었거나 발병을 예방하려는 피험체 모두를 포함한다. 종양(예를 들어, 암) 치료에서, 치료제는 종양 세포의 병적 상태를 직접 감소시키거나, 종양 세포가 다른 치료제, 예를 들어, 방사선이나 화학요법에 더욱 감수성이 되도록 변화시킬 수 있다. 질병의 임상적, 생화학적, 방사선적 또는 주관적 증후가 있는 환자를 치료하는 것은 그와 같은 증상의 일부 또는 전부를 완화시키는 것 또는 질병의 소인을 감소시키는 것을 포함할 수 있다. 암의 "병적 상태"는 환자의 건강 양호한 상태를 악화시키는 모든 현상을 포함한다. 이는 비제한적인 예로서 비정상적 또는 조절불가의 세포 성장, 전이, 인접 세포의 정상 기능과의 간섭, 사이토카인 또는 다른 분비 생성물의 비정상적 농도에서의 방출, 염증 또는 면역학적 반응의 억제 또는 악화 등을 포함한다. 따라서, 치료 후의 개선은 감소된 종양 크기, 종양 성장 속도의 감소, 기존 종양 세포 또는 전이 세포의 파괴 및(또는) 전이 부위 크기 및 수의 감소로 나타날 수 있다.

[0072]

치료의 목적상 "포유동물"이라 함은 포유동물로 분류되는 임의의 동물을 이르는 것으로, 예를 들어, 인간, 가정 또는 농장 동물, 및 동물원, 스포츠 또는 애완 동물로서, 개, 말, 고양이, 암소 등을 포함한다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.

[0073]

본 명세서에서, "치료 유효량"이란 본 발명의 구체적 실시예에 적절한 치료 또는 예방적 항체의 양, 즉, 바람직한 치료 계획으로 투여될 때 질병 증후의 일부 또는 전부를 완화시키던가 발병에의 소인을 감소시키는 등, 바람직한 치료 또는 예방 효과 또는 반응을 나타내는 항체의 양이다.

[0074]

항체

[0075]

"친화도" 또는 "결합 친화도"는 종종 평형 결합 상수(K_A) 또는 평형 해리 상수(K_D)로 측정된다. 용어 "면역특이적" 또는 "특이적으로 결합하는"이란 항체가 PRLR 또는 그의 ECD에 약 $10^6 M^{-1}$ 이상, 약 $10^7 M^{-1}$ 이상, 약 $10^8 M^{-1}$

[0076]

이상, 또는 약 $10^9 M^{-1}$, $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$ 또는 $10^{12} M^{-1}$ 이상의 평형 결합 상수(K_A)로 결합하는 것을 말한다. 항체는 관련 없는 분자에 비하여 표적 항원에 대해 상당히 큰 친화도를 가질 수 있다. 항체는 또한 오르쏘로그(ortholog) 또는 동족체에 비하여 표적 항원에 대해 상당히 큰 친화도, 예컨대, 표적 항원에 대해 1.5배, 2배, 5배 10배, 100배, 10^3 배, 10^4 배, 10^5 배, 10^6 배 이상 큰 상대 친화도를 가질 수 있다. 다른 방식으로는, 항체가 알려진 오르쏘로그 또는 동족체와 교차 반응하는 것이 유용할 수 있다.

[0077] 본 발명의 항체는 또한 $10^{-4} M$, $10^{-6} M$ 내지 $10^{-7} M$, 또는 $10^{-8} M$, $10^{-10} M$, $10^{-11} M$ 또는 $10^{-12} M$ 이하의 평형 해리 상수(K_D)로 특징지워질 수 있다. 그와 같은 친화도는 통상의 방법, 예컨대, 평형 투석; 제조자의 일반 지시에 따른 바이오코어(BIAcore 2000) 기기 사용; 방사선 표지된 표적 항원을 사용하는 방사선면역분석; 또는 당업자에 알려진 다른 방법으로 쉽게 측정될 수 있다. 친화도 데이터 분석은, 예를 들어, 문헌(Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949))의 방법에 따를 수 있다.

[0078] "중화 항체"는 그것이 결합하는 표적 항원의 이펙터 기능을 제거하거나 상당히 감소시킬 수 있는 항체 분자를 의미한다. 따라서, "중화" 항-표적 항체는 이펙터 기능, 예컨대, 효소 활성, 리간드 결합 또는 세포내 시그널링을 제거하거나 상당히 감소시킬 수 있다.

[0079] 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되며, 완전히 조립된 항체, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중 특이적 항체(예를 들어, 이중 특이적 항체), 항원에 결합할 수 있는 항체 단편(예컨대, Fab', F'(ab)₂, Fv, 단일쇄 항체, 다이아바디), 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한도내에서 상기 항체 성분을 포함하는 카멜 바디(camel body) 및 재조합 펩티드를 포함한다. 항체 단편은 재조합 DNA 기술 또는 온전한 항체를 효소 또는 화학 절단하여 생산할 수 있으며, 이하 상세히 기술된다. 모노클로날 항체의 비제한적인 예는 쥐과 동물, 키메라, 인간화, 인간 및 인간 가공™ 면역글로불린, 항체, 면역글로불린으로부터 유도된 서열을 갖는 키메라 융합 단백질, 또는 그의 뮤테인 또는 유도체를 포함하며, 이하 상세히 설명된다. 화학적으로 유도된 항체를 포함하여, 온전한 분자 및(또는) 단편의 다량체 또는 응집체가 또한 포함된다. 이소타입 클래스 또는 서브클래스의 항체도 또한 본 발명에 포함된다.

[0080] 본 명세서에서 "모노클로날 항체"란 실질적으로 동질의 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 의미하여, 즉 집단을 이루는 개개의 항체가 소량으로 존재할 수 있는 천연 돌연변이의 경우를 제외하고는 동일한 집단으로부터 수득된 항체이다. 모노클로날 항체는 고도로 특이적이어서, 단일한 항원성 부위로 유도된다. 또한, 전형적으로 상이한 결정소(에피토프)에 대해 유도된 상이한 항체들을 포함하는 통상의(폴리클로날) 항체 제제와는 다르게, 각 모노클로날 항체는 항원상의 단일 결정소에 대해 유도된다. 특이성에 더하여, 모노클로날 항체는 그들이 상이한 특이성 및 특징을 갖는 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않는 채로, 균질 배양물로부터 합성된다는 점에서 유리하다.

[0081] "모노클로날"이란 수식어는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 얻어진다는 것을 의미할 뿐, 어느 특정한 방법에 의해 항체가 생산될 것을 요하는 것은 아니다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 문헌(Kohler et al., Nature, 256:495 (1975))에 처음으로 소개된 하이브리도마 방법에 의하거나, 재조합 DNA 방법(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호)으로 제조될 수 있다. "모노클로날 항체"는 또한 예를 들어, 재조합, 키메라, 인간화, 인간, 인간 가공™, 또는 항체 단편일 수 있다.

[0082] "단리된" 항체는 그의 천연 환경의 성분으로부터 확인되어 분리 및 회수된 항체를 이른다. 천연 환경의 오염 성분은 항체를 진단 또는 치료 목적에 사용하는 것에 간섭하는 물질로서, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 항체는 (1) 로우리(Lowry) 방법에 의해 측정되는 바와 같은, 균질도 95 중량% 초과인 항체, 더욱 바람직하게는 99 중량%보다 큰 정도, (2) 스피닝 컵 시퀀터를 사용하여 N-말단의 15개 잔기 이상 또는 내부 아미노산 서열을 얻기에 충분한 정도, 또는 (3) 쿠마시 블루(Coomassie blue) 또는 바람직하게는 은 염색을 사용한 환원 또는 비환원 조건하의 SDS-PAGE에 의한 균질도로 정제된다. 단리된 항체는 항체의 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이므로, 재조합 세포 내의 항체도 포함한다. 그러나, 일반적으로 단리된 항체는 적어도 하나의 정제 단계를 거쳐 제조된다.

[0083] "면역글로불린" 또는 "천연 항체"는 사량체 당단백질이다. 천연 면역글로불린에서, 각 사량체는 두 개의 동일한 쌍의 폴리펩티드 사슬로 이루어지며, 각 쌍은 하나의 "경쇄"(약 25 kDa) 및 하나의 "중쇄"(약 50 내지 70 kDa)를 갖는다. 각 쇠의 아미노 말단부는 약 100 내지 110개 이상의 아미노산으로 된 "가변" 영역을 포함하는데, 이는 주로 항원 인식을 담당한다. 각 쇠의 카복시 말단부는 불변 영역을 구성하며, 이는 주로 이펙터 기능을 담당

한다. 면역글로불린은 그의 중쇄 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라서 다른 클래스로 분류된다. 중쇄는 뮤(μ), 델타(δ), 감마(γ), 알파(α) 및 엡실론(ϵ)으로 분류되며, 이들은 각각 항체 이소타입 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE를 구성한다. 이들 중 몇몇은 서브클래스 또는 이소타입, 예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 더욱 분류된다. 상이한 이소타입은 상이한 이펙터 기능을 갖는다. 예컨대, IgG1 및 IgG3 이소타입은 ADCC 활성을 갖는다. 인간 경쇄는 카파(κ) 및 람다(λ) 경쇄로 분류된다. 경쇄 및 중쇄에서, 가변 및 불변 영역은 약 12개 이상 아미노산의 "J" 영역에 의해 연결되어 있으며, 중쇄는 또한 약 10개 이상 아미노산의 "D" 영역을 포함한다. 일반적인 사항에 관해서는 문헌(Fundamental Immunology, Ch. 7, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))을 참조할 수 있다.

[0084] 항체의 구조 및 생산에 관한 상세한 사항은 문헌(Roth, D.B., and Craig, N.L., Cell, 94:411-414 (1998), 전문이 본 명세서에 포함됨)을 참조할 수 있다. 간략히 설명하면, 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자를 코딩하는 DNA를 생산하는 과정은 주로 B 세포 발달시에 일어난다. 각종 면역글로불린 유전자 세그먼트의 재배열 및 결합 이전에, V, D, J 및 불변(C) 유전자 세그먼트가 일반적으로 단일 염색체상 상대적으로 근접한 위치에서 발견된다. B 세포 분화 중에, V, D, J(또는 경쇄 유전자의 경우 단지 V 및 J) 유전자 세그먼트의 적절한 패밀리를 구성할 각각의 하나가 재조합되어 기능적으로 재배열된 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자를 형성한다. 이와 같은 유전자 세그먼트 재배열 과정은 연속적인 것으로 보인다. 먼저, 중쇄 D에서 J로의 연결부가 만들어진 후 중쇄 V에서 DJ로의 연결부 및 경쇄 V에서 J로의 연결부가 만들어진다. V, D 및 J 세그먼트의 재배열에 더하여, 추가의 다양성은 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 일차적 레파토어에 의해서, 즉, 경쇄 내 V 및 J 세그먼트가 연결되는 위치 및 중쇄의 D 및 J 세그먼트가 연결되는 위치에서의 다양한 재조합을 통하여 생성된다. 경쇄 내에서의 그러한 변화는 전형적으로는 V 유전자 세그먼트의 마지막 코돈 및 J 세그먼트의 첫번째 코돈에서 일어난다. 연결에 있어서의 유사한 현상이 중쇄 염색체상 D 및 J_H 세그먼트 사이에서 일어나며, 많게는 10 뉴클레오티드를 넘게 연장될 수 있다. 또한, 게놈 DNA에 의해 코딩되지 않은 수 개의 뉴클레오티드가 D 및 J_H 유전자 세그먼트 사이 및 V_H 및 D 유전자 세그먼트 사이에 삽입될 수 있다. 이들 뉴클레오티드의 부가는 N-영역 다양성으로 알려져 있다. 다양한 영역 유전자 세그먼트 내의 그와 같은 재배열 및 연결시에 일어날 수 있는 다양한 재조합의 순효과는 일차적 항체 레파토어의 생성이다.

[0085] "항체 단편"은 완전한 전질이 항체(예를 들어, 인간 항체 포함)의 일부, 바람직하게는 완전한 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함하며, 항체 단편들로부터 형성된 다중 특이적 항체를 포함한다. 항체 단편의 비제한적인 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 도메인 항체(dAb), 상보성 결정 영역(CDR) 단편, 단일쇄 항체(scFv), 단일쇄 항체 단편, 다이아바디, 트리아바디, 테트라바디, 미니바디, 선형 항체(Zapata et al., Protein Eng., 8(10):1057-1062 (1995)); 킬레이팅 재조합 항체, 트리바디 또는 바이바디, 인트라바디, 나노바디, 소형 모듈 면역약제(SMIP), 항원-결합-도메인 면역글로불린 융합 단백질, 낙타화(camelized) 항체, VHH 함유 항체, 또는 뮤테인 또는 그의 유도체, 목적하는 생물학적 활성을 보유하는 한도내에서 특이적 항원 결합 특성을 부여하기에 충분한 면역글로불린의 적어도 일부, 예컨대, CDR 서열을 함유하는 폴리펩티드를 포함한다.

[0086] 항체를 파파인 분해하면 "Fab" 단편이라 불리우는 두 개의 동일한 항원 결합 단편이 얻어지는데, 이들은 각각 단일한 항원 결합 부위와, 쉽게 결정화되는 능력을 따라 명명된 나머지 "Fc" 단편을 갖는다. 펩신 처리는 두 개의 "Fv" 단편을 갖는 F(ab')₂ 단편을 생산한다. "Fv" 단편은 완전한 항원 인식 및 결정 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 영역은 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인이 치밀하게 비-공유 결합되어 있는 이량체로 구성된다. 바로 이러한 구조에서 각 가변 도메인의 세 개의 CDR이 상호작용하여 V_H V_L 이량체의 표면에 항원 결합 부위를 형성한다. 총괄적으로는, 여섯 개의 CDR이 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인(또는 항원에 특이적인 단지 세 개의 CDR을 포함하는 Fv의 절반)일지라도 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.

[0087] "단일쇄 Fv" 또는 "sFv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함하는데, 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬상에 존재한다. 바람직하게는, Fv 폴리펩티드는 V_H 및 V_L 도메인 사이에 추가로 폴리펩티드 링커를 포함함으로써 Fv가 항원 결합에 바람직한 구조를 갖도록 한다. sFv에 대해서는 문헌(Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 1 13, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994))을 참조할 수 있다.

[0088] Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 첫번째 불변 도메인(CH1)을 함유한다. Fab 단편은 Fab' 단편과, 중쇄 CH1 도메인의 카복시 말단에, 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 수 개의 잔기가 부가되어 있다는 점에서 다르다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기가 유리 티올기를 갖는 Fab'를 지칭하

는 것이다. F(ab')₂ 항체 단편은 원래 그들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 한 쌍의 Fab' 단편으로서 생산되었다.

- [0089] "초가변" 영역이란 항원-결합에 관여하는 항체의 아미노산 잔기를 이른다. 초가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 CDR로부터의 아미노산 잔기 [즉, 경쇄 가변 도메인 중 잔기 24-34(L1), 50-56(L2) 및 89-97(L3), 및 중쇄 가변 도메인 중 잔기 31-35(H1), 50-65(H2) 및 95-102(H3), 문헌(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))에 기재된 바와 같음] 및(또는) 초가변 루프로부터의 잔기(즉, 경쇄 가변 도메인 중 잔기 26-32(L1), 50-52(L2) 및 91-96(L3) 및 중쇄 가변 도메인 중 잔기 26-32(H1), 53-55(H2) 및 96-101(H3), 문헌(Chothia et al., J. Mol.Biol. 196: 901-917 (1987))에 기재된 바와 같음]를 포함한다.
- [0090] "골격구조" 또는 FR 잔기는 초가변 영역 잔기가 아닌 가변 도메인 잔기이다.
- [0091] "불변 영역"이란 이펙터 기능을 부여하는 항체 분자의 부분을 말한다.
- [0092] 본 명세서에서 "키메라 항체"란 전형적으로는 다른 종으로부터 유래하는 두 개의 상이한 항체로부터 유도된 서열을 함유하는 항체(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호)를 말한다. 가장 전형적으로, 키메라 항체는 인간 및 쥐과 동물 항체 단편, 일반적으로 인간 불변 및 마우스 가변 영역을 포함한다.
- [0093] "뮤테인" 또는 "변이체"는 상호교환적으로 사용될 수 있으며, 그들이 목적하는 결합 친화도 또는 생물학적 활성을 보유하는 한도내에서 가변 영역 또는 가변 영역과 대등한 부분에서 적어도 하나의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 함유하는 항체의 폴리펩티드 서열을 이른다. 뮤테인은 패런트(parent) 항체에 실질적으로 유사하거나 실질적으로 동일할 수 있다.
- [0094] 본 발명의 항체와 관련되어 사용되는 "유도체"란 유비퀴틴화, 치료제 또는 진단제와의 결합, 표지화(예를 들어, 방사선훈중 또는 각종 효소), PEG화(폴리에틸렌 글리콜로 유도)와 같은 공유결합적 중합체 부착 및 비천연 아미노산의 화학 합성에 의한 삽입 또는 치환과 같은 기술에 의하여 공유결합 변형된 항체를 이른다. 본 발명의 유도체는 본 발명의 비유도된 분자의 결합 특성을 보유할 것이다.
- [0095] 본 명세서에서, "항체"란 구체적으로 PRLR의 세포외 부분에 결합하는 능력을 보유한 다음 성분들 중의 하나를 포함한다:
- [0096] 1) 도 7A-7C 또는 도 8에 개시된 아미노산 서열을 갖는 패런트 항체의 아미노산 뮤테인으로서, 패런트 아미노산 서열에 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성인 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 뮤테인, 및(또는) 패런트 아미노산 서열에 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성인 가변 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 뮤테인을 포함하는 뮤테인(동일성 결정에 유사 아미노산을 고려함);
- [0097] 2) 도 7A-7C 또는 도 8에 개시된 아미노산 서열을 갖는 패런트 항체의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 PRLR-결합 폴리펩티드로서, 바람직하게는 적어도 중쇄의 CDR3, 바람직하게는 둘 이상, 또는 셋 이상, 또는 넷 이상, 또는 다섯 이상, 또는 여섯 개 모두의 CDR을 포함하는 폴리펩티드;
- [0098] 3) 문헌(Studnicka et al., 미국 특허 제5,766,886호) 및 실시예 5에 기재된 방법(저, 중 및 고도의 위험 잔기를 표시하기 위해 카뮷 넘버링 사용)에 따라 패런트 서열을 변경하여 제조한 인간 가공™ 항체로서, 적어도 하나의 하기 중쇄 및 적어도 하나의 하기 경쇄를 포함하는 항체: (a) 인간 표준 면역글로불린 서열 중의 상응하는 잔기와 다른 저위험 설치류 잔기 모두가 인간 표준 면역글로불린 서열 내의 인간 잔기와 동일하도록 변형된 중쇄, 또는 (b) 모든 저위험 및 중간 위험 설치류 잔기가, 필요에 따라, 인간 표준 면역글로불린 서열 내에 있는 것과 동일한 잔기로 변형된 중쇄, (c) 모든 저위험 잔기가, 필요에 따라, 인간 표준 면역글로불린 서열 내에 있는 것과 동일한 잔기로 변형된 경쇄, 또는 (b) 모든 저위험 및 중간 위험 잔기가, 필요에 따라, 인간 표준 면역글로불린 서열 내에 있는 것과 동일한 잔기로 변형된 경쇄;
- [0099] 4) 상기 단락 (3)에 언급된 항체의 뮤테인으로서, 본래의 설치류 경쇄와 60% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 85% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는 중쇄 또는 경쇄 또는 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 뮤테인(예를 들어, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 및 100% 동일한 것 포함);
- [0100] 5) 설치류 항체의 하나 이상의 CDR의 고위험 잔기를 포함하는 PRLR-결합 폴리펩티드, 및 바람직하게는 둘 이상, 또는 셋 이상, 또는 넷 이상, 또는 다섯 이상, 또는 여섯 개 모두의 CDR의 고위험 잔기, 및 경우에 따라 저위험

또는 중간 위험 잔기에서의 하나 이상의 변화를 포함하는 폴리펩티드,

- [0101] 예를 들어, 저위험 잔기에서 하나 이상의 변화 및 중간 위험 잔기에서 보존적 치환을 포함하는 폴리펩티드,
- [0102] 예를 들어, 중간 위험 및 고위험 아미노산 잔기를 보유하며, 저위험 잔기에서 하나 이상의 변화를 포함하는 폴리펩티드,
- [0103] 상기 폴리펩티드에서 변화는 삽입, 결실 또는 치환을 포함하며, 보존적 치환이거나, 가공 항체가 서열에 있어서 인간 경쇄 또는 중쇄 서열, 인간 생식세포 경쇄 또는 중쇄 서열, 보존 인간 경쇄 또는 중쇄 서열 또는 보존 인간 생식세포 경쇄 또는 중쇄 서열에 근사해지도록 하는 것을 포함한다. 그와 같은 변화는 다음과 같이 서열에 포맷으로 제시될 수 있다. 가정적인 서열 AKKLVHTPYSFKEDF를 예로 들어, 문헌(Studnicka et al., 미국 특허 제 5,766,886호)에 따라 각 잔기에 부여된 위험이 HMLHMLHMLHMLHML(H = 고위험, M = 중간 위험, L = 저위험)일 때, 가정적 서열의 저위험 잔기에 대한 변화는, 예를 들어, AKXLVXTPXSFXEDX(여기서, X는 임의의 아미노산이거나, 또는 X는 그 위치에서 본래의 잔기의 보존적 치환임)로 표시될 수 있고, 저위험 및 중간 위험 잔기에 대한 변화는 유사하게, 예를 들어, AYXLYXTYXSXYXEYX(여기서, X는 임의의 아미노산이고, Y는 그 위치에서 본래의 잔기의 보존적 치환임)로 표시될 수 있다.
- [0104] "경쟁하는 항체"는 다음을 포함한다:
- [0105] 1) X-선 결정구조 분석을 통해 측정된 바에 따라, 항체 chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 또는 XHA.06.907과 동일한 PRLR의 에피토프에 결합하는 비-쥐과 동물 또는 비-설치류 모노클로날 항체; 및(또는)
- [0106] 2) 항체 chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 또는 XHA.06.907과, 75% 초과, 80% 초과 또는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 또는 95%를 초과하는 정도로 경쟁하는 비-쥐과 동물 또는 비-설치류 모노클로날 항체; 또는, chXHA.06.642, chXHA.06.275, he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4, XPA.06.128, XPA.06.129, XPA.06.130, XPA.06.131, XPA.06.141, XPA.06.147, XPA.06.148, XPA.06.158, XPA.06.159, XPA.06.163, XPA.06.167, XPA.06.171, XPA.06.178, XPA.06.181, XPA.06.192, XPA.06.202, XPA.06.203, XPA.06.206, XPA.06.207, XPA.06.210, XPA.06.212, XPA.06.217, XPA.06.219, XPA.06.229, XPA.06.233, XPA.06.235, XPA.06.239, XPA.06.145, XHA.06.567, XHA.06.642, XHA.06.983, XHA.06.275, XHA.06.189 또는 XHA.06.907의 결합을 2, 3, 4, 5, 6, 10, 20, 50, 100배 이상 억제하는 비-쥐과 동물 또는 비-설치류 모노클로날 항체. 하나의 실시태양에서, 비-쥐과 동물 또는 비-설치류 모노클로날 항체는 50배 몰 과량이다.
- [0107] 본 발명의 항체는 바람직하게는 PRLR의 ECD에 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M 이하의 평형 해리 상수로 결합하며, 바람직하게는 PRLR 세포내 인산화 및 예컨대, STAT5, MAPK 또는 AKT의 활성화를 통한 하류 PRLR 시그널링의 활성화를 억제한다.
- [0108] 경우에 따라, 본 출원 출원일 이전에 공개되거나, 본 출원일 이전에 출원된 출원서에 개시된 임의의 키메라, 인간 또는 인간화 항체는 본 발명의 범주에서 제외된다.
- [0109] "비-설치류" 모노클로날 항체 항체는, 넓은 의미에서, 설치류 하이브리도마에 의해 생산된 완전하게 온전한 설치류 모노클로날 항체가 아닌 항체를 말한다. 따라서, 비-설치류 항체의 구체적인 예는 설치류 항체의 뮤테인, 설치류 항체 단편, 선형 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 가공™ 항체 및 인간 항체(트랜스제닉 동물 또는 파아지 디스플레이 기술을 이용하여 생산된 인간 항체 포함)를 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다. 마찬가지로, 비-쥐과 동물 항체는 쥐과 동물 항체의 뮤테인, 쥐과 동물 항체 단편, 선형 항체, 키메라, 인간화, 인

간 가공™ 및 인간 항체를 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0110] **표적 항원**

[0111] 항체의 생산에 사용되는 표적 항원은, 예를 들어, PRLR의 세포외 부분, 또는 목적하는 에피토프를 보유하는 단편으로서, 경우에 따라 에피토프가 그의 천연의 구조로 제시되도록 다른 폴리펩티드에 융합된 것일 수 있다. 또는, 세포 표면 상에 발현된 온전한 PRLR이 항체 생산에 사용될 수 있다. 그러한 세포는 PRLR을 발현하도록 형질 전환되거나, 또는 PRLR를 발현하는 다른 천연 세포일 수 있다. 항체를 생산하는 데 유용한 PRLR 폴리펩티드의 다른 형태는 당업자에게 자명할 것이다.

[0112] **폴리클로날 항체**

[0113] 폴리클로날 항체는 바람직하게는 동물에 관련 항원 및 보조제를 수회 피하(sc) 또는 복강내(ip) 주사하여 얻는다. 개선된 항체 반응은 관련 항원을 면역될 중에 면역원성인 단백질, 예를 들어, 키홀 림펫 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 싸이로글로불린 또는 대두 트립신 억제제를, 이작용성제 또는 유도제, 예컨대, 말레이미도벤조일 설포석신이미드 에스테르(시스테인 잔기를 통한 접합), N-히드록시석신이미드(리신 잔기를 통한 접합), 글루타르알데히드, 석신산 무수물 또는 당업계에 알려진 다른 화합물을 사용하여 결합시킴으로써 얻어질 수 있다.

[0114] 예를 들어, 100 µg 또는 5 µg의 단백질 또는 접합체(각각 토끼 또는 마우스에 대하여)를 3 부피의 프로인트 완전 보조제와 합하고, 그 용액을 여러 부위에 피내 주사하여, 동물을 항원, 면역원성 접합체 또는 유도체에 대하여 면역시킨다. 한 달 후, 동물을 프로인트 완전 보조제 중 원래 펩티드 또는 접합체 양의 1/5 내지 1/10로, 여러 위치에 피하 주사하여 추가 접종한다. 추가 접종한 지 7 내지 14일 후에, 동물로부터 혈액을 채취하여 항체 역가에 대해 혈청을 분석한다. 역가가 높은 수치로 일정하게 될 때까지(plateau) 동물을 추가 접종한다. 바람직하게는, 동물을 에피토프는 동일하되 다른 단백질에 접합되었거나 다른 가교결합제를 통해 접합된 접합체로 추가 접종한다. 접합체는 또한 단백질 융합체로서 제조할 세포 배양물 중에서 만들어질 수 있다. 또한, 명반과 같은 응집제를 적절히 사용하여 면역 반응을 증진시킬 수 있다.

[0115] **모노클로날 항체**

[0116] 모노클로날 항체는 문헌(Kohler et al., Nature, 256:495 (1975))에 처음으로 기술된 하이브리도마 방법을 이용하여, 재조합 DNA 방법으로 제조할 수 있다.

[0117] 하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 햄스터 또는 짧은꼬리 원숭이와 같은 다른 적절한 숙주 동물을, 면역에 사용된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유발시키도록 본 명세서에 기재된 바와 같이 면역시킨다. 다른 방법으로는, 림프구를 시험관내에서 면역시킬 수 있다. 림프구를 골수종 세포와, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적절한 융합제를 사용하여 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성하거나(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59- 103(Academic Press, 1986)), 또는 전기 세포융합으로 융합시킬 수 있다.

[0118] 이와 같이 제조된 하이브리도마 세포를, 바람직하게는 비융합 패런트 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적절한 배양 배지 중에서 접종 및 성장시킨다. 예컨대, 패런트 골수종 세포에 효소 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제(HGPRT 또는 HPRT)가 결핍된 경우, 하이브리도마를 위한 배양 배지는 전형적으로 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방해하는 물질인 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘(HAT 배지)을 함유하게 될 것이다.

[0119] 바람직한 골수종 세포는 효율적으로 융합되고, 선택된 항체 생산 세포에 의한 안정한 고농도 항체 생산을 유지하며, 배지에 감응성인 세포이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 헤테로골수종 세포주가 인간 모노클로날 항체를 생산하는 것으로 기재되어 있다(Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984) ;Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)). 쥐 과 동물 골수종 세포주의 예는 MOP-21 및 M.C.-11 마우스 종양(입수원: the SaIk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA), 및 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포주(입수원: the American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA)를 포함한다.

[0120] 하이브리도마 세포주가 성장하는 배양 배지를 항원에 대해 유도된 모노클로날 항체 생산에 대해 분석한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생산된 모노클로날 항체의 결합 특이성을 면역침강에 의해, 또는 방사선면역분석(RIA) 또는 효소-결합 면역흡수분석(ELISA)와 같은 시험관내 결합 분석으로 결정한다. 모노클로날 항체의 결합 친화도는, 예컨대, 스캇차드(Scatchard) 분석으로 측정할 수 있다(Munson et al., Anal. Biochem.,

107:220 (1980)).

[0121] 목적하는 특이성, 친화도 및(또는) 활성의 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 찾아낸 후에, 클론은 한계 희석 방법으로 서브클로닝하고 표준 방법으로 성장시킬 수 있다(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). 이러한 목적에 적절한 배양 배지는, 예를 들어, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포는 동물 중 복수 종양으로서 생체내 성장될 수도 있다. 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체를 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적절히, 예를 들어, 프로테인 A-세파로스, 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화도 크로마토그래피와 같은 통상의 면역글로불린 정제 방법으로 분리할 수 있다.

[0122] 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA를 하이브리도마 세포로부터 단리 및 시퀀싱할 수 있으며, 이는 통상의 방법, 예를 들어, 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하여 수행할 수 있다. 서열 결정은 일반적으로 관심있는 유전자 또는 cDNA의 적어도 일부를 단리할 것을 필요로 한다. 보통 이 과정은 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA, 또는 바람직하게는 mRNA(즉, cDNA)를 클로닝하는 것을 필요로 한다. 클로닝은 표준 기술을 사용하여 수행된다(예를 들어, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Guide*, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press, 전문이 본 명세서에 포함됨). 예를 들어, cDNA 라이브러리는 폴리A+ mRNA, 바람직하게는 멤브레인-결합 mRNA의 역전사에 의해 구축되며, 인간 면역글로불린 폴리펩티드 유전자 서열에 특이적인 프로브를 사용하여 라이브러리를 스크리닝한다. 그러나, 바람직한 실시태양에서, 관심있는 면역글로불린 유전자 세그먼트(예를 들어, 경쇄 가변 세그먼트)를 코딩하는 cDNA(또는 전길이 cDNA의 일부)를 증폭시키기 위해 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)을 사용한다. 증폭된 서열은 적절한 벡터, 예를 들어, 발현 벡터, 미니유전자 벡터 또는 파아지 디스플레이 벡터 내로 쉽게 클로닝될 수 있다. 관심있는 면역글로불린 폴리펩티드의 일부의 서열을 결정할 수 있는 한, 어떤 클로닝 방법을 사용하였는가가 중요하지 않다는 것은 자명할 것이다. 본 명세서에서 "단리된" 핵산 분자 또는 "단리된" 핵산 서열이란 (1) 핵산의 천연 공급원에서 본래 서로 결합되어 있던 오염 핵산 분자로부터 확인되어 분리된 핵산 분자, 또는 (2) 관심있는 핵산의 서열이 결정될 수 있도록 백그라운드 핵산으로부터 클로닝, 증폭, 태깅 또는 다른 방식으로 구별되는 핵산 분자를 의미한다. 단리된 핵산 분자는 그것이 자연에서 발견된 형태 또는 상태가 아닌 다른 형태로 존재한다. 단리된 핵산 분자는 따라서 천연 세포에 존재하는 핵산 분자와는 구별된다. 그러나, 단리된 핵산 분자는 핵산 분자가 천연 세포와는 다른 염색체 상의 위치에 있는 경우, 본래 항체를 발현하는 세포 내에 함유된 핵산 분자를 포함한다.

[0123] 클로닝 및 시퀀싱에 사용되는 RNA의 하나의 공급원은 트랜스제닉 마우스로부터 B 세포를 얻고 이를 불멸 세포에 융합시켜 얻은 하이브리도마이다. 하이브리도마를 사용하는 것의 잇점은 이들이 쉽게 스크리닝되어 관심있는 인간 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마가 선택된다는 점이다. 다른 방법으로는, RNA를 면역된 동물의 B 세포(또는 비장 전체)로부터 단리할 수 있다. 하이브리도마가 아닌 공급원을 사용하는 경우, 특이적 결합 특성을 갖는 면역글로불린 또는 면역글로불린 폴리펩티드를 코딩하는 서열에 대해 스크리닝하는 것이 바람직하다. 그러한 스크리닝 방법 중의 하나는 파아지 디스플레이 기술을 사용하는 것이다. 파아지 디스플레이 기술은 문헌(Dower et al., WO 91/17271, McCafferty et al., WO 92/01047, and Caton and Koprowski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6450-6454 (1990))에 기재되어 있으며, 이들 각각의 전문이 본 명세서에 포함된다. 파아지 디스플레이 기술을 사용하는 하나의 실시태양에서, 면역된 트랜스제닉 마우스로부터 cDNA(예를 들어, 총 비장 cDNA)를 단리하고, 폴리머라제 연쇄 반응을 사용하여 면역글로불린 폴리펩티드의 일부, 예컨대, CDR 영역을 코딩하는 cDNA 서열을 증폭시키고, 증폭된 서열을 파아지 벡터 내로 삽입한다. 관심있는 펩티드, 예를 들어, 바람직한 결합 특성을 갖는 가변 영역 펩티드를 코딩하는 cDNA는 패닝과 같은 표준 기술로 찾아낸다.

[0124] 증폭 또는 클로닝된 핵산의 서열을 결정한다. 전형적으로는, 면역글로불린 폴리펩티드의 전체 가변 영역을 코딩하는 서열을 결정하지만, 때로는 단지 가변 영역의 일부, 예를 들어, CDR 코딩 부분만을 서열 결정하는 것으로 충분한 경우가 있다. 전형적으로는 시퀀싱되는 부분은 30 염기 이상의 길이이며, 보다 일반적으로는 가변 영역 길이의 약 3분의 1 이상 또는 약 2분의 1 이상을 코딩하는 염기가 서열 결정된다.

[0125] 시퀀싱은 cDNA 라이브러리로부터 단리된 클론에 대하여, 또는 PCR이 사용된 경우 증폭된 서열을 서브클로닝한 후에, 또는 증폭된 세그먼트를 직접 PCR 시퀀싱하여 수행할 수 있다. 시퀀싱은 표준 기술을 사용하여 수행할 수 있다(예를 들어, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Guide*, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press, and Sanger, F. et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467, 전문이 본 명세서에 포함됨). 클로닝된 핵산의 서열과 공개된 인간 면역글로불린 유전자 및 cDNA의 서열을 비교하여, 당업자는 서열 결정된 영역에 따라 (i) 하이브리도마 면역글로불린 폴리펩티드(중쇄의 이소타입 포함)의 생식세포 세그먼트

트 이용, 및 (ii) 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 서열(N-영역 부가 및 체세포 돌연변이 과정에 기인한 서열 포함)을 쉽게 결정할 수 있다. 면역글로불린 유전자 서열 정보원 중의 하나는 국립생물공학 정보센터(National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md)이다.

[0126] **항체 단편**

[0127] 상기한 바와 같이, 항체 단편은 완전한 전길이 항체의 일부, 바람직하게는 완전한 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함하며, 항체 단편들로부터 형성된 선형 항체 및 다중 특이적 항체를 포함한다. 항체 단편의 비제한적인 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 도메인 항체(dAb), 상보성 결정 영역(CDR) 단편, 단일쇄 항체(scFv), 단일쇄 항체 단편, 다이아바디, 트리아바디, 테트라바디, 미니바디, 선형 항체(Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)); 킬레이팅 재조합 항체, 트리바디 또는 바이바디, 인트라바디, 나노바디, 소형 모듈 면역약제(SMIP), 항원-결합-도메인 면역글로불린 융합 단백질, 낙타화(camelized) 항체, VHH 함유 항체, 또는 뮤테인 또는 그의 유도체, 목적하는 생물학적 활성을 보유하는 한도내에서 특이적 항원 결합 특성을 부여 하기에 충분한 면역글로불린의 적어도 일부, 예컨대, CDR 서열을 함유하는 폴리펩티드를 포함한다. 그러한 항체 단편은 전체 항체를 변형시켜 생산하거나, 재조합 DNA 기술 또는 펩티드 합성을 이용하여 디 노보(de novo) 합성할 수 있다.

[0128] "다이아바디"란 두 개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 말하는 것으로, 단편은 동일 폴리펩티드 사슬(VH VL)내에, 경쇄 가변 도메인(VL)에 결합된 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함한다. 동일 사슬 상의 두 도메인 사이에 쌍을 이루기에는 너무 짧은 링커를 사용하여, 도메인은 다른 사슬 상의 상보적 도메인과 쌍을 이루게 되어 두 개의 항원 결합 부위를 생성한다. 다이아바디는 문헌(EP 404,097; WO 93/11161; and 30 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993))에 더욱 상세히 설명되어 있다.

[0129] "단일쇄 Fv" 또는 "sFv" 또는 "scFv" 항체 단편은 단일 폴리펩티드 사슬상에 존재하는 항체의 VH 및 VL 도메인, 및 경우에 따라 VH 및 VL 도메인 사이에 Fv가 항원 결합에 바람직한 구조를 갖도록 하는 폴리펩티드 링커를 포함한다(Bird et al., Science 242:423-426, 1988, and Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988). Fd 단편은 VH 및 CH1 도메인으로 이루어진다.

[0130] 또 다른 항체 단편은 VH 도메인으로 이루어지는 도메인 항체(dAb) 단편을 포함한다(Ward et al., Nature 341:544-546, 1989).

[0131] "선형 항체"는 한 쌍의 항원 결합 영역을 형성하는 한 쌍의 텐덤 Fd 세그먼트(VH-CH1-VH-CH1)를 포함한다. 선형 항체는 이중 특이적 또는 단일 특이적일 수 있다(Zapata et al. Protein Eng. 8:1057-62 (1995)).

[0132] 펩티드 링커를 통해(힌지가 없는) 또는 IgG 힌지를 통해 CH3에 융합된 scFv로 이루어진 "미니바디"가 문헌에 개시되어 있다(Olafsen, et al., Protein Eng Des Sel. 2004 Apr;17(4):315-23).

[0133] 경쇄가 없는 기능적 중쇄 항체가 미국 수염상어(nurse sharks)(Greenberg et al., Nature 374:168-73, 1995), 수염 상어(wobbegong sharks)(Nuttall et al., Mol Immunol. 38:313-26, 2001) 및 낙타, 단봉낙타, 알파카 및 라마와 같은 낙타류(Camelidae)(Hamers-Casterman et al., Nature 363: 446- 8, 1993; Nguyen et al., J. Mol. Biol. 275: 413, 1998)에 천연적으로 존재한다. 이들 동물에서 항원 결합 부위는 단일 도메인인 VH_H 도메인으로 축소되었다. 이들 항체는 단지 중쇄 가변 영역을 사용하여 항원 결합 영역을 형성하며, 즉, 이들 기능적 항체는 단지 구조 H₂L₂"중쇄 항체" 또는 "HCAb"로 지칭)를 갖는 중쇄의 호모이량체이다. 낙타화 VH_H는 보고에 따르면 힌지, CH2 및 CH3 도메인을 함유하나 CH1 도메인이 결여된 IgG2 및 IgG3 불변 영역과 재조합된다(Hamers-Casterman et al., 상기 문헌). 예를 들어, 라마 IgG1은 VH가 힌지, CH1, CH2 및 CH3 도메인을 함유하는 불변 영역과 재조합된 통상의 (H₂L₂) 항체 이소타입인 반면, 라마 IgG2 및 IgG3는 CH1 도메인이 결여되어 있고 경쇄가 하나도 없는 중쇄로만 된 이소타입이다. 전통적인 V_H-단독 단편은 가용성 형태로 생산하기 어려우나, 골격구조 잔기를 보다 VH_H와 유사하게 변화시킬 때 용해도 및 특이적 결합의 개선을 가져올 수 있다(예를 들어, Reichman, et al., J Immunol Methods 1999, 231:25-38). 낙타화 VH_H 도메인은 항원에 높은 친화도로 결합하는 것으로 나타났으며(Desmyter et al., J. Biol. Chem. 276:26285-90, 2001), 용액 중 안정성이 높다(Ewert et al., Biochemistry 41:3628-36, 2002). 낙타화 중쇄를 갖는 항체 생산 방법은, 예를 들어, 미국 특허 공개 제 20050136049호 및 제20050037421호에 기재되어 있다.

- [0134] 중쇄 항체의 가변 도메인은 분자량이 단지 15 kDa에 이르는 가장 작은 완전 기능적 항원 결합 단편이므로 나노바디로 불리운다(Cortez-Retamozo et al., Cancer Research 64:2853-57, 2004). 나노바디 라이브러리는 문헌(Conrath et al., Antimicrob Agents Chemother 45: 2807-12, 2001)에 기재된 바와 같이 면역된 단봉낙타로부터 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 재조합 방법으로 생산될 수 있다.
- [0135] 인트라바디는 세포내 발현을 나타내고 세포내 단백질 기능을 조절할 수 있는 단일쇄 항체이다(Biocca, et al., EMBO J. 9:101-108, 1990; Colby et al, Proc Natl Acad Sci U SA. 101:17616-21, 2004). 세포내 영역에서 항체 구조를 보유하는 세포 시그널 서열을 포함하는 인트라바디는 문헌에 기재된 바와 같이 생산될 수 있다(Mhashilkar et al., EMBO J 14:1542-51, 1995; and Wheeler et al., FASEB J. 17:1733-5. 2003). 트랜스바디는 단백질 트랜스덕션 도메인(PTD)이 단일쇄 가변 단편(scFv) 항체와 융합되어 있는 세포 투과성 항체이다(Heng et al., Med Hypotheses. 64:1105-8, 2005).
- [0136] 또 다른 항체는 SMIP 또는 표적 단백질에 특이적인 결합 도메인 면역글로불린 융합 단백질이다. 이들 구조물은 항체 이펙터 기능을 수행하는 데 필요한 면역글로불린 도메인에 융합된 항원 결합 도메인을 포함하는 단일쇄 폴리펩티드이다(예를 들어, WO 03/041600, 미국 특허 공개 제20030133939호 및 제20030118592호).
- [0137] **다가 항체**
- [0138] 일부 실시태양에서, 다가 또는 심지어는 다중 특이적(예를 들어, 이중 특이적, 삼중 특이적 등) 모노클로날 항체를 생산하는 것이 바람직할 수 있다. 그러한 항체는 표적 항원의 적어도 두 개의 에피토프에 대한 결합 특이성을 가질 수 있거나, 다른 식으로는, 두 개의 상이한 분자, 예를 들어, 표적 항원 및 세포 표면 단백질 또는 수용체에 결합할 수 있다. 예를 들어, 이중 특이적 항체는 표적에 결합하는 암(arm), 및 세포 방어 메커니즘을 표적 발현 세포에 집중시키도록 T 세포 수용체 분자(예를 들어, CD2 또는 CD3), 또는 Fc γ RI(CD64), Fc γ RII(CD32) 및 Fc γ RIII(CD 16) 등의 IgG에 대한 Fc 수용체(Fc γ R)와 같은 백혈구 상의 개시 분자에 결합하는 다른 암을 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 이중 특이적 항체는 세포독성체를 표적 항원을 발현하는 세포에 편재시키는데 사용될 수 있다. 이들 항체는 표적-결합 암 및 세포독성체(예를 들어, 사포린, 항-인테페론-60, 빈카 알칼로이드, 리신 A 사슬, 메토티렉세이트 또는 방사성 동위원소 합텐)에 결합하는 암을 갖는다. 다중 특이적 항체는 전질이 항체 또는 항체 단편으로 제조될 수 있다.
- [0139] 이중 특이적 항체는 가교결합 또는 "이중 접합체" 항체를 포함한다. 예를 들어, 이중 접합체 중 하나의 항체는 아비딘에 접합되고, 다른 하나는 비오틴에 접합될 수 있다. 이중 접합체 항체는 편리한 가교결합 방법을 사용하여 만들 수 있다. 적절한 가교결합제는 당업계 잘 알려져 있으며, 다수의 가교기술과 함께 미국 특허 제 4,676,980호에 기재되어 있다.
- [0140] 이중 특이적 항체를 만드는 다른 접근법에 따라서, 한 쌍의 항체 분자 사이의 계면을 가공하여 재조합 세포 배양액으로부터 회수되는 헤테로이량체의 퍼센트를 최대로 할 수 있다. 바람직한 계면은 적어도 일부의 항체 불변 영역 CH3 도메인을 포함한다. 이 방법에서, 제1 항체 분자 계면으로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄를 보다 큰 측쇄(예를 들어, 타이로신 또는 트립토판)로 교체한다. 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 아미노산 측쇄(예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)로 교체함으로써 제2 항체 분자의 계면에 큰 측쇄에 동일하거나 유사한 크기의 보상적 "캐비티"를 생성할 수 있다. 이는 호모이량체와 같은 다른 원하지 않는 최종 생성물보다 헤테로이량체의 수율을 증가시키는 메커니즘을 제공한다(WO 96/27011, 1996년 9월 6일 공개).
- [0141] 항체 단편으로부터 이중 특이적 항체를 생산하는 기술은 문헌에도 기재되어 있다. 예를 들어, 이중 특이적 항체는 화학 결합을 사용하여 제조할 수 있다. 문헌(Brennan et al., Science 229:81 (1985))은 온전한 항체를 단백질 분해 절단하여 F(ab')₂ 단편을 생성하는 방법을 기술하고 있다. 이들 단편은 디티올 착화제 나트륨 아르세나이트 존재하에 환원되어 인접한 디티올을 안정화시키고 분자간 디설파이드 형성을 방지한다. 생성된 Fab' 단편은 티오니트로벤조에이트(TNB) 유도체로 전환된다. Fab'-TNB 유도체 중의 하나는 머캅토에틸아민으로 환원되어 Fab'-티올로 재전환되고, 등몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합되어 이중 특이적 항체를 형성한다. 생산된 이중 특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 물질로 사용될 수 있다. 문헌(Better et al., Science 240: 1041-1043 (1988))은 세균으로부터의 기능적 항체 단편의 분비를 기재하고 있다(예를 들어, Better et al., Skerra et al. Science 240: 1038-1041 (1988)). 예를 들어, Fab'-SH 단편을 이. 콜라이(E. coli)로부터 직접 회수하여 화학적 커플링시켜 이중 특이적 항체를 형성할 수 있다(Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992); Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992)).
- [0142] 문헌(Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992))은 완전한 인간화 이중 특이적 항체 F(ab')₂ 분자의

생산을 기술하고 있다. 각 Fab' 단편이 이. 콜라이로부터 별도로 분리되었으며, 시험관내 유도 화학적 커플링에 의해 이중 특이적 항체를 형성하였다. 이와 같이 형성된 이중 특이적 항체는 HER2 수용체 및 정상 인간 T 세포를 과다발현하는 세포에 결합시키는데 뿐만 아니라 인간 유방 종양 표적에 대하여 인간 세포 독성 림프구의 용해 활성을 촉발하는 데 사용될 수 있었다.

[0143] 이중 특이적 항체 단편을 재조합 세포 배양물로부터 직접 제조하고 단리하는 여러가지 기술이 기재되어 있다. 예를 들어, 이중 특이적 항체는 GCN4와 같은 루신 지퍼를 사용하여 생산되었다(Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)). Fos 및 Jun 단백질로부터의 루신 지퍼 펩티드를 유전자 융합에 의해 두 개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 결합시켰다. 항체 호모이량체를 힌지 영역에서 환원시켜 단량체를 형성한 다음 다시 재산화시켜 항체 헤테로이량체를 형성하였다. 이 방법을 항체 호모이량체를 생산하는 데에도 사용할 수 있다.

[0144] "다이아바디"란 두 개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 말하는 것으로, 단편은 동일 폴리펩티드 사슬(VH VL)내에, 경쇄 가변 도메인(VL)에 결합된 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함한다. 동일 사슬 상의 두 도메인 사이에 쌍을 이루기에는 너무 짧은 링커를 사용하여, 도메인은 다른 사슬 상의 상보적 도메인과 쌍을 이루게 되어 두 개의 항원 결합 부위를 생성한다. 예를 들어, 문헌(Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993))을 참조할 수 있다.

[0145] 단일쇄 Fv(sFv) 이량체를 사용하여 이중 특이적 항체 단편을 만드는 다른 전략이 보고되어 있다(Gruber et al., J. Immunol. 152: 5368 (1994)).

[0146] 다른 방식으로서, 이중 특이적 항체는 문헌(Zapata et al. Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995))에 기재된 바와 같이 제조된 "선형 항체"일 수 있다. 간략히 설명하면, 이들 항체는 한 쌍의 항원 결합 영역을 형성하는 한 쌍의 탠덤 Fd 세그먼트(V_H-C_H1-V_H-C_H1)를 포함한다. 선형 항체는 이중 특이적 또는 단일 특이적일 수 있다.

[0147] 3가 이상의 항체도 고려될 수 있다. 예를 들어, 삼중 특이적 항체를 제조할 수 있다(Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991)).

[0148] "킬레이팅 재조합 항체"는 표적 항원의 근접하고 비-중첩된 에피토프를 인식하는 이중 특이적 항체로서, 두 에피토프에 동시에 결합하기에 충분히 유연하다(Neri et al., J MoI Biol. 246:367-73, 1995).

[0149] 이중 특이적 Fab-scFv("바이바디") 및 삼중 특이적 Fab-(scFv)(2) ("트리바디")의 생산 방법이 기재되어 있다(Schoonjans et al., J Immunol. 165:7050-57, 2000; and Willems et al., Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 786:161-76, 2003). 바이바디 및 트리바디를 위해, scFv 분자가 VL-CL(L) 및 VH-CH1(Fd) 사슬 중의 하나 또는 둘다에 융합되며, 예를 들어, 트리바디 생산을 위하여는 두 개의 scFv가 Fab의 C-말단에 융합되는 반면, 바이바디 생산을 위해서는 하나의 scFv가 Fab의 C-말단에 융합된다.

[0150] **항체의 재조합 생산**

[0151] 항체는 당업계에 잘 알려진 항체 발현 시스템을 사용하여 재조합 DNA 방법으로 제조될 수 있다(예를 들어, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)).

[0152] 본 발명의 항체를 코딩하는 DNA를 발현 벡터 내에 넣은 다음, 이를 숙주 세포, 예컨대, 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 인간 배아 신장 293 세포(예를 들어, 293E 세포), 차이니스 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 다른 경우에는 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는 골수종 세포 내로 트랜스펙션시켜 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체를 합성시켜 얻는다. 항체의 재조합 생산은 당업계에 잘 알려져 있다. 항체 단편은 온전한 항체를 단백질 분해 소화하여 유도하여 왔다(예를 들어, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992) and Brennan et al., Science 229:81 (1985)). 그러나, 이들 단편은 지금은 재조합 숙주 세포에 의해 직접 생산될 수 있다. 펩티드 합성 및 공유 결합을 포함하는, 항체 단편을 생산하기 위한 다른 기술은 당업자에게 자명할 것이다.

[0153] 발현 조절 서열은 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는 데 필요한 DNA 서열을 이른다. 원핵세포에 적절한 조절 서열은, 예를 들어, 프로모터, 경우에 따라 오퍼레이터 서열, 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서를 이용하는 것으로 알려져 있다.

[0154] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치되어 있을 때 작동 가능하게 연결되어 있는 것이다. 예를 들어, 선행서열(presequence) 또는 분비 리더에 대한 DNA는 폴리펩티드의 분비에 관여하는 전구단백질로 발현되는 경우 그 폴리펩티드에 대한 DNA에 작동 가능하게 연결되어 있거나; 프로모터 또는 인핸서는 그것이 코딩 서열의 전사

를 일으키는 경우 그 서열에 작동 가능하게 연결되어 있거나; 또는 리보솜 결합 부위는 그것이 번역을 촉진하기 위해 배치된 경우 코딩 서열에 작동 가능하게 연결되어 있다. 일반적으로, "작동 가능하게 연결된"이란 연결되는 DNA 서열이 연속적이고, 분비 리더의 경우, 연속적이고 리딩 페이스 내에 있다는 것을 의미한다. 그러나, 인헨서는 연속적일 필요가 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서 결합에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따라 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 링커를 사용한다.

[0155] 세포, 세포주, 세포 배양물은 종종 교환적으로 사용되며, 이들 모든 용어는 자손을 포함한다. 형질전환체 또는 형질전환된 세포는 일차적 대상 세포 및 형질전환의 수와 관계없이 그로부터 유도된 배양물을 포함한다. 모든 자손은 계획적 또는 우연적 돌연변이에 의해 DNA 내용에 있어서 정확히 일치하지 않는다는 것을 이해하여야 한다. 최초의 형질전환된 세포에서 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 것으로 스크리닝된 변이 자손이 포함된다. 명확한 언급이 의도되는 경우, 문맥으로부터 명백할 것이다.

[0156] 다른 실시태양에서, 관심있는 면역글로불린의 아미노산 서열은 직접적인 단백질 시퀀싱에 의해서 결정될 수 있다. 적절한 코딩 뉴클레오티드 서열은 공통 코돈 테이블에 따라 설계될 수 있다.

[0157] 바람직한 항체의 아미노산 서열 뮤테인은 코딩 DNA 내로 적절한 뉴클레오티드 변화를 도입하거나, 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. 그러한 뮤테인은, 예를 들어, 항체의 아미노산 서열 내의 잔기의 결실 및(또는) 삽입 및(또는) 치환을 포함한다. 최종 구조물이 목적하는 특징을 갖는 한, 어떠한 결실, 삽입 및 치환의 조합으로 최종 생성물에 도달하던지 관계없다. 아미노산 변화는 또한 모노클로날, 인간, 인간화, 인간 가공™ 또는 뮤테인 항체의 번역후 과정을 변화, 예를 들어, 글리코실화 부위의 수 및 위치를 변화시킬 수 있다.

[0158] 항체의 아미노산 서열 뮤테인을 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 알려진 각종 방법으로 제조된다. 이들 방법은 천연 공급원으로부터의 단리(천연 아미노산 서열 뮤테인의 경우) 또는 올리고뉴클레오티드 매개(또는 부위 지정) 변이유발에 의한 제조, PCR 변이유발, 및 항체의 조기 제조된 뮤테인 또는 비-뮤테인 버전의 카세트 변이유발을 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0159] 본 발명은 또한 경우에 따라 숙주 세포에 의해 인식되는 조절 서열에 작동 가능하게 연결된, 본 발명의 항체를 코딩하는 단리된 핵산, 그러한 핵산을 포함하는 벡터 및 숙주 세포, 및 핵산이 발현되도록 상기 숙주 세포를 배양하고, 숙주 세포 배양물 또는 배양 배지로부터 항체를 회수하는 단계를 포함할 수 있는 항체 생산의 제조합 기술을 제공한다.

[0160] 항체의 제조합 생산을 위하여, 그것을 코딩하는 핵산을 단리하고, 추가의 클로닝(DNA 증폭) 또는 발현을 위하여 복제가능 벡터 내로 도입한다. 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 통상의 방법(예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여) 쉽게 단리되며 시퀀싱된다. 많은 벡터를 이용할 수 있다. 벡터 성분은 일반적으로 시그널 서열, 복제 기점, 하나 이상의 선택 마커 유전자, 인헨서 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0161] (1) 시그널 서열 성분

[0162] 본 발명의 항체는 직접적으로뿐만 아니라 바람직하게는 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 시그널 서열 또는 다른 폴리펩티드인 이중단백질과 함께 융합된 융합 폴리펩티드로서 제조합 생산될 수 있다. 선택되는 시그널 서열은 바람직하게는 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱(즉, 시그널 펩티다제에 의해 절단)되는 것이다. 원핵 숙주 세포가 천연 항체 시그널 서열을 인식하고 프로세싱하지 못하는 경우, 시그널 서열은, 예를 들어, 펩테이트 리아제(예를 들어, pe1B), 알칼라인 포스파타제, 페니실리나제, lpp 또는 열-안정성 엔테로톡신 II 리더로 구성되는 군에서 선택되는 시그널 서열로 치환될 수 있다. 효모 분비를 위하여, 천연 시그널 서열은, 예를 들어, 효모 인버타제 리더, α-인자 리더(사카로마이세스 및 클루이베로마이세스 α-인자 리더 포함) 또는 산 포스파타제 리더, 씨. 알비칸스 글루코아밀라제 리더, 또는 WO 90/13646에 기재된 시그널로 치환될 수 있다. 포유동물 세포 발현을 위하여, 포유동물 시그널 서열은 물론 허피스 심플렉스 gD 시그널과 같은 바이러스 분비 리더를 사용할 수 있다.

[0163] 그와 같은 전구 영역을 위한 DNA를 항체를 코딩하는 DNA에 리딩 프레임 내 결합시킨다.

[0164] (2) 복제 기점 성분

[0165] 발현 및 클로닝 벡터는 둘 다 벡터가 하나 이상의 선택된 숙주 세포에서 복제할 수 있게 하는 핵산 서열을 함유한다. 일반적으로, 클로닝 벡터에서 이 서열은 벡터가 숙주 염색체 DNA와 독립적으로 복제할 수 있게 하는 것이며, 복제 기점 또는 자발 복제 서열을 포함한다. 그러한 서열은 각종 세균, 효모 및 바이러스에 대하여 잘 알려

져 있다. 플라스미드 pBR322로부터의 복제 기점은 대부분의 그램 음성 세균에 적절하고, 2 μ 플라스미드 기원은 효모에 적절하며, 각종 바이러스 기원은 포유동물 세포에서 클로닝 벡터에 유용하다. 일반적으로, 복제 기점 성분은 포유동물 발현 벡터에는 필요하지 않다(SV40 기원은 단지 그것이 조기 프로모터를 함유한다는 이유로 전형적으로 사용될 수 있다).

[0166] (3) 선택적 마커 성분

[0167] 발현 및 클로닝 벡터는 선택가능 마커라고도 불리우는 선택 유전자를 함유할 수 있다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예컨대, 암피실린, 네오마이신, 메토틱세이트, 테트라사이클린, G418, 제네티신, 히스티딘올 또는 마이코페놀산에 대한 내성을 부여하거나, (b) 영양요구성 결핍을 보완하거나, 또는 (c) 복합 배지로부터 얻을 수 없는 결정적 영양소를 공급하는(예를 들어, 바실러스(Bacilli)에 있어서 D-알라닌 라세마제를 코딩하는 유전자) 단백질을 코딩한다.

[0168] 선택 과정의 한 예는 숙주 세포의 성장을 정지시키는 약물을 이용하는 것이다. 이중 유전자로 성공적으로 형질 전환된 세포는 약물 내성을 부여하는 단백질을 생산할 것이므로, 선택 과정을 극복하고 생존할 수 있다. 그와 같은 우성 선택은 메토틱세이트, 네오마이신, 히스티딘올, 푸로마이신, 마이코페놀산 및 하이그로마이신 등의 약물을 사용한다.

[0169] 포유동물 세포를 위한 적절한 선택 마커의 또 다른 예는 항체 코딩 핵산을 수용할 수 있는 세포의 확인을 가능하게 하는 것으로서, 예를 들어, DHFR, 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영양류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 데아미나제, 오르니틴 데카복실라제 등이다.

[0170] 예를 들어, DHFR 선택 유전자로 형질전환된 세포를 먼저 모든 형질전환체를 DHFR의 경쟁적 길항제인 메토틱세이트(Mtx)를 함유하는 배양 배지에서 배양하여 찾아낸다. 야생형 DHFR이 사용되는 경우 적절한 숙주 세포는 DHFR 활성이 결핍된 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포주이다.

[0171] 다른 방법으로는, 본 발명의 항체, 야생형 DHFR 단백질 및 아미노글리코사이드 3'-포스포트랜스퍼라제(APH)와 같은 다른 선택 마커를 코딩하는 DNA 서열로 형질전환 또는 동시형질전환된 숙주 세포(특히, 내생 DHFR를 함유하는 야생형 숙주)를 그 선택 마커를 위한 선택제, 예를 들어, 가나마이신, 네오마이신 또는 G418와 같은 아미노글리코사이드계 항생제를 함유하는 배지 중에서 생육시켜 선택할 수 있다(미국 특허 제4,965,199호).

[0172] 효모에 사용하기에 적절한 선택 유전자는 효모 플라스미드 YRp7에 존재하는 *trp1* 유전자이다(Stinchcomb et al., Nature, 282: 39 (1979)). *trp1* 유전자는 트립토판 중에서 생육하는 능력이 결여된 효모 변이주(예를 들어, ATCC No. 44076 또는 PEP4-1, Jones, Genetics, 85: 12 (1977))에 대한 선택 마커를 제공한다. 효모 숙주 세포 계능 중의 *trp1* 손상의 존재는 트립토판 부재하에 생육시킴으로써 형질전환 검출을 위한 효과적인 환경을 제공한다. 유사하게, *Leu2*-결여 효모 균주(ATCC 20,622 또는 38,626)는 *Leu2* 유전자를 함유하는 공지된 플라스미드에 의해 보완된다. *ura3*-결여 효모 균주는 *ura3* 유전자를 함유하는 플라스미드에 의해 보완된다.

[0173] 또한, 1.6 μ m 환상 플라스미드 pKD1으로부터 유도된 벡터를 *클루이베로마이세스(Kluyveromyces)* 효모를 형질전환하는 데 사용할 수 있다. 또한, 재조합 송아지 카이모신을 대량 생산하는 발현 시스템이 *케이. 락티스(K. lactis)*에 대해 보고되었다(Van den Berg, Bio/Technology, 8: 135 (1990)). *클루이베로마이세스* 산업용 균주에 의해 성숙 재조합 인간 혈청 알부민을 분비하기 위한 안정한 멀티카피 발현 벡터가 또한 개시되었다(Fleer et al, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991)).

[0174] (4) 프로모터 성분

[0175] 발현 및 클로닝 벡터는 보통 숙주 생물에 의해 인식되고 항체 코딩 핵산에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터를 함유한다. 원핵 숙주 세포에 사용하기에 적절한 프로모터는 아라비노스(예를 들어, *araB*) 프로모터, *phoA* 프로모터, β -락타마제 및 락토즈 프로모터 시스템, 알칼라인 포스파타제, 트립토판(*trp*) 프로모터 시스템, 및 *tac* 프로모터와 같은 하이브리드 프로모터를 포함한다. 그러나, 다른 공지된 세균 프로모터도 적절하다. 세균계에 사용하기 위한 프로모터는 또한 본 발명의 항체를 코딩하는 DNA에 작동 가능하게 연결된 샤인-달가르노(Shine-Dalgarno; S. D.) 서열을 포함할 것이다.

[0176] 프로모터 서열은 진핵 세포에 대해서도 알려져 있다. 실질적으로 모든 진핵 세포 유전자가 전사가 개시되는 부위로부터 대략 25 내지 30 염기 상류에 AT-풍부 영역을 갖는다. 여러 유전자의 전사 개시 부위로부터 대략 70 내지 80 염기 상류에서 발견되는 다른 서열은 CNCAAT 영역으로서, N은 어느 뉴클레오티드이어도 무방하다. 대부분의 진핵 세포 유전자의 3' 말단에 코딩 서열의 3' 말단에 폴리 A 테일을 부가하기 위한 시그널일 수 있는

AATAAA 서열이 있다. 이들 모든 서열은 진핵 발현 벡터 내로 적절히 도입된다.

- [0177] 효모 숙주에 사용하기에 적절한 프로모팅 서열은, 예를 들어, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 당분해 효소, 예컨대, 예놀라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데하이드로게나제, 헥소키나제, 피루베이트 데카복실라제, 포스포프럭토키나제, 글루코스-6-포스페이트 이소머라제, 3-포스포글리세레이트 뮤타제, 피루베이트 키나제, 트리오스포스페이트 이소머라제, 포스포글루코스 이소머라제 및 글루코키나제를 위한 프로모터를 포함한다.
- [0178] 전사가 생육 조건에 의해 조절되는 추가의 잇점을 가지는 유도 프로모터인 다른 효모 프로모터는 알콜 데하이드로게나제 2, 이소사이토크롬 C, 산 포스파타제, 질소 대사와 관련된 분해 효소, 메탈로티오네인, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데하이드로게나제, 및 말토스 및 갈락토스 이용에 관여하는 효소에 대한 프로모터 영역이다. 효모 발현에 사용하기 위한 적절한 벡터 및 프로모터는 EP 73,657에 상세히 기재되어 있다. 효모 인핸서 또한 효모 프로모터와 함께 사용하는 것이 유리하다.
- [0179] 포유동물 숙주 세포에서 벡터로부터의 항체 전사는, 숙주 세포 시스템에서 기능할 수 있는 한, 예를 들어, 아벨슨(Abelson) 백혈병 바이러스, 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스(예를 들어, 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 가장 바람직하게는 싸이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, 간염-B 바이러스, 원숭이 바이러스 40(SV40)와 같은 바이러스 계놈으로부터 얻어진 프로모터, 이중 포유동물 프로모터, 예를 들어, 액틴 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터, 또는 열-충격 프로모터에 의해 조절된다.
- [0180] SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 편리하게는 SV40 바이러스 복제 기점도 포함하는 SV40 제한 단편으로서 얻어진다. 인간 싸이토메갈로바이러스의 초기 프로모터는 HindIII E 제한 단편으로서 얻어진다. 소 유두종 바이러스를 벡터로 사용한 포유동물 숙주에서 DNA 발현을 위한 시스템은 미국 특허 제4,419,446호에 개시되어 있다. 이 시스템의 변형은 미국 특허 제4,601,978호에 개시되어 있다. 허피스 심플렉스 바이러스로부터의 티미딘 키나제 프로모터 조절하의 마우스 세포에서의 인간 β -인터페론 cDNA의 발현에 관해서는 문헌(Reyes et al., Nature 297: 598-601 (1982))을 참조할 수 있다. 또한, 라우스 육종 바이러스 장 말단 반복부를 프로모터로 사용할 수 있다.
- [0181] (5) 인핸서 요소 성분
- [0182] 고급 진핵 세포에 의한 본 발명의 항체를 코딩하는 DNA의 전사는 종종 벡터 내로 인핸서 서열을 삽입함으로써 증가된다. 포유동물 유전자(글로빈, 엘라스타제, 알부민, 알파-페토프로테인 및 인슐린)로부터 많은 인핸서 서열이 알려져 있다. 그러나, 전형적으로는 진핵 세포 바이러스로부터의 인핸서를 사용한다. 이의 예는 복제 기점의 후측(염기쌍 100-270)의 SV40 인핸서, 싸이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인핸서, 복제 기점의 후측의 폴리오마 인핸서 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다. 진핵 세포 프로모터의 활성화를 위한 인핸싱 요소에 관해서는 문헌(Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982))을 참조할 수 있다. 인핸서는 항체 코딩 서열에 대해 5' 또는 3' 위치로 벡터 내로 스플라이싱될 수 있으나, 프로모터로부터 5' 위치에 배치되는 것이 바람직하다.
- [0183] (6) 전사 종결 성분
- [0184] 진핵 숙주 세포(효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간, 또는 다른 다세포 생물로부터의 핵화 세포)에 사용되는 발현 벡터는 또한 전사를 종결하고 mRNA를 안정화시키는데 필요한 서열을 함유할 것이다. 그러한 서열은 일반적으로 진핵 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및, 때로는 3'의 비번역 영역에 있을 수 있다. 이들 영역은 항체를 코딩하는 mRNA의 미번역된 부분에 폴리아데닐화 단편으로서 전사되는 뉴클레오티드 세그먼트를 함유한다. 하나의 유용한 전사 종결 성분은 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역이다. 이것과 발현 벡터에 대해서는 WO 94/11026를 참조할 수 있다. 또 다른 것은 마우스 면역글로불린 경쇄 전사 터미네이터이다.
- [0185] (7) 숙주 세포의 선택 및 형질전환
- [0186] 벡터 중 DNA의 클로닝 및 발현에 적절한 숙주 세포는 원핵 세포, 효모, 또는 상기한 바와 같은 고등 진핵 세포이다. 이러한 목적에 적절한 원핵 생물은 진정 세균, 예컨대, 그람 음성 또는 그람 양성 미생물, 예를 들어, 장내 세균으로서 에스케리치아(*Escherichia*, 예를 들어, *E. coli*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 에르위니아(*Erwinia*), 클렙시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*, 예를 들어, *Salmonella typhimurium*), 세라티아(*Serratia*, 예를 들어, *Serratia marcescans*) 및 쉬겔라(*Shigella*) 뿐만 아니라 바실러스(*Bacilli*, 예를 들어, *B. subtilis* 및 *B. licheniformis*, 특히 1989년 4월 12일 공개된 DD 266,710에 기재된 *B. licheniformis* 41 P), 슈도모나스(*Pseudomonas*, 예를 들어, *P. aeruginosa*) 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)를 포함한다. 하나의 바람직한 이. 콜라이 클로닝 숙주는 이. 콜라이 294(ATCC 31,446)이지만, 이. 콜라이 B, 이. 콜라이 X1776(ATCC 31,537), 및 이. 콜라이 W3110(ATCC 27,325)와 같은 다른 균주도 적절하

다. 이들은 제한적이라기보다는 예시적인 것이다.

- [0187] 원핵 생물에 더하여, 필라멘트상 진균 또는 효모와 같은 진핵 미생물도 항체 코딩 벡터를 위한 클로닝 및 발현 숙주로서 적절하다. 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 통상의 제빵용 효모는 하등 진핵 숙주 미생물 중 가장 많이 사용되는 것이다. 그러나, 많은 다른 속, 종 및 균주가 본 발명에 통상적으로 또한 유용하게 사용되며, 이들의 예는 쉬조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*); 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 숙주, 예를 들어, 케이. 락티스(*K. lactis*), 케이. 프래질리스(*K. fragilis*, ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스(*K. bulgaricus*, ATCC 16,045), 케이. 위케라미(*K. wickeramii*, ATCC 24,178), 케이. 왈티(*K. waltii*, ATCC 56,500), 케이. 드로소필라럼(*K. drosophilorum*, ATCC 36,906), 케이. 써모톨러란스(*K. thermotolerans*) 및 케이. 마룩시아누스(*K. marxianus*); 애로위아(*Yarrowia*, EP 402,226); 피치아 파스토르스(*Pichia pastoris*, EP 183,070); 캔디다(*Candida*); 트리코더마 리지아(*Trichoderma reesia*, EP 244,234); 뉴로스포라 크라싸(*Neurospora crassa*); 슈바니오마이세스(*Schwanniomyces*), 예를 들어, 슈바니오마이세스 옥시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*); 및 필라멘트상 진균, 예를 들어, 뉴로스포라(*Neurospora*), 페니실륨(*Penicillium*), 톨리코플라둠(*Tolypocladium*), 및 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 숙주, 예컨대, 에이. 니둘란스(*A. nidulans*) 및 에이. 나이거(*A. niger*)이다.
- [0188] 글리코실화 항체의 발현을 위해 적절한 숙주 세포는 다세포 생물로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 많은 배칼로바이러스 주 및 변이주, 및 스포도테라 프루지페르다(*Spodoptera frugiperda*, 썩기벌레), 이데스 이집티(*Aedes aegypti*, 모기), 이데스 알보픽투스(*Aedes albopictus*, 모기), 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*, 과일파리) 및 밤비스 모리(*Bombyx mori*)와 같은 숙주로부터의 상응하는 허용되는 곤충 숙주 세포가 확인되었다. 트랜스펙션을 위한 다양한 바이러스주가 공통 이용가능하며, 예를 들어, 오토그라파 캘리포니카(*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이주, 및 밤비스 모리(*Bombyx mori*) NPV의 Bm-5 스트레인이 있다. 그러한 바이러스는 본 발명에 따라 사용될 수 있으며, 특히 스포도테라 프루지페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포를 트랜스펙션하는 데 사용될 수 있다.
- [0189] 목화, 옥수수, 감자, 대두, 가지, 토마토, 담배, 개구리밥의 식물 세포 배양 및 다른 식물 세포를 또한 숙주로 사용할 수 있다.
- [0190] 그러나, 최대의 주목받는 것은 척추동물 세포이며, 배양중 척추동물 세포의 증식(조직 배양)은 통상적인 과정이 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 차이나이즈 햄스터 난소 세포, 예를 들어, CHOK1 세포(ATCC CCL61), DXB-11, DG-44 및 차이나이즈 햄스터 난소 세포/-DHFR(CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); SV40으로 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주(293 세포 또는 현탁 배양 중 성장을 위해 서브클로닝된 293 세포) [Graham et al., J. Gen Virol. 36: 59 (1977)]; 베이비 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 마우스 세르톨리(Sertoli) 세포(TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); 원숭이 신장 세포(CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 사바나원숭이 신장 세포(VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포(HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포(MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포(W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포(Hep G2, HB 8065); 마우스 유선 종양 세포(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포(Mather et al., Annals N.Y Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암 세포주(Hep G2)이다.
- [0191] 숙주 세포를 항체 생산을 위해 상기한 바와 같은 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환 또는 트랜스펙션시키고, 프로모터 유도, 형질전환체 선택 또는 목적하는 서열을 코딩하는 유전자 증폭을 위해 적절히 변형된 통상의 영양 배지에서 배양한다. 또한, 선택 마커에 의해 분리된 다중 카피의 전사 단위를 갖는 새로운 벡터 및 트랜스펙션된 세포주가 항체 발현을 위해 특히 유용하고 바람직하다.
- [0192] (8) 숙주 세포의 배양
- [0193] 본 발명의 항체 생산을 위해 사용되는 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 시판용 배지, 예를 들어, 햄(Ham's) F10(Sigma), 최소 필수 배지(Minimal Essential Medium(MEM), Sigma), RPMI-1640(Sigma) 및 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), Sigma)가 숙주 세포 배양에 적절하다. 또한, 문헌(Ham et al., Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102: 255 (1980), 미국 특허 제 4,767,704호; 제4,657,866호; 제4,927,762호; 제4,560,655호; 또는 제5,122,469호; WO 90103430; WO 87/00195; 또는 미국 재발행 특허 제30,985호)에 기재된 어떠한 배지나 숙주 세포를 위한 배양 배지로 사용될 수 있다. 이들 배지 중 어느 것이나 필요에 따라 호르몬 및(또는) 다른 성장 인자(예컨대, 인슐린, 트랜스페린 또는 상피 성장 인자), 염(예컨대, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 인산염), 완충액(예를 들어, HEPES), 뉴클레오티드(예

를 들어, 아데노신 및 티미딘), 항생제(예를 들어, 젠타마이신™ 약물), 미량 원소(보통 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로 정의됨), 및 글루코스 또는 대등한 에너지원으로 보충될 수 있다. 필요한 다른 임의의 보충제를 당업자에 알려진 적절한 농도로 가할 수 있다. 온도, pH 등과 같은 배양 조건은 발현을 위해 선택된 숙주 세포에 사용되는 것과 같은 것으로서, 당업자는 이를 잘 알고 있을 것이다.

[0194] (9) 항체의 정제

[0195] 제조합 기술을 사용하는 경우, 항체는 세포 내 또는 페리플라즘 공간에 생산되거나, 미생물 배양물을 포함하여 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포내에 생산되는 경우, 첫번째 단계로서, 숙주 세포 또는 분해된 단편인 입자상 과편을, 예를 들어, 원심분리 또는 초원심분리에 의해 제거한다. 문헌(Better et al. Science 240: 1041-1043 (1988); ICSU Short Reports 10: 105 (1990); and Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 457-461 (1993))은 이. 콜라이의 페리플라즘 공간으로 분비된 항체를 단리하는 과정을 기술하고 있다[Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)].

[0196] 미생물 또는 포유동물 세포로부터 제조된 항체 조성물은, 예를 들어, 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 양이온 또는 음이온 교환 크로마토그래피 및 친화도 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있으며, 친화도 크로마토그래피가 가장 바람직한 정제 기술이다. 친화도 리간드로서의 단백질 A의 적절성은 항체내에 존재하는 면역글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소타입에 따라서 달라진다. 단백질 A는 인간 $\gamma 1$, $\gamma 2$ 또는 $\gamma 4$ 중쇄에 기초한 항체를 정제하는 데 사용될 수 있다(Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). 단백질 G는 모든 마우스 이소타입 및 인간 $\gamma 3$ 에 사용할 것이 추천된다(Guss et al., EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)). 친화도 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 빈번하게는 아가로즈이지만, 다른 매트릭스도 사용할 수 있다. 조절 다공성 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠과 같은 기계적으로 안정한 매트릭스는 아가로즈를 사용하는 경우보다 빠른 유속 및 짧은 프로세싱 시간을 가능하게 한다. 항체가 C₃ 도메인을 포함하는 경우, 베이커본드(Bakerbond) ABX™ 수지(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ.)가 정제에 유용하다. 다른 단백질 정제 기술, 예를 들어, 이온-교환 칼럼 상의 분획화, 에탄올 침강, 역상 HPLC, 실리카상 크로마토그래피, 헤파린 세파로스(SEPHAROSE™) 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 상의 크로마토그래피(예를 들어, 폴리아스파르트산 칼럼), 크로마토포커싱, SDS-PAGE 및 암모늄 설페이트 침강을 또한 회수될 항체에 따라 사용할 수 있다.

[0197] **키메라 항체**

[0198] 설치류 항체를 단독으로 또는 접합체로서 인간에 생체내 반복적으로 투여할 때 수여자에게서 설치류 항체에 대항하는 면역 반응이 일어나는데, 이를 소위 HAMA(인간 항 마우스 항체) 반응이라 한다. HAMA 반응은 반복되는 투여가 필요할 때 약제의 효과를 제한할 수 있다. 항체의 면역원성은 항체를 폴리에틸렌 글리콜과 같은 친수성 중합체로 화학적 변형시키거나, 항체의 구조를 보다 인간과 유사하게 만드는, 예를 들어, 키메라, 인간화, 인간 또는 인간 가공™ 항체로 하는 유전적 가공 방법을 사용하여 감소시킬 수 있다. 그와 같이 가공된 항체는 패런트 마우스 모노클로날 항체보다 인간에서 덜 면역원성이기 때문에, 아나필락시스의 위험이 훨씬 낮은 상태로 인간을 치료하는 데 사용할 수 있다. 따라서, 이들 항체는 인간에 생체내 투여하는 것을 포함하는 치료 용도에 바람직하다.

[0199] 마우스 모노클로날 항체의 가변 Ig 도메인이 인간 불변 Ig 도메인에 융합된 키메라 모노클로날 항체는 당업계에 알려진 표준 기술로 생산할 수 있다(Morrison, S. L., et al. (1984) Chimeric Human Antibody Molecules; Mouse Antigen Binding Domains with Human Constant Region Domains, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6841-6855; and, Boulianne, G. L., et al, Nature 312, 643-646. (1984)). 예를 들어, CEA에 결합하는 설치류 항체의 가변 도메인에 대한 유전자 서열로 인간 골수종 단백질의 가변 도메인을 치환하여 재조합 키메라 항체를 생산할 수 있다. 이러한 과정은 EP 194276, EP 0120694, EP 0125023, EP 0171496, EP 0173494 및 WO 86/01533에 상세히 기재되어 있다. 몇몇 키메라 모노클로날 항체가 인간에서 덜 면역원성인 것으로 증명되기는 하였지만, 마우스 가변 Ig 도메인은 여전히 상당한 인간 항-마우스 반응을 일으킬 수 있다.

[0200] **인간화 항체**

[0201] 인간화 항체는 다음과 같은 여러 가지 방법으로 얻을 수 있다: (1) 비-인간 상보성 결정 영역(CDR)을 인간 골격 구조 및 불변 영역 상으로 그래프팅(당업계에서는 "CDR 그래프팅"을 통한 인간화라고 함), 또는 (2) 전체 비-인간 가변 도메인을 이식하지만, 표면 잔기를 치환하여 인간-유사 표면으로 "감추기(cloaking)"함(당업계에서는 "비니어링(veneering)"이라고 함). 본 발명에서, 인간화 항체는 "인간화" 및 "비니어링된" 항체 모드를 포함한다. 이들 방법은 문헌(Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci.,

U.S.A., 81:6851 6855 (1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65 92 (1988); Verhoeyer et al., Science 239:1534 1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489 498 (1991); Padlan, Molec. Immunol. 31(3):169 217 (1994); and Kettleborough, CA. et al., Protein Eng. 4(7):773 83 (1991))에 개시되어 있으며, 문헌의 내용이 본 명세서에 포함된다.

[0202] 예를 들어, 설치류 항체의 CDR의 유전자 서열을 단리 또는 합성한 다음, 상동 인간 항체 유전자의 상응하는 서열 영역을 치환하여 본래의 설치류 항체의 특이성을 갖는 인간 항체를 생산할 수 있다. 이들 과정은 EP 023940, WO 90/07861 및 WO 91/09967에 기재되어 있다.

[0203] CDR 그래프팅은 마우스 중쇄 및 경쇄 가변 Ig 도메인으로부터의 6개의 CDR 중 하나 이상을 인간 가변 Ig 도메인의 적절한 4개의 골격구조 영역으로 도입하는 것을 포함한다. 이 기술(Riechmann, L., et al., Nature 332, 323 (1988))은 보존된 골격구조 영역(FR1 내지 FR4)을, 항원과 일차 접촉하는 CDR 루프를 지지하는 스캐폴드로 이용한다. 그러나, CDR 그래프팅의 단점은 본래의 마우스 항체보다 실질적으로 낮은 결합 친화도를 갖는 인간화 항체가 만들어질 수 있다는 것이고, 이는 골격구조 영역의 아미노산이 항원 결합에 기여할 수 있고, CDR 루프의 아미노산이 두 개의 가변 Ig 도메인의 회합에 영향을 줄 수 있기 때문이다. 인간화 모노클로날 항체의 친화도를 유지하기 위하여, CDR 그래프팅 기술은 본래의 마우스 항체의 골격구조 영역과 가장 근사한 인간 골격구조 영역을 선택하고, 항원 결합 부위의 컴퓨터 모델링의 도움을 받아 골격구조 또는 CDR 내의 단일 아미노산을 부위-유도 변이유발시켜 개선될 수 있다(예를 들어, Co, M. S., et al. (1994), J. Immunol. 152, 2968-2976).

[0204] 항체를 인간화하는 하나의 방법은 비-인간 중쇄 및 경쇄 서열을 인간 중쇄 및 경쇄 서열에 정렬시키고, 그와 같은 정렬에 기초하여 비-인간 골격구조를 인간 골격구조로 선택 및 교체하고, 인간화 서열의 구조를 예측하기 위해 분자 모델링하고 이를 패런트 항체의 구조와 비교하는 것을 포함한다. 이 과정에 이어서, 인간화 서열 모델의 예측된 구조가 패런트 비-인간 항체의 비-인간 CDR의 구조와 근사하게 될 때 까지, CDR의 구조를 방해하는 CDR 영역 내 잔기의 역변이유발을 반복한다. 그러한 인간화 항체는, 예를 들어, 애쉬웰(Ashwell) 수용체를 통해 흡수 및 제거를 촉진하기 위해 더욱 유도될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,530,101호 및 제5,585,089호, 전문이 본 명세서에 포함됨).

[0205] 합리적인 설계에 의해 마우스 모노클로날 항체를 인간화한 많은 사례가 보고되어 왔다(예를 들어, 2002091240, 2002년 7월 11일 공개, WO 92/11018 및 미국 특허 제5,693,762호, 미국 특허 제5,766,866호).

[0206] **인간 가공™ 항체**

[0207] "인간 가공™ 항체"란 비-인간 항체, 전형적으로 마우스 모노클로날 항체로부터 유도된 항체를 말한다. 또한, 패런트 비-인간 항체의 항원 결합 특성을 보유하거나 실질적으로 보유하지만, 인간에 투여될 때 패런트 항체에 비하여 감소된 면역원성을 나타내는 키메라 항체로부터 유도될 수 있다.

[0208] 항체 가변 도메인의 인간 가공™은 스테드니카(Studnicka)에 의해 항체 분자의 결합 활성을 유지하면서 면역원성을 감소시키는 방법으로서 기재되어 있다[예를 들어, Studnicka et al., 미국 특허 제5,766,886호; Studnicka et al. Protein Engineering 7: 805-814 (1994)]. 이 방법에 따르면, 각 가변 영역 아미노산은 치환의 위험도를 배정받는다. 아미노산 치환은 세 개의 위험도 카테고리 중의 하나로 구별된다: (1) 저위험 변경은 항원 결합을 최소한의 확률로 방해하면서 면역원성을 최대한으로 감소시키는 변경이고; (2) 중간 위험 변경은 항원 결합이나 단백질 폴딩에 영향을 미칠 확률이 보다 크지만, 면역원성을 더 감소시킬 수 있는 변경이고; (3) 고위험 잔기는 결합 또는 항원 구조를 유지하는 데 중요하고, 항원 결합 또는 단백질 폴딩이 영향을 받을 위험이 가장 큰 잔기이다. 프롤린의 삼차원 구조 역할 때문에, 위치가 전형적인 저위험 위치라 할지라도, 프롤린에서의 변형은 일반적으로 적어도 중간 위험 변화로 간주된다.

[0209] 설치류 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 다음과 같이 인간 가공™되어 항원 결합이나 단백질 폴딩에 역효과를 미칠 것 같지는 않으나 인간 환경에서 면역원성을 감소시킬 것으로 측정된 위치에서 인간 아미노산으로 치환된다. "저위험" 위치에 존재하며, 상기 방법에 따른 변형 후보인 아미노산 잔기는 설치류 가변 영역의 아미노산 서열을 인간 가변 영역 서열과 정렬시켜 찾아낸다. 개개의 VH 또는 VL 서열 또는 인간 보존 VH 또는 VL 서열 또는 개개의 또는 보존 인간 생식세포 서열을 포함하여 어느 인간 가변 영역을 사용하여도 무방하다. 저위험 위치 중 일부 또는 모든 저위험 위치가 변화될 수 있다. 예를 들어, 정렬된 쥐과 동물 및 인간 아미노산 서열이 다른 각각의 저위험 위치에서, 설치류 잔기를 인간 잔기로 교체하는 아미노산 변형이 도입된다. 다른 식으로는, 모든 저위험 위치 및 중간 위험 위치의 임의의 일부의 아미노산 잔기가 변화될 수 있다. 이상적으로는, 최소한의 변

역원성을 얻도록, 모든 저위험 및 중간 위험 위치를 설치류에서 인간으로 변경한다.

[0210] 변형된 중쇄 및(또는) 경쇄 가변 영역을 함유하는 합성 유전자를 제작하여 인간 γ 중쇄 및(또는) 카파 경쇄 불변 영역에 연결시킨다. 어떠한 인간 중쇄 및 경쇄 불변 영역이라도 인간 가공™ 항체 가변 영역과 조합하여 사용할 수 있으며, 이들은 IgA(서브클래스 IgA1 또는 IgA2), IgD, IgE, IgG(서브클래스 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4) 또는 IgM을 포함한다. 인간 중쇄 및 경쇄 유전자를 포유동물 세포와 같은 숙주 세포 내로 도입하고, 생산된 재조합 면역글로불린 생성물을 수득하여 특성화한다.

[0211] **트랜스제닉 동물로부터의 인간 항체**

[0212] 표적 항원에 대한 인간 항체는 내생 면역글로불린을 생산하지 않으며 인간 면역글로불린 좌위를 함유하도록 가공된 트랜스제닉 동물을 사용하여 생산될 수 있다. 예컨대, WO 98/24893은 인간 Ig 좌위를 갖는 트랜스제닉 동물을 개시하고 있는데, 그 동물은 내생 중쇄 및 경쇄 좌위가 불활성화되었기 때문에 기능적 내생 면역글로불린을 생산하지 못한다. WO 91/10741 또한 면역원에 대해 면역 반응을 나타낼 수 있는 트랜스제닉 비-영장류 포유동물 숙주를 개시하고 있는데, 항체는 영장류 불변 및(또는) 가변 영역을 가지며, 내생 면역글로불린 코딩 좌위는 치환되거나 불활성화되었다. WO 96/30498은 포유동물에서 면역글로불린 좌위를 변형시키기 위해, 예컨대, 불변 또는 가변 영역의 전부 또는 일부를 교체하여 변형된 항체 분자를 형성하기 위해 Cre/Lox 시스템을 사용하는 것을 개시하고 있다. WO 94/02602는 불활성화된 인간 Ig 좌위 및 기능적 인간 Ig 좌위를 갖는 비-인간 포유동물 숙주를 개시하고 있다. 미국 특허 제5,939,598호는 내생 중쇄가 결여되어 있으며, 하나 이상의 이중 불변 영역을 포함하는 외래 면역글로불린 좌위를 발현하는 트랜스제닉 마우스를 만드는 방법을 개시하고 있다.

[0213] 상기한 바와 같은 트랜스제닉 동물을 사용하여, 선택된 항원 분자에 대하여 면역 반응을 유발시킬 수 있으며, 항체 생산 세포를 동물로부터 회수하여 인간 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마를 생산할 수 있다. 면역화 프로토콜, 보조제 등은 당업계에 알려져 있으며, 예컨대, 트랜스제닉 마우스를 면역화시키는데 WO 96/33735에 기재된 바와 같이 사용된다. 이 공개 문헌은 각종 항원성 분자, 예컨대, IL6, IL8, TNFa, 인간 CD4, L 셀렉틴, gp39, 및 테타누스 독소 등에 대한 모노클로날 항체를 개시하고 있다. 모노클로날 항체는 상응하는 단백질의 생물학적 활성 또는 생리학적 효과를 억제 또는 중화하는 능력에 대해 시험될 수 있다. WO 96/33735는 IL-8로 면역된 트랜스제닉 마우스의 면역 세포로부터 유도된, IL-8에 대한 모노클로날 항체가 호중구의 IL-8 유도된 기능을 차단하는 것을 개시하고 있다. 트랜스제닉 동물을 면역화하는 데 사용된 항원에 대한 특이성을 갖는 인간 모노클로날 항체는 WO 96/34096 및 미국 특허 출원 제20030194404호; 및 미국 특허 출원 제20030031667호에 개시되어 있다. 또한 문헌(Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immune, 7:33 (1993); 및 미국 특허 제5,591,669호, 미국 특허 제5,589,369호, 미국 특허 제5,545,807호; 및 미국 특허 출원 제20020199213호, WO 96/34096 및 미국 특허 출원 제20030194404호; 및 미국 특허 출원 제20030031667호)을 참조할 수 있다.

[0214] 모노클로날 항체를 만드는 데 유용한 또 다른 트랜스제닉 동물은 메다렉스(Medarex) HuMab-MOUSE®(미국 특허 제5,770,429호 및 Fishwild, et al., Nat. Biotechnol. 14:845-851, 1996)를 포함하며, 이는 인간 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는, 재배열되지 않은 인간 항체 유전자로부터의 유전자 서열을 함유한다. HuMab-MOUSE® 를 면역화시킴으로써 표적 단백질에 대한 모노클로날 항체를 생산할 수 있다.

[0215] 또한, 문헌(Ishida et al., Cloning Stem Cells. 4:91-102, 2002)은 인간 DNA의 메가염기-크기의 세그먼트를 포함하며, 전체 인간 면역글로불린(hIg) 좌위를 포함하는 트랜스크로모 마우스(TransChromo Mouse; TCMOUSE™)를 개시하고 있다. TCMOUSE는 IgG의 모든 서브클래스(IgG1 내지 G4)를 포함하는, 완전히 다양한 인간 면역글로불린 레파토어이다. TC 마우스를 각종 인간 항원으로 면역화시키면 인간 항체를 포함하는 항체 반응이 일어난다.

[0216] 미국 특허 출원 제20030092125호는 동물의 면역 반응을 목적하는 에피토프로 바이어싱하는 방법을 기재하고 있다. 인간 항체는 시험관내 활성화된 B 세포에 의해 생산될 수도 있다(미국 특허 제5,567,610호 및 제5,229,275호).

[0217] **파아지 디스플레이 기술로부터의 항체**

[0218] 재조합 인간 항체 유전자의 레파토어를 만드는 기술 및 코딩된 항체 단편을 필라멘트상 박테리오파아지의 표면에 디스플레이하는 기술의 개발은 인간 항체를 직접 만들고 선택하는 재조합 수단을 제공하였으며, 이 기술은 또한 인간화, 키메라, 쥐과 동물 또는 뮤테인 항체에도 적용될 수 있다. 파아지 기술에 의해 생산된 항체는 세균 중 항원 결합 단편, 주로 Fv 또는 Fab 단편으로 생산되며, 따라서 이펙터 기능이 없다. 이펙터 기능은 하나

이상의 전략으로 도입될 수 있다: 단편을 포유동물 세포에서 발현시키기 위한 완전한 항체 내로, 또는 이펙터 기능을 촉발할 수 있는 제2의 결합 부위를 갖는 이중 특이적 항체 단편 내로 가공하여 넣는다.

[0219] 전형적으로, 항체의 Fd 단편(VH-CH1) 및 경쇄(VL-CL)를 PCR에 의해 별도로 클로닝하여, 조합 파아지 디스플레이 라이브러리 내에 랜덤하게 조합한 다음, 특정 항원에 결합 여부에 대해 선택할 수 있다. Fab 단편은 파아지 표면에 발현되며, 즉 그것을 코딩하는 유전자에 물리적으로 연결되어 있다. 따라서, 항원 결합에 의한 Fab의 선택은 Fab 코딩 서열을 동시에 선택하게 하며, 이는 후에 증폭될 수 있다. 패닝(panning)이라고도 불리우는, 항원 결합 및 재증폭을 수 차례함으로써, 항원에 특이적인 Fab가 농축되고, 최종적으로 단리된다.

[0220] 1994년에, "가이드드 선택(guided selection)"이라 불리는 항체의 인간화 방법이 기재되었다. 가이드드 선택은 마우스 모노클로날 항체를 인간화하기 위하여 파아지 디스플레이 기술을 이용한다(Jespers, L. S., et al., Bio/Technology 12, 899-903 (1994)). 이를 위해, 마우스 모노클로날 항체의 Fd 단편을 인간 경쇄 라이브러리와 함께 디스플레이할 수 있으며, 생성된 하이브리드 Fab 라이브러리를 항원으로 선택할 수 있다. 마우스 Fd 단편은 이와 같이 선택을 가이드하는 주형을 제공한다. 결과적으로, 선택된 인간 경쇄가 인간 Fd 단편 라이브러리와 조합된다. 생성된 라이브러리의 선택으로 완전한 인간 Fab가 수득된다.

[0221] 파아지 디스플레이 라이브러리로부터 인간 항체를 유도하는 각종 방법이 기재되어 있다(Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); 미국 특허 제5,565,332호 및 제5,573,905호; Clackson, T., and Wells, J. A., TIBTECH 12, 173-184 (1994)). 특히, 파아지 디스플레이 라이브러리로부터 유도된 항체를 시험관내 선택 및 전개시키는 것이 강력한 수단이 되었다(Burton, D. R., and Barbas III, C. F., Adv. Immunol. 57, 191-280 (1994); and, Winter, G., et al., Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455 (1994); 미국 특허 출원 제20020004215호 및 WO 92/01047; 미국 특허 출원 제20030190317호, 2003년 10월 9일 공개 및 미국 특허 제6,054,287호; 미국 특허 제5,877,293호).

[0222] 왓킨스의 문헌(Watkins, "Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift," Methods in Molecular Biology, Antibody Phage Display: Methods and Protocols 178: 187- 193) 및 미국 특허 출원 제 200120030044772호(2003년 3월 6일 공개)는 캡처 리프트에 의해 파아지 발현 항체 라이브러리 또는 다른 결합 분자를 스크리닝하는 방법을 기재하고 있는데, 이 방법은 후보 결합 분자를 고체 지지체 상에 고정시키는 것을 포함한다.

[0223] 항체 생성물은 본 명세서 중 "스크리닝 방법"란에 기재되었거나 당업계에 알려진 적절한 분석법을 사용하여 활성 및 본 발명의 치료 방법에서의 적합성에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0224] **아미노산 서열 뮤테인**

[0225] 본 발명의 항체는 목적하는 결합 친화도 또는 생물학적 활성을 보유하는 한패턴트 항체의 뮤테인 또는 변이체를 포함하는데, 이들에게서 패턴트 항체의 폴리펩티드 서열은 CDR을 포함하여 가변 영역 내 또는 가변 영역에 대응하는 부분 내에서 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실 또는 부가에 의해 변화되어 있다. 뮤테인은 패턴트 항체에 실질적으로 상동성이거나 실질적으로 동일할 수 있으며, 예를 들어, 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성 또는 상동성일 수 있다. 이 서열과 관련하여 동일성 또는 상동성은 본 명세서에서 서열들을 정렬하고 필요에 따라 갭(gap)을 도입하여 최대 퍼센트 동일성을 수득한 후에(보존적 치환은 서열 동일성의 부분으로서 고려하지 않음), 패턴트 서열과 일치하는 후보 서열 중의 아미노산 잔기의 퍼센트로서 정의된다. 항체 서열 내로의 N-말단, C-말단 또는 내부 연장, 결실 또는 삽입 중 어느 것도 서열 동일성 또는 상동성에 영향을 주는 것으로 간주되지 않는다. 따라서, 서열 동일성은 두 폴리펩티드에서 아미노산 위치의 유사성을 비교하는 데 통상적으로 사용되는 표준 방법에 의해 결정될 수 있다. BLAST 또는 FASTA와 같은 컴퓨터 프로그램을 사용하여, 두 폴리펩티드를 그들 각각의 아미노산의 최적 매칭을 위해 정렬시킨다(하나 또는 두 서열의 전 길이를 따라서, 또는 하나 또는 두 서열의 예정된 부분을 따라서). 이 프로그램은 디폴트 오프닝 패널티와 디폴트 갭 패널티를 제공하며, PAM 250 [표준 스코어링 매트릭스; Dayhoff et al., in Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, supp. 3 (1978)]와 같은 스코어링 매트릭스를 컴퓨터 프로그램과 함께 사용할 수 있다. 예를 들어, 퍼센트 동일성을 다음과 같이 계산할 수 있다: 동일한 매치의 총수에 100을 곱한 것을, 매칭된 스캔 내보다 긴 서열의 길이와 두 서열을 정렬시키기 위해 보다 긴 서열 내로 도입된 갭의 수의 합으로 나눈다.

[0226] 본 발명의 항체는 또한 불변 영역의 폴리펩티드 서열 내에 변화를 포함할 수 있는데, 이와 같은 변화는 결합 친화도에는 영향을 미치지 않지만, 항체 의존적 세포독성 세포독성(ADCC), 보체 의존적 세포독성(CDC) 또는 제거 및

흡수(및 반감기에 대한 결과적인 효과)와 같은 이펙터 기능을 변화시킬 수 있다..

[0227]

삽입

[0228]

아미노산 서열 삽입은 길이가 하나의 잔기에서 백 개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 아미노- 및(또는) 카복실-말단 융합뿐만 아니라 단수 또는 복수 개 아미노산 잔기, 예컨대, 2, 3 또는 그 이상의 아미노산 잔기의 서열내의 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체, 에피토프 태그 또는 샬비지(salvage) 수용체 에피토프에 융합된 항체(항체 단편 포함)를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입형 뮤테인은 글리코실화 부위의 부가, 분자내 또는 분자간 결합을 위한 시스테인 부가, 또는 N-말단 또는 C-말단에서 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드에의 부가를 포함한다. 예를 들어, 안정성을 증가시키기 위해(특히, 항체가 Fv 단편과 같은 항체 단편인 경우), 항체에 시스테인 결합을 부가할 수 있다.

[0229]

항체의 글리코실화는 전형적으로는 N-결합 또는 O-결합된다. N-결합이라는 것은 탄수화물 잔기를 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착시키는 것을 이른다. 트리펩티드 서열, 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌(X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 탄수화물 잔기를 아스파라긴 측쇄에 효소적 부착시키기 위한 인식 서열이다. 폴리펩티드 중에 이들 트리펩티드 중 어느 하나가 존재하면, 유력한 글리코실화 부위가 된다. 따라서, N-결합 글리코실화 부위는 하나 이상의 이들 트리펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변경하여 부가될 수 있다. O-결합 글리코실화는 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중 하나의 당을 히드록시아미노산, 가장 대표적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착시키는 것을 이르나, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신도 또한 사용될 수 있다. O-결합 글리코실화 부위는 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 본래의 항체 서열에 삽입 또는 치환하여 항체에 부가될 수 있다.

[0230]

"에피토프 태그된"이란 에피토프 태그에 융합된 항체를 이른다. 에피토프 태그 폴리펩티드는 대항하는 항체가 만들어질 수는 있지만 항체의 활성화에 간섭하기에는 너무 짧은 에피토프를 제공하기에 충분한 잔기를 제공한다. 에피토프 태그는 바람직하게는 그에 대항하는 항체가 실질적으로 다른 에피토프와 교차 반응하지 않을 정도로 충분히 독특하여야 한다. 적절한 태그 폴리펩티드는 일반적으로 6개 이상 아미노산 잔기, 대개 약 8 내지 50개 아미노산 잔기, 바람직하게는 약 9 내지 30 개의 아미노산 잔기를 갖는다. 태그의 예는 flu HA 태그 폴리펩티드 및 그의 항체 12CA5 [Field et al., *Mol. Cell. Biol.* 8: 2159-2165 (1988)]; c-myc 태그 및 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 및 9E10 항체 [Evan et al., *Mol. Cell. Biol.* 5(12): 3610-3616 (1985)]; 허피스 심플렉스 바이러스 글리코프로테인 D(gD) 태그 및 그의 항체 [Paborsky et al., *Protein Engineering* 3(6): 547-553 (1990)]를 포함한다. 다른 태그의 예로서 니켈 킬레이션을 사용하여 그와 같이 표지된 화합물의 단리를 가능하게 하는, 일반적으로 약 6개의 히스티딘 잔기로 이루어진 폴리-히스티딘 서열이 있다. 다른 표지 및 태그, 예컨대, FLAG® 태그(Eastman Kodak, Rochester, NY)가 잘 알려져 있으며, 당업계에서 통상적으로 사용되고 있으며, 본 발명에 포함된다.

[0231]

본 명세서에서, "샬비지 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기를 증가시키는 역할을 하는, IgG 분자(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4)의 Fc 영역의 에피토프를 이른다.

[0232]

결실

[0233]

아미노산 서열 결실은 결과적으로 표적 항원에 대한 결합 친화도를 보유하는 단편을 생성시키는, 길이에 있어 하나 내지 백 또는 그 이상의 잔기에 이르는 아미노- 및(또는) 카복시-말단 결실뿐만 아니라 단수 또는 복수 개 아미노산 잔기, 예컨대, 2, 3 또는 그 이상의 아미노산 잔기의 서열내의 결실을 포함한다. 예를 들어, 글리코실화 부위는 트리펩티드 또는 다른 글리코실화 인식 서열의 전부 또는 일부를 제거하여 결실되거나 다른 위치로 이동될 수 있다.

[0234]

치환

[0235]

뮤테인의 다른 형태는 아미노산 치환 뮤테인이다. 이들 뮤테인은 항체 분자 내 적어도 하나의 아미노산 잔기가 제거되고 그 자리에 다른 잔기가 삽입된 것이다. 초가변 또는 CDR 영역 또는 골격구조 영역 중 어디에서나 치환적 변이가 고려될 수 있다. 보존적 치환은 표 1에 나타나 있다. 가장 보존적인 치환은 "바람직한 치환"이라는 항목 아래에 있다. 그러한 치환이 생물학적 활성화에 아무런 변화를 가져오지 않을 때, 표 1에서 "예시적 치환"이라고 나타내거나 또는 하기에서 아미노산 클래스와 관련하여 기재된 것과 같은 보다 실질적인 변화를 도입하고, 생성물을 스크리닝할 수 있다.

[0236]

[표 1]

[0237]	본래의 예시적 치환	바람직한 잔기 치환
[0238]	아미노산	
[0239]	Ala (A) 발린; 루신; 이소루신	발린
[0240]	Arg (R) 리신; 글루타민; 아스파라긴	리신
[0241]	Asn (N) 아르기닌; 히스티딘; 아스파르트산; 리신; 아르기닌	
[0242]	글루타민	
[0243]	Asp (D) 글루탐산; 아스파라긴	글루탐산
[0244]	Cys (C) 세린; 알라닌	세린
[0245]	Gln (Q) 아스파라긴; 글루탐산	아스파라긴
[0246]	Glu (E) 아스파르트산; 글루타민	아스파르트산
[0247]	Gly (G) 알라닌	
[0248]	His (H) 아스파라긴; 글루타민; 리신; 아르기닌	
[0249]	Ile (I) 루신; 발린; 메티오닌; 알라닌;	루신
[0250]	페닐알라닌;	노르루신
[0251]	Leu (L) 노르루신; 이소루신; 발린;	이소루신
[0252]	메티오닌; 알라닌; 페닐알라닌	
[0253]	Lys (K) 아르기닌; 글루타민; 아스파라긴	아르기닌
[0254]	Met (M) 루신; 페닐알라닌; 이소루신	루신
[0255]	Phe (F) 루신; 발린; 이소루신; 알라닌; 타이로신	
[0256]	Pro (P) 알라닌	
[0257]	Ser (S) 트레오닌	
[0258]	Thr (T) 세린	세린
[0259]	Trp (W) 타이로신; 페닐알라닌	타이로신
[0260]	Tyr (Y) 트립토판; 페닐알라닌; 트레오닌; 세린	페닐알라닌
[0261]	Val (V) 이소루신; 루신; 메티오닌; 페닐알라닌;	루신
[0262]	알라닌; 노르루신	
[0263]	<p>항체의 생물학적 특성에 있어서의 실질적인 변화는 (a) 치환 영역에서 폴리펩티드 골격의 구조, 예를 들어, 쉬이트 또는 나선 구조, (b) 표적 부위에서 분자의 하전 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 크기에 미치는 효과에 있어서 상당하게 다른 치환을 선택함으로써 달성될 수 있다. 천연 잔기는 일반적 측쇄 특성에 따라 몇 개의 군으로 나누인다:</p>	
[0264]	(1) 소수성: 노르루신, 메티오닌, 알라닌, 발린, 루신, 이소루신;	
[0265]	(2) 중성 친수성: 시스테인, 세린, 트레오닌;	
[0266]	(3) 산성: 아스파르트산, 글루탐산;	
[0267]	(4) 염기성: 아스파라긴, 글루타민, 히스티딘, 리신, 아르기닌;	
[0268]	(5) 사슬 배향에 영향을 주는 잔기: 글리신, 프롤린; 및	
[0269]	(6) 방향족: 트립토판, 타이로신, 페닐알라닌.	
[0270]	보존적 치환은 아미노산을 같은 클래스의 다른 아미노산으로 교체하는 것을 포함한다. 비보존적 치환은 어느 한	

클래스의 아미노산을 다른 클래스의 아미노산으로 교체하는 것을 포함한다.

- [0271] 항체의 적절한 구조를 유지하는 데 관여하지 않는 시스테인은 분자의 산화 안정성을 개선하고 비정상적 가교결합을 방지하기 위해, 일반적으로는 세린으로 치환될 수 있다.
- [0272] 친화도 성숙은 일반적으로 페런트 항체의 CDR 내에 치환을 갖는 항체 변이체를 제조 및 스크리닝하고, 페런트 항체에 비하여 결합 친화도와 같은 생물학적 특성이 개선된 변이체를 선택하는 것을 포함한다. 그러한 치환 변이체를 생산하는 편리한 방법은 파아지 디스플레이를 사용한 친화도 성숙이다. 간략히 설명하여, 수 개의 추가 변 영역 부위(예를 들어, 6 내지 7 부위)를 변이시켜 각 부위에서 모든 가능한 아미노산 치환을 생성시킨다. 이와 같이 생성된 항체 변이체를 각 입자내에 패키징된 M13의 유전자 III 생성물에 대한 융합체로서 필라멘트상 파아지 입자로부터 모노발렌트 방식으로 디스플레이한다. 파아지-디스플레이된 변이체를 그들의 생물학적 활성(예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝한다(예를 들어, WO 92/01047, WO 93/112366, WO 95/15388 및 WO 93/19172).
- [0273] 현재의 항체 친화도 성숙 방법은 두 가지 변이유발 카테고리, 즉, 확률론적(stochastic) 및 비확률론적(nonstochastic) 방법에 속한다. 에러-프론 PCR, 변이유발 세균주(Low et al., J. Mol. Biol. 260, 359-68, 1996) 및 포화 변이유발(Nishimiya et al., J. Biol. Chem. 275:12813-20, 2000; Chowdhury, P. S. Methods Mol. Biol. 178, 269-85, 2002)은 확률론적 변이유발법의 전형적인 예이다(Rajpal et al., Proc Natl Acad Sci U SA. 102:8466-71, 2005). 비확률론적 기술은 종종 특이적 변이체의 제한된 컬렉션을 얻기 위하여 알라닌-스캐닝 또는 부위-유도 변이유발을 이용한다. 몇몇 방법을 하기 상세히 설명한다.
- [0274] 패닝(panning) 방법을 통한 친화도 성숙 - 재조합 항체의 친화도 성숙은 통상적으로는 감소하는 양의 항원 존재 하에 후보 항체를 몇 차례 패닝하여 수행한다. 회 마다 항원의 양을 감소시켜 항원에 대해 가장 높은 친화도를 갖는 항체를 선택함으로써, 출발 물질의 대형 풀로부터 높은 친화도의 항체를 수득한다. 패닝을 통한 친화도 성숙은 당업계에 잘 알려져 있으며, 문헌에도 기재되어 있다(HuIs et al., Cancer Immunol Immunother. 50:163-71, 2001). 파아지 디스플레이 기술을 이용한 친화도 성숙 방법은 본 명세서에 기재되고 당업계에 알려져 있다(예를 들어, Daugherty et al., Proc Natl Acad Sci USA. 97:2029-34, 2000).
- [0275] 룩-쓰루(Look-through) 변이유발 - 룩-쓰루 변이유발(LTM)(Rajpal et al., Proc Natl Acad Sci U SA. 102:8466-71, 2005)은 항체-결합 부위를 신속히 맵핑하는 방법을 제공한다. LTM에 있어서, 20가지 천연 아미노산에 의해 제공되는 주된 측쇄 화학적 성질을 대표하는 9종의 아미노산을 선택하여 항체의 6개의 CDR 모두 중 각 위치에서 결합에 대한 기능적 측쇄의 기여도를 상세히 분석한다. LTM은 CDR내에 위치 연속적 일련의 단일 변이유발을 일으키는데, 여기서 각 "야생형" 잔기는 선택된 9개의 아미노산 중의 하나로 체계적으로 치환된다. 변이된 CDR을 조합하여 모든 변이체의 정량적 디스플레이가 가능한 상태에서 증가하는 복잡성 및 크기의 조합 단 일쇄 가변 단편(scFv) 라이브러리를 생산한다. 양성 선택 후에, 개선된 결합을 갖는 클론을 시퀀싱하고, 유익한 변이를 맵핑한다.
- [0276] 에러-프론(Error-prone) PCR - 에러-프론 PCR은 다른 회차의 선택 과정 사이에 핵산을 랜덤화하는 것을 포함한다. 랜덤화는 사용된 폴리머라제의 고유 에러율에 의해 낮은 비율로 일어나지만, 전자 중 높은 고유 에러율을 갖는 폴리머라제를 사용하는 에러-프론 PCR(Zaccolo et al., J. Mol. Biol. 285:775-783, 1999)에 의해 증가될 수 있다(Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-96, 1992). 변이 사이클 후에, 항원에 대한 개선된 친화도를 갖는 클론을 당업계 통상의 방법으로 선택한다.
- [0277] DNA 셔플링(Shuffling) - 핵산 셔플링은 변이 폴리뉴클레오티드를 생산하기 위해 보다 짧거나 작은 폴리뉴클레오티드의 풀을 시험관내 또는 생체내 상동 재조합하는 방법이다. DNA 셔플링은 미국 특허 제6,605,449호, 미국 특허 제 6,489,145호, WO 02/092780 및 문헌(Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 91:10747-51 (1994))에 기재되어 있다. 일반적으로, DNA 셔플링은 3 단계로 이루어지는데, 셔플링될 유전자를 DNase I로 단편화하는 단계, 단편을 랜덤 혼성화하고 단편화 유전자를 DNA 폴리머라제 존재하의 PCR(섹슈얼 PCR)에 의해 재결합 또는 채워넣는 단계 및 재결합된 생성물을 통상의 PCR로 증폭시키는 단계이다.
- [0278] DNA 셔플링은 에러-프론 PCR과 역 연쇄 반응이라는 점에서 다르다. 에러-프론 PCR에서, 폴리머라제 개시 부위의 수와 분자의 수는 지수적으로 증가한다. 대조적으로, 랜덤 폴리뉴클레오티드의 핵산 재결합 또는 셔플링에서 개시 부위의 수와 랜덤 폴리뉴클레오티드의 수(크기가 아님)는 시간이 지남에 따라 감소한다.
- [0279] 항체의 경우에, DNA 셔플링은 예를 들어, 모든 CDR1이 모든 CDR2와 또한 모든 CDR3와 자유롭게 조합될 수 있게 한다. 같은 반응에서 다수의 서열 패밀리가 셔플링될 수 있다. 또한, 셔플링은 일반적으로 상대적인 순서를 보

존하는데, 예컨대, CDR1은 CDR2의 위치에서 발견되지 않는다. 극소수의 셔플란트(shufflant)만이 다수의 최상의 (예를 들어, 높은 친화도) CDR을 포함할 것이며, 이들 극소수의 셔플란트는 그들의 일정한 친화도에 의해 선택 될 수 있다.

[0280] DNA 셔플링에 사용될 수 있는 주형 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA일 수 있다. 재조합 또는 재결합될 유전자 또는 보다 작거나 짧은 폴리뉴클레오티드 크기에 따라서 다양한 길이일 수 있다. 바람직하게는, 주형 폴리뉴클레오티드는 50 bp 내지 50 kb이다. 주형 폴리뉴클레오티드는 종종 이중 가닥이다.

[0281] 유전자 선택의 초기 단계에, 주형 폴리뉴클레오티드와 일치하는 영역 및 주형 폴리뉴클레오티드와 다른 영역을 갖는 단일 가닥 또는 이중 가닥 핵산 폴리뉴클레오티드를 주형 폴리뉴클레오티드에 가할 수 있다. 또한, 초기 단계에 두 개의 상이하지만 관련된 폴리뉴클레오티드 주형을 혼합할 수 있다.

[0282] 알라닌 스캐닝 - 항원 결합에 상당히 기여하는 추가변 영역 잔기를 찾아내기 위해 알라닌 스캐닝 변이유발을 수행할 수 있다(Cunningham and Wells, Science 244: 1081-1085, 1989). 표적 잔기 또는 일군의 표적 잔기(예를 들어, 아르기닌, 아스파르트산, 히스티딘, 리신 및 글루탐산과 같은 하전된 잔기)를 찾아내서 중성 또는 음으로 하전된 아미노산(가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 치환하여 아미노산과 항원의 상호작용을 일으킨다. 치환 위치를 위해 또는 치환 위치에 추가의 또는 다른 변종을 도입하여 치환에 기능적 감수성을 나타내는 아미노산 위치들을 세밀하게 찾아낸다. 이와 같이, 아미노산 서열 변이를 도입할 위치는 미리결정되지만, 변이 자체의 특성은 미리결정될 필요가 없다. 예를 들어, 주어진 위치에서 변이의 결과를 분석하기 위하여, 알라닌 스캐닝 또는 랜덤 변이유발을 표적 코돈 또는 영역에서 수행하고, 발현된 항체 뮤테인을 목적하는 활성에 대해 스크리닝한다.

[0283] 컴퓨터 보조 설계 - 또 다른 방법으로 또는 추가의 방법으로, 항체와 항원 사이의 접촉점을 찾아내기 위해 항원-항체 결합체의 결정 구조를 분석하거나, 그와 같은 접촉점을 모델링하기 위해 컴퓨터 소프트웨어를 사용하는 것이 유익할 수 있다. 그러한 접촉 잔기 및 인접 잔기는 본 명세서에 설명된 기술에 따른 치환 후보 위치가 된다. 일단 그러한 변이체가 생성되면, 변이체 패넬을 본 명세서에 기재된 바와 같이 스크리닝하고, 하나 이상의 관련 분석에서 일정한 특성을 갖는 항체를 추후 개발을 위해 선택한다.

[0284] 친화도 성숙은 일반적으로 패런트 항체의 CDR 내에 치환을 갖는 항체 변이체를 제조 및 스크리닝하고, 패런트 항체에 비하여 결합 친화도와 같은 생물학적 특성이 개선된 변이체를 선택하는 것을 포함한다. 그러한 치환 변이체를 생산하는 편리한 방법은 파아지 디스플레이를 사용한 친화도 성숙이다. 간략히 설명하여, 수 개의 추가 변 영역 부위(예를 들어, 6 내지 7 부위)를 변이시켜 각 부위에서 모든 가능한 아미노산 치환을 생성시킨다. 이와 같이 생성된 항체 변이체를 각 입자내에 패키징된 M13의 유전자 III 생성물에 대한 융합체로서 필라멘트상 파아지 입자로부터 모노발렌트 방식으로 디스플레이한다. 파아지-디스플레이된 변이체를 그들의 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝한다.

[0285] 알라닌 스캐닝 변이유발은 결합에 상당히 기여하는 추가변 영역 잔기를 찾아내기 위해 수행할 수 있다. 또 다른 방법으로 또는 추가의 방법으로, 항체와 항원 사이의 접촉점을 찾아내기 위해 항원-항체 결합체의 결정 구조를 분석하는 것이 유익할 수 있다. 그러한 접촉 잔기 및 인접 잔기는 본 명세서에 설명된 기술에 따른 치환 후보 위치가 된다. 일단 그러한 변이체가 생성되면, 변이체 패넬을 본 명세서에 기재된 바와 같이 스크리닝하고, 하나 이상의 관련 분석에서 일정한 특성을 갖는 항체를 추후 개발을 위해 선택한다.

[0286] **변경된 이펙터 기능**

[0287] 항체의 다른 변형을 고려할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 항체를 이펙터 기능과 관련하여 변형시켜, 예를 들어, 암을 치료하는 데 있어서 항체의 효과를 증진시키는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 시스템인 잔기를 Fc 영역 내로 도입함으로써, 이 영역에서 사슬간 디설파이드 결합을 형성할 수 있다. 이와 같이 제조된 호모이량체 항체는 개선된 내재화 능력 및(또는) 증가된 보체 매개 세포 사멸 및 항체 의존적 세포독성(ADCC)을 가질 수 있다(Caron et al., J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) and Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)). 증진된 활성을 갖는 호모이량체 항체는 또한 문헌에 기재된 바와 같은 헤테로이작용성 크로스-링커를 사용하여 제조될 수 있다(Wolff et al., Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)). 또한, 이중 Fc 영역을 가짐으로써 증진된 보체 분해 및 ADCC 성능을 갖는 항체를 가공할 수 있다(Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)). 또한, CDR 내의 서열은 항체가 MHC 클래스 II에 결합하게 하여 원치 않는 헬퍼 T 세포 반응을 촉발하게 할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 보존적 치환은 항체가 결합 활성은 보유하지만 원치 않는 헬퍼 T 세포 반응을 촉발하는 능력은 상실하게 할 수 있다. 전문이 본 명세서에 포함되는 문헌(Steplewski et

al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85(13):4852-6)은 쥐과 동물 가변 영역이 인간 감마 1, 감마 2, 감마 3, 및 감마 4 불변 영역에 결합된 키메라 항체를 기재하고 있다.

- [0288] 본 발명의 특정 실시태양에서, 예컨대, 종양 관통을 증가시키기 위하여 온전한 항체를 사용하는 것보다 항체 단편을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 이 경우에, 예를 들어, 혈청 반감기를 증가시키기 위해 PEG 또는 폴리아카라이드 중합체를 포함하는 다른 수용성 중합체와 같은 분자를 항체 단편에 가하여 항체 단편을 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 반감기 증가는 또한, 예컨대, 항체 단편 내로 셀비지 수용체 결합 에피토프를 도입(예를 들어, 항체 단편 내의 적절한 영역을 변이시키거나, 에피토프를 펩티드 태그 내로 포함시킨 후, 이를 항체 단편에 어느 한 쪽 말단 또는 중간에, 예를 들어, DNA 또는 펩티드 합성으로 융합시켜)하여 달성할 수 있다(예를 들어, WO 96/32478).
- [0289] 셀비지 수용체 결합 에피토프는 바람직하게는 Fc 도메인의 하나 또는 두 루프로부터의 어느 하나 이상의 아미노산 잔기가 항체 단편의 유사한 위치로 이동된 영역을 구성한다. 보다 바람직하게는, Fc 도메인의 하나 또는 두 루프로부터의 세 개 이상의 잔기가 이동된다. 더욱 바람직하게는, 에피토프는 Fc 영역(예를 들어, IgG의)의 CH2 도메인으로부터 취해져 CH1, CH3 또는 VH 영역, 또는 그러한 둘 이상의 영역으로 이동된다. 또한, 에피토프는 Fc 영역의 CH2 도메인으로부터 취해져 항체 단편의 C_L 영역 또는 V_L영역 또는 이들 둘 다로 이동된다. 또한 국제 출원 WO 97/34631 및 WO 96/32478는 Fc 변이체 및 그의 셀비지 수용체와의 상호작용을 기재하고 있다.
- [0290] 따라서, 본 발명의 항체는 인간 Fc 부분, 인간 보존 Fc 부분, 또는 Fc 셀비지 수용체와 상호작용할 수 있는 능력을 보유한 그의 뮤테인을 포함할 수 있으며, 뮤테인은 디설파이드 결합에 관여하는 시스테인이 변형 또는 제거되고(거나) 메티오닌이 N-말단에 부가되고(거나) N-말단 20개 아미노산 중 하나 이상이 제거되고(거나) 보체와 상호작용하는 영역, 예를 들어, C1q 결합 부위가 제거되고(거나) ADCC 부위가 제거된 뮤테인을 포함한다[예를 들어, Molec. Immunol. 29 (5): 633-9 (1992)]. IgG 클래스의 항체는 또한 상이한 불변 영역을 포함할 수 있으며, 예를 들어, IgG2 항체를 변형시켜 IgG1 또는 IgG4 불변 영역을 제시하게 할 수 있다.
- [0291] IgG1의 경우에, 특히 힌지 또는 CH2 영역과 같은 불변 영역의 변형은 ADCC 및(또는) CDC 활성화와 같은 이펙터 기능을 증가시키거나 감소시킬 수 있다. 다른 실시태양에서, IgG2 불변 영역을 변형시켜 항체-항원 응집체 형성을 감소시킨다. IgG4의 경우, 불변 영역, 특히 힌지 영역의 변형은 반-항체의 형성을 감소시킬 수 있다. 구체적인 실시태양에서, IgG4 힌지 서열 Cys-Pro-Ser-Cys를 IgG1 힌지 서열 Cys-Pro-Pro-Cys로 변이시킨다.
- [0292] 이전의 연구는 주로 IgG 잔기 233-239로 이루어진 낮은 힌지 영역으로 FcR에 대한 인간 및 쥐과 동물 IgG 상의 결합 부위를 맵핑하였다. 다른 연구는 또 다른 넓은 세그먼트, 예를 들어, 인간 Fc 수용체 I에 대해 Gly316-Lys338, 인간 Fc 수용체 III에 대해 Lys274-Arg301 및 Tyr407-Arg416을 제안하거나, 낮은 힌지 영역 바깥쪽의 몇몇 특이적 잔기, 예를 들어, 쥐과 동물 IgG2b가 쥐과 동물 Fc 수용체 II와 상호작용하는 Asn297 및 Glu318을 발견하였다. 인간 IgG1 Fc 단편과 인간 Fc 수용체 IIIA의 3.2-Å 결정 구조의 보고는 IgG1 잔기 Leu234-Ser239, Asp265-Glu269, Asn297-Thr299, 및 Ala327-Ile332가 Fc 수용체 IIIA에의 결합에 관여하는 것으로 기술하였다. 결정 구조에 기초하여, 낮은 힌지(Leu234-Gly237) 뿐 아니라 IgG CH2 도메인 루프 FG(잔기 326-330) 및 BC(잔기 265-271)내의 잔기가 Fc 수용체 IIA에의 결합에 역할을 할 수 있을 것이라고 제시되었다(Shields et al., J. Biol. Chem., 276(9):6591-6604 (2001), 전문이 본 명세서에 포함됨). Fc 수용체 결합 부위 내의 잔기의 변이는 변화된 이펙터 기능, 예를 들어, 변화된 ADCC 또는 CDC 활성화, 또는 변화된 반감기를 가져올 수 있다. 상술한 바와 같이, 가능한 변이는 하나 이상의 잔기의 삽입, 결실 또는 치환을 포함하며, 치환은 또한 알라닌으로의 치환, 보존적 치환, 비보존적 치환, 또는 다른 IgG 서브클래스에서 동일한 위치에 있는 상응하는 잔기로의 치환(예컨대, IgG1 잔기를 그 위치에 있는 상응하는 IgG2 잔기로 교체)을 포함한다.
- [0293] 쉴즈(Shields) 등은 모든 인간 Fc 수용체에의 결합에 관여하는 IgG1 잔기는 CH2 도메인 내에 힌지에 근접하여 위치하며, 다음의 두 카테고리로 분류된다고 보고하였다: 1) 모든 FcR과 직접 상호작용할 수 있는 위치는 Leu234-Pro238, Ala327, 및 Pro329(및 가능하게는 Asp265)를 포함한다; 2) 탄수화물 특성 또는 위치에 영향을 주는 위치는 Asp265 및 Asn297을 포함한다. Fc 수용체 II에의 결합을 일으키는 추가의 IgG1 잔기는, (가장 큰 효과) Arg255, Thr256, Glu258, Ser267, Asp270, Glu272, Asp280, Arg292, Ser298, 및 (덜한 효과) His268, Asn276, His285, Asn286, Lys290, Gln295, Arg301, Thr307, Leu309, Asn315, Lys322, Lys326, Pro331, Ser337, Ala339, Ala378 및 Lys414이다. A327Q, A327S, P329A, D265A 및 D270A는 결합을 감소시켰다. 모든 FcR에 대하여 상기 밝혀진 잔기 외에, Fc 수용체 IIIA에의 결합을 40% 이상 감소시키는 IgG1 잔기는 Ser239, Ser267(단지 Gly), His268, Glu293, Gln295, Tyr296, Arg301, Val303, Lys338, 및 Asp376이다. FcRIIIA에의 결합을 개선시킨 뮤테인은 T256A, K290A, S298A, E333A, K334A, 및 A339T을 포함한다. Lys414는 FcRIIA 및

FcRIIB에의 결합에 있어 40% 감소를, Arg416은 FcRIIA 및 FcRIIIA에의 결합에 있어 30% 감소를, Gln419는 FcRIIA에 대해서는 30% 감소를 FcRIIB에 대해서는 40% 감소를, Lys360은 FcRIIIA에 대해서 23% 개선을 나타냈다(Presta et al., Biochem. Soc. Trans. (2001) 30, 487-490).

- [0294] 예를 들어, 미국 특허 제6,194,551호(전문이 본 명세서에 포함됨)는 인간 IgG Fc 영역 아미노산 위치 329, 331 또는 322(카뱃 넘버링)에 변이를 함유하는, 이펙터 기능이 변화된 뮤테인을 기재하고 있는데, 그들 중 일부는 감소된 C1q 결합 또는 CDC 활성을 나타낸다. 다른 예로서, 미국 특허 제6,737,056호(전문이 본 명세서에 포함됨)는 인간 IgG Fc 영역 아미노산 위치 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 또는 439(카뱃 넘버링)에 변이를 함유하는, 이펙터 기능 또는 Fc-감마-수용체 결합이 변화된 뮤테인을 기재하고 있는데, 그들 중 일부는 감소된 ADCC 또는 CDC 활성과 관련된 수용체 결합 프로파일을 나타낸다. 이들 중 아미노산 위치 238, 265, 269, 270, 327 또는 329에서의 변이는 FcRI에의 결합을 감소시키고, 아미노산 위치 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 또는 439에서의 변이는 FcRII에의 결합을 감소시키고, 아미노산 위치 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 또는 437에서의 변이는 FcRIII에의 결합을 감소시키는 것으로 기재되어 있다.
- [0295] 미국 특허 제5,624,821호(전문이 본 명세서에 포함됨)는 쥐과 동물 항체의 C1q 결합 활성이 중쇄의 아미노산 잔기 318, 320 또는 322를 변이시켜 변화될 수 있으며, 잔기 297(Asn)의 교체는 분해 활성의 제거를 가져온다고 보고하고 있다.
- [0296] 미국 출원 제20040132101호(전문이 본 명세서에 포함됨)는 아미노산 위치 240, 244, 245, 247, 262, 263, 266, 299, 313, 325, 328 또는 332(카뱃 넘버링)에서, 또는 아미노산 위치 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330 또는 332(카뱃 넘버링)에서 변이를 갖는 뮤테인을 기재하고 있으며, 이 중 위치 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330 또는 332에서의 변이는 ADCC 활성을 감소시키거나 또는 Fc 감마 수용체에의 결합을 감소시킬 수 있는 것으로 기재하고 있다.
- [0297] 문헌(Chappel et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 ;88(20):9036-40, 전문이 본 명세서에 포함됨)은 IgG1의 세포 친화 활성은 그의 중쇄 CH2 도메인의 고유 특성임을 보고하고 있다. IgG1의 아미노산 잔기 234-237 중 어느 하나에서의 단일점 변이는 그의 활성을 저하 또는 소멸시켰다. 완전한 결합 활성을 회복하기 위해서 IgG1 잔기 234-237(LLGG)의 모두를 IgG2 및 IgG4로 치환하는 것이 필요하였다. 전체 ELLGGP 서열(잔기 233-238)을 함유하는 IgG2 항체는 야생형 IgG1보다 활성인 것으로 관찰되었다.
- [0298] 문헌(Isaacs et al., J Immunol. 1998;161(8):3862-9, 전문이 본 명세서에 포함됨)은 Fc γ R 결합에 결정적인 모티프 내의 변이(글루타메이트 233을 프롤린으로, 루신/페닐알라닌 234를 발린으로, 및 루신 235를 알라닌으로)는 표적 세포의 고갈을 완전히 막는 것으로 보고하고 있다. 글루타메이트 318의 알라닌으로의 변이는 마우스 IgG2b의 이펙터 기능을 제거하였으며, 인간 IgG4의 강도를 감소시켰다.
- [0299] 문헌(Armour et al., Mol Immunol. 2003;40(9):585-93, 전문이 본 명세서에 포함됨)은 활성화 수용체 Fc γ RIIa와는 야생형 IgG1보다 10배 이상 덜 효율적으로 반응하지만, 억제 수용체 Fc γ RIIb에의 결합은 단지 4배 감소된 IgG1 뮤테인을 개시하고 있다. 변이는 아미노산 위치 233-236의 영역 및(또는) 아미노산 위치 327, 330 및 331에서 만들어졌다. WO 99/58572(전문이 본 명세서에 포함됨)를 또한 참조할 수 있다.
- [0300] 문헌(Xu et al., J Biol Chem. 1994;269(5):3469-74, 전문이 본 명세서에 포함됨)은 IgG1 Pro331을 Ser으로 변이시키는 것이 C1q 결합을 현저하게 감소시키고, 실질적으로 분해 활성을 제거하는 것으로 보고하고 있다. 대조적으로, IgG4 중 Ser331 대신 Pro를 사용하면 IgG4 Pro331 뮤테인에 부분적 분해 활성(40%)을 부여하는 것으로 나타났다.
- [0301] 문헌(Schuurman et al., Mol Immunol. 2001 ;38(1): 1-8, 전문이 본 명세서에 포함됨)은 중쇄간 결합 형성에 관여하는 힌지 시스템 중의 하나인 Cys226을 세린으로 변이시키는 것이 결과적으로 더욱 안정한 중쇄간 결합을 가져왔다고 보고하고 있다. IgG4 힌지 서열 Cys-Pro-Ser-Cys를 IgG1 힌지 서열 Cys-Pro-Pro-Cys로 변이시

키는 것 또한 중쇄 사이의 공유 상호작용을 현저히 안정화시킨다.

[0302] 문헌(Angal et al., Mol Immunol. 1993;30(1): 105-8, 전문이 본 명세서에 포함됨)은 IgG4 중 아미노산 위치 241의 세린을 프롤린(IgG1 및 IgG2 중 같은 위치에서 발견됨)으로 변이시키는 것이 균질한 항체를 생산할 뿐만 아니라 본래의 키메라 IgG4에 비해 반감기를 연장시키고 조직 분포를 개선하는 것으로 보고하고 있다.

[0303] 본 발명은 또한 결과적으로 이펙터 활성을 변화시키는 변화된 탄수화물 구조를 갖는 항체 분자, 예컨대, 푸코실화가 없거나 감소되어 개선된 ADCC 활성을 나타내는 항체 분자를 생산하는 것을 포함한다. 이러한 목적을 달성하기 위한 여러 방법이 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, ADCC 이펙터 활성은 항체 분자가 Fc γ RIII 수용체에 결합함으로써 매개되는데, 이는 CH2 도메인의 Asn-297에서의 N-결합 글리코실화의 탄수화물 구조에 달려있다는 것이 밝혀졌다. 비-푸코실화 항체는 이 수용체에 증가된 친화도로 결합하여 천연의 푸코실화 항체보다 더 효율적으로 Fc γ RIII 매개 이펙터 기능을 촉발시킨다. 예를 들어, 알파-1,6-푸코실 트랜스퍼라제 효소가 녹아웃된 CHO 세포 중 비-푸코실화 항체의 재조합 생산 결과 100배 증가된 ADCC 활성을 갖는 항체를 얻었다[Yamane-Ohnuki et al., Biotechnol Bioeng. 2004 Sep 5;87(5):614-22]. 푸코실화 경로 내 이와 같은 또는 다른 효소의 활성을, 예를 들어, siRNA 또는 안티센스 RNA 처리, 효소를 녹아웃시키기 위해 세포주 가공, 또는 선택적 글리코실화 억제제와 함께 배양하는 등의 방법으로 감소시켜 유사한 효과를 달성할 수 있다[Rothman et al., Mol Immunol. 1989 Dec;26(12): 1113-23]. 몇몇 숙주 세포주, 예컨대, Lec13 또는 래트 하이브리도마 YB2/0 세포주는 천연적으로 푸코실화 수준이 낮은 항체를 생산한다(Shields et al., J Biol Chem. 2002 Jul 26;277(30):26733-40; Shinkawa et al., J Biol Chem. 2003 Jan 31;278(5):3466-73). GnTIII 효소를 과다발현하는 세포 중에서 항체를 재조합 생산하는 방법 등을 통해 둘로 갈라진 탄수화물의 수준을 증가시키는 것 또한 ADCC 활성을 증가시키는 것으로 나타났다(Umana et al., Nat Biotechnol. 1999 Feb;17(2):176-80). 두 개의 푸코스 잔기 중 단지 하나만 없어도 ADCC 활성을 증가시키기에 충분할 것으로 예측된다(Ferrara et al., J Biol Chem. 2005 Dec 5; 인쇄 이전 전자공개).

[0304] **다른 공유결합 변형**

[0305] 항체의 공유결합 변형도 또한 본 발명의 범주에 포함된다. 변형은 화학 합성 또는 적절한 경우 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 만들어질 수 있다. 항체의 다른 형태의 공유결합 변형은 항체의 표적 아미노산 잔기를 선택된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도제와 반응시킴으로써 분자내로 도입될 수 있다.

[0306] 시스테인 잔기를 가장 통상적으로는 α -할로아세테이트(및 상응하는 아민), 예를 들어, 클로로아세트산 또는 클로로아세트아미드와 반응시켜 카복시메틸 또는 카복시아미도메틸 유도체를 형성한다. 시스테인 잔기를 또한 브로모트리플루오로아세톤, α -브로모- β -(5-이미다졸릴)프로피온산, 클로로아세틸 포스페이트, N-알킬말레이미드, 3-니트로-2-피리딜 디설파이드, 메틸 2-피리딜 디설파이드, p-클로로머큐리벤조에이트, 2-클로로머큐리-4-니트로페놀, 또는 클로로-7-니트로벤조-2-옥사-1,3-디아졸과 반응시켜 유도한다.

[0307] 히스티딜 잔기를 pH 5.5 내지 7.0에서 디에틸피로카보네이트와 반응시켜 유도하는데, 이 반응제가 히스티딜 측쇄에 비교적 특이적이기 때문이다. 파라-브로모펜아실 브로마이드 또한 유용하며, 반응은 바람직하게는 0.1 M 나트륨 카코딜레이트 중 pH 6.0에서 수행한다.

[0308] 리시닐 및 아미노-말단 잔기를 숙신산 또는 다른 카복실산 무수물과 반응시킨다. 이들 반응제로의 유도체화는 리시닐 잔기의 하전을 역전시키는 효과가 있다. 알파-아미노 함유 잔기를 유도하는 다른 적절한 반응제는 메틸 피롤린이미데이트와 같은 이미도에스테르, 피리독살 포스페이트, 피리독살, 클로로보로하이드라이드, 트리니트로벤젠술포산, 0-메틸이소우레아, 2,4-펜탄디온, 및 글리옥실레이트와의 트랜스아미나제-촉매 반응을 포함한다.

[0309] 아르기닐 잔기는 통상의 반응제 하나 또는 수 종, 예를 들어, 페닐글리옥살, 2,3-부탄디온, 1,2-시클로헥산디온 및 난히드린 등과 반응시켜 변형한다. 아르기닌 잔기의 유도체화는 구아니딘 작용기의 높은 pKa 때문에 알칼리 조건에서 수행될 것을 요한다. 또한, 이러한 반응제는 아르기닌의 엡실론-아미노기뿐만 아니라 리신의 기와도 반응할 수 있다.

[0310] 타이로실 잔기의 구체적인 변형으로 특히 주목되는 것은, 타이로실 잔기를 방향족 디아조늄 화합물 또는 테트라니트로메탄과 반응시켜 잔기 내에 스펙트럼 표지를 도입하는 것이다. 가장 통상적으로는 N-아세틸이미다졸 및 테트라니트로메탄이 각각 0-아세틸 타이로실 종 및 3-니트로 유도체를 형성하는 데 사용된다. 타이로실 잔기는 방사선면역분석에 사용하기 위한 표지된 단백질을 제조하기 위해 ¹²⁵I 또는 ¹³¹I로 요오드화될 수 있다.

- [0311] 카복실 측쇄기(아스파르틸 또는 글루타미)는 카보디이미드($R-N=C=N-R'$; R 및 R'는 상이한 알킬기임), 예를 들어, 1-시클로헥실-3-(2-모르폴리닐-4-에틸)카보디이미드 또는 1-에틸-3-(4-아조니아-4,4-디메틸펜틸)카보디이미드와 반응시켜 선택적으로 변형시킨다. 또한, 아스파르틸 및 글루타미 잔기를 암모늄 이온과 반응시켜 아스파라지닐 및 글루타미닐 잔기로 전환시킨다.
- [0312] 글루타미닐 및 아스파라지닐 잔기는 종종 탈아미드화되어 상응하는 글루타미 및 아스파르틸로 된다. 이들 잔기는 중성 또는 염기성 조건하에 탈아미드된다. 이들 잔기의 탈아미드 형태 또한 본 발명의 범주에 든다.
- [0313] 다른 변형은 프롤린 및 리신의 히드록실화, 세틸 또는 트레오닐 잔기의 히드록시기의 인산화, 리신, 아르기닌 및 히스티딘 측쇄의 알파-아미노기의 메틸화(T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), N-말단 아민의 아세틸화 및 임의의 C-말단 카복실기의 아미드화를 포함한다.
- [0314] 다른 유형의 공유결합 변형은 글리코사이드를 항체에 화학적 또는 효소적 커플링하는 것을 포함한다. 이러한 과정은 항체를 N- 또는 O-결합 글리코실화에 대한 글리코실화 능력이 있는 숙주 세포 중에서 생산하여야 할 필요가 없다는 점에서 유리하다. 사용되는 커플링 방식에 따라서, 당을 (a) 아르기닌 및 히스티딘, (b) 유리 카복실기, (c) 유리 설프히드릴기, 예를 들어, 시스테인의 설프히드릴기, (d) 유리 히드록실기, 예를 들어, 세린, 트레오닌 또는 히드록시프롤린의 히드록실기, (e) 방향족 잔기, 예를 들어, 페닐알라닌, 타이로신, 또는 트립토판의 방향족 잔기, 또는 (f) 글루타민의 아미드기에 부착시킬 수 있다. 이들 방법은 WO 87/05330(1987년 9월 11일 공개) 및 문헌(Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981))에 기재되어 있다.
- [0315] 항체 상에 존재하는 탄수화물의 제거는 화학적으로 또는 효소적으로 수행될 수 있다. 화학적 탈글리코실화는 항체를 트리플루오로메탄술폰산 또는 그와 동등한 화합물에 노출시킬 것을 필요로 한다. 이러한 처리로 결합 당(N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)을 제외한 대부분 또는 모든 당이 절단되는 반면, 항체는 온전하게 남아있다. 화학적 탈글리코실화는 문헌(Hakimuddin, et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 259: 52 (1987); and Edge et al. *Anal. Biochem.*, 118: 131 (1981))에 기재되어 있다. 항체 상의 탄수화물 잔기의 효소적 절단은 각종 엔도- 및 엑소-글리코시다제를 사용하여 수행할 수 있다(Thotakura et al. *Meth. Enzymol.* 138: 350 (1987)).
- [0316] 다른 유형의 항체의 공유결합적 변형은 항체를 각종 비단백질성 중합체의 하나, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸화 폴리올, 폴리옥시에틸화 솔비톨, 폴리옥시에틸화 글루코스, 폴리옥시에틸화 글리세롤, 폴리옥시알킬렌, 또는 텍스트라판과 같은 폴리사카라이드에 결합시키는 것을 포함한다. 이러한 방법은 당업계에, 예를 들어, 미국 특허 제4,640,835호; 제4,496,689호; 제4,301,144호; 제4,670,417호; 제4,791,192호, 제4,179,337호, 제4,766,106호, 제4,179,337호, 제4,495,285호, 제4,609,546호 또는 EP 315 456에 알려져 있다.
- [0317] 각 항체 분자는 하나 이상의(즉, 1, 2, 3, 4, 5 또는 그 이상) 중합체 분자에 부착될 수 있다. 중합체 분자는 바람직하게는 항체에 링커 분자에 의해 부착된다. 중합체는 일반적으로 합성 또는 천연 중합체일 수 있으며, 예를 들어, 임의로 치환된 직쇄 또는 분지쇄 폴리알켄, 폴리알케닐렌 또는 폴리옥시알킬렌 중합체 또는 분지 또는 비분지 폴리사카라이드, 예를 들어, 호모- 또는 헤테로-폴리사카라이드일 수 있다. 바람직한 중합체는 폴리옥시에틸렌 폴리올 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이다. PEG는 실온에서 수용성이며, 일반식 $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$ (R은 수소, 또는 알킬 또는 알칸올 기와 같은 보호기임)을 갖는다. 바람직하게는 보호기는 1 내지 8개의 탄소를 가지며, 더욱 바람직하게는 메틸이다. 부호 n은 양의 정수, 바람직하게는 1 내지 1,000, 보다 바람직하게는 2 내지 500이다. PEG는 바람직하게는 1000 내지 40,000, 보다 바람직하게는 2000 내지 20,000, 가장 바람직하게는 3,000 내지 12,000의 평균 분자량을 갖는다. PEG는 바람직하게는 적어도 하나의 히드록시기, 보다 바람직하게는 말단 히드록시기를 갖는다. 이 히드록시기가 바람직하게는 활성화되어 억제제 상의 유리 아미노기와 반응한다. 그러나, 본 발명의 공유결합된 PEG/항체를 얻기 위한 반응성 기의 유형 및 양은 다양할 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 바람직한 중합체 및 그를 펩티드에 부착시키는 방법은 미국 특허 제4,766,106호; 제4,179,337호; 제4,495,285호; 및 제4,609,546호에 기재되어 있으며, 이들 특허 문헌의 전문이 본 명세서에 포함된다.
- [0318] **유전자 치료법**
- [0319] 적절한 세포로 치료 항체를 전달하는 것은 당업계에 알려진 적절한 방법, 예를 들어, 물리적 DNA 전달 방법(예를 들어, 리포솜 또는 화학적 처리)을 사용하거나 바이러스 벡터(예를 들어, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스 또는 레트로바이러스)를 사용하여 생체외, 환부 또는 생체내에서 이루어질 수 있다. 예를 들어, 생체내 치

료에서, 목적하는 항체를 코딩하는 핵산을 단독으로 또는 벡터, 리포솜 또는 침전물과 함께 피험체에 직접 주사할 수 있으며, 일부 실시태양에서는 항체 화합물의 발현이 요구되는 위치에 주사할 수 있다. 생체의 치료에서, 피험체의 세포를 채취하여, 핵산을 세포 내로 도입시킨 다음, 변형된 세포를 피험체에 직접적으로 또는 환자 내로 이식되는 다공성 멤브레인 내에 캡슐화된 상태로 돌려보낸다. 이에 관해 미국 특허 제4,892,538호 및 제5,283,187호를 참조할 수 있다. 핵산을 생 세포 내로 도입하는 다양한 기술이 있다. 이 기술은 핵산이 시험관 내 배양된 세포로 전달되느냐 또는 목적하는 숙주의 세포 내로 생체내 전달되느냐에 달려있다. 핵산을 시험관 내 포유동물 세포 내로 전달하는 데 적절한 기술은 리포솜, 전기천공, 마이크로주사, 세포 융합, DEAE-텍스트란 및 인산칼슘 침전을 사용하는 것을 포함한다. 핵산의 생체의 전달에 통상적으로 사용되는 벡터는 레트로바이러스이다.

[0320] 다른 생체내 핵산 전달 기술은 바이러스 벡터(예를 들어, 아데노바이러스, 허피스 심플렉스 I 바이러스, 또는 아데노 관련 바이러스) 및 지질-기재 시스템을 사용한 트랜스펙션을 포함한다. 핵산 및 트랜스펙션제는 경우에 따라 마이크로입자와 결합된다. 트랜스펙션제의 예는 인산칼슘 또는 염화칼슘 동시침전, DEAE-텍스트란 매개 트랜스펙션, 4급 암모늄 양쪽성 DOTMA((디올레오일옥시프로필) 트리메틸암모늄 브로마이드, GIBCO-BRL에 의해 상표명 리포펙틴(Lipofectin)으로 시판)(Felgner et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417; Malone et al. (1989) Proc. Natl Acad. Sci. USA 86 6077-6081); 펜던트 트리메틸암모늄 헤드가 있는 친지성 글루타메이트 디에스테르(Ito et al. (1990) Biochem. Biophys. Acta 1023, 124- 132); 대사가가능한 페던트 지질, 예를 들어, 양이온성 지질 디옥타데실아미도 글리실스페르민(DOGS, 트랜스펙탐, Promega) 및 디팔미토일포스파디딜 에탄올아밀스페르민(DPPES)(J. P. Behr (1986) Tetrahedron Lett. 27, 5861-5864; J. P. Behr et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6982-6986); 대사 가능한 4급 암모늄 염(DOTB, N-(1-[2,3-디올레오일 옥시프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 메틸설페이트(DOTAP)(Boehringer Mannheim), 폴리에틸렌이민(PEI), 디올레오일 에스테르, ChoTB, ChoSC, DOSC(Leventis et al. (1990) Biochim. Inter. 22, 235-241); 3베타[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤(DC-Chol), 디올레오일포스파디딜 에탄올아민(DOPE)/3베타[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤 DC-Chol 1:1 혼합물(Gao et al., (1991) Biochim. Biophys. Acta 1065, 8-14), 스페르민, 스페르미딘, 리포폴리아민(Behr et al., Bioconjugate Chem, 1994, 5: 382-389), 친지성 폴리리신(LPLL)(Zhou et al., (1991) Biochim. Biophys. Acta 939, 8-18), 과량의 포스파디딜콜린/콜레스테롤과 함께 [[(1,1,3,3-테트라메틸부틸)크레주시]에톡시]에틸]디메틸벤질벤질암모늄 히드록사이드(DEBDA 히드록사이드)(Ballas et al., (1988) Biochim. Biophys. Acta 939, 8-18), 세틸트리메틸암모늄 브로마이드(CTAB)/DOPE 혼합물(Pinnaduwege et al., (1989) Biochim. Biophys. Acta 985, 33-37), 글루탐산과(TMAG)과 DOPE의 친지성 디에스테르, CTAB, DEBDA, 디도데실암모늄 브로마이드(DDAB), 및 포스파디딜에탄올아민과 혼합된 스테아릴아민(Rose et al., (1991) Biotechnique 10, 520-525), DDAB/DOPE(TransfectACE, BRL), 및 올리고갈락토스 함유 지질을 포함한다. 전달 효율을 증가시키는 트랜스펙션 증진제의 예는 DEAE-텍스트란, 폴리브렌, 라이소솜-과괴 펩티드(Ohmori N I et al, Biochem Biophys Res Commun Jun. 27, 1997;235(3):726-9), 콘드로이탄-기재 프로테오글리칸, 설페이트화 프로테오글리칸, 폴리에틸렌이민, 폴리리신(Pollard H et al. J Biol Chem, 1998 273(13):7507-11), 인테그린-결합 펩티드 CYGGRGDTP, 선형 텍스트란 논사카라이드, 글리세롤, 올리고뉴클레오티드의 3'-말단 뉴클레오시드간 결합에 구속된(tethered) 콜레스테릴기(Letsinger, R. L. 1989 Proc Natl Acad Sci USA 86: (17):6553-6), 라이소포스파티드, 라이소포스파티딜콜린, 라이소포스파티딜에탄올아민 및 1-올레오일 라이소포스파티딜콜린을 포함한다.

[0321] 일부의 경우에, 핵산 분자를 핵산 함유 벡터를 표적 세포로 유도하는 물질과 함께 전달하는 것이 바람직할 수 있다. 그러한, "표적 유도" 분자는 표적 세포의 세포-표면 막 단백질에 특이적인 항체, 또는 표적 세포 상의 수용체에 대한 리간드를 포함한다. 리포솜이 사용되는 경우, 내포 작용과 관련된 세포-표면 막 단백질에 결합하는 단백질을 표적 유도를 위해 또는 세포 흡수를 촉진하기 위해 사용할 수 있다. 그러한 단백질의 예는 특정 세포 유형에 대해 친화성인 캡시드 단백질 및 그의 단편, 사이클 중 내재화되는 단백질에 대한 항체, 세포내 편재를 표적으로하고 세포내 반감기를 증진시키는 단백질을 포함한다. 다른 실시태양에서, 수용체 매개 내포 작용을 이용할 수 있다. 그러한 방법은 문헌(Wu et al., 1987 or Wagner et al., 1990)에 기재되어 있다. 현재 알려진 유전자 마킹 및 유전자 치료 프로토콜에 대해서는 문헌(Anderson 1992), 및 WO 93/25673과 그에 인용된 문헌들을 참조할 수 있다. 유전자 치료 기술에 대해서는 추가로 문헌(Friedmann, Science, 244: 1275-1281 (1989); Anderson, Nature, supplement to vol. 392, no 6679, pp. 25-30 (1998); Verma, Scientific American: 68-84 (1990); and Miller, Nature, 357: 455460 (1992))을 참조할 수 있다.

[0322] 스크리닝 방법

- [0323] 본 발명의 또 다른 측면은 PRLR을 항체와 접촉시키는 단계 및 항체가 PRLR 활성을 변화시키는지 여부를 결정하는 단계를 포함하는, PRLR 활성을 조절(즉, 감소)하는 항체를 찾아내는 방법에 관한 것이다. 시험 항체 존재하의 활성을 시험 항체 부재하의 활성과 비교한다. 시험 항체를 함유하는 샘플 중에서의 활성이 시험 항체가 없는 샘플 중에서의 활성보다 낮은 경우, 항체가 활성을 억제한 것이 된다. 유효한 치료는 심각한 독성이 없는 효율적인 치료제를 찾아내는 것에 달려있다. 항체는 당업계에서 알려진 방법에 따라 결합 친화도에 대해 스크리닝될 수 있다. 예를 들어, 겔-쉬프트 분석, 웨스턴 블롯, 방사성표지된 경쟁 분석, 크로마토그래피에 의한 공-분획화, 공-침전, 가교 결합, ELISA, 표면 플라즈몬 공명(예를 들어, 바이오코어®), 시간-해상 형광분석(예를 들어, DELFIA) 등이 사용될 수 있으며, 이 방법들은, 예를 들어, 문헌(Current Protocols in Molecular Biology (1999), Current Protocols in Immunology (2007) John Wiley & Sons, NY, 전문이 본 명세서에 포함됨)에 기재되어 있다. 상기한 방법 외에, 두 항체 간의 경쟁을 평가하기 위하여 표면 플라즈몬 공명(예를 들어, 바이오코어®)을 이용할 수 있다(예를 들어, 하기 실시예 7). 두 항체 간의 경쟁 수준을 평가하기 위하여 시간-해상 형광분석(예를 들어, DELFIA)을 또한 이용할 수 있다. 예를 들어, 마이크로플레이트 기초 경쟁 스크리닝 DELFIA® 분석(Perkin Elmer)은 제조자에 의해 제공된 프로토콜에 따라 수행될 수 있다.
- [0324] 표적 항원 상의 목적하는 에피토프에 결합하는 항체를 초기 스크리닝하기 위하여, 문헌(Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988))에 기재된 것과 같은 통상의 크로스-블록킹 분석을 수행할 수 있다. 통상의 경쟁 결합 분석을 또한 수행할 수 있는데, 여기서 미지의 항체를, 표적이 본 발명의 표적 특이적 항체에 결합하는 것을 억제하는 능력에 의해 특성화한다. 온전한 항원, 또는 세포의 도메인과 같은 단편, 또는 선형 에피토프를 사용할 수 있다. 에피토프 맵핑은 문헌(Champe et al., J. Biol. Chem. 270: 1388-1394 (1995))에 기재되어 있다.
- [0325] 시험관내 결합 분석의 한 변형으로서, 본 발명은 (a) 고정화된 PRLR을 후보 항체와 접촉시키는 단계, 및 (b) 후보 항체의 PRLR에의 결합을 검출하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 다른 실시태양에서는, 후보 항체가 고정화되고, PRLR의 결합을 측정한다. 고정화는 당업계에 잘 알려진 어느 방법을 사용하여 수행하여도 무방하며, 예를 들어, 지지체, 비드 또는 크로마토그래피 수지로의 공유 결합뿐만 아니라 항체 결합과 같은 비공유적 고정화도 상호작용, 또는 스트렙타비딘/비오틴 결합 (고정화된 화합물이 비오틴 잔기 함유)의 사용을 포함한다. 결합의 검출은 (i) 고정화되지 않은 화합물 상에 방사성 표지를 사용하거나, (ii) 비-고정화 화합물 상에 형광 표지를 사용하거나, (iii) 비-고정화 화합물에 면역특이적인 항체를 사용하거나, (iv) 비-고정화 화합물 상에, 고정화 화합물이 부착된 형광 지지체를 여기시키는 표지를 사용하거나, 또는 당업계에 잘 알려져 있고 통상적으로 실시되는 다른 기술을 이용하여 수행될 수 있다.
- [0326] 표적 항원의 활성을 조절(즉, 증가, 감소 또는 차단)하는 항체는 표적 항원(또는 표적 항원을 발현하는 세포)을 후보 항체와 인큐베이션한 다음, 후보 항체가 표적 항원의 활성 또는 발현에 미치는 효과를 측정하여 찾아낼 수 있다. 시험 항체 존재하의 활성을 시험 항체 부재하의 활성과 비교한다. 시험 항체를 함유하는 샘플 중에서의 활성이 시험 항체가 없는 샘플 중에서의 활성보다 낮은 경우, 항체가 활성을 억제한 것이 된다. 표적 항원 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 활성을 조절하는 항체의 선택성은 표적 항원에 대한 그의 효과를 다른 관련 화합물에 대한 그의 효과와 비교하여 평가할 수 있다.
- [0327] 하나의 실시태양에서, PRLR 이량체화를 방지하고(거나) STAT5 및(또는) MAPK 및(또는) AKT의 인산화 또는 PRLR 시그널링의 다른 지표를 유도함에 있어서 PRLR을 중화하는 능력을 측정하기 위해, 항체를 배양 세포계에 있어서 그들의 효과에 대해 시험한다. 또한, 본 명세서에 기재된 바와 같은 증식 분석, 소프트 아가 분석 및(또는) 세포독성 분석 등의 세포 분석을 특정 PRLR 항체를 평가하는 데 사용할 수 있다.
- [0328] 항체 또는 항체 조합물의 생물학적 활성은 적절한 동물 모델을 사용하여 생체내 평가될 수 있다. 예를 들어, 인간 암 세포가 면역손상된 동물 내로 도입된, 누드 또는 SCID 마우스와 같은 이종 암 모델을 사용할 수 있다. 효능은 종양 형성의 억제, 종양 퇴행 또는 전이 등을 측정하는 분석법을 사용하여 예측될 수 있다.
- [0329] 본 발명은 또한 표적 항원과 상호작용하거나 그의 생물학적 활성을 억제하는(즉, 효소 활성, 결합 활성, 세포내 시그널링 등을 억제하는) 항체를 찾아내기 위한 고 처리용량 스크리닝(HTS) 분석을 포함한다. HTS 분석은 다수의 화합물을 효율적인 방식으로 스크리닝할 수 있게 한다. 세포-기초 HTS 시스템은 표적 항원과 그의 결합 파트너 사이의 상호작용을 검사하기 위한 것이다. HTS 분석은 목적하는 특성을 갖는 "히트" 또는 "리드 화합물"을 찾아내도록 설계되며, 이들로부터 목적하는 특성을 개선시키기 위한 변형이 설계된다.
- [0330] 본 발명의 다른 실시태양에서, CDR 내 아미노산에 대한 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 변형을 갖는, 표적 항원 폴리펩티드에 대한 적절한 결합 친화도를 갖는 항체 단편 또는 CDR을 찾기 위한 고 처리용량 스크리닝이 이용될

수 있다.

[0331] **병용 치료법**

[0332] 동물 모델에서 효과적인 하나 이상의 항체를 찾은 다음에는 그와 같은 항체 둘 이상(동일하거나 상이한 표적 항원에 결합하는)을 함께 혼합하여 더욱 개선된 효과를 얻는 것이 유익할 수 있다. 하나 이상의 항체를 포함하는 조성물을 암을 앓고 있거나 암의 소인이 있는 사람 또는 포유동물에 투여할 수 있다. 두 가지 치료제를 병용 투여하는 것은, 두 치료제가 치료 효과를 발휘하는 기간이 겹치는 한, 치료제가 같은 시간에 같은 경로로 투여되어야 할 필요는 없다. 동시 투여 또는 다른 날 또는 다른 주에 투여되는 것과 같은 순차 투여가 고려된다.

[0333] 항체 치료법은 모든 단계의 암에 유용한 것이기는 하지만, 특히 진행된 암이나 전이된 암에 적절할 수 있다. 화학요법제 치료를 받지 않은 환자에 있어서 항체 치료법과 화학치료 또는 방사선 요법을 병행하는 것이 바람직할 수 있는 반면, 항체 치료법은 하나 이상의 화학요법제를 투여받은 환자에 적용될 수 있다. 또한, 항체 치료는 특히 화학요법제의 독성을 잘 견디내지 못하는 환자에 있어서 화학요법제의 투여량을 감소시킬 수 있게 한다.

[0334] 본 발명의 방법은 단일 항체 뿐만 아니라 상이한 항체의 조합물, 또는 "칵테일"을 투여하는 것을 포함한다. 그러한 항체 칵테일은, 그들이 상이한 이펙터 메카니즘을 이용하는 항체들을 함유하거나 직접적 세포독성 항체를 면역 이펙터 기능에 의존하는 항체와 조합한 것인 한, 유리한 효과를 나타낼 수 있다. 그와 같이 조합된 항체는 상승적 치료 효과를 나타낼 수 있다. 예컨대, 본 발명의 방법은 M-CSF에 대한 항체, RANKL, 탁소테어(Taxotere™), 헤르셉틴(Herceptin™), 아바스틴(Avastin™), 에르비투스(Erbix™) 또는 항-EGFR 항체, 및 타목시펜을 투여하는 것을 포함한다.

[0335] 세포독성제는 세포의 기능을 억제 또는 방지하고(거나) 세포의 파괴를 일으키는 물질을 이른다. 이 용어는 방사성 동위원소(예를 들어, I^{131} , I^{125} , Y^{90} 및 Re^{186}), 화학요법제 및 독소, 예컨대, 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소 또는 합성 독소 또는 그의 단편을 포함하는 의미로 사용된다. 비-세포독성제는 세포의 기능을 억제 또는 방지하지 않고(거나) 세포의 파괴를 일으키지 않는 물질을 이른다. 비-세포독성제는 활성화되어 세포독성으로 될 수 있는 물질을 포함할 수 있다. 비-세포독성제는 비드, 리포솜, 매트릭스 또는 입자(예를 들어, 미국 특허 공개 제2003/0028071호 및 제2003/0032995호, 전문이 본 명세서에 포함됨)을 포함할 수 있다. 그러한 물질은 본 발명에 따른 항체에 접합, 커플링, 연결 또는 결합될 수 있다.

[0336] 암 화학요법제는 카보플라틴, 시스플라틴과 같은 알킬화제; 니트로젠 머스타드 알킬화제; 카무스타인(BCNU)과 같은 니트로소우레아 알킬화제; 메토틱렉세이트와 같은 대사길항제; 폴린산; 퓨린 유사체 대사길항제, 머캅토피린; 플루오로우라실(5-FU) 및 젬시타빈(젬자르®)과 같은 피리미딘 유사체 대사길항제; 고세렐린, 루프롤라이드 및 타목시펜과 같은 호르몬성 항종양제; 알데스루킨, 인터루킨-2, 도세탁셀, 에토포사이드(VP-16), 인터페론 알파, 파클리탁셀(탁솔®) 및 트레티노인(ATRA)과 같은 천연 항종양제; 블레오마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 다우노마이신 및 미토마이신 C와 같은 미토마이신 등의 항생제 항종양제; 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신과 같은 빈카 알칼로이드 천연 항종양제; 히드록시우레아; 아세글라톤, 아드리아마이신, 이포스파미드, 에노시타빈, 에피티오스타놀, 아클라루비신, 안시타빈, 니무스틴, 프로카바진 하이드로클로라이드, 카보큐온, 카보플라틴, 카모푸르, 크로모마이신 A3, 항종양 폴리사카라이드, 항종양 혈소판 인자, 시클로포스파미드(싸이톡신®), 스킴조필란, 시타라빈(시토신 아리비노사이드), 다카바진, 티오이노신, 티오테과, 테가푸르, 돌라스타틴, 오리스타틴과 같은 돌라스타틴 유사체, CPT-11(이리노테칸), 미토잔트론, 비노렐빈, 테니포사이드, 아미노프테린, 카미노마이신, 에스페라미신(예를 들어, 미국 특허 제4,675,187호), 네오카지노스타틴, OK-432, 블레오마이신, 푸르틀론, 브록스우리딘, 부솔판, 혼반, 페플로마이신, 베스타틴(우베니맥스®), 인터페론-β, 메피티오스탄, 미토브로톨, 멜팔란, 라미닌 펩티드, 렌티난, 운지 버섯(Coriolus versicolor) 추출물, 테가푸르/우라실, 에스트라무스틴(에스트로젠/메콜레타민)을 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0337] 또한, 암 환자의 치료에 사용되는 추가의 치료제는 EPO, G-CSF, 간시클로비어; 항생제 루프롤라이드; 메페리딘; 지도부딘(AZT); 인터루킨 1 내지 18, 그의 변이체 및 유사체; 인터페론 또는 사이토카인, 예를 들어, 인터페론 α, β 및 γ; 호르몬, 예를 들어, 항체 호르몬 방출 호르몬(LHRH) 및 유사체, 고나도트로핀 방출 호르몬(GnRH); 성장 인자, 예를 들어, 변형 성장 인자-β(TGF-β), 섬유아세포 성장 인자(FGF), 신경 성장 인자(NGF), 성장 호르몬 방출 인자(GHRF), 상피 성장 인자(EGF), 섬유아세포 성장 인자 동족체 인자(FGFHF), 간세포 성장 인자(HGF) 및 인슐린 성장 인자(IGF); 종양 괴사 인자-α 및 β(TNF-α 및 β); 침윤 억제 인자-2(IIF-2); 골 형태형성 단백질 1-7(BMP 1-7); 소마토스타틴; 타이모신-α-1; γ-글로불린; 수퍼옥시드 디스뮤타제(SOD); EGFR(상피 성장 인자 수용체) 길항제, 예를 들어, 세툽시맙 및 제피티닙; PR(프로게스테론 수용체) 길항제 및 조절제, 예를 들어, 미페프리스톤™ 및 오나프리스톤™; 아로마타제 억제제, 예를 들어, 아나스트로졸, 엑젠크스

탄 및 레트로졸; 항-에스트로겐제, 에스트로겐 수용체 길항제 및 조절제, 예를 들어, 타목시펜, 토레미펜 및 플베스트란트; 보체 인자; 항-혈관신생 인자; 항원성 물질; 및 전구 약물을 포함한다.

[0338] 전구약물은 패러인트 약물에 비하여 종양 세포에 대해 덜 세포독성이거나 비-세포독성이며, 효소적으로 활성화 또는 전환되어 활성화 또는 보다 활성인 패러인트 형태로 될 수 있는 약제학적 활성화 물질의 전구체 또는 유도체를 말한다(예를 들어, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) and Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borhardt et al., (ed.), pp. 247 '-267 ', Humana Press (1985)). 전구약물은 인산염 함유 전구약물, 티오인산염 함유 전구약물, 황산염 함유 전구약물, 펩티드 함유 전구약물, D-아미노산-개질 전구약물, 글리코실화 전구약물, β-락탐 함유 전구약물, 임의로 치환된 페녹시아세트아미드 함유 전구약물 또는 임의로 치환된 페닐아세트아미드 함유 전구약물, 5-플루오로시토신 및 보다 활성인 세포독성 유리 약물로 전환될 수 있는 다른 5-플루오로우리딘 전구약물을 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다. 전구약물 형태로 유도될 수 있는 세포독성 약물의 예는 상기한 바와 같은 화학요법제를 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0339] **투여 및 제제**

[0340] 본 발명의 항체는 목적하는 전달 경로에 적합한 담체를 포함하는 제약 조성물로 제제화될 수 있다. 적절한 담체는 항체와 합해질 때 항체의 목적하는 활성을 유지하며 피험체의 면역계와 비반응성인 물질은 어느 것이나 포함한다. 담체의 예로는, 다수의 표준 제약용 담체, 예컨대, 멸균 인산염 완충 염수, 정균수 등을 들 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 각종 수성 담체, 예를 들어, 물, 완충액, 0.4% 염수, 0.3% 글리신 등이 사용될 수 있으며, 이들은 안정성 증진을 위해 다른 단백질, 예컨대, 약간의 화학적 변형이 있을 수 있는 알부민, 지단백질, 글로불린 등을 포함할 수 있다.

[0341] 항체의 치료용 제제는 목적하는 정도의 순도를 갖는 항체를 임의의 생리학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))와 함께 동결건조 제제 또는 수용액체의 형태로 혼합하여 보관용으로 제조될 수 있다. 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수약자에게 비독성이며, 완충제, 예컨대, 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산; 아스코르브산, 메티오닌 등의 항산화제; 보존제(예를 들어, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 메틸 또는 프로필 파라벤 등의 알킬 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥산올; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산; 글루코스, 만노오스 또는 텍스트린을 포함하는 모노사카라이드, 디사카라이드 및 다른 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트제; 슈크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨과 같은 당; 나트륨과 같은 염-형성 카운터 이온; 금속 착물(예를 들어, Zn-단백질 착물); 및(또는) 비-이온성 계면활성제, 예컨대, 트윈(TWEEN™), 플루로닉스(PLURONICS™) 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함한다.

[0342] 본 발명의 제제는 치료되는 증상에 따라 필요한 경우 하나 이상의 활성 화합물을 함유할 수 있으며, 그들의 활성은 서로에 역효과를 내지 않으며 상보적인 것이 바람직하다. 그러한 분자는 의도하는 목적에 효율적인 양으로 조합되어 존재하는 것이 바람직하다.

[0343] 활성 성분은 또한, 예컨대, 코아세르베이션(coacervation) 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어, 각각 히드록시메틸셀룰로즈 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에, 콜로이드 약물 전달계(예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로캡슐, 마이크로에멀션, 나노입자 및 나노캡슐) 내에 또는 매크로에멀션 내에 포획될 수 있다. 그러한 기술은 문헌(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))에 개시되어 있다.

[0344] 생체내 투여에 사용될 제제는 멸균 상태라야 한다. 이는 멸균 여과막을 통해 여과함으로써 쉽게 달성될 수 있다.

[0345] 항체는 비경구, 피하, 복강내, 폐내 및 비내 투여를 포함하는 적절한 수단으로, 국소 처치가 바람직한 경우에는, 환부내 투여 수단으로 투여된다. 비경구 주입은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 피내 또는 피하 투여를 포함한다. 또한, 항체는 적절하게는 펄스 주입에 의해, 특히 감소되는 항체 용량으로 투여된다. 투여는 바람직하게는 주사에 의해서, 가장 바람직하게는 정맥내 또는 피하 주사를 통해 이루어진다. 고려되는 다른 투여

방법은 국소 투여, 특히 경피, 경점막, 직장, 구강 또는 예컨대, 목적하는 부위에 근접하게 위치한 카테테르를 통한 지엽적 투여를 포함한다.

- [0346] 비내 투여를 위해, 약제학적 제제 및 약제는 적절한 용매와 경우에 따라 다른 화합물, 비제한적인 예로서 안정 화제, 향미생물제, 향산화제, pH 조절제, 계면활성제, 생체이용률 변경제 및 이들의 조합 등을 함유하는 스프레이 또는 에어로졸일 수 있다. 에어로졸 제제를 위한 추진제는 압축 공기, 질소, 이산화탄소 또는 탄화수소계 저비점 용매를 포함할 수 있다.
- [0347] 주사용 투여형은 일반적으로 적절한 분산화제, 습윤제 또는 현탁화제를 사용하여 제조할 수 있는 수성 현탁액 또는 오일 현탁액일 수 있다. 주사용 제형은 용액상 또는 현탁액 형태일 수 있으며, 이는 용매 또는 희석제를 사용하여 제조된다. 사용할 수 있는 용매 또는 비히클은 멸균수, 링거액 또는 등장성 염수를 포함한다.
- [0348] 주사 투여를 위해, 약제학적 제제 및(또는) 약제는 상기한 바와 같은 적절한 용액으로 재생시킬 수 있는 분제일 수 있다. 이의 예는 동결 건조, 회전 건조 또는 분무 건조된 분말, 무정형 분말, 과립, 침전물, 또는 미립자를 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다. 주사용 제제는 경우에 따라 안정화제, pH 조절제, 계면활성제, 생체이용률 변경제 및 이들의 조합을 함유할 수 있다.
- [0349] 서방형 제제를 제조할 수 있다. 서방형 제제의 적절한 예는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하는데, 매트릭스는 성형물의 형태, 예를 들어, 필름 또는 마이크로캡슐일 수 있다. 서방형 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 하이드로겔(예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드(미국 특허 제3,773,919호), L-글루탐산과 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대, 루프론 데포(Lupron Depot™)(락트산-글리콜산 공중합체와 루프롤라이드 아세테이트로 이루어진 주사 가능한 마이크로스피어), 및 폴리-D(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체가 100일에 걸쳐 분자를 방출시킬 수 있는 반면, 하이드로겔은 단백질을 보다 짧은 기간 동안 방출한다. 캡슐화된 항체가 체내에 장기간 유지될 때, 37°C의 습한 환경에 노출된 결과 변성 또는 응집이 일어나 결과적으로 생물학적 활성의 상실 또는 면역원성에 있어서의 변화를 초래할 수 있다. 관련 메카니즘에 따라 전략을 고안해낼 수 있다. 예를 들어, 응집 메카니즘이 티오-디설파이드 상호교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 밝혀진 경우, 설프히드릴 잔기를 변형시키고, 산성 용액으로부터 동결건조시키고, 수분 함량을 조절하고, 적절한 첨가제를 사용하고, 특수한 중합체 매트릭스를 개발하여 안정화를 이룰 수 있다. 당업계에 알려진 다른 전략을 사용할 수 있다.
- [0350] 본 발명의 제제는 단기 작용, 급속 방출, 장기 작용 또는 상기한 바와 같이 서서히 방출되도록 설계될 수 있다. 따라서, 약제학적 제제는 조절 방출 또는 지연 방출용으로 제형화될 수 있다.
- [0351] 본 발명의 조성물은 또한, 예를 들어, 미셀 또는 리포솜, 또는 다른 캡슐화된 형태를 포함할 수 있거나, 장기 보관 및(또는) 전달 효과를 제공하기 위해 장기 방출 형태로 투여될 수 있다. 따라서, 약제학적 제제 및 약제는 펠렛 또는 실린더로 압착되어, 데포 주사 또는 스텐트와 같은 임플란트로서 근육내 또는 피하 이식될 수 있다. 그러한 임플란트는 실리콘 및 생분해성 중합체와 같은 공지의 불활성 물질을 사용할 수 있다.
- [0352] 상기한 바와 같은 대표적 투여형 외에, 제약상 허용되는 부형제 및 담체가 당업자에게 일반적으로 알려져 있으며, 따라서 본 발명의 범주에 속한다. 그러한 부형제 및 담체는, 예를 들어, 문헌("Remingtons Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., New Jersey (1991), 전문이 본 명세서에 포함됨)이 게재되어 있다.
- [0353] 개별적 투여량은 질병의 증상, 투여 대상의 연령, 체중, 일반적 건강 상태, 유전자형, 성별 및 식사, 투여 간격, 투여 경로, 배출 속도 및 약물의 조합에 따라 조정될 수 있다. 활성 성분 유효량을 함유하는 상기 투여형 중 어느 것이나 통상의 실험의 범주에 드는 것이며, 따라서, 본 발명의 범위에 속한다.
- [0354] 본 발명의 항체는 종종 다른 천연 면역글로불린 또는 다른 생물학적 분자가 실질적으로 없는 상태로 제조된다. 바람직한 항체는 암을 앓고 있거나 암의 소인이 있는 포유동물에 투여될 때 최소한의 독성을 나타낼 것이다.
- [0355] 본 발명의 조성물은 통상의 잘 알려진 멸균 기술로 멸균될 수 있다. 생성된 용액은 사용을 위해 포장되거나 무균 조건하에 여과되어 동결건조될 수 있으며, 동결 건조된 제제는 투여 전에 멸균 용액과 혼합된다. 조성물은 생리적 상태에 맞추기 위해 필요한 제약상 허용되는 보조 물질, 예를 들어, pH 조절제 및 완충제, 강도 조절제, 아세트산나트륨, 락트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘 및 안정화제(예를 들어, 20% 말토스 등)를 함유할 수 있다.
- [0356] 본 발명의 항체는 또한 리포솜을 통해 투여될 수 있는데, 리포솜은 각종 유형의 지질 및(또는) 인지질 및(또는)

약물(예컨대, 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체, 및 경우에 따라 화학요법제)을 전달하는 데 유용한 계면활성제로 이루어진 작은 주머니이다. 리포솜은 에멀션, 포유, 미셀, 불용성 단층, 인지질 분산액, 라멜라 층 등을 포함하며, 항체를 특정 조직을 표적으로 하여 유도할 뿐만 아니라 조성물의 반감기를 증가시키는 비히클로서 작용할 수 있다. 리포솜을 제조하기 위한 각종 방법이, 예를 들어, 미국 특허 제4,837,028호 및 제5,019,369호(전문이 본 명세서에 포함됨)에 기재되어 있다.

[0357] 항체를 함유하는 리포솜은 당업계에 알려진, 예를 들어, 문헌(Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030 (1980)) 및 미국 특허 제4,485,045호 및 제4,544,545호에 기재된 바와 같이 제조된다. 증가된 순환 시간을 갖는 리포솜이 미국 특허 제5,013,556호에 기재되어 있다. 특히 유용한 리포솜은 포스파디딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도 포스파디딜에탄올아민을 포함하는 지질 조성물을 사용하여 역상 증발법으로 제조될 수 있다. 리포솜은 정해진 개공 크기의 필터를 통해 압출되어 목적하는 직경을 갖는 리포솜으로 된다. 본 발명의 항체의 Fab' 단편은 디설파이드 상호교환 반응을 통해 리포솜에 접합될 수 있다(Martin et al., J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)). 화학요법제(예를 들어, 독소루비신)도 경우에 따라 리포솜 내에 함유된다[Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19): 1484 (1989)].

[0358] 조성물 중 항체의 농도는 다양한 범위, 즉, 약 10% 미만으로부터, 보통은 25% 이상에서 많게는 75% 또는 90%까지 변할 수 있으며, 선택된 특성의 투여 경로에 따라, 액체 부피 또는 점도 등에 의해 주로 선택될 것이다. 경구, 국소 및 비경구 투여가능한 조성물의 실제 제조 방법은 당업자에게 알려져 있거나 자명할 것이며, 상세하게는, 예를 들어, 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1995), 전문이 본 명세서에 포함됨)에 기재되어 있다.

[0359] 환자의 질병 치료를 위해 본 발명의 조성물의 유효량을 결정하는 것은 당업계에 알려진 표준 경험적 방법에 따라 이루어질 것이다.

[0360] 본 발명의 조성물은, 예컨대, 유방암, 전립선암 또는 폐암을 앓고 있거나 암의 소인이 있거나 암의 위험이 있는 포유동물에, 질병의 발발을 방지하거나 적어도 부분적으로 정지시키기에 충분한 양으로 투여된다. 이러한 목적을 달성하기에 충분한 양을 "치료 유효량"으로 정의한다. 항체 유효량은 질병의 정도, 치료되는 환자의 체중 및 일반적 상태에 따라서 달라지는 것이지만, 일반적으로는 약 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 100 mg/kg (체중) 범위 내이다. 투여량의 예는 1회 투여 당 약 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 30 mg/kg , 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg , 또는 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 일 수 있다. 항체는 또한 체표면을 통해 투여될 수 있다(예를 들어, 최대 4.5 g/m^2). 항체의 다른 예시적 투여량은 1회 투여시 최대 총 8 g 일 수 있다(체중 80 kg 또는 체표면적 1.8 m^2 가정).

[0361] 투여는 당업계에 알려진 어떠한 수단으로나 할 수 있다. 예를 들어, 항체는 1회 이상의 개별적 볼러스 투여 또는 예컨대, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 분 또는 그 이상에 걸친 단시간 또는 장시간 주입으로 행해질 수 있다. 초기 치료기 후에, 환자의 반응 및 치료를 감내하는 정도에 따라서, 필요한 경우 환자의 반응을 유지시키기 위해, 매주, 매 2, 3 또는 4 주마다, 매월, 매 2, 3 또는 6월마다 유지량을 투여할 수 있다. 질병 증상의 억제가 원하는 만큼 일어날 때까지, 빈번한 투여가 필요할 수 있다. 치료의 진전은 통상의 기술 및 분석으로 쉽게 모니터링할 수 있다. 치료는 정해진 기간 동안만 하거나, 계속적으로 하거나 또는 질병의 진전이 있거나 사망시까지 수 년에 걸쳐 이루어질 수 있다.

[0362] 투여는 담당 의사에 의해 선택된 투여량 수준 및 패턴에 따라 한 차례 또는수 차례 이루어질 수 있다. 질병의 치료 또는 예방을 위하여, 항체의 적절한 투여량은 치료될 질병의 종류, 질병의 심각도 및 경과, 예방용인지 치료용인지 여부, 이전의 치료, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 담당의의 재량에 따라 달라질 것이다. 항체는 환자에 1회로 또는 연속되는 치료 시기에 걸쳐 적절하게 투여된다.

[0363] 어떠한 경우라도, 제제는 목적하는 생물학적 활성을 발휘하기에, 예컨대, 암의 심각도를 방지하거나 최소화하기에 충분한 시간 동안 치료 항체를 제공하여야 한다. 본 발명의 조성물은 단독으로 또는 그러한 질병의 치료를 위해 당업계에 알려진 다른 치료와 함께 보조 치료법으로 투여될 수 있다.

[0364] 항체 조성물은 적절한 의료 지침에 따른 방식으로 제조, 투여량 결정 및 투여될 수 있다. 이때 고려되어야 할 사항은 치료되는 특정 질병, 치료되는 특정 포유동물, 개개 환자의 임상 증상, 질병의 원인, 치료제 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄 및 의사에 알려진 다른 요소 등을 포함한다. 투여될 항체의 치료 유효량은 위와 같은 사항을 고려하여 결정될 것이며, 표적 매개 질환, 증상 또는 질병을 방지, 완화 또는 치료하는 데 필요한 최소량이다. 그러한 양은 바람직하게는 숙주에 독성을 나타내거나 숙주를 상당히 감염되기 쉽게 만드는 양보다

작다.

[0365] 본 발명의 항체는 질병을 예방하거나 치료하는 데 현재 사용되고 있는 하나 이상의 치료제와 함께 제제화될 필요가 있는 것은 아니지만 경우에 따라 그렇게 할 수 있다. 그와 같은 다른 치료제의 유효량은 제제 중의 항체의 양, 질병, 증상, 질환 또는 치료의 종류 및 상기한 바와 같은 다른 요소에 따라서 달라질 수 있다. 이들은 일반적으로 상기한 바와 같은 투여 경로로 같은 투여량으로 투여되거나, 이제까지 사용된 투여량의 약 1 내지 99%로 사용된다.

[0366] 본 발명의 또 다른 실시태양에서, 목적하는 증상을 치료하는 데 유용한 물질을 함유하는 제품이 제공된다. 제품은 용기와 라벨을 포함한다. 적절한 용기는, 예를 들어, 바늘, 바이알, 주사기 및 시험관을 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱 등의 각종 재료로 제조될 수 있다. 증상을 치료하는 데 유용한 조성물을 함유하며, 멸균 접근 포트(예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘에 의해 찢어질 수 있는 정맥 주사용액 백 또는 바이알일 수 있음)를 가질 수 있다. 조성물 중의 활성제는 본 발명의 항체이다. 용기와 결합되거나 그 위에 있는 라벨은 조성물이 선택된 특정 질병의 치료에 사용되는 것임을 나타내는 것이다. 제품은 또한 제2의 치료제(본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 제2의 치료제 포함)를 함유하는 제2의 용기를 추가로 포함할 수 있다. 제품은 또한 동결건조된 항체 제제를 재생시키기 위한 제약상 허용되는 완충제, 예를 들어, 인산염 완충 염수, 링거액 또는 텍스트로스 용액을 함유하는 용기를 포함할 수 있다. 제품은 또한 상업적 또는 생산자 측면에서 바람직한 다른 물질, 예를 들어, 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 주사기 및 사용 지시가 있는 포장 삽입물을 포함할 수 있다.

[0367] **면역치료법**

[0368] 암이 있는 환자를 치료하는 데 유용한 항체는 종양에 대해 강력한 면역 반응을 개시할 수 항체 및 직접 세포독성을 나타낼 수 있는 항체를 포함한다. 세포독성체에 결합된 항체는 세포독성체를 PRLR을 발현하는 조직으로 유도하는 데 사용될 수 있다. 또한, 항체는 보체 매개 또는 항체 의존적 세포 세포독성(ADCC) 메커니즘에 의한 종양 세포 분해를 일으킬 수 있는데, 양자 모두 이펙터 세포 Fc 수용체 부위 또는 보체 단백질과 상호작용하기 위해 면역글로불린 분자의 온전한 Fc 부분을 필요로 한다. 또한, 종양 성장에 직접적인 생물학적 효과를 나타내는 항체는 본 발명의 실시예에 유용하다. 그와 같이 직접적으로 세포독성인 항체가 작용할 수 있는 유력한 메커니즘은 세포 성장 억제, 세포 분화 조절, 종양 혈관신생 인자 프로파일 조절 및 아포토시스 유도를 포함한다. 항체가 항-종양 효과를 나타내는 메커니즘은 당업계에 일반적으로 알려진 바와 같이, ADCC, ADMMC, 보체 매개 세포 용해 등을 측정하도록 설계된 다수의 시험관 내 분석으로 평가될 수 있다.

[0369] 하나의 실시태양에서, 면역치료법은 PRLR에 결합하여 PRLR의 활성화를 억제하는 항체를 사용하여 실시된다.

[0370] 항-PRLR 항체는 그들의 "네이키드" 또는 결합되지 않은 형태로 투여될 수 있거나, 다른 치료제 또는 진단제에 직접 결합되거나, 다른 치료제나 진단제를 포함하는 캐리어 중합체에 간접적으로 결합될 수 있다.

[0371] 항체는 방사성 동위원소, 친화도 표지(예를 들어, 비오틴, 아비딘 등), 효소 표지(예를 들어, 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼라인 포스파타제 등), 형광 또는 발광 또는 생물발광(예컨대, FITC 또는 로다민 등), 상자성 원자 등을 사용하여 검출가능하게 표지될 수 있다. 이러한 표지화 과정은 당업계에 잘 알려져 있다(Sternberger, L.A. et al., J. Histochem. Cytochem. 18:315 (1970); Bayer, E.A. et al., Meth. Enzym. 62:308 (1979); Engval, E. et al., Immunol. 109:129 (1972); Goding, J.W. J. Immunol. Meth. 13:215 (1976)).

[0372] 항체 잔기의 접합은 미국 특허 제6,306,393호에 기재되어 있다. 일반적 기술은 또한 문헌(Shih et al., Int. J. Cancer 41:832-839 (1988); Shih et al., Int. J. Cancer 46:1101-1106 (1990); and Shih et al., 미국 특허 제5,057,313호)에 기재되어 있다. 일반적 방법은 산화된 탄수화물 부분을 갖는 항체 성분을 적어도 하나의 유리 아민 작용기를 가지며 복수의 약물, 독소, 킬레이터, 붕소 어텐드(boron addend), 또는 다른 치료제가 부착된 캐리어 중합체와 반응시키는 것을 포함한다. 이 반응은 초기에 슈프(Schiff) 염기(이민) 결합을 형성시키며, 이후 2차 아민으로의 환원에 의해 안정화되어 최종 접합체를 형성할 수 있다.

[0373] 캐리어 중합체는, 예를 들어, 아미노텍스트란 또는 아미노산 잔기 50개 이상의 폴리펩티드일 수 있다. 약물 또는 다른 활성제를 캐리어 중합체에 결합시키는 각종 기술이 당업계에 알려져 있다. 아미노텍스트란 대신 폴리펩티드 캐리어를 사용할 수 있으나, 폴리펩티드 캐리어는 사슬 내에 적어도 50개의 아미노산 잔기, 바람직하게는 100 내지 5000 아미노산 잔기를 가져야 한다. 아미노산 잔기의 적어도 일부는 리신 잔기, 또는 글루타메이트 또는 아스파르테이트 잔기이어야 한다. 리신 잔기의 펜던트 아민 및 글루타메이트 및 아스파르테이트의 펜던트 카복실레이트는 약물, 독소, 면역조절제, 킬레이터, 붕소 어텐드 또는 다른 치료제를 부착시키기에 편리하다. 적절한 폴리펩티드 캐리어의 예는 폴리리신, 폴리글루탐산, 폴리아스파르트산, 이들의 공중합체, 및 이들 아미노

산과 다른 아미노산(예를 들어, 세린)의 혼합 중합체를 포함하며, 생성된 부착된 캐리어 및 접합체에 바람직한 용해도 특성을 부여한다.

- [0374] 또한, 접합된 항체는 항체 성분을 치료제와 직접 결합시켜 제조할 수 있다. 일반적인 과정은 치료제가 산화된 항체 성분에 직접 부착되는 것을 제외하고는 간접 접합 방법과 유사하다. 예를 들어, 항체의 탄수화물 잔기는 반감기를 증가시키기 위해 폴리에틸렌 글리콜에 부착될 수 있다.
- [0375] 다른 방법으로는, 치료제가 환원된 항체의 힌지 영역에 디설파이드 결합 형성을 통해, 또는 N-석시닐 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP)와 같은 헤테로이작용성 가교결합 링커를 사용하여 부착될 수 있다(Yu et al., Int. J. Cancer 56:244 (1994)). 이와 같은 접합을 위한 일반적인 과정은 당업계에 알려져 있다(예를 들어, Wong, Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking(CRC Press 1991); Upešlaciš et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods," in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch et al. (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter et al. (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995)). 각종 이작용성 단백질 커플링제가 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어, N-석시닐이미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트(SPDP), 이미노티올란(IT), 이미도에스테르의 이작용성 유도체(예를 들어, 디메틸 아디피미테이트 HCL), 활성 에스테르(예를 들어, 디석신이미딜 수베레이트), 알데히드(예를 들어, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물(예를 들어, 비스(p-아지도벤조일) 핵산디아민), 비스-디아조늄 유도체(예를 들어, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예를 들어, 톨리엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물(예를 들어, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)이 있다.
- [0376] 마지막으로, 하나 이상의 항-PRLR 항체 잔기 및 다른 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질이 제조될 수 있다. 항체 융합 단백질을 제조하는 방법은 당업계, 예를 들어, 미국 특허 제6,306,393호에 알려져 있다. 인터루킨-2 잔기를 포함하는 항체 융합 단백질이 문헌(Boleti et al., Ann. Oncol. 6:945 (1995), Nicolet et al., Cancer Gene Ther. 2:161 (1995), Becker et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 93:7826 (1996), Hank et al., Clin. Cancer Res. 2:1951 (1996), and Hu et al., Cancer Res. 56:4998 (1996))에 기재되어 있다.
- [0377] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 항체는 방사선증감제로 사용된다. 그러한 실시태양에서, 항체는 방사선 감각제에 결합된다. 본 명세서에서 "방사선증감제"란 세포가 전자기방사선에 대해 방사선 감각되는 민감성을 증가시키기 위해 및(또는) 전자기방사선으로 치료될 수 있는 질병의 치료를 촉진시키기 위해, 동물에 치료 유효량으로 투여되는 분자, 바람직하게는 저분자량 분자로 정의된다. 전자기방사선으로 치료될 수 있는 질병은 신생물 질환, 양성 및 악성 종양 및 암성 세포를 포함한다.
- [0378] 본 명세서에서 "전자기 방사선" 및 "방사선"이란 비제한적으로는 파장이 10^{-20} 내지 100 미터인 방사선을 포함한다. 본 발명의 바람직한 실시태양은 감마선(10^{-20} 내지 10^{-13} m), X-선(10^{-12} 내지 10^{-9} m), 자외선(10 nm 내지 400 nm), 가시광선(400 nm 내지 700 nm), 적외선(700 nm 내지 1.0 mm) 및 마이크로파선(1 mm 내지 30 cm)을 사용한다.
- [0379] 방사선증감제는 암성 세포의 전자기 방사선 독성 효과에 대한 감수성을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 많은 암 치료 프로토콜이 현재 X-선 전자기 방사선에 의해 활성화된 방사선증감제를 이용하고 있다. X-선 활성화된 방사선증감제의 예는 메트로니다졸, 미소니다졸, 테스메틸미소니다졸, 피모니다졸, 에타니다졸, 니모라졸, 미토마이신 C, RSU 1069, SR 4233, E09, RB 6145, 니코틴아미드, 5-브로모데옥시우리딘(BuDR), 5-요오도데옥시우리딘(IuDR), 브로모데옥시시티딘, 플루오로데옥시우리딘(FuDR), 히드록시우레아, 시스플라틴, 및 이들의 치료 유효 유사체 및 유도체를 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0380] 암의 광역학 치료(PDT)는 감각제의 방사선 활성화제로서 가시광을 이용한다. 광역학 방사선증감제의 예는 헤마토포르피린 유도체, 포토프린(r), 벤조포르피린 유도체, NPe6, 주석 에티오포르피린(SnET2), 피오보바이드-a, 박테리오클로포일-a, 나프탈로시아닌, 프탈로시아닌, 아연 프탈로시아닌, 및 이들의 치료 유효 유사체 및 유도체를 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0381] 또 다른 실시태양에서, 항체는 종양 프리타겟팅에 사용하기 위한 수용체(예컨대, 스트렙타비딘)에 결합될 수 있으며, 이 경우 항체-수용체 접합체가 환자에 투여되고, 이어서 비결합된 접합체가 순환으로부터 제거체를 사용하여 제거된 후, 세포독성체(예를 들어, 방사선헤중)에 결합된 리간드(예를 들어, 아비딘)가 투여된다.

- [0382] "표지"는 항체에 직접 또는 간접적으로 결합된 검출 가능한 화합물 또는 조성물이다. 표지는 그 자체로 검출 가능한 것이거나(예를 들어, 방사성 동위원소 표지 또는 형광 표지), 또는 효소 표지의 경우, 기질 화합물 또는 조성물의 검출 가능한 화학적 변화를 촉매할 수 있다. 다른 식으로는, 표지는 그 자체로는 검출될 수 없으나, 검출 가능한 다른 화합물에 결합된 요소(예를 들어, 에피토프 태그 또는 비오틴-아비딘과 같은 결합 파트너 쌍 중의 하나)일 수 있다. 따라서, 항체는 그의 단리를 촉진하는 표지 또는 태그를 포함할 수 있으며, 항체를 찾아 내는 본 발명의 방법은 항체를 표지 또는 태그와의 상호작용을 통해 단리하는 단계를 포함한다.
- [0383] 치료용 면역 접합체의 예는 본 명세서에 기재된 것으로서 세포독성제, 예를 들어, 화학요법제, 독소(예를 들어, 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소(즉, 방사능 접합체)에 결합된 것을 포함한다. 융합 단백질은 하기 상세히 설명된다.
- [0384] 방사성금속 또는 자기 공명 증진제를 위한 킬레이터는 당업계에서 잘 알려져 있다. 전형적인 것은 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA) 및 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTPA)의 유도체이다. 이들 킬레이터는 전형적으로는 킬레이터를 캐리어에 부착시킬 수 있는 기를 촉매 상에 갖는다. 그러한 기의 예로는 벤질이소티오시아네이트가 있으며, 그에 의해 DTPA 또는 EDTA가 캐리어의 아민 기에 커플링될 수 있다. 다른 방식으로는, 킬레이터 상의 카복실 기 또는 아민 기가 잘 알려진 수단으로 활성화 또는 예비유도 후의 커플링에 의해 캐리어에 커플링될 수 있다.
- [0385] 카보란과 같은 붕소 어텐드는 통상의 방법으로 항체 성분에 부착될 수 있다. 예를 들어, 펜던트 촉매 상에 카복실 작용기를 갖는 카보란을 당업계에 알려진 바와 같이 제조할 수 있다. 그러한 카보란을 아미노텍스트란과 같은 캐리어에 부착시키는 것은 카보란의 카복실 기를 활성화시킨 후 캐리어 상의 아민과 축합시켜 중간체 접합체를 생성함으로써 수행될 수 있다. 그러한 중간체 접합체를 항체 성분에 부착시켜 상기한 바와 같은 치료적으로 유용한 면역 접합체를 생산한다.
- [0386] 캐리어 중합체는, 예를 들어, 아미노텍스트란 또는 아미노산 잔기 50개 이상의 폴리펩티드일 수 있다. 약물 또는 다른 활성제를 캐리어 중합체에 결합시키는 각종 기술이 당업계에 알려져 있다. 아미노텍스트란 대신 폴리펩티드 캐리어를 사용할 수 있으나, 폴리펩티드 캐리어는 사슬 내에 적어도 50개의 아미노산 잔기, 바람직하게는 100 내지 5000 아미노산 잔기를 가져야 한다. 아미노산 잔기의 적어도 일부는 리신 잔기, 또는 글루타메이트 또는 아스파르테이트 잔기이어야 한다. 리신 잔기의 펜던트 아민 및 글루타메이트 및 아스파르테이트의 펜던트 카복실레이트는 약물, 독소, 면역조절제, 킬레이터, 붕소 어텐드 또는 다른 치료제를 부착시키기에 편리하다. 적절한 폴리펩티드 캐리어의 예는 폴리리신, 폴리글루탐산, 폴리아스파르트산, 이들의 공중합체, 및 이들 아미노산과 다른 아미노산, 예를 들어, 세린의 혼합 중합체를 포함하며, 생성된 부착된 캐리어 및 접합체에 바람직한 용해도 특성을 부여한다.
- [0387] 중간체 접합체를 항체 성분과 결합시키는 것은 항체 성분의 탄수화물 부분을 산화시키고, 생성된 알데히드(및 케톤) 카보닐을 약물, 독소, 킬레이터, 면역조절제, 붕소 어텐드, 또는 다른 치료제를 부착시킨 후에 캐리어 상에 잔존하는 아민 기와 반응시켜 수행한다. 다른 방식으로는, 중간체 접합체를 치료제를 부착시킨 후에 중간체 접합체에 도입된 아민 기를 통하여 산화된 항체 성분에 부착할 수 있다. 산화는 NaIO_4 또는 다른 당분해 시약을 사용하여 화학적으로, 또는 예컨대, 뉴라미니다제 및 갈락토스 옥시다제를 사용하여 효소적으로 수행할 수 있다. 아미노텍스트란 캐리어의 경우, 일반적으로 아미노텍스트란의 아민 전부가 치료제의 부착에 사용되는 것은 아니다. 아미노텍스트란의 잔존하는 아민이 산화된 항체 성분과 축합하여 쉬프 염기 어덕트를 생산하며, 이를 통상적으로는 보로하이드라이드 환원제를 사용하여 환원적으로 안정화시킨다.
- [0388] 본 발명에 따른 다른 면역 접합체를 제조하기 위하여 유사한 방법이 사용된다. 로딩된 폴리펩티드 캐리어는 바람직하게는 항체 성분의 산화된 부분과 축합을 위하여 남겨진 유리 리신 잔기를 갖는다. 폴리펩티드 캐리어 상의 카복실은 필요에 따라, 예컨대, DCC로 활성화시킨 후 과량의 디아민과 반응시켜 아민으로 전환시킬 수 있다.
- [0389] 최종 면역 접합체를 통상의 방법, 예컨대, 세파크릴 S-300 상의 크기 크로마토그래피 또는 하나 이상의 CD84Hy 에피토프를 사용한 친화도 크로마토그래피에 의해 정제한다.
- [0390] 다른 방식으로는, 면역 접합체는 항체 성분을 치료제와 직접 결합시켜 제조할 수 있다. 일반적인 과정은 치료제가 산화된 항체 성분에 직접 부착되는 것을 제외하고는 간접 접합 방법과 유사하다.
- [0391] 본 명세서에 기재된 킬레이터 대신에 다른 치료제를 사용할 수 있음이 명백하다. 당업자는 과도한 실험 없이도 접합 계획을 고안할 수 있을 것이다.

- [0392] 또 다른 예로서, 치료제는 환원된 항체 성분의 힌지 영역에 디설파이드 결합 형성을 통해 부착될 수 있다. 예를 들어, 테타누스 독소 펩티드는 펩티드를 항체 성분에 부착시키는 단일 시스템 잔기를 갖도록 제작될 수 있다. 또 다른 방법으로는 그러한 펩티드는 항체 성분에 N-석시닐 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP)와 같은 헤테로이작용성 가교결합 링커를 사용하여 부착될 수 있다(Yu et al., *Int. J. Cancer* 56:244 (1994)). 그러한 접합을 위한 일반적인 기술은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, Wong, *Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking* (CRC Press 1991); Upešlaciš et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods," in *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch et al. (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter et al. (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995)).
- [0393] 항체와 세포독성제의 접합체는 각종 이작용성 단백질 커플링제, 예를 들어, N-석신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP), 이미노티올란(IT), 이미도에스테르의 이작용성 유도체(예를 들어, 디메틸 아디피미데이트 HCL), 활성 에스테르(예를 들어, 디석신이미딜 수베레이트), 알데히드(예를 들어, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물(예를 들어, 비스(p-아지도벤조일) 핵산디아민), 비스-디아조늄 유도체(예를 들어, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예를 들어, 톨리엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 불소 화합물(예를 들어, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조한다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌(Vitetta et al., *Science* 238: 1098(1987))에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산(MX-DTPA)은 방사선 핵종을 항체에 접합시키는 킬레이트제의 한 예이다(예를 들어, WO 94/11026)
- [0394] 상기한 바와 같이, 항체 Fc 영역 중의 탄수화물 잔기는 치료제를 결합시키는데 사용될 수 있다. 그러나, 항체 단편이 면역 접합체의 항체 성분으로 사용되는 경우, Fc 영역은 존재하지 않을 수 있다. 그럼에도 불구하고, 항체 또는 항체 단편의 경쇄 불변 영역 내로 탄수화물 잔기를 도입할 수 있다(예를 들어, Leung et al., *J. Immunol.* 154:5919 (1995); Hansen et al., 미국 특허 제5,443,953호). 가공된 탄수화물 잔기는 치료제를 부착시키는데 사용된다.
- [0395] 또한, 당업자는 접합 방법의 여러 가능한 변형법을 알 수 있을 것이다. 예컨대, 탄수화물 잔기는 온전한 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 혈액, 림프, 또는 다른 세포외 체액에서의 반감기를 증가시키기 위해 폴리에틸렌 글리콜을 부착시키는데 사용될 수 있다. 또한, 치료제를 탄수화물 잔기 및 유리 설프히드릴 기에 부착시켜 "이 가 면역 접합체"를 제조할 수 있다. 그러한 유리 설프히드릴 기는 항체 성분의 힌지 영역에 위치할 수 있다.
- [0396] 항체 융합 단백질
- [0397] 본 발명은 하나 이상의 항체 잔기와, 면역조절제 또는 독소 잔기와 같은 다른 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질의 사용에 관한 것이다. 항체 융합 단백질의 제조 방법은 당업계에 알려져 있다(예를 들어, 미국 특허 제 6,306,393호). 인터투킨-2 잔기를 포함하는 항체 융합 단백질이 문헌(Boleti et al., *Ann. Oncol.* 6:945 (1995), Nicolet et al., *Cancer Gene Ther.* 2:161 (1995), Becker et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93:7826 (1996), Hank et al., *Clin. Cancer Res.* 2:1951 (1996), and Hu et al., *Cancer Res.* 56:4998 (1996))에 기재되어 있다. 또한, 문헌(Yang et al., *Hum. Antibodies Hybridomas* 6:129 (1995))은 F(ab')₂ 단편과 종양 괴사 인자 알파 잔기를 포함하는 융합 단백질을 기재하고 있다.
- [0398] 제조합 분자가 하나 이상의 항체 성분과 독소 또는 화학요법제를 포함하는 항체-독소 융합 단백질의 제조 방법이 또한 당업자에게 알려져 있다. 예를 들어, 항체-슈도모나스 외독소 A 융합 단백질이 문헌(Chaudhary et al., *Nature* 339:394 (1989), Brinkmann et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 88:8616 (1991), Batra et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89:5867 (1992), Friedman et al., *J. Immunol.* 150:3054 (1993), Weis et al., *Int. J. Can.* 60:137 (1995), Fominaya et al., *J. Biol. Chem.* 271:10560 (1996), Kuan et al., *Biochemistry* 35:2872 (1996), and Schmidt et al., *Int. J. Can.* 65:538 (1996))에 기재되어 있다. 디프테리아 독소 잔기를 함유하는 항체-독소 융합 단백질은 문헌(Kreitman et al., *Leukemia* 7:553 (1993), Nicholls et al., *J. Biol. Chem.* 268:5302 (1993), Thompson et al., *J. Biol. Chem.* 270:28037 (1995), and Vallera et al., *Blood* 88:2342 (1996))에 기재되어 있다. 문헌(Deonarain et al., *Tumor Targeting* 1:177 (1995))은 RNase 잔기를 갖는 항체-독소 융합 단백질을 기재하고 있고, 문헌(Linardou et al., *Cell Biophys.* 24-25:243 (1994))은 DNase I 성분을 포함하는 항체-독소 융합 단백질을 기재하고 있다. 젤로닌도 또한 항체-독소 융합 단백질의 독소 성분으로 사용되었다(Wang et al., Abstracts of the 209th ACS National Meeting, Anaheim,

Calif., Apr. 2-6, 1995, Part 1, BIOT005). 또 다른 예로서, 문헌(Dohlsten et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91:8945 (1994))은 스타필로코커스 엔테로톡신-A를 포함하는 항체-독소 융합 단백질을 기재하고 있다..

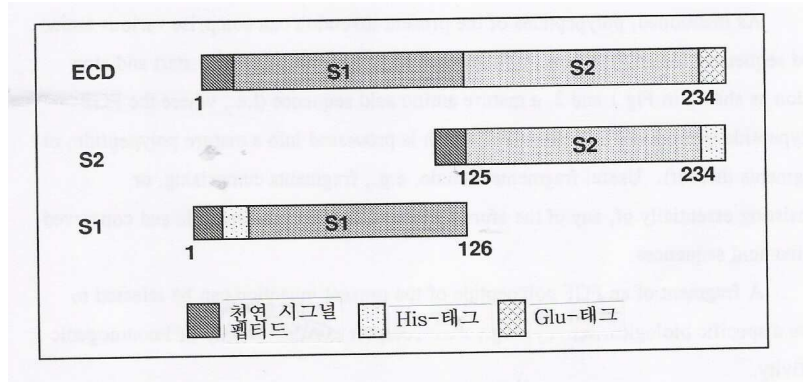
- [0399] 상기한 바와 같은 접합체의 제조에 적절하게 사용되는 독소의 예로는 리신, 아브린, 리보뉴클레아제, DNase I, 스타필로코커스 엔테로톡신-A, 미국자리공(pokeweed) 항바이러스 단백질, 젤로닌, 디프테린 독소, 슈도모나스 외독소, 및 슈도모나스 내독소가 있다(Pastan et al., Cell 47:641 (1986), and Goldenberg, CA-A Cancer Journal for Clinicians 44:43 (1994)). 다른 적절한 독소는 당업자에게 알려져 있다.
- [0400] 본 발명의 항체는 또한 항체를, 전구약물(예를 들어, 펩티딜 화학요법제, WO 81/01145 참조)을 활성 항암 약물로 전환시키는 전구약물 활성화 효소에 결합시킴으로써 ADEPT에 사용될 수 있다(예를 들어, WO 88/07378 및 미국 특허 제4,975,278호).
- [0401] ADEPT에 유용한 면역 접합체의 효소 성분은 전구약물을 보다 활성이고, 세포독성인 형태로 전환시키도록 전구약물에 작용할 수 있는 효소를 포함한다.
- [0402] 본 발명의 방법에 유용한 효소는 인산염 함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는 데 유용한 알칼라인 포스파타제; 황산염 함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는 데 유용한 아릴설파타제; 비-독성 5-플루오로시토신을 항암 약물, 5-플루오로우라실로 전환시키는 데 유용한 시토신데아미나제; 펩티드 함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는 데 유용한 프로테아제, 예를 들어, 세라티아 프로테아제, 썬모리신, 서브틸리신, 카복시펩티다제 및 카텡신(예를 들어, 카텡신 B 및 L); D-아미노산 치환체를 함유하는 전구약물을 전환시키는 데 유용한 D-알라닐 카복시펩티다제; 글리코실화 전구약물을 유리 약물로 전환시키는 데 유용한 탄수화물-절단 효소, 예를 들어, β -갈락토시다제 및 뉴라미니다제; β -락탐으로 유도된 약물을 유리 약물로 전환시키는 데 유용한 β -락타마제; 및 아민 질소에서 페녹시아세틸 또는 페닐아세틸기로 유도된 약물을 유리 약물로 전환시키는 데 유용한 페니실린 아미다제, 예를 들어, 각각 페니실린 V 아미다제 또는 페니실린 G 아미다제를 포함하나, 이에 국한되는 것은 아니다. 또한, 당업계에 아브자임이라고도 알려진, 효소 활성을 갖는 항체가 본 발명의 전구약물을 유리 활성 약물로 전환시키는데 사용될 수 있다(예를 들어, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). 항체-아브자임 접합체는 본 명세서에 기재된 바와 같이 아브자임을 종양 세포 집단으로 전달하기 위해 제조될 수 있다.
- [0403] 본 발명의 효소는 당업계에 잘 알려진 기술로, 예를 들어, 상기한 바와 같이 헤테로이작용성 가교결합 시약을 사용하여 항체에 공유결합될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체의 적어도 하나의 항원 결합 영역이 본 발명의 효소의 적어도 하나의 기능적 활성 부분에 결합된 융합 단백질이 당업계에 잘 알려진 제조법 DNA 기술을 사용하여 제조될 수 있다(예를 들어, Neuberger et al., Nature 312: 604-608 (1984)).
- [0404] 비-치료 용도
- [0405] 본 발명의 항체는 표적 항원에 대한 친화도 정제를 위한 물질로서, 또는 표적 항원에 대한 진단 분석에서, 예를 들어, 특정 세포, 조직 또는 혈청에서 그의 발현을 검출하는 데 사용될 수 있다. 항체는 또한 생체내 진단 분석에도 사용될 수 있다. 일반적으로, 이와 같은 목적으로 사용될 때 면역신티오그래피에 의해 종양 위치를 찾아낼 수 있도록 항체가 방사선 핵종(예를 들어, ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P 또는 ^{35}S)으로 표지된다.
- [0406] 본 발명의 항체는 공지된 임의의 분석 방법, 예를 들어, 경쟁 결합 분석, ELISA와 같은 직접 및 간접 샌드위치 분석, 및 면역침강 분석에 사용될 수 있다(Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158(CRC Press, Inc. 1987)). 항체는 또한 면역조직화학에서 종양 샘플을 당업계에 알려진 방법으로 표지하기 위해 사용될 수 있다.
- [0407] 편의를 위하여, 본 발명의 항체는 키트로, 즉, 진단 분석 수행에 관한 설명서와 함께 소정량의 시약들의 포장된 조합체로 제공될 수 있다. 항체가 효소로 표지된 경우, 키트는 효소에 의해 요구되는 기질과 조인자(예를 들어, 검출 가능한 발색단 또는 형광단을 제공하는 기질 전구체)를 포함할 것이다. 또한, 다른 첨가제, 예컨대, 안정화제, 완충액(예를 들어, 차단 완충액 또는 용해 완충액) 등이 포함될 수 있다. 각종 시약의 상대적인 양은 분석의 감도를 실질적으로 최적화시키는 시약 용액 중의 농도를 제공하기 위해 넓은 범위에서 변화될 수 있다. 특히, 시약은 용해 시에 적절한 농도를 갖는 시약 용액을 제공하는 부형제를 포함하며, 대개는 동결건조된 건조 분말로서 제공될 수 있다.
- [0408] 본 발명이 하기 실시예에 의해 설명되지만, 실시예는 어떠한 의미에서도 본 발명을 제한하려는 의도로 주어지지 않는다.

실시예

[0409] 실시예 1: PRLR의 ECD, S1 및 S2 도메인 단편의 제조

[0410] PRLR의 세포외 도메인(ECD, 서열 번호 2의 아미노산 25 내지 234), S1 도메인(서열 번호 2의 아미노산 25 내지 125) 및 S2 도메인(서열 번호 2의 아미노산 126 내지 234)에 상응하는 PRLR 단편의 제조 및 정제를 다음과 같이 수행하였다. ECD, S1 및 S2의 곤충 발현을 위한 발현 구조물을 표 2에 나타낸 바와 같이 설계하고, 각각의 아미노산 서열에 기초하여 단편을 클로닝하기 위한 프라이머를 설계하였다(표 3).

[0411] [표 2]



[0412]

[0413] [표 3]

도메인	사용된 PCT 프라이머 (F=정방향; R=역방향)	PCR 프라이머 서열	
ECD	F1 서열 번호 3	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTACGAAGGAGA TATACATATGAAGGAAATGTGGCATCTGCAA	
	R1 서열 번호 4	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAAGCTCCGTG ATGGTGATGGTGATGTGCTCCATCATTATGGTGAAGTC	
S1	F2 서열 번호 5	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGA ACCATG	
	F3 서열 번호 6	CAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGAAGGAAAAATGTGGCAT CTGCAACC	
	F4 서열 번호 7	GAAGGAAAAATGTGGCATCTGCAACCGTTTTCACTCTGCTACTT TTTCTC	
	F5 서열 번호 8	CGTTTTCACTCTGCTACTTTTTCTCAACACCTGCCTTCTGAATG GAGGAG	
	F6 서열 번호 9	CAACACCTGCCTTCTGAATGGAGGAGCACATCACCATCACCAT CACGGAG	
	F7 서열 번호 10	CACATCACCATCACCATCACGGAGCTCAGTTACCTCCTGGAAA ACCTGAG	
	R2 서열 번호 11	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCACTGAACTATGTAAGTC ACGTCCAC	
	S2	F8 서열 번호 12	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGA ACCATG
		F9 서열 번호 13	CAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGAAGGAAAAATGTGGCAT CTGCAACC
		F10 서열 번호 14	GAAGGAAAAATGTGGCATCTGCAACCGTTTTCACTCTGCTACTT TTTCTC
F11 서열 번호 15		CGTTTTCACTCTGCTACTTTTTCTCAACACCTGCCTTCTGAATG TTCA	
F12 서열 번호 16		TCTCAACACCTGCCTTCTGAATGTTCCAGCCAGACCCTCCTTGG AGCTG	
R3 서열 번호 17	CGTGATGGTGATGGTGATGTGCTCCATCATTATGGTGAAGTC ACTAGG		
R4 서열 번호 18	CAAGAAAGCTGGGTTTAAGCTCCGTGATGGTGATGGTGATGTG CTCC		
R5 서열 번호 19	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAAGCTCC		

[0414]

[0415] S1 및 S2 도메인의 클로닝을 위하여, 네스티드(nested) PCR 기법을 이용하여 태그를 삽입하고, 3'/5' 영역을 가공하였다. S1에 대해, 클로닝을 위한 6개의 정방향 네스티드 프라이머 및 1개의 역방향 프라이머가 있다. S2에 대해, 클로닝을 위한 5 개의 정방향 네스티드 프라이머 및 3개의 역방향 프라이머가 있다.

[0416] PCR 증폭은 제조사의 권장사항에 따라, 피에프유올트라 핫스타트 PCR 마스터 믹스(PfuUltra™ Hotstart PCR Master Mix; Stratagene)를 사용하여 수행하였다. 증폭에 사용된 주형은 pDEST3218 중에 클로닝된 PRLR ECD 단편이다(데이터는 제시되지 않음). ECD PCR 생성물을 토포이소머라제 클로닝 전략으로 BlueBac4.5/V5-His TOPO-TA(Invitrogen) 내로 클로닝하였다. S1 및 S2 PCR 생성물을 게이트웨이 테크놀로지(Gateway Technology;

Invitrogen)를 사용하여 실험실내 적응된 pAcMP3 내로 클로닝하였다. 최종 선택된 클론을 이중 가닥 시퀀싱으로 확인하였다. 10 내지 20 μg 의 DNA를 곤충 트랜스펙션을 위해 제조하였다.

- [0417] 곤충 세포에서 각각의 PRLR 단편을 발현시키기 위하여 재조합 구조물을 다음과 같이 사용하였다. PRLR의 세포외 도메인을 코딩하는 플라스미드 DNA와 사파이어(Sapphire™) 게놈 오토그라프 캘리포니카(Autographa californica) DNA의 동시 트랜스펙션의 플라크 정제에 의해 배칼로바이러스를 단리하였다. 재조합 바이러스를 증폭시켜 10 L(작업 부피) 웨이브생물반응기 중 접종비(moi) 2 내지 10에서 Tn5 곤충 세포를 $1 \times 10^6 - 1.5 \times 10^6$ 세포/ml의 밀도로 감염시키는 데 사용하였다. 48 시간 감염시킨 후, 세포와 상등액을 모아서 원심분리하고, 상등액을 농축을 위해 준비했다. 상등액을 0.45 μm 중공 섬유 카트리지 상에서 청정화하고, 탄젠트 플로우 10 kDa MW 컷-오프 멤브레인으로 5배 농축시켰다. 단백질 정제 전에, 상등액을 IL, 0.2 μm 기공 진공 플라스크로 멸균 여과하였다.
- [0418] 유사한 방법으로 곤충 세포에서 S1 및 S2 도메인을 발현시켰으며, 단, S1 단편은 정제 전 농축시키지 않았고, S2 단편은 5 kDa MW 카트리지 상에서 농축시켰다.
- [0419] PRLR 단편을 다음과 같이 정제하였다. 발현된 PRLR ECD 또는 서브도메인을 함유하는 곤충-세포 배양물 상등액을 순수하거나 1 또는 5 kD 공칭 분자량 컷 오프를 갖는 적층 멤브레인 카세트 장치(Pall Filtron)를 사용하여 최대 10배 농축시킨 발현군에서 얻었다. 가능한 경우, 상등액을 0.2 마이크로 필터를 통해 여과시켰다. 상등액을 PBS-평형된 칼럼 상에 직접 걸었다.
- [0420] His-태깅된 단백질을 1- 또는 5-mL 히스트랩(HisTrap) 칼럼(GE Healthcare)에서 제조자의 권장 유속으로 정제하였다. Glu-태깅된 단백질을 다음과 같이 제조된 고정화 항-glu 모노클로날 항체 칼럼에서 정제하였다: PBS 중 정제된 항-glu 모노클로날 항체(농도 3 내지 10 mg/mL)를 n-히드록시석신이미드 활성화 아가로즈 겔인 어피-겔(Affi-gel) 10(Bio-Rad)에 제조자의 지시에 따라 결합시켰다. 항-glu 아가로즈를 XK 16 칼럼(GE Healthcare) 내에 채워넣고, 선형 유속 15 내지 30 cm/시에서 가동시켰다.
- [0421] 히스트랩(HisTrap) 칼럼의 단백질의 용출은 완충액 A(PBS)에서 완충액 B(PBS + 0.25 M 이미다졸(IX-0005, EM Merck) pH 7.4)에 이르는 20배 칼럼 부피의 구배 용출에 의하였다. 항-glu 칼럼으로부터의 단백질 용출은, Glu-Glu 에피토프와 경쟁하는 펩티드 EYMPD를 0.1 mg/mL 함유하는 PBS에 의하였다. 분획들을 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 또는 질량 분석으로 검사하고, 적절히 합하였다.
- [0422] 합해진 PRLR ECD 또는 서브도메인을 PBS 중에 평형시키고 2.5 mL/분으로 가동되는 슈퍼덱스(Superdex) 75 26/60 칼럼(GE Healthcare)을 사용한 크기 배제 크로마토그래피로 더욱 정제하였다. 10 mL 이하를 칼럼에 걸었다. 분획들을 SDS-PAGE로 검사하고, 적절히 합하였다.
- [0423] **실시예 2: 인간 항체 파아지 디스플레이 라이브러리로부터의 표적 특이적 항체의 단리**
- [0424] 인간 PRLR의 활성을 중화할 수 있는 항체 패널을 단리시키기 위해, scFv 단편을 발현하는 3개의 인간 항체 파아지 디스플레이 라이브러리를 평행하게 검사하였다. 라이브러리 패닝에 사용된 표적은 상기 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조된, 프롤락틴 수용체의 가용성 세포외 도메인(ECD)(인간 프롤락틴 수용체 아미노산 25 내지 234)이었다. 수용체를 비오틴닐화(NHS-LC 비오틴, Pierce)하고, 비오틴닐화 ECD 상에 가용성 패닝을 수행하였다.
- [0425] 파아지 디스플레이로부터의 표적 특이적 항체의 선택을 문헌(Marks et al. (Methods MoI Biol. 248:161-76, 2004))에 기재된 방법에 따라 수행하였다. 간단히 설명하면, 파아지 디스플레이 라이브러리를 실온에서 1 시간 동안 50 pmol의 비오틴닐화 ECD와 함께 인큐베이션한 후, 형성된 결합체를 100 μl 의 스트렙타비딘 비드 현탁액(다이내비드® M-280 스트렙타비딘, Invitrogen)을 사용하여 캡처하였다. 비특이적 파아지는 비드를 세척 완충액(PBS + 5% 우유)으로 세척하여 제거하였다. 결합된 파아지를 0.5 ml의 100 nM 트리에틸아민(TEA)으로 용출시킨 다음, 같은 부피의 1 M TRIS-Cl, pH 7.4를 가하여 즉시 중화시켰다. 용출된 파아지 풀을 사용하여 로그 성장기에 있는 TG1 이. 콜라이 세포를 감염시키고, 문헌에 기재된 바와 같이 파아지미드를 이탈시켰다(Methods MoI Biol. 248:161-76, 2004). 총 3회 선택을 반복하였다. 3회차 패닝으로부터 용출된 파아지로 감염된 TG1 세포로부터 얻어진 단일 콜로니를 ELISA 분석에서 결합 활성에 대해 스크리닝하였다. 간단히 설명하면, 용출된 파아지로 감염된 TG1 세포로부터 얻어진 단일 콜로니를 사용하여 96웰 플레이트 중 배지를 접종하였다. 마이크로 배양물을 OD₆₀₀ = 0.6까지 성장시켰으며, 이때 30°C에서 웨이커 인큐베이터 중 밤새 배양 후 1 mM IPTG의 첨가에 의해 가용성 항체 단편의 발현이 유도된다. 세균을 스핀 분해하고, 페리플라즈 추출물을 준비하여, 마이크로플레이트 제조자에 의해 제공되는 표준 ELISA 프로토콜에 따라, 96웰 마이크로플레이트(96웰 편평 바닥 면역흡착

플레이트, Nunc) 상에 고정된 ECD에 대한 항체 결합 활성을 검출한다.

[0426] 항-프롤락틴 수용체(PRLR) 항체의 재조합 세포외 도메인(ECD)에 결합에 대한 친화도는 바이아코어(Biacore®) 2000을 사용하여 평가하였으며, 항체의 친화도 순위를 정하는 데 사용하였다. 인간 scFv-Fc 융합체에 대해서는 프로테인 A/G 캡처 표면을, 하이브리도마에 의해 생산된 항체에 대해서는 토끼 항-마우스 IgG-Fc(RAM-Fc) 항체 캡처 표면을 사용하였다. 프로테인 A/G 및 RAM-Fc 캡처 칩은 제조사(Biacore® Inc.)로부터의 권장되는 프로토콜에 따라, 표준 EDC-NHS 아민 커플링 화학을 통해 모두 4개의 유동 셀 상에 고정화된 최대 수준의 캡처 분자(프로테인 A/G 또는 RAM-Fc)를 갖는 CM5 센서 칩이다. 가동 완충액은 HBS-EP(Biacore®, Inc.)이고, 온도는 25 ° C로 설정되었으며, 유속은 초기에 10 µl/분이었다. 정제된 항체를 HBS-EP 내로 희석하여 대략 1 내지 3 µg/mL 농도로 만들고, 1 내지 2분 동안 캡처 칩 위로 주사한다. 유속을 25 내지 30 µl/분으로 증가시켰다. PRLR의 재조합 ECD를 1 µg/mL로 희석하여 5 내지 6 분 동안 주사하고, 10분간 해리시켰다.

[0427] 바이아이벨류에이션(BIAEvaluation) 소프트웨어를 사용하여 핏팅(fitting)을 수행하고, 동력학 결합 및 해리 속도 상수(각각 kon 및 koff)를 계산하는 데 사용하였다. 질량 수송 보정이 있는 1:1 랑뮈르(Langmuir) 상호작용 모델을 사용하여 각 샘플에 동시 ka/kd 핏팅을 수행하였다. 몇몇 샘플이 같은 시간에 핏팅되었으며, Rmax, kon, 및 koff 파라미터는 로컬에 맞게 설정되었다. 베이스라인 드리프트(drift)가 있을 때, 드리프팅 베이스라인 모델을 사용하였으며, 드리프트 값을 일정 값으로 하고, 수동으로 입력하였다. 드리프트 값은 -0.03 내지 +0.05 RU/초이었다.

[0428] 항체 결합은 또한 형광 활성 세포 분류(Fluorescent Activated Cell Sorting; FACS) 분석 및 형광측정 마이크로볼륨 분석 기술(Fluorometric Microvolume Assay Technology; FMAT)(Swartzman et al., Anal Biochem. 271:143-51, 1999)을 사용하여, 프롤락틴 수용체 발현 세포로의 결합을 측정하여 분석하였다. FACS 또는 FMAT 분석에서 결합을 나타내는 클론을 서열 분석하고, 탁월한 중쇄 CDR3 및 경쇄 CDR3 단백질 서열을 코딩하는 클론을 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이 scFv-Fc로 리포매팅하였다. 이들 scFv-Fc를 BaF3/PRLR 세포주에서 PRLR-유도 ERK1/2 인산화 및 PRLR-유도 증식을 억제하는 능력에 대해 시험하였다(실시예 5 및 6). 선택된 항체를 ECD, S1 및 S2에 대한 결합뿐만 아니라, PRLR ECD에의 결합에 대한 항체 쌍 사이의 상대적 경쟁(실시예 7에 기재됨)에 대해 시험하여 더욱 특성화하였다. 선택된 항체에 대한 데이터가 표 4에 나타나 있다.

[표 4]

항체	pERK1/2 억제 IC50	BaF3/PRLR 증식 억제 IC50	친화도 또는 평형해리상수 K _D (nM)	도메인 특이성	에피토프 빈 (같은 빈 항체의 PRLR 결합 경쟁)
XPA.06.158	0.01	0.06	0.7	S1	4.5
XPA.06.167	0.04	0.14	4	S1	3.8
XPA.06.178	0.09	0.23	20	S1	3.8
XPA.06.145	0.30	0.77	10	S1	4
XPA.06.217	0.35	1.18	7	S1	7
XHA.06.983	0.11	0.1	0.1	S?	6
XHA.06.189	0.2	0.15	<0.1	S1	3.8
XHA.06.275	0.5	1.31	0.4	S2	5
XHA.06.567	0.65	7.06	0.8	S2	6.5

[0430]

[0431] 실시예 3: 클론의 scFv-Fc 포맷으로의 리포매팅

[0432] 실시예 2에서 확인된 각각의 유효한 scFv 클론에 대하여, scFv 단편을 코딩하는 cDNA를 과거 디스플레이 벡터로부터 PCR로 증폭시켜, 소마(XOMA's) 소유의 발현 벡터(WO 2004/033693에 기재, 카파(κ), 람다(λ) 또는 감마-2(γ2) 불변 영역 유전자 코딩)의 변형인 포유동물 발현 벡터 내로 결합시켜, 각 항체를 scFv-Fc 단백질(단백질의 Fc 부분은 IgG1 분자의 CH2 및 CH3 도메인을 나타냄)로 발현시켰다. scFv-Fc 융합 단백질의 제조는 당업계 에 잘 알려져 있다(Fredericks et al, Protein Eng Des Sel. 2004 Jan;1 7(1):95-106, Powers et al, J

Immunol Methods. 2001 May 1;251(1-2):123-35, or Shu et al, Proc. Nat. Acad. Sci USA 1993, 90, 7995-7998). 미국 특허 제5,892,019호는 또한 Fc 융합 단백질 백터의 제작 및 scFv-Fc 융합 단백질의 발현을 기재하고 있다.

[0433] 융합 단백질의 발현은 제조자의 지시에 따라 리포펙타민(Lipofectamine) 2000(Invitrogen)으로 293E 현탁 세포를 트랜스펙션하여 수행하였다. 5일 후에 세포를 원심분리로 제거하고, scFv-Fc 융합체를 제조자의 제안된 프로토콜에 따라 프로테인 A 세파로스(GE Healthcare)를 사용하여 상등액으로부터 정제하였다.

[0434] **실시예 4: 쥐과 동물 하이브리도마에 의해 분비되는 표적 특이적 항체의 확인**

[0435] 인간 프롤락틴 수용체(PRLR)의 세포외 도메인(ECD)에 대한 마우스 항체를 다음과 같이 생산하였다. 6마리의 Balb/C 마우스를 제조할 PRLR 세포의 도메인(상기한 바와 같이 제조)을 피하주사하여 면역시켰다. 마우스에 28일에 걸쳐 10회 주사하였다. 최종 주사 후 4일에, 마우스를 희생시키고, 배액 림프절을 수거하였다. 림프절로부터의 세포를 현탁시킨 후, 마우스 골수종 세포주 P3xAg8.653와, BTX ECM2001 일렉트로-셀 매니플레이터(Harvard Apparatus)를 사용하여 전기세포 융합에 의해 융합시켰다.

[0436] 융합 후, 세포를 대략 40개 96웰 플레이트 내로 깔았다. 12일 후, 플레이트를 제조할 ECD에 대해 ELISA로 또한 FMAT로 스크리닝하였다. FMAT 분석은 안정하게 트랜스펙션되어 고 수준의 PRLR 수용체를 발현하는 CHO 세포주를 사용하였다.

[0437] 선택된 하이브리도마를 BaF3/PRLR 세포주의 PRLR-유도 ERK1/2 인산화 및 PRLR-유도 증식을 억제하는 능력에 대해 시험하였다(하기 실시예 5 및 6). 선택된 항체를 ECD, S1 및 S2에 대한 결합뿐만 아니라, PRLR ECD에의 결합에 대한 항체 쌍 사이의 상대적 경쟁(실시예 7에 기재됨)에 대해 시험하여 더욱 특성화하였다. 선택된 항체에 대한 데이터가 상기 표 4에 나타나 있다.

[0438] **실시예 5: ERK1/2 인산화에 미치는 항체 효과 측정**

[0439] 5 시간 동안의 혈청 공급중단 후, T47D 세포를 마이크로타이터 내 완전 성장 배지 중 24 시간 동안 37°C에서 시딩하였다. 세포를 인산염 완충 염수(PBS)로 2회 세척한 후, 0.1% BSA를 함유하는 혈청 비함유 배지 중 희석된 항체와 함께 30 분간 37°C에서 인큐베이션하였다. 항체의 최종 출발 농도는 40 µg/ml였다. 배지를 제거하고, 0.1% BSA를 함유하는 혈청 비함유 배지 중 희석된 프롤락틴을 최종 농도 30 ng/ml로 가하였다. 세포를 프롤락틴과 함께 30 분간 37°C에서 인큐베이션한 후, 빙냉 PBS로 2회 세척하였다. 세척제, 킬레이트 및 각종 프로테아제 및 포스파타제 억제제를 함유하는 표준 용해 완충액을 가하여 세포 용해물을 얻었다. 인산화 ERK1/2(pERK1/2)의 수준을 듀오셋(DUOSET®) IC 포스포로-ERK1/ERK2(R&D Systems, Inc.)의 지시에 따라 표준 ELISA로 측정하였다. 대표적 분석 결과를 도 2, 3 및 4에 나타내었으며, 선택된 항체에 대한 분석 결과는 상기 표 4에 나타나 있다.

[0440] 도 7A 내지 7C는 pERK 분석에서 80%를 넘는 억제율을 보인 항체의 VH 및 VL 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

[0441] **실시예 6: PRL-반응성 세포주의 증식에 미치는 항체 효과 측정**

[0442] 쥐과 동물 pro-B 세포주 BaF3를 전질이 인간 PRLR 및 네오마이신 내성 카세트를 함유하는 발현 벡터로 전기 천공하여 BaF3/PRLR를 얻었다. 세포를 G418(1 mg/ml) 및 rmIL-3(10 ng/ml)로 보충된 배지 중에서 7일간 선택하고, G418 또는 IL-3가 없이 rhPRL(1 µg/ml) 중에서 7일간 선택하였다. 14일에 걸쳐, 배지 PRL 농도를 유지 수준 50 ng/ml에 이를 때까지 단계적으로 감소시켰다. 실험하는 날에, 1×10^4 세포를 편평 바닥 96웰 플레이트의 각 웰로 시딩하였다. 항체(scFv-Fc 융합 포맷)를 웰에 10 µg/ml 농도로 50 ng/ml rhPRL의 존재 또는 부재하에 가하였다. 플레이트를 48 시간 동안 인큐베이션하고, 셀타이터(CellTiter) Glo 시약을 사용하여 분석하였다. 샘플을 삼중으로 실시하며, PRL 부재하에 항체에 의해 유도되는 세포 증식에 의해 아고니즘(효능작용)을 분석하고, PRL 존재하의 세포 증식에 의해 길항작용을 분석하였다. 이러한 증식 분석의 결과가 상기 표 4에 나타나 있다.

[0443] PRL-유도된 증식 및 항-PRLR 항체에 의한 증식 억제를 분석하기 위하여, T47D 또는 MCF7-NCI 세포를 통상의 성장 배지(페놀 레드 비함유 RPMI/10% FCS) ml 당 1×10^6 세포의 밀도로 T75 플라스크(12 ml 총 부피)로 분할하여 넣었다. 분배 72 시간 후, 세포를 트립신 처리하고 계수한 다음, 편평 바닥 96웰 플레이트(100 µl/웰)에 5K/웰(T47D) 또는 20K/웰(MCF7)의 밀도로 시딩하였다. MCF7 세포를 혈청 비함유 및 페놀 레드 비함유 RPMI에 시딩하고, T47D 세포를 혈청 비함유 RPMI 또는 10% 목탄 정제 혈청을 함유하는 RPMI에 시딩하였다. 시딩 24 시간 후

에, PRL 및 항-PRLR 항체를 웰에 가하였다(50 μ l, 3 X 농축). 72 시간 동안 인큐베이션한 후, ³[H] 티미딘(1 μ ci/웰)을 플레이트에 가하여 최소 6 시간 동안 37°C 인큐베이터 안에 두었다. 세포를 트립신 및 토타(Tomtec) 96웰 플레이트 세포 수확기를 사용하여 수확하였다. 필터를 트릴룩스(Trilux) 광측정기로 옮기고 분석하였다(1 분 계수). 도 5에 나와 있는 증식 연구 결과는 scFv가 증식에 있어서 프롤라틴 매개 증가를 억제하는 것을 보여 준다.

[0444] 실시예 7: 바이아코어를 통한 결합 친화도 및 경쟁의 측정

[0445] 실시예 2에 기재된 바와 같은 바이아코어(BIACORE) 분석을 반복하여, 선택된 항체의 PRLR의 ECD, S1 및 S2 도메인에 대한 상대적 결합을 측정하였으며, 단, S1, S2, 또는 ECD 단백질을 10 μ g/mL 농도로 2 분 동안 15 μ l/분으로 주사하였다. 이 분석으로부터의 데이터를 바이아코어(Biacore®) 콘트롤 소프트웨어에 의한 리포트 점수(공명 단위(RU))로서 모으고, 결합된 항원의 양을 캡처된 항체의 양으로 나누어 정규화하였다. 데이터는 하기 표 5에 나타나 있다.

[0446] [표 5] 항-PRLR 항체에 의한 정규화된 S1, S2 및 ECD 결합

샘플	결합된 PRLR 단편 (결합된 RU/ Ab 캡처 RU)		
	S1	S2	ECD
XPA.06.145	3.0%	-0.8%	4.8%
XPA.06.158	20.5%	0.1%	28.2%
XPA.06.167	23.7%	0.1%	35.0%
XPA.06.178	16.4%	0.0%	20.5%
XPA.06.217	19.4%	0.4%	25.8%
XHA.06.567	0.9%	16.7%	31.1%
XHA.06.983	-2.2%	-2.5%	27.4%
XHA.06.275	0.0%	13.4%	26.2%
XHA.06.189	16.9%	0.2%	31.6%

[0447]

[0448] 정제된 항체의 친화도를 바이아코어® 2000 상에 일련의 주사를 수행하여 측정하였다. 생성된 친화도 및 속도 상수는 이들 항체가 25°C, HBS-EP 완충액 중 프롤라틴 수용체(PRLR)의 제조항 세포의 도메인(ECD)에 결합하는 것과 관련이 있다. 약 5000 내지 1000 RU의 단백질 A/G를 갖는 CM5 센서 칩을 제조자(Biacore® Inc.)로부터의 권장 프로토콜에 따라 표준 EDC-NHS 아민 커플링 화학법에 의해 제조하고 항체를 캡처하는 데 사용하였다. 정제된 항체를 캡처를 위해 HBS-EP 완충액 중 약 1 μ g/mL로 희석하였다. 250 및 400 RU의 항체 캡처를 위한 주사 시간을 측정하였다. 동력학 분석을 위한 항체 캡처를 캡처 수준 최적화의 결과에 따라, 항체를 10 μ l/분으로 1.5 내지 3 분 동안 주사하여 수행하였다.

[0449] 동력학 분석을 위해, 유속을 40 μ l/분으로 설정하였다. 5 가지 농도의 PRLR ECD를 148 nM(4 μ g/mL) 또는 37 nM(1 μ g/mL)로부터 1:3 연속 희석으로 준비하였다. 각 농도 희석액과 완충액 대조군(제로 농도)를 2회씩 주사하였다. 데이터 세트를 이중-레퍼런싱하고(double-referenced), 1:1 랑뮈르(Langmuir) 결합 상호작용 모델을 사용하여 전체적으로 피팅하였다. 이와 같은 분석을 IgG1 및 IgG2 구조물에 대해, XPA.06.167의 IgG 리포매팅된 구조물에 수행하였다.

[0450] 선택된 항체의 PRLR의 ECD에 대한 결합의 동력학 상수 및 친화도가 하기 표 6에 나타나 있다.

[0451] [표 6] 친화도 분석 결과

항체	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)
XPA.06.131	3.4E+04	7.3E-05	2.1E-09
XPA.06.158	1.1E+05	7.3E-05	7.0E-10
XPA.06.141	6.3E+04	5.3E-04	8.4E-09
XPA.06.147	5.5E+05	5.3E-03	9.8E-09
XPA.06.167 IgG1	2.3E+05	6.0E-04	2.6E-09
XPA.06.167 IgG2	2.1E+05	5.7E-04	2.7E-09

[0452]

[0453] 유사한 방법으로 추가의 항체에 대해 동력학 상수 및 친화도를 측정하였다(하기 표 7에 요약).

[0454] [표 7]

	kon	koff	KD
XHA.06.642	9.2E+05	8.6E-04	934 pM
XHA.06.275	1.0E+06	3.4E-04	337 pM
XHA.06.983	7.3E+05	3.2E-04	43 pM
	kon	koff	KD
chXHA.06.642	6.5E+04	5.2E-04	801 pM
chXHA.06.275	1.1E+06	2.2E-04	196 pM
chXHA.06.983	2.4E+05	1.0E-05	42 pM

[0455]

[0456]

PRLR에의 결합에 대한 한 쌍의 항체 사이의 상대적 경쟁 또는 간섭(예를 들어, 항체쌍 분석)을 다음과 같이 연속 경쟁 분석 전략으로 측정하였다. 이 접근법에서, 하나의 항체를 센서 칩 상으로 직접 또는 캡처제를 통해 고정화시키고, ECD가 고정화 항체 상으로 주사될 때 ECD에 결합하도록 둔다. 필요에 따라, 고농도의 무관한 IgG를 주사하여 과량의 캡처제가 차단되도록 한다(예를 들어, 토끼-항-마우스 IgG 캡처 표면을 사용하여 두 개의 쥐과 동물 항체를 시험할 때). 이어서, 경쟁 시험될 항체를 주사하고, 제1 항체에 의해 캡처된 ECD에 결합하는 능력을 측정한다. 두 항체가 ECD 상의 공간적으로 분리된 에피토프에 결합하는 경우, 제2의 항체는 ECD/제1 항체 결합체 상에도 결합할 수 있을 것이다. 두 항체가 간섭하거나 경쟁하는 경우, 제2의 항체는 ECD/제1 항체 결합체에 잘 결합하지 못하거나 전혀 결합할 수 없을 것이다. 이 경쟁 분석의 결과는 상기 표 4에 나타나 있다(두 항체가 같은 에피토프 빈(bin) 수를 갖는 경우, 그들은 ECD 결합에 대하여 서로 경쟁할 것이며, 다른 빈으로부터의 항체에 대해 같은 패턴의 경쟁을 나타낼 것이다). 본 발명은 특히 본 명세서에 기재된 항체와 같은 PRLR 상 에피토프에 결합하거나 그러한 항체와 PRLR ECD 결합에 대해서 경쟁하는 다른 항체를 찾아내는 것에 관한 것이다.

[0457]

실시예 8: 웨스턴 블롯에 의한 PRL-유도된 PRLR, STAT5 및 AKT 인산화에 대한 효과

[0458]

선택된 항체가 PRL-유도된 STAT5 및 AKT 인산화를 억제하는 능력을 다음과 같이 측정하였다. 세포를 6웰 플레이트 중, 3×10^5 세포/ml의 밀도로 페놀 레드 비함유 RPMI/10% FBS 중에 밤새 시딩하였다. 다음 날, 배지를 혈청 비함유 RPMI로 30 분 동안 교체하였다. 일부 실험에서, 항-PRLR 또는 비특이적 대조군 항체를 이 혈청-결핍 기간 동안 세포와 함께 인큐베이션하였다. 50 ng/ml PRL을 웰에 30 분 동안 가한 후, 세포를 PBS 중에서 한 번 세척한 다음, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM Na_3VO_4 , 50 mM NaF, 0.25% 테옥시콜레이트 및 프로테아제 억제제로 구성된 완충액 중에서 용해시켰다. 튜브를 냉장 마이크로튜브 중 14,000 rpm에서 회전 분해하고, 용해물을 BCA 시약을 사용하여 정량하였다. 30 μ g의 전세포 용해물을 10% SDS-PAGE로 분리하고, 단백질을 STAT5A/B(Y694/Y699, Upstate) 또는 PRLR(Y546/Y611, 실험실내) 및 AKT에 대한 포스포 특이적 항체를 사용하여 검출하였다. 총 STAT5(BD) 또는 PRLR(Zymed) 또는 AKT(Cell Signalling)에 특이적인 항체로 염색하여 같은 단백질 로딩을 측정하였다. PRLR 특이적 항체가 PRLR 세포내 인산화에 미치는 효과의 대표적 분석의 결과가 표 6에 나타나 있다.

[0459]

실시예 9: 쥐과 동물 항체의 인간화

[0460]

이 실시예는 쥐과 동물 항-PRLR 항체를 인간화하는 방법을 설명한다.

[0461]

인간화 PRLR 항체 경쇄 및 중쇄 유전자의 설계

[0462]

쥐과 동물 항체 XHA.06.983, XHA.06.275, 및 XHA.06.642를 위한 VL 및 VH 아미노산 서열이 도 10에 개시되어 있다. NBFPIR(National Biomedical Foundation Protein Identification Resource) 또는 유사한 데이터베이스를 사용하여 찾아낸 인간 항체의 서열을 사용하여 인간화 항체의 골격구조를 제공하였다. 인간화 중쇄의 서열을 선택하기 위해, 쥐과 동물 중쇄 서열을 인간 항체 중쇄의 서열과 정렬시켰다. 쥐과 동물 아미노산 서열을 선택하는 하기 네 가지 카테고리 중 하나에 해당되지 않는 한, 각 위치에서 인간화 서열을 위한 인간 항체 아미노산을 선택하였다:

[0463]

(1) 위치가 상보성 결정 영역(CDR) 내인 경우(Kabat, J. Immunol., 125, 961-969 (1980));

- [0464] (2) 인간 항체 아미노산이 그 위치에서의 인간 중쇄에 회귀한 것인 반면, 쥐과 동물 아미노산은 그 위치에서의 인간 중쇄에 통상적인 것인 경우;
- [0465] (3) 위치가 쥐과 동물 중쇄 아미노산 서열 내 CDR에 바로 인접한 경우; 또는
- [0466] (4) 쥐과 동물 항체의 3차원 모델링이 항원 결합 영역과 물리적으로 유사한 경우.
- [0467] 인간화 경쇄의 서열을 선택하기 위하여, 쥐과 동물 경쇄 서열을 인간 항체 경쇄 서열과 정렬시킨다. 상기한 바와 같고 하기 반복되는 카테고리 중 하나에 해당되지 않는 한, 각 위치에서 인간화 서열을 위한 인간 항체 아미노산을 선택하였다:
- [0468] (1) CDR 서열인 경우;
- [0469] (2) 쥐과 동물 아미노산 서열이 인간 항체보다 전형적인 것인 경우;
- [0470] (3) CDR에 인접한 경우; 또는
- [0471] (4) 결합 영역에의 3차원 근접성.
- [0472] 중쇄 및 경쇄 유전자의 실제 뉴클레오티드 서열은 다음과 같이 선택된다:
- [0473] (1) 상기한 바와 같이 선택된 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- [0474] (2) 이들 코딩 서열의 5'의, 리더(시그널) 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열. 리더 서열은 항체에 전형적인 것으로 선택된다;
- [0475] (3) 코딩 서열의 3'의, 마우스 경쇄 J5 세그먼트 및 마우스 중쇄 J2 세그먼트를 뒤따르는 뉴클레오티드 서열로서, 이들은 쥐과 동물 서열의 일부를 이룬다. 이들 서열은 이들이 스플라이스 도너 시그널을 함유하기 때문에 포함된다.
- [0476] (4) 서열의 각 말단에 Xba I 부위가 존재하여, Xba I 부위에서 잘라 벡터의 Xba I 부위 내로 클로닝된다.
- [0477] 인간화 경쇄 및 중쇄 유전자의 제작
- [0478] 중쇄를 합성하기 위하여, 4개의 올리고뉴클레오티드를 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems) 380B DNA 합성기를 사용하여 합성하였다. 올리고뉴클레오티드 중 두 개는 중쇄의 각 스트랜드의 일부이고, 각 올리고뉴클레오티드는 다음의 것과 약 20 뉴클레오티드 만큼 겹쳐져 있어 어닐링을 가능하게 한다. 올리고뉴클레오티드는 함께 전체 인간화 중쇄 가변 영역을 커버하며, 양 말단의 수 개의 추가의 뉴클레오티드에 의해 Xba I 부위에서 절단하는 것이 가능하다. 올리고뉴클레오티드는 폴리아크릴아미드 겔로부터 정제된다.
- [0479] 각 올리고뉴클레오티드를 ATP 및 T4 폴리뉴클레오티드 키나제를 사용하여 표준 방법으로 인산화한다(Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). 인산화 올리고뉴클레오티드를 어닐링하기 위하여, 함께 40 μ l의 TA(33 mM Tris 아세테이트, pH 7.9, 66 mM 칼륨 아세테이트, 10 mM 마그네슘 아세테이트) 중에 각각 약 3.75 μ M 농도로 현탁시키고, 95°C로 4 분간 가열한 다음, 4°C로 서서히 냉각시켰다. 각 올리고뉴클레오티드의 반대쪽 가닥을 합성함으로써 올리고뉴클레오티드로부터 완전한 유전자를 합성하기 위하여 다음 성분들을 최종 부피 100 μ l로 가한다:
- [0480] 10 μ l 어닐링된 올리고뉴클레오티드
- [0481] 0.16 mM 각 데옥시리보뉴클레오티드
- [0482] 0.5 mM ATP
- [0483] 0.5 mM DTT 100
- [0484] 100 μ g/ml BSA
- [0485] 3.5 μ g/ml T4 g43 단백질(DNA 폴리머라제)
- [0486] 25 μ g/ml T4 g44/62 단백질(폴리머라제 보조 단백질)
- [0487] 25 μ g/ml 45 단백질(폴리머라제 보조 단백질)
- [0488] 혼합물을 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 10 u의 T4 DNA 리가제를 가하고, 37°C에서 다시 30분간 인큐베이션하였다. 폴리머라제 및 리가제를 반응물을 70°C에서 15 분간 인큐베이션하여 불활성화시켰다. 유

전자를 Xba I로 소화하기 위하여, BSA(200 $\mu\text{g/ml}$) 및 DTT(1 mM)를 함유하는 50 μl 의 2 X TA, 43 μl 의 물, 및 50 u의 Xba I(5 μl)를 반응에 가하였다. 반응을 3 시간 동안 37°C에서 인큐베이션한 다음, 겔 상에서 정제하였다. Xba I 단편을 겔로부터 정제하고, 플라스미드 pUC19 내의 Xba I 부위로 표준 방법으로 클로닝하였다. 플라스미드를 표준 방법으로 정제하고, 디데옥시 방법으로 시퀀싱하였다.

- [0489] 인간화 경쇄 및 중쇄를 발현시키는 플라스미드를 제조하는 것은 경쇄 및 중쇄 Xba I 단편을 그것이 삽입되어 있는 pUC19 플라스미드로부터 단리한 다음, 그것을 다시 적절한 숙주 세포 내로 트랜스펙션될 때 완전한 중쇄를 높은 수준으로 발현하는 적절한 발현 벡터의 Xba I 부위 내로 삽입하여 달성할 수 있다.
- [0490] 인간화 항체의 합성 및 친화도
- [0491] 발현 벡터를 마우스 Sp2/0 세포 내로 트랜스펙션시키고, 플라스미드를 통합하는 세포를 발현 벡터에 의해 주어진 선택 마커에 기초하여 표준 방법으로 선택하였다. 이들 세포가 PRLR에 결합하는 항체를 분비한다는 것을 입증하기 위하여, 세포로부터의 상등액을 PRLR을 발현하는 것으로 알려진 세포와 함께 인큐베이션하였다. 세척 후, 세포를 플루오레세인 접합 염소 항-인간 항체와 함께 인큐베이션하고, 세척한 다음, FACSCAN 세포형광 측정기 상에서 형광 분석하였다.
- [0492] 인간화 항체를 생산하는 세포를 시험관 내 배양하였다. 인간화 항체를 표준 방법에 따라 세포 상등액을 프로테인 A의 친화도 칼럼(Pro-Chem Inc., Littleton, MA 또는 등가물)을 통과시켜 실질적으로 균질하게 정제하였다. 본래의 쥐과 동물 항체에 비교한 인간화 항체의 친화도를 당업계에서 알려진 기술에 따라 측정하였다.
- [0493] **실시예 10: 쥐과 동물 항체의 인간 가공™**
- [0494] 이 실시예는 인간 가공™ 항체의 클로닝 및 발현 뿐만 아니라 그러한 항체의 정제 및 결합 활성 시험에 대해 기재하고 있다.
- [0495] 인간 가공™ 서열의 설계
- [0496] 항체 가변 도메인의 인간 가공™은 스테드니카(Studnicka)에 의해 항체 분자의 결합 활성을 유지하면서 면역원성을 감소시키는 방법으로서 기재되어 있다[예를 들어, Studnicka et al. 미국 특허 제5,766,886호; Studnicka et al. Protein Engineering 7: 805-814 (1994)]. 그 방법에 따르면, 각 가변 영역 아미노산에 대해 치환 위험이 매겨진다. 아미노산 치환은 다음의 세 개 위험 카테고리 중의 하나로 구별된다: (1) 저위험 변경은 항원 결합을 파괴할 가능성은 최소이면서 면역원성을 감소시킬 확률이 아주 큰 변경이고; (2) 중간 위험 변경은 면역원성은 더 감소시킬 수 있지만, 항원 결합 또는 단백질 폴딩에 영향을 줄 확률이 보다 큰 변경이고; (3) 고위험 잔기는 결합 또는 항체 구조의 유지에 중요하고, 항원 결합 또는 단백질 폴딩에 영향을 줄 가장 큰 위험을 수반하는 잔기이다. 프롤린의 3차원적 구조에 있어서의 역할 때문에, 프롤린 위치에서의 변화는 그 위치가 전형적으로 저위험 위치인 경우일지라도, 일반적으로 적어도 중간 위험 변화인 것으로 간주된다. 도 10은 쥐과 동물 항체 XHA.06.983, XHA.06.275, 및 XHA.06.642의 경쇄 및 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 보여준다.
- [0497] 쥐과 동물 항체의 경쇄 및 중쇄를 이 방법으로 인간 가공™하였다. 이 방법에 따라 저위험 변화인 후보 아미노산 잔기를 쥐과 동물 가변 영역의 아미노산 서열을 인간 가변 영역 서열과 정렬시켜 찾아냈다. 어떠한 인간 가변 영역이나 사용할 수 있으며, 여기에는 개개의 VH 또는 VL 서열 또는 인간 보존 VH 또는 VL 서열이 포함된다. 저위험 위치의 임의의 일부에서 또는 모든 저위험 위치에서 변화가 있을 수 있다.
- [0498] 마찬가지로, 이 방법에 따라 모든 저위험 및 중간 위험 위치에서 변화 후보인 아미노산 잔기를 쥐과 동물 가변 영역의 아미노산 서열을 인간 가변 영역 서열과 정렬시켜 찾아냈다. 저위험 또는 중간 위험 위치의 임의의 일부에서 또는 모든 저위험 및 중간 위험 위치에서 변화가 있을 수 있다.
- [0499] 인간 가공™ 항체 서열의 제조
- [0500] 인간 가공™ 중쇄 및 경쇄 V 영역 서열을 시그널(예를 들어, 항체-유도된 시그널 서열) 서열과 함께 코딩하는 DNA 단편을 합성 뉴클레오티드 합성으로 제작하였다. 본 명세서에 기재된 각 경쇄 V 영역 아미노산 서열을 코딩하는 DNA를 인간 카파 또는 람다 경쇄 불변 영역을 함유하는 벡터 내로 삽입하였다. 본 명세서에 기재된 각 중쇄 V 영역 아미노산 서열을 코딩하는 DNA를 인간 감마-1, 2, 3 또는 4 중쇄 불변 영역을 함유하는 벡터 내로 삽입하였다. 이들 벡터는 모두 임시적 발현용인지 또는 안정한 세포주 개발용인지에 따라, 프로모터(예를 들어, hCMV 프로모터) 및 3' 비번역 영역(예를 들어, 마우스 카파 경쇄 3' 비번역 영역)을 추가의 조절 서열과 함께 함유한다(US 2006/0121604).

- [0501] 가변 영역 서열을 함유하는 상기한 바와 같은 벡터를 사용하여 인간 가공™ 항체를 발현시키기 위하여, 저위험 경쇄, 저위험+중간 위험 경쇄, 저위험 중쇄 및 저위험+중간 위험 중쇄로부터 적어도 4가지 변이체가 생성될 수 있다. 중간 위험 변화가 경쇄 또는 중쇄 중 어느 하나 또는 둘다에 포함되지 않은 경우, 더 적은 수의 변이체가 생성된다.
- [0502] 임시 발현을 위한 발현 벡터의 제조
- [0503] 상기한 바와 같은 경쇄 또는 중쇄 유전자를 함유하는 벡터를 임시 트랜스펙션을 위해 제조하였다. 상기한 바와 같은 인간 가공™ 항체 서열, 프로모터 및 경쇄 3' 비번역 영역 외에, 이들 벡터는 바람직하게는 엡슈타인-바 (Epstein-Barr) 바이러스 핵 항원을 발현하는 HEK293 세포 중에서의 복제를 위해 엡슈타인-바 바이러스 oriP를 함유한다.
- [0504] HEK293E 세포 중 인간 가공™ PRLR 항체의 임시 발현
- [0505] 각각 엡슈타인-바 바이러스로부터의 oriV 및 상기한 바와 같은 경쇄 및 중쇄 유전자를 함유하는 분리된 벡터를 US 2006/0121604에 기재되어 있는 바와 같이 HEK293E 세포 내로 임시로 트랜스펙션시켰다. 임시로 트랜스펙션된 세포를 최대 10일간 인큐베이션한 후, 상등액을 회수하고, 항체를 단백질 A 크로마토그래피로 정제하였다.
- [0506] 영구적 세포주 개발을 위한 발현 벡터의 제조
- [0507] 상기한 바와 같은 인간 가공™ 항체 서열, 프로모터 및 경쇄 3' 비번역 영역 외에, 영구적 세포주 개발을 위한 벡터는 마커 유전자, 예를 들어, 각각 G418- 또는 히스티딘-내성 트랜스펙턴트의 선택을 위한 neo 또는 his를 함유한다. 한 카피의 중쇄 및 한 카피의 경쇄를 함유하는 최종 벡터가 제작되었다.
- [0508] 영구적으로 트랜스펙션된 CHO-K1 세포의 개발
- [0509] 각각 한 카피의 경쇄 및 중쇄 유전자를 함께 함유하는 상기한 바와 같은 벡터를 엑스-셀(Ex-Cell) 302-적응된 CHO-K1 세포 내로 트랜스펙션시켰다. 엑스-셀 302 배지 중에서 현탁 성장에 적응된 CHO-K1 세포는 전형적으로는 선형 폴리에틸렌이민(PEI)를 사용하여 선형화 벡터로 트랜스펙션된다. 세포를 1% FBS 및 G418으로 보충된 엑스-셀 302 배지를 함유하는 96웰 플레이트에 깔았다. 클론을 96웰 플레이트에서 스크리닝하고, 각 트랜스펙션으로부터의 최상위 약 10%의 클론을 G418로 보충된 엑스-셀 302 배지를 함유하는 깊은 웰 96웰 플레이트로 옮겼다.
- [0510] 14일 동안 성장시킨 배양물에 대하여 깊은 웰 96웰 플레이트 내 엑스-셀 302 배지에서 생산성 시험을 수행하였으며, 배양 상등액을 IgG에 대한 면역글로불린 ELISA 분석으로 분비된 항체 수준에 대해 시험하였다.
- [0511] 최상위 클론을 엑스-셀 302 배지를 함유하는 셰이크 플라스크로 옮겼다. 엑스-셀 302 배지 중 이 클론으로 셰이크 플라스크 시험을 수행하였다. 세포를 14 일 동안 25 ml 배지를 함유하는 125 ml 에를렌메이어 플라스크 중에서 성장시켰다. 배양 배지 중 면역글로불린 폴리펩티드의 수준을 인큐베이션 중기에 IgG ELISA 또는 HPLC로 측정하였다. 같은 세포주를 2 또는 3의 다단위 전사 벡터로 다수 회 순차적 트랜스펙션한 결과 면역글로불린 생산 수준이, 바람직하게는 300 µg/ml 이상까지 증가한 클론 및 세포주를 얻었다.
- [0512] 정제
- [0513] 본 발명에 따른 모든 세포주로부터 면역글로불린 폴리펩티드를 정제해내는 방법이 설계될 수 있다(예를 들어, US 2006/0121604). 예를 들어, 당업계에서 알려진 방법에 따라서, 배양 종결 후 세포를 여과에 의해 제거한다. 여액을 단백질 A 칼럼(필요에 따라 다수회 통과)에 건다. 칼럼을 세척한 다음, 발현되고 분비된 면역글로불린 폴리펩티드를 칼럼으로부터 용출시킨다. 항체 생성물 제조를 위하여, 바이러스 불활성화 단계로서 단백질 A 풀을 낮은 pH(최소 30 분 및 최대 1 시간 동안 pH 3)로 유지시킨다. 다음으로 흡착 양이온 교환 단계를 사용하여 생성물을 더욱 정제한다. 흡착 분리 칼럼으로부터의 용출물을 바이러스 유지 필터를 통과시켜 존재할 수 있는 바이러스 입자를 더욱 제거한다. 여액을 생성물이 결합하지 않는 음이온 교환 칼럼을 통해 통과시켜 더욱 정제한다. 최종적으로, 생성물을 투석여과를 통해 제제화 완충액 내로 이동시켜 정제를 마무리 짓는다. 보유액을 단백질 농도 1 mg/mL 이상으로 조정하고, 안정화제를 가한다.
- [0514] 결합 활성
- [0515] 제조한 인간 가공™ 항체의 PRLR 결합 활성을 평가하였다. 단백질을 단백질 A 칼럼을 통과시켜 셰이크 플라스크 상등액으로부터 정제하고, A280에 의해 농도를 측정하였다. 다른 실시예에서와 같이 결합 분석을 수행하였다.

[0516] 실시예 11: 인간 가공 항체

[0517] 상기한 쥐과 동물 항체 중 3개는 일반적으로 실시예 10에 기재된 바와 같이 인간 가공TM되었다.

[0518] 프롤락틴 수용체 항체 XHA.06.642 및 XHA.06.275의 인간 가공TM

[0519] XHA.06.642에 있어서, 중쇄를 11개 저위험 또는 13개 저위험+중간 위험 위치에서 인간 가공TM하였고, 경쇄를 단지 저위험 위치에서만(14개 변화) 인간 가공TM하였는데, 모든 중간 위험 위치가 이미 인간 아미노산이었기 때문이다. XHA.06.275에 있어서, 중쇄를 7개 저위험 또는 11개 저위험+중간 위험 위치에서 인간 가공TM하였고, 경쇄를 8개 저위험 또는 10개 저위험+중간 위험 위치에서 인간 가공TM하였다.

[0520] XHA.06.642, XHA.06.275 및 XHA.06.983로부터 유도된 인간 가공TM 가변 영역의 아미노산 서열을 하기 나타내었다(CDR은 밑줄). 이들 가변 영역을 여러 조합으로 통합하여(예를 들어, 서열 번호 88 및 서열 번호 89; 서열 번호 88 및 서열 번호 90; 서열 번호 91 및 서열 번호 93; 서열 번호 91 및 서열 번호 94; 서열 번호 92 및 서열 번호 93; 또는 서열 번호 92 및 서열 번호 94) 인간 가공TM 항체 he.06.642-1, he.06.642-2, he.06.275-1, he.06.275-2, he.06.275-3, he.06.275-4를 생성하였다.

[0521] he.06.642 LC 가변 영역 저위험(서열 번호 88):

[0522] DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASKSVSTSGYTYMHVYQQKPGQPPLLIYLASN

[0523] RESGVPDRFSGSGSGTDFLTITISPVQAEDVATYYCQHSSELPPSFGQGTKLEIK

[0524] he.06.642 HC 가변 영역 저위험(서열 번호 89):

[0525] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSSYGMSWVRQAPGKRLEWVATVSSGGT

[0526] YTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARHRGNYYATYYYAM

[0527] DYWGQGTLLTVSS

[0528] he.06.642 HC 가변 영역 저위험+중간 위험(서열 번호 90):

[0529] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSSYGMSWVRQAPGKLEWVATVSSGGT

[0530] YTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRGNYYATYYYAM

[0531] DYWGQGTLLTVSS

[0532] he.06.275 LC 가변 영역 저위험(서열 번호 91):

[0533] DVQITQSPSSLSASPGDRITLTCRASKNIYKYLAWYQEKPGKTNLLIYSGSTLHSGIP

[0534] SRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDFAMYYCQQHNDYPYTFGQGTKLEIK

[0535] he.06.275 LC 가변 영역 저위험+중간 위험(서열 번호 92):

[0536] DVQITQSPSSLSASPGDRITLTCRASKNIYKYLAWYQEKPGKANKLLIYSGSTLHSGIP

[0537] SRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDFAMYYCQQHNDYPYTFGQGTKLEIK

[0538] he.06.275 HC 가변 영역 저위험(서열 번호 93):

[0539] DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSDYAWNWIROFPGKLEWWMGYISYSGS

[0540] TSYNPSLKSRTITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTAVYFCARDYGVVFDYWGQGTTLT

[0541] VSS

[0542] he.06.275 HC 가변 영역 저위험+중간 위험(서열 번호 94):

[0543] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNWIROFPGKLEWWMGYISYSGS

[0544] TSYNPSLKSRTITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTAVYFCARDYGVVFDYWGQGTTLT

[0545] VSS

[0546] he.06.983 LC 가변 영역 저위험(서열 번호 95):

- [0547] DIVMTQSPDLSAVSAGERVTINCKASQGVSNDAVWFQKPGQSPKLLIYSASTRYTG
- [0548] VPDRLSGSGSGTDFTFITISSVQAEDVAVYFCQQDYTSPTFGQGTKLEIK
- [0549] he.06.983 LC 가변 영역 저위험+중간 위험(서열 번호 96):
- [0550] DIVMTQSPDLSAVSLGERVTINCKASQGVSNDAVWFQKPGQSPKLLIYSASTRRESG
- [0551] VPDRLSGSGSGTDFTFITISSVQAEDVAVYFCQQDYTSPTFGQGTKLEIK
- [0552] he.06.983 HC 가변 영역 저위험(서열 번호 97):
- [0553] DVQLVESGGGLVQPGGSRRLSCAASGFASFSGMQWVRQAPGKGLEWVAYISSGSS
- [0554] TIYYADTVKGRFTISRDNPKNTLYLQMNLSRAEDTAMYYCVRSGRDYWGQGLVT
- [0555] VSS
- [0556] he.06.983 HC 가변 영역 저위험+중간 위험(서열 번호 98):
- [0557] EVQLVESGGGLVQPGGSRRLSCAASGFASFSGMQWVRQAPGKGLEWVAYISSGSS
- [0558] TIYYADSVKGRFTISRDNPKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCVRSGRDYWGQGLVTV
- [0559] SS
- [0560] **실시예 12: he.06.642 및 he.06.275 항체의 발현 및 정제**
- [0561] 인간 가공™ he.06.642 및 he.06.275 경쇄 및 중쇄 V 영역을 각각 인간 카파 및 감마-1 또는 감마-2 불변 영역에 융합시켰다. 중쇄 및 경쇄 유전자를 강한 프로모터 및 효율적 3' 비번역 영역에 융합시킨 다음, 엡슈타인-바 바이러스 복제 기점을 함유하는 임시 발현 벡터 내로 클로닝하였다.
- [0562] 항체 중쇄 및 경쇄 서열을 실시예 10에 일반적으로 기재된 바와 같은 각종 저위험 또는 저위험+중간 위험 조합으로 코딩하는 개별 플라스미드를 사용하여 항체를 HEK293 세포에서 임시 발현하였다. 중쇄 : 경쇄 DNA의 비율은 1:2였다. 세포의 트랜스펙션은 PEI(DNA:PEI = 1:2) 및 DNA 농도 1 µg/mL으로 수행되었다. 세포 밀도는 8e5 세포/mL였다. DNA를 표준 쿼이젠(Qiagen) 키트를 사용하여 제조하였다. 발현 배양물을 2 L 플라스크 중 IS293 배지(Irvine Scientific) + 1% 저 Ig FBS(Hyclone)에서 400 mL 배지/플라스크로 성장시켰다. 배양 조건은 37°C, 5% CO₂, 및 교반 속도 90 내지 95 RPM이었다. 배양 5 내지 7 일 후에, 배양 배지를 수확하고, 정제하여 청정하게 하였다.
- [0563] 상기한 바와 같은 항체의 키메라 및 인간 가공™ 버전을 임시 발현 배양 상등액을 직접 제조합 단백질 A 패스트 플로우 칼럼(GE Healthcare)을 통과시켜 단계로 정제하였다. 주된 피크의 용출은 0.1 mM 글리신, pH 3.5에 의하였다. 합한 물질을 PBS 내로 투석하고, 원심분리 농축기 중에서 공칭 분자량 컷-오프 30 kD으로 농축하였다. 최종 순도는 >95% 였으며, 전체 수율은 약 60%였다. 최종 풀을 엔도세이프(Endosafe) PTS LAL 유닛(Charles River) 또는 QCL-1000 크로모제닉 LAL 엔드포인트 에세이(Chromogenic LAL Endpoint Assay; Lonza)를 사용하여 내독소에 대해 분석하였으며, 결과는 모든 항체에 대해 <0.05 EU/mg(검출 한계 미만)이었다. 키메라 항체 he.06.642-2의 응집 상태를 측정하여 슈퍼텍스 200 10/300 GL 칼럼(GE Healthcare) 상에서 SEC로 측정하여 단량체임을 확인하였다.
- [0564] chXHA.06.642를 단일 크로마토그래피 단계로 순도 >95%로 정제하고, 완충액 교환을 위해 투석하였다. chXHA.06.642는 PBS에 3 mg/mL로 용해되었으며, 크기 배제 크로마토그래피에 의할 때 주된 불순물이나 응집이 검출되지 않았다.
- [0565] 유세포 분석에 의한 인간 가공 항-인간 PRLR 항체의 시험
- [0566] CHO-K1 페런트 및 인간 프롤락틴 수용체(PRLR) 발현 세포를 수확하여 원심분리하고, 2% FBS 및 0.1% 나트륨 아지드(FACS 완충액)를 함유하는 1 X PBS에 대략 5 x 10⁶ 세포/ml로 현탁시켰다. 인간 가공 항-인간 PRLR 및 항-KLH 이소타입 대조군 항체를 FACS 완충액 중에 2X 최종 농도로 희석하고, 적절한 샘플 웰(50 ml/웰)에 가하였다. 제2의 항체 및 자기형광 대조군의 경우, 50 ml FACS 완충액을 적절한 웰에 가하였다. 50 ml의 세포 현탁액을 각 샘플 웰에 가하였다. 샘플을 4°C에서 1 시간 동안 가열하고, 차가운 FACS 완충액으로 2회 세척한 다음, PE-결합된 염소 항-인간 IgG(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)를 함유하는 FACS 완충액 중에

1:100 희석으로 재현탁시켰다. 4℃에서 30 분간 인큐베이션한 후, 세포를 차가운 FACS 완충액으로 2회 세척한 후, 1 mg/ml 프로피듐 요오다이드(Invitrogen, San Diego, CA)를 함유하는 FACS 완충액에 재현탁시키고, 유세포 분석법으로 분석하였다. 표 7에 나타나 있는 바와 같이, 항-PRLR 항체는 PRLR 발현 세포에는 결합하나 페런트 세포에는 결합하지 않았다.

[0567] [표 8]

PRLR 세포주, 클론 1G5		CHO-K1 페런트 세포주	
샘플	MFI:	샘플	MFI:
자기형광 대조, 1G5	2.51	자기형광 대조, 1G5	2.66
GAH-PE, 1G5	2.6	GAH-PE, PAR	2.54
GAM-PE, 1G5	2.61	GAM-PE, PAR	2.58
MAB1167, 1G5	33.8	MAB1167, PAR	2.58
KLH8.G2, 1G5	2.75	KLH8.G2, PAR	2.66
he.06.642 3 G2, 1G5	38.5	he.06.642-3 G2, PAR	2.58
KLH8.G1, 1G5	2.69	KLH8.G1, PAR	2.59
he.06.642 3 G1 (1), 1G5	39.1	he.06.642 3 G1 (1), PAR	2.57
he.06.642 3 G1 (2), 1G5	43	he.06.642 3 G1 (2), PAR	2.55
chXHA.06.642(1), 1G5	37.3	chXHA.06.642 (1), PAR	2.56
chXHA.06.642 (2), 1G5	37.3	chXHA.06.642 (2), PAR	2.55

[0568]

[0569] **실시예 13: 인간 가공™ 항체의 친화도**

[0570] 키메라 및 인간 가공™ 항체의 친화도를 바이아코어(Biacore) 분석으로 측정하였다. 간단히 설명하면, NHS/EDC를 통해 단백질 A/G(Pierce)가 고정화된 CM5 센서 칩(Biacore)을 사용하여 칩 표면 상에 대략 600 RU의 항체를 캡처하였다. 5 µg/mL(185 nM)로부터 시작하여 연속적으로 5배 희석하여 0.3 nM에 이르는 5 가지 농도의 PRLR ECD를 가장 낮은 농도에서 가장 높은 농도로 동력학 적정 주사 모드로 주사하고, 15 분의 해리 데이터를 수집하였다. 실험은 이중-레퍼런싱되었으며, 즉, 인접한 유세포 반응을 자동적으로 삭감하였으며, 완충액 주사 실험으로부터의 반응을 실험 데이터 세트로부터 제하였다. 동력학 및 유도 파라미터(ka, kd 및 K_D)를 동력학 적정 주사 모드에 따라 설정된 바이아이벨(BiaEval) 소프트웨어를 사용하여 1 : 1 랑뮈르(Langmuir) 모델에 피팅하여 측정하였다. 인간 및 싸이노몰구스 PRLR ECD에 대한 키메라 및 모든 인간 가공™ 항체의 친화도 측정을 표 9 및 10에 요약하였다.

[0571] [표 9]

샘플	KD	kd	ka	Chi2
chXHA.06.275 인간	3.9E-10	2.7E-04	7.0E+05	0.574
he.06.275-1 인간	5.0E-10	3.1E-04	6.2E+05	0.594
he.06.275-2 인간	6.1E-10	3.7E-04	6.0E+05	0.532
he.06.275-3 인간	4.3E-10	2.7E-04	6.4E+05	0.555
he.06.275-4 인간	5.2E-10	3.2E-04	6.2E+05	0.69
chXHA.06.275 싸이노	1.2E-09	5.0E-04	4.3E+05	1.48
he.06.275-1 싸이노	1.6E-09	5.7E-04	3.6E+05	2.78
he.06.275-2 싸이노	1.9E-09	6.9E-04	3.7E+05	1.49
he.06.275-3 싸이노	1.3E-09	5.0E-04	3.9E+05	1.19
he.06.275-4 싸이노	1.7E-09	6.0E-04	3.6E+05	1.2

샘플	KD	kd	ka	Chi2
chXHA.06.642 인간	1.3E-09	4.6E-04	3.5E+05	5.15
he.06.642-1 인간	2.0E-09	3.5E-04	1.7E+05	12.9
he.06.642-2 인간	3.1E-09	5.3E-04	1.7E+05	12.6
chXHA.06.642 싸이노	26E-08	4.3E-03	1.7E+05	12.6
he.06.642-1 싸이노	3.1E-08	3.8E-03	1.2E+05	8.29
he.06.642-2 싸이노	4.7E-08	8.3E-03	1.8E+05	11.1

[0572]

[0573] [표 10]

샘플	ka	kd	KD	Res SD
he.06.642 3 -G1 lot1	1.038(1)e5	3.828(5)e-4	3.688(5)nM	0.977
he.06.642 3 -G1 lot2	1.02E+5	3.88E-4	3.79977nM	1.06
he.06.642 3 -G2	9.801(1)e4	4.210(7)e-4	4.296(6)nM	1.054
chXHA.06.642	1.962(3)e5	6.47E-04	3.296(5)nM	1.389
CHO.KLHG2-60	결합 없음	결합 없음	결합 없음	결합 없음

[0574]

[0575]

공유 결합 고정화된 항체를 사용하여 래트 및 마우스 교차 반응성을 비교하기 위하여, CM4 칩을 he.06.642-2 및 he.06.275-4 항체와 제조자(Biacore® Inc.)의 권장 프로토콜에 따라 표준 EDC-NHS 아민 커플링 화학을 통해 커플링시켰다. PRLR ECD 주사를 111 nM에서 시작하여 1.37 nM에 이르는 3배 적정 계열의 5가지 농도에서 수행하였다. 글리신(pH3.0)으로 재생하였다. XHA.06.642 및 XHA.06.275의 HE 변이체 모두의 친화도는 패턴트 키메라 항체의 친화도와 매우 비슷하였다. 항체 he.06.642-2는 인간, 마우스 및 래트 PRLR에 동등한 친화도로 결합한다. 싸이노물구스 PRLR에는 인간 PRLR보다 15배 약한 친화도로 결합한다. 항체 he.06.275-4는 싸이노물구스 PRLR에 인간 PRLR보다 5배 약한 친화도로 결합한다. 항체 he.06.275-4는 마우스 또는 래트 PRLR에는 효과적으로 결합하지 않는다. 데이터의 요약을 표 11에 나타내었다.

[0576]

[표 11] 공유결합 고정화된 항체상에서 선택된 HE 변이체의 중 교차 친화도 분석

he.06.642-2 결과

샘플	kon	koff	KD (nM)
he.06.642-2 인간	3.5E+05	9.1E-04	2.6
he.06.642-2 싸이노	1.5E+05	6.0E-03	38.9
he.06.642-2 마우스	1.1E+05	3.1E-04	2.7
he.06.642-2 래트	7.6E+04	1.4E-04	1.9

[0577]

[0578]

싸이노물구스 KD/인간 KD = 15; 마우스 KD/인간 KD = 1; 래트 KD/인간 KD = 0.75

he.06.275-4 결과

샘플	kon	koff	KD (nM)
he.06.275-4 인간	3.4E+05	4.5E-04	1.3
he.06.275-4 싸이노	1.3E+05	8.2E-04	6.4
he.06.275-4 마우스	2.1E+03	3.7E-02	17,613
he.06.275-4 래트	0.0E+00	0.0E-00	0

[0579]

[0580]

싸이노물구스 KD/인간 KD = 5; 마우스 KD/인간 KD = 13,548; 래트 KD/인간 KD =

[0581]

실시예 14: BaF/PRLR 세포 증식 및 생존의 억제 및 PRLR-유도 ERK1/2 인산화의 억제

[0582]

키메라 mAb를 BaF/PRLR 세포의 증식 및 생존을 억제하는 능력에 대해서 분석하였다(도 9). 시험된 모든 키메라 항체가 그들의 상응하는 하이브리도마 클론에 비하여 성능을 유지하는 것으로 나타났다. 사실, XHA.06.642 및 XHA.06.275는 키메라화 후에 이 분석에서 성능을 보유했다. 인간 유방암 모델에서, 키메라 항체의 PRLR 시그널-중화 성능을 평가하기 위하여, T47D 세포를 PRL 자극 전에 1 µg/ml mAb로 30분간 처리하였다. 동시에, 추가의 세포 샘플을 단지 항체와 함께 인큐베이션하여, 항체 후보의 키메라화를 통해 얻어질 수 있는 효능작용을 검사하였다. 도 12에서 볼 수 있는 바와 같이, 모든 키메라 항체는 T47D 중 PRL-유도된 시그널링을 차단하는 능력을 보유한 반면, 단지 chXHA.06.983만이 포스포-PRLR 및 포스포-Stat5에 의해 표시되는 PRLR 시그널링의 검출 가능한 유도(작지만 재현가능한 효과)를 나타냈다.

[0583]

ERK 1/2 인산화에 대한 항체 효과의 측정

[0584]

선택된 인간 가공™ 항체를, 하기 및 상기 실시예 5에 기재된 바와 같이, PRLR-유도된 ERK1/2 인산화를 억제하는 능력에 대해 시험하였다.

[0585]

5 시간 혈청 공급중단 후에, T47D 세포를 마이크로타이터 플레이트 중 완전 성장 배지에 24 시간 동안 37°C에서 시딩하였다. 세포를 인산염 완충 염수(PBS)로 2회 세척하고, 0.1% BSA를 함유하는 혈청 비함유 배지 중에 희석된 항체와 함께 30분간 37°C에서 인큐베이션하였다. 항체의 최종 출발 농도는 40 µg/ml였다. 배지를 제거하고,

0.1% BSA를 함유하는 혈청 비함유 배지 중에 희석된 프롤락틴을 최종 농도 30 ng/ml로 가하였다. 세포를 프롤락틴과 30분 동안 37°C에서 인큐베이션한 다음, 빙냉 PBS로 2회 세척하였다. 세척제, 킬레이터 및 각종 프로테아제 및 포스파타제 억제제를 함유하는 표준 용해 완충액을 가하여 세포 용해물을 얻었다. 인산화 ERK1/2(pERK1/2)의 수준을 듀오셋(DUOSET®) IC Phospho-ERK1/ERK2(R&D Systems, Inc.)의 지시에 따라 표준 ELISA로 측정하였다. 대표적 분석 결과가 도 13에 나타나 있다.

[0586] 실시예 15

[0587] A. mAb 후보가 PRLR 발현 표적 세포에 대해 ADCC를 매개하는 능력

[0588] 항-PRLR mAb의 의도된 작용 메카니즘의 하나는 항체 의존성 세포성 세포독성(ADCC)을 매개하는 능력이다. 후보 항체의 ADCC 능력을 평가하기 위하여, T47D 세포를 PRLR 발현 유방 상피조직 표적으로 이용하였다. 도 14에 나타나 있는 바와 같이, 키메라 항-PRLR mAb 중의 두 가지는 정제된 인간 NK 세포에 의해 매개되는 ADCC를 유도할 수 있다. chXHA.06.275는 4 시간 내에 표적 세포의 대략 30%의 특이적 용해를 유도할 수 있는 것으로 나타났다. chXHA.06.642의 지연된 생산시간 때문에, 이 후보는 본래의 ADCC 분석에는 포함되지 않았었다.

[0589] B. 사이토카인 수준에 대한 항-PRLR 항체 효과

[0590] 유방암 세포에서 PRL에 의한 강력한 사이토카인 조절이 조사되었다. 이 실험에서, MCF7 또는 T47D 세포를 PRL에 chXHA.06.642와 함께 또는 이것 없이 48 시간 동안 노출시켰다. 강력한 PRL-조절된 사이토카인에 대한 chXHA.06.642의 효과를 측정하기 위하여, 메조스케일 다이아그노스틱스(MesoScale Diagnostics)의 멀티플렉스 샌드위치 면역분석을 이용하였다. PRL이 T47D 세포로부터 VEGF 분비를 유도하며, 이러한 효과는 항체 chXHA.06.642를 가했을 때 완전히 소실되는 것으로 밝혀졌다. PRL 또는 항-PRLR mAb에 의한 IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IFN-γ 또는 TNF-α의 강력한 조절은 이 실험에서는 검출되지 않았다. 이들 결과는 PRL/PRLR 경로가 유방 종양에서 혈관신생뿐만 아니라 세포 성장 및 생존에 기여할 수 있으며, 이 VEGF-조절 경로를 억제하는 것은 항-PRLR 치료 항체에 대한 또다른 가능한 생체내 작용 메카니즘일 수 있다는 것을 시사한다.

[0591] C. 항-PRLR mAb 및 화학요법제를 이용하는 시험관 내 병용 연구

[0592] 강력한 항-PRLR 치료 항체가 임상에서 세포 독성 약물과 함께 투여될 가능성 때문에, 그러한 병용치료가 배양 내 세포 성장에 미치는 효과를 조사하였다. 이러한 목적으로, BaF3/PRLR 세포를 각종 농도의 chXHA.06.642 또는 chXHA.06.275로 화학요법제와 병행하여 5일 동안 처리한 후, 세포 생존을 세포수 마커로서 셀타이터(CellTiter) Glo를 사용하여 평가하였다. 임상적으로 관련이 있고 작용 메카니즘이 다양한 일련의 세포독성제를 이 분석에 사용하였다: 독소루비신(안트라사이클린 Topo II 억제제), 탁솔(마이크로튜블 안정화제), 플루다라빈(대사길항제) 및 시스플라틴(백금-기재 DNA 가교결합 약물). chXHA.06.275 및, 보다 큰 정도로는 chXHA.06.642가 독소루비신과 상승작용하여 BaF/PRLR 세포에서 세포 사멸을 증진시키는 것으로 나타났다(도 15 참조). 항-PRLR mAb chXHA.06.642 및 chXHA.06.275의 존재 및 부재하의 화학요법제 IC50 값의 차이를 표 12에 요약하였다.

[0593] [표 12]

세포독성 약물	KLH (1ug/ml)	chXHA.06.642 (1ug/ml)	chXHA.06.275 (1ug/ml)
독소루비신	6.44 nM	2.14 nM	2.56 nM
탁솔	4.14 nM	2.07 nM	2.45 nM
플루다라빈	104.6 uM	40.0 uM	93.8 uM
시스플라틴	165.5 nM	27.6 nM	46.8 nM

[0594]

[0595] D. 항-PRLR mAb의 항-PRLR 기능적 활성

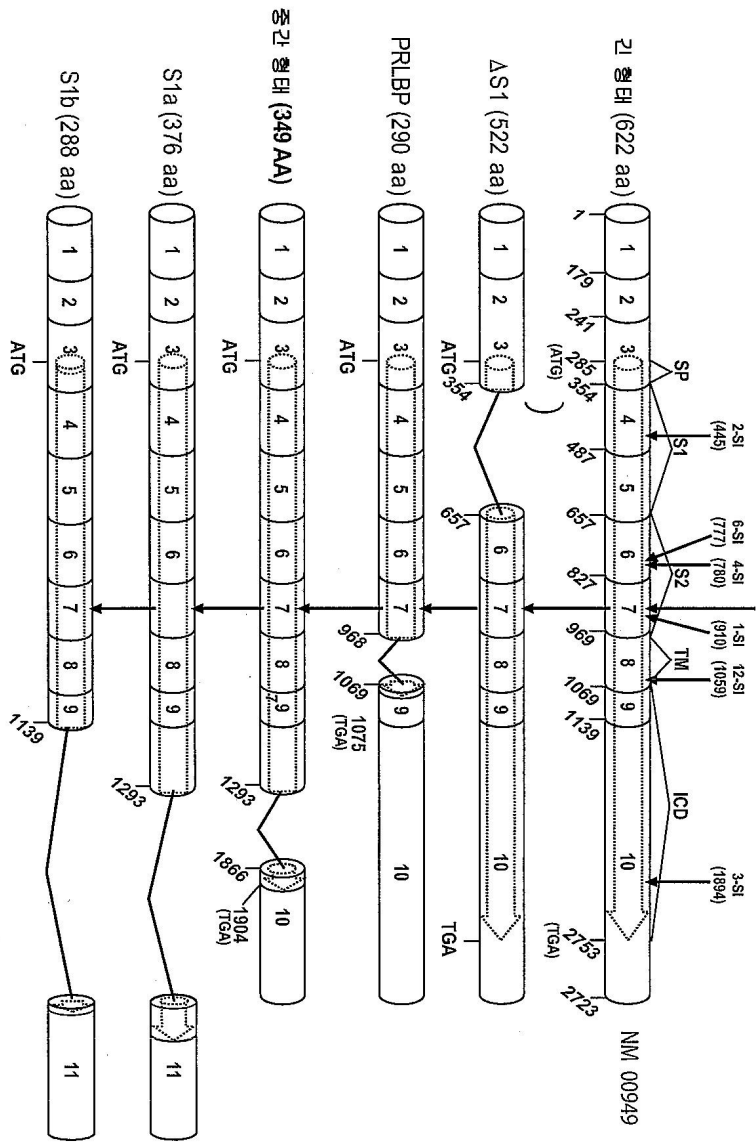
[0596] 항체를 표적 조절 및 세포 증식 분석에서 평가하였다. 도 16은 T47D 세포 중 PRL-유도된 Stat5 인산화에 대한 2 가지 농도의 chXHA.06.642 및 인간 가공™ 항체 he.06.642-1 및 he.06.642-2의 효과를 도시하고 있다. 완전한 p-Stat5 시그널 상실에 의해 증명되는 바와 같이, 둘 다 모두 강력한 길항 특성을 보유하고 있다. 또한, 항체나 mAb 단독으로 처리된 세포나 어떠한 효능 활성을 나타내지 않았다. 유사한 결과가 chXHA.06.275 변이체에 대해 나타났다. 따라서, 인간 가공™은 이들 항체의 전체적인 길항 또는 효능 작용 특질에 영향을 미치지 않았다.

- [0597] 항-PRLR 키메라 및 인간 가공™ 항체의 상대적 IC50 값을 결정하기 위하여, BaF/PRLR 세포 증식 분석을 이용하였다(도 17 참조). 이 실험의 결과로서, 모든 인간 가공™ 항체는 쥐과 동물 카운터파트에 비하여 대략 동등한 강도를 나타냈다.
- [0598] **실시에 16: Nb2-C11 래트 림프종 모델에서 항-PRLR 항체의 항-종양 활성 평가**
- [0599] Nb2-C11 종양 이종이식 모델에서 chXHA.06.642로 단일-투여 PD 연구를 이용하여 항-PRLR mAb가 종양에 도착하여 시그널링을 차단할 수 있는지를 측정하였다. 항체 chXHA.06.642는 이 연구에서 래트 PRLR에 대한 그의 친화도에 기초하여 사용되었다(상기한 바와 같음). 모니터링된 PD 마커는 p-STAT5이며, 이는 면역블롯 또는 IHC 방법에 의해 검출 가능한 PRLR 시그널링의 하류 매개자이다. Nb2-C11 종양 이종이식물에서 베이스라인 p-STAT5 수준이 충분히 검출하기에는 너무 낮기 때문에, 마우스에 외래 양(o) PRL 자극을 주어 베이스라인 p-STAT5 수준을 증가 시킴으로써 보다 적절한 역동적 범위를 제공하였다.
- [0600] 양 PRL을 주사한 Nb2-C11 종양 수반 동물에서 웨스턴 및 IHC 분석에 의해 p-STAT5의 유도를 측정하였으며, 대조군에는 염수를 주사하였다(도 18A 및 B 참조). oPRL 주사 48시간 이전에 10 mg/kg chXHA.06.642로 처리된 마우스에서는 p-STAT5의 억제가 관찰되었으나, KLH IgG1 처리된 대조군 마우스에서는 관찰되지 않았다.
- [0601] PRLR 시그널링의 억제가 Nb2-C11 종양 성장 억제와 관련이 있는지 알아보기 위하여, chXHA.06.642를 주 1회 투여하여 다수회-투여 효과 연구를 수행하였다(도 19A 및 B). 투여는 세포 이식 후 4일에(종양을 촉진으로 감지할 수 있기 전에) chXHA.06.642 또는 KLH IgG1을 10 mg/kg으로 또는 염수(대조군)로 개시하였다. 4회 주마다 mAb를 복강내 투여하였다. 모델은 조건부 생존 또는 진행 종말점까지의 시간을 이용하였는데, 이들 종양이 근육에 침입하여 캘리포로 정확히 측정하기 어렵기 때문이다. chXHA.06.642로 처리된 군 중의 종양은 이식 후 약 11주까지는 검출되지 않았으며(4회째 mAb 투여 후 7.5 주), 11주에 이 군의 15 마리 중 두 마리가 종양으로 인해 죽었다. 염수 및 KLH IgG1 대조군 처리된 군에서 생존일 중앙값은 이식 후 20일(p < 0.0001)이었으며, 이때 동물을 종양 때문에 안락사시켰다. chXHA.06.642 처리된 군의 동물은 체중이 늘었으며, 대조군 동물의 체중은 유지되거나 추축근대 질병으로 인해 줄었다.
- [0602] 이 연구에 부속 연구를 포함시켰으며, 즉, 수립된 종양이 있는 동물을 세포 이식 후 12일에 이 연구에 참여시켰다(도 20A 및 B). 평균 종양 부피는 투여 개시시에 135 mm³였다. 동물에 1주에 한 번 복강 내로 10 mg/kg의 chXHA.06.642 또는 KLH IgG1 대조군 항체를 2회 투여하였다. 2차 투여 후 2일째에(이식 후 3 주) 종양이 완전히 퇴행한 것으로 보였다. 그러나, 약 2주 후에 마우스에 종양이 나타나기 시작하였다. 비교하자면, KLH IgG1 대조군 동물은 아주 큰 종양을 가졌으며, 평균 부피가 > 600 mm³였다. 이들 종양이 직접 근육 내로 성장하기 때문에, 평균 종양 부피는 캘리포로 측정 기록된 크기보다 더 클 수 있다. 염수 및 KLH IgG1 대조군 처리된 군에서 생존일 중앙값은 이식 후 23일(p < 0.0001)이었다. 초기 시험과 마찬가지로, chXHA.06.642 처리된 군의 동물은 체중이 늘었으며, 대조군 동물의 체중은 유지되거나 줄었다. 따라서, chXHA.06.642 mAb는 낮은 수의 종양 세포에 효과적인 뿐만 아니라(이식 후 4일에 치료 시작), 2주 넘게 동안 공격적인 수립된 Nb2-C11 종양을 완전히 퇴행시킬 수 있었다.
- [0603] Nb2-C11 모델은 항-PRLR mAb가 생체내 표적 항원 발현 종양을 효과적으로 표적화하는 능력을 가지고, 종양내 PRL-유도된 시그널링을 억제하며, 공격적 수립된 종양이 있는 경우에도 종양 존재량에 있어서 측정가능한 결과를 가져온다는 것을 입증하였다.
- [0604] **실시에 17: PD 평가를 위한 인간 유방 암종 T47D 모델**
- [0605] 유방 암종 T47D 세포를 사용하여 실시에 16에서 시험된 항체 chXHA.06.642로 생체내 단일 투여 PD 연구를 수행하였다. oPRL이 PRLR 시그널링을 자극하는 능력뿐만 아니라 chXHA.06.642가 생체내 이러한 시그널링을 억제하는 능력을 평가하였다. 종양-이식된 동물에 염수, KLH IgG1 대조군 mAb 또는 chXHA.06.642를 복강내 주사하고, 48시간 후에 염수 또는 20 µg oPRL을 볼러스 주사하였다. 40분 후에, 종양 조직을 수집하였다. oPRL 볼러스 처리된 동물로부터의 종양에서 상당한 p-STAT5 유도가 관찰되었으나, 염수 대조군 동물에서는 관찰되지 않았고, 이는 웨스턴 블롯팅에 의해 평가되었으나, IHC 분석에서는 약간 보다 변동적이다(도 21). p-AKT 및 p-ERK의 수준은 생체내 oPRL 자극에 의해 증가되지 않았다. 중요한 것은, chXHA.06.642로의 처리가 oPRL 볼러스 주사 후 p-STAT5 유도를 강력히 억제하는 것으로 입증되었으나, KLH IgG1 대조군의 경우에는 그러하지 않았다. IHC 분석은 일반적으로 이 결과를 확인하였다. 중요한 것은, p-STAT5가 웨스턴 블롯팅 및 IHC 분석에 의할 때 4 마리의 chXHA.06.642 처리된 동물 중 4 마리의 종양에서 억제되었다는 것이다.

- [0606] 실시예 18: PRLR 발현 및 PRLR 발현과 ER 및 Her2-neu 발현의 상관 관계
- [0607] 정상 조직에서 PRLR 발현은 RT-PCR로 정량할 때 유방 및 자궁에서 가장 높고, 이어서 신장, 간, 전립선 및 난소에서 높게 나타난다. PRLR mRNA의 수준은 기관, 뇌 및 폐에서 가장 낮다(Pierce SK, et al., J Endocr; 171(1):R1-R4 (2001)).
- [0608] 면역조직화학(IHC) 분석은 다음과 같이 수행될 수 있다. 암 환자로부터의 동결된 조직 샘플을 최적 커팅 온도(OCT) 화합물에 매립하고, 이소펜탄 중에서 드라이 아이스로 급속 동결시켰다. 냉동절편을 라이카(Leica) 3050 CM 마이크로톰으로 두께 5 μ m로 절단하고, 벡타바운드-코팅된(vectabound-coated) 슬라이드 상에 해동-마운팅하였다. 절편을 에탄올로 -20°C에서 고정시키고, 실온에서 밤새 공기 건조되도록 두었다. 고정된 절편을 사용시까지 -80°C에서 보관하였다. 조직 절편을 꺼내어 먼저 차단 완충액(PBS, 5% 정상 염소 혈청, 0.1% Tween 20)에서 30분간 실온에서 인큐베이션한 다음, 완충액 중에 희석된(1 μ g/ml) 암 관련 단백질 특이적 모노클로날 항체 및 대조군 모노클로날 항체와 함께 120 분간 인큐베이션하였다. 절편을 차단 완충액으로 3회 세척하였다. 결합된 모노클로날 항체를 염소 항-마우스 IgG + IgM(H+L) F(ab')₂-퍼옥시다제 접합체 및 0.1 M 나트륨 아세테이트 완충액, pH 5.05 중 퍼옥시다제 기질 디아미노벤지딘(1 mg/ml, Sigma Catalog No. D 5637) 및 0.003% 과산화수소(Sigma cat. No. H 1009)로 검출하였다. 염색된 슬라이드를 헤마톡실린으로 카운터-염색하고, 니콘(Nikon) 현미경하에 검사하였다.
- [0609] 암 관련 단백질(항원)에 대한 모노클로날 항체를 사용하여 다른 유형의 조직으로부터의 각종 세포주에 대한 반응성을 시험하였다. 다른 수립된 세포주로부터의 세포를 프로테아제를 사용하지 않고 성장 표면으로부터 제거하여, OCT 화합물 중에 충전 및 매립하였다. 세포를 동결 및 절단한 다음, 표준 IHC 프로토콜로 염색하였다. 셀어레이(CellArray™) 기술은 WO 01/43869에 기재되어 있다. 외과적 절제에 의해 얻어진 정상 조직(인간)을 동결 및 마운팅하였다. 냉동절편을 라이카(Leica) 3050 CM 마이크로톰으로 두께 5 μ m로 절단하고, 벡타바운드-코팅된 슬라이드 상에 해동-마운팅하였다. 절편을 에탄올로 -20°C에서 고정하고, 실온에서 밤새 공기 건조되도록 두었다. 폴리미카(PolyMICA™) 검출 키트를 사용하여 암 관련 항원 특이적 모노클로날 항체가 정상 조직에 결합하는 것을 측정하였다. 1차 모노클로날 항체를 최종 농도 1 μ g/ml에서 사용하였다.
- [0610] PRLR의 발현을 및 그와 ER 및 Her2-neu 발현과의 상관 관계를 조사하기 위하여, 122개의 침윤성 유방암 환자 샘플을 면역조직화학분석(IHC)을 이용하여 평가하였다. 전체적으로 122개 중 62개(50%)의 샘플이 PRLR을 발현하였고, 122개 중 58개(47%)가 ER을 발현하였으며, 122개 중 32개(26%)가 Her2-neu를 발현하였다. 96개(78%)의 샘플은 침윤성 유관 암종으로 이루어졌으며, 이중 48개(50%)는 PRLR을 발현하였다. 이들 샘플 48개 중 24개(50%)가 또한 ER을 발현하였으며, 48개 중 13개(26%)가 또한 Her2-neu를 발현하였다.
- [0611] 본 명세서에 인용되고(거나) 출원 데이터 지면에 기록된 모든 미국 특허, 미국 특허출원 공개 및 미국 특허 출원, 외국 특허 및 외국 특허 출원 및 비-특허 문헌은 그 전문이 본 명세서에 포함된다.
- [0612] 본 명세서에 예시의 목적으로 본 발명의 구체적인 실시태양이 기재되어 있지만, 본 발명의 요지 및 범주를 벗어나지 않고서 각종 변형이 가능하다는 것이 상기한 바로부터 명백해질 것이다.

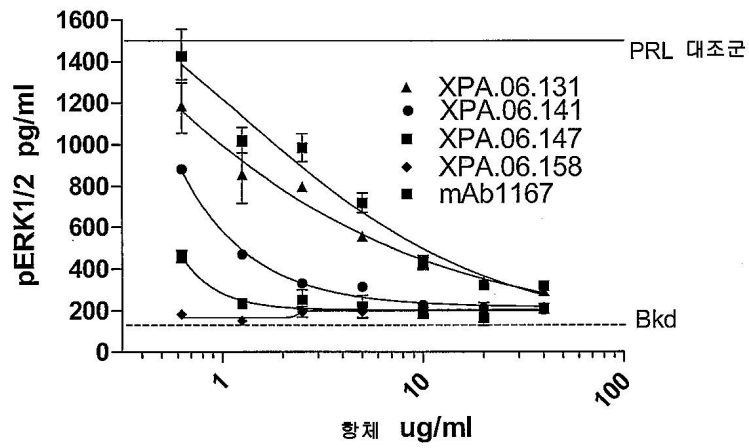
도면

도면1



도면2

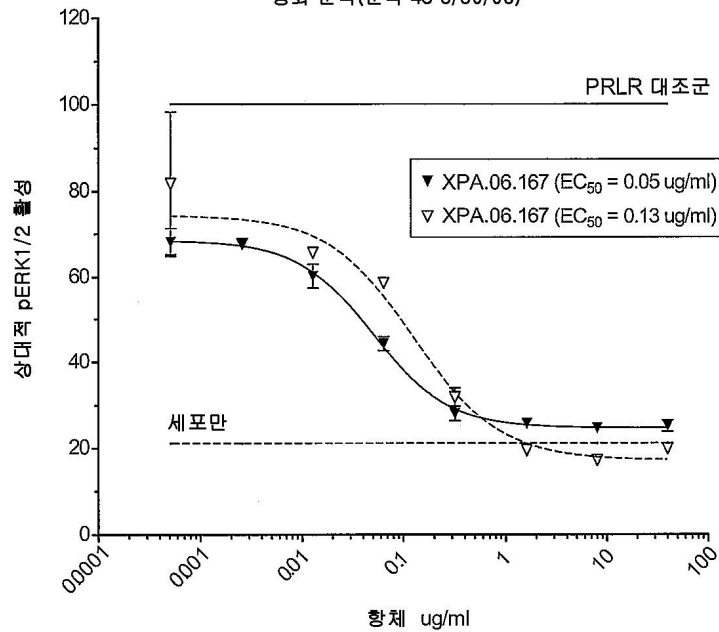
PRLR 특이적 항체는 pERK1/2 인산화를 억제함



도면3

PRLR 특이적 항체는 pERK1/2 인산화를 억제함

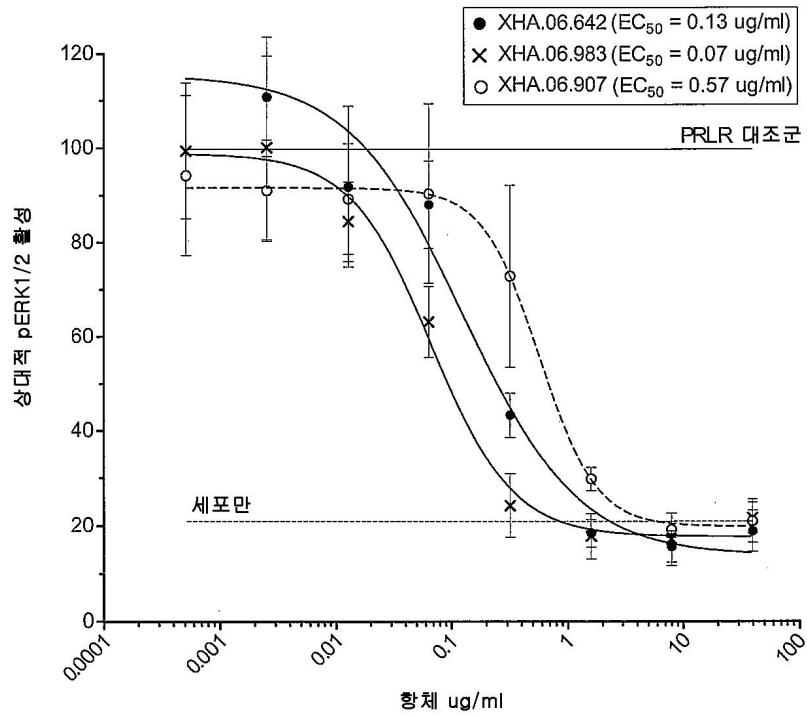
pERK1/2를 측정하는 T47D 세포 ± 30 ng/ml PRL에서의 중화 분석(분석 48 3/30/06)



도면4

PRLR 특이적 항체는 pERK1/2 인산화를 억제함

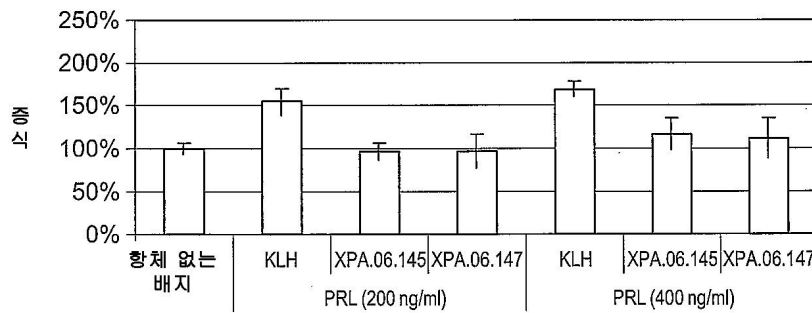
pERK1/2를 측정하는 T47D 세포 ± 30 ng/ml PRL에서의
중화 분석(분석 47, 48 3/28, 3/30/06)



도면5

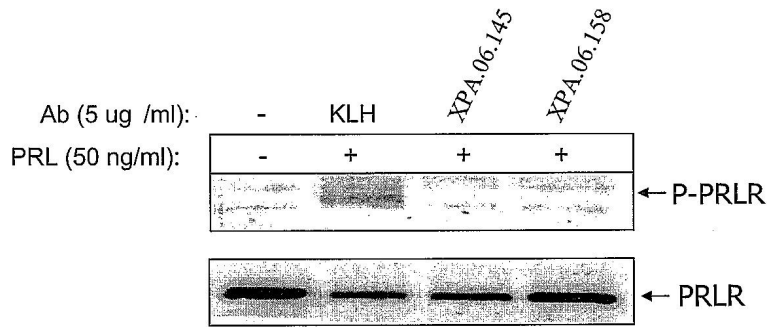
5 μg/ml의 scFv는 종양 세포주 증식을 억제함

MCF7 (NCI)



도면6

PRLR 특이적 항체는 PRL 유도 수용체 인산화를 억제함



도면7A

서열번호 20
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNS
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATPVVYAPGYWGQGLTVT

서열번호 21
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCAAWDDSLGGPVGFGGTKLTVL

서열번호 22
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYGMHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSYTYADSVKGRFTISRDNS
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARASSTSDYWGQGLTVT

서열번호 23
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGNNAVNWYQQLPGTAPKLLIYDNYRPPGIPDRFSGSKSGTSASLAISGL
 RSEDXADYYCAVWDGRLNGPVGFGGTKLTVL

서열번호 24
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYGMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGVVAADSVKGRFTISRDNS
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTIYVYR WGQGLTVT

서열번호 25
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCAAWDDSLGGPLFGGTKLTVL

서열번호 26
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYPVHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGNTKYYADSVKGRFTISRDNS
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNPPFDYWGQGLTAV

서열번호 27
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCEAWDDTLNGPHVVGFGGTKLTVL

서열번호 28
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNMGHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNS
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARADSSGTVDYWGQGLTVT

서열번호 29
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYDNYRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSKDEADYYCAAWDDSLNGLVFGGTKLTVL

서열번호 30
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIGGRGVSTYYADSVKGRFTISRDNS
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSNWTHALGFDFWGQGLTVT

서열번호 31
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYDGNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL
 RSEDEADYYCAGWDGRLGHWVGFGGTKLTVL

서열번호 32
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYGMHWVRQAPGKGLEWVLSISWDGGSTYYADSVKGRFTISRDNS
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATGIAVAGFDYWGQGLTVT

서열번호 33
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGSNAVNWYQQLPGTAPKLLIYDGNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL
 RSEDEADYYCAWDSNLNGVVGFGGTKLTVL

서열번호 34
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVLSISWDGGRVTHYADSVKGRFTISRDNS
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTGASVHALWGQGLTVT

서열번호 35
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNIKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL
 RSEDEADYYCATWDDSLNGPVGFGGTKLTVL

서열번호 36
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDYGMHWVRQAPGKGLEWVALISFDGSKTNYGGPVQGRFTISRDNS
 ENTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGAFDI WGQGLTVT

서열번호 37
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGSNVYVWYQQLPGTAPKLLIYDNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCAAWDDSLKPVFGGTKLTVL

도면7B

서열번호 38
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSSWVRQAPGKGLEWVAFISYDGNKESYADSVKGRFTISRDNK
 NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGYGLFDYWGQGLVTV

서열번호 39
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNYVYVYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCAAWDDSLSGRVFGGRTKLTVL

서열번호 40
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYGMHWVRQAPGKGLEWVSLISWDGGSTYYADSVKGRFTISRDNK
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASSISAAAATGLDYWGQGLVTV

서열번호 41
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSTSNIIGSNVYVYQQLPGTVPKLLIYENKKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 RSEDEADYYCAAWDDSLSGWVFGGRTKLTVL

서열번호 42
 EVQLLESGGGLVQPGGFLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNK
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATRRRAIAVAGAFDIWGQGLVTV

서열번호 43
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSASNIINGVYVYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCAAWDDSLSGOVVFGGRTKLTVL

서열번호 44
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSSWVRQVPGKGLEWVSLISWDGGSTYYADSVKGRFTISRDNK
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPSGAYPTFFDNWGQGLVTV

서열번호 45
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSTSNIIGSNYVYVYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCAAWDDSLSGWVFGGRTKLTVL

서열번호 46
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGPMSWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNK
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAEIIFIWGQGLVTV

서열번호 47
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYGNNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCASWDDSLSGVVFVFGGRTKLTVL

서열번호 48
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSSWVRQAPGKGLEWVSLISWDGGSTYYADSVKGRFTISRDNK
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGFDPWGQGLVTV

서열번호 49
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCMIWPSNAWVFGGRTKLTVL

서열번호 50
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKSSPMHWVRQAPGKGLEWVSGVSWNGSRTHYVDSVKRRFTISRDNK
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPAFDIWGQGLVTV

서열번호 51
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGTTSSIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 RSEDEADYYCAAWDDSLNGVVFVFGGRTKLTVL

서열번호 52
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSSWVRQAPGKGLEWVSGVSSGVNTYYADSVKGRFTISRDNK
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGAATSTHFDYWGQGLVTV

서열번호 53
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGRFNIIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYRNENRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAISG
 RSEDEADYYCAAWDGSLSAWVFGGRTKLTVL

서열번호 54
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAISYEGSTKIFYADSVKGRFTISRDNK
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGVYYXGMDVWGQGLVTV

서열번호 55
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSTSNIIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYDNNLRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCQSYDSSLIGWVFGGRTKLTVL

도면7C

서열번호 56
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARLNRAAGAFDIWGQGTIVTV

서열번호 57
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYKNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LRSEDEADYYCAVWDGSLSGWAFGGRTKLTIVL

서열번호 58
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSLISWDGGSTYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWFDPWGQGTIVTV

서열번호 59
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LRSEDEADYYCAAWDGSLNGPVFGGGKLTIVL

서열번호 60
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNYAMSWVRQAPGKGLEWVSGYSWNGSRTHYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTTVSLYWGQGTIVTV

서열번호 61
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS
GLRSEDEADYYCQSYDSSLRWVFGGGKLTIVL

서열번호 62
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSSIYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGGQQLGAFDIWGQGTIVTV

서열번호 63
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYQNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL
RSEDEADYYCAAWDGSLSGWVFGGGKLTIVL

서열번호 64
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATAFDTPDAFDIWGQGTIVTV

서열번호 65
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYDNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL
RSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGKLTIVL

서열번호 66
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYPMTWVRQAPGKGLEWVAVISYDASQTYAEPVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTYGLLDYWGQGTIVTV

서열번호 67
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LRSEDEADYYCAAWDDSLSGVFGGGRTKLTIVL

서열번호 68
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVSLISWDGGSTYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCIGSWFDPWGQGTIVTV

서열번호 69
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYDNDRRPLGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LRSDXDEADYYCAAWDDSLSGVFGGGRTKLTIVL

서열번호 70
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASWLOYDAFDIWGQGTIVTV

서열번호 71
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYQNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL
RSEDEADYYCATWDDSLNGWVFGGGKLTIVL

서열번호 72
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVALISFDGSKTNYGGPVQGRFTISRDN
ENTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGAFDIWGQGTIVTV

서열번호 73
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNVYVYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LRSEDEADYYCAAWDDSLKPVFGGGKLTIVL

도면8

서열번호 74
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVSLISWDGGRTSYTDSVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLIGDNWGQGTIVTVSS

서열번호 75
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKS
GTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGKLTIVL

도면9

XHA.06.983 LC 가변 영역 (서열번호 76)

atgaagtcacagaccaggctcctgatttctactgctctgagctcggctcatgggagattgtga
tgaccagactccaaaatcctgctgtatcagcaggagacagggtaccataacctgcaaggccagctca
gggtgtagtaaatgtagctgggtccagcagaagccaggcagctcctaactgctgataactct
gcatccactgctacactggagtcctgatccctactggcagtgatattggacggatffcaacttca
ccatcaaacactgfcagggcgaagacctggcagttactctgicagcaggattatacctcgcagctt
cggaggagcccaagctggaafcaaacggct

XHA.06.983 HC 가변 영역 (서열번호 77)

atgactccaggctcaatttagtttccctgctctattttaaagggtccagtgacgctgagcctgg
tggagctggggaggctgggagcctggagggtcccgaacctctctgfcagcctcggatcgc
ttcagtagtttggaaatgagctgggtcgtcagcctccagagaagggtggagtggtcgcatafatt
agtagggcagtagtaccatctactatgcagacagtggaaggccgattccatctcagagacaatc
caagaacacctgttctcgaatgaccagctaaaggctgagggacagccatgtattactgtgtaag
atctggaggagactggggcaaggaaacctcagtcaccgtcagctca

XHA.06.275 LC 가변 영역 (서열번호 78)

atgagttccaggctcaggctcctctgctctggafatcagggtgccagtgatgacagataaccagctc
gcatctcctggagaaccattactcttaattgcaaggcgaagaaacatttacaatattgacctggtatc
aatcaacctcttactctcctggatccacttggacttggaaatccatcaagggtcagtgccagtggtat
gtagcctggatcctgaaatttgaatgtaactgtcaacagcataatgattaccgtacagttcggagg
aaacgggt

XHA.06.275 HC 가변 영역 (서열번호 79)

atgagagtgctgattcttggctgtcacagccttccctggtatcctgctgatgagcagctcaggagtc
ttctcagctctgtccctcactgcactgtcactggctactcaatcaccagtgattatgcccggaaact
ctggagtgaggggctacataagttacagtggtgactactcaaccatctcctcaaaagtcgaatct
aaccagttcctcagctggaattctgactactgaggacacagccacatattttgcaagagactacgg
ccaaggcaccactctcacgtctcctca

XHA.06.642 LC 가변 영역 (서열번호 80)

atggagacagacacactcctgtatgggtactgctctcgggtccagggtccactgggacattgctgac
ctgtatctctgggagggggccaccatctcagcaggccagcaaaagtgtcagtagatctggctata
aaaccaagcagccaccaaacctctatctatctgcatccaactagaatctgggtccctggcaggtc
cagactcaccctcaacatccatcctgtggaggaggaggtgctgcaaccttactgicagcagtg
gggggaccaaagctggaataaacgggt

XHA.06.642 HC 가변 영역 (서열번호 81)

atgaactcgggctcagcttgatttccctgcccctcaattttaaagggtgccagtgagggtgcagctg
agcctggagggtccctgaaactcctctgcaactctggatcacttccagtagctatggcagcttgggt
ggctggagtggtcgaaccgtagtagtggtgacttacacctatccagacagtggaaggcggatc
lgccaagaacacctgtacctgcaaatgacagctgaaagtggagactcagccatgtattacigigca
ctacttactatgctatgactactggggcaaggaaacctcagtcaccgtctcctcg

도면10

XHA.06.983 VL (서열번호 82)

SIVMTQTPKFLLSVAGDRVITITCKASQGVSNVDVAWFQQKPGQSPKLLIYSASTRYTG
VPDRLTGSGYGTDFITINTVQAEDLAVYFCQDYTSPTFGGGTKLEIKRA

XHA.06.983 VH (서열번호 83)

DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSAASGFASFSSFGMOWVRQAPEKGLEWVAYISSGSS
TIYYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCVRSGRDYWGQGTSTVTV
SS

XHA.06.275 VL (서열번호 84)

DVQITQSPSYLAASPGETITLNCRASKNIYKYLAWYQEKPGKTNLLIYSGSTLHSGIP
SRFSGSGSGTDFLTITSLDPEDFAMYYCQHNDYPYTFGGGKLEIKRA

XHA.06.275 VH (서열번호 85)

DVQLQESGGLVKPSQSLTCTVTGYSTSDYAWNWRQFPGNKLEWVMGYISYSGS
TSYNPSLKSRIISITRDTSKNQFFLQLNSVTEDTATYFCARDYGYVFDYWGQGTTLTV
SS

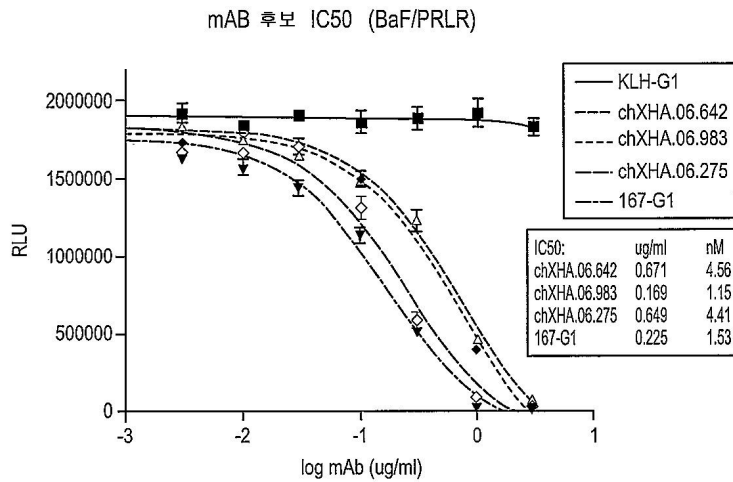
XHA.06.642 VL (서열번호 86)

DIVLTQSPASLAIVSLGQGATISCRASKSVSTSGYTYMHWYQQKPGQPPELLIYLASNL
ESGVPARFSGSGSGTDFLTNIHPVEEEDAATYYCQHSSELPPSFGGGKLEIKRA

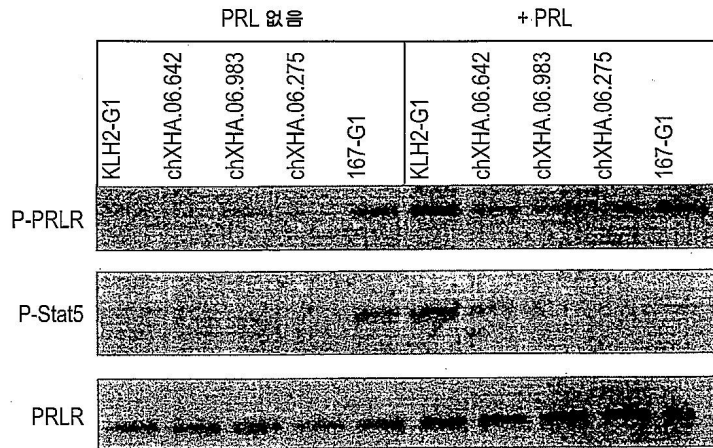
XHA.06.642 VH (서열번호 87)

EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAVSGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVATVSSGGT
YTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDSAMYYCARHRGNYYATYYYAM
DYWGQGTSTVTVSS

도면11

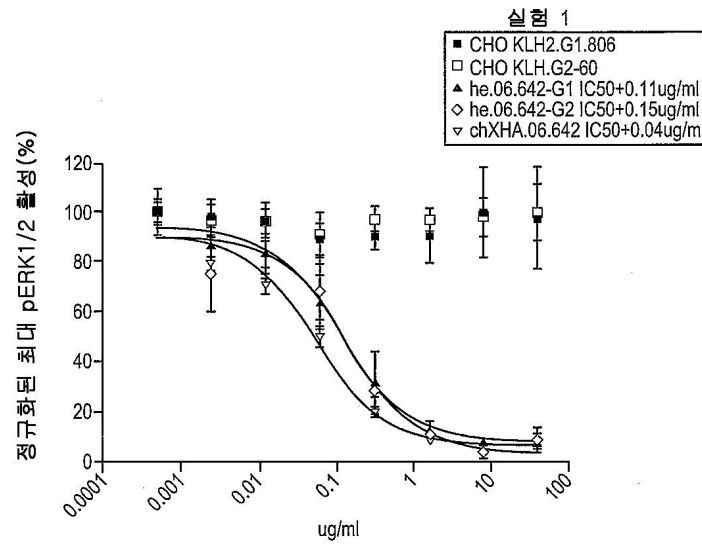


도면12

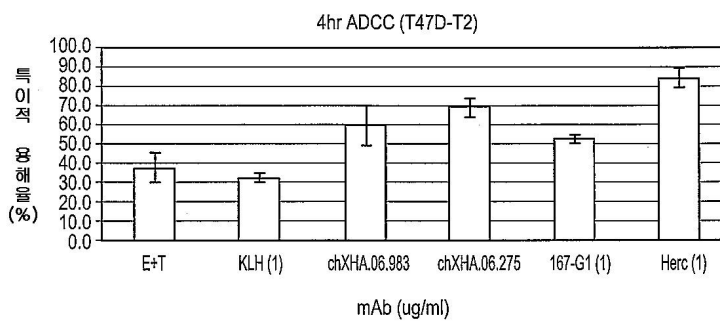


도면13

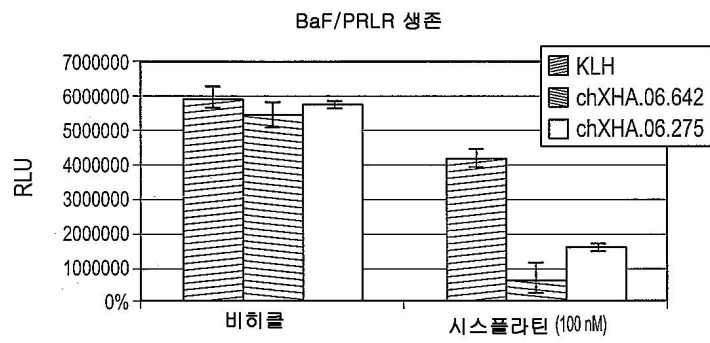
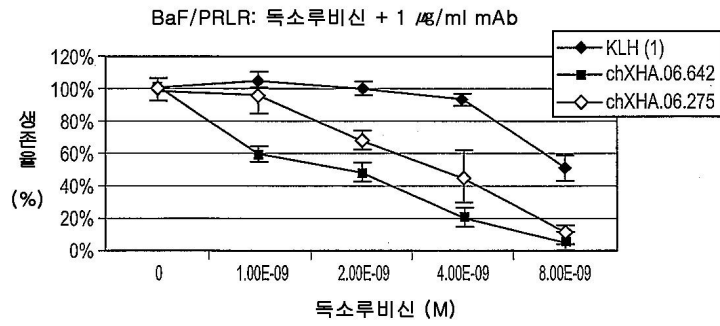
pERK1/2를 측정하는 T47D 세포 ± 30 ng/ml PRL에서의 중화 분석



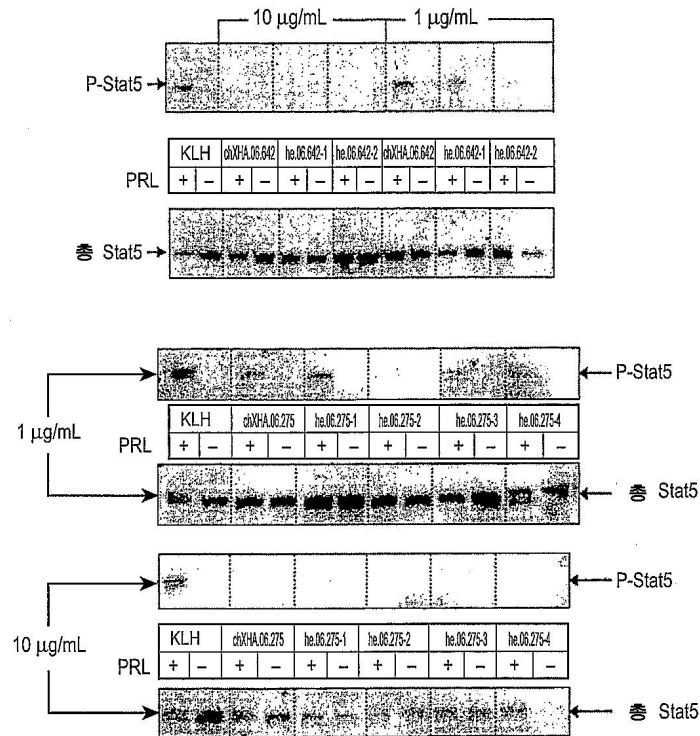
도면14



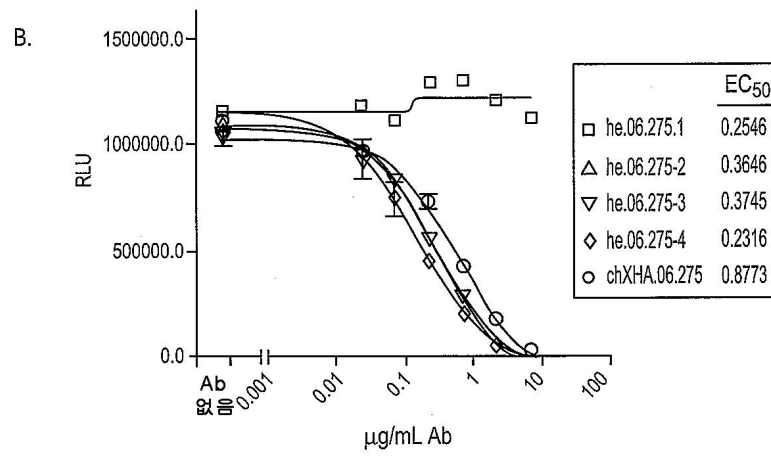
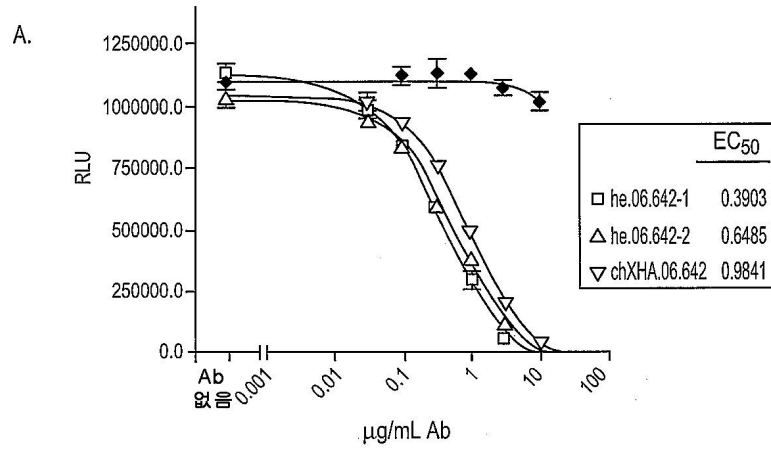
도면15



도면16

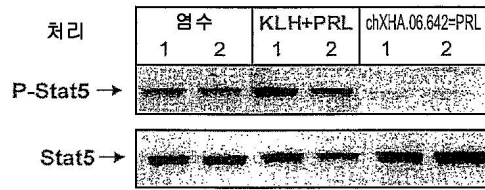


도면17

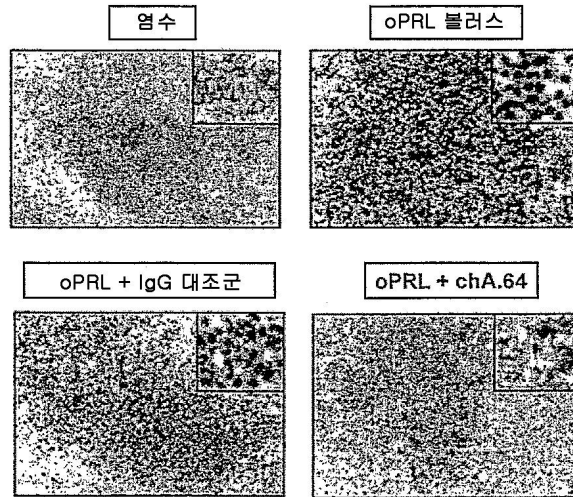


도면18

A.



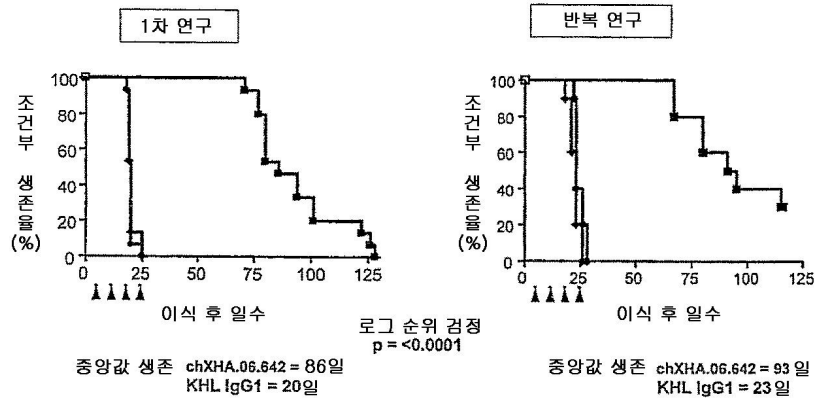
B.



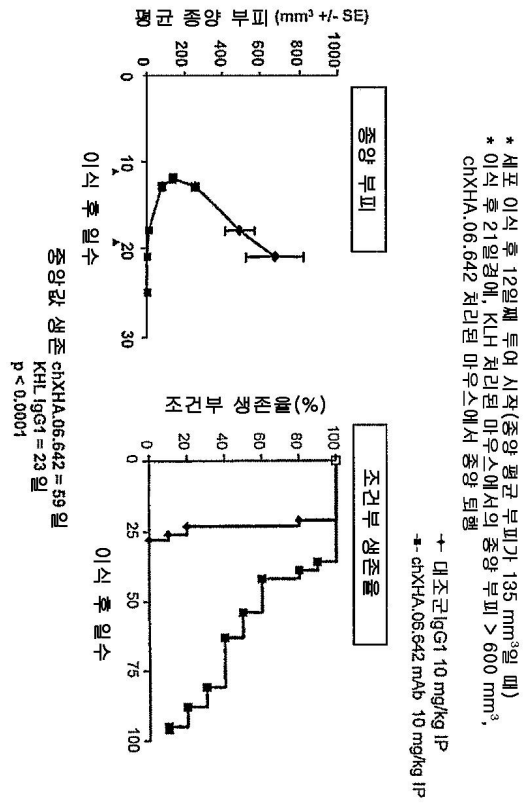
도면19

이식 후 4일째 투여 시작; n=10-15/군; Q7D x 4

- 대조군 IgG1 10 mg/kg IP
- chXHA.06.642 mAb 10 mg/kg
- 염수 IP

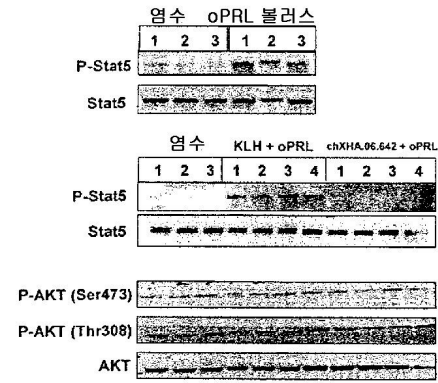


도면20

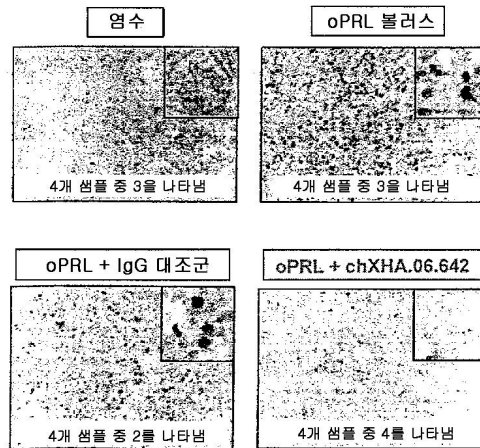


도면21

A.



B.



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Bedinger, et al.

<120> PRLR-Specific Antibody and Uses Thereof

<130> 27527/43177

<150> 60/838648

<151> 2006-08-18

<150> 60/946360

<151> 2007-06-26

<160> 98

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 1846

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

atgaaggaaa atgtggcatc tgcaaccgtt ttcactctgc tactttttct caacacctgc      60
cttctgaatg gacagttacc tcttgaaaaa cctgagatct ttaaagtctg ttctccaat      120
aaggaaacat tcacctgctg gtggaggcct gggacagatg gaggacttcc taccaattat      180
tcactgactt accacagga aggagagaca ctcatgcatg aatgtccaga ctacataacc      240
ggtggcccca actcctgcca ctttggcaag cagtacacct ccatgtggag gacatacatc      300
atgatggtea atgccactaa ccagatggga agcagtttct cggatgaact ttatgtggac      360
gtgacttaca tagttcagcc agaccctcct ttggagctgg ctgtggaagt aaaacagcca      420
gaagacagaa aaccctacct gtggattaaa tggctccac ctaccctgat tgacttaaaa      480
actggttggg tcacgtcctt gtatgaaatt cgattaaaac cggagaaagc agctgagtgg      540
gagatccatt ttgctgggca gcaaacagag ttaagattc tcagcctaca tccaggacag      600
aaataccttg tccaggttcg ctgcaaacca gaccatggat actggagtgc atggagtcca      660
gcgaccttea ttcagatacc tagtgacttc accatgaatg atacaaccgt gtggatctct      720
gtggctgtcc tttctgctgt catctgtttg attattgtct gggcagtggc tttgaagggc      780
tatagcatgg tgacctgeat ctttccgcca gttcctgggc caaaaataaa aggatttgat      840
gctcatctgt tggagaaggg caagtctgaa gaactactga gtgccttggg atgccaagac      900

```

ttctctccca ctctgacta tgaggacttg ctggtggagt atttagaagt agatgatagt 960
 gaggaccagc atctaattgc agtccattca aaagaacacc caagtcaagg tatgaaaccc 1020
 acatacctgg atcctgacac tgactcaggc cgggggagct gtgacagccc ttccttttg 1080
 tctgaaaagt gtgaggaacc ccaggccaat cctccacat tctatgatcc tgaggtcatt 1140
 gagaagccag agaatcctga aacaaccac acctgggacc cccagtgcac aagcatggaa 1200
 ggcaaaatcc cctattttca tgctggtgga tccaaatgtt caacatggcc cttaccacag 1260
 cccagccagc acaacccag atcctcttac cacaatatta ctgatgtgtg tgagctggct 1320
 gtgggcctg caggtgcacc ggccactctg ttgaatgaag caggtaaaga tgctttaaaa 1380
 tcctctcaaa ccattaagtc tagagaagag ggaaaggcaa cccagcagag ggaggtagaa 1440
 agcttcatt ctgagactga ccagatacg ccttggtgc tgccccagga gaaaacccc 1500
 ttggtctcg ctaaaccctt ggattatgtg gagattcaca aggtcaaca agatggtgca 1560
 ttatcattgc taccaaaaca gagagagaac agcggcaagc ccaagaagcc cgggactcct 1620
 gagaacaata aggagtatgc caaggtgtcc ggggtcatgg ataacaacat cctggtgttg 1680
 gtgccagatc cacatgctaa aaactggct tgctttgaag aatcagcaa agaggccca 1740
 ccatcacttg aacagaatca agctgagaaa gcctggcca acttactgc aacatcaagc 1800
 aagtgcagc tccagctggg tggtttggat tacctggatc cgcac 1846

<210> 2
 <211> 622
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

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

1 5 10 15

 Leu Asn Thr Cys Leu Leu Asn Gly Gln Leu Pro Pro Gly Lys Pro Glu
 20 25 30

 Ile Phe Lys Cys Arg Ser Pro Asn Lys Glu Thr Phe Thr Cys Trp Trp
 35 40 45

 Arg Pro Gly Thr Asp Gly Gly Leu Pro Thr Asn Tyr Ser Leu Thr Tyr
 50 55 60

 His Arg Glu Gly Glu Thr Leu Met His Glu Cys Pro Asp Tyr Ile Thr
 65 70 75 80

 Gly Gly Pro Asn Ser Cys His Phe Gly Lys Gln Tyr Thr Ser Met Trp
 85 90 95

 Arg Thr Tyr Ile Met Met Val Asn Ala Thr Asn Gln Met Gly Ser Ser
 100 105 110

 Phe Ser Asp Glu Leu Tyr Val Asp Val Thr Tyr Ile Val Gln Pro Asp
 115 120 125

 Pro Pro Leu Glu Leu Ala Val Glu Val Lys Gln Pro Glu Asp Arg Lys
 130 135 140

 Pro Tyr Leu Trp Ile Lys Trp Ser Pro Pro Thr Leu Ile Asp Leu Lys
 145 150 155 160

 Thr Gly Trp Phe Thr Leu Leu Tyr Glu Ile Arg Leu Lys Pro Glu Lys
 165 170 175

 Ala Ala Glu Trp Glu Ile His Phe Ala Gly Gln Gln Thr Glu Phe Lys
 180 185 190

 Ile Leu Ser Leu His Pro Gly Gln Lys Tyr Leu Val Gln Val Arg Cys

Ala Asn Phe Thr Ala Thr Ser Ser Lys Cys Arg Leu Gln Leu Gly Gly
 595 600 605

Leu Asp Tyr Leu Asp Pro Ala Cys Phe Thr His Ser Phe His
 610 615 620

<210> 3
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 gggacaagtt tgtacaaaa agcaggctac gaaggagata tacatatgaa ggaaaatgtg 60

gcatctgcaa 70

<210> 4
 <211> 79
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 gggaccactt tgtacaagaa agctggggtt aagctccgtg atggtgatgg tgatgtgctc 60

catcattcat ggtgaagtc 79

<210> 5
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 gggacaagtt tgtacaaaa agcaggcttc gaaggagata gaaccatg 48

<210> 6
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 caggcttcga aggagataga accatgaagg aaaatgtggc atctgcaacc 50

<210> 7
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 gaaggaaaat gtggcatctg caaccgtttt cactctgcta ctttttctc 49

<210> 8
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 cgttttcact ctgctacttt ttctcaacac ctgccttctg aatggaggag 50

<210> 9
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 caacacctgc ctctgaaatg gaggagcaca tcaccatcac catcacggag 50

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

<400> 10
 cacatcacca tcaccatcac ggagctcagt tacctcctgg aaaacctgag 50

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

<400> 11
 gggaccactt tgtacaagaa agctgggttc actgaactat gtaagtcag tccac 55

<210> 12
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 gggacaagtt tgiacaaaaa agcaggcttc gaaggagata gaaccatg 48

<210> 13
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 caggcttcga aggagataga accatgaagg aaaatgtggc atctgcaacc 50

<210> 14
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 gaaggaaaat gtggcatctg caaccgtttt cactctgcta ctttttctc 49

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

<400> 15
 cgttttcact ctgctacttt ttctcaacac ctgccttctg aatgttca 48

<210> 16
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 16
tctcaacacc tgccttctga atgttcagcc agaccctcct ttggagctg 49

<210> 17
<211> 49
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 17
cgtgatgggtg atggatgatg gtcctcatcat tcatggtgaa gtcactagg 49

<210> 18
<211> 47
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 18
caagaaagct gggtttaagc tccgtgatgg tgatggatgat gtgctcc 47

<210> 19
<211> 37
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 19
gggaccactt tgtacaagaa agctgggttt aagctcc 37

<210> 20
<211> 115
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

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

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

20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Thr Pro Val Val Val Ala Pro Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val
 115

<210> 21
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50

55

60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 22

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ala Ser Ser Thr Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100

105

110

Thr Val

- <210> 23
- <211> 110
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (84)..(84)
- <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 23

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Tyr Arg Arg Pro Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Val Trp Asp Gly Arg Leu
 85 90 95

Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 24
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Val Val Ala Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Thr Thr Tyr Val Pro Tyr Ser Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val

<210> 25
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Ser Gly Pro Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 26

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val

- <210> 27
- <211> 112
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 27

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg

115

<210> 29
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Lys Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Asn Gly Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 30
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30

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

1 5 10 15

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

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

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

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

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

 Ala Arg Gly Ser Asn Trp Thr His Ala Leu Gly Phe Asp Pro Trp Gly
 100 105 110

 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 115

<210> 31
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31

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

 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

 Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Gly Trp Asp Gly Arg Leu
85 90 95

Ile Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 32
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

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

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

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

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

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

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

85

90

95

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

Leu Val Thr Val
 115

<210> 33
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asn Ser Leu
 85 90 95

Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 34
 <211> 114

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34

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

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

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

Ser Leu Ile Ser Trp Asp Gly Tyr Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Thr Thr Gly Ala Ser Tyr His Ala Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val

<210> 35
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 35

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1 5 10 15

 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

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

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

 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

 Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

 <210> 36
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 36

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

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

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

 Ala Leu Ile Ser Phe Asp Gly Ser Lys Thr Asn Tyr Gly Gly Pro Val

50

55

60

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

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

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

<210> 37

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Lys Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100

105

<210> 38
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Gly Gly Tyr Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val
 115

<210> 39
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 39

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Asn Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Ser Gly Arg Val Phe Gly Gly Arg Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 40

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Ser Ile Ser Ala Ala Ala Thr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val
 115

<210> 41
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 41

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Val Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg

115

<210> 43
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 43

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ala Ser Asn Ile Gly Ile Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Ser Gly Gln Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 44
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44

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

1 5 10 15

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

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

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

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

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

 Ala Arg Pro Ser Gly Ala Tyr Pro Thr Pro Phe Asp Asn Trp Gly Gln
 100 105 110

 Gly Thr Leu Val Thr Val
 115

<210> 45
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 45

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

 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

35 40 45

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 46
<211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

85

90

95

Ala Arg Gly Ala Glu Ile Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val

<210> 47
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 48
 <211> 111

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48

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

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

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

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

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

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

Thr Arg Gly Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

<210> 49
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 49

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn

20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ile Trp Pro Ser Asn Ala
85 90 95

Trp Val Phe Gly Gly Arg Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 50
<211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

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

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

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

Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

100 105 110

<210> 52
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 52

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

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

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

Ser Gly Val Gly Ser Ser Gly Val Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val
 115

<210> 53
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 53

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Phe Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Ser Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Gly Ser Leu
 85 90 95

Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 54

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (103)..(103)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 54

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Gly Val Tyr Tyr Xaa Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val
 115

<210> 55
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 55

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Asn Ser
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
 85 90 95

Ile Gly Trp Met Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Lys Val Leu
 100 105 110

<210> 56
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 56

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Leu Asn Arg Ala Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Leu Val Thr Val
115

<210> 57
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Arg Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Val Trp Asp Gly Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Trp Ala Phe Gly Gly Arg Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 58
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

<210> 59

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

35

40

45

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Gly Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 60

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

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

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

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

Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

85 90 95

Thr Thr Val Ser Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

<210> 61
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 61

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
 20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

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

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

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95

Leu Ser Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 62
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 62

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Gly Gln Gln Leu Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val
 115

<210> 63

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Gly Ser Leu
 85 90 95

Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 64
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 64

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Thr Ala Phe Thr Gly Pro Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val
115

<210> 65
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 66
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 66

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Ala Ser Gln Thr Tyr Tyr Ala Glu Pro Val
 50 55 60

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

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

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

Val Thr Val
 115

<210> 67
 <211> 109
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (38)..(38)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 67

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Xaa Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Ser Gly Val Phe Gly Gly Arg Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 68

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

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

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

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

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

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

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

Ile Gly Ser Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

<210> 69

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (72)..(72)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (82)..(82)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 69

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Xaa Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Xaa Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 70

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Ser Trp Leu Gln Val Asp Ala Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val
 115

<210> 71
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 71

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

<210> 73
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 73

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Lys Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 74
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 74

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

1 5 10 15

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

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

 Ser Leu Ile Ser Trp Asp Gly Gly Arg Thr Ser Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

 Ala Arg Gly Leu Ile Gly Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

 Val Ser Ser
 115

 <210> 75
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 75

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

 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
 20 25 30

 Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu

35

40

45

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

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

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser
 85 90 95

Leu Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 76
 <211> 384
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 76
 atgaagtcac agaccaggt ctctgtatct ctactgctct gtgtgtctgg tgctcatggg 60
 agtattgtga tgaccagac tcccaaattc ctgcttgtat cagcaggaga cagggttacc 120
 ataacctgca aggccagtca ggggtgtgagt aatgatgtag cttggttcca gcagaagcca 180
 gggcagtctc ctaaactgct gatatactct gcatccactc gctacactgg agtcctgat 240
 cgctcactg gcagtggata tgggacggat ttactttca ccatcaacac tgtgcaggct 300
 gaagacctgg cagtttactt ctgtcagcag gattatacct ctccgacgtt cggtggaggc 360
 accaagctgg aatcaaacg ggct 384

<210> 77
 <211> 399
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 77
atggactcca ggcTcaattt agttttcctt gTccttattt taaaaggTgt ccagtgtgac 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtgcagcctg gagggTcccg gaaactctcc 120

tgtgcagcct ctggattcgc tttcagtagt tttggaatgc agtgggttcg tcaggctcca 180

gagaaggggc tggagtgggt cgcataatatt agtagtggca gtagtaccat ctactatgca 240

gacacagtga agggccgatt caccatctcc agagacaatc ccaagaacac cctgttcctg 300

caaatgacca gtctaaggTc tggagacacg gccatgtatt actgtgtaag atctgggagg 360

gactactggg gtcaaggaac ctcaGtcacc gTcagctca 399

<210> 78
<211> 387
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 78
atgaggttcc aggttcaggt tctggggctc cttctgctct ggatattcagg tgcccagTgt 60

gatgtccaga taaccagTc tccatcttat cttgctgcat ctctggaga aaccattact 120

cttaattgca gggcaagTaa gaacatttac aaatatttag cctggtatca agaaaaacct 180

gggaaaacta ataacctct tctctactct ggatccactt tgcattctgg aattccatca 240

aggttcagTg gcagtggatc tggTcacagat ttcaTctca ccatcagtag cctggatcct 300

gaagattttg caatgtatta ctgtcaacag cataatgatt acccgtacac gttcggaggg 360

gggaccaagc tggagataaa acgggct 387

<210> 79
<211> 405
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 79

atgagagtgc tgattctttt gtggctgttc acagcctttc ctggtatcct gctctgatgtg 60
 cagcttcagg agtcgggacc tggcctgggtg aagccttctc agtctctgtc cctcacctgc 120
 actgtcactg gctactcaat caccagtgat tatgcctgga actggatccg gcagtttcca 180
 ggaaacaaac tggagtggat gggctacata agttacagtg gtagtactag ctacaacca 240
 tctctcaaaa gtcgaatctc tctactcga gacacatcca agaaccagt tctcctgcag 300
 ttgaattctg tgactactga ggacacagcc acatattttt gtgcaagaga ctacggctac 360
 gctcttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 405

<210> 80

<211> 399

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 80

atggagacag acacactcct gttatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
 gacattgtgc tgacacagtc tctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gggggccacc 120
 atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atacttatat gcaactgtac 180
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc ttgcatcaa cctagaatct 240
 ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 300
 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtgggga gettctctcc 360
 tcgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgggct 399

<210> 81

<211> 429

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 81

atgaacttcg ggctcagctt gattttcctt gccctcattt taaaaggtgt ccagtgtgag 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggagactta gtgaagcctg gagggtcctt gaaactctcc 120

tgtgcagtct ctggattcac tttcagtagc tatggcatgt cttgggttcg ccagactcca 180

gacaagaggc tggagtgggt cgcaaccgtt agtagtggtg gtacttacac ctactatcca 240

gacagtgtga aggggcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300

caaatgagca gtctgaagtc tgaggactca gccatgtatt actgtgcaag acatagggga 360

aactactatg ctacttatta ctatgctatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc 420

gtctcctcg 429

<210> 82

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

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

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

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

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

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

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

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

<210> 83
<211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 83

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

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Phe
20 25 30

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

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

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

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

Val Arg Ser Gly Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 84
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 84

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

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

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

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

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

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

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

<210> 85
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 85

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

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

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

Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 86
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 86

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

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

Gly Tyr Thr Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu 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 Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Gly
 85 90 95

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

Ala

- <210> 87
- <211> 124
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 87

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

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

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

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

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Arg Gly Asn Tyr Tyr Ala Thr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 88
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Thr Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

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

<210> 89
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 89

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

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

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

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

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

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

Ala Arg His Arg Gly Asn Tyr Tyr Ala Thr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 90
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 90

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

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

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

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

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

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

Ala Arg His Arg Gly Asn Tyr Tyr Ala Thr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 91

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

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

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

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

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

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

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

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

<210> 92
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 92

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

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

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

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

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

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

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

<210> 93

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

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

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

100

105

110

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 94

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

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

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

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 95

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

<400> 95

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

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

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

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

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

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

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

<210> 96
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 96

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

Glu Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Gly Val Ser Asn Asp

20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 97
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 97

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

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

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

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

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

100

105

110

Ser Ser