



등록특허 10-2172541



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월02일

(11) 등록번호 10-2172541

(24) 등록일자 2020년10월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/57484 (2013.01)

G01N 33/577 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0016347

(22) 출원일자 2019년02월12일

심사청구일자 2019년02월12일

(65) 공개번호 10-2020-0098329

(43) 공개일자 2020년08월20일

(56) 선행기술조사문헌

JP2003504073 A*

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

주식회사 메드팩토

서울특별시 서초구 명달로 92(서초동, 보림빌딩)

성균관대학교 산학협력단

경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

김성진

서울특별시 서초구 명달로 91, 901호(서초동, 더미켈란아파트)

양경민

인천광역시 연수구 해돋이로120번길 16, 208동 1101호(송도동, 송도풍림아이원2단지아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 21 항

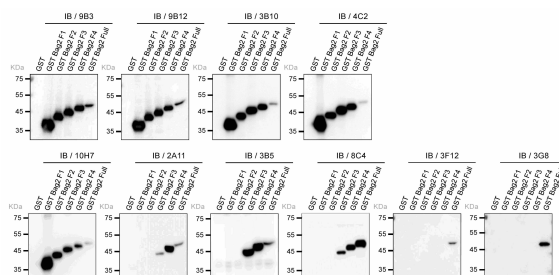
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 BAG2 항체를 이용한 암 진단용 조성물 및 이를 이용한 방법

(57) 요약

BAG2 폴리펩티드 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 암을 진단하는데 사용하기 위한 조성물; 상기 조성물을 포함하는 암을 진단하는데 사용하기 위한 키트; 및 암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2b



(72) 발명자

정준

서울특별시 강남구 논현로 218, 1동 1409호(도곡동, 삼익아파트)

안성귀

경기도 용인시 수지구 신봉1로347번길 57-16, 1층(신봉동)

박석희

경기도 수원시 장안구 화산로 263, 105동 706호(율전동, 신일아파트)

강동우

경기도 하남시 미사강변서로 65, 3305동 1001호(풍산동, 미사강변제일풍경채)

(56) 선행기술조사문헌

JP2002524068 A

KR1020180101052 A

US20120264710 A1

C I Yoon et al, European Journal of Cancer (2018), Poster, Prognostic impact of BAG2 expression on breast cancer is highlighted in patients with large tumor or lymph node metastasis, S44:179(PB-080).

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HA15C0003

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 국립암센터

연구사업명 암연구소 및 국가암관리사업본부 운영 암정복추진연구개발 사업

연구과제명 NGS 기법에 의해 도출된 단백질들에 의한 삼중음성유방암의 새로운 전이기전 규명

및 치료 진단 기술 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 성균관대학교 산학협력단

연구기간 2015.05.01 ~ 2020.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

BAG2 폴리펩티드 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 암을 진단 하는데 사용하기 위한 조성물로서,

상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은

서열번호 33의 아미노산 서열로 이루어지는 상보성 결정 영역(VH-CDR)1, 서열번호 39의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR2, 및 서열번호 45의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 51의 아미노산 서열로 이루어지는 상보성 결정 영역(VL-CDR)1, 서열번호 57의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR2, 서열번호 63의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것,

서열번호 34의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR1, 서열번호 40의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR2, 및 서열번호 46의 아미노산 서열로 이루어지는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 52의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR1, 서열번호 58의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR2, 서열번호 64의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것,

서열번호 35의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR1, 서열번호 41의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR2, 및 서열번호 47의 아미노산 서열로 이루어지는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 53의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR1, 서열번호 59의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR2, 서열번호 65의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것,

서열번호 36의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR1, 서열번호 42의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR2, 및 서열번호 48의 아미노산 서열로 이루어지는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 54의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR1, 서열번호 60의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR2, 서열번호 66의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역VL을 포함하는 것,

서열번호 37의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR1, 서열번호 43의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR2, 및 서열번호 49의 아미노산 서열로 이루어지는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 55의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR1, 서열번호 61의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR2, 서열번호 67의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것,

서열번호 38의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR1, 서열번호 44의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR2, 및 서열번호 50의 아미노산 서열로 이루어지는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 56의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR1, 서열번호 62의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR2, 서열번호 68의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것, 또는 이들의 조합인 것인 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은

서열번호 21 내지 26으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역;

서열번호 27 내지 32으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;

또는 상기 중쇄 가변 영역 및 상기 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 33의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR1, 서열번호 39에서 6번째 및 7번째 Xaa는 Gly인 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR2, 및 서열번호 45의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 51의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR1, 서열번호 57의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR2, 및 서열번호 63의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편; 및

서열번호 38의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR1, 서열번호 44의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR2, 및 서열번호 50의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 56의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR1, 서열번호 62의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR2, 및 서열번호 68의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편인 것인 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은

서열번호 35에서 2번째 Xaa는 Tyr인 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR1, 서열번호 41에서 8번째 Xaa는 Ser인 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR2, 및 서열번호 47에서 12번째 Xaa는 His인 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 53에서 3번째 Xaa는 Met인 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR1, 서열번호 59에서 2번째 Xaa는 Ala인 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR2, 및 서열번호 65의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편; 및

서열번호 37의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR1, 서열번호 43의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR2, 및 서열번호 49의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 55의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR1, 서열번호 61의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR2, 및 서열번호 67의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편인 것인 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은

서열번호 33의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR1, 서열번호 39에서 6번째 및 7번째 Xaa는 각각 Ala 및 Gly인 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR2, 및 서열번호 45의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 51의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR1, 서열번호 57의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR2, 및 서열번호 63의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편; 및

서열번호 37의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR1, 서열번호 43의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR2, 및 서열번호 49의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 55의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR1, 서열번호 61의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR2, 및 서열번호 67의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편인 것인 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은

서열번호 36의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR1, 서열번호 44의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR2, 및 서열번호 50의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 56의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR1, 서열번호 62의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR2, 및 서열번호 68의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편; 및

서열번호 37의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR1, 서열번호 43의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR2, 및 서열

번호 49의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 55의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR1, 서열번호 61의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR2, 및 서열번호 67의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편인 것인 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 단일클론성 항체인 것인 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 검출가능한 표지 또는 검출가능한 신호를 방출할 수 있는 표지로 표지된 것인 조성물.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 기탁번호 KCTC 13737BP, KCTC 13738BP, KCTC 13739BP, KCTC 13740BP, KCTC 13741BP, KCTC 13742BP, KCTC 13743BP, KCTC 13744BP, KCTC 13745BP 및 KCTC 13746BP로 기탁된 하이브리도마 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 하이브리도마 세포에 의해 생산되는 것인 조성물.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 암은 유방암, 결장직장암, 두경부암, 대장암, 피부암, 췌장암, 폐암, 위암, 난소암, 전립선암, 방광암, 요도암, 간암, 신장암, 투명세포 육종, 흑색종, 뇌척수종양, 뇌암, 흉선종, 중피종, 식도암, 담도암, 고환암, 생식세포종, 갑상선암, 부갑상선암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 림프종, 골수형성이상 증후군 (myelodysplastic syndromes: MDS), 골수섬유증(myelofibrosis), 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 호치킨병(Hodgkin's Disease), 내분비계암, 및 육종으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물.

청구항 12

청구항 1, 및 3 내지 11 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 암을 진단하는데 사용하기 위한 키트.

청구항 13

개체로부터 분리된 시료와 BAG2 폴리펩티드 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 접촉시키는 단계; 및

형성된 BAG2 폴리펩티드 또는 그의 단편과 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 복합체를 측정하는 단계를 포함하는 개체의 암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법으로서,

상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은

서열번호 33의 아미노산 서열로 이루어지는 상보성 결정 영역(VH-CDR)1, 서열번호 39의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR2, 및 서열번호 45의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 51의 아미노산 서열로 이루어지는 상보성 결정 영역(VL-CDR)1, 서열번호 57의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR2, 서열번호 63의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것,

서열번호 34의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR1, 서열번호 40의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR2, 및 서열번호 46의 아미노산 서열로 이루어지는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 52의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR1, 서열번호 58의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR2, 서열번호 64의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것,

서열번호 35의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR1, 서열번호 41의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR2, 및 서열번호 47의 아미노산 서열로 이루어지는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 53의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR1, 서열번호 59의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR2, 서열번호 65의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것,

서열번호 36의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR1, 서열번호 42의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR2, 및 서열번호 48의 아미노산 서열로 이루어지는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 54의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR1, 서열번호 60의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR2, 서열번호 66의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역VL을 포함하는 것,

서열번호 37의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR1, 서열번호 43의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR2, 및 서열번호 49의 아미노산 서열로 이루어지는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 55의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR1, 서열번호 61의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR2, 서열번호 67의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것,

서열번호 38의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR1, 서열번호 44의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR2, 및 서열번호 50의 아미노산 서열로 이루어지는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 56의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR1, 서열번호 62의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR2, 서열번호 68의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것, 또는 이들의 조합인 것인 방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은

서열번호 21 내지 26으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역;

서열번호 27 내지 32으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;

또는 상기 중쇄 가변 영역 및 상기 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 15

청구항 13에 있어서, 상기 시료는 생물학적 시료인 것인 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 생물학적 시료는 세포, 기관, 세포 용해물, 전혈, 혈액, 혈청, 혈장, 림프액, 세포 외액, 체액, 소변, 분변, 조직, 골수, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 이들의 조합인 방법.

청구항 17

청구항 13에 있어서, 상기 암은 유방암, 결장직장암, 두경부암, 대장암, 피부암, 췌장암, 폐암, 위암, 난소암, 전립선암, 방광암, 요도암, 간암, 신장암, 투명세포 육종, 흑색종, 뇌척수종양, 뇌암, 흉선종, 중피종, 식도암, 담도암, 고환암, 생식세포종, 갑상선암, 부갑상선암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 림프종, 골수형성이상 증후군, 골수섬유증, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 호치킨병, 내분비계암, 및 육종으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 18

청구항 13에 있어서, 상기 정보는 상기 개체에서 측정된 상기 BAG2의 수준이 음성 대조군으로부터 측정된 BAG2의 수준에 비해 높은지, 동일한지 또는 낮은지에 대한 정보인 것인 방법.

청구항 19

청구항 13 또는 14에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 33의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR1, 서열번호 39에서 6번째 및 7번째 Xaa는 Gly인 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR2, 및 서열번호 45의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 51의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR1, 서열번호 57의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR2, 및 서열번호 63의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편; 및

서열번호 38의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR1, 서열번호 44의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR2, 및 서열번호 50의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 56의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR1, 서열번호 62의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR2, 및 서열번호 68의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편인 것인 방법.

청구항 20

청구항 13 또는 14에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은

서열번호 35에서 2번째 Xaa는 Tyr인 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR1, 서열번호 41에서 8번째 Xaa는 Ser인 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR2, 및 서열번호 47에서 12번째 Xaa는 His인 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 53에서 3번째 Xaa는 Met인 아미노산 서열로 이루어진 VLCDR1, 서열번호 59에서 2번째 Xaa는 Ala인 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR2, 및 서열번호 65의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편; 및

서열번호 37의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR1, 서열번호 43의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR2, 및 서열번호 49의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 55의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR1, 서열번호 61의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR2, 및 서열번호 67의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편인 것인 방법.

청구항 21

청구항 13 또는 14에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은

서열번호 33의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR1, 서열번호 39에서 6번째 및 7번째 Xaa는 각각 Ala 및 Gly인 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR2, 및 서열번호 45의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 51의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR1, 서열번호 57의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR2, 및 서열번호 63의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편; 및

서열번호 37의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR1, 서열번호 43의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR2, 및 서열번호 49의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 55의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR1, 서열번호 61의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR2, 및 서열번호 67의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편인 것인 방법.

청구항 22

청구항 13 또는 14에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은

서열번호 36의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR1, 서열번호 44의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR2, 및 서열번호 50의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 56의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR1, 서열번호 62의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR2, 및 서열번호 68의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편; 및

서열번호 37의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR1, 서열번호 43의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR2, 및 서열번호 49의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 55의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR1, 서열번호 61의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR2, 및 서열번호 67의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편인 것인 방법.

발명의 설명

기술분야

- [0001] BAG2 폴리펩티드 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 암을 진단 하는데 사용하기 위한 조성물 및 암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0003] 코-샤페론 Bcl-2-결합 아타노젠(co-chaperone Bcl-2-associated athanogene: BAG) 단백질 패밀리는 세포 내 단백질 폴딩, 스트레스 반응, 신경 분화, 세포 사멸, 세포 증식 등을 포함하는 다양한 생리학적 과정을 매개하고 다양한 협력 단백질들과 기능적으로 결합한다. 이들 중 항-세포 사멸 활성을 갖는 BAG 도메인 패밀리 구성원 중 하나인 BAG2는 샤페론-관련 유비퀴틴 리가제인 Hsc70-상호작용 단백질의 C-말단(C-terminus of Hsc70-interacting protein: CHIP)의 음성 조절자로서 알려져 있다. CHIP 활성을 억제하는 것을 통한 단백질의 조절에서 BAG2의 주 역할은 PINK1 및 CFTR과 같은 샤페론 관련 단백질의 안정화를 통해 신경퇴행성 질환 및 상염색체 열성 장애와 관련되어 있다. BAG2의 발현은 프로테아좀 억제자-유도된 세포사멸을 증가시키고, BAG2 녹다운은 갑상선 암종 세포를 프로테아좀 억제자인 MG132에 노출시키는 경우, 세포 사멸을 부분적으로 억제함으로써, BAG2가 항-세포사멸(pro-apoptotic) 활성을 가질 수 있음이 제시된바 있다. 한편, 다양한 돌연변이 K-Ras-유도된 종양에서, BAG2의 과발현이 강력한 종양 유전자인 STK33 단백질의 안정화를 촉진시켜 종양 발생을 촉진시킬 수 있음이 제시된 바 있다. 그러나 이러한 발견들에도 불구하고, 암 진행 및 전이에서의 BAG2 역할은 분명하게 밝혀진 바 없다.
- [0004] 이에, BAG2 폴리펩티드 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 암을 진단하기 위한 조성물 및 방법에 대한 개발이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 일 양상은 BAG2 폴리펩티드 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 암을 진단하는데 사용하기 위한 조성물을 제공한다.
- [0007] 다른 양상은 상기 조성물을 포함하는 암을 진단하는데 사용하기 위한 키트를 제공한다.
- [0008] 또 다른 양상은 암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 일 양상은 BAG2 폴리펩티드 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 암을 진단하는데 사용하기 위한 조성물을 제공한다.
- [0011] 상기 BAG2 폴리펩티드는 각각 포유 동물로부터 유래된 것일 수 있다. 상기 포유동물은 인간(*Homo sapiens*), 마우스(*Mus musculus*), 원숭이, 소 또는 말일 수 있다. BAG2는 서열번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 서열번호 69 아미노산 서열은 NCBI 참조 서열번호 NM_004282.4에 해당하는 서열이다. 상기 BAG2 단백질은 서열번호 69의 아미노산 서열이 일치하지 않지만, 상기 BAG2 단백질과 생물학적으로 동등한 활성을 갖는 변이체도 포함한다. 상기 BAG2 폴리펩티드는 서열번호 69의 서열과 60% 이상, 예를 들면, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 99% 이상, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 또한 상기 BAG2 단백질은 각각 상기 서열번호 69의 서열에서 1개 이상의 아미노산, 2개 이상의 아미노산, 3개 이상의 아미노산, 4개 이상의 아미노산, 5개 이상의 아미노산, 6개 이상의 아미노산 또는 7개 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 갖는 폴리펩티드일 수 있다. 본 명세서에서 상기 '폴리펩티드'는 '단백질'과 상호 교환적으로 사용될 수 있다.
- [0012] 상기 항체는 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역 글로불린을 의미한다. 상기 항체는 BAG2 폴리펩티드 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드의 조합을 의미한다. 상기 항체의 형태는 다중클론성 항체, 단일클론성 항체, 또는 재조합 항체, 예를 들어, ScFv 단편, 디아바디, 단쇄 항체 등을 포함하며, 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2 개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태뿐만 아니라, 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 갖는 완전한 형태 온전한 항체의 구조를 갖지는 않지만, 항원성 부위에 대해 지시되는 특이적인 항원결합부위 즉 결합 도메인을 가져 항원 결합 기능을 보유하고

있는, 항체 분자의 기능적 단편 또한 포함할 수 있다.

- [0013] 상기 항원 결합 단편(antigen-binding fragment)은 면역글로불린 전체 구조에 대한 그의 단편으로, 항원이 결합할 수 있는 부분을 포함하는 폴리펩티드의 일부를 말한다. 예를 들어, 항원 결합 단편은 scFv, (scFv)₂, Fv, Fab, Fab', Fv F(ab')₂, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0014] 상기 중쇄(heavy chain)는 γ , δ , α , μ , ϵ 5가지 종류가 있으며 중쇄가 항체의 종류를 결정지을 수 있다. α 와 γ 는 450개, μ 와 ϵ 는 550개의 아미노산으로 구성되어 있다. 중쇄는 두 영역 즉 가변 영역과 불변 영역이 있다.
- [0015] 상기 경쇄(light chain)는 λ , κ 2가지 종류가 있으며 대략 211 내지 217개의 아미노산으로 구성될 수 있다. 경쇄는 불변 영역과 가변 영역이 연속적으로 이루어져 있다.
- [0016] 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 33의 아미노산 서열로 이루어지는 상보성 결정 영역(VH-CDR)₁, 서열번호 39의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR₂, 및 서열번호 45의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR₃을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 51의 아미노산 서열로 이루어지는 상보성 결정 영역(VL-CDR)₁, 서열번호 57의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR₂, 서열번호 63의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR₃을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것, 서열번호 34의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR₁, 서열번호 40의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR₂, 및 서열번호 46의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR₃을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 52의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR₁, 서열번호 58의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR₂, 서열번호 64의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR₃을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것, 서열번호 35의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR₁, 서열번호 41의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR₂, 및 서열번호 47의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR₃을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 53의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR₁, 서열번호 59의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR₂, 서열번호 65의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR₃을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것, 서열번호 36의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR₁, 서열번호 42의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR₂, 및 서열번호 48의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR₃을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 54의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR₁, 서열번호 60의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR₂, 서열번호 66의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR₃을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것, 서열번호 37의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR₁, 서열번호 43의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR₂, 및 서열번호 49의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR₃을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 55의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR₁, 서열번호 61의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR₂, 서열번호 67의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR₃을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 38의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR₁, 서열번호 44의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR₂, 및 서열번호 50의 아미노산 서열로 이루어지는 VH-CDR₃을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 56의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR₁, 서열번호 62의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR₂, 서열번호 68의 아미노산 서열로 이루어지는 VL-CDR₃을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0017] 상기 서열번호 39에서 6 및 7번째 Xaa는 글리신(Gly) 또는 알라닌(Ala)일 수 있다. 상기 서열번호 35에서 2번째 Xaa는 티로신(Tyr) 또는 히스티딘(His)일 수 있다. 상기 서열번호 41에서 8번째 Xaa는 세린(Ser) 또는 트레오닌(Thr)일 수 있다. 상기 서열번호 47에서 12번째 Xaa는 티로신(Tyr) 또는 히스티딘(His)일 수 있다. 상기 서열번호 53에서 3번째 Xaa는 메티오닌(Met) 또는 이소류신(Ile)일 수 있다. 상기 서열번호 59에서 2번째 Xaa는 알라닌(Ala) 또는 세린(Ser)일 수 있다.
- [0018] 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 33의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR₁, 서열번호 39에서 6번째 및 7번째 Xaa는 Gly인 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR₂, 및 서열번호 45의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR₃을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 51의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR₁, 서열번호 57의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR₂, 및 서열번호 63의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR₃을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편; 및 서열번호 38의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR₁, 서열번호 44의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR₂, 및 서열번호 50의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR₃을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 56의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR₁, 서열번호 62의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR₂, 및 서열번호 68의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR₃을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편일 수 있다.
- [0019] 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 35에서 2번째 Xaa는 Tyr인 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR₁, 서열번호 41에서 8번째 Xaa는 Ser인 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR₂, 및 서열번호 47에서 12번째 Xaa는 His

인 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 53에서 3번째 Xaa는 Met인 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR1, 서열번호 59에서 2번째 Xaa는 Ala인 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR2, 및 서열번호 65의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편; 및 서열번호 37의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR1, 서열번호 43의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR2, 및 서열번호 49의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 55의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR1, 서열번호 61의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR2, 및 서열번호 67의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편일 수 있다.

[0020] 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 33의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR1, 서열번호 39에서 6번째 및 7번째 Xaa는 각각 Ala 및 Gly인 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR2, 및 서열번호 45의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 51의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR1, 서열번호 57의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR2, 및 서열번호 63의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편; 및 서열번호 37의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR1, 서열번호 43의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR2, 및 서열번호 49의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 55의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR1, 서열번호 61의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR2, 및 서열번호 67의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편일 수 있다.

[0021] 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 36의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR1, 서열번호 44의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR2, 및 서열번호 50의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 56의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR1, 서열번호 62의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR2, 및 서열번호 68의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편; 및 서열번호 37의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR1, 서열번호 43의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR2, 및 서열번호 49의 아미노산 서열로 이루어진 VH-CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 55의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR1, 서열번호 61의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR2, 및 서열번호 67의 아미노산 서열로 이루어진 VL-CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편일 수 있다.

[0022] 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 21 내지 26으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 서열번호 27 내지 32로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는 상기 중쇄 가변 영역 및 상기 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.

[0023] 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 21의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 27의 경쇄 가변 영역; 서열번호 22의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 28의 경쇄 가변 영역; 서열번호 23의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 29의 경쇄 가변 영역; 서열번호 24의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 30의 경쇄 가변 영역; 서열번호 25의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 31의 경쇄 가변 영역; 또는 서열번호 26의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 32의 경쇄 가변 영역 포함하는 것, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0024] 상기 서열번호 21에서 56번째 및 57번째 Xaa는 글리신(Gly) 또는 알라닌(Ala)일 수 있다. 상기 서열번호 23에서 1번째 Xaa는 글루타민(Gln) 또는 글루탐산(Glu)일 수 있고, 7번째 Xaa는 세린(Ser) 또는 프롤린(Pro)일 수 있고, 12번째 Xaa는 발린(Val) 또는 알라닌(Ala)일 수 있고, 27번째 Xaa는 티로신(Tyr) 또는 히스티딘(His)일 수 있고, 58번째 Xaa는 세린(Ser) 또는 트레오닌(Thr)일 수 있고, 61번째 Xaa는 아스파라긴(Asn) 또는 세린(Ser)일 수 있고, 74번째 Xaa는 아르기닌(Arg) 또는 라이신(Lys)일 수 있고, 83번째 Xaa는 페닐알라닌(Phe) 또는 류신(Leu)일 수 있고, 92번째 Xaa는 글리신(Gly) 또는 알라닌(Ala)일 수 있고, 108번째 Xaa는 히스티딘(His) 또는 티로신(Tyr)일 수 있다. 상기 서열번호 27에서 53번째 Xaa는 이소류신(Ile) 또는 페닐알라닌(Phe)일 수 있다. 상기 서열번호 29에서 23번째 Xaa는 메티오닌(Met) 또는 이소류신(Ile)일 수 있고, 45번째 Xaa는 알라닌(Ala) 또는 세린(Ser)일 수 있고, 73번째 Xaa는 글루탐산(Glu) 또는 아스파르트산(Asp)일 수 있고, 100번째 Xaa는 메티오닌(Met) 또는 이소류신(Ile)일 수 있다.

[0025] 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 단일클론성(monoclonal) 항체일 수 있다.

[0026] 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 검출가능한 표지 또는 검출가능한 신호를 방출할 수 있는 표지로 표지된 것일 수 있다. 상기 표지는 표지된 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 생성하도록 항체에 직접 또는 간접적으로 공유결합된 검출가능한 화합물 또는 조성물을 말한다. 표지는 그 자체로 검출가능할 수 있고, 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변형을 촉매화할 수 있다. 상기 표지는 면역형광 표지, 화학발광 표지, 인광 표지, 방사선 표지, 에피토프 태그, 아비딘/비오틴, 콜로이드 금 입자, 착색 입자, 자석 입자, 발색단 표지,

ECL 표지, 효소 등일 수 있다.

[0027] 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 기탁번호 KCTC 13737BP, KCTC 13738BP, KCTC 13739BP, KCTC 13740BP, KCTC 13741BP, KCTC 13742BP, KCTC 13743BP, KCTC 13744BP, KCTC 13745BP 및 KCTC 13746BP으로 기탁된 하이브리도마 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 하이브리도마 세포에 의해 생산되는 것일 수 있다. 상기 하이브리도마 세포(hybridoma cell)는 2종류의 세포를 인공적으로 융합시켜 만든 종양성을 갖는 잡종세포를 의미하며, 일반적으로 면역된 개체로부터 분리한 B 세포와 형질세포종 세포와 융합함으로써 항체를 배양에서 계속적으로 생산하기 위해 이용될 수 있다. 본 명세서에서, 상기 하이브리도마 세포는 하이브리도마 세포 또는 융합세포와 혼용되어 사용될 수 있다.

[0028] 상기 암은 고형암 또는 비고형암일 수 있다. 고형암은 예를 들어 간, 폐, 유방, 피부 등 장기에 암 종양이 발생한 것을 말한다. 비고형암은 혈액 내에서 발생한 암이고, 혈액암으로도 불린다. 상기 암은 암종(carcinoma), 육종(sarcoma), 조혈세포 유래의 암, 배세포 종양(germ cell tumor), 또는 모세포종(blastoma)일 수 있다. 상기 암은 예를 들어 유방암, 결장직장암, 두경부암, 대장암, 피부암, 췌장암, 폐암, 위암, 난소암, 전립선암, 방광암, 요도암, 간암, 신장암, 투명세포 육종, 흑색종, 뇌척수종양, 뇌암, 흉선종, 중피종, 식도암, 담도암, 고환암, 생식세포종, 갑상선암, 부갑상선암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 림프종, 골수형성이상 증후군(myelodysplastic syndromes: MDS), 골수섬유증(myelofibrosis), 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 호치킨병(Hodgkin's Disease), 내분비계암, 및 육종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0029] 본 발명자들은 항-BAG2 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 특히 BAG2 도메인 스크리닝을 통해 선별한 항-BAG2 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 조합을 이용하는 경우, 정상 세포에서와 달리, 유방암 세포주, 췌장암 세포주, 다형성아교모세포종 세포주, 위암 세포주, 난소암 세포주, 미만성 거대 B세포 림프종 세포주를 포함하는 다양한 암 세포주에서 BAG2의 존재가 측정되거나 그 수준이 현저하게 높은 것으로 측정됨을 확인하였다. 따라서, 상기 조성물로 진단할 수 있는 암은 유방암, 췌장암, 신경아교종, 위암, 난소암, 및 림프종으로부터 선택된 것일 수 있다.

[0030] 본 발명자들은 항-BAG2 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 특히 항-BAG2 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 조합을 이용하는 경우, BAG2가 정상 개체에 비하여, 유방암 환자에서 BAG2가 과발현하고, 특히 BAG2 수준이 높게 측정된 유방암 환자는 높은 확률로 전이성 유방암을 앓고 있음을 확인할 수 있음을 증명하였다. 따라서, 상기 조성물로 진단할 수 있는 유방암은 전이성 유방암일 수 있다.

[0031] 유방암의 분자적 하위 유형 중, 삼중음성 유방암(triple-negative breast cancer: TNBC)은 체계적인 치료에도 불구하고 좋지 않은 예후를 보이고 높은 사망률과 관련된 매우 공격적인 유형이다. TNBC는 내강형(luminal type) 또는 HER2-과다형(HER2-enriched type)과 비교하여 이질적인 유형이다. 대부분의 표적 유방암 치료는 호르몬 수용체성 및 HER2 양성 유방암에 대해 호전적인 성과를 보여주는 반면, TNBC 환자는 3 가지 표적 수용체인 에스트로겐 수용체(estrogen receptor: ER), 프로게스테론 수용체(progesterone receptor: PR), 및 인간 표피 성장인자 수용체(human epidermal growth factor receptor: HER2) 또는 다른 잘 정의된 분자 표적이 부재하므로 효과적인 치료를 위해 한정된 옵션인, 예를 들어, 폴리 ADP-리보스 폴리머라제(PARP), 표피 성장 인자 수용체(epidermal growth factor receptor: EGFR), 및 Src 티로신 키나아제 등을 가질 수 밖에 없다. 따라서, TNBC 환자들에게 불필요한 치료적 접근을 방지하고 효과적인 치료법을 선택하기 위해 다양한 유형의 유방암 환자들 중에서 TNBC 환자를 신속하고 정확하게 구별해 낼 필요가 있다.

[0032] 본 발명자들은 항-BAG2 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 특히 항-BAG2 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 조합을 이용하는 경우, BAG2가 유방암 환자에서 과발현하고, 특히 BAG2 수준이 높게 측정된 유방암 환자는 높은 확률로 TNBC형 유방암을 앓고 있음을 진단할 수 있음을 증명하였다. 따라서, 상기 방법으로 진단할 수 있는 유방암은 삼중음성 유방암 또는 TNBC형 유방암일 수 있다.

[0034] 다른 양상은 상기 조성물을 포함하는 암을 진단하는데 사용하기 위한 키트를 제공한다.

[0035] 상기 키트는 그 키트가 이용하는 분석 방법인, 예를 들어, 웨스턴 블롯팅, ELISA, 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS, 단백질 칩, 또는 이들의 조합에 적합한 하나 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 시료 중의 BAG2와 이들 각각에 특이적인 항체와의 면역 복합체의 검출을 위하여 기질, 적합한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질을 더 포함할 수 있다. 상기 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스티렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유

리 슬라이드글라스 등일 수 있고, 발색효소로서 퍼옥시다아제(oxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase)가 이용될 수 있고, 형광물질로서 아이소타이오사이안산 플루오레스세인(fluorescein isothiocyanate: FITC), 로다민 B-아이소타이오사이안산(rhodamine B-isothiocyanate: RITC) 등, 발색 기질로서 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid): ABTS) 또는 o-페닐렌디아민(o-phenylenediamine: OPD), 테트라메틸벤지딘(tetramethylbenzidine: TMB) 등이 사용될 수 있다.

[0037] 또 다른 양상은 암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0038] 상기 방법은 암을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법으로서, 개체에서 BAG2의 존재를 검출하여 개체 내에 존재하는 암을 진단하기 위한 것이다.

[0039] 상기 방법은 개체로부터 분리된 시료와 BAG2 폴리펩티드 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 접촉시키는 단계; 및 형성된 BAG2 폴리펩티드 또는 이의 단편과 상기 항체의 복합체를 측정하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0040] 상기 방법은 개체가 암을 갖고 있는지 결정하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0041] 상기 정보는 상기 개체에서 측정된 상기 BAG2의 수준이 대조군으로부터 측정된 BAG2의 수준에 비해 높은지, 동일한지 또는 낮은지에 대한 정보일 수 있다.

[0042] 상기 시료는 진단의 대상이 되는 개체로부터 분리된 것으로서 생물학적 시료일 수 있다. 상기 생물학적 시료는 세포, 기관, 세포 용해물, 전혈, 혈액, 혈청, 혈장, 림프액, 세포 외액, 체액, 소변, 분변, 조직, 골수, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0043] 상기 시료는 혈액, 혈청(serum), 혈장(plasma), 또는 이들의 조합일 수 있다. 본 발명자들은 BAG2가 세포 밖으로 분비될 수 있고, 실제로 유방암 환자의 혈청에서 BAG2가 항-BAG2 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 이용하여 검출될 수 있음을 증명하였다. 따라서, 상기 BAG2는 혈액, 혈액, 혈청(serum), 혈장(plasma), 또는 이들의 조합에 가용성인 것일 수 있다.

[0044] 개체로부터 분리된 시료 중에 BAG2가 존재하는 경우 BAG2 폴리펩티드 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체는 상기 시료 중의 BAG2와 결합할 수 있다. 상기 항체는 상기 시료 중의 BAG2의 존재를 시각화하기 위하여, 예를 들어, 형광물질(fluorophore), 발색단(chromophore), 또는 기질을 발색단으로 전환시킬 수 있는 효소로 표시된 것일 수 있다.

[0045] 상기 결합 반응으로 인하여 상기 시료 중의 BAG2가 상기 BAG2 폴리펩티드 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체와 복합체를 형성하게 되고, 상기 복합체로부터 통상의 기술자에게 알려진 방법을 이용하여 BAG2 존재, 또는 필요에 따라 그 수준을 측정할 수 있다. 상기 복합체를 측정하는 단계는 웨스턴 블롯팅, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(Radioimmunoassay: RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓(roket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩(protein chip), 또는 이들의 조합에 의한 것일 수 있다. 상기 측정은 시료 중 상기 복합체의 수준을 측정하는 것일 수 있다.

[0046] 상기 대조군은 건강한 개체로부터 채취된 시료 또는 필요에 따라 유방암, 췌장암, 다형성아교모세포종, 위암, 난소암 또는 미만성 거대 B세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma: DLBCL) 환자로부터 채취된 시료일 수 있다. 따라서, 상기 대조군으로부터 측정된 BAG2 수준은 BAG2 수준의 건강한 개체로부터 채취된 시료 또는 필요에 따라 유방암, 췌장암, 다형성아교모세포종, 위암, 난소암 또는 미만성 거대 B세포 림프종 환자로부터 채취된 시료 중의 BAG2 농도의 평균 값을 의미하는 것일 수 있다.

[0047] 상기 대조군으로 사용되는 시료는 상기 진단을 위한 시료와 해부학적으로 동일한 위치에서 채취한 것으로서 동일한 종류의 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 시료가 개체의 팔오금중간정맥(Median Cubital Vein)으로부터 채취된 혈액이라면, 상기 대조군 또한 대조군의 팔오금중간정맥으로부터 채취된 혈액일 수 있다.

[0048] 상기 건강한 개체는 임의의 급성 또는 만성적 질환을 앓고 있지 않은 것으로서, 적어도 암을 앓고 있지 않고, 바람직하게는 유방암, 췌장암, 다형성아교모세포종, 위암, 난소암 또는 미만성 거대 B세포 림프종(DLBCL)을 앓고 있지 않은 것일 수 있다.

[0049] 상기 건강한 개체로부터 채취된 시료 중의 BAG2 수준은 BAG2가 실질적으로 존재하지 않는 것일 수 있다. 따라서, 대조군을 건강한 개체로부터 수득된 값으로 설정하는 경우, 진단 대상이 되는 개체에서 BAG2의 존재가 측정되거나 그 수준이 현저하게 높은 것으로 측정된다면, 상기 개체는 암을 앓고 있는 것으로 의심할 수 있다. 반면, 본 명세서의 실시예 2의 3절에서 보여주는 바와 같이, 유방암 환자 중 전이성 유방암 환자, 특히 TNBC형 환자의 혈액에서는 BAG2의 존재가 측정될 확률이 높고 평균 값이 현저하게 높은 것을 알 수 있다(도 6 및 도 7). 따라서, 대조군을 유방암 환자, 비전이성 유방암 환자 또는 TNBC형이 아닌 유방암 환자로부터 분리된 시료로 설정하는 경우, 진단 대상이 되는 개체에서 BAG2의 수준이 현저하게 높은 것으로 측정된다면, 상기 개체는 전이성 유방암 또는 TNBC 형 유방암을 앓고 있는 것으로 의심할 수 있다.

발명의 효과

[0051] 일 양상에 따른 항-BAG2 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 암을 진단하는데 사용하기 위한 조성물은 암 진단에 필요한 정보를 제공할 수 있다.

[0052] 다른 양상에 따른 암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법은 조직을 채취하는 기존의 진단방법에 비해 혈액으로부터 혈중 BAG2 폴리펩티드의 존재 또는 수준의 측정이 가능하며 높은 진단 유용성을 나타내므로 다양한 기관에서 암을 진단하기 위해 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0054] 도 1은 10종의 마우스 하이브리도마 세포로부터 생산된 항-BAG2 항체의 웨스턴 블로팅 결과를 나타낸 도면이다.
 도 2는 항-BAG2 항체의 전장 BAG2 폴리펩티드 또는 이의 단편에 대한 웨스턴 블로팅 결과를 나타낸 도면이다.
 도 3은 각각의 항-BAG2 항체가 반응하는 BAG2 도메인을 나타낸 도면이다.
 도 4는 항-BAG2 항체의 가능한 90개의 조합에서 BAG2 단백질에 대한 표준 곡선(Standard curve)을 나타낸 도면이다.
 도 5는 상기 선별된 14개의 항체 조합의 BAG2 단백질에 대한 특이적인 결합력을 나타낸 도면이다.
 도 6은 2A11-3F12, 및 9B12-3G8 항체 조합을 이용하여 관찰된 다양한 암 세포주에서의 BAG2 발현 패턴 차이를 나타낸 도면이다.
 도 7은 2A11-3F12, 및 9B12-3G8 항체 조합을 이용하여 관찰된 루미날 타입 및 TNBC 타입의 유방암 환자의 혈청에서 BAG2 단백질 발현의 유의적인 차이를 나타낸 도면이다.
 도 8은 8C4-3G8, 및 10H7-3G8 항체 조합을 이용하여 관찰된 루미날 타입 및 TNBC 타입의 유방암 환자의 혈청에서 BAG2 단백질 발현의 유의적인 차이를 나타낸 도면이다.
 도 9는 상기 4개의 항체 조합에서의 ROC 곡선 및 AUC 값을 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0057] 실시예 1: 항-BAG2 항체의 선별, 서열 분석 및 이의 항원-항체 반응 확인

[0058] 1. BAG2를 표적으로 하는 단일클론성 항체의 선별 및 아미노산 서열의 분석

[0059] 본 발명자들은 BAG2를 표적으로 하는 항체를 선별하고, 그의 아미노산 서열을 분석하고, 각 항체의 상보성 결정 영역(complementarity determining region: CDR)을 결정하였다.

[0060] 구체적으로, 서열번호 69의 아미노산 서열로 이루어진 인간 BAG2 단백질을 코딩하는 서열번호 70의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 유전자를 pCAGGS 플라스미드에 클로닝하여 선형화한 후, 상기 선형화된 컨스트럭트(construct)를 전기충격을 가하여 5마리의 6주령 암컷 BALB/c 마우스의 근육으로 접종하였다. 컨스트럭트를 3주간격으로 3회 근육 내로 접종하였으며, PBS 100ul 내의 DNA 100ug으로 구성되었다. 이때, 대조군의 플라스미드 역시 동일한 방법으로 상기 과정을 수행하였다. 치료용 및 진단용 항체를 제작하기 위해, 단백질을 이용한 항원 주입법 보다 효율적인 DNA 백신 기반 면역화 전략을 수행했다. 마우스의 안저정맥총 또는 미정맥으로부터 채혈하여, 그 혈청 항체가를 나타내는 효소 면역 측정법으로 조사하고, 충분한 항체가를 나타낸 마우스로부터 최종

면역 3일 후에 비장을 적출하였다. 비장에서 B 림프구를 분리한 다음, 분리된 B림프구를 배양한 골수종 세포 즉 ATCC의 SP2/0-Ag14 세포주와 융합시켜 융합된 세포를 얻었다. 융합된 세포를 히포잔틴(hypoxanthin), 아미노프테린(aminopterin) 및 티미딘(thymidine)이 첨가되어 있는 HAT 배지에서 배양한 후, 골수종과 B 림프구만이 융합된 하이브리도마 세포를 약 130 클론을 선별하여 얻었다. 면역 블로팅을 이용한 선별과정을 통해 얻어진 하이브리도마 세포 중에서, 인간 BAG2 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하는 10개의 하이브리도마 세포를 얻었다.

- [0061] 상기 5×10^6 개의 하이브리도마 세포로부터 항-BAG2 항체의 총 RNA를 제조하고, 제조자의 지시에 따라 스마트 레이스(SMART RACE) cDNA 증폭 키트(Clontech)를 사용하여 100 ng 총 RNA로부터 5'-RACE-cDNA를 제조하였다. 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL) 코딩 영역을 PCR에 의해 증폭시키고, 상기에서 증폭된 유전자는 pGEM-T 벡터(Promega, USA)에 삽입하여 클로닝하고, 자동유전자분석기(ABI 프리즘 310, Applied Biosystem Co.)를 이용하여 뉴클레오티드 서열을 분석하였다. 분석된 유전자의 뉴클레오티드 서열은 기보고된 뉴클레오티드 서열과 비교하여 확인하였고, 확인된 뉴클레오티드 서열을 인위적으로 번역하여 상보성 결정 영역(VH-CDR1, -CDR2, -CDR3 및 VL-CDR1, -CDR2, -CDR3)의 서열 결정에 이용하였다. 상보성 결정 영역의 서열 결정은 Kabat's 데이터베이스를 이용하였다 (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>).
- [0062] 그 결과, 상기 하이브리도마 세포로부터 BAG2에 특이적으로 결합하는 10 종의 항-BAG2 항체 즉, 2A11, 4C2, 8C4, 3B5, 9B3, 9B12, 3B10, 10H7, 3G8 및 3F12 항체를 얻었다. 또한, 표 1 내지 3에 나타난 바와 같은 중쇄 가변 영역, 경쇄 가변 영역 및 이들의 상보성 결정 영역의 아미노산 서열 및 상기 항체를 코딩하는 유전자의 뉴클레오티드 서열을 결정하였다.
- [0063] 2A11, 4C2, 및 8C4 항체는 서열번호 21의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 서열번호 27의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함한다. 2A11 항체는 서열번호 21에서 56번째 및 57번째 Xaa는 Gly이고, 서열번호 27에서 53번째 Xaa는 Ile이다. 4C2 항체는 서열번호 21에서 56번째 Xaa는 Gly이고, 57번째 Xaa는 Ala이고, 서열번호 27에서 53번째 Xaa는 Phe이다. 8C4 항체는 서열번호 21에서 56번째 Xaa는 Ala이고, 57번째 Xaa는 Gly이고, 서열번호 27에서 53번째 Xaa는 Phe이다.
- [0064] 또한, 2A11, 4C2, 및 8C4 항체의 VH-CDR1, -CDR2 및 -CDR3은 각각 서열번호 33, 39 및 45의 아미노산 서열로 이루어지고, VL-CDR1, -CDR2 및 -CDR3은 각각 서열번호 51, 57 및 63의 아미노산 서열로 이루어진다. 2A11 항체는 서열번호 21에서 56번째 및 57번째 Xaa는 Gly이다. 4C2 항체는 서열번호 21에서 56번째 Xaa는 Gly이고, 57번째 Xaa는 Ala이다. 8C4 항체는 서열번호 21에서 56번째 Xaa는 Ala이고, 57번째 Xaa는 Gly이다.
- [0065] 9B3, 9B12 및 3B10 항체는 서열번호 23의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 및 서열번호 29의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역을 포함한다. 9B3 항체는 서열번호 23에서 1번째 Xaa는 Glu이고, 7번째 Xaa는 Ser이고, 12번째 Xaa는 Val이고, 27번째 Xaa는 Tyr이고, 58번째 Xaa는 Ser이고, 61번째 Xaa는 Asn이고, 74번째 Xaa는 Lys이고, 83번째 Xaa는 Phe이고, 92번째 Xaa는 Ala이고, 108번째 Xaa는 Tyr이다. 9B3 항체는 서열번호 29에서 23번째 Xaa는 Ile이고, 45번째 Xaa는 Ala이고, 73번째 Xaa는 Glu이고, 100번째 Xaa는 Ile이다. 9B12 항체는 서열번호 23에서 1번째 Xaa는 Gln이고, 7번째 Xaa는 Ser이고, 12번째 Xaa는 Val이고, 27번째 Xaa는 Tyr이고, 58번째 Xaa는 Ser이고, 61번째 Xaa는 Asn이고, 74번째 Xaa는 Arg이고, 83번째 Xaa는 Phe이고, 92번째 Xaa는 Gly이고, 108번째 Xaa는 His이다. 9B12 항체는 서열번호 29에서 23번째 Xaa는 Met이고, 45번째 Xaa는 Ala이고, 73번째 Xaa는 Glu이고, 100번째 Xaa는 Met이다. 3B10 항체는 서열번호 23에서 1번째 Xaa는 Gln이고, 7번째 Xaa는 Pro이고, 12번째 Xaa는 Ala이고, 27번째 Xaa는 His이고, 58번째 Xaa는 Thr이고, 61번째 Xaa는 Ser이고, 74번째 Xaa는 Arg이고, 83번째 Xaa는 Leu이고, 92번째 Xaa는 Gly이고, 108번째 Xaa는 His이다. 3B10 항체는 서열번호 29에서 23번째 Xaa는 Met이고, 45번째 Xaa는 Ser이고, 73번째 Xaa는 Asp이고, 100번째 Xaa는 Ile이다.
- [0066] 또한, 9B3, 9B12 및 3B10 항체의 VH-CDR1, -CDR2 및 -CDR3은 각각 서열번호 35, 41 및 47의 아미노산 서열로 이루어지고, VL-CDR1, -CDR2 및 -CDR3은 각각 서열번호 53, 59 및 65의 아미노산 서열로 이루어진다. 9B3 항체는 서열번호 35에서 2번째 Xaa는 Tyr이고, 서열번호 41에서 8번째 Xaa는 Ser이고, 서열번호 47에서 12번째 Xaa는 Tyr이고, 서열번호 53에서 3번째 Xaa는 Ile이고, 서열번호 59에서 2번째 Xaa는 Ala이다. 9B12 항체는 서열번호 35에서 2번째 Xaa는 Tyr이고, 서열번호 41에서 8번째 Xaa는 Ser이고, 서열번호 47에서 12번째 Xaa는 His이고, 서열번호 53에서 3번째 Xaa는 Met이고, 서열번호 59에서 2번째 Xaa는 Ala이다. 3B10 항체는 서열번호 35에서 2번째 Xaa는 His이고, 서열번호 41에서 8번째 Xaa는 Thr이고, 서열번호 47에서 12번째 Xaa는 His이고, 서열번호 53에서 3번째 Xaa는 Met이고, 서열번호 59에서 2번째 Xaa는 Ser이다.

표 1

[0068]

항체명	VH 유전자의 뉴클레오티드 서열	VL 유전자의 뉴클레오티드 서열
2A11	서열번호 1	서열번호 11
4C2	서열번호 2	서열번호 12
8C4	서열번호 3	서열번호 13
3B5	서열번호 4	서열번호 14
9B3	서열번호 5	서열번호 15
9B12	서열번호 6	서열번호 16
3B10	서열번호 7	서열번호 17
10H7	서열번호 8	서열번호 18
3G8	서열번호 9	서열번호 19
3F12	서열번호 10	서열번호 20

표 2

[0069]

항체명	VH 영역의 아미노산 서열	VL 영역의 아미노산 서열
2A11	서열번호 21	서열번호 27
4C2	서열번호 21	서열번호 27
8C4	서열번호 21	서열번호 27
3B5	서열번호 22	서열번호 28
9B3	서열번호 23	서열번호 29
9B12	서열번호 23	서열번호 29
3B10	서열번호 23	서열번호 29
10H7	서열번호 24	서열번호 30
3G8	서열번호 25	서열번호 31
3F12	서열번호 26	서열번호 32

표 3

[0070]

항체명	VH-CDR1의 아미노산 서열	VH-CDR2의 아미노산 서열	VH-CDR3의 아미노산 서열	VL-CDR1의 아미노산 서열	VL-CDR2의 아미노산 서열	VL-CDR3의 아미노산 서열
2A11	서열번호 33	서열번호 39	서열번호 45	서열번호 51	서열번호 57	서열번호 63
4C2	서열번호 33	서열번호 39	서열번호 45	서열번호 51	서열번호 57	서열번호 63
8C4	서열번호 33	서열번호 39	서열번호 45	서열번호 51	서열번호 57	서열번호 63
3B5	서열번호 34	서열번호 40	서열번호 46	서열번호 52	서열번호 58	서열번호 64
9B3	서열번호 35	서열번호 41	서열번호 47	서열번호 53	서열번호 59	서열번호 65
9B12	서열번호 35	서열번호 41	서열번호 47	서열번호 53	서열번호 59	서열번호 65
3B10	서열번호 35	서열번호 41	서열번호 47	서열번호 53	서열번호 59	서열번호 65
10H7	서열번호 36	서열번호 42	서열번호 48	서열번호 54	서열번호 60	서열번호 66
3G8	서열번호 37	서열번호 43	서열번호 49	서열번호 55	서열번호 61	서열번호 67
3F12	서열번호 38	서열번호 44	서열번호 50	서열번호 56	서열번호 62	서열번호 68

[0072]

2. 유방암 세포에서 항-BAG2 항체의 항원-항체 반응 확인

[0073]

도 1은 10종의 마우스 하이브리도마 세포로부터 생산된 항-BAG2 항체의 면역 블로팅 결과를 나타낸 도면이다. 구체적으로, 인간 유방암 세포인 MDA-MB-231 세포는 37 °C에서, 10% FBS, 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신을 함유하는 DMEM(Welgene) 배지에서 배양하였다. 상기 세포를 웰로부터 수거하고 PBS로 세척하고, 1% Brij 97, 5mM EDTA, 0.02M HEPES pH 7.3, 0.15M NaCl, 1mM PMSF, 0.5mM NaF, 10 µg/ml 아프로티닌, 0.2mM 소듐 오르토바나데이트(sodium orthovanadate)가 함유된 용해 완충액에 용해시켰다. 얼음에서 15분 동안 배양한 후, 원심분리로 핵을 제거하고 상층액을 수거하였다. 20% 글리세롤, 4.6% SDS, 0.125M 트리스, pH 6.8, 0.1% 브로모페놀 블루로 구성되는 2X 시료 완충액을 적량의 상층액에 첨가하였다. 10 µg 단백질 시료는 mini-Protein II 시스템(Bio-Rad Hercules, CA)을 이용하여 표준 조건 하에 12% 겔에서 SDS-PAGE 분석을 실시하였다. 면역 블로팅을 위하여, 단백질은 PVDF 막인 밀리포어에 이전시켰다. TBS에 넣은 0.1% Tween 20 및 5% 소혈청 알부민(Bovine serum albumin: BSA)으로 구성되는 차단 용액(blocking solution)을 1시간 동안 반응시켰다. 이후, 1

차 항체는 하이브리도마 세포 배양액에서 추출한 항-BAG2 항체를 1/2000 희석 농도로 사용하였고, 2차 항체로 사용된 염소 항-마우스 HRP 공액체(Dako)는 1/5000 희석 농도로 사용하였다. 기질로 ECL 시약(Amersham Pharmacia Biotech)을 이용하여 암실에서 필름 감광하였다. 감광된 띠는 표준 분자 마커와 비교하여 BAG2의 사이즈에 해당하는 띠를 확인하였다.

[0074] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 양성 대조군으로 사용된 상업적 다클론성 항-BAG2 항체인 ab58682(Abcam)와 비교하여, 상기 항체 2A11, 3B5, 3B10, 3F12, 3G8, 4C2, 8C4, 9B3, 9B12 및 10H7은 BAG2를 표적으로 하여 항원-항체 반응을 나타내었다.

[0075] 다음으로, 상기 1절에서 동정된 10종의 항체가 결합하는 BAG2 항원의 도메인 맵핑(domain mapping)을 위해, 약 26 kDa 분자량을 가지는 GST-Empty 벡터(pcDNA3.1+/GST vector, NovoPro Bioscience Inc. China)가 도입된 세포를 음성 대조군으로 이용하였다. 인간 BAG2 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 BAG2 단백질의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 GST-Bag Full 벡터, GST-Bag F1 벡터, GST-Bag F2 벡터, GST-Bag F3 벡터, 및 GST-Bag F4 벡터를 세포에 도입하고, 상기 벡터가 도입된 세포를 배양하여 상기 유전자를 발현시킨 후, 세포 파쇄물을 얻었다. 세포 파쇄물에 대하여 상기 10종의 항체 각각을 사용하여 면역 블로팅을 수행하였다. 인간 BAG2 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 70의 염기 서열을 갖는다. GST-Bag F1, -Bag F2, -Bag F3, -Bag F4 벡터는 각각 서열번호 71 내지 74의 염기 서열로 이루어진 것이다.

[0076] 도 2는 항-BAG2 항체의 전장 BAG2 폴리펩티드 또는 이의 단편에 대한 면역 블로팅 결과를 나타낸 도면이다. 도 2에서 A는 벡터 및 BAG2 단백질 및 그의 단편을 도식적으로 나타낸 것이고, B는 면역 블로팅 결과이다. 구체적으로, 상기 면역 블로팅은 상기 각 벡터를 HEK293T 세포에 리포펙타민 형질전환(lipofectamine transfection, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) 방법을 사용하여 도입하고, 얻어진 형질전환된 세포를 37 °C에서, 10% FBS, 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신을 함유하는 DMEM(Welgene) 배지에서 30시간 동안 배양한 후 세포를 분리하였다. 분리된 세포는 도 1과 동일한 방법을 사용하여 파쇄하고 12% 겔에서 SDS-PAGE 분석을 실시하였다. 면역 블로팅을 위하여, 도 1과 동일한 차단 용액(blocking solution)으로 1시간 동안 반응시킨 후, 1차 항체로 2 mg/ml 농도의 정제된 10종 각 항-BAG2 항체를 1/10000 희석하여 결합하였다. 2차 항체로 사용된 염소 항-마우스 HRP 공액체는 1/5000 희석 농도로 사용하였고, 기질로 ECL 시약(Amersham Pharmacia Biotech)을 이용하여 암실에서 필름 감광하였다. BAG2의 사이즈를 확인하기 위해 표준 분자 마커 사이즈를 표현하였다.

[0077] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 각각의 항-BAG2 항체는 전장 BAG2 폴리펩티드 또는 그의 단편과 차별적으로 결합하였다. 특히, 10종의 항-BAG2 항체 모두 GST-Bag Full 벡터가 도입된 세포 파쇄물에서 약 50 KDa 위치에서 공통적으로 신호가 검출되고 있으며, 이는 이들 항체 모두가 전장 BAG2 폴리펩티드와 결합할 수 있음을 나타낸다. 최종적으로, 각각의 항-BAG2 항체가 반응하는 BAG2의 도메인 영역을 확인하였다.

[0078] 도 3은 각각의 항-BAG2 항체가 반응하는 BAG2 도메인을 나타낸 도면이다. 도 3에 나타난 바와 같이, 9B3, 9B12, 3B10 및 10H7 항체는 BAG2 단백질의 N-말단에 결합하였고, 2A11, 3B5, 4C2 및 8C4 항체는 중간 영역, 3F12 및 3G8 항체는 C-말단에 결합하였다. 상기 N-말단은 21-60 아미노산의 코일드 코일 영역을 공통적으로 포함하고 있으며, 상기 중간 영역은 109-189 아미노산의 BNB 영역의 일부와 결합한다. 따라서, 서로 다른 부위에 결합하는 항체의 세트를 사용함으로써, 시료 중에 존재하는 BAG2 단백질 또는 그 단편을 높은 민감도, 및 특이도로 검출할 수 있다.

[0080] **실시예 2: 항-BAG2 항체의 조합 선별 및 암 진단 효능 확인**

[0081] **1. 암 진단에 유용한 항-BAG2 항체의 조합 선별**

[0082] 도 4는 항-BAG2 항체의 가능한 90개의 조합에서 BAG2 단백질에 대한 표준 곡선(Standard curve)을 나타낸 도면이다. 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 상기 항-BAG2 항체의 가능한 조합들 중에서도 높은 기울기의 표준 곡선을 나타내는 14개의 항체 조합, 2A11-3F12, 10H7-3G8, 9B12-3G8, 10H7-3F12, 9B8-3G8, 3G8-3F12, 3B5-3F12, 3G8-4C2, 3F12-3G8, 3B5-3G8, 3B5-4C2, 3G8-8C4 및 9B3-3F12를 선별하였다.

[0083] 도 5는 상기 선별된 14개의 항체 조합의 BAG2 단백질에 대한 특이적인 결합력을 나타낸 도면이다. 구체적으로, 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231에 리포펙타민 2000(Invitrogen)을 이용하여 제조사의 지침에 따라 Myc-tag BAG2 발현 벡터 또는 Myc-tag empty 벡터를 각각 형질도입시켰다. 14개의 항체 조합을 이용하여, Myc-tag empty 벡터가 도입된 대조군 세포 및 Myc-tag BAG2 발현 벡터가 도입된 BAG2 단백질을 과발현하는 세포의 용해물 30 µg에서 분리된 BAG2 단백질 상대적인 양을 확인하였다. 대조군 세포를 EV로 표시하고, BAG2 과발현 세포

를 OE로 표시하였다. 즉, BAG2 과발현 세포와 대조군 세포의 분비된 Bag2 단백질의 상대적인 양을 확인함으로써, BAG2 단백질에 대한 항체 조합의 특이적 결합력을 판단할 수 있다.

[0084] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, BAG2 단백질에 대하여 특이적 결합력이 높은 4개의 항체 조합, 2A11-3F12, 9B12-3G8, 8C4-3G8 및 10H7-3F12을 선별하였다.

[0086] 2. 선별된 항-BAG2 항체 조합의 다양한 암을 진단하는 효능 확인

[0087] 상기 1절에서 선별된 항체 조합의 암 진단 효능을 확인하기 위해, BAG2와의 항원-항체 반응을 확인하였다. 구체적으로, 항원으로서 인간 293T 세포로부터 생산되고 및 정제된 N-말단에 6개의 히스티딘이 부착된 인간 BAG2 단백질을 얻었다. 상기 2A11-3F12, 및 9B12-3G8 항체 조합을 각각 사용하여 샌드위치 효소흡착 면역 분석법 (Sandwich Enzyme-linked immunosorbent assay: Sandwich ELISA)를 수행하였다.

[0088] 보다 구체적으로, Sandwich ELISA는 다음과 같은 과정을 통해 수행되었다. 항체 3F12 또는 3G8 각각을 1 mg씩 10 mM NHS-비오틴(Succinimidyl Biotin, Thermo scientific, Cat #21435) 27 μ l와 반응시켜 비오틴이 결합된 검출 항체(detecting antibody)를 제조하였다. ELISA 플레이트-코팅 완충액(R&D system, DY006)을 이용하여 포획 항체(capturing antibody)로서 항체 2A11, 9B12, 8C4 또는 10H7 각각을 3 μ g/ml의 농도로 희석하여 96 웰 플레이트의 각 웰에 100 μ l씩 분주하고, 하룻밤 동안 4°C에서 코팅하였다. 항체를 코팅한 플레이트를 1% 소 혈 청 알부민(Bovine serum albumin: BSA) 완충액(R&D system, DY995)으로 실온에서 1시간 블로킹하였다. BAG2 표준 물질로서 인간 유래의 세포주 HEK293T에서 생산 및 정제한 인간 히스-태깅(His-tagging) BAG2 재조합 단백질(Ybiologics, 한국)을 상기 1% BSA 완충액을 이용하여 100 ng/ml로 제조한 후, 4배 희석하여 0.02, 0.097, 0.31, 1.56, 6.25, 및 25 ng/ml의 표준 용액을 제조하였다. 혈액시료는 건강한 사람 14명, 내강형 유방암을 진단 받은 환자 20명, 및 TNBC 타입 유방암을 진단 받은 환자 38명으로부터 8 ml 이상 채혈하여 가볍게 흔들어 혼합하여 실온에 20-30분간 세워둔 후, 2,500 rpm, 10분 동안 원심분리하여 회수하였다. 4°C이하에 보관된 혈청은 상기 1% BSA 완충액을 이용하여 1/2배 희석하여 사용하였다. 블로킹 용액을 제거한 플레이트의 각 웰에 상기 BAG2 표준 용액 0, 0.02, 0.097, 0.39, 1.56, 6.25, 25, 및 100 ng/ml와 1/2배 희석한 환자 샘플을 100 μ l씩 분주하여 실온에서 1시간 반응시킨 후, 세척 완충액(R&D system, WA126)으로 세척하였다. 상기 1% BSA 완충액으로 1:50000의 비율로 희석한 스트렙트아비딘-HRP(Pierce, 21130)를 각 웰에 100 μ l씩 분주하여, 실온에서 30분 동안 반응시킨 후, 세척 완충액으로 세척하였다. 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB, R&D system, DY999)를 각 웰에 100 μ l씩 분주하여 실온 및 암소에서 15분 동안 반응시킨 후, 정지액(stop solution)을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 450 nm에서 반응액의 흡광도를 측정하여 얻은 항체의 표준 곡선을 통하여, 환자 샘플에서의 BAG2 단백질의 농도를 계산하였다.

[0089] 도 6은 항-BAG2 항체 조합을 이용하여 관찰된 유방암, 췌장암, 다형성아교모세포종, 위암, 난소암, 미만성 거대 B 세포 림프종을 포함하는 암 세포주에서의 BAG2 발현 패턴 차이를 나타낸 도면이다. 도 6에서, A는 2A11-3F12 항체 조합의 sandwich ELISA 결과를 나타낸 것이고, B는 9B12-3G8 항체 조합의 sandwich ELISA 결과를 나타낸 것이다.

[0090] 도 6에 나타난 바와 같이, 2A11-3F12, 및 9B12-3G8 항체 조합을 이용하는 경우, 유방암 세포주인 MDA-MB-231 및 Hs578T, 췌장암 세포주인 SNU2564 및 PANC1, 다형성아교모세포종(Glioblastoma Multiforme: GBM) 세포주인 U251MG 및 T98G, 위암 세포주인 SNU1 및 SNU484, 난소암 세포주인 SKOV3 및 A2780, 미만성 거대 B 세포 림프종(Diffuse large B-cell lymphoma: DLBCL) 세포주인 SU-DHL4 및 SU-DHL6를 포함한 다양한 암 세포주는 BAG 단백질이 높게 발현되었다. 이와 달리, 정상 세포주인 T47D, SNU2469, A172, SNU620, OVCAR3 및 U2932에서는 BAG2 단백질의 발현이 나타나지 않거나 거의 발현되지 않았다. 즉, 2A11-3F12, 및 9B12-3G8 항체 조합을 이용하여 유방암, 췌장암, 다형성아교모세포종, 위암, 난소암, 미만성 거대 B 세포 림프종을 포함한 암 세포에서는 정상 세포와 비교하여 BAG2 단백질이 현저히 높게 발현됨을 확인하였다.

[0091] 따라서, 상기의 항체 조합을 이용하는 경우, 정상 세포와 비교하여 암 세포에서 나타나는 유사한 BAG2 단백질의 발현 패턴을 관찰함으로써 암을 진단하는 데에 유용하게 이용될 수 있다.

[0093] 3. 선별된 항-BAG2 항체 조합의 유방암을 진단하는 효능 확인

[0094] 상기 2절에 기재된 동일한 Sandwich ELISA 방법을 이용하여, 루미날 타입 및 TNBC 타입의 유방암 환자와 정상 개체 간의 혈청 내 BAG2 단백질의 발현 패턴 차이를 확인하였다. 구체적으로, 건강한 자원자(N=14), 루미날 타입의 유방암 환자(N=20) 및 TNBC 타입의 유방암 환자(N=38)의 혈청을 채취하여, 채취된 혈청 내 BAG2 단백질의 발현 패턴을 확인하였다.

- [0095] 도 7 및 도 8은 항-BAG2 항체 조합을 이용하여 루미날 타입 및 TNBC 타입의 유방암 환자의 혈청에서 관찰된 BAG2 단백질 발현의 유의적인 차이를 나타낸 도면이다. 도 7에서, A는 2A11-3F12 항체 조합을 이용한 경우를 나타낸 것이고, B는 9B12-3G8 항체 조합을 이용한 경우를 나타낸 것이다. 도 8에서, A는 8C4-3G8 항체 조합을 이용한 경우를 나타낸 것이고, B는 10H7-3G8 항체 조합을 이용한 경우를 나타낸 것이다.
- [0096] 도 7 및 도 8에 나타낸 바와 같이, 9B12-3G8, 2A11-3F12, 8C4-3G8, 및 10H7-3F12의 항체 조합을 이용하는 경우, 각 항체 조합에 따른 p-값은 $p < 0.0001$, $p = 0.0373$, $p = 0.0009$, $p = 0.0190$ 으로, 정상 개체와 비교하여 루미날 타입 및 TNBC 타입의 유방암 환자의 혈청에서 BAG2 단백질 발현 패턴은 유의적인 차이를 나타내었다. 따라서, 상기의 항체 조합을 통해 유의적인 BAG2 단백질 발현 패턴 차이를 관찰함으로써 유방암을 진단하는 데에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0098] **4. 선별된 항-BAG2 항체 조합의 유방암 진단의 유용성 확인**
- [0099] 상기 4개의 항체 조합 각각을 이용한 암 진단의 민감도(Sensitivity) 및 특이도(Specificity)를 확인하기 위해, 상기 2절의 결과를 ROC 곡선으로 나타내었다.
- [0100] 도 9는 각각의 항체 조합에서의 ROC 곡선(Receiver Operating Characteristic curve) 및 곡선 하면적 값(Area under the curve: AUC)을 나타낸 것이다. 도 9에서, A는 9B12-3G8 항체 조합을 이용한 경우를 나타낸 것이고, B는 8C4-3G8 항체 조합을 이용한 경우를 나타낸 것이고, C는 2A11-3F12 항체 조합을 이용한 경우를 나타낸 것이고, D는 10H7-3F12 항체 조합을 이용한 경우를 나타낸 것이다.
- [0101] 도 9에 나타낸 바와 같이, 9B12-3G8, 8C4-3G8, 2A11-3F12 및 10H7-3G8 항체 조합을 이용한 경우, AUC 값은 각각 0.8596, 0.8368, 0.8554 및 0.6736 이었다. 즉, 모든 항체 조합에서 ROC 곡선에서의 AUC 값은 0.7 내외이며, 특히 9B12-3G8, 8C4-3G8 및 2A11-3F12 항체 조합을 이용할 경우의 AUC 값은 0.8 내지 0.9 사이 값으로 측정되었다. 이러한 결과는 각각의 항체 조합을 이용할 경우 높은 민감도와 특이도로 유방암을 진단할 수 있음을 보여주는 것이다. 따라서, 상기 4개의 항체 조합은 유방암 진단에 유용하게 이용될 수 있다.

수탁번호

[0103]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13737BP

수탁일자 : 20181128

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13738BP

수탁일자 : 20181128

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13739BP

수탁일자 : 20181128

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13740BP

수탁일자 : 20181128

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13741BP

수탁일자 : 20181128

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13742BP

수탁일자 : 20181128

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13743BP

수탁일자 : 20181128

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13744BP

수탁일자 : 20181128

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13745BP

수탁일자 : 20181128

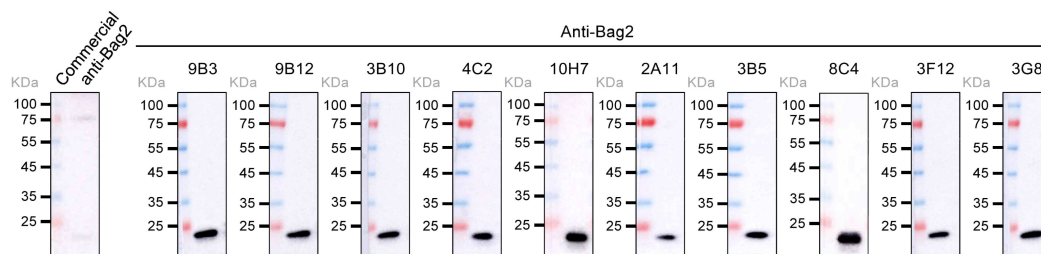
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13746BP

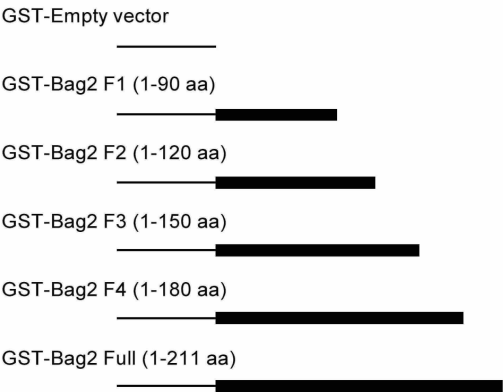
수탁일자 : 20181128

도면

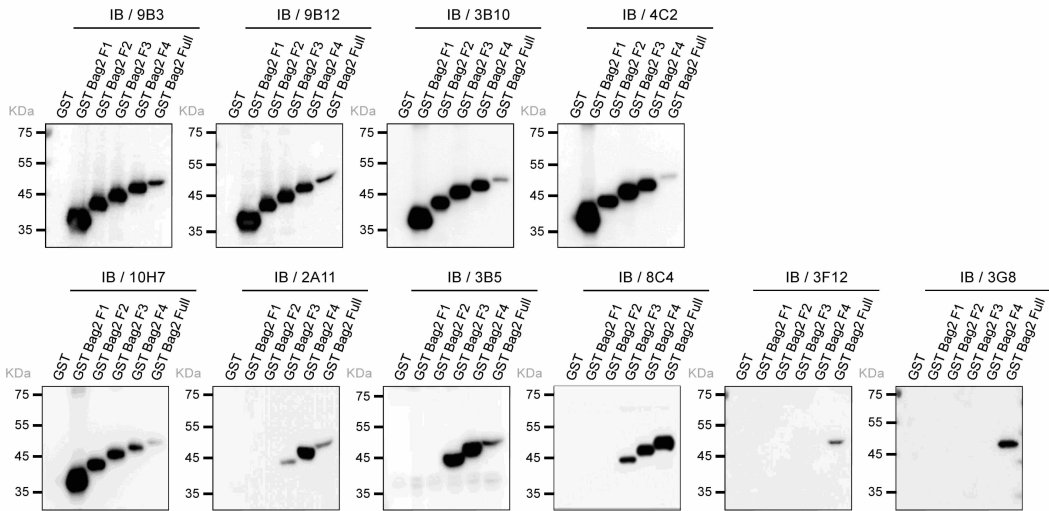
도면1



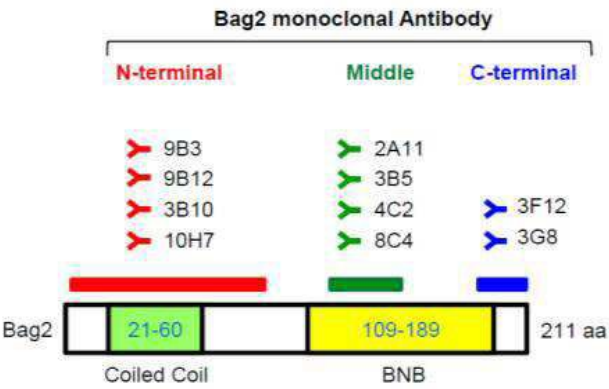
도면2a



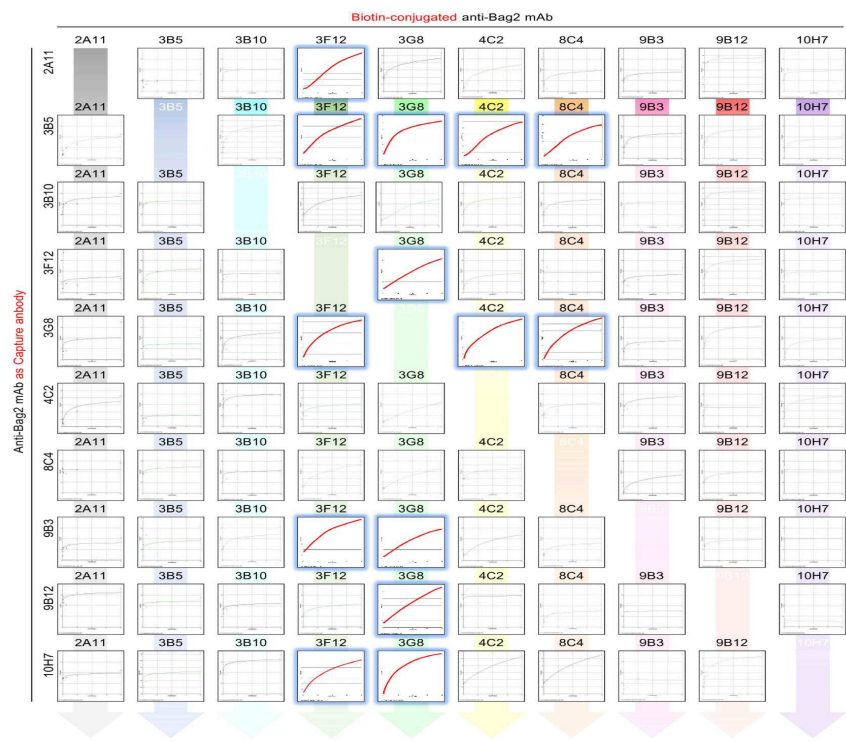
도면2b



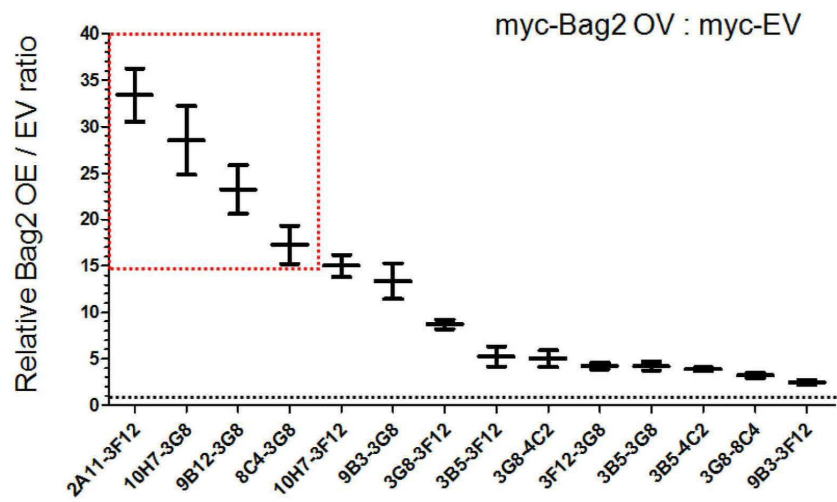
도면3



도면4

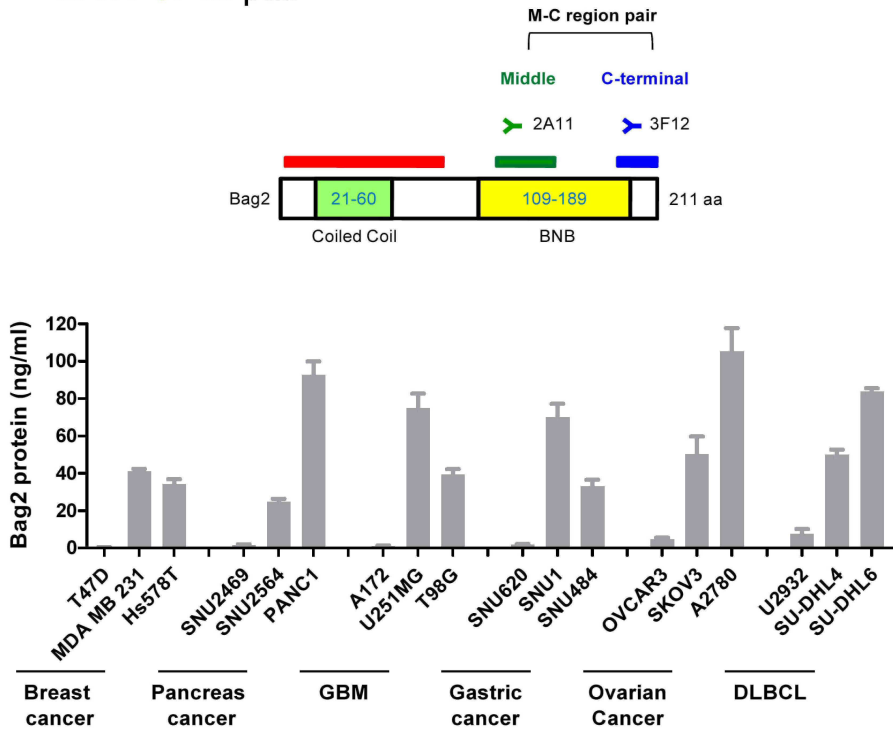


도면5



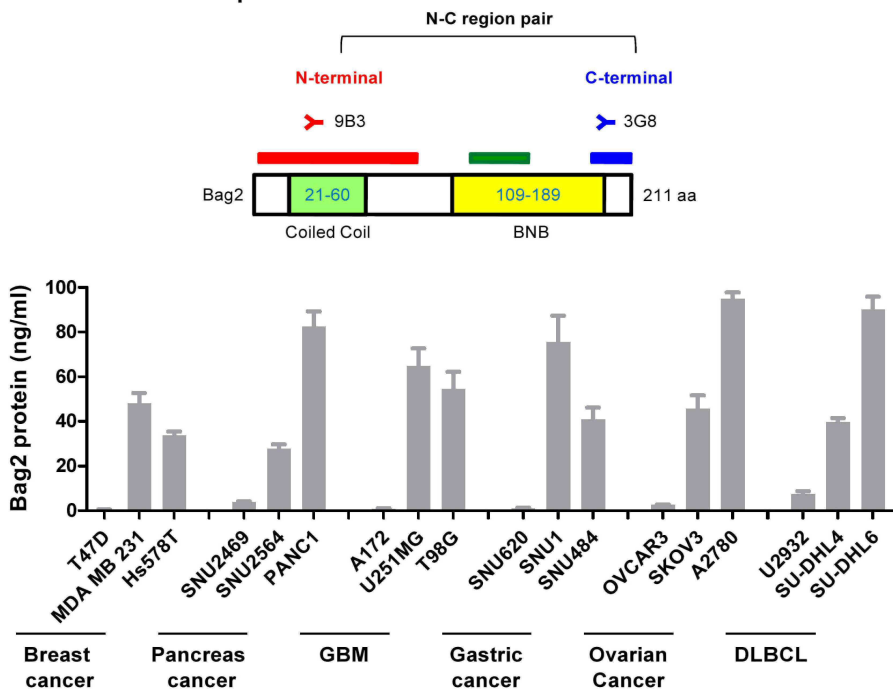
도면6a

2A11-3F12 pair



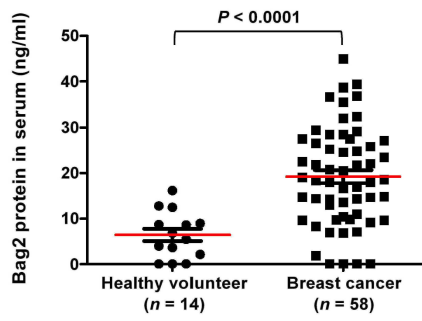
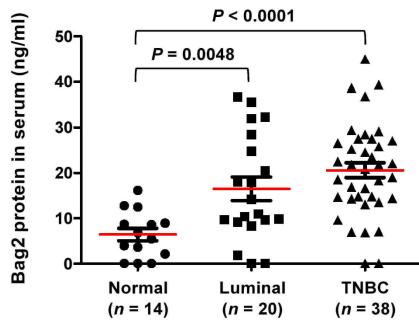
도면6b

9B12-3G8 pair



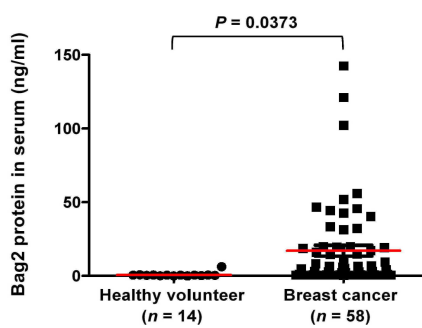
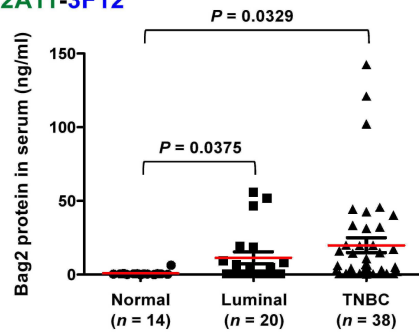
도면7a

9B12-3G8



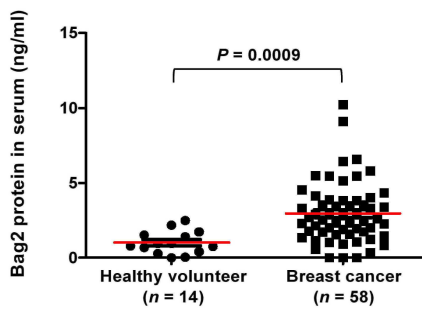
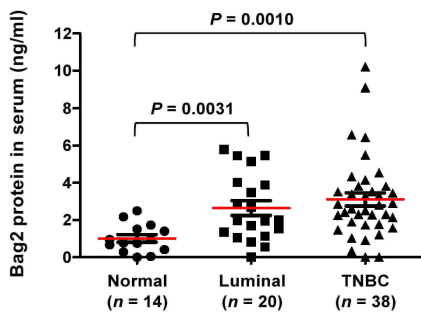
도면7b

2A11-3F12



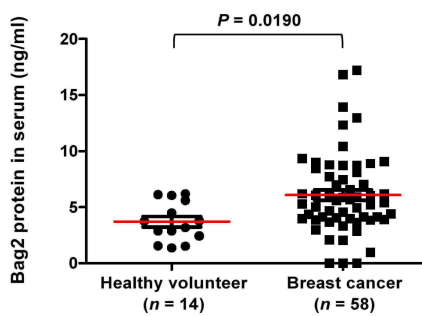
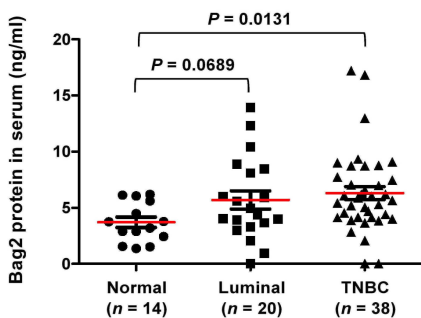
도면8a

8C4-3G8

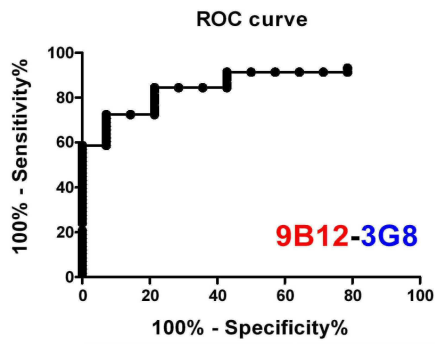


도면8b

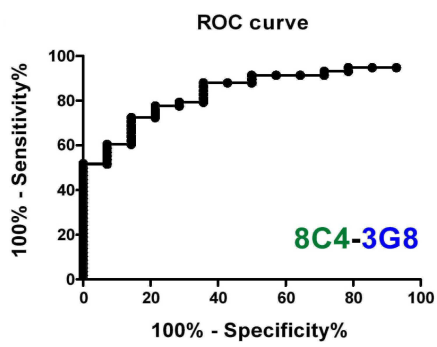
10H7-3G8



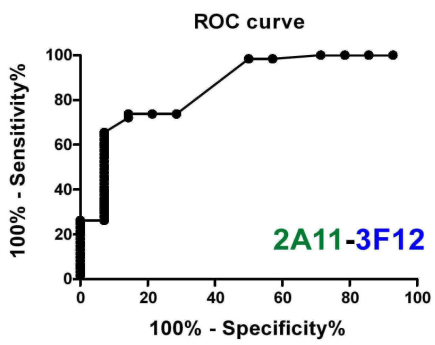
도면9a



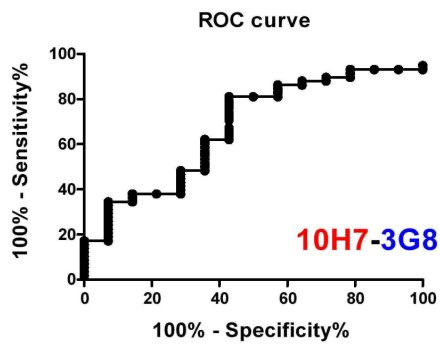
도면9b



도면9c



도면9d



서열 목록

<110> Medpacto Inc.

Research and Business Foundation SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY
 Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> A Composition comprising antibody specifically binding to BAG2
 for the diagnosis of cancer and method using the same

<130> PN119594

<160> 74

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2A11-VH

<400> 1

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg 60

tcctgcaagg cttcgggcta cacatttact gactatgaaa tgcactgggt gaagcagact 120

cctgtgcatg gcctggaatg gattggagt attgatcctg aaactggtgc tactgcctac 180

aatcagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag tacagcctac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtac aagagggaaa 300

ttttattact ccggtcggga ctatgctatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc 360

gtctcctca 369

<210> 2

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4C2-VH

<400> 2

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg 60

tcctgcaagg cttcgggcta cacatttact gactatgaaa tgcactgggt gaagcagact 120

cctgtgcatg gcctggaatg gattggagt attgatcctg aaactggtgc tactgcctac 180

aatcagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag tacagcctac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtac aagagggaaa 300

ttttattact ccggtcggga ctatgctatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc 360

gtctcctca 369

<210> 3

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8C4-VH

<400> 3

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg 60

tcctgcaagg cttcgggcta cacatttact gactatgaaa tgcactgggt gaagcagact 120

cctgtgcatg gcctggaatg gattggagtt attgatcctg aaactgctgg tactgcctac 180

aatcagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag tacagcctac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtac aagagggaaa 300

ttttattact ccggtcggga ctatgctatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc 360

gtctcctca 369

<210> 4

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3B5-VH

<400> 4

gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagtta 60

tcctgcaagg cttctgggta ctcatcact gactacacct ttctactgggt gaggcagagc 120

catggagaga gccttgagtg gattggatat attgatcctt acaatggtgg taatacttat 180

aaccggaagt tcaagggcaa ggccacattg actgttgaca agtcctccag cacagccttc 240

atgcacatca acagcctgac atctgaagac tctgcagtct attactgtgc gagagggtac 300

tataggtacg gggggggggg ggactttgac tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc 360

tcctca 366

<210> 5

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 9B3-VH

<400> 5

gaggtccagc tgcacaatc tggagctgag ctggtaaggc ctgggacttc agtgaaggtg	60
tcctgcaagg ctcttgata cgccttcact aattacatga tagagtggat aaaacagagg	120
cctggacagg gccttgagtg gattggagtg attaatacctg gaagtgggtg tagttattac	180
aatgagaagg tcaagggcaa ggcaacactg accgcagaca aatcctccag cactgcctac	240
atgcagttca gcagcctgac agctgatgac tctgcggtct atttctgtcg gatctatggt	300
aactacaagg ggtactttga ctattggggc caaggcacca ctctcacagt ctctca	357
<210> 6	
<211> 357	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 9B12-VH	
<400> 6	
caggtccaac tgcagcagtc tggagctgag ctggtaaggc ctgggacttc agtgaaggtg	60
tcctgcaagg ctcttgata cgccttcact aattacatga tagagtggat aaaacagagg	120
cctggacagg gccttgagtg gattggagtg attaatacctg gaagtgggtg tagttataac	180
aatgagaagg tcaagggcaa ggcaacactg accgcagaca gatcctccag cactgcctac	240
atgcagttca gcagcctgac agctgatgac tctggggtct atttctgtcg gatctatggt	300
aactacaagg ggtactttga ccattggggc caaggcacca ctctcacagt ctctca	357
<210> 7	
<211> 357	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 3B10-VH	
<400> 7	
caggtccaac tgcagcagcc tggagctgag ctggcaaggc ctgggacttc agtgaaggtg	60
tcctgcaagg ctcttgcca cgccttcact aattacatga tagagtggat aaaacagagg	120
cctggacagg gccttgagtg gattggagtg attaatacctg gaagtgggtg tacttataac	180
agtgagaagg tcaagggcaa ggcaacactg accgcagaca gatcctccag cactgcctac	240
atgcagctca gcagcctgac agctgatgac tctggggtct atttctgtcg gatctatggt	300
aactacaagg ggtactttga ccattggggc caaggcacca ctctcacagt ctctca	357
<210> 8	
<211> 363	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 10H7-VH
 <400> 8
 cagatccagt tgggtgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60
 tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca gactattcaa ttactgggt gaggcaggct 120
 ccaggaaagg gttttaagtg gatgggctgg ataaacactg agactggtga gccaacatat 180
 gcagatgact tcaagggacg gtttgcctc tctttgaaa cctctgccag cactgcctac 240
 ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acggtacat atttctgtgc tagatttgac 300
 tacggtacta gttactggta cttcgatgtc tggggcgcag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363
 <210> 9
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3G8-VH
 <400> 9
 cagatccagt tgggtgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60
 tcctgcaagg cttctgggta tagcttcaca aagtatggaa tgaactgggt gaagcaggct 120
 ccaggaaagg atatcaagtg gatggggtgg ataaacacca aacttgaga ggcaacatat 180
 ggtgaagagg tcaagggacg gtttgcctc tctttgaaa cctctgccag cactgcctat 240
 ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acggtacat atttctgtgc aagattggga 300
 ttgaggtacc ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctctc a 351
 <210> 10
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3F12-VH
 <400> 10
 caggtgcaac tgcaggagtc aggacctgac ctggtgaaac cttctcagtc actttcactc 60
 acctgcactg tcaactgggta ctccatcacc agtgggtata gctggcactg gatccggcag 120
 tttccaggaa acaaattgga atggatgggc tacatatatt atagaggtag cactaactac 180

aacccatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgagaca catccaagaa ccagttcttc 240
ctgctgttga aatctgtgac tactgaggac acagccacat attactgtgc aagagaggct 300
tactggggcc aagggactct ggtcactgtc tcagca 336

<210> 11
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 2A11-VL
<400> 11

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttga gatctagtca gagtattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgtatct acaaagtttc caaccgattt 180
tctggggtec cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ttcaaggttc acaggttcct 300
ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 12
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 4C2-VL
<400> 12

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttga gatctagtca gagtattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgttct acaaagtttc caaccgattt 180
tctggggtec cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ttcaaggttc acaggttcct 300
ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 13
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 8C4-VL
<400> 13

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc	60
atctcttgca gatctagta gaggatttga catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg	120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgttct acaaagtctt caaccgattt	180
tctgggggcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc	240
agcagagtgg aggtcagga tctgggagtt tttttctgct ttcaaggttc acaggttctt	300
ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa	336
<210> 14	
<211> 336	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 3B5-VL	
<400> 14	
gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc	60
atctcttgca gatccagta gaggcttga cacagtaatg gaaacaccta ttacattgg	120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatcc acaaagtctt caaccgattt	180
tctgggggcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc	240
agcagagtgg aggtcagga tctgggaatt tttttctgct ctcaaaatac acatattctt	300
ccgacgttcg ctggaggcac caagctggaa atcaaa	336
<210> 15	
<211> 357	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 9B3-VL	
<400> 15	
gaggtccagc tgcaacaatc tggagctgag ctggttaaggc ctgggacttc agtgaagggtg	60
tcctgcaagg ctcttgata cgccttcact aattacatga tagagtggat aaaacagagg	120
cttgacagg gccttgagtg gattggagtg attaatctg gaagtgggtg tagttattac	180
aatgagaagg tcaagggcaa ggcaacactg accgcagaca aatctccag cactgcctac	240
atgcagttca gcagcctgac agctgatgac tctgcgtct atttctgtc gatctatggt	300
aactacaagg ggtactttga ctattggggc caaggcacca ctctcacagt ctctca	357
<210> 16	
<211> 321	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 9B12-VL

<400> 16

gacattgtga tgaccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 60

atcacttgca aggcgagtc ggacatgaat agctatttaa gctggttcca gcagaaacca 120

gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt gcaaacagat tggtagatgg ggtcccatca 180

aggttcagt ggcagtgatc tgggcaagat tattctctca ccatcagcag cctggagtat 240

gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag aatgatgagt ttccattcac gttcggctcg 300

gggacaaagc tggaaatgaa g 321

<210> 17

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3B10-VL

<400> 17

gacattgtga tgaccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 60

atcacttgca aggcgagtc ggacatgaat agctatttaa gctggttcca gcagaaacca 120

gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt tcaaacagat tggtagatgg ggtcccatca 180

aggttcagt ggcagtgatc tgggcaagat tattctctca ccatcagcag cctggactat 240

gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag aatgatgagt ttccattcac gttcggctcg 300

gggacaaagc tggaaataaa a 321

<210> 18

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10H7-VL

<400> 18

gatgtccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagccacc 60

atcacttgcc gggcaagtc gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaaccc 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagt ggcagtgatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacacta ccccgctcac tticggtgga 300
ggcaccaagc tggaaatcaa acgtggagga gccagcctcg tggaattcaa g 351

<210> 19
<211> 333
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 3G8-VL
<400> 19

gacattgtga tgaccagtc tctgcttcc ttagttgtat ctctggggca gagggccacc 60
atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctgact atagtatat gcactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaagtc ctcatctatc ttgcatccaa cctagaatct 180
ggggtccctg ccaggttcag tggcagtgga tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acaataggga gcttcctccc 300
acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa 333

<210> 20
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 3F12-VL
<400> 20

gatgttttga tgaccctaac tccactcact ttgtcgggta cctttgggca gccagcctcc 60
atctcttga ggtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gagagacata ttgaattgg 120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaactt atctgggtgc taaactggac 180
tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggtgagga ttggggagtt tattattgct ggcaaggtac acattttccg 300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 21
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 2A11,4C2,8C4-VH
<220><221> VARIANT
<222> (56)..(57)

<223> Xaa is Gly or Ala

<400> 21

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

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

<210> 22

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3B5-VH

<400> 22

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

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

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

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

Ala Arg Gly Tyr Tyr Arg Tyr Gly Gly Gly Gly Asp Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 23

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 9B3,9B12,3B10-VH

<220><221> VARIANT

<222> (1)

<223> Xaa is Glu or Gln

<

220><221> VARIANT

<222> (7)

<223> Xaa is Ser or Pro

<220><221> VARIANT

<222> (12)

<223> Xaa is Val or Ala

<220><221> VARIANT

<222> (27)

<223> Xaa is Tyr or His

<220><221> VARIANT

<222> (58)

<223> Xaa is Ser or Thr

<220><221> VARIANT

<222> (61)

<223> Xaa is Asn or Ser

<220><221> VARIANT

<222> (74)

<223> Xaa is Arg or Lys

<220><221> VARIANT

<222> (83)

<223> Xaa is Phe or Leu

<220><221> VARIANT

<222> (92)

<223> Xaa is Gly or Ala

<220><221> VARIANT

<222> (108)

<223> Xaa is His or Tyr

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Tyr Tyr Asn Glu Lys Val

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 Phe Ser Ser Leu Thr Ala Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Arg Ile Tyr Gly Asn Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 24

<211>

121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10H7-VH

<400> 24

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 Asp Tyr

20 25 30

Ser Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Phe Lys Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210

> 25

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3G8-VH

<400> 25

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 Ser Phe Thr Lys Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Asp Ile Lys Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Gly Glu Glu Val

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 Leu Arg Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Leu Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 26
 <211> 112
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3F12-VH

<400> 26

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

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80
 Leu Leu Leu Lys Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 100 105 110
 <210> 27
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 2A11,4C2,8C4-VL

<220><221> VARIANT

<222> (53)

<223> Xaa is Ile or Phe

<400> 27

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Xaa Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly

85 90 95

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

100 105 110

<210> 28

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3B5-VL

<400> 28

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile His Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Phe Cys Ser Gln Asn
85 90 95

Thr His Ile Pro Pro Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 9B3,9B12,3B10-VL

<220><221> VARIANT

<222> (23)

<223> Xaa is Met or Ile

<220><221> VARIANT

<222> (45)

<223> Xaa is Ala or Ser

<220><221> VARIANT

<222> (73)

<223> Xaa is Glu or Asp

<220><221> VARIANT

<222> (100)

<223> Xaa is Met or Ile

<400> 29

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

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

50

55

60

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

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Asp Glu Phe Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Xaa Lys
100 105

<210> 30

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10H7-VL

<400> 30

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

Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 31

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3G8-VL

<400> 31

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Val Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg

85 90 95

Glu Leu Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3F12-VL

<400> 32

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Asp Gly Glu Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 33

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2A11,4C2,8C4-VHCDR1

<400> 33

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu

1 5

<210> 34

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3B5-VHCDR1

<400> 34

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Thr

1 5

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> 9B3,9B12,3B10-VHCDR1

<220><221> VARIANT

<222> (2)

<223> Xaa is Tyr or His

<400> 35

Gly Xaa Ala Phe Thr Asn Tyr Met

1 5

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10H7-VHCDR1

<400> 36

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser

1 5

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3G8-VHCDR1

<400> 37

Gly Tyr Ser Phe Thr Lys Tyr Gly

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3F12-VHCDR1

<400> 38

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Ser

1 5

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2A11,4C2,8C4-VHCDR2

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(7)

<223> Xaa is Gly or Ala

<400> 39

Ile Asp Pro Glu Thr Xaa Xaa Thr

1 5

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3B5-VHCDR2

<400> 40

Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Asn

1 5

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 9B3,9B12,3B5-VHCDR2

<220><221> VARIANT

<222> (8)

<223> Xaa is Ser or Thr

<400> 41

Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Xaa

1 5

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10H7-VHCDR2

<400> 42

Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro

1 5

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3G8-VHCDR2

<400> 43

Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Ala

1 5

<210> 44

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> 3F12-VHCDR2

<400> 44

Ile Tyr Tyr Arg Gly Ser Thr

1 5

<210> 45

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2A11,4C2,8C4-VHCDR3

<400> 45

Thr Arg Gly Lys Phe Tyr Tyr Ser Gly Arg Asp Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3B5-VHCDR3

<400> 46

Ala Arg Gly Tyr Tyr Arg Tyr Gly Gly Gly Gly Asp Phe Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 47

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 9B3,9B12,3B10-VHCDR3

<220><221> VARIANT

<222> (12)

<223> Xaa is Tyr or His

<400> 47

Arg Ile Tyr Gly Asn Tyr Lys Gly Tyr Phe Asp Xaa

1 5 10
 <210> 48
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 10H7-VHCDR3
 <400> 48
 Ala Arg Phe Asp Tyr Gly Thr Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10
 <210> 49
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3G8-VHCDR3
 <400> 49
 Ala Arg Leu Gly Leu Arg Tyr Leu Asp Tyr

1 5 10
 <210> 50
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3F12-VHCDR3
 <400> 50
 Ala Arg Glu Ala Tyr

1 5
 <210> 51
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 2A11,4C2,8C4-VLCDR1
 <400> 51
 Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr

1 5 10
 <210> 52

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3B5-VLCDR1

<400> 52
 Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10

<210> 53
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 9B3,9B12,3B10-VLCDR1
 <220><221> VARIANT

<222> (3)
 <223> Xaa is Ile or Met
 <400> 53

Gln Asp Xaa Asn Ser Tyr
 1 5

<210> 54
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 10H7-VLCDR1
 <400> 54

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 55
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3G8-VLCDR1
 <400> 55

Lys Ser Val Ser Thr Ser Asp Tyr Ser Tyr

1 5 10

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3F12-VLCDR1

<400> 56

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Glu Thr Tyr

1 5 10

<210> 57

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2A11,4C2,8C4-VLCDR2

<400> 57

Lys Val Ser

1

<210> 58

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3B5-VLCDR2

<400> 58

Lys Val Ser

1

<210> 59

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 9B3,9B12,3B10-VLCDR2

<220><221> VARIANT

<222> (2)

<223> Xaa is Ala or Ser

<400> 59

Arg Xaa Asn

1

<210> 60

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10H7-VLCDR2

<400> 60

Ala Ala Ser

1

<210> 61

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3G8-VLCDR2

<400> 61

Leu Ala Ser

1

<210> 62

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3F12-VLCDR2

<400> 62

Leu Val Ser

1

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2A11,4C2,8C4-VLCDR3

<400> 63

Phe Gln Gly Ser Gln Val Pro Pro Thr

1

5

<

210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3B5-VLCDR3

<400> 64

Ser Gln Asn Thr His Ile Pro Pro Thr

1 5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 9B3,9B12,3B10-VLCDR3

<400> 65

Leu Gln Asn Asp Glu Phe Pro Phe Thr

1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10H7-VLCDR3

<400> 66

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3G8-VLCDR3

<400> 67

Gln His Asn Arg Glu Leu Pro Pro Thr

1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3F12-VLCDR3

<400> 68

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 69

<211> 211

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Met Ala Gln Ala Lys Ile Asn Ala Lys Ala Asn Glu Gly Arg Phe Cys

1 5 10 15

Arg Ser Ser Ser Met Ala Asp Arg Ser Ser Arg Leu Leu Glu Ser Leu

20 25 30

Asp Gln Leu Glu Leu Arg Val Glu Ala Leu Arg Glu Ala Ala Thr Ala

35 40 45

Val Glu Gln Glu Lys Glu Ile Leu Leu Glu Met Ile His Ser Ile Gln

50 55 60

Asn Ser Gln Asp Met Arg Gln Ile Ser Asp Gly Glu Arg Glu Glu Leu

65 70 75 80

Asn Leu Thr Ala Asn Arg Leu Met Gly Arg Thr Leu Thr Val Glu Val

85 90 95

Ser Val Glu Thr Ile Arg Asn Pro Gln Gln Gln Glu Ser Leu Lys His

100 105 110

Ala Thr Arg Ile Ile Asp Glu Val Val Asn Lys Phe Leu Asp Asp Leu

115 120 125

Gly Asn Ala Lys Ser His Leu Met Ser Leu Tyr Ser Ala Cys Ser Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Cys Ala Leu Glu Asp Gln Lys Lys Ile Lys Arg Arg Leu Glu Thr
165 170 175
Leu Leu Arg Asn Ile Glu Asn Ser Asp Lys Ala Ile Lys Leu Leu Glu
180 185 190
His Ser Lys Gly Ala Gly Ser Lys Thr Leu Gln Gln Asn Ala Glu Ser
195 200 205
Arg Phe Asn

210

<210> 70

<211> 636

<212> DNA

<213

> Homo sapiens

<400> 70

atggctcagg cgaagatcaa cgctaaagcc aacgaggggc gcttctgccg ctctctctcc 60
atggctgacc gctccagccg cctgctggag agcctggacc agctggagct cagggttgaa 120
gctttgagag aagcagcaac tgctgttgag caagagaaag aaatccttct ggaaatgac 180
cacagtatcc aaaatagcca ggacatgagg cagatcagtg acggagaaag agaagaatta 240
aatctgactg caaacctgtt gatgggaaga actctcaccg ttgaagtgtc agtagaaaca 300
attagaaacc cccagcagca agaatcccta aagcatgcca caaggattat tgatgaggtg 360
gtcaataagt ttctggatga ttggggaat gccagagtc atttaatgtc gctctacagt 420

gcatgttcat ctgaggtgcc acatgggcca gttgatcaga agtttcaatc catagtaatt 480
ggctgtgctc ttgaagatca gaagaaaatt aagagaagat tagagactct gcttagaaat 540
attgaaaact ctgacaaggc catcaagctt ttagagcatt ctaaaggagc tggttccaaa 600
actctgcaac aaaatgctga aagcagattc aattag 636

<210> 71

<211> 270

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GST-Bag F1 vector

<400> 71

atggctcagg cgaagatcaa cgctaaagcc aacgaggggc gcttctgccg ctctctctcc 60
atggctgacc gctccagccg cctgctggag agcctggacc agctggagct cagggttgaa 120

gctttgagag aagcagcaac tgctgttgag caagagaaag aaatccttct ggaaatgac 180
cacagtatcc aaaatagcca ggacatgagg cagatcagtg acggagaaag agaagaatta 240
aatctgactg caaaccgttt gatgggaaga 270

<210> 72

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GST-Bag F2 vector

<400> 72

atggctcagg cgaagatcaa cgctaaagcc aacgaggggc gcttctgccg ctctcctcc 60

atggctgacc gctccagccg cctgctggag agcctggacc agctggagct cagggttgaa 120
gctttgagag aagcagcaac tgctgttgag caagagaaag aaatccttct ggaaatgac 180
cacagtatcc aaaatagcca ggacatgagg cagatcagtg acggagaaag agaagaatta 240
aatctgactg caaaccgttt gatgggaaga actctcaccg ttgaagtgtc agtagaaaca 300
attagaaacc cccagcagca agaatcccta aagcatgcca caaggattat tgatgaggtg 360
360

<210> 73

<211> 450

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GST-Bag F3 vector

<400> 73

atggctcagg cgaagatcaa cgctaaagcc aacgaggggc gcttctgccg ctctcctcc 60
atggctgacc gctccagccg cctgctggag agcctggacc agctggagct cagggttgaa 120
gctttgagag aagcagcaac tgctgttgag caagagaaag aaatccttct ggaaatgac 180
cacagtatcc aaaatagcca ggacatgagg cagatcagtg acggagaaag agaagaatta 240
aatctgactg caaaccgttt gatgggaaga actctcaccg ttgaagtgtc agtagaaaca 300
attagaaacc cccagcagca agaatcccta aagcatgcca caaggattat tgatgaggtg 360

gtcaataagt ttctggatga ttgggaaat gccaaagatc atttaatgtc gctctacagt 420
gcatgttcat ctgaggtgcc acatgggcca 450

<210> 74

<211> 540

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GST-Bag F4 vector

<400> 74

atggctcagg cgaagatcaa cgctaaagcc aacgaggggc gcttctgccg ctctctctcc	60
atggctgacc gctccagccg cctgctggag agcctggacc agctggagct cagggttgaa	120
gctttgagag aagcagcaac tgctgttgag caagagaaag aaatccttct ggaaatgac	180
cacagtatcc aaaatagcca ggacatgagg cagatcagtg acggagaaag agaagaatta	240
aatctgactg caaaccgttt gatgggaaga actctcaccg ttgaagtgtc agtagaaaca	300
attagaaacc cccagcagca agaatcccta aagcatgcca caaggattat tgatgaggtg	360
gtcaataagt ttctggatga ttgaggaaat gccaagagtc atttaatgtc gctctacagt	420
gcatgttcat ctgaggtgcc acatgggcca gttgatcaga agtttcaatc catagtaatt	480
ggctgtgctc ttgaagatca gaagaaaatt aagagaagat tagagactct gcttagaaat	540
	540