



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0099992
(43) 공개일자 2017년09월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
G01N 33/564 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2875 (2013.01)
G01N 33/564 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7020607
(22) 출원일자(국제) 2016년01월08일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년07월21일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2016/050314
(87) 국제공개번호 WO 2016/110587
국제공개일자 2016년07월14일
(30) 우선권주장
2014108 2015년01월09일 네덜란드(NL)

(71) 출원인
아두로 바이오테크 홀딩스, 유럽 비.브이.
네덜란드 5349에이비 오에스에스 클루스터스트라
트 9 알엑스1101
(72) 발명자
반 이네남, 한스
네덜란드 6524 케이지 니즈메건 반도어그스트레트
12
반 엘사스, 안드레아
네덜란드 5343 제이엘 오스, 러스브로스가아드
139
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 변경된 APRIL 결합 항체

(57) 요약

본 개시내용은 hAPRIL.01A의 항원 결합 부위를 갖는 항체와 동일한 인간 APRIL의 에피토프에 결합하는 APRIL-결합 항체에 관한 것이다. 본 발명의 개시내용의 항체는 V_H 및 V_L 도메인의 프레임워크 서열의 특이적 선택을 포함하고, hAPRIL.01A와 비교하여 예상 밖의 특징을 갖는다. 본 개시내용은 추가로 본 발명의 항체를 포함하는 조성물 및 항체 및 조성물의 의학적 및 진단적 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

G01N 33/57488 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)
C07K 2317/567 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2317/94 (2013.01)
G01N 2800/24 (2013.01)

(72) 발명자

메드마, 젠 파울

네덜란드 2151 에이치씨 니우 벤넵, 고우텐스테인
파크 12

루제 홀썸, 데이비드

네덜란드 6512 비알 니즈메건, 그레프스웨그 47 지

명세서

청구범위

청구항 1

hAPRIL.01A의 항원 결합 부위를 갖는 항체 유사체, 예를 들어 항체 단편을 포함하는 항체로서, 인간 APRIL의 동일 에피토프에 대한 결합을 경쟁하는 항체 유사체, 예를 들어 항체 단편을 포함하는 APRIL-결합 항체이고, 상기 APRIL-결합 항체가 V_H 및 V_L 도메인을 포함하는 다수의 항원 결합 부위를 포함하되, 항원 결합 부에서 상기 V_H 도메인의 프레임워크 서열이 서열번호 12, 14, 16, 18, 바람직하게는 서열번호 14 또는 18로부터 선택된 V_H 아미노산 서열의 프레임워크 서열과 적어도 70% 서열 유사성을 갖고, 상기 V_L 도메인의 프레임워크 서열이 서열번호 30의 프레임워크 아미노산 서열과 적어도 70% 서열 유사성을 갖는, APRIL-결합 항체.

청구항 2

제1항에 있어서,

- 상기 V_H 도메인에서 CDR1, CDR2, CDR3 중 적어도 1개 및 바람직하게는 3개 모두가 각각 서열번호 5, 6, 7, 또는 상기 서열의 임의의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택되고/선택되거나;
- 상기 V_L 도메인에서 CDR1, CDR2, CDR3 중 적어도 1개 및 바람직하게는 3개 모두가 각각 서열번호 8, 9 및 10, 또는 상기 서열의 임의의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 V_H 도메인 아미노산 서열이 서열번호 42, 44, 46, 48, 바람직하게는 서열번호 44 또는 48으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 70% 서열 유사성을 갖는 중쇄 아미노산 서열에 존재하고, 상기 V_L 도메인 아미노산 서열이 서열번호 50의 아미노산 서열과 적어도 70% 서열 유사성을 갖는 경쇄 아미노산 서열에 존재하는, 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 V_H 아미노산 서열에서 위치 72에서의 아미노산이 S이고, 상기 V_H 아미노산 서열이 바람직하게는 서열번호 32, 34, 36, 38 또는 40으로부터 선택되는, 항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 70% 서열 유사성이 적어도 85% 서열 유사성인, 항체.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 70% 서열 유사성이 적어도 90% 서열 유사성인, 항체.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 70% 서열 유사성이 적어도 95% 서열 유사성인, 항체.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 70% 서열 유사성이 적어도 99% 서열 유사성인, 항체.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 V_H 아미노산 서열에서 위치 67에서의 아미노산이 K이고, 위치 68에서의 아미노산이 A이며, 상기 V_H 아미노산 서열이 바람직하게는 서열번호 40으로부터 선택되는, 항체.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 하기 특징 중 하나 이상을 갖는, 항체:

- 인간 APRIL에 약 100nM 이하의 K_D 로 결합함;
- 인간 BCMA 및 인간 TACI에 대한 인간 APRIL의 결합을 약 100nM 이하의 IC_{50} 으로 차단함;
- 인간 APRIL에 대한 hAPRIL.01A의 결합을 약 100nM 이하의 IC_{50} 으로 차단함.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 항체의 V_H 도메인 및/또는 V_L 도메인을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드로서, 상기 V_H 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열이 바람직하게는 서열번호 11, 13, 15, 17, 더욱 바람직하게는 서열번호 13 또는 17로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 서열 유사성을 갖는 폴리뉴클레오타이드 서열이고, 상기 V_L 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열이 바람직하게는 서열번호 29로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 서열 유사성을 갖는 폴리뉴클레오타이드 서열인, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 12

적합한 조절 서열의 제어 하에 제11항의 다수의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 다수의 발현 벡터를 포함하는 발현 유닛으로서, 상기 다수의 폴리뉴클레오타이드가 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 항체의 V_H 도메인 및 V_L 도메인을 인코딩하고, 상기 V_H 도메인에 대한 폴리뉴클레오타이드 서열 코딩이 V_L 도메인에 대한 폴리뉴클레오타이드 서열 코딩과 동일하거나 상이한 발현 벡터에서 이루어지는, 발현 유닛.

청구항 13

제11항의 다수의 폴리뉴클레오타이드 및/또는 제12항의 발현 유닛을 포함하는 숙주 세포로서, 바람직하게는 발현 유닛이 상기 V_H 도메인에 대한 폴리뉴클레오타이드 서열 코딩 및 상기 V_L 도메인에 대한 폴리뉴클레오타이드 서열 코딩 둘 다를 포함하는 발현 벡터를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 14

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 항체를 제조하는 방법으로서,

- a) 제13항에 따른 숙주 세포를 배양 배지에서 상기 다수의 폴리뉴클레오타이드가 발현되는 조건하에 배양하여, 상기 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 제조하는 단계; 및
- b) 상기 폴리펩타이드를 상기 숙주 세포 또는 배양 배지로부터 회수하는 단계를 포함하는, 항체를 제조하는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 항체를 담체 또는 희석제, 바람직하게는 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제, 및 임의로 다수의 다른 활성 화합물, 특히, 예를 들면, 펩타이드, 빈크리스틴, 플루다라빈, 클로람부실, 벤다무스틴, 에토포사이드, 독소루비신, 사이클로포스파마이드, 시스플라틴, 면역 조절제, 예를 들면, 코르티코스테로이드, 예를 들면, 텍사메타손, 프레드니솔론, 탈리도마이드 유사체, 예를 들면, 탈리도마이드, 레날리도마이드, 포말리도마이드, 키나제 억제제, 예를 들면, 이브루티닙, 이텔라리셉, CD20을 표적화하는 항체 요법, 예를 들면, 리툭시맵, 오파투무맵, 오비노투주맵, CD52를 표적화하는 항체 요법, 예를 들면, 알렘투주맵, CD38을 표적화하는 항체 요법, 예를 들면, 다라투무맵, IL-6 또는 IL-6 수용체를 표적화하는 항체 요법, 예를 들면, 사릴루맵, 토실리루맵, CS-1을 표적화하는 항체 요법, 예를 들면, 엘로투주맵, BCMA를 표적화하는 항체 요법, 예를 들면, GSK2857916, BAFF 또는 Blyss를 표적화하는 항체 요법, 예를 들면, 타발루맵, 비스포스포네이트, 예를 들면, 파미드로네이트 또는 졸렌드론산, 또는 보르테조미드로부터 선택된 다수의 치료적 활성 화합물과 조합하여 포함하는 조성물.

청구항 16

요법, 바람직하게는 하기 a 내지 e로부터 선택된 하나 이상을 목표로 하는 요법에서 사용하기 위한, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 항체:

- a. 면역 세포 증식 및/또는 생존의 억제;
- b. 암의 치료;
- c. 자가면역 질환의 치료;
- d. 염증성 질환의 치료; 또는
- e. 면역글로불린 수준의 저하가 유익한 병태의 치료.

청구항 17

대상체, 바람직하게는 인간 대상체를 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 항체의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체를 치료하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 치료가 하기 a 내지 e로부터 선택된 하나 이상을 목표로 하는, 대상체를 치료하는 방법:

- a. 면역 세포 증식 및/또는 생존의 억제;
- b. 암의 치료;
- c. 자가면역 질환의 치료;
- d. 염증성 질환의 치료; 또는
- e. 면역글로불린 수준의 저하가 유익한 병태의 치료.

청구항 19

진단 방법, 예를 들면, 바람직하게는 생체의 또는 시험관내 진단 방법, 예를 들면, 유세포 분석법, 웨스턴 블롯팅, 효소 결합 면역 흡착 분석법(ELISA) 또는 면역조직화학으로부터 선택된 진단 방법에서의, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 항체의 용도.

청구항 20

VH11.VL15, VH12.VL15, VH13.VL15, VH14.VL15, VH14_1.VL15, VH14_1C.VL15, VH14_1D.VL15, VH14_1E.VL15, 및 VH14_1G.VL15로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 영역. 경쇄 가변 영역 쌍을 포함하는 인간화 항체.

청구항 21

제20항에 따른 인간화 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 22

인간화 항체의 발현을 제공하도록 구성된 조절 서열에 작동적으로 연결된, 제20항에 따른 인간화 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 인간 APRIL에 결합하는, 이의 단편을 포함하는 단리된 항체, 이러한 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 항체를 생성하는 숙주 세포에 관한 것이다. 항체는 암을 치료하고, 면역 세포 증식 및 이러한 면역 세포 증식의 억제로부터 이익을 얻을 수 있는 병태, 예를 들면, 자가면역 질환, 염증성 질환, 또는 면역글로불린 과잉 생성과 관련된 질환을 억제하는데 사용될 수 있다. 추가로, 항체는 진단 도구 및 면역 세포 증식 및/또는 생존의 억제를 위한 시험관내 제제로서 사용될 수 있다.

배경 기술

- [0002] APRIL은 II형 막투과 단백질로서 발현되지만, 대부분의 다른 TNF 패밀리를 멤버와 달리 이는 주로 분비된 단백질로서 가공되고 골지체에서 절단되며, 여기서 퓨린 전환효소에 의해 절단되어 가용성 활성 형태를 방출한다(Lopez-Fraga *et al.*, 2001, *EMBO Rep* 2:945-51). APRIL은 다수의 다른 TNF 패밀리를 리간드에 대하여 단백질 폴딩으로 유사한 구조적 상동성을 갖는 비공유적으로 연결된 호모-트리머로서 조립된다(Wallweber *et al.*, 2004, *Mol Biol* 343, 283-90). APRIL은 2개의 TNF 수용체인 B 세포 성숙 항원(BCMA) 및 막투과 활성제 및 칼슘 조절제 및 사이클로필린 리간드 상호작용물질(TACI)에 결합한다(문헌[Kimberley *et al.*, 2009, *J Cell Physiol.* 218(1): 1-8]에서 검토됨). 추가로, APRIL은 헤파란 황산 프로테오글리칸(HSPG)에 결합하는 것으로 최근 밝혀졌다(Hendriks *et al.*, 2005, *Cell Death Differ* 12, 637-48). APRIL은 B 세포 신호전달에서 역할을 하고, 시험관내 인간 및 무린 B 세포의 증식 및 생존 둘 다를 촉진시키는 것으로 밝혀졌다(문헌[Kimberley *et al.*, 2009, *J Cell Physiol.* 218(1): 1-8]에서 검토됨).
- [0003] APRIL은 대부분 면역 세포 서브세트, 예를 들면, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, 호중구, B-세포, 및 T-세포에 의해 발현되고, 이들 중 다수는 또한 BAFF를 발현한다. 추가로, APRIL은 비면역 세포, 예를 들면, 파골세포, 상피 세포 및 다양한 종양 조직에 의해 발현될 수 있다(문헌[Kimberley *et al.*, 2009, *J Cell Physiol.* 218(1): 1-8]에서 검토됨). 사실, APRIL은 본래 암 세포에서 이의 발현을 기초로 하여 확인되었다(Hahne *et al.*, 1998, *J Exp Med* 188, 1185-90). APRIL mRNA의 높은 발현 수준은 한 패질의 종양 세포주뿐만 아니라 인간 일차 종양, 예를 들면, 결장, 및 림프 암종에서 확인되었다.
- [0004] 95 만성 림프구성 백혈병(CLL)에 대한 회고적인 연구에서 CLL 환자는 혈청 중의 APRIL의 증가된 수준을 나타냈고, 이는 질환 진행 및 전체 환자 생존, 높은 APRIL 혈청 수준을 갖는 환자에 있어서 더 불량한 예후와 연관성이 있다(Planelles *et al.*, 2007, *Haematologica* 92, 1284-5). 유사하게, APRIL(의 증가된 수준)은 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종(NHL) 및 다발성 골수종(MM)에서 발현되는 것으로 밝혀졌다(문헌[Kimberley *et al.*, 2009, *J Cell Physiol.* 218(1): 1-8]에서 검토됨). DLBCL 환자(NHL)에서 회고적인 연구는 불량한 생존율과 관련이 있는 암 병변에서 높은 APRIL 발현을 보여주었다(Schwaller *et al.*, 2007, *Blood* 109, 331-8). 최근에, 결장직장암으로 고통 받는 환자로부터의 혈청 중의 APRIL 혈청 수준은 양성 진단값을 갖는 것으로 나타났다(Ding *et al.*, 2013, *Clin. Biochemistry*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.06.008>).
- [0005] B 세포 생물학에서 이의 역할로 인하여 APRIL은 또한 많은 자가면역 질환에서 역할을 한다. APRIL의 증가된 혈청 수준은 많은 SLE 환자에서 보고되었다(Koyama *et al.*, 2005, *Ann Rheum Dis* 64, 1065-7). 회고적인 분석은 APRIL 혈청 수준이 항-dsDNA 항체 역가와 관련이 있는 경향을 갖는다는 것을 드러냈다. 또한 염증성 관절염을 가진 환자의 관절 낭액에서 비염증성 관절염, 예를 들면, 골관절염으로 고통 받는 환자의 것과 비교하여 유의미하게 증가된 APRIL 수준이 검출되었다(Stohl *et al.*, 2006, *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 6, 351-8; Tan *et al.*, 2003, *Arthritis Rheum* 48, 982-92).
- [0006] 몇몇 연구는 광범위한 전신적 면역 기반 류머티스성 질환(현재 쇼그렌 증후군, 라이터 증후군, 건선성 관절염, 다발근육염 및 강직성 척추염을 포함 포함함)으로 고통 받는 환자의 혈청 중의 APRIL의 존재에 집중하였고, 이들 환자에서 유의미하게 증가한 APRIL 수준을 확인하였고, 이는 또한 이들 질환에서 APRIL의 중요한 역할을 제시한다(Jonsson *et al.*, 1986, *Scand J Rheumatol Suppl* 61, 166-9; Roschke *et al.*, 2002, *J Immunol* 169, 4314-21). 추가로, 증가된 APRIL 혈청 수준이 아토피성 피부염으로 고통 받는 환자로부터의 혈청에서 검출되었다(Matsushita *et al.*, 2007, *Exp. Dermatology* 17, 197-202). 또한, 혈청 APRIL 수준은 패혈증에서 상승하고 심각하게 아픈 환자에서 사망을 예상한다(Roderburg *et al.*, *J. Critical Care*, 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrc.2012.11.007>). 추가로, APRIL 혈청 수준은 IgA 신증으로 고통 받는 환자에서 증가하는 것으로 확인되었다(McCarthy *et al.*, 2011, *J. Clin. Invest.* 121(10): 3991-4002).
- [0007] 최종적으로, 증가된 APRIL 발현은 또한 다발성 경화증(MS)에 연결되었다. APRIL 발현은 정상 대조군과 비교된 MS 환자의 성상세포에서 증가된 것으로 확인되었다. 이는 교아세포종 및 교아세포종 환자의 혈청에서 기재된 APRIL 발현과 연결되어 있다(Deshayes *et al.*, 2004, *Oncogene* 23, 3005-12; Roth *et al.*, 2001, *Cell Death Differ* 8, 403-10).
- [0008] APRIL은 몇몇 B-세포 악성종양, 및 잠재적으로 또한 몇몇 고체 종양의 생존 및 증식 능력에 중요한 역할을 한다. APRIL은 또한 염증성 질환 또는 자가면역에서 중요한 역할을 하는 것으로 나타난다. 따라서, APRIL을 길항작용시키는 전략은 다수의 이들 질환에서 치료적 목적을 갖는다. 실제로 몇몇 자가면역 질환의 치료를 위한 TACI-Fc(아타시셉트(Atacicept))로 APRIL을 표적화하는 임상적 연구가 최근 진행 중이다. 그러나, TACI-Fc는 또한 정상 B-세포 유지와 연관된 인자인 BAFF를 표적화한다. APRIL에 대항하는 항체는 제W09614328호, 제

WO2001/60397호, 제WO2002/94192호, 제WO9912965호, 제WO2001/196528호, 제WO9900518호 및 제WO2010/100056호에 기재되어 있다. 제WO2010/100056호에는 APRIL를 특이적으로 표적화하는 항체가 기재된다. 제WO2010/100056호의 항체는 TACI에 대한 APRIL의 결합을 완전하게 차단하고, BCMA에 대한 결합을 적어도 부분적으로 차단한다. 항체 hAPRIL.01A는 BCMA 및 TACI 둘 다에 대한 결합을 완전하게 차단한다. hAPRIL.01A 항체는 B-세포 증식, 생존 및 항원-특이적 면역글로불린 분비를 시험관내 및 생체내에서 억제하였다(Guadagnoli et al., 2011, *Blood* 117(25): 6856-65). 추가로, hAPRIL.01A는 인간 CLL 및 MM 질환의 대표적인 악성 세포의 증식 및 생존을 시험관내 및 생체내에서 억제하였다(Guadagnoli et al., 2011, *Blood* 117(25): 6856-65; Lascano et al., 2013, *Blood* 122(24): 3960-3; Tai et al., 2014, *ASH poster* 2098). 최종적으로, hAPRIL.01A는 항원-특이적 IgA의 분비를 억제하였다(Guadagnoli et al., 2011, *Blood* 117(25): 6856-65). 이들 유일한 결합 특징의 관점에서 이러한 무린 항체는 유일한 억제학적 유용성을 갖는다. 그러나, 이의 무린 기원의 관점에서 인체용 약제에서 이러한 항체의 억제학적 유용성에는 특정한 단점이 또한 존재한다. 본 발명은 따라서 인체용 약제에서 사용하기에 더 적합한 변경된 hAPRIL.01A 항체를 제공하는 것을 목표로 한다.

발명의 내용

- [0009] 본 발명은 V_H 및 V_L 도메인의 프레임워크 영역의 특정한 치환을 포함하는 hAPRIL.01A 유사체를 제공한다. hAPRIL.01A의 항원 결합 부위에서 hAPRIL.01A의 V_H 도메인의 프레임워크 영역이 서열번호 12, 14, 16 또는 18로부터 선택된 V_H 아미노산 서열로부터의 프레임워크 영역을 치환하고, hAPRIL.01A의 V_L 도메인의 프레임워크 영역이 서열번호 30로부터 선택된 V_L 아미노산 서열의 프레임워크 영역을 치환하는 경우, 기능성 hAPRIL.01A 유사체가 수득된다는 것이 놀랍게도 밝혀졌다. 이는 본 발명의 발명자들에 의한 연구가 인간 기원으로부터의 대체적인 V_H 및 V_L 프레임워크 서열의 오직 한정된 조합만이 인간 APRIL에 대한 hAPRIL.01A CDR의 적절한 결합을 지지할 수 있고, 따라서 기능성 hAPRIL.01A 유사체를 야기할 수 있다는 것을 보여주었다는 사실의 관점에서 놀라운 일이다. 추가로 본 발명의 발명자는 hAPRIL.01 유사체에서 추가의 개선이 특정한 특이적 아미노산 치환, 특히 선택된 V_H 아미노산 서열에서 아미노산 치환 R72S 및/또는 V68A와 조합으로 이중 치환 R67K을 도입함으로써 수득될 수 있다는 것을 보여주었다.
- [0010] 제1 측면에 따른 본 발명은 따라서 hAPRIL.01A의 항원 결합 부위를 갖는 항체, 예를 들면, 제WO2010/100056호에 기재된 단일클론 항체 hAPRIL.01A와 동일한 인간 APRIL의 에피토프에 결합하는 APRIL-결합 항체에 관한 것이고, 상기 인간 APRIL-결합 항체는 V_H 및 V_L 도메인을 포함한 다수의 항원 결합 부위를 포함하고, 여기서 항원 결합 부위에서 V_H 도메인의 프레임워크 서열은 서열번호 12, 14, 16 또는 18, 바람직하게는 서열번호 14 또는 18, 가장 바람직하게는 서열번호 18로부터 선택된 V_H 아미노산 서열의 프레임워크 서열과 적어도 70% 서열 유사성을 갖고, V_L 도메인의 프레임워크 서열은 서열번호 30으로부터 선택된 V_L 아미노산 서열의 프레임워크 서열과 적어도 70% 서열 유사성을 갖는다.
- [0011] 본 발명의 추가의 측면은 본 발명의 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 코딩하는, 단리된 형태의, 폴리뉴클레오타이드, 다수의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 유닛 및 발현 유닛 및/또는 다수의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0012] 본 발명의 추가의 측면은 본 발명의 항체를 제조하는 방법으로서,
- [0013] a) 본 발명의 숙주 세포를 다수의 폴리뉴클레오타이드가 발현되는 조건하에 배양 배지에서 배양하여, 중쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 제조하는 단계; 및
- [0014] b) 폴리펩타이드를 숙주 세포 또는 배양 배지로부터 회수하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 항체를 억제학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제 및 임의로 다수의 다른 활성 화합물과 조합하여 포함하는 조성물은 본 발명의 추가의 측면의 대상이다.
- [0015] 본 발명의 항체의 치료적 및 진단적 사용은 본 발명의 또 다른 측면이다.
- [0016] 서열의 간단한 설명
- [0017] 서열 목록에 나타난 서열은 V_H 및 V_L 도메인 및 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열 및 인코딩 DNA 서열에 관한 것이고, 이로부터 프레임워크 서열은 본 발명에 따른 항체에서 사용될 수 있다. 추가로 hAPRIL.01A의 V_H 및 V_L 도메

인 둘 다 및 중쇄 및 경쇄의 CDR의 아미노산 서열이 존재한다. 본 발명의 특정한 실시형태에 따라 hAPRIL.01A의 CDR은 본 발명의 항체에서 사용된다. 하기 표 1은 이들 각각의 서열에 대한 서열번호와 연관성이 있다.

표 1

서열 목록

서열 번호	설명
1	hAPRIL.01A 중쇄 가변 영역(DNA)
2	hAPRIL.01A 경쇄 가변 영역(DNA)
3	hAPRIL.01A 중쇄 가변 영역(AA)
4	hAPRIL.01A 경쇄 가변 영역(AA)
5	hAPRIL.01A 중쇄 CDR1(AA)
6	hAPRIL.01A 중쇄 CDR2(AA)
7	hAPRIL.01A 중쇄 CDR3(AA)
8	hAPRIL.01A 경쇄 CDR1(AA)
9	hAPRIL.01A 경쇄 CDR2(AA)
10	hAPRIL.01A 경쇄 CDR3(AA)
11	VH11 중쇄 가변 영역(DNA)
12	VH11 중쇄 가변 영역(AA)
13	VH12 중쇄 가변 영역(DNA)
14	VH12 중쇄 가변 영역(AA)
15	VH13 중쇄 가변 영역(DNA)
16	VH13 중쇄 가변 영역(AA)
17	VH14 중쇄 가변 영역(DNA)
18	VH14 중쇄 가변 영역(AA)

19	VL10 경쇄 가변 영역(DNA)
20	VL10 경쇄 가변 영역(AA)
21	VL11 경쇄 가변 영역(DNA)
22	VL11 경쇄 가변 영역(AA)
23	VL12 경쇄 가변 영역(DNA)
24	VL12 경쇄 가변 영역(AA)
25	VL13 경쇄 가변 영역(DNA)
26	VL13 경쇄 가변 영역(AA)
27	VL14 경쇄 가변 영역(DNA)
28	VL14 경쇄 가변 영역(AA)
29	VL15 경쇄 가변 영역(DNA)
30	VL15 경쇄 가변 영역(AA)
31	VH14_1 중쇄 가변 영역(DNA)
32	VH14_1 중쇄 가변 영역(AA)
33	VH14_1C 중쇄 가변 영역(DNA)
34	VH14_1C 중쇄 가변 영역(AA)
35	VH14_1D 중쇄 가변 영역(DNA)
36	VH14_1D 중쇄 가변 영역(AA)
37	VH14_1E 중쇄 가변 영역(DNA)
38	VH14_1E 중쇄 가변 영역(AA)
39	VH14_1G 중쇄 가변 영역(DNA)
40	VH14_1G 중쇄 가변 영역(AA)
41	VH11 중쇄(DNA)
42	VH11 중쇄(AA)
43	VH12 중쇄(DNA)
44	VH12 중쇄(AA)
45	VH13 중쇄(DNA)
46	VH13 중쇄(AA)
47	VH14 중쇄(DNA)
48	VH14 중쇄(AA)
49	VL15 경쇄(DNA)
50	VL15 경쇄(AA)

51	VH14 1G 중쇄(DNA)
52	VH14 1G 중쇄(AA)
53	hAPRIL.01A 중쇄(DNA)
54	hAPRIL.01A 경쇄(DNA)
55	hAPRIL.01A 중쇄(AA)
56	hAPRIL.01A 경쇄(AA)
57	중쇄 분비 리더 서열(DNA)
58	중쇄 분비 리더 서열(AA)
59	경쇄 분비 리더 서열(DNA)
60	경쇄 분비 리더 서열(AA)

[0020]

[0021]

서열번호 11 내지 52는 지시된 바와 같은 조작된 면역글로불린 VH, VL, 중쇄 또는 경쇄 서열에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0022]

도 1은 T-세포 독립적인 B 세포 반응에 대하여 생체내 시험에서 APRIL을 hAPRIL.01A 또는 유사체 14_1G.15로 표적화한 결과를 보여준다. 형질전환 마우스(APRIL-Tg)를 NP-피콜(Ficoll) 250 μ g으로 시험감염시키고(0일), -1일 및 3일에 hAPRIL.01A 또는 14_1G.15로 처리하였다. PBS 및 아생형 마우스(WT)를 음성 대조군으로서 사용하였다. 면역글로불린 역가(IgA1(패널 a) 및 IgA2(패널 b), IgG(패널 c) 및 IgM(패널 d))를 ELISA로 측정하였다. 14_1G.15는 이의 hAPRIL.01A 유사체보다 더 효과적인 NP-피콜에 대한 T-세포 독립적인 면역 반응을 억제하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023]

본 발명은 따라서 hAPRIL.01A의 항원 결합 부위를 갖는, 항체 유사체, 예를 들면, 항체 단편을 포함하는 항체와 동일한 인간 APRIL의 에피토프에 결합하는 항체에 관한 것이다. 항체 hAPRIL.01A는 V_H 및 V_L 도메인 및 CDR의 서열과 함께 제W02010/100056호에 기재되어 있다. 본 발명의 발명자는 인간 대체물로 hAPRIL.01A의 V_H 및 V_L 도메인의 마우스 프레임워크 영역을 치환하는 한정된 가능성이 존재한다는 것을 확인하였다. 추가로 선택된 대체적인 프레임워크 서열은 예상 밖의 특징을 갖는 대체적인 항-인간 APRIL 항체를 야기한다. 선택된 프레임워크 서열은 hAPRIL.01A에 대하여 인간 APRIL 에피토프에 대한 결합의 맥락 내에서 이들의 특정한 특징을 드러내고, 따라서 이러한 맥락에서 넓은 이용성을 갖는 것으로 여겨진다. 따라서, 본 발명은 hAPRIL.01A와 동일한 에피토프에 결합하는 임의의 항체(단편 및/또는 유도체 및/또는 유사체 포함)를 목표로 하고, 이는 이의 V_H 및 V_L 도메인에서 선택된 프레임워크 서열을 포함한다. 특정한 실시형태에 있어서 이러한 항체는 hAPRIL.01A의 CDR과 상이한 대체적인 CDR을 포함할 것이다. 그러나, 다른 실시형태에 따라 항체는 hAPRIL.01A의 것들과 유사하거나 심지어 동일한 CDR을 포함할 것이다. 특정한 실시형태에 따라 hAPRIL.01A의 V_H 도메인 CDR1, CDR2 및 CDR3 및 V_L 도메인 CDR1, CDR2 및 CDR3 또는 임의의 상기 서열의 변이체를 포함하는 항체는 단일클론 항체 hAPRIL.01A와 동일한 인간 APRIL의 에피토프에 결합하는 항체로 간주된다. 이는 특히 인간 APRIL에 약 100nM 이하의 K_D로 결합하고/결합하거나 약 100nM 이하의 IC₅₀으로 인간 APRIL의 인간 BCMA 및 TACI에 대한 결합을 차단하는 경우이다. 본 발명 내에서 바람직한 항체는 인간 APRIL에 약 100nM 이하, 예를 들면, 100 내지 0.001nM, 예를 들면, 100 내지 0.010, 100 내지 0.050, 100 내지 0.100, 100 내지 0.150, 100 내지 0.200, 100 내지 0.250, 100 내지 0.300, 100 내지 0.350, 100 내지 0.400, 100 내지 0.450, 90 내지 0.500, 80 내지 0.550, 70 내지 0.600, 60 내지 0.650, 50 내지 0.700, 40 내지 0.750, 30 내지 0.800, 20 내지 0.850, 10 내지 0.900 또는 1.0 내지 0.950nM로부터 선택된 간격 내의 K_D 값으로 결합한다. 당해 분야의 숙련가는 50, 20, 10, 1.00nM 이하의 값과 같은 낮은 값이 K_D에 대하여 바람직하다는 것을 이해할 것이다. 이러한 간격 내의 K_D 값을 갖는 항체는 임상학적 적용에 적합하다(예를 들면, 문헌[Presta, et al., 2001, Thromb. Haemost. 85:379-389]; [Yang, et al., 2001, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 38:17-23]; [Carnahan, et al., 2003, Clin. Cancer Res.(Suppl.) 9: 3982s-3990s] 참조). 항체 친화력은, 예를 들면, 실험 부문에 예시된 바와 같은 당해 분야의 숙련가에게 알려진 표준 분석을 사용하여 측정할 수 있다.

[0024]

본 발명의 항체는 약 100nM 이하, 예를 들면, 100 내지 0.001nM, 예를 들면, 100 내지 0.010, 100 내지 0.050, 100 내지 0.100, 100 내지 0.150, 100 내지 0.200, 100 내지 0.250, 100 내지 0.300, 100 내지 0.350, 100 내지 0.400, 100 내지 0.450, 90 내지 0.500, 80 내지 0.550, 70 내지 0.600, 60 내지 0.650, 50 내지 0.700, 40 내지 0.750, 30 내지 0.800, 20 내지 0.850, 10 내지 0.900 또는 1.0 내지 0.950nM로부터 선택된 간격 내의

IC₅₀ 값으로 인간 BCMA 및 TACI에 대한 인간 APRIL의 결합을 차단하는 경우가 추가로 바람직하다. 숙련가는 50, 20, 10, 1.00nM 이하의 값과 같이 낮은 값이 IC₅₀에 대하여 바람직하다는 것을 이해할 것이다.

[0025] hAPRIL.01A와 동일한 에피토프에 대한 항체의 결합은 제W02010/100056호의 실시예 2 또는 5에 기재된 방법 또는 하기 논의된 바와 같이 숙련가에게 알려진 다른 교차-차단 또는 에피토프 맵핑 기술에 따라 본 발명의 항체와 hAPRIL.01A의 항원 결합 부위를 갖는 참조 항체의 인간 APRIL에 대한 결합 경쟁을 평가함으로써 평가할 수 있다. hAPRIL.01A의 항원 결합 부위는 서열번호 3 및 4에 존재하는 바와 같이 V_H 및 V_L 도메인에 의해 정의된다. 따라서 서열번호 3 및 4로 표시된 V_H 및 V_L 도메인을 포함하는 항체 유사체, 예를 들면, 항체 단편을 포함하는 임의의 항체는 hAPRIL.01A와 동일한 인간 APRIL의 에피토프에 대한 결합을 평가하기 위하여 참조 항체로서 사용될 수 있다. 제W02010/100056호에 기재된 항체 hAPRIL.01A는 hAPRIL.01A의 항원 결합 부위를 갖는 항체의 예이고, 본 발명의 맥락 내에 적합한 참조 항체이다. 그러나, 또한 항체 단편, 예를 들면, hAPRIL.01A로부터 유래된 Fab, F(ab)₂ 또는 Fv 단편은 참조 항체로서 사용될 수 있다. 서열번호 1 및 2의 DNA 서열 및 서열번호 3 및 4의 아미노산 서열을 기반으로, 숙련가는 hAPRIL.01A로부터 유래된 이러한 항체 단편을 구축하고 제조할 수 있을 것이다. 제공된 서열을 기반으로 숙련가는 또한 IgG1 불변 영역(마우스 또는 상이한 종, 바람직하게는 마우스로부터)에 대한 서열번호 3의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열(서열번호 1에 의해 코딩됨)의 결합 및 κ 불변 영역(마우스 또는 상이한 종, 바람직하게는 마우스로부터)에 대한 서열번호 4의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열(서열번호 2에 의해 코딩됨)의 결합에 의해 참조 항체로서 사용을 위하여 hAPRIL.01A 유사체를 제조할 수 있을 것이다.

[0026] 이러한 방법으로 평가되는 경우, hAPRIL.01A와 동일한 인간 APRIL의 에피토프에 대한 항체 결합은 약 100nM 이하, 예를 들면, 100 내지 0.001nM, 예를 들면, 100 내지 0.010, 100 내지 0.050, 100 내지 0.100, 100 내지 0.150, 100 내지 0.200, 100 내지 0.250, 100 내지 0.300, 100 내지 0.350, 100 내지 0.400, 100 내지 0.450, 90 내지 0.500, 80 내지 0.550, 70 내지 0.600, 60 내지 0.650, 50 내지 0.700, 40 내지 0.750, 30 내지 0.800, 20 내지 0.850, 10 내지 0.900 또는 1.0 내지 0.950nM로부터 선택된 간격 내의 IC₅₀으로 인간 APRIL에 대한 hAPRIL.01A 항원 결합 부위를 갖는 참조 항체의 결합을 차단할 수 있다. 숙련가는 낮은 값이 IC₅₀, 예를 들면, 50, 20, 10, 1.00nM 이하의 값에 대하여 바람직하다는 것을 이해할 것이다.

[0027] 본 발명의 항체는 따라서 하나 이상의 하기 특징을 가질 수 있다:

[0028] (i) 약 100nM 이하의 K_D로 인간 APRIL에 결합하고;

[0029] (ii) 약 100nM 이하의 IC₅₀으로 인간 BCMA 및 인간 TACI에 대한 인간 APRIL의 결합을 차단하고;

[0030] (iii) 약 100nM 이하의 IC₅₀으로 인간 APRIL에 대한 hAPRIL.01A의 결합을 차단한다.

[0031] 이들 특징은 다음 조합으로 조합될 수 있다: (i) 또는 (ii) 또는 (iii); (i) 및 (ii); (i) 및 (iii); (ii) 및 (iii); (i) 및 (ii) 및 (iii).

[0032] 본 발명에 따라 항체의 항원 결합 부위의 V_H 도메인의 프레임워크 서열은 이들이 서열번호 12, 14, 16 또는 18로부터 선택된 V_H 아미노산 서열의 프레임워크 서열과 적어도 70% 서열 유사성을 갖도록 선택된다. 바람직한 양태에 따라 항체의 V_H 도메인의 프레임워크 서열은 이들이 서열번호 14 또는 18, 가장 바람직하게는 서열번호 18로부터 선택된 V_H 아미노산 서열의 프레임워크 서열과 적어도 70% 서열 유사성을 갖도록 선택된다. 항체의 상기 항원 결합 부위에서 V_L 도메인의 프레임워크 서열은 이들이 서열번호 30으로부터 선택된 V_L 아미노산 서열의 프레임워크 서열과 적어도 70% 서열 유사성을 갖도록 선택된다.

[0033] 서열번호 12, 14, 16 또는 18로부터 선택된 V_H 아미노산 서열 및 서열번호 30으로부터 선택된 V_L 아미노산 서열은 프레임워크 서열 및 CDR 서열 둘 다를 포함한다. 이들 V_H 및 V_L 아미노산 서열 내에 도입된 CDR 서열은 hAPRIL.01A의 것들이고, 서열번호 5(hAPRIL.01A V_H CDR1), 6(hAPRIL.01A V_H CDR2), 7(hAPRIL.01A V_H CDR3), 8(hAPRIL.01A V_L CDR1), 9(hAPRIL.01A V_L CDR2), 10(hAPRIL.01A V_L CDR3)에 상응한다. 그러나, 상기 이미 기재된 바와 같이, 본 발명 내에서 선택된 V_H 및 V_L 프레임워크 서열의 사용은 hAPRIL.01A의 특이적 CDR과의 조합으로 한정되지 않는다. 따라서 특정한 실시형태에 따른 적어도 70%의 서열 유사성은 서열번호 12, 14, 16, 18로부터

터 선택된 완전 V_H 아미노산 서열, 또는 서열번호 30으로부터 선택된 완전 V_L 아미노산 서열에 대한 것이 아니라 오직 프레임워크 서열에 대한 것으로 간주된다. 서열번호 12, 14, 16 또는 18로 표시된 V_H 아미노산 서열에 대한 프레임워크 서열은 V_H CDR 외부의 이들 서열의 부분, 즉 서열번호 5(hAPRIL.01A V_H CDR1), 6(hAPRIL.01A V_H CDR2), 7(hAPRIL.01A V_H CDR3)과 동일한 서열 부분 이외의 부분이다. 서열번호 30으로 표시된 V_L 아미노산 서열에 대한 프레임워크 서열은 V_L CDR 외부의 이러한 서열의 부분, 즉, 서열번호 8(hAPRIL.01A V_L CDR1), 9(hAPRIL.01A V_L CDR2), 10(hAPRIL.01A V_L CDR3)과 동일한 서열 부분 이외의 부분이다.

[0034] 대안적인 실시형태에 따라 적어도 70%의 서열 유사성은 서열번호 12, 14, 16 또는 18로부터 선택된 완전 V_H 아미노산 서열 및 서열번호 30으로부터 선택된 완전 V_L 아미노산 서열에 대한 것으로 간주된다.

[0035] 본 발명의 기재 내에서 적어도 70% 서열 유사성은 적어도 80%, 예를 들면, 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더욱 바람직하게는 적어도 95%, 예를 들면, 적어도 99% 서열 유사성을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0036] 숙련가는 "서열 유사성"이 개별적인 뉴클레오타이드 또는 펩타이드 서열이 유사한 정도를 나타낸다는 것을 이해할 것이다. 두 서열 사이의 유사성 정도는 보존적 변화의 정도와 조합된 동일성의 정도를 기반으로 한다. "서열 유사성"의 퍼센트는 동일하게 또는 보존적으로 변화된 아미노산 또는 뉴클레오타이드의 퍼센트이고, 즉, "서열 유사성" = (% 서열 동일성) + (% 보존적 변화)이다.

[0037] 본 발명의 목적을 위하여 "보존적 변화" 및 "동일성"은 일종의 더 넓은 용어 "유사성"인 것으로 간주된다. 따라서, 용어 서열 "유사성"이 사용되는 경우, 이는 서열 "동일성" 및 "보존적 변화"를 포함한다. 특정한 실시형태에 따라 보존적 변화는 무시되고, % 서열 유사성은 % 서열 동일성을 나타낸다.

[0038] 용어 "서열 동일성"은 숙련가에게 알려져 있다. 2개의 아미노산 서열 또는 2개의 핵산 서열에 의해 공유된 서열 동일성의 정도를 측정하기 위하여, 서열은 최적의 비교 목적을 위하여 정렬된다(예를 들면, 짧은 제2 아미노산 또는 핵산 서열과의 최적 정렬에 대하여 제1 아미노산 또는 핵산 서열의 서열로 도입될 수 있음). 이러한 정렬은 완전 길이의 서열을 비교하면서 수행될 수 있다. 대체적으로, 정렬은 더 짧은 비교 길이, 예를 들면, 약 20, 약 50, 약 100 또는 그 이상의 핵산/염기 또는 아미노산에 대하여 수행될 수 있다.

[0039] 그 다음, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오타이드 위치에서 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드를 비교한다. 제1 서열에서 위치가 제2 서열에서 상응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드에 의해 점유되는 경우, 분자는 그 위치에서 동일하다. 서열 사이에 공유된 동일성의 정도는 전형적으로 서열 사이의 퍼센트 동일성의 관점에서 표시되고, 서열에서 동일한 잔기에 의해 공유된 동일한 위치의 수의 함수(즉, % 동일성 = 상응하는 위치에서 동일한 잔기의 수/총 위치의 수 x 100)이다. 바람직하게는, 비교되는 2개의 서열은 동일하거나 실질적으로 동일한 길이이다.

[0040] "보존적 변화"의 퍼센트는 서열 동일성의 퍼센트와 유사하게 측정될 수 있다. 그러나, 이러한 경우에 원래 잔기의 기능성 성질을 거의 보존하는 것으로 보이는 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열의 특이적 위치에서의 변화는 변화가 일어나지 않는 것으로 기록된다.

[0041] 아미노산 서열에 있어서 관련 기능성 성질은 아미노산의 물리-화학적 성질이다. 본 발명의 폴리펩타이드에서 아미노산에 대한 보존적 치환은 아미노산이 속한 부류의 다른 일원으로부터 선택될 수 있다. 예를 들면, 특정한 크기 또는 특징(예를 들면, 전하, 소수성 및 친수성)을 갖는 아미노산의 그룹화에 속하는 아미노산이, 특히 생물학적 활성과 직접적으로 연관되지 않은 단백질의 영역에서, 단백질의 활성을 실질적으로 변경하지 않고 또 다른 아미노산에 의해 치환될 수 있다는 것이 단백질 생화학 분야에 잘 알려져 있다(예를 들면, 문헌[Watson, et al., Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224(4th Edition 1987)] 참조). 예를 들면, 무극성(소수성) 아미노산은 알라닌, 류신, 이소류신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 크립토판, 및 티로신을 포함한다. 극성 중성 아미노산은 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함한다. 양성으로 하전된(염기성) 아미노산은 아르기닌, 리신 및 히스티딘을 포함한다. 음성으로 하전된(산성) 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 보존적 치환은, 예를 들면, 양성 전하를 유지하기 위하여 Arg를 Lys로 치환하거나 그 반대; 음성 전하를 유지하기 위하여 Asp를 Glu로 치환하거나 그 반대; 유리-OH가 유지되도록 Thr를 Ser로 치환하거나 그 반대; 유리-NH₂를 유지하기 위하여 Asn를 Gin로 치환하거나 그 반대를 포함한다.

[0042] 본 발명의 CD70 결합 펩타이드의 아미노산 서열에서 예시적인 보존적 치환은 다음과 같이 하기 기재된 것들에

따라 만들어질 수 있다:

표 2

예시적인 보존적 아미노산 치환

원래 잔기	보존적 치환
Ala(A)	Gly; Ser
Arg(R)	Lys, His
Asn(N)	Gln; His
Asp(D)	Glu; Asn
Cys(C)	Ser; Ala
Gln(Q)	Asn
Glu(E)	Asp; Gln
Gly(G)	Ala
His(H)	Asn; Gln
Ile(I)	Leu; Val
Leu(L)	Ile; Val
Lys(K)	Arg; His
Met(M)	Leu; Ile; Tyr
Phe(F)	Tyr; Met; Leu
Pro(P)	Ala
Ser(S)	Thr
Thr(T)	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe
Tyr(Y)	Trp; Phe
Val(V)	Ile; Leu

[0043]

[0044]

뉴클레오타이드 서열에 있어서 관련 기능성 성질은 단지 특정한 뉴클레오타이드가 전사 및/또는 번역 기구와 관련하여 서열의 오픈 리딩 프레임 내에 포함된다는 생물학적 정보이다. 유전자 코드가 축중(또는 중복)을 갖고, 다중 코돈이 이들이 코딩하는 아미노산에 관한 동일한 정도를 가질 수 있다는 것이 일반적인 지식이다. 예를 들면, 특정한 종에서 아미노산 류신은 UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG 코돈(또는 DNA에 있어서 TTA, TTG, CTT, CTC, CTA, CTG)에 의해 코딩되고, 아미노산 세린은 UCA, UCG, UCC, UCU, AGU, AGC(또는 DNA에 있어서 TCA, TCG, TCC, TCT, AGT, AGC)에 의하여 특정된다. 번역된 정보를 변경하지 않는 뉴클레오타이드 변화는 보존적 변화로 간주된다.

[0045]

숙련가는 상이한 수학적 알고리즘을 사용하는 몇몇 상이한 컴퓨터 프로그램이 서열 사이의 동일성을 측정하는데 이용 가능하다는 사실을 알 것이다. 예를 들면, 사용은 니들만(Needleman) 및 운쉬(Wunsch) 알고리즘(Needleman et al.(1970))을 사용하는 컴퓨터 프로그램으로 만들어 질 수 있다. 실시형태에 따라 컴퓨터 프로그램은 액셀리스(Accelrys) GCG 소프트웨어 패키지(액셀리스 인크(Accelrys Inc.), 미국 산디에고 소재)의 GAP 프로그램이다. 사용될 수 있는 치환 매트릭스는 예를 들면, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4의 갭 중량 및 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 길이 중량을 갖는 BLOSUM 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스이다. 숙련가는 모든 이들 상이한 파라미터가 살짝 상이한 결과를 수득할 것이지만, 상이한 알고리즘을 사용하는 경우, 2개의 서열의 전체 퍼센트 동일성이 유의미하게 변경되지 않는다는 것을 인식할 것이다.

[0046]

실시형태에 따라 2개의 뉴클레오타이드 서열 사이의 퍼센트 동일성은 액셀리스 GCG 소프트웨어 패키지(액셀리스 인크, 미국 산디에고 소재)의 GAP 프로그램을 사용하여 측정된다. NWSgapdna CMP 매트릭스 및 40, 50, 60, 70, 또는 80의 갭 중량 및 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 길이 중량이 사용된다.

[0047]

또 다른 실시형태에 있어서, 2개의 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열의 퍼센트 동일성은 이 메이어스(E. Meyers) 및 더블유 밀러(W. Miller)의 알고리즘(Meyers et al .(1989))을 사용하여 측정되고, 이는 PAM120 중량 잔기 테이블, 12의 갭 길이 패널티 및 4의 갭 패널티를 사용하여 ALIGN 프로그램(버전 2.0)(진스트림 서버 IGH 몬트펠리에 프랑스(Genestream server IGH Montpellier France)의 서열 데이터를 사용하여 ALIGN 쿼리(Query)에서 이용 가능함, <http://xylian.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>)로 도입된다.

[0048] 본 발명에 있어서 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 사이의 퍼센트 동일성 및/또는 유사성을 측정하는데 BLAST(Basic Local Alignment Tool)를 사용하는 것이 가장 바람직하다.

[0049] 알출(Altschul) 외(1990)의 BLASTn, BLASTp, BLASTx, tBLASTn 및 tBLASTx 프로그램을 사용한 쿼리는 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov]를 통해 접근 가능한 BLAST의 온라인 버전을 통해 포스팅될 수 있다. 대안적으로 NCBI 인터넷 사이트를 통해 또한 다운로드 가능한 BLAST의 단독형 버전(예를 들면, 버전 2.2.29(2014년 1월 3일 배포))이 사용될 수 있다. 바람직하게는 BLAST 쿼리는 하기 파라미터로 수행한다. 아미노산 서열 사이의 퍼센트 동일성 및/또는 유사성을 측정하기 위하여: 알고리즘: blastp; 워드 크기: 3; 매트릭스 점수화: BLOSUM62; 갭 코스트: 존재: 11, 확장: 1; 조성 조절: 조건적인 조성 스코어 매트릭스 조절; 필터: 오프; 마스크: 오프. 뉴클레오타이드 서열 사이의 퍼센트 동일성 및/또는 유사성을 측정하기 위하여: 알고리즘: blastn; 워드 크기: 11; 쿼리 범위에서 최대 매치: 0; 매치/미스매치 스코어: 2, -3; 갭 코스트: 존재: 5, 확장: 2; 필터: 저 복잡도 영역; 마스크: 탐색표만을 위한 마스크.

[0050] "보존적 변화"의 퍼센트는 지시된 알고리즘 및 컴퓨터 프로그램의 도움으로 서열 동일성의 퍼센트에 유사한 것으로 측정될 수 있다. 몇몇 컴퓨터 프로그램, 예를 들면, BLASTp는 양성(= 유사성)의 수/퍼센트 및 동일성의 수/퍼센트를 나타낸다. 보존적 변화의 퍼센트는 양성/유사성의 퍼센트로부터 동일성의 퍼센트를 차감함으로써 이로부터 유래될 수 있다(퍼센트 보존적 변화 = 퍼센트 유사성 - 퍼센트 동일성).

[0051] 숙련가는 본 발명의 항체는 다수의 항원 결합 부위를 포함할 것이라는 것을 이해할 것이다. 선택된 V_H 및 V_L 도메인의 아미노산 서열의 프레임워크 서열은 CDR 서열과 함께 항원 결합 부위에서 조합된다. 본 발명에 의해 구상된 V_H 및 V_L 도메인으로부터의 프레임워크 서열의 특이적 조합은 하기 표 3에 표시되고, 여기서 "X"는 구상된 V_H 및 V_L 도메인의 조합의 위치를 나타낸다.

표 3

프레임워크 서열의 V_H 및 V_L 조합

		V_H 서열 번호								
V_L 서열 번호		12	14	16	18	32	34	36	38	40
	30	X	X	X	X	X	X	X	X	X

[0052] 이들 V_H 및 V_L 도메인으로부터의 프레임워크 서열의 조합은 인간 APRIL에 대한 기능성 결합을 갖는 항체를 야기한다. 추가로 실험 부문에서 추가로 나타내는 바와 같이, 본 발명의 발명자에 의해 수행된 시험에서, 본 발명의 V_H 서열과 서열번호 30의 V_L 서열(VL15)을 조합하는 경우, APRIL 결합 기능성을 갖는 항체만이 오직 수득되었다는 것을 주의하여야 한다. 선택된 V_H 서열과 다른 V_L 서열(VL10 내지 VL14)의 시험된 조합에서, 수득된 항체는 기능성 APRIL 결합 성질을 갖지 않았다. 본 발명에 따라 사용된 V_H 및 V_L 서열의 조합의 추가의 놀라운 효과는 실험 부문에서 나타난 바와 같은 hAPRIL.01A V_H 및 V_L 서열을 갖는 항체와 비교하여 개선된(열적) 안정성이다.

[0053] 서열번호 30의 V_L 프레임워크 서열과 서열번호 18 또는 이로부터 유래된 서열, 예를 들면, 서열번호 32, 34, 36, 38, 40의 V_H 프레임워크 서열의 조합이 바람직하다. 이들 바람직한 조합은 표 3에서 밑줄 친 "X"로 표시된다. 서열번호 30으로부터의 V_L 프레임워크 서열과 서열번호 40으로부터의 V_H 프레임워크 서열의 가장 바람직한 조합은 굵은(그리고 밑줄 친) 폰트의 "X"로 표 3에 표시된다. 놀랍게도 이들 V_L 및 V_H 프레임워크 서열의 조합은 인간 APRIL 표적에 대한 유익한 안정성 특징 및/또는 개선된 결합을 포함하는, 추가로 유리한 특징을 갖는 항체를 야기한다는 것이 확인되었다.

[0054] 특정한 실시형태에 따라 V_H 도메인에서 CDR1, CDR2, CDR3 중 적어도 하나는 각각 서열번호 5, 6, 7, 또는 상기 서열의 임의의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는 V_H 도메인에서, CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 서열번호 5, 6, 7, 또는 상기 서열의 임의의 변이체로부터 선택된다. 이들 V_H 도메인 CDR 서열은 hAPRIL.01A의 V_H 도메인 CDR에 상응한다.

[0055] 특정한 실시형태에 따라 V_L 도메인에서 CDR1, CDR2, CDR3 중 적어도 하나는 각각 서열번호 8, 9, 10, 또는 상기

서열의 임의의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는 V_L 도메인에서 CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 서열번호 8, 9, 10, 또는 상기 서열의 임의의 변이체로부터 선택된다. 이들 V_L 도메인 CDR 서열은 hAPRIL.01A의 V_L 도메인 CDR에 상응한다.

[0057] 특정한 실시형태에 따라 항체의 항원 결합 부위에서 V_H 도메인 CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 서열번호 5, 6, 7, 또는 상기 서열의 임의의 변이체로부터 선택되고, V_L 도메인 CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 서열번호 8, 9, 10, 또는 상기 서열의 임의의 변이체로부터 선택된다.

[0058] 본 발명의 발명자는 놀랍게도 추가의 개선이 본 발명에서 사용되는 V_H 및 V_L 프레임워크 서열을 조합하는 항체로 만들어질 수 있다는 것을 확인하였다. 특히 V_H 아미노산 서열에서 치환 R72S는 인간 APRIL에 대한 개선된 결합을 야기한다.

[0059] V_H 아미노산 서열에서 추가로 조합된 치환 R67K-V68A는 또한 인간 APRIL에 대한 개선된 결합을 야기한다. 특정한 실시형태에 따라 본 발명은 따라서 V_H 아미노산 서열에서 위치 72에서 아미노산은 S인 항체에 관한 것이다. 서열번호 32, 34, 36, 38, 40의 V_H 아미노산 서열은 위치 72에서 S 잔기를 갖는 이러한 V_H 아미노산 서열의 예이다. 다른 실시형태에 따라 본 발명은 V_H 아미노산 서열에서 위치 67에서 아미노산이 K이고, 위치 68에서 아미노산이 A인 항체에 관한 것이다. 모든 3개의 아미노산 치환 R72S, R67K 및 V68A의 조합은 또한 본 발명 내에 구상된다. 따라서 다른 실시형태에 따라 본 발명은 V_H 아미노산 서열에서 위치 72에서 아미노산이 S이고, 위치 67에서 아미노산이 K이고, 위치 68에서 아미노산이 A인 항체에 관한 것이다.

[0060] V_H 및 V_L 도메인을 제외하고, 항체는 도메인, 예를 들면, 적합한 수의 C_H 도메인 및 적합한 수의 C_L 도메인을 추가로 포함할 수 있다. C_H 도메인 및 C_L 도메인은 인간 기원일 수 있다. 이러한 도메인은 또한 변형된(또는 차단된) Fc 영역을 갖는 항체를 제공하여 변경된 효과기 기능을 제공하는 도메인을 포함한다. 예를 들면, 미국 특허 제5,624,821호; 제W02003/086310호; 제W02005/120571호; 제W02006/0057702호; 문헌[Presta, 2006, *Adv. Drug Delivery Rev.* 58:640-656]; [Vincent and Zurini, *Biotechnol. J.*, 2012, 7:1444-50]; [Kaneko and Niwa, *Biodrugs*, 2011, 25: 1-11]을 참조한다. 이러한 변형은 진단 및 치료에 가능한 유리한 효과와 함께 면역계의 다양한 반응을 강화시키거나 억제시키는데 사용될 수 있다. Fc 영역의 대체물은 아미노산 변화(치환, 결실 및 삽입), 글리코실화 또는 탈글리코실화, 및 다중 Fc 첨가를 포함한다. 특정한 실시형태에 따라 감소된 Fc 효과기 기능을 나타내는 Fc 영역을 사용하는 것이 바람직하다. 특정한 실시형태에 따른 본 발명의 항체는 또한 인간 IgG4로부터 유래된 Fc 영역 및/또는 N297Q 글리코실화 결핍 돌연변이를 갖는 Fc 영역을 가질 수 있다. C_L 도메인은 인간 카파 또는 람다 불변 도메인으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 인간 카파 C_L 도메인이 사용된다.

[0061] 본 발명의 특정한 실시형태에 따라, Fc 및 C_L 도메인을 포함하는 항체가 제공되고, 여기서 V_H 도메인 아미노산 서열은 서열번호 42, 44, 46, 48, 52, 바람직하게는 서열번호 48 또는 52, 가장 바람직하게는 서열번호 52로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 70% 서열 유사성을 갖는 중쇄 아미노산 서열이고, V_L 도메인 아미노산 서열은 서열번호 50으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 70% 서열 유사성을 갖는 경쇄 아미노산 서열이다.

[0062] 본 발명에 의해 구상된 이들 중쇄 및 경쇄의 특이적 조합은 하기 표 4에 나타난 바와 같고, 여기서 "X"는 구상된 중쇄 및 경쇄의 조합의 위치를 나타낸다.

표 4

		중쇄 서열 번호				
경쇄 서열 번호		42	44	46	48	52
	50	X	X	X	X	X

[0063]

[0064] 바람직한 조합은 밑줄 친 "X"로 표시된다. 더욱 바람직한 조합은 굵은(그리고 밑줄 친) 폰트의 "X"로 표시된다.

- [0065] 추가의 측면에 따라, 본 발명은 본 발명에 따른 항체의 V_H 도메인 및/또는 V_L 도메인을 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다. V_H 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 바람직하게는 서열번호 11, 13, 15, 17, 31, 39, 41, 43, 45, 47, 51, 바람직하게는 서열번호 17, 31, 39, 47 또는 51, 더욱 바람직하게는 서열번호 51로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 서열 유사성을 갖는 폴리뉴클레오타이드 서열이다. V_L 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 바람직하게는 서열번호 29 또는 49, 바람직하게는 서열번호 49로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 서열 유사성을 갖는 폴리뉴클레오타이드 서열이다.
- [0066] 본 발명은 추가로 적합한 조절 서열의 제어 하에 본 발명에 따른 다수의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 다수의 발현 벡터를 포함하는 발현 유닛에 관한 것이고, 여기서 폴리뉴클레오타이드의 수는 본 발명에 따른 항체의 V_H 도메인 및 V_L 도메인을 인코딩한다. 발현 유닛은 V_H 도메인에 대한 폴리뉴클레오타이드 서열 코딩 및 V_L 도메인에 대한 폴리뉴클레오타이드 서열 코딩이 동일한 발현 벡터일 수 있도록 설계될 수 있다. 따라서 발현 유닛은 단일 벡터를 포함할 수 있다. 대안적으로 V_H 도메인에 대한 폴리뉴클레오타이드 서열 코딩 및 V_L 도메인에 대한 폴리뉴클레오타이드 서열 코딩은 상이한 발현 벡터일 수 있다. 이러한 실시형태에 있어서 발현 유닛은 복수의, 예를 들면, 2개의 발현 벡터를 포함할 것이다.
- [0067] 본 발명의 추가의 측면은 본 발명의 다수의 폴리뉴클레오타이드 및/또는 본 발명의 발현 유닛을 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 발현 유닛은 바람직하게는 V_H 도메인에 대한 폴리뉴클레오타이드 서열 코딩 및 V_L 도메인에 대한 폴리뉴클레오타이드 서열 코딩을 둘 다 포함하는 발현 벡터를 포함하는 발현 유닛이다.
- [0068] 본 발명의 항체는 하기 중 임의의 하나일 수 있다:
- [0069] - 키메라 항체 또는 이의 단편;
- [0070] - 인간화 항체 또는 이의 단편; 또는
- [0071] - Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂, 이중특이성 mAb 및 다이아바디(diabody)로 이루어진 군으로부터 선택된 항체 단편. hAPRIL.01A의 CDR을 기반으로 한 다수의 항원 결합 부위를 포함하는 인간화 항체를 바람직하다. 본 발명에 따라 선택된 프레임워크 영역은 인간 기원으로부터 유래되고, 따라서 인간화 항체를 수득하는데, 특히 인간 기원으로부터의 불변 영역과 조합되는 경우에 적합하게 사용될 수 있다는 것에 주목할 수 있다.
- [0072] 이의 추가의 측면에 따라, 본 발명은 본 발명의 항체를 제조하는 방법으로서,
- [0073] a) 본 발명의 다수의 폴리뉴클레오타이드 및/또는 본 발명의 발현 유닛을 포함하는 숙주 세포를 배양 배지에서 폴리뉴클레오타이드가 발현되는 조건하에 배양하여 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 제조하는 단계; 및
- [0074] b) 폴리펩타이드를 숙주 세포 또는 배양 배지로부터 회수하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0075] 본 발명은 추가로 본 발명의 항체를 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제와 조합하여 포함하는 조성물에 관한 것이다. 이러한 조성물은 하나의 실시형태에 있어서 하나 이상의 항체를 포함할 수 있다. 하나의 실시형태에 있어서, 조성물은 본 발명의 하나 이상의 항체 이외에 하나 이상의 다른 활성 화합물을 포함한다. 이러한 조합 조성물은, 예를 들면, 암의 치료에서 병용 요법에 사용될 수 있다. 이런 경우에 항체는 하나 이상의 일반적인 항암 약물과 조합될 수 있다. 다른 병용 요법에 있어서 다른 추가의 활성 화합물이 사용될 수 있다. 병용 요법에 있어서 동일한 조성물 중에 둘 이상의 활성 화합물을 갖는 것이 의무적이지는 않다. 따라서, 또한 본 발명의 부분은 항체 및 다른 활성 화합물의 조합되거나 후속적인 사용이고, 여기서 항체 및 다른 활성 화합물은 동시에 또는 순차적으로 투여된다.
- [0076] 상기 기재로부터 명백한 바와 같이, 본 발명의 항체는 치료 및 진단, 및 다른 비치료적 목적에 사용될 수 있다. 본 발명은 따라서 추가로 치료 및 진단 및 다른 비치료적 목적에 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다.
- [0077] 하나의 실시형태에 있어서, 요법은 면역 세포 증식 및/또는 면역 세포 생존의 억제를 포함한다. 또 다른 실시형태에 있어서 치료는 암의 치료를 목표로 한다. 하나의 실시형태에 있어서, 요법은 자가면역 질환의 치료를 포함한다. 하나의 실시형태에 있어서, 요법은 염증성 질환의 치료를 포함한다. 하나의 실시형태에 있어서, 요법은 Ig 분비 매개된 질환, 특히 IgA 분비 매개된 질환의 치료를 포함한다. 본 발명의 항체의 치료적 사용은 하기 더

욱 상세하게 논의될 것이다.

[0078] 본 발명의 항체는 비치료적 적용에서 사용되는 경우, 예를 들면, 시험관내 또는 생체외 기술로, 예를 들면, 유세포 분석법, 예를 들면, 웨스턴 블롯팅, 효소 결합 면역 흡착 분석법(ELISA) 및 면역조직화학에서 적용될 수 있다.

[0079] **요법**

[0080] 본 발명의 항체가 hAPRIL.01A에 유사한 인간 APRIL에 결합한다는 사실의 관점에서, 본 발명의 항체는 상기 논의된 개선과 함께 실험 부문에서 hAPRIL.01A에 유사한 요법에서 사용하기에 적합하다. 따라서, 본 발명의 항체는 BCMA 및/또는 TACI와 인간 APRIL의 상호작용을 차단함으로써 완화되는 것으로 알려지거나 예상된 병태의 치료에 적합하다. 당해 분야에 이미 알려진 바와 같이, BCMA 및/또는 TACI와 인간 APRIL의 상호작용을 차단하는 것은 면역 세포 증식 및/또는 생존을 억제하고, 따라서 이러한 면역 세포 증식 및/또는 생존의 차단이 유익한 병태, 예를 들면, 염증성 질환, Ig 분비 및/또는 자가면역 질환에 의해 매개되는 질환에 가치가 있다. BCMA 및/또는 TACI와 인간 APRIL의 상호작용을 차단하는 것은 또한 암의 치료에 유익할 수 있다.

[0081] 본 발명의 항체가 유익할 수 있는 자가면역 병태는 다발성 경화증, 류머티즘성 관절염, 1형 당뇨병, 건선, 크론 병 및 다른 염증성 장 질환, 예를 들면, 궤양성 대장염, 전신성 홍반성 루푸스(SLE), 자가면역 뇌척수염, 중증 근無力증(MG), 하시모토 갑상선염, 굿패스처 증후군, 수포창, 그레이브스병, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 혈소판감소성 자반증, 항콜라겐성 항체를 갖는 경피증, 혼합 결합 조직병, 다발성근염, 악성 빈혈, 특발성 애디슨병, 자가면역 연관 불임, 사구체신염, 반월형 사구체신염, 증식성 사구체신염, 수포성 유선포창, 쇼그렌 증후군, 건선성 관절염, 인슐린 저항성, 자가면역 진성 당뇨병, 자가면역 간염, 자가면역 혈우병, 자가면역 림프구 증식 증후군(ALPS), 자가면역 간염, 자가면역 혈우병, 자가면역 림프구증식 증후군, 자가면역 포도막망막염, 길랑 바레 증후군, 동맥경화증 및 알츠하이머병으로부터 선택될 수 있다.

[0082] 추가로, 본 발명의 항체는 또한 면역 반응의 저하가 유익한 다른 관련 병태, 예를 들면, 이식 (graft/transplant) 거부 또는 알레르기 병태의 치료에 유익할 수 있다.

[0083] 또한, 본 발명의 항체는 면역글로불린 수준, 예를 들면, IgA1 또는 IgA2를 포함한 IgA, IgG, IgM 수준의 저하가 유익한 다른 병태, 예를 들면, Ig 분비, 특히 IgA 분비, Ig 과잉 생산, 예를 들면, IgA1 또는 IgA2를 포함하는 IgA, IgG, IgM 과잉 생산, 특히 IgA 과잉 생산, 또는 Ig 퇴적, 특히 IgA 퇴적과 관련된 병태의 치료에 유익할 수 있다. 이러한 병태의 예는 IgA 신증 및 사구체신염의 다른 형태, 소아 지방변증, 유선포창 질환, 헤노흐 쉐라인 자반병, 및 Ig 퇴적과 연관된 다른 자가면역 질환을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0084] 본 발명 내에서 "병태"의 치료는 항-인간 APRIL 항체의 예방학적 및 치료적 사용을 포함한 임의의 치료적 사용을 포함한다. 따라서 용어 "병태"는 질환 상태이지만 또한 생리학이 유해한 상태로 변경되지 않는 예방적 환경에서 생리학적 상태를 의미할 수 있다.

[0085] 본 발명 내의 암은 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 골수아세포 전골수세포, 골수단핵구 단핵구 적백혈병, 만성 백혈병, 만성 골수성(과립구) 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 맨틀 세포 림프종, 원발성 중추 신경계 림프종, 버키트 림프종 및 변연부 B 세포 림프종, 진성 다혈구증 림프종, 호지킨병, 비호지킨병, 다발성 골수종, 발텐스트롬 거대글로불린증, 증쇄병, 고형 종양, 육종, 및 암종, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골원성 육종, 골육종, 척삭종, 맥관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 윤활막종, 중피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 육종, 결장직장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선암종, 한선 암종, 피지선 암종, 유두상 암종, 유두상 선암종, 낭선암종, 속질 암종, 기관지원성 암종, 신장 세포 암종, 간암, 담관 암종, 용모막암종, 고환종, 배아 암종, 윌름 종양, 자궁경부암, 자궁암, 고환 종양, 폐 암종, 소세포 폐 암종, 비-소세포 폐 암종, 방광 암종, 상피암종, 신경교종, 성상세포종, 속질모세포종, 두개인두종, 뇌교종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 희돌기교종, 수막종, 흑색종, 신경아세포종, 망막아종, 코인두 암종, 식도 암종, 기저 세포 암종, 담도암, 방광암, 골암, 뇌 및 중추 신경계(CNS) 암, 자궁경부암, 용모막암종, 결장직장암, 결합조직 암, 소화계 암, 자궁내막암, 식도암, 안암, 두경부암, 위암, 상피내 신생물, 신장암, 후두암, 간암, 폐암(소세포, 대세포), 흑색종, 신경아세포종; 구강암(예를 들면, 입술, 혀, 입 및 인두), 난소암, 췌장암, 망막아종, 횡문근육종, 직장암; 호흡계의 암, 육종, 피부암, 위암, 고환암, 갑상선암, 자궁암, 및 비뇨계의 암을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 특정하게 흥미있는 암은 APRIL을 발현하는 세포, 예를 들면, B-세포 유래된 악성종양, 림프성 또는 결장 또는 폐 암종 또는 다발성 골수종(MM) 또는 만성 림프구성 백혈병(CLL) B 세포를 갖는 암이다.

- [0086] 상기 언급된 임의의 병태의 치료를 목적으로, 본 발명의 항체는 대상체에게 직접적으로, 단독으로 또는 다른 치료제와의 조합으로 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명의 특정한 실시형태에 따라 이의 사용 및/또는 조성물 중에서 본 발명의 항체는 다발성 골수종(MM), 골수이형성 증후군(MDS), 발덴스트롬 거대글로불린증, B-CLL, 미만성 거대 세포 B 세포 림프종, 비호지킨 림프종 및 베게너 육아종증을 치료하는데 사용되는 다수의 치료제, 예를 들면, 멜팔란, 빈크리스틴, 플루다라빈, 클로람부실, 벤다무스틴, 에토포사이드, 독소루비신, 사이클로포스파마이드, 시스플라틴과 조합될 수 있다. 추가로, 이의 사용 및/또는 조성물 중에서 본 발명의 항체는 다수의 면역 조절제, 예를 들면, 코르티코스테로이드(덱사메타손, 프레드니솔론), 탈리도마이드 유사체(탈리도마이드, 레날리도마이드, 포말리도마이드)와 조합될 수 있다. 또한 이의 사용 및/또는 조성물 중에서 본 발명의 항체는 다수의 표적화된 키나제 억제제, 예를 들면, 이브루티닙, 이텔라리십과 조합될 수 있다. 추가로, 이의 사용 및/또는 조성물 중에서 본 발명의 항체는 CD20을 표적화하는 다수의 항체 요법, 예를 들면, 리툭시맙, 오파투무맙, 오비노투주맙; 또는 CD52를 표적화하는 항체 요법, 예를 들면, 알렘투주맙; 또는 CD38을 표적화하는 항체 요법, 예를 들면, 다라투무맙; 또는 IL-6 또는 IL-6 수용체를 표적화하는 항체 요법(예를 들면, 사릴루맙, 토실리루맙); 또는 CS-1을 표적화하는 항체 요법(예를 들면, 엘로투주맙); 또는 BCMA를 표적화하는 항체 요법(예를 들면, GSK2857916); 또는 BAFF 또는 Blyss를 표적화하는 항체 요법(예를 들면, 타발루맙)과 조합될 수 있다. 추가로, 이의 사용 및/또는 조성물 중의 본 발명의 항체는 다수의 비스포스포네이트(예를 들면, 파미드로네이트, 졸렌드론산)과 조합될 수 있다. APRIL가 MM 세포를 IL-6 박탈, 덱사메타손 및 보르테조미드 치료로부터 보호한다는 것이 이전에 기재되어 있다(Moreaux et al., 2004, *Blood* 103(8): 3148-57; Li et al., 2010, *Med Oncol.* 27:439-45). hAPRIL.01A는 레날리도마이드 및 덱사메타손 치료에서 MM 세포의 APRIL 매개된 생존을 역전시키는 것으로 나타났다(Tai et al., 2014, ASH poster 2098). 당해 분야에서 이러한 발견의 관점에서, 본 발명의 항체는 특히 이의 사용 및/또는 조성물 중에서 코르티코스테로이드, 예를 들면, 덱사메타손, 프레드니솔론, 바람직하게는 덱사메타손, 또는 탈리도마이드 유사체, 예를 들면, 탈리도마이드, 레날리도마이드, 포말리도마이드, 특히 레날리도마이드, 또는 보르테조미드로부터 선택된 추가의 치료제와 조합될 수 있다.
- [0087] **진단**
- [0088] APRIL이 질환, 예를 들면, 이로써 한정되지는 않지만, 자가면역 질환, 염증성 질환 및 악성종양을 위한 중요한 마커를 나타내기 때문에, 인간 대상체의 혈청 및/또는 조직 중의 APRIL 검출은 중요하다. 진단 적용을 위하여, 항체는 전형적으로 검출 가능한 잔기로 라벨링(직접적으로 또는 간접적으로)될 것이다. 일반적으로 하기 카테고리 그룹화될 수 있는 많은 라벨들이 이용 가능하다: 비오틴, 플루오로크롬, 방사성뉴클레오타이드, 효소, 요오드, 및 생합성 라벨.
- [0089] 상이한 환자의 범위의 혈청 및 다른 체액 및/또는 조직 중에 존재하는 가용성 APRIL은 환자의 질환 중증도와 연관이 있는 것으로 보였다. 예를 들면, 만성 림프구성 백혈병(CLL), 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종(NHL) 및 다발성 골수종(MM), DLBCL 환자(NHL), 결장직장암, SLE, 광범위한 전신성 면역 기반 류머티즘성 질환(현재 쇼그렌 증후군, 라이터 증후군, 건선성 관절염, 다발근육염 및 강직성 척추염을 포함 포함함) 및 아토피성 피부염을 겪는 환자는 가용성 APRIL의 혈청 수준이 극적으로 증가하였다. 추가로, IgA 신증을 겪고 있는 환자에서 혈청 APRIL 수준이 상승한다(McCarthy et al., 2011, *J. Clin. Invest.* 121(10): 3991-4002). 또한, 혈청 APRIL 수준은 혈청 APRIL 수준은 패혈증에서 상승하고 심각하게 아픈 환자에서 사망을 예상한다(Jonsson et al., 1986, *Scand J Rheumatol Suppl* 61, 166-9; Roschke et al., 2002, *J Immunol* 169, 4314-21). hAPRIL.01A의 증명된 결합 특성을 기반으로, 본 발명의 항체는 체액 및/또는 조직에서 가용성 APRIL을 검출하는 진단적 도구로서 사용될 수 있다.
- [0090] 본 발명의 항체는 임의의 공지된 분석 방법, 예를 들면, 경쟁 결합 분석, 직접 및 간접 샌드위치 분석, 및 면역침전 분석에서 사용될 수 있다(Zola, *Monoclonal Antibodies, A Manual of Techniques*, pp.147-158(CRC Press, Inc. 1987)).
- [0091] 본 발명의 항체는 또한 생체내 진단 분석에 사용될 수 있다. 일반적으로, 항체는 이를 발현하는 항원 또는 세포가 면역신티그래피 또는 양전자 방사 단층 촬영을 사용하여 편재될 수 있도록 방사성핵종으로 라벨링된다.
- [0092] **비치료적 용도**
- [0093] 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 항체는 다른 비치료적 용도를 갖는다. 본 발명의 항체에 있어서 비치료적 용도는 유세포 분석법, 웨스턴 블롯팅, 효소 결합 면역 흡착 분석법(ELISA) 및 면역조직화학을 포함한다.
- [0094] 본 발명의 항체는, 예를 들면, 고정화를 통해 단백질 A-세파로스 컬럼에 대한 친화력 정제 시약으로서 사용될

수 있다.

[0095] **일반적인 정의**

[0096] 용어 "항체"는, 예를 들면, 이의 수용체에 대한 리간드의 결합을 억제하거나, 또는 수용체의 리간드-유도된 신호전달을 억제함으로써 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 임의의 형태의 항체를 나타낸다. 본 발명의 경우에서 생물학적 활성은 이의 수용체 BCMA 및/또는 TACI에 대한 APRIL의 결합을 차단하는 것을 포함한다. 따라서, "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 특히, 예를 들면, 듀오바디(Duobody)(등록상표) 기술(젠맵(Genmab)) 또는 헥사바디(Hexabody)(등록상표) 기술(젠맵) 또는 항체 단편을 기반으로 한 단일클론 항체(완전한 길이의 단일클론 항체 포함) 및 다중특이적 항체(예를 들면, 이중특이성 항체)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0097] "항체 단편" 및 "항체 결합 단편"은 모 항체의 항원 결합 또는 가변 영역(예를 들면, 하나 이상의 CDR)의 적어도 일부분을 전형적으로 포함하는, 항체의 항원-결합 단편을 의미한다. 항체 단편은 모 항체의 결합 특이성의 적어도 일부를 유지한다. 전형적으로, 항체 단편은 모 결합 활성의 적어도 10%를 유지하고, 이때 이러한 활성은 몰 기준으로 표현된다. 바람직하게는, 항체 단편은 표적에 대한 모 항체의 결합 친화력의 적어도 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100% 이상을 유지한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편; 다이아바디; 선형 항체; 단일쇄 항체 분자, 예를 들면, sc-Fv, 유니바디(unibody)(젠맵으로부터의 기술); 나노바디(nanobody)(애블링스(Ablynx)로부터의 기술); 도메인 항체(도만티스(Domantis)로부터의 기술); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 조작된 항체 변이체가 문헌[Holliger and Hudson, 2005, Nat. Biotechnol. 23:1126-1136]에서 검토된다.

[0098] "Fab 단편"은 1개의 경쇄, 및 1개의 중쇄의 CH1 및 가변 영역으로 구성된다. Fab 분자의 중쇄는 또 다른 중쇄 분자와 다이설파이드 결합을 형성할 수 없다.

[0099] "Fc" 영역은 항체의 C_H1 및 C_H2 도메인을 포함하는 2개의 중쇄 단편을 함유한다. 2개의 중쇄 단편은 2개 이상의 다이설파이드 결합 및 C_H3 도메인의 소수성 상호작용에 의해 함께 유지된다.

[0100] "Fab' 단편"은 1개의 경쇄, 및 V_H 도메인 및 C_H1 도메인을 함유하고, F(ab')₂ 분자를 형성하기 위해 2개의 Fab' 단편의 2개의 중쇄 사이에 사슬간 다이설파이드 결합이 형성될 수 있도록 C_H1 도메인과 C_H2 도메인 사이의 영역을 또한 함유하는 1개의 중쇄의 일부분을 함유한다.

[0101] "F(ab')₂ 단편"은 2개의 경쇄, 및 2개의 중쇄 사이에 사슬간 다이설파이드 결합이 형성되도록 C_H1 도메인과 C_H2 도메인 사이의 불변 영역의 일부분을 함유하는 2개의 중쇄를 함유한다. 따라서 F(ab')₂ 단편은 2개의 중쇄 사이의 다이설파이드 결합에 의해 함께 유지되는 2개의 Fab' 단편으로 구성된다.

[0102] "Fv 영역"은 중쇄 및 경쇄 양쪽 모두로부터의 가변 영역을 포함하지만, 불변 영역은 결여된다.

[0103] "단일쇄 Fv 항체"(또는 "scFv 항체")는 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함하는 항체 단편을 지칭하고, 이때 이러한 도메인들이 단일 폴리펩타이드 사슬 내에 존재한다. 일반적으로, Fv 폴리펩타이드는 scFv가 항원 결합을 위한 원하는 구조를 형성할 수 있게 하는, V_H 도메인과 V_L 도메인 사이의 폴리펩타이드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 검토를 위해, 문헌[Pluckthun, 1994, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315]을 참조한다. 국제 특허 출원 공개 제WO 88/01649호 및 미국 특허 제4,946,778호 및 제5,260,203호를 또한 참조한다.

[0104] "다이아바디"는 2개의 항원-결합 부위가 있는 소형 항체 단편이다. 이러한 단편은 동일한 폴리펩타이드 사슬(V_H-V_L 또는 V_L-V_H) 내의 경쇄 가변 도메인(V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인(V_H)을 포함한다. 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 사이에 쌍이 형성되는 것을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인들이 또 다른 사슬의 상보적인 도메인과 쌍을 형성하도록 강요되고, 2개의 항원-결합 부위가 생성된다. 다이아바디는, 예를 들면, 제 EP 404,097호; 제WO 93/11161호; 및 문헌[Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448]에서 더욱 충분히 기재된다.

[0105] "듀오바디"는 정상 IgG 구조를 갖는 이중특이성 항체이다(Labrijn et al., 2013, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110(13): 5145-5150).

[0106] "헥사바디"는 규칙적인 구조 및 특이성을 보유한 채로 증가된 살해 능력을 가진 항체이다(Diebold et al.,

2014, Science 343(6176): 1260-3).

- [0107] "도메인 항체 단편"은 중쇄의 가변 영역 또는 경쇄의 가변 영역만 함유하는 면역학적으로 기능성인 면역글로불린 단편이다. 일부 경우에, 2개 이상의 V_H 영역이 펩타이드 링커로 공유결합으로 연결되어 2가 도메인 항체 단편이 생성된다. 2가 도메인 항체 단편의 2개의 V_H 영역은 동일한 항원 또는 상이한 항원을 표적화할 수 있다.
- [0108] 본 명세서에 사용되는 바와 같이 항체 hAPRIL.01A는 중쇄가 서열번호 55의 아미노산 서열을 갖고, 경쇄가 서열번호 56의 아미노산 서열을 갖는 마우스 항체이다.
- [0109] 예를 들면, 중쇄 사이의 다이설파이드 결합에서 정상적으로 수반되는 힌지 시스테인 중 적어도 1개가 숙련가가 이용가능한 공지된 방법으로 변경된 경우에, 본 발명의 항체 단편은 다이설파이드 결합 능력이 감소된 중쇄의 이량체화(또는 다량체화)를 허용하도록 불변 영역의 충분한 일부분을 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태에 있어서, 항체 단편, 예를 들면, Fc 영역을 포함하는 단편이 무손상 항체 내에 존재할 때 Fc 영역과 정상적으로 연관된 생물학적 기능, 예를 들면, FcRn 결합, 항체 반감기 조정, ADCC(항체 의존적 세포형 세포독성) 기능, 및/또는 보체 결합(예를 들면, 항체에 ADCC 기능 또는 보체 결합에 필요한 글리코실화 프로파일이 있는 경우) 중 하나 이상을 유지한다.
- [0110] 용어 "키메라" 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부분은 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 한편 사슬(들)의 나머지는 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체, 뿐만 아니라 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 이러한 항체의 단편 내의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 항체를 나타낸다(예를 들면, 미국 특허 제4,816,567호 및 문헌[Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855] 참조).
- [0111] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "인간화 항체"라는 용어는 비-인간(예를 들면, 무린) 항체, 뿐만 아니라 인간 항체로부터의 서열을 함유하는 항체 형태를 지칭한다. 이러한 항체는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유한다. 일반적으로, 인간화 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 면역글로불린의 것에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 면역글로불린 서열의 것인 적어도 1개, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이다. 인간화 항체는 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부분, 전형적으로는 인간 면역글로불린의 것을 선택적으로 또한 포함할 것이다. 본질적으로 인간화 형태의 설치류 항체는 모 설치류 항체와 동일한 CDR 서열을 포함할 것이지만, 친화력 증가, 인간화 항체의 안정성 증가 또는 기타 이유를 위해 특정 아미노산 치환이 포함될 수 있다.
- [0112] 본 발명의 항체는 변형된 효과기 기능을 제공하도록 Fc 영역이 변형(또는 차단)된 항체를 또한 포함한다. 예를 들면, 미국 특허 제5,624,821호; 제W02003/086310호; 제W02005/120571호; 제W02006/0057702호; 문헌[Presta, 2006, Adv. Drug Delivery Rev. 58:640-656]을 참조한다. 이러한 변형은 진단 및 요법에서의 가능한 이로운 효과와 함께 면역계의 다양한 반응을 강화하거나 억제하는데 사용될 수 있다. Fc 영역의 변형은 아미노산 변화(치환, 결실 및 삽입), 글리코실화 또는 탈글리코실화, 및 다중 Fc를 부가하는 것을 포함한다. Fc에 대한 변화는 치료 항체에서 항체 반감기를 또한 변경시킬 수 있고, 더 긴 반감기는 덜 빈번한 투약을 초래할 것이며, 이때 편리 증가 및 물질 사용 감소가 동반된다. 문헌[Presta, 2005, J. Allergy Clin. Immunol. 116:731, pp 734-35]을 참조한다.
- [0113] 본 발명의 항체는 또한 완전한 효과기 기능을 제공하는 무손상 Fc 영역이 있는 항체, 예를 들면, 아이소타입 IgG1의 항체를 포함하고, 이는 항체에 대한 표적과 연관된 세포에서 보체-의존적 세포독성(CDC) 또는 항체 의존적 세포형 세포독성(ADCC)을 유도한다.
- [0114] 보관 동안 항체 안정성을 개선하거나 또는 생체 내에서 항체 반감기를 증가시키는 분자에 항체가 접합(예를 들면, 공유결합으로 연결)될 수도 있다. 반감기를 증가시키는 분자의 예는 알부민(예를 들면, 인간 혈청 알부민) 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이다. 관련 분야에 주지된 기술을 사용하여 항체의 알부민-연결 및 PEG화 유도체가 제조될 수 있다. 예를 들면 문헌[Chapman, 2002, Adv. Drug Deliv. Rev. 54:531-545]; [Anderson and Tomasi, 1988, J. Immunol. Methods 109:37-42]; [Suzuki et al., 1984, Biochim. Biophys. Acta 788:248-255]; 및 [Brekke and Sandlie, 2003, Nature Rev. 2:52-62]을 참조한다.
- [0115] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "초가변 영역"은 항원-결합에 책임이 있는 항체의 아미노산 잔기를 나타낸다. 초가변 영역은 서열 정렬에 의해 정의된 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기, 예를 들면, 경쇄 가변 도메인에서 잔기 24-34(L1), 50-56(L2) 및 89-97(L3) 및 중쇄 가변 도메인에서 31-35(H1),

50-65(H2) 및 95-102(H3)(문헌[Rabat et al., 1991, Sequences of proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.] 참조) 및/또는 구조적으로 정의되는 바와 같은 "초가변 루프"(HVL)로부터의 이들 잔기, 예를 들면, 경쇄 가변 도메인에서 잔기 26-32(L1), 50-52(L2) 및 91-96(L3) 및 중쇄 가변 도메인에서 26-32(H1), 53-55(H2) 및 96-101(H3)(문헌[Chothia and Leskl, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917] 참조)을 포함한다.

[0116] "프레임워크" 또는 "FR" 잔기 또는 서열은 본 명세서에 정의된 바와 같은 CDR 잔기 이외의 이들 가변 도메인 잔기 또는 서열이다.

[0117] 특정한 실시형태에 따른 본 발명의 항체는 단리된 항체일 수 있다. "단리된" 항체는 이의 자연 환경의 성분을 확인하고 분리하고/분리하거나 이로부터 회수된 것이다. 이의 자연 환경의 오염 성분은 항체에 있어서 진단적 또는 치료적 사용을 방해할 물질이고, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 항체는 (1) 로우리(Lowry) 방법에 의해 측정된 바, 항체의 95 중량% 이상, 가장 바람직하게는 99 중량% 이상, (2) 스피닝 컵 배열결정장치의 사용에 의하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15 잔기를 획득하는데 충분한 정도, 또는 (3) 쿠마시 블루 또는, 바람직하게는, 은 염색을 사용하는 환원 또는 비환원 조건하에 SDS-PAGE에 의한 동질성으로 정제될 것이다. 분리된 항체는 항체의 자연 환경의 적은 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에 재조합 세포 내 원위치의 항체를 포함한다. 일반적으로, 그러나, 단리된 항체는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 수 있다.

[0118] "단리된" 핵산 분자는 적어도 하나의 오염 핵산 분자로부터 확인되고 분리된 핵산 분자이고, 이는 항체 핵산의 자연 공급원과 일반적으로 연관된다. 단리된 핵산 분자는 자연에서 발견된 형태 또는 설정과 상이한 것이다. 단리된 핵산 분자는 따라서 핵산 분자로부터 자연 세포에서 존재하는 바와 구별된다. 그러나, 단리된 핵산 분자는, 예를 들면, 핵산 분자가 천연 세포의 것과 상이한 염색체 위치에 있는 항체를 정상적으로 발현하는 세포 내에 포함된 핵산 분자를 포함한다.

[0119] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "단일클론 항체"라는 용어는 실질적으로 균질한 항체들의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하고, 즉 집단을 이루는 개별적인 항체들은 미량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 단일클론 항체는 단일 항원 부위에 대해 지시되어 고도로 특이적이다. 또한, 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체들을 전형적으로 포함하는 통상적인(다중클론) 항체 제제와 대조적으로, 각각의 단일클론 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 지시된다. "단일클론"이라는 수식어구는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된다는 항체의 특징을 가리키고, 임의의 특정 방법에 의해 항체 생산을 필요로 하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 예를 들면, 본 발명에 따라 사용될 단일클론 항체는 문헌[Kohler et al., 1975, Nature 256:495]에 최초로 기술된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다(예를 들면, 미국 특허 번호 제4,816,567호 참조). 문헌[Clackson et al., 1991, Nature 352:624-628] 및 [Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581-597]에, 예를 들면, 기술된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 "단일클론 항체"를 단리할 수도 있다. 본 명세서에서의 단일클론 항체는 구체적으로 "키메라" 항체를 포함한다.

[0120] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "면역 세포"는 조혈 기원이고 면역 반응에 역할을 하는 세포를 포함한다. 면역 세포는 림프구, 예를 들면, B 세포 및 T 세포, 자연 살해 세포, 골수 세포, 예를 들면, 단핵구, 대식세포, 호산백혈구, 비만 세포, 호염기성 세포, 및 과립구를 포함한다.

[0121] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "면역접합"은 치료적 모이어티, 예를 들면, 박테리아 독소, 세포독성 약물 또는 방사선독소에 접합된 항-인간 APRIL 항체, 또는 이의 단편을 나타낸다. 독소 모이어티는 당해 분야에서 이용 가능한 방법을 사용하여 본 발명의 항체에 접합될 수 있다.

[0122] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 서열 "변이체" 또는 "변이체 서열"은 모 분자의 생물학적 활성을 유지하면서 하나 이상의 아미노산 잔기에서 기재된 서열과 상이한 서열을 나타낸다. 본 발명은 다양한 서열에 의해 분명하게 기재된 항체의 변이체를 포함한다. V_H 도메인 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열에 있어서, 몇몇 실시형태에 따라, 변이체 서열은 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열에 대하여 종합적으로 6개 이상의 아미노산 치환, 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 유사하게 V_L 도메인 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열에 있어서, 몇몇 실시형태에 따라, 변이체 서열은 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열에 대하여 종합적으로 6개 이하의 아미노산 치환, 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[0123] "보존적으로 변형된 변이체" 또는 "보존적 아미노산 치환"은 관련 분야의 기술자에게 공지되어 있고, 일반적으

로 생성된 분자의 생물학적 활성을 변경시키지 않으면서 이루어질 수 있는 아미노산 치환을 지칭한다. 이러한 분야의 숙련가는, 일반적으로, 폴리펩타이드의 비-필수 영역에서의 단일 아미노산 치환이 생물학적 활성을 실질적으로 변경시키지 않는다는 것을 인지한다(예를 들면, 문헌[Watson, et al., *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224(4th Edition 1987)] 참조). 바람직하게는 이러한 예시적인 치환은 위에서 표 2에서 기재된 것에 따라 이루어진다.

[0124] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "약"이라는 용어는 통상의 숙련가에 의해 결정된 바와 같은 특정 값에 대한 허용 가능한 오차 범위 내인 값을 지칭하고, 이는 값이 측정 또는 결정된 방식, 즉, 측정 시스템의 한계에 부분적으로 좌우될 것이다. 예를 들면, "약"은 관련 분야에서의 실행 당 1 이상의 표준 편차를 의미할 수 있다. 대안적으로, "약" 또는 "를 본질적으로 포함하는"은 20% 이하의 범위를 의미할 수 있다. 또한, 특히 생물학적 시스템 또는 프로세스와 관련하여, 이러한 용어는 값의 10배 이하 또는 5배 이하를 의미할 수 있다. 출원 및 청구항에서 특정 값이 제공되는 경우, 달리 언급되지 않는 한, "약" 또는 "를 본질적으로 포함하는"의 의미는 이러한 특정 값에 대한 허용 가능한 오차 범위 내인 것으로 가정되어야 한다.

[0125] 용어 "다수의"는 하나 이상을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 이의 사용의 맥락에 따라 "다수의"는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10으로부터 선택된 임의의 적합한 수를 나타낼 수 있다. 특정한 실시형태에 따라 "다수의"는 "복수"의 의미를 가질 수 있다. 이의 사용의 맥락에 따라 "복수"는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10으로부터 선택된 임의의 적합한 수를 나타낸다.

[0126] "특이적으로" 결합하는 것은, 리간드/수용체, 항체/항원, 또는 다른 결합 쌍을 나타내는 경우, 단백질 및/또는 다른 생물학의 이중 개체군에서 단백질, 예를 들면, APRIL의 존재에 결정적인 결합 반응을 지시한다. 따라서, 지정된 조건하에, 특정한 수용체/항체에 대한 특이적인 리간드/항원 결합은 샘플 중에 존재하는 다른 단백질에 대하여 유의미한 양으로 결합하지 않는다.

[0127] "투여", "요법" 및 "치료"는, 동물, 인간, 실험 대상체, 세포, 조직, 기관, 또는 생체액에 적용될 때, 동물, 인간, 대상체, 세포, 조직, 기관, 또는 생체액에 대한 외인성 약제학적, 치료, 진단 작용제 또는 조성물의 접촉을 지칭한다. "투여", "요법" 및 "치료"는, 예를 들면, 치료, 약동학, 진단, 연구 및 실험 방법을 지칭할 수 있다. 세포의 치료는 세포에 대한 시약의 접촉, 뿐만 아니라 유체가 세포와 접촉된 경우의 유체에 대한 시약의 접촉을 포함한다. "투여", "요법" 및 "치료"는 시약, 진단, 결합 조성물에 의한 또는 또 다른 세포에 의한 예를 들면 세포의 시험관내 및 생체의 치료를 또한 의미한다. 본 발명의 현재 기재 내에서 용어 "시험관내" 및 "생체의"는 유사한 의미를 갖고 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0128] 항체 DNA는 또한 상동 무린 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 치환하거나(미국 특허 제4,816,567호; 문헌[Morrison, et al., 1984, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851]), 또는 번역글로불린 코딩 서열에 비-번역글로불린 물질(예를 들면, 단백질 도메인)에 대한 코딩 서열 모두 또는 부분을 공유적으로 결합시킴으로써 변형될 수 있다. 전형적으로 이러한 비-번역글로불린 물질은 항체의 불변 도메인을 치환하거나, 항체의 하나의 항원-결합 부위의 가변 도메인을 치환하여 항원에 대하여 특이성을 갖는 하나의 항원-결합 부위 및 상이한 항원에 특이성을 갖는 또 다른 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 이가 항체를 생성한다.

[0129] 본 발명의 항-인간 APRIL 항체의 아미노산 서열 변이체는 적절한 뉴클레오타이드 변화를 코딩 DNA로 도입하거나, 펩타이드 합성에 의해 제조된다. 이러한 변이체는, 예를 들면, 항-APRIL 항체에 대하여 나타낸 아미노산 서열로부터의 결실, 및/또는 이의 삽입, 및/또는 이의 치환을 포함한다. 결실, 삽입, 및 치환의 임의의 조합은 최종 작제물이 목적하는 특징을 소유하는 한, 최종 작제물로 도착하도록 만들어진다. 아미노산 변화는 또한 항-APRIL 항체의 번역후 가공을 변경할 수 있고, 예를 들면, 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 변화시킬 수 있다.

[0130] 돌연변이생성에 대한 바람직한 위치인 항-APRIL 항체 폴리펩타이드의 특정한 잔기 또는 영역의 확인에 유용한 방법은 문헌[Cunningham and Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085]에 기재된 바와 같은 "알라닌 스캐닝 돌연변이생성"으로 지칭된다. 여기서, 표적 잔기의 잔기 또는 그룹이 확인되고(예를 들면, 하전된 잔기, 예를 들면, Arg, Asp, His, Lys, 및 Glu), 중성 또는 음성 하전된 아미노산(가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)로 교체되어 아미노산과 APRIL 항원의 상호작용에 영향을 미친다. 그 다음, 치환에 대한 기능적 감응성을 증명하는 아미노산 잔기를 치환 부위에서 또는 치환 부위에 대하여 추가의 또는 다른 변이체를 도입함으로써 정제된다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위가 미리 결정되어 있지만, 돌연변이의 성질 그 자체는 미리 결정될 필요가 없다. 예를 들면, 정해진 부위에서 돌연변이의 성능을 분석하기 위하여, Ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이생성을 표적 코돈 또는 영역에서 수행하고, 발현된 항-APRIL 항체의 변이체에서 목적하는 활성에 대한

여 스크리닝된다.

- [0131] 정상적으로, 항-APRIL 항체의 아미노산 서열 변이체는 중쇄 또는 경쇄의 원래 항체 아미노산 서열과 적어도 75%, 더욱 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 85%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%, 가장 바람직하게는 적어도 95%, 98% 또는 99% 아미노산 서열 유사성을 갖는 아미노산 서열을 가질 것이다. 이러한 서열에 관한 유사성 또는 상동성은 상기 정의된 바와 같다.
- [0132] 목적하는 바와 같은 본 명세서에서 확인된 특성을 갖는 항체는 시험관내 증가된 생물학적 활성에 대하여 또는 적합한 결합 친화력에 대하여 스크리닝될 수 있다. hAPRIL.01A와 동일한 인간 APRIL의 에피토프에 결합하는 항체를 스크리닝하기 위하여, 예를 들면, 문헌[항체, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane(1988)]에 기재된 일상적인 교차-차단 분석이 수행될 수 있다. 동일한 에피토프에 결합하는 항체는 이러한 분석에서 교차-차단으로 보이지만, 교차-차단은 오버랩핑 에피토프, 또는 심지어 근처의 비-오버랩핑 에피토프에서 항체 결합에 의해 항체 결합의 입체 장으로부터 야기될 수 있기 때문에 모든 교차-차단 항체가 반드시 동일한 에피토프에 정밀하게 결합되지는 않을 것이다.
- [0133] 대안적으로, 예를 들면, 문헌[Champe et al., 1995, *J. Biol. Chem.* 270:1388-1394]에 기재된 에피토프 맵핑을 수행하여 항체가 흥미 있는 에피토프에 결합하는지 여부를 측정할 수 있다. 문헌[Cunningham and Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085]에 기재된 바와 같은 "알라닌 스캐닝 돌연변이생성", 또는 인간 APRIL에서 아미노산 잔기의 점돌연변이생성 일부 다른 형태는 또한 본 발명의 항-APRIL 항체에 대하여 기능성 에피토프를 측정하는데 사용될 수 있다.
- [0134] 항체의 에피토프를 맵핑하는 또 다른 방법은 슬루트스트라(Slootstra) 외(Slootstra et al., 1996, *Mol. Diversity* 1: 87-96) 및 팀머맨(Timmerman) 외(Timmerman et al., 2007, *J. Mol. Recognit.* 20: 283-299)에 기재된 바와 같은 크레딧-카드 포맷 미니 PEPSCAN 카드를 사용하는 스크리닝될 수 있는 합성 선형 및 CLIPS 펩타이드에 대한 항체의 결합을 연구하는 것이다. 각각의 펩타이드에 대한 항체의 결합은 PEPSCAN-기반의 효소-연결된 면역 분석(ELISA)에서 측정된다.
- [0135] hAPRIL.01A와 동일한 에피토프에 대한 추가의 항체 결합은, 예를 들면, 에피토프에 대한 결합에 대하여 APRIL에 대항하여 상승된 항체의 스크리닝, 또는 에피토프 서열을 포함하는 인간 APRIL의 단편을 포함하는 펩타이드와 동물의 면역화에 의해 획득될 수 있다. 동일한 기능성 에피토프에 결합하는 항체는 유사한 생물학적 활성, 예를 들면, 유사한 APRIL 결합 및 BCMA 및 TACI 차단 활성을 나타내는 것으로 예상될 수 있고, 이러한 활성은 항체의 기능성 분석에 의해 확인될 수 있다.
- [0136] 항체는 IgM, IgG, IgD, IgA, 및 IgE를 포함하는 면역글로불린의 임의의 클래스로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 항체는 IgG 항체이다. IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4를 포함하는 IgG의 임의의 이소타입이 사용될 수 있다. IgG 이소타입의 변이체가 또한 예상된다. 항체는 하나 이상의 분류 또는 이소타입으로부터의 서열을 포함할 수 있다. 목적하는 생물학적 활성을 발생시키는 필수적인 불변 도메인 서열의 최적화는 실시예에 기재된 생물학적 분석에서 항체를 스크리닝함으로써 실제로 달성된다.
- [0137] 이와 같이, 경쇄의 분류는 본 명세서에서 조성물 및 방법에서 사용될 수 있다. 특히적으로, 카파, 람다, 또는 이의 변이체는 본 발명의 조성물 및 방법에서 유용하다.
- [0138] 본 발명의 항체 및 항체 단편은 또한 세포독성 페이로드, 예를 들면, 세포독성제 또는 방사선뉴클레오타이드, 예를 들면, ⁹⁹Tc, ⁹⁰Y, ¹¹¹In, ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H, ¹³¹I, ¹¹C, ¹⁵O, ¹³N, ¹⁸F, ³⁵S, ⁵¹Cr, ⁵⁷To, ²²⁶Ra, ⁶⁰Co, ⁵⁹Fe, ⁵⁷Se, ¹⁵²Eu, ⁶⁷Cu, ²¹⁷Pb, ²¹¹At, ²¹²Pb, ⁴⁷Sc, ¹⁰⁹Pd, ²³⁴Th, 및 ⁴⁰K, ¹⁵⁷Gd, ⁵⁵Mn, ⁵²Tr 및 ⁵⁶Fe와 접합될 수 있다. 이러한 항체 접합체는 면역요법에서 사용되어 이의 표면에서 표적(항체에 대한 항원)을 발현하는 세포를 선택적으로 표적화하고 살해할 수 있다. 예시적인 세포독성제는 리신, 빈카 알칼로이드, 메토타렉세이트, 슈도모나스 엑소톡신, 사포린, 디프테리아 독소, 시스플라틴, 독소루비신, 아브린 독소, 젤로닌 및 자리공 항바이러스성 단백질을 포함한다.
- [0139] 본 발명의 항체 및 항체 단편은 또한 형광단, 예를 들면, 희토류 킬레이트, 플루오레신 및 이의 유도체, 로다민 및 이의 유도체, 이소티오시아네이트, 피코에리트린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈알데히드, 플루오레스캄, ¹⁵²Eu, 단실, 움벨리페론, 루시페린, 루미날 라벨, 이소루미날 라벨, 방향족 아크리디늄 에스터 라벨, 이미다졸 라벨, 아크리디늄 염 라벨, 옥살레이트 에스터 라벨, 아쿠오린 라벨, 2,3-디하이드로프탈아지네디온, 비오틴/아비딘, 스핀 라벨 및 안정한 유리 라디칼을 포함하는 형광성 또는 화학발광성 라벨과 접합될 수 있다.

- [0140] 본 발명의 항체 분자 또는 단백질 분자는 문헌[Hunter et al., 1962, *Nature* 144:945; David et al., 1974, *Biochemistry* 13:1014]; [Pain et al., 1981, *J. Immunol. Meth.* 40:219]; 및 [Nygren, J., 1982, *Histochem. and Cytochem.* 30:407]에 기재된 이들 방법을 포함하여 다양한 모이어티에 접합시키는 당해 분야의 임의의 방법이 사용될 수 있다. 항체 및 단백질을 접합시키는 방법은 통상적이고 당해 분야에 잘 알려져 있다.
- [0141] **항체 정제**
- [0142] 재조합 기술을 사용하는 경우, 항체는 세포내 세포질 공간에서 생성될 수 있거나, 배지 내로 직접적으로 분비될 수 있고, 항체가 세포내에서 생성되는 경우, 제1 단계로서, 숙주 세포 또는 용해된 단편인 입자 잔해가, 예를 들면, 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거된다. 문헌[Carter et al., 1992, *Bio/Technology* 10:163-167]에는 이.콜라이(*E.coli*)의 원형질막주위 공간으로 분비되는 항체를 분리하는 과정이 기재되어 있다. 간략하게, 세포 페이스트를 아세트산나트륨(pH 3.5), EDTA, 및 페닐메틸설포닐플루오라이드(PMSF)의 존재하에 약 30분 동안 해동시킨다. 세포 잔해를 원심분리로 제거할 수 있다. 항체가 배지로 분비되는 경우, 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액을 일반적으로 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과 유닛을 사용하여 먼저 농축시킨다. 프로테아제 억제제, 예를 들면, PMSF는 임의의 상기 단계 중에 포함되어 단백질분해를 억제할 수 있고, 항생제가 포함되어 우발적인 오염물의 성장을 방지할 수 있다.
- [0143] 세포로부터 제조된 항체 조성물은, 예를 들면, 하이드록시아파티트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 및 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있고, 친화성 크로마토그래피가 정제 기술로 바람직하다. 친화성 리간드로서 단백질 A의 적합성은 항체에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 영역의 중 및 이소타입에 따라 좌우된다. 단백질 A는 인간 Ig.감마1, Ig.감마2, 또는 Ig.감마4 중쇄를 기반으로 한 항체를 정제하는데 사용될 수 있다(Lindmark et al., 1983, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13). 단백질 G는 모든 마우스 이소타입 및 인간.감마.3에 대하여 권고된다(Guss et al., 1986, *EMBO J* 5:1567-1575). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 대부분 종종 아가로스지만, 다른 매트릭스도 이용 가능하다.
- [0144] 기계적으로 안정한 매트릭스, 예를 들면, 조절 공극 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스에 의해 달성되는 것보다 더 빠른 유속 및 더 짧은 가공 시간을 가능하게 한다. 항체가 C₃ 도메인을 포함하는 경우, 베이커본드 ABX(Bakerbond ABX)TM 수지(J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.)는 정제에 유용하다. 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예를 들면, 이온 교환 컬럼 상의 분류, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 헤파린 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지(예를 들면, 폴리아스파르트산 컬럼) 상의 세파로스TM 크로마토그래피, 크로마토초점맞춤, SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전이 또한 회수되는 항체에 따라 이용 가능하다.
- [0145] 하나의 실시형태에 있어서, 렉틴 기질(예를 들면, 렉틴 친화성 컬럼) 상의 흡착을 사용하여 당단백질을 정제하여, 푸코스-함유 당단백질을 제조로부터 제거하고 따라서 푸코스-무함유 당단백질을 풍부하게 할 수 있다.
- [0146] **약제학적 제형**
- [0147] 본 발명은 항-인간 APRIL 항체의 약제학적 제형을 포함한다. 약제학적 또는 살균 조성물을 제조하기 위하여, 항체, 특히 항체 또는 이의 단편은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제와 혼합될 수 있고, 예를 들면, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA(1984)]을 참조한다. 예를 들면, 동결건조 분말, 슬러리, 수용액 또는 현탁액의 형태로 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합함으로써 치료제 및 진단제의 제형이 제조될 수 있다(예를 들면, 문헌[Hardman, et al., 2001, *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, NY]; [Gennaro, 2000, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY]; [Avis, et al.(eds.), 1993, *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker, NY]; [Lieberman, et al.(eds.), 1990, *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker, NY]; [Lieberman, et al.(eds.), 1990, *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, NY]; [Weiner and Kotkoskie, 2000, *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY] 참조).
- [0148] 예를 들면, LD₅₀(집단의 50%에 대해 치사성인 용량) 및 ED₅₀(집단의 50%에서 치료적으로 효과적인 용량)을 결정하기 위해, 단독으로 또는 또 다른 제제, 예컨대 일반적인 항암 약물과 조합되어 투여된 결합 화합물, 특히 항체, 조성물의 독성 및 치료 효능을 표준 제약 절차에 의해 세포 배양물 또는 실험 동물에서 결정할 수 있다. 독

성 효과와 치료 효과 사이의 용량 비가 치료 지수이고, 이는 LD₅₀과 ED₅₀ 사이의 비로서 표현될 수 있다. 이러한 세포 배양 검정법 및 동물 연구로부터 수득된 데이터가 인간에서 사용하기 위한 광범위한 투여량을 제형하는데 사용될 수 있다. 바람직하게는 이러한 화합물의 투여량은 독성이 거의 없는 또는 독성이 없는 ED₅₀을 포함하는 광범위한 혈중 농도 내이다. 사용된 투여 형태 또는 이용된 투여 경로에 따라 이러한 범위 내에서 투여량이 변할 수 있다.

[0149] 적절한 투여 경로는 비경구 투여, 예를 들면, 근육내, 정맥내 또는 피하 투여, 및 경구 투여를 포함한다. 약제학적 조성물에서 사용되거나 본 발명의 방법을 실행하는데 사용하기 위한 항체의 투여는 다양한 통상적인 방식, 예를 들면, 경구 섭취, 흡입, 국소 적용 또는 피부, 피하, 복막내, 비경구, 동맥내 또는 정맥내 주사로 수행될 수 있다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 결합 화합물은 정맥 내로 투여된다. 또 다른 실시형태에 있어서, 본 발명의 결합 화합물은 피하 투여된다.

[0150] 대안적으로, 전신 방식보다는 국소 방식으로, 예를 들면, 종종 저장소 또는 지속 방출 제형에서, 작용 부위 내로 항체 또는 항체들을 직접 주사하는 것을 통해 항체를 투여할 수 있다. 추가로, 표적화된 약물 전달 시스템에서 항체를 투여할 수 있다.

[0151] 항체, 사이토카인 및 소형 분자의 적합한 용량을 선택하는 것에서의 지침이 입수가능하다(예를 들면, 문헌 [Wawrzynczak, 1996, *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK]; [Kresina(ed.), 1991, *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY]; [Bach(ed.), 1993, *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY]; [Baert, et al., 2003, *New Engl. J. Med.* 348:601-608]; [Milgrom, et al., 1999, *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973]; [Slamon, et al., 2001, *New Engl. J. Med.* 344:783-792]; [Benjaminovitz, et al., 2000, *New Engl. J. Med.* 342:613-619]; [Ghosh, et al., 2003, *New Engl. J. Med.* 348:24-32]; [Lipsky, et al., 2000, *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602] 참조).

[0152] 예를 들면, 치료에 영향을 미치는 것으로 관련 분야에 공지되어 있거나 또는 추정되거나 또는 치료에 영향을 미칠 것으로 예측되는 파라미터 또는 인자를 사용하여, 임상적에 의해 적합한 용량의 결정이 이루어진다. 일반적으로, 용량은 최적 용량보다 다소 적은 양으로 시작하고, 그 후 임의의 음성 부작용과 관련하여 원하는 효과 또는 최적의 효과가 달성될 때까지 소량의 증분만큼 증가된다. 중요한 진단 척도는 예를 들면 염증의 증상 또는 생산된 염증성 사이토카인의 수준의 척도를 포함한다.

[0153] 바람직한 용량 프로토콜은 유의미한 바람직하지 않은 부작용을 피하는 최대 용량 또는 용량 빈도를 수반하는 것이다. 총 주간 용량은 일반적으로는 적어도 0.05 μ g/체중 kg, 더욱 일반적으로는 적어도 0.2 μ g/kg, 가장 일반적으로는 적어도 0.5 μ g/kg, 전형적으로는 적어도 1 μ g/kg, 더욱 전형적으로는 적어도 10 μ g/kg, 가장 전형적으로는 적어도 100 μ g/kg, 바람직하게는 적어도 0.2 mg/kg, 더욱 바람직하게는 적어도 1.0 mg/kg, 가장 바람직하게는 적어도 2.0 mg/kg, 최적으로는 적어도 10 mg/kg, 더욱 최적으로는 적어도 25 mg/kg, 가장 최적으로는 적어도 50 mg/kg이다(예를 들면, 문헌[Yang, et al., 2003, *New Engl. J. Med.* 349:427-434]; [Herold, et al., 2002, *New Engl. J. Med.* 346:1692-1698]; [Liu, et al., 1999, *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67:451-456]; [Portielji, et al., 2003, *Cancer Immunol. Immunother.* 52:133-144] 참조). 소형 분자 치료제, 예를 들면, 펩타이드 모방체, 천연 제품, 또는 유기 화합물질의 원하는 용량은 μ g/kg 기준으로 항체 또는 폴리펩타이드에 대한 것과 대략적으로 동일하다.

[0154] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "억제하다" 또는 "치료하다" 또는 "치료"는 질환과 연관된 증상이 발달되는 것의 연기 및/또는 상기 질환과 함께 발달될 것으로 예상되거나 발달될 것인 이러한 증상의 중증도의 감소를 포함한다. 이러한 용어는 기존 증상을 호전시키는 것, 추가 증상을 방지하는 것, 및 이러한 증상의 기저 원인을 호전시키거나 방지하는 것을 추가로 포함한다. 따라서, 이러한 용어는 질환에 걸린 척추동물 대상체에서 이로온 결과가 부여되었음을 나타낸다.

[0155] 치료적 목적을 위한 본 발명의 항체는 치료적 유효량으로 투여된다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "치료적 유효량" 또는 "유효량"이라는 용어는 단독으로 또는 추가적인 치료제와 조합되어 세포, 조직 또는 대상체에게 투여되었을 때 치료될 질환 또는 병태를 방지하거나 호전시키는데 효과적인 항체 또는 항체들의 양을 지칭한다. 치료적 유효 용량은 증상의 호전, 예를 들면, 관련된 의학적 병태의 치료, 치유, 예방 또는 호전, 또는 이러한 병태의 치료, 치유, 예방 또는 호전 속도의 증가를 초래하는데 충분한 화합물의 양을 추가로 지칭한다. 단독으로 투여된 개별적인 활성 성분에 적용되었을 때, 치료적 유효 용량은 이러한 성분 단독을 지칭한다. 조합물에

적용되었을 때, 치료적 유효 용량은 조합되어, 순차적으로 또는 동시에 투여되었든 치료 효과를 초래하는 활성 성분들의 조합된 양을 지칭한다. 치료제의 유효량은 전형적으로는 적어도 10%만큼; 일반적으로는 적어도 20%만큼; 바람직하게는 적어도 약 30%만큼; 더욱 바람직하게는 적어도 40%만큼, 가장 바람직하게는 적어도 50%만큼 증상을 감소시킬 것이다.

[0156] 제2 치료제와의 함께 공동-투여 또는 치료하기 위한 방법이 관련 분야에 주지되어 있고, 예를 들면, 문헌 [Hardman, et al.(eds.), 2001, *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed., McGraw-Hill, New York, NY]; [Poole and Peterson(eds.), 2001, *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA]; [Chabner and Longo(eds.), 2001, *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA]을 참조한다.

[0157] 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 세포독성제, 화학요법제, 세포증식억제제, 혈관형성억제제 또는 항대사제, 종양 표적제, 면역 자극제, 면역 조절제, 또는 세포독성제, 세포증식억제제, 또는 다른 독성 제제와 접합된 항체를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다른 제제를 함유할 수 있다. 약제학적 조성물은 또한 다른 치료적 양식, 예를 들면, 수술, 화학요법 및 방사선과 함께 사용될 수 있다.

[0158] 본 발명은 이제 하기 비한정적인 실험을 참조로 하여 추가로 설명되고 지지될 것이다.

[0159] 실험

[0160] 실험 1

[0161] 항-APRIL 인간화 항체 디자인

[0162] CDR 그래프팅

[0163] 인간 APRIL에 결합하는 특이한 항체, hAPRIL.01A(제W02010/100056호)를 먼저 확인하였다. CDR-그래프팅 기술(예를 들면, 미국 특허 제5, 225, 539호 및 문헌[Williams, D.G. et al., 2010, *Antibody Engineering*, volume 1, Chapter 21] 참조)로 마우스 hAPRIL.01A 항체를 인간화시켰다. 먼저, 인간 생식선 서열을 IgBLAST(Ye J. et al., 2013, *Nucleic Acids Res.* 41:W34-40)를 사용하여 확인하는 전략이 설계된다. hAPRIL.01A VH에 있어서, 인간 생식선 서열IGHV1-3*01(70.4% 동일성), 및 hAPRIL.01A VL에 있어서, 인간 생식선 서열IGKV1-16*01(65.3% 동일성)을 확인하였다.

[0164] 그 다음, 90,401개의 개별적인 서열을 확인하는 IMGT 데이터베이스(발간 201222-4: 161905 항목, 색인 04-Jun-2012)(Lefranc, M.-P. et al., 1999, *Nucleic Acids Res.* 27:209-212)에서 이용 가능한 모든 인간 성숙 서열을 함유하는 데이터베이스를 구축하였다. TBLASTN(2.2.26+)을 사용하여 이들 서열을 질의하여 hAPRIL.01A VH 및 VL 서열(각각 서열번호 3 및 4)에 대한 가장 높은 동일성을 입증하는 주형 서열을 확인하였다. hAPRIL.01A에서 각각 VH CDR1, CDR2, CDR3(서열번호 5 내지 7) 및 VL CDR1, CDR2 및 CDR3(서열번호 8 내지 10) 이들과 80% 이상의 유사성 점수를 입증하거나, 유사한, 바람직하게는 동일한 CDR 길이를 나타내도록 3개의 VH 및 7개의 VL 서열을 선택하였다.

[0165] 중쇄에 있어서, 젠뱅크(GenBank)(Benson, D. A. et al., 2013, *Nucleic Acids Res.* 41(D1):D36-42) 등록 번호 AF022000, AB363149, 및 AB063827에 의해 인코딩된 프레임워크를 hAPRIL.01A VH CDR의 직선 그래프팅에 대하여 선택하고, 이는 하기 cDNA 작제물을 야기하였다: 각각 서열번호 11, 13, 및 15. 경쇄에 있어서, 젠뱅크 등록 번호 AX375917, DD272023, AB363267, AJ241396, DI152527, 및 DQ840975에 의해 인코딩된 프레임워크를 hAPRIL.01A VL CDR의 직선 그래프팅에 대하여 선택하고, 이는 하기 cDNA 작제물을 야기하였다: 서열번호 19, 21, 23, 25, 27 및 29.

[0166] TBLASTN 결과로부터 25개의 가장 우수한 매칭 서열(E-값 5e-46 내지 9e-43)의 정렬로부터의 공통 서열을 기초로 추가의 중쇄 서열을 설계하고, 이는 하기 cDNA 작제물을 야기하였다: 서열번호 17.

[0167] 프레임워크 잔기의 인간화의 구조적 효과를 측정하기 위하여, WHATIF(Krieger E. et al., 2003, *Methods Biochem Anal.* 44:509-23)를 사용하여 hAPRIL.01A 항체의 상동성 모델을 만들었다. VH 및 VL 쇠에 대한 주형, 2GKI(Kim Y.R. et al., 2006, *J.Biol.Chem.* 281: 15287-15295) 및 2AEQ(Venkatramani L. et al. 2006, *J.Mol.Biol.* 356: 651-663) 각각은 프로틴 데이터뱅크(Protein Databank)(www.rcsb.org, release June 2012; Berman H.M. et al., 2000, *Nucleic Acids Res.* 28:235-242)를 사용하는 BLASTP 연구(Altschul, S.F. et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410)로 확인하였다. VH 및 VL 쇠는 MUSTANG 정렬(Konagurthu A.S. et al., 2006, *Proteins* 64:559-574)을 사용하여 Fab 단편으로서 조합될 수 있고, 이는 2AEQ 주형에 의해 가이드되었다.

hAPRIL.01A의 구축된 상동성 모델을 사용하여 인간화에 영향을 받고 인간화 작제물의 기능성에 영향을 미칠 수 있는 잔기를 선택하고, 선택된 잔기의 교체 여부와 상관없이 평가를 수행하였다: 6개의 VL 주형(VL15)에 있어서, VL 잔기 Y49 및 Y87을 더 작은 S49 및 F87로 대체하는 것으로 결정되었다.

[0168] 신호 펩타이드 확인

[0169] NCBI IgBlast(BLASTN)(Ye J. et al., 2013, Nucleic Acids Res. 41(Web Server issue): W34-40)를 사용하여 마우스 hAPRIL.01A VH 및 VL을 매칭하는 인간 생식선 레퍼토리를 확인하고, 이를 사용하여 VH 및 VL에 대한 분비 리더를 선택하였다: 생식선 IGHV1-3*01(NCBI 등록 번호 X62107)을 기초로 한 VH, 및 생식선 IGKV16*01(NCBI 등록 번호 X62109)를 기초로 한 VL. 서열번호 57에 의해 코딩된 하기 VH 분비 리더 서열 "MDWTWRILFLVAAATGAHS"(서열번호 58) 및 서열번호 59에 의해 코딩된 VL 분비 리더 서열 "MDMRVLAQLLGLLLCFPGARC"(서열번호 60)를 사용하여 모든 인간화 VH 및 VL 작제물을 발현하였다.

[0170] 안정화 아테어(Adair) 돌연변이(Angal S. et al., 1993, Mol Immunol. 30: 105-108)로 인간화 항체의 IgG4 버전을 제조하고, 여기서 세린 241(라바트(Rabat) 번호지정)은 프롤린으로 전환된다.

[0171] 실험 2

[0172] 합성, 서브클로닝, 발현, 결합

[0173] 합성

[0174] 인간화 VH 및 VL 작제물을 인코딩하는 cDNA, 서열번호 11, 13, 15, 17, 21, 23, 25, 27, 29를 옵젠(OptGene) 소프트웨어(버전 2.0.6.0)를 사용하여 코돈 최적화하고, 베이스클리어(BaseClear)로 화학적으로 합성하였다. 그 다음, 5'-HindIII 및 3'-ApaI(VH) 또는 3'-BsiWI(VL) 제한 엔도뉴클레아제 절단 부위를 사용하여 서열을 pUC57 벡터(베이스클리어) 내로 클로닝하였다.

[0175] 서브클로닝

[0176] 상기 언급된 제한 엔도뉴클레아제 절단 부위를 사용하여, EcoRI 및 HindIII 제한 엔도뉴클레아제 절단 부위 내로 클로닝된 인간 IgG4 불변 도메인(CH1 - CH3, 젠뱅크 등록 번호K01316)을 함유하는 pcDNA3.1(+) 벡터(인비트로젠(Invitrogen)) 내로 인간화 VH 작제물을 클로닝하였다. 상기 언급된 제한 엔도뉴클레아제 절단 부위를 사용하여, HindIII 및 EcoRI 제한 엔도뉴클레아제 절단 부위 내로 클로닝된 인간 CL(카파) 도메인(젠뱅크 등록 번호 J00241)을 함유하는 pcDNA3.1(+) 벡터(인비트로젠) 내로 인간화 VL 작제물을 클로닝하였다. 제조사의 설명에 따라, 작제물을 서브클로닝 효율적인 DH5 α 컴피턴트 세포(인비트로젠)에서 형질전환시켰다. 제조사의 프로토콜에 따라 퀴아젠 플라스미드 미디 키트(Qiagen Plasmid Midi Kit)(퀴아젠(QIAGEN))을 사용하여 플라스미드 DNA를 분리하였다. 작제물의 완결성은 DNA 시퀀싱(마크로젠(Macrogen))으로 확인하였다.

[0177] 발현 및 결합

[0178] VH 및 VL 작제물을 인코딩하는 플라스미드를 1:3 비율(전체 중의 4 μ g)로 혼합하고, 제조사의 설명에 따라 리포펙타민(Lipofectamine) 2000 형질감염 시약(인비트로젠)을 사용하여, HEK293T 인간 배아 신장 세포(HEK293T/17, ATCC-CRL-11268) 내로 형질감염시킴으로서 일시적으로 발현시켰다. 세포 상청액을 5일 후 수집하고, 효소 결합 면역 분석(ELISA)을 사용하여 항체의 발현 및 APRIL에 대한 결합을 시험하였다. 이들 ELISA에서, 모든 배양 단계는 PBST(0.01% 트윈(Tween) 20을 함유한 PBS)에 의한 세척 단계가 뒤따랐다. 맥시소브(Maxisorb) 96-웰 플레이트(눈크(Nunc))를 0.5 μ g/ml 항-FLAG(시그마(Sigma)) 또는 항-IgG4(잭슨 라보라토리스(Jackson laboratories))로 코팅하고, 밤새 4°C에서 배양하였다. 후속적으로, 항-FLAG 코팅된 96-웰 플레이트를 1시간 동안 실온에서 FLAG-태깅된 인간 APRIL로 배양하였다. 그 다음, 상청액 및 이의 회석물을 1시간 동안 배양하고, 그 후 마우스 항-인간 IgG HRP-접합체(서던 바이오테크놀로지(Southern Biotechnology))와 함께 1시간 동안 배양하였다.

[0179] TMB 안정화된 크로마젠(Stabilized Chromagen)(인비트로젠) 100 μ l로 면역반응성을 가시화시켰다. 0.5M H₂SO₄ 100 μ l로 반응을 중단시키고, 흡광도를 450 및 620nm에서 측정하였다.

[0180] 실험 3

[0181] 정제 및 안정성

[0182] 정제

[0183] 상기 기재된 인간화 항체의 서브셋을 추가의 분석을 위하여 선택하였다. 다시, VH 및 VL 작제물을 인코딩하는 플라스미드를 1:3 비율($32\mu\text{g}$)로 혼합하고, 제조사의 설명에 따라 리포펙타민 2000 형질감염 시약(인비트로젠)을 사용하여 (8×10^6) HEK293T 인간 배아 신장 세포(HEK293T) 내로 형질감염시킴으로써 일시적으로 발현시켰다. 상청액을 수집하고(10ml), 제조사의 설명(GE 헬스케어(GE Healthcare))에 따라 맵셀렉트 슈어 프로틴 A(MabSelect Sure Protein A) 수지를 사용하여 항체를 절제하였다. 제바(Zeba) 탈염 컬럼(써모 사이언티픽(Thermo Scientific))을 사용하여 PBS에 대하여 버퍼를 교체하였다. 정제된 항체의 농도는 OD280(나노드롭(Nanodrop) ND-1000)를 기반으로 측정하였다. 상기 기재된 APRIL ELISA를 사용하여 APRIL에 대한 정제된 항체의 결합을 확립하였다. BCMA 및 TACI 수용체에 의한 인간화 항체의 차단 능력을 경쟁 ELISA에서 시험하였다. 이들 ELISA에서, 모든 배양 단계는 PBST(0.01% 트윈 20을 함유한 PBS)에 의한 세척 단계가 뒤따랐다. 맥시소브 96-웰 플레이트(누크)를 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ Fc-BCMA(R&D 시스템즈(R&D Systems)) 또는 Fc-TACI(R&D 시스템즈)로 코팅하고, 밤새 4°C 에서 배양하였다. FLAG-태깅된 APRIL와 전혼합된 인간화 항체 및 이의 희석물을 1시간 동안 배양한 후, 이를 항-FLAG HRP-접합체(시그마)와 함께 1시간 동안 배양하였다. TMB 안정화된 크로마젠(인비트로젠) $100\mu\text{l}$ 로 면역반응성을 가시화시켰다. 0.5M H_2SO_4 $100\mu\text{l}$ 로 반응을 중단시키고, 흡광도를 450 및 620nm 에서 측정하였다. 전체 결합 신호 또는 차단의 50%가 관찰되는 농도를 나타내는 계산된 EC_{50} 및 IC_{50} 은 표 5에 표시된다.

[0184] 표 5: EC_{50} 값, APRIL에 대한 결합. IC_{50} , BCMA-Fc에 대한 APRIL 결합의 차단. C4-hAPRIL.01A는 각각의 ELISA에서 실험 참조로서 사용되었다. n.c.는 역제를 지시하지만, 적절하지 않은 피팅으로 인하여 IC_{50} 이 계산될 수 없었다.

VH.VL 조합	$\text{EC}_{50}(\text{nM})$	$\text{IC}_{50}(\text{nM})$
C4-hAPRIL.01A	5.7	7.6
VH11.VL15	120.8	4.3
VH12.VL15	19.8	n.c.
VH13.VL15	223.4	n.c.
VH14.VL15	48.3	n.c.

[0185]

[0186] TACI-Fc에 대한 APRIL 결합의 차단에 있어서 유사한 차단 효과가 관찰되었다.

[0187] 놀랍게도, VL10 - VL14와 VH11-VH14의 조합은 나노- 또는 마이크로몰 EC_{50} 값을 나타내지 않고, 오직 VL15의 프레임워크 서열과 선택된 VH 프레임워크 서열의 조합만이 기능성 APRIL 결합 성질을 갖는 항체를 야기하였다.

[0188] 안정성

[0189] 항체의 안정화에 대한 인간화의 효과를 측정하기 위하여, 인간화 항체를 10분 동안 다양한 온도 범위에 노출시켰다. 정제된 항체를 $3.16\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 PBS 중의 이의 희석물로 희석시켰다. 그 다음, 이들 용액을 65°C 또는 70°C 에 노출시키고, 이전에 기재된 바와 같은 FLAG-태깅된 APRIL ELISA 분석을 사용하여 항체의 열 처리 후 잔여 결합을 측정하였다(표 6 참조).

[0190] 표 6: ELISA에 의해 측정된 바와 같은 FLAG-APRIL에 대한 (인간화) 항체의 잔여 결합. 세 농도에서 결합을 측정한다: 3.16, 1 및 $0.316\mu\text{g}/\text{ml}$. 65 또는 70°C 에서 %결합을 실온($=100\%$)에서 각각의 항체에 대하여 관찰된 %결합으로서 표시한다.

농도	65 $^\circ\text{C}$	hAPRIL.01A	c4-hAPRIL.01A	11.15	12.15	13.15	14.15
	3.16	27.1	42.8	63.1	66.4	76.2	58.6
	1	8.4	10.4	55.1	49.8	44.4	45.2
	0.316	13.7	18.8	74.6	74.3	66.1	63.7
농도	70 $^\circ\text{C}$	hAPRIL.01A	c4-hAPRIL.01A	11.15	12.15	13.15	14.15
	3.16	6.7	6.6	59.1	50.2	80.5	50.0
	1	4.9	7.4	62.4	51.8	47.4	42.5
	0.316	11.2	16.9	82.0	70.3	65.0	63.1

[0191]

[0192] 실험 4

[0193] 백 돌연변이(back mutation) 및 버니어(Vernier) 잔기에 의한 결합, 차단 및 안정성의 개선

[0194] 백 돌연변이에 의한 결합 및 차단 개선

[0195] 서열 및 구조적 수준에 대한 분석을 수행하여 상이한 VH/VL 조합의 결합 및 차단에서의 차이에 대한 분자 기준을 이해하였다. 인간화 항체의 상동성 모델을 상기 기재된 바와 같이 만들었다. VH 및 VL 둘 다에 대하여 선택된 주형은 3HC4(Jordan J.L. et al., 2009, Proteins 77: 832-841)이었다. 생성된 모델의 조심스러운 분석을 기반으로, 본 발명의 발명자는 선택된 VH 쇄에서 잔기 S72가 CDR2 루프의 방향에 대하여 중요하다고 가정하였다. 이러한 가정을 조사하기 위하여, 돌연변이 R72S를 VH 14 내로 도입하고, 이는 서열번호 31의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 VH 14_1, 서열번호 32를 야기하였다. 항체 14_1.15를 상기 기재된 바와 같이 결합 및 차단에 대하여 시험하였다. 표 7에 나타난 바와 같이, 항체 14_1.15의 결합 및 차단은 표 5에 나타난 바와 같은 항체 14.15의 결합에 비하여 개선된다.

[0196] **표 7:** 항체 14_1.15의 BCMA-Fc에 대한 APRIL에 대한 결합 및 APRIL 결합의 차단. hAPRIL.01A 및 C4-hAPRIL.01A는 각각의 ELISA에서 실험적 참조로서 사용하였다.

VH.VL 조합	EC50(nM)	IC50(nM)
VH14 1.VL15	1.29±0.16	2.63±0.55
C4-hAPRIL.01A	0.35±0.13	0.77±0.22
hAPRIL.01A	0.16±0.14	0.46±0.35

[0197]

[0198] TACI-Fc에 대한 APRIL 결합의 차단에 있어서 유사한 IC50 값이 획득되었다.

[0199] 버니어 잔기

[0200] 서열 및 구조적 수준에 대한 분석을 수행하여 항체 14_1.15의 결합 및 차단을 추가로 개선시켰다. 이러한 hAPRIL.01A 유사체의 상동성 모델을 상기 기재된 바와 같이 제조하였다. VH 쇄에 대한 선택된 주형은 2GKI이고, VL 쇄에 있어서 4GMT(Lee P.S. et al., 2012, PNAS 109: 17040-17045)이고, 주형 2AEQ에 의해 가이드된 Fab 단편로서 조합되었다.

[0201] CDR에 밀접한 잔기는 루프 변형에 영향을 미칠 수 있기 때문에 이들을 상세하게 연구하였다. 분석에서, 발명자는 다수의 잠재적으로 관련된 버니어 잔기를 확인하였다(Foote J. et al., 1992, J. Mol. Biol. 224:487-499). 이들의 관련성을 평가하기 위하여 이들을 마우스 아미노산으로 치환하였다.

[0202] 돌연변이 M70I의 도입은 VH14_1C(서열번호 33, 34)를 야기하였고, 돌연변이 T74K는 VH14_1D(서열번호 35, 36)중에 존재하고, 돌연변이 Q1E는 VH14_1E(서열번호 37, 38)를 야기하였다. R67K 및 V68A의 조합된 돌연변이는 VH 14_1G, 서열번호 39, 40을 야기하였다. 상기 기재된 바와 같이 항체를 결합, 차단, 및 안정성에 대하여 시험하였다. 표 8에 나타난 바와 같이, 놀랍게도 결합 및 차단은 2 내지 3배 개선된다. 특히 항체 VH14_1G.VL15 내로 도입된 돌연변이는 놀랍게도 상당한 개선을 나타낸다.

[0203] **표 8:** 항체 14_1.15 및 버니어 영역 돌연변이의 결합 및 차단. hAPRIL.01A를 각각의 ELISA에서 참조로서 사용하였다.

VH.VL 조합	EC50(nM)	IC50(nM)
VH14 1.VL15	1.29±0.16	2.63±0.55
VH14 1C.VL15	7.04±2.23	5.26±0.08
VH14 1D.VL15	1.95±0.28	0.96±0.38
VH14 1E.VL15	2.67±0.28	1.74±0.32
VH14 1G.VL15	0.78±0.16	1.35±0.39
hAPRIL.01A	0.16±0.14	0.46±0.35

[0204]

[0205] 추가로, 치환된 인간화 항체의 안정성은 실시예 3에 기재된 바와 같은 열안정성 연구를 사용하여 측정된 바와 같이 개선되었다(표 9 참조).

[0206] **표 9:** ELISA에 의해 측정된 바와 같은 FLAG-APRIL에 대한 (인간화) 항체의 잔여 결합. 결합을 세 농도로 측정한다: 3.16, 1 및 0.316µg/ml. 65 또는 70°C에서 %결합을 실온(=100%)에서 항체 각각에 대하여 관찰된 %결합으로서 표시한다.

농도	65℃	14.15	14 1.15	14 1C.15	14 1D.15	14 1E.15	14 1G.15
	3.16	59.0	59.9	86.3	75.3	82.3	94.5
	1	47.5	46.1	44.7	39.8	39.7	31.3
	0.316	67.5	71.0	59.1	49.4	52.0	34.2
농도	70℃	14.15	14 1.15	14 1C.15	14 1D.15	14 1E.15	14 1G.15
	3.16	58.6	38.0	99.4	84.3	78.8	78.2
	1	55.1	38.3	43.8	32.7	28.0	16.9
	0.316	79.1	63.0	59.1	45.6	43.3	23.8

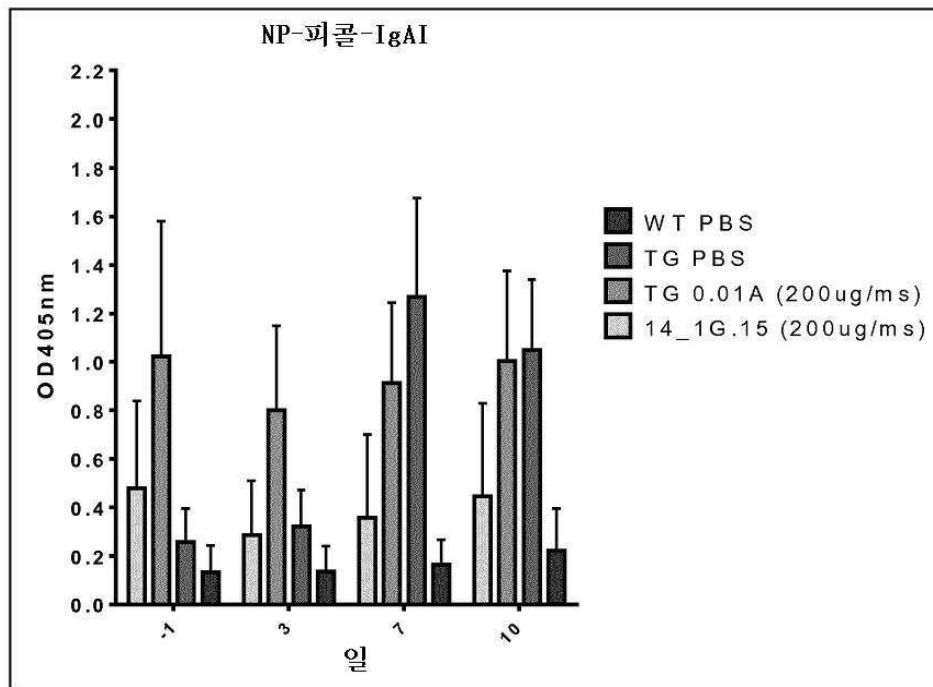
실험 5

14 1G.15는 생체내 억제에서 더욱 효율적임을 증명한다.

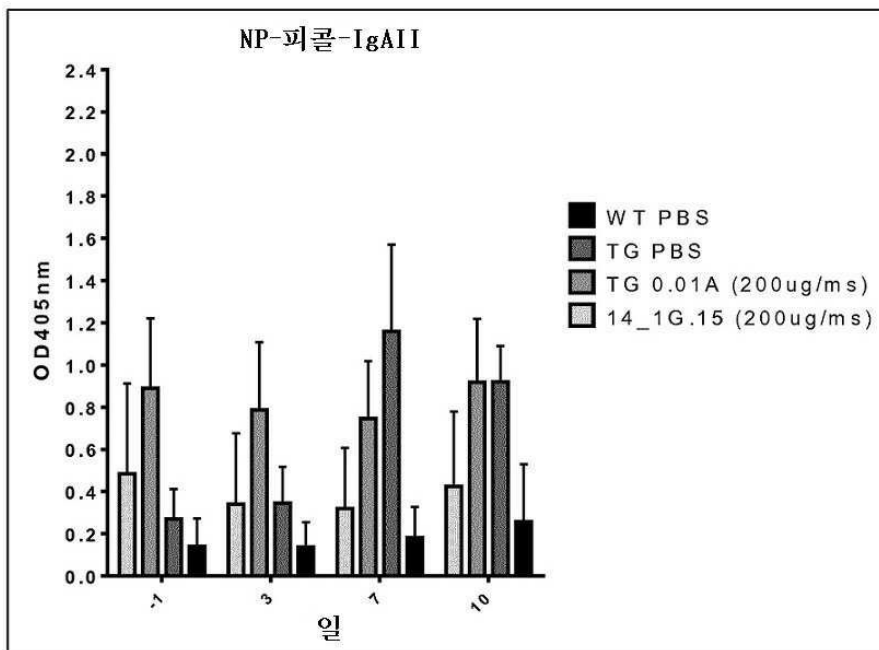
APRIL 기능에 대한 APRIL 유사체 항체의 생체내 차단 효과를 증명하기 위하여, 우리는 마우스에서 NP-피콜 유도된 체액 반응을 차단하는 항체의 능력을 시험하였다. 사용된 마우스는 둘 다 C57BL/6 백그라운드에 대하여 8-10주 연령의 APRIL 형질전환(TG) 마우스 및 아생형(WT) 한배새끼이다. APRIL 형질전환 마우스는 Lck-말단 촉진자 하에 인간 APRIL을 발현하고, 이는 성숙 흉선세포 및 주변 T 림프구에 대한 이식유전자 발현을 지시한다(Stein et al., 2002, J Clin Invest 109, 1587-98). 마우스를 대학 의료 기관의 동물 시설에서 기르고, 실험은 기관 윤리 위원회에 의해 승인 받았다. 마우스를 몇몇 그룹으로 나누고, 하기에 따라 처리하였다: WT 마우스를 PBS(200 μ l)으로 처리하고, APRIL 형질전환 마우스 세 그룹을 하기 분자로 처리하였다: hAPRIL.01A 또는 14 1G.15(-1일 및 3일에 PBS 200 μ g 중의 200 μ g/마우스) 또는 PBS. 0일에, 마우스를 NP-피콜(0일; 면역원 250 μ g과 함께 100 μ l i.p.)로 면역화시켰다. -1, 3, 7, 10일에 꼬리 혈관을 통해 혈액을 수집하였다. 항-(4-하이드록시-나이트로벤자세틸)(NP)-특이적 항체(IgM, IgG 및 IgAa/2)를 상기 기재된 바와 같이 회석된 혈청을 사용하여 ELISA으로 분석하였다(Hardenberg et al., Immunol Cell Biol, 86(6): 530-4,(2008); Guadagnoli et al., 2011, Blood 117(25): 6856-65). 간략하게 96-웰 ELISA 플레이트(그레이너(Greiner))를 탄산나트륨 버퍼(pH 9.6) 중의 NP-BSA 5 μ g/ml(바이오서치 테크놀로지(Bioscience Technologies))으로 밤새 4℃에서 코팅하였다. 웰을 1시간 동안 37℃에서 1% BSA로 차단하고, 회석된 혈청과 함께 2시간 동안 실온에서 배양하였다. HRP-접합된 이소타입 특이적 항체(염소 항-마우스 IgG, IgA 및 IgM, 서던 바이오테크(Southern Biotech)로부터)를 드러내는 항체로서 사용하였다. 모든 회석물을 PBS/BSA 1%/트윈 20 0.05% 중에서 제조하였다. 도 1로부터 명백한 바와 같이, hAPRIL.01A 및 14 1G.15 둘 다는 T-세포 의존적 B-세포 반응을 생체내 억제하였다. hAPRIL.01A는 14 1G.15보다 덜 효과적으로 이러한 반응을 억제하였다. 이소타입-매칭된 대조군으로서 PBS 및 마우스 IgG1은 IgA, IgM 및 IgG 항-NP 반응에 영향을 미치지 않았다.

도면

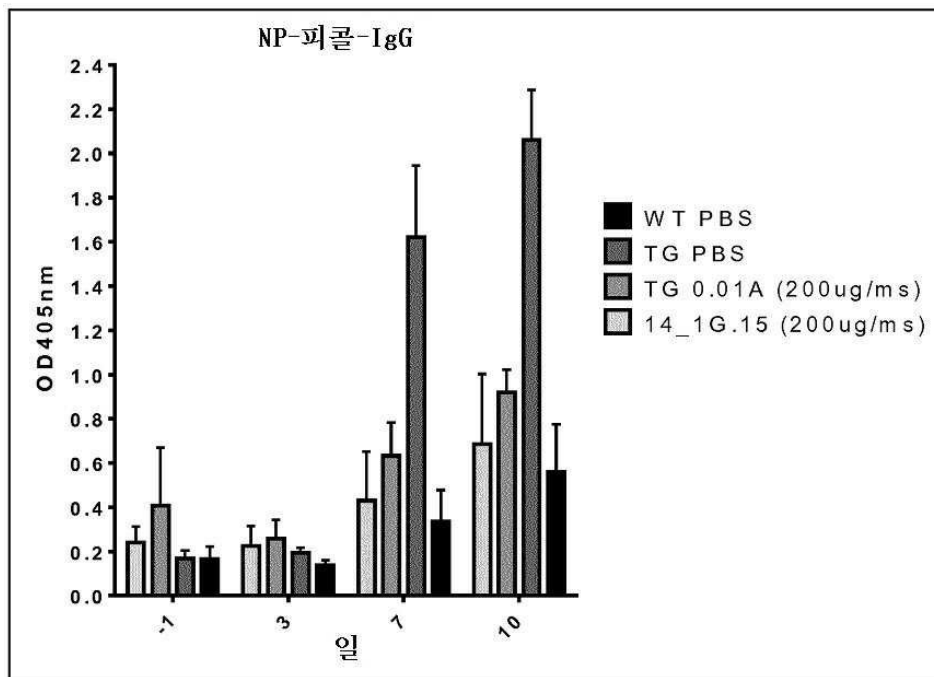
도면1a



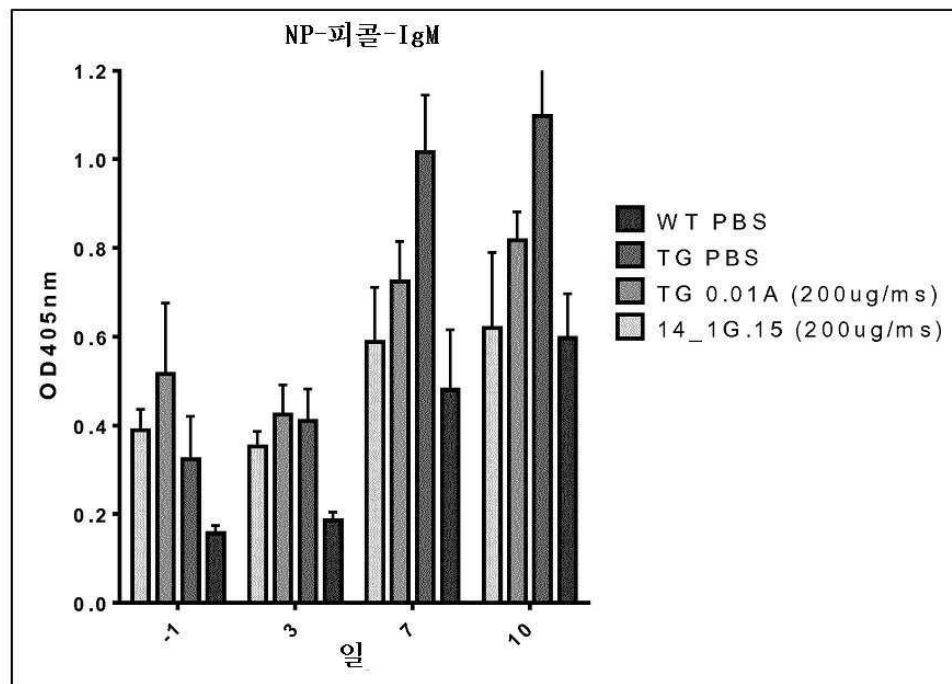
도면1b



도면1c



도면1d



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Aduro Biotech Holdings, Europe B.V.

<120> Altered APRIL binding antibodies

<130> W02016/110587

```

<140> PCT/EP2016/050314
<141> 2016-01-08
<150> NL 2014108
<151> 2014-01-09
<160> 60
<170> BiSSAP 1.2
<210> 1
<211> 363
<212> DNA
<213> Mus musculus
<220>
<221> source
<222> 1..363
<223> /mol_type="unassigned DNA"
        /organism="Mus musculus"
<400> 1
gaggtccagt tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg      60
tcctgcaagg ctctggata cacattcact agctatgtga tgcactgggt gaagcagaag      120

cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt ataatgatgc tcctaaatac      180
aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacagtg acttcagaca agtcctccgg cacagcctac      240
atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aaggggcttg      300
ggttacgcc tttactatgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc      360
tca                                          363

<210> 2
<211> 321
<212> DNA
<213> Mus musculus
<220>
<221> source
<222> 1..321
<223> /mol_type="unassigned DNA"
        /organism="Mus musculus"

<400> 2

```

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc aagtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
gtcacctgca aggccagtc gaattgtgggt aataatgtag cctggtatca acagaaagca 120
gggcaatctc ctaaagcact gatttcctcg gcatccaacc gtgacagtgg agtcctgat 180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtgcagtct 240
gaagacttgg cagactatct ctgtcagcaa tataacatct atccattcac gttcggctcg 300
gggacaaagt tggaaataaa a 321

<210> 3

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

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

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

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213>

> Mus musculus

<400> 4

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

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val

1 5

<210> 6

<211> 16

<

212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Ala Pro Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Gly Leu Gly Tyr Ala Leu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Asn Asn Val Ala

1 5 10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Ser Ala Ser Asn Arg Asp Ser

1 5

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Phe Thr Phe

1 5 10

<210> 11

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..363

<223> /mol_type="unassigned DNA"

/note="Engineered immunoglobulin VH sequence"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 11

caggtccagc ttgtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60

tcctgcaagg cttctggata cacattcact agctatgtga tgcattgggt gcgccaggcc 120

ccccgacaaa ggcttgagtg gatgggatat attaatecctt ataatgatgc tcctaaatac 180

aatgagaagt tcaaaggcag agtcaccatt accagggaca catccgcgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaagac acggctgtgt attactgtgc gagaggcttg 300

ggttacgcc tttactatgc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 12

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Engineered immunoglobulin VH sequence

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Leu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 13

```

<211> 363
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..363
<223> /mol_type="unassigned DNA"
      /note="Engineered immunoglobulin VH sequence"
      /organism="Artificial Sequence"
<400> 13
caggtccagc ttgtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctggata cacattcact agctatgtga tgcactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatat attaatcctt ataatgatgc tcctaaatac      180
aatgagaagt tcaaaggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac      240

atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaggcttg      300
ggttacgcc tttactatgc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcg      360
agc                                          363

<210> 14
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Engineered immunoglobulin VH sequence
<400> 14
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

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

```

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

Ala Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Leu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 15

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<221> source

<222> 1..363

```
<223> /mol_type="unassigned DNA"
```

/note="Engineered immunoglobulin VH sequence"

```
/organism="Artificial Sequence"
```

 $\langle 400 \rangle$

15		
cagg	tccagc	60
ttgtgcagtc	ttggggtgag	
gtgaagaagc	ctggggcctc	
ag	tgaaggtt	
tcctgcaagg	catctggata	120
cacattcact	agctatgtga	
tgcactgggt	gcgacaggcc	
cctggacaag	ggcttgagtg	180
gatgggatat	attaatcctt	
ataatgatgc	tcctaaatac	
aatgagaagt	tcaaaggcag	240
agtcaccatg	accagggaca	
cgtccacgag	cacagtctac	
atggagctga	gcagcctgag	300
atctgaggac	acggccgtgt	
attactgtgc	gagaggcttg	
ggttacgccc	tttactatgc	360
tatggactac	tggggccaag	
ggacaatgg	caccgtctcg	
agc		363

<210> 16

 $\langle 211 \rangle$ 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> Engineered immunoglobulin VH sequence

<400> 16

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

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

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 17

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..363

<223> /mol_type="unassigned DNA"

/note="Engineered immunoglobulin VH sequence"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 17

caggtccagc ttgtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc cgggcgccag cgtgaaggtg 60
 agctgcaagg ccagcggata cacattcact agctatgtga tgcactgggt gagacaggcc 120
 cccggccagg gcctggagtg gatgggctat attaatcctt ataatgatgc tcctaaatac 180

aatgagaagt tcaaaggcag agtgaccatg accagagaca ccagcgccag caccgcctac 240
 atggagctga gcagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagaggcttg 300

ggttacgcc tttactatgc tatggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgagc 360
agc 363

<210> 18
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Engineered immunoglobulin VH sequence
<400> 18
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Leu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 19
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<222> 1..321
<223> /mol_type="unassigned DNA"

/note="Engineered immunoglobulin VL sequence"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 19

```
gacattgtga tgaccagtc tcaaaattc atgtccacat ccgtaggaga cagggtcagc      60
atcacctgca aggccagtc gaatgtgggt aataatgtag cctggtatca acagaaacca      120
ggacaatctc ctaaattgct gatttactcg gcatccaacc gtgacagtgg agtcctgat      180
cgcttctcag gcagtgggtc tgggacagat ttactctca ccatcagcaa tatgcagtct      240
gaagacctgg cagattattt ctgccagcaa tataacatct atccattcac gttcggaggg      300
gggaccaagc tggaaatcaa a                                              321
```

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Engineered immunoglobulin VL sequence

<400> 20

```
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 Gly Asn Asn
          20          25          30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
          35          40          45

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

<210> 21

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..321

<223> /mol_type="unassigned DNA"

/note="Engineered immunoglobulin VL sequence"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 21

```

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgccacat cagtaggaga cagggtcagc      60
gtcacctgca aggccagtc gaattgtgggt aataatgtag cctggtatca acagaaacca    120
gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcatccaacc gtgacagtgg agtcctgat     180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcaccaa tgtgcagtct    240

```

```

gaagacttgg cagagtatct ctgtcagcaa tataacatct atccattcac gttcggtgct    300
gggaccaagc tggagctgaa a                                              321

```

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Engineered immunoglobulin VL sequence

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

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

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

<210> 23

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..321

<223> /mol_type="unassigned DNA"

 /note="Engineered immunoglobulin VL sequence"

 /organism="Artificial Sequence"

<400> 23

gaaattgtgt tgacgcagtc tccttcacc cagtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtc gaattgtgggt aataatgtag cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaaactcct aatctattcg gcatccaacc gtgacagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgatatttg caacttatta ctgccagcaa tataacatct atccattcac gtttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 24

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Engineered immunoglobulin VL sequence

<400> 24

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

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

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 25

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..321

<223> /mol_type="unassigned DNA"

/note="Engineered immunoglobulin VL sequence"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 25

gacatcgtga tgaccacgtc tccttctacc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60

atcacttgca aggccagtca gaatgtgggt aataatgtag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagtcct gatctattcg gcatccaacc gtgacagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagag ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gatgatattg caacttatta ctgccagcaa tataacatct atccattcac gtttgccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Engineered immunoglobulin VL sequence

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 27

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..321

<223> /mol_type="unassigned DNA"

/note="Engineered immunoglobulin VL sequence"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 27

gatatacctga tgaccacgtc tcaaaaaatc atgccacat cagtgggaga cagggtcagc 60

gtcacctgca aggccagtca gaatgtgggt aataatgtag cctggtatca acagaaacca 120

ggacagtctc ctaaagcact gatttactcg gcatccaacc gtgacagtgg agtcctgat 180

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcaccaa tgtgcagtct 240

gaggacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacatct atccattcac gttcggtgct 300

gggaccaagc tggacctgaa a

321

<210> 28

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Engineered immunoglobulin VL sequence

<400> 28

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

1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Asn Asn

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

 35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

 50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser

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

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

 100 105

<210> 29

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..321

<223> /mol_type="unassigned DNA"

 /note="Engineered immunoglobulin VL sequence"

 /organism="Artificial Sequence"

<400> 29

gacatcgtga tgacccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgca aggccagtc gaattgtgggt aataatgtag cctggatatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctcttcg gcatccaacc gtgacagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gatgatittg caacttatit ctgccagcaa tataacatct atccattcac gtttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 30

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Engineered immunoglobulin VL sequence

<400> 30

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

<210> 31

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..363

<223> /mol_type="unassigned DNA"

/note="Engineered immunoglobulin VH sequence"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 31

```
caggtccagc ttgtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc cggcgccag cgtgaaggtg      60
agctgcaagg ccagcggata cacattcact agctatgtga tgcactgggt gagacaggcc      120
cccggccagg gcctggagtg gatgggctat attaatcctt ataatgatgc tcctaaatac      180
aatgagaagt tcaaaggcag agtgaccatg accagtgaca ccagcgccag caccgcctac      240
atggagctga gcagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagaggcttg      300
```

```
ggttacgcc tttactatgc tatggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgagc      360
agc                                             363
```

<210> 32

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Engineered immunoglobulin VH sequence

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85

90

95

Ala Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Leu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 33

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..363

<223> /mol_type="unassigned DNA"

/note="Engineered immunoglobulin VH sequence"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 33

caggtccagc ttgtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ccggcgccag cgtgaaggtg 60

agctgcaagg ccagcggata cacattcact agctatgtga tgcactgggt gagacaggcc 120

cccggccagg gcctggagtg gatgggctat attaatcctt ataatgatgc tcctaaatac 180

aatgagaagt tcaaaggcag agtgaccatc accagtgaca ccagcgccag caccgcctac 240

atggagctga gcagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagaggcttg 300

ggttacgcc tttactatgc tatggactac tggggccagg gcaccacgt gaccgtgagc 360

agc 363

<210> 34

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Engineered immunoglobulin VH sequence

<400> 34

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

1

5

10

15

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

<210> 35

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..363

<223> /mol_type="unassigned DNA"

/note="Engineered immunoglobulin VH sequence"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 35

caggtccagc ttgtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ccggcgccag cgtgaaggtg	60
agctgcaagg ccagcggata cacattcact agctatgtga tgcactgggt gagacaggcc	120
cccgccagg gcctggagtg gatgggctat attaatcctt ataatgatgc tcctaaatac	180
aatgagaagt tcaaaggcag agtgacatg accagtgaca agagcgccag caccgcctac	240
atggagctga gcagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagaggcttg	300
ggttacgcc tttactatgc tatggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgagc	360
agc	363

<210> 36

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Engineered immunoglobulin VH sequence

<400> 36

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Leu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 37

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..363

<223> /mol_type="unassigned DNA"

/note="Engineered immunoglobulin VH sequence"

/organism="Artificial Sequence"

<400>

37
gaggtccagc ttgtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ccggcgccag cgtgaaggtg 60
agctgcaagg ccagcggata cacattcact agctatgtga tgcactgggt gagacaggcc 120
cccgccagg gcctggagtg gatgggctat attaatcctt ataatgatgc tcctaatac 180
aatgagaagt tcaaaggcag agtgaccatg accagtgaca ccagcgccag caccgcctac 240
atggagctga gcagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagaggcttg 300
ggttacgcc ttactatgc tatggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgagc 360
agc 363

<210> 38

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Engineered immunoglobulin VH sequence

<400> 38

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..363

<223> /mol_type="unassigned DNA"

/note="Engineered immunoglobulin VH sequence"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 39

caggtccagc ttgtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ccggcgccag cgtgaaggtg 60

agctgcaagg ccagcggata cacattcact agctatgtga tgcactgggt gagacaggcc 120

cccggccagg gcctggagtg gatgggctat attaatcctt ataatgatgc tcctaaatac 180

aatgagaagt tcaaaggcaa agcgacatg accagtgaca ccagcgccag caccgcctac 240

atggagctga gcagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagaggcttg 300

ggttacgcc tttactatgc tatggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgagc 360

agc 363

<210> 40

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Engineered immunoglobulin VH sequence

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Leu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 41

<211> 1344

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..1344

<223> /mol_type="unassigned DNA"

/note="Engineered immunoglobulin heavy chain sequence"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 41

caggtccagc ttgtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcctgaagg ctcttgata cacattcact agctatgtga tgcattgggt gcgccaggcc 120
cccgacaaa ggcttgagt gatgggatat attaatcctt ataatgatgc tcctaaatac 180
aatgagaagt tcaaaggcag agtcaccatt accagggaca catccgcgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaagac acggctgtgt attactgtgc gagaggttg 300
ggttacgcc ttactatgc tatggactac tggggccaag ggaccacgt caccgtctcc 360
tcagcatcca ccaagggcc atccgtcttc ccctggcgc cctgtccag gagcacctcc 420

gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480
tcgtggaact caggcgcct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540
tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag 600
acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 660
tccaaatatg gtccccatg cccaccatgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca 720
gtcttcctgt tcccccaaa acccaaggac actctcatga tctccggac ccctgaggtc 780

acgtgcgtgg tggtagacgt gagccaggaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg 840

gatggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg 900

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960

aagtgcagg tcaccaaaa aggccctccc tctccatcg agaaaacat ctccaaagcc 1020

aaagggcagc cccgagagcc acaggtgtac accctgcccc catcccagga ggagatgacc 1080

aagaaccagg tcagcctgac ctgctgtgtc aaaggcttct accccagcga catgccgtg 1140

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200

tccgacggct cttcttctct ctacagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag 1260

gggaatgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacacagaag 1320

agcctctccc tgtctctggg taaa 1344

<210> 42

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Engineered immunoglobulin heavy chain sequence

<400> 42

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Leu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

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

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 43

<211> 1344

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..1344

<223> /mol_type="unassigned DNA"

/note="Engineered immunoglobulin heavy chain sequence"

/organism="Artificial Sequence"

<400>

43
 caggtccagc ttgtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgaagg ctcttgata cacattcact agctatgtga tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatat attaatcctt ataatgatgc tcctaaatac 180
 aatgagaagt tcaaaggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaggcttg 300
 ggttacgcc tttactatgc tatggactac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcg 360
 agcgcatcca ccaagggcc atccgtcttc ccctggcgc cctgctccag gagcacctcc 420
 gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480
 tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540
 tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag 600

acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 660
 tccaaatatg gtcccccatg cccaccatgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca 720
 gtcttcctgt tcccccaaa acccaaggac actctcatga tctcccgac ccctgaggtc 780
 acgtgcgtgg tggtagcgt gagccaggaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg 840

gatggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg 900
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
 aagtgaagg tctccaacaa aggcctcccg tcttccatcg agaaaacat ctccaagcc 1020
 aaagggcagc cccgagagcc acaggtgtac accctgcccc catcccagga ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 1140
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200
 tccgacggct cttcttctct ctacagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag 1260

gggaatgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctgc acaaccacta cacacagaag 1320
 agcctctccc tgtctctggg taaa 1344

<210> 44

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Engineered immunoglobulin heavy chain sequence

<400> 44

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85

90

95

Ala Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Leu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100

105

110

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

115

120

125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

195

200

205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly

210

215

220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser

225

230

235

240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245

250

255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro

260

265

270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275

280

285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290

295

300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

305

310

315

320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr

325

330

335

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

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

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

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

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 45

<211> 1344

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..1344

<223> /mol_type="unassigned DNA"

/note="Engineered immunoglobulin heavy chain sequence"

/organism="Artificial Sequence"

<400>

45
caggtccagc ttgtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
tcctgcaagg catctggata cacattcact agctatgtga tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggettgagtg gatgggatat attaatcctt ataagatgc tcctaaatac 180
aatgagaagt tcaaaggcag agtcacatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaggcttg 300
ggttacgccc ttactatgc tatggactac tggggccaag ggacaatggt caccgtctcg 360

agcgcatcca ccaagggccc atccgtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc 420

gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtec 540

tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag 600

acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 660

tccaaatatg gtccccatg cccaccatgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca 720

gtcttctgt tcccccaaa acccaaggac actctcatga tctccggac ccctgaggtc 780

acgtgctggg tgggtggacgt gagccaggaa gaccccaggg tccagttcaa ctggtacgtg 840

gatggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg 900

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960

aagtgcgaagg tctccaacaa aggcctcccg tctccatcg agaaaacat ctccaaagcc 1020

aaagggcagc cccgagagcc acaggtgtac accctgcccc catcccagga ggagatgacc 1080

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 1140

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200

tccgacggct ctttcttct ctacagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag 1260

gggaatgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctgc acaaccacta cacacagaag 1320

agcctctccc tgctcttggg taaa 1344

<210> 46

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Engineered immunoglobulin heavy chain sequence

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50	55	60	
Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Leu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly			
	100	105	110
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser			
	115	120	125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala			
	130	135	140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val			
145	150	155	160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
	165	170	175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val			
	180	185	190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His			
	195	200	205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly			
210	215	220	
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser			
225	230	235	240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
	245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro			
	260	265	270
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
	275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val			
290	295	300	

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

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

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 47

<211> 1344

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..1344

<223> /mol_type="unassigned DNA"

/note="Engineered immunoglobulin heavy chain sequence"

/organism="Artificial Sequence"

<400>

47

cagggtccagc ttgtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ccggcgccag cgtgaaggtg	60
agctgcaagg ccagcggata cacattcact agctatgtga tgcactgggt gagacaggcc	120
cccggccagg gcctggagtg gatgggctat attaatcctt ataatgatgc tcctaaatac	180

aatgagaagt tcaaaggcag agtgaccatg accagagaca ccagcgccag caccgcctac 240
atggagctga gcagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagaggcttg 300
ggttacgcc tttactatgc tatggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgagc 360
agcgcatcca ccaagggccc atccgtcttc ccctggcgc cctgctccag gagcacctcc 420

gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480
tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtec 540
tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag 600
acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 660
tccaaatatg gtccccatg cccaccatgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca 720
gtcttctgt tcccccaaa acccaaggac actctcatga tctccggac ccctgaggtc 780
acgtgctgg tggtagcgt gagccaggaa gaccccagg tccagttcaa ctggtacgtg 840

gatggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg 900
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
aagtgaagg tctccaacaa aggctcccg tctccatcg agaaaacat ctccaaagcc 1020
aaagggcagc cccgagagcc acaggtgtac accctgcccc catcccagga ggagatgacc 1080
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 1140
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200
tccgacggct ctttcttct ctacagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag 1260

gggaatgtct tctcatgtct cgtgatgat gaggtctctg acaaccacta cacacagaag 1320
agcctctccc tgtctctggg taaa 1344

<210> 48

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Engineered immunoglobulin heavy chain sequence

<400> 48

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Ala Pro Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Leu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140

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

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

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

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

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

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

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

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

 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

 <210> 49
 <211> 642
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <222> 1..642
 <223> /mol_type="unassigned DNA"
 /note="Engineered immunoglobulin light chain sequence"
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 49

gacattgtga tgaccagtc tccttcact ctctctgcat ctgtgggaga cagagtaacc 60
atcacttgca aggccagtc gaattgtgggt aataatgtag cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctact gatctcttcc gcatccaacc gggacagtgg tgtgccctca 180
aggtttagcg gcagtggatc agggacagag ttcacattga ccatatccag cctgcagcct 240
gatgattttg ctacttattt ctgccaacaa tataacattt acccattcac gtttgccag 300
ggcaccaagc tagagatcaa acggacgggt gctgcaccct ctgtctttat cttcccgcca 360
tctgatgaac agttgaagtc cggaacagcc tctgttgtgt gcctgctgaa taactttat 420

ccccgcgagg cgaaagtcca gtggaaggig gataacgccc tccaatcagg caattcccag 480
gagagtgtga cagagcaaga ttccaaggac tcaacctaca gcctcagcag tactttaact 540
ctgagcaaag cagactacga gaagcacaaa gtctacgctt gcgaagtcac ccatcagggc 600
cttagctcgc ccgtcacaaa gagctttaac aggggagaat gt 642

<210> 50

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Engineered immunoglobulin light chain sequence

<400> 50

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Asn Asn
20 25 30

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

Ser Ser Ala Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 51

<211> 1344

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..1344

<223> /mol_type="unassigned DNA"

/note="Engineered immunoglobulin heavy chain sequence"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 51

caggtccaac ttgtgcagtc tggggctgaa gtgaagaagc cggcgctag tgtgaaggtt 60
 tcatgtaagg ctctggata cacatttact tcatatgtaa tgcactgggt gcgtcaagcc 120
 cctggccagg gcctggagtg gatggggtat attaatcctt ataatgatgc tcctaaatac 180

aatgagaagt tcaaaggaag agcaactatg accagtata ctagcgcttc aaccgcctac 240
 atggagctga gcagcttaag aagcgacgac accgcgtgt actattgtgc caggggcttg 300

ggttacgcc tttattatgc tatggactac tggggtcagg gcaccacagt gaccgttagc 360
tctgcatcta ctaagggacc atccgtcttc cccttgccgc catgctcccg cagtacaagt 420
gagagcacag cagccctggg ctgtttggta aaggactact tccccgaacc tgtgactgtg 480
tcttggaact caggcgccct gactagcggc gtgcacactt tccctgctgt cctacagtcc 540
tcaggactat actccctctc gtctgtggtg acagtgcctt cctcatcatt gggaacgaaa 600

acctatactt gcaacgttga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttag 660
tccaaatatg gtcccccatg tccaccatgt ccagcacctg agtttcttgg cggaccaagt 720
gttttctgt tcccccaaa acccaaggat actctcatga taagtgcac ccctgaagtc 780
acttgcgtgg tggtaggact tagccaggaa gatcccgaag tccaattcaa ctggtacgta 840
gatggcgtag aagtgcataa tgcgaagaca aagccgagag aggagcagtt taattcgacg 900
tatcgggtgg tcagcgtcct cacagtcttg caccaggact ggctgaacgg caaggagtat 960
aagtgaagg tctccaaca aggtctcccg tctccattg agaaaacaat ctccaaagca 1020

aaagggcagc cccgagaacc acaagtgtac accctgcccc catctcagga ggagatgacc 1080
aagaaccagg tcagtcttac ctgctggtc aaaggctttt atccctcaga tatcgccgtt 1140
gagtgggaaa gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgttctggat 1200
tctgacggat cgttcttttt atacagcagg ctaaccgtgg acaagtctcg gtggcaggaa 1260
gggaatgtat tttcttcag tgtaatgcat gaggtctgc acaatcatta cacacagaag 1320
tctctctccc tgtctcttgg taaa 1344

<210> 52

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Engineered immunoglobulin heavy chain sequence

<400> 52

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Leu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly

210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser

225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro

260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr

325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

340 345 350
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

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

385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser

405 410 415
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435 440 445

<210> 53

<211> 1335

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> source

<222> 1..1335

<223> /mol_type="unassigned DNA"

/organism="Mus musculus"

<400> 53

gaggtccagt tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaagg ctctggata cacattcact agctatgtga tgcactgggt gaagcagaag 120

cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt ataatgatgc tcctaaatac 180

aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacagtg acttcagaca agtcctccgg cacagcctac 240

atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aaggggcttg 300

ggttacgccc ttactatgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 360

tcagccaaaa cgacaccccc atctgtctat ccactggccc ctggatctgc tgcccaaact 420

aactccatgg tgacctggg atgcctggtc aagggtatt tccctgagcc agtgacagt 480

acctggaact ctggatccct gtccagcgg gtgcacacct tcccagctgt cctggagtct 540

gacctctaca ctctgagcag ctcatgtact gtccctcca gccctcggcc cagcgagacc 600

gtcacctgca acgttgccca cccggccagc agcaccaagg tggacaagaa aattgtgccc 660

agggattgtg gtgtgaagcc ttgcatatgt acagtcccag aagiatcatc tgtcttcac 720

ttcccccaa agcccaagga tgtgtcacc attactctga ctccaaagt cacgtgtgtt 780

gtggtagaca tcagcaagga tgatcccag gtccagttca gctggtttgt agatgatgtg 840

gaggtgcaca cagctcagac gcaaccccg gaggagcagt tcaacagcac ttccgctca 900

gtcagtgaac ttccatcat gcaccaggac tggtcaatg gcaaggagtt caaatgcagg 960

gtcaacagtg cagctttccc tgcccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaaggcaga 1020

ccgaaggctc cacaggtgta caccattcca cctcccaagg agcagatggc caaggataaa 1080

gtcagtctga cctgcatgat aacagacttc ttccctgaag acattactgt ggagtggcag 1140

tggaatgggc agccagcgga gaactacaag aacactcagc ccatcatgaa cacgaatggc 1200

tcttacttcg tctacagca gctcaatgtg cagaagagca actgggaggc aggaaatact 1260

ttcacctgct ctgtgttaca tgagggcctg cacaaccacc ataactgagaa gagcctctcc 1320

cactctcctg gtaaa 1335

<210> 54

<211> 642

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> source

<222> 1..642

<223> /mol_type="unassigned DNA"

/organism="Mus musculus"

<400> 54

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc aagtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60

gtcacctgca aggccagtca gaatgtgggt aataatgtag cctggtatca acagaaagca 120
 gggcaatctc ctaaagcact gatttcctcg gcatccaacc gtgacagtgg agtcctgat 180
 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcaa tgtgcagtct 240
 gaagacttgg cagactatit ctgtcagcaa tataacatct atccattcac gticggctcg 300
 gggacaaagt tggaaataaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca 360
 tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac 420

cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg 480
 aacagttgga ctgacagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcacg 540
 ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgagggcac tcacaagaca 600
 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gt 642

<210> 55

<211> 445

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 55

Glu 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 Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Leu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140
 Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

 145 150 155 160
 Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

 165 170 175
 Val Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro

 180 185 190
 Ser Ser Pro Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro

 195 200 205
 Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly

 210 215 220
 Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys

 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln

 260 265 270
 Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln

 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu
 290 295 300
 Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg
 305 310 315 320
 Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

 325 330 335
 Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro

 340 345 350
 Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
 355 360 365
 Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln

 370 375 380

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly
385 390 395 400
Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu
405 410 415
Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn
420 425 430
His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440 445
<210> 56
<211> 214
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 56
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Lys Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Asn Asn
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45
Ser Ser Ala Ser Asn Arg Asp Ser 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 Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110
Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
115 120 125
Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu

145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr

180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys

210

<210> 57

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> source

<222> 1..57

<223> /mol_type="unassigned DNA"

/organism="Homo sapiens"

<400> 57

atggactgga cctggaggat cctctttttg gtggcagcag ccacaggtgc ccactcc 57

<210> 58

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 59

<211> 66

<212> DNA

```

<213
> Homo sapiens
<220>
<221> source
<222> 1..66
<223> /mol_type="unassigned DNA"
      /organism="Homo sapiens"
<400> 59
atggacatga gagtctctgc tcagctcctg gggtctcctgc tgctctgttt cccaggtgcc      60
agatgt                                           66
<210> 60
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 60
Met Asp Met Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys
1           5           10           15
Phe Pro Gly Ala Arg Cys
20

```