



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0108430
 (43) 공개일자 2013년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-7018236
 (22) 출원일자(국제) 2011년12월09일
 심사청구일자 2013년07월25일
 (85) 번역문제출일자 2013년07월12일
 (86) 국제출원번호 PCT/IB2011/055595
 (87) 국제공개번호 WO 2012/080926
 국제공개일자 2012년06월21일
 (30) 우선권주장
 61/423,578 2010년12월15일 미국(US)
 61/552,578 2011년10월28일 미국(US)

(71) 출원인
와이어쓰 엘엘씨
 미합중국 뉴저지주 07940-0874 매디슨 파이프 지
 랄다 팜즈
 (72) 발명자
겔레스, 케네쓰, 지.
 미국 10965 뉴욕 펄 리버 빌딩 140 - 4층 플로어
 노스 미들타운 로드 401 화이자 인크.
조우, 빈-빙, 스티븐
 미국 07423 뉴저지 호 호 코스 프레스코트 로드
 18
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
김영, 양영준

전체 청구항 수 : 총 45 항

(54) 발명의 명칭 **항-노치1 항체**

(57) 요약

본 발명은 노치1에 결합하는 항체를 제공한다. 본 개시는 또한 상기 항체의 제조 방법, 이들 항체를 포함하는 제약 조성물, 그리고 상기 항체 및 제약 조성물을 사용한 장애의 치료 방법을 제공한다.

(72) 발명자

트치스티아코바, 리오우드밀라, 젠나디에브나

미국 02140 매사추세츠 캠프리지 캠프리지 파크 드
라이브 87 화이자 글로벌 리서치 앤드 디벨롭먼트

가오, 이지예

미국 02140 매사추세츠 캠프리지 캠프리지 파크 드
라이브 87 화이자 글로벌 리서치 앤드 디벨롭먼트

바드, 조엘

미국 02140 매사추세츠 캠프리지 캠프리지 파크 드
라이브 87 화이자 글로벌 리서치 앤드 디벨롭먼트

특허청구의 범위

청구항 1

노치1에 결합하며, 서열 71을 포함하는 중쇄 가변 영역으로부터의 CDR1 영역, CDR2 영역 및 CDR3 영역을 가지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 2

노치1에 결합하며, 서열 97을 포함하는 경쇄 가변 영역으로부터의 CDR1 영역, CDR2 영역 및 CDR3 영역을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 3

노치1에 결합하며,

서열 71에 나타난 바와 같은 중쇄 가변 영역으로부터의 CDR1 영역, CDR2 영역 및 CDR3 영역을 가지는 중쇄 가변 영역, 및

서열 97에 나타난 바와 같은 경쇄 가변 영역으로부터의 CDR1 영역, CDR2 영역 및 CDR3 영역을 가지는 경쇄 가변 영역

을 포함하는 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 71과 90% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 항체.

청구항 5

제4항에 있어서, 서열 71에 제시되어 있는 바와 같은 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 항체.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 97과 90% 이상 동일한 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 항체.

청구항 7

제6항에 있어서, 서열 97에 제시되어 있는 바와 같은 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 항체.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 111과 90% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체.

청구항 9

제8항에 있어서, 서열 111에 제시되어 있는 바와 같은 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체.

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 113과 90% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체.

청구항 11

제10항에 있어서, 서열 113에 제시되어 있는 바와 같은 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체.

청구항 12

노치1에 결합하며,

서열 71과 90% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 아미노산 서열; 및

서열 97과 90% 이상 동일한 경쇄 가변 아미노산 서열을 포함하는 항체.

청구항 13

노치1에 결합하며,
서열 71에 제시되어 있는 바와 같은 중쇄 가변 영역 아미노산 서열; 및
서열 97에 제시되어 있는 바와 같은 경쇄 가변 아미노산 서열을 포함하는 항체.

청구항 14

노치1에 결합하며,
서열 111과 90% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열; 및
서열 113과 90% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체.

청구항 15

노치1에 결합하며,
서열 111에 제시되어 있는 바와 같은 중쇄 아미노산 서열; 및
서열 113에 제시되어 있는 바와 같은 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체.

청구항 16

노치1에 결합하며, 노치1에의 결합에 대하여 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 항체와 경쟁하는 항체.

청구항 17

노치1에 결합하며, Asn 1461, Lys 1462, Val 1463, Cys 1464, Leu 1466, Leu 1580, Tyr 1621, Gly 1622, Met 1670, Asp 1671, Val 1672, Arg 1673, Leu 1707, Ala 1708, Leu 1710, Leu 1711, Leu 1712, Leu 1713, Leu 1716 및 Leu 1718에서 선택되는 7개 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 에피토프에 결합하는, 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM 분자이거나, 또는 그로부터 유래되는 항체.

청구항 19

제18항에 있어서, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군에서 선택되는 하위부류를 가지는 IgG이거나, 또는 그로부터 유래되는 항체.

청구항 20

제19항에 있어서, 하위부류가 IgG1로부터 유래되는 것인 항체.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 항체를 코딩하는 핵산.

청구항 22

서열 112에 제시되어 있는 바와 같은 서열을 포함하는 핵산.

청구항 23

서열 114에 제시되어 있는 바와 같은 서열을 포함하는 핵산.

청구항 24

제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 25

제24항에 따른 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 26

제25항에 따른 숙주 세포를 배양하는 것, 및 배양 배지로부터 항체를 회수하는 것을 포함하는, 항체의 제조 방법.

청구항 27

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 항체를 제조함으로써 생성시키는 숙주 세포.

청구항 28

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 29

장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 제28항에 따른 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서의 장애의 치료 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 장애가 노치1의 이상 활성화와 연관되어 있는 것인 방법.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서, 상기 장애가 그의 치료를 필요로 하는 대상체에서의 T-세포 급성 림프모구성 백혈병 (T-ALL), 비-소세포 폐암 (NSCLC) 및 유방암으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 32

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 요법에 사용하기 위한 항체.

청구항 33

의약의 제조를 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 항체의 용도.

청구항 34

제32항 또는 제33항에 있어서, 상기 용도가 치료를 필요로 하는 대상체에서의 T-세포 급성 림프모구성 백혈병 (T-ALL), 비-소세포 폐암 (NSCLC) 및 유방암의 치료를 위한 것인 용도.

청구항 35

노치1에 결합하며,

서열 115에 제시되어 있는 바와 같은 중쇄 가변 영역 아미노산 서열; 및

서열 129에 제시되어 있는 바와 같은 경쇄 가변 아미노산 서열

을 포함하는 항체.

청구항 36

노치1에 결합하며,
 서열 149에 제시되어 있는 바와 같은 중쇄 아미노산 서열; 및
 서열 151에 제시되어 있는 바와 같은 경쇄 아미노산 서열
 을 포함하는 항체.

청구항 37

인간 노치1에 결합하며, Asp 1458, Asn 1461, Val 1463, Cys 1464, Leu 1466, Leu 1580, Met 1581, Pro 1582, Tyr 1621, Gly 1622, Arg 1623, Asp 1671, Val 1672, Arg 1673, Gly 1674, Leu 1710, Gly 1711, Ser 1712, Leu 1713, Asn 1714, Ile 1715, Pro 1716 및 Lys 1718에서 선택되는 8개 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 에 피토프에 결합하는 항체.

청구항 38

천연 노치1 수용체의 노치1 활성화의 억제에 비해 더 높은 돌연변이 노치1 수용체의 노치1 활성화의 억제를 나타내는 항체.

청구항 39

제35항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 40

장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 제35항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 제39항에 따른 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서의 장애의 치료 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 장애가 노치1의 이상 활성화와 연관되어 있는 것인 방법.

청구항 42

제40항 또는 제41항에 있어서, 상기 장애가 그의 치료를 필요로 하는 대상체에서의 T-세포 급성 림프모구성 백혈병 (T-ALL), 비-소세포 폐암 (NSCLC) 및 유방암으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 43

제35항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 요법에 사용하기 위한 항체.

청구항 44

의약의 제조를 위한 제35항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 항체의 용도.

청구항 45

제43항 또는 제44항에 있어서, 상기 용도가 치료를 필요로 하는 대상체에서의 T-세포 급성 림프모구성 백혈병 (T-ALL), 비-소세포 폐암 (NSCLC) 및 유방암의 치료를 위한 것인 용도.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 항-노치1 항체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 암의 치료에서의 상기 항체의 사용 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 노치 수용체는 다세포 유기체에서 리간드-유도 단백질분해에 의해 촉발되는 신호전달 경로를 통하여 정상 세포 성장, 분화 및 사멸을 조절한다 (문헌 [Bray, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7(9):678-689, 2006]). 부위 S1에서의 퓨린-유사 프로테아제 절단 후의 성숙한 노치 이종이량체는 3개의 Lin12/Notch 반복체 (LNR-A, B, C) 및 이종이량체화 (HD) 도메인으로 구성되는 막근접(juxtamembrane) 음성 조절 영역 (NRR)에 의해 자가-억제 상태로 유지된다. HD 도메인은 부위 S1에서의 절단에 의해 N-말단 (HD1) 및 C-말단 (HD2) 절반체로 분할되어 있다. 분명하지 않은 기작을 통하여, N-말단의 EGF-반복 영역에 대한 델타(Delta)/세레이트(Serrate)/Lag-2 (DSL) 즉 리간드의 결합은 이와 같은 억제를 완화하고, C-말단 영역 HD-2 부근의 S2, 및 노치의 막형단 도메인 내 S3에서 각각 ADAM-유형 메탈로프로테이나제 및 감마-세크레타제에 의해 촉매촉진되는 2회의 연속적인 추가 절단을 유도한다 (문헌 [Gordon, W.R., et.al, Nature Structural & Molecular Biology, 2007, volume 14, 295-300]). 후자의 절단은 노치의 세포내 도메인 (노치^{ICD})을 방출시킴으로써, 그것이 핵으로 이동하여 표적 유전자의 전사를 활성화하는 것을 가능케 한다.

[0003] 포유동물 세포에는, 4종의 알려져 있는 노치 수용체가 존재한다. 노치 1-4는 배아 및 성체 조직에서 광범위하게 중복되는 발현 패턴을 가지며, 조혈 줄기 세포 분화, T 세포 발생, 장 음(crypt) 세포 분화 및 혈관 발생 동안 대체불가능한 역할을 수행한다. 특정 노치1 수용체와 연관된 후천성 이상이 T 세포 급성 림프모구성 백혈병 (T-ALL), 유방암 및 폐암과 같은 암에 연루된 바 있다. 또한, 활성화된 노치1은 무린 모델에서 강력한 백혈병 유도제이며, 비-소세포 폐암, 유방암 및 난소암을 포함한 다양한 고형 종양들에서 과발현된다.

[0004] 50%를 초과하는 T-ALL 환자가 노치1 수용체의 돌연변이들을 보유하며, 그들 중 일부는 부분적으로 NRR 자가-억제 도메인 또는 그 부근에서의 변경에 의해 야기되는 노치1 리간드-과민 또는 리간드-무관 활성화에 기인하는 상시성의 수용체 절단 및 노치1^{ICD} 생성을 초래한다. 이러한 돌연변이들은 3개의 주요 부류로 범주화된다. 부류 1 돌연변이는 HD1에서의 단일 아미노산 치환, 및 소형 인프레임 결실 또는 삽입이다. 부류 2 돌연변이는 S2-메탈로프로테아제 절단 부위를 자가-억제 NRR 도메인 너머로 이동시키는 HD2 말단 영역에서의 더 긴 삽입이다. 막근접 확대 (JME) 돌연변이로도 지칭되는 부류 3 돌연변이는 NRR을 세포 막으로부터 떨어뜨리는 대규모 삽입으로부터 발생한다.

[0005] 암에서의 치료 목적을 위하여 노치 신호전달을 억제하는 몇 가지 전략이 개발 중에 있다. 한 가지 접근법은 감마-세크레타제의 억제제 (GSI)를 사용한 치료에 의해 막으로부터의 세포내 노치의 단백질분해 방출을 차단하는 것이다. GSI가 임상까지 진행되어 있기는 하였지만, 그것은 개별 노치 수용체들을 구분할 수 없고, 노치1 및 노치2 양자의 억제에 기인하는 장 독성을 야기한다. 업계에는, 감소된 부작용, 특히 장 독성을 동시에 제공하는 암 치료용의 신규 항-노치1 요법에 대한 요구가 여전히 존재한다.

발명의 내용

[0006] **발명의 개요**

[0007] 한 실시양태에서, 본 발명은 노치1에 결합하며, 서열 71을 포함하는 중쇄 가변 영역으로부터의 CDR1 영역, CDR2 영역 및 CDR3 영역을 가지는 중쇄 가변 영역을 가지는 항체를 제공한다.

[0008] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 노치1에 결합하며, 서열 97을 포함하는 경쇄 가변 영역으로부터의 CDR1 영역, CDR2 영역 및 CDR3 영역을 가지는 경쇄 가변 영역을 가지는 항체를 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한 노치1에 결합하며, 1) 서열 71을 포함하는 중쇄 가변 영역으로부터의 CDR1 영역, CDR2 영역 및 CDR3 영역을 가지는 중쇄 가변 영역, 및 2) 서열 97을 포함하는 경쇄 가변 영역으로부터의 CDR1 영역, CDR2 영역 및 CDR3 영역을 가지는 경쇄 가변 영역을 가지는 항체를 제공한다.

[0010] 역시 제공되는 것은 노치1에 결합하며, 서열 71과 90% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 가지는 항체이다. 추가 제공되는 것은 노치1에 결합하며, 서열 71에 제시되어 있는 바와 같은 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 가지는 항체이다.

[0011] 역시 제공되는 것은 노치1에 결합하며, 서열 97과 90% 이상 동일한 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 가지는 항체이다. 추가 제공되는 것은 노치1에 결합하며, 서열 97에 제시되어 있는 바와 같은 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 가지는 항체이다.

[0012] 역시 제공되는 것은 노치1에 결합하며, 서열 111과 90% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열을 가지는 항체이다. 추가 제공되는 것은 노치1에 결합하며, 서열 111에 제시되어 있는 바와 같은 중쇄 아미노산 서열을 가지는 항체

이다.

- [0013] 역시 제공되는 것은 서열 113과 90% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 가지는 항체이다. 추가 제공되는 것은 서열 113에 제시되어 있는 바와 같은 경쇄 아미노산 서열을 가지는 항체이다.
- [0014] 다른 실시양태에서, 본 발명은 노치1에 결합하며, 서열 71과 90% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 아미노산 서열; 및 서열 97과 90% 이상 동일한 경쇄 가변 아미노산 서열을 가지는 항체를 제공한다. 추가 제공되는 것은 노치1에 결합하며, 서열 71에 제시되어 있는 바와 같은 중쇄 가변 영역 아미노산 서열; 및 서열 97에 제시되어 있는 바와 같은 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 가지는 항체이다.
- [0015] 다른 실시양태에서, 본 발명은 노치1에 결합하며, 서열 111과 90% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열; 및 서열 113과 90% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 가지는 항체를 제공한다. 추가 제공되는 것은 노치1에 결합하며, 서열 111에 제시되어 있는 바와 같은 중쇄 아미노산 서열; 및 서열 113에 제시되어 있는 바와 같은 경쇄 아미노산 서열을 가지는 항체이다.
- [0016] 다른 실시양태에서, 본 발명은 인간 노치1에 결합하며, Asn 1461, Lys 1462, Val 1463, Cys 1464, Leu 1466, Leu 1580, Tyr 1621, Gly 1622, Met 1670, Asp 1671, Val 1672, Arg 1673, Leu 1707, Ala 1708, Leu 1710, Leu 1711, Leu 1712, Leu 1713, Leu 1716 및 Leu 1718에서 선택되는 8개 이상의 아미노산 잔기를 가지는 에피토프(epitope)에 결합하는 항체를 제공한다.
- [0017] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 노치1에 결합하며, 서열 115를 포함하는 중쇄 가변 영역으로부터의 CDR1 영역, CDR2 영역 및 CDR3 영역을 가지는 중쇄 가변 영역을 가지는 항체를 제공한다.
- [0018] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 노치1에 결합하며, 서열 129를 포함하는 경쇄 가변 영역으로부터의 CDR1 영역, CDR2 영역 및 CDR3 영역을 가지는 경쇄 가변 영역을 가지는 항체를 제공한다.
- [0019] 본 발명은 또한 노치1에 결합하며, 1) 서열 115를 포함하는 중쇄 가변 영역으로부터의 CDR1 영역, CDR2 영역 및 CDR3 영역을 가지는 중쇄 가변 영역, 및 2) 서열 129를 포함하는 경쇄 가변 영역으로부터의 CDR1 영역, CDR2 영역 및 CDR3 영역을 가지는 경쇄 가변 영역을 가지는 항체를 제공한다.
- [0020] 역시 제공되는 것은 노치1에 결합하며, 서열 115와 90% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 가지는 항체이다. 추가 제공되는 것은 노치1에 결합하며, 서열 115에 제시되어 있는 바와 같은 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 가지는 항체이다.
- [0021] 역시 제공되는 것은 노치1에 결합하며, 서열 129와 90% 이상 동일한 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 가지는 항체이다. 추가 제공되는 것은 노치1에 결합하며, 서열 129에 제시되어 있는 바와 같은 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 가지는 항체이다.
- [0022] 역시 제공되는 것은 노치1에 결합하며, 서열 149와 90% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열을 가지는 항체이다. 추가 제공되는 것은 노치1에 결합하며, 서열 149에 제시되어 있는 바와 같은 중쇄 아미노산 서열을 가지는 항체이다.
- [0023] 역시 제공되는 것은 서열 151과 90% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 가지는 항체이다. 추가 제공되는 것은 서열 151에 제시되어 있는 바와 같은 경쇄 아미노산 서열을 가지는 항체이다.
- [0024] 다른 실시양태에서, 본 발명은 노치1에 결합하며, 서열 115와 90% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 아미노산 서열; 및 서열 129와 90% 이상 동일한 경쇄 가변 아미노산 서열을 가지는 항체를 제공한다. 추가 제공되는 것은 노치1에 결합하며, 서열 115에 제시되어 있는 바와 같은 중쇄 가변 영역 아미노산 서열; 및 서열 129에 제시되어 있는 바와 같은 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 가지는 항체이다.
- [0025] 다른 실시양태에서, 본 발명은 노치1에 결합하며, 서열 149와 90% 이상 동일한 중쇄 아미노산 서열; 및 서열 151과 90% 이상 동일한 경쇄 아미노산 서열을 가지는 항체를 제공한다. 추가 제공되는 것은 노치1에 결합하며, 서열 149에 제시되어 있는 바와 같은 중쇄 아미노산 서열; 및 서열 151에 제시되어 있는 바와 같은 경쇄 아미노산 서열을 가지는 항체이다.
- [0026] 다른 실시양태에서, 본 발명은 인간 노치1에 결합하며, Asp 1458, Asn 1461, Val 1463, Cys 1464, Leu 1466, Leu 1580, Met 1581, Pro 1582, Tyr 1621, Gly 1622, Arg 1623, Asp 1671, Val 1672, Arg 1673, Gly 1674, Leu 1710, Gly 1711, Ser 1712, Leu 1713, Asn 1714, Ile 1715, Pro 1716 및 Lys 1718에서 선택되는 8개 이상의 아미노산 잔기를 가지는 에피토프에 결합하는 항체를 제공한다.

- [0027] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 천연 노치1 수용체의 노치1 활성화의 억제에 비해 더 높은 돌연변이 노치1 수용체의 노치1 활성화의 억제를 나타내는 항체를 제공한다. 돌연변이 노치1 수용체가 음성 조절 영역 (NRR)에 돌연변이를 가지는 것 또한 제공된다. 다른 실시양태에서, NRR에서의 상기 돌연변이는 부류 1, 부류 2 및 부류 3 돌연변이로 이루어진 군에서 선택된다. 다른 실시양태에서는, NRR에서의 상기 돌연변이가 노치1의 이상 활성화를 가지는 세포와 연관된다. 세포가 T-세포 급성 림프모구성 백혈병 (T-ALL) 세포인 것 또한 제공된다. 상기 T-ALL 세포가 HPB-ALL, ALL-SIL, CCRF-CEM, MOLT-4 및 DND-41 세포로 이루어진 군에서 선택되는 것 역시 제공된다.
- [0028] 역시 제공되는 것은 노치1에 결합하며, 노치1에의 결합에 대하여 본원에서 기술되는 임의의 항체와 경쟁하는 항체이다.
- [0029] 다른 실시양태에서, 본 발명은 노치1에 결합하며, 이소형 IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM의 것인 항체를 제공한다. 추가 제공되는 것은 노치1에 결합하며, 이소형이 IgG이고, 하위부류가 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 이거나 그로부터 유래되는 항체이다. 역시 제공되는 것은 노치1에 결합하며, 하위부류가 IgG1로부터 유래되는 항체이다.
- [0030] 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에서 기술되는 임의의 항체를 코딩하거나, 본원에서 기술되는 항체의 임의의 중쇄 및/또는 경쇄를 코딩하는 핵산을 제공한다. 예를 들어 한 실시양태에서, 본 발명은 서열 112에 제시되어 있는 바와 같은 서열을 가지는 핵산을 제공한다. 다른 실시양태에서, 본 발명은 서열 114에 제시되어 있는 바와 같은 서열을 가지는 핵산을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 서열 150에 제시되어 있는 바와 같은 서열을 가지는 핵산을 제공한다. 다른 실시양태에서, 본 발명은 서열 152에 제시되어 있는 바와 같은 서열을 가지는 핵산을 제공한다.
- [0031] 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에서 기술되는 임의의 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에서 기술되는 임의의 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에서 기술되는 임의의 숙주 세포를 배양하는 것, 및 배양 배지로부터 항체를 회수하는 것을 포함하는, 본원에서 기술되는 임의의 항체의 제조 방법을 제공한다. 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에서 기술되는 임의의 항체를 재조합으로 생성시키는 숙주 세포를 제공한다. 한 실시양태에서는, 본원에서 기술되는 임의의 숙주 세포가 단리된다.
- [0032] 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에서 기술되는 임의의 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에서 기술되는 임의의 항체 또는 제약 조성물을 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서의 장애의 치료 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 본원에서 기술되는 임의의 항체 또는 제약 조성물을 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서의 노치1 이상 활성화와 연관된 장애의 치료 방법을 제공한다. 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에서 기술되는 임의의 항체 또는 제약 조성물을 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서의 T-세포 급성 림프모구성 백혈병 (T-ALL), 비-소세포 폐암 (NSCLC), 유방암 및 결장암과 같은 장애의 치료 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 본원에서 기술되는 임의의 항체 또는 제약 조성물을 1종 이상 치료제와의 조합으로써 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서의 장애의 치료 방법을 제공한다.
- [0033] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 요법에 사용하기 위한 본원에서 개시되는 임의의 항체를 제공한다. 다른 실시양태에서, 본 발명은 치료용 의약의 제조를 위한 본원에서 개시되는 임의의 항체의 용도를 제공한다. 다른 실시양태에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상체에서 노치1 이상 활성화와 연관된 장애를 치료하는 데에 사용하기 위한 본원에서 개시되는 임의의 항체를 제공한다. 다른 실시양태에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상체에서 T-세포 급성 림프모구성 백혈병 (T-ALL), 비-소세포 폐암 (NSCLC), 유방암 및 결장암과 같은 장애를 치료하는 데에 사용하기 위한 본원에서 개시되는 임의의 항체를 제공한다.
- [0034] 다른 실시양태에서, 본 발명은 인간, 마우스 및 시노몰구스(cynomolgus) (이하 "시노(cyno)") 노치1에는 결합하나 인간 노치2에는 결합하지 않는 항체를 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 인간, 마우스 및 시노노치1에는 결합하나 인간 및 마우스 노치3에는 결합하지 않는 항체를 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1은 Avi 및 His 태그를 가지는 재조합 S-1 절단 이중이량체 노치1 NRR 단백질 면역원의 개략도를 나타낸다.

- 도 2는 항-노치1 항체 래트 351-mIgG1, 래트 438-mIgG1 및 A2의 에피토프 매핑을 위한 재조합 인간 노치1 NRR 및 노치3 NRR 도메인 교환 키메라 구축물을 나타낸다.
- 도 3은 인간 노치1 NRR상 래트 438 에피토프의 구조도를 나타낸다.
- 도 4는 인간 노치1 NRR상 래트 351 에피토프의 구조도를 나타낸다.
- 도 5는 인간 노치1 NRR상 A2 에피토프의 구조도를 나타낸다.
- 도 6은 래트 438 및 A2 항체에 결합된 노치1 NRR 구조의 중첩상태를 나타낸다.
- 도 7은 래트 351 및 A2 항체 (분자 표면으로 나타냄)에 결합된 노치1 NRR (리본으로 나타냄) 구조의 중첩상태를 나타낸다.
- 도 8은 인간 노치1 리포터 세포에서의 노치1 의존성 신호전달에 대한 인간화 438 VH1.1/VL1.8, 래트 438-mIgG1 및 A2 항체의 중화 활성을 나타낸다.
- 도 9는 마우스 노치1 리포터 세포에서의 노치1 의존성 신호전달에 대한 인간화 438 VH1.1/VL1.8, 래트 438-mIgG1 및 A2 항체의 중화 활성을 나타낸다.
- 도 10은 인간 노치1 신호전달에 대한 래트 351 및 A2 항체의 중화 활성을 나타낸다.
- 도 11은 마우스 노치1 신호전달에 대한 래트 351 및 A2 항체의 중화 활성을 나타낸다.
- 도 12는 인간 노치1 리포터 세포에서의 노치1 의존성 신호전달에 대한 인간화 351 변이체, 래트 351-mIgG1 및 A2 항체의 중화 활성을 나타낸다.
- 도 13은 마우스 노치1 리포터 세포에서의 노치1 의존성 신호전달에 대한 인간화 351 변이체, 래트 351-mIgG1 및 A2 항체의 중화 활성을 나타낸다.
- 도 14a 및 14b는 LNR-A 영역에서의 래트 351과 노치1 NRR 사이의 상호작용 경계면 구조도를 나타낸다.
- 도 15는 공동-배양 리포터 유전자 검정에서의 래트 351, 돌연변이 래트 351 및 A2의 중화 활성을 나타낸다.
- 도 16은 래트 438, 래트 351 및 A2, 그리고 대조 배지 단독 및 항-VEGF 항체를 사용한 처리 10일차에서의 HUVEC-발아물 CD31-Cy3 면역염색의 대표적인 외형광 이미지를 나타낸다.
- 도 17은 래트 438-mIgG1, 래트 351-mIgG1 및 A2 항체, 그리고 대조 항-E.테넬라 항체를 사용한 처리 및 미처리 후 혈관생성의 마우스 망막 모델에서의 이소렉틴 B4-알렉사488 염색의 대표적인 공초점 이미지를 나타낸다.
- 도 18은 재조합 인간 DLL4 리간드상에 플레이팅되어 점증 농도의 래트 351, 래트 438 및 A2, 그리고 대조 항-E.테넬라 항체로 처리된 CCD1076SK 인간 섬유모세포로부터 생성된 단백질 추출물의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다.
- 도 19는 점증 농도의 인간화 438 VH1.1/VL1.8, 래트 438-mIgG1, 및 대조 항-E.테넬라 항체로 처리된 HBP-ALL 세포로부터 생성된 단백질 추출물의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다.
- 도 20은 점증 농도의 래트 351-mIgG1, 래트 438-mIgG1 및 A2, 그리고 대조 항-E.테넬라 항체를 사용하여 처리된 T-ALL 세포주로부터 생성된 단백질 추출물의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다.
- 도 21은 37622A1 NSCLC 환자 유래 이중이식편에서의 노치1 수용체 및 자기트1 리간드의 면역조직화학적 검출을 나타낸다.
- 도 22는 37622A1 NSCLC 환자 유래 이중이식편이 인간 K-ras 유전자에 G13V 돌연변이를 보유한다는 것을 표시하는 크로마토그램을 나타낸다.
- 도 23은 래트 438-mIgG1, A2 및 대조 항-E.테넬라 항체를 사용하여 처리된 37622A1 NSCLC 환자 유래 이중이식편 으로부터 생성된 단백질 추출물의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다.
- 도 24는 래트 351-mIgG1 및 대조 항-E.테넬라 항체를 사용하여 처리된 87393A1 NSCLC 환자 유래 이중이식편에서 생성된 단백질 추출물의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다.
- 도 25는 래트 351-mIgG1 및 대조 항-E.테넬라 항체를 사용한 처리 후 87393A1 NSCLC 환자 유래 이중이식편에서의 인블루크린 발현의 면역조직화학적 검출을 나타낸다.

도 26은 래트 351-mIgG1 및 대조 항-E.테넬라 항체를 사용한 처리 후 87393A1 NSCLC 환자 유래 이중이식편에서의 인플루크린 발현의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다.

도 27은 래트 438-mIgG1, A2 및 대조 항-E.테넬라 항체를 사용하여 처리된 칼루-6 효능 연구로부터의 마우스 장 회장 절편에서의 알시안 블루 염색을 사용한 분비성 술잔 세포의 조직화학적 확인을 나타낸다.

도 28은 래트 438-mIgG1, A2 및 대조 항-E.테넬라 항체를 사용하여 처리된 칼루-6 효능 연구로부터의 마우스 장 움에서의 항-Ki67 면역조직화학을 나타낸다.

도 29는 래트 351-mIgG1 및 대조 항-E.테넬라 항체를 사용하여 처리된 87393A1 환자 유래 이중이식편 효능 연구로부터의 마우스 장 움에서의 항-Ki67 면역조직화학을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 본 발명은 단리된 항체, 구체적으로는 노치1에 결합하는 인간, 인간화, 키메라 및 래트 모노클로날 항체에 관한 것이다. 또한, 본 개시는 천연 노치1 수용체의 노치1 활성화의 억제에 비해 더 높은 돌연변이 노치1 수용체의 노치1 활성화의 억제를 나타내는 단리 항체를 제공한다. 본 개시는 단리된 항체 및 그와 같은 항체의 제조 방법, 그리고 상기 항체를 함유하는 제약 조성물을 제공한다. 본 개시는 또한 그와 같은 항체들을 함유하는 면역 접합체(immunoconjugate) 및 이중특이적(bispecific) 분자에 관한 것이다. 본 개시는 또한 노치1 활성화를 억제하고, 암 (예컨대 T-세포 급성 림프모구성 백혈병 (T-ALL), 비-소세포 폐암 (NSCLC), 결장암, 유방암 및 난소암)과 같은 비정상적인 세포 성장과 관련된 다양한 질환을 치료하기 위한 상기 항체의 사용 방법에 관한 것이다.

[0037] 일반적인 기술

[0038] 다르게 표시되지 않는 한, 본 발명의 방법 및 기술들은 일반적으로 업계에 잘 알려져 있는 통상적인 방법에 따라, 그리고 다르게 표시되지 않는 한 본 명세서 전체에 걸쳐 인용 및 논의되는 다양한 일반적이면서도 구체적인 참고문헌들에 기술되어 있는 바와 같이 수행된다. 예를 들어, 본원에 참조로써 개제되는 문헌 [Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)] 및 [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992)], 그리고 [Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)]을 참조하라.

[0039] 정의

[0040] "노치1" 또는 "노치-1"은 인간 노치1 단백질의 천연체, 변이체, 이소형 및 중 상동체를 지칭한다. 천연의 인간 노치1 단백질은 예를 들어 리더(leader) 펩티드, 대형 표피 성장 인자 (EGF)-유사 반복 영역, 3개의 Lin12 반복체, N 말단 이중이량체화 도메인 (HD-1), C 말단 이중이량체화 도메인 (HD-2), 막횡단 (TM) 서열 및 세포내 도메인 (노치1^{ICD})으로 이루어진다. 전장 인간 노치1의 NCBI/GenBank 등재 번호는 NM_017617.2이다.

[0041] 다르게 표시되지 않는 한, 본원에서 사용될 때의 "노치1 음성 조절 영역" 또는 "노치1 NRR"은 3개의 Lin12 도메인, 그리고 3개 Lin12 도메인들 사이에 위치하는 아미노산 서열 또는 서열들, 더하기 노치1의 HD1 및 HD2 도메인으로 구성되는 노치1의 소정 천연 또는 합성 폴리펩티드 영역을 지칭한다. 한 실시양태에서, "노치1 NRR"에는 3개의 Lin12 도메인과 2개의 이중이량체화 도메인 HD-1 및 HD-2가 포함되며, 여기서 노치1의 상기 HD-1 및 HD-2 도메인은 공유 결합되어 있고, 아직 푸린-유사 프로테아제에 의해 절단되어 있지 않다 (S1 절단 전임). 또 다른 실시양태에서, "노치1 NRR"에는 3개의 Lin12 도메인과 2개의 이중이량체화 도메인 HD-1 및 HD-2가 포함되며, 여기서 HD-1 및 HD-2 도메인은 비-공유로 결합되어 있다 (S1 절단 후임). 이와 같은 실시양태의 한 측면에서, HD-2 도메인 내의 S2 부위는 ADAM-유형 메탈로프로테아제에 의해 절단되어 있지 않다. 이와 같은 실시양태의 또 다른 구체적인 측면에서는, HD-2 도메인 내의 S2 부위가 ADAM-유형 메탈로프로테아제에 의해 절단되는 중이거나 이미 절단되어 있다 (문헌 [Gordon, W.R., et.al, Nature Structural & Molecular Biology, 2007, volume 14, 295-300]).

[0042] "항체"는 이뮤노글로불린 분자의 가변 영역에 위치하는 하나 이상의 항원 인식 부위를 통하여 탄수화물, 폴리뉴클레오티드, 지질, 폴리펩티드 등과 같은 표적에 대한 특이적 결합을 할 수 있는 이뮤노글로불린 분자이다. 본원에서 사용될 때, 상기 용어는 무손상의 폴리클로날 또는 모노클로날 항체뿐만 아니라, 그의 단편 (예를 들어 항원 결합 부분) (예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), 단일쇄 (ScFv) 및 도메인 항체 예컨대 샤크(shark) 및 카멜

리드(camelid) 항체, 그리고 항체 일부 (예컨대 도메인 항체)를 포함하는 융합 단백질, 및 항원 인식 부위를 포함하는 임의의 다른 변형된 배열구조의 이뮤노글로불린 분자도 포괄한다. 항체에는 모든 부류의 항체, 예컨대 IgG, IgA 또는 IgM (또는 이들의 하위-부류)이 포함되며, 항체가 임의의 특정 부류의 것일 필요는 없다. 해당 중쇄 불변 영역의 항체 아미노산 서열에 따라, 이뮤노글로불린은 상이한 부류에 할당될 수 있다. IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM인 5개 주요 부류 (이소형)의 이뮤노글로불린이 존재하는데, 이들 중 몇몇은 하위부류, 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 추가 분할될 수 있다. 상기 상이한 부류의 이뮤노글로불린에 반응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 지칭된다. 상이한 부류의 이뮤노글로불린들의 하위단위 구조 및 3-차원 배열구조에 대해서는 잘 알려져 있다.

[0043] 본원에서 사용될 때, "단리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 가지는 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 지칭하고자 하는 것이다 (예컨대 노치1에 특이적으로 결합하는 단리 항체에는 노치1이 아닌 다른 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없음). 그러나, 노치1에 특이적으로 결합하는 단리 항체가 다른 종으로부터의 노치-1 분자와 같은 다른 항원에 대한 교차-반응성을 가질 수는 있다. 또한, 단리 항체에는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질도 실질적으로 없을 수 있다.

[0044] 본원에서 사용될 때, "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체들의 군집으로부터 획득되는 항체를 지칭하는데, 다시 말하자면 미량으로 존재할 수 있는 자연-발생 돌연변이의 가능성 이외에는, 군집을 구성하는 개체 항체들이 동일하다. 단일 항원 부위에 대하여 유도되기 때문에, 모노클로날 항체는 고도로 특이성이다.

[0045] "인간화된" 항체는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래되는 최소한의 서열을 함유하는 키메라 이뮤노글로불린, 이뮤노글로불린 쇠, 또는 이들의 단편 (예컨대 Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 기타 항원-결합 하위서열)인 비-인간 (예컨대 뮤린) 항체의 형태를 지칭한다. 바람직하게는, 인간화 항체는 수용자의 상보성 결정 영역(CDR)에 속하는 잔기가 원하는 특이성, 친화성 및 용량을 가지는 마우스, 래트, 또는 토끼와 같은 비-인간 중 (공여자 항체)의 CDR에 속하는 잔기로 치환되어 있는 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에는, 인간 이뮤노글로불린의 Fv 프레임워크 영역 (FW) 잔기가 상응하는 비-인간 잔기로 치환된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체는 물론 도입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서도 발견되지 않지만, 항체 성능을 추가적으로 정련 및 최적화하기 위하여 포함되는 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 CDR 영역의 전체 또는 실질적으로 전체가 비-인간 이뮤노글로불린의 것에 상응하고, FW 영역의 전체 또는 실질적으로 전체가 인간 이뮤노글로불린 공통 서열의 것인 하나 이상, 통상적으로는 2개 가변 도메인의 실질적으로 전체를 포함하게 된다. 인간화 항체는 최적으로는 또한 통상적으로 인간 이뮤노글로불린의 것인 이뮤노글로불린 불변 영역 또는 도메인 (Fc)의 일부 이상을 포함하게 된다. 다른 형태의 인간화 항체는 원래 항체 대비 변경되어 있으며, 원래 항체에 속하는 하나 이상 CDR"로부터 유래되는" 하나 이상의 CDR로도 지칭되는, 하나 이상의 CDR (L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1, H-CDR2, 또는 H-CDR3)을 가진다.

[0046] "인간 항체" 또는 "완전 인간 항체(fully human antibody)"는 프레임워크 및 CDR 영역 모두가 인간 생식계열 이뮤노글로불린 서열로부터 유래되는 가변 영역을 가지는 항체를 포함하고자 하는 것이다. 또한, 상기 항체가 불변 영역을 함유하는 경우, 상기 불변 영역 역시 인간 생식계열 이뮤노글로불린 서열로부터 유래한다. 본 개시의 인간 항체는 인간 생식계열 이뮤노글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예컨대 시험관내에서의 랜덤 또는 부위-특이적 돌연변이유발 또는 생체내에서의 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 인간 항체에 대한 이와 같은 정의에는 하나 이상의 인간 중쇄 폴리펩티드 또는 하나 이상의 인간 경쇄 폴리펩티드를 포함하는 항체가 포함된다. 인간 항체는 업계에 알려져 있는 다양한 기술을 사용하여 제조될 수 있다.

[0047] "키메라 항체"라는 용어는 가변 영역 서열이 마우스 항체로부터 유래하고 불변 영역 서열은 인간 항체로부터 유래되는 항체와 같이, 가변 영역 서열은 하나의 종으로부터 유래하고 불변 영역 서열은 또 다른 종으로부터 유래되는 항체를 지칭하고자 하는 것이다.

[0048] 본원에서 사용될 때, "재조합 항체"라는 용어에는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리되는 모든 항체가 포함된다. 그와 같은 재조합 항체는 프레임워크 및 CDR 영역이 생식계열 이뮤노글로불린 서열로부터 유래되는 가변 영역을 가진다. 그러나, 소정의 실시양태에서는, 그와 같은 재조합 항체가 시험관내 돌연변이유발 (또는 Ig 서열에 대하여 트랜스제닉인 동물이 사용되는 경우, 생체내 체세포 돌연변이유발)에 적용될 수 있으며, 그에 따라 재조합 항체 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열이 생식계열 VH 및 VL 서열로부터 유래하며 그와 관련되기는 하지만 생체내의 항체 생식계열 목록 내에 자연적으로 존재하지는 않을 수 있는 서열이다.

[0049] "항원을 인식하는 항체" 및 "항원에 대하여 특이적인 항체"라는 구는 본원에서 "항원에 특이적으로 결합하는 항

체"라는 용어와 호환가능하게 사용된다.

- [0050] 업계에 알려져 있는 바와 같이, "Fc 영역"이라는 용어는 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 영역 (CH2 + CH3)을 정의하는 데에 사용된다. "Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역 또는 변이체 Fc 영역일 수 있다.
- [0051] "천연 서열 Fc 영역"은 자연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. "변이체 Fc 영역"은 하나 이상의 아미노산 변형으로 인하여 천연 서열 Fc 영역의 것과 다르지만 아직 천연 서열 Fc 영역의 하나 이상 기능을 유지하는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0052] "Fc 수용체" 또는 "FcR"이라는 용어는 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기술하는 데에 사용된다. 예를 들어, 상기 FcR은 천연 서열 인간 FcR일 수 있다. 또한, 상기 FcR은 IgG 항체에 결합하여 (감마 수용체) Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII 및 Fc γ RIV 하위부류의 수용체들 (이러한 수용체들의 대립유전자 변이체 및 다르게 스플라이싱된 형태들 포함)을 유도하는 것일 수 있다. Fc γ RII 수용체에는 주로 해당 세포질 도메인에서 서로 다른 유사 아미노산 서열을 가지는 Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB ("억제 수용체")가 포함된다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 업계 숙련 자라면 알고 있을 바와 같이, 억제 수용체 Fc γ RIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다. FcR에 대해서는 광범위하게 고찰되어 있으며, 업계 숙련자에게 잘 알려져 있다. 본원에서는, 미래에 확인될 것들을 포함한 다른 FcR들도 "FcR"이라는 용어에 의해 포괄된다. 상기 용어에는 또한 태아에의 모계 IgG의 전달 및 IgG의 연장된 반감기를 담당하는 신생아 수용체 FcRn도 포함된다.
- [0053] "결합하다"라는 용어는 2개의 분자, 예를 들어 항원과 항체 사이의 친화성을 지칭한다. "노치1에 특이적으로 결합하는" 항체는 100배, 바람직하게는 1000배 이상의 K_D 차이를 가지는 다수의 상이한 항원들을 포함하는 샘플 중에서의 노치1 항원에 대한 항체의 선택적인 결합을 지칭한다.
- [0054] "높은 친화성"이라는 용어는 1×10⁻⁶ M 이하의 K_D, 더욱 바람직하게는 1×10⁻⁸ M 이하의 K_D를 가지는 항체를 지칭한다. 친화성은 예를 들어 표면 플라즈몬(Plasmon) 공명을 사용하여 측정될 수 있다.
- [0055] "에피토프"에는 면역글로불린 또는 T-세포 수용체에 대한 특이적 결합을 할 수 있는 소정의 단백질 결정인자가 포함된다. 에피토프 결정인자는 보통 아미노산 또는 당 측쇄와 같이 화학적으로 활성인 표면 분자단으로 구성되며, 보통 특정의 3차원 구조 특성은 물론 특정의 전하 특성을 가진다.
- [0056] 본원에서 사용될 때, "k_{on}"이라는 용어는 특정 항체-항원 상호작용의 온-속도(on-rate) 또는 결합 속도를 지칭하고자 하는 것인 반면, 본원에서 사용될 때의 "k_{off}"라는 용어는 특정 항체-항원 상호작용의 오프-속도(on-rate) 또는 해리 속도를 지칭하고자 하는 것이다. 본원에서 사용될 때, "K_D"라는 용어는 k_{off} 대 k_{on}의 비 (즉 k_{off}/k_{on})로부터 수득되며 몰 농도 (M)로 표현되는 평형 해리 상수를 지칭하고자 하는 것이다. 항체에 대한 K_D 값은 업계에 잘 알려져 있는 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 항체의 K_D를 측정하는 한 가지 방법은 표면 플라즈몬 공명을 사용하는 것, 통상적으로는 비아코어(Biacore)® 시스템과 같은 바이오센서 시스템을 사용하는 것에 의한다.
- [0057] 본원에서 "폴리펩티드", "올리고펩티드", "펩티드" 및 "단백질"이라는 용어는 바람직하게는 비교적 짧은 (예컨대 10-100 아미노산) 임의 길이의 아미노산 쇄를 지칭하는 데에 호환가능하게 사용된다. 상기 쇄는 선형 또는 분지형일 수 있으며, 변형된 아미노산을 포함할 수 있거나, 및/또는 비-아미노산이 개재될 수도 있다. 폴리펩티드는 단일쇄 또는 결합된 쇄들로 이루어질 수 있는 것으로 양해된다.
- [0058] 업계에 알려져 있는 바와 같이, 본원에서 호환가능하게 사용될 때의 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 임의 길이의 뉴클레오티드 쇄를 지칭하며, 여기에는 DNA 및 RNA가 포함된다. 상기 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 변형 뉴클레오티드 또는 염기, 및/또는 이들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 폴리머라제에 의해 쇄에 도입될 수 있는 임의의 기질일 수 있다.
- [0059] 항체의 "가변 영역"은 단독 또는 조합 중 어느 하나로써의 항체 경쇄의 가변 영역 또는 항체 중쇄의 가변 영역을 지칭한다. 업계에 알려져 있는 바와 같이, 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 각각 초가변 영역으로도 알려져 있는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)에 의해 연결된 4개의 프레임워크 영역 (FW)으로 구성된다. 각 쇄의 CDR들은 FW들에 의해 매우 근접하여 함께 유지되며, 다른 쇄의 CDR들과 함께 항체의 항원-결합 부위 형성에 기여한다.
- [0060] 가변 도메인의 "CDR"은 카바트(Kabat), 초티아(Chothia)의 정의, 카바트와 초티아 양자의 복합, AbM, 접촉

(contact), 및/또는 입체형태적 정의, 또는 업계에 잘 알려져 있는 소정의 CDR 결정 방법에 따라 확인되는 가변 영역 내 아미노산 잔기이다. 항체 CDR은 카바트 등에 의해 최초로 정의된 초가변 영역으로 확인될 수 있다. 예를 들어 문헌 [Kabat et al., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C.]을 참조하라. CDR의 위치는 초티아 등에 의해 최초로 기술된 구조적 루프에 확인될 수도 있다. 예를 들어 문헌 [Chothia et al., 1989, Nature 342:877-883]을 참조하라. CDR 확인에 대한 다른 접근법으로는 카바트와 초티아 사이의 절충으로써 옥스포드 분자 AbM 항체 모델링 소프트웨어 (Oxford Molecular's AbM antibody modeling software) (현재는 아셀리스(Accelrys)®)를 사용하여 유추되는 "AbM 정의", 또는 문헌 [MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol., 262:732-745]에 제시되어 있는 바와 같이 관찰되는 항원 접촉을 기반으로 하는 CDR의 "접촉 정의"가 포함된다. 본원에서 CDR의 "입체형태적 정의"로 지칭되는 또 다른 접근법에서, CDR의 위치는 항원 결합에 대하여 엔탈피 기여를 하는 잔기로 확인될 수 있다. 예를 들어 문헌 [Makabe et al., 2008, Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166]을 참조하라. 또 다른 CDR 경계 정의는 상기 접근법들 중 하나를 그대로 따르지 않을 수 있는데, 그럼에도 불구하고 카바트 CDR의 일부 이상과 겹치게 되지만, 특정 잔기 또는 잔기 군, 또는 심지어는 전체 CDR은 항원 결합에 상당한 영향을 주지 않는다는 예상 또는 실험적 발견에 근거하여 그것이 짧아지거나 길어질 수 있다. 본원에서 사용될 때, CDR은 접근법들의 조합을 포함하여, 업계에 알려져 있는 임의의 접근법에 의해 정의되는 CDR을 지칭할 수 있다. 본원에서 사용되는 방법은 임의의 상기 접근법에 따라 정의되는 CDR을 이용할 수 있다. 하나를 초과하는 CDR을 함유하는 임의의 주어진 실시양태에 있어서, CDR은 카바트, 초티아, 연장, AbM, 접촉 및/또는 입체형태적 정의 중 어느 하나에 따라 정의될 수 있다.

- [0061] 항체의 "불변 영역"은 단독 또는 조합 중 어느 하나로써의 항체 경쇄의 불변 영역 또는 항체 중쇄의 불변 영역을 지칭한다.
- [0062] "숙주 세포"에는 폴리뉴클레오티드 삽입물의 도입을 위한 벡터(들)의 수용자일 수 있거나 수용자였던 개별 세포 또는 세포 배양물이 포함된다. 숙주 세포에는 단일 숙주 세포의 자손이 포함되는데, 자연, 우연 또는 고의 돌연변이로 인하여, 상기 자손이 반드시 원래의 모세포와 (형태구조 또는 게놈 DNA 전수가) 완전히 동일한 것을 아닐 수 있다. 숙주 세포에는 본 개시의 폴리뉴클레오티드(들)를 사용하여 생체내에서 형질감염된 세포가 포함된다.
- [0063] 본원에서 사용될 때, "벡터"는 숙주 세포에서 하나 이상의 해당 유전자(들) 또는 서열(들)을 전달하고 바람직하게는 발현할 수 있는 구축물을 의미한다. 벡터의 예에는 바이러스 벡터, 노출된(naked) DNA 또는 RNA 발현 벡터, 플라스미드, 코스미드 또는 파지 벡터, 양이온성 압축제(condensing agent)와 결합된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 리포솜 내에 캡슐화된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 및 프로듀서(producer) 세포와 같은 소정의 진핵 세포가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0064] 본원에서 사용될 때, "발현 조절 서열"은 핵산의 전사를 좌우하는 핵산 서열을 의미한다. 발현 조절 서열은 프로모터, 예컨대 상시성 또는 유도성 프로모터, 또는 인핸서일 수 있다. 발현 조절 서열은 전사될 핵산 서열과 작용가능하게 연결된다.
- [0065] 본원에서 사용될 때, "제약상 허용되는 담체" 또는 "제약상 허용되는 부형제"에는 활성 성분과 조합되었을 때 상기 성분이 생물학적 활성을 유지하는 것을 가능케 하며, 대상체의 면역 시스템과 비-반응성인 소정의 물질이 포함된다. 그 예에는 포스페이트 완충된 식염수 용액, 물, 에멀전 예컨대 오일/물 에멀전, 및 다양한 유형의 습윤제와 같은 임의의 표준 제약 담체들이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 에어로졸 또는 비경구 투여를 위한 바람직한 희석제는 포스페이트 완충된 식염수 (PBS) 또는 표준 (0.9%) 식염수이다. 그와 같은 담체를 포함하는 조성물은 잘 알려져 있는 통상적인 방법에 의해 제제화된다.
- [0066] "개체" 또는 "대상체"는 포유동물, 더욱 바람직하게는 인간이다. 포유동물에는 또한 농장 동물, 스포츠 동물, 애완동물, 영장류, 말, 개, 고양이, 마우스 및 래트가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0067] "단리된 단백질", "단리된 폴리펩티드" 또는 "단리된 항체"는 그의 기원 또는 유래원으로 인하여, (1) 그의 천연 상태에서는 그것에 동반하는 자연상에서는 연관되는 성분들과 연관되어 있지 않거나, (2) 동일 종에 속하는 다른 단백질이 없거나, (3) 상이한 종에 속하는 세포에 의해 발현되거나, 또는 (4) 자연에서는 출현하지 않는 단백질, 폴리펩티드 또는 항체이다. 예컨대, 화학적으로 합성되거나, 또는 그것이 자연에서 기원하는 세포와는 다른 세포 시스템에서 합성되는 폴리펩티드는 그의 자연상의 연관 성분들로부터 "단리"되게 된다. 단백질은 또한 업계에 잘 알려져 있는 단백질 정제 기술을 사용한 단리에 의해 자연상의 연관 성분이 실질적으로 없도록 될 수 있다.

- [0068] 노치1 수용체
- [0069] 인간 노치1 cDNA는 리더 펩티드, 36개의 EGF-유사 반복체, 음성 조절 영역 (NRR), 막횡단 (TM) 서열 및 세포내 도메인 (노치1^{ICD})로 구성되는 2556개 아미노산 잔기의 단백질을 코딩한다.
- [0070] NRR에 결합하는 항-노치1 항체
- [0071] 본 개시가 숙고한 바는 높은 친화도로 노치1 도메인에 결합하는 항체가 노치1 신호 전달을 감소시킬 수 있으며, 그에 따라 시험관내 및 생체내에서 암 세포 성장, 특히 T-세포 급성 림프모구성 백혈병 (T-ALL), 비-소세포 폐암 (NSCLC), 유방암, 결장암 및 난소암을 억제하는 생물학적 활성을 나타낼 수 있다는 것이다. 그와 같은 항체는 업계 일반의 숙련자에게 알려져 있는 일반적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 한 실시양태에서, 그와 같은 항체는 면역원을 사용한 래트의 면역화 후 이어지는 그렇게 생성된 항체의 하이브리도마 클로닝, 및 다양한 검정에 의한 클로닝된 항체의 검정을 통하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 고체-상 ELISA 면역검정, 면역침전, 비아코어(BIAcore), FACS, 및 웨스턴 블롯 분석이 여러 검정법들 중에서도 특히 노치1과 특이적으로 반응하는 항체를 확인하는 데에 사용될 수 있는 것이다. ELISA 검정에 따라 선택된 항체의 노치1 결합 친화도는 표면 플라즈마 공명 비아코어® 기기에서 측정될 수 있다.
- [0072] 본 개시의 항-노치1 항체는 상기 단락에 기술되어 있는 것이 아닌 다른 업계에 알려져 있는 어떠한 기타 방법에 의해서도 제조될 수 있다. 본원에서 추가 기술되는 바와 같이, 숙주 동물의 면역화 경로 및 일정은 일반적으로 항체 자극 및 생성을 위한 알려져 있는 통상적인 기술을 견지한다. 인간 및 마우스 항체의 생성을 위한 일반적인 기술에 대해서는 업계에 알려져 있거나, 및/또는 본원에서 기술된다.
- [0073] 하이브리도마 기술에 의해 생성되는 항-노치1 항체
- [0074] 본 개시가 숙고한 바는 인간을 포함한 어떠한 포유동물 대상체 또는 그로부터의 항체 생성 세포도 인간을 포함한 포유동물 하이브리도마 세포주의 생성을 위한 바탕으로 기능하도록 조작될 수 있다는 것이다. 통상적으로, 숙주 동물은 본원에서 기술되는 것과 같은 것을 포함한 일정량의 면역원에 의해 복강내로, 근육내로, 경구로, 피하로, 족저내로, 및/또는 진피내로 접종된다.
- [0075] 하이브리도마는 문헌 [Kohler, B. and Milstein, C. (1975) Nature 256:495-497]의 일반적인 체세포 혼성화 기술을 사용하여, 또는 문헌 [Buck, D.W., et al., In Vitro, 18:377-381 (1982)]에 의해 변형된 바와 같이 림프구 및 불멸화된 골수종 세포로부터 제조될 수 있다. 항체의 공급원으로 사용될 수 있는 하이브리도마에는 노치1에 특이적인 모노클로날 항체 또는 그의 일부를 생성하는 모 하이브리도마의 모든 유도체, 자손 세포가 포함된다.
- [0076] 그와 같은 항체를 생성하는 하이브리도마는 알려져 있는 절차를 사용하여 시험관내 또는 생체내에서 성장될 수 있다. 모노클로날 항체는 통상적인 이뮤노글로불린 정제 절차에 의해 배양 배지 또는 체액으로부터 단리될 수 있다.
- [0077] 숙주 동물에서의 면역화에 의해 생성되는 항-노치1 항체의 인간화
- [0078] 본 개시가 숙고한 바는, 숙주 동물에서의 면역화에 의해 항체가 생성될 경우, 본 개시의 항 노치1 항체가 그의 생물학적 활성 및 제약 특성이 개선되도록 많은 방식으로 조작될 수 있다는 것이다. 그와 같은 조작의 한 가지 방식은 인간화이다.
- [0079] 항체를 인간화하는 방법에 대해서는 업계 일반의 숙련자에게 잘 알려져 있다. 일반적으로, 모노클로날 항체를 인간화하는 데에는 4개의 기본 단계가 존재한다. 그것은 하기이다: (1) 개시 항체 경쇄 및 중쇄 가변 도메인의 뉴클레오티드 및 예상 아미노산 서열을 결정하는 단계, (2) 인간화 항체를 설계하는 단계, 즉 인간화 과정 동안 어느 항체 프레임워크 영역을 사용할 것인지를 결정하는 단계, (3) 실제 인간화 방법론/기술, 및 (4) 인간화 항체의 형질감염 및 발현.
- [0080] 인간 불변 도메인에 융합된 설치류 또는 변형된 설치류 V 영역 및 그의 연관 CDR; 적절한 인간 항체 불변 도메인과의 융합 전에 인간 지지 프레임워크 영역 (FR)에 그래프팅된 설치류 CDR; 및 재조합으로 조작된 설치류 프레임워크 영역에 의해 지지되는 설치류 CDR을 가지는 키메라 항체를 포함하여, 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래되는 항원-결합 부위를 포함하는 수많은 "인간화" 항체 분자들이 문헌에 기술되어 있다. 그와 같은 "인간화" 분자들은 인간 수용자에서의 해당 잔기의 치료적 적용의 기간 및 유효성을 제한하는 설치류 항-인간 항체 분자에 대한 원치 않는 면역학적 반응을 최소화하도록 설계된다.

[0081] 인간 항-노치1 항체

[0082] 본 개시가 숙고한 바는 특정 인간 이뮤노글로불린 단백질을 발현하도록 조작된 시중에서 구입가능한 마우스를 사용하면 완전한 인간 항-노치1 항체가 수득될 수 있다는 것이다. 더욱 바람직하거나 (예컨대 완전한 인간 항체) 또는 더욱 강력한 면역 반응을 생성하도록 설계된 트랜스제닉 동물이 인간화 또는 인간 항체의 생성에 사용될 수도 있다. 그와 같은 기술의 예는 아브제닉스(Abgenix, Inc.) 사 (캘리포니아 프레몬트 소재)의 제노마우스(Xenomouse)TM 및 메다렉스(Medarex, Inc.) 사 (뉴저지 프린스턴 소재)의 HuMAb-마우스[®] 및 TC 마우스TM이다.

[0083] 역시 본 개시가 숙고한 바는 업계 숙련자라면 쉽게 알 수 있을 바와 같이, 파지 디스플레이(phage display) 기술의 일반적인 방법에 따라 제조함에 의해 완전 인간 항-노치1 항체가 수득될 수 있다는 것이다. 다르게는, 면역화되지 않은 공여자로부터의 이뮤노글로불린 가변 (V) 도메인 유전자 목록으로부터 시험관내에서 인간 항체 및 항체 단편을 생성하는 데에 파지 디스플레이 기술이 사용될 수 있다.

[0084] 인간 항체가 개시 설치류 항체와 유사한 친화성 및 특이성을 가지는 경우, 유전자 셔플링(shuffling)이 설치류 항체로부터 인간 항체를 유도하는 데에 사용될 수도 있다. 상기 논의가 인간화 및 인간 항체에 관한 것이기는 하지만, 논의된 일반 원리는 예컨대 개, 고양이, 영장류, 말 및 소에서 사용하기 위한 항체를 설계하는 데에 적용가능하다. 본원에서 기술되는 항체를 인간화하는 하나 이상의 측면은 조합된, 예컨대 CDR 그래프팅, 프레임워크 돌연변이 및 CDR 돌연변이일 수 있다.

[0085] 제조함에 의해 제조된 조작 및 변형된 항-노치1 항체

[0086] 일반적으로, 원하는 항체의 DNA 서열을 발현 벡터에 위치시킨 후, 이어서 달리 이뮤노글로불린 단백질을 생성하지 않는 비제한적으로 E. 콜라이(coli) 세포, 유인원 COS 세포, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 골수종 세포를 포함한 숙주 세포에서 형질감염 및 발현시킴으로써, 제조함에 의해 항체가 제조될 수 있다. 트랜스제닉 식물 세포 또는 트랜스제닉 밀크(milk) 세포와 같은 다른 숙주 세포가 사용될 수도 있다.

[0087] 항체는 제조함에 의해 변형될 수도 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 불변 영역의 DNA가 무린 항체 DNA의 상동 무린 서열 대신, 또는 코딩 서열의 전부 또는 일부가 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드에 대한 것인 이뮤노글로불린 코딩 서열에 공유 결합시킴으로써 사용될 수 있다. 유사한 방식으로, 본원 항-노치1 모노클로날 항체의 결합 특이성을 가지는 "키메라" 또는 "혼성" 항체가 제조될 수 있다.

[0088] CDR 그래프팅에 의해 항체 가변 영역이 변형될 수도 있다. CDR 서열이 주로 대부분의 항체-항원 상호작용을 담당하기 때문에, 상이한 특성을 가지는 상이한 항체로부터의 프레임워크 서열상에 그래프팅된 특정 자연 발생 항체로부터의 CDR 서열을 포함하는 발현 벡터를 구축하는 것에 의해, 특정 자연 발생 항체의 특성을 모방한 제조 항체를 발현하는 것이 가능하다.

[0089] 따라서, 본 개시의 또 다른 측면은 본원에서 기술되는 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 본원에서 기술되는 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 모노클로날 항체에 관한 것이다. 따라서, 그와 같은 항체는 본원에서 기술되는 모노클로날 항체의 VH 및 VL CDR 서열을 함유하면서도 여전히 해당 항체로부터의 상이한 프레임워크 서열을 함유할 수 있다. 그와 같은 프레임워크 서열은 생식계열 항체 유전자 서열을 포함한 공공 DNA 데이터베이스 또는 공개된 참고문헌으로부터 입수될 수 있다.

[0090] 또 다른 유형의 가변 영역 변형은 VH 및/또는 VL CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 영역 내의 아미노산 잔기를 돌연변이 시킴으로써 해당 항체의 하나 이상 결합 특성 (예컨대 친화성)을 개선하는 것이다. 돌연변이(들)을 도입하기 위해서는 위치-지정 돌연변이유발 또는 PCR-매개 돌연변이유발이 수행될 수 있으며, 본원에서 기술되는 바와 같은 시험관내 또는 생체내 검정을 사용하여 항체 결합 또는 기타 중요한 기능적 특성에 대한 영향이 평가될 수 있다. 통상적으로, 보존적 변형 (하기에서 논의되는 바와 같음)이 도입된다. 돌연변이는 아미노산 치환, 첨가 또는 결실일 수 있다. 또한, 통상적으로 CDR 영역 내의 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 이하 잔기가 변형된다.

[0091] 에피토프 매핑

[0092] 항원-항체 상호작용의 유형에 따라, 수많은 방법에 의해 항원상 모노클로날 항체의 결합 에피토프가 매핑될 수 있다.

[0093] 항체가 항원의 순차적인 아미노산 잔기로 구성되는 단일 에피토프에 결합하는 경우, 그의 결합은 보통 항원 입체형태 변화에 의해 영향을 받지 않으며, 결합 에피토프는 선형 에피토프로 지칭된다. 선형 에피토프의 아미노

산 서열을 결정하는 것은 업계에 잘 알려져 있는 기술을 이용하여 수행될 수 있다. 해당 천연 구조로의 항원의 접합에 의해 서로 근접되는 수개의 순차적으로 불연속적인 분절 또는 비연속 잔기들로 구성되는 비-선형 에피토프는 입체형태 에피토프로 알려져 있다.

[0094] 입체형태 에피토프의 매핑은 해당 천연 입체형태에서의 항원에 대한 항체의 상호작용에 따라 달라진다. 업계에 잘 알려져 있는 수많은 기술들이 입체형태 에피토프를 결정하는 데에 유용하다. 예를 들어, 항원-항체 복합체의 공동-결정화, X-선 회절 및 구조 분석이 항원-항체 상호작용의 개략적인 상을 제공한다. 아미노산 돌연변이 유발과 조합될 경우, 상기 기술들은 항체 결합 에피토프에 대한 강력한 증거 및 생생한 화상을 제공할 수 있다. 각 항-노치1 항체가 결합하는 에피토프 또는 에피토프 세트는 업계에 일반적으로 알려져 있는 상기 매핑 방법들 등에 따라 결정될 수 있다.

[0095] 보존적 치환

[0096] 항체는 또한 항체의 하나 이상 아미노산 잔기의 보존적 치환에 의해, 또는 항체의 것에 대한 하나 이상의 아미노산 결실 또는 첨가에 의해 재조합으로 변형될 수 있다. 아미노산 서열 삽입에는 하나의 잔기에서부터 100개 이상 잔기를 함유하는 폴리펩티드까지 길이 범위의 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합은 물론, 단일 또는 다수 아미노산 잔기의 서열내 삽입이 포함된다. 말단 삽입의 예에는 N-말단 메티오닐 잔기를 가지는 항체 또는 에피토프 태그(epitope tag)에 융합된 항체가 포함된다. 항체 분자의 기타 삽입 변이체에는 혈액 순환 중 항체의 반감기를 증가시키는 효소 또는 폴리펩티드의 항체 N- 또는 C-말단에의 융합이 포함된다.

[0097] 치환 변이체는 항체 분자의 하나 이상 아미노산 잔기를 제거하고, 그 자리에 상이한 잔기를 삽입한다. 치환 돌연변이유발의 대단히 중요한 부위에는 추가변 영역이 포함되나, FR 변경도 고려된다.

[0098] 친화성 성숙된 항-노치1 항체

[0099] 본 개시에는 친화성 성숙된(affinity matured) 실시양태가 포함된다. 예를 들어, 친화성 성숙된 항체는 업계에 알려져 있는 절차 (예컨대 문헌 [Marks et al. (1992) Bio/Technology, 10:779-783]; [Barbas et al. (1994) Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813]; [Schier et al. (1995) Gene, 169:147-155]; [Yelton et al. (1995) J. Immunol., 155:1994-2004]; [Jackson et al. (1995) J. Immunol., 154(7):3310-9]; [Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol., 226:889-896]; 및 PCT 공개 제W02004/058184호)에 의해 제조될 수 있다. 그와 같은 방법들은 항체의 친화성을 조정하는 데에, 그리고 CDR을 특성화하는 데에 사용될 수 있다.

[0100] 항-노치1 항체의 번역후 변형

[0101] 항체는 업계에 잘 알려져 있는 기술에 의해, 비제한적으로 상이한 당들에 의한 글리코실화, 아세틸화, 및 인산화를 포함한 번역후 변형에 의해 변형될 수도 있다.

[0102] 번역후 변형의 다른 방법으로는 비제한적으로 효소 수단, 산화성 치환 및 킬레이션(chelation)을 포함하여, 업계에 알려져 있는 커플링 기술들을 사용하는 것이 포함된다. 변형은 예를 들어 면역검정을 위한 표지의 결합에 사용될 수 있다.

[0103] 변형된 불변 영역을 가지는 항-노치1 항체

[0104] 본 개시의 일부 실시양태에서, 항체는 면역학적으로 불활성이거나 부분적으로 불활성인, 예컨대 보체 매개 용해를 촉발하지 않거나, 항체-의존성 세포 매개 세포독성 (ADCC)을 자극하지 않거나, 또는 소교세포를 활성화하지 않거나; 또는 보체 매개 용해를 촉발하는 것, 항체-의존성 세포 매개 세포독성 (ADCC)을 자극하는 것, 또는 소교세포를 활성화하는 것 중 어느 하나 이상에서 감소된 활성 (변형되지 않은 항체와 비교)을 가지는 불변 영역과 같이, 변형된 불변 영역을 포함한다. 상이한 불변 영역 변형들이 효과인자 기능의 최적 수준 및/또는 조합을 달성하는 데에 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Morgan et al., Immunology 86:319-324 (1995)]; [Lund et al., J. Immunology 157:4963-9 157:4963-4969 (1996)]; [Idusogie et al., J. Immunology 164:4178-4184 (2000)]; [Tao et al., J. Immunology 143:2595-2601 (1989)]; 및 [Jefferis et al., Immunological Reviews 163:59-76 (1998)]을 참조하라.

[0105] 일부 실시양태에서, 항체는 하기의 돌연변이를 포함하는 인간 중쇄 IgG1 불변 영역을 포함한다: 실질적으로 감소된 ADCC 및 CDC 활성을 초래하는 하부 힌지(hinge) 영역의 L234A/L235A/G237A. 예를 들어, US20090155256호를 참조하라.

[0106] Fc 영역 내의 변형은 통상적으로 혈청 반감기, 보체 고정, Fc 수용체 결합, 및/또는 항원-의존성 세포성 세포독

성과 같은 항체의 하나 이상의 기능적 특성을 변경하는 데에 사용될 수 있다. 또한, 본 개시의 항체는 역시 항체의 하나 이상의 기능적 특성을 변경하기 위하여 화학적으로 변형되거나 (예컨대 하나 이상의 화학적 잔기가 항체에 결합될 수 있음), 또는 그의 글리코실화 패턴이 변경되도록 변형될 수 있다.

[0107] 본원에서 본 개시에 의해 기획되는 항체의 또 다른 변형은 페길화(pegylation)이다. 항체는 예를 들어 항체의 생물학적 (예컨대 혈청) 반감기를 증가시키기 위하여 페길화될 수 있다. 항체를 페길화하기 위하여, 항체 또는 그의 단편은 통상적으로 하나 이상의 PEG 기가 항체 또는 항체 단편에 결합되게 되는 조건하에서 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 예컨대 PEG의 반응성 에스테르 또는 알데히드 유도체와 반응된다. 통상적으로, 페길화는 반응성 PEG 분자 (또는 유사 반응성 수용성 중합체)를 사용한 아실화 반응 또는 알킬화 반응을 통하여 수행된다. 본원에서 사용될 때, "폴리에틸렌 글리콜"이라는 용어는 다른 단백질들을 유도체화하는 데에 사용되어 온 임의의 PEG 형태, 예컨대 모노 (C1 내지 C10) 알콕시- 또는 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜-말레이미드를 포괄하고자 하는 것이다. 소정의 경우, 페길화될 항체는 비글리코실화(aglycosylated) 항체이다. 단백질을 페길화하기 위한 방법에 대해서는 업계에 알려져 있어서, 본 개시의 항체 적용될 수 있다.

[0108] 융합 단백질

[0109] 본 개시는 또한 본 개시의 항체 또는 폴리펩티드로부터의 하나 이상의 단편 또는 영역을 포함하는 융합 단백질을 포괄한다. 한 실시양태에서는, 본 개시 항체 가변 경쇄 영역의 10개 이상 연속 아미노산, 및/또는 가변 중쇄 영역의 10개 이상 아미노산을 포함하는 융합 폴리펩티드가 제공된다. 다른 실시양태에서는, 가변 경쇄 영역의 약 10개 이상, 약 15개 이상, 약 20개 이상, 약 25개 이상, 또는 약 30개 이상 연속 아미노산, 및/또는 가변 중쇄 영역의 약 10개 이상, 약 15개 이상, 약 20개 이상, 약 25개 이상, 또는 약 30개 이상 연속 아미노산을 포함하는 융합 폴리펩티드가 제공된다. 또 다른 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 본 개시 항체의 경쇄 가변 영역 및/또는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 본 개시 항체의 하나 이상 CDR(들)을 포함한다. 본 개시의 목적상, 융합 단백질은 하나 이상의 항체, 그리고 천연 분자에서는 그것이 결합되지 않는 또 다른 아미노산 서열, 예를 들어 이중유래 서열 또는 또 다른 영역으로부터의 동종유래 서열을 함유한다. 대표적인 이중유래 서열에는 FLAG 태그(tag) 또는 6His 태그와 같은 "태그"가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0110] 융합 폴리펩티드는 업계에 알려져 있는 방법, 예를 들어 합성에 의해, 또는 재조합에 의해 생성될 수 있다.

[0111] 이중특이적 분자

[0112] 본 개시의 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 2중 이상의 상이한 결합 부위 또는 표적 분자에 결합하는 이중특이적 분자를 생성시키기 위하여 또 다른 기능성의 분자, 예컨대 또 다른 펩티드 또는 단백질 (예컨대 또 다른 항체, 또는 수용체에 대한 리간드)에 유도체화 또는 연결될 수 있다. 본 개시의 항체는 사실상 2중을 초과하는 상이한 결합 부위 및/또는 표적 분자에 결합하는 다중특이적 분자를 생성시키기 위하여 1중을 초과하는 다른 기능성 분자에 유도체화 또는 연결될 수 있는데, 그와 같은 다중특이적 분자 역시 본원에서 사용될 때의 "이중특이적 분자"라는 용어로서 포괄하고자 한다. 본 개시의 이중특이적 분자를 생성시키기 위하여, 본 개시의 항체는 1중 이상의 다른 결합 분자, 예컨대 또 다른 항체, 항체 단편, 펩티드 또는 결합 모방체에 이중특이적 분자가 초래되도록 기능적으로 연결될 (예컨대 화학적 커플링, 유전적 융합, 비공유 결합 또는 기타에 의함) 수 있다.

[0113] 단일쇄 항체

[0114] 본 개시의 항체는 중쇄 및 경쇄 가변 영역 (Fv 영역)이 가요성 링커(flexible linker)에 의해 연결됨으로써 단일 폴리펩티드 쇄를 형성하고, 그것이 항원-결합 영역을 형성한 단일쇄 항체 (scFv)일 수 있다. 그와 같은 단일쇄 항체는 펩티드 링커를 코딩하는 DNA를 두 가변 도메인 폴리펩티드 (VL 및 VH)를 코딩하는 DNA들 사이에 융합함으로써 제조될 수 있다. 생성되는 폴리펩티드는 그 자체가 다시 접혀 항원-결합 단량체를 형성할 수 있거나, 또는 두 가변 도메인 사이 가요성 링커의 길이에 따라서는 그것들이 다량체 (예컨대 이량체, 삼량체 또는 사량체)를 형성할 수 있다 (문헌 [Kortt et al. (1997) Prot. Eng. 10:423]; [Kortt et al. (2001) Biomol. Eng. 18:95-108]). 상이한 VL과 VH-포함 폴리펩티드들을 조합함으로써, 상이한 에피토프에 결합하는 다량체 scFvs를 형성시킬 수 있다 (문헌 [Kriangkum et al. (2001) Biomol. Eng. 18:31-40]). 단일쇄 항체는 업계에 알려져 있는 다양한 기술을 사용하여 제조될 수 있다.

[0115] 면역접합체

[0116] 본 개시의 항체는 면역접합체(immunoconjugate) 또는 항체-약물 접합체 (ADC)일 수 있다. 면역접합체는 모노클

로날 항체의 결합 특이성을 화학치료제의 효능과 조합한다.

[0117] 항-노치1 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드

[0118] 본 개시는 또한 본 개시의 항체 및 펩티드를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드, 그리고 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 숙주 세포를 제공한다.

[0119] 한 측면에서, 본 개시는 본 개시의 임의의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물, 예컨대 제약 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 본 개시의 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 포함한다. 다른 실시양태에서, 조성물은 본 개시의 임의의 항체 또는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 포함한다.

[0120] 또 다른 측면에서, 본 개시는 본원에서 기술되는 임의의 폴리뉴클레오티드의 제조 방법을 제공한다.

[0121] 그와 같은 소정의 서열에 상보적인 폴리뉴클레오티드 역시 본 개시에 의해 포괄된다. 폴리뉴클레오티드는 단일-가닥 (코딩 또는 안티센스) 또는 이중-가닥의 것일 수 있으며, DNA (게놈, cDNA 또는 합성) 또는 RNA 분자일 수 있다. RNA 분자에는 인트론을 함유하며 DNA 분자에 일-대-일 방식으로 상응하는 HnRNA 분자, 및 인트론을 함유하지 않는 mRNA 분자가 포함된다. 반드시 그러한 것은 아니지만, 본 개시의 폴리뉴클레오티드 내에는 추가적인 코딩 또는 비-코딩 서열이 존재할 수 있으며, 반드시 그러한 것은 아니지만, 폴리뉴클레오티드가 다른 분자 및/또는 지지 물질에 연결되어 있을 수도 있다.

[0122] 폴리뉴클레오티드는 천연 서열 (즉 항체 또는 그의 일부를 코딩하는 내생 서열)을 포함할 수 있거나, 또는 그와 같은 서열의 변이체를 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드 변이체는 코딩되는 폴리펩티드의 면역반응성이 천연 면역반응성 분자에 비해 감소되지 않도록, 하나 이상의 치환, 첨가, 결실 및/또는 삽입을 함유한다. 코딩되는 폴리펩티드의 면역반응성에 대한 효과는 일반적으로 본원에서 기술되는 바와 같이 평가될 수 있다. 변이체는 바람직하게는 천연 항체 또는 그의 일부를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 약 70% 이상의 동일성, 더욱 바람직하게는 약 80% 이상의 동일성, 더욱 더 바람직하게는 약 90% 이상의 동일성, 가장 바람직하게는 약 95% 이상의 동일성을 나타낸다.

[0123] 2개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열은 최대 일치되도록 정렬하였을 때 두 서열 뉴클레오티드 또는 아미노산의 서열이 동일할 경우, "동일하다"고 지칭된다.

[0124] 업계 일반의 숙련자라면, 유전 코드의 축퇴성(degeneracy)의 결과로서, 본원에서 기술되는 바와 같은 폴리펩티드를 코딩하는 많은 뉴클레오티드 서열들이 존재한다는 것을 알고 있을 것이다. 이러한 폴리뉴클레오티드들 중 일부는 소정 천연 유전자의 뉴클레오티드 서열에 대하여 최소한의 동일성을 보유한다. 그럼에도 불구하고, 코돈 용법(codon usage)의 차이로 인하여 달라지는 폴리뉴클레오티드들은 본 개시에 의해 명확하게 고려된다. 또한, 본원에서 제공되는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자의 대립유전자가 본 개시의 영역에 속한다. 대립유전자는 뉴클레오티드의 결실, 첨가 및/또는 치환과 같은 하나 이상 돌연변이의 결과로서 변경된 내생 유전자이다. 반드시 그러한 것은 아니지만, 생성되는 mRNA 및 단백질은 변경된 구조 또는 기능을 가질 수 있다. 대립유전자는 표준 기술 (예컨대 혼성화, 증폭 및/또는 데이터베이스 서열 비교)을 사용하여 확인될 수 있다.

[0125] 본 개시의 폴리뉴클레오티드는 화학적 합성, 재조합법 또는 PCR을 사용하여 수득될 수 있다.

[0126] 재조합법을 사용하여 폴리뉴클레오티드를 제조하기 위해서는, 원하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 적합한 벡터에 삽입될 수 있으며, 상기 벡터는 다시 복제 및 증폭을 위한 적합한 숙주 세포에 도입될 수 있다. 적합한 클로닝 벡터는 표준 기술에 따라 구축될 수 있거나, 또는 업계에서 가용한 매우 많은 수의 클로닝 벡터들에서 선택될 수 있다. 선택되는 클로닝 벡터가 사용하고자 하는 숙주 세포에 따라 달라질 수 있기는 하지만, 유용한 클로닝 벡터라면 일반적으로 자가-복제 능력을 가지고 있거나, 특정 제한 엔도뉴클레아제의 단일 표적을 보유할 수 있거나, 및/또는 벡터를 함유하는 클론을 선택하는 데에 사용될 수 있는 마커의 유전자를 보유할 수 있을 것이다.

[0127] 발현 벡터는 일반적으로 본 개시에 따른 폴리뉴클레오티드를 함유하는 복제가능한 폴리뉴클레오티드 구축물이다. 발현 벡터는 에피솜, 또는 염색체 DNA의 통합된 일부 중 어느 하나로서 숙주 세포 내에서 복제 가능해야 하는 것으로 상정된다. 벡터 구성요소로는 일반적으로 하기 중 하나 이상이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다: 신흥 서열; 복제 기점(origin of replication); 하나 이상의 마커 유전자; 적합한 전사 조절 요소 (예컨대 프로모터, 인핸서 및 터미네이터).

[0128] 해당 폴리뉴클레오티드를 함유하는 벡터는 전기천공; 염화 칼슘, 염화 루비듐, 인산 칼슘, DEAE-텍스트란 또는

기타 물질을 사용하는 형질감염; 미세사출(microprojectile bombardment); 리포펙션(lipofection); 및 감염 (예컨대 박테리아가 우두 바이러스와 같은 감염 인자인 경우)을 포함한 임의의 수많은 적절한 수단에 의해 숙주 세포에 도입될 수 있다. 박테리아 또는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 것의 선택은 종종 숙주 세포의 특징에 따라 달라지게 된다.

[0129] 본 개시는 또한 본원에서 기술되는 임의의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 이중유래 DNA를 과-발현할 수 있는 어떠한 숙주 세포도 해당 항체, 폴리펩티드 또는 단백질을 코딩하는 유전자를 단리할 목적으로 사용될 수 있다. 적합한 비-포유동물 숙주 세포에는 원핵생물 (예컨대 E. 콜라이 또는 B. 서브틸리스(subtilis)) 및 효모 (예컨대 S. 세레비자에(cerevisiae), S. 폼베(pombe); 또는 K. 락티스(lactis))가 포함된다. 바람직하게는, 숙주 세포는 존재할 경우 숙주 세포에서 해당하는 상응 내생 항체 또는 단백질의 것에 비해 약 5배 더 높거나, 더욱 바람직하게는 10배 더 높거나, 더욱 더 바람직하게는 20배 더 높은 수준으로 cDNA를 발현한다.

[0130] 제약 조성물

[0131] 또 다른 측면에서, 본 개시는 제약상 허용되는 담체와 함께 제제화된 본 개시의 1종 또는 조합으로써의 모노클로날 항체, 또는 그의 항원-결합 부분(들)을 함유하는 조성물, 예컨대 제약 조성물을 제공한다. 그와 같은 조성물은 1종 또는 조합으로써의 본 개시의 (예컨대 2종 이상의 상이한) 항체, 또는 면역접합체 또는 이중특이적 분자를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 제약 조성물은 표적 항원상의 상이한 에피토프들에 결합하거나 보완적인 활성을 가지는 항체들 (또는 면역접합체들 또는 이중특이적 물질들)의 조합을 포함할 수 있다.

[0132] 본 개시의 제약 조성물은 또한 조합 요법으로써, 즉 다른 작용제와 조합되어 투여될 수 있다. 예를 들어, 상기 조합 요법은 1종 이상의 다른 항-염증, 항-암 또는 면역억제 작용제와 조합된 본 개시의 항-노치1 항체를 포함할 수 있다. 조합 요법에 사용될 수 있는 치료제의 예는 하기의 본 개시 항체의 용도에 대한 부문에 매우 상세하게 기술되어 있다.

[0133] 본원에서 사용될 때, "제약상 허용되는 담체"에는 생리학적으로 상용성인 임의의 모든 용매, 분산 매체, 코팅, 항세균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등이 포함된다. 통상적으로, 상기 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척수 또는 표피 투여 (예컨대 주사 또는 주입에 의함)에 적합하다. 투여 경로에 따라, 활성 화합물, 즉 항체, 그의 항원-결합 부분, 면역접합체, 또는 이중특이적 분자는 화합물을 불활성화할 수 있는 산 및 기타 자연 조건의 작용으로부터 화합물을 보호하기 위한 물질로 코팅될 수 있다.

[0134] 소정 실시양태에서, 본 개시의 항체는 중성의 형태 (양쪽성 이온 형태 포함)로, 또는 양성 또는 음성-하전된 중으로 존재할 수 있다. 일부 경우, 항체는 상대이온과 복합체화됨으로써 제약상 허용되는 염을 형성할 수 있다. 따라서, 본 개시의 제약 화합물에는 1종 이상의 제약상 허용되는 염이 포함될 수 있다.

[0135] "제약상 허용되는 염"은 본 발명 화합물 (예컨대 항체)의 원하는 생물학적 활성을 유지하며, 원치 않는 독성학적 효과는 주지 않는 염을 지칭한다 (예컨대 문헌 [Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19] 참조). 예를 들어, "제약상 허용되는 염"이라는 용어에는 1종 이상의 항체 및 1종 이상의 상대이온을 포함하며, 여기서 상기 상대이온은 제약상 허용되는 무기 및 유기 산 및 염기로부터 유래되는 복합체가 포함된다.

[0136] 그와 같은 염의 예에는 산 부가염 및 염기 부가염이 포함된다. 산 부가염에는 비독성의 무기 산, 예컨대 염산, 질산, 인산, 황산, 히드로브롬산, 히드로아이오딘산, 아인산 등은 물론, 비독성의 유기 산 예컨대 지방족 모노- 및 디카르복실산, 페닐-치환 알칸산, 히드록시 알칸산, 방향족 산, 지방족 및 방향족 술폰산 등으로부터 유래되는 것들이 포함된다. 염기 부가염에는 알칼리토 금속, 예컨대 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등은 물론, 비독성의 유기 아민, 예컨대 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인 등으로부터 유래되는 것들이 포함된다.

[0137] 또한, 제약상 허용되는 무기 염기에는 금속성 이온이 포함된다. 금속성 이온에는 적절한 알칼리 금속염, 알칼리토 금속염 및 기타 생리학적으로 허용가능한 금속 이온이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 무기 염기로부터 유래되는 염에는 해당 보통 원자가의 알루미늄, 암모늄, 칼슘, 코발트, 니켈, 몰리브덴, 바나듐, 망가니즈, 크로뮴, 셀레늄, 주석, 구리, 제2철, 제1철, 리튬, 마그네슘, 제2망가니즈 염, 제1망가니즈, 칼륨, 루비듐, 나트륨 및 아연이 포함된다.

[0138] 본 개시 항체의 제약상 허용되는 산 부가염은 비제한적으로 포름산, 아세트산, 아세트아미도벤조산, 아디프산, 아스코르브산, 붕산, 프로피온산, 벤조산, 캄포산, 탄산, 시클람산, 데히드로폴산, 말론산, 에테트산, 에틸술폰

르산, 펜디조산, 메타인산, 숙신산, 글리콜산, 글루콘산, 락트산, 말산, 타르타르산, 탄닌산, 시트르산, 질산, 아스코르브산, 글루쿠론산, 말레산, 염산, 푸마르산, 프로피온산, 피루브산, 아스파르트산, 글루탐산, 벤조산, 염산, 히드로브롬산, 히드로아이오딘산, 리신, 이소시트르산, 트리플루오로아세트산, 팜산, 프로피온산, 안트라닐산, 메실산, 오르트산, 옥살산, 옥살아세트산, 올레산, 스테아르산, 살리실산, 아미노살리실산, 실리케이트, p-히드록시벤조산, 니코틴산, 페닐아세트산, 만델산, 엠본산, 술폰산, 메탄술폰산, 인산, 포스폰산, 에탄술폰산, 에탄디술폰산, 암모늄, 벤젠술폰산, 판토텐산, 나프탈렌술폰산, 톨루엔술폰산, 2-히드록시에탄술폰산, 술과닐산, 황산, 질산, 아질산, 황산 모노메틸 에스테르, 시클로헥실아미노술폰산, β-히드록시부티르산, 글리신, 글리실글리신, 글루탐산, 카코딜레이트, 디아미노헥산산, 캄포술폰산, 글루콘산, 티오시안산, 옥소글루타르산, 피리독살 5-포스페이트, 클로로페녹시아세트산, 운데칸산, N-아세틸-L-아스파르트산, 갈락타르산 및 갈락투론산을 포함한 산으로부터 제조될 수 있다.

[0139] 제약상 허용되는 유기 염기에는 트리메틸아민, 디에틸아민, N,N'-디벤질에틸렌디아민, 클로로프로카인, 콜린, 디벤질아민, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 메글루민 (N-메틸글루카민), 프로카인, 시클릭 아민, 4차 암모늄 양이온, 아르기닌, 베타인, 카페인, 클레미졸, 2-에틸아미노에탄올, 2-디에틸아미노에탄올, 2-디메틸아미노에탄올, 에탄디아민, 부틸아민, 에탄올아민, 에틸렌디아민, N-에틸모르폴린, N-에틸피페리딘, 에틸글루카민, 글루카민, 글루코사민, 히스티딘, 히드라바민, 이미다졸, 이소프로필아민, 메틸글루카민, 모르폴린, 피페라진, 피리딘, 피리독신, 네오디름, 피페리딘, 폴리아민 수지, 프로카인, 퓨린, 테오브로민, 트리에틸아민, 트리프로필아민, 트리에탄올아민, 트로메타민, 메틸아민, 타우린, 콜레이트, 6-아미노-2-메틸-2-헵탄올, 2-아미노-2-메틸-1,3-프로판디올, 2-아미노-2-메틸-1-프로판올, 지방족 모노- 및 디카르복실산, 페닐-치환 알칸산, 히드록시 알칸산, 방향족 산, 지방족 및 방향족 술폰산, 스트론튬, 트리신, 히드라진, 페닐시클로헥실아민, 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산, 비스(2-히드록시에틸)아미노-트리스(히드록시메틸)메탄, N-(2-아세트아미도)-2-아미노에탄술폰산, 1,4-피페라진디에탄술폰산, 3-모르폴리노-2-히드록시프로판술폰산, 1,3-비스[트리스(히드록시메틸)메틸아미노]프로판, 4-모르폴린프로판술폰산, 4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄술폰산, 2-[(2-히드록시-1,1-비스(히드록시메틸)에틸)아미노]에탄술폰산, N,N-비스(2-히드록시에틸)-2-아미노에탄술폰산, 4-(N-모르폴리노)부탄술폰산, 3-(N,N-비스[2-히드록시에틸]아미노)-2-히드록시프로판술폰산, 2-히드록시-3-[트리스(히드록시메틸)메틸아미노]-1-프로판술폰산, 4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-(2-히드록시프로판술폰산), 피페라진-1,4-비스(2-히드록시프로판술폰산) 2수화물, 4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진프로판술폰산, N,N-비스(2-히드록시에틸)글리신, N-(2-히드록시에틸)피페라진-N'-(4-부탄술폰산), N-[트리스(히드록시메틸)메틸]-3-아미노프로판술폰산, N-트리스(히드록시메틸)메틸-4-아미노부탄술폰산, N-(1,1-디메틸-2-히드록시에틸)-3-아미노-2-히드록시프로판술폰산, 2-(시클로헥실아미노)에탄술폰산, 3-(시클로헥실아미노)-2-히드록시-1-프로판술폰산, 3-(시클로헥실아미노)-1-프로판술폰산, N-(2-아세트아미도)아미노디아세트산, 4-(시클로헥실아미노)-1-부탄술폰산, N-[트리스(히드록시메틸)메틸]글리신, 2-아미노-2-(히드록시메틸)-1,3-프로판디올, 및 트로메타몰이 포함된다.

[0140] 본 개시의 제약 조성물은 또한 제약상 허용되는 항산화제를 포함할 수 있다. 제약상 허용되는 항산화제의 예에는 하기가 포함된다: (1) 수용성 항산화제, 예컨대 아스코르브산, 시스테인 히드로클로리드, 나트륨 비술피이트, 나트륨 메타비술피이트, 나트륨 술파이트 등; (2) 유용성 항산화제, 예컨대 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔 (BHA), 부틸화 히드록시톨루엔 (BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등; 및 (3) 금속 킬레이팅제, 예컨대 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등.

[0141] 본 개시의 제약 조성물에서 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예에는 물, 에탄올, 폴리올 (예컨대 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예컨대 올리브 오일, 및 주사가능한 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트가 포함된다. 적절한 유통성은 예를 들어 코팅 물질, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.

[0142] 이러한 조성물은 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 아주반트(adjutant)들도 함유할 수 있다. 미생물 존재의 방지는 상기한 멸균 절차, 그리고 다양한 항세균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등의 포함 모두에 의해 보장될 수 있다. 등장제, 예컨대 당, 염화 나트륨 등을 조성물에 포함시키는 것 역시 바람직할 수 있다. 또한, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같이 흡수를 지연하는 작용제의 포함에 의해, 주사가능 제약 형태의 연장 흡수가 초래될 수도 있다.

[0143] 제약상 허용되는 담체에는 멸균 수용액 또는 분산액, 및 멸균 주사가능 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말이 포함된다. 제약으로 활성인 물질을 위한 그와 같은 매체 및 작용제의 사용에 대해서는 업계에 알

려져 있다. 소정의 통상적인 매체 또는 작용제가 활성 화합물과 비상용성이 아닌 한, 본 개시 제약 조성물에서의 그의 사용이 고려된다. 보충 활성 화합물이 조성물에 도입될 수도 있다.

[0144] 치료 조성물은 통상적으로 멸균 상태이어야 하며, 제조 및 저장 조건하에서 안정해야 한다. 조성물은 용액, 미세에멀전, 리포솜, 또는 높은 약물 농도에 적합한 기타 요구되는 구조로 제제화될 수 있다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예컨대 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매체일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우에서, 등장제, 예를 들어 당, 폴리알콜 예컨대 만니톨, 소르비톨, 또는 염화 나트륨을 조성물에 포함시키는 것이 바람직하게 된다. 주사가능 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연하는 작용제, 예를 들어 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에 포함시키는 것에 의해 초래될 수 있다.

[0145] 멸균 주사가능 용액은 요구량의 활성 화합물을 필요에 따라 1종 또는 조합으로써의 상기에 열거한 성분들과 함께 적절한 용매에 도입한 후, 이어서 멸균 미세여과함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산 매체 및 상기에 열거한 것들에 속하는 기타 요구 성분들을 함유하는 멸균된 비히클에 활성 화합물을 도입하는 것에 의해 제조된다. 멸균 주사가능 용액 제조용 멸균 분말의 경우, 제조 방법에는 활성 성분 더하기 미리 살균-여과된 해당 용액으로부터의 소정의 추가적인 원하는 성분의 분말을 산출하는 진공 건조, 및 냉동-건조 (동결건조)가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0146] 단일 투여 형태를 제조하기 위하여 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료되는 대상체 및 구체적인 투여 양식에 따라 달라지게 된다. 단일 투여 형태를 제조하기 위하여 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 생성시키는 조성물의 양이 될 것이다. 일반적으로, 100% 중 이와 같은 양은 제약 상 허용되는 담체와의 조합에서 활성 성분 약 0.01% 내지 약 99%, 바람직하게는 약 0.1% 내지 약 70%, 가장 바람직하게는 활성 성분 약 1% 내지 약 30%의 범위일 것이다.

[0147] 투여 처방계획은 최적의 원하는 반응 (예컨대 치료 반응)을 제공하도록 조정된다. 예를 들어, 단일 환약이 투여될 수 있거나, 몇 개의 분할된 투여량이 시간에 따라 투여될 수 있거나, 또는 치료 상황의 긴급성이 나타내는 바에 따라 비례하여 투여량이 감소 또는 증가될 수 있다. 비경구 조성물은 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위한 투여 단위 형태로 제제화하기가 특히 유리하다. 본원에서 사용될 때의 투여 단위 형태는 치료될 대상체를 위한 하나의 투여량으로서 적합화된 물리적으로 별개인 단위를 지칭하는데; 각 단위는 요구되는 제약 담체와 결합되어 원하는 치료 효과를 생성시키도록 계산된 사전결정된 양의 활성 화합물을 함유한다. 본 개시 투여 단위 형태에 대한 세부사항은 (a) 활성 화합물의 고유 특성 및 달성될 구체적인 치료 효과, 및 (b) 개체에서의 민감도의 처리를 위한 그와 같은 활성 화합물을 컴파운드하는 업계에서의 고유 제한에 의해 영향을 받으며 그에 따라 직접적으로 달라진다.

[0148] 항체의 투여에 있어서, 투여량은 숙주 체중의 약 0.0001 내지 100 mg/kg, 더 보편적으로는 0.01 내지 5 mg/kg 범위이다. 예를 들어, 투여량은 0.3 mg/kg체중, 1 mg/kg체중, 3 mg/kg체중, 5 mg/kg체중 또는 10 mg/kg체중, 또는 1 내지 10 mg/kg의 범위 이내일 수 있다. 대표적인 치료 처방계획은 주당 1회, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 월당 1회, 3개월마다 1회, 또는 3 내지 6개월마다 1회의 투여를 포함한다. 본 개시 항-노치 1 항체의 투여 처방계획에는 예를 들어 정맥내 투여를 통한 1 mg/kg체중 또는 3 mg/kg체중으로써, 하기의 투여 일정 중 하나를 사용하여 항체가 제공되는 것이 포함된다: (i) 4주마다 6회 투여 이후 3개월마다; (ii) 3주마다; (iii) 3 mg/kg체중 1회 후, 3주마다 1 mg/kg체중.

[0149] 일부 방법에서는, 상이한 결합 특이성을 가지는 2종 이상의 모노클로날 항체가 동시에 투여되는데, 이 경우 투여되는 각 항체의 투여량은 표시된 범위에 속한다. 항체는 보통 다수의 시기에 투여된다. 단일 투여 사이의 간격은 예를 들어 매주, 매월, 3개월마다 또는 매년일 수 있다. 간격은 환자에서 표적 항원에 대한 항체의 혈중 농도를 측정함으로써 나타남에 따라 불규칙할 수도 있다. 일부 방법에서는 약 1 내지 1000 $\mu\text{g/ml}$, 일부 방법에서는 약 25 내지 300 $\mu\text{g/ml}$ 의 혈장 항체 농도가 달성되도록 투여량이 조정된다.

[0150] 다르게는, 항체는 지속 방출 제제로 투여될 수 있는데, 이 경우 덜 빈번한 투여가 요구된다. 투여량 및 빈도는 환자에서의 항체의 반감기에 따라 달라진다. 일반적으로, 인간 항체가 가장 긴 반감기를 나타내며, 그 다음이 인간화된 항체, 키메라 항체 및 비인간 항체이다. 투여량 및 투여 빈도는 치료가 예방용인지 치료용인지에 따라 달라질 수 있다. 예방적 적용에서는, 상대적으로 적은 투여량이 상대적으로 빈번하지 않은 간격으로 오랜 시간 기간 동안 투여된다. 일부 환자는 그의 나머지 수명 동안 계속하여 치료를 받는다. 치료적 적용에서는, 종종 질환의 진행이 감소되거나 종료될 때까지, 바람직하게는 환자가 질환 증상의 부분적이거나 완전한 개선을

나타낼 때까지, 상대적으로 짧은 간격의 상대적으로 많은 투여량이 요구된다. 이후, 환자는 예방적 처방계획을 투여받을 수 있다.

[0151] 본 개시 제약 조성물에서의 활성 성분의 실제 투여량 수준은 환자에게 독성이 아니면서도 특정 환자, 조성물 및 투여 양식에 따른 원하는 치료 반응을 달성하는 데에 효과적인 활성 성분의 양이 얻어지도록 변화될 수 있다. 선택되는 투여량 수준은 사용되는 구체적인 본 개시 조성물, 또는 그의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배설률, 치료 기간, 사용되는 구체적인 조성물과의 조합으로써 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료되는 환자의 연령, 성, 체중, 상태, 일반적인 건강 및 선행 의료 이력, 및 의료 업계에 잘 알려져 있는 기타 인자들을 포함한 다양한 약동학적 인자들에 따라 달라지게 된다.

[0152] 본 개시 항-노치 항체의 "치료 유효 투여량"은 바람직하게는 질환 증상 중증도의 감소, 질환 증상이 없는 기간의 빈도 및 기간의 증가, 또는 질환의 고통으로 인한 손상 또는 장애의 예방을 초래한다. 예를 들어, 노치1-양성 종양 치료의 경우, "치료 유효 투여량"은 바람직하게는 세포 성장 또는 종양 성장을 미치료 대상체에 비해 약 20% 이상, 더욱 바람직하게는 약 40% 이상, 더욱 더 바람직하게는 약 60% 이상, 더 더욱 바람직하게는 약 80% 이상까지 억제한다. 종양 성장을 억제하는 화합물의 능력은 인간 종양에서의 효능을 예상하게 해주는 동물 모델 시스템에서 평가될 수 있다. 다르게는, 조성물의 이와 같은 특성은 숙련 진료의에게 알려져 있는 시험관 내에서의 해당 억제의 검정에 의해 화합물의 억제 능력을 조사하는 것에 의해 평가될 수 있다. 치료 유효량의 치료 화합물은 종양 크기를 감소시키거나, 또는 다르게는 대상체에서의 증상을 개선할 수 있다. 업계 일반의 숙련자라면, 대상체의 크기, 대상체 증상의 중증도, 및 선택된 구체적인 조성물 또는 투여 경로와 같은 인자들을 바탕으로 그와 같은 양을 결정할 수 있을 것이다.

[0153] 본 개시의 조성물은 업계에 알려져 있는 다양한 방법들 중 하나 이상을 사용하는 하나 이상의 투여 경로를 통하여 투여될 수 있다. 숙련 기술자라면 알고 있을 바와 같이, 투여의 경로 및/또는 양식은 원하는 결과에 따라 달라지게 된다. 본 개시의 항체를 위한 투여 경로에는 예컨대 주사 또는 주입에 의한 정맥내, 근육내, 진피내, 복강내, 피하, 척수 또는 기타 비경구 투여 경로가 포함된다. 본원에서 사용될 때의 "비경구 투여"라는 구는 보통 주사에 의한 것인, 소화관내 및 국소 투여가 아닌 다른 투여 양식을 의미하는 것으로써, 여기에는 비제한적으로 정맥내, 근육내, 동맥내, 수막강내, 포내, 안와내, 심장내, 진피내, 복강내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입이 포함된다. 다르게는, 본 개시의 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 국소, 표피 또는 점막 투여 경로와 같은 비-비경구 경로를 통하여, 예컨대 비내로, 경구로, 질내로, 직장내로, 설하로 또는 국소로 투여될 수 있다.

[0154] 이식물, 경피 패치 및 미세캡슐화 전달 시스템을 포함한 지속 방출 제제와 같이, 활성 화합물은 빠른 방출로부터 화합물을 보호하게 되는 담체를 사용하여 제조될 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르소에스테르, 및 폴리락트산과 같은 생분해성인 생체적합성 중합체가 사용될 수 있다. 그와 같은 제제의 제조를 위한 많은 방법들이 특허화되어 있거나, 업계 숙련자에게 일반적으로 알려져 있다. 예를 들어 문헌 [Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978]을 참조하라.

[0155] 본 개시의 용도 및 방법

[0156] 본 개시의 항체, 특히 인간 항체, 항체 조성물 및 방법은 노치1 매개 장애의 진단 및 치료와 관련된 수많은 시험관내 및 생체내 진단 및 치료 효용을 가지고 있다. 예를 들어, 이러한 분자들은 다양한 장애를 치료, 예방 및 진단하기 위하여, 시험관내 또는 생체외로 배양물 중 세포에, 또는 예컨대 생체내로 인간 대상체에 투여될 수 있다. 본원에서 사용될 때, "대상체"라는 용어는 인간 및 비-인간 동물을 포함하고자 하는 것이다. 비-인간 동물에는 모든 척추동물, 예를 들어 포유동물 및 비-포유동물, 예컨대 비-인간 영장류, 양, 개, 고양이, 소, 말, 닭, 양서류, 및 파충류가 포함된다. 바람직한 대상체에는 노치1 활성화에 의해 매개되는 장애를 가지는 인간 환자가 포함된다. 상기 방법은 이상 노치1 발현 또는 활성화와 연관된 장애를 가지는 인간 환자를 치료하는 데에 특히 적합하다. 노치1에 대한 항체가 또 다른 작용제와 함께 투여되는 경우, 상기 2종은 순서대로 또는 동시에 중 어느 하나로 투여될 수 있다.

[0157] 노치1에 대한 본 개시 항체의 특이적 결합을 고려할 때, 본 개시의 항체는 세포 표면에서의 노치1 발현을 특이적으로 검출하는 데에 사용될 수 있으며, 또한 면역친화성 정제를 통하여 노치1을 정제하는 데에 사용될 수 있다.

[0158] 또한, 본 개시의 항체, 항체 조성물 및 방법은 이상 노치1 발현, 예컨대 암을 가지는 대상체를 치료하는 데에

사용될 수 있다. 구체적인 한 실시양태에서, 상기 암은 T-세포 급성 림프모구성 백혈병 (T-ALL)이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 암은 비-소세포 폐암 (NSCLC), 유방암, 결장암 또는 난소암이다.

[0159] 본 개시의 항체에 의해 치료될 수 있는 다른 유형의 이상 노치1 발현에는 예를 들어 중피종, 간쓸개 (간 및 쓸개 관), 1차 또는 2차 CNS 종양, 1차 또는 2차 뇌 종양, 폐암 (NSCLC 및 SCLC), 골암, 췌장암, 피부암, 두부 및 경부의 암, 피부 또는 안내 흑색종, 직장암, 항문부의 암, 위암, 위장관 (위, 결장직장 및 십이지장), 자궁암, 난관의 암종, 자궁내막의 암종, 자궁경부의 암종, 질의 암종, 외음의 암종, 호지킨병, 식도의 암, 소장암, 내분비 시스템의 암, 갑상샘의 암, 부갑상샘의 암, 부신의 암, 연조직의 육종, 요도의 암, 음경의 암, 전립샘암, 고환암, 만성 또는 급성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 림프구성 림프종, 방광의 암, 신장 또는 요관의 암, 신장 세포 암종, 신우의 암종, 중추신경계 (CNS)의 신생물, 1차 CNS 림프종, 비호지킨 림프종, 척수 축 종양, 뇌졸중 신경아교종, 뇌하수체 샘종, 부신피질암, 담낭암, 다발성 골수종, 쓸개관 암종, 섬유육종, 신경모세포종, 망막모세포종, 또는 전기 암들 중 1종 이상의 조합이 포함된다.

[0160] 생체내 및 시험관내에서 본 개시의 항체 조성물 (예컨대 인간 모노클로날 항체, 다중특이적 및 이중특이적 분자, 및 면역접합체)을 투여하는 적합한 경로에 대해서는 업계에 잘 알려져 있어서, 일반 숙련자에 의해 선택될 수 있다. 예를 들어, 항체 조성물은 주사 (예컨대 정맥내 또는 피하)에 의해 투여될 수 있다. 사용되는 분자의 적합한 투여량은 대상체의 연령 및 체중, 그리고 항체 조성물의 농도 및/또는 제제에 따라 달라지게 된다.

[0161] 본 개시의 인간 항-노치1 항체는 1종 이상의 다른 치료제, 예컨대 세포독성 작용제, 방사성독성 작용제 또는 면역억제제와 함께 공동-투여될 수 있다. 항체는 상기 작용제에 연결될 수 있거나 (면역복합체로서), 또는 작용제와 별도로 투여될 수 있다. 후자의 경우 (별도 투여), 항체는 작용제 전에, 후에 또는 그와 동시에 투여될 수 있거나, 또는 다른 공지의 요법, 예컨대 항암 요법, 예컨대 방사선과 공동-투여될 수 있다. 항체와 작용제는 동시 투여, 순차 투여 또는 별도 투여용으로 제조될 수 있다. 그와 같은 치료제에는 특히 항-신생물제 예컨대 그 자체로는 환자에 대하여 독성이거나 준독성(subtoxic)인 농도에서만 효과적인 도세탁셀, 독소루비신 (아드리아마이신), 시스플라틴 블레오마이신 술페이트, 카르무스틴, 클로람부실, 및 시클로포스파미드 히드록시우레아가 포함된다. 시스플라틴은 100 mg/투여로 4주마다 1회 정맥내 투여될 수 있으며, 아드리아마이신은 60 내지 75 mg/ml 투여량으로 21일마다 1회 정맥내 투여될 수 있다. 화학치료제와의 본 개시 인간 항-노치1 항체의 공동-투여는 인간 종양 세포에 대한 세포독성 효과를 산출하는 상이한 기작을 통하여 작용하는 2종 항암제를 제공한다.

[0162] 키트

[0163] 역시 본 개시의 영역에 속하는 것은 본 개시의 항체 조성물 (예컨대 인간 항체, 이중특이적 또는 다중특이적 분자, 또는 면역접합체) 및 사용 지침을 포함하는 키트이다. 키트는 또한 1종 이상의 추가적인 반응물, 예컨대 면역억제제, 세포독성 작용제 또는 방사성독성 작용제, 또는 1종 이상의 추가적인 본 개시 항체 (예컨대 첫 번째 인간 항체와 별개인 노치1 항원의 에피토프에 결합하는 보완적인 활성을 가지는 인간 항체)를 포함할 수 있다.

[0164] 따라서, 본 개시의 항체 조성물에 의해 치료되는 환자는 인간 항체의 치료 효과를 강화하거나 증대시키는 또 다른 치료제, 예컨대 세포독성 또는 방사성독성 작용제를 추가적으로 투여받을 (본 개시 인간 항체의 투여 전에, 그와 동시에, 또는 후에) 수 있다.

[0165] 하기의 실시예로써 본 개시를 추가 설명하는 바, 추가 제한하는 것으로 간주되어서는 아니 된다. 본 출원 전체에 걸쳐 인용되는 모든 도면 및 모든 참고문헌, 특허 및 공개된 특허 출원의 내용은 명시적으로 본원에 참조로써 개재된다.

[0166] 실시예

[0167] 실시예 1

[0168] 제조합 인간 및 마우스 노치1 단백질 면역원의 생성

[0169] A. 인간 및 마우스 노치1 NRR 단백질의 발현 및 정제

[0170] N-말단의 신호 펩티드 및 C-말단의 Avi 및 His6 태그와 함께, 노치1 NRR 영역인 하기 표 1에 나타난 인간 노치1에 대한 서열 2의 아미노산 및 마우스 노치1에 대한 서열 6의 아미노산을 코딩하는 cDNA 구축물을 발현 벡터 pSMED2에 클로닝하였다. 이와 같은 구축물을 COS 또는 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포에 일시적으로 형질감염시키고, 컨디셔닝된 배지 중에서 분비되는 단백질을 SDS-PAGE상에서 분석하였다. S1 절단 부위에서의 프로세싱

후, 노치1 NRR 도메인의 N-말단 ~26 kDa (LNR-A, B, C 및 HD1) 및 C-말단 ~12 kDa (HD2 및 Avi_His 태그) 절반체는 비-공유 상호작용을 통하여 결합되어 유지됨으로써 도 1에 나타낸 바와 같은 이종이량체 복합체를 형성한다. 노치1 NRR의 S1 프로세싱은 CHO 세포로부터 제조된 샘플에서 약 50% 이하인 것으로 측정되었다.

[0171] S1 절단 부위에서의 프로세싱을 강화하기 위하여, 노치1 NRR 발현 구축물을 CHO-PACE 세포 (문헌 [Harrison et, al, Semin Hematol. 1998 Apr;35(2 Suppl 2):4-10])에 형질감염시킨 후, 노치1 NRR의 최고 발현 및 완전한 프로세싱을 나타내는 안정한 세포주를 선택하였다. 일련의 컨디셔닝된 배지 (CM)들에 대하여 이와 같은 세포주 배양의 규모를 확대하고, 그로부터 노치1 NRR 단백질을 정제하였다.

[0172] 농축된 CHO-PACE CM을 4°C에서 1 ml/분 유량의 PBS로 평형화된 27 ml 키아젠 (Qiagen) Ni-NTA 수퍼플로우 (Superflow) 컬럼에 적재하였다. 적재 후, 10 컬럼 부피 (CV)의 PBS, 이어서 10 CV의 완충제 A (300 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, pH 8.0), 그리고 이어서 10 CV의 4% 완충제 B (500 mM 이미다졸, 300 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, pH 8.0)를 사용하여 컬럼을 세척하였다. 인간 노치1 Avi_His는 10 CV에 걸친 100% 완충제 B까지의 선형 구배를 사용하여 용리하였다. 인간 노치1 Avi_His를 함유하는 분획을 합쳐, 여과하고, 칼슘, 마그네슘이 없는 (CMF) PBS에 투석하였다. TBS + 1 mM CaCl₂, 0.1 mM ZnCl₂로 평형화된 직렬의 수퍼덱스(Superdex)-200 및 수퍼덱스-75 컬럼 (총 CV = 600 ml)상에서의 2반복의 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 단백질을 추가 정제하였다. 정제된 인간 및 마우스 노치1 NRR_Avi_His 태그 단백질의 SDS-PAGE 분석은 > 90%의 정제된 단백질이 예상된 노치1 NRR N-말단 및 C-말단 펩티드 크기로 올바르게 절단되었음을 나타내었다. 정제된 인간 및 마우스 노치1 NRR 단백질의 광 산란 (SEC-MAL) 분석은 천연 조건하의 크기 배제 컬럼에서 예상한 40 kDa의 분자량에서 피크를 나타냄으로써, 무손상 노치1 NRR 이종이량체의 적절한 형성을 표시하였다.

[0173] B. 시노-노치1 NRR-Fc 융합 단백질의 발현 및 정제

[0174] N-말단의 신호 펩티드 및 C-말단의 인간 IgG1 Fc 단편과 함께, 시노 노치1 NRR 영역인 하기 표 1에 나타낸 시노 노치1에 대한 서열 10의 아미노산을 코딩하는 cDNA 구축물을 발현 벡터 pSMED2에 클로닝하였다. 시노-노치1 NRR 영역의 완전한 프로세싱을 확보하기 위하여, 이와 같은 구축물을 가용성 PACE 과발현 구축물 (문헌 [Harrison et, al, Semin Hematol. 1998 Apr;35(2 Suppl 2):4-10])와 함께 일시적으로 293 (인비트로젠 (Invitrogen) 사) 세포에 공동-형질감염시켰다. 형질감염된 세포로부터 컨디셔닝된 배지를 수거하고, 단백질 A 친화성 정제를 통하여 시노-노치1 NRR-Fc 융합 단백질을 정제하였다. 다음에, 정제된 단백질을 1 mM의 CaCl₂를 함유하는 TBS에 투석하였다. SDS-PAGE 분석은 > 95%의 단백질 제조 순도로 예상했던 크기 12 Kd (HD1) 및 37 Kd (HD2 + Fc)의 2종의 폴리펩티드 단편을 나타내었다. 천연 조건하에서의 분석용 SEC는 50 K_D 부근의 단일 피크를 나타냄으로써, 상기한 2종 단편의 이종이량체가 제조시 최소량의 응집체 (< 1%)를 포함함을 나타내었다.

[0175] 하기 표 1은 인간, 마우스 및 시노 노치1 NRR 영역의 아미노산 및 뉴클레오티드 서열을 제공한다.

표 1

인간, 마우스 및 시노 노치1 NRR 영역의 아미노산 및 뉴클레오티드 서열.

서열	
1	인간 노치1 NRR 아미노산 서열 (소문자 유형의 아미노산은 Gp1b 신호 서열 및 Avi_His 태그를 나타냄)

```

mpllllllpsplhpGGAGRDIPPLIEEACELPECQE
DAGNKVCSLQCNNHACGWDGGDCSLNFNDP
WKNCTQSLQCWKYFSDGHCDSCNSAGCLF
DGFDCQRAEGGCNPLYDQYCKDHFSDGHCD
QGCNSAECEWDGLDCAEHVPERLAAGTLVVV
VLMPPPEQLRNSSFHFLRELSRVLHTNVVFKRD
AHGQQMIFPYYGREEELRKHPIKRAAEGWAAP
DALLGQVKASLLPGGSEGGRRRRELDPM DVR
GSIVYLEIDNRQCVQASSQCFQSATDVA AFLG
ALASLGS LNIPYKIEAVQSE TVEPPPPAQLHFM
gggggggIndifeaqkiewheggpphhhhh
    
```

[0176]

2	인간 노치1 NRR 아미노산 서열	GGAGRDIPPLIEEACELPECQEDAGNKVCSL QCNNHACGWDDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQ CWKYFSDGHCDSDQNSAGCLFDGFDCCQRAE GQCNP LYDQYCKDHFSDGHCDQGCNSAECE WDGLDCAEHVPERLAAGTLVVVVLMPPEQLR NSSFHFLRELSRVLHTNVVFKRDAHGQQMIFP YYGREEELRKHPKRAAEGWAAPDALLGQVKA SLLPGGSEGGRRRRELDPM DVRSIVYLEIDN RQCVQASSQCFQSATDVA AFLGALASLGS LNI PYKIEAVQSETVEPPPPAQLHFM
3	인간 노치1 NRR 뉴클레오티드 서열 (소분자 유형의 뉴클레오티드는 신호 펩티드 Avi_His 태그 코딩 서열을 나타냄)	atgcctctcctctctgtgctcctgctgccaagcccttacagc gGGTGGGGCCGGGCGGACATCCCCCGC CGCTGATCGAGGAGGCGTGCGAGCTGCCCG AGTGCCAGGAGGACGCGGGCAACAAGGTCT GCAGCCTGCAGTGCAACAACCACGCGTGCG GCTGGGACGGCGGTGACTGCTCCCTCAACT TCAATGACCCCTGGAAGAACTGCACGCACTC TCTGCAGTGCTGGAAGTACTTCAGTGACGGC CACTGTGACAGCCAGTGCAACTCAGCCGGC TGCCCTTCGACGGCTTTGACTGCCAGCGTG CGGAAGGCCAGTGCAACCCCTGTACGACC AGTACTGCAAGGACCACTTCAGCGACGGGC ACTGCGACAGGGCTGCAACAGCGCGGAGT GCGAGTGGGACGGGCTGGACTGTGCGGAG CATGTACCCGAGAGGCTGGCGGCCGGCAGC CTGGTGGTGGTGGTGTGATGCCGCCGGAG CAGCTGCGCAACAGCTCCTTCCACTTCTGC GGGAGCTCAGCCGCGTGCTGCACACCAACG TGGTCTTCAAGCGTGACGCACAGCCGACG AGATGATCTTCCCTACTACGGCCGCGAGGA GGAGCTGCGCAAGCACCCCATCAAGCGTGC CGCCGAGGGCTGGGCCGACCTGACGCCCT GCTGGGCCAGGTGAAGGCTCGCTGCTCCC TGGTGGCAGCGAGGGTGGGCGGGCGGGA GGGAGCTGGACCCCATGGACGTCCGCGGCT CCATCGTCTACCTGGAGATTGACAACCGGCA GTGTGTGCAGGCTCCTCGCAGTGCTTCCA GAGTGCCACCGACGTGGCCGATTCTGGG AGCGCTCGCCTCGCTGGGACGCTCAACAT CCCCTACAAGATCGAGGCCGTGCAGAGTGA GACCGTGGAGCCGCCCGCCGCGCGCAGC TGCACTTCATGggaggggggagcgaggcgactgaa cgacatctcgaggctcagaaaatcgaatggcacgaaggtggc ccaccacatcatcatcatcac
4	인간 노치1 NRR 뉴클레오티드 서열	GGTGGGGCCGGGCGGACATCCCCCGCC GCTGATCGAGGAGGCGTGCGAGCTGCCCGA GTGCCAGGAGGACGCGGGCAACAAGGTCTG CAGCCTGCAGTGCAACAACCACGCGTGCGG CTGGGACGGCGGTGACTGCTCCCTCAACTT CAATGACCCCTGGAAGAATGCACGCAGTCT CTGCAGTGCTGGAAGTACTTCAGTGACGGC CACTGTGACAGCCAGTGCAACTCAGCCGGC TGCCCTTCGACGGCTTTGACTGCCAGCGTG CGGAAGGCCAGTGCAACCCCTGTACGACC AGTACTGCAAGGACCACTTCAGCGACGGGC

[0177]

		TGGGATGGCCTAGACTGTGCTGAGCATGTAC CCGAGCGGCTGGCAGCCGGCACCCCTGGTG CTGGTGGTGCTGCTTCCACCCGACCAGCTA CGGAACAACCTCCTTCCACTTTCTGCGGGAGC TCAGCCACGTGCTGCACACCAACGTGGTCTT CAAGCGTGATGCGCAAGGCCAGCAGATGAT CTTCCCGTACTATGGCCACGAGGAAGAGCT GCGCAAGCACCCAATCAAGCGCTCTACAGT GGGTTGGGCCACCTCTTCACTGCTTCTGCT ACCAGTGGTGGGCGCCAGCGCAGGGAGCT GGACCCCATGGACATCCGTGGCTCCATTGTC TACCTGGAGATCGACAACCGGCAATGTGTGC AGTCATCCTCGCAGTGCTTCCAGAGTGCCAC CGATGTGGCTGCCTTCCTAGGTGCTCTTGCG TCACTTGGCAGCCTCAATATTCTTACAAGAT TGAGGCCGTGAAGAGTGAGCCGGTGGAGCC TCCGCTGCCCTCGCAGCTGCACCTCATGgga gggggaagcggaggcggactgaacgacatctcaggctcag aaaatcgaaatggcacggaaggtggccaccacatcatcatca tcac
8	마우스 노치1 NRR 뉴클레오티드 서열	GGTGGCGCTGGGCGGACATTCCCCACCG CAGATTGAGGAGGCTGTGAGCTGCCTGAG TGCCAGGTGGATGCAGGCAATAAGGTCTGC AACCTGCAGTGTAAATAATCACGCATGTGGCT GGGATGGTGGGACTGCTCCCTCAACTCAA TGACCCCTGGAAGAAGTGCACGAGTCTCTA CAGTGCTGGAAGTATTTTAGCGACGGCCACT GTGACAGCCAGTGAACCTGGCCGGCTGCC TCTTTGATGGCTTCCACTGCCAGCTCACCGA GGGACAGTGCAACCCCTGTATGACCAAGTA CTGCAAGGACCACTTCAGTGATGGCCACTGC GACCAGGGCTGTAAACAGTGCCGAATGTGAG TGGGATGGCCTAGACTGTGCTGAGCATGTAC CCGAGCGGCTGGCAGCCGGCACCCCTGGTG CTGGTGGTGCTGCTTCCACCCGACCAGCTA CGGAACAACCTCCTTCCACTTTCTGCGGGAGC TCAGCCACGTGCTGCACACCAACGTGGTCTT CAAGCGTGATGCGCAAGGCCAGCAGATGAT CTTCCCGTACTATGGCCACGAGGAAGAGCT GCGCAAGCACCCAATCAAGCGCTCTACAGT GGGTTGGGCCACCTCTTCACTGCTTCTGCT ACCAGTGGTGGGCGCCAGCGCAGGGAGCT GGACCCCATGGACATCCGTGGCTCCATTGTC TACCTGGAGATCGACAACCGGCAATGTGTGC AGTCATCCTCGCAGTGCTTCCAGAGTGCCAC CGATGTGGCTGCCTTCCTAGGTGCTCTTGCG TCACTTGGCAGCCTCAATATTCTTACAAGAT TGAGGCCGTGAAGAGTGAGCCGGTGGAGCC TCCGCTGCCCTCGCAGCTGCACCTCATG
9	시노-노치1 NRR-Fc 아미노산 서열 (소문자 유형의 아미노산은 정제된 단백질의 신호 서열 및 hIgG1 Fc 단편을 나타냄)	mgwsciiifvatatgahsGGAGRDIPPLIEEACELPE CQEDAGNKVCSLQCNNHACGWDDGGDCSLNF NDPWKNCTQSLQCWKYFSDGHCDNSQNSAG CLFDGFDCQRAEQCNPLYDQYCKDHFSDGH CDQGCNSAECEWDGLDCAEHVPERLAAGTLV VVVLMPPPEQLRNSSFHFLRELSRVLHTNVVFK

[0179]

		<p>RDAHGQQMIFPYYGREEELRKHPIKRAAEGWA APEALLGQVKASLLPGGGGGRRRRRELDPM VRGSIVYLEIDNRQCVQASSQCFQSATDVA AFLGALASLGSNLNIPYKIEAVQSETVEPP PPAQLHF Mggggsgggggekssdkthtppcpapellg gpsvflfpkpk dtlmisrtpevtcvvdvshedpevkfnwyv dgvevhnaktpr eeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckv snkalpapiektisk akqqprepqvlytppsreemtknqvstclv kgfypsdiavewes ngqpennykttppvldsdgsfflyskltvd ksrwqqgnvfscsvm heahnhytqkslsispk</p>
10	시노-노치1 NRR 아미노산 서열	<p>GGAGRDIPPLIEEACELPEQCQEDAGNKVCSL QCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQ CWKYFSDGHCDSDQNSAGCLDFGDFCQRAE GQCNPLOYDYCKDHFSDGHCDQGCNSAECE WDGLDCAEHVPERLAAGTLVVVVLMPPEQLR NSSFHFLRELSRVLHTNVFKRDAHGQQMIFP YGREEELRKHPIKRAAEGWAAPEALLGQVKA SLLPGGGGGRRRRRELDPM DVRGSIVYLEIDN RQCVQASSQCFQSATDVA AFLGALASLGSNLN IPYKIEAVQSETVEPPPAQLHFM</p>
11	시노-노치1 NRR-Fc 뉴클레오티드 서열 (소문자 유형의 뉴클레오티드는 정제된 단백질의 신호 서열 및 hlgG1 Fc 단편을 나타냄)	<p>atgggatggagctgtatcatcctcttggtagcaacagctacag gcgcgcactccGGTGGGGCCGGCGCGACATCC CCCCGCCGCTGATCGAGGAGCGGTGCGGAGC TGCCCGAGTGCCAGGAGGACGCGGGCAACA AGGTCTGCAGCCTGCAGTGCAACAACCACG CGTGCGGCTGGGACGCGGCTGACTGCTCCC TCAACTTCAATGACCCTGGAAGAAGTGCAC GCAGTCTCTGCAGTGCTGGAAGTACTTCAGT GACGGCCACTGTGACAGCCAGTGCAACTCA GCCGGCTGCTCTTCGACGGCTTTGACTGC CAGCGTGCGGAAGGCCAGTGCAACCCCTG TACGACCAGTACTGCAAGGACCCTTACGCG ACGGGCACTGCGACCAAGGGCTGCAACAGCG CGGAGTGCGAGTGGGACGGGCTGGACTGTG CGGAGCATGTACCCGAGAGGCTGGCGGCCG GCACGCTGGTGGTGGTGGTCTGATGCCGC CGGAGCAGCTGCGCAACAGCTCCTTCCACTT CCTGCGGGAGCTCAGCCGCTGTGTCACAC CAACGTGGTCTTCAAGCGTGACGCACACGG CCAGCAGATGATCTTCCCTACTACGGCCGC GAGGAGGAGCTGCGCAAGCACCCCATCAAG CGTGCCGCCGAGGGCTGGGCCGACCTGAA GCCCTGCTGGGCCAGGTGAAGGCCTCGCTG CTCCCTGGTGGCGGTGGAGGTGGCGGCG GCGGAGGGAGCTGGACCCATGGACGTCCG CGGCTCCATCGTCTACCTGGAGATTGACAAC CGGCAGTGTGTGCAGGCCTCTCGCAGTGC TTCCAGAGTGCCACCGACGTGGCCGATTC CTGGGAGCGCTCGCCTCGCTGGGCAGCCTC AACATCCCTACAAGATCGAGGCCGTGCAGA GTGAGACCGTGGAGCCGCCCGCGGGCG CAGCTGCACTTCATGggagggggcgatccggc ggagggagcccaaatcttgacaaactcacatgccc acggtcccagcacctgaactcctgggggaccgtc agtcttctctt cccccaaaaccgaaggacacctatgatctccggaccct</p>

[0180]

		<p>gaggtcacatgctgggtgggagcgtgagccaagaagaccctg aggtcaagttcaactggtacgtggagcggcggtgaggtgataat gccaaagacaagccgcgaggagcagtaacaacagcacgta ccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgaccaggactggctgaa tggcaaggagtacaagtcaaggtctccaacaaagccctcca gccccatcgagaaaacatctcaaaagcacaaggcagccc cgagaaccacaggtgtacacctgccccatccggaggag atgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtcaaaggctt ctatcccagcgacatgcccgggagtgaggagcaatgggcag ccggagaacaactacaagaccagcctccgtgtgactccg acggctccttctctatagcaagctcaccgtggacaagagca gggtggcagcaggggaaactctctatgctcctgtagcatgagg ctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgccccg ggtaaa</p>
12	시노-노치1 NRR 뉴클레오티드 서열	<p>GGTGGGGCCGGGCGCGACATCCCCCGCC GCTGATCGAGGAGGCGTGCGAGCTGCCCGA GTGCCAGGAGGACGCGGGCAACAAGGTCTG CAGCCTGCAGTGCAACAACCACGCGTGCGG CTGGGACGGCGGTGACTGCTCCCTCAACTT CAATGACCCCTGGAAGAAGTGCACGAGTCT CTGCAGTGTGGAAGTACTTCAAGTACGCGC CACTGTGACAGCCAGTGCACACTCAGCCGGC TGCCCTTTGACGGCTTTGACTGCCAGCGTG CGGAAGGCCAGTGCAACCCCTGTACGACC AGTACTGCAAGGACCACTTCAAGCAGCGGC ACTGCGACAGGGCTGCAACAGCGCGGAGT GCGAGTGGGACGGGCTGGACTGTGCGGAG CATGTACCCGAGAGGCTGGCGGCCGCGCAG CTGGTGGTGGTGGTGTGATGCCGCCGGAG CAGCTGCGCAACAGCTCCTTCCACTTCTGC GGGAGCTCAGCCGCTGCTGCACACCAACG TGGTCTTCAAGCGTGACGCACACGGCCAGC AGATGATCTTCCCTACTACGGCCGCGAGGA GGAGCTGCGCAAGCACCCATCAAGCGTGC CGCCGAGGGCTGGGCCGACCTGAAGCCCT GCTGGGCCAGGTGAAGGCCTCGCTGCTCCC TGGTGGCGGTGGAGGTGGGCGCGCGCGGA GGGAGCTGGACCCCATGGAGTCCCGGGCT CCATCGTCTACCTGGAGATTGACAACCGGCA GTGTGTGCAGGCCTCCTCGCAGTCTTCCA GAGTGCCACCGACGTGGCCGATTCTGGG AGCGCTCGCTCGCTGGGCAGCCTCAACAT CCCCTACAAGATCGAGGCGGTGCAGAGTGA GACCGTGGAGCCGCCCCCGCGGCGCAGC TGCACCTCATG</p>

[0181]

[0182] 실시예 2

[0183] 래트 항-노치1 억제 항체의 생성, 클로닝 및 인간화

[0184] A. 번역화 및 하이브리도마 생성

[0185] 하이브리도마의 생성을 위하여, 실시예 1에서 기술된 인간 및 마우스 면역원을 스프래그-도울리(Sprague-Dawley) 래트에 공동-주사하였다. 프로인트 완전 아주반트 중에 각각 20 µg의 인간 및 마우스 노치1 NRR_Avi_His 재조합 단백질을 함유하는 혼합물의 피하 주사에 의해 스프래그-도울리 래트를 번역화하였다. 2주간격으로 12주 동안 번역화를 반복하였다. 1차 주사 후 0, 35, 49, 및 63일차에 수집된 혈청 샘플들을 하기에 기술되어 있는 바와 같이 효소-연관 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 혈중 항-노치1 항체 역가 활성에 대하여 시험하였다.

[0186] 최적의 역가에 도달하였을 때, 단백질 혼합물의 최종 투여량을 최적의 항체 역가를 가지는 래트에 정맥내로 (꼬리 정맥) 주사하고, 4일 후 비장세포 수집을 위하여 그것을 희생시켰다. PEG 4000을 사용하여, 래트로부터의 완전 비장세포(total splenocyte) (2×10E08)를 마우스 골수종 세포주 P3×63.Ag8.653 (2.5×10E07)과 융합시켰다. 융합된 세포를 96-웰 플레이트에 플레이팅하고 (0.2 ml/웰), HAT 선택 (5×10E-04 M 히포크산틴, 1.6×10E-05 M 티미딘, 4×10E-04 M 아미놉테린, 및 20% 열 불활성화 FCS를 함유하는 RPMI 1640)에 적용하였다.

[0187] 융합 14일 후, 하이브리도마 상청액을 수거하고, 하기에 기술되어 있는 바와 같이 ELISA에 의해, 인간 및/또는 마우스 노치1 NRR 재조합 단백질, 및 U-2 OS 세포의 표면에 발현된 전장 노치1에 결합 활성을 나타내는 래트 IgG의 존재에 대하여 시험하였다. 하기에 기술되어 있는 바와 같은 리포터 유전자 검정에서, 노치1 표적에 대하여 결합 활성을 나타내는 상청액을 노치1 매개 신호전달 활성을 차단하는 그의 능력에 대하여 추가 시험하였다. 다음에, 추가 분석을 위하여, 선택된 노치1 신호전달 차단 클론을 서브클로닝하였다(subcloned).

[0188] B. 노치1 특이적 항체의 스크리닝 및 선택

[0189] 1. 재조합 단백질 결합 ELISA

- [0190] 하이브리도마 배양물로부터의 상청액을 먼저 ELISA에 의해 제조합 인간 및 마우스 면역원에 대한 결합에 대하여 스크리닝하였다. 정제된 인간 또는 마우스 노치1 NRR_Avi_His 태그 단백질을, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 Mg/Ca를 포함하는 100 μl 의 PBS 중 코스타 하이-바운드(CoStar hi-bound) 96-웰 ELISA 플레이트상에 밤새 코팅하였다. PBS-Mg/Ca로 플레이트를 세척하고, PBS-Mg/Ca 중 1% BSA를 사용하여 1시간 동안 블로킹하였다(blocked). 플레이트로부터 블로킹 용액을 따르고, 하이브리도마 배양 상청액을 플레이트에 적용하였다. 실온에서 1시간 동안의 인큐베이션 후, 다시 PBS-Mg/Ca를 사용하여 플레이트를 세척한 후, 블로킹 완충제 중에 희석된 (1:20,000) HRP-접합 2차 항체를 적용하였다. 시험되었던 1차 항체가 래트 IgG인 경우, 2차 항체는 염소 항-래트 IgG Fc (베틀 바이오테크(Bethyl Biotech) 사)이었으며; 1차 항체가 마우스 IgG인 경우, 2차 항체는 염소 항-마우스 IgG Fc (서멀 사이언티픽(Thermal Scientific) 사)이었다.
- [0191] 2차 항체를 사용한 1시간의 인큐베이션 후, 상기한 바와 같이 플레이트를 다시 세척하고, TMB 기질 용액을 첨가하였다. 현상(developing) 반응을 10분 동안 허용한 후, 중지 용액인 0.18 M H_2SO_4 를 첨가하였다. O.D. 450 nM에서의 흡광도를 측정하고, 데이터를 플로팅하여, 마이크로소프트 엑셀(Microsoft Excel) 및 그래프패드-프리즘(Graphpad-Prizm) 소프트웨어로 분석하였다. 하기에 기술되어 있는 바와 같은 추가적인 세포 기반 ELISA를 위하여, 인간 및/또는 마우스 노치1 NRR에 대하여 결합 활성을 나타내는 항체를 선택하였다.
- [0192] 2. 세포 기반 ELISA
- [0193] 다음에, 상기한 제조합 노치1 NRR 기반 ELISA에서 면역원에 대하여 양성의 결합을 나타내는 클론으로부터의 상청액을 세포-기반 ELISA에서 세포 표면 노치1 결합에 대하여 스크리닝하였다. 세포 표면에서 인간 또는 마우스 전장 노치1 단백질을 안정하게 과발현하는 U-2 OS 세포를 ELISA 분석 전일에 50,000 세포/웰로 96웰 플레이트 (백색 불투명, BD/VWR)에 플레이팅하였다. ELISA 당일, 웰로부터 배양 배지를 제거하고, 연속 희석된 (블로킹 완충제 중에 1:3) 항체 용액 또는 하이브리도마 배양 상청액을 플레이트에 적용하였다. 실온에서 2시간 동안 플레이트를 인큐베이팅한 후, PBS-Mg/Ca로 세척하였다. 다음에, HRP-접합된 2차 항체를 적용하고, 제조합 단백질 ELISA를 위하여 상기한 바와 같이 세포와 함께 1시간 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 PBS-Mg/Ca로 세척한 후, 피코-케미루미네센트(Pico-Chemiluminescent) 현상 키트 (서멀 사이언티픽 사)를 사용하여 현상하고, 제조사의 지침에 따라 화학발광 측정을 수행하였다. 마이크로소프트 엑셀 및 그래프패드-프리즘 소프트웨어를 사용하여 데이터 플로팅 및 분석을 수행하였다. 이와 같은 데이터를 하기 실시예에 기술되어 있는 바와 같이 하이브리도마 클론의 스크리닝 및 모 래트 및 인간화 항체의 특성화에 사용하였다.
- [0194] 3. 리포터 유전자 검정
- [0195] 다음에, 면역원에 대하여 양성의 결합을 나타내는 클론으로부터의 상청액을 인간 및 마우스 노치1 리포터 유전자 공동-배양 검정 (RGA)에서 중화 활성에 대하여 스크리닝하였다. 스크리닝 결과를 1차 클론을 선택하는 데에 사용하였다.
- [0196] 인간 노치1 리포터 세포를 트립신처리하고, 완전 맥코이(McCoy's) 5A 배지 (10% FBS, 및 페니실린, 스트렙토마이신을 포함하는 맥코이 5A, 인비트로젠 사) 중에서 배양 플레이트로부터 수거하고, 계수하였다. 연속 희석된 (완전 맥코이 5A 배지 중에 1:3) 항체 용액 또는 하이브리도마 배양 상청액의 존재하에, 96웰 배양 플레이트 (백색 불투명, BD/VWR)에서 80 μl /웰의 총 부피로 3,000 세포/웰이 되도록, 동일 배지를 사용하여 적절한 세포 희석물을 제조하였다. 세포와 항체 희석물의 혼합물을 세포 배양 인큐베이터 (37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2) 내의 플레이트에서 1시간 동안 인큐베이팅한 후, 15,000/웰의 인간 DLL4-HEK293 세포를 각 웰에 첨가하였다. hDLL4-HEK293 세포의 첨가 후, 인큐베이터 내에서 20시간 동안 플레이트를 추가 인큐베이팅하고, 듀얼-글로(Dual-Glo) 루시퍼라제 검정 시스템 (프로메가(Promega) 사)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 반딧불이 루시퍼라제 및 내부 조절 레닐라(Renilla) 루시퍼라제 활성을 측정하였다. 마이크로소프트 엑셀 및 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 데이터를 플로팅 및 분석하였다. 40,000세포/웰의 마우스 DLL4-HEK293 세포와 함께 20,000 세포/웰의 마우스 노치1 리포터 세포가 공동-배양된 것 이외에는 인간 노치1 리포터 유전자 공동-배양 검정에 대하여 기술된 바와 같이, 마우스 노치1 리포터 유전자 공동-배양 검정을 수행하였다.
- [0197] C. 클로닝 및 서열분석
- [0198] 하기에 추가 기술되는 클론 438 및 351과 같이, 확인된 세포 표면 결합 또는 중화 활성을 가지는 1차 클론들을 서브클로닝하였다. 서브클론으로부터의 RNA를 추출하고, 하기에 기술되어 있는 바와 같은 RT-PCR 클로닝을 통하여 발현된 항체로부터의 가변 영역 DNA 서열을 획득하였다.

[0199] 키아젠 RNaseasy 미니 키트를 사용한 총 RNA 단리를 위하여, 1 내지 5백만개의 서브클로닝된 하이브리도마 세포를 균질화하였다. 다음에, 수퍼스크립트(SuperScript) III RT 키트 (인비트로젠 사)를 사용하여 제1 가닥 cDNA를 생성시켰다. 이어서 항-노치1 IgG의 가변 영역에 대한 이중 가닥 cDNA를 생성시키고, 하기에 기술되어 있는 바와 같이 래트 IgG 중쇄 (IgG1, 2a, 2b) 및 경쇄 (카파 또는 람다) 불변 영역으로부터의 프라이머를 사용한 PCR에 의해 증폭하였다. PCR 순환 조건: 95℃에서 1분 동안 1순환; 95℃에서 1분 동안, 63℃에서 1분 동안 및 72℃에서 1분 동안 25순환. 생성되는 RT-PCR 생성물을 TOPO-블러트(Blunt) 클로닝 벡터 (인비트로젠 사)에 클로닝하고, 통상적인 방법에 의해 서열분석하였다.

[0200] 모 래트 438 및 모 래트 351 (이하 각각 "래트 438" 및 "래트 351")로부터의 가변 (V) 영역 cDNA를 래트 가변 중쇄 (VH)가 뮤린 IgG1 (mIgG1)과 인프레임(in frame) 융합되어 있으며 래트 가변 경쇄 (VL)가 뮤린 카파와 융합되어 있는 포유동물 발현 벡터에 서브클로닝하였다. 유사하게, 래트 V 영역 및 인간 IgG 불변 영역을 가지는 키메라 항체의 생성을 위하여, 래트 VH를 인간 IgG1 (hIgG1)과, 그리고 VL을 인간 카파와 각각 인프레임 융합시켰다. COS 세포에서의 일시적 형질감염에 의해 이와 같은 구축물로부터 상응하는 키메라 항체를 생성시킨 후, 그의 결합 및 중화 활성을 검정 확인하였다.

[0201] 하기 실시예들에 기술되어 있는 바와 같이, 재조합 항원 및 세포 표면 표적 결합, RGA 및 혈관생성 검정에서의 노치1 활성의 억제, 및 마우스 모델에서의 종양 성장 억제를 포함한 일련의 시험관내 및 생체내 검정에서 정제된 래트 가변-마우스 불변 키메라 항체 (이하 "래트 438-mIgG1" 및 "래트 351-mIgG1")를 추가 특성화하였다. 이러한 연구들을 바탕으로 선도 항체(lead antibody) 래트 438 및 래트 351을 선택하였다. 하기 표 2에, 래트 438 및 래트 351의 가변 영역 및 추가적인 클론 90, 132, 132 (A12/G111) 및 137의 다양한 영역들의 아미노산 및 핵산 서열을 목록화하였다.

표 2

래트 가변 영역 서열

서열		
13	438 중쇄 가변 영역 아미노산 서열	AVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCTASGFTFS SFAMAWVRQAPTKGLEWVASISYGGADTY YRDSVKGRFTISRDNKSSLYLQMDSLRSE DTSTYYCAKDLPPYYGYTPFVMDAWGQGTS VTVSS
14	438 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열	GCGGTACAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAG GCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCTTGAAA CTCTCCTGTACAGCCTCTGGATTCACTTT CAGTAGCTTTGCAATGGCCTGGGTCCGC CAGGCTCCAACGAAGGGCTGGAGTGGG TCGCATCCATTAGTTATGGTGGTGTCTGAC ACTTACTATCGAGACTCCGTGAAGGGCC GATTCACTATCTCCAGAGATAATGCAAAA AGCAGCCTATATTTGCAAATGGACAGTCT GAGGTCTGAGGACACGTCCACTTATTA GTGCAAAAGACCTTCCATACTACGGATAT ACCCCTTTGTTATGGATGCCTGGGGTCA GGGAACCTCAGTCACTGTCTCTCA

[0202]

15	438 중쇄 가변 영역 CDR1 아미노산 서열 카바트	SFAMA
16	438 중쇄 가변 영역 CDR1 아미노산 서열 초티아	GFTFSSFAMA
17	438 중쇄 가변 영역 CDR1 뉴클레오티드 서열 카바트	TCCTTCGCCATGGCC
18	438 중쇄 가변 영역 CDR1 뉴클레오티드 서열 초티아	GGATTCACCTTTAGTTCCTTCGCCATGGCC
19	438 중쇄 가변 영역 CDR2 아미노산 서열 카바트	SISYGGADTYRDSVKG
20	438 중쇄 가변 영역 CDR2 아미노산 서열 초티아	SYGGAD
21	438 중쇄 가변 영역 CDR2 뉴클레오티드 서열 카바트	TCCATCTCCTATGGAGGCGCTGACACCTACTACCGGGACTCCGTGAAGGGC
22	438 중쇄 가변 영역 CDR2 뉴클레오티드 서열 초티아	CCTATGGAGGCGCTGAC
23	438 중쇄 가변 영역 CDR3 아미노산 서열 카바트 및 초티아	DLPYYGYTPFVMDA
24	438 중쇄 가변 영역 CDR3 뉴클레오티드 서열 카바트 및 초티아	GATCTGCCCTACTACGGCTACACCCCTTCGTGATGGACGCC
25	438 경쇄 가변 영역 아미노산 서열	DIMLTQSPPTLSVTPGETISLSCRASQRINTDLHWYQQKPNESPRVLIKAFASQTISGVPSRFSGSGSGTDFTLNINRVEPEDFSVYYCQQNSWPYTFGAGTKLELK
26	438 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열	GACATCATGCTGACTCAGTCTCCACCTACCCTGTCTGTAACCTCAGGAGACCATCATGTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGAATTAACTGACTTACATTGGTATCAGCAAAAACCAAATGAGTCTCCAAGGGTTCTCATCAATTTGCTTCCCAGACCATCTCTGGAGTCCCTCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAATATTAACAGAGTAGAGCCTGAAGATTTTCAGTTATTACTGTCAACAGAGTAATAGCTGGCCATACACGTTTGCGCTGGACCAAGCTGGAAGCTGAAA
27	438 경쇄 가변 영역 CDR1 아미노산 서열 카바트 및 초티아	RASQRINTDLH
28	438 경쇄 가변 영역 CDR1 뉴클레오티드 서열 카바트 및 초티아	CGGGCCTCCCAGCGGATCAACACCGACCTGCAC

[0203]

29	438 경쇄 가변 영역 CDR2 아미노산 서열 카바트 및 초티아	FASQTIS
30	438 경쇄 가변 영역 CDR2 뉴클레오티드 서열 카바트 및 초티아	TTGCCAGCCAGACCATCTCC
31	438 경쇄 가변 영역 CDR3 아미노산 서열 카바트 및 초티아	QQSNSWPYT
32	438 경쇄 가변 영역 CDR3 뉴클레오티드 서열 카바트 및 초티아	CAGCAGTCCAACCTCTGGCCCTACACC
33	351 중쇄 가변 영역 아미노산 서열	EVQLVESGGGLVQPGRSLKVSCLASGFTFS HYGMNWIRQAPGKGLDWVASISRSGSYIR YVDTVKGRFTVSRDIKNTLYLQMTSLRSE DTALYYCAREGQFGDYFEYWGQGMVTV SS
34	351 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAG GCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCCTGAA AGTCTCCTGTTTAGCCTCTGGATCACTTT CAGTCACTATGGAATGAACTGGATTCCGC AGGCTCCAGGAAGGGGCTGGACTGGGT TGCATCTATTAGTAGGAGTGGCAGTTACA TCCGCTATGTAGACACAGTGAAGGGCCG ATCACCGTCTCCAGAGACATTGCCAAGA ACACCCGTACCTGCAAATGACCAGTCTG AGGTCTGAAGACTGCCTTGATTACTG TGCAAGAGAGGGACAATTCGGGGACTAC TTTGAGTACTGGGGCCAAGGAGTCATGG TCACAGTCTCCTCA
35	351 중쇄 가변 영역 CDR1 아미노산 서열 카바트	HYGMN
36	351 중쇄 가변 영역 CDR1 아미노산 서열 초티아	GFTFSHYGMN
37	351 중쇄 가변 영역 CDR1 뉴클레오티드 서열 카바트	CACTATGGAATGAAC
38	351 중쇄 가변 영역 CDR1 뉴클레오티드 서열 초티아	GGATTCACCTTCAGTCACTATGGAATGAA C
39	351 중쇄 가변 영역 CDR2 아미노산 서열 카바트	SISRSGSYIRYVDTVKG
40	351 중쇄 가변 영역 CDR2 아미노산 서열 초티아	SRSGSY
41	351 중쇄 가변 영역 CDR2 뉴클레오티드 서열 카바트	TCTATTAGTAGGAGTGGCAGTTACATCCG CTATGTAGACACAGTGAAGGGC
42	351 중쇄 가변 영역 CDR2 뉴클레오티드 서열 초티아	AGTAGGAGTGGCAGTTAC

[0204]

43	351 중쇄 가변 영역 CDR3 아미노산 서열 카바트 및 초티아	EGQFGDYFEY
44	351 중쇄 가변 영역 CDR3 뉴클레오티드 서열 카바트 및 초티아	GAGGGACAATTCGGGGACTACTTTGAGTAC
45	351 경쇄 가변 영역 아미노산 서열	DIMLTQSPATLSVTPGERISLSCRASQKIST NLHWYQQKPNESPRILIKYASQTISGIPSRF SGSGSGTDFTLHINTVEPEDFSVYYCQQTN SWPLTFGSGTKLEIK
46	351 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열	GACATCATGCTGACTCAGTCTCCAGCTAC CCTGTCTGTAACCTCCAGGAGAGAGAATCA GTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAAAAATT AGCACTAACTTACATTGGTATCAGCAAAA GCCAAATGAGTCTCCAAGGATTCTCATCA AATATGCTTCCCAGACCATCTCTGGAATC CCCTCCAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAG GGACAGATTTCACTCTCCATATTAACACA GTAGAGCCTGAAGATTTTTAGTTTTATTAC TGTAACAGACTAATAGTTGGCCGCTCAC GTTTCGGTTCTGGGACCAAGCTGGAGATC AAG
47	351 경쇄 가변 영역 CDR1 아미노산 서열 카바트 및 초티아	RASQKISTNLH
48	351 경쇄 가변 영역 CDR1 뉴클레오티드 서열 카바트 및 초티아	AGGGCCAGTCAGAAAATTAGCACTAACTT ACAT
49	351 경쇄 가변 영역 CDR2 아미노산 서열 카바트 및 초티아	YASQTIS
50	351 경쇄 가변 영역 CDR2 뉴클레오티드 서열 카바트 및 초티아	TATGCTTCCCAGACCATCTCT
51	351 경쇄 가변 영역 CDR3 아미노산 서열 카바트 및 초티아	QQTNSWPLT
52	351 경쇄 가변 영역 CDR3 뉴클레오티드 서열 카바트 및 초티아	CAACAGACTAATAGTTGGCCGCTCACG
53	90 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 (카바트 CDR 밀출)	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCLASGFTFS HYGVNWIRQAPGKGLEWIASISRSSSYIYYA DTVKGRFTISRDNKNTLFLQLTSLRSEDTA LYYCAREGQFGDYFEYWGRGVMVTVSS
54	90 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열	GAGGTGCAGCTAGTGGAGTCTGGAGGAG GCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCTGAA ACTCTCCTGTTTAGCCTCTGGATTCACITTT CAGTCACTATGGAGTGAACGGATTGCGC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGAT TGCATCTATTAGTAGAAGTAGCAGTTACA TCTACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGA ACACCCTGTTCTGCAATTGACCACTCTG AGGTCTGAAGACACTGCCTTGTTACTG

[0205]

		TGCAAGAGAGGGGCAATTCGGGGACTAC TTTGAATACTGGGGCCGAGGAGTCATGG TCACAGTCTCCTCA
55	90 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (카바트 CDR 밀출)	DIILTQSPAALSVTPGESISLSCRASQSINTN LHWYQQKPNESPRVLIKYASQTISGIPSRFS GSGSGTDFTLNINRVEPEDFSVYYCQQSNS WPLTFGSGTKLEIK
56	90 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열	GACATCATACTGACTCAGTCTCCAGCTGC CCTGTCTGTAACCTCAGGAGAGGCATCA GTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATT AACACTAACTTGCATTGGTATCAGCAAAA ACCAATGAGTCTCCAAGGGTTCTCATCA AATATGCTTCCCAGACCATCTCTGGAATC CCCTCCAGGTTCACTGGCAGTGGATCAG GGACAGATTTCACTCTCAATATTAACAGA GTAGAGCCTGAAGATTTTTCAGTTTATTAC TGTCACAGAGTAATAGCTGGCCGCTCAC GTTCCGTTCTGGGACCAAGCTGGAGATC AAA
57	132 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 (카바트 CDR 밀출)	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCLASGFTFS HYGMNWRQAPGKGLEWITSITSSSYIYYA DTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMTLSRSED ALYYCAREGQFGDYFDYWGQGMVTVSS
58	132 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAG GCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCTGAA ACTCTCCTGTTTAGCCTCTGGATTCACIT CAGTCACTATGGAATGAACTGGATTCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGAT TACATCTATTACTAGTAGTAGCAGTTACAT CTACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCGA TTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAA CACCCGTACCTGCAAATGACCAGTCTGA GGTCTGAAGACACTGCCTTGTATTACTGT GCAAGAGAGGGGCAATTCGGGGACTACT TTGATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTC ACAGTCTCCTCA
59	132 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (카바트 CDR 밀출)	DIMLTQSPATLSVTPGESISLSCRASQSINT NLHWYQQKPNESPRVLIKYASQTISGIPSRF S S GSGTDFTLNINRVEPEDFSVYYCQQSN SWPLTFGSGTKLEIK
60	132 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열	GACATCATGCTGACTCAGTCTCCAGCTAC CCTGTCTGTAACCTCAGGAGAGGCATCA GTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATT AACACTAACTTACATTGGTATCAGCAAAA CCAAATGAGTCTCCAAGGGTTCTCATCAA ATATGCTTCCCAGACCATCTCTGGAATCC CCTCCAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGG GACAGATTTCACTCTCAATATTAACAGAGT AGAGCCTGAAGATTTTTCAGTTTATTACTG TCAACAGAGTAATAGCTGGCCGCTCACGT TCGGTTCTGGGACCAAGCTGGAGATCAA A

[0206]

61	132_A12 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 (카바트 CDR 밀출)	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCLASGFTFS HYGMNWIRQAPGKLEWITSITSSSSYYIA DTVKGRFTISRDNKNTLYLQMTSLRSED ALYYCAREGQFGDYFDYWGQGMVTVSS
62	132_A12 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAG GCTTAGTGCAGCCTGGAAGTCCCTGAA ACTCTCCTGTTAGCCTCTGGATCACTTT CAGTCACTATGGAATGAACTGGATTGCGC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGAT TACATCTATTACTAGTAGCAGTTACAT CTACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCGA TTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAA CACCTGTACCTGCAAATGACCAGTCTGA GGTCTGAAGACACTGCCTTGTATTACTGT GCAAGAGAGGGGCAATTCGGGGACTACT TTGATTACTGGGCCAAGGAGTCATGGTC ACAGTCTCCTCA
63	132_G11 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (카바트 CDR 밀출)	DIMLTQSPATLSVTPGESISLSCRASQSINT NLHWYQQKPNESPRVLIKYASQTISGIPSRF SGSGSGTDFTLNINRVEPEDFSVYCCQQSN SWPLTFGSGTKLEIK
64	132_G11 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열	GACATCATGCTGACTCAGTCTCCAGCTAC CCTGTCTGTAAGTCCAGGAGAGAGCATCA GTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAGTATT AACACTAACTTACATTGGTATCAGCAAAAA CCAAATGAGTCTCCAAGGTTCTCATCAA ATATGCTTCCAGACCATCTCTGGAATCC CCTCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGG GACAGATTTCACTCTCAATATTAACAGAGT AGAGCCTGAAGATTTTTTCAAGTTTATTACTG TCAACAGAGTAATAGCTGGCCGCTCACGT TCGGTTCTGGACCAAGCTGGAGATCAA A
65	137 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 (카바트 CDR 밀출)	QVQVKESGPGPLVQPSQTLSTCTVSGFSLT SYHVSWVRQPPGKLEWWMGAIWTTGGSTA YNSLLKSRLSISRDISKSQVFLKMNSLQTED TATYYCARADFYVMDAWGQGASVTVSS
66	137 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열	CAGGTGCAGGTGAAGGAGTCAAGACCTG GTCTGGTGCAGCCCTCACAGACTTTGTCT CTCACCTGCAGTGTCTCTGGGTTCTCACT AACCAGCTATCATGTAAGCTGGGTTCCGCC AGCCTCCAGGAAAAGGCTGGAGTGGAT GGGAGCAATATGGACTGGTGAAGCACA GCATATAATTCAGTCTCAATCCCGACT GAGCATCAGCAGGGACATCTCAAAGAGC CAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAA ACTGAAGACACAGCCACTTACTACTGTGC CAGAGCCGATTTCTATGTTATGGATGCCT GGGGTCAAGGAGCTTCAGTCACTGTCTC CTCA

[0207]

67	137 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (카바트 CDR 밀출)	DIMLTQSPVTLVSPGESISLSCRASQSIST DLHWYQQKPNESPRVLIKYGSQTISGIPSRF SGSGSGTDFTLNINRVEPEDFSVYCCQQSN SWPWTFGGGTKLEIK
68	137 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열	ACATCATGCTGACTCAGTCTCCAGTTACC CTGTCTGTGCTCCAGGAGAGAGCATCA GTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAGTATT AGCACTGACTTGCAATGGTATCAGCAAAA ACCAAATGAGTCTCCAAGGTTCTCATCA AATATGGTTCAGACCATCTCTGGAATC CCCTCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAG GGACAGATTTCACTCTCAATATTAACAGA GTAGAGCCTGAAGATTTTTTCAAGTTTATTAC TGTCAGCAGAGTAATAGCTGGCCATGGA CATTGGTGGAGGCCAAGCTGGAATT GAAA

[0208]

[0209] D. 래트 438 및 래트 351의 인간화

[0210] 래트 438 및 래트 351을 인간화하고, 인간화된 모노클로날 항체 438 및 351 (이하 각각 "인간화 438" 및 "인간화 351")을 제공하도록 더 발달시켰다. hIgG1의 효과인자 기능을 불활성화하는 하부 힌지 영역의 3중 돌연변이 (L234A/L235A/G237A)를 가지는 인간 IgG1 중쇄 불변 영역, 및 인간 카파 경쇄 불변 영역을 인간화 438 및 인간화 351 항체의 불변 영역으로 사용하였다. 래트 438 및 래트 351 가변 영역의 인간화는 CDR 그래프트 전략을 사용하여 수행하였다.

[0211] 표 3은 인간화 438 및 인간화 351 변이체의 다양한 영역들의 아미노산 및 핵산 서열을 제공한다. 선도 인간화

438 변이체는 시험 후 VH1.1/VL1.8인 것으로 측정되었다. 인간화된 438 VH1.1/VL1.8은 서열 71에 제시되어 있는 바와 같은 가변 중쇄 및 서열 97에 제시되어 있는 바와 같은 가변 경쇄를 가진다. 인간화 438 변이체의 경우, 변이체 VH 1.0 및 1.1의 CDR 영역이 동일하며, 변이체 VL 1.0, 1.1, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 1.10 및 1.11의 CDR 영역이 동일하다. 선도 인간화 351 변이체는 시험 후 VH1.0/VL1.1인 것으로 측정되었다. 인간화된 351 VH1.0/VL1.1은 서열 115에 제시되어 있는 바와 같은 가변 중쇄 및 서열 129에 제시되어 있는 바와 같은 가변 경쇄를 가진다. 인간화 351 변이체의 경우, 변이체 VL 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6 및 1.7의 CDR 영역이 동일하다.

표 3

인간화 438 및 인간화 351 서열

서열		
69	438 중쇄 가변 영역 아미노산 (VH1.0)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFAMAWVRQAPGKGLEWVASISYGGADTYRDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLPYYGYTPFVMDAWGQGT LVTVSS
70	438 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (VH1.0)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGA GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACC TTTAGTTCCTTCGCCATGGCCTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG GGTGGCCTCCATCTCCTATGGAGGCGCT GACACCTACTACCGGACTCCGTGAAGG GCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA TTACTGTGCGAGAGATCTGCCCTACTACG GCTACACCCCTTCGTGATGGACGCCTG GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC TCA
71	438 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 (VH1.1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFAMAWVRQAPGKGLEWVASISYGGADTYRDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLFPYYGYTPFVMDAWGQGT LVTVSS
72	438 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (VH1.1)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGA GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACC TTTAGTTCCTTCGCCATGGCCTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG GGTGGCCTCCATCTCCTATGGAGGCGCT GACACCTACTACCGGACTCCGTGAAGG GCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA TTACTGTGCGAAGGATCTGCCCTACTACG GCTACACCCCTTCGTGATGGACGCCTG GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC TCA
73	438 중쇄 가변 영역 CDR1 아미노산 서열 (VH1.1) 카바트	SFAMA
74	438 중쇄 가변 영역 CDR1 아미노산 서열 (VH1.1) 초티아	GFTFSSFAMA
75	438 중쇄 가변 영역 CDR1 뉴클레오티드 서열 (VH1.1) 카바트	TCCTTCGCCATGGCC
76	438 중쇄 가변 영역 CDR1 뉴클레오티드 서열 (VH1.1) 초티아	GGATTCACCTTTAGTTCCTTCGCCATGGC C

[0212]

77	438 중쇄 가변 영역 CDR2 아미노산 서열 (VH1.1) 카바트	SISYGGADTYRDSVKG
78	438 중쇄 가변 영역 CDR2 아미노산 서열 (VH1.1) 초티아	SYGGAD
79	438 중쇄 가변 영역 CDR2 뉴클레오티드 서열 (VH1.1) 카바트	TCCATCTCCTATGGAGGCGCTGACACCTA CTACCGGGACTCCGTGAAGGGC
80	438 중쇄 가변 영역 CDR2 뉴클레오티드 서열 (VH1.1) 초티아	CCTATGGAGGCGCTGAC
81	438 중쇄 가변 영역 CDR3 아미노산 서열 (VH1.1) 카바트 및 초티아	DLPYGYTPFVMDA
82	438 중쇄 가변 영역 CDR3 뉴클레오티드 서열 (VH1.1) 카바트 및 초티아	GATCTGCCCTACTACGGCTACACCCCTT CGTGATGGACGCC
83	438 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (VL1.0)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQRINT DLHWYQQKPKGKAPKLLIYFASQTISGVPSR FSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIK
84	438 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (VL1.0)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGCGGAT CAACACCGACCTGCACTGGTATCAGCAG AAACCAGGAAAGCCCTAAGCTCCTGAT CTATTTGCCAGCCAGACCATCTCCGGG GTCCCATCAAGTTTCACTGGCAGTGGAT CTGGGACAGATTTCACTCTACCATCAGC AGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCTA CTACTGTCAGCAGTCCAACCTCTGGCCCT ACACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGA GATCAAA
85	438 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (VL1.1)	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQRINT DLHWYQQKPKGKAPKVLIFASQTISGVPSR FSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIK
86	438 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (VL1.1)	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGCGGAT CAACACCGACCTGCACTGGTATCAGCAG AAACCAGGAAAGCCCTAAGGTGCTGA TCAAGTTGCCAGCCAGACCATCTCCGG GGTCCCATCAAGTTTCACTGGCAGTGGAT TCTGGGACAGATTTCACTCTACCATCAG CAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCT ACTACTGTGAGCAGTCCAACCTCTGGCCC TACACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGG AGATCAAA
87	438 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (VL1.3)	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQRINT DLHWYQQKPKGKAPKLLIYFASQTISGVPSR FSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIK

[0213]

88	438 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (VL1.3)	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGCGGAT CAACACCGACCTGCACTGGTATCAGCAG AAACCAGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CTATTTGCCAGCCAGACCATCTCCGGG GTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGAT CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC AGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTA CTACTGTCAGCAGTCCAACCTCTGGCCCT ACACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGA GATCAAA
89	438 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (VL1.4)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQRINT DLHWYQQKPGKAPKVLIIYFASQTISGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS NSWPTYFGQGTKLEIK
90	438 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (VL1.4)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGCGGAT CAACACCGACCTGCACTGGTATCAGCAG AAACCAGGAAAGCCCCTAAGGTGCTGA TCTATTTGCCAGCCAGACCATCTCCGGG GTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGAT CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC AGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTA CTACTGTCAGCAGTCCAACCTCTGGCCCT ACACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGA GATCAAA
91	438 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (VL1.5)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQRINT DLHWYQQKPGKAPKLLIKFASQTISGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS NSWPTYFGQGTKLEIK
92	438 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (VL1.5)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGCGGAT CAACACCGACCTGCACTGGTATCAGCAG AAACCAGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CAAGTTCGCCAGCCAGACCATCTCCGGG GTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGAT CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC AGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTA CTACTGTCAGCAGTCCAACCTCTGGCCCT ACACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGA GATCAAA
93	438 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (VL1.6)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQRINT DLHWYQQKPGKAPKVLIIYFASQTISGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS NSWPTYFGQGTKLEIK
94	438 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (VL1.6)	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA

[0214]

		CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGCGGAT CAACACCGACCTGCACTGGTATCAGCAG AAACCAGGAAAGCCCCTAAGGTGCTGA TCTATTTGCCAGCCAGACCATCTCCGGG GTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGAT CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC AGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTA CTACTGTCAGCAGTCCAACCTCTGGCCCT ACACCTTTGGCCAGGGACCAAGCTGGA GATCAAA
95	438 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (VL1.7)	DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQRINT DLHWYQQKPGKAPKLLIKFASQTISGVPSR FSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQS NSWPYTFGGGKLEIK
96	438 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (VL1.7)	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGCGGAT CAACACCGACCTGCACTGGTATCAGCAG AAACCAGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CAAGTTGCCAGCCAGACCATCTCCGGG GTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGAT CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC AGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTA CTACTGTCAGCAGTCCAACCTCTGGCCCT ACACCTTTGGCCAGGGACCAAGCTGGA GATCAAA
97	438 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (VL1.8)	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQRINT DLHWYQQKPGKAPKVLIKFASQTISGVPSR FSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQS NSWPYTFGGGKLEIK
98	438 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (VL1.8)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGCGGAT CAACACCGACCTGCACTGGTATCAGCAG AAACCAGGAAAGCCCCTAAGGTGCTGA TCAAGTTGCCAGCCAGACCATCTCCGG GGTCCCATCAAGTTCACTGGCAGTGGGA TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG CAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTT ACTACTGTCAGCAGTCCAACCTCTGGCCC TACACCTTTGGCCAGGGACCAAGCTGG AGATCAAA
99	438 경쇄 가변 영역 CDR1 아미노산 서열 (VL1.8) 카바트 및 초티아	RASQRINTDLH
100	438 경쇄 가변 영역 CDR1 뉴클레오티드 서열 (VL1.8) 카바트 및 초티아	CGGGCCTCCAGCGGATCAACACCGACC TGAC
101	438 경쇄 가변 영역 CDR2 아미노산 서열 (VL1.8) 카바트 및 초티아	FASQTIS
102	438 경쇄 가변 영역 CDR2 뉴클레오티드 서열 (VL1.8) 카바트 및 초티아	TTCGCCAGCCAGACCATCTCC

[0215]

103	438 경쇄 가변 영역 CDR3 아미노산 서열 (VL1.8) 카바트 및 초티아	QQSNSWPYTT
104	438 경쇄 가변 영역 CDR3 뉴클레오티드 서열 (VL1.8) 카바트 및 초티아	CAGCAGTCCAACCTCCTGGCCCTACACC
105	438 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (VL1.9)	DIMLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQRINT DLHWYQQKPKGKAPKVLKIFASQTISGVPSR FSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIK
106	438 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (VL1.9)	GACATCATGCTGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGCGGAT CAACACCGACCTGCACTGGTATCAGCAG AAACCAGGAAAGCCCCTAGGGTGTCTGA TCAAGTTCGCCAGCCAGACCATCTCCGG GGTCCCATCAAGGTTTCAAGTGGCAGTGG TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG CAGTCTGCAACCTGAAGATTTTCAACTT ACTACTGTGACGAGTCCAACCTCCTGGCCC TACACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGG AGATCAAA
107	438 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (VL1.10)	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQRINT DLHWYQQKPKGKAPRVLIKIFASQTISGVPSR FSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIK
108	438 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (VL1.10)	GACATCATGCTGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGCGGAT CAACACCGACCTGCACTGGTATCAGCAG AAACCAGGAAAGCCCCTAGGGTGTCTGA TCAAGTTCGCCAGCCAGACCATCTCCGG GGTCCCATCAAGGTTTCAAGTGGCAGTGG TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG CAGTCTGCAACCTGAAGATTTTCAACTT ACTACTGTGACGAGTCCAACCTCCTGGCCC TACACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGG AGATCAAA
109	438 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (VL1.11)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQRINT DLHWYQQKPKGKAPRVLIKIFASQTISGVPSR FSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQS NSWPYTFGQGTKLEIK
110	438 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (VL1.11)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCCAGCGGAT CAACACCGACCTGCACTGGTATCAGCAG AAACCAGGAAAGCCCCTAGGGTGTCTGA TCAAGTTCGCCAGCCAGACCATCTCCGG GGTCCCATCAAGGTTTCAAGTGGCAGTGG TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG CAGTCTGCAACCTGAAGATTTTCAACTT ACTACTGTGACGAGTCCAACCTCCTGGCCC TACACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGG AGATCAAA

[0216]

111	438 중쇄 아미노산 서열 (VH1.1)-hIgG1-3M (CDR 밑줄)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSFAMAWVRQAPGKGLEWVASISYGGADT YYRDSVKGRFTISRDNANSLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKDLPLYGYTPFVMDAWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
112	438 중쇄 뉴클레오타드 서열 (VH1.1)-hIgG1-3M	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGCTTGGTCCAGCCTGGGGGTCCCTGA GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACT TTTAGTTCCTTCGCCATGGCCTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTG GGTGGCCTCCATCCTATGGAGGCCT GACACCTACTACCGGGACTCCGTGAAGG GCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAACTCACTGTATCTGCAAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA TTACTGTGCGAAGGATCTGCCCTACTACG GCTACACCCCTTCGTGATGGACGCCTG GGGCCAGGGAACCTGGTCAACCGTCTCC TCAGCGTCGACCAAGGCCCATCGGTCT TCCCCCTGGCACCCCTCCTCAAGAGCAC CTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTG CCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCG GTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCC TGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGC TGCTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC AACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTT GTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC CCAGCACCTGAAGCCGCTGGGGCACCGT CAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAG GACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTG AGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCG TCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCG AGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCA GCCCGGAGAACCACAGGTGTACACCCCTG CCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGA

[0217]

		ACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT GGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTATA GCAAGCTCACCGTGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCG GGTAAA
113	438 경쇄 아미노산 서열 (VL1.8)-h카파 (CDR 밑줄)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQRINT <u>DLHWYQQKPKAPKPKVLIK</u> <u>FASQTISGV</u> PSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS NSWPTYFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLT SKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNR GEC
114	438 경쇄 뉴클레오티드 서열 (VL1.8)-h카파	GACATCATGCTGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCTCCAGCGGAT CAACACCGACCTGCACTGGTATCAGCAG AAACCAGGGAAAGCCCTAGGGTGCTGA TCAAGTTCGCCAGCCAGACCATCTCCGG GGTCCCATCAAGGTTTCAAGTGGCAGTGG TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG CAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCACTT ACTACTGTCAGCAGTCCAACCTCTGGCCC TACACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGG AGATCAAACGAACCTGTGGCTGCACCATCT GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGT GCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAG GCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACG CCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAG TGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGC TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA GTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGG GCCTGAGCTCGCCCGTCACAAGAGCTT CAACAGGGGAGAGTGT
115	351 중쇄 가변 영역 아미노산 (VH1.0)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SHYGMNWVRQAPGKGLWVASISRSYSYI RYVDTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCAREGQFGDYFEYWQQGLTVT SS
116	351 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (VH1.0)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGA GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACC TTTAGTCACTACGGCATGAACTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG GGTGGCCTCCATCTCCAGATCCGGCTCC TACATCAGATACGTGGACACCGTGAAGG

[0218]

		GCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA TTACTGTGCGAGAGAGAGGGCCAGTTCGGC GACTACTTCGAGTACTGGGGCCAGGGAA CCCTGGTCACCGTCTCCTCA
117	351 중쇄 가변 영역 CDR1 아미노산 서열 (VH1.0) 카바트	HYGMN
118	351 중쇄 가변 영역 CDR1 아미노산 서열 (VH1.0) 초티아	GFTFSHYGMN
119	351 중쇄 가변 영역 CDR1 뉴클레오티드 서열 (VH1.0) 카바트	CACTATGGAATGAAC
120	351 중쇄 가변 영역 CDR1 뉴클레오티드 서열 (VH1.0) 초티아	GGATTCACCTTCAGTCACTATGGAATGAA C
121	351 중쇄 가변 영역 CDR2 아미노산 서열 (VH1.0) 카바트	SISRSGSYIRYVDTVKG
122	351 중쇄 가변 영역 CDR2 아미노산 서열 (VH1.0) 초티아	SRSGSY
123	351 중쇄 가변 영역 CDR2 뉴클레오티드 서열 (VH1.0) 카바트	TCTATTAGTAGGAGTGGCAGTTACATCCG CTATGTAGACACAGTGAAGGGC
124	351 중쇄 가변 영역 CDR2 뉴클레오티드 서열 (VH1.0) 초티아	AGTAGGAGTGGCAGTTAC
125	351 중쇄 가변 영역 CDR3 아미노산 서열 (VH1.0) 카바트 및 초티아	EGQFGDYFEY
126	351 중쇄 가변 영역 CDR3 뉴클레오티드 서열 (VH1.0) 카바트 및 초티아	GAGGGACAATTCGGGGACTACTTTGAGTA C
127	351 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (VL1.0)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQKIST NLHWYQQKPGKAPKLLIYYASQTISGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQT NSWPLTFGGGTKVEIK
128	351 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (VL1.0)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCAGAAGAT CTCCACCAACCTGCACTGGTATCAGCAGA AACCAGGGAAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CTATTACGCCTCTCAGACCATCTCCGGGG TCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG TCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCTACTA CTGTCAAGCAGACCAACTCCTGGCCCTG ACCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGA TCAA

[0219]

129	351 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (VL1.1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQKIST NLHWYQQKPGKAPKILIKYASQTISGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTN SWPLTFGGGTKVEIK
130	351 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (VL1.1)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCCTCCAGAAAGAT CTCCACCAACCTGCACTGGTATCAGCAGA AACCAGGGAAAGCCCCTAAGATCCTGATC AAGTACGCCTCTCAGACCATCTCCGGGG TCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG TCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTA CTGTCAGCAGACCAACTCTGGCCCTG ACCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGA TCAAA
131	351 경쇄 가변 영역 CDR1 아미노산 서열 (VL1.1) 카바트 및 초티아	RASQKISTNLH
132	351 경쇄 가변 영역 CDR1 뉴클레오티드 서열 (VL1.1) 카바트 및 초티아	AGGGCCAGTCAGAAAATTAGCACTAACTT ACAT
133	351 경쇄 가변 영역 CDR2 아미노산 서열 (VL1.1) 카바트 및 초티아	YASQTIS
134	351 경쇄 가변 영역 CDR2 뉴클레오티드 서열 (VL1.1) 카바트 및 초티아	TATGCTTCCCAGACCATCTCT
135	351 경쇄 가변 영역 CDR3 아미노산 서열 (VL1.1) 카바트 및 초티아	QQTNSWPLTT
136	351 경쇄 가변 영역 CDR3 뉴클레오티드 서열 (VL1.1) 카바트 및 초티아	CAACAGACTAATAGTTGGCCGCTCACG
137	351 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (VL1.2)	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQKIST NLHWYQQKPGKAPKLLIYYASQTISGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQT NSWPLTFGGGTKVEIK
138	351 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (VL1.2)	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCCTCCAGAAAGAT CTCCACCAACCTGCACTGGTATCAGCAGA AACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CTATTACGCCTCTCAGACCATCTCCGGGG TCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG TCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTA CTGTCAGCAGACCAACTCTGGCCCTG ACCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGA TCAAA
139	351 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (VL1.3)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQKIST NLHWYQQKPGKAPKILIIYYASQTISGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTN

[0220]

		SWPLTFGGGTKVEIK
140	351 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (VL1.3)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCAGAAGAT CTCCACCAACCTGCACTGGTATCAGCAGA AACCAGGAAAGCCCTAAGATCCTGATC TATTACGCCTCTCAGACCATCTCCGGGGT CCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG TCTGCAACCTGAAGATTTGCAACTTACTA CTGTCAAGCAGACCAACTCTGGCCCTG ACCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGA TCAA
141	351 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (VL1.4)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQKIST NLHWYQQKPKAPKLLIKYASQTISGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQT NSWPLTFGGGTKVEIK
142	351 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (VL1.4)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCAGAAGAT CTCCACCAACCTGCACTGGTATCAGCAGA AACCAGGAAAGCCCTAAGCTCCTGAT CAAGTACGCCTCTCAGACCATCTCCGGG GTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGAT CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC AGTCTGCAACCTGAAGATTTGCAACTTA CTACTGTCAAGCAGACCAACTCTGGCCC CTGACCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGG AGATCAA
143	351 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (VL1.5)	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQKIST NLHWYQQKPKAPKILIIYASQTISGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTN SWPLTFGGGTKVEIK
144	351 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (VL1.5)	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCAGAAGAT CTCCACCAACCTGCACTGGTATCAGCAGA AACCAGGAAAGCCCTAAGATCCTGATC TATTACGCCTCTCAGACCATCTCCGGGGT CCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG TCTGCAACCTGAAGATTTGCAACTTACTA CTGTCAAGCAGACCAACTCTGGCCCTG ACCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGA TCAA
145	351 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (VL1.6)	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQKIST NLHWYQQKPKAPKLLIKYASQTISGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQT NSWPLTFGGGTKVEIK
146	351 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (VL1.6)	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCGGGCCTCCAGAAGAT CTCCACCAACCTGCACTGGTATCAGCAGA AACCAGGAAAGCCCTAAGCTCCTGAT

[0221]

		CAAGTACGCCTCTCAGACCATCTCCGGG GTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGAT CTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC AGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCTTA CTACTGTCAGCAGACCAACTCCTGGCCC CTGACCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGG AGATCAAA
147	351 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (VL1.7)	DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQKIST NLHWYQQKPGKAPKILIKYASQTISGVPSRF SGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQTN SWPLTFGGGKVEIK
148	351 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (VL1.7)	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCTGGCCCTCCAGAAAGAT CTCCACCAACCTGCACTGGTATCAGCAGA AACCAGGAAAGCCCTAAGATCCTGATC AAGTACGCCTCTCAGACCATCTCCGGGG TCCATCAAGTTTCAAGTGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG TCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCTTACTA CTGTGACAGACCAACTCCTGGCCCCTG ACCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGA TCAAA
149	351 중쇄 아미노산 서열 (VH1.0)-hIgG1-3M (CDR 밀출)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SHYGMNWVVRQAPGKLEWVASISRSYSYI RYVDTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCAREGQFGDYFEYWGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHNK PSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAA GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTIKAKGQPREPKVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKLS RWQQGNVVFSCSVMHREALHNHYTQKLSLS PGK
150	351 중쇄 뉴클레오티드 서열 (VH1.0)-hIgG1-3M	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGCTTGGTCCAGCCTGGGGGTCCTGA GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACC TTTAGTCACTACGGCATGAAGTGGTCCG CCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG GGTGGCCTCCATCTCCAGATCCGGCTCC TACATCAGATACGTGGACACCGTGAAGG GCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGC CAAGAATCACTGTATCTGCAAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA TACTGTGCGAGAGAGGGCCAGTTCCGGC GACTACTTCGAGTACTGGGGCCAGGGAA CCCTGGTCAACCGTCTCCTCA

[0222]

151	351 경쇄 아미노산 서열 (VL1.1)-h카파 (CDR 밀출)	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQKIST NLHWYQQKPGKAPKILIKYASQTISGVPSRF SGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQTN SWPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
152	351 경쇄 뉴클레오티드 서열 (VL1.1)-h카파	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGCCTGGCCCTCCAGAAAGAT CTCCACCAACCTGCACTGGTATCAGCAGA AACCAGGAAAGCCCTAAGATCCTGATC AAGTACGCCTCTCAGACCATCTCCGGGG TCCCATCAAGTTTCAAGTGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG TCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCTTACTA CTGTGACAGACCAACTCCTGGCCCCTG ACCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGA TCAAA

[0223]

[0224]

관련 CDR 공여자 서열과 함께 인간 수용체 프레임워크인 DP54 (중쇄) 및 DPK9 (경쇄)을 함유하는 cDNA를 진아트 (GeneArt), AG 사에서 합성하였다. 합성된 cDNA 생성물을 서브클로닝하여, 각각 포유동물 발현 벡터 pSMED2 및 pSMN2 중에서 중쇄의 경우 인간 IgG1-3m 불변 영역과, 또는 경쇄의 경우 인간 카파와 인프레임 융합시켰다. 래트 351 및 인간화 351 변이체와 함께, 인간 수용체 프레임워크, 래트 438 및 인간화 438 변이체의 VH 및 VL 정렬을 하기 표 4에 나타내었다. 카바트 체계의 CDR은 밀출로 표시하였다. 351VH 및 351VL의 경우, 프레임워크 영역의 소문자 문구는 래트 351과 인간화 351 변이체 사이의 잔기 차이를 표시한다.

[0225] 인간 수용체 프레임워크와 래트 438 가변 영역의 것 사이에는 VH가 78%, VL이 61%로써 상당한 상동성이 존재한다. 또한, 인간 수용체 프레임워크와 래트 351 가변 영역 사이에도 VH가 76%, VL이 61%로써 상당한 상동성이 존재한다.

표 4

래트 351 및 인간화 351 변이체와 함께, 인간 수용체 프레임워크, 래트 438 및 인간화 438 변이체의 정렬 (카바트 체계의 CDR은 밑줄로 표시하였음)

438VH:	
DP54_JH4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDQSEKYYVDSVKGKRTISRDNAKNSLY 80
래트 438VH	AVQLVESGGGLVQFGRSLKLSCTASGFTFSFAMAWVRQAPTKGLEWVASISYGGADTYRDSVKGKRTISRDNAKNSLY 80
438VH1.0	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFAMAWVRQAPGKGLEWVASISYGGADTYRDSVKGKRTISRDNAKNSLY 80
438VH1.1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFAMAWVRQAPGKGLEWVASISYGGADTYRDSVKGKRTISRDNAKNSLY 80
DP54_JH4	LQMNSLRaedTAVYYCAR---YFDY-----WGQGTlLVtVSS 113
래트 438VH	LQMNSLRsEDTstYYCAKdLpYyGtPFVMDaWGQGTsvTVSS 123
438VH1.0	LQMNSLRaedTAVYYCARdLpYyGtPFVMDaWGQGTlLVtVSS 123
438VH1.1	LQMNSLRaedTAVYYCAKdLpYyGtPFVMDaWGQGTlLVtVSS 123
438VL:	
DPK9_Jk2	DIQMTQSPFSSLSASVGDRTVITCRASQSISSYLHWYQQKPKGAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP 80
래트 438VL	DIQLTQSPPTLSVTPGETISLSCRASQRINTDLHWYQQKPNESPRVLIKFASQTIscvpsrfsGSGSGTDFTLINRVEP 80
438VL1.0	DIQMTQSPFSSLSASVGDRTVITCRASQRINTDLHWYQQKPKGAPKLLIYFASQTIscvpsrfsGSGSGTDFTLTISSLQP 80
438VL1.8	DIQMTQSPFSSLSASVGDRTVITCRASQRINTDLHWYQQKPKGAPKVLIKFASQTIscvpsrfsGSGSGTDFTLTISSLQP 80
DPK9_Jk2	EDFATYYCQQSYSTFYTFGQGTkLEIK 107
래트 438VL	EDFSVYYCQQSNSWYTFGAGTKLEIK 107
438VL1.0	EDFATYYCQQSNSWYTFGQGTkLEIK 107
438VL1.8	EDFATYYCQQSNSWYTFGQGTkLEIK 107
351VH:	
DP54_JH4	EVQLVESGGGLVQPGGSLrLsCaASGFTFSYMSWVRQAPGKGLewVaNiKQDQSEKYYVDSVKGKRTISRdnAKNsLY 80
래트 351VH	EVQLVESGGGLVQFGRSLKvSCLASGFTFSHYGMNwIRQAPCKGLDWVAsISRSRGSYIRYVDTVKGRFTVSRDIakNTLY 80
351VH1.0	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLScaASGFTFSHYGMNwVRQAPGKGLEWVAsISRSRGSYIRYVDTVKGRFTISRDNakNSLY 80
DP54_JH4	LQMNSLRaedTAVYYCAR-----YFDYWGQGTlLVtVSS 113
래트 351VH	LQMNSLRsEDTALYYCApEGQFGDYfEYwGQGMVtVSS 119
351VH1.0	LQMNSLRaedTAVYYCApEGQFGDYfEYwGQGTlLVtVSS 119
351VL:	
DPK9_Jk4	DIQMTQSPFSSLSASvGdRvtItCRASQSISSYLHWYQQKPKgkaPKLLIYAASLQSGvPSRFSGSGSGTDFTLTIsslqP 80
래트 351VL	DIQLTQSPATLSVTPGERISLSCRASQKISTNLHWYQQKPNESPRILIKYASQTIscIPSRFSGSGSGTDFTLHINTVEP 80
351VL1.0	DIQMTQSPFSSLSASVGDRTVITCRASQKISTNLHWYQQKPKGAPKLLIYASQTIscvpsrfsGSGSGTDFTLTISSLQP 80
351VL1.1	DIQMTQSPFSSLSASVGDRTVITCRASQKISTNLHWYQQKPKGAPKLLIKYASQTIscvpsrfsGSGSGTDFTLTISSLQP 80
DPK9_Jk4	EDFATYYCQQSYSTPLTFGgGTkVeiK 107
래트 351VL	EDFSVYYCQQTNSWPLTFGSGTKLEIK 107
351VL1.0	EDFATYYCQQTNSWPLTFGGGTkVeiK 107
351VL1.1	EDFATYYCQQTNSWPLTFGGGTkVeiK 107

[0226]

[0227] 인간화시, CDR 그래프팅된 항체는 원래 항체 활성의 손실을 초래할 수 있다. 프레임워크 영역의 차이는 생성되는 인간화 438 및 인간화 351 항체의 변경된 입체형태의 원인이 될 수 있는데, 활성 및 결합 에피토프의 회복을 위하여, 인간 수용체 프레임워크에서의 원래 항체의 것으로의 선택 역돌연변이를 도입하였다. 하기 표 5는 활성 및 결합 에피토프를 최적화하기 위한 해당 위치에서의 래트 438 및 래트 351 잔기로의 인간 수용체 프레임워크에서의 선택 역돌연변이를 나타낸다.

표 5

인간화 438 및 인간화 351 변이체의 VH 및 VL에서의 역돌연변이.

438 VH 변이체	1.0	1.1							
VH 역 돌연변이	없음	R94K							
438 VL 변이체	1.0	1.1	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9
VL 역 돌연변이	없음	M4L L46V Y49K	M4L	L46V	Y49K	M4L L46V	M4L Y49K	L46V Y49K	Q3M M4L L46V Y49K
351 VH 변이체	1.0								
VH 역 돌연변이	없음								
351 VL 변이체	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	
VL 역 돌연변이	없음	L46V Y49K	M4L	L46I	Y49K	M4L L46I	M4L Y49K	M4L L46V Y49K	

[0228]

[0229] 실시예 3

[0230] 항-노치1 억제 항체의 특성화

[0231] A. 발현 및 노치1에 대한 결합

[0232] COS 세포에서의 일시적 발현 검정에서, 인간화 438 및 인간화 351 변이체의 상대적 발현 수율을 시험하였다. 하기 표 6에 나타난 바와 같이, 인간화 438 VH1.1/VL1.8을 포함한 수많은 인간화 438 변이체들, 및 인간화 351 VH1.0/VL1.1을 포함한 수많은 인간화 351 변이체들이 30 µg/ml를 초과하는 상당한 수율을 나타내었다.

표 6

COS 세포에서의 일시적 발현에 있어서 인간화 438 변이체 및 인간화 351 변이체의 컨디셔닝된 배지 중 상대적 발현 수율.

438 변이체	VH1.0/VL1.3	VH1.0/VL1.4	VH1.0/VL1.5	VH1.0/VL1.6	VH1.0/VL1.7	VH1.0/VL1.8	VH1.0/VL1.9	VH1.0/VL1.10
438 수율 (µg/ml)	41.51	41.63	85.73	35.11	36.94	40.08	51.9	62.58
438 변이체	VH1.0/VL1.11	VH1.1/VL1.3	VH1.1/VL1.4	VH1.1/VL1.5	VH1.1/VL1.6	VH1.1/VL1.7	VH1.1/VL1.8	VH1.1/VL1.9
438 수율 (µg/ml)	45.86	23.2	49.47	65.93	47.72	31.95	66.65	14.12
438 변이체	VH1.1/VL1.10	VH1.1/VL1.11						
438 수율 (µg/ml)	36.7	37.54						
351 변이체	VH1.0/VL1.0	VH1.0/VL1.1	VH1.0/VL1.2	VH1.0/VL1.3	VH1.0/VL1.4	VH1.0/VL1.5	VH1.0/VL1.6	VH1.0/VL1.7
351 수율 (µg/ml)	33.5	26.66	24.52	25.1	35.20	29.25	28.93	33.54

[0233]

[0234] 실시예 2에 기술되어 있는 바와 같이, 정량 IgG ELISA에 의해, 컨디셔닝된 배지 중 IgG의 총 발현 농도를 측정하였다. 하기 표 7은 인간화 351 변이체 및 래트 351과 함께 인간화 438 변이체 및 래트 438에 대한 세포 표면 노치1 결합 ELISA로부터 계산된 EC50 (nM) 값을 나타낸다.

[0235] 데이터는 인간화 438 VH1.1/VL1.8을 포함한 인간화 438의 다수의 변이체들이 U-2 OS 세포의 세포 표면에 발현된 전장 인간 노치1에 대한 결합에 있어서 래트 438과 유사함을 나타낸다. 또한, 표 7은 인간화 438 VH1.1/VL1.8 및 VH1.1/VL1.3 양자가 U-2 OS 세포의 세포 표면에 발현된 마우스 노치1에 대한 래트 438의 교차-반응성을 완전하게 보유한다는 것을 보여준다.

[0236] 데이터는 또한 인간화 351 VH1.0/VL1.1 및 VH1.1/VL1.4가 U-2 OS 세포의 세포 표면에 발현된 전장 인간 노치1에 대한 결합에 있어서 래트 351과 유사함을 나타낸다. 표 7은 또한 인간화 351 VH1.0/VL1.1 및 VH1.1/VL1.4가 U-2 OS 세포의 세포 표면에 발현된 마우스 노치1에 대한 래트 351의 교차-반응성을 완전하게 보유한다는 것

을 보여준다.

표 7

인간화 351 변이체 및 래트 351과 함께, 인간화 438 변이체 및 래트 438에서의 세포 표면 노치1 결합 ELISA의 EC50 (nM) 값.

EC50 (nM)								
항체	래트 438	VH1.0/ VL1.1	VH1.1/ VL1.0	VH1.1/ VL1.1	VH1.1/ VL1.3	VH1.1/ VL1.5	VH1.1/ VL1.8	VH1.1/ VL1.9
인간 노치1	0.2132	0.305	0.2956	0.1773	0.1516	0.2189	0.2025	0.1776
마우스 노치1	0.1725	0.2287	0.1437	0.1291	0.09337	0.1457	0.1489	0.1374
EC50 (nM)								
항체	래트 351	VH1.0/ VL1.1	VH1.0/ VL1.4					
인간 노치1	0.10	0.15	0.10					
마우스 노치1	0.07	0.08	0.07					

[0237]

[0238] B. 경쟁 ELISA

[0239] 재조합 또는 세포 표면 발현 전장 인간 노치1에 대하여, 인간화 351 변이체와 비오틴닐화(biotinylated) 래트 351과 함께, 인간화 438 변이체와 비오틴닐화 래트 438 사이의 경쟁 ELISA를 수행하였다. 재조합 단백질 또는 세포 기반 ELISA에 대하여 기술된 것과 유사한 방식으로, 96웰 세포 배양 플레이트를 각각 노치1 NRR_Avi_His 단백질로 코팅하거나 (하이-바운드 코-스타(hi-bound co-Star) 플레이트), 또는 전장 노치1 발현 U-2 OS 세포를 사용하여 접종하였다 (세포 배양 플레이트, 코-스타). 0.8 nM의 비오틴닐화 래트 438 또는 비오틴닐화 래트 351 항체의 존재하에, 연속 희석된 (블로킹 완충제 중에 1:3) 항체 용액 또는 세포 배양 컨디셔닝된 배지를 플레이트에 적용하였다.

[0240] 2시간 동안의 인큐베이션 후, 상기한 바와 같이 플레이트를 세척하고, 블로킹 완충제 중에 1:5000 희석된 HRP-접합 스트렙타비딘 (서던 바이오테크(Southern Biotech) 사)을 적용하였다. 스트렙타비딘을 사용한 인큐베이션을 30분 동안 실시한 후, 플레이트를 다시 세척하여, TMB 용액으로 10분 동안 현상하였다. 0.18 M H₂SO₄를 첨가함으로써 현상 반응을 중지시킨 후, 450 nM에서의 흡광도를 측정하였다. 마이크로소프트 엑셀 및 그래프패드-프리즘 소프트웨어를 사용하여 데이터 플로팅 및 분석을 수행하였다.

[0241] 표 8은 재조합 인간 노치1 NRR 면역원에의 결합에 대한 인간화 438 변이체의 비오틴닐화된 래트 438 항체와의 경쟁 ELISA의 EC50 (nM) 값을 나타낸다. 데이터는 경쟁 ELISA에서 인간화 438 VH1.1/VL1.8을 포함한 인간화 438의 다수의 변이체들이 비표지 래트 438과 유사한 EC50 값을 가진다는 것을 보여준다. 이는 인간화 438 변이체가 비표지 래트 438과 마찬가지로 노치1 NRR 면역원에의 결합에 대하여 비오틴닐화 래트 438과 경쟁한다는 것을 나타낸다. 이러한 결과는 인간화 438 변이체가 래트 438 항체와 동일하거나 유사한 면역원상 에피토프에 결합한다는 것을 나타낸다.

[0242] 표 8은 또한 U-2 OS 세포의 세포 표면에 발현된 전장 인간 노치1에 대한 결합에 있어서의 인간화 438 변이체의 비오틴닐화 래트 438 항체와의 경쟁 ELISA의 EC50 (nM) 값을 보여준다. 데이터는 경쟁 ELISA에서 인간화 438 VH1.1/VL1.8을 포함한 인간화 438의 다수 변이체들이 비표지 래트 438과 유사한 EC50 값을 가진다는 것을 보여준다. 이는 인간화 438 변이체가 비표지 래트 438과 마찬가지로 U-2 OS 세포의 세포 표면에 발현된 전장 인간 노치1에의 결합에 대하여 비오틴닐화 래트 438과 경쟁한다는 것을 나타낸다. 이러한 결과는 인간화 438 변이체가 래트 438 항체와 동일하거나 유사한 U-2 OS 세포의 세포 표면에서 발현되는 전장 인간 노치1상 에피토프에 결합한다는 것을 나타낸다.

표 8

재조합 또는 세포 표면 발현 전장 인간 노치1에 대한 인간화 438 변이체와 비오티닐화 래트 438 사이의 경쟁 ELISA의 EC50 (nM) 값

항체	래트 438-mIgG	VH1.0 /VL1.1	VH1.1 /VL1.0	VH1.1 /VL1.1	VH1.1 /VL1.3	VH1.1 /VL1.9	VH1.0 /VL1.8	VH1.1 /VL1.8	VH1.1 /VL1.5	래트 438-hIgG
재조합 인간 노치1	1.5	0.7	1.1	0.6	2.5	0.4	2.1	1.2	7.0	2.1
세포 표면 전장 인간 노치1	3.6	4.0	2.8	2.4	2.8	2.2	11.6	3.2	3.3	4.4

[0243]

[0244]

도 9는 U-2 OS 세포의 세포 표면에 발현된 전장 인간 노치1에 대한 인간화 351 변이체와 비오티닐화 래트 351 항체의 경쟁 ELISA의 EC50 (nM) 값을 보여준다. 데이터는 경쟁 ELISA에서 인간화 351 VH1.0/VL1.1을 포함한 인간화 351의 다수 변이체들이 비표지 래트 351과 유사한 EC50 값을 가진다는 것을 보여준다. 이는 인간화 351 변이체가 비표지 래트 351과 마찬가지로 세포 표면에 발현된 전장 인간 노치1에 대한 비오티닐화 래트 351과 경쟁한다는 것을 나타낸다. 이러한 결과는 인간화 351 변이체가 래트 351 항체와 동일하거나 유사한 U-2 OS 세포의 세포 표면에서 발현되는 전장 인간 노치1상 에피토프에 결합한다는 것을 나타낸다.

표 9

세포 표면 발현 전장 인간 노치1에 대한 인간화 351 변이체와 비오티닐화 래트 351 사이의 경쟁 ELISA의 EC50 (nM) 값

항체	래트 351	VH1.0 /VL1.1	VH1.0 /VL1.4	항-E. 테넬라
세포 표면 전장 인간 노치1	4.43	2.75	2.11	비-경쟁

[0245]

[0246]

C. 다른 인간 노치 상동체에 대한 결합의 특이성

[0247]

노치 수용체 족의 기타 구성원들은 생물학적 과정에서 중요한 역할을 한다. 예를 들어, 노치2 결핍은 마우스 모델에서 배아 사멸로 이어진다. 반면, 노치3 결핍은 단지 말초 동맥에서의 가벼운 현상으로 이어지며, 노치4 결핍은 마우스 모델에서 검출가능한 현상을 초래하지 않는다. 노치1 NRR 영역의 가장 가까운 상동체는 노치2 및 노치3 (~50% 상동성)이며, 노치4는 더 먼 상동체 (34% 상동성)이다. 노치 족의 다른 구성원, 특히 노치2에 대한 항-노치1 항체의 교차반응성은 환자에서 원치 않는 효과로 이어질 수 있다. 따라서, 래트 351 및 인간화 351 항체와 함께, 래트 438 및 인간화 438의 다른 노치 족 구성원에 대한 잠재적인 교차반응성을 평가하였다.

[0248]

인간 IgG1 Fc 단편과 융합된 인간 노치2 및 노치3 NRR 영역을 코딩하는 발현 구축물을 CHO-PACE 세포에 안정하게 도입하였다. NRR-Fc 융합체를 발현하는 이와 같은 세포로부터의 컨디셔닝된 배지를 수집하였다. 단백질 A 친화성에 의해 인간 노치2 NRR-Fc, 및 인간 및 마우스 노치3 NRR-Fc를 정제한 후, 이어서 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)를 수행하였다. 정제된 조제물을 1 mM CaCl₂를 포함하는 TBS에 투석하고, 분석용 SEC에서 순도가 >99%인 것으로 분석하였다.

[0249]

하기 표 10에 나타낸 바와 같이, 래트 438에는 인간 노치2 NRR-Fc 융합 단백질에 대한 검출가능한 결합이 결핍되어 있었다. 역시 표 10에 나타낸 바와 같이, 인간화 438 변이체에는 U-2 OS 세포 표면에 발현되는 전장 인간 노치3에 대한 검출가능한 결합이 결핍되어 있어서, 438이 노치3와 교차-반응하지 않음을 나타내었다.

표 10

노치2 NRR-Fc 및 노치3 U-2 OS 세포에 대한 래트-mIgG1 및 인간화 438 변이체의 결합 (N/B는 비-결합을 나타냄)

노치2 NRR-Fc에 대한 결합		노치3 U2-OS 세포에 대한 결합	
래트 438-mIgG1	N/B	래트 438-mIgG	N/B
인간화 438 VH1.0/VL1.1	N/B	A2	N/B
인간화 438VH1.1/VL1.0	N/B		
인간화 438VH1.1/VL1.3	N/B		
인간화 438VH1.1/VL1.5	N/B		
인간화 438VH1.1/VL1.8	N/B		
인간화 438VHH1.1/VL1.9	N/B		
A2	N/B		

[0250]

[0251] 표 11에 나타낸 바와 같이, 인간화 351 VH1.0/VL1.1에는 인간 노치2 NRR-Fc 융합 단백질, 그리고 인간 및 마우스 노치3 NRR-Fc 융합 단백질 양자에 대한 검출가능한 결합이 결핍되어 있었다. 그러나, 인간화 351 VH1.0/VL1.1은 인간, 마우스 및 시노-노치1 NRR과는 교차-반응하였다.

표 11

제조합 인간, 마우스 및 시노-노치1; 인간 노치2; 및 인간 및 마우스 노치3 NRR-Fc 융합 단백질에 대한 인간화 351 VH1.0/VL1.1의 결합 (N/B는 비-결합을 나타냄)

IC50 (nM)	인간 노치1 NRR-Fc	마우스 노치1 NRR-Fc	시노볼구스 노치1 NRR-Fc	인간 노치2 NRR-Fc	인간 노치3 NRR-Fc	마우스 노치3 NRR-Fc
인간화 351 VH1.0/VL1.1	0.249	0.27	0.26	N/B	N/B	N/B

[0252]

[0253] D. 인간 노치1 NRR에 대한 결합 친화성

[0254] 표면 플라즈몬 공명 (비아코어(Biacore)® T100, 비아코어사, 뉴저지 피스카타웨이 소재)에 의해, 항-노치1 NRR 상호작용의 반응속도 상수(kinetic constant)를 측정하였다. CM5 칩의 유동 셀(flow cell)을 10 µl/분의 10 mM 글리신, pH 5.0 중 항-인간 IgG-Fc (비아코어®)의 대략 10,000 공명 단위 (RU)로 600초 동안 고정하였다. 10 µl/분으로, 1 mM CaCl₂를 포함하는 TBS 중에 희석된 10 µg/ml의 항-노치1 인간화 438 변이체 및 인간화 351 변이체를 포획하였다. 1 mM CaCl₂를 포함하는 TBS 중에서, 100 µl/분의 4가지 농도의 인간 노치1 NRR_Avi_His 제조합 단백질 (3.7-100 nM) 및 제로 농도 (전개 완충제)의 결합을 3분 동안 기록하였다. 복합체의 해리는 10 분 동안 측정하였다. 10 µl/분으로 60초 동안, 3 mM EGTA를 포함하는 3M MgCl₂를 주사함으로써, 칩의 표면을 재생시켰다. 비아코어® T100 평가 소프트웨어 (비아코어®)를 사용하여, 참조 및 완충제 신호를 차감한 후 수득된 곡선을 1:1 랑뮈르(Langmuir) 결합 모델에 피팅하였다.

[0255] 인간 노치1 NRR 단백질에 대한 선택된 인간화 438 변이체 및 인간화 351 변이체, 그리고 A2 항체 (문헌 [Wu, Y. et al., Nature 464:1052-1057, 2010])의 결합 친화성을 측정하고, 하기 표 12에 나타내었다. 비아코어에 의한 동역학적 분석은 VH1.1/VL1.8 및 VH1.1/VL1.3을 포함한 선택된 인간화 438 변이체에 대하여 A2 항체와 유사한 ka (온(on)) 및 kd (오프(off)) 속도를 나타내었다.

[0256] 비아코어에 의한 동역학적 분석은 또한 래트 351, 및 VH1.0/VL1.1 및 VH1.1/VL1.4를 포함한 선택된 인간화 351 변이체에 대하여 A2 항체에 비해 더 높은 ka (온) 및 kd (오프) 속도를 나타내었다. 래트 351 및 선택된 인간화 351 변이체에 대한 결과적인 K_d 값이 유사하기는 하였지만, 하기 실시예에 기술되어 있는 노치1 의존성 신호 전달에 대한 별개의 중화 활성에서는 ka (온) 및 kd (오프) 속도에서 나타나는 차이가 역할을 할 수 있다.

표 12

대조 A2 항체와 비교한, 래트 351 및 인간화 351 변이체와 함께 래트 438 및 인간화 438 변이체의 재조합 인간 노치1 NRR 단백질에 대한 비아코어 분석 (N/A는 적용가능하지 않음을 나타냄).

438	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)	K _D (nM)	래트 438과의 배수 차이
래트 438-hiG1	5.27E+04	2.29E-4	4.34E-09	4.34	1.00
438 VH1.1/VL1.3	2.42E+05	4.42E-04	1.83E-09	1.83	0.42
438 VH1.1/VL1.8	2.14E+05	4.49E-04	2.10E-09	2.10	0.48
438 VH1.0/VL1.1	6.05E+04	3.89E-04	6.42E-09	6.4	1.47
438 VH1.1/VL1.0	4.74E+04	1.03E-03	2.18E-08	21.8	5.02
438 VH1.1/VL1.1	4.37E+04	4.22E-04	9.65E-09	9.6	2.21
351	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)	K _D (nM)	래트 351과의 배수 차이
래트 351	4.39E+05	1.02E-03	2.33E-09	2.3	1.00
351 VH1.0/VL1.1	4.92E+05	1.55E-03	3.14E-09	3.1	1.35
351 VH1.0/VL1.4	4.58E+05	2.23E-03	4.88E-09	4.9	2.10
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)	K _D (nM)	
A2	1.20E+05	3.53E-04	2.94E-09	2.94	N/A

[0257]

[0258] D. 열적 안정성

[0259] 단백질 또는 단백질 도메인의 열적 안정성은 단백질 또는 단백질 도메인의 안정성과 양성으로 상관된다. 단백질 또는 단백질 도메인의 더 높은 융점은 종종 개선된 제조성 및 더 긴 보관 수명을 제공한다. 시차 주사 열량법 (DSC)을 사용하여 인간화 438 변이체 및 래트 438-mIgG1의 열적 안정성을 평가하였다. 단백질 샘플들을 250 μl 부피 중 0.3 mg/ml로 PBS에 희석하였다. 참조 샘플로는 해당 제제화 완충제 바탕(blank)을 사용하였다. 8 °C로 설정된 마이크로칼 서모박 샘플 디개싱 앤드 서모스타트(MicroCal ThermoVac Sample Degassing and Thermostat) (마이크로칼(Microcal, Inc.) 사, 매사추세츠 노스햄프턴 소재)를 사용하여 양 샘플을 철저히 배기하였다. 마이크로칼 VP-DSC 캐필러리 셀 마이크로칼로리미터(Capillary Cell MicroCalorimeter) (마이크로칼 사, 매사추세츠 노스햄프턴 소재)의 적절한 셀에 샘플들을 분배하였다. 샘플들을 15°C로 4분 동안 평형화한 다음, 시간 당 100°C의 속도로 100°C까지 상향 스캐닝하였다. 20초의 여과 기간을 선택하였다. 미가공 데이터를 기준선 보정하고, 단백질 농도를 표준화하였다. 데이터를 오리진(Origin) 소프트웨어 (오리진랩 코포레이션 (OriginLab Corporation)사, 매사추세츠 노스햄프턴 소재)를 사용하여 적절한 추이 수(number of transition)로 MN2-스테이트(State) 모델에 피팅하였다.

[0260] 하기 표 13에 나타낸 바와 같이, 모든 인간화 438 변이체들이 래트 438-mIgG1에 비해 그의 Fab 영역에서 더 높은 융점으로 나타나는 바와 같은 (모두 77°C 상회) 더 고도의 열안정성을 가지고 있었다.

표 13

인간화 438 변이체 및 래트 438-mIgG1의 열적 안정성 (DSC) 분석.

	Tm (°C)			
	CH2	Fab	CH3	ΔT Fab
래트 438-mIgG1	71.82		81.92	—
VH1.0/VL1.8	75.33		84.65	3.5
VH1.0/VL1.1	73.28	77.34	84.59	5.5
VH1.1/VL1.8	72.90	79.26	85.50	7.4
VH1.1/VL1.1	72.96	80.79	85.84	9.0
VH1.1/VL1.5	71.91	80.97	86.21	9.2
VH1.1/VL1.0	72.79	82.90		11.1
VH1.1/VH1.3	72.84	84.00		12.2

[0261]

[0262] 실시예 4

[0263] 노치1 NRR상 항-노치1 억제 항체 결합 에피토프의 확인

[0264] A. 도메인 교환 키메라 구축물

- [0265] 실시예 3에 기술되어 있는 바와 같이, 인간화 438 및 인간화 351 변이체에는 노치3 단백질과의 교차-반응성이 결핍되어 있다. 항-노치1 래트 438-mIgG1, 래트 351-mIgG1 및 A2 항체의 에피토프 매핑을 위하여, 노치1과 노치3 NRR에 대한 도메인 교환 키메라 구축물을 제조하였다. 인간 노치3-노치1 (본원에서는 노치3-1로 지칭) NRR 영역 도메인 교환 키메라를 코딩하며 C-말단 Fc 융합체 (인간 IgG1 Fc 단편)를 포함하는 발현 구축물을 CHO-PACE에 개별적으로 형질감염시키고, 각 키메라를 발현하는 안정한 풀(pool)을 확보하였다. 각 안정 풀로부터의 컨디셔닝된 배지를 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 적용한 후, 이어서 키메라 융합 단백질의 정제를 위한 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)를 수행하였다. 다음에, 정제된 조제물을 1 mM CaCl₂를 포함하는 TBS에 투석하고, 분석용 SEC에서 분석하였다. 도 2는 래트 351-mIgG1, 래트 438-mIgG1 및 A2를 에피토프 매핑하기 위한 재조합 인간 노치1 NRR 및 노치3 NRR 도메인 교환 키메라 구축물을 나타낸다. 도 2에 나타난 바와 같이, 재조합 NRR 키메라 단백질은 인간 Fc (미도시)에 융합된 다양한 노치3 (회색으로 나타냄) 및 노치 1 (흑색으로 나타냄) 도메인들로 구성된다.
- [0266] 비아코어® SPR 기술, 및 시험되는 항체의 상대적인 공명 단위 (RU) 결합 능력을 사용하여, 노치3-1 NRR 도메인 교환 키메라에 대한 래트 438-mIgG1 및 래트 351-mIgG1의 상대적 결합 능력을 시험하였다. SPR에 의한 노치3-1 NRR 키메라에 대한 래트 438-mIgG1 및 래트 351-mIgG1의 결합은 표면 플라즈몬 공명 (비아코어® 3000, 비아코어사, 뉴저지 피스카타웨이 소재)에 의해 측정하였다. CM5 칩의 유동 셀을 10 µl/분의 10 mM 글리신, pH 5.0 중 항-뮤린 IgG (염소) 및 대조로서의 염소 IgG의 각각 대략 10,000 RU로 600초 동안 고정하였다. 0.1 mM CaCl₂를 포함하는 HBS-P 중에 1 µg/ml로 희석된 래트 438-mIgG1 및 래트 351-mIgG1 항체를 10 µl/분으로 300초 동안 포획하였다. 각 항체의 대략적인 포획은 150 RU이었다 (반응 1). 다음에, 10 µg/ml의 노치3-1 NRR 키메라를 동일 완충제 중에서 10 µl/ml로 300초 동안 포획된 래트 438-mIgG1 및 래트 351-mIgG1 항체에 주입하고, 포획되는 노치3-1 NRR을 측정하였다 (반응 2). 20초 동안의 30 µl/분의 10 mM Ac pH 1.5를 사용하여, 각 주기 후의 복합체의 해리를 달성하였다.
- [0267] 도 2에 나타난 바와 같이, 노치1 NRR의 도메인에 대한 래트 438-mIgG1 및 래트 351-mIgG1의 에피토프 결합 프로파일은 노치1 NRR의 도메인에 대한 A2의 결합 프로파일과 구별된다. 더 구체적으로, NRR에 대한 A2의 결합은 래트 438-mIgG1에 비해 LNR-B 도메인에 대하여 더 의존적이다. 또한, 노치1 NRR에 대한 래트 351-mIgG1의 결합은 A2에 비해 LNR-A 및 LNR-B 도메인에 대하여 덜 의존적이다. 도메인 결합 프로파일에서의 차이는 하기하는 공동-결정 구조에 의해 드러나는 바와 같은 노치1 NRR에서의 접촉 잔기의 차이, 그리고 래트 438-mIgG1 및 A2와의 결합시의 노치1 NRR의 구별되는 배향에 대한 더욱 상세한 정보와 함께, 래트 438-mIgG1이 A2와는 상이한 방식으로 노치1 NRR과 상호작용한다는 것을 나타낸다.
- [0268] B. X-선 결정학 분석
- [0269] 래트 438 및 래트 351을 발현시키고, 실시예 2에서 상기한 바와 같이 정제하였다. 피어스(Pierce) Fab 제조 키트 (파페인 고정) 제품 # 44685를 사용하여, 래트 438 및 래트 351로부터 Fab (항원-결합 단편)를 생성시켰다. 고정된 파페인과 함께 37°C에서 24시간 동안 래트 438 및 래트 351을 인큐베이팅하였다. 50 mM 트리스(Tris) pH 8.0을 사용하여 평형화된 제바(Zeba) 컬럼 (피어스 사)을 사용한 탈염에 의해 Fab를 정제하였다. 50 mM 트리스 pH 8.0을 사용하여 평형화된 Q FF 컬럼으로부터의 유출물에서 Fab를 수집하였다.
- [0270] 생성되는 Fab 단편을 0.9 mM CaCl₂를 첨가하여 1:1.2의 몰비로 인간 노치1 NRR 단백질과 혼합하고, 얼음상에서 30분 동안 인큐베이팅한 후, 25 mM 트리스 pH 8.0, 150 mM NaCl, 및 0.9 mM CaCl₂를 사용하여 평형화된 S200 크기 배제 컬럼에서 정제하였다. Fab:NRR 복합체를 함유하는 주 피크로부터의 분획을 합치고, 10 K_D 컷오프 비바스핀(Vivaspin) HY 농축기 (사르토리우스(Sartorius) 사)를 사용하여 11 mg/ml로 농축하였다. 현수 액적 증기 확산법(hanging drop vapor diffusion method)을 사용하여 Fab:NRR 복합체를 결정화하였다.
- [0271] 래트 438의 경우, 결정을 수득하기 위해서는 키모트립신을 사용한 복합체의 제한 단백질분해가 필요하다. 복합체를 먼저 2 µg/ml의 최종 농도까지 키모트립신과 혼합한 다음, 100 mM 나트륨 카코딜레이트 pH 5.5, 14-20% PEG 8000, 100-200 mM 칼슘 아세테이트로 구성되는 동일 부피의 웰 용액과 합쳤다. 1주 이내에 결정이 출현하여, 3주 동안 계속 성장하였다. 래트 351의 경우, 복합체를 20% PEG 3350, 200 mM 나트륨 술페이트로 구성되는 동일 부피의 웰 용액과 합쳤다. 1주 후 결정이 출현하여, 3주 동안 계속 성장하였다.
- [0272] 25% 글리세롤의 첨가에 의해 웰 용액을 스위핑(swiping through)함으로써 결정을 냉동-방지하였다. 어드밴스드 포톤 소스(Advanced Photon Source)에서 래트 438의 경우 SER-CAT 빔라인(beamline) 22BM, 래트 351의 경우

22ID로 X-선 데이터를 수집하고, HKL-2000 (HKL 소프트웨어 사) 소프트웨어를 사용하여 2.6 옹스트롬의 해상도로 가공하였다. 페이서(Phaser) 소프트웨어를 사용한 분자 재배치에 의해 구조를 해상하였다. 서치 모델은 노치1 NRR의 경우 pdb id 3L95로부터, 래트 438의 경우 중쇄는 2HRP, 경쇄는 1xgp로부터, 래트 351의 경우 중쇄는 1BM3, 경쇄는 3L95로부터 취하였다. 소프트웨어 NCS 규제(restraint)를 포함하는 쿄트(coot) 및 버스터(BUSTER) (글로벌 페이싱(Global Phasing), Ltd. 사)를 사용하여 생성 모델을 재구성 및 정련하였다. 몰프로비티(molprobity)를 사용하여 구조를 확인하였다. 피몰(pymol) 및 피사(PISA)를 사용하여 상호작용에 연관된 잔기들을 확인하였다.

[0273] 인간 노치1 NRR상 래트 438 에피토프의 구조도를 도 3에 나타내었으며, 인간 노치1 NRR상 래트 351 에피토프를 도 4에 나타내었다. A2 항체에 대하여 공개된 데이터를 사용하여 유사한 X-선 결정학 분석을 완료하였는데, 도 5는 인간 노치1 NRR상 A2 에피토프의 구조도를 나타낸다. 도 3-5에서는, 항체의 3.8 옹스트롬 이내 아미노산 잔기들을 흑색으로 표시하였다. 하기 표 14는 래트 438, 래트 351 및 A2에 있어서의 노치1 NRR 항체 상호작용에 연관된 잔기를 제공한다.

[0274] 데이터는 래트 438과 A2가 겹치지만 구별되는 노치1 NRR 내 표면에 결합한다는 것을 보여준다. 양 에피토프에는 중앙 HD 도메인이 포함된다. 래트 438 및 A2는 LNR-A와 상호작용하지만, 래트 438이 더 큰 표면과 상호작용한다. 래트 438만이 S1 루프 영역과 상호작용하며, A2만이 LNR-B와 상호작용한다. 더 구체적으로, 데이터는 래트 438이 인간 노치1 NRR 잔기 Asn 1461, Lys 1462, Val 1463, Cys 1464, Leu 1466, Leu 1580, Tyr 1621, Gly 1622, Met 1670, Asp 1671, Val 1672, Arg 1673, Leu 1707, Ala 1708, Leu 1710, Leu 1711, Leu 1712, Leu 1713, Leu 1716 및 Leu 1718에 결합한다는 것을 보여준다.

[0275] 데이터는 또한 래트 351과 A2가 겹치지만 구별되는 노치1 NRR 내 표면에 결합한다는 것을 보여준다. 특히, 래트 351만이 S1 루프 영역과 상호작용하며, A2만이 LNR-B와 상호작용한다. 래트 351과 A2는 모두 LNR-A와 상호작용하지만, 래트 351은 LNR-A 아미노산들 중 구별되는 하위세트와 상호작용한다. 더 구체적으로, 데이터는 래트 351이 인간 노치1 NRR 잔기 Asp 1458, Asn 1461, Val 1463, Cys 1464, Leu 1466, Leu 1580, Met 1581, Pro 1582, Tyr 1621, Gly 1622, Arg 1623, Asp 1671, Val 1672, Arg 1673, Gly 1674, Leu 1710, Gly 1711, Ser 1712, Leu 1713, Asn 1714, Ile 1715, Pro 1716, Lys 1718에 결합한다는 것을 보여준다.

[0276] 프로그램 피사를 사용하여, 노치1 NRR에 결합하는 래트 438 및 래트 351 잔기들의 x-선 결정 구조를 추가 분석하였다. 데이터는 래트 438이 잔기 Lys1718 및 Arg1673과 강한 정전기적 상호작용 (염 가교)을 형성한다는 것을 나타낸다. 래트 438 항체와 수소 결합을 형성한 노치1 NRR 잔기는 Asn1461, Asp1671, Arg1673, Leu1713, Lys1718, Cys1464, Ala1708 및 Ser1712이었다. 래트 438 항체와의 복합체 형성시 40 Å²을 초과하는 매립 표면적(buried surface area)을 기여하는 노치1 NRR 잔기는 중쇄와의 상호작용에서 Arg1673, Val1463, Lys1462, Gly1622, Asp1671, 경쇄와의 상호작용에서 Leu1466, Lys1718, Gly1711, Cys1464, Pro1716, 및Val1463이었다. 확인된 잔기들 중, 래트 438은 적어도 잔기 Asn1461, Val1463, Lys1462, Asp1671, Arg1673, Leu1713, 및 Lys1718에서 인간 노치1 NRR에 결합한다.

[0277] 데이터는 래트 351이 잔기 Asp1458 및 Arg1673과 강한 정전기적 상호작용 (염 가교)을 형성한다는 것을 나타낸다. 래트 351 항체와 수소 결합을 형성한 노치1 NRR 잔기는 Asp1458, Val1463, Cys1464, Ser1465, Tyr1621, Asp1671, Val1672, Arg1673, Gly1711, Ser1712, Leu1713, 및 Asn1714이었다. 래트 351과의 복합체 형성시 40 Å²을 초과하는 매립 표면적을 기여하는 노치1 NRR 잔기는 경쇄와의 상호작용에서 Val1463, Cys1464, Leu1466, Gly1711, Asn1714, Pro1716, 및 Lys1718, 중쇄와의 상호작용에서 Asn1461, Leu1580, Asp1671, 및 Arg1673이었다. 확인된 잔기들 중, 래트 351은 적어도 잔기 Asp1458, Val1463, Tyr1621, Asp1671, Val1672, Arg1673, Ser1712, 및 Leu1713에서 인간 노치1 NRR에 결합한다. 또한, A2는 잔기 Asp1458, Val1463, Tyr1621, Asp1671, Val1672, Arg1673, Ser1712, 및 Leu1713과는 상호작용하지 않는다.

표 14

인간 노치1 NRR 항체 상호작용에 연관되어 있는 래트 438 및 래트 351의 잔기

인간 노치1 NRR 잔기			래트 351 잔기			래트 438 잔기			A2 잔기		
LNR-A	ASP	1458	ARG	58	H						
	ASN	1461	ARG	58	H	TYR	58	H			
			TRP	94	L						
	LYS	1462				TYR	58	H			
						TYR	100A	H			
	VAL	1463	TRP	94	L	TYR	58	H			
						THR	100B	H			
	CYS	1464	ASN	92	L	ASN	92	L	TYR	49	L
			SER	93	L	SER	93	L	PHE	53	L
			TRP	94	L	TRP	94	L			
	SER	1465				TRP	94	L	TYR	49	L
	LEU	1466	ILE	2	L	ASP	1	L	SER	96	H
			GLN	27	L	ILE	2	L	PHE	98	H
			SER	93	L	GLN	27	L	TYR	49	L
						SER	93	L			
GLN	1467				TRP	94	L	SER	56	L	
ASN	1469							PHE	98	H	
LNR-B	LYS	1499							SER	30	H
									SER	31	H
									ASN	52	H
	TYR	1500							PRO	53	H
									ASN	54	H
	PHE	1501							ARG	99	H
	SER	1502							ARG	99	H
	ASP	1503							ARG	50	H
									ASN	52	H
									ASN	54	H
									SER	56	H
	HIS	1505							ARG	99	H
								ASN	54	H	
								SER	56	H	
ASP	1507							ASN	54	H	

[0278]

S1 루프	LEU	1580	PHE	98	H	PRO	97	H		
	MET	1581	GLN	53	L					
	PRO	1582	PHE	98	H					
	TYR	1621	ARG	52A	H	TYR	99	H		
	GLY	1622	ARG	52A	H	TYR	99	H		
	ARG	1623	ARG	52A	H					
	ASP	1671	TYR	32	H	TYR	98	H		
			GLN	97	H	TYR	99	H		
						GLY	100	H		
	VAL	1672	GLN	97	H	PRO	97	H		
			PHE	98	H	TYR	98	H		
						TYR	99	H		
						GLY	100	H		
	ARG	1673	HIS	31	H	PRO	97	H		
			TYR	32	H	TYR	98	H		
			ARG	52A	H	TYR	99	H		
			GLU	95	H	GLY	100	H		
		GLY	96	H						
		GLN	97	H						
		PHE	98	H						
	GLY	1674	PHE	98	H					
HD 코어	LEU	1707				ASN	30	L		
	ALA	1708				ASN	30	L	PHE	98
	SER	1709							GLY	97
									PHE	98
	LEU	1710	LYS	28	L	ARG	28	L	GLY	97
									PHE	98
									ARG	99
	GLY	1711	LYS	28	L	ARG	28	L	PHE	98
			SER	30	L	ASN	30	L		
						GLY	68	L		
	SER	1712	LYS	28	L	ARG	28	L		
			SER	30	L	ASN	30	L		
	LEU	1713	SER	30	L	ASN	30	L		
	ASN	1714	SER	30	L	ASN	30	L	PHE	91
			SER	67	L	SER	67	L	TYR	92
			GLY	68	L					
ILE	1715	THR	31	L				TYR	92	
PRO	1716	GLN	53	L	GLN	53	L	ASP	28	
								TYR	92	
TYR	1717				GLN	53	L			
LYS	1718	ASN	32	L	ASP	32	L	ALA	99	
		TYR	50	L	PHE	50	L	TYR	100	
		GLN	53	L	GLN	53	L			

[0279]

[0280] 도 6은 래트 438 및 A2 항체에 결합된 인간 노치1 NRR 구조의 중첩상태를 보여주는데; 인간 노치1 NRR이 저부에 있다. 래트 438 및 A2의 중쇄는 흑색으로 나타내었으며, 회색으로 나타낸 경쇄는 2개의 중쇄들 사이에 있다. 도 6에 나타낸 바와 같이, NRR에 대비한 래트 438 및 A2 항체의 배향은, 래트 438의 경쇄 N-말단이 LNR-A를 지향하는 반면 A2의 경쇄는 LNR-C (노치1 NRR의 흑색 영역에 있음)를 지향하도록, 거의 180도 회전되어 있다. 이는 NRR의 관점에서 중쇄를 2개 경쇄의 반대 측에 위치시킨다. 따라서, A2 중쇄는 S1 루프로부터 경쇄의 반대 측에 있다.

[0281] 도 7은 래트 351 및 A2 항체 (분자 표면으로 나타냄)에 결합된 인간 노치1 NRR (리본으로 나타냄) 구조의 중첩상태를 보여준다. 래트 351 및 A2의 중쇄는 흑색으로 나타내었다. 래트 351의 경쇄는 짙은 회색으로 나타내었으며, A2의 경쇄는 밝은 회색으로 나타내었다. 도 7은 래트 351 및 A2 항체가 반대 배향으로 결합함으로써 그들의 고유 에피토프와의 결합을 확인해준다는 것을 나타낸다.

[0282] 실시예 5

[0283] 세포-기반 검정에서의 항-노치1 억제 항체의 기능적 특성화

[0284] A. 노치1 리포터 유전자 검정에서의 EDTA-처리

[0285] 리간드의 부재하에서, 이중이량체성 S1-절단 노치1 수용체는 세포 막에서 불활성으로 유지된다. 노치1 NRR 도메인은 절단 부위 2 (S2)를 매립하는 것에 의한 자가억제 입체형태를 취함으로써, 메탈로프로테아제에 대한 접근을 방지한다. 노치1 NRR 도메인들은 칼슘과 같은 2가 양이온에 의해 안정화되는 비-공유 상호작용을 통하여

결합된다. 그러나, 노치1 NRR 도메인의 억제성 상호작용은 킬레이팅제 EDTA에 의해 붕괴될 수 있다. EDTA에 의한 칼슘 킬레이션은 세포 막으로부터의 세포의 도메인의 빠른 탈락을 초래하므로, 노치1 신호전달을 활성화하기에 충분하다 (문헌 [Rand et al., Mol. Cell. Biol. 20(5):1825-35, 2000]).

[0286] 항-노치1 억제성 항체가 2가 양이온의 킬레이션시 노치1 NRR을 불활성인 입체형태로 안정화하는지를 확인하기 위하여, 노치1-리포터 세포 (하기 단락 B 참조)를 래트 438-mIgG1, 래트 351-mIgG1 또는 A2 항체, 및 대조 항-E.테넬라 항체와 함께 사전-인큐베이팅한 다음, 5 mM의 EDTA로 처리하였다. 인간 노치1 수용체 세포를 웰 당 40,000 세포로 백벽(white-walled) 96웰 플레이트에 플레이트하고, 맥코이 5A 배지, 10% FBS, Pen/Strep/글루타민에서 배양하였다. 흡인에 의해 배지를 제거한 후, 0, 0.01, 0.1, 1, 10 및 30 µg/ml로 래트 438-mIgG1, 래트 351-mIgG1 또는 A2 항체, 및 대조 항-E.테넬라 항체를 함유하는 배지로 실온에서 1시간 동안 대체하였다. 1시간의 항체 사전-처리 후, 5 mM의 최종 농도로 EDTA를 세포에 첨가하고, 5% CO₂ 중에서 6시간 동안 37°C로 인큐베이팅하였다. 듀얼-글로(Dual-Glo) 루시퍼라제 검정 시스템 (프로메가 사)을 사용하여 8×CSL 반딧불이-루시퍼라제 (노치1-유도) 및 *레닐라*-루시퍼라제 (상시성) 리포터의 활성을 측정하였다. 반딧불이-루시퍼라제로부터의 발광 해독치를 *레닐라*-루시퍼라제 해독치로 나누어 노치1 신호전달의 수준을 계산하였다. 각 처리 3반복의 평균을 계산하고, 표준 편차와 함께 플로팅하였다.

[0287] 표 15는 킬레이팅제 EDTA 존재하 및 리간드 부재하에 점증 농도의 래트 438-mIgG1, 래트 351-mIgG1 및 A2 항체, 그리고 대조 항-E.테넬라 항체를 사용하여 수행된 노치1 리포터 유전자 검정을 나타낸다. 데이터는 노치1-리포터 세포주에 대한 EDTA 단독의 첨가가 반딧불이-루시퍼라제 리포터 유전자의 활성화를 자극한다는 것을 보여준다 (0 µg/ml 조건 참조). 예상대로, 대조 항-E.테넬라 항체는 노치1 신호전달을 억제하지 않았다. 반면, 각각 점증 농도의 래트 438-mIgG1, 래트 351-mIgG1 및 A2 항체를 사용한 세포의 사전-처리는 EDTA의 존재하에서 투여량-의존적인 방식으로 반딧불이-루시퍼라제 리포터 유전자의 활성화를 억제하였다. 1 µg/ml, 10 µg/ml 및 30 µg/ml 농도에서, 래트 351-mIgG1, 래트 438-mIgG1 및 A2 처리의 반딧불이 대 *레닐라*-루시퍼라제 비는 대조 항-E.테넬라에 비해 상당히 더 낮아서, 노치1 신호전달의 억제를 나타내었다.

표 15

킬레이팅제 EDTA 존재하 및 리간드 부재하에 점증 농도의 래트 438-mIgG1, 래트 351-mIgG1 또는 A2 항체, 및 대조 항-E.테넬라 항체를 사용하여 수행된 노치1 리포터 유전자 검정.

항체 농도	반딧불이/ <i>레닐라</i> 발광					
	0 µg/mL	0.01 µg/mL	0.1 µg/mL	1 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL
래트 351-mIgG1	315.2	303.9	202.1	84.8	62.1	57.0
래트 438-mIgG1	333.5	338.2	245.5	116.9	54.3	46.9
A2	307.1	312.3	172.5	89.9	63.5	55.2
항-E.테넬라	266.7	267.2	299.0	278.4	257.1	229.0
	표준 편차					
래트 351-mIgG1	37.3	23.7	33.6	6.6	2.0	4.8
래트 438-mIgG1	20.5	13.2	9.9	14.5	9.0	9.0
A2	25.0	17.7	10.7	14.9	7.8	8.0
항-E.테넬라	16.5	34.1	48.4	27.0	23.1	6.2

[0288] B. 노치1 리포터 유전자 공동-배양 검정을 위한 세포주 구축

[0290] 실시예 2에 기술되어 있는 노치1 리포터 유전자 공동-배양 검정에서, 항-노치1 인간화 438 및 인간화 351 항체의 억제 활성을 시험하였다. 인간화 438 및 인간화 351 항체를 노치1 리포터 세포와 함께 사전-인큐베이팅한 다음, DLL4-HEK293 세포와 공동-배양함으로써 노치1 신호전달을 활성화하거나, 또는 대조로서 모 HEK293 세포와 공동-배양하였다.

[0291] 노치1 리포터 세포주를 생성시키기 위하여, U-2 OS 인간 골육종 세포주 (ATCC, 버지니아 마나사스 소재)에서 3회 일련의 순차적이고 안정한 형질감염을 수행하였다. 1차 형질감염은 pCMV6-엔트리(Entry)-Myc-플래그(Flag) 백본 (오리젠(Origene) 사) 기반의 전장 인간 노치1 또는 마우스 노치1 발현용 벡터를 사용하였는데, 모두에서 노치1 삽입물의 올바른 DNA 서열이 확인되었다. 트랜스IT-LT1 형질감염 시약 (마이러스(Mirus) 사, 위스콘신 매디슨 소재)을 사용한 형질감염 후, G418에서 U-2 OS 세포를 선택하고, 클론주를 단리하였다. 2차로, 히그로마이신 B 더하기 G418에서 선택된 CSL 인헨서 서열 (CGTGGGAAAAT)의 8개 직렬 사본을 함유하는 pGL4.27

[*luc2P/minP/Hygro*] 벡터 (프로메가 사, 위스콘신 매디슨 소재)를 사용하여 안정한 노치1-발현 U-2 OS 클론을 재-형질감염시키고, 클론주를 단리하였다. 8×CSL 반딧불이-루시페라제 리포터 구축물은 활성화된 노치1 신호 전달에 대하여 반응성이다 (예컨대 문헌 [Jeffries et al., Mol. Cell. Biol. 22(11):3927-3941, 2002] 참조). 3차로, 퓨로마이신, 히그로마이신 B 및 G418에서 선택된 pGL4.74 [*hRluc*/TK] 벡터 (프로메가 사) 더하기 선형 퓨로마이신 마커 (클론테크(Clontech) 사, 캘리포니아 마운틴 뷰 소재)를 사용하여 노치1-pGL4.27 U-2 OS 세포를 재-형질감염시키고, 클론주를 단리하였다. pGL4.74 벡터는 HSV-TK 프로모터로부터 상시 발현되는 레닐라-루시페라제 유전자를 코딩하고 있으므로, 내부 대조로 사용되었다. 삼중으로 안정하게 형질감염된 U-2 OS 주 (본원에서는 "노치1 리포터 세포"로 지칭)를 10% FBS, 1× 페니실린/스트렙토마이신/L-글루타민 (기브코(Gibco) 사), 0.25 mg/ml G418 술페이트, 0.3 mg/ml 히그로마이신 B 및 0.001 mg/ml 퓨로마이신을 함유하는 맥코이 5A 배지 (기브코 사, 뉴욕 그랜드 아일랜드 소재) 중에서 유지하였다.

[0292] 리간드-발현 세포를 생성시키기 위하여, HEK293 세포 (ATCC)를 인간 DLL4 또는 마우스 DLL4 발현용 벡터로 형질 감염시켰다. 양 벡터는 pCMV6-AC-HA-His 백본 (오리젠 사, 매릴랜드 로크빌 소재) 기반의 것으로서, DLL4 삽입물의 올바른 DNA 서열이 확인되었다. 형질감염 후, HEK293 세포를 0.5 mg/ml G418 중에서 선택하고, 클론주를 단리하여, 팽창시킨 후, DLL4 발현에 대하여 분석하였다. U-2 OS 세포에서 높은 DLL4 발현 및 높은 노치1 리포터 활성 유도를 가지는 클론을 사용하여 항-노치1 항체의 억제 효과를 평가하였다.

[0293] 반딧불이-루시페라제로부터의 발광 해독치를 내부 대조인 레닐라-루시페라제 해독치로 나누어 신호를 표준화하였다 (본원에서는 "F/R 비"로 지칭). 노치1 신호전달의 배수-유도를 계산하기 위하여, DLL4-HEK293 공동-배양 리포터 검정으로부터 생성된 F/R 비를 모 HEK293 공동-배양으로부터의 F/R 비로 나누고, 상대적 루시페라제 단위 (RLU) 또는 활성으로 지칭하였다.

[0294] 인간 및 무린 노치1 리포터 공동-배양 검정에서의 인간화 438 VH1.1/VL1.8 및 A2의 역가측정은 투여량-의존성 방식의 강력한 노치1 신호전달 억제를 나타내었다. 도 8 및 9는 각각 인간 및 마우스 노치1 리포터 세포에서의 노치1 의존성 신호전달에 대한 인간화 438 VH1.1/VL1.8 및 래트 438 항체의 중화 활성을 보여준다. 인간화 438 VH1.1/VL1.8은 인간 및 마우스 노치1 의존성 신호전달 리포터 검정 모두에서 래트 438의 것과 동등한 중화 활성을 나타내었다. 따라서, 인간화 438 VH1.1/VL1.8은 래트 438의 중화 활성을 완전히 보유하고 있다.

[0295] 하기 표 16에 제공되어 있는 바와 같이, 노치1 리포터 유전자 공동-배양 검정에서의 노치1 의존성 신호전달의 억제로부터 래트 438-mIgG1 및 인간화 438 변이체의 IC50 (nM) 값을 계산하였다. 인간화 438 VH1.1/VL1.8이, 모든 인간화 438 변이체들 중 최저 IC50 값으로 나타나는 바와 같이, 인간 및 마우스 노치1 신호전달 모두에 대하여 가장 현저한 수준의 억제를 나타내었다.

표 16

래트 438-mIgG1 및 인간화 438 변이체의 IC50 (nM) 값 (n.d. = 확인되지 않음)

항체	A2	r438-mIgG	VH1.0/VL1.1	VH1.1/VL1.0	VH1.1/VL1.1	VH1.1/VL1.3	VH1.1/VL1.9	VH1.0/VL1.8	VH1.1/VL1.8	VH1.1/VL1.5	r438-hIgG
인간 노치1	0.31	0.68	1.19	0.46	0.657	0.45	0.38	1.87	0.17	0.35	0.65
마우스 노치1	0.32	0.71	nd	nd	nd	0.62	nd	1.37	0.46	0.50	nd

[0296] 약 0.01 nM 내지 200 nM 범위에 걸쳐 점증 농도의 항체를 첨가하는 것에 의해, 공동-배양 리포터 검정에서의 래트 351 및 A2 항-노치1 항체의 억제 효과를 조사하였다. 항-노치1 항체 처리된 공동-배양의 백분율 (%) 억제를 계산하기 위하여, 수학적 $(1 - (\text{처리}/\text{미처리}) * 100)$ 을 사용하여 점증 농도의 항체 처리로부터의 RLU를 미처리 대조로 나누었다.

[0297] 인간 및 무린 노치1 리포터 공동-배양 검정에서의 래트 351 및 A2 항체의 역가측정은 노치1 신호전달에 대한 래트 351의 우수한 중화 활성을 나타내었다. 도 10, 11 및 표 17에 나타낸 바와 같이, 래트 351 및 A2 모두가 투여량-의존성 방식으로 노치1 신호전달을 억제하였으며, 노치1 리포터 공동-배양 검정으로부터 계산된 유사한 IC50 값을 가졌다. 도 10 및 표 17은 A2가 항체 농도가 IC50 값의 20배를 상회하였을 때 인간 노치1 리포터 공동-배양 검정에서 약 100%의 최대 노치1 신호전달 억제 (평탄 억제(plateau inhibition))를 달성하였다는 것을

보여준다. 반면, 래트 351은 A2에서 관찰된 최대 억제보다 더 낮은 약 85% 만의 최대 억제를 달성하였다. 래트 351은 항체 농도가 IC50 값의 250배이었을 때에도 100% 최대 억제를 달성하는 데에 실패하였다. 도 11 및 표 17은 마우스 노치1 리포터 공동-배양 검정에 대해서도 유사한 결과가 관찰되었다는 것을 보여준다. A2가 마우스 노치1 리포터 공동-배양 검정에서 약 86%의 최대 노치1 신호전달 억제를 달성하였다. 반면, 래트 351은 A2에서 관찰된 86% 최대 억제보다 더 낮은 약 55% 만의 최대 억제를 달성하였다.

표 17

리포터 유전자 검정에 있어서 인간 및 뮤린 노치1-의존성 신호전달에 대한 래트 351 및 A2 항체의 중화 활성

항체	중화 활성 (인간 RGA)		중화 활성 (뮤린 RGA)	
	IC50 (nM)	% 억제	IC50 (nM)	% 억제
래트 351	0.4	~85%	0.3	55%
A2	0.3	~100%	0.2	86%

[0299]

[0300]

도 12 및 13은 각각 인간 및 마우스 노치1 의존성 신호전달 리포터 검정 양자에서의 인간화 351 변이체 및 래트 351-mIgG1의 중화 활성을 나타낸다. 표 18은 노치1 리포터 유전자 공동-배양 검정에서의 노치1 의존성 신호전달의 억제로부터 계산된 인간화 351 변이체, 래트 351-mIgG1 및 A2의 IC50 (nM) 값을 제공한다. 데이터는 인간화 351 VH1.0/VL1.1이 래트 351-mIgG1 및 래트 351과 유사한 중화활성 프로필을 나타내었다는 것을 보여준다. 인간화 351 VH1.0/VL1.1은 A2에서 관찰된 최대 억제보다 더 낮은 약 ~87.4%의 최대 노치1 신호전달 억제를 달성하였다.

표 18

리포터 유전자 검정에 있어서 인간 및 뮤린 노치1-의존성 신호전달에 대한 래트 351-mIgG1 및 인간화 351 변이체의 중화 활성

항체	중화 활성 (인간 RGA)		중화 활성 (뮤린 RGA)	
	IC50 (nM)	% 억제	IC50 (nM)	% 억제
래트 351-mIgG1	0.22	~85.4%	0.42	~51%
인간화 351 VH1.0/VL1.1	0.19	~87.4%	0.38	~48%
인간화 351 VH1.0/VL1.4	0.17	~85.4%	0.49	~46%
A2	0.27	~99.1%	0.36	~82%

[0301]

[0302]

실시예 6

[0303]

클론 351의 중화 활성을 위한 구조 및 기능적 기반

[0304]

노치1 NRR 구조의 완전성을 유지하기 위해서는, 노치1 NRR의 LNR-A, B 및 C 도메인 각각에서 결합된 Ca²⁺를 필요로 한다. 예를 들어, 노치1 발현 세포의 배지에 대한 EDTA의 첨가에 의한 Ca²⁺의 제거는 노치1 NRR 구조의 불안정화로 이어진다. 이는 노치1 NRR 내 S2 메탈로프로테이나제 절단 부위의 노출 및 노치1 신호전달의 활성화를 초래한다 (문헌 [Rand et al., Mol. Cell. Biol. 20(5):1825-35, 2000]).

[0305]

래트 351 Fab의 인간 노치1 NRR과의 공동-결정 구조는 단일 결정 내에 4개의 독립적인 복합체를 가진다. 그러나, 4개 복합체 중 하나만이 LNR-A에 결합된 예상 Ca²⁺를 함유하였다. 도 14a는 복합체 1의 LNR-A 영역에서의 래트 351과 인간 노치1 NRR의 상호작용을 나타낸다. 이와 같은 구조에서, 노치1 NRR 내의 음으로 하전된 잔기 Asp1458은 구조 내에 존재하는 칼슘과 이온 상호작용을 가진다. 도 14b는 복합체 2의 LNR-A 영역에서의 래트 351과 인간 노치1 NRR의 상호작용을 나타낸다. 복합체 2는 복합체 2-4의 대표적인 이미지이다. 복합체 2-4에서는, 칼슘과의 이온 상호작용을 가지는 대신, 인간 노치1 NRR의 Asp1458이 래트 351 VH CDR2의 양으로 하전된 잔기 Arg58과 염 가교를 형성하였다. 이는 래트 351의 양으로 하전된 Arg58이 인간 노치1 NRR의 음으로 하전된 Asp1458에 대한 결합에 있어서 양으로 하전된 Ca²⁺와 경쟁한다는 것을 나타낸다.

[0306]

래트 351의 기능적 특성에서의 양으로 하전된 잔기 Arg58의 중요성을 증명하기 위하여, VH의 Arg58이 중성의 잔기인 Tyr로 (는 물론, Val60-Ala 또는 Arg와 조합된 Arg58-Tyr) 돌연변이된 돌연변이 래트 351-mIgG1 항체를

생성시켰다. 상기 돌연변이 래트 351-mIgG1 항체를 노치1 신호전달 억제 리포터 검정에서 시험하고, 결과를 도 15 및 표 19에 나타내었다. 나타낸 바와 같이, 래트 351은 약 87%만의 최대 억제를 달성한 반면, 돌연변이 래트 351-mIgG1 및 A2는 각각 ~95% 및 ~98%의 더 높은 최대 억제를 달성하였다.

표 19

래트 351, 돌연변이 래트 351 및 A2의 IC50 (nM) 및 최대 억제 (%) 값

항체	A2	래트 351 wt	래트 351 VH R58Y	래트 351 VH R58Y/V60A	래트 351 VH R58Y/V60R
IC50 (nM)	0.18	0.19	0.21	0.16	0.11
최대 억제 (%)	97.7%	87.5%	95.3%	95.3%	95.3%

[0307]

[0308] 실시예 7

[0309] 내피 세포 발아, 혈관생성 및 혈관화(vascularization)에 대한 항-노치1 억제 항체의 효과

[0310] A. 항-노치1 억제 항체의 시험관내 평가

[0311] 인간 제대 정맥 내피 세포 (HUVEC) 섬유소 젤 비드 검정 (FGBA) (본원에서는 HUVEC-FGBA로도 지칭)을 사용하여 내피 세포 발아(sprouting)의 시험관내 모델에서 혈관생성에 대한 항-노치1 억제 항체의 효과를 조사하였다. 디트로이트(Detroit) 551 피부 섬유모세포 대신 1차 인간 폐 종양-관련 섬유모세포 (LTAF)를 대용하였다는 것 이외에는 본질적으로 문헌 [Nakatsu, et al. (*Microvasc. Res.* 66(2):102-112, 2003)]에 기술되어 있는 바와 같이, 변형된 버전의 HUVEC-FGBA를 수행하였다. 섬유모세포 첨가 10-15일 후, HUVEC 발아물을 조사하였다.

[0312] 인간 폐암 조직 (샘플 87852A1; 아스테란드(Asterand) 사, 미시간 디트로이트 소재)을 기계적 및 효소적으로 해체시켰다. 40 μm 세포 여과기를 통하여 세포를 체질함으로써 단일 세포 현탁액을 수득하였다. 적혈구 세포 용해 완충제 (로체(Roche) 사, 인디애나 인디애나폴리스 소재)를 사용한 처리, 및 사멸 세포로부터의 자기 분리 (밀테니이 바이오테크(Miltenyi Biotec) 사, 캘리포니아 어번 소재)에 따라 생존가능 세포를 분리하였다. 1차 폐 종양-관련 섬유모세포를 확립하여, 20% FBS를 함유하는 RPMI 배지에서 유지하였다.

[0313] LTAF-함유 HUVEC-FGBA를 래트 438, 래트 351 또는 A2 항체로 처리하였다. 배지 단독 (미처리) 및 항-VEGF 억제제인 아바스틴(AVASTIN) (제넨테크(Genentech) So. 사, 캘리포니아 샌프란시스코 소재) 대조 처리도 포함되었다. 도 16은 래트 438, 래트 351 및 A2 처리된 HUVEC-발아물의 10일차에서의 CD31-Cy3 면역염색의 대표적인 외형광(epifluorescent) 이미지를 나타낸다. 배지 단독 (미처리) 대조에 비해 래트 438 및 래트 351 처리의 HUVEC 발아 및 혈관 길이에서 증가가 확인되었다. 반면, 항-VEGF 억제제 아바스틴을 사용한 처리는 HUVEC 발아를 완전히 방지하였다. 따라서, 래트 438 및 래트 351을 사용한 노치1 신호전달의 억제는 아바스틴과 같은 항-VEGF 억제제와는 구별되는 방식으로 혈관생성을 하향-조절하였다.

[0314] 또한, 표 20은 래트 438 및 래트 351이 처리 6일차 및 12일차에 HUVEC-FGBA에서 대조 항-E.테넬라 항체에 비해 비드 당 평균 발아 분지점 수를 증가시켰다는 것을 보여준다. 그러나, 비드 당 평균 분지점 수에 대한 래트 351의 효과는 6일차에 래트 438 및 A2에 비해 더 낮았다. 12일차까지는, 래트 438 및 래트 351 양자는 물론 A2가 유사한 수의 비드 당 분지점을 유도하였다. 혈관생성시, 활성의 노치1 신호전달은 내피 첨단 세포(tip cell)의 수를 음성으로 조절함으로써 분지화 및 발아의 수준을 조절한다 (문헌 [Hellstrom, M. et al., *Nature* 445(7129):776-780, 2007]).

표 20

HUVEC-FGBA 중 래트 351, 래트 438 및 A2 처리에서의 평균 분지점 수/비드.

6일차				
	래트 351	래트 438	A2	항-E.테넬라
평균 분지점 수/비드	2.7	6.1	5.9	1.3
표준 편차	1.3	1.8	2.1	1.1
12일차				
	래트 351	래트 438	A2	항-E.테넬라
평균 분지점 수/비드	9.3	11.2	10.6	1.2
표준 편차	1.8	2.6	2.3	1.1

[0315]

[0316] B. 항-노치1 억제 항체의 생체내 평가

[0317] 혈관생성 및 혈관화의 생체내 마우스 검정에서 항-노치1 억제 항체의 효과를 추가 조사하였다. 신생아 망막은 잘 특성화되어 있는 혈관생성의 모델로써, 본 방법에서 노치 경로의 역할을 연구하는 데에 사용되었다. 마우스 망막에는 출생시부터 광범위한 혈관생성이 존재한다. 인간 망막에서와 마찬가지로, 시신경으로부터 혈관구조가 기원하여 확산됨으로써 이후 하향 발아하여 2차 네트워크를 확립하게 되는 혈관의 네트워크를 형성한다. 노치 신호전달의 유전적 및 약리학적 조작은 신생아 망막에서의 혈관생성에 적절한 노치 신호전달이 필요함을 입증하였다 (문헌 [Hellstrom, M. et al., *Nature* 445(7129):776-780, 2007]).

[0318] 임신한 CD-1 마우스를 개별적으로 수용하고, 규칙적으로 새끼의 탄생을 모니터링하였다. 래트 438-mIgG1의 경우, 탄생 1일 및 3일 후에 10 mg/kg의 대조 항-E.테넬라 항체, 10 mg/kg의 래트 438-mIgG1 또는 10 mg/kg의 A2 중 어느 하나를 새끼에게 투여하였다. 래트 351-mIgG1의 경우, 탄생 1일 및 3일 후에 30 mg/kg의 대조 항-E.테넬라 항체, 30 mg/kg의 래트 351-mIgG1 또는 30 mg/kg의 A2 중 어느 하나를 새끼에게 투여하였다.

[0319] 탄생 5일 후, 새끼를 안락사시키고, 안구를 수거하여, 2% 포르말데히드 중에 밤새 고정시켰다. 다음날, PBS로 안구를 씻기고, 망막을 분리하였다. 망막을 염색하기 위하여, 표지화 키트 (인비트로젠 사, 캘리포니아 칼스배드 소재)를 사용하여 이소렉틴 B4 (시그마(Sigma) 사, 미주리 세인트루이스 소재)를 알렉사 플루어(Alexa Fluor) 488에 접합시키고, 10% 염소 혈청, 1% 트리톤 X-100, 0.1% 나트륨 아지드, 및 각각 0.1 mM의 CaCl₂, MgCl₂ 및 MnCl₂를 포함하는 PBS 중 15 mg/ml로 사용하였다. 1% 트리톤 X-100, 0.1% 나트륨 아지드, 및 각각 0.1 mM의 CaCl₂, MgCl₂ 및 MnCl₂를 포함하는 PBS 중에서 5회, 그리고 최종 회에는 0.1% 나트륨 아지드, 및 각각 0.1 mM의 CaCl₂, MgCl₂ 및 MnCl₂를 포함하는 PBS 중에서 망막을 세척하였다. 플루오르마운트(Fluormount)-G (EMS 사, 펜실베이니아 햇필드 소재)를 사용하여 망막을 절단 및 탑재하고, 제이스(Zeiss) LSM510 공초점 현미경 (칼 제이스 마이크로이미징(Carl Zeiss MicroImaging), LLC 사, 뉴욕 톤우드 소재)에서 이미지화하였다. 도 17은 래트 438-mIgG1, 래트 351-mIgG1 및 A2를 사용한 처리 후 혈관생성의 마우스 망막 모델에서의 이소렉틴 B4-알렉사488 염색의 대표적인 공초점 이미지를 나타낸다. 항-E.테넬라 항체 및 미처리 대조 역시 포함되어 있다.

[0320] 도 17에 나타낸 바와 같이, 래트 438-mIgG1 처리 군에서의 마우스 새끼로부터의 망막은 항-E.테넬라 항체 및 미처리 대조 군에서의 마우스 새끼로부터의 망막과 비교하였을 때 상이한 혈관구조를 가지고 있었다. 이는 래트 438-mIgG1 항체가 생체내에서 혈관생성을 붕괴시켰음을 나타낸다. 특히, 래트 438-mIgG1 처리 군으로부터의 망막은 이전에 노치 신호전달의 유전적 및 약리학적 조작 후 보고되었던 것 (문헌 [Hellstrom, M. et al., *Nature* 445(7129):776-780, 2007])과 유사한 더 광범위한 혈관구조를 나타내었다. 이는 래트 438-mIgG1을 사용한 노치1 신호전달의 억제자가 마우스 신생아 망막에서의 혈관생성에 직접적으로 영향을 주었음을 나타낸다.

[0321] 역시 도 17에 나타낸 바와 같이, 래트 351-mIgG1 처리 군에서의 마우스 새끼의 망막은 항-E.테넬라 항체 및 미처리 대조 군에서의 마우스 새끼로부터의 망막과 비교하였을 때 유사한 혈관구조를 가지고 있었다. 반면, A2 군으로부터의 망막은 이전에 노치 신호전달의 유전적 및 약리학적 조작 후 보고되었던 것 (문헌 [Hellstrom, M. et al., *Nature* 445(7129):776-780, 2007])과 유사한 더 광범위한 혈관구조를 나타내었다. 이는 A2와 달리 래트 351-mIgG1 항체가 생체내에서 무린 혈관생성을 눈에 띄게 붕괴시키지 않았다는 것, 또는 무린 혈관구조에 대한 래트 351-mIgG1의 잠재적인 효과가 선택된 시점에는, 또는 시험된 투여 처방계획으로는 관찰되지 않았다는 것을 나타낸다.

- [0322] 실시예 8
- [0323] 천연 및 돌연변이 노치1 수용체를 가지는 세포주에 대한 항-노치1 억제 항체의 효과
- [0324] A. 천연 노치1 수용체를 가지는 인간 섬유모세포 세포주 CCD1076SK에서의 노치1 활성화에 대한 항-노치1 억제 항체의 효과
- [0325] 노치1 신호전달은 세포의 노치1 NRR 도메인 내에서의 입체형태 변화를 유도함으로써 메탈로프로테아제 및 감마-세크레타제 절단 부위를 노출시키는 리간드 결합에 의해 활성화된다. 단백질분해는 세포 막으로부터의 전사 활성화인자인 노치1 세포내 도메인 (노치1^{ICD})의 방출을 초래한다. 점증 농도의 래트 438, 래트 351 또는 A2 항체, 그리고 대조 항-E.테넬라 항체를 사용하여 24시간 동안 처리된 재조합 인간 DLL4 리간드에 플레이팅되었던 인간 섬유모세포 세포주 CCD1076SK로부터 생성된 단백질 추출물의 웨스턴 블롯 분석에 의해 노치1 활성화 및 노치1^{ICD} 방출을 조사하였다. D3B8 항체 (항-노치1^{ICD}) (셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology) 사, 매사추세츠 덴버 소재)를 사용하여 발린 잔기로 시작되는 방출된 노치1^{ICD} 분자를 검출하였다.
- [0326] 노치1 신호전달을 활성화하기 위하여, DLL4 리간드의 존재하에 CCD1076SK 피부 섬유모세포를 배양하였다. CaCl₂ 및 MgCl₂를 함유하는 1× DPBS 중 2 µg/ml의 재조합 인간 DLL4 (R&D 시스템즈(Systems) 사, 미네소타 미네아폴리스 소재)를 사용하여 6-웰 플레이트를 코팅하였다. 10% FBS를 함유하는 DMEM 배지 중 2×10E6 CCD1076SK 피부 섬유모세포를 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 및 10 µg/ml의 래트 438, 래트 351 및 A2 항체, 그리고 대조 항-E.테넬라 항체의 존재하에 재조합 인간 DLL4-코팅된 웰에 첨가하였다. 세포를 5% CO₂ 중에서 37°C로 24시간 동안 항체와 함께 인큐베이팅하였다. 1% NP40, 0.5% 나트륨 데옥시콜레이트, 5 mM EDTA, 0.25 M NaCl, 0.025 M 트리스-HCl, pH 7.5 함유 완전 미니 프로테아제 억제제 각테일 (로체 사) 및 0.4 mM PMSF 중에서 세포를 용해시켰다. SDS-PAGE에 의해 7.5% 폴리아크릴아미드 겔상에서 추출물을 용해시키고, 아이블롯 겔(iBlot Gel) 이동 시스템 (인비트로젠 사)을 사용하여 니트로셀룰로스 페이퍼로 옮겼다. 표준 웨스턴 블롯 절차를 사용하고 항-노치1^{ICD}, 및 적재 대조로서의 항-베타-액틴을 사용하여, 발린 잔기에서 시작하는 방출된 노치1^{ICD} 분자를 검출하였다. 바이오래드(BioRad) GS-800 보정 농도측정기를 사용하여 스캐닝된 필름상에서 농도측정 분석을 수행하고, 콰티티 원(Quantity One) 버전 4.6.9 소프트웨어 (바이오래드 사)를 사용하여 분석하였다. 각 샘플에서 베타-액틴 대조에 노치1^{ICD} 농도를 표준화한 다음, 미처리 대조와 비교하였다.
- [0327] 도 18에 나타낸 바와 같이, 래트 438의 역가측정은, 검출된 방출 노치1^{ICD}의 농도로 표시되는 바와 같이, 투여량-의존성 방식으로 노치1 활성화를 강력하게 억제하였다. 역시 도 18 및 표 21에 나타낸 바와 같이, 10 µg/ml까지의 래트 351의 역가측정은, 검출된 방출 노치1^{ICD}의 농도로 표시되는 바와 같이, A2에 비해 더 낮은 천연 노치1 수용체의 노치1 활성화 억제를 나타내었다. 모든 농도에서, 특히 0.1 µg/mL에서 시작하여, 래트 351은 A2에 비해 더 높은 방출 노치1^{ICD} 농도를 나타내었다.

표 21

도 18의 웨스턴 블롯으로부터의 노치1^{ICD} 농도의 농도측정 분석

Ab, µg/ml	표준화된 노치1 ^{ICD} 농도	
	래트 351	A2
0	1.000	1.000
0.001	0.826	0.748
0.01	0.848	0.402
0.1	0.554	0.003
1	0.393	0.003
10	0.302	0.006

- [0328]
- [0329] B. 돌연변이 노치1 수용체를 가지는 T-세포 급성 림프모구성 백혈병 (T-ALL) 세포주에서의 노치1 활성화에 대한 항-노치1 억제 항체의 효과

- [0330] 상시성인 노치1 활성화 및 노치1 세포내 도메인 (노치1^{ICD})의 방출이 T-세포 급성 림프모구성 백혈병 (T-ALL) 환자의 하위세트, 및 노치1 수용체의 NRR 도메인 내에 돌연변이를 보유하는 T-ALL 세포주에서 보고되어 있다 (문헌 [Weng et al., Science 306:269-271, 2004]). 이러한 돌연변이들은 3개의 주요 부류로 범주화된다. 부류 1 돌연변이는 HD1에서의 단일 아미노산 치환, 및 소형 인프레임 결실 또는 삽입이다. 부류 2 돌연변이는 S2-메탈로프로테아제 절단 부위를 자가-억제 NRR 도메인 너머로 이동시키는 HD2 말단 영역에서의 더 긴 삽입이다. 막근접 확대 돌연변이 (JME)로도 지칭되는 부류 3 돌연변이는 NRR을 세포 막으로부터 떨어뜨린다.
- [0331] 노치1 수용체 부류 1 돌연변이를 가지는 시험된 T-ALL 세포주에는 아미노산 1575에 류신 대 프롤린 돌연변이 (L1575P)를 가지는 HPB-ALL 세포, 아미노산 1594에 류신 대 프롤린 돌연변이 (L1594P)를 가지는 ALL-SIL 세포, 아미노산 1601에 류신 대 프롤린 돌연변이 (L1601P)를 가지는 MOLT-4 세포, 그리고 아미노산 위치 1594에 류신 대 프롤린 및 아미노산 위치 1610에 아스파르트산 대 발린의 복합 부류 1 돌연변이 (L1594P/D1610V)를 가지는 DND-41 세포가 포함된다. CCRF-CEM 세포주는 부류 2 돌연변이를 보유하며, 위치 1595에 12개 아미노산 삽입물을 보유한다. 주르캣(Jurkat) 세포주는 위치 1740에 17개 아미노산을 삽입하는 부류 3 JEM 돌연변이를 보유한다.
- [0332] 점증 농도의 래트 438-mIgG1, 인간화 438 VH1.1/VH1.8, 래트 351-mIgG1 또는 A2 항체, 그리고 대조 항-E.테벨라 항체로 처리된 T-ALL 세포주로부터 생성된 단백질 추출물의 웨스턴 블롯 분석에 의해, 노치1 활성화 및 노치1^{ICD} 방출을 조사하였다. 발린 잔기에서 시작하는 방출된 노치1^{ICD} 분자는 D3B8 항체 (항-노치1^{ICD})를 사용하여 특이적으로 검출하였다.
- [0333] T-ALL 세포주 HPB-ALL, ALL-SIL, CCRF-CEM, MOLT-4, DND-41 및 주르캣 세포를 상기한 바와 같은 CCD1076SK 섬유모세포 대신 사용하였다. T-ALL 세포는 상시성으로 방출되는 노치1^{ICD}를 보유하기 때문에, 외인성 DLL4 리간드를 필요로 하지 않는다. 2×10⁶ T-ALL 세포의 현탁 배양물을 10% FBS, Pen/Strep/글루타민을 함유하는 RPMI 1640 배지 중에서 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 및 10 µg/ml의 래트 438-mIgG1, 인간화 438 VH1.1/VH1.8, 래트 351-mIgG1 또는 A2 항체, 그리고 대조 항-E.테벨라 항체와 혼합하였다. 세포를 항체와 함께 5% CO₂ 중에서 37 °C로 24시간 동안 인큐베이팅하였다. 원심분리에 의해 세포를 수거하고, 흡인에 의해 배지를 제거하였다. 1% NP40, 0.5% 나트륨 데옥시콜레이트, 5 mM EDTA, 0.25 M NaCl, 0.025 M 트리스-HCl, pH 7.5 함유 완전 미니 프로테아제 억제제 콕테일 (로체 사) 중에서 세포 펠렛을 용해시켰다. SDS-PAGE에 의해 7.5% 폴리아크릴아미드 겔상에서 추출물을 용해시키고, 아이블롯 겔 이동 시스템 (인비트로젠 사)을 사용하여 니트로셀룰로스 페이퍼로 옮겼다. 표준 웨스턴 블롯 절차를 사용하고 항-노치1^{ICD}, 및 적재 대조로서의 항-베타-액틴을 사용하여, 발린 잔기에서 시작하는 방출된 노치1^{ICD} 분자를 검출하였다. 바이오래드 GS-800 보정 농도측정기를 사용하여 스캐닝된 필름상에서 농도측정 분석을 수행하고, 콰터티 윈 버전 4.6.9 소프트웨어 (바이오래드 사)를 사용하여 분석하였다. 각 샘플에서 베타-액틴에 노치1^{ICD} 농도를 표준화한 다음, 미처리 대조와 비교하였다.
- [0334] 도 19에 나타낸 바와 같이, 점증 농도의 래트 438-mIgG1 및 인간화 438 VH1.1/VL1.8을 사용한 HPB-ALL 세포의 처리는, 검출된 방출 노치1^{ICD}의 농도로 나타나는 바와 같이, 상시성 노치1 활성화를 상당히 억제하였다. 따라서, 위치 1575에서의 류신 대 프롤린의 돌연변이는 노치1 활성화를 억제하는 래트 438-mIgG1 및 인간화 438 VH1.1/VL1.8 항체의 능력에 영향을 주지 않았다. 이는 래트 438 항체가 야생형 NRR-항체 공동-결정 구조에서 위치 1575의 아미노산과 상호작용하지 않았음을 나타내는 표 14와 일치한다.
- [0335] 도 20 및 표 22에 나타낸 바와 같이, 점증 농도의 래트 438-mIgG1, 래트 351-mIgG1 및 A2를 사용한 T-ALL 세포주 HPB-ALL, ALL-SIL, CCRF-CEM, MOLT-4 및 DND-41 세포의 처리는, 웨스턴 블롯 및 농도측정 분석에 의한 감소된 방출 노치1^{ICD} 검출로 나타나는 바와 같이, 투여량 의존성 방식으로 노치1 활성화를 억제하였다. 반면, 점증 농도의 래트 351-mIgG1 및 A2를 사용한 주르캣 세포의 처리는 웨스턴 블롯 분석에 의한 방출 노치1^{ICD}의 검출로 나타나는 바와 같이, 노치1 활성화를 억제하는 데에 실패하였다. 예상대로, 대조 항-E.테벨라 항체는 어떠한 T-ALL 세포주에서도 방출 노치1^{ICD}의 농도에 대하여 효과를 나타내지 않았다.
- [0336] 래트 438-mIgG1, 래트 351-mIgG1 및 A2 항체는 부류 1 (L1575P를 가지는 HPB-ALL 세포, L1594P를 가지는 ALL-SIL 세포, L1601P를 가지는 MOLT-4 세포, 및 복합 부류 1 돌연변이 L1594P/D1610V를 가지는 DND-41 세포) 및 부류 2 (위치 1595에 12개 아미노산 삽입물을 가지는 CCRF-CEM 세포주) NRR 돌연변이를 가지는 소정의 T-ALL 세

포주들에서 노치1 활성화 및 노치1^{ICD} 방출을 유사하게 억제하였으며, 래트 351-mIgG1 및 A2는 부류 3 JEM 돌연변이를 가지는 주르캣 세포에서 노치1 수용체의 절단 및 노치1^{ICD} 방출을 억제하는 데에 실패하였다. 또한, 래트 351-mIgG1은 도 18 및 표 21에 나타난 바와 같은 래트 351에 의한 천연 노치1 수용체의 노치1 활성화 억제에 비해, 도 20 및 표 22에 나타난 바와 같이, 더 높은 돌연변이 노치1 수용체의 노치1 활성화 억제를 나타내었다.

표 22

도 20의 웨스턴 블롯으로부터의 노치1^{ICD} 농도의 농도측정 분석 (n.d = 확인되지 않음)

Ab, μg/ml	표준화된 노치1 ^{ICD} 농도											
	HPB-ALL		ALL-SIL		CCRF-CEM		MOLT-4		DND-41		주르캣	
	A2	래트 351-mIgG1	A2	래트 351-mIgG1	A2	래트 351-mIgG1	A2	래트 351-mIgG1	A2	래트 351-mIgG1	A2	래트 351-mIgG1
0	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
0.001	0.852	0.833	1.565	0.982	1.119	0.982	n.d.	n.d.	0.787	1.020	1.197	1.535
0.01	1.145	0.886	1.310	0.712	1.276	1.038	0.962	1.525	0.840	0.988	1.165	1.435
0.1	0.330	0.156	0.068	0.080	0.424	0.413	0.644	0.751	0.479	0.367	0.983	1.406
1	0.038	0.075	0.033	0.030	0.048	0.043	0.075	0.284	0.199	0.322	1.152	1.078
10	0.041	0.020	0.043	0.019	0.027	0.034	0.043	0.082	0.114	0.219	1.586	1.204

[0337]

[0338] C. 돌연변이 노치1 수용체를 가지는 T-세포 급성 림프모구성 백혈병 (T-ALL) 세포주의 생존가능성에 대한 항-노치1 억제 항체의 효과

[0339] MTS 세포 생존가능성 표시장치 (프로메가 사, 위스콘신 매디슨 소재)를 사용하여 처리 후% 생존가능 세포를 측정함으로써, HBP-ALL 세포에 대한 항-노치1 항체의 효과를 추가 평가하였다. MTS 시약을 대사적으로 활성인 살아 있는 세포에 의해서는 490 나노미터의 광학 밀도 (O.D. 490 nm)에서 측정될 수 있으나 사멸 세포에서는 그렇지 않은 생성물로 전환시켰다. 10% FBS, Pen/Strep/글루타민을 함유하는 RPMI 1640 배지 중 HBP-ALL 세포 (1 × 10⁴ 세포/웰)를 0, 0.47, 1.88, 7.5 및 30 μg/ml의 인간화 438 VH1.1/VL1.8, 래트 438-mIgG1, 래트 351-mIgG1 및 A2 항체, 그리고 대조 항-E.테넬라 항체와 함께 7일 동안 인큐베이팅한 다음, MTS 시약을 사용하여 제조사의 지침에 따라 검정하였다.

[0340] 하기 표 23은 점증 농도의 래트 438-mIgG1, 래트 351-mIgG1 및 A2 항체, 그리고 대조 항-E.테넬라 항체를 사용한 HPB-ALL 세포의 항-노치1 억제 항체 처리의 MTS 생존가능성 검정을 나타낸다. 결과적으로, 30 μg/ml까지 점증 농도의 래트 438-mIgG1, 351-mIgG1 및 A2를 사용하여 처리된 HPB-ALL 세포는 대조 항-E.테넬라 처리보다 O.D. 490 nm에서 더 낮은 전환된 MTS 시약 농도를 나타내었다. 이는 증가된 세포 사멸 및/또는 감소된 증식의 결과로서 래트 438-mIgG1, 래트 351-mIgG1 및 A2 처리된 세포에서 더 적은 세포가 존재하였음을 나타낸다.

표 23

래트 438-mIgG1, 래트 351-mIgG1 및 A2, 그리고 대조 항-E.테넬라 항체를 사용하여 처리된 HPB-ALL 백혈병 세포의 MTS 생존가능성 검정

O.D. 490nm		0 μg/mL	0.47 μg/mL	1.88 μg/mL	7.5 μg/mL	30 μg/mL
항체 농도						
래트 438-mIgG1	0.361	0.394	0.284	0.180	0.110	
래트 351-mIgG1	0.366	0.267	0.175	0.119	0.082	
A2	0.355	0.271	0.167	0.107	0.076	
항-E.테넬라	0.366	0.425	0.440	0.427	0.445	
표준 편차						
래트 438-mIgG1	0.003	0.004	0.007	0.019	0.010	
래트 351-mIgG1	0.009	0.015	0.015	0.011	0.006	
A2	0.002	0.018	0.004	0.008	0.013	
항-E.테넬라	0.012	0.004	0.056	0.024	0.010	

[0341]

[0342] 점증 농도의 인간화 438 VH1.1/VL1.8, 래트 438-mIgG1 및 대조 항-E.테넬라를 사용한 HPB-ALL 세포의 항-노치1 억제 항체 처리의 MTS 검정을 설명하는 표 24에 나타난 바와 같이, 인간화 438 VH1.1/VL1.8에서도 유사한 결과

가 관찰되었다. 따라서, 노치1 활성화를 억제하는 것 이외에, 인간화 438 VH1.1/VL1.8 항체는 T-ALL 환자에서의 공통적인 특징인 노치1의 NRR 도메인의 돌연변이를 가지는 암 세포의 성장 역시 억제하였다.

표 24

인간화 438 VH1.1/VH1.8, 래트 438-mIgG1 및 대조 항-E.테넬라 항체를 사용하여 처리된 HPB-ALL 백혈병 세포의 MTS 생존가능성 검정

O.D. 490nm					
항체 농도	0 µg/mL	0.47 µg/mL	1.88 µg/mL	7.5 µg/mL	30 µg/mL
인간화 438 VH1.1/VL1.8	0.464	0.427	0.306	0.204	0.162
래트 438-mIgG1	0.456	0.478	0.373	0.259	0.190
항-E.테넬라	0.457	0.488	0.428	0.524	0.525
표준 편차					
인간화 438 VH1.1/VL1.8	0.016	0.014	0.011	0.009	0.003
래트 438-mIgG1	0.012	0.038	0.051	0.034	0.004
항-E.테넬라	0.008	0.003	0.099	0.029	0.013

[0343]

[0344]

돌연변이 래트 351 항체의 시험관내 활성을 입증하기 위하여, HPB-ALL 세포를 점증 농도의 래트 351-mIgG1, 래트 351(R58Y)-mIgG1, 래트 351(R58Y/V60A)-mIgG1, 438 인간화 VH1.1/VL1.8, A2 항체 또는 대조 항-E.테넬라 항체 중 어느 하나로 처리하였다. 하기 표 25는 항-노치1 억제 항체 처리의 MTS 검정 및 그의 결과적인 IC50 값을 나타낸다. 래트 351(R58Y)-mIgG1 및 래트 351(R58Y/V60A)-mIgG1 항체 모두가 HPB-ALL 성장을 억제하였으나, 그의 IC50 값으로 확인하였을 때 야생형 래트 351-mIgG1 항체보다는 인간화 438 VH1.1/VL1.8에 더 유사한 방식으로 억제하였다. 따라서, 래트 351-mIgG1의 Arg58 잔기는 돌연변이 NRR을 가지는 노치1 수용체에 대한 그의 강력한 억제 활성에 기여하였다.

표 25

돌연변이 래트 351-mIgG1 항체를 사용하여 처리된 HPB-ALL 백혈병 세포의 MTS 생존가능성 검정 및 IC50 (nM) 값

O.D. 490nm							
항체 농도	0 µg/mL	0.0391 µg/mL	0.1563 µg/mL	0.625 µg/mL	2.5 µg/mL	10 µg/mL	IC50, nM
래트 351-mIgG1	0.755	0.726	0.514	0.311	0.235	0.192	1.27
래트 351-R58Y-mIgG1	0.697	0.715	0.582	0.345	0.236	0.184	2.17
래트 351 R58Y/V60A-mIgG1	0.697	0.775	0.667	0.363	0.265	0.184	2.49
438 인간화 VH1.1/VL1.8	0.694	0.702	0.601	0.339	0.223	0.198	2.26
A2	0.755	0.706	0.568	0.325	0.204	0.178	1.85
항-E.테넬라	0.694	0.735	0.758	0.759	0.772	0.774	n.a.
표준 편차							
래트 351-mIgG1	0.017	0.032	0.018	0.014	0.015	0.005	
래트 351-R58Y	0.020	0.008	0.024	0.012	0.019	0.006	
래트 351-R58Y/V60A	0.020	0.024	0.025	0.017	0.014	0.007	
438 인간화 VH1.1/VL1.8	0.022	0.006	0.023	0.016	0.014	0.008	
A2	0.017	0.012	0.029	0.010	0.009	0.017	
항-E.테넬라	0.022	0.023	0.024	0.009	0.034	0.054	

[0345]

[0346] 실시예 9

[0347] 인간 중앙 이종이식편의 생체내 성장에 대한 항-노치1 억제 항체의 효과

[0348] A. 노치1 및 자기트1 공동-면역조직화학

[0349] 해당 잠재적 효능을 최대화하기 위하여, 이종이식된 중앙 및 숙주 간질 세포 모두에서 노치1 발현을 가지는 전임상 모델에서, 항-노치1 억제 항체의 효과를 시험하였다. 노치1 및 그의 리간드 중 하나인 자기트(Jagged)1을 발현하는 전임상 모델을 확인하기 위하여, 이하 "37622A1 NSCLC PDX"로 지칭되는 37622A1 비-소세포 폐암(NSCLC) 환자-유래 이종이식편(PDX)에서 항-노치1 및 항-자기트1 항체를 사용한 면역조직화학을 수행하였다. 37622A1 NSCLC PDX로부터의 조직 단편을 포르말린-고정하고, 표준 조직학 절차를 사용하여 파라핀 매립(FFPE)하였다. 5 마이크로미터 FFPE 절편을 절단하여, 왁스를 제거한 후, 증류수에 수화시켰다. 압력 쿠키 내 pH

6.0의 시트레이트 완충제 중에서 항원을 재생시켰다. 0.3% H2O2를 사용하여 15분 동안 내생 퍼옥시다제를 블로킹하였다. DAKO 단백질 블로킹과 함께 20분 동안 절편을 인큐베이팅하였다. 아비딘/바이오틴 블로킹 키트 (벡터 (Vector) 사)에 의해 내생 바이오틴을 블로킹하였다. 토끼 항-노치1 (ab52627; 아브캠(Abcam) 사) 1:50 희석물을 실온에서 1시간 동안 절편에 적용하였다. 항-토끼 IgG-바이오틴 (잭슨이뮤노(JacksonImmuno) 사)을 실온에서 30분 동안 절편에 적용하였다. 스트렙타비딘-HRP를 실온에서 30분 동안 절편에 적용하였다. DAB를 사용하여 5분 동안 색상을 현상하였다. pH 6.0의 시트레이트 완충제 중에서 98℃로 10분 동안 절편을 가열함으로써, 첫 번째 반응으로부터의 결합 항-노치1 1차 및 항-토끼 IgG 2차 항체를 붕괴시켰다. DAKO 단백질 블로킹 중에서 20분 동안 절편을 블로킹한 후, 토끼 항-자기드1 항체 (산타 크루즈(Santa Cruz) 사)의 1:100 희석물을 사용하여 실온에서 2시간 동안 인큐베이팅하였다. 항-토끼 IgG-HRP 중합체 (DAKO)를 실온에서 30분 동안 적용하였다. ImmPACT VIP 기질을 사용하여 7분 동안 색상을 현상하였다. 메이어 헤마톡실린(Mayer's hematoxylin) 중에서 절편을 간단하게 대조염색하고, 탈수하여, 정화한 후, 커버슬립을 덮었다.

[0350] 도 21에 나타낸 바와 같이, 37622A1 NSCLC PDX는 종양 세포 군집 (뚜꺼운 선으로 구분) 내에서 인간 노치1 수용체 (파선의 좌측) 및 인간 자기드1 리간드 (파선의 우측)의 이중유래 발현을 가졌다. 인간 노치1과 인간 자기드1 종양 세포의 경계면에서 핵 노치1^{ICD} (화살표)도 검출됨으로써, 활성인 노치1 신호전달을 표시하였다. 마우스 간질 내에서는, PDX-연관 혈관구조에서도 뮤린 노치1이 검출되었는데, 노치1 신호전달이 뮤린 신생아 망막에서 혈관생성을 조절한다는 이전의 발견과 일치하였다. 37622A1 NSCLC PDX에서의 노치1 및 자기드1의 발현 패턴은 그것이 항-노치1 항체의 생체내 효과를 조사하기 위한 적절한 모델이라는 것을 나타내었다.

[0351] NSCLC에서는, K-ras가 종양 성장을 촉진하는 빈번하게 돌연변이되는 종양유전자이다. 따라서, 37622A1 NSCLC PDX로부터의 K-ras 유전자를 서열분석하여 그것이 야생형 또는 돌연변이 K-ras를 함유하는지를 확인하였다. 프레프캡(PrepGEM) 키트를 사용하여 제조자의 지침에 따라 (자이젯(ZyGEM) 사, 캘리포니아 솔라나 비치 소재) 37622A1 NSCLC PDX의 단편으로부터 게놈 DNA를 분리하였다. 순방향 및 역방향 프라이머를 사용하여 KOD 폴리머라제 (EMD 케미칼즈(Chemicals) 사, 뉴저지 김스타운 소재)로 K-ras DNA 서열을 증폭하였다. PCR 주기 조건: 75℃에서 15분 동안 1 주기, 95℃에서 5분 동안 1 주기, 96℃에서 1분 동안 1 주기, 그리고 96℃에서 15초 동안, 60℃에서 15초 동안 및 72℃에서 40초 동안 35 주기, 및 72℃에서 1분 20초 동안 1 주기. 키아퀵(QIAquick) PCR 정제 키트 (키아젠 사, 캘리포니아 발렌시아 소재)를 사용하여 496 염기쌍의 증폭 PCR 생성물을 정제하고, 빅다이 터미네이터(BigDye Terminator) v1.1 주기 서열분석 키트 (ABI 사, 캘리포니아 포스터 시티 소재)를 사용하여 제조자의 지침에 따라 DNA 서열분석을 수행하였다.

[0352] 도 22에 나타낸 바와 같이, DNA 서열분석은 37622A1 NSCLC PDX가 인간 K-ras 유전자의 아미노산 13에 글리신 대발린 (DNA 서열 GTT에 의해 코딩됨) 돌연변이 (G13V)를 보유한다는 것을 표시하였다.

[0353] B. NSCLC 이중이식편에 대한 생체내 성장 억제 연구

[0354] 면역결핍 마우스에서 적절하게 부합하는 절차에 따라 수득된 새로 절개된 NSCLC 종양의 단편으로부터 확립된 인간 종양 이중이식편 (아스테란드 사)의 생체내 성장에 대한 항-노치1 억제 항체의 효과를 조사하였다. 87393A1 NSCLC 환자-유래 이중이식편 및 37622A NSCLC 환자-유래 이중이식편 (이하 각각 "87393A1 NSCLC PDX" 및 "37622A1 NSCLC PDX"로 지칭)을 각각 NOD-SCID 및 누드 (Nu/Nu) 암컷 마우스에서 동물에서 동물로 단편으로서 생체내 계대시켰다 (passaged).

[0355] 종양이 200 내지 400 mm³에 도달하였을 때, 다양한 처리 군들간 종양 크기의 균일성을 확보하도록 그것을 단계 조정 후, 항-노치1 및 대조 항-E.테넬라 항체를 투여하였다. 37622A1 NSCLC PDX 모델에는 10 mg/kg의 래트 438-mIgG1 및 A2, 그리고 대조 항-E.테넬라 항체를 주당 1회 3주 동안 i.p.로 투여하였다. 87393A1 NSCLC PDX 모델에는 20 mg/kg의 래트 351-mIgG1 및 대조 항-E.테넬라 항체를 주당 2회 4주 동안 i.p.로 투여하였다. 주당 1회 이상 종양을 측정하고, 하기 수학적식을 사용하여 그 부피를 계산하였다: 종양 부피 (mm³) = 0.5 × (종양 너비²)(종양 길이). 8-11 동물로부터, 각 처리 군에 대한 평균 종양 부피 (±SEM)를 계산하고, 대조-처리와 비교하였다.

[0356] 하기 표 26은 대조 항-E.테넬라 항체와 비교하였을 때의 K-ras에 G13V 돌연변이를 가지는 37622A1 NSCLC 환자 유래 이중이식편에서의 래트 438-mIgG1 및 A2 항체의 효능을 나타낸다. 래트 438-mIgG1에 의한 37622A1 PDX의 성장 억제는 활성화된 노치1 및/또는 K-ras 종양유전자 내 돌연변이를 가지는 NSCLC가 노치1 경로 억제제에 민감할 수 있다는 것을 표시한다.

표 26

K-ras에 G13V 돌연변이를 가지는 37622A1 NSCLC 환자 유래 이종이식편에서의 래트 438-mIgG1 및 A2 항체의 효능

	대조 항-E.테넬라					
	0 일차	3 일차	7 일차	10 일차	14 일차	16 일차
종양 부피 (mm ³)	341.5	547.5	901.0	1128.4	1606.3	1860.5
S.E.M.	40.0	67.1	103.2	151.6	231.3	275.8
	래트 438-mIgG1					
	0 일차	1 일차	4 일차	8 일차	11 일차	14 일차
종양 부피 (mm ³)	336.5	584.5	498.4	429.9	502.5	539.2
S.E.M.	44.6	76.4	81.8	87.1	97.3	126.9
	A2					
	0 일차	1 일차	4 일차	8 일차	11 일차	14 일차
종양 부피 (mm ³)	344.3	533.7	523.9	428.7	536.2	622.8
S.E.M.	45.6	72.7	72.1	63.0	117.0	147.5

[0357]

[0358] 표 27은 대조 항-E.테넬라 항체와 비교하였을 때의 87393A1 NSCLC PDX에서의 래트 351-mIgG1의 효능을 나타낸다. 28일차에, 래트 351-mIgG1을 사용한 처리는 대조 항-E.테넬라 처리된 종양에 비교하였을 때 29%의 종양 성장 억제를 초래하였다.

표 27

87393A1 NSCLC 환자 유래 이종이식편에서의 래트 351-mIgG1의 효능

	대조 항-E.테넬라					
	0 일차	7 일차	14 일차	20 일차	26 일차	28 일차
종양 부피 (mm ³)	312.4	456.5	596.8	695.6	880.4	836.6
S.E.M.	7.7	37.4	45.6	33.3	61.1	41.8
	래트 351-mIgG1					
	0 일차	7 일차	14 일차	20 일차	26 일차	28 일차
종양 부피 (mm ³)	275.4	299.5	433.3	466.2	529.5	590.4
S.E.M.	5.1	35.5	57.8	62.2	89.6	93.5

[0359]

[0360] 노치1 활성화가 억제되었는지를 확인하기 위하여, 연구 종료시에 이종이식편으로부터 생성되는 단백질 추출물상에서 D3B8 항체 (항-노치1^{ICD})를 사용한 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 연구 종료시에, 래트 438-mIgG1, A2 및 대조 항-E.테넬라 처리된 37622A1 NSCLC PDX 모델로부터의 이종이식편, 및 래트 351-mIgG1 및 대조 항-E.테넬라 처리된 87393A1 NSCLC PDX 모델로부터의 이종이식편을 수거하였다. 1% NP40, 0.5% 나트륨 데옥시콜레이트, 5 mM EDTA, 0.25 M NaCl, 0.025 M 트리스-HCl, pH 7.5 함유 완전 미니 프로테아제 억제제 각테일 (로체 사) 중에서 종양 조직을 용해시켰다. SDS-PAGE에 의해 7.5% 폴리아크릴아미드 겔상에서 추출물을 용해시키고, 아이블롯 겔 이동 시스템 (인비트로젠 사)을 사용하여 니트로셀룰로스 페이퍼로 옮겼다. D3B8 항체 (항-노치1^{ICD})를 사용하여 발린 잔기에서 시작하는 방출된 노치1^{ICD} 분자를 검출하고, 표준 웨스턴 블롯 절차를 사용하고 D1E11 (항-노치1) (셀 시그널링 테크놀로지스 사)을 사용하여 노치1 C-말단 도메인의 총 농도를 검출하였다. 적재 대조로서 β-액틴을 나타내었다.

[0361] 도 23은 래트 438-mIgG1 및 A2를 사용하여 처리된 37622A1 NSCLC PDX로부터 생성된 단백질 추출물의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다. 대조 항-E.테넬라 처리된 종양에서는 방출 노치1^{ICD}의 검출이 관찰되었으나, 래트 438-mIgG1 처리된 종양에서는 관찰되지 않음으로써, 노치1 활성화의 억제를 표시하였다. 도 24는 래트 351-mIgG1 및 대조 항-E.테넬라 항체를 사용하여 처리된 87393A1 NSCLC PDX로부터 생성된 단백질 추출물의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다. 대조 항-E.테넬라 처리된 종양에서는 방출 노치1^{ICD}의 검출이 관찰되었으나, 래트 351-mIgG1 처리된 종양에서는 관찰되지 않음으로써, 노치1 활성화의 억제를 표시하였다.

[0362] 원래의 87393A1 NSCLC PDX 시편으로부터의 공여자 임상 정보는 환자의 종양이 폐의 침습성이며 저조하게 분화된

편평 세포 암종임을 나타내었다. 인볼루크린은 폐 종양에서 편평 세포 분화의 마커이다 (문헌 [Said, J.W., et. al., Laboratory Investigation, 1983, volume 49, 563-568]). 노치1 활성화의 억제가 87393A1 NSCLC PDX 종양 세포 분화에 대하여 효과를 가지는지를 확인하기 위하여, 면역조직화학 및 웨스턴 블롯 분석에 의해 인볼루크린 발현을 분석하였다. 도 25 및 26은 각각 래트 351-mIgG1 및 대조 항-E.테넬라 처리된 종양의 인볼루크린 면역조직화학 및 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다. 87393A1 NSCLC PDX에서의 노치1 활성화의 억제는 면역조직화학 및 웨스턴 블롯 분석에 의해 나타나는 바와 같이 증가된 인볼루크린 발현 농도를 초래하였다. 따라서, 종양 크기를 감소시키는 것 이외에, 항-노치1 처리는 종양 세포 분화도 증가시켰다.

[0363] 노치1 활성화의 억제가 단독으로 체중에 영향을 주는지를 확인하기 위하여, 생체내 효능 연구 동안 마우스를 칭량하였다. 표 28은 연구 과정 동안의 래트 351-mIgG 및 대조 항-E.테넬라 항체 처리된 군의 평균 마우스 체중 (빼기 종양 중량)이 87393A1 NSCLC PDX에서 유의성 있게 다르지 않았음을 나타낸다.

표 28

래트 351-mIgG1을 사용한 처리 후의 87393A1 NSCLC PDX에서의 평균 마우스 체중 (빼기 종양 중량).

그래프로 나타낸 평균 마우스 체중 (빼기 종양 중량)					
항체	0 일차	7 일차	14 일차	20 일차	26 일차
대조 항-E.테넬라	23.9	23.1	23.4	23.3	22.9
래트 351-mIgG1	23.4	23.0	23.1	23.3	23.5

[0364]

[0365] C. HPB-ALL 이종이식편에 대한 생체내 성장 억제 연구

[0366] 돌연변이 노치1 HPB-ALL 세포주를 사용하여 상기한 37622A1 NSCLC PDX 및 87393A1 NSCLC PDX에서 수행된 것과 유사한 생체내 실험을 수행하였다. 이종이식편을 생성시키기 위하여, 누드 암컷 마우스 (Nu/Nu)에 50% 매트릭젤(Matrigel) (BD 바이오사이언시즈(Biosciences) 사) 중 8×10^6 HPB-ALL 세포를 피하 이식하였다. 종양이 200 내지 400 mm³의 부피에 도달하였을 때, 다양한 처리 군들간 종양 크기의 균일성을 확보하도록 종양을 단계 조정된 후, 항-노치1 및 대조 D16A 항체를 투여하였다. HPB-ALL 모델에 20 mg/kg의 래트 438-mIgG1, 래트 351-mIgG1, A2 또는 D16A 항체를 주당 2회 2주 동안 s.c.로 투여하였다. 주당 1회 이상 종양을 측정하고, 하기 수학적식을 사용하여 그 부피를 계산하였다: 종양 부피 (mm³) = $0.5 \times (\text{종양 너비}^2)(\text{종양 길이})$. 8-11 동물로부터, 각 처리 군에 대한 평균 종양 크기 (\pm SEM)를 계산하고, 대조-처리와 비교하였다.

[0367] 하기 표 29는 노치1 NRR에 L1575P 돌연변이를 가지는 HPB-ALL 이종이식편에서의 래트 438-mIgG1, 래트 351-mIgG1 및 A2 항체의 효능을 나타낸다. 데이터는 래트 438-mIgG1을 사용한 처리 및 래트 351-mIgG1을 사용한 처리 양자가 대조 D16A 항체에 비해 HPB-ALL 세포의 생체내 성장을 억제함으로써 종양 성장을 느리게 하였음을 나타낸다.

표 29

노치1 NRR에 L1575P 돌연변이를 가지는 HPB-ALL 이종이식편에서의 래트 351-mIgG1, 래트 438-mIgG1 및 A2 항체의 효능.

	대조 D16A					
	0 일차	1 일차	4 일차	8 일차	11 일차	14 일차
중양 부피 (mm ³)	175.3	201.9	261.2	522.0	735.9	1003.4
S.E.M.	6.4	4.4	11.4	44.1	82.3	162.2
	래트351-mIgG1					
	0 일차	1 일차	4 일차	8 일차	11 일차	14 일차
중양 부피 (mm ³)	166.1	198.6	244.1	267.0	231.0	251.0
S.E.M.	8.3	5.5	12.0	21.6	21.3	36.2
	래트438-mIgG1					
	0 일차	1 일차	4 일차	8 일차	11 일차	14 일차
중양 부피 (mm ³)	165.1	194.7	225.0	244.3	176.9	179.2
S.E.M.	4.9	5.0	7.3	25.6	21.6	25.9
	A2					
	0 일차	1 일차	4 일차	8 일차	11 일차	14 일차
중양 부피 (mm ³)	174.5	197.9	218.5	201.4	157.5	146.3
S.E.M.	2.8	4.6	7.4	12.5	13.2	13.9

[0368]

[0369] D. 칼루-6 NSCLC 이종이식편에 대한 생체내 성장 억제 연구

[0370] 칼루(Calu)-6 NSCLC 세포주를 사용하여 생체내 연구를 위해 상기에서 HPB-ALL 세포를 사용하여 수행된 것과 유사한 실험을 수행하였다. 칼루-6 이종이식편을 먼저 50% 매트릭셀 (BD 바이오사이언시즈 사) 중에서 2×10E6 시험관내 배양된 세포로부터 누드 암컷 마우스 (Nu/Nu)에 확립시킨 다음, 동물에서 동물로의 종양 단편으로서 생체내에서 연속 계대시켰다. 종양이 200 내지 400 mm³의 부피에 도달하였을 때, 다양한 처리 군들간 종양 크기의 균일성을 확보하도록 종양을 단계조정된 후, 항-노치1 및 대조 항체를 투여하였다. 칼루-6 모델에 3, 10 및 30 mg/kg의 래트 438-mIgG1 또는 A2, 또는 10 mg/kg의 대조 항-E.테넬라를 주당 2회 2주 동안 i.p.로 투여하였다. 주당 1회 이상 종양을 측정하고, 하기 수확식을 사용하여 그 부피를 계산하였다: 부피 (mm³) = 0.5 × (종양 너비²)(종양 길이). 8-11 동물로부터, 각 처리 군에 대한 평균 종양 부피 (±SEM)를 계산하고, 대조-처리와 비교하였다.

[0371] 칼루-6 모델은 그것이 항-DLL4 (문헌 [Ridgeway et al., Nature 444:1083-1087, 2006]) 및 A2 항체와 같은 노치 경로 억제제에 대하여 반응하는 것으로 이전에 입증되었었기 때문에 선택되었다. 하기 표 30은 칼루-6 폐암 모델에서의 래트 438-mIgG1 및 A2의 효능을 나타낸다. 3 mg/kg, 10 mg/kg 및 30 mg/kg의 래트 438-mIgG1을 사용한 처리는 종양 성장의 투여량-의존성 감소를 초래하였다. 그러나, 칼루-6 이종이식편의 효율적인 (> 50%) 성장 감소는 37622A1 PDX의 성장을 유사한 수준까지 억제하는 데에 요구되는 투여량보다 3배 더 높은 30 mg/kg 투여량에서만 이루어졌다.

표 30

칼루-6 폐암 모델에서의 래트 438-mIgG1 및 A2의 효능

	0 일차	6 일차	9 일차	13 일차	16 일차	19 일차
항-E.테넬라 (10 mg/kg)	258±17	491±34	740±64	1156±140	1260±171	1613±222
438 (3 mg/kg)	250±29	362±58	465±88	742±127	888±171	1279±219
438 (10 mg/kg)	263±26	383±40	448±51	566±68	667±87	904±129
438 (30 mg/kg)	242±27	343±58	445±82	566±106	601±120	720±152
A2 (3 mg/kg)	238±29	349±42	450±58	603±74	664±91	851±113
A2 (10 mg/kg)	250±34	297±35	348±47	444±64	480±70	603±101
A2 (30 mg/kg)	241±26	376±52	486±68	598±115	622±121	779±168

[0372]

[0373] 노치1 신호전달의 억제가 단독으로 체중에 영향을 주는지를 확인하기 위하여, 생체내 효능 연구 동안 마우스를

칭량하였다. 하기 표 31은 연구 과정 동안의 래트 438-mIgG1 및 A2, 그리고 대조 항-E.테넬라 처리 군의 평균 마우스 체중 (빼기 종양 중량)이 유의성 있게 다르지 않았음을 나타낸다.

표 31

칼루-6 모델에서의 래트 438-mIgG1 및 A2, 그리고 대조 항-E.테넬라 처리의 평균 마우스 체중 (빼기 종양 중량) (n = 10-11).

	6 일차	9 일차	13 일차	16 일차	19 일차
E.테넬라 (10 mg/kg)	24.6±1.56	25.2±1.42	24.3±1.64	24.7±1.74	24.0±1.77
래트 438-mIgG1 (3 mg/kg)	24.5±2.18	25.8±1.74	25.8±1.67	26.4±1.60	25.7±1.66
래트 438-mIgG1 (10 mg/kg)	25.1±2.06	25.1±2.21	24.6±1.88	25.1±1.71	24.5±1.54
래트 438-mIgG1 (30 mg/kg)	24.7±2.21	25.7±2.10	25.2±2.48	25.8±2.18	25.3±2.23
A2 (3 mg/kg)	24.7±2.39	26.1±2.06	26.1±2.05	27.1±1.99	26.4±1.82
A2 (10 mg/kg)	24.5±1.63	25.2±1.74	25.1±1.86	25.3±1.79	24.7±1.69
A2 (30 mg/kg)	25.8±1.61	26.4±1.54	26.2±1.73	26.8±1.99	26.0±2.07

[0374]

[0375] E. 유방암 이종이식편에 대한 생체내 성장 억제 연구

[0376] 삼중 음성 유방암 이종이식편 모델인 Sum149 및 MDA-MB-231에서 생체내 성장에 대한 인간화 438 VH1.1/VL1.8의 효과를 조사하였다. 찰스 리버 래보라토리즈(Charles River Laboratories)로부터 무흉선(athymic) 암컷 마우스 (Nu/Nu, 6-8주)를 입수하여, 국제 실험 동물 관리 승인 및 인가 협회(Association for the Assessment and Accreditation for Laboratory Animal Care, International)의 지침에 따라 특별한 무-병원체 조건에 수용하였다. 동물에는 멸균된 설치류용 식사 및 물을 임의로 제공하였다.

[0377] 무흉선 마우스에의 이식을 위한 세포를 수거하고, 450×g에서의 5-10분 동안의 원심분리에 의해 펠렛화하였다. 세포 펠렛을 1회 세척한 후, 멸균 무-혈청 배지에 재현탁하였다. 종양 흡수 및 선택된 종양 세포의 이종이식편으로서의 성장을 촉진하기 위하여 종양 세포에 50% 매트릭셀 (BD 바이오사이언시즈 사)을 보충하였다. 마우스의 후방 옆구리 영역에 세포 (100 μL 중 2-3 × 10⁶)를 피하로 이식하고, 설계된 크기로 성장시킨 후, 각 실험을 위한 화합물을 투여하였다.

[0378] 항-종양 효능용으로, 크기 150-300 mm³의 종양을 보유하는 동물을 대조 항체 (26H6) 또는 인간화 438 VH1.1/VL1.8 중 어느 하나를 투여받는 군으로 무작위 분할하고, 매주 s.c. 주사에 의해 투여하였다. 매주 i.p. 주사에 의해 도세탁셀을 투여하였다. 2-3일마다 종양 측정치를 수집하였다. 베르니어(Vernier) 캘리퍼스를 사용하여 종양 부피 (mm³)를 측정하고, 하기 수확식을 사용하여 계산한 후, 하기 표 32 및 33에 나타내었다: 길이 (mm) × 너비 (mm) × 너비 (mm) × 0.52.

표 32

삼중 음성 유방암 이종이식편 모델 SUM149에서의 인간화 438 VH1.1/VL1.8의 효능

평균 종양 부피 (mm ³)				
이식 다음날	비히클 + 26H6	도세탁셀, 6 mgk I.P 매주	인간화 438 VH1.1/VL1.8, 5 mgk SC 매주	인간화 438 VH1.1/VL1.8 + 도세탁셀
36	220	225	214	223
41	266	239	166	181
46	408	282	153	149
49	543	486	150	125
53	529	458	135	104
56	711	587	177	144
60	796	638	179	129
63	937	769	239	187
67	1271	962	244	185
SE				
이식 다음날	비히클 + 26H6	도세탁셀, 6 mgk I.P 매주	인간화 438 VH1.1/VL1.8, 5 mgk SC 매주	인간화 438 VH1.1/VL1.8 + 도세탁셀
36	8	6	8	6
41	12	7	6	9
46	21	18	16	12
49	34	45	18	9
53	38	39	17	10
56	45	41	19	14
60	68	44	18	12
63	100	53	23	24
67	125	62	22	26

[0379]

표 33

삼중 음성 유방암 이종이식편 모델 MDA-MB-231에서의 인간화 438 VH1.1/VL1.8의 효능

평균 종양 부피 (mm ³)				
이식 다음날	비히클 + 26H6	도세탁셀, 10 mgk I.P 매주	인간화 438 VH1.1/VL1.8, 5 mgk SC 매주	인간화 438 VH1.1/VL1.8 + 도세탁셀
50	413	431	409	428
52	462	478	510	441
57	697	535	451	339
62	1204	717	466	354
65	1716	1326	694	506
69	2291	1396	768	486
SE				
이식 다음날	비히클 + 26H6	도세탁셀, 10 mgk I.P 매주	인간화 438 VH1.1/VL1.8, 5 mgk SC 매주	인간화 438 VH1.1/VL1.8 + 도세탁셀
50	33	25	21	21
52	38	30	22	26
57	45	33	25	17
62	62	41	27	30
65	145	109	69	56
69	216	128	73	34

[0380]

[0381] 연구 최종일에, 약물-처리된 것에 대하여 비히클-처리 마우스에 비교한 백분율 (%) 억제 값을 측정하였는데, $100 - \{1 - [(처리_{최종일} - 처리_{1일차}) / (대조_{최종일} - 대조_{1일차})]\}$ 로 계산하였다. 모든 종양 성장 억제 실험에 있어서, 투여 군 당 8 내지 10 마리의 마우스를 사용하였다. 스튜던트 *t* 검정을 사용하여 *P* 값을 측정하였다. 하기 표 34는 삼중 음성 유방암 이종이식편 모델에서의 인간화 438 VH1.1/VL1.8의 효능을 나타낸다.

표 34

삼중 음성 유방암 이종이식편 모델에서의 인간화 438 VH1.1/VL1.8의 효능

종양 모델	작용제	%TGI
Sum 149	비히클 +26H6	0
	도세탁셀, 6 mpk	30
	인간화 438 VH1.1/VL1.8, 5 mgk	97
	인간화 438 VH1.1/VL1.8 + 도세탁셀	104
MDA-MB-231	비히클 +26H6	0
	도세탁셀, 10 mpk	49
	인간화 438 VH1.1/VL1.8, 5 mgk	81
	인간화 438 VH1.1/VL1.8 + 도세탁셀	97

[0382]

[0383] 실시예 10

[0384] 장 세포의 분화 및 증식에 대한 항-노치1 억제 항체의 효과

[0385] 노치 신호전달의 약리학적 및 유전적 억제제는 장 읍 내 증식성 기원 세포(progenitor cell)를 분비성 술잔 세포(goblet cell)로 전환시킨다 (문헌 [van Es et al., Nature 435:959-963, 2005]). 실시예 9의 칼루-6 및 87393A1 NSCLC PDX 효능 연구에서 수집된 조직상에서, 마우스 장에서의 세포의 증식 및 분화에 대한 항-노치1 억제 항체의 효과를 조사하였다. 장 샘플에서, 점액소(mucin) (분비성 술잔 세포)에 대한 알시안 블루 염색을 사용한 면역조직화학 및 증식에 대한 항-Ki67을 수행하였다.

[0386] 칼루-6 및 87393A1 NSCLC PDX 효능 연구로부터 마우스 소장을 수거하고, 세로로 손질한 후, 포르말린 고정하고, 70% ETOH 중에서 유지하였다. 다음에, 조직을 파라핀 중에 매립하였다. 제조자의 지침에 따라, 점액물질에 대하여 알시안 블루 염색을 수행하였다. 제조자의 지침에 따라 다크(Dako) 자동 염색장치 (다코 사, 캘리포니아 카핀테리아 소재)에서 항-Ki67 항체 (SP6, 아브캄(Abcam) 사, 매사추세츠 캄브리지 소재)를 사용한 면역조직화학을 수행함으로써 세포 증식을 확인하였다.

[0387] 1. 이미지 포착

[0388] 염색된 조직 절편을 나노줌머 슬라이드 스캐너(Nanozoomer Slide Scanner) (하마마츠(Hamamatsu) 사, 뉴저지 브릿지워터 소재)에서 20×obj 설정을 사용하여 스캐닝하였다. 이미지를 스캐닝한 후, ndp 파일 포맷으로 저장하였다. 실제 이미지는 아페리오 이미지 스코프(Aperio Image Scope) 소프트웨어 (아페리오 테크놀로지스(Aperio Technologies) 사, 캘리포니아 비스타 소재)에서 열었다. 장 내강의 반대 측으로부터의 2개 이미지를 10 × 실제 크기로 포착하고, Tiff 이미지로 저장하였다.

[0389] 도 27은 10 mg/kg의 래트 438-mIgG1, A2 또는 대조 항-E.테넬라 항체 중 어느 하나로 처리된 칼루-6 효능 연구로부터의 마우스 장 회장 절편에서의 알시안 블루 염색을 사용한 분비성 술잔 세포의 조직화학적 확인을 보여준다. 장 읍모 및 읍의 대표적인 이미지를 나타내었다. 술잔 세포는 화살표로 구분하였으며, 단순성을 위하여, 예로서 각 이미지 당 1개의 세포만을 강조하였다. 항-노치1 항체가 연구 동안 체중 손실을 야기하지는 않았지만, 래트 438-mIgG1 또는 A2 중 어느 하나를 사용한 처리는 읍모는 물론 읍에서의 증가된 알시안 블루 염색에 의해 입증되는 바와 같이 분비성 술잔 세포의 분화를 유도하였다. 따라서, 노치1 신호전달의 억제는 단독으로 술잔 세포 분화를 증가시켰으나, 체중에 상당한 영향을 주는 수준까지는 아니었다.

[0390] 2. 이미지 분석

[0391] 이미지 프로-플러스(Image Pro-Plus) 소프트웨어 (미디어 사이버네틱스(Media Cybernetics) 사, 매릴랜드 베테스다 소재)에서 실제 이미지를 열었다. 장 조직 (읍 및 읍모)은 포함하나 평활근, 인공물, 주름 및 잔재는 배제한 수동 윤곽 관심 영역 (AOI)을 생성시켰다. 알시안 블루 염색 영역과 조직 영역을 식별하는 역치를 생성시켰다. AOI에 역치를 적용하고, 범위 통계자료를 엑셀 스프레드시트로 익스포트하였다. 엑셀에서, 2개의 수집된 염색 비율로부터 각 동물에 대하여 평균 알시안 블루 염색 비율을 계산하여, 동물 당 단일 계산 알시안 블루 염색 비율을 제공하였다. 각 군에 대하여 평균 알시안 블루 염색 비율 및 표준 편차를 생성시켰다. JMP 통계 소프트웨어 (JMC 사, 노스캐롤라이나 캐리 소재)를 사용하여 통계학을 수행하였다.

[0392] 표 35는 칼루-6 효능 연구에서의 래트 438-mIgG1 및 A2, 그리고 대조 항-E.테넬라 항체 처리된 마우스 장의 알시안 블루 염색 비율의 이미지 정량을 보여준다. 10 mg/kg에서의 항-E.테넬라 대조와 비교할 때, 10 mg/kg 및

30 mg/kg으로 투여된 래트 438-mIgG1에서 알시안 블루 염색 비율의 상당한 증가가 있었다. 알시안 블루 염색의 정량 이미지 분석은 도 27에 나타난 영역과 비교해 볼 때 회장의 더 큰 영역에 걸친 증가된 술잔 세포의 분화를 확인해준다.

표 35

칼루-6 효능 연구에서의 래트 438-mIgG1 및 A2, 그리고 대조 항-E.테넬라 항체 처리된 마우스 장의 알시안 블루 염색 비율의 이미지 정량을 나타냄.

처리 군	알시안 블루 염색 비율	S.E.M.
항-E.테넬라, 10mg/kg	2.71	0.23
438, 3mg/kg	3.97	0.59
438, 10mg/kg	7.64	0.79
438, 30mg/kg	8.24	0.63
A2, 3mg/kg	7.38	1.44
A2, 10mg/kg	14.13	2.32
A2, 30mg/kg	11.63	1.07

[0393]

[0394]

각 처리 군으로부터의 평균 또는 중간 알시안 블루 염색 비율들 사이의 쌍형식(pairwise) 비교의 통계 분석을 하기 표 36에 나타내었다. 각 쌍에 있어서의 비율은 스튜던트 t 검정을 사용하여 측정하였다. 양의 값은 상당히 상이한 평균의 쌍을 나타낸다. A2와 달리, 3 mg/kg으로 투여된 래트 438-mIgG1은 대조 항-E.테넬라 항체에 비해 알시안 블루 염색 비율에 있어서의 상당한 증가를 유도하지 않았다. 또한, 10 mg/kg으로 투여된 A2가 10 mg/kg으로 투여된 래트 438-mIgG1에 비해 알시안 블루 염색 비율에 있어서 상당한 증가를 유도함으로써, 래트 438-mIgG1이 A2에 비해 장 세포에서 세포 분화를 덜 야기한다는 것을 암시하였다.

표 36

알시안 블루 염색 평균 비교의 통계적 분석

t	알파						
2.03452	0.05						
Abs(Dif)-LSD	A2 10mpk	A2 30mpk	래트 438-mIgG1 30mpk	래트 438-mIgG1 10mpk	A2 3mpk	래트 438-mIgG1 3mpk	항 E.테넬라 10mpk
A2 10mpk	-3.48282	-0.9733	2.409854	2.84528	3.268058	6.512037	7.942685
A2 30mpk	-0.9733	-3.48282	-0.09967	0.335759	0.758538	4.002516	5.433165
래트 438-mIgG1 30mpk	2.409854	-0.09967	-3.48282	-3.0474	-2.62462	0.619362	2.05001
래트 438-mIgG1 10mpk	2.84528	0.335759	-3.0474	-3.81524	-3.40003	-0.14848	1.2746
A2 3mpk	3.268058	0.758538	-2.62462	-3.40003	-3.48282	-0.23884	1.191806
래트 438-mIgG1 3mpk	6.512037	4.002516	0.619362	-0.14848	-0.23884	-3.81524	-2.39216
항 E.테넬라 10mpk	7.942685	5.433165	2.05001	1.2746	1.191806	-2.39216	-3.48282

[0395]

[0396]

도 28은 10 mg/kg의 래트 438-mIgG1, A2 또는 대조 항-E.테넬라 항체 중 어느 하나로 처리된 칼루-6 효능 연구로부터의 마우스 장 육에서의 항-Ki67 면역조직화학을 보여준다. Ki67-염색된 장 육의 대표적인 이미지를 나타내었다. Ki67-염색은 래트 438-mIgG1 처리된 동물에서는 육의 기저에서 감소되었으나, 대조 항-E.테넬라 처리된 동물에서는 그렇지 않았다. Ki67-염색된 증식성 육 세포의 손실은 알시안 블루 염색에 의해 관찰되었던 감수분열후(post-mitotic) 술잔 세포로의 전환과 일치하였다.

[0397]

표 37은 87393A1 NSCLC PDX 효능 연구에서의 래트 351-mIgG1 및 대조 항-E.테넬라 항체 처리된 마우스 장의 알시안 블루 염색 비율의 이미지 정량을 보여준다. 항-E.테넬라 대조와 비교하였을 때, 래트 351-mIgG1 처리된 마우스에서 알시안 블루 염색 비율에 있어서 유의성 있는 차이는 없었다 ($p = 0.22$). 알시안 블루 염색의 정량 이미지 분석은 래트 351-mIgG1이 다른 노치 경로 억제제들과 같이 술잔 세포 과다형성을 유도하지 않았음을 나타내었다. 따라서, 래트 351-mIgG1을 사용한 노치1 신호전달의 억제는 술잔 세포 분화를 증가시키지 않았다.

표 37

87393A1 NSCLC PDX 효능 연구에서의 래트 351-mIgG1 및 항-E.테넬라 처리된 마우스 장의 알시안 블루 염색 비율의 정량

	래트 351-mIgG1	항 E.테넬라
알시안 블루 염색 비율	3.06	2.53
표준 편차	0.61	0.81

[0398]

[0399]

도 29 및 표 38은 래트 351-mIgG1 또는 대조 항-E.테넬라 항체 중 어느 하나로 처리된 87393A1 NSCLC PDX 효능 연구로부터의 마우스 장 음에서의 항-Ki67 면역조직화학 및 Ki67 염색 비율의 정량을 보여준다. 도 29는 Ki67-염색이 래트 351-mIgG1 처리된 동물에서는 음의 기저에서 감소되었으나, 대조 항-E.테넬라 처리된 동물에서는 그렇지 않았음을 표시하는 Ki67-염색 장 음의 대표적인 이미지를 나타낸다.

[0400]

이와 같은 관찰에 부합하여, 하기 표 38은 래트 351-mIgG1 및 대조 항-E.테넬라 항체 처리된 마우스 장의 Ki67 염색 비율의 이미지 정량을 보여준다. 데이터는 대조 항-E.테넬라 항체 처리에 비해 래트 351-mIgG1에서 Ki67 염색 비율의 작지만 통계적으로 유의성 있는 ($p = 0.023$) 감소가 있음을 나타내었다. Ki67 염색 비율의 정량 분석은 도 29의 상부 패널에 나타난 영역과 비교할 때 회장의 더 큰 영역에 걸친 상대적인 Ki67 염색 수준의 감소로 나타나는 바와 같은 음 기저에서의 세포 증식의 감소를 나타내었다. 따라서, 래트 351-mIgG1을 사용한 노치1 신호전달의 억제제는 증식을 감소시켰다.

표 38

래트 351-mIgG1 및 대조 항-E.테넬라 항체를 사용하여 처리된 87393A1 NSCLC PDX로부터의 마우스 장 음에서의 Ki67 염색 비율의 정량.

	래트351-mIgG1	항-E.테넬라
Ki67 염색 비율	5.66	7.39
표준 편차	0.34	1.47

[0401]

[0402]

실시예 11

[0403]

항-노치1 억제 항체의 약동학 및 약력학

[0404]

1. 아이오딘화 절차

[0405]

아이오도-비드법(IODO-BEADS method)을 사용하여 제조자의 지침에 따라 (피어스(Pierce) 사, 일리노이 록포드 소재), 아이오딘화를 수행하였다. 간단하게 말하자면, 2 mCi의 125-아이오딘 (퍼킨-엘머(Perkin-Elmer) 사) 당 ~200 μ g의 시험 항목을 사용하여, 2개의 아이오도-비드 및 ~200 μ L의 PBS와 함께 주변 온도에서 15-25분 동안 인큐베이션하였다. 여과 (매사추세츠 빌레리카 소재 밀리포어(Millipore) 사의 쉐트리콘(Centricon)-10)에 의해 아이오도-비드로부터 반응 혼합물을 분리하였다.

[0406]

2. 투여 용액의 제조 및 특성화

[0407]

래트 438-mIgG1의 경우, 마우스에서 10 mL/kg 투여의 투여 부피를 가능케 하는 2 mg/mL의 최종 단백질 농도가 되도록 비표지 시험 항목 래트 438-mIgG1, 미량의 ¹²⁵I-표지된 시험 항목, 및 제제화 완충제 (PBS)를 혼합함으로써, 투여 용액을 제조하였다. 래트 351-mIgG1의 경우, 군 I (5 mg/kg i.v.), II (5 mg/kg i.p.) 및 III (30 mg/kg i.p.)에 대하여 각각 마우스에서 2.5, 10 및 12.5 mL/kg 투여의 투여 부피를 가능케 하는 2, 0.5 및 2.4 mg/mL의 최종 단백질 농도가 되도록 래트 351-mIgG1의 비표지 시험 항목, 미량의 ¹²⁵I-표지된 시험 항목, 및 제제화 완충제 (PBS)를 혼합함으로써, 3개의 투여 용액을 제조하였다.

[0408]

트리클로로아세트산 (TCA)-침전을 사용하여 유리 아이오딘이 차지하는 투여 용액 중 방사능의 분율 ("% 유리 아이오딘")을 측정하였다. 투여 용액 분취량 (5 μ L)을 마우스 혈청 (45 μ L)와 혼합하고, 총 방사능을 (3반복으로) 산출하였다 (매릴랜드 가이터스부르크 소재 왈락(Wallac Inc.) 사의 모델 1480 위자드(WIZARD)TM, 또는 매사추세츠 왈탐 소재 퍼킨 엘머 사의 모델 2470). TCA (50 μ L의 20% 모액)을 샘플에 첨가하였다. 샘플을 대략 3000g에서 10분 동안 원심분리하였다. 생성 상청액의 50 μ L 분취량에 대하여 가용성 분 당 카운트(counts per

minute) (cpm)을 산출하였다. 하기의 수학적식을 사용하여 투여 용액 중 유리 아이오딘의 분율을 계산하였다: [2 * 평균 가용성 용리 cpm / 평균 총 용리 cpm * 100%]. 하기 수학적식에 의해 투여 용액의 비활성 (μCi/mg)을 계산하였다: [평균 총 cpm - 2 * 평균 가용성 cpm] / [투여 용액 농도 (mg/mL) * 투여 용액 부피 (mL) * 2,200,000 cpm/μCi]. SDS-PAGE를 사용하여 투여 용액의 순도도 정량 분석한 바, 주로 비-환원성 조건하의 단일 밴드 및 환원성 조건하의 이중 밴드로 확인되었다.

[0409] 3. 혈청 및 조직에서의 방사능 당량 농도의 측정

[0410] 감마 카운팅(gamma counting)에 의해 혈청 샘플 (50 μL, 2반복) 중 총 방사능을 측정하였다. 20% TCA의 당량 부피를 각 혈청 분취량에 첨가하고, ~12000 rpm으로 10분 동안 샘플을 회전시켰다. 감마-카운팅에 의해 50 μL 상청액 분취량 중 TCA-가용성 방사능을 측정하였다. 주어진 샘플 중 TCA-침전성 방사능 (cpm) (총 cpm - 2 * TCA-가용성 cpm), 투여 용액의 비활성 (단백질 mg 당 TCA-침전성 cpm)은 물론, 샘플 (tS) 및 투여 용액 (tD) 측정치의 일수를 사용하여, 하기 수학적식으로 주어진 샘플의 시험 항목 농도를 계산하였다: [평균 TCA-침전성 cpm / EXP(-0.693/60.2*(tS-tD))] / [비활성 (cpm/mg) * 샘플 부피 (mL)].

[0411] ¹²⁵I-표지된 시험 항목의 방사능 당량 조직 농도 (μg당량/g)의 정량은 하기 수학적식을 사용하고, 조직 중 총 방사능, 및 ¹²⁵I 반감기 보정 후 투여 용액의 비활성을 기준으로 하였다: [샘플 cpm / EXP(-0.693/60.2*(tS-tD))] / [비활성 (cpm/mg) * 샘플 중량 (mg)]. 조직 샘플에 대한 TCA-침전은 수행하지 않았다. 조직에서의 방사능 당량 농도 (μg당량/g) 대 혈청에서의 그것 (μg당량/mL)의 비를 사용하여 주어진 시점의 조직 샘플에서의 조직 대 혈청 농도비 (T/S)를 계산하였다.

[0412] 4. 약동학 계산

[0413] 약동학 계산은 마우스에서의 평균 혈청 또는 조직 농도를 기준으로 하였다. 약동학 소프트웨어 패키지인 윈논린(WinNonlin) ver. 5.1 (파르사이트(Pharsight) 사)의 비-구획 분석 모듈 (IV 및 IP 투여 후 혈청 데이터 분석용으로 각각 모델 201 및 200)을 사용하였다. 선형 사다리꼴법을 사용하여 혈청 농도 대 시간 곡선 아래의 면적 (AUC)를 계산하였다. 3개 이상의 데이터 점을 사용한 log-선형 회귀에 의해 겉보기 종료 단계(apparent terminal phase)의 기울기를 추정하고, 기울기로부터 종료 속도 상수 (λ)를 유추하였다. AUC0-∞는 AUC0-t (여기서 t는 최종 측정가능 농도의 시간임)과 Ct/λ의 합계로서 추정하였다. 겉보기 종료 반감기 (t½)는 0.693/λ로 계산하였다.

[0414] 하기 표 39는 ¹²⁵아이오딘-표지된 래트 438-mIgG1 항체의 단일 5 mg/kg i.p. 주사 후 표시된 시점에 측정된 래트 438-mIgG1 항체에 대한 비-종양 보유 누드 마우스의 혈청 및 조직 노출을 보여준다. 최고의 방사능 당량 (RE) 농도 및 노출 (AUC0-INF)은 조사된 모든 시점에 혈청에서 발견되었으며, 이어서 간, 피부, 신장, 대장, 소장, 폐 및 안구가 뒤따랐다. 표 39에 나타낸 바와 같이, 조직의 방사능은 시간에 따라 감소하였다. 마우스 위장관 로에서의 노치1 신호전달의 공지의 발현 및 필수 역할에도 불구하고, 래트 438-mIgG1은 시험된 다른 조직에 비해 대장 또는 소장에 우선적으로 축적되지는 않았다.

표 39

누드 마우스에 대한 5 mg/kg의 단일 i.p. 주사 후 ¹²⁵아이오딘-표지된 래트 438-mIgG1 항체의 혈청 및 조직 농도.

	1시간	3시간	6시간	24시간	72시간	120시간	168시간	240시간	336시간
혈청	4855±5992	16439±9789	15834±1267	6640±539	2983±886	1618±332	1006±291	690±129	111±147
안구			832±141	302±22	155±41	142±36	46.0±40.6		
신장			2121±375	798±95	486±235	373±166	216±40		87.4±8.8
대장			2093±156	514±107	154±46	94.2±16.9	54.9±0.8		
간			7590±925	1677±225	704±501	541±158	322±59		97.9±61.1
폐			1047±633	227±111	253±149	178±46	124±100		25.3±14.8
피부			2688±429	1688±192	513±30	430±160	171±54		70.3±46.0
소장			1855±232	353±78	195±40	114±18	55.1±6.5		16.0±9.6

[0415]

[0416] 조직 대 혈청 농도의 비를 계산하고, 누드 마우스에 대한 래트 438-mIgG1의 단일 5 mg/kg i.p. 투여 후 평균 조직/혈청 농도 비를 하기 표 40에 나타내었다. 조직 대 혈청 농도 비는 조사된 시점 내내 비교적 일정하게 유지

됨으로써, 혈청과 조직 사이의 평형을 나타내었다. 래트 438-mIgG1의 혈청 농도는 조직 농도에 비해 더 높아서, T/S 비는 mIgG1에 대하여 관찰되는 통상적인 범위 이내의 낮은 (일반적으로 < 1) 것이었다.

표 40

누드 마우스에 대한 래트 438-mIgG1의 단일 5 mg/kg i.p. 투여 후 평균 조직/혈청 농도 비

	6 시간	24 시간	72 시간	120 시간	168 시간
눈	0.053±0.007	0.046±0.001	0.052±0.004	0.092±0.034	0.056±0.058
신장	0.133±0.016	0.121±0.022	0.158±0.035	0.224±0.053	0.220±0.028
대장	0.133±0.012	0.077±0.010	0.052±0.003	0.059±0.006	0.058±0.020
간	0.478±0.023	0.255±0.053	0.212±0.127	0.331±0.040	0.332±0.064
폐	0.065±0.036	0.034±0.016	0.086±0.044	0.117±0.051	0.123±0.079
피부	0.172±0.040	0.256±0.045	0.185±0.067	0.269±0.103	0.173±0.033
소장	0.117±0.008	0.053±0.007	0.067±0.007	0.071±0.008	0.057±0.014

[0417]

[0418] ¹²⁵I-표지된 래트 438-mIgG1의 투여 후, Cmax는 16.4 µg당량/mL인 것으로 계산되었으며, Tmax는 3시간에 달성되었다. 하기 표 41에 나타난 바와 같이, 제거 t1/2은 58시간이었으며, 노출 (AUC0-∞)는 788 µg당량*시간/mL이었다. 단일 5 mg/kg i.p. 투여 후 래트 438-mIgG1의 반감기는 비교적 짧았다 (~2.4일).

표 41

5 mg/kg의 단일 i.p. 투여 후 암컷 누드 마우스에서의 항-노치1 억제 항체 래트 438-mIgG1의 약동학 파라미터.

Cmax (ug/mL)	Tmax (시간)	t1/2 (시간)	AUClast (시간*ug/mL)	AUC0-inf (시간*ug/mL)	AUC0-inf/투여량 (시간*kg*ug/mL/mg)	AUC Extrapolation (%)	MRT (시간)
16.4	3	58	779	788	158	1.2	67

주의: PK 파라미터는 평균 혈장 농도로부터 생성되었음 (시점 당 n=3)

[0419]

[0420] ¹²⁵I-표지된 래트 351-mIgG1 항체의 단일 5 mg/kg i.v., 5 mg/kg i.p. 또는 30 mg/kg i.p. 주사 후, 비-종양 보유 누드 마우스에서 래트 351-mIgG1의 혈청 노출을 측정하였다. 관찰된 혈청 농도 값을 사용하여 표 42 및 표 43에 나타난 바와 같은 다수의 약동학 파라미터들을 계산하였다.

[0421] 하기 표 42는 암컷 누드 마우스에 대한 ¹²⁵I-표지된 래트 351-mIgG1의 5 mg/kg i.p. 투여 후의 약동학 파라미터들을 나타낸다. 제거 t1/2 및 래트 351-mIgG1의 전신성 청소는 각각 ~3일 (70.2시간) 및 1.74 mL/시간/kg이었다. 정상 상태에서의 분포 부피 (Vdss)는 177 mL/kg이었다. 노출 (AUC0-INF)은 2871 µg당량.시간/mL이었다.

표 42

단일 5 mg/kg 투여량의 i.v. 투여 후 암컷 누드 마우스에서의 ¹²⁵I-표지된 래트 351-mIgG1의 약동학 파라미터.

투여량 mg/kg	C0 µg당량/mL	AUC0-last µg당량 시간/mL	AUC0-∞ µg당량 시간/mL	AUC0-∞/투여량 µg당량*시간/mL/mg/kg	AUC%Extrap %	t1/2 시간	CL mL/시간/kg	Vdss mL/kg
5	50.6	2766	2871	574	3.68	70.2	1.74	177

[0422]

[0423] 하기 표 43은 암컷 누드 마우스에 대한 ¹²⁵I-표지된 래트 351-mIgG1 5 및 30 mg/kg의 i.p. 투여 후의 약동학 파라미터들을 나타낸다. Cmax는 각각 30 및 151 µg당량/mL이었으며, Tmax는 양 투여 군에서 6시간에 달성되었다. 5 및 30 mg/kg 후 각각 제거 t1/2은 93 및 163시간 (~4-7일)이었으며, 노출 (AUC0-INF)은 2754 및 24080 µg당량*시간/mL이었다. i.p. 및 i.v. 투여 사이의 투여량 표준화 AUC 비 (F)는 ~1.4이어서, 마우스에서 30 mg/kg의 i.p. 투여 후 흡수가 완료되었음을 암시하였다.

표 43

5 mg/kg 및 30 mg/kg의 i.p. 투여 후 암컷 누드 마우스에서의 ¹²⁵I-표지된 래트 351-mIgG1 항체의 약동학 파라미터.

투여량 mg/kg	C _{max} µg 당량/mL	T _{max} 시간	T _{1/2} 시간	AUC _{0-last} µg 당량*시간/mL	AUC _{0-∞} µg 당량*시간/mL	AUC _{0-∞} /투여량 µg 당량*시간/mL/mg/kg	AUC % _{Extrap} %	MRT 시간	F %
5	29.7	6	93.2	2572	2754	551	6.64	117	95.9
30	151	6	163	18687	24080	803	22.4	221	완료

[0424]

[0425] ¹²⁵I-표지된 래트 351-mIgG1의 단일 5 및 30 mg/kg i.p. 주사 후, 래트 351-mIgG1에 대한 비-종양 보유 누드 마우스의 혈청 및 조직 노출을 측정하였다. 5 mg/kg i.p. 투여의 경우, 하기 표 44에 나타낸 바와 같이, 최고 방사능 당량 (RE) 농도 및 노출 (AUCO-INF)은 조사된 모든 시점에 혈청에서 발견되었으며, 이어서 간, 비장, 피부, 신장, 소장, 대장, 폐 및 안구가 뒤따랐다. 30 mg/kg i.p. 투여의 경우, 하기 표 45에 나타낸 바와 같이, 최고 방사능 당량 (RE) 농도 및 노출 (AUCO-INF)은 조사된 모든 시점에 혈청에서 발견되었으며, 이어서 간, 피부, 비장, 소장, 폐, 신장, 안구 및 대장이 뒤따랐다. 데이터는 래트 351-mIgG1이 5 mg/kg 및 30 mg/kg i.p. 투여 모두에서 시험된 다른 조직과 비교할 때 대장 또는 소장에 우선적으로 축적되지는 않았다는 것을 보여준다.

표 44

5 mg/kg의 단일 i.p. 투여 후 누드 마우스에서의 ¹²⁵I-표지된 래트 351-mIgG1의 평균 조직 및 혈청 농도 (µg당량/g조직) (시점 당 n=3).

시간, 시간	6	24	72	120	168	240	336
안구	920	631	510	439	235	162	75
신장	2052	1167	1128	1029	304	229	89
대장	1147	545	378	316	131	99	41
간	12228	3417	1223	1135	501	599	140
폐	990	1294	1264	726	183	464	193
피부	2761	3435	2023	1480	665	430	192
소장	1888	767	459	389	171	144	50
비장	2897	1411	1189	888	349	323	103
혈청	29664	16894	12303	9014	4724	2858	1359

[0426]

표 45

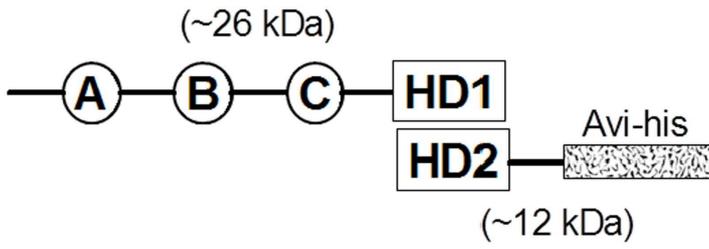
30 mg/kg의 i.p. 투여 후 누드 마우스에서의 ¹²⁵I-표지된 래트 351-mIgG1의 평균 조직 및 혈청 농도 (µg당량/g조직) (시점 당 n=3).

시간, 시간	6	24	72	120	168	240	336
안구	8451	9733	3733	2183	2534	1899	1223
신장	9423	6487	8693	2722	4870	4315	967
대장	5225	3175	2644	1448	1133	968	493
간	56856	20363	11979	5497	4843	3614	1456
폐	10237	7091	2496	1749	2902	3002	1925
피부	22323	17707	15125	8381	7287	4439	3011
소장	10496	4505	3523	1956	1956	1491	638
비장	14353	6805	7346	3314	3454	3135	1111
혈청	150928	101971	80782	53137	46925	35299	22982

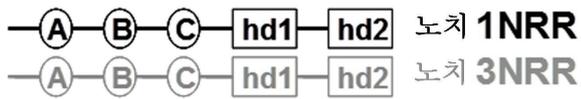
[0427]

도면

도면1

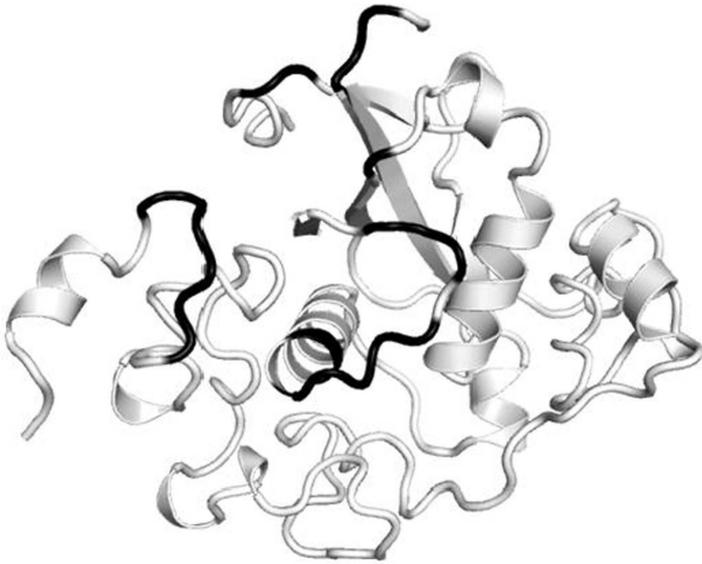


도면2



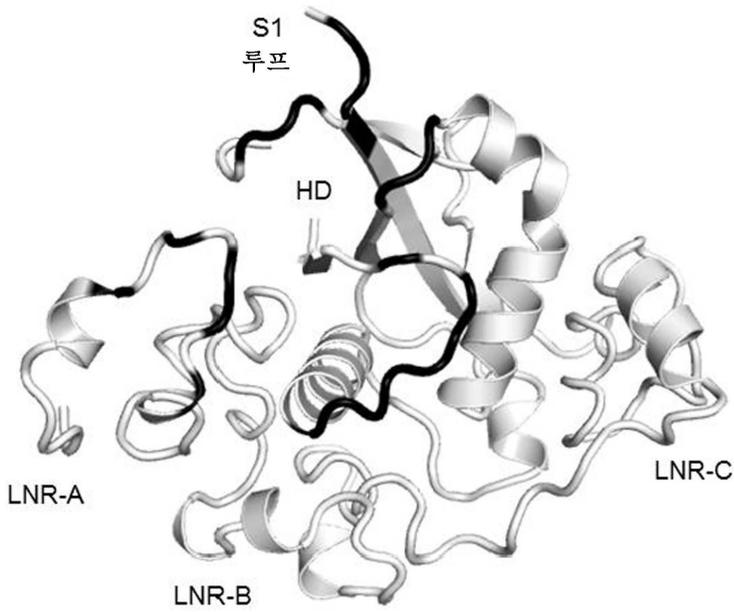
항 노치 1:	래트 351- mlgG1	래트 438- mlgG1	A2
—A—B—C—hd1—hd2	57	51	75
—A—B—C—hd1—hd2	40	1	1
—A—B—C—hd1—hd2	78	6	2
—A—B—C—hd1—hd2	56	2	6
—A—B—C—hd1—hd2	20	15	6
—A—B—C—hd1—hd2	55	47	70
—A—B—C—hd1—hd2	34	29	50
—A—B—C—hd1—hd2	0	0	0
—A—B—C—hd1—hd2	60	53	83

도면3



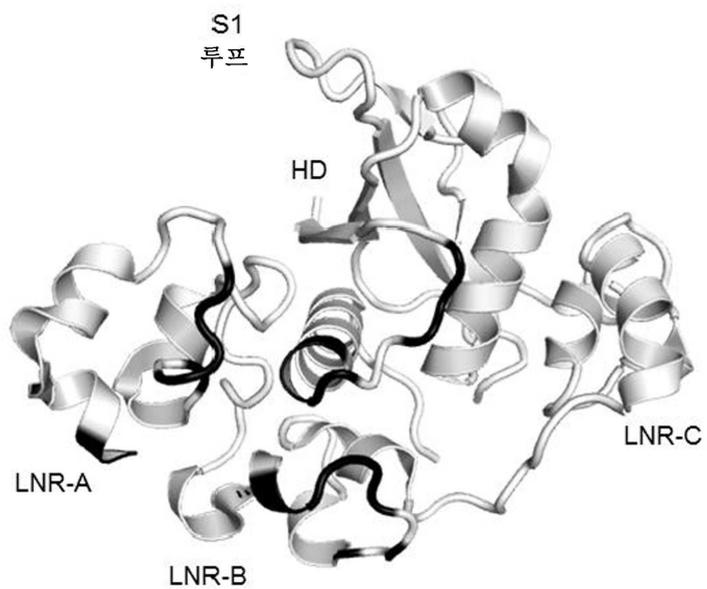
인간 노치1 NRR상 래트 438 에피토프

도면4



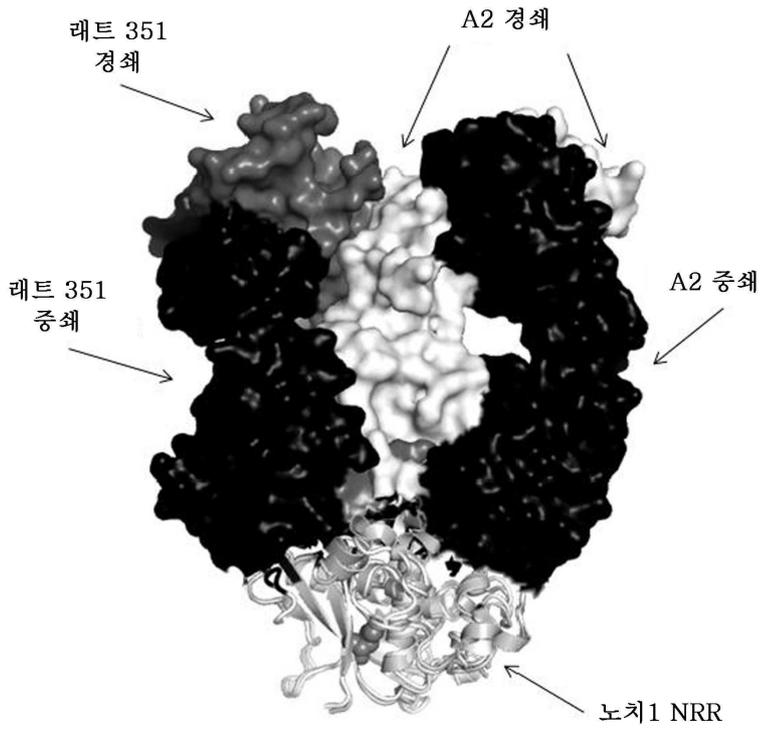
인간 노치1 NRR상 래트 351 에피토프

도면5



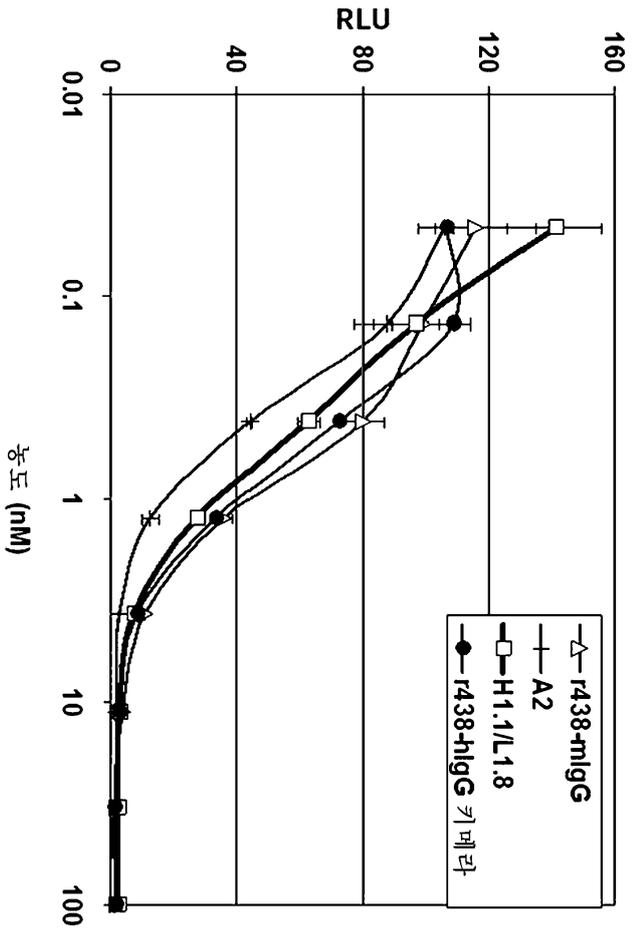
인간 노치1 NRR상 A2 에피토프

도면7

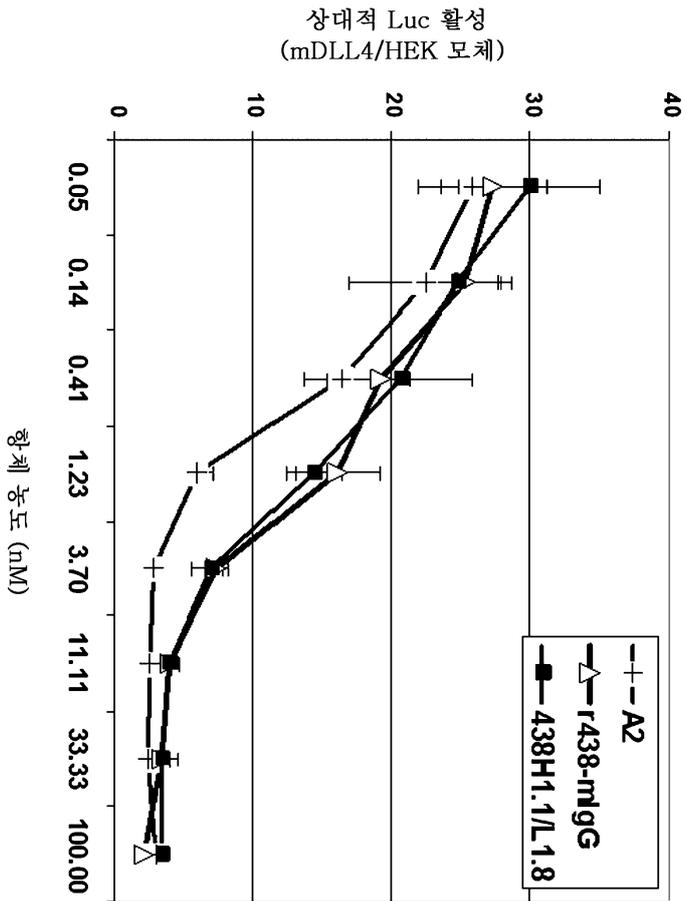


라트 351 및 A2에 결합된
인간 노치1 NRR 구조의 중첩상태

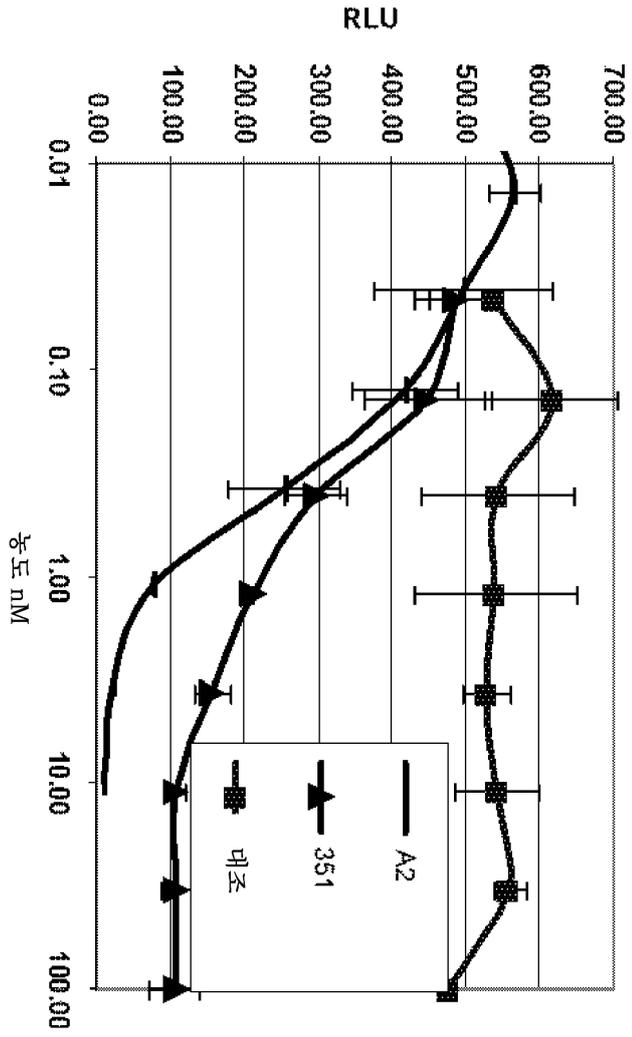
도면8



도면9



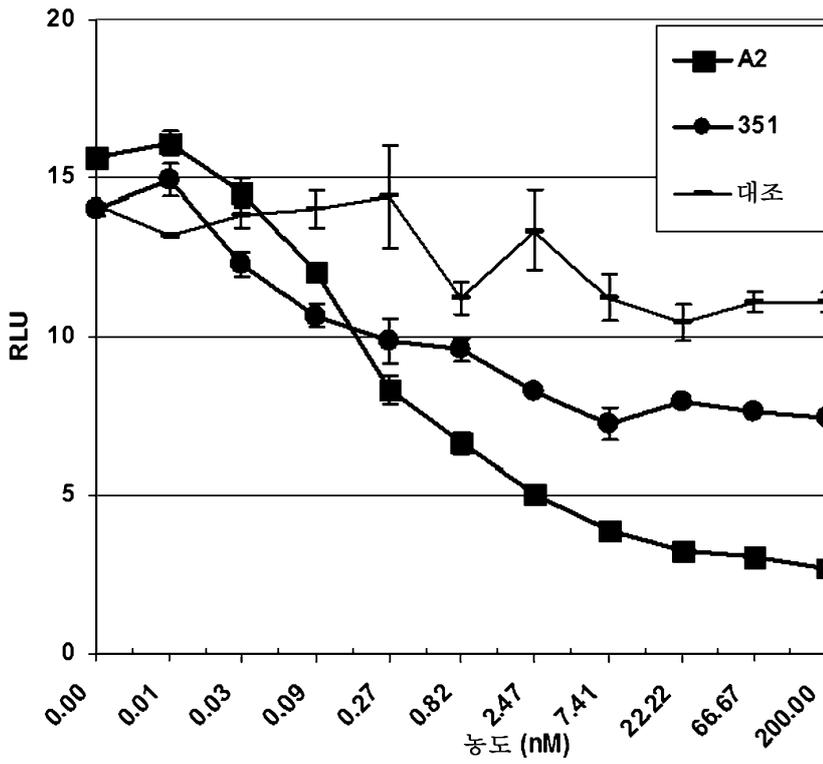
도면10



인간 노치1 신호전달에 대한 레트 351 및 A2 항체의 중화 활성

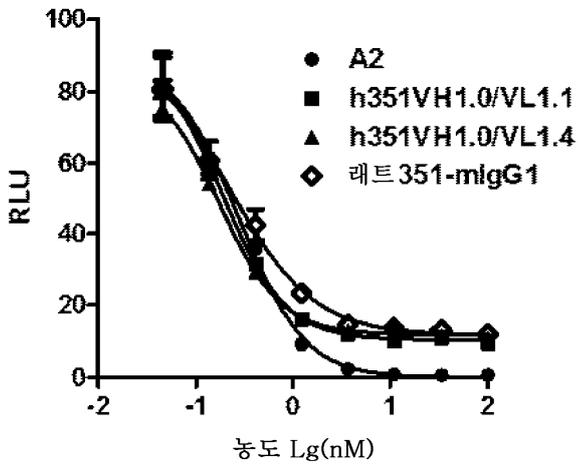
도면11

마우스 노치1 신호전달에 대한 래트 351 및 A2 항체의 증화 활성



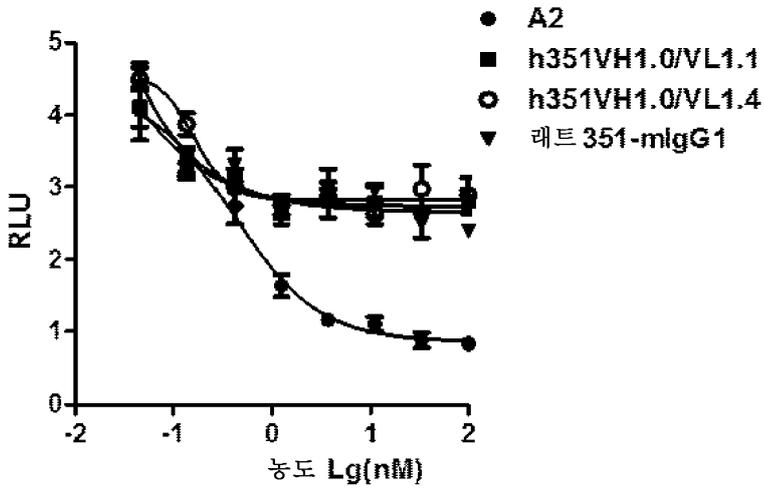
도면12

인간 노치1 신호전달에 대한 인간화 351 변이체, 래트 351-mIgG1 및 A2 항체의 증화 활성



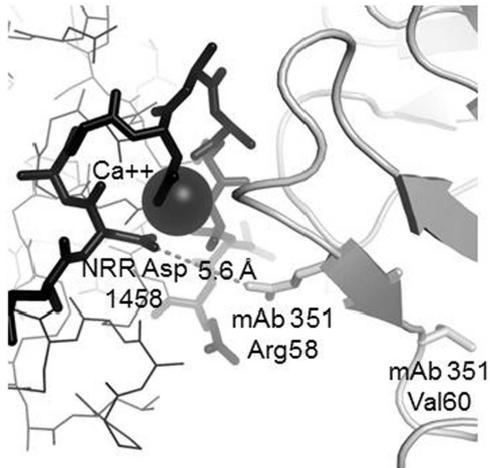
도면13

인간 노치1 신호전달에 대한 인간화 351 변이체,
 래트 351-mIgG1 및 A2 항체의 중화 활성



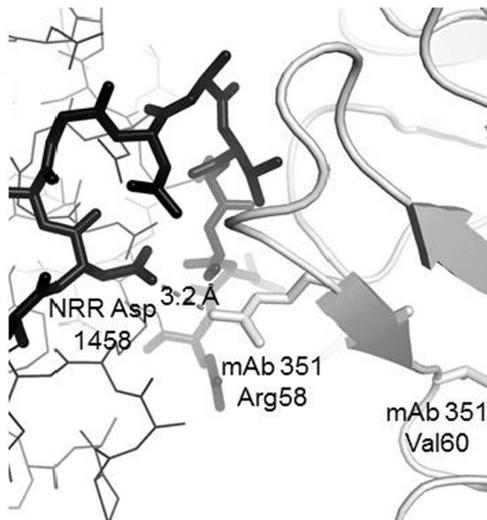
도면14a

복합체 1에서의 LNR-A/중쇄 상호작용



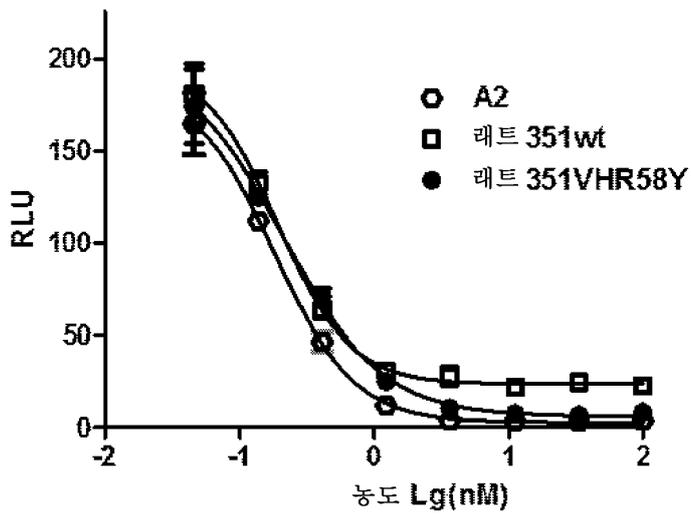
도면14b

복합체 2에서의 LNR-A/중쇄 상호작용

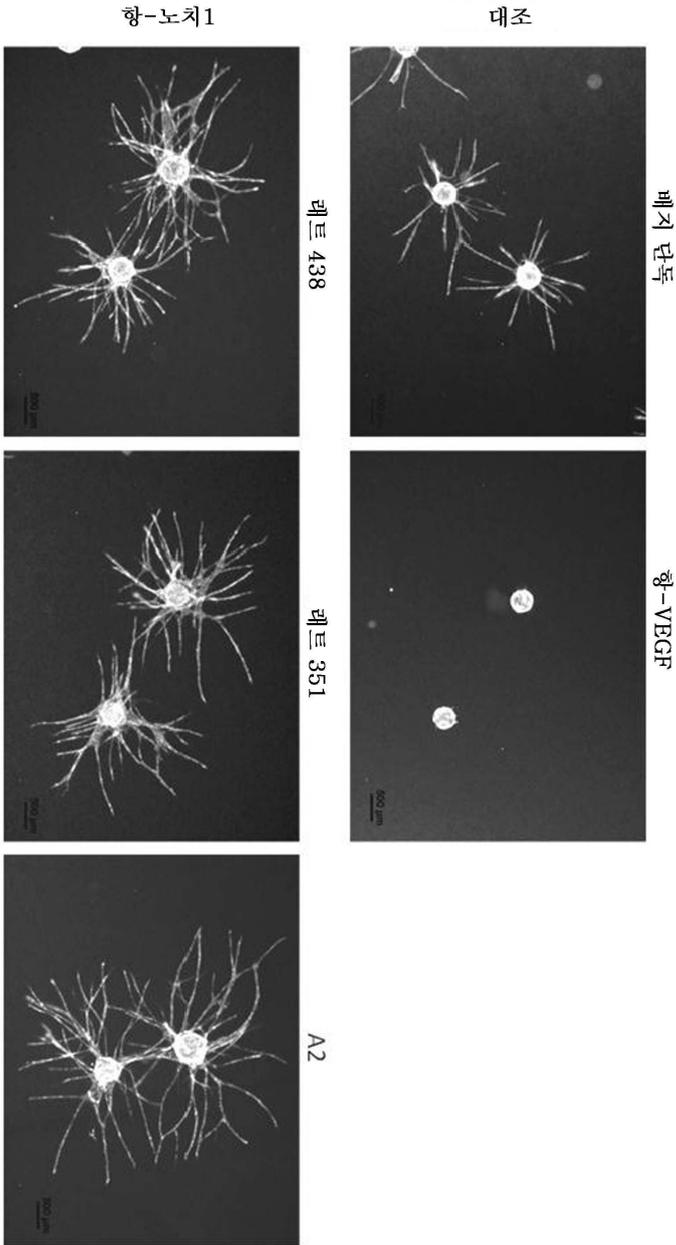


도면15

공동-배양 리포터 유전자 검정에서의 래트 351, 돌연변이 래트 351 및 A2의 중화 활성

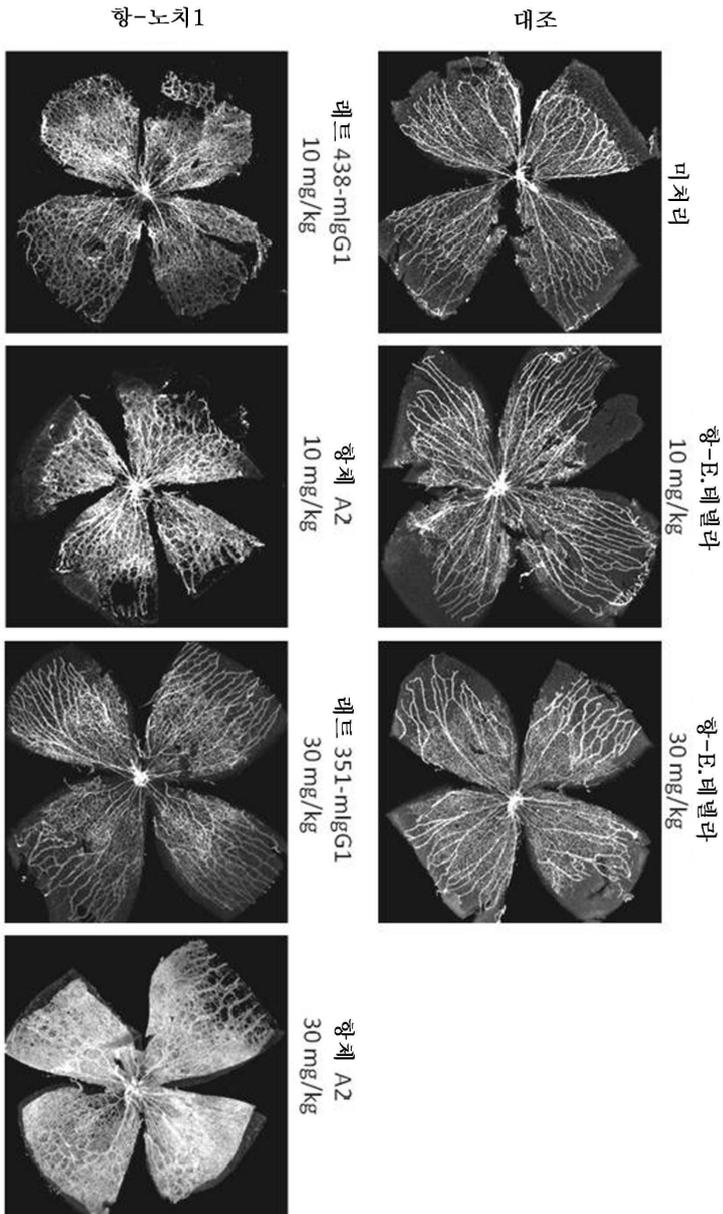


도면16



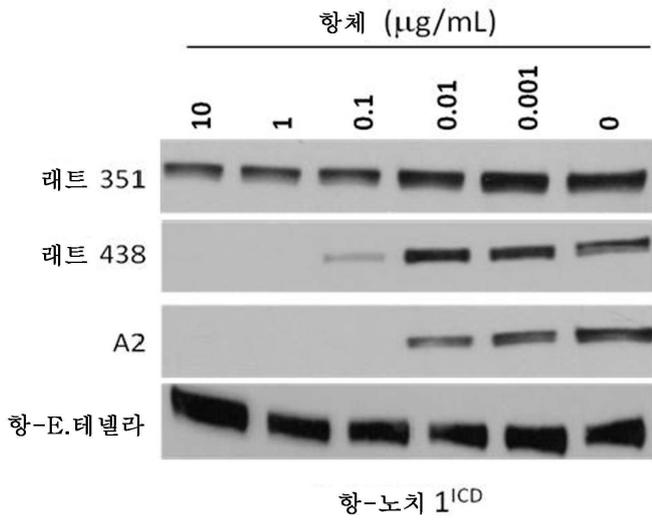
인간 폐 중앙-연관 섬유모세포를 사용한 HUVEC-FGBA의 CD31-Cy3 면역염색의 대표적인 외형 광 이미지

도면17



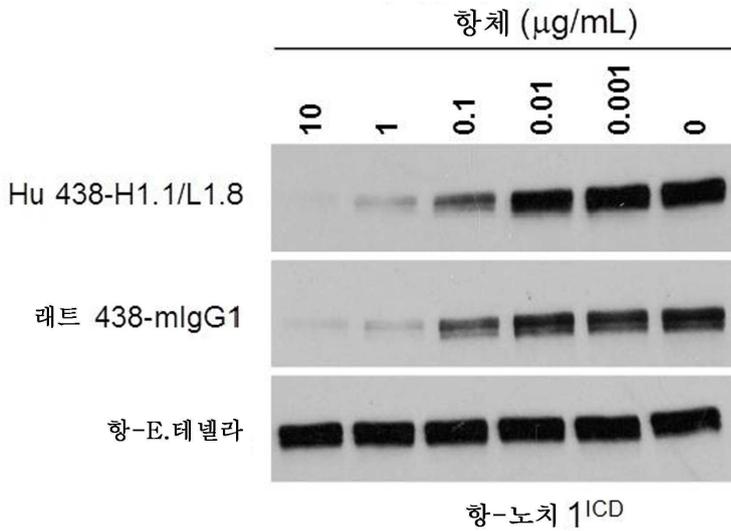
혈관생성의 마우스 망막 모델에서의 이소테틴 B4-알렉시488 염색의 대표적인 공초점 이미지

도면18



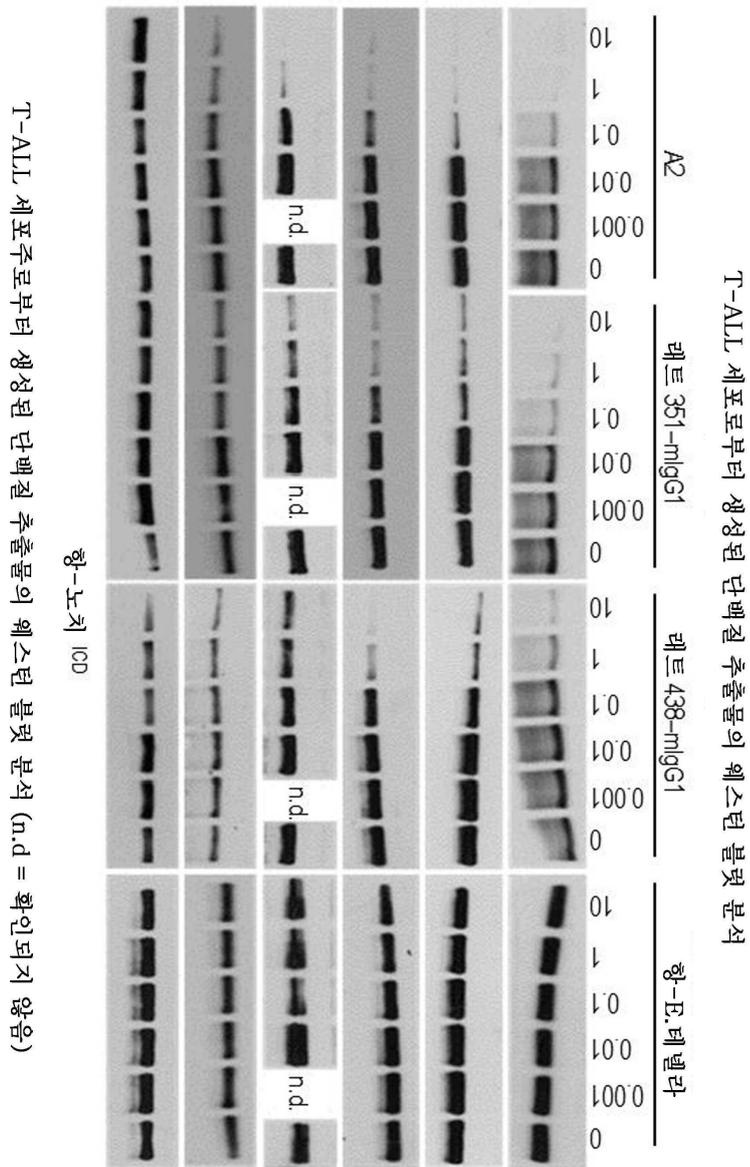
재조합 인간 DLL4 리간드상에 플레이팅된 CCD1076SK 인간 섬유모세포로부터 생성된 단백질 추출물의 웨스턴 블롯 분석

도면19

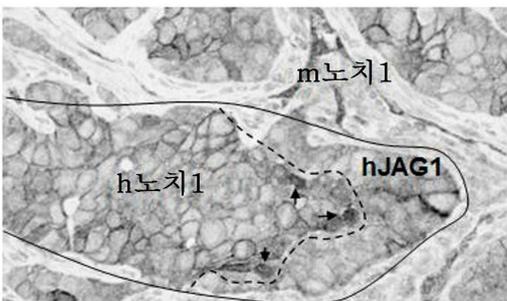


HPB-ALL 세포로부터 생성된 단백질 추출물의 웨스턴 블롯 분석

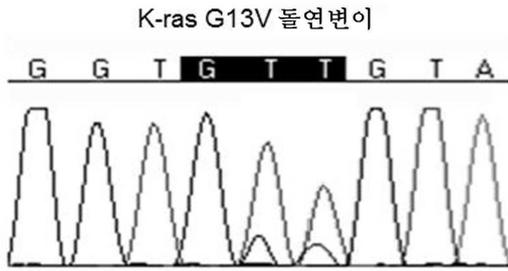
도면20



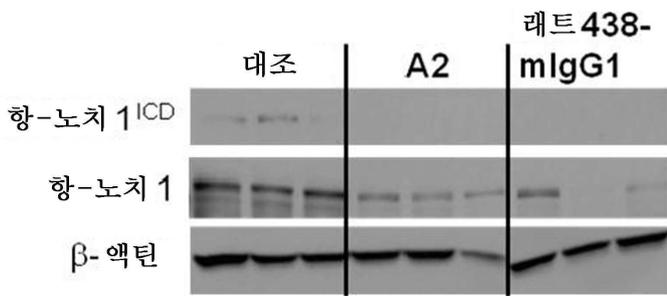
도면21



도면22

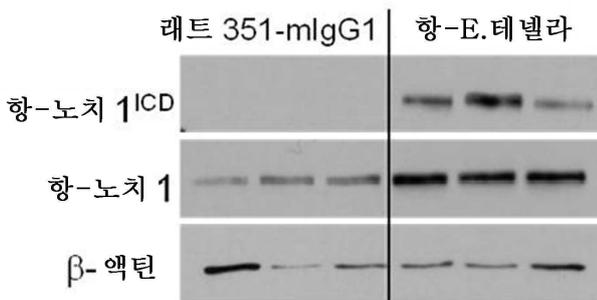


도면23



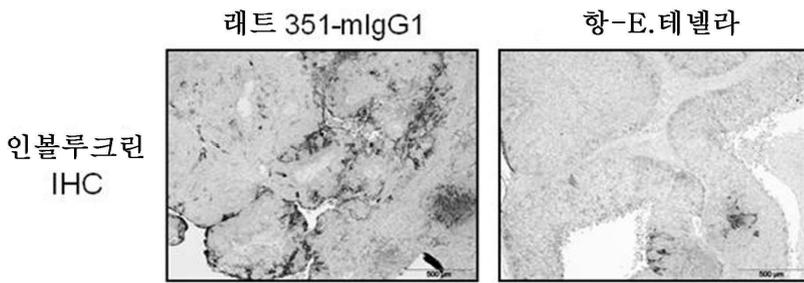
37622A1 NSCLC 환자 유래
이종이식편에서 생성된 단백질 추출물의
웨스턴 블롯 분석

도면24



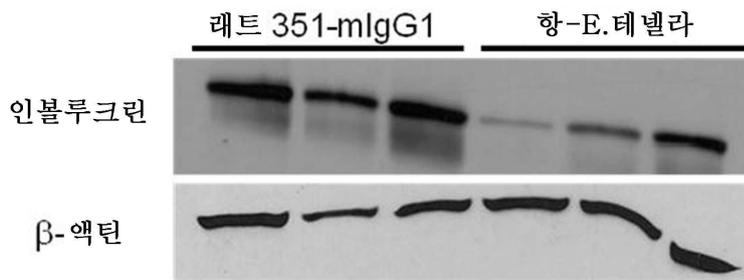
87393A1 NSCLC 환자 유래
이종이식편에서 생성된 단백질 추출물의
웨스턴 블롯 분석

도면25



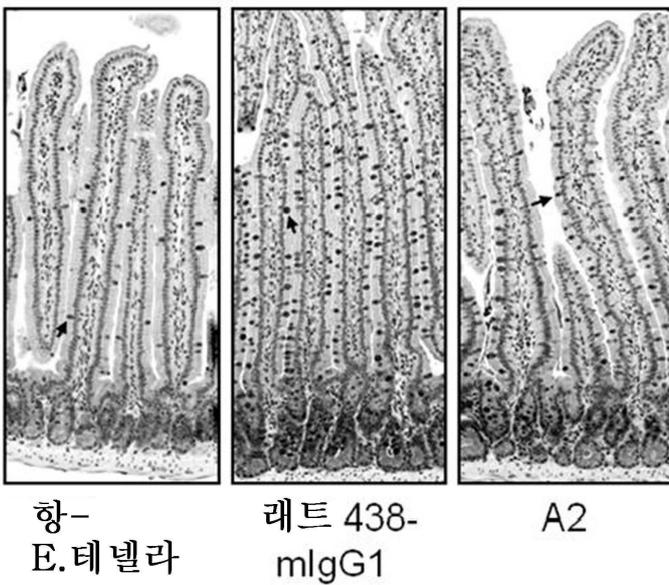
87393A1 NSCLC 환자 유래 이종이식편에서의 인플루크린 발현의 면역조직화학적 검출

도면26



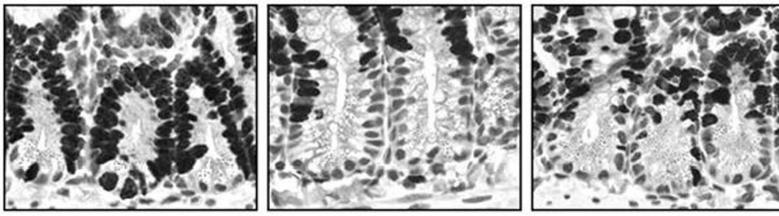
87393A1 NSCLC 환자 유래 이종이식편에서의 인플루크린 발현의 웨스턴 블롯 분석

도면27



칼루-6 효능 연구로부터의 마우스 장 회장 절편에서의 알시안 블루 염색을 사용한 분비성 술관 세포의 조직화학적 확인

도면28



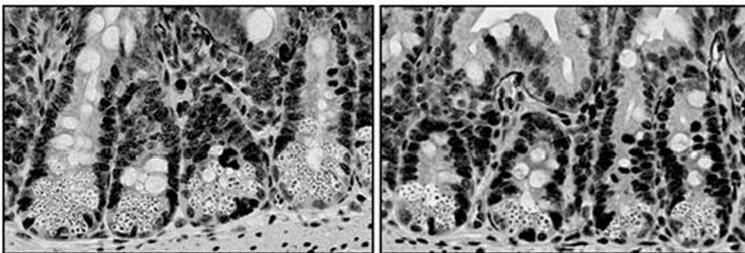
항-E.테벨라

래트 438-mIgG1

A2

칼루-6 효능 연구로부터의 마우스 장 움에서의 항-Ki67 면역조직화학

도면29



래트 351-mIgG1

항-E.테벨라

87393A1 NSCLC 환자 유래 이중이식편 효능 연구로부터의 마우스 장 움에서의 항-Ki67 면역조직화학

서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Wyeth LLC
- GELES, Kenneth G.
- ZHOU, Bin-Bing Stephen
- TCHISTIAKOVA, Lioudmila Gennadijevna
- GAO, Yijie
- BARD, Joel

- <120> ANTI-NOTCH1 ANTIBODIES
- <130> PC71751A
- <160> 152
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 351
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 1

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Ser Pro Leu His Pro
 1 5 10 15

Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro Pro Pro Leu Ile Glu Glu Ala Cys
 20 25 30

Glu Leu Pro Glu Cys Gln Glu Asp Ala Gly Asn Lys Val Cys Ser Leu
 35 40 45

Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu
 50 55 60

Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys Asn Cys Thr Gln Ser Leu Gln Cys Trp
 65 70 75 80

Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Ser Gln Cys Asn Ser Ala Gly
 85 90 95

Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Arg Ala Glu Gly Gln Cys Asn
 100 105 110

Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser Asp Gly His Cys
 115 120 125

Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp Gly Leu Asp Cys
 130 135 140

Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu Val Val Val
 145 150 155 160

Val Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Arg Asn Ser Ser Phe His Phe Leu
 165 170 175

Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu His Thr Asn Val Val Phe Lys Arg Asp
 180 185 190

Ala His Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly Arg Glu Glu Glu
 195 200 205

Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ala Ala Glu Gly Trp Ala Ala Pro
 210 215 220

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

 Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr Asp Val Ala Ala Phe Leu Gly Ala
 275 280 285
 Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala Val
 290 295 300
 Gln Ser Glu Thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ala Gln Leu His Phe Met
 305 310 315 320
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys
 325 330 335

 Ile Glu Trp His Glu Gly Gly Pro Pro His His His His His His
 340 345 350

 <210> 2
 <211> 304
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro Pro Pro Leu Ile Glu Glu Ala Cys
 1 5 10 15
 Glu Leu Pro Glu Cys Gln Glu Asp Ala Gly Asn Lys Val Cys Ser Leu
 20 25 30
 Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu
 35 40 45
 Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys Asn Cys Thr Gln Ser Leu Gln Cys Trp
 50 55 60
 Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Ser Gln Cys Asn Ser Ala Gly
 65 70 75 80
 Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Arg Ala Glu Gly Gln Cys Asn

85 90 95
 Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser Asp Gly His Cys

100 105 110
 Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp Gly Leu Asp Cys

115 120 125
 Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu Val Val Val

130 135 140
 Val Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Arg Asn Ser Ser Phe His Phe Leu

145 150 155 160
 Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu His Thr Asn Val Val Phe Lys Arg Asp

165 170 175
 Ala His Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly Arg Glu Glu Glu

180 185 190
 Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ala Ala Glu Gly Trp Ala Ala Pro

195 200 205
 Asp Ala Leu Leu Gly Gln Val Lys Ala Ser Leu Leu Pro Gly Gly Ser

210 215 220
 Glu Gly Gly Arg Arg Arg Arg Glu Leu Asp Pro Met Asp Val Arg Gly

225 230 235 240
 Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Ala Ser

245 250 255
 Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr Asp Val Ala Ala Phe Leu Gly Ala

260 265 270
 Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala Val

275 280 285
 Gln Ser Glu Thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ala Gln Leu His Phe Met

290 295 300

- <210> 3
- <211> 1053
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 3

```

atgcctctcc tcctcttget gctcctgctg ccaagcccct tacacgcggg tggggccggg      60
cgcgacatcc ccccgcgct gatcgaggag gcgtgcgagc tgcccagtg ccaggaggac      120
gcgggcaaca aggtctgcag cctgcagtgc aacaaccacg cgtgcggtg ggacggcggg      180
gactgctccc tcaacttcaa tgaccctgg aagaactgca cgcagtctct gcagtgtg      240
aagtacttca gtgacggcca ctgtgacagc cagtgcaact cagccggctg cctcttcgac      300

ggctttgact gccagcgtgc ggaaggccag tgcaaccccc tgtacgacca gtactgcaag      360
gaccatttca gcgacgggca ctgcgaccag ggctgcaaca gcgaggagtg cgagtgggac      420
gggctggact gtgcgagca tgtacccag aggctggcgg ccggcacgct ggtggtggtg      480
gtgctgatgc ccccggagca gctgcgcaac agctccttc acttcctgcg ggagctcagc      540
cgcgtgctgc acaccaact ggtcttcaag cgtgacgcac acggccagca gatgatcttc      600
ccctactacg gccgagagga ggagctgagc aagcacccca tcaagcgtgc cgccgagggc      660
tgggccgcac ctgacccct gctgggcccag gtgaaggcct cgtgctccc tgggtggcagc      720

gaggggtggc ggcggcggag ggagctggac cccatggacg tccgcgctc catcgtctac      780
ctggagattg acaaccggca gtgtgtgcag gcctcctcgc agtgcttcca gagtgccacc      840
gacgtggccg cattcctggg agcgtctgcc tcgctgggca gcctcaacat cccctacaag      900
atcgaggccg tgcagagtga gaccgtggag ccgccccgc cggcgcagct gcacttcatg      960
ggagggggaa gcggaggcgg actgaacgac atcttcgagg ctcaaaaat cgaatggcac      1020
gaaggtggcc caccacatca tcatcatcat cac                                  1053

```

<210> 4

<211> 912

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

ggtggggccg ggcgcgacat cccccgcg ctgatcgagg aggcgtgcga gctgcccag      60
tgccaggagg acgcgggcaa caaggtctgc agcctgcagt gcaacaacca cgcgtgcggc      120
tgggacggcg gtgactgctc cctcaacttc aatgaccct ggaagaactg cacgcagtct      180
ctgcagtgtt ggaagtactt cagtgcggc cactgtgaca gccagtgcaa ctgagccggc      240
tgcctcttcg acggctttga ctgcccagct gcggaaggcc agtgcaacc cctgtacgac      300
cagtactgca aggaccactt cagcgacggg cactgcgacc agggctgcaa cagcgcggag      360

```

tgcgagtggg acgggctgga ctgtcggag catgtacccg agaggctggc ggccggcacg 420

ctggtggigg tgggtgat gccgccgag cagctgcga acagctcctt ccacttctg 480

cgggagctca gccgctgct gcacaccaac gtggcttca agcgtgacgc acacggccag 540

cagatgatct tcccacta cggccgcgag gaggagctgc gcaagcacc catcaagcgt 600

gccgccgagg gctgggccg acctgacgcc ctgctggcc aggtgaaggc ctcgctgctc 660

cctggtggca gcgaggtgg gcggcggcg agggagctgg accccatgga cgtccgcggc 720

tccatgctct acctggagat tgacaaccgg cagtgtgtgc agcctctc gcagtgttc 780

cagagtgcc cgcagctggc cgcattctg ggagcgtcg cctcgtggg cagcctcaac 840

atcccctaca agatcgaggc cgtgcagagt gagaccgtgg agccgcccc gccggcgag 900

ctgcacttca tg 912

<210> 5

<211> 341

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 5

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Ser Pro Leu His Pro

1 5 10 15

Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro Pro Pro Gln Ile Glu Glu Ala Cys

20 25 30

Glu Leu Pro Glu Cys Gln Val Asp Ala Gly Asn Lys Val Cys Asn Leu

35 40 45

Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu

50 55 60

Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys Asn Cys Thr Gln Ser Leu Gln Cys Trp

65 70 75 80

Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Ser Gln Cys Asn Ser Ala Gly

85 90 95

Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Leu Thr Glu Gly Gln Cys Asn

100 105 110

Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser Asp Gly His Cys

<213> Mus musculus

<400> 6

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

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

Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu Val Leu Val
 130 135 140
 Val Leu Leu Pro Pro Asp Gln Leu Arg Asn Asn Ser Phe His Phe Leu
 145 150 155 160
 Arg Glu Leu Ser His Val Leu His Thr Asn Val Val Phe Lys Arg Asp
 165 170 175
 Ala Gln Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly His Glu Glu Glu
 180 185 190

Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ser Thr Val Gly Trp Ala Thr Ser
 195 200 205
 Ser Leu Leu Pro Gly Thr Ser Gly Gly Arg Gln Arg Arg Glu Leu Asp
 210 215 220
 Pro Met Asp Ile Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp Asn Arg

atcttcgagg ctcaaaaaat cgaatggcac gaaggtggcc caccacatca tcatcatcat 1020

cac 1023

<210> 8

<211> 882

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 8

ggtggcgtg ggcgcgacat tccccaccg cagattgagg aggctgtga gctgcctgag 60

tgccaggagg atgcaggcaa taaggtctgc aacctgcagt gtaataatca cgcatgtggc 120

tgggatgggtg gcgactgctc cctcaacttc aatgaccctt ggaagaactg cacgcagtct 180

ctacagtgtc ggaagtattt tagcgacggc cactgtgaca gccagtgcaa ctggccggc 240

tgcctctttg atggcttcga ctgccagctc accgaggggac agtgaaccc cctgtatgac 300

cagtactgca aggaccactt cagtgtatggc cactgacgacc agggctgtaa cagtgccgaa 360

tgtgagtggg atggcctaga ctgtgctgag catgtaccg agcggctggc agccggcacc 420

ctggtgctgg tgggtgctgt tccacccgac cagctacgga acaactcctt ccactttctg 480

cgggagctca gccacgtgct gcacaccaac gtggcttca agcgtgatgc gcaaggccag 540

cagatgatct tcccgtacta tggccacgag gaagagctgc gcaagcacc aatcaagcgc 600

tctacagtgg gtgggccac ctcttactg ctctctggta ccagtggagg gcgccagcgc 660

agggagctgg accccatgga catccgtggc tccattgtct acctggagat cgacaaccgg 720

caatgtgtgc agtcactcgc gcagtgtctc cagagtgcca ccgatgtggc tgccttctca 780

ggtgctcttg cgtcacttgg cagcctcaat attccttaca agattgaggc cgtgaagagt 840

gagccggagg agcctccgct gccctgcag ctgcacctca tg 882

<210> 9

<211> 564

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 9

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Ala His Ser Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro Pro Pro Leu Ile Glu

20 25 30

Glu Ala Cys Glu Leu Pro Glu Cys Gln Glu Asp Ala Gly Asn Lys Val
 35 40 45
 Cys Ser Leu Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly Trp Asp Gly Gly Asp
 50 55 60
 Cys Ser Leu Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys Asn Cys Thr Gln Ser Leu
 65 70 75 80
 Gln Cys Trp Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Ser Gln Cys Asn
 85 90 95
 Ser Ala Gly Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Arg Ala Glu Gly
 100 105 110
 Gln Cys Asn Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser Asp
 115 120 125
 Gly His Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp Gly
 130 135 140
 Leu Asp Cys Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu
 145 150 155 160
 Val Val Val Val Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Arg Asn Ser Ser Phe
 165 170 175
 His Phe Leu Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu His Thr Asn Val Val Phe
 180 185 190
 Lys Arg Asp Ala His Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly Arg
 195 200 205
 Glu Glu Glu Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ala Ala Glu Gly Trp
 210 215 220
 Ala Ala Pro Glu Ala Leu Leu Gly Gln Val Lys Ala Ser Leu Leu Pro
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Arg Arg Arg Glu Leu Asp Pro Met Asp
 245 250 255
 Val Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp Asn Arg Gln Cys Val
 260 265 270
 Gln Ala Ser Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr Asp Val Ala Ala Phe

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 530 535 540
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 545 550 555 560
 Ser Pro Gly Lys

<210> 10

<211> 304

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 10

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

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

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

130 135 140
 Val Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Arg Asn Ser Ser Phe His Phe Leu
 145 150 155 160
 Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu His Thr Asn Val Val Phe Lys Arg Asp

165 170 175
 Ala His Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly Arg Glu Glu Glu
 180 185 190
 Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ala Ala Glu Gly Trp Ala Ala Pro
 195 200 205
 Glu Ala Leu Leu Gly Gln Val Lys Ala Ser Leu Leu Pro Gly Gly Gly
 210 215 220
 Gly Gly Gly Arg Arg Arg Arg Glu Leu Asp Pro Met Asp Val Arg Gly
 225 230 235 240
 Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Ala Ser
 245 250 255
 Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr Asp Val Ala Ala Phe Leu Gly Ala

260 265 270
 Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala Val
 275 280 285
 Gln Ser Glu Thr Val Glu Pro Pro Pro Ala Gln Leu His Phe Met
 290 295 300

<210> 11

<211> 1692

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 11

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggcgc gactccggt 60
 ggggccgggc gcgacatccc cccgccgctg atcgaggagg cgtgagct gcccgagtgc 120
 caggaggacg cgggcaacaa ggtctgcagc ctgcagtgca acaaccacgc gtgcggctgg 180
 gacggcggtg actgctccct caacttcaat gaccctgga agaactgcac gcagtctctg 240
 cagtgtgga agtacttcag tgacggccac tgtgacagcc agtgcaactc agccggctgc 300
 ctcttcgacg gctttgactg ccagcgtgcg gaaggccagt gcaacccct gtacgaccag 360
 tactgcaagg accacttcag cgacgggac tgcgaccagg gctgcaacag cgcgagtgc 420
 gagtgggacg ggctggactg tgcggagcat gtacccgaga ggctggcggc cggcacgctg 480

gtggtggtgg tgctgatgcc gccggagcag ctgcgcaaca gctccttcca cttcctgcgg 540
gagctcagcc gcgtgctgca caccaactg gtcttcaagc gtgacgcaca cggccagcag 600
atgatcttcc cctactacgg ccgcgaggag gagctgcgca agcaccccat caagcgtgcc 660
gccgagggct gggccgcacc tgaagccctg ctgggccagg tgaaggcctc gctgctccct 720
ggtggcggtg gaggtggcg gcggcggagg gagctggacc ccatggacgt ccgcggtcc 780
atcgtctacc tggagattga caaccggcag tgtgtgcagg cctcctcgca gtgcttccag 840
agtgccaccg acgtggccgc attcctggga gcgctcgct cgtgggcag cctcaacatc 900

ccctacaaga tcgaggccgt gcagagtgag accgtggagc cgccccgcc ggccagctg 960
cacttcatgg gagggggcgg atccggcgga ggccgagagc ccaaatcttc tgacaaaact 1020
cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa ctctggggg gaccgtcagt cttcctcttc 1080
ccccaaaac ccaaggacac cctcatgat tcccggacc ctgaggtcac atgcgtggtg 1140
gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagtccaact ggtacgtgga cggcgtggag 1200
gtgcataatg ccaagacaaa gcccgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 1260
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1320

tccaacaaag cccteccage ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1380
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1440
agcctgacct gcctgtgcaa aggtctctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1500
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1560
ttcttctct atagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1620
tcctgctccg tgatgatga ggctctgcac aacctata cgcagaagag cctctccctg 1680
tccccgggta aa 1692

<210> 12

<211> 912

<212> DNA

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 12

ggtggggccg ggccgcacat cccccccg ctgatcgagg aggcgtgcga gctgcccag 60
tgccaggagg acgcgggcaa caaggtctgc agcctgcagt gcaacaacca cgcgtgcggc 120
tgggacggcg gtgactgctc cctcaacttc aatgacctt ggaagaactg cacgcagtct 180
ctgcagtct ggaagtactt cagtgcggc cactgtgaca gccagtgcaa ctgagccggc 240
tgctcttcg acggtttga ctgccagct gcggaaggcc agtgaaccc cctgtacgac 300

cagtactgca aggaccactt cagcgacggg cactgacgacc agggctgcaa cagcgcgag 360

tgcgagtggg acgggctgga ctgtgaggag catglacccg agaggctggc ggccggcacg 420

ctggtgggtg tgggtgctgat gccgccggag cagctgcgca acagctcctt ccacttcctg 480

cgggagctca gccgctgct gcacaccaac gtggtcttca agcgtgacgc acacggccag 540

cagatgatct tcccacta cggccgcgag gaggagctgc gcaagcacc catcaagcgt 600

gccgccgagg gctgggccgc acctgaagcc ctgctgggcc aggtgaaggc ctcgctgctc 660

cctggtggcg gtggaggtgg gcggcggcgg agggagctgg acccatgga cgtccgcggc 720

tccatcgtct acctggagat tgacaaccgg cagtgtgtgc agcctcctc gcagtgttc 780

cagagtgcc cgcagctggc cgcattcctg ggagcgtcg cctcgctggg cagcctcaac 840

atcccctaca agatcgaggc cgtgcagagt gagaccgtgg agccgcccc gccggcgag 900

ctgcattca tg 912

<210> 13

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Asp Leu Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Pro Phe Val Met Asp Ala

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 14

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 14

gcggtacagt tgggtgagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggaaggtc cttgaaactc 60

tcctgtacag cctctggatt cactttcagt agctttgcaa tggcctgggt cgcagcagct 120

ccaacgaagg ggctggagtg ggtcgcaccc attagttatg gtggtgctga cacttactat 180

cgagactccg tgaagggccg attcactatc tccagagata atgcaaaaag cagcctatat 240

ttgcaaatgg acagtctgag gtctgaggac acgtccactt attactgtgc aaaagacctt 300

ccatactacg gatatacccc ctttgttatg gatgcctggg gtcaggaac ttcagtcact 360

gtctcctca 369

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 15

Ser Phe Ala Met Ala

1 5

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 16

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ala Met Ala

1 5 10

<210> 17

<211> 15

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic nucleotide sequence
 <400> 17
 tccttcgcca tggcc 15

<210> 18
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 18
 ggattcacct ttagttcctt cgccatggcc 30

<210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic peptide sequence
 <400> 19
 Ser Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic peptide sequence
 <400> 20
 Ser Tyr Gly Gly Ala Asp
 1 5

<210> 21
 <211> 51
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic nucleotide sequence
 <400> 21
 tccatctcct atggaggcgc tgacacctac taccgggact ccgtgaaggg c 51
 <210> 22
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic nucleotide sequence
 <400> 22
 cctatggagg cgctgac 17
 <210> 23
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic peptide sequence
 <400> 23

 Asp Leu Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Pro Phe Val Met Asp Ala
 1 5 10
 <210> 24
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic nucleotide sequence
 <400> 24
 gatctgcct actacggcta cacccttc gtgatggacg cc 42
 <210> 25
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic peptide sequence
 <400> 25
 Asp Ile Met Leu Thr Gln Ser Pro Pro Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Thr Ile Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp

 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asn Glu Ser Pro Arg Val Leu Ile

 35 40 45

Lys Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Asn Arg Val Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ser Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr

 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

 100 105

<210> 26

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 26

gacatcatgc tgactcagtc tccacctacc ctgtctgtaa ctccaggaga gaccatcagt 60

ctctcctgca gggccagtca gagaattaac actgacttac attggatca gcaaaaacca 120

aatgagtctc caaggttct catcaaattt gcttcccaga ccatctctgg agtcccctcc 180

aggttcagtg gcagtggtac agggacagat ttcactctca atattaacag agtagagcct 240

gaagattttt cagtttatta ctgtcaacag agtaatagct ggccatacac gtttggcgct 300

gggaccaagc tggaactgaa a 321

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 27

Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp Leu His

1 5 10

<210> 28

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 28

cgggcctccc agcggatcaa caccgacctg cac

33

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 29

Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser

1 5

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 30

ttcgccagcc agaccatctc c

21

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 31

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr Thr

1 5

<210> 32

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 32

cagcagtcca actcctggcc ctacacc

27

<210> 33

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 33

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

1	5	10	15
Ser	Leu	Lys	Val
Ser	Cys	Leu	Ala
Ser	Gly	Phe	Thr
Phe	Ser	His	Tyr
	20	25	30
Gly	Met	Asn	Trp
Ile	Arg	Gln	Ala
Pro	Gly	Lys	Gly
Leu	Asp	Trp	Val
	35	40	45
Ala	Ser	Ile	Ser
Arg	Ser	Gly	Ser
Tyr	Ile	Arg	Tyr
Val	Asp	Thr	Val
	50	55	60
Lys	Gly	Arg	Phe
Thr	Val	Ser	Arg
Asp	Ile	Ala	Lys
Asn	Thr	Leu	Tyr
	65	70	75
Leu	Gln	Met	Thr
Ser	Leu	Arg	Ser
Glu	Asp	Thr	Ala
Leu	Tyr	Tyr	Cys
	85	90	95
Ala	Arg	Glu	Gly
Gln	Phe	Gly	Asp
Tyr	Phe	Glu	Tyr
Trp	Gly	Gln	Gly
	100	105	110
Val	Met	Val	Thr
Val	Ser	Ser	
	115		

<210> 34

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 34

gaggtgcagc tggaggagtc tggaggagtc ttagtgcagc ctggaaggtc cctgaaagtc 60
 tcctgttttag cctctggatt cactttcagt cactatggaa tgaactggat tcgccaggct 120
 ccaggaagg ggctggactg ggttgcactc attagtagga gtggcagtta catccgctat 180
 gtagacacag tgaaggccg attcaccgtc tccagagaca ttccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaatga ccagtctgag gtctgaagac actgccttgt attactgtgc aagagaggga 300
 caattcgggg actactttga gtactggggc caaggagtca tggtcacagt ctcctca 357

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 35

His Tyr Gly Met Asn

1 5

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 36

Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr Gly Met Asn

1 5 10

<210> 37

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 37

cactatggaa tgaac 15

<210> 38

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 38

ggattcactt tcagtcacta tggaatgaac

30

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 39

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

1 5 10 15

Gly

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 40

Ser Arg Ser Gly Ser Tyr

1 5

<210> 41

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 41

tctattagta ggagtggcag ttacatccgc tatgtagaca cagtgaaggg c

51

<210> 42

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 42

agtaggagtg gcagttac

18

<210> 43

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 43

Glu Gly Gln Phe Gly Asp Tyr Phe Glu Tyr

1 5 10

<210> 44

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 44

gagggacaat tcggggacta ctttgagtac

30

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 45

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

1 5 10 15

Glu Arg Ile Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn

20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asn Glu Ser Pro Arg Ile Leu Ile

35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

agggccagtc agaaaattag cactaactta cat

33

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 49

Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser

1 5

<210> 50

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 50

tatgcttccc agaccatctc t

21

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 51

Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 52

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 52

caacagacta atagttggcc gctcacg

27

<210> 53

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 53

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

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

<210> 54

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 54

gaggtgcagc tagtggagtc tggaggaggc ttagtgcagc ctggaaggtc cctgaaactc 60
 tcctgttttag cctctggatt cactttcagt cactatggag tgaactggat tcgccaggct 120
 ccagggaaagg ggctggaatg gattgcatct attagtagaa gtagcagtta catctactat 180
 gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgttc 240
 ctgcaattga ccagtctgag gtctgaagac actgccttgt attactgtgc aagagagggg 300
 caattcgggg actactttga atactggggc cgaggagtca tggtcacagt ctctctca 357

<210> 55

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 55

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

1 5 10 15

Glu Ser Ile Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Thr Asn

20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asn Glu Ser Pro Arg Val Leu Ile

35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Asn Arg Val Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ser Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 56

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 56

gacatcatac tgactcagtc tccagctgcc ctgtctgtaa ctccaggaga gagcatcagt 60

ctctcctgca gggccagtca gagtattaac actaacttgc attggtatca gcaaaaacca 120

aatgagtctc caagggttct catcaaatat gcttcccaga ccatctctgg aatcccctec 180

aggttcagtg gcagtgatc agggacagat ttcactctca atattaacag agtagagcct 240

gaagattttt cagtttatta ctgtcaacag agtaatagct ggccgctcac gttcggttct 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 57

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 57

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Thr Ser Ile Thr Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr 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 Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gln Phe Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Val Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 58

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 58

gaggtgcagc tggaggagtc tggaggagtc ttagtgagc ctggaaggct cctgaaactc 60

tcctgttttag cctctggatt cactttcagt cactatggaa tgaactggat tcgccaggct 120

ccaggaagg ggctggagtg gattacatct attactagta gtagcagtta catctactat 180

gcagacacag tgaaggcgcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa cacctgtac 240

ctgcaaatga ccagtctgag gtctgaagac actgccttgt attactgtgc aagagagggg 300

caattcgggg actactttga ttactggggc caaggagtca tggtcacagt ctcctca 357

<210> 59

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 59

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

1 5 10 15

Glu Ser Ile Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Thr Asn

20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asn Glu Ser Pro Arg Val Leu Ile

35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Asn Arg Val Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ser Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 60

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 60

gacatcatgc tgactcagtc tccagctacc ctgtctgtaa ctccaggaga gagcatcagt 60

ctctcctgca gggccagtca gagtattaac actaacttac attggtatca gcaaaaacca 120

aatgagtctc caagggttct catcaaatat gcttcccaga ccatctctgg aatcccctcc 180

aggttcagtg gcagtggtac agggacagat ttcactctca atattaacag agtagagcct 240

gaagatTTTT cagtttatta ctgtcaacag agtaatagct ggcgcgtcac gttcggttct 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 61

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 61

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

Thr Ser Ile Thr Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr 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 Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Gln Phe Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Val Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 62

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 62

gaggtgcagc tggaggagtc tggaggagtc ttagtgcagc ctggaaggtc cctgaaactc 60
 tcctgtttag cctctggatt cactttcagt cactatggaa tgaactggat tcgccaggct 120

ccaggggaagg ggctggagtg gattacatct attactagta gtagcagtta catctactat 180
 gcagacacag tgaagggccg attcacatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaatga ccagtctgag gtctgaagac actgccttgt attactgtgc aagagagggg 300

caattcgggg actactttga ttactggggc caaggagtca tggtcacagt ctctca 357

<210> 63

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 63

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

1 5 10 15

Glu Ser Ile Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Thr Asn

20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asn Glu Ser Pro Arg Val Leu Ile

35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Asn Arg Val Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ser Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 64

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 64

gacatcatgc tgactcagtc tccagctacc ctgtctgtaa ctccaggaga gagcatcagt 60

ctctcctgca ggccagtc gagtattaac actaacttac attggtatca gcaaaaacca 120

aatgagtctc caaggttctt catcaaatat gcttcccaga ccatctctgg aatcccctcc 180
 aggttcagtg gcagtggtatc agggacagat ttcactctca atattaacag agtagagcct 240
 gaagattttt cagtttatta ctgtcaacag agtaatagct ggccgctcac gttcggttct 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 65

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 65

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 66

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 66

caggtgcagg tgaaggagtc aggacctggt ctggtgcagc cctcacagac tttgtctctc 60
 acctgcactg tctctgggtt ctactaacc agctatcatg taagctgggt tcgccagcct 120
 ccaggaaaag gtctggagtg gatgggagca atatggactg gtggaagcac agcatataat 180
 tcacttctca aatcccgact gagcatcagc agggacatct ccaagagcca agttttctta 240
 aaaatgaaca gctgcaaac tgaagacaca gccacttact actgtgccag agccgatttc 300

tatgttatgg atgcctgggg tcaaggagct tcagtcactg tctcctca 348

<210> 67

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 67

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

1 5 10 15

Glu Ser Ile Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Asp

20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asn Glu Ser Pro Arg Val Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Asn Arg Val Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ser Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 68

<211> 320

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 68

acatcatgct gactcagtct ccagttaccc tgtctgtgtc tccaggagag agcatcagtc 60
 tctcctgcag ggccagtcag agtattagca ctgacttgca ttggatcag caaaaaccaa 120
 atgagtctcc aagggttctc atcaaatatg gttccagac catctctgga atccctcca 180
 ggttcagtgg cagtggatca gggacagatt tcactctcaa tattaacaga gtagagcctg 240
 aagatTTTTc agtttattac tgtcagcaga gtaatagctg gccatggaca ttcggtggag 300
 gcaccaagct ggaattgaaa 320

<210> 69

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 69

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Leu Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Pro Phe Val Met Asp Ala

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 70

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence
 <400> 70
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tctgtgcag cctctggatt cacctttagt tccttcgcca tggcctgggt cgcaggct 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggtggcctcc atctcctatg gagcgctga cacctactac 180
 cgggactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240

 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggetgtgt attactgtgc gagagatctg 300
 ccctactag gctacacccc ctctgtgatg gacgcctggg gccaggaac cctggtcacc 360
 gtctcctca 369

<210> 71

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence
 <400> 71
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe

 20 25 30
 Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95
 Ala Lys Asp Leu Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Pro Phe Val Met Asp Ala
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 72

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 72

gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttgggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt tccttcgcca tggcctgggt cgccagget 120

ccaggaagg ggctggagtg ggtggcctcc atctcctatg gaggcgctga cacctactac 180

cgggactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaggatctg 300

ccctactag gctacacccc cttcgtgatg gacgcctggg gccaggaac cctggtcacc 360

gtctcctca 369

<210> 73

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 73

Ser Phe Ala Met Ala

1 5

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 74

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ala Met Ala

1 5 10

<210> 75

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 75
 tccttcgcca tggcc 15

<210> 76

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 76
 ggattcacct ttagttcctt cgccatggcc 30

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 77
 Ser Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 78

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 78
 Ser Tyr Gly Gly Ala Asp
 1 5

<210> 79

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 79

tccatctcct atggaggcgc tgacacctac taccgggact ccgtgaaggg c 51

<210> 80

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 80

cctatggagg cgctgac 17

<210> 81

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 81

Asp Leu Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Pro Phe Val Met Asp Ala

1 5 10

<210> 82

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 82

gatctgcct actacggcta caccaccttc gtgatggacg cc 42

<210> 83

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 83

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 84

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 84

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcaacttgcc gggcctccca gcgatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggcctacac ctttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 85

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 85

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

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

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

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 86

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 86

gacatccagc tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcaacttgcc gggcctccca gcgatcaac accgacctgc actggatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagtgct gatcaagttc gccagccaga ccatctcgg ggtccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagatttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggcctacac ctttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 87

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 87

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

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

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

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 88

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 88

gacatccagc tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcaacttgcc gggcctccca gcgatcaac accgacctgc actggatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggcctacac ctttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 89

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 89

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

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

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

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 90

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 90

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcaacttgcc gggcctccca gcgatcaac accgacctgc actggatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaaggtgct gatctatttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180

 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccttacac ctttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 91

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 91

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

20 25 30

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

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 92

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 92

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcaacttgcc gggcctccca gcgatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatcaagttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccttacac ctttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 93

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 93

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp
 20 25 30

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

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 94

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 94

gacatccagc tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcaacttgcc gggcctccca gcgatcaac accgacctgc actggatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaaggtgct gatctatttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggcctacac ctttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 95

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 95

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

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

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

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 96

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 96

gacatccagc tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcaacttgcc gggcctccca gcgatcaac accgacctgc actggatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatcaagttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180

 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccttacac ctttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 97

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 97

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

20 25 30

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

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 98

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 98

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcaacttgcc gggcctccca gcgatcaac accgacctgc actggatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagtgct gatcaagttc gccagccaga ccatctcgg ggtccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggcctacac ctttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 99

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 99

Arg Ala Ser Gln Arg Ile Asn Thr Asp Leu His

1 5 10

<210> 100

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 100

cgggcctccc agcggatcaa caccgacctg cac

33

<210> 101

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 101

Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser

1 5

<210> 102

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 102

ttcgccagcc agaccatctc c

21

<

210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 103

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr Thr

1 5

<210> 104

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 104

cagcagtcca actcctggcc ctacacc

27

<210> 105

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 105

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Lys Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 106

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 106

gacatcatgc tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaaggtgct gatcaagttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccttacac ctttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a

321

<210> 107

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 107

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

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

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

<210> 108

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 108

gacatcatgc tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
ataccttgcc gggcctccca gggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctagggtgct gatcaagttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggcctacac ctttggccag	300

gggaccaagc tggagatcaa a

321

<210> 109

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 109

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

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

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

Lys Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

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

<210> 110

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 110

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atacacttgcc gggcctccca gggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctagggtgct gatcaagttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccttacac ctttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a

321

<210> 111

<211> 453

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 111

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Asp Leu Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Pro Phe Val Met Asp Ala

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly

115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly

130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val

145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val

180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val

Leu Ser Pro Gly Lys

450

<210> 112

<211> 1359

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 112

gaggtgcagc tggtagtc tggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt tccttcgcca tggcctgggt ccgccaggct 120

ccaggaagg ggctggagt ggtggcctcc atctcctatg gaggcgctga cacctactac 180

cgggactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaggatctg 300

ccctactacg gctacacccc ctctgtgat gacgcctggg gccaggaac cctggtcacc 360

gtctcctcag cgtegaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcacctc ctccaagagc 420

acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggccaagg actacttccc cgaaccggtg 480

acggtgtcgt ggaactcagg cgcctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 540

cagtctcag gactctactc cctcagcagc gtggtagaccg tgcctccag cagcttgggc 600

accagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa 660

gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgccacg acctgaagcc 720

gtggggcac cgtcagctt cctcttcccc caaaaccca aggacacct catgatctcc 780

cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 840

ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 900

cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg tcctgcacca ggactggctg 960

aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1020

accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gccccatcc 1080

cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg cttctatccc 1140

agcgacatcg ccgtggagt ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccagc 1200

cctcccgtgc tggactccga cggtccttc ttctctata gcaagctcac cgtggacaag 1260

agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1320

cactacacgc agaagagcct ctccctgtcc ccgggtaaa 1359

<210> 113

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 113

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Lys Phe Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

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

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 114

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 114

gacatcatgc tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcctccca gcggatcaac accgacctgc actggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctagggtgct gatcaagttc gccagccaga ccatctccgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcagcag tccaactcct ggccttacac ctttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gectgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 115

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 115

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

<400> 122

Ser Arg Ser Gly Ser Tyr

1 5

<210> 123

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 123

tctattagta ggagtggcag ttacatccgc tatgtagaca cagtgaaggg c 51

<210> 124

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 124

agtaggagtg gcagttac 18

<210> 125

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 125

Glu Gly Gln Phe Gly Asp Tyr Phe Glu Tyr

1 5 10

<210> 126

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 126

gagggacaat tcggggacta ctttgagtac 30

<210> 127

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 127

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 128

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 128

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcctccca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctattac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 129

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 129

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 130

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 130

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcctccca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagatcct gatcaagtac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 131

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 131

Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn Leu His

1 5 10

<210> 132

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<

220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 132

agggccagtc agaaaattag cactaactta cat 33

<210> 133

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 133

Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser

1 5

<210> 134

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 134

tatgcttccc agaccatctc t 21

<210> 135

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 135

Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu Thr Thr
 1 5 10

<210> 136

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 136

caacagacta atagttggcc gctcacg

27

<210> 137

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 137

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

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

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

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

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

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

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

<210> 138

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 138

gacatccagc tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcctccca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagetct gatctattac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 139

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 139

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 140

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 140

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcctcca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagatcct gatctattac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 141

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 141

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 142

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 142

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc ggcctccca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagctct gatcaagtac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca      180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga      300
gggaccaagg tggagatcaa a                                          321
    
```

<210> 143

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 143

```

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn

           20           25           30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ile Leu Ile
           35           40           45
Tyr Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu

           85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
           100          105
    
```

<210> 144

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 144

```

gacatccagc tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc ggcctccca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagatcct gatctattac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca      180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga      300
gggaccaagg tggagatcaa a                                              321
    
```

<210> 145

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 145

```

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn

           20           25           30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45
Lys Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu

           85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
           100          105
    
```

<210> 146

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 146

gacatccagc tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc ggcctccca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatcaagtac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca 180

 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 147

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 147

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ser Thr Asn

 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ile Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu

 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 148

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 148

```

gacatccagc tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc ggcctccca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagatcct gatcaagtac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca      180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaactcct ggcccctgac cttcggcgga      300
gggaccaagg tggagatcaa a                                              321
    
```

<210> 149

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide sequence

<400> 149

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr

           20           25           30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
           35           40           45
Ala Ser Ile Ser Arg Ser Gly Ser Tyr Ile Arg Tyr Val Asp Thr Val
           50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

           85           90           95
Ala Arg Glu Gly Gln Phe Gly Asp Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
           100          105          110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
           115          120          125
    
```

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

atcacttgcc ggcctcca gaagatctcc accaacctgc actggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagatcct gatcaagtac gcctctcaga ccatctccgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag accaacctct ggeccctgac cttcggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa a	321