



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0061695
(43) 공개일자 2017년06월05일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>C07K 16/44</i> (2006.01) <i>A61K 39/00</i> (2006.01)
<i>C07D 487/04</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
<i>C07K 16/44</i> (2013.01)
<i>C07D 487/04</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-7011208</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2015년09월30일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2017년04월25일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2015/072606</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2016/050867
국제공개일자 2016년04월07일</p> <p>(30) 우선권주장
62/058,458 2014년10월01일 미국(US)
62/114,931 2015년02월11일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
메디문 리미티드
영국 씨비21 6지에이치 캠프리지 그랜타 파크 밀스테인 빌딩</p> <p>(72) 발명자
류캐넌 앤드루
영국 캠프리지 캠프리지셔 그랜타 파크 밀스테인 빌딩 메디문 리미티드 내
닐란테르 스벤
스웨덴 에스에-151 85 쇠테르텔리에 아스트라라제네카 아베 내
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
김진희, 김태홍</p> |
|--|--|

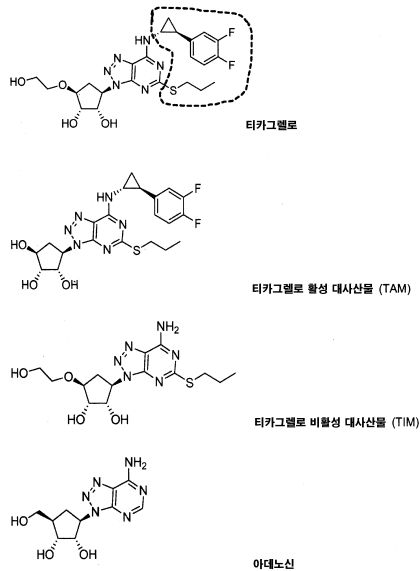
전체 청구항 수 : 총 54 항

(54) 발명의 명칭 **티카그렐로에 대한 항체 및 이의 사용 방법**

(57) 요약

본 개시내용은 대체적으로 티카그렐로 및 티카그렐로의 대사 산물과 결합하는 항체 및 이 항체의 항원 결합 단편을 제공한다. 본 개시내용은 또한 항체, 이 항체를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 조성물, 이 항체를 투여하는 단계를 포함하는 환자를 치료하는 방법, 그리고 이 항체를 제조 및 사용하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도2a



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/54 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/569 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/626 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)

(72) 발명자

페니 마크

영국 캠브리지 캠브리지셔 그랜타 파크 밀스테인
빌딩 메디문 리미티드 내

뉴튼 필립

영국 캠브리지 캠브리지셔 그랜타 파크 밀스테인
빌딩 메디문 리미티드 내

케이스 피나

영국 캠브리지 캠브리지셔 그랜타 파크 밀스테인
빌딩 메디문 리미티드 내

인하르트 토르드

스웨덴 에스에-151 85 쇠테르텔리에 아스트라제네
카 아베 내

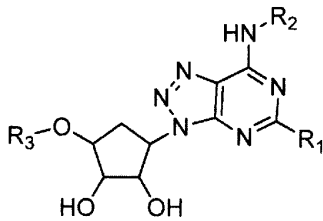
명세서

청구범위

청구항 1

화학식 Ia의 사이클로펜틸트리아졸로피리미딘 화합물에 특이적으로 결합하는 항체.

[화학식 Ia]



(상기 식 중,

R₁은 C₁-C₆ 알콕시 및 C₁-C₆ 알킬티오로 이루어진 군으로부터 선택되고;

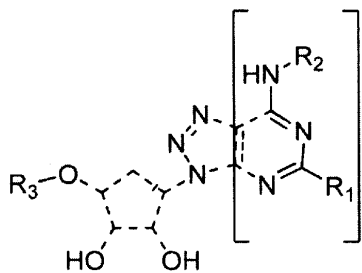
R₂는 H, C₁-C₆ 알킬, 치환된 C₁-C₆ 알킬, C₃-C₆ 사이클로알킬 및 치환된 C₃-C₆ 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되며;

R₃은 H, C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알콕시 및 C₁-C₆ 알칸올로 이루어진 군으로부터 선택됨)

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체는 화학식 IIa에서 괄호로 지정된, 화합물의 부분 내 에피토프에서 화학식 Ia의 사이클로펜틸트리아졸로피리미딘 화합물에 결합하는 것인 항체.

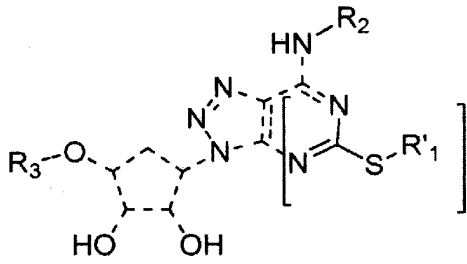
[화학식 IIa]



청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체는 화학식 IIIa에서 괄호로 지정된, 화합물의 부분 내 에피토프에서 화학식 Ia의 사이클로펜틸트리아졸로피리미딘 화합물에 결합하는 것인 항체.

[화학식 IIIa]

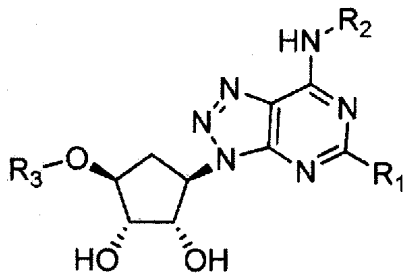


(상기 식 중, R₁은 C₁-C₄ 알킬로 이루어진 군으로부터 선택됨)

청구항 4

화학식 Ib의 사이클로펜틸트리아졸로피리미딘 화합물과 특이적으로 결합하는 항체.

[화학식 Ib]



청구항 5

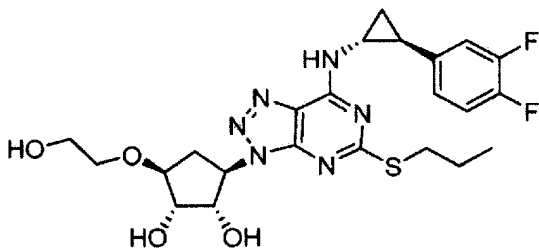
제4항에 있어서, R₁은 C₁-C₆ 알킬티오인 항체.

청구항 6

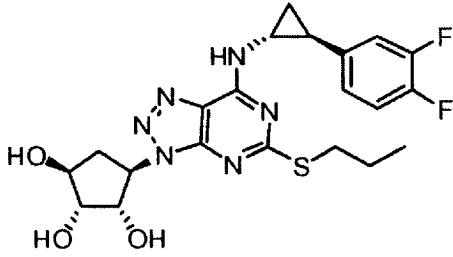
제4항에 있어서, 상기 화학식 Ib의 화합물은 티카그렐로((1S,2S,3R,5S)-3-[7-[(1R,2S)-2-(3,4-디플루오로페닐)사이클로프로필]아미노]-5-(프로필티오)-3H-[1,2,3]트리아졸로[4,5-d]피리미딘-3-일]-5-(2-하이드록시에톡시)사이클로펜탄-1,2-디올), 또는 이의 대사 산물 또는 유도체인 항체.

청구항 7

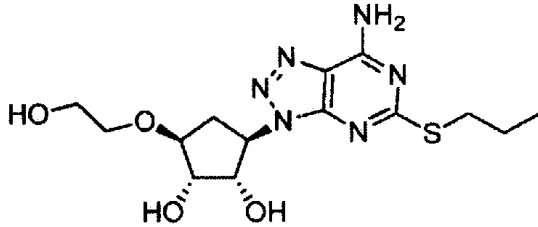
제4항에 있어서, 상기 화학식 Ib의 화합물은



티카그렐로;



티카그렐로 활성 대사 산물(TAM); 및



티카그렐로 비활성 대사 산물(TIM)

로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 항체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 인간화된 항체, 인간 항체, 단일 사슬 Fv(scFv), 단일 도메인 항체, Fab, F(ab')₂, 단일 사슬 다이아바디, 항체 모의체 및 항체 가변 도메인으로부터 선택되는 것인 항체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 항체는 scFv를 포함하는 것인 항체.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 항체는 Fab를 포함하는 것인 항체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 티카그렐로, 또는 이의 대사 산물 또는 유도체에 IC₅₀ 약 200 nM 이하로 결합하는 것인 항체.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 티카그렐로, 또는 이의 대사 산물 또는 유도체에 IC₅₀ 약 100 nM 내지 약 1 nM의 범위로 결합하는 것인 항체.

청구항 13

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 티카그렐로 또는 티카그렐로의 활성 대사 산물에 IC₅₀ 약 10 nM 내지 약 1 nM의 범위로 결합하는 것인 항체.

청구항 14

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 티카그렐로, 또는 이의 대사 산물 또는 유도체와 K_D 약 50 nM 이하로 결합하는 것인 항체.

청구항 15

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 티카그렐로, 또는 이의 대사 산물 또는 유도체와 K_D 약 250 pM 내지 약 1 pM의 범위로 결합하는 것인 항체.

청구항 16

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 티카그렐로 또는 티카그렐로의 활성 대사 산물과 K_D 약 100 pM 내지 약 1 pM의 범위로 결합하는 것인 항체.

청구항 17

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 페노피브레이트, 닐바디핀, 실로스타졸, 부클라데신, 레가데노손, 사이클로티아지드, 사이플루트린, 로바스타틴, 리네졸리드, 심바스타틴, 칸그렐로, 판토프라졸, 아데노신, 아데노신 디포스페이트, 아데노신 트리포스페이트, 2-MeS 아데노신 디포스페이트 및 2-MeS 아데노신 트리포스페이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물에 대해 IC_{50} 을 약 50 μ M 이하로 나타내는 것인 항체.

청구항 18

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 생체 내 반감기가 약 12 시간인 항체.

청구항 19

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 티카그렐로 또는 티카그렐로의 활성 대사 산물의 항혈소판 효과를 중화하는 것인 항체.

청구항 20

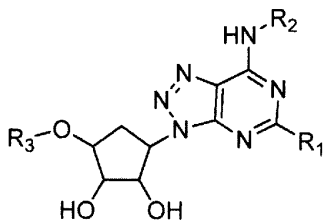
제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 투여된 후 약 30 분 이내에 티카그렐로 또는 티카그렐로의 활성 대사 산물의 항혈소판 효과를 중화하는 것인 항체.

청구항 21

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 티카그렐로 또는 티카그렐로의 활성 대사 산물의 존재 하에 ADP-유도성 혈소판 응집을 복구하는 것인 항체.

청구항 22

화학식 Ia의 사이클로펜틸트리아졸로피리미딘 화합물에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편으로서,
[화학식 Ia]



(상기 식 중,

R_1 은 C_1-C_6 알콕시 및 C_1-C_6 알킬티오로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R_2 는 H, C_1-C_6 알킬, 치환된 C_1-C_6 알킬, C_3-C_6 사이클로알킬 및 치환된 C_3-C_6 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되며;

R_3 은 H, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알콕시 및 C_1-C_6 알칸올로 이루어진 군으로부터 선택됨)

서열 번호 2, 서열 번호 12, 서열 번호 22, 서열 번호 32, 서열 번호 42, 서열 번호 52, 서열 번호 62 및 서열 번호 72로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역(VH) 서열과;

서열 번호 7, 서열 번호 17, 서열 번호 27, 서열 번호 37, 서열 번호 47, 서열 번호 57, 서열 번호 67 및 서열 번호 77로 이루어진 군으로부터 선택되는 경쇄 가변 영역(VL) 서열

을 포함하는 항체 또는 이의 단편.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 항체는 서열 번호 2 및 서열 번호 7; 서열 번호 12 및 서열 번호 17; 서열 번호 22 및 서열 번호 27; 서열 번호 32 및 서열 번호 37; 서열 번호 42 및 서열 번호 47; 서열 번호 52 및 서열 번호 57; 서열 번호 62 및 서열 번호 67; 및 서열 번호 72 및 서열 번호 77로 이루어진 군으로부터 선택되는 VH 및 VL 서열들의 조합을 포함하는 것인 항체.

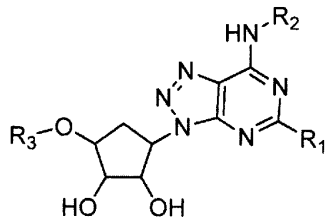
청구항 24

제23항에 있어서, 상기 항체는 서열 번호 52 및 서열 번호 57; 서열 번호 62 및 서열 번호 67; 및 서열 번호 72 및 서열 번호 77로 이루어진 군으로부터 선택되는 VH 및 VL의 조합을 포함하는 것인 항체.

청구항 25

화학식 Ia의 사이클로펜틸트리아졸로피리미딘 화합물에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편으로서,

[화학식 Ia]



(상기 식 중,

R₁은 C₁-C₆ 알콕시 및 C₁-C₆ 알킬티오로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R₂는 H, C₁-C₆ 알킬, 치환된 C₁-C₆ 알킬, C₃-C₆ 사이클로알킬 및 치환된 C₃-C₆ 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되며;

R₃은 H, C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알콕시 및 C₁-C₆ 알칸올로 이루어진 군으로부터 선택됨)

이 항체 또는 이의 단편은 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역의 구조 틀 영역(FR)과 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는데, 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열은

서열 번호 3(CDR1), 서열 번호 4(CDR2) 및 서열 번호 5(CDR3);

서열 번호 13(CDR1), 서열 번호 14(CDR2) 및 서열 번호 15(CDR3);

서열 번호 23(CDR1), 서열 번호 24(CDR2) 및 서열 번호 25(CDR3);

서열 번호 33(CDR1), 서열 번호 34(CDR2) 및 서열 번호 35(CDR3);

서열 번호 43(CDR1), 서열 번호 44(CDR2) 및 서열 번호 45(CDR3);

서열 번호 53(CDR1), 서열 번호 54(CDR2) 및 서열 번호 55(CDR3);

서열 번호 63(CDR1), 서열 번호 64(CDR2) 및 서열 번호 65(CDR3); 또는

서열 번호 73(CDR1), 서열 번호 74(CDR2) 및 서열 번호 75(CDR3)

를 포함하고;

상기 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열들은

서열 번호 8(CDR1), 서열 번호 9(CDR2) 및 서열 번호 10(CDR3);

서열 번호 18(CDR1), 서열 번호 19(CDR2) 및 서열 번호 20(CDR3);

서열 번호 28(CDR1), 서열 번호 29(CDR2) 및 서열 번호 30(CDR3);
 서열 번호 38(CDR1), 서열 번호 39(CDR2) 및 서열 번호 40(CDR3);
 서열 번호 48(CDR1), 서열 번호 49(CDR2) 및 서열 번호 50(CDR3);
 서열 번호 58(CDR1), 서열 번호 59(CDR2) 및 서열 번호 60(CDR3);
 서열 번호 68(CDR1), 서열 번호 69(CDR2) 및 서열 번호 70(CDR3); 또는
 서열 번호 78(CDR1), 서열 번호 79(CDR2) 및 서열 번호 80(CDR3)
 을 포함하는 항체 또는 이의 단편.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 항체는

서열 번호 53(VH CDR1), 서열 번호 54(VH CDR2), 서열 번호 55(VH CDR3), 서열 번호 58(VL CDR1), 서열 번호 59(VL CDR2) 및 서열 번호 60(VL CDR3);

서열 번호 63(VH CDR1), 서열 번호 64(VH CDR2), 서열 번호 65(VH CDR3), 서열 번호 68(VL CDR1), 서열 번호 69(VL CDR2) 및 서열 번호 70(VL CDR3); 및

서열 번호 73(VH CDR1), 서열 번호 74(VH CDR2), 서열 번호 75(VH CDR3), 서열 번호 78(VL CDR1), 서열 번호 79(VL CDR2) 및 서열 번호 80(VL CDR3)

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR 영역들의 조합을 포함하는 것인 항체.

청구항 27

제22항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 인간화된 항체, 인간 항체, 단일 사슬 Fv(scFv), 단일 도메인 항체, Fab, F(ab')₂, 단일 사슬 다이아바디, 항체 모의체 및 항체 가변 도메인으로부터 선택되는 것인 항체.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 항체는 scFv를 포함하는 것인 항체.

청구항 29

제27항에 있어서, 상기 항체는 Fab를 포함하는 것인 항체.

청구항 30

제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 티카그렐로, 또는 이의 대사 산물 또는 유도체에 IC₅₀ 약 100 nM 이하로 결합하는 것인 항체.

청구항 31

제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 티카그렐로, 또는 이의 대사 산물 또는 유도체에 IC₅₀ 약 100 nM 내지 약 1 nM의 범위로 결합하는 것인 항체.

청구항 32

제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 티카그렐로 또는 티카그렐로의 활성 대사 산물에 IC₅₀ 약 100 nM 내지 약 1 nM의 범위로 결합하는 것인 항체.

청구항 33

제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 티카그렐로, 또는 이의 대사 산물 또는 유도체에 K_D 약 50 nM 이하로 결합하는 것인 항체.

청구항 34

제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 티카그렐로, 또는 이의 대사 산물 또는 유도체에 K_D 약 250 pM 내지 약 1 pM의 범위로 결합하는 것인 항체.

청구항 35

제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 티카그렐로 또는 티카그렐로의 활성 대사 산물에 K_D 약 100 pM 내지 약 1 pM의 범위로 결합하는 것인 항체.

청구항 36

제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 페노피브레이트, 닐바디핀, 실로스타졸, 부클라데신, 레가데노손, 사이클로티아지드, 사이플루트린, 로바스타틴, 리네졸리드, 심바스타틴, 칸그렐로, 판토프라졸, 아데노신, 아데노신 디포스페이트, 아데노신 트리포스페이트, 2-MeS 아데노신 디포스페이트 및 2-MeS 아데노신 트리포스페이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물에 대해 IC_{50} 을 약 50 μ M 이하로 나타내는 것인 항체.

청구항 37

제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 생체 내 반감기가 약 12 시간인 항체.

청구항 38

제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 티카그렐로 또는 티카그렐로의 활성 대사 산물의 항혈소판 효과를 중화하는 것인 항체.

청구항 39

제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 투여된 후 약 30 분 이내에 티카그렐로 또는 티카그렐로의 활성 대사 산물의 항혈소판 효과를 중화하는 것인 항체.

청구항 40

제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 티카그렐로 또는 티카그렐로의 활성 대사 산물의 존재 하에 ADP-유도성 혈소판 응집을 복구하는 것인 항체.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항의 항체 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 티카그렐로를 투여받은 환자에서 급성 출혈을 치료하는 방법.

청구항 42

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항의 항체 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 외과 수술을 받았거나 받고 있는 환자이면서, 티카그렐로를 투여받은 환자에서 심각한 출혈을 치료하는 방법.

청구항 43

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항의 항체 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 티카그렐로를 투여받은 환자에서 출혈을 예방하는 방법.

청구항 44

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항의 항체 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 수용체(P2Y₁₂)에 대한 티카그렐로 또는 이의 활성 대사 산물의 효과를 억제하는 방법.

청구항 45

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항의 항체 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 P2Y₁₂ 수용체

와 티카그렐로 또는 이의 활성 대사 산물이 결합하는 것을 억제하는 방법.

청구항 46

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항의 항체 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 티카그렐로를 투여받은 환자에서 ADP-유도성 혈소판 응집을 활성화하는 방법.

청구항 47

제43항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 외과 수술이 예정된 것인 방법.

청구항 48

제22항 내지 제26항 중 어느 한 항의 항체를 암호화하는 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 조성물.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 핵산 분자는 서열 번호 1, 서열 번호 6, 서열 번호 11, 서열 번호 16, 서열 번호 21, 서열 번호 26, 서열 번호 31, 서열 번호 36, 서열 번호 41, 서열 번호 46, 서열 번호 51, 서열 번호 56, 서열 번호 61, 서열 번호 66, 서열 번호 71 또는 서열 번호 76의 서열들을 포함하는 것인 조성물.

청구항 50

서열 번호 1, 서열 번호 6, 서열 번호 11, 서열 번호 16, 서열 번호 21, 서열 번호 26, 서열 번호 31, 서열 번호 36, 서열 번호 41, 서열 번호 46, 서열 번호 51, 서열 번호 56, 서열 번호 61, 서열 번호 66, 서열 번호 71 또는 서열 번호 76의 서열들을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 51

제50항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 52

제1항 내지 제10항 또는 제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 티카그렐로의 사이클로펜틸 고리 상에 하이드록시에틸기를 포함하는 에피토프와 결합하지 않는 것인 항체.

청구항 53

제1항 내지 제10항 또는 제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 티카그렐로의 사이클로프로필-디플루오로페닐기를 포함하는 에피토프와 결합하는 것인 항체.

청구항 54

제1항 내지 제10항 또는 제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 티카그렐로의 사이클로프로필-디플루오로페닐기를 포함하는 에피토프와 결합하지만, 티카그렐로의 사이클로펜틸 고리 상에 하이드록시에틸기를 포함하는 에피토프와는 결합하지 않는 것인 항체.

발명의 설명

배경 기술

- [0001] 전자 제출된 서열 목록에 대한 참조
- [0002] 본 출원은 컴퓨터 가독성 형태(CRF)로 본 출원과 함께 텍스트 파일명 "Ticagrelor_SeqList_ST25.TXT"(2014년 10월 1일 생성, 크기 33,900 바이트)로서 제출된 서열 목록을 참조로 포함하고 있다.
- [0003] 배경
- [0004] 티카그렐로(Ticagrelor)(BRILINTA™, BRILIQUE™)는 선택적 및 가역적 결합 아데노신 디포스페이트(ADP) 수용체 길항제인 경구 활성 사이클로펜틸트리아졸로피리미딘이다. 급성 관상동맥증후군(ACS) 환자에 있어서, 주 심혈관(CV) 발작을 감소시키기 위해 저 용량 아스피린과 함께 매일 2 회 티카그렐로 90 mg을 투여하는 것이 승인되어

있다. 티카그렐로는 항 혈소판 효과(P2Y₁₂) 및 항진 아데노신 반응(ENT-1) 둘 다를 매개하는 이중 경로를 통해 작용한다(Cattaneo M et al 2014. J Am Coll Cardiol. 63(23):2503-9). 승인된 결과는 아직 없지만, 진행 중인 연구 및 계획된 연구는, 이전 심근경색, 확립된 말초 동맥 질병, 그리고 급성 뇌졸중 환자뿐만 아니라 당뇨병 환자 그리고 만성 관상죽상경화증 환자에 있어서 이 티카그렐로가 주 CV 발작을 감소시키는데에 대해 평가한다.

[0005] 티카그렐로는 주요 대사 산물 2 개, 즉 티카그렐로 활성 대사 산물(TAM) 및 티카그렐로 비활성 대사 산물(TIM)을 가진다(Teng et al 2010 Drug Metab. and Dispos. 38:1514-1521). AR-C124910XX라고도 공지되어 있는 TAM은 티카그렐로의 주요 혈중 대사 산물로서, P2Y₁₂ 길항제 활성에 있어서 균등하게 효과적이다. TAM은 통상적으로 BRILINTA/BRILIQUE 투여 환자 내에서 모 티카그렐로 농도의 약 30% 내지 40%를 차지한다. 티카그렐로와 TAM은 혈중 반감기(circulating half-life)가 각각 8 시간 및 12 시간이다. AR-C133913XX라고도 공지되어 있는 TIM은 P2Y₁₂에 대해 비활성으로서, 모 티카그렐로의 10% 미만을 이루는데, 이는 투여된 지 8 시간 경과 후에는 검출이 불가능하고, 소변을 통해 배출되는 주요 대사 산물이다.

[0006] PLATO(PLATElet inhibition and patient Outcomes) 시험은, (의학적 또는 외과적으로 관리되는) 관리 전략과는 상관없이, 클로피도그렐과 비교하였을 때 티카그렐로는 광범위한 ACS 환자 집단(UA, NSTEMI, STEMI)에서의 대출혈 총량을 증가시키지 않고 더 큰 효능이 있음을 입증한바 있다(Wallentin et al 2009 NEJM 361(11): 1045-1057). 그러나 모든 항 혈소판 제제를 사용할 때와 같이, 티카그렐로를 사용할 때 환자에서 출혈이 일어날 잠재성은 존재한다. 만일 이중 항 혈소판 요법(dual antiPlatelet therapy; DAPT)이 실행되는 환자에 있어서 심각한 출혈이 일어나면 치료에 대한 선택권은 제한된다. 만일 DAPT 중인 환자에 있어서 출혈 현상이 일어나면, 지혈을 촉진하기 위한 시도에 응고 인자의 투여 또는 혈소판 수혈이 사용될 수 있다. 그러나, 티카그렐로 투여 대상체에 있어서 대출혈 현상이 일어난 후 또는 일어나는 도중에 실행된 혈소판 수혈 또는 재조합 인자 VIIa 사용의 지혈 이익을 평가하는 임상 데이터는 현재 존재하지 않는다(Dalén M et al 2013 J Cardiothorac Vasc Anesth. 27(5):e55-7).

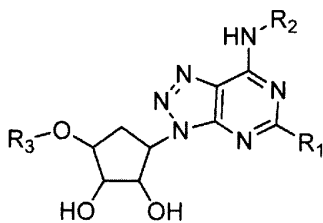
[0007] 따라서, 해독제, 예를 들어 티카그렐로 특이 중화 항체의 이용 가능성은 원하는 항 트롬빈 효과 대 출혈 억제 사이 균형을 임상적으로 더 잘 관리할 수 있도록 허용할 것이다. 티카그렐로는 유일하게 시판되고 있는 가역적 결합 혈소판 억제제로서, 이의 항체는 신선한 혈소판의 수혈의 필요없이도 혈소판 억제의 역전을 제공할 수 있으므로, 혈소판 수혈과 연관된 위험들을 피할 수 있다. 티카그렐로 및 TAM과 연관된 ADP-유도성 혈소판 응집의 억제를 극복하는 제제의 이용 가능성은 충족되지 못했던 중요 임상학적 요구, 예를 들어 대출혈을 겪은 환자 또는 응급 수술이 필요한 환자에 있어서 충족되지 못했던 중요 임상학적 요구를 충족시킬 것이다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0008] 하나의 양태에서, 본 개시내용은 화학식 Ia의 사이클로펜틸트리아졸로피리미딘 화합물에 특이적으로 결합하는 항체에 관한 것으로서,

[0009] [화학식 Ia]



[0010]

[0011] 상기 식 중,

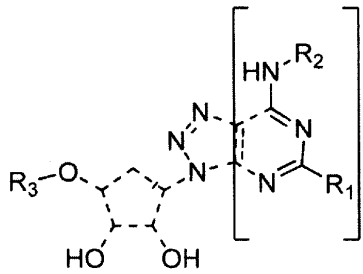
[0012] R₁은 C₁-C₆ 알콕시 및 C₁-C₆ 알킬티오로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0013] R₂는 H, C₁-C₆ 알킬, 치환된 C₁-C₆ 알킬, C₃-C₆ 사이클로알킬 및 치환된 C₃-C₆ 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0014] R₃은 H, C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알콕시 및 C₁-C₆ 알칸올로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0015] 몇몇 구현예에서, 항체는 화학식 IIa에서 괄호로 지정된, 화합물의 부분 내 에피토프와 결합하는데,

[0016] [화학식 IIa]

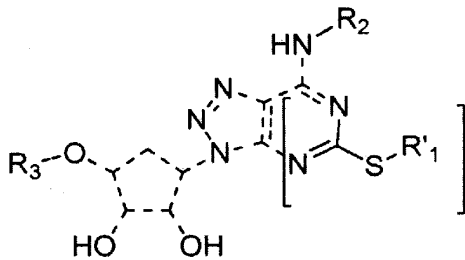


[0017]

[0018] 상기 식 중, R₁, R₂ 및 R₃은 상기 정의된 바와 같다.

[0019] 추가의 구현예에서, 항체는 하기 화학식 IIIa에서 괄호로 지정된, 화합물의 부분 내 에피토프와 결합하는데,

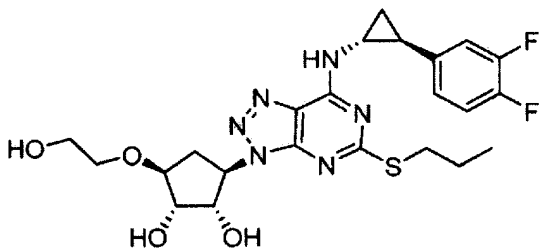
[0020] [화학식 IIIa]



[0021]

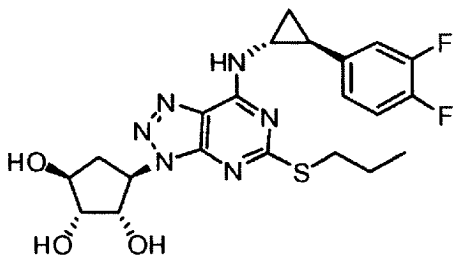
[0022] 상기 식 중, R₂ 및 R₃은 상기 정의된 바와 같고, R'₁은 C₁-C₄ 알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0023] 추가의 구현예에서, 항체는



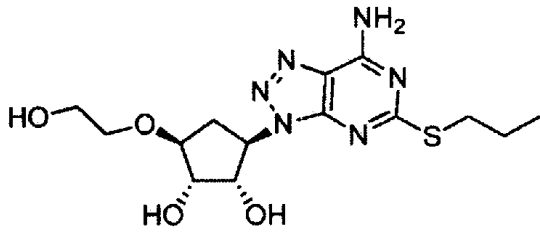
[0024]

티카그렐로;



[0025]

티카그렐로 활성 대사 산물(TAM); 및



티카그렐로 비활성 대사 산물(TIM)

- [0026] 로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물과 결합한다.
- [0027] 상기 양태들과 구현예들의 추가 구현예들에서, 항체 또는 이의 단편은 서열 번호 2, 서열 번호 12, 서열 번호 22, 서열 번호 32, 서열 번호 42, 서열 번호 52, 서열 번호 62 및 서열 번호 72로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역(VH) 서열과; 서열 번호 7, 서열 번호 17, 서열 번호 27, 서열 번호 37, 서열 번호 47, 서열 번호 57, 서열 번호 67 및 서열 번호 77로 이루어진 군으로부터 선택되는 경쇄 가변 영역(VL) 서열을 포함한다. 몇몇 구현예들에서, 항체는 서열 번호 2 및 서열 번호 7; 서열 번호 12 및 서열 번호 17; 서열 번호 22 및 서열 번호 27; 서열 번호 32 및 서열 번호 37; 서열 번호 42 및 서열 번호 47; 서열 번호 52 및 서열 번호 57; 서열 번호 62 및 서열 번호 67; 및 서열 번호 72 및 서열 번호 77로 이루어진 군으로부터 선택되는 VH 및 VL 서열들의 조합을 포함한다. 추가의 구현예들에서, 항체는 서열 번호 52 및 서열 번호 57; 서열 번호 62 및 서열 번호 67; 및 서열 번호 72 및 서열 번호 77로 이루어진 군으로부터 선택되는 VH 및 VL의 조합을 포함한다.
- [0029] 상기 양태들과 구현예들의 추가의 구현예들에서, 항체 또는 이의 단편은 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역의 구조 틀 영역/framework region; FR)과 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는데, 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열은 서열 번호 3(CDR1), 서열 번호 4(CDR2) 및 서열 번호 5(CDR3); 서열 번호 13(CDR1), 서열 번호 14(CDR2) 및 서열 번호 15(CDR3); 서열 번호 23(CDR1), 서열 번호 24(CDR2) 및 서열 번호 25(CDR3); 서열 번호 33(CDR1), 서열 번호 34(CDR2) 및 서열 번호 35(CDR3); 서열 번호 43(CDR1), 서열 번호 44(CDR2) 및 서열 번호 45(CDR3); 서열 번호 53(CDR1), 서열 번호 54(CDR2) 및 서열 번호 55(CDR3); 서열 번호 63(CDR1), 서열 번호 64(CDR2) 및 서열 번호 65(CDR3); 또는 서열 번호 73(CDR1), 서열 번호 74(CDR2) 및 서열 번호 75(CDR3)를 포함하고; 상기 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열들은 서열 번호 8(CDR1), 서열 번호 9(CDR2) 및 서열 번호 10(CDR3); 서열 번호 18(CDR1), 서열 번호 19(CDR2) 및 서열 번호 20(CDR3); 서열 번호 28(CDR1), 서열 번호 29(CDR2) 및 서열 번호 30(CDR3); 서열 번호 38(CDR1), 서열 번호 39(CDR2) 및 서열 번호 40(CDR3); 서열 번호 48(CDR1), 서열 번호 49(CDR2) 및 서열 번호 50(CDR3); 서열 번호 58(CDR1), 서열 번호 59(CDR2) 및 서열 번호 60(CDR3); 서열 번호 68(CDR1), 서열 번호 69(CDR2) 및 서열 번호 70(CDR3); 또는 서열 번호 78(CDR1), 서열 번호 79(CDR2) 및 서열 번호 80(CDR3)을 포함한다. 추가의 구현예들에서, 항체는 서열 번호 53(VH CDR1), 서열 번호 54(VH CDR2), 서열 번호 55(VH CDR3), 서열 번호 58(VL CDR1), 서열 번호 59(VL CDR2) 및 서열 번호 60(VL CDR3); 서열 번호 63(VH CDR1), 서열 번호 64(VH CDR2), 서열 번호 65(VH CDR3), 서열 번호 68(VL CDR1), 서열 번호 69(VL CDR2) 및 서열 번호 70(VL CDR3); 및 서열 번호 73(VH CDR1), 서열 번호 74(VH CDR2), 서열 번호 75(VH CDR3), 서열 번호 78(VL CDR1), 서열 번호 79(VL CDR2) 및 서열 번호 80(VL CDR3)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR 영역들의 조합을 포함한다.
- [0030] 상기 양태들과 구현예들에서, 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 인간화된 항체, 인간 항체, 단일 사슬 Fv(scFv), 단일 도메인 항체, Fab, F(ab')₂, 단일 사슬 다이아바디(diabody), 항체 모의체 및 항체 가변 도메인 으로부터 선택된다. 몇몇 구현예들에서, 항체는 scFv를 포함한다. 몇몇 구현예들에서, 항체는 Fab를 포함한다.
- [0031] 몇몇 구현예들에서, 상기 기술된 항체는 티카그렐로 또는 티카그렐로 활성 대사 산물(TAM)과 결합한다.
- [0032] 추가의 구현예들에서, 항체는 티카그렐로 또는 이의 대사 산물 또는 유도체에 IC₅₀ 약 200 nM 이하로 결합한다. 또 다른 구현예들에서, 항체는 티카그렐로 또는 이의 대사 산물 또는 유도체에 IC₅₀ 약 100 nM 내지 약 1 nM로 결합하거나, 또는 IC₅₀ 약 10 nM 내지 약 1 nM로 결합한다.
- [0033] 추가의 구현예들에서, 항체는 티카그렐로 또는 이의 대사 산물 또는 유도체에 K_D 약 50 nM 이하로 결합한다. 또 다른 구현예들에서, 항체는 티카그렐로 또는 이의 대사 산물 또는 유도체에 K_D 약 250 pM 내지 약 1 pM의 범위, 또는 K_D 약 100 pM 내지 약 1 pM의 범위로 결합한다.

- [0034] 추가의 구현예들에서, 항체는 티카그렐로 또는 이의 대사 산물 또는 유도체에 결합하고, 페노피브레이트, 닐바디핀, 실로스타졸, 부클라데신, 레가데노손, 사이클로티아지드, 사이플루트린, 로바스타틴, 리네졸리드, 심바스타틴, 칸그렐로, 판토프라졸, 아데노신, 아데노신 디포스페이트, 아데노신 트리포스페이트, 2-MeS 아데노신 디포스페이트 및 2-MeS 아데노신 트리포스페이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물과 결합하지 않는다. 구현예들에서, 항체는 페노피브레이트, 닐바디핀, 실로스타졸, 부클라데신, 레가데노손, 사이클로티아지드, 사이플루트린, 로바스타틴, 리네졸리드, 심바스타틴, 칸그렐로, 판토프라졸, 아데노신, 아데노신 디포스페이트, 아데노신 트리포스페이트, 2-MeS 아데노신 디포스페이트 및 2-MeS 아데노신 트리포스페이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물의 활성을 억제하지 않는다. 추가의 구현예들에서, 항체는 페노피브레이트, 닐바디핀, 실로스타졸, 부클라데신, 레가데노손, 사이클로티아지드, 사이플루트린, 로바스타틴, 리네졸리드, 심바스타틴, 칸그렐로, 판토프라졸, 아데노신, 아데노신 디포스페이트, 아데노신 트리포스페이트, 2-MeS 아데노신 디포스페이트 및 2-MeS 아데노신 트리포스페이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물에 대해 IC₅₀을 적어도 약 1000 μM 나타낸다.
- [0035] 몇몇 구현예들에서, 항체의 생체 내 반감기는 약 4 시간 내지 12 시간이다. 특정 구현예들에서, 항체의 생체 내 반감기는 약 12 시간이다.
- [0036] 몇몇 구현예들에서, 항체는 티카그렐로 또는 티카그렐로의 활성 대사 산물의 항 혈소판 효과를 증화한다. 추가의 구현예에서, 항체는 투여된 지 약 60 분 이내에 티카그렐로 또는 티카그렐로의 활성 대사 산물의 항 혈소판 효과를 증화한다.
- [0037] 몇몇 구현예들에서, 항체는 티카그렐로를 포함하는 치료법 개시의 지속을 허용하는, 티카그렐로 또는 티카그렐로 활성 대사 산물에 대한 오프-레이트(off-rate)를 가진다.
- [0038] 다른 양태들에서, 본 개시내용은 급성 출혈의 치료를 필요로 하는 환자에 있어서 이와 같은 출혈을 치료하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 본원에 개시된 항체 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 본 방법의 몇몇 구현예들에서, 환자는 외과 수술을 받았거나 받고 있는 환자이자, 티카그렐로를 투여받은 환자이다. 본 방법의 몇몇 구현예들에서, 환자는 응급 처치 및/또는 응급 외상 관리를 필요로 하는 환자이다.
- [0039] 본 개시내용의 다른 양태들은, 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께, 상기 양태들 및 구현예들 중 임의의 것의 항체를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0040] 몇몇 추가 양태들은 상기 청구항들 중 임의의 것에 따른 항체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 제공한다. 몇몇 구현예들에서, 핵산 분자는 서열 번호 1, 서열 번호 6, 서열 번호 11, 서열 번호 16, 서열 번호 21, 서열 번호 26, 서열 번호 31, 서열 번호 36, 서열 번호 41, 서열 번호 46, 서열 번호 51, 서열 번호 56, 서열 번호 61, 서열 번호 66, 서열 번호 71 및 서열 번호 76의 서열들을 포함한다.
- [0041] 본 개시내용의 추가의 양태들은 본원에 개시된 핵산 분자 적어도 1 개를 포함할 수 있는 조성물, 벡터 및 숙주 세포를 제공한다. 몇몇 구현예들에서, 조성물, 벡터 및 숙주 세포는 본원에 개시된 단백질들 중 1 개 이상을 암호화하는 제1 핵산 분자와 제2 핵산 분자를 포함한다.
- [0042] 이하 발명의 설명과 예시적 서술이 검토될 때 기타 다른 양태들은 당업자에게 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0043] 본 개시내용은 예시하기 위한 목적으로 본 개시내용의 특정 양태들이 도면에 도시되어 있다. 그러나, 본 개시내용은 도면들에 도시된 양태들의 정확한 정렬과 방편에 제한되지 않는다.

도 1은, 제III기 PLATO 데이터를 기반으로 한 티카그렐로 중화 Fab의 PK/PD 모델링을 도시한다. 티카그렐로가 유도 용량 180 mg으로 투여된 후 매일 2 회 90 mg 투여되고 나서, 중화 Fab가 0 시(time zero)에 추가된다. 환자는 제1 일에 티카그렐로 투여를 재개한다. Fab는 티카그렐로 및 TAM을 신속하게 중화하여 환자들 중 99%에서 혈소판 응집이 복구될 것으로 예측된다. 제0 일과 제1 일 사이의 "언덕(hill)"은 티카그렐로가 더 천천히 소모된 환자들 중 1%의 기타 다른 조직으로부터 티카그렐로가 재분배됨을 나타낸다.

도 2a 내지 2c는, 합텐 및 Fab 특이성을 도시한다. 도 2a는 티카그렐로, 티카그렐로 활성 대사 산물(TAM), 티카그렐로 비활성 대사 산물(TIM) 및 아데노신의 화학 구조를 제공한다. 독특한 R 기, 즉 디플루오로페닐-사이클로프로필 및 티오프로필 치환기는 점선으로 강조 표시되어 있다. 도 2b: TICA0072에 대한 특이성 프로필. 도 2c: TICA0212(MEDI 2452)에 대한 특이성 프로필. 특이성 프로필은 티카그렐로, TAM, TIM, 아데노신, ADP, ATP, 그

리고 도 4의 관련 화합물 12 개 중 3 개를 포함한다(명확히 말하자면, 0.1 mM 이하의 농도에서 12 개의 화합물 중 어느 것에 대한 결합도 검출되지 않음). 데이터는 3 회의 반복 실험에 대한 평균 및 SEM이다.

도 3은, 바이오틴화 링커 티카그렐로에 대한 scFv의 결합(x-축)과, 비 변형 티카그렐로가 50 배 과량으로 존재할 때 바이오틴화 링커 티카그렐로에 대한 scFv의 결합(y-축)의 상관관계를 설명한다. 과량의 비 변형 티카그렐로의 존재 시 scFv 결합의 억제율은 0%, 50%, 80% 및 90% 억제에 대한 선들에 의해 나타난다.

도 4는, 티카그렐로에 대한 2D, 3D 또는 정전기적 유사성을 어느 정도 가지는 것으로 확인된 화합물들을 나타낸다.

도 5는, TICA0049 및 TICA0072 Fab에 대한 선택성 연구 결과를 제공한다. a 내지 c는 TICA0049 Fab와 바이오틴화 티카그렐로 결합의, 나열된 화합물들에 의한 경쟁을 나타낸다. d 내지 f는 TICA0072 Fab와 바이오틴화 티카그렐로 결합의, 나열된 화합물들에 의한 경쟁을 나타낸다. 데이터는 DMSO 정규화되었다.

도 6은, 제2 세대 에피토프 경쟁 검정에 있어서, 모 TICA0072 및 최적화된 변이체 TICA0152, TICA0162 및 TICA0212 Fab에 대한 경쟁 곡선을 제공한다.

도 7은, TICA0162 및 TICA0212 Fab에 대한 선택성 연구 결과를 나타낸다. a 내지 c는 TICA0162 Fab와 바이오틴화 티카그렐로 결합의, 나열된 화합물들에 의한 경쟁을 나타낸다. d 내지 f는 TICA0212 Fab와 바이오틴화 티카그렐로 결합의, 나열된 화합물들에 의한 경쟁을 나타낸다. 데이터는 DMSO 정규화되었다.

도 8a 내지 8c는, 티카그렐로의 TICA0212/MEDI2452 또는 TICA0072 농도 의존성 역전의 결과들을 나타낸다. 도 8a: 20 μM ADP-유도성 응집의 TICA0212/MEDI2452 1 μM 티카그렐로 매개 억제(▲) 또는 1 μM TAM 매개 억제(●). 도 8b: TICA0212/MEDI2452는 1 μM 티카그렐로 존재시 혈장 중 유리 티카그렐로 농도의 감소를 나타낸다. 평균(n=5) ± 평균의 표준 오차. 도 8c: 티카그렐로의 TICA0072 역전 및 P2Y₁₂ 신호전달의 TAM 억제.

도 9는, 티카그렐로 처리 마우스에 TICA0212 250 mg/kg가 투여된 후, 이 TICA0212에 의해 매개되는 생체 외 ADP-유도성 전혈 응집의 역전 결과들을 나타낸다.

도 10은, 티카그렐로와의 복합체 중 TICA0072의 결정 구조(A) 및 TICA0212/MEDI2452의 결정 구조(B)의 부분도를 나타낸다. Fab는 막대기로서 나타낸 티카그렐로로부터 7 Å 이내에 있는 아미노산 잔기들과 함께 리본 표시로 나타내어져 있다. 몇몇 주요 사슬 원자들은 명료함을 위해 생략되었다. 경쇄들은 베이지색으로, 그리고 중쇄들은 밝은 청색으로 나타내어져 있다. 두 사슬로부터 유래하는 CDR3들은 녹색으로 채색되어 있다. V_H CDR3은 TICA0072 구조 내에서 모델링될 수 없었으며, 임시 자리는 점선으로 표시되어 있다. 오렌지색 화살표는, TICA0072에서 관찰되는 V_L CDR3에서의 이동과 비교되었을 때의 TICA0212/MEDI 2452에서 관찰되는 V_L CDR3에서의 이동을 표시한다. kabat에 따라서 잔기들에 번호가 매겨졌으며, 접두사 L 또는 H는 각각 경쇄 또는 중쇄를 표시한다.

도 11은 생체 외 ADP-유도성 전혈 응집의 역전을 나타낸다. (A): 티카그렐로 주입이 중지된 후 각각의 처리군에 대한 개별 데이터. 비이클 대조군(■). 티카그렐로 단독(●), 티카그렐로 + TICA0212/MEDI 2452(○), 그리고 티카그렐로 + 동종 대조군(△). 막대는 평균 데이터(n = 4)를 나타낸다. AU는 응집 유닛을 나타낸다. 15 분 경과 시에는 티카그렐로 + TICA0212/MEDI 2452 군에 대한 데이터만을 수집하였다. (B): TICA0212/MEDI 2452에 의해 유도된 역전 %, 평균 데이터(n = 4) ± SEM.

도 12는 티카그렐로 유도 출혈의 역전을 나타낸다. (A): 총 실험에 대한 개별 데이터. (B): 총 출혈 시간 동안의 개별 데이터. 비이클 대조군(■). 티카그렐로 단독(●) 및 티카그렐로 + TICA0212/MEDI 2452(○). 막대는 평균 데이터(n = 12)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 본 개시내용이 계속 더 상세히 기술되기에 앞서서, 본 개시내용은 특정 조성물 또는 방법의 과정에 제한되지 않고 다양할 수 있음이 이해되어야 한다. 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이 단수 형태("a", "an" 및 "the")는 달리 명확하게 규정되지 않는 한 복수의 지시대상을 포함함이 주목되어야 한다.

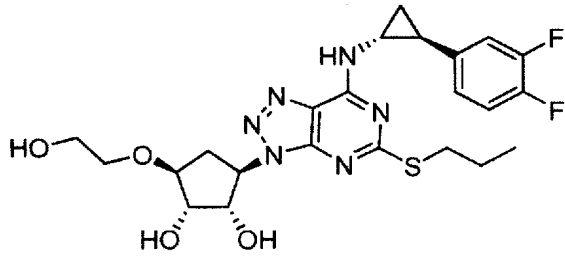
[0045] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 관련된 업계의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미와 동일한 의미를 가진다. 예를 들어 문헌[the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei>Show, 2nd ed., 2002, CRC Press]; [The Dictionary of Cell and Molecular

Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press]; 및 [the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press]은 본 발명에 사용된 다수의 용어들에 관한 일반적인 사전을 당업자에게 제공한다.

- [0046] 아미노산은 본원에서 IUPAC-IUB 생화학 명명 위원회(Biochemical Nomenclature Commission)가 권고하는 바와 같이, 통상적으로 공지된 자체의 3 문자 부호 또는 1 문자 부호에 의해 지칭될 수 있다. 이와 유사하게 뉴클레오타이드도 통상적으로 승인된 자체의 단일 문자 암호에 의해 지칭될 수 있다.
- [0047] 항체의 가변 도메인, 상보성 결정 영역(CDR) 및 구조 틀 영역(FR) 내 아미노산들의 번호 매김은, 달리 지정되지 않는 한, 문헌[Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]에 제시된 바와 같은 Kabat 정의를 따른다. 이러한 번호 매김 체계를 사용할 때, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR 중 단축 부 또는 삽입 부에 상응하는, 결실된 수만큼의 아미노산 또는 부가된 수만큼의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어 중쇄 가변 도메인은 H2의 52번 잔기 뒤에 단일 아미노산 삽입 부(Kabat에 따르면 52a번 잔기)와, 중쇄 FR의 82번 잔기 뒤에 삽입 잔기들(예를 들어, Kabat에 따르면 82a, 82b 및 82c번 잔기들 등)을 포함할 수 있다. 잔기들의 Kabat 번호 매김은 주어진 항체에 대해서 항체 서열 중 상동성 영역에서 이루어지는 "표준" Kabat 번호 매김 서열과의 정렬에 의하여 결정될 수 있다. 구조 틀 잔기들의 최대 정렬은 종종 번호 매김 체계에 Fv 영역에 대해 사용될 "스페이스(spacer)" 잔기들의 삽입을 필요로 하기도 한다. 뿐만 아니라, 임의의 주어진 Kabat 위치 번호에 있는 특정 개별 잔기들의 동일성은 중간 차이 또는 대립 형질별 차이로 말미암아 항체 사슬 대 항체 사슬로 다양할 수 있다.
- [0048] 본원에 사용된 바와 같이, 면역 글로불린이라고도 공지된 용어 "항체" 및 "항체들"은 모노클로날 항체(전장 모노클로날 항체 포함), 폴리클로날 항체, 적어도 2 개의 상이한 에피토프 결합 단편으로부터 형성된 다중 특이적 항체(예를 들어, 본원에 전체로서 참조로 포함되어 있는 PCT 공개 WO 2009018386, PCT 출원 PCT/US2012/045229 에 개시된 바와 같은 다중 특이적 항체), biMab, 인간 항체, 인간화된 항체, 낙타화 항체(camelised antibody), 단일 사슬 Fv(scFv), 단일 사슬 항체, 단일 도메인 항체, 도메인 항체, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, 원하는 생체 활성을 나타내는 항체 단편(예를 들어, 항원 결합부), 이항화 결합 Fv(dsFv), 그리고 항 유전자형(항-Id) 항체(예를 들어, 본 발명의 항체에 대한 항-Id 항체 포함), 인트라바디, 그리고 이것들 중 임의의 것의 에피토프 결합 단편을 포함한다. 본원에 제공된 특정 구현예들에서, 항체들은 항체의 활성 결합 단편들, 즉 항원 결합 위치 적어도 1 개를 함유하는 분자, 예를 들어 scFv 및 Fab에 관한 것이다. 항체는 또한 항체 또는 이의 일부와의 퀵트드 융합체, 예를 들어 Fc 도메인에 융합된 단백질을 포함한다. 면역 글로불린 분자는 임의의 동종의 것(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 하위 동종의 것(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 동종이인자형의 것(예를 들어, Gm, 예를 들어 G1m(f, z, a 또는 x), G2m(n), G3m(g, b 또는 c), Am, Em 및 Km(1, 2 또는 3))일 수 있다. 항체들은, 인간, 원숭이, 돼지, 말, 토끼, 개, 고양이, 마우스 등, 또는 기타 다른 동물, 예를 들어 조류(예를 들어, 닭)(이에 한정되는 것은 아님)를 포함하여 임의의 포유동물로부터 유도될 수 있다.
- [0049] 본원에 사용된 바와 같이, C₁-C₆ 알킬이란, 탄소 원자를 1 개 내지 6 개 가지는 직쇄 및 분지형 알킬을 지칭하고, 메틸, 에틸, 프로필, n-부틸, 이소-부틸, 펜틸, 이소펜틸, 네오펀틸 및 헥실을 포함한다.
- [0050] 본원에 사용된 바와 같이, C₁-C₆ 알콕시란, 상기 언급된 바와 같이 기 내에 산소를 가지는 알킬을 지칭한다. 몇몇 구현예들에서, 산소 원자는 치환기가 중심 구조(즉, 고리 구조)에 부착되는 위치에 위치하고 있다.
- [0051] 본원에 사용된 바와 같이, C₁-C₆ 알킬티오란, 상기 언급된 바와 같이 기 내에 황을 가지는 알킬을 지칭한다. 몇몇 구현예들에서, 황 원자는 치환기가 중심 구조(즉, 고리 구조)에 부착되는 위치에 위치하고 있다.
- [0052] 본원에 사용된 바와 같이, C₁-C₆ 알칸올이란, 상기 언급된 바와 같이 치환기 구조의 말단부에 하이드록실기를 가지는 알킬을 지칭한다.
- [0053] 본원에 사용된 바와 같이, C₃-C₆ 사이클로알킬이란, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸 및 사이클로헥실을 지칭한다.
- [0054] 본원에 사용된 바와 같이, "치환된" C₃-C₆ 사이클로알킬 및 C₁-C₆ 알킬이란, 적어도 1 개의 탄소 원자 상에서 1 개 내지 3 개의 할로젠 원자라도 치환되는 아릴기로 치환되는, 상기 논의된 알킬기 및 사이클로알킬기를 지칭한다.

다.

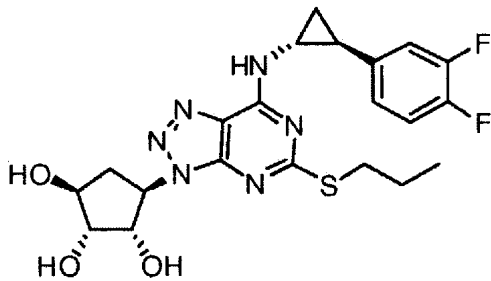
[0055] 본원에 사용된 바와 같이, "티카그렐로"란, 하기 화학 구조



[0056]

[0057] 를 가지는 가역성 P2Y₁₂ 억제제인 ((1S,2S,3R,5S)-3-[7-{{(1R,2S)-2-(3,4-디플루오로페닐)사이클로프로필}아미노}-5-(프로필티오)-3H-[1,2,3]트리아졸로[4,5-d]피리미딘-3-일]-5-(2-하이드록시에톡시)사이클로펜탄-1,2-디올)을 지칭한다.

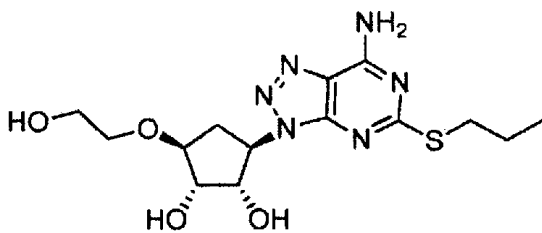
[0058] 본원에 사용된 바와 같이, "티카그렐로 활성 대사 산물" 또는 "TAM"이란, 화학 구조



[0059]

[0060] 를 가지는 티카그렐로의 주요 활성 대사 산물(AR-C124910XX, 가역성 P2Y₁₂ 억제제라고도 지칭됨)을 지칭한다.

[0061] 본원에 사용된 바와 같이, "티카그렐로 비활성 대사 산물" 또는 "TIM"이란, 화학 구조



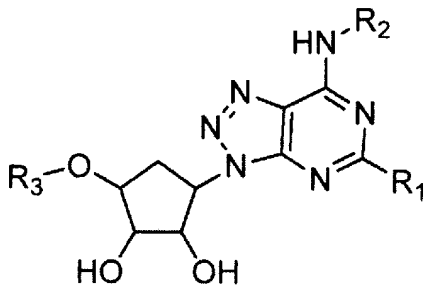
[0062]

[0063] 를 가지는 티카그렐로의 비활성 대사 산물(AR-C133913XX라고도 지칭됨)을 지칭한다.

[0064] **항체**

[0065] 일반적인 의미에서 본 개시내용은, 화학식 Ia의 사이클로펜틸트리아졸로피리미딘 화합물에 결합하는 신규의 항체를 제공하는데,

[0066] [화학식 Ia]



[0067]

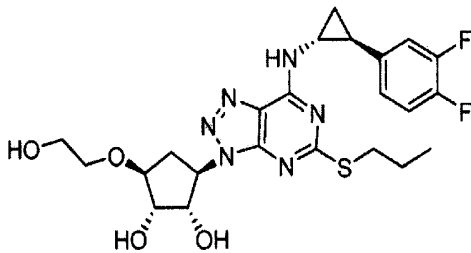
[0068] 상기 식 중,

[0069] R₁은 C₁-C₆ 알콕시 및 C₁-C₆ 알킬티오로 이루어진 군으로부터 선택되고;

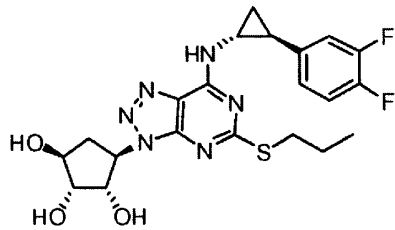
[0070] R₂는 H, C₁-C₆ 알킬, 치환된 C₁-C₆ 알킬, C₃-C₆ 사이클로알킬 및 치환된 C₃-C₆ 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0071] R₃은 H, C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알콕시 및 C₁-C₆ 알칸올로 이루어진 군으로부터 선택된다.

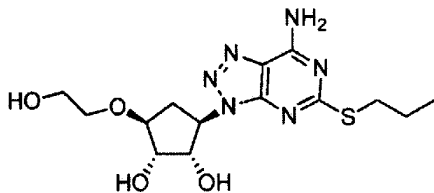
[0072] 특정 구현예들에서, 항체는



[0073] 티카그렐로;



[0074] 티카그렐로 활성 대사 산물(TAM); 및



[0075] 티카그렐로 비활성 대사 산물(TIM)

[0076] 로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물에 특이적으로 결합한다.

[0077] 특정 양태에서, 본 개시내용은, (예를 들어, 티카그렐로를 포함하는 치료법의 공동 적용 또는 선택적 연속 적용을 허용하는) 큰 결합 특이성, 큰 결합 친화성, 빠른 개시 시간, 그리고 빠른 상쇄 시간을 포함하는 특징들 중 임의의 것 1 개 이상을 가지고, 티카그렐로 및 TAM과 결합하는 항체를 제공한다.

[0078] 몇몇 구현예들에서, 항체는 티카그렐로와 결합하고, 티카그렐로 및 TAM의 항 혈소판 응집 활성을 중화하므로, 티카그렐로 및 TAM 존재시에 ADP-유도성 혈소판 응집을 복구한다.

[0079] 몇몇 구현예들에서, 피험체 내 항체 반감기는 티카그렐로 및 TAM의 반감기와 거의 동일하다. 몇몇

구현예들에서, 항체 반감기는 약 4 시간 내지 약 24 시간(예를 들어, 4 시간, 5 시간, 6 시간, 7 시간, 8 시간, 9 시간, 10 시간, 11 시간, 12 시간, 13 시간, 14 시간, 15 시간, 16 시간, 17 시간, 18 시간, 19 시간, 20 시간, 21 시간, 22 시간, 23 시간 또는 24 시간)이다. 몇몇 구현예들에서, 항체 반감기는 약 4 시간 내지 약 12 시간(예를 들어, 4 시간, 5 시간, 6 시간, 7 시간, 8 시간, 9 시간, 10 시간, 11 시간 또는 12 시간)이다.

[0080] 몇몇 구현예들에서, 항체는 활성의 빠른 개시를 제공한다. 예를 들어 구현예들에서, 티카그렐로 및 TAM 매개 혈소판 억제를 중화하는 시간 또는 항체 개시 시간은 약 15 분 내지 약 120 분, 또는 약 15 분 내지 약 60 분이다. 몇몇 구현예들에서, 개시 시간은 60 분 미만이다.

[0081] 몇몇 구현예들에서, 항체는, 활성의 빠른 상쇄를 제공하여, 예를 들어 해당 항체를 투여받은 피험체가 처방된 티카그렐로 치료법을 재개할 수 있게 되는 항체의 PK/PD 프로필을 가진다. 몇몇 구현예들에서, 본원에 개시된 항체를 (예를 들어, 정맥 내 주입에 의해) 투여받은 피험체는 항체 투여 후 24 시간 이내에 티카그렐로를 투여받을 수 있거나 티카그렐로 치료법을 재개할 수 있다.

[0082] 본원의 특정 구현예들에서 논의되었고 예시된 바와 같이, 항체는 티카그렐로 또는 이의 대사 산물에 결합하며, 기타 다른 구조상 관련된 화합물이나, 공동 치료법으로서 티카그렐로와 함께 투여될 수 있는 화합물에는 결합하지 않는다. 예를 들어, 적합하게 항체는 페노피브레이트, 닐마디핀, 실로스타졸, 부클라데신, 레가데노손, 사이클로티아지드, 사이플루트린, 로바스타틴, 리네졸리드, 심바스타틴, 칸그렐로, 판토프라졸, 아데노신, 아데노신 디포스페이트, 아데노신 트리포스페이트, 2-MeS 아데노신 디포스페이트 및 2-MeS 아데노신 트리포스페이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물의 활성을 억제하지 않는다.

[0083] 본원에 기술된 항체는 오로지 항체 분자의 선택 부분들만을 함유하는 항원 결합 단편, 예를 들어 Fab, F(ab')₂, Fab', scFv, 디-scFv, sdAb 단편을 포함할 수 있고, 진단제 또는 치료제로서 사용될 수 있다. 뿐만 아니라, 가변 도메인 내 특이적 잔기들은 항체 및 항체 단편들의 결합 특이성 및/또는 안정성을 개선하도록 변경될 수 있다. 항원 결합에 직접 수반되지 않는 기타 다른 잔기들은 비인간 항체의 영역들을 "인간화"하고, 항체의 면역원성을 감소하도록 대체되었다.

[0084] 특정 양태들에서, 항체는 Fab 단편, 예를 들어 항체의 Fab 단편이거나, 또는 가변 경쇄(VL), 불변 경쇄(CL), 가변 중쇄(VH) 및 불변 중쇄(CH1) 부를 포함하는 재조합 생산 항원 결합 단편이다. 선택적으로 Fab의 경쇄 및 중쇄는 1 개 이상의 이황화 결합, 예를 들어 적합한 항체 힌지 영역을 통해 상호 연결될 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, Fab는 경구 활성 제제의 사이클로펜틸트리아졸로피리미딘 군의 화합물의 에피토프와 결합한다. 몇몇 구현예들에서, Fab는 티카그렐로 또는 이의 대사 산물과 결합한다.

[0085] 특정 양태들에서, Fab는 항체, 예를 들어 종래의 쥐와 동물 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체의 서열로부터 유도될 수 있거나, 또는 이를 기반으로 할 수 있다. 특정 양태들에서, Fab는 1 개 이상의 scFv, 예를 들어 라이브러리로부터 스크리닝 및 유도된 scFv로부터 유도될 수 있거나, 또는 이를 기반으로 할 수 있다. 이러한 구현예들에서, 종래의 항체 서열로부터 유도되었거나 이를 기반으로 한 Fab 또는 scFv는 종래의 항체의 기능 활성 1 개 이상을 보유한다(예를 들어, 기능 활성의 적어도 80% 또는 그 이상(80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100%)을 보유한다). 예를 들어 특정 양태들에서, Fab는 항체 또는 scFv의 항원(예를 들어, 티카그렐로)에 대한 친화성, 억제 활성 및/또는 선택성 중 1 개 이상을 보유한다.

[0086] Fab 단편은 사이클로펜틸트리아졸로피리미딘의 에피토프와 결합하는 서열을 포함할 수 있는 한편, 특정 구현예들에서, Fab는 티카그렐로와 결합한다. 몇몇 양태들에서, Fab는 티카그렐로의 활성 대사 산물과 결합한다. 특정 양태들에서, Fab는 티카그렐로와 티카그렐로의 활성 대사 산물 둘 다와 결합한다.

[0087] 몇몇 구현예들에서, Fab는 티카그렐로 또는 이의 활성 대사 산물과 결합하는 상이한 항체들로부터 유래하는 CDR 영역들의 조합을 포함할 수 있다.

[0088] 특정 양태들에서, Fab는 서열 번호 7, 서열 번호 17, 서열 번호 27, 서열 번호 37, 서열 번호 47, 서열 번호 57, 서열 번호 67 및 서열 번호 77 중 임의의 것에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄부(VL)를 포함한다. 추가의 구현예들에서, Fab는 서열 번호 57, 서열 번호 67 및 서열 번호 77 중 임의의 것에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄부를 포함한다. 특정 양태들에서, Fab는 서열 번호 2, 서열 번호 12, 서열 번호 22, 서열 번호 32, 서열 번호 42, 서열 번호 52, 서열 번호 62 및 서열 번호 72 중 임의의 것에 제시된 바와 같은 아미노산을 포함하는 중쇄부(VH)를 포함한다. 추가의 구현예들에서, Fab는 서열 번호 52, 서열 번호 62 및 서열 번호 72 중 임의의 것에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄부를 포함한다. 특정 양태들에서, Fab는 경쇄부(VL)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열과, 중쇄부(VH)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열, 예를 들어 서열 번호 1, 서열 번

호 11, 서열 번호 21, 서열 번호 31, 서열 번호 41, 서열 번호 51, 서열 번호 61 또는 서열 번호 71에 제시된 핵산 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열; 및 서열 번호 6, 서열 번호 16, 서열 번호 16, 서열 번호 16, 서열 번호 16, 서열 번호 16, 서열 번호 16 또는 서열 번호 76에 제시된 바와 같은 핵산 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된다.

- [0089] 특정 양태들에서, 항체는 scFv일 수 있다. scFv는 가요성 폴리펩티드 링커를 통해 가변 경쇄 도메인(VL)에 결합되어 있는 가변 중쇄 도메인(VH)을 포함하는 폴리펩티드 사슬을 포함하는 것이 이해된다. 몇몇 양태들에서, VH 및 VL 사이의 폴리펩티드 링커는 프로테아제 절단 위치를 포함한다. scFv의 VH 및 VL 도메인은 동일한 항체 또는 상이한 항체로부터 유도될 수 있다. 몇몇 양태들에서, scFv의 VH 및 VL은 관심 있는 표적과 결합하는 CDR 1 개 이상을 포함할 수 있는 반면에, VH 또는 VL 도메인들의 나머지는 상이한 항체로부터 유도되거나 또는 합성된다. 몇몇 양태들에서, scFv는 항체, 예를 들어 티카그렐로 또는 이의 대사 산물에 대한 결합 활성을 가지는 항체의 CDR 적어도 1 개를 포함한다. 몇몇 양태들에서, scFv는 소정의 항체의 CDR 적어도 2 개를 포함한다. 몇몇 양태들에서, scFv는 소정의 항체의 CDR 적어도 3 개를 포함한다. 몇몇 양태들에서, scFv는 소정의 항체의 CDR 적어도 4 개를 포함한다. 몇몇 양태들에서, scFv는 소정의 항체의 CDR 적어도 5 개를 포함한다. 몇몇 양태들에서, scFv는 소정의 항체의 CDR 적어도 6 개를 포함한다.
- [0090] scFv 분자의 안정성을 개선하기 위해 몇몇 방법들은 단독으로 또는 조합되어 사용될 수 있다. 단독으로, 또는 기타 다른 방법들 중 1 개 이상과 조합되어 사용될 수 있는 하나의 방법은, scFv 부분을 안정화하기 위해 scFv 도메인들을 연결하는 링커의 길이 및/또는 조성을 조작하는 것이다.
- [0091] 단독으로, 또는 본원에 기술된 기타 다른 방법들 중 1 개 이상과 조합되어 사용될 수 있는 또 다른 잠재적 방법은 적어도 2 개의 아미노산 치환(변형 또는 돌연변이로 지칭되기도 함)을 scFv의 VH 및/또는 VL 도메인에 도입하여, 이황화 결합 형성을 촉진하는 것이다(예를 들어, 문헌[Brinkmann et al., 1993, PNAS, 90:7538-42]; [Zhu et al., 1997, Prot. Sci. 6:781-8]; [Reiter et al., 1994, Biochem. 33:5451-9]; [Reiter et al., 1996, Nature 14: 1239-45]; [Luo et al., 1995, J. Biochem. 118:825-31]; [Young et al., 1995, FEBS Lett. 377:135-9]; [Glockshuber et al., 1990, Biochem. 29:1362-7]을 참조한다).
- [0092] 특정 양태들에서, 하나의 돌연 변이는 scFv의 VH 및 VL 도메인들 각각에 도입될 수 있으며, 그 결과 scFv가 발현될 때 VH 및 VL 도메인들 사이에 사슬 간 이황화 결합 형성을 촉진한다. 다른 양태에서, 2 개의 돌연 변이는 사슬의 동일한 도메인에 도입된다. 특정 양태에서, 2 개의 돌연 변이는 상이한 사슬에 도입된다. 특정 양태들에서, 이황화 결합 다수 개의 형성을 촉진하기 위해 2 개의 돌연 변이 쌍 다수 개가 도입된다. 특정 양태들에서, 이황화 결합 형성을 촉진하기 위해 시스테인이 도입된다. 시스테인으로 돌연 변이될 수 있는 예시적 아미노산은 VH2의 43번, 44번, 45번, 46번, 47번, 103번, 104번, 105번 및 106번 아미노산과, VL2의 42번, 43번, 44번, 45번, 46번, 98번, 99번, 100번 및 101번 아미노산을 포함한다. 전술된 번호 매김은 (항체의 전장 서열 중 아미노산의 위치에 상대적이지 않고) 오로지 scFv의 VH2 및 VL2에만 상대적인 위치를 지정하는 Kabat 번호 매김을 기반으로 한다. 시스테인 잔기들로 돌연 변이될 수 있는 아미노산 위치들의 예시적 조합은 VH44-VL100, VH105-VL43, VH105-VL42, VH44-VL101, VH106-VL43, VH104-VL43, VH44-VL99, VH45-VL98, VH46-VL98, VH103-VL43, VH103-VL44 및 VH103-VL45를 포함한다. 몇몇 양태들에서, VH의 44번 아미노산과 VL의 100번 아미노산은 시스테인으로 돌연 변이된다.
- [0093] 단독으로, 또는 본원에 기술된 기타 다른 방법들 중 하나 이상과 조합되어 사용될 수 있는 추가의 잠재적 방법은, scFv의 도메인들의 순서를 선택하는 것이다. 특정 양태들에서, VL 도메인에 상대적인 VH 도메인의 배향은 안정성을 위해 최적화된다. 특정 양태들에서, scFv는 VH-링커-VL 배향으로 존재한다. 특정 양태들에서, scFv는 VL-링커-VH 배향으로 존재한다.
- [0094] 단독으로, 또는 본원에 기술된 방법들 중 하나 이상과 조합되어 사용될 수 있는 추가의 방법은, scFv의 표면 잔기 1 개 이상을 돌연 변이시켜 1 개 이상의 안정화 돌연 변이(stabilizing mutation)를 도입하는 것에 의한다. 몇몇 양태들에서, 1 개, 2 개, 3 개, 4 개, 5 개, 6 개 또는 6 개 초과 잔기는 scFv의 VH 및/또는 VL 도메인 중 어느 하나 또는 둘 다에서 돌연 변이된다. 특정 양태들에서, 오로지 scFv의 VH 도메인에서만 변화가 일어난다. 특정 양태들에서, 오로지 scFv의 VL 도메인에서만 변화가 일어난다. 특정 양태들에서, scFv의 VH 및 VL 도메인 둘 다에서 변화가 일어난다. 각각의 도메인에 동일한 수의 변화가 일어날 수 있거나, 또는 각각의 도메인에 상이한 수의 변화가 일어날 수 있다. 특정 양태들에서, 변화들 중 1 개 이상은 비 변형 모 scFv에 존재하는 잔기에서의 보존적 아미노산 치환이다. 다른 양태들에서, 변화들 중 1 개 이상은 비 변형 모 scFv에 존재하는 잔기에서의 비 보존적 아미노산 치환이다. scFv의 VH 또는 VL 도메인들 중 어느 하나 또는 둘 다에서 다수의 치

환이 일어날 때, 각각의 치환은 독립적으로 보존적 치환 또는 비 보존적 치환이다. 특정 양태들에서, 치환들 전부는 보존적 치환이다. 특정 양태들에서, 치환들 전부는 비 보존적 치환이다. 특정 양태들에서, 치환들 중 적어도 1 개는 보존적 치환이다. 특정 양태들에서, 치환들 중 적어도 1 개는 비 보존적 치환이다.

[0095] 단독으로, 또는 본원에 기술된 추가의 방법들 중 하나 이상과 조합되어 사용될 수 있는 또 다른 방법은, 공지, 스크리닝 및/또는 확인된 항체의 VH 및/또는 VL 도메인의 공통 서열의 상기 특정 위치에 가장 빈번하게 출현하는 잔기와 매칭되는, scFv의 VH 및/또는 VL 도메인에 존재하는 잔기 1 개 이상을 돌연 변이시켜 1 개 이상의 치환을 도입하는 것이다. 특정 양태들에서, 치환들은 scFv의 VH 도메인 및/또는 VL 도메인 중 어느 하나 또는 둘 다의 1 개, 2 개, 3 개, 4 개, 5 개, 6 개 또는 6 개 초과 위치들에 도입된다. 각각의 도메인에 동일한 수의 변화가 일어날 수 있거나, 또는 각각의 도메인에 상이한 수의 변화가 일어날 수 있다. 특정 양태들에서, 소정의 공통 서열에서의 변화와 매칭되는 서열에서의 변화들 중 1 개 이상은 비 변형 VH 및/또는 VL 서열 내에 존재하는 잔기에서의 보존적 아미노산 치환이다. 다른 양태들에서, 변화들 중 1 개 이상은 비 변형 VH 및/또는 VL 서열 내에 존재하는 잔기에서의 비 보존적 아미노산 치환을 나타낸다. scFv의 VH 도메인 또는 VL 도메인 중 하나 또는 둘 다에서 다수의 치환이 일어날 때, 각각의 치환은 독립적으로 보존적 치환 또는 비 보존적 치환이다. 특정 양태들에서, 치환들 전부는 보존적 치환이다. 특정 양태들에서, 치환들 전부는 비 보존적 치환이다. 특정 양태들에서, 치환들 중 적어도 하나는 보존적 치환이다. 특정 양태들에서, 치환들 중 적어도 하나는 비 보존적 치환이다.

[0096] scFv 부를 변형 또는 안정화하는 데에 유용한 것으로 기술된 변형들 중 임의의 것은 Fab 부를 변형하도록 적용될 수 있음이 주목되어야 한다. 예를 들어 Fab의 가변 도메인은 안정성 및 항원 결합 능 등을 개선하도록 변형될 수 있다. 더욱이, Fab 부 또는 scFv 부는 면역원성을 감소시키도록 변형될 수 있다.

[0097] 특정 양태들에서, 항체는 서열 번호 7, 서열 번호 17, 서열 번호 27, 서열 번호 37, 서열 번호 47, 서열 번호 57, 서열 번호 67 및 서열 번호 77 중 임의의 것에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄부(VL)를 포함하는 scFv일 수 있다. 추가의 구현예들에서, scFv는 서열 번호 57, 서열 번호 67 및 서열 번호 77 중 임의의 것에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄부를 포함한다. 특정 양태들에서, scFv는 서열 번호 2, 서열 번호 12, 서열 번호 22, 서열 번호 32, 서열 번호 42, 서열 번호 52, 서열 번호 62 및 서열 번호 72 중 임의의 것에 제시된 아미노산을 포함하는 중쇄부(VH)를 포함한다. 추가의 구현예들에서, scFv는 서열 번호 52, 서열 번호 62 및 서열 번호 72 중 임의의 것에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄부를 포함한다.

[0098] 본원에 개시된 항체는 링커 폴리펩티드 1 개 이상을 추가로 포함할 수 있다. 링커는 중쇄 도메인과 경쇄 도메인을 상호 연결할 수 있거나(scFv), 또는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 다른 제제, 예를 들어 표지, 또는 Fc 도메인 등에 연결할 수 있다. 링커는 길이와 서열이 다양할 수 있다고 당업계에 일반적으로 알려져 있다.

[0099] Fc 영역을 포함하는 항체의 혈청 중 반감기는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합 친화성을 증가시킴으로써 증가할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항체 반감기"는, 항체 분자 투여 후 이 항체 분자의 평균 생존 시간의 척도인 항체의 약동학적 특성을 의미한다. 항체 반감기는, 혈청 중에서 측정되거나(즉, 혈중 반감기) 또는 기타 다른 조직에서 측정된 바와 같은, 환자(또는 기타 다른 포유동물)의 몸 또는 이의 특정 구획에서 유래한 면역 글로불린 농도량의 50 퍼센트가 소모되는데 필요한 시간으로 표현될 수 있다. 반감기는 개별 면역 글로불린마다 또는 면역 글로불린 군 중에서는 구성 면역 글로불린들 간에 달라질 수 있다. 일반적으로 항체 반감기의 증가는 투여된 항체의 혈중 평균 체류 시간(MRT)의 증가를 초래한다.

[0100] 반감기 증가는 환자에 투여된 제제의 양의 감소뿐만 아니라, 투여 횟수의 감소도 허용할 수 있다. 예를 들어 미국 특허 5,739,277에 기술된 바와 같이, 항체의 혈청 중 반감기를 증가시키기 위해서 구조 수용체 결합 에피토프가 항체(특히 항체 단편)에 통합될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "구조 수용체 결합 에피토프"란, IgG 분자(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4)의 생체 내 혈청 중 반감기를 증가시키는데 관여하는, IgG 분자의 Fc 영역의 에피토프를 지칭한다. 대안적으로, 반감기가 증가한 본 개시내용의 항체는 Fc와 FcRn 수용체 사이의 상호 작용에 수반되는 것으로 확인된 아미노산 잔기들을 변형함으로써 생성될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 6,821,505 및 7,083,784; 및 WO 09/058492 참조). 뿐만 아니라, 본 개시내용의 항체의 반감기는 당업계에서 널리 사용되는 기법에 의해 PEG 또는 알부민과의 접합을 통해 증가할 수 있다.

[0101] 본 개시내용의 범주 내에 속하는 항체는 본원에서 확인된 구조상 및/또는 기능상 특징들 중 임의의 것에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어 항체는 본원에 예시된 기법들 또는 당업계에 알려진 기타 기법들 중 임의의 것을 사용하여 특정 결합 특징들(예를 들어, 티카그렐로 및 티카그렐로 대사 산물에 대한 K_{off} , K_D , IC_{50} ,

특이성/선택성)에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0102] 표지, 접합체 및 모이이터(moiety)

[0103] 본 개시내용의 항체는 진단 및 기타 다른 검정을 위해 표지에 접합할 수 있는데, 이 경우 항체들 및/또는 이의 표적(들)은 검출될 수 있다. 표지는 발색 단, 형광 단, 형광 단백질, 인광 염료, 이원 염료(tandem dye), 입자, 합텐, 효소 및 방사성 동위원소를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0104] 특정 양태들에서, 항체는 형광 단에 접합된다. 항체에 부착되는 형광 단의 선택은 접합된 항체의 흡광성 및 형광 방출성을 결정할 것이다. 항체 및 항체 결합 리간드에 사용될 수 있는 형광 단 표지의 물리적 특성들은 스펙트럼 분광 특징(흡광, 발광 및 스토크스 이동), 형광 세기, 평균수명, 편광률 및 광 퇴색 속도, 또는 이것들의 조합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 물리적 특성들 전부는 하나의 형광 단을 다른 형광 단과 구분하는 데에 사용될 수 있으며, 이로써 다중 분석이 가능하게 된다. 형광 표지의 기타 다른 바람직한 특성들은, 예를 들어 항체 표지화가 세포나 모델 유기체(예를 들어, 살아있는 동물) 내에서 이루어진다면, 세포 투과성 및 작은 독성을 포함할 수 있다.

[0105] 특정 양태들에서, 효소는 표지이면서, 항체에 접합된다. 효소는, 검출 가능한 신호의 증폭을 이룰 수 있고, 그 결과 검정의 감도가 증가하게 되므로, 바람직한 표지이다. 효소 자체는 검출 가능한 반응을 나타내지 않지만, 효소가 적절한 기질과 접촉하면 이 기질을 분해하는 작용을 하고, 이때 전환된 기질은 형광 신호, 비색 신호 또는 발광 신호를 발생시키게 된다. 표지화 시약 상 하나의 효소는 다수 기질의 검출 가능 신호로의 전환을 초래할 수 있으므로, 효소는 검출 가능한 신호를 증폭한다. 효소 기질은 바람직한 측정 가능 생성물, 예를 들어 비색성, 형광성 또는 화학발광성을 보이는 것으로 선택된다. 이와 같은 기질은 업계에서 광범위하게 사용되고, 당업자에게 널리 공지되어 있으며, 예를 들어 산화환원효소, 예를 들어 호오스래디쉬 과산화효소 및 기질, 예를 들어 3,3'-디아미노벤지딘(DAB); 포스파타아제 효소, 예를 들어 산 포스파타아제, 알칼리 및 기질, 예를 들어 5-브로모-6-클로로-3-인돌릴 포스페이트(BCIP); 글리코시다아제, 예를 들어 베타-갈락토시다아제, 베타-글루쿠로니다아제 또는 베타-글루코시다아제 및 기질, 예를 들어 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴 베타-D-갈락토피라노사이드(X-gal)를 포함하고; 추가의 효소는 가수분해효소, 예를 들어 콜린에스테라아제 및 펩티다아제, 산화효소, 예를 들어 글루코스 산화효소 및 시토크롬 산화효소, 그리고 적합한 기질이 공지된 환원효소를 포함한다.

[0106] 화학발광을 하는 효소 및 이의 적절한 기질은 일부 검정에 적합하다. 그 예로서는 루시페라아제 및 에퀴린의 친연 형태 및 재조합 형태를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 포스파타아제, 글리코시다아제 및 산화효소에 있어서 화학발광을 하는 기질, 예를 들어 안정적인 디옥세탄, 루미놀, 이소루미놀 및 아크리디늄 에스테르를 함유하는 것들도 추가로 유용하다.

[0107] 다른 양태에서, 합텐, 예를 들어 바이오틴 또한 표지로서 사용된다. 바이오틴은 효소 계에서 검출 가능 신호를 더 증폭하는 기능을 할 수 있으므로 유용하고, 이 바이오틴은 또한 친화성 크로마토그래피에서 분리의 목적으로 사용될 태그로서 기능을 할 수 있다. 검출을 위해서, 바이오틴에 대한 친화성을 가지는 효소 접합체, 예를 들어 아비딘-HRP가 사용된다. 추후 과산화효소 기질이 첨가되면 검출 가능 신호가 발생한다.

[0108] 합텐은 또한 호르몬, 자연 발생 및 합성 약물, 오염원, 알레르기원, 작용제 분자(affector molecule), 성장 인자, 케모카인, 시토카인, 림포카인, 아미노산, 펩티드, 화학 중간체 및 뉴클레오티드 등도 포함한다.

[0109] 특정 양태들에서, 형광 단백질은 표지로서 항체와 접합할 수 있다. 형광 단백질의 예들은 녹색 형광 단백질(GFP) 및 피코빌리 단백질 및 이의 유도체를 포함한다. 형광 단백질, 특히 피코빌리 단백질이 이원 염료가 표지화된 표지화 시약을 형성하는 데에 특히 유용하다. 이러한 이원 염료는, 발광 스펙트럼이 형광 단백질의 흡수 스펙트럼의 파장으로부터 더 멀리 이동하는, 더 큰 스토크스 이동을 이루기 위한 형광 단백질과 형광 단을 포함한다.

[0110] 특정 양태들에서, 표지는 방사성 동위원소이다. 적합한 방사성 물질의 예들로서는 요오드(¹²¹I, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I), 탄소(¹⁴C), 황(³⁵S), 삼중 수소(³H), 인듐(¹¹¹In, ¹¹²In, ¹¹³In, ¹¹⁵mIn), 테크네튬(⁹⁹Tc, ^{99m}Tc), 티튬(²⁰¹Ti), 갈륨(⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), 팔라듐(¹⁰³P), 몰리브덴(⁹⁹Mo), 제논(¹³⁵Xe), 불소(¹⁸F), ¹⁵³SM, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh 및 ⁹⁷Ru를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0111] 몇몇 양태들에서, 약물은 항체에 접합할 수 있다. 예를 들어 scFv를 포함하는 항체는 심혈관 질병 및/또는 급성 관상동맥 증후군의 치료를 위한 약물에 접합할 수 있다.

- [0112] 특정 특징들에 있어서, 약물 및 기타 다른 분자는 위치 특이적 접합을 통하여 항체에 표적화될 수 있다. 예를 들어 항체는 (결합 단위 및/또는 Fc 도메인에 조각되어 도입된 시스테인(들)을 포함하는) 시스테인 조각 도메인을 포함할 수 있으며, 이로 말미암아 접합 반응을 위한 유리 티올기가 생성된다. 특정 양태들에서, 항체는 특이 접합 위치들이 통합되도록 조각된다.
- [0113] **항체를 암호화하는 핵산 분자**
- [0114] 본 개시내용은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산 분자를 제공한다. 본 개시내용의 일 양태는 본원에 구체적으로 기술된 항체들 중 임의의 것을 암호화하는 핵산 분자를 제공한다. 핵산 분자는 항체의 중쇄 및/또는 경쇄의 가변 영역을 암호화할 수 있다.
- [0115] 몇몇 양태들에서, 항체는 Fab 또는 scFv인데, 이 Fab 또는 scFv를 암호화하는 핵산 부분은 VL 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과, VH 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, VL 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 가요성 폴리펩티드 링커를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 통해 VH 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 선택적으로 연결되어 있다.
- [0116] 추가의 양태는 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자들 중 임의의 것으로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다. 본 개시내용의 다른 양태에 있어서, 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자들을 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 하나의 양태에서, 숙주 세포는 1 개 초과인 벡터를 포함할 수 있다.
- [0117] 본 개시내용은 본 개시내용의 임의의 항체를 암호화하는 핵산 분자들뿐만 아니라, 항체의 경쇄 또는 중쇄 중 어느 하나도 고려한다. 예를 들어, 본 개시내용은 서열 번호 2, 서열 번호 12, 서열 번호 22, 서열 번호 32, 서열 번호 42, 서열 번호 52, 서열 번호 62, 서열 번호 72, 서열 번호 7, 서열 번호 17, 서열 번호 27, 서열 번호 37, 서열 번호 47, 서열 번호 57, 서열 번호 67 및 서열 번호 77 중 1 개 이상을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 고려한다. 본 개시내용은, 추가의 영역들(예를 들어, Fc 또는 변형된 Fc)을 추가로 포함하는, 본 개시내용의 임의의 항체를 암호화하는 핵산 분자를 추가로 고려한다. 몇몇 구현예들에서, 핵산 분자는 서열 번호 1, 서열 번호 6, 서열 번호 11, 서열 번호 16, 서열 번호 21, 서열 번호 26, 서열 번호 31, 서열 번호 36, 서열 번호 41, 서열 번호 46, 서열 번호 51, 서열 번호 56, 서열 번호 61, 서열 번호 66, 서열 번호 71 또는 서열 번호 76 중 1 개 이상으로부터 선택될 수 있다. 추가의 구현예들에서, 본 개시내용은 서열 번호 1, 서열 번호 6, 서열 번호 11, 서열 번호 16, 서열 번호 21, 서열 번호 26, 서열 번호 31, 서열 번호 36, 서열 번호 41, 서열 번호 46, 서열 번호 51, 서열 번호 56, 서열 번호 61, 서열 번호 66, 서열 번호 71 또는 서열 번호 76 중 1 개 이상으로부터 선택되는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0118] **항체, Fab 및 scFv를 제조하기 위한 방법**
- [0119] 본 개시내용은 본원에 개시된 항체 및 이의 단편을 제조하기 위한 방법을 제공한다. 몇몇 양태들에서, 본원에 개시된 티카그렐로, 및 티카그렐로 및/또는 TAM의 특이적 에피토프를 인지하는 항체의 항원 결합 단편은 당업자들에게 공지된 임의의 기법에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, Fab 및 F(ab')₂ 단편은, 효소, 예를 들어 파파인(Fab 단편 제조용) 또는 펩신(F(ab')₂ 단편 제조용)을 사용하여 면역글로불린 분자의 단백질 절단에 의해 항체로부터 제조될 수 있다. 뿐만 아니라, 본원에 기술된 바와 같은 scFv 및 Fab를 포함하는 항체는 당업계에 공지된 다양한 파지 전사 방법을 사용하여 생성될 수 있다.
- [0120] 일반적으로 파지 전사 방법에 있어서, 기능성 항체 도메인은 이 기능성 항체 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 운반하는 파지 입자 표면 상에 전사된다. 특히 VH 및 VL 도메인을 암호화하는 DNA 서열은 동물 cDNA 라이브러리(예를 들어, 인간 또는 쥐와 동물 림프 조직의 cDNA 라이브러리)로부터 증폭된다. VH 및 VL 도메인을 암호화하는 DNA는 PCR에 의해 scFv 링커와 함께 재조합된 후, 파지미드 벡터에 클로닝된다. 벡터는 전기천공을 통해 이.콜라이(*E. coli*) 내에 도입되고, 이.콜라이는 조력자 파지(helper phage)로 감염된다. 이러한 방법에서 사용된 파지는 fd 및 M13을 포함한 사상 파지일 수 있고, VH 및 VL 도메인은 파지 유전자 III 또는 유전자 VIII 중 어느 하나와 재조합에 의해 융합될 수 있다. 티카그렐로 및/또는 TAM과 결합하는 항원 결합 도메인을 발현하는 파지는 항원으로, 예를 들어 고체 표면 또는 비드에 결합 또는 포착된 항원 또는 표지화된 항원을 사용하여 선택 또는 확인될 수 있다. 이와 유사하게, 티카그렐로 및/또는 TAM에 더하거나 또는 이 티카그렐로 및/또는 TAM을 제외하고 항원/항체와 결합하는 결합 도메인은 선택 해제를 위해 확인될 수 있다. 본 발명의 항체를 제조하기 위해 사용될 수 있는 파지 전사 방법의 예들은 문헌[Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods 182:41-50]; [Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods 184:177-186]; [Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:952-958]; [Persic et al., 1997, Gene 187:9-18]; [Burton et al., 1994, Advances in

Immunology 57:191-280]; PCT 출원 PCT/GB91/01 134; PCT 공개 WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401, 및 WO 97/13844; 및 미국 특허 5,698,426, 5,223,409, 5,403,484, 5,580,717, 5,427,908, 5,750,753, 5,821,047, 5,571,698, 5,427,908, 5,516,637, 5,780,225, 5,658,727, 5,733,743 및 5,969,108에 개시된 것들을 포함하며, 이들 각각은 본원에 전체가 참고로 포함되어 있다.

[0121] 상기 참고 문헌들에 기술된 바와 같이, 과지 선택 후 이 과지로부터 유래하는 항체 암호화 영역은, 인간 항체, 또는 기타 다른 임의의 원하는 항원 결합 단편(scFv 및 Fab)을 포함하여 전 항체를 생성하기 위해 분리 및 사용될 수 있으며, 예를 들어 이하에 기술된 바와 같은, 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모 및 박테리아를 포함하는 임의의 원하는 숙주 내에서 발현될 수 있다. 당업계에 공지된 방법들, 예를 들어 PCT 공개 WO 92/22324; 문헌[Mullinax et al., 1992, BioTechniques 12(6):864-869]; [Sawai et al., 1995, AJRI 34:26-34]; 및 [Better et al., 1988, Science 240:1041-1043](이 문헌들은 전체가 참조로 포함되어 있음)에 개시된 방법들을 사용하는, Fab, Fab' 및 F(ab')₂ 단편을 재조합에 의해 제조하기 위한 기법도 또한 사용될 수 있다.

[0122] 특정 양태들에서, 본원에 개시된 핵산은 발현 구성물 중 조절 뉴클레오티드 서열 1 개 이상과 작동 가능하도록 연결될 수 있다. 항체 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 핵산 서열들은 동일한 발현 벡터 내에 임의의 배향(예를 들어, 경쇄(앞) 다음 중쇄(뒤), 또는 이의 반대)으로 클로닝될 수 있거나, 또는 2 개의 상이한 벡터에 클로닝될 수 있다. 만일 발현이 하나의 벡터를 사용하여 수행되면, 암호화 유전자 2 개는 자체의 유전 요소(예를 들어, 프로모터, RBS, 리더, 종결, 폴리 A 등)를 가질 수 있거나, 또는 이 암호화 유전자 2 개는 유전 요소들의 단일 세트 하나와 함께 클로닝되며, 시스트론 요소와 연결될 수 있다. 조절 뉴클레오티드 서열은 일반적으로 발현에 사용되는 숙주 세포에 적절할 것이다. 다양한 숙주 세포에 적절한 발현 벡터 및 적합한 조절 서열의 다수의 유형들이 당업계에 공지되어 있다. 통상적으로 상기 1 개 이상의 조절 뉴클레오티드 서열은 프로모터 서열, 리더 또는 신호 서열, 리보솜 결합 위치, 전사 개시 및 종결 서열, 번역 개시 및 종결 서열, 그리고 인핸서 또는 활성 인자 서열을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 당업계에 공지된 바와 같은 구성적 또는 유도성 프로모터가 본 개시내용에 의해 고려된다. 프로모터는 자연 발생 프로모터, 또는 1 개 초과 프로모터의 요소들을 합한 하이브리드 프로모터 중 어느 하나일 수 있다. 발현 구성물은 에피솜, 예를 들어 플라스미드로서 세포 내에 존재할 수 있거나, 또는 발현 구성물은 염색체 내에 삽입될 수 있다.

[0123] 특정 양태들에서, 발현 벡터는 형질전환된 숙주 세포의 선택을 허용하는 선택 가능 마커 유전자를 함유한다. 선택 가능 마커 유전자는 당업계에 널리 공지되어 있고, 사용된 숙주 세포에 따라서 달라질 것이다. 특정 양태들에서, 본 개시내용은 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 적어도 하나의 조절 서열과 작동 가능하도록 연결되어 포함되어 있는 발현 벡터에 관한 것이다. 조절 서열은 업계에 인지되어 있으며, 암호화된 폴리펩티드의 발현을 유도하도록 선택된다. 따라서, 용어 "조절 서열"은 프로모터, 인핸서 및 기타 다른 발현 조절 요소를 포함한다. 예시적이지, 비 제한적인 조절 서열은 문헌[Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990)]에 기술되어 있다. 발현 벡터의 설계는 형질전환된 숙주 세포의 선택 및/또는 발현이 요망되는 단백질의 유형과 같은 인자들에 의존할 수 있음이 이해되어야 한다. 더욱이, 벡터의 복사체 수, 벡터에 의해 암호화되는 임의의 기타 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현 및 복사체 수를 제어하는 능력도 또한 고려되어야 한다.

[0124] 본 개시내용의 항체를 제조하기 위한 방법은, 예를 들어 항체를 암호화하는 발현 벡터(예를 들어, 중쇄 및 경쇄 또는 이것들의 가변 영역들을 암호화하는 단일 벡터, 또는 2 개의 벡터(하나는 중쇄 또는 이의 가변 영역을 암호화하고 다른 하나는 경쇄 또는 이의 가변 영역을 암호화하는 벡터) 1 개 또는 1 개 초과로 형질감염된 숙주 세포를 포함할 수 있으며, 이 숙주 세포는 항체의 발현이 일어날 수 있는 적절한 조건 하에서 배양될 수 있다. 항체는 세포 및 항체 함유 배지의 혼합물로부터 분비 및 분리될 수 있다. 대안적으로, 항체는 세포질이나, 막 분획 및 수확되어 용해된 세포, 그리고 분리된 단백질 중에 머무를 수 있다. 세포 배양액은 숙주 세포, 배지 및 기타 다른 부산물을 포함한다. 세포 배양에 적합한 배지는 당업계에 널리 공지되어 있다. 항체는 세포 배양 배지, 숙주 세포로부터 분리될 수 있거나, 이 두 경우, 이온 교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 한외 여과, 전기영동 및 면역친화성 정제를 포함하여 단백질, 항체 및 이의 항원 결합 단편을 정제하기 위한 것으로 업계에 공지된 기법을 사용할 수 있다. 특정 양태들에서, 항체는 용해도를 증가시키고 정제를 촉진할 수 있도록 중쇄 및 경쇄 가변 영역들을 포함하는 항체의 항원 결합 단편으로서 제조된다.

[0125] 재조합 핵산은 클로닝된 유전자 또는 이의 일부의, 원핵생물 세포에서의 발현, 진핵생물 세포(효모, 조류, 곤충 또는 포유동물)에서의 발현 또는 이 둘 다에 적합한 벡터로의 결합에 의해 제조될 수 있다. 재조합 폴리펩티드의 제조를 위한 발현 비이클은 플라스미드 및 기타 다른 벡터를 포함한다. 예를 들어, 원핵생물 세포, 예를 들

어 이.콜라이 내에서의 발현에 적합한 벡터는 pBR322-유도 플라스미드, pEMBL-유도 플라스미드, pEX-유도 플라스미드, pBTac-유도 플라스미드 및 pUC-유도 플라스미드와 같은 유형의 플라스미드들을 포함한다. 특정 양태들에서, 포유동물 발현 벡터는 박테리아 내 벡터의 번식을 촉진하기 위한 원핵생물 서열과, 진핵생물 세포 내에서 발현되는 1 개 이상의 진핵생물 전사 단위 둘 다를 함유한다. pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo 및 pHyg 유도 벡터는 진핵생물 세포의 형질감염에 적합한 포유동물 발현 벡터의 예들이다. 이러한 벡터들 중 몇몇은 원핵생물 세포 및 진핵생물 세포 둘 다에서 약물 내성 선택과 복제를 촉진하기 위해 박테리아 플라스미드, 예를 들어 pBR322로부터 유래하는 서열로 변형된다. 대안적으로, 바이러스, 예를 들어 소 유두종 바이러스(BPV-1)의 유도체들 또는 엡스타인-바 바이러스의 유도체들(pHEBo, pREP-유도 및 p205)은 진핵생물 세포 내 단백질의 일시적 발현을 위해 사용될 수 있다. 숙주 유기체의 형질전환 및 플라스미드의 제조에 사용된 다양한 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 기타 다른 원핵생물 세포 및 진핵생물 세포 둘 다에 적합한 발현 계뿐만 아니라, 일반적인 재조합 방법에 대해서는 문헌 [*Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) Chapters 16 및 17]을 참조한다. 몇몇 경우에 있어서, 바큘로바이러스 발현 계를 사용함으로써 재조합 폴리펩티드를 발현하는 것이 바람직할 수 있다. 이와 같은 바큘로바이러스 발현 계의 예들은 pVL-유도 벡터(예를 들어, pVL1392, pVL1393 및 pVL941), pAcUW-유도 벡터(예를 들어, pAcUW1), 및 pBlueBac-유도 벡터(예를 들어, β -gal 함유 pBlueBac III)를 포함한다.

[0126] 융합 유전자를 제조하기 위한 기법들이 널리 공지되어 있다. 본질적으로, 상이한 폴리펩티드/항체 서열들을 암호화하는 다양한 핵산 단편들의 집합은, 결찰을 위해 평활 말단 또는 지그재그 말단, 적절한 종단을 제공하는 제한 효소 분해, 적절한 대로의 점착 말단 채움, 바람직하지 않는 집합을 피하기 위한 알칼리 포스포타아제 처리, 그리고 효소 결찰을 사용하는 종래의 기법에 따라서 수행된다. 다른 양태에서, 융합 유전자는 자동화 DNA 합성기를 포함하는 종래의 기법들에 의해 합성될 수 있다. 대안적으로, 유전자 단편의 PCR 증폭은, 추후 어닐링되어 키메라 유전자 서열을 형성할 수 있는 2 개의 연속 핵산 단편들 간 상보성 돌출부(overhang)를 발생시키는 앵커 프라이머를 사용하여 수행될 수 있다(예를 들어, 문헌[*Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992] 참조).

[0127] 몇몇 양태들에서, 본원에 기술된 핵산들 중 임의의 것을 발현하는 발현 벡터는 숙주 세포 내에서 항체를 발현하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체는 박테리아 세포, 예를 들어 이.콜라이, 곤충 세포(예를 들어, 바큘로바이러스 발현 계를 사용함), 효모 또는 포유동물 세포 내에서 발현될 수 있다. 기타 다른 적합한 숙주 세포는 당업자들에게 공지되어 있다.

[0128] 일단 발현 벡터가 종래의 기법에 의해 숙주 세포로 운반되면, 형질감염된 세포는 이후 종래의 기법에 의해 배양되어 항체를 생산하게 된다. 그러므로 본 개시내용은 항체 또는 이의 단편들을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 이중 프로모터와 작동 가능하도록 연결되어 함유되어 있는 숙주 세포를 포함한다. 특정 양태들에서, 중쇄 및 경쇄 둘 다, 및/또는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 둘 다는 숙주 세포 내에서 (동일 벡터 또는 상이한 벡터로부터) 동시 발현될 수 있으며, 그 결과 전 항체가 발현될 수 있다. 특정 양태들에서, 항체의 중쇄 및 경쇄 둘 다는 단일 프로모터로부터 발현된다. 특정 양태들에서, 항체의 중쇄 및 경쇄는 다수의 프로모터로부터 발현된다. 특정 양태들에서, 항체의 중쇄 및 경쇄는 단일 벡터 상에서 암호화된다. 특정 양태들에서, 항체의 중쇄 및 경쇄는 다수의 벡터 상에서 암호화된다.

[0129] 재조합 항체의 발현을 위한 숙주로서 사용 가능한 포유동물 세포주가 당업계에 널리 공지되어 있으며, ATCC(American Type Culture Collection)로부터 입수 가능한, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, HeLa 세포, 새끼 햄스터 신장(BHK) 세포, 원숭이 신장 세포(COS), 인간 간세포 암종 세포(예를 들어, Hep G2), 인간 상피 신장 293 세포, 그리고 기타 다른 다수의 세포주(이에 한정되는 것은 아님)를 포함하여 다수의 무한 증식성 세포주를 포함한다. 상이한 숙주 세포는 번역 후 가공, 및 단백질과 유전자 산물의 변형에 특징적이면서 특이적인 기작들을 가진다. 적절한 세포주 또는 숙주 계는 발현된 항체 또는 이의 부분의 올바른 변형과 가공을 보장하도록 선택될 수 있다. 이를 위해서 1차 전사체의 적절한 가공, 유전자 산물의 글리코실화 및 인산화를 위한 세포 내 기구를 가지는 진핵생물 숙주 세포가 사용될 수 있다. 이와 같은 포유동물 숙주 세포는 CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, NS0(내재적으로 임의의 기능성 면역글로불린 사슬을 생산하지 않는 쥐과동물 골수종 세포주), SP20, CRL7030 및 HsS78Bst 세포를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 하나의 양태에서, 인간 림프구의 무한 증식에 의해 개발된 인간 세포주는 모노클로날 항체를 재조합에 의해 생산하는 데에 사용될 수 있다. 하나의 양태에서, 인간 세포주 PER.C6.(CruCell, Netherlands)은 모노클로날 항체를 재조합에 의해 생산하기 위해 사용될 수 있다.

- [0130] 재조합 항체를 발현하기 위한 숙주로서 사용될 수 있는 추가의 세포주는 곤충 세포(예를 들어, Sf21/Sf9, 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*) Bti-Tn5b1-4) 또는 효모 세포(예를 들어, 에스.세레비시아에(*S. cerevisiae*), 피치아(*Pichia*), US 7326681 등), 식물 세포(US 20080066200); 그리고 닭 세포(WO 2008142124)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0131] 특정 양태들에서, 본 개시내용의 항체는 세포주 내에서 안정적으로 발현된다. 안정적인 발현은 재조합 단백질, 항체 및 이의 항원 결합 단편의 장기 고수율 생산에 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체 분자를 안정적으로 발현하는 세포주가 생성될 수 있다. 숙주 세포는 발현 제어 요소(예를 들어, 프로모터, 인핸서, 전사 종결인자, 폴리아데닐화 위치 등) 및 선택 가능 마커 유전자를 포함하도록 적절하게 조작된 벡터로 형질전환될 수 있다. 세포로의 외래 DNA 도입 후, 이 세포는 부유 배지 중에서 1 일 내지 2 일 동안 성장이 허용될 수 있으며, 이후에는 선택적 배지로 전환된다. 재조합 플라스미드 내 선택 가능 마커는 선택에 대한 내성을 제공하고, 플라스미드가 자체의 염색체에 안정적으로 통합된 세포가 성장하여, 추후 플라스미드가 세포주로 클로닝되었을 때 증식할 수 있도록 만드는 초점을 형성할 수 있도록 허용한다. 높은 수율로 안정한 세포주를 제조하기 위한 방법들이 당 업계에 널리 공지되어 있으며, 시약들은 일반적으로 시판되고 있다.
- [0132] 특정 양태들에서, 본 개시내용의 항체는 세포주 내에서 일시적으로 발현된다. 일시적 형질감염은 세포 내에 도입된 핵산이 해당 세포의 게놈이나 염색체 DNA에 통합되지 않는 방법이다. 이와 같이 세포 내에 도입된 핵산은 사실상 잉여 염색체 요소, 예를 들어 에피솜으로서 세포 내에 유지된다. 에피솜 중 핵산의 전사 과정은 영향받지 않으며, 에피솜 핵산에 의해 암호화된 단백질이 제조된다.
- [0133] 안정적으로 형질감염되었거나 일시적으로 형질감염된 세포주는 모노클로날 항체의 발현 및 생산을 초래하는, 당 업계에 널리 공지된 조건 하에서 세포 배양 배지 중에 유지된다. 특정 양태들에서, 포유동물 세포 배양 배지는 예를 들어 DMEM 또는 Ham의 F12를 포함하여 시판되는 배지 제형을 기반으로 한다. 다른 양태들에서, 세포 배양 배지는 세포 성장과 생체 단백질 발현 둘 다의 증가를 지지하도록 개질된다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "세포 배양 배지", "배양 배지" 및 "배지 제형"이란, 다세포 유기체 또는 조직 외부의 인공 시험관 내 환경에서의 세포 유지, 성장, 번식 또는 증식을 위한 영양 용액을 지칭한다. 세포 배양 배지는 특정의 세포 배양액의 용도에 대해 최적화될 수 있는데, 예를 들어 세포 성장을 촉진하기 위해 제형화된 세포 배양 성장 배지, 또는 재조합 단백질 생산을 촉진하기 위해 제형화된 세포 배양 생산 배지를 포함한다. 용어 "영양", "성분" 및 "구성성분"은 본원에서 호환되어 사용되고 있는 것으로서, 세포 배양 배지를 구성하는 구성성분을 지칭한다.
- [0134] 일단 분자가 제조되면, 해당 분자는 면역글로불린 분자 또는 이의 단편의 정제를 위한 것으로 당업계에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환, 친화성, 특히 특이 항원인 단백질 A 또는 단백질 G에 대한 친화성, 그리고 크기별 컬럼 크로마토그래피), 원심분리, 미분 용해도(differential solubility)에 의하거나, 또는 단백질, 항체 및/또는 항체 단편의 정제를 위한 임의의 기타 다른 표준 기법에 의해 정제될 수 있다. 뿐만 아니라, 본 개시내용의 분자 또는 이의 단편은, 정제를 촉진하는 것으로 본원에 기술되었거나 아니면 당업계에 공지된 이중 폴리펩티드 서열(본원에서는 "태그"로서 지칭되며, 예를 들어 히스티딘 태그가 있음)에 융합될 수 있다.
- [0135] 재조합 기법이 사용될 때, 분자는 세포 내, 주변세포질 공간에서 생산될 수 있거나, 아니면 배지에 직접 분비될 수 있다. 만일 분자가 첫 번째 단계로서 세포 내에서 생산되면, 숙주 세포이거나 용해된 단편 중 어느 하나인 미립자 파편은, 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거된다. 문헌[Carter *et al.*, *Bio/Technology*, 10:163-167 (1992)]에는, 이.콜라이의 주변세포질 공간에 분비된 항체를 분리하기 위한 방법이 기술되어 있다. 분자가 배지에 분비되는 경우, 이와 같은 발현 계로부터 유래하는 상청액은 일반적으로 시판되는 단백질 농축 필터, 예를 들어 Amicon 또는 Millipore Pellicon 한외여과 유닛을 사용하여 처음에 농축된다. 프로테아제 억제제, 예를 들어 PMSF는 단백질분해를 억제하기 위한 앞선 단계들 중 임의의 단계에 포함될 수 있으며, 항생제는 우발적인 오염물질의 성장을 방지하기 위해 포함될 수 있다.
- [0136] 세포로부터 제조된 조성물은, 예를 들어 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 및/또는 친화성 크로마토그래피가 단독으로 또는 기타 다른 정제 단계들과 함께 사용하여 정제될 수 있다. 단백질 A의 친화성 리간드로서의 적합성은, 만일 분자 내에 존재한다면 임의의 면역글로불린 Fc 도메인의 동종 및 종에 의존함이 당업자에 의해 이해될 것이다. 친화성 리간드가 부착되는 기재로서는 아가로스가 가장 흔하게 사용되지만, 기타 다른 기재도 사용 가능하다. 기계적으로 안정적인 기재, 예를 들어 제어된 공극 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스에 의해 달성될 수 있는 유속 및 처리 시간보다 더욱 빠른 유속 및 더욱 짧은 처리 시간을 허용한다. 회수될 분자에 따라서, 단백질 정제

를 위한 기타 다른 기법, 예를 들어 이온 교환 컬럼 상 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상 크로마토그래피, 헤파린 상 크로마토그래피, 음이온 교환 수지 상 또는 양이온 교환 수지 상 SEPHAROSE 크로마토그래피(예를 들어, 폴리아스파르트산 컬럼), 크로마토 초점맞춤, SDS-PAGE, 그리고 황산암모늄 침전 등도 또한 사용 가능하다.

[0137] 임의의 예비 정제 단계(들) 이후, 관심 분자 및 오염물을 포함하는 혼합물은, pH 약 2.5 내지 약 4.5, 그리고 낮은 염 농도(예를 들어, 약 0 M 내지 약 0.25 M의 염)에서 용리 완충액을 사용하는 저 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피의 대상이 될 수 있다.

[0138] 항체는, 예를 들어 상기 및/또는 실시예에 제시된 기법들 중 임의의 것 하나 또는 조합을 사용하여 제조 및 정제될 수 있다. 항체가 어떻게 정제되는지에 상관 없이, 본 개시내용의 항체의 기능상 결합을 확인하기 위해 (정제 전 및/또는 후에) 결합 검정이 수행될 수 있다. 예를 들어, 이중 ELISA 검정이 사용될 수 있다. 몇몇 양태들에서, 제1 항원(예를 들어, 티카그렐로 또는 이의 경쟁물질)은 웰 상에 코팅되며, 이 항원에의 결합은 항체를 고정하여 항체가 검출되도록 만든다.

[0139] **약학 제형**

[0140] 특정 양태들에서, 본 개시내용은 약학 조성물을 제공한다. 이와 같은 약학 조성물은 항체를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 조성물일 수 있다. 이와 같은 약학 조성물은 또한 항체, 또는 항체들의 조합, 그리고 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 조성물일 수 있다. 특정 양태들에서, 본 개시내용의 약학 조성물은 약품으로서 사용된다.

[0141] 특정 양태들에서, 항체 또는 항체들의 조합(또는 항체 또는 항체들의 조합을 암호화하는 핵산 분자들)은 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정화제와 함께 약학 조성물로서 제형화될 수 있다. 특정 양태들에서, 이와 같은 약학 조성물은 당업계에 공지된 방법들을 사용하는 투여 경로들 중 임의의 하나 또는 그 이상의 경로를 통한 인간 또는 인간 이외의 동물에의 투여에 적합하다. 당업자에 의해 이해될 바와 같이, 투여 경로 및/또는 투여 방식은 요망되는 결과들에 따라서 달라질 것이다. 용어 "약학적으로 허용 가능한 담체"란, 활성 성분들의 생체 활성 효능을 방해하지 않는 1 개 이상의 무독성 물질을 의미한다. 이와 같은 제조물은 통상적으로 염, 완충제, 보존제, 혼화성 담체, 그리고 선택적으로는 기타 다른 치료제를 함유할 수 있다. 이와 같은 약학적으로 허용 가능한 제조물은 또한 인간에의 투여에 적합한 혼화성 고체 또는 액체 충전제, 희석제 또는 캡슐화 물질을 함유할 수 있다. 본원에 기술된 제형에 사용될 수 있는 것으로 고려되는 기타 다른 담체, 부형제 및/또는 첨가제는, 예를 들어 풍미제, 향미생물 제제, 감미제, 향산화제, 대전방지제, 지질, 단백질 부형제, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴, 카세인, 염 형성 반대이온, 예를 들어 나트륨 등을 포함한다. 이러한, 그리고 추가로 공지된 것으로서, 본원에 기술된 제형에 사용되기 적합한 약학 담체, 부형제 및/또는 첨가제는, 예를 들어 문헌 ["Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, (2005)], 및 [the "Physician's Desk Reference", 60th ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (2005)]에 나열된 바와 같이, 당업계에 공지되어 있다. 요망되거나 요구되는 투여 방식, 용해도 및/또는 안정성에 적합한, 약학적으로 허용 가능한 담체가 선택될 수 있다.

[0142] 본원에 기술된 제형은 활성 제제(예를 들어, 항체 또는 항체 단편, 예를 들어 Fab 또는 scFv)를, 요망되는 용량에 적절한 w/v를 달성하는 농도로 포함한다. 특정 양태들에서, 제형 중 활성 제제는 약 1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml, 약 1 mg/ml 내지 약 100 mg/ml, 약 1 mg/ml 내지 약 50 mg/ml, 또는 약 1 mg/ml 내지 약 25 mg/ml의 농도로 존재한다. 특정 양태들에서, 활성 제제는 약 25 mg/ml의 농도로 존재한다. 특정 양태들에서, 제제 중 활성 제제의 농도는 약 0.1 중량% 내지 약 100 중량%로 다양할 수 있다. 특정 양태들에서, 활성 제제의 농도는 0.003 몰 내지 1.0 몰의 범위이다.

[0143] 하나의 양태에서, 본 개시내용의 제형은 내독소 및/또는 관련 발열 물질이 실질적으로 존재하지 않는 무 발열원 제형이다. 내독소는 미생물 내부에 가두어져 있다가 미생물이 분해되거나 사멸될 때에만 방출되는 독소들을 포함한다. 발열 물질은 또한 박테리아 및 기타 다른 미생물의 외막으로부터 유래하는 열 유도성, 열 안정성 물질(당 단백질)을 포함한다. 이러한 물질들 둘 다는 인간에 투여되었을 때 발열, 저혈압 및 쇼크를 유발할 수 있다. 내독소는, 잠재적 유해 효과로 말미암아 심지어 적은 양일지라도 정맥 내 투여되는 약학적 약물 용액으로부터 제거되어야 한다. 식품 의약품국("FDA")은, 정맥 내 약물 적용에 있어서 체중 1 kg에 대하여 1 시간의 기간 한 단위에 용량 당 5 내독소 유닛(EU)으로 상한치를 확립한 바 있다(The United States Pharmacopoeial Convention, Pharmacopoeial Forum 26 (1):223 (2000)). 특정한 구체적 양태들에 있어서, 조성물 중 내독소 및

발열원 수준은 10 EU/mg 미만, 또는 5 EU/mg 미만, 또는 1 EU/mg 미만, 또는 0.1 EU/mg 미만, 또는 0.01 EU/mg 미만, 또는 0.001 EU/mg 미만이다.

[0144] 본 개시내용의 제형이 생체 내 투여용으로 사용될 때, 이 제형은 멸균되어야 한다. 본 개시내용의 제형은, 멸균 여과, 방사선(radiation) 등을 포함하는 다양한 멸균 방법에 의해 멸균될 수 있다. 하나의 양태에서, 제형은 예비 멸균된 0.22 마이크론 필터로 멸균 여과된다. 주사용 멸균 조성물은 문헌["Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, (2005)]에 기술된 바와 같이 종래의 제약 실무에 따라서 제형화될 수 있다.

[0145] 본 개시내용의 치료용 조성물은 특정 투여 경로, 예를 들어 경구, 비강, 폐, 국소(혈측 및 설하 포함), 직장, 질 및/또는 장관 외 투여에 대해 제형화될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 어구 "비경구 투여" 및 "비경구 투여된"이란, 장관 내 및 국소 투여 이외의, 일반적으로 주사에 의한 투여 방식을 지칭하며, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 초 내, 관절낭 내, 안와 내, 심 내, 피 내, 복막 내, 경 기관지, 피하, 표피 하, 관절 내, 관절낭 하, 지주막하, 척추 내, 경막 외 및 흉골 내 주사 및 주입을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 국소 투여 또는 경피 투여에 적합한 본 개시내용의 제형은 분말, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 겔, 용액, 패치 및 흡입제를 포함한다. 항체는 멸균 조건 하에서 약학적으로 허용 가능한 담체, 그리고 요구될 수 있는 임의의 보존제, 완충제 또는 추진제와 함께 혼합될 수 있다(미국 특허 7,378,110; 7,258,873; 7,135,180; 미국 특허출원공개 2004-0042972; 및 2004-0042971).

[0146] 제형은 단위 투여형으로서 편리하게 제공될 수 있으며, 약업계에 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 개시내용의 약학 조성물 중 활성 성분의 실제 용량 수준은, 환자에게 유해한 영향을 미치지 않고 특성의 환자, 조성물 및 투여 방식에 대해 요망되는 치료 반응을 달성하기에 유효한 활성 성분의 양(예를 들어, "치료학적 유효량")을 얻도록 변화가 가하여질 수 있다. 선택되는 용량 수준은, 사용된 특정 조성물의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용 중인 특정 화합물의 배출률, 치료 지속기간, 사용된 특정 조성물과 함께 사용되는 기타 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료 중인 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 전반적인 건강 및 이전 병력, 그리고 의료업계에 널리 공지된 유사 인자들을 포함하여 다양한 약동학적 인자들에 의존할 것이다. 적합한 용량은 체중 1 kg 당 약 0.0001 mg 내지 약 100 mg의 범위 또는 이 이상, 예를 들어 체중 1 kg 당 약 0.1 mg, 1 mg, 10 mg 또는 50 mg일 수 있으며, 체중 1 kg 당 약 1 mg 내지 약 10 mg이 적합하다.

[0147] 본 개시내용은 이와 유사하게 진단용 및 연구용으로 적합한 제형도 또한 제조될 수 있음을 고려함에 주목한다. 이와 같은 제형 중 활성 제제의 농도뿐만 아니라, 부형제 및/또는 발열원의 존재 또는 부재는 구체적인 적용 및 의도된 용도를 기반으로 선택될 수 있다.

[0148] **용도**

[0149] 본원에 개시된 항체는 혈소판 활성화, 응집 및 탈과립화 억제제, 혈소판 탈응집 촉진제, 그리고 항 혈소판 제제의 활성을 중화하기 위한 조합 치료법을 포함한 치료 방법에 유용하다. 그러므로, 본원에 기술된 항체는 (동반 방법들을 포함하여) 티카그렐로의 투여와 관련되고, 티카그렐로 및/또는 티카그렐로의 대사 산물 1 개 이상의 효과를 중화하는 데 적합하게 유용한 다수의 응용에서 용도를 발견한다. 이와 같은 방법에서, 항체는 티카그렐로의 활성을, 선택적으로는 가역적으로 감소, 중화, 제거 또는 억제할 수 있으며, 티카그렐로 투여와 연관되고/연관되거나 티카그렐로를 포함하는 치료법에서 발생하는 임의의 수의 효과, 질환 및/또는 증상을 치료 또는 예방할 수 있다.

[0150] 항체는 치료 중인 환자, 또는 티카그렐로(BRILINTA)로서 치료 가능하고/치료 가능하거나 이에 대하여 나타내어지는 징후들, 예를 들어 불안정 협심증, 죽상경화증의 원발성 동맥 혈전 합병증, 예를 들어 혈전성 뇌졸중 또는 색전성 뇌졸중, 일과성 허혈 발작, 말초 혈관 질병, 혈전용해가 동반되거나 동반되지 않는 심근경색, 죽상경화 질병에서의 개입, 예를 들어 혈관조영술(관상 동맥 혈관조영술(PTCA), 동맥 내막 절제술, 스텐트 치환술, 관상 동맥 및 기타 다른 혈관 이식술 포함)로 말미암은 동맥 합병증, 수술에 의한 손상 또는 기계적 손상의 혈전성 합병증, 예를 들어 사고 또는 외과적 외상 후 조직 구조, 피부 및 근육 판을 포함하는 재건술, 미만성 혈전/혈소판 소모 성분에 의한 병태, 예를 들어 과중성 혈관 내 응고, 혈전성 혈소판 감소증, 용혈성 요독 증후군, 폐혈증의 혈전성 합병증, 성인 호흡 곤란 증후군, 항 인지질 증후군, 헤파린 유도성 혈소판 감소증 및 임신중독증/자간, 또는 정맥 혈전증, 예를 들어 심정맥 혈전증, 정맥폐쇄병, 혈액학적 병태, 예를 들어 골수증식성질환(혈소판 증가증 포함), 겸상 적혈구병의 치료 또는 예방; 또는 기계적으로 유도된 생체 내 혈소판 활성화, 예를 들어 심폐 우회로 및 체외 막 산소화의 예방(미세혈전색전 예방), 기계적으로 유도된 시험관 내 혈소판 활성화, 예를 들어 혈액 생성물, 예를 들어 농축혈소판 또는, 예를 들어 신장 투석 및 혈장 반출에 있어서의 섀트 패색

(shunt occlusion), 혈관 손상/염증(예를 들어, 혈관염, 동맥염, 사구체신염, 염증성 장 질환 및 장기 이식 거부)에 속발성인 혈전증, 편두통과 같은 병태의 예방을 필요로 하는 환자에게 투여될 수 있다.

[0151] 몇몇 구현예들에서, 본원에 개시된 항체는 티카그렐로를 포함하는 치료를 받고 있는 환자 또는 받은 환자와, 관상 동맥 우회로 이식(CABG), 흉부외과수술, 종격동 재탐색, 수술 후 뇌졸중, 기계적 인공호흡, 중환자실에서의 연장된 체류, 응급 비 심장 수술(예를 들어, 신경학과 또는 안과 수술, 척추 수술, 두개골 내 수술, 안와 수술, 정형외과 수술, 신절제술, 결장 반절제술 등과 연관된 출혈 또는 잠재적 출혈의 치료를 필요로 하는 환자 또는 이의 치료를 필요로 할 환자에 투여될 수 있다. 그러므로, 본원에 제공된 방법들은 공동 치료제로서 항체를, 티카그렐로와 함께 (동시) 투여하는 것, 또는 티카그렐로 투여 후 일정 기간(예를 들어, 수 분, 수 시간 또는 수 일) 이내에 투여하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 몇몇 구현예들에서, 본 방법은 티카그렐로가 투여된 지 10 분 내지 120 분 이내에 다시 티카그렐로가 투여된 환자에게 항체를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 몇몇 구현예들에서, 본 방법은 티카그렐로가 투여된 지 1 시간 내지 48 시간 이내에 다시 티카그렐로가 투여된 환자에게 항체를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 몇몇 구현예들에서, 항체는, 티카그렐로 및/또는 이의 대사 산물의 피험체로부터의 제거 및 대사가 허용되지 않는 일정 기간 이내에 티카그렐로가 투여된 피험체에 투여된다.

[0152] 몇몇 구현예들에서, 본 개시내용은 티카그렐로 또는 이의 활성 대사 산물의 환자 내 (P2Y₁₂) 수용체에 대한 영향을 억제하는 방법을 제공한다.

[0153] 몇몇 구현예들에서, 본 개시내용은 티카그렐로 또는 이의 활성 대사 산물의 환자 내 P2Y₁₂ 수용체와의 결합을 억제하는 방법을 제공한다.

[0154] 몇몇 구현예들에서, 본 개시내용은 티카그렐로가 투여된 환자 내에서 ADP-유도성 혈소판 응집을 활성화하는 방법을 제공한다.

[0155] 본 개시내용의 항체, 예를 들어 실시예에 예시된 항체는 또한 진단의 목적으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 1 개 이상의 표적 체제(티카그렐로 또는 이의 대사 산물)는 피험체의 조직 또는 세포 내에서 검출될 수 있으며, 그 결과 피험체 내 티카그렐로의 혈중량을 측정 또는 스크리닝할 수 있다. 진단 키트는 1 개 이상의 항체와, 항체 및 (존재한다면) 티카그렐로 또는 이의 대사 산물의 반응을 나타내기 위한 검출 계를 포함할 수 있다.

[0156] 그러므로, 본 개시내용은 항체에 대한 치료 용도, 진단 용도 및 연구 용도를 포함하여 다수의 용도들을 고려한다. 진단 용도 및 연구 용도는 생체 내 또는 생체 외 용도일 수 있다.

[0157] **키트**

[0158] 본 개시내용의 다른 양태는 키트이다. 하나의 양태에서, 키트는 상기 기술된 핵산, 항체, 발현 벡터 또는 숙주 세포의 조성물들 또는 약학 조성물들 중 임의의 것, 그리고 적절한 사용 또는 투여를 안내하는 지침 및 라벨을 포함한다. 선택적으로 키트는 또한 운반이나 사용을 촉진하기 위한 용기 및/또는 시린지 또는 기타 다른 디바이스 1 개 이상을 포함할 수 있다. 본 개시내용은 연구 검정이나 진단 검정을 수행하기 위하고/위하거나, 치료학적 유효량을 투여하기 위한 부품들 전부 또는 임의의 하위 세트가 키트 내에 포함될 수 있는 것으로 간주한다. 이와 유사하게, 키트는, 예를 들어 본 개시내용의 항체를 암호화하는 핵산을 발현하는 숙주 세포를 적합한 조건 하에서 배양함으로써 항체를 제조하기 위한 지침을 포함할 수 있다. 추가의 예를 들면, 본 개시내용의 항체의 치료를 위한 투여용인 키트는 항체의 동결 건조된 제조물 또는 항체의 약학 제형을 함유하는 용액, 그리고 조성물의 투여를 필요로 하는 환자에게 이 조성물을 투여하는 것, 및/또는 동결건조된 제품의 재구성에 대한 지침을 포함할 수 있다. 특정 구현예들에서, 키트는 피험체에의 투여에 적절한 제형 중 티카그렐로(예를 들어, BRILINTA™, BRILIQUE™)를 추가로 포함할 것이다. 이와 같은 구현예들에서, 키트는 항체, 티카그렐로, 또는 항체와 티카그렐로 둘 다가 사용되는 치료를 필요로 하는 환자에 항체 및 티카그렐로 제형 둘 다를 투여하는 것에 대한 지침을 추가로 포함할 수 있다.

[0159] 본 개시내용은 또한 완성되어 포장 및 라벨이 붙여진 약학 제품을 포함한다. 이 제조 물품은, 적절한 그릇 또는 용기, 예를 들어 유리 바이알, 또는 기타 다른 밀봉 차단된 용기 내에 적절한 단위 투여형을 포함한다. 비경구 투여에 적합한 투여형의 경우, 활성 성분, 예를 들어 상기 기술된 항체, 및/또는 티카그렐로 제형은 멸균된 것으로서, 미립자 불포함 용액(particulate free solution)으로서 투여되기에 적합하다. 특정 양태들에서, 제형은 주사 가능 투여 경로에 적합하다. 몇몇 구현예들에서, 투여는 피하 투여이다. 몇몇 구현예들에서, 투여는 정맥 내 투여이다. 그러므로, 인간 또는 동물에의 주사 또는 주입을 포함하는 투여 경로가 고려된다.

[0160] 특정 양태에서, 본 개시내용의 제형은 단일 용량 바이알에 멸균 액체로서 제형화된다. 예시적 용기로서는 바이

알, 보틀, 예비 충전 시린지, IV 백, (1 개 이상의 알약을 포함하는) 블리스터 팩을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 선택적으로 약제 또는 생체 산물의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 당국에 의해 규정된 형태의 공지문, 즉 인간의 진단 및/또는 인간에의 투여를 위한 제조, 사용 또는 판매에 관한 당국의 승인을 반영하는 공지문은 이와 같은 용기(들)에 부착될 수 있다.

[0161] 임의의 약학 제품과 연관되는 바와 같이, 물질 및 용기의 포장은 보관 및 운송시 제품의 안정성을 보호하도록 설계된다. 뿐만 아니라, 본 개시내용의 제품은 사용에 관한 지침, 또는 전문의, 기술자 또는 환자에게 미지의 질병 또는 질환을 적절하게 예방 또는 치료하는 방법에 대해 조언하는 기타 다른 유의한 자료를 포함한다. 다시 말해서, 본 제조 물품은 실제 용량, 모니터링 절차 등과, 기타 다른 모니터링 정보(이에 한정되는 것은 아님)를 포함하여 투여 계획을 지시 또는 암시하는 지침수단을 포함한다.

[0162] 진단 검정용 키트는 본 개시내용의 항체를 함유하는 용액 또는 이 항체의 동결 건조된 제조물을 포함할 수 있는데, 이 경우 항체는 티카그렐로 및/또는 이의 대사 산물뿐만 아니라, 이와 같은 항체를 검출하기 위한 시약과 특이적으로 결합한다. 항체는 당업계에 공지된 방법에 따라서, 그리고 본원에 기술된 바와 같이, 소 분자 형광 태그, 단백질, 예를 들어 바이오틴, GFP 또는 기타 다른 형광 단백질, 또는 에피토프 서열, 예를 들어 his 또는 myc를 포함하는(이에 한정되는 것은 아님) 표지로 표지화될 수 있다. 이와 유사하게, 항체의 검출에 사용되는 1차 항체는 키트 내에 포함될 수 있다. 1차 항체는, 항체의 서열에 대해 생성될 수 있거나, 또는 항체를 표지하는 표지, 태그 또는 에피토프에 대해 생성될 수 있다. 결과적으로, 1차 항체는 검출을 위해 표지될 수 있거나, 또는 신호가 추가로 증폭되는 것이 요망되면, 1차 항체는 키트에 또한 포함될 수도 있는 2차 항체에 의해 검출될 수 있다.

[0163] 연구용 키트도 또한 고려된다. 이와 같은 키트는, 예를 들어 진단용 또는 치료용으로 의도된 키트와 유사할 수 있으나, 키트 및 이의 용도가 연구 목적에만 국한됨을 명시하는 라벨도 추가로 포함할 수 있다.

[0164] **실시예**

[0165] **축약어 목록**

[0166]	<u>축약어</u>	<u>설명</u>
[0167]	ACN	아세토니트릴
[0168]	br	광폭
[0169]	BSA	소 혈청 알부민
[0170]	CV	컬럼 용적
[0171]	d	이중향
[0172]	dd	이중 이중향
[0173]	DCM	디클로로메탄
[0174]	DMF	N,N-디메틸포름아미드
[0175]	DMSO	디메틸설폭시드
[0176]	DPBS	Dulbecco 인산염 완충 염수
[0177]	EDC	1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드
[0178]	EtOAc	아세트산에틸
[0179]	FA	포름산
[0180]	HOAc	아세트산
[0181]	HPLC	고성능 액체 크로마토그래피
[0182]	HRMS	고해상 질량분광분석법
[0183]	HTS	고 처리량 스크린

[0184]	HTRF [®]	균일 시간 해상 형광도
[0185]	HYFLO [®]	탄산나트륨 처리 용제 소결 필터 보조제
[0186]	Hz	헤르츠
[0187]	J	결합 상수
[0188]	LC	액체 크로마토그래피
[0189]	m	다중항
[0190]	MS	질량 스펙트럼
[0191]	NMR	핵 자기 공명
[0192]	OAc	아세트산염
[0193]	Pd/C	숯 상 팔라듐
[0194]	pM	피코몰
[0195]	PK/PD	약동학/약력학
[0196]	KF	플루오르화칼륨
[0197]	q	사중항
[0198]	r. t.	실온
[0199]	s	일중항
[0200]	sat.	포화
[0201]	scFv	단일 사슬 가변 단편
[0202]	t	삼중항
[0203]	TFA	트리플루오로아세트산
[0204]	TEA	트리에틸아민
[0205]	TBME	<i>tert</i> -부틸 메틸 에테르
[0206]	THF	테트라하이드로푸란
[0207]	TIM	티카그렐로 비활성 대사 산물
[0208]	TLC	박층 크로마토그래피
[0209]	TR-FRET	시간 해상 형광도 공명 에너지 전달

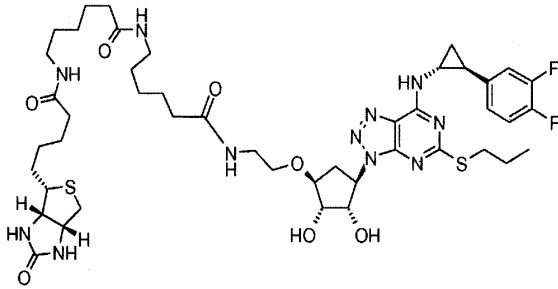
[0210] **실시예 1: 합텐의 제조 및 특성규명**

[0211] 본 실시예는, 본원에 기술된 바와 같은 예시적 항체들을 생성하는 데 사용되었던 몇몇 합텐의 합성, 최적화, 분리 및 특성규명 방법을 기술한다. 합텐은 티카그렐로, 티카그렐로 대사 산물(TAM 및 TIM), 바이오틴화 티카그렐로, 그리고 바이오틴화 아데노신을 포함한다(예를 들어, 바이오틴화되지 않은 형태의 화학적 합텐 구조에 대한 도 2 참조). 티카그렐로를 국제 특허 공개 WO 2000/034283(Guile et al., 2000)에 기술된 바와 같이 합성하고, TAM을 국제 특허 공개 WO 1999/005143(Guile et al., 1999)에 기술된 바와 같이 합성하였으며, 상기 국제 특허 공개 각각은 전체가 참조로 포함되어 있다.

[0212] 실리카 겔 40S, 40M, 12i 또는 Merck 실리카 겔 60(0.063 mm 내지 0.200 mm)을 사용하여 직선 상 크로마토그래피를 수행하였다. 표준 유리 컬럼 또는 플라스틱 컬럼을 사용하거나 또는 Biotage Horizon 계 상에서 플래시 크로마토그래피를 수행하였다. 내부 표준으로서 용매를 사용할 때의 화학 이동을 ppm으로 제공하였다. NMR에서 검출될 때에만 이중 원자 상 양성자, 예를 들어 NH 및 OH 양성자를 보고하였으므로, 생략되는 경우도 있을 수 있었다.

[0213] 실시예 1.1: 바이오틴화 티카그렐로

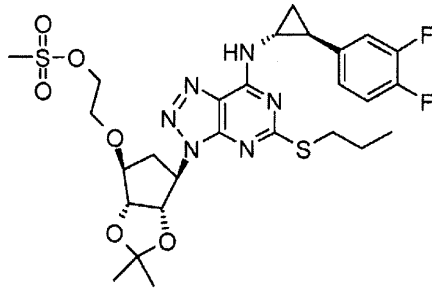
[0214] N-(2-(((1S,2S,3S,4R)-4-(7-(((1R,2S)-2-(3,4-디플루오로페닐)사이클로프로필)아미노)-5-(프로필티오)-3H-[1,2,3]트리아졸로[4,5-d]피리미딘-3-일)-2,3-디하이드록시사이클로펜틸)옥시)에틸)-6-(6-(5-((3aS,4S,6aR)-2-옥소헥사하이드로-1H-티에노[3,4-d]이미다졸-4-일)펜탄아미도)헥산아미도)헥산아미드(1.1)



(1.1)

[0215]

[0216] (i) 2-(((3aR,4S,6R,6aS)-6-(7-(((1R,2S)-2-(3,4-디플루오로페닐)사이클로프로필)아미노)-5-(프로필티오)-3H-[1,2,3]트리아졸로[4,5-d]피리미딘-3-일)-2,2-디메틸테트라하이드로-3aH-사이클로펜타[d][1,3]디옥솔-4-일)옥시)에틸 메탄설폰산염(1.a)의 제조



(1.a)

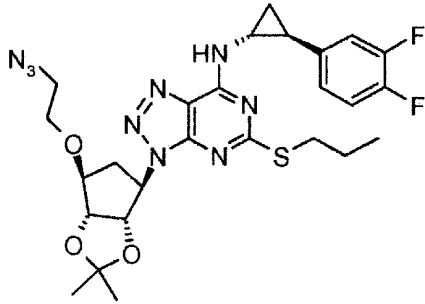
[0217]

[0218] 0°C에서 염화메탄설포닐(0.086 ml, 1.10 mmol)을, DCM(5 ml) 중 2-(((3aR,4S,6R,6aS)-6-(7-(((1R,2S)-2-(3,4-디플루오로페닐)사이클로프로필)아미노)-5-(프로필티오)-3H-[1,2,3]트리아졸로[4,5-d]피리미딘-3-일)-2,2-디메틸테트라하이드로-3aH-사이클로펜타[d][1,3]디옥솔-4-일)옥시)에탄올(문헌[Springthorpe, B. *et. al.* Bioorg.Med. Chem. Lett., 2007, 17, 6013-6018] 참조)(0.563 g, 1.0 mmol) 및 TEA(0.209 ml, 1.50 mmol)의 용액에 적가하였다. 이 혼합물을 3 시간에 걸쳐 0°C 내지 약 5°C에서 교반하였다. 반응 혼합물을 DCM(30 ml)으로 희석한 다음, 물(5 ml)로 세정하였다. 혼합물을 상 분리기에 통과시켜 건조하였다. 용매를 증발 및 톨루엔으로부터의 공비 시킨 결과, 표제 화합물(1.a)(714 mg, 111%)을 황색의 진한 오일로서 제공하였는데, 이는 추가의 정제를 거치지 않고 미정제물로서 사용되었다.

[0219] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.02 (dd, 3H), 1.3 - 1.47 (m, 5H), 1.55 (s, 3H), 1.72 (d, 2H), 2.20 (d, 1H), 2.6 - 2.71 (m, 2H), 2.97 (s, 3H), 3 - 3.19 (m, 3H), 3.57 - 3.68 (m, 1H), 3.69 - 3.79 (m, 1H), 4.02 (td, 1H), 4.13 - 4.24 (m, 2H), 4.78 (dd, 1H), 5.13 (td, 1H), 5.57 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 7.07 - 7.16 (m, 2H).

[0220] ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -141.37 (J = 21.3), -138.10 (J = 21.3).

[0221] (ii) 3-((3aS,4R,6S,6aR)-6-(2-아지도에톡시)-2,2-디메틸테트라하이드로-3aH-사이클로펜타[d][1,3]디옥솔-4-일)-N-(((1R,2S)-2-(3,4-디플루오로페닐)사이클로프로필)-5-(프로필티오)-3H-[1,2,3]트리아졸로[4,5-d]피리미딘-7-아민(1.b)의 제조



(1.b)

[0222]

[0223]

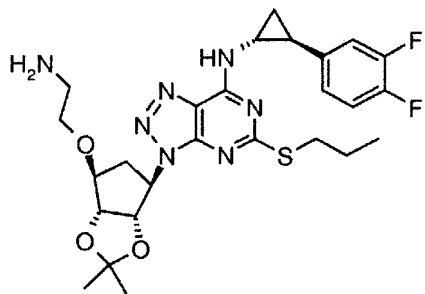
질소 대기 하에 DMF(7 ml) 중 2-(((3aR,4S,6R,6aS)-6-(7-(((1R,2S)-2-(3,4-디플루오로페닐)사이클로프로필)아미노)-5-(프로필티오)-3H-[1,2,3]트리아졸로[4,5-d]피리미딘-3-일)-2,2-디메틸테트라하이드로-3aH-사이클로펜타[d][1,3]디옥솔-4-일)옥시)에틸 메탄설포산염(1.a)(0.641 g, 1 mmol) 및 나트륨 아지드(0.070 ml, 2.00 mmol)의 혼합물을 15.5 시간 동안 60°C까지 가열하였다. 백색 침전물이 형성되었다. 여기에 물(20 ml)을 첨가하고, 생성물을 TBME로 2 회 추출하였다(100 ml + 40 ml). 유기상을 Na₂SO₄ 상에서 건조하였다. 유기상을 여과한 다음, 용매를 감압 하에 제거하였다. 잔류물을 2 cm × 8 cm 실리카 컬럼 상 플래시 크로마토그래피(용리액으로서 헵탄/EtOAc 1/1 사용)(헵탄/EtOAc 1/1 사용 TLC(Rf 프로덕트 = 0.5))에 의해 정제하였다. 관련 분획들을 수집하고, 용매를 증발시킨 결과, 표제 화합물(1.b)(514 mg, 87%)을 투명하고 진한 오일로서 제공하였다.

[0224]

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.00 (s, 3H), 1.33 - 1.42 (m, 5H), 1.59 (s, 3H), 1.73 (d, 2H), 2.17 (s, 1H), 2.68 (t, 2H), 2.96 - 3.17 (m, 3H), 3.19 - 3.33 (m, 2H), 3.52 - 3.63 (m, 1H), 3.72 (ddd, 1H), 4.03 (td, 1H), 4.79 (dd, 1H), 5.13 (td, 1H), 5.54 (dd, 1H), 6.43 (s, 1H), 6.96 - 7.23 (m, 3H).

[0225]

(iii) 중간체 3-((3aS,4R,6S,6aR)-6-(2-아미노에톡시)-2,2-디메틸테트라하이드로-3aH-사이클로펜타[d][1,3]디옥솔-4-일)-N-((1R,2S)-2-(3,4-디플루오로페닐)사이클로프로필)-5-(프로필티오)-3H-[1,2,3]트리아졸로[4,5-d]피리미딘-7-아민(1.c)의 제조



(1.c)

[0226]

[0227]

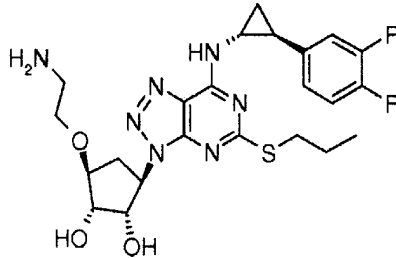
EtOH(99.5%)(2 ml) 중 3-((3aS,4R,6S,6aR)-6-(2-아미노에톡시)-2,2-디메틸테트라하이드로-3aH-사이클로펜타[d][1,3]디옥솔-4-일)-N-((1R,2S)-2-(3,4-디플루오로페닐)사이클로프로필)-5-(프로필티오)-3H-[1,2,3]트리아졸로[4,5-d]피리미딘-7-아민(1.b)(62.0 mg, 0.11 mmol)을 Pd/C(5% Pd, 50 wt% Pd/C, 22.46 mg, 5.28 μmol)에 첨가한 다음, 이 혼합물을 대기압 하에 2 시간 동안 수소화하였다. 반응 혼합물을 HYFLO[®]를 통과시켜 여과한 다음, 플러그를 EtOH(99.5%)로 더 행구었다. 용매를 감압 하에서 제거한 다음, 잔류물을 DCM 중에 재용해하였으며 (2 × 2 ml), 용매를 감압 하에 제거하였다. 잔류물을 2 cm × 8 cm 실리카 컬럼 상 플래시 크로마토그래피(용리액으로서 MeOH 중 DCM/NH₃(포화) 95/5 사용)에 의해 정제하였다. 관련 분획들을 수집한 결과, 표제 화합물(1.c)(41 mg, 69%)을 제공하였다.

[0228]

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.98 (m, 3H), 1.28 - 1.46 (m, 7H), 1.54 (s, 3H), 1.62 - 1.81 (m, 2H), 2.15 (s, 1H), 2.48 - 2.81 (m, 4H), 3.07 (tt, 3H), 3.34 - 3.47 (m, 1H), 3.53 (ddd, 1H), 3.99 (td, 1H), 4.79 (dd, 1H), 5.12 (td, 1H), 5.52 (dd, 1H), 7.02 (s, 1H), 7.09 (dt, 2H), 7.23 (s, 1H).

[0229] ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -141.43 ($J = 21.3$), -138.13 ($J = 21.3$).

[0230] (iv) 중간체
 (1S,2S,3S,5R)-3-(2-아미노에톡시)-5-(7-(((1R,2S)-2-(3,4-디플루오로페닐)사이클로프로필)아미노)-5-(프로필티오)-3H-[1,2,3]트리아졸로[4,5-d]피리미딘-3-일)사이클로펜탄-1,2-디올(**1.d**)의 제조



(1.d)

[0231]

[0232] 예비 냉각한 얼음/물 조 온도에서, TFA(8 ml, 103.84 mmol) 및 물(0.88 ml, 48.85 mmol)의 혼합물을, 3-((3aS,4R,6S,6aR)-6-(2-아미노에톡시)-2,2-디메틸테트라하이드로-3aH-사이클로펜타[d][1,3]디옥솔-4-일)-N-(((1R,2S)-2-(3,4-디플루오로페닐)사이클로프로필)-5-(프로필티오)-3H-[1,2,3]트리아졸로[4,5-d]피리미딘-7-아민(**1.c**))(340 mg, 0.61 mmol)이 담긴 예비 냉각 플라스크에 첨가하였다. 반응 혼합물을 0°C 내지 5°C에서 1 시간 동안 교반하였다. 감압 하에서 용매를 제거한 다음, 잔류물을 DCM(100 ml) 중에 용해한 다음, 이를 NaHCO_3 (포화 10 ml)로 세정하였다. 수성상에 염수(5 ml)를 첨가한 다음, 이를 EtOAc(30 ml)로 추출하였다. 합한 유기상들을 Na_2SO_4 상에서 건조하였다. 여과 후 용매를 증발시킨 결과, 미정제 생성물을 회백색 고체로서 제공하였다. 화합물을 XBridge C18 컬럼(10 μm 250 \times 50 ID mm) 상 예비 HPLC(20 분에 걸쳐 $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{NH}_3$ 95/5/0.2 완충액 중 35% 내지 75% ACN 구배, 유속 100 ml/분)에 의해 정제하였다. 화합물을 298 nm에서 UV로 검출하였다. 피크 분획들을 감압 하에 증발시켜 건조하였다. 잔류물을 DCM 중에 용해하고 나서, 상 분리기를 통해 여과하였다. 감압 하에 용매를 제거한 결과, 표제 화합물(**1.d**)(213 mg, 67.5%)을 제공하였다. LC-MS m/z 522.3 ($\text{M}+\text{H}^+$)

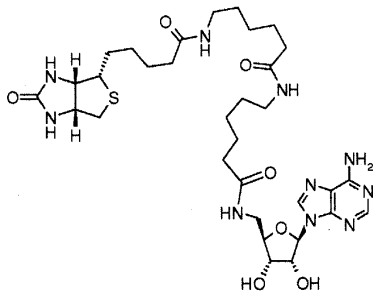
[0233] (v) 화합물 N-(2-(((1S,2S,3S,4R)-4-(7-(((1R,2S)-2-(3,4-디플루오로페닐)사이클로프로필)아미노)-5-(프로필티오)-3H-[1,2,3]트리아졸로[4,5-d]피리미딘-3-일)-2,3-디하이드록시사이클로펜틸)옥시)에틸)-6-(6-(5-(((3aS,4S,6aR)-2-옥소헥사하이드로-1H-티에노[3,4-d]이미다졸-4-일)펜탄아미도)헥산아미도)헥사노에이트(21.77 mg, 0.04 mmol)를, 무수 DMF(1.0 ml) 중 (1S,2S,3S,5R)-3-(2-아미노에톡시)-5-(7-(((1R,2S)-2-(3,4-디플루오로페닐)사이클로프로필)아미노)-5-(프로필티오)-3H-[1,2,3]트리아졸로[4,5-d]피리미딘-3-일)사이클로펜탄-1,2-디올(20 mg, 0.04 mmol)의 용액에 첨가하고 나서, 이 혼합물을 질소 대기 하에 방치한 다음, 실온에서 6 시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에 40°C에서 제거하였다. 화합물을 Kromasil C18 컬럼(10 μm , 250 \times 20 ID mm, 20 분에 걸쳐 $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{FA}$ 95/5/0.2 완충액 중 20% 내지 60% ACN 구배 적용; 유속 19 ml/분) 상 예비 HPLC로 정제하였다. 화합물을 298 nm에서 UV에 의해 검출하였다. 피크 분획들을 수집하여, 농축한 다음, 동결 건조한 결과, 표제 화합물(**1.1**)(21.4 mg, 57.3%)을 제공하였다.

[0234] ^1H NMR (600 MHz, DMSO): 회전이성체 2 개 존재(비율 5:1), δ 0.81 (t, 3H)에서 주 회전이성체로부터 나오는 신호들, 1.15 - 1.64 (m, 20H), 2.03 (ddd, 7H), 2.12 (ddd, 1H), 2.57 (d, 1H), 2.59 - 2.67 (m, 1H), 2.77 - 2.89 (m, 2H), 2.93 (dd, 1H), 2.96 - 3.01 (m, 4H), 3.05 - 3.12 (m, 1H), 3.15 (td, 1H), 3.18 - 3.25 (m, 2H), 3.39 - 3.46 (m, 1H), 3.48 (tt, 1H), 3.7 - 3.76 (m, 1H), 3.92 (s, 1H), 4.08 - 4.14 (m, 1H), 4.30 (dd, 1H), 4.54 (dd, 1H), 4.95 (q, 1H), 5.06 (s, 1H), 5.13 (d, 1H), 6.35 (s, 1H), 6.42 (s, 1H), 7.07 (d, 1H), 7.31 (ddt, 2H), 7.71 (dt, 2H), 7.82 (t, 1H), 9.36 (d, 1H). δ 0.98 (CH_3)에서 부 회전이성체로부터 나오는 선택 신호, 8.95 (ArNH).

[0235] [C45H65F2N11O7S2] $^+$ 에 대해 산정된 HRMS: 974.4556; 실측치: 974.4585 ($\text{M}+\text{H}^+$)

[0237] 실시예 1.2: 바이오틴화된 아데노신

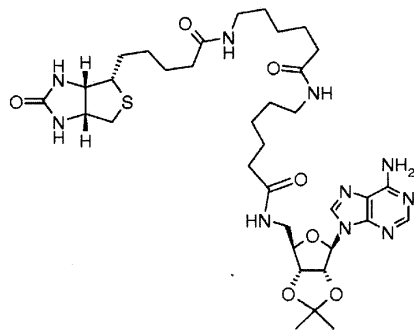
[0238] N-(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-퓨린-9-일)-3,4-디하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메틸)-6-(6-(5-((3aS,4S,6aR)-2-옥소헥사하이드로-1H-티에노[3,4-d]이미다졸-4-일)펜탄아미도)헥산아미도)헥산아미드(1.2)



(1.2)

[0239]

[0240] (i) N-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-아미노-9H-퓨린-9-일)-2,2-디메틸테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메틸)-6-(6-(5-((3aS,4S,6aR)-2-옥소헥사하이드로-1H-티에노[3,4-d]이미다졸-4-일)펜탄아미도)헥산아미도)헥산아미드(1.e)의 제조



(1.e)

[0241]

[0242] 실온에서 DMF(2 ml)를 2,5-디옥스포리딘-1-일-6-(6-(5-((3aS,4S,6aR)-2-옥소헥사하이드로-1H-티에노[3,4-d]이미다졸-4-일)펜탄아미도)헥산아미도)헥사노에이트(55.6 mg, 0.10 mmol) 및 9-((3aR,4R,6R,6aR)-6-(아미노메틸)-2,2-디메틸테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)-9H-퓨린-6-아민(30 mg, 0.10 mmol)에 첨가한 다음(문헌[Austin, D.J. and Liu, F., Tetrahedr. Lett., 2001, 3153-3154] 참조), 이 반응 혼합물을 질소 대기 하에 방치한 후, 1 시간 45 분 동안 교반한 결과, (1.e)을 제공하였다. 이후 용매를 감압 하에서 제거하였다. 추가의 정제를 거치지 않고 미정제 생성물을 사용하였다. LC-MS m/z 759 (M+H)⁺, 757 (M-H)⁻

[0243] (ii) 최종 화합물 N-(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-퓨린-9-일)-3,4-디하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메틸)-6-(6-(5-((3aS,4S,6aR)-2-옥소헥사하이드로-1H-티에노[3,4-d]이미다졸-4-일)펜탄아미도)헥산아미도)헥산아미드(1.2)의 제조

[0244] TFA(1.8 ml, 23.36 mmol) 및 물(0.2 ml, 11.10 mmol)의 혼합물을 미정제 N-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-아미노-9H-퓨린-9-일)-2,2-디메틸테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메틸)-6-(6-(5-((3aS,4S,6aR)-2-옥소헥사하이드로-1H-티에노[3,4-d]이미다졸-4-일)펜탄아미도)헥산아미도)헥산아미드(1.e)(76 mg, 0.1 mmol)에 첨가한 다음, 이 반응 혼합물을 0°C에서 1 시간 25 분 동안 교반하였다. 감압 하에서 용매를 제거한 다음, 잔류물을 DMSO 중에 용해하였다. 화합물을 XBridge C18 컬럼(10 μm, 250 × 19 ID mm) 상 예비 HPLC(20 분에 걸쳐 H₂O/ACN/NH₃ 95/5/0.2 완충액 중 ACN 5%에서 45% 구배, 유속 19 ml/분)로 정제하였다. 화합물을 259 nm에서 UV에 의해 검출하였다. 피크 분획들을 농축하고 나서, 동결 건조한 결과, 표제 화합물(1.2)(50 mg, 69.6%)을 백색의 솜털 모양 고체로서 제공하였다.

[0245] ¹H NMR (600 MHz, DMSO, 40°C) δ 1.17 - 1.26 (m, 4H), 1.27 - 1.4 (m, 6H), 1.43 - 1.54 (m, 7H), 1.62 (ddt, 1H), 1.99 - 2.06 (m, 4H), 2.12 (t, 2H), 2.58 (d, 1H), 2.82 (dt, 1H), 2.96 - 3.05 (m, 4H), 3.05 -

3.14 (m, 1H), 3.36 (dt, 1H), 3.44 (dt, 1H), 3.96 (dd, 1H), 4.04 (dd, 1H), 4.11 - 4.15 (m, 1H), 4.29 - 4.33 (m, 1H), 4.67 (dd, 1H), 5.16 (d, 1H), 5.38 (d, 1H), 5.84 (d, 1H), 6.29 (s, 1H), 6.33 (d, 1H), 7.25 (s, 2H), 7.64 (dt, 2H), 8.11 (t, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.31 (s, 1H). [C₃₂H₅₀N₁₀O₇S]⁺에 대한 HRMS 산정치: 719.3657; 실측치: 719.3667 (M+H)⁺

[0246] 실시예 2: 항티카그렐로/TAM 항체의 분리 및 확인

[0247] 본 실시예는, ATP와 구조적으로 유사하고 아데노신 유사 코어 부를 가지는 화합물인 티카그렐로와 이의 대사 산물에 대한 항체를 제조하는 데에 사용될 수 있는 전략 및 기법을 예시한다(Springthorpe et al 2007 Bioorg Med Chem Lett. 17:6013-6018). 티카그렐로, 티카그렐로 활성 대사 산물(TAM) 및 티카그렐로 비활성 대사 산물(TIM)의 화학 구조를 도 2에 나타내었다. 상기 개시된 바와 같이, 본원에 개시 및 생성된 항체는 티카그렐로 및 TAM에 결합하여 이를 중화할 수 있으며, TIM에도 결합할 수 있되, 다만 기타 다른 구조적으로 관련된 화합물, 예를 들어 아데노신에는 결합하지 않거나 이를 거의 억제하지 않는다. TIM에 대한 결합 활성은 본원에 개시되어 있는 항체의 선택적 특징인 한편, TIM에 대해 결합 활성을 나타내는 항체는 항체/해독제의 필요 용량에 영향을 미칠 것으로 예상되지는 않는데, 그 이유는 TIM이 통상 티카그렐로 대사 산물을 소량 또는 비 유의적 분량만큼 내기 때문이다.

[0248] 공통 에피토프, 즉 티카그렐로 및 TAM의 독특한 R기(디-플루오로페닐-사이클로프로필 및 티오프로필 치환기)를 표적화하여, 이 화합물에 대한 항체 결합 특이성 및 선택성을 부여하였다. 관심 에피토프를 점선으로 둘러싸서 표시하였다(도 2). 실시예 1에 기술된 합텐을 사용하여 디-플루오로페닐-사이클로프로필 및 티오프로필 치환기 지향 항체 에피토프를 생성하였다. 실시예 1에 기술된 바와 같이, 바이오틴화된 합텐(바이오틴화된 티카그렐로 및 바이오틴화된 아데노신)에 대한 링커를 글리콜기 상에 배치하였다. 이 전략은 비변형 디-플루오로페닐-사이클로프로필 및 티오프로필 기에 대한 결합 특이성, 즉 바이오틴화된 티카그렐로/TAM에 대한 결합 특이성을 가지는 항체의 생산을 가능하게 하였을 뿐만 아니라, 아데노신에 결합하는 항체 라이브러리의 스크리닝 및 선택해제도 가능하게 하였다.

[0249] 본원에 참조로 포함되어 있는 문헌[Lloyd et al 2009 PDS 22:159-168]에 기술된 바와 본질적으로 동일하게, 공지된 기법을 사용하여 인간 scFv 파지 전사 라이브러리를 scFv 항체 생성에 사용하였으며, 바이오틴화된 아데노신에 대해 선택해제를 진행하면서, 바이오틴화된 티카그렐로를 대상으로 일련의 반복된 선택 주기를 수행하여 상기 라이브러리로부터 특이 scFv를 분리하였다. 제2 라운드 및 제3 라운드 선택 아웃풋으로부터 다수의 개별 클론을 선택하였으며, scFv를 박테리아 주변세포질에서 발현시킨 다음, 동시진행 3 중 생화학 검정에서 특이성에 대해 스크리닝하였다. 상기 검정은 i) 바이오틴화된 티카그렐로와의 결합 능(제1 검정), ii) 바이오틴화된 아데노신과의 결합 능(제2 검정), 그리고 iii) 바이오틴화된 링커가 아닌 티카그렐로에 대한 특이성을 확인하기 위해, 비변형 티카그렐로 50 배 과량의 존재 하에서 바이오틴화된 티카그렐로와의 결합 능(제3 검정)에 대해 스크리닝하였다.

[0250] 일반 기법 및 전략과 동일한 기법 및 전략을 사용하여 제1 검정, 제2 검정 및 제3 검정을 수행하였다. 요약하면, HTRF[®] 검정 기술을 이용하여 미정제 주변세포질 scFv 시료의, 바이오틴화된 티카그렐로 또는 바이오틴화된 아데노신과의 결합에 대한 HTS를 수행하였다. HTRF[®](균일 시간 해상 형광도)는 TR-FRET(시간 해상 형광도 공명 에너지 전달)의 원리를 기반으로 한다. 요약하면, TR-FRET는 공여체 형광 단(이 경우, 유로퓸 크립테이트)으로부터 수용체 형광 단(이 경우, XL⁶⁶⁵)으로의 에너지 전달을 이용한다. 공여체 및 수용체 형광 단이 충분히 가깝게(약 10 nm 미만) 위치하면, 유로퓸 크립테이트 공여체의 여기(337 nm)는 XL⁶⁶⁵ 수용체로의 에너지 전달을 초래하는데, 이로 말미암아 665 nm에서 형광 신호가 발생하게 된다. 이 기술은, 특성의 상호작용에서 공여체 및 수용체 형광 단을(직접적으로나 간접적으로) 각각의 결합 파트너에 부착함으로써 생체 분자 상호작용들을 민감하게 측정하는 데 사용될 수 있다. 바이오틴화된 티카그렐로와 scFv 결합에 대한 HTS 포맷(제1 검정)을 이하에 제시하였는데, 이 포맷은 바이오틴화된 티카그렐로 및 his-태깅 주변세포질 scFv 둘 다에 화학 태그가 존재하는지에 달려있다:

[0251] 유로퓸 크립테이트 스트랩타비딘: 바이오틴화된 티카그렐로: scFv-His : 항 His-XL⁶⁶⁵

[0252] 본 검정을, 검정 색의 얇은 웰을 가지는 384 웰 검정 평판(Corning / Costar 3676)을 사용하여, DPBS pH7.4(Gibco 14190-086), KF(VWR 103444T)(0.4 M) 및 Tween 20(Sigma P9416)(0.05%)(검정 용적 10 ul)을 포함

하는 완충액 중에서 수행하였다. 본 검정은, 바이오틴화된 티카그렐로 5 ul(60 nM로서, 최종 농도 30 nM), 주변 세포질 scFv 시료 2 ul(최종 농도 20%), 그리고 유로폼 크립테이트 표지화 스트렙타비딘(CisBio 610SAKLB)(4.2 nM로서, 최종 농도 1.26 nM) 및 XL⁶⁶⁵ 표지화 항-His 항체(CisBio 61HISXLB)(40 nM로서, 최종 농도 12 nM) 둘 다를 함유하는 용액 3 ul을 첨가하여 준비하였다. 상기 검정 성분들 전부를 함유하는 네거티브 결합 대조군 웰을 준비하였는데, 다만 주변세포질 scFv 대신 검정 완충액 2 ul를 첨가하였다. 검정 평판들을 RT에서 4 시간 동안 항온처리한 다음, 표준 HTRF 관독 프로토콜을 사용하여 Envision 평판 판독기상에서 판독하였는데, 이때 시료들을 337 nm에서 여기시켰으며, 시간 해상 형광 방출은 620 nm와 665 nm 둘 다에서 측정하였다.

[0253] 미가공 665 nm 및 620 nm 카운트를 처음에 665 nm/620 nm 비율의 값으로 전환한 후, 그 결과를 델타 F(%) 값으로 표현하였다. 델타 F를 이하 등식에 따라서 산정하였다:

[0254]
$$\text{델타 F(\%)} = \{((\text{시료 } 665/620 \text{ 비율}) - (\text{네거티브 } 665/620 \text{ 비율})) / (\text{네거티브 } 665/620 \text{ 비율})\} \times 100$$

[0255] (네거티브 비율은 네거티브 결합 대조군 웰로부터 구하였다). 델타 F 값을 100% 초과로 보이는 scFv를 본 검정에서 히트(hit)로서 규정하였다.

[0256] 상기 기술된 바와 동일한 프로토콜을 사용하여 바이오틴화된 아테노신(최종 검정 농도 30 nM)과의 결합에 대해 미정제 주변세포질 scFv 시료의 HTS를 수행하였다. 제2 검정 포맷은 이하에 제시된 바와 같이 표현될 수 있다:

[0257] 유로폼 크립테이트 스트렙타비딘: 바이오틴화된 아테노신: scFv-His: 항-His-XL⁶⁶⁵

[0258] 제3 검정은, 과량의 유리 비변형 티카그렐로 존재 하에서 바이오틴화된 티카그렐로와의 감소한 결합을 나타내는 미정제 주변세포질 scFv 시료를 확인하였던 HTS를 수행하기 위해 상기 기술된 바와 동일한 프로토콜을 이용하였다. 제3 검정은 50 배 몰 과량(1500 nM)의 유리 비변형 티카그렐로 존재 하에 수행되었다는 점에서 이 프로토콜은 제1 검정의 수정된 방법이었다.

[0259] 히트를, 바이오틴화된 티카그렐로와의 결합(제1 검정에 있어서, 델타 F > 100%), 바이오틴화된 아테노신과의 비결합(제2 검정에 있어서, 델타 F < 25%) 및 과량의 유리 비변형 티카그렐로의 존재 하에서의 바이오틴화된 티카그렐로와의 50% 초과 감소한 결합으로서 정의하였다. 제1 검정 및 제3 검정으로부터 얻어진 데이터의 예시적 상관관계를 도 3에 나타내었다. 다수의 scFv는, 과량의 유리 비변형 티카그렐로 존재 하에 제한된 억제를 나타냈는데, 이는 이 scFv가 티카그렐로의 몇몇 성분 및 링커와 결합 상호작용을 하였음을 암시한다. scFv의 하위세트를 확인하였는데, 여기서 바이오틴화된 티카그렐로와의 결합은, 과량의 유리 비변형 티카그렐로 존재 하에서 (50% 초과하여) 억제되었다. 제3 검정에서 관찰되는 결합 억제 % 대 제1 검정에서 관찰되는 결합 억제 %(50% 내지 80%, 80% 내지 90%, 90% 초과)를 바탕으로 scFv에 등급을 매겼는데, 이때 추가의 특성구명을 위해 90% 초과 억제율을 제공하는 scFv(TICA0072 포함)를 우선적으로 처리하였다. 서열 특이 scFv 히트를 Fab으로 전환하였으며, 표준 기법을 이용하여 CHO 세포 내에서 발현시켰다.

[0260] *Fab 발현 및 정제*

[0261] 별도의 HC 및 LC 발현 플라스미드들을, Persic외 다수(1997)에 의해 기술된 발현 벡터들을 바탕으로 하는 일시적 형질감염을 위해 사용하였다. 벡터들을 변형하여 EBV 복제 기원(*oriP*)을 함유하도록 만들었다. Fab(HC) 벡터는 오로지 불변 영역 1(CH1) 및 힌지 영역만을 함유하였으며, CH2 및 CH3은 제거하였다. 제조자의 권고에 따라서, HC 및 LC DNA를 150 mM NaCl 및 25-kDa 선형 PEI(Polysciences Europe, Germany 23966)에 첨가하였다. 이후, 현탁 배양에 적응시킨 CHOK1 세포주(ECACC No:85051005)로부터 유래한 중국 햄스터 난소 야생형(CHO wt) 세포에 DNA-PEI 복합체를 첨가하였다(Daramola 0, *et al* 2014). 7 일 경과 후, 세포를 원심분리에 의해 수확한 다음, 상청액을 여과하였다. Fab 단백질을 함유하는 세포 배양 상청액을, CaptureSelect IgG-CH1(Life Technologies, Carlsbad, USA) 5 ml로 팩킹한 크로마토그래피 컬럼 상에 직접 로딩하였다(유속 5 ml/분, Äkta Purifier(GE Healthcare) 사용). 수지 제조자의 지시에 따라서, 컬럼을 평형화한 다음, 인산염 완충 염수(PBS)(pH 7.2)로 세정하고 나서, 시트르산나트륨 20 mM, 염화나트륨 150 mM(CaptureSelect IgG-CH1)을 이용하여 용리하였다(pH 3.5). 용리된 Fab의 pH를 5.5로 맞추고 나서, 여과한 다음(0.22 µm Steriflip, Millipore EMD, Bethdesa, USA), 분석하였다. DU520 UV/vis 분광분석계(Beckman Coulter, Brea, USA)를 사용하여 280 nm에서의 흡광도에 의해 단백질 농도를 측정하였다. TSKgel G3000SWxl 컬럼(Tosoh Bioscience, Tokyo, Japan) 및 1100 HPLC 계(Agilent Technologies, Santa Clara, USA)(1.0 ml/분으로 전개)를 사용하여 시료의 순도를 측정하였다.

[0262] **실시예 3: 항 티카그렐로/TAM Fab**

[0263] 시판되는 약물을 포함하는 구조 데이터베이스(본원에 참조로 포함된 문헌["DrugsDB", Oprea T.I et al 2011 Mol. Inform. 30(2-3), 100-111])로부터 정보를 얻어 티카그렐로와 구조적으로 어느 정도 유사한 분자들을 찾았다. 일단 분자가 찾아지면, 구조적으로 유사한 분자들을 사용하여 아데노신 및 이의 인산화된 형태들(예를 들어, ADP 및 ATP)과 Fab의 결합 특이성을 시험하였다. 티카그렐로의 X선 및 NMR 구조를 기반으로, 티카그렐로와의 2D 핑거프린트 유사성, 3D 형상 및 정전기적 유사성을 가지는 분자의 데이터베이스로 정보를 얻었다. 이러한 컴퓨터 기반 분석으로부터, 잠재적 공동 약제 6 개를 포함하였던 한 무리의 화합물들(12 개)을 선택하였다. 이러한 화합물들의 구조들을 도 4에 나타내었다.

[0264] 각각의 시험 화합물이, 바이오틴화된 티카그렐로와 관련 Fab의 상호작용을 경쟁적으로 억제하는 능력 등이 시험되었던 경쟁 결합 검정 포맷에서 특이성을 관찰하였다. 이하에 제시된 바와 같은 HTRF® 경쟁 검정 포맷을 사용하였는데, 이 검정의 목표는 한 무리의 시험 화합물들에 의한, 각각의 His-Fab과 바이오틴화 티카그렐로 결합의 경쟁을 측정하는 것이었다:

[0265] 유로폼 크립타이트 항 His 항체: 시험 His-Fab: 바이오틴화된 티카그렐로: XL⁶⁶⁵ 표지화된 스트렙타비딘.

[0266] 이 기본적 검정 포맷은 선두 분리 단계 및 선두 최적화 단계 둘 다의 종료시로부터 선두 Fab의 선택성 프로필을 평가하기 위해 사용하였으며, 이러한 연구를 위해 His-Fab 발현 벡터를 사용하여 Fab를 제조하였다.

[0267] 본 검정을, 검정 색의 얇은 웰을 가지는 384 웰 검정 평판(Corning / Costar 3676)에서 DPBS pH7.4(Gibco 14190-086), KF(VWR 103444T)(0.4 M) 및 BSA(PAA K05-013)(0.1%)를 검정 용량 20 ul로 포함하는 완충액 중에서 수행하였다. 검정의 조건은, 바이오틴화된 티카그렐로 5 ul, 각각의 시험 선택성 화합물 적정량 5 ul, 관련 His-Fab 5 ul, 그리고 유로폼 크립타이트 표지화 항 His 항체(CisBio 61HISKLB)(5.33 nM로서, 최종 농도 1.33 nM) 및 XL⁶⁶⁵ 표지화 스크렙타비딘(CisBio 611SAXLB)(40 nM로서, 최종 농도 10 nM) 둘 다를 함유하는 합한 용액 5 ul를 첨가하는 것을 수반하였다. 시험 선택성 화합물이 첨가된 대신에 검정 완충액 5 ul가 첨가되었다는 점을 제외하고 상기 검정 성분 전부를 함유하는 "총 결합 대조군 웰"을 마련하였다. His-Fab이 첨가된 대신에 검정 완충액 5 ul가 첨가되었다는 점을 제외하고 상기 "총 결합 대조군 웰"에 포함되었던 검정 성분 전부를 함유하는 "네거티브 결합 대조군 웰"을 마련하였다. 시험 화합물의 일련의 적정은, 특정 실험에 따라서 1/2 또는 1/3 중 어느 하나였고, 최고 최종 검정 화합물 농도를 화합물 특이적으로 최적화하였다. 바이오틴화된 티카그렐로 및 His-Fab의 농도를, 별도의 실험에서 Fab 특이적으로 최적화하였다. 선두 분리 단계의 종료시에 4 개의 Fab(TICA0010, TICA0049, TICA0053 및 TICA0072)를 관찰하기 위해 적용된 최종 검정 시약 농도를 이하 표 1에 제시하였다.

표 1

항체ID	[항체] (nM)	[바이오틴화 티카그렐로](nM)
TICA0039	16.0	139.9
TICA0049	16.0	37.9
TICA0053	16.0	70.7
TICA0072	8.0	17.6

[0268]

[0269] 선두 최적화 단계의 종료시에 2 개의 Fab(TICA0162 및 TICA0212)를 관찰하기 위해 적용된 최종 검정 시약 농도는, 두 경우에 있어서 바이오틴화된 티카그렐로는 5 nM이었고, His-Fab는 1 nM이었다. 이러한 실험들에서 사용된 시험 선택성 화합물들 중 몇몇을 100% DMSO 중에 용해하였으며, 검정 신호의 비이클 관련 감소는 농도 약 1%를 초과하는 DMSO에서 시작될 수 있었다. 이와 같은 비이클 관련 효과들 중 임의의 것을 교정하는 데이터의 후속 정규화를 가능하게 하기 위해서, DMSO만의 동시 수행 적정을 대부분의 실험에 포함시켰는데, 이때 최종 검정 DMSO 농도는 시험 화합물의 일련의 희석 농도를 반영하였다. 마련한 방법 후에, 상기 검정물을 RT에서 3 시간 동안 항온처리하였으며, 이후 Envision 평판 판독기 상에서 표준 판독 프로토콜을 사용하여 판독하였다.

[0270] 추후의 데이터 분석을 위해, 처음에 미가공 665 nm 및 620 nM 카운트를 665 nm/620 nm 비율 값으로 전환하였으

며, 이후 이 값들을 사용하여 제1 검정에 제시하였던 등식에 따라서 델타 F% 값들을 산정하였다. 델타 F% 산정에 사용된 네거티브 비율 값을 네거티브 결합 대조군 웰로부터 구하였다. 그 다음, 이하 등식에 따라서 특이 결합 % 값을 산정하기 위해 델타 F% 값들을 사용하였다:

[0271]
$$\text{특이 결합(\%)} = \{(\text{시료 델타 F} - \text{네거티브 결합 델타 F}) / (\text{총 결합 델타 F} - \text{네거티브 결합 델타 F})\} \times 100$$

[0272] 특이 결합 %의 표준적인 산정을 위해서, 상기 언급된 검정 성분들 전부를 함유하되, 다만 임의의 경쟁 시험 화합물을 포함하지 않았던 총 결합 대조군 웰로부터 총 결합 델타 F를 구하였다.

[0273] DMSO 정규화가 적용되었던 실험들에 있어서, DMSO 정규화 특이 결합 %는 본질적으로 상기 등식에 따라서 산정하였는데, 다만 이 경우 총 결합 델타 F는 총 결합 대조군 웰 내 성분들 모두를 함유하는 웰 뿐만 아니라, 관련 시료의 웰 내 농도와 동일한 농도로 DMSO를 함유하는 웰로부터 구하였다.

[0274] 이러한 유형의 초기 실험들로부터 얻은 결과들을 표 2에 요약하였다. 관찰되었던 4 개의 초기 Fab들 중 3 개 (TICA0010, TICA0049 및 TICA0053)에 있어서, 화합물 칸그렐로는, 바이오틴화된 티카그렐로와 Fab 결합의 경쟁적 억제를 나타내었다. TICA0049의 경우, 판토프라졸 및 린네졸리드 둘 다는 부분 경쟁 억제를 나타내었다. 표 2에 나타낸 바와 같이, TICA0072 Fab은 12 개 화합물 중 11 개로 인해 억제를 나타내지 않았고, 판토프라졸로 인해는 약한 부분 억제를 나타내었다.

[0275] 실험의 첫 번째 시리즈에서 시험된 4 개의 Fab 전부에 대해서 비변형 티카그렐로 및 TAM으로 인한 억제가 관찰되었는데, 이때 IC₅₀ 값은 0.1 μM 내지 0.5 μM의 범위에 속하였다. 4 개의 Fab 중 2 개(TICA0049 및 TICA0072)에 대해서 TIM에 의한 경쟁적 억제도 또한 검출되었으나, IC₅₀ 값은 50 μM을 초과하였는데, 이는 비변형 티카그렐로 및 TAM에 대한 친화성에 비하여 TIM에 대한 친화성이 훨씬 많이 감소하였음을 시사하는 것이다. 표 2의 결과들을 기반으로 하였을 때, TICA0072는 가장 유리한 선택성 프로필을 가지는 것으로 확인되었다. TICA0049는 기준, 즉 이 Fab가 나머지 3 개의 Fab의 경우에 비하여 칸그렐로와 최소 결합을 나타내었다는 기준을 바탕으로 하였을 때, 잠재적 백업(potential back up)인 것으로 확인되었다.

표 2

각각의 시험 Fab와 바이오틴화 티카그렐로 결합의 억제를 위한, 시험 화합물들 12개(도4), 비변형 티카그렐로, TAM 및 TIM 각각의 상대적 IC50 값들

화합물	his-Fab에 대한 다양한 화합물들의 IC50 (uM)			
	TICA0010	TICA0049	TICA0053	TICA0072
페노피브레이트	NI	NI	NI	NI
닐바디핀	NI	NI	NI	NI
실로스타졸	NI	NI	NI	NI
부클라데신	NI	NI	NI	NI
레기데노손	NI	NI	NI	NI
사이클로티아지드	NI	NI	NI	NI
사이클루트린	NI	NI	NI	NI
로바스타틴	NI	NI	NI	NI
리네졸리드	NI	467.1	NI	NI
심바스타틴	NI	NI	NI	NI
칸그렐로	102.4	207.9	17.5	NI
판토프라졸	NI	263.7	NI	498.0
티카그렐로	0.122	0.257	0.109	0.113

[0276]

TAM	0.124	0.412	0.134	0.299
TIM	NI	53.4	NI	54.4

[0277]

[0278]

(NI = 억제가 일어나지 않음)

[0279]

제2 시리즈 실험에 있어서, TICA0049 및 TICA0072 Fab에 대한 추가의 선택성 데이터를 구하였는데, 여기서 도 4에 나열된 12 개의 화합물 중 4 개의 하위 세트를 티카그렐로, TAM 및 TIM, 그리고 몇몇 아데노신 관련 화합물들과 함께 재시험하였다. 이때, 표 2에서의 더욱 이른 관찰에서 확인된 개선에 있어서, 특이 결합 % 값의 정규화에 의해 DMSO로 말미암은 임의의 비 특이 비이클 관련 효과를 교정할 수 있도록 실험을 설계하였다. 이 제2 시리즈 실험으로부터의 예시적 플롯화 데이터를 표 3에 표로서 제시한 IC₅₀ 값과 함께 도 5에 나타내었다.

표 3

경쟁 결합 선택성 연구에서, 도4에 나열된 화합물 12개중 4개의 하위세트, 티카그렐로, TAM, TIM 및 몇몇 아데노신 군 화합물들에 대한 예시적 IC₅₀ 결과들(DMSO 정규화)

화합물	TICA0049	TICA0072
아데노신	NI	NI
ADP	NI	NI
2MeS ADP	NI	NI
ATP	NI	NI
2 MeS ATP	NI	NI
부클라데신	864.9	NI
리네졸리드	902.0	NI
칸그렐로	188.4	NI
판토프라졸	243.5	1546.0
티카그렐로	0.368	0.356
TAM	0.366	0.483
TIM	74.8	119.5

[0280]

[0281]

더 먼저 행하여진 실험에서와 같이, TICA0072는 가장 유리한 선택성 프로필을 나타내었는데, 이 경우 시험된 화합물 4 개 중 오로지 판토프라졸만이 약한 부분 억제(IC₅₀ > 1500 μM)를 나타내었다. TICA0049의 경우, 칸그렐로 및 판토프라졸에 의한 상당한 억제가 관찰되었고, 이때 리네졸리드와 부클라데신에 대해서는 약한 억제가 관찰되었다. 제1 시리즈 실험과 제2 시리즈 실험 간 특정 시험 화합물에 대한 IC₅₀ 절대값의 미묘한 차이는 근본적으로 전체 결과들을 바꾸진 않았음에 주목하여야 한다. 이와 같은 차이는, 몇몇 경우에 본 발명자들이 아주 약한 억제의 측정을 시도하였다는 사실과 함께, DMSO 정규화가 제2 시리즈 실험에 통합되었다는 사실로부터 기인할 수 있다.

[0282]

TICA0049 및 TICA0072 둘 다에 있어서, 티카그렐로 및 TAM에 대해 측정된 IC₅₀ 값은 0.3 μM 내지 0.5 μM의 범위에 있었으며, 이때, TIM에 대한 IC₅₀ 값들은 각각 74.8 μM 및 119.5 μM에서 2 로그값 이상으로 컸다. TICA0049 및 TICA0072 Fab 둘 다에 있어서 아데노신, ADP, ATP, 그리고 ADP와 ATP의 메틸-티오 유도체에 의한 미세한 억제가 관찰되었으나, 이는 오로지 시험된 화합물 농도 중 가장 높은 농도에서만 검출되었고, 유의적인 것으로 간주되지는 않았다.

[0283]

TICA0072가 티카그렐로 및 TAM에 특이적인 것으로 간주되는 유일한 Fab이라는 결론이 도출되었다.

[0284] **실시예 4: 항 티카그렐로/TAM Fab의 친화성 측정**

[0285] Octet Red384를 대상으로 한 Biolayer 간섭계법을 사용하여, 전술된 바와 같이 생성된 항 티카그렐로 Fab의 친화성을 측정하였다. 친화성 측정을 위해서, 항 티카그렐로 Fab 항체를, 검정 완충액(PBS, Tween 20 0.05%, BSA 0.02%) 중 최종 검정 농도의 2 배에 해당하는 농도(예를 들어, 200 nM)로 희석하였다. Greiner 폴리프로필렌 96 웰 평판에서 티카그렐로의 10-점 2 배 연속 희석을 준비하였다. 그 다음, 희석된 항체와 유리 티카그렐로의 균일 용적(예를 들어, 70 μ l + 70 μ l)만큼을 제2의 Greiner 폴리프로필렌 평판에 옮겼다. 시료를 피펫팅으로 혼합한 다음, 이를 평판 밀봉재로 덮은 후, 실온에서 3 일 내지 5 일 동안 평형화시켰다. 평형화 후, 항체/티카그렐로 적정액 60 μ l를 384 웰 검은 사면 바닥 폴리프로필렌 평판에 옮겼다(2 회). 바이오틴화 티카그렐로를 검정 완충액 중에 250 nM로 희석하고 나서, 384 웰 검정 평판 내 처음 2 개 컬럼의 교호 웰에 가하였으며, 나머지 웰은 오로지 검정 완충액만이 담겨있도록 만들었다. 스트렙타비딘 바이오센서를 적어도 10 분 동안 검정 완충액 중에 미리 침지해 두었다. 이후, 시료 평판들과 바이오센서들을 Octet Red384 단 위에 로딩하였다.

[0286] 모든 검정은 실온에서 수행하였다. 검정 완충액 중에서 60 초 동안 기준치 평형화를 달성한 후, 300 초 동안 스트렙타비딘 바이오센서 상에 바이오틴화 티카그렐로를 로딩하고 나서, 600 초 동안 검정 완충액을 로딩하여, 새로운 기준치를 확립하였다. 그 다음, 항체/티카그렐로 혼합물을, 사용된 항체의 농도에 따라서 30 초 내지 600 초 동안 바이오틴화 티카그렐로 센서 표면과 결합시켰다. 이로부터 얻어진 결합 위상 데이터를, Octet Red 데이터 분석 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 신호를 기준치에 대해 정렬하고, 기준 센서 신호(항체 부재 대조군)를 각각의 시료로부터 공제한 다음, 분석을 위해 KinExA n-Curve 분석 소프트웨어를 사용하여 데이터의 스포트를 실시하였다. 상수 파트너 분석을 사용하여 항 티카그렐로 Fab 항체에 대한 평형화 KD를 측정하였다. 데이터는, Fab TICA0072 및 TICA0049가 티카그렐로에 대해 각각 7.4 nM 및 11.6 nM의 친화성을 가짐을 나타내었다(표 4).

표 4

항티카그렐로 Fab에 대한 평형화 친화도 분석

항체 ID	합텐	평형화 KD	95% 신뢰도 구간
TICA0072	티카그렐로	7.43 nM	1.75 - 21.46 nM
TICA0049	티카그렐로	11.6 nM	1.7 - 66.5 nM

[0287]

[0288] **실시예 5: 항 티카그렐로/TAM 항체 TICA0072의 최적화**

[0289] 친화성 기반 위상 선택법을 사용하여 항체 TICA0072를 최적화하였다. 문헌[Clackson and Lowman 2004 Practical Approach Series 266]에 기술된 바와 같이 표준 분자 생물학 기법을 사용하여, 가변 중쇄(VH) 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 또는 3이나, 가변 경쇄(VL) CDR 1, 2 또는 3의 올리고뉴클레오티드 유도 돌연변이유발에 의해, 선두 scFv 서열로부터 유도된 대 scFv 라이브러리를 형성하였다. 라이브러리들을 대상으로 친화성 기반 파지 전시 선택을 수행하여, 티카그렐로 및 TAM에 대한 친화성이 더 큰 변이체들을 선택하였다. 요약하면, 본질적으로 문헌[Thompson et al 1996 J Mol Biol. 256 (1):77-88]에 이미 기술된 바와 같이, 바이오틴화된 티카그렐로의 농도를 감소시키면서(통상적인 예로서, 4차의 선택 라운드를 거쳐 20 nM에서 20 pM로 농도를 감소시키면서), scFv-파지 입자를 용액 중에서 항은 처리하였다. CDR 표적화 선택 아웃풋으로부터 대표적인 수만개 개별 scFv에 대한 미정제 scFv 함유 주변세포질 추출물을 제조하고 나서, TICA072에 비한 친화성 개선에 대해 스크리닝하도록 설계된 HTRF[®] 에피토프 경쟁 검정 포맷에서 스크리닝하였다.

[0290] 요약하면, 개선된 친화성을 가지는 scFv 및 Fab 변이체들을 스크리닝하기 위해, 모 TICA0072 IgG 및 바이오틴화된 티카그렐로 간 상호작용의 시험 scFv 변이체에 의한 경쟁을 기반으로 한 HTRF[®] 에피토프 경쟁 검정을 수행하였다. 이 검정은 미정제 주변세포질 추출물 scFv 시료를 스크리닝하기 위한 1차 단일점 HTS로서 뿐만 아니라, 정제된 scFv 변이체 및 Fab 변이체 둘 다 대 모 TICA0072에 대한 IC₅₀ 값의 개선을 측정하기 위한 다중점 2차 프로파일링 검정으로서 사용되었다. 비록 에피토프 경쟁 검정, 예를 들어 본원에 기술된 한 가지 검정은 일반적으로 친화도 절대값을 측정하는데 사용되지는 않았지만, 이와 같은 검정은 친화도 기반 HTS의 기초의 역할을 할 수 있었다. 뿐만 아니라, 정제된 scFv/Fab 변이체들에 대한 IC₅₀의 (모 scFv/Fab에 대한 IC₅₀에 비한) 개선 배수

는 친화성의 전반적인 배수 증가에 대한 훌륭한 지표를 제공할 수 있으며, 선두 최적화 캠페인에서 scFv/Fab 변이체들의 친화성에 등급을 매기는 데에 있어서 효과적인 방법을 대표할 수 있다. 본원에 기술된 TICA0072 모 IgG 기반 에피토프 경쟁 검정에 대한 포맷을 이하에 제시하였다:

- [0291] 유로폼 표지화된 스트렙타비딘: 바이오틴화된 티카그렐로: TICA0072 IgG: XL⁶⁶⁵ 표지화된 항 인간 Fc 항체.
- [0292] 검정 색의 얇은 웰을 가지는 384 웰 검정 평판(Corning / Costar 3676) 내 DPBS pH7.4(Gibco 14190-086), KF(VWR 103444T)(0.4 M) 및 Tween 20(Sigma P9416)(0.05%)를 포함하는 완충액 중에서 검정을 수행하였다. 미정제 주변세포질 scFv 변이체의 단일점 시험을 위해서, 검정 용적 10 ul을 사용하였으나, 정제된 scFv 및 Fab를 다중점 2차 IC₅₀ 프로필링 검정에서 시험할 때에는 20 ul의 검정 용적을 사용하였다.
- [0293] 단일점 HTS를 위해서, TICA0072 IgG 3 ul(53.3 nM로서, 최종 농도 16 nM), 미정제 주변세포질 추출물 scFv 시료 2 ul, 바이오틴화된 티카그렐로 2.5 ul(8 nM로서, 최종 농도 2 nM), 그리고 유로폼 표지화된 스트렙타비딘 (CisBio 610SAKLB)(최종 검정 농도 0.75 nM에 대해 3 nM) 및 XL⁶⁶⁵ 표지화된 항 인간 Fc 항체(CisBio 61HFCXLB)(30 nM로서, 최종 검정 농도 7.5 nM)를 함유하는 합한 용액 2.5 ul를 첨가하여 검정을 준비하였다. 모 TICA0072 미정제 주변세포질 scFv를 벤치마크로 사용하였으며, 모체에 비하여 개선된 억제체를 제공하는 변이체를 확인하도록 HTS를 배치하였다. 총 결합 대조군 웰은 검정 성분들 모두를 함유하였는데, 다만 scFv 시료 대신에 검정 완충액 2 ul이 첨가되었다. 네거티브 결합 대조군 웰은 총 결합 대조군 웰의 성분들 모두를 함유하였는데, 다만 TICA0072 IgG 대신에 검정 완충액 3 ul가 첨가되었다.
- [0294] 정제된 scFv/Fab 변이체의 다중점 IC₅₀ 시험을 위해서, TICA0072 IgG 5 ul(53.3 nM로서, 최종 농도 16 nM), 정제된 시험 scFv 또는 Fab 변이체의 1/3 적정액 5 ul, 바이오틴화된 티카그렐로 5 ul(8 nM로서, 최종 농도 2 nM(scFv 프로필링), 4 nM로서 최종 검정 농도 1 nM(Fab 프로필링)), 그리고 유로폼 표지화된 스트렙타비딘 (CisBio 610SAKLB)(최종 검정 농도 0.75 nM에 대해 3 nM) 및 XL⁶⁶⁵ 표지화된 항 인간 Fc 항체(CisBio 61HFCXLB)(30 nM로서, 최종 검정 농도 7.5 nM)를 함유하는 합한 용액 5 ul를 첨가하여 검정을 준비하였다. 모든 실험에서 정제된 모 TICA0072(scFv 또는 Fab)를 벤치마크로 사용하였으며, 최적화된 변이체(scFv 또는 Fab)가 사용되어 측정된 IC₅₀ 개선은 모 TICA0072 IC₅₀에 비한 개선 배수로서 표현될 수 있었다. 총 결합 대조군 웰은 검정 성분들 모두를 함유하였는데, 다만 정제된 scFv 또는 Fab 시료 대신에 검정 완충액 5 ul이 첨가되었다. 네거티브 결합 대조군 웰은 총 결합 대조군 웰의 성분들 모두를 함유하였는데, 다만 TICA0072 IgG 대신에 검정 완충액 5 ul가 첨가되었다.
- [0295] 검정의 단일점 HTS 및 다중점 IC₅₀ 프로필링 버전 둘 다에 있어서, 평판을 RT에서 3 시간 동안 항온 처리한 다음, 표준 HTRF 판독 프로토콜을 사용하는 Envision 평판 판독기상에서 판독하였는데, 이때 시료들은 337 nm에서 여기시켰으며, 시간 해상 형광 방출은 620 nm와 665 nm 둘 다에서 측정하였다.
- [0296] 미가공 665 nm 및 620 nm 카운트를 사용하여 제1 검정 및 제4 검정에서 앞서 기술된 등식들에 따라서 각각에 대한 델타 F(%) 및 특이 결합 %을 산정하였다. 다중점 2차 프로필링 실험을 위해서, S 자형 용량 반응(가변적 기울기) 곡선 피팅(4 매개 변수 로지스틱 등식)을 사용하는 Graphpad Prism 소프트웨어를 사용하여 IC₅₀ 값을 측정하였다.
- [0297] 스크리닝에서 확인된 히트, 즉 모 TICA0072 scFv와 비교될 때 상당히 개선된 억제 효과를 나타내었던 scFv 변이체를 대상으로 DNA 서열결정을 수행한 결과, 가변 중쇄 CDR1, CDR2 또는 CDR3과, 가변 경쇄 라이브러리 CDR1, CDR2 또는 CDR3 아웃풋으로부터 유래한 독특한 변이체들이 정제된 scFv로서 제조되었으며, 이것들을 동일한 검정에서 재시험하여 농도 반응 IC₅₀ 곡선을 결정하였다. 그 다음, 가장 많이 개선된 IC₅₀ 값을 나타내는 scFv 변이체를 Fab로서 제조하였으며, 이하에 기술된 바와 같이 제2 세대 에피토프 경쟁 검정에서 시험하였다.
- [0298] *최고 친화성 Fab를 스크리닝/등급 매김하기 위한 제2 세대 에피토프 경쟁 검정*
- [0299] 선두 최적화 캠페인의 종료시에 친화성이 매우 큰 정제 Fab를 효과적으로 구분하기 위해, 추가 HTRF[®] 에피토프 경쟁 검정을 수행하였는데, 이 검정은 모 TICA0072 IgG와는 반대로, 중간 정도의 친화성을 가지는 최적화 TICA0072 계통 IgG(TICA0159)와 바이오틴화 티카그렐로와의 결합에 대한 경쟁적 억제를 기반으로 하였다. 이 검정은 (HTS 포맷과는 반대로) 오로지 다중점 IC₅₀ 프로필링 포맷으로만 사용되었으며, 모 TICA0072 IgG 기반 에피

토프 경쟁 검정에서 정제된 Fab 변이체의 다중점 IC₅₀ 프로파일링을 위한 (상기) 제5 검정에 제공된 방법과 본질적으로 동일하게 수행되었다. 유일한 차이는, 검정 조건 중 적절한 시점에 TICA0072 IgG 대신에 TICA0159 IgG가 동일한 최종 검정 농도(16 nM)로 사용되었다는 점이다. 다른 양태들 모두에서, 이 검정은 정제된 Fab에 대한 다중점 2차 프로파일링 버전에서 상기 기술된 바와 정확하게 동일하게 수행되었다.

[0300] 제2 세대 검정은, 가장 큰 친화성을 보이는 Fab의 구별 및 등급 매김이 TICA0072 기반 에피토프 경쟁 검정에서 달성될 수 있었던 것보다 더 효과적으로 가능하도록, TICA0072 대신에 부분 최적화된 항체 TICA0159를 사용하였다.

[0301] 가장 많이 개선된 VH는 CDR3 변이체 TICA0162인 것으로 확인되었다. 가장 많이 개선된 VL은 CDR3 변이체 TICA0152인 것으로 확인되었다. 추가의 친화성 개선을 생성하기 위해, 개선된 항체로부터 유래하는 상이한 CDR들을 표준 분자 생물학 기법을 사용하여 합함으로써 새로운 Fab를 만들었다. 이러한 재조합 작업에서 TICA0162 및 TICA0152의 조합으로부터, 에피토프 경쟁 프로파일 더 개선된 새로운 Fab TICA0212가 생성되었다. 제2 세대 에피토프 경쟁 검정에 있어서 TICA0072, TICA0152, TICA0162 및 TICA0212 Fab에 대해 플랫폼된 경쟁 곡선을 표 5에 제시된 IC₅₀ 측정치와 함께, 도 6에 나타내었다. TICA0212는, 모 TICA0072 Fab에 비하여 IC₅₀에 있어서 약 2 로그만큼의 개선을 나타내었다.

표 5

제2세대 에피토프 경쟁 검정에서, 나열된 최적화 항티카그렐로 Fab에 대한 IC50 데이터

Fab	IC ₅₀ (nM)	개선된 배수
TICA0072	1714.0	0
TICA0152	73.5	23.3
TICA0162	16.3	105.2
TICA0212	12.0	142.8

[0302]

[0303] 실시예 6: 최적화된 항 티카그렐로/TAM Fab의 친화성 개선

[0304] KinExA3200을 사용하여 실시예 5에서 생성된 항 티카그렐로/TAM Fab의 친화성을 측정하였다. KinExA 친화성 측정을 위해, 처음에 50 mM NaHCO₃ 중에서 스트렙타비딘 1 mg과 항 티카그렐로/TAM Fab를 밤새 반응시켜 비드 (Azlactone 비드 600 mg)를 제조하였다. Tris 완충액(1 M Tris pH 8.7, 10 mg/ml BSA)을 2 회 바꾸어서 차단을 수행한 다음, 스트렙타비딘이 코팅된 비드를 총 용적 8 ml 중에 재현탁하였다. 비드 1.33 ml(즉, 원래의 무수 Azlactone 비드 100 mg에 상응하는 용적)를 PBS로 완전히 세정한 다음, 10 분 동안 PBS 1 ml 중에서 바이오틴-티카그렐로 약 2.5 µg과 결합하도록 만들었는데, 이때 종종 교반을 수행하였다. 이때 생성된 바이오틴-티카그렐로 코팅된 비드를 PBS로 세정한 다음, 0.1% BSA 및 0.02% Na₃N를 함유하는 PBS 50 ml 중에 재현탁하고 나서, KinExA 비드 바이알로 옮길 때까지 실온에 보관하였다.

[0305] 상기 방법에 기술된 바와 본질적으로 동일하게 항체/티카그렐로 시료 제조를 수행하였다. 항 티카그렐로 Fab 항체를, 검정 완충액(PBS, Tween 20 0.05%, BSA 0.02%, 0.02% Na₃N) 중 최종 검정 농도의 2 배가 되는 농도(예를 들어, 200 nM)로 희석하였다. Falcon 50 ml 폴리프로필렌 튜브에 티카그렐로의 10-점 2 배 연속 희석을 준비하였다. 그 다음, 희석된 항체와 유리 티카그렐로의 균등 용적만큼(예를 들어, 5 ml + 5 ml)을 제2의 Falcon 폴리프로필렌 튜브에 옮겼다. 시료를 피펫팅으로 혼합한 다음, 실온에서 3 일 내지 5 일 동안 평형화시켰다. 평형화 후, 분석을 위해 시료 튜브들을 KinExA 3200에 옮겼다.

[0306] 모든 검정은 실온에서 수행하였다. 항체/티카그렐로 혼합물을 시료로서 채취한 다음, 이를 바이오-티카그렐로 비드와 혼합되도록 하였으며, 이때 미결합 유리 티카그렐로는 세정하여 제거하였다. 그 다음, DyLight649 표지화 마우스 항 인간 중쇄 및 경쇄 항체를 사용하여 결합 항체를 검출하였다. 시료 용적(300 µl 내지 1300 µl) 및 주사 시간(90 초 내지 120 초)은 농도에 의하여 바뀌었으며, 시료 당 2 개 내지 3 개의 관독 결과들은 달라졌다. KinExA n-곡선 분석 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하였다. 상수 파트너 분석을 사용하여 항

티카그렐로 Fab 항체에 대한 평형화 KD를 측정하였다.

[0307] 이전 실시예에서와 같이, 비변형 티카그렐로 또는 TAM 중 어느 하나가 존재할 때 20 배 과량으로 달성되는 농도 및 실온에서 Fab는 평형화될 수 있었다. 바이오틴화된 티카그렐로를 스트렙타비딘 코팅된 비드 표면 상에 로딩하였다. 평형화 후, 나머지 유리 항체를 바이오틴화 티카그렐로와 결합시켰다. 그 다음, DyLight649 표지화 마우스 항 인간 중쇄 및 경쇄 검출용 항체를 사용하여 결합 항체를 검출하였다. 겔보기 KD가 적어도 10 배 변화된 별도의 적정 프로필을 생성하기 위해, 적어도 3 가지의 상이한 고정 농도만큼의 항체를 사용하여 유리 티카그렐로 또는 TAM의 적정을 준비하였다. KinExA Pro n-곡선 분석 소프트웨어를 사용함으로써 데이터를 분석하여, 유리 티카그렐로 또는 TAM에 대한 평형화 KD를 측정하였다. Fab TICA0212는 비변형 티카그렐로 및 TAM에 대한 친화도가 약 20 pM이었다(표 6). 평형화 데이터로부터, TICA0212는 티카그렐로 및 TAM과 균등하게 큰 친화성(약 20 pM) 결합을 보임이 입증되었다.

표 6

항티카그렐로/TAM Fab에 대한 평형화 친화도 분석

항체 ID	CDR3 서열들(서열번호)	합텐	평형화 KD	95% C. I.
TICA0072	VH GSHLY ⁹⁹ DFW ^{100b} SASHPPNDALAI (35) VL GTW ⁹¹ D ⁹² P ⁹³ S ⁹⁴ LSAGL (40)	티카그렐로	7.4 nM	1.8-21.5 nM
TICA0152	VH GSHLYDFWSASHPPNDALAI (65) VL GTWLYDRAVGL (70)	티카그렐로	43.17 pM	2.8-119.2 pM
TICA0162	VH GSF ¹⁶² DY ¹⁶³ Y ¹⁶⁴ FWSASHPPNDALAI (55) VL GTWDISLSAGL (60)	티카그렐로	162.48 pM	125.4-206.3 pM
TICA0212 (MED12452)	VH GSF ¹⁶² DY ¹⁶³ Y ¹⁶⁴ FWSASHPPNDALAI (75) VL GTWLYDRAVGL (80)	티카그렐로	19.6 pM	13.0 - 28.7 pM
		TAM	19.7 pM	4.9 - 44.7 pM
		TIM	~ 20 nM	

[0308]

[0309] (모 TICA0072로부터 유래하는 서열 잔기들의 변이는 굵은 글씨로 표시하였으며, Kabat 번호는 TICA0072 내 특정 잔기들에 대해 매겨졌다.)

[0310] 실시예 7: 항 티카그렐로/TAM Fab TICA0162 및 TICA0212의 특이성

[0311] Fab, TICA0162 및 TICA0212의 특이성을 실시예 3에서와 같이 시험하였으며, DMSO에 대해 정규화하였다. TICA0162 및 TICA0212에 대한 모든 가용 선택성 데이터의 요약 표를 표 7에 포함시켰다. 또한, 도 4에 나열된 화합물 12 개 중 5 개를 티카그렐로, TAM, TIM 및 몇몇 아데노신 군의 화합물들과 함께 시험하였던 실험으로부터 얻은 예시적 플롯화 데이터를 도 7에 나타내었다.

표 7

TICA0162 및 TICA0212 Fab들과 바이오틴화 티카그렐로 결합의 억제에 대한, 티카그렐로, TAM, TIM 및 아데노신군의 화합물들 이외에 구조적으로 관련된 화합물 12개의 상대적 IC50값들

화합물	선두 his-Fab들에 대한 다양한 화합물들의 IC50 (uM)	
	TICA0162	TICA0212
페노피브레이트	NI	NI
닐바디핀	NI	NI
실로스타졸	NI (n=2)	NI (n=2)
부클라데신	NI	NI
레가데노손	NI (n=2)	NI (n=2)
사이클로티아지드	> 1000 (n=2)	NI (n=2)
사이클루트린	NI	NI
로바스타틴	NI	NI
리네졸리드	NI	NI
심바스타틴	NI (n=2)	NI (n=2)
칸그렐로	NI	NI
판토프라졸	> 1000 (n=2)	NI (n=2)
아데노신	NI	NI
ADP	NI	NI
2MeS-APD	NI	NI
ATP	NI	NI
2MeS-ATP	NI	NI
티카그렐로	0.023 (n=2)	0.035 (n=2)
TAM	0.032 (n=2)	0.031 (n=2)
TIM	19.8 (n=2)	28.8 (n=2)

[0312]

[0313]

(NI = 억제되지 않음)

[0314]

데이터에 의해 예시되는 바와 같이, TICA0212(MEDI2452)는 티카그렐로 및 TAM에 대한 결합 특이성이 본질적으로 동일하였으며, TIM와의 결합은 더 약하였다. 뿐만 아니라, MEDI2452/TICA0212는 기타 다른 구조적으로 관련된 임의의 약물 또는 아데노신 관련 화합물과 유의적 결합을 나타내지 않았다.

[0315]

실시예 8: 단백질 결정화

[0316]

C 말단 his-태그를 가지는 TICA0072를 PBS 중에서 9 mg/ml로 농축하였다. DMSO 중에 용해된 티카그렐로 1 mM을 첨가하여 복합체 형성을 달성하였다. 복합체를 실온에서 2 시간 동안 항온 처리한 다음, 시팅 드롭(sitting drop)을 동반하는 증기 확산 방법을 사용하여 결정화 시험을 준비하였다. 3 개의 시판 스크린을 사용하여 광범위 스크리닝을 수행하였으며, 이때 히트 몇 개를 얻었다. 가장 잘 회절하는 결정들을 Morpheus[®] (Molecular Dimensions, UK) 히트의 격자 최적화로부터 얻었다. 균등 용적의 TICA0072-티카그렐로 복합체와, 12.8% PEG 3350, 12.8% PEG 1000, 12.8% MPD, 1.7% 1,6-헥산디올, 1.7% 1-부탄올, 1.7% 1,2-프로판디올, 1.7% 2-프로판올, 1.7% 1,4-부탄디올, 1.7% 1,3-프로판디올, 25 mM 이미다졸, 25 mM 나트륨 카코딜레이트, 25 mM MES 및 25 mM 비스-Tris pH 6.5으로 이루어진 저장기 용액을 혼합함으로써, 구조 결정용으로 사용될 결정들을 20°C에서 성장시켰다. 결정을 액체 질소 중에서 어떠한 동해방지제도 첨가하지 않고 플래시 동결하였다.

[0317]

PBS 중 TICA0212/MEDI2452(농도 약 15 mg/ml)를 티카그렐로와 혼합하여 농도가 1 mM이 되도록 만들고, 이후 실온에서 2 시간 동안 항온 처리한 다음, 광범위 스크리닝을 수행하였다. 자발적 히트는 얻어지지 않았다. 30 ul 웰 용액 중 몇몇 결정들을 부수어서 TICA0072-티카그렐로 결정 유래 시드(seed)를 제조하여, 이를 광범위 상업

용 스크린에서의 MMS(미세 시드 기재 스크리닝)에 사용하였다. 히트를 몇 개 얻었으나, 구조 측정에 사용되는 결정들을 20% 글리세롤, 20% PEG 4000, 10% 2-프로판올, 0.1 M NaCl 및 0.5 M 아세트산나트륨 pH 4.6의 조건 하에 20°C에서 성장시켰다. 점적들을 단백질 0.2 ul, 웰 용액 0.18 ul, 그리고 시드 스톱 0.02 ul으로 구성하였다. 결정을 액체 질소 중에서 어떠한 동해방지제도 첨가하지 않고 플래시 동결하였다.

[0318] 프랑스 그르노블 소재 유럽 싱크로톤 방사광 시설에서 빔 라인 ID23-1에서 데이터를 수집하였다. AutoProc 작업 흐름[Vonrhein, C., et al., *Acta Cryst.* 2011; D67: 293-302]에 따라서 데이터를 가공하고, 축적한 다음, 더 줄였다(이에 대한 통계는 도 8a 내지 8c를 참조한다). 출발 모델로서 고휘상도 Fab 구조를 사용하는 분자 치환 (PDB id code 1a9k, [Faber C., et al., *Immunotechnology.* 1998; 3:253-70])에 의해 TICA0072 초기 위상 조정을 수행하였다. TICA0212/MEDI2452에 있어서는, TICA0072의 구조를 출발 모델로서 사용하였다. Coot[Bricogne G., et al., (2011). BUSTER version 2.11.4. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd]를 사용하여 모델 재구성을 수행하였으며, 오토버스터를 사용하여 정제(refinement)를 수행하였다[Emsley, P., et al., *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 2004, D60, 2126-2132]. 최종 모델에 대한 통계학은 표 8을 참조한다.

표 8

Fab-티카그렐로 복합 결정구조로부터의 데이터 수집 및 정제 통계. 괄호안의 값들은 최고 해상도 셀을 지칭함. 설명	TICA0072	TICA0212 (MED)2452)
PDB 승인 코드		
데이터 수집 통계		
방사광원	ESRF/ID23-1	ESRF/ID23-1
방사광 검출기	필라투스	필라투스
공간 군	P21	P21212
셀 치수	a=41.2, b=72.6, c=67.8 β=98.9	a=69, b=173, c=42
해상력 (Å)	49-1.7 (1.87-1.7)	41-2.16 (2.27-2.16)
관찰 반사율	143002	232480
고유 반사율	41888	36570
무결률 (%)	97.0 (95.3)	99.4 (94.7)
평균 I/σ _i	13.6 (1.7)	10.7 (1.2)
R _{sym} % ^b	4.8 (74.4)	9.7 (27.7)
정제 통계학		
해상력 (Å)	49-1.7	41-2.16
단백질수 + 리간드원자수	3308	3371
용매 원자수	142	87
R (%), 무 R (%)	19.8, 23.7	21.7, 25.7
월슨 B (Å ²), 정제된 (Å ²)	45.6, 48.5	42.1, 44.6
Rmsd 이상적 결합길이 (Å)	0.008	0.010
결합각 (°)	1.10	1.25

[0319]

[0320]

티카그렐로와의 복합체 중 TICA0072의 구조를 1.7 Å 해상력으로 측정하였다(도 10). CDR들은 매우 오목한 표면을 형성하였으며, 티카그렐로는 VH 도메인과 VL 도메인 사이 계면에 깊숙이 끼워졌다. 이러한 유형의 결합은 통상 소 함텐에서 관찰되었다. VL CDR2를 제외한 CDR 모두는 티카그렐로 결합에 직접적으로 기여하였으며, VH CDR3의 대부분은 무질서하였다. 티카그렐로의 디플루오로페닐기는 버니어 잔기 VH Trp47, VL Phe98 및 VH CDR3 잔기 Leu100L를 포함하는 소수성 잔기들과 나란히 있는 공동 내에 위치하였다. 티카그렐로와의 상호작용에 있어서 핵심 잔기는 VL Trp91이었는데, 이 VL Trp91은, 아데노신 유사 코어에 대항하는 파이-스택킹(pi-stacking)과, 사이클로펜틸 모이어티에 있는 리보스 하이드록실기들 중 하나와의 수소 결합 둘다에 수반되었다. 아데노신 유사 코어에 대한 추가의 상호작용은 VH CDR1 His35 및 VH CDR3 Tyr99에 의해 제공되었다. 티오프로필 치환기는 VH CDR2 루프의 주 사슬에 대항하여 스택킹되었다. 사이클로펜틸 모이어티 상 하이드록시에틸 치환기는 용매쪽으로 돌출되어 있으며, Fab과는 어떠한 상호작용도 하지 않았다.

- [0321] 친화성이 개선된 Fab, TICA0212/MEDI2452의 구조에 있어서 티카그렐로의 결합은 TICA0072와 티카그렐로의 결합과 유사하였는데, 이 경우 상기 언급된 모든 상호작용이 유지되었지만, 몇 가지 중요한 차이점이 있었다(도 10b). VL CDR3 돌연변이들 Asp92Leu 및 Ser94Asp의 조합은 VL CDR3 루프 내부에 있는 수소 결합을 파괴하여, 더 "이완된" 구조를 형성하였다. 새로운 입체구조는 사이클로프로필-디플루오로페닐 치환기 부착점 주위로 피리미딘 고리와 15° 경사를 이루며 상관되어 있다. 피리미딘 고리의 새로운 위치는 이 피리미딘 고리가 Fab72 보다 TICA0212/MEDI2452 내에서 VH CDR3 Tyr99에 약 0.2 Å 더 가까이 위치하도록 만든다. 더욱이, VL Ile93Tyr은 수소 결합 공여체를 도입하는데, 이로써 VL Ile93Tyr은 VH CDR3 루프와 상호작용을 하도록 만들므로 결합 위치가 더 한정된다.
- [0322] TICA0212/MEDI2452에 대한 결정 구조는 V_H 및 V_L 계면 사이 깊숙한 틈에 티카그렐로가 결합되어 있음을 나타낸다. 하이드록시에틸기를 나타내는 결정 구조는 TICA0212/MEDI2452와의 임의의 상호작용에 수반되지 않으므로, 트리-아미드 링커를 통해 티카그렐로를 바이오틴과 함께 하이드록시에틸기에 표지화하는 설계 전략이 지지되고 있다. 이는, Fab도 또한 동일한 친화성으로 하이드록시에틸기가 결실된 TAM과 결합한다는 사실에 의해서도 추가로 지지된다. TICA0212/MEDI2452는, 사이클로프로필-디플루오로페닐기가 결실된 TIM에 대하여 약한 결합을 나타내었다. TICA0212/MEDI2452-티카그렐로 복합체에 있어서, 사이클로프로필-디플루오로페닐기는 소수성 포켓의 저부에 묻혀있으면서, V_L CDR3 잔기 Trp L91과 티카그렐로 아데노신 유사 코어를 정렬함에 있어 구조상 핵심 역할을 담당해야 한다. 티카그렐로에 대한 화학 개시점은 ATP였고, 이 ATP는 아데노신 유사 코어를 보유하고 있으므로, 해독제 특이성에 중요한 속성은 아데노신이 결합하지 않음을 입증하는 것이었다. 선두 분리 전략은 고처리량 분석 및 특이성 상세 분석 둘 다를 포함하였고, 아데노신이 결합하지 않음을 경쟁적 분석 또는 직접 결합 분석 중 어느 하나에 의해 확인되었다. 구조 분석으로부터, 아데노신의 퓨린 고리와 리보스 기는 티카그렐로의 아데노신 유사 코어의 상호작용을 모의할 것임이 예상될 수 있었다. 그러나, 결합이 일어나지 않는 것은, 결합 상호작용의 소수성과 상대적 형상 상보성 둘 다를 상당히 감소시키는 소수성 R기 2 개(사이클로프로필-디플루오로페닐 및 티오프로필)의 부재에 의해 설명될 수 있다.
- [0323] 모 TICA0072 및 TICA0212/MEDI2452의 구조들에 관한 분석은, 친화성 성숙(affinity maturation)이 일어나는 동안 도입된 변이들 일부의 유의성을 나타낸다. V_L CDR3에서의 돌연변이는 특히 큰 영향력을 가지고, 이로 인해 TICA0212/MEDI2452 내에 상이한 루프 입체구조와 추가의 수소 결합은 결합 공동을 한정하는 것으로 보인다. 이와는 대조적으로, V_H CDR3에서의 돌연변이의 기여는 구조적으로 덜 명확하다. TICA0072에 비해 각각 200 배 및 50 배의 개선을 초래하였던, 구조들로부터 얻어진 관찰 결과들은, 오로지 V_L CDR3(TICA0152) 또는 V_H CDR3(TICA0162) 내에만 변형들을 함유하는 변형 항체에 대한 데이터에 의해 부분적으로 확인되었다. 그러나, 비록 V_L CDR3의 변화들은 더 큰 영향을 미치는 것으로 보였지만, 돌연변이들의 세트들 둘 다는 상당한 개선을 부가하였다. 결정 구조는 복합체의 정지된 사진으로서, 결합에 관여하는 단백질과 리간드의 역학 관계들 중 임의의 것을 캡처할 수는 없었음이 주목되어야 한다.
- [0324] **실시예 9: TICA0212/MEDI2452는 티카그렐로 또는 TAM의 존재 시에 시험관 내에서 혈소판 응집을 농도에 의존적으로 복구하였다**
- [0325] 인간 혈소판이 풍부한 혈장(PRP) 중에서 TICA0212/MEDI2452가 ADP-유도성 혈소판 응집의 티카그렐로 또는 TAM 매개 억제를 역전하는 정도와 효능을 광 투과 혈소판 응집 능 검사를 사용하여 측정하였다.
- [0326] 시험관 내 인간 PRP 검정을 위해서, 공복의 건강한 지원자로부터 요추피정맥의 정맥 천자에 의해 혈액을 수집하였다. 처음에는 혈액 2 ml 정도를 버리고 나서, 분취량을 수집하여 0.109 M 시트르산나트륨, 1 + 9(시트르산염 + 혈액)이 담겨있는 튜브에 담아, 최종 농도가 10.9 mM이 되도록 만들었다. 응고 방지 처리된 인간 혈액을 240 × g에서 15 분 동안 원심분리하였다. PRP를 조심스럽게 분리해내어 깨끗한 바이알에 옮겨담았다. PRP를 2000 × g에서 15 분 동안 원심분리하여 혈소판이 부족한 혈장(PPP)을 제조하였다. 혈소판 응집 프로파일러(PAP-8E, Bio/Data Corporation, PA, USA)에 의해 PRP에서 광 투과 혈소판 응집 능 검사(LTA)를 평가하였다. 0% 응집은 PRP의 광 투과도로서 정의하였고, 100% 응집은 PPP의 광 투과도로서 정의하였다.
- [0327] PRP를 1 μM 티카그렐로 또는 TAM과 함께 1 시간 동안 예비 항온처리한 다음, 상이한 농도의 TICA0212 또는 동종 대조군 Fab과 함께 30 분 동안 공동 항온처리하였다. 여기에 20 μM ADP를 첨가하여 혈소판 응집을 개시시켰으며, 6 분 동안 계속해서 기록하였다. 6 분이 되었을 때 최종 응집(FA) 정도에 대한 데이터를 분석하였다.
- [0328] 최대 역전의 절반 값(IC₅₀)을 제공하는 TICA0212/MEDI2452의 농도를 산정하였다. TICA0212/MEDI2452는 1 μM 티

카그렐로의 농도 의존적 역전과, 20 μM ADP-유도성 혈소판 응집의 1 μM TAM 매개 억제를 나타내었는데, 이때 산정된 평균($n=5$) IC_{50} 값은 각각 0.64 μM 및 0.78 μM 이었다(도 8). 1:1 조건(1 μM TICA0212/MEDI2452: 1 μM 티카그렐로 또는 TAM)에서 평가되었을 때, 평균 역전도는 각각 78% 및 62%였다. 동종 대조군 Fab는 티카그렐로 및 TAM ADP-유도성 혈소판 응집의 상당한 역전을 유발하지 않았다. 예를 들어 30 분 경과 후, 동종 대조군 Fab의 항온 처리는 티카그렐로 및 TAM의 역전을 각각 -3% 및 2% 초래하였다.

[0329] 이로부터 데이터는, TICA0212/MEDI2452가 시험관 내 ADP-유도성 혈소판 응집의 티카그렐로 매개 억제 및 TAM 매개 억제 둘 다를 농도 의존적 방식으로 역전할 수 있음을 나타내고 있다. 1:1 실험 조건에서 평가되었을 때 최대, 그리고 거의 완전한 역전 효과가 달성되었는데, 이는 TICA0212/MEDI2452가 화학 양론 비 1:1로 티카그렐로 또는 TAM과 결합할 때에도 예상될 것이다.

[0330] **실시예 10: TICA0212/MEDI2452는 티카그렐로 또는 TAM의 존재 시에 시험관 내에서 혈소판 응집을 효과적으로, 그리고 신속하게 복구한다**

[0331] TICA0212/MEDI2452가 티카그렐로 또는 TAM을 역전시키기 시작하는 시간을, 실시예 8에서와 같이 인간 혈소판 풍부 혈장(PRP) 중에서 광 투과 혈소판 응집 능 검사를 사용하여 측정하였다. PRP를 1 μM 티카그렐로 또는 TAM과 함께 1 시간 동안 예비 항온처리한 다음, 여기에 1 μM TICA0212/MEDI2452를 첨가하여 5 분, 10 분, 15 분, 30 분 및 60 분 동안 공동 항온 처리하였거나, 또는 동종 대조군 Fab를 30 분 동안 첨가하였다. 여기에 20 μM ADP를 첨가하여 혈소판 응집을 개시하고 나서, 6 분 동안 계속해서 기록하였다. 6 분이 되었을 때 최종 응집(FA) 정도에 관한 데이터를 분석하였다.

[0332] TICA0212/MEDI2452는, 공동 항온처리 시간과는 상관없이, 티카그렐로 매개 억제의 유사한 역전도를 나타내었는데, 이때 평균($n = 3$) 역전도는 5 분, 10 분, 15 분, 30 분 및 60 분 경과 후에 각각 85%, 69%, 74%, 80% 및 81%였다. 이와 유사하게, TICA0212/MEDI2452에 의해 유도된 평균($n = 3$) TAM 역전도는, 5 분, 10 분, 15 분, 30 분 및 60 분 경과 후에 각각 53%, 56%, 58%, 69% 및 74%였다. TICA0212/MEDI2452는 ADP-유도성 혈소판 응집의 티카그렐로 및 TAM 매개 억제를 신속하고 효과적으로 역전하였다. 30 분 동안 이루어진 동종 대조군 Fab와의 공동 항온처리 후, 역전은 일어나지 않았다(평균($n = 3$) -2%). 이 데이터는 TICA0212/MEDI2452가, 1:1 실험 조건에서 평가되었을 때 ADP-유도 응집의 티카그렐로 매개 억제 및 TAM 매개 억제 둘 다를 신속하고 효과적으로 역전할 수 있음을 나타내었다.

[0333] **실시예 11: TICA0212/MEDI2452는 티카그렐로 처리된 마우스에 투여된 후 시험관 내에서 혈소판 응집을 신속하고 효과적으로 복구하였다.**

[0334] 전혈 중 ADP-유도성 혈소판 응집의 티카그렐로 매개 억제의 TICA0212/MEDI2452 매개 역전의 개시 속도와 그 정도(임피던스 응집 능 검사)를, 마우스에 티카그렐로를 정맥 내(i.v.) 투여한 후 생체 외에서 측정하였다. 마우스에 티카그렐로를 볼루스(1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)로서 5 분에 걸쳐 정맥 내 투여한 다음, 15 분 동안 연속으로 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{분}$ 의 속도로 주입하였다. 티카그렐로 주입을 마친 후, 티카그렐로 혈장 노출이 평균 1.4 μM 으로 이루어진 것으로 측정되었을 때, 마우스에 TICA0212/MEDI2452 250 mg/kg 을 정맥 내 볼루스로서 투여하였다. TICA0212/MEDI2452 투여 후 5 분, 30 분 및 60 분 경과시 마우스를 죽여서 혈액 시료를 수집하였다. 이 연구에서, 6 분 동안 ADP-유도 응집 반응을 측정하여, 데이터를, 경시적으로 기록된 응집 유닛(AU) 곡선 아래 평균 면적으로 표현하였다(AU*분).

[0335] 임피던스 응집 능 검사를 수행함에 있어서, 마우스를 죽여서 혈액 시료를 수집하여 7 μM 히루딘에 넣었다. 혈액(175 μl)을 다중평판 미니 시험 셀들 내에 담겨있던 예열 NaCl_2 (37 $^{\circ}\text{C}$, 175 μl)에 첨가한 다음, 3 분 동안 혼합하고 나서, 여기에 ADP 12 μl 를 첨가하여 최종 농도 6.5 μM 로 만들었다. 1 회용 다중평판 미니 시험 셀들은 교반 막대를 포함하고, 혈액 시료 중에 침지된 전극들의 별도 쌍 2 개를 가진다.

[0336] 작동제(ADP)가 첨가되고, 교반에 의해 전단이 유도될 때, 혈소판들은 전극에 부착되어 응집하기 시작하였다. 이로 말미암아 전극에서의 임피던스는 증가하였는데, 이를 다중평판 임피던스 응집 능 검사기(DynaByte, Munchen, Germany)에 의해 경시적으로 계속 기록하였다.

[0337] 평균($n = 4$) 응집 반응은, 티카그렐로 주입 및 PBS 볼루스 투여 후 5 분, 30 분 및 60 분 경과시 각각 432 AU*분에서 2 AU*분, 474 AU*분에서 6 AU*분, 그리고 494 AU*분에서 14 AU*분으로 감소하였으므로, 티카그렐로 처리는 ADP-유도 응집의 거의 완전한 억제를 유도하였다(도 9). 평균($n = 4$) 응집 반응은, 티카그렐로 주입 및 TICA0212 볼루스 투여 후 5 분, 30 분 및 60 분 경과시 각각 2 AU*분에서 147 AU*분, 6 AU*분에서 448 AU*분,

그리고 14 AU*분에서 413 AU*분으로 증가하였으므로, TICA0212/MEDI2452는 생체 내 티카그렐로 매개 역제의 역전을 매개하였다(도 9). 평균(n = 4) 응집 반응은 6 AU*분에서 4 AU*분으로 바뀌지 않고 유지되었으므로, 동중 대조군 투여 후 30 분 경과시 역전은 발생하지 않았다.

[0338] 이 데이터는, 티카그렐로가 혈장 중 농도 1.4 μM(ADP-유도 응집을 완전히 억제하였던 농도)이 되도록 투여된 마우스에 TICA0212/MEDI2452가 정맥 내 볼루스로서 투여될 때, 이 TICA0212/MEDI2452는 ADP-유도성 혈소판 응집을 신속하고 효과적으로 복구할 수 있음을 나타낸다.

[0339] **실시예 12: 티카그렐로 처리 마우스 내에서의 마우스의 출혈**

[0340] TICA0212/MEDI2452에 대하여 의도된 용도들 중 하나는 응급 수술을 요하는 티카그렐로 환자용 해독제이므로, 수술 개시 전 달성되어야 했던 완전 역전을 보이는 임상 조건을 모의하도록 설계된 마우스 출혈 실험에서 TICA0212/MEDI2452를 평가하였다.

[0341] 300 μg/kg/분으로 티카그렐로 또는 비이클을 20 분 동안 연속으로 주입하여 마우스를 예비 처리하였다. 주입을 멈춘 후, t = 0일 때 TICA0212/MEDI2452(600 mg/kg) 또는 비이클(히스티딘 수크로스 완충액) 볼루스 용량을 45 초에 걸쳐 투여하였으며, t = 30 분일 때 꼬리 끝 부분으로부터 5 mm를 베어 출혈을 유도하였다. 꼬리 끝 부분을 물로 행구고(2 ml/분), 혈액과 물의 혼합물을 작은 챔버에 모아 두었는데, 이 챔버 내에서는 교반자가 유체를 혼합하여 용혈을 촉진하여 균질의 용액을 확립하였다. 525 nm에서의 광 투과도를 30 분 동안 기록하였는데, 이때 마지막 혈액 시료를 혈소판 응집 분석을 위해 복부 대동맥으로부터 수집하여 두었다. 광 투과도를 흡광도로 변환하여 혈액 소실(흡광도 곡선 하 면적(AUA, 흡광도*초))과, 총 출혈 시간(BT, 초)(경시적 흡광도 플랫폼)을 산정하는 데에 사용하였다. 95% 미만의 모든 투과도는 출혈이 일어난 경우로서 정하였다. 티카그렐로 주입 종료시(t = 0) 및 꼬리를 베었을 때(t = 30 분), 혈소판 응집과, 총혈장(total plasma) 및 유리 혈장(free plasma) 노출 분석을 위한 시료들도 수집하였다.

[0342] 본 연구들은 스웨덴 소재 예테보리(Göteborg) 대학교 동물 연구에 관한 윤리 위원회의 승인을 받았다. 이소플루란 가스(Forene®, Abbot Scandinavia AB, Sweden)로 마우스를 안락사시켰다. 카테터를 좌측 목 정맥에 삽입하고 비이클 또는 약물을 투여하였다. 외부 난방으로 체온을 38℃로 유지시켰다.

[0343] 혈소판 응집에 대한 TICA0212/MEDI2452의 효과를 출혈에 대한 잠재적 효과로 바꾸어 해석하기 위해, 예방적 마우스 꼬리 출혈 연구를 수행하였다. 티카그렐로를 평균 총 티카그렐로 농도 및 TAM 혈장 농도 각각 7.6 μM 및 0.3 μM이 될 때까지 주입하여, 상당한 약물 의존적 출혈 윈도우를 제공하였다. 티카그렐로 주입을 멈춘 직후 TICA0212/MEDI2452를 단일 볼루스(600 mg/kg)로서 30 초에 걸쳐 투여하였다. 30 분 후, ADP-유도 응집을 완전히 정상화한 다음, 티카그렐로의 평균 유리 혈장 농도를 4.7 nM에서 0.03 nM 미만(정량의 하한)로 감소시켰다. 꼬리를 베어 출혈을 개시하였으며, 30 분 동안 모니터링하였다. 비이클 처리 마우스에서 꼬리를 베었을 때 평균 총 티카그렐로 및 TAM 혈장 농도는 2.4 μM 및 0.6 μM였다. 30 분 동안의 총 혈액 소실 및 출혈 시간은 티카그렐로에 의해 유의적으로(p < 0.05) 증가하였다(각각 약 3.8 배 및 약 1.6 배 증가). TICA0212/MEDI2452는, 혈액 소실과 출혈 시간을 티카그렐로 단독 처리시보다 유의적으로(p < 0.05) 역전시켰다가, 다시 티카그렐로로 처리되지 않은 마우스와 유의적으로 다르지 않은 수준으로 되돌렸다(도 12). 이러한 예방적 조건에서, TICA0212/MEDI2452는 티카그렐로 의존적 출혈을 정상화하였다. TICA0212/MEDI2452에 대해 설명해 주는, 생체 외 모델로부터 이와 같은 생체 내 모델로 바꾸어 해석된 개시 시간 30 분은 혈액 소실 및 출혈 시간 둘 다를 티카그렐로 처리되지 않은 마우스에서의 혈액 소실 및 출혈 시간 둘 다로 정상화할 수 있었다.

[0344] **실시예 13: 티카그렐로 및 TAM의 총 혈장 농도**

[0345] 혈액 시료를 수집하여, EDTA 항 응고제가 담긴 튜브에 담고 나서, 실온 및 10000 ×g에서 5 분 동안 원심 분리하여 혈장을 마련하였다. 공지된 문헌[Sillé H., et al., J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2010;878:2299-306]에 기술된 바와 같되 다음과 같은 수정을 가하여, 단백질 침전과, 이원 질량 분광분석법 병행 액체 크로마토그래피(LC-MS/MS)에 의해 티카그렐로 및 TAM의 혈장 농도를 측정하였다. 혈장 50μl에서 아세트니트릴 중 180 μl 내부 표준(D7-ZD6140)으로 단백질을 침전시켰다. 액체 크로마토그래피 시스템 및 질량 분광분석기는, Waters사의 Xevo TQ-S 질량 분광분석기와 통합된 Acquity Ultra Performance LC였다. Acquity UPLC® BEH C18 컬럼(2.1 × 50 mm, 입도 = 1.7 μm) 상에서 크로마토그래피 분리를 수행하였다. 네거티브 전자분무이온화를 이용하였다. 용리액 A는 10 mmol/L 아세트산암모늄을 포함하는 물(pH 5)이었으며, 용리액 B는 10 mmol/L 아세트산암모늄을 포함하는 아세트니트릴이었다. 주사 용적은 1 μl 내지 5 μl였으며, 분석 구배는, 4% B로부터

시작하여, 1.5 분 이내에 95%까지 증가시켜 2.3 분이 될 때까지 유지시킨 다음, 다시 2.4 분 이내에 처음 조건으로 복구시키고 나서, 0.3 분 동안 다시 평형화하도록 적용하였다. 본 분석에서는 품질 대조군 시료를 사용하지 않았다. 정량의 하한(LLOQ)은 0.005 $\mu\text{mol/L}$ 였으며, 교정 범위는 0.005 μM 내지 15.0 μM 이었다.

[0346] TICA0212/MEDI2452 존재 하에 티카그렐로 및 TAM의 총 혈장 농도는, 1% 포름산(FA: 시료, 1:5)을 첨가한 다음, 상기 기술된 바와 같이 단백질 침전 및 LC-MS/MS를 수행하여 측정하였다. 시료에 포름산을 첨가하여, 티카그렐로와 TICA0212/MEDI2452의 해리를 촉진하였다.

[0347] **실시예 14: 무 티카그렐로 혈장 농도**

[0348] 이미 발표된 문헌[Sillén H., et al., J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2011 Aug 1;879(23):2315-22]의 방법을 기반으로 하여 본 방법을 최적화하였다. 6 kDa 내지 8 kDa 미만의 질량을 가지는 분자는 통과시킬 수 있는 투석 막(Spectrum Laboratories, Inc)을 10 분 내지 15 분 동안 ELGA 물에 침지한 다음, (실험실 내 제작한) 투석 평판들 2 개의 사이에 배치하였다. 혈장 130 μL 를 이 투석 평판 중 한쪽에 첨가한 후, 반대쪽에는 인산염 완충액 130 μL (pH 7.0)를 첨가하였다. 양쪽에 있는 웰들을 뚜껑으로 막은 다음, 이 평판들의 양쪽 윗부분에 알루미늄 평판을 올려놓아 누수를 방지하였다. 그 다음, 평판을 궤도 진탕기 상에 수직으로 놓은 다음, 진탕하였다(100 rpm/분, 37°C, 24 시간). 혈장이 있는 쪽으로부터 유래하는 투석유물 50 μL 와, 완충액이 있는 쪽으로부터 유래하는 투석물 75 μL 를, 아세트니트릴 중 75 μL 내부 표준(D7-ZD6140)과 150 μL 내부 표준이 각각 담긴 단백질 LoBind PCR 청정 96 심-웰 평판으로 옮겨담아 투석을 마쳤다. 평판 중 내용물을 1 분 동안 혼합한 다음, 20 분 동안 1500 \times g 및 4°C에서 원심분리하였다. 원심분리 후, 침전된 투석유물로부터 유래하는 상청액 50 μL 를 옮겨 담은 후, 이를 ELGA H₂O 50 μL 로 희석하고 나서, LC-MS/MS(Xevo TQ-S 질량 분광 분석기와 통합된 Acquity Ultra Performance LC, Waters) 분석을 수행하였다. 본 분석에서는 품질 대조군 시료를 사용하지 않았다. 투석유물에 대한 교정 범위는 0.4 nmol/L 내지 1000 nmol/L이었고, 투석물에 대한 교정 범위는 0.003 nmol/L 내지 50 nmol/L이었다. 투석물 중 티카그렐로에 대한 LLOQ는 0.0003 nmol/L이었다.

[0349] 이하 표 9는 상기 실시예들에 기술되어 있고, 본원에 개시된 기술의 특정 구현예들을 예시하는 데에 사용된 예시적 항체들에 관한 개관을 제공한다.

표 9

항체/scFv/Fab 서열들의 요약

항체 기준 서열	서열
TICA0010 VH DNA (서열번호 1)	GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGCT ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG CACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCAACATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC AACAGAGTAC GACCTGCAAC GGCCTTTTCG GTTTGACTTC TGGGGCAAGG GGACAATGGT CACCGTCTCG AGT
TICA0010 VH (서열번호 2)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSYAMS WVRQAPGKLEWVSAL SGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEYDL QRPFGFDFWGRGTMIVSS
TICA0010 VH CDR1 (서열번호 3)	SYAMS
TICA0010 VH CDR2 (서열번호 4)	AISGSGGSTYYADSVK
TICA0010 VH CDR3 (서열번호 5)	EYDLQRPFGFDF

[0350]

TICA0010 VL DNA (서열번호 6)	TCCTATGTGC TGA CT CAGCC ACCCTCAGCG TCTGGGGCCC CCGGGCAGAG GGCTACCATC TCCTGCTCTG GAAGCAGCTC CAACATCGGA AGTAATCTTG TGA ACT TGGTA CCAACAATTC CCAGGAGAGG CCCCCAAGCT CCTCATCTTT AGTGACAATC AACGACCCCTC AGGGGTCCCT GACCGATTCT CTGGCTCCAG GTCTGGCACC TCAGCCTCCC TGGCCATCAG TGGGCTCCAG TCCGAGGATG AGGCTGATTA T T ACTGTGCA ACGTGGGATG ACAGACTGGA TGGTTATGTG GTATTCCGGC GAGGGACCAA GCTGACCGTC CTA
TICA0010 VL (서열번호 7)	<u>SYVLTQPPSASGAPGQRATISCSGSSSNIGSNLVNWYQQFPGEAPKLLIFS</u> <u>DNQRPSGVPDRFSGRSRGTASLAISGLQSEDEADYYCATWDDRLDGYVVF</u> GGGTKLTVL
TICA0010 VL CDR1 (서열번호 8)	SGSSSNIGSNLVN
TICA0010 VL CDR2 (서열번호 9)	SDNQRPS
TICA0010 VL CDR3 (서열번호 10)	ATWDDRLDGYVV
TICA0049 VH DNA (서열번호 11)	CAGGTACAGC TGCAGCAGTC AGGGGCTGAG GTGAAGAAGC CTGGGGCCTC AGTGAAGGTI TCCTGCAAGG CTTCTGGATA CACCTTCATT ACCTATGGTA T T CACTGGGT GCGCCAGGCC CCCGGACAAG GGCTTGAGTG GATGGGATGG ATCGACCCCG GGCATGGTTA CACAAAATAT TCACAGAAGT TCCAGGGCAG AGTCACCATT ACCAGGGACA CATCCGCGAG CACAGCCTAC ATGGAGATGA GCAGCCTCAG ATCTGAAGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGAGCGGAC CTGGGTGACT ACTGGGGCCG GGGAACCCTG GTCACCGTCT CGAGT
TICA0049 VH (서열번호 12)	<u>QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITYGIHWVRQAPGQGLEWMGWI</u> <u>DPGHGYTKYSQKFQGRVTITRDTSASTAYMEMSSLRSEDTAVYYCARADLG</u> <u>DYWGRGTLTVSS</u>
TICA0049 VH CDR1 (서열번호 13)	TYGIH
TICA0049 VH CDR2 (서열번호 14)	WIDPGHGYTKYSQK FQ
TICA0049 VH CDR3 (서열번호 15)	ADLG Y

[0351]

TICA0049 VL DNA (서열번호 16)	CAGTCTGTCG TGACGCAGCC GCCCTCAGTG TCTGCGGCC CAGGACAGAA GGTCACCATC TCCTGCTCTG GAAGCAGCTC CAACATTGGG AAGAATTATG TTTCCTGGTT CCAGCAGCTC CCAGGTACAG CCCCCTAACT CCTCATTAT GACAATCATA AGCGACCCCTC AGGGATTCTT GACCGATTCT CTGCTCCAA GTCTGGCACG TCAGCCACCC TGGTCATCTC CGGTCTCCAG ACTGGGGACG AGGCCCATTA TTA ^U CTGCGGA ACATGGGATA CCAGACTGAG TGCTGGGGTG TTCGGCGGAG GGACCAAGGT CACCGTCCTA
TICA0049 VL (서열번호 17)	QSVVTQPPSVSAAPGQKVTI ^U SCSGSSSNIGK ^U NYVSWFQQLPGTAPKLLIYD NHKRE ^U SGIPDRFSASKSGTSATLVISGLQTGDEAHYYCGTWDTRLSAGVFG GGTKVTVL
TICA0049 VL CDR1 (서열번호 18)	SGSSSNIGK ^U NYVS
TICA0049 VL CDR2 (서열번호 19)	DNHKRPS
TICA0049 VL CDR3 (서열번호 20)	GTWDTRLSAGV
TICA0053.VH DNA (서열번호 21)	GAGGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGCT ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG CACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCA ^U CCATC TCCAGAGACA ATCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGG CCATGATAGT AGTGGTACT CCTACTCCTT TGACTTCTGG GGGCGGGGA CCACGGTCAC CGTCTCGAGT
TICA0053 VH (서열번호 22)	EVQLLES ^U GGGLVQP ^U GGSLRLS ^U CAASGFTFSSYAMS ^U WVRQAPGKLEWVSAI SGSGG ^U STYYADSVKGRFTISR ^U DN ^U SKNTLYLQMN ^U SLRAEDTAVYYCGHDSSG YSYSFDFWGRGTTTVTVSS
TICA0053 VH CDR1 (서열번호 23)	SYAMS
TICA0053 VH CDR2 (서열번호 24)	AISGSGGSTYYADSVKG
TICA0053 VH CDR3 (서열번호 25)	DSSGYSYDFD

[0352]

TICA0053 VL DNA (서열번호 26)	CAGTCTGTGT TGACGCAGCC GCCCTCAGCG TCTGGGACCC CCGGGCAGAG GGTACCACATC TCTTGTTCIG GCAACATCTC CAACATCGGA AGTAACACTG TCAACTGGTA TCAACACGTC CCAGGAGCGG CCCCAGACT CCTCATCTAT GTTAATGATC AGCGGCCGTC AGGGGTCCCT GACCGATTCT CTGGCTCAA TCTTGGCACC TCAGCCTCCC TGGCCATCAG TGGGCTCCAG TCTGAAGATG AGGCTGATTA TTAAGTGTGCA ACGTGGGATG ACACCCTGAA TGGAGGGGTC TTCGGCGGAG GGACCAAGCT GACCGTCCTA
TICA0053 VL (서열번호 27)	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISC <u>SGNISNIGSNITVN</u> WYQHVPGAAPRLLIYV NDQRPSGVPDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEADYCATWDDTLNGGVFG GGTKLTVL
TICA0053 VL CDR1 (서열번호 28)	SGNISNIGSNITVN
TICA0053 VL CDR2 (서열번호 29)	VNDQRPS
TICA0053 VL CDR3 (서열번호 30)	ATWDDTLNGGV
TICA0072 VH DNA (서열번호 31)	CAGGTGCAGC TGCAGGAGTC CGGGGCTGAG GTGAAGAAGC CTGGGTCCTC GGTGAGGGTC TCCTGCAAGG CTTCTGGAGG CACCTTCGAC AGTTATAGTA TCCATTGGGT GCGCCAGGCC CCTGGACAAG GGCTTGAGTG GATGGGAGGG ATCATCCCTG CCTTTGGGAC ATTAAGCAGC GCACAGGACT TCCAGGCCAG AGTCACCATT AGCGCGGACA AGTCCACGAG CACAGCCTAT ATGGAGCTGA GCGGCCTGAG ATCTGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAGAGGGTCC CATCTTTACG ATTTTGGAG TGCTTCTCAT CCCCCAATG ATGCTCTTGC TATTTGGGGC CAAGGAACCC TGGTCACCGT CTCGAGT
TICA0072 VH (서열번호 32)	QVQLQESGAEVKKPGSSVRVSKASGGTFD <u>SYSIH</u> WVRQAPGGLEWMGGI IPAFGLTSSAQDFQARVTISADKSTSTAYMELSLRSEDYAVYYCARGSHL YDFWSASHPPNDALAIWQGQTLVTVSS
TICA0072 VH CDR1 (서열번호 33)	SYSIH
TICA0072 VH CDR2 (서열번호 34)	GIIPAFGLTSSAQDFQA
TICA0072 VH CDR3 (서열번호 35)	GSHLYDFWSASHPPNDALAI

[0353]

TICA0072 VL DNA (서열번호 36)	CAGTCTGTCG TGACGCAGCC GCCCTCAGTG TCTGCGGCC CAGGACAGAA GGTCACCATC TCCTGCTCTG GAAGCAACTC CGACATTGGC AACAAATTATG TGTCGTGGTA CCAACAGCTC CCAGGAACAG CCCCCAAACT CCTCATTAT GACAATAATA AACGACCCCTC AGGGATTCTT GACCGATTCT CTGGCTCCAA GTCTGGCAGC TCAGCCACCC TGGCCATCAC CGGACTCCAG GCTGGGGACG AGGCCGATTA TTAGTGCAGG ACATGGGATA TCAGCCTGAG CGCTGGCTTG TTCGGCGGAG GGACCAAGGT CACCGTCCTA
TICA0072 VL (서열번호 37)	QSVVTQPPSVSAAPGQKVTIISCSGSNSDIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYD NNKRESGIPDRFSGSKSGTSATLAIITGLQAGDEADYCYGTWDISLSAGLFG GGTKVTVL
TICA0072 VL CDR1 (서열번호 38)	SGSNSDIGNNYVS
TICA0072 VL CDR2 (서열번호 39)	DNNKRPS
TICA0072 VL CDR3 (서열번호 40)	GTWDISLSAGL
TICA0159 Vh DNA (서열번호 41)	CAGGTGCAGC TGCAGGAGTC CGGGGCTGAG GTGAAGAAGC CTGGGTCCIC GGTGAGGGTC TCCTGCAAGG CTTCTGGAGG CACCTTCGAC AGTTATAGTA TCCATTGGGT GCGCCAGGCC CCTGGACAAG GGCTTGAGTG GATGGGAGGG ATCATCCCTG CCTTTGGGAC ATTAAGCAGC GCACAGGACT TCCAGGCCAG AGTCACCATT AGCGCGGACA AGTCCACGAG CACAGCCTAT ATGGAGCTGA GCGGCCTGAG ATCTGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAGAGGGAGC TTCGACTACA GGTTTTGGAG TGCTTCTCAT CCCCCAATG ATGCTCTTGC TATTTGGGGC CAAGGAACCC TGGTCACCGT CTCGAGT
TICA0159 Vh (서열번호 42)	QVQLQESGAEVKKKPGSSVRVSKASGGTFDYSYIHWVRQAPGQGLEWMGGI IPAFCTLSSAQDFQARVTISADKSTSTAYMELSLRSEDYAVYYCARGSFD YRFWSASHPPNDALAIWGGTLVTVSS
TICA0159 Vh CDR1 (서열번호 43)	SYSIH
TICA0159 Vh CDR2 (서열번호 44)	GIIPAFCTLSSAQDFQA
TICA0159 Vh CDR3 (서열번호 45)	GSFDYRFWSASHPPNDALAI

[0354]

TICA0159 VL DNA (서열번호 46)	CAGTCTGTGCG TGACGCAGCC GCCCTCAGTG ICTGCGGCC CAGGACAGAA GGTCACCATC TCCTGCTCTG GAAGCAACTC CGACATTGGC AACAAATTATG TGTCGTGGTA CCAACAGCTC CCAGGAACAG CCCCCAACT CCTCATTTAT GACAATAATA AACGACCCTC AGGGATTCTT GACCGATTCT CTGGCTCCAA GTCTGGCACG TCAGCCACCC TGGCCATCAC CGGACTCCAG GCTGGGGACG AGGCCGATTA TTA CTGCGGG ACATGGGATA TCAGCCTGAG CGCTGGCTT TTCGGCGGAG GGACCAAGGT CACCGTCCTA
TICA0159 VL (서열번호 47)	QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSNSDIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYD NNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAIITGLQAGDEADYYCGTWDISLSAGLFG GGTKVTVL
TICA0159 VL CDR1 (서열번호 48)	SGSNSDIGNNYVS
TICA0159 VL CDR2 (서열번호 49)	DNNKRPS
TICA0159 VL CDR3 (서열번호 50)	GTWDISLSAGL
TICA0162 VH DNA (서열번호 51)	CAGGTGCAGC TGCAGGAGTC CGGGGCTGAG GTGAAGAAGC CTGGGTCCCTC GGTGAGGGTC TCCIGCAAGG CTTCTGGAGG CACCTTCGAC AGTTATAGTA TCCATTGGGT GCGCCAGGCC CCTGGACAAG GGCTTGAGTG GATGGGAGGG ATCATCCCTG CCTTTGGGAC ATTAAGCAGC GCACAGGACT TCCAGGCCAG AGTCACCATT AGCGCGGACA AGTCCACGAG CACAGCCTAT ATGGAGCTGA GCGGCCTGAG ATCTGAGGAC ACGGCCGTAT ATIACTGTGC GAGAGGCTCC TTCGACTACT ACTTTGGAG TGCTTTCAT CCCCCAATG ATGCTCTTGC TATTTGGGGC CAAGGAACCC TGGTCACCGT CTCGAGT
TICA0162 VH (서열번호 52)	QVQLQESGAIEVKKPGSSVRVSKASGGTFDSYSIHWVRQAPGQGLEWMGGI IPAFGTLSSAQDFQARVTISADKSTSTAYMELSGLRSEDTAVYYCARGSEF YFWSASHPPNDALAIWGQGLVTVSS
TICA0162 VH CDR1 (서열번호 53)	SYSIH
TICA0162 VH CDR2 (서열번호 54)	GIIPAFCTLSSAQDFQA
TICA0162 VH CDR3 (서열번호 55)	GSFYYFWSASHPPNDALAI

[0355]

TICA0162 VL DNA (서열번호 56)	CAGTCTGTCG TGACGCAGCC GCCCTCAGTG TCTGCGGCC CAGGACAGAA GGTACCATC TCCTGCTCTG GAAGCAACT CGACATTGGC AACCAATTATG TGTCGTGGTA CCAACAGCTC CCAGGAACAG CCCCCAACT CCTCATTTAT GACAATAATA AACGACCCTC AGGGATTCTT GACCGATTCT CTGGCTCCAA GTCTGGCAGC TCAGCCACCC TGGCCATCAC CGGACTCCAG GCTGGGGACG AGGCCGATTA TTA CTGCGGG ACATGGGATA TCAGCCTGAG CGCTGGCTTG TTCGGCGGAG GGACCAAGGT CACCGTCCTA
TICA0162 VL (서열번호 57)	QSVVTQPPSVSAAPGQKVTIISC.SGSNSDIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYD NNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAIITGLQAGDEADYYCGTWDISLSAGLFG GGTKVTVL
TICA0162 VL CDR1 (서열번호 58)	SGSNSDIGNNYVS
TICA0162 VL CDR2 (서열번호 59)	DNNKRPS
TICA0162 VL CDR3 (서열번호 60)	GTWDISLSAGL
TICA0152 VH DNA (서열번호 61)	CAGGTGCAGC TGCAGGAGTC CGGGGCTGAG GTGAAGAAGC CTGGGTCCTC GGTGAGGGTC TCCTGCAAGG CTCTGGAGG CACCTTCGAC AGTTATAGTA TCCATTGGGT GCGCCAGGCC CCTGGACAAG GGCTTGAGTG GATGGGAGGG ATCATCCCTG CCTTGGGAC ATTAAGCAGC GCACAGGACT TCCAGGCCAG AGTCACCATT AGCGCGGACA AGTCCACGAG CACAGCCTAT ATGGAGCTGA GCGGCCTGAG ATCTGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAGAGGGTCC CATCTTTACG ATTTTGGAG TGCTTCTCAT CCCCCAATG ATGCTCTTGC TATTTGGGGC CAAGGAACCC TGGTCACCGT CTCGAGT
TICA0152 VH (서열번호 62)	QVQLQESGAEVKPKGSSVRVSKASGGTFDYSYIHWVRQAPGQGLEWMGGI IPAFGTLSSAQDFQARVTISADKSTSTAYMELSGLRSEDVAVYYCARGSHL YDFWSASHPPNDALAIWGQGLTVTVSS
TICA0152 VH CDR1 (서열번호 63)	SYSIH
TICA0152 VH CDR2 (서열번호 64)	GIIPAFGTLSSAQDFQA
TICA0152 VH CDR3 (서열번호 65)	GSHLYDFWSASHPPNDALAI

[0356]

<p>TICA0152 VL DNA (서열번호 66)</p>	<p>CAGTCTGTGC TGACGCAGCC GCCCTCAGTG TCTGCGGCC CAGGACAGAA GGTCACCATC TCCTGCTCTG GAAGCAACTC CGACATTGGC AACAATTATG TGTCGTGGTA CCAACAGCTC CCAGGAACAG CCCCCTAACT CCTCATTAT GACAATAATA AACGACCCTC AGGGATTCTT GACCGATTCT CTGGCTCCAA GTCTGGCAGC TCAGCCACCC TGGCCATCAC CGGACTCCAG GCTGGGGACG AGGCCGATTA TTAGTGGGG ACATGGCTGT ACGACCGGGC CGTCGGCTTG TTCGGCGGAG GGACCAAGGT CACCGTCTTA</p>
<p>TICA0152 VL (서열번호 67)</p>	<p>QSVVTOPPSVSAAPGQKVTISCSGSNSDIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYD NNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAIITGLQAGDEADYYCGTWLYDRAVGLFG GGTKVTVL</p>
<p>TICA0152 VL CDR1 (서열번호 68)</p>	<p>SGSNSDIGNNYVS</p>
<p>TICA0152 VL CDR2 (서열번호 69)</p>	<p>DNNKRPS</p>
<p>TICA0152 VL CDR3 (서열번호 70)</p>	<p>GTWLYDRAVGL</p>
<p>TICA0212/MEDI2452 VH DNA (서열번호 71)</p>	<p>CAGGTGCAGC TGCAGGAGTC CGGGGCTGAG GTGAAGAAGC CTGGGTCCCTC GGTGAGGGTC TCCTGCAAGG CTCTGGAGG CACCTTCGAC AGTTATAGTA TCCATTGGGT GCGCCAGGCC CCTGGACAAG GGCTTGAGTG GATGGGAGGG ATCATCCCTG CCTTTGGGAC ATTAAGCAGC GCACAGGACT TCCAGGCCAG AGTCACCATT AGCGCGGACA AGTCCACGAG CACAGCCTAT ATGGAGCTGA GCGGCCTGAG ATCTGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAGAGGCTCC TTCGACTACT ACTTTGGAG TGCTTCTCAT CCCCCAATG ATGCTCTTGC TATTGGGGC CAAGGAACCC TGGTCACCGT CTCGAGT</p>
<p>TICA0212/MEDI2452 VH (서열번호 72)</p>	<p>QVQLQESGAEVKPKGSSVRVSKASGGTFDSYSIHWVROAPGQGLEWMGGI IPAFGLTSSAQDFQARVTISADKSTSTAYMELSGLRSEDTAVYYCARGSEF YYFWSASHPPNDALAIWQQGTLVTVSS</p>
<p>TICA0212/MEDI2452 VH CDR1 (서열번호 73)</p>	<p>SYSIH</p>
<p>TICA0212/MEDI2452 VH CDR2 (서열번호 74)</p>	<p>GIIPAFGLTSSAQDFQA</p>

[0357]

TICA0212/MEDI2452 Vh CDR3 (서열번호 75)	GSFDYYFWSASHPPNDALAI
TICA0212/MEDI2452 VL DNA (서열번호 76)	CAGTCTGTCTG TGACGCAGCC GCCCTCAGTG TCTGCGGCC CAGGACAGAA GGTCAACATC TCCTGCTCTG GAAGCAACTC CGACATTGGC AACAAATTATG TGTCGTGGTA CCAACAGCTC CCAGGAACAG CCCCAAACCT CTCATTAT GACAATAATA AACGACCCTC AGGGATTCTT GACCGATTCT CTGGCTCCAA GTCTGGCAGC TCAGCCACCC TGGCCATCAC CGGACTCCAG GCTGGGGACG AGGCCGATTA TTAGTGC GGG ACATGGCTGT ACGACCGGGC CGTCGGCTTG TCGGCGGAG GGACCAAGGT CACCGTCCTA
TICA0212/MEDI2452 VL (서열번호 77)	QSVVTQPPSVSAAPGQKVTIISCSGSNSDIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYD NNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQAGDEADYCGTWLYDRAVGLFG GGTKVTVL
TICA0212/MEDI2452 VL CDR1 (서열번호 78)	SGSNSDIGNNYVS
TICA0212/MEDI2452 VL CDR2 (서열번호 79)	DNNKRPS
TICA0212/MEDI2452 VL CDR3 (서열번호 80)	GTWLYDRAVGL

[0358]

[0359]

참고문헌들 및 참고문헌으로서의 포함

1. Van Giezen JJ, Nilsson L, Berntsson P, et al. Ticagrelor binds to human P2Y₁₂ independently from ADP but antagonizes ADP-induced receptor signalling and platelet aggregation. *J Thromb Haemost.* 2009;7(9):1556-1565
2. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2009;361:1045-1057.
3. Amsterdam EA, Wenger NK, Brindis RG, et al. 2014 ACC/AHA guideline for the management of patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: a report of the

[0360]

- American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014;000:000-000
4. Storey RF, Angiolillo DJ, Patil SB, et al. Inhibitory effects of ticagrelor compared with clopidogrel on platelet function in patients with acute coronary syndromes: the PLATO (PLATElet inhibition and patient Outcomes) PLATELET substudy. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56(18):1456-1462.
 5. Taylor G, Osinski D, Thevenin A, et al. Is platelet transfusion efficient to restore platelet reactivity in patients who are responders to aspirin and/or clopidogrel before emergency surgery? *J Trauma Acute Care Surg*. 2013;74:1367-1369.
 6. Prüller F, Drexler C, Archan S, Macher S, Raggam RB, Mahla E. Low platelet reactivity is recovered by transfusion of stored platelets: a healthy volunteer in vivo study. *J Thromb Haemost*. 2011;9(8):1670-1673.
 7. Hansson EC, Shams Hakimi C, Åström-Olsson K, et al. Effects of ex vivo platelet supplementation on platelet aggregability in blood samples from patients treated with acetylsalicylic acid, clopidogrel, or ticagrelor. *Br J Anaesth*. 2014;112(3):570-575.
 8. Thiele T, Sümnig A, Hron G. Platelet transfusion for reversal of dual antiplatelet therapy in patients requiring urgent surgery: a pilot study. *J Thromb Haemost*. 2012;10:968-971.
 9. Pehrsson S, Hansson K, Nylander S. Ticagrelor-induced bleeding in mice can be reversed by FVIIa (NovoSeven®) and FII. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(10S):E212.
 10. Dolgin E. Antidotes edge closer to reversing effects of new blood thinners. *Nat Med*. 2013;19(3):251.
 11. Crowther MA, Ageno W, Garcia D, et al. Oral vitamin K versus placebo to correct excessive anticoagulation in patients receiving warfarin: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2009;150:293-300.
 12. Schiele F, van Ryn J, Canada K, et al. A specific antidote for dabigatran: functional and structural characterization. *Blood*. 2013;121:3554-3562.
 13. Lu G, DeGuzman FR, Hollenbach SJ, et al. A specific antidote for reversal of anticoagulation by direct and indirect inhibitors of coagulation factor Xa. *Nat Med*. 2013;19:446-451.

[0361]

14. Storey RF, Husted S, Harrington RA, et al. Inhibition of platelet aggregation by AZD6140, a reversible oral P2Y12 receptor antagonist, compared with clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50:1852-1856.
15. Husted SE, Storey RF, Bliden K, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ticagrelor in patients with stable coronary artery disease: results from the ONSET-OFFSET and RESPOND studies. *Clin Pharmacokinet.* 2012;51(6):397-409.
16. Teng R, Oliver S, Hayes MA, Butler K. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of ticagrelor in healthy subjects. *Drug Metab Dispos.* 2010;38(9):1514-1521.
17. Daramola O, Stevenson J, Dean G, et al. A high-yielding CHO transient system: coexpression of genes encoding EBNA-1 and GS enhances transient protein expression. *Biotechnol Prog.* 2014;30(1):132-141.
18. Oprea TI, Nielsen SK, Ursu O, et al. Associating Drugs, Targets and Clinical Outcomes into an Integrated Network Affords a New Platform for Computer-Aided Drug Repurposing. *Mol Inform.* 2011;30:100-111.
19. Springthorpe B, Bailey A, Barton P, et al. From ATP to AZD6140: the discovery of an orally active reversible P2Y12 receptor antagonist for the prevention of thrombosis. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007;17:6013-6018.
20. Fanning SW1, Horn JR. An anti-hapten camelid antibody reveals a cryptic binding site with significant energetic contributions from a nonhypervariable loop. *Protein Sci.* 2011;20:1196-1207.
21. Zhang K, Zhang J, Gao ZG, et al. Structure of the human P2Y12 receptor in complex with an antithrombotic drug. *Nature.* 2014;509:115-118.
22. Cattaneo M, Schulz R, Nylander S. Adenosine-mediated effects of ticagrelor: evidence and potential clinical relevance. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63:2503-2509.
23. Sillén H, Cook M, Davis P. Determination of unbound ticagrelor and its active metabolite (AR-C124910XX) in human plasma by equilibrium dialysis and LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011;879(23):2315-2322.

[0362]

본원에 언급된 모든 간행물들과 특허들은, 각각의 개별 간행물 또는 특허가 구체적으로, 그리고 개별적으로 참고문헌으로 포함되었다고 지정되어 있는 바와 같이, 본원에 전체가 참고로 포함되어 있다.

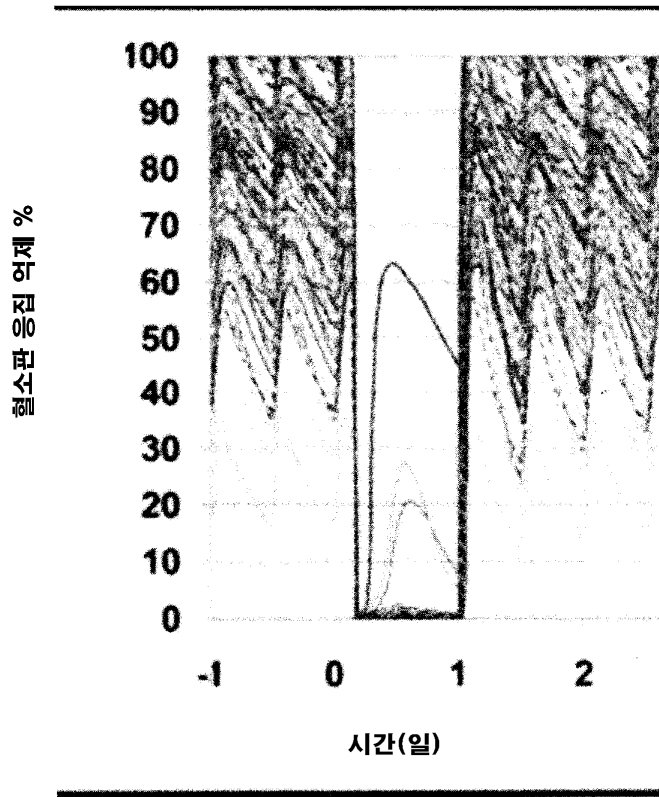
[0363]

본 개시내용의 특정 양태들이 논의되어 있으나, 전술된 발명의 설명은 예시적인 것이지 제한적인 것은 아니다. 본 명세서 및 이하 청구범위가 검토될 때 본 개시내용의 다수의 변형은 당업자들에게 명백할 것이다. 본 개시내용의 전체 범주는, 청구항들 및 이것들의 균등물의 전체 범위와, 발명의 설명 및 이의 변형을 참고로 하여 결정되어야 할 것이다.

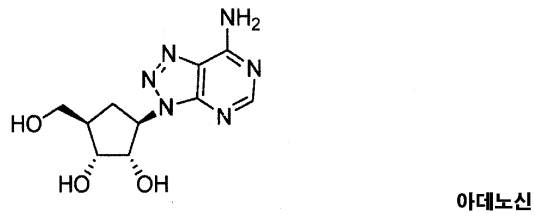
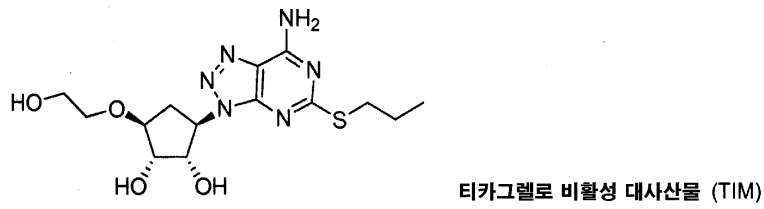
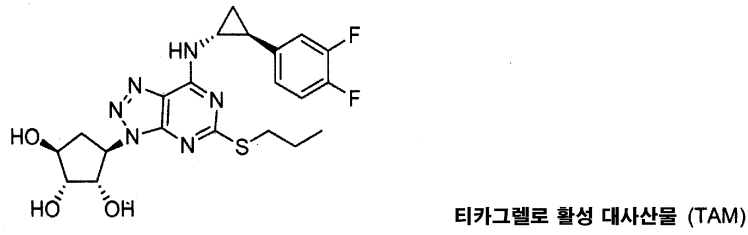
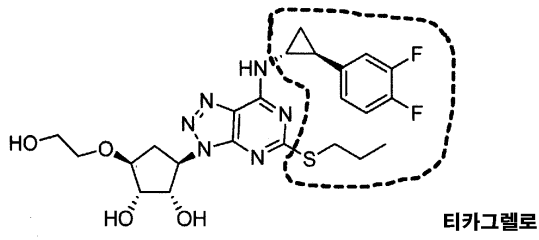
[0364]

도면

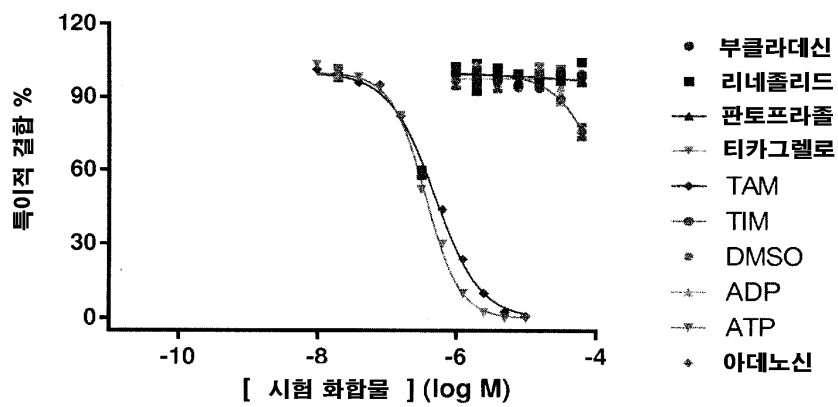
도면1



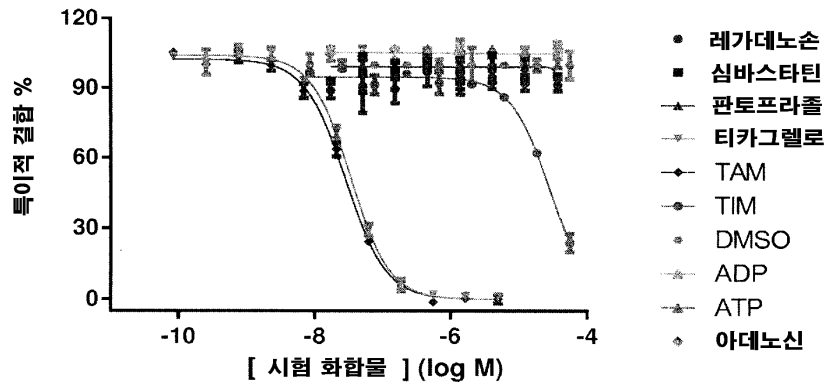
도면2a



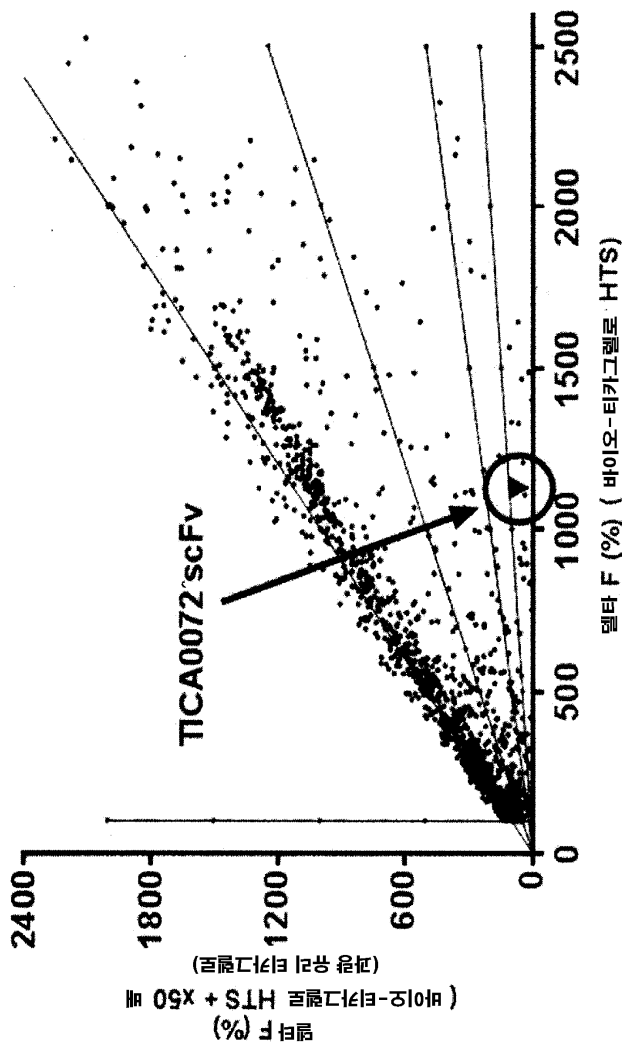
도면2b



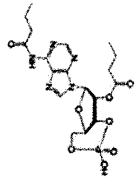
도면2c



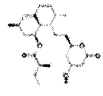
도면3



도면4



부클라데신



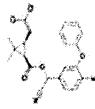
로바스타틴



판토프라졸



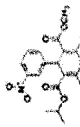
심로스타졸



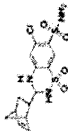
사이플루루트린



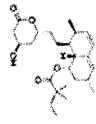
칸그렐로



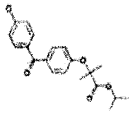
님바디핀



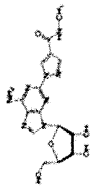
사이클로티아지드



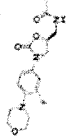
심비스타틴



페노피브레이트

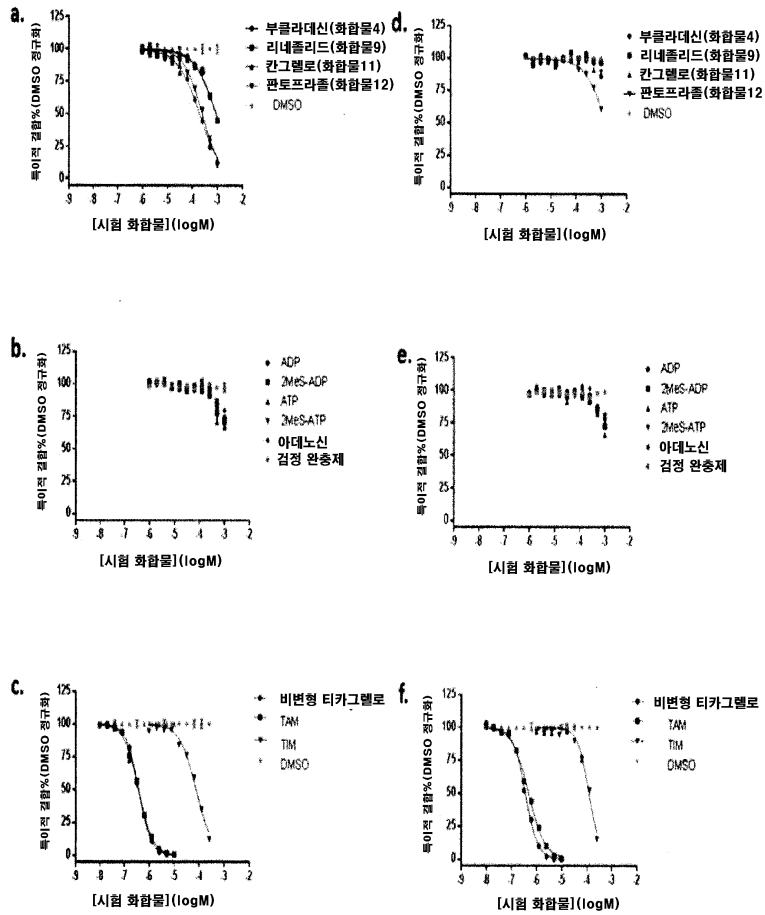


레가데노손

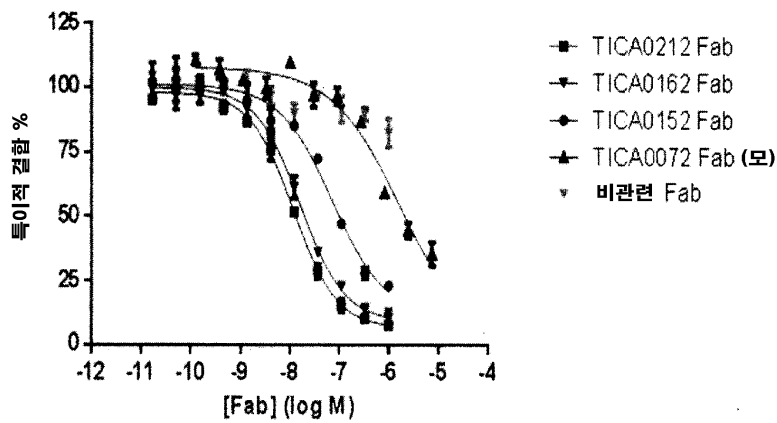


리네졸리드

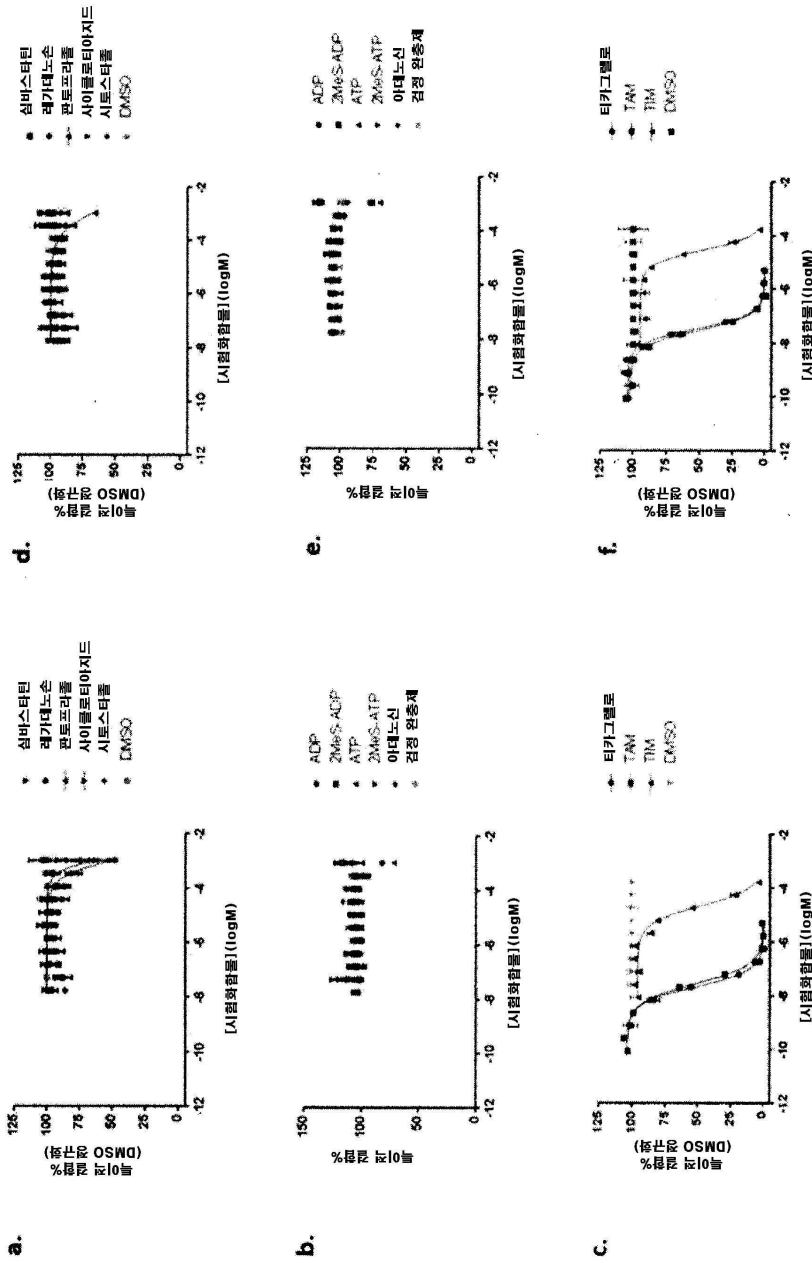
도면5



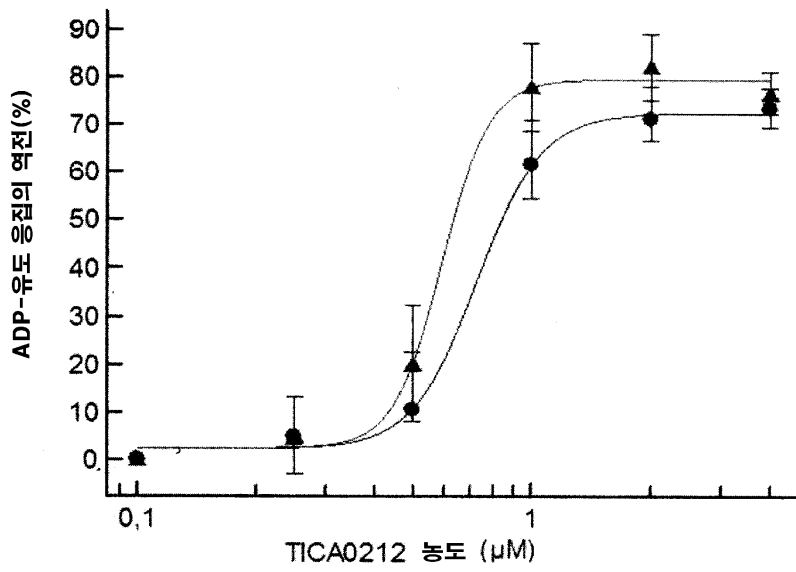
도면6



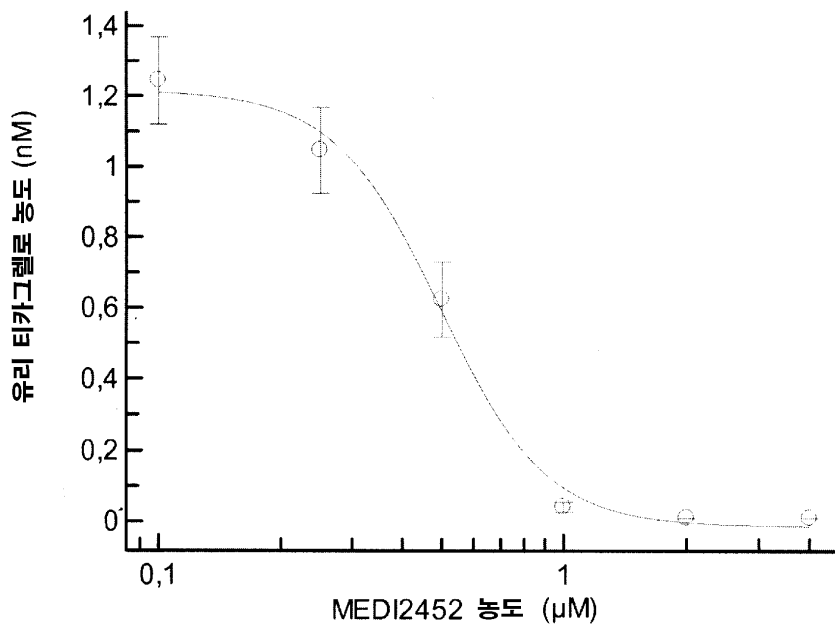
도면7



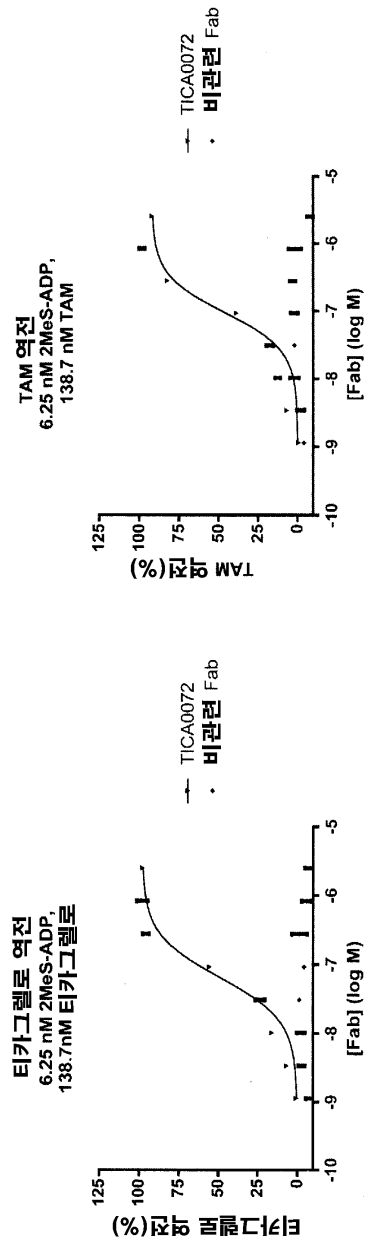
도면8a



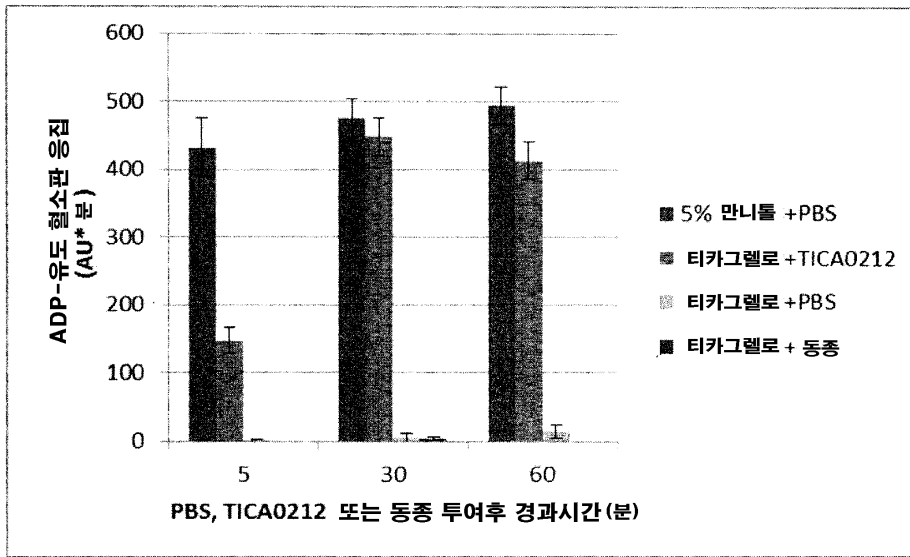
도면8b



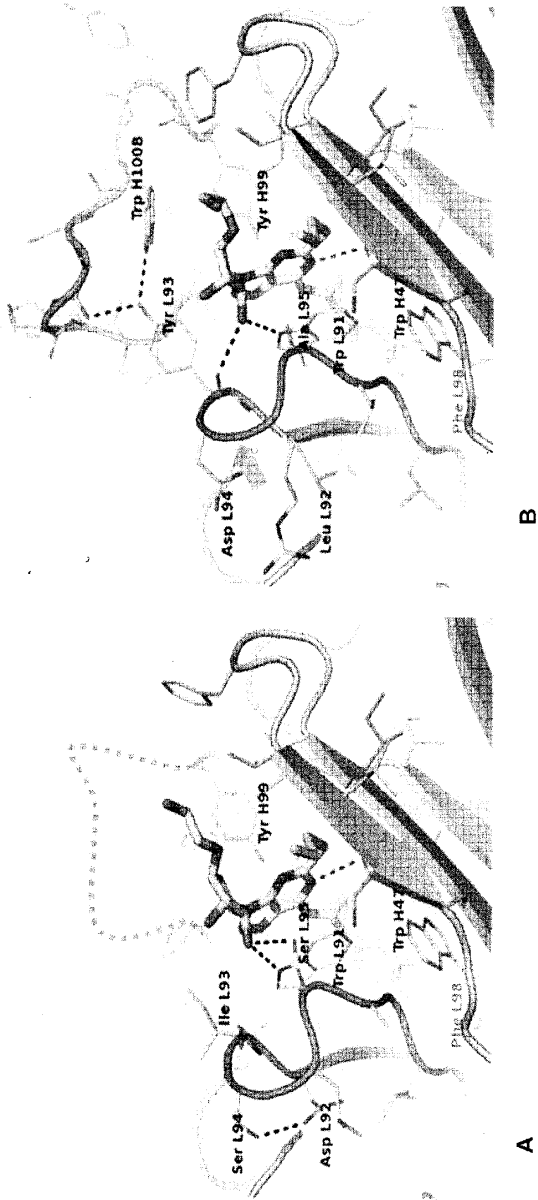
도면8c



도면9

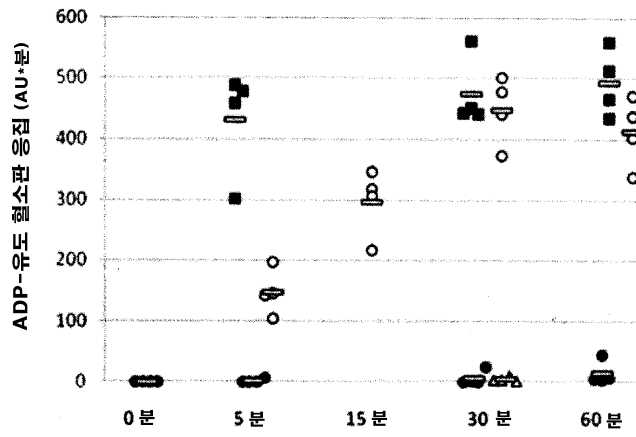


도면10

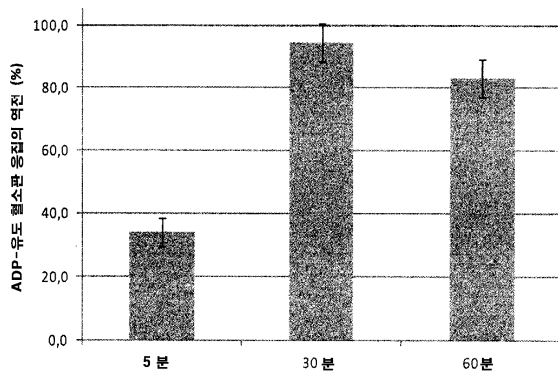


도면11

A

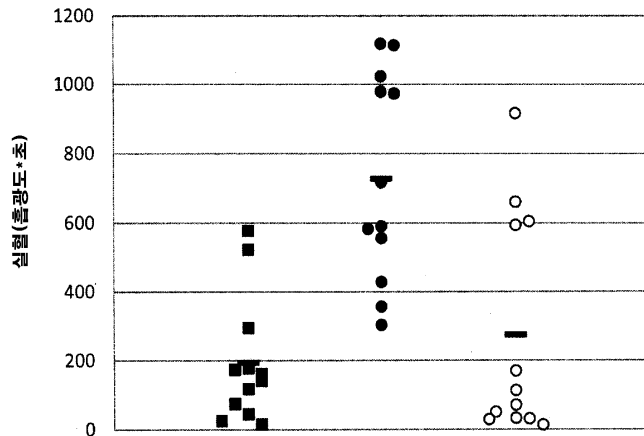


B

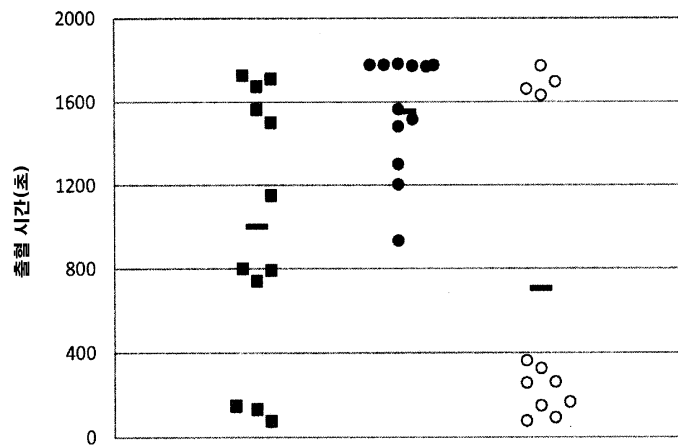


도면12

A



B



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110>

<120> Antibodies to Ticagrelor and Methods of Use

<130> TICA-100W01

<160> 80

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 363

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt cgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggttag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc aacagagtac 300
 gacctgcaac ggcccttcgg gtttgacttc tggggcaagg ggacaatggt caccgtctcg 360
 agt 363

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

Lys Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

1 5 10 15

Gly

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Glu Tyr Asp Leu Gln Arg Pro Phe Gly Phe Asp Phe

1 5 10

<210> 6

<211> 333

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

tcctatgtgc tgactcagcc accctcagcg tctggggccc ccgggcagag ggctaccatc 60

tcctgctctg gaagcagctc caacatcgga agtaatcttg tgaactggta ccaacaattc 120

ccaggagagg cccccaagct cctcatcttt agtgacaatc aacgaccctc aggggtccct 180

gaccgattct ctggctccag gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240

tccgaggatg aggctgatta ttactgtgca acgtgggatg acagactgga tggttatgtg 300

gtattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta 333

<210> 7

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

1 5 10 15

Arg Ala Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn

 20 25 30

Leu Val Asn Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu

 35 40 45

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

 50 55 60

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

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

 85 90 95

Asp Gly Tyr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

 100 105 110

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Leu Val Asn

1 5 10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Ser Asp Asn Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

1 5 10

<210> 11

<211> 345

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

caggtacagc tgcagcagtc aggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg ctcttgata caccttcatt acctatggta ttcactgggt gcgccaggcc 120
 cccggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcgaccccg ggcatggtta cacaaaatat 180
 tcacagaagt tccagggcag agtcaccatt accagggaca catccgcgag cacagcctac 240
 atggagatga gcagcctcag atctgaagac acggctgtgt attactgtgc gagagcggac 300
 ctgggtgact actggggcgg gggaaccctg gtcaccgtct cgagt 345

<210> 12

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Gly His Gly Tyr Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

Val Ser Ser
 115

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Thr Tyr Gly Ile His
 1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Trp Ile Asp Pro Gly His Gly Tyr Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ala Asp Leu Gly Asp Tyr
 1 5

<210> 16

<211> 330

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

cagtctgtcg tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60

tctgtctctg gaagcagctc caacattggg aagaattatg tttcttggtt ccagcagctc 120
 ccaggtacag cccccaaact cctcatttat gacaatcata agcgaccctc agggattcct 180
 gaccgattct ctgcctcaa gtctggcacg tcagccaccc tggatcatctc cggtctccag 240
 actggggacg aggccatta ttactgcgga acatgggata ccagactgag tgctggggtg 300
 ttcggcggag ggaccaaggt caccgtccta 330

<210> 17
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17

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

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

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

<210> 18
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Lys Asn Tyr Val Ser

1 5 10
 <210> 19
 <211>

7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Asp Asn His Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Gly Thr Trp Asp Thr Arg Leu Ser Ala Gly Val

1 5 10

<210> 21

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt cgccaggct 120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgg ccatgatagt 300

agtggttact cctactcctt tgacttctgg gggcggggga ccacggtcac cgtctcgagt 360

<210> 22

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

Gly His Asp Ser Ser Gly Tyr Ser Tyr Ser Phe Asp Phe Trp Gly Arg
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23

Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5
 <210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly
 <210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 25

Asp Ser Ser Gly Tyr Ser Tyr Ser Phe Asp Phe
 1 5 10
 <210> 26
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 26
 cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
 tcttgttctg gcaacatctc caacatcgga agtaaacactg tcaactggta tcaacacgtc 120
 ccaggagcgg cccccagact cctcatctat gttaatgata agcggccgtc aggggtcctc 180
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240

 tctgaagatg aggctgatta ttactgtgca acgtgggatg acaccctgaa tggaggggtc 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330
 <210> 27
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 27
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Asn Ile Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30
 Thr Val Asn Trp Tyr Gln His Val Pro Gly Ala Ala Pro Arg Leu Leu

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

 100 105 110

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Ser Gly Asn Ile Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn

1 5 10

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Val Asn Asp Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Ala Thr Trp Asp Asp Thr Leu Asn Gly Gly Val

1 5 10

<210> 31

<211> 387

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

caggtgcagc tgcaggagtc cggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgagggtc 60

tcctgcaagg cttctggagg caccttcgac agttatagta tccattgggt gcgccaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcctg cctttgggac attaagcagc 180

gcacaggact tccaggccag agtcaccatt agcgcggaca agtccacgag cacagcctat 240

atggagctga gcggcctgag atctgaggac acggccgtat attactgtgc gagagggtcc 300

catctttacg atttttggag tgcttctcat cccccaatg atgctcttgc tatttggggc 360

caaggaacce tggtcaccgt ctcgagt 387

<210> 32
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 32
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

 Asn Asp Ala Leu Ala Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser

<210> 33
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 33
 Ser Tyr Ser Ile His
 1 5
 <210> 34
 <211> 17
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

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

1 5 10 15

Ala

<210> 35

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Gly Ser His Leu Tyr Asp Phe Trp Ser Ala Ser His Pro Pro Asn Asp

1 5 10 15

Ala Leu Ala Ile

20

<210> 36

<211> 330

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 36

cagtctgtcg tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60

tctgtctctg gaagcaactc cgacattggc aacaattatg tgtctgtgta ccaacagctc 120

ccaggaacag cccccaaact cctcatTTat gacaataata aacgaccctc agggattcct 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tggccatcac cggactccag 240

gctggggacg aggccgatta ttactgcggg acatgggata tcagcctgag cgctggcttg 300

ttcggcggag ggaccaaggt caccgtccta 330

<210> 37

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

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

1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asp Ile Gly Asn Asn
 20 25 30
 Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ile Ser Leu
 85 90 95
 Ser Ala Gly Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105 110

<210> 38
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 38

Ser Gly Ser Asn Ser Asp Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 39
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 39

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 40
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 40

Gly Thr Trp Asp Ile Ser Leu Ser Ala Gly Leu

1 5 10

<210> 41

<211> 387

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

caggtgcagc tgcaggagtc cggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgagggtc 60

tcctgcaagg ctcttgagg caccttcgac agttatagta tccattgggt gcgccaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcctg cctttgggac attaagcagc 180

gcacaggact tccaggccag agtcaccatt agcgcggaca agtccacgag cacagcctat 240

atggagctga gcggcctgag atctgaggac acggccgtat attactgtgc gagagggagc 300

ttcgactaca ggttttggag tgcttctcat ccccccaatg atgctcttgc tatttggggc 360

caaggaaccc tggtcaccgt ctcgagt 387

<210> 42

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Arg Gly Ser Phe Asp Tyr Arg Phe Trp Ser Ala Ser His Pro Pro

100 105 110

Asn Asp Ala Leu Ala Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

115 120 125

Ser

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Ser Tyr Ser Ile His

1 5

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

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

1 5 10 15

Ala

<210> 45

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Gly Ser Phe Asp Tyr Arg Phe Trp Ser Ala Ser His Pro Pro Asn Asp

1 5 10 15

Ala Leu Ala Ile

20

<210> 46

<211> 330

<212> DNA

<213> Homo sapiens
 <400> 46
 cagtctgtcg tgacgcagcc gccctcagtg tctgcgcccc caggacagaa ggtcaccatc 60
 tcctgctctg gaagcaactc cgacattggc aacaattatg tgtcgtggta ccaacagctc 120
 ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata aacgacctc agggattcct 180
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tggccatcac cggactccag 240

 gctggggacg aggccgatta ttactgctggg acatgggata tcagcctgag cgctggcttg 300
 ttcggcggag ggaccaaggt caccgtccta 330

<210> 47

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

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

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

100 105 110

<210> 48

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Ser Gly Ser Asn Ser Asp Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Gly Thr Trp Asp Ile Ser Leu Ser Ala Gly Leu

1 5 10

<210> 51

<211> 387

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 51

caggtgcagc tgcaggagtc cggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgagggtc 60

tcctgcaagg ctcttgagg caccttcgac agttatagta tccattgggt gcgccaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcctg cctttgggac attaagcagc 180

gcacaggact tccaggccag agtcaccatt agcgcggaca agtccacgag cacagcctat 240

atggagctga gcggcctgag atctgaggac acggccgtat attactgtgc gagaggctcc 300

ttcgactact acttttggag tgcttctcat cccccaatg atgctcttgc tatttggggc 360

caaggaacce tggtcaccgt ctcgagt 387

<210> 52

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

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

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

Asn Asp Ala Leu Ala Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 53
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 53

Ser Tyr Ser Ile His
 1 5
 <210> 54
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 54

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

<210> 55

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Gly Ser Phe Asp Tyr Tyr Phe Trp Ser Ala Ser His Pro Pro Asn Asp

1 5 10 15

Ala Leu Ala Ile

20

<210> 56

<211> 330

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 56

cagtctgtcg tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60

tcttctctcg gaagcaactc cgacattggc aacaattatg tgtcgtggta ccaacagctc 120

ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata aacgaccctc agggattcct 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tggccatcac cggactccag 240

gctggggacg aggccgatta ttactgcggg acatgggata tcagcctgag cgctggcttg 300

ttcggcggag ggaccaaggt caccgtccta 330

<210> 57

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

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

1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asp Ile Gly Asn Asn

20 25 30

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

35

40

45

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

100 105 110

<210> 58
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 58

Ser Gly Ser Asn Ser Asp Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 59

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 60
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 60

Gly Thr Trp Asp Ile Ser Leu Ser Ala Gly Leu
 1 5 10

<210> 61
 <211> 387
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 61
 caggtgcagc tgcaggagtc cggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgagggtc 60
 tcctgcaagg ctcttgaggg caccttcgac agttatagta tccattgggt gcgccaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatccttg cctttgggac attaagcagc 180
 gcacaggact tccaggccag agtcaccatt agcgcggaca agtccacgag cacagcctat 240
 atggagctga gcggcctgag atctgaggac acggccgtat attactgtgc gagagggtcc 300
 catctttacg atttttggag tgcttctcat ccccccaatg atgctcttgc tatttggggc 360

caaggaacce tggtcaccgt ctcgagt 387

<210> 62

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

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

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

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

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

Gln Ala Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Asn Asp Ala Leu Ala Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 63

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Ser Tyr Ser Ile His

1 5

<210> 64

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

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

1 5 10 15

Ala

<210> 65

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Gly Ser His Leu Tyr Asp Phe Trp Ser Ala Ser His Pro Pro Asn Asp

1 5 10 15

Ala Leu Ala Ile

20

<210> 66

<211> 330

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 66

cagtctgtcg tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60

tcttctctcg gaagcaactc cgacattggc aacaattatg tctcgtggta ccaacagctc 120

ccaggaacag cccccaact cctcatttat gacaataata aacgaccctc agggattcct 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcagc tcagccaccc tggccatcac cggactccag 240

gctggggacg aggccgatta ttactgctgg acatggctgt acgaccgggc cgtcggcttg 300
 ttcggcggag ggaccaaggt caccgtccta 330

<210> 67
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 67

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

 100 105 110
 <210> 68
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 68

Ser Gly Ser Asn Ser Asp Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 69
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 69

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 70

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Gly Thr Trp Leu Tyr Asp Arg Ala Val Gly Leu

1 5 10

<210> 71

<211> 387

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 71

caggtgcagc tgcaggagtc cggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgagggtc 60
 tcctgcaagg ctcttgagg caccttcgac agttatagta tccattgggt gcgccaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcctg cctttgggac attaagcagc 180
 gcacaggact tccaggccag agtcaccatt agcgcggaca agtccacgag cacagcctat 240
 atggagctga gcggcctgag atctgaggac acggccgtat attactgtgc gagaggctcc 300
 ttcgactact acttttggag tgcttctcat cccccaatg atgetcttgc tatttggggc 360

caaggaaccc tggtcaccgt ctcgagt 387

<210> 72

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

Asn Asp Ala Leu Ala Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser

<210> 73

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Ser Glu Arg Thr Tyr Arg Ser Glu Arg Ile Leu Glu His Ile Ser
 1 5 10 15

<210> 74

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

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

Ala

<210> 75

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Gly Ser Phe Asp Tyr Tyr Phe Trp Ser Ala Ser His Pro Pro Asn Asp
 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Ile
 20
 <210> 76
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 76
 cagtctgtcg tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
 tctgtctctg gaagcaactc cgacattggc aacaattatg tgctctggta ccaacagctc 120
 ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata aacgaccctc agggattcct 180

 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccacc tggccatcac cggactccag 240
 gctggggacg aggccgatta ttactcgggg acatggctgt acgaccgggc cgtcggcttg 300
 ttcggcggag ggaccaaggt caccgtccta 330
 <210> 77
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 77
 Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asp Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

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

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

<210> 78

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Ser Gly Ser Asn Ser Asp Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 79

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 80

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Gly Thr Trp Leu Tyr Asp Arg Ala Val Gly Leu

1 5 10