(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0003860
(43) 공개일자 2019년01월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/38 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 9/50 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/38 (2013.01)
A61K 39/3955 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7000043(분할)
(22) 출원일자(국제) 2007년10월31일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2017-7026557
원출원일자(국제) 2007년10월31일
심사청구일자 2017년10월20일
(85) 번역문제출일자 2019년01월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2007/083172
(87) 국제공개번호 WO 2008/055206
국제공개일자 2008년05월08일
(30) 우선권주장
60/856,505 2006년11월02일 미국(US)

(71) 출원인
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
(72) 발명자
우, 헤렌
미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
싱, 산자야
미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장덕순, 이귀동

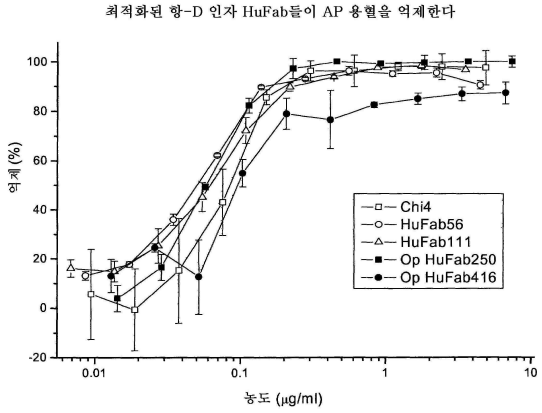
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **인간화 항-D 인자 항체**

(57) 요 약

본 발명은 항-인간 D 인자 모노클로날 항체, 이의 핵산 및 아미노산 서열, 이러한 항체를 보유하는 세포 및 벡터, 및 과도한 또는 제어되지 않은 보체 활성화와 관련된 질환 및 장애의 치료를 위한 조성물 및 의약의 제조에서의 이들의 용도에 관한 것이다. 이러한 항체는 질환의 진단, 예방 및 치료에 유용하다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12N 9/50 (2013.01)
C12Y 304/21 (2013.01)
C12Y 304/21046 (2013.01)
(72) 발명자
풍, 세크, 청
미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코 디 엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
안, 링-링
미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코 디 엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
로우맨, 헨리, 비.
미국 94018 캘리포니아주 엘 그라나다 샌 후안 애비뉴 400
켈리, 로버트, 에프.
미국 94066 캘리포니아주 샌 브루노 샌 펠리페 애비뉴 1029

명 세 서

청구범위

청구항 1

(1) 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, 서열 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 서열 19의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인; 및

(2) 서열 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, 서열 14의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 서열 20의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항-D 인자 항체 또는 그의 D 인자 결합 단편을 이용하여, 과도한 또는 제어되지 않은 보체 활성화와 관련된 장애를 치료하기 위한 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 보체 시스템은 면역 복합체의 소거 및 감염성 물질, 외래 항원, 바이러스-감염 세포 및 종양 세포에 대한 면역 응답에서 중심적인 역할을 한다. 그러나, 보체는 병리학적 염증 및 자가면역 질환에서 또한 수반된다. 따라서, 보체 케스케이드의 과도한 또는 제어되지 않은 활성화를 억제하면 이같은 질환 및 용태의 환자에게 임상 이점을 제공할 수 있다.

배 경 기 술

[0002] 보체 시스템은 고전 경로 및 대안 경로로 지정된 2가지 별개의 활성화 경로를 포함한다 ([V.M. Holers, Clinical Immunology: Principles and Practice, ed. R.R. Rich, Mosby Press; 1996, 363-391]). 고전 경로는 항원-항체 복합체의 형성에 의해 정상적으로 활성화되는 칼슘/마그네슘-의존적 케스케이드이다. 대안 경로는 특정한 감수성 표면 (예를 들어, 효모 및 박테리아의 세포벽 다당류, 및 특정 생체중합체) 상에서의 C3의 침착 및 활성화에 의해 활성화되는 마그네슘-의존적 케스케이드이다. 보체 경로의 활성화로 보체 단백질, 예를 들어 C3a, C4a 및 C5a 아나필락시스독소 및 C5b-9 막 공격 복합체 (MAC)의 생물학적으로 활성인 단편이 생성되고, 이는 백혈구 화학주성과 관련된 염증성 활성, 대식세포, 호중구, 혈소판, 비만 세포 및 내피 세포의 활성화, 혈관 투과성, 세포용해, 조직 손상을 매개한다.

[0003] D 인자는 대안적인 보체 경로의 활성화에 필수적인, 고도로 특이적인 세린 프로테아제이다. 이는 C3b에 결합된 B 인자를 절단하여, 대안 경로 C3/C5 컨버타제의 활성 성분인 C3b/Bb 효소를 생성시킨다. D 인자는 억제에 대한 적절한 표적일 수 있는데, 이는 인간에서의 혈장 농도가 매우 낮고 (1.8 ㎍/㎖), 대안적인 보체 경로의 활성화에 대한 제한적인 효소인 것으로 나타났기 때문이다 ([P.H. Lesavre and H.J. Mueller-Eberhard. J. Exp. Med., 1978; 148: 1498-1510]; [J.E. Volanakis et al., New Eng. J. Med., 1985; 312: 395-401]).

[0004] 보체 활성화의 하향 조절은 동물 모델 및 생체외 연구에서 여러 질환 적응증, 예를 들어, 전신 홍반 루푸스 및 사구체신염 ([Y. Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1996, 93: 8563-8568]), 류머티스성 관절염 ([Y. Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1995; 92: 8955-8959]), 심폐 우회술 및 혈액투석 ([C.S. Rinder, J. Clin. Invest, 1995; 96: 1564-1572]), 장기 이식에서의 초급성 거부 ([T.J. Kroshus et al., Transplantation, 1995; 60: 1194-1202]), 심근 경색 ([J.W. Homeister et al., J. Immunol., 1993; 150: 1055-1064]; [H.F. Weisman et al., Science, 1990; 249: 146-151]), 재관류 손상 ([E.A. Amsterdam et al., Am. J. Physiol., 1995; 268: H448-H457]), 및 성인성 호흡 곤란 증후군 ([R. Rabinovici et al., J. Immunol., 1992; 149: 1744-1750])을 치료하는데 효과적인 것으로 증명되었다. 더욱이, 열 손상, 중증 천식, 아나필락시스성 쇼크, 장 염증, 두드러기, 혈관부종, 혈관염, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 막증식성 사구체신염, 및 쇼그렌 증후군이 포함되는 기타 염증성 용태 및 자가면역/면역 복합체 질환이 보체 활성화와 또한 밀접하게 관련된다 ([V.M. Holers, 동일 문헌], [B.P. Morgan. Eur. J. Clin. Invest, 1994: 24: 219-228]).

[0005] 보체-매개 장애 분야에서 항체 치료제가 요구되고, 본 발명의 인간화 항체는 이러한 요구를 만족시키는데 유용한 고친화력 항체를 제공한다.

발명의 내용

[0006] **발명의 개요**

[0007] 일반적으로 본 발명은 D 인자와 관련된 생물학적 활성을 억제할 수 있는 항체인 뮤린(murine) 항체 166-32의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 서열을 포함하는 항체에 관한 것이다. 예를 들어, 18 ㎍/㎖ (혈액 내의 인간 D 인자의 몰 농도의 약 1.5배에 상당함; 약 1.5:1의 항-D 인자 항체 대 D 인자의 몰비)의 농도에서, 대안적인 보체 활성의 항체에 의한 상당한 억제가 관찰될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,956,107 참조)

[0008] 또한 본 발명은 뮤린 MAb 166-32의 인간화 항체에 관한 것이다. 본 발명은 항체의 가변 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열, 및 이들의 상응하는 핵산 서열을 포함한다. 본 발명의 또다른 실시양태는 이러한 항체들의 CDR 서열을 포함한다.

[0009] 본 발명의 또다른 실시양태는 본 발명의 항체를 포함하는 조성물을 포함한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체 서열을 보유하는 세포주 및 벡터를 제공한다. 한 양상에서, 본 발명은 본 발명의 항체 및 조성물의 제조 및 사용 방법을 포함한다.

[0010] 본 발명의 또다른 실시양태는 과도한 또는 제어되지 않은 보체 활성화와 관련된 장애의 치료를 위한 의약 또는 조성물의 제조를 위한 이러한 인간화 항체의 용도이다. 여기에는 심폐 우회술 수술 동안의 보체 활성화; 급성 심근 경색, 동맥류, 뇌졸중, 출혈성 쇼크, 압궤 손상, 다발성 장기 부전, 혈액량감소성 쇼크, 장 허혈 또는 허혈을 야기하는 기타 이벤트 후의 허혈-재관류로 인한 보체 활성화가 포함된다. 보체 활성화는 염증성 용태 예컨대 중증 화상, 내독소혈증, 패혈성 쇼크, 성인성 호흡 곤란 증후군, 혈액투석; 아나필락시스성 쇼크, 중증 천식, 혈관부종, 크론병, 겸상 적혈구 빈혈, 연쇄구균감염후 사구체신염 및 췌장염과 관련되는 것으로 또한 나타났다. 장애는 불리한 약물 반응, 약물 알러지, IL-2 유도 혈관 누출 증후군 또는 방사성 조영 물질 알러지의 결과일 수 있다. 자가면역 질환 예컨대 전신 홍반 루푸스, 중증 근무력증, 류머티스성 관절염, 알츠하이머병 및 다발성 경화증이 또한 포함된다. 보체 활성화는 이식 거부와 또한 관련된다. 보체 활성화는 눈 질환 예컨대 연령-관련 황반 변성, 당뇨병성 망막병증과 또한 관련된다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1A 및 1B는 뮤린 MAb 166-32 가변 중쇄 (도 1A) 및 가변 경쇄 (도 1B)의 아미노산 서열을 묘사한다.

도 2A 및 2B는 뮤린 MAb 166-32 가변 중쇄 (도 2A) 및 가변 경쇄 (도 2B)의 핵산 서열을 묘사한다.

도 3은 뮤린 MAb 166-32의 중쇄의 비교를 묘사한다.

도 4는 뮤린 MAb 166-32의 경쇄의 비교를 묘사한다.

도 5는 각각의 인간화 항체 클론 #56, #111, #250, 및 #416에 대한 가변 중쇄 및 가변 경쇄의 아미노산 서열을 묘사한다.

도 6은 인간화 항체 Fab 클론 #56, #111, #250, 및 #416에 대한 용혈 분석법 결과를 묘사한다.

도 7은 인간화 항체 Fab 클론 #56, #111, # 250, 및 #416에 의한 대안적인 보체 활성의 억제를 묘사한다.

도 8A-B (가변 중쇄 (VH) 컨센서스(consensus) 프레임워크(framework)) 및 도 9A-B (가변 경쇄 (VL) 컨센서스 프레임워크)는 본 발명의 실행에서 사용될 수 있는 대표적인 어셉터(acceptor) 인간 컨센서스 프레임워크 서열을 묘사하고, 이때 서열 식별자는 하기와 같다: (도 8A-B) 인간 VH 서브그룹(subgroup) I 컨센서스 프레임워크 빼기 카밧(Kabat) CDR (서열 28), 인간 VH 서브그룹 I 컨센서스 프레임워크 빼기 확장된 초가변 영역 (서열 29-31), 인간 VH 서브그룹 II 컨센서스 프레임워크 빼기 카밧 CDR (서열 32), 인간 VH 서브그룹 II 컨센서스 프레임워크 빼기 확장된 초가변 영역 (서열 33-35), 인간 VH 서브그룹 III 컨센서스 프레임워크 빼기 카밧 CDR (서열 36), 인간 VH 서브그룹 III 컨센서스 프레임워크 빼기 확장된 초가변 영역 (서열 37-39), 인간 VH 서브그룹 VII 컨센서스 프레임워크 빼기 카밧 CDR (서열 55), 인간 VH 서브그룹 VII 컨센서스 프레임워크 빼기 확장된 초가변 영역 (서열 56-58), 인간 VH 어셉터 프레임워크 빼기 카밧 CDR (서열 40), 인간 VH 어셉터 프레임워크 빼기 확장된 초가변 영역 (서열 41-42), 인간 VH 어셉터 2 프레임워크 빼기 카밧 CDR (서열 43) 및 인간 VH 어셉터 2 프레임워크 빼기 확장된 초가변 영역 (서열 44-46) 및 (도 9A-B) 인간 VL 카파 서브그룹 I 컨센서스 프레임워크 (서열 47), 인간 VL 카파 서브그룹 II 컨센서스 프레임워크 (서열 48), 인간 카파 서브그룹 III 컨센서스 프레임워크 (서열 49) 및 인간 카파 서브그룹 IV 컨센서스 프레임워크 (서열 50).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 정의

[0013] 본 출원 전반에 걸쳐 사용된 용어들은 당업자에게 통상적이고 전형적으로 의미로 해석되어야 한다. 그러나, 출원인은 하기의 용어들에게 하기에 정의된 바와 같은 특별한 정의가 부여되기를 원한다.

[0014] 항체 사슬 폴리펩티드 서열과 관련하여 "실질적으로 동일한"이라는 구절은 기준 폴리펩티드 서열에 대해 적어도 70%, 또는 80%, 또는 90% 또는 95%의 서열 동일성을 나타내는 항체 사슬로 해석될 수 있다. 핵산 서열과 관련하여 이러한 용어는 기준 핵산 서열에 대해 적어도 약 85%, 또는 90%, 또는 95% 또는 97%의 서열 동일성을 보이는 뉴클레오티드의 서열로 해석될 수 있다.

[0015] 용어 "동일성" 또는 "상동성"은 서열들을 정렬하고, 필요하다면 갭(gap)을 도입하여, 전체 서열에 대해 최대 백분율의 동일성을 달성한 후의 자신이 비교되는 상응하는 서열의 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율을 의미하는 것으로 해석되고, 이때 어떠한 보존성 치환도 서열 동일성의 일부로 간주되지 않는다. N- 또는 C-말단 확장 또는 삽입은 동일성 또는 상동성을 감소시키는 것으로 해석되지 않는다. 정렬을 위한 방법 및 컴퓨터 프로그램은 당업계에 주지되어 있다. 서열 분석 소프트웨어를 사용하여 서열 동일성을 측정할 수 있다.

[0016] 용어 "항체"는 가장 광범위한 의미로 사용되고, 구체적으로 모노클로날 항체 (전장 모노클로날 항체 포함), 폴리클로날 항체, 및 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체)를 포함한다. 항체 (Ab) 및 면역글로불린 (Ig)은 구조적 특성이 동일한 당단백질이다. 항체는 특정 표적에 대한 결합 특이성을 나타내는 반면, 면역글로불린은 항체 및 표적 특이성이 없는 기타 항체-유사 분자를 모두 포함한다. 일반적으로, 천연 항체 및 면역글로불린은 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된, 약 150,000 달톤의 이종사량체성 당단백질이다. 각각의 중쇄는 다수의 불변 도메인이 이어지는 가변 도메인 (V_H)을 한쪽 말단에 갖는다. 각각의 경쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인 (V_L)을 갖고 다른쪽 말단에 불변 도메인을 갖는다.

[0017] 본원에서 사용된 "항-인간 D 인자 항체"는 보체 활성화를 억제하거나 실질적으로 감소시키는 방식으로 인간 D 인자에 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다.

[0018] 항체의 가변 도메인의 문맥에서의 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분이 항체들 간에서 서열이 광범위하게 상이하고 각각의 특정 항체의 자신의 특정 항원에 대한 결합 및 특이성에서 사용된다는 사실을 지칭한다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전반에 걸쳐 고르게 분포되지 않는다. 이는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 양쪽 모두에서 상보성 결정 영역 (CDR) (초가변 영역 (HVR)으로 또한 알려짐)으로 칭해지는 3개의 절편에 집중된다. 가변 도메인의 더욱 고도로 보존된 부분은 프레임워크 (FR)로 칭해진다. 천연 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 도메인은 3개의 CDR에 의해 연결된, β-시트 형상을 주로 채택한 4개의 FR을 포함하고, 상기 CDR은 β-시트 구조를 연결하고 일부 경우에는 β-시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 각각의 사슬 내의 CDR은 FR 영역에 의해 매우 근접하게 함께 유지되고, 다른 사슬로부터의 CDR들과 함께 항체의 표적 결합 부위를 형성하는데 기여한다 ([Kabat et al.] 참조). 본원에서 사용된, 면역글로불린 아미노산 잔기의 번호매김은 달리 지시되지 않는 한 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, Md. 1987]의 면역글로불린 아미노산 잔기 번호매김 시스템에 따라 수행된다.

[0019] 용어 "초가변 영역", "HVR", 또는 "HV"는, 본원에서 사용될 때, 서열이 초가변성이고/이거나 구조적으로 한정된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 6개의 초가변 영역을 포함한다: VH 내의 3개 (H1, H2, H3) 및 VL 내의 3개 (L1, L2, L3). 다수의 초가변 영역 서술이 사용되고 있고, 본원에 포함된다. 카밧 상보성 결정 영역 (CDR)은 서열 가변성을 기초로 하고, 가장 통상적으로 사용된다 ([Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]). 그 대신, 코티아(Chothia)는 구조적 루프의 위치를 지칭한다 ([Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]). AbM 초가변 영역은 카밧 CDR과 코티아 구조적 루프 간의 절충안을 나타내고, Oxford Molecular의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 사용된다. "접촉" 초가변 영역은 입수가능한 복합체 결정 구조의 분석을 기초로 한다. 이러한 초가변 영역 각각으로부터의 잔기를 하기에 나타낸다.

루프	카밧	AbM	코티아	접촉
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(카밧 번호매김)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(코티아 번호매김)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0020]

[0021] 초가변 영역은 하기와 같은 "확장된 초가변 영역"을 포함할 수 있다: VL 내의 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 및 VH 내의 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102 또는 95-102 (H3). 가변 도메인 잔기는 각각의 이러한 정의에 대해 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 번호가 매겨진다.

[0022] "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에서 정의된 초가변 영역 잔기 또는 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

[0023] 용어 "카밧에서와 같은 가변 도메인 잔기 번호매김" 또는 "카밧에서와 같은 아미노산 위치 번호매김", 및 이의 변형은 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]에서의 항체의 편집의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 대해 사용된 번호매김 시스템을 지칭한다. 이러한 번호매김 시스템을 사용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축 또는 이들 내로의 삽입에 상응하는 더 적은 아미노산 또는 추가적인 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 뒤의 단일 아미노산 삽입물 (카밧에 따른 잔기 52a), 및 중쇄 FR 잔기 82 뒤의 삽입 잔기 (예를 들어, 카밧에 따른 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카밧 번호매김은 소정의 항체에 대해 "표준" 카밧 번호매김 서열과 항체 서열의 상동성의 영역에서의 정렬에 의해 결정될 수 있다.

[0024] 가변 도메인 (대략적으로, 경쇄의 잔기 1-107 및 중쇄의 잔기 1-113) 내의 잔기를 지칭할 때 카밧 번호매김 시스템이 일반적으로 사용된다 (예를 들어, [Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]). "EU 번호매김 시스템" 또는 "EU 지수"는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 내의 잔기를 지칭할 때 일반적으로 사용된다 (예를 들어, [Kabat et al., 상기 문헌]에서 보고된 EU 지수; 중쇄의 불변 도메인 내의 힌지(hinge) 영역은 대략적으로 중쇄의 잔기 216-230 (EU 번호매김)이다). "카밧에서와 같은 EU 지수"는 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 번호매김을 지칭한다. 본원에서 달리 언급되지 않는 한, 항체의 가변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 카밧 번호매김 시스템에 의한 잔기 번호매김을 의미한다. 본원에서 달리 언급되지 않는 한, 항체의 불변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 EU 번호매김 시스템에 의한 잔기 번호매김을 의미한다 (예를 들어, EU 번호매김을 위해, 미국 특허 가출원 번호 60/640,323의 도면 참조).

[0025] 용어 "항체 단편"은 전장 항체의 일부분, 일반적으로는 표적 결합 또는 가변 영역을 지칭한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', $F(ab')_2$ 및 Fv 단편이 포함된다. 항체의 "기능적 단편 또는 유사체"라는 구절은 전장 항체와 공통적인 정성적인 생물학적 활성이 있는 화합물이다. 예를 들어, 항-인간 D 인자 항체의 기능적 단편 또는 유사체는 보체 활성화를 방지하거나 실질적으로 감소시키는 방식으로 D 인자에 결합할 수 있는 것이다. 본원에서 사용된, 항체와 관련된 "기능적 단편"은 Fv, F(ab) 및 $F(ab')_2$ 단편을 지칭한다. "Fv" 단편은 완전한 표적 인식 및 결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이러한 영역은 1개의 중쇄 가변 도메인과 1개의 경쇄 가변 도메인이 단단한 비공유결합으로 회합되어 있는 이량체로 구성된다 (V_H-V_L 이량체). 각각의 가변 도메인의 3개의 CDR이 상호작용하여 V_H-V_L 이량체의 표면 상에 표적 결합 부위를 규정하는 것은 이러한 형상 내이다. 총괄적으로, 6개의 CDR이 표적 결합 특이성을 항체에 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 표적에 특이적인 3개의 CDR만을 포함한 Fv의 절반)도 표적을 인식하고 이에 결합하는 능력을 갖는다. "단일쇄 Fv" 또는 "sFv" 항체 단편은 단일 폴리펩티드 사슬 내에 존재하는 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함한다. 일반적으로, Fv 폴리펩티

드는 sFv가 표적 결합을 위한 원하는 구조를 형성할 수 있도록 하는 V_H 도메인과 V_L 도메인 간의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다.

[0026] Fab 단편은 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은, 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하여 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 몇개의 잔기들이 부가되어 있다는 점에서 Fab 단편과 다르다. F(ab') 항체 단편은 $F(ab')_2$ 펩신 소화 생성물의 힌지 시스테인에서의 디술피드 결합의 절단에 의해 생산된다. 항체 단편들의 추가적인 화학적 커플링이 당업자에게 공지되어 있다.

[0027] 본원에서 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체들의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하고, 즉 집단을 이루는 개별적인 항체들은 미량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 표적 부위에 대해 지시되어 고도로 특이적이다. 또한, 여러 결정인자 (에피토프)에 대해 지시된 여러 항체를 전형적으로 포함하는 통상적인 (폴리클로날) 항체 제제와는 달리, 각각의 모노클로날 항체는 표적 상의 단일 결정인자에 대해 지시된다. 이의 특이성에 더하여, 모노클로날 항체는 다른 면역글로불린에 오염되지 않고 하이브리도마 배양에 의해 합성될 수 있다는 점에서 유리하다. 수식어구 "모노클로날"은 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된다는 항체의 특성을 가리키는 것이며, 임의의 특정한 방법에 의한 항체 생산을 필요로 하는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에서 사용하기 위한 모노클로날 항체를 주지된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리할 수 있다. 본 발명에 따라 사용될 어버이 모노클로날 항체는 [Kohler and Milstein, Nature 256, 495 (1975)]에 최초로 기술된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 재조합 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0028] 비-인간 (예를 들어, 뮤린) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 사슬 또는 이의 단편 (예컨대 항체의 Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ 또는 기타 표적-결합 하위서열)이다. 일반적으로, 인간화 항체는 1개 이상, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함하고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비-인간 면역글로불린의 것들에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 면역글로불린 컨센서스 서열의 것들이다. 또한 인간화 항체는 면역글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 전형적으로는 선택된 인간 면역글로불린 주형의 것을 또한 포함할 수 있다.

[0029] 비-인간 항체를 인간화시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 일반적으로, 인간화 항체에는 비-인간 공급원으로부터의 하나 이상의 아미노산 잔기가 도입되어 있다. 이러한 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "수입" 잔기로 지칭되고, 이는 전형적으로는 "수입" 가변 도메인으로부터 취해진다. 인간화는 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 인간 항체의 상응하는 서열을 치환함으로써 Winter 및 공동 연구원의 방법 ([Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988)]; [Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)])에 따라 본질적으로 수행할 수 있다. 따라서, 이같은 "인간화" 항체는 무손상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 적은 서열이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체 (미국 특허 번호 4,816,567)이다. 실제로, 전형적으로 인간화 항체는 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사한 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다.

[0030] 인간화 항체를 제조하는데 사용되는 인간 가변 도메인 (경쇄 및 중쇄 모두)을 선택하는 것은 항체가 인간 치료 용도로 의도될 때 항원성 및/또는 HAMA 응답 (인간 항-마우스 항체)을 감소시키는데 일부 경우에 중요할 수 있다. 일반적으로, HAMA 응답의 감소 또는 제거는 적절한 치료제의 임상 개발의 중요한 양상이다. 예를 들어, [Khaxzaeli et al., J. Natl. Cancer Inst. (1988), 80:937]; [Jaffers et al., Transplantation (1986), 41:572]; [Shawler et al., J. Immunol. (1985), 135:1530]; [Sears et al., J. Biol. Response Mod. (1984), 3:138]; [Miller et al., Blood (1983), 62:988]; [Hakimi et al., J. Immunol. (1991), 147:1352]; [Reichmann et al., Nature (1988), 332:323]; [Junghans et al., Cancer Res. (1990), 50:1495] 참조. 본원에 기술된 바와 같이, 본 발명은 HAMA 응답이 감소 또는 제거되도록 인간화된 항체를 제공한다. 당업계에 공지된 일상적인 방법을 사용하여 이러한 항체들의 변이체가 추가로 수득될 수 있고, 상기 방법들 중 일부가 하기에 추가로 기술된다. 소위 "베스트-핏(best-fit)" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열을 공지된 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 설치류의 서열에 가장 근접한 인간 V 도메인 서열이 확인되고, 이러한 서열 내의 인간 프레임워크 영역 (FR)이 인간화 항체에 대해 수락된다 ([Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993)]; [Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901 (1987)]). 또다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 서브그룹의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정 프레임워크 영역을 사용한다. 여러 상이한 인간화 항체에 대해 동일한 프레임워크를 사용할 수 있다 ([Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci.

USA, 89:4285 (1992)]; [Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993)]).

[0031] 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 항체로부터의 아미노산 서열이 프레임워크 및/또는 초가변 서열(들)의 다양화를 위한 출발 (어버이) 서열로 작용할 수 있다. 출발 초가변 서열이 연결되는 선별된 프레임워크 서열은 본원에서 어셉터 인간 프레임워크로 지칭된다. 어셉터 인간 프레임워크가 인간 면역글로불린 (이의 VL 및/또는 VH 영역)으로부터의 것이거나 또는 이로부터 유래되지만, 어셉터 인간 프레임워크는 인간 컨센서스 프레임워크 서열로부터의 것이거나 이로부터 유래될 수 있는데, 이는 이같은 프레임워크가 인간 환자에서 면역원성이 최소이거나 없는 것으로 증명되었기 때문이다. 본원에서의 목적을 위한 "어셉터 인간 프레임워크"는 인간 면역글로불린 프레임워크로부터, 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 유래된 VL 또는 VH 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크"로부터 유래된" 어셉터 인간 프레임워크는 이의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 선재(先在)하는 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 아미노산 변화가 선재하는 경우, 바람직하게는 5개 이하, 바람직하게는 4개 이하, 또는 3개 이하의 아미노산 변화가 선재한다. 한 실시양태에서, VH 어셉터 인간 프레임워크는 VH 인간 면역글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열과 서열이 동일하다. 한 실시양태에서, VL 어셉터 인간 프레임워크는 VL 인간 면역글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열과 서열이 동일하다. "인간 컨센서스 프레임워크"는 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선집(選集)에서 가장 통상적으로 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 서열의 선집은 가변 도메인 서열의 서브그룹으로부터의 것이다. 일반적으로, 서열의 서브그룹은 [Kabat et al.]에서와 같은 서브그룹이다. 한 실시양태에서, VL에 대해, 서브그룹은 [Kabat et al.]에서와 같은 서브그룹 카파 I이다. 한 실시양태에서, VH에 대해, 서브그룹은 [Kabat et al.]에서와 같은 서브그룹 III이다.

[0032] 어셉터가 인간 면역글로불린으로부터 유래되는 경우, 도너 프레임워크 서열을 인간 프레임워크 서열들의 선집 내의 다양한 인간 프레임워크 서열과 정렬하고, 가장 상동성인 프레임워크 서열을 어셉터로 선별함으로써 도너 프레임워크 서열에 대한 상동성을 기초로 인간 프레임워크 서열을 임의로 선별할 수 있다. 어셉터 인간 프레임워크는 공공 데이터베이스에서 입수가능한 인간 항체 생식계열 서열로부터의 것이거나 이로부터 유래될 수 있다.

[0033] 한 실시양태에서, 본원에서의 인간 컨센서스 프레임워크는 VH 서브그룹 VII 및/또는 VL 카파 서브그룹 I 컨센서스 프레임워크 서열로부터의 것이거나 이로부터 유래된다.

[0034] 한 실시양태에서, 항-D 인자 항체의 생성에 사용된 인간 프레임워크 주형은 VH 사슬에 대한 VI-4.1b+ (VH7 패밀리) 및 JH4d의 조합물 (도 3) 및/또는 VL 사슬에 대한 DPK4 (VκI 패밀리) 및 JK2의 조합물 (도 4)을 포함하는 주형으로부터의 프레임워크 서열을 포함할 수 있다.

[0035] 따라서, VH 어셉터 인간 프레임워크는 하기의 프레임워크 서열들 중 1개, 2개, 3개 또는 모두를 포함할 수 있다: $QX_1QLVQSGX_2ELKKPGASVKVSCKAS$ (서열 27의 아미노산 1-25) [식중, X_1은 I 또는 V이고, X_2는 P 또는 S이다]를 포함하는 FR1; $WVX_3QAPGQGLE$ (서열 27의 아미노산 36-46) [식중, X_3은 K 또는 R이다]를 포함하는 FR2; $RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAX_4YYCX_5R$ (서열 27의 아미노산 67-98) [식중, X_4 는 T 또는 V이고, X_5는 E 또는 A이다]를 포함하는 FR3; WGQGTLVTVSS (서열 8의 아미노산 105-115 또는 서열 27의 아미노산 105-115)를 포함하는 FR4.

[0036] VH 컨센서스 프레임워크의 예로는 하기의 것들이 포함된다:

[0037] 인간 VH 서브그룹 I 컨센서스 프레임워크 빼기 카밧 CDR (서열 28);

[0038] 인간 VH 서브그룹 I 컨센서스 프레임워크 빼기 확장된 초가변 영역 (서열 29-31);

[0039] 인간 VH 서브그룹 II 컨센서스 프레임워크 빼기 카밧 CDR (서열 32);

[0040] 인간 VH 서브그룹 II 컨센서스 프레임워크 빼기 확장된 초가변 영역 (서열 33-35);

[0041] 인간 VH 서브그룹 III 컨센서스 프레임워크 빼기 카밧 CDR (서열 36);

[0042] 인간 VH 서브그룹 III 컨센서스 프레임워크 빼기 확장된 초가변 영역 (서열 37-39);

[0043] 인간 VH 서브그룹 VII 컨센서스 프레임워크 빼기 카밧 CDR (서열 55);

[0044] 인간 VH 서브그룹 VII 컨센서스 프레임워크 빼기 확장된 초가변 영역 (서열 56-58);

[0045] 인간 VH 어셉터 프레임워크 빼기 카밧 CDR (서열 40);

[0046] 인간 VH 어셉터 프레임워크 빼기 확장된 초가변 영역 (서열 41-42);

[0047] 인간 VH 어셉터 2 프레임워크 빼기 카밧 CDR (서열 43); 또는

[0048] 인간 VH 어셉터 2 프레임워크 빼기 확장된 초가변 영역 (서열 44-45).

[0049] 한 실시양태에서, VH 어셉터 인간 프레임워크는 하기의 프레임워크 서열들 중 1개, 2개, 3개 또는 모두를 포함한다:

[0050] QVQLVQSGPELKKPGASVKVSCKAS (서열 8의 아미노산 1-25)를 포함하는 FR1,

[0051] WVRQAPGQGLE (서열 8의 아미노산 36-46)를 포함하는 FR2,

[0052] RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCER (서열 8의 아미노산 67-98),

[0053] RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCE (서열 8의 아미노산 67-97),

[0054] RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYC (서열 8의 아미노산 67-96),

[0055] RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCS (서열 51), 또는

[0056] RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCSR (서열 52)를 포함하는 FR3,

[0057] WGQGTLVTVSS (서열 8의 아미노산 105-115 또는 서열 27의 아미노산 105-115)를 포함하는 FR4.

[0058] VL 어셉터 인간 프레임워크는 하기의 프레임워크 서열들 중 1개, 2개, 3개 또는 모두를 포함할 수 있다:

[0059] $DIQX_6TQSPSSLSX_7SVGDRVTITC$ (서열 26의 아미노산 1-23) [식중, X_6은 V 또는 M이고, X_7은 M 또는 A이다]를 포함하는 FR1;

[0060] $WYQQKPGKX_8PKLLIX_9$ (서열 26의 아미노산 35-49) [식중, X_8은 P 또는 V이고, X_9는 S 또는 Y이다]를 포함하는 FR2;

[0061] $GVPSRFSX_{10}SGSGX_{11}DFTLTISSLQPEDVATYYC$ (서열 26의 아미노산 57-88) [식중, X_{10}은 S 또는 G이고, X_{11}은 A 또는 T이다]를 포함하는 FR3;

[0062] $FGQGTKX_{12}EIK$ (서열 54) [식중, X_{12}는 V 또는 L이다]를 포함하는 FR4.

[0063] VL 컨센서스 프레임워크의 예로는 하기의 것들이 포함된다:

[0064] 인간 VL 카파 서브그룹 I 컨센서스 프레임워크 (서열 47);

[0065] 인간 VL 카파 서브그룹 II 컨센서스 프레임워크 (서열 48);

[0066] 인간 VL 카파 서브그룹 III 컨센서스 프레임워크 (서열 49); 또는

[0067] 인간 VL 카파 서브그룹 IV 컨센서스 프레임워크 (서열 50)

[0068] 한 실시양태에서, VL 어셉터 인간 프레임워크는 하기의 프레임워크 서열들 중 1개, 2개, 3개 또는 모두를 포함할 수 있다:

[0069] DIQVTQSPSSLSASVGDRVTITC (서열 7의 아미노산 1-23)를 포함하는 FR1,

[0070] WYQQKPGKVPKLLIS (서열 7의 아미노산 35-49)를 포함하는 FR2,

[0071] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC (서열 7의 아미노산 57-88)를 포함하는 FR3,

[0072] FGQGTKLEIK (서열 7의 아미노산 98-107), 또는 FGQGTKVEIK (서열 53)를 포함하는 FR4.

[0073] 어셉터가 선별된 인간 프레임워크 서열과 서열이 동일할 수 있는 한편, 인간 면역글로불린으로부터의 것이든 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터의 것이든, 어셉터 서열이 인간 면역글로불린 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열과 비교하여 선재하는 아미노산 치환을 포함할 수 있다는 것이 본 발명에서 구현된다. 이러한 선재하는 치환은 바람직하게는 최소의 치환이고, 일반적으로는 인간 면역글로불린 서열 또는 컨센서스 프레임워크 서열과 비교하여 일반적으로 4개, 3개, 2개 또는 1개의 아미노산 차이이다.

[0074] 비-인간 항체의 초가변 영역 잔기가 VL 및/또는 VH 어셉터 인간 프레임워크 내로 혼입된다. 예를 들어, 카밧 CDR 잔기, 코티아 초가변 루프 잔기, Abm 잔기, 및/또는 접촉 잔기에 상응하는 잔기를 혼입시킬 수 있다. 임의로, 하기와 같은 확장된 초가변 영역 잔기가 혼입된다: 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102, 또는 95-102 (H3).

[0075] 한 양상에서, 본 발명은 (a) 서열 13, 서열 23 및 서열 25로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 15 및 서열 20으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 17, 서열 21 및 서열 24로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 18, 서열 22 및 서열 19로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 HVR을 포함하는 항체를 제공한다.

[0076] 한 양상에서, 본 발명은 (a) 서열 13 및 서열 25로부터 선택된 아미노산 서열에 대한 서열 동일성이 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%인 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 14의 아미노산 서열에 대한 서열 동일성이 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%인 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 15 및 서열 20으로부터 선택된 아미노산 서열에 대한 서열 동일성이 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%인 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 16의 아미노산 서열에 대한 서열 동일성이 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%인 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 17, 서열 21 및 서열 24로부터 선택된 아미노산 서열에 대한 서열 동일성이 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%인 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 18, 서열 22 및 서열 19로부터 선택된 아미노산 서열에 대한 서열 동일성이 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%인 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 HVR을 포함하는 항-D 인자 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 서열 동일성이 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%인 아미노산 서열을 갖는 HVR은 기준 서열과 비교하여 치환, 삽입 또는 결실을 함유하지만, 이러한 아미노산 서열을 포함하는 항체는 D 인자에 결합하는 능력을 유지한다. 일부 실시양태에서, 서열 13, 서열 25, 서열 14, 서열 15, 서열 20, 서열 16, 서열 17, 서열 21, 서열 23, 서열 18, 서열 19, 서열 22 및 서열 24로 구성된 군으로부터 선택된 기준 서열에서 총 1개 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 또는 결실되었다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 (a) 서열 13 및 서열 25로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 15 및 서열 20으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 17, 서열 21 및 서열 24로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 18, 서열 22 및 서열 19로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 HVR을 포함하는 항체를 제공한다.

[0077] 한 양상에서, 본 발명은 서열 6, 서열 8, 서열 10, 서열 12로부터 선택된 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다. 한 양상에서, 본 발명은 서열 5, 서열 7, 서열 9 및 서열 11로부터 선택된 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다. 한 양상에서, 본 발명은 서열 6의 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다. 한 양상에서, 본 발명은 서열 5의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다. 한 양상에서, 본 발명은 서열 6을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 5를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다. 한 양상에서, 본 발명은 서열 8을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다. 한 양상에서, 본 발명은 서열 7을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다. 한 양상에서, 본 발명은 서열 8을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 7을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다. 한 양상에서, 본 발명은 서열 10을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다. 한 양상에서, 본 발명은 서열 9를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다. 한 양상에서, 본 발명은 서열 10을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 9를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다. 한 양상에서, 본 발명은 서열 12를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다. 한 양상에서, 본 발명은 서열 11을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다. 한 양상에서, 본 발명은 서열 12를 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 11을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다.

[0078] 한 양상에서, 본 발명은 서열 6, 8, 10 및 12로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 대한 서열 동일성이 적어도 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항-D 인자 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 서열 동일성이 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%인 아미노산 서열은 기준 서열과 비교하여 치환, 삽입 또

는 결실을 함유하지만, 이러한 아미노산 서열을 포함하는 항체는 D 인자에 결합하는 능력을 유지한다. 일부 실시양태에서, 서열 6, 8, 10 또는 12로 구성된 군으로부터 선택된 서열에서 총 1개 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 또는 결실되었다. 일부 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부의 영역 (즉, FR 내의 영역)에서 발생한다. 일부 실시양태에서, 항-D 인자 항체는 서열 6, 8, 10 또는 12로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0079] 일부 실시양태에서, 본 발명은 서열 5, 7, 9 및 11로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 대한 서열 동일성이 적어도 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%인 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-D 인자 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 서열 동일성이 적어도 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%인 아미노산 서열은 기준 서열과 비교하여 치환, 삽입 또는 결실을 함유하지만, 이러한 아미노산 서열을 포함하는 항체는 D 인자에 결합하는 능력을 유지한다. 일부 실시양태에서, 서열 5, 7, 9 및 11로 구성된 군으로부터 선택된 서열에서 총 1개 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 또는 결실되었다. 일부 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부의 영역 (즉, FR 내의 영역)에서 발생한다. 일부 실시양태에서, 항-D 인자 항체는 서열 5, 7, 9 및 11로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0080] 항-D 인자 항체는, 항체가 D 인자에 결합하는 능력을 유지하는 한, 임의의 적절한 프레임워크 가변 도메인 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-D 인자 항체는 VI.4.1b+ 및 JH4d의 조합물인 중쇄 가변 도메인 프레임워크 서열을 포함한다 (도 3 참조). 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-D 인자 항체는 인간 서브그룹 VII 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-D 인자 항체는 서열 8의 아미노산 1-25를 포함하는 FR1, 서열 8의 아미노산 36-46를 포함하는 FR2, 서열 8의 아미노산 67-98을 포함하는 FR3 및 서열 8의 아미노산 105-115를 포함하는 FR4를 포함하는 중쇄 가변 도메인 프레임워크 서열을 포함한다. 이러한 항체들의 한 실시양태에서, 중쇄 가변 도메인 서열은 위치 40 및/또는 88 (카밧 번호매김)에서의 치환(들)을 포함한다. 이러한 항체들의 한 실시양태에서, 위치 40은 시스테인 (C) 또는 알라닌 (A)이고/이거나 위치 88은 시스테인 (C) 또는 알라닌 (A)이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-D 인자 항체는 DPK4 및 JK2의 조합물인 경쇄 가변 도메인 프레임워크 서열을 포함한다 (도 4 참조). 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-D 인자 항체는 인간 카파 I (κI) 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-D 인자 항체는 서열 7의 아미노산 1-23을 포함하는 FR1, 서열 7의 아미노산 35-49를 포함하는 FR2, 서열 7의 아미노산 57-88을 포함하는 FR3 및 서열 7의 아미노산 98-107을 포함하는 FR4를 포함하는 경쇄 가변 도메인 프레임워크 서열을 포함한다. 이러한 항체들의 한 실시양태에서, 경쇄 가변 프레임워크 서열은 위치 15, 43 및/또는 104 (카밧 번호매김)에서의 하나 이상의 치환(들)을 포함한다. 이러한 항체들의 한 실시양태에서, 위치 15는 시스테인 (C) 또는 발린 (V)이고/이거나, 위치 43은 시스테인 (C) 또는 알라닌 (A)이고/이거나, 위치 104는 발린 (V) 또는 류신 (L)이다.

[0081] 또한, 항-D 인자 항체는, 항체가 D 인자에 결합하는 능력을 유지하는 한, 임의의 적절한 불변 도메인 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-D 인자 항체는 중쇄 불변 도메인의 적어도 일부분을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항-D 인자 항체는 α, δ, ε, γ, 또는 μ 중쇄 중 임의의 하나 또는 이의 조합물의 중쇄 불변 도메인을 포함한다. 중쇄의 불변 도메인 (C_H)의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 여러 클래스 또는 이소타입로 지정될 수 있다. 면역글로불린에는 5가지 부류가 있다: 각각 α, δ, ε, γ 및 μ로 지정된 중쇄를 갖는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM. γ 및 α 클래스는 C_H 서열 및 기능에서의 비교적 작은 차이를 기초로 서브클래스로 추가로 분류되고, 예를 들어, 인간은 하기의 서브클래스를 발현한다: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2. 한 실시양태에서, 본 발명의 항-D 인자 항체는 이펙터 기능 (예를 들어, 결합 친화력)에 대한 원하는 효과를 초래하는 아미노산 위치에서의 치환을 포함하는 중쇄 불변 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항-D 인자 항체는 이펙터 기능 (예를 들어, 결합 친화력)에 대한 효과를 초래하지 않는 아미노산 위치에서의 치환을 포함하는 중쇄 불변 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항-D 인자 항체는 IgG 유형 (예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4)의 중쇄 불변 도메인을 포함하고, 위치 114 (카밧 번호매김; EU 번호매김에서의 118과 동등), 168 (카밧 번호매김; EU 번호매김에서의 172와 동등), 172 (카밧 번호매김; EU 번호매김에서의 176과 동등) 및/또는 228 (EU 번호매김)에서의 치환을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항-D 인자 항체는 IgG (예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4) 유형의 중쇄 불변 도메인을 포함하고, 위치 114에서의 치환을 추가로 포함하며, 이때 위치 114는 시스테인 (C) 또는 알라닌 (A)이고/이거나, 위치 168은 시스테인 (C) 또는 알라닌 (A)이고/이거나, 위치 172는 시스테인 (C) 또는 알라닌 (A)이고/이거나, 위치 228은 프롤린 (P), 아르기닌 (R) 또는 세린 (S)이다.

[0082] 또한, 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-D 인자 항체는 경쇄 불변 도메인의 적어도 일부분을 포함한다. 한 실시양태에서, 임의의 척추동물 종으로부터의 경쇄는 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 카파 및 람다로 칭해지는 명백하게 상이한 2가지 유형 중 하나로 지정될 수 있기 때문에, 본 발명의 항-D 인자 항체는 카파 또는 람다 경쇄 중 하나 또는 이의 조합물의 경쇄 불변 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항-D 인자 항체는 이펙터 기능 (예를 들어, 결합 친화력)에 대한 원하는 효과를 초래하는 아미노산 위치에서의 치환을 포함하는 경쇄 불변 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항-D 인자 항체는 이펙터 기능 (예를 들어, 결합 친화력)에 대한 효과를 초래하지 않는 아미노산 위치에서의 치환을 포함하는 경쇄 불변 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항-D 인자 항체는 카파 유형의 경쇄 불변 도메인을 포함하고, 위치 110, 144, 146 및/또는 168 (카밧 번호매김)에서의 치환을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항-D 인자 항체는 카파 유형의 경쇄 불변 도메인을 포함하고, 위치 110에서의 치환 (이때 110은 시스테인 (C) 또는 발린 (V)이다), 위치 144에서의 치환 (이때 144는 시스테인 (C) 또는 알라닌 (A)이다), 위치 146에서의 치환 (이때 146은 이소류신 (I) 또는 발린 (V)이다) 및/또는 위치 168에서의 치환 (이때 168은 시스테인 (C) 또는 세린 (S)이다)을 추가로 포함한다.

[0083] 한 양상에서, 본 발명은 뮤린 항체 166-32 및/또는 인간화 항-D 인자 항체 클론 #56, #111, #250 또는 #416, 및/또는 인간화 항-D 인자 항체 클론 #56, #111, #250 또는 #416의 가변 도메인 또는 HVR 서열을 포함하는 항체와 경쟁하는 항체를 제공한다. 뮤린 항체 166-32 및/또는 인간화 항-D 인자 항체 클론 #56, #111, #250 또는 #416, 및/또는 인간화 항-D 인자 항체 클론 #56, #111, #250 또는 #416의 가변 도메인 또는 HVR 서열을 포함하는 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 또한 제공된다.

[0084] 한 실시양태에서, 본 발명은 서열 2의 경쇄 가변 도메인 및 서열 1의 중쇄 가변 도메인을 포함하거나, 이들로 구성되거나, 이들로 본질적으로 구성되는, D 인자에 대한 항체의 1가 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 키메라 항체의 1가 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 키메라 항체의 친화력)보다 더 낮은, 예를 들어 적어도 1배 또는 2배 더 낮은 항-D 인자 항체를 제공한다.

[0085] 한 실시양태에서, 본 발명은 서열 2의 경쇄 가변 도메인 및 서열 1의 중쇄 가변 도메인을 포함하거나, 이들로 구성되거나, 이들로 본질적으로 구성되는, D 인자에 대한 항체의 2가 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 IgG로서의 항체의 친화력)이 키메라 항체의 2가 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 IgG로서의 키메라 항체의 친화력)보다 더 낮은, 예를 들어 적어도 1배 또는 2배 더 낮은 항-D 인자 항체를 제공한다.

[0086] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 서열 2의 경쇄 가변 도메인 및 서열 1의 중쇄 가변 도메인을 포함하거나, 이들로 구성되거나, 이들로 본질적으로 구성되는, D 인자에 대한 항체의 1가 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 키메라 항체의 1가 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 키메라 항체의 친화력)보다 더 높은, 예를 들어 적어도 1배 또는 2배 더 높은 항-D 인자 항체를 제공한다.

[0087] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 서열 2의 경쇄 가변 도메인 및 서열 1의 중쇄 가변 도메인을 포함하거나, 이들로 구성되거나, 이들로 본질적으로 구성되는, D 인자에 대한 항체의 2가 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 IgG로서의 항체의 친화력)이 키메라 항체의 2가 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 IgG로서의 키메라 항체의 친화력)보다 더 높은, 예를 들어 적어도 1배 또는 2배 더 높은 항-D 인자 항체를 제공한다.

[0088] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 1가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 1.0 nM (1.0×10^{-9} M)이거나 이보다 양호한 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 1가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 0.5 nM (0.5×10^{-9} M)이거나 이보다 양호한 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 1가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 1.0 pM (1.0×10^{-12} M)이거나 이보다 양호한 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 1가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 0.5 pM (0.5×10^{-12} M)이거나 이보다 양호한 항-D 인자 항체를 제공한다.

[0089] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 2가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 IgG로서의 항체의 친화력)이 1.0 nM (1.0×10^{-9} M)이거나 이보다 양호한 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 2가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 IgG로서의 항체의 친화력)이 0.5 nM (0.5×10^{-9} M)이거나 이보다 양호한 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본

발명은 D 인자에 대한 2가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 IgG로서의 항체의 친화력)이 1.0 pM (1.0×10^{-12} M)이거나 이보다 양호한 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 2가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 IgG로서의 항체의 친화력)이 0.5 pM (0.5×10^{-12} M)이거나 이보다 양호한 항-D 인자 항체를 제공한다.

[0090] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 1가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 0.5 mM (0.5×10^{-6} M) 내지 0.5 pM (0.5×10^{-12} M) 사이인 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 1가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 15 nM (15×10^{-9} M) 내지 0.1 nM (0.1×10^{-9} M) 사이인 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 1가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 5.5 nM (5.5×10^{-9} M) 내지 1 nM (1×10^{-9} M) 사이인 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 1가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 0.5 pM (0.5×10^{-12} M) 내지 2 pM (2×10^{-12} M) 사이인 항-D 인자 항체를 제공한다.

[0091] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 2가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 IgG로서의 항체의 친화력)이 0.5 mM (0.5×10^{-6} M) 내지 0.5 pM (0.5×10^{-12} M) 사이인 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 2가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 IgG로서의 항체의 친화력)이 10 nM (10×10^{-9} M) 내지 0.05 nM (0.05×10^{-9} M) 사이인 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 2가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 IgG로서의 항체의 친화력)이 5.5 nM (5.5×10^{-9} M) 내지 1 nM (1×10^{-9} M) 사이인 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 2가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 IgG로서의 항체의 친화력)이 0.5 pM (0.5×10^{-12} M) 내지 2 pM (2×10^{-12} M) 사이인 항-D 인자 항체를 제공한다.

[0092] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 1가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 약 0.37 nM (3.7×10^{-10} M)인 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 1가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 약 0.33 nM (3.3×10^{-10} M)인 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 1가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 약 0.51 nM (5.1×10^{-10} M)인 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 1가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 약 2.7 nM (2.7×10^{-9} M)인 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 1가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 약 1.4 nM (1.4×10^{-9} M)인 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 1가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 약 1.4 pM (1.4×10^{-12} M)인 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 2가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 IgG로서의 항체의 친화력)이 약 1.1 pM (1.1×10^{-12} M)인 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 1가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 약 0.19 nM (0.19×10^{-9} M)인 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 2가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 IgG로서의 항체의 친화력)이 약 0.08 nM (0.08×10^{-9} M)인 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 1가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 약 12.3 nM (12.3×10^{-9} M)인 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 2가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 IgG로서의 항체의 친화력)이 약 9.0 nM (9.0×10^{-9} M)인 항-D 인자 항체를 제공한다.

[0093] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 1가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 약 1.4 pM (1.4×10^{-12} M) +/- 0.5인 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 2가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 IgG로서의 항체의 친화력)이 약 1.1 pM (1.1×10^{-12} M) +/- 0.6인 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 1가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 약 0.19 nM (0.19×10^{-9} M) +/- 0.01인 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 2가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 IgG로서의 항체의 친화력)이 약 0.08 nM (0.08×10^{-9} M) +/- 0.01인 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 1가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 약 12.3 nM (12.3×10^{-9} M) +/- 2인 항-D 인자 항체를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 D 인자에 대한 2가 형태에서의 항체의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 IgG로서의 항체의 친화력)이 약 9.0 nM (9.0×10^{-9} M) +/- 1인 항-D 인자 항체를 제공한다.

[0094] 또다른 실시양태에서, 항-D 인자 항체는 D 인자에 대한 1가 형태에서의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 약 3.7 nM (3.7×10^{-9} M) +/- 2일 수 있다. 또다른 실시양태에서, 항-D 인자 항체는 D 인자에 대한 1가 형태에서의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 약 3.3 nM (3.3×10^{-9} M) +/- 2일 수 있다. 또다른 실시양태에서, 항-D 인자 항체는 D 인자에 대한 1가 형태에서의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 약 5.1 nM (5.1×10^{-9} M) +/- 2일 수 있다. 또다른 실시양태에서, 항-D 인자 항체는 D 인자에 대한 1가 형태에서의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 약 2.7 nM (2.7×10^{-9} M) +/- 2일 수 있다. 또다른 실시양태에서, 항-D 인자 항체는 D 인자에 대한 1가 형태에서의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 약 1.4 nM (1.4×10^{-9} M) +/- 2일 수 있다. 또다른 실시양태에서, 항-D 인자 항체는 D 인자에 대한 1가 형태에서의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 약 1.4 pM (1.4×10^{-12} M) +/- 2일 수 있다. 또다른 실시양태에서, 항-D 인자 항체는 D 인자에 대한 2가 형태에서의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 IgG로서의 항체의 친화력)이 약 1.1 pM (1.1×10^{-12} M) +/- 2일 수 있다. 또다른 실시양태에서, 항-D 인자 항체는 D 인자에 대한 1가 형태에서의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 약 0.19 nM (0.19×10^{-9} M) +/- 2일 수 있다. 또다른 실시양태에서, 항-D 인자 항체는 D 인자에 대한 2가 형태에서의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 IgG로서의 항체의 친화력)이 약 0.08 nM (0.08×10^{-9} M) +/- 2일 수 있다. 또다른 실시양태에서, 항-D 인자 항체는 D 인자에 대한 1가 형태에서의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 Fab 단편으로서의 항체의 친화력)이 약 12.3 nM (12.3×10^{-9} M) +/- 2일 수 있다. 또다른 실시양태에서, 항-D 인자 항체는 D 인자에 대한 2가 형태에서의 친화력 (예를 들어, D 인자에 대한 IgG로서의 항체의 친화력)이 약 9.0 nM (9.0×10^{-9} M) +/- 2일 수 있다.

[0095] 당업계에 잘 확립되어 있는 바와 같이, 자신의 수용체에 대한 리간드의 결합 친화력은 다양한 분석법들 중 임의의 분석법을 사용하여 결정할 수 있고, 다양한 정량값으로 표현될 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 결합 친화력은 Kd 값으로 표현되고, 고유 결합 친화력 (예를 들어, 결합성(avidity) 효과가 최소화된 친화력)을 반영한다. 일반적으로, 그리고 바람직하게는, 결합 친화력은 무세포 또는 세포-회합 환경에서 시험관내에서 측정된다. 본원에서 더욱 상세하게 기술된 바와 같이, 결합 친화력에서의 배수 차이는 인간화 항체의 1가 결합 친화력 값 (예를 들어, Fab 형태에서의 값)과 기준/비교물 항체 (예를 들어, 도너 초가변 영역 서열을 갖는 뮤린 항체)의 1가 결합 친화력 값 (예를 들어, Fab 형태에서의 값)의 비율로 정량화될 수 있고, 이때 결합 친화력 값들은 유사한 분석법 조건 하에 결정된다. 따라서, 한 실시양태에서, 결합 친화력에서의 배수 차이는 Fab 형태의 인간화 항체 및 상기 기준/비교물 Fab 항체의 Kd 값의 비율로 결정된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 본 발명의 항체 (A)의 친화력이 기준 항체 (M)의 친화력보다 "3배 더 낮고", A에 대한 Kd 값이 3x인 경우, M의 Kd 값은 1x일 것이고, A의 Kd 대 M의 Kd의 비율은 3:1일 것이다. 반대로, 한 실시양태에서, 본 발명의 항체 (C)의 친화력이 기준 항체 (R)의 친화력보다 "3배 더 크고", C에 대한 Kd 값이 1x인 경우, R의 Kd 값은 3x일 것이고, C의 Kd 대 R의 Kd의 비율은 1:3일 것이다. 본원에 기술된 것들을 포함하여, 당업계에 공지된 임의의 분석법이

결합 친화력 측정을 수득하는데 사용될 수 있고, 여기에는, 예를 들어, 비아코어(Biacore), 방사성면역분석법(RIA) 및 ELISA가 포함된다.

[0096] 또한, 본 발명의 항체에 대한 Kd 값은 사용된 특정 분석법의 조건에 따라 변할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, Fab 또는 항체가 고정되고, 리간드, 즉 D 인자의 결합이 측정되거나, 별법적으로 Fab 또는 항체에 대한 리간드, 즉 D 인자가 고정되고, Fab 또는 항체의 결합이 측정되는 분석법에서 결합 친화력 측정이 수득될 수 있다. 한 실시양태에서, 재생 조건이 (1) 10 mM 글리신 또는 4M $MgCl_2$ (pH 1.5), 및 (2) pH 1.0 내지 pH 7.5 사이의 pH (pH 1.5, pH 5.0, pH 6.0 및 pH 7.2 포함)을 포함할 수 있는 분석법에서 결합 친화력 측정이 수득될 수 있다. 한 실시양태에서, 결합 조건이 (1) PBS 또는 HEPES-완충 염수 및 (2) 트윈(Tween)-20, 즉, 0.1 % 트윈-20을 포함할 수 있는 분석법에서 결합 친화력 측정이 수득될 수 있다. 한 실시양태에서, 리간드, 즉 D 인자의 공급원이 시판 공급원으로부터의 것일 수 있는 분석법에서 결합 친화력 측정이 수득될 수 있다. 한 실시양태에서, (1) Fab 또는 항체가 고정되고, 리간드, 즉 D 인자의 결합이 측정되고, (2) 재생 조건이 4M $MgCl_2$ (pH 7.2)를 포함하며, (3) 결합 조건이 0.1 % 트윈-20을 함유하는 HEPES-완충 염수 (pH 7.2)를 포함하는 분석법에서 결합 친화력 측정이 수득될 수 있다. 한 실시양태에서, (1) 리간드 즉, D 인자가 고정되고, Fab 또는 항체의 결합이 측정되고, (2) 재생 조건이 10 mM 글리신 (pH 1.5)을 포함하며, (3) 결합 조건이 PBS 완충제를 포함하는 분석법에서 결합 친화력 측정이 수득될 수 있다.

[0097] 용어 "세포", "세포주" 및 "세포 배양물"은 자손을 포함한다. 의도적인 또는 의도적이지 않은 돌연변이로 인해, 모든 자손이 DNA 함량이 정확하게 동일하지 않을 수 있다는 것이 또한 이해된다. 원래의 형질전환된 세포에서 스크리닝된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 성질이 있는 변이체 자손이 포함된다. 본 발명에서 사용된 "숙주 세포"는 일반적으로 원핵생물 또는 진핵생물 숙주이다.

[0098] 용어 "벡터"는 적절한 숙주 내에서의 DNA의 발현을 달성할 수 있는 적절한 제어 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 구축물을 의미한다. 이같은 제어 서열에는 전사를 달성하기 위한 프로모터, 이같은 전사를 제어하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적절한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 번역의 종결을 제어하는 서열이 포함된다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적인 게놈 삽입물일 수 있다. 적절한 숙주 내로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 독립적으로 복제되고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에는 게놈 자체 내로 통합된다. 본 명세서에서, 플라스미드가 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이기 때문에 "플라스미드" 및 "벡터"는 때때로 상호교환가능하게 사용된다. 그러나, 본 발명은 등가의 기능을 수행하고 당업계에 공지된 또는 공지되는 다른 형태의 벡터를 포함하도록 의도된다.

[0099] 본원에서 사용된 "표지"라는 단어는 분자 또는 단백질, 예를 들어 항체에 직접적으로 또는 간접적으로 접합될 수 있는 검출가능한 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 표지는 자체가 검출가능할 수 있거나 (예를 들어, 방사성 동위원소 표지 또는 형광 표지), 또는 효소 표지의 경우에는 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변형을 촉매할 수 있다.

[0100] 본원에서 사용된 "고체 상"은 본 발명의 항체가 부착될 수 있는 비-수성 매트릭스를 의미한다. 본원에서 포함되는 고체 상의 예로는 유리 (예를 들어, 제어형 다공성 유리), 다당류 (예를 들어, 아가로스), 폴리아크릴아미드, 폴리스티렌, 폴리비닐 알코올 및 실리콘으로 부분적으로 또는 전체적으로 형성된 것들이 포함된다. 특정 실시양태에서, 환경에 따라, 고체 상은 분석 플레이트의 웰을 포함할 수 있고, 또한 다르게는 정제 컬럼 (예를 들어, 친화성 크로마토그래피 컬럼)이다.

[0101] **항체의 생성**

[0102] **숙주 세포의 선별 및 형질전환**

[0103] 본원에서의 벡터 내의 DNA를 클로닝 또는 발현시키는데 적절한 숙주 세포는 원핵생물, 효모, 또는 고급 진핵생물 세포이다. 이러한 목적을 위한 적절한 원핵생물에는 그람-음성 또는 그람-양성 생물 양쪽 모두, 예를 들어, 장내세균 예컨대 대장균, 엔테로박테르(*Enterobacter*), 에르위니아(*Erwinia*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*), 세라티아(*Serratia*), 및 시겔라(*Shigella*), 뿐만 아니라 바실러스(Bacillus), 슈도모나스(Pseudomonas), 및 스트렙토마이세스(Streptomyces)가 포함된다. 한 바람직한 대장균 클로닝 숙주는 대장균 294 (ATCC 31,446)이지만, 다른 균주 예컨대 대장균 B, 대장균 X1776 (ATCC 31,537), 및 대장균 W3110 (ATCC 27,325)도 적절하다. 이러한 예들은 제한적이기보다는 예시적이다.

[0104] 원핵생물에 더하여, 진핵생물 미생물 예컨대 필라멘트형 진균 또는 효모가 항체를 코딩하는 벡터에 대한 적절한

클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)가 저급 진핵생물 숙주 미생물들 중에서 가장 통상적으로 사용된다. 그러나, 스키조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*); 클루이베로마이세스(Kluyveromyces); 칸디다(Candida); 트리코데르마(Trichoderma); 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*);및 필라멘트형 진균 예컨대 뉴로스포라(Neurospora), 페니실리움(Penicillium), 톨리포클라디움(Tolypocladium), 및 아스페르길루스(Aspergillus) 숙주, 예컨대 아스페르길루스 니둘란스(*A. nidulans*) 및 아스페르길루스 니게르(*A. niger*)와 같은 다수의 또다른 속, 종, 및 계통이 통상적으로 이용가능하고 본원에서 유용하다.

[0105] 글리코실화 항체의 발현을 위한 적절한 숙주 세포는 다세포 생물로부터 유래된다. 원칙적으로, 척추동물 배양물로부터의 것이든 또는 무척추동물 배양물로부터의 것이든 임의의 고급 진핵생물 세포 배양물이 이용될 수 있다. 무척추동물 세포의 예로는 식물 및 곤충 세포가 포함된다 ([Luckow et al., Bio/Technology 6, 47-55 (1988)]; [Miller et al., Genetic Engineering, Setlow et al. eds. Vol. 8, pp. 277- 279 (Plenam publishing 1986)]; [Mseda et al., Nature 315, 592-594 (1985)]). 스포돕테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda) (모충), 아에데스(Aedes) (모기), 드로소필라 멜라노가스테르(Drosophila melanogaster) (과일파리), 및 봄빅스 모리(Bombyx mori)와 같은 숙주로부터의 수많은 배큘로바이러스 균주 및 변이체, 및 상응하는 증식허용성 곤충 숙주 세포가 확인되어 있다. 다양한 형질감염용 바이러스 균주, 예를 들어, 오토그래파 칼리포니카(Autographa californica) NPV의 L-1 변이체 및 봄빅스 모리 NPV의 Bm-5 균주가 공개적으로 입수가능하고, 이같은 바이러스들은, 특히 스포돕테라 프루기페르다 세포의 형질감염을 위해, 본 발명에 따라 본원에서 바이러스로 사용될 수 있다. 또한, 면, 옥수수, 감자, 대두, 페튜니아, 토마토 및 담배의 식물 세포 배양물 또한 숙주로서 사용될 수 있다.

[0106] 척추동물 세포, 및 배양물 (조직 배양물)에서의 척추동물 세포의 증식은 일상적인 절차가 되어 있다. [Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson, eds. (1973)] 참조. 유용한 포유류 숙주 세포주의 예는 원숭이 신장; 인간 배아 신장 세포주; 베이비 햄스터 신장 세포; 차이니즈 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)]); 마우스 세르톨리(Sertoli) 세포; 인간 자궁경부암종 세포 (HELA); 개 신장 세포; 인간 폐 세포; 인간 간 세포; 마우스 유방 종양; 및 NSO 세포이다.

[0107] 숙주 세포를 항체 생산을 위한 상기 기술된 벡터로 형질전환시키고, 프로모터 유도, 형질전환체 선별 또는 원하는 서열을 코딩하는 유전자의 증폭에 적합하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양한다.

[0108] 본 발명의 항체 변이체를 생산하는데 사용된 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 시판되는 배지 예컨대 햄(Ham) F10 (Sigma), 최소 필수 배지 (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma), 및 둘베코 변형 이글 배지 (DMEM, Sigma)가 숙주 세포를 배양하는데 적절하다. 또한, [Ham et al., Meth. Enzymol. 58: 44 (1979)], [Barnes et al., Anal. Biochem. 102: 255 (1980)], 미국 특허 번호 4,767,704; 4,657,866; 4,560,655; 5,122,469; 5,712,163; 또는 6,048,728에 기술된 배지들 중 임의의 것을 숙주 세포에 대한 배양 배지로 사용할 수 있다. 임의의 이러한 배지에 필요하다면 호르몬 및/또는 기타 성장 인자 (예컨대 인슐린, 트랜스페린, 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대 X-클로라이드 [식중, X는 나트륨, 칼슘, 마그네슘이다]; 및 포스페이트), 완충제 (예컨대 HEPES), 뉴클레오티드 (예컨대 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예컨대 GENTAMYCIN™ 약물), 미량원소 (마이크로몰 범위의 최종 농도로 일반적으로 존재하는 무기 화합물로 정의됨), 및 글루코스 또는 등가의 에너지 공급원이 보충될 수 있다. 임의의 기타 필요한 보충물이 당업자에게 공지된 적합한 농도로 또한 포함될 수 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현용으로 선별된 숙주 세포와 함께 기존에 사용된 것들이고, 당업자에게 명백할 것이다.

[0109] **항체 정제**

[0110] 재조합 기술을 사용하는 경우, 항체는 세포 내에서 생산되거나, 원형질막 주위공간 내에서 생산되거나, 또는 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 항체 변이체가 세포 내에서 생산되는 경우, 첫번째 단계로서, 숙주 세포 또는 용해된 단편인 입상물질 잔해물을, 예를 들어, 원심분리 또는 초여과에 의해 제거할 수 있다. [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]에는 대장균의 원형질막 주위공간으로 분비된 항체를 단리하는 절차가 기술되어 있다. 간략하게, 세포 페이스트를 아세트산나트륨 (pH 3.5), EDTA, 및 페닐메틸술포닐플루오라이드 (PMSF)의 존재 하에 약 30분에 걸쳐 융해시킨다. 세포 잔해물을 원심분리에 의해 제거할 수 있다. 항체 변이체가 배지 내로 분비되는 경우, 일반적으로 이같은 발현 시스템으로부터의 상등액을 시판되는 단백질 농축 필터, 예를 들어, Amicon 또는 Millipore Pellicon 초여과 유닛을 사용하여 먼저 농축시킨다. 단백질분해를 억제하기 위해 프로테아제 억제제 예컨대 PMSF가 임의의 상기 단계에서 포함될 수 있고, 우발적인 오염물의 성장

을 방지하기 위해 항생제가 포함될 수 있다.

[0111] 세포로부터 제조된 항체 조성물을, 예를 들어, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 젤 전기영동, 투석, 및 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있고, 친화성 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다. 친화성 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 항체 변이체에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 도메인의 종 및 이소타입에 좌우된다. 단백질 A는 인간 IgG1, IgG2 또는 IgG4 중쇄를 기초로 하는 항체를 정제하는데 사용될 수 있다 ([Lindmark et al., J. Immunol Meth. 62:1-13 (1983)]). 단백질 G는 모든 마우스 이소타입 및 인간 IgG3에 대해 권장된다 ([Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)]). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 거의 대부분 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정적인 매트릭스 예컨대 제어형 다공성 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스로 달성할 수 있는 것보다 유속이 더 빠르게 하고 처리 시간이 더 짧게 한다. 항체가 CH3 도메인을 포함하는 경우, Bakerbond ABX™ 수지 (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.)가 정제에 유용하다. 회수될 항체 변이체에 따라 기타 단백질 정제 기술 예컨대 이온-교환 컬럼 상에서의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상에서의 크로마토그래피, 헤파린 SEPHAROSE™ 상에서의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예컨대 폴리아스파르트산 컬럼) 상에서의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전이 또한 이용가능하다.

[0112] 임의의 예비 정제 단계(들) 후에, 당해 항체 변이체 및 오염물을 포함하는 혼합물을 pH 약 2.5-4.5의 용출 완충제를 사용하는 낮은 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피에 적용시킬 수 있고, 이는 바람직하게는 낮은 염 농도 (예를 들어, 약 0-0.25M 염)에서 수행된다.

[0113] **제약 제형**

[0114] 폴리펩티드 또는 항체의 치료적 제형은 원하는 정도의 순도를 갖는 폴리펩티드를 당업계에서 전형적으로 사용되는 임의의 "제약상 허용가능한" 담체, 부형제 또는 안정화제 (모두 "부형제"로 칭해짐)와 혼합함으로써 동결건조 제형 또는 수용액의 형태로 보관용으로 제조된다. 예를 들어, 완충제, 안정화제, 방부제, 등장화제, 비-이온성 세제, 항산화제 및 기타 다양한 첨가제. ([Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, A. Osol, Ed. (1980)] 참조). 이같은 첨가제들은 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이어야 한다.

[0115] 완충제는 pH를 생리 조건에 가까운 범위로 유지시키는 것을 돕는다. 바람직하게는, 이는 약 2 mM 내지 약 50 mM 범위의 농도로 존재한다. 본 발명과 함께 사용하기 위한 적절한 완충제에는 유기 및 무기 산 및 이의 염 예컨대 시트레이트 완충제 (예를 들어, 시트르산1나트륨-시트르산2나트륨 혼합물, 시트르산-시트르산3나트륨 혼합물, 시트르산-시트르산1나트륨 혼합물 등), 숙시네이트 완충제 (예를 들어, 숙신산-숙신산1나트륨 혼합물, 숙신산-수산화나트륨 혼합물, 숙신산-숙신산2나트륨 혼합물 등), 타르트레이트 완충제 (예를 들어, 타르타르산-타르타르산나트륨 혼합물, 타르타르산-타르타르산칼륨 혼합물, 타르타르산-수산화나트륨 혼합물 등), 푸마레이트 완충제 (예를 들어, 푸마르산-푸마르산1나트륨 혼합물 등), 푸마레이트 완충제 (예를 들어, 푸마르산-푸마르산1나트륨 혼합물, 푸마르산-푸마르산2나트륨 혼합물, 푸마르산1나트륨-푸마르산2나트륨 혼합물 등), 글루코네이트 완충제 (예를 들어, 글루콘산-글루콘산나트륨 혼합물, 글루콘산-수산화나트륨 혼합물, 글루콘산-글루콘산칼륨 혼합물 등), 옥살레이트 완충제 (예를 들어, 옥살산-옥살산나트륨 혼합물, 옥살산-수산화나트륨 혼합물, 옥살산-옥살산칼륨 혼합물 등), 락레이트 완충제 (예를 들어, 락트산-락트산나트륨 혼합물, 락트산-수산화나트륨 혼합물, 락트산-락트산칼륨 혼합물 등) 및 아세테이트 완충제 (예를 들어, 아세트산-아세트산나트륨 혼합물, 아세트산-수산화나트륨 혼합물 등)가 포함된다. 추가적으로, 포스페이트 완충제, 히스티딘 완충제, 트리메틸아민 염 예컨대 트리스(Tris)가 언급될 수 있다.

[0116] 방부제는 미생물 성장을 지연시키기 위해 첨가될 수 있고, 0.2%-1% (w/v) 범위의 양으로 첨가될 수 있다. 본 발명과 함께 사용하기 위한 적절한 방부제에는 페놀, 벤질 알코올, 메타-크레졸, 메틸 파라벤, 프로필 파라벤, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드, 벤즈알코늄 할라이드 (예를 들어, 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드), 헥사메토늄 클로라이드, 알킬 파라벤 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤, 카테콜, 레조르시놀, 시클로헥사놀, 및 3-펜타놀이 포함된다.

[0117] 때때로 "안정화제"로 알려진 등장화제는 본 발명의 액체 조성물의 등장성을 확실히 하기 위해 첨가될 수 있고, 여기에는 다가 당 알코올, 바람직하게는 3가 이상의 당 알코올, 예컨대 글리세린, 에리트리톨, 아라비톨, 자일리톨, 소르비톨 및 만니톨이 포함된다.

[0118] 안정화제는 기능 면에서, 증량제에서 치료제를 가용화시키거나 변성 또는 용기 벽에의 부착을 방지하는 것을 돕는 첨가제까지의 범위에 이를 수 있는 광범위한 카테고리의 부형제를 지칭한다. 전형적인 안정화제는 다가 당

알코올 (상기 열거됨); 아미노산 예컨대 아르기닌, 라이신, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 알라닌, 오르니틴, L-류신, 2-페닐알라닌, 글루탐산, 트레오닌 등; 유기 당 또는 당 알코올, 예컨대 락토스, 트레할로스, 스타키오스, 만니톨, 소르비톨, 자일리톨, 리비톨, 미오이니시톨, 갈락티톨, 글리세롤 등 (사이클리톨 예컨대 이노시톨 포함); 폴리에틸렌 글리콜; 아미노산 중합체; 황-함유 환원제, 예컨대 요소, 글루타티온, 티옥트산, 소듐 티오글리콜레이트, 티오글리세롤, 알파-모노티오글리세롤 및 소듐 티오술페이트; 저분자량 폴리펩티드 (즉, 10개 미만의 잔기); 단백질 예컨대 인간 혈청 알부민, 소 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 단당류, 예컨대 자일로스, 만노스, 프룩토스, 글루코스; 이당류 예컨대 락토스, 말토스, 수크로스 및 삼당류 예컨대 라피노스; 다당류 예컨대 덱스트란일 수 있다. 안정화제는 활성 단백질 1 중량부 당 0.1 내지 10,000 중량부의 범위로 존재할 수 있다.

[0119] 비-이온성 계면활성제 또는 세제 ("습윤화제"로 또한 알려짐)는 치료제를 가용화시키는 것을 돕기 위해, 뿐만 아니라 치료 단백질을 진탕-유도 응집에 대해 보호하기 위해 첨가될 수 있고, 또한 이는 제형이 단백질의 변성을 야기하지 않으면서 압력이 가해진 전단면에 노출되도록 한다. 적절한 비-이온성 계면활성제에는 폴리소르베이트 (20, 80 등), 폴리옥사머 (184, 188 등), 플루로닉(Pluronic).RTM. 폴리올, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노에테르 (트윈(Tween).RTM.-20. 트윈.RTM.-80 등)가 포함된다. 비-이온성 계면활성제는 약 0.05 mg/㎖ 내지 약 1.0 mg/㎖, 바람직하게는 약 0.07 mg/㎖ 내지 약 0.2 mg/㎖ 범위로 존재할 수 있다.

[0120] 추가적인 다양한 부형제에는 증량제 (예를 들어, 전분), 킬레이팅제 (예를 들어, EDTA), 항산화제 (예를 들어, 아스코르브산, 메티오닌, 비타민 E), 및 공용매가 포함된다. 본원에서의 제형은 치료될 특정 적응증에 필요하다면 1가지를 초과하는 활성 화합물, 바람직하게는 서로에게 역효과를 일으키지 않는 보완적인 활성이 있는 것들을 또한 함유할 수 있다. 예를 들어, 면역억제제를 추가로 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 이같은 분자들은 의도된 목적에 효과적인 양으로 조합되어 적절하게 존재한다. 활성 성분은 코아세르베이션(coacervation) 기술에 의해 또는 계면 중합에 의해 예를 들어 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어, 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀션, 나노입자 및 나노캡슐) 내에, 또는 마크로에멀션 내에 또한 포획될 수 있다. 이같은 기술은 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 116th edition, A. Osal. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0121] 생체내 투여에 사용될 제형은 반드시 무균성이어야 한다. 이는 예를 들어 무균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 이루어진다. 서방성 제제가 제조될 수 있다. 서방성 제제의 적절한 예로는 항체 변이체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함되고, 이 매트릭스는 성형품, 예를 들어, 필름, 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 서방성 매트릭스의 예로는 폴리에스테르, 히드로젤 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알코올)), 폴리락티드 (미국 특허 번호 3,773,919), L-글루탐산과 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체 예컨대 LUPRON DEPOT™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 루프롤리드 아세테이트로 구성된 주사용 마이크로스피어), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산이 포함된다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체는 100일을 초과하여 분자를 방출할 수 있는 반면, 특정 히드로젤은 단백질을 더 짧은 기간 동안 방출한다. 캡슐화된 항체가 신체 내에서 장기간 동안 유지되는 경우, 37℃에서 습도에 노출된 결과로 항체가 변성되거나 응집되어, 생물학적 활성의 손실 및 면역원성에서의 가능한 변화가 초래될 수 있다. 수반된 메커니즘에 따라 안정화를 위한 합리적인 전략이 고안된다. 예를 들어, 응집 메커니즘이 티오-디술피드 교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 발견되면, 술프히드릴 잔기를 변화시킴, 산성 용액으로부터 동결건조시킴, 수분 함량을 제어함, 적합한 첨가제를 사용함, 및 특정 중합체 매트릭스 조성물을 개발함에 의해 안정화가 달성될 수 있다.

[0122] 특정 장애 또는 용태의 치료에서 효과적일 치료적 폴리펩티드, 항체 또는 이의 단편의 양은 장애 또는 용태의 성질에 좌우될 것이고, 표준 임상 기술에 의해 결정될 수 있다. 가능한 경우, 먼저 시험관내에서, 그후 인간에서의 테스트 전에 유용한 동물 모델에서 본 발명의 제약 조성물의 용량-응답 곡선을 결정하는 것이 바람직하다.

[0123] 바람직한 실시양태에서, 치료적 폴리펩티드, 항체 또는 이의 단편의 수용액은 피하 주사에 의해 투여된다. 각각의 용량은 체중 1 kg 당 약 0.5 ㎍ 내지 약 50 ㎍, 더욱 바람직하게는 체중 1 kg 당 약 3 ㎍ 내지 약 30 ㎍ 범위일 수 있다.

[0124] 피하 투여를 위한 투약 스케쥴은 질환의 유형, 질환의 중증도 및 치료제에 대한 환자의 민감도가 포함되는 다수의 임상 요인에 따라 한달에 한번에서 매일까지로 변할 수 있다.

[0125] **인간화 항체에 대한 용도**

[0126] 본 발명의 인간화 항체는 진단 분석법, 예를 들어, 특정 세포, 조직 또는 혈청에서의 당해 표적의 발현을 검출하기 위한 분석법에서 유용하다. 진단 용도를 위해, 전형적으로 항체 변이체가 검출가능한 모이어티(moiety)로 표지될 것이다. 다수의 표지가 이용가능하다. 형광의 변화를 정량하기 위한 기술은 상기 기술되어 있다. 화학발광성 기질은 화학 반응에 의해 전기적으로 여기된 후, 측정 (예를 들어, 화학발광분석기를 사용하여 측정)할 수 있는 빛을 방출할 수 있거나, 또는 형광 어셉터에 에너지를 공여한다. 효소 표지의 예로는 루시페라제 (예를 들어, 개똥벌레 루시페라제 및 박테리아 루시페라제; 미국 특허 번호 4,737,456), 루시페린, 2,3-디히드로프탈라진디온, 말레이트 탈수소효소, 요소분해효소, 과산화효소 예컨대 양고추냉이 과산화효소 (HRPO), 알칼리성 포스파타제, 베타-갈락토시다제, 글루코아밀라제, 라이소자임, 당류 산화효소 (예를 들어, 글루코스 산화효소, 갈락토스 산화효소, 및 글루코스-6-포스페이트 탈수소효소), 헤테로시클릭 옥시다제 (예를 들어 요산분해효소 및 잔틴 산화효소), 락토퍼옥시다제, 마이크로퍼옥시다제 등이 포함된다. 효소를 항체에 접합시키는 기술은 [O'Sullivan et al., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay, Methods in Enzym. (Ed. J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73: 147-166 (1981)]에 기술되어 있다.

[0127] 때때로, 표지는 항체 변이체에 간접적으로 접합된다. 당업자는 이를 달성하는 다양한 기술을 알고 있을 것이다. 예를 들어, 항체 변이체는 비오틴과 접합될 수 있고, 상기 언급된 표지들의 광범위한 3가지 카테고리 중 임의의 것이 아비딘과 접합될 수 있거나, 또는 반대로 접합될 수 있다. 비오틴은 아비딘에 선택적으로 결합하고, 따라서 표지가 이러한 간접적인 방식으로 항체 변이체와 접합될 수 있다. 별법적으로, 표지와 항체 변이체의 간접적인 접합을 달성하기 위해서, 항체 변이체가 소형 합텐 (예를 들어, 디곡신)과 접합되고, 상기 언급된 여러 유형의 표지 중 하나가 항-합텐 항체 (예를 들어, 항-디곡신 항체)와 접합된다. 따라서, 표지와 항체 변이체의 간접적인 접합을 달성할 수 있다.

[0128] 본 발명의 또다른 실시양태에서, 항체 변이체가 표지될 필요가 없고, 항체 변이체에 결합하는 표지된 항체를 사용하여 이의 존재를 검출할 수 있다.

[0129] 본 발명의 항체는 임의의 공지된 분석 방법, 예컨대 경쟁적 결합 분석법, 직접적 및 간접적 샌드위치 분석법, 및 면역침전 분석법에서 사용될 수 있다. [Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987)].

[0130] 경쟁적 결합 분석법은 제한된 양의 항체 변이체와의 결합에 대해 테스트 샘플과 경쟁하는 표지된 기준물의 능력에 의존한다. 테스트 샘플 내의 표적의 양은 항체에 결합되는 기준물의 양에 반비례한다. 결합되는 표준물의 양을 결정하는 것을 용이하게 하기 위해, 일반적으로 항체는 경쟁 전 또는 후에 불용성이다. 그 결과, 항체에 결합된 기준물 및 테스트 샘플이 결합되지 않은 기준물 및 테스트 샘플로부터 편리하게 분리될 수 있다.

[0131] 샌드위치 분석법은 검출될 단백질의 상이한 면역원성 부분 또는 에피토프에 각각 결합할 수 있는 2개의 항체를 사용하는 것을 수반한다. 샌드위치 분석법에서, 분석될 테스트 샘플이 고체 지지체 상에 고정된 1차 항체에 결합된 후, 2차 항체가 테스트 샘플에 결합하여, 불용성의 3-부분 복합체가 형성된다. 예를 들어, 미국 특허 번호 4,376,110 참조. 2차 항체는 자체가 검출가능한 모이어티로 표지될 수 있거나 (직접적 샌드위치 분석법), 또는 검출가능한 모이어티로 표지된 항-면역글로불린 항체를 사용하여 측정될 수 있다 (간접적 샌드위치 분석법). 예를 들어, 샌드위치 분석법의 한가지 유형은 ELISA 분석법이고, 이러한 경우 검출가능한 모이어티는 효소이다.

[0132] 면역조직화학을 위해, 종양 샘플은 신선하거나 동결된 것일 수 있거나, 또는 파라핀에 매립되어 방부제 예컨대 포르말린으로 고정될 수 있다.

[0133] 항체는 생체내 진단 분석법에 또한 사용될 수 있다. 일반적으로, 종양이 면역섬광조영술을 사용하여 국소화될 수 있도록, 항체 변이체가 방사선핵종 (예컨대 ^{111}In, ^{99}Tc, ^{14}C, ^{131}I, ^{3}H, ^{32}P, 또는 ^{35}S)으로 표지된다. 예를 들어, 본 발명의 고친화력 항-IgE 항체가 천식 환자의 폐에 예를 들어 존재하는 IgE의 양을 검출하는데 사용될 수 있다.

[0134] 본 발명의 항체는 진단 분석법을 수행하기 위한 지침서와 함께 키트, 예를 들어, 미리 결정된 양의 시약들의 포장 조합물 내에서 제공될 수 있다. 항체 변이체가 효소로 표지되는 경우, 키트는 효소가 필요로 하는 기질 및 보조인자 (예를 들어, 검출가능한 발색단 또는 형광단을 제공하는 기질 전구물질)를 포함할 것이다. 또한, 기타 첨가제 예컨대 안정화제, 완충제 (예를 들어, 차단 완충제 또는 용해 완충제) 등이 포함될 수 있다. 각종 시약들의 상대적인 양은 분석법의 감도를 실질적으로 최적화하는 시약들의 용액 내 농도를 제공하기 위해 광범

위하게 변할 수 있다. 특히, 시약은 용해 시 적합한 농도의 시약 용액을 제공할 부형제를 포함하는 건조 분말(일반적으로 동결건조됨)로서 제공될 수 있다.

[0135] **항체에 대한 생체내 용도**

[0136] 본 발명의 항체가 포유동물을 치료하는데 사용될 수 있는 것으로 구현된다. 한 실시양태에서, 항체는, 예를 들어, 전-임상 데이터를 수득하기 위한 목적으로 비-인간 포유동물에게 투여된다. 치료될 대표적인 비-인간 포유동물에는 비-인간 영장류, 개, 고양이, 설치류 및 전-임상 연구가 수행되는 기타 포유동물이 포함된다. 이같은 포유동물은 항체로 치료될 질환에 대한 확립된 동물 모델일 수 있거나, 또는 당해 항체의 독성을 연구하는데 사용될 수 있다. 각각의 이러한 실험에서, 용량의 단계적 확대 연구가 포유동물에 대해 수행될 수 있다.

[0137] 항체 또는 폴리펩티드는 비경구, 피하, 복강내, 폐내 및 비강내를 포함하는 임의의 적절한 수단에 의해 투여되고, 원한다면, 국소적인 면역억제성 치료, 병변내 투여를 위해 투여된다. 비경구 주입에는 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여가 포함된다. 또한, 항체 변이체는 펄스 주입, 특히 항체 변이체의 용량이 감쇠되는 펄스 주입으로 적절하게 투여된다. 바람직하게는, 주사에 의해 투약이 제공되고, 가장 바람직하게는 정맥내 또는 피하 주사에 의해 제공되며, 이는 투여가 단시간인지 또는 장기간인지 여부에 부분적으로 좌우된다.

[0138] 질환의 예방 또는 치료를 위해, 항체 또는 폴리펩티드의 적합한 투여량은 치료될 질환의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 항체 변이체가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지 여부, 기존의 요법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 응답, 및 주치의의 재량에 좌우될 것이다.

[0139] 질환의 유형 및 중증도에 따라, 예를 들어, 1회 이상의 별도의 투여에 의한 것이든 또는 연속 주입에 의한 것이든, 약 0.1 mg/kg 내지 150 mg/kg (예를 들어, 0.1-20 mg/kg)의 항체가 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량이다. 전형적인 일일 투여량은 상기 언급된 인자들에 따라 약 1 mg/kg 내지 100 mg/kg 이상의 범위일 수 있다. 수 일 이상에 걸친 반복 투여를 위해, 용태에 따라, 치료는 질환 증상의 원하는 억제가 일어날 때까지 지속된다. 그러나, 또다른 투여량 계획이 유용할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통상적인 기술 및 분석법에 의해 쉽게 모니터링된다. 대표적인 투약 계획이 WO 94/04188에 개시된다.

[0140] 항체 조성물은 의료 업무 기준(good medical practice)과 부합하는 방식으로 제형, 투약 및 투여될 수 있다. 이러한 환경에서 고려되는 인자에는 치료될 특정 장애, 치료될 특정 포유동물, 개별적인 환자의 임상 용태, 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투약 스케쥴, 및 개업의에게 공지된 기타 인자가 포함된다. 투여될 항체의 "치료적 유효량"은 이같은 고려사항에 의해 좌우될 것이고, 질환 또는 장애를 방지하거나, 완화시키거나, 또는 치료하는데 필요한 최소량이다. 반드시 그럴 필요는 없지만, 임의로, 항체는 문제의 장애를 예방 또는 치료하는데 현재 사용되는 하나 이상의 작용제와 함께 제형된다. 이같은 또다른 작용제의 유효량은 제형내에 존재하는 항체의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 기타 인자에 좌우된다. 일반적으로 이들은 상기에서 사용된 것과 동일한 투여량 및 투여 경로로, 또는 지금까지 사용된 투여량의 약 1 내지 99 %로 사용된다.

[0141] D 인자를 표적으로 인식하는 본 발명의 항체는 보체-매개 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 이러한 장애는 과도한 또는 제어되지 않은 보체 활성화와 관련된다. 여기에는 심폐 우회술 수술 동안의 보체 활성화; 급성 심근 경색, 동맥류, 뇌졸중, 출혈성 쇼크, 압궤 손상, 다발성 장기 부전, 혈액량감소성 쇼크 및 장 허혈 후의 허혈-재관류로 인한 보체 활성화가 포함된다. 이러한 장애는 염증성 용태 예컨대 중증 화상, 내독소혈증, 패혈성 쇼크, 성인성 호흡 곤란 증후군, 혈액투석; 아나필락시스성 쇼크, 중증 천식, 혈관부종, 크론병, 겸상 적혈구 빈혈, 연쇄구균감염후 사구체신염 및 췌장염을 또한 포함할 수 있다. 장애는 불리한 약물 반응, 약물 알러지, IL-2 유도 혈관 누출 증후군 또는 방사성 조영 물질 알러지의 결과일 수 있다. 자가면역 질환 예컨대 전신 홍반 루푸스, 중증 근무력증, 류머티스성 관절염, 알츠하이머병 및 다발성 경화증이 또한 포함된다. 보체 활성화는 이식 거부와 또한 관련된다. 최근, 보체 활성화와 눈 질환 예컨대 연령-관련 황반 변성, 당뇨병성 망막병증 간의 강력한 상관관계가 나타났다.

[0142] [실시예]

[0143] 하기의 예들은 한정적인 방식이 아니라 예시적인 방식으로 제공된다.

[0144] **실시예 1: D 인자 뮤린 MAb 166-32의 인간화**

[0145] 뮤린 mAb 166-32의 중쇄 가변 영역 (V_H) 및 경쇄 가변 영역 (V_L)의 서열을 공공 데이터베이스에서 입수가능한 인간 항체 생식계열 서열과 비교하였다. 상기 단계 1에 기술된 바와 같이 주형 상에서 결정할 때, 전체 길이, 프

레임워크 내의 유사한 CDR 위치, 전체적인 상동성, CDR의 크기 등을 포함하여, 여러 기준을 사용하였다. 합쳐진 모든 이러한 기준들은 도 3 및 4에 묘사된 166-32 MAb 중쇄 및 경쇄 서열과 각각의 인간 주형 서열 간의 서열 정렬에 나타난 바와 같이 최적의 인간 주형을 선택하기 위한 결과를 제공하였다.

[0146] 이러한 경우에, 1가지를 초과하는 인간 프레임워크 주형이 이러한 항체를 디자인하는데 사용되었다. V_H 사슬에 대해 선택된 인간 주형은 VI-4.1b+ (7-04.1 유전자좌) (접근# X62110) (VH7 패밀리) 및 JH4d의 조합물이었다 (도 3 참조). V_L 사슬에 대해 선택된 인간 주형은 JK2와 조합된 DPK4 (VK I 패밀리)의 조합물이었다 (도 4 참조).

[0147] 일단 주형이 선택되면, DNA 합성 및 중첩 PCR에 의해 Fab 라이브러리를 구축하였다. 라이브러리는 각각의 선택된 인간 주형과 함께 합성된 합성 MAb 166-32 CDR로 구성되었다. 부분적인 V_H 및 V_L 서열을 코딩하는 중첩 뉴클레오티드가 뉴클레오티드 약 63개 내지 약 76개의 범위로 합성되었고, 이때 뉴클레오티드 18개 내지 21개가 중첩되었다. D 인자 항원에 대한 인간화 Fab의 라이브러리를 발현하는 벡터를 구축하였고, 대장균 DH10B 내로 형질전환시킨 후, XL-1B 박테리아 론(bacterial lawn)에 플레이팅하였다.

[0148] 라이브러리 품질을 크기 (독립적인 클론의 수) 및 다양성 (돌연변이의 분포)에 대해 평가하였다. 중쇄 및 경쇄 모두가 이중 삽입된 개별적인 클론들은 서열분석된 20개 중 약 14개였다. 프레임워크 워블(wobble) 돌연변이는 균일하게 분포되었다.

[0149] V_L 및 V_H 유전자의 PCR 증폭을 프레임워크 영역 FR1에 대한 특이적 서열 및 리더 서열 (GeneIII)의 끝에 어닐링된 오버행잉(overhanging) 서열을 함유하는 비오틴화 전방향 프라이머, 및 보존된 불변 영역 (C_κ 또는 CH1)으로부터의 역 프라이머를 사용하여 표준 PCR 조건 하에 수행하였다. 혼입되지 않은 비오틴화 프라이머 및 비-특이적 PCR을 제거하기 위해 시판되는 PCR 정제 키트에 의해, 또는 아가로스 젤 전기영동에 의해 PCR 생성물을 정제하였다.

[0150] **실시예 2: 라이브러리 스크리닝**

[0151] 캡처 필터 리프트(Capture Filter Lift)를 1차 스크리닝에 사용하였다. 크기가 결정된 실제 스크리닝은 이론적인 라이브러리 크기보다 3배를 초과하여 더 크다. 후보물을 단일-지점 ELISA 분석법에 의해 추가로 스크리닝하였다. Fab 농도를 기초로 하는, D 인자를 사용한 직접적인 항원 적정에 의해 최상의 결합제를 추가로 확증하였다.

[0152] *캡처 리프트 스크리닝*

[0153] 캡처 필터 리프트 분석법을 D 인자에의 Fab의 결합에 대한 1차 스크리닝에 사용하였다. 역가가 높은 파지를 플레이팅하고, 사용할 때까지 37℃에서 인큐베이션하였다 (약 6-8 시간). 염소 항-인간 카파를 10 ㎖ PBST에 10 ㎍/㎖로 희석하였다; 플라크를 리프팅(lifting)시키기 위한 니트로셀룰로스 필터를 표준 플라크 리프팅 절차에 따라 제조한 후, 진탕기 상에서 2시간 동안 10 ㎖의 차단 완충제에 함침시켰다. 필터를 PBST로 3× 세정하였다. 필터를 플라크 론에 적용하고, 실온에서 약 15-24시간 동안 인큐베이션하였다. 그후, 필터를 플레이트로부터 제거하고, TBST로 3× 세정하였다.

[0154] D 인자 (50 ㎍/㎖)를 PBST에서 0.1 ㎍/㎖로 희석하고, 필터 당 4 ㎖를 첨가하였다. 필터를 실온에서 진탕기 상에서 2시간 동안 용액 내에서 인큐베이션한 후, 3× 세정하였다 (각각 5분). 희석된 166-222-HRP (PBST로 1:10,000)를 필터 당 4 ㎖의 부피로 첨가하고, 필터를 1시간 동안 진탕기 상에서 인큐베이션하였다. 필터를 4× 세정하였다. 필터를 건조시킨 후, TMB 기질에 함침시키고 나서, 물에 함침시켜 반응을 정지시켰다. 양성 클론이 확인되었다.

[0155] **실시예 3: 단일-지점 ELISA 스크리닝**

[0156] 단일-지점 ELISA 분석법을 2차 스크리닝에 사용하였다. 이뮬론(Immulon) II 플레이트를 염소 항-인간 Fab (1:12,000, 50 ㎕/웰)로 하룻밤 동안 실온에서 코팅하였다. 다음날, 플레이트를 플레이트 세척제로 4× 세척하였다. 차단 완충제를 100 ㎕/웰의 부피로 첨가하고, 플레이트를 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 그후, 플레이트를 4× 세척하였다.

[0157] 스크리닝할 각각의 Fab를 50 ㎕/웰의 부피로 첨가하고 (15 ㎖ 주위공간 제제 또는 상등액으로부터), 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 4× 세척한 후, 0.01 ㎍/㎖의 비오틴화 D 인자를 50 ㎕/웰로 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 4× 세척하였다. 스트렙타비딘-HRP를 첨가하고 (PBST

내의 1:10,000), 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 5× 세척한 후, 50 ㎕/웰의 TMB 기질을 첨가하여 발색시켰다. 충분히 발색되었을 때 (10-45분), 정지 완충제를 50㎕의 부피로 첨가하였고, 플레이트를 450 nm에서 판독하였다.

[0158] **실시예 4: 인간화 항-D 인자 클론의 서열분석**

[0159] 인간 D 인자에 대한 결합 친화력이 양호한 16개의 인간화 클론을 서열분석하였다 (표 1 참조). 이들 중에서, 경쇄 내의 위치 2 (100% 인간) 및 49 (100% 마우스), 및 중쇄 내의 위치 93 (100% 마우스)가 고도로 보존되었고, 이는 이들이 항체 결합 능력을 유지하는데 중요하다는 것을 가리킨다.

표 1

인간화 라이브러리로부터의 인간화 클론의 아미노산 서열 분석

[0160]

VK	2	4	13	43	49	64	69	VH	2	9	38	93	97
마우스	T	V	M	P	S	S	A		I	P	K	T	E
인간	I	M	A	V	Y	G	T		V	S	R	V	A
7	I	M	M	V	S	S	T		I	P	K	V	E
30	I	V	A	V	S	S	A		V	P	K	T	E
45	I	V	M	V	S	G	A		I	S	R	V	E
46	I	V	M	V	S	S	T		I	S	R	V	E
47	I	V	A	V	S	S	T		I	S	R	V	E
48	I	V	M	V	S	S	T		V	P	R	V	E
50	I	V	M	V	S	G	A		V	P	R	T	E
51	I	M	M	V	S	G	T		I	S	K	T	E
56	**I**	**V**	**A**	**V**	**S**	**G**	**T**		**V**	**P**	**K**	**T**	**E**
57	I	M	M	V	S	S	A		V	S	R	V	E
58	I	V	M	P	S	G	A		V	P	R	V	E
59	I	V	A	P	S	S	T		V	P	K	V	E
60	I	V	M	P	S	G	T		V	P	R	V	E
63	I	V	M	V	S	S	T		V	S	R	T	E
74	I	V	M	V	S	S	T		I	S	R	V	E

[0161] 클론 #56을 BIAcore 분석 및 용혈 억제 분석법에 의해 평가하였다. BIAcore 분석은 클론 #56이 인간 D 인자에 대한 친화력이 키메라 166-32 Fab와 유사하다는 것을 나타냈다 (표 4 참조). 용혈 억제 분석법은 클론 #56이 키메라 166-32 Fab보다 다소 더욱 강력하다는 것을 나타냈다 (도 6 참조). 클론 #56은 경쇄의 프레임워크 내에 2개의 뮤린 잔기를, 중쇄 내에 4개의 뮤린 잔기를 함유한다 (표 1 참조). 이러한 결과를 기초로, 추가적인 최적화가 수행되었다.

표 2

인간화/CDR3 최적화 라이브러리로부터의 최적화 항체의 아미노산 서열 분석

VK 위치	2	4	13	43	49	64	69	CDR-L3	92	93	97	
166-32	T	V	M	P	S	S	A		D	N	T	
인간 주형	I	M	A	V	Y	G	T					
104	I	V	M	P	S	S	T		D	S	T	
109	I	V	A	V	S	G	A		M	N	T	
111	I	V	A	V	S	G	T		D	S	T	
112	I	V	A	V	S	G	T		D	S	T	
114	I	V	A	V	S	G	T		D	C	T	
121	I	V	A	V	S	S	A		D	N	T	
125	I	V	A	P	S	S	T		D	N	T	
130	I	V	A	V	S	S	T		D	N	S	

VH 위치	2	9	38	93	97	CDR-H3	98	99	100
166-32	I	P	K	T	E		V	D	N
인간 주형	V	S	R	V	A				
104	V	S	R	V	E		V	D	T
109	V	S	R	V	E		V	N	N
111	V	S	R	V	E		V	N	N
112	V	S	R	V	E		V	N	N
114	V	S	K	V	E		V	N	N
121	I	S	R	V	E		V	N	T
125	V	S	R	V	E		P	D	N
130	V	S	R	V	E		V	D	H

[0162]

[0163] 클론 #111 및 #114를 BIAcore 분석에 의해 특성화하였다 (표 4 참조). 클론 #104, #111, #114 및 #130를 용혈 억제 분석법에 의해 또한 특성화하였다 (도 6 참조). 이러한 클론들은 키메라 166-32보다 친화력이 더 높았고, 용혈 억제 분석법에 의해 나타난 바와 같이 대안 경로를 억제하는데 있어서 키메라 Fab보다 더욱 강력하였다 (도 7). 클론 #111은 클론 #56과 같이 경쇄 내에 2개의 뮤린 잔기를 함유한다 (위치 4 및 49). 이는 클론 #56에서 발견된 바와 같이 중쇄 위치 97 내에 보존된 뮤린 잔기를 또한 함유한다. 클론 #111의 경쇄 및 중쇄 CDR3 양쪽 모두 내에 1개의 이로운 돌연변이가 있다. 스크리닝된 2개의 독립적인 라이브러리 (인간화 라이브러리, 및 인간화 /CDR3 최적화 라이브러리)로부터, 최상의 클론들에 유사한 컨센서스 잔기가 있다는 것을 발견하였다.

[0164] 클론 #111의 친화력을 추가로 최적화하기 위해, 단일 돌연변이를 CDR-H1 및 CDR-L2 내로 동시에 도입함으로써 항체 라이브러리를 구축하였다. 간략하게, 부위-지정 돌연변이유발 접근법을 사용하여, 단일 돌연변이를 코딩하는 올리고뉴클레오티드를 클론 #111의 주형에 어닐링시킴으로써 이같은 라이브러리를 구축하였다. 인간 D 인자에 대한 친화력이 매우 높은 총 24개의 클론을 서열분석하였다. 이러한 24개의 클론들 중에서, 여러 중복된 이로운 돌연변이가 확인되었다. 클론 #250, #315, #345 및 #416이 BIAcore 분석에 선택되었다 (표 4 참조). BIAcore 데이터는 이러한 클론들이 초기의 클론 #111보다 인간 D 인자에 대한 친화력이 더 높다는 것을 나타냈다. 클론 #250, #315, #348 및 #416을 용혈 억제 분석법 (도 6 참조) 및 대안 경로의 억제 (도 7)에서 또한 테스트하였다.

[0165] **실시예 5: AP 용혈 분석법**

[0166] 인간화 클론의 생물학적 기능을 용혈 억제 분석법 및 BIAcore 분석 (하기 실시예 6 참조)을 사용하여 결정하였다. 용혈 분석법을 하기의 절차에 따라 수행하였다. 약 1:2×10^4 희석의 20 ㎖ 염수 (0.9% NaCl) 내의 1:20 희석 토끼 적혈구 (RRBC) (0.5 ㎖ + 9.5 ㎖ GVB/Mg-EGTA 완충제) 20 ㎕를 쿨터 카운터(Coulter Counter)로 카운팅하였다. 그후, 세포 농도를 약 2-5 ×10^4 개의 세포/㎖로 조정하였다. 각각의 플레이트에 약 500×10^6 개/

플레이트의 RRBC 또는 약 1 ㎖의 RRBC/플레이트 (500×10^6/2-5×10^4)를 제공하였다.

[0167] 세포를 6 ㎖ GVB/Mg-EGTA 완충제/플레이트에서 희석하고, 혼합하고, 4℃에서 1360 rpm × 4분의 스피닝에 의해 3회 세척하였다. RRBC 펠렛을 3 ㎖ GVB/Mg-EGTA 완충제/플레이트에 현탁시키고, 얼음 상에서 유지시켰다.

[0168] -80℃ 냉동고로부터의 인간 혈청을 사용 직전에 해동시켰다. 혈청을 GVB/Mg-EGTA 완충제 내의 20% 혈청, 5 ㎖/플레이트의 농도로 희석하고 (최종 10 %), 얼음 상에서 유지시켰다.

표 3

[0169]

	1	2	3	S	SB
GVB/Mg-EGTA:	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul
mAb: 50 ul 믹스	50 ul	50 ul	50 ul	--------	-------
20% Hu 혈청:	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul
30초 동안 5-6℃에서 진탕시킨 후, 실온에서 7분 동안 유지시킨다					
토끼 RBC:	30ul	30 ul	30 ul		30 ul

[0170] 샘플을 30초 동안 5-6℃에서 진탕시킨후, 40분 동안 37℃에서 진탕시켰다. 샘플을 진탕시키면서 5-6℃로 냉각한 후, 4℃에서 2,000 rpm × 3분으로 원심분리하였다. 약 80 ㎕의 상등액을 바닥이 편평한 96웰 플레이트로 옮기고, 590 nm에서의 OD값을 표준 플레이트 판독기를 사용하여 판독하였다. 억제 백분율을 하기와 같이 계산하였다: % 억제 = {[(S-SB)-(U-SB)]/(S-SB)}×100%. (U = 샘플 1, 2 또는 3 (각각 표 3의 컬럼 1, 2 또는 3)).

[0171] **실시예 6: BiaCore에 의한 항-인간 D 인자 Fab의 키네틱 분석**

[0172] *고정* - 인간 D 인자 (Advanced Research Inc, 0.1 mg/㎖)를 아민-커플링 방법을 사용하여 CM5 칩 (BiaCore) 상에 직접 고정시켰다. 하기와 같이 간략하게 절차가 기술된다: (1) 정류 (PBS)는 5 ㎕/분이다. (2) 35 ㎕ EDC/NHS (1:1)의 주입. (3) 아세테이트 완충제 (pH 4.5) 내의 인간 D 인자 35 ㎕의 주입. (4) 35 ㎕ 에톨아민의 주입에 의한 활성화된 기의 차단. (5) 5 ㎕ 10 mM 글리신 (pH 1.5)에 의한 표면 정화. 리간드 (인간 D 인자) 고정 수준은 약 1,000 RU였다. α-인간 D 인자 (huDi, 40 ㎕, 31.5 ㎍/㎖)를 사용한 테스트 러닝에서 약 900 RU의 상대 응답이 산출되었다.

[0173] *키네틱 분석* - 모든 항-인간 D 인자 Fab를 PBS 완충제에서 희석하였다. 각각의 샘플을 12.5 nM, 25 nM, 50 nM, 75 nM, 100 nM, 125 nM, 및 150 nM의 일련의 농도로 제조하였고, 높은 획득 속도에서 40 ㎕ 주입을 사용하였다. 5 ㎕ 펄스의 10 mM 글리신 (pH 1.5)을 적용함으로써 재생이 달성되었다. BIAvaluation 버젼 3.0을 사용하여 유사-1차 키네틱 하에 1:1 결합 모델에 Fab 결합 추적물을 피팅함으로써 키네틱 파라메터들을 수득하였다. 결과가 하기 표 4에 제시된다. 모든 데이터는 전반적인 피팅 루틴(routine)에 의해 수득된다.

표 4

[0174]

BIAcore 결과

Fab 클론	ka (M-1s-1)	kd (s-1)	Kd (M)
항-D 인자 D Fab 315	7.1×10^5	2.7×10^{-4}	3.7×10^{-10}
항-D 인자 D Fab 416	8.2×10^5	1.8×10^{-4}	3.3×10^{-10}
항-D 인자 D Fab 345	6.8×10^5	3.5×10^{-4}	5.1×10^{-10}
항-D 인자 D Fab 250	5.7×10^5	1.9×10^{-4}	3.3×10^{-10}
항-D 인자 D Fab 56	3.6×10^5	9.8×10^{-4}	2.7×10^{-9}
키메라	4.4×10^5	1.2×10^{-3}	2.7×10^{-9}
항-D 인자 D Fab 111	3.3×10^5	3.7×10^{-4}	1.14×10^{-9}

[0175] 당업자는 본원에 기술된 발명의 구체적인 실시양태들에 대한 다수의 등가물을 인지할 것이거나, 또는 단지 일상적인 실험을 사용하여 확인할 수 있다. 이같은 등가물은 하기의 청구항에 포함되도록 의도된다.

도면

도면1a

뮤린 MAb 166-32의 가변 중쇄의 아미노산 서열

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINT
YTGETTYADDFKGRFVFSLETSASTAYLEINNLKNEDMATYFCEREGGVDNWG
QGTTLTVSS (서열 1)

도면1b

뮤린 MAb 166-32의 가변 경쇄의 아미노산 서열

ETTVTQSPASLSMAIGEKVTIRCITSTDIDDDMNWYQQKPGEPPKLLISGGNTLR
PGVPSRFSSSGYGADFVFTIDNMLSEDVADYYCLQSDNLPYTFGGGTRLEIK
(서열 2)

도면2a

MAb 166-32의 중쇄 가변 영역에 대한 뮤린 핵산 서열

CAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACA

GTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACAAACTATGGAATGA

ACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAA

ACACCTACACTGGAGAGACAACATATGCTGATGACTTCAAGGGACGGTTTGT

CTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCTATTTGGAGATCAACAACCTCA

AAAATGAGGACATGGCTACATATTTCTGTGAAAGAGAGGGGGGGGTTGACAA

CTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA (서열 3)

도면2b

MAb 166-32의 경쇄 가변 영역에 대한 뮤린 핵산 서열

GAAACAACTGTGACCCAGTCTCCTGCATCCCTGTCCATGGCTATAGGAGAAAA

AGTCACCATCAGATGCATAACCAGCACTGATATTGATGATGATATGAACTGGT

ACCAGCAGAAGCCAGGGGAACCTCCTAAGCTCCTTATTTCAGGAGGCAATACT

CTTCGTCCTGGAGTCCCATCCCGATTCTCCAGCAGTGGCTATGGTGCAGATTTT

GTTTTTACAATTGACAACATGCTCTCAGAAGATGTTGCAGATTACTACTGTTTG

CAAAGTGATAACTTGCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAGGCTGGAAATAA

AA (서열 4)

도면3

뮤린 MAb 166-32에 대한 인간 중쇄 주형의 비교

```
                1                 10                  20                  30                  40
Mu  166-32      Q I Q L V Q S G P E L K K P G E T V K I S C K A S G Y T F T N Y G M N W V K Q A P G K G L K W M G
Hu VI-4.1b+       V             S             A S     V           G Y T F T S Y A M N     R         Q     E

                50 52 a 53            60        65        70                  80  82 a b c 83            90
Mu  166-32      W I N T Y T G E T T Y A D D F K G R F V F S L E T S A S T A Y L E I N N L K N E D M A T Y F C E R
Hu VI-4.1b+     W I N T N T G N P T Y A Q G F T G             D     V           Q   S S     A     T   V   Y   A

                95          103           110   113
Mu. 166-32      E G G V D N W G Q G T T L T V S S
Hu VI-4.1b+         Y F D Y           L V         (JH4d)
```

카밧 CDR: 밑줄. 볼드체/이탤릭체: 코티아 CDR1.

도면4

뮤린 MAb 166-32와 인간 경쇄 주형의 비교

```
            1                   10                  20                  30                  40
 Mu. 166-32 E T T V T Q S P A S L S M A I G E K V T I R C I T S T D I D D D M N W Y Q Q K P G E P P K L L I
HUtemp DPK4 D I Q M         S       A S V   D R       T   R A S Q G I S N Y L A               K V

             50                  60                  70                  80                  90
 Mu. 166-32 S G G N T L R P G V P S R F S S S G Y G A D F V F T I D N M L S E D V A D Y Y C L Q S D N L P Y
Hutemp DPK4 Y A A S T L Q S               G     S   T     T L     S S L Q P         T       Q K Y N S A P Y

                 100
 Mu. 166-32 T F G G G T R L E I K
HUtemp JK2  T     Q     K        (JK2)
```

도면5

#56 VK
DIQVTQSPSSLSASVRDRVTITCitstdidddmnWYQQKPGKVPKLLISggntlrpGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSLQPEDVATYYClqsdnlpytFGQGTKLEIK

#56 VH
QVQLVQSGPELKKPGASVKVSCKASgytftnygmnWVKQAPGQGLEwmgwintytgettyaddfkGRFVF
SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTATYYCERegqvdnWGQGTLVTVSS

#111 VK
DIQVTQSPSSLSASV**G**DRVTITCitstdidddmnWYQQKPGKVPKLLISggntlrpGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSLQPEDVATYYClqsd**s**lpytFGQGTKLEIK

#111 VH
QVQLVQSGPELKKPGASVKVSCKASgytftnygmnWV**R**QAPGQGLEwmgwintytgettyaddfkGRFVF
SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTA**V**YYCERegqvnnWGQGTLVTVSS

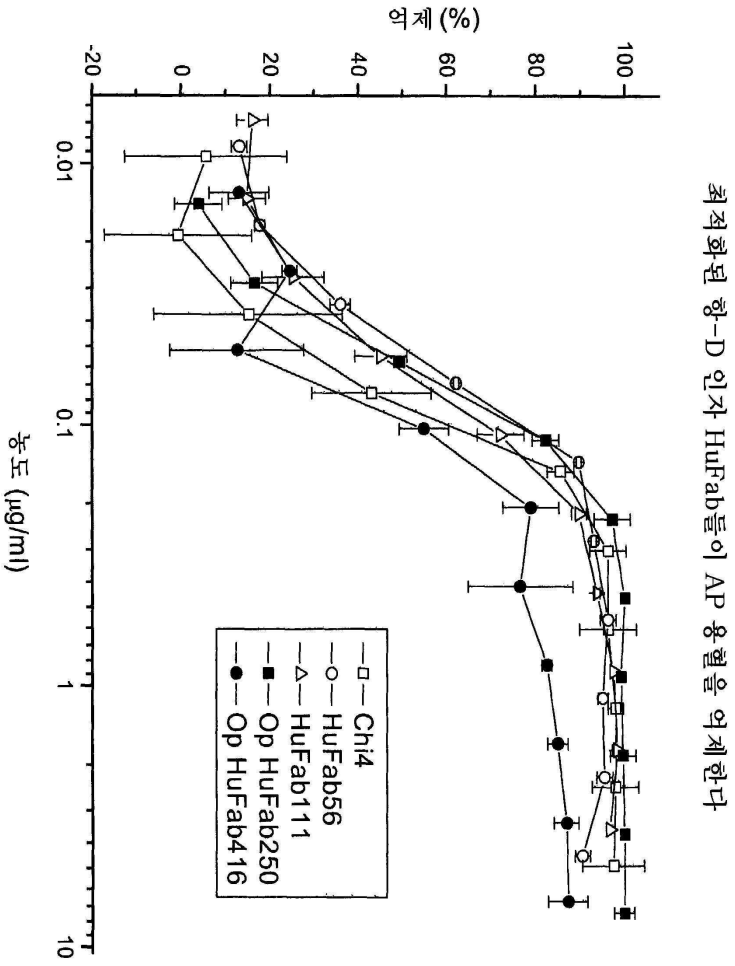
#250 VK
DIQVTQSPSSLSASV**G**DRVTITCitstdidddmnWYQQKPGKVPKLLIS**h**gntlrpGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSLQPEDVATYYClqsd**s**lpytFGQGTKLEIK

#250 VH
QVQLVQSGPELKKPGASVKVSCKASgytftnyq**l**nWV**R**QAPGQGLEwmgwintytgettyaddfkGRFVFS
LDTSVSTAYLQISSLKAEDTA**V**YYCERegqvnnWGQGTLVTVSS

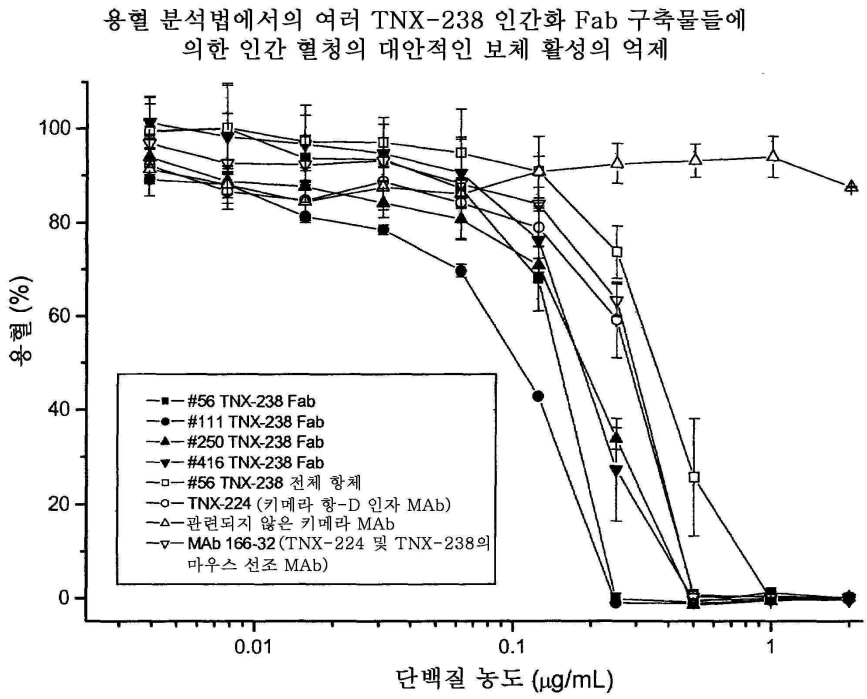
#416 VK
DIQVTQSPSSLSASV**G**DRVTITCitstdidddmnWYQQKPGKVPKLLIS**d**gntlrpGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSLQPEDVATYYClqsd**s**lpytFGQGTKLEIK

#416 VH
QVQLVQSGPELKKPGASVKVSCKASgytft**s**ygmnWV**R**QAPGQGLEwmgwintytgettyaddfkGRFVF
SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTA**V**YYCERegqvnnWGQGTLVTVSS

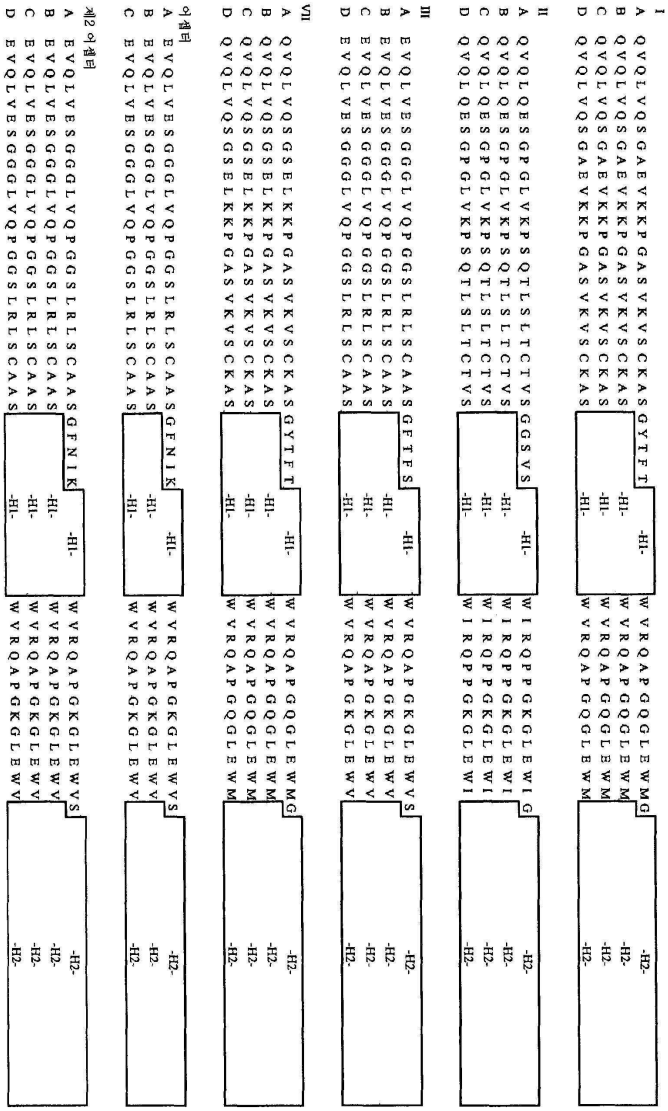
도면6



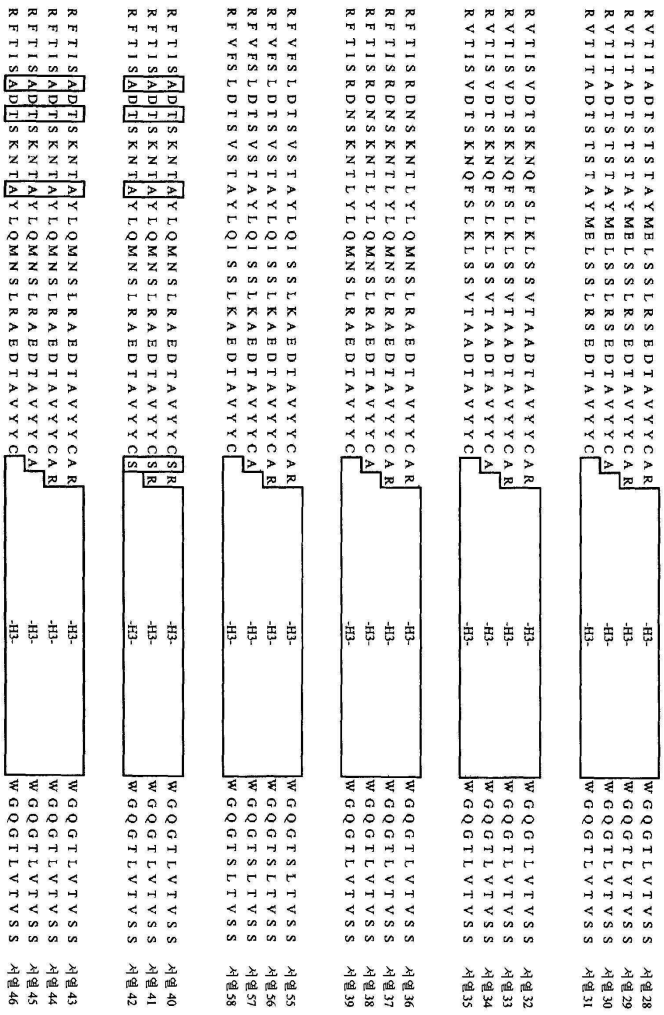
도면7


용혈 분석법에서의 여러 TNX-238 인간화 Fab 구축물들에
의한 인간 혈청의 대안적인 보체 활성의 억제
용혈 (%)
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
단백질 농도 (μg/mL)
#56 TNX-238 Fab
#111 TNX-238 Fab
#250 TNX-238 Fab
#416 TNX-238 Fab
#56 TNX-238 전체 항체
TNX-224 (키메라 항-D 인자 MAb)
관련되지 않은 키메라 MAb
MAb 166-32 (TNX-224 및 TNX-238의
마우스 선조 MAb)

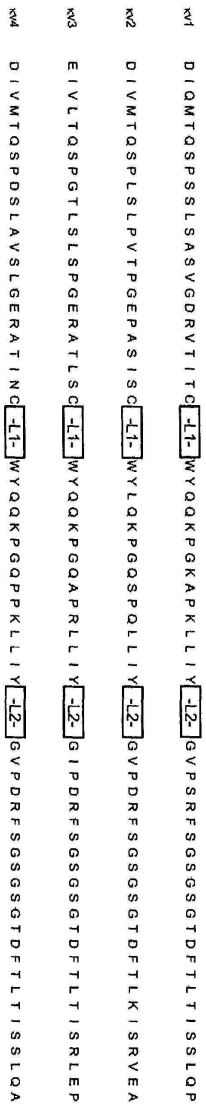
도면8a



도면8b


서열 28
서열 29
서열 30
서열 31
서열 32
서열 33
서열 34
서열 35
서열 36
서열 37
서열 38
서열 39
서열 40
서열 41
서열 42
서열 43
서열 44
서열 45
서열 46
서열 55
서열 56
서열 57
서열 58

도면9a



도면9b

EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK 서열 47

EDVGVYYC -L3- FGQGTKVEIK 서열 48

EDFAVYYC -L3- FGQGTKVEIK 서열 49

EDVAVYYC -L3- FGQGTKVEIK 서열 50

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Genentech, Inc.

WU, Herren

SINGH, Sanjaya

FUNG, Sek Chung

AN, Ling-Ling

LOWMAN, Henry B.

KELLEY, Robert F.

<120> Humanized Anti-Factor D Antibodies and Uses Thereof

<130> P4028R1 WO

<150> US 60/856,505

<151> 2006-11-02

<160> 58

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 115

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> VARIABLE HEAVY CHAIN DOMAIN OF MAB 166-32

<

400> 1

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Val Ser Ser
115

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> VARIABLE LIGHT CHAIN DOMAIN OF MAB 166-32

<400> 2

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

Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 345

<212> DNA

<213> ARTIFICIAL

<220><223> VARIABLE HEAVY CHAIN DOMAIN OF MAB 166-32

<400> 3

cagatccagt tggtgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60

tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca aactatggaa tgaactgggt gaagcaggct 120

ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacct acactggaga gacaacatat 180

gctgatgact tcaagggacg gtttgtcttc tctttggaaa cctctgccag cactgcctat 240

ttggagatca acaacctcaa aaatgaggac atggctacat atttctgtga aagagagggg 300

ggggttgaca actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 345

<210> 4

<211> 321

<212> DNA

<213> ARTIFICIAL

<220><223> VARIABLE LIGHT CHAIN DOMAIN OF MAB 166-32

<400> 4

gaaacaactg tgacccagtc tcctgcatcc ctgtccatgg ctataggaga aaaagtcacc 60

atcagatgca taaccagcac tgatattgat gatgatatga actggtacca gcagaagcca 120

ggggaacctc ctaagctcct tatttcagga ggcaatactc ttcgtcctgg agtcccatcc 180

cgattctcca gcagtggcta tggtgcagat tttgttttta caattgacaa catgctctca 240

gaagatgttg cagattacta ctgtttgcaa agtgataact tgccgtacac gttcggaggg 300

gggaccaggc tggaaataaa a 321

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> VARIABLE LIGHT CHAIN DOMAIN OF HUMANIZED CLONE #56

<400> 5

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp

20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Ser Gly Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 6

<211> 115

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> VARIABLE HEAVY CHAIN DOMAIN OF HUMANIZED CLONE #56

<400> 6

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Val Ser Ser
115

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> VARIABLE LIGHT CHAIN DOMAIN OF HUMANIZED CLONE #111

<400> 7

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp
20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Ser Gly Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Ser Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 8

<211> 115

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> VARIABLE HEAVY CHAIN DOMAIN OF HUMANIZED CLONE # 111

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Glu Arg Glu Gly Gly Val Asn Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> VARIABLE LIGHT CHAIN DOMAIN OF HUMANIZED CLONE #250

<400> 9

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp

20 25 30

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

Ser His Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Ser Leu Pro Tyr

85 90 95

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

<210> 10

<211> 115

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> VARIABLE HEAVY CHAIN DOMAIN OF HUMANIZED CLONE #250

<400> 10

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

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

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

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

Glu Arg Glu Gly Gly Val Asn Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 107
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220><223> VARIABLE LIGHT CHAIN DOMAIN OF HUMANIZED CLONE #416
<400> 11
Asp Ile Gln Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp
20 25 30

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

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

<210> 12
<211> 115

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> VARIABLE HEAVY CHAIN DOMAIN OF HUMANIZED CLONE #416

<400> 12

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

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

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

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

Glu Arg Glu Gly Gly Val Asn Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> CDR-H1 OF MAB 166-32

<400> 13

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
1 5 10

<210> 14

<211> 19

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> CDR-H2 OF MAB 166-32

<400> 14

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> CDR-H3 OF MAB 166-32

<400> 15

Glu Gly Gly Val Asp Asn

1 5

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> CDR-L1 OF MAB 166-32

<400> 16

Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp Met Asn

1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> CDR-L2 OF MAB 166-32

<400> 17

Gly Gly Asn Thr Leu Arg Pro

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> CDR-L3 OF MAB 166-32

<400> 18

Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> CDR-L3 OF HUMANIZED CLONE #111

<400> 19

Leu Gln Ser Asp Ser Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> CDR-H3 OF HUMANIZED CLONE #111

<400> 20

Glu Gly Gly Val Asn Asn

1 5

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> CDR-L2 OF HUMANIZED CLONE #250

<400> 21

His Gly Asn Thr Leu Arg Pro

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> CDR-L3 OF HUMANIZED CLONE #250

<400> 22

Leu Gln Ser Asp Ser Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> CDR-H1 OF HUMANIZED CLONE #250

<400> 23

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Leu Asn

1 5 10

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> CDR-L2 OF HUMANIZED CLONE #416

<400> 24

Asp Gly Asn Thr Leu Arg Pro

1 5

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> CDR-H1 OF HUMANIZED CLONE #416

<400> 25

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Met Asn

1 5 10

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> VARIABLE LIGHT CHAIN COMPOSITE OF HUMANIZED CLONES

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (43)..(43)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (49)..(49)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (64)..(64)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (69)..(69)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 26

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp
20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Xaa Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Xaa Asp Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Xaa

50 55 60

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

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

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

<210> 27

<211> 115

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> VARIABLE HEAVY CHAIN COMPOSITE OF HUMANIZED CLONES

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (38)..(38)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (93)..(93)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (97)..(97)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 27

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

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

Gly Met Asn Trp Val Xaa Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Xaa Tyr Tyr Cys
85 90 95

Xaa Arg Glu Gly Gly Val Asn Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 28

<211> 87

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 28

Gln Val Gln Leu Val 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 Thr Trp Val

20 25 30

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

35 40 45

Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu

50 55 60

Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly

65 70 75 80

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

85

<210> 29

<211> 81

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 29

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

20 25 30

Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser

<210> 30

<211> 80

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 30

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

20 25 30

Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr

35 40 45

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

50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

65 70 75 80

<210> 31

<211> 79

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 31

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

20 25 30

Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr

35 40 45

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

50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

65 70 75

<210> 32

<211> 87

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 32

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Trp Ile

20 25 30

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Val Thr Ile

35 40 45

Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val

50 55 60

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly

65 70 75 80

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

85

<210> 33

<211> 81

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 33

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
20 25 30
Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
35 40 45

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
50 55 60
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
65 70 75 80
Ser

<210> 34
<211> 80
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220><223> Sequence is synthesized
<400> 34
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

<210> 35
<211> 79
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220><223> Sequence is synthesized
<400> 35

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

50 55 60
Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70 75

<210> 36
<211> 87
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220><223> Sequence is synthesized
<400> 36
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Val
20 25 30

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

<210> 37
<211> 81
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 37

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

<210> 38

<211> 80

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 38

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

<210> 39

<211> 79

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 39

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

50 55 60
Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70 75

<210> 40

<211> 87

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 40

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Trp Val
20 25 30

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

<210> 41

<211> 81

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 41

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

<210> 42

<211> 80

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 42

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

65 70 75 80

<210> 43

<211> 87

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 43

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

<210> 44

<211> 81

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 44

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser

<210> 45

<211> 80

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 45

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys

35 40 45

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

50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

65 70 75 80

<210> 46

<211> 79

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 46

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys

35 40 45

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

50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

65 70 75

<210> 47

<211> 80

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 47

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala

20 25 30

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly

35 40 45

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

50 55 60

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

65 70 75 80

<210> 48

<211> 80

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 48

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

20 25 30

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly

35 40 45

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp
50 55 60
Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
65 70 75 80

<210> 49
<211> 80
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220><223> Sequence is synthesized
<400> 49

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala

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

<210> 50
<211> 80
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized
<400> 50

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

35 40 45

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

50 55 60

Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

65 70 75 80

<210> 51

<211> 31

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 51

Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser

20 25 30

<210> 52

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 52

Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 53

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 54

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Xaa Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 55

<211> 87

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 55

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu

50 55 60

Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly

65 70 75 80

Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser

85

<210> 56

<211> 81

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 56

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

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

Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val
35 40 45

Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser
65 70 75 80

Ser

<210> 57

<211> 80

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 57

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

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

Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val
35 40 45

Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala
50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
65 70 75 80

<210> 58

<211> 79

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220><223> Sequence is synthesized

<400> 58

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

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

Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val
35 40 45

Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala

50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
65 70 75