



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0027483
 (43) 공개일자 2013년03월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
 A61P 25/28 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-7025884
 (22) 출원일자(국제) 2011년03월01일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2012년10월02일
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2011/053038
 (87) 국제공개번호 WO 2011/107480
 국제공개일자 2011년09월09일
 (30) 우선권주장
 61/309,957 2010년03월03일 미국(US)

(71) 출원인
글락소 그룹 리미티드
 영국 유비6 0엔엔 미들섹스 그린포우드 버클리 애
 비뉴 글락소 웰컴 하우스
 (72) 발명자
브린더, 테진더, 카우르
 영국 에스지1 2엔와이 허트포드셔 스티브니지 건
 넬스 우드 로드 글락소스미스클라인
포드, 수산나, 카렌
 영국 에스지1 2엔와이 허트포드셔 스티브니지 건
 넬스 우드 로드 글락소스미스클라인
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
특허법인 남앤드남

전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 **혈청 아밀로이드 P 성분에 특이적인 항원 결합 단백질**

(57) 요약

본 발명은 혈청 아밀로이드 P 성분 (SAP)에 결합하는 항체와 같은 항원 결합 단백질, 상기 항원 결합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 항원 결합 단백질을 포함하는 약학적 조성물 및 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 전신 아밀로이드증, 국소 아밀로이드증, 알츠하이머병, 및 타입 2 당뇨병을 포함하는 아밀로이드 침착과 관련된 질병의 치료 또는 예방에서의 그러한 항원 결합 단백질의 용도에 관한 것이다.

(72) 발명자

게르마셰브스키, 볼커

영국 에스지1 2엔와이 허트포드셔 스티브니지 건넬
스 우드 로드 글락소스미스클라인

루이스, 알란, 피터

영국 에스지1 2엔와이 허트포드셔 스티브니지 건넬
스 우드 로드 글락소스미스클라인

페피스, 마크, 브리안

영국 더블유1티 4티피 런던 토던햄 코트 로드 97
네트워크 빌딩 유씨엘 비지니스 피엘씨 쉐트라신
테라페우틱스 엘티디

특허청구의 범위

청구항 1

혈청 아밀로이드 P 성분 (SAP)에 특이적으로 결합하고, SEQ ID NO:7의 중쇄 가변 영역 서열 및 SEQ ID NO:9의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 기준 항체(reference antibody)와 SAP와의 결합에 대해 경쟁하는 비-뮤린 항원 결합 단백질.

청구항 2

SAP에 결합하고, SEQ ID NO:3에 개시된 CDRH3 또는 CDRH3의 기능적 변이체를 포함하는 비-뮤린 항원 결합 단백질.

청구항 3

제 2항에 있어서, CDRH1 (SEQ ID NO:1), CDRH2 (SEQ ID NO:12), CDRL1 (SEQ ID NO:4), CDRL2 (SEQ ID NO:5), 및 CDRL3 (SEQ ID NO:6); 또는 CDRH1, CDRH2, CDRL1, CDRL2 또는 CDRL3의 기능적 변이체로부터 선택된 하나 이상의 CDR 또는 모든 CDR을 추가로 포함하는 항원 결합 단백질.

청구항 4

제 2항 또는 제 3항에 있어서, CDRH3 기능적 변이체가, Ser 102가 Tyr, His, Val, Ile, Asp 또는 Gly로 치환된 SEQ ID NO:3의 변이체인 항원 결합 단백질.

청구항 5

제 3항 또는 제 4항에 있어서,

(a) CDRH1 기능적 변이체가, Tyr 32가 Ile, His, Phe, Thr, Asn, Cys, Glu 또는 Asp로 치환되고/거나; Asn 33이 Tyr, Ala, Trp, Gly, Thr, Leu 또는 Val로 치환되고/거나; Met 34가 Ile, Val 또는 Trp로 치환되고/거나; His 35가 Glu, Asn, Gln, Ser, Tyr 또는 Thr로 치환된 SEQ ID NO:1의 변이체이고/거나;

(b) CDRH2 기능적 변이체가, Tyr 50이 Arg, Glu, Trp, Gly, Gln, Val, Leu, Asn, Lys 또는 Ala로 치환되고/거나; Ile51이 Leu, Val, Thr, Ser 또는 Asn로 치환되고/거나; Tyr 52가 Asp, Leu, Asn 또는 Ser로 치환되고/거나, Gly 53이 Ala, Tyr, Ser, Lys, Thr 또는 Asn로 치환되고/거나, Asp 54가 Asn, Ser, Thr, Lys 또는 Gly로 치환되고/거나; Asn 56이 Tyr, Arg, Glu, Asp, Gly, Val, Ser 또는 Ala로 치환되고/거나; Asn 58이 Lys, Thr, Ser, Asp, Arg, Gly, Phe 또는 Tyr로 치환된 SEQ ID NO:2의 변이체이고/거나;

(c) CDRL1 기능적 변이체가, Asn 28이 Ser, Asp, Thr 또는 Glu로 치환되고/거나; Ile 29가 Val로 치환되고/거나; Tyr 30이 Asp, Leu, Val, Ile, Ser, Asn, Phe, His, Gly 또는 Thr로 치환되고/거나; Ser 31이 Asn, Thr, Lys 또는 Gly로 치환되고/거나; Tyr 32가 Phe, Asn, Ala, His, Ser 또는 Arg로 치환되고/거나; Leu 33이 Met, Val, Ile 또는 Phe로 치환되고/거나; Ala 34가 Gly, Asn, Ser, His, Val 또는 Phe로 치환된 SEQ ID NO:4의 변이체이고/거나;

(d) CDRL2 기능적 변이체가, Ala 51이 Thr, Gly 또는 Val로 치환된 SEQ ID NO:5의 변이체이고/거나;

(e) CDRL3 기능적 변이체가, Gln 89가 Ser, Gly, Phe 또는 Leu로 치환되고/거나; His 90이 Gln 또는 Asn로 치환되고/거나; His 91이 Asn, Phe, Gly, Ser, Arg, Asp, Thr, Tyr 또는 Val로 치환되고/거나; Tyr 92가 Asn, Trp, Thr, Ser, Arg, Gln, His, Ala 또는 Asp로 치환되고/거나; Gly 93이 Glu, Asn, His, Thr, Ser, Arg 또는 Ala로 치환되고/거나; Ala 94가 Asp, Tyr, Thr, Val, Leu, His, Asn, Ile, Trp, Pro 또는 Ser로 치환되고/거나; Leu 96이 Pro, Tyr, Arg, Ile, Trp 또는 Phe로 치환된 SEQ ID NO:6의 변이체인 항원 결합 단백질.

청구항 6

SAP에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단백질로서, 항원 결합 단백질이 SEQ ID NO:7의 가변 도메인 서열의 상응하는 CDRH3, 또는 CDRH3의 기능적 변이체를 포함하는 키메라 또는 인간화 항체인 항원 결합 단백질.

청구항 7

제 6항에 있어서, SEQ ID NO:7의 가변 도메인 서열의 CDRH1 또는 CDRH2; 또는 SEQ ID NO:9의 가변 도메인 서열의 CDRL1, CDRL2, CDRL3; 또는 CDRH1, CDRH2, CDRL1, CDRL2 또는 CDRL3의 기능적 변이체로부터 선택된 상응하는 CDR 중 하나 이상 또는 전부를 추가로 포함하는 항원 결합 단백질.

청구항 8

SAP에 특이적으로 결합하고, SEQ ID NO:7의 케이벳(Kabat) 잔기 95-101을 포함하는 결합 단위 H3 또는 결합 단위 H3의 기능적 변이체를 포함하는 항원 결합 단백질.

청구항 9

제 8항에 있어서, SEQ ID NO:7의 케이벳 잔기 31-32를 포함하는 H1, SEQ ID NO:7의 케이벳 잔기 52-56을 포함하는 H2, SEQ ID NO:9의 케이벳 잔기 30-34를 포함하는 L1, SEQ ID NO:9의 케이벳 잔기 50-55를 포함하는 L2; 및 SEQ ID NO:9의 케이벳 잔기 89-96을 포함하는 L3; 또는 결합 단위 H1, H2, L1, L2 또는 L3의 기능적 변이체로부터 선택된 하나 이상의 결합 단위 또는 모든 결합 단위를 추가로 포함하는 항원 결합 단백질.

청구항 10

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질이 하기 중쇄 및/또는 경쇄를 포함하는 항원 결합 단백질:

(a) 하기 잔기를 포함하는 중쇄 프레임워크: 위치 2에 Val, Ile 또는 Gly; 위치 4에 Leu 또는 Val; 위치 20에 Leu, Ile, Met 또는 Val; 위치 22에 Cys; 위치 24에 Thr, Ala, Val, Gly 또는 Ser; 위치 26에 Gly; 위치 29에 Ile, Phe, Leu 또는 Ser; 위치 36에 Trp; 위치 47에 Trp 또는 Tyr; 위치 48에 Ile, Met, Val 또는 Leu; 위치 69에 Ile, Leu, Phe, Met 또는 Val; 위치 71에 Val, Ala 또는 Leu; 위치 78에 Ala, Leu, Val, Tyr 또는 Phe; 위치 80에 Leu 또는 Met; 위치 90에 Tyr 또는 Phe; 위치 92에 Cys; 및/또는 위치 94에 Arg, Lys, Gly, Ser, His 또는 Asn; 및/또는

(b) 하기 잔기를 포함하는 경쇄 프레임워크: 위치 2에 Ile, Leu 또는 Val; 위치 3에 Val, Gln, Leu 또는 Glu; 위치 4에 Met 또는 Leu; 위치 23에 Cys; 위치 35에 Trp; 위치 36에 Tyr, Leu 또는 Phe; 위치 46에 Leu, Arg 또는 Val; 위치 49에 Tyr, His, Phe 또는 Lys; 위치 71에 Tyr 또는 Phe; 위치 88에 Cys; 및/또는 위치 98에 Phe.

청구항 11

제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 프레임워크가 하기 잔기: 위치 2에 Val, 위치 4에 Leu, 위치 20에 Val, 위치 22에 Cys, 위치 24에 Ala, 위치 26에 Gly, 위치 29에 Phe, 위치 36에 Trp, 위치 47에 Trp, 위치 48에 Met, 위치 69에 Ile, 위치 71에 Ala, 위치 78에 Ala, 위치 80에 Met, 위치 90에 Tyr, 위치 92에 Cys, 및 위치 94에 Arg을 포함하고/거나 경쇄 프레임워크가 하기 잔기: 위치 2에 Ile, 위치 3에 Gln, 위치 4에 Met, 위치 23에 Cys, 위치 35에 Trp, 위치 36에 Tyr, 위치 46에 Leu, 위치 49에 His, 위치 71에 Phe, 위치 88에 Cys, 및 위치 98에 Phe을 포함하는 항원 결합 단백질.

청구항 12

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, SEQ ID NO:25에 개시된 프레임워크 영역과 75% 또는 그 초과 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인 항체 프레임워크 및/또는 SEQ ID NO:32에 개시된 프레임워크 영역과 75% 또는 그 초과 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인 항체 프레임워크를 추가로 포함하는 항원 결합 단백질.

청구항 13

SAP에 특이적으로 결합하고, SEQ ID NO:27-31로부터 선택된 중쇄 가변 영역; 및/또는 SEQ ID NO:34-36으로부터 선택된 경쇄 가변 영역; 또는 75% 또는 그 초과 서열 동일성을 갖는 변이체 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 단백질.

청구항 14

SAP에 특이적으로 결합하고, SEQ ID NO:62의 중쇄; 및/또는 SEQ ID NO:64의 경쇄; 또는 75% 또는 그 초과 서

열 동일성을 갖는 변이체 중쇄 또는 경쇄를 포함하는 항원 결합 단백질.

청구항 15

제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서, SAP가 생체내 아밀로이드 원섬유에 결합된 인간 SAP인 항원 결합 단백질.

청구항 16

제 1항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질이 인간 SAP의 A 면에 결합하는 항원 결합 단백질.

청구항 17

제 1항 내지 제 16항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질이 인간 보체 시스템을 활성화시키는 항원 결합 단백질.

청구항 18

제 1-5항, 제 8항, 제 9항 또는 제 15-17항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라, 인간화, 또는 인간 항원 결합 단백질인 항원 결합 단백질.

청구항 19

제 1항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질이 인간 IgG1 또는 IgG3 불변 도메인을 포함하는 항원 결합 단백질.

청구항 20

제 1항 내지 제 19항 중 어느 한 항에 정의된 항원 결합 단백질을 엔코딩하는 핵산 분자.

청구항 21

제 20항에 있어서, 핵산 서열이 SEQ ID NO:54 및/또는 SEQ ID NO:59를 포함하는 핵산 분자.

청구항 22

제 21항에 있어서, 핵산 서열이 SEQ ID NO:61 및/또는 SEQ ID NO:63을 포함하는 핵산 분자.

청구항 23

제 20항 내지 제 22항 중 어느 한 항에 정의된 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 24

제 23항에 정의된 발현 벡터를 포함하는 재조합 숙주 세포.

청구항 25

제 24항에 정의된 숙주 세포를 배양하는 단계 및 항원 결합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 제 1항 내지 제 19항 중 어느 한 항에 정의된 항원 결합 단백질을 생산하는 방법.

청구항 26

제 1항 내지 제 19항 중 어느 한 항에 정의된 항원 결합 단백질 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 27

아밀로이드 침착과 관련된 질병에 걸린 피검체를 치료하는 방법으로서, 상기 피검체에게 치료적 유효량의 제 1항 내지 제 19항 중 어느 한 항에 정의된 항원 결합 단백질 또는 제 26항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 28

피검체에서 아밀로이드 침착과 관련된 질병을 예방하는 방법으로서, 상기 피검체에게 예방적 유효량의 제 1항 내지 제 19항 중 어느 한 항에 정의된 항원 결합 단백질 또는 제 26항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 29

제 27항 또는 제 28항에 있어서, 항원 결합 단백질이 SAP 고갈 화합물(SAP depleting compound)과 함께 투여되는 방법.

청구항 30

아밀로이드 침착과 관련된 질병을 치료 또는 예방하기 위해 사용되는 제 1항 내지 제 19항 중 어느 한 항에 정의된 항원 결합 단백질로서, SAP 고갈 화합물과 함께 투여되는 항원 결합 단백질.

청구항 31

아밀로이드 침착과 관련된 질병을 치료 또는 예방하기 위해 사용되는 SAP 고갈 화합물로서, 제 1항 내지 제 19항 중 어느 한 항에 정의된 항원 결합 단백질과 함께 투여되는 SAP 고갈 화합물.

청구항 32

항원 결합 단백질 및 SAP 고갈 화합물의 투여가 연속하여 일어나는, 제 27항 내지 제 29항 중 어느 한 항에 따른 방법, 제 29항에 따른 항원 결합 단백질, 또는 제 31항에 따른 SAP 고갈 화합물.

청구항 33

제 32항에 있어서, SAP 고갈 화합물이 먼저 투여되는, 방법, 항원 결합 단백질, 또는 SAP 고갈 화합물.

청구항 34

제 33항에 있어서, 피검체에서 순환하는 실질적으로 모든 SAP가 제거된 후에 항원 결합 단백질이 투여되는, 방법, 항원 결합 단백질, 또는 SAP 고갈 화합물.

청구항 35

질병이 전신 아밀로이드증(systemic amyloidosis), 국소 아밀로이드증(local amyloidosis), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 타입 2 당뇨병(type 2 diabetes), 투석-관련 아밀로이드증(dialysis-related amyloidosis), 모노클로날 면역글로불린 쇄(AL) 아밀로이드증(monoclonal immunoglobulin chain (AL) amyloidosis) 및 대뇌 아밀로이드 혈관병증(cerebral amyloid angiopathy)으로 구성된 군으로부터 선택되는, 제 27항, 28항, 29항, 31항, 33항, 또는 34항에 따른 방법, 제 30항, 32항, 33항, 또는 34항에 따른 항원 결합 단백질, 또는 제 31항, 32항, 33항, 또는 34항에 따른 SAP 길항 화합물.

청구항 36

SAP 고갈 화합물이 D-프롤린 유도체 또는 글리세롤 시클릭 피루베이트 유도체인, 제 27항, 28항, 29항, 32항, 33항, 34항 또는 35항에 따른 방법, 제 30항, 32항, 33항, 34항 또는 35항에 따른 항원 결합 단백질, 또는 제 31항, 32항, 33항, 34항 또는 35항에 따른 SAP 고갈 화합물.

청구항 37

제 36항에 있어서, D-프롤린 유도체가 (R)-1-[6-[(R)-2-카르복시-피롤리딘-1-일]-6-옥소 옥소헥사노일]피롤리딘-2-카르복실산(CPHPC)인 방법, 항원 결합 단백질 또는 SAP 고갈 화합물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 혈청 아밀로이드 P 성분 (SAP)에 결합하는 항체와 같은 항원 결합 단백질, 그러한 항원 결합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 항원 결합 단백질을 포함하는 약학적 조성물 및 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 전신 아밀로이드증(systemic amyloidosis), 국소 아밀로이드증(local amyloidosis), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 및 타입 2 당뇨병(type 2 diabetes)을 포함하는 아밀로이드 침착과 관련된 질병의 치료 또는 예방에서의 그러한 항원 결합 단백질의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 아밀로이드증은 아밀로이드 원섬유로서 공지된 비정상 불용성 단백질 섬유의 조직에서의 세포외 축적에 의해 야기되는 심각한, 일반적으로 치명적인 질병이다. 이들은 상이한 형태의 질병에서 20개를 초과하는 상이한 단백질로부터 유래하나 모든 아밀로이드 원섬유는 공통의 크로스-β 코어 구조를 공유하고, 모두는 보통 용해성 전구체 단백질의 미스폴딩에 의해 유래된다 (Pepys, M.B. (2006) Annu. Rev. Med., 57: 223-241). 정상적인 비-원섬유 혈장 단백질인 혈청 아밀로이드 P 성분 (SAP)도 모든 유형의 아밀로이드 원섬유에 대한 그 결합성 (avid) 특이적인 칼슘 의존성 결합에 의해 아밀로이드 침착물에 항상 존재한다 (Pepys et al. (1979) Clin. Exp. Immunol., 38: 284-293; Pepys et al. (1997) Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest., 4: 274-295).

[0003] 인간 SAP는 혈장에 약 20-40 mg/l의 농도로 존재하고 (Nelson et al. (1991) Clin. Chim. Acta, 200:191-200) 정상 개체 및 아밀로이드증 이외의 질병이 있는 환자 둘 모두의 조합된 혈장 및 혈관의 구획에서 총 약 50-100 mg의 SAP인 (Hawkins et al. (1990) J. Clin. Invest., 86: 1862-1869) 항시적 단백질이다. 아밀로이드증 환자에서, SAP는 또한 아밀로이드 침착물에 특히 집중되고 광범위 전신 아밀로이드증 개체에서 원섬유에 가역적으로 결합되고 유체상 SAP 풀과 평형인 아밀로이드에 20,000 mg만큼의 SAP가 존재할 수 있다 (Pepys et al. (1994) PNAS, 91: 5602-5606). SAP를 순환시키는 정상적인 생리적 기능은 충분히 이해되어 있지 않으나, 동물 실험 및 시험관내 연구는 숙주 방어에서의 역할을 제안한다 (Noursadeghi et al. (2000) PNAS, 97: 14584-14589)). SAP 또한 그 기능은 알려져 있지 않으나 사구체 기저막 및 탄력 섬유와 관련된 정상적인 조직 매트릭스 구성요소이다.

[0004] 아밀로이드증에서, 세포외 아밀로이드 침착물은 이들이 구조를 손상시키고 이에 따라 이들이 점유하는 모든 조직의 기능을 손상시킬 때까지 점진적인 축적에 의해 질병을 야기시킨다 (Pepys, M.B. (2006) Annu. Rev. Med., 57: 223-241). 조직에서 국소적으로 나타나거나 염증의 전신 마커에 의해 시사되는 아밀로이드 침착에 대한 어떠한 염증 또는 "이물" 반응은 매우 드물다. 전신 아밀로이드증은 임의의 기관과 연관될 수 있고, 일반적으로 치명적이며, 선진국에서 천 명에 ~1명의 사망 원인이다. 단일 해부학적 위치 또는 조직 유형에 국한된 국소 아밀로이드도 매우 심각할 수 있고, 예를 들어 대뇌 아밀로이드 혈관병증은 출혈 뇌졸중의 중요한 원인이다. 아밀로이드증의 임상적 표지는 매우 다양하며 현저한 기관 손상이 존재하기 전에는 좀처럼 진단되지 않는다. 20개가 넘는 상이한 아밀로이드 원섬유 단백질이 상이한 형태의 아밀로이드증의 원인이지만, 개별적인 아밀로이드 원섬유 전구체 단백질의 풍부함을 실질적으로 감소시키는 치료는 아밀로이드 축적을 정지시키며 침착물은 퇴행할 수 있다. 불행히도, 효과적인 측정법이 항상 이용가능한 것이 아니고, 존재하는 경우에도, 독성이거나 위험하고 느리게 작용한다 (Pepys, M.B. (2006) Annu. Rev. Med., 57: 223-241). 따라서, 확립된 아밀로이드 침착물의 제거를 안전하게 촉진시키는 요법에 대한 충족되지 않은 주된 의학적 요구가 존재한다. 더욱이, 아밀로이드 침착물이 항상 존재하는 그 밖의 질환, 가장 중요하게는 알츠하이머병 (AD) 및 타입 2 당뇨병이 있는데, 여기서 질병의 발병기전, 특히 각각 인지 및 이자섬 기능의 손실에 대한 아밀로이드 침착의 기여도는 알려져 있지 않다 (Pepys, M.B. (2006) Annu. Rev. Med., 57: 223-241). 그러나, 신체의 다른 어디에 있는 아밀로이드 침착물도 명백히 병원성이며, 아마도 AD의 대뇌 침착물 및 타입 2 당뇨병의 섬 아밀로이드 침착물 역시 유해하다. 전신 아밀로이드증에서 아밀로이드 침착물을 제거하는 처치는 분명히 치료에 도움이 될 것이며 (Pepys, M.B. (2006) Annu. Rev. Med., 57: 223-241), AD 및 타입 2 당뇨병에서 아밀로이드 침착물의 제거가 또한 임상적으로 유리할 것이다.

[0005] SAP의 결합은 아밀로이드 원섬유를 안정화시키고, 시험관내 단백질분해로부터 이들을 보호하며 (Tennent et al., (1995) PNAS, 92: 4299-4303), 시험관내 아밀로이드 원섬유발생을 증진시킬 수 있고 (Myers et al., (2006), Biochemistry, 45: 2311-2321) 생체내 전신 아밀로이드증의 발병기전에 기여한다 (Botto et al., (1997) Nature Med., 3: 855-859). 모든 아밀로이드 침착물에서 이의 보편적인 존재와 결부시켜 볼 때, SAP는 이러한 특성으로 인해 매력적인 치료용 표적이 된다.

[0006] 유럽 특허 출원 EP 0915088호는 아밀로이드 원섬유에 대한 SAP의 결합의 경쟁적 억제제인 D-프롤린 유도체 화합물뿐만 아니라 이들의 제조 방법을 기재한다. EP 0915088에 기재된 바람직한 화합물은 (R)-1-[6-[(R)-2-카르복시

-피롤리딘-1-일]-6-옥소 옥소헥사노일]피롤리딘-2-카르복실산 (CPHPC)이다.

- [0007] 국제 특허 출원 WO 03/051836호는 D-프롤린 유도체 화합물에 대한 프로드럭을 기재한다.
- [0008] 국제 특허 출원 WO 2004/099173호는 아밀로이드 원섬유에 대한 SAP의 결합의 경쟁적 억제제인 글리세롤 시클릭 피루베이트 유도체를 기재한다.
- [0009] 국제 특허 출원 WO 04/059318호는 SAP에 결합하는 조성물의 제공을 포함하는 섬유세포 형성을 향상시킨다고 주장하는 방법을 기재한다. 그러한 조성물은 항-SAP 항체 및 CPHPC를 포함한다. WO 04/059318호는 아밀로이드 침착과 관련된 질병의 치료를 기재하지 않는다. 게다가, SAP도 이의 고갈도 인간에서의 섬유증에 아무런 영향을 미치지 않는다는 강력한 임상적 및 생체내 증거가 존재한다 (Tennent et al., (2007) *Arthritis Rheum.*, 56: 2013-2017; Pepys, M.B., Tennent, G.A. and Denton, C.P. (2007) Reply to Letter from Pilling, D., Buckley, C.D., Salmon, M. and Gomer, R.G., Serum amyloid P and fibrosis in systemic sclerosis: comment on the article by Tennent et al. *Arthritis Rheum.*, 56: 4229-4230).
- [0010] 상기 열거된 특허에 기재된 비스-D-프롤린 화합물인 CPHPC는 인간 SAP에 의해 높은 친화도로 결합되며 생체내 아밀로이드 침착물로부터 SAP를 제거하고 이에 의해 이들의 제거를 촉진시키는 약물로서 의도된다. SAP에 의한 CPHPC의 결합은 간에 의한 복합체의 신속한 제거를 촉발시키고, 약물이 투여되는 동안에는 거의 모든 순환 SAP를 고갈시키며, SAP에 결합된 전부는 아니지만 많은 아밀로이드를 제거한다 (Pepys et al., (2002) *Nature*, 417: 254-259). 초기 임상 연구에서 (Gillmore et al., (2010) *Brit. J. Haematol.*, doi:10.1111/j.1365-2141.2009.08036.x), CPHPC의 투여는 아밀로이드 축적을 억제하는 것처럼 보였으나 이것은 아밀로이드 퇴행을 제공하지 않았고, CPHPC가 아밀로이드 침착물로부터 모든 SAP를 완전히 제거하는 것은 아니므로, 또 다른 접근법이 요구된다.
- [0011] 국제 특허 출원 WO 2009/000926호는 아밀로이드증의 치료 또는 예방을 위해 SAP에 특이적인 항체와 함께, SAP를 순환으로부터 고갈시키는 화합물, 예컨대 D-프롤린 유도체, 특히 CPHPC의 용도를 기재한다.
- [0012] 관련 국제 특허 출원 PCT/EP2008/011135호는 아밀로이드증의 치료 또는 예방을 위해 SAP를 순환으로부터 고갈시키는 화합물, 예컨대 D-프롤린 유도체, 특히 CPHPC와 함께 사용될 수 있는 다양한 마우스 모노클로날 항체에 관한 것이다.
- [0013] 따라서, 기관 기능을 보존하고 수명을 연장시키기 위해 아밀로이드 침착과 관련된 질병을 갖는 환자, 특히 인간 환자에서 특히 SAP를 표적화하고 향상된 치료 효능을 제공하는 항체, 특히 인간화 또는 인간 항체에 대한 요구가 당 분야에 존재한다.

발명의 내용

- [0014] **발명의 개요**
- [0015] 본 발명은 첫 번째 양태에서 SAP에 특이적으로 결합하고, SEQ ID NO:7의 중쇄 가변 영역 서열 및 SEQ ID NO:9의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 기준 항체(reference antibody)와 SAP와의 결합에 대해 경쟁하는 항원 결합 단백질 제공한다.
- [0016] 본 발명의 두 번째 양태에서, SAP에 결합하고, SEQ ID NO:3에 개시된 CDRH3 또는 CDRH3의 기능적 변이체를 포함하는 항원 결합 단백질이 제공된다.
- [0017] 본 발명의 세 번째 양태에서, SAP에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단백질이 제공되는데, 상기 항원 결합 단백질은 SEQ ID NO:7의 가변 도메인 서열의 상응하는 CDRH3 또는 CDRH3의 기능적 변이체를 포함하는 키메라 또는 인간화 항체이다.
- [0018] 본 발명의 네 번째 양태에서, SAP에 특이적으로 결합하고, SEQ ID NO:7의 케이뱃(Kabat) 잔기 95-101을 포함하는 결합 단위 H3 또는 결합 단위 H3의 기능적 변이체를 포함하는 항원 결합 단백질이 제공된다.
- [0019] 본 발명의 다섯 번째 양태에서, SAP에 특이적으로 결합하고, SEQ ID NO:27-31로부터 선택된 중쇄 가변 영역; 및 /또는 SEQ ID NO:34-36로부터 선택된 경쇄 가변 영역; 또는 75% 또는 그 초과 서열 동일성을 갖는 변이체 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 단백질이 제공된다.
- [0020] 본 발명의 여섯 번째 양태에서, SAP에 특이적으로 결합하고, SEQ ID NO:62의 중쇄; 및/또는 SEQ ID NO:64의 경쇄; 또는 75% 또는 그 초과 서열 동일성을 갖는 변이체 중쇄 또는 경쇄를 포함하는 항원 결합 단백질이 제공

된다.

[0021] 본 발명은 또한 본 발명의 항원 결합 단백질을 엔코딩하는 핵산 분자, 이를 포함하는 발현 벡터, 및 본 발명의 항원 결합 단백질을 생산할 수 있는 숙주 세포를 제공한다.

[0022] 본 발명의 추가 양태에서, 본원에 정의된 항원 결합 단백질을 포함하는 약학적 조성물이 제공된다. 본 발명은 또한 아밀로이드 침착과 관련된 질병에 걸리기 쉽거나 질병에 걸린 피검체를 예방 및/또는 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 예방적 또는 치료적 유효량의 항원 결합 단백질을 상기 피검체에게 투여하는 단계를 포함한다. 아밀로이드 침착과 관련된 질병에 걸리기 쉽거나 질병에 걸린 피검체를 예방 및/또는 치료하기 위한 본원에 기재된 항원 결합 단백질의 용도가 제공된다. 아밀로이드 침착과 관련된 질병에 걸리기 쉽거나 질병에 걸린 피검체를 예방 및/또는 치료하기 위한 약제의 제조에서 본원에 기재된 항원 결합 단백질의 용도가 또한 제공된다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 인간 SAP의 코팅 농도에서 무린 항체 SAP-E 및 SAP-K에 대한 결합 곡선을 도시한다.
 도 2는 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 인간 SAP의 코팅 농도에서 무린 항체 SAP-E 및 SAP-K에 대한 결합 곡선을 도시한다.
 도 3은 키메라 항체 cSAP-E 및 cSAP-K에 대한 결합 곡선을 도시한다. 키메라 항체에 대한 곡선의 프로파일은 동등한 하이브리도마의 것과 동일하다.
 도 4는 SAP-K 키메라에 비해 SAP-K HOLO, SAP-K H1L0, SAP-K H2L0 및 SAP-K H3L0에 대한 결합 곡선 그리고 SAP-E 키메라에 비해 SAP-E H1L1에 대한 결합 곡선을 도시한다. 무관한 인간 IgG1 카파 항체를 또한 네거티브 대조군으로서 시험하였다.
 도 5는 SAP-E 키메라와의 경쟁 ELISA에서 정제된 SAP-K 및 SAP-E 무린 모노클로날 항체를 도시한다.
 도 6은 SAP-K 키메라와의 경쟁 ELISA에서 정제된 SAP-K 및 SAP-E 무린 모노클로날 항체를 도시한다.
 도 7은 고정된 양 폴리클로날 항-인간 SAP 항체에 의해 포획된 인간 SAP에 대한 모노클로날 마우스 항체 SAP-E 및 SAP-K의 결합에 대한 면역방사측정법을 도시한다.
 도 8은 모노클로날 항-인간 SAP 항체 SAP-E에 대한 에피토프 맵핑(mapping)을 도시한다.
 도 9는 SAP-K (A, 검정색으로 강조됨) 및 SAP-E (B, 흰색으로 도시됨)에 의해 인지된 인간 SAP 상의 에피토프의 위치를 도시한다.
 도 10은 전체 인간 혈청에서 인간화 모노클로날 항-인간 SAP 항체에 의한 C3 활성화를 도시한다.
 도 11은 전체 인간 혈청에서 저용량 인간화 모노클로날 항-인간 SAP 항체에 의한 C3 활성화를 도시한다.
 도 12는 순수한 인간 SAP가 보충된 전체 마우스 혈청에서 인간화 모노클로날 항-인간 SAP 항체에 의한 C3 활성화를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] **발명의 상세한 설명**

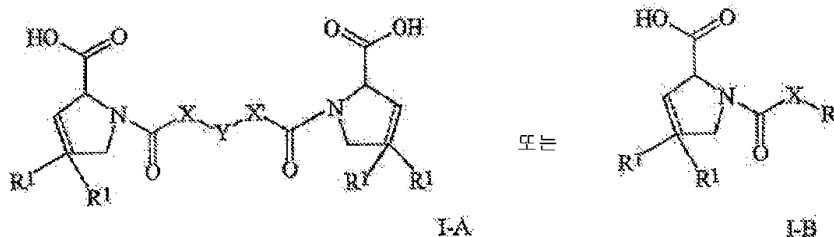
[0025] 본 발명은 혈청 아밀로이드 P 성분 (SAP), 예를 들어 인간 SAP에 결합하는 특이적 항원으로서의 (즉, SAP 결합 단백질) 항원 결합 단백질을 제공한다. 본 발명의 치료적 적용에서, 항원 결합 단백질은 조직으로부터의 비정상 조직과편의 제거를 위한 신체의 유력한 메카니즘을 활성화시킨다. 항원 결합 단백질은 항체, 예를 들어 모노클로날 항체일 수 있다. 본 발명의 항원 결합 단백질은 무린 항체가 아니다. 구체예에서, 본 발명의 항원 결합 단백질은 무린 항원 결합 단백질이 아니다. 특히, 본 발명의 항원 결합 단백질은 키메라, 인간화 또는 인간 항원 결합 단백질이다.

[0026] "혈청 아밀로이드 P 성분" 또는 "SAP"는 펜트라신 패밀리의 동중오합체 혈장 당단백질을 지칭한다. 각각의 분자는 5개의 동일한 프로모터로 구성되며, 각각은 시클릭 오합체 대칭을 갖는 디스크형 고리에 비공유적으로 결합된 평평한 β -젤리 롤 폴드 및 단일 알파 나선을 갖는다 (Hutchinson et al., (2000) Mol. Med., 6: 482-493); Pepys et al., (2002) Nature, 417: 254-259). 본원에서 사용된 용어 "SAP"는 또한 인간 유전자 APCS (염색체: 1; 위치: 1q21-q23) 또는 다른 유기체에서의 동중 유전자에 의해 엔코딩된 개별적인 서브유닛, 예를

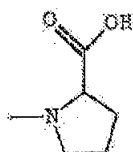
들어 SEQ ID NO:43에 개시된 서열을 갖는 인간 SAP 폴리펩티드 서브유닛뿐 아니라 SAP의 천연 오합체 형태, 및 생체내 아밀로이드 원섬유에 결합하는 생물학적 활성을 보유하는 SAP의 어떠한 단편 및 변이체를 포함한다.

[0027] 본 발명의 SAP 결합 단백질은 상기 기재된 상이한 형태의 SAP 중 어느 하나 또는 임의의 조합물에 결합할 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 항원 결합 단백질은 인간 SAP에 결합한다. SAP가 신체내 임의의 세포의 위치에서 임의의 유형의 아밀로이드 원섬유에 결합할 때 본 발명의 SAP 결합 단백질은 SAP에 결합할 수 있다. 본 발명의 항원 결합 단백질은 또한 결합되지 않은 천연 SAP에 결합할 수 있다.

[0028] 치료 방법에서 본 발명의 SAP-결합 단백질을 활용하는 본질적인 양태는 순환중인 SAP의 농도가 SAP-결합 단백질의 투여 전에 그 정상적인 값의 적어도 90% 이하로 감소되어야 한다는 것이다. 특히, 이것은 순환하는 SAP의 양을 감소시키는 화합물, 특히 본원에 "SAP 고갈 화합물"로서 정의된 순환하는 SAP의 고갈을 초래하는 화합물에 의해 달성될 수 있다. 그러한 화합물은 SAP에 의해 결합된 리간드이고 D-프롤린 유도체 및 글리세롤 시클릭 피루베이트 유도체와 같이 아밀로이드 원섬유에 대한 SAP의 결합의 경쟁적 억제제이다. D-프롤린 유도체는 그 전문이 본원에 참조로서 포함된 EP 0915088호에 기재되어 있고, 용어 "D-프롤린 유도체"는 그 전문이 또한 본원에 참조로서 포함된 WO 03/051836호에 기재된 것들과 같은 프로드럭을 포함한다. 하기 화학식의 D-프롤린 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 모노- 또는 다이에스테르가 고려된다:



[0029]



[0030] 상기 식에서, R은 이고;

[0031] R¹ 기는 수소 또는 할로젠이고;

[0032] X는 -(CH₂)_n-; -CH(R²)(CH₂)_n-; -CH₂O(CH₂)_n-; -CH₂NH-; -C(R²)=CH-; -CH₂CH(OH)-; 또는 티아졸-2,5-디일; 또는 -O-이고;

[0033] Y는 -S-S-; -(CH₂)_n-; -O-; -NH-; -N(R²)-; -CH=CH-; -NHC(O)NH-; -N(R²)C(O)N(R²)-; -N[CH₂C₆H₅(OCH₃)₂]-; -N(CH₂C₆H₅)-; -N(CH₂C₆H₅)C(O)N(CH₂C₆H₅)-; -N(알콕시알킬)-; N(시클로알킬-메틸)-; 2,6-피리딜; 2,5-푸라닐; 2,5-티에닐; 1,2-시클로헥실; 1,3-시클로헥실; 1,4-시클로헥실; 1,2-나프틸; 1,4-나프틸; 1,5-나프틸; 1,6-나프틸; 또는 1,2-페닐렌, 1,3-페닐렌 또는 1,4-페닐렌이고, 여기서 페닐렌기는 할로젠, 저급 알킬, 저급 알콕시, 히드록실, 카르복시, -COO-저급 알킬, 니트릴로, 5-테트라졸, (2-카르복실산 피롤리딘-1-일)-2-옥소-에톡시, N-히드록시카르브아미미오딜, 5-옥소[1,2,4]옥사디아졸릴, 2-옥소[1,2,3,5]옥사티아디아졸릴, 5-티옥소[1,2,4]옥사디아졸릴 및 5-3차-부틸설파닐-[1,2,4]옥사디아졸릴에서 선택된 1 내지 4개의 치환기로 치환되거나 치환되지 않고;

[0034] X'는 -(CH₂)_n-; -(CH₂)_nCH(R₂)-; -(CH₂)_nOCH₂-; -NHCH₂-; -CH=C(R²)-; CH(OH)CH₂; 또는 티아졸-2,5-디일; 또는 -O-이고;

[0035] R²는 저급 알킬, 저급 알콕시 또는 벤질이고;

[0036] n은 0 내지 3이고, 여기서

[0037] 알킬 또는 저급 알킬은 C₁₋₆ 알킬이고; 알콕시 또는 저급 알콕시는 C₁₋₆ 알콕시이며; 시클로알킬은 C₃₋₆ 시클로알킬이고; 할로젠은 F, Cl 또는 Br이며; 화학식에서 점선으로 나타낸 위치는 단일 또는 이중 결합이다.

- [0038] 상기 화학식 I-A의 D-프롤린은 리간드-링커-리간드로서 기록될 수 있고, 여기서 화학식 I-A의 X-Y-X' 모이어티(moiety)가 링커를 형성한다. 링커(X-Y-X')는 4-15개의 선형 탄소 원자, 5-10개의 선형 탄소 원자, 및 6-8개의 선형 탄소 원자 길이를 포함하는, 4 내지 20개의 선형 탄소 원자 길이일 수 있다. 링커는 직쇄 또는 분지쇄일 수 있거나, 4개 이상의 선형 또는 직쇄 탄소 원자가 링커에 존재하는 경우, 임의로 하나 이상의 고리 구조를 형성할 수 있다. 선형 또는 직쇄 C 원자들 중 하나 이상은 N, O, 또는 S로부터 선택된 하나 이상의 헤테로원자, 유리하게는 O 또는 S, 유리하게는 O로 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.
- [0039] 따라서, "치환되거나 치환되지 않은 링커"는 링커의 선형 또는 직쇄 탄소 원자들 중 탄소 원자(들)의 하나 이상의 치환 및/또는 분지를 초래하는 하나 이상의 치환을 가질 수 있고, 예컨대 링커는 에테르 또는 치환된 에테르일 수 있다.
- [0040] (R)-1-[6-[(R)-2-카르복시-피롤리딘-1-일]-6-옥소-헥사노일]피롤리딘-2-카르복실산(CPHPC)은 본 발명에서 고려되는 특수한 D-프롤린이다. 특정 구체예에서, CPHPC를 인간 환자에게 투여한다.
- [0041] 글리세롤 시클릭 피루베이트 유도체는 그 전문이 본원에 참조로서 포함된 WO 2004/099173호에 기재되어 있다.
- [0042] 본원에서 사용된 용어 "항원 결합 단백질"은 SAP에 결합할 수 있는 도메인과 같은 항체, 항체 단편 및 그 밖의 단백질 작제물을 지칭한다.
- [0043] 용어 "항체"는 가장 넓은 의미에서 면역글로불린-유사 도메인을 갖는 분자를 지칭하기 위해 본원에서 사용되며, 모노클로날, 재조합, 폴리클로날, 키메라, 인간화, 이종특이적 및 헤테로컨주게이트 항체; 단일 가변 도메인, 도메인 항체, 항원 결합 단편, 면역학적으로 효과적인 단편, 단일 체 Fv, 디아보디(diabody), Tandabs™ 등 (대안적인 "항체" 포맷의 개요에 관해 문헌[Holliger and Hudson, Nature Biotechnology, 2005, Vol 23, No. 9, 1126-1136] 참조)을 포함한다.
- [0044] 어구 "단일 가변 도메인"은 상이한 가변 영역 또는 도메인에 무관하게 항원 또는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단백질 가변 도메인 (예를 들어, VH, VHH, VL)을 지칭한다.
- [0045] "도메인 항체" 또는 "dAb"는 항원에 결합할 수 있는 "단일 가변 도메인"과 동일하게 고려될 수 있다. 단일 가변 도메인은 인간 항체 가변 도메인일 수 있지만, 설치류 (예를 들어, WO 00/29004에 기재된 바와 같음), 너스샤크(nurse shark) 및 카멜리드(Camelid) V_H dAb와 같은 다른 종으로부터의 단일 항체 가변 도메인을 또한 포함한다. 카멜리드 V_H는, 본래 경쇄가 없는 중쇄 항체를 생성시키는, 낙타, 라마(llama), 알파카(alpaca), 단봉낙타(dromedary) 및 과나코(guanaco)를 포함하는 종으로부터 유래된 면역글로불린 단일 가변 도메인 폴리펩티드이다. 이러한 V_H 도메인은 당 분야에서 이용가능한 표준 기술에 따라 인간화될 수 있고, 그러한 도메인은 "도메인 항체"로 간주된다. 본원에서 사용되는 경우, V_H는 카멜리드 V_H 도메인을 포함한다.
- [0046] 본원에서 사용된 용어 "도메인"은 폴딩된 단백질 구조를 지칭하는데, 이러한 구조는 단백질의 나머지 부분과 무관한 3차 구조를 지닌다. 일반적으로, 도메인은 단백질의 구별된 기능적 특성을 담당하고, 많은 경우에 그러한 단백질의 잔여 부분 및/또는 도메인의 기능 상실없이 다른 단백질로 첨가되거나 제거되거나 이동될 수 있다. "단일 가변 도메인"은 항체 가변 도메인의 특징적인 서열을 포함하는 폴딩된 폴리펩티드 도메인이다. 따라서, 이는 완전한 항체 가변 도메인 및 변형된 가변 도메인, 예를 들어 하나 이상의 루프가 항체 가변 도메인의 특징이 아닌 서열에 의해 대체된 가변 도메인, 또는 트렁케이션되거나 N- 또는 C-말단 연장부를 포함하는 항체 가변 도메인 뿐만 아니라 적어도 전장 도메인의 결합 활성 및 특이성을 보유하는 가변 도메인의 폴딩된 단편을 포함한다. 도메인은 상이한 가변 영역 또는 도메인과 무관하게 항원 또는 에피토프에 결합할 수 있다.
- [0047] 항원 결합 단편은 도메인과 같은 비-항체 단백질 스캐폴드 상에 하나 이상의 CDR의 정렬에 의해 제공될 수 있다. 도메인은 도메인 항체일 수 있거나, 천연 리간드 이외에, SAP와 같이, 항원에 대한 결합을 획득하기 위해 단백질 공학처리된, CTLA-4, 리포칼린(lipocalin), SpA, 애프바디(Affibody), 아비머(avimer), GroEl, 트랜스페린, GroES 및 피브로넥틴/아드넥틴(fibronectin/adnectin)으로 구성된 군으로부터 선택된 스캐폴드의 유도체인 도메인일 수 있다.
- [0048] 항원 결합 단편 또는 면역학적으로 효과적인 단편은 부분적인 중쇄 또는 경쇄 가변 서열을 포함할 수 있다. 단편은 적어도 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 길이이다. 대안적으로, 단편은 적어도 15개, 적어도 20개, 적어도 50개, 적어도 75개, 또는 적어도 100개의 아미노산 길이이다.
- [0049] 항원 결합 단백질에 관해 본 명세서에 걸쳐 사용된 용어 "특이적으로 결합하는"이란 항원 결합 단백질이, 인간

에서 잔기 아미노산 서열 동일성에 대해 55%의 엄격한 잔기를 공유하고 본질적으로 동일한 단백질 폴딩을 갖는 C-반응성 단백질 (CRP)과 같은 밀접하게 관련된 분자를 포함하는 어떠한 다른 단백질에 대한 결합 없이 또는 대단치 않은 결합을 지니며, SAP에 결합하는 것을 의미한다.

- [0050] 항원 결합 단백질-SAP 상호작용의 평형 분리 상수 (KD)는 1 mM 또는 그 미만, 100 nM 또는 그 미만, 10 nM 또는 그 미만, 2 nM 또는 그 미만, 또는 1 nM 또는 그 미만일 수 있다. 대안적으로, KD는 5 내지 10 nM; 또는 1 내지 2 nM일 수 있다. KD는 1 pM 내지 500 pM; 또는 500 pM 내지 1 nM일 수 있다.
- [0051] 예를 들어, 일차 아민 커플링에 의한 카르복시메티텍스트란 칩 상에 커플링된 SAP를 이용한 항원 포획 및 그 표면 상에 항체 포획에 의해, 결합 친화도를 BIAcore™에 의해 측정할 수 있다. 대안적으로, 결합 친화도는, CM5 칩 상에 고정된 O-포스포에탄올아민에 의해 포획된 인간 SAP에 대한 항-SAP 항체의 결합에 의해 BIAcore™에 의해 측정될 수 있다. 실시예 8에 기재된 BIAcore™ 방법을 이용하여 결합 친화도를 측정할 수 있다.
- [0052] 분리율 상수 (kd)는 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 또는 그 미만, $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 또는 그 미만, 또는 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 또는 그 미만일 수 있다. kd는 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 내지 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; 또는 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 내지 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 일 수 있다. 낮은 kd는 항원 결합 단백질-리간드 복합체의 느린 분리 및 아밀로이드에 결합된 SAP 복합체의 개선된 제거를 초래할 수 있다.
- [0053] 용어 "유래된"은 물질에 대한 물리적 기원이라는 의미로 공급원(source)을 정의할 뿐만 아니라 그러한 물질과 구조적으로 동일하지만 참조 공급원(reference source)으로부터 비롯되지 않은 물질도 정의하고자 한다. 따라서, "도너 항체에서 발견되는 잔기들"이 반드시 도너 항체에서 정제된 것일 필요는 없다.
- [0054] "단리된"이라는 것은, 항원 결합 단백질과 같은 분자가 이것이 자연에서 발견될 수 있는 환경으로부터 제거된 것을 의미한다. 예를 들어, 분자는 자연에서 보통 이것을 지니도록 존재할 물질로부터 정제될 수 있다. 예를 들어, 샘플 중 분자의 질량은 총 질량의 95%일 수 있다.
- [0055] "키메라 항체"는 엑셉터 항체로부터 유래된 경쇄 및 중쇄 불변 영역과 관련하여 도너 항체로부터 유래된 천연 발생 가변 영역 (경쇄 및 중쇄)를 함유하는 공학처리된 항체의 유형을 지칭한다.
- [0056] "인간화 항체"는 비-인간 도너 면역글로불린으로부터 유래된 CDR을 갖는 공학처리된 항체의 유형을 지칭하며, 분자의 나머지 면역글로불린-유래 부분은 하나 이상의 인간 면역글로불린(들)으로부터 유래된다. 또한, 프레임워크 지지 잔기는 결합 친화도를 보존하도록 변경될 수 있다 (예컨대, 문헌[Queen et al. Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al. Bio/Technology, 9:421 (1991)] 참조). 적합한 인간 엑셉터 항체는 도너 항체의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열과의 상동성에 의한 통상적인 데이터베이스, 예컨대 케이벳® 데이터베이스, Los Alamos 데이터베이스, 및 Swiss Protein 데이터베이스로부터 선택될 것일 수 있다. 도너 항체 (아미노산 기재상)의 프레임워크 영역에 대한 상동성을 특징으로 하는 인간 항체가 도너 CDR의 삽입을 위한 중쇄 불변 영역 및/또는 중쇄 가변 프레임워크 영역을 제공하는데 적합할 수 있다. 경쇄 불변 또는 가변 프레임워크 영역을 공유할 수 있는 적합한 엑셉터 항체가 유사한 방식으로 선택될 수 있다. 엑셉터 항체 중쇄 및 경쇄가 동일한 엑셉터 항체로부터 비롯될 필요는 없음을 주목하여야 한다. 종래 기술은 그러한 인간화 항체를 생산하는 여러 방법을 기재한다 - 예를 들어 EP-A-0239400호 및 EP-A-054951호 참조.
- [0057] 용어 "도너 항체"는 첫 번째 면역글로불린 파트너에 대한 가변 영역, CDR 또는 이들의 그 밖의 기능성 단편 또는 유사체의 아미노산 서열을 제공하는 항체를 지칭한다. 따라서, 도너는 변경된 면역글로불린 코딩 영역 및 그로 인해 발현된 도너 항체의 특징적인 항원성 특이성 및 중화 활성을 갖는 변경된 항체를 제공한다.
- [0058] 용어 "엑셉터 항체"는 첫 번째 면역글로불린 파트너에 대한 중쇄 및/또는 경쇄 프레임워크 영역 및/또는 중쇄 및/또는 경쇄 불변 영역을 엔코딩하는 모든 (또는 어떠한 부분의) 아미노산 서열을 제공하는 도너 항체에 이종성인 항체를 지칭한다. 인간 항체가 엑셉터 항체일 수 있다.
- [0059] 용어 "인간 항체"는 인간 면역글로불린 유전자 서열로부터 유래된 항체를 지칭한다. 이러한 완전한 인간 항체는 낮은 면역원성의 치료 항체의 공급원으로서 재공학처리되거나 탈면역화된 설치류 모노클로날 항체 (예컨대, 인간화 항체)에 대한 대안을 제공하고 이들은 일반적으로 파아지 디스플레이 또는 유전자이식 마우스 플랫폼을 이용하여 생성된다. 구체예에서, 본 발명의 항체는 인간 항체이다.
- [0060] 용어 "V_H" 및 "V_L"은 항원 결합 단백질의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 각각 지칭하기 위해 본원에서 사용된다.

[0061] "CDR"은 항원 결합 단백질의 상보성 결정 영역 아미노산 서열로서 정의된다. 이들은 번역글로불린 중쇄 및 경쇄의 과가변 영역이다. 번역글로불린의 가변 부분에는 세 개의 중쇄와 세 개의 경쇄 CDR (또는 CDR 영역)이 존재한다. 따라서, "CDR"은 세 개 모두의 중쇄 CDR, 세 개 모두의 경쇄 CDR, 모든 중쇄와 경쇄 CDR, 또는 적어도 두 개의 CDR을 지칭하기 위해 본원에서 사용된다.

[0062] 본 명세서 전반에 걸쳐서, 가변 도메인 서열 및 전장 항체 서열에서 아미노산 잔기는 케이벳 넘버링 관례에 따라 넘버링된다. 유사하게, 실시예에 사용된 용어 "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3"은 케이벳 넘버링 관례에 따른다. 추가 정보를 위해, 문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)]을 참조한다.

[0063] 그러나, 본 명세서 전반에 걸쳐 가변 도메인 서열 및 전장 항체 서열에서의 아미노산 잔기에 대해 케이벳 넘버링 관례를 이용하지만, 가변 도메인 서열 및 전장 항체 서열의 아미노산 잔기에 대해 대안적인 넘버링 관례가 존재함이 당업자에게 자명할 것이다. 문헌[Chothia et al. (1989) Nature 342: 877-883]에 개시된 것들과 같은 CDR 서열에 대한 대안적인 넘버링 관례가 또한 존재한다. 항체의 구조 및 단백질 폴딩은 그 밖의 잔기가 CDR 서열의 일부로 고려됨을 의미할 수 있고 당업자에 의해 그렇게 이해될 것이다.

[0064] 당업자에게 이용가능한 CDR 서열에 대한 그 밖의 넘버링 관례는 "AbM" (University of Bath) 및 "컨택 (Contact)"(University College London) 방법을 포함한다. "최소 결합 단위"를 제공하기 위해 케이벳, 코티아 (Chothia), AbM 및 컨택 방법들 중 둘 이상을 이용하여 최소 중첩 영역을 결정할 수 있다. 최소 결합 단위는 CDR의 서브-부분일 수 있다.

[0065] 하기 표 1은 각각의 CDR 또는 결합 단위에 대한 각각의 넘버링 관례를 이용한 한 가지 정의를 나타낸다. 케이벳 넘버링 계획을 이용하여 표 1에서 가변 도메인 아미노산 서열을 넘버링하였다. CDR 정의 중 일부는 사용된 개별적인 간행물에 따라 다양할 수 있음이 인지되어야 한다.

[0066] 표 1

	케이벳 CDR	코티아 CDR	AbM CDR	컨택 CDR	최소 결합 단위
H1	31-35/35A/35B	26-32/33/34	26-35/35A/35B	30-35/35A/35B	31-32
H2	50-65	52-56	50-58	47-58	52-56
H3	95-102	95-102	95-102	93-101	95-101
L1	24-34	24-34	24-34	30-36	30-34
L2	50-56	50-56	50-56	46-55	50-55
L3	89-97	89-97	89-97	89-96	89-96

[0067]

[0068] 본원에서 사용된 용어 "항원 결합 부위"는 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 단백질 상의 부위를 지칭한다. 이것은 단일 도메인 (예를 들어, 에피토프-결합 도메인), 또는 단일-쇄 Fv (ScFv) 도메인일 수 있거나, 표준 항체 상에서 발견될 수 있는 페어링된(paired) V_H/V_L 도메인일 수 있다.

[0069] 본원에서 사용된 용어 "에피토프"는 항원 결합 단백질의 특정 결합 도메인과 접촉하고 있는 항원의 부분을 지칭한다. 에피토프는 항원으로부터의 본래 선형 아미노산 서열을 포함하여, 선형일 수 있다. 대안적으로, 에피토프는 입체구조적이거나(conformational) 불연속(discontinuous)일 수 있다. 예를 들어, 입체구조적 에피토프는 구조적 제약의 요소를 요구하는 아미노산 잔기를 포함한다. 입체구조적 에피토프의 경우에, 비록 잔기가 펩티드 쇠의 다른 영역으로부터 비롯될 수 있으나, 이들은 항원의 3차원 구조에서 근접하여 존재할 수 있다. SAP와 같은 다합체 항원의 경우, 입체구조적 에피토프는 항원의 3차원 구조에서 근접하여 존재할 수 있는 상이한 펩티드 쇠로부터의 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 구조적으로 인접한 잔기들은 컴퓨터 모델링 프로그램을 통해 결정되거나, X선 결정학과 같은 당 분야에 공지된 방법들을 통해 획득된 3차원 구조에 의해 결정될 수 있다.

[0070] 불연속 에피토프는 다른 서열에 의해 분리된 아미노산 잔기를 포함하고, 즉 항원의 일차 서열에서 연속 서열이 아니다. 항원의 3차 및 4차 구조와 관련하여, 불연속 에피토프의 잔기들은 항원 결합 단백질에 의해 서로 결합하기에 충분할 정도로 가까이 있다.

[0071] 구체예에서, 본 발명의 항원 결합 단백질은 인간 SAP의 잔기 140-158내에서 에피토프에 결합한다.

- [0072] 뉴클레오티드 및 아미노산 서열의 경우, "동일한" 또는 "서열 동일성"이란 용어는 적절한 삽입 또는 결실과 관련하여 최적으로 정렬되고 비교된 경우 두 개의 핵산 서열 또는 두 개의 아미노산 서열 간의 동일성 정도를 나타낸다.
- [0073] 두 개의 서열 간의 동일성 퍼센트는 그러한 두 개 서열의 최적 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 갭(gap)의 개수 및 각각의 갭의 력스(length)를 고려한, 상기 서열들이 공유하는 동일한 위치들의 개수의 함수이다 (즉, % 동일성 = 동일한 위치 개수/전체 위치 개수 x 100). 서열들의 비교 및 두 개 서열 간의 동일성 퍼센트의 측정은 하기 기재된 수학적 알고리즘을 이용하여 달성될 수 있다.
- [0074] 두 개의 뉴클레오티드 서열 간의 동일성 퍼센트는, NWSgapdna.CMP 매트릭스 및 40, 50, 60, 70 또는 80의 갭 웨이트(gap weight) 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 력스 웨이트(length weight)를 사용하는, GCG 소프트웨어 패키지 중의 GAP 프로그램을 사용하여 측정될 수 있다. 두 개의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 간의 동일성 퍼센트는, PAM120 웨이트 잔기 표, 12의 갭 력스 패널티 및 4의 갭 패널티를 사용하는, ALIGN 프로그램 (버전 2.0)으로 통합된 이. 메이어스(E. Meyers)와 더블유. 밀러(W. Miller)의 알고리즘 (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988))을 사용하여 또한 측정될 수 있다. 또한, 두 개의 아미노산 서열 간의 동일성 퍼센트는, Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스 및 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 갭 웨이트 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 력스 웨이트를 사용하는, GCG 소프트웨어 패키지 중의 GAP 프로그램으로 통합된 니들만(Needleman)과 분쉬(Wunsch) (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) 알고리즘을 사용하여 측정될 수 있다.
- [0075] 예로서, 폴리뉴클레오티드 서열은 본원에 기재된 기준 폴리뉴클레오티드 서열 (예를 들어, SEQ ID NO:8, 10, 18, 20, 45-48, 51-61, 63, 65-73 참조)과 동일할 수 있고, 즉, 100% 동일하거나, 상기 기준 서열과 비교하여 특정 정수 이하의 뉴클레오티드 변화를 포함할 수 있는데, 예를 들어 적어도 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일할 수 있다. 이러한 변화는 하나 이상의 뉴클레오티드 결실, 트랜지션(transition)과 트랜스버전(transversion)을 포함하는 치환, 또는 삽입으로 구성된 군으로부터 선택되며, 상기 변화는 상기 기준 서열의 뉴클레오티드 사이에 개별적으로 산재되거나 상기 기준 서열내의 하나 이상의 연속된 그룹에 산재된 형태로 상기 기준 폴리뉴클레오티드 서열의 5' 또는 3' 말단 위치에서 일어날 수 있거나, 이들 말단 위치 사이의 임의의 위치에서 일어날 수 있다. 뉴클레오티드 변화의 개수는, 본원에 기재된 기준 폴리뉴클레오티드 서열 (예를 들어, SEQ ID NO:8, 10, 18, 20, 45-48, 51-61, 63, 65-73 참조)의 전체 뉴클레오티드 개수와 각각의 동일성 퍼센트의 퍼센트 수치 (100으로 나눈 값)를 곱한 후, 본원에 기재된 기준 폴리뉴클레오티드 서열 (예를 들어, SEQ ID NO:8, 10, 18, 20, 45-48, 51-61, 63, 65-73 참조)의 상기 전체 뉴클레오티드 개수에서 이러한 적(積)을 뺀으로써 결정되거나; 하기 식에 의해 결정된다:
- [0076]
$$n_n \leq x_n - (x_n \cdot y)$$
- [0077] 상기 식에서, n_n 은 뉴클레오티드 변화의 개수이고, x_n 은 본원에 기재된 기준 폴리뉴클레오티드 서열 (예를 들어, SEQ ID NO:8, 10, 18, 20, 45-48, 51-61, 63, 65-73 참조)의 전체 뉴클레오티드 개수이고, y 는, 50%인 경우 0.50이고, 60%인 경우 0.60이고, 70%인 경우 0.70이고, 75%인 경우 0.75이고, 80%인 경우 0.80이고, 85%인 경우 0.85이고, 90%인 경우 0.90이고, 95%인 경우 0.95이고, 98%인 경우 0.98이고, 99%인 경우 0.99이고, 100%인 경우 1.00이다. \cdot 는 곱셈 연산자에 대한 기호이며, x_n 과 y 의 임의의 정수 이외의 적(積)은 x_n 로부터의 뺄셈 전에 우수리를 잘라서 최근접 정수가 되게 한다.
- [0078] 유사하게는, 폴리펩티드 서열은 본원에 기재된 폴리펩티드 기준 서열 (예를 들어, SEQ ID NO:1-7, 9, 11-17, 19, 21-24, 27-31, 34-42, 62, 64, 74 참조)과 동일할 수 있고, 즉, 100% 동일하거나, 상기 기준 서열과 비교하여 특정 정수 이하의 아미노산 변화를 포함할 수 있는데, % 동일성은 100% 미만, 예를 들어 적어도 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일하다. 이러한 변화는 하나 이상의 아미노산 결실, 보존적 치환과 비보존적 치환을 포함하는 치환, 또는 삽입으로 구성된 군으로부터 선택되며, 상기 변화는 상기 기준 서열의 아미노산 사이에 개별적으로 산재되거나 상기 기준 서열내의 하나 이상의 연속된 그룹에 산재된 형태로 상기 기준 폴리펩티드 서열의 아미노-말단 또는 카르복시-말단 위치에서 일어날 수 있거나, 이들 말단 위치 사이의 임의의 위치에서 일어날 수 있다. 아미노산 변화의 개수는, 본원에 기재된 폴리펩티드 기준 서열 (예를 들어, SEQ ID NO:1-7, 9, 11-17, 19, 21-24, 27-31, 34-42, 62, 64, 74 참조)에 의해 엔코딩된 폴리펩티드 서열의 전체 아미노산 개수와 각각의 동일성 퍼센트의 퍼센트 수치 (100으로 나눈 값)를 곱한 후, 본원에 기재된 폴리펩티드 기준 서열 (예를 들어, SEQ ID NO:1-7, 9, 11-17, 19, 21-24, 27-31, 34-42, 62, 64, 74 참조)의 상기 전체 아미노산 개수에서 이러한 적(積)을 뺀으로써 결정되거나; 하기 식에 의해 결정된다:

[0079] $n_a \leq x_a - (x_a \cdot y)$

[0080] 상기 식에서, n_a 는 아미노산 변화의 개수이고, x_a 는 본원에 기재된 기준 폴리펩티드 서열 (예를 들어, SEQ ID NO:1-7, 9, 11-17, 19, 21-24, 27-31, 34-42, 62, 64, 74 참조)의 전체 아미노산 개수이고, y 는, 50%인 경우 0.50이고, 60%인 경우 0.60이고, 70%인 경우 0.70이고, 75%인 경우 0.75이고, 80%인 경우 0.80이고, 85%인 경우 0.85이고, 90%인 경우 0.90이고, 95%인 경우 0.95이고, 98%인 경우 0.98이고, 99%인 경우 0.99이고, 100%인 경우 1.00이다. \cdot 는 곱셈 연산자에 대한 기호이며, x_a 와 y 의 임의의 정수 이외의 적(積)은 x_a 로부터의 뺄셈 전에 우수리를 잘라서 최근접 정수가 되게 한다.

[0081] % 동일성은 서열의 길이에 걸쳐 측정할 수 있다.

[0082] 용어 "펩티드", "폴리펩티드" 및 "단백질" 각각은 둘 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 분자를 지칭한다. 펩티드는 단량체 또는 다량체일 수 있다.

[0083] 특정한 아미노산 치환은 "보존적"인 것으로 간주된다는 것이 당 분야에 널리 인식되어 있다. 아미노산은 공통의 측쇄 특성을 기초로 하여 몇몇 그룹으로 분류되고, 항원 결합 단백질의 결합 친화도를 전부 보유하거나 실질적으로 전부 보유하는 그룹내에서의 치환은 보존적 치환으로서 간주되는데, 이에 대해서는 하기 표 2가 참조된다:

[0084] 표 2

측쇄	구성원
소수성	Met, Ala, Val, Leu, Ile
중성 친수성	Cys, Ser, Thr
산성	Asp, Glu
염기성	Asn, Gln, His, Lys, Arg
쇄 배향에 영향을 미치는 잔기	Gly, Pro
방향족	Trp, Tyr, Phe

[0085]

[0086] 항원 결합 단백질은 SEQ ID NO:7의 측쇄 가변 영역 서열 및 SEQ ID NO:9의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 기준 항체와 SAP와의 결합에 대해 경쟁할 수 있다. 대안적으로 항원 결합 단백질은 SEQ ID NO:17의 측쇄 가변 영역 서열 및 SEQ ID NO:19의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 기준 항체와 SAP와의 결합에 대해 경쟁할 수 있다.

[0087] 항원 결합 단백질과 기준 항체 간의 경쟁은 경쟁 ELISA, FMAT 또는 BIAcore에 의해 측정될 수 있다. 경쟁적인 항원 결합 단백질은 동일한 에피토프, 중첩 에피토프, 또는 기준 항체가 결합하는 에피토프와 근접한 위치에 있는 에피토프에 결합할 수 있다.

[0088] 본 발명은 또한 SAP에 특이적으로 결합하고 SEQ ID NO:3의 CDRH3 또는 이의 변이형 CDR을 포함하는 항원 결합 단백질을 제공한다. 항원 결합 단백질은 CDRH1 (SEQ ID NO:1), CDRH2 (SEQ ID NO:2), CDRL1 (SEQ ID NO:4), CDRL2 (SEQ ID NO:5), 및 CDRL3 (SEQ ID NO:6); 또는 이들의 변이체로부터 선택된 하나 이상의 CDR, 또는 모든 CDR들을 임의의 조합으로 추가로 포함할 수 있다.

[0089] 예를 들어, 항원 결합 단백질은 CDRH3 (SEQ ID NO:3) 및 CDRH1 (SEQ ID NO:1), 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질은 CDRH3 (SEQ ID NO:3) 및 CDRH2 (SEQ ID NO:2), 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질은 CDRH1 (SEQ ID NO:1) 및 CDRH2 (SEQ ID NO:2), 및 CDRH3 (SEQ ID NO:3), 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다.

[0090] 항원 결합 단백질은 CDRL1 (SEQ ID NO:4) 및 CDRL2 (SEQ ID NO:5), 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질은 CDRL2 (SEQ ID NO:5) 및 CDRL3 (SEQ ID NO:6), 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질은 CDRL1 (SEQ ID NO:4), CDRL2 (SEQ ID NO:5) 및 CDRL3 (SEQ ID NO:6), 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다.

[0091] 항원 결합 단백질은 CDRH3 (SEQ ID NO:3) 및 CDRL3 (SEQ ID NO:6), 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질은 CDRH3 (SEQ ID NO:3), CDRH2 (SEQ ID NO:2) 및 CDRL3 (SEQ ID NO:6), 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질은 CDRH3 (SEQ ID NO:3), CDRH2 (SEQ ID NO:2), CDRL2 (SEQ ID NO:5) 및 CDRL3 (SEQ ID NO:6), 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다.

- [0092] 항원 결합 단백질은 CDRH1 (SEQ ID NO:1), CDRH2 (SEQ ID NO:2), CDRH3 (SEQ ID NO:3), CDRL1 (SEQ ID NO:4), CDRL2 (SEQ ID NO:5) 및 CDRL3 (SEQ ID NO:6), 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0093] 본 발명은 또한 SAP에 특이적으로 결합하고 SEQ ID NO:13의 CDRH3 또는 이의 변이형 CDR을 포함하는 항원 결합 단백질을 제공한다. 항원 결합 단백질은 CDRH1 (SEQ ID NO:11), CDRH2 (SEQ ID NO:12), CDRL1 (SEQ ID NO:14), CDRL2 (SEQ ID NO:15), 및 CDRL3 (SEQ ID NO:16); 또는 이들의 변이체로부터 선택된 하나 이상의 CDR, 또는 모든 CDR들을 임의의 조합으로 추가로 포함할 수 있다.
- [0094] 본 발명은 또한 SAP에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단백질을 제공하고, 여기서 항원 결합 단백질은 SEQ ID NO:7의 가변 도메인 서열의 상응하는 CDRH3, 또는 변이형 CDRH3을 포함하는 키메라 또는 인간화 항체이다.
- [0095] 키메라 또는 인간화 항원 결합 단백질은 SEQ ID NO:7 또는 SEQ ID NO:9의 가변 도메인 서열로부터 선택된 상응하는 CDR, 또는 이의 변이형 CDR 중의 하나 이상, 또는 전부를 추가로 포함할 수 있다.
- [0096] 예를 들어, 항원 결합 단백질은 상응하는 CDRH3 및 상응하는 CDRH1, 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질은 상응하는 CDRH3 및 상응하는 CDRH2, 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질은 상응하는 CDRH1, 상응하는 CDRH2, 및 상응하는 CDRH3; 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0097] 항원 결합 단백질은 상응하는 CDRL1 및 상응하는 CDRL2, 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질은 상응하는 CDRL2 및 상응하는 CDRL3, 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질은 상응하는 CDRL1, 상응하는 CDRL2 및 상응하는 CDRL3, 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0098] 항원 결합 단백질은 상응하는 CDRH3 및 상응하는 CDRL3, 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질은 상응하는 CDRH3, 상응하는 CDRH2 및 상응하는 CDRL3, 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질은 상응하는 CDRH3, 상응하는 CDRH2, 상응하는 CDRL2 및 상응하는 CDRL3, 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0099] 항원 결합 단백질은 상응하는 CDRH1, 상응하는 CDRH2, 상응하는 CDRH3, 상응하는 CDRL1, 상응하는 CDRL2 및 상응하는 CDRL3, 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0100] 상응하는 CDR은 케이벳 (1987), 코티아 (1989), AbM 또는 컨택 방법, 또는 이러한 방법들의 조합에 기준하여 정의될 수 있다. 각각의 방법의 한 가지 정의를 표 1에서 찾아볼 수 있고 기준 중쇄 가변 도메인 SEQ ID NO:7 및 기준 경쇄 가변 도메인 SEQ ID NO:9에 적용시켜 상응하는 CDR을 결정할 수 있다.
- [0101] 본 발명은 또한 SAP에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단백질을 제공하며, 여기서 항원 결합 단백질은 SEQ ID NO:17의 가변 도메인 서열의 상응하는 CDRH3, 또는 변이형 CDRH3을 포함하는 키메라 또는 인간화 항체이다.
- [0102] 키메라 또는 인간화 항원 결합 단백질은 SEQ ID NO:17 또는 SEQ ID NO:19의 가변 도메인 서열로부터 선택된 상응하는 CDR, 또는 이의 변이체 CDR 중 하나 이상 또는 전부를 추가로 포함할 수 있다.
- [0103] 본 발명은 또한 SAP에 특이적으로 결합하고 SEQ ID NO:7의 케이벳 잔기 95-101를 포함하는 결합 단위 H3 또는 변이형 H3을 포함하는 항원 결합 단백질을 제공한다. 항원 결합 단백질은 SEQ ID NO:7의 케이벳 잔기 31-32를 포함하는 H1, SEQ ID NO:7의 케이벳 잔기 52-56을 포함하는 H2, SEQ ID NO:9의 케이벳 잔기 30-34를 포함하는 L1, SEQ ID NO:9의 케이벳 잔기 50-55를 포함하는 L2 및 SEQ ID NO:9의 케이벳 잔기 89-96을 포함하는 L3; 또는 변이형 결합 단위로부터 선택된 하나 이상의 결합 단위 또는 모든 결합 단위를 추가로 포함할 수 있다.
- [0104] 예를 들어, 항원 결합 단백질은 결합 단위 H3 및 결합 단위 H1, 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질은 결합 단위 H3 및 결합 단위 H2, 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질은 결합 단위 H1, 결합 단위 H2, 및 결합 단위 H3; 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0105] 항원 결합 단백질은 결합 단위 L1 및 결합 단위 L2, 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질은 결합 단위 L2 및 결합 단위 L3, 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질은 결합 단위 L1, 결합 단위 L2, 및 결합 단위 L3; 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0106] 항원 결합 단백질은 결합 단위 H3 및 결합 단위 L3, 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질은 결합 단위 H3, 결합 단위 H2, 및 결합 단위 L3; 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질은 결합 단위 H3, 결합 단위 H2, 결합 단위 L2, 및 결합 단위 L3; 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0107] 항원 결합 단백질은 결합 단위 H1, 결합 단위 H2, 결합 단위 H3, 결합 단위 L1, 결합 단위 L2, 및 결합 단위

L3; 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다.

- [0108] 본 발명은 또한 SAP에 특이적으로 결합하고, SEQ ID NO:17의 케이벳 잔기 95-101을 포함하는 결합 단위 H3 또는 변이형 H3을 포함하는 항원 결합 단백질을 제공한다. 항원 결합 단백질은 SEQ ID NO:17의 케이벳 잔기 31-32를 포함하는 H1, SEQ ID NO:17의 케이벳 잔기 52-56을 포함하는 H2, SEQ ID NO:19의 케이벳 잔기 30-34를 포함하는 L1, SEQ ID NO:19의 케이벳 잔기 50-55를 포함하는 L2 및 SEQ ID NO:19의 케이벳 잔기 89-96을 포함하는 L3; 또는 변이형 결합 단위로부터 선택된 하나 이상의 결합 단위 또는 모든 결합 단위를 추가로 포함할 수 있다.
- [0109] CDR 변이체 또는 변이형 결합 단위는 하나 이상의 아미노산에 의해 변형된 아미노산 서열을 포함하는데, 상기 변형은 아미노산 서열의 (예를 들어, 10개 이하의 아미노산에 의한) 화학적 또는 부분적 변화일 수 있고, 그러한 변형은 변이체로 하여금 변형되지 않은 서열의 생물학적 특성을 보유하도록 한다. 예를 들어, 변이체는 SAP에 특이적으로 결합하고 조직으로부터 아밀로이드에 결합된 SAP의 복합체의 제거를 활성화시키는 기능적 변이체이다. CDR 아미노산 서열의 부분적 변화는 1개 내지 수 개의 아미노산의 결실 또는 치환에 의하거나, 1개 내지 수 개의 아미노산의 부가 또는 삽입에 의하거나, 이들의 조합에 의해서 (예를 들어, 10개 이하의 아미노산에 의해) 일어날 수 있다. CDR 변이체 또는 결합 단위 변이체는 아미노산 서열에서 어떠한 조합으로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 함유할 수 있다. CDR 변이체 또는 결합 단위 변이체는 아미노산 서열에서 어떠한 조합으로 1개, 2개 또는 3개의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 함유할 수 있다. 아미노산 잔기의 치환은 보존적 치환일 수 있는데, 예를 들어 하나의 소수성 아미노산이 또 다른 소수성 아미노산으로 치환되는 것이다. 예를 들어, 류신은 발린 또는 이소류신으로 치환될 수 있다.
- [0110] 본원에 기재된 CDR, 상응하는 CDR, 변이형 CDR 또는 결합 단위들 중 하나 이상인, 예를 들어 인간화 또는 키메라 가변 도메인으로서 인간 프레임워크와 관련하여 존재할 수 있다. 본원에 기재된 CDR, 상응하는 CDR, 변이형 CDR 또는 결합 단위들 중 하나 이상을 포함하는 완전한 인간 항체가 또한 고려되며 본 발명의 범위내에 있다.
- [0111] CDR L1, L2, L3, H1 및 H2는 구조적으로 한정된 수의 주요 쇠 입체형태 중 하나를 나타내는 경향이 있다. CDR의 특정 캐노니컬(canonical) 구조 부류는 CDR 및 프레임워크 영역 둘 모두에서의 중요한 위치에 정위된 잔기에 의해 결정된, CDR의 길이 및 로프 패키징 둘 모두에 의해 정의된다 (구조적 결정성 잔기 또는 SDR). 마틴 및 손톤(Martin and Thornton) (1996; J Mol Biol 263:800-815)은 "중요한 잔기" 캐노니컬 주형을 정의하기 위한 자동 방법을 생성하였다. 클러스터 분석을 이용하여 CDR의 세트에 대한 캐노니컬 부류를 정의한 후, 매몰(buried) 소수성물질(hydrophobics), 수소-결합 잔기, 및 보존된 글리신 및 프롤린을 분석함에 의해 캐노니컬 주형을 동정한다. 서열들을 중요한 잔기 주형과 비교하고 각각의 주형을 동일성 또는 유사성 매트릭스를 이용하여 채점함에 의해 항체 서열의 CDR을 캐노니컬 부류에 할당할 수 있다.
- [0112] 본 발명의 범위내에서 CDR 캐노니컬의 예를 하기에 제공한다. 이용된 아미노산 넘버링은 케이벳이다.
- [0113] SEQ ID NO:1에 개시된 CDRH1, 이의 변이체, SEQ ID NO:7의 CDRH1 또는 상응하는 CDR에 대한 캐노니컬의 예는 다음과 같다: Tyr 32가 Ile, His, Phe, Thr, Asn, Cys, Glu 또는 Asp로 치환되고/거나; Asn 33이 Tyr, Ala, Trp, Gly, Thr, Leu 또는 Val로 치환되고/거나; Met 34가 Ile, Val 또는 Trp로 치환되고/거나; His 35가 Glu, Asn, Gln, Ser, Tyr 또는 Thr로 치환된다.
- [0114] SEQ ID NO:2에 개시된 CDRH2, 이의 변이체, SEQ ID NO:7의 CDRH2 또는 상응하는 CDR에 대한 캐노니컬의 예는 다음과 같다: Tyr 50이 Arg, Glu, Trp, Gly, Gln, Val, Leu, Asn, Lys 또는 Ala로 치환되고/거나; Ile51이 Leu, Val, Thr, Ser 또는 Asn로 치환되고/거나; Tyr 52가 Asp, Leu, Asn 또는 Ser로 치환되고/거나; Gly 53이 Ala, Tyr, Ser, Lys, Thr 또는 Asn로 치환되고/거나; Asp 54가 Asn, Ser, Thr, Lys 또는 Gly로 치환되고/거나; Asn 56이 Tyr, Arg, Glu, Asp, Gly, Val, Ser 또는 Ala로 치환되고/거나; Asn 58이 Lys, Thr, Ser, Asp, Arg, Gly, Phe 또는 Tyr로 치환된다.
- [0115] SEQ ID NO:3에 개시된 CDRH3, 이의 변이체, SEQ ID NO:7의 CDRH3 또는 상응하는 CDR에 대한 캐노니컬의 예는 다음과 같다: Ser 102가 Tyr, His, Val, Ile, Asp 또는 Gly로 치환된다.
- [0116] SEQ ID NO:4에 개시된 CDRL1, 이의 변이체, SEQ ID NO:9의 CDRL1 또는 상응하는 CDR에 대한 캐노니컬의 예는 다음과 같다: Asn 28이 Ser, Asp, Thr 또는 Glu로 치환되고/거나; Ile 29가 Val로 치환되고/거나; Tyr 30이 Asp, Leu, Val, Ile, Ser, Asn, Phe, His, Gly 또는 Thr로 치환되고/거나; Ser 31이 Asn, Thr, Lys 또는 Gly로 치환되고/거나; Tyr 32가 Phe, Asn, Ala, His, Ser 또는 Arg로 치환되고/거나; Leu 33이 Met, Val, Ile 또는 Phe로 치환되고/거나; Ala 34가 Gly, Asn, Ser, His, Val 또는 Phe로 치환된다.

- [0117] SEQ ID NO:5에 개시된 CDRL2, 이의 변이체, SEQ ID NO:9의 CDRL1 또는 상응하는 CDR에 대한 캐노니컬의 예는 다음과 같다: Ala 51이 Thr, Gly 또는 Val로 치환된다.
- [0118] SEQ ID NO:6에 개시된 CDRL3, 이의 변이체, SEQ ID NO:9의 CDRL1 또는 상응하는 CDR에 대한 캐노니컬의 예는 다음과 같다: Gln 89가 Ser, Gly, Phe 또는 Leu로 치환되고/거나; His 90이 Gln 또는 Asn로 치환되고/거나; His 91이 Asn, Phe, Gly, Ser, Arg, Asp, Thr, Tyr 또는 Val로 치환되고/거나; Tyr 92가 Asn, Trp, Thr, Ser, Arg, Gln, His, Ala 또는 Asp로 치환되고/거나; Gly 93이 Glu, Asn, His, Thr, Ser, Arg 또는 Ala로 치환되고/거나; Ala 94가 Asp, Tyr, Thr, Val, Leu, His, Asn, Ile, Trp, Pro 또는 Ser로 치환되고/거나; Leu 96이 Pro, Tyr, Arg, Ile, Trp 또는 Phe로 치환된다.
- [0119] SEQ ID NO:11에 개시된 CDRH1, 이의 변이체, SEQ ID NO:17의 CDRH1 또는 상응하는 CDR에 대한 캐노니컬의 예는 다음과 같다: Tyr 32가 Ile, His, Phe, Thr, Asn, Cys, Glu 또는 Asp로 치환되고/거나; Trp 33이 Tyr, Ala, Gly, Thr, Leu 또는 Val로 치환되고/거나; Met 34가 Ile, Val 또는 Trp로 치환되고/거나; His 35가 Glu, Asn, Gln, Ser, Tyr 또는 Thr로 치환된다.
- [0120] SEQ ID NO:12에 개시된 CDRH2, 이의 변이체, SEQ ID NO:17의 CDRH1 또는 상응하는 CDR에 대한 캐노니컬의 예는 다음과 같다: Met 50이 Arg, Glu, Trp, Tyr, Gly, Gln, Val, Leu, Asn, Lys 또는 Ala로 치환되고/거나; Ile51이 Leu, Val, Thr, Ser 또는 Asn로 치환되고/거나; His 52가 Asp, Leu, Asn, Ser 또는 Tyr로 치환되고/거나; Asn 53이 Ala, Gly, Tyr, Ser, Lys 또는 Thr로 치환되고/거나; Ser 54가 Asn, Thr, Lys, Asp 또는 Gly로 치환되고/거나; Asn 56이 Tyr, Arg, Glu, Asp, Gly, Val, Ser 또는 Ala로 치환되고/거나; Asn 58이 Lys, Thr, Ser, Asp, Arg, Gly, Phe 또는 Tyr로 치환된다.
- [0121] SEQ ID NO:13에 개시된 CDRH3, 이의 변이체, SEQ ID NO:17의 CDRH1 또는 상응하는 CDR에 대한 캐노니컬의 예는 다음과 같다: Val 102가 Tyr, His, Ile, Ser, Asp 또는 Gly로 치환된다.
- [0122] SEQ ID NO:14에 개시된 CDRL1, 이의 변이체, SEQ ID NO:19의 CDRL1 또는 상응하는 CDR에 대한 캐노니컬의 예는 다음과 같다: Asn 28이 Ser, Asp, Thr 또는 Glu로 치환되고/거나; Val 29가 Ile로 치환되고/거나; Asn 30이 Asp, Leu, Tyr, Val, Ile, Ser, Phe, His, Gly 또는 Thr로 치환되고/거나; Ser 31이 Asn, Thr, Lys 또는 Gly로 치환되고/거나; Asn 32가 Phe, Tyr, Ala, His, Ser 또는 Arg로 치환되고/거나; Val 33이 Met, Leu, Ile 또는 Phe로 치환되고/거나; Ala 34가 Gly, Asn, Ser, His, Val 또는 Phe로 치환된다.
- [0123] SEQ ID NO:15에 개시된 CDRL2, 이의 변이체, SEQ ID NO:19의 CDRL1 또는 상응하는 CDR에 대한 캐노니컬의 예는 다음과 같다: Ala 51이 Thr, Gly 또는 Val로 치환된다.
- [0124] SEQ ID NO:16에 개시된 CDRL3, 이의 변이체, SEQ ID NO:19의 CDRL1 또는 상응하는 CDR에 대한 캐노니컬의 예는 다음과 같다: Gln 89가 Ser, Gly, Phe 또는 Leu로 치환되고/거나; Gln 90이 Asn 또는 His로 치환되고/거나; Cys 91이 Asn, Phe, Gly, Ser, Arg, Asp, His, Thr, Tyr 또는 Val로 치환되고/거나; Asn 92가 Tyr, Trp, Thr, Ser, Arg, Gln, His, Ala 또는 Asp로 치환되고/거나; Asn 93이 Glu, Gly, His, Thr, Ser, Arg 또는 Ala로 치환되고/거나; Tyr 94가 Asp, Thr, Val, Leu, His, Asn, Ile, Trp, Pro 또는 Ser로 치환되고/거나; Phe 96이 Pro, Leu, Tyr, Arg, Ile 또는 Trp로 치환된다.
- [0125] CDR 당, 상응하는 CDR 당, 결합 단위 당, 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 당, 중쇄 또는 경쇄 당, 그리고 항원 결합 단백질 당 다수의 변이형 CDR 캐노니컬 위치가 존재할 수 있으므로, 항원 결합 단백질이 SAP에 특이적으로 결합할 수 있도록 CDR의 캐노니컬 구조가 유지된다면 임의의 조합의 치환이 본 발명의 항원 결합 단백질에 존재할 수 있다.
- [0126] 상기 논의된 대로, CDR의 특정 캐노니컬 구조 부류는 CDR 및 프레임워크 영역 둘 모두에서의 중요한 위치에 정위된 잔기에 의해 결정된, CDR의 길이 및 루프 패킹 둘 모두에 의해 정의된다.
- [0127] 따라서, SEQ ID NO:1-6 또는 11-16에 나열된 CDR, SEQ ID NO:7, 9, 17 또는 19의 CDR, 상응하는 CDR, 결합 단위, 또는 이들의 변이체 외에, 본 발명의 항원 결합 단백질의 캐노니컬 프레임워크 잔기는 하기를 포함할 수 있다 (케이벳 넘버링 이용):
- [0128] 중쇄: 위치 2에 Val, Ile 또는 Gly; 위치 4에 Leu 또는 Val; 위치 20에 Leu, Ile, Met 또는 Val; 위치 22에 Cys; 위치 24에 Thr, Ala, Val, Gly 또는 Ser; 위치 26에 Gly; 위치 29에 Ile, Phe, Leu 또는 Ser; 위치 36에 Trp; 위치 47에 Trp 또는 Tyr; 위치 48에 Ile, Met, Val 또는 Leu; 위치 69에 Ile, Leu, Phe, Met 또는 Val; 위치 71에 Val, Ala 또는 Leu; 위치 78에 Ala, Leu, Val, Tyr 또는 Phe; 위치 80에 Leu 또는 Met; 위치 90에

Tyr 또는 Phe; 위치 92에 Cys; 및/또는 위치 94에 Arg, Lys, Gly, Ser, His 또는 Asn.

- [0129] 경쇄: 위치 2에 Ile, Leu 또는 Val; 위치 3에 Val, Gln, Leu 또는 Glu; 위치 4에 Met 또는 Leu; 위치 23에 Cys; 위치 35에 Trp; 위치 36에 Tyr, Leu 또는 Phe; 위치 46에 Leu, Arg 또는 Val; 위치 49에 Tyr, His, Phe 또는 Lys; 위치 71에 Tyr 또는 Phe; 위치 88에 Cys; 및/또는 위치 98에 Phe.
- [0130] 특정 구체예에서, 중쇄 프레임워크는 하기 잔기: 위치 2에 Val, 위치 4에 Leu, 위치 20에 Val, 위치 22에 Cys, 위치 24에 Ala, 위치 26에 Gly, 위치 29에 Phe, 위치 36에 Trp, 위치 47에 Trp, 위치 48에 Met, 위치 69에 Ile, 위치 71에 Ala, 위치 78에 Ala, 위치 80에 Met, 위치 90에 Tyr, 위치 92에 Cys, 및 위치 94에 Arg을 포함하고; 경쇄 프레임워크는 하기 잔기: 위치 2에 Ile, 위치 3에 Gln, 위치 4에 Met, 위치 23에 Cys, 위치 35에 Trp, 위치 36에 Tyr, 위치 46에 Leu, 위치 49에 His, 위치 71에 Phe, 위치 88에 Cys, 및 위치 98에 Phe을 포함한다.
- [0131] 상기 기재된 프레임워크 위치들 중 어느 하나, 임의의 조합, 또는 전부가 본 발명의 항원 결합 단백질에 존재할 수 있다. 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 당, 중쇄 또는 경쇄 당, 그리고 항원 결합 단백질 당 다수의 변이체 프레임워크 캐노니컬 위치가 존재할 수 있으므로, 프레임워크의 캐노니컬 구조가 유지하는 한, 본 발명의 항원 결합 단백질에 임의의 조합이 존재할 수 있다.
- [0132] 인간화 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO:25에서의 인간 엑셉터 가변 도메인 서열에 대해 프레임워크 영역에서 75% 또는 그 초과, 80% 또는 그 초과, 85% 또는 그 초과, 90% 또는 그 초과, 95% 또는 그 초과, 98% 또는 그 초과, 99% 또는 그 초과 또는 100% 동일성을 갖는 엑셉터 항체 프레임워크 내에 SEQ ID NO:1-3에 나열된 CDR; 변이형 CDR; SEQ ID NO:7에서의 상응하는 CDR; 결합 단위; 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다, 인간화 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO:32에서의 인간 엑셉터 가변 도메인 서열에 대해 프레임워크 영역에서 75% 또는 그 초과, 80% 또는 그 초과, 85% 또는 그 초과, 90% 또는 그 초과, 95% 또는 그 초과, 98% 또는 그 초과, 99% 또는 그 초과 또는 100% 동일성을 갖는 엑셉터 항체 프레임워크 내에 SEQ ID NO:4-6에 나열된 CDR; 변이형 CDR; SEQ ID NO:9에서의 상응하는 CDR; 결합 단위; 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0133] 인간화 중쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO:25에서의 인간 엑셉터 가변 도메인 서열에 대해 프레임워크 영역에서 75% 또는 그 초과, 80% 또는 그 초과, 85% 또는 그 초과, 90% 또는 그 초과, 95% 또는 그 초과, 98% 또는 그 초과, 99% 또는 그 초과 또는 100% 동일성을 갖는 엑셉터 항체 프레임워크 내에 SEQ ID NO:11-13에 나열된 CDR; 변이형 CDR; SEQ ID NO:17에서의 상응하는 CDR; 결합 단위; 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다, 인간화 경쇄 가변 도메인은 SEQ ID NO:32에서의 인간 엑셉터 가변 도메인 서열에 대해 프레임워크 영역에서 75% 또는 그 초과, 80% 또는 그 초과, 85% 또는 그 초과, 90% 또는 그 초과, 95% 또는 그 초과, 98% 또는 그 초과, 99% 또는 그 초과 또는 100% 동일성을 갖는 엑셉터 항체 프레임워크 내에 SEQ ID NO:14-16에 나열된 CDR; 변이형 CDR; SEQ ID NO:19에서의 상응하는 CDR; 결합 단위; 또는 이들의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0134] 본 발명은 또한 SAP에 특이적으로 결합하고 SEQ ID NO:27-31 중 어느 하나로부터 선택된 중쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 단백질을 제공한다. 항원 결합 단백질은 SEQ ID NO:34-36 중 어느 하나로부터 선택된 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 중쇄 가변 영역들 중 어떠한 것은 임의의 경쇄 가변 영역과 조합될 수 있다.
- [0135] 항원 결합 단백질은 하기 중쇄 및 경쇄 가변 영역 조합들 중 어느 하나를 포함할 수 있다: H0L0 (SEQ ID NO:27 및 SEQ ID NO:34), H0L1 (SEQ ID NO:27 및 SEQ ID NO:35), H0L2 (SEQ ID NO:27 및 SEQ ID NO:36), H1L0 (SEQ ID NO:28 및 SEQ ID NO:34), H1L1 (SEQ ID NO:28 및 SEQ ID NO:35), H1L2 (SEQ ID NO:28 및 SEQ ID NO:36), H2L0 (SEQ ID NO:29 및 SEQ ID NO:34), H2L1 (SEQ ID NO:29 및 SEQ ID NO:35), H2L2 (SEQ ID NO:29 및 SEQ ID NO:36), H3L0 (SEQ ID NO:30 및 SEQ ID NO:34), H3L1 (SEQ ID NO:30 및 SEQ ID NO:35), H3L2 (SEQ ID NO:30 및 SEQ ID NO:36), H4L0 (SEQ ID NO:31 및 SEQ ID NO:34), H4L1 (SEQ ID NO:31 및 SEQ ID NO:35), 또는 H4L2 (SEQ ID NO:31 및 SEQ ID NO:36).
- [0136] 본 발명은 SAP에 특이적으로 결합하고 SEQ ID NO:37-40 중 어느 하나로부터 선택된 중쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 단백질을 제공한다. 항원 결합 단백질은 SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42 또는 SEQ ID NO:74의 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 중쇄 가변 영역들 중 어떠한 것은 임의의 경쇄 가변 영역과 조합될 수 있다.
- [0137] 항원 결합 단백질은 하기 중쇄 및 경쇄 가변 영역 조합들 중 어느 하나를 포함할 수 있다: H0L0 (SEQ ID NO:37 및 SEQ ID NO:41), H0L1 (SEQ ID NO:37 및 SEQ ID NO:42), H1L0 (SEQ ID NO:38 및 SEQ ID NO:41), H1L1 (SEQ ID NO:38 및 SEQ ID NO:42), H2L0 (SEQ ID NO:39 및 SEQ ID NO:41), H2L1 (SEQ ID NO:39 및 SEQ ID NO:42), H3L0 (SEQ ID NO:40 및 SEQ ID NO:41), 또는 H3L1 (SEQ ID NO:40 및 SEQ ID NO:42).

- [0138] L0 (SEQ ID NO:41)를 L0 91 A (SEQ ID NO:74)가 대신할 수 있다.
- [0139] 항체 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:28과 75% 또는 그 초과, 80% 또는 그 초과, 85% 또는 그 초과, 90% 또는 그 초과, 95% 또는 그 초과, 96% 또는 그 초과, 97% 또는 그 초과, 98% 또는 그 초과, 99% 또는 그 초과, 또는 100% 동일성을 가질 수 있다. 항체 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:35와 75% 또는 그 초과, 80% 또는 그 초과, 85% 또는 그 초과, 90% 또는 그 초과, 95% 또는 그 초과, 96% 또는 그 초과, 97% 또는 그 초과, 98% 또는 그 초과, 99% 또는 그 초과, 또는 100% 동일성을 가질 수 있다.
- [0140] 항체 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:40과 75% 또는 그 초과, 80% 또는 그 초과, 85% 또는 그 초과, 90% 또는 그 초과, 95% 또는 그 초과, 96% 또는 그 초과, 97% 또는 그 초과, 98% 또는 그 초과, 99% 또는 그 초과, 또는 100% 동일성을 가질 수 있다. 항체 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:41과 75% 또는 그 초과, 80% 또는 그 초과, 85% 또는 그 초과, 90% 또는 그 초과, 95% 또는 그 초과, 96% 또는 그 초과, 97% 또는 그 초과, 98% 또는 그 초과, 99% 또는 그 초과, 또는 100% 동일성을 가질 수 있다. 항체 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:74와 75% 또는 그 초과, 80% 또는 그 초과, 85% 또는 그 초과, 90% 또는 그 초과, 95% 또는 그 초과, 96% 또는 그 초과, 97% 또는 그 초과, 98% 또는 그 초과, 99% 또는 그 초과, 또는 100% 동일성을 가질 수 있다.
- [0141] 항체 중쇄 가변 영역은 30개, 25개, 20개, 15개, 10개, 9개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 함유하는 SEQ ID NO:27-31 중 어느 하나의 변이체일 수 있다. 항체 경쇄 가변 영역은 30개, 25개, 20개, 15개, 10개, 9개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 함유하는 SEQ ID NO:34-36 중 어느 하나의 변이체일 수 있다.
- [0142] 항체 중쇄 가변 영역은 30개, 25개, 20개, 15개, 10개, 9개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 함유하는 SEQ ID NO:37-40 중 어느 하나의 변이체일 수 있다. 항체 경쇄 가변 영역은 30개, 25개, 20개, 15개, 10개, 9개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 함유하는 SEQ ID NO:41, 42 또는 74의 변이체일 수 있다.
- [0143] 예를 들어, 상기 기재된 캐노니컬 CDR 및 캐노니컬 프레임워크 잔기 치환은 또한 75% 이상의 동일성을 갖거나 30개 이하의 아미노산 치환을 함유하는 변이체 서열로서 변이형 중쇄 또는 경쇄 가변 영역에 존재할 수 있다.
- [0144] 어떠한 중쇄 가변 영역도 적합한 인간 불변 영역과 조합될 수 있다. 어떠한 경쇄 가변 영역도 적합한 불변 영역과 조합될 수 있다.
- [0145] 본 발명의 항원 결합 단백질은 SEQ ID NO:62의 중쇄 및 또는 SEQ ID NO:64의 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.
- [0146] 항체 중쇄는 SEQ ID NO:62와 75% 또는 그 초과, 80% 또는 그 초과, 85% 또는 그 초과, 90% 또는 그 초과, 95% 또는 그 초과, 96% 또는 그 초과, 97% 또는 그 초과, 98% 또는 그 초과, 99% 또는 그 초과, 또는 100% 동일성을 가질 수 있다. 항체 경쇄는 SEQ ID NO:64와 75% 또는 그 초과, 80% 또는 그 초과, 85% 또는 그 초과, 90% 또는 그 초과, 95% 또는 그 초과, 96% 또는 그 초과, 97% 또는 그 초과, 98% 또는 그 초과, 99% 또는 그 초과, 또는 100% 동일성을 가질 수 있다.
- [0147] 항체 중쇄는 30개, 25개, 20개, 15개, 10개, 9개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 함유하는 SEQ ID NO:62의 어느 하나의 변이체일 수 있다. 항체 경쇄는 30개, 25개, 20개, 15개, 10개, 9개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 함유하는 SEQ ID NO:64의 어느 하나의 변이체일 수 있다.
- [0148] 디스크형 SAP 분자는 두 개의 면(face)을 갖는다. 5개 프로모터 각각에 존재하는 단일 알파 나선은 A 면 상에 위치한다. 각각의 프로모터의 칼슘 의존성 리간드 결합 포켓은 B 면 상에 위치하며, 따라서 이러한 면은 SAP가 아밀로이드 원섬유에 결합할 때 폐쇄된다. 본 발명의 항원 결합 단백질이 치료적 유용성을 갖기 위해서, 본원에 기재된 항원 결합 단백질에 의해 인지된 에피토프는 SAP가 아밀로이드 침착물에 결합할 때 SAP에서 바람직하게 접근하기 쉽고 따라서 SAP 분자의 A 면 상이나 에지 상에 정위된다. 이후에 항원 결합 단백질이 아밀로이드 결합된 SAP를 인지하고 여기에 결합하여 신체의 효율적인 대식세포 의존성 메커니즘을 촉발하는 보체(complement) 활성화를 초래한다. 따라서, 본 발명의 구체예에서, 항원 결합 단백질은 생체내 아밀로이드 원섬유에 결합된 인간 SAP에 결합한다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 항원 결합 단백질은 인간 SAP의 A 면에 결합한다.
- [0149] 항원 결합 단백질은 랫트, 마우스, 토끼, 낙타 (또는 관련 카멜리드 종), 또는 영장류 (예컨대, 시노몰구스, 구세계 원숭이(Old World monkey), 유인원 또는 인간)로부터 유래될 수 있다. 특정 구체예에서, 항원 결합 단백질

질은 마우스로부터 유래된다. 또 다른 구체예에서, 항원 결합 단백질은 인간으로부터 유래된다. 항원 결합 단백질은 인간화 또는 키메라 항체일 수 있다. 항원 결합 단백질은 인간 항체일 수 있다. 항원 결합 단백질은 무린 항체가 아니다.

- [0150] 항원 결합 단백질은 어떠한 아이소형 또는 하위부류일 수 있는 불변 영역을 포함할 수 있다. 불변 영역은 IgG 아이소형, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 또는 이들의 변이체일 수 있다. 항원 결합 단백질 불변 영역은 IgG1일 수 있다.
- [0151] 본 발명의 특정 구체예에서, 항원 결합 단백질은 보체를 활성화하는데 기능하는 불변 영역, 예컨대 인간 IgG1, IgG2 또는 IgG3을 포함한다.
- [0152] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 항원 결합 단백질은 대식세포에 결합하는데 기능하는 불변 영역, 예컨대 인간 IgG1 또는 IgG3을 포함한다.
- [0153] 본 발명의 추가의 구체예에서, 항원 결합 단백질은 보체를 활성화하고 대식세포에 결합하는 둘 모두에 기능하는 불변 영역, 예컨대 인간 IgG1 또는 IgG3을 포함한다.
- [0154] 항원 결합 단백질은 항체가 변화된 이펙터 기능/ADCC 및/또는 보체 활성화를 갖도록 돌연변이된 불변 도메인으로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 적합한 변형의 예가 문헌[Shields et al. J. Biol. Chem (2001) 276: 6591-6604, Lazar et al. PNAS (2006) 103: 4005-4010 and US6737056, W02004063351 and W02004029207]에 기재되어 있다.
- [0155] 항원 결합 단백질은 항원 결합 단백질이 변화된 이펙터 기능/ADCC 및/또는 보체 활성화를 갖도록 변화된 글리코실화(glycosylation) 프로파일을 갖는 불변 도메인을 포함할 수 있다. 변화된 글리코실화 프로파일을 갖는 항원 결합 단백질을 생산하는 적합한 방법의 예가 문헌[W02003/011878, W02006/014679 and EP1229125]에 기재되어 있다.
- [0156] 본 발명의 구체예에서, 탈아미드화하기 쉬운 항원 결합을 담당하는 영역, 예컨대 CDR내 잔기를 갖지 않는 항원 결합 단백질이 선택된다. 본 발명의 추가의 구체예에서, 탈아미드화하기 쉬운 보체 활성화를 책임지는 영역내 잔기를 갖지 않는 항원 결합 단백질이 선택된다.
- [0157] 본 발명은 또한 본원에 기재된 항원 결합 단백질을 엔코딩하는 핵산 분자를 제공한다. 핵산 분자는 중쇄 가변 또는 전장 서열; 및 경쇄 가변 또는 전장 서열 둘 모두를 엔코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, 본원에 기재된 항원 결합 단백질을 엔코딩하는 핵산 분자는 중쇄 가변 또는 전장 서열; 또는 경쇄 가변 또는 전장 서열을 엔코딩하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0158] 중쇄 가변 영역을 엔코딩하는 핵산 분자는 SEQ ID NO:51 또는 53-57 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 경쇄 가변 영역을 엔코딩하는 핵산 분자는 SEQ ID NO:52 또는 58-60 중 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0159] 중쇄를 엔코딩하는 핵산 분자는 SEQ ID NO:61을 포함할 수 있다. 경쇄를 엔코딩하는 핵산 분자는 SEQ ID NO:63을 포함할 수 있다.
- [0160] 중쇄 가변 영역을 엔코딩하는 핵산 분자는 SEQ ID NO:65 또는 67-70 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 경쇄 가변 영역을 엔코딩하는 핵산 분자는 SEQ ID NO:66 또는 71-73 중 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0161] 핵산 분자는 또한 엔코딩된 중쇄 및/또는 경쇄의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 하나 이상의 뉴클레오티드 치환을 함유할 수 있다.
- [0162] 본 발명은 또한 본원에 기재된 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 본원에 기재된 발현 벡터를 포함하는 제조합 숙주 세포가 또한 제공된다.
- [0163] 본원에 기재된 항원 결합 단백질은 적합한 숙주 세포에서 생산될 수 있다. 본원에 기재된 항원 결합 단백질을 생산하는 방법은 본원에 기재된 숙주 세포를 배양하는 단계 및 항원 결합 단백질을 회수하는 단계를 포함할 수 있다. 제조합 형질전환된, 트랜스펙션된, 또는 형질도입된 숙주 세포는 하나 이상의 발현 카세트를 포함할 수 있는데, 이에 의해 상기 발현 카세트는 본원에 기재된 항원 결합 단백질의 중쇄를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고 본원에 기재된 항원 결합 단백질의 경쇄를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함한다. 대안적으로, 제조합 형질전환된, 트랜스펙션된, 또는 형질도입된 숙주 세포는 하나 이상의 발현 카세트를 포함할 수 있는데, 이에 의해 첫 번째 발현 카세트는 본원에 기재된 항원 결합 단백질의 중쇄를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고 본원에 기재된 항원 결합 단백질의 경쇄를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 두 번째

카세트를 추가로 포함한다. 안정하게 형질전환된 숙주 세포는 본원에 기재된 항원 결합 단백질의 중쇄 및/또는 경쇄를 엔코딩하는 하나 이상의 발현 카세트를 포함하는 벡터를 포함할 수 있다. 예를 들어, 그러한 숙주 세포는 경쇄를 엔코딩하는 첫 번째 벡터 및 중쇄를 엔코딩하는 두 번째 벡터를 포함할 수 있다.

[0164] 숙주 세포는 진핵생물, 예를 들어 포유동물일 수 있다. 그러한 세포주의 예는 CHO 또는 NS0을 포함한다. 숙주 세포는 배양 배지, 예를 들어 무혈청 배양 배지에서 배양될 수 있다. 항원 결합 단백질이 숙주 세포에 의해 배양 배지내로 분비될 수 있다. 항원 결합 단백질은 항원 결합 단백질을 함유하는 상기 배양 배지에 관해 적어도 95% 또는 그 초과로 (예컨대, 98% 또는 그 초과) 정제될 수 있다.

[0165] 항원 결합 단백질 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물이 제공될 수 있다. 사용을 위한 설명서와 함께 약학적 조성물을 포함하는 부품 키트(kit-of-parts)가 제공될 수 있다. 편의상, 키트는 사용을 위한 설명서와 소정량의 시약들을 포함할 수 있다.

[0166] **항체 구조**

[0167] **무손상 항체**

[0168] 대부분의 척추동물 중으로부터의 항체의 경쇄는 불변 영역의 아미노산 서열을 기초로 하여 카파(Kappa)와 람다(Lambda)라 일컬어지는 2개의 유형 중 하나로 지정될 수 있다. 인간 항체는 이의 중쇄의 불변 영역의 아미노산 서열에 따라 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM의 5개의 상이한 부류로 지정될 수 있다. IgG와 IgA는 각각 하위부류 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4와 IgA1 및 IgA2으로 추가로 세분될 수 있다. 마우스와 랫트 간에 적어도 IgG2a, IgG2b를 지닌 중 변이체가 존재한다.

[0169] 가변 영역의 보다 보존되는 부분은 프레임워크 영역(FR)으로 일컬어진다. 무손상 중쇄와 경쇄의 가변 도메인은 각각 3개의 CDR에 의해 연결된 4개의 FR을 포함한다. 각각의 쇠의 CDR은 FR 영역에 의해 매우 근접한 상태로 함께 유지되고, 나머지 쇠로부터의 CDR과 함께 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다.

[0170] 불변 영역은 항체가 항원에 결합하는 데에 직접 관여하지 않지만, 다양한 이펙터 기능을 나타내는데, 예를 들어 항체 의존성 세포매개성 세포독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC), Fc γ 수용체와의 결합에 의한 식세포작용(phagocytosis), 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 의한 반감기/제거율 및 C1q 보체에 의한 보체 활성화에 참여하여 보체의 화학주성, 옵소닌 및, 생육가능한 세포의 항원 표적의 경우에, 세포용해 작용을 초래한다. IgG1 부류의 인간 항체는 보체 시스템을 활성화하는데 가장 효능이 있으므로, 본 발명의 항체의 치료적 적용에 바람직한 아이소형이다.

[0171] 인간 IgG2 불변 영역은 전형적 경로에 의해 보체를 활성화시키는 능력 또는 항체 의존성 세포독성을 매개하는 능력이 본질적으로 결여된 것으로 보고되었다. IgG4 불변 영역은 전형적 경로에 의해 보체를 활성화시키는 능력이 결여된 것으로 보고되었고, 항체 의존성 세포독성을 약한 정도로만 매개한다. 이러한 이펙터 기능이 본질적으로 결여된 항체는 "비용해성(non-lytic)" 항체로 명명될 수 있다.

[0172] **인간 항체**

[0173] 인간 항체는 당업자에게 공지된 다수의 방법에 의해 생성될 수 있다. 인간 항체는 인간 골수종 또는 마우스-인간 이종골수종(heteromyeloma) 세포주를 사용하는 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있다 (참조: Kozbor (1984) J.Immunol 133, 3001, 및 Brodeur, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63 (Marcel Dekker Inc, 1987). 대안적 방법들은 파아지 라이브러리 또는 유전자이식 마우스를 사용하는 것을 포함하는데, 이 둘 모두는 인간 가변 영역 레퍼토리(repertory)를 이용한다 (참조: Winter (1994) Annu.Rev.Immunol 12,433-455, Green (1999) J.Immunol.Methods 231: 11-23).

[0174] 마우스 면역글로불린 유전자좌가 인간 면역글로불린 유전자 세그먼트로 대체된 수 가지의 유전자이식 마우스 계통(strain)이 현재 이용가능하다 (참조: Tomizuka (2000) PNAS 97: 722-727; Fishwild (1996) Nature Biotechnol. 14: 845-851; Mendez (1997) Nature Genetics, 15: 146-156). 항원 공격(challenge)시에, 이러한 마우스는 인간 항체의 레퍼토리를 생성시킬 수 있고, 이러한 레퍼토리로부터 관심있는 항체가 선택될 수 있다.

[0175] 파아지 디스플레이 기술을 이용하여 항원 결합 단백질 (및 이의 단편)을 생산할 수 있다 (참조: McCafferty (1990) Nature 348: 552-553 and Griffiths et al. (1994) EMBO 13: 3245-3260).

[0176] 결합 친화도를 개선시키기 위해 친화도 성숙(affinity maturation) 기술이 이용될 수 있는데 (Marks

Bio/technol (1992) 10: 779-783), 여기서 일차 인간 항체의 친화도는 중쇄(H) 및 경쇄(L) 가변 영역을 천연 발생 변이체로 순차적으로 대체하고 개선된 결합 친화도를 기초로 하여 선별함으로써 개선된다. "에피토프 임프린팅(epitope imprinting)"과 같은 이러한 기술의 변형법이 또한 이용가능하다 (참조: 예를 들어 WO 93/06213, Waterhouse (1993); Nucl.Acids Res 21, 2265-2266).

[0177] **키메라 및 인간화 항체**

[0178] 키메라 항체는 재조합 DNA 방법을 이용하여 전형적으로 생산된다. 항체를 엔코딩하는 DNA (예를 들어, cDNA)가 단리되고 통상적인 절차를 이용하여 시퀀싱된다 (예를 들어, 항체의 H 및 L 쇄를 엔코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함에 의해). 하이브리도마 세포는 그러한 DNA의 전형적인 공급원으로서 기능한다. 단리된 경우, DNA는 발현 벡터내로 넣어진 후, 다른 경우에는 면역글로불린 단백질을 생성하지 못하는 숙주 세포, 예를 들어 이. 콜라이(*E.coli*), COS 세포, CHO 세포 또는 골수종 세포내로 트랜스펙션되어, 항체가 합성된다. DNA는 인간 L 및 H 쇄에 대한 코딩 서열로 상응하는 비-인간 (예를 들어, 뮤린) H 및 L 불변 영역을 치환함으로써 변형될 수 있다 (참조: 예를 들어 Morrison (1984) PNAS 81: 6851).

[0179] 면역원성의 커다란 감소는 비-인간 (예를 들어, 뮤린) 항체 ("도너" 항체)의 CDR만을 인간 프레임워크 ("억셉터 프레임워크")와 불변 영역상으로 그래프팅시켜 인간화 항체를 생성함으로써 달성될 수 있다 (참조: Jones et al. (1986) Nature 321: 522-525; and Verhoeyen et al. (1988) Science 239: 1534-1536). 그러나, CDR 그래프팅은 그 자체로서 항원-결합 특성의 완전한 보유를 초래할 수 없고, 현저한 항원-결합 친화성이 회복되어야 하는 경우 인간화 분자에서 도너 항체의 일부 프레임워크 잔기들(때때로 "역-돌연변이(backmutation)"라고 지칭됨)이 보존될 필요가 있다는 것이 자주 관찰된다 (참조: Queen et al. (1989) PNAS 86: 10,029-10,033; Co et al. (1991) Nature 351: 501-502). 이러한 경우, 인간 프레임워크(FR)를 제공하기 위해, 비-인간 도너 항체에 대해 최대의 서열 상동성을 나타내는 인간 가변 영역이 데이터베이스로부터 선택된다. 인간 FR의 선택은 인간 컨센서스(consensus) 또는 개개의 인간 항체로부터 이루어질 수 있다. 필요한 경우, CDR 형태를 보존하기 위해, 도너 항체로부터의 핵심 잔기들이 인간 억셉터 프레임워크내로 치환될 수 있다. 이러한 구조적으로 중요한 잔기들을 확인하는 것을 보조하기 위해 항체의 컴퓨터 모델링이 이용될 수 있다 (참조: WO99/48523).

[0180] 또한, 인간화는 "베니어링(veneering)" 공정에 의해 달성될 수 있다. 독특한 인간 및 뮤린 면역글로불린 중쇄와 경쇄 가변 영역의 통계 분석은 노출된 잔기들의 정밀한 패턴이 인간과 뮤린 항체에서 상이하고 대부분의 개개의 표면 위치가 소수의 상이한 잔기들에 대한 강력한 선호(preference)를 나타낸다는 것을 밝혀주었다 (참조: Padlan et al. (1991) Mol. Immunol. 28: 489-498; and Pedersen et al. (1994) J. Mol. Biol. 235: 959-973). 따라서, 인간 항체에서 통상적으로 발견되는 잔기들과 상이한, 비-인간 Fv의 프레임워크 영역내의 노출된 잔기를 대체함으로써 상기 비-인간 Fv의 면역원성을 감소시키는 것이 가능하다. 단백질 항원성이 표면 접근성과 상호관련될 수 있으므로, 표면 잔기들을 대체하는 것이 인간 면역계가 마우스 가변 영역을 "발견하지 못하게(invisible)" 하기에 충분할 수 있다 (또한 참조: Mark et al. (1994) in Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 113: The pharmacology of Monoclonal Antibodies, Springer-Verlag, 105-134). 이러한 인간화 절차는 "베니어링"이라 지칭되는데, 이는 항체의 표면만이 변화될 뿐이고 지탱하고 있는 잔기들은 영향을 받지 않은 상태로 존재하기 때문이다. 추가의 대안적인 방법들로는 WO04/006955에 제시된 방법 및 세균 발현 시스템을 사용하여 서열면에서 인간 생식선(human germline)에 가까운 항체를 생성시키는 Humaneering™ (Kalobios) 절차가 있다 (Alfenito-M Advancing Protein Therapeutics January 2007, San Diego, California).

[0181] **이중특이적 항원 결합 단백질**

[0182] 이중특이적 항원 결합 단백질은 두 개 이상의 상이한 에피토프에 대해 결합 특이성을 지닌 항원 결합 단백질이다. 이러한 항원 결합 단백질을 제조하는 방법은 당 분야에 공지되어 있다. 통상적으로, 이중특이적 항원 결합 단백질의 재조합적 생성은 두 개의 면역글로불린 H 쇄-L 쇄 쌍의 동시발현(co-expression)을 기반으로 하는데, 여기서 상기 두 개의 H 쇄는 상이한 결합 특이성을 지닌다 (참조: Millstein et al. (1983) Nature 305: 537-539; WO 93/08829; and Traunecker et al. (1991) EMBO 10: 3655-3659). H 및 L 쇄의 무작위 조합으로 인해 10개의 상이한 항체 구조물의 잠재적 혼합물이 생성되며, 이러한 혼합물중에서 단지 하나가 요망되는 결합 특이성을 지닌다. 또 다른 방법은 요망되는 결합 특이성을 지닌 가변 도메인을, 힌지 영역의 적어도 일부, CH2 및 CH3 영역을 포함하는 중쇄 불변 영역에 융합시키는 것을 포함한다. 경쇄 결합을 위해 필요한 부위를 함유하는 CH1 영역이 융합체들 중 하나 이상에 존재할 수 있다. 이러한 융합체를 엔코딩하는 DNA 및 요망되는 경우 L 쇄가 별도의 발현 벡터내로 삽입된 후, 적절한 숙주 유기체내로 코트랜스펙션(co-transfection)된다. 그러나, 2개의 쇄 또는 3개의 모든 쇄에 대한 코딩 서열을 하나의 발현 벡터내로 삽입시키는 것이 가능하다. 한 가지

방법에서, 이중특이적 항체는 제 1 결합 특이성을 지닌 H 쇠와 제 2 결합 특이성을 제공하는 H-L 쇠 쌍으로 구성되어 있고, 여기서 상기 H 쇠는 한 쪽 아암(arm)에 존재하고 H-L 쇠 쌍은 다른 쪽 아암에 존재한다 (참조: WO94/04690). 또한, 문헌 [Suresh et al. (1986) *Methods in Enzymology* 121: 210]이 참조된다.

[0183] **항원 결합 단편**

[0184] 불변 영역이 결합된 단편은 전형적 경로에 의해 보체를 활성화시키는 능력 또는 항체 의존성 세포독성을 매개하는 능력이 없다. 통상적으로, 이러한 단편은 무손상 항체의 단백질 분해, 예를 들어 과파인 분해에 의해 생성되지만 (참조: WO 94/29348), 재조합적으로 형질전환된 숙주 세포로부터 직접 생성될 수 있다. ScFv의 생성에 대해서는, 문헌 [Bird et al. (1988) *Science* 242: 423-426]이 참조된다. 또한, 항원 결합 단편은 하기 기재된 다양한 공학 기술을 이용하여 생성될 수 있다.

[0185] Fv 단편은 이들의 2개의 쇠의 상호작용 에너지가 Fab 단편 보다 더 적은 것으로 여겨진다. V_H 와 V_L 도메인의 결합을 안정화시키기 위해, 이들 도메인은 펩티드 (Bird et al. (1988) *Science* 242: 423-426; Huston et al. (1988) *PNAS* 85(16): 5879-5883), 이황화물 다리 (Glockshuber et al. (1990) *Biochemistry* 29: 1362-1367) 및 "뿔 인 홀(knob in hole)" 돌연변이 (Zhu et al. (1997) *Protein Sci.*, 6: 781-788)를 사용하여 연결되었다. ScFv 단편은 당업자에게 널리 공지된 방법들에 의해 생성될 수 있다 (참조: Whitlow et al. (1991) *Methods Companion Methods Enzymol.*, 2: 97-105 and Huston et al. (1993) *Int. Rev. Immunol* 10: 195-217). ScFv는 이.콜라이(*E. coli*)와 같은 세균 세포 또는 진핵 세포에서 생성될 수 있다. ScFv의 한 가지 단점은 생성물이 1가라는 점 (이는 다가 결합으로 인한 증가된 결합성(avidity)을 배제시킴)과 반감기가 짧은 것이다. 이러한 문제점들을 극복하기 위한 시도는 화학적 커플링 (Adams et al. (1993) *Can. Res* 53: 4026-4034; and McCartney et al. (1995) *Protein Eng.* 8: 301-314)에 의하거나 쌍을 이루지 않은 C 말단 시스테인 잔기를 함유하는 ScFv의 자발적인 부위-특이적(site-specific) 이합체화 (참조: Kipriyanov et al. (1995) *Cell. Biophys* 26: 187-204)에 의해 추가의 C 말단 시스테인을 함유하는 ScFv로부터 생성된 2가 (ScFv')₂를 포함한다. 또한, ScFv는 펩티드 링커를 3개 내지 12개의 잔기로 축소함에 의해 다합체를 형성하도록 함으로써 "디아보디(diabody)"를 형성할 수 있다 (참조: Holliger et al. (1993) *PNAS* 90: 6444-6448). 링커를 추가로 감소시켜도 여전히 ScFv 삼합체("트리아보디(triabody)", 참조: Kortt et al. (1997) *Protein Eng* 10: 423-433) 및 사합체("테트라보디(tetrabody)", 참조: Le Gall et al. (1999) *FEBS Lett*, 453: 164-168)가 추가로 생성될 수 있다. 2가 ScFv 분자의 작제(construction)는, "미니안티보디(miniantibody)" (참조: Pack et al. (1992) *Biochemistry* 31: 1579-1584) 및 "미니보디(minibody)" (참조: Hu et al. (1996) *Cancer Res.* 56: 3055-3061)를 형성하도록 단백질 이합체화 모티프를 사용하는 유전자 융합(genetic fusion)에 의해 또한 달성될 수 있다. 또한, 2개의 ScFv 단위를 제 3의 펩티드 링커에 의해 결합시킴으로써 ScFv-ScFv 탠덤(tandem) ((ScFv)₂)이 생성될 수 있다 (참조: Kurucz et al. (1995) *J. Immunol.* 154: 4576-4582). 이중특이적 디아보디는 짧은 링커에 의해 또 다른 항체의 V_L 도메인에 연결된 하나의 항체로부터의 V_H 도메인으로 구성된 2개의 단일 쇠 융합 생성물의 비공유 결합을 통해 생성될 수 있다 (참조: Kipriyanov et al. (1998) *Int. J. Can* 77: 763-772). 이러한 이중특이적 디아보디의 안정성은 상기 기재된 이황화물 다리 또는 "뿔 인 홀" 돌연변이의 도입에 의해 또는 2개의 하이브리드 ScFv 단편이 펩티드 링커를 통해 연결된 단일 쇠 디아보디(ScDb)의 형성에 의해 향상될 수 있다 (참조: Kontermann et al. (1999) *J. Immunol. Methods* 226:179-188). 예를 들어 ScFv 단편을 힌지 영역을 통해 IgG 분자의 CH3 도메인 또는 Fab 단편에 융합시킴으로써 4가의 이중특이적 분자가 이용가능하다 (참조: Coloma et al. (1997) *Nature Biotechnol.* 15: 159-163). 또한, 이중특이적 단일 쇠 디아보디들의 융합에 의해 4가의 이중특이적 분자가 생성되었다 (참조: Alt et al. (1999) *FEBS Lett* 454: 90-94). 또한, 나선-루프-나선(helix-loop-helix) 모티프를 함유하는 링커를 사용하는 ScFv-ScFv 탠덤 (DiBi 미니안티보디, 참조: Muller et al. (1998) *FEBS Lett* 432: 45-49)의 이합체화에 의해 또는 분자내 쌍형성을 방지하는 배향으로 4개의 항체 가변 도메인 (V_H 및 V_L)을 포함하는 단일 쇠 분자 (탠덤 디아보디, 참조: Kipriyanov et al. (1999) *J. Mol. Biol.* 293: 41-56)의 이합체화에 의해 보다 작은 4가의 이중특이적 분자가 형성될 수 있다. Fab' 단편의 화학적 커플링에 의해 또는 류신 지퍼(zipper)를 통한 이중이합체화(heterodimerization)에 의해 이중특이적 F(ab')₂ 단편이 생성될 수 있다 (참조: Shalaby et al. (1992) *J. Exp. Med.* 175: 217-225; and Kostelny et al. (1992), *J. Immunol.* 148: 1547-1553). 또한, 단리된 V_H 및 V_L 도메인 (Domantis plc)이 이용가능하다 (참조: US 6,248,516; US 6,291,158; and US 6,172,197).

[0186] **헤테로컨쥬게이트(heteroconjugate) 항체**

[0187] 헤테로퀴제이트 항체는 임의의 편리한 가교 방법을 이용하여 형성된 2개의 공유결합된 항체들로 구성된다 (참조: 예를 들어 US 4,676,980).

[0188] **다른 변형**

[0189] 본 발명의 항원 결합 단백질은 이들의 이펙터 기능을 향상시키거나 변화시키는 다른 변형을 포함할 수 있다. 항체의 Fc 영역과 다양한 Fc 수용체(Fc γ R) 간의 상호작용은 항체-의존성 세포독성 (ADCC), 보체의 고정, 식세포 작용 및 항체의 반감기/제거율을 포함하는 항체의 이펙터 기능을 매개하는 것으로 믿어진다. 항체의 Fc 영역에 대한 다양한 변형은 요망되는 특성에 따라 수행될 수 있다. 예를 들어, 달리 용해성 항체, 비-용해성 항체가 되게 하는 Fc 영역에서의 특수한 변형이 EP 0629240 및 EP 0307434에 설명되어 있거나 당업자는 혈청 반감기를 증가시키기 위해 구조(salvage) 수용체 결합 에피토프를 항체내로 혼입시킬 수 있다 (참조: US 5,739,277). 인간 Fc γ 수용체는 Fc γ R (I), Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa 및 신생아 FcRn를 포함한다. 문헌 [Shields et al. (2001) J. Biol. Chem 276: 6591-6604]에는 공통적인 일련의 IgG1 잔기가 모든 Fc γ R과 결합하는 데에 관여하며, Fc γ RII와 Fc γ RIII는 이러한 공통적인 일련의 잔기에 속하지 않는 별개의 부위를 이용한다는 것이 입증되어 있다. 알라닌으로 변화된 경우 모든 Fc γ R에 대한 결합을 감소시켰던 1군의 IgG1 잔기들은 다음과 같다: Pro-238, Asp-265, Asp-270, Asn-297 및 Pro-239. 이들 모두는 IgG CH2 도메인에 존재하고, CH1과 CH2를 연결하는 힌지 근처에 모여있다. Fc γ RI는 결합을 위해 단지 공통적인 일련의 IgG1 잔기들을 이용하지만, Fc γ RII와 Fc γ RIII는 그러한 공통적인 일련의 잔기들에 더하여 별개의 잔기들과 상호작용한다. 일부 잔기의 변화는 단지 Fc γ RII (예를 들어, Arg-292) 또는 Fc γ RIII (예를 들어, Glu-293)에 대한 결합을 감소시켰다. 일부 변이체는 Fc γ RII 또는 Fc γ RIII에 대해 개선된 결합을 나타내었지만, 다른 수용체에 대한 결합에는 영향을 미치지 못했다 (예를 들어, Ser-267Ala는 Fc γ RII에 대한 결합을 개선시켰지만, Fc γ RIII에 대한 결합에는 영향을 주지 않았다). 다른 변이체는 Fc γ RII 또는 Fc γ RIII에 대해 개선된 결합을 나타내며 다른 수용체에 대한 결합은 감소시켰다 (예를 들어, Ser-298Ala는 Fc γ RIII에 대한 결합을 개선시켰고, Fc γ RII에 대한 결합을 감소시켰다). Fc γ RIIIa의 경우, 가장 잘 결합하는 IgG1 변이체는 Ser-298, Glu-333 및 Lys-334에서 조합된 알라닌 치환을 지녔다. 신생아 FcRn 수용체는 항체 제거율 및 조직을 가로지르는 트랜스사이토시스 (transcytosis) 둘 모두에 관여하는 것으로 믿어진다 (참조: Junghans (1997) Immunol. Res 16: 29-57; and Ghetie et al. (2000) Annu. Rev. Immunol. 18: 739-766). 인간 FcRn과 직접 상호작용하는 것으로 측정된 인간 IgG1 잔기로는 Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 및 His435가 있다. 본 섹션에 기재된 임의의 위치에서의 치환은 혈청 반감기를 증가시킬 수 있고/거나 항체의 이펙터 특성을 변화시킬 수 있다.

[0190] 다른 변형은 항체의 글리코실화 변이체를 포함한다. 항체가 이의 불변 영역의 보존된 위치에서 글리코실화된 경우 항체 기능, 특히 상기 설명된 것들과 같은 이펙터 기능에 대해 중대한 효과를 미치는 것으로 알려져 있다 (참조: Boyd et al. (1996) Mol. Immunol. 32: 1311-1318). 하나 이상의 탄수화물 부분이 첨가되거나, 치환되거나, 결실되거나, 변형된, 항체의 글리코실화 변이체 또는 이의 항원 결합 단편이 고려된다. 아스파라긴-X-세린 또는 아스파라긴-X-트레오닌 모티프가 도입되면 탄수화물 모이어티의 효소적 결합을 위한 잠재적 부위가 생성되므로, 이는 항체의 글리코실화를 조작하기 위해 사용될 수 있다. 문헌 [Raju et al. (2001) Biochemistry 40: 8868-8876]에서는, TNFR-IgG 면역부착소 (immunoadhesin)의 말단 시알릴화 (sialylation)가, 베타-1,4-갈락토실트랜스퍼라아제 및/또는 알파 2,3 시알릴트랜스퍼라아제를 사용한 리갈락토실화 (regalactosylation) 및/또는 리시알릴화 (resialylation) 공정을 통해 증가되었다. 말단 시알릴화를 증가시키는 것은 면역글로불린의 반감기를 증가시키는 것으로 믿어진다. 항체는 대부분의 당단백질과 마찬가지로 전형적으로 글리코폼 (glycoform)의 혼합물로서 전형적으로 생성된다. 이러한 혼합물은, 항체가 진핵 세포, 특히 포유동물 세포에서 생성되는 경우에 특히 분명하다. 규정된 (defined) 글리코폼을 제조하기 위해 다양한 방법이 개발되었다 (참조: Zhang et al. (2004) Science 303: 371; Sears et al. (2001) Science 291: 2344; Wacker et al. (2002) Science 298: 1790; Davis et al. (2002) Chem. Rev. 102: 579; Hang et al. (2001) Acc. Chem. Res 34: 727). 본원에 기재된 항체 (예를 들어, IgG 아이소형, 예컨대 gG1)는 규정된 개수 (예를 들어, 7개 이하, 예를 들어 5개 이하, 예를 들어 2개 또는 1개)의 글리코폼(들)을 포함할 수 있다.

[0191] 항체는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리옥시알킬렌과 같은 비-단백성(non-proteinaeous) 중합체에 커플링될 수 있다. 단백질을 PEG에 컨주게이션시키는 것은 단백질의 반감기를 증가시킬 뿐만 아니라 단백질의 항원성과 면역원성을 감소시키는 확립된 기술이다. 다양한 분자량과 유형 (선형 또는 분지형)에 의한 폐길화(PEGylation)를 사용하는 것이 무손상 항체 뿐만 아니라 Fab' 단편에 대해 조사되었다 (참조: Koumenis et al. (2000) Int. J. Pharmaceut. 198: 83-95).

[0192] **생산 방법**

[0193] 항원 결합 단백질은 염소 (참조: Pollock et al. (1999) J. Immunol. Methods 231: 147-157), 닭 (참조: Morrow (2000) Genet. Eng. News 20: 1-55), 마우스 (참조: Pollock et al) 또는 식물 (참조: Doran (2000) Curr. Opin Biotechnol. 11: 199-204; Ma (1998) Nat. Med. 4: 601-606; Baez et al. (2000) BioPharm 13: 50-54; Stoger et al. (2000) Plant Mol. Biol. 42: 583-590)과 같은 유전자이식 유기체에서 생산될 수 있다.

[0194] 또한, 항원 결합 단백질은 화학적 합성에 의해 생산될 수 있다. 그러나, 전형적으로 항원 결합 단백질은 당업자에게 널리 공지된 재조합 세포 배양 기술을 이용하여 생산된다. 항원 결합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드가 단리되고, 추가 클로닝 (증폭) 또는 발현을 위해 플라스미드와 같은 복제가능한 벡터내로 삽입된다. 한 가지 발현 시스템은 글루타메이트 합성효소 시스템 (예를 들어, 론자 바이올로지스(Lonza Biologics)에 의해 판매되는 것), 특히 숙주 세포가 CHO 또는 NSO인 시스템이다. 항원 결합 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 통상적인 절차 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드 프로브)를 이용하여 용이하게 분리되고 시퀀싱된다. 사용될 수 있는 벡터로는 플라스미드, 바이러스, 파아지, 트랜스포손, 미니크로모솜(minichromosome)이 있고, 이들 중에서 플라스미드가 전형적으로 사용된다. 일반적으로, 이러한 벡터는, 발현을 촉진시키기 위해 항원 결합 단백질 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 결합된, 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 엘리먼트, 프로모터 및 전사 종결 서열을 추가로 포함한다. 경쇄와 중쇄를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 개별 벡터내로 삽입되어 동일한 숙주 세포내로 동시에 또는 순차적으로 (예를 들어, 형질전환, 트랜스펙션, 일렉트로포레이션 또는 형질도입에 의해) 도입될 수 있거나, 요망되는 경우 중쇄와 경쇄 둘 모두가 동일한 벡터내로 삽입된 후 그렇게 도입될 수 있다.

[0195] 숙주 세포에 의해 생산된 단백질의 총 수준이 서열로 트랜스펙션되었을 때의 수준에 비해 코돈-최적화된 유전자로 트랜스펙션되었을 때에 더 커지게 할 목적으로 코돈 최적화를 이용할 수 있다. 여러 방법이 공개되어 있다 (Nakamura et al. (1996) Nucleic Acids Research 24: 214-215; W098/34640; W097/11086). 유전부호의 과잉으로 인해, 본원에 기재된 것들에 대한 폴리뉴클레오티드 (특히 주어진 숙주 세포에서의 발현을 위해 최적화된 코돈)는 또한 본원에 기재된 항원 결합 단백질을 엔코딩할 수 있다. 따라서, 본 발명의 항원 결합 단백질의 코돈 사용빈도(codon usage)는 전사체 및/또는 생성물 수율을 증강시키기 위해 숙주 세포의 코돈 편향(bias)에 적합하도록 변화될 수 있다 (참조: Hoekema A et al Mol Cell Biol 1987 7(8):2914-24). 코돈의 선택은 발현에 이용된 숙주 세포와의 적합한 상용성(compatibility)에 기반할 수 있다.

[0196] **신호 서열**

[0197] 본 발명의 항원 결합 단백질은 성숙 단백질의 N 말단에 특정 절단 부위를 갖는 이종(heterologous) 신호 서열을 지닌 융합 단백질로서 생산될 수 있다. 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱되어야 한다. 원핵 숙주 세포의 경우, 신호 서열은, 예를 들어 알칼리 포스파타아제, 페니실리나아제(penicillinase) 또는 열 안정성 엔테로톡신 II 리더(leader)일 수 있다. 효모 분비의 경우, 신호 서열은, 예를 들어 효모 인버타아제 (invertase) 리더, α 인자 리더 또는 산 포스파타아제 리더일 수 있다 (참조: W090/13646). 포유동물 세포 시스템의 경우, 바이러스 분비 리더, 예를 들어 단순 포진 gD 신호 및 천연 면역글로블린 신호 서열이 적합할 수 있다. 전형적으로, 신호 서열은 항원 결합 단백질을 엔코딩하는 DNA에 리딩 프레임 형태로(in reading frame) 라이게이션(ligation)된다. SEQ ID NO:79에 개시된 것과 같은 뮤린 신호 서열을 이용할 수 있다.

[0198] **복제 기점**

[0199] 복제 기점은 당 분야에 널리 공지되어 있는데, 대부분의 그람-음성 세균에 대해서는 pBR322이고, 대부분의 효모에 대해서는 2 μ 플라스미드이고, 대부분의 포유동물 세포에 대해서는 다양한 바이러스 기점, 예를 들어 SV40, 폴리오마(polyoma), 아데노바이러스, VSV 또는 BPV이다. 일반적으로, 복제 기점 성분은 포유동물 발현 벡터에 필요하지 않다. 그러나, SV40이 이용될 수 있는데, 그 이유는 이것이 초기 프로모터를 함유하기 때문이다.

[0200] **선별 마커**

[0201] 전형적인 선별 유전자는, 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암피실린, 네오마이신, 메토틱세이트 또는 테트라사이클린에 대해 내성을 부여하거나(a), 영양분 결핍(auxotrophic deficiency)을 보충하거나 복합 배지에서 이용가능하지 않은 영양분을 공급하거나(b), (a)와 (b) 둘 모두를 수행하는(c), 단백질을 엔코딩한다. 선별 계획은 숙주 세포의 증식을 정지시키는 것을 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질을 엔코딩하는 유전자를 사용하여 성공적으로 형질전환된 세포는 동시전달된(co-delivered) 선별 마커에 의해 부여된 예를 들어 약물 내성으로 인해 생존한다. 한 가지 예는 DHFR 선별 마커인데, 여기서 형질전환체는 메토틱세이트의 존재하에 배양된다.

세포는 관심있는 외인성 유전자의 카피 개수를 증폭시키기 위해 증가량의 메토틱세이트의 존재하에 배양될 수 있다. CHO 세포는 DHFR 선별을 위한 특히 유용한 세포주이다. 추가의 예가 글루타메이트 합성효소 발현 시스템이다 (Lonza Biologics). 효모에서 사용되는 선별 유전자의 예는 trp1 유전자이다 (참조: Stinchcomb et al. (1979) Nature 282: 38).

[0202] **프로모터**

[0203] 항원 결합 단백질을 발현시키기 위한 적절한 프로모터가 항원 결합 단백질을 엔코딩하는 DNA/폴리뉴클레오티드에 작동적으로 결합된다. 원핵 숙주를 위한 프로모터로는 phoA 프로모터, 베타-락타마아제와 락토오스 프로모터 시스템, 알칼리 포스파타아제, 트립토판 및 하이브리드 프로모터, 예를 들어 Tac이 있다. 효모 세포에서의 발현을 위한 적절한 프로모터로는 3-포스포글리세레이트 키나아제 또는 다른 해당 효소(glycolytic enzyme), 예를 들어 에놀라아제(enolase), 글리세르알데히드 3 포스페이트 데히드로게나아제, 헥소키나아제, 피루베이트 데카르복실라아제, 포스포프рук토키나아제, 글루코오스 6 포스페이트 이소머라아제, 3-포스포글리세레이트 뮤타아제 및 글루코키나아제가 있다. 유도성 효모 프로모터로는 알코올 데히드로게나아제 2, 이소시토크롬 C, 산 포스파타아제, 메탈로티오네인, 및 질소 대사 또는 말토오스/갈락토오스 이용을 담당하는 효소가 있다.

[0204] 포유동물 세포 시스템에서의 발현을 위한 프로모터는 바이러스 프로모터, 예를 들어 폴리오마, 계두(fowlpox) 및 아데노바이러스 (예를 들어, 아데노바이러스 2), 소(bovine) 유두종 바이러스, 조류(avian) 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스 (특히, 즉시형 초기 유전자 프로모터), 레트로바이러스, B형 간염 바이러스, 액틴, 라우스(rous) 육종 바이러스(RSV) 프로모터 및 초기 또는 후기 시미안(Simian) 바이러스 40을 포함한다. 물론 프로모터의 선택은 발현을 위해 사용되는 숙주 세포와의 적절한 상용성에 기반할 수 있다. 첫 번째 플라스미드는 네오마이신 및 암피실린 내성 선별 마커와 함께 RSV 및/또는 SV40 및/또는 CMV 프로모터, 경쇄 가변 영역 (V_L)을 엔코딩하는 DNA, κC 영역을 포함할 수 있고, 두 번째 플라스미드는 RSV 또는 SV40 프로모터, 중쇄 가변 영역 (V_H)을 엔코딩하는 DNA, γ1 불변 영역을 엔코딩하는 DNA, DHFR 및 암피실린 내성 마커를 포함할 수 있다.

[0205] **인헨서 엘리먼트**

[0206] 적절한 경우, 예를 들어 고등 진핵생물에서 발현되는 경우, 프로모터 엘리먼트에 작동적으로 결합된 인헨서 엘리먼트가 벡터에 사용될 수 있다. 포유동물 인헨서 서열로는 글로빈(globin), 엘라스타아제(elastase), 알부민, 페토프로테인(fetoprotein), 및 인슐린으로부터의 인헨서 엘리먼트가 있다. 대안적으로, 진핵 세포 바이러스, 예를 들어 SV40 인헨서 (bp100-270에서), 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인헨서, 폴리마 인헨서, 바칼로바이러스 인헨서 또는 뮤린 IgG2a 유전자좌로부터의 인헨서 엘리먼트가 사용될 수 있다 (참조: WO04/009823). 인헨서는 벡터상에서 프로모터의 업스트림에 있는 부위에 위치할 수 있다. 대안적으로, 인헨서는 다른 부위에 위치할 수 있는데, 예를 들어 비번역된 영역내에 위치하거나 폴리아데닐화 신호의 다운스트림에 위치한다. 인헨서의 선택 및 위치배정(positioning)은 발현을 위해 사용되는 숙주 세포와의 적절한 상용성에 기반할 수 있다.

[0207] **폴리아데닐화/종결**

[0208] 진핵 시스템의 경우, 폴리아데닐화 신호는 항원 결합 단백질을 엔코딩하는 DNA/폴리뉴클레오티드에 작동적으로 결합된다. 이러한 신호는 전형적으로 오픈 리딩 프레임의 3' 측에 위치한다. 포유동물 시스템의 경우, 비제한적인 예는 성장 호르몬, 신장 인자(elongation factor)-1 알파 및 바이러스 (예를 들어, SV40) 유전자 또는 레트로바이러스 장말단(long terminal) 반복체로부터 유래된 신호를 포함한다. 효모 시스템의 경우, 폴리아데닐화/종결 신호의 비제한적인 예로는 포스포글리세레이트 키나아제(PGK) 및 알코올 데히드로게나아제 1(ADH) 유전자로부터 유래된 것들이 있다. 원핵 시스템의 경우, 폴리아데닐화 신호는 통상적으로 필요치 않으며, 그 대신 보다 짧고 더욱 한정된 종결자 서열(terminator sequence)을 사용하는 것이 일반적이다. 폴리아데닐화/종결 서열의 선택은 발현을 위해 사용되는 숙주 세포와의 적절한 상용성에 기반할 수 있다

[0209] **수율 향상을 위한 다른 방법/엘리먼트**

[0210] 상기 사항에 더하여, 수율을 향상시키기 위해 사용될 수 있는 다른 특징으로는 크로마틴 리모델링 엘리먼트, 인트론 및 숙주-세포 특이적 코돈 변형이 있다.

[0211] **숙주 세포**

[0212] 항원 결합 단백질을 엔코딩하는 벡터를 클로닝하거나 발현시키기 위한 적절한 숙주 세포는 원핵, 효모 또는 고등 진핵 세포이다. 적절한 원핵생물 세포로는 진정세균, 예를 들어 엔테로박테리아세아(enterobacteriaceae),

예를 들어 이.콜라이(*E.coli*)(예를 들어, ATCC 31,446; 31,537; 27,325), 엔테로박터(*Enterobacter*), 얼위니아(*Erwinia*), 클레브시엘라 프로테우스(*Klebsiella Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*), 예를 들어 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아(*Serratia*), 예를 들어 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*) 및 쉬겔라(*Shigella*) 뿐만 아니라 바실러스, 예를 들어 바실러스 서브틸리스(*B.subtilis*) 및 바실러스 리체니포르미스(*B.licheniformis*) (참조: DD 266 710), 슈도모나스, 예를 들어 슈도모나스 애루기노사(*P.aeruginosa*) 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)가 있다. 효모 숙주 세포에 대해서는, 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 스키포사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 클루베로마이세스(*Kluyveromyces*) (예를 들어, ATCC 16,045; 12,424; 24178; 56,500), 야로위아(*yarrowia*) (EP 402,226), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) (EP 183,070, 또한 문헌 [Peng et al (2004) J.Biotechnol. 108: 185-192]이 참조됨), 칸디다(*Candida*), 트리코데르마 리시아(*Trichoderma reesia*) (EP 244,234), 페니실린(*Penicillin*), 톨리포클라디움(*Tolypocladium*) 및 아스페르길루스(*Aspergillus*) 숙주, 예를 들어 아스페르길루스 니둘란스(*A.nidulans*) 및 아스페르길루스 니게르(*A.niger*)가 또한 고려된다.

[0213] 고등 진핵생물 숙주 세포로는 포유동물 세포, 예를 들어 COS-1 (ATCC No.CRL 1650), COS-7 (ATCC CRL 1651), 인간 배아 신장 세포주 293, 베이비 햄스터 신장 세포(BHK) (ATCC CRL.1632), BHK570 (ATCC NO: CRL 10314), 293 (ATCC NO.CRL 1573), 차이니즈 햄스터 난소 세포 CHO (예를 들어, CHO-K1, ATCC NO: CCL 61), DHFR- CHO 세포주, 예를 들어 DG44 (Urlaub et al. (1986) Somatic Cell Mol. Genet.12: 555-556), 특히 현탁 배양을 위해 적합된 CHO 세포주, 마우스 세르톨리(*sertoli*) 세포, 원숭이 신장 세포, 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (ATCC CRL-1587), HELA 세포, 개(*canine*) 신장 세포 (ATCC CCL 34), 인간 폐 세포 (ATCC CCL75), Hep G2 및 골수종 또는 림프종 세포, 예를 들어 NS0 (참조: US 5,807,715), Sp2/0, Y0가 있다.

[0214] 또한, 이러한 숙주 세포는 항원 결합 단백질의 특성, 기능 및/또는 수율을 변화시키기 위해 추가로 공학처리되거나 적합될 수 있다. 비제한적인 예로는 특정 조절(modifying) (예컨대, 글리코실화) 효소 및 단백질 폴딩 샤페론(chaperone)의 발현이 있다.

[0215] **세포 배양 방법**

[0216] 항원 결합 단백질을 엔코딩하는 벡터로 형질전환된 숙주 세포는 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 배양될 수 있다. 숙주 세포는 스피너(*spinner*) 플라스크, 롤러 보틀(*roller bottle*) 또는 중공 섬유 시스템에서 배양될 수 있지만, 대규모 생산을 위해서는 교반 탱크 반응기가 특히 현탁 배양을 위해 사용된다. 교반 탱커(*stirred tanker*)는, 예를 들어 분사기(*sparger*), 배플 또는 하부 전단임펠러(*low shearimpeller*)를 사용하는 통기(*aeration*)를 위해 적합해질 수 있다. 버블 컬럼(*bubble column*) 및 에어리프트(*airlift*) 반응기의 경우, 공기 또는 산소 버블에 의한 직접적인 통기가 사용될 수 있다. 숙주 세포가 무혈청 배지에서 배양되는 경우, 이러한 배지에는 통기 처리로 인한 세포 손상을 방지하는 것을 보조하기 위해 플루로닉(*pluronic*) F-68과 같은 세포 보호제가 보충될 수 있다. 숙주 세포 특성에 따라, 앵커리지(*anchorage*) 의존성 세포주의 경우 성장 기질로서 마이크로캐리어(*microcarrier*)가 사용될 수 있거나 세포가 현탁 배양에 적합될 수 있다 (후자가 전형적임). 숙주 세포, 특히 무척추동물 숙주 세포를 배양하는 데에는 다양한 동작 모드, 예를 들어 페드-배치(*fed-batch*), 반복 배치 공정 (참조: Drapeau et al (1994) Cytotechnology 15: 103-109), 연장(*extended*) 배치 공정 또는 관류 배양(*perfusion culture*)을 이용할 수 있다. 재조합적으로 형질전환된 포유동물 숙주 세포가 우태아 혈청(FCS)과 같은 혈청 함유 배지에서 배양될 수 있지만, 이러한 숙주 세포는 합성 무혈청 배지, 예를 들어 문헌 [Keen et al. (1995) Cytotechnology 17: 153-163]에 기재된 바와 같은 합성 무혈청 배지, 또는 필요에 따라 글루코오스와 같은 에너지원 및 재조합 인슐린과 같은 합성 성장 인자가 보충된, 시판 배지, 예를 들어 ProCHO-CDM 또는 UltraCHO™ (Cambrex NJ, USA)에서 배양될 수 있다. 숙주 세포를 무혈청 배양하는 데에는 그러한 세포가 무혈청 조건에서 증식하도록 적합될 것을 필요로 한다. 한 가지 적합화 방법은 그러한 숙주 세포를 혈청 함유 배지에서 배양하고, 상기 배양 배지의 80%를 무혈청 배지로 반복적으로 교환함으로써, 상기 숙주 세포가 무혈청 조건에 적응하게 하는 것이다 (참조: 예컨대 Scharfenberg et al. (1995) in Animal Cell Technology: Developments towards the 21st century (Beuvery et al. eds, 619-623, Kluwer Academic publishers).

[0217] 배지내로 분비된 항원 결합 단백질은 의도된 용도를 위해 적절한 정제도를 제공하도록 다양한 기술을 이용하여 회수되고 정제될 수 있다. 예를 들어, 인간 환자의 치료를 위해 항원 결합 단백질을 사용하는 것은 전형적으로 (미정제 배양 배지와 비교하여) 95% 이상의 순도, 더욱 전형적으로는 98% 또는 99% 또는 그 초과 순도를 요구한다. 배양 배지로부터의 세포 파편은 전형적으로 원심분리에 이어, 예컨대 미세여과, 한외여과 및/또는 다층여과(*depth filtration*)를 사용한 상청액의 정화(*clarification*) 단계를 사용하여 분리된다. 다양한 다른

기술, 예를 들어 투석 및 겔 전기영동 및 크로마토그래피 기술, 예를 들어 히드록시아파타이트(hydroxyapatite)(HA), 친화성 크로마토그래피 (임의로 폴리히스티딘과 같은 친화성 태깅(tagging) 시스템을 포함함) 및/또는 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC, 참조: US 5,429,746)가 이용가능하다. 다양한 정화 단계 후에, 항체는 단백질 A 또는 G 친화성 크로마토그래피를 이용하여 포획될 수 있다. 이온 교환 및/또는 HA 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환, 크기 배제 크로마토그래피 및 암모늄 설페이트 침전과 같은 추가의 크로마토그래피 단계가 후속될 수 있다. 다양한 바이러스 제거 단계가 또한 사용될 수 있다 (예: 예를 들어, DV-20 필터를 사용한 나노여과). 이러한 다양한 단계 후에, 적어도 75mg/ml 또는 그 초과, 또는 100mg/ml 또는 그 초과 항원 결합 단백질을 포함하는 정제된 (예를 들어, 모노클로날) 제제가 제공된다. 이러한 제제는 항원 결합 단백질의 응집된 형태를 실질적으로 함유하지 않는다.

[0218] 항원 결합 단편의 발현을 위해 세균 시스템이 이용될 수 있다. 이러한 단편은 주변세포질(periplasma)내에서 세포내에 국한되거나 세포외로 분비될 수 있다. 당업자에게 공지된 방법에 따라 활성 단백질을 형성하도록 불용성 단백질이 추출되고 리폴딩(refolding)될 수 있다 (참조: Sanchez et al. (1999) J. Biotechnol. 72: 13-20; and Cupit et al. (1999) Lett Appl Microbiol 29: 273-277).

[0219] 탈아미드화는 아미드 작용기가 제거되는 화학적 반응이다. 생화학에서, 상기 방법은 단백질의 분해에 중요한데, 그 이유는 이것이 아미노산 아스파라긴 및 글루타민의 아미드-함유 측쇄를 손상시키기 때문이다. 아스파라긴은 이소아스파르테이트 및 아스파르테이트의 혼합물로 전환된다. 글루타민 잔기의 탈아미드화는 훨씬 느린 속도로 발생한다. 탈아미드화 반응은 단백질의 수명시간(useful lifetime)을 제한할 수 있는 인자들 중 하나로 여겨지고, 이것은 치료용 단백질의 제조 동안에 발생하는 가장 일반적인 번역후 변형 중 하나이기도 하다. 예를 들어, 시험관내 또는 생체내 생물학적 활성의 감소 또는 손실이 재조합 인간 DNase 및 재조합 용해성 CD4에 대해 보고된 반면, 다른 재조합 단백질들은 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

[0220] **약학적 조성물**

[0221] 본원에 기재된 항원 결합 단백질의 정제된 제제는 본원에 기재된 인간 질병, 질환 및 장애의 치료에 사용되는 약학적 조성물내로 혼입될 수 있다. 질병, 질환 및 장애라는 용어들은 상호교환적으로 사용된다. 이러한 약학적 조성물은 아밀로이드 침착물이 조직에 존재하여 임상 질병을 야기하는 구조적 및 기능적 손상에 기여하는 어떠한 질병의 치료에도 이용될 수 있다. SAP는 생체내 모든 아밀로이드 침착물에 항상 존재하며, 본원에 기재된 치료적 유효량의 항원 결합 단백질을 포함하는 약학적 조성물을 조직으로부터 아밀로이드의 제거에 반응성인 질병의 치료에 이용할 수 있다.

[0222] 약학적 제제는 약학적으로 허용되는 담체와 함께 항원 결합 단백질을 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질은 단독으로, 또는 약학적 조성물의 일부로서 투여될 수 있다.

[0223] 전형적으로, 이러한 조성물은 공지되어 있고 허용되는 제약 실무에 의해 요구되는 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다 (참조: Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16th edition (1980), Mack Publishing Co.). 이러한 담체의 예로는 멸균 담체, 예를 들어 식염수, 링거 용액 또는 텍스트로오스 용액이 있으며, 이는 적절한 완충제에 의해 5 내지 8 범위의 pH로 임의로 완충된다. 약학적 조성물은 주사 또는 연속 주입 (예를 들어, 정맥내, 복막내, 피내, 피하, 근내 또는 문맥내(intraportal))에 의해 투여될 수 있다. 그러한 조성물은 적절하게는 가시적인(visible) 미립자 물질을 함유하지 않는다. 또한, 약학적 조성물, 특히 CPHPC를 함유하는 것들은 경구적으로 투여될 수 있다.

[0224] 약학적 조성물은 1mg 내지 10g의 항원 결합 단백질, 예를 들어 5mg 내지 1g의 항원 결합 단백질을 포함할 수 있다. 대안적으로, 조성물은 5mg 내지 500mg, 예를 들어 5mg 내지 50mg의 항원 결합 단백질을 포함할 수 있다.

[0225] 이러한 약학적 조성물의 제조 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 약학적 조성물은 1mg 내지 10g의 항원 결합 단백질을 단위 투여 형태로, 임의로 사용 설명서와 함께 포함할 수 있다. 약학적 조성물은 당업자에게 널리 공지되어 있거나 명백한 방법에 따라 투여 전에 재구성되도록 동결건조(냉동건조)될 수 있다. 항체가 IgG1 아이소형을 지니는 경우, 이러한 아이소형의 항체의 구리 매개성 분해의 정도를 감소시키기 위해, 구리의 킬레이터, 예를 들어 시트레이트 (예를 들어, 소듐 시트레이트) 또는 EDTA 또는 히스티딘이 약학적 조성물에 첨가될 수 있다 (참조: EP0612251). 또한, 약학적 조성물은, 가용화제, 예를 들어 아르기닌 염기, 세정제/항-응집제, 예를 들어 폴리소르베이트 80, 및 바이알 헤드스페이스(headspace) 산소를 대체하는 비활성 가스, 예를 들어 질소를 포함할 수 있다.

[0226] 항원 결합 단백질을 투여하기 위한 유효량 및 투여 계획(regime)은 일반적으로 경험적으로 결정되며, 환자의 연

령, 체중 및 건강 상태 및 치료하고자 하는 질병 또는 장애와 같은 인자에 좌우될 수 있다. 이러한 인자들은 주치의(attending physician)의 지식범위내에 있는 것이다. 적절한 투여량을 선택하는 데에 있어서의 지침은 예를 들어 문헌 [Smith et al (1977) Antibodies in human diagnosis and therapy, Raven Press, New York]에서 발견될 수 있다.

- [0227] 피검체에게 투여되는 항원 결합 단백질의 용량은 일반적으로 피검체의 체중 1 kg에 대해 1 μ g 내지 150 mg, 0.1 mg 내지 100 mg, 0.5 mg 내지 50 mg, 1 내지 25 mg 또는 1 내지 10 mg이다. 예를 들어, 용량은 10 mg/kg, 30 mg/kg, 또는 60 mg/kg일 수 있다. 항원 결합 단백질은 비경구적으로, 예를 들어 피하, 정맥내 또는 근내 투여될 수 있다.
- [0228] SAP-고갈 화합물은 이의 활성에 따라 0.1 mg/kg 내지 2 mg/kg의 용량으로 투여될 수 있다. SAP-고갈 화합물은 피검체 체중에 대한 용량 비와 무관하게, 고정된 용량으로 투여될 수 있다. SAP-고갈 화합물은 100 mg 또는 그 미만, 50 mg 또는 그 미만, 25 mg 또는 그 미만, 또는 10 mg 또는 그 미만의 1회 이상의 분리된 용량, 동시 용량 또는 순차적인 비경구 용량으로 투여될 수 있다.
- [0229] 요망되는 경우, 치료용 조성물의 효과적인 매일 용량은 임의로 단위 용량 형태로, 하루 동안에 적합한 간격으로 별도로 투여된 2회, 3회, 4회, 5회, 6회 또는 그 초과와 서브용량으로서 투여될 수 있다.
- [0230] 항원 결합 단백질은 단일의 큰 용량이나 소량의 반복 용량으로 투여될 수 있다.
- [0231] 용량의 투여는 2 내지 24시간, 예컨대 2 내지 12시간, 또는 2 내지 6시간의 기간에 걸쳐 느린 연속 주입에 의해 이루어질 수 있다. 이것은 독성 부작용을 감소시킬 수 있다.
- [0232] 용량의 투여는 필요한 경우 1회 이상 반복될 수 있고, 예를 들어 매일 3회, 매일 1회, 이틀에 1회, 1주일에 1회, 2주일에 1회, 한 달에 1회, 3개월에 1회, 6개월에 1회, 또는 12개월에 1회일 수 있다. 항원 결합 단백질은 지속 요법에 의해 투여될 수 있고, 예를 들어 6개월 이상의 기간 동안 1주일에 한번 투여될 수 있다. 항원 결합 단백질은 간헐적 요법에 의해 투여될 수 있고, 예를 들어 3 내지 6개월의 기간 동안 항원 결합 단백질을 투여한 후 3 내지 6개월 동안 투여하지 않고, 이어서 다시 3 내지 6개월 동안 투여하는 등의 사이클로 투여될 수 있다.
- [0233] 예를 들어, 용량은 각각의 투여일에 다수의 서브용량 형태로 14일 또는 28일마다 1회 피하 투여될 수 있다.
- [0234] 항원 결합 단백질은 특정 부위에 치료를 표적화하는 방식으로 피검체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 항원 결합 단백질은 조직에서 경계가 정해진 국소 아밀로이드 덩어리내로 국소적으로 주사될 수 있거나, 아밀로이드성 기관으로 혈액 공급량 내로 주입될 수 있다.
- [0235] 항원 결합 단백질은 본원에 기재된 질병의 치료를 위해, 하나 이상의 다른 치료학적으로 활성인 작용제, 특히 SAP 고갈 화합물과 함께 이용되어야 한다. 순환으로부터 SAP의 효과적인 고갈은 SAP 결합 단백질이 안전하고 효과적으로 제공되도록 하기 위해 이의 투여 전에 달성되어야 한다.
- [0236] SAP 고갈 화합물은 우선 순환하는 SAP의 거의 전부가 제거되도록 먼저 투여된다. 이로 인해 조직에 아밀로이드 침착물과 관련된 상당량의 SAP가 남기 때문에, 항-SAP 항원 결합 단백질의 연속되는 투여가 아밀로이드 침착물에 대한 국소화 및 특이적 결합을 가능하게 하여 이들의 신속하고도 광범위한 퇴행을 촉진시킨다. 적합하게는, 항-SAP 항원 결합 단백질이 SAP 고갈 화합물로 치료(들)를 시작한 지 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20 또는 25일 또는 그 초과일 후에 투여될 수 있다.
- [0237] 연속되는 투여는 SAP 고갈 화합물로의 2회 이상의 연속 치료를 수반할 수 있고, 항-SAP 항원 결합 단백질을 이용한 2회 이상의 연속 치료가 이어진다.
- [0238] 연속되는 투여는 SAP 고갈 화합물로의 1회 치료에 이어 항-SAP 항원 결합 단백질로의 1회의 연속 치료를 수반할 수 있고, 그 후 이는 1회 이상 반복된다.
- [0239] 연속/후속 용량은 초기/이전 용량보다 많거나 초기/이전 용량보다 적은 양일 수 있다.
- [0240] 초기 용량의 SAP-고갈 화합물 단백질의 투여에 이어 1회 이상의 연속 (예컨대, 후속) 용량의 SAP 고갈 화합물 및/또는 항-SAP 항원 결합 단백질의 투여가 계속되며, 여기서 상기 1회 이상의 연속 용량은 초기 용량과 대략 동일하거나 초기 용량보다 적은 양일 수 있다.
- [0241] 순환하는 SAP의 초기 고갈 후에, 추가 용량의 SAP 고갈 화합물 및 첫 번째 용량의 항-SAP 항원 결합 단백질의

투여에 이어 1회 이상의 연속 (예컨대, 후속) 용량이 투여될 수 있으며, 여기서 후속 용량들 중 1회 이상은 초기 용량보다 많은 양이다.

- [0242] 따라서, 투여는 투여를 위한 소정의 스케줄 또는 관례적인 스케줄을 이용할 수 있고, 이에 의해 용량 투여들 간에 미리 정해진 지정 기간이 주어진다. 스케줄은, 이러한 스케줄이 미리 정해지는 한, 동일하거나 상이한 길이의 기간을 포함할 수 있다. 적절한 스케줄이 특정일에서의 투여를 포함하는 지가 사전에 결정된다면, 어떠한 특정 조합이 스케줄에 포함될 것이다.
- [0243] 약학적 조성물은 임의로 사용 설명서와 함께, 항원 결합 단백질과 그 밖의 약제로 된 키트의 일부를 구성할 수 있다. 편의상, 키트는 사용 설명서와 함께 소정량의 시약을 포함할 수 있다.
- [0244] 용어 "개체", "피검체" 및 "환자"는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 피검체는 영장류 (예컨대, 마모셋 또는 원숭이)일 수 있다. 피검체는 통상적으로 인간이다.
- [0245] 치료는 치료적, 예방적 또는 방지용일 수 있다. 피검체는 이를 필요로 하는 누군가일 것이다. 치료를 필요로 하는 누군가는 앞으로 질병이 발생할 수 있는 개체 외에 특정 의학적 질병에 이미 걸려 있는 개체를 포함할 수 있다.
- [0246] 따라서, SAP 고갈 화합물에 이어서 본원에 기재된 SAP 항원 결합 단백질을 예방적 또는 방지용 치료에 이용할 수 있다. 이러한 경우에, 본원에 기재된 순차적인 치료가 개체에 투여되어 질병의 하나 이상의 양태 또는 징후의 개시를 방지 또는 지연시킨다. 피검체는 자각증상이 없거나 질병에 대한 유전적 소인을 지닐 수 있는데, 그 이유는 아밀로이드 침착물이 조직에 존재하여 소정 기간 동안 축적된 후에 임상적 징후를 나타내기에 충분한 손상을 야기하기 때문이다. 그러한 준-임상(sub-clinical) 아밀로이드 침착은 방사성표지된 SAP 신티그래피(scintigraphy), 심장초음파(echocardiography) 및 심장 자기 공명 영상장치를 포함하는 조직 생검의 조직학적 검사 또는 비침습적 영상 절차에 의해 검출될 수 있다. 먼저 순환하는 SAP가 고갈된 후에, 예방적 유효량의 항원 결합 단백질이 그러한 개체에게 투여된다. 예방적 유효량은 본원에 기재된 질병의 하나 이상의 양태 또는 징후의 개시를 방지하거나 지연시키는 양이다.
- [0247] 본원에 기재된 항원 결합 단백질을 또한 치료 방법에 이용할 수 있다. 용어 "치료"는 질병의 하나 이상의 양태 또는 징후의 경감, 감소 또는 예방을 포함한다. 예를 들어, 본원에 기재된 항원 결합 단백질을 이용하여 본원에 기재된 질병의 하나 이상의 양태 또는 징후를 경감 또는 감소시킬 수 있다.
- [0248] 본원에 기재된 항원 결합 단백질은 치료적, 예방적 또는 방지용 치료를 위한 유효량으로 사용된다. 본원에 기재된 항원 결합 단백질의 치료적 유효량은 질병의 하나 이상의 양태 또는 징후를 경감 또는 감소시키기에 효과적인 양이다. 본원에 기재된 항원 결합 단백질은 본원에 기재된 질병을 치료, 예방 또는 치유하기 위해 사용될 수 있다.
- [0249] 본원에 기재된 항원 결합 단백질은 일반적으로 피검체의 건강에 유리한 효과를 지닐 수 있고, 예를 들어 피검체의 예상 수명을 증가시킬 수 있다.
- [0250] 본원에 기재된 항원 결합 단백질은 완전한 치유를 달성하거나, 실행가능한 치료적 처치를 구성하기 위해 질병의 모든 징후 또는 소견을 근절시킬 필요는 없다. 관련 분야에서 인지된 바와 같이, 치료제로서 사용되는 약물은 주어진 질병 상태의 중증도를 감소시킬 수 있으나, 유용한 치료제로서 간주되기 위해 질병의 모든 소견을 철폐시킬 필요는 없다. 유사하게, 예방적으로 투여되는 치료는 실행가능한 예방제를 구성하기 위해 질병의 개시를 방지하는데 완벽하게 효과적일 필요가 없다. 단순히 질병의 영향력을 감소시키거나 (예를 들어, 징후의 수 또는 중증도를 감소시키거나, 또 다른 치료의 유효성을 증가시키거나, 또 다른 유리한 효과를 제공함에 의해), 질병이 발생하거나 (예를 들어, 질병의 개시를 지연시킴에 의해) 피검체가 악화될 가능성을 감소시키는 것으로 충분하다.
- [0251] 본원에 기재된 항원 결합 단백질을 아밀로이드 침착과 관련된 질병, 즉 아밀로이드증을 치료하거나 예방하는데 이용할 수 있다.
- [0252] "아밀로이드증"은 신체의 다양한 기관 및 조직에서 아밀로이드의 세포외 축적을 특징으로 하는 임의의 질병이다.
- [0253] 용어 "아밀로이드"는 특징적인 초미세구조 형태학, 크로스-β 시트 코어 구조 및 알칼리 알코올 용액으로부터 콩고 레드(Congo red) 염료에 결합한 후 강한 교차 편광에서 현미경으로 봤을 때 레드-그린 2색성을 제공하는 병리특징적 조직화학적 착색 특성을 갖는 원섬유로 구성된 불용성 단백질 섬유의 조직에서의 세포외 침착물을

지칭한다. 약 25개의 상이한 비관련 단백질이 인간 조직에 침착되고 모든 이러한 전형적인 특징을 공유하는 아밀로이드 원섬유를 형성하는 것이 알려져 있다. 뇌질에서의 아밀로이드 침착물인 대뇌 아밀로이드는 이들이 항상 초점에 있고 크기에 있어서 극히 작다는 점에서 다른 아밀로이드 침착물과 다소 구별되며, 보통 아밀로이드 플라크로서 지칭된다.

[0254] 조직에서의 아밀로이드 침착에 의해 직접 야기되는 질병인 아밀로이드증은 침착물이 하나의 해부적 영역 및/또는 하나의 조직 또는 기관 시스템에 제한된 국소 아밀로이드증, 및 침착물이 혈관 및 결합 조직을 포함하는 신체의 어떠한 기관 또는 조직에서도 발생할 수 있는 전신 아밀로이드증 둘 모두를 포함한다. 아밀로이드증의 원인은 후천성 또는 유전성일 수 있다. 후천성 아밀로이드증은 그 자체가 후천성 또는 유전성일 수 있는 이전의 의학적 장애의 합병증으로서 발생한다. 따라서, 아밀로이드 A 단백질 (AA) 타입으로서 알려진 반응성 전신 아밀로이드증은 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 소아 류마티스 관절염(juvenile rheumatoid arthritis), 크론병(Crohn's disease), 만성 감염(chronic infections) 및 만성 패혈증(chronic sepsis)과 같은 만성 활성 감염성 질병, 및 가족성 지중해열(familial Mediterranean fever), 머클-웰스 증후군(Muckle-Wells syndrome) 및 CINCA 증후군과 같은 유전성 주기적 발열 증후군의 합병증이다. 투석 관련 아밀로이드증은 말기 신부전의 결과로서 β 2-마이크로글로불린의 축적에 의해 야기된다. 모노클로날 면역글로불린 경쇄 (AL) 아밀로이드증은 다발성 경화증(multiple myeloma) 또는 달리 양성 모노클로날 감마글로불린병증(benign monoclonal gammopathy) (중요성이 불확실한 모노클로날 감마글로불린병증, MGUS)의 합병증이다. 트랜스타이레틴 타입의 후천성 아밀로이드증은 어떠한 이전의 질병 없이 단지 노화의 합병증으로 발생할 수 있다. 유전성 아밀로이드증은 아밀로이드 원섬유를 형성하는 증가된 경향을 갖는 변이형 단백질의 발현을 엔코딩하는 다양한 단백질에 대한 유전자에서 돌연변이에 의해 야기되고, 트랜스타이레틴, 아포지단백질 A1, 켈슬린, 리소자임, 시스타틴 C 및 아밀로이드 β -단백질에 의해 초래된 질병을 포함한다. 모든 상이한 형태의 아밀로이드증 및 관련 단백질의 포괄적인 설명은 텍스트북 및 과학문헌(Pepys, M.B. (2006) *Annu. Rev. Med.*, 57: 223-241; Pepys and Hawkins (2003) *Amyloidosis*. Oxford Textbook of Medicine, 4th Ed., Vol. 2, Oxford University Press, Oxford, pp. 162-173; Pepys and Hawkins (2001) *Amyloidosis*. *Samter's Immunologic Diseases*, Sixth Ed., Vol. 1, Lippincott Williams & Williams, Philadelphia, pp. 401-412)에서 입수할 수 있다.

[0255] 하나의 기관 또는 조직에 제한된 국소 아밀로이드 침착은 임상적으로 침묵할 수 있거나 심각한 조직 손상 및 질병을 야기할 수 있다. 예를 들어, 혈관 아밀로이드 침착물이 A β 단백질로 구성된 대뇌 아밀로이드 혈관병증은 일반적으로 어떠한 다른 질병의 부재하에 이해되지 않는 이유로 발생하는 산발 후천성 장애이며, 대뇌 출혈 및 뇌졸중의 주요 원인이다. 아밀로이드 침착물이 항상 존재하지만 이러한 개개의 질병을 야기하는 정확한 메커니즘은 아직 알려지지 않은 수 개의 매우 중요하고도 일반적인 질병, 특히 알츠하이머병(AD) 및 타입 2 당뇨병이 존재한다. 그럼에도 불구하고 알츠하이머병에서의 뇌 및 대뇌 혈관, 및 당뇨병에서의 이자섬에서의 아밀로이드의 국소 침착은 병리학 및 질병을 악화시킬 가능성이 매우 높다. 따라서, 본 발명은 본원에 기재된 항원 결합 단백질을 이용하여 알츠하이머병 및 타입 2 당뇨병 둘 모두, 실제로 조직에서 아밀로이드 침착물의 존재와 관련된 어떠한 장애의 치료를 포함한다.

[0256] 다수의 형태의 전파성 해면모양 뇌병증(transmissible spongiform encephalopathy)(프리온 질병)이 뇌에서의 아밀로이드 침착물과 관련되고, 따라서 본 발명은 인간에서 변이형 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease), 크로이츠펠트-야콥병 그 자체, 쿠루(kuru) 및 인간 프리온 질병의 다양한 다른 형태, 및 또한 소해면양뇌증(bovine spongiform encephalopathy), 물사슴 및 엘크의 만성 소모병(chronic wasting disease), 및 멧크의 전파성 뇌병증을 포함하는 모든 이러한 장애에 관한 것이다.

[0257] **진단적 사용 방법**

[0258] 본원에 기재된 항원 결합 단백질을 이용하여 진단 목적으로 시험관내 또는 생체내 생물학적 샘플에서 SAP를 검출할 수 있다. 예를 들어, 항-SAP 항원 결합 단백질을 이용하여 혈청에서 또는 아밀로이드, 예컨대 아밀로이드 플라크와 관련하여 SAP를 검출할 수 있다. 아밀로이드를 먼저 인간 또는 동물체로부터 제거할 수 있다 (예를 들어, 생검). ELISA, 웨스턴 블롯, 면역조직화학법, 또는 면역침전법을 포함하는 통상적인 면역검정법을 이용할 수 있다.

[0259] 하나 이상의 항원 결합 단백질, 검출가능한 표지, 및 키트의 사용 설명서를 포함하는 진단 키트에 항원 결합 단백질을 제공할 수 있다. 편의상, 키트는 사용 설명서와 함께 소정량의 시약을 포함할 수 있다.

[0260] **실시예**

- [0261] 실시예 1 - 하이브리도마 가변 도메인의 시퀀싱: SAP-E 및 SAP-K
- [0262] SAP-E 및 SAP-K는 항-SAP 모노클로날의 두 개의 그룹으로부터 비롯되며, 각각의 그룹은 시험관내 인간 SAP에 대한 이들의 결합에 대해 별도로 시험되었다. SAP-E 및 SAP-K는 이들의 그룹 내에서 SAP에 대해 가장 강한 결합을 나타내었으며, 상이한 검정에서 서로 비교되었다.
- [0263] 항체의 첫 번째 그룹은 정제된 인간 SAP (하기 도시된 SEQ ID NO:43)(인간 SAP를 정제하기 위한 방법의 상세 설명은 문헌[Hawkins *et al.* (1991) Clin. Exp. Immunol. 84, 308-316]에서 제공된다) 및 융합 프로토콜을 이용한 단일의 통상적인 면역화에서 생성된 7개의 하이브리도마로부터의 항체들을 포함하며, 이들은 SAP-A 내지 SAP-G로 지정된다. 이러한 항체들 중 두 개인 SAP-E 및 SAP-B는 IgG2a 아이소형인 한편, 나머지는 모두 IgG1 아이소형이다 (참조: 실시예 13, 표 11).
- [0264] 항체의 두 번째 그룹은 정제된 인간 SAP (하기 도시된 SEQ ID NO:43)(Hawkins *et al.* (1991) Clin. Exp. Immunol. 84, 308-316) 및 종래 방법에 의해 클로닝된 하이브리도마를 생산하기 위한 통상적인 융합체를 이용한 면역화로부터 표준 기술에 의해 유래된 6개의 상이한 IgG2a 모노클로날 (SAP-H 내지 SAP-M)을 포함한다.
- [0265] 호모 사피엔스 SAP 성숙 아미노산 서열 (SEQ ID NO:43)
- HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLTLPLEKPLQNFTLCFRAYSDSLRSYSLFSYNTQGRDNELLVYKERVGEYS
LYIGRHKVTSKVIEKFPAPVHICVSWESSGGIAEFWINGTPLVKKGLRQGYFVEAQPKIVLGQEQQDSYGGK
FDRSQSFVGEIGDLYMWDVSLPPENILSAYQGTPLPANILDWQALNYEIRGYVIIKPLVWV
- [0266]
- [0267] 비교를 위해, 인간 SAP와 69.4% 동일성을 갖는 마우스 SAP 서열을 하기에 제공한다.
- [0268] 일반 쥐(*mus musculus*) SAP 성숙 단백질 (SEQ ID NO:44)
- QTDLKRKVFVFPRESDHVKLIPHEKPLQNFTLCFRYSDSLRSQSLFSYSVKGRDNELLYKEKVGESLY
IGQSKVTVRGMEEYLSPVHLCTTWESSGIVFVWVNGKPVVKKSLQREYTVKAPPSIVLGQEQQDNYGG
GFQRSQSFVGEFSDLYMWDYVLTQDILFVYRDSVNPINLNWQALNYEINGYVIRPRVW
- [0269]
- [0270] Qiagen으로부터의 RNeasy 키트(#74106)를 이용하여 대략 10⁶개 세포의 하이브리도마 세포 펠렛으로부터 전체 RNA를 추출하였다. AccessQuick RT-PCR 시스템 (A1702)을 이용하여 무린 면역글로불린 유전자 리더 서열 및 무린 IgG2a/κ 불변 영역에 특이적인 축퇴성 프라이머를 이용하여 가변 중쇄 및 경쇄 영역의 cDNA를 생산하였다. 정제된 RT-PCR 단편을 Invitrogen으로부터의 TA 클로닝 키트 (K2000-01)를 이용하여 클로닝시켰다. 서열 정렬, 및 케이벳에 열거된 공지된 면역글로불린 가변 서열과의 정렬에 의해 각각의 하이브리도마에 대한 컨센서스 서열을 획득하였다 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)). SAP-E 및 SAP-K에 대한 컨센서스 서열을 하기에 도시한다.
- [0271] **SAP-E 서열**
- [0272] SAP-E CDRH1 (SEQ ID NO:1)
- [0273] **TYNMH**
- [0274] SAP-E CDRH2 (SEQ ID NO:2)
- [0275] **YIYPGDGNANYNQFKG**
- [0276] SAP-E CDRH3 (SEQ ID NO:3)
- [0277] **GDFDYDGGYYFDS**
- [0278] SAP-E CDRL1 (SEQ ID NO:4)
- [0279] **RASENIYSYLA**

- [0280] SAP-E CDRL2 (SEQ ID NO:5)
- [0281] **NAKTLAE**
- [0282] SAP-E CDRL3 (SEQ ID NO:6)
- [0283] **QHHYGAPLT**
- [0284] CDR을 밑줄로 표시한 SAP-E V_H 아미노산 서열 (SEQ ID NO:7)
- QASLQQSGTELVRSGASVKMSCKASGFTFATYNMHWIKQTPGQGLEWIGYIYPGDGNANYNQQFKGK
ATLTADTSSNTAYMQISSLTSEDSAVYFCARGDFDYDGGYYFDSWGQGTTLTVSS
- [0285]
- [0286] SAP-E V_H DNA 서열 (SEQ ID NO:8)
- CAGGCTTCTCTACAGCAGTCTGGGACTGAGCTGGTGAGGTCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGC
AAGGCTTCTGGCTTCACATTTGCCACTTACAATATGCACTGGATTAAGCAGACACCCGGACAGGGCC
TGGAATGGATTGGGTATATTTATCCTGGAGATGGTAATGCTAACTACAATCAGCAGTTC AAGGGCAA
GGCCACATTGACTGCAGACACATCTCCAACACAGCCTACATGCAGATCAGCAGCCTGACATCTGAA
GACTCTGCGGTCTATTCTGTGCAAGAGGGGACTTTGATTACGACGGAGGGTACTACTTTGACTCCT
GGGGCCAGGGCACCCTCTCACAGTCTCCTCA
- [0287]
- [0288] CDR을 밑줄로 표시한 SAP-E V_L 아미노산 서열 (SEQ ID NO:9)
- DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQGRSPQLLVHNAKTLAEGVPSRVSGSGSGTH
FSLKINGLQPEDFGNYCQHHHYGAPLTFGAGTKLELK
- [0289]
- [0290] SAP-E V_L DNA 서열 (SEQ ID NO:10)
- GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATG
TCGAGCAAGTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAGATCCCCTCAG
CTCCTGGTCCATAATGCAAAAACCTTAGCAGAAGGTGTGCCATCAAGGGTCAGTGCCAGTGGATCA
GGCACACACTTTTCTCTGAAGATCAACGGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAATTATTACTGTCAAC
ATCATTATGGTGCTCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAAGTGA
- [0291]
- [0292] **SAP-K 서열**
- [0293] SAP-K CDRH1 (SEQ ID NO:11)
- [0294] **SYWMH**
- [0295] SAP-K CDRH2 (SEQ ID NO:12)
- [0296] **MIHPNSVNTNYNEKFKS**
- [0297] SAP-K CDRH3 (SEQ ID NO:13)
- [0298] **RNDYYWYFDV**
- [0299] SAP-K CDRL1 (SEQ ID NO:14)
- [0300] **KASQNVNSNVA**
- [0301] SAP-K CDRL2 (SEQ ID NO:15)
- [0302] **SASYRYS**

[0303] SAP-K CDRL3 (SEQ ID NO:16)

[0304] **QQCNNYPFT**

[0305] CDR을 밑줄로 표시한 SAP-K V_H 아미노산 서열 (SEQ ID NO:17)

[0306] QVQLQQPGAELIKPGASVKLSCKASGYFTSYW**MHWVKQRPGQGLEWIGMIHPNSVNTNYNEKFKSK**
ATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARRNDYYWYFDVWGTGTTVTVSS

[0307] SAP-K V_H DNA 서열 (SEQ ID NO:18)

[0308] CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGATAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGCCTGC
AAGGCTTCTGGCTACACTTTCACCGACTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGC
CTTGAGTGGATTGGAATGATTCATCCTAATAGTGTTAATACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGAGTA
AGGCCACACTGACTGTAGACAAATCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAACAGCCTGACATCTGA
GGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACGGAATGATTACTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACA
GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

[0309] CDR을 밑줄로 표시한 SAP-K V_L 아미노산 서열 (SEQ ID NO:19)

[0310] DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTK**ASQNVNSNVAWYQKPGQSPKALIYSASRYSGVPDRFTGSGSG**
TDFLTITNVQSEDLAEYFC**QQCNNYPFT**FGSGTKLEIK

[0311] SAP-K V_L DNA 서열 (SEQ ID NO:20)

[0312] GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCT
GCAAGGCCAGTCAGAAATGTGAATTCTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAA
AGCACTGATTTACTCGGCTTCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCT
GGGACAGATTTCACTCTCACCATCACCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAAGC
AATGTAACAACATATCCATTACGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGAAATAAAA

[0313] 실시예 2: 키메라 항체의 작제

[0314] 인간 IgG1/κ 야생형 불변 영역 상에 그래프팅된 부모 무린 가변 도메인을 포함하는 키메라 항체를 SAP-E 및 SAP-K에 대한 PCR 클로닝에 의해 작제하였다. 컨센서스 서열에 기반하여, 포유동물 발현 벡터 내로의 클로닝을 촉진하는데 필요한 제한 부위를 포함하는, 무린 가변 도메인을 증폭시키는 프라이머를 설계하였다. FR4 (프레임워크 영역 4 (CDR3 뒤에 그리고 첫 번째 불변 도메인 앞에 있는 V-영역 서열))에서의 제한 부위의 도입을 통해, SAP-E에서의 V_H 아미노산 서열이 SEQ ID NO:7에 도시된 TTLTVSS에서 TLTVSS로 변화되었고, SAP-K에서의 V_H 아미노산 서열이 SEQ ID NO:17에 도시된 TTVTSS에서 TLTVSS로 변화되었다. SAP-K 가변 경쇄에서, 내부 EcoRI 부위가 CDRL1에 존재하였고, 하나의 염기쌍을 변화시킴에 의해 - 이것은 아미노산 서열을 변화시키지 않았다 - 이러한 요망되지 않는 내부 EcoRI 부위를 제거하기 위한 돌연변이유발 프라이머를 설계하였다.

[0315] SAP-E 키메라 항체 (cSAP-E)의 전장 중쇄 및 경쇄 단백질 서열이 SEQ ID NO:21 및 SEQ ID NO:22에 각각 제공된다. SAP-K 키메라 항체 (cSAP-K)의 전장 중쇄 및 경쇄 단백질 서열이 SEQ ID NO:23 및 SEQ ID NO:24에 각각 제공된다.

[0316] SAP-E V_H 키메라 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO:45)

CAGGCTTCTCTACAGCAGTCTGGGACTGAGCTGGTGAGGTCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGC
 AAGGCTTCTGGCTTACATTTGCCACTTACAATATGCACTGGATTAAGCAGACACCCGGACAGGGCC
 TGGAATGGATTGGGTATATTTATCCTGGAGATGGTAATGCTAACTACAATCAGCAGTTCAAGGGCAA
 GGCCACATTGACTGCAGACACATCTCCAACACAGCCTACATGCAGATCAGCAGCCTGACATCTGAA
 GACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGGGGACTTTGATTACGACGGAGGGTACTACTTTGACTCCT
 GGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGG
 CCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGGCCAGCAGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCC
 CCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCCGCCG
 TGCTGCAGAGCAGCGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTCCCAGCAGCAGCCTGGGC
 ACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAG

[0317]

CCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCA
 GCGTGTCTCTGTCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCGAGGTGACCTG
 TGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCACTGGTACGTGGACGGCGTGG
 AGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCC
 GTGCTGACCGTGTGCACCAAGATTGGCTGAACGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAG
 GCCCTGCCTGCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGAGAGCCCCAGGTG
 TACACCCTGCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAG
 GGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATAAA
 GACCACCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAG
 AGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTAC
 ACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

[0318]

[0319] SAP-E V_H 키메라 아미노산 서열 (SEQ ID NO:21)

QASLQQSGTELVRSGASVKMSCKASGFTFATYNMHWIKQTPGQGLEWIGYIYPGDGNANYNQQFKGK
 ATLTADTSSNTAYMQISLTSSEDSAVYFCARGDFDYDGGYFDSWQGLTVLVSSASTKGPSVFLPLPSS
 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN
 HKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

[0320]

[0321] SAP-E V_L 키메라 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO:46)

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACTGTACCATCACATG
 TCGAGCAAGTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAGATCCCCTCAG
 CTCTGGTCCATAATGCAAAAACCTTAGCAGAAGGTGTGCCATCAAGGGTCAAGTGGCAGTGGATCA
 GGCACACACTTTTCTGAAGATCAACGGCCTGCAGCCTGAAGATTTGGGAATTATTACTGTCAAC
 ATCATTATGGTGTCTCCGCTCACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAAGTGAACGTAACGGTGGCCG
 CCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCCAGCGTGGTGT
 GTCTGTGAACAACTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAAGTGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGA
 GCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC
 ACCCTGACCCTGAGCAAGGCCACTACGAGAAGCAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAG
 GGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

[0322]

[0323] SAP-E V_I 키메라 아미노산 서열 (SEQ ID NO:22)
 DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKGRSPQLLVHNAKTLAEGVPSRVSGSGSGTH
 FSLKINGLQPEDFGNYQCQHHYGAPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
 GEC

[0325] SAP-K V_H 키메라 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO:47)
 CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGATAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGC
 AAGGCTTCTGGCTACACTTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGCCTGGACAAGGC
 CTTGAGTGGATTGGAATGATTCATCCTAATAGTGTTAATACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGAGTA
 AGGCCACACTGACTGTAGACAAATCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAACAGCCTGACATCTGA
 GGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACGGAATGATTACTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACA
 GGGACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGC
 AGCAAGAGCACCAAGCGCGGCACAGCCGCCCTGGGGCTGCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCG
 GTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGCGTGACACCTTCCCCGCGTGTGCAG
 AGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGAC
 CTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGA
 GCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCTGCCCTGCCCCGAGTGTCTGGGAGGCCCCAGCGTGT
 CCTGTTCCCCCAAGCCTAAGGACACCTGATGATCAGCAGAACCCCGAGGTGACCTGTGTGGTG
 GTGGATGTGAGCCACGAGGACCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGCGTGGAGGTGCA
 CAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGAC
 CGTGTGACACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCC
 TGCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGAGAGCCCAGGTGTACACCT
 GCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTA
 CCCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAGAACAATAACAAGACACCC
 CCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGAT
 GGCAGCAGGGCAACGTGTTCACTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGA
 AGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

[0326]

[0327] SAP-K V_H 키메라 아미노산 서열 (SEQ ID NO:23)
 QVQLQQPGAELIKPGASVKLSCKASGYFTFSYWMHWVKQRPGQGLEWIGMIHPNSVNTNYNEKFKSK
 ATLVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVVYCARNDYYWYFDVWGTGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKST
 SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
 SNTKVDKVKVEPKSCDKHTHTCPPCPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0328]

[0329] SAP-K V_L 키메라 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO:48)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCT
 GCAAGGCCAGTCAGAAATGTGAACTCTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTA
 AAGCACTGATTACTCGGCTTCTACCCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATC
 TGGGACAGATTTCACTCTACCATCACCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTACG
 CAATGTAACAACATATCCATTACGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAACGTACGGTGGCC
 GCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTG
 TGTCTGCTGAACAACCTTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTGCAG
 AGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCCAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAG
 CACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCA
 GGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

[0330] SAP-K V_L 키메라 아미노산 서열 (SEQ ID NO:24)

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVNSNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSVGPDRFTGSGSG
 TDFLTITNVQSEDLAEYFCQQCNYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFY
 PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
 RGEC

[0331] 실시예 3: 인간화 전략

[0332] 무린 항체로부터의 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3을 적합한 인간 프레임워크 서열 상에 그래프
 텅시키는 공정에 의해 인간화 항체를 생성하였다.

[0333] SAP-E 인간화 전략

[0334] SAP-E 중쇄 인간화

[0335] SAP-E 마우스 가변 중쇄 서열의 경우, JH1 미니젠(minigene)(케이벳: AEYFQHWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:26))과 함
 께 마우스 SAL-E 가변 중쇄 서열 (SEQ ID NO:7)과 60% 동일성 (CDR 포함)을 갖는 인간 생식선 억제제 프레임워
 크를 선택하였다 (IGHV1-69, SEQ ID NO:25). JH1 미니젠 잔기의 처음 6개 잔기는 CDR3 영역 내에 있고, 도너
 항체로부터의 도입(incoming) CDR로 대체되었다.

[0336] 서열 비교 및 항체 기능에 대한 가능한 영향력에 기초하여 5개의 인간화 변이체를 생성하였다. 작제물 H0은 상
 기 선택된 인간 억제제 프레임워크 내로의 무린 CDR (케이벳 넘버링 이용)의 직 이식편(straight graft)이었다.
 작제물 H1은 잔기 27 및 30에 추가 역-돌연변이를 갖는다. 작제물 H2 및 H3은 잔기 2 (H2), 그리고 48 및 67
 (H3)에 추가 역-돌연변이를 갖는 H1에 기반하였다. 작제물 H4는 잔기 69, 73 및 91에 추가 역-돌연변이를 갖는
 H3에 기반하였다. 표 3 참조.

[0337] H0, H1, H2, H3 및 H4의 인간화 가변 중쇄 도메인의 서열을 하기에 제공한다 (각각 SEQ ID NO:27, SEQ ID
 NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30 및 SEQ ID NO:31).

[0340] 표 3: 생성된 SAP-E 인간화 V_H 변이체의 요약

작제물	역셉터/주형 프레임워크	역-돌연변이@aa# (케이벳)	역-돌연변이의 총 개수	인간 역셉터 프레임워크	원래 마우스 서열
H0 (SEQ ID NO:27)	IGHV1-69 (SEQ ID NO:25)	-----	없음	----	-----
H1 (SEQ ID NO:28)	H0	27 30	2	G S	F A
H2 (SEQ ID NO:29)	H1	2	3	V	A
H3 (SEQ ID NO:30)	H1	48 67	4	M V	I A
H4 (SEQ ID NO:31)	H3	69 73 91	7	I K Y	L T F

[0341]

[0342] SAP-E 경쇄 인간화

[0343] SAP-E 마우스 가변 경쇄 서열의 경우, 서열 유사성에 기반하여 J-영역 카파 2 미니젠 (케이벳: YTFGQGTKLEIK, SEQ ID NO:33))과 함께 마우스 SAP-E 가변 경쇄 서열 (SEQ ID No:9)과 68% 동일성 (CDR 포함)을 갖는 인간 생식선 역셉터 프레임워크를 선택하였다 (IGKV1-39, SEQ ID NO:32). JK-2 미니젠 잔기의 처음 2개 잔기는 CDR3 영역 내에 있고, 도너 항체로부터의 도입 CDR로 대체되었다.

[0344] 서열 비교 및 항체 기능에 대한 가능한 영향력에 기초하여 3개의 인간화 변이체를 생성하였다. 작제물 L0은 상기 선택된 인간 역셉터 프레임워크 내로의 무린 CDR (케이벳 넘버링 이용)의 직 이식편이었다. 작제물 L1은 잔기 49에 역-돌연변이를 지니며 작제물 L2는 위치 48 및 49에 역-돌연변이를 갖는다. 표 4 참조.

[0345] L0, L1 및 L2의 인간화 가변 경쇄 도메인의 서열을 하기에 제공한다 (각각 SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35 및 SEQ ID NO:36).

[0346] 표 4: 생성된 SAP-E 인간화 V_L 변이체의 요약

작제물	역셉터/주형 프레임워크	역-돌연변이@aa# (케이벳)	역-돌연변이의 총 개수	인간 역셉터 프레임워크	원래 마우스 서열
L0 (SEQ ID NO:34)	IGKV1-39 (SEQ ID NO:32)	-----	없음	----	-----
L1 (SEQ ID NO:35)	L0	49	1	Y	H
L2 (SEQ ID NO:36)	L1	48 49	2	I Y	V H

[0347]

[0348] SAP-K 인간화 전략

[0349] SAP-K 중쇄 인간화

[0350] SAP-K 마우스 가변 중쇄 서열의 경우, JH1 미니젠 (케이벳: AEYFQHWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:26))과 함께 마우스 SAL-K 가변 중쇄 서열 (SEQ ID NO:17)과 65% 동일성 (CDR 포함)을 갖는 인간 생식선 역셉터 프레임워크를 선택하였다 (IGHV1-69, SEQ ID NO:25). JH1 미니젠 잔기의 처음 6개 잔기는 CDR3 영역 내에 있고, 도너 항체로부터의 도입(incoming) CDR로 대체되었다.

[0351] 서열 비교 및 항체 기능에 대한 가능한 영향력에 기초하여 4개의 인간화 변이체를 생성하였다. 작제물 H0은 상기 선택된 인간 역셉터 프레임워크 내로의 무린 CDR (케이벳 넘버링 이용)의 직 이식편이었다. 작제물 H1은 잔기 27 및 30에 추가 역-돌연변이를 갖는다. 작제물 H2는 잔기 48 및 67에 추가 역-돌연변이를 갖는 H1에 기반하였다. 작제물 H3은 잔기 69 및 71에 추가 역-돌연변이를 갖는 H2에 기반하였다. 표 5 참조.

[0352] H0, H1, H2 및 H3의 인간화 가변 중쇄 도메인의 서열을 하기에 제공한다 (각각 SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39 및 SEQ ID NO:40).

[0353] 표 5: 생성된 SAP-K 인간화 V_H 변이체의 요약

작제물	역셉터/주형 프레임워크	역-돌연변이@ aa# (케이벳)	역-돌연변이의 총 개수	인간 역셉터 프레임워크	원래 마우스 서열
H0 (SEQ ID NO:37)	IGHV1-69 (SEQ ID NO: 25)	-----	없음	----	-----
H1 (SEQ ID NO:38)	H0	27 30	2	G S	Y T
H2 (SEQ ID NO:39)	H1	48 67	4	M V	I A
H3 (SEQ ID NO:40)	H2	69 71	6	I A	L V

[0354]

[0355] SAP-K 경쇄 인간화

[0356] SAP-K 마우스 가변 경쇄 서열의 경우, 서열 유사성에 기반하여 J-영역 카과 2 미니젠 (케이벳: YTFGQGTKLEIK, SEQ ID NO:33))과 함께 마우스 SAP-K 가변 경쇄 서열 (SEQ ID No:19)과 63% 동일성 (CDR 포함)을 갖는 인간 생식선 역셉터 프레임워크를 선택하였다 (IGKV1-39, SEQ ID NO:32). JK-2 미니젠 잔기의 처음 2개 잔기는 CDR3 영역 내에 있고, 도너 항체로부터의 도입 CDR로 대체되었다.

[0357] 서열 비교 및 항체 기능에 대한 가능한 영향력에 기초하여 2개의 인간화 변이체를 생성하였다. 작제물 L0은 상기 선택된 인간 역셉터 프레임워크 내로의 무린 CDR (케이벳 넘버링 이용)의 직 이식편이었다. 작제물 L1은 잔기 46에 역-돌연변이를 갖는다.

[0358] L0 및 L1의 인간화 가변 경쇄 도메인의 서열을 하기에 제공한다 (각각 SEQ ID NO:41 및 SEQ ID NO:42).

[0359] 표 6: 생성된 SAP-K 인간화 V_L 변이체의 요약

작제물	역셉터/주형 프레임워크	역-돌연변이@ aa# (케이벳)	역-돌연변이의 총 개수	인간 역셉터 프레임워크	원래 마우스 서열
L0 (SEQ ID NO:41)	IGKV1-39 (SEQ ID NO:32)	-----	없음	----	-----
L1 (SEQ ID NO:42)	L0	46	1	L	A

[0360]

[0361] 인간화 항체 벡터의 작제

[0362] 인간화 가변 영역 DNA 서열을 서열 최적화하였다. 인간화 가변 중쇄 및 가변 경쇄 영역을 엔코딩하는 DNA 단편을 PCR-기반 전략 및 증폭 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 새로 작제하였다. PCR 생성물을 인간 감마 1 불변 영역 및 인간 카과 불변 영역을 각각 함유하는 포유동물 발현 벡터내로 클로닝시켰다. 이것은 야생형 Fc 영역이다.

- [0363] IGHV1-69 인간 가변 중쇄 생식선 억제 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO:49)
 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTG
 CAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGG
 GCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACACGCACAGAAGTCCAGGG
 CAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC
 TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA
- [0364]
- [0365] IGHV1-69 인간 가변 중쇄 생식선 억제 아미노산 서열 (SEQ ID NO:25)
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFKGRV
 TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVVYCAR
- [0366]
- [0367] IGKV1-39 인간 가변 중쇄 생식선 억제 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO:50)
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG
 CCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAA
 GCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGCAGTGGATCT
 GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACA
 GAGTTACAGTACCCCT
- [0368]
- [0369] IGKV1-39 인간 가변 중쇄 생식선 억제 아미노산 서열 (SEQ ID NO:32)
 DIQMTQSPSSLSASVGRVITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSDF
 TLTISSLQPEDFATYYCQSYSTP
- [0370]
- [0371] JH1 미니제 (SEQ ID NO:26)
AEYFQHWGQGLVTVSS
- [0372]
- [0373] J_K2 미니제 (SEQ ID NO:33)
YTFGQGTKLEIK
- [0374]
- [0375] 코돈 최적화되지 않은 SAP-E 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H0 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO:51)
 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTG
 CAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCACTTACAATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGG
 GCTTGAGTGGATGGGATATATTTATCCTGGAGATGGTAATGCTAACTACAATCAGCAGTCAAGGGC
 AGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCT
 GAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGACTTTGATTACGACGGAGGGTACTACTTTGAC
 TCCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA
- [0376]
- [0377] 코돈 최적화되지 않은 SAP-E 인간화 경쇄 V 영역 변이체 L0 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO:52)
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG
 CCGAGCAAGTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAA
 GCTCCTGATCTATAATGCAAAAACCTTAGCAGAAGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGCAGTGGATCT
 GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACA
 TCATTATGGTGCTCCGCTCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
- [0378]

[0379] SAP-E 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H0 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨) (SEQ ID NO:53)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGGCGCCGAGGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGAGCT
GCAAGGCTAGCGGGGACCTTCTCCACCTACAACATGCACTGGGTCAGGCAGGCACCCGGCCAGG
GCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTACCCCGGCGACGGCAACGCCAACTACAACCAGCAGTTCAAGG
GCAGGGTGACCATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGG
AGCGAGGATACCGCGGTGTAATACTGCGCCAGGGGCGACTTCGACTACGACGGCGGCTACTACTTC
GACAGCTGGGGACAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

[0380]

[0381] SAP-E 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H0 아미노산 서열 (SEQ ID NO:27)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYINMHWVRQAPGQGLEWMGYIYPGDGNANYNQQFK
GRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDFDYDGGYFDSWGQGLTVTVSS

[0382]

[0383] SAP-E 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H1 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨) (SEQ ID NO:54)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGGCGCCGAGGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGAGCT
GCAAGGCTAGCGGGTTACCTTCGCCACCTACAACATGCACTGGGTCAGGCAGGCACCCGGCCAGG
GCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTACCCCGGCGACGGCAACGCCAACTACAACCAGCAGTTCAAGG
GCAGGGTGACCATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGG
AGCGAGGATACCGCGGTGTAATACTGCGCCAGGGGCGACTTCGACTACGACGGCGGCTACTACTTC
GACAGCTGGGGACAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

[0384]

[0385] SAP-E 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H1 아미노산 서열 (SEQ ID NO:28)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFATYINMHWVRQAPGQGLEWMGYIYPGDGNANYNQQFK
GRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDFDYDGGYFDSWGQGLTVTVSS

[0386]

[0387] SAP-E 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H2 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨) (SEQ ID NO:55)

CAGGCGCAGCTGGTGCAGAGCGGGCGCCGAGGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGAGCT
GCAAGGCTAGCGGGTTACCTTCGCCACCTACAACATGCACTGGGTCAGGCAGGCACCCGGCCAGG
GCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTACCCCGGCGACGGCAACGCCAACTACAACCAGCAGTTCAAGG
GCAGGGTGACCATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGG
AGCGAGGATACCGCGGTGTAATACTGCGCCAGGGGCGACTTCGACTACGACGGCGGCTACTACTTC
GACAGCTGGGGACAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

[0388]

[0389] SAP-E 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H2 아미노산 서열 (SEQ ID NO:29)

QAQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFATYINMHWVRQAPGQGLEWMGYIYPGDGNANYNQQFK
GRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDFDYDGGYFDSWGQGLTVTVSS

[0390]

[0391] SAP-E 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H3 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨) (SEQ ID NO:56)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGGCGCCGAGGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGAGCT
GCAAGGCTAGCGGGTTACCTTCGCCACCTACAACATGCACTGGGTCAGGCAGGCACCCGGCCAGG
GCCTGGAGTGGATCGGCTATATCTACCCCGGCGACGGCAACGCCAACTACAACCAGCAGTTCAAGG
GCAGGGCCACCATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGGA
GCGAGGATACCGCGGTGTAATACTGCGCCAGGGGCGACTTCGACTACGACGGCGGCTACTACTTCG
ACAGCTGGGGACAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

[0392]

- [0393] SAP-E 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H3 아미노산 서열 (SEQ ID NO:30)
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTFATYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPGDGNANYNQQFKG
 RATITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDFDYDGGYYFDSWGQGLTVTVSS
- [0394]
- [0395] SAP-E 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H4 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨) (SEQ ID NO:57)
 CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGCGCCGAGGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGAGCT
 GCAAGGCTAGCGGGTTCACCTTCGCCACCTACAACATGCACTGGGTGAGCAGGCACCCGGCCAGG
 GCCTGGAGTGGATCGGTATATCTACCCCGGCGACGGCAACGCCAACTACAACCAGCAGTTC AAGG
 GCAGGGCCACCTGACCGCCGACACCAGCACCAGCACCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGGA
 GCGAGGATACCGCGTGTACTTCTGCGCCAGGGGCGACTTCGACTACGACGGCGGCTACTACTCG
 ACAGCTGGGGACAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC
- [0396]
- [0397] SAP-E 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H4 아미노산 서열 (SEQ ID NO:31)
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTFATYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPGDGNANYNQQFKG
 RATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARGDFDYDGGYYFDSWGQGLTVTVSS
- [0398]
- [0399] SAP-E 인간화 경쇄 V 영역 변이체 L0 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨) (SEQ ID NO:58)
 GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCACTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATTACC
 TGCAGGGCCTCCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCC
 AAGCTGCTGATCTACAACGCCAAGACCCTCGCCGAGGGCGTCCCTAGCAGGTTCTCTGGAAGCGGC
 AGCGGCACCGACTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTATTACTGCC
 AGCACCCTACGGCGCCCCCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGAGATCAAG
- [0400]
- [0401] SAP-E 인간화 경쇄 V 영역 변이체 L0 아미노산 서열 SEQ ID NO:34
 DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASENIYSYLAWYQQKPKGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFSGSGSDF
 TLTISLQPEDFATYYCQHHYGAPLTFGQGTKLEIK
- [0402]
- [0403] SAP-E 인간화 경쇄 V 영역 변이체 L1 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨) (SEQ ID NO:59)
 GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCACTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATTACC
 TGCAGGGCCTCCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCC
 AAGCTGCTGATCCACAACGCCAAGACCCTCGCCGAGGGCGTCCCTAGCAGGTTCTCTGGAAGCGGC
 AGCGGCACCGACTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTATTACTGCC
 AGCACCCTACGGCGCCCCCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGAGATCAAG
- [0404]
- [0405] SAP-E 인간화 경쇄 V 영역 변이체 L1 아미노산 서열 (SEQ ID NO:35)
 DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASENIYSYLAWYQQKPKGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFSGSGSDF
 TLTISLQPEDFATYYCQHHYGAPLTFGQGTKLEIK
- [0406]
- [0407] SAP-E 인간화 경쇄 V 영역 변이체 L2 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨) (SEQ ID NO:60)
 GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCACTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATTACC
 TGCAGGGCCTCCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCC
 AAGCTGCTGGTGCACAACGCCAAGACCCTCGCCGAGGGCGTCCCTAGCAGGTTCTCTGGAAGCGGC
 AGCGGCACCGACTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTATTACTGCC
 AGCACCCTACGGCGCCCCCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGAGATCAAG
- [0408]

- [0409] SAP-E 인간화 경쇄 V 영역 변이체 L2 아미노산 서열 (SEQ ID NO:36)
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLVHNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTD
 FTLTISSLQPEDFATYYCQHYYGAPLTFGQGTKLEIK
- [0410]
- [0411] SAP-E 인간화 중쇄 H1 전체 성숙 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨) (SEQ ID NO:61)
 CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGGCGCCGAGGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGAGCT
 GCAAGGCTAGCGGGTTACCTTCGCCACCTACAACATGCACTGGGTGAGGCAGGCACCCGGCCAGG
 GCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTACCCGGCGACGGCAACGCCAACTACAACCAGCAGTTCAAGG
 GCAGGGTGACCATCACCGCGACAAGAGCACCAGCACCCGCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGG
 AGCGAGGATACCGCGGTGACTACTGCGCCAGGGGCGACTTCGACTACGACGGCGGCTACTACTTC
 GACAGCTGGGGACAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGT
 CCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGGCGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGG
 ACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTT
 CCCC GCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTACCCTGCCAGCAGCAG
 CCTGGGCACCCAGACTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA
 GGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGG
 AGGCCCCAGCGTGTCTGTTCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCGAG
 GTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGA
 CGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGG
 TGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGATTGGTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGT
 CCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGAGAGC
 CCCAGGTGTACACCCTGCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCT
 GGTGAAGGGCTTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACA
 ACTACAAGACCACCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGT
 GGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTGAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACA
 ATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG
- [0412]
- [0413] SAP-E 인간화 중쇄 H1 전체 성숙 아미노산 서열 (SEQ ID NO:62)
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFATYNMHWVRQAPGQGLEWMGYIYPGDGNANYNQQFK
 GRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCARGDFDYDGGYYFDSWGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
 VNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
- [0414]

- [0415] SAP-E 인간화 경쇄 L1 전체 성숙 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨) (SEQ ID NO:63)
- GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCACTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATTACC
 TGCAGGGCCTCCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCC
 AAGCTGCTGATCCACAACGCCAAGACCCTCGCCGAGGGCGTCCCTAGCAGGTTCTCTGGAAGCGGC
 AGCGGCACCGACTTACCCTGACCATCAGCAGCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTATTACTGCC
 AGCACCCTACGGCGCCCCCTGACCTTTGGCCAGGGCACAAACTGGAGATCAAGCGTACGGTGG
 CCGCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGG
 TGTGTCTGCTGAACAACCTTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGC
 AGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGC
 AGCACCTGACCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCAC
 CAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC
- [0416]
- [0417] SAP-E 인간화 경쇄 L1 전체 성숙 아미노산 서열 (SEQ ID NO:64)
- DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASENIYSYLAWYQKPGKAPKLLIHNAKTLAEGVPSRFSGSGSDF
 TLTISSLQPEDFATYYCQHHYGAPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
 KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
- [0418]
- [0419] 코돈 최적화되지 않은 SAP-K 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H0 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO:65)
- CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGTCTCCTG
 CAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTACTGGATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGG
 GCTTGAGTGGATGGGAATGATTCATCCTAATAGTGTAACTAATACTACAATGAGAAGTTCAAGAGT
 AGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCT
 GAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGACGGAATGATTACTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGC
 CAGGGCACCTGGTACCCTCTCCTCA
- [0420]
- [0421] 코돈 최적화되지 않은 SAP-K 인간화 경쇄 V 영역 변이체 L0 뉴클레오티드 서열 (SEQ ID NO:66)
- GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG
 CAAGGCCAGTCAGAATGTGAACCTAATGTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAA
 GCTCCTGATCTATTGCGCTTCTACCGGTACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCT
 GGGACAGATTTCACTCTACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCAACTTACTACTGTCAGCA
 ATGTAACAACATATCCATTCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
- [0422]
- [0423] SAP-K 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H0 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨) (SEQ IS NO:67)
- CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCCGGAGCAGCGTGAAAGTGAGCT
 GCAAGGCCAGCGGCGGAACCTTCAGCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCACCCGGCCAG
 GGCCTGGAGTGGATGGGCATGATCCACCCCAACAGCGTGAACACCAACTACAACGAGAAGTTCAAG
 AGCAGAGTGACCATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCCTATATGGAGCTGAGCTCTCTGAGG
 AGCGAGGATACCGCGTGTACTACTGCGCCAGGAGGAACGACTACTACTGGTACTTCGACGTCTGG
 GGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC
- [0424]
- [0425] SAP-K 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H0 아미노산 서열 (SEQ ID NO:37)
- QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYWMHWRQAPGQGLEWMGMIHNPNSVNTNYNEKFK
 SRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRNDYYWYFDVWVGQGLVTVSS
- [0426]

[0427] SAP-K 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H1 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨) (SEQ ID NO:68)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCCGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCT
GCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCACCCGGCCAG
GGCCTGGAGTGGATGGGCATGATCCACCCCAACAGCGTGAACACCAACTACAACGAGAAGTTCAAG
AGCAGAGTGACCATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACC GCCTATATGGAGCTGAGCTCTCTGAGG
AGCGAGGATACCGCCGTGTA C TACTGCGCCAGGAGGAACGACTACTACTGGTACTTCGACGTCTGG
GGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

[0428]

[0429] SAP-K 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H1 아미노산 서열 (SEQ ID NO:38)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYFTFSYWMHWVRQAPGQGLEWMGMHPNSVNTNYNEKFK
SRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRNDYYWYFDVWVGQGLTVTVSS

[0430]

[0431] SAP-K 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H2 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨) (SEQ ID NO:69)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCCGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCT
GCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCACCCGGCCAG
GGCCTGGAGTGGATCGGCATGATCCACCCCAACAGCGTGAACACCAACTACAACGAGAAGTTCAAG
AGCAGAGCCACCATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACC GCCTATATGGAGCTGAGCTCTCTGAGG
AGCGAGGATACCGCCGTGTA C TACTGCGCCAGGAGGAACGACTACTACTGGTACTTCGACGTCTGG
GGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

[0432]

[0433] SAP-K 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H2 아미노산 서열 (SEQ ID NO:39)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYFTFSYWMHWVRQAPGQGLEWIGMIHPNSVNTNYNEKFKS
RATITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRNDYYWYFDVWVGQGLTVTVSS

[0434]

[0435] SAP-K 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H3 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨) (SEQ ID NO:70)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCCGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCT
GCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCACCCGGCCAG
GGCCTGGAGTGGATCGGCATGATCCACCCCAACAGCGTGAACACCAACTACAACGAGAAGTTCAAG
AGCAGAGCCACCCTGACCGTGGACAAGAGCACCAGCACC GCCTATATGGAGCTGAGCTCTCTGAGG
AGCGAGGATACCGCCGTGTA C TACTGCGCCAGGAGGAACGACTACTACTGGTACTTCGACGTCTGG
GGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

[0436]

[0437] SAP-K 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H3 아미노산 서열 (SEQ ID NO:40)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYFTFSYWMHWVRQAPGQGLEWIGMIHPNSVNTNYNEKFKS
RATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRNDYYWYFDVWVGQGLTVTVSS

[0438]

[0439] SAP-K 인간화 경쇄 V 영역 변이체 L0 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨) SEQ ID NO:71)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTTCACTGAGCGTAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACC
TGCAAGGCCAGCCAGAACGTGAACAGCAACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCAAAGCCCC
CAAGCTCCTGATCTACAGCGCCAGCTACAGATATAGCGCGTGCTAGCAGGTTTAGCGGCAGCGG
AAGCGGGACCGATTTACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACTTACTACTGC
CAGCAGTGCAACAACCTACCCCTTACCTTCGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

[0440]

[0441] SAP-K 인간화 경쇄 V 영역 변이체 L0 아미노산 서열 (SEQ ID NO:41)

DIQMTQSPSSLSASVGRVITITKASQNVNSVAWYQKPKGKAPKLLIYSASYRSGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSLQPEDFATYYCQQCNYPFTFGQGTKLEIK

[0442]

[0443] SAP-K 인간화 경쇄 V 영역 변이체 L1 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨) (SEQ ID NO:72)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTTCTCACTGAGCGCTAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACC
 TGCAAGGCCAGCCAGAACGTGAACAGCAACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCAAAGCCCC
 CAAGGCCCTGATCTACAGCGCCAGCTACAGATATAGCGGCGTGCCTAGCAGGTTTAGCGGCAGCGG
 AAGCGGGACCGATTTCACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACTTACTACTGC
 CAGCAGTGCAACAACTACCCCTCACCTTCGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

[0444]
 [0445] SAP-K 인간화 경쇄 V 영역 변이체 L1 아미노산 서열 (SEQ ID NO:42)

DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCKASQNVNSNVAWYQKPKGKAPKALIYSASYRYSRVSRFSGSGSGT
 DFTLTISSLQPEDFATYYCQQCNYPFTFGQGTKLEIK

[0446]
 [0447] SAP-K 인간화 H3 중쇄 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨) (SEQ ID NO:75)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGCGCCGAAGTGAAGAAGCCCGCAGCAGCGTGAAGTGAGCT
 GCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCACCCGCGCCAG
 GGCCTGGAGTGATCGGCATGATCCACCCCAACAGCGTGAACACCAACTACAACGAGAAGTTCAAG
 AGCAGAGCCACCTGACCGTGGAACAAGACACCAGCACCAGCCTATATGGAGCTGAGCTCTCTGAGG
 AGCGAGGATACCGCGGTACTACTGCGCCAGGAGAACGACTACTACTGGTACTTCGACGTCTGG
 GGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCC

[0448]
 CCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCC
 GAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCGGTG
 CTGCAGAGCAGCGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTACCGTGCAGCAGCAGCCTGGGCAC
 CCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCC
 CAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAG
 CGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCTAAGGACACCCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGT
 GTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
 GGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGTGGTGTCCG
 TGCTGACCGTGTGACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGG
 CCCTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGAGAGCCCCAGGTGT
 ACACCCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGG
 GCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGA
 CCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAG
 CAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTACGTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACAC
 CCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

[0449]
 [0450] SAP-K 인간화 H3 중쇄 아미노산 서열 (SEQ ID NO:76)

QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGYFTFSYWMHWVRQAPGQGLEWIGMIHPNSVNTNYNEKFKS
 RATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRNDYYWYFDVWVGQGLTVVSSASTKGPSVFLPAPSSKS
 TSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHK
 PSNTKVDKVKVEPKSCDKHTHTCPPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTIKAKGQPRE
 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKLVTKSR
 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0451]

[0452] SAP-K 인간화 L0 경쇄 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨) (SEQ ID NO:77)
 GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTTCTCACTGAGCGCTAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACC
 TGCAAGGCCAGCCAGAACGTGAACAGCAACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCAAAGCCCC
 CAAGCTCCTGATCTACAGCGCCAGCTACAGATATAGCGGCGTGCCTAGCAGGTTTAGCGGCAGCGG
 AAGCGGGACCGATTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACTTACTACTGC
 CAGCAGTGCAACAACCTACCCCTTACCTTCGCGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTG
 GCCGCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTG

[0453] GTGTGTCTGCTGAACAACCTTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAAGTGAAGGTGGACAATGCCCTG
 CAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAG
 CAGCACCTGACCCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTGTGAGGTGACCCA
 CCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

[0454] SAP-K 인간화 L0 경쇄 아미노산 서열 (SEQ ID NO:78)

[0455] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVNSNVAWYQKPKAPKLLIYSASYRSGVPSRFSGSGSGTD
 FTLTISLQPEDFATYYCQQCNYPFTFGQGTLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPRE
 AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
 EC

[0456] 면역글로불린 쇠에 대한 리더 서열 (SEQ ID: 79)

[0457] **MGWSCILFLVATATGVHS**

[0458] 실시예 4: - 항체 발현

[0459] 제조함 항체 발현

[0460] 키메라 또는 인간화 항체의 중쇄 및 경쇄를 각각 엔코딩하는 발현 플라스미드를 펙틴(Fectin) 293을 이용한 지
 질 트랜스펙션에 의해 HEK2936E 세포 내로 일시적으로 코트랜스펙션시켰다. 세포를 10% 플루로닉 F68 및
 50mg/ml 제네티신을 갖는 프리스타일(Freestyle) 발현 배지 293에서 37°C, 5% CO₂에서 72 내지 120시간 동안 성
 장시키고, 상청액을 원심분리에 의해 수거하였다. 일부 예에서, 상청액 물질을 결합 검정에서 시험 물질으로서
 이용하였다. 다른 예에서, 상청액 물질을 여과 살균시키고, 단백질 A MAbSelect SuRE 컬럼을 이용한 친화성 크
 로마토그래피 이후 PBS내로의 투석에 의해 회수하였다.

[0461] 하이브리도마 항체 발현

[0462] 하이브리도마 세포를 4mM 글루타맥스 및 10% 저 IgG FCS가 보충된 Ex620 배지에서 진탕 플라스크에서 성장시켰
 다. 세포를 계대배양하고 무혈청 배지에서 잘 성장할 때까지 혈청과 떼어 놓았다 (wean off). 그 후 세포를
 10L 웨이브백(wavebag)에 대한 시드(seed)로서 이용하였다. 생육성이 30%로 떨어질 때까지 세포를 웨이브백에
 서 22 rocks/분으로 37°C, 5% CO₂에서 0.1L/분으로 성장시켰다. 조건화된 배지를 살균 여과에 의해
 수집하였다. 항체를 제조함 단백질 A를 이용한 친화성 크로마토그래피에 이어서 PBS내로의 투석에 의해 회수하
 였다.

[0463] 실시예 5-7: 하이브리도마 및/또는 키메라 mAb 및/또는 인간화 Mab 간의 비교 데이터

[0464] 실시예 5: 인간 SAP 결합 ELISA에서 SAP-K 및 SAP-E 하이브리도마의 비교

[0465] 1 µg/mL 또는 5 µg/mL의 인간 SAP를 ELISA 플레이트 상에 직접 고정시키고 1%B_{SA}/TBS와 0.05% TWEEN20으로 차
 단시켰다. 정제된 물질로부터의 항-SAP 항체를 플레이트를 가로질러 적정하였다. 결합된 항체를 호스래디쉬
 퍼옥시다제 (HRP)-컨쥬게이션된 토끼-항-마우스 IgG 항체 (Dako, P0260)로의 처리에 의해 검출하였다. ELISA를
 0-페닐렌디아민 디히드로클로라이드 (OPD) 퍼옥시다제 기질 (Sigma, P9187)을 이용하여 현상하였다.

[0466] 도 1은 인간 SAP의 1 µg/mL의 코팅 농도에서 무린 항체 SAP-E 및 SAP-K에 대한 결합 곡선을 도시한다.

[0467] 도 2는 인간 SAP의 5 µg/mL의 코팅 농도에서 무린 항체 SAP-E 및 SAP-K에 대한 결합 곡선을 도시한다.

- [0469] 5 $\mu\text{g/mL}$ 코팅 농도에서, SAP-K 및 SAP-E는 고정된 인간 SAP와 유사한 결합을 나타낸 반면, 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 보다 낮은 밀도 코팅에서 SAP-K는 SAP-E보다 큰 결합을 나타내었다. 이러한 포맷을 이용한 모든 후속하는 인간 SAP 결합 ELISA는 두 개의 항체의 결합 특성을 구별하기 위해 보다 낮은 밀도 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 코팅 농도를 이용하였다.
- [0470] 실시예 6: 인간 SAP 결합 ELISA에서 SAP-K 및 SAP-E 키메라/인간화 mAb의 비교
- [0471] 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 인간 SAP를 ELISA 플레이트 상에 직접 고정시키고 1%BSA/TBS와 0.05% TWEEN20으로 차단시켰다. 시험 상청액 또는 정제된 물질로부터의 항-SAP 항체를 플레이트를 가로질러 적정하였다. 결합된 항체를 염소 항-인간 카파 경쇄 퍼옥시다제 컨쥬게이트 (Sigma, A7164)로의 처리에 의해 검출하였다. ELISA를 O-페닐렌디아민 디히드로클로라이드 (OPD) 퍼옥시다제 기질 (Sigma, P9187)을 이용하여 현상하였다.
- [0472] 도 3은 키메라 항체 cSAP-E 및 cSAP-K에 대한 결합 곡선을 도시한다. 키메라 항체들에 대한 곡선의 프로파일은 동등한 하이브리도마와 동일하다.
- [0473] 도 4는 SAP-K 키메라에 비해 SAP-K H0L0, SAP-K H1L0, SAP-K H2L0 및 SAP-K H3L0에 대한 결합 곡선 및 SAP-E 키메라에 비해 SAP-E H1L1에 대한 결합 곡선을 도시한다. 무관한 인간 IgG1 카파 항체를 또한 네거티브 대조군으로서 시험하였다. 데이터는, SAP-K 항체의 인간화가 부모 SAP-K 키메라에 비해 약 2배의 인간 SAP 결합 활성의 손실을 야기한 반면, 인간화 SAP-E 항체는 부모 SAP-E 키메라에 비해 결합 활성을 유지시켰음을 나타낸다.
- [0474] 실시예 7 - 경쟁 ELISA
- [0475] ELISA 플레이트를 1 $\mu\text{g/mL}$ (SAP-K 키메라와의 경쟁을 위해) 또는 5 $\mu\text{g/mL}$ (SAP-E 키메라와의 경쟁을 위해)의 인간 SAP로 코팅하고 1% BSA/PBS로 차단시켰다. 일정한 농도의 키메라 항-SAP mAb를 연속 희석된 (1:1) 양의 마우스 항-SAP mAb와 혼합시켰다. 플레이트를 세척하고, 고정된 인간 SAP에 결합된 키메라 항체의 양을 염소 항-인간 카파 경쇄 퍼옥시다제 컨쥬게이트 (Sigma, A7164)를 이용하여 검출하였다. ELISA를 O-페닐렌디아민 디히드로클로라이드 (OPD) 퍼옥시다제 기질 (Sigma, P9187)을 이용하여 현상하였다.
- [0476] 도 5는 SAP-E 키메라와의 경쟁 ELISA에서 정제된 SAP-K 및 SAP-E 뮤린 모노클로날 항체를 도시한다.
- [0477] 도 6은 SAP-K 키메라와의 경쟁 ELISA에서 정제된 SAP-K 및 SAP-E 뮤린 모노클로날 항체를 도시한다.
- [0478] 두 개의 도면 5 및 6에서, 두 개의 항체가 인간 SAP 분자상의 별개의 에피토프에 결합하는 SAP-E 및 SAP-K 항체 간에 어떠한 경쟁도 관찰되지 않는다.
- [0479] 실시예 8: 결합 동력학의 측정
- [0480] 정제된 인간 및 정제된 시노물구스 원숭이 SAP에 대한 인간화 항-SAP 항체 변이체의 결합의 Biacore 분석
- [0481] 인간 및 시노물구스 원숭이 SAP를 일차 아민 커플링에 의해 제조자의 지시에 따라 Biacore C1 칩 상에 고정시켰다. 배양 상청액에 함유된 인간화 항-SAP 항체 및 512nM의 정제된 키메라 항체를 인간 및 시노물구스 원숭이 둘 모두의 SAP 표면 상에서 통과시키고 결합 센소그램을 획득하였다. 모든 이동(run)은 인간 및 시노물구스 SAP 표면 상에서 상청액 샘플에 대한 배지 또는 정제된 샘플에 대한 완충 주사액(buffer injection)으로 2중 참조(double referenced)되었다. 분석을 HBS-EP 완충액을 이용하여 25°C에서 수행하였다. 3M MgCl₂의 존재하에 표면을 재생시켰고 표면의 재생은 후속 사이클에서 인간 SAP에 재결합하는 항체의 능력에 아무런 영향을 미치지 않았다. 데이터를 Biacore T100 평가 소프트웨어 내에서 1 대 1 분리 모델을 이용하여 분석하였다.
- [0482] 표 6a 및 6b에서 생성된 데이터는 각각 인간화 SAP-E 및 SAP-K 항체 상청액의 오프 레이트(off-rate)(kd)를 나타낸다. 값들은 단일 곡선에 기반하였고 인간 SAP와의 결합에 대한 상이한 작제물들 간의 등급화 목적에 이용되었다. 인간화 SAP-E 항체는 인간 SAP와의 결합에 대해 인간화 SAP-K 항체보다 나은 오프-레이트를 나타내었다. 다수의 SAP-K 인간화 항체 변이체가 시노물구스 원숭이 SAP (N.B. SAP-K 키메라가 시노물구스 원숭이 SAP에 결합하였다)와의 결합을 나타낸 반면, 어떠한 인간화 SAP-E 항체 변이체도 시노물구스 원숭이 SAP (N.B. 마찬가지로 SAP-E 키메라가 시노물구스 원숭이 SAP에 결합하지 않았다)에 결합하지 않았다. 직 이식편 인간화 중쇄 (H0) 또는 직 이식편 인간화 경쇄 (L0) 또는 둘 모두의 조합물을 함유하는 인간화 SAP-E 변이체가 가장 좋지 않은 오프-레이트를 나타내었다. SAP-E 인간화 L1 경쇄가 가장 우수한 경쇄 변이체였고, L1과 H1 중쇄 변이체의 조합물이 역-돌연변이의 수를 최소로 유지하면서 허용가능한 오프-레이트를 갖는 인간화 항체를 제공하였다. 인간화 SAP-K 변이체의 오프-레이트 등급화는 L0 직 이식편이 가장 우수한 인간화 경쇄 변이체이고 H0 직 이식편이 가장 좋지 않은 인간화 중쇄 변이체임을 나타내었다.

[0483] 표 6a

SAP-E 변이체	인간 SAP 에 대한 Kd (s ⁻¹)
SAP-E 키메라	3.83E-03
SAP-E H1L1	4.80E-03
SAP-E H4L1	5.43E-03
SAP-E H1L2	5.51E-03
SAP-E H3L1	5.76E-03
SAP-E H4L2	5.80E-03
SAP-E H2L1	6.09E-03
SAP-E H3L2	6.31E-03
SAP-E H2L2	6.52E-03
SAP-E H1L0	8.09E-03
SAP-E H3L0	9.10E-03
SAP-E H2L0	9.79E-03
SAP-E H4L0	9.81E-03
SAP-E H0L1	4.02E-02
SAP-E H0L2	4.29E-02
SAP-E H0L0	5.35E-02

[0484]

[0485] 표 6b

[0486] N.B. Kd는 인간 SAP에 대한 것이다.

	kd (s ⁻¹)	시노물구스 SAP에 대한 결합
SAP-K 키메라	6.64E-03	예
SAP-K H1L0	1.71E-02	불충분함
SAP-K H3L0	1.84E-02	예
SAP-K H2L0	2.04E-02	예
SAP-K H3L1	2.36E-02	예
SAP-K H0L0	2.63E-02	아니오
SAP-K H1L1	2.96E-02	불충분함
SAP-K H2L1	3.21E-02	불충분함
SAP-K H0L1	4.79E-02	아니오

[0487]

[0488] 고형상 지지체에 직접 고정된 정제된 인간 SAP에 대한 항-SAP 항체의 결합의 Biacore 분석

[0489] 인간 SAP를 일차 아민 커플링에 의해 제조자의 지시에 따라 Biacore CM3 칩 상에 고정시켰다. 항-SAP 항체를

512, 128, 32, 8, 2, 0.5nM로 이러한 표면 상에서 통과시키고 결합 센소그램을 획득하였다. 모든 이동은 인간 SAP 표면 상에서 완충 주사액으로 2중 참조되었다. 분석을 HBS-EP 완충액을 이용하여 25℃에서 수행하였다. 완충액이 수 분간 표면 상에서 흐르게 함으로써 표면을 재생시켰고 표면의 재생은 후속 사이클에서 항체에 재결합하는 인간 SAP의 능력에 아무런 영향을 미치지 않았다. 데이터를 Biacore T100 평가 소프트웨어 고유의 2가 분석 모델을 이용하여 128 내지 0.5nM 이동으로부터 분석하였다.

[0490] 표 7에 따른 생성 데이터는 작제물들 간에 비교를 위해 의도되었고, 이는 SAP-K 항체가 이러한 검정에서 양호한 회합율(association rate)을 갖는 반면 SAP-E 항체가 양호한 분리율(dissociation rate)을 가짐을 나타낸다. 더욱이, 인간화는 SAP-E 항체의 결합 동력학을 변화시키지 않는 반면, SAP-K의 경우, 인간화 후에 회합 및 분리율에서의 손실이 관찰되었다.

[0491] 표 7

	Ka (M ⁻¹ .s ⁻¹)	Kd (s ⁻¹)	KD (nM)
SAP-K 키메라	4.06E+5	7.59E-03	18.7
SAP-K H0L0	6.08E+4	4.49E-02	739
SAP-K H1L0	1.15E+5	1.78E-02	155
SAP-K H2L0	1.15E+5	2.20E-02	191
SAP-K H3L0	1.50E+5	1.92E-02	128
SAP-E 키메라	2.64E+4	2.18E-03	82.6
SAP-E H1L1	2.64E+4	2.07E-03	78.3

[0492] 고정된 O-포스포에탄올아민 상에 포획된 정제된 인간 SAP에 대한 항-SAP 항체의 결합의 Biacore 분석

[0493] O-포스포에탄올아민을 일차 아민 커플링에 의해 제조자의 지시에 따라 Biacore CM5 칩 상에 고정시켰다. 그 후, 인간 SAP를 칼슘 클로라이드의 존재하에 표면에 포획하여, 시험관내 Biacore 시스템에서, 생체내 아밀로이드 원섬유에 결합된 정확한 배향의 SAP 분자를 복제하였다. 그 후, 항-SAP 항체를 256, 64, 16, 4, 1nM로 이러한 표면 상에서 통과시키고, 결합 센소그램을 획득하였다. 4% BSA, 10mM Tris, 140mM NaCl, 2mM CaCl₂, 0.05% 계면활성제 P20, 0.02% NaN₃, pH 8.0을 이동 완충액으로서 이용하여 분석을 25℃에서 수행하였다. 결합된 인간 SAP를 제거하거나 고정된 포스포에탄올아민에 대한 SAP의 후속하는 결합에는 현저한 영향을 미치지 않는 2 펄스의 Tris-EDTA (10mM Tris, 140mM NaCl, 10mM EDTA, pH 8.0)를 이용하여 재생을 달성하였다. 생성된 데이터는 인간 SAP 표면 상에서 완충 주사액으로 2중 참조되었고 Biacore T100 평가 소프트웨어에서 2가 분석 모델을 이용하여 분석되었다.

[0494] 표 8에 도시된 대로, 생성된 데이터는 단지 작제물들 간에 비교를 위한 것이다. 이들은 검정 포맷 본래의 결합성(avidity) 효과에 의해 가능한 결합의 변형으로 인해, 정밀한 동력학 수치를 구성하지 않는다. 결합성은 아마도 항체 분리율에 영향을 미쳐서 보다 낮은 계산된 KD 값을 생성할 것이다. 더욱이, 모든 SAP-E 항체의 경우에, 획득된 분리율 (kd)은 Biacore 측정 범위의 한계를 벗어난다. 그럼에도 불구하고, 결과는 SAP와 고행상 리간드와의 상호작용에 의해 고정된 인간 SAP에 대한 항-SAP 항체의 단단한 결합을 나타내는데, 그 이유는 단지 본 발명의 치료적 표적인 생체내 아밀로이드 침착물에 고행상 리간드가 존재하기 때문이다.

[0496] 표 8

	ka (M ⁻¹ .s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	KD (nM)
SAP-K 키메라	3.32E+5	2.97E-4	0.895
SAP-E 키메라	2.03E+4	9.12E-7	4.49E-11
마우스 SAP-K	3.00E+5	2.19E-4	0.730
마우스 SAP-E	3.15E+4	1.51E-8	4.79E-13
SAP-K H3L0	1.36E+5	5.01E-3	36.8
SAP-E H1L1	1.94E+4	1.58E-7	8.14E-12

[0497]

[0498] 실시예 9: SAP-K L0 인간화 경쇄의 위치 91에서 아미노산 스캔

[0499] 부위-지정 포화 돌연변이발생을 이용하여 위치 91의 시스테인 잔기 (케이벳 넘버링)가 이러한 위치에서 NNK (여기에서 N은 아데노신 또는 시티딘 또는 구아노신 또는 티미딘을 코딩하고, K는 구아니신 또는 티미딘을 코딩한다)를 엔코딩하는 돌연변이발생 프라이머를 이용함에 의해 단일 반응으로 19개의 모든 다른 아미노산으로 잠재적으로 치환된 변이체의 패널을 생성하였다. 생성된 변이체에 대해 항체 상청액 상에서 수행된 Biacore 오프-레이트 등급화로부터, HEK2936E 세포에서의 스케일 업(scale up) 및 정제를 위해 4개를 선택하였다. 실시예 7에 설명된 0-포스포에탄올아민 방법을 이용한 Biacore 동력학 분석은 위치 91에 알라닌을 갖는 변이체 (SEQ ID NO:43)가 야생형에 비해 향상된 친화도를 지녔음을 나타내었다; 0.436 nM 및 36.8 nM의 KD 값이 각각 측정되었다. N.B. 모든 변이체를 표 7에 도시된 결과를 생성하기 위해 사용된 동일한 실험으로 조사하였다.

[0500] 그 밖의 변이체, 예를 들어 글리신, 세린 및 발린은 H3L0에 관해 결합을 향상시켰으나, 알라닌보다는 적은 한도로 향상시켰다. 또한, 경쇄가 H1과 페어링될 때, 이러한 4개의 변이체가 L0보다 양호한 결합 특성을 지녔다는 사실이 결합 ELISA 및 Biacore 오프-레이트 등급화 실험에서도 관찰되었다.

[0501] SAP-K 인간화 경쇄 V 영역 변이체 L0 91A 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨) (SEQ ID NO:73)

```
GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCTTCACTGAGCGCTAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACC
TGCAAGGCCAGCCAGAACGTGAACAGCAACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCAAAGCCCC
CAAGCTCCTGATCTACAGCGCCAGCTACAGATATAGCGGCGTGCTAGCAGGTTTAGCGGCAGCGG
AAGCGGGACCGATTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACTTACTACTGC
CAGCAGGCGAACAACACTACCCCTTACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG
```

[0502]

[0503] SAP-K 인간화 경쇄 V 영역 변이체 L0 91A 아미노산 서열 (SEQ ID NO:74)

```
DIQMTQSPSSLSASVGRVTITTKASQNVNSNVAWYQQKPKAPKLLIYSASYRYSYGVPSRFSGSGSDT
FTLTISSLQPEDFATYYCQQANNYPFTFGQGTKLEIK
```

[0504]

[0505] 실시예 10: 항-SAP 항체에 의한 아밀로이드 제거의 보체 의존성

[0506] 보체 결손을 갖는 마우스 및 충분한 보체(complement sufficient)의 정상 동물 간에 치료의 효능을 비교함에 의해, 항-SAP 항체에 의한 아밀로이드 제거에 있어서 보체의 역할을 조사하였다. C1q에 대한 유전자의 표적화된 결실은 전형적인 보체 경로의 활성화를 차단하는데, 이러한 경로는 항체-항원 복합체에 대한 C1q의 결합에 의해 개시되지만, 보체의 주요 생물학적 기능인 화학주성 및 옵소닌화를 담당하는 중요한 기능적 단계인 C3 활성화는 비-보체 세린 프로테이나제에 의한 직접 C3 절단뿐만 아니라 다른 방도 및 렉틴 경로를 통해 여전히 계속될 수 있다. C3에 대한 유전자의 표적화된 결실은 이러한 기능을 완전히 파기시킨다.

[0507] AA 아밀로이드증의 유도

[0508] AA 아밀로이드증을 두 그룹의 보체 결손 마우스: C3 녹아웃 (n=14) 및 C1q 녹아웃 (n=12), 및 15마리의 야생형 마우스에서 유도하고 확인하였다. 모든 마우스는 순수한 C57BL/6 계통이었다. 각각의 마우스에게 정맥내 주사에 의해 아밀로이드 원섬유를 함유하는 아밀로이드 조직의 추출물인 단일 용량의 아밀로이드 항상 인자 (Baltz et al, (1986) Plenum Press, New York, pp. 1 15-121)를 투여하고 4일 뒤에 0.1M NaHCO₃에 용해된 10% w/v 카제인의 10회의 매일 피하 주입을 12일의 기간에 걸쳐 투여하였다 (Botto et al, (1997) *Nature Med.*, 3: 855-859). 카제인은 지속적인 급성 염증을 유도하며 모든 동물에서 AA 아밀로이드 침착을 야기하는 혈청 아밀로이드 A 단백질 (SAA) 생산을 계속 증가시킨다. 마지막 카제인을 주사한 지 7일 후에, KI를 모든 마우스의 음용수에 도입시키고 3일 후에 각각의 마우스에게 표준 용량의 ¹²⁵I-표지된 인간 SAP를 정맥내 주사하였다 (Hawkins et al, (1990) *J. Clin. Invest.*, 86: 1862-1 869 and Hawkins et al, (1988) *J. Exp. Med.*, 167: 903-913). 전신 아밀로이드 로드의 정확한 지수인 방사능의 체류를 측정하기 위해 트레이서(tracer) 주사 24h 및 48h 후에 모든 마우스의 전신 방사능 계측을 수행하였다. ¹²⁵I-SAP 트레이서 주사 10일 후에, 마우스 당 10 mg의 단리된 순수한 인간 SAP의 단일 주사에 의해 모든 마우스에 인간 SAP가 "로딩(loaded)"되었다. 아밀로이드 마우스내로 주사된 인간 SAP는 아밀로이드 침착물에 국소화되며 거기에서 약 3-4일의 반감기를 지속하는 반면 아밀로이드에 결합되지 않은 임의의 인간 SAP는 약 3-4시간의 반감기를 지니며 순환으로부터 제거된다 (Hawkins et al, (1988) *J. Exp. Med.*, 167: 903-913 and Pepys et al, (2002) *Nature*, 41 7: 254-259).

[0509] 단리된 순수한 인간 SAP의 주사 후에 아밀로이드 마우스의 비장에서 항-인간 SAP 항체로의 면역조직화학적 염색은 이들의 전형적인 마진널 존(marginal zone) 분포에 있어서 모든 아밀로이드 침착물의 강한 포지티브 염색이 존재함을 나타낸다. 이러한 결합된 인간 SAP가 본 발명에 따른 치료용 항-SAP 항체의 표적이다.

[0510] 항-SAP 치료

[0511] 인간 SAP를 주사한 지 3일 후에, 인간 SAP가 순환에서 더 이상 검출되지 않을 때, 보체 녹아웃 그룹들 각각에서 두 마리를 제외한 모든 마우스에게 7 mg/ml의 실제 항-SAP 항체를 함유하는, 포스페이트 완충 염수 (PBS)에 50 mg/ml로 용해된 단일특이적 양 항-인간 SAP 항혈청의 1 ml의 전체 IgG 분획 (배치 번호 2866)을 단일 복막내 주사하였다. 영국 버밍엄 소재 The Binding Site Ltd에 의한 인간 SAP (아밀로이드증 및 급성기 단백질에 대해 University College London Centre에서 엄격하게 100%로 정제됨) 및 유료 면역화 절차를 이용하여 항혈청을 생산하였다. 그 후, 알칼리 알코올 콩고 레드 염색에 의해 아밀로이드 로드의 조직학적 평가를 위해 항-SAP 투여 15일 후에 모든 동물을 치사시켰다 (Puchtler, H., Sweat, F. and Levine, M. (1962) On the binding of Congo red by amyloid. *J. Histochem. Cytochem.*, 10: 355-364). 모든 동물의 비장 및 간의 콩고 레드 섹션을 각각의 마우스가 받은 치료를 모르게 하여 한 명 이상의 전문 관찰자가 독립적으로 조사하였고, 이전에 보고된 존재하는 아밀로이드의 양에 대해 기록하였다 (Botto et al, (1997) *Nature Med.*, 3: 855-859). 1-5의 점수는, 특정 기관의 여러 섹션들 중 아밀로이드의 하나 또는 2개의 작은 반점에 상응하는 1점으로부터 등급 1에 비해 약 10,000배 더 많은 아밀로이드를 포함하는 넓게 펼쳐진 풍부한 침착물에 상응하는 5점까지 대략 밑(base)이 10인 로그 등급화 스케일을 나타낸다 (Botto et al, (1997) *Nature Med.*, 3: 855-859). 비록 일부 관찰자가 정수.5의 중간 점수도 사용하였으나, 상이한 관찰자들의 점수는 항상 대단히 일치하였다. 각각의 동물에서 개개 기관에 대한 모든 관찰자들의 점수의 산술적 평균을 통계적 분석에 이용하였다.

[0512] 결과

[0513] 충분한 보체의 야생형 마우스에서 아밀로이드 침착물의 효과적 제거와 현저하게 대조적으로, 보체 결손 동물의 두 그룹 모두에서는, 비록 각 유형의 2마리의 대조군 보체 결손 마우스에서보다 더 많은 단편화 양상이 보이는 경향은 있지만, 여전히 풍부한 아밀로이드가 존재한다. 중앙 값, 범위, 비장 아밀로이드 점수는 다음과 같았다: 야생형, 1.17, 0.0-1.5, n=15; C3 녹아웃, 1.92, 1.17-4.33, n=12; C1q 녹아웃, 1.25, 1.17-3.5, n=10 (비모수 크루스칼-왈리스(Kruskal-Wallis non-parametric) ANOVA, P<0.001). 야생형 대조군 및 둘 모두의 보체 결손 그룹 간의 차이는 현저하였으나, C3 녹아웃의 경우 P<0.001 및 C1q 녹아웃의 경우 P=0.036 (다중 비교를 위한 본페로니(Bonferroni) 교정 이용), C3 및 C1q 녹아웃 간의 차이는 현저하지 않았다, P=0.314 (만-휘트니(Mann-Whitney) U 테스트).

[0514] 논의

[0515] C1q 또는 C3이 결여된 마우스에서, 항-SAP 치료는 충분한 보체 야생형 마우스에서처럼 효과적으로 아밀로이드 침착물을 제거하지 못했다. 따라서, 항-SAP의 치료용 효능은 매우 실질적으로 보체 의존적이며, 이론적으로 Fc(γ) 수용체를 통해 포식세포를 끌어들이 수 있었던 IgG 항체 결합 단독에 의해서는 매개되지 않는다. 그럼

에도 불구하고, 보체 결손 마우스에서 지속적인 아밀로이드 침착물의 더 많은 단편화 양상은 적어도 항체 단독의 일부 효과를 제안하였다. 또한 C3 결손 동물에 비해 C1q 결손에서의 더 많은 제거 경향은 C3 활성화가 중요하며 일부 보체 활성화가 C1q의 부재하에 발생할 수 있음을 시사하였다.

[0516] 실시예 11: 무손상 IgG 항-SAP 항체에 대한 요건

[0517] IgG 항체에 의한 보체 활성화는 Fc 영역을 포함하는 전체 무손상 분자를 요구하며, C1q의 결합에 의해 개시되는 전형적인 경로를 통해 진행된다. 그러나, 일부 항체-항원 시스템에서, 대안적인 경로를 통한 보체 활성화는 F(ab)₂ 단편에 의해 매개될 수 있다. 항-SAP 항체에 의한 아밀로이드 제거의 보체 의존성을 확인하고 항체의 Fc 영역에 대한 잠재적인 요건을 조사하기 위해, 양 폴리클로날 항-인간 SAP 항혈청의 IgG 분획의 pH 4.0에서의 펩신 절단에 의해 생성되고 (배치 2866) 표준 방법에 의해 정제된 F(ab)₂ 항-SAP 항체의 효과를 시험하였다.

[0518] AA 아밀로이드증의 유도 및 치료

[0519] 상기 실시예 10에 설명된 대로 야생형 C57BL/6 마우스에서 AA 아밀로이드증을 유도하고 확인하였다. 또한 실시예 10에 설명된 대로 인간 SAP를 갖는 아밀로이드 침착물을 로딩시킨 후에, 마우스의 그룹들을 양 폴리클로날 항-인간 SAP 항혈청의 전체 IgG 분획, 완충액 비히클 단독 또는 IgG 분획의 F(ab)₂ 단편으로 처리하였다. 주사된 항-SAP 항체 활성화의 용량은 F(ab)₂를 투여받은 마우스 당 7.28 mg이었고, 전체 IgG를 투여받은 마우스 당 7 mg (일반적으로 50 mg의 총 IgG)이었다. 콩고 레드 염색에 의한 아밀로이드 로드를 산정하기 위해 14일 후에 모든 마우스를 치사시켰다.

[0520] 결과

[0521] 아밀로이드 침착물의 제거는 비히클만을 투여받은 대조군 마우스에서의 대량 아밀로이드 침착물에 비해 IgG 항-SAP 항체를 투여받은 마우스에서 거의 완전하였다. F(ab)₂를 투여받은 마우스는 치료되지 않은 대조군에 비해 아밀로이드를 덜 지니지만, 전체 IgG 항-SAP 항체로 치료된 마우스보다 여전히 실질적으로 많다 (표 9).

[0522] 표 9. 아밀로이드 침착물을 제거하는데 있어서 무손상 IgG 항체에 비해 F(ab)₂ 항-SAP의 감소된 효능

그룹 (치료, 그룹 크기)	아밀로이드 스코어 중앙 값, 범위	
	비장	간
1 (항체 없음, n=10)	4.0, 4.0-4.33	3.5, 2.67-4.67
2 (IgG 항-SAP 항체, n=8)	1.0, 1.0-3.67*	1.25, 1.0-1.5
3 (F(ab) ₂ 항-SAP 항체, n=5)	2.17, 1.33-3.0	1.67, 1.33-1.67

[0523]

[0524] 크루스칼-윌리스 테스트: 비장, P<0.001; 간 P<0.001

[0525] 만-휘트니 테스트***: 1 vs 2, 비장 & 간 둘 모두, P<0.001; 1 vs 3, 비장 & 간 둘 모두, P=0.001; 2 vs 3, 비장, P=0.284; 간, P=0.019

[0526] *IgG 항-SAP 치료에도 불구하고 대량의 비장 아밀로이드를 갖는 그룹 2에서의 단일 외자층(outlier). 이러한 동물을 제외시키는 것이 IgG 및 F(ab)₂ 항-SAP 항체 치료의 효능 간에 고도로 현저한 차이를 제공한다. **다중 비교로 인해, 0.01 또는 그 미만의 P 값이 유의성에 요구된다.

[0527] 논의

[0528] 이러한 연구에 사용된 F(ab)₂ 항-SAP 항체의 몰 용량은 IgG 항체보다 약 3분의 1만큼 더 큰데, 그 이유는 전체 IgG보다 F(ab)₂ 단편의 몰 중량이 더 적기 때문이다. 아밀로이드 제거에 대한 최적 효과를 위해, Fc가 요구된다. 이는 Fc(γ) 수용체에 의한 세포 인지의 직접적인 관련성 때문이 아니라, 전체 IgG가 심지어 충분한 보체

마우스에서의 F(ab)₂보다 보체 결손 마우스에서 덜 효과적이었기 때문이다. 투여된 고용량의 F(ab)₂가 대안적인 경로를 통해 일부 보체를 활성화할 수 있었을 것이다.

[0529] 실시예 12: 대식세포의 요건

[0530] US 2009/0191196에 기재된 조직학적 및 조직화학적 연구는 항-SAP 항체로 처리된 마우스에서 아밀로이드 침착물에 침윤되어, 이를 둘러싸 포식하는 세포가 대식세포임을 제시한다. 대식세포가 실제로 아밀로이드의 제거를 책임짐을 확인하기 위해, 양 폴리클로날 항-인간 SAP 항혈청의 전체 IgG 분획을 이용한 치료 효과를 (배치 2866) 모든 대식세포 활성이 리포솜 클로드로네이트의 투여에 의해 억제된 마우스에서 시험하였다. 리포솜 클로드로네이트의 대식세포 기능에 대한 시약, 실험 프로토콜 및 효과는 잘 확립되어 있고 광범하게 문서화되어 있다 (Van Rooijen et al, (2002) *J. Liposome Research*. Vol. 12. Pp, 81-94).

[0531] AA 아밀로이드증의 유도 및 치료

[0532] 야생형 마우스에서 AA 아밀로이드증의 유도 및 확인 후에, 상기 실시예 10에 설명된 프로토콜을 이용하여, 모든 동물에게 단일 복막내 용량의 10 mg의 단리된 순수한 인간 SAP를 투여하여 인간 SAP를 갖는 이들의 침착물을 로딩시켰다. 그 후, 시험 그룹은 직후와 2, 7 및 14일 후에 0.3 ml의 리포솜 클로드로네이트를 복막내 투여받았다. 한 대조군 및 시험 그룹은 인간 SAP를 주사한 지 3일 후에 50 mg의 양 항-인간 SAP 항혈청의 IgG 분획의 단일 복막내 용량을 투여받았다. 두 번째 대조군은 항-SAP를 투여받지 않았고 어떠한 추가 치료도 없었다. 항-SAP를 시험 및 항체 대조군에 투여한 지 14일 후에 콩고 레드 염색에 의한 아밀로이드 로드의 산정을 위해 모든 마우스를 처사시켰다.

[0533] 결과

[0534] 항-SAP로의 치료는 항체를 투여받지 않은 그룹에 비해 아밀로이드 침착물을 거의 완전히 제거시켰다. 대조적으로, 대식세포 기능을 완전히 없애는 것으로 알려진 섭생에서 리포솜 클로드로네이트를 투여받은 마우스에서는 아밀로이드 침착물의 어떠한 제거도 없었다 (표 10).

[0535] **표 10. 대식세포 고갈은 항-SAP 항체에 의한 아밀로이드 침착물의 제거를 억제한다.**

그룹 (치료, 그룹 크기)	아밀로이드 스코어 중앙 값, 범위	
	비장	간
1 (클로드로네이트+항-SAP, n=13)	4.83, 2.0-5.0	3.17, 2.0-3.5
2 (항-SAP 단독, n=12)	1.33, 0.67-3.5	1.0, 0.67-2.5
3 (없음, n=12)	4.0, 3.5-4.5	2.83, 1.0-3.17

[0536] 크루스칼-왈리스 테스트: 비장, P<0.001; 간 P<0.001

[0538] 본페로니 교정을 이용한 만-휘트니 테스트: 1 vs 2: 비장 & 간 둘 모두, P<0.003; 1 vs 3: 비장, P=0.078; 간, P=0.411; 2 vs 3, 비장 & 간 둘 모두, P<0.003.

[0539] 논의

[0540] 이러한 특정 실험에서의 결과는 대식세포 기능이 항-인간 SAP 항체에 의한 아밀로이드 침착물의 제거에 필요함을 확인시켜 주었다.

[0541] 실시예 13: 마우스 전신 AA 아밀로이드 침착물을 제거하는데 있어서 마우스 모노클로날 항-인간 SAP 항체, SAP-E의 효능

[0542] 인간 SAP를 함유하는 무린 AA 아밀로이드 침착물의 제거를 매개하는 다양한 모노클로날 항체의 능력을 포지티브

대조군으로서 표준 양 폴리클로날 항-인간 SAP 항체와 비교하고자 하였다.

[0543] AA 아밀로이드증의 유도 및 치료

[0544] 마우스 SAP 유전자가 결실된 순수한 C57BL/6 동물주 (Botto et al, (1997) *Nature Med.*, 3: 855-859)를 인간 SAP 이식유전자를 포함하는 C57BL/6 마우스와 교배시킴에 의해 인간 SAP에 대해 유전자이식된 SAP 녹아웃 C57BL/6 마우스를 생성하였다 (Yamamura et al, (1993) *Mol. Reprod. Dev.*, 36: 248-250 and Gillmore et al, (2004) *Immunology*, 112: 255-264). 따라서 이러한 마우스에는 마우스 SAP가 없지만 사람에서 나타난 것보다 현저하게 높은 농도로 인간 SAP를 발현시킨다. 전신 AA 아밀로이드증을 실시에 10에 기재된 인간 SAP 유전자이식 마우스 SAP 녹아웃 마우스에서 유도하였고, 마우스에게 카제인을 최종 주사한 지 9일 후에, 아밀로이드 침착의 존재 및 정도를 트레이서 용량의 ¹²⁵I-표지된 인간 SAP를 주사한 후에 아밀로이드의 전신 방사능 계측에 의해 일반적으로 확인하였다. 모든 마우스는 실질적인 양 및 필적하는 양의 아밀로이드를 지녔고, 상이한 치료를 받도록 하기 위해 밀접하게 대등한 그룹으로 할당되었다. 트레이서 주사 1주일 후에, 각각의 마우스에게 단일 용량의 5 mg CPHPC를 복막내 주사에 의해 투여시켜 이들의 순환하는 인간 SAP를 고갈시킨 후, 5h 후에 표준 양 폴리클로날 항-인간 SAP IgG 분획 (배치 2866, 7 mg/ml의 항-인간 SAP 항체를 함유하는 1 ml의 50 mg/ml의 총 단백질) 또는 9개의 상이한 단리된 순수 모노클로날 항-인간 SAP 항체들 중 5 mg의 어느 하나를 동일한 경로를 통해 투여하였다 (표 11). 항체를 주사한 지 21일 후에 모든 마우스를 치사시켰고 그 비장의 콩고 레드 조직학에 의해 아밀로이드 로드를 측정하였다.

[0545] 표 11. CPHPC 및 다양한 항-인간 SAP 항체로 치료 후에 전신 AA 아밀로이드증을 갖는 마우스의 비장에서 아밀로이드의 존재

항체 치료	항체 아이소형	아밀로이드 스코어 중앙 값, 범위
없음		3, 3-5
폴리클로날	NA	1, 1-1
모노클로날 SAP-A	IgG1	3, 2-4
모노클로날 SAP-B	IgG2a	3, 2-4
모노클로날 SAP-C	IgG1	4, 2-4
모노클로날 SAP-D (n=1)	IgG1	4
모노클로날 SAP-E	IgG2a	1, 1-1
모노클로날 SAP-F (n=1)	IgG1	2
모노클로날 SAP-G	IgG1	3, 2-4

[0546] 시험된 모노클로날 항체들 중에서, SAP-E만이 아밀로이드 침착물을 제거시켰으며 그 효과는 양 폴리클로날 항체의 고도로 재현가능하고도 놀라운 작용과 동일하였다. 중요하게는, SAP-E는 마우스 보체를 활성화시키는 것으로 알려진 마우스 IgG2a 아이소형을 갖지만, SAP-B를 제외한 모든 다른 모노클로날들은 보체를 활성화시키지 않는 마우스 IgG1 아이소형이었다. 비록 SAP-B가 마우스 IgG2a 아이소형이지만, 시험관내 SAP에 대한 이의 결합은 SAP-E보다 현저하게 낮았고, 분명히 생체내에서 유효하기에는 충분하지 못했다.

[0548] 논의

[0549] 이러한 결과는 충분히 결합성인(avid) 보체 활성화 IgG2a 마우스 모노클로날 항-인간 SAP 항체가 양 폴리클로날 항-인간 SAP 항체만큼 효과적으로 생체내 아밀로이드 제거를 매개함을 입증한다.

[0550] 실시예 14: 모노클로날 마우스 항-인간 SAP 항체, SAP-K 및 SAP-E의 시험관내 비교 특성화

[0551] 임상적인 방법에 의해 클로닝된 하이브리도마를 생산하기 위해 정제된 인간 SAP 및 통상적인 융합을 이용한 면역화로부터 표준 기법에 의해 유래된, 6개의 상이한 가장 강하게 결합하는 마우스 IgG2a 모노클로날 중에서 SAP-K를 선택하였다. 이러한 IgG2a 항체들 중에서, SAP-K는 고정된 인간 SAP에 가장 큰 결합을 보여 주었다. 이것은, 아밀로이드 원섬유 또는 소형 분자 리간드, 포스포에탄올아민이든지 간에, 인간 SAP가 비특이적 부착 또는 공유 부착에 의해 플라스틱 표면 상에 직접 고정되었는지 또는 고정된 리간드에 대한 SAP의 특이적 칼슘 의존성 결합에 의해서인지와 무관하게 사실이다. SAP-K는 또한 칼슘의 존재 또는 부재하에 고정된 SAP에 직접 잘 결합하였고, SAP가 CPHPC와 사전에 복합체화된 경우 복합체 SAP-CPHPC 복합체에 공유적으로 "고정(fixed)"되었다 (Pepys, M.B. *et al* (2002) Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis. *Nature*, 417: 254-259; Kolstoe, S.E. *et al* (2009) Molecular dissection of Alzheimer's disease neuropathology by depletion of serum amyloid P component. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106: 7619-7623). SAP-E도 이렇게 상이한 모든 배치에서 인간 SAP에 잘 결합하였다. 그러나, 두 개의 항체는, 인간 SAP가 단지 희박하게 이용가능할 때, 예를 들어 플레이트가 코팅을 위해 단지 1 µg/ml의 인간 SAP에 노출되었을 때 SAP-E보다 훨씬 많은 SAP-K가 결합되어지고, 반면 더 풍부한 고정된 SAP가 존재할 때, 예를 들어 코팅 용액이 100 µg/ml의 SAP를 함유할 때, SAP-K보다 SAP-E의 결합이 더 많다는 점에서 현저하게 다르다. 이러한 차이는 SAP-K가 단리된 단일 SAP 분자에 강하게 결합하는 한편 하나를 초과하는 SAP 분자가 또 다른 분자와 밀접하게 함께 있을 때 SAP-E가 최적으로 결합함을 제안한다. 이러한 메카니즘은 각각의 양 IgG 항체 분자의 두 개의 아암에서 함께 밀접하게 유지된 SAP 분자들의 쌍을 제공하는, 인간 SAP가 폴리클로날 양 항-인간 SAP (배치 2866)로 코팅된 플레이트 상에 포획에 의해 고정될 때, 모든 수준의 인간 SAP 투입에서 SAP-E가 SAP-K보다 양호하게 결합한다는 발견에 의해 뒷받침된다 (도 7).

[0552] 도 7은 고정된 양 폴리클로날 항-인간 SAP 항체에 의해 포획된 인간 SAP에 대한 모노클로날 마우스 항체의 결합에 대한 면역방사측정법을 도시한다. 실질적으로 제공된 인간 SAP의 모든 농도에서 SAP-K보다 더 많은 SAP-E가 결합되었다. 각각의 포인트는 3회 반복의 평균이다.

[0553] 매우 중요하게도, 단리된 순수한 인간 SAP 및 전체 인간 혈청 둘 모두에 대한 아가로스 겔에서의 이중 면역확산법에서 두 개 항체 모두의 유사한 면역침전에 의해 도시된 대로, SAP-E 및 SAP-K 둘 모두는 천연 인간 SAP에 명백히 동등하게 잘 결합하였다. 이러한 두 개의 마우스 모노클로날 항체의 유사한 결합은 칩 상에 공유적으로 고정된 인간 SAP를 이용한 Biacore 기계 (BiacoreX, Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden)에서 측정된 유사한 파라미터에 반영되었다 (표 12).

[0554] 표 12. Biacore에 의해 측정된 인간 SAP에 대한 모노클로날 항체의 친화도

	$k_a (M^{-1} sec^{-1})$	$k_d (sec^{-1})$	$K_D (M)$
SAP-E	$2 \pm 5 \times 10^4$	$6 \pm 4 \times 10^{-5}$	$5 \pm 4 \times 10^{-9}$
SAP-K	$3.18 \pm 5 \times 10^4$	$1.7 \pm 0.9 \times 10^{-5}$	$1 \pm 1.7 \times 10^{-9}$

[0555] 제시된 값들은 3회 반복 측정의 평균 및 SD이다.

[0557] 대조적으로, 두 개의 항체 모두가 생리학적 완충액에서 아가로스 겔 전기영동 후에 웨스턴 블롯팅에서 천연 인간 SAP에 결합하였으나, SAP-E만이 환원된 SDS-PAGE로부터의 웨스턴 블롯팅에서 인간 SAP에 결합하였다. 따라서, SAP-E는 변성된 인간 SAP를 인지하는 한편, SAP-K만이 천연 인간 SAP를 인지하고 입체구조적 에피토프에 결합하여야 한다.

[0558] 인간 SAP의 CNBr 분해는 159M 및 160W 사이에 절단을 야기하는데, 이것은 위치 159가 메티오닌으로부터 호모세린 락톤 (150-158-호모세린 락톤으로 명명됨)으로 전환되었을 때 신규한 펩티드를 생성한다. SDS-PAGE로부터의 웨스턴 블롯팅에서, SAP-E는 잔기 Met159에서 SAP의 CNBr 절단에 의해 방출된 N-말단 1-158-호모세린 락톤 폴리펩티드에 결합하지만, 칼슘의 부재하에 키모트립신 분해에 의해 방출된 1-140 단편과 거의 반응하지 않는다 (도 8). 따라서, SAP-E에 의해 인지된 에피토프는 일부 변성 내성 이차 구조를 분명하게 포함하는 영역 140-158에 있어야 하는데, 그 이유는 SAP-E 결합이 용해 상태인 펩티드 136-147, 138-149, 140-151 및 112-119에 의해 유력하게 억제되지 않기 때문이다. 이것은 SAP의 동력학 안정성 및 변성에 대한 내성과 연관된다 (Manning, M.

and Colon, W. (2004) *Biochemistry*, 43: 11248-11254).

- [0559] 도 8은 모노클로날 항-인간 SAP 항체, SAP-E에 대한 에피토프 맵핑을 도시한다. **A**, 70%TFA에서 CNBr에 의해 (잔기 159M) 그리고 칼슘의 부재하에 암모늄 비카르보네이트에서, 환원/카르브아미도메틸화 없이, 키모트립신에 의해 (잔기 140Y 및 144F) 절단된 위치를 나타내는 인간 SAP의 완전한 아미노산 서열. **B**, CNBr로 절단된 SAP의 SDS-PAGE 분석. 좌측 패널: 코마시 블루(Coomassie blue) 염색; 레인 1, 처리되지 않은 대조군 SAP; 레인 2, CNBr 절단 후 SAP, 트레이스 잔류성 미절단 무손상 프로모터 및 대략 20kD (잔기 1-158-호모세린-락톤) 및 5kD (160-204)의 예상 단편을 각각 나타냄. 이들을 질량 분광분석법에 의해 정밀하게 확인하였다. 우측 패널: 레인 1 (100 ng 로딩) 및 2 (10 ng)에서 무손상 미처리 SAP의 강한 염색, 및 또한 레인 3 (600 ng), 4 (130 ng) 및 5 (64 ng)에서 잔류성 무손상 SAP 및 CNBr 절단된 SAP에서의 더 큰 잔기 1-158-호모세린-락톤 단편을 나타내는, SAP-5를 이용한 웨스턴 블롯. 레인 6은 SAP-5가 전혀 반응하지 않는 단리된 순수한 인간 CRP를 함유하였다. **C**, 키모트립신으로 분해된 SAP의 SDS-PAGE 분석. 좌측 패널: 코마시 블루 염색; 레인 1, 처리되지 않은 대조군 SAP; 레인 2, 키모트립신 분해 후 SAP, 잔기 1-140 및 145-204에 상응하는 예상 주요 단편을 나타냄. 이들을 질량 분광분석법에 의해 정밀하게 확인하였다. 우측 패널: 레인 1 (500 ng 로딩) 및 2 (100 ng)에서 무손상 미처리 SAP의 강한 염색, 및 또한 키모트립신 분해된 SAP를 상이한 로딩수준으로 함유하는 레인 3 및 4에서 잔류성 무손상 SAP를 나타내는, SAP-E를 이용한 웨스턴 블롯. 잔기 1-140 단편에 대한 SAP-E의 매우 약한 결합은 가장 많이 로딩된 레인 3에서만 보여진다. 레인 5 (500 ng) 및 6 (100 ng)은 SAP-E가 전혀 반응하지 않는 단리된 순수한 인간 CRP를 함유하였다. **D**, 잔기 136-147에 대해 인간 SAP (h)와 마우스 SAP (m) 간의 서열 비교. 상부 패널, 무린 서열에서 검정색으로 도시된 잔기에 의한 상기 지시된 차이. 하부 패널, 인간 SAP의 3D 서브유닛 구조에서 흰색으로 도시된 그 정상에 140Y를 갖는 이러한 연장된 루프의 위치. 무린 서열에서의 상이한 잔기들을 검정색으로 도시한다. 회색 구체는 리간드 결합 포켓에서 결합된 칼슘 원자를 나타낸다.
- [0560] SAP-K에 의해 인지된 입체구조적 에피토프는 디스크형 오합체 천연 SAP 분자의 원주에서, 노출된 주변 루프, 잔기 121-131로서 CLIPS® 기술 에피토프 맵핑 (Pepscan Presto BV)에 의해 확인되었다.
- [0561] 도 9는 SAP-K (A, CLIPS® 기술에 의해 결정된 바와 같이, 검정색으로 강조됨) 및 SAP-E (B, 흰색으로 도시됨, SAP의 CNBr 절단 생성물 및 칼슘의 부재하에 키모트립신 분해에 의해 방출된 단편과의 결합 결과에 의해 결정된 140-158)에 인지된 인간 SAP 상의 에피토프의 위치를 도시한다.
- [0562] 실시예 15: 마우스 AA 아밀로이드증 모델에서 생체내 아밀로이드 침착물을 제거하는데 있어서 SAP-K 마우스 모노클로날 항-인간 SAP 항체의 효능
- [0563] SAP-K의 능력을 마우스에서 확립된 전신 AA 아밀로이드 침착물을 제거하는데 있어서 표준 양 폴리클로날 항체의 작용과 비교하였다.
- [0564] AA 아밀로이드증의 유도 및 치료
- [0565] 상기 실시예 10에 설명된 대로 야생형 C57BL/6 마우스에서 AA 아밀로이드증을 유도하고 확인하였다. 역시 실시예 10에 설명된 대로 아밀로이드 침착물에 인간 SAP를 로딩시킨 후에, 마우스의 그룹을, 7 mg의 실제 항-SAP 항체의 용량을 제공하는 양 폴리클로날 항-인간 SAP 항혈청의 전체 IgG 분획으로서 (배치 2866) 마우스 당 50 mg의 총 IgG, 마우스 당 5 mg의 용량의 단리된 정제 SAP-K, 마우스 당 1 mg의 용량의 단리된 정제 SAP-K, 및 네거티브 대조군으로서, 관련이 없는 인간 항원에 특이적이고 인간 SAP 또는 어떠한 무린 항원에 비반응성인 단리된 정제 모노클로날 마우스 IgG2a 항체로 처리하였다. 콩고 레드 염색에 의해 아밀로이드 로드를 산정하기 위해 17일 후에 모든 마우스를 치사시켰다.
- [0566] 결과
- [0567] 5 mg의 SAP-K로 치료된 마우스는 7 mg 용량의 양 폴리클로날 항체 이용시 나타난 것과 동일한 비장 및 간 아밀로이드 침착물의 현저한 제거를 나타내었다. 치료된 마우스의 비장에는 아밀로이드의 자취 반점만이 남아 있었고 다수의 간에서는 전혀 검출되지 않았는데, 이것은 비관련 대조군 마우스 IgG2a 항체를 투여받은 모든 동물에 광범한 비장 및 간 아밀로이드 침착물이 있는 것과 몹시 대조적이다 (표 13). 마우스 당 1 mg, 0.5 mg 및 0.1 mg (0.5 mg 및 0.1 mg에 대한 데이터는 도시되지 않음)의 SAP-K의 보다 낮은 용량에서, 현저한 효과는 없었다.
- [0568] **표 13. 전신 AA 아밀로이드증을 갖는 마우스에서 내장 아밀로이드 침착물에 대한 모노클로날 마우스 IgG2a 항-인간 SAP 항체의 효과**

아밀로이드 스코어

중앙 값, 범위

그룹 (치료, 그룹 크기)	비장	간
1 (네거티브 대조군 마우스 IgG2a, n=8)	4.08, 1.5-4.50	2.42, 2.0-2.67
2 (7 mg 양 폴리클로날 IgG 항-인간 SAP 항체, n=5)	1.17, 1.0-1.5	1.0, 0.67-1.17
3 (1 mg 모노클로날 마우스 IgG2a 항-인간 SAP 항체, SAP-K, n=10)	3.5, 2.83-4.5	1.83, 1.0-2.83
4 (5 mg 모노클로날 마우스 IgG2a 항-인간 SAP 항체, SAP-K, n=10)	1.25, 1.0-2.0	1.0, 1.0-1.33

[0569]

[0570]

[0571]

[0572]

[0573]

[0574]

[0575]

[0576]

[0577]

[0578]

크루스칼-왈리스 테스트: 비장, P<0.001; 간 P, 0.001

만-휘트니 테스트*: 1 vs 2, 비장, P=0.002; 간, P=0.002; 1 vs 3, 비장, P=0.173; 간, P=0.083; 1 vs 4, 비장, P<0.001; 간, P<0.001; 2 vs 3, 비장, P=0.001; 간, P=0.019; 2 vs 4, 비장, P=0.513; 간, P=0.768; 3 vs 4, 비장, P<0.001; 간, P=0.004. *다중 비교로 인해, 0.01 또는 그 미만의 P 값이 유의성에 요구된다.

논의

이러한 결과는 모노클로날 항-인간 SAP 항체의 생체내 아밀로이드 침착물 제거에 있어서 입체구조적 에피토프를 특히 인지하는, 보체 활성화 마우스 IgG2a 아이소형의 효능을 입증한다. 따라서, 본 발명에 따라 이용되는 모노클로날 항-인간 SAP 항체는 항체 SAP-E와 같이 대개의 서열 에피토프, 또는 SAP-K와 같이 오로지 입체구조적 에피토프에서 유도될 수 있다.

실시에 16: 마우스에서 전신 AA 아밀로이드 침착물을 제거하는데 있어서 SAP-E 및 SAP-K의 효능 비교, 및 혈장 항-SAP 항체 농도의 산정

AA 아밀로이드증의 유도 및 치료

상기 실시예 10에 설명된 대로 야생형 C57BL/6 마우스에서 AA 아밀로이드증을 유도하고 확인하였다. 역시 실시예 10에 설명된 대로 아밀로이드 침착물에 인간 SAP를 로딩시킨 후에, 마우스의 그룹을 마우스 당 3 mg 및 1 mg의 두 상이한 항체들로 치료하였다. 아밀로이드가 또한 유도된 대조군은 항체 대신 PBS만을 투여받았고 추가의 두 그룹에는 공지된 유효량의 5 mg/마우스의 각각의 항체가 제공되었다. 항체를 투여한 지 1, 5 및 15일 후에 순환하는 항-SAP 항체의 검정을 위해 모든 마우스에서 채혈하고, 콩고 레드 염색에 의해 아밀로이드 로드를 평가하기 위해 21일에 모두 치사시켰다. 정상 마우스 혈청내로 알려진 농도로 스파이킹된, 정제 SAP-E 및 SAP-K로 각각 표준화된 로부스트(robust) 면역방사측정법을 이용하여 모든 혈청을 항-SAP 활성화에 대해 검정하였다.

결과

조사된 각각의 조직의 실체를 모두 모르게 하여 4명의 독립적인 전문 관찰자에 의해 아밀로이드 로드를 스코어링하였다. 모든 관찰자의 점수는 일반적으로 매우 일치하였으며, 통계적 분석의 경우, 각각의 마우스에 대해 비장과 간 둘 모두에 대한 모든 관찰자들의 총 점수를 합계하였다. 두 개의 항체 모두는 이전에 입증된 바와 같이 유효하였고, 뚜렷한 용량 의존성 효과가 존재하였으나 저용량에서는 SAP-E가 SAP-K보다 분명히 더 효능 있었다.

[0579] 표 14. 내장 AA 아밀로이드 침착물을 제거하는데 있어서 SAP-E 및 SAP-K 간의 능력 비교

그룹 (치료, 마우스의 개수)	비장+간 아밀로이드 스코어	
	중앙 값, 범위	
C (네거티브 대조군, PBS 만)	6.81, 4.25-8.0	
K5 (SAP-K 5 mg, n=5)	2.25, 2.25-2.5	
K3 (SAP-K 3 mg, n=10)	2.81, 2.0-4.25	
K1 (SAP-K 1 mg, n=10)	5.63, 4.0-6.5	
E5 (SAP-E 5 mg, n=5)	2.0, 1.5-2.38	
E3 (SAP-E 3 mg, n=10)	2.5, 2.0-5.0	
E1 (SAP-E 1 mg, n=10)	3.38, 2.5-5.63	

[0580]

[0581] 크루스칼-왈리스 테스트: $P < 0.001$

[0582] 만-휘트니 테스트*: K5 vs E5, $P = 0.095$; K3 vs E3, $P = 0.684$; K1 vs E1, $P = 0.001$; K5 vs K3, $P = 0.594$; K5 vs K1, $P = 0.001$; K3 vs K1, $P < 0.001$; E5 vs E3, $P = 0.008$; E5 vs E1, $P = 0.001$; E3 vs E1, $P = 0.004$; K5 vs C, $P = 0.001$; E5 vs C, $P = 0.001$; K3 vs C, $P < 0.001$; E3 vs C, $P < 0.001$; K1 vs C, $P = 0.043$; E1 vs C, $P < 0.001$. * 다중 비교로 인해, 0.01 또는 그 미만의 P 값이 유의성에 요구된다.

[0583] 순환하는 항-SAP 항체 활성의 농도는, 저용량 그룹 각각에서 중심에서 벗어난 단일 개체를 별도로 했을 때, 모든 동물에게 투여된 단일 용량 이후에 강력하고 일관되게 용량 의존성이었다. 마우스 당 1 mg의 용량 후에, 대부분의 마우스에서 심지어 1일에도 백그라운드 이상의 무엇도 일반적으로 검출될 수 없었다. 대조적으로, 5 mg 용량 후에는 풍부한 항체가 15일에도 여전히 존재하였고, 3 mg 후에는 대부분의 마우스가 5일에 순환하는 항체를 가졌으나 15일 후에는 거의 갖지 않았다 (표 15). SAP-E 및 SAP-K에 대한 패턴 간에 유의한 차이는 없었다.

[0584] 표 15. 단일 복막내 투약 후에 항-SAP 항체의 혈청 농도

그룹 (항-SAP 항체의 투약)	투약 후 항-SAP 농도 중앙 값, 범위 ($\mu\text{g/ml}$)*		
	1 일	5 일	15 일
K5 (SAP-K 5 mg)	950, 840-1200	400, 300-480	45, 25-90
E5 (SAP-E 5 mg)	1000, 800-1500	600, 360-700	80, 15-113
K3 (SAP-K 3 mg)	240, 50-600	40, 8-280	8, 6-30
E3 (SAP-E 3 mg)	275, 4-480	48, 0-240	4, 2-68
K1 (SAP-K 1mg)	7, 7-90	6, 5-38	4, 2-9
E1 (SAP-E 1mg)	7, 6-280	7, 6-120	5, 3-12
C (PBS 만)	5, 5-7	5, 5-13	5, 5-16

[0585]

[0586] *17 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 겉보기 항-SAP 항체 농도가 검정에 대한 백그라운드이며 어떠한 진정한 활성을 나타내지 않는다.

[0587] 논의

[0588] 직접적인 헤드 투 헤드 비교(head to head comparison)에서 SAP-E가 다소 그러나 유의하게 SAP-K보다 효능 있었다는 일관된 증거가 있었다. 마우스 당 1 mg의 투여 후에, 순환하는 항-SAP 항체 활성은 1일 후에 검출될 수

없었는데, 이는 분명하게 전부가 아밀로이드 침착물내 인간 SAP에 국소화된 것이다. 3 mg의 용량 후에 풍부한 항-SAP가 1일에 순환 중에 존재하였고 5일에도 여전히 존재하였다. 마우스 당 5 mg 이후에는, 15일 후에 현저한 농도의 항-SAP가 혈액 중에 여전히 존재하였다. 이러한 관찰은 항-SAP 항체의 반복된 소량 투여가 아밀로이드 제거를 촉발하는데 충분할 수 있음을 시사한다.

[0589] 실시예 17: 마우스에서 전신 AA 아밀로이드 침착물을 제거하는데 있어서 저용량 SAP-E 및 SAP-K의 효능 비교

[0590] AA 아밀로이드증의 유도 및 치료

[0591] 상기 실시예 10에 설명된 대로 야생형 C57BL/6 마우스에서 AA 아밀로이드증을 유도하고 확인하였다. 역시 실시예 10에 설명된 대로 아밀로이드 침착물에 인간 SAP를 로딩한 후에, 마우스의 그룹 (각각 n=10)을 마우스 당 0.5 mg 및 1 mg의 두 개의 상이한 항체의 단일 용량, 또는 3 또는 4일 간격으로 제공되는 0.15 mg의 6회의 반복된 용량으로 치료하였다. 아밀로이드가 또한 유도된 대조군 (n=9)은 항체 대신 PBS만을 투여받았고, 추가의 두 그룹에는 (각각 n=3) 공지된 유효량의 5 mg/마우스의 각각의 항체가 제공되었다. 콩고 레드 염색에 의해 아밀로이드 로드를 산정하기 위해 29일에 모든 동물을 치사시켰다.

[0592] 결과

[0593] 반복된 매우 소량을 포함하는 저용량은 특히 간에서 아밀로이드 로드를 감소시키는데 상당한 효능을 나타내었다. SAP-E가 다시 분명하게 SAP-K보다 더 효능 있었다.

[0594] 표 16. 내장 AA 아밀로이드 침착물을 제거하는데 있어서 저용량의 SAP-E 및 SAP-K 간의 효능 비교

아밀로이드 스코어, (중앙 값, 범위)

그룹	비장	간
C, 네거티브 대조군	4.5, 4.0-4.75	3.25, 2.0-4.0
PBS 만		
E1, SAP-E 1 mg	1.25, 1.0-4.25	1.0, 0.5-1.25
E0.5, SAP-E 0.5 mg	4.75, 1.0-5.0	1.0, 0.5-3.5
Erep, SAP-E 6x 0.15 mg	3.5, 2.0-4.5	0.5, 0.0-3.25
K1, SAP-K 1 mg	4.13, 1.0-5.0	1.0, 0.0-4.0
K0.5, SAP-K 0.5 mg	4.25, 1.75-4.5	1.13, 0.0-2.75
Krep, SAP-K 6x 0.15 mg	4.38, 1.5-4.75	1.0, 0.0-2.25

[0595] 크루스칼-왈리스 테스트: 비장, P<0.001; 간, P=0.001

[0597] 만-휘트니 테스트*: E1 vs C: 비장, P<0.001; 간 P<0.001; E0.5 vs C: 비장, P=0.604; 간 P=0.004; Erep vs C: 비장, P=0.002; 간, P<0.001; K1 vs C: 비장, P=0.065; 간, P=0.001; K0.5 vs C: 비장, P=0.022; 간, P=0.001; Krep vs C: 비장, P=0.079; 간, P<0.001; E1 vs E0.5: 비장, P=0.005; 간 P=0.143; E1 vs Erep: 비장, P=0.043; 간, P=0.280; E0.5 vs Erep: 비장, P=0.019; 간, P=0.043; K1 vs K0.5: 현저한 유의성 없음; K1 vs Krep: 현저한 유의성 없음; K0.5 vs Krep: 현저한 유의성 없음; E1 vs K1: 비장, P=0.015; 간, P=0.353; E0.5 vs K0.5: 현저한 유의성 없음; Erep vs Krep: 현저한 유의성 없음. *다중 비교로 인해, 0.01 또는 그 미만의 P 값이 유의성에 요구된다.

[0598] 논의

[0599] SAP-K보다 SAP-E의 현저하게 큰 효능은 재현가능한 것으로 보인다. 반복적으로 투여될 때 심지어 더 낮은 용량의 효능 그리고 비장보다 간에 있는 아밀로이드 침착물에 대한 더 큰 효과의 시사가 흥미로우며 잠재적인 임상적 유의성이 있다.

[0600] 실시예 18: 시험관내 인간화 모노클로날 항-인간 SAP 항체에 의한 보체의 활성화

[0601] 보체 활성화는 본 발명에 따라 항-인간 SAP 항체에 의한 아밀로이드 제거의 효능에 필수적이다. 상이한 양의 단리된 순수한 항체를 30 mg/l의 SAP 농도를 함유하는 전체 인간 혈청, 또는 이러한 동일한 농도로 단리된 순수한 인간 SAP로 스파이킹된(spiked) 전체 마우스 혈청에 첨가함에 의해, 인간 및 마우스 혈청에서 C3을 활성화시키는 인간화 모노클로날 항체, SAP-E H1L1 및 SAP-K H3L0의 능력을 시험관내에서 비교하였다. 두 경우 모두

에서, 혈청은 새롭고 충분한 보체였고 실험 조건은 희석제로서 보체 고정화 시험 완충액 (CFT)을 이용한 보체 활성화에 최적이었다.

[0602] 하기 혼합물을 제조하였다 (표 17):

튜브 번호	혈청	모노클로날 항-SAP 항체	최종 농도 (µg/ml)	
			항-SAP	인간 SAP
M1	마우스 + 인간 SAP	SAP-E H1L1	15	30
M2	마우스 + 인간 SAP	SAP-E H1L1	30	30
M3	마우스 + 인간 SAP	SAP-E H1L1	60	30
M4	마우스 + 인간 SAP	SAP-E H1L1	120	30
M5	마우스 + 인간 SAP	SAP-K H3L0	15	30
M6	마우스 + 인간 SAP	SAP-K H3L0	30	30
M7	마우스 + 인간 SAP	SAP-K H3L0	60	30
M8	마우스 + 인간 SAP	SAP-K H3L0	120	30
M9	마우스 + 인간 SAP	없음	0	30
H1	인간	SAP-E H1L1	15	30
H2	인간	SAP-E H1L1	30	30
H3	인간	SAP-E H1L1	60	30
H4	인간	SAP-E H1L1	120	30
H5	인간	SAP-K H3L0	15	30
H6	인간	SAP-K H3L0	30	30
H7	인간	SAP-K H3L0	60	30
H8	인간	SAP-K H3L0	120	30
H9	인간	없음	0	30

[0603]

[0604] 모든 튜브를 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션시켜 보체 활성화가 진행되도록 하였다. 혈청에서는 느린 자발적 활성화가 항상 일어나기 때문에, M10 및 H10으로 지정된 M9 및 H9의 복제물인 두 개의 추가 대조군을 제공하였으며, 이들은 인큐베이션되지 않으나 혼합 직후에 -80°C에서 동결된 다음 C3 절단에 대한 검정 직전에 해동되었다. M/H9 및 M/H10 간의 비교는 인간 SAP 단독 t 마우스 혈청 첨가의 어떠한 효과뿐 아니라 항-SAP 항체에 의해 생성된 어떠한 추가 활성화와 자발적 C3 절단 사이의 구별을 가능하게 한다.

[0605] 인간 혈청에서 C3 절단은 인간 C3에 대한 단일특이적 항체를 이용한 2차원 일렉트로이뮤노포레시스 (electroimmunophoresis)에 의해 검정되었다. 이러한 방법은 마우스 C3의 상이한 전기영동 이동도가 인간 C3의 경우보다 신뢰할만하게 구별하기가 더욱 어렵기 때문에 마우스 C3 절단의 경우에 낮은 민감도를 갖는다. 따라서 마우스 C3 절단을 아가로스 겔 전기영동 이후에 단일특이적 항-마우스 C3 항체를 이용한 면역블롯팅에 의해 검정하였다.

[0606] 결과

[0607] 인간화 항체 둘 모두는 C3의 주요 용량 의존성 절단에 의해 입증되는 대로 인간 보체를 효율적으로 활성화시켰고, 보다 느린 이동성 천연 C3 면역침전 피크의 크기에서의 감소 및 보다 빠른 절단된 C3c 피크의 크기에서의 증가를 생성하였다 (도 10).

- [0608] 도 10은 전체 인간 혈청에서 인간화 모노클로날 항-인간 SAP 항체에 의한 C3 활성화를 도시한다.
- [0609] 샘플 H10에서 기준선 C3 절단에 대한 대조군을 포함하는 검정에서, 항-SAP 항체 둘 모두가 심지어 가장 낮은 용량에서도 항체 없음, 자발적 절단, 대조군에서 보여진 것보다 더 많은 C3 절단을 생성함이 명백하다 (도 11).
- [0610] 도 11은 전체 인간 혈청에서 저용량 인간화 모노클로날 항-인간 SAP 항체에 의한 C3 활성화를 도시한다.
- [0611] 매우 유사한 결과가 인간 SAP가 보충된 전체 마우스 혈청에서 마우스 C3의 절단에 대하여 획득되었다. 항체 둘 모두는 느린 이동성 천연 C3 밴드의 감소된 세기 및 보다 빠른 이동성 활성화 형태의 증가된 세기를 야기하는 천연 마우스 C3의 용량 의존성 절단을 나타내었다. 또한, 각각의 항체는 심지어 가장 낮은 용량에서도 항체 없음, 자발적 활성화, 대조군에서 보여진 것보다 더 많은 C3 절단을 생성하였다 (도 12).
- [0612] 도 12는 순수한 인간 SAP가 보충된 전체 마우스 혈청에서 인간화 모노클로날 항-인간 SAP 항체에 의한 C3 활성화를 도시한다.
- [0613] 논의
- [0614] 인간화 모노클로날 항-인간 SAP 항체 둘 모두는 인간 SAP의 존재하에 보체를 효율적으로 활성화시키므로, 본 발명에 따라 전신 아밀로이드증, 및 조직에서 세포외 아밀로이드 침착물에 의해 야기된 그 밖의 어떠한 질병의 치료에 사용하기 위한 적합한 후보이다.

[0615] 서열 색인

SEQ ID NO	서열 설명
1	SAP-E CDRH1 아미노산 서열
2	SAP-E CDRH2 아미노산 서열
3	SAP-E CDRH3 아미노산 서열
4	SAP-E CDRL1 아미노산 서열
5	SAP-E CDRL2 아미노산 서열
6	SAP-E CDRL3 아미노산 서열
7	SAP-E V _H 아미노산 서열
8	SAP-E V _H DNA 서열
9	SAP-E V _L 아미노산 서열
10	SAP-E V _L DNA 서열
11	SAP-K CDRH1 아미노산 서열
12	SAP-K CDRH2 아미노산 서열
13	SAP-K CDRH3 아미노산 서열
14	SAP-K CDRL1 아미노산 서열
15	SAP-K CDRL2 아미노산 서열
16	SAP-K CDRL3 아미노산 서열
17	SAP-K V _H 아미노산 서열
18	SAP-K V _H DNA 서열
19	SAP-K V _L 아미노산 서열
20	SAP-K V _L DNA 서열
21	SAP-E V _H 키메라 아미노산 서열
22	SAP-E V _L 키메라 아미노산 서열
23	SAP-K V _H 키메라 아미노산 서열
24	SAP-K V _L 키메라 아미노산 서열
25	IGHV1-69 인간 가변 중쇄 생식선 엑셉터 아미노산 서열
26	JH1 미니젠

[0616]

27	SAP-E 인간화 V _H 변이체 H0 아미노산 서열
28	SAP-E 인간화 V _H 변이체 H1 아미노산 서열
29	SAP-E 인간화 V _H 변이체 H2 아미노산 서열
30	SAP-E 인간화 V _H 변이체 H3 아미노산 서열
31	SAP-E 인간화 V _H 변이체 H4 아미노산 서열
32	IGKV1-39 인간 가변 경쇄 생식선 엑셀터 아미노산 서열
33	JK2 미니겐
34	SAP-E 인간화 V _L 변이체 L0 아미노산 서열
35	SAP-E 인간화 V _L 변이체 L1 아미노산 서열
36	SAP-E 인간화 V _L 변이체 L2 아미노산 서열
37	SAP-K 인간화 V _H 변이체 H0 아미노산 서열
38	SAP-K 인간화 V _H 변이체 H1 아미노산 서열
39	SAP-K 인간화 V _H 변이체 H2 아미노산 서열
40	SAP-K 인간화 V _H 변이체 H3 아미노산 서열
41	SAP-K 인간화 V _L 변이체 L0 아미노산 서열
42	SAP-K 인간화 V _L 변이체 L1 아미노산 서열
43	호모 사피엔스 SAP 아미노산 서열
44	일반 쥐 SAP 아미노산 서열
45	SAP-E VH 키메라 뉴클레오티드 서열
46	SAP-E VL 키메라 뉴클레오티드 서열
47	SAP-K VH 키메라 뉴클레오티드 서열
48	SAP-K VL 키메라 뉴클레오티드 서열
49	IGHV1-69 인간 가변 중쇄 생식선 엑셀터 뉴클레오티드 서열
50	IGHV1-39 인간 가변 중쇄 생식선 엑셀터 뉴클레오티드 서열
51	코돈 최적화되지 않은 SAP-E 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H0 뉴클레오티드 서열
52	코돈 최적화되지 않은 SAP-E 인간화 경쇄 V 영역 변이체 L0 뉴클레오티드 서열

[0617]

53	SAP-E 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H0 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨)
54	SAP-E 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H1 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨)
55	SAP-E 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H2 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨)
56	SAP-E 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H3 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨)
57	SAP-E 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H4 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨)
58	SAP-E 인간화 경쇄 V 영역 변이체 L0 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨)
59	SAP-E 인간화 경쇄 V 영역 변이체 L1 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨)
60	SAP-E 인간화 경쇄 V 영역 변이체 L2 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨)
61	SAP-E 인간화 중쇄 H1 전체 성숙 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨)
62	SAP-E 인간화 중쇄 H1 전체 성숙 아미노산 서열
63	SAP-E 인간화 경쇄 L1 전체 성숙 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨)
64	SAP-E 인간화 경쇄 L1 전체 성숙 아미노산 서열
65	코돈 최적화되지 않은 SAP-K 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H0 뉴클레오티드 서열
66	코돈 최적화되지 않은 SAP-K 인간화 경쇄 V 영역 변이체 L0 뉴클레오티드 서열
67	SAP-K 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H0 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨)

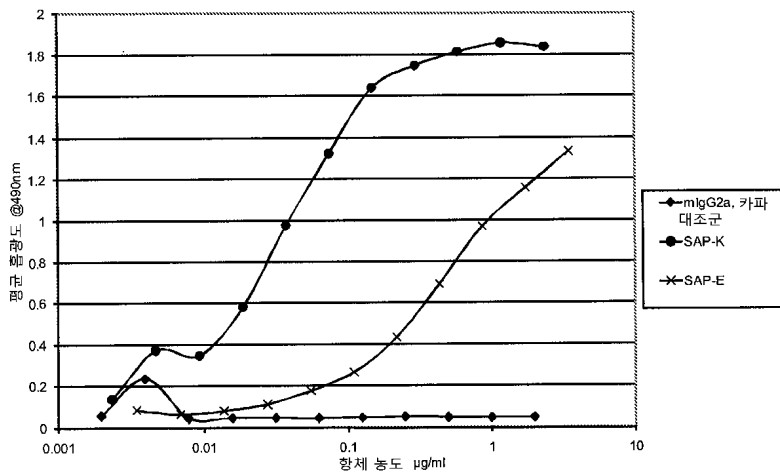
[0618]

68	SAP-K 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H1 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨)
69	SAP-K 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H2 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨)
70	SAP-K 인간화 중쇄 V 영역 변이체 H3 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨)
71	SAP-K 인간화 경쇄 V 영역 변이체 L0 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨)
72	SAP-K 인간화 경쇄 V 영역 변이체 L1 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨)
73	SAP-K 인간화 경쇄 V 영역 변이체 L0 91A 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨)
74	SAP-K 인간화 경쇄 V 영역 변이체 L0 91A 아미노산 서열
75	SAP-K 인간화 H3 중쇄 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨)
76	SAP-K 인간화 H3 중쇄 아미노산 서열
77	SAP-K 인간화 L0 경쇄 뉴클레오티드 서열 (코돈 최적화됨)
78	SAP-K 인간화 L0 경쇄 아미노산 서열
79	면역글로불린 쇄에 대한 신호 서열

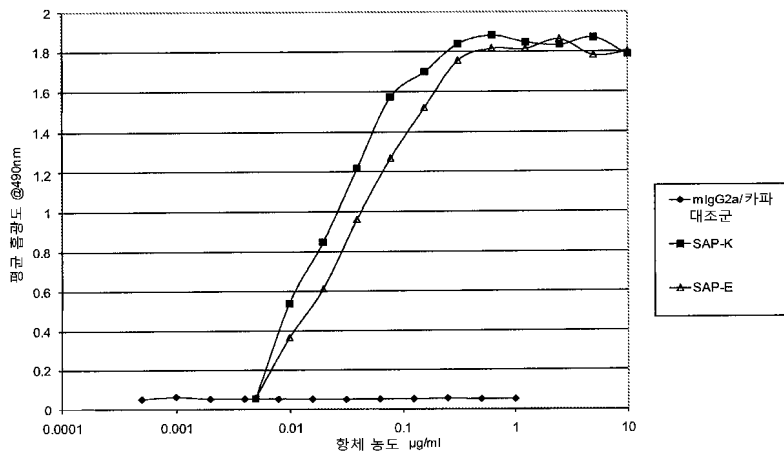
[0619]

도면

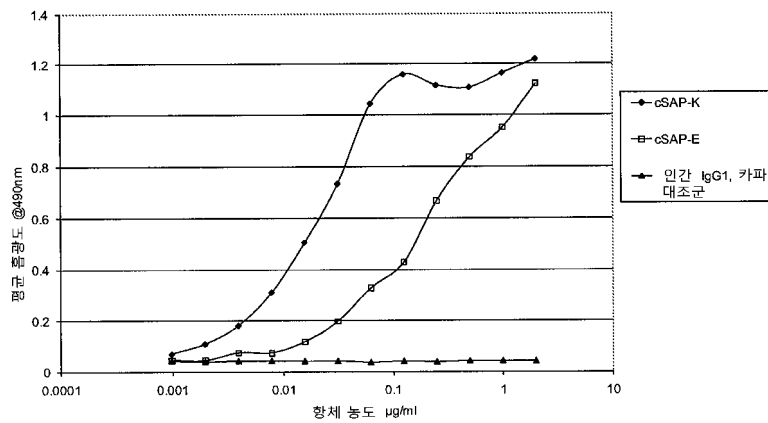
도면1



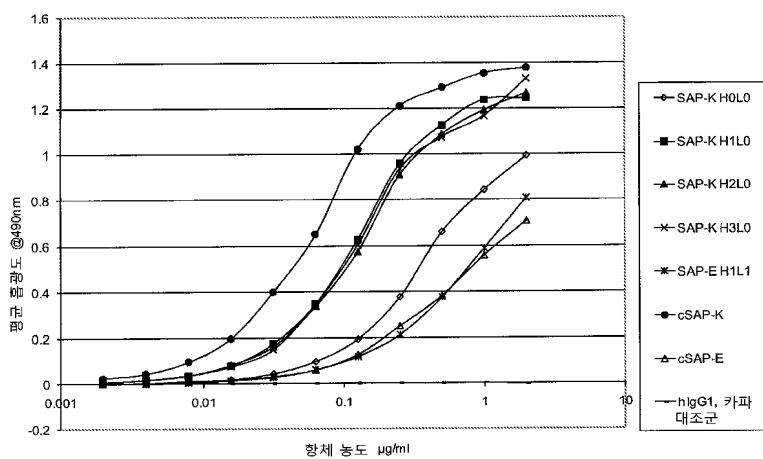
도면2



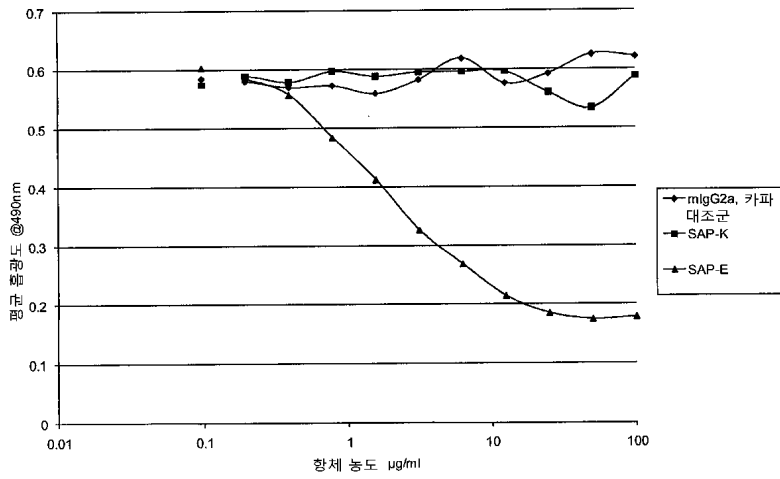
도면3



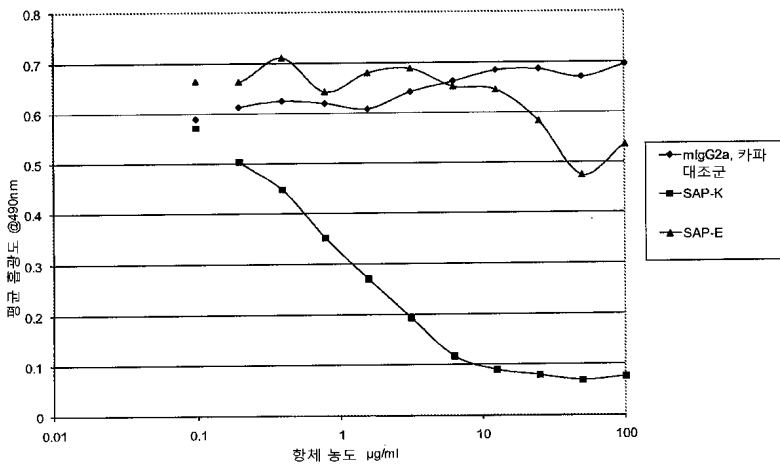
도면4



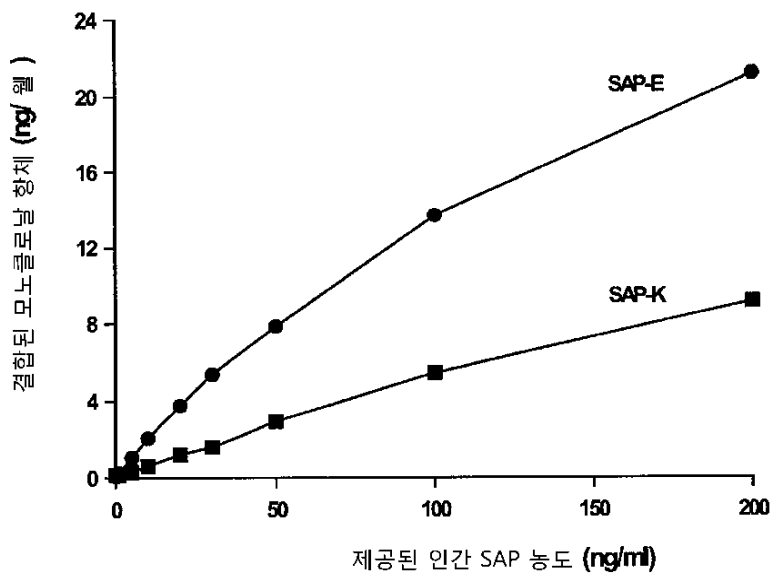
도면5



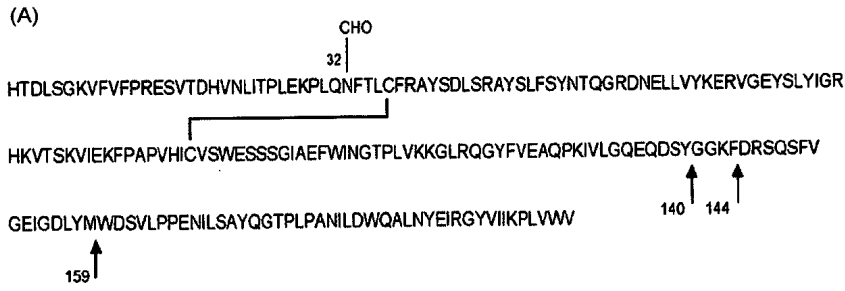
도면6



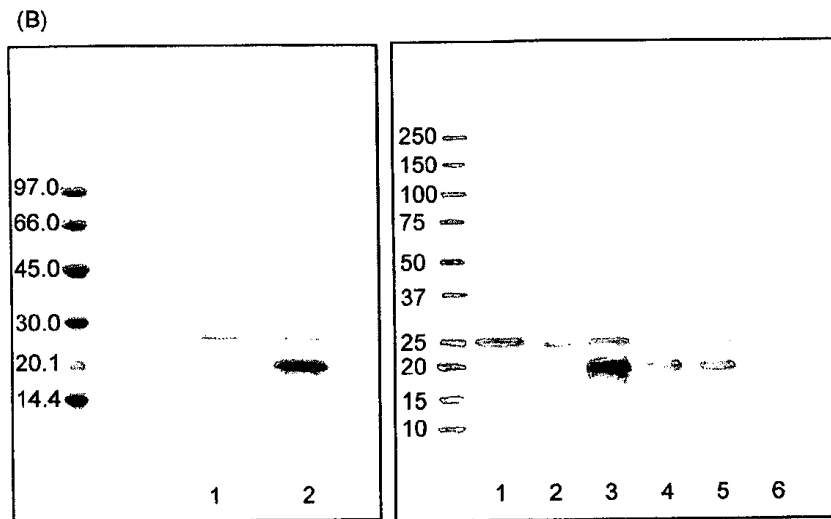
도면7



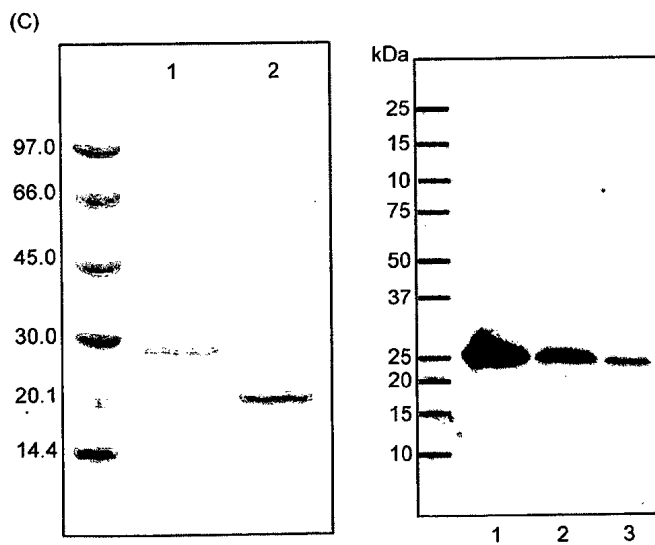
도면8a



도면8b



도면8c



도면8d

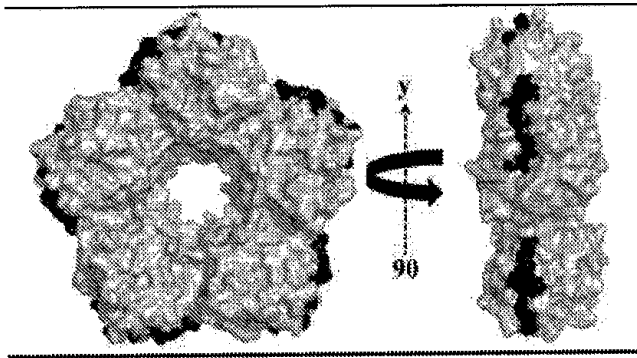
(D)

136 140 147
h EQDSYGGKFD RS
m EQDNYGGGFQ RS



도면9

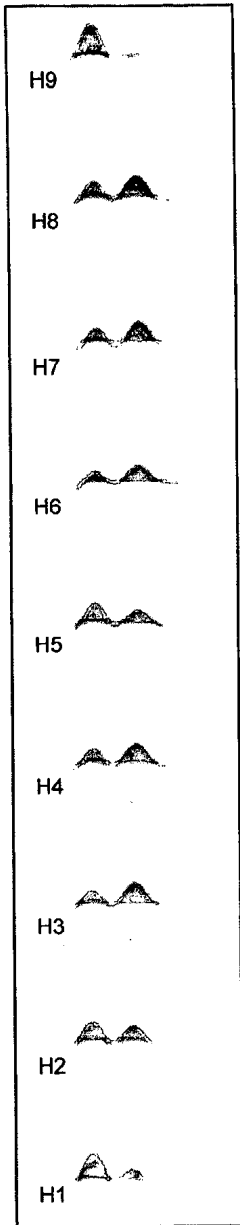
(A)



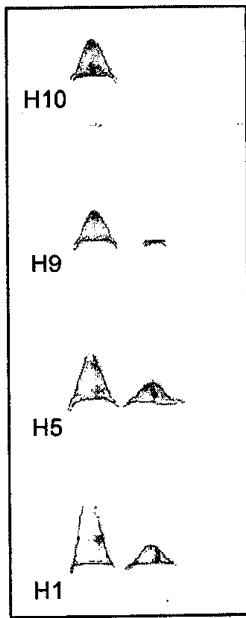
(B)



도면10



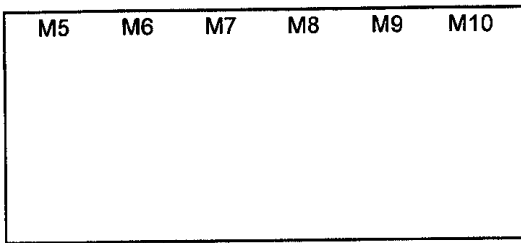
도면11



도면12

(A)

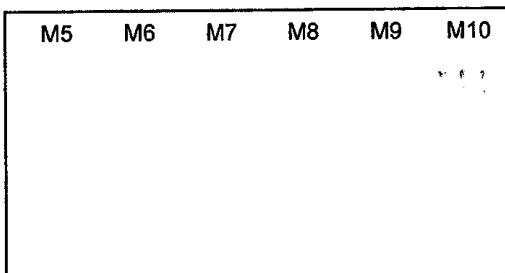
-ve



+ve

(B) 항-마우스 C3으로 1:5000에서 프로빙된 면역블롯

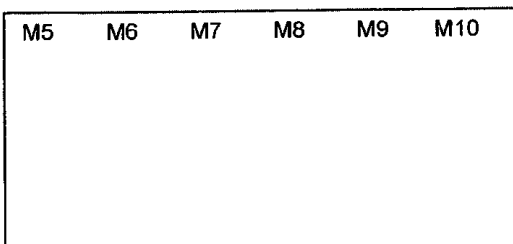
-ve



+ve

(C) 항-마우스 C3으로 1:10000에서 프로빙된 면역블롯

-ve



+ve

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Glaxo Group Limited

Tejinder Kaur BHINDER

Susannah Karen FORD

Volker GERMASCHEWSKI

Alan Peter LEWIS

Mark PEPYS

<120> Anti-SAP mab

<130> PB63944 WO

<150> 61/309957

<151> 2010-03-03

<160> 79

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus sequence

<220>

<223> SAP-E CDRH1 amino acid sequence

<400> 1

Thr Tyr Asn Met His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus sequence

<220>

<223> SAP-E CDRH2 amino acid sequence

<400> 2

Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Ala Asn Tyr Asn Gln Gln Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus sequence

<220>

<223> SAP-E CDRH3 amino acid sequence

<400> 3

Gly Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Ser

1 5 10

<210> 4

<211

> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus sequence

<220>

<223> SAP-E CDRL1 amino acid sequence

<400> 4

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus sequence

<220>

<223> SAP-E CDRL2 amino acid sequence

<400> 5

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus sequence

<220>

<223> SAP-E CDRL3 amino acid sequence

<400> 6

Gln His His Tyr Gly Ala Pro Leu Thr

1 5

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus sequence

<220>

<223> SAP-E VH amino acid sequence

<400> 7

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

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

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8

<211> 366

<212> DNA

<213> Mus musculus sequence

<220>

<223> SAP-E VH DNA sequence

<400> 8

caggcttctc tacagcagtc tgggactgag ctggtgaggt ctggggcctc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg ctcttgctt cacatttgcc acttacaata tgcactggat taagcagaca 120
 cccggacagg gcctggaatg gattgggtat atttatcctg gagatggtaa tgctaactac 180
 aatcagcagt tcaagggcaa ggccacattg actgcagaca catcctcaa cacagcctac 240
 atgcagatca gcagcctgac atctgaagac tctgcggtct atttctgtgc aagaggggac 300

tttgattacg acggagggta ctactttgac tcctggggcc agggcaccac tctcacagtc 360
 tcctca 366

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus sequence

<220>

<223> SAP-E VL amino acid sequence

<400> 9

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

His Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Val Ser Gly

 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Ser Leu Lys Ile Asn Gly Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Ala Pro Leu

 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

 100 105

<210> 10

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus musculus sequence

<220>

<223> SAP-E VL DNA sequence

<400> 10

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60

atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agttatttag catggtatca gcagaaacag 120

ggaagatccc ctcagctcct ggtccataat gcaaaaacct tagcagaagg tgtgccatca 180

agggtcagtg gcagtggatc aggcacacac ttttctctga agatcaacgg cctgcagcct 240

gaagattttg ggaattatta ctgtcaacat cattatggtg ctccgctcac gttcgggtgct 300

gggaccaagc tggaactgaa a

321

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus sequence

<220>

<223> SAP-K CDRH1 amino acid sequence

<400> 11

Ser Tyr Trp Met His

1 5

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus sequence

<220>

<223> SAP-K CDRH2 amino acid sequence

<400> 12

Met Ile His Pro Asn Ser Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Ser

<210

> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus sequence

<220>

<223> SAP-K CDRH3 amino acid sequence

<400> 13

Arg Asn Asp Tyr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus sequence

<220>

<223> SAP-K CDRL1 amino acid sequence

<400> 14

Lys Ala Ser Gln Asn Val Asn Ser Asn Val Ala

1 5 10

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus sequence

<220>

<223> SAP-K CDRL2 amino acid sequence

<400> 15

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus sequence

<220>

<223> SAP-K CDRL3 amino acid sequence

<400> 16

Gln Gln Cys Asn Asn Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 17

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus sequence

<220>

<223> SAP-K VH amino acid sequence

<400> 17

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

1 5 10 15

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

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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 18

<211> 357

<212> DNA

<213> Mus musculus sequence

<220>

<223> SAP-K VH DNA sequence

<400> 18

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctgataaagc ctggggcttc agtgaagttg 60

tctgcaagg cttctggcta cactttcacc agctactgga tgactgggt gaagcagagg 120

cctggacaag gccttgagtg gattggaatg attcatccta atagtgttaa tactaactac 180

aatgagaagt tcaagagtaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240

atgcaactca acagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagacggaat 300

gattactact ggiacttcga tgtctggggc acagggacca cggtcaccgt ctctca 357

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus sequence

<220>

<223> SAP-K VL amino acid sequence

<400> 19

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Cys Asn Asn Tyr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 20

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus musculus sequence

<220>

<223> SAP-K VL DNA sequence

<400> 20

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60

gtcacctgca aggccagtc gaatgtgaat tctaattgtag cctggatca acagaaacca 120

gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcttcctacc ggtacagtgg agtccctgat 180

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcaccaa tgtgcagtct 240

gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tgtaacaact atccattcac gttcggctcg 300

gggacaaaagt tggaaataaa a 321

<210> 21

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-E VH chimera amino acid sequence

<400> 21

Gln Ala Ser Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
 1 5 10 15

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

Asn Met His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Ala Asn Tyr Asn Gln Gln Phe
 50 55 60

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

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

Arg Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

<223> SAP-E VL chimera amino acid sequence

<400> 22

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

1 5 10 15
 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr

 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Arg Ser Pro Gln Leu Leu Val

 35 40 45
 His Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Val Ser Gly

 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Ser Leu Lys Ile Asn Gly Leu Gln Pro

65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Ala Pro Leu

 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu 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> 23

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-K VH chimera amino acid sequence

<400> 23

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Gly Met Ile His Pro Asn Ser Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 180 185 190

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

 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Tyr Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Lys Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 24

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-K VL chimera amino acid sequence

<400> 24

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Cys Asn Asn Tyr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Ser 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> 25

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens sequence

<220>

<223> IGHV1-69 human variable heavy chain germline

acceptor amino acid sequence

<400> 25

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Arg

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens sequence

<220>

<223> JH1 minigene

<400> 26

Ala Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

1 5 10 15
 Ser

<210> 27

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-E humanised VH variant H0 amino acid sequence

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Ala Asn Tyr Asn Gln Gln Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 28

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-E humanised VH variant H1 amino acid sequence

<400> 28

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Thr Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Ala Asn Tyr Asn Gln Gln Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Arg Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 29

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-E humanised VH variant H2 amino acid sequence

<400> 29

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

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-E humanised VH variant H4 amino acid sequence

<400> 31

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Ala Asn Tyr Asn Gln Gln Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Arg Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 32

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens sequence

<220>

<223> IGKV1-39 human variable light chain germline

acceptor amino acid sequence

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro

85 90 95
 <210> 33

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens sequence

<220>

<223> JK2 minigene

<400> 33

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 34

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-E humanised VL variant L0 amino acid sequence

<400> 34

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 Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

<220>

<223> SAP-E humanised VL variant L2 amino acid sequence

<400> 36

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 Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

His Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Tyr Gly Ala Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 37

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-K humanised VH variant H0 amino acid sequence

<400> 37

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Met Ile His Pro Asn Ser Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 38

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-K humanised VH variant H1 amino acid sequence

<400> 38

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 39

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-K humanised VH variant H2 amino acid sequence

<400> 39

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Gly Met Ile His Pro Asn Ser Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

 50 55 60

Lys Ser Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Arg Arg Asn Asp Tyr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly

 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

 115

<210> 40

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-K humanised VH variant H3 amino acid sequence

<400> 40

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

1 5 10 15

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

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

85 90 95
 Ala Arg Arg Asn Asp Tyr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-K humanised VL variant L0 amino acid sequence

<400> 41

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 Lys Ala Ser Gln Asn Val Asn Ser Asn
 20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr 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 Cys Asn Asn Tyr Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-K humanised VL variant L1 amino acid sequence

<400> 42

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 Lys Ala Ser Gln Asn Val Asn Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr 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 Cys Asn Asn Tyr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 43

<211> 204

<212> PRT

<213> Homo sapiens sequence

<220>

<223> Homo sapiens SAP amino acid sequence

<400> 43

His Thr Asp Leu Ser Gly Lys Val Phe Val Phe Pro Arg Glu Ser Val

1 5 10 15

Thr Asp His Val Asn Leu Ile Thr Pro Leu Glu Lys Pro Leu Gln Asn

20 25 30

Phe Thr Leu Cys Phe Arg Ala Tyr Ser Asp Leu Ser Arg Ala Tyr Ser
 35 40 45
 Leu Phe Ser Tyr Asn Thr Gln Gly Arg Asp Asn Glu Leu Leu Val Tyr
 50 55 60
 Lys Glu Arg Val Gly Glu Tyr Ser Leu Tyr Ile Gly Arg His Lys Val
 65 70 75 80
 Thr Ser Lys Val Ile Glu Lys Phe Pro Ala Pro Val His Ile Cys Val
 85 90 95

Ser Trp Glu Ser Ser Ser Gly Ile Ala Glu Phe Trp Ile Asn Gly Thr
 100 105 110
 Pro Leu Val Lys Lys Gly Leu Arg Gln Gly Tyr Phe Val Glu Ala Gln
 115 120 125
 Pro Lys Ile Val Leu Gly Gln Glu Gln Asp Ser Tyr Gly Gly Lys Phe
 130 135 140
 Asp Arg Ser Gln Ser Phe Val Gly Glu Ile Gly Asp Leu Tyr Met Trp
 145 150 155 160

Asp Ser Val Leu Pro Pro Glu Asn Ile Leu Ser Ala Tyr Gln Gly Thr
 165 170 175
 Pro Leu Pro Ala Asn Ile Leu Asp Trp Gln Ala Leu Asn Tyr Glu Ile
 180 185 190
 Arg Gly Tyr Val Ile Ile Lys Pro Leu Val Trp Val
 195 200

<210> 44

<211> 203

<212> PRT

<213> Mus musculus sequence

<220>

<223> Mus musculus SAP amino acid sequence

<400> 44

Gln Thr Asp Leu Lys Arg Lys Val Phe Val Phe Pro Arg Glu Ser Glu

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

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

 130 135 140
 Gln Arg Ser Gln Ser Phe Val Gly Glu Phe Ser Asp Leu Tyr Met Trp
 145 150 155 160
 Asp Tyr Val Leu Thr Pro Gln Asp Ile Leu Phe Val Tyr Arg Asp Ser
 165 170 175
 Pro Val Asn Pro Asn Ile Leu Asn Trp Gln Ala Leu Asn Tyr Glu Ile
 180 185 190
 Asn Gly Tyr Val Val Ile Arg Pro Arg Val Trp
 195 200

<210> 45

<211> 1356

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-E VH chimera nucleotide sequence

<400> 45

caggcttctc tacagcagtc tgggactgag ctggtgaggt ctggggcctc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg ctctggctt cacatttgcc acttacaata tgcactggat taagcagaca 120
 cccggacagg gcctggaatg gattgggtat atttatcctg gagatggtaa tgctaactac 180
 aatcagcagt tcaagggcaa ggccacattg actgcagaca catcctccaa cacagcctac 240
 atgcagatca gcagcctgac atctgaagac tctgcggtct atttctgtgc aagaggggac 300
 ttgattacg acggagggta ctactttgac tcctggggcc agggcacact agtgaccctg 360

tccagcgcca gcaccaaggg cccacagcgtg ttccccctgg cccccagcag caagagcacc 420
 agcggcgcca cagccgcctt gggctgcctg gtgaaggact acttccccga accggtgacc 480
 gtgtcctgga acagcggagc cctgaccagc ggcgtgcaca ctttccccgc cgtgctgcag 540
 agcagcggcc tgiacagcct gagcagcgtg gtgaccgtgc ccagcagcag cctgggcacc 600
 cagacctaca tctgtaactg gaaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaggtg 660
 gagcccaaga gctgtgacaa gaccacacac tgccccccct gccctgcccc cgagctgctg 720
 ggaggcccca gcgtgttctt gttccccccc aagcctaagg acaccctgat gatcagcaga 780
 acccccgagg tgacctgtgt ggtggtggat gtgagccacg aggaccctga ggtgaagttc 840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aatgccaaga ccaagcccag ggaggagcag 900
 tacaacagca cctaccgggt ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ttggctgaac 960
 ggcaaggagt acaagtgtaa ggtgtccaac aaggccctgc ctgcccctat cgagaaaacc 1020
 atcagcaagg ccaagggcca gccagagag ccccaggtgt acaccctgcc ccctagcaga 1080
 gatgagctga ccaagaacca ggtgtccctg acctgcctgg tgaagggtt ctaccccagc 1140
 gacatcgccg tggagtggga gagcaacggc cagcccgaga acaactaaa gaccaccccc 1200
 cctgtgctgg acagcgatgg cagcttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagagc 1260
 agatggcagc agggcaacgt gttcagctgc tccgtgatgc acgaggccct gcacaatcac 1320

tacaccaga agagcctgag cctgtcccct ggcaag 1356

<210> 46

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-E VL chimera nucleotide sequence

<400> 46

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60
 atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agttatttag catggtatca gcagaaacag 120

ggaagatccc ctgagctcct ggtccataat gcaaaaacct tagcagaagg tgtgcatca 180
 aggtcagtg gcagtgatc aggcacacac ttttctctga agatcaacgg cctgcagcct 240
 gaagattttg ggaattatta ctgtcaacat cattatgggtg ctccgctcac gttcgggtgct 300

gggaccaagc tggaactgaa acgtacgggtg gccgccccca gcgtgttcat cttcccccc 360
 agcgatgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtgggtg gtctgctgaa caacttctac 420
 cccccggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaatgccc tgcagagcgg caacagccag 480
 gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540
 ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgctt gtgaggtgac ccaccagggc 600
 ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gc 642

<210> 47

<211> 1347

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-K VH chimera nucleotide sequence

<400> 47

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctgataaagc ctggggcttc agtgaagttg 60
 tcctgaagc ctctggcta cactttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg 120
 cctggacaag gccttgagtg gattggaatg attcatccta atagtgttaa tactaactac 180
 aatgagaagt tcaagagtaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atgcaactca acagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagacggaat 300
 gattactact ggtacttcca gtgtggggc acagggacac tagtgaccgt gtccagcgcc 360
 agcaccaagg gccccagcgt gttccccctg gccccagca gcaagagcac cagcggcggc 420

acagccgccc tgggtgctt ggtgaaggac tacttccccg aaccggtgac cgtgtcctgg 480
 aacagcggag cctgaccag cggcgtgcac accttccccg ccgtgctgca gagcagcggc 540
 ctgtacagcc tgagcagcgt ggtgaccgtg cccagcagca gcctgggac ccagacctac 600
 atctgtaac tgaaccaca gccagcaac accaaggtgg acaagaaggt ggagcccaag 660
 agctgtgaca agaccacac ctgcccccc tgcctgccc ccgagctgct gggaggcccc 720
 agcgtgttcc tgttcccc caagcctaag gacaccctga tgatcagcag aacccccgag 780
 gtgacctgtg tgggtgtgga tgtgagccac gaggacctg aggtgaagtt caactggtac 840
 gtggacggcg tggaggtgca caatgccaag accaagccca gggaggagca gtacaacagc 900

acctaccggg tgggtgccgt gctgaccgtg ctgcaccagg attggctgaa cggcaaggag 960
 tacaagtgtg aggtgtccaa caagccctg cctgcccta tcgagaaaac catcagcaag 1020
 gcccaaggcc agcccagaga gcccagggtg tacaccctgc ccctagcag agatgagctg 1080
 accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg gtgaagggt tctaccccag cgacatcgcc 1140
 gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 1200
 gacagcgatg gcagcttctt cctgtacagc aagctgaccg tggacaagag cagatggcag 1260
 cagggcaacg tgitcagctg ctccgtgatg cagaggccc tgcacaatca ctacaccag 1320
 aagagcctga gcctgtcccc tggcaag 1347

<210> 48

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-K VL chimera nucleotide sequence

<400> 48

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
 gtcacctgca aggccagtc gaatgtgaac tctaatgtag cctggtatca acagaaacca 120
 gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcttcctacc ggtacagtgg agtccctgat 180
 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcaccaa tgtgcagtct 240
 gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tgaacaact atccattcac gttcggctcg 300
 gggacaaagt tggaaataaa acgtacggtg gccgcccaca gcgtgttcat cttcccccc 360

 agcgatgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gtctgctgaa caacttctac 420
 cccgggagg ccaaggtgca gtggaagggt gacaatgccc tgcagagcgg caacagccag 480
 gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540
 ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgct gtgaggtgac ccaccagggc 600
 ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gc 642

<210> 49

<211> 294

<212> DNA

<213> Homo sapiens sequence

<220>

<223> IGHV1-69 human variable heavy chain germline

acceptor nucleotide sequence

<400> 49

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg ctcttgagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggagg atcatccta tctttggtac agcaaactac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaga 294

<210> 50

<211> 285

<212> DNA

<213> Homo sapiens sequence

<220>

<223> IGHV1-39 human variable heavy chain germline

acceptor nucleotide sequence

<400> 50

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtc gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccct 285

<210> 51

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-E humanised heavy chain V region variant H0

nucleotide sequence non-codon optimised

<400> 51

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg ctcttgagg caccttcagc acttacaata tgactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatat attatcctg gagatggtaa tgctaactac 180
 aatcagcagt tcaagggcag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaggggac 300
 ttgattacg acggagggta ctactttgac tcttggggcc agggcacctc ggtcacctgc 360
 tcctca 366

<210> 52

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-E humanised light chain V region variant L0

nucleotide sequence non-codon optimised

<400> 52

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gagcaagtga gaatatttac agttatttag catggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctataat gcaaaaacct tagcagaagg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacat cattatgggtg ctccgctcac gtttgccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 53

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-E humanised heavy chain V region variant H0

nucleotide sequence (codon optimised)

<400> 53

caggtgcagc tggatgcagag cggcggcag gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaaggtg 60
 agctgcaagg ctacggggg cacttctcc acctacaaca tgactgggt caggcaggca 120
 cccggccagg gctggagtg gatgggctat atctaccg ggcacggcaa cgccaactac 180
 aaccagcagt tcaagggcag ggtgaccatc accgcccaca agagcaccag caccgcctac 240

atggaactga gcagcctgag gagcaggat accgccgtgt actactgcgc caggggagc 300
 ttcgactacg acggcggtc ctacttcgac agctggggac agggcacact agtgaccgtg 360
 tccagc 366

<210> 54

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-E humanised heavy chain V region variant H1
nucleotide sequence (codon optimised)

<400> 54

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaaac cggcagcag cgtgaaggtg 60
agctgcaagg ctacggggtt caccttcgcc acctacaaca tgactgggt caggcaggca 120

cccggccagg gcctggagtg gatgggctat atctaccccg ggcacggcaa cgccaactac 180
aaccagcagt tcaagggcag ggtgaccatc accgccgaca agagcaccag caccgcctac 240
atggaactga gcagcctgag gagcgaggat accgccgtgt actactgcgc caggggcgac 300
ttcgactacg acggcggcta ctacttcgac agctggggac agggcacact agtgaccgtg 360
tccagc 366

<210> 55

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-E humanised heavy chain V region variant H2
nucleotide sequence (codon optimised)

<400> 55

caggcgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaaac cggcagcag cgtgaaggtg 60
agctgcaagg ctacggggtt caccttcgcc acctacaaca tgactgggt caggcaggca 120
cccggccagg gcctggagtg gatgggctat atctaccccg ggcacggcaa cgccaactac 180
aaccagcagt tcaagggcag ggtgaccatc accgccgaca agagcaccag caccgcctac 240
atggaactga gcagcctgag gagcgaggat accgccgtgt actactgcgc caggggcgac 300
ttcgactacg acggcggcta ctacttcgac agctggggac agggcacact agtgaccgtg 360
tccagc 366

<210> 56

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-E humanised heavy chain V region variant H3
nucleotide sequence (codon optimised)

<400> 56

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaaggtg 60
agctgcaagg ctagcgggtt caccttcgcc acctacaaca tgcaactgggt caggcaggca 120
cccggccagg gcctggagtg gatcggctat atctaccccg gcgacggcaa cgccaactac 180
aaccagcagt tcaagggcag ggccaccatc accgccgaca agagcaccag caccgcctac 240
atggaactga gcagcctgag gagcgaggat accgccgtgt actactgcgc caggggcgac 300

ttcgactacg acggcggcta ctacttcgac agctggggac agggcacact agtgaccgtg 360
tccagc 366

<210> 57

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-E humanised heavy chain V region variant H4
nucleotide sequence (codon optimised)

<400> 57

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaaggtg 60
agctgcaagg ctagcgggtt caccttcgcc acctacaaca tgcaactgggt caggcaggca 120
cccggccagg gcctggagtg gatcggctat atctaccccg gcgacggcaa cgccaactac 180

aaccagcagt tcaagggcag ggccaccctg accgccgaca ccagcaccag caccgcctac 240
atggaactga gcagcctgag gagcgaggat accgccgtgt acttctgcgc caggggcgac 300
ttcgactacg acggcggcta ctacttcgac agctggggac agggcacact agtgaccgtg 360
tccagc 366

<210> 58

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-E humanised light chain V region variant L0
 nucleotide sequence (codon optimised)

<400> 58

gacatccaga tgaccagag cccagctca ctgagcgcca gcgtgggcca cagggtgacc 60

attacctgca gggcctccga gaacatctac agctacctgg cctggtacca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaac gccaagaccc tcgccgaggg cgtccctagc 180

aggttctctg gaagcggcag cggcaccgac ttaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctatta ctgccagcac cactacggcg cccccctgac ctttgccag 300

ggcaccaaac tggagatcaa g 321

<210> 59

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-E humanised light chain V region variant L1
 nucleotide sequence (codon optimised)

<400> 59

gacatccaga tgaccagag cccagctca ctgagcgcca gcgtgggcca cagggtgacc 60

attacctgca gggcctccga gaacatctac agctacctgg cctggtacca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatccacaac gccaagaccc tcgccgaggg cgtccctagc 180

aggttctctg gaagcggcag cggcaccgac ttaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctatta ctgccagcac cactacggcg cccccctgac ctttgccag 300

ggcaccaaac tggagatcaa g 321

<210> 60

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-E humanised light chain V region variant L2
 nucleotide sequence (codon optimised)

<400> 60

gacatccaga tgaccagag cccagctca ctgagcgcca gcgtgggcca cagggtgacc 60

attacctgca gggcctccga gaacatctac agctacctgg cctggtacca gcagaagccc 120
 ggcaaggccc ccaagctgct ggtgcacaac gccaaagacc tcgccgaggg cgtccctagc 180
 aggttctctg gaagcggcag cggcaccgac ttaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240
 gaggacttcg ccacctatta ctgccagcac cactacggcg ccccctgac ctttgccag 300
 ggcaccaaac tggagatcaa g 321

<210> 61

<211> 1356

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-E humanised heavy chain H1 full mature
 nucleotide sequence (codon optimised)

<400> 61

caggtgcagc tggcgcagag cggcggcag gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaaggtg 60
 agctgcaagg ctacgggtt caccttcgcc acctacaaca tgactgggt caggcaggca 120
 cccggccagg gcctggagt gatgggctat atctaccccg gcgacggcaa cgccaactac 180
 aaccagcagt tcaagggcag ggtgaccatc accgccgaca agagcaccag caccgcctac 240
 atggaactga gcagcctgag gagcaggat accgccgtgt actactgcgc caggggagc 300

ttcgactacg acggcggcta ctacttcgac agctggggac agggcacact agtgaccgtg 360
 tccagcgcca gcaccaaggg cccagcgtg ttccccctgg ccccagcag caagagcacc 420
 agcggcggca cagccgcctt gggctgcctg gtgaaggact acttccccga accggtgacc 480
 gtgtcctgga acagcggagc cctgaccagc ggcgtgcaca cttccccgc cgtgctgcag 540
 agcagcggcc tgiacagcct gagcagcgtg gtgaccgtgc ccagcagcag cctgggcacc 600
 cagacctaca tctgtaacct gaaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaggtg 660
 gagcccaaga gctgtgacaa gaccacacc tgeccccct gccctgcccc cgagctgctg 720
 ggaggcccca gcgtgttctt gttcccccc aagcctaagg acacctgat gatcagcaga 780

acccccgagg tgacctgtgt ggtggtggat gtgagccacg aggacctga ggtgaagttc 840
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aatgccaaga ccaagcccag ggaggagcag 900
 tacaacagca cctaccgggt ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ttggctgaac 960
 ggcaaggagt acaagtgtaa ggtgtccaac aaggccctgc ctgccctat cgagaaaacc 1020
 atcagcaagg ccaagggcca gccagagag ccccaggtgt acacctgcc cctagcaga 1080
 gatgagctga ccaagaacca ggtgtccctg acctgcctgg tgaagggtt ctacccagc 1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaacggc cagccccgaga acaactacaa gaccaccccc 1200
 cctgtgctgg acagcgatgg cagcttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagagc 1260

agatggcage agggcaacgt gttcagctgc tccgtgatgc acgaggccct gcacaatcac 1320
 tacaccaga agagcctgag cctgtcccct ggcaag 1356

<210> 62

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-E humanised heavy chain H1 full mature amino
 acid sequence

<400> 62

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Ala Asn Tyr Asn Gln Gln Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

Gly Ser Phe Phe Lys Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 63

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-E humanised light chain L1 full mature
 nucleotide sequence
 (codon optimised)

<400> 63

gacatccaga tgaccagag ccccagctca ctgagcgcca gcgtgggcca cagggtgacc 60
 attacctgca gggcctccga gaacatctac agctacctgg cctggtacca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatccacaac gccaagacct tcgccgaggg cgtccctagc 180
 aggttctctg gaagcggcag cggcaccgac ttaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240
 gaggacttcg ccacctatta ctgccagcac cactacggcg cccccctgac ctttgccag 300
 ggacacaaac tggagatcaa gcgtacggtg gccgccccca gcgtgttcat ctccccccc 360
 agcgatgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gtctgctgaa caacttctac 420
 cccgggagg ccaaggtgca gtggaagtg gacaatgccc tgcagagcgg caacagccag 480
 gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540
 ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgct gtgaggtgac ccaccagggc 600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gc 642

<210> 64

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-E humanised light chain L1 full mature amino
acid sequence

<400> 64

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 Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
 20 25 30

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

35 40 45

His Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Tyr Gly Ala Pro Leu
 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> 65

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-K humanised heavy chain V region variant H0

nucleotide sequence non-codon optimised

<400> 65

caggtgcagc tggcgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaagtc 60
 tcctgcaagg ctctggagg caccttcagc agctactgga tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg attcatccta atagtgttaa tactaactac 180
 aatgagaagt tcaagagtag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagacggaat 300
 gattactact ggtacttcga tgtctggggc cagggcaccc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 66

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-K humanised light chain V region variant L0

nucleotide sequence non-codon optimised

<400> 66

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttga aggccagtc gaatgtgaac tctaattgtag cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctattcg gcttctacc ggtacagtgg ggtccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttg caacttacta ctgtcagcaa tgtaacaact atccattcac gtttgccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 67

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-K humanised heavy chain V region variant H0

nucleotide sequence (codon optimised)

<400> 67

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgaa gtgaagaagc cgggcagcag cgtgaaagtg 60
 agctgcaagg ccagcggcgg aaccttcagc agctactgga tgcactgggt gaggcaggca 120
 cccggccagg gcctggagtg gatgggcatg atccacceca acagcgtgaa caccaactac 180
 aacgagaagt tcaagagcag agtgaccatc accgccgaca agagcaccag caccgcctat 240

atggagctga gctctctgag gagcaggat accgccgtgt actactgcgc caggaggaac 300
 gactactact ggiacttcga cgtctggggc cagggcacac tagtgaccgt gtccagc 357

<210> 68

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-K humanised heavy chain V region variant H1

nucleotide sequence (codon optimised)

<400> 68

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgaa gtgaagaagc cgggcagcag cgtgaaagtg 60
 agctgcaagg ccagcggcga caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaggcaggca 120
 cccggccagg gcctggagtg gatgggcatg atccacceca acagcgtgaa caccaactac 180

aacgagaagt tcaagagcag agtgaccatc accgccgaca agagcaccag caccgcctat 240
 atggagctga gctctctgag gagcaggat accgccgtgt actactgcgc caggaggaac 300
 gactactact ggiacttcga cgtctggggc cagggcacac tagtgaccgt gtccagc 357

<210> 69

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-K humanised heavy chain V region variant H2

nucleotide sequence (codon optimised)

<400> 69

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgaa gtgaagaagc cgggcagcag cgtgaaagtg 60

agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaggcaggca 120

cccggccagg gcctggagtg gatcgccatg atccaccca acagcgtgaa caccaactac 180

aacgagaagt tcaagagcag agccaccatc accgccgaca agagcaccag caccgcctat 240

atggagctga gctctctgag gagcaggat accgccgtgt actactgcmc caggaggaac 300

gactactact ggtacttcga cgtctggggc cagggcacac tagtgaccgt gtccagc 357

<210> 70

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-K humanised heavy chain V region variant H3

nucleotide sequence (codon optimised)

<400> 70

caggtgcagc tgggtgcagag cggcggcga gtgaagaagc ccggcagcag cgtgaaagtg 60

agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaggcaggca 120

cccggccagg gcctggagtg gatcgccatg atccaccca acagcgtgaa caccaactac 180

aacgagaagt tcaagagcag agccaccctg accgtggaca agagcaccag caccgcctat 240

atggagctga gctctctgag gagcaggat accgccgtgt actactgcmc caggaggaac 300

gactactact ggtacttcga cgtctggggc cagggcacac tagtgaccgt gtccagc 357

<210> 71

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-K humanised light chain V region variant L0

nucleotide sequence (codon optimised)

<400> 71

gacatccaga tgaccagag cccctcttca ctgagccta gcgtgggca cagggtgacc 60

atcacctgca aggccagcca gaacgtgaac agcaacgtgg cctggtacca gcagaagccc 120

ggcaaagccc ccaagctect gatctacagc gccagctaca gatatagcgg cgtgcctagc 180

aggtttagcg gcagcggag cgggaccgat ttaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacttcg ccaattacta ctgccagcag tgcaacaact accccttac cttcggccag 300

ggcaccaagc tggagatcaa g 321

<210> 72

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-K humanised light chain V region variant L1

nucleotide sequence (codon optimised)

<400> 72

gacatccaga tgaccagag cccctcttca ctgagcgcta gcgtgggcga cagggtgacc 60
 atcacctgca aggccagcca gaacgtgaac agcaacgtgg cctggtacca gcagaagccc 120
 ggcaaagccc ccaaggcct gatctacagc gccagctaca gatatagcgg cgtgcctagc 180
 aggtttagcg gcagcgggaag cgggaccgat ttaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240
 gaggacttcg ccaattacta ctgccagcag tgcaacaact accccttcac cttcggccag 300
 ggcaccaagc tggagatcaa g 321

<210> 73

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-K humanised light chain V region variant L0

91A nucleotide sequence (codon optimised)

<400> 73

gacatccaga tgaccagag cccctcttca ctgagcgcta gcgtgggcga cagggtgacc 60
 atcacctgca aggccagcca gaacgtgaac agcaacgtgg cctggtacca gcagaagccc 120
 ggcaaagccc ccaagctcct gatctacagc gccagctaca gatatagcgg cgtgcctagc 180
 aggtttagcg gcagcgggaag cgggaccgat ttaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240
 gaggacttcg ccaattacta ctgccagcag gcgaacaact accccttcac cttcggccag 300

ggcaccaagc tggagatcaa g 321

<210> 74

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-K humanised light chain V region variant L0

91A amino acid sequence

<400> 74

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 Lys Ala Ser Gln Asn Val Asn Ser Asn
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr 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 Ala Asn Asn Tyr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 75

<211> 1347

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-K humanised H3 heavy chain nucleotide sequence

(codon optimised)

<400> 75

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgaa gtgaagaagc cggcagcag cgtgaaagtg 60
 agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaggcaggca 120
 cccggccagg gcttgagtg gatcgcatg atccaccca acagcgtgaa caccaactac 180
 aacgagaagt tcaagagcag agccaccctg accgtggaca agagcaccag caccgcctat 240
 atggagctga gctctctgag gagcgaggat accgccgtgt actactgctc caggaggaac 300

gactactact ggiacttcga cgtctggggc cagggcacac tagtgaccgt gtccagcgcc 360
 agcaccaagg gccccagcgt gttccccctg gccccagca gcaagagcac cagcggcggc 420
 acagccgccc tgggctgcct ggtgaaggac tacttccccg aaccggtgac cgtgtcctgg 480
 aacagcggag ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ccgtgctgca gagcagcggc 540
 ctgtacagcc tgagcagcgt ggtgaccgtg cccagcagca gcctggggcag ccagacctac 600
 atctgtaacg tgaaccacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaggt ggagcccaag 660
 agctgtgaca agaccacac ctgccccccc tgcctgccc ccgagctgct gggaggcccc 720
 agcgtgttcc tgttcccc caagcctaag gacacctga tgatcagcag aacccccgag 780

gtgacctgtg tggagggtga tgtgagccac gaggacctg aggtgaagtt caactggtac 840
 gtggacggcg tggaggtgca caatgccaag accaagccca gggaggagca gtacaacagc 900
 acctaccggg tgggtgctcct gctgaccgtg ctgcaccagg attggctgaa cggcaaggag 960
 tacaagtgta aggtgtccaa caaggccctg cctgcccta tcgagaaaac catcagcaag 1020
 gccaaaggcc agcccagaga gcccagggtg tacaccctgc ccctagcag agatgagctg 1080
 accaagaacc aggtgtcctt gacctgctg gtgaagggt tctaccccag cgacatcgcc 1140
 gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 1200
 gacagcgatg gcagcttctt cctgtacagc aagctgaccg tggacaagag cagatggcag 1260

cagggcaacg tgttcagctg ctccgtgatg cagaggcccc tgcacaatca ctacaccag 1320
 aagagcctga gcctgtcccc tggcaag 1347

<210> 76

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-K humanised H3 heavy chain amino acid sequence

<400> 76

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Met Ile His Pro Asn Ser Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Lys Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 77

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-K humanised L0 light chain nucleotide sequence

(codon optimised)

<400> 77

gacatccaga tgaccagag ccctcttca ctgagcgta gcgtggcga cagggtgacc 60
 atcacctgca aggccagcca gaactgaac agcaactgg cctggtacca gcagaagccc 120

 ggcaaagccc ccaagctcct gatctacagc gccagctaca gatatagcgg cgtgcctagc 180
 aggttttagcg gcagcgggaag cgggaccgat ttaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240
 gaggacttcg ccaattacta ctgccagcag tgcaacaact accccttac cttcggccag 300
 ggcaccaagc tggagatcaa gcgtacggtg gccgccccca gcgtgttcat cttcccccc 360

agcgatgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gctgctgaa caacttctac 420
 ccccgaggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaatgccc tgcagagcgg caacagccag 480
 gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540
 ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgctt gtgaggtgac ccaccagggc 600

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gc 642

<210> 78

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SAP-K humanised L0 light chain amino acid sequence

<400> 78

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 Lys Ala Ser Gln Asn Val Asn Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr 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 Cys Asn Asn Tyr Pro Phe

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> 79

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> Signal sequence for immunoglobulin chains

<400> 79

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

1 5 10 15

Val His Ser