



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년04월10일
(11) 등록번호 10-2099875
(24) 등록일자 2020년04월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/30 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7033164(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2006년11월24일
심사청구일자 2018년12월17일
- (85) 번역문제출일자 2018년11월15일
- (65) 공개번호 10-2018-0126091
- (43) 공개일자 2018년11월26일
- (62) 원출원 특허 10-2017-7031759
원출원일자(국제) 2006년11월24일
심사청구일자 2017년12월01일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2006/011302
- (87) 국제공개번호 WO 2007/059997
국제공개일자 2007년05월31일
- (30) 우선권주장
05025657.7 2005년11월24일
유럽특허청(EPO)(EP)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020050083962 A
Mol. Cell. Biol., 2001, 제21권, 제21호, 페이지
7380-7390

- (73) 특허권자
가니메드 파마슈티칼스 게엠베하
독일 55131 마인츠 안 데르 골드그루베 12
요하네스 구텐베르크-유니버시티 마인츠
독일 데-55128 마인츠 자르스트라쎄 21
- (72) 발명자
사힌 유구르
독일 55116 마인츠 필립-본-자베른 플라츠 1
투레시 오즈렘
독일 55116 마인츠 필립-본-자베른 플라츠 1
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
박장원

전체 청구항 수 : 총 26 항

심사관 : 최승희

(54) 발명의 명칭 암 치료를 위한 클라우딘-18에 대한 모노클로날 항체

(57) 요약

본 발명은 위암, 식도암, 췌장암, 폐암, 난소암, 대장암, 간암, 두경부암, 및 담낭암을 비롯한 종양관련 질병을 함유하는, CLD18을 발현하는 세포와 관련된 질병을 치료 및/또는 예방하기 위한 치료제로써 유용한 항체를 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

유세네르 덕

독일 65185 위에스바덴 마인제르 스트라세 25에이

프리츠 스테판

독일 55237 플론하임 가이스터베크 35

유헤렉 크리스토프

독일 65462 긴췌임 마리아마-바-스트라세 32

브란덴부르크 군다

독일 55122 마인츠 윌리-브랜드-플라츠 7

겍페르트 하랄드-게르하드

독일 55118 마인츠 웨이날리 109

슈로더 안자 크리스티나

독일 55122 마인츠 야콥-니콜라스-웨그 8

티엘 필립페

독일 82152 플라넵 케테-콜비츠-스트라세 4

명세서

청구범위

청구항 1

SEQ ID NO: 16의 아미노산 서열로 이루어지는 CLD18A2에 결합하고 CLD18A2를 발현하는 세포의 살해를 매개하는 항-CLD18A2 항체로서,

상기 항-CLD18A2 항체는 중쇄 가변 영역 (V_H) 및 경쇄 가변 영역 (V_L)을 포함하고,

상기 V_H 는 SEQ ID NO: 135로 나타내는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 V_L 은 SEQ ID NO: 142로 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 항-CLD18A2 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항-CLD18A2 항체는,

SEQ ID NO: 135로 나타내는 아미노산 서열을 갖는 V_H 및 SEQ ID NO: 142로 나타내는 아미노산 서열을 갖는 V_L 을 포함하는 키메라 항체인 것인 항-CLD18A2 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항-CLD18A2 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, 분비 IgA, IgD 및 IgE 항체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 항-CLD18A2 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항-CLD18A2 항체는 인간 IgG1 불변 영역을 포함하는 것인 항-CLD18A2 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항-CLD18A2 항체는 인간 카파 경쇄 불변 영역을 포함하는 것인 항-CLD18A2 항체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 항-CLD18A2 항체는 인간 IgG1 중쇄 불변 영역 및 인간 카파 경쇄 불변 영역을 포함하는 것인 항-CLD18A2 항체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 항-CLD18A2 항체는 SEQ ID NO: 41로 나타내는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 불변 영역을 포함하는 것인 항-CLD18A2 항체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 항-CLD18A2 항체는 SEQ ID NO: 148로 나타내는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 불변 영역을 포함하는 것인 항-CLD18A2 항체.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 항-CLD18A2 항체는 SEQ ID NO: 46으로 나타내는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 불변 영역을 포함하는 것인 항-CLD18A2 항체.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 항-CLD18A2 항체는 SEQ ID NO: 150으로 나타내는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 불변 영역을 포함하는 것인 항-CLD18A2 항체.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 항-CLD18A2 항체는 SEQ ID NO: 150으로 나타내는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 불변 영역 및 SEQ ID NO: 41로 나타내는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 불변 영역을 포함하는 것인 항-CLD18A2 항체.

청구항 12

CLD18A2에 결합하고, CLD18A2를 발현하는 세포의 살해를 매개하는 능력을 갖는 항체로서,

상기 항체는 하기 세트 (i) 내지 (ix) 중에서 선택되는 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3의 세트를 포함하는 중쇄 가변 도메인 (VH)와 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함하고:

(i) VH: CDR1: SEQ ID NO: 115의 위치 45-52, CDR2: SEQ ID NO: 115의 위치 70-77, CDR3: SEQ ID NO: 115의 위치 116-125, VL: CDR1: SEQ ID NO: 122의 위치 49-53, CDR2: SEQ ID NO: 122의 위치 71-73, CDR3: SEQ ID NO: 122의 위치 110-118,

(ii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 116의 위치 45-52, CDR2: SEQ ID NO: 116의 위치 70-77, CDR3: SEQ ID NO: 116의 위치 116-126, VL: CDR1: SEQ ID NO: 121의 위치 47-58, CDR2: SEQ ID NO: 121의 위치 76-78, CDR3: SEQ ID NO: 121의 위치 115-123,

(iii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 117의 위치 45-52, CDR2: SEQ ID NO: 117의 위치 70-77, CDR3: SEQ ID NO: 117의 위치 116-124, VL: CDR1: SEQ ID NO: 123의 위치 47-52, CDR2: SEQ ID NO: 123의 위치 70-72, CDR3: SEQ ID NO: 123의 위치 109-117,

(iv) VH: CDR1: SEQ ID NO: 119의 위치 44-51, CDR2: SEQ ID NO: 119의 위치 69-76, CDR3: SEQ ID NO: 119의 위치 115-125, VL: CDR1: SEQ ID NO: 126의 위치 47-58, CDR2: SEQ ID NO: 126의 위치 76-78, CDR3: SEQ ID NO: 126의 위치 115-122,

(v) VH: CDR1: SEQ ID NO: 118의 위치 45-52, CDR2: SEQ ID NO: 118의 위치 70-77, CDR3: SEQ ID NO: 118의 위치 116-126, VL: CDR1: SEQ ID NO: 125의 위치 47-58, CDR2: SEQ ID NO: 125의 위치 76-78, CDR3: SEQ ID NO: 125의 위치 115-123,

(vi) VH: CDR1: SEQ ID NO: 120의 위치 45-53, CDR2: SEQ ID NO: 120의 위치 71-78, CDR3: SEQ ID NO: 120의 위치 117-128, VL: CDR1: SEQ ID NO: 124의 위치 47-58, CDR2: SEQ ID NO: 124의 위치 76-78, CDR3: SEQ ID NO: 124의 위치 115-123,

(vii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 120의 위치 45-53, CDR2: SEQ ID NO: 120의 위치 71-78, CDR3: SEQ ID NO: 120의 위치 117-128, VL: CDR1: SEQ ID NO: 127의 위치 47-58, CDR2: SEQ ID NO: 127의 위치 76-78, CDR3: SEQ ID NO: 127의 위치 115-123,

(viii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 120의 위치 45-53, CDR2: SEQ ID NO: 120의 위치 71-78, CDR3: SEQ ID NO: 120의 위치 117-128, VL: CDR1: SEQ ID NO: 128의 위치 47-58, CDR2: SEQ ID NO: 128의 위치 76-78, CDR3: SEQ ID NO: 128의 위치 115-123, 및

(ix) VH: CDR1: SEQ ID NO: 120의 위치 45-53, CDR2: SEQ ID NO: 120의 위치 71-78, CDR3: SEQ ID NO: 120의 위치 117-128, VL: CDR1: SEQ ID NO: 129의 위치 47-52, CDR2: SEQ ID NO: 129의 위치 70-72, CDR3: SEQ ID NO: 129의 위치 109-117,

상기 항체의 VH 및 VL 도메인은 단일 폴리펩타이드 사슬상에서 발현되는 것인 항체.

청구항 13

제12항에 있어서,

CLD18A1 및 CLD18A2에 결합하거나, 또는

CLD18A2에 결합하지만 CLD18A1에 결합하지 않는 것인 항체.

청구항 14

제12항에 있어서, T 세포를 포함하는 효과기 세포(effector cell)에 결합 가능한 것인 항체.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 항체는 IgG1, IgG2a 및 IgG2b를 포함하는 IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, 분비 IgA, IgD, IgE 항체, 이중 특이적 항체 및 다중 특이적 항체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 항체.

청구항 16

제15항에 있어서,

CLD18에 대한 제1 결합 특이성 및

Fc 수용체 또는 T 세포 수용체인 제2 표적 에피토프에 대한 제2 결합 특이성

을 포함하는 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체인 것인 항체.

청구항 17

제12항에 있어서, CLD18A2은 SEQ ID NO: 2에 따른 아미노산 서열을 갖는 것인 항체.

청구항 18

제13항에 있어서, CLD18A1은 SEQ ID NO: 8에 따른 아미노산 서열을 갖는 것인 항체.

청구항 19

제12항에 있어서, 살아있는 세포의 표면에 존재하는 CLD18A2의 천연(native) 에피토프에 결합하는 것인 항체.

청구항 20

제12항에 있어서, SEQ ID NO: 132, 133, 134, 135, 136, 137 및 이들의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)를 포함하는 것인 항체.

청구항 21

제12항에 있어서, SEQ ID NO: 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146 및 이들의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 것인 항체.

청구항 22

제12항에 있어서, 하기 가능성 (i) 내지 (ix) 중에서 선택되는 중쇄 가변 영역 (VH)와 경쇄 가변 영역 (VL)의 조합을 포함하는 것인 항체:

(i) VH는 SEQ ID NO: 132로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 및

VL은 SEQ ID NO: 139로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고,

(ii) VH는 SEQ ID NO: 133로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 및

VL은 SEQ ID NO: 138로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고,

(iii) VH는 SEQ ID NO: 134로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 및

VL은 SEQ ID NO: 140로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고,

(iv) VH는 SEQ ID NO: 136 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 및

VL은 SEQ ID NO: 143로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고,

(v) VH는 SEQ ID NO: 135로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 및

VL은 SEQ ID NO: 142로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고,

(vi) VH는 SEQ ID NO: 137로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 및

VL은 SEQ ID NO: 141로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고,

- (vii) VH는 SEQ ID NO: 137로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 및 VL은 SEQ ID NO: 144로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고,
- (viii) VH는 SEQ ID NO: 137로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 및 VL은 SEQ ID NO: 145로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고,
- (ix) VH는 SEQ ID NO: 137로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 및 VL은 SEQ ID NO: 146로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함한다.

청구항 23

제12항에 있어서,

- (i) SEQ ID NO: 115, 116, 117, 118, 119, 120 및 그의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는
- (ii) SEQ ID NO: 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 및 그의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 것인 항체.

청구항 24

제12항에 있어서, 하기 가능성 (i) 내지 (ix) 중에서 선택되는 중쇄와 경쇄의 조합을 포함하는 것인 항체:

- (i) 중쇄는 SEQ ID NO: 115로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 및 경쇄는 SEQ ID NO: 122로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고,
- (ii) 중쇄는 SEQ ID NO: 116로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 및 경쇄는 SEQ ID NO: 121로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고,
- (iii) 중쇄는 SEQ ID NO: 117로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 및 경쇄는 SEQ ID NO: 123로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고,
- (iv) 중쇄는 SEQ ID NO: 119로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 및 경쇄는 SEQ ID NO: 126로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고,
- (v) 중쇄는 SEQ ID NO: 118로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 및 경쇄는 SEQ ID NO: 125로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고,
- (vi) 중쇄는 SEQ ID NO: 120로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 및 경쇄는 SEQ ID NO: 124로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고,
- (vii) 중쇄는 SEQ ID NO: 120로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 및 경쇄는 SEQ ID NO: 127로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고,
- (viii) 중쇄는 SEQ ID NO: 120로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 및 경쇄는 SEQ ID NO: 128로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고,
- (ix) 중쇄는 SEQ ID NO: 120로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 및 경쇄는 SEQ ID NO: 129로 나타내는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함한다.

청구항 25

CLDN18.2를 발현하는 것을 특징으로 하는 암 질병을 치료 또는 예방하기 위한 약학적 조성물로서,

상기 조성물은 제1항 내지 제24항 중 어느 하나의 항에 기재된 항-CLD18A2 항체 및, 필요에 따라 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 것인 약학적 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 암 질병은 위암, 식도암, 췌장암, 폐암, 난소암, 결장암, 간장(hepatic)암, 두경부암(head-neck cancer), 담낭암으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 약학적 조성물.

청구항 27

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 암에 대한 항체에 기초한 치료요법은 종래의 약물과 비교하여 높은 특이성 및 낮은 부작용 프로파일의 잠재성을 가진다. 그 이유는 항체에 의한 정상 및 종양성신생세포들 사이에 정밀한 구분과, 작용 모드가 세포독성의 면역 세포들의 모집(recruitment) 및 보체 활성을 비롯한 적은 독성 면역 항종양 메커니즘에 의존한다는 사실이다.
- [0002] 항체 기초한 치료요법을 위한 표적(target)은 특별한 특질을 갖는 것을 필요로하고, 이것은 정상 및 종양성신생 세포들 사이에 적절한 구분을 위한 기초를 형성한다. 명백하게, 정상 조직에 완전히 검출할 수 없고, 종양 세포들에 대한 어느 한쪽의 배타적인 제한을 가진 표적은 효율적이고 안전한 항체 치료요법의 발달을 위해 이상적이다. 다른 면에서, 고수준 과발현은 인간 상피 성장 인자 리셉터 유형 2 (HER-2)에 의해 예시된 치료 윈도우(window) 및 낮은 부작용을 위한 근거일 수 있고, 이것은 유전자 증폭의 결과로써 항체트라스트주맙(헤셉틴)을 위한 좋은 표적이다.

배경 기술

- [0003] 종양 치료법을 위한 임상적 발달에서 또는 이미 승인된 항체를 위한 다른 표적은 구별되는 품질을 가지고, 이것은 종양 세포에서 표적 분자의 수많은 과발현에 기초한 것은 아니다. 프로테오글리칸 MUC-1에 대한 항체의 경우에, 표적의 골격에서 펩티드 반복 에피토프는 종양 세포에서 언더(under)글리코실화되고, 그리하여 그것의 정상 카운터파트(counterpart)로 변경된다. CD20 (리툰시맙), CD52 (캄파스-1H) 및 CD22 (에프라투주맙)의 경우에, 항체 표적은 종양 세포 및 정상 림포사이트에서 비교할만한 발현 수준을 가진다. 여기에, 항체에 의한 정상 세포의 제거는 표적-음성 줄기 세포들이 정상 림포사이트 레퍼토어(repertoire)를 복원하기 때문에 허용할 수 있다. 항체 표적의 차별적인(differential) 접근성의 다른 예들은 태아성 암항원(CEA) 및 카르보안하이드라제 IX (CA9)이다. 모든 항원들은 각각 결장 및 신장의 정상 상피에서 발현된다. 그러나, 방사능적으로 표지된 이미징 항체들은 종양 조직과 정상 조직 사이에서 잘 구분되고, 세포독성의 항체들은 잘 견딘다. 이것은 가장 IgG 항체들이 접근하지 않는 정상 상피 조직의 루미날(luminal) 면에 CA9 및 CEA의 제한된 발현 때문일 것 같다. 또한 항원 상피 세포 부착 분자 (Ep-CAM)는 이러한 카테고리에 속한다. 상피 세포를 위한 동형(homotypic) 세포 부착 분자로써, 그것은 세포내 공간에서 국소화(localize)된다. 흥미롭게, 고(high)-친화성 항-Ep-CAM 항체들은 매우 독성이 있고, 중(intermediate)-친화성 항체들은 잘 견딘다. 이것은 정상 세포들 상에 Ep-CAM 표적의 접근가능성을 제시하고, 항체 결합의 동태가 치료적 윈도우를 열 수 있다는 것을 가리킨다.
- [0004] 한가지 가능성은 세포/세포 부착에 관련있는 다른 상피 세포 특정 단백질들이 항체 접근을 위해 매력적일 수 있고, 그것들은 잘 구축된 상피에서 항체에 거의 접근가능하지 않지만, 종양 세포에서는 노출되기 때문이다. 우리는 그리하여 치료적 항체들을 위한 표적으로써 적절성을 위한 상피 조직 구축을 계획하는데 관련있는 단백질들을 분석하였다. 단백질, 우리의 관심을 특히 끌었던 것은 클라우딘 18(claudin 18)이다.
- [0005] 클라우딘 18 (CLD18)은 분자 (Genbank 수탁 번호: 스플라이스 변이체 1 (CLD18A1): NP_057453, NM_016369, 및 스플라이스 변이체 2 (CLD18A2): NM_001002026, NP_001002026)는 분자량 약 27,9 / 27,72 kD를 가진 인테그랄(integral) 막통과 단백질이다. 클라우딘은 상피와 내피의 치밀 이음새(tight junction) 내에 위치되는 인테그랄 막 단백질이다. 치밀 이음새는 내부막 입자들과 주변 세포들 사이의 내부 연결된 스트랜드의 네트워크를 조직한다. 치밀 이음새에서, 오클루딘(occludin)과 클라우딘은 가장 두드러진 막횡단 단백질 요소이다. 강한 세포간 부착성질 때문에, 그것들은 용질의 세포주위적(paracellular) 수송을 조절하고 방해하기 위한 초기 장벽을 생성하고, 세포적 극성을 유지하기 위한 막 지질 및 단백질의 측면 확산을 제한한다. 치밀 이음새를 형성하는 단백질은 상피 조직 구축을 조직하는데에 중요하게 관련되어 있다. 우리는 그러한 단백질들이 잘 구축된 상피에서 항체에 거의 접근할 수 없으나, 종양 세포들에는 노출되어 있다는 것을 추측했다.

- [0006] CLD18은 테트라스파닌이고, 4개의 소수성 영역을 가진다. 우리는 CLD18이 몇몇 상이한 입체배좌를 나타내고, 이것이 항체에 선택적으로 인지될 수 있다는 것을 나타내는 자료를 만들었다. 클라우딘 패밀리 멤버의 광대한 다수를 위해 설명된 바와 같이, 하나의 입체배좌(CLD18-입체배좌-1)는 모든 4개의 소수성 영역이 일정한 막횡단 도메인(TM)으로써 역할하고, 2개의 세포외 루프 (소수성 영역 1 및 소수성 영역 2에 의해 포함(embrace)된 루프 1; 소수성 영역 3 및 4에 의해 포함된 루프 2)는 형성된다. 두번째 입체배좌(CLD18-입체배좌-2)는 PMP22를 위해 설명된 바와 같이, 테트라스파닌 패밀리 (Taylor et al., J. Neurosc. Res. 62:15-27, 2000)의 다른 멤버로, 두번째 및 세번째 소수성 도메인들은 첫번째 및 네번째 막통과 도메인 사이에 부위 (루프D3)는 세포밖이기 위해 플라즈마 막을 완전히 통과하지 않는다. 세번째 입체배좌(CLD18-입체배좌-3)는, 첫번째 및 네번째 소수성 영역에 의해 포함된 2개의 내부 소수성 영역이 있는 큰 세포밖 도메인을 의미하며, 이것은 일정한 막통과 도메인들로 작용한다. 루프D3 내에 전형적인 N-글리코실화 사이트의 존재 때문에, 클라우딘-18 토폴로지(topology) 변이체는 CLD18 토폴로지2- 및 CLD18 토폴로지-3은 추가적인 세포밖N-글리코실화 사이트를 품는다(habour).
- [0007] 다른 수준의 복잡성은 두개의 상이한 스플라이스 변이체의 존재에 의해 CLD18 분자에 추가되고, 이것은 마우스 및 인간 내에 설명된다 (Niimi, Mol. Cell. Biol. 21:7380-90, 2001). 스플라이스 변이체들 CLD18A1 및 CLD18A2은 첫번째 21 N-말단 아미노산들에서 다르고, 이것은 첫번째 TM 및 루프1을 포함하는 반면, C-말단의 초기 단백질 서열은 동일하다.
- [0008] CLD18A1은 선택적으로 정상 폐 및 위 상피들에 발현되는 반면, CLD18A2는 위 세포들 상에 오직 발현된다 (Niimi, Mol. Cell. Biol. 21:7380-90, 2001). 가장 중요하게, CLD18A2는 위 상피의 분화된 짧은 수명 세포들로 제한되지만, 위 줄기 세포 영역에는 없다. 민감한 RT-PCR을 이용하여, 우리는 변이체들 모두가 어떠한 정상 인간 기관에서도 검출가능하지 않지만, 인간 암 세포주 뿐만 아니라 위, 식도, 췌장 및 폐 종양들을 함유한 몇몇 암 유형들에서 강하게 발현된다는 것을 보여줘왔다. 발현은 이러한 표지들의 선암종 서브유형에서 가장 두드러진 것이다.
- [0009] 단백질의 분자량은 몇몇 암들 및 인접한 정상 조직에서 다르다. 건강한 조직 내에서 관찰된 고분자량 단백질은 디글리코실화 화합물 PNGase F로 조직 용해물을 처리함에 의해 암에서 관찰된 바와 같이 동일한 분자량 내에서 전달될 수 있다. 이는 CLD18이 그 정상 조직 카운터파트에 비교하여 암에서 덜 N-글리코실화된다는 것을 제시한다. 이러한 구조적 차이는 변경된 에피토프를 일으키는 것 같다. 전통적인 N-글리코실화 모티프는 분자의 루프 D3 도메인 내에서 aa116 위치이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명에 따른 용어들 "CLD18" 및 "CLD18-변이체"는 (i) CLD18-스플라이스 변이체들, (ii) CLD18-N-글리코실화 변이체들, (iii) CLD18-입체배좌 변이체들, (iv) 세포간 치밀 이음새에 위치한CLD18-프리 및 동형적으로/이형적으로 관련된 변이체들 및 (v) CLD18-암 관련된 및 CLD18-비-암 세포 관련된 변이체들을 포함할 것이다.
- [0011] CLD18의 분자량 및 기능적 특징들은 이 분자를 항체에 근거한 암 치료법을 위한 매우 흥미로운 표적으로 만든다. 이것들은 특히 (i) 광대한 다수의 독성 관련된 정상 조직들로부터 CLD18의 부재, (ii) CLD18A2 변이체 발현의 분화된 위 세포들로서 없어도되는 (dispensible) 세포 집단으로의 제한, 이것은 위의 표적-음성 줄기 세포에 의해 보충될 수 있다, (iii) 정상 및 종양성신생세포들 상이에 잠재적인 차별적 글리코실화에 대한 힌트, 및 (iv) 상이한 입체배좌 토폴로지(topology)들의 존재들이다. 또한, 치밀 이음새로 단백질로서 CLD18의 역할은 좋은 치료적 윈도우(window)로 기여할 수 있다. 종양 세포들이 클라우딘은 발현하지만, 정상 상피 조직에서 나타난 바와 같이 클라우딘의 동형 및 이형적 연합에 의해 전통적인 치밀 이음새를 형성하지 않기 때문에, 종양 세포들은 세포밖 항체 결합 및 면역치료를 받을 수 있는 고려할만한 풀(pool)의 자유 클라우딘을 가질 수 있다. 건강한 상피에서 클라우딘의 결합 에피토프는 그러한 항체들에 의한 접근으로부터 치밀 이음새 내에서 보호된다.
- [0012] 본 발명의 목적은 종양 질병을 비롯하여 CLD18이 발현되는 질병의 치료에 유용한 항체들을 제공하는 것이다. 여기에 개시된 바와 같은 항체들은 그러한 질병을 진단하는데 또한 유용성을 가진다.

과제의 해결 수단

- [0013] **발명의 요약**

- [0015] 본 발명은 일반적으로 위암, 식도암, 췌장암, 폐암, 난소암, 결장암, 간장(hepatic)암, 두경부암(head-neck cancer), 담낭암을 비롯한 종양 관련 질병을 함유하는 CLD18을 발현하는 세포와 관련된 질병을 치료 및/또는 예방하기 위한 치료제로써 유용한 항체를 제공한다.
- [0016] 일 면에서, 본 발명은 CLD18에 결합하는 능력을 가지고, CLD18을 발현하는 세포들의 살해를 매개하는 항체에 관한 것이다. 종계는, 항체는 CLD18A1 및 CLD18A2에 결합하고, 더 종계는, CLD18A1이 아닌 CLD18A2에 결합한다. 종계는, 본 발명의 항체는 CLD-입체배좌-1의 루프1 또는 루프2에 특이적이고 결합한다. 추가적으로 선호되는 구체예에서, 본 발명의 항체는 CLD-입체배좌-2의 루프3에 특이적이고 결합하며, 특히, 루프D3 내에 116 위치에서 잠재적인 N-글리코실레이션 사이트나 그 주변에 결합한다. 추가적인 구체예에서, 본 발명의 항체는 루프 D3 내에 116 위치에 잠재적인 N-글리코실레이션 사이트의 비글리코실화된 형태에 특이적이다.
- [0017] 본 발명의 항체에 의한 세포들의 살해는 종계는 상기 세포들에 의해 발현된 CLD18에 항체의 결합에 의해, 더 종계는, 상기 세포들에 의해 발현된 CLD18A2에 대한 항체의 결합에 의해 유도된다. 일 구체예에서, 본 발명의 항체의 상기 세포에 의해 발현된 CLD18A1에 대한 결합은 상기 세포들의 살해를 유도하지 않는다.
- [0018] CLD18을 발현하는 세포들은 종계는 암세포들이고, 특히, 종양성 위암 세포, 식도암 세포, 췌장암 세포, 폐암 세포, 난소암 세포, 결장암 세포, 간장암 세포, 두경부암 세포, 및 담낭암 세포로 구성된 군에서 선택된다.
- [0019] 종계는 본 발명의 항체는 보체 의존성 세포독성 (CDC) 매개된 용해, 항체 의존성 세포 독성 (ADCC) 매개된 용해, 아포토시스, 동형 부착 및/또는 식균작용, 종계는 CDC 매개된 용해 및/또는 ADCC 매개된 용해의 유도에 의해 세포들의 살해를 매개한다.
- [0020] 일 구체예에서 본 발명의 항체는 세포들의 CDC 매개 용해를 일으키지 않는다.
- [0021] 종계는 세포의 ADCC 매개 용해는 효과기 세포(effector cell)의 존재에서 일어나고, 특히 이것은 모노사이트, 단핵 세포, NK 세포 및 PMN들로 구성된 군에서 선택되고, 식세포작용은 대식세포에 의한다.
- [0022] 본 발명의 항체는 단핵의, 키메라, 인간 또는 인간화된 항체 또는 그 항체의 단편일 수 있고, IgG1, IgG2, 종계는 IgG2a 및 IgG2b, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, 분비 IgA, IgD 및 IgE 항체로 구성된 군에서 선택될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 모든 면에 따르면, CLD18은 종계는 인간 CLD18, 종계는 인간 CLD18A2, CLD18A2는 종계는 서열번호: 2에 따른 아미노산 서열을 가지고, CLD18A1은 종계는 서열번호: 8에 따른 아미노산 서열을 가진다.
- [0024] 특별한 선호된 구체예에서, 본 발명의 항체는 살아있는 세포 표면에 존재하는 CLD18의 친연 에피토프에 결합한다. 추가적인 구체예에서, 본 발명의 항체는 암세포, 종계는 위암 세포에 특이적이다.
- [0025] 본 발명의 임의의 구체예에서, CLD18은 세포 표면에 발현된다.
- [0026] 본 발명의 항체는, 서열번호 2, 4, 6, 16, 18, 20, 21-23, 및 26-31로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열을 가지는 단백질 또는 백티도, 또는 그 면역원성 단편, 또는 상기 단백질 또는 펩티드를 발현하는 숙주세포 또는 핵산, 또는 그 면역원성 단편으로 면역화하는 단계를 포함하는 방법에 의해 획득될 수 있다. 종계는, 본 발명의 항체는 앞서 언급한 단백질, 펩티드, 또는 그 면역원성 단편에 특이적이다.
- [0027] 특별히 선호되는 구체예에서, 본 발명의 항체는 기탁번호 DSM ACC2737 (182-D1106-055), DSM ACC2738 (182-D1106-056), DSM ACC2739 (182-D1106-057), DSM ACC2740 (182-D1106-058), DSM ACC2741 (182-D1106-059), DSM ACC2742 (182-D1106-062), DSM ACC2743 (182-D1106-067), DSM ACC2745 (182-D758-035), DSM ACC2746 (182-D758-036), DSM ACC2747 (182-D758-040), DSM ACC2748 (182-D1106-061), DSM ACC2808 (182-D1106-279), DSM ACC2809 (182-D1106-294), 또는 DSM ACC2810 (182-D1106-362)를 가지는 클론에 의해 생산된다.
- [0028] 일 구체예에서, 본 발명의 항체는 독소, 방사성동위원소, 약물 또는 세포독성제를 비롯한 치료제에 결합된다.
- [0029] 추가적인 면에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 생산할 수 있는 하이브리도마에 관한 것이다. 바람직한 하이브리도마는 기탁번호 DSM ACC2737 (182-D1106-055), DSM ACC2738 (182-D1106-056), DSM ACC2739 (182-D1106-057), DSM ACC2740 (182-D1106-058), DSM ACC2741 (182-D1106-059), DSM ACC2742 (182-D1106-062), DSM ACC2743 (182-D1106-067), DSM ACC2745 (182-D758-035), DSM ACC2746 (182-D758-036), DSM ACC2747 (182-D758-040), DSM ACC2748 (182-D1106-061), DSM ACC2808 (182-D1106-279), DSM ACC2809 (182-D1106-294), 또는 DSM ACC2810 (182-D1106-362)를 가지는 것들이다.

- [0030] 본 발명의 항체는 예컨대, 183-D758-035 항체의 고안을 참고하고/또는 예컨대, 26D12 항체를 생산하는 클론을 참고함으로써 여기에 고안된다.
- [0031] 본 발명은 본 발명의 항체 및/또는 치료제와 함께 그 콘주게이트 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0032] 추가적인 면에서, 본 발명은 세포를 유효량의 본 발명의 항체 및/또는 그 콘주게이트와 함께 치료제와 접촉하는 단계를 포함하는, CLD18, 종게는, CLD18A2를 발현하는 세포의 살해 및/또는 성장을 억제하는 방법에 관한 것이다. CLD18은 종게는 상기 세포의 표면에 발현된다.
- [0033] 추가적인 면에서 본 발명은 CLD18, 종게는 CLD18A2를 발현하는 세포들에 관련된 질병 또는 질환을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 항체, 치료제와 함께 그 콘주게이트, 또는 본 발명의 항체 또는 치료제와 함께 그 콘주게이트를 포함하는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 종게는 질병 또는 질환은 중앙 관련 질병이고, 특히 구체에는 위암, 식도암, 췌장암, 폐암, 난소암, 결장암, 간장암, 두경부암, 담낭암으로 구성된 군에서 선택된다. CLD18은 종게는 상기 세포들의 표면에 발현된다.
- [0034] 종게는, 본 발명의 항체는 암세포 및 비악성 세포들을 함유하는 상이한 세포 유형에 의해 발현되는 CLD18-변이체를 구별하는 능력을 가진다. 특별히 선호되는 구체예에서, 본 발명의 항체는 CLD18A2에 결합하는 능력을 가진 반면, CLD18A2에 결합 특이성과 비교하여 낮은 특이성을 가진 CLD18A1에 결합하거나 CLD18A1에 결합하지 않는다.
- [0035] 본 발명에 따른 "결합(binding)"이라는 용어는 종게는 특이적 결합에 관한 것이다. "특이적 결합"은 항체를 비롯한 작용제가, 다른 표적과의 결합과 비교하여 특이적인 에피토프를 비롯한 표적에 더 강하게 결합한다는 것을 의미한다. 만약 작용제가 제2 표적 해리상수보다 낮은 해리 상수(K_D)로 제1 표적과 결합한다면 제2 표적과 비교하여 제1 표적은 강하게 결합한다. 종게는 작용제가 특이적으로 결합하는 표적을 위한 해리 상수(K_D)는 10배 이상, 종게는 20배 이상, 종게는 50배 이상, 더 종게는, 작용제가 특이적으로 결합하지 않는 표적을 위한 해리 상수(K_D)보다 낮은, 100배 이상, 200배, 500배, 또는 1000배 이상이다.
- [0036] 본 발명의 항체는 종게는 상기 세포의 표면에 발현된, CLD18과의 결합에 의해, CLD18, 종게는 CLD18A2를 발현하는 세포를 살해를 매개한다. 일 구체예에서, 본 발명의 항체는 보체 의존성 세포독성 (CDC), 예컨대, CLD18을 발현하는 세포의 적어도 20-40% CDC 매개 용해, 종게는 40-50% CDC 매개 용해, 그리고 더 종게는 50% 이상의 용해를 유도한다. 그러한 항체는 다음의 항체들에 의해 여기에 예시된다: 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 61C2, 26B5, 26D12, 28D10, 163E12, 175D10, 45C1, 125E1, ch-163E12, 및 ch-175D10. 또 다르게, 또는 CDC를 유도하는 것에 더하여, 본 발명의 항체는 효과기 세포(예컨대, 모노사이트, 단핵세포, NK 세포들 및 PMN들)의 존재하에 CLD18을 발현하는 세포들의 항체 의존성 세포독성 (ADCC)을 유발한다. 그러한 항체는 다음의 항체들에 의해 예시된다: 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 43A11, 61C2, 26B5, 26D12, 28D10, 42E12, 163E12, 175D10, 45C1, 및 125E1. 본 발명의 항체는 CLD18을 발현하는 세포들의 아포토시스를 유도하고, CLD18을 발현하는 세포들의 동형(homotypic) 부착을 유도하고/거나 대식세포 존재하에 CLD18을 발현하는 세포들의 식세포 작용을 유도한다. 본 발명의 항체는 상기 기재된 기능적 특징을 하나 이상 가진다. 종게는, 본 발명의 항체는 CLD18을 발현하는 세포들의 CDC 매개 용해 및 ADCC 매개 용해를 유도하고, 더 종게는 CLD18을 발현하는 세포들의 ADCC 매개 용해를 유도하는 반면, 상기 세포들의 CDC 매개 용해는 유도하지 않는다. 본 발명의 항체를 위한 대표적인 표적 세포들은 이것에 제한되는 것은 아니나, CLD18, 종게는, CLD18A2를 발현하는 발암성의 위암 세포, 췌장암세포, 식도암 세포, 폐암 세포를 비롯한 암세포들을 함유한다. 특별한 선호된 구체예에서, 본 발명의 항체에 의해 매개되는 세포의 살해는 CLD18A2에 특이적이고, 즉, 본 발명의 항체는 세포들의 살해를 매개하고, 종게는 CLD18A2를 발현하는 것이 아닌 CLD18A1을 발현하는 세포들의 살해를 매개하지 않는 CLD18A2를 발현하는 세포들의 CDC 및/또는 ADCC 매개된 세포의 용해를 매개한다. 상기한 항체는 위암, 식도암, 췌장암, 폐암, 난소암, 결장암, 간장암, 두경부암, 담낭암을 비롯한 암의 치료 또는 예방에서 중앙 세포들의 살해를 매개하는데 사용될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 항체는 그것들의 결합 성질 및 CLD18을 발현하는 세포들상에 효과기 기능을 매개하는 능력에 따라 별개의 클래스로 카테고리화 할 수 있다. 본 발명의 항체는
- [0038] · CLD18A1 또는 CLD18A2를 발현하는 세포들상에 매개된 효과기 기능 및/또는 그들의 결합 성질 (CLD18 스플라이스 변이체의 구별),
- [0039] · 글리코실화되거나 비-글리코실화된 CLD18 변이체를 발현하는 세포상에 매개된 효과기 기능 및/또는 결합 성질

(N-글리코실화가 있는 것과 없는 CLD18-변이체들 사이 구별),

- [0040] · 암세포 또는 정상세포에 매개된 효과기 기능 및/또는 결합 성질 (종양 세포 또는 정상 비악성 세포들에 의해 발현되는 CLD18-변이체들 사이에 구별),
- [0041] · 치밀 이음새의 형성에 의해 덮여진(masked) CLD18-에피토프에 대한 결합 성질,
- [0042] · 살아있는 세포 상에 CLD18의 집합 형성을 유도하는 능력,
- [0043] · 비인간 CLD18 변이체, 특히, 마우스, 래트, 래빗 및 영장류로부터의 CLD18 변이체에 결합하는 능력에 따라 카테고리화될 수 있다.
- [0044] 발명의 항체는 하나 이상의 다음의 성질을 가지고 이것에 의해 여기에 개시된 본 발명의 항체의 특정 예(24H5, 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 61C2, 75B8, 85A3, 9E8, 19B9, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2, 175D10, ch-43A11, ch-45C1, ch-125E1, ch-163E12, ch-166E2, ch-175D10)가 주어진다:
- [0045] a) CLD18A1 뿐만 아니라 CLD18A2에 결합 (예컨대, 26D12, 28D10, 37H8, 38H3, 39F11, 61C2, 및 41C6)
- [0046] b) CLD18A1이 아니라 CLD18A2에 결합 (예컨대, 26B5, 37G11, 38G5, 42E12, and 43A11, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2, 175D10, ch-43A11, ch-45C1, ch-125E1, ch-163E12, ch-166E2, ch-175D10)
- [0047] c) 위와 폐 세포를 비롯한 조직 또는 비(non)-암 세포들에 의해 천연 발현되는 CLD18이 아닌 종양 세포들에 의해 천연 발현되는 CLD18에 결합 (예컨대, 26B5, 75B8, 24H5, 39F11, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2, 175D10).
- [0048] d) CLD18A1을 발현하는 세포들이 아닌 CLD18A2를 발현하는 세포들의 CDC 유도된 살해 매개 (예컨대, 26D12, 28D10, 37H8, 및 39F11, 163E12, ch-125E1, ch-163E12, ch-175D10)
- [0049] e) CLD18을 발현하는 세포들의 ADCC 유도된 살해 매개 (예컨대, 26B5, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 43A11, 47D12, 및 61C2, ch-163E12, ch-175D10)
- [0050] f) CLD18을 발현하는 세포들의 CDC 매개된 살해가 아닌 ADCC 유도된 살해 매개 (예컨대, 37G11, 42E12, 및 43A11)
- [0051] g) CLD18A2를 발현하는 세포들의 CDC 유도된 살해 및 ADCC 유도된 살해 매개 (예컨대, 37H8, 38H3, 39F11, ch-163E12, ch-175D10).
- [0052] 여기에 대표된 바와 같이, 본 발명의 항체는 추가적으로 다음과 같은 분자를 함유한다,
- [0053] a) 위의 줄기 세포가 아닌 정상 위의 분화된 세포에 결합 (예컨대, 39F11)
- [0054] b) 정상 위 조직 뿐만 아니라 다른 정상 기관에 결합하지 않지만 암 세포들에는 배타적인 (예컨대, 26B5)
- [0055] c) CLD18의 116 위치에서 비글리코실화된 Asn을 포함하는 에피토프에 결합
- [0056] d) 마우스 내에서 전임상 독성 연구를 완전히 수행하게 하는 마우스 뿐만 아니라 인간 CLD18에 결합.
- [0057] 본 발명의 항체는 이것에 제한되는 것은 아니지만, 마우스, 래트, 래빗, 귀니아 피그 및 인간을 함유하는 상이한 종들로부터 유래될 수 있다. 본 발명의 항체는 하나의 종, 종계는 인간으로부터 유래된 항체 불변 영역이 다른 종들로부터 유래된 항원 결합 사이트와 조합된 키메라 분자를 함유한다. 또한, 본 발명의 항체는 비인간 종들로부터 유래된 항체의 항원 결합 사이트가 인간 기원의 불변 및 뼈대(framework) 영역과 조합된 인간화된 분자를 함유한다.
- [0058] 본 발명의 항체는 폴리클로날 및 모노클로날 항체를 함유하고, IgG2a (예컨대, IgG2a, κ , λ), IgG2b (예컨대, IgG2b, κ , λ), IgG3 (예컨대, IgG3, κ , λ) 및 IgM 항체를 함유한다. 그러나, 다른 항체 이소타입(isotype)은 본 발명에 포함되고, IgG1, IgA1, IgA2, 분비 IgA, IgD, 및 IgE 항체를 함유한다. 항체는 전체 항체 또는 예컨대, Fab, F(ab')₂, Fv, 단일 사슬 Fv 단편들 또는 이중특이적(bispecific) 항체를 함유하는 그 항원 결합 단편일 수 있다. 또한, 항원 결합 단편은 (i) 면역글로불린 경첩(hinge) 부위 폴리펩티드와 융합되는 (중연쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역을 비롯한) 결합 도메인 폴리펩티드, (ii) 경첩 부위에 융합된 면역 글로불린 중연쇄 CH2 불변 영역, 및 (iii) CH2 불변 영역에 융합된 면역 글로불린 중연쇄 CH3 불변 영역을 포함하는 결합-도메인 면역글로불린 융합 단백질을 함유한다. 그러한 결합-도메인 면역글로불린 융합 단백질은

US2003/0118592 및 US 2003/0133939에 추가적으로 개시된다.

- [0059] 본 발명의 항체는 종게는 CLD18로부터 약 1-100 nM 이하의 해리 평형 상수 (KD)를 가지고 해리된다. 종게는, 본 발명의 항체는 관련된 세포-표면 항원들과 교차반응하지 않고, 그리하여 그 기능을 억제하지 않는다.
- [0060] 선호된 구체예에서, 본 발명의 항체는 다음의 성질 중 하나 이상에 의해 특징된다:
- [0061] a) CLD18에 특이적이고, 특히, CLD18A2에 특이적임;
- [0062] b) CLD18, 특히 CLD18A2에 대한 약 100nM 이하, 종게는 약 5-10nM 이하, 그리고 더 종게는 약 1-3nM 이하의 결합 친화도;
- [0063] c) CD55/59 음성 또는 CD55/59 양성 세포들에서 높은 수준의 CDC를 매개(mediate)하는 능력;
- [0064] d) CLD18을 발현하는 세포들의 성장을 억제하는 능력;
- [0065] e) CLD18을 발현하는 세포들의 아포토시스를 유도하는 능력;
- [0066] f) CLD18을 발현하는 세포들의 동형(homotypic) 부착을 유도하는 능력;
- [0067] g) 효과기 세포들의 존재에서 CLD18을 발현하는 세포들의 ADCC를 유도하는 능력;
- [0068] h) CLD18을 발현하는 종양 세포들을 가지는 대상의 생명을 연장하는 능력;
- [0069] i) CLD18을 발현하는 세포들을 고갈하는 능력;
- [0070] j) 낮은 수준의 CLD18을 발현하는 세포들을 고갈하는 능력;
- [0071] k) 살아있는 세포들의 표면에 CLD18을 밀집하는 능력
- [0072] 본 발명의 항-CLD18 항체는 유도체화(derivatize)되고, 다른 결합 특이성(specificities)과 공동발현되거나 결합될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명은 적어도 하나의 CLD18를 위한 제1 결합 특이성 (예컨대, 항-CLD18 항체 또는 그 모방물(mimetic)) 및 Fc 수용체 (예컨대, Fc-감마 RI를 비롯한 Fc-감마 수용체, 또는 다른 Fc 수용체) 또는 T세포 수용체, 예컨대, CD3를 위한 결합 특이성을 비롯한 효과기 세포에 대한 제2결합 특이성을 포함하는 이중특이성, 다중 특이성 분자를 제공한다.
- [0073] 따라서, 본 발명은 CLD18 및 Fc 수용체 또는 T 세포 수용체, 예컨대, CD3에 모두 결합하는 이중특이성 및 다중 특이성 분자를 함유한다. Fc 수용체의 예들은 IgG 수용체, Fc γ RI(CD64), Fc γ RII(CD32), 및 Fc γ RIII(CD16)을 비롯한 Fc-감마 수용체 (Fc γ R)이다. IgA 수용체 (예컨대, Fc α RI)를 비롯한 다른 Fc 수용체들 또한 표적될 수 있다. Fc 수용체는 종게는 효과기 세포, 예컨대, 모노사이트, 대식세포 또는 활성화된 단핵 세포의 표면에 위치된다. 선호된 구체예에서, 이중특이성 및 다중 특이성 분자는 수용체의 면역글로불린 Fc (예컨대, IgG 또는 IgA) 결합 사이트로부터 구별되는 사이트에서 Fc 수용체와 결합한다. 그러므로, 이중특이성 및 다중특이성 분자는 면역글로불린의 생리학적 수준에 의해 차단되지 않는다.
- [0074] 다른 면에서, 본 발명의 항-CLD18 항체는 유도체화되고, 다른 기능적 분자, 예컨대, 다른 펩티드 또는 단백질 (예컨대, Fab 단편)에 결합되거나 공동 발현된다. 예를들어, 본 발명의 항체는 다른 항체(예컨대, 이중특이성 또는 다중특이성 항체를 생산하기 위한), 세포독소(cytotoxin), 세포 리간드 또는 항원(면역독소를 비롯한 면역 콘주게이트를 생산하기 위한)를 비롯한 하나 이상의 다른 분자적 실체(entities)에 기능적으로 결합(예컨대, 화학적 커플링, 유전자적 융합, 비공유적 조합 또는 다른)될 수 있다. 본 발명의 항체는 다른 치료적 모이어티(moieties) 예컨대, 방사성동위원소, 작은 분자 항암 약물, 재조합 사이토카인 또는 케모카인과 결합할 수 있다. 따라서, 본 발명은 다양한 항체 콘주게이트, 이중특이성 및 다중특이성 분자 및 융합 단백질을 포함하고, 이것은 CLD18 발현 세포에 결합하고, 그러한 세포들에 대해 다른 분자들을 표적화하는데 사용될 수 있다.
- [0075] 다른 면에서, 본 발명은 본 발명의 항체의 하나 또는 조합과 함께 조제된 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물 예컨대, 약학적 및 진단 조성물/키트를 제공한다. 특정 구체예에서, 조성물은 CDC 및/또는 ADCC를 유도하고 아포토시스를 유도하는 것을 비롯한 구별되는 기능적 특징을 가지는 또는 구별되는 에피토프와 결합하는 항체의 조합을 함유한다. 본 발명의 일 구체예에서, 항체는 예컨대, 둘 이상의 항-CLD18 모노클로날 항체를 포함하는 약학적 조성물로서 조합에 사용될 수 있다. 예를 들어, 상이하지만 상보적인 활성을 가지는 항-CLD18 항체는 바람직한 치료적 효과를 달성하기 위해 단일 치료법에 조합될 수 있다. 선호된 구체예에서, 조성물은 아포토시스를 유도하는 다른 항-CLD18 항체와 조합된 CDC를 매개하는 항-CLD18 항체를 함유한다. 다른 구체예에서, 조성물은 효과기 세포의 존재에서 표적 세포의 높은 효과적인 살해를 매개하고, CLD18을 발현하는 세포들의 성

장을 억제하는 다른 항-CLD18 항체와 결합된 항-CLD18 항체를 함유한다.

- [0076] 본 발명은 둘 이상의 본 발명의 항-CLD18 항체들의 동시적 또는 순차적인 투여를 함유하고, 적어도 하나의 상기 항체는 키메라 항-CLD18 항체이고, 적어도 하나의 추가적인 항체는 인간 항-CLD18 항체, CLD18의 동일한 또는 상이한 에피토프와 결합된 항체들이다. 종게는, 본 발명의 키메라 CLD18 항체는 처음 투여되고, 본 발명의 인간 항-CLD18 항체의 투여가 그 다음에되고, 여기서 인간 항-CLD18 항체는 종게는 연장된 기간의 시간동안, 즉, 유지 치료법으로, 투여된다.
- [0077] 본 발명의 항체, 면역곤주게이트, 이중특이성 및 다중특이성 분자 및 조성물은 세포의 성장이 억제되고/거나 세포가 살해되는 유효량의 이중특이성/다중특이성 분자 또는 조성물, 면역곤주게이트, 항체를 세포와 접촉하는 것에 의해, CLD18, 특히 CLD18A2를 발현하는 세포의 성장을 억제 및/또는 CLD18, 특히 CLD18A2를 발현하는 세포를 선택적으로 살해하기 위한 다양한 방법에 사용될 수 있다. 일 구체예에서, 방법은 CLD18를 발현하는 세포의 살해, 임의적으로, 효과기 세포의 존재하에, 예컨대, CDC, 아포토시스, ADCC, 식세포작용, 또는 둘 이상의 이러한 기전의 조합에 의해 함유할 수 있다. 본 발명이 항체를 이용하는 억제되거나 살해될 수 있는 CLD18을 발현하는 세포들은 종양성 위, 췌장, 식도, 폐, 난소, 결장, 간장, 두경부, 및 담낭 세포를 비롯한 암세포들을 함유한다.
- [0078] 따라서, 본 발명의 항체는 그러한 질병으로부터 고통받는 환자들에게 항체를 투여함으로써 CLD18을 발현하는 세포들과 관련된 다양한 질병들을 치료 및/또는 예방하는데 사용될 수 있다. 치료되는 (예컨대, 경감되는) 또는 예방될 수 있는 대표적인 질병은 이것에 제한되는 것은 아니지만, 종양성 질병을 함유한다. 치료되고/거나 예방될 수 있는 종양성 질병의 예들은 위암, 췌장암, 식도암, 폐암, 난소암, 결장암, 간장암, 두경부암, 담낭암을 함유한다.
- [0079] 본 발명의 특별한 구체예에서, 항체가 투여될 대상은 화학치료제, 방사선, 또는 사이토카인을 비롯한 Fc 리셉터, 예컨대, Fc-감마 리셉터의 활성 또는 발현을 조절, 예컨대 증가하거나 억제하는 작용제로 추가적으로 처리될 수 있다. 치료중에 투여를 위한 전형적인 사이토카인은 G-CSF(granulocyte colony-stimulating factor), GM-CSF(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), IFN- γ (interferon- γ), 및 TNF(tumor necrosis factor)를 함유한다. 전형적인 치료제는 다른 것들, 독소루비신, 시스플라틴, 텍소티어, 5-플루오르우라실, 메토포렉사트(methotrexat), 겐지타빈(gemcitabin), 및 시클로포스파미드(cyclophosphamide)를 비롯한 항종양제를 함유한다.
- [0080] 다른 면에서, 본 발명은 인간 CLD18 또는 그 단편 펩티드, 종게는 CLD18A2 또는 그 항체를 얻기 위한 그 펩티드 단편으로 마우스들을 비롯한 비인간 동물들을 면역화하기 위한 면역화 전략에 관한 것이다. 면역화를 위한 선호된 펩티드는 서열번호: 2, 4, 6, 16, 18, 20-23, 및 26-31로 이루어진 군으로부터 선택된 것들이다. 따라서, 선호된 구체예에서, 본 발명의 항체들은 서열번호: 2, 4, 6, 16, 18, 20-23, 및 26-31로 이루어진 군으로부터 선택된 펩티드를 이용한 면역화에 의해 획득된 것이다. 유사하게, CLD18에 대한 항체는 유전자 이식 마우스를 비롯한 유전자 이식 비-인간 동물에서 생산될 수 있다. 유전자이식 비인간 동물은 항체의 전부 또는 부분을 코딩하는 중연쇄 유전자이식(transgene) 및 경쇄 유전자이식(transgene)을 포함하는 게놈을 가지는 유전자 이식 마우스일 수 있다.
- [0081] 와일드타입 뿐만 아니라 유전자이식 비인간 동물은 CLD18 항원 및/또는 핵산 및/또는 CLD18 또는 그 펩티드 단편을 발현하는 세포들의 정제된 또는 풍부한 제조물로 면역화될 수 있다. 종게는, 비인간 동물은 V-D-J 재조합 및 아이소타입 스위칭(switching)을 거침에 의해 CLD18에 대한 인간 모노클로날 항체들의 다중 아이소타입(예컨대, IgG, IgA 및/또는 IgM)을 생산할 수 있다. 아이소타입 스위칭은 예컨대, 전통적인 또는 비전통적인 아이소타입 스위칭에 의해 일어날 수 있다.
- [0082] 따라서, 다른 면에서, 본 발명은 상기된 비인간 동물로부터의 분리된 B 세포들을 제공한다. 분리된 B 세포들은 그리고나서 본 발명의 항체의 소스 (예컨대, 하이브리도마)를 제공하기 위한 불사화된 세포들에 융합에 의해 불사화될 수 있다. 그러한 하이브리도마 (즉, 이것은 본 발명의 항체를 생산한다)는 또한 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- [0083] 여기에 예시된 바와 같이, 본 발명의 항체들은 항체를 발현하는 하이브리도마로부터 직접 획득될 수 있거나, 클론되고, 숙주 세포(예컨대, CHO 세포, 또는 림포사이트 세포)에서 재조합적으로 발현될 수 있다. 또한, 숙주 세포들의 예들은 대장균을 비롯한 미생물들, 효모를 비롯한 균류들이다. 또 다르게, 그것들은 유전자이식 비인간 동물 또는 식물에서 재조합적으로 생산될 수 있다.
- [0084] 본 발명의 항체들을 생산하기 위한 선호된 하이브리도마는 시퀀싱되고, 다음의 지명(designation) 및 수탁번호

를 가지는 DSMZ(Mascheroder Weg 1b, 31824 Braunschweig, Germany; new address: Inhoffenstr. 7B, 31824 Braunschweig, Germany)에 기탁된 것들이다:

- [0085] a. 2005년 10월 19일에 기탁된 기탁번호 DSM ACC2737, 182-D1106-055
- [0086] b. 2005년 10월 19일에 기탁된 기탁번호 DSM ACC2738, 182-D1106-056
- [0087] c. 2005년 10월 19일에 기탁된 기탁번호 DSM ACC2739, 182-D1106-057
- [0088] d. 2005년 10월 19일에 기탁된 기탁번호 DSM ACC2740, 182-D1106-058
- [0089] e. 2005년 10월 19일에 기탁된 기탁번호 DSM ACC2741, 182-D1106-059
- [0090] f. 2005년 10월 19일에 기탁된 기탁번호 DSM ACC2742, 182-D1106-062
- [0091] g. 2005년 10월 19일에 기탁된 기탁번호 DSM ACC2743, 182-D1106-067
- [0092] h. 2005년 11월 17일에 기탁된 기탁번호 DSM ACC2745, 182-D758-035
- [0093] i. 2005년 11월 17일에 기탁된 기탁번호 DSM ACC2746, 182-D758-036
- [0094] j. 2005년 11월 17일에 기탁된 기탁번호 DSM ACC2747, 182-D758-040
- [0095] k. 2005년 11월 17일에 기탁된 기탁번호 DSM ACC2748, 182-D1106-061
- [0096] l. 2006년 10월 26일에 기탁된 기탁번호 DSM ACC2808, 182-D1106-279
- [0097] m. 2006년 10월 26일에 기탁된 기탁번호 DSM ACC2809, 182-D1106-294
- [0098] n. 2006년 10월 26일에 기탁된 기탁번호 DSM ACC2810, 182-D1106-362

[0099] 본 발명의 선호된 항체들은 상기 설명된 하이브리도마; 즉, 182-D1106-055의 경우에서37G11, 182-D1106-056의 경우에서37H8, 182-D1106-057의 경우에서 38G5, 182-D1106-058의 경우에서38H3, 182-D1106-059의 경우에서 39F11, 182-D1106-062의 경우에서 43A11, 182-D1106-067의 경우에서61C2, 182-D758-035의 경우에서26B5, 182-D758-036의 경우에서 26D12, 182-D758-040의 경우에서28D10, 182-D1106-061의 경우에서42E12, 182-D1106-279의 경우에서 125E1, 182-D1106-294의 경우에서 163E12, 및 182-D1106-362의 경우에서 175D10; 및 그것의 키메라화된 및 인간화된 형태들로부터 획득가능하고 생산된 것들이다.

[0100] 선호된 구체예에서, 본 발명에 따른 항체들의 특별히 키메라화된 형태들에서, 항체들은 서열번호: 46 또는 150에 의해 나타난 아미노산 서열 또는 그 단편을 비롯한 인간 중연쇄 불변 영역으로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하는 중연쇄 불변 영역 (CH)을 포함하는 항체들을 함유한다. 추가적인 선호된 구체예에서, 본 발명에 따른 특히 키메라화된 형태들, 항체들은 서열번호: 41 또는 148에 의해 나타난 아미노산 서열 또는 그 단편을 비롯한 인간 경쇄 불변 영역으로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역 (CL)을 포함하는 항체들을 함유한다. 특별히 선호된 구체예에서, 본 발명에 따른 항체들의 특별히 키메라화된 형태들에서, 항체들은 서열번호: 46 또는 150에 의해 나타난 아미노산 서열 또는 그의 단편을 비롯한 인간 CH로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하는 CH를 포함하는 항체들과 서열번호:41 또는 148에 의해 나타난 아미노산 서열 또는 그 단편을 비롯한 인간 CL으로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하는 CL을 포함하는 항체들을 함유한다.

[0101] 서열번호: 46에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 CH는 서열번호: 45에 의해 나타난 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 150에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 CH는 서열번호: 149에 의해 나타난 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 41에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 CL은 서열번호: 40에 의해 나타난 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 148에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 CL은 서열번호: 147에 의해 나타난 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다.

[0102] 임의의 선호된 구체예에서, 항체의 키메라화된 형태들은 서열번호: 115, 116, 117, 118, 119, 120 로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 그 단편들을 포함하는 중연쇄를 포함하는 및/또는 서열번호: 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및 그 단편들을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체들을 함유한다.

[0103] 임의의 선호된 구체예에서, 항체들의 키메라화된 형태들은 다음의 가능성들 (i) 내지 (ix)로부터 선택되는 중연쇄 및 경쇄들의 조합을 포함하는 항체들을 함유한다:

- [0104] (i) 중연쇄는 서열번호: 115에 의해 나타난 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 경쇄는 서열번호: 122에 의해 나타난 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함함,
- [0105] (ii) 중연쇄는 서열번호: 116에 의해 나타난 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 경쇄는 서열번호: 121에 의해 나타난 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함함,
- [0106] (iii) 중연쇄는 서열번호: 117에 의해 나타난 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 경쇄는 서열번호: 123에 의해 나타난 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함함,
- [0107] (iv) 중연쇄는 서열번호: 119에 의해 나타난 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 경쇄는 서열번호: 126에 의해 나타난 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함함,
- [0108] (v) 중연쇄는 서열번호: 118에 의해 나타난 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 경쇄는 서열번호: 125에 의해 나타난 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함함,
- [0109] (vi) 중연쇄는 서열번호: 120에 의해 나타난 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 경쇄는 서열번호: 124에 의해 나타난 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함함,
- [0110] (vii) 중연쇄는 서열번호: 120에 의해 나타난 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 경쇄는 서열번호: 127에 의해 나타난 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함함,
- [0111] (viii) 중연쇄는 서열번호: 120에 의해 나타난 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 경쇄는 서열번호: 128에 의해 나타난 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함함, 및
- [0112] (ix) 중연쇄는 서열번호: 120에 의해 나타난 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, 경쇄는 서열번호: 129에 의해 나타난 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함함.
- [0113] 상기에서 사용된 "단편" 또는 "아미노산 서열의 단편"은 항체 서열의 일부, 즉, N- 및/또는 C-말단에서 단축된 항체 서열을 나타내는 서열에 관한 것이고, 이것은 그것이 항체에서 상기 항체 서열을 되돌려(replace) 놓을 때, CLD18에 대한 상기 항체의 결합과 종계는, 여기에 기재된 상기 항체들의 기능들, 예컨대, CDC 매개된 용해 또는 ADCC 매개된 용해를 보유한다. 종계는, 아미노산 서열의 단편은 상기 아미노산 서열의 아미노산 잔기들의 적어도 80%, 종계는 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%를 포함한다. 서열번호: 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 및 129으로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열의 단편은 상기 서열에 관한 것이고, 종계는 N-말단에서 17, 18, 19, 20, 21, 22 또는 23개의 아미노산들이 제거된다. 여기에 기재된 아미노산 서열의 단편들은 상기 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열들의 각각의 단편들에 의해 코딩될 수 있다.
- [0114] 서열번호: 115에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 중연쇄는 서열번호: 100에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 116에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 중연쇄는 서열번호: 101에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 117에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 중연쇄는 서열번호: 102에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 119에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 중연쇄는 서열번호: 104에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 118에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 중연쇄는 서열번호: 103에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 120에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 중연쇄는 서열번호: 105에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다.
- [0115] 서열번호: 122에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 경쇄는 서열번호: 107에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 121에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 경쇄는 서열번호: 106에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 123에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 경쇄는 서열번호: 108에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 126에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 경쇄는 서열번호: 111에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 125에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 경쇄는 서열번호: 110에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 124에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 경쇄는 서열번호: 109에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 127에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 경쇄는 서열번호: 112에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 128에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 경쇄는 서열번호:

113에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 129에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 경쇄는 서열번호: 114에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다.

- [0116] 선호된 구체예에서, 본 발명의 항체는 서열번호: 132, 133, 134, 135, 136, 137, 및 그 단편으로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중연쇄 가변 영역(VH)을 포함한다.
- [0117] 선호된 구체예에서, 본 발명의 항체는 서열번호: 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146 및 그 단편으로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다.
- [0118] 임의의 선호된 구체예에서, 본 발명의 항체는 다음의 가능성들 (i) 내지 (ix)로부터 선택되는 중연쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)의 조합을 포함한다:
- [0119] (i) VH는 서열번호: 132에 의해 나타나는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, VL은 서열번호: 139에 의해 나타나는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함함,
- [0120] (ii) VH는 서열번호: 133에 의해 나타나는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, VL은 서열번호: 138에 의해 나타나는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함함,
- [0121] (iii) VH는 서열번호: 134에 의해 나타나는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, VL은 서열번호: 140에 의해 나타나는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함함,
- [0122] (iv) VH는 서열번호: 136에 의해 나타나는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, VL은 서열번호: 143에 의해 나타나는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함함,
- [0123] (v) VH는 서열번호: 135에 의해 나타나는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, VL은 서열번호: 142에 의해 나타나는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함함,
- [0124] (vi) VH는 서열번호: 137에 의해 나타나는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, VL은 서열번호: 141에 의해 나타나는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함함,
- [0125] (vii) VH는 서열번호: 137에 의해 나타나는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, VL은 서열번호: 144에 의해 나타나는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함함,
- [0126] (viii) VH는 서열번호: 137 또는 그 단편에 의해 나타나는 아미노산 서열을 포함하고, VL은 서열번호: 145 또는 그 단편에 의해 나타나는 아미노산 서열을 포함함,
- [0127] (ix) VH는 서열번호: 137에 의해 나타나는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함하고, VL은 서열번호: 146에 의해 나타나는 아미노산 서열 또는 그 단편을 포함함.
- [0128] 서열번호: 132에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 VH는 서열번호: 55에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 133에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 VH는 서열번호: 56에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 134에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 VH는 서열번호: 57에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 136에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 VH는 서열번호: 59에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 135에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 VH는 서열번호: 58에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 137에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 VH는 서열번호: 60에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다.
- [0129] 서열번호: 139에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 VL은 서열번호: 62에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 138에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 VL은 서열번호: 61에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 140에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 VL은 서열번호: 63에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 143에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 VL은 서열번호: 66에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 142에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 VL은 서열번호: 65에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 141에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 VL은 서열번호: 64에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 144에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 VL은 서열번호: 67에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 145에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는 VL은 서열번호: 68에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 서열번호: 146에 의해 나타난 아미노산 서열을 포함하는

는 VL은 서열번호: 69에 의해 나타나는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩될 수 있다.

- [0130] 일 선호된 구체예에서, 본 발명의 항체는 다음의 구체예 (i) 내지 (iv)로부터 선택되는 하나의 세트의 상보 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 VH를 포함한다:
- [0131] (i) CDR1: 서열번호 115의 45-52위치들, CDR2: 서열번호 115의 70-77위치들, CDR3: 서열번호 115의 116-125 위치들
- [0132] (ii) CDR1: 서열번호 116의 45-52위치들, CDR2: 서열번호 116의 70-77위치들, CDR3: 서열번호 116의 116-126 위치들
- [0133] (iii) CDR1: 서열번호 117의 45-52위치들, CDR2: 서열번호 117의 70-77위치들, CDR3: 서열번호 117의 116-124 위치들
- [0134] (iv) CDR1: 서열번호 118의 45-52위치들, CDR2: 서열번호 118의 70-77위치들, CDR3: 서열번호 118의 116-126 위치들
- [0135] (v) CDR1: 서열번호 119의 44-51위치들, CDR2: 서열번호 119의 69-76위치들, CDR3: 서열번호 119의 115-125 위치들, 및
- [0136] (vi) CDR1: 서열번호 120의 45-53위치들, CDR2: 서열번호 120의 71-78위치들, CDR3: 서열번호 120의 117-128 위치들.
- [0137] 일 선호된 구체예에서, 본 발명의 항체는 다음의 구체예 (i) 내지 (ix)로부터 선택되는 하나의 세트의 상보 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 VL을 포함한다:
- [0138] (i) CDR1: 서열번호 121의 47-58위치들, CDR2: 서열번호 121의 76-78위치들, CDR3: 서열번호 121의 115-123 위치들,
- [0139] (ii) CDR1: 서열번호 122의 49-53위치들, CDR2: 서열번호 122의 71-73위치들, CDR3: 서열번호 122의 110-118 위치들,
- [0140] (iii) CDR1: 서열번호 123의 47-52위치들, CDR2: 서열번호 123의 70-72위치들, CDR3: 서열번호 123의 109-117 위치들,
- [0141] (iv) CDR1: 서열번호 124의 47-58위치들, CDR2: 서열번호 124의 76-78위치들, CDR3: 서열번호 124의 115-123 위치들,
- [0142] (v) CDR1: 서열번호 125의 47-58위치들, CDR2: 서열번호 125의 76-78위치들, CDR3: 서열번호 125의 115-123 위치들,
- [0143] (vi) CDR1: 서열번호 126의 47-58위치들, CDR2: 서열번호 126의 76-78위치들, CDR3: 서열번호 126의 115-122 위치들,
- [0144] (vii) CDR1: 서열번호 127의 47-58위치들, CDR2: 서열번호 127의 76-78위치들, CDR3: 서열번호 127의 115-123 위치들,
- [0145] (viii) CDR1: 서열번호 128의 47-58위치들, CDR2: 서열번호 128의 76-78위치들, CDR3: 서열번호 128의 115-123 위치들, 및
- [0146] (ix) CDR1: 서열번호 129의 47-52위치들, CDR2: 서열번호 129의 70-72위치들, CDR3: 서열번호 129의 109-117 위치들.
- [0147] 선호되는 구체예에서, 본 발명의 항체는 하기 구체예 (i) 내지 (ix)로부터 선택되는 한 세트의 상보적 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3를 각각 포함하는 하나의 조합의 VH 및 VL을 포함한다:
- [0148] (i) VH: CDR1: 서열번호: 115의 45-52 위치들, CDR2: 서열번호: 115의 70-77 위치들, CDR3: 서열번호: 115의 116-125 위치들, VL: CDR1: 서열번호: 122의 49-53 위치들, CDR2: 서열번호: 122의 71-73 위치들, CDR3: 서열번호: 122의 110-118 위치들,
- [0149] (ii) VH: CDR1: 서열번호: 116의 45-52 위치들, CDR2: 서열번호: 116의 70-77 위치들, CDR3: 서열번호: 116의 116-126 위치들, VL: CDR1: 서열번호: 121의 47-58 위치들, CDR2: 서열번호: 121의 76-78 위치들, CDR3: 서열

번호: 121의 115-123 위치들,

- [0150] (iii) VH: CDR1: 서열번호: 117의 45-52 위치들, CDR2: 서열번호: 117의 70-77 위치들, CDR3: 서열번호: 117의 116-124 위치들, VL: CDR1: 서열번호: 123의 47-52 위치들, CDR2: 서열번호: 123의 70-72 위치들, CDR3: 서열번호: 123의 109-117 위치들,
- [0151] (iv) VH: CDR1: 서열번호: 119의 44-51 위치들, CDR2: 서열번호: 119의 69-76 위치들, CDR3: 서열번호: 119의 115-125 위치들, VL: CDR1: 서열번호: 126의 47-58 위치들, CDR2: 서열번호: 126의 76-78 위치들, CDR3: 서열번호: 126의 115-123 위치들,
- [0152] (v) VH: CDR1: 서열번호: 118의 45-52 위치들, CDR2: 서열번호: 118의 70-77 위치들, CDR3: 서열번호: 118의 116-126 위치들, VL: CDR1: 서열번호: 125의 47-58 위치들, CDR2: 서열번호: 125의 76-78 위치들, CDR3: 서열번호: 125의 115-123 위치들,
- [0153] (vi) VH: CDR1: 서열번호: 120의 45-53 위치들, CDR2: 서열번호: 120의 71-78 위치들, CDR3: 서열번호: 120의 117-128 위치들, VL: CDR1: 서열번호: 124의 47-58 위치들, CDR2: 서열번호: 124의 76-78 위치들, CDR3: 서열번호: 124의 115-123 위치들,
- [0154] (vii) VH: CDR1: 서열번호: 120의 45-53 위치들, CDR2: 서열번호: 120의 71-78 위치들, CDR3: 서열번호: 120의 117-128 위치들, VL: CDR1: 서열번호: 127의 47-58 위치들, CDR2: 서열번호: 127의 76-78 위치들, CDR3: 서열번호: 127의 115-123 위치들,
- [0155] (viii) VH: CDR1: 서열번호: 120의 45-53 위치들, CDR2: 서열번호: 120의 71-78 위치들, CDR3: 서열번호: 120의 117-128 위치들, VL: CDR1: 서열번호: 128의 47-58 위치들, CDR2: 서열번호: 128의 76-78 위치들, CDR3: 서열번호: 128의 115-123 위치들, 및
- [0156] (ix) VH: CDR1: 서열번호: 120의 45-53 위치들, CDR2: 서열번호: 120의 71-78 위치들, CDR3: 서열번호: 120의 117-128 위치들, VL: CDR1: 서열번호: 129의 47-52 위치들, CDR2: 서열번호: 129의 70-72 위치들, CDR3: 서열번호: 129의 109-117 위치들.
- [0157] 추가적인 선호된 구체예에서, 본 발명의 항체는 CLD18에 대한 모노클로날 항체의 중연쇄 가변 영역(VH)의 및/또는 경쇄 가변 영역(VL)의, 총계는 여기에 개시된 CLD18에 대한 모노클로날 항체의, 총계는 하나 이상의 상보적 결정 영역(CDRs)들, 총계는 적어도 CDR3 가변 영역을 포함하는 그리고 총계는 여기에 개시된 중연쇄 가변 영역(VH)의 및/또는 경쇄 가변 영역(VL)의, 하나 이상의 상보적 결정 영역(CDRs)들, 총계는 적어도 CDR3 가변 영역을 포함한다. 일 구체예에서, 상기 하나 이상의 상보적 결정 영역들은 여기에 개시된 한 세트의 상보적 결정 영역들 CDR1, CDR2 및 CDR3로부터 선택된다. 특별히 선호된 구체예에서, 본 발명의 항체는 총계는 CLD18에 대한 모노클로날 항체는, 총계는 여기에 개시된 CLD18에 대한 모노클로날 항체의 중연쇄 가변 영역(VH) 및/또는 경쇄 가변 영역(VL)의 상보적 결정 영역들 CDR1, CDR2, CDR3을 포함하고, 총계는, 여기에 개시된 중연쇄 가변 영역(VH) 및/또는 경쇄 가변 영역(VL)의 상보적 결정 영역들 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함한다.
- [0158] 일 구체예에서, 여기에 개시된 것과 같은 CDR들의 세트의 조합 또는 한 세트의 CDR들, 또는 하나 이상의 CDR들을 포함하는 본 발명의 항체는 그 사이에 개입하는 프레임워크(framework) 영역과 함께 상기 CDR들을 포함한다. 총계는, 부분은 제1 및 제4 프레임워크 영역 모두 또는 하나의 적어도 약 50%, 제1 프레임워크 영역의 50% C-말단이 되는 50%와 제4 프레임워크 영역의 50% N말단이 되는 50%를 또한 함유할 것이다. 재조합 DNA 기술에 의해 만들어진 본 발명의 항체의 구축은 N-말단 또는 C-말단 잔기를, 단백질 표지들 또는 다른 가변 도메인 (예컨대, 이체(diabodies)의 생산에서), 면역글로불린 중연쇄를 함유하는 추가적인 단백질 서열과 본 발명의 가변 영역을 결합하기 위한 링커의 도입을 포함하는 클로닝 또는 다른 조작 단계를 실행하기 위해 도입되는 링커에 의해 코딩되는 가변 영역에 도입할 수 있다.
- [0159] 일 구체예에서, 여기에 개시된 하나 이상의 CDR들, CDR들의 세트, CDR 세트들의 조합을 포함하는 본 발명의 항체는 인간 항체 프레임워크(framework)에서 상기 CDR를 포함한다.
- [0160] 항체의 중연쇄에 관하여 특별한 사슬, 또는 특별한 영역 또는 서열을 포함하는 항체에 대한 여기에서의 참고는 총계는 상기 항체의 모든 중연쇄들이 특별한 사슬, 영역 또는 서열을 포함하는 상황에 관한 것이다. 이것은 상응하게 항체의 경쇄에 적용한다.
- [0161] 본 발명은 여기에 개시된 항체 또는 그 일부, 예컨대, 항체 사슬을 코딩하는 핵산 서열 또는 유전자를 포함하는 핵산에 관한 것이다. 핵산은 벡터, 예컨대, 플라스미드, 코스미드, 바이러스, 박테리오파지 또는 예컨대, 유전

공학에서 통상적으로 사용된 다른 벡터에 포함될 수 있다. 벡터는 적절한 숙주세포 및 적절한 조건하에 벡터의 선택을 허용하는 마커 유전자로써 추가적인 유전자를 포함할 수 있다. 또한, 벡터는 적절한 숙주에서 코딩 영역의 적절한 발현을 허용하는 발현 조절 요소를 포함할 수 있다. 그러한 조절 요소는 당업자에게 알려져있고, 프로모터, 스플라이스 카세트 및 번역 개시 코돈을 함유할 수 있다.

[0162] 좋게는, 본 발명의 핵산은 진핵 또는 원핵 세포들에서 발현하게 하는 상기 발현 조절 서열에 작동적으로 결합된다. 진핵 세포 또는 원핵 세포에서 발현을 보증하는 조절 요소는 기술분야에 잘 알려져 있다.

[0163] 발현을 일으키거나 이루기 위해, 선택된 숙주 세포에 적절히 도입되기 위한 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터구축을 위한 본 발명에 따른 핵산 분자를 구축하기 위한 방법은 기술분야에 잘 알려져있다.

[0164] 본 발명의 추가적인 면은 여기에 개시된 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주세포에 관한 것이다.

[0165] 본 발명의 다른 특징 및 잇점은 후술하는 상세한 설명 및 청구항들로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0166] 도 1은 녹색 형광 색소와 결합된 CLD18A2로 형질감염되고, 헬퍼 에피토프에 융합된 서열번호 15로 DNA 번역 후 마우스 혈청으로 반응시킨 HEK293 세포들의 면역 형광 분석을 나타낸 것이다.

도 2는 CLD18A2-myc (서열번호 3)로 형질감염시킨 HEK293 세포들과 모노클로날 마우스-항-c-myc 항체 9E11 (Serotec, CRL MCA2200)로 형질감염되지 않은 HEK293 세포들의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸 것이다.

도 3은 CLD18A2로 형질감염된 CHO 세포들 및 폴리클로날 래빗-항-CLD18 항체 (Zymed, CRL 38-8000)를 이용한 면역형광 분석을 나타낸 것이다.

도 4A 및 B는 플로우 사이토메트리에 의해 측정된 바와 같이 형광 마커 및 인간 CLD18A2로 일시적으로 형질감염된 HEK293 세포들에 대한 하이브리도마 상청액 24H5 및 85A3의 결합을 나타낸 것이다. 도 4C는 인간 CLD18A2로 안정적으로 형질감염되고, 프로피디움 요오드화물로 카운터 염색된 HEK293 세포들에 대한 하이브리도마 상청액 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 및 175D10의 결합을 나타낸 것이다.

도 5는 플로우 사이토메트리에 의해 분석된 바와 같이 형광 마커 및 인간 CLD18A2 또는 CLD18A2-Myc 또는 CLD18A2-HA로 일시적으로 형질감염된 HEK293 세포들에 대한 하이브리도마 상청액 24H5 (A), 9E8 (B), 26B5 (C) 및 19B9 (D)의 결합을 나타낸 것이다.

도 6A 및 B는 플로우 사이토메트리에 의해 측정된 바와 같이 인간 CLD18A2 또는 CLD18A1으로 안정적으로 형질감염된 HEK293 세포들에 대한 하이브리도마 상청액 37H8, 43A11, 45C1 및 163E12의 결합을 나타낸 것이다.

도 7은 CLD18A2 (A, C) 및 CLD18A1 (B, D) 각각으로 형질감염된 HEK293 세포들의 염색에 의해 CLD18A2 아이소 형태(isoform) 특이적 모노클로날 항체 37G11의 면역형광 분석을 나타낸 것으로, 각각 천연 조건 (A, B) 및 파라포름알데히드 고정 (C, D) 조건이다.

도 8은 CLD18A2 (A, C) 및 CLD18A1 (B, D) 각각으로 형질감염된 HEK293 세포들의 염색에 의해 CLD18 모노클로날 항체 26B5의 면역형광 분석을 나타낸 것으로, 각각 천연 조건 (A, B) 및 파라포름알데히드 고정 (C, D) 조건이다.

도 9는 세포주 RT-PCR

CLD18A2-특이적 프라이머로 RT-PCR 분석은 4/5 시험된 세포주에서 분명한 발현을 나타냈다.

도 10은 DAN-G 세포 (서브클론 F2) 및 폴리클로날 래빗-항-CLD18 항체 (Zymed, CRL 38-8000)의 면역형광 분석을 나타낸 것이다.

도 11은 KATO-III 세포 (서브클론 3B9 4D5) 및 폴리클로날 래빗-항-CLD18 항체 (Zymed, CRL 38-8000)의 면역형광 분석을 나타낸 것이다.

도 12A는 폴리클로날 래빗-항-CLD18 항체 (Zymed, CRL 38-8000)과 함께 SNU-16 세포 (서브클론 G5)의 면역형광 분석을 나타낸 것이다. 도 12B는 본 발명의 모노클로날 항체들로 KATO-III 세포들의 면역형광 분석을 나타낸 것이다.

도 13은 모노클로날 항체 61C2 및 163E12와 함께 세포의 염색 후 플로우 사이토메트리 분석에 의해 분석된 바와

같은 KATO-III 및 NUGC-4 세포들 상에 CLD18의 표면 발현을 나타낸 것이다.

도 14는 인간 CLD18A1 (NP_057453), 인간 CLD18A2 (NP_001002026), 마우스 CLD18A1 (NP_062789) 및 마우스 CLD18A2 (AAL15636)의 단백질-정렬이다.

도 15A 및 B는 플로우 사이토메트리에 의해 분석된 바와 같이 형광 마커 및 뮤린 CLD18A1 또는 CLD18A2로 일시적으로 형질감염된 HEK293 세포들에 대해 하이브리도마 상청액 38G5, 38H3, 37G11, 45C1, 및 163E12 각각의 결합을 나타낸 것이다.

도 16은 폴리클로날 AB p105로 면역조직화학적 분석.

정상 조직 (위, 폐, 골수 및 전립선)의 서브셋 상에 면역조직화학적 염색들은 위 조직 특이성 (A)을 확인한다. 발현은 또한 위 암종(윗줄) 및 폐 암종(B)에서 검출되었다. 줄기 세포가 아닌 오직 분화된 세포들이 CLD18A2 (C)를 발현한다.

도 17은 모노클로날 AB 39F11D7으로 면역조직화학적 분석.

(A) 특이적 단백질 발현은 정상 위 점막에서 검출된 반면, 다른 모든 검사된 정상 조직은 음성을 나타냈다.

(B) 강한 CLD18A2 발현은 위 및 폐 암종에서 발견되었다.

도 18은 모노클로날 AB 26B5 (A), 175D10 (B), 43A11 (C), 163E12 (D), 및 45C1 (E)로 면역조직화학적 분석. 모든 항체들은 HEK293-CLD18A2 이종이식(xenograft) 종양들 및 위 암 표본의 강한 염색을 나타내는 반면, HEK293-Mock 대조-형질감염된 종양들에서는 그렇지 않았다.

도 19는 플로우사이토메트리를 이용하여 인간 CLD18A2로 안정하게 형질감염된 HEK293 세포들에 대한 85A3, 28D10, 24H5 또는 26D12에 의한 CDC 유도 후에 죽은 세포들의 백분율을 비교하는 그래프이다.

도 20은 형광 측정으로 측정된 바와 같은 인간 CLD18A1 또는 인간 CLD18A2으로 안정적으로 형질감염된 부착 CHO 세포들에 대한 24H5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 또는 61C2에 의한 CDC 유도후에 특이적 세포 용해의 백분율을 비교하는 그래프이다.

도 21은 형광 측정에 의해 측정된 바와 같은 75B8 (A), 28D10 (B), 또는 37H8 (C)에 의해 인간 CLD18A2로 안정적으로 형질감염된 CHO 세포들에 대한 CDC 농도-의존성 유도를 나타낸 것이다.

도 22는 MNC 존재하에서, 26B5, 37H8, 38G5, 47D12, 및 61C2 각각에 의한 HEK293-CLD18A2 세포들의 용해를 나타낸 것이다.

도 23은 MNC 존재하에서, 26B5, 37H8, 38G5, 47D12, 및 61C2, 각각에 의한 HEK293-CLD18A1 세포들의 용해를 나타낸 것이다.

도 24는 HEK293-CLD18A2 세포들로 초기 처리 이종이식 모델에 있어서 본 발명의 항체에 의한 종양 성장 억제를 나타낸 것이다.

도 25A 및 B는 HEK293-CLD18A2 세포들로 두번 초기 처리 이종이식 모델에 있어서 본 발명의 항체의 처리에 의한 연장된 생존을 나타낸 것이다.

도 26은 HEK293-CLD18A2 세포들로 발달된 처리 이종이식 모델에서 본 발명의 항체에 의한 생존 연장을 나타낸 것이다.

도 27A는 초기 처리 이종이식 모델에서 본 발명의 항체들에 의한 종양 성장 억제를 나타낸 것이다. 도 27B는 초기 처리 이종이식 모델에서 본 발명의 항체들에 의한 생존 연장을 나타낸 것이다. 내생적으로 CLD18A2 발현 DAN-G 세포들이 사용되었다.

도 28은 마우스 조직에서 CLD18A2 mRNA 발현을 나타낸 것이다. CLD18A2-특이적 프라이머들로 RT-PCR 조사들은 위를 제외한 모든 시험된 정상 조직들 내에 어떠한 의미있는 발현을 나타내지 않았다. 다음의 정상 조직들은 분석되었다: 1: 소장, 2:비장, 3: 피부, 4: 위, 5: 폐, 6: 췌장, 7: 림프절, 8: 흉선, 9:음성대조군.

도 29는 정상 위에서 CLD18 발현을 나타낸다. 마우스 위의 CLD18 특이적 항체로의 면역조직화학적 분석은 보존된 발현 패턴을 나타낸다. 표면 상피 및 깊은 크립트(crypt)는 세포 표면에서 CLD18을 발현하고, 중앙 넥(neck) 지역은 CLD18 음성이다.

도 30은 마우스 위 조직의 헤마톡실린 및 에오신 염색을 나타낸 것이다. 전체 (A) 및 상세포 (B), 대조군 마우스와 비교한 37G11-처리된 마우스의 위 (C 및 D) 나타낸 것으로, PBS로 오직 처리한 것이다.

도 31A 및 B는 본 발명의 항체들(43A11, 125E1, 163E12, 166E2, and 175D10)로 내생적으로 발현하는 KATO-III 세포들 및 인간 CLD18A1 및 A2 각각으로 안정적으로 형질감염된 HEK293 세포들의 플로우 사이토메트리 염색 결과를 나타낸 것이다.

도 32는 본 발명의 키메라 항체에 의해 매개된 CLD18A2 발현 세포 상에 CDC를 나타낸 것이다.

도 33은 본 발명의 키메라 항체에 의해 매개된 KATO-III 세포들 상에 ADCC를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0167] 여기에 기재된 항체들은 CLD18 상에 존재하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 분리된 모노클로날 항체들일 수 있다. 본 발명에 의해 포함되는 분리된 모노클로날 항체들은 IgA, IgG1-4, IgE, IgM, 및 IgD 항체들을 함유한다. 일 구체예에서, 항체는 IgG1 항체, 더욱 특별히 IgG1, 카파 또는 IgG1, 람다 아이소타입이다. 다른 구체예에서, 항체는 IgG3 항체, 더욱 특별하게 IgG3, 카파 또는 IgG3, 람다 아이소타입이다. 또 다른 구체예에서, 항체는 IgG4 항체, 더욱 특별하게 IgG4, 카파 또는 IgG4, 람다 아이소타입이다. 다른 구체예에서, 항체는 IgA1 또는 IgA2 항체이다. 다른 구체예에서, 항체는 IgM 항체이다.
- [0168] 일 구체예에서, 본 발명은 CLD18을 발현하는 세포에 특이적으로 결합하는, 및 종게는 (i) CLD18A2 발현 세포에 결합하고, (ii) CLD18A2 발현이 아니라 CLD18A1 발현 세포에 결합하지 않는 항체들에 관한 것이다. 본 발명의 항체들은 종게는 (i) CLD18A2 발현하는 세포의 살해를 매개하고, (ii) CLD18A2 발현하지 않고, CLD18A1 발현하는 세포의 살해를 매개하지 않는다.
- [0169] 다른 구체예에서, 본 발명은 (i) CLD18 발현 종양 세포들에 결합하고/거나, (ii) 정상 위 점막의 CLD18 발현 세포들에 결합하지 않고/거나 (iii) 비-암 폐 조직의 CLD18 발현 세포들에 결합하지 않는 항체들에 관한 것이다.
- [0170] 본 발명은 또한 (i) CLD18 발현 종양 세포들의 살해를 매개하고/거나, (ii) 정상 위 점막의 CLD18 발현 세포들의 살해를 매개하지 않고/거나 (iii) 비-암 폐 조직의 CLD18 발현 세포들의 살해를 매개하지 않는 항체들을 함유한다.
- [0171] 특별한 구체예에서, 본 발명의 항체들은 (i) CLD18A1 상에 존재하지 않는 CLD18A2 상에 에피토프, 종게는 서열번호: 21, 22, 및 23에 결합하거나, (ii) CLD18A2-루프1 상에 위치되는 에피토프, 종게는 서열번호: 28에 결합하거나, (iii) CLD18A2-루프2 상에 위치되는 에피토프, 종게는 서열번호: 30에 결합하거나, (iv) CLD18A2-루프3 상에 위치되는 에피토프, 종게는 서열번호: 31에 결합하거나, (v) CLD18A2-루프1 및 CLD18A2-루프3를 포함하는 에피토프에 결합하거나, (vi) CLD18A2-루프3 상에 위치되는 비-글리코실화 에피토프, 종게는 서열번호: 29에 결합하거나, (vii) 인간 및 마우스 CLD18에 존재하는 에피토프 (각각 서열번호: 2, 서열번호: 8, 및 서열번호: 35, 서열번호: 37)에 결합한다.
- [0172] 특별히 선호된 구체예에서, 본 발명의 항체들은 CLD18A1 상에 존재하지 않는 CLD18A2 상에 에피토프에 결합한다.
- [0173] 본 발명의 항체들은 완전히 인간 항체들은 함유한다. 그러한 항체들은 V-D-J 재조합 및 아이소타입 스위칭에 의해 CLD18에 대한 인간 모노클로날 항체들의 다중 아이소타입을 생산할 수 있는 비-인간 형질전환(transgenic) 동물, 예컨대, 형질전환 마우스, 에서 생산될 수 있다. 그러한 형질전환 동물은 또한 US 2003/0017534에 개시된 바와 같은 폴리클로날 항체들을 생산하기 위한 형질전환(transgenic) 래빗일 수 있다.
- [0174] CLD18 항원에 대한 본 발명의 항체의 결합은 CLD18 발현 세포들(예컨대, 종양 세포)의 살해, 예컨대, 보체 시스템의 활성화에 의해, 매개할 수 있다. CLD18 발현 세포들의 살해는 다음의 메커니즘의 하나 이상에 의해 일어날 수 있다: CLD18 발현 세포들의 보체 의존성 세포독성 (CDC); CLD18 발현 세포들의 아포토시스; CLD18 발현 세포들의 효과기 세포 식균작용; 또는 CLD18 발현 세포들의 효과기 세포 항체 의존성 세포 독성 (ADCC).
- [0175] 본 발명이 더 쉽게 이해되기 위해서, 임의의 용어들이 먼저 정의된다. 추가적인 정의는 상세한 설명을 통해 설명한다.
- [0176] **용어의 정의들**
- [0177] 용어 "CLD18"은 클라우딘-18에 관한 것이고, CLD18A1 및 CLD18A2, 입체배좌(conformation), 아이소형태 및 CLD18 유전자로 형질감염된 세포들에 의해 발현되거나 세포들에 의해 천연 발현되는 CLD18의 중 동족체

(homolog)를 함유하는 어떠한 변이체들을 함유한다. 종게는, "CLD18"은 인간 CLD18, 특히 CLD18A2 (서열번호: 1, 2) 및/또는 CLD18A1 (서열번호: 7, 8), 더 종게는 CLD18A2에 관한 것이다.

- [0178] 용어 "CLD18A1"은 번역후(posttranslationally) 변형된 변이체들, 아이소형태들 및 CLD18A1 유전자로 형질감염된 세포들에 의해 발현되거나 세포들에 의해 천연 발현되는 CLD18A1의 종 동족체(homolog)를 함유하는 어떠한 변이체들을 함유한다.
- [0179] 용어 "CLD18A2" 번역후(posttranslationally) 변형된 변이체들, 아이소형태들 및 CLD18A2 유전자로 형질감염된 세포들에 의해 발현되거나 세포들에 의해 천연 발현되는 CLD18A2의 종 동족체(homolog)를 함유하는 어떠한 변이체들을 함유한다.
- [0180] 용어 "CLD18 변이체"는 (i) CLD18 스플라이스 변이체들, (ii) CLD18-번역후 변형된 변이체들, 특히 상이한 N-글리코실화 지위(status)가 있는 변이체들을 함유하는 변이체들, (iii) CLD18 입체배좌(conformation) 변이체들, 특히 CLD18-입체배좌-1, CLD18-입체배좌-2 및 CLD18-입체배좌-3를 함유하는 입체배좌 변이체들, (iv) 세포간 치밀 이음새에 위치된 CLD18 프리(free) 및 동형적/이형적으로 관련된 변이체들, (v) CLD18 암 관련된 및 CLD18 비-암 관련된 변이체들을 포함할 것이다.
- [0181] 용어 "래프트(raft)"는 세포의 원형질막의 바깥쪽 리프렛(leaflet) 영역에 위치된 스펅고지질- 및 콜레스테롤-풍부 막 미세도메인을 일컫는다. 그러한 도메인들과 결합하기 위한 어떠한 능력 및 "응집체(aggregate)" 또는 "포칼(focal) 응집체"를 형성하는 그 능력은 단백질의 기능에 영향을 미칠 수 있다. 예컨대, 본 발명의 항체들에 의해 결합된 이후에, CLD18 분자의 그러한 구조들로의 전좌(translocation)는 원형질 막에서 높은 밀도의 CLD18 항원-항체 복합체들을 형성한다. 그러한 높은 밀도의 CLD18 항원-항체 복합체들은 CDC동안 보체 시스템의 효율적인 활성을 가능하게 해준다.
- [0182] "입체배좌" 및 "토폴로지"라는 용어들은 어떻게 인테그랄(integral) 막 분자가 어떻게 세포 표면막에 위치되는지와 특히 그 영역의 어떤 부분이 세포외이고 그리하여 항체들에 적절한지를 설명해준다. 예컨대 CLD18은 세 개의 상이한 입체배좌들로 존재할 수 있고, 호모머(homomer) 또는 헤테로머(heteromer)로써 알려져 있는지와 초분자의 치밀 이음새 구조들 또는 "프리(free)"에서 삼입되는지 여부에 가장 좌우될 것 같다. 이러한 상이한 상태들은 항체들에 적합한 서로 다른 에피토프들을 만들어준다.
- [0183] 본 발명에 따라, "질병"이라는 용어는 암, 특히 여기에 개시된 형태들의 암을 포함한 병적인 상태를 일컫는다.
- [0184] "종양"은 급격하고, 조절이 되지 않는 세포 증식에 의해 자라고 새로운 성장 정지를 개시하는 자극 후에 성장을 계속하는 세포들 또는 조직들의 비정상적 그룹을 의미하는 것이다. 종양들은 정상 조직에 부분적으로 또는 완전히 결핍된 구조적 조정 및 기능적 연합을 나타내고, 조직의 분명한 덩어리(mass)를 보통 형성하는, 이것은 양성 또는 악성일 수 있다.
- [0185] "전이(metastasis)"는 원래 위치로부터 신체의 다른 일부에 암 세포들의 전이를 의미한다. 전이의 형성은 매우 복잡한 과정이고, 초기 종양으로부터 악성 세포들의 분리, 세포외 기질의 침입, 체강 및 혈관에 들어가기 위한 내피 기저막의 통과, 그리고나서, 혈액에 의해 운반된 후, 표적 기관으로의 침투에 의존한다. 최종적으로, 표적 사이트에서 새로운 종양의 성장은 혈관신생에 의한다.
- [0186] 종양 전이는 초기 종양의 제거 후에도 자주 일어날 수 있는데, 왜냐하면 종양 세포들 또는 성분들이 남아있을 수 있고, 전이 잠재력을 발달시킬 수 있기 때문이다. 일 구체예에서, 본 발명에 따른 "전이"라는 용어는 초기 종양 및 국부적 림프 절계로부터 떨어진 전이에 관한 것인 "원격 전이(distant metastasis)"에 관한 것이다.
- [0187] "질병의 치료"라는 용어는 질병 또는 그 증상의 치료, 기간의 단축, 완화, 예방, 진행 또는 악화를 늦추거나 억제, 또는 발병의 예방 또는 지연을 포함한다.
- [0188] 본 발명에 따라, 시료는 본 발명에 따라 유용한 어떠한 시료, 체액들을 포함한 특히 조직 시료와 같은 생물학적 시료 및/또는 세포적 시료일 수도 있고, 펀치(punch) 생검을 포함한 조직 생검 및 혈액, 기관지 흡인(bronchial aspirate), 가래, 소변, 대변 또는 다른 체액들에 의한 것과 같은 통상적인 방법에 의해 얻을 수 있다. 본 발명에 따라, "생물학적 시료"라는 용어는 생물학적 시료들의 분획들을 또한 포함한다.
- [0189] "항체"라는 용어는 이황화결합에 의해 상호-연결된 적어도 두개의 중연쇄(H) 및 적어도 두개의 경쇄(L) 또는 그 항원 결합 부분을 포함하는 당단백질을 일컫는다. "항체"라는 용어는 항체들, 특이 여기에 개시된 항체들, 예컨대, 원핵세포들에서 발현된 항체들, 비글리코실화된 항체들, 및 어떠한 항원-결합 항체 단편들 및 하기하는 유도체들의 모든 재조합 형태들을 포함한다. 각각의 중연쇄는 중연쇄 가변 영역(줄여서, 여기에서 VH) 및 중연쇄

불변 영역으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (줄여서, 여기에서 VL) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. VH 및 VL 영역들은 프레임 영역들(FR)로 불리는 더 보존된 영역들로 산재된(interspersed), 상보성 결정 영역들(CDR)로 불리는 과변이의 영역들로 추가적으로 다시나누어질 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 다음과 같은 순서: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4로 아미노 말단부터 카복시 말단까지 3개의 CDR들과 4개의 FR들로 구성된다. 중연쇄 및 경쇄들의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 포함한다. 항체들의 불변 영역들은 전통적인 보체 시스템의 제1 성분 (C1q) 및 면역 시스템 (예컨대, 효과기 세포들)의 다양한 세포들을 포함하는 숙주 조직들 또는 인자들에 면역 글로불린의 결합을 매개할 수 있다.

[0190] "인간화된 항체"라는 용어는 비인간 종들로부터의 면역글로불린으로부터 실질적으로 유래된 항원 결합 사이트를 가지는 분자를 말하는 것으로, 분자의 남아있는 면역글로불린 구조는 인간 면역글로불린의 구조 및/또는 서열에 근거한다. 항원 결합 사이트는 불변 도메인들 상에 융합된 완전 가변 영역들 또는 가변 도메인들에서 적절한 프레임워크 영역들 상에 이식된 오직 상보성 결정 영역들 (CDR)를 포함할 수 있다. 항원 결합 사이트는 야생(wild-type)이거나 하나 이상의 아미노산 치환, 예컨대, 인간 면역글로불린과 좀 더 닮기위한 변형에 의해 변형될 수 있다. 인간화된 항체들의 몇몇 형태들은 모든 CDR 서열들 (예컨대 마우스 항체로부터 모든 6개의 CDR들을 포함하는 인간화된 마우스 항체)을 보존한다. 다른 형태들은 원래의 항체에 관하여 변경된 하나 이상의 CDR들을 가진다.

[0191] "키메라 항체"라는 용어는 중연쇄 및 경쇄의 각각의 아미노산 서열의 일 부분이 특별한 클래스에 속하거나 특별한 종들로부터 유래된 항체들에서 상응하는 서열들과 상동성이고, 반면 사슬의 남아있는 부분(segment)은 상응하는 서열들에 달리 상동성이다. 전형적으로 경쇄 및 중쇄들의 가변 영역은 포유류의 한 종들로부터 유래된 항체들의 가변 영역들과 닮은 반면, 불변 부분들은 달리 유래된 항체들의 서열들과 상동성이다. 그러한 키메라 형태들의 한가지 분명한 잇점은 가변 영역이 예컨대, 인간 세포 제조로부터 유래된 불변 영역들과 조합하여 비인간 숙주 유기체로부터 쉽게 이용가능한B-세포들 또는 하이브리도마를 이용하여 현재 알려진 소스로부터 편리하게 유래될 수 있다는 것이다. 가변 영역은 제조가 쉽다는 잇점을 가지고, 특이성은 소스에 영향을 받지 않는 반면, 인간인 불변 영역은 항체들이 비인간 소스로부터의 불변 영역인 것 보다 항체들이 주입될 때 인간 대상으로부터의 면역 반응을 잘 이끌어내지 않는다. 그러나 정의는 이러한 특별한 예시에 제한되지 않는다.

[0192] 여기에서 사용되는 항체의 "항원-결합 부분"이라는 용어 (또는 간단히, "결합 부분")은 항체에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 말한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장(full-length) 항체의 단편들에 의해 수행될 수 있다는 것으로 나타났다. 항체의 "항원-결합 부분"이라는 용어 내에 포함된 결합 단편들의 예들은 (i) Fab 단편들, VL, VH, CL 및 CH 도메인들로 구성된 1개의 단편들; (ii) F(ab')₂ 단편들, 힌지 영역에서 이황화 결합에 의해 연결된 2개의 Fab 단편들을 포함하는 2개의 단편들; (iii) VH 및 CH 도메인들로 구성된 Fd 단편들; (iv) 항체의 단일 팔(arm)의 VL 및 VH 도메인들로 구성된 Fv 단편들, (v) dAb 단편들 (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), VH 도메인으로 구성됨; (vi) 분리된 상보성 결정 영역들 (CDR), 및 (vii) 합성 링커에 의해 임의적으로 결합될 수 있는 두개 이상의 CDR들의 조합들을 포함한다. 또한, VL 및 VH인 Fv 단편의 2개의 도메인들이 분리된 유전자들에 의해 코딩되에도 불구하고, VL과 VH영역들이 1개의 분자들을 형성하기 위해 짝을 이루는 단일 단백질 사슬로써 그것들이 만들어지도록 하는 합성 링커에 의해 재조합 방법들을 이용하여 결합될 수 있다 (단일 사슬 Fv(scFv)로 알려진; Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; and Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 참고). 그러한 단일 사슬 항체들은 항체의 "항원-결합 부분"이라는 용어 내에서 포함될 수 있는 것으로 생각된다. 추가적인 예는 (i) 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드에 융합되는 결합 도메인 폴리펩티드, (ii) 힌지 영역에 융합되는 면역글로불린 중연쇄 CH2 불변 영역, (iii) CH2 불변 영역에 융합되는 면역글로불린 중연쇄 CH3 불변 영역을 포함하는 결합-도메인 면역글로불린 융합 단백질들이다. 결합 도메인 폴리펩티드는 중연쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역일 수 있다. 결합-도메인 면역글로불린 융합 단백질들은 추가적으로 US 2003/0118592 및 US 2003/0133939에 개시된다. 이러한 항체 단편들은 기술분야에 당업자에게 알려져있는 통상의 기술을 이용하여 얻고, 그 단편들은 인такт(intact) 항체들처럼 동일한 방식으로 사용에 대하여 스크리닝된다.

[0193] "에피토프"라는 용어는 항체에 결합할 수 있는 단백질 결정자(determinant)를 의미하고, 여기서 "결합"이라는 용어는 좋게는 특이적 결합에 관한 것이다. 에피토프들은 당 결사슬 또는 아미노산들을 비롯한 분자들의 화학적 활성 표면 그룹핑들로 구성되고, 일반적으로 특이적 전하 특징들 뿐만 아니라 특이적 3차원 구조적 특징을 가진다. 입체배좌적인(Conformational) 에피토프 및 비입체배좌적인 에피토프들은 후자가 아닌 전자에 대한 결합이 변성 용매들의 존재에서 잃는다는 점에서 구별된다.

- [0194] 여기에서 사용되는 "불연속적인 에피토프"는 단백질의 초기 서열에서 적어도 2개의 분리된 영역들로부터 형성되는 단백질 항원 상에 입체배좌적 에피토프를 말한다.
- [0195] "이중특이성 분자"는 예컨대, 단백질, 펩티드 또는 단백질 또는 펩티드 복합체와 같은 어떠한 작용제를 포함하는 것으로 생각되고, 이것은 두개의 서로다른 결합 특이성을 가진다. 예컨대, 분자는 (a) 세포 표면 항원, 및 (b) 효과기 세포의 표면 상에 Fc 수용체와 결합하거나 상호작용할 수 있다. "다중특이성 분자" 또는 "이중특이성 분자"라는 용어는 예컨대, 단백질, 펩티드 또는 단백질 또는 펩티드 복합체와 같은 어떠한 작용제를 포함하는 것으로 생각되고, 이것은 두개 이상의 서로다른 결합 특이성을 가진다. 예컨대, 분자는 (a) 세포 표면 항원, (b) 효과기 세포의 표면상에 Fc 수용체, 및 (c) 적어도 하나의 다른 성분과 결합하거나 상호작용 할 수 있다. 따라서, 본 발명은, 이것에 제한되는 것은 아니지만, CLD18 및 효과기 세포들 상에 Fc 수용체를 비롯한 다른 표적들에 지시된 이중특이성, 삼중특이성, 사중특이성, 및 다른 다중특이성 분자들을 포함한다. "이중특이성 항체들"이라는 용어는 이체(diabodies)들을 또한 포함한다. 이체들은 2가이고, VH 및 VL 도메인들이 단일 폴리펩티드 사슬에 발현되지만, 같은 사슬상에 두개의 도메인들 사이에 짝을 이루도록 하기에는 너무 짧은 링커를 사용하고 그것에 의해 도메인들이 다른 사슬들의 상보적 도메인들과 짝을 이루고, 두개의 항원 결합 사이트들을 생성할 수 있는 이중특이성 항체들이다 (Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2: 1121-1123 참고).
- [0196] 본 발명은 또한 여기에 기재된 항체들의 유도체들을 포함한다. "항체 유도체들(derivatives)"이라는 용어는 예컨대, 항체와 다른 작용제 또는 항체의 콘주게이트와 같은 항체의 변형된 형태를 말한다. 여기에서 사용된 바와 같이, 만약 항체가 면역글로불린 유전자 라이브러리의 스크리닝에 의해 또는 동물의 면역화에 의해 시스템으로부터 얻어지고, 여기에서 선택된 항체는 점라인(germline) 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열에 대하여 아미노산 서열에 있어서 적어도 90%, 더 좋게는 적어도 95%, 좀 더 좋게는 적어도 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 것이라면, 항체는 특별한 점라인 서열로부터 "유래된" 것이다. 전형적으로, 특별한 점라인 서열로부터 유래된 항체는 점라인 면역글로콜린 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열로부터 단지 10개의 아미노산 차이를 나타낼 것이고, 더 좋게는, 단지 5개 또는 더욱 더 좋게는 단지 4, 3, 2, 또는 1개의 아미노산 차이를 나타낼 것이다.
- [0197] 여기에서 사용된 바와 같이, "헤테로항체(heteroantibody)"라는 용어는 둘 이상의 항체들, 그 유도체들, 또는 함께 결합되는 항원 결합 영역들, 적어도 2개의 상이한 특이성을 가지는 것에 관한 것이다. 이러한 상이한 특이성들은 효과기 세포 상에 Fc 수용체를 위한 결합 특이성, 및 표적 세포, 예컨대 종양 세포 상에 항원 또는 에피토프를 위한 결합 특이성을 포함한다.
- [0198] 여기에 기재된 항체들은 인간 항체들일 수 있다. 여기에서 사용된 "인간 항체"라는 용어는 인간 점라인 면역글로불린 서열들로부터 가변 영역들 및 불변영역들을 가지는 항체들을 포함하는 것으로 생각된다. 본 발명의 인간 항체들은 인간 점라인 면역글로불린 서열들에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기들을 포함할 수 있다 (예컨대, 시험관 내에서 무작위적으로 또는 사이트-특이적 돌연변이유발 또는 생체 내에서 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이).
- [0199] 여기에서 사용된 "모노클로날 항체"라는 용어는 단일 분자 조성물의 항체 분자들의 제조물을 말한다. 모노클로날 항체는 특정 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 특정 에피토프를 위한 친화도를 나타낸다. 일 구체예에서, 모노클로날 항체들은 불사화된 세포에 융합되는 비인간 동물, 예컨대, 마우스,로부터 얻어지는 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생산된다.
- [0200] 여기에서 사용된 바와 같이, "재조합 항체"라는 용어는 (a) 면역글로불린 유전자들 또는 그들로부터 제조되는 하이브리도마에 관하여 유전자 이식 또는 트랜스염색체적인 동물 (예컨대, 마우스)로부터 분리된 항체들, (b) 항체를 발현하기 위해 형질전환된 숙주 세포, 예컨대, 트랜스팩토마로부터 분리된 항체들, (c) 재조합, 조합 항체 라이브러리로부터 분리된 항체들, 및 (d) 다른 DNA 서열들에 면역글로불린 유전자 서열들의 스플라이싱과 관련된 다른 수단들에 의해 분리되거나, 생성되거나, 발현되거나 제조된 항체들을 비롯한, 재조합적 수단에 의해 분리되거나, 생성되거나, 발현되거나, 제조된 모든 항체들을 포함한다.
- [0201] 여기에 사용된, "트랜스팩토마(transfectome)"라는 용어는 CHO 세포들, NS/O 세포들, HEK293 세포들, HEK293T 세포들, 식물 세포들, 또는 효모를 포함하는 균류를 비롯한 항체를 발현하는 재조합 진핵 숙주세포들을 포함한다.
- [0202] 여기에 사용된, "이종 항체(heterologous antibody)"는 그러한 항체를 생산하는 형질전환 유기체와 관련하여 구

정된다. 이러한 용어는 아미노산 서열을 가지거나, 형질전환 유기체를 구성하지 않는 유기체에서 나타나는 것에 상응하는 핵산 서열을 코딩하고, 형질전환 유기체 외에 종들로부터 일반적으로 유래되는 항체를 지시한다.

- [0203] 여기에서 사용된, "헤테로하이브리드 항체"는 상이한 유기체들 기원의 경쇄 및 중연쇄를 가지는 항체를 말한다. 예컨대, 무린 경쇄와 연관된 인간 중연쇄를 가지는 항체는 헤테로하이브리드 항체이다.
- [0204] 여기에 기재된 항체들은 종게는 분리된다. 여기에서 사용된 "분리된 항체"는 상이한 항원성 특이성을 가지는 다른 항체들이 프리(free)한 항체들을 나타내는 것으로 생각된다 (예컨대, CLD18에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 실질적으로 CLD18이 아닌 항체들에 특이적으로 결합하는 항체들이 프리(free)한 것이다). 인간 CLD18의 에피토프, 아이소형태 또는 변이체에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 그러나, 다른 관련된 항원들, 예컨대, 다른 종들(예컨대, CLD18 종들 동족체)로부터, 크로스-반응성을 가질 수 있다. 또한, 분리된 항체는 실질적으로 다른 세포성 물질 및/또는 화학물질이 프리(free)할 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서, "분리된" 모노클로날 항체들의 조합은 상이한 특이성들을 가지고 잘 규정된 조성물에서 혼합되는 항체들에 관한 것이다.
- [0205] 본 발명에 따라, "결합"이라는 용어는 종게는 "특이적 결합"에 관한 것이다. 여기에서 사용된 "특이적 결합"은 소정의 항원에 결합하는 항체를 일컫는다. 전형적으로, 항체는 약 1×10^{-7} M 또는 그 이하의 KD에 상응하는 친화도로 결합하고, 소정의 항원 또는 가깝게 관련된 항원이 아닌 비특이적 항원(예컨대, BSA, 카세인)에 결합하기 위한 친화도 보다 적어도 2차수 규모로 낮은 KD에 상응하는 친화도를 가진 소정의 항원과 결합한다.
- [0206] 여기에서 사용된 바와 같이, "KD"(M)라는 용어는 특정 항체-항원 작용의 해리 평형 상수를 나타내기 위한 것이다.
- [0207] 여기에서 사용된 바와 같이, "아이소타입(isotype)"은 중연쇄 불변 영역 유전자들에 의해 코딩되는 항체 클래스 (예컨대, IgM 또는 IgG1)를 나타낸다.
- [0208] 여기에서 사용된 바와 같이, "아이소타입 스위칭(itching)"은 항체들의 클래스 또는 아이소타입이 하나의 Ig 클래스로부터 다른 Ig 클래스들 중 하나까지로 변화하는 것에 의한 현상을 나타낸다.
- [0209] 목적에서 적용된 바와 같이, 여기에서 사용된 바와 같은, "자연적으로 일어나는"이라는 용어는 목적을 자연에서 찾을 수 있는 사실을 나타낸다. 예컨대, 자연에서 스스로부터 분리될 수 있고, 실험실에서 사람에게 의해 의도적으로 변형되지 않은 유기체 (바이러스들을 포함)에 존재하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열이 자연적으로 일어난다.
- [0210] 여기에서 사용된 바와 같이, "재배열된(rearranged)"라는 용어는 중연쇄 또는 경쇄 면역글로불린 로커스(locus)의 배열을 나타내는 것으로, V 부분은 필수적으로 완전한 VH 또는 VL 도메인을 코딩하는 입체배좌구조에서 D-J 또는 J 부분에 즉시 인접하여 위치된다. 재배열된 면역글로불린 (항체) 유전자 로커스는 점라인(germline) DNA와 비교에 의해 확인될 수 있다; 재배열된 로커스는 적어도 하나의 재조합된 헵타머/나노머 상동성 요소를 가질 것이다.
- [0211] V 부분을 참고하여 여기에서 사용된 "비재배열된(rearranged)" 또는 "점라인(germline) 배열"이라는 용어는 배열을 나타내는 것이고, 여기서 V 부분은 D 또는 J 부분에 즉시 인접하기 위해 재조합되지 않는다.
- [0212] 여기에서 사용된 바와 같은 "핵산 분자"라는 용어는 DNA 분자들 및 RNA 분자들을 함유하는 것으로 생각된다. 핵산 분자는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있지만, 종게는 이중 가닥 DNA이다.
- [0213] 본 발명에 따라 기재된 핵산들은 종게는 분리된다. "분리된 핵산"이라는 용어는 본 발명에 따라 핵산이 (i) 시험관 내, 예컨대 PCR에 의해 증폭되거나, (ii) 클로닝에 의해 재조합적으로 생산되거나, (iii) 예컨대 절단 및 젤 전기영동 분획에 의해 정제되거나, 또는 (iv) 예컨대 화학 합성에 의해 합성되었다는 것을 의미한다. 분리된 핵산은 재조합 DNA 기술에 의한 조작을 위해 이용될 수 있는 핵산이다.
- [0214] 본 발명에 따른 핵산들은 단독 또는 다른 핵산들과 조합하여 존재할 수 있고, 이것은 동종이거나 이종일 수 있다. 선호된 구체예에서, 핵산은 상기 핵산에 관하여 동종 또는 이종일 수 있는 발현 조절 서열들에 기능적으로 연결된다. "동종(homologous)"이라는 용어는 핵산이 자연적으로 발현 조절 서열에 또한 기능적으로 연결된 것을 의미하고, "이종(heterologous)"은 핵산이 자연적으로 발현 조절 서열에 기능적으로 연결되지 않았다는 것을 의미한다.
- [0215] 만약, 핵산 및 발현조절 서열이 상기 핵산의 발현 또는 전사가 조절되거나 상기 발현 조절 서열의 영향 하에 있는 방식으로 서로 공유적으로 연결되어 있다면, RNA 및/또는 단백질 또는 펩티드를 발현하는 핵산을 비롯한 핵

산 및 발현 조절 서열은 서로 "기능적으로" 연결된다. 핵산이 기능적 단백질로 번역되고, 그리고나서 코딩 서열에 기능적으로 결합된 발현 조절 서열과 함께라면, 코딩 서열 또는 소망하는 단백질 또는 펩티드로 번역될 수 없는 상기 코딩 서열에서 프레임 쉬프트(frame shift)를 일으키는 것 없이, 상기 발현 조절 서열의 유도는 핵산의 전사를 일으킨다.

[0216] "발현 조절 서열"이라는 용어는 본 발명에 따라 프로모터, 리보솜 결합 사이트, 인핸서(enhancer), 및 유전자의 전사 또는 mRNA의 번역을 조절하는 다른 조절 요소들을 포함한다. 본 발명의 특별한 구체예에서, 발현 조절 서열은 조절될 수 있다. 발현 조절 서열의 정확한 구조는 세포 유형 또는 종들의 기능에 따라 변화될 수 있지만, TATA 박스, 캡핑 서열, CAAT 서열, 및 유사종을 비롯한 전사 및 번역 개시에 관련된 5'-비전사된 및 5'- 및 3'-비번역된 서열들 각각을 일반적으로 포함한다. 더 구체적으로, 5'-비전사화된 발현 조절 서열은 기능적으로 연결된 핵산의 전사 조절을 위한 프로모터 서열을 포함하는 프로모터 영역을 포함한다. 발현 조절 서열은 또한 인핸서 서열들 또는 업스트림 활성화 서열들을 포함할 수 있다.

[0217] 본 발명에 따라 "프로모터" 또는 "프로모터 영역"이라는 용어는 발현되는 핵산 서열에 대해 업스트림 (5') 위치되는 핵산 서열에 관한 것이고, RNA-폴리머라제를 위한 인식 및 결합 사이트를 제공하는 것에 의해 서열의 발현을 조절한다. "프로모터 영역"은 유전자의 전사 조절에 관련된 추가적인 인자들을 위한 인식 및 결합 사이트를 추가적으로 포함한다. 프로모터는 원핵 또는 진핵 유전자들의 전사를 조절할 수 있다. 또한, 프로모터는 "유도 가능할" 수 있고, 유도제에 반응하는 전사를 개시할 수 있거나, 전사가 유도제에 의해 조절되지 않는다면 "구조적" 일 수 있다. 만약 유도제가 없다면, 유도가능한 프로모터의 조절 하에 유전자는 발현되지 않거나, 작은 범위로 오직 발현된다. 유도제의 존재에서, 유전자는 스위치-온(switch on)되거나 전사의 수준이 증가된다. 이것은 일반적으로, 특이적 전사 인자의 결합에 의해 매개된다.

[0218] 본 발명에 따라 선호된 프로모터들은 SP6, T3 및 T7 폴리머라제를 위한 프로모터들, 인간 U6 RNA 프로모터, CMV 프로모터, 및 일부분(part) 또는 부분들이 예컨대, 인간 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 비롯한 다른 세포 단백질들의 유전자들의 프로모터들의 일부분 또는 부분들과 융합된 그것의 인공적인 하이브리드 프로모터들 (예컨대, CMV) 및 추가적인 인트론(들)을 포함하거나 포함하지 않는 프로모터들을 포함한다.

[0219] 본 발명에 따라, "발현"이라는 용어는 가장 일반적인 의미에서 사용되고, RNA 또는 RNA 및 단백질/펩티드의 생산을 포함한다. 그것은 또한 핵산들의 부분적인 발현을 포함한다. 또한, 발현은 일시적으로 또는 안정적으로 수행될 수 있다.

[0220] 선호되는 구체예에서, 본 발명에 따른 핵산 분자는 벡터 내에 존재하고, 적절하게 프로모터와 함께, 이것은 핵산의 발현을 조절한다. "벡터"라는 용어는 가장 넓은 의미에서 사용되고, 상기 핵산을 예컨대, 원핵세포 및/또는 진핵세포에 도입시키고, 적절하게, 게놈에 삽입하는 핵산을 위한 어떠한 중개 비히클(intermediary vehicle)을 포함한다. 이러한 종류의 벡터들은 종게는 복제되고/거나 세포 내에서 발현된다. 벡터들은 플라스미드, 파지미드, 박테리오파지 또는 바이러스 게놈들을 포함한다. "플라스미드"라는 용어는 여기에서 사용된 바와 같이, 일반적으로 엑스트라크로모솜적인 유전적 물질의 컨스트럭트, 보통 원형 DNA 듀플렉스의 컨스트럭트에 관한 것이고, 이것은 염색체 DNA의 독립적으로 복제할 수 있다.

[0221] 항체의 발현을 위한 벡터로서, 항체 중연쇄 및 경쇄가 서로다른 벡터들에서 존재하는 벡터 유형이거나 중연쇄 및 경쇄가 동일한 벡터 내에 존재하는 벡터 유형도 사용될 수 있다.

[0222] 특이적 핵산 및 아미노산 서열에 관하여 여기에 주어진 개시, 예컨대, 서열 리스트에서 나타난 그것들과 같은 것은 상기 특이적 서열들에 기능적으로 등가인 서열들을 나타내는 상기 특이적 서열들의 변형들, 예컨대, 특이적 핵산 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열의 그것들과 비슷하거나 동일한 특징들을 나타내는 아미노산 서열들을 코딩하는 핵산 서열들 및 특이적 아미노산 서열들의 그것과 동일하거나 유사한 특징을 나타내는 아미노산 서열에 관한 것이기 위해, 해석되어야만 한다. 하나의 중요한 특징은 항체의 효과기 기능을 유지하거나 그 표적에 대한 항체의 결합을 보유하기 위한 것이다. 종게는, 특이적 서열에 관하여 변형된 서열은, 그것이 항체 내 특이적 서열을 리플레이스(replace)할 때, 종게는 예컨대, CDC 매개된 용해 또는 ADCC 매개된 용해와 같이 여기에 개시된 바와 같은 상기 항체들의 기능들, 그리고 CLD18에 대한 상기 항체의 결합을 유지한다.

[0223] 특별히 CDR의 서열들, 과변이성 및 변이 영역들은 CLD18에 결합하는 능력을 잃어버리지 않고 변형될 수 있다는 것은 당업자에게 인식될 수 있을 것이다. 예컨대, CDR 영역들은 여기에 특정된 영역들과 동일하거나 매우 상동적일 것이다. "매우 상동적(highly homologous)"에 의해, 1 내지 3 또는 1 또는 2 치환을 비롯한 1 내지 5, 종게는 1 내지 4의 치환들이 CDR들에서 만들어진다는 것은 고려된다. 추가적으로, 과변이 및 가변 영역들은 그것

[0227] 서열번호:45 및 서열번호:149의 정렬

```

GGCCCATCGGTCTTCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC 60
||||| ||| ||||||||| ||| | ||||||||| ||| ||||||||| |||
GGCCCAAGCGTGTTCCTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACAGCGGCGGCACAGCGGCC 60

CTGGGTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGG 120
||||| ||| ||||||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
CTGGGTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAGCCCGTACCGTGTGAGCTGGAACAGCGGA 120

GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTTC 180
||||| ||| ||||||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
GCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCGCGCTGTGCAGAGCAGCGGCGTACAGC 180

CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC 240
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
CTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCAGCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC 240

GTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGAC 300
||||| ||| ||||||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
GTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCAAAGAGTGTGAC 300

AAAACTCACATGCCACCCTGCCAGCACCTGAACTCTGGGGGACCGTCACTCTTC 360
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
AAGACCCACACTGCCCTCCAGCAGCCAGAGCTGTGGGCGGACCCAGCGTGTTC 360

CTTTCCTCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGC 420
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
CTTTCCTCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGC 420

GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC 480
||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC 480

```

[0228]

```

GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT 540
||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT 540

GTGGTCAAGCGTCTCACCCTGCACAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC 600
||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
GTGGTCAAGCGTCTCACCCTGCACAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC 600

AAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG 660
||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
AAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG 660

CAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAAC 720
||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
CAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAAC 720

CAGGTCAAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG 780
||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
CAGGTCAAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG 780

GAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAAGACCAGCCTCCCGTGTGACTCCGAC 840
||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
GAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAAGACCAGCCTCCCGTGTGACTCCGAC 840

GGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA 900
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
GGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA 900

GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACCGCAGAAGGCCTC 960
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACCGCAGAAGGCCTC 960

TCCCTGTCTCCGGGTAATGA 981
||||| ||| ||| ||| |||
AGCCTGAGCCCGGCAAGTAG 981

```

[0229]

[0230] 또한, 본 발명에 따라 여기에서 개시된 아미노산 서열들, 특히, 소망하는 알로타입, 예컨대, 카프카스 집단에서 발견된 알로타입(allotype)에 서열을 적응시키기 위하여 인간 중연쇄 불변 영역들의 아미노산 서열들을 변형하는 것이 바람직할 수 있다. 그러한 변형들은 총계는, 서열번호: 46 또는 다른 인간 중연쇄 불변 영역들: K93R, D235E, 및 L237M 내에 상응하는 위치들에서 아미노산 교체들로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 총계는, 모든 이러한 변형들은 인간 중연쇄 불변 영역들의 아미노산 서열에 함유된다.

[0231] 본 발명에 따라 "상응하는 위치들"이라는 용어는 두개의 핵산 또는 단백질 서열들의 서열 정렬에서 서로 일치 (align)되는 뉴클레오티드들 또는 아미노산 잔기들에 관한 것이다.

[0232] 총계는, 여기에 개시된 특이적 핵산 서열 및 상기 특이적 핵산 서열에 관하여 변형된 핵산 서열 사이에 동일성

(identity)의 정도는 적어도 70%, 좋게는 적어도 75%, 더 좋게는 적어도 80%, 더욱 더 좋게는 적어도 90% 또는 가장 좋게는 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%일 것이다. 좋게는, 두개의 서열들은 혼성화 및 좋게는 폴리뉴클레오티드들 (엄격한 조건들) 사이에 특이적 혼성화를 허용하는 조건하에 수행되는 혼성화와 함께 서로 안정적인 듀플렉스(duplex)를 형성할 수 있다. 엄격한 조건들은 예컨대, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook et al., Editors, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 or Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., Editors, John Wiley & Sons, Inc., New York에 기재되고, 예컨대, 혼성화 완충액 (3.5 x SSC, 0.02% 피콜, 0.02% 폴리비닐피롤리돈, 0.02% 소혈청알부민, 2.5 mM NaH₂PO₄ (pH 7), 0.5% SDS, 2 mM EDTA)에서 65°C에서 혼성화를 나타내는 것이다. SSC는 0.15 M 염화나트륨/0.15 M 구연산나트륨, pH 7이다. 혼성화 후, DNA가 전이된 막은 예컨대, 실온에서 2 X SSC로 세척하고 난 다음, 68°C까지의 온도를 올려서 0.1-0.5 ×SSC/0.1 ×SDS로 세척한다.

[0233] 좋게는, 실질적인 상동성을 나타내는 아미노산 서열들 사이와 같이, 여기에 개시된 특이적 아미노산 서열 및 상기 특이적 아미노산 서열에 관하여 변형된 아미노산 서열 사이에 유사성, 좋게는 동일성(identity)의 정도는 적어도 70%, 좋게는 적어도 80%, 더욱 더 좋게는 적어도 90% 또는 가장 좋게는 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%일 것이다.

[0234] 여기에 개시된 모든 변형된 서열들은 본 발명의 범위 내이다.

[0235] "서열 유사성"은 동일하거나 또는 보존적 아미노산 치환을 나타내는 아미노산들의 백분율을 나타낸 것이다. 두 폴리펩티드 또는 핵산 서열들 사이에 "서열 동일성"은 서열들 사이에 동일하다는 아미노산들 또는 뉴클레오티드들의 백분율을 나타낸 것이다.

[0236] "백분율(percentage) 동일성"은 최상의 정렬 후에 얻어지고, 이러한 백분율은 순수히 통계적이고, 두 서열들 사이에 차이들은 무작위적으로 전체 길이에 따라 분배된다. 두 뉴클레오티드들 또는 아미노산 서열들 사이에 서열 비교들은 전통적으로 그것들을 최적으로 정렬시킨 후에 이러한 서열들을 비교함으로써 수행되고, 상기 비교는 서열 유사성의 국부 영역을 비교하고 확인하기 위해 "비교의 윈도우(window)"에 의해 또는 부분(segment)에 의해 수행될 수 있다.

[0237] 비교를 위한 서열의 최적 정렬은 손으로 뿐만 아니라, Smith and Waterman, 1981, Ads App. Math. 2, 482의 로컬 상동성 알고리즘에 의해, 또는 Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48, 443 의 로컬 상동성 알고리즘에 의해, 또는 Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl Acad. Sci. USA 85, 2444의 유사성 조사 방법에 의해, 또는 이러한 알고리즘들을 이용하는 컴퓨터 프로그램들(GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N and TFASTA in Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.)에 의해, 생산될 수 있다.

[0238] 백분율 동일성은 비교되는 두개의 서열들 사이에 동일한 위치들의 수를 측정하고, 이러한 수를 비교되는 위치들의 수로 나누고, 두 서열들 사이의 백분율 동일성을 얻기 위해 100을 곱하여 결과값을 얻음으로써 계산된다.

[0239] "보존적 치환"은 예컨대, 관련된 잔기들의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성, 및/또는 양친매성 성질에서 유사성에 근거하여 만들어진다. 예컨대, (a) 비극성 (소수성) 아미노산들은 알라닌, 루신, 이소루신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판 및 메티오닌을 함유한다; (b) 극성 중성 아미노산들은 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴, 및 글루타민을 함유한다; (c) 양성적으로 전하를 띠는 (염기) 아미노산들은 아르기닌, 리신, 및 히스티딘을 함유한다; (d) 음성적으로 전하를 띠는 (산성) 아미노산들은 아스파틱산 및 글루탐산을 함유한다. 치환은 전형적으로 (a)-(d) 그룹들 내에서 만들어질 수 있다. 추가적으로, 글리신 및 프롤린은 [알파]-헬릭스를 붕괴시키기 위한 능력에 근거하여 서로 치환될 수 있다. 몇몇 선호되는 치환들은 다음의 그룹들: (i) S 및 T; (ii) P 및 G; 및 (iii) A, V, L 및 I 중에서 만들어질 수 있다. 알려진 유전적 코드, 재조합 및 합성 DNA 기술을 가지고, 숙련된 과학자는 쉽게 보존적 아미노산 변이체를 코딩하는 DNA들을 구성할 수 있다.

[0240] 본 발명은 항체들의 기능적 또는 약력학적 성질들을 변화시키기 위해 Fc 영역에서 변경이 만들어지는 항체들을 포함한다. 그러한 변경은 C1q 결합 및 CDC 또는 FcγR 결합 및 ADCC의 감소 또는 증가를 가져올 수 있다. 치환들은 예컨대, 하나 이상의 중연쇄 불변 영역의 아미노산 잔기들에서 만들어질 수 있고, 그것에 의해 변형된 항체들과 비교하여 항원에 결합하는 능력은 보존되면서 효과기 기능에서 변경을 일으킬 수 있다 (US 5,624,821 및 US 5,648,260 참고).

- [0241] 항체의 생체 내 반감기는, 분자가 인такт(intact) CH2 도메인 또는 인такт Ig Fc 영역(US 6,121,022 및 US 6,194,551 참고)을 포함하지 않는 것과 같이, Ig 유사 불변 영역 또는 Ig 불변 영역의 샬비지(salvage) 수용체에 피토프를 변형함으로써 증진될 수 있다. 생체 내 반감기는 또한 예컨대, 252 위치에서 루신을 트레오닌으로, 254 위치에서 세린을 트레오닌으로, 256 위치에서 페닐알라닌을 트레오닌으로 치환함으로써 (US 6,277,375 참고), Fc 영역에서 돌연변이를 만듦으로써 더 증가될 수 있다.
- [0242] 또한, 항체들의 글리코실화 패턴은 항체들의 효과기 기능을 변화시키기 위해 변형될 수 있다. 예컨대, 항체들은, NK 세포들의 존재에서 항체들의 증가된 ADCC가 교대로 일어날 수 있는 Fc-수용체를 위한 Fc 영역의 친화도를 증가시키기 위해 Fc 영역의 297 위치에서 Asn에 일반적으로 결합된 푸코오스(fucose) 유닛을 추가하지 않는 트랜스팩토마에서 발현될 수 있다(Shield et al. (2002) JBC, 277: 26733 참고). 또한, 갈락토실화의 변형은 CDC를 변형하기 위해 만들어질 수 있다.
- [0243] 또 다르게, 다른 구체예에서, 돌연변이들은 포화 돌연변이유발(saturation mutagenesis)에 의해서와 같이, 서열을 코딩하는 항-CLD18 항체의 전부 또는 일부를 따라 무작위적으로 도입될 수 있고 생산된 변경 항-CLD18 항체를 결합 활성에 대하여 스크리닝할 수 있다.
- [0244] "재조합 숙주 세포" (또는 간단히 "숙주 세포")라는 용어는, 여기에 사용된 바와 같이, 재조합 발현 벡터가 도입되는 세포를 나타내는 것이다. 그러한 용어들은 특별한 대상 세포 뿐만 아니라, 그러한 세포의 자손까지도 언급하기 위함으로 이해되어야 한다. 임의의 변형들이 돌연변이 또는 환경적인 영향으로 인해 세대를 거듭하면서 일어날 수 있기 때문에, 그러한 자손들은, 사실 부모세포와 동일하지 않을 수 있지만, 여기에 개시된 "숙주 세포"의 용어 범위 내에 여전히 포함된다. 재조합 숙주 세포들은 예컨대, CHO 세포들, NS/O 세포들, 및 림포사이틱 세포들을 비롯한, 트랜스팩토마(transfectoma)들을 포함한다.
- [0245] 여기에 사용된 바와 같이, "대상"은 임의의 인간 또는 비-인간 동물을 포함한다. "비-인간 동물" 용어는 모든 척추동물들, 예컨대, 비-인간 영장류, 양, 개, 소, 닭, 양서류, 파충류 등을 비롯한 포유동물들 및 비-포유동물들을 포함한다.
- [0246] 용어 "형질전환(transgenic) 동물"은 하나 이상의 이식 유전자(transgene), 종게는 중연쇄 및/또는 경쇄 이식 유전자 또는 트랜스염색체 (동물의 자연 게노믹(genomic) DNA에 삽입된 또는 비삽입된)를 포함하는 계통을 가지고, 종게는 이식 유전자들을 발현할 수 있는 동물을 나타낸다. 예컨대, 형질전환 마우스는 인간 경쇄 이식 유전자 및 인간 중연쇄 이식 유전자 또는 인간 중연쇄 트랜스염색체를 가질 수 있고, 마우스는 CLD18 및/또는 CLD18 발현 세포들로 면역화될 때 인간 항-CLD18 항체들을 생산한다. 인간 중연쇄 이식 유전자는 형질전환 마우스들, 예컨대, HCo7 또는 HCo12 마우스들을 비롯한 HuMAb 마우스들의 경우와 같이, 마우스의 염색체 DNA로 삽입될 수 있거나, 인간 중연쇄 이식 유전자는 WO 02/43478에 기재된 바와 같이, 트랜스염색체 (예컨대, KM) 마우스의 경우처럼, 염색체의적으로 유지될 수 있다. 그러한 형질전환 및 트랜스염색체 마우스들은 V-D-J 재조합 및 아이소타입 스위칭을 거침에 의해 CLD18에 대한 인간 모노클로날 항체들의 다양한 아이소타입들(예컨대, IgG, IgA 및/또는 IgE)을 생산할 수 있다.
- [0247] **mAb작용의 메커니즘**
- [0248] 후술하는 것이 본 발명의 항체의 치료적 효능에 근거한 메커니즘에 관한 고려를 제공하더라도, 어떠한 방법으로도 본 발명을 제한하는 것으로 고려되지 않는다.
- [0249] 여기에 개시된 항체는 종게는 면역 시스템, 종게는 ADCC 또는 CDC를 통한 면역 시스템의 인자와 상호반응한다. 본 발명의 항체는 직접 종양 세포를 살해하는 표적 페이로드(payload)(예컨대, 방사성동위원소, 약물 또는 독소)에 또한 이용될 수 있거나, T 림포사이트에서 화학치료적 세포독성 부작용 때문에 타협될 수 있는 항종양 면역 반응을 함유할 수 있는 작용의 상보적인 기전을 통해 종양을 공격하는 전통적인 화학치료제를 상승적으로 사용할 수 있다.
- [0250] **항체 의존성 세포-매개된 세포독성.** ADCC는 여기에 개시된 것처럼 효과기 세포들, 특히 림포사이트들의 세포 살해 능력을 설명하고, 이것은 종게는 항체에 의해 마킹(mark)되는 표적 세포를 필요로 한다.
- [0251] ADCC는 종게는 항체들이 종양 세포상에 항원과 결합하고, 항체 Fc 도메인들이 면역 효과기 세포들의 표면에 Fc 수용체와 관여할 때 일어난다. Fc 수용체들의 몇몇 패밀리는 확인되어왔고, 특이적 세포 집단은 특징적으로 규명된 Fc 수용체들을 발현한다. ADCC는 항원 표시 및 종양 관련된 T 세포 반응의 유도를 가져오는 즉각적인 종양 파괴의 다양한 정도를 직접 유도하기 위한 메커니즘으로서 간주될 수 있다. 종게는, ADCC의 생체 내 유도는 종

양 관련 T 세포 반응들 및 숙주 유래 항체 반응을 가져온다.

- [0252] **보체 의존성 세포독성.** CDC는 항체에 의해 지시될 수 있는 다른 세포 살해 방법이다. IgM은 보체 활성을 위한 가장 효과적인 아이소타입이다. IgG1 및 IgG3는 전형적인 보체활성 경로를 통해 CDC를 지시하는 것에서 매우 효과적이다. 종게는, 이러한 캐스캐이드(cascade)에서, 항원-항체 복합체들의 형성은 IgG 분자 (C1q는 보체 C1의 3개의 하위인자 중 하나이다)를 비롯한 항체 분자를 참여하는 CH2 도메인상에 가깝게 근접하여 다중 C1q 결합 사이트의 노출을 일으킨다. 종게는, 이러한 노출된 C1q 결합 사이트는 이전의 낮은 친화도의 C1q-IgG 상호반응을 높은 애비더티(avidity)로 전환하고, 이것은 다른 일련의 보체 단백질이 관련된 하나의 캐스캐이드 작용을 일으키고, 효과기 세포 화학주성의/활성제 C3a 및 C5a의 단백질 분해적 방출을 가져온다. 종게는, 막의 형성에서 보체 캐스캐이드 말단은 복합체를 공격하고, 이것은 세포 내외의 용질 및 물의 자유(free) 통로를 촉진하는 세포 막에서 구멍을 형성한다.
- [0253] **항체의 생산**
- [0254] 본 발명의 항체는 통상적인 모노클로날 항체 방법론, 예컨대, the standard somatic cell hybridization technique of Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975),을 함유하는 다양한 기술에 의해 생산가능하다. 체세포 혼성화 절차가 선호될 지라도, 주로, 모노클로날 항체를 생산하기 위한 다른 기술들이 이용될 수 있다, 예컨대, B-림포사이트의 바이러스성 또는 중양 형질변환 또는 항체 유전자의 라이브러리를 이용한 파지 디스플레이 기술이 이용될 수 있다.
- [0255] 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마를 생산하기 위한 선호되는 동물 시스템은 쥐과(murine) 계열이다. 마우스에서 하이브리도마 생산은 매우 잘 구축된 절차이다. 융합을 위한 면역화된 비장세포의 분리를 위한 면역화 프로토콜 및기술은 기술분야에서 잘 알려져있다. 융합 파트너 (예컨대, 쥐과 골수종 세포)와 융합 절차는 또한 알려져있다.
- [0256] 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마를 제조하기 위한 다른 선호되는 동물 시스템은 래트 및 래빗 시스템이다 (예컨대, Spieker-Polet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:9348 (1995)에 개시된, Rossi et al., Am. J. Clin. Pathol. 124: 295 (2005) 참고).
- [0257] 다른 구체예에서, CLD18에 관한 인간 모노클로날 항체들은 마우스 시스템 보다 인간 면역 시스템의 부분들을 수행하는 유전자이식(transgenic) 또는 트랜스염색체적(transchromosomal) 마우스를 이용하여 생성가능하다. 이러한 유전자이식 및 트랜스염색체적 마우스는 각각 HuMab 마우스 및 KM 마우스로 알려져 있고, "유전자 이식 마우스"로 여기에 집합적으로 언급된다. 그러한 유전자 이식 쥐 내에 인간 항체의 생산은 W02004 035607에서 CD20을 위한 자세히 기재된 내용으로써 수행될 수 있다.
- [0258] 모노클로날 항체들을 생성하기 위한 또 다른 전략은 예컨대, Babcock et al., 1996; 규정된 전략의 항체를 생산하는 단일의 분리된 림포사이트들로부터 모노클로날 항체를 생산하기 위한 신규한 전략을 참고한, 규정된 전략의 항체를 생산하는 림포사이트로부터 항체를 코딩하는 유전자를 직접 분리하는 것이다. 제조항체 공학의 자세한 내용은 또한 elschof and Kraus, Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8 and Benny K.C. Lo Antibody Engineering ISBN 1-58829-092-1을 참고하라.
- [0259] **면역화**
- [0260] CLD18에 대한 항체를 생성하기 위해 상기 개시된 바와 같이, 마우스는 CLD18 서열로부터 유래된 담체-콘주게이트된 펩티드, CLD18 항원을 재조합적으로 발현된 풍부한 제조물 또는 그 단편 및/또는 CLD18을 발현하는 세포들로 면역화될 수 있다. 또 다르게, 마우스는 전장 인간 CLD18 (서열번호 1)을 코딩하는 DNA 또는 그 단편, 특히 서열번호 15, 17 및 19의 DNA로 면역화될 수 있다. CLD18 항원의 정제된 또는 풍부한 제조물을 이용한 면역화가 항체를 생성하지 않는 경우에, 마우스는 면역 반응을 촉진하기 위해, CLD18을 발현하는 세포들, 예컨대 세포주 또는 또한 면역화될 수 있다.
- [0261] 면역 반응은 꼬리 정맥 또는 안와후(retroorbital) 블리즈(bleeds)에 의해 수득되는 혈장 및 혈청 시료로 면역화 프로토콜의 코스로 모니터될 수 있다. 충분한 역가의 항-CLD18 면역글로불린을 가진 마우스는 융합에 이용될 수 있다. 마우스는 희생되어, 하이브리도마를 분비하는 특이적 항체의 비율을 증가시키기 위한 비장(spleen) 제거전에 3일동안 CLD18 발현 세포들로 복강내 또는 정맥내로 부스트(boost)될 수 있다.
- [0262] **모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마의 생성**
- [0263] CLD18에 대한 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마를 생성하기 위해, 면역화된 마우스들로부터의 림프절

세포들 및 비장세포는 분리되고, 마우스 골수종 세포주를 비롯한 적절한 불사화된 세포주에 융합될 수 있다. 결과적으로 나오는 하이브리도마들은 그리고나서 항원 특이적 항체의 생산에 대하여 스크리닝될 수 있다. 그리고나서, 각각의 웰들은 하이브리도마를 분비하는 항체에 대하여 ELISA에 의해 스크리닝될 수 있다. CLD18 발현 세포들을 이용한 면역형광 및 FACS에 의해, CLD18에 특이적인 항체들이 확인될 수 있다. 하이브리도마를 분비하는 항체는 리플레이트(replate)될 수 있고, 다시 스크린될 수 있으며, 만약 항-CLD18 모노클로날 항체들에 대하여 여전히 양성이라면 제한하는 희석에 의해 서브클론될 수 있다. 안정적인 서브클론은 그리고나서 특성화를 위한 조직 배양 배지에서 항체를 생성하기 위해 시험관내(in vitro)에서 배양될 수 있다.

[0264] **모노클로날 항체를 생산하는 트랜스펙토마(transfectoma)의 생성**

[0265] 본 발명의 항체들은 예컨대, 기술분야에 잘 알려져 있는 재조합 DNA 기술 및 유전자 형질감염 방법들의 조합을 이용하여 숙주 세포 트랜스펙토마에서 생산될 수 있다 (Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

[0266] 예컨대, 일 구체예에서, 관심대상 유전자(들), 예컨대, 항체 유전자들은 WO 87/04462, WO 89/01036 및 EP 338 841에 개시된 GS 유전자 발현 시스템 또는 기술분야에 잘 알려진 다른 발현 시스템에 의해 사용된 것을 비롯한 진핵 발현 플라스미드를 비롯한 발현 벡터내로 라이게이션 될 수 있다. 클론된 항체 유전자들을 가진 정제된 플라스미드는 진핵 숙주 세포, 예컨대 CHO 세포들, NS/O 세포들, HEK293T 세포들 또는 HEK293 세포들 또는 대안적으로 식물 유래 세포들, 진균 또는 효모 세포들과 같은 다른 진핵 세포들내로 도입될 수 있다. 이러한 유전자들을 도입하기 위해 사용되는 방법은 일렉트로포레이션, 리포펙틴, 리포펙타민 또는 다른 것들을 비롯한 기술분야에 기재된 방법들일 수 있다. 숙주 세포 내에서 이러한 항체 유전자들의 도입 후에, 항체를 발현하는 세포들은 확인되고 선택된다. 이러한 세포들은 그리고나서 그 발현 수준을 위해 증폭되고, 항체를 생산하기 위해 업스케일(upscale)될 수 있는 트랜스펙토마를 나타낸다. 재조합 항체들은 이러한 배양 상청액 및/또는 세포들로부터 분리되고 정제될 수 있다.

[0267] 다르게, 클론된 항체 유전자들은 E.coli를 비롯한 미생물을 비롯한 원핵 세포들을 함유하는 다른 발현 시스템에서 발현될 수 있다. 또한, 항체들은 sheep 또는 래빗으로부터의 우유에서 또는 암탉의 달걀에서와 같은 형질전환 비인간 동물들 또는 형질전환 식물들에서 생산될 수 있다: Verma, R., et al. (1998) J. Immunol. Meth. 216: 165-181; Pollock, et al. (1999) J. Immunol. Meth. 231: 147-157; and Fischer, R., et al. (1999) Biol. Chem. 380: 825-839 참고.

[0268] **인такт(intact) 항체를 발현하기 위한 부분적인 항체 서열의 용도 (즉, 인간화 및 키메라화)**

[0269] a) 키메라화

[0270] 뮤린(murine) 모노클로날 항체들은 독소 또는 방사성 동위원소로 표지될 때 인간 내에서 치료적 항체로써 사용될 수 있다. 비표지된 뮤린 항체들은 인간 내에서 높은 면역성이며, 반복적으로 적용할 때 치료적 효과의 감소를 가져온다. 뮤린 항체의 면역원성은 중연쇄 불변 영역에 의해 매개된다. 인간에서 뮤린 항체들의 면역원성은 만약 각각의 항체들이 키메라화되거나 인간화되면 감소되거나 완전히 막을 수 있다. 키메라 항체들은 항체들이고, 뮤린 항체로부터 유래된 가변 영역 및 인간 면역글로불린 불변 영역을 가지는 것을 비롯한 상이한 동물 종들로부터 유래된 상이한 부분들이다. 항체들의 키메라화는 인간 중연쇄 및 경쇄의 불변영역과 뮤린 항체 중연쇄 및 경쇄의 불변 영역을 결합함에 의해 성취된다 (예컨대, Kraus et al., in Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8에 의해 개시된). 선호되는 방식으로는, 키메라화된 항체는 인간 카파 경쇄의 불변 영역을 뮤린 경쇄의 가변 영역에 결합시킴으로써 생성할 수 있다. 또 다른 선호되는 항체의 키메라화 방식으로는 인간 람다(lambda) 경쇄의 불변 영역을 뮤린 경쇄의 가변 영역에 결합시키는 방법이 있다. 키메라화된 항체 생성을 위한 선호되는 중연쇄 불변 영역은 IgG1, IgG3 및 IgG4가 있다. 그 밖에 키메라 항체의 생성을 위해 선호되는 중연쇄 불변 영역으로는 IgG2, IgA, IgD 및 IgM이 있다.

[0271] b) 인간화

[0272] 항체는 주로 6개의 중연쇄 및 경쇄 CDR안에 존재하는 아미노산 잔기를 통해 표적 항원과 상호작용한다. 이 때문에 CDR 내부의 아미노산 서열들은 CDR 외부의 서열보다 각각의 항체들 사이에서 다양하게 나타난다. CDR 서열이 대부분의 항체-항원간 상호작용에 있어 결정적 역할을 하기 때문에, 서로 다른 성질들을 가진 서로 다른 항체로부터의 프레임워크(framework) 서열들 상에 이식되는 특이적 자연적으로 일어나는 항체로부터 CDR 서열을 포함하는 발현 벡터를 구축함으로써, 특이적 자연적으로 발생하는 항체들의 성질을 모방하는 재조합 항체를 발현하는 것이 가능하다(e.g., Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332: 323-327; Jones, P. et al. (1986) Nature

321: 522-525; and Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86: 10029-10033). 그러한 프레임워크 서열은 점라인(germline) 항체 유전자 서열을 포함하는 공공 DNA 데이터베이스에서 얻을 수 있다. 이러한 점라인 서열은 성숙한 항체 유전자 서열과 다를 것인데, 이들은 B 세포의 성숙 분열기 동안 V (D) J가 결합됨으로써 생성되는 완전히 결합된 가변 유전자를 포함하지 않을 것이기 때문이다. 점라인 유전자 서열은 또한 가변 영역 전체에 고르게 분포된 각각의 고친화도 이차적 레퍼토리 항체와도 다를 것이다. 예를 들어, 체세포 돌연변이는 프레임워크 영역 1의 아미노 말단 부분과 프레임워크 영역 4의 카르복시기 말단 부분에서는 상대적으로 빈번하지 않다. 또한 많은 체세포 돌연변이는 항체의 결합 성질을 크게 변화시키지 못한다. 따라서, 원래의 항체의 결합 성질과 유사한 성질을 갖는 온전한 재조합 항체를 재현하고자 특정 항체의 DNA 서열 전체를 얻을 필요는 없다(WO 99/45962). 이 같은 목적을 위해서는 해당 CDR 영역에 걸쳐있는(spanning) 중연쇄 및 경쇄 서열의 일부만으로 충분하다. 이 부분적 서열은 재조합된 항체 가변 영역들에 기여되는 점라인 가변 및 결합 유전자 단편을 결정하는 데 사용된다. 그 후 이 점라인 서열은 가변 영역의 빠진 부분을 채우게 된다. 중연쇄 및 경쇄 리딩(leading) 서열은 단백질 성숙기 동안 분열되어 최종 항체의 성질에는 아무런 영향을 끼치지 못한다. 빠진 서열을 더하기 위해, 클론된 cDNA 서열들은 라이게이션 또는 PCR 증폭을 통해 합성 올리고뉴클레오타이드와 결합될 수 있다. 또는 그 대신, 전체적으로 합성 가변 영역 클론을 생성하기 위해 가변 영역 전체가 하나의 짧고 겹쳐진 올리고뉴클레오타이드 세트에 합성되어 PCR 증폭을 통해 합성될 수도 있다. 이 과정은 제거나 함유, 특정 제한 사이트, 또는 특정 코돈의 최적화 등의 장점이 있다.

[0273] 하이브리도마로부터의 중연쇄 및 경쇄 전사물의 뉴클레오타이드 서열은 자연적 서열과 같은 동일한 아미노산 코딩 능력을 갖는 합성 V 서열을 생성하기 위한 합성뉴클레오타이드의 중복 세트를 고안하는데 사용된다. 이러한 합성 중연쇄 및 카파 사슬 서열은 세가지 측면에서 자연적 서열과 다를 수 있다: 첫째, 반복되는 뉴클레오타이드 염기의 스트링(strings)들은 올리고뉴클레오타이드 합성과 PCR 증폭을 촉진하기 위해 방해받는다; 둘째, Kozak의 룰(Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266: 19867-19870)에 따라 최적 번역 개시 사이트들이 병합된다; 셋째, HindIII 사이트들은 번역 개시 사이트들의 업스트림에 구축(engineered)된다.

[0274] 중연쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역의 경우, 최적화된 코딩 및 대응 비코딩, 스트랜드(strand) 서열들은 대응 비코딩 올리고뉴클레오타이드의 거의 중간점에서 30-50개의 뉴클레오타이드로 쪼개진다. 이에 따라 각각의 사슬에서, 올리고뉴클레오타이드들은 150-400개의 뉴클레오타이드 단편을 걸치는 중복 더블 스트랜드 세트에 조합될 수 있다. 이 풀은 다시 150-400개 뉴클레오타이드의 PCR 증폭 생산물을 생성하는 데 주형으로 쓰인다. 전형적으로, 단일 가변 영역 올리고뉴클레오타이드 세트는 두개의 풀로 분해되고 따로 증폭되어 두 개의 겹치는 PCR 생산물을 생성하게 된다. 이렇게 생성된 겹치는 생산물은 다시 PCR 증폭에 의해 결합되어 완전한 가변 영역을 형성한다. 발현 벡터 구축물로 쉽게 클론될 수 있는 단편을 생성하기 위해, PCR 증폭 내에 중연쇄 또는 경쇄 불변 영역의 겹치는 단편을 PCR 증폭에 포함시키는 것이 바람직할 수 있다.

[0275] 재구축된 키메라화 또는 인간화된 중연쇄 및 경쇄 가변 영역들은 클론된 프로모터, 리더, 번역 개시, 불변 영역, 3' 비번역된, 폴리아데닐레이션, 전사 종결 서열과 결합되어 발현 벡터 구축물을 형성한다. 중연쇄 및 경쇄 발현 구축물은 단일 벡터로 결합되거나, 숙주 세포로 공동-형질감염되거나, 연속적으로 형질감염되거나, 혹은 개별적으로 형질감염될 수 있다. 이 숙주 세포는 이후 합쳐져 두 사슬을 모두 발현하는 숙주 세포를 구성하게 된다. 인간 IgG_k를 위한 발현 벡터의 구축에 사용되는 플라스미드에 대해서는 아래에 설명되어 있다. 이 플라스미드가 구축되었기 때문에, PCR 증폭된 V 중연쇄 및 V 카파 경쇄 cDNA 서열이 완전한 중연쇄 및 경쇄 미니 유전자들(minigenes)을 재구축하는 데 쓰일 수 있게 되었다. 이러한 플라스미드는 완전히 인간 또는 키메라화된 IgG1, 카파 또는 IgG4, 카파 항체들을 발현하는 데 쓰일 수 있다. 유사한 플라스미드가 다른 중연쇄 아이소타입 발현이나 램다 경쇄를 포함하는 항체 발현을 위해 구축될 수 있다.

[0276] 따라서, 본 발명의 또 다른 면으로, 본 발명의 항-CLD 18 항체들의 구조적 특질은 CLD18에 결합하는 것을 비롯한, 본 발명의 항체들의 적어도 하나의 기능적 특질을 보유하는 구조적으로 관련된 인간화된 항-CLD18 항체들을 생성하기 위해 사용된다. 좀 더 구체적으로, 마우스 모노클로날 항체들의 하나 이상의 CDR 영역들은 본 발명의 추가적인, 재조합적으로-구축된(engineered), 인간화된 항-CLD18 항체들을 생성하기 위해 알려진 인간 프레임워크 영역들 및 CDR들에 재조합적으로 결합될 수 있다.

[0277] **항원 발현 세포들에 대한 결합**

[0278] CLD18에 결합하는 항체의 능력은 예들에서 개시된 것들을 비롯한 표준 결합 어세이들을 이용하여 측정될 수 있다 (예컨대, ELISA, 웨스턴 블롯, 면역형광 및 플로우 사이토메트리 분석)

[0279] 항체들의 결합의 특징화

- [0280] 항-CLD18 항체들을 정제하기 위해, 선택된 하이브리도마들은 모노클로날 항체 정제를 위한 2-리터 스피너-플라스크에서 자랄 수 있다. 또 다르게, 항-CLD18 항체들은 투석에 근거한 생물반응기에서 생산될 수 있다. 상청액은 필터될 수 있고, 만약 필요하다면, 단백질 G-세파로스 또는 단백질 A-세파로스로 친화도 크로마토그래피 전에 농축될 수 있다. 녹여서 분리된(eluted) IgG는 순도를 보장하기 위해 젤 전기영동 및 고 수행 액체 크로마토그래피에 의해 체크될 수 있다. 완충 용액은 PBS로 교체될 수 있고, 농도는 1.43 소강 계수(extinction coefficient)를 이용하여 OD280에 의해 측정된다. 모노클로날 항체들은 나누어떨어지고(aliquote), -80℃에서 보관될 수 있다.
- [0281] 만약 선택된 항-CLD18 모노클로날 항체들이 유일한 에피토프와 결합하는지를 알아보기 위해, 사이트-지시된(site-directed) 또는 멀티사이트 지시된(multi-site directed) 돌연변이유발(mutagenesis)이 이용될 수 있다.
- [0282] **아이소타입 결정(determination)**
- [0283] 정제된 항체들의 아이소타입을 알아보기 위해, 다양한 키트의 아이소타입 ELISA(예컨대, Zymed, Roche Diagnostics)가 수행되었다. 마이크로 타이터 플레이트의 웰들은 항-마우스 Ig로 코팅될 수 있다. 블로킹 후에, 플레이트는 2시간동안 주변 온도에서 모노클로날 항체들 또는 정제된 아이소타입 대조군들로 반응시켰다. 그리고 나서 웰들은 마우스 IgG1, IgG2a, IgG2b 또는 IgG3, IgA 또는 마우스 IgM-특이적 페록시다제-콘주게이트된 프로브들과 반응시킬 수 있다. 세척 후, 플레이트들은 ABTS 기질(1mg/ml)로 현상시키고, 405-650 OD로 분석할 수 있다. 또 다르게는, 아이소스트립 마우스 모노클로날 항체 아이소타이핑 키트 (Roche, Cat. No. 1493027)가 제조자에 의해 기재된 바와 같이 사용될 수 있다.
- [0284] **플로우 사이토메트리 분석(Flow cytometric analysis)**
- [0285] CLD18을 발현하는 살아있는 세포들에 대한 모노클로날 항체들의 결합 또는 면역화된 마우스들의 혈청에서 항-CLD18 항체들의 존재를 증명하기 위해, 플로우 사이토메트리가 사용되었다. 천연 또는 형질감염후 CLD18 발현하는 세포주들 및 CLD18 발현을 결여한 음성 대조군들 (표준 성장 조건에서 자란)은 하이브리도마 상청액들 또는 1% FBS 함유 PBS 내 모노클로날 항체들의 다양한 농도로 혼합될 수 있고, 30분동안 4℃에서 인큐베이션 할 수 있다. 세척 후, APC- 또는 Alexa647-표지된 항 IgG 항체는 초기 항체 염색과 같은 조건하에 CLD18-결합된 모노클로날 항체와 결합할 수 있다. 시료들은 단일, 살아있는 세포들을 게이트(gate)하기 위한 빛 및 사이드 산란 특징(light and side scatter properties)들을 이용한 FACS 기구로 플로우 사이토메트리에 의해 분석될 수 있다. 단일 측정에서 비특정 바인더(binder)들로부터 CLD18-특이적 모노클로날 항체들을 구별하기 위해, 공동-형질감염 방법이 구현될 수 있다. CLD18 및 형광 마커를 코딩하는 플라스미드로 일시적으로 형질감염된 세포들은 상기에 기재된 바와 같이 염색될 수 있다. 형질감염된 세포들은 항체-염색된 세포들보다 서로 다른 형광 채널에서 검출될 수 있다. 형질감염된 세포들의 다수가 이식유전자(transgene) 모두를 발현하는 것처럼, CLD18-특이적 모노클로날 항체들은 형광 마커 발현 세포들에 선호되게 결합하는 반면, 비특이적 항체들은 비형질감염된 세포들에 비교할만한 비율로 결합한다. 형광 현미경을 이용하는 대안적인 어세이는 플로우 사이토메트리 어세이에 더하여 또는 대신으로 사용될 수 있다. 세포들은 상기한 바와 같이 정확히 염색되고, 형광 현미경에 의해 조사될 수 있다.
- [0286] 만약 특히 점착성있는 세포의 주변 세포에 대한 세포간의 접촉이 예를 들어 세포들의 분리에 의해 상실되면 치밀이음새 단백질은 흡수되는 경향이 있다. CLD18의 세포 표면 발현은 다음에 의해 최적화된다. a) 배양 조건 조절, 예를 들어 표준화된 방식으로 더 높은 세포 밀도에서 배양해, 부드러운 분리를 사용하고(예를 들어 2mM EDTA/PBS 또는 아큐타제(acutase)), 실온에서 가공하여, 엔도시토시스(endocytosis)의 억제제(예, 소듐 아지드) 또는 CLD18 전사나 번역의 활성제를 첨가, b) 예를 들어 형질감염된 세포의 측면에서 항생 물질의 선택, 면역자기 혹은 FACS 세포 분류, 또는 제한적 희석 클로닝에 의해 세포 표면에서 높은 수준에서 CLD 18을 유지하는 세포를 선택 및 클로닝.
- [0287] **면역 형광 현미경 검사**
- [0288] 면역화된 마우스의 혈청에 항 CLD18 항체의 존재 또는 CLD18을 발현하는 살아있는 세포와 모노클로날 항체와의 결합을 증명하기 위해 면역 형광 현미경 검사가 사용될 수 있다. 예를 들어 자발적으로, 혹은 형질감염 후에 CLD18을 발현하는 세포주나 CLD18 발현을 결여하는 음성대조군은 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100IU/ml 페니실린, 100µg/ml 스트렙토마이신이 보충된 DMEM/F12 배지에서 표준 성장 조건하의 챔버 슬라이드에서 배양된다. 세포들은 그 후 메탄올이나 파라포름알데히드로 고정되거나 미처리된다. 그리고 나서 30분간 25℃에서 CLD18에 대

해 모노클로날 항체와 반응하게 된다. 세척 후, 이 세포들은 동일 조건에서 Alexa555 표지된 항-마우스 IgG 2차 항체(Molecular Probes)와 반응하게 된다. 그리고 나서 형광 현미경 검사로 세포를 조사할 수 있다.

[0289] 세포안의 총 CLD18 수준은 세포가 메탄올 또는 파라포름알데히드로 고정되거나 트리톤 X-100으로 투과될 때 관찰할 수 있다. 살아있는 세포와 투과되지 않고 파라포름알데히드 고정된 세포에서 CLD18의 표면 국소화(localization)가 관찰될 수 있다. 또한 치밀 이음새(tight junction)에 대한 CLD18의 표적화는 ZO-1과 같은 치밀 이음새 마커와의 공동-염색에 의해 분석될 수 있다. 또한, 항체 결합의 효과 및 세포막내의 CLD18 국소화를 조사할 수 있다.

[0290] **웨스턴 블롯(Western Blot)**

[0291] CLD18 항원과의 반응성을 위해, 항-CLD18 IgG를 웨스턴 블롯팅에 의해 추가로 실험할 수 있다. 간단히 말해, CLD18을 발현하는 세포나 적절한 음성대조군으로부터의 세포추출물을 준비해 SDS 폴리악릴아마이드 젤 전기영동시킬 수 있다. 전기이동 후, 분리된 항원은 니트로셀룰로오스 막으로 이동되어 차단되고, 실험할 모노클로날 항체와 함께 조사된다. IgG 결합은 항-마우스 IgG 페록시다아제를 사용해 검출되고 ECL 기질로 현상(develop)된다.

[0292] **면역조직화학(Immunohistochemistry)**

[0293] 항-CLD18 마우스 IgGs는 당업자에게는 잘 알려진 방식으로 면역조직화학에 의해, 예컨대, 일상적인 수술 과정에서 환자로부터, 혹은 자발적으로나(예컨대, DAN-G, SNU-16, 또는 KATO-III) 형질 감염후(예컨대, HEK293) CLD18을 발현하는 세포주가 접종된 이중 이식된 종양을 갖고 있는 마우스로부터 얻은 암 없는 조직이나 암 조직 시료들로부터 파라포름알데히드나 아세톤 고정된 크라이오섹션, 또는 파라핀을 함유하고 파라포름알데히드로 고정된 조직 섹션을 사용하는 방식에 의해, CLD18 항원에 대한 반응성을 추가적으로 측정할 수 있다. 면역염색을 위해, CLD18에 대해 반응성있는 항체들은 인큐베이션될 수 있고, 그 다음으로 파는 사람의 지시에 따라 고트 항-마우스 또는 고트(goat) 항-라빗 항체들(DAKO)과 홀스라디시-페록시다제 콘주게이트된다.

[0294] **시험관 내 항체의 식균(phagocytic) 및 세포 살해 작용**

[0295] CLD18에 대한 특이적인 결합에 더해, CLD18 발현 세포의 식세포작용(phagocytosis)과 세포 살해 매개 능력을 측정하기 위해 항-CLD18 항체들이 시험될 수 있다. 시험관 내 모노클로날 항체 활성의 측정은 생체 내 모델 시험에 앞서 초기 스크리닝을 제공할 것이다.

[0296] *항체 의존적 세포-매개된 세포독성(ADCC):*

[0297] 간단히 말해, 건강한 공여자로부터 나온 PMNs(polymorphonuclear cells), NK 세포, 모노사이트, 단핵 세포, 또는 다른 효과기 세포는 피콜 하이파크 밀도 원심분리 후, 오염된 적혈구의 용해에 의해 정제될 수 있다. 세척된 효과기 세포는 다양한 효과기 세포 대 표적 세포의 비율에서 10% 열-비활성화된 FCS 또는 대신 5% 열-비활성화된 인간 혈청이 보충된 RPMI에서 현탁되고 CLD18을 발현하는⁵¹Cr 로 표지된 표적 세포와 섞인다. 이와 다르게, 표적 세포가 리간드를 향상시키는 형광(BATDA)으로 표지될 수도 있다. 죽은 세포에서 나오는 강화하는 리간드를 가진 유로피움의 고휘광 킬레이트는 형광계에 의해 측정될 수 있다. 또다른 대안 기술은 루시퍼레이즈를 가진 표적 세포의 형질감염을 활용하는 것이다. 첨가된 루시퍼 엘로우는 이후 생존가능한 세포에 의해서만 산화될 수도 있다. 정제된 항-CLD18 IgGs는 이후 다양한 농도에서 더해질 수 있다. 부적절한 인간 IgG는 음성대조군으로 쓰일 수 있다. 어세이는 사용된 효과기 세포 유형에 따라 적게는 4시간에서 많게는 20시간동안 37℃에서 이동된다. 시료들은 배양 상청액의⁵¹Cr 배출 또는 EuTDA 킬레이트 화합물의 존재를 측정함으로써 세포용해에 대하여 어세이된다. 다르게, 루시퍼엘로우의 산화에 의한 발광은 생존가능한 세포를 측정할 수 있다.

[0298] 항-CLD18 모노클로날 항체는 또한 세포용해가 다수의 모노클로날 항체와 함께 증가하는 지를 측정하기 위해 다양한 조합으로 테스트될 수 있다.

[0299] **보체 의존적 세포독성(CDC)**

[0300] 모노클로날 항-CLD18 항체의 CDC 매개 능력을 다양한 알려진 테크닉을 통해 테스트할 수 있다. 예를 들어, 보체를 위한 혈청은 당업자에게 알려진 방식에 따라 혈액으로부터 얻을 수 있다. mAbs의 CDC 작용을 측정하기 위해서는 다른 방법이 사용된다. 예를 들어⁵¹Cr 배출을 측정할 수도 있고 상승한 세포막 삼투성을 PI 제외 어세이를 사용해 측정할 수도 있다. 간단하게, 표적 세포를 세척해 5 x 10⁵/ml를 다양한 농도의 mAb로 10-30분간 37℃ 또

는 실온에서 인큐베이팅할 수 있다. 그리고나서 혈청이나 혈장을 최종 농도가 20%(v/v)가 될 때까지 더해 세포를 37°C에서 20-30분간 인큐베이트한다. 각각의 시료에서 나온 모든 세포를 FACS 튜브의 PI 용액에 더한다. 이 혼합물은 FACS 어레이를 사용하여 플로우 사이토메트릭 분석을 통해 즉시 분석할 수 있다.

[0301] 다른 어세이에서, CDC 유도는 부착 세포(adherent cell)에 따라 결정된다. 이러한 어세이의 일 구체예에서, 세포들이 조직배양 편평한 바닥 마이크로티터 플레이트에서 3×10^4 /웰의 밀도로 어세이 24시간 전에 씨드(seed)된다. 그 다음날 생 장 배지는 제거되고 이 세포들은 항체들과 함께 세벌(triplicate)로 인큐베이트된다. 대조군 세포들은 각각 배경(background) 용해나 최대 용해의 측정을 위해 생장 배지나 0.2%의 사포닌을 함유하는 생장 배지와 함께 인큐베이트된다. 20분간 상온에서 인큐베이트한 후에 상청액은 제거되고 DMEM(37°C 에서 예열된) 안의 20%(v/v) 인간 혈장이나 혈청을 세포에 더해 37°C에서 다시 20분간 인큐베이트한다. 각 시료에서 나온 모든 세포들을 프로피디움 요오드화물 용액(10 μ g/ml)에 더한다. 그리고나서, 상청액은 2.5 μ g/ml 에디티움 브로마이드를 포함하는 PBS로 대체되고 520 nm에서 여기(excitation)에 의한 형광 방출은 Tecan Safire를 사용해 600nm에서 측정된다. 그 백분율(percentage) 특이적 용해는 다음과 같이 계산된다.: % 특이적 용해 = (형광 시료-형광 배경) / (형광 최대 용해-형광 배경) x 100

[0302] 모노클로날 항체에 의한 세포 확산의 억제:

[0303] 아포토시스(apoptosis) 개시 능력을 시험하기 위해, 예를 들어 모노클로날 항 CLD18를 CLD18 양성 종양 세포, 예를 들면 SNU-16, DAN-G, KATO-III, 또는 CLD18감염된 종양 세포와 37°C 에서 약 20시간 동안 인큐베이트할 수 있다. 이 세포들은 채취된 후 Annexin-V 결합되는 버퍼(BD 생명과학)에서 세척되어 FITC나 APC(BD 생명과학)와 결합된 Annexin V와 15분간 어둠속에서 인큐베이트 된다. 각 시료에서 나온 모든 세포들은 FACS 튜브 안의 PI 용액(10 μ g/ml in PBS)에 더해지고 즉시 플로우 사이토메트리(위에서 언급한대로)에 의해 평가된다. 대신 모노클로날 항체에 의한 세포 증식의 일반적 억제제는 상용 키트로 검출할 수 있다. DELFIA Cell Proliferation Kit (Perkin-Elmer, Cat. No. AD0200)는 마이크로플레이트 안의 증식하는 세포의 DNA 합성 동안의 5-브로모-2'-디옥시우리딘 (BrdU) 혼합 측정에 기초한 비동위원소 면역어세이이다. 혼합된 BrdU는 유로피움 표지된 모노클로날 항체를 사용해 검출된다. 항체 검출을 허락하기 위해, 세포들은 고정되고 Fix 용액을 사용해 DNA 변성된다. 결합되어 있지 않은 항체는 세척되어 떨어져 나가고, 표지된 항체로부터 유로피움 이온을 분리시키기 위해 용액에 DELFIA 유도인자가 첨가된다. 이 용액에서 이들은 DELFIA 유도인자의 구성성분을 가진 고 형광 킬레이트 화합물을 형성한다. 측정된 형광 -검출에서 시간-분해된(time-resolved) 플루오로메트리를 활용-은 각 웰의 세포에서 DNA 합성에 비례한다.

[0304] 전임상 연구

[0305] CLD18 발현 종양 세포의 성장 조절에 있어, 그 효능을 측정하기 위해, CLD18에 결합하는 모노클로날 항체는 또한 생체 내 모델(예를 들어 CLD18을 발현하는 세포주, 예를 들면 DAN-G, SNU-16, 또는 KATO-III 등이 주입된, 또는 HEK293과 같이 감염 후 세포주로 접종된 이종 이식 종양을 가진 면역 결핍 마우스에서)에서 실험할 수 있다.

[0306] CLD18 발현 종양성 세포를 면역부족 마우스나 다른 동물에 이종 이식한 후의 체내 연구를 본 발명의 항체를 사용해 수행할 수 있다. 종양의 형성이나 종양 관련 증상을 예방하기 위한 항체의 효과를 측정하기 위해, 종양 없는 마우스에게 항체들을 투여하고 종양 세포의 투여할 수 있다. 항체들을 종양이 있는 마우스에 투여하여 종양의 성장, 전이 또는 종양 관련 증상을 줄이기 위한 각각의 항체의 치료 효능을 측정할 수 있다. 항체 적용(application)은 세포 증식 억제제(cystostatic drugs), 성장 인자 억제제, 세포주기 차단제, 혈관신생 억제제 같은 다른 물질과 다른 항체들의 적용을 조합들의 시너지 효과나 잠재적 독성을 측정할 수 있다. 본 발명의 항체들에 의해 나타나는 독성 부작용을 분석하기 위해 동물에 항체나 대조 시약을 주입하고 CLD18 항체 치료와 연관이 있을 수 있는 증상에 대해 면밀히 조사할 수 있다. CLD18 항체의 생체 내 적용의 가능한 부작용으로는 특히 위나 폐 등의 CLD18 발현 조직에서의 독성이 있다. 인간이나 그 밖에 쥐와 같은 다른 종에서의 CLD18을 인식하는 항체는 특히 인간에서의 모노클로날 CLD18 항체의 적용에 의해 나타나는 잠재적 부작용을 예방하는 데 유용하다.

[0307] 에피토프 맵핑(mapping)

[0308] 본 발명의 항체에 의해 인지되는 에피토프 맵핑을 "Epitope Mapping Protocols (Methods in Molecular Biology) by Glenn E. Morris ISBN-089603-375-9 and in 'Epitope Mapping: A Practical Approach' Practical Approach Series, 248 by Olwyn M. R. Westwood, Frank C. Hay 에 자세히 설명된 대로 수행할 수 있다.

[0309] I. CLD18에 결합되는 이중특이적(bispecific)/다중특이적(multispecific) 분자

[0310] 본 발명의 또 다른 구현에 있어서, CLD18에 대한 항체는 파생되거나 또다른 기능적 분자, 예를 들면 또 다른 펩티드나 단백질(예를 들어 Fab' 단편)에 연결되어 다수의 결합 사이트나 표적 에피토프에 결합하는 이중특이적 혹은 다중특이적 분자를 생성할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체가 또다른 항체, 펩티드, 또는 결합 의태물(mimetic) 등의 다른 하나의 혹은 여러개의 결합 분자에 기능적으로 연결될 수 있다(화학적 결합, 유전적 융합, 비공유 결합 또는 다른 방법에 의해).

[0311] 따라서, 본 발명은 CLD18에 대한 적어도 하나의 일차 결합 특이성과 이차 표적 에피토프에 대한 이차 결합 특이성을 가진 이중특이적이며 다중특이적인 분자들을 포함한다. 본 발명의 특정 구체예에 있어서, 이차 표적 에피토프는 예컨대, 인간 Fc-감마 RI(CD64)나 인간 Fc-알파 수용체(CD89) 같은 Fc 수용체나, CD3같은 T 세포 수용체이다. 그러므로, 본 발명은 Fc-감마R, Fc-알파R이나 Fc-엡실론R을 발현하는 효과기 세포들(예컨대, 모노사이트, 소식세포(macrophages), 또는 다형핵세포(PMNs) 등)에 결합할 수 있으면서 CLD18 발현 표적 세포에도 결합 가능한 이중특이적, 다중특이적 분자들을 포함한다. 이러한 이중특이적, 다중특이적 분자들은 CLD18 발현 세포들을 효과기 세포에 표적으로 하거나 CLD18 발현 세포의 식균 작용, 항체 의존적 세포 독성(ADCC), 사이토카인 배출, 또는 슈퍼옥사이드 음이온의 생성과 같은 Fc 수용체에 의해 매개되는 효과기 세포 작용을 유발할 수도 있다.

[0312] 본 발명의 이중특이적, 다중특이적 분자들은 또한 항-Fc 결합 특이성과 항(anti)-CLD18 결합 특이성에 더하여 삼차 결합 특이성을 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 삼차 결합 특이성은 항(anti)-향상 인자(EF, enhancement factor) 부분, 예를 들면 세포독성 작용에 관여하는 표면 단백질에 결합함으로써 표적 세포에 대한 면역 반응을 증가시키는 분자이다. "항-향상 인자 부분"은 항원이나 수용체 같은 특정 분자에 결합함으로써 Fc 수용체나 표적 세포 항원에 대해 결합 결정자(determinant)의 효과를 향상시키는 결과를 가져오는 항체나 기능적 항체 단편, 또는 리간드일 수 있다. "항-향상 인자 부분"은 Fc 수용체나 표적 세포 항원을 결합할 수 있다. 대신, 항-향상 인자 부분은 일차, 이차 결합 특이성이 결합하는 엔티티(entity)와는 다른 엔티티(entity)에 결합할 수 있다. 예를 들어, 항-향상 인자 부분은 세포독성의 T 세포(예를 들면, CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 등 표적 세포에 대한 면역 반응을 증가시키는 면역 세포)를 결합할 수 있다.

[0313] 일 구체예에서, 본 발명의 이중특이적, 다중특이적 분자들은 결합 특이성으로서 적어도 하나의 항체, 예를 들어, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 또는 단일 사슬 Fv 등을 포함한다. 이 항체는 또한 경쇄나 중연쇄 다이머(dimer), 또는 그것의 소수(minimal) 단편, 예를 들어 Fv나 Ladner et al., US 4,946,778에 묘사된 바와 같은 단일 사슬 구축물일 수도 있다. 항체는 또한 US2003/0118592 및 US 2003/0133939에서 설명된 바와 같이 결합 도메인 면역 글로불린 융합 단백질일 수도 있다.

[0314] 일 구체예에서, 본 발명의 이중특이적, 다중특이적 분자들은 효과기 세포의 표면에 존재하는 Fc-감마R이나 Fc-알파R에 대한 결합 특이성과, CLD18과 같은 표적 세포 항원에 대한 결합 특이성을 포함한다.

[0315] 일 구체예에서, Fc 수용체에 대한 결합 특이성은 모노클로날 항체에 의해 생산되며, 모노클로날 항체의 결합은 인간 면역 글로불린 G(IgG)에 의해 억제되지 않는다. 여기서 사용된 바와 같이, "IgG 수용체"는 염색체 1에 위치하는 8 감마-사슬 유전자 중 하나를 가리킨다. 이러한 유전자는 Fc-gammaRI (CD64), Fc-gammaRII (CD32), and Fc-gammaRIII (CD16)라는 세개의 Fc-감마 수용체 클래스로 구분되는 총 12개의 트랜스멤브레인 또는 가용성 수용체 아이소형태(isoform)를 코딩한다. 일 선호된 구체예에서, Fc-감마 수용체는 인간 고친화도 Fc-감마RI이다.

[0316] 이러한 선호되는 모노클로날 항체의 생산과 특징화는 Fanger et al에 의해 WO 88/00052 및 US 4,954,617에 설명되어 있다. 이 항체들은 Fc-gammaRI, Fc-gammaRII 또는 Fc-gammaRIII의 에피토프에 수용체의 Fc γ 결합 사이트와는 구별되는 사이트에서 결합되며, 따라서 그들의 결합은 IgG의 생리적 수준에 의해 실질적으로 차단되지 않는다. 본 발명에서 유용한 구체적 항-Fc-감마RI 항체들 mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 및 mAb 197 이다. 다른 구체예에서, 항-Fc γ 수용체 항체는 모노클로날 항체 22의 인간화된 형태(H22)이다. H22 항체의 생산과 특징화는Graziano, R. F. et al. (1995) J. Immunol. 155 (10): 4996-5002 및 WO 94/10332에 설명되어 있다. H22 항체 생성 세포주는 HA022CL1 지정하에 1992년 11월 4일 the American Type Culture Collection에 기탁되었으며, 수탁번호 CRL 11177 을 갖는다.

[0317] 다른 선호된 구체예에서, Fc 수용체에 대한 결합 특이성은 Fc-알파 수용체(Fc-알파RI (CD89))와 같이 인간 IgA 수용체에 결합하는 항체에 의해 제공된다. 이 인간 IgA 수용체의 결합은 오히려 인간 면역글로불린 A(IgA)에 의

해 차단되지 않는다. "IgA 수용체"라는 용어는 염색체 19에 위치한 하나의 알파-유전자(Fc-알파RI)의 유전 물질을 포함하려는 목적이다. 이 유전자는 55에서 110 kDa의 스플라이스된 몇몇 트랜스멤브레인 아이소형태들을 대안적으로 코딩하는 것으로 알려져 있다. Fc-알파RI(CD89)는 모노사이트/마크로파지(대식세포), 호산성 및 호중성 과립구에 구조적으로 발현되나, 비-효과기 세포군에는 발현되지 않는다. Fc-알파RI는 IgA1과 IgA2 모두에 중간 정도의 친화력을 갖는데, 이는 G-CSF나 GM-CSF(Morton, H. C. et al. (1996) *Critical Reviews in Immunology* 16: 423-440) 같은 사이토키네 노출될 경우 증가한다. 네 개의 Fc-알파RI 특이적 모노클로날 항체, 즉 A3, A59, A62, 그리고 A77는 IgA리간드 결합 도메인 밖에서 Fc-알파RI를 결합하며, 설명되어 있다 (Monteiro, R. C. et al. (1992) *J.Immunol.* 148: 1764).

[0318] Fc-알파RI와 Fc-감마RI는 본 발명에서의 사용에 선호되는 트리거(trigger) 수용체이다. 왜냐하면 이들은 (1) 주로 면역 효과기 세포, 예를 들어 모노사이트, PMNs, 대식세포, 수지상 세포 등에서 발현되며; (2) 높은 수준(예를 들어, 세포 당 5,000-100,000)으로 발현되고; (3) 세포독성 작용(예를 들어 ADCC, 식균작용)의 매개물질이며; (4) 그것의 표적이 되고 자기항원을 포함한 항원들의 향상된 항원 표시를 증대하기 때문이다.

[0319] 또다른 구체예에서, 이중특이적 분자는 상보적인 기능적 활성을 포함하는 본 발명에 따르면 두 가지 모노클로날 항체, 즉 CDC 유도에 의해 주로 작용하는 항체와 아포토시스를 유도해 주로 작용하는 항체로 구성된다.

[0320] 여기서 사용된 "효과기 세포 특이적 항체"라 함은 효과기 세포의 Fc 수용체를 결합하는 항체 혹은 기능적 항체 단편을 가리킨다. 본 발명에서 사용을 위해 선호된 항체는 효과기 세포의 Fc 수용체를 내생적 면역 글로불린에 의해 결합되지 않는 사이트에서 결합시킨다.

[0321] 여기에서 사용된 "효과기 세포"는 면역 반응의 인지적 및 활성화 단계에 반대되는 면역 반응의 효과기 단계에 관련된 면역 세포를 가리킨다. 대표적 면역 세포는 골수 또는 림프구 기원 세포, 예를 들어 림프구 세포(예를 들어 B 세포 및 세포용해성 T 세포(CTLs)를 포함하는 T세포, 살해 세포, NK 세포, 대식 세포, 모노사이트, 호산성 세포(eosinophils), 호중성 세포(neutrophils), 다형핵 세포, 과립성 세포, 비만 세포, 호염기성 세포(basophils))를 포함한다. 일부 효과기 세포는 특이적 Fc 수용체를 발현하고 특이적 면역 기능을 수행한다. 선호된 구체예에서, 예를 들어 ADCC를 유도할 수 있는 호중성 세포와 같이 효과기 세포는 ADCC를 유도할 수 있다. 예를 들어, FcR을 발현하는 모노사이트, 대식 세포는 표적세포의 특이적 치사에 관여하고, 면역체계의 다른 구성성분에 항원을 표시하거나 항원을 표시하는 세포에 결합하는 데 관여한다. 다른 구체예에서, 효과기 세포는 표적 항원, 표적 세포, 또는 미생물을 식균할 수 있다. 효과기 세포상에 특정 FcR의 발현은 사이토카인과 같은 체액(humoral) 인자에 의해 통제된다. 예를 들어, Fc-감마RI의 발현은 인터페론 감마(IFN- γ)에 의해 상승 통제되는 것으로 밝혀졌다. 이러한 향상된 발현은 Fc-감마RI를 포함하는 세포의 표적에 대한 세포 독성 작용을 증가시킨다. 효과기 세포는 표적 항원이나 표적 세포를 식균하거나 용해시킬 수 있다.

[0322] "표적 세포"는 본 발명의 항체의 표적이 될 수 있는 대상(예를 들어 인간 혹은 동물)의 바람직하지 않은 어떠한 세포도 의미한다. 선호된 구체예에서, 표적 세포는 CLD18을 발현 또는 과발현하는 세포이다. CLD18을 발현하는 세포는 전형적으로 종양 세포를 포함한다.

[0323] 본 발명의 이중특이적, 다중특이적 분자들은 화학적 기술(예를 들어 D. M. Kranz et al. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:5807를 참고)이나, "폴리도마" 기술들 (US 4,474,893, to Reading 참고), 재조합형 DNA 기술을 사용해 만들 수 있다.

[0324] 특히, 본 발명의 이중특이적, 다중특이적 분자들은 기술분야에서 알려진 방법을 사용해 예를 들어 항-FcR과 항-CLD18 결합 특이성과 같은 구성 결합 특이성을 활용해 만들 수 있다. 예를 들어, 이중특이적, 다중특이적 분자의 각각의 결합 특이성은 개별적으로 생산된 후 서로 결합될 수 있다. 결합 특이성이 단백질이나 펩타이드이면, 다양한 결합 및 교차결합 작용제가 공유 결합에 사용될 수 있다. 교차 결합 작용제의 예로는 단백질 A, 카르보디이미드, SATA(N-succinimidyl-S-acetyl-thioacetate), DTNB(5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)), oPDM(o-phenylenedimaleimide), SPDP(N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propanoate (SPDP)) 및 , 술포-SMCC(sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate(sulfo-SMCC)가 있다. (예컨대, Karpovsky et al. (1984) *J. Exp. Med.* 160: 1686; Liu, MA et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8648 참고). 다른 방법들로는, Paulus (Behring Ins. Mitt. (1985) No. 78,118-132), Brennan et al. (*Science* (1985) 229: 81-83), 그리고 Glennie et al. (*J. Immunol.* (1987) 139: 2367-2375)가 설명한 것들이 있다. 선호되는 콘주게이트 작용제로는 SATA와 술포-SMCC가 있으며, 이 둘은 Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)에서 입수할 수 있다.

[0325] 결합 특이성이 항체들일 때, 이들은 두 중연쇄의 C-말단 힌지 영역의 술폰드릴(sulfhydryl) 결합을 통해 결합될 수 있다. 특히 선호되는 구체예에서, 이 힌지 영역은 변형되어 결합 전에 홀수개의, 가능하면 한 개의, 술폰드릴 잔여물을 포함한다.

[0326] 대신, 두 결합 특이성은 같은 벡터에 코딩되고 같은 숙주 세포에서 발현되고 집합될 수 있다. 이 방법은 특히 이중특이적, 다중특이적 분자가 mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ 또는 리간드 x Fab 융합 단백질일 경우 유용하다. 본 발명의 이중특이적, 다중특이적 분자는, 예를 들어 이중특이적 분자의 경우, 하나의 단일 사슬 이중특이적 항체, 하나의 단일 사슬 항체와 결합 결정물로 구성된 단일 사슬 이중특이적 분자, 또는 두 개의 결합 결정물로 구성된 단일 사슬 이중특이적 분자와 같은 단일 사슬 분자일 수 있다. 이중특이적, 다중특이적 분자는 또한 단일 사슬 분자들이거나, 또는 적어도 두 개의 단일 사슬 분자로 구성될 수도 있다. 이중 및 다중특이적 분자들을 만드는 방법은 예를 들어 US 5,260,203; US 5,455,030; US 4,881,175; US 5,132,405; US 5,091,513; US 5,476,786; US 5,013,653; US 5,258,498; 및 US 5,482,858에 설명되어 있다.

[0327] 이중특이적, 다중특이적 분자들의 각각의 특이적 표적과의 결합은 ELISA, RIA, FACS 분석, 생물학적 어세이(예를 들어 성장 억제), 또는 웨스턴 블롯 어세이에 의해 확인할 수 있다. 이들 어세이들은 일반적으로 모두 해당 합성물 특이적인 표지된 시약(예를 들어 항체)을 사용해 특정 대상의 단백질-항체 복잡성의 존재를 검출한다. 예를 들어, FcR-항체 합성물들은 예를 들어 효소-연관 항체나 특히 항체-FcR 합성물을 인식하고 이에 결합되는 항체 단편을 사용해 검출할 수 있다. 대신, 이 합성물들은 다른 다양한 면역 어세이를 사용해 검출할 수 있다. 예를 들어, 항체는 방사성으로 표지되고, RIA어세이에서 사용될 수 있다(예를 들어 Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986를 보라). 이 방사성 동위 원소는 γ -카운터의 사용이나 신틸레이션 카운터, 혹은 방사능사진촬영에 의해 검출할 수 있다.

[0328] **II. 면역곤주게이트**

[0329] 또 다른 면에서, 본 발명은 세포독소, 약물(예를 들어 면역 억제약), 또는 방사성 동위원소와 같은 치료적 모이 어티나 작용제에 곤주게이트된 항-CLD18 항체를 특징으로 한다. 그러한 결합은 여기서 "면역곤주게이트"을 지칭한다. 하나 이상의 세포독소를 포함하는 면역곤주게이트는 "면역독소"를 가리킨다. 세포독소 또는 세포독성 작용제는 세포에 해롭거나 특히 세포를 살해시키는 모든 작용제를 포함한다. 그 예로는 택솔, 사이토크라신 B(cytochalasin B), 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴(emetine), 마이토마이신, 에토포시드(etoposide), 테노포시드(tenoposide), 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신(daunorubicin), 디히드록시 안트라신 디온(dihydroxy anthracin dione), 미토크산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-디히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 그리고 퓨로마이신과 이것들의 유사물 또는 동족물질을 포함한다.

[0330] 본 발명의 면역곤주게이트를 형성하기 위한 적절한 치료적 작용제는, 이것에 제한되는 것은 아니지만, 항대사산물(예컨대, 메토포레사트(methoptrexate), 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 플루다라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬레이팅 작용제(예컨대, 메크로레타민, 티오에파, 클로람부실, 멜파란, 카르무스틴(BSNU), 및 로무스틴(CCNU), 시클로포스파미드, 부셀판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C 및 시스-디클로로디아민 플라티넘 (II) (DDP) 시스플라틴), 안트라시클린(예컨대, 다우노루비신(이전에 다우노마이신)) 및 독소루비신), 항생제(예컨대, 닥티노마이신(이전에 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신(AMC), 및 항-미토틱 작용제(예컨대, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)를 포함한다. 일 선호된 구체예에서, 치료제는 세포 독성 작용제나 방사성 독성 작용제이다. 다른 구체예에서, 치료제는 면역억제제이다. 또 다른 구체예에서, 치료제는 GM-CSF이다. 선호된 구체예에서, 치료제는 독소루비신, 시스플라틴, 블레오마이신, 황산염, 카르무스틴, 클로람부실, 시클로포스파미드 또는 리신 A이다.

[0331] 본 발명의 항체는 또한 암과 같은 CLD-18과 관련된 질병을 치료하기 위해 요오드-131, 이트륨-90, 인듐-111과 같은 방사성 동위원소에 결합해 세포 독성 방사성 의약품을 생산할 수 있다. 본 발명의 항체 결합물은 해당 생물학적 반응을 변형시키는 데 사용될 수 있으며, 이 약물 모이어티는 전통적 화학 치료 작용제에 국한되는 뜻으로 해석되지 않는다. 예를 들어, 이 약물 모이어티는 바람직한 생물학적 작용을 억제하는 단백질이나 폴리펩타이드일 수 있다. 그러한 단백질에는 예를 들어 효소적 활성 독성, 또는 그것의 활성 단편인 아브린, 리신 A, 수도모나스 외독소, 디프테리아 독성; 중앙 괴사 인자나 인터페론- γ 와 같은 단백질; 또는 예를 들어 림포킨, 인터루킨-1("IL-1"), 인터루킨-2("IL-2"), 인터루킨-6("IL-6"), 과립성 대식세포 군집 자극 인자(GM-CSF), 과립성 군집 자극 인자(G-CSF) 또는 다른 성장 인자들을 비롯한 생물학적 반응 변형자들을 포함할 수 있다.

- [0332] 항체에 대한 그러한 치료적 물질을 결합하는 테크닉은 잘 알려져 있으며, 예를 들어 Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al.(eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982)를 보라.
- [0333] 추가적 구체예에서, 본 발명에 따르면 항체들은 링커-킬레이트 물질, 예를 들어 티우젝탄(tiuxetan)과 같이 항체가 방사성 동위원소에 결합할 수 있게 하는 물질에 결합된다.
- [0334] **III. 약학적 조성물**
- [0335] 또다른 면에서, 본 발명은 예를 들면 약학적 조성물과 같이 본 발명의 항체나 혹은 항체들의 조합을 포함하는 조성물을 제공한다. 이러한 약학적 조성물은 약학적으로 수용가능한 매개체나 희석액, 그리고 다른 알려진 아쥬반트 및 부형제를 사용해 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995에 개시된 통상적인 테크닉에 따라 제조할 수 있다. 일 구체예에서, 조성물은 본 발명의 다수의(예를 들면 두개나 그 이상의) 독립된 항체의 조합을 포함하는데, 이는 예를 들어 CDC 유도에 의해 주로 작용하는 하나의 항체를 아포토시스 유도에 의해 주로 작용하는 다른 항체와 결합시키는 것과 같은 다른 매커니즘에 따라 작용한다.
- [0336] 본 발명의 약학적 조성물은 또한 예를 들어 다른 작용제와 합쳐지는 것과 같은 조합 치료에서 투여될 수 있다. 예를 들어, 조합 치료는 본 발명과 적어도 하나의 항염 작용제나 면역억제 작용제와의 조성물을 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 그러한 치료적 작용제는 하나 이상의 항염 작용제, 예를 들면 스테로이드 약이나 NSAID를 포함한다. 선호되는 작용제는 예를 들면 아스피린 및 다른 살리실산염, 로펙콕시브(Vioxx)와 셀레콕시브(Celebrex) 등의 Cox-2 억제제, 이부프로펜(Motrin, Advil), 페노프로펜(Nalfon), 나프록센(Naprosyn), 슐린닥(Clinoril), 디클로페낙(Voltaren), 피록시캅(Feldene), 케토프로펜(Orudis), 디플루니살(Dolobid), 나부메톤(Relafen), 에토들락(Lodine), 옥사프로진(Daypro), 그리고 인도메사신(Indocin)과 같은 NSAIDs를 포함한다.
- [0337] 또 다른 구체예에서, 그러한 치료적 작용제는 낮은 투여량의 시클로포스파미드, 항-CTLA4 항체, 항-IL2, 또는 항-IL2-수용체 항체 등과 같은 조절 T 세포의 고갈(depletion) 또는 기능적 비활성화로 이어지는 작용제를 포함한다.
- [0338] 그러나 또다른 구체예에서, 그러한 치료적 작용제는 탁솔 유도체, 탁소테르, 젬시타빈, 5-플루오로우라실, 독소루비신(Adriamycin), 시스플라틴(Platinol), 시클로포스파미드(Cytoxan, Procytox, Neosar)와 같은 하나 이상의 화학치료요법제를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 항체는 종게는, 위, 식도, 췌장, 폐암 환자들에서 많은 치료 효험을 보이는 화학요법 작용제와 함께 투여할 수 있다.
- [0339] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 항체는 방사성 치료 및/또는 자가조직 말초 줄기 세포나 골수 이식과 병행하여 투여될 수 있다.
- [0340] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 항체는 항CD-25 항체, 항-EPCAM 항체, 항-EGFR, 항-Her2/neu, 그리고 항-CD40 항체에서 선택된 하나 이상의 항체와 함께 조합하여 투여될 수 있다.
- [0341] 또 다른 구체예에서, 보체 활성을 향상시키기 위해 본 발명의 항체는 항-C3b(i) 항체와 함께 조합하여 투여될 수 있다.
- [0342] 여기서 사용된 "약학적으로 허용가능한 담체"에는 모든 용매, 분산 미디어(media), 코팅, 항박테리아 및 항균 작용제, 등장 및 흡수지연 작용제, 그리고 생리적으로 용화가능한 유사물이 포함된다. 종게는, 담체는 정맥, 근육, 피하, 비경구, 척수, 상피 투여(예를 들어 주사나 주입에 의한)에 적합하다. 투여의 방법에 따라, 항체, 이종특이적 또는 다중특이적 분자와 같은 활성 화합물은 산이나 그 밖에 그 화합물의 작용을 저하시킬 수도 있는 다른 자연적 조건들로부터 화합물을 보호하기 위해 코팅될 수도 있다.
- [0343] "약학적으로 허용가능한 염"은 부모(parent) 화합물의 바람직한 생물학적 활성을 유지하면서 어떠한 바람직하지

않은 독소 효과(예를 들어 Berge, S. M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19 참고)를 첨가하지 않는 염을 가리킨다.

[0344] 그러한 염의 예에는 산 부가 염과 염기 부가 염이 포함된다. 산 부가 염에는 염화수소산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아인산, 그리고 다른 유사물과 같은 무독성 무기산 뿐 아니라 지방성 모노카르복시 및 디카르복시 산, 페닐치환된 알카노익 산, 수산기 알카노익 산, 방향족 산, 지방성 및 방향족 술폰산 및 그 유사물과 같은 무독성 유기산으로부터 유래된 염들이 포함된다. 염기 부가 염에는 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘, 그 밖의 유사물과 같은 알칼리토류 금속으로부터 유래된 그것들 뿐만 아니라 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로케인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로케인과 그 유사물을 비롯한 비독성 유기 아민으로부터 유래된 그것들도 포함된다.

[0345] 본 발명의 조성물은 기술분야에서 알려진 다양한 방법에 의해 투여될 수 있다. 당업자에 의해 인정되듯이, 투여의 방법 및 방식은 바람직한 결과에 따라 다양할 것이다. 활성 화합물은 주입, 경피성 패치, 마이크로캡슐 전달 체계 등을 포함하는 억제된 방출 조제와 같은 빠른 방출로부터 합성물을 보호할 담체와 함께 제조될 수 있다. 생분해가능한, 생체적합성 폴리머, 예를 들어, 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리인하이드라이드, 폴리글리콜릭산, 폴라겐, 폴리옥소에스텔, 폴리락티산이 사용될 수 있다. 그러한 제형들의 조제를 위한 방법들은 기술분야에 일반적으로 알려져있다. e.g., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978 참고.

[0346] 본 발명의 화합물을 특정 투여 방식에 의해 투여하기 위해서는 비활성화를 예방하기 위해 그 화합물을 다른 물질로 코팅하거나 다른 물질과 함께 투여할 필요가 있다. 예를 들어, 그 화합물을 예를 들면 리포솜이나 희석제와 같은 적절한 담체에 내에서 투여해야 한다. 약학적으로 허용가능한 희석제에는 식염수나 수성 완충 용액이 있다. 리포솜에는 수중유중수적(water-in-oil-in-water) CGF 에멀전과 전통적인 리포솜이 있다(Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7: 27).

[0347] 약학적으로 허용가능한 담체들은 살균 수용액 또는 분산액, 및 살균 투여가능 용액 또는 분산물의 임시적 조제를 위한 살균 파우더를 포함한다. 약학적으로 활성의 물질로 그러한 매개물이나 작용제를 사용하는 것은 기술분야에서는 알려져 있다. 다만 모든 전통적인 미디어(media)나 작용제가 그 활성 화합물과 배합 금지인(incompatible) 경우를 제외하고, 본 발명에서 약학적 화합물에 그러한 사용은 심사숙고된다. 보충하는 활성 화합물도 또한 그러한 조성물들에 혼합될 수 있다.

[0348] 치료적 조성물은 전형적으로 반드시 제조나 보관 조건에서 있어 살균이고 안정적이어야 한다. 이 조성물은 용액, 마이크로에멀전, 리포솜, 또는 다른 고 약물 농도에 적합한 질서 구조로 제조될 수 있다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액상 폴리에틸렌 글리콜, 및 유사물) 등을 포함하는 용매나 분산 매개물일 수 있으며 그러한 것들의 적합한 화합물일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어 레시틴 등의 코팅 사용이나 분산의 경우에는 필요한 입자 크기 유지에 의해, 또는 계면 활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우, 조성물 안의 예를 들어 설탕, 만니톨, 소르비톨과 같은 폴리알코올, 또는 소듐 염화물 폴리알코올과 같은 등장 작용제를 포함하는 것이 선호될 것이다. 주입가능한 조성물의 흡수 지연은 조성물에 예를 들어 모노스테아레이트 염이나 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 작용제를 포함시킴으로써 가능하다.

[0349] 살균 투입가능 용액은 필요한 양 내의 활성 화합물을 위에서 열거한 성분 중 하나나 혹은 조합으로 이루어진 적절한 용매에 혼합하여 만든 다음, 살균 마이크로필트레이션 하여 제조될 수 있다.

[0350] 일반적으로, 분산물은 활성 화합물을 염기성 분산 매개물과 위에서 열거한 다른 필요한 성분을 포함하는 살균 비히클에 혼합함으로써 만들 수 있다. 살균 투입가능 용액의 조제를 위한 살균 파우더의 경우, 선호되는 조제 방식은 이전에 살균 필터된 용액으로부터 어떠한 추가적 바람직한 구성성분에 더해 활성 성분의 파우더를 만들어내는 진공 건조나 동결 건조이다.

[0351] 투약요법은 최적의 바람직한 반응(예를 들면 치료적 반응)을 제공하기 위해 조절된다. 예를 들어, 하나의 큰 환약을 투여할 수도 있으며 시간을 두고 여러번 나누어 투약할 수도 있고 치료 상황의 급박성에 따라 1회 투여량을 비율적으로 줄이거나 늘릴 수 있다. 투약의 용이성과 투약량의 균일성을 위해 투약 제형 단위를 비경구성 약제로 조제하는 것이 특히 유리하다. 여기서 투약 제형 단위는 대상의 치료를 위한 단일 투약에 적합하게 물리적으로 분리된 단위를 가리키며, 각각의 단위는 필요한 약학적 담체와 관련되어 바람직한 치료적 효과를 생산할 수 있도록 계산된 활성 약품의 선결정된 양을 포함한다. 본 발명의 투약 제형 단위에 대한 명세는 (a) 활성 화합물의 독특한 특징과 달성될 특정 치료적 효과와 (b) 개인의 자극 반응성을 다루기 위한 그러한 활성 약품을 화

합하는 기술에 내재된 한계에 의해, 그리고 직접적으로 의존되어 지시된다.

- [0352] 약학적으로 허용가능한 산화방지제의 예들은 다음을 포함한다: (1)아스코르브산, 시스테인 히드로클로라이드, 소듐 중황산염, 소듐 메타중황산염, 소듐 아황산염 및 유사물을 비롯한 수용성 산화방지제; (2)아스코빌 팔미테이트, 부틸 히드록시아니솔(BHA), 부틸 히드록시톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필 갈라트, 알파-토코페롤, 및 유사물을 비롯한 유성 산화방지제; (3)구연산, EDTA(ethylenediamine tetraacetic acid), 소르비톨, 타르타르산, 인산, 및 유사물을 비롯한 금속 킬레이트제.
- [0353] 치료적 조성물을 위해, 본 발명의 제형들은 구강, 비강, 국소(topical) (볼 또는 설하를 포함하는), 직장, 질, 및/또는 비경구(parenteral) 투여에 적합한 제형을 포함한다. 제형은 유닛 투약 형태로 편리하게 존재할 수 있고, 약학 분야에 알려진 방법에 의해 제조될 수 있다. 단일 투약 형태를 생산하기 위한 담체 물질과 결합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료되는 대상과 투여의 특별한 모드에 따라 변화할 것이다. 단일 투약 형태를 생산하기 위한 담체 물질과 결합될 수 있는 상당한 양의 활성 성분은 일반적으로 치료적 효과를 생산하는 조성물의 양일 것이다.
- [0354] 일반적으로, 100% 중에서, 이 양은 활성 성분의 약 0.01 퍼센트에서 99퍼센트, 총계는 약 0.1부터 70퍼센트, 가장 좋게는 1 퍼센트부터 30 퍼센트의 범위일 것이다.
- [0355] 질 투여에 적절한 본 발명의 제형들은 기술분야에서 적절하다고 알려진 담체들을 포함하는 페서리(pessaries), 탐폰, 크림, 젤, 페이스트들, 폼(foam), 또는 스프레이 제형들을 또한 포함한다. 본 발명의 국소 또는 경피성 투여를 위한 투약 형태들은 분말, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 용액, 패치 및 흡입제들을 포함한다. 활성 화합물은 약학적으로 허용가능한 담체, 그리고 필요로하는 임의의 보존제, 완충액, 또는 추진제(propellant)와 살균 조건하에서 혼합될 수 있다.
- [0356] 여기에 사용된 바와 같은 "비경구(parenteral) 투여" 및 "비경구적으로 투여되는"이라는 어구는 일반적으로 주사에 의해 장 및 국소적 투여가 아닌 투여 모드를 의미하고, 제한없이, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척수내(intrathecal), 낭내(intracapsular), 안와내(intraorbital), 심장내, 피내(intradermal), 복막내, 경기관(transtracheal), 피하(subcutaneous), 서브큐티쿨라(subcuticular), 관절내, 서브캡슐라(subcapsular), 서브아라크노이드(subarachnoid), 척수강내(intraspinal), 경막밖의(epidural) 및 흉골내(intrasternal) 주사 및 주입을 포함한다.
- [0357] 본 발명의 약학적 조성물에 구현될 수 있는 적절한 수성 및 비수성 담체들의 예들은 물, 에탄올, 폴리올(글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 및 그 유사종과 같이), 그리고 그것의 적절한 혼합물, 올리브 오일을 비롯한 식물유, 그리고 에틸 올레이트를 비롯한 주사가능한 유기 에스터들을 포함한다. 적절한 유동성은 예컨대, 레시틴을 비롯한 코팅 물질의 사용에 의해, 분산의 경우에 필요로하는 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 이용에 의해 유지될 수 있다.
- [0358] 이러한 조성물들은 보존제, 습윤제, 에멀전화제, 및 분산제를 비롯한 아쥘란트들을 또한 포함할 수 있다. 미생물들의 존재 예방은 살균 과정에 의해서 그리고, 예컨대, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르빅산, 및 그 유사종 같은 다양한 항박테리아 및 항곰팡이제의 포함에 의해 보장될 수 있다. 또한, 설탕, 염화나트륨과 같은 등장 작용제를 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 추가적으로, 주입가능한 약학적 형태의 연장된 흡수는 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 비롯한 흡수를 지연하는 작용제의 혼합에 의해 일어날 수 있다.
- [0359] 일 구체예에서, 본 발명의 모노클로날 항체들은 피하 주사에 의한 결정 형태에서 투여될 수 있다, Yang et al. (2003) PNAS, 100 (12): 6934-6939 참고. 본 발명의 화합물이 약제로써 인간 및 동물들에게 투여될 때, 그것들은 예컨대, 약학적으로 허용가능함 담체와 함께 조합하여 예컨대, 활성 성분의 0.01 내지 99.5% (더 좋게는, 0.1 내지 90%)를 포함하는 약학적 조성물로서 또는 단독으로 주어질 수 있다.
- [0360] 선택된 투여 경로 고려함 없이, 본 발명의 화합물은 적절히 수화된 상태에서 사용가능하고/거나 본 발명의 약학적 조성물에서 사용가능하고, 이것은 기술분야 당업자에게 알려진 통상의 방법에 의한 약학적으로 허용가능한 투약 형태로 조제될 수 있다.
- [0361] 본 발명의 약학적 조성물 내에 활성 성분의 실제 투약 수준은 환자에게 독성없이, 투여 모드, 조성물, 특별한 환자의 소망되는 치료적 반응을 성취하는데 유효한 활성성분 상당한 양을 얻기 위해 변화가능하다. 선택된 투약 수준은/ 구현되는 본 발명의 특별한 조성물의 활성, 투여 경로, 투여시간, 구현되는 특별한 화합물의 배설물, 치료의 지속, 다른 약물들, 화합물들, 및/또는 구현되는 특별한 조성물과 조합하여 사용되는 물질들, 치료되는 환자의 나이, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강 및 이전 의학적 히스토리, 그리고 의학 기술분야에 알려진 유사

인자들을 비롯한 다양한 약물동력학적 요소에 의해 좌우될 것이다.

- [0362] 기술분야에서 일반적인 지식을 가진 의사 또는 수의사는 필요로하는 약학적 조성물의 유효량을 쉽게 결정하고 처방할 수 있다. 예컨대, 의사 또는 수의사는 소망하는 치료적 효과를 달성하기 위해 필요로하는 수준보다 낮은 수준에서 약학적 조성물에 구현되는 본 발명의 화합물의 투여량으로 시작할 수 있고, 소망하는 효과가 달성될 때까지 투약을 점차적으로 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 조성물의 적절한 일일 투여량은 치료적 효과를 생산하기 위해 유효한 가장 낮은 투여량인 화합물의 양일 것이다. 그러한 유효 투여량은 상기 기재된 인자들상에서 일반적으로 좌우될 것이다. 투여는 정맥내, 근육내, 복막내, 또는 피하, 종게는 표적의 사이트에 근접하여 투여될 수 있는 것이 바람직하다. 소망한다면, 치료적 조성물의 유효한 일일 투여량은 하루에 걸쳐 적절한 간격으로 분리하여 2, 3, 4, 5, 6 이상의 서브-투여량으로, 임의적으로 유닛 투여 형태로 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물이 단독으로 투여되는 것이 가능하지만, 약학적 제형(조성물)으로써 화합물을 투여하는 것이 바람직하다.
- [0363] 일 구체예에서, 본 발명의 항체들은 독성 부작용을 막기 위해, 주입, 종게는 24시간 이상과 같은 긴 기간 이상 느끼고 연속적인 주입에 의해 투여될 수 있다. 이러한 투여는 2 내지 12시간을 비롯한 2 내지 24시간들의 기간 이상 연속적인 주입에 의해 또한 수행될 수 있다. 그러한 요법은 예컨대, 6개월 또는 12개월 후에 필요로써 하나 또는 그 이상의 횟수들로 반복될 수 있다. 그 투여량은 항-CLD18 항체들을 표적하는 항-유전자형(anti-idiotypic) 항체들을 사용함에 의한 생물학적 시료내 투여상에 있어서 순환하는 모노클로날 항-CLD18 항체들의 양을 측정함에 의해 결정되거나 조절될 수 있다.
- [0364] 또 다른 구체예에서, 항체들은 예컨대, 6개월 또는 그 이상의 기간에 1주일에 한번과 같은 유지 치료에 의해 투여된다.
- [0365] 또 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 항체들은 CLD18에 대한 항체의 하나의 주입, 그 다음으로 방사성동위원소와 콘쥬게이트된 CLD18에 대한 항체의 주입을 포함하는 요법에 의해 투여될 수 있다. 요법은 예컨대, 7 내지 9일 후에 반복될 수 있다.
- [0366] 치료적 조성물들은 기술분야에 알려진 의학적 장치들로 투여될 수 있다. 예컨대, 일 선호된 구체예에서, 본 발명의 치료적 조성물은 US 5,399,163; US 5,383,851; US 5,312,335; US 5,064,413; US 4,941,880; US 4,790,824; 또는 US 4,596,556에 기재된 장치들을 비롯한 바늘없는 피하 주사 장치로 투여될 수 있다. 본 발명에 유용한 잘 알려진 임플란트들 및 모듈들은 다음에 기재된 것들을 포함한다: US 4,487,603는 조절된 비율로 약제를 조제하기 위한 이식가능한 미세-주입 펌프 개시 US 4,486,194는 피부를 통한 약제의 투여를 위한 치료적 장치를 개시 US 4,447,233은 정확한 주입 비율로 약제를 전달하기 위한 약제 주입 펌프를 개시 US 4,447,224는 연속적인 약물 전달을 위한 변화가능한 플로우 이식가능한 주입 장치를 개시 US 4,439,196은 멀티-챔버 구획들을 가지는 삼투성 약물 전달 시스템을 개시 및 US 4,475,196은 삼투성 약물 전달 시스템을 개시.
- [0367] 많은 다른 그러한 임플란트(implant)들, 전달 시스템, 및 모듈들은 기술분야의 당업자에게 알려져 있다. 임의의 구체예에서, 본 발명의 항체들은 생체 내 적절한 분배를 보장하기 위해 제조될 수 있다. 예컨대, 혈액-뇌 장벽(BBB)은 많은 수의 매우 친수성인 화합물들을 배제한다. BBB (소망한다면)를 가로지르도록 본 발명의 치료적 화합물을 보장하기 위해서는, 그것들은 예컨대, 리포솜에서 제조될 수 있다. 리포솜 제조 방법을 위해, 예컨대, US 4,522,811; US 5,374,548; 및 US 5,399,331 참고. 리포솜은 특정 세포들 또는 기관들에 선택적으로 운송되고, 그리하여 표적화된 약물 전달을 증강시키는 하나 이상의 모이어티들을 포함할 수 있다 (예컨대, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29: 685 참고). 대표적인 표적 모이어티들은 폴레이트(folate) 또는 바이오틴 (예컨대, US 5,416,016 to Low et al. 참고); 만노시드(Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1038); 항체들 (P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357: 140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39: 180); 및 계면활성제 단백질 A 수용체 (Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233: 134)를 포함한다.
- [0368] 본 발명의 일 구체예에서, 본 발명의 치료적 화합물은 리포솜(liposome)에서 조제될 수 있다. 일 선호된 구체예에서, 리포솜은 표적 모이어티(moiety)를 포함한다. 일 가장 선호된 구체예에서, 그 리포솜 내에 치료적 화합물들은 소망하는 지역, 예컨대 종양의 사이트에 근접한 사이트에 볼러스(bolus) 주사에 의해 전달될 수 있다. 그 조성물은 쉽게 주사될 수 있는 유동성있는 상태로 존재해야만 한다. 그것은 제조 및 저장 조건 하에서 안정해야만 하고, 박테리아 및 곰팡이를 비롯한 미생물들의 오염 작용에 대하여 보존되어야만 한다.
- [0369] 일 추가적인 구체예에서, 본 발명의 항체들은 태반을 가로지르는 운송을 예방하거나 줄이기 위해 제조될 수 있

다. 이것은 기술분야에 알려진 방법들, 예컨대, 항체들의 페그화에 의해 또는 F(ab)₂' 단편들의 사용에 의해 행해질 수 있다.

[0370] 추가적인 참고는 "Cunningham-Rundles C, Zhuo Z, Griffith B, Keenan J. (1992) Biological activities of polyethylene-glycol immunoglobulin conjugates. Resistance to enzymatic degradation. J. Immunol. Methods, 152: 177-190; and to "Landor M. (1995) Maternal-fetal transfer of immunoglobulins, Ann. Allergy Asthma Immunol. 74: 279-283"로부터 만들어질 수 있다.

[0371] 종양 치료를 위한 "치료적으로 유효한 투약량(dosage)"은 완전 또는 부분적인 목적 종양 반응들에 의해 측정될 수 있다. 완전 반응 (CR)은 질병의 아무런 임상적, 방사선적 또는 다른 증거들이 없는 것으로 규정된다. 부분적 반응 (PR)은 50% 이상의 총 종양 크기에 감소에 기인한다. 진행에 대한 중간 시간(median time)은 목적 종양 반응의 내구성(durability)을 특징화하는 측정값이다.

[0372] 종양 치료를 위한 "치료적으로 유효한 투약량(dosage)"는 질병의 진행을 안정화하기 위한 능력에 의해 또한 측정될 수 있다. 암을 억제하기 위한 화합물의 능력은 인간 종양들에서의 효능을 예측하는 동물 모델 시스템에서 평가될 수 있다. 다르게는, 조성물의 이러한 특징은 당업자에게 알려진 시험관 내 어세이에 의해 세포 성장 또는 아포토시스를 억제하기 위한 화합물의 능력의 조사에 의해 평가될 수 있다. 치료적으로 유효한 양의 치료 화합물은 종양 크기를 감소시킬 수 있거나 그렇지 않으면 대상 내에 증상을 개선시킬 수 있다. 기술분야의 당업자는 대상의 크기, 대상 증상의 심한정도, 및 특별한 조성물 또는 선택되는 투여 경로를 비롯한 인자들에 기초한 양들을 결정할 수 있다.

[0373] 조성물은 살균되어야 하고, 조성물이 주사기에 의해 전달될 수 있는 범위의 유동성이어야 한다. 물에 더하여, 담체는 등장성 완충 식염수, 에탄올, 폴리올 (예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜, 및 그 유사종), 그리고 적절한 그 혼합물일 수 있다. 적절한 유동성은 예컨대, 레시틴을 비롯한 코팅을 이용하여, 분산의 경우에 필요로하는 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우에, 등장성 작용제, 예컨대, 조성물 내에 당, 만니톨 또는 솔비톨을 비롯한 폴리알콜, 그리고 염화 나트륨을 포함하는 것이 바람직하다. 주입가능한 조성물들의 긴 기간의 흡수는 조성물 내에 흡수를 지연하는 작용제, 예컨대, 알루미늄 모노스테아레이트, 또는 젤라틴을 포함시킴에 의해 일어날 수 있다.

[0374] 상기 개시된 바와 같이, 활성 화합물이 적절히 보호될 때, 화합물은 경구 투여, 예컨대, 비활성 희석제 또는 동화할 수 있는 식용가능한 담체로 경구투여 될 수 있다.

[0375] **IV. 본 발명의 용도 및 방법**

[0376] 본 발명의 항체들 (면역곤주계이트, 이중특이성/다중특이성, 조성물 및 여기에 기재된 다른 유도체들을 포함하는)은 CLD18을 발현하는 세포들과 관련된 질환들을 치료하는데 관련된 많은 수의 치료적 유틸리티(utility)를 가진다. 예컨대, 항체들은 예컨대, 시험관 내 또는 생체 외에서의 배양에서 세포들에게 또는 여기에 기재된 것들을 비롯한 다양한 질환들을 치료 또는 예방하기 위해 예컨대 생체 내, 인간 대상에게 투여될 수 있다. 여기에서 사용된 바와 같이, "대상"이라는 용어는 CLD18에 대한 항체들에 반응하는 인간 및 비인간 동물들을 포함하는 것으로 생각된다. 선호된 대상들은 질병걸린 세포들, 특히 정상 세포들과 비교되는 CLD18의 변경된 발현 패턴에 의해 특징되는 세포들을 살해시킴으로써 고쳐지거나 개선될 수 있는 질환들을 가진 인간 환자들을 포함한다.

[0377] 여기에 논의되는 치료들에서 치료적 효과는 좋게는, 예컨대, 보체 의존성 세포독성 (CDC) 매개 용해, 항체 의존성 세포독성 (ADCC) 매개 용해, 아포토시스, 동형 부착 및/또는 식세포작용에 의해, 좋게는, CDC 매개 용해 및/또는 ADCC 매개 용해를 유도하는 것에 의해 세포들의 살해를 매개하는 본 발명의 항체들의 기능적 특징들을 통해 이뤄질 수 있다.

[0378] 예를 들어, 일 구체예에서, 본 발명의 항체들은 예컨대, 위암을 포함하는 CLD18 발현 종양 세포들의 존재에 의해 특징되는 질환들인 종양성 질환들이 있는 대상을 치료하는데 사용될 수 있다. 치료되고/거나 예방될 수 있는 종양성 질병의 예들은, 위암, 식도암, 췌장암, 폐암, 난소암, 유방암, 대장암, 간암, 담낭암 및 두경부암을 포함하는 종양들 및 모든 CLD18 발현 암들을 포함한다. 이러한 암들은 초기, 중기 또는 예컨대 전이와 같은 발달된 단계(advanced stage)일 수 있다.

[0379] 본 발명에 따라 기재된 치료 방법 및 약학적 조성물은 여기에 개시된 질병을 예방하기 위한 면역화 또는 백신접종(vaccination)을 위해 또한 사용될 수 있다.

[0380] 다른 구체예에서, 본 발명의 항체들은 CLD18 또는 CLD18의 특별한 형태들의 수준(level) 또는 그 막 표면상에

CLD18을 포함하는 세포들의 수준을 검출하는데 사용될 수 있고, 그 수준은 그래서 상기 기재된 바와 같은 임의의 질병 또는 질병 징후와 연결될 수 있다. 다르게는, 항체들은 CLD18 발현 세포들의 기능과 상호작용 또는 고갈시키는데 사용될 수 있고, 그것에 의해 질병의 중요한 매개자로서 이러한 세포들이 연관된다. 이것은 항체와 CLD18 사이에 복합체의 형성을 허용하는 조건하에서 항-CLD18 항체와 시료 및 대조군 시료를 접촉하는 것에 의해 이뤄질 수 있다. 항체와 CLD18 사이에 형성된 임의의 복합체들은 검출되고 시료 및 대조군 시료, 즉 참조 시료 내에서 비교된다.

- [0381] 본 발명의 항체들은 시험관 내 치료적 또는 진단적 용도들과 관련된 그 결합 활성을 위해 우선 시험될 수 있다. 예컨대, 항체들은 여기에 기재된 바와 같이 플로우 사이토메트리 어세이를 이용하여 시험될 수 있다.
- [0382] 또한, CLD18을 발현하는 세포들의 살해 및/또는 성장을 억제하는 적어도 하나의 효과기-매개된 효과기 세포 활성을 일으키는데 있어서 항체들의 활성은, 어세이(assay)될 수 있다. 예컨대, CDC 및/또는 아포토시스를 일으키기 위한 항체들의 능력은 어세이될 수 있다. CDC, 동형(homotypic) 부착, 분자 클러스터링 또는 아포토시스용 어세이를 위한 프로토콜은 여기에 개시된다.
- [0383] 본 발명의 항체들은 생체 내 또는 시험관 내 하나 이상의 다음의 생물학적 활성들을 이끌어내는데 사용될 수 있다: CLD18을 발현하는 세포의 성장 및/또는 분화를 억제하는 활성; CLD18을 발현하는 세포들을 살해하는 활성; 효과기 세포들의 존재하에서 CLD18을 발현하는 세포의 ADCC 또는 식세포작용을 매개하는 활성; 보체 존재하에서 CLD18을 발현하는 세포의 CDC를 매개하는 활성; CLD18을 발현하는 세포들의 아포토시스를 매개하는 활성; 동형(homotypic) 부착을 유도하는 활성; 및/또는 CLD18에 결합하는 지질 래프트(raft)로의 전좌를 유도하는 활성.
- [0384] 일 특별한 구체예에서, 항체들은 다양한 CLD18-관련된 질병들을 치료, 예방 또는 진단하기 위해 생체 내 또는 시험관 내에서 사용될 수 있다. CLD18-관련된 질병들의 예들은 다른 것들 중에서, 위암, 췌장암, 식도암, 폐암 및 상기 리스트된 것들로서 암들을 포함한다.
- [0385] CLD18A2는 또한 분화된 정상 위세포들에서 발현될 수 있다. 이러한 세포들의 살해에 의한 가능한 항체 유도된 임상 부작용들은 안타시드(antacida)를 비롯한 위 보호 약물 또는 오메프라졸을 비롯한 위 양성자 펌프의 억제 또는 관련된 약물들의 평행 투여에 의해 감소되거나 막을 수 있다.
- [0386] 본 발명의 항체 조성물들을 생체 내 및 시험관 내에서 투여하는 적절한 경로는 기술분야에 잘 알려져있고, 당업자에 의해 선택될 수 있다.
- [0387] 상기 기재된 바와 같이, 본 발명의 항-CLD18 항체들은 하나 이상의 치료제, 예컨대, 세포독성제, 방사성독성제, 항신생혈관제 또는 본 발명의 항체들에 대한 면역 반응 유도를 줄이는 면역억제제로 공동-투여될 수 있다. 항체는 작용제와 연결될 수 있거나 (면역복합체로써), 작용제와 분리하여 투여될 수 있다. 후자의 경우 (분리 투여), 항체는 전, 후 또는 작용제와 동시에 투여될 수 있고, 다른 알려진 치료법들 예컨대, 항암 치료법 예컨대, 방사능과 함께 공동-투여될 수 있다. 그러한 치료제들은 상기 리스트된 바와 같은 항-종양제(anti-neoplastic agents), 다른 것들 중에서 포함될 수 있다. 본 발명의 항-CLD18 항체들과 화학치료제들과의 공동-투여는 종양 세포들에게 세포독성 효과를 생산하는 상이한 메커니즘들을 통해 작동하는 두개의 항암제를 제공한다. 그러한 공동-투여는 약물에 내성의 발달 또는 종양 세포들이 항체에 반응하지 않도록하는 종양 세포들의 항원성(antigenicity)에있어서 변화로 인한 문제들을 해결할 수 있다.
- [0388] 본 발명의 다른 구체예에서, 항체가 투여되는 대상은 VEGF 또는 VEGFR을 표적으로 하는 항체들을 포함하는 항혈관신생제 또는 신생혈관형성을 억제하는 하나 이상의 화학적 화합물들로 추가적으로 처리될 수 있다. 이러한 약물들로의 전처리 또는 평행 적용(application)은 대량의 종양들에서 항체들의 투과성을 개선시킬 수 있다.
- [0389] 본 발명의 다른 특별한 구체예에서, 항체가 투여되는 대상은 EGFR 수용체에 결합하는 모노클로날 항체들 뿐만 아니라 EGFR, Her1 또는 Her2/neu 수용체에 의해 개시되는 시그널링을 억제하는 화학적 화합물들을 함유하는 성장인자 수용체 시그널링을 억제하는 화합물로 추가적으로 처리될 수 있다.
- [0390] 표적-특이성 효과기 세포들, 예컨대, 본 발명의 조성물들(예컨대, 항체들, 다중특이성 및 이중특이성 분자들)에 연결된 효과기 세포들은 치료제로써 또한 사용될 수 있다. 표적화를 위한 효과기 세포들은 마크로파지, 뉴트로필 또는 모노사이트를 비롯한 인간 백혈구일 수 있다. 다른 세포들은 호산구(eosinophils), 자연살해세포들 및 세포들을 베어링(bearing)하는 다른 IgG- 또는 IgA-수용체를 포함한다. 소망한다면, 효과기 세포들은 처리되는 대상들로부터 수득될 수 있다. 표적-특이성 효과기 세포들은 생리학적으로 수용가능한 용액에서 세포들의 현탁액으로써 투여될 수 있다. 투여되는 세포들의 수는 대략 10^8 내지 10^9 일 수 있지만, 치료 목적에 따라 변화할 수

있을 것이다. 일반적으로, 표적 세포, 예컨대, CLD18을 발현하는 종양 세포에서 국소화를 얻고, 예컨대, 식세포 작용에 의해 살해하는 효과기 세포들을 얻기 위해서 그 양은 충분할 것이다. 투여 경로는 또한 변화가능하다.

- [0391] 표적-특이성 효과기 세포들로 치료는 표적화된 세포들의 제거를 위한 다른 기술들과 함께 수행될 수 있다. 예컨대, 본 발명의 조성물들 및/또는 이러한 조성물들로 동반된(armed) 효과기 세포들을 사용하는 항-종양 치료법은 화학적 치료요법과 함께 사용될 수 있다. 추가적으로, 조합 면역치료법은 종양 세포 거부를 향한 두개의 구별되는 세포독성 효과기 집단들을 지시하는데 사용될 수 있다. 예컨대, 항-Fc-RI 또는 항-CD3 연결된 항-CLD18 항체들은 IgG- 또는 IgA-수용체 특이적 결합제와 함께 사용될 수 있다.
- [0392] 본 발명의 이중특이성 및 다중특이성 분자들은 세포 표면 상에서 수용체들을 캡핑하고 제거하는 것에 의해서와 같이 효과기 세포들 상에 Fc-감마R 또는 Fc-알파R 수준을 조절하는데 사용될 수 있다. 항-Fc 수용체들의 혼합물들은 이러한 목적을 위해 또한 사용될 수 있다.
- [0393] 보체와 결합하는 IgG1, -2, 또는 -3 또는 IgM으로부터의 부분을 비롯한 보체 결합 사이트들을 가지는 본 발명의 조성물 (예컨대, 항체들, 다중특이성 및 이중특이성 분자들 및 면역콘주게이트들)은 또한 보체의 존재하에서 사용될 수 있다. 일 구체예에서, 표적세포를 포함하는 세포 집단의 본 발명의 결합제와 적절한 효과기 세포들로의 생체 외 처리는 보체 또는 보체를 함유한 혈청의 추가에 의해 보충될 수 있다. 본 발명의 결합제로 코딩된 표적 세포들의 식세포 작용은 보체 단백질의 결합에 의해 개선될 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물로 코딩된 표적 세포들은 보체에 의해 용해될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물들은 보체를 활성화하지 않는다.
- [0394] 본 발명의 조성물들은 또한 보체와 함께 투여된다. 따라서, 본 발명의 범위내에서는 항체들, 다중특이성 또는 이중특이성 분자들 및 혈청 또는 보체가 그 범위내이다. 이러한 조성물들은 보체가 항체들, 다중특이성 또는 이중특이성 분자들과 가까이 근접한 곳에 위치된다는 점에서 잇점이 있다.
- [0395] 다르게는, 본 발명의 항체들, 다중 특이성 또는 이중특이성 분자들과 보체들 또는 혈청은 분리하여 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물과 표적 세포들과의 결합은 세포막의 지질 래프트 내로 CLD18 항원-항체 복합체의 전좌를 일으킨다. 그러한 전좌는 효율적으로 CDC를 활성화하고/거나 증강시킬 수 있는 높은 밀도의 항원-항체 복합체들을 생성한다.
- [0396] 또한, 본 발명의 범위내에서는 본 발명의 항체 조성물(예컨대, 항체들 및 면역콘주게이트들)을 포함하는 키트 및 사용을 위한 지시가 있다. 키트는 세포독성제 또는 방사성독성제, 면역억제제를 비롯한 하나 이상의 추가적인 시약들, 또는 하나 이상의 추가적인 본 발명의 항체들 (예컨대, 상보적 활성을 가지는 항체)을 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0397] 따라서, 본 발명의 항체 조성물로 치료된 환자들에게 본 발명의 항체들의 치료적 효과를 증강시키거나 증대시키는 세포독성제 또는 방사성독성제를 비롯한 다른 치료적 작용제가 추가적으로 투여(본 발명의 항체 투여 전, 동시에, 또는 후에)될 수 있다.
- [0398] 다른 구체예에서, 대상은 추가적으로 예컨대, Fc-감마 또는 Fc-알파 수용체의 활성 또는 발현을 예컨대, 사이토카인을 대상에 처리함으로써 조절하는, 예컨대, 증가시키거나 억제하는 작용제로 추가적으로 처리될 수 있다. 선호되는 사이토카인은 과립구 콜로니 자극인자 (G-CSF), 과립구-마크로파지 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 인터페론- γ (IFN- γ), 및 종양 괴사 인자(TNF)를 포함한다. 여기에 개시된 항체들 및 약학적 조성물들의 치료적 효능을 증가시키기 위한 다른 중요한 작용제는 가지있는 글루코스 잔기의 호모폴리사카라이드이고 다양한 식물 및 미생물, 예컨대, 박테리아, 조류, 곰팡이, 효모 및 곡물에 의해 생산되는 β -글루칸이다. 유기체에 의해 생산된 β -글루칸의 단편들 또한 사용될 수 있다. 총계는, β -글루칸은 β (1,3)의 폴리머로, 적어도 몇몇의 뼈대(backbone) 글루코스 유닛, 예컨대, 뼈대 글루코스 유닛의 3-6%는 β (1,6) 가지들을 비롯한 가지들을 가지고 있다.
- [0399] 특별한 구체예에서, 본 발명은 시료 내에 CLD18 항원의 존재를 검출하거나, CLD18 항원의 양을 측정하기 위한 방법을 제공하는 것으로, 항체 또는 그 부분 및 CLD18 사이에 복합체의 형성을 허용하는 조건하에서, CLD18과 특이적으로 결합하는 항체를 시료 및 대조군 시료와 접촉하는 단계를 포함한다. 복합체의 형성은 그리고나서 검출되고, 대조군 시료와 비교하여 시료 사이에 복합체 형성 차이는 시료 내에 CLD18 항원의 존재를 나타낸다.
- [0400] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 생체 내 또는 시험관 내 CLD18-발현하는 세포의 양을 정량하거나 존재를 검출하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 (i) 검출가능한 마커와 콘주게이트된 본 발명의 조성물을 대상에 투여하

는 단계 (ii) CLD18-발현 세포를 포함하는 영역을 확인하기 위한 상기 검출가능한 마커를 검출하기 위한 수단에 대상을 노출시키는 단계를 포함한다.

[0401] 상기 기술된 방법은 특히, 암 질병을 비롯한 CLD18-관련된 질병들의 국소화(localization) 및/또는 CLD18-관련된 질병들을 진단하는데 유용하다. 종기로는,

[0402] 대조군 시료에서 CLD18, 종게는, CLD18-A2의 양 보다 높은, 시료 내에 CLD18, 종게는 CLD18-A2의 양은 시료가 유래된 대상, 특히 인간에서 CLD18-관련된 질병의 존재를 나타낸다.

[0403] 다른 구체예에서, 본 발명의 면역 콘주게이트는 항체에 그러한 화합물을 연결하는 것에 의해 그 표면에서 발현된 CLD18을 가지는 세포들에 화합물들 (예컨대, 치료제, 표지, 세포독소, 방사성독소, 면역억제제, 등)을 표적하는데 사용될 수 있다. 그리하여, 본 발명은 순환 종양 세포를 비롯한 CLD18을 발현하는 세포들을 생체 외 또는 시험관 내 국소화(localize)하기 위한 방법을 또한 제공한다.

[0404] 본 발명은 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되지 않는 하기 실시예로부터 추가적으로 설명된다.

[0405] **실시예**

[0406] 1. CLD18에 대한 뮤린(murine) 항체의 생성

[0407] a. 면역화:

[0408] Balb/c 또는 C57/BL6 마우스들은 인간 CLD18 단편들 (서열번호: 15, 16; 17, 18)을 코딩하는 진핵 발현 벡터로 면역화되었다. 50 μ g 또는 25 μ g의 플라스미드 DNA를 Set1의 모노클로날 항체 생성을 위해 1일 및 10일에 또는 아쥬반트 예컨대, CpG (상세한 사항은 표 1b참고)의 존재하에 Set2의 모노클로날 항체 생성을 위해 1일 및 9일, 1일 및 11일, 또는 1일, 16일 및 36일에 대퇴사두근 (근육내, i.m.)에 주입되었다. CLD18A2(서열번호: 1)로 단독형질감염된 또는 RNA를 코딩하는 뮤린 용해성 CD40L을 추가적으로 공동-형질감염된 세포 뿐만 아니라 CpG는 근육내로 주입되고, PEI-Man은 근육내로 또는 복강내로 주입되었다. 마우스들의 혈청 내에 인간 CLD18에 대한 항체들의 존재는 사용된 특이적 면역화 프로토콜상에 의존하여 16일 및 43일 사이에 면역 형광 현미경에 의해 관찰되었다. 면역형광은 인간 CLD18A2 (서열번호: 1, 2) 및 형광 리포터 단백질을 포함하는 융합 컨스트럭트를 코딩하는 핵산으로 일시적으로 형질감염된 HEK293 세포들을 이용하여 측정되었다. 측정가능한 면역 반응 (도. 1)이 있는 마우스들은 Set1의 모노클로날 항체들의 생성을 위한 비장 절제술(splenectomy)에 앞서 3일 동안 부스트(boost)되거나, 마우스들은 3일, 3일 및 2일동안 부스트되거나, 마우스들은 인간 CLD18A2 (서열번호: 1, 2) (표 1b 참고) 를 코딩하는 핵산으로 일시적으로 형질감염된 5 x 10⁷ 또는 다르게 1 x 10⁸ HEK293 세포들의 복강내 주입에 의해 Set2의 모노클로날 항체의 생성을 위한 비장 절제술에 앞서 4일, 3일, 2일동안 부스트되었다. 표 1a에서 사용된 면역화 프로토콜은 각각의 모노클로날 항체들에 이용되었다.

[0409] [표 1a]

[0410] 모노클로날 항체들의 생성을 위해 사용된 면역화 프로토콜

mAB	면역화 프로토콜*	mAB	면역화 프로토콜
세트1			
24H5	40	42E12	45
26B5	40	43A11	45
26D12	40	44E10	45
28D10	40	47D12	45
37G11	45	61C2	45
37H8	45	75B8	6
38G5	45	85A3	6
38H3	45	9E8	40
39F11	45	19B9	40
41C6	45		
세트2			
45C1	53	166E2	51
125E1	45	175D10	51
163E12	51		

[0411]

[0412] 특이적 면역화 프로토콜은 표 1b 참조.

[0413] [표 1b]

[0414] 상세한 면역화 프로토콜

면역화 프로토콜	면역화(DNA로 프라임(prime) 및 부스트(boost))			혈청-모니터링	형질감염된 세포로 부스트(boost)		
	아쥘반트로	일(day)에	일(day)에		CLD18A2(서열번호:1)로 단독형질감염된 세포들	RNA를 코딩하는 유린 용해가능한 CD40L과 CLD18A2(서열번호:1)로 공동-형질감염된 세포들	비장절제술 전에 날들(day)
6	서열번호:1 5:50 μ g	50 μ gCpG	1 및 10	18	5 $\times 10^7$ 형질감염된 MC3T3 세포들	무(none)	3
40	서열번호:1 7:50 μ g	50 μ gCpG	1 및 10	18		5 $\times 10^7$ HEK293 세포들; 아쥘반트로서 100 μ gCpG	3
45	서열번호:1 5:50 μ g	50 μ gCpG	1 및 9	16		1 $\times 10^8$ HEK293 세포들	3
51	서열번호:1 5:25 μ g	5% 글루코스가 있는 H ₂ O내에 2.5 μ l PEI-Man*(150mM)	1, 16 및 36	22, 30 및 43	5 $\times 10^7$ 형질감염된 HEK293 세포들	무(none)	3 및 2
53	프라이밍(priming):서열번호:15:25 μ g, 및 서열번호:17:25 μ g; 부스팅(boosting):서열번호:17:50 μ g	5% 글루코스가 있는 H ₂ O내에 CpG 50 μ g	1 및 11	20	5 $\times 10^7$ 형질감염된 HEK293 세포들	무(none)	4, 3 및 2

[0415]

[0416] 폴리플러스 트랜스펙션(PolyPlus Transfection)으로부터의 인 비보-jetPEI™-Man

[0417] b. CLD18에 대한 인간 모노클로날 항체들을 생산하는 하이브리도마의 생성:

[0418] 마우스 비장세포(splenocyte)가 분리되고, 표준 프로토콜에 근거하여 마우스 골수종 세포주에 PEG와 융합시켰다. 그리고나서, 결과적으로 나오는 하이브리도마는 FACS 분석에 의해 인간 CLD18을 코딩하는 핵산에 의해 형질감염된 HEK293 세포들을 사용하여 CLD18 특이성 있는 면역글로불린의 생산에 대하여 스크리닝되었다.

[0419] 면역화된 마우스들로부터 비장 림프사이트의 단일 세포 현탁액은 50% PEG (Roche Diagnostics, CRL 738641)를 사용하여 2:1 비율에서 P3X63Ag8U.1 비분비 마우스 골수종 세포주 (ATCC, CRL1597)로 융합되었다. 세포들은 편평한 바닥 마이크로타이터 플레이트에서 약 3 x 10⁴/웰로 깔렸고, 10% 우태혈청, 10 mM HEPES, 0.055 mM 2-머캅토에탄올, 50 μ g/ml 겐타마이신 및 1x HAT (Sigma, CRL H0262)를 첨가한 2% 하이브리도마 융합 및 클로닝 보충물 (HFCS, Roche Diagnostics, CRL 1 363 735) 을 함유한 선택적 배지에서 2주동안 배양되었다. 10 내지 14일 후 각각의 웰은 항-CLD18 모노클로날 항체들에 대하여 플로우 사이토메트리로 스크리닝되었다. 하이브리도마를 분리하는 항체는 다시 채워졌고(replate), 다시 스크리닝되었고, 여전히 항-CLD18 모노클로날 항체들에 대해 양성이면, 제한 희석액에 의해 서브클로닝되었다. 안정한 서브클론들은 그리고나서 특정화를 위한 조직 배양 배지에서 적은 양의 항체를 생산하기 위해 시험관내에서 배양되었다. 각각의 하이브리도마로부터 적어도 하나의 클론은, 부모 세포들의 반응성을 보유하고(FACS에 의해), 선택되었다. 9 바이알 세포 बैं크들은 각각의 클론들에 대하여

생성되고, 액상 질소에 저장되었다.

- [0420] c. CLD18에 결합한 모노클로날 항체의 선택:
- [0421] 항체의 아이소타입을 결정하기 위해, 아이소타입 ELISA는 수행되었다. 마우스 모노AB ID 키트 (Zymed, CRL 90-6550) 또는 다르게 아이소스트립 마우스 모노클로날 항체 아이소타이핑 키트 (Roche, Cat. No. 1493027)는 확인된 CLD18 반응성 모노클로날 항체들의 Ig 서브클래스를 결정하는데 사용되었다.
- [0422] Set1로 규명된, 19개의 하이브리도마 세포주들이 생산되고, CLD18A2-LoopD3 (서열번호들: 17, 18)로 면역화된 C57/BL6 마우스들로부터의 세포들의 융합으로부터의 6개, CLD18A2-Loop1 (서열번호: 15, 16)으로 면역화된 Balb/c 마우스들로부터 세포들의 융합으로부터 13개이고, 다음의 항체들을 발현한다:
- [0423] 24H5, 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 61C2, 75B8, 85A3, 9E8, 19B9
- [0424] 24H5: 마우스 모노클로날 IgG2b, κ 항체, 182-D758-034
- [0425] 26B5: 마우스 모노클로날 IgG2a, κ 항체, 182-D758-035, DSM ACC2745
- [0426] 26D12: 마우스 모노클로날 IgG3, κ 항체, 182-D758-036, DSM ACC2746
- [0427] 28D10: 마우스 모노클로날 IgG3, κ 항체, 182-D758-040, DSM ACC2747
- [0428] 37G11: 마우스 모노클로날 IgG2a, κ 항체, 182-D1106-055, DSM ACC2737
- [0429] 37H8: 마우스 모노클로날 IgG3, κ 항체, 182-D1106-056, DSM ACC2738
- [0430] 38G5: 마우스 모노클로날 IgG3, κ 항체, 182-D1106-057, DSM ACC2739
- [0431] 38H3: 마우스 모노클로날 IgG3, κ 항체, 182-D1106-058, DSM ACC2740
- [0432] 39F11: 마우스 모노클로날 IgG3, κ 항체, 182-D1106-059, DSM ACC2741
- [0433] 41C6: 마우스 모노클로날 IgG2a, κ 항체, 182-D1106-060
- [0434] 42E12: 마우스 모노클로날 IgG2a, κ 항체, 182-D1106-061, DSM ACC2748
- [0435] 43A11: 마우스 모노클로날 IgG2a, κ 항체, 182-D1106-062, DSM ACC2742
- [0436] 44E10: 마우스 모노클로날 IgG3, κ 항체, 182-D1106-063
- [0437] 47D12: 마우스 모노클로날 IgG3, κ 항체, 182-D1106-064
- [0438] 61C2: 마우스 모노클로날 IgG2b, κ 항체, 182-D1106-067, DSM ACC2743
- [0439] 75B8: 마우스 모노클로날 IgM, κ 항체, 182-D756-001
- [0440] 85A3: 마우스 모노클로날 IgM, κ 항체, 182-D756-002
- [0441] 9E8: 마우스 모노클로날 IgM, κ 항체, 182-D758-011
- [0442] 19B9: 마우스 모노클로날 IgM, κ 항체, 182-D758-024
- [0443] Set2로 규명된, 5개의 하이브리도마 세포주들이 생산되고, CLD18A2-LoopD3 (서열번호들: 17, 18) 및 CLD18A2-LoopD1(서열번호들: 15, 16)로 면역화된 Balb/c 마우스들로부터의 세포들의 융합으로부터의 1개, CLD18A2-LoopD1 (서열번호: 15, 16)으로 면역화된 Balb/c 마우스들로부터 세포들의 융합으로부터 4개이고, 다음의 항체들을 발현한다:
- [0444] 45C1, 125E1, 163E12, 166E2, 175D10
- [0445] 45C1: 마우스 모노클로날 IgG2a, κ 항체, 182-D758-187
- [0446] 125E1: 마우스 모노클로날 IgG2a, κ 항체, 182-D1106-279, DSM ACC2808
- [0447] 163E12: 마우스 모노클로날 IgG3, κ 항체, 182-D1106-294, DSM ACC2809
- [0448] 166E2: 마우스 모노클로날 IgG3, κ 항체, 182-D1106-308

- [0449] 175D10: 마우스 모노클로날 IgG1, κ 항체, 182-D1106-362, DSM ACC2810
- [0450] **2. 모노클로날 항체의 생산**
- [0451] CLD18에 대해 반응성있는 모노클로날 항체들의 생산 및 정제:
- [0452] 기능적 특징화를 위한 mg 양의 항체들을 생산하기 위해, 하이브리도마 세포들은 2×10^6 세포들/ml에서 생물반응기 (CELLine CL1000, Integra, Chur, CH)에 기초한 투석에서 시드(seed)되었다. 항체를 포함한 상청액을 1주일에 1회 채취하였다. 마우스 모노클로날 항체는 Melon Gel (Pierce, Rockford, USA)을 이용하여 정제되었고, 암모늄 설페이트 침강에 의해 농축되거나 FPLC를 이용하여 ProteinA에 의해 정제되었다. 항체 농축 및 순도는 BCA-어세이에 의해 측정되고, 소듐 도데실설페이트 젤 전기영동 및 코마시 염색에 의해 순도가 체크되었다.
- [0453] **3. 모노클로날 항체들의 결합 특징**
- [0454] a. WB, IF에서 트랜스팩턴트의 질 조절:
- [0455] CLD18A2 발현하는 세포들을 생성하기 위해, HEK293 또는 CHO 세포들은 CLD18A2 (서열번호: 1, 2) 또는 CLD18A2-myc (서열번호: 3, 4)을 코딩하는 핵산으로 형질감염되었다.
- [0456] HEK293 세포들은 CLDN18A2-myc (서열번호: 3, 4)로 형질감염되거나 형질감염되지 않은 채로 있었다. 형질감염된 지 24시간 후에, 세포들은 채취되고, 용해되어 소듐 도데실설페이트 젤 전기영동을 거쳤다. 젤은 마우스 항-myc 항체로 블로팅되고 염색되었다. 항 마우스 항체로 표지된 페록시다제로 인큐베이션 후에, 블롯(blot)은 ECL 시약으로 현상(develop)되고, LAS-3000 imager (Fuji)를 이용하여 시각화하였다. 음성 대조군에서가 아닌 형질감염된 세포에서 오직, CLD18-myc의 예상된 분자량으로 밴드가 관찰되었다 (도. 2).
- [0457] CHO 세포들이 CLD18A2 (서열번호: 1, 2)로 형질감염되었고, 24시간동안 챔버 슬라이드상에서 성장되었다. 세포들은 메탄올로 고정되고, 25°C에서 60분동안 CLD18에 대한 래빗 폴리클로날 항체 $1 \mu\text{g/ml}$ 로 염색되었다. 세척 후, 세포들은 고틀(goat) 항-래빗 IgG (Molecular Probes)로 표지된 Alexa488로 염색되었고, 형광 현미경검사로 측정되었다. 도 3은 비형질감염된 세포들 뿐만 아니라 세포막에서 CLD18을 발현하는 형질감염된 CHO 세포들을 나타낸다.
- [0458] 이러한 이종조직으로(heterologously) CLD18 발현 세포들은 항체 결합의 특이성을 시험하기 위해 다음의 어세이에 이용되었다.
- [0459] b. CLD18에 결합한 모노클로날 항체들의 선택/플로우 사이토메트리에 의한 1차 스크린:
- [0460] HEK293 세포들은 어세이 40시간 전에, 인간 CLD18A2 (서열번호:1, 2) 및 형광 리포터 단백질을 코딩하는 발현벡터와 공동 형질감염되었거나, 또 다르게 인간 CLD18A2를 안정적으로 발현하는 HEK293 세포들 (HEK293-CLD18A2)가 사용되었고, 프로피듐 요오드화합물 (PI)로 카운터염색되었다. 2mM EDTA/PBS를 이용한 세포 분리 후에, 세포들은 완전 성장 배지로 세척되고, U-바텀 마이크로타이터 플레이트로 약 $1-5 \times 10^5$ 세포/웰로 플레이트팅되었다. 세포들은 하이브리도마 상청액으로 4°C에서 30분동안 인큐베이션 하였고, 그 다음에, 1% 열-불활성된 FBS/PBS로 2번의 세척단계를 거치고, 최종적으로 APC 또는 Alexa647-콘주게이트된 항-마우스 IgG 특이적 2차 항체로 인큐베이션 하였다. 두번의 세척 단계후에, 공동-형질감염된 세포들은 CellFIX (BD Biosciences)로 고정되었다. 결합은 BD FACSAarray를 이용하여 플로우 사이토메트리에 의해 평가되었다. 세로축에 항체 결합에 대하여 형광 마커 발현은 가로축에 플롯(plot)된다. 모든 마우스 항체들 24H5, 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 61C2, 75B8, 85A3, 9E8, 19B9, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2, 및 175D10는 모노클로날 항체들 24H5 (도 4A, Q2에서 세포들), 85A3 (도 4B), 175D10, 125E1, 163E12, 166E2 및 45C1 (도 4C, Q1에서 세포들)을 포함하는 하이브리도마 상청액을 위해 예시된 바와 같이 형광 마커 발현 세포들 (도 4, Q2에서 세포들)의 표면에 특이적으로 결합하여 검출되었다.
- [0461] c. Myc- 또는 HA-태그된 CLD18A2에 결합하는 항체의 비교:
- [0462] 확인된 CLD18-특이적 모노클로날 항체들의 결합 특징은 추가적으로 특정되었다. 그러므로, 모노클로날 항체 결합은 CLD18A2 돌연변이체에 대하여 분석 되었고, 에피토프 태그(tag)의 삽입에 의해 생성되었다. CLD18A2-HA(서열번호: 6)는 CLD18A2-루프1에서 HA-에피토프 태그를 포함하는 반면, CLD18A2-Myc (서열번호: 4)은 CLD18A2-루프2에 삽입된 Myc-에피토프 태그를 포함한다. 이러한 태그들의 삽입이 에피토프의 파괴를 가져오는 것 때문에, 확인된 모노클로날 항체들은 어떠한 돌연변이에 대한 결합의 손실에 따라 그룹화될 수 있다. 형광 마커 및 인간

CLD18A2 또는 형광마커 및 인간 CLD18A2-HA 또는 형광 마커 및 CLD18A2-Myc으로 일시적으로 공동-형질감염된 HEK293 세포들은 CLD18-특이적 모노클로날 항체들을 함유하는 하이브리도마 상청액으로 30분동안 4℃에서 인큐베이션되고, 그 다음으로 Alexa647-콘주게이트된 항-마우스 IgG 2차 항체로 인큐베이션되었다. BD FACSAArray 상에 분석 전에, 세포들은 CellFIX를 이용하여 고정되었다. 도 5에서 24H5, 9E8, 26B5 및 19B9를 위해 예시된 바와 같이, 모노클로날 항체들은 그 결합 특질들에 따라 4개의 상이한 그룹들로 분리될 수 있다: (i) 비변형된 CLD18A2 뿐만 아니라 CLD18A2-HA 및 CLD18A2-Myc에 결합하는 항체들, 예컨대, 24H5, (도 5A), 또는 (ii) CLD18A2-HA 와 결합하지 않는 항체들, 예컨대, 9E8, (도 5B), 또는 (iii) CLD18A2-Myc에 결합하지 않는 항체들, 예컨대, 26B5, (도 5C), 또는 (iv) CLD18A2-HA에도 CLD18A2-Myc에도 결합하지 않는 항체들, 예컨대, 19B9, (도 5D).

[0463] d. 플로우 사이토메트리에 의한 인간 CLD18A1 대 CLD18A2 트랜스팩턴트들에 결합하는 항체의 비교:

[0464] CLD18A2 아이소형태들에 대한 확인된 모노클로날 항체들의 결합 특이성은 플로우 사이토메트리에 의해 분석되었다. 인간 CLD18A2를 안정적으로 발현하는 HEK293 세포들 (HEK293-CLD18A2) 및 인간 CLD18A1 (서열번호: 7, 8) 을 안정적으로 발현하는 HEK293 세포들 (HEK293-CLD18A1)은 30분동안 4℃에서 모노클로날 항체들을 포함하는 하이브리도마 상청액들로 인큐베이션한 다음에, Alexa647-콘주게이트된 항-마우스 IgG 2차 항체로 인큐베이션하고, 세포들을 고정하거나 또는 고정없이 PI 카운터 염색한다. 결합은 BD FACSAArray를 이용하여 플로우 사이토메트리에 의해 평가되었다. 도 6은 24H5, 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 61C2, 75B8, 85A3, 9E8, 19B9, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2, 175D10가 포함된 패널에서 확인된 두개의 그룹의 모노클로날 항체들을 위한 예들을 나타낸 것이다: (i) 인간 CLD18A1이 아닌 인간 CLD18A2에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체들 43A11, 45C1, 및 163E12 (도 6A,B), 그리고 (ii) 인간 아이소형태들 양쪽 모두에 결합하는 모노클로날 항체 37H8 (도 6A).

[0465] e. 면역형광 현미경검사에 의해 인간 CLD18A1 대 CLD18A2 트랜스팩턴트에 결합하는 항체의 비교:

[0466] HEK293 세포들은 CLD18A1 (서열번호: 8) 또는 CLD18A2 (서열번호: 2)와 형광 리포터의 융합 단백질을 코딩하는 발현 벡터로 일시적으로 형질감염되었고, 챔버 슬라이드들에서 성장되었다. 세포들은 고정되지 않은채로 염색되거나 파라포름알데히드 고정후에 37℃에서 30분동안 조직 배양 상청액을 함유하는 모노클로날 항체로 염색하였다. 세척 후, 세포들은 Alexa555-표지된 항-마우스 Ig 항체 (Molecular Probes)로 염색되었다. 항체들의 결합은 형광 현미경검사에 의해 평가되었다. 도 7에 나타난 바와 같이, 항체 37G11은 CLD18A1 (도 7B)이 아닌 특이적으로 CLD18A2 (도 7A)와 반응하였다. 대조적으로, 항체 26B5는 CLD18A2 및 CLD18A1 모두에 반응하였다(도 8).

[0467] 항체들 24H5, 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 61C2, 75B8, 85A3, 9E8, 19B9에 대하여, 염색한 살아있는 세포들과 파라포름알데히드 고정된 세포들 사이에 분명한 차이가 관찰되었다. 세포들이 고정될 때, 항체들은 일정한 형태의 막 염색을 형성하였다 (도 7C, 8C, 8D). 대조적으로, 살아있는 세포들의 이러한 항체들과의 인큐베이션은 염색 패턴과 같은 스퍩클(speckle)로써 눈에 보이는 단백질 클러스터들의 생성을 가져온다 (도 7A, 8A, 8B). 이것은 모든 항체들이 살아있는 세포들의 표면상에서 발견되는 천연 에피토프들에 결합한다는 것을 나타낸다.

[0468] f. 내생적으로 발현하는 세포주의 결정:

[0469] CLD18A2 유전자-특이적 프라이머쌍 (서열번호: 11, 12)은 CLD18A2의 발현에 대하여 세포주를 스크린하기 위한 RT-PCR 분석들에 사용되었다. 인간 위 암종 세포주들 NCI-SNU-16 (ATCC CRL-5974), NUGC-4 (JCRB0834) 및 KATO-III (ATCC HTB-103) 및 인간 췌장 선암종 세포주 DAN-G (DSMZ ACC249)는 CLD18의 강한 내생적 발현을 나타내는 것으로 발견되었다(Fig. 9). 발현은 CLD18에 대한 래비트 폴리클로날 혈청으로 염색에 의해 단백질 수준에서 확인되었다.

[0470] g. CLD18 특이적 항체들로 내생적으로 발현하는 세포주들의 염색 및 면역형광 분석:

[0471] DAN-G, SNU-16, NUGC-4 및 KATO-III 세포들은 표준 조건에서 챔버 슬라이드들 상에 성장되었다. 세포들은 고정되지 않거나 또는 메탄올로 고정되고, 각각의 항체들로 염색되었다. 항체들 24H5, 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 61C2, 75B8, 85A3, 9E8, 19B9에 대하여 세포 표면의 염색은 도 10, 11, 12A에서 예시된 바와 같이 관찰되었다. 항체들 45C1, 125E1, 163E12, 166E2, 및 175D10에 대하여, 천연 에피토프 인식은 분석되었고, 세포 표면 염색은 도 12B에 나타난 바와 같이 비고정된 세포들상에 관찰되었다. 항체들의 서브그룹은 세포-세포 공간에 우세하게 또는, 다른 세포들의 인접이 아닌, 막의 자유 부분들에서 세포 표면의 균일한 염색을 나타냈다. 다른 항체들은, 각각의 항체들이 미리형성된 치밀 이음

새에서 접근가능한 CLD18 에피토프들 뿐만 아니라 CLD18의 동형의 또는 이형의 결합에 의해 마스크(mask)된 에피토프들을 함유하는 상이한 에피토프들에 결합한다는 것을 입증하는 세포 막 상에 분리된 포커스들 및 집합체(aggregate)들을 염색하였다.

[0472] h. 플로우 사이토메트리에 의해 세포주를 내생적으로 발현하는 염색:

[0473] KATO-III 및 NUGC-4 살아있는 세포들 상에 구조적으로 발현된 CLD18A2의 표면 발현은 플로우 사이토메트리에 의해 분석되었다. 이것은 모노클로날 항체 61C2 또는 163E12로 염색된 KATO-III 및 NUGC-4 세포들에 의해 예시되고, 그리고나서, Alexa647-콘쥬게이트된 항-마우스 IgG 2차 항체로 인큐베이션 한 다음, 세포를 고정하거나 또는 고정하지 않는다. 결합은 BD FACSArray를 이용한 플로우 사이토메트리에 의해 평가되었다. 도 13은 KATO-III 및 NUGC-4 세포들 상에 CLD18A2에 대한 163E12의 강한 결합 및 KATO-III세포들의 적어도 70.3%에 대한 61C2의 강한 결합을 나타낸다.

[0474] i. 마우스 및 인간 CLD18A1 및 CLD18A2의 서열 정렬:

[0475] 서열 비교에서 인간 CLD18A2(NP_001002026) 및 인간 CLD18A1 (NP_057453)는 N-말단에서 다르고, 마우스 CLD18 변이체들 (NP_062789 and AAL15636)은 분자들 사이에 높은 상동성 및 서열 변이 사이트들을 증명한다 (도 14 참고).

[0476] j. 플로우 사이토메트리에 의해 분석된 뮤린 CLD18A1 및 뮤린 CLD18A2와 항체들의 반응성:

[0477] 뮤린 CLD18A2 및 CLD18A1에 대한 확인된 모노클로날 항체들의 결합은 플로우 사이토메트리에 의해 분석되었다. 형광 마커 및 뮤린 CLD18A2 (서열번호:33, 35)로 또는 형광 마커 및 뮤린 CLD18A1 (서열번호:36, 37)로 일시적으로 공동-형질감염된 HEK293 세포들은 4°C에서 30분동안 인간 CLD18-특이적 모노클로날 항체들 38G5, 38H3, 37G11, 45C1 및 163E12를 각각 함유하는 하이브리도마 상청액으로 인큐베이션 한 다음, Alexa647-콘쥬게이트된 항-마우스 IgG 2차 항체로 인큐베이션 하고, 세포들을 고정하였다. 결합은 BD FACSArray를 이용한 플로우 사이토메트리에 의해 평가되었다. 도 15는 3개의 상이한 결합 프로파일들을 나타낸 것이고: 38G5, 및 45C1은 뮤린 CLD18 아이소형태들 중 어느 하나에도 결합하지 않고, 37G11및163E12는 뮤린 CLD18A2에 결합하지만, 뮤린 CLD18A1에 결합하지 않고, 38H3은 뮤린 CLD18A1 및 CLD18A2에 결합하는 것을 나타낸다. 이러한 항체들은 전임상 연구에서 CLD18 모노클로날 항체들의 잠재적인 독성을 측정하기 위한 귀중한 도구이다.

[0478] 전체로서 이러한 데이터들은 CLD18에 대하여 생성되는 본 발명의 항체들 24H5, 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 61C2, 75B8, 85A3, 9E8, 19B9, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2, 및 175D10는 인간 CLD18의 상이한 에피토프들 및 토폴로지(topology)에 대한 다양한 결합 특징을 표현한다는 것을 나타낸다.

[0479] 예들 3b, c, d, e, g, h, 및 j에 설명된 상이한 특징들의 조합은 그러한 상이한 클래스들 내로 모노클로날 항체들을 분류하는데 사용될 수 있다.

[0480] **4. 면역조직화학 (IHC)**

[0481] 서열번호: 21의 펩티드로 면역화에 의해 생성되는 CLD18A2 에피토프 특이적 항체는 CLD18A2 발현의 면역조직화학적 특징 결정을 위해 사용되었다. 정상 및 종양 조직의 광범위한 패널로부터 유래된 파라핀이 끼워넣어진 조직 부분은 단백질 발현 및 국소화(localization) 분석을 위해 사용되었다. 위를 제외한 다른 정상 기관 조직에서는 어떠한 의미있는 발현도 검출되지 않았다 (표 2, 도 16A 참고). 대조적으로, CLD18A2 발현은 위암 및 폐암을 함유하는 상이한 암들에서 면역조직화학에 의해 입증되었다 (도 16B).

[0482] 흥미롭게, 위 점막에서 CLD18A2 단백질의 발현은 베이스(base) 및 피트 영역(pit region)에서 위 상피의 최종적으로 분화된 세포들로 제한되었다. 대조적으로, 위 점막의 넥(neck) 영역에서 세포들, 특히 협부(isthmus) 부분에서 위 줄기 세포들은 전체 점막을 보충하는 것으로, CLD18A2를 발현하지 않는다 (도 16C).

표 2

[0483] IHC에 의해 분석된 바와 같은 정상 및 종양 조직들 내에 CLD18A2 발현

조직 타입	결과
부신	-
방광	-
혈구	-

골수	-
유방	-
대장	-
상피	-
식도	-
나팔관	-
심장	-
신장 (사구체, 세관)	-
간	-
폐	-
립프절	-
난소	-
췌장	-
부갑상선	-
뇌하수체	-
태반	-
전립선	-
피부	-
비장	-
위	+
가로무늬근	-
정소	-
흉선	-
갑상선	-
수노관	-
자궁 (세레릭스, 자궁내막)	-

[0484] 모노클로날 항체 39F11은 면역조직화학적 CLD18A2 특이적 연구를 위해 이용되었다. 도 17A에 나타난 바와 같이, 위를 제외한 모든 실험된 정상 조직들에서는 유의적인 반응성이 검출되지 않은 반면 (도 17A), 위 암들 및 폐 암들은 강하게 양성으로 남아있다 (도 17B). 본 발명 항체들의 다른 그룹은 위암에 결합한, 하지만 정상 위 조직에는 반응성 없는 특이적 암 염색 패턴을 나타낸다. 그러한 염색 패턴은 모노클로날 항체 26B5로 도 18A에 나타난 바와 같다.

[0485] 면역조직화화학법은 HEK293 종양 세포주들로부터 유래된 부분상에 175D10 (도 18B), 43A11 (도 18C), 163E12 (도 18D) 및 45C1 (도 18E)의 특이성 분석을 위해 사용되었다: 인간 CLD18A2 (HEK293-CLD18A2) 또는 CLD18A1 (HEK293-CLD18A1)를 안정적으로 발현하거나, 선택을 위해 오직 항생물질 내성 유전자를 포함하는 발현 대조군 플라스미드로 형질감염된 (HEK293-mock) HEK293 종양 세포주들은 고휘 종양을 형성하도록 마우스들 내에 이종이식(xenograft) 되었다. mock-형질감염된 HEK293 이종이식 종양들 내에 어떠한 발현도 관찰되지 않았다. 반대로, HEK293-CLD18A2 이종이식 종양들 및 위 암 표본들에서 강하고 균일한 막염색이 관찰되었다.

[0486] **5. 보체 의존적 세포독성 (CDC)**

[0487] a. 플로우 사이토메트리에 의해 측정된 Set1의 모노클로날 항체들의 CDC:

[0488] 보체 용해를 위한 혈장은 건강한 지원자들로부터의 혈액을 S-Monovette-EDTA vacutainer tubes (Sarstedt, N-murbrecht, Germany)로 끌어온 다음, 20분동안 600g에서 원심분리하여 제조되었다. 혈장은 채취되고, -20°C에서 저장되었다.

[0489] 실험의 첫번째 세트에서, 하이브리도마 상청액은 인간 CLD18A2를 안정적으로 발현하는 HEK293 세포들 (HEK293-CLD18A2)에 대한 보체 의존적 세포독성 (CDC)을 유도하기 위한 능력에 대하여 분석되었다. 세포들은 모노클로날 항체들 85A3, 28D10, 24H5 또는 26D12 각각을 포함한 하이브리도마 상청액들로 20분동안 실내 온도(room temperature)에서 배양하였다. 원심분리 후 (5분, 450g), 상청액은 제거되고, DMEM (37°C로 미리 데워놓은) 내 20% 인간 혈장이 세포들에 추가되고, 또 다른 20분동안 37°C에서 인큐베이션 되었다. 그리고나서, 세포 용해는

프로피디움 요오드화합물 (PI) 염색 방법을 이용해 FACS 상에서 측정되었다. PI는 최종 농도 2.5 μ g/ml에 추가되었다. 플로우사이토미터를 위하여, BD FACSArray 플로우 사이토미터가 사용되었다 (BD Biosciences, Mountain View, CA). 적어도 10000 건들이 분석을 위해 포워드 사이드워드 스캐터 (forward sideward scatter) (FSC/SSC) 트레솔드의 조절에 의해 배제된 세포 잔해물들과 함께 회수되었다. 용해된 세포들의 백분율 (PI-양성 세포들)은 도 19에 나타난 바와 같다. 모노클로날 항체들 85A3, 28D10 및 26D12는 HEK293-CLD18A2 세포들의 각각 33.5%, 38.2% 및 39.2%의 용해를 유도한 반면, 24H5에 의해 매개된 CDC는 오직 19.3%였다.

[0490] b. Set1의 모노클로날 항체들의 CDC:

[0491] 실험의 두번째 세트에서는, CLD18A2 발현하는 세포들 상에 CDC를 유도하기 위한 모노클로날 항체들의 특이성이 분석되었다. 그러므로, 인간 CLD18A2에 특이적이거나 또한 인간 CLD18A1에 결합하는 한 세트의 항체들을 인간 CLD18A2 (CHO-CLD18A2) 또는 인간 CLD18A1 (CHO-CLD18A1)로 안정적으로 형질감염된 CHO 세포들에 대한 CDC-유도를 위해 시험되었다. CHO-CLD18A2 및 CHO-CLD18A1 세포들은 분석 24시간 전에 조직 배양용 편평한 바닥 마이크로타이터 플레이트에 3 x 10⁴/웰의 밀도로 시드(seed)되었다. 다음날, 성장 배지가 제거되고, 세포들은 모노클로날 항체들 24H5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 및 61C2, 각각을 포함하는 10 μ g/ml의 농도로 조절된 하이브리도마 상청액들로 3개 한벌(in triplicates)로 인큐베이션하였다. 대조군 세포들은 배경 용해 및 최대 용해 각각의 측정을 위한 0.2% 사포닌을 함유하는 성장 배지 또는 성장 배지로 인큐베이션되었다. 실온에서 20분동안 인큐베이션 후에, 상청액은 제거되고, DMEM (37 $^{\circ}$ C로 미리 데워진) 내 20% 인간 혈장이 세포들에 추가되고 37 $^{\circ}$ C에서 또 20분동안 인큐베이션되었다. 그리고 나서, 상청액은 2.5 μ g/ml 에티디움 브로마이드를 함유하는 PBS에 의해 교체되었고, 520nm에서 여기 후에 형광 발광은 Tecan Safire를 이용하여 측정되었다. 특이적 용해 백분율은 다음과 같이 계산되었다: % 특이적 용해= (형광 시료-형광 배경)/(형광 최대 용해-형광 배경)x100. 도 20은 모노클로날 항체들 26D12, 28D10, 37H8, 38H3 및 39F11은 높음을 매개하고, 모노클로날 항체 38G5는 중간을 매개하고, 모노클로날 항체들 41C6 및 61C2는 낮음을 매개하고, 모노클로날 항체들 24H5, 37G11, 42E12, 43A11, 44E10 및 47D12는 CHO-CLD18A2 세포들에 대한 아무런 CDC도 매개하지 않는다는 것을 나타낸다. 대조적으로, 플로우 사이토미터 및 면역형광에 의해 측정된 바와 같이, 26D12, 28D10, 37H8, 38H3, 39F11, 41C6, 47D12 및 61C2 또한 CLD18A1에 결합함에도 불구하고, 항체들 중 어느 것도 CHO-CLDA1 세포들에 대한 CDC를 유도할 수 없다.

[0492] c. Set1의 모노클로날 항체들을 이용한 CDC 및 모노클로날 항체 역가측정(titration):

[0493] 낮은 농도에서 CDC를 유도하기 위한 항-CLD18 항체들의 능력을 측정하기 위해, 실험은 수행되었고, 3개의 상이한 항체들이 역가측정(titrate)되었다. 마이크로타이터 플레이트에서 성장하는 CHO-CLD18A2 세포들은 실온에서 20분동안 75B8 (100, 30, 10, 3 및 1 μ g/ml), 37H8 (10, 3.3 및 1 μ g/ml) 및 28D10 (10, 1 및 0.1 μ g/ml), 각각의 농도 범위로 인큐베이션하였다. 상청액은 제거되고, DMEM (37 $^{\circ}$ C로 미리 데워진) 내 20% 인간 혈장이 세포들에 추가되고, 또 다른 20분동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양되었다. Tecan Safire를 이용한 분석 전에, 상청액들은 2.5 μ g/ml 에티디움 브로마이드를 함유하는 PBS에 의해 교체되었다. 도 21A-C는 항체 농도의 함수로써 특이적 용해의 백분율을 나타낸 것이다. 모노클로날 항체 75B8은 10 μ g/ml에서 31.0% CHO-CLD18A2 세포들의 용해를 유도하고, 1 μ g/ml에서는 6.2%로 떨어지는 반면 (도 21A), 모노클로날 항체들 28D10 및 37H8은 여전히 1 μ g/ml에서 각각 39% 및 26.5% 특이적 용해를 유도한다 (도 21B, C).

[0494] d. 플로우 사이토미터에 의해 측정된 바와 같이 Set2의 모노클로날 항체들의 CDC:

[0495] 보체(complement) 용해를 위한 혈청은 건강한 지원자로부터의 혈액을 Serum-Monovette vacutainer tubes (Sarstedt, Nurbrecht, Germany)으로 끌어오고, 20분동안 600g로 원심분리함에 의해 제조되었다. 혈청은 채취되고, -20 $^{\circ}$ C에서 저장되었다. 대조군 혈청은 저장 전에 30분동안 56 $^{\circ}$ C에서 열-불활성화되었다.

[0496] 하이브리도마 상청액은 인간 CLD18A2를 내생적으로 발현하는 KATO-III 세포들에 대한 보체 의존적 세포독성 (CDC)을 유도하는 능력에 대하여 분석되었다. 세포들은 30분동안 37 $^{\circ}$ C에서 모노클로날 항체들 45C1, 125E1, 163E12, 166E2, 및 175D10 각각을 포함하는 미정제 또는 정제된 하이브리도마 상청액들로 인큐베이션하였다. RPMI에서 20% 인간 혈청이 그 세포들에 첨가되고, 또 30분동안 37 $^{\circ}$ C에서 인큐베이션 하였다. 그에 따라, 세포 용해는 프로피디움 요오드화합물 (PI) 염색 방법을 이용하여 FACS상에서 측정되었다. PI는 최종 농도 2.5 μ g/ml에 추가되었다.

[0497] 사이토미터를 위하여, BD FACSArray 플로우 사이토미터가 사용되었다 (BD Biosciences, Mountain View, CA). 적어도 10000 건들이 분석을 위해 포워드 사이드워드 스캐터 (forward sideward scatter) (FSC/SSC) 트레솔드

의 조절에 의해 배제된 세포 잔해물들과 함께 회수되었다. 특이적 용해는 다음의 식에 의해 계산되었다: 특이적 용해 = (% 시료에서 PI-양성 세포들 - 열 불활성화된 혈청이 있는 시료에서 %PI-양성 세포들). 강한 CDC 매개된 용해는 163E12에 특별히 관찰되었다.

[0498] **6. 항체 의존적 세포 독성 (ADCC)**

[0499] 하이브리도마 상청액들은 안정적으로 인간 CLD18A2 (HEK293-CLD18A2) 또는 인간 CLD18A1 (HEK293-CLD18A1)를 발현하는 HEK293 세포들에 대한 항체-의존적 세포 독성 (ADCC)을 유도하기 위한 능력을 분석하였다.

[0500] a. 인간 말초 혈액 단핵 세포들의 풍부(enrichment): 건강한 공여자로부터의 인간 혈액을 인산완충액(PBS)에 2 번 희석하고, 혈구들은 피콜 (Lymphocyte Separation Medium 1077 g/ml, PAA Laboratories, cat. no. J15-004) 상에 층을 이루었다. 말초 혈액 단핵 세포들 (MNCs)은 간기로부터 회수되고, 세척되고, 10% 열-불활성화된 FCS(fetal calf serum), 2mM L-글루타민이 첨가된 RPMI 1640 배양 배지에서 재현탁되었다.

[0501] b. ADCC 셋업: 표적 세포들은 30분동안 형광 강화 리간드 (BADTA, Perkin Elmer cytotoxicity assay kit DELFIA EuTDA Cytotoxicity Reagents, cat. no. AD0116)로 표지되었다. 10mM 프로베네시드(Sigma, cat. no. P8761), 10-20mM HEPES, 및 10% 열-불활성화된 FCS, 를 첨가한 RPMI-10에서 광범위한 세척 후에, 세포들은 1×10^5 세포들/ml로 조절되었다. 표지된 표적 세포들, 효과기 세포들(MNCs), 및 10 μ g/ml 의 농도로 조절된 모노클로날 항체들을 함유하는 상청액들은 둥근 바닥 마이크로타이터 플레이트에 첨가되었다. 분리된 효과기 세포들을 위해, 효과기 대 표적의 비가 100:1이 사용되었다 (50:1 과 25:1은 데이터에 나타나있지 않음). 인큐베이션 후 (2시간들, 37°C), 어세이들은 원심분리에 의해 정지되었고, 듀플리케이트들(duplicate)로부터의 형광 리간드 방출은 시간 분해 플루오로미터(time-resolved fluorometer)에서 유로피움 수에서 측정되었다. 세포 독성의 백분율은 다음의 식을 이용하여 계산되었다: % 특이적 용해 = (실험적 방출 수 - 자연발생적 방출 수)/(최대 방출 수 - 자연발생적 방출 수), Triton X-100 (0,25% 최종 농도)을 표적 세포들에 첨가하는 것에 의해 측정된 최대 형광 리간드 방출과 함께, 항체들 및 효과기 세포들의 부재에서 측정된 자연발생적 방출. 도 22는 HEK293-CLD18A2 세포들에 대한 모노클로날 항체들 26B5, 37H8, 38G5, 47D12, 및 61C2이 ADCC를 매개하는 것을 나타냈다. 대조적으로, 이러한 항체들은 CLD18A2 특이적 ADCC를 입증하는 CLD18A1 표적들 상에 의미있는 것이 아닌 또는 오직 낮은 수준의 세포독성을 유발한다 (도 23).

[0502] **7. 증식 억제**

[0503] 정제된 무린 모노클로날 항체들은 인간 CLD18A2를 내생적으로 발현하는 KATO-III 세포들의 세포 성장을 억제하기 위한 능력에 대하여 분석되었다.

[0504] CLD18A2를 내생적으로 발현하는 1×10^4 표적 세포들(KATO-III)은 약 10 μ g 모노클로날 항체들의 존재에서 배양되었다.

[0505] DELFIA 세포 증식 키트 (Perkin-Elmer, Cat. No. AD0200)는 마이크로플레이트 내에 증식하는 세포들의 DNA 합성동안에 5-브로모-2'-디옥시유리딘 (BrdU) 편입(incorporation)의 측정에 근거한 비-동위원소의 면역 어세이이다. 편입된 BrdU는 유로피움 표지된 모노클로날 항체를 이용하여 검출된다. 항체 검출을 하기 위해, 세포들은 Fix 용액을 이용하여 고정되고, DNA 변성된다. 결합하지 않은 항체는 세척되어가고, DELFIA 유도인자(inducer)는 표지된 항체로부터의 유로피움 이온을 용액으로 해리하기 위해 추가되고, 그것들은 DELFIA 유도인자의 성분과 높은 형광 길레이트를 형성한다. 측정된 형광-검출에서 활용하는 시간-분해된 플루오로미터-은 각각의 웰의 세포에서 DNA 합성에 비례한다.

[0506] 증식의 강한 억제는 항체들 125E1, 163E12, 45C1, 37G11, 37H8, 28D10 및 166E2 각각과 함께 관찰되었다. 증식의 중간정도의(moderate) 억제가 무린 항체들 43A11, 175D10, 42E12, 26D12, 61C2 및 38H3 각각으로 관찰되었다.

[0507] **8. 치료적 마우스 이종이식(xenograft) 모델에서의 수행**

[0508] CLD18A2에 특이적으로 결합하는 확인된 모노클로날 항체들의 치료적 잠재성이 치료적 이종이식 모델에서 연구되었다.

[0509] a. 마우스들 내에서 높은 수준으로 CLD18A2를 발현하는 종양들의 초기 처리

[0510] SCID 마우스들에게 높은 수준의 인간 CLD18A2 (HEK293-CLD18A2)를 안정적으로 발현하는 1×10^7 HEK293 세포

들이 피하에 접종되었다. HEK293-CLD18A2 세포들에서 인간 CLD18A2의 발현 수준들은 환자로부터 초기 위암에서 발현수준과 비교할만하였다. 각각의 실험 처리군은 10 마리 마우스들(그룹 당 마우스의 수 n=10)을 포함하였다. 마우스들의 처리는 종양 접종 후 3일에 시작되었다. 무린 모노클로날 항체들 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 39F11, 42E12, 43A11, 38H3, 또는 61C2을 나타내는 정제된 하이브리도마 상청액들 200 μ g은 정맥 내로 4주동안 1주에 한번씩 주입되었다. 또 다르게, 무린 모노클로날 항체들 45C1, 125E1, 163E12, 166E2, 또는 175D10을 포함하는 정제된 하이브리도마 상청액 200 μ g은 교차하는 정맥내 및 복막내 주입에 의해 6주동안 1주일에 두번씩 투여되었다. 처리된 마우스들의 종양 성장은 1주당 2번 모니터링되었다 (종양 부피= 길이 x 너비 x 너비/2 (mm³)). 마우스들은 만약 종양이 500 mm³ 부피에 도달하거나, 심한 질병의 경우에, 사망하였다. 도 24는 본 발명의 항체들에 의해 HEK293-CLD18A2 종양 세포 성장의 강한 억제력을 예시한 것이다. 도 25A 및 25B는 HEK293-CLD18A2 세포들을 이용하여 초기 치료 이종이식(xenograft) 모델에서 본 발명의 항체들로 처리에 의해 생존을 연장함을 나타낸 것이다.

[0511] b. 마우스들내에 촉진된 높은 수준으로 CLD18A2를 발현하는 종양들의 후기 개시 치료

[0512] HEK293-CLD18A2 세포들에 근거한 같은 종양 이종이식 모델은 상기한 바와 같은 초기 처리와 반대로 후기 치료 개시 프로토콜에 따라 고안되었다. 종양 세포 접종 후 27일째에 마우스들은 시험군에서 무작위화 각각 5-6마리 마우스들을 포함하여 무작위화하였고, 치료는 각각 무린 모노클로날 항체들 43A11, 163E12, 및 175D10을 포함하는 정제된 하이브리도마 상청액 200 μ g으로 개시되었다. 항체들은 교차로 정맥 내 및 복막내 주입에 의해 6주동안 한주에 2번씩 투여되었다. 이러한 모델에서 또한, 본 발명의 항체들은 종양 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 몇몇 항체들에서, 이것은 생존을 연장하게 한다 (도 26).

[0513] c. 낮은 수준의 CLD18A2를 발현하는 종양 초기 처리

[0514] SCID 마우스들에 낮은 수준으로 CLD18A2 단백질을 구조적으로 발현하는 침윤 인간 췌장 선암종(adenocarcinoma) 세포주, DAN-G 종양 세포주 2 x 10⁵ 세포들을 피하로 접종하였다. 마우스들 (그룹당 10마리)의 처리는 종양 그래프팅 후 3일에 개시되었다: 무린 모노클로날 항체들 45C1, 125E1, 163E12, 166E2, 또는 175D10을 포함하는 정제된 하이브리도마 상청액 200 μ g이 교차로 정맥내 및 복막내 주입에 의해 6주동안 1주에 2번씩 투여되었다. 생체 내에 췌장 DAN-G 종양 세포주의 공격적이고 빠른 종양 성장 때문에, 마우스들은 종양 약액질(cachexia)을 발전시켰고, 며칠내로 사망하였다. 그 결과, 치료적 효과를 측정하기 위한 윈도우(window)가 좁다고 하더라도, 본 발명의 항체들에 의해 매개된 종양 성장 억제 및 연장된 생존은 또한 이 모델에서 관찰되었다 (도 27A 및 27B).

[0515] d. 본 발명의 항체들은 마우스들 내에 부작용을 유도하지 않는다

[0516] 무린 CLD18A2-특이적 프라이머 쌍(s: CTA CCA AGG GCT ATG GCG TTC, as: GCA CCG AAG GTG TAC CTG GTC)은 정상 마우스 조직들의 넓은 패널로부터 유래된 cDNA를 증폭하기 위해 RT-PCR 분석들에서 사용되었다(도 28 참고).

[0517] 무린 CLD18A2의 발현은 위를 제외하고는 어떠한 시험된 정상 조직에서 관측가능하지 않았다(도 28 참고). 또한, 인간 및 마우스 CLD18A2와 교차반응하는, CLD18A2 특이적 항체는 정상 마우스 조직의 큰 패널에서 CLD18A2 발현의 면역조직화학적 분석들에 사용되었다(표 3 참고). 정상 위 조직을 제외하고, 모든 시험된 정상 조직들은 CLD18A2 발현을 나타내지 않았다. 우리가 인간 CLD18A2를 관찰한 바로는, 우리는 또한 마우스 카운터파트(counterpart)에 대하여, 표면 상피 세포들 및 깊은 크립트(crypt) 세포들의 표면은 그 세포들 표면에서 CLD18A2를 발현하는 반면에, 중앙 넥(neck) 영역은 CLD18A2 음성이다(도 29 A-C 참고). 요약하면, CLD18A2의 조직 분배는 인간과 마우스에서 동일한 것으로 나타난다.

표 3

[0518] 면역조직화학에 의해 분석된 바와 같이 무린 정상 조직들 내에 CLD18 발현

조직	CLD18 발현
소뇌	-
대뇌	-
대장	-
식도	-
심장	-
신장	-
간	-

폐	-
립프질	-
난소	-
췌장	-
골격근	-
비장	-
위	+
흉선	-
방광	-

[0519] 우리는 추가적으로 마우스들 내에 항체들 125E1, 163E12, 166E2 및 175D10에 의해 매개된 잠재적인 부작용(side effect)을 조사하였다. 이러한 모든 항체들은 인간 단백질 뿐만 아니라 뮤린 CLD18A2와 반응하는 것이 FACS 분석에 의해 이전에 나타났었다. 이러한 항체들의 처리 동안 및 후에 마우스들 내에 어떠한 눈에 보이는 부작용도 관찰되지 않았고, 비처리된(PBS-treated) 마우스들과 비교하여 항체 처리된 마우스들의 위 점막에서 관찰되는 독성의 어떠한 조직형태학적 상관성도 없었다 (도 30 참고).

[0520] **9. 항체의 키메라화**

[0521] **a. 마우스/인간 키메라 모노클로날 항체들의 생성**

[0522] 총 RNA 및 후속하는 단일 가닥 cDNA는 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 인간 비장 조직으로부터 기술분야 당업자에게 알려진 표준 방법, 예컨대, RNeasy Midi Kit (Qiagen) 및 Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen)를 이용하여 제조되었다.

[0523] 인간 카파 경쇄의 불변 영역은 PCR에 의해 PBMC cDNA로부터 증폭되었다. 센스 올리고머 (서열번호: 38)는 불변 영역의 5' 말단에 BamHI 제한효소 사이트를 추가하고, 불변 영역의 첫번째 두개의 아미노산들 (Arg-Thr)을 코딩하는 원래의 핵산 서열 5'-CGAACT-3'을 5'-CGTACG-3'로 변경하여, 아미노산 서열의 변화없이 BsiWI 제한효소 사이트를 생성하였다. 안티센스 올리고머 (서열번호: 39)는 정지 코돈을 함유하였고, 증폭된 불변 영역의 3' 말단에서 NotI 제한효소 사이트를 추가하였다. PCR 산물과 표준 발현 벡터 (예컨대, pcDNA3.1(+), Invitrogen)는 연속적으로 BamHI 및 NotI 제한효소로 인큐베이션하였다. 그 벡터는 추가적으로 CIAP(calf intestinal alkaline phosphatase)로 재순환을 방지하기 위해 처리되었다. 불변 영역은 최종적으로 벡터에 라이게이션되고, 불변 영역에 앞에 가변 영역의 다가오는 어떠한 융합도 잔기 벡터 다중 클로닝 사이트로부터의 HindIII 제한효소 사이트 (5'-AAGCTT-3')를 통해 가능하고 및 PCR 산물로 생성된 BsiWI 제한효소 사이트(5'-CGTACG-3')를 통해 가능하다. 벡터에 삽입된 인간 카파 경쇄 불변 영역의 서열은 서열번호: 40과 같이 리스트되고, 인간 카파 불변 영역의 아미노산 서열은 서열번호: 41에서와 같이 리스트된다.

[0524] 인간 감마-1 중연쇄의 불변 영역은 비장 cDNA로부터 PCR에 의해 증폭되었다. 5' 인산화된 센스 올리고머(서열번호: 42)는 불변영역 시작의 11개 뉴클레오타이드 다운스트림에 위치하는 자연 발생적인 ApaI 제한효소 사이트 위에 두고, 불변 영역의 증폭된 부분의 5' 말단에 HindIII 제한효소 사이트를 추가하였다. 5'인산화된 안티센스 올리고머 (서열번호: 43)은 정지 코돈을 함유하였고, 그리하여 증폭된 불변 영역의 3' 말단에 NotI 제한효소 사이트를 추가하였다. 그리하여 생성된 PCR 산물은 평활 말단 (blunt end)되었고, 5'인산화되었다. 증폭된 감마 불변 영역은 구별하는 안티센스 올리고머(서열번호: 44)에서의 PCR 및 시퀀싱에 의해 IgG1 서브클래스로 입증되었다. 경쇄의 발현에 사용되기 위한 벡터의 항생물질 내성(예컨대, 네오마이신)보다 서로 다른 항생물질 내성(예컨대, 하이그로마이신)을 가진 표준 발현 벡터 (예컨대 pcDNA3.1(+)/Hygro, Invitrogen)는 평활 말단을 남기는 다중 클로닝 사이트를 완전히 제거하기 위해 PmeI 제한효소로 인큐베이션하였다. 벡터는 재순환을 방지하기 위해 CIAP(calf intestinal alkaline phosphatase)로 추가적으로 처리하였다. 불변 영역은 최종적으로 벡터에 라이게이션되고, 불변 영역에 앞서 가변 영역의 다가오는 어떠한 융합도 모두 PCR 산물로 생성된 HindIII 제한효소 사이트(5'-AAGCTT-3') 및 ApaI 제한효소 사이트(5'-GGGCC-3')를 통해 현재 가능하다. 벡터에서 불변 영역의 바른 오리엔테이션(orientation), 즉, 벡터의 프로모터를 진행하는데 적절한, 바른 오리엔테이션은 시퀀싱에 의해 입증되었다. ApaI 제한효소 사이트의 위치 때문에, 이러한 목적을 위한 가변 영역의 증폭은 인간 ApaI 사이트의 서열에 더하여 인간 감마-1 불변 영역의 서열의 첫번째 11개의 뉴클레오타이드를 함유해야만 한다. 그리하여 벡터에 삽입된 증폭된 감마-1 중연쇄 불변 영역의 서열은 서열번호: 45와 같이 리스트되고, 그리하여 발현된 인간 감마-1 불변 영역의 아미노산 서열은 서열번호: 46과 같이 리스트된다.

[0525] [표 4]

[0526] 항체 클로닝에 사용되는 마우스 하이브리도마 세포주들

항체 클로닝에 사용되는 마우스 하이브리도마 세포주

	클론	mAb	아이소타입	가변 영역	올리고머 쌍	
					PCR	키메라화 항체
중연쇄	43A11	182-D1106-062	IgG2a	서열번호 : 55, 132	서열번호 : 70, 71	서열번호 : 100, 115
	163E12	182-D1106-294	IgG3	서열번호 : 56, 133	서열번호 : 72, 73	서열번호 : 101, 116
	125E1	182-D1106-279	IgG2a	서열번호 : 57, 134	서열번호 : 74, 75	서열번호 : 102, 117
	166E2	182-D1106-308	IgG3	서열번호 : 59, 136	서열번호 : 78, 79	서열번호 : 104, 119
	175D10	182-D1106-362	IgG1	서열번호 : 58, 135	서열번호 : 76, 77	서열번호 : 103, 118
	45C1	182-D758-187	IgG2a	서열번호 : 60, 137	서열번호 : 80, 81	서열번호 : 105, 120
경쇄	43A11	182-D1106-062	IgK	서열번호 : 62, 139	서열번호 : 84, 85	서열번호 : 107, 122
	163E12	182-D1106-294	IgK	서열번호 : 61, 138	서열번호 : 82, 83	서열번호 : 106, 121
	125E1	182-D1106-279	IgK	서열번호 : 63, 140	서열번호 : 86, 87	서열번호 : 108, 123
	166E2	182-D1106-308	IgK	서열번호 : 66, 143	서열번호 : 92, 93	서열번호 : 111, 126
	175D10	182-D1106-362	IgK	서열번호 : 65, 142	서열번호 : 90, 91	서열번호 : 110, 125
	45C1	182-D758-187	IgK	서열번호 : 64, 141	서열번호 : 88, 89	서열번호 : 109, 124
	45C1	182-D758-187	IgK	서열번호 : 67, 144	서열번호 : 94, 95	서열번호 : 112, 127
	45C1	182-D758-187	IgK	서열번호 : 68, 145	서열번호 : 96, 97	서열번호 : 113, 128
45C1	182-D758-187	IgK	서열번호 : 69, 146	서열번호 : 98, 99	서열번호 : 114, 129	

[0527]

[0528]

그것들의 뮤린 카운터 염색에 상응하여, 키메라 모노클로날 항체들은 접두어 "ch-"에 더하여, 예컨대, ch-43A11, ch-163E12, ch-125E1, ch-166E2, ch-175D10, ch-45C1로 명명하였다.

[0529]

경쇄 및 중연쇄의 뮤린 가변 영역들의 증폭은 Matz *et al.* (Nucleic Acids Research, 1999, Vol. 27, No. 6)에 기재된 "step-out PCR" 방법에 따라 수행되었다. 이를 위해, 전체 RNA는 기술분야에 당업자에게 알려진 표준 방법, 예컨대, RNeasy Mini Kit (Qiagen)를 이용하여, 모노클로날 하이브리도마 세포주들(표 4 참조)로부터 제조되었다. 단일 가닥 cDNA는 in Matz *et al.* (Nucleic Acids Research, 1999, Vol. 27, No. 6, 1558)에 또한 기재된 "template-switch"방법에 따라 제조되었다. (dT)30 올리고머 (서열번호: 47)에 추가하여, 그것은 cDNA 가닥의 중합화 동안에 주형 스위칭을 위한 5'어댑터로 작용하는 DNA/RNA 하이브리드 올리고머 (서열번호: 48)을 함유한다. 이러한 어댑터 올리고머에서 마지막 3개의 뉴클레오티드들은 디옥시리보뉴클레오티드 대신에 리보뉴클레오티드였다. 다음의 "step-out PCR"은 감마 사슬의 서브클래스 1, 2a 또는 3 (각각, 서열번호: 49 내지 52)의 불변 영역에 또는 마우스 카파 사슬의 불변 영역에 표적된 안티센스 올리고머를 사용하였다. 하이브리도마 세포주들에 의해 생산된 뮤린 모노클로날 항체의 IgG 서브클래스는 전에 IsoStrip으로 면역학적으로 분석되었고 (실시에 1 참조), 그리고 적절한 안티센스 올리고머는 따라서 선택되었다 (표 4 참조). 프라이머 믹스는 "step-out PCR"에서 센스 올리고머로 작용하고, 서열번호: 53 및 54에 리스트된 두개의 올리고머를 포함한다. 몇몇 하이브리도마 세포주들은 한 개 이상의 중연쇄 또는 경쇄를 발현한다 (하이브리도마들의 생성을 위한 골수종 세포주에 의해 발현되는 사슬들에 더하여). 표 4는 클로닝되고 시퀀싱된 뮤린 항체 사슬들 (서열번호: 55 내지 69 및 서열번호: 132 내지 146)의 가변 영역들 및 클로닝되고 시퀀싱된 전장(full-length) 키메라 항체 사슬들(서열번호: 100 내지 129)의 서열번호들을 요약한 것이다.

[0530]

확인된 뮤린 가변 영역들은 그리고나서 5' UTR 및 3' 마우스 불변 영역을 빼고, PCR에 의해 증폭시키고, 인간 불변 영역들을 가지는 제조된 발현 벡터들에 서브클론하게 하는 말단들에 제한효소 사이트를 추가하였다. 추가적으로, 센스 올리고머는 공통적인 Kozak 서열 (5'-GCCGCCACC-3' 또는 5'-AGCCACC-3')을 제공하였고, 중연쇄 가변 영역을 위한 안티센스 올리고머들은 ApaI 제한 효소 사이트에 더하여 인간 감마-1 불변 영역의 첫번째 11 염기들을 함유하였다 (표 4 참조, 서열번호: 70 내지 99). 카파 경쇄 가변 영역들은 HindIII 및 BsiWI 제한 효소들을 이용하여 클로닝되었고, 감마 중연쇄 가변 영역들은 HindIII 및 ApaI 제한효소가 요구되었다. 모노클로날 항체 45C1의 감마 중연쇄 가변 영역은 내부의 HindIII 제한효소 사이트를 포함한다- 여기서, 친화성 BsaI 효소가 대신 사용되었다(서열번호: 80 참조). 서열번호: 100 내지 114는 결과적으로 나오는 키메라화된 항체들의 핵

산 서열을 나타낸다 (표 4 참고). 서열번호: 115 내지 129는 그에 따라 발현되는 키메라 항체들의 아미노산 서열을 나타낸 것이다 (표 4 참고).

[0531] b. CLD18에 대한 키메라 항체들의 생성 및 생산

[0532] CLD18 특이성을 가진 키메라 항체들을 생산하는 포유동물 세포주가 생성되었다. 그 세포주들은 HEK293T 세포들 (ATCC CRL-11268)로부터 유래되었다. 형질감염 하루전에, 2.5×10^7 세포들은 14.5 cm의 조직 배양 접시에 플레이트되었고, 완전 배지 20 ml로 배양되거나, 다르게는 1×10^7 세포들이 10cm 조직 배양 접시에 플레이트되었고, 10ml 완전 배지로 배양되거나, 다르게는 0.6×10^6 세포들이 12-웰 조직 플레이트의 한 웰에 플레이트되었고, 2-3 ml 완전 배지로 배양되었다 (완전 배지: 항생제 없이 10% FBS가 첨가된 DMEM:F12 배지). 형질감염시의 추천되는 세포 밀도는 90%의 콘플루언스(confluence)이어야 한다. 형질감염 전에 즉시, 배지는 신선한 배지로 교체하였다. HEK293T 세포들은 형질감염 시약, 예컨대, 리포펙타민 2000 (Invitrogen, 11668-019) 또는 다르게 폴리에틸렌이민 (Sigma-Aldrich, 408727)으로 형질감염되었다. HEK293T 세포들의 형질감염을 위해 예시된 총 DNA양 110 μ g 또는 296 μ g 14.5cm 조직 접시에서 사용되었고, 형질감염 시약 대 DNA의 비율은 리포펙타민 2000 및 PEI의 경우 각각 1:2.5 및 1:12였다. 형질감염 24시간 후, 배지는 GMP 적절 배지, 예컨대, 혈청 없는 Pro293a 유사 화학적으로 규명된 배지 (Cambrex) 또는 X-Vivo 15 (Cambrex) 로 교체하였다. CLD18에 대한 키메라 모노클로날 항체들을 생산하는 형질감염된 HEK293T 세포들은 추가적으로 96시간동안 배양되었다. 미정제 상청액이 채취되고, 무균 필터되고, 단백질 A-세파로스에 의해 정제되었다. 항체 농도는 BCA 어세이에 의해 측정되었고, 소듐 도데실설페이트 겔 전기영동 및 코마시 스테이닝에 의해 순도가 체크되었다.

[0533] c. 키메라 모노클로날 항체들의 결합 특징

[0534] CLD18A2에 대한 클로닝되고 생성된 키메라 모노클로날 항체들의 결합 특이성은 실시예 3에서 설명된 플로우 사이토메트리에 의해서 분석되었다. 안정적으로 인간 CLD18A2를 발현하는 HEK293 살아있는 세포들 (HEK293-CLD18A2) 및 인간 CLD18A1 (서열번호: 7, 8)을 안정적으로 발현하는 HEK293 세포들 (HEK293-CLD18A1)은 키메라 모노클로날 항체를 포함하는 정제된 HEK293T 세포 배양 상청액과 함께 4°C에서 30분동안 인큐베이션되었고, 그 다음으로, APC-콘쥬게이트된 F(ab')₂ 단편 고트(goat) 항-인간 IgG Fc γ 2차 항체로 인큐베이션 하고, PI로 카운터 염색하였다. 결합은 BD FACSAArray를 이용하여 플로우 사이토메트리에 의해 평가되었다.

[0535] 유사하게, 내생적으로 CLD18A2 발현 인간 종양 세포주, 예컨대, KATO-III 및 NUGC-4 세포들은 플로우 사이토메트리에 의해 분석되었다.

[0536] 도 31A 및 B는 키메라 항체들 ch-43A11, ch-125E1, ch-163E12, ch-166E2, 및 ch-175D10의 플로우사이토메트리 분석을 나타낸 것이다. 모두 천연 에피토프 인식을 나타내고, CLD18A1이 아닌 CLD18A2 발현 세포들에 특이적으로 강한 결합을 나타낸다.

[0537] d. 보체 의존적 독성 (CDC)

[0538] 보체 용해를 위한 혈청은 Serum-Monovette 진공 채혈관(Sarstedt, Nurbrecht, Germany)으로 건강한 자원자들로부터의 혈액을 끌어내는 것에 의해 제조되었고, 그리고나서 20분동안 600g로 원심분리되었다. 혈청은 채취되고, -20°C에서 저장되었다. 대조군 혈청은 저장 전에 30분동안 56°C에서 열-불활성화되었다.

[0539] 본 발명의 단백질 A-세파로스-정제된 키메라 항체들은 내생적으로 인간 CLD18A2를 발현하는 KATO-III 세포들과 안정하게 형질감염된 CHO-CLD18A2 세포들에 대하여 보체 의존성 독성 (CDC)를 유도하는 능력에 대하여 분석되었다. 세포들은 각각 37°C에서 30분동안 2.5 μ g/ml 내지 35 μ g/ml의 최종 농도로, 모노클로날 항체들 ch-163E12, ch-166E2, 및 ch-175D10로 인큐베이션 되었다. RPMI에서 20% 인간 혈청은 세포에 추가되었고, 또 다시 30 분동안 37°C에서 인큐베이션되었다. 그리고나서, 죽은 세포들과 산 세포들은 최종 농도 2.5 μ g/ml에서 PI 염색으로 구분하고, 항체-매개된 세포 용해의 백분율은 플로우 사이토메트리로 측정되었다. 플로우 사이토메트리 분석을 위하여, BD FACSAArray 플로우 사이토미터가 사용되었다 (BD Biosciences, Mountain View, CA). 적어도 10000 건들이 분석을 위해 포워드 사이드워드 스캐터 (forward sideward scatter) (FSC/SSC) 트레슬드의 조절에 의해 세포 잔해물들이 배제되어 회수되었다. 특이적 용해는 다음의 식에 의해 계산되었다: 특이적 용해 = (% 시료에서 PI-양성 세포들 - 열 불활성화된 혈청이 있는 시료에서 %PI-양성 세포들). CDC에 의해 매개된 특이적 용해는 몇몇 항체들로 나타났다. 모든 3개의 항체들은 CHO-CLD18A2 세포들 (도 32)상에 강한 CDC를 매개하였다. KATO-III 세포들상에서, 항체들 ch-163E12 및 ch-175D10은 강한 CDC의 유도자들이었다.

[0540] e. 항체 의존성 세포 독성 (ADCC)

[0541] 본 발명의 FPLC-정제된, 키메라 항체들은 내생적으로 인간 CLD18A2를 발현하는 KATO-III 세포들에 대한 항체-의존성 세포 독성 (ADCC)를 유도하기 위한 능력에 대하여 분석되었다.

[0542] 건강한 공여자로부터의 인간 혈액은 PBS로 두번 희석되었고, 혈구는 피콜 (1077 g/ml, Pharmacia)상에 층을 이루었다. 원심분리 후, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)는 간기로부터 회수되었고, 세척되고, 5% 열-비활성화된 인간 혈청이 첨가된 X-Vivo-15 배양 배지에서 재현탁되었다.

[0543] 어세이 전 15시간, KATO-III 세포들은 루시페라아제로 형질감염되었고, 흰색 마이크로플레이트에 5×10^4 세포들/웰로 플레이트되었다.

[0544] 어세이를 위해, 효과기 대 표적 (E:T)의 비율이 20:1인 효과기 세포들 (PBMC, 상기된 바와 같이 제조된)과 FPLC-정제된 키메라 항체들은 첨가되고, 2-3시간동안 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션되었다. 웰 내에 항체들의 최종 농도는 50µg/ml 였다. 전-인큐베이션의 2-3시간 후에, 루시페 노란색 (BD Biosciences, San Jose USA)는 1mg/ml로 첨가되었다. 생존가능한 세포들의 루피세라아제에 의해 루시페 노란색의 산화로부터 일어나는 루미네선스는 마이크로플레이트-리더 (Infinite200, Tecan, Switzerland)를 이용하여 6시간 까지 계속적으로 측정되었다. 세포 독성의 백분율은 다음의 식을 이용하여 계산되었다: % 특이적 용해 = 100-((시료 루미네선스 수(counts) - 자연발생적 루미네선스 수(counts)) / (최대 루미네선스 수(counts) - 자연발생적 루미네선스 수(counts)) x 100), Triton X-100 (0,2% 최종 농도) 추가에 의해 측정되는 자연발생적 루미네선스, 항체의 부재에서 측정된 최대 신호.

[0545] 어세이를 이용하여, 모노클로날 항체 ch-163E12 및 ch-175D10는 KATO-III 세포들 (도. 33)상에 강한 ADCC를 매개하는 것으로 나타났다.

[0546] f. 증식 억제

[0547] 본 발명의 FPLC-정제된 키메라 항체들은 인간 CLD18A2를 내생적으로 발현하는 KATO-III 세포들의 세포 성장을 억제하기 위한 능력에 대하여 분석되었다. 표적 세포들(KATO-III)은 각각의 키메라 항체들 (뮤린 항체들의 증식 억제, 실시예 7 참고)의 존재하에 배양되었다. FPLC 정제된 키메라 항체들 ch-163E12 및 ch-166E2는 세포 증식을 억제하는 것으로 나타났다.

[0548] 10. 임상 선도 후보들로서 항체의 선택

[0549] 이상적인 임상 선도들은 다양한 범위의 치료적 및 진단적 응용들 (섹션 IV- 본 발명의 이용 및 방법들 또한 참고)에 걸친다. 본 발명에 따라 CLD18-A2에 관한 본 발명의 항체들이 제공된다. 본 발명에 따라 제공되는 항체들은 CLD18을 발현하는 세포, 특히 종양 세포들의 CDC 및 ADCC를 유도하고 증식을 억제하는 능력, 특이성에 관한 특징들의 넓은 스펙트럼을 제공하는 것으로 나타났다. 또한, 항체들의 키메라화는 부모의 뮤린 분자들에서 나타나지 않는 추가적인 Fc-의존성 효과기 기능의 획득을 가져올 수 있는 것으로 입증되었다. 예컨대, 뮤린 IgG1이 있는 항체 175D10은 보체 의존성 세포독성 (실시예 5 참고)을 유도하지 않고, 반면 인간 IgG1이 있는 ch-175D10은 구조적으로 CLD18 발현 종양 세포들의 특이적 용해를 유도하는 (표. 5 및 표. 6 참고) 것으로 나타났다.

[0550] 본 발명에 따른 제공된 항체들은 CLD18을 발현하는 세포들상에 효과기 기능들을 매개하기 위한 능력 및 결합 성질에 따라 별개의 클래스들로 분류할 수 있다. 본 발명에 따라 제공된 항체들로부터, 임상 선도 후보들은 그 기능적 특징들에 기초하여 선택될 수 있다. 본 발명의 선택된 뮤린 및 키메라 항체들의 특징의 개관은 표 5 및 표 6에 각각 주어진다.

[0551] 본 발명의 임상 선도 후보들은 하나 이상의 다음의 특징을 가질 수 있다:

[0552] a) 인간 CLD18A2에 결합하나 인간 CLD18A1에 결합하지 않음(예컨대, 43A11, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 및 175D10, 및 ch-43A11, ch-45C1, ch-125E1, ch-163E12, ch-166E2 및 ch-175D10). 예컨대, 도 6A 및 6B 참고.

[0553] b) 마우스 CLD18A2에 결합하나 마우스 CLD18A1에 결합하지 않음(예컨대, 125E1, 163E12, 166E2 및 175D10). 예컨대, 도 15A 및 15B 참고.

[0554] c) 종양 세포들에 의해 자연적으로 발현된 CLD18에 결합(예컨대, 45C1, 43A11, 125E1, 163E12, 166E2 및 175D10, 및 ch-45C1, ch-43A11, ch-125E1, ch-163E12, ch-166E2 및 ch-175D10). 예컨대, 도 13 참고.

[0555] d) 세포간 접촉 지대에 결합(예컨대, 45C1, 43A11, 125E1, 163E12, 166E2 및 175D10). 예컨대, 도 12A 및 도

12B 참고.

- [0556] e) CLD18을 발현하는 CDC 유도된 살해를 매개(예컨대, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 및 175D10, 및 ch-163E12 및 ch-175D10). 예컨대, 도 32 참고.
- [0557] f) CLD18을 발현하는 세포들의 ADCC 유도된 살해를 매개 (예컨대, ch-163E12 및 ch-175D10). 예컨대, 도 33 참고.
- [0558] g) CLD18을 발현하는 세포들의 증식 억제 (예컨대, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 및 175D10, 및 ch-163E12 및 ch-166E2).
- [0559] h) CLD18을 발현하는 세포들로 제노그래프트(xenograft) 모델들에서 종양 성장 억제 (예컨대, 43A11, 125E1, 163E12, 166E2, 및 175D10). 예컨대, 도 24 참고.
- [0560] i) CLD18을 발현하는 세포들로 제노그래프트 모델들에서 생존을 연장 (예컨대, 43A11, 125E1, 163E12, 166E2 및 175D10). 예컨대, 도 25B 참고.
- [0561] 선도 (lead) 후보 선택을 위한 성질의 대표적인 개요

표 5

뮤린 항체들

항체	A1은 아니지만 인간 CLD18A2의 결합	A1은 아니지만 마우스 CLD18A2의 결합	천연 발현하는 종양세포 상에 CLD18에 대한 결합	접촉지역 에서 CLD18에 대한 결합	CLD18 발현세포 상에 CDC 매개	CLD18 발현세포 의 증식억제	CLD18 발현 하는 이종 이식에 종 양 성장억 제	CLD18 발 현하는 이 종이식에서 생존연장
45C1	+	-	+	+	(+)	+	(+)	(+)
125E1	+	+	+	+	(+)	+	+	+
163E12	+	+	+	+	+	+	+	+
175D10	+	+	+	+	(+)	(+)	+	+

[0563] 표시:+ 우수한 수행, (+)다른 셋업에서의 수행

표 6

키메라 항체들

항체	A1은 아니지만 인간 CLD18A2의 결합	천연 발현하는 종양세포상에 CLD18에 대한 결합	CLD18 발현세포 상에 CDC 매개	CLD18 발현세포 상에 ADCC 매개	CLD18 발현세포의 증식억제
ch-45C1	+	+	n.d.	n.d.	n.d.
ch-125E1	+	+	n.d.	n.d.	n.d.
ch-163E12	+	+	+	+	+
ch-175D10	+	+	+	+	n.d.

[0565] 표시:+ 우수한 수행, (+)다른 셋업에서의 수행, n.d. 일어나지 않음새로운 국제 특허 출원

[0566] 가니메드 파마슈티칼스 아게, et al.

[0567] "암 치료를 위한 클라우딘-18에 대한 모노클로날 항체들"

[0568] 우리 참조:342-31PCT

[0569] 생물학적 물질에 대한 추가적인 시트

[0570] 추가 기탁의 확인:

[0571] 1) 기탁(DSM ACC2738, DSM ACC2739, DSM ACC2740, DSM ACC2741, DSM ACC2742, DSM ACC2743, DSM ACC2745, DSM ACC2746, DSM ACC2747, DSM ACC2748)을 위한 기탁 기관의 이름 및 주소:

[0572] DSMZ-독일 미생물 보존 센터

[0573] 마스체로더 웨그 1b

[0574] 38124 브라운슈바이크

[0575] 독일

[0576] 2) 기탁(DSM ACC2808, DSM ACC2809, DSM ACC2810)을 위한 기탁 기관의 이름 및 주소:

[0577] DSMZ-독일 미생물 보존 센터

[0578] 인호프펜스트르. 7B

[0579] 38124 브라운슈바이크

[0580] 독일

기탁날짜	기탁번호	아래 표시들은 다음 페이지에 서의 기재 내에 기탁된 미생물 에 관한 것임
2005년 10월 19일	DSM ACC2738	16페이지, 34줄
2005년 10월 19일	DSM ACC2739	17페이지, 1줄
2005년 10월 19일	DSM ACC2740	17페이지, 2줄
2005년 10월 19일	DSM ACC2741	17페이지, 3줄
2005년 10월 19일	DSM ACC2742	17페이지, 4줄
2005년 10월 19일	DSM ACC2743	17페이지, 5줄
2005년 11월 17일	DSM ACC2745	17페이지, 6줄
2005년 11월 17일	DSM ACC2746	17페이지, 7줄
2005년 11월 17일	DSM ACC2747	17페이지, 8줄
2005년 11월 17일	DSM ACC2748	17페이지, 9줄
2006년 10월 26일	DSM ACC2808	17페이지, 10줄
2006년 10월 26일	DSM ACC2809	17페이지, 11줄
2006년 10월 26일	DSM ACC2810	17페이지, 12줄

[0581]

[0582] 상기 기재된 모든 기탁들을 위한 추가적인 표시들:

[0583] - 마우스 (Mus musculus) 비장립프구와 융합된 마우스(Mus musculus) 골수종 P3X63Ag8U.1

[0584] - 인간 클라우딘-18A2에 대한 항체를 분비하는 하이브리도마

[0585] 3) 기탁자:

[0586] 상기 기재된 모든 기탁들은:

[0587] 가니메드 파마슈티칼스 아게

[0588] 프라일리히라트슈트라세 12

[0589] 55131 마인츠

[0590] 독일

[0591] 에 의해 이루어짐.

Applicant's or agent's file reference 342-31 PCT	International application No PCT/EP2006/011302
---	---

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 16, line 33.	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Name of depositary institution DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
Address of depositary institution (including postal code and country) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Date of deposit October 19, 2005	Accession Number DSM ACC2737
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
- Mouse (Mus musculus) myeloma P3X63Ag8U.1 fused with mouse (Mus musculus) splenocytes - Hybridoma secreting antibody against human claudin-18A2	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable) The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	

For receiving Office use only	For International Bureau use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer	Authorized officer

Form PCT/RO/134 (July 1998; reprint January 2004)

[0592]

RUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: 182-D1106-055	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2737
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2005-10-19 (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert its original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request) for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascherode Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): <i>V. Wechs</i> Date: 2005-11-01

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.
Form DSMZ-BP/4 (sole page) 12/2001

[0593]

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name:	Ganymed Pharmaceuticals AG Freiligrathstr. 12	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:	DSM ACC2737
Address:	55131 Mainz	Date of the deposit or the transfer ¹ :	2005-10-19
III. VIABILITY STATEMENT			
The viability of the microorganism identified under II above was tested on		2005-10-19 ²	
On that date, the said microorganism was			
<input checked="" type="checkbox"/> viable <input type="checkbox"/> no longer viable			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED³			
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY			
Name:	DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):	<i>V. Weits</i>
Address:	Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Date:	2005-11-01

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
³ Mark with a cross the applicable box.
⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: 182-D1106-056	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2738
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2005-10-19 (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): <i>V. Weis</i> Date: 2005-11-01

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, each date is the date on which the status of International Depository Authority was acquired.
Form DSMZ-BP/4 (sole page) 12/2001

[0595]

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name:	Ganymed Pharmaceuticals AG Freiligrathstr. 12	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:	DSM ACC2738
Address:	55131 Mainz	Date of the deposit or the transfer ¹ :	2005-10-19
III. VIABILITY STATEMENT			
The viability of the microorganism identified under II above was tested on		2005-10-19 ²	
On that date, the said microorganism was			
<input checked="" type="checkbox"/> viable <input type="checkbox"/> no longer viable			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ³			
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY			
Name:	DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):	<i>V. Weiss</i>
Address:	Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Date:	2005-11-01

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (i) and (iii), refer to the most recent viability test.
³ Mark with a cross the applicable box.
⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

Form DSMZ-BP/9 (sole page) 12/2001

[0596]

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: 182-D1106-037	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2739
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross when applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2005-10-19 (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Maschender Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): <i>U. Wechs</i> Date: 2005-11-01

* Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of International depositary authority was acquired.
Form DSMZ-BP/4 (sole page) 12/2001

[0597]

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name:	Ganymed Pharmaceuticals AG Freiligrathstr. 12	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:	DSM ACC2739
Address:	55131 Mainz	Date of the deposit or the transfer ¹ :	2005-10-19
III. VIABILITY STATEMENT			
The viability of the microorganism identified under II above was tested on		2005-10-19 ²	
On that date, the said microorganism was			
<input checked="" type="checkbox"/> viable <input type="checkbox"/> no longer viable			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ³			
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY			
Name:	DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):	<i>V. Weils</i>
Address:	Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Date:	2005-11-01

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
³ Mark with a cross the applicable box.
⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: 182-D1106-038	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2740
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2005-10-19 (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above was received by this International Depository Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request) for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascherode Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): <i>V. Wehler</i> Date: 2005-11-01

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired.
Form DSMZ-BP/4 (sole page) 12/2001

[0599]

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name: Ganymed Pharmaceuticals AG Freiligrathstr. 12 Address: 55131 Mainz		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2740 Date of the deposit or the transfer ¹ : 2005-10-19	
III. VIABILITY STATEMENT			
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 2005-10-19 ² . On that date, the said microorganism was (x) ³ viable () ³ no longer viable			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ⁴			
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mescheder Weg 1b D-58124 Brunnichweg		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date: 2005-11-01	

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (i) and (ii), refer to the most recent viability test.
³ Mark with a cross the applicable box.
⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

Form DSMZ-BP/B (sole page) 12/2001

[0600]

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: 182-D1106-019	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2741
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2005-10-19 (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above was received by this International Depositary Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert its original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Maschenstr. Weg 1b D-38124 Emmerke	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): <i>V. Weh</i> Date: 2005-11-01

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, each date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.
Form DSMZ-BP/4 (sole page) 12/2001

[0601]

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freitagstr. 12
55131 Mainz

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name:	Ganymed Pharmaceuticals AG Freitagstr. 12	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2741	
Address:	55131 Mainz	Date of the deposit or the transfer: 2005-10-19	
III. VIABILITY STATEMENT			
The viability of the microorganism identified under II above was tested on		2005-10-19 ² .	
On that date, the said microorganism was			
<input checked="" type="checkbox"/> ³ viable <input type="checkbox"/> ³ no longer viable			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED⁴			
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY			
Name:	DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):	
Address:	Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	 Date: 2005-11-01	

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
³ Mark with a cross the applicable box.
⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: 182-D1106-062	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2742
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2005-10-19 (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Marchfelder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): <i>V. Weiler</i> Date: 2005-11-01

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired.
Form DSMZ-BP/4 (sole page) 12/2001

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name: Ganymed Pharmaceuticals AG Freiligrathstr. 12 Address: 55131 Mainz		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2742 Date of the deposit or the transfer: 2005-10-19	
III. VIABILITY STATEMENT			
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 2005-10-19 ¹ . On that date, the said microorganism was			
<input checked="" type="checkbox"/> viable <input type="checkbox"/> no longer viable			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED*			
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Miescherstr. Weg 1b D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  Date: 2005-11-01	

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
³ Mark with a cross the applicable box.
⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

[0604]

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: 182-D1106-067	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2743
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross when applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2005-10-19 (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above was received by this International Depository Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Maschener Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): <i>V. Weh</i> Date: 2005-11-01

* Where Rule 6.4 (e) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired.
Form DSMZ-BP/4 (sep page) 12/2001

[0605]

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name: Ganymed Pharmaceuticals AG Freiligrathstr. 12 Address: 55131 Mainz		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2743 Date of the deposit or the transfer: 2005-10-19	
III. VIABILITY STATEMENT			
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 2005-10-19 ¹ . On that date, the said microorganism was (x) ² viable () ³ no longer viable			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ⁴			
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): <i>V. Weh</i> Date: 2005-11-01	

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
³ Mark with a cross the applicable box.
⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: 182-D758-035	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2745
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: <input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2005-11-17 (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mescheder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): <i>V. Wechs</i> Date: 2005-12-05

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired.
Form DSMZ-BP/4 (sole page) 12/2001

[0607]

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name: Ganymed Pharmaceuticals AG Address: Freiligrathstr. 12 55131 Mainz		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2745 Date of the deposit or the transfer: 2005-11-17	
III. VIABILITY STATEMENT			
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 2005-11-21 ¹ . On that date, the said microorganism was			
(x) ³ viable () ³ no longer viable			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ⁴			
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascherode Weg 1b D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  Date: 2005-12-05	

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
³ Mark with a cross the applicable box.
⁴ Fill in if the information has been requested and if the result of the test were negative.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
Issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: 182-D758-036	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2746
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: <input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2005-11-17 (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above was received by this International Depository Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Marchfelder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): <i>V. Weh</i> Date: 2005-12-05

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, each date is the date on which the status of international depository authority was acquired.

TREATY ON THE INTERNATIONAL
OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name: Ganymed Pharmaceuticals AG Freilignhstr. 12 Post: 55131 Mainz		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2746 Date of the deposit or the transfer: 2005-11-17	
VIABILITY STATEMENT			
Viability of the microorganism identified under II above was tested on 2005-11-21 ¹ . At that date, the said microorganism was <input checked="" type="checkbox"/> viable <input type="checkbox"/> no longer viable			
CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED*			
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): <i>V. Wehls</i> Date: 2005-12-05	

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (i) and (ii), refer to the most recent viability test.
³ Mark with a cross the applicable box.
⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

Form DSMZ-BP/9 (only page) 12/2001

[0610]

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
Identified at the bottom of this page.

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: 182-D758-040	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2747
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: <input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2005-11-17. (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mescheder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date: 2005-12-05

¹ Where Rule 6.4 (f) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.
Form DSMZ-BP/4 (sole page) 1/2/2001

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name:	Ganymed Pharmaceuticals AG Freiligrathstr. 12	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:	DSM ACC2747
Address:	55131 Mainz	Date of the deposit or the transfer:	2005-11-17
III. VIABILITY STATEMENT			
The viability of the microorganism identified under II above was tested on		2005-11-21	
On that date, the said microorganism was			
<input checked="" type="checkbox"/> viable <input type="checkbox"/> no longer viable			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED*			
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY			
Name:	DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):	<i>V. Weils</i>
Address:	Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Date:	2005-12-05

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
³ Mark with a cross the applicable box.
⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

Form DSMZ-BP/9 (sole page) 12/2001

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: 182-D1106-01	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2748
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: <input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2005-11-17 (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): <i>V. Wehler</i> Date: 2005-12-05

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired.
Form DSMZ-BP/4 (sole page) 12/2001

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

VIABILITY STATEMENT
Issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name: Ganymed Pharmaceuticals AG Freiligrathstr. 12 Address: 55131 Mainz		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2748 Date of the deposit or the transfer: 2005-11-17	
III. VIABILITY STATEMENT			
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 2005-11-21 ¹ . On that date, the said microorganism was (x) ² viable () ³ no longer viable			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED*			
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  Date: 2005-12-05	

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (i) and (ii), refer to the most recent viability test.
³ Mark with a cross the applicable box.
⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: 182-D1106-279	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2808
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2006-10-26 (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Inhoffenstr. 7 B D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): <i>V. Wehlo</i> Date: 2006-11-08

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired.
Form DSMZ-BP/4 (sole page) 08/2006

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name: Ganymed Pharmaceuticals AG Freiligrathstr. 12 Address: 55131 Mainz		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2808 Date of the deposit or the transfer ¹ : 2006-10-26	
III. VIABILITY STATEMENT			
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 2006-10-30 ² . On that date, the said microorganism was (x) ³ viable () ³ no longer viable			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ⁴			
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Inhofenstr. 7 B D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s). Date: 2006-11-08	

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (i) and (iii), refer to the most recent viability test.
³ Mark with a cross the applicable box.
⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

Form DSMZ-BI/9 (sole page) 08/2006

[0616]

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganyined Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: 182-D1106-294	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2809
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2006-10-26 (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Inhoffenstr. 7 B D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): <i>V. Wechs</i> Date: 2006-11-08

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired.
Form DSMZ-BP/4 (sole page) 08/2006

[0617]

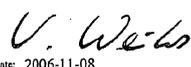
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name: Ganymed Pharmaceuticals AG Freiligrathstr. 12 Address: 55131 Mainz		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2809 Date of the deposit or the transfer ¹ : 2006-10-26	
III. VIABILITY STATEMENT			
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 2006-10-30 ² . On that date, the said microorganism was			
<input checked="" type="checkbox"/> ³ viable <input type="checkbox"/> ³ no longer viable			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ⁴			
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY			
Name: DSMZ/DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Inhoffenstr. 7 B D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  Date: 2006-11-08	

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
³ Mark with a cross the applicable box.
⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: 182-D1106-362	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2810
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2006-10-26 (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above was received by this International Depository Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Inhofenstr. 7 B D-38114 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): <i>V. Weh</i> Date: 2006-11-08

¹ Where Rule 6.4 (f) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE



INTERNATIONAL FORM

Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstr. 12
55131 Mainz

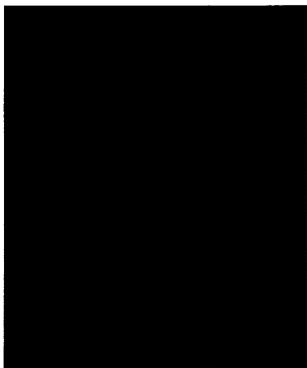
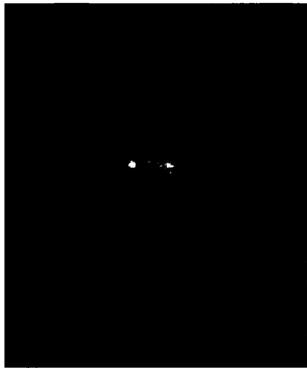
VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name: Ganymed Pharmaceuticals AG Freiligrathstr. 12 Address: 55131 Mainz		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2810 Date of the deposit or the transfer ¹ : 2006-10-26	
III. VIABILITY STATEMENT			
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 2006-10-30 ² . On that date, the said microorganism was			
<input checked="" type="checkbox"/> viable <input type="checkbox"/> no longer viable			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ³			
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Inhoffenstr. 7 B D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date: 2006-11-08	

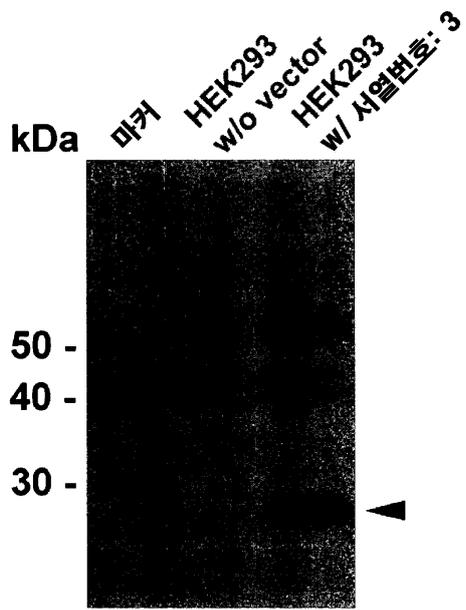
¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
³ Mark with a cross the applicable box.
⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

도면

도면1



도면2

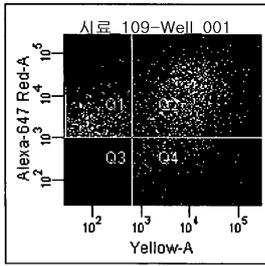


도면3



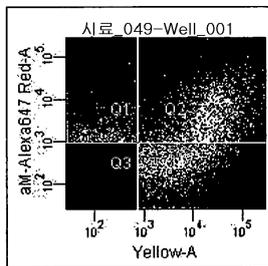
도면4a

24H5 (182-D758-034)

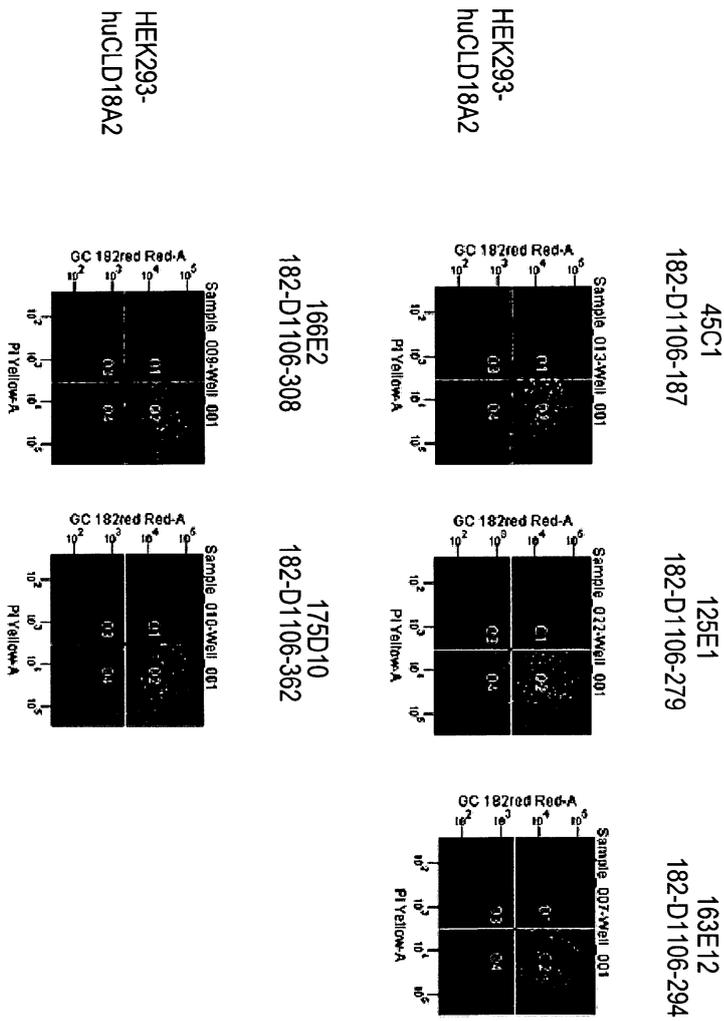


도면4b

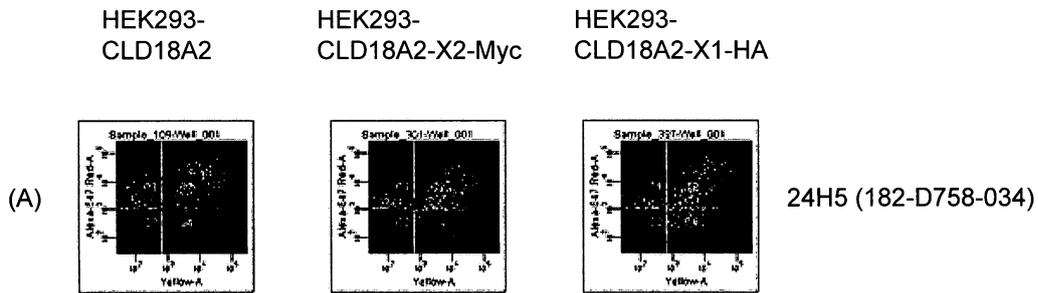
85A3 (182-D756-002)



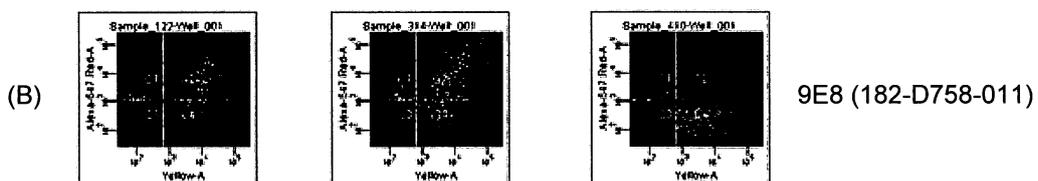
도면4c



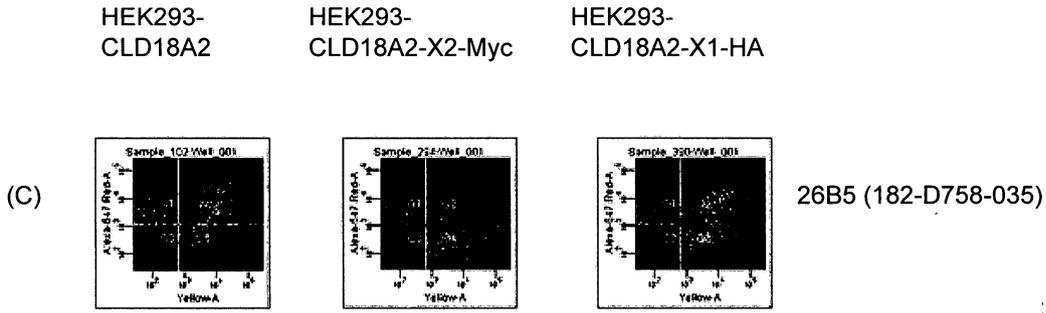
도면5a



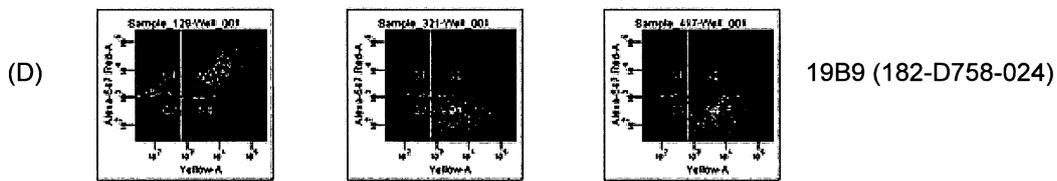
도면5b



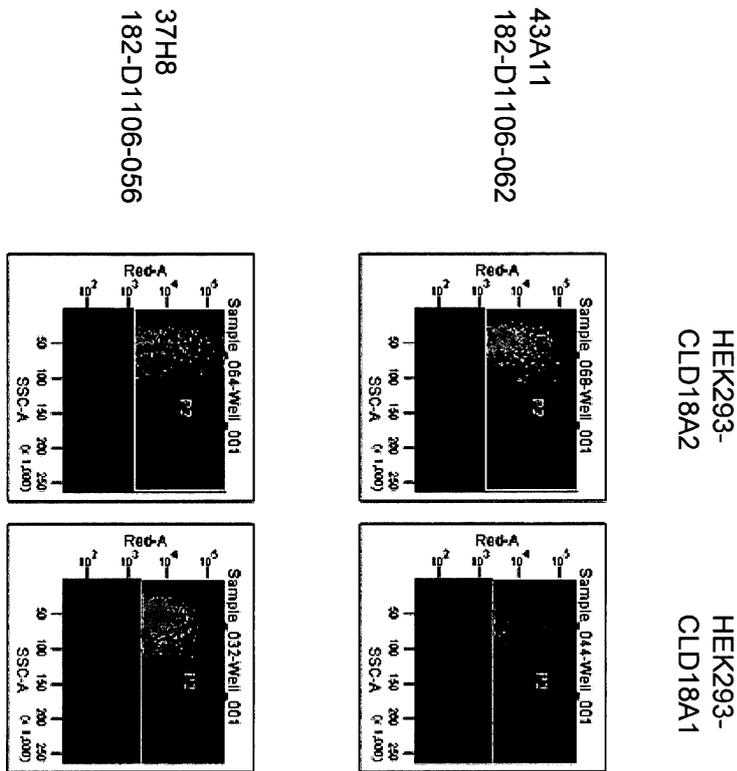
도면5c



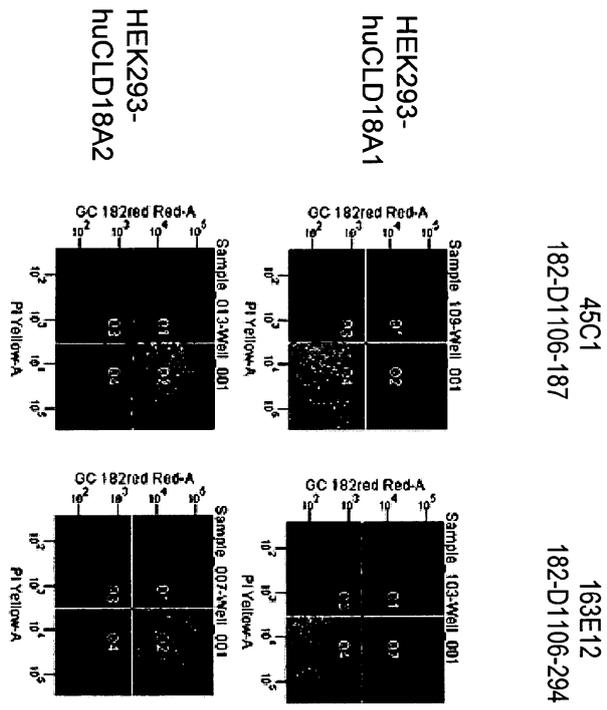
도면5d



도면6a



도면6b



도면7a

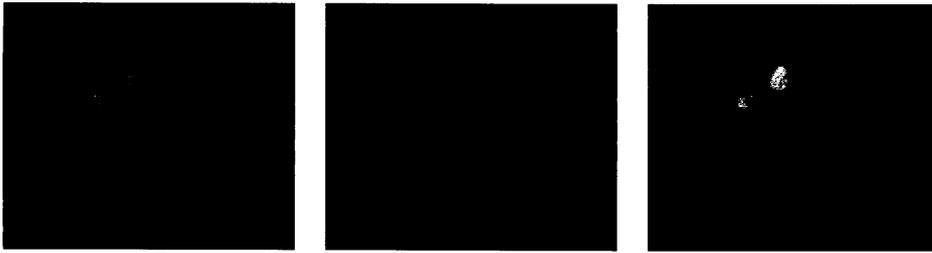


도면7b



도면7c

(C)



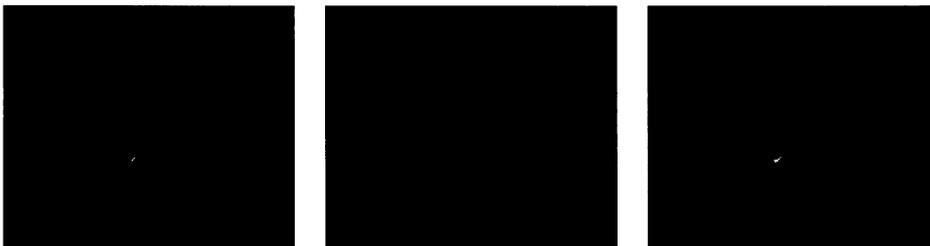
도면7d

(D)



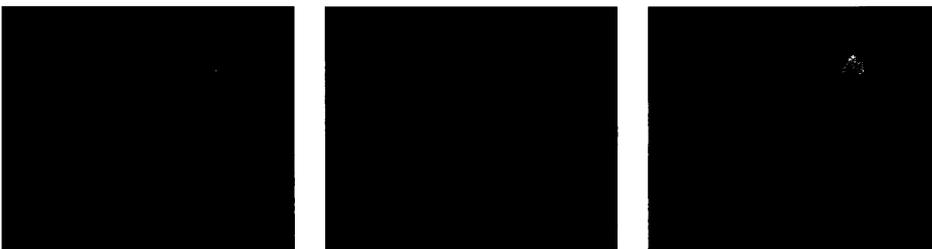
도면8a

(A)



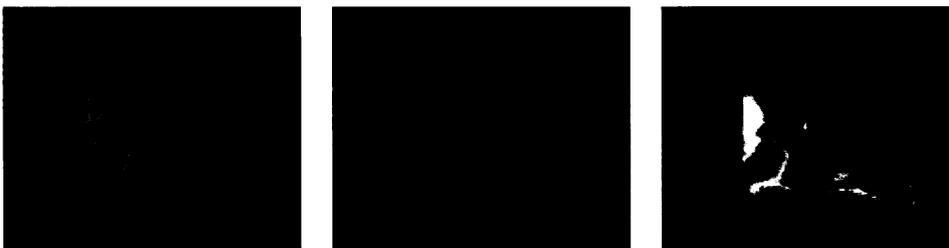
도면8b

(B)



도면8c

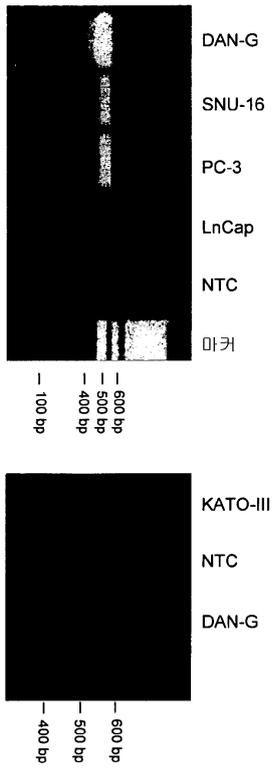
(C)



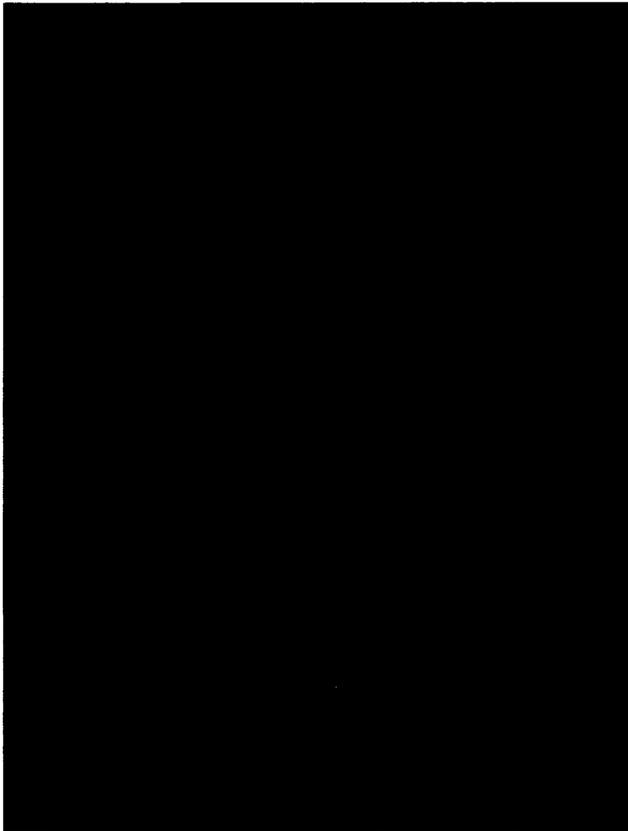
도면8d



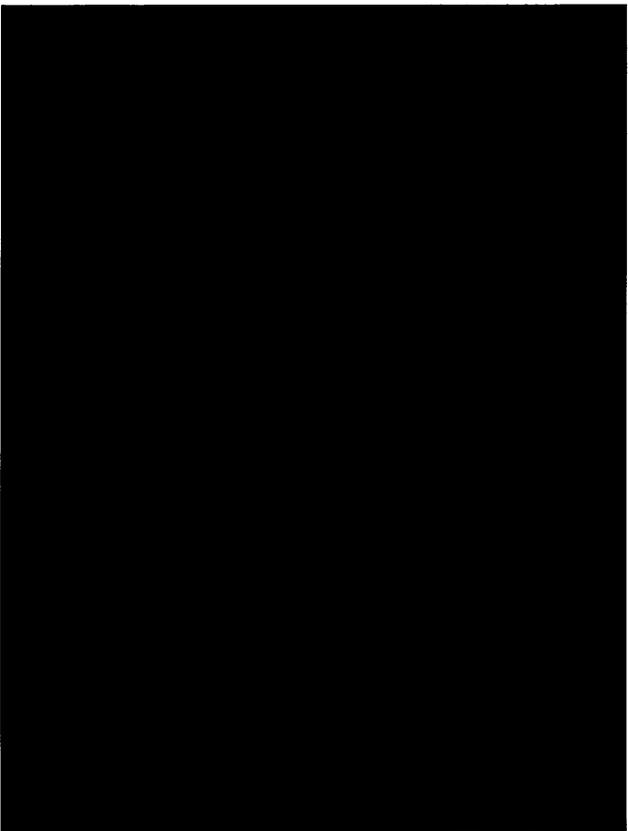
도면9



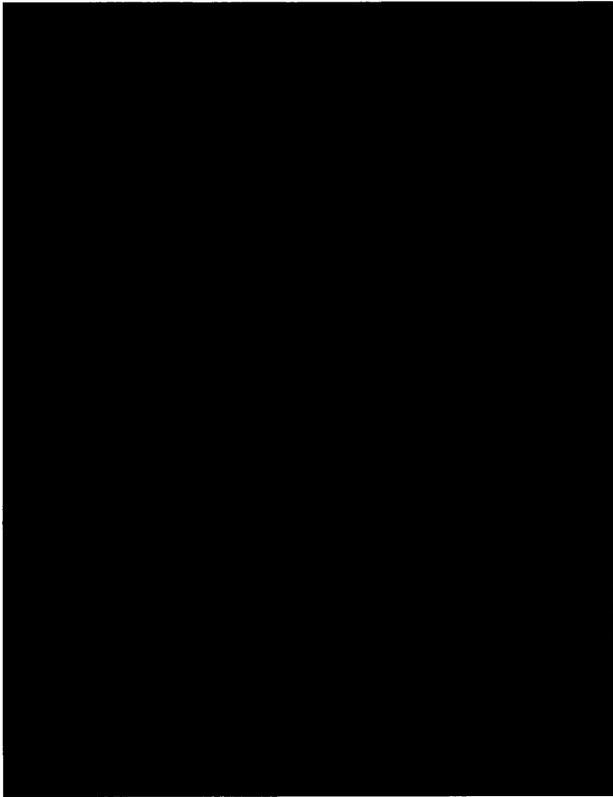
도면10



도면11



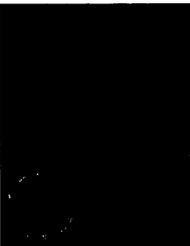
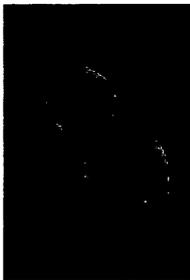
도면12a



45C1
182-D758-187

129E1
182-D1106-279

163E12
182-D1106-294

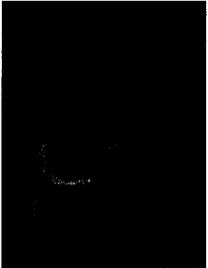
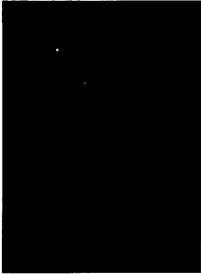


KATO-III

166E2
182-D1106-308

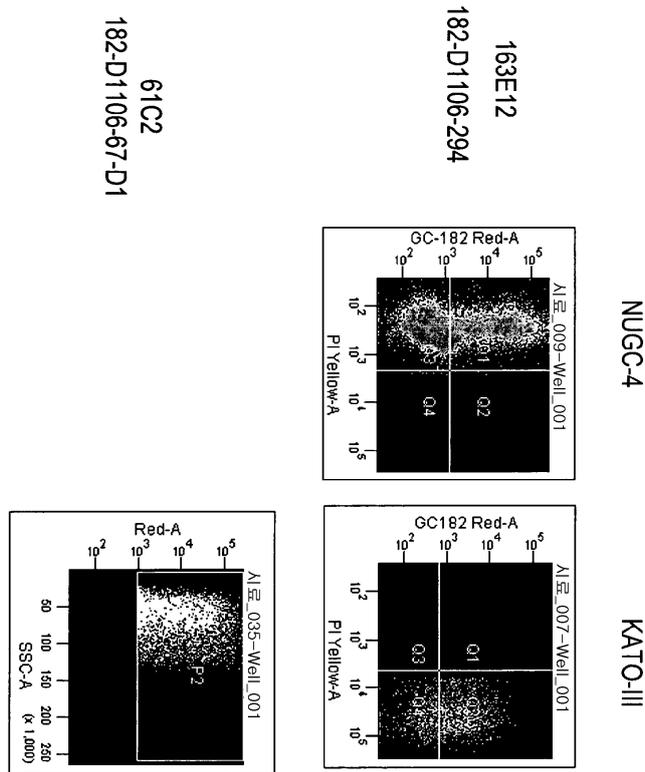
175D10
182-D1106-362

KATO-III



도면12b

도면13

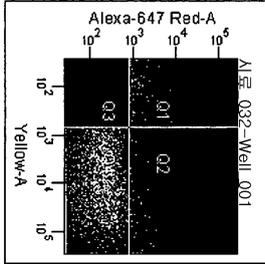


도면14

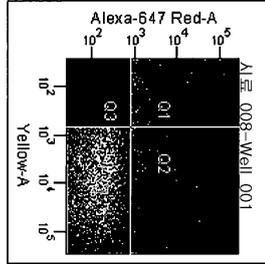
	1	50
NP_062789	(1) -----MATTTCQVVGLL LSL LGLAGCIAAT@MDMWS TQDLY DNPVTA V	
NP_057453	(1) -----MSTTTCQVVAPLLSILGLAGCIAAT@MDMWS TQDLY DNPVTS V	
AAL15636	(1) -----MSVTACQGLGFV VSL IGFAGIIAATCMDQ WSTQDLY NNPVTA V	
NP_001002026	(1) -----NAV TACQGLGFV VSLIGIAGIIAATCMDQ WSTQDLY NNPVTA V	
	Extrazellular	
	51	100
NP_062789	(44) FQYEG LWRSCVQ SSGFTECR F YFTILGLPAMLQAVRALMIVGIVLGVIG	
NP_057453	(44) FQYEG LWRSCVR SSGFTECR F YFTILGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIG	
AAL15636	(44) FNYQGL WRSCV RESSGFTECRGYFTILGLPAMLQAVRALMIVGIVLGVIG	
NP_001002026	(44) FNYQGL WRSCV RESSGFTECRGYFTILGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIG	
	Extrazellular 1	
	101	150
NP_062789	(94) ILVSI FALKCIRIGSM DSAKAMTLTSGI LFI ISGICAIIGVSVFANML	
NP_057453	(94) LLVSI FALKCIRIGSM EDSAKA MTLTSGIM FI YSGLCAIAGVSVFANML	
AAL15636	(94) ILVSI FALKCIRIGSM DSAKAMTLTSGI LFI ISGICAIIGVSVFANML	
NP_001002026	(94) LLVSI FALKCIRIGSM EDSAKA MTLTSGIM FI YSGLCAIAGVSVFANML	
	Extra / intra 3 N-Glyc	ex2
	151	200
NP_062789	(144) VTNFWMSTANMYSGMCGMG GMVQ TVQTRYTFGAALFVGVWAGGLTLIGGV	
NP_057453	(144) VTNFWMSTANMYTGMG---GMVQTVQTRYTFGAALFVGVWAGGLTLIGGV	
AAL15636	(144) VTNFWMSTANMYSGMCGMG GMVQ TVQTRYTFGAALFVGVWAGGLTLIGGV	
NP_001002026	(144) VTNFWMSTANMYTGMG---GMVQTVQTRYTFGAALFVGVWAGGLTLIGGV	
	Extrazellular 2	
	201	250
NP_062789	(194) MMCIA CRGLT PDDSN E KAVSYHASG@NVA YR PGGPKASTGFGSNT R KNKKI	
NP_057453	(191) MMCIA CRGLA PE ET NYKAVSYHASGHSVA YK PGGPKASTGFGSNT R KNKKI	
AAL15636	(194) MMCIA CRGLT PDDSN E KAVSYHASG@NVA YR PGGPKASTGFGSNT R KNKKI	
001002026	(191) MMCIA CRGLA PE ET NYKAVSYHASGHSVA YK PGGPKASTGFGSNT R KNKKI	
	251	271
NP_062789	(244) YDGGARTED EQ SHPTKYDYV	
NP_057453	(241) YDGGARTED EVQ SYP S KHDYV	
AAL15636	(244) YDGGARTED EQ SHPTKYDYV	
NP_001002026	(241) YDGGARTED EVQ SYP S KHDYV	

도면15a

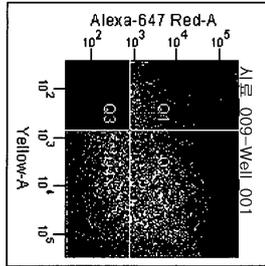
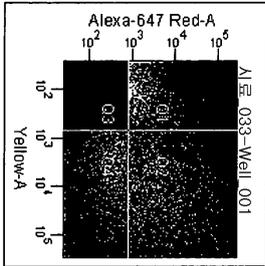
HEK293-
muCLD18A2



HEK293-
muCLD18A1



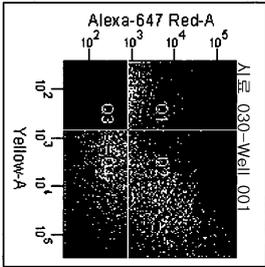
38G5
182-D1106-057-D1



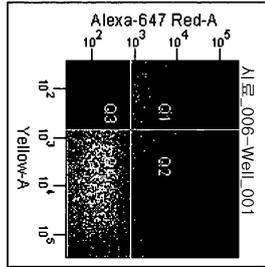
38H3
182-D1106-058-D1

도면15b

HEK293-
muCLD18A2



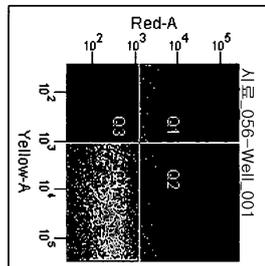
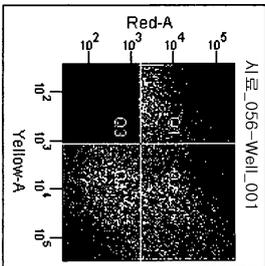
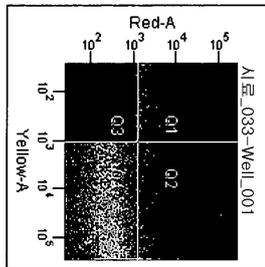
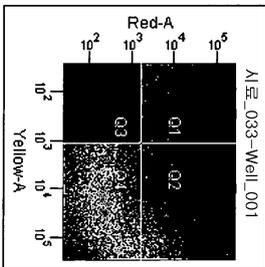
HEK293-
muCLD18A1



37G11
182-D1106-055-D1

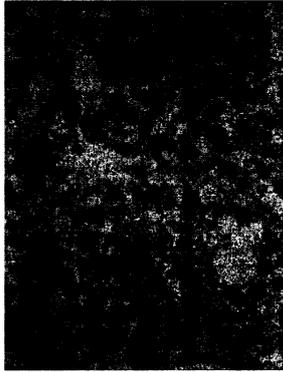
45C1
182-D1106-187

163E12
182-D1106-294



도면16a

가



나



다

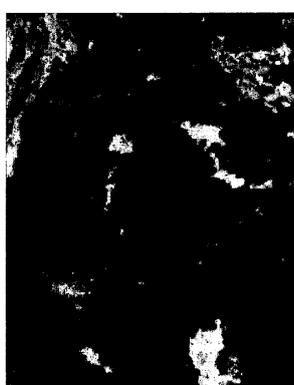
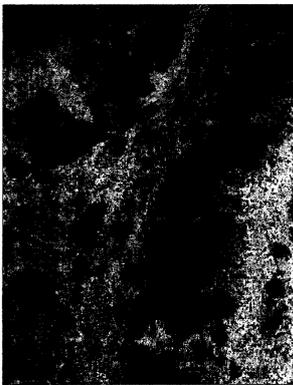


라



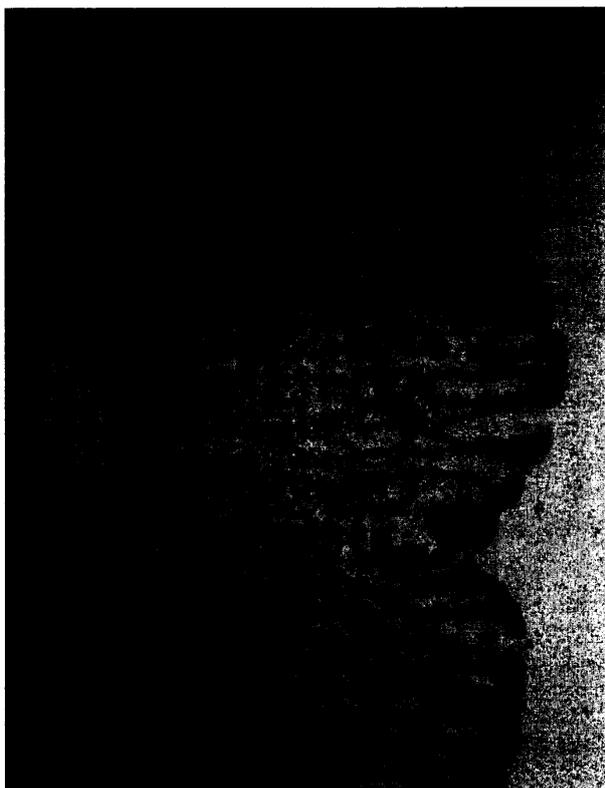
도면16b

폐 암종



위 암종 (carcinoma)

도면16c



도면17a

양방



위



포배

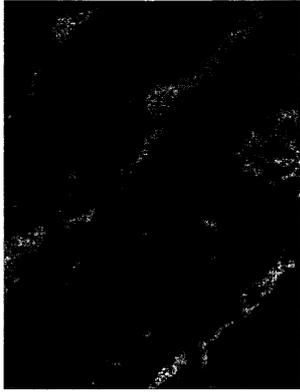


신장



도면17b

계
양
경



위
양
경



도면18a

위 암종 (stomach carcinomass)



위 정상

도면18b

위암 (gastric cancer)



Hek293-GC182A2



위암

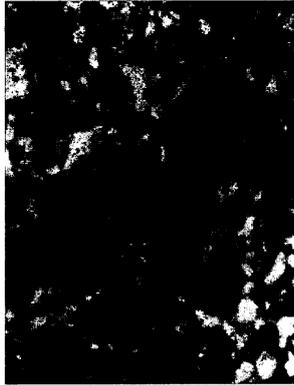


Hek293-mock

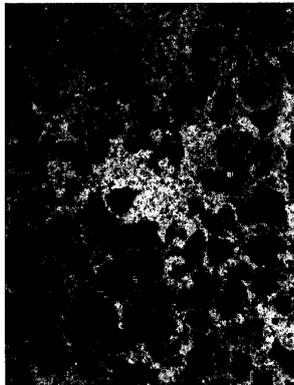


도면18c

위와



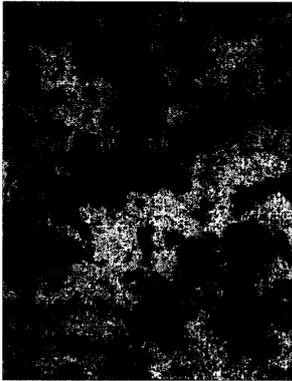
HeK293-GC182A2



HeK293-mock

도면18d

위양



HeK293-GC182A2

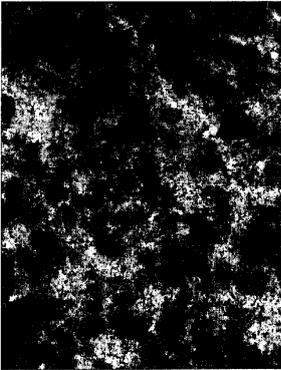


HeK293-mock

도면18e

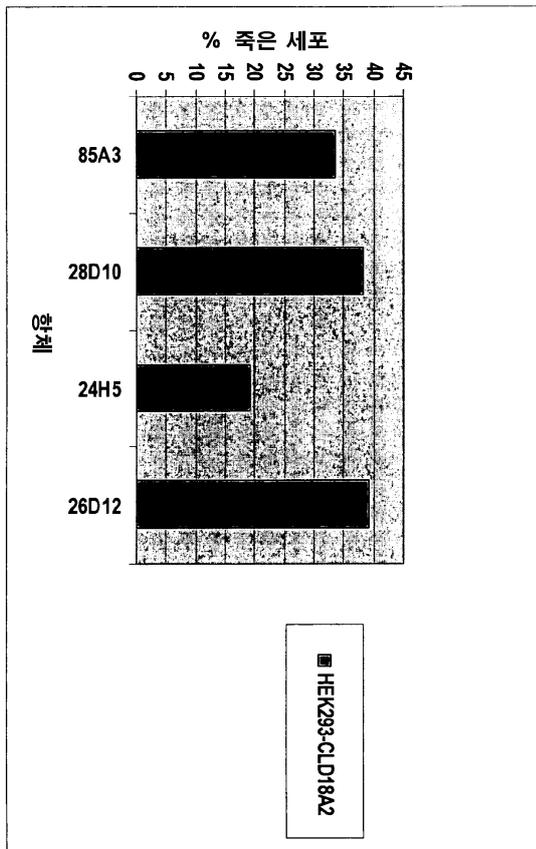


Hek293-GC182A2

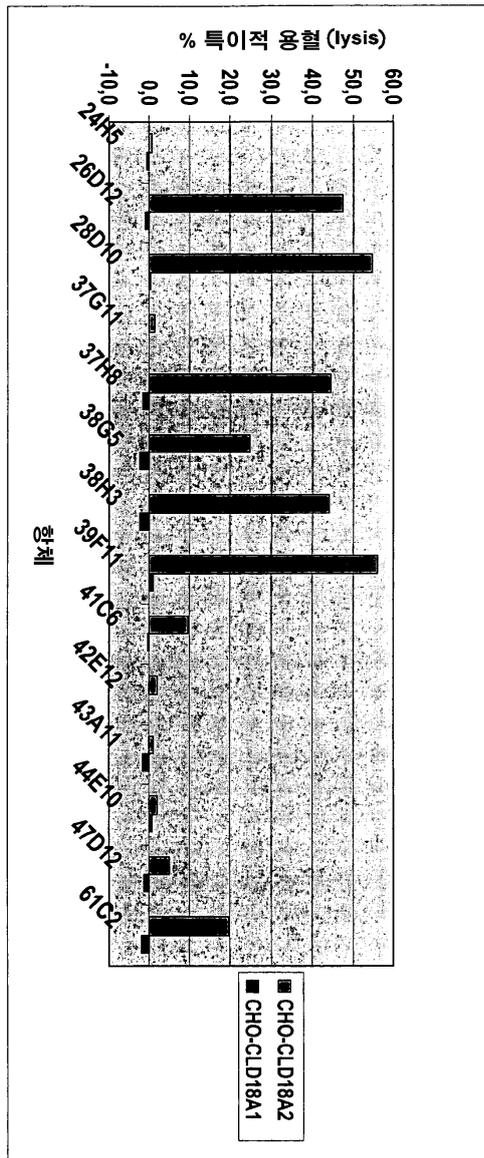


Hek293-mock

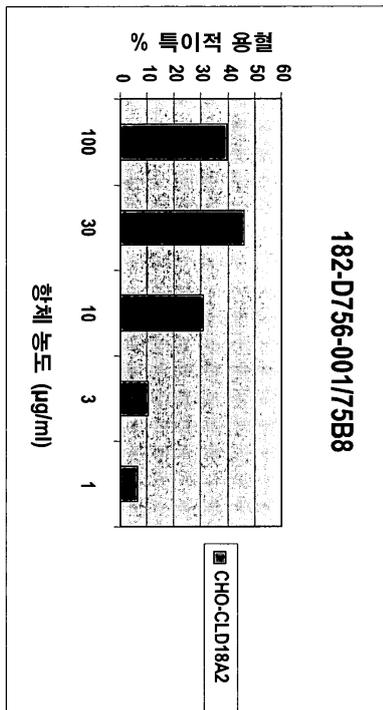
도면19



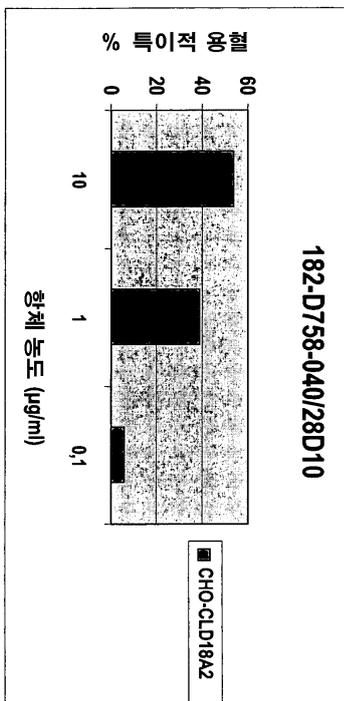
도면20



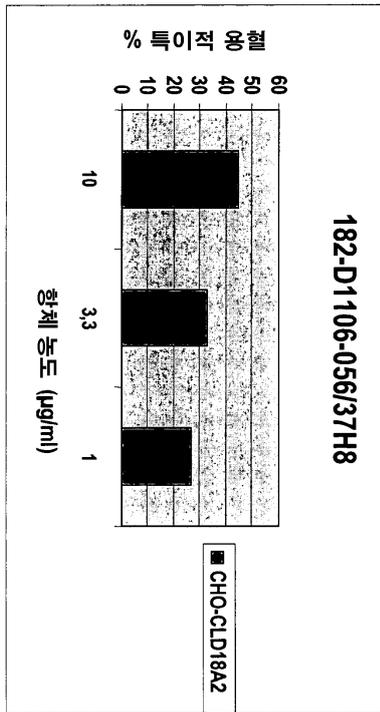
도면21a



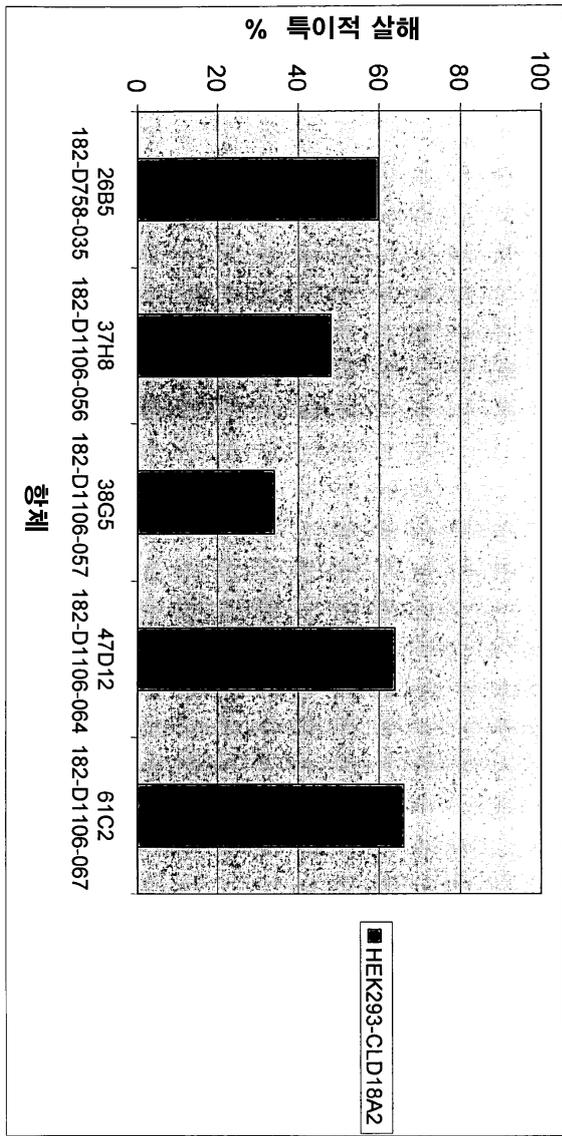
도면21b



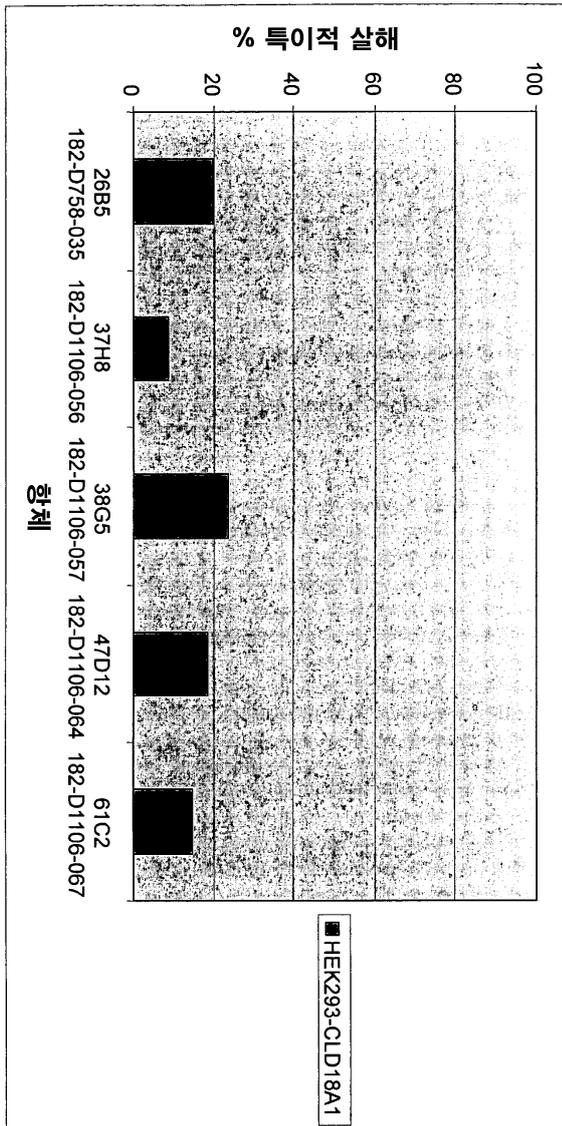
도면21c



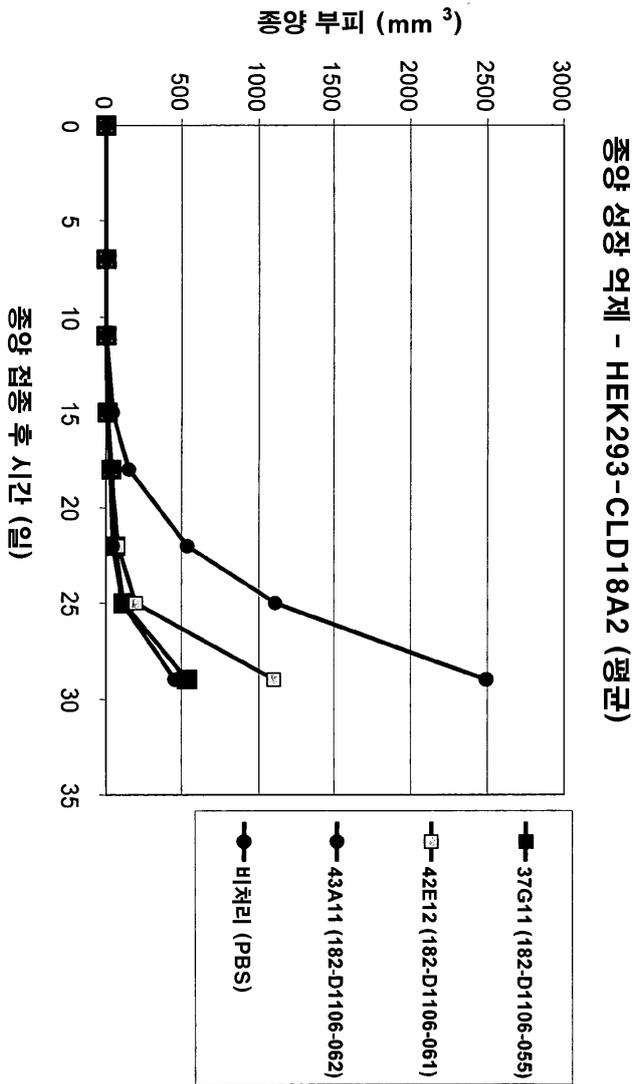
도면22



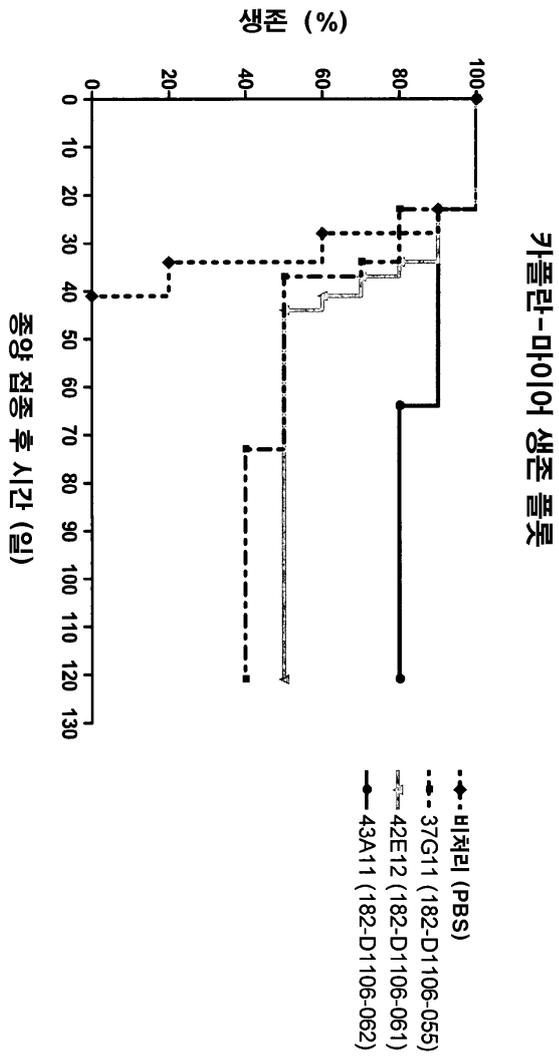
도면23



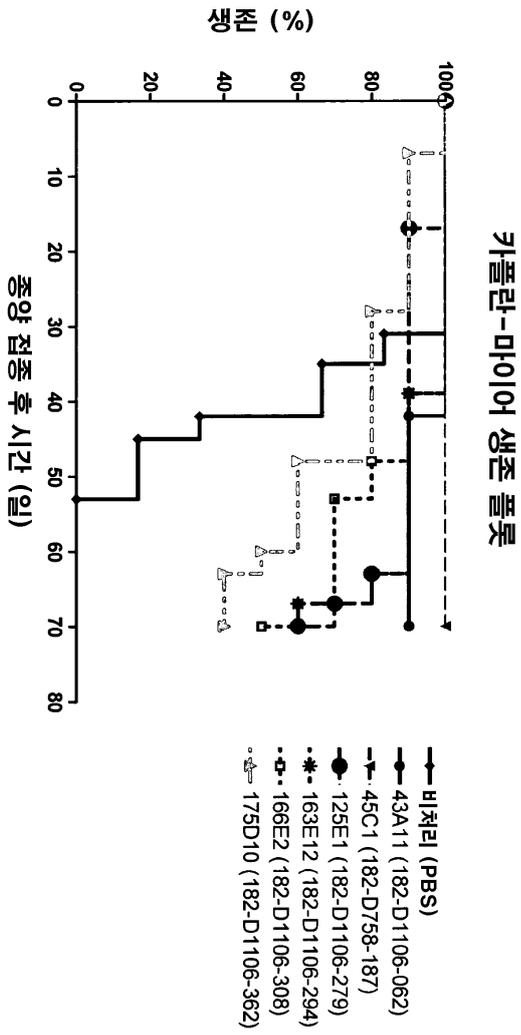
도면24



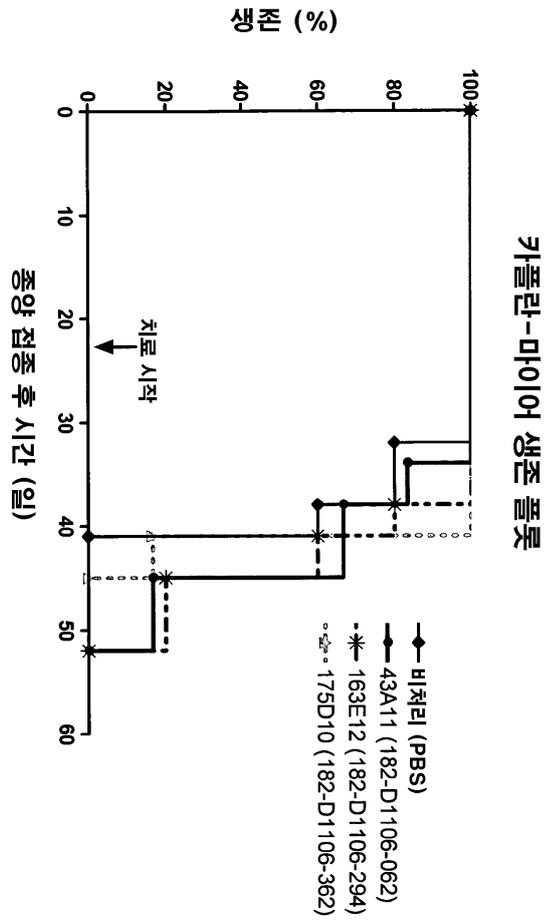
도면25a



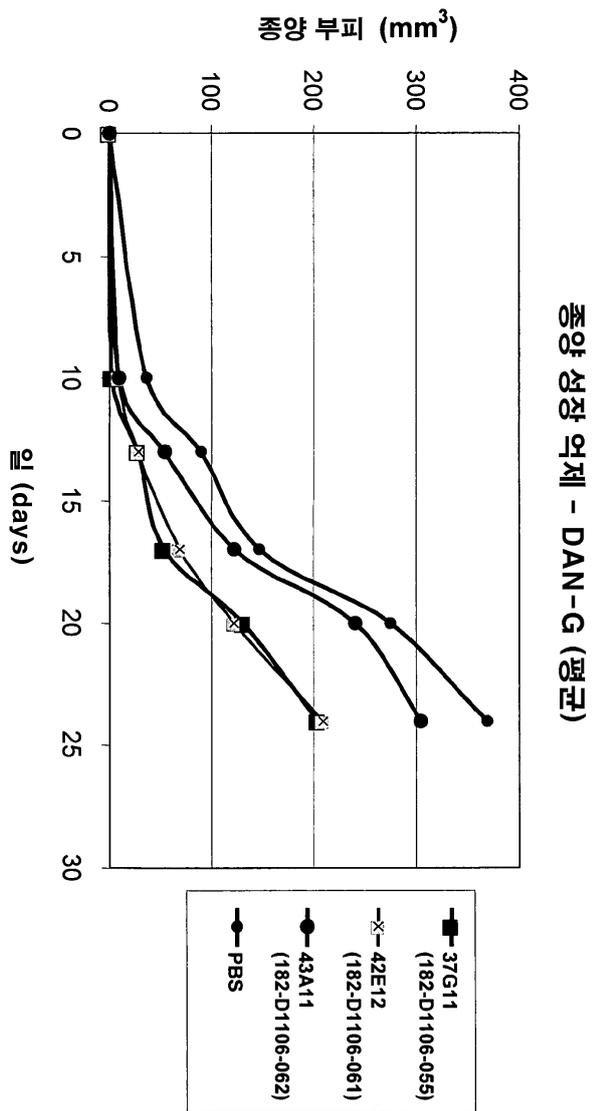
도면25b



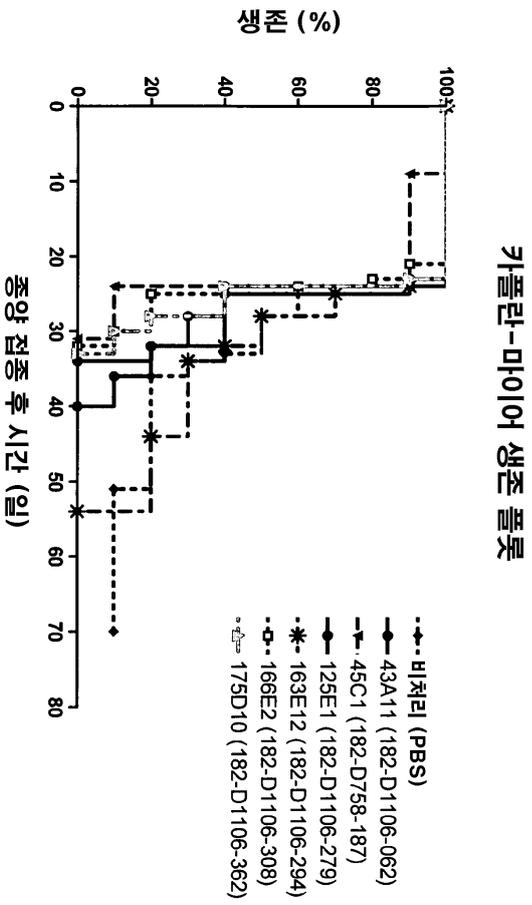
도면26



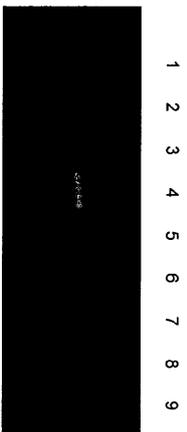
도면27a



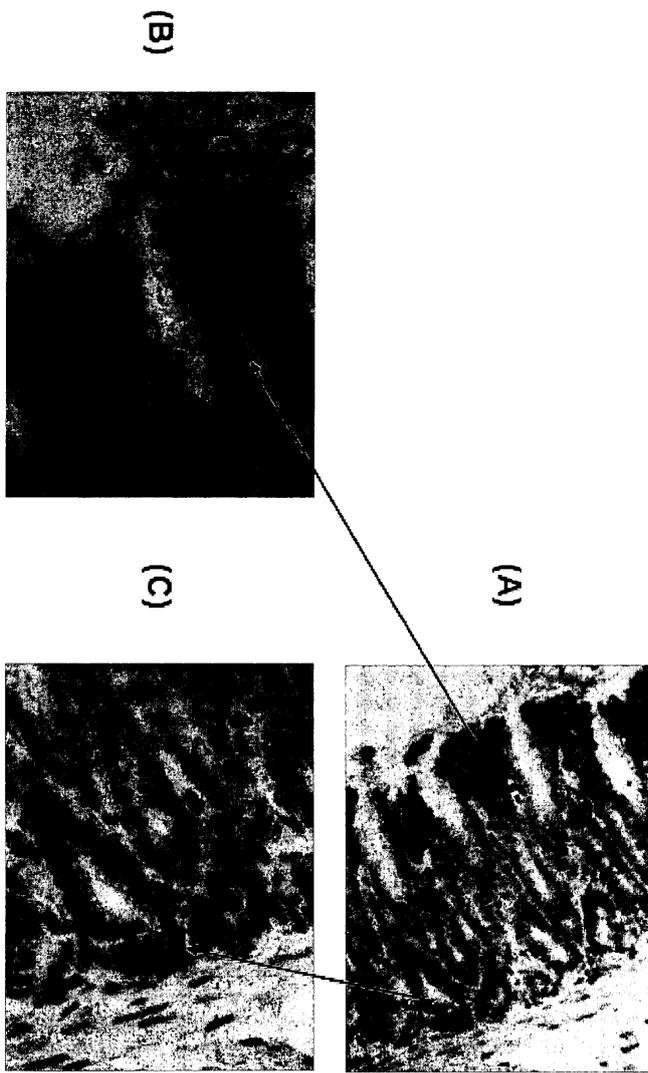
도면27b



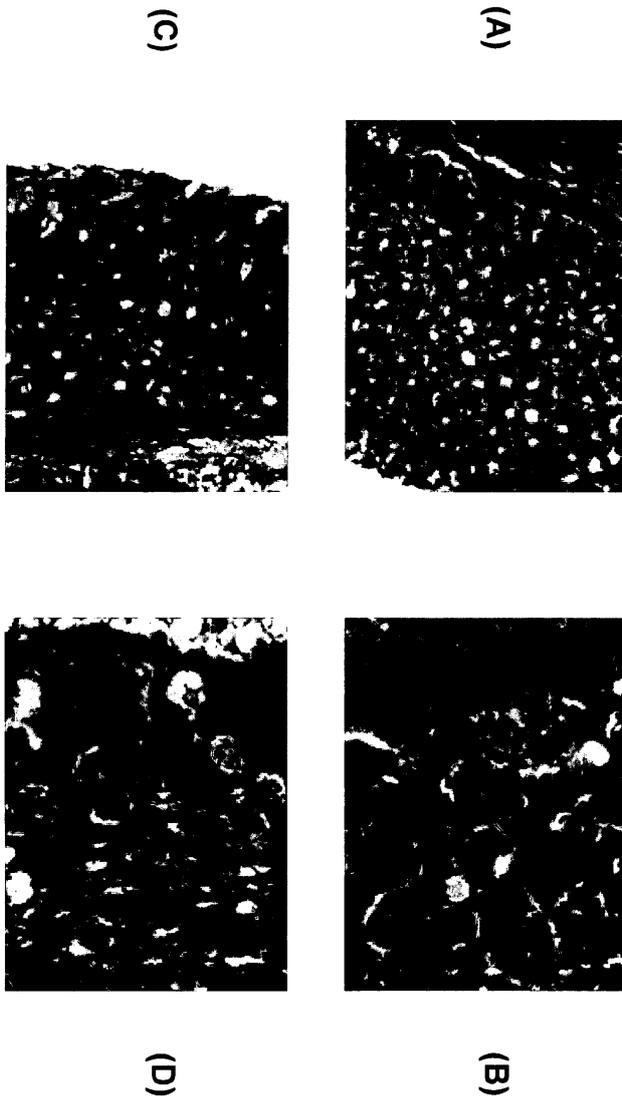
도면28



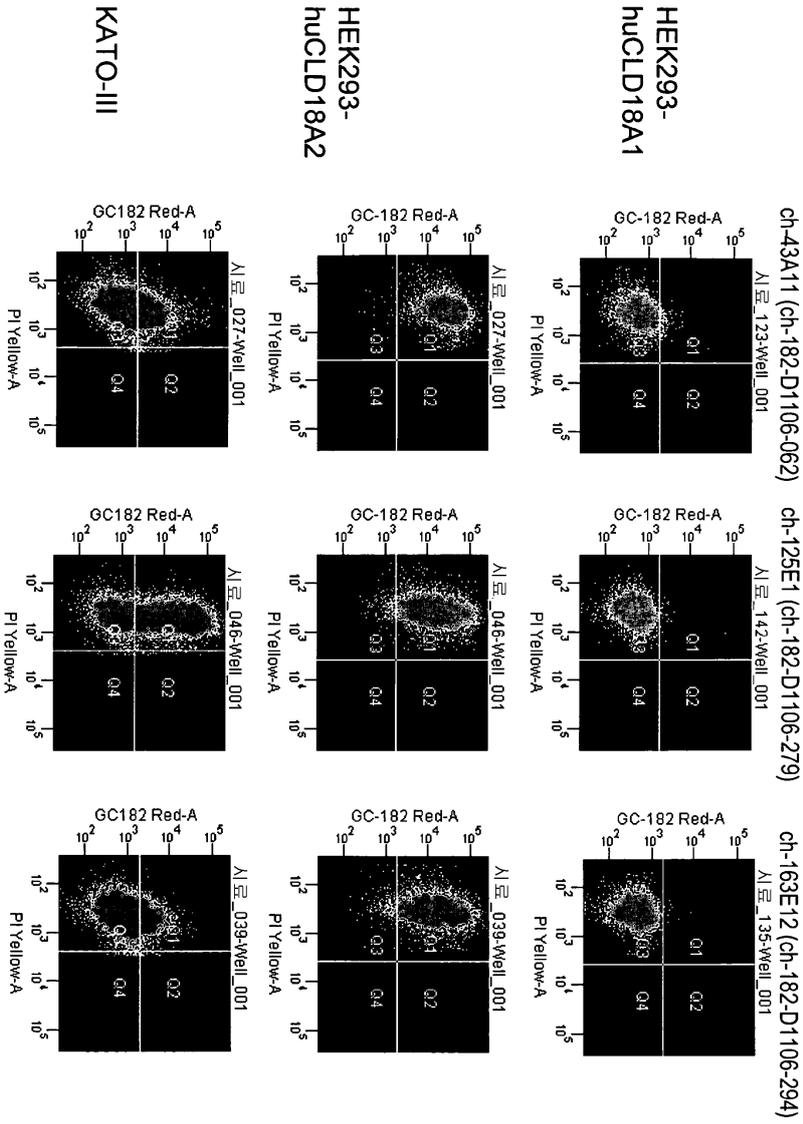
도면29



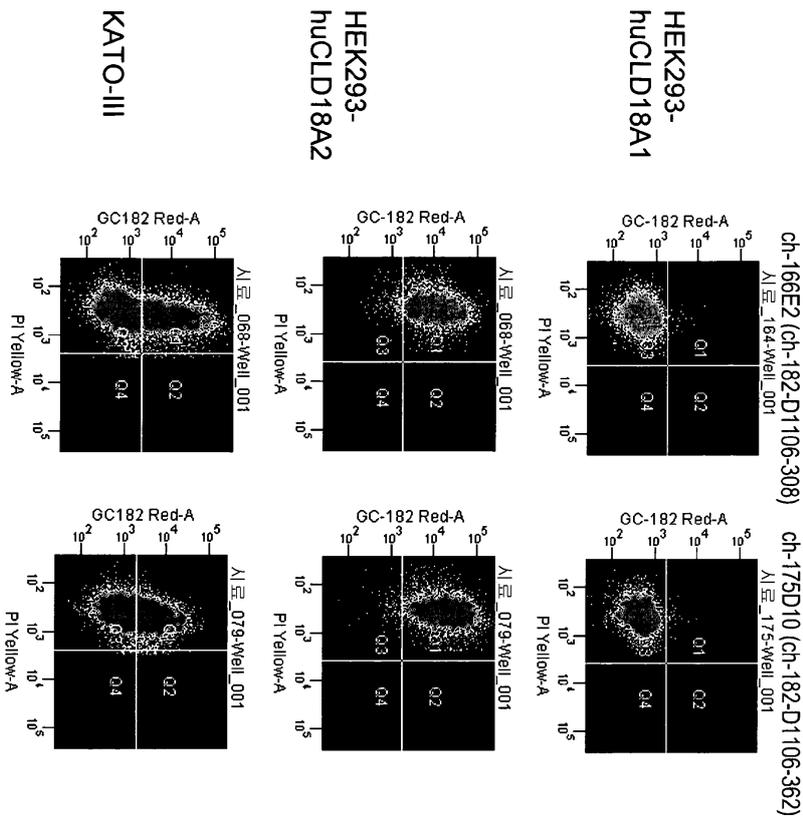
도면30



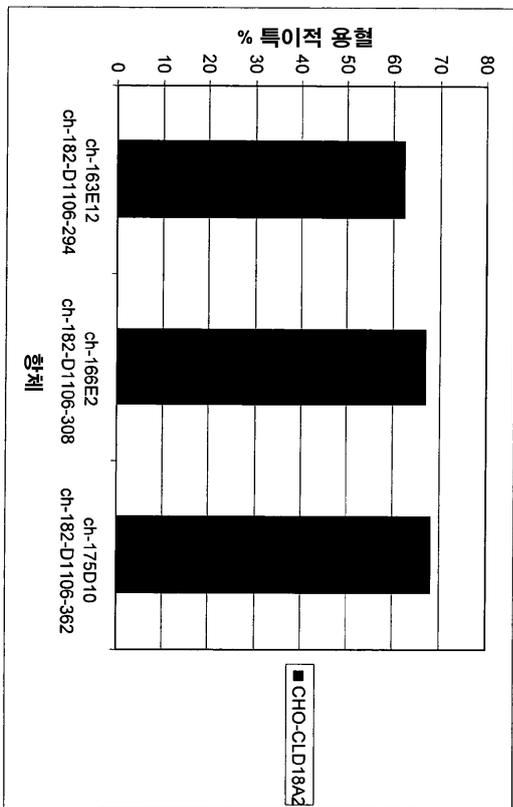
도면31a



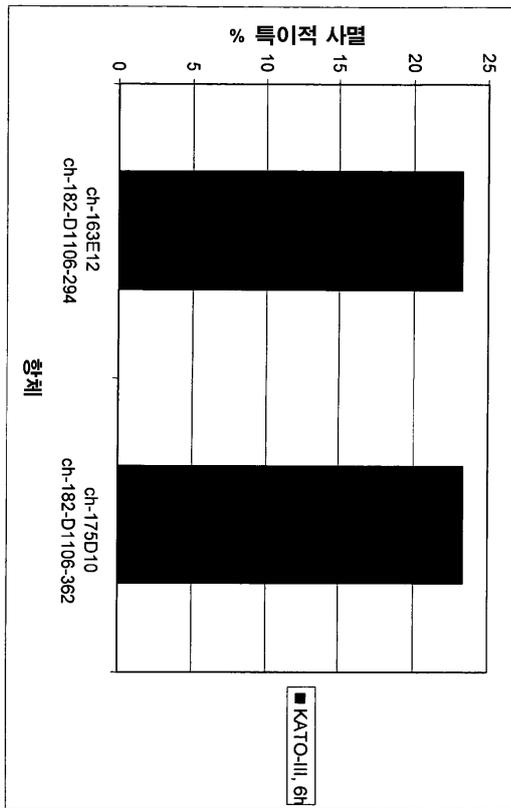
도면31b



도면32



도면33



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Ganymed Pharmaceuticals AG
 - <120> Monoclonal antibodies against claudin-18 for treatment of cancer
 - <130> 342-31PCT
 - <150> EP 05 025 657.7
 - <151> 2005-11-24
 - <160> 150
 - <170> PatentIn version 3.3
 - <210> 1
 - <211> 786
 - <212> DNA
 - <213> Homo sapiens
 - <400> 1
- ```

atggccgtga ctgcctgtca gggcttgggg ttcgtggttt cactgattgg gattgcgggc 60
atcattgctg ccacctgcat ggaccagtgg agcacccaag acttgtaaa caaccocgta 120

```

acagctgttt tcaactacca ggggctgtgg cgctcctgtg tccgagagag ctctggcttc 180

accgagtgcc ggggctactt caccctgctg gggctgccag ccatgctgca ggcagtgcga 240

gccctgatga tcgtaggcat cgctcctgggt gccattggcc tcctggatc catctttgcc 300

ctgaaatgca tccgcattgg cagcatggag gactctgcca aagccaacat gacactgacc 360

tccgggatca tgttcattgt ctcaggctctt tgtgcaattg ctggagtgtc tgtgtttgcc 420

aacatgctgg tgactaactt ctggatgtcc acagctaaca tgtacaccgg catgggtggg 480

atggtgcaga ctgttcagac caggtacaca ttgggtcgg ctctgttcgt gggctgggtc 540

gctggaggcc tcacactaat tgggggtgtg atgatgtgca tgcctgccc gggcctggca 600

ccagaagaaa ccaactacaa agccgtttct tatcatgcct cgggccacag tgttgctac 660

aagcctggag gcttcaaggc cagcactggc ttgggtcca acacaaaaa caagaagata 720

tacgatggag gtgcccgcac agaggacgag gtacaatctt atccttccaa gcacactat 780

gtgtaa 786

<210> 2

<211> 261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

1                    5                    10                    15

Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr

                  20                    25                    30

Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly

                  35                    40                    45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val

                  85                    90                    95

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser

                  100                    105                    110

Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser  
 115 120 125

Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val  
 130 135 140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly  
 145 150 155 160

Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe  
 165 170 175

Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met  
 180 185 190

Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala  
 195 200 205

Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly  
 210 215 220

Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile  
 225 230 235 240

Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser  
 245 250 255

Lys His Asp Tyr Val  
 260

<210> 3

<211> 816

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atggccgtga ctgcctgtca gggcttgggg ttcgtggttt cactgattgg gattgcgggc 60

atcattgctg ccacctgcat ggaccagtgg agcacccaag acttgtaaa caaccccgta 120

acagctgttt tcaactacca ggggctgtgg cgtcctgtg tccgagagag ctctggcttc 180

accgagtgcc ggggctactt caccctgctg gggctgccag ccatgctgca ggcagtgcca 240

gcctgatga tcgtaggcat cgtcctgggt gccattggcc tcttggtatc catctttgcc 300

ctgaaatgca tccgattgg cagcatggag gactctgcca aagccaacat gacactgacc 360

tccgggatca tgttcattgt ctcaggtctt tgtgcaattg ctggagtgtc tgtgtttgcc 420

aacatgctgg tgactaactt ctggatgtcc acagctaaca tgtacaccgg catgggtgaa 480  
 caaaaactca tctcagaaga ggatctgggg atggtgcaga ctgttcagac caggtacaca 540  
 ttgggtgagg ctctgttcgt gggctgggtc gctggaggcc tcacactaat tgggggtgtg 600  
 atgatgtgca tcgctgccc gggcctggca ccagaagaaa ccaactacaa agccgtttct 660  
 tatcatgctt cgggccacag tgttgcttac aagcctggag gcttcaagc cagcactggc 720  
 ttgggtcca acacaaaaa caagaagata tacgatggag gtgcccgcac agaggacgag 780  
 gtacaatctt atccttcaa gcacgactat gtgtaa 816

<210> 4

<211> 271

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400

> 4

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

1                    5                    10                    15

Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr

20                    25                    30

Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly

35                    40                    45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val

85                    90                    95

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser

100                    105                    110

Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser

115                    120                    125

Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val

130                    135                    140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Glu

145                    150                    155                    160  
 Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Met Val Gln Thr Val Gln  
                          165                    170                    175  
 Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp Val Ala Gly  
                          180                    185                    190

Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met Cys Ile Ala Cys Arg Gly  
                          195                    200                    205  
 Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala Val Ser Tyr His Ala Ser  
                          210                    215                    220  
 Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly Phe Lys Ala Ser Thr Gly  
 225                    230                    235                    240  
 Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile Tyr Asp Gly Gly Ala Arg  
                          245                    250                    255

Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser Lys His Asp Tyr Val  
                          260                    265                    270

<210> 5  
 <211> 813  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5

atggccgtga ctgcctgtca gggcttgggg ttcgtggttt cactgattgg gattgcgggc 60  
 atcattgctg ccacctgcat ggaccagtgg agcacccaag acttgtaaa caaccccgta 120  
 acagctgttt tcaactacca ggggctgtgg cgctcctgtg tccgagagag ctctggcttc 180  
 accgagtgcc ggggctactt caccctgtac ccatacgacg tgccagacta cgcactgggg 240  
 ctgccagcca tgetgcaggc agtgcgagcc ctgatgatcg taggcatcgt cctgggtgcc 300  
  
 attggcctcc tggatccat ctttgccttg aatgcatcc gcattggcag catggaggac 360  
 tctgccaag ccaacatgac actgacctcc gggatcatgt tcattgtctc aggtctttgt 420  
 gcaattgctg gagtgtctgt gtttccaac atgctggtga ctaacttctg gatgtccaca 480  
 gctaacatgt acaccggcat ggggtgggatg gtgcagactg ttcagaccag gtacacattt 540  
 ggtgcggctc tgttcgtggg ctgggtcgct ggaggcctca cactaattgg ggggtgtgatg 600  
 atgtgcatcg cctgccgggg cctggcacca gaagaaacca actacaaagc cgtttcttat 660

```

catgcctcgg gccacagtgt tgcctacaag cctggaggct tcaagccag cactggcttt 720

gggtccaaca ccaaaaacaa gaagatatac gatggagggtg cccgcacaga ggacgaggtta 780
caatcttate ctccaagca cgactatgtg taa 813

<210> 6
<211> 270
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6

Met Ala Val Thr Ala Cys Gln Gly Leu Gly Phe Val Val Ser Leu Ile
1 5 10 15
Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr
 20 25 30
Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly
 35 40 45
Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
 50 55 60
Gly Tyr Phe Thr Leu Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Leu Gly
65 70 75 80
Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg Ala Leu Met Ile Val Gly Ile
 85 90 95
Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys
 100 105 110
Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu
 115 120 125
Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly
 130 135 140
Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr
145 150 155 160
Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr
 165 170 175
Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp Val Ala Gly Gly

```



<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Ser Thr Thr Thr Cys Gln Val Val Ala Phe Leu Leu Ser Ile Leu  
 1                    5                    10                    15

Gly Leu Ala Gly Cys Ile Ala Ala Thr Gly Met Asp Met Trp Ser Thr  
                   20                    25                    30

Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val Thr Ser Val Phe Gln Tyr Glu Gly  
                   35                    40                    45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Gln Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg  
                   50                    55                    60

Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg  
 65                    70                    75                    80

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val  
                   85                    90                    95

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser  
                   100                    105                    110

Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser  
                   115                    120                    125

Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val  
                   130                    135                    140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly  
 145                    150                    155                    160

Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe  
                   165                    170                    175

Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met  
                   180                    185                    190

Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala  
                   195                    200                    205

Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly  
                   210                    215                    220

Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile  
 225                      230                      235                      240  
 Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser  
                                  245                      250                      255  
 Lys His Asp Tyr Val  
                                  260

<210> 9  
 <211> 795  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 9

atggccacca ccacgtgcc ggtgtaggg cttctcctgt ccctcctggg tctggccggc 60  
 tgcatagccg ccaactgggat ggacatgtgg agcactcaag acctgtatga caaccagtc 120  
 accgcegtgt tccagtatga agggctctgg aggagtggc tgcaacagag ctcggggttc 180  
 accgagtgcc ggccatactt caccatcctg ggccttcag ccatgctgca agctgtacga 240  
 gccctgatga tcgtgggcat tgttctgggg gtcateggta tcctcgtgtc catcttcgcc 300  
 ctgaagtgca ttcgcattgg tagcatggat gactctgcca aggccaagat gactctgact 360  
 tctgggatct tgttcatcat ctccggcatc tgtgcaatca ttggtgtgtc tgtgtttgcc 420  
  
 aacatgctgg tgaccaactt ctggatgtcc acagctaaca tgtacagcgg catgggcggc 480  
 atgggtggca tggatgcagc cgttcagacc aggtacacct ttggtgcagc tctgttcgtg 540  
 ggctgggttg ctggaggcct caccctgatt gggggagtga tgatgtgcat cgctgccgt 600  
 ggctgacac cagatgacag caacttcaaa gctgtgtctt accatgcctc tggccaaaat 660  
 gttgcctaca ggctggagg ctttaaggcc agcactggct ttgggtccaa caccagaaac 720  
 aagaagatct acgatggggg tgcccgcaca gaagacgatg aacagtctca tctaccaag 780  
 tatgactatg ttag 795

<210> 10  
 <211> 795  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 10

atgtcggatga ccgctgcc gggcttgggg tttgtggtgt cactgatcgg gtttcgggc 60  
 atcattgcag ccacttgat ggaccagtgg agcaccagg atttataca caaccgggtg 120

accgctgtat tcaactacca agggctatgg cgttcatgcg tccgagagag ctctggcttc 180  
 accgagtgcc gaggctactt caccctgttg gggttgccag ccatgctgca agctgtacga 240  
 gccttgatga tcgtgggcat tgttctgggg gtcacggtg tectcgtgtc catcttcgcc 300  
 ctgaagtgca ttcgcattgg tagcatggat gactctgcca aggccaagat gactctgact 360

tctgggatct tgttcatcat ctccggcatc tgtgcaatca ttggtgtgtc tgtgtttgcc 420  
 aacatgctgg tgaccaactt ctggatgtcc acagctaaca tgtacagcgg catgggcggc 480  
 atgggtggca tggcagac cggtcagacc aggtacacct ttggtgcagc tctgttcgtg 540  
 ggctgggttg ctggaggcct caccctgatt gggggagtga tgatgtgcat cgctgcctt 600  
 ggctgacac cagatgacag caacttcaaa gctgtgtctt accatgcctc tggccaaaat 660  
 gttgcctaca ggctggagg cttaagcc agcactggct ttgggtcaa caccagaaac 720  
 aagaagatct acgatggggg tgcccgcaca gaagacgatg aacagtctca tctaccaag 780

tatgactatg ttag 795

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide

<400> 11

tggctctgtg tcgacctgt g 21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide

<400> 12

gtgtacatgt tagctgtgga c 21

<210> 13

<211> 55

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Asp Met Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val Thr Ser

1                    5                    10                    15  
 Val Phe Gln Tyr Glu Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Gln Ser Ser  
                          20                    25                    30  
 Gly Phe Thr Glu Cys Arg Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala  
                          35                    40                    45  
 Met Leu Gln Ala Val Arg Ala  
                          50                    55  
 <210> 14

<211> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Asp Met Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val Thr Ser  
 1                    5                    10                    15  
 Val Phe Gln Tyr Glu Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Gln Ser Ser  
                          20                    25                    30  
 Gly Phe Thr Glu Cys Arg Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala  
                          35                    40                    45  
 Met Leu Gln Ala Val Arg Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly  
                          50                    55                    60  
 Ala Ile Gly Leu Leu Val Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Gly Ser Met Glu Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly  
                          85                    90                    95  
 Ile Met Phe Ile Val Ser Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val  
                          100                    105                    110  
 Phe Ala Asn Met Leu Val Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met  
                          115                    120                    125  
 Tyr Thr Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr  
                          130                    135                    140  
 Phe Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp  
 145                    150

<210> 15  
 <211> 390  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 15

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60  
 gacgcggccc agccggccag gcgcgcgcgc cgtacgaagc ttggtaccga gctcggatcc 120  
 actccagtgt ggtggaattc tgcagatggc cgcattggacc agtggagcac ccaagacttg 180

tacaacaacc ccgtaacagc tgttttcaac taccaggggc tgtggcgctc ctgtgtccga 240  
 gagagctctg gcttcaccga gtgccggggc tacttcaccc tgctggggct gccagccatg 300  
 ctgcaggcag tgcgagcggc catccagcac agtggcggcc gctcgaggag ggcccgaaca 360  
 aaaactcatc tcagaagagg atctgaatag 390

<210> 16  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 16

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



Ile Val Ser Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn  
 100 105 110  
 Ala Ala Ile Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Arg Arg Ala Arg Thr Lys  
 115 120 125  
 Thr His Leu Arg Arg Gly Ser Glu  
 130 135

<210> 19

<211> 531

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

atggagacag acacactcct gctatgggia ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60  
 gacgcggccc agccggccag gcgcgccatg gaccagtgga gcaccaaga cttgtacaac 120  
 aacccegtaa cagctgtttt caactaccag gggctgtggc gctcctgtgt ccgagagagc 180  
 tctggcttca ccgagtgccg gggctacttc accctgctgg ggctgccagc catgctgcag 240  
 gcagtgcgag ccctgatgat cgtaggcatc gtcttgggtg ccattggcct cctggtatcc 300  
 atctttgccc tgaatgcat ccgcattggc agcatggagg actctgcaa agccaacatg 360  
  
 aactgacct ccgggatcat gttcattgtc tcaggctctt gtgcaattgc tggagtgtct 420  
 gtgtttgcca acatgctggt gactaacttc tggatgtcca cagctaacat gtacaccggc 480  
 atgggtggga tggatgcagac tgttcagacc aggtacacat ttggtgcgta g 531

<210> 20

<211> 176

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Met Asp Gln  
 20 25 30

Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn  
 35 40 45  
 Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr



<

<400> 23

Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe

1                    5                    10

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Asp Met Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro

1                    5                    10

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Cys Arg Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala

1                    5                    10

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213>

> Homo sapiens

<400> 26

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly

1                    5                    10

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile

1                    5                    10

<210> 28

<211> 55

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala  
 1                    5                    10                    15

Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser  
                   20                    25                    30

Gly Phe Thr Glu Cys Arg Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala  
                   35                    40                    45

Met Leu Gln Ala Val Arg Ala  
                   50                    55

<210> 29

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser Ala Lys  
 1                    5                    10                    15

Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly  
                   20

<210> 30

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Ala Asn Met Leu Val Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr  
 1                    5                    10                    15

Thr Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe  
                   20                    25                    30

Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp  
                   35                    40

<210> 31

<211> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

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

Tyr Thr Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr  
                   130                    135                    140  
 Phe Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp  
 145                    150

<210> 32

<211> 3359

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

cacaccttcg gcagcaggag ggcggcagct tctcgcaggc ggcagggcgg gcggccagga    60  
 tcatgtccac caccacatgc caagtgggtgg cgttctctct gtccatcctg gggctggccg    120  
 gctgcatcgc ggccaccggg atggacatgt ggagcaccca ggacctgtac gacaaccccc    180

tcacctccgt gttccagtac gaagggtctt ggaggagctg cgtgaggcag agttcaggct 240  
  
 tcaccgaatg caggccctat ttcacatcc tgggacttcc agccatgctg caggcagtgc 300  
 gagccctgat gatcgtaggc atcgtcctgg gtgccattgg cctcctggta tccatctttg 360  
 ccctgaaatg catccgcatt ggcagcatgg aggactctgc caaagccaac atgacactga 420  
 cctccgggat catgttcatt gtctcaggtc tttgtgcaat tgctggagtg tctgtgtttg 480  
 ccaacatgct ggtgactaac ttctggatgt ccacagctaa catgtacacc ggcattgggtg 540  
 ggatggtgca gactgttcag accaggtaca catttgggtg ggctctgttc gtgggctggg 600  
 tcgctggagg cctcacacta attgggggtg tgatgatgtg catgcctgc cggggcctgg 660  
  
 caccagaaga aaccaactac aaagccgttt cttatcatgc ctgagccac agtgttgctt 720  
 acaagcctgg aggcttcaag gccagcactg gctttgggtc caacaccaa aacaagaaga 780  
 tatacgatgg aggtgccgc acagaggacg aggtacaatc ttatcctcc aagcacgact 840  
 atgtgtaatg ctctaagacc tctcagcacg ggcggaagaa actcccggag agctcaccca 900  
 aaaaacaagg agatcccatc tagatttctt cttgcttttg actcacagct ggaagttaga 960  
 aaagcctcga tttcatcttt ggagaggcca aatggtetta gcctcagtct ctgtctctaa 1020  
 atattccacc ataaaacagc tgagttattt atgaattaga ggctatagct cacattttca 1080  
  
 atcctctatt tctttttta aatataactt tctactctga tgagagaatg tggttttaat 1140  
 ctctctctca cattttgatg atttagacag actccccctc ttcctcctag tcaataaacc 1200  
 cattgatgat ctatttccca gcttatcccc aagaaaactt ttgaaaggaa agagtagacc 1260  
 caaagatggt attttctgct gtttgaattt gtctcctcca ccccaactt ggctagtaat 1320  
 aaacacttac tgaagaagaa gcaataagag aaagatattt gtaatctctc cagcccatga 1380  
 tctcggtttt cttacactgt gatcttaaaa gttaccaaac caaagtcatt ttcagtttga 1440  
 ggcaacccaaa ctttctact gctgttgaca tcttcttatt acagcaacac cattctagga 1500  
  
 gtttctgag ctctccactg gagtctctt tctgtcgcgg gtcagaaatt gtccttagat 1560  
 gaatgagaaa attatttttt ttaatttaag tcctaaatat agttaaata aataatgttt 1620  
 tagtaaatg atacactatc tcttgaaat agcctcacc ctacatgtgg atagaaggaa 1680  
 atgaaaaat aattgctttg acattgtcta tafggtactt tgtaaagtca tgcttaagta 1740  
 caaatccat gaaaagctca ctgatcctaa tcttttccct ttgaggctctc tatggtctg 1800  
 attgtacatg atagtaagt taagccatgt aaaaagtaaa taatgtctgg gcacagtggc 1860  
 tcacgcctgt aatcctagca ctttgggagg ctgaggagga aggatcactt gagcccagaa 1920

gttcgagact agcctgggca acatggagaa gcctgtctc tacaaaatac agagagaaaa 1980  
aatcagccag tcatggtggc ctacacctgt agtcccagca ttccgggagg ctgaggtggg 2040  
aggatcactt gagcccaggg aggttggggc tgcagtgagc catgatcaca ccaactgcaact 2100  
ccagccagggt gacatagcga gatcctgtct aaaaaataa aaaataaata atggaacaca 2160  
gcaagtccta ggaagtaggt taaaactaat tctttaaaa aaaaaaaaaag ttgagcctga 2220  
atataatgta atgtttccaa gtgacaggta tccacatttg catggttaca agccactgcc 2280  
agtttagcagt agcactttcc tggcactgtg gtcggttttg tttgttttg cttgttttag 2340

agacggggtc tcaactttca ggctggcctc aaactcctgc actcaagcaa ttcttctacc 2400  
ctggcctccc aagtagctgg aattacaggt gtgcgccatc acaactagct ggtggtcagt 2460  
ttgttactc tgagagctgt tcaacttctc gaattcacct agagtggttg gaccatcaga 2520  
tgtttgggca aaactgaaag ctctttgcaa ccacacacct tcctgagct tacatcactg 2580  
cccttttgag cagaaagtct aaattccttc caagacagta gaattccatc ccagtaccaa 2640  
agccagatag gcccctagg aaactgaggt aagagcagtc tctaaaaact acccacagca 2700  
gcattggtgc aggggaactt ggccattagg ttattatttg agaggaaagt cctcacatca 2760

atagtacata tgaagtgac ctccaagggg attggtgaat actcataagg atcttcaggc 2820  
tgaacagact atgtctgggg aaagaacgga ttatgcccc ttaaataaca agttgtgttc 2880  
aagagtcaga gcagtgagct cagaggccct tctcactgag acagcaacat ttaaaccaaa 2940  
ccagaggaag tatttggga actcactgcc tcagtttggg taaaggatga gcagacaagt 3000  
caactaaaga aaaaagaaaa gcaaggagga gggttgagca atctagagca tggagtttgt 3060  
taagtctct ctggattga gttgaagagc atccattga gttgaaggcc acagggcaca 3120  
atgagctctc cttctacca ccagaaagtc cctggtcagg tctcaggtag tgcggtgtgg 3180

ctcagctggg tttttaatta ggcattctc tatccaacat ttaattgttt gaaagcctec 3240  
atatagttag attgtgcttt gtaattttgt tgtgttgct ctatcttatt gtatatgcat 3300  
tgagtattaa cctgaatggt ttgttactta aatattaaaa aactgttat cctacagtt 3359

<210> 33  
<211> 849  
<212> DNA  
<213> Mus musculus  
<400> 33

gagaacctgc ctgtctcttg tctctccat ttgtgtggac tctgtctcc atcatgtcgg 60  
tgaccgcctg ccagggcttg gggtttgtgg tgcactgat cgggtttgcg ggcattattg 120

cagccacttg tatggaccag tggagcacc aggatttata caacaaccg gtgaccgctg 180

tattcaacta ccaagggcta tggcgttcat ggtccgaga gagctctggc ttcaccgagt 240

gccgaggcta cttcacctg ttggggttgc cagccatgct gcaagctgta cgagccctga 300

tgatcgtggg cattgttctg ggggtcatcg gtatcctcgt gtccatcttc gcctgaagt 360

gcattcgcat tggtagcatg gatgactctg ccaaggccaa gatgactctg acttctggga 420

tcttgttcat catctccggc atctgtgcaa tcattggtgt gtctgtgttt gccaacatgc 480

tggtagccaa ctctggatg tccacagcta acatgtacag cggcatgggc ggcattgggtg 540

gcatggtgca gaccgttcag accaggtaca ccttcgggtc agctctgttc gtgggctggg 600

ttgctggagg cctcacctg attgggggag tgatgatgtg catcgctgc cgtggcctga 660

caccagatga cagcaactc aaagctgtgt cttaccatgc ctctggccaa aatgttgct 720

acaggcctgg aggctttaag gccagcactg gctttgggtc caacaccaga aacaagaaga 780

tctacgatgg gggtgcccgc acagaagacg atgaacagtc tcatcctacc aagtatgact 840

atgtgtagt 849

<210> 34

<211> 3350

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

agaattgcgc tgtccacttg tctgtggct ctgtgtcgc actgtgcgc accatggccg 60

tgactgcctg tcagggcttg gggttcgtgg ttccactgat tgggattgcg ggcattctg 120

ctgccacctg catggaccag tggagcacc aagacttcta caacaaccc gtaacagctg 180

ttttcaacta ccagggctg tggcgctcct gtgtccgaga gagctctggc ttcaccgagt 240

gccggggcta cttcacctg ctggggctgc cagccatgct gcaggcagt cgagccctga 300

tgatcgtagg catcgtcctg ggtgccattg gcctcctggt atccatcttt gcctgaaat 360

gcatccgcat tggcagcatg gaggactctg ccaaagccaa catgacactg acctccggga 420

tcatgttcat tctctcaggc ctttgtgcaa ttgctggagt gtctgtgttt gccaacatgc 480

tggtagctaa ctctggatg tccacagcta acatgtacac cggcatgggt gggatgggtg 540

agactgttca gaccaggtac acatttgggt cggctctgtt cgtgggctgg gtcgctggag 600

gcctcacact aattgggggt gtgatgatgt gcatcgctg cggggcctg gcaccagaag 660

aaaccaacta caaagccgtt tcttatcatg cctcaggcca cagtgttggc tacaagcctg 720

gaggcttcaa ggccagcact ggctttgggt ccaacaccaa aaacaagaag atatacatg 780

gaggtgcccc cacagaggac gaggtacaat cttatccttc caagcacgac tatgtgtaat 840  
 gctctaagac ctctcagcac gggcggaaga aactcccgga gagctcacc aaaaaacaag 900  
  
 gagatcccat ctagatttct tcttgctttt gactcacagc tggaggttag aaaagcctcg 960  
 atttcatctt tggagaggcc aaatggtctt agcctcagtc tctgtctcta aatattccac 1020  
 cataaaacag ctgagttatt tatgaattag aggctatagc tcacattttc aatcctctat 1080  
 ttcttttttt aaatataact ttctactctg atgagagaat gtggttttta tetctctctc 1140  
 acattttgat gatthagaca gactccccct cttcctccta gtcaataaac ccattgatga 1200  
 tctatttccc agcttatccc caagaaaact ttgaaagga aagagtagac ccaaagatgt 1260  
 tattttctgc tgtttgaatt ttgtctcccc accccaact tggctagtaa taaacctta 1320  
  
 ctgaagaaga agcaataaga gaaagatatt tgaatctct ccagcccatg atctcggttt 1380  
 tcttacactg tgatcttaaa agttaccaa ccaagtcct tttcagtttg aggcaaccaa 1440  
 acctttctac tgctgttgac atcttcttat tacagcaaca ccattctagg agtttctga 1500  
 gctctccact ggagtcctct ttctgtcgcg ggtcagaaat tgtccctaga tgaatgagaa 1560  
 aattatTTTT ttaatttaa gtccctaaata tagttaaaat aaataatgtt ttagtaaaat 1620  
 gatacactat ctctgtgaaa tagcctcacc cctacatgtg gatagaagga aatgaaaaaa 1680  
 taattgcttt gacattgtct atatggtact ttgtaaagtc atgcttaagt acaaattcca 1740  
  
 tgaagagctc acigatccta attctttccc ttgaggtct ctatggctct gattgtiacat 1800  
 gatagtaagt gtaagccatg taaaaagtaa ataatgtctg ggcacagtgg ctcacgcctg 1860  
 taatcctage actttgggag gctgaggagg aaggatcact tgagcccaga agttcgagac 1920  
 tagcctgggc aacatggaga agccctgtct ctacaaaata cagagagaaa aatcagcca 1980  
 gtcattggtg cctacacctg tagtcccagc attccgggag gctgaggtgg gaggatcact 2040  
 tgagcccagg gaggttgggg ctgcagtgag ccatgatcac accactgcac tccagccagg 2100  
 tgacatagcg agatcctgtc taaaaaata aaaaataaat aatggaacac agcaagtcct 2160  
  
 aggaagtagg ttaaaactaa ttctttaaaa aaaaaaaaaa gttgagcctg aattaaatgt 2220  
 aatgtttcca agigacagg atccacattt gcatggttac aagccactgc cagtttagcag 2280  
 tagcactttc ctggcactgt ggtcggtttt gttttgttt gctttgttta gagacggggt 2340  
 ctcactttcc aggctggcct caaactcctg cactcaagca attcttctac cctggcctcc 2400  
 caagtagctg gaattacagg tgtgcgccat cacaactagc tggtggtcag ttttgttact 2460  
 ctgagagctg ttcacttctc tgaattcacc tagagtggtt ggaccatcag atgtttgggc 2520

aaaactgaaa gcicctttgca accacacacc ttccctgagc ttacatcact gcccttttga 2580  
  
 gcagaaagtc taaattcctt ccaagacagt agaattccat cccagtacca aagccagata 2640  
 ggccccctag gaaactgagg taagagcagt ctctaaaaac taccacagc agcattggtg 2700  
 caggggaact tggccattag gttattattt gagaggaaag tcctcacatc aatagtacat 2760  
 atgaaagtga cctccaaggg gattggtgaa tactcataag gatcttcagg ctgaacagac 2820  
 tatgtctggg gaaagaacgg attatgcccc attaaataac aagttgtgtt caagagtcag 2880  
 agcagtgagc tcagaggccc ttctcactga gacagcaaca tttaaccaa accagaggaa 2940  
 gtatttggg aactcactgc ctcagtttgg gtaaaggatg agcagacaag tcaactaaag 3000  
  
 aaaaaagaaa agcaaggagg aggggtgagc aatctagagc atggagtttg ttaagtgctc 3060  
 tctggatttg agttgaagag catccatttg agttgaaggc cacagggcac aatgagctct 3120  
 cccttctacc accagaaagt ccctggtcag gtctcaggta gtgcggtgtg gctcagctgg 3180  
 gtttttaatt agcgattct ctatccaaca ttttaattgtt tgaaagcctc catatagtta 3240  
 gattgtgctt tgtaattttg ttgttgttgc tctatcttat tgtatatgca ttgagtatta 3300  
 acctgaatgt tttgttactt aaatattaaa aacctgtta tcctacagtt 3350  
  
 <210> 35  
 <211> 264  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
  
 <400  
 > 35  
 Met Ser Val Thr Ala Cys Gln Gly Leu Gly Phe Val Val Ser Leu Ile  
 1 5 10 15  
 Gly Phe Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr  
 20 25 30  
 Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly  
 35 40 45  
 Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg  
 50 55 60  
  
 Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg  
 65 70 75 80  
 Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Val Ile Gly Ile Leu Val  
 85 90 95

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Asp Asp Ser  
 100 105 110

Ala Lys Ala Lys Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Leu Phe Ile Ile Ser  
 115 120 125

Gly Ile Cys Ala Ile Ile Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val  
 130 135 140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Ser Gly Met Gly Gly  
 145 150 155 160

Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala  
 165 170 175

Ala Leu Phe Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly  
 180 185 190

Val Met Met Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Thr Pro Asp Asp Ser Asn  
 195 200 205

Phe Lys Ala Val Ser Tyr His Ala Ser Gly Gln Asn Val Ala Tyr Arg  
 210 215 220

Pro Gly Gly Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Arg Asn  
 225 230 235 240

Lys Lys Ile Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Asp Glu Gln Ser  
 245 250 255

His Pro Thr Lys Tyr Asp Tyr Val  
 260

<210> 36

<211> 2786

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 36

ggccgggaac ctccccagca agagggtggt ggttgctcct ggaagcctgc gcccagcagc 60  
 tgaagccatg gccaccacca cgtgccaggt ggtagggtt ctcctgtccc tctgggtct 120  
 ggccggctgc atagccgcca ctgggatgga catgtggagc actcaagacc tgtatgaaa 180  
 cccagtcacc gccgtgttcc agtatgaagg gctctggagg agttgcgtgc aacagagctc 240

ggggttcacc gaggccggc catacttcac catcctgggc cttccagcca tgctgcaagc 300  
  
 tgtacgagcc ctgatgatcg tgggcattgt tctgggggtc atcggtatcc tcgtgtccat 360  
 cttegcctg aagtgcattc gcattggttag catggatgac tctgccaagg ccaagatgac 420  
 tctgacttct gggatcttgt tcatcatctc cggcatctgt gcaatcattg gtgtgtctgt 480  
 gtttgccaac atgctggtga ccaacttctg gatgtccaca gctaacatgt acagcggcat 540  
 gggcggcatg ggtggcatgg tgcagaccgt tcagaccagg tacaccttcg gtgcagctct 600  
 gttcgtgggc tgggttgctg gaggcctcac cctgattggg ggagtgatga tgtgcatcgc 660  
 ctgccgtggc ctgacaccag atgacagcaa cttcaaagct gtgtcttacc atgcctctgg 720  
  
 ccaaaatggt gcctacaggc ctggaggcct taaggccagc actggctttg ggtccaacac 780  
 cagaaacaag aagatctacg atgggggtgc ccgcacagaa gacgatgaac agtctcatcc 840  
 tacciaagtat gactatgtgt agtgtctctaa gaccgcccaa cctgtgtgca ggaggaacce 900  
 ttccccaaga agagctcacc ccaaagcaac gggagtctac cttgttcctt tgttgatttc 960  
 aactgacatc taaagtgg taaagcctga tttcatcca tagggaggct agacagtctt 1020  
 ggccacatgt gtctgcctct aaatatccca tcacaaaaca gctgagttat cgtttatgag 1080  
 ttagaggcca taacactcac tttagcccaa ccctctgctt tttaccgtag actttctttt 1140  
  
 catctggtga tggaatggaa tttgactcac agactaatac tttaatggtt tagagaaact 1200  
 ttccctctc gtacttaata agcctgctga tggctgattt tccagcttga ccaccaaggg 1260  
 aaattttaa aggaaaaaa aatacattaa aaggcattat ttctactca attgtgcctt 1320  
 acccaccccc aacttgactg ataataataa tgaacaccac ttaaagaaag aatgccagag 1380  
 gaaagatagt tggtttccc ccagccagc catctgagtc ccctatgtg gtgatctaga 1440  
 acattactcg ccacagtgat tttcaagaa ggcaagcgag cctgttcgct ctgctcagca 1500  
 tctgtgatt ccagcaaggc ccttcagag ctttccacta gaagtcctcc ttctctcgga 1560  
  
 agtcagaaat tccccctaga agagtaagaa atagattctt ttgggtaacc tgagtcctag 1620  
 gtatagttat aataaatagt atattagcaa aacggtttgg tatctcagtg aattagttc 1680  
 agccttacat atagaaaaag ctggggaaaa aaaaagcatc ccttgacatt gtctatagcg 1740  
 taagatccta tataaatcca agcttcaaca aaagctcact gagtctaata gttttctttt 1800  
 gaggtctcca cggccttagt actcatagat gcagccctg tttaaaagta aaaaaattaa 1860  
 agtagcttaa aacgggttct ttttttttt tttttttca aaaaatccaa tagagacctg 1920  
 tgtgtctggc atagctacag ttactgcaa tcgacagggc cacttctttg gtctctgagg 1980

cagttttgca gttctgacag ctgcccggg catcaatag cagaccacac ctttctctgt 2040  
 gcttgtagga cgaccggtc aaggagaaag catgaactcc atctccatgt gacgctgaat 2100  
 gctcccagga aatggagata gggctctctc caaaaccac ctgaacctga aacagctgta 2160  
 gcgctatgct gtaagagcct ggccatcaag ttctatgga gaaaaagggc agtccttgca 2220  
 ttaatagtgc atatataagt ggcctctggg gggcagggat gaatattcag tggtggtctc 2280  
 gagtatgtac agaccgtcta aggagctgtg ttgaccaaga gccaggttaa tacgcagagt 2340  
 ttttccact gggactacag tgattttaga ctatactgaa gaaggccctc tggaaaatca 2400

ttatctgaaa tggcataaag aatgaacaga ccaaacaatt taaggggagg gggcaggtgg 2460  
 aaggaggggg aaggaggtag aaataagaat ctaggcatg aagattgtta aggttcttgg 2520  
 ggtccaaatg gaaggtcacc cctttgaggc catggacaca atgcaccca ccctacccc 2580  
 cacctgcccc cccaccagaa agtccctggt cggactggag gcagtgagaa tcagctgttt 2640  
 tcagttagtg ggictcggtg tagcacctgg ctgtttcaaa gcttcccctt gctttgccgt 2700  
 tttttccgcc attgctgtct tgttttctgt gttattaacc tccatgtttt gtacgttaaa 2760  
 tattaaaaca ctgttaacat ccattc 2786

<210> 37

<211> 264

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 37

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

100 105 110  
 Ala Lys Ala Lys Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Leu Phe Ile Ile Ser

115 120 125  
 Gly Ile Cys Ala Ile Ile Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val

130 135 140  
 Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Ser Gly Met Gly Gly

145 150 155 160  
 Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala

165 170 175  
 Ala Leu Phe Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly

180 185 190  
 Val Met Met Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Thr Pro Asp Asp Ser Asn

195 200 205  
 Phe Lys Ala Val Ser Tyr His Ala Ser Gly Gln Asn Val Ala Tyr Arg

210 215 220  
 Pro Gly Gly Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Arg Asn

225 230 235 240  
 Lys Lys Ile Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Asp Glu Gln Ser

245 250 255  
 His Pro Thr Lys Tyr Asp Tyr Val

260

<210> 38

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide

<400> 38

gagaggatcc cgtacgggtgg ctgcaccatc tgccttcac

40

<210> 39

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 39  
 gagagcggcc gcctaacct ctcccctggt gaagctc 37

<210> 40  
 <211> 324  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: PCR product  
 <400> 40  
 cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60  
 ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120  
 tggaaggtgg ataacgcct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180  
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc acctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240  
 aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300  
 agcttcaaca ggggagagtg ttag 324

<210> 41  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product  
 <400> 41  
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 1 5 10 15  
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 20 25 30  
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 35 40 45  
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 50 55 60  
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 65 70 75 80  
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

| 85                                                               | 90  | 95  |
|------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys                      |     |     |
| 100                                                              | 105 |     |
| <210> 42                                                         |     |     |
| <211> 34                                                         |     |     |
| <212> DNA                                                        |     |     |
| <213> Artificial                                                 |     |     |
| <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide   |     |     |
| <400> 42                                                         |     |     |
| gagaaagctt tccaccaagg gcccatcggc cttc                            |     | 34  |
| <210> 43                                                         |     |     |
| <211> 36                                                         |     |     |
| <212> DNA                                                        |     |     |
| <213> Artificial                                                 |     |     |
| <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide   |     |     |
| <400> 43                                                         |     |     |
| gagagcggcc gtcatttac ccggagacag ggagag                           |     | 36  |
| <210> 44                                                         |     |     |
| <211> 21                                                         |     |     |
| <212> DNA                                                        |     |     |
| <213> Artificial                                                 |     |     |
| <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide   |     |     |
| <400> 44                                                         |     |     |
| taccagttga acttgacctc a                                          |     | 21  |
| <210> 45                                                         |     |     |
| <211> 981                                                        |     |     |
| <212> DNA                                                        |     |     |
| <213> Artificial                                                 |     |     |
| <220><223> Description of artificial sequence: PCR product       |     |     |
| <400> 45                                                         |     |     |
| ggcccatcgg tcttcccct ggcaacctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc |     | 60  |
| ctgggctgcc tggcaagga ctactcccc gaaccggtga cgggtcgtg gaactcaggc   |     | 120 |
| gcctgacca gggcgtgca cacctcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc   |     | 180 |

ctcagcagcg tggtagacct gccctccagc agcttgggca cccagacct catctgcaac 240

gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagaaag ttgagccaa atcttgtgac 300

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc 360

ctcttccccc caaaacccaa ggacacctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 420

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 480

gtggagggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 540

gtggtcagcg tcctcacctg cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 600

aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 660

cagccccgag aaccacaggt gtacacctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 720

caggtcagcc tgacctgct ggtcaaagge ttctatcca gcgacatgc cgtggagtgg 780

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc cteccgtgct ggactccgac 840

ggctccttct tcctctatag caagtcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 900

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacagca gaagagcctc 960

tcctgtctc cgggtaaatg a 981

<210> 46

<211> 326

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 46

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

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

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

35                    40                    45

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

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro



<210> 47  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (31)..(32)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <400> 47  
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt mn 32  
 <210> 48  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 48  
 aagcagtggg atcaacgcag agtacgcggg 30  
 <210> 49  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 49  
 ctgctcactg gatggtggga agatgg 26  
 <210> 50  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 50  
 gggacagtca ctgagctgct cagag 25  
 <210> 51  
 <211> 25

<212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 51  
 acaggggcca gtggatagac cgatg 25  
 <210> 52  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 52  
 agccagggac caagggatag acagatg 27  
 <210> 53  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 53  
 gtaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagt 45  
 <210> 54  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 54  
 gtaatacgac tcactatagg gc 22  
 <210> 55  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: PCR product  
 <400> 55  
 caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctgatgaagc ctggggcctc agtgaagata 60

tcttgcgaagg ctactggcta cacattcagt agctactgga tagagtgggt aaagcagagg 120

cctggacatg gccttgagtg gattggagag attttacctg gaagtggtag tactaactac 180

aatgagaagt tcaagggcaa ggccacattc actgcagata catcctccaa cacagcctac 240

atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtgc aagatatgat 300

taccctggt ttgcttactg gggccaaggg actctgttca ctgtctctgc a 351

<210> 56

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: PCR product

<400> 56

cagatccagt tggatgagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60

tcttgcgaagg ctcttgggta tacctcaca aactatggaa tgaactgggt gaagcaggct 120

ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacca aactggaga gccaacatat 180

gctgaagagt tcaagggacg gtttgcttc tctttgaaa cctctgccag cactgcctat 240

ttgcagatca acaacctcaa aatgaggac acggctacat atttctgtgc aagactgggt 300

tttgtaatg ctatggacta ctggggtaaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca 354

<210> 57

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: PCR product

<400> 57

caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctggcgaggc ccggggcttc agtgaagctg 60

tcttgcgaagg ctcttggcta caccttcaact gactactata taaactgggt gaagcagagg 120

actggacagg gccttgagtg gattggagag atttatcctg gaagtggtaa tacttactac 180

aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240

atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct atttctgtgc aagatcgtat 300

ggtgcctttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctca 348

<210> 58

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: PCR product

<400> 58

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgaagctg 60

tcttgcaagg ctcttggcta caccttcacc agctactgga taaactgggt gaagcagagg 120

cttgacaag gccttgagtg gatcggaaat atttatecctt ctgatagtta tactaactac 180

aatcaaaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240

atgcagctca gcagcccagc atctgaggac tctgcggtct attactgtac aagatcgtgg 300

aggggtaact cctttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca 354

<210> 59

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: PCR product

<400> 59

caggttcagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcttgcaagg ctcttgata cacattcaact gactatgtta taagctgggt gaagcagaga 120

actggacagg gccttgagtg gattggagag atttatecctg gaagtggtag tacttactac 180

aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccaa cacagcctac 240

atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaggggta 300

ttactacggg ctatggacta ctggggtaaa ggaacctcag tcacctctc ctca 354

<210> 60

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: PCR product

<400> 60

caggttcacc tacaacagtc tggttctgaa ctgaggagtc ctgggtcttc agtaaagctt 60

tcatgcaagg attttgattc agaagtcttc ccttttgctt atatgagttg gattaggcag 120

aagcctgggc atggatttga atggattgga gacatactcc caagtattgg tagaacaatc 180

tatggagaga agtttgagga caaagccaca ctggatgcag acacagtgtc caacacagcc 240

tacttggagc tcaacagtct gacatctgag gactctgcta tctactactg tgcaaggggg 300

gagggtacg gtcctgggtt tgcttactgg ggccaagga ctctgggtcac tgtctctgca 360  
 <210> 61  
 <211> 339  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: PCR product  
 <400> 61  
 gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggtcact 60  
 atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc 120  
  
 tggtagcagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 180  
 gaatctgggg tcctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240  
 atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat 300  
 ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaa 339  
 <210> 62  
 <211> 318  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: PCR product  
 <400> 62  
 caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60  
 ataacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggttccagca gaagccaggc 120  
  
 acttctccca aactctggat ttatagcaca tccaacctgg cttctggagt cctgctcgc 180  
 ttcagtggca gtggatctgg gacctcttac tctctcacia tcagccgaat ggaggtgaa 240  
 gatgctgcca cttattactg ccagcaaagg agtagttacc caccacggt cggagggggg 300  
 accaagctgg aaataaaa 318  
 <210> 63  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: PCR product  
 <400> 63  
 gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60

atcacctgca aggccagtc gaatgttcgt actgctgtag cctggatca acagaaacca 120

gggcagtctc ctaaagcact gattfacttg gcatccaacc ggcacactgg agtccctgat 180

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactetca ccattagcaa tgtgcaatct 240

gaagacctgg cagattatct ctgtctgcaa cattggaatt atcctctgac gttcgggtgga 300

ggcaccaage tggaaatcaa a 321

<210> 64

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: PCR product

<400> 64

gacattgtga tgcacagtc tccatcctcc ctactgtgt cagttggaga gaaggttact 60

atgagctgca agtccagtc gagcctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttgccc 120

tggtaccagc agaaaccagg gcagctcctc aaactgetga tttactgggc atccactagg 180

gaatctgggg tcctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240

atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat 300

ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaa 339

<210> 65

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: PCR product

<400> 65

gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggtcact 60

atgagctgca agtccagtc gactctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc 120

tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 180

gaatctgggg tcctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240

atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatagtat 300

ccattcacgt tcggctcggg gacaaagttg gaaataaaa 339

<210> 66

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: PCR product

<400> 66

```

gacattgtga tgcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggcact 60
atgagctgca aatccagtc gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttgct 120

tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tcctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg 300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

```

<210> 67

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: PCR product

<400> 67

```

gacatcgtga tgcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagtggaga gaaggttact 60
atgagctgca agtccagtc gagcctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttgcc 120

tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tttactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tcctgatcg cttcacaggc agtggatctg caacagattt cactctgacc 240
atcagcagtg tgcaggctga agaccttgca gattatcact gtggacaggg ttacagctat 300
ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaa 339

```

<210> 68

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: PCR product

<400> 68

```

gacattgtga tgcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagtggaga gaaggttact 60
atgagctgca agtccagtc gagcctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttgcc 120

tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tttactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tcctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat 300

```

ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaa 339

<210> 69

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: PCR product

<400> 69

aacattgtaa tgaccaatc tcccaaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc 60

ttgacctgca aggccagtga gaatgtggtt acttatgttt cctggtatca acagaaacca 120

gagcagtctc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggtacactgg ggtccccgat 180

cgtttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttactctca ccatcagcag tgtgaaggct 240

gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa tattatagct atccgctcac gttcgggtgct 300

gggaccaagc tggagctgaa a 321

<210> 70

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide

<400> 70

gagaaagctt gccgccacca tggaatggac ctgggtcttt etc 43

<210>

> 71

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide

<400> 71

gagagggccc ttggtggagg ctgcagagac agtgaccaga gtc 43

<210> 72

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide

<400> 72

gagaaagctt gccccacca tggattggct gtggaacttg ctattcc 47

<210> 73

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide

<400> 73

gagagggcc ttggtggagg ctgaggagac ggtgactgag gttc 44

<210> 74

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide

<400> 74

gagaaagctt gccccacca tggaaatggat ctggatcttt ctcttc 46

<210> 75

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide

<400> 75

gagagggcc ttggtggagg ctgaggagac tgtgagagtg gtgc 44

<210> 76

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide

<400> 76

gagaaagctt gccccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttc 46

<210> 77

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 77  
 gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac tgtgagagtg gtg 43  
 <210> 78  
 <211> 47  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 78  
 gagaaagctt gccgccacca tggaatggag gatctttctc ttcaccc 47  
 <210> 79  
 <211> 44  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 79  
 gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac ggtgactgag gttc 44  
 <210> 80  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 80  
 gagaggtctc aagcttagcc accatggact ggatttggat catgctccat c 51  
 <210> 81  
 <211> 44  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 81  
 gagagggccc ttggtggagg ctgcagagac agtgaccaga gtcc 44  
 <210> 82  
 <211> 43

<212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 82  
 gagaaagctt gccgccacca tggaatcaca gactcaggtc ctc 43  
 <210> 83  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 83  
 cacacgtacg ttcagctcc agcttgggtcc cagc 34  
 <210> 84  
 <211> 46  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 84  
 gagaaagctt gccgccacca tgcattttca agtgcagatt ttcagc 46  
 <210> 85  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 85  
 cacacgtacg ttttatttcc agcttgggtcc 30  
 <210> 86  
 <211> 44  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 86  
 gagaaagctt gccgccacca tggagtttca gaccaggtc ttg 44

<210> 87  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 87  
 cacacgtacg ttgatttcc agcttgggtgc ctc 33  
 <210> 88  
 <211> 46  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 88  
 gagaaagctt gccgccacca tggattcaca ggcccaggtt cttatg 46  
 <210> 89  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 89  
 cacacgtacg tttcagctcc agcttgggtcc 30  
 <210> 90  
 <211> 46  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 90  
 gagaaagctt gccgccacca tggaatcaca gactcaggtc ctcatg 46  
 <210> 91  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide

<400> 91  
cacacgtacg tttatttcc aactttgtcc 30

<210> 92  
<211> 49  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
<400> 92  
gagaaagctt gccgccacca tggattcaca ggcccaggtt cttatattg 49

<210> 93  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide

<400> 93  
cacacgtacg tttatttcc agcttgggtcc 30

<210> 94  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
<400> 94  
gagaaagctt gccgccacca tggattcaca ggcccaggtt cttatg 46

<210> 95  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
<400> 95  
cacacgtacg tttatttcc agcttgggtcc 30

<210> 96  
<211> 46  
<212> DNA

<213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 96  
 gagaaagctt gccgccacca tggattcaca ggctcagggtt cttatg 46  
 <210> 97  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 97  
 cacacgtacg tttcagctcc agcttgggtcc cag 33  
 <210> 98  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 98  
 gagaaagctt agccacatg gaatcacaga ctctgggtctt c 41  
 <210> 99  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 99  
 cacacgtacg tttcagctcc agcttgggtcc 30  
 <210> 100  
 <211> 1401  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody  
 <400> 100  
 atggaatgga cctgggtctt tctcttctc ctgtcagtaa ctgcagggtg cactcccag 60  
 gttcagctgc agcagtctgg agctgagctg atgaagcctg gggcctcagt gaagatatcc 120

tgcaaggcta ctggctacac attcagtagc tactggatag agtgggtaaa gcagaggcct 180  
 ggacatggcc ttgagtggat tggagagatt ttacctggaa gtggtagtag taactacaat 240  
 gagaagtcca agggcaaggc cacattcact gcagatacat cctccaacac agcctacatg 300  
 caactcagca gcctgacatc tgaggactct gccgtctatt actgtgcaag atatgattac 360  
 ccctggtttg cttactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgcagc ctccaccaag 420  
 ggcccatcgg tcttccccct ggcacccctc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 480

ctgggctgcc tggcaagga ctacttccc gaaccggtga cgggtcctg gaactcaggc 540  
 gccctgacca gggcgctgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600  
 ctgagcagcg tggtagcctg gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 660  
 gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 720  
 aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc 780  
 ctcttcccc caaaacccaa ggacacccct atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 840  
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 900

gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 960  
 gtggtcagcg tcctcacctg cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1020  
 aaggtctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg 1080  
 cagccccgag aaccacaggt gtacacccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1140  
 caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc ttctatcca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200  
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1260  
 ggctcctctt tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1320

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1380  
 tcctgtctc cgggtaaatg a 1401

<210> 101

<211> 1404

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 101

atggattggc tigtgaactt gctattcctg atggcagctg cccaaagtat ccaagcacag 60  
 atccagtggc tgcagtctgg acctgagctg aagaagcctg gagagacagt caagatctcc 120  
 tgcaaggcct ctgggtatac cttcacaac tatggaatga actgggtgaa gcaggetcca 180

ggaaagggtt taaagtggat gggctggata aacaccaaca ctggagagcc aacatatgct 240  
 gaagagtcca agggacgggt tgccttctct ttggaaacct ctgccagcac tgcctatttg 300  
 cagatcaaca acctcaaaaa tgaggacacg gctacatatt tctgtgcaag actgggtttt 360  
 ggtaatgcta tggactactg gggtaagga acctcagtca ccgtctcctc agcctccacc 420  
 aagggcccat cggctctccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480  
 gccctgggct gcctggtaa ggactacttc ccggaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540  
 ggcgcctga ccagcggcgt gcacacctic ccggctgtcc tacagtctc aggactctac 600  
  
 tcctcagca gcgtggtgac cgtgcctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc 660  
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 720  
 gacaaaactc acacatgccc accgtgcca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780  
 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840  
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 900  
 ggcggtgagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtaca cagcacgtac 960  
 cgtgtggtea gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020  
  
 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080  
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 1140  
 aaccaggtca gectgacctg cctggtaaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200  
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1260  
 gacggctcct tcttctcta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320  
 aacgtcttct catgctcctg gatgatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380  
 ctctcctgt ctccgggtaa atga 1404

<210> 102

<211> 1398

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 102

atggaatgga tctggatctt tctcttcac ctctcaggaa ctgcaggtgt ccaactccag 60  
 gttcagctgc agcagtctgg agctgagctg gcgaggcccg gggcttcagt gaagctgtcc 120  
 tgcaaggctt ctggctacac cttcactgac tactatataa actgggtgaa gcagaggact 180  
 ggacagggcc ttgagtggat tggagagatt tatcctggaa gtggttaatac ttactacaat 240

gagaagtcca agggcaaggc cacactgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300  
  
 cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcagtctatt tctgtgcaag atcgtatggt 360  
 gcctttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctcagcctc caccaagggc 420  
 ccatcggctt tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg 480  
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa cgggtgacgg tgtcgtggaa ctcagcgccc 540  
 ctgaccagcg gcggtcacac ctccccgct gtcctacagt cctcaggact ctactcctc 600  
 agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 660  
 aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagtg agcccaaatac ttgtgacaaa 720  
  
 actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc 780  
 ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg 840  
 gtggtggacg tgagccacga agacctgag gtcaagtcca actggtacgt ggacggcgtg 900  
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 960  
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggtgaaatg gcaaggagta caagtcaag 1020  
 gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaaggcgag 1080  
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1140  
  
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200  
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1260  
 tccttcttc tctatagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320  
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1380  
 ctgtctccgg gtaaatga 1398  
  
 <210> 103  
 <211> 1404  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody  
  
 <400> 103  
 atgggatgga gctgtatcat cctctctctg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactccag 60  
 gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaggcctg gggcttcagt gaagctgtcc 120  
 tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagc tactggataa actgggtgaa gcagaggcct 180  
 ggacaaggcc ttgagtggat cggaaatatt taccctctg atagttatac taactacaat 240  
 caaaagtcca aggacaaggc cacattgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg 300

cagctcagca gcccgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtacaag atcgtggagg 360  
 ggtaactcct ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctctc agcctccacc 420

aagggeccat cggtcttccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacageg 480  
 gccctgggct gcctggtaaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540  
 ggcgcctga ccagcggcgt gcacaccttc cggctgtcc tacagtctc aggactctac 600  
 tcctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc 660  
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 720  
 gacaaaactc acacatgcc accgtgcca gcacctgaac tctgggggg accgtcagtc 780  
 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840

tgctgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 900  
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaaag ccgcgaggagg agcagtacaa cagcacgtac 960  
 cgtgtgtgca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020  
 tgcaaggtct ccaacaaaag cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080  
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga getgaccaag 1140  
 aaccaggtca gcctgacctg cctggtaaaa ggcttctatc ccagcgacat cggcgtggag 1200  
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccctg gctggactcc 1260

gacggctcct tcttctcta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320  
 aacgtcttct catgctcctg gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380  
 ctctcctgt ctccgggtaa atga 1404

<210> 104  
 <211> 1401  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody  
 <400> 104

atggaatgga ggatctttct cttcatcctg tcaggaactg caggtgtcca ctcccaggtt 60  
 cagctgcagc agtctggacc tgagctgggtg aagcctgggg cttcagtga gatgtcctgc 120

aaggcttctg gatacacatt cactgactat gttataagct ggggaagca gagaactgga 180  
 cagggccttg agtggattgg agagatttat cctggaagtg gtagtactta ctacaatgag 240  
 aagttcaagg gcaaggccac actgactgca gacaaatcct ccaacacagc ctacatgcag 300  
 ctcagcagcc tgacatctga ggactctgcg gtctatttct gtgcaagagg ggtattacta 360

cgggctatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcctcagc ctccaccaag 420  
 ggcccatcgg ttttcccctt ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 480  
 ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccgggta cgggtgctgt gaactcaggc 540  
  
 gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600  
 ctcagcagcg tggtagacct gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 660  
 gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 720  
 aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc 780  
 ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 840  
 gtgggggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 900  
 gtggaggtgc ataatgcaaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 960  
  
 gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggetga atggcaagga gtacaagtgc 1020  
 aaggctctca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg 1080  
 cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1140  
 caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc ttctatecca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200  
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac 1260  
 ggctccttct tctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1320  
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgagget ctgcacaacc actacagca gaagagcctc 1380  
  
 tcctgtctc cgggtaaatg a 1401  
 <210> 105  
 <211> 1410  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody  
 <400> 105  
 atggactgga tttgatcat gctccatctg ctggcagcag ctacaggtat ccaatcccag 60  
 gttcacctac aacagtctgg ttctgaactg aggagtctg ggtcttcagt aaagctttca 120  
 tgcaaggatt ttgattcaga agtcttccct tttgcttata tgagtggat taggcagaag 180  
 cctgggcatg gatttgaatg gattggagac atactcccaa gtattggtag aacaatctat 240  
  
 ggagagaagt ttgaggacaa agccacactg gatgcagaca cagtgccaa cacagcctac 300  
 ttggagctca acagtctgac atctgaggac tetgctatct actactgtgc aaggggggag 360  
 ggctacgggt cctggtttgc ttactggggc caagggactc tggctactgt ctctgcagcc 420

tccaccaagg gcccatcggg cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 480  
 acagcggccc tgggctgctt ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540  
 aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtctcagga 600  
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 660

atctgcaacg tgaatcaca gccccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 720  
 tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 780  
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacaccctca tgatctccc gaccctgag 840  
 gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 900  
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 960  
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacctgc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1020  
 tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1080

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatccc ggatgagctg 1140  
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1200  
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag acaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1260  
 gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320  
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggtc tgcacaacca ctacacgacg 1380  
 aagagcctct cctgtctcc gggtaaatga 1410

<210> 106

<211> 723

<212> DNA

<213> Artificial

<220

><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 106

atggaatcac agactcaggt cctcatgtcc ctgctgttct gggatatctgg tacctgtggg 60  
 gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggctcact 120  
 atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc 180  
 tggtagcagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 240  
 gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 300  
 atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatagtat 360

ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaac gtacgggtgc tgcaccatct 420

gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 480

ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgcctc 540  
 caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gacgaggaca gcaaggacag cacctacagc 600  
 ctacgagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 660  
 gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 720  
 tag 723

<210> 107

<211> 708

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 107

atgcattttc aagtgcagat ttccagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatgtcc 60  
 agaggacaaa ttgtttcac ccagctcca gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag 120  
 gtaccataa cctgcagtc cagctcaagt gtaagttaca tgcaactggtt ccagcagaag 180  
 ccaggcactt ctccaaact ctggatttat agcacatcca acctggcttc tggagtcctt 240  
 gctcgcttca gtggcagtgg atctgggacc tcttactctc tcacaatcag ccgaatggag 300

gctgaagatg ctgccactta ttactgccag caaaggagta gttaccacc cacgttcgga 360  
 ggggggacca agctggaat aaaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttccc 420  
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480  
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc ggtaactcc 540  
 caggagatg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 600  
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 660  
 ggctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag 708

<210> 108

<211> 705

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 108

atggagtttc agaccaggt ctttgatttc gtgttctct ggttctctgg tgttgatgga 60  
 gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccatc cagtaggaga cagggtcagc 120  
 atcacctgca aggccagtc gaatgttcgt actgctgtag cctggtatca acagaaacca 180

gggcagtctc ctaaagcact gatttacttg gcatccaacc ggcacactgg agtccctgat 240  
 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccattagcaa tgtgcaatct 300

gaagacctgg cagattatit ctgtctgcaa cattggaatt atcctctgac gttcgggtgga 360  
 ggcaccaagc tggaaatcaa acgtacgggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 420  
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgtttgtg gcctgctgaa taacttctat 480  
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540  
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600  
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgctt gcgaagtac ccatcagggc 660  
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

<210> 109

<211> 723

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 109

atggattcac aggccaggt tcttatgtta ctgctgctat gggtatctgg tacctgtggg 60  
 gacattgtga tgcacagtc tccatcctcc ctgctgtgt cagttggaga gaaggttact 120  
 atgagctgca agtccagtc gagcctttta tatagtagca atcaaaagaa ctactggcc 180  
 tggtagcagc agaaaccagg gcagctcctt aaactgctga tttactgggc atccactagg 240  
 gaatctgggg tcctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300

atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat 360  
 ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaac gtacgggtgc tgcaccatct 420  
 gtcttcatct tcccgcctc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 480  
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgcctc 540  
 caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 600  
 ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgctgc 660  
 gaagtaccc atcagggctt gagctcgcct gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 720

tag 723

<210> 110

<211> 723

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 110

```

atggaatcac agactcaggt cctcatgtcc ctgctgttct gggtatctgg tacctgtggg 60
gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggtcact 120
atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc 180
tggtagcagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 240

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 300
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatagtat 360
ccattcacgt tggctcggg gacaaagttg gaaataaac gtacggtggc tgcacatct 420
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 480
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc 540
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 600
ctcagcagca cctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 660

gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 720
tag 723

```

<210> 111

<211> 720

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 111

```

atggattcac aggcccaggt tcttatattg ctgctgctat gggtatctgg tacctgtggg 60
gacattgtga tgcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 120
atgagctgca aatccagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggt 180

tggtagcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 240
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg 360
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgta cgggtggctgc accatctgtc 420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgctg 480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 540

```

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600

agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaac acaaagtcta cgcttgcgaa 660

gtcaccate agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 720

<210> 112

<211> 723

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 112

atggattcac agggccagg tcttatgtta ctgctgctat gggtatctgg tacctgtggg 60

gacatcgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctgactgtgt cagttggaga gaaggttact 120

atgagctgca agtccagtc gagcctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc 180

tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tttactgggc atccactagg 240

gaatctgggg tcctgatcg ctccacaggc agtggatctg caacagattt cactctgacc 300

atcagcagtg tgcaggctga agaccttgca gattatcact gtggacaggg ttacagctat 360

ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaac gtacggtggc tgcaccatct 420

gtcttcatct tcccgcate tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 480

ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc 540

caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 600

ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 660

gaagtcacc atcagggcct gagctgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 720

tag 723

<210> 113

<211> 723

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 113

atggattcac aggctcagg tcttatgtta ctgctgctat gggtatctgg tacctgtggg 60

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctgactgtgt cagttggaga gaaggttact 120

atgagctgca agtccagtc gagcctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc 180

tgggtaccagc agaaaccagg gcagctctct aaactgctga tttactgggc atccactagg 240  
 gaatctgggg tcctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300  
 atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat 360  
 ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaac gtacgggtggc tgcacatct 420  
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 480  
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc 540  
  
 caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gacgaggaca gcaaggacag cacctacagc 600  
 ctgagcagca ccctgacgt gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 660  
 gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 720  
 tag 723

<210> 114

<211> 705

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 114

atggaatcac agactctggt cttcatatcc atactgctct ggttatatgg agctgatggg 60  
  
 aacattgtaa tgaccaatc tcccaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc 120  
 ttgacctgca aggccagtga gaatgtggtt acttatgttt cctggtatca acagaaacca 180  
 gagcagtctc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggtacactgg ggtccccgat 240  
 cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat tcactctca ccatcagcag tgtgaaggct 300  
 gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa tattatagct atccgctcac gttcggtgct 360  
 gggaccaagc tggagctgaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 420  
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480  
  
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggctg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540  
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600  
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgctt gcgaagtac ccatcagggc 660  
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

<210> 115

<211> 466

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 115

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

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

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

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

                  50                    55                    60  
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn

65                    70                    75                    80  
Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn

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

                  100                    105                    110  
Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asp Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

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

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

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

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

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

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

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

225                    230                    235                    240  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
                                  245                    250                    255  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
  
                                  260                    265                    270  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
                                  275                    280                    285  
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
                                  290                    295                    300  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 305                    310                    315                    320  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
  
                                  325                    330                    335  
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
                                  340                    345                    350  
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
                                  355                    360                    365  
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
                                  370                    375                    380  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
  
 385                    390                    395                    400  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
                                  405                    410                    415  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
                                  420                    425                    430  
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
                                  435                    440                    445  
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
  
                                  450                    455                    460  
 Gly Lys  
 465

<210> 116

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 116

Met Asp Trp Leu Trp Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

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

35                    40                    45

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

50                    55                    60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala

65                    70                    75                    80

Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser

85                    90                    95

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

100                    105                    110

Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly

115                    120                    125

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

130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

165                    170                    175

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

180                    185                    190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

195                    200                    205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 210 215 220  
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
  
 225 230 235 240  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 245 250 255  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 260 265 270  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 275 280 285  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
  
 290 295 300  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 305 310 315 320  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 325 330 335  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 340 345 350  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
  
 355 360 365  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 370 375 380  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 385 390 395 400  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 405 410 415  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
  
 420 425 430  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 435 440 445  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser



|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 180                                                             | 185 | 190 |     |
| Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
| Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro |     |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |     |
|                                                                 |     |     |     |
| Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser |     |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |     |
| Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp |     |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |     |
| Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn |     |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |     |
| Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val |     |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
|                                                                 |     |     |     |
| Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu |     |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |     |
| Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys |     |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |     |
| Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr |     |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |     |
| Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr |     |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |     |
|                                                                 |     |     |     |
| Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu |     |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 | 400 |
| Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu |     |     |     |
| 405                                                             | 410 | 415 |     |
| Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys |     |     |     |
| 420                                                             | 425 | 430 |     |

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 450 455 460

Lys

465

<210> 118

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 118

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg  
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn  
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly  
 115 120 125

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 130 135 140

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



Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 450 455 460

Pro Gly Lys  
 465

<210> 119

<211> 466

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 119

Met Glu Trp Arg Ile Phe Leu Phe Ile Leu Ser Gly Thr Ala Gly Val  
 1 5 10 15

His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro  
 20 25 30

Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
 35 40 45

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

Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu  
 65 70 75 80

Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr  
 85 90 95

Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr  
 100 105 110

Phe Cys Ala Arg Gly Val Leu Leu Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln



Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 450 455 460

Gly Lys

465

<210> 120

<211> 469

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 120

Met Asp Trp Ile Trp Ile Met Leu His Leu Leu Ala Ala Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

Ile Gln Ser Gln Val His Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Arg Ser  
 20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Asp Phe Asp Ser Glu Val  
 35 40 45

Phe Pro Phe Ala Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Lys Pro Gly His Gly  
 50 55 60

Phe Glu Trp Ile Gly Asp Ile Leu Pro Ser Ile Gly Arg Thr Ile Tyr  
 65 70 75 80

Gly Glu Lys Phe Glu Asp Lys Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Val Ser

|                                                                 |     |     |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                                                                 | 85  |     | 90  |     | 95  |
| Asn Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 100 |     | 105 |     | 110 |
| Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Gly Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 115 |     | 120 |     | 125 |
| Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 130 |     | 135 |     | 140 |
| Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly |     |     |     |     |     |
| 145                                                             |     | 150 |     | 155 | 160 |
|                                                                 |     |     |     |     |     |
| Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 165 |     | 170 |     | 175 |
| Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 180 |     | 185 |     | 190 |
| Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 195 |     | 200 |     | 205 |
| Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 210 |     | 215 |     | 220 |
|                                                                 |     |     |     |     |     |
| Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys |     |     |     |     |     |
| 225                                                             |     | 230 |     | 235 | 240 |
| Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 245 |     | 250 |     | 255 |
| Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 260 |     | 265 |     | 270 |
| Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 275 |     | 280 |     | 285 |
|                                                                 |     |     |     |     |     |
| Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 290 |     | 295 |     | 300 |
| Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser |     |     |     |     |     |
| 305                                                             |     | 310 |     | 315 | 320 |
| Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 325 |     | 330 |     | 335 |

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys  
 465

<210> 121

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223>

Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 121

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Phe Trp Val Ser  
 1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr  
 20 25 30

Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser  
 35 40 45

Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln





<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 123

Met Glu Phe Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Val Leu Leu Trp Leu Ser

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

                  85                    90                    95

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp

                  100                    105                    110

Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

                  115                    120                    125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

                  130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

                  165                    170                    175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

                  180                    185                    190

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

                  195                    200                    205

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

                  210                    215                    220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys



Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser

195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His

210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235 240

<210> 125

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 125

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Phe Trp Val Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser

35 40 45

Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln

50 55 60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg

65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr

115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe

130 135 140

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



115 120 125  
 Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro

130 135 140  
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu  
 145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp  
 165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp  
 180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys

195 200 205  
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln

210 215 220  
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235

<210> 127

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 127

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser

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

20 25 30  
 Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser

35 40 45  
 Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln

50 55 60  
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg

65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp  
                           85                          90                          95  
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr  
                           100                          105                          110  
 His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr  
                           115                          120                          125  
 Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe  
  
                           130                          135                          140  
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys  
 145                          150                          155                          160  
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
                           165                          170                          175  
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
                           180                          185                          190  
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser  
  
                           195                          200                          205  
 Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His  
                           210                          215                          220  
 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225                          230                          235                          240  
 <210> 128  
 <211> 240  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody  
 <400> 128  
 Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser  
  
 1                          5                          10                          15  
 Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala  
                           20                          25                          30  
 Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser  
                           35                          40                          45

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
 50 55 60  
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg  
  
 65 70 75 80  
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 85 90 95  
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr  
 100 105 110  
 Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr  
 115 120 125  
 Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe  
  
 130 135 140  
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys  
 145 150 155 160  
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
 165 170 175  
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
 180 185 190  
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser  
  
 195 200 205  
 Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His  
 210 215 220  
 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235 240  
 <210> 129  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody  
 <400> 129  
 Met Glu Ser Gln Thr Leu Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr

1                    5                    10                    15  
 Gly Ala Asp Gly Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser  
                          20                    25                    30  
 Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn  
                          35                    40                    45  
 Val Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro  
                          50                    55                    60  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp  
  
 65                    70                    75                    80  
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
                          85                    90                    95  
 Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr  
                          100                    105                    110  
 Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
                          115                    120                    125  
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
  
                          130                    135                    140  
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 145                    150                    155                    160  
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
                          165                    170                    175  
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
                          180                    185                    190  
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
  
                          195                    200                    205  
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
                          210                    215                    220  
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225                    230  
 <210> 130  
 <211> 18  
 <212> DNA

<213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 130  
 ccaagggcta tggcgttc 18  
 <210> 131  
 <211  
 > 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Oligonucleotide  
 <400> 131  
 ccgaaggtgt acctggtc 18  
 <210> 132  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product  
 <400> 132  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Tyr Asp Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 133

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 133

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 Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe

50                    55                    60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65                    70                    75                    80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85                    90                    95

Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100                    105                    110

Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 134

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 134

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

1                    5                    10                    15

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

20 25 30  
 Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115  
 <210> 135  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product  
 <400> 135

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

100 105 110  
 Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115  
 <210> 136  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220  
 ><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product  
 <400> 136

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

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

115  
 <210> 137  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product  
 <400> 137  
 Gln Val His Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Arg Ser Pro Gly Ser

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
                          115                    120

<210> 138

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 138

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

85 90 95  
 Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu

100 105 110  
 Lys

<210> 139

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 139

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 140

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 140

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

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

<210> 141

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 141

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

100

105

110

Lys

<210> 142

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 142

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

1                    5                    10                    15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

                  50                    55                    60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65                    70                    75                    80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn

                  85                    90                    95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile

                  100                    105                    110

Lys

<210> 143

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 143

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

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

<210> 144

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 144

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

100 105 110

Lys

<210> 145

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 145

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Lys

<210> 146

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 146

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly

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

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

<210> 147

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: codon optimized nucleic acid

<400> 147

cgtacggtgg ccgctcccag cgtgttcac ttcccccca gcgacgagca gctgaagtcc     60  
 ggaccgccca gcgtggtgtg cctgctgaac aacttctacc cccgggaggc caaggtgcag     120  
 tggaaagtgg acaacgcctt gcagagcggc aacagccagg agagcgtcac cgagcaggac     180  
 agcaaggact ccacctacag cctgagcagc acctgaccc tgagcaaggc cgactacgag     240  
 aagcacaagg tgtacgcctg cgaggtgacc caccagggcc tgtccagccc cgtgaccaag     300  
 agcttcaaca ggggcgagtg ctag                                                             324

<210> 148

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: codon optimized protein

<400> 148

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

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

<210> 149

<211> 981

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: codon optimized nucleic acid

<400> 149

```

ggcccaagcg tgttcccct ggccccagc agcaagagca ccagcggcgg cacagccgcc 60
ctgggtgcc tggatgaagga ctacttccc gagcccgtga ccgtgagctg gaacagcggga 120
gccctgacct ccggcgtgca caccttccc gccgtgctgc agagcagcgg cctgtacagc 180
ctgagcagcg tggatgacct gccccagcagc agcctgggca cccagaccta catctgcaac 240
gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag tggagcccaa gagctgcgac 300
aagaccaca cctgcccccc ctgcccagcc ccagagctgc tgggcggacc cagcgtgttc 360

ctgttcccc ccaagcccaa ggacacctg atgatcagca ggacccccga ggtgacctgc 420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaggacca gaggtgaagt tcaactggtg cgtggacggc 480
gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg 540
gtggtgtccg tgctgacctg gctgcaccag gactggctga acggcaagga atacaagtgc 600
aaggtctcca acaaggccct gccagcccc atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc 660
cagccacggg agccccaggt gtacacctg cccccagcc gggaggagat gaccaagaac 720

```

caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg 780  
 gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc ccccagtgct ggacagcgac 840  
 ggcagettct tectgtacag caaetgacc gtggacaagt ccaggtggca gcagggcaac 900  
 gtgttcagct gcagcgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagtcctg 960  
 agcctgagcc cggcaagta g 981

<210> 150

<211> 326

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Description of artificial sequence: codon optimized protein

<400> 150

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

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 20 25 30

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 35 40 45

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 50 55 60

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 65 70 75 80

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro  
 85 90 95

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 100 105 110

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 165 170 175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 260 265 270

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325