



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0004726
(43) 공개일자 2023년01월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61P 7/06 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2896 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7040580
(22) 출원일자(국제) 2021년04월22일
심사청구일자 2022년11월21일
- (85) 번역문제출일자 2022년11월18일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2021/089059
(87) 국제공개번호 WO 2021/213475
국제공개일자 2021년10월28일
- (30) 우선권주장
202010324783.4 2020년04월22일 중국(CN)
202110270671.X 2021년03월12일 중국(CN)

- (71) 출원인
아케소 바이오파마, 인크.
중국 528437 광둥성 중산 토치 디벨롭먼트 존 선
농 불리바드 6
- (72) 발명자
장, 평
중국 광둥 528437 중산 토치 디벨롭먼트 존 선농
로드 6
리, 빠이용
중국 광둥 528437 중산 토치 디벨롭먼트 존 선농
로드 6
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김경교, 양용

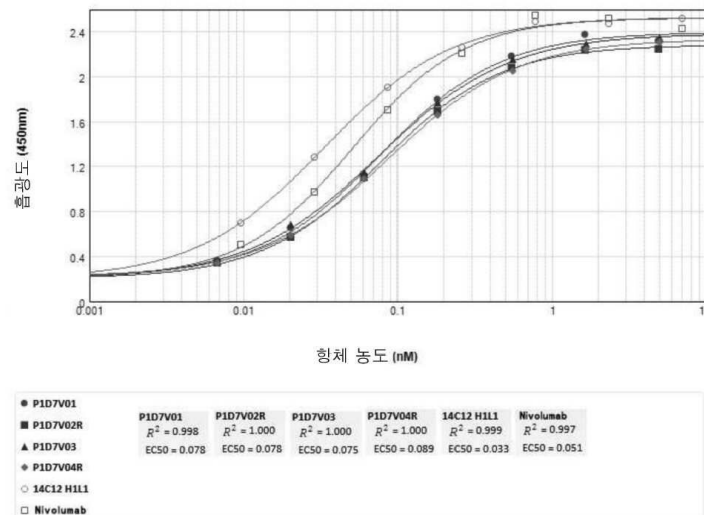
전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 발명의 명칭 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체, 이의 약물 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 7/06 (2018.01)

C07K 16/2818 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/55 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2317/73 (2013.01)

G01N 2333/70503 (2013.01)

G01N 2333/70596 (2013.01)

(72) 발명자

샤, 유

중국 광둥 528437 쑹산 토치 디벨롭먼트 존 선농
로드 6

왕, 쑹민

중국 광둥 528437 쑹산 토치 디벨롭먼트 존 선농
로드 6

명세서

청구범위

청구항 1

항-CD73/항-PD-1 이중특이항체로서,

PD-1을 표적으로 하는 제1단백질 기능 영역, 및 CD73을 표적으로 하는 제2단백질 기능 영역을 포함하고,

상기 제1단백질 기능 영역은 서열번호 44로 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역에 포함된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 서열번호 49로 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역에 포함된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하고, 여기서

바람직하게는 상기 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 45-47에 기재된 서열, 또는 서열번호 45-47에 기재된 서열과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 45-47에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열이며;

바람직하게는 상기 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 50-52에 기재된 서열, 또는 서열번호 50-52에 기재된 서열과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 50-52에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열이며;

또는

상기 제2단백질 기능 영역은 서열번호 2로 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역에 포함된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 서열번호 7로 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역에 포함된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고;

여기서,

바람직하게는 상기 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 3-5에 기재된 서열, 또는 서열번호 3-5에 기재된 서열과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 3-5에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열; 및

바람직하게는 상기 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 8-10에 기재된 서열, 또는 서열번호 8-10에 기재된 서열과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 8-10에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열인, 항-CD73/항-PD-1이중특이항체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제1단백질 기능 영역은,

서열번호 44 또는 서열번호 62에 기재된 서열, 또는 서열번호 44 또는 62에 기재된 서열과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 44 또는 62에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미

노산 서열; 및

서열번호 49 또는 서열번호 64에 기재된 서열, 또는 서열번호 49 또는 64에 기재된 서열과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 49 또는 64에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상 (바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이 (바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하고;

및/또는

상기 제2단백질 기능 영역은,

서열번호 2 또는 서열번호 20에 기재된 서열, 또는 서열번호 2 또는 서열번호 20에 기재된 서열과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 2 또는 서열번호 20에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상 (바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이 (바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열; 및

서열번호 7 또는 서열번호 22에 기재된 서열, 또는 서열번호 7 또는 서열번호 22에 기재된 서열과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 7 또는 서열번호 22에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상 (바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이 (바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하고;

또는

상기 제2단백질 기능 영역은,

서열번호 20에 기재된 서열, 또는 서열번호 20에 기재된 서열과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 20에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상 (바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이 (바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열; 및

서열번호 24에 기재된 서열, 또는 서열번호 24에 기재된 서열과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 24에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상 (바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이 (바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하는,

항-CD73/항-PD-1 이중특이항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 제1단백질 기능 영역 및 제2단백질 기능 영역의 수는 독립적으로 1개 또는 2개 이상인, 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1단백질 기능 영역 및 제2단백질 기능 영역은 직접 또는 링커를 통해 연결되고;

바람직하게는, 상기 링커는 (GGGS) n 이고, n 은 양의 정수, 예컨대, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6인,

항-CD73/항-PD-1 이중특이항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1단백질 기능 영역 및 제2단백질 기능 영역은 독립적으로 면역글로불린 또는 불완전항체, Fab, F(ab')₂ 또는 단일쇄 항체와 같은 항원결합 단편이고,

바람직하게는, 상기 제1단백질 기능 영역은 면역글로불린이고, 상기 제2단백질 기능 영역은 항원결합 단편이거나; 또는

상기 제1단백질 기능 영역은 항원결합 단편이고, 상기 제2단백질 기능 영역은 면역글로불린인,

항-CD73/항-PD-1 이중특이항체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항원결합 단편의 중쇄 가변 영역 N-말단은 상기 면역글로불린의 CH1의 C-말단에 직접 (또는 링커를 통해) 연결되고, 상기 항원결합 단편의 경쇄 가변 영역 N-말단은 상기 면역글로불린의 경쇄 가변 영역 CL의 C-말단에 직접 (또는 링커를 통해) 연결되거나; 또는

상기 항원결합 단편의 중쇄 가변 영역 N-말단은 상기 면역글로불린의 경쇄 가변 영역 CL의 C-말단에 직접 (또는 링커를 통해) 연결되고, 상기 항원결합 단편의 경쇄 가변 영역 N-말단은 상기 면역글로불린의 중쇄 가변 영역 CH1의 C-말단에 직접 (또는 링커를 통해) 연결되거나; 또는

상기 항원결합 단편의 중쇄 가변 영역 C-말단은 상기 면역글로불린의 중쇄 N-말단에 직접 (또는 링커를 통해) 연결되고, 상기 항원결합 단편의 경쇄 가변 영역 C-말단은 상기 면역글로불린의 경쇄 N-말단에 직접 (또는 링커를 통해) 연결되거나; 또는

상기 항원결합 단편의 중쇄 가변 영역 C-말단은 상기 면역글로불린의 경쇄 N-말단에 직접 (또는 링커를 통해) 연결되고, 상기 항원결합 단편의 경쇄 가변 영역 C-말단은 상기 면역글로불린의 중쇄 N-말단에 직접 (또는 링커를 통해) 연결되는,

항-CD73/항-PD-1 이중특이항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항원결합 단편은 단일쇄 항체이고;

바람직하게는 상기 제1단백질 기능 영역은 면역글로불린이고, 상기 제2단백질 기능 영역은 단일쇄 항체이거나; 또는

상기 제1단백질 기능 영역은 단일쇄 항체이고, 상기 제2단백질 기능 영역은 면역글로불린인,

항-CD73/항-PD-1 이중특이항체.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 단일쇄 항체는 링커를 통해 항체 중쇄 가변 영역(V_H)과 항체 경쇄 가변 영역(V_L)을 연결한 분자이고;

바람직하게는 상기 단일쇄 항체는 NH₂-V_L-링커-V_H-COOH 또는 NH₂-V_H-링커-V_L-COOH의 구조를 가지는,

항-CD73/항-PD-1 이중특이항체.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서,

상기 단일쇄 항체가 링커를 통해 면역글로불린의 중쇄의 C-말단(C_H)(또는 중쇄의 N-말단, 중쇄 가변 영역의 CH1의 C-말단)에 연결될 경우, 우선 상기 단일쇄 항체의 항체 중쇄 가변 영역(V_H)이 연결되거나, 또는 우선 상기 단일쇄 항체의 항체 경쇄 가변 영역(V_L)이 연결되며;

바람직하게는 단일쇄 항체는 링커- V_H -링커- V_L -COOH 또는 링커- V_L -링커- V_H -COOH의 구조를 가질수 있으며;

바람직하게는

상기 면역글로불린의 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 3-5로 기재된 CDR을 포함하고, 상기 면역글로불린의 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 8-10으로 기재된 CDR을 포함하며;

상기 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 45-47로 기재된 CDR을 포함하고, 상기 단일쇄 항체의 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 50-52로 기재된 CDR을 포함하며;

바람직하게는 상기 단일쇄 항체(예컨대, NH_2 - V_L -링커- V_H -COOH 또는 NH_2 - V_H -링커- V_L -COOH)가 링커를 통해 면역글로불린의 중쇄의 C-말단에 연결될 경우, 우선 상기 단일쇄 항체의 아미노산 서열이 서열번호 45-47로 기재된 CDR을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역(V_H)이 연결될 수 있거나, 또는 우선 상기 단일쇄 항체의 아미노산 서열이 서열번호 50-52로 기재된 CDR을 포함하는 항체 경쇄 가변 영역(V_L)이 연결될 수 있으며;

또는 바람직하게는,

상기 면역글로불린의 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 45-47로 기재된 CDR을 포함하고, 상기 면역글로불린의 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 50-52로 기재된 CDR을 포함하며;

및/또는

상기 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 3-5로 기재된 CDR을 포함하고, 상기 단일쇄 항체의 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 8-10으로 기재된 CDR을 포함하며;

여기서, 상기 단일쇄 항체(예컨대, NH_2 - V_L -링커- V_H -COOH 또는 NH_2 - V_H -링커- V_L -COOH)가 링커를 통해 면역글로불린의 중쇄의 C-말단에 연결될 경우, 우선 상기 단일쇄 항체의 아미노산 서열이 서열번호 3-5로 기재된 CDR을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역(V_H)이 연결될 수 있고, 또는 우선 상기 단일쇄 항체의 아미노산 서열이 서열번호 8-10으로 기재된 CDR을 포함하는 항체 경쇄 가변 영역(V_L)이 연결될 수 있으며;

바람직하게는,

하나의 면역글로불린 분자는 두 개의 단일쇄 항체 분자와 연결되고;

더 바람직하게는 두 개의 단일쇄 항체 분자는 동일한,

항-CD73/항-PD-1 이중특이항체.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 면역글로불린은 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM;

바람직하게는 IgG, 예컨대, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4인,

항-CD73/항-PD-1 이중특이항체.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 단일쇄 항체는 면역글로불린의 중쇄 C-말단에 연결되고;

바람직하게는, 하나의 면역글로불린 분자는 두개의 단일쇄 항체 분자와 연결되고;

더 바람직하게는, 두 개의 단일쇄 항체 분자는 동일한,

항-CD73/항-PD-1 이중특이항체.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 면역글로불린의 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 45-47로 기재된 CDR을 포함하고, 상기 면역글로불린의 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 50-52로 기재된 CDR을 포함하며;

및/또는

상기 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 3-5로 기재된 CDR을 포함하고, 상기 단일쇄 항체의 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 8-10로 기재된 CDR을 포함하며;

바람직하게는 상기 단일쇄 항체가 링커를 통해 면역글로불린의 중쇄의 C-말단에 연결될 경우, 우선 상기 단일쇄 항체의 아미노산 서열이 서열번호 3-5로 기재된 CDR을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역(V_H)이 연결될 수 있고, 또는 우선 상기 단일쇄 항체의 아미노산 서열이 서열번호 8-10으로 기재된 CDR을 포함하는 항체 경쇄 가변 영역(V_L)이 연결될 수 있는,

항-CD73/항-PD-1 이중특이항체.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 면역글로불린의 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 3-5로 기재된 CDR을 포함하고, 상기 면역글로불린의 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 8-10으로 기재된 CDR을 포함하며;

및/또는

상기 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 45-47로 기재된 CDR을 포함하고, 상기 단일쇄 항체의 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 50-52로 기재된 CDR을 포함하며;

여기서, 상기 단일쇄 항체가 링커를 통해 면역글로불린의 중쇄의 C-말단에 연결될 경우, 우선 상기 단일쇄 항체의 아미노산 서열이 서열번호 45-47로 기재된 CDR을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역(V_H)이 연결될 수 있고, 또는 우선 상기 단일쇄 항체의 아미노산 서열이 서열번호 50-52로 기재된 CDR을 포함하는 항체 경쇄 가변 영역(V_L)이 연결될 수 있는,

항-CD73/항-PD-1 이중특이항체.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 면역글로불린의 중쇄 가변 영역은 서열번호 44 또는 서열번호 62로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 면역글로불린의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 49 또는 서열번호 64로부터 선택되며;

및/또는

상기 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 2 또는 서열번호 20으로부터 선택되고, 상기 단일쇄 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 7 또는 서열번호 22로부터 선택되며;

또는 상기 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 20이고, 상기 단일쇄 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 24이며;

여기서, 상기 단일쇄 항체가 링커를 통해 면역글로불린의 중쇄의 C-말단에 연결될 시, 우선 상기 단일쇄 항체의 항체 중쇄 가변 영역(V_H)이 연결될 수 있고, 또는 우선 상기 단일쇄 항체의 항체 경쇄 가변 영역(V_L)이 연결될 수 있는,

항-CD73/항-PD-1 이중특이항체.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 면역글로불린의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 2 또는 서열번호 20으로부터 선택되고, 상기 면역글로불린의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 7 또는 서열번호 22로부터 선택되며;

또는 상기 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 20이고, 상기 단일쇄 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 24이며;

및/또는

상기 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 44 또는 서열번호 62로부터 선택되고, 상기 단일쇄 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 49 또는 서열번호 64로부터 선택되며;

여기서, 상기 단일쇄 항체가 링커를 통해 중쇄의 C-말단에 연결될 시, 우선 상기 단일쇄 항체의 항체 중쇄 가변 영역(V_H)이 연결될 수 있고, 또는 우선 항체 경쇄 가변 영역(V_L)이 연결될 수 있는,

항-CD73/항-PD-1 이중특이항체.

청구항 16

제5항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 면역글로불린은 비-CDR 영역을 포함하고, 상기 비-CDR 영역은 뮤린 이외의 종, 예컨대 인간 항체로부터 유래되고, 더 바람직하게는 상기 면역글로불린의 불변 영역은 인간화된 것이고, 예컨대, 중쇄 불변 영역은 Ig 감마-1 사슬 C 영역(Ig gamma-1 chain C region), ACCESSION:P01857이고, 경쇄 불변 영역은 Ig 카파 사슬 C 영역(Ig kappa chain C region), ACCESSION:P01834이며;

또는 상기 면역글로불린의 중쇄 불변 영역이 Ig 감마-1 사슬 C 영역, ACCESSION:P01857에 기초하여, 234번, 235번 및 237번 위치중의 임의 2개 위치 또는 3개 위치에서 돌연변이가 발생하고, 돌연변이가 발생 후, 상기 이중특이항체의 Fc γ RIa, Fc γ RIIIa 및/또는 C1q에 대한 친화도 상수는 돌연변이 전보다 감소하고;

더 바람직하게는 EU 넘버링 시스템에 따라, Ig 감마-1 사슬 C 영역, ACCESSION:P01857에 기초하여 234번, 235번 및/또는 237번 위치에 하기 돌연변이를 가지고 있고;

L234A 및 L235A;

L234A 및 G237A;

L235A 및 G237A; 또는

L234A, L235A, G237A;

훨씬 더 바람직하게는 상기 면역글로불린의 중쇄 불변 영역은 하기로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이를 가지고 있으며;

N297A, D265A, D270A, P238D, L328E, E233D, H268D, P271G, A330R, C226S, C229S, E233P, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E, N297Q, P238S, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, T394D, G236R, G236A, L328R, A330S, P331S, H268A, E318A 및 K320A;

바람직하게는, 상기 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체 구조는 중쇄-경쇄-링커 1-scFv로 표시되고, 상기 scFv는 14C12H1V-링커 2-14C12L1V, 14C12H1V-링커 1-14C12L1V, 14C12H1V-링커 2-14C12L1V 및 14C12H1V-링커 1-14C12L1V로부터 선택되고, 구체적으로 하기로 구성된 군으로부터 선택되며;

(1)NTPDV1, 이의 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 85로 기재되고, 경쇄 아미노산 서열은 서열번호 28로 기재되며, 링커 1의 아미노산 서열은 서열번호 79로 기재되고, 14C12H1V의 아미노산 서열은 서열번호 66으로 기재되며, 링커 2의 아미노산 서열은 서열번호 81로 기재되고, 14C12L1V의 서열번호는 서열번호 68로 기재되며;

(2)NTPDV2, 이의 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 85로 기재되고, 경쇄 아미노산 서열은 서열번호 28로 기재되며, 링커 1의 아미노산 서열은 서열번호 79로 기재되고, 14C12H1V의 아미노산 서열은 서열번호 66으로 기재되며, 링커 1의 아미노산 서열은 서열번호 79로 기재되고, 14C12L1V의 서열번호는 서열번호 68로 기재되며;

(3)NTPDV3, 이의 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 85로 기재되고, 경쇄 아미노산 서열은 서열번호 96로 기재되며, 링커 1의 아미노산 서열은 서열번호 79로 기재되고, 14C12H1V의 아미노산 서열은 서열번호 66으로 기재되며, 링커 2의 아미노산 서열은 서열번호 81로 기재되고, 14C12L1V의 서열번호는 서열번호 68로 기재되며; 및

(4)NTPDV4, 이의 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 85로 기재되고, 경쇄 아미노산 서열은 서열번호 96로 기재되며, 링커 1의 아미노산 서열은 서열번호 79로 기재되고, 14C12H1V의 아미노산 서열은 서열번호 66으로 기재되며, 링커 1의 아미노산 서열은 서열번호 79로 기재되고, 14C12L1V의 서열번호는 서열번호 68로 기재되는,

항-CD73/항-PD-1 이중특이항체.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체는 약 10^{-5} M 미만, 예컨대, 약 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M 또는 10^{-10} M 미만 또는 더 작은 K_D 로 CD73 단백질 및/또는PD-1 단백질에 결합하는, 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체.

청구항 18

이중특이항체 중쇄 가변 영역을 코딩할 수 있는 핵산 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자:

여기서, 상기 항체의 중쇄 가변 영역은

아미노산 서열이 서열번호 3-5로 기재된 CDR, 아미노산 서열이 서열번호 45-47로 기재된 CDR 및 아미노산 서열이 서열번호 50-52로 기재된 CDR을 포함하며;

또는

아미노산 서열이 서열번호 45-47로 기재된 CDR, 아미노산 서열이 서열번호 3-5로 기재된 CDR 및 아미노산 서열이 서열번호 8-10으로 기재된 CDR을 포함하며;

또한, 상기 이중특이항체 중쇄 가변 영역은 상기 이중특이항체의 일부분으로서, CD73 및 PD-1 항원에 특이성 결합하고, 상기 이중특이항체는 경쇄 가변 영역을 더 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은

아미노산 서열이 서열번호 8-10으로 기재된 CDR을 포함하며;

또는, 아미노산 서열이 서열번호 50-52로 기재된 CDR을 포함하며;
바람직하게는, 경쇄 가변 영역의 CDR과 중쇄 가변 영역의 CDR은 다르다.

청구항 19

제18항에 따른 분리된 핵산 분자를 포함하는, 벡터.

청구항 20

제18항에 따른 분리된 핵산 분자 또는 제19항에 따른 벡터를 포함 하는, 숙주 세포.

청구항 21

제20항에 따른 숙주 세포를 적합한 조건하에서 배양하는 단계, 및 세포 배양물로부터 이중특이항체를 분리하는 단계를 포함하는는, 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 이중특이항체를 제조하는 방법.

청구항 22

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체 및 접합된 모이어티(conjugated moiety)를 포함하고, 여기서, 상기 접합된 모이어티는 검출 가능한 표지이고, 구체적으로 상기 접합된 모이어티는 방사성 동위원소, 형광 물질, 화학 발광 물질, 착색 물질 또는 효소인 것인, 접합체.

청구항 23

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체 또는 제22항에 따른 접합체를 포함하는 키트:

바람직하게는 상기 키트는 상기 이중특이항체를 특이적으로 인식하는 제2항체를 더 포함하고;

선택적으로, 상기 제2항체는 검출 가능한 표지, 예컨대, 방사성 동위원소, 형광 물질, 화학 발광 물질, 착색 물질 또는 효소를 더 포함한다.

청구항 24

샘플 내의 CD73 및/또는 PD-1의 존재 또는 수준을 검출하기 위한 키트를 제조하는데 있어서의 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 용도.

청구항 25

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체 또는 제22항에 따른 접합체를 포함하고;

선택적으로 약학적으로 허용 가능한 벡터 및/또는 부형제를 더 포함하는는, 약학적 조성물.

청구항 26

종양 또는 빈혈을 예방 및/또는 치료 또는 진단하는데 있어서의 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 항-

CD73/항-PD-1 이중특이항체 또는 제22항에 따른 접합체의 용도.

청구항 27

종양 또는 빈혈의 예방 및/또는 치료 또는 진단용 약물을 제조하는데 있어서의 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 항-CD73-항-PD-1 이중특이항체 또는 제22항에 따른 접합체의 용도.

청구항 28

하기 약물을 제조하는데 있어서의 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체 또는 제22항에 따른 접합체의 용도:

샘플 내의 CD73 수준을 검출하는 약물;

CD73의 효소활성 반응을 억제하는 약물;

및/또는

PD-1과 PDL1의 결합을 차단하는 약물;

PD-1의 활성 또는 수준을 조절(예컨대, 하향 조절)하는 약물;

PD-1이 생물체에 대한 면역억제를 완화하는 약물;

T 림프구 내에서의 IL-2 발현을 제고하는 약물; 또는

T 림프구 내에서의 IFN- γ 발현을 제고하는 약물.

청구항 29

유효량의 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체 또는 제22항에 따른 접합체를 세포에 투여하는 단계 또는 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 생체 내 또는 생체 외 방법.

청구항 30

2018년 6월 19일에 중국 전형 배양물 기탁센터(CCTCC)에 기탁 번호 CCTCC NO:C2018137로 기탁된 하이브리도마 세포주 LT014(CD73-19F3로도 지칭됨); 또는

2015년 6월 16일에 중국 전형 배양물 기탁센터(CCTCC)에 기탁 번호 CCTCC NO:C2015105로 기탁된 하이브리도마 세포주 LT003(PD-1-14C12로도 지칭됨)으로부터 선택되는, 하이브리도마 세포주.

청구항 31

19F3H2L3(hG1TM)이고;

중쇄 아미노산 서열은 서열번호 30으로 기재되고, 경쇄 아미노산 서열은 서열번호 28로 기재되는, 항-CD73 단 일클론 항체.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 종양 치료 및 분자 면역학 분야에 속하고, 특히 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체, 이의 약물 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 엑토-5'-뉴클레오티다제(Ecto-5'-nucleotidase), 즉 CD73 단백질은 NT5E 유전자에 의해 코딩된 일종의 단백질 분자량이 70KD인 다기능 당단백질로서, 이는 글리코실 포스파티딜 이노시톨(glycosyl phosphatidyl inositol, GPI)을 통해 세포막상에 고정된다(Zimmermann H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. Biochem J. 1992; 285:345-365).
- [0003] CD73은 인체 조직세포의 표면에 광범위하게 분포되어 있으며, 다종의 고형종양 특히 암세포, 수지상 세포, 조절형 T세포(Treg), 자연살해 세포(NK세포), 골수유래 억제세포(MDSC), 종양관련 대식세포(TAM) 및 종양 미세환경에서 고도로 발현된다는 것이 연구에서 밝혀졌다. CD73의 발현은 TGF- β , EGFR, AKT, β -catenin 및 다른 분자들에 의해 조절되고, 특히 전사 인자 기능을 수행하는 HIF-1이 가장 관련이다. 종양 미세환경의 하나의 중요한 특징은 저산소이며, 저산소는 저산소 유도인자-1(HIF-1)등 분자의 상향 조절을 유도하여, CD73의 종양 미세환경에서 광범위하게 발현을 유도한다(Synnestvedt K, et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. J Clin Invest. 2002; 110:993-1002.). 임상 종양 샘플에 대하여 분석한 결과에 따르면, CD73의 높은 발현은 일종의 잠재적인 바이오마커이고, 유방암, 폐암, 난소암, 신장암, 위암, 두경부암등을 포함해 다양한 유형의 종양의 불량 예후와 밀접한 관련이 있다.
- [0004] CD73은 가수분해효소 활성을과 비가수분해효소 활성을 가지고 있다. CD73의 효소와 비효소 기능은 동시에 종양의 관련 과정에 존재하고, 종양의 진화를 상호 촉진하고 유지한다. 점점 더 많은 연구에서, CD73이 생체 외(in vitro) 종양 세포 증식, 전이 및 침입, 생체 내 종양 혈관 생성 및 종양 면역 회피 메커니즘의 핵심 조절분자라는 것을 발견하였다. 여기서, 중요한 면역 억제 메커니즘은 CD73-아데노신(Adenosine) 대사 신호 경로에 의해 매개된다. CD73 업스트림의 CD39는 ATP를 촉매화하여 아데노신 모노포스페이트(AMP)를 생성할 수 있으며, 생성된 AMP는 CD73에 의해 아데노신으로 전환되고, 아데노신은 다운스트림의 아데노신 수용체 (A2AR)와 결합된다. A2AR는 단백질 키나제 A(PKA) 및 Csk 키나제를 활성화시켜, LCK, MAPK, PKC와 같은 면역 활성화와 관련된 일련의 신호 경로를 억제하고, T세포의 면역 살해 작용을 억제함으로써 종양이 면역 회피를 실현할 수 있도록 면역 억제 역할을 한다(Antoniooli L, et al. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. Nat Rev Cancer. 2013; 13:842-857). 임상 전 동물모델연구는 면역세포와 비면역세포가 발현하는 CD73은 종양의 면역 회피, 발전 및 전이를 촉진시킬 수 있다는 것을 보여준다. 여기서, Treg 세포와 관련된 CD73-아데노신 신호가 CTL(세포독성 T세포) 및 NK세포의 기능에 대한 억제가 가장 뚜렷하다.
- [0005] 고형종양 치료에 있어서, 약물 내성을 극복하고 치료효과를 향상시키기 위한 하나의 중요한 한 측면은 면역세포에 대한 종양 미세환경 (Tumor micro environment, TME)의 억제작용을 완화하는 것이다. TME는 다종의 세포, 세포간물질, 효소, 사이토카인, 대사산물등으로 구성된 매우 복잡한 시스템으로, 현저한 저수소, 저pH 및 고압의 특성을 가지고 있으며, 정상조직과 매우 다르다. 종양 세포 사멸을 위한 화학방사선 요법에 의한 저산소 또는 ATP 농축은, CD39-CD73 아데노신 신호의 캐스케이드 반응을 촉진하여, 다양한 암촉진류 세포의 증식 및 기능에 도움이 되지만 암억제류 세포에는 도움이 되지 않는다. (Regateiro, F. S., Cobbald, S. P. & Waldmann, H. CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. Clin. Exp. Immunol. 2013; 171:1-7).
- [0006] 동물모델에서 CD73을 표적으로 하는 항체 또는 CD73의 유전자 녹아웃을 이용하여 종양 성장 및 전이를 효과적으로 차단할 수 있다. 최근에는 CD73 단일클론 항체, 소간섭 RNA 기술, 특이성 억제제 APCP등을 이용하여 동물 실험의 항종양 치료에서 현저한 치료 효과를 거두어 항종양 치료에 새로운 방법을 제공하였다. 생체 내(in vivo) 실험의 증거는, CD73의 표적 차단이 종양 환자를 위한 효과적인 치료 방법이 될 것임을 보여준다.
- [0007] CD73 과발현과 종양 아형, 예후 및 환자의 약물 반응 사이의 관계는 CD73이 향후 개체 종양 치료 및 검출에 중요한 지표로 사용될수 있음을 보여준다. 따라서, CD73 표적에 대한 연구는 필수적이다.
- [0008] 막관통 수용체 PD-1(세포예정사 단백질 1)은 CD28 패밀리 멤버중 하나이고, 활성화된 T세포, B세포 및 골수계 세포에서 발현된다. PD-1의 수용체인 PDL1과 PDL2는 B7 슈퍼패밀리에 속한다., PDL1은 T세포, B세포 및 내피세포 및 상피세포를 포함하는 다종의 세포에서 발현되고, PDL2는 수지상세포 및 대식세포와 같은 항원제시세포에서만 발현된다.
- [0009] PD-1은 T세포의 활성화를 음성조절하는 과정 중에 매우 중요한 역할을 하며, PD-1이 매개하는 T세포에 대한 음성조절 작용은 종양 면역회피의 중요한 메커니즘 중 하나이다. 종양 표면에 발현된 PDL-1은 면역세포 표면의

PD-1과 결합할 수 있고, 나아가 PD-1/PDL-1 신호 경로를 통하여 면역세포의 종양 조직에 대한 살해를 억제하며, PD-L1을 고도로 발현하는 종양은 검출하기 어려운 암을 동반한다(Hamanishi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007;104:3360-5). PD-1을 길항하여 PD-1/PDL-1 신호 경로를 억제하는 일종의 효과적인 방법은 항-PD-1 항체를 생체 내에 주사하는 것이다.

[0010] PD-1 항체는 광범위한 항종양 전망과 놀라운 효능을 가지고 있어, PD-1 경로를 표적으로 하는 항체가 다종의 종양 즉 비소세포성 폐암, 신장세포암, 난소암 및 흑색종(Homet M. B., Parisi G., et al., Anti-PD-1 Therapy in Melanoma. Semin Oncol. 2015 Jun;42(3):466-473), 및 혈액종양 및 빈혈(Held SA, Heine A, et al., Advances in immunotherapy of chronic myeloid leukemia CML. Curr Cancer Drug Targets. 2013 Sep;13(7):768-74)의 치료에 있어 획기적인 발전을 가져올 것임은 널리 알려져 있다.

[0011] 이중특이항체(Bispecific Antibody)라고도 하는 이중특이항체는 두 종의 다른 항원을 동시에 표적, 결합하는 특이성 항체 약물로서, 이는 면역선택 정제를 통하여 생산될 수 있으며, 유전공학을 통하여 얻을 수도 있다. 유전공학은 결합 부위의 최적화, 합성 형태의 고려 및 생산량등 측면에서 상응하는 유연성을 가지고 있어, 일정한 우세가 있다. 현재, 이중특이항체의 존재 형태는 45가지를 넘는 것으로 증명되었다(Muller D, Kontermann RE. Bispecific antibodies for cancer immunotherapy:Current perspectives. BioDrugs 2010; 24:89-98). IgG-ScFv 형태 즉 Morrison 모드(Coloma MJ, Morrison SL. Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies. Nat Biotechnol.Nature Biotechnology, 1997; 15:159-163)는 자연적으로 존재하는 IgG의 형태와 유사하고, 항체 공학, 발현 및 정제상에서 우세가 있어, 이중특이항체의 일종의 이상적 존재 형태인 것으로 증명되었다(Miller BR, Demarest SJ, et al., Stability engineering of scFvs for the development of bispecific and multivalent antibodies. Protein Eng Des Sel 2010; 23:549-57; Fitzgerald J, Lugovskoy A. Rational engineering of antibody therapeutics targeting multiple oncogene pathways. MAbs 2011; 3:299-309).

[0012] ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)는 항체 의존성 세포 매개 세포독성 작용으로서, 이는 항체의 Fab 단편이 바이러스 감염세포 또는 종양세포의 항원결정기 (epitope)에 결합하고, 항체의 Fc 단편과 살해세포(NK 세포, 대식세포등) 표면의 Fc 수용체 (Fc Receptor, FcR)가 결합하여, 살해세포가 직접 표적세포를 살해하도록 매개하는 것을 의미한다.

[0013] CDC (complement dependent cytotoxicity)는 보체 의존성 세포독성을 의미한다. CDC 작용에 있어서, 항체와 세포막 표면의 상응하는 항원이 결합한 후, 보체 C1q와 결합하고, C2-C9이 활성화되어 막공격 복합체를 형성하여, 표적세포에 대하여 용해효과를 발휘한다.

[0014] IgG 패밀리는 네 멤버, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하며, 이들의 중쇄 불변 영역의 결정화가능 단편(fragment crystallizable, Fc) 영역의 아미노산이 상이하어, 이들과 Fc γ R의 친화도가 상이하다. 야생형 IgG1은 각종 Fc γ Rs에 결합될 수 있고, ADCC 및 CDC 효과를 유도할 수 있다. Zhang등(Zhang T et al., Cancer ImmunolImmunother. 2018;67(7):1079-1090.) 및 Dahan등(Dahan R et al., Cancer Cell. 2015; 28(3):285-95.)의 연구에 따르면, PD-1등 면역 체크포인트를 표적으로 하는 항체의 Fc 단편과 Fc 수용체의 결합은 항체 매개 항암 활성에 부정적인 영향을 미칠 수 있는데, 이는 Fc 의존성 이펙터 기능에 의해 유도된 면역세포의 손상 때문일 수 있다. 항체 의존성 세포 매개 세포독성은 면역세포 손상을 일으키는 중요한 메커니즘이다.

[0015] 인터루킨-8(interleukin-8, IL-8)은 일종의 화학주성 사이토카인(Chemotactic cytokines)이고, 주요하게 단핵세포등에 의해 분비된다. IL-8은 정상 세포 및 종양 세포의 증식에 중요한 역할을 하며, 특히 종양의 발생 및 발전에 대하여 중요한 촉진 작용을 가지고 있다. 연구에 따르면, IL-8은 종양의 발생을 촉진시킬 수 있고, 종양 세포 자체도 IL-8을 분비하여 종양의 성장과 전이를 촉진시킬 수 있다(Lo MC et al. Cancer letters, 2013, 335(1):81-92.). 따라서, IL-8은 이미 종양 미세환경에서 없어서는 안 될 일종의 중요한 염증인자가 되었다.

[0016] IL-8은 일종의 염증촉진(proinflammatory) 인자로서, 종양의 발생 및 발전과 밀접한 관련이 있다. 메틸아르손산(methylarsonate)이 비신장암 세포의 악화를 유도하는 과정에서 IL-8 유전자의 발현이 증가되고, IL-8 유전자의 침묵은 마우스 체내 이식종양의 성장을 현저하게 억제시킬 수 있으며, 또한 IL-8 수준의 감소는 종양의 성장 및 전이와 관련된 기질 금속 프로테이나제-9(Matrix metalloproteinase-9), 사이클린 D1(Cyclin D1), 프로아포토틱 단백질 Bcl-2, 혈관내피 성장인자(VEGF)의 발현을 억제시킬 수 있다(Escudero-Lourdes C et al. Toxicology and applied pharmacology, 2012, 258(1):10-18.). Inoue등의 연구에서는, IL-8은 비종양성 방광 세포계(233JP)의 악화 및 침습성의 증가를 유도할 수 있지만, IL-8 녹아웃 마우스에서 233JP 세포가 악성 형질전환하는 확률이 현저히 감소한 것을 발견하였다(Inoue K et al. Cancer Res, 2000, 60(8):2290-2299.). 또한, 전립

선암에서 IL-8은 환자의 거세저항성 전립선암(CRPC)의 발생을 촉진시킬 수 있고(Chen K et al. Cancer research, 2015, 75(10):1992-2004.), 종양 치료의 내약성과 연관되어 있다(Araki S et al. Cancer Res, 2007, 67(14):6854-6862.). IL-8 또는 그 수용체의 유전자 침묵은 종양세포의 세포주기 정지를 유도할 수 있고, 종양의 증식을 억제시킬 수 있다(Singh RK, Lokeshwar BL. Molecul Cancer, 2009, 8:57.). 상술한 연구는 IL-8의 수준이 종양의 발생 및 발전과 밀접한 관련이 있음을 표명한다. 추가 연구(Mian BM et al. Clin Cancer Res, 2003, 9(8):3167-3175.)는 IL-8이 종양 치료의 새로운 표적으로 사용될 수 있음을 표명한다. 방광암의 종양 모델에서 항-IL-8 항체의 사용은 종양의 성장을 현저하게 억제시킬 수 있다.

[0017] IL-6은 주로 대식세포에 의해 빠르게 생성되며, 병원체 관련 분자 패턴(PAMP) 또는 손상 관련 분자 패턴(DAMP)에 반응하고, 감염 인자의 제거를 통하여, 급성기 및 면역 응답을 유도하여 손상된 조직을 치유하고, 보호하는 역할을 한다. IL-6은 감염 및 조직 손상의 저항 및 복구에 중요한 역할을 발휘하지만, 높은 수준의 IL-6은 응혈 경로와 혈관 내피 세포를 활성화시켜, 심근 기능을 억제하고, 심지어 "사이토카인 폭풍"을 일으켜 심각한 급성 전신 염증 반응을 유발할 수 있다. 사이토카인 폭풍은 바이러스 감염 및 종양 면역 요법등에서의 일종의 치명적인 합병증 및 이상반응이다.

[0018] 면역 관련 이상반응은 면역 체크포인트 억제제(immune checkpoint inhibitor, ICI)의 항종양 치료중에서 흔히 볼 수 있고 또한 위험한 이상반응이다(Spain L et al. Cancer Treat Rev. 2016;44:51-60.). 최근에, 면역 체크포인트 억제제는 종양 면역 치료 방면에서 커다란 성공을 거두었지만, 탈표적(off-target) 효과로 인해 완전 새로운 독성 스펙트럼을 초래하였다. 여기서, 특히 주요 기관(심장, 폐, 뇌를 포함)의 심각한 면역 관련 불량사건(irAE)이 생명을 위협할 수 있다(Bergqvist V, et al. Cancer Immunol Immunother. 2017;66(5):581-592.; Gomatou G et al. Respiration. 2020;1:1-11.; Joshi MN et al. Clin Endocrinol (Oxf). 2016;85(3):331-9.; Prioux-Klotz C et al. Target Oncol. 2017;12(3):301-308.; Tajiri K et al. Jpn J Clin Oncol. 2018;48(1):7-12.). 기존 데이터에 의하면, ICI는 가능하게 4가지 메커니즘을 통하여 탈표적 효과를 유도한다. 상기 4가지 메커니즘은, 정상 세포 표면에서 발현되는 면역 체크포인트 분자에 직접 결합하여 보체 과민 반응을 활성화시키고; 정상 조직과 종양 세포에 동종항원/항원결정기가 존재하고; 자가 항체를 생성하며; IL-6과 같은 전염증성 사이토카인의 수준을 증가하는 것을 포함한다(Martins F et al., The Lancet Oncology, 20(1), e54-e64.).

[0019] 현재 항-IL-6 요법, 예를 들어 토실리주맙, 일종의 재조합 인간화 항-IL-6R 단일클론 항체는 이미 급성기 중증 irAE, 중증 또는 난치성 관절염, 대혈관 혈관염, 포도막염, 심근염, 폐염, 중증근무력증 및 중증 급성기를 치료하는데 사용되고 있다(Martins F et al., The Lancet Oncology, 20(1), e54-e64.).

[0020] 대식세포상의 Fc γ RIa와 야생형 IgG1 또는 IgG4 항체의 결합은 IL-8 및 IL-6(Kinder M et al., mAbs. 2015)의 분비를 유도할 수 있으며, 항체 Fc 단편의 돌연변이를 진행시킬 수 있다. Fc γ RIa와의 결합을 제거하면, IL-8의 분비를 효과적으로 억제시켜, 항체의 안전성과 유효성을 증가시킬 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0021] 본 발명자는 포유동물 세포발현 시스템을 이용하여 재조합 CD73 및 PD-1을 각각 항원으로 발현하여 마우스를 면역시키고, 마우스 비장 세포와 골수종 세포의 융합시켜 하이브리도마 세포를 얻었다. 발명자는 대량의 샘플에 대한 스크리닝을 통해 각각 하기 하이브리도마 세포주를 얻었다.

[0022] 2018년 6월 19일에 중국 전형 배양물 기탁센터(CCTCC)에 기탁 번호 CCTCC NO:C2018137로 기탁된 하이브리도마 세포주 LT014(CD73-19F3로도 지칭됨)으로부터 선택되는 것인, 하이브리도마 세포주; 및

[0023] 2015년 6월 16일에 중국 전형 배양물 기탁센터(CCTCC)에 기탁 번호 CCTCC NO:C2015105로 기탁된 하이브리도마 세포주 LT003(PD-1-14C12로도 지칭됨).

[0024] 본 발명자는 놀랍게 다음을 발견하였다.

[0025] 하이브리도마 세포주 LT014는 인간 CD73과 특이적으로 결합하는 특이성 단일클론 항체(19F3으로 명명됨)를 분비할 수 있고, 또한 상기 단일클론 항체는 비-기질결정의 방식으로 CD73의 효소활성 반응을 매우 효과적으로 억제시킬 수 있고, 아데노신의 생성을 감소시킬 수 있으며, 그리고 T세포 활성화 및 종양 억제 효과를 촉진시킬 수 있다.

- [0026] 하이브리도마 세포주 LT003은 PD-1과 특이적으로 결합하는 특이성 단일클론 항체(14C12로 명명됨)를 분비생성할 수 있고, 또한 상기 단일클론 항체는 PD-1과 PDL1의 결합을 효과적으로 차단시킬 수 있다.
- [0027] 더 나아가, 본 발명자는 항-CD73의 인간화 항체(각각 19F3H2L2, 19F3H2L3, 19F3H2L3(hG1M) 및 19F3H2L3(hG1TM)로 명명됨)와 항-PD-1의 인간화 항체(14C12H1L1 및 14C12H1L1(hG1TM)로 명명됨)를 창조적으로 제조하였다.
- [0028] 더 나아가, 본 발명자는 창조적으로 두 종류의 인간화 항체를 단백질 재조합 융합시켜 새로운 항체로 만들어, CD73 및 PD-1과 결합하고, CD73 활성을 억제시키고, PD-1과 PDL1의 결합을 차단시킬 수 있는 인간화 이중특이항체(각각 P1D7V01, P1D7V03, NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 및 NTPDV4(본 명세서 및 출원번호가 202110270671.X인 중국 발명 특허 중에서는 NTPDV1(hG1TM), NTPDV2(hG1TM), NTPDV3(hG1TM) 및 NTPDV4(hG1TM)로 기재되어 있음)로 명명됨)를 얻었다. 이는 고형종양 및 혈액종양을 예방 및 치료하는데 잠재력이 있다.
- [0029] 따라서, 하기 발명을 제공하였다.

과제의 해결 수단

- [0030] 본 발명의 일 양태는 일종의 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체에 관한 것으로,
- [0031] 상기 이중특이항체는 PD-1을 표적으로 하는 제1단백질 기능 영역, 및 CD73을 표적으로 하는 제2단백질 기능 영역을 포함한다.
- [0032] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 이중특이항체에 있어서,
- [0033] 제1단백질 기능 영역은 서열번호 44의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역에 포함된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 서열번호 49의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역에 포함된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고;
- [0034] 여기서,
- [0035] 바람직하게는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 45-47에 기재된 서열, 또는 서열번호 45-47에 기재된 서열에 대하여 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 45-47에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열이며;
- [0036] 바람직하게는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 50-52에 기재된 서열, 또는 서열번호 50-52에 기재된 서열에 대하여 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 50-52에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열이다.
- [0037] 제2단백질 기능 영역은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역에 포함된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역에 포함된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고;
- [0038] 여기서,
- [0039] 바람직하게는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3의 아미노산 서열은 서열번호 3-5에 기재된 서열, 또는 서열번호 3-5에 기재된 서열에 대하여 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 3-5에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열이며;
- [0040] 바람직하게는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 8-10에 기재된 서열, 또는 서열번호 8-10에 기재된 서열에 대하여 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 8-10에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열이다.
- [0041] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체에 있어서,

- [0042] 상기 제1단백질 기능 영역은,
- [0043] 서열번호 44 또는 서열번호 62에 기재된 서열, 또는 서열번호 44 또는 62에 기재된 서열에 대하여 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 44 또는 62에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열; 및
- [0044] 서열번호 49 또는 서열번호 64에 기재된 서열, 또는 서열번호 49 또는 64에 기재된 서열에 대하여 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 49 또는 64에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하고;
- [0045] 및/또는
- [0046] 상기 제2단백질 기능 영역은,
- [0047] 서열번호 2, 서열번호 20에 기재된 서열, 또는 서열번호 2, 서열번호 20에 기재된 서열에 대하여 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 2 또는 서열번호 2, 서열번호 20에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열; 및
- [0048] 서열번호 7 또는 서열번호 22에 기재된 서열, 또는 서열번호 7 또는 서열번호 22에 기재된 서열에 대하여 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 7 또는 서열번호 22에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하고;
- [0049] 또는
- [0050] 상기 제2단백질 기능 영역은,
- [0051] 서열번호 20에 기재된 서열, 또는 서열번호 20에 기재된 서열에 대하여 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 20에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열; 및
- [0052] 서열번호 24에 기재된 서열, 또는 서열번호 24에 기재된 서열에 대하여 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 24에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열.
- [0053] 본 발명의 일 양태는 일종의 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체에 관한 것이되,
- [0054] 상기 이중특이항체는 CD73을 표적으로 하는 제1단백질 기능 영역, 및 PD-1을 표적으로 하는 제2단백질 기능 영역을 포함한다.
- [0055] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 이중특이항체에 있어서,
- [0056] 제1단백질 기능 영역은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역에 포함된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역에 포함된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고;
- [0057] 여기서,
- [0058] 바람직하게는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 3-5에 기재된 서열, 또는 서열번호 3-5에 기재된 서열에 대하여 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 3-5에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환,

삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열이며;

- [0059] 바람직하게는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 8-10에 기재된 서열, 또는 서열번호 8-10에 기재된 서열에 대하여 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 8-10에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열이다.
- [0060] 제2단백질 기능 영역은 서열번호 44의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역에 포함된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 서열번호 49의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역에 포함된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고;
- [0061] 여기서,
- [0062] 바람직하게는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 45-47에 기재된 서열, 또는 서열번호 45-47에 기재된 서열에 대하여 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 45-47에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열이며;
- [0063] 바람직하게는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 50-52에 기재된 서열, 또는 서열번호 50-52에 기재된 서열에 대하여 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 50-52에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열이다.
- [0064] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체에 있어서,
- [0065] 상기 제1단백질 기능 영역은
- [0066] 서열번호 2 또는 서열번호 20에 기재된 서열, 또는 서열번호 2 또는 20에 기재된 서열에 대하여 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 2 또는 20에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열; 및
- [0067] 서열번호 7, 서열번호 22, 서열번호 24에 기재된 서열, 또는 서열번호 7, 서열번호 22, 서열번호 24에 기재된 서열에 대하여 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 7, 22 또는 24에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하고;
- [0068] 및/또는
- [0069] 상기 제2단백질 기능 영역은,
- [0070] 서열번호 44 또는 서열번호 62에 기재된 서열, 또는 서열번호 44 또는 서열번호 62에 기재된 서열에 대하여 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 44 또는 서열번호 62에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열; 및
- [0071] 서열번호 49 또는 64에 기재된 서열, 또는 서열번호 49 또는 64에 기재된 서열에 대하여 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 49 또는 64에 기재된 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열.
- [0072] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체에 있어서,

- [0073] 상기 제1단백질 기능 영역 및 제2단백질 기능 영역은 직접 또는 링커를 통해 연결되고;
- [0074] 바람직하게는 상기 링커는 (GGGS)_n이고, n은 양의 정수, 예컨대, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다.
- [0075] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체 중의 상기 제1단백질 기능 영역 및 제2단백질 기능 영역은 독립적으로 면역글로불린 또는 불완전항체, Fab, F(ab')₂ 또는 단일쇄 항체와 같은 항원결합 단편이고, 예컨대,
- [0076] 바람직하게는 상기 제1단백질 기능 영역은 면역글로불린이고, 상기 제2단백질 기능 영역은 항원결합 단편이거나; 또는
- [0077] 상기 제1단백질 기능 영역은 항원결합 단편이고, 상기 제2단백질 기능 영역은 면역글로불린이다.
- [0078] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 항원결합 단편의 중쇄 가변 영역 N-말단은 상기 면역글로불린의 CH1의 C-말단에 직접 (또는 링커를 통해) 연결되고, 상기 항원결합 단편의 경쇄 가변 영역 N-말단은 상기 면역글로불린의 경쇄 가변 영역 CL의 C-말단에 직접 (또는 링커를 통해) 연결되며;
- [0079] 또는 상기 항원결합 단편의 중쇄 가변 영역 N-말단은 상기 면역글로불린의 경쇄 가변 영역 CL의 C-말단에 직접 (또는 링커를 통해) 연결되고, 상기 항원결합 단편의 경쇄 가변 영역 N-말단은 상기 면역글로불린의 중쇄 가변 영역 CH1의 C-말단에 직접 (또는 링커를 통해) 연결된다.
- [0080] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 항원결합 단편의 중쇄 가변 영역 C-말단은 상기 면역글로불린의 중쇄 N-말단에 직접 (또는 링커 단편을 통해) 연결되고, 상기 항원결합 단편의 경쇄 가변 영역 C-말단은 상기 면역글로불린의 경쇄 N-말단에 직접 (또는 링커를 통해) 연결되며;
- [0081] 또는 상기 항원결합 단편의 중쇄 가변 영역 C-말단은 상기 면역글로불린의 경쇄 N-말단에 직접 (또는 링커를 통해) 연결되고, 상기 항원결합 단편의 경쇄 가변 영역 C-말단은 상기 면역글로불린의 중쇄 N-말단에 직접 (또는 링커를 통해) 연결된다.
- [0082] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 항원결합 단편은 단일쇄 항체이고;
- [0083] 바람직하게는 상기 제1단백질 기능 영역은 면역글로불린이고, 상기 제2단백질 기능 영역은 단일쇄 항체이고;
- [0084] 또는 상기 제1단백질 기능 영역은 단일쇄 항체이고, 상기 제2단백질 기능 영역은 면역글로불린이다.
- [0085] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 이중특이항체에 있어서,
- [0086] 상기 제1단백질 기능 영역 및 제2단백질 기능 영역의 수는 독립적으로 1개 또는 2개 이상이다.
- [0087] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체에 있어서,
- [0088] 상기 단일쇄 항체는 링커(Linker)를 통해 항체 중쇄 가변 영역(V_H)과 항체 경쇄 가변 영역(V_L)을 연결한 분자이고;
- [0089] 바람직하게는 상기 단일쇄 항체는 NH₂-V_L-링커-V_H-COOH 또는 NH₂-V_H-링커-V_L-COOH의 일반구조를 가지고 있다.
- [0090] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체에 있어서,
- [0091] 상기 단일쇄 항체가 링커를 통해 면역글로불린의 중쇄의 C-말단(C_H) (또는 중쇄의 N-말단, 중쇄 가변 영역의 CH1의 C-말단)에 연결될 경우, 우선 상기 단일쇄 항체의 항체 중쇄 가변 영역(V_H)이 연결되거나, 또는 우선 상기 단일쇄 항체의 항체 경쇄 가변 영역(V_L)이 연결될 수 있으며;
- [0092] 바람직하게는 단일쇄 항체는 C_H-링커-V_H--V_L-COOH 또는 C_H-링커-V_L-링커-V_H-COOH의 일반구조를 가질 수 있으며;
- [0093] 바람직하게는
- [0094] 상기 면역글로불린의 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 3-5로 기재된 CDR을 포함하고, 상기 면역글로불린의 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 8-10으로 기재된 CDR을 포함하며;
- [0095] 상기 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 45-47로 기재된 CDR을 포함하고, 상기 단일쇄 항체의 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 50-52로 기재된 CDR을 포함하며;

- [0096] 바람직하게는 상기 단일쇄 항체(예컨대, $\text{NH}_2\text{-V}_\text{L}$ -링커- V_H -COOH 또는 $\text{NH}_2\text{-V}_\text{H}$ -링커- V_L -COOH)가 링커를 통해 면역글로불린의 중쇄의 C-말단에 연결될 경우, 우선 상기 단일쇄 항체의 아미노산 서열이 서열번호 45-47로 기재된 CDR을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역(V_H)이 연결될 수 있거나, 또는 우선 상기 단일쇄 항체의 아미노산 서열이 서열번호 50-52로 기재된 CDR을 포함하는 항체 경쇄 가변 영역(V_L)이 연결될 수 있으며;
- [0097] 또는 바람직하게는
- [0098] 상기 면역글로불린의 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 45-47로 기재된 CDR을 포함하고, 상기 면역글로불린의 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 50-52로 기재된 CDR을 포함하며;
- [0099] 및/또는
- [0100] 상기 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 3-5로 기재된 CDR을 포함하고, 상기 단일쇄 항체의 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 8-10으로 기재된 CDR을 포함하며;
- [0101] 여기서, 상기 단일쇄 항체(예컨대, $\text{NH}_2\text{-V}_\text{L}$ -링커- V_H -COOH 또는 $\text{NH}_2\text{-V}_\text{H}$ -링커- V_L -COOH)가 링커를 통해 면역글로불린의 중쇄의 C-말단에 연결될 경우, 우선 상기 단일쇄 항체의 아미노산 서열이 서열번호 3-5로 기재된 CDR을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역(V_H)이 연결될 수 있고, 또는 우선 상기 단일쇄 항체의 아미노산 서열이 서열번호 8-10으로 기재된 CDR을 포함하는 항체 경쇄 가변 영역(V_L)이 연결될 수 있으며;
- [0102] 바람직하게는,
- [0103] 하나의 면역글로불린 분자는 두 개의 단일쇄 항체 분자와 연결되고;
- [0104] 더 바람직하게는 두 개의 단일쇄 항체 분자는 동일하다.
- [0105] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체에 있어서,
- [0106] 상기 면역글로불린은 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM이고;
- [0107] 바람직하게는 IgG이며, 예컨대, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4이다.
- [0108] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체에 있어서,
- [0109] 상기 단일쇄 항체는 면역글로불린의 중쇄의 C-말단에 연결된다. 면역글로불린은 두개 중쇄로 구성되어 있기에, 하나의 면역글로불린 분자는 두 개의 단일쇄 항체 분자와 연결되어 있다. 바람직하게는 두 개의 단일쇄 항체 분자는 동일하다.
- [0110] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체에 있어서,
- [0111] 상기 면역글로불린의 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 3-5로 기재된 CDR을 포함하고, 상기 면역글로불린의 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 8-10으로 기재된 CDR을 포함하며;
- [0112] 및/또는
- [0113] 상기 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 45-47로 기재된 CDR을 포함하고, 상기 단일쇄 항체의 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 50-52로 기재된 CDR을 포함하며;
- [0114] 바람직하게는 상기 단일쇄 항체(예컨대, $\text{NH}_2\text{-V}_\text{L}$ -링커- V_H -COOH 또는 $\text{NH}_2\text{-V}_\text{H}$ -링커- V_L -COOH)가 링커를 통해 면역글로불린의 중쇄의 C-말단에 연결될 경우, 우선 상기 단일쇄 항체의 아미노산 서열이 서열번호 45-47로 기재된 CDR을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역(V_H)이 연결될 수 있고, 또는 우선 상기 단일쇄 항체의 아미노산 서열이 서열번호 50-52로 기재된 CDR을 포함하는 항체 경쇄 가변 영역(V_L)이 연결될 수 있다.
- [0115] 본 발명의 다른 실시형태에서, 상기 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체에 있어서,
- [0116] 상기 면역글로불린의 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 45-47로 기재된 CDR을 포함하고, 상기 면역글로불린의 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 50-52로 기재된 CDR을 포함하며;
- [0117] 및/또는
- [0118] 상기 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 3-5로 기재된 CDR을 포함하고, 상기 단일쇄 항

체의 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열이 서열번호 8-10으로 기재된 CDR을 포함하며;

- [0119] 여기서, 상기 단일쇄 항체(예컨대, $\text{NH}_2\text{-V}_\text{L}$ -링커- V_H - COOH 또는 $\text{NH}_2\text{-V}_\text{H}$ -링커- V_L - COOH)가 링커를 통해 면역글로불린의 중쇄의 C-말단에 연결될 경우, 우선 상기 단일쇄 항체의 아미노산 서열이 서열번호 3-5로 기재된 CDR을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역(V_H)이 연결될 수 있고, 또는 우선 상기 단일쇄 항체의 아미노산 서열이 서열번호 8-10으로 기재된 CDR을 포함하는 항체 경쇄 가변 영역(V_L)이 연결될 수 있다.
- [0120] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체에 있어서,
- [0121] 상기 면역글로불린의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 2 또는 서열번호 20으로부터 선택되고, 상기 면역글로불린의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 7 또는 서열번호 22로부터 선택되며;
- [0122] 또는 상기 면역글로불린의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 20에 기재된 서열이고, 상기 면역글로불린의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 24에 기재된 서열이며;
- [0123] 및/또는
- [0124] 상기 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 44 또는 서열번호 62로부터 선택되고, 상기 단일쇄 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 49 또는 서열번호 64로부터 선택되며;
- [0125] 여기서, 상기 단일쇄 항체가 링커(Linker)를 통해 면역글로불린의 중쇄의 C-말단에 연결될 시, 우선 상기 단일쇄 항체의 항체 중쇄 가변 영역(V_H)이 연결될 수 있고, 또는 우선 상기 단일쇄 항체의 항체 경쇄 가변 영역(V_L)이 연결될 수 있다.
- [0126] 본 발명의 다른 실시형태에서, 상기 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체에 있어서,
- [0127] 상기 면역글로불린의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 44 또는 서열번호 62로부터 선택되고, 상기 면역글로불린의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 49 또는 서열번호 64로부터 선택되며;
- [0128] 또는 상기 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 2 또는 서열번호 20으로부터 선택되고, 상기 단일쇄 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 7 또는 서열번호 22로부터 선택되며;
- [0129] 또는 상기 단일쇄 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 20에 기재된 서열이고, 상기 단일쇄 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 24에 기재된 서열이다.
- [0130] 본 발명의 다른 일 양태는 분리된 핵산 분자에 관한 것이되,
- [0131] 이는 이중특이항체 중쇄 가변 영역을 코딩할 수 있는 핵산 서열을 포함하며;
- [0132] 여기서, 상기 항체의 중쇄 가변 영역은
- [0133] 아미노산 서열이 서열번호 3-5로 기재된 CDR, 아미노산 서열이 서열번호 45-47로 기재된 CDR 및 아미노산 서열이 서열번호 50-52로 기재된 CDR을 포함하며;
- [0134] 또한, 상기 이중특이항체 중쇄 가변 영역은 상기 이중특이항체의 일부분으로서, CD73 및 PD-1 항원에 특이성 결합하고, 상기 이중특이항체는 경쇄 가변 영역을 더 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은
- [0135] 아미노산 서열이 서열번호 8-10으로 기재된 CDR을 포함하며;
- [0136] 바람직하게는 경쇄 가변 영역의 CDR과 중쇄 가변 영역에 포함된 CDR은 다르다.
- [0137] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 이중특이항체에 있어서,
- [0138] 상기 면역글로불린은 비-CDR 영역을 포함하고, 상기 비-CDR 영역은 무린 이외의 종, 예컨대, 인간 항체로부터 유래된다.
- [0139] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 면역글로불린의 불변 영역은 인간화된 것이고, 예컨대, 중쇄 불변 영역은 Ig 감마-1 사슬 C 영역(Ig gamma-1 chain C region), ACCESSION:P01857을 사용하고, 경쇄 불변 영역은 Ig 카파 사슬 C 영역(Ig kappa chain C region), ACCESSION:P01834를 사용한다.
- [0140] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 면역글로불린의 불변 영역은 인간화된 것이고, 예컨대, 중쇄 불변 영역은 Ig 감마-1 사슬 C 영역(Ig gamma-1 chain C region), ACCESSION:P01857을 사용하고, 경쇄 불변 영역은 Ig 카파 사

슬 C 영역(Ig kappa chain C region), ACCESSION:P01834를 사용하며;

- [0141] 여기서, EU 넘버링 시스템(EU numbering system)에 따라, 상기 면역글로불린의 중쇄 불변 영역은 234번, 235번 및 237번 위치중의 임의 2개 위치 또는 3개 위치에서 돌연변이가 발생하고, 돌연변이 발생 후, 이중특이항체의 Fc γ RIa, Fc γ RIIIa 및/또는 C1q에 대한 친화도 상수는 돌연변이 전보다 감소하고;
- [0142] 바람직하게는 상기 친화도 상수는 포르테바이오 옥텟 시스템 (Fortebio Octet system)으로 측정된다.
- [0143] 본 발명의 하나 이상 실시형태에서, 상기 이중특이항체에 있어서,
- [0144] EU 넘버링 시스템에 따라, 상기 면역글로불린의 중쇄 불변 영역은 234번, 235번 및/또는 237번 위치에 하기 돌연변이를 가지고 있고;
- [0145] L234A 및 L235A;
- [0146] L234A 및 G237A;
- [0147] L235A 및 G237A;
- [0148] 또는
- [0149] L234A, L235A 및 G237A.
- [0150] 본 발명에서, 달리 특별한 설명이 없는 한, 위치 번호 전의 문자는 돌연변이 전의 아미노산을 표시하고, 위치 번호 후의 문자는 돌연변이 후의 아미노산을 표시한다.
- [0151] 본 발명의 하나 이상 실시형태에서, 상기 이중특이항체에 있어서,
- [0152] EU 넘버링 시스템에 따라, 상기 면역글로불린의 중쇄 불변 영역은 하기로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 더 가지고 있으며;
- [0153] N297A, D265A, D270A, P238D, L328E, E233D, H268D, P271G, A330R, C226S, C229S, E233P, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E, N297Q, P238S, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, T394D, G236R, G236A, L328R, A330S, P331S, H268A, E318A 및 K320A.
- [0154] 구체적인 실시형태에서, 상기 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체 구조는 중쇄-경쇄-링커 1-scFv로 표시되고, 상기 scFv는 14C12H1V-링커 2-14C12L1V, 14C12H1V-링커 1-14C12L1V, 14C12H1V-링커 2-14C12L1V 및 14C12H1V-링커 1-14C12L1V로부터 선택되고, 구체적으로 하기로 구성된 군으로부터 선택되며;
- [0155] (1)NTPDV1, 이의 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 85로 기재되고, 경쇄 아미노산 서열은 서열번호 28로 기재되며, 링커 1의 아미노산 서열은 서열번호 79로 기재되고, 14C12H1V의 아미노산 서열은 서열번호 66으로 기재되며, 링커 2의 아미노산 서열은 서열번호 81로 기재되고, 14C12L1V의 서열번호는 서열번호 68로 기재되며;
- [0156] (2)NTPDV2, 이의 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 85로 기재되고, 경쇄 아미노산 서열은 서열번호 28로 기재되며, 링커 1의 아미노산 서열은 서열번호 79로 기재되고, 14C12H1V의 아미노산 서열은 서열번호 66으로 기재되며, 링커 1의 아미노산 서열은 서열번호 79로 기재되고, 14C12L1V의 서열번호는 서열번호 68로 기재되며;
- [0157] (3)NTPDV3, 이의 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 85로 기재되고, 경쇄 아미노산 서열은 서열번호 96로 기재되며, 링커 1의 아미노산 서열은 서열번호 79로 기재되고, 14C12H1V의 아미노산 서열은 서열번호 66으로 기재되며, 링커 2의 아미노산 서열은 서열번호 81로 기재되고, 14C12L1V의 서열번호는 서열번호 68로 기재되며; 및
- [0158] (4)NTPDV4, 이의 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 85로 기재되고, 경쇄 아미노산 서열은 서열번호 96로 기재되며, 링커 1의 아미노산 서열은 서열번호 79로 기재되고, 14C12H1V의 아미노산 서열은 서열번호 66으로 기재되며, 링커 1의 아미노산 서열은 서열번호 79로 기재되고, 14C12L1V의 서열번호는 서열번호 68로 기재된다.
- [0159] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체는 약 10^{-5} M 미만, 예컨대, 약 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M 또는 10^{-10} M 미만 또는 더 작은 K_D 로 CD73 단백질 및/또는PD-1 단백질에 결합한다.
- [0160] 본 발명의 또 다른 일 양태는 일종의 벡터에 관한 것이되,
- [0161] 이는 본 발명의 분리된 핵산 분자를 포함한다.

- [0162] 본 발명의 또 다른 일 양태는 일종의 숙주 세포에 관한 것이되,
- [0163] 이는 본 발명의 분리된 핵산 분자 또는 본 발명의 벡터를 포함한다.
- [0164] 본 발명의 또 다른 일 양태는 본 발명의 이중특이항체를 제조하는 방법에 관한 것이되,
- [0165] 이는 본 발명의 숙주 세포를 적합한 조건하에서 배양하는 단계, 및 세포 배양물로부터 상기 이중특이항체를 분리하는 단계를 포함한다.
- [0166] 본 발명의 또 다른 일 양태는 접합체에 관한 것이되,
- [0167] 이는 이중특이항체 및 접합된 모이어티(conjugated moiety)를 포함하고, 여기서, 상기 이중특이항체는 본 발명의 이중특이항체이고, 상기 접합된 모이어티는 검출 가능한 표지이고, 구체적으로 상기 접합된 모이어티는 방사성 동위원소, 형광 물질, 화학 발광 물질, 착색 물질 또는 효소이다.
- [0168] 본 발명의 또 다른 일 양태는 키트에 관한 것이되,
- [0169] 이는 본 발명의 이중특이항체 또는 본 발명의 접합체를 포함하며;
- [0170] 바람직하게는 상기 키트는 상기 이중특이항체를 특이적으로 인식하는 제2항체를 더 포함하고;
- [0171] 선택적으로, 상기 제2항체는 검출 가능한 표지, 예컨대, 방사성 동위원소, 형광 물질, 화학 발광 물질, 착색 물질 또는 효소를 더 포함한다.
- [0172] 본 발명의 또 다른 일 양태는
- [0173] 샘플 내의 CD73 및/또는 PD-1의 존재 또는 수준을 검출하기 위한 키트를 제조하는데 있어서의 본 발명의 이중특이항체의 용도에 관한 것이다.
- [0174] 본 발명의 또 다른 일 양태는 일종의 약물 조성물에 관한 것이되,
- [0175] 이는 본 발명의 이중특이항체 또는 본 발명의 접합체를 포함하며;
- [0176] 선택적으로 약학적으로 허용 가능한 벡터 및/또는 부형제를 더 포함한다.
- [0177] 본 발명의 또 다른 일 양태는 종양 또는 빈혈을 예방 및/또는 치료 또는 진단하는데 있어서의 본 발명의 이중특이항체 또는 본 발명의 접합체의 용도에 관한 것이다.
- [0178] 본 발명의 또 다른 일 양태는 종양 또는 빈혈을 예방 및/또는 치료 또는 진단하는 약물을 제조하는데 있어서의 본 발명의 이중특이항체 또는 본 발명의 접합체의 용도에 관한 것이다.
- [0179] 본 발명의 또 다른 일 양태는 하기 약물을 제조하는데 있어서의 본 발명의 이중특이항체 또는 본 발명의 접합체의 용도에 관한 것이다.
- [0180] 샘플 내의 CD73 수준을 검출하는 약물;
- [0181] CD73의 효소활성 반응을 억제하는 약물;
- [0182] 및/또는
- [0183] PD-1과 PDL1의 결합을 차단하는 약물;
- [0184] PD-1의 활성 또는 수준을 조절(예컨대, 하향 조절)하는 약물;
- [0185] PD-1이 생물체에 대한 면역억제를 완화하는 약물;
- [0186] T 림프구 내에서의 IL-2 발현을 제고하는 약물; 또는
- [0187] T 림프구 내에서의 IFN- γ 발현을 제고하는 약물.
- [0188] 본 발명의 또 다른 일 양태는 일종의 생체 내 또는 생체 외 방법에 관한 것이되,
- [0189] 세포를 투여하는 단계 또는 이를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 본 발명의 이중특이항체 또는 본 발명의 접합체를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0190] 본 발명에 관한 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체는 세포막 표면 CD7의 효소활성을 억제시킬 수 있고, IFN γ , IL-2의 분비를 유도하고 면역반응을 활성화시킬 수 있다.

- [0191] 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은 항원의 결합을 결정하고, 각 사슬의 가변 영역은 상보성 결정 영역 (CDR)이라고 하는 3개 초가변 영역을 포함한다. 중쇄 (H 사슬)의 CDR은 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3을 포함하고, 경쇄 (L 사슬)의 CDR은 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하며, 이는 Kabat등에 의해 명명되었으며, Bethesda M.d., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 1991; 1-3:91-3242을 참고할 수 있다.
- [0192] 바람직하게는 CDR은 IMGT 넘버링 시스템을 통해서도 정의될 수 있으며, Ehrenmann F, Kaas Q, Lefranc M P. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign:a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF[J]. Nucleic acids research, 2009; 38(suppl_1):D301-D307을 참고할 수 있다.
- [0193] 하기 (1) 내지 (11)의 단일클론 항체 서열의 CDR의 아미노산 서열은 당업자에게 공지된 기술적 수단, 예컨대 IMGT 정의를 통해 분석되고, 결과는 다음과 같다.
- [0194] (1) 19F3
- [0195] 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 2로 기재되고, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 7로 기재된다.
- [0196] 그 중쇄 가변 영역의 3개 CDR의 아미노산 서열은 다음과 같다:
- [0197] HCDR1:GYSFTGYT(서열번호:3),
- [0198] HCDR2:INPYNAGT(서열번호:4), 및
- [0199] HCDR3:ARSEYRYGGDYFDY(서열번호:5);
- [0200] 그 경쇄 가변 영역의 3개 CDR의 아미노산 서열은 다음과 같다:
- [0201] LCDR1:QSLNSSNQKNY(서열번호:8),
- [0202] LCDR2:FAS(서열번호:9), 및
- [0203] LCDR3:QQHYDTPYT(서열번호:10).
- [0204] (2) 19F3H2L2
- [0205] 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 20으로 기재되고, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 24로 기재된다.
- [0206] 그 중쇄 가변 영역의 3개 CDR의 아미노산 서열은 19F3과 같다:
- [0207] 그 경쇄 가변 영역의 3개 CDR의 아미노산 서열은 19F3과 같다.
- [0208] (3) 19F3H2L3
- [0209] 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 20으로 기재되고, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 24로 기재된다.
- [0210] 그 중쇄 가변 영역의 3개 CDR의 아미노산 서열은 19F3과 같다:
- [0211] 그 경쇄 가변 영역의 3개 CDR의 아미노산 서열은 19F3과 같다.
- [0212] (4) 14C12
- [0213] 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 44로 기재되고, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 49로 기재된다.
- [0214] 그 중쇄 가변 영역의 3개 CDR의 아미노산 서열은 다음과 같다:
- [0215] HCDR1:GFAFSSYD(서열번호:45),
- [0216] HCDR2:ISGGGRYT(서열번호:46),
- [0217] HCDR3:ANRYGEAWFAY(서열번호:47);
- [0218] 그 경쇄 가변 영역의 3개 CDR 영역의 아미노산 서열은 다음과 같다:

- [0219] LCDR1:QDINTY(서열번호:50),
- [0220] LCDR2:RAN(서열번호:51),
- [0221] LCDR3:LQYDEFPLT(서열번호:52).
- [0222] (5) 14C12HIL1
- [0223] 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 62로 기재되고, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 64로 기재된다.
- [0224] 그 중쇄 가변 영역의 3개 CDR의 아미노산 서열은 14C12과 같다:
- [0225] 그 경쇄 가변 영역의 3개 CDR의 아미노산 서열은 14C12과 같다.
- [0226] (6) NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 및 NTPDV4
- [0227] 그 중쇄에 포함된 9개 CDR의 아미노산 서열은 N-말단에서 C-말단으로의 순서에 따라 각각 13F9 중쇄, 14C12 중쇄 및 14C12 경쇄 영역의 CDR 아미노산 서열과 일치하고, 상술한 배열에 따른 서열은 다음과 같다:
- [0228] HCDR1:GYSFTGYT(서열번호:3)
- [0229] HCDR2:INPYNAGT(서열번호:4)
- [0230] HCDR3:ARSEYRYGGDYFDY(서열번호:5)
- [0231] HCDR4:GFAFSSYD(서열번호:45)
- [0232] HCDR5:ISGGGRYT(서열번호:46)
- [0233] HCDR6:ANRYGEAWFAY(서열번호:47)
- [0234] HCDR7:QDINTY(서열번호:50)
- [0235] HCDR8:RAN(서열번호:51)
- [0236] HCDR9:LQYDEFPLT(서열번호:52)
- [0237] 그 경쇄의 3개 CDR의 아미노산 서열은 19F3 경쇄의 3개 CDR 아미노산 서열과 일치하고, 서열은 다음과 같다:
- [0238] LCDR1:QSLNSSNQKNY(서열번호:8)
- [0239] LCDR2:FAS(서열번호:9)
- [0240] LCDR3:QQHYDTPYT(서열번호:10).
- [0241] 본 발명의 또 다른 일 양태는 하이브리도마 세포주 LT014에 관한 것이되,
- [0242] 이는 중국 전형 배양물 기탁센터(CCTCC)에 기탁되고, 기탁 번호는 CCTCC NO:C2018137이다.
- [0243] 본 발명의 또 다른 일 양태는 하이브리도마 세포주 LT003에 관한 것이되,
- [0244] 이는 중국 전형 배양물 기탁센터(CCTCC)에 기탁되고, 기탁 번호는 CCTCC NO:C2015105이다.
- [0245] 본 발명에서, 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 과학적이고 기술적인 용어는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 또한, 본 명세서에서 사용된 세포 배양, 분자 유전학, 핵산 화학 및 면역학의 실험실 작업 절차는 해당 분야에서 널리 사용되는 일상적인 절차이다. 한편, 본 발명을 보다 잘 이해하기 위하여, 관련 용어에 대한 정의 및 설명이 아래에 제공된다.
- [0246] 본 명세서에서 사용된 용어 EC_{50} 은 최대 효과의 50%의 농도(concentration for 50% of maximal effect), 즉 최대 효과의 50%를 유발할 수 있는 농도를 의미한다.
- [0247] 본 명세서에서 사용된 용어 "항체"는 일반적으로 두 쌍의 폴리펩타이드 사슬(각 쌍은 하나의 "가벼운" (L) 사슬 및 하나의 "무거운" (H) 사슬)로 구성되는 면역글로불린 분자를 의미한다. 항체 경쇄는 κ 및 γ 경쇄로 분류될 수 있다. 중쇄는 μ , δ , γ , α 또는 ϵ 로 분류될 수 있고, 또한 항체의 아이소타입(isotype)을 각각 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로 정의한다. 경쇄 및 중쇄에서, 가변 영역과 불변 영역은 약 12개 이상의 아미노산의 "J" 영역을 통해 연결되고, 중쇄 또한 약 3개 이상의 아미노산의 "D" 영역을 포함한다. 각 중쇄는 중쇄 가변

영역(VH) 및 중쇄 불변 영역(CH)으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개 도메인(CH1, CH2 및 CH3)으로 구성된다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역(VL) 및 경쇄 불변 영역(CL)으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인 CL로 구성된다. 항체의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포(예컨대, 이펙터 세포)와 고전적 보체 시스템의 제1 구성요소(C1q)의 결합을 포함하는, 면역글로불린과 숙주 조직 또는 인자의 결합을 매개할 수 있다. VH 및 VL 영역은 초가변성을 지닌 영역(상보성 결정 영역(CDR)으로 지칭됨)으로 더 세분화될 수 있으며, 그 사이에 프레임워크 영역(FR)이라고 하는 보존적인 영역이 분포되어 있다. 각 VH 및 VL은 다음의 순서 즉 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4로 아미노 말단에서 카르복실 말단으로 배열되는 3개 CDR 및 4개 FR로 구성된다. 각 중쇄/경쇄 쌍의 가변 영역(VH 및 VL)은 항체결합 부위를 각각 형성한다. 각 영역 또는 도메인에 대한 아미노산 할당은 Bethesda M.d., Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, (1987 and 1991)), 또는 Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 1987;196:901-917; Chothia et al. Nature 1989;342:878-883, 또는 IMGT 넘버링 시스템의 정의는 Ehrenmann F, Kaas Q, Lefranc M P. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF[J]. Nucleic acids research, 2009; 38(suppl_1):D301-D307을 참고할 수 있다..

[0248] 특히, 중쇄는 6개, 9개 또는 12개와 같은, 3개 이상의 CDR을 더 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 이중특이항체에서, 중쇄는 IgG 항체의 중쇄의 C-말단이 다른 항체와 연결된 ScFv일 수 있고, 이 경우, 중쇄는 9개 CDR을 포함한다.

[0249] 용어 "항체"는 어떤 특정의 항체 생산 방법에 의해 한정되지 않는다. 예컨대, 항체는 재조합 항체, 단일클론 항체 및 다중클론 항체를 포함한다. 항체는 IgG(예컨대, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 아형), IgA1, IgA2, IgD, IgE 또는 IgM 항체와 같은, 다른 아이소타입의 항체일 수 있다.

[0250] 본 명세서에서 사용된 용어 "mAb" 및 "단일클론 항체"는 고도로 상동성인 항체 분자의 그룹, 즉 자발적으로 발생할 수 있는 자연 돌연변이를 제외한, 동일한 항체 분자의 그룹으로부터 유래되는 하나의 항체 또는 항체의 하나의 단편을 의미한다. 단일클론 항체는 항원 상의 단일 항원결정기에 대해 매우 특이적이다. 단일클론 항체에 비해 다중클론 항체는 일반적으로 항원 상의 다른 항원결정기를 인식하는 적어도 2개 이상의 다른 항체를 포함한다. 단일클론 항체는 일반적으로 Kohler 등(Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. nature, 1975; 256(5517):495)에 의해 최초로 보고된 하이브리도마 기술을 사용하여 얻을 수 있지만, 재조합 DNA 기술(예컨대, 미국 특허 제4,816,567호 참고)을 사용하여 얻을 수도 있다.

[0251] 본 명세서에서 사용된 용어 "인간화 항체"는 인간 면역글로불린(수용체 항체)의 CDR 영역의 전부 또는 일부가 비-인간 항체(공여체 항체)의 CDR 영역으로 대체된 경우 얻어지는 항체 또는 항체 단편을 의미하며, 여기서 공여체 항체는 예상된 특이성, 친화성 또는 반응성을 갖는 비-인간(예컨대, 마우스, 래트 또는 토끼) 항체일 수 있다. 또한, 수용체 항체의 프레임워크 영역(FR)의 일부 아미노산 잔기는 항체의 성능을 더 개선하거나 최적화하기 위해 상응하는 비-인간 항체의 아미노산 잔기 또는 다른 항체의 아미노산 잔기로 대체될 수 있다. 인간화 항체에 대한 자세한 내용은 예를 들어 Jones et al., Nature 1986; 321:522-525; Reichmann et al., Nature, 1988; 332:323-329; Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 1992; 2:593-596; 및 Clark, Immunol. Today 2000; 21:397-402를 참고할 수 있다. 일부 경우에, 항체의 항원 결합 단편은 이량항체(Diabodies)이다. 여기서, V_H 및 V_L 도메인은 단일 폴리펩타이드 사슬 상에서 발현되는데, 사용된 링커가 너무 짧아서 동일 사슬에서 두 도메인이 짝을 이룰 수 없기에, 도메인은 다른 사슬의 상보적 도메인과 짝을 이루도록 되고 두개 항원 결합 부위가 생성된다(예를 들어, Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90:6444-6448 및 Poljak R. J. et al., Structure 1994; 2:1121-1123을 참고).

[0252] 본 명세서에서 사용된 용어 "단일쇄 항체(single chain fragment variable, ScFv)"는 링커를 통해 항체 중쇄 가변 영역(V_H) 및 항체 경쇄 가변 영역(V_L)을 연결한 분자를 포함한다. 여기서, V_L 및 V_H 도메인은 이들이 단일 폴리펩타이드 사슬을 생성할 수 있도록 하는 링커를 통해 짝을 이루어 1가(monovalent) 분자를 형성한다(예를 들어, Bird et al, Science 1988; 242:423-426 및 Huston et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85:5879-5883을 참고). 이러한 scFv 분자는 NH_2 - V_L -링커- V_H -COOH 또는 NH_2 - V_H -링커- V_L -COOH의 일반구조를 가질 수 있다. 선행기술에서 적합한 링커는 반복되는 GGGGS 아미노산 서열 또는 이의 변이체로 구성된다. 예컨대, (GGGGS) 4의 아미노산 서열을 갖는 링커가 사용될 수 있고, 이의 변이체 역시 사용될 수 있다(Holliger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90:6444-6448). 본 발명에 사용될 수 있는 다른 링커는 Alfthan et al, Protein Eng. 1995; 8:725-731, Choi et al, Eur. J. Immunol. 2001; 31:94-106, Hu et al, Cancer Res. 1996; 56:3055-

3061, Kipriyanov et al, J. Mol. Biol. 1999; 293:41-56 및 Roovers et al, Cancer Immunology, Immunotherapy, 2001, 50(1):51-59.를 통해 기술된다.

[0253] 본 명세서에서 사용된 용어 "분리된"은 자연 상태에서 인공적인 수단에 의해 얻은 것을 의미한다. 소정의 "분리된" 물질 또는 성분이 자연계에 나타났다면, 이는 자연 환경이 변화하였거나, 또는 자연 환경으로부터 상기 물질이 분리되었거나, 또는 두 경우 모두 발생하였을 수 있다. 예를 들어, 소정의 비-분리된 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 소정의 살아있는 동물에서 자연적으로 발생하며, 이러한 자연 상태에서 분리된 고순도의 동일한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 분리된 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드로 지칭된다. 용어 "분리된"은 물질의 활성에 영향을 미치지 않는 인공 또는 합성 물질 또는 기타 불순물의 존재를 배제하지 않는다.

[0254] 본 명세서에서 사용된 용어 "벡터(vector)"는 폴리뉴클레오타이드가 삽입될 수 있는 핵산 운반체를 의미한다. 벡터가 삽입된 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩된 단백질의 발현을 허용하는 경우, 벡터는 발현 벡터로 지칭된다. 벡터는 벡터에 의해 운반되는 유전 물질 요소가 숙주 세포에서 발현될 수 있도록 형질전환, 형질도입 또는 형질감염을 통해 숙주 세포에 도입될 수 있다. 벡터는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 다음을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 플라스미드; 파지미드; 코스미드; 효모 인공 염색체(YAC), 세균 인공 염색체(BAC) 또는 P1-유래 인공 염색체(PAC)와 같은 인공 염색체; 람다 파지 또는 M13 파지와 같은 파지; 및 동물 바이러스. 벡터로 사용될 수 있는 동물 바이러스는 레트로바이러스(렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 헤르페스 바이러스(예컨대, 단순 포진 바이러스), 폭스바이러스, 바콜로바이러스, 파필로마바이러스 및 파포바이러스(예컨대, SV40)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 벡터는 프로모터 서열, 전사 개시 서열, 인핸서 서열, 선별 요소 및 리포터 유전자를 포함하지만 이에 한정되지 않는 발현을 조절하는 다종의 요소를 포함할 수 있다. 또한, 벡터는 복제 개시 부위를 더 포함할 수 있다.

[0255] 본 명세서에서 사용된 용어 "숙주 세포"는 대장균 또는 고초균등과 같은 원핵세포, 효모 세포 또는 아스페르길루스등과 같은 진균 세포, S2 초파리 세포 또는 Sf9등과 같은 곤충 세포, 또는 섬유아세포, CHO 세포, GS 세포, COS 세포, NSO 세포, HeLa 세포, BHK 세포, HEK 293 세포 또는 인간 세포와 같은 동물 세포를 포함하지만, 이에 한정되지 않는 벡터가 도입될 수 있는 세포를 의미한다.

[0256] 본 명세서에서 사용된 용어 "특이적으로 결합"은 항체와 이를 표적으로 하는 항원 간의 반응과 같은 2개 분자 간의 비-랜덤 결합 반응을 의미한다. 일부 실시형태에서, 항원에 특이적으로 결합하는 항체 (또는 항원에 특이적인 항체)는 항체가 약 10^{-5} M 미만, 예컨대, 약 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M 또는 10^{-10} M 미만 또는 더 작은 친화도(K_D)로 항원에 결합하는 것을 의미한다.

[0257] 본 명세서에서 사용된 용어 " K_D "는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 평형 상수를 의미하며, 이는 항체와 항원 간의 결합 친화도를 설명하는데 사용된다. 평형 해리 상수가 작을수록, 항체-항원 결합이 더 단단하고, 항체와 항원 간의 친화도가 더 높다. 일반적으로, 항체는 약 10^{-5} M 미만, 예컨대, 약 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M 또는 10^{-10} M 미만 또는 더 작은 해리 평형 상수(K_D)로 항원 (예컨대, PD-1 단백질)에 결합한다. 당업자에게 공지된 방법, 예컨대, 포르테바이오 시스템을 사용하여 K_D 를 측정할 수 있다.

[0258] 본 명세서에서 사용된 용어 "단일클론 항체" 및 "mAb"는 동일한 의미를 가지며, 상호교환적으로 사용될 수 있다. 용어 "다중클론 항체" 및 "pAb"는 동일한 의미를 가지며, 상호교환적으로 사용될 수 있다. 또한, 본 발명에서, 아미노산은 일반적으로 당업계에 공지된 1-문자 및 3-문자 약어로 표시된다. 예컨대, 알라닌은 A 또는 Ala로 표시될 수 있다.

[0259] 본 명세서에서 사용된 용어 "약학적으로 허용 가능한 벡터 및/또는 부형제"는 약리학적 및/또는 생리학적으로 대상체 및 활성성분과 상용하는 벡터 및/또는 부형제를 의미한다. 이는 당업계에 공지된 것이고 (예를 들어 Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania:Mack Publishing Company, 1995를 참고), pH 조절제, 계면활성제, 보조제(adjutant) 및 이온강도 증강제를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 예컨대, pH 조절제는 인산 완충 용액을 포함하지만, 이에 한정되지 않고; 계면활성제는 양이온, 음이온 또는 Tween-80과 같은, 비이온형 계면활성제를 포함하지만, 이에 한정되지 않으며; 이온강도 증강제는 염화나트륨을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0260] 본 명세서에서 사용된 용어 "유효량"은 원하는 효과를 얻거나 또는 적어도 부분적으로 얻기에 충분한 양을 의미

한다. 예를 들어, 질병(예컨대, 종양) 예방적 유효량은 질병(예컨대, 종양)의 발생을 예방, 중단 또는 지연시키기에 충분한 양을 의미하고; 질병 치료적 유효량은 질병이 있는 환자의 질병 및 그 합병증을 치유하거나 적어도 부분적으로 중단시키기에 충분한 양을 의미한다. 이러한 유효량의 측정은 의심할 여지없이 당업자의 능력범위 내에 있다. 예를 들어, 치료 용도의 유효량은 치료하고자 하는 질병의 심각도, 환자 자신의 면역계의 전반적인 상태, 연령, 체중 및 성별과 같은 환자의 일반적인 상태, 약물의 투여 방식 및 동시에 제공되는 기타 치료법에 따라 다를 것이다.

발명의 효과

[0261] 본 발명의 단일클론 항체(예컨대, 13F9H2L3)는 CD73과 특이적으로 잘 결합할 수 있고, 비-기질경쟁의 방식으로 CD73의 효소활성 반응을 효과적으로 억제시킬 수 있고, 아데노신의 생성을 감소시킬 수 있으며, T세포 활성화 및 종양 억제 효과를 촉진시킬 수 있다.

[0262] NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 및 NTPDV4와 같은 본 발명에 관한 이중특이항체는 PD-1 및 CD73과 특이적으로 잘 결합할 수 있고, PD-1과 PDL1의 결합을 효과적으로 차단시킬 수 있고, PD-1이 생물에 대한 면역억제를 특이적으로 완화할 수 있으며, CD73의 촉매화 활성을 억제시킬 수 있고, 아데노신이 면역세포에 대한 억제를 완화할 수 있으며, T 림프구를 활성화시킬 수 있고, 사이토카인 IL-8 및 IL-6의 방출을 일으키지 않아 안전성과 유효성을 효과적으로 증가시킬 수 있다.

[0263] 본 발명의 이중특이항체는 항종양 약물의 제조에 응용될 잠재력을 가지고 있다.

[0264] **생물재료 기탁에 대한 정보:**

[0265] 하이브리도마 세포주 LT003(PD-1-14C12로도 지칭됨)는 2015년 6월 16일에 중국 전형 배양물 기탁센터(CCTCC)에 기탁 번호 CCTCC NO:C2015105로 기탁되었으며, 기탁기관의 주소는 중국 우한시 우한 대학교이고, 우편 번호는 430072이다.

[0266] 하이브리도마 세포주 LT014(CD73-19F3로도 지칭됨)는 2018년 6월 21일에 중국 전형 배양물 기탁센터(CCTCC)에 기탁 번호 CCTCC NO:C2018137로 기탁되었으며, 기탁기관의 주소는 중국 우한시 우한 대학교이고, 우편 번호는 430072이다.

도면의 간단한 설명

[0267] 도 1은 ELISA에 의해 검출한 PD-1-mFc에 대한 P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R, 14C12H1L1 및 Nivolumab 결합의 결과를 보여준다.

도 2는 ELISA에 의해 검출한 인간 NT5E-Biotin에 대한 P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R, 19F3, H2L3 및 MEDI9447 결합의 결과를 보여준다.

도 3은 인간 PD-L1-mFc와 경쟁하여 인간 PD-1-mFc-Biotin에 결합하는 P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R, 14C12H1L1 및 Nivolumab의 활성의 검출 결과를 보여준다.

도 4는 PD-1-mFc에 대한 P1D7V01의 친화도 상수를 측정한 결과를 보여준다.

도 5는 PD-1-mFc에 대한 14C12H1L1의 친화도 상수를 측정한 결과를 보여준다.

도 6은 PD-1-mFc에 대한 Nivolumab의 친화도 상수를 측정한 결과를 보여준다.

도 7은 인간 NT5E(1-552)-his에 대한 P1D7V01의 친화도 상수를 측정한 결과를 보여준다.

도 8은 인간 NT5E(1-552)-his에 대한 MEDI 9447의 친화도 상수를 측정한 결과를 보여준다.

도 9는 FACS에 의해 검출한 293T-PD1 세포표면 PD-1에 대한 P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R 및 14C12H1L1의 결합 활성의 결과를 보여준다.

도 10은 FACS에 의해 검출한 MDA-MB-231 세포표면 CD73에 대한 P1D7V01, P1D7V03, MEDI9447 및 19F3H2L3의 결합 활성의 결과를 보여준다.

도 11은 MDA-MB-231 막표면 CD73 효소활성에 대한 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 억제작용을 보여준다.

도 12는 U87-MG 막표면 CD73 효소활성에 대한 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 억제작용을 보여준다.

도 13은 Raji-PDL1 혼합 림프 반응계의 IFN- γ 분비를 촉진하는 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 생물적 활성의 검출 결과를 보여준다.

도 14는 Raji-PDL1 혼합 림프 반응계의 IL-2 분비를 촉진하는 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 생물적 활성의 검출 결과를 보여준다.

도 15는 DC 혼합 림프 반응계의 IFN- γ 분비를 촉진하는 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 생물적 활성의 검출 결과를 보여준다.

도 16은 DC 혼합 림프 반응계의 IL-2 분비를 촉진하는 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 생물적 활성의 검출 결과를 보여준다.

도 17은 PD-1-mFc에 대한 14C12H1L1(hG1TM)의 친화도 상수를 측정한 결과를 보여준다.

도 18은 PD-1-mFc에 대한 Nivolumab의 친화도 상수를 측정한 결과를 보여준다.

도 19는 PD-1-mFc에 대한 NTPDV1의 친화도 상수를 측정한 결과를 보여준다.

도 20은 PD-1-mFc에 대한 NTPDV2의 친화도 상수를 측정한 결과를 보여준다.

도 21은 PD-1-mFc에 대한 NTPDV3의 친화도 상수를 측정한 결과를 보여준다.

도 22는 PD-1-mFc에 대한 NTPDV4의 친화도 상수를 측정한 결과를 보여준다.

도 23은 인간 NT5E(1-552)-his에 대한 19F3H2L3(hG1M)의 친화도 상수를 측정한 결과를 보여준다.

도 24는 인간 NT5E(1-552)-his에 대한 NTPDV1의 친화도 상수를 측정한 결과를 보여준다.

도 25는 인간 NT5E(1-552)-his에 대한 NTPDV2의 친화도 상수를 측정한 결과를 보여준다.

도 26은 인간 NT5E(1-552)-his에 대한 NTPDV3의 친화도 상수를 측정한 결과를 보여준다.

도 27은 인간 NT5E(1-552)-his에 대한 NTPDV4의 친화도 상수를 측정한 결과를 보여준다.

도 28은 U87-MG 세포막표면 CD73 효소활성에 대한 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 억제 효과의 검출 결과를 보여준다.

도 29는 혼합 림프구 반응MLR에 의해 검출한 IFN- γ 및 IL-2 분비를 촉진하는 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 생물적 활성의 결과를 보여준다.

도 30은 마우스 종양 체적에 대한 아이소타입 대조군, 19F3H2L3(hG1M) 및 상이한 투여량의 NTPDV2의 영향을 보여준다.

도 31은 마우스 체중에 대한 아이소타입 대조군, 19F3H2L3(hG1M) 및 상이한 투여량의 NTPDV2의 영향을 보여준다.

도 32는 CHO-K1-PD1 세포 및 인간 대식세포의 공동 배양 체계중에서 Fc 단편 아미노산의 돌연변이가 PD-1/CD73 이중특이항체가 매개하는 인간 대식세포의 IL-8 분비를 효과적으로 제거한 결과를 보여준다.

도 33은 CHO-K1-PD1 세포 및 인간 대식세포의 공동 배양 체계중에서 Fc 단편 아미노산의 돌연변이가 PD-1/CD73 이중특이항체가 매개하는 인간 대식세포의 IL-6 분비를 효과적으로 제거한 결과를 보여준다.

도 34는 U87-MG 세포 및 인간 대식세포의 공동 배양 체계중에서 Fc 단편 아미노산의 돌연변이가 PD-1/CD73 이중특이항체가 매개하는 인간 대식세포의 IL-8 분비를 효과적으로 제거한 결과를 보여준다.

도 35는 U87-MG 세포 및 인간 대식세포의 공동 배양 체계중에서 Fc 단편 아미노산의 돌연변이가 PD-1/CD73 이중특이항체가 매개하는 인간 대식세포의 IL-6 분비를 효과적으로 제거한 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0268]

이하 실시예를 참조하여 본 발명의 실시형태에 대하여 상세히 설명한다. 당업자는 하기 실시예가 단지 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다는 것을 이해할 것이다. 실시예에 기술 또는 조건에 대한 구체적인 설명이 없는 경우, 해당 기술분야의 문헌에 기재된 기술이나 조건(예를 들어, J. Sambrook 등이 저술하고 Huang Peitang 등이 번역한 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third

Edition, Science Press를 참고) 또는 제품 설명서에 따라 진행하였다. 사용된 시약 또는 기기는 제조사가 명시되지 않은 경우 시판되고 있는 종래의 제품이다. 예를 들어, MDA-MB-231 세포 및 U87-MG 세포는 ATCC에서 구입할 수 있다.

- [0269] 본 발명의 하기 실시예에서, 사용된 BALB/c 마우스는 Guangdong Medical Laboratory Animal Center에서 구입하였다.
- [0270] 본 발명의 하기 실시예에서, 사용된 양성 대조군 항체 MEDI9447(통용명:Oleclumab)은 Zhongshan Akeso Co. Ltd.에서 생산되었고, 그 서열은 공개 번호가 US 20160129108A1인 MedImmune Limited의 공개 특허에서 기술한 항체의 서열번호 21-24와 동일하다.
- [0271] 본 발명의 하기 실시예에서, 사용된 동일 표적에 대한 시판 약물 항체 Nivolumab는 상품명 Opdivo이고, BMS에서 구입하였다.
- [0272] 본 발명의 하기 실시예에서, 사용된 293T-PD1 세포계는 Zhongshan Akeso Co. Ltd.에서 구축되었다. 293T-PD1 세포계는 HEK293T 세포를 바이러스에 감염시켜 제조되었고, 바이러스 제조에서 제3대 렌티바이러스 시스템(3rd Generation Lentiviral Systems)을 사용하였다(예를 들어, A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L. J Virol. 1998. 72(11):8463-8471을 참고). 여기서, 사용된 렌티바이러스 발현 벡터는 pCDH-CMV-PD-1FL-Puro(여기서, PD1의 Genbank ID는 NM_005018이고, 벡터 pCDH-CMV-Puro는 YouBio에서 구입하였고 제품 번호는 VT1480임)이다.
- [0273] 본 발명의 하기 실시예에서, 사용된 Raji-PDL1 세포계는 Zhongshan Akeso rma Ltd.에서 구축되었다. Raji-PDL1 세포계는 Raji 세포를 바이러스에 감염시켜 제조되었고, 바이러스 제조에서 제3대 렌티바이러스 시스템(3rd Generation Lentiviral Systems)을 사용하였다(예를 들어, A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L. J Virol. 1998. 72(11):8463-8471을 참고). 여기서, 사용된 렌티바이러스 발현 벡터는 plenti6.3-PDL1(여기서, PDL1의 Genbank ID는 NP_054862이고, 벡터 plenti6.3은 Invitrogen에서 구입하였고 아티클 번호는 K5315-20임)이다.
- [0274] 본 발명의 하기 실시예에서, 사용된 CHO-K1-PD1 세포계는 Zhongshan Akeso Co. Ltd.에서 구축되었다. CHO-K1-PD1 세포계는 CHO-K1 세포를 바이러스에 감염시켜 제조되었고, 바이러스 제조에서 제3대 렌티바이러스 시스템(3rd Generation Lentiviral Systems)을 사용하였다(예를 들어, A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L. J Virol. 1998. 72(11):8463-8471을 참고). 여기서, 사용된 렌티바이러스 발현 벡터는 pCDH-CMV-PD-1FL-Puro(여기서, PD1의 Genbank ID는 NM_005018이고, 벡터 pCDH-CMV-Puro는 YouBio에서 구입하였고 제품 번호는 VT1480임)이다.
- [0275] 실시예에서 사용된 S228P 돌연변이를 지니고 있는 IgG4 아형 항-PD-1 항체 Nivolumab(상품명 Opdivo)는 대조군 항체로서 BMS에서 구입하였다.
- [0276] 본 발명의 이하 실시예에서, 사용된 아이소타입 대조군 항체 즉 hIgG1은 인간 항-계란 라이소자임(anti-hen egg lysozyme, HEL)을 표적으로 하는 항체이다. 항체의 가변 영역의 서열은 Acierno등에 의해 발표된 Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies(Acierno et al., J Mol Biol. 2007; 374(1):130-46.)에서 유래되었다. hIgG1의 불변 영역 단편은 Ig 감마-1 사슬 C 영역(Ig gamma-1 chain C region), ACCESSION:P01857을 중쇄 불변 영역으로 사용하고, Ig 카파 사슬 C 영역(Ig kappa chain C region), ACCESSION:P01834를 경쇄 불변 영역으로 사용한다. hIgG1은 Zhongshan Akeso Co.Ltd.의 실험실에서 제조되었다.
- [0277] **실시예1: 항-CD73 항체 19F3의 제조**
- [0278] **1.하이브리도마 세포주 LT014의 제조**
- [0279] 항-CD73 항체의 제조에 사용된 항원은 인간 NT5E-his(NT5E의 Genbank ID는 NP_002517.1이고, 위치는 1-552임)이다. 면역화된 마우스의 비장 세포를 마우스의 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 제조하였다. NT5E Biotin (NT5E의 Genbank ID는 NP_002517.1이고, 위치는 1-552임)-을 항원으로 사용하고, 하이브리도마 세포를 간접 ELISA에 의해 스크리닝하여, CD73에 특이적으로 결합하는 항체를 분리할 수 있는 하이브리도마 세포를 얻

었다. ELISA 스크리닝에 의해 얻어진 하이브리도마 세포에 대하여, 한계희석을 거쳐 안정한 하이브리도마 세포주를 얻었다. 상기 하이브리도마 세포주를 하이브리도마 세포주 LT014로 명명하고, 이로부터 분비되는 단일클론 항체를 19F3로 명명하였다.

[0280] 하이브리도마 세포주 LT014(CD73-19F3로도 지칭됨)는 2018년 6월 21일에 중국 전형 배양물 기탁센터(CCTCC)에 기탁 번호 CCTCC NO:C2018137로 기탁되었으며, 기탁기관의 주소는 중국 우한시 우한 대학교이고, 우편 번호는 430072이다.

[0281] 2. 항-CD73 항체 19F3의 제조

[0282] 위에서 제조된 LT014 세포주를 5% CO₂, 37℃ 인큐베이터에서 CD 배지(1% 페니실린-스트렙토마이신을 포함)를 사용하여 배양하였다. 7일 후, 세포배양 상청액을 채취하여 고속 원심분리 및 미세여과막을 통한 진공 여과를 실시하고, HiTrap 단백질 A HP 칼럼을 통해 정제하여 항체 19F3을 얻었다.

[0283] 실시예2: 항-CD73 항체 19F3의 서열 분석

[0284] RNeasy pure Cell/Bacteria Kit(Tiangen, 아티클 번호 DP430)의 설명서에 기재된 방법에 따라 실시예1에서 배양된 LT014 세포주로부터 mRNA를 추출하였다.

[0285] RT-PCR용 Invitrogen SuperScript® III First-Strand 합성 시스템의 설명서에 따라 cDNA가 합성되었고, PCR에 의해 증폭되었다.

[0286] pEASY-T1 클로닝 키트 (Transgen CT101)의 설명서에 따라 PCR-증폭된 산물을 직접 TA 클로닝하였다.

[0287] TA-클로닝된 산물을 직접 시퀀싱하였으며, 시퀀싱 결과는 다음과 같다.

[0288] 19F3 중쇄 가변 영역의 핵산 서열(363 bp)은 서열번호 1로 기재되고, 이에 의해 코딩된 아미노산 서열(121 aa)은 서열번호 2로 기재된다.

[0289] IMGT 넘버링 시스템에 의하면, 중쇄 CDR1의 서열은 서열번호 3으로 기재되고, 중쇄 CDR2의 서열은 서열번호 4로 기재되고, 중쇄 CDR3의 서열은 서열번호 5로 기재된다.

[0290] 19F3 경쇄 가변 영역의 핵산 서열(339 bp)은 서열번호 6으로 기재되고, 이에 의해 코딩된 아미노산 서열(113 aa)은 서열번호 7로 기재된다.

[0291] IMGT 넘버링 시스템에 의하면, 경쇄 CDR1의 서열은 서열번호 8로 기재되고, 경쇄 CDR2의 서열은 서열번호 9로 기재되고, 경쇄 CDR3의 서열은 서열번호 10으로 기재된다.

[0292] 19F3 중쇄의 4개 프레임워크 영역(FR-H1 내지 FR-H4) 아미노산 서열은 각각 서열번호 11 내지 서열번호 14로 기재되고, 19F3 경쇄의 4개 프레임워크 영역(FR-H1 내지 FR-H4) 아미노산 서열은 각각 서열번호 15 내지 서열번호 18로 기재된다.

[0293] 실시예3: 인간화 항-인간 CD73 항체의 설계, 제조 및 검출

[0294] 1. 인간화 항체 19F3H2L3 및 19F3H2L2의 경쇄 및 중쇄 서열의 설계

[0295] 인간 CD73 단백질의 3차원 결정 구조(Hage T, Reinemer P, Sebald W. Crystals of a 1:1 complex between human interleukin-4 and the extracellular domain of its receptor alpha chain. Eur J Biochem. 1998; 258(2):831-6) 및 실시예2에서 얻은 무린 항체 19F3의 서열에 기초하여, 컴퓨터를 통해 항체 모델을 모델링하고, 모델에 따라 돌연변이를 설계하여, 항체 19F3H1L1, 19F3H2L3 및 19F3H2L3의 가변 영역 서열을 얻었다. 그에 상응하는 중쇄 가변 영역 서열은 각각 19F3H1 및 19F3H2(아미노산 서열은 각각 서열번호 93, 서열번호 97로 기재됨)이고, 경쇄 가변 영역 서열은 각각 19F3L1, 19F3L2 및 19F3L3(아미노산 서열은 각각 서열번호 95, 서열번호 98 및 서열번호 99로 기재됨)이다. 항체 불변 영역 서열은 NCBI 데이터베이스로부터 유래되고, 중쇄 불변 영역은 Ig 감마-1 사슬 C 영역, ACCESSION:P01857을 사용하고, 경쇄 불변 영역은 Ig 카파 사슬 C 영역, ACCESSION:P01834이다. 여기서, 19F3H2L3은 출원번호가 202110270671.X인 중국 발명 특허에서 19F3H2L3(hg1WT)로 기재되어 있으며, 여기서, 19F3H1L1, 19F3H2L2 및 19F3H2L3의 경쇄, 중쇄 가변 영역은 19F3H1V(또는 19F3H1_V), 19F3H2V(또는 19F3H2_V), 19F3L1V(또는 19F3L1_V), 19F3L2V(또는 19F3L2_V) 및 19F3L3V(또는 19F3L3_V)로도 표기할 수 있다.

- [0296] (1) 인간화 단일클론 항체 19F3H1L1의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 서열:
- [0297] 중쇄 가변 영역의 핵산 서열(363 bp)은 서열번호 92로 기재되고, 이에 의해 코딩된 아미노산 서열(121 aa)은 서열번호 93으로 기재된다.
- [0298] 경쇄 가변 영역의 핵산 서열(339 bp)은 서열번호 94로 기재되고, 이에 의해 코딩된 아미노산 서열(113 aa)은 서열번호 95로 기재된다.
- [0299] (2) 인간화 단일클론 항체 19F3H2L2의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 서열:
- [0300] 중쇄 가변 영역 19F3H2의 핵산 서열(363 bp)은 서열번호 19로 기재되고, 이에 의해 코딩된 아미노산 서열(121 aa)은 서열번호 20으로 기재된다.
- [0301] 경쇄 가변 영역 19F3L3의 핵산 서열(339 bp)은 서열번호 21로 기재되고, 이에 의해 코딩된 아미노산 서열(113 aa)은 서열번호 22로 기재된다.
- [0302] (3) 인간화 단일클론 항체 19F3H2L3의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 서열
- [0303] 중쇄 가변 영역 19F3H2의 핵산 서열(363 bp)은 서열번호 19로 기재되고, 이에 의해 코딩된 아미노산 서열(121 aa)은 서열번호 20으로 기재된다.
- [0304] 경쇄 가변 영역 19F3L3의 핵산 서열(339 bp)은 서열번호 23으로 기재되고, 이에 의해 코딩된 아미노산 서열(113 aa)은 서열번호 24로 기재된다.
- [0305] **2. 인간화 항체 19F3H1L1, 19F3H2L2 및 19F3H2L3의 제조**
- [0306] 중쇄 불변 영역은 Ig 감마-1 사슬 C 영역(Ig gamma-1 chain C region), ACCESSION:P01857을 사용했고, 경쇄 불변 영역은 Ig 카파 사슬 C 영역(Ig kappa chain C region), ACCESSION:P01834를 사용했다.
- [0307] 19F3H1L1, 19F3H2L2 및 19F3H2L3의 중쇄 cDNA 및 경쇄 cDNA를 pUC57simple(Genscript에 의해 제공됨) 벡터에 별도로 클로닝하여, 각각 pUC57simple-19F3H1, pUC57simple-19F3L1, pUC57simple-19F3H2, pUC57simple-19F3L2 및 pUC57simple-19F3L3을 얻었다. Molecular Cloning: A Laboratory Manual(Second Edition)에서 소개한 표준 기법을 참고하여, EcoRI&HindIII 소화(digestion)에 의해 합성된 중쇄 및 경쇄 전장 유전자를 제한효소(EcoRI&HindIII)의 소화를 통해 발현 벡터 pcDNA3.1에 서브클로닝하여 발현 플라스미드 pcDNA3.1-19F3H1, pcDNA3.1-19F3L1, pcDNA3.1-19F3H2, pcDNA3.1-19F3L2 및 pcDNA3.1-19F3L3을 얻었고, 재조합 발현 플라스미드의 중쇄 및 경쇄 유전자를 시퀀싱 분석하였다. 그 후 상응하는 경쇄 및 중쇄 재조합 플라스미드를 함유한 설계 유전자 조합(pcDNA3.1-19F3H1/ pcDNA3.1-19F3L1, pcDNA3.1-19F3H2/pcDNA3.1-19F3L2 및 pcDNA3.1-19F3H2/pcDNA3.1-19F3L3)을 각각 293F 세포에 동시에 형질감염 시키고, 배양액을 수집하여 정제하였다. 서열을 확인한 후, 내독소가 없는 발현 플라스미드를 제조하고, 항체 발현을 위해 HEK293 세포에 일시적으로 형질감염 시켰다. 7일 후, 세포 배양액을 수집하고, 단백질을 A 칼럼을 사용하여 친화성 정제를 진행하여 인간화 항체를 얻었다.
- [0308] **3. 인간화 항체 19F3H2L3(hG1M) 및 19F3H2L3(hG1TM)의 경쇄 및 중쇄 서열의 설계**
- [0309] 본 발명자는 실시예3의 1에서 얻은 19F3H2L3에 기초하여, 그 중쇄의 234번 위치에 류신-알라닌 점 돌연변이(L234A)를 도입하고, 235번 위치에 류신-알라닌 점 돌연변이(L235A)를 도입하여, 19F3H2L3(hG1M)을 얻었다. 19F3H2L3(hG1M)의 중쇄 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 25 및 서열번호 26으로 기재되고, 19F3H2L3(hG1M)의 경쇄 불변 영역은 Ig 카파 사슬 C 영역, ACCESSION:P01834이며, 19F3H2L3(hG1M)의 경쇄 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 27 및 서열번호 28로 기재된다.
- [0310] 본 발명자는 실시예3의 1에서 얻은 19F3H2L3에 기초하여, 그 중쇄의 234번 위치에 류신-알라닌 점 돌연변이(L234A)를 도입하고, 235번 위치에 류신-알라닌 점 돌연변이(L235A)를 도입하며, 237번 위치에 글리신-알라닌 점 돌연변이(G237A)를 도입하여 19F3H2L3(hG1TM)을 얻었다. 이의 중쇄 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 29 및 서열번호 30으로 기재되고, 경쇄는 19F3H2L3(hG1M)과 일치하다.
- [0311] 19F3H2의 4개 프레임워크 영역(FR-H1 내지 FR-H4) 아미노산 서열은 각각 서열번호 31 내지 서열번호 34로 기재된다.
- [0312] 19F3L2 경쇄의 4개 프레임워크 영역(FR-H1 내지 FR-H4) 아미노산 서열은 각각 서열번호 35 내지 서열번호 38로 기재된다.

- [0313] 19F3L3 경쇄의 4개 프레임워크 영역(FR-H1 내지 FR-H4) 아미노산 서열은 각각 서열번호 39 내지 서열번호 42로 기재된다.
- [0314] **4. 인간화 항체 19F3H2L3(hG1M)의 제조**
- [0315] 19F3H2L3(hG1M)의 중쇄 cDNA 및 경쇄 cDNA를 pUC57simple(Genscript에 의해 제공됨) 벡터에 별도로 클로닝하여, 각각 pUC57simple-19F3H2(hG1M) 및 pUC57simple-19F3L3을 얻었다. Molecular Cloning: A Laboratory Manual(Second Edition)에서 소개한 표준 기법을 참고하여, EcoRI&HindIII 소화에 의해 합성된 중쇄 및 경쇄 전장 유전자를 제한효소(EcoRI&HindIII)의 소화를 통해 발현 벡터 pcDNA3.1에 서브클로닝하여 발현 플라스미드 pcDNA3.1-19F3H2(hG1M) 및 pcDNA3.1-19F3L3을 얻었다. 더 나아가, 재조합 발현 플라스미드의 중쇄 및 경쇄 유전자를 시퀀싱 분석하였다. 그 후 상응하는 경쇄 및 중쇄 재조합 플라스미드를 함유한 설계 유전자 조합(pcDNA3.1-19F3H2(hG1M)/pcDNA3.1-19F3L3)을 293F 세포에 동시 형질감염시키고, 배양액을 수집하여 정제하였다. 서열을 확인한 후, 내독소가 없는 발현 플라스미드를 제조하고, 항체 발현을 위해 HEK293 세포에 일시적으로 형질감염시켰다. 7일 후, 세포 배양액을 수집하고, 단백질 A 칼럼을 사용하여 친화성 정제를 진행하여 인간화 항체19F3H2L3(hG1M)를 얻었다.
- [0316] **실시예4: 항-PD-1 항체 14C12의 제조**
- [0317] **1. 하이브리도마 세포주 LT003의 제조**
- [0318] PD-1-mFc 융합 단백질(PD-1의 GenBank는 NM_005018이고, mFc의 서열번호는 89임)을 항원으로 사용하고, 면역화된 BALB/c 마우스(Guangdong Medical Laboratory Animal Center에서 구입됨)의 비장 세포를 마우스의 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 제조하였다. 현재 이미 확립된 방법을 참고하면 된다(예를 들어, Stewart, S.J., "Monoclonal Antibody Production", in Basic Methods in antibody Production and Characterization, Eds. G.C. Howard and D.R. Bethell, Boca Raton:CRC Press, 2000).
- [0319] PD-1-hFc(PD-1의 Genbank ID는 NM_005018이고, hFc는 인간 IgG Fc 정제 태그이고, 구체적으로 Ig 감마-1 사슬 C 영역이고, Genbank ID는 P01857이며, 위치는 114-330임)을 항원으로 사용하여 마이크로플레이트를 코팅하고, 간접 ELISA에 의해 스크리닝하여 PD-1과 특이적으로 결합하는 새로운 항체를 분비하는 하이브리도마 세포를 얻었다.
- [0320] 경쟁 ELISA를 통해 PD-1에 결합하기 위해 리간드 PD-L1-hFc(PD-L1의 Genbank ID는 NP_054862.1임)와 경쟁하는 단일클론 항체를 분비할 수 있는 하이브리도마 세포주를 스크리닝하고, 제한희석을 거쳐 안정한 하이브리도마 세포주를 얻고, 제한희석을 거쳐 LT003 안정 세포주(PD-1-14C12)를 얻었다. 이로부터 분비되는 단일클론 항체를 14C12로 명명하였다.
- [0321] 하이브리도마 세포주 LT003(PD-1-14C12로도 지칭됨)는 2015년 6월 16일에 중국 전형 배양물 기탁센터(CCTCC)에 기탁 번호 CCTCC NO:C2015105로 기탁되었으며, 기탁기관의 주소는 중국 우한시 우한 대학교이고, 우편 번호는 430072이다.
- [0322] **2. 항-PD-1 항체 14C12의 제조**
- [0323] 위에서 제조된 LT003 세포주를 10% 저 IgG 소태아혈청을 포함한 IMDM 배지 (5% CO₂, 37℃ 인큐베이터에서 배양된 1% 페니실린-스트렙토마이신을 포함하는 IMDM 배지)에서 배양하였다. 7일 후, 세포배양 상청액을 수집하고 정제하여 항체 14C12를 얻었다.
- [0324] **실시예5: 항-PD-1 항체 14C12의 서열 분석**
- [0325] RNeasy pure Cell/Bacteria Kit(Tiangen, 아티클 번호 DP430)의 설명서에 기재된 방법에 따라 실시예1에서 제조된 하이브리도마 세포주 LT003으로부터 mRNA를 추출하였다.
- [0326] Invitrogen의 RT-PCR을 위한 SuperScript® III First-Strand 합성 시스템의 설명서에 따라 cDNA가 합성되고, PCR에 의해 증폭되었다.
- [0327] PCR-증폭된 산물을 직접 TA 클로닝하였다. 구체적인 작업은 pEASY-T1 클로닝 키트(Transgen CT101)의 설명서를 참고하였다.
- [0328] TA-클로닝된 산물을 직접 시퀀싱하였으며, 시퀀싱 결과는 다음과 같다.
- [0329] 중쇄 가변 영역의 핵산 서열(354 bp)은 서열번호 43으로 기재되고, 이에 의해 코딩된 아미노산 서열(118 aa)은

서열번호 44로 기재된다.

[0330] IMGT 넘버링 시스템에 의하면, 중쇄 CDR1의 서열은 서열번호 45로 기재되고, 중쇄 CDR2의 서열은 서열번호 46으로 기재되고, 중쇄 CDR3의 서열은 서열번호 47로 기재된다.

[0331] 경쇄 가변 영역의 핵산 서열(321 bp)은 서열번호 48로 기재되고, 이에 의해 코딩된 아미노산 서열(107 aa)은 서열번호 49로 기재된다.

[0332] IMGT 넘버링 시스템에 의하면, 경쇄 CDR1의 서열은 서열번호 50으로 기재되고, 경쇄 CDR2의 서열은 서열번호 51로 기재되고, 경쇄 CDR3의 서열은 서열번호 52로 기재된다.

[0333] 14C12 중쇄의 4개 프레임워크 영역(FR-H1 내지 FR-H4) 아미노산 서열은 각각 서열번호 53 내지 서열번호 56로 기재되고, 14C12 경쇄의 4개 프레임워크 영역(FR-H1 내지 FR-H4) 아미노산 서열은 각각 서열번호 57 내지 서열번호 60으로 기재된다.

[0334] **실시예6: 인간화 항-PD-1 항체 14C12H1L1 및 14C12H1L1(hG1TM)의 설계 및 제조**

[0335] **1. 인간화 항-PD-1 항체 14C12H1L1의 설계**

[0336] 인간화 항체 14C12H1L1의 경쇄 및 중쇄 서열의 설계는 PD-1 단백질의 3차원 결정 구조(Shinohara T, et al., Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). Genomics 1995, 23 (3):704-6) 및 실시예5에서 얻은 항체 14C12의 서열에 기초하여, 컴퓨터를 통해 항체 모델을 모델링하고, 모델에 따라 돌연변이를 설계하여, 항체 14C12H1L1의 가변 영역 서열을 얻었다.

[0337] 설계된 가변 영역 서열은 다음과 같다.

[0338] 인간화 항체 14C12H1L1의 중쇄 가변 영역 14C12H1의 핵산 서열(354 bp)은 서열번호 61로 기재되고, 이에 의해 코딩된 아미노산 서열(118 aa)은 서열번호 62로 기재된다.

[0339] 인간화 항체 14C12H1L1의 경쇄 가변 영역 14C12L1의 핵산 서열(321 bp)은 서열번호 63으로 기재되고, 이에 의해 코딩된 아미노산 서열(107 aa)은 서열번호 64로 기재된다.

[0340] 항체 14C12H1L1의 항체 불변 영역 서열은 NCBI 데이터베이스로부터 유래되고, 중쇄 불변 영역은 Ig 감마-1 사슬 C 영역, ACCESSION:P01857을 사용하고, 경쇄 불변 영역은 Ig 카파 사슬 C 영역, ACCESSION:P01834이다. 14C12H1L1 중쇄의 뉴클레오타이드 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 65 및 서열번호 66으로 기재되고, 14C12H1L1 경쇄의 뉴클레오타이드 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 67 및 68로 기재된다. 여기서, 14C12H1L1은 본 명세서 및 출원번호가 202110270671.X인 중국 발명 특허에서 14C12H1L1(hG1WT)로 기재되어 있으며, 여기서, 14C12H1L1의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 본 명세서 및 출원번호가 202110270671.X인 중국 발명 특허에서 14C12H1V(또는 14C12H1_V) 및 14C12L1_V(또는 14C12L1_V)로 기재되어 있다.

[0341] **2. 인간화 항체 14C12H1L1(hG1TM)의 경쇄 및 중쇄 서열의 설계**

[0342] 본 발명자는 실시예6의 1에서 얻은 14C12H1L1에 기초하여, 그 중쇄의 234번 위치에 류신-알라닌 점 돌연변이(L234A)를 도입하고, 235번 위치에 류신-알라닌 점 돌연변이(L235A)를 도입하며, 237번 위치에 글리신-알라닌 점 돌연변이(G237A)를 도입하여 항체 14C12H1L1(hG1TM)을 얻었다. 14C12H1L1(hG1TM)의 중쇄 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 69 및 서열번호 70으로 기재되고, 경쇄 가변 영역 아미노산 서열은 항체 14C12H1L1의 경쇄 가변 영역과 일치하다.

[0343] 14C12H1의 4개 프레임워크 영역(FR-H1 내지 FR-H4) 아미노산 서열은 각각 서열번호 71 내지 서열번호 74로 기재된다.

[0344] 14C12L1 경쇄의 4개 프레임워크 영역(FR-H1 내지 FR-H4) 아미노산 서열은 각각 서열번호 75 내지 서열번호 78로 기재된다.

[0345] **3. 인간화 항체 14C12H1L1, 14C12H1L1(hG1TM)의 제조**

[0346] 14C12H1L1(hG1TM) 및 14C12H1L1의 중쇄 cDNA 및 경쇄 cDNA를 pUC57simple(Genscript에 의해 제공됨) 벡터에 별도로 클로닝하여, 각각 pUC57simple-14C12H1, pUC57simple-14C12L1 및 pUC57simple-14C12H1(hG1TM)을 얻었다. Molecular Cloning: A Laboratory Manual(Second Edition)에서 소개한 표준 기법을 참고하여, EcoRI&HindIII 소화에 의해 합성된 중쇄 및 경쇄 전장 유전자를 제한효소(EcoRI&HindIII)의 소화를 통해 발현 벡터 pcDNA3.1에

서브클로닝하여 발현 플라스미드 pcDNA3.1-14C12H1, pcDNA3.1-14C12L1 및 pcDNA3.1-14C12H1(hG1TM)을 얻었다. 더 나아가, 재조합 발현 플라스미드의 중쇄 및 경쇄 유전자를 시퀀싱 분석하였다. 그 후 상응하는 경쇄 및 중쇄 재조합 플라스미드를 함유한 설계 유전자 조합(pcDNA3.1-14C12H1(hG1TM)/pcDNA3.1-14C12L1 및 pcDNA3.1-14C12H1/pcDNA3.1-14C12L1)을 각각 293F 세포에 동시 형질감염시키고, 배양액을 수집하여 정제하였다. 서열을 확인한 후, 내독소가 없는 발현 플라스미드를 제조하고, 항체 발현을 위해 HEK293 세포에 일시적으로 형질감염시켰다. 7일 후, 세포 배양액을 수집하고, 단백질을 A 칼럼을 사용하여 친화성 정제를 진행하여 인간화 항체를 얻었다.

실시예7: 항-PD-1/CD73 이중특이항체의 서열 설계 및 발현

1. 서열 설계

본 발명의 이중특이항체의 구조 형태는 모리슨(Morrison) 형태 (IgG-scFv)에 속하고, 즉, 하나의 IgG 항체의 두 개 중쇄의 C-말단이 각각 다른 하나의 항체의 scFv 단편에 연결된다. 중쇄 및 경쇄의 주요 구성 설계는 하기 표 1에 나타난 바와 같다.

표 1

P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R, P1D7V07 및 P1D7V08의 중쇄 및 경쇄의 구성 설계

이중특이항체 번호	중쇄			경쇄
	IgG 부분	링커	scFv 부분	
P1D7V01	14C12H1	Linker1	19F3H2 _v -Linker1-19F3L3 _v	14C12L1
P1D7V02R	14C12H1	Linker1	19F3L3 _v -Linker1-19F3H2 _v	14C12L1
P1D7V03	14C12H1	Linker2	19F3H2 _v -Linker1-19F3L3 _v	14C12L1
P1D7V04R	14C12H1	Linker2	19F3L3 _v -Linker1-19F3H2 _v	14C12L1
P1D7V07	19F3H2	Linker1	14C12H1 _v -Linker1-14C12L1 _v	19F3L3
P1D7V08	19F3H2	Linker2	14C12H1 _v -Linker1-14C12L1 _v	19F3L3

위의 표1에서,

(1) 우측 하단 모서리에 "V" 표시가 있는 항목은 상응하는 중쇄의 가변 영역 또는 상응하는 경쇄의 가변 영역을 의미한다. "V" 표시가 없는 항목에서, 상응하는 중쇄 또는 경쇄는 불변 영역을 포함하는 전장 (full length)이다. 이러한 가변 영역 또는 전장의 아미노산 서열 및 이를 코딩하는 핵산 서열은 위의 실시예에 기재된 상응하는 서열을 참고한다.

(2) Linker 1의 아미노산 서열은 (GGGS)4(뉴클레오타이드 서열은 서열번호 80이고, 아미노산 서열은 서열번호 79임)이고, Linker 2의 아미노산 서열은 (GGGS)3(뉴클레오타이드 서열은 서열번호 82이고, 아미노산 서열은 서열번호 81임)이다.

2. 항체의 발현 및 정제

P1D7V01의 중쇄 cDNA 서열 및 경쇄 cDNA 서열을 pUC57simple(Genscript에 의해 제공됨) 벡터에 별도로 클로닝하여, 각각 pUC57simple-VP101H 및 pUC57simple-VP101L 플라스미드를 얻었다.

플라스미드 pUC57simple-VP101H 및 pUC57simple-VP101L을 각각 HindIII&EcoRI로 소화시키고, 전기영동을 거쳐 중쇄 및 경쇄를 회수하였다. 얻은 중쇄 및 경쇄를 각각 pcDNA3.1 벡터에 서브클로닝하여 재조합 플라스미드를 추출하고, 이를 293F 세포에 동시 형질감염시켰다. 세포 배양 7일 후, 배양액을 고속 원심분리하고, 상청액을 농축시킨 후, HiTrap MabSelect SuRe 칼럼에 로딩하였다. 단백질을 용출 버퍼 (elution buffer)로 용출시키고, 표적 샘플을 회수하고, PBS로 교환하였다.

상기 P1D7V01의 발현 및 정제 방법에 따라 정제된 항체 P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R, P1D7V07 및 P1D7V08을 얻었다.

실시예8: ELISA 방법에 의한 항원에 대한 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 결합 활성 측정

[0359] 1. ELISA 방법에 의한 항원 PD-1-mFc에 대한 P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 및 P1D7V04R의 결합 활성 측정 구별적인 방법은 다음과 같다.

[0360] PD-1-mFc를 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 로 S마이크로플레이트에 코팅하고, 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 그 후, PBST를 사용하여 항원-코팅된 마이크로플레이트를 1회 세척하고, 1% BSA의 PBS 용액을 차단액으로 사용하여, 37℃조건하에서 마이크로플레이트를 2시간 동안 차단시켰다. 그 후, 마이크로플레이트를 PBST로 3회 세척하였다. PBST 용액으로 연속 희석한 항체(항체에 대한 희석 구배는 표2에 자세히 나와 있음)를 첨가하고, 테스트 항체를 포함하는 마이크로플레이트를 37℃조건하에서 30분 동안 인큐베이션한 후, PBST로 3회 세척하였다. 그 후, 1:5000의 비율로 희석된 HRP-표지된 염소 항-인간 IgG(H+L)(Jackson, 아티클 번호:109-035-088) 2차 항체 작업 용액을 첨가하고, 37℃조건하에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, PBST를 사용하여 마이크로 플레이트를 4회 세척하고, TMB(Neogen, 308177)를 첨가하여 암실에서 5분 동안 발색시킨 후, 중지액을 첨가하여 발색 반응을 중지시켰다. 마이크로플레이트를 즉시 마이크로판독기에 넣고, 마이크로플레이트의 각 웰의 OD 값을 450nm 광파장에서 판독하였다. SoftMax Pro 6.2.1 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0361] 검출 결과는 표2 및 도1에 나타난 바와 같다. 도에서 알수 있다 시피, P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 및 P1D7V04R은 항원 PD-1-mFc와 효과적으로 결합할 수 있고, 또한 그 결합 효율은 투여량 의존 관계를 나타내고, 각 투여량의 흡광도 강도는 표2에 나타난 바와 같다. 결합된 항체에 대해 흡광도 정량 분석을 진행하고, 곡선 시뮬레이션 계산을 통해 얻은 항체 P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R, 14C12H1L1 및 Nivolumab(대조군)의 결합 효율 EC50은 각각 0.078nM, 0.078nM, 0.075nM, 0.089 nM, 0.033nM 및 0.051nM이다.

[0362] 위의 실험결과는 동일한 실험 조건하에서 항원 PD-1-mFc에 대한 P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 및 P1D7V04R의 결합 활성은 동일 표적 양성 약 14C12H1L1 및 Nivolumab과 유사하며, 이는 P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 및 P1D7V04R은 PD-1-mFc과 효과적으로 결합하는 활성을 가지고 있다는 것을 보여준다.

표 2

ELISA 에 의한 PD-1-mFc 에 대한 P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R,

14C12H1L1 및 Nivolumab 의 결합에 대한 검출

항체 희석 농도 ($\mu\text{g/ml}$)	항원-코팅된 PD-1-mFc 0.5 $\mu\text{g/ml}$											
	P1D7V01		P1D7V02R		P1D7V03		P1D7V04R		14C12 H1L1		Nivolumab	
1	2.345	2.300	2.169	2.323	2.406	2.292	2.225	2.393	2.441	2.609	2.386	2.473
1:3	2.461	2.295	2.114	2.361	2.288	2.303	2.199	2.302	2.414	2.548	2.441	2.600
1:9	2.279	2.085	2.063	2.094	2.135	2.178	2.075	2.043	2.461	2.525	2.519	2.572
1:27	1.838	1.765	1.701	1.696	1.777	1.764	1.659	1.659	2.236	2.295	2.196	2.219
1:81	1.153	1.097	1.089	1.120	1.149	1.154	1.062	1.131	1.858	1.954	1.711	1.712
1:243	0.629	0.684	0.570	0.582	0.675	0.686	0.584	0.592	1.251	1.318	0.980	0.965
1:729	0.361	0.364	0.334	0.349	0.360	0.370	0.340	0.341	0.683	0.709	0.521	0.498
0	0.201	0.198	0.187	0.210	0.197	0.197	0.213	0.257	0.208	0.199	0.196	0.190
제 2 항체	염소 항-인간 IgG(H+L), HRP(1:5000)											
EC50(nM)	0.078		0.078		0.075		0.089		0.033		0.051	

[0363]

[0364] 2. ELISA 방법에 의한 항원 인간 NT5E-Biotin에 대한 P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 및 P1D7V04R의 결합 활성 측정

[0365] 스트렙타비딘을 2 $\mu\text{g/ml}$ 로 마이크로플레이트에 코팅한 후, 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 그 후, PBST를

사용하여 스트렙타아비딘-코팅된 마이크로플레이트를 1회 세척하고, 1% BSA의 PBS 용액을 차단액으로 사용하여, 37℃에서 ELISA 플레이트를 2시간 동안 차단시켰다. 그 후, 마이크로플레이트를 PBST로 3회 세척하였다. 0.5 μg/ml의 항원 인간 NT5E-Biotin을 첨가하고, 37℃조건하에서 30분 동안 인큐베이션한 후, PBST로 3회 세척하였다. 마이크로플레이트의 웰 내에 PBST 용액으로 연속 희석한 항체(항체에 대한 희석 구배는 표3에 자세히 나와 있음)를 첨가하고, 테스트 항체를 포함하는 마이크로플레이트를 37℃조건하에서 30분 동안 인큐베이션한 후, PBST로 3회 세척하였다. 그 후, 1:5000의 비율로 희석된 HRP-표지된 염소 항-인간 IgG(H+L)(Jackson, 아티클 번호:109-035-088) 2차 항체 작업 용액을 첨가하고, 37℃조건하에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, PBST를 사용하여 마이크로플레이트를 4회 세척하고, TMB(Neogen, 308177)를 첨가하여 암실에서 5분 동안 발색시킨 후, 중지액을 첨가하여 발색 반응을 중지시켰다. 마이크로 플레이트를 즉시 마이크로판독기에 넣고, 마이크로플레이트의 각 웰의 OD 값을 450nm 광 파장에서 판독하였다. SoftMax Pro 6.2.1 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0366] 검출 결과는 표3 및 도2에 나타난 바와 같다. 도에서 알수 있다시피, P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 및 P1D7V04R은 항원 인간 NT5E-Biotin과 효과적으로 결합할 수 있고, 또한 그 결합 효율은 투여량 의존 관계(각 투여량의 흡광도 강도는 표3에 나타난 바와 같음)를 나타낸다. 결합된 항체에 대해 흡광도 정량 분석을 진행하고, 곡선 시뮬레이션 계산을 통해 얻은 항체 P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R, 14C12H1L1 및 MEDI9447(대조군 항체)의 결합 효율 EC50은 각각 0.063nM, 0.230nM, 0.068nM, 0.439 nM, 0.045nM 및 0.042nM이다.

[0367] 위의 실험결과는 동일한 실험 조건하에서 인간 NT5E-Biotin에 대한 이중특이 항체 P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 및 P1D7V04R의 결합 활성은 동일 표적 양성 약 19F3H2L3 및 MEDI9447과 유사하며, 이는 P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 및 P1D7V04R은 인간 NT5E-Biotin과 효과적으로 결합하는 활성을 가지고 있다는 것을 보여준다.

표 3

[0368] ELISA에 의한 인간 NT5E-Biotin에 대한 P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R, 19F3H2L3 및 MEDI9447의 결합에 대한 검출

항체 희석 농도 (μg/ml)	항원-코팅된 SA : 2 μg/ml											
	인간 NT5E-Biotin (0.5 μg/ml)											
	P1D7V01		P1D7V02R		P1D7V03		P1D7V04R		19F3 H2L3		MEDI9447	
0.333	2.465	2.254	2.125	2.024	2.245	2.311	1.992	1.864	2.345	2.413	2.460	2.570
1:3	2.310	2.207	1.718	1.680	2.202	2.194	1.385	1.397	2.366	2.376	2.434	2.528
1:9	1.899	1.856	1.090	1.086	1.834	1.782	0.886	0.898	2.164	2.120	2.219	2.345
1:27	1.276	1.239	0.556	0.554	1.199	1.132	0.464	0.465	1.681	1.631	1.729	1.810
1:81	0.704	0.654	0.289	0.279	0.610	0.601	0.235	0.230	1.048	0.978	1.091	1.166
1:243	0.363	0.333	0.183	0.178	0.308	0.302	0.155	0.156	0.548	0.504	0.547	0.587
1:729	0.199	0.197	0.138	0.141	0.183	0.184	0.130	0.122	0.283	0.278	0.288	0.305
0	0.135	0.119	0.115	0.117	0.116	0.119	0.115	0.111	0.120	0.126	0.121	0.121
제2항체	염소 항-인간 IgG(H+L), HRP(1:5000)											
EC50(nM)	0.063		0.230		0.068		0.439		0.045		0.042	

[0369] 실시예 9: 경쟁 ELISA 방법에 의한 인간 PD-L1-mFc와 경쟁하여 인간 PD-1-mFc-Biotin에 결합하는 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 활성 측정

[0370] 인간 PD-L1-mFc(PD-L1의 Genbank ID는 NP_054862.1이고, mFc의 서열번호는 143임)를 2 μg/mL로 마이크로플레이트에 코팅하고, 4 °C에서 밤새 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 1% BSA의 PBS 용액을 사용하여, 37℃조건하에서 ELISA 플레이트를 2시간 동안 차단시켰다. 그 후, 마이크로플레이트를 3회 세척하고, 두드러서 건조시켰다. 희석 플레이트상에서 10 μg/mL를 초기 농도로 하고 1:3의 희석비율로 항체를 연속 희석하여 7개 농도를 얻었다. 또한 블랭크 대조군을 설정하였다. 그 후, 동등 체적의 0.3 μg/mL 인간 PD-1-mFc-Biotin 용액을 첨가하고, 균일하게 혼합한 후, 실온에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 반응후의 혼합액을 코팅된 마이크로플레이트에 첨가하고, 37℃조건하에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 마이크로플레이트를 PBST로 3회 세척하고, 두드러서 건조시켰다. SA-HRP(KPL, 14-30-00) 작업 용액을 첨가하고, 37℃조건하에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 마이크로플레이트를 4회 세척하고, 두드러서 건조시킨 후, TMB(Neogen, 308177)를 첨가하여 암실에서 5분 동안 발색시킨 후, 중지액을 첨가하여 발색 반응을 중지시켰다. 마이크로플레이트를 즉시 마이크로판독기에 넣고, 마이크로플레이트의 각 웰의 OD 값을 450nm 광 파장에서 판독하였다. SoftMax Pro 6.2.1 소프

트웨어를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0371] 검출 결과는 도3에 나타난 바와 같다. 모든 투여량의 OD 값을 표4에 나타내었다. 결합된 항체에 대해 흡광도 정량 분석을 진행하고, 곡선 시뮬레이션을 통해 항체의 결합 효율 EC50을 얻었다 (표 4).

[0372] 결과에 따르면, P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R, 14C12H1L1 및 Nivolumab(대조군)는 항원 인간 PD-1-mFc-Biotin과 이의 수용체 인간 PD-L1-mFc의 결합을 효과적으로 차단할 수 있고, 또한 차단 효율은 투여량 의존 관계를 나타내고, 인간 PD-1-mFc-Biotin과 이의 리간드 인간 PD-L1-mFc의 결합을 차단하는 P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R, 14C12H1L1 및 Nivolumab의 EC50은 각각 1.115nM, 1.329nM, 1.154nM, 1.339nM, 1.459nM 및 1.698nM이다.

표 4

[0373] 인간 PD-L1-mFc와 경쟁하여 인간 PD-1-mFc-Biotin에 결합하는 P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R, 14C12H1L1 및 Nivolumab의 활성의 검출 결과

항체 희석 (μg/mL)	항원-코팅: 인간 PD-L1-mFc 2 μg/ml											
	P1D7V01		P1D7V02R		P1D7V03		P1D7V04R		14C12 H1L1		Nivolumab	
5	0.049	0.047	0.047	0.048	0.048	0.048	0.048	0.051	0.046	0.047	0.057	0.057
1:3	0.050	0.050	0.051	0.051	0.052	0.050	0.052	0.054	0.048	0.050	0.075	0.076
1:9	0.070	0.065	0.097	0.104	0.067	0.068	0.105	0.107	0.053	0.055	0.107	0.100
1:27	1.056	1.109	1.253	1.216	1.109	1.121	1.187	1.158	0.817	0.849	1.014	0.875
1:81	1.460	1.505	1.414	1.372	1.453	1.491	1.424	1.337	1.263	1.299	1.235	1.152
1:243	1.474	1.551	1.503	1.505	1.449	1.447	1.442	1.382	1.316	1.383	1.387	1.207
1:729	1.499	1.604	1.501	1.493	1.569	1.452	1.436	1.424	1.336	1.403	1.347	1.284
0	1.399	1.283	1.467	1.456	1.288	1.252	1.343	1.342	1.302	1.391	1.265	1.156
인간 PD-1-mFc-Biotin:0.3 μg/ml												
제2항체	SA-HRP(1:4000)											
EC50(nM)	1.115		1.329		1.154		1.339		1.459		1.698	

[0374] 실시예10: 포르테바이오 시스템에 의한 항원 인간 PD-1-mFc에 대한 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체 결합의 동역학 매개변수에 대한 측정

[0375] 샘플 희석 완충액은 PBST, 0.1%BSA, pH7.4이다. 항체를 5 μg/mL의 농도로 AHC 센서에 약 0.4 nm의 고정 높이로 고정하고, 센서를 완충액에서 60초 동안 평형화시켰다. 센서에 고정된 항체를 항원 PD-1-mFc에 결합시켰다. 항원 농도는 0.6-50 nM(3배 희석)이고, 결합 시간은 120초이다. 단백질을 완충액에서 180초 동안 해리시켰다. 검출 온도는 37℃이고, 검출 주파수는 0.3 Hz이며, 샘플 플레이트 진동 속도는 1000 rpm이다. 데이터는 1:1 모델 피팅으로 분석하여, 친화도 상수를 얻었다.

[0376] 인간 PD-1-mFc에 대한 인간화 항체 P1D7V01, 14C12H1L1 및 Nivolumab(대조군 항체)의 친화도 상수의 측정 결과는 표5에 나타난 바와 같고, 검출 결과는 도4, 도5 및 도6에 나타난 바와 같다. 인간 PD-1-mFc에 대한 인간화 항체 P1D7V01, 14C12H1L1 및 Nivolumab의 친화도 상수는 차례로 1.76E-10M, 1.64E-10M 및 2.32E-10M이다. 위의 실험결과는P1D7V01은 14C12H1L1 및 Nivolumab의 결합 능력과 유사하며, 인간화 항체 P1D7V01은 인간 PD-1-mFc보다 비교적 강한 결합 능력을 가지고 있다는 것을 나타낸다.

표 5

[0377] PD-1-mFc에 대한 P1D7V01, 14C12H1L1 및 Nivolumab의 친화도 상수의 측정

테스트 항체	KD (M)	kon(1/Ms)	SE (kon)	kdis(1/s)	S E(kdis)	Rmax (nm)
P1D7V01	1.76E-10	4.19E+05	1.52E+04	7.37E-05	3.12E-05	0.13-0.17
14C12H1L1	1.64E-10	4.55E+05	1.61E+04	7.47E-05	2.98E-05	0.24-0.28
Nivolumab	2.32E-10	5.85E+05	2.03E+04	1.36E-04	3.47E-05	0.02-0.14

[0378] K_D는 친화도 상수이고, K_D=kdis/kon이다.

[0379] 실시예11: 포르테바이오 시스템에 의한 항원 인간 NT5E (1-552)-his에 대한 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체 결합

의 동역학 매개변수에 대한 측정

- [0380] 샘플 희석 완충액은 PBST, pH7.4이다. 항체를 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 Protein A 센서에 15초 동안 고정하고, 센서를 완충액에서 120초 동안 평형화시켰다. 센서에 고정된 항체를 항원 인간 NT5E(1-552)-his에 결합시켰다. 항원 농도는 3.125-200 nM(2배 희석)이고, 결합 시간은 120초이다. 단백질을 완충액에서 600초 동안 해리시켰다. 센서를 10mM 글리신, pH1.5 용액에서 재생시켰다. 검출 온도는 37°C이고, 검출 주파수는 0.6 Hz이며, 샘플 플레이트 진동 속도는 1000 rpm이다. 데이터는 1:1 모델 피팅으로 분석하여, 친화도 상수를 얻었다.
- [0381] 인간 NT5E (1-552)-his에 대한 인간화 항체 P1D7V01 및 MEDI 9447(대조군 항체)의 친화도 상수의 측정 결과는 표6에 나타난 바와 같고, 검출 결과는 도7 및 도8에 나타난 바와 같다. 인간 NT5E (1-552)-his에 대한 인간화 항체 P1D7V01 및 MEDI 9447의 친화도 상수는 차례로 2.29E-10M 및 1.04E-10M이다.
- [0382] 이상의 실험 결과에 따르면, P1D7V01은 MEDI9447의 결합 능력과 유사하며, 인간화 항체 P1D7V01은 인간 NT5E(1-552)-his보다 강한 결합 능력을 가지고 있다는 것을 나타낸다.

표 6

- [0383] 인간 NT5E(1-552)-his에 대한 P1D7V01, MEDI9447의 친화도 상수의 측정

테스트 항체	KD (M)	kon(1/Ms)	S E (kon)	kdis(1/s)	S E(kdis)	Rmax (nm)
P1D7V01	2.29E-10	1.81E+05	2.30E+03	4.13E-05	4.54E-06	0.47-0.57
MEDI 9447	1.04E-10	2.34E+05	3.20E+03	2.44E-05	5.02E-06	0.59-0.82

- [0384] K_D 는 친화도 상수이고, $K_D=kdis/kon$ 이다.

- [0385] 실시예12: FACS에 의한 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 결합 활성에 대한 검출

- [0386] 1.FACS에 의한 293T-PD1 막표면 PD-1에 대한 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 결합 활성에 대한 검출

- [0387] 대수 성장기 293T-PD1 세포를 수집하고, 3×10^5 개 세포/튜브에 따라 세포를 1.5ml 원심분리 튜브로 옮겼다. 500 μL PBSA를 첨가하고, 5600 rpm로 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. PBSA로 희석한 항체 100 μL (최종 농도는 각각 100, 33.33, 11.11, 3.7, 1.23, 0.41, 0.14, 0.05nM임)를 첨가하고, 부드럽게 혼합한 후, 얼음 상에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 500 μL PBSA를 첨가하고, 5600 rpm로 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 500배로 희석된 FITC-표지된 염소 항-인간 IgG 제2항체(Jackson, 아티클 번호:109-095-098)를 첨가하고, 재현탁시키고 균일하게 혼합한 후, 암실에서 0.5시간 동안 얼음 상에서 인큐베이션하였다. 500 μL PBSA를 첨가하고, 5600rpm로 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 200 μL PBSA를 첨가하고, 세포를 재현탁시켜 침전시키고, 이를 플로우 튜브에 옮기고, FACSCalibur에 의해 검출하였다.

- [0388] 실험 결과는 표7 및 도9에 나타난 바와 같다. P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 및 P1D7V04R은 293T-PD1 막표면 PD-1과 특이적으로 결합할 수 있고, 또한 투여량 의존 관계를 나타내며, PD1 단일 표적 대조군 항체 14C12H1L1보다 강하다.

- [0389] 동일한 실험 조건하에서, 293T-PD1에 대한 P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 및 P1D7V04R의 결합 EC50은 각각 1.000nM, 1.075nM, 1.377nM 및 1.57nM이고, 293T-PD1에 대한 14C12H1L1의 결합 EC50은 2.111nM이다.

- [0390] 위의 실험결과는 동일한 실험 조건하에서 293T-PD1에 대한 P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 및 P1D7V04R의 결합 활성은 모두 PD1 단일 표적 대조군 항체 14C12H1L1보다 우수하다는 것을 보여주며, P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 및 P1D7V04R은 293T-PD1 막표면 PD-1과 효과적으로 결합하는 활성을 가지고 있다는 것을 나타낸다.

표 7

- [0391] FACS에 의한 293T-PD1 세포표면 PD-1에 대한 P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R 및 14C12H1L1의 결합 활성에 대한 검출

농도(nM)	0.05	0.14	0.41	1.23	3.70	11.11	33.33	100.00	EC50
14C12H1L1	35.69	57.70	129.42	437.62	974.97	1384.91	1174.75	1500.20	2.111
P1D7V01	26.65	58.65	150.57	307.19	530.77	577.76	479.34	531.15	1.000
P1D7V02R	23.44	42.98	108.44	217.56	404.33	426.06	405.29	301.40	1.075

P1D7V03	24.05	49.21	118.03	289.08	384.62	459.40	808.38	343.48	1.377
P1D7V04R	24.79	52.43	112.56	288.79	466.72	1284.73	400.33	360.79	1.57.0

2.FACS에 의한 MDA-MB-231 막표면 CD73에 대한 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 결합 활성에 대한 검출

대수기 MDA-MB-231 세포를 통상적으로 트립신화(trypsinization)시키고, 3×10^5 개 세포/튜브에 따라 세포를 1.5ml 원심분리 튜브로 옮겼다. 500 μ L PBSA를 첨가하고, 5600 rpm로 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. PBSA로 희석한 항체 100 μ L(최종 농도는 각각 100, 33.33, 11.11, 3.7, 1.23, 0.41, 0.14, 0.05nM임)를 첨가하고, 부드럽게 혼합한 후, 얼음 상에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 500 μ L PBSA를 첨가하고, 5600 rpm로 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 500배로 희석된 FITC-표지된 염소 항-인간 IgG 제2항체(Jackson, 아티클 번호:109-095-098)를 첨가하고, 재현탁시키고 균일하게 혼합한 후, 암실에서 0.5시간 동안 얼음 상에서 인큐베이션하였다. 500 μ L PBSA를 첨가하고, 5600rpm로 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 200 μ L PBSA를 첨가하고, 세포를 재현탁시켜 침전시키고, 이를 플로우 튜브에 옮기고, FACSCalibur에 의해 검출하였다.

실험 결과는 표8 및 도10에 나타난 바와 같다. MDA-MB-231 막표면 CD73에 대한 P1D7V01 및 P1D7V03의 결합 활성은 19F3H2L3보다 우수하고, 여기서, P1D7V01은 동일 표적 양성 약 MEDI9447보다 우수하다. 동일한 실험 조건 하에서, MDA-MB-231 막표면 CD73에 대한 P1D7V01 및 P1D7V03의 결합 EC50은 각각 1.384nM, 2.009nM이고, MDA-MB-231 막표면 CD73에 대한 MEDI9447 및 19F3H2L3의 결합 EC50은 각각 1.589nM, 2.773nM이다.

위의 실험결과는P1D7V01, P1D7V03, 19F3H2L3 및 동일 표적 양성 약 MEDI9447은 MDA-MB-231 막표면 CD73과 투여량 의존적으로 특이적 결합할 수 있다. P1D7V01 및 P1D7V03의 결합 활성은 19F3H2L3보다 우수하였고, P1D7V01은 동일 표적 양성 약 MEDI9447보다 우수하였다. P1D7V01 및 P1D7V03은 MDA-MB-231 막표면 CD73과 효과적으로 결합하는 활성을 가지고 있다는 것을 나타낸다.

표 8

FACS에 의한 MDA-MB-231 세포표면 CD73에 대한 P1D7V01, P1D7V03, MEDI9447 및 19F3H2L3의 결합 활성에 대한 검출

농도(nM)	0.05	0.14	0.41	1.23	3.70	11.11	33.33	100.00	EC50
MEDI9447	32.59	64.38	157.75	388.51	697.80	829.29	930.26	878.04	1.589
19F3H2L3	25.95	45.13	102.56	189.07	466.87	658.72	843.09	639.57	2.773
P1D7V01	23.37	38.02	76.84	271.72	571.56	560.81	525.91	705.50	1.384
P1D7V03	16.96	44.05	106.39	233.32	457.61	525.37	576.19	677.66	2.009

실시예13: 세포막표면 CD73 효소활성에 대한 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 억제 검출

1.MDA-MB-231 세포막표면 CD73 효소활성에 대한 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 억제에 대한 검출

실험 절차는 아래와 같다. 상태가 양호한 대수기 MDA-MB-231 세포를 취하고, 무혈청 RPMI-1640 배양액을 사용하여 세포를 재현탁시키고 계수한다. MDA-MB-231 세포를 96웰 플레이트에 2×10^4 개 세포/100 μ L/웰로 접종한다. 항체를 무혈청 RPMI-1640 배양액으로 2.5배에 따라 연속 희석한다. 항체를 50 μ L/웰로 96웰 플레이트에 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 각 웰에 50 μ L의 1200 μ M RPMI-1640으로 희석된 AMP(TCL, 아티클 번호:A0157)를 첨가하였다. 3시간 후, 25 μ L 세포 배양 상청액을 취하고, 이를 새로운 96웰 플레이트로 옮긴 후, 각 웰에 25 μ L 100 μ M의 ATP(TCL, 아티클 번호:A0158)를 첨가하였다. 각 웰에 50 μ L CTG(CellTiterGlo, Promega, 아티클 번호:G8641) 발색액을 첨가하여 발색을 진행한 후, 멀티 표지 마이크로플레이트 검출기(PerkinElmer 2140-0020)에 의해 상대 형광강도 RLU를 판독하였다.

실험 결과는 도11에 나타난 바와 같다. P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R은 양성 대조 약 MEDI9447의 AMP 함량과 유사하고, 또한 농도 의존 관계를 나타낸다.

이상의 실험 결과는 다음을 보여준다. 첨가된 AMP는 무-항체 경우에는 MDA-MB-231 세포표면 CD73의 효소 활성 촉매화에 의해 아데노신 A로 전환하지만, 항체를 첨가한 경우에는 P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 및 P1D7V04R 항체와 CD73의 결합이 그 효소 촉매화의 활성을 감소시켜 AMP는 아데노신 A로 전환하지 못한다. 항체는 비-기질

경쟁의 방식으로 그 효소 활성 반응을 효과적으로 억제시키고, 아데노신의 생성을 감소시킨다는 것을 나타낸다.

[0402] **2.U87-MG 세포막표면 CD73 효소활성에 대한 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 억제에 대한 검출**

[0403] 상태가 양호한 대수기 U87-MG 세포를 취하고, 무혈청 RPMI-1640 배양액을 사용하여 세포를 재현탁시키고 계수하였다. U87-MG 세포를 96웰 플레이트에 2×10^4 개 세포/100 μ L/웰로 접종하였다. 항체를 무혈청 RPMI-1640 배양액으로 2.5배에 따라 연속 희석하였다. 항체를 50 μ L/웰로 96웰 플레이트에 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 1시간 후, 각 웰에 50 μ L의 1200uM RPMI-1640으로 희석된 AMP를 첨가하였다. 3시간 후, 25 μ L 세포 배양 상청액을 취하여, 새로운 96웰 플레이트로 옮기고, 각 웰에 25 μ L 100 μ M의 ATP를 첨가하였다. 각 웰에 50 μ L CTG(CellTiterGlo) 발색액을 첨가하여 발색을 진행하고, 멀티 포지 마이크로플레이트 검출기(PerkinElmer 2140-0020)에 의해 상대 형광강도 RLU를 관독하였다.

[0404] 실험 결과는 도12에 나타난 바와 같다. P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 및 P1D7V04R은 양성 대조 약 MEDI9447의 AMP 함량과 유사하고, 또한 농도 의존 관계를 나타낸다.

[0405] 이상의 실험 결과는 다음을 보여준다. 첨가된 AMP는 무-항체 경우에는 U87-MG 세포표면 CD73의 효소 활성 촉매화에 의해 아데노신 A로 전환하지만, 항체를 첨가한 경우에는 P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 및 P1D7V04R 항체와 CD73의 결합이 그 효소 촉매화의 기능을 감소시켜 AMP는 아데노신 A로 전환하지 못한다. 항체는 비-기질 경쟁의 방식으로 그 효소 활성 반응을 효과적으로 억제시키고, 아데노신의 생성을 감소시킨다는 것을 나타낸다.

[0406] **실시예14: 혼합 림프구 반응MLR에 의한 IFN- γ 및 IL-2 분비를 촉진하는 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 생물학적 활성에 대한 검출**

[0407] **1.Raji-PDL1 혼합 림프 반응계의 IFN- γ 분비를 촉진하는 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 생물학적 활성의 검출**

[0408] Raji-PDL1 세포를 정상적으로 계대배양하였다. PBMC를 회복시키고, 10mL 1640 완전배지를 사용하여 배양하며, 0.5 μ g/mL의 SEB(Dianotech, 아티클 번호:S010201)로 2일 동안 자극시켰다. 25 μ g/mL의 MMC(Sigma, 아티클 번호:M4287)로 Raji-PDL1 세포를 처리한 후, 37°C 인큐베이터에서 1시간 배양하였다. SEB 자극 2일 후의 PBMC 및 1시간 MMC 처리를 거친 Raji-PDL1 세포를 수집하고, PBS로 2회 세척하고, 완전배지를 재현탁시키고, 계수한 후, U형 96웰 플레이트에 100000개 세포/웰로 각각 첨가하였다. 실험 설계에 따라 항체를 첨가하고, 인큐베이터에서 3일 동안 공동 배양하였다. 3일 후, 세포배양 상청액을 수집하고, ELISA 방법에 의해 IFN- γ 를 검출하였다.

[0409] 도13에서 나타난 바와 같이, 인간 PBMC와 Raji-PDL1 세포를 혼합 배양 후, PBMC의 IFN- γ 분비에 대해 현저한 촉진 작용이 있고, 혼합 배양 체계에 항체를 동시에 첨가하면 PBMC가 IFN- γ 를 추가로 분비하도록 현저히 유도할 수 있다. IFN- γ 분비를 촉진하는 활성 수준에 있어서, P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 및 P1D7V04R 항체는 그 마스터 PD-1 단일 표적 항체 14C12H1L1의 활성과 유사하다.

[0410] **2.Raji-PDL1 혼합 림프 반응계의 IL-2 분비를 촉진하는 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 생물학적 활성의 검출**

[0411] Raji-PDL1 세포를 정상적으로 계대배양하였다. PBMC를 회복시키고, 10mL 1640 완전배지를 사용하여 배양하며, SEB(0.5 μ g/mL)로 2일 동안 자극시켰다. 25 μ g/mL의 MMC로 Raji-PDL1 세포를 처리한 후, 37°C 인큐베이터에서 1시간 배양하였다. SEB 자극 2일 후의 PBMC 및 1시간 MMC 처리를 거친 Raji-PDL1 세포를 수집하고, PBS로 2회 세척하고, 완전배지를 재현탁시키고, 계수한 후, U형 96웰 플레이트에 100000개 세포/웰로 각각 첨가하였다. 실험 설계에 따라 항체를 첨가하고, 3일 동안 공동 배양하였다. 세포배양 상청액을 수집하고, ELISA 방법에 의해 IL-2를 검출하였다.

[0412] 도14에서 나타난 바와 같이, 인간 PBMC와 Raji-PDL1 세포를 혼합 배양 후, PBMC의 IL-2 분비에 대해 일정한 촉진 작용이 있고, 혼합 배양 체계에 항체를 동시에 첨가하면 PBMC가 IL-2를 추가로 분비하도록 현저히 유도할 수 있으며, 투여량 의존 관계가 뚜렷하다. IL-2 분비를 촉진하는 활성 수준에 있어서, 이중특이항체 P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 및 P1D7V04R는 저 농도에서의 활성은 그 마스터 PD-1 단일 표적 항체 14C12H1L1보다 조금 낮지만, 중-고 농도에서의 활성은 그와 유사하며, PD1 표적 양성 대조 약 Nivolumab에 비하여, P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 및 P1D7V04R은 3개 다른 항체 농도 수준에서 더 좋은 IL-2 분비 촉진 잠재능을 가진다.

[0413] **3.DC 혼합 림프 반응계의 IFN- γ 분비를 촉진하는 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 생물학적 활성의 검출**

[0414] 정상인 말초 혈액 PBMC를 분리하고, 완전 배지에서 재현탁시키고, 페트리 살레에 접종하였다. 인큐베이터에서 밤새 두고 배양하였다. 현탁된 PBMC를 수집하여 버린 후, 페트리 살레 바닥 부착 세포를 PBS 완충액으로 세척한 후, DC 성숙을 유도하였다. 매 페트리 살레에 GM-CSF 및 IL-4를 함유한 RPMI1640 완전 배지 10mL를 각각

1000U/mL 농도의GM-CSF 및 IL-4와 함께 각 접시에 첨가하였다. 접시는 3일동안 37℃및 5% 이산화탄소의 인큐베이터에서 배양되었다. 배지의 절반을 교환하고 GM-CSF 및 IL-4를 각각 1000U/mL로 보충하고, 37℃및 5% 이산화탄소의 인큐베이터에서 3일 동안 계속 배양하였다. 3일 후 재차 배지의 절반을 교환하고 GM-CSF 및 IL-4를 각각 1000U/mL로, TNF- α 를 100U/mL로 첨가하여 2일 동안 계속 배양하였다. 다른 공여자의 신선한 PBMC를 분리하고, 세포를 계수한 후, 96웰 플레이트에 100000개 세포/웰로 접종하였다. 성숙 유도된 DC 세포를 수집하고, 완전 배지로 1회 세척하고, 세포를 계수한 후, PBMC를 포함하는 96웰 플레이트에 10000개 세포/웰로 접종한다. 실험 설계에 따라 항체를 첨가하고, 균일하게 혼합한 후, 37℃및 5% 이산화탄소의 인큐베이터에서 5일 동안 공동 배양하였다. 5일 후, 세포 배양 상청액을 수집하고, ELISA 방법에 의해 IFN- γ 를 정량 검출하였다.

[0415] 결과는 도15에 나타난 바와 같다. DC 또는 PBMC의 단독 배양에 비하여, DC 및 PBMC의 혼합 배양은 IFN- γ 의 분비를 현저히 촉진시킬 수 있고, 아이소타입 대조군에 비하여, DC 및 PBMC 양자를 혼합 배양한 기초상에서 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체를 첨가하면, IFN- γ 분비 수준을 더 한층 현저히 제고시킬 수 있다.

[0416] DC 혼합 림프 반응계의 IL-2 분비를 촉진하는 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 생물적 활성의 검출

[0417] 정상인 말초 혈액 PBMC를 분리하고, 완전 배지에서 재현탁시키고, 페트리 살레에 접종하고, 인큐베이터에서 밤새 두고 배양하였다. 현탁된 PBMC를 수집하여 버린 후, 페트리 살레 바닥 부착 세포를 PBS 완충액으로 세척한 후, DC 성숙을 유도한다. 매 페트리 살레에 GM-CSF 및 IL-4를 함유한 RPMI1640 완전 배지 10mL를 각각 2000U/mL 농도의GM-CSF 및 IL-4와 함께 각 접시에 첨가했다. 접시는 3일동안 37℃및 5% 이산화탄소의 인큐베이터에서 배양되었다. 배지의 절반을 교환하고 50ng/mL의 IFN- γ 및 100ng/mL의 LPS를 첨가하고, 37℃및 5% 이산화탄소의 인큐베이터에서 2일 동안 계속 배양한다. 다른 공여자의 PBMC를 회복시키고, 세포를 계수하고, 96웰 플레이트에 100000개 세포/웰로 접종하였다. 성숙 유도된 DC 세포를 수집하고, 완전 배지로 1회 세척하고, 세포를 계수한 후, PBMC를 포함하는 96웰 플레이트에 10000개 세포/웰로 접종한다. 실험 설계에 따라 항체를 첨가하고, 균일하게 혼합하고, 37℃및 5% 이산화탄소의 인큐베이터에서 5일 동안 공동 배양하였다. 5일 후, 세포 배양 상청액을 수집하고, ELISA 방법에 의해 IL-2를 정량 검출하였다. 결과는 도16에 나타난 바와 같다. DC 또는 PBMC의 단독 배양에 비하여, DC 및 PBMC의 혼합 배양은 IL-2의 분비를 현저히 촉진시킬 수 있고, 아이소타입 대조군에 비하여, DC 및 PBMC 양자를 혼합 배양한 기초상에서 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체를 첨가하면, IL-2 분비 수준을 더 현저히 제고시킬 수 있다.

[0418] 실시예15: 항-PD-1/CD73 이중특이항체 NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 및 NTPDV4의 제조

[0419] 이중특이항체 NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 및 NTPDV4의 구조 형태는 모리슨(Morrison) 형태 (IgG-scFv)에 속하고, 즉, 하나의 IgG 항체의 두개 중쇄의 C-말단이 링커를 통해 다른 하나의 항체의 scFv 단편에 연결된다. 중쇄 및 경쇄의 설계 구성은 하기 표9에 나타난 바와 같다.

[0420] Fc γ R과의 결합 활성을 제거하기 위하여 그 면역글로불린 부분의 불변 영역에 아미노산 돌연변이를 도입하였기에, NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 및 NTPDV4를 본 명세서 및 출원번호가 202110270671.X인 중국 발명 특허에서는 NTPDV1(hG1TM), NTPDV2(hG1TM), NTPDV3(hG1TM) 및 NTPDV4(hG1TM)로도 알려져 있다.

표 9

[0421] NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 및 NTPDV4의 서열 설계

	중쇄		경쇄
	면역글로불린 부분	링커 scFv 부분	
NTPDV1	19F3H2 (hG1TM)	Linker1	14C12H1 _V -Linker 2-14C12L1 _V
NTPDV2			14C12H1 _V -Linker 1-14C12L1 _V
NTPDV3			14C12H1 _V -Linker 2-14C12L1 _V
NTPDV4			14C12H1 _V -Linker1-14C12L1 _V

[0422] 위의 표9에서,

[0423] 우측 하단 모서리에 "V" 표시가 있는 항목은 상응하는 중쇄의 가변 영역 또는 상응하는 경쇄의 가변 영역을 의미한다. "V" 표시가 없는 항목에서, 상응하는 중쇄 또는 경쇄는 불변 영역을 포함하는 전장 (full length)이다.

이러한 가변 영역 또는 전장의 아미노산 서열 및 이를 코딩하는 핵산 서열은 위의 실시예에 기재된 상응하는 서열을 참고한다.

- [0424] Linker 1의 아미노산 서열은 (GGGGS) 구조가 4회 반복된 즉 (GGGGS)₄ 또는 (G₄S)₄(뉴클레오타이드 서열:서열번호 80, 아미노산 서열:서열번호 79)이다.
- [0425] Linker 2의 아미노산 서열은 (GGGGS) 구조가 3회 반복된 즉 (GGGGS)₃ 또는 (G₄S)₃(뉴클레오타이드 서열:서열번호 82, 아미노산 서열:서열번호 81)이다.
- [0426] NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 및 NTPDV4의 면역글로불린 부분의 경쇄 19F3L2 및 19F3L3의 3개 CDR 서열은 19F3의 경쇄 CDR 서열과 일치하다.
- [0427] NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4의 면역글로불린 부분의 19F3H2(hG1TM)의 3개 CDR 서열은 19F3의 중쇄 CDR 서열과 일치하다.
- [0428] NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4의 scFv 부분의 14C12H1V-Linker2-14C12L1V 및 14C12H1V-Linker1-14C12L1V의 CDR 서열은 14C12의 중쇄 CDR 및 경쇄 CDR과 일치하다.
- [0429] NTPDV2 및 NTPDV4 중쇄의 아미노산 서열은 일치하고, NTPDH2/4(서열번호 83)로 표기한다. NTPDV2 및 NTPDV4의 중쇄 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 84이다.
- [0430] NTPDV1 및 NTPDV3의 중쇄 아미노산 서열은 일치하고, NTPDH1/3(서열번호 85)로 표기한다. NTPDV1 및 NTPDV3의 중쇄 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 86이다.
- [0431] NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4의 면역글로불린 부분의 19F3L3 및 19F3L2의 3개 CDR 서열은 항체 19F3의 경쇄 3개 CDR과 일치하다.
- [0432] NTPDV1 및 NTPDV2의 면역글로불린 부분의 경쇄 19F3L3의 아미노산 서열은 항체 19F3H2L3(G1M)의 경쇄 서열과 일치한다(서열번호 28). NTPDV1 및 NTPDV2의 면역글로불린 부분의 경쇄 19F3L3의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 27이다. NTPDV3 및 NTPDV4의 면역글로불린 부분의 경쇄 19F3L2의 아미노산 서열은 서열번호 96이다. NTPDV3 및 NTPDV4의 면역글로불린 부분의 경쇄 19F3L2의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 100이다.
- [0433] (1)NTPDV1, 이의 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 85로 기재되고, 경쇄 아미노산 서열은 서열번호 28로 기재되며, 링커 1의 아미노산 서열은 서열번호 79로 기재되고, 14C12H1V의 아미노산 서열은 서열번호 66으로 기재되며, 링커 2의 아미노산 서열은 서열번호 81로 기재되고, 14C12L1V의 서열번호는 서열번호 68로 기재되며;
- [0434] (2)NTPDV2, 이의 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 85로 기재되고, 경쇄 아미노산 서열은 서열번호 28로 기재되며, 링커 1의 아미노산 서열은 서열번호 79로 기재되고, 14C12H1V의 아미노산 서열은 서열번호 66으로 기재되며, 링커 1의 아미노산 서열은 서열번호 79로 기재되고, 14C12L1V의 서열번호는 서열번호 68로 기재되며;
- [0435] (3)NTPDV3, 이의 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 85로 기재되고, 경쇄 아미노산 서열은 서열번호 96으로 기재되며, 링커 1의 아미노산 서열은 서열번호 79로 기재되고, 14C12H1V의 아미노산 서열은 서열번호 66으로 기재되며, 링커 2의 아미노산 서열은 서열번호 81로 기재되고, 14C12L1V의 서열번호는 서열번호 68로 기재되며; 및
- [0436] (4)NTPDV4, 이의 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 85로 기재되고, 경쇄 아미노산 서열은 서열번호 96으로 기재되며, 링커 1의 아미노산 서열은 서열번호 79로 기재되고, 14C12H1V의 아미노산 서열은 서열번호 66으로 기재되며, 링커 1의 아미노산 서열은 서열번호 79로 기재되고, 14C12L1V의 서열번호는 서열번호 68로 기재된다.
- [0437] **항체의 발현 및 정제**
- [0438] NTPDV1, NTPDV3의 중쇄 cDNA과 NTPDV2 및 NTPDV4의 중쇄 cDNA 서열, 및 그 경쇄 cDNA 서열을 pUC57simple(Genscript에 의해 제공됨) 벡터에 별도로 클로닝하여, 각각 pUC57simple-NTPDH2/4, pUC57simple-NTPDH1/3, pUC57simple-19F3L3 플라스미드 및 pUC57simple-19F3L2 플라스미드를 얻었다.
- [0439] pUC57simple-NTPDH2/4 및 pUC57simple-19F3L3 플라스미드, pUC57simple-NTPDH2/4 및 pUC57simple-19F3L2 플라스미드, pUC57simple-NTPDH1/3 및 pUC57simple-19F3L3 플라스미드, pUC57simple-NTPDH1/3 및 pUC57simple-19F3L2 플라스미드를 효소(HindIII&EcoRI)로 소화시키고, 전기영동을 거쳐 중쇄 및 경쇄를 회수하였다. 얻은 중쇄 및 경쇄를 각각 pcDNA3.1 벡터에 서브클로닝하여 pcDNA3.1-NTPDH2/4 및 pcDNA3.1-19F3L3 플라스미드, pcDNA3.1-NTPDH2/4 및 pcDNA3.1-19F3L2 플라스미드, pcDNA3.1-NTPDH1/3 및 pcDNA3.1-19F3L3 플라스미드,

pcDNA3.1-NTPDH1/3 및 pcDNA3.1-19F3L2 플라스미드를 얻었고, 재조합 플라스미드를 추출하여 이를 293F 세포에 동시 형질감염시켰다. 세포 배양 7일 후, 배양액을 고속 원심분리하고, 상청액을 농축시킨 후, HiTrap MabSelect SuRe 칼럼에 로딩하였다. 단백질을 용출 버퍼 (elution buffer)로 용출시키고, 표적 샘플을 회수하고, PBS로 교환하였다.

상기 제조예에 기재된 발현 및 정제 방법에 따라 정제된 항체 NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 및 NTPDV4를 얻었다.

실시예16: ELISA 방법에 의한 항원에 대한 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 결합 활성 측정

1. ELISA 방법에 의한 항원 PD-1-mFc에 대한 NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 및 NTPDV4의 결합 활성 측정

PD-1-mFc(0.5 μ g/ml)를 마이크로플레이트에 코팅하고, 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 그 후, PBST를 사용하여 항원-코팅된 마이크로플레이트를 1회 세척하고, 1% BSA의 PBS 용액을 차단액으로 사용하여, 37°C 조건하에서 마이크로플레이트를 2시간 동안 차단시켰다. 그 후, 마이크로플레이트를 PBST로 3회 세척하였다. PBST 용액으로 연속 희석한 항체(항체에 대한 희석 구배는 표2에 자세히 나와 있음)를 첨가하였다. 테스트 항체를 포함하는 ELISA 플레이트를 37°C 조건하에서 30분 동안 인큐베이션한 후, PBST로 3회 세척하였다. 그 후, 1:5000의 비율로 희석된 HRP-표지된 염소 항-인간 IgG Fc(Jackson, 아티클 번호:109-035-098) 2차 항체 작업 용액을 첨가하고, 37°C 조건하에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, PBST를 사용하여 마이크로플레이트를 4회 세척하고, TMB(Neogen, 308177)를 첨가하여 암실에서 8분 동안 발색시킨 후, 중지액을 첨가하여 발색 반응을 중지시켰다. 마이크로플레이트를 즉시 마이크로판독기에 넣고, 마이크로플레이트의 각 웰의 OD 값을 450nm 광 파장에서 판독하였다. SoftMax Pro 6.2.1 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하였다.

검출 결과는 표10에 나타난 바와 같다. 알수 있다시피, NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 및 NTPDV4은 항원 PD-1-mFc와 효과적으로 결합할 수 있고, 또한 그 결합 효율은 투여량 의존 관계를 나타내고, 각 투여량의 흡광도 강도는 표 10에 나타난 바와 같다. 결합된 항체에 대해 흡광도 정량 분석을 진행하고, 곡선 시뮬레이션 계산을 통해 얻은 항체 NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4 및 14C12H1L1(hG1TM)(대조군)의 결합 효율 EC50은 각각 0.101nM, 0.119nM, 0.110nM, 0.123nM 및 0.031nM이다.

위의 실험결과에서, 동일한 실험 조건하에서 항원 PD-1-mFc에 대한 NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 및 NTPDV4의 결합 활성은 동일 표적 양성 약 14C12H1L1(hG1TM)과 유사하며 NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 및 NTPDV4은 PD-1-mFc과 효과적으로 결합하는 활성을 가지고 있다는 것을 나타낸다.

표 10

ELISA 에 의한 PD-1-mFc 에 대한 NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4 및

14C12H1L1(hG1TM)의 결합에 대한 검출

항체 희석 농도 (nM)	항원-코팅된 PD-1-mFc 0.5 μ g/ml									
	NTPDV1		NTPDV2		NTPDV3		NTPDV4		14C12H1L1 (hG1TM)	
5	2.222	2.231	2.249	2.249	2.204	2.171	2.244	2.289	2.399	2.524
1:3	2.206	2.195	2.160	2.223	2.211	2.167	2.222	2.209	2.361	2.441
1:9	2.039	2.027	1.922	2.013	2.010	1.971	1.920	1.944	2.273	2.401
1:27	1.514	1.530	1.425	1.446	1.489	1.414	1.417	1.464	2.071	2.091
1:81	0.880	0.844	0.804	0.802	0.829	0.807	0.794	0.804	1.644	1.691
1:243	0.400	0.396	0.363	0.369	0.386	0.381	0.373	0.379	1.006	1.059
1:729	0.183	0.184	0.176	0.174	0.175	0.174	0.170	0.178	0.503	0.531
0	0.053	0.056	0.055	0.056	0.056	0.056	0.054	0.059	0.057	0.059
제 2 항 체	HRP-표지된 염소 항-인간 IgG Fc(1:5000)									
EC50 (nM)	0.101		0.119		0.110		0.123		0.031	

[0447] 2. ELISA 방법에 의한 항원 인간 NT5E-Biotin에 대한 NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 및 NTPDV4의 결합 활성 측정

[0448] 마이크로플레이트를 스트렙타아비딘SA(2 $\mu\text{g/ml}$)로 코팅하고 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 그 후, PBST를 사용하여 스트렙타아비딘-코팅된 마이크로플레이트를 1회 세척하고, 1% BSA의 PBS 용액을 차단액으로 사용하여, 37℃에서 마이크로플레이트를 2시간 동안 차단시켰다. 그 후, 마이크로플레이트를 PBST로 3회 세척하였다. 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 항원 인간 NT5E-Biotin을 첨가하고, 37℃조건하에서 30분 동안 인큐베이션한 후, PBST로 3회 세척하였다. 마이크로플레이트의 웰 내에 PBST 용액으로 연속 희석한 항체(항체에 대한 희석 구배는 표11에 자세히 나와 있음)를 첨가하고, 테스트 항체를 포함하는 마이크로플레이트를 37℃조건하에서 30분 동안 인큐베이션한 후, PBST로 3회 세척하였다. 그 후, 1:5000의 비율로 희석된 HRP-표지된 염소 항-인간 IgG Fc(Jackson, 아티클 번호:109-035-098) 2차 항체 작업 용액을 첨가하고, 37℃조건하에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, PBST를 사용하여 마이크로플레이트를 4회 세척하고, TMB(Neogen, 308177)를 첨가하여 암실에서 7분 동안 발색시킨 후, 중지액을 첨가하여 발색 반응을 중지시켰다. 마이크로플레이트를 즉시 마이크로판독기에 넣고, 마이크로플레이트의 각 웰의 OD 값을 450nm 광 파장에서 판독하였다. SoftMax Pro 6.2.1 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0449] 검출 결과는 표11에 나타난 바와 같다. 알수 있다시피, NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4 및 19F3H2L3(hG1M)은 항원 인간 NT5E-Biotin과 효과적으로 결합할 수 있고, 또한 그 결합 효율은 투여량 의존 관계(각 투여량의 흡광도 강도는 표11에 나타난 바와 같음)를 나타낸다. 결합된 항체에 대해 흡광도 정량 분석을 진행하고, 곡선 시뮬레이션 계산을 통해 얻은 항체 NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4 및 19F3H2L3(hG1M)(대조군 항체)의 결합 효율 EC50은 각각 0.079nM, 0.082nM, 0.084nM, 0.077nM 및 0.029nM이다.

[0450] 위의 실험결과는 동일한 실험 조건하에서 인간 NT5E-Biotin에 대한 이중특이 항체 NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 및 NTPDV4의 결합 활성은 동일 표적 양성 약 19F3H2L3(hG1M)과 유사하며, NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 및 NTPDV4은 인간 NT5E-Biotin과 효과적으로 결합하는 활성을 가지고 있다는 것을 나타낸다.

표 11

[0451] ELISA에 의한 인간 NT5E-Biotin에 대한 NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4 및 19F3H2L3(hG1M)의 결합에 대한 검출

항체 희석 농도 (nM)	항원-코팅된 SA : 2 $\mu\text{g/ml}$									
	인간 NT5E-Biotin (0.5 $\mu\text{g/ml}$)									
	NTPDV1		NTPDV2		NTPDV3		NTPDV4		19F3H2L3 (hG1M)	
5	2.286	2.300	2.322	2.333	2.364	2.286	2.298	2.291	2.371	2.383
1:3	2.412	2.347	2.450	2.409	2.381	2.412	2.427	2.421	2.420	2.506
1:9	2.227	2.177	2.226	2.238	2.230	2.081	2.186	2.222	2.322	2.345
1:27	1.795	1.729	1.744	1.746	1.768	1.698	1.734	1.759	2.125	2.162
1:81	1.071	1.070	1.103	1.058	1.068	1.025	1.095	1.125	1.649	1.752
1:243	0.528	0.527	0.540	0.551	0.552	0.534	0.552	0.611	1.067	1.143
1:729	0.273	0.274	0.271	0.275	0.279	0.267	0.275	0.309	0.542	0.601
0	0.092	0.092	0.090	0.087	0.092	0.090	0.092	0.095	0.112	0.206
제2항체	HRP-표지된 염소 항-인간 IgG Fc(1:5000)									
EC50 (nM)	0.079		0.082		0.084		0.077		0.029	

[0452] 실시예17: 경쟁 ELISA 방법에 의한 인간 PD-L1-mFc와 경쟁하여 인간 PD-1-mFc-Biotin에 결합하는 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 활성 측정

[0453] 인간 PD-L1-mFc(PD-L1의 Genbank ID는 NP_054862.1이고, mFc의 서열번호는 89임)를 2 $\mu\text{g/mL}$ 로 마이크로플레이트에 코팅하고, 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 1% BSA의 PBS 용액을 사용하여, 37℃조건하에서 마이크로플레이트를 2시간 동안 차단시켰다. 그 후, 마이크로플레이트를 1회 세척하고, 두드러서 건조시켰다. 희석 플레이트상에서 10 $\mu\text{g/mL}$ 를 초기 농도로 하고 1:3의 희석비율로 항체를 연속 희석하여 7개 농도를 얻었다. 또한 블랭크 대조군을 설정하였다. 그 후, 동등 체적의 0.3 $\mu\text{g/mL}$ 인간 PD-1-mFc-Biotin 용액을 첨가하고, 균일하게 혼합한 후, 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 반응후의 혼합액을 코팅된 마이크로플레이트에 첨가하고, 37℃조건하에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 마이크로플레이트를 PBST로 3회 세

적하고, 두드려서 건조시켰다. SA-HRP(KPL, 14-30-00) 작업 용액을 첨가하고, 37°C 조건하에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 마이크로 플레이트를 4회 세척하고, 두드려서 건조시킨 후, TMB(Neogen, 308177)를 첨가하여 암실에서 5분 동안 발색시킨 후, 중지액을 첨가하여 발색 반응을 중지시켰다. 마이크로플레이트를 즉시 마이크로판독기에 넣고, 마이크로플레이트의 각 웰의 OD 값을 450nm 광 파장에서 판독하였다. SoftMax Pro 6.2.1 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0454] 모든 투여량의 OD 값은 표12에 나타난 바와 같다. 결합된 항체에 대해 흡광도 정량 분석을 진행하고, 곡선 시뮬레이션을 통해 항체의 결합 효율 EC50을 얻었다(표12).

[0455] 결과에 따르면, NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4 및 14C12H1L1(hG1TM)(대조군)는 항원 인간 PD-1-mFc-Biotin과의 수용체 인간 PD-L1-mFc의 결합을 효과적으로 차단할 수 있고, 또한 차단 효율은 투여량 의존 관계를 나타내고, NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4 및 14C12H1L1(hG1TM)가 인간 PD-1-mFc-Biotin과의 리간드 인간 PD-L1-mFc의 결합을 차단하는 EC50은 각각 2.249nM, 2.253nM, 2.332nM, 2.398nM, 2.216nM 및 2.231nM이다.

표 12

[0456] 인간 PD-L1-mFc와 경쟁하여 인간 PD-1-mFc-Biotin에 결합하는 NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4 및 14C12H1L1(hG1TM)의 활성의 검출 결과

항체 희석 (nM)	항원-코팅: 인간 PD-L1-mFc 2 µg/ml									
	NTPDV1		NTPDV2		NTPDV3		NTPDV4		14C12H1L1 (hG1TM)	
50	0.086	0.082	0.084	0.081	0.077	0.087	0.076	0.076	0.081	0.077
1:3	0.083	0.083	0.083	0.084	0.083	0.085	0.084	0.090	0.087	0.082
1:9	0.202	0.195	0.204	0.204	0.195	0.183	0.189	0.214	0.120	0.119
1:27	0.604	0.616	0.564	0.593	0.628	0.598	0.521	0.584	0.576	0.634
1:81	0.837	0.821	0.790	0.809	0.816	0.884	0.782	0.768	0.797	0.871
1:243	0.946	0.938	0.822	0.929	0.895	0.851	0.926	0.891	0.880	0.934
1:729	0.956	0.938	0.884	0.878	0.928	0.923	0.854	0.902	0.901	0.964
0	1.012	0.952	0.891	0.966	0.918	0.983	0.919	0.966	0.904	0.954
인간 PD-1-mFc-Biotin:0.3 µg/ml										
제2항체 SA-HRP(1:4000)										
EC50 (nM)	2.253		2.332		2.398		2.216		2.231	

[0457] 실시예18: 포르테바이오 시스템에 의한 항원 인간 PD-1-mFc에 대한 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체 결합의 동역학 매개변수에 대한 측정

[0458] 샘플 희석 완충액은 PBS, 0.02%Tween-20, 0.1%BSA, pH7.4이다. PD1-mFc를 5 µg/mL의 농도로 AMC 센서에 약 0.1 nm의 고정 높이로 60초 동안 고정하고, 센서를 완충액에서 60초 동안 평형화시켰다. 센서에 고정된 PD1-mFc를 항체에 결합시켰다. 농도는 0.62-50 nM(3배 희석)이고, 시간은 120초이다. 단백질을 완충액에서 300초 동안 해리시켰다. 검출 온도는 30°C이고, 검출 주파수는 0.3 Hz이며, 샘플 플레이트 진동 속도는 1000 rpm이다. 데이터는 1:1 모델 피팅으로 분석하여, 친화도 상수를 얻었다.

[0459] 인간 PD-1-mFc에 대한 인간화 항체 NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4 및 Nivolumab(대조군 항체)의 친화도 상수의 측정 결과는 표13에 나타난 바와 같고, 검출 결과는 도19, 도20, 도21, 도22 및 도18에 나타난 바와 같다. 인간 PD-1-mFc에 대한 인간화 항체 NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4 및 Nivolumab의 친화도 상수는 차례로 1.40E-10M, 7.39E-11M, 1.25E-10M, 1.13E-11M 및 2.26E-10M이다. 위의 실험결과는 NTPDV1, NTPDV3 및 Nivolumab의 결합 능력은 유사하며, NTPDV2 및 NTPDV4의 결합 능력은 Nivolumab보다 우수하고, 인간화 항체 NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4는 인간 PD-1-mFc보다 강한 결합 능력을 가지고 있다는 것을 나타낸다.

표 13

[0460] PD-1-mFc에 대한 14C12H1L1(hG1TM), NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4 및 Nivolumab의 친화도 상수의 측정

테스트 항체	KD (M)	kon(1/Ms)	S E (kon)	kdis(1/s)	S E(kdis)	Rmax (nm)
14C12H1L1(hG1TM)	4.45E-11	1.18E+06	5.74E+04	5.23E-05	4.47E-05	0.38-0.57

Nivolumab	2.26E-10	1.52E+06	7.79E+04	3.43E-04	4.66E-05	0.25-0.37
NTPDV1	1.40E-10	6.09E+05	2.01E+04	8.55E-05	3.18E-05	0.38-0.52
NTPDV2	7.39E-11	6.83E+05	2.47E+04	5.05E-05	3.50E-05	0.40-0.55
NTPDV3	1.25E-10	6.68E+05	2.52E+04	8.35E-05	3.44E-05	0.38-0.50
NTPDV4	1.13E-11	5.35E+05	1.59E+04	6.03E-06	2.77E-05	0.35-0.47

[0461] KD는 친화도 상수이고, $KD=kdis/kon$ 이다.

[0462] **실시예19: 포르테바이오 시스템에 의한 항원 인간 NT5E (1-552)-his에 대한 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체 결합의 동역학 매개변수에 대한 측정**

[0463] 샘플 희석 완충액은 PBS, 0.02% Tween-20, 0.1% BSA, pH 7.4이다. HNT5E(1-552)-His를 5 μ g/mL의 농도로 HIS1K 센서에 약 0.4 nm의 고정 높이로 (50초) 고정하고, 센서를 완충액에서 60초 동안 평형화시켰다. 센서에 고정된 HNT5E(1-552)-His를 항체에 결합시켰다. 농도는 0.31-25 nM(3배 희석)이고, 시간은 100초이다. 단백질을 완충액에서 180초 동안 해리시켰다. 검출 온도는 30℃이고, 검출 주파수는 0.3 Hz이며, 샘플 플레이트 진동 속도는 1000 rpm이다. 데이터는 1:1 모델 피팅으로 분석하여, 친화도 상수를 얻었다.

[0464] 인간 NT5E (1-552)-his에 대한 인간화 항체 19F3H2L3(hG1M)(대조군 항체), NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 및 NTPDV4의 친화도 상수의 측정 결과는 표14에 나타난 바와 같고, 검출 결과는 도24-27에 나타난 바와 같다. 인간 NT5E (1-552)-his에 대한 인간화 항체 NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 및 NTPDV4의 친화도 상수는 차례로 3.29E-11M, 2.88E-11M, 7.92E-11M 및 5.77E-11M이다.

[0465] 위의 실험결과는19F3H2L3(hG1M), NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 및 NTPDV4의 결합 능력은 유사하며, 인간화 항체 NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 및 NTPDV4가 인간 NT5E(1-552)-his보다 강한 결합 능력을 가지고 있다는 것을 나타낸다.

표 14

[0466] 인간 NT5E(1-552)-his에 대한 19F3H2L3(hG1M), NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 및 NTPDV4의 친화도 상수의 측정

테스트 항체	KD (M)	kon(1/Ms)	S E (kon)	kdis(1/s)	S E(kdis)	Rmax (nm)
19F3H2L3 (hG1M)	4.05E-11	1.16E+06	6.50E+04	4.68E-05	8.96E-05	0.36-0.77
NTPDV1	3.29E-11	1.16E+06	3.27E+04	3.80E-05	4.63E-05	0.49-0.61
NTPDV2	2.88E-11	1.27E+06	3.84E+04	3.66E-05	4.88E-05	0.63-0.71
NTPDV3	7.92E-11	1.28E+06	4.08E+04	1.02E-04	5.29E-05	0.55-0.65
NTPDV4	5.77E-11	1.23E+06	3.82E+04	7.09E-05	4.95E-05	0.52-0.63

[0467] K_D 는 친화도 상수이고, $K_D=kdis/kon$ 이다.

[0468] **실시예20: U87-MG 세포막표면 CD73 효소활성에 대한 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 억제 측정**

[0469] 상태가 양호한 대수기 U87-MG 세포를 취하여, 무혈청 RPMI-1640 배양액을 사용하여 세포를 재현탁시키고 계수하였다. U87-MG 세포를 96웰 플레이트에 2.5×10^4 개 세포/60 μ L/웰로 접종하였다. 항체를 무혈청 RPMI-1640 배양액으로 실험 설계 농도에 따라 연속으로 희석하였다. 항체를 60 μ L/웰로 96웰 플레이트에 첨가하고, 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 1시간 후, 각 웰에 60 μ L의 600uM RPMI-1640으로 희석된 AMP를 첨가하였다. 3시간 후, 100 μ L 세포 배양 상청액을 취하고, 이를 새로운 96웰 플레이트로 옮기고, 각 웰에 40 μ L CTG(CellTiterGlo) 발색액을 첨가하여 실온에서 5분 동안 암실에 방치시켰다. 5분 후, 각 웰에 10 μ L 300 μ M의 ATP를 첨가하고, 발색을 진행한 후, 멀티 표지 마이크로플레이트 검출기(PerkinElmer 2140-0020)에 의해 상대 형광강도 RLU를 판독하였다.

[0470] 실험 결과는 표15 및 도28에 나타난 바와 같다. NTPDV2는 양성 대조 약 MEDI9447의 AMP 함량과 유사하다.

[0471] 이상의 실험 결과는 다음을 보여준다. 첨가된 AMP는 무-항체 경우에는 U87-MG 세포표면 CD73의 효소 활성 촉매화에 의해 아데노신 A로 전환하지만, 항체를 첨가한 경우에는 NTPDV2 항체와 CD73의 결합이 그 효소 촉매화의 기능을 감소시켜 AMP는 아데노신 A로 전환하지 못한다. 항체는 비-기질 경쟁의 방식으로 그 효소 활성 반응을

효과적으로 억제시키고, 아테노신의 생성을 감소시킨다는 것을 나타낸다.

표 15

[0472] U87-MG 세포막표면 CD73 효소활성에 대한 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 억제 검출

항체 명칭	MEDI9447	19F3H2L3(hG1M)	NTPDV2
IC50 (nM)	0.1189	0.3647	0.5551

[0473] 실시예21: 혼합 림프구 반응MLR에 의한 IFN- γ 및 IL-2 분비를 촉진하는 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 생물학적 활성에 대한 검출

[0474] 1. Raji-PDL1 혼합 림프 반응계의 IFN- γ 분비를 촉진하는 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 생물학적 활성의 검출

[0475] Raji-PDL1 세포를 정상적으로 계대배양하였다. PBMC를 회복시키고, 10mL 1640 완전배지를 사용하여 배양하며, 0.5 μ g/mL의 SEB(Dianotech, 아티클 번호:S010201)로 2일 동안 자극시켰다. 25 μ g/mL의 MMC(미토마이신 C, Stressmarq, 목록:SIH-246, 로트 번호:SM286474)로 Raji-PDL1 세포를 처리한 후, 37°C 인큐베이터에서 1시간 배양하였다. SEB 자극 2일 후의 PBMC 및 1시간 MMC 처리를 거친 Raji-PDL1 세포를 수집하고, PBS로 2회 세척하고, 완전배지를 재현탁시키고, 계수하여, U형 96웰 플레이트에 1x10⁵개 세포/웰로 각각 첨가하였다. 실험 설계에 따라 항체를 첨가하고, 인큐베이터에서 3일 동안 공동 배양하였다. 3일 후, 세포배양 상청액을 수집하고, ELISA 방법에 의해 IFN- γ 를 검출하였다.

[0476] 도29에서 나타난 바와 같이, 인간 PBMC와 Raji-PDL1 세포를 혼합 배양 후, PBMC의 IFN- γ 분비에 대해 현저한 촉진 작용이 있고, 혼합 배양 체계에 항체를 동시에 첨가하면 PBMC가 IFN- γ 를 추가로 분비하도록 현저히 유도할 수 있다. IFN- γ 분비를 촉진하는 활성 수준에 있어서, NTPDV2 항체는 그 마스터 PD-1 단일 표적 항체 14C12H1L1의 활성과 유사하다.

[0477] 2. Raji-PDL1 혼합 림프 반응계의 IL-2 분비를 촉진하는 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 생물학적 활성의 검출

[0478] Raji-PDL1 세포를 정상적으로 계대배양하였다. PBMC를 회복시키고, 10mL 1640 완전배지를 사용하여 배양하며, SEB(0.5 μ g/mL)로 2일 동안 자극시켰다. 25 μ g/mL의 MMC로 Raji-PDL1 세포를 처리한 후, 37°C 인큐베이터에서 1시간 배양하였다. SEB 자극 2일 후의 PBMC 및 1시간 MMC 처리를 거친 Raji-PDL1 세포를 수집하고, PBS로 2회 세척하고, 완전배지를 재현탁시키고, 계수한 후, U형 96웰 플레이트에 1x10⁵개 세포/웰로 각각 첨가하였다. 실험 설계에 따라 항체를 첨가하고, 3일 동안 공동 배양하였다. 세포배양 상청액을 수집하고, ELISA 방법에 의해 IL-2를 검출하였다.

[0479] 도29에서 나타난 바와 같이, 인간 PBMC와 Raji-PDL1 세포를 혼합 배양 후, PBMC의 IL-2 분비에 대해 일정한 촉진 작용이 있고, 혼합 배양 체계에 항체를 동시에 첨가하면 PBMC가 IL-2를 추가로 분비하도록 현저히 유도할 수 있으며, 투여량 의존 관계가 뚜렷하다. IL-2 분비를 촉진하는 활성 수준에 있어서, 이중특이항체 NTPDV2는 저 농도에서의 활성은 그 마스터 PD-1 단일 표적 항체 14C12H1L1과 유사하지만, 중-고 농도에서의 활성은 마스터 PD-1 단일 표적 항체 14C12H1L1보다 조금 낮다.

[0480] 실시예22: 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 생체내 종양 성장 억제에 대한 실험

[0481] 항-CD73/항-PD-1 이중특이항체의 생체내 종양억제 활성을 검출하기 위하여, 우선, MC38-hPDL1/hCD73 세포 (GEMPHARMATECH CO., LTD에 의해 제공됨)를 5-7주령의 암컷 C57BL6-hPD1hPDL1hCD73 삼중 형질전환 마우스 (GEMPHARMATECH CO., LTD에 의해 제공됨)에 피하 접종시켰다. 모델링 및 구체적인 투여 방식은 표16에 나타난 바와 같다. 투여 후, 각 그룹의 종양의 길이 및 너비를 측량하고, 종양 체적을 계산하였다.

표 16

[0482] 실험 설계

그룹핑	n	종양 이종이식체	투여 정황
-----	---	----------	-------

아이소타입 대조군	8	MC38-hPDL1/hCD73, 1백만개 세포/마우스, 피하	아이소타입 대조군 항체 hIgG, 10 mg/kg, 매주 2회 투여, 3주 투여
19F3H2L3 (hG1M)	8		19F3H2L3(hG1M), 10 mg/kg, 매주 2회 투여, 3주 투여
NTPDV2	8		NTPDV2, 13.3 mg/kg, 매주 2회 투여, 3주 투여
NTPDV2	8		NTPDV2, 1.33 mg/kg, 매주 2회 투여, 3주 투여

[0483] 실험 결과는 도30 및 도31에 나타난 바와 같다. 결과에 따르면, 아이소타입 대조군 항체 hIgG 및 19F3H2L3(hG1M)에 비하여, 투여량이 다른 NTPDV2는 마우스 종양의 성장을 효과적으로 억제시킬 수 있고, 고 투여량 NTPDV2의 종양에 대한 억제는 저 투여량 NTPDV2보다 우수하다. 또한, NTPDV2는 암을 지닌 마우스(tumor-bearing mice)의 체중에 영향을 미치지 않는다.

[0484] 실시예23: 이중특이면역 체크포인트 억제제 PD-1/CD73 이중특이항체가 매개하는 IL-8 및 IL-6의 분비를 효과적으로 제거할 수 있는 Fc 단편 돌연변이

[0485] HPMM는 PBMC로부터 유도된 것이다. 본 연구에서 사용된 PBMC는 Zhongshan Akeso Co. Ltd.에서 분리하여 제조된 것이고, 제공자의 사전 동의를 받았다.

[0486] Ficoll-Paque PLUS 림프구 분리액(GE, 아티클 번호:17-1440-03); RPMI 1640(Gibco, 아티클 번호:22400-105); CHO-K1-PD1 세포(Zhongshan Akeso Co. Ltd.에 의해 구축됨); U87-MG 세포(세포는 ATCC에서 유래됨, BEIJING ZHONGYUAN LTD.에서 구입됨); FBS(Fetal Bovine Serum, Excell bio, 아티클 번호:FSP500); 인간 IFN- γ 단백질(sinobio, 아티클 번호:11725-HNAS-100); LPS(Lipopolysaccharides), 지질다당류(sigma, 아티클 번호:L4391); 96웰 세포배양 플레이트(Corning).

[0487] 분리액 Ficoll-PaqueTM Plus 시약 설명서에 따라 건강인 PBMC를 분리하였고, 2% FBS를 포함한 1640 배지를 사용하여 재현탁시키고, 37℃ 및 5% CO2의 인큐베이터에 넣었다. 2시간 후, 상청액을 버리고, 부착 세포를 PBS로 2회 세척하고, 1640 완전 배지(10%FBS 포함) 및 100ng/mL 인간 M-CSF를 첨가하여 7일 동안 유도시켰다. 제3일 및 제5일에 배지를 교환하고 M-CSF를 보충하여 HPMM으로 유도시켰다. 제7일 HPMM 유도 완성 후, 수집하고, 완전 배지를 사용하여 농도를 10만/mL로 조절하고, 96웰 플레이트에 나누어 넣고, 재조합 인간 IFN- γ (50ng/mL)을 첨가한 후, 인큐베이터에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 24시간 후, 대수기의 발현 인간 PD-1의 CHO-K1-PD1 세포 또는 구성적 발현 인간 CD73의 U87-MG 세포를 수집하였다. 세포를 재현탁시키고, 완전 배지를 사용하여 농도를 30만/mL로 조절하였다. 항체를 완전 배지로 희석하여, 작업 농도를 25nM, 2.5nM, 0.25nM로 하였다. 동시에 아이소타입 대조군 항체와 블랭크 대조군을 설계하였다. 96웰 플레이트의 상청액을 버리고, CHO-K1-PD1 또는 U87-MG 세포 현탁액과 항체(최종 체적:200 μ L)를 첨가하였다. 시스템을 균일하게 혼합하고, 인큐베이터에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 혼합물을 500x g에서 5분동안 원심분리하고, 상청액을 수집하고, Dakewe 키트를 사용하여 IL-8, IL-6 분비량을 검출하였다. LPS는 양성 대조 약물로서, 실험에서는 완전 배지로 농도를 100 ng/mL로 조절하였다.

[0488] 본 실시예에서, CHO-K1-PD1 및 U87-MG 세포를 표적 세포로 하여 HPMM과 공동 배양하면, HPMM의 활성화를 유도할 수 있고, 활성화된 HPMM는 항체 Fab를 통해 표적 세포에 연결되고, 항체 Fc 단편은 HPMM의 Fc γ R과 작용하여 HPMM이 사이토카인을 분비하도록 하였다.

[0489] 3. 실험결과

[0490] 도32-도35에 나타난 바와 같다.

[0491] 결과는 아생형 IgG1 아형의 PD-1 항체 또는 CD73 항체에 비하여, Fc 단편 돌연변이를 지닌 항-PD-1/CD73 이중특이항체는 면역세포의 IL-6 및/또는 IL-8의 분비를 효과적으로 제거할 수 있다는 것을 보여준다.

[0492] 이상, 본 발명의 바람직한 실시형태를 상세히 설명하였지만, 본 발명은 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다. 당업자는 본 발명의 사상을 침해하지 않고 다양한 등가의 수정 또는 대체를 할 수 있다. 이러한 등가의 수정 또는 대체는 본 출원의 청구범위에 의해 정의된 범위에 포함된다.

[0493] 서열표

[0494] 19F3의 중쇄 가변 영역 뉴클레오타이드 서열 :

- [0495] GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGACCAGAGCTGGTGAAGCCTGGCGCCTCCATGCGGATGTCTTGTAAAGCCTCTGGCTACAGCTTCACCGGCTATACAATG
AACTGGGTGAAGCAGTCTCACGGCAAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCTTACAATGCCGGCACCAGCTATAACCAGAAGTTTAAGGGCAAGGCC
ACCCTGACAGTGGACAAGAGCTCCTCTACCGCTACATGGAGCTGTGTCCCTGACATCTGAGGATAGCGCGGTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGA
TATGGCGGCGACTACTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCACACTGACAGTGAAGCTCC
- [0496] (서열번호 1, 밑줄은 CDR 서열을 표시함)
- [0497] 19F3의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 :
- [0498] EVQLQQSGPELVKPGASMRMSCKASGYSFTGYTMNWKQSHGKNLEWIGL INPYNAGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARSEYR
YGGDYFDYWQGTTLTVSS
- [0499] (서열번호 2, 밑줄은 CDR 서열을 표시함)
- [0500] 19F3의 HCDR1:GYSFTGYT
- [0501] (서열번호 3)
- [0502] 19F3의 HCDR2: INPYNAGT
- [0503] (서열번호 4)
- [0504] 19F3의 HCDR3: ARSEYRYGGDYFDY
- [0505] (서열번호 5)
- [0506] 19F3경쇄 가변 영역의 뉴클레오타이드 서열 :
- [0507] GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAAGCTCCCCTGGCAATGAGCGTGGGACAGAAGGTGACAATGTCTTGTAAAGTCTAGCCAGAGCCTGCTGAACTCCTCTAAT
CAGAAGAACTACTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAGCTGCTGGTGTACTTTGCCAGCACCCAGGGAGTCCGGAGTGCCTGACAGATTC
ATCGGCTCCGGCTCTGGCACAGACTTACCCTGACAATCAGCTCCGTGCAGGCAGAGGACCTGGCAGATTATTCTGCCAGCAGCACTACGACACCCCTTAT
ACATTTGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG
- [0508] (서열번호 6, 밑줄은 CDR 서열을 표시함)
- [0509] 19F3경쇄 가변 영역의 아미노산 서열 :
- [0510] DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVFASTRESGVPDFRIGSGSGTDFLTLSVQAEDLADYFCQQHYDTPY
TFGGGTKLEIK
- [0511] (서열번호 7, 밑줄은 CDR 서열을 표시함)
- [0512] 19F3의 LCDR1 아미노산 서열:QSLNSSNQKNY
- [0513] (서열번호 8)
- [0514] 19F3의 LCDR2 아미노산 서열:FAS
- [0515] (서열번호 9)
- [0516] 19F3의 LCDR3 아미노산 서열:QQHYDTPY
- [0517] (서열번호 10)
- [0518] 19F3 중쇄의 프레임워크 영역 아미노산 서열 :
- [0519] FR-H1 : EVQLQQSGPELVKPGASMRMSCKAS (서열번호 11)
- [0520] FR-H2 : MNWKQSHGKNLEWIGL (서열번호 12)
- [0521] FR-H3 : SYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYC (서열번호 13)
- [0522] FR-H4 : WQGTTLTVSS (서열번호 14)
- [0523] 19F3경쇄의 프레임워크 영역 아미노산 서열 :
- [0524] FR-L1 : DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSS (서열번호 15)

- [0525] FR-L2 : LAWYQQKPGQSPKLLVY (서열번호 16)
- [0526] FR-L3 : TRESGVPDRFIGSGSGTDFLTISSVQAEDLADYFC (서열번호 17)
- [0527] FR-L4 : FGGGTKLEIK (서열번호 18)
- [0528] 19F3H2의 뉴클레오타이드 서열 : (서열번호 19, 밑줄은 CDR 서열을 표시함)
- [0529] CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTGTGAAGGTGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGCTATACAATG
AACTGGGTGAGGCAGGCACCAGGACAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCCTTACAATGCCGGCACCTTTATAACCAGAAGTTTCAGGGCAAGGTG
ACCCGTGACAGTGGACAAGTCCACCTCTACAGCCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGA
TATGGCGGCGACTACTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCACACTGACCGTGTCTAGC
- [0530] 19F3H2의 아미노산 서열 : (서열번호 20, 밑줄은 CDR 서열을 표시함)
- [0531] QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWRQAPGQNLWIGL INPYNAGTSYNQKFQGVKTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSEYR
YGGDYFDYWGQGTTLTVSS
- [0532] 19F3L2의 뉴클레오타이드 서열 : (서열번호 21, 밑줄은 CDR 서열을 표시함)
- [0533] GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCCGTGTCTGTGGGAGAGCGGGTGACAATCTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAACTCCTCTAAT
CAGAAGAACTACTTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTTTCGCTCTACCAGGGAGAGCGGAGTGCCAGACAGATTC
TCTGGCAGCGGTCCGGCACAGACTTACCCTGACAATCAGTCCGTGCAGGCAGAGGACGTGGCAGATTACTATTGCCAGCAGCACTACGATACCCCTAT
ACATTTGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG
- [0534] 19F3L2의 아미노산 서열 : (서열번호 22, 밑줄은 CDR 서열을 표시함)
- [0535] DIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLIYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFLTISSVQAEDVADYYCQQHYDTPY
TFGGGTKLEIK
- [0536] 19F3L3의 뉴클레오타이드 서열 : (서열번호 23, 밑줄은 CDR 서열을 표시함)
- [0537] GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCCGTGTCTGTGGGAGAGCGGGTGACAATCTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAACTCCTCTAAT
CAGAAGAACTACTTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTTTCGCTCTACCAGGGAGAGCGGAGTGCCAGACAGATTC
TCTGGCAGCGGTCCGGCACAGACTTACCCTGACAATCAGTCCCTGCAGGCAGAGGACGTGGCCGTGTACTATTGCCAGCAGCACTACGATACCCCTAT
ACATTTGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG
- [0538] 19F3L3의 아미노산 서열 : (서열번호 24, 밑줄은 CDR 서열을 표시함)
- [0539] DIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLIYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFLTISSVQAEDVADYYCQQHYDTPY
TFGGGTKLEIK
- [0540] 19F3H2L3(G1M)의 중쇄 뉴클레오타이드 (서열번호 25, 밑줄 부분은 불변 영역 서열임)
- [0541] CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTGTGAAGGTGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGCTATACAATG
AACTGGGTGAGGCAGGCACCAGGACAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCCTTACAATGCCGGCACCTTTATAACCAGAAGTTTCAGGGCAAGGTG
ACCCGTGACAGTGGACAAGTCCACCTCTACAGCCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGA
TATGGCGGCGACTACTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCACACTGACCGTGTCTAGCGCCTCCACAAAG_ggG_ccC_agc_gtg_ttt_cct_ctc_gcc
ccc_tcc_tcc_aaa_a
- [0542] gcaccagcggaggaaccgctgctctcgatgtctggtgaaggactacttccctgaaccgctcacctgagctggaatagcggcgctctgacaagcggagtcc
atacattccctgctgtgtgcaaaagcagcggactctattccctgtccagcgtcgtcacagtgcaccagcagcctgggcaccagacctacatctgtaacg
tcaaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagaaagtggagcccaaatcctgcgacaagacacacactgtccccctgtcctgctcccgaaGCTGCTg
gaggccctagcgtcttccctcttctcccaaaccaaggacacctcatgatcagcagaacctgaagtcaactgtgtcgtcgtggtatgtagccatgagg
accccgaggtgaaattcaactggtatgtcgatggcgtcgaggtgcacaacgccaacaaagccagggaggaacagtacaactccacctacagggtggtgt
ccgtgctgacagtcctccaccaggaactggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtgtccaacaaggctctccctgccccattgagaagaccatcagca
aggccaaagcccaacccagggagccccaggtctatacactgcctccctccagggagcaactcacaagaaccaggtgtccctgacctgcctggtcaagggt
tttatcccagcgacatcgccgtcgagtgggagttcaacggacagcccgagaataactacaagaccacctcctgtcctcgactccgacggtccttcttcc
tgtacagcaagctgacctgtgacaaaagcaggtggcagcagggaacgtgttctcctgcagcgtgatgcacgaagccctccacaaccactacaccagaaaa
gcctgtccctgagccccggcaaatga

- [0543] **19F3H2L3(G1M)의 중쇄 아미노산** (서열번호 26, 밑줄 부분은 불변 영역 서열임)
- [0544] QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYSTGYTMNWVRQAPGQNLEWIGLINPYNAGTSYNQKFQGVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSEYR
YGGDYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0545] **19F3H2L3(G1M)의 경쇄 뉴클레오타이드** (서열번호 27, 밑줄 부분은 불변 영역 서열임)
- [0546] GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCCGTGTCTGTGGGAGAGCGGGTGACAATCTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAACCTCTCTAAT
CAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTTCGCCTCTACCAGGGAGAGCGGAGTGCCAGACAGATTCT
TCTGGCAGCGGCTCCGGCACAGACTTCACCTGACAATCAGCTCCCTGCAGGCAGAGGACGTGGCCGTGTACTATTGCCAGCAGCACTACGATACCCCTAT
ACATTTGGCGGCGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCAGCCCCATCTGTCTTCATTTTCCCCCTAGTGACGAGCAGCTGAAATCCGGAACAGCC
TCTGTGGTCTGTCTGTGAACAATTTCTACCTCGCGAAGCAAGGTGCAGTGGAAGTCGATAACGCTCTGCAGAGTGGCAATTCACAGGAGAGCGTGACT
GAACAGGACTCCAAGGATTCTACCTATAGTCTGAGCTCCACTCTGACCTGTCCAAAGCAGATTACGAAAAGCACAAAGTGTATGCCTGTGAGGTACCCAC
CAGGGGTGAGTTCTCCAGTCACCAATCCTTCAACAGAGGCGAATGT
- [0547] **19F3H2L3(G1M)의 경쇄 아미노산** (서열번호 28, 밑줄 부분은 불변 영역 서열임)
- [0548] DIVMTQSPSSLAIVSVERVITISCKSSQLNNSNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLIYFASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHYDTPY
TFGGGKLEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSITLTSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC
- [0549] **19F3H2L3(hG1TM)의 중쇄 뉴클레오타이드** (서열번호 29, 밑줄 부분은 불변 영역 서열임)
- [0550] CAGGTGCAGCTGGTGAGTCTGGAGCAGAGGTGTAAGCCAGGAGCCTCTGTGAAGGTGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTACCCGGCTATACAATG
AAGTGGGTGAGGCAGGCACAGGACAGAATCTGGAGTGGATCGGCTGATCAACCTTACAATGCCGGCACCTCTTATAACCAAGTTCAGGGCAAGGTG
ACCCTGACAGTGGACAAGTCCACCTCTACAGCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGA
TATGGCGCGACTACTTTGATTATTGGGGCCAGGCACCACTGACCGTGTCTAGCGCTCCACAAAG ggG ccC agc gtg ttt cct etc gcc
ccc tcc tcc aaa a
- [0551] gcaccagcggaggaaccgctgctctcggatgtctggtgaaggactacttccctgaaccgctcacctgagctggaatagcggcgctctgacaagcggagtcc
atacattccctgctgtgctgcaaacgagcggactctattccctgtccagcgtcgtcagatgccagcagcagcctgggcaccagacctaactctgtaaac
tcaaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagaaagtgagagcccaatcctgcgacaagacacacactgtccccctgtcctgctcccgaa GCTGCTg
gaGCCcctagcgtcttctcttctcccaaaccaaggacaccctcatgatcagcagaaccctgaagtcaactgtgtcgtcgtggtgatgcagcatgagg
accccgaggtgaaatcaactggtatgtcgatggcgtcgaggtgcacaacgcgaacaaagccagggaggaacagtaactccacctaaggggtggtgt
ccgtgctgacagtcctccaccaggactggctgaacggcaaggagtaacagtgaagggtgtccaacaaggctctccctgccccattgagaagaccatcagca
aggccaaagcccaaccagggagccccaggtctatacactgcctccctccaggagcgaactcacaagaaccaggtgtccctgacctgcctggtcaagggt
tttatcccagcgacatcgccgtcgagtgagggtccaacggacagccccgagaataactacaagaccaccctcctgtcctcgactccgacggctccttcttcc
tgtacagcaagctgaccgtggacaaaagcaggtggcagcagggaacgtgttctcctgcagcgtgatgcacgaagccctccacaaccactacaccagaaaa
gcctgtccctgagccccggcaaatga
- [0552] **19F3H2L3(hG1TM)의 중쇄 아미노산 서열** : (서열번호 30)
- [0553] QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYSTGYTMNWVRQAPGQNLEWIGLINPYNAGTSYNQKFQGVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSEYR
YGGDYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0554] **19F3H2의 프레임워크 영역 아미노산 서열** :
- [0555] FR-H1 : QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKAS (서열번호 31)
- [0556] FR-H2 : MNWVRQAPGQNLEWIGL (서열번호 32)
- [0557] FR-H3 : SYNQKFQGVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC (서열번호 33)

- [0558] FR-H4 : WGQGTTLTVSS (서열번호 34)
- [0559] **19F3L2의 프레임워크 영역 아미노산 서열 :**
- [0560] FR-L1 : DIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSS (서열번호 35)
- [0561] FR-L2 : LAWYQQKPGQAPKLLIY (서열번호 36)
- [0562] FR-L3 : TRESGVPDFRSGSGSGTDFTLTISVQAEDVADYYC (서열번호 37)
- [0563] FR-L4 : FGGGTKLEIK (서열번호 38)
- [0564] **19F3L3의 프레임워크 영역 아미노산 서열 :**
- [0565] FR-L1 : DIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSS (서열번호 39)
- [0566] FR-L2 : LAWYQQKPGQAPKLLIY (서열번호 40)
- [0567] FR-L3 : TRESGVPDFRSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC (서열번호 41)
- [0568] FR-L4 : FGGGTKLEIK (서열번호 42)
- [0569] **14C12중쇄 가변 영역 뉴클레오타이드 서열 :** (서열번호 43)
- [0570] GAGGTCAAACGTGGTGAGAGCGGCGGGCTGGTGAAGCCCGGCGGTCAGTAACTGAGCTGCGCCGCTCCGGCTTCGCCTTAGCTCCTACGACATGTCATGGGTGAGGCAGACCCCTGAGAAGCGCCTGGAATGGGTGCTACTATCAGCGGAGCGGGCGATACACCTACTATCCTGACTCTGTCAAAGGGAGATTCACAATTAGTCGGGATAACGCCAGAAATACTCTGTATCTGCAGATGTCTAGTCTGCGGTCCGAGGATACAGCTCTGTACTATTGTGCAAACCGGTACGGCGAAGCATGGTTTGCTATTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTCTCTGCC
- [0571] **14C12중쇄 가변 영역 아미노산 서열 :** (서열번호 44)
- [0572] EVKLVESGGGLVKPGSLKLSCAASGFATSSYDMSWVRQTPEKRLWVATISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGLTVTSA
- [0573] **14C12의 HCDR1 아미노산 서열:**GFAFSSYD
- [0574] (서열번호 45)
- [0575] **14C12의 HCDR2 아미노산 서열:**ISGGGRYT
- [0576] (서열번호 46)
- [0577] **14C12의 HCDR3 아미노산 서열:**ANRYGEAWFAY
- [0578] (서열번호 47)
- [0579] **14C12경쇄 가변 영역 뉴클레오타이드 서열 :** (서열번호 48)
- [0580] GACATTAAGATGACACAGTCCCCTTCCTCAATGTACGCTAGCCTGGGCGAGCGAGTGACCTTCACATGCAAAGCATCCCAGGACATCAACACATACCTGTCTTGGTTTCAGCAGAAGCCAGGCAAAAGCCCCAAGACCCTGATCTACCGGCCAATAGACTGGTGACGGGTCCCAGCAGATTCTCCGGATCTGGCAGTGGGCAGGATTACTCCCTGACCATCAGCTCCCTGGAGTATGAAGACATGGGCATCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCTCTGACCTTTGGAGCAGGCACA AACTGGAAGTGAAG
- [0581] **14C12경쇄 가변 영역 아미노산 서열 :** (서열번호 49)
- [0582] DIKMTQSPSSMYASLGERVTFTCKASQDINTYLSWFQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSQDYSLTISSELEYEDMGIIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK
- [0583] **14C12의 LCDR1 아미노산 서열:**QDINTY (서열번호 50)
- [0584] **14C12의 LCDR2 아미노산 서열:**RAN (서열번호 51)
- [0585] **14C12의 LCDR3 아미노산 서열:**LQYDEFPLT (서열번호 52)
- [0586] **14C12중쇄 프레임워크 영역 아미노산 서열 :**
- [0587] FR-H1 : EVKLVESGGGLVKPGSLKLSCAAS (서열번호 53)

- [0588] FR-H2 : MSWVRQTPEKRLEWVAT (서열번호 54)
- [0589] FR-H3 : YYPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDALYYC (서열번호 55)
- [0590] FR-H4 : WGQGLTVTSA (서열번호 56)
- [0591] **14C12경쇄 프레임워크 영역 아미노산 서열 :**
- [0592] HR-L1 : DIKMTQSPSSMYASLGERVTFTCKAS (서열번호 57)
- [0593] HR-L2 : LSWFQQKPGKSPKTLIY (서열번호 58)
- [0594] HR-L3 : RLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYC (서열번호 59)
- [0595] HR-L4 : FGAGTKLELK (서열번호 60)
- [0596] **14C12H1의 뉴클레오타이드 서열 :** (서열번호 61)
- [0597] GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGAGGGCTGGTGCAGCCGCGGGTCACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTCCGGATTGCGCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGGGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGACTGGATTGGGTGCTACTATCTCAGGAGCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAA GCATGGTTTGCTATTGGGGGCAGGGAACCCCTGGTGACAGTCTCTAGT
- [0598] **14C12H1의 아미노산 서열 :** (서열번호 62)
- [0599] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFATSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGLTVTVSS
- [0600] **14C12L1의 뉴클레오타이드 서열 :** (서열번호 63)
- [0601] GACATTCAGATGACTCAGAGCCCTCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTTCAGCAGAAGCCAGGGAAGCCCAAGACACTGATCTACCGGCTAATAGACTGGTGTCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGCTCAGGAGCGGACAGGACTACACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAACTGGAGCTGAAG
- [0602] **14C12L1의 아미노산 서열 :** (서열번호 64)
- [0603] DIQMTQSPSSMSASVGDRTVFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK
- [0604] **14C12H1L1의 중쇄 뉴클레오타이드** (서열번호 65)
- [0605] GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGAGGGCTGGTGCAGCCGCGGGTCACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTCCGGATTGCGCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGGGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGACTGGATTGGGTGCTACTATCTCAGGAGCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAA GCATGGTTTGCTATTGGGGGCAGGGAACCCCTGGTGACAGTCTCTAGTGCCAGCACCAAGGACCTAGCGTGTTCCTCTCGCCCCCTCTCCAAAAGCACCAGCGGAGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGACTACTCCCTGAACCCGTACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGTCCATACATTCCCTGTGTGTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAGCGTCGTACAGTGCCAGCAGCAGCTGGGACCCAGACCTACATCTGTAAAGTCAACACAAGCCCTCCAAACCAAGGTGGACAAGAAAGTGAGCCCAATCTGCGACAAGACACACACCTGTCCCCCTGTCTGCTCCCGAACTCCTCGGAGGCCTAGCGTCTTCTCTTCTCCCAACCAAGGACACCCCTCATGATCAGCAGAACCCTGAAGTCACCTGTGTGTGTCGTGGATGTGAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTCGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCAGGGAGGAACAGTACAATCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCTCCACCAGGACTGGGTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCCATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAACCCAGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGGACGAACTACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCCAGCGACATCGCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCGAGAATAACTACAAGACCACCCCTCTGTCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCTGCAGCGTGATGCACGAAGCCCTCCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA
- [0606] **14C12H1L1의 중쇄 아미노산 서열 :** (서열번호 66)
- [0607] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFATSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV

LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0608] 14C12H1L1의 경쇄 뉴클레오타이드 서열 : (서열번호 67)

[0609] GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGC
TGGTTTCAGCAGAAGCCAGGGAAGCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGACTGGTGTCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGA
CAGGACTACACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCTGAGCTTTGGCGCCGGGACA
AAACTGGAGCTGAAGCGAACTGTGGCCGCTCCCTCCGTCTTCATTTTCCCTCTTCTGACGAACAGCTGAAATCAGGCACAGCCAGCGTGGTCTGTCTGCTG
AACAATTTCTACCTAGAGAGGCAAAAGTGCAGTGAAGGTCGATAACGCCCTGCAGTCCGGCAACAGCCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAAAGAT
AGCACCTATTCCTGTCTAGTACACTGACTCTGTCCAAGGCTGATTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCATGCGAAGTGACACATCAGGGACTGTCAAGCCCC
GTGACTAAGTCTTTTAACCGGGGCGAATGT

[0610] 14C12H1L1의 경쇄 아미노산 서열 : (서열번호 68)

[0611] DIQMTQSPSSMSASVGDRTFTCRASQDINTYLSWFQKPGKSPKTLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGT
KLELKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC

[0612] 14C12H1L1(G1TM)의 중쇄 뉴클레오타이드 서열 (서열번호 69)

[0613] GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGCGGGTCACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTTCGCTTTAGCTCCTACGACATG
TCCTGGGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTACTATCTCAGGAGCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTC
ACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGAA
GCATGGTTTGCCTATTGGGGGAGGGAACCTGGTGACAGTCTCTAGTGCCAGCACCAAGGGCCAGCGTGTTCCTCTCGCCCCCTCTCCAAAAGCACC
AGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAACCGGTACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGTCCATACA
TTCCCTGTGTGTGCAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAGCGTCGTACAGTGCCAGCAGCAGCTGGGACCCAGACCTACATCTGTAACGTCAAC
CACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAATCTGCGACAAGACACACCTGTCCCCCTGTCTGCTCCCGAAGCTGTGAGAGCC
CCTAGCGTCTTCTCTTCTCCCAACCCAAAGGACACCTCATGATCAGCAGAACCCTGAAGTCACCTGTGTGCTGCTGGATGTGAGCCATGAGGACCCC
GAGGTGAAATTCAACTGGTATGTCGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAACCAAGCCAGGGAGGAACAGTACAACCTACAGGTGGTGTCCGTG
CTGACAGTCTCCACCAGGACTGGCTGAACGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAGGCTCTCCCTGCCCCATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCC
AAAGGCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGGGACGAACCTACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTAT
CCCAGCGACATCGCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCGAGAATAACTACAAGACCACCCCTCCTGTCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTAC
AGCAAGCTGACCGTGGACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTGTTTCTCTGCAGCGTGATGCACGAAGCCCTCCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTG
TCCCTGAGCCCCGGCAAA

[0614] 14C12H1L1(G1TM)의 중쇄 아미노산 (서열번호 70)

[0615] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGE
AWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVKDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0616] 14C12H1의 중쇄 프레임워크 영역 아미노산 서열 :

[0617] FR-H1 : EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열번호 71)

[0618] FR-H2 : MSWVRQAPGKGLDWVAT (서열번호 72)

[0619] FR-H3 : YYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYC (서열번호 73)

[0620] FR-H4 : WGQGLTVTVSS (서열번호 74)

[0621] 14C12L1의 경쇄 프레임워크 영역 아미노산 서열 :

[0622] FR-L1 : DIQMTQSPSSMSASVGDRTFTCRAS (서열번호 75)

[0623] FR-L2 : LSWFQKPGKSPKTLIY (서열번호 76)

- [0624] FR-L3 : RLVSGVPSRFSGSGSQDYTLTISSLQPEDMATYYC (서열번호 77)
- [0625] FR-L4 : FGAGTKLELK (서열번호 78)
- [0626] **Linker1의 아미노산 서열 : GGGGSGGGSGGGSGGGGS** (서열번호 79)
- [0627] **Linker1의 뉴클레오타이드 서열 : (서열번호 80)**
- [0628] GGCGGCGGCGGACGCGGCGGCGGCTCCGGAGGAGCGGCTCTGGCGGCGGCGGCGAGC
- [0629] **Linker2의 아미노산 서열 : GGGGSGGGSGGGGS** (서열번호 81)
- [0630] **Linker2의 뉴클레오타이드 서열 : (서열번호 82)** GGCGGCGGCGGCTCCGGAGGAGCGGCTCTGGCGGCGGCGGCGAGC
- [0631] NTPDV2 및 NTPDV4의 중쇄의 아미노산 서열 (서열번호 83) : 그중의 번역글로불린 부분의 19F3H2(hG1TM)의 CDR 영역은 실선 밑줄로 굵게 표시하였고, scFv 부분의 14C12H1V-Linker1-14C12L1V의 CDR 영역은 각각 물결 모양 밑줄로 굵게 표시하였으며, 중쇄 영역 돌연변이 아미노산은 이탤릭체로 굵게 표시하였고, linker 영역은 굵게 표시하였음 :
- [0632] QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKAS**GYSFTGYTM**NWVRQAPGQNLEWIGL**INPYNAGT**SYNQKFQGKVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC**ARSEYR**
YGGDYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC
 NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AAGAP**SVFLFPPKPKDTLMI SRTEPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
 FLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSMVHEALHNHYTQKSLSLSPGK**GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGLVQPGGSLRLS**CAAS**GF**AFSSYDMSI**WVRQ**
APGKGLDWATI**SGGGRYT**YYPDSVKG**RFTISR**DN**SKNNLYLQ**MNSLRAEDTALYYC**ANRYGEAWFAY**WGQGTTLTVTS**GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQ**
MTQSPSSMSASVGD**RVTFTCRASQDINTYLSW**FQ**KPGKSPKTLIYRANRL**VSGVPSRFSGSGSQDYTLTISSLQPEDMATYYC**LQYDEFPLT**FGAGTKLE
 LKR
- [0633] NTPDV2 및 NTPDV4의 중쇄의 뉴클레오타이드 서열 : (서열번호 84)
- [0634] CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTGTGAAGGTGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTACC GGCTATACAATG
 AACTGGGTGAGGCAGGCACCAGGACAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCTTACATGCCGGCACCTCTTATAACCAAGAAGTTTCAGGGCAAGGTG
 ACCCTGACAGTGGACAAGTCCACCTCTACAGCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGA
 TATGGCGGCGACTACTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCACACTGACCGTGTCTAGCgcctccacaaaggggccagcgtgttctctcgccccctcctcc
 aaaagcaccagcggaggaaacccgtgctctcggtgtgtggtgaaggactacttccctgaaccctgacccgtgagctggaatagcggcgctctgacaagcgga
 gtccatcatattcctgctgtgctgcaaaagcagggactctattccctgtccagcgtcgtcacagtgccagcagcagcctgggacaccagacctacatctgt
 aacgtcaaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagaaagtgagcccaaatcctgcgacaagacacacacctgtccccctgtcctgctccgaaGCT
 GCTggagCccctagcgtcttctcttctcccaaaccaaggacacctcatgatcagcagaacctgaagtcaacctgtgtcgtcgtggatgtcagccat
 gaggaccccgaggtgaaattcaactggtatgtcgatggcgtcgaggtgcacaacgcaaaaccaagcccgagggaacagtacaactccacctacagggtg
 gtgtcctgtgtgacagtctccaccaggactggctgaacggcaaggagtagaagtgaaggtgtccaacaaggctctccctgccccattgagaagaccatc
 agcaaggccaagggccaaccagggagccccaggtctatacactgctccctccagggaagcaactcacaagaaccaggtgtccctgacctgctgggtcaag
 ggcttttatccagcgacatcgccgtcgagtgaggagccaacggacagcccgagaataactacaagaccacctcctgtcctcgactccgacggctccttc
 ttcctgtacagcaaaactgaccgtcgataaatctaggtggcagcagggaacgtgttctctgttgcgtgatgcatgaagcactgcacaaccattataccag
 aagtctctgagcgtgtccccggcaagGGCGGCGGCGGCTCTGGAGGAGGAGGCAGCGCGGAGGAGGCTCCGGAGGCGGCGGCTCTGAGGTGCAGCTGGTG
 GAGTCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCAGCAAGCGGATTTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGAGCTGGGTGCGGCAG
 GCACCTGGCAAGggtCTGGATTGGGTGGCAACCATCAGCGGAGGCGGCAGATACACATACTATCCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCCGCGAT
 AACTTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACAGCCCTGTACTATTGCGCCAACCGCTACGGCGAGGCTGGTTTGCCTAT
 TGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGAGGCGGCTCTGGCGGCGGCGGCGAGCATATCCAG
 ATGACCCAGTCCCCCTCTCTATGTCTGCCAGCGTGGGCGACCGGGTGACCTTCACATGTAGAGCCTCCAGGATATCAACACCTACCTGTCTTGGTTTCAG
 CAGAAGCCCGGAAGAGCCCTAAGACTGATCTATCGGGCCAATAGACTGGTGAGCGGAGTGCCTTCCCGTCTCCGGCTCTGGCAGCGGACAGGACTAT
 ACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGCCAGAGGATATGGCCACATACTATTGCCTGCAGTATGACGAGTTCCCGCTGACCTTCGGGgctGGCACTAAGCTGGAG
 CTGAAAAGA
- [0635] NTPDV1 및 NTPDV3의 중쇄의 아미노산 서열 (서열번호 85) : 그중의 번역글로불린 부분의 19F3H2(hG1TM)의 CDR 영역은 실선 밑줄로 굵게 표시하였고, scFv 부분의 14C12H1V-Linker2-14C12L1V의 CDR 영역은 각각 물결 모양 밑줄로 굵게 표시하였으며, 중쇄 영역 돌연변이 아미노산은 이탤릭체로 굵게 표시하였고, linker 영역은 굵게 표시하였음 :

[0636] QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKKASGYSFTGYTMNWRQAPGQNLEWIGL **INPYNAGT**SYNQKFQGVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC**ARSEYR**
YGGDYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
 NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AAGAP**SVFLFPPKPKDTLMI SRTEPVTCTVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
 FLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK**GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSIWRQ**
APGKGLDWATISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYC**ANRYGEAWFAY**WGQGTTLTVTS**GGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSP**
 SSMSASVGDRTFTCRASQ**DINTYL**SWFQQKPGKSPKTLIY**RANRL**VSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATIYY**LQYDEFPLT**FGAGTKLELKR

[0637] NTPDV1 및 NTPDV3의 중쇄의 뉴클레오타이드 서열 : (서열번호 86)

[0638] CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTGTGAAGGTGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTACC GGCTATACAATG
 AACTGGGTGAGGCAGGCACCAGGACAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCCTTACAATGCCGGCACCTCTTATAACCAAGAAGTTTCAGGGCAAGGTG
 ACCCTGACAGTGGACAAGTCCACCTCTACAGCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGA
 TATGGCGCGGACTACTTTGATTATTGGGGCCAGGGACCACTGACCGTGTCTAGCGCTCCACAAaggggccagcgtgttctctctgcccctctctcc
 aaaagcaccagcggaggaacccgtgctctcggtgtctggtgaaggactacttccctgaaccctgacccgtgagctggaatagcggcgctctgacaagcggg
 gtccatacatctccctgctgtgctgcaaaagcagcgactctattccctgtccagcgtcgtcacagtcccagcagcagcctgggacccagacctacatctgt
 aacgtcaaccacaagccctccaacaccaagtggaagaagaagtggaagcccaaatctgcaagaagacacacactgtccccctgtcctgctccgaaGCT
 GCTggagCccctagcgtcttctcttctcccaaaccaaggacacctcatgatcagcagaaccCCTGAAGTACCTGTGTCGTGCGTGGATGTGAGCCAT
 GAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTCGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCCACTACAGGGTG
 GTGTCCGTGCTGACAGTCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCATTGAGAAGACCATC
 AGCAAGGCCAAAGCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGGACGAACTCACCAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAG
 GGCTTTTATCCAGCGACATCGCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCGAGAATAACTACAAGACCACCCCTCTGTCTCGACTCCGACGGCTCCTTC
 TTCCTGTACAGAACTGACCGTCGATAAATCTAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTTGTTCGTGATGCATGAAGCACTGCACAACCATATACCCAG
 AAGTCTCTGAGCCTGTCCCCCGCAAGGGCGGCGGGCTCTGGAGGAGGAGCAGCGCGGAGGAGGCTCCGGAGGCGGCGGCTCTGAGGTGACGTGGTG
 GAGTCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGTCTTGCAGCAAGCGGATTGCGCTTTAGCTCTACGACATGAGCTGGGTGCGGCAG
 GCACCTGGCAAGGGTCTGGATTGGGTGGCAACCATCAGCGGAGGCGGCAGATACACATACTATCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCCGGAT
 AACTCTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACAGCCCTGTACTATTGCGCCAACCGCTACGGCGAGGCTGGTTTGCTAT
 TGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCGGCGGCGGGCTCCGGAGGAGGCGGCTCTGGCGGCGGGCAGCGATATCCAGATGACCCAGTCCCC
 TCCTCTATGTCTGCCAGCGTGGGCGACCGGGTGACCTTCACATGTAGAGCCTCCAGGATATCAACACCTACCTGTCTTGGTTTCAGCAGAAGCCCGGCAAG
 AGCCCTAAGACACTGATCTATCGGGCAATAGACTGGTGAGCGGAGTGCTTCCCGTCTCCGGCTCTGGCAGCGGACAGGACTATACCTGACAATCAGC
 TCCCTGCAGCCAGAGGATATGGCCACATACTATTGCCTGCAGTATGACGAGTTCCCCCTGACCTTCGGGGCTGGCACTAAGCTGGAGCTGAAAAGATGATAA
 GAATTC

[0639] NT5E (1-552)-his의 아미노산 서열 (서열번호 87)

[0640] MCPRAARAPATLLLALGAVLWPAAGAWELTILHTNDVHSRLQTSSESSKCVNASRCMGGVARLFTKVQVIRRAEPNVLLLDAGDQYQGTIWFTVYKGAEVA
 HFMNALRYDAMALGNHEFDNGVEGLIEPLLKEAKFPILSANIKAKGLASQISGLYLPYKVLVPGDEVVGI VGYTSKETPFLSNPNTLVFEDEITALQPEV
 DKLKTLLNVNKI IALGHSGFEMDKLIAQKVRGVDVVGGHSNTFLYTGNPPSKEVPAGKYPIVTSDDGRKVPVQYAFGKYLGLYKIEFDERGNV ISSHGN
 PILLNSSIPEDPSIKADINKWRIKLDNYSTQELGKTIIVLDSSQSCRRECNMGNLICDAMINNNLRHTDEMFWNHVSMCILNGGIRSPIDERNNGTITW
 ENLAAVLPFGGTFDLVQLKGSTLKKAFEHSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDL SRKPGDRVVKLDVLCTKCRVPSYDPLKMDDEVYKVI LPNFLANGGDGFQM
 IKDELLRHDSGDQDINVSTYISKMKVIYPAVEGRIFSTGSHHHHHH

[0641] NT5E (1-552)-his의 뉴클레오타이드 서열 (서열번호 88)

[0642] ATGTGTCCTAGAGCCGCCAGAGCTCCAGCTACACTGCTGCTGGCTCTGGGAGCAGTCTCTGGCCAGCAGCAGGAGCTTGGGAAGTACCATCCTGCACACC
 AACGACGTGCACAGCAGGCTGGAACAGACCAGCAGGACAGCAGCAAGTGCCTGAACGCCAGTGCCTGTATGGGAGGAGTGGCAAGGCTGTTCACCAAGGTG
 CAGCAGATCCGAGAGCCGAACCTAACGTGCTGCTGCTGGACGCCGAGATCAGTATCAGGAACCATCTGGTTACCGTGTACAAGGGCGCCGAAGTGGCC
 CACTTCATGAACGCTCTGCGCTACGACGCTATGGCCCTGGGCAATCACGAGTTCGATAACGGCGTGGAGGACTGATCGAGCCTCTGCTGAAGGAGGCCAAG
 TTCCCATCTGAGCGCAACATCAAGGCCAAGGGACCTCTGGCTAGCCAGATTAGCGGCTGTACCTGCCTTACAAGGTGCTGCCGTGGGAGACGAAGTG
 GTGGGAATCGTGGGTACACCAGCAAGGAGACCCCTTCTCTGAGCAACCCAGGCACCAACCTGGTGTTCGAGGACGAGATACCGCTCTGCAGCCAGAGGTG
 GACAAGCTGAAGACCTGAACGTGAACAAGATCATGCCCTGGGACACAGCGGCTTCGAGATGGACAAGCTGATCGCCAGAAAGTGCAGGAGTGGACGTG
 GTCGTGGGCGGACACAGCAACACCTTCTGTACACCGGCAACCTCCTTCTAAGGAAGTGCCAGCGGCAAGTACCCCTTCATCGTGACGACGACGCGGA
 AGAAAGGTGCCAGTGGTGCAGGCTTACGCCTTCGGCAAGTACCTGGGTACCTGAAGATCGAGTTCGACGAGCGGGCAACGTGATCTCTAGCCACGGCAAC
 CCCATCTGCTGAACAGCAGCATCCCAGAGGACCCAGCATCAAGGCCGACATCAACAAGTGGCGGATCAAGCTGGACAACCTACAGACCCAGGAGCTGGGA

AAGACCATCGTGTACCTGGACGGCAGCTCTCAGTCTTGCCGGTTCCGCGAGTGCAACATGGGCAACCTGATTTGCGACGCCATGATCAACAACAACCTGCGG
CACACCGACGAGATGTTTTGGAACACGTCAGCATGTGCATCCTGAACGGCGGAGGCATCAGAAGCCCTATTGACGAGCGGAACAACGGCACCATCACTTGG
GAGAACCTGGCAGCAGTGTGCTTCTTTGGCGGAACATTCGACCTGGTGAGCTGAAGGGCAGCAGCTGAAGAAGGCCTTCGAGCACAGCGTGACAGATAC
GGCCAGAGACAGGCGAGTTCCTGCAGGTGCGAGGAATCCACGTGGTGATACGACCTGAGCAGGAAGCCAGGAGACAGAGTGGTGAAGCTGGACGTGCTCTGC
ACCAAGTGTGCGGTGCCAAGTACGACCCCCGTAAGATGGACGAGGTGTACAAGTTCATCTGCCCAACTTCCTGGCTAACGGAGGAGACGGCTTCCAGATG
ATCAAGGACGAGCTGCTGAGGCACGACAGCGGAGACCAGGACATCAACGTGCTGTCCACCTACATCAGCAAGATGAAGGTCTATACCCCGCCGTGGAAGGC
AGGATCAAGTTCAGACCGGCTCTACCAACCACCATCACAC

[0643] **mFc의** 아미노산 서열 : (서열번호 89)
PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMI SLSP I VTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQQTTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGK
EFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLSDGSYFMYSKLRVEKKNWVE
RNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFRTPGK

[0644] 19F3H1V-Linker-19F3L2V의 아미노산 서열 : (서열번호 90)

[0645] QVQLQSGAEVVKPGASMKMSCKASGYSTGYTMNVVKQAHGQNLIEWIGLINPYNAGTSYNQKFQKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSEYR
YGGDYFDYWGGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSSQSLNNSNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLIYFASTRESGVPDRF
SGSGSGTDFTLTISSVQAEDVADYYCQQHYDTPYTFGGGTKLEIK

[0646] 19F3H1V-Linker2-19F3L2V의 뉴클레오타이드 서열 : (서열번호 91)

[0647] CAGGTGCAGTGCAGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTATGAAGATGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGTATACAATG
AACTGGGTGAAGCAGGCCACGCCAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCCTACAATGCCGGCACCTCTTATAACCAGAAGTTTCAGGGCAAGGCC
ACCCTGACAGTGGACAAGTCCACCTCTACAGCCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGA
TATGGCGGCGACTACTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCACACTGACCGTGTCTAGC
GGCCTGTACGGCCTGTACGGCCTGTACGGCCTGTACAGCGAGAGGGGCTGTACGGCCTGTACGGCCTGTACGGCCTGTACAGCGAGAGGGGCTGTACGGC
CTGTACGGCCTGTACGGCCTGTACAGCGAGAGGGACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCCGTGTCTGTGGGAGAGCGGGTGACAATCTCCTGT
AAGTCTAGCCAGTCTCTGTGAATCCTCTAATCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTTCGCC
TCTACCAGGAGAGCGGAGTGCCAGACAGATTCTCTGGCAGCGGCTCCGGCAGACTTCACCCCTGACAATCAGCTCCGTGCAGGCAGAGGACGTGGCAGAT
TACTATTGCCAGCAGCACTACGATACCCCTATACATTTGGCGGCGGCCAAGCTGGAGATCAAG

[0648] 19F3H1의 뉴클레오타이드 서열 : (서열번호 92)

[0649] CAGGTGCAGTGCAGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTATGAAGATGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGTATACAATG
AACTGGGTGAAGCAGGCCACGCCAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCCTACAATGCCGGCACCTCTTATAACCAGAAGTTTCAGGGCAAGGCC
ACCCTGACAGTGGACAAGTCCACCTCTACAGCCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGA
TATGGCGGCGACTACTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCACACTGACCGTGTCTAGC

[0650] 19F3H1의 아미노산 서열 : (서열번호 93)
QVQLQSGAEVVKPGASMKMSCKASGYSTGYTMNVVKQAHGQNLIEWIGLINPYNAGTSYNQKFQKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSEYR
YGGDYFDYWGGTTLTVSS

[0651] 19F3L1의 뉴클레오타이드 서열 : (서열번호 94)

[0652] GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCAATGTCTGTGGGAGAGAGGGTGACAATGTCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAATCCTCTAAT
CAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTAAGCTGTGGTGTACTTTGCCTCTACCAGGAGAGCGGAGTGCCAGACAGATTCT
TCTGGCAGCGGCTCCGGCACAGACTTCACCCCTGACAATCAGCTCCGTGCAGGCAGAGGACCTGGCAGATTATTCTGCCAGCAGCACTACGATACCCCTAT
ACATTTGGCGGCGGCCACCAAGCTGGAGATCAAG

[0653] 19F3L1의 아미노산 서열 : (서열번호 95)

[0654] DIVMTQSPSSLAMSVGERVTMSCKSSQSLNNSNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLVYFASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYDTPY
TFGGGTKLEIK

[0655] 19F3L2의 경쇄 아미노산 (전장) (서열번호 96, 밑줄 부분은 불변 영역 서열임)

[0656] DIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSSQSLNNSNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLIYFASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVADYYCQQHYDTPY
TFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC

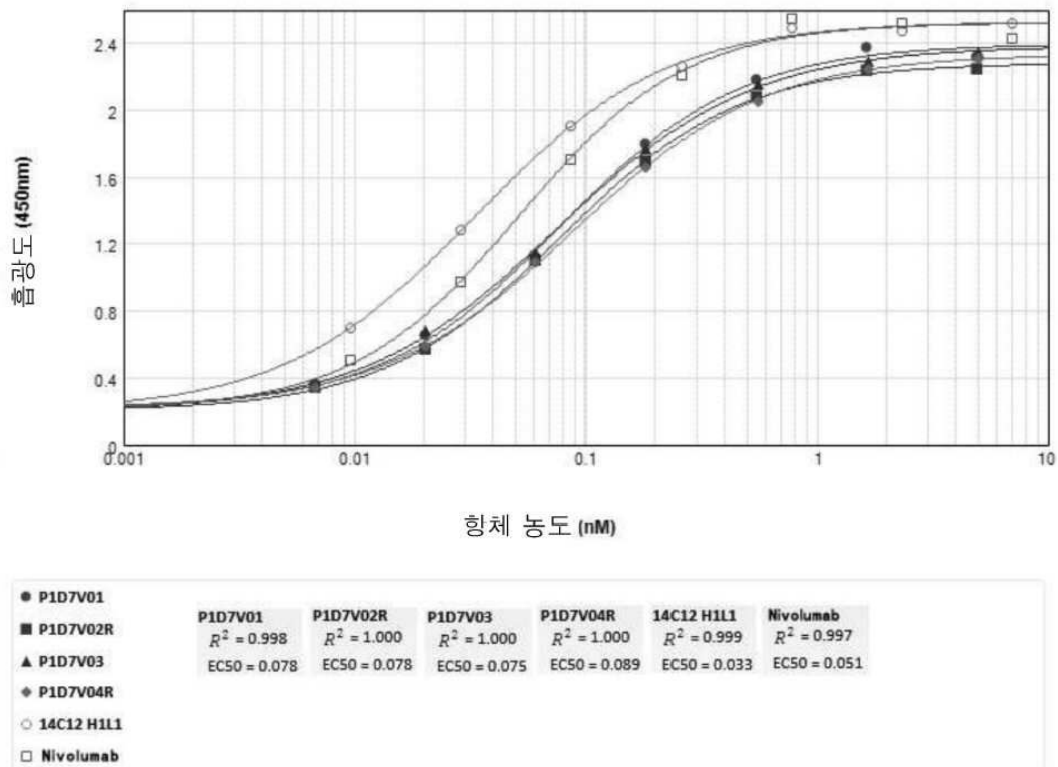
- [0657] 19F3H2 가변 영역의 아미노산 서열, 밑줄은 CDR 서열을 표시함 : (서열번호 97)
- [0658] QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQNLEWIGLINPYNAGTSYNQKFQKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSEYR
YGGDYFDYWGQGTTLTVSS
- [0659] 19F3L2 가변 영역의 아미노산 서열, 밑줄은 CDR 서열을 표시함 : (서열번호 98)
- [0660] DIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLIYFASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVADYYCQQHYDTPY
TFGGGTKLEIK
- [0661] 19F3L3 가변 영역의 아미노산 서열, 밑줄은 CDR 서열을 표시함 : (서열번호 99)
- [0662] DIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLIYFASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYDTPY
TFGGGTKLEIK
- [0663] 19F3L2의 경쇄 뉴클레오타이드 (전장) (서열번호 100)
- [0664] GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCCGTGTCTGTGGGAGAGCGGGTGACAATCTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAACTCCTCTAAT
CAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTTCGCCTCTACCAGGGAGAGCGGAGTGCCAGACAGATTC
TCTGGCAGCGGCTCCGGCACAGACTTCACCCCTGACAATCAGCTCCGTGCAGGCAGAGGACGTGGCAGATTACTATTGCCAGCAGCACTACGATACCCCTAT
ACATTTGGCGGGCGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCAGCCCCATCTGTCTTCATTTTCCCCCTAGTGACGAGCAGCTGAAATCCGGAACAGCC
TCTGTGGTCTGTCTGTGAACAATTTCTACCCTCGCGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGTCGATAACGCTCTGCAGAGTGGAATTCACAGGAGAGCGTGACT
GAAACAGGACTCCAAGGATTCTACCTATAGTCTGAGCTCCACTCTGACCCTGTCCAAAGCAGATTACGAAAAGCACAAAGTGTATGCCTGTGAGGTCACCCAC
CAGGGGCTGAGTTCTCCAGTCACCAAATCCTTCAACAGAGGCGAATGT

수탁번호

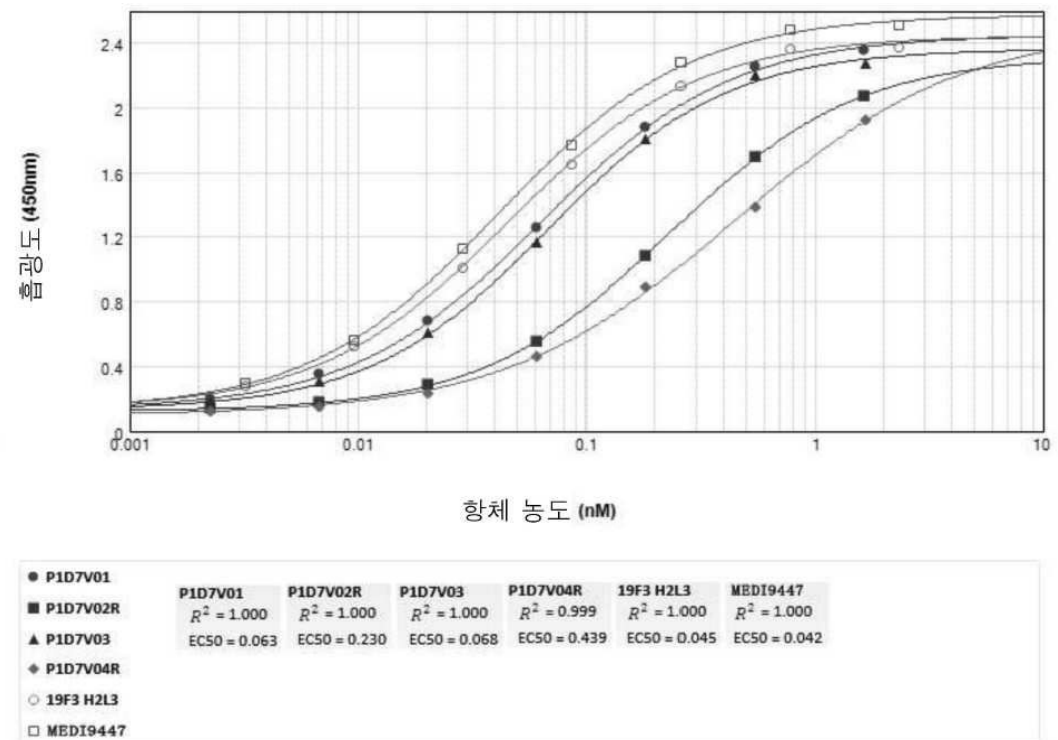
- [0665] 기탁기관명 : 중국 전형 배양물 기탁센터
- 수탁번호 : CCTCCC2015105
- 수탁일자 : 20150616

도면

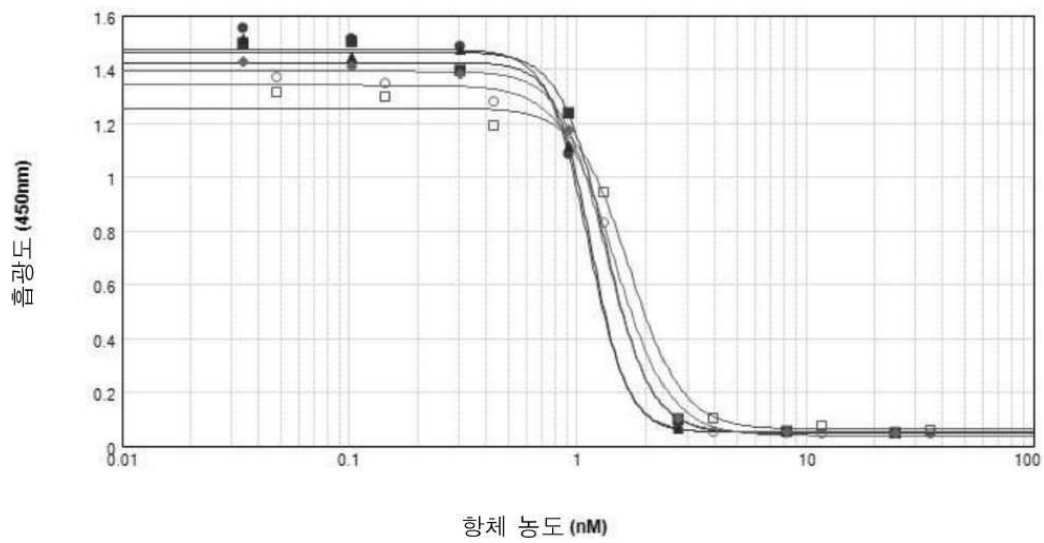
도면1



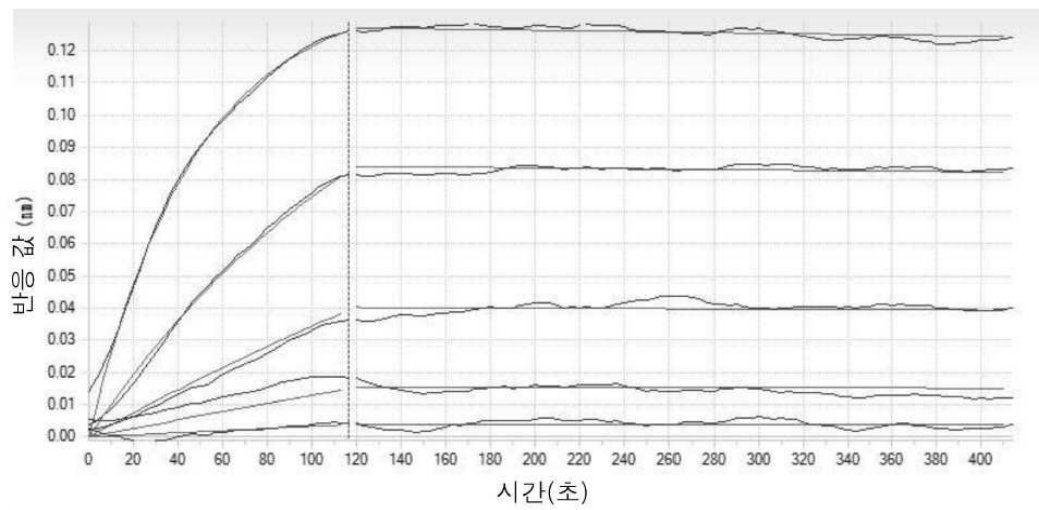
도면2



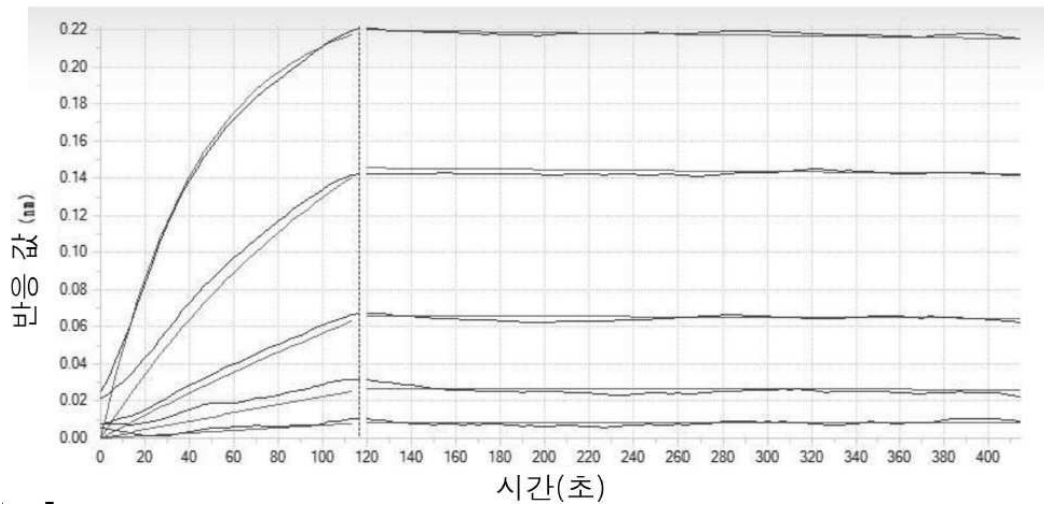
도면3



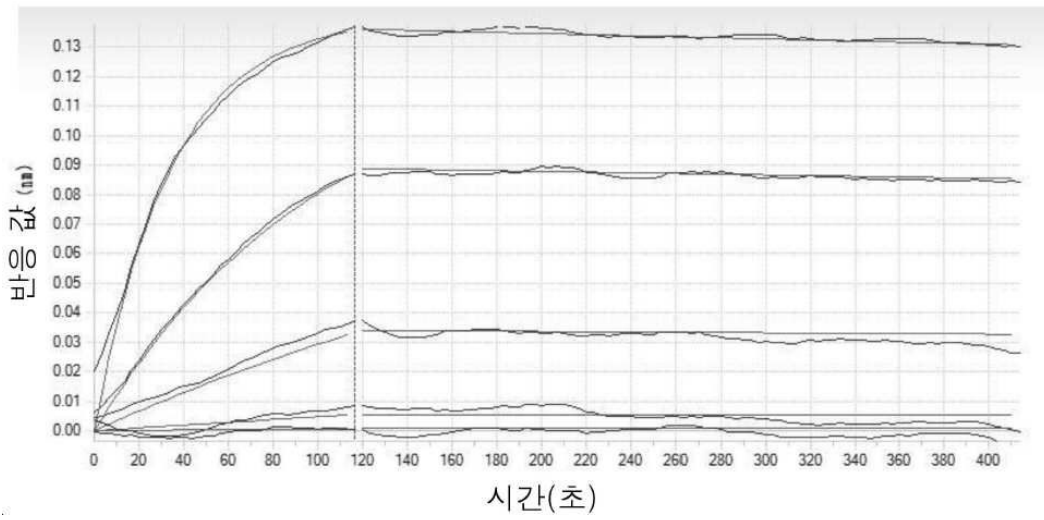
도면4



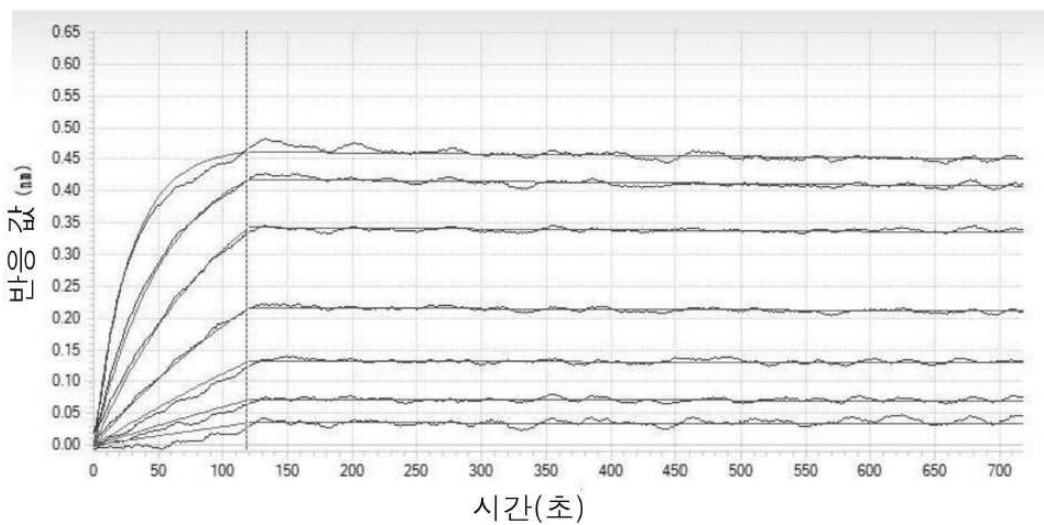
도면5



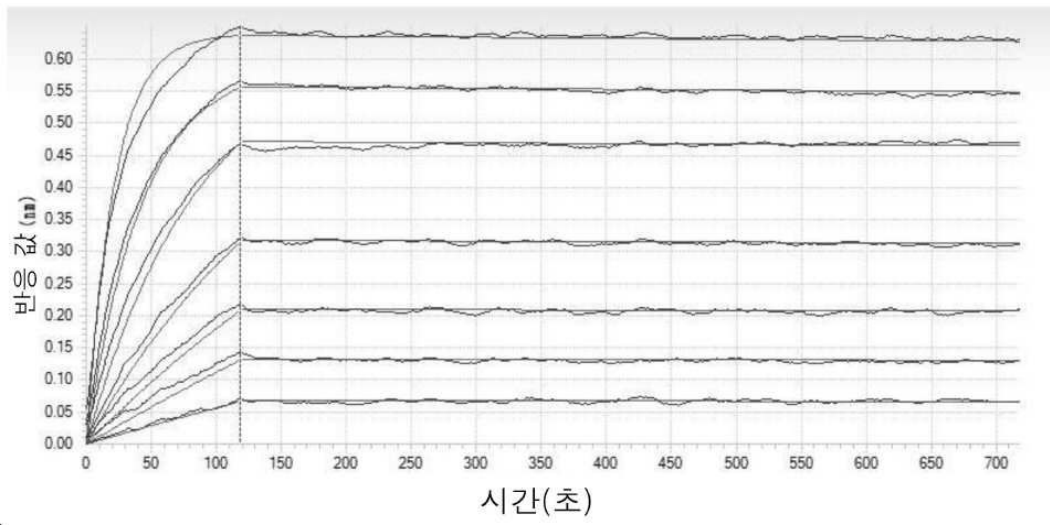
도면6



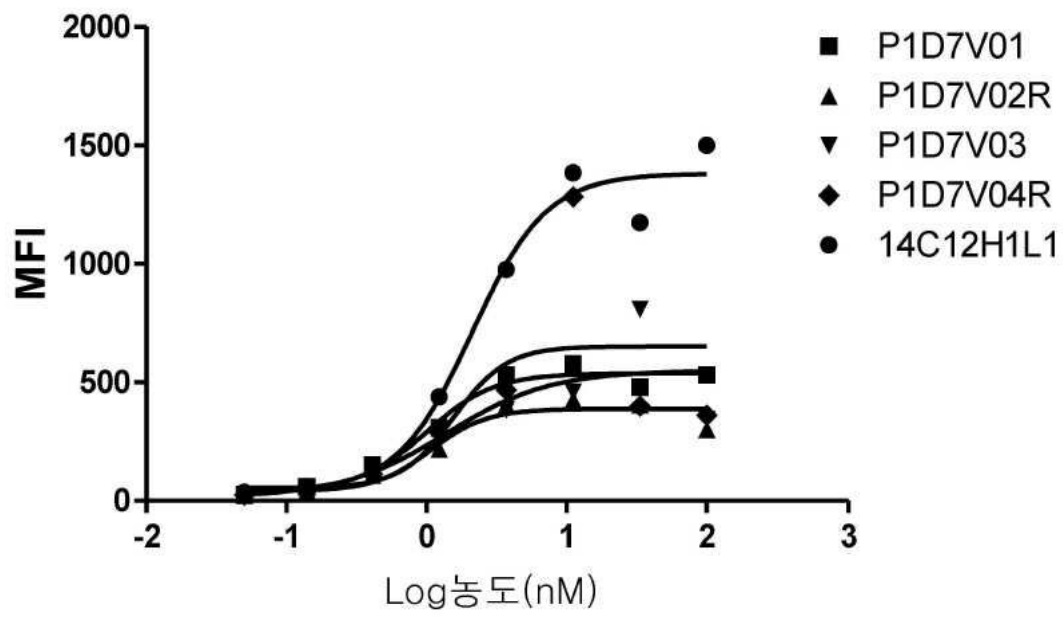
도면7



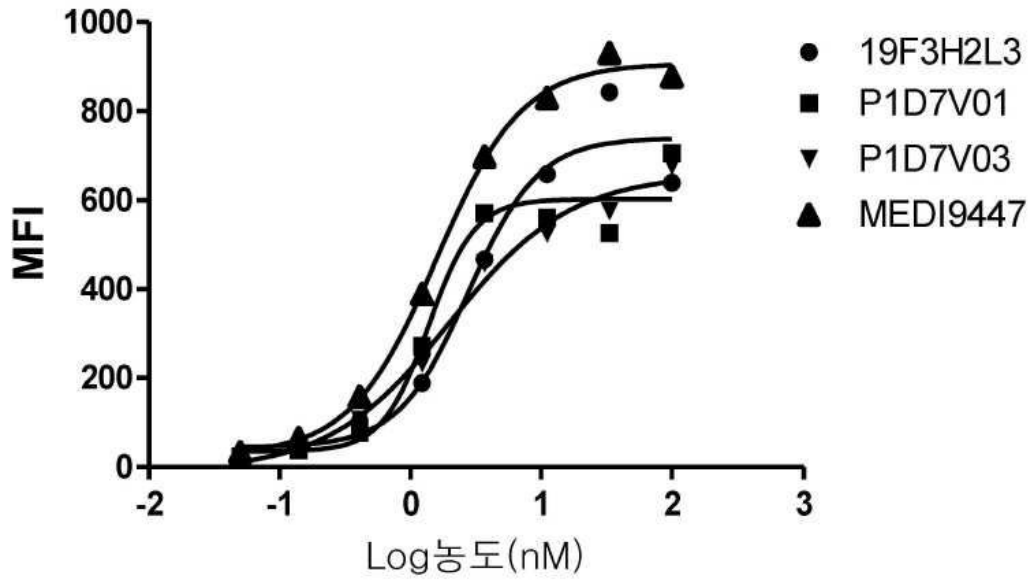
도면8



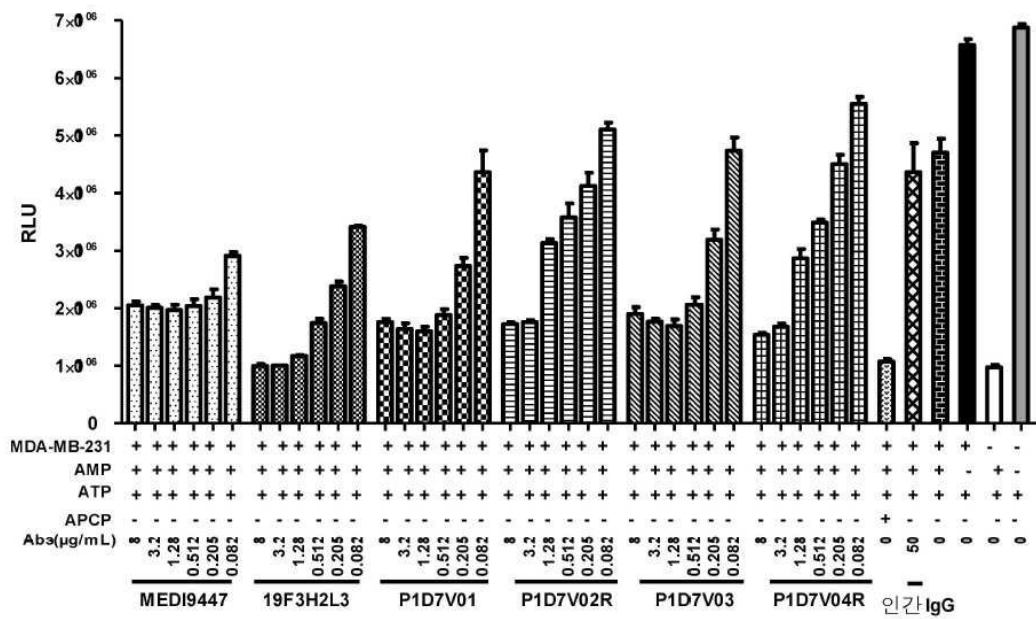
도면9



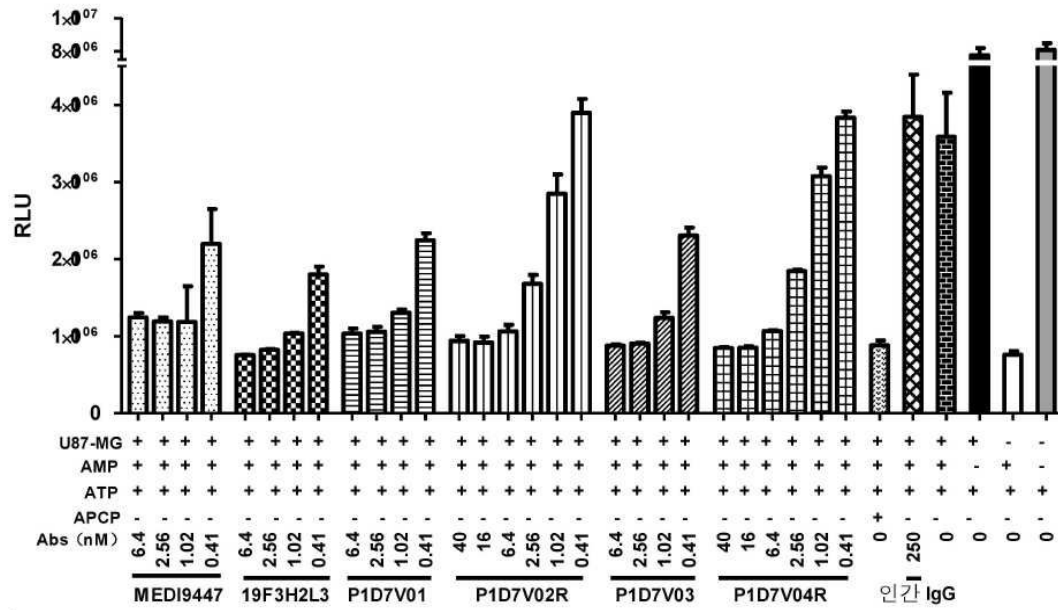
도면10



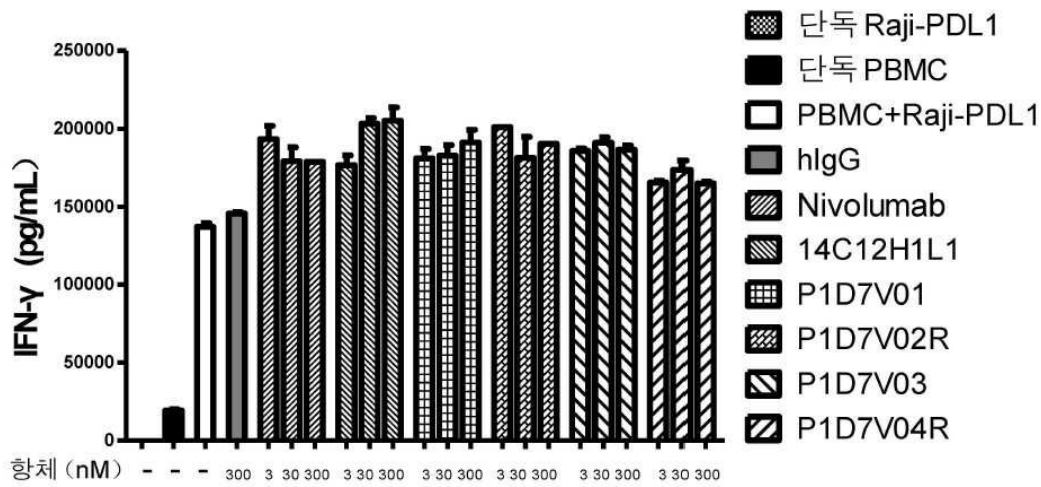
도면11



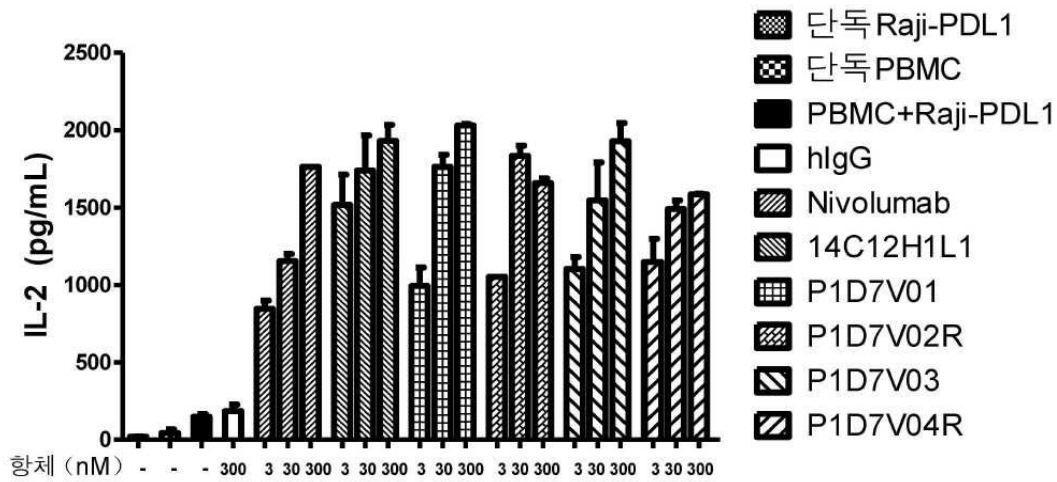
도면12



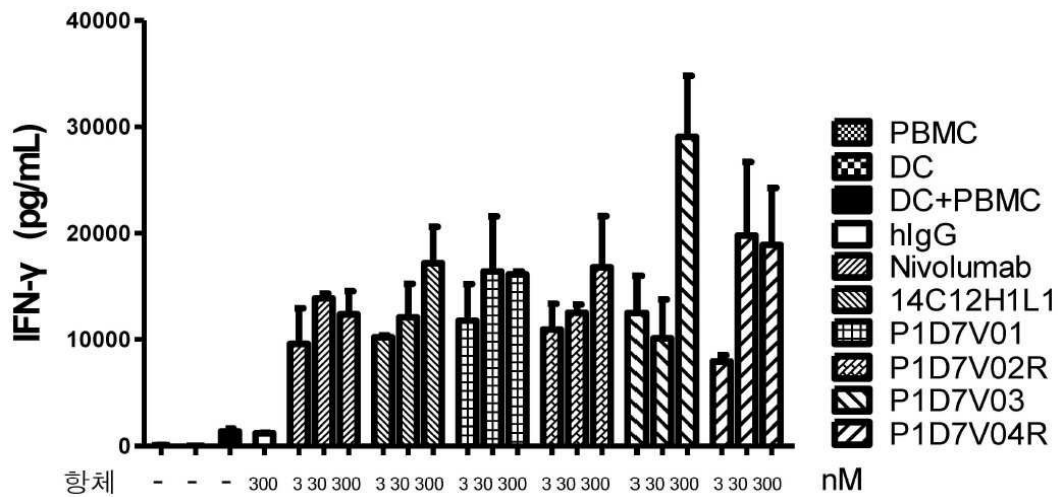
도면13



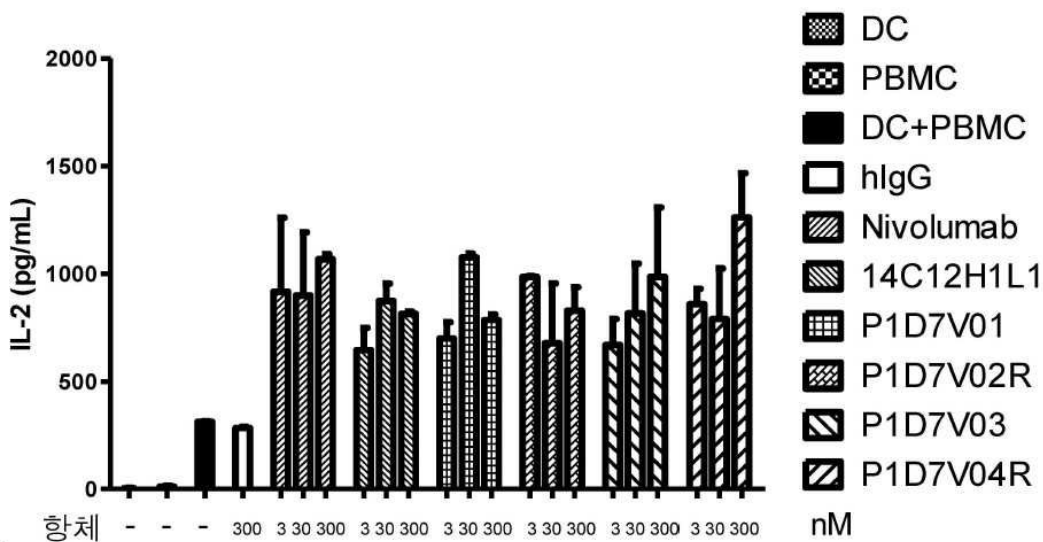
도면14



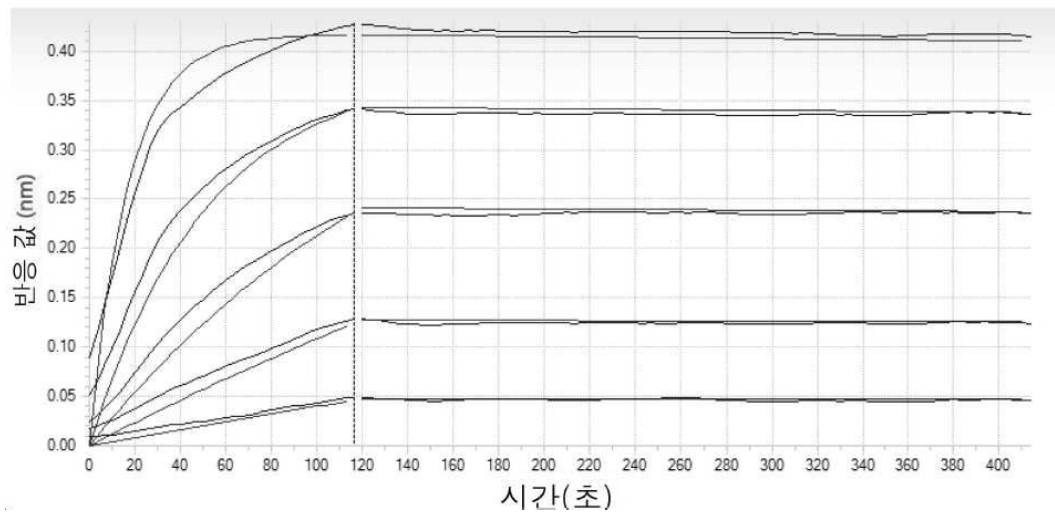
도면15



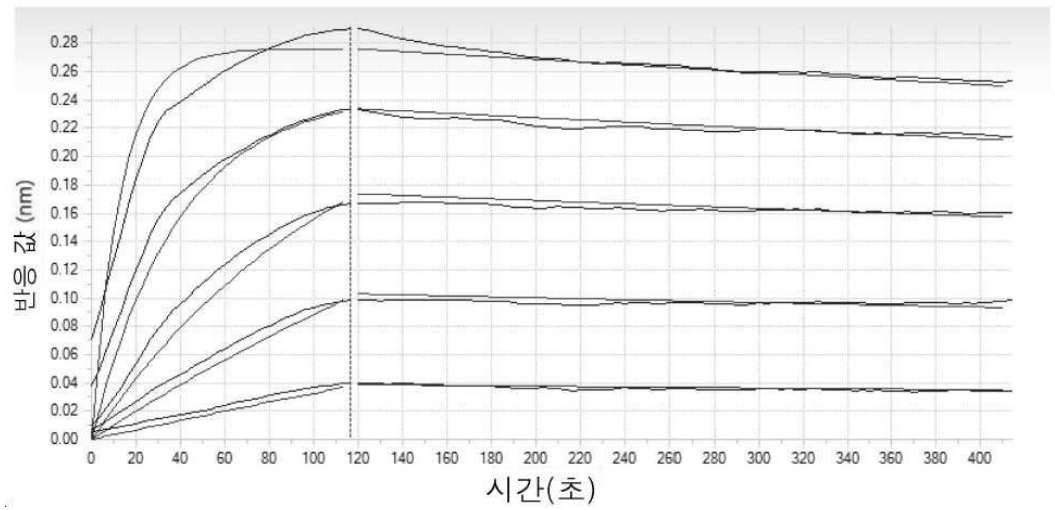
도면16



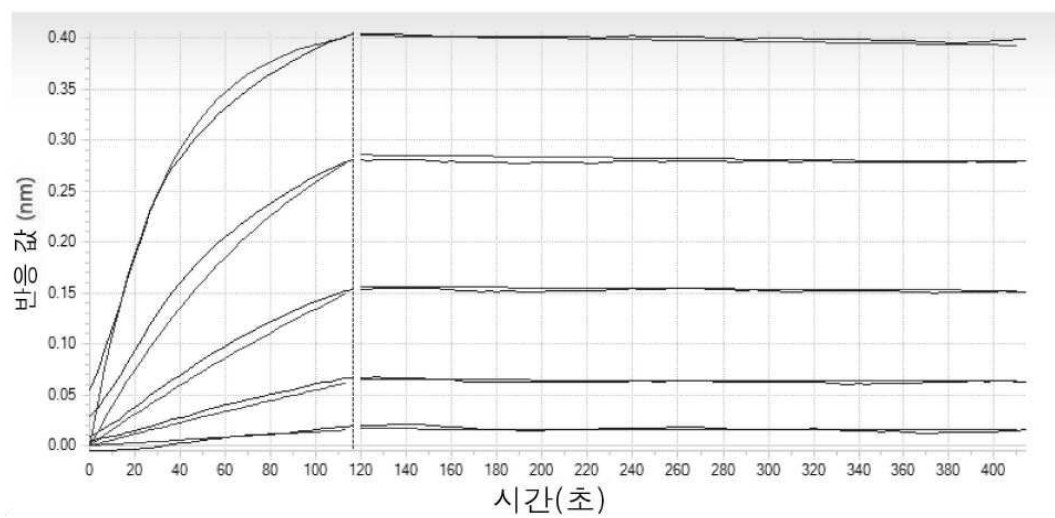
도면17



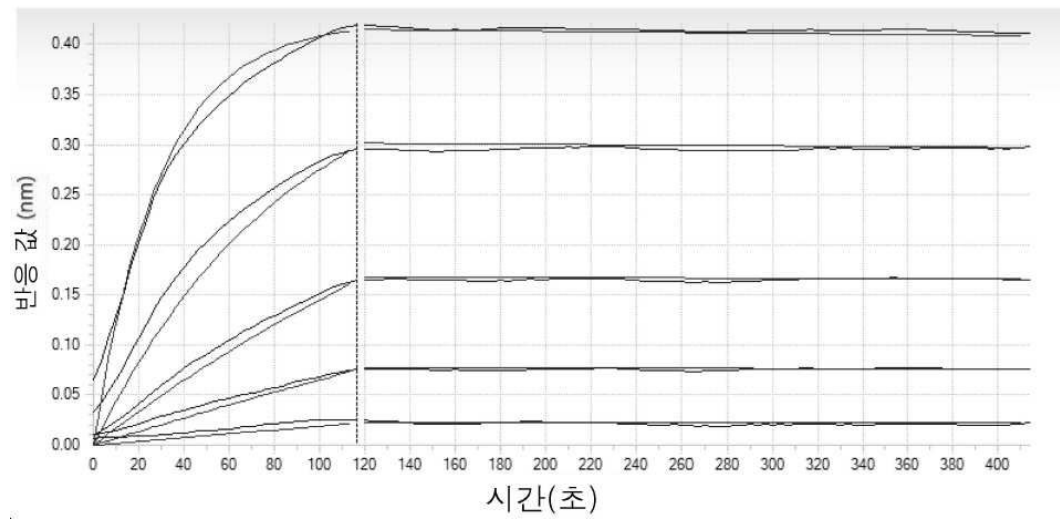
도면18



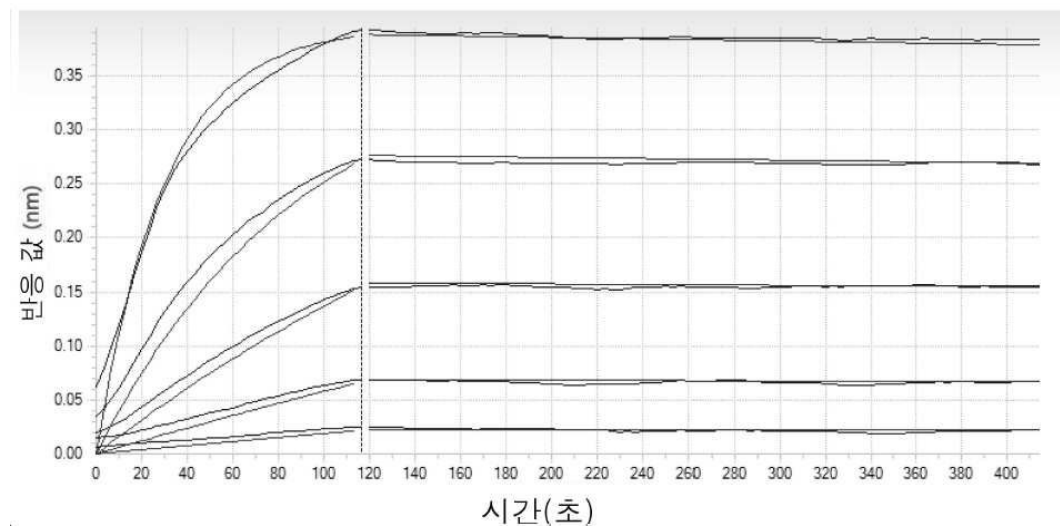
도면19



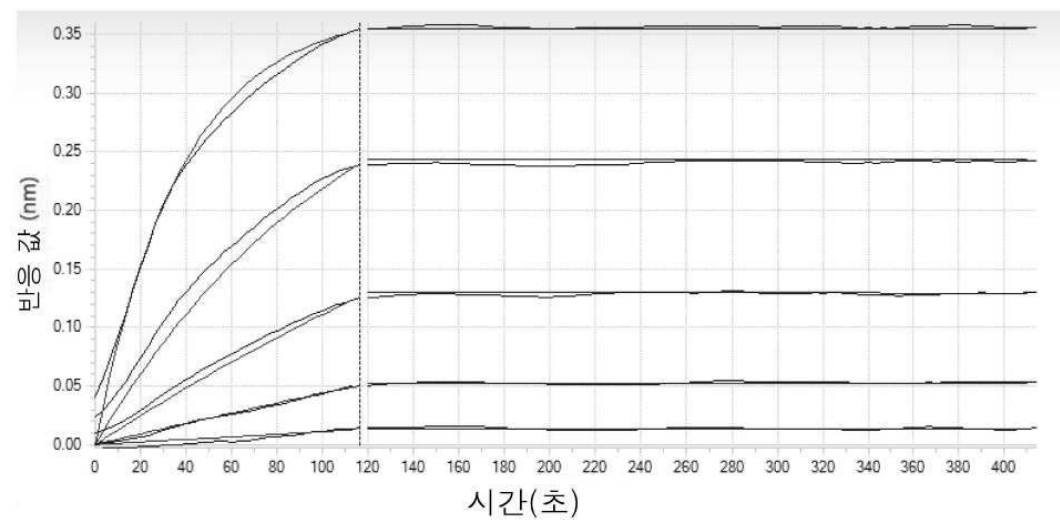
도면20



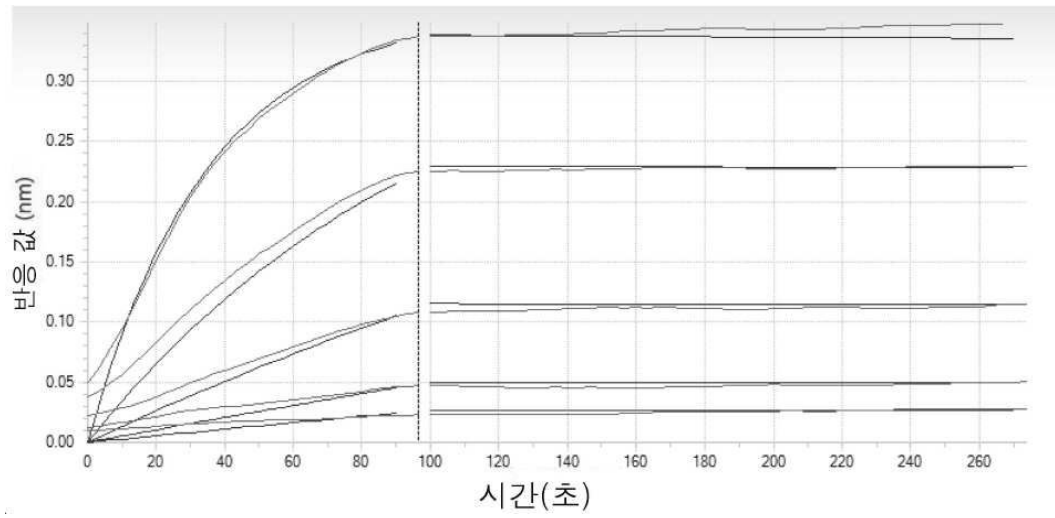
도면21



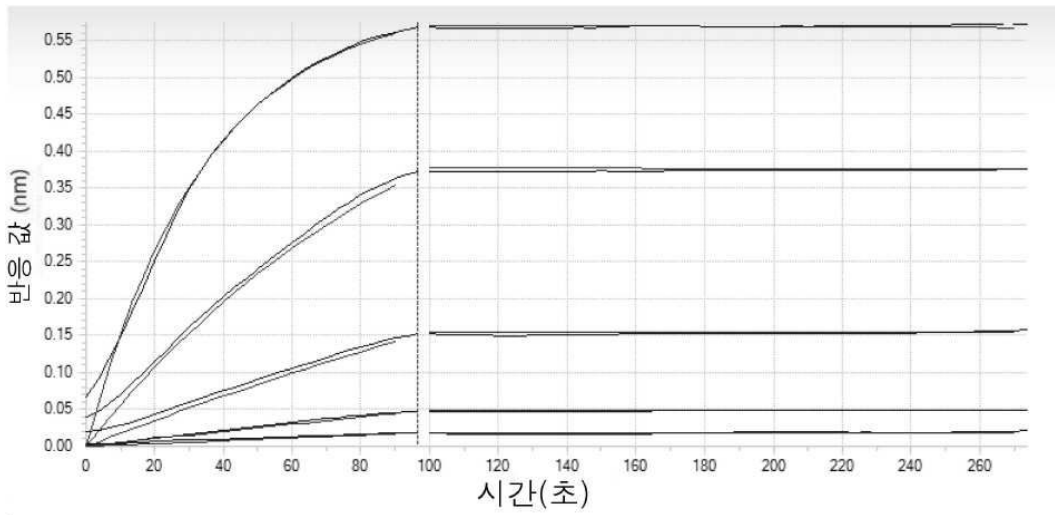
도면22



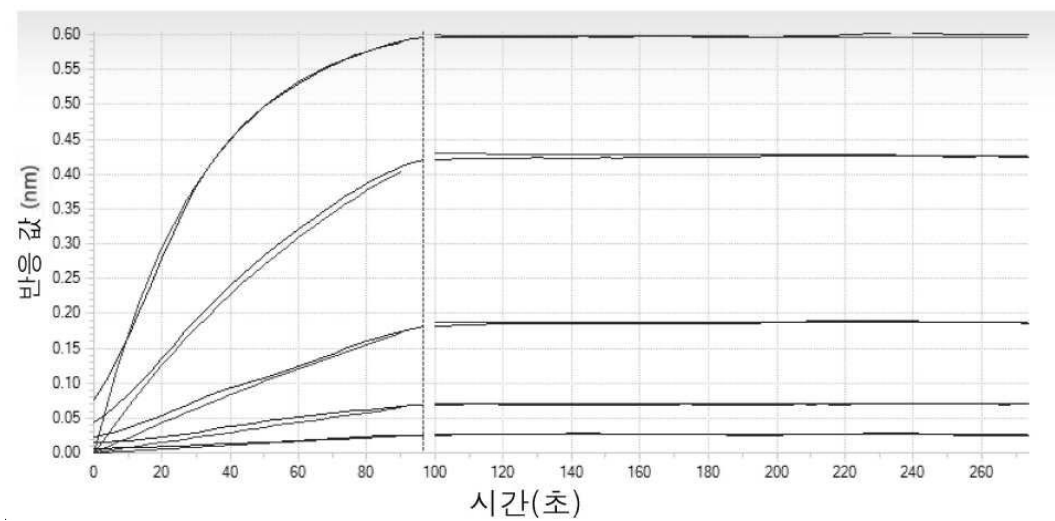
도면23



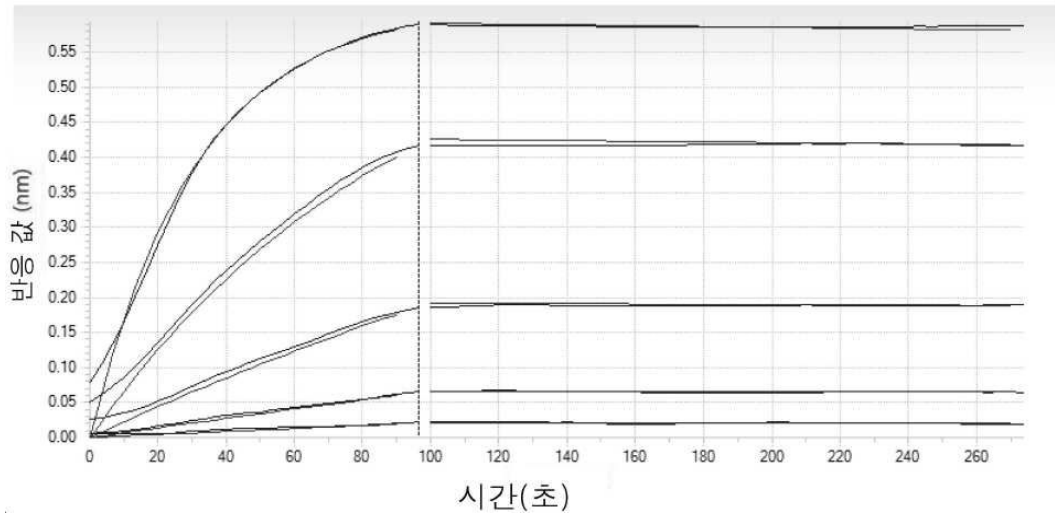
도면24



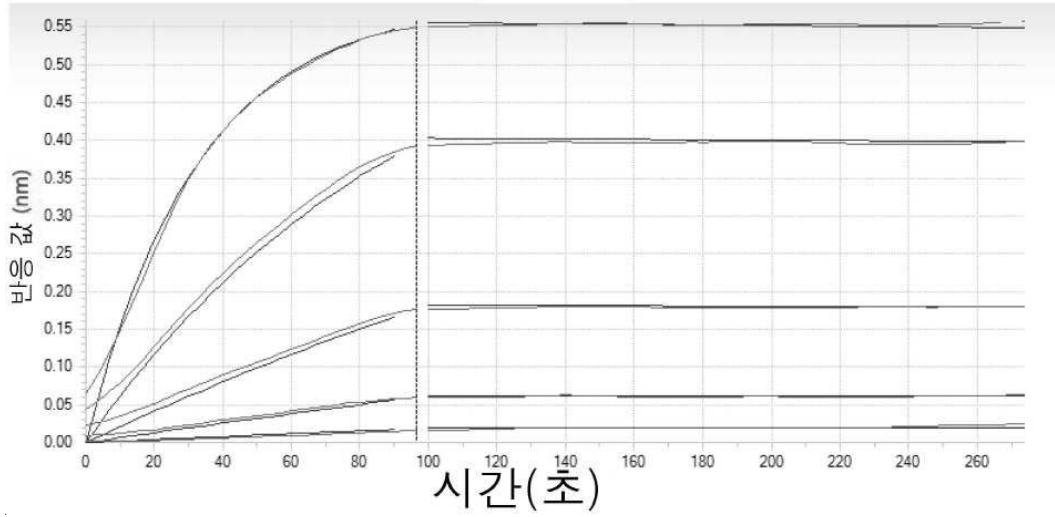
도면25



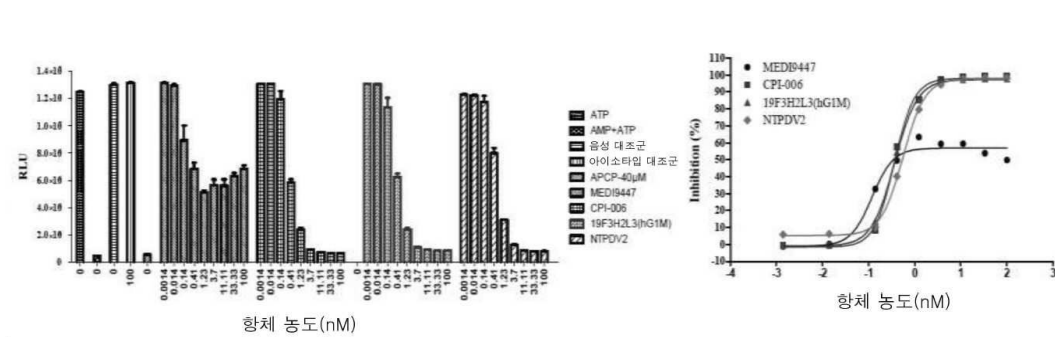
도면26



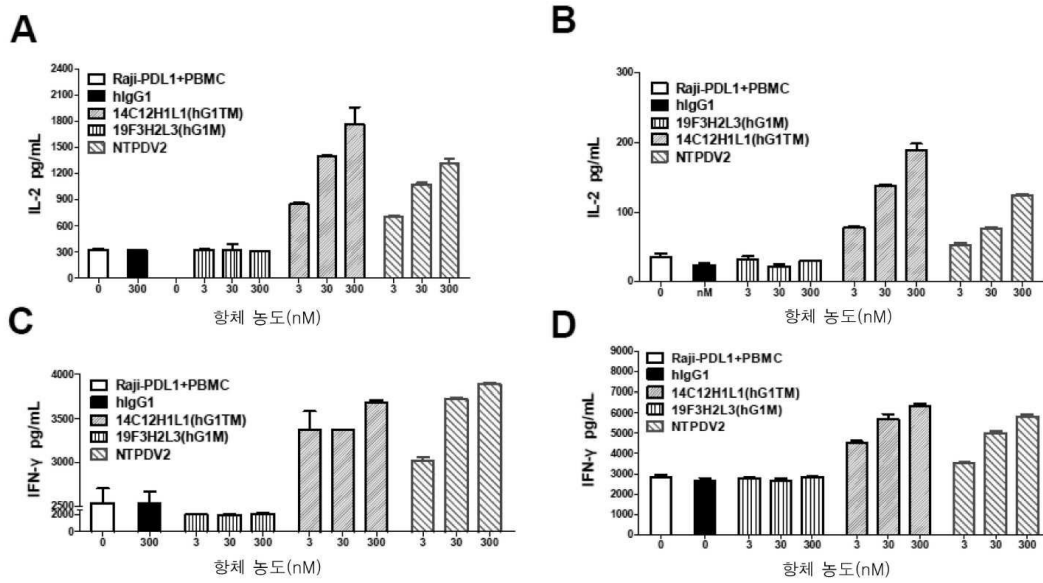
도면27



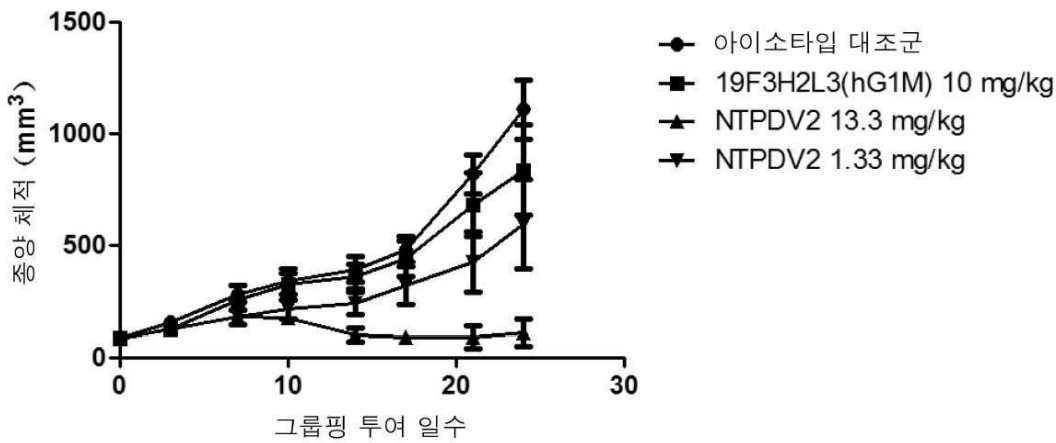
도면28



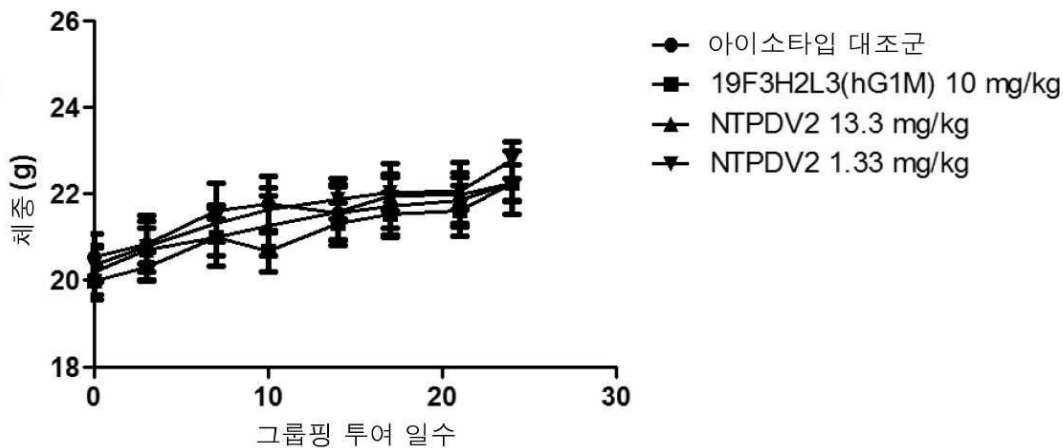
도면29



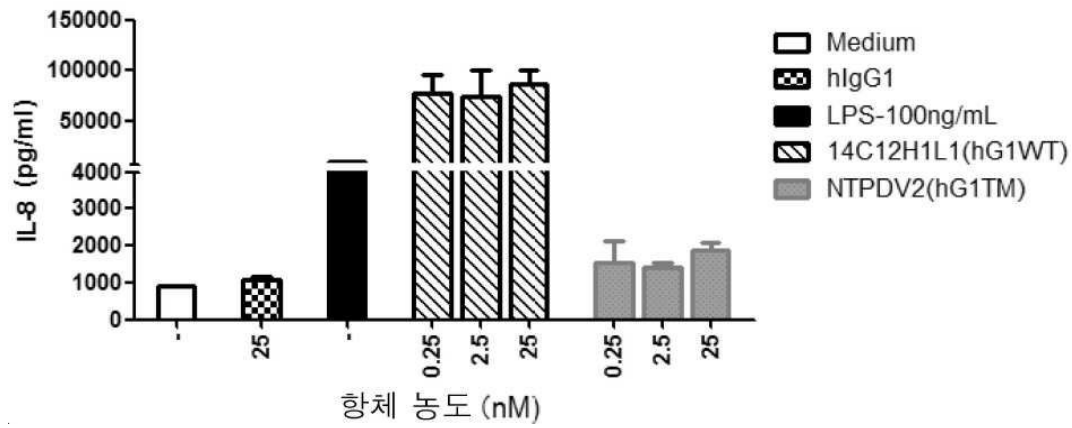
도면30



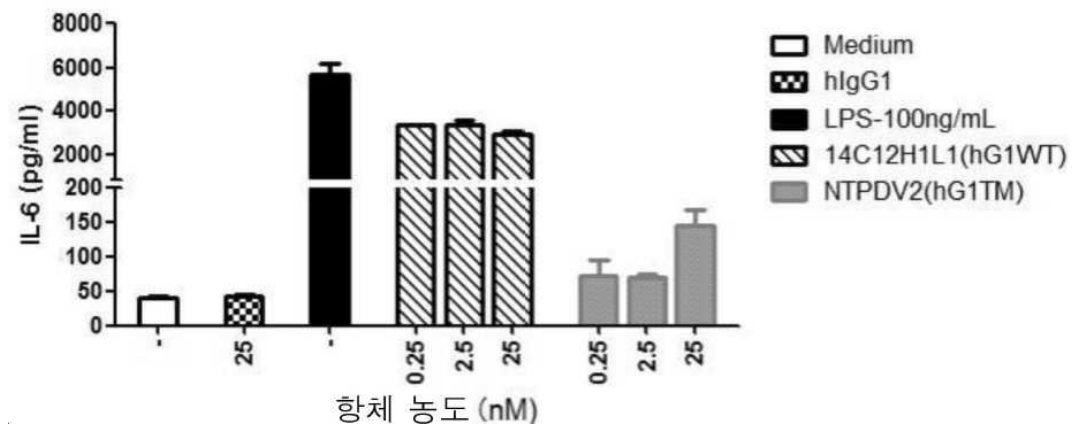
도면31



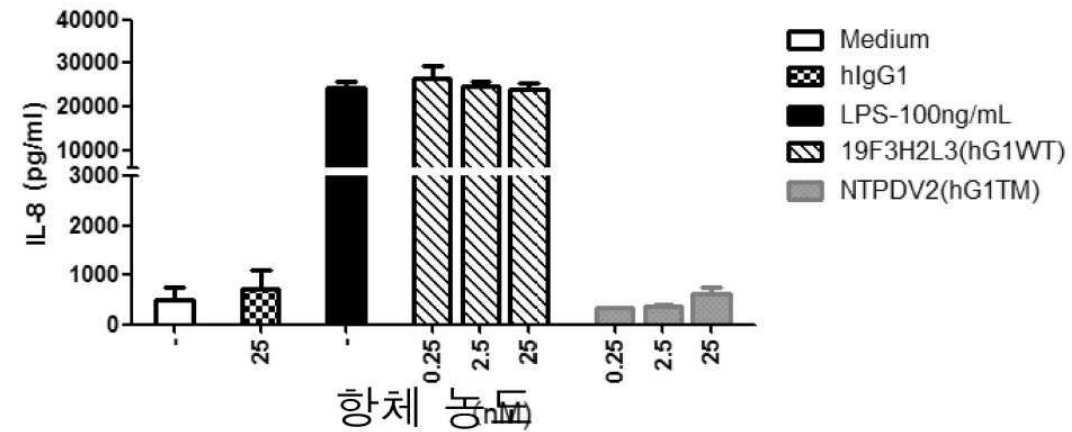
도면32



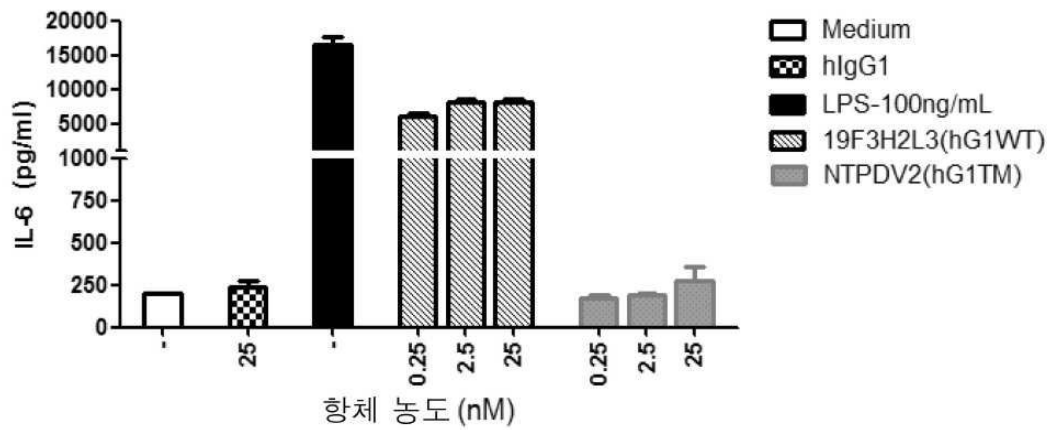
도면33



도면34



도면35



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Akeso Biopharma, Inc

<120> Anti-CD73-Anti-PD-1 Bispecific Antibody and Use thereof

<130> IP190597

<160> 100

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 1

gaggtgcagc tgcagcagtc cggaccagag ctggtgaagc ctggcgctc catgcgcatg 60

tcttgaagg cctctggcta cagcttcacc ggctatacaa tgaactgggt gaagcagctc 120

cacggcaaga atctggagtg gatcgccctg atcaaccctt acaatgccgg caccagctat 180

aaccagaagt ttaagggcaa ggccaccctg acagtggaca agagctcctc taccgcctac 240

atggagctgc tgtccctgac atctgaggat agcgccgtgt actattgcgc ccggtccgag 300

tacagatatg gcggcgacta ctttgattat tggggccagg gcaccacact gacagtgagc 360

tcc 363

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Ala Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Glu Tyr Arg Tyr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 3

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr

1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 4

Ile Asn Pro Tyr Asn Ala Gly Thr

1 5

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 5

Ala Arg Ser Glu Tyr Arg Tyr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 6

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 6

gacatcgtga tgaccagtc tccaagctcc ctggcaatga gcgtgggaca gaaggtagaca	60
atgtcttgta agtctagcca gagcctgctg aactcctcta atcagaagaa ctacctggcc	120
tggtatcagc agaagccagg ccagctctcc aagctgctgg tgtactttgc cagcaccagg	180
gagtcgggag tgctgacag attcatcggc tccggctctg gcacagactt caccctgaca	240
atcagctccg tgcaggcaga ggacctggca gattatttct gccagcagca ctacgacacc	300
ccttatacat ttggcggcgg caccaagctg gagatcaag	339

<210> 7

<211> 113

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 8

Gln Ser Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 9

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 9

Phe Ala Ser

1

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 10

Gln Gln His Tyr Asp Thr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 11

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 11

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

1 5 10 15

Ser Met Arg Met Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 12

Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10 15

Leu

<210> 13

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 13

Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 14

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 15

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 15

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

1 5 10 15

Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser

20 25

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 16

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

1 5 10 15

Tyr

<210> 17

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 17

Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Tyr Phe Cys

35

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 18

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 19

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 19

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtggtgaagc caggagcctc tgtgaaggtg 60

agctgtaagg ccagcggcta ctcttcacc ggctatacaa tgaactgggt gaggcaggca 120

ccaggacaga atctggagtg gatcggcctg atcaaccctt acaatgccgg cacctcttat 180

aaccagaagt ttcagggcaa ggtgaccctg acagtggaca agtccacctc tacagcctac 240

atggagctga gtcacctgag gagcgaggat acagccgtgt actatgctgc ccggtccgag 300

tacagatatg gcggcgacta ctttgattat tggggccagg gcaccacact gaccgtgtct 360

agc 363

<210> 20

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 20

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Ala Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr 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 Ser Glu Tyr Arg Tyr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 21

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 21

gacatcgtga tgaccagtc cccaagctcc ctggccgtgt ctgtgggaga gcggtgaca 60
 atctcctgta agtctagcca gtctctgtg aactcctcta atcagaagaa ctacctggcc 120
 tggatatcagc agaagcccg ccaggccct aagctgctga tctacttcgc ctctaccagg 180
 gagagcggag tgccagacag attctctggc agcggctccg gcacagactt caccctgaca 240
 atcagctccg tgcaggcaga ggacgtggca gattactatt gccagcagca ctacgatacc 300
 ccctatacat ttggcggcgg caccaagctg gagatcaag 339

<210> 22

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 22

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

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

100 105 110

Lys

<210> 23

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 23

gacatcgtga tgaccagtc cccaagctcc ctggccgtgt ctgtgggaga gcgggtgaca 60

atctcctgta agtctagcca gtctctgctg aactcctcta atcagaagaa ctacctggcc 120

tggtatcagc agaagcccg ccagccct aagctgctga tctacttcgc ctctaccagg 180

gagagcggag tgccagacag attctctggc agcggctccg gcacagactt caccctgaca 240

atcagctccc tgcaggcaga ggacgtggcc gtgtactatt gccagcagca ctacgatacc 300

ccctatacat ttggcggcgg caccaagctg gagatcaag 339

<210> 24

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 24

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Lys

<210> 25

<211> 1356

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 25

caggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtggtgaagc caggagcctc tgtgaaggtg 60

agctgtaagg ccagcggcta ctccttcacc ggctatacaa tgaactgggt gaggcaggca 120

ccaggacaga atctggagtg gatcggcctg atcaaccctt acaatgccgg cacctcttat 180
aaccagaagt ttcagggcaa ggtgaccctg acagtggaca agtccacctc tacagcctac 240
atggagctga gctccctgcg gagcgaggat acagccgtgt actattgcgc ccggtccgag 300

tacagatatg gcggcgacta ctttgattat tggggccagg gcaccacact gaccgtgtct 360
agcgctcca caaaggggcc cagcgtgttt cctctgccc cctcctcaa aagcaccagc 420
ggaggaaccg ctgctctcgg atgtctggtg aaggactact tccctgaacc cgtcacctg 480
agctggaata gcggcgctct gacaagcgga gtccatacat tccctgctgt gctgcaaagc 540
agcggactct attccctgtc cagcgtctgc acagtgccca gcagcagcct gggcaccag 600
acctacatct gtaacgtcaa ccacaagccc tccaacacca aggtggacaa gaaagtggag 660
cccaaatcct gcgacaagac acacacctgt cccccctgtc ctgctcccga agctgctgga 720

ggccctagcg tcttctcttt tcttcccaaa cccaaggaca cctcatgat cagcagaacc 780
cctgaagtca cctgtgtcgt cgtggatgtc agccatgagg accccgaggt gaaattcaac 840
tggtatgtcg atggcgtcga ggtgcacaac gccaaaacca agcccaggga ggaacagtac 900
aactccacct acagggtggt gtccgtgctg acagtctcc accaggactg gctgaacggc 960
aaggagtaca agtgcaaggt gtccaacaag gctctccctg ccccatgtga gaagaccatc 1020
agcaaggcca aaggccaacc caggagccc caggtctata cactgcctcc ctccaggac 1080
gaactacca agaaccaggt gtccctgacc tgcctggtca agggctttta tcccagcgac 1140

atcgccgtcg agtgggagtc caacggacag cccgagaata actacaagac caccctcct 1200
gtcctcgact ccgacgctc cttcttcttg tacagcaagc tgaccgtgga caaaagcagg 1260
tggcagcagg gaaacgtgtt ctctgcagc gtgatgcacg aagccctcca caaccactac 1320
accagaaaa gcctgtccct gagccccggc aaatga 1356

<210> 26

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Ala Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr 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 Ser Glu Tyr Arg Tyr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

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

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

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

 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 27

<211> 660

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 27

gacatcgtga tgaccagtc cccaagctcc ctggccgtgt ctgtgggaga gcggtgaca	60
atctcctgta agtctagcca gtctctgctg aactcctcta atcagaagaa ctacctggcc	120
tggtatcagc agaagcccg ccaggccct aagctgctga tctacttcgc ctctaccagg	180

gagagcggag tgccagacag attctctggc agcggctccg gcacagactt caccctgaca 240
atcagctccc tgcaggcaga ggacgtggcc gtgtactatt gccagcagca ctacgatacc 300
ccctatacat ttggcggcgg caccaagctg gagatcaagc gtacggtggc agcccatct 360
gtcttcattt ttccccctag tgacgagcag ctgaaatccg gaacagcctc tgtggtctgt 420

ctgctgaaca atttctaccc tcgcaagcc aaggtgcagt ggaaagtcga taacgtctg 480
cagagtggca attcacagga gagcgtgact gaacaggact ccaaggattc tacctatagt 540
ctgagctcca ctctgacct gtccaaagca gattacgaaa agcacaaagt gtatgcctgt 600
gaggtcacc accaggggct gagttctcca gtcaccaaat ccttcaacag aggcgatgt 660

<210> 28

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 28

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

130	135	140	
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu			
145	150	155	160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp			
	165	170	175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr			
	180	185	190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser			
195	200	205	
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210	215	220	
<210> 29			
<211> 1356			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Synthetic Artificial Sequence			
<400> 29			
cagggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtggtgaagc caggagcctc tgtgaaggtg	60		
agctgtaagg ccagcggcta ctcttcacc ggctatacaa tgaactgggt gaggcaggca	120		
ccaggacaga atctggagtg gatcggcctg atcaaccctt acaatgccgg cacctcttat	180		
aaccagaagt ttcagggcaa ggtgaccctg acagtggaca agtccacctc tacagcctac	240		
atggagctga gtcacctgcg gagcaggat acagccgtgt actatgctgc ccggtccgag	300		
tacagatatg gcggcgacta ctttgattat tggggccagg gcaccacact gaccgtgtct	360		
agcgctcca caaaggggcc cagcgtgttt cctctgccc cctctccaa aagcaccagc	420		
ggaggaaccg ctgctctcgg atgtctggtg aaggactact tcctgaacc cgtcacctg	480		
agctggaata gcggcgctct gacaagcgga gtccatacat tcctgctgt gctgcaaagc	540		
agcggactct attccctgtc cagcgtctc acagtgccca gcagcagcct gggcaccag	600		
acctacatct gtaacgtcaa ccacaagccc tccaacacca aggtggacaa gaaagtggag	660		
cccaaactct gcgacaagac acacacctgt cccccctgtc ctgctcccga agctgctgga	720		
gccccagcg tcttctcttt tcttcccaaa cccaaggaca cctcatgat cagcagaacc	780		
cctgaagtca cctgtgtcgt cgtggatgtc agccatgagg accccgaggt gaaattcaac	840		

tggtatgtcg atggcgtcga ggtgcacaac gccaaaacca agcccaggga ggaacagtac 900
aactccacct acagggtggt gtccgtgctg acagtcctcc accaggactg gctgaacggc 960
aaggagtaca agtgcaaggt gtccaacaag gctctccctg cccccattga gaagaccatc 1020
agcaaggcca aaggccaacc caggagagccc caggtctata cactgcctcc ctccagggac 1080

gaactcacca agaaccaggt gtccctgacc tgcctggtca agggctttta tcccagcgac 1140
atcgccgtcg agtgggagtc caacggacag cccgagaata actacaagac caccctcct 1200
gtcctcgact ccgacggctc cttcttcttg tacagcaagc tgaccgtgga caaagcagg 1260
tggcagcagg gaaacgtgtt ctctgcagc gtgatgcagc aagccctcca caaccactac 1320
accagaaaa gcctgtccct gagccccggc aaatga 1356

<210> 30

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 30

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

1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

20 25 30
Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Asn Leu Glu Trp Ile

35 40 45
Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Ala Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

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

100 105 110
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

195 200 205

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

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly

225 230 235 240

Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

305 310 315 320

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

325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

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

405 410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435 440 445
Pro Gly Lys

450

<210> 31

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 31

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 32

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

1 5 10 15

Leu

<210> 33

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 33

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 34

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 35

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 35

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Ser Cys Lys Ser Ser

20 25

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 36

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

1 5 10 15

Tyr

<210> 37

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 37

Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Tyr Tyr Cys

35

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 38

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 39

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 39

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Ser Cys Lys Ser Ser

20 25

<210> 40

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 40

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

1 5 10 15

Tyr

<210> 41

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 41

Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 42

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 43

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 43

```
gaggtcaaac tgggtggagag cggcggcggg ctggtgaagc cggcggggtc actgaaactg      60
agctgcgccg cttccggctt cgcctttagc tcctacgaca tgtcatgggt gaggcagacc      120
cctgagaagc gcctggaatg ggtcgtact atcagcggag gcgggcgata cacctactat      180
cctgactctg tcaaaggag attcacaatt agtcgggata acgccagaaa tactctgtat      240
ctgcagatgt ctagtctgcg gtccgaggat acagctctgt actattgtgc aaaccggtac      300
ggcgaagcat ggittgccta ttggggacag ggcaccctgg tgacagtctc tgcc          354
```

<210> 44

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 44

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

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

100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ala		
115		
<210> 45		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Synthetic Artificial Sequence		
<400> 45		
Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Asp		
1	5	
<210> 46		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Synthetic Artificial Sequence		
<400> 46		
Ile Ser Gly Gly Gly Arg Tyr Thr		
1	5	
<210> 47		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Synthetic Artificial Sequence		
<400> 47		
Ala Asn Arg Tyr Gly Glu Ala Trp Phe Ala Tyr		
1	5	10
<210> 48		
<211> 321		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Synthetic Artificial Sequence		
<400> 48		

gacattaaga tgacacagtc ccttcctca atgtacgcta gcctgggcga gcgagtacc 60
 ttcacatgca aagcatcca ggacatcaac acatacctgt cttggtttca gcagaagcca 120
 ggcaaaagcc ccaagaccct gatctaccgg gccaatagac tggtaggacgg ggtccccagc 180
 agattctccg gatctggcag tgggcaggat tactccctga ccatcagctc cctggagtat 240

gaagacatgg gcattacta ttgcctgcag tatgatgagt tccctctgac ctttgagca 300
 ggcacaaaac tggaactgaa g 321

<210> 49

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 49

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Phe Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Thr Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr

65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 50

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 50

Gln Asp Ile Asn Thr Tyr

1 5

<210> 51

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 51

Arg Ala Asn

1

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 52

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 53

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 53

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 54

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 54

Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala

1 5 10 15

Thr

<210> 55

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 55

Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

35

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 56

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

1 5 10

<210> 57

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 57

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Phe Thr Cys Lys Ala Ser

20

25

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 58

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

1

5

10

15

Tyr

<210> 59

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 59

Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1

5

10

15

Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr Glu Asp Met Gly

20

25

30

Ile Tyr Tyr Cys

35

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 60

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

1

5

10

<210> 61

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 61

gaagtgcagc tggtcgagtc tgggggaggg ctggtgcagc ccggcgggtc actgcgactg	60
agctgcgcag cttccggatt cgccttttagc tctacgaca tgtcctgggt gcgacaggca	120
ccaggaaagg gactggattg ggtcgctact atctcaggag gcgggagata cacctactat	180
cctgacagcg tcaagggccg gttcacaatc tctagagata acagtaagaa caatctgtat	240
ctgcagatga acagcctgag ggctgaggac accgcactgt actattgtgc caaccgtac	300
ggggaagcat ggittgccta ttgggggcag ggaaccctgg tgacagtctc tagt	354

<210> 62

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 62

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

Ala Asn Arg Tyr Gly Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100	105	110
-----	-----	-----

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 63

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 63

gacattcaga tgactcagag cccctcctcc atgtccgcct ctgtgggcga cagggtcacc 60
 ttcacatgcc gcgctagtca ggatatcaac acctacctga gctggtttca gcagaagcca 120
 gggaaaagcc ccaagacact gatctaccgg gctaataagac tgggtgtctgg agtcccaagt 180
 cggttcagtg gctcagggag cggacaggac tacactctga ccatcagctc cctgcagcct 240
 gaggacatgg caacctacta ttgcctgcag tatgatgagt tcccactgac ctttggcgcc 300

gggacaaaac tggagctgaa g 321

<210> 64

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 64

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

100

105

<210> 65

<211> 1344

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 65

gaagtgcagc tggtcgagtc tgggggaggg ctggtgcagc ccggcgggtc actgcgactg 60
agctgcgcag cticcggatt cgccttttagc tctacgaca tgtcctgggt gcgacaggca 120
ccaggaaagg gactggattg ggtcgtact atctcaggag gcgggagata cacctactat 180
cctgacacgc tcaagggccg gttcacaatc tctagagata acagtaagaa caatctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag ggctgaggac accgcactgt actattgtgc caaccgtac 300
ggggaagcat ggtttccta ttgggggcag ggaaccctgg tgacagtctc tagtgccagc 360

accaaaggac ctacgtgttt tctctcgc ccctcctcca aaagcaccag cggaggaacc 420
gctgctctcg gatgtctggt gaaggactac ttccctgaac ccgtcaccgt gagctggaat 480
agcggcgctc tgacaagcgg agtcacatac ttccctgctg tgctgcaaag cagcggactc 540
tattccctgt ccagcgtcgt cacagtgecc agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600
tgtaactga accacaagcc ctccaacacc aaggtggaca agaaagtga gcccaaatcc 660
tgcgacaaga cacacacctg tccccctgt cctgtcccg aactcctcgg aggccttagc 720
gtcttctctt ttctcctcaa acccaaggac accctcatga tcagcagaac ccctgaagtc 780

acctgtgtcg tcgtggatgt cagccatgag gaccccagg tgaaattcaa ctggtatgtc 840
gatggcgctc aggtgcacaa cgccaaaacc aagcccagg aggaacagta caactccacc 900
tacagggtgg tgtccgtgct gacagtctc caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
aagtgaagg tgtccaacaa ggctctcctt gccccattg agaagaccat cagcaaggcc 1020
aaaggccaac ccaggagacc ccaggtctat aactgcctc cctccaggga cgaactcacc 1080
aagaaccagg tgtccctgac ctgcctgggtc aagggtcttt atcccagcga catcgccgtc 1140
gagtgggagt ccaacggaca gcccgagaat aactacaaga ccaccctcc tgtctcgcac 1200

tccgacggct ccttcttct gtacagcaag ctgaccgtgg aaaaagcag gtggcagcag 1260
ggaaactgtt tctcctgcag cgtgatgcac gaagccctcc acaaccacta caccagaaa 1320
agcctgtccc tgagccccgg caaa 1344

<210> 66

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 66

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Asn Arg Tyr Gly Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu 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 His Glu Asp Pro

260 265 270

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

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 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 Ala Leu Pro Ala Pro 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 Arg Asp Glu Leu 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 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

405 410 415

Arg Trp Gln Gln 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 Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 67

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 67

gacattcaga tgactcagag cccctcctcc atgtccgcct ctgtgggcga cagggtcacc 60

ttcacatgcc gcgctagtca ggatatcaac acctacctga gctggtttca gcagaagcca 120

gggaaaagcc ccaagacact gatctaccgg gctaatagac tgggtgtctgg agtcccaagt 180

cggttcagtg gctcaggag cggacaggac tacactctga ccatcagctc cctgcagcct 240

gaggacatgg caacctacta ttgcctgcag tatgatgagt tccactgac ctttggcgcc 300

gggacaaaac tggagctgaa gcgaactgtg gccgctccct ccgtcttcat ttttcccct 360

tctgacgaac agctgaaatc aggcacagcc agcgtggtct gtctgctgaa caatttctac 420

cctagagagg caaaagtga gtggaaggtc gataacgccc tgcagtccgg caacagccag 480

gagagtgtga ctgaacagga ctcaaaagat agcacctatt cctgtctag tacactgact 540

ctgtccaagg ctgattacga gaagcacaaa gtgtatgcat gcgaagtac acatcaggga 600

ctgtcaagcc ccgtgactaa gtcttttaac cggggcgaat gt 642

<210> 68

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 68

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Thr Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Met Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu

85

90

95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu 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> 69

<211> 1344

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 69

gaagtgcagc tggtcgagtc tgggggaggg ctggtgcagc ccggcgggtc actgcgactg 60

agctgcgcag ctcccgatt cgcctttagc tctacgaca tgtcctgggt gcgacaggca 120

ccaggaaagg gactggattg ggctgctact atctcaggag gcgggagata cacctactat 180

cctgacagcg tcaagggccg gttcacaatc tctagagata acagtaagaa caatctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag ggctgaggac accgcactgt actattgtgc caaccgctac 300

ggggaagcat ggtttccta ttgggggcag ggaaccctgg tgacagtctc tagtgccagc 360

accaaagggc ccagcgtgtt tctctcgc ccctcctcca aaagcaccag cggaggaacc 420

gtgtctctcg gatgtctggt gaaggactac ttccctgaac ccgtcaccgt gagctggaat 480
 agcggcgctc tgacaagcgg agtccataca ttccctgctg tgctgcaaag cagcggactc 540
 tattccctgt ccagcgtcgt cacagtgcc agcagcagcc tgggcacca gacctacatc 600
 tgtaacgtca accacaagcc ctccaacacc aagggtggaca agaaagtgga gcccaaatcc 660
 tgcgacaaga cacacacctg tccccctgt cctgctcccg aagctgctgg agcccctagc 720
 gtcttctctt ttcttccaa acccaaggac acctcatga tcagcagaac cctgaagtc 780

acctgtgtcg tcgtggatgt cagccatgag gaccccgagg tgaaattcaa ctggatatgc 840
 gatggcgctc aggtgcacaa cgccaaaacc aagcccaggg aggaacagta caactccacc 900
 tacagggtgg tgtccgtgct gacagtcttc caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
 aagtgcagg tgtccaacaa ggctctcctt gccccattg agaagaccat cagcaaggcc 1020
 aaaggccaac ccaggagacc ccaggtctat aactgcctc cctccaggga cgaactcacc 1080
 aagaaccagg tgtccctgac ctgcctggtc aagggtcttt atcccagcga catcgccgtc 1140
 gagtgggagt ccaacggaca gcccgagaat aactacaaga ccaccctcc tgtcctcgac 1200

tccgacggct ccttcttctt gtacagcaag ctgaccgtgg acaaaagcag gtggcagcag 1260
 ggaaacgtgt tctcctgcag cgtgatgcac gaagccctcc acaaccacta caccagaaa 1320
 agcctgtccc tgagccccgg caaa 1344

<210> 70

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 70

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Asn Arg Tyr Gly Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala 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 His Glu Asp Pro

260 265 270

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

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 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 Ala Leu Pro Ala Pro 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 Arg Asp Glu Leu 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 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

405 410 415
Arg Trp Gln Gln 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 Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 71

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 71

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 72

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 72

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val Ala

1 5 10 15
Thr

<210> 73

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 73

Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

35

<210> 74

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 74

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 75

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 75

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Arg Ala Ser

20 25

<210> 76

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 76

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

1 5 10 15

Tyr

<210> 77

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 77

Arg Leu Val Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gln Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Met Ala

20 25 30

Thr Tyr Tyr Cys

35

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 78

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

1 5 10

<210> 79

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 79

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 80

<211> 60

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 80

ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggctcc ggaggaggcg gctctggcgg cggcggcagc 60

<210> 81

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 81

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 82

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 82

ggcggcggcg gctccggagg aggcggctct ggccggcgcg gcagc 45

<210> 83

<211> 717

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 83

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Ala Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr 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 Ser Glu Tyr Arg Tyr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

195 200 205

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

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly

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

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

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

 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 450 455 460
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
 465 470 475 480

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

485 490 495

Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro

500 505 510

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

515 520 525

Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

530 535 540

Asn Ser Lys Asn Asn Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu

545 550 555 560

Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Asn Arg Tyr Gly Glu Ala Trp Phe

565 570 575

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

580 585 590

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu

645 650 655

Ile Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser

660 665 670

Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln

675 680 685

Pro Glu Asp Met Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro

690 695 700

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

705 710 715

<210> 84

<211> 2151

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 84

caggtgcagc tggatgcagtc tggagcagag gtggtgaagc caggagcctc tgtgaaggtg	60
agctgtaagg ccagcggcta ctcttcacc ggctatacaa tgaactgggt gaggcaggca	120
ccaggacaga atctggagtg gatcggcctg atcaaccctt acaatgccgg cacctcttat	180
aaccagaagt ttcagggcaa ggtgacctg acagtggaca agtccacctc tacagcctac	240
atggagctga gtcctctcgc gagcaggat acagccgtgt actattgcgc ccggtccgag	300
tacagatatg gcggcgacta ctttgattat tggggccagg gcaccacact gaccgtgtct	360
agcgcctcca caaaggggcc cagcgtgttt cctctcgccc cctctccaa aagcaccagc	420
ggaggaaccg ctgctctcgg atgtctggtg aaggactact tccctgaacc cgtcacctg	480
agctggaata gcggcgctct gacaagcgga gtccatacat tccctgctgt gctgcaaagc	540
agcggactct attccctgtc cagcgtcgtc acagtgccca gcagcagcct gggcacccag	600
acctacatct gtaacgtcaa ccacaagccc tccaacacca aggtggacaa gaaagtggag	660
cccaaatcct gcgacaagac acacacctgt cccctctgtc ctgctccga agctgctgga	720
gcccctagcg tcttctcttt tcttccaaa cccaaggaca ccctcatgat cagcagaacc	780
cctgaagtca cctgtgtcgt cgtggatgtc agccatgagg accccgaggt gaaattcaac	840
tggatatgtc atggcgtcga ggtgcacaac gccaaaacca agcccaggga ggaacagtac	900
aactccacct acaggggtgt gtccgtgtg acagtcctcc accaggactg gctgaacggc	960
aaggagtaca agtgcaaggt gtccaacaag gctctccctg ccccatgtga gaagaccatc	1020
agcaaggcca aaggccaacc caggagccc caggtctata cactgcctcc ctccaggac	1080
gaactacca agaaccaggt gtccctgacc tgctgtgtca agggctttta tcccagcgac	1140
atcgccgtcg agtgggagtc caacggacag cccgagaata actacaagac caccctcct	1200
gtcctcgact ccgacggctc cttcttctg tacagcaaac tgaccgtcga taaatctagg	1260
tggcagcagg gcaacgtgtt ctcttgttcc gtgatgatg aagcactgca caaccattat	1320
accagaagt ctctgagcct gtccccggc aaggcgccg gcggctctgg aggaggaggc	1380
agcggcggag gaggtctcgg aggcggcggc tctgaggtgc agctggtgga gtctggagga	1440
ggactggtgc agcctggagg ctccctgagg ctgtcttgcg cagcaagcgg attcgccttt	1500
agctcctacg acatgagctg ggtgcggcag gcacctggca aggtctgga ttgggtggca	1560

accatcagcg gaggcggcag atacacatac tatcccgact ccgtgaaggg caggttcacc 1620
atctcccgcg ataactctaa gaacaatctg tatctgcaga tgaacagcct gagggccgag 1680
gacacagccc tgtactattg cgccaaccgc tacggcgagg cctggtttgc ctattggggc 1740
cagggcaccc tggtagacagt gtctagcggc ggcgggcgga gcggcgggcg cggtccgga 1800

ggaggcggct ctggcgggcg cggcagcgat atccagatga ccagtcgcc ctcctctatg 1860
tctgccagcg tggcgaccg ggtgaccttc acatgtagag cctcccagga tatcaacacc 1920
tacctgtctt ggtttcagca gaagcccggc aagagcccta agacactgat ctatcggggc 1980
aatagactgg tgagcggagt gccttcccgg ttctccggct ctggcagcgg acaggactat 2040
accctgacaa tcagctccct gcagccagag gatatggcca catactattg cctgcagtat 2100
gacgagttcc ccctgacctt cggggctggc actaagctgg agctgaaaag a 2151

<210> 85

<211> 712

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 85

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Ala Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr 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 Ser Glu Tyr Arg Tyr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 225 230 235 240
 Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435 440 445

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro

500 505 510

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

515 520 525

Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

530 535 540

Asn Ser Lys Asn Asn Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu

545 550 555 560

Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Asn Arg Tyr Gly Glu Ala Trp Phe

565 570 575

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

580 585 590

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met

595 600 605

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr

610	615	620	
Phe Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Phe			
625	630	635	640
Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Arg Ala Asn			
	645	650	655
Arg Leu Val Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly			
	660	665	670
Gln Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Met Ala			
	675	680	685
Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala			
690	695	700	
Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg			
705	710		
<210> 86			
<211> 2148			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Synthetic Artificial Sequence			
<400> 86			
caggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtggtgaagc caggagcctc tgtgaaggtg	60		
agctgtaagg ccagcggcta ctcttcacc ggctatacaa tgaactgggt gaggcaggca	120		
ccaggacaga atctggagtg gatcggcctg atcaaccctt acaatgccgg cacctcttat	180		
aaccagaagt ttcagggcaa ggtgaccctg acagtggaca agtccacctc tacagcctac	240		
atggagctga gctccctgcg gagcgaggat acagccgtgt actattgcgc ccggtccgag	300		
tacagatatg gcggcgacta ctttgattat tggggccagg gcaccacact gaccgtgtct	360		
agcgctcca caaaggggcc cagcgtgttt cctctcgccc cctcctcaa aagcaccagc	420		
ggaggaaccg ctgctctcgg atgtctggtg aaggactact tccctgaacc cgtcaccgtg	480		
agctggaata gcggcgctct gacaagcgga gtccatacat tccctgctgt gctgcaaagc	540		
agcggactct attccctgtc cagcgtcgtc acagtgccca gcagcagcct gggcacccag	600		
acctacatct gtaacgtcaa ccacaagccc tccaacacca aggtggacaa gaaagtggag	660		
cccaaactct gcgacaagac acacacctgt cccccctgtc ctgctcccga agctgctgga	720		

gcccctagcg tcttcctctt tcctcccaaa cccaaggaca ccctcatgat cagcagaacc 780
 cctgaagtca cctgtgtcgt cgtggatgtc agccatgagg accccgaggt gaaattcaac 840
 tggatatgtc atggcgctga ggtgcacaac gccaaaacca agcccaggga ggaacagtac 900
 aactccacct acaggggtgtt gtccgtgtc acagtctctc accaggactg gctgaacggc 960
 aaggagtaca agtgcaaggt gtccaacaag gctctcctg ccccatgga gaagaccatc 1020
 agcaaggcca aaggccaacc caggagccc cagggtctata cactgcctcc ctccaggac 1080

gaactcacca agaaccaggt gtccctgacc tgctgtgtca agggctttta tcccagcgac 1140
 atcgccgtcg agtgggagtc caacggacag cccgagaata actacaagac caccctctc 1200
 gtctctgact ccgacggctc ctctctctg tacagcaaac tgaccgtcga taaatctagg 1260
 tggcagcagg gcaacgtgtt ctctgttcc gtgatgcatg aagcactgca caaccattat 1320
 acccagaagt ctctgagcct gtccccggc aagggcggcg gcggctctgg aggaggaggc 1380
 agcggcggag gaggtctcgg aggcggcggc tctgaggtgc agctgggtga gtctggagga 1440
 ggactggtgc agcctggagg ctccctgagg ctgtcttgcg cagcaagcgg attcgcttt 1500

agctcctacg acatgagctg ggtgcggcag gcacctggca aggtcttga ttgggtggca 1560
 accatcagcg gaggcggcag atacacatac tatcccgact ccgtgaaggg cagggtcacc 1620
 atctcccgcg ataactctaa gaacaatctg tatctgcaga tgaacagcct gagggccgag 1680
 gacacagccc tgtactattg cgccaaccgc tacggcgagg cctggtttgc ctattggggc 1740
 cagggcaccc tggtagacgt gtctagcggc ggcggcggct ccggaggagg cggtctggc 1800
 ggcggcggca gcgatatcca gatgaccag tccccctcct ctatgtctgc cagcgtgggc 1860
 gaccgggtga ccttcacatg tagagcctcc caggatatca acacctacct gtcttggttt 1920

cagcagaagc ccggcaagag ccctaagaca ctgatctatc gggccaatag actggtgagc 1980
 ggagtgcctt cccgtttctc cggtcttggc agcggacagg actataccct gacaatcagc 2040
 tccctgcagc cagaggatat ggccacatac tattgcctgc agtatgacga gttccccctg 2100
 accttcgggg ctggcactaa gctggagctg aaaagatgat aagaattc 2148

<210> 87

<211> 558

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 87

Met Cys Pro Arg Ala Ala Arg Ala Pro Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu

1 5 10 15

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

 Leu Asp Ala Gly Asp Gln Tyr Gln Gly Thr Ile Trp Phe Thr Val Tyr
 85 90 95
 Lys Gly Ala Glu Val Ala His Phe Met Asn Ala Leu Arg Tyr Asp Ala
 100 105 110
 Met Ala Leu Gly Asn His Glu Phe Asp Asn Gly Val Glu Gly Leu Ile
 115 120 125
 Glu Pro Leu Leu Lys Glu Ala Lys Phe Pro Ile Leu Ser Ala Asn Ile
 130 135 140

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

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

Glu Val Pro Ala Gly Lys Tyr Pro Phe Ile Val Thr Ser Asp Asp Gly
260 265 270

Arg Lys Val Pro Val Val Gln Ala Tyr Ala Phe Gly Lys Tyr Leu Gly
275 280 285

Tyr Leu Lys Ile Glu Phe Asp Glu Arg Gly Asn Val Ile Ser Ser His
290 295 300

Gly Asn Pro Ile Leu Leu Asn Ser Ser Ile Pro Glu Asp Pro Ser Ile
305 310 315 320

Lys Ala Asp Ile Asn Lys Trp Arg Ile Lys Leu Asp Asn Tyr Ser Thr
325 330 335

Gln Glu Leu Gly Lys Thr Ile Val Tyr Leu Asp Gly Ser Ser Gln Ser
340 345 350

Cys Arg Phe Arg Glu Cys Asn Met Gly Asn Leu Ile Cys Asp Ala Met
355 360 365

Ile Asn Asn Asn Leu Arg His Thr Asp Glu Met Phe Trp Asn His Val
370 375 380

Ser Met Cys Ile Leu Asn Gly Gly Gly Ile Arg Ser Pro Ile Asp Glu
385 390 395 400

Arg Asn Asn Gly Thr Ile Thr Trp Glu Asn Leu Ala Ala Val Leu Pro
405 410 415

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

Lys Ala Phe Glu His Ser Val His Arg Tyr Gly Gln Ser Thr Gly Glu
435 440 445

Phe Leu Gln Val Gly Gly Ile His Val Val Tyr Asp Leu Ser Arg Lys
450 455 460

Pro Gly Asp Arg Val Val Lys Leu Asp Val Leu Cys Thr Lys Cys Arg
465 470 475 480

Val Pro Ser Tyr Asp Pro Leu Lys Met Asp Glu Val Tyr Lys Val Ile
485 490 495

Leu Pro Asn Phe Leu Ala Asn Gly Gly Asp Gly Phe Gln Met Ile Lys

500	505	510	
Asp Glu Leu Leu Arg His Asp Ser Gly Asp Gln Asp Ile Asn Val Val			
515	520	525	
Ser Thr Tyr Ile Ser Lys Met Lys Val Ile Tyr Pro Ala Val Glu Gly			
530	535	540	
Arg Ile Lys Phe Ser Thr Gly Ser His His His His His His			
545	550	555	
<210> 88			
<211> 1674			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Synthetic Artificial Sequence			
<400> 88			
atgtgtccta gagccgccag agctccagct aactgtctgc tggctctggg agcagtcctc	60		
tggccagcag caggagcttg ggaactgacc atcctgcaca ccaacgacgt gcacagcagg	120		
ctggaacaga ccagcgagga cagcagcaag tgcgtgaacg ccagtcgctg tatgggagga	180		
gtggcaaggc tgttcaccaa ggtgcagcag atccggagag ccgaacctaa cgtgctgctg	240		
ctggacgccg gagatcagta tcagggaacc atctgggtca ccgtgtacaa gggcgccgaa	300		
gtggcccact tcatgaacgc tctgcgtac gacgtatgg ccctgggcaa tcacgagttc	360		
gataacggcg tggagggact gatcgagcct ctgctgaagg aggccaagtt cccatcctg	420		
agcgccaaca tcaaggccaa gggacctctg gctagccaga ttagcggcct gtacctgcct	480		
tacaaggtgc tgcccgtggg agacgaagtg gtgggaatcg tgggtacac cagcaaggag	540		
acccctttcc tgagcaaccc aggcaccaac ctggtgttcg aggacgagat caccgtctcg	600		
cagccagagg tggacaagct gaagacctg aacgtgaaca agatcatcgc cctgggacac	660		
agcggcttcg agatggacaa gctgatcgcc cagaaagtgc gaggagtgga cgtggctcgtg	720		
ggcggacaca gcaacacctt cctgtacacc ggcaacctc cttctaagga agtgccagcc	780		
ggcaagtacc cttcatcgt gaccagcgac gacggaagaa aggtgccagt ggtgcaggct	840		
tacgccttcg gcaagtacct gggctacctg aagatcgagt tcgacgagcg gggcaacgtg	900		
atctctagcc acggcaaccc catcctgctg aacagcagca tcccagagga ccccagcatc	960		
aaggccgaca tcaacaagtg gcggatcaag ctggacaact acagcaccca ggagctggga	1020		
aagaccatcg tgiacctgga cggcagctct cagtcttgcc ggttcgcga gtgcaacatg	1080		

ggcaacctga ttgcgacgc catgatcaac aacaacctgc ggcacaccga cgagatgttt 1140
 tggaaccacg tcagcatgtg catcctgaac ggcggaggca tcagaagccc tattgacgag 1200
 cggaacaacg gcaccatcac ttgggagAAC ctggcagcag tgctgccttt tggcggaaca 1260
 ttcgacctgg tgcagctgaa gggcagcaca ctgaagaagg ccttcgagca cagcgtgcac 1320
 agatacggcc agagcacagg cgagttcctg caggtcggag gaatccacgt ggtgtacgac 1380

ctgagcagga agccaggaga cagagtgggtg aagctggacg tgctctgcac caagtgtcgg 1440
 gtgccaagct acgacccct gaagatggac gaggtgtaca aggtcatcct gccaacttc 1500
 ctggctaacg gaggagacgg cttccagatg atcaaggacg agctgctgag gcacgacagc 1560
 ggagaccagg acatcaacgt cgtgtccacc tacatcagca agatgaaggt catctacccc 1620
 gccgtggaag gcaggatcaa gttcagcacc ggctctcacc accacatca ccac 1674

<210> 89

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 89

Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala

1 5 10 15
 Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile

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

35 40 45
 Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val

50 55 60
 Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp

65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln

85 90 95
 Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp

100 105 110
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val

115 120 125

Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr

130 135 140

Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu

145 150 155 160

Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr

165 170 175

Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr

180 185 190

Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr

195 200 205

Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys

210 215 220

Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys

225 230

<210> 90

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 90

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ala His Gly Gln Asn Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Ala Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

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

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp
 210 215 220
 Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Asp Thr Pro Tyr Thr Phe
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 245

<210> 91

<211> 837

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 91

caggtgcagc tgcagcagtc tggagcagag gtggtgaagc caggagcctc tatgaagatg 60

agctgtaagg ccagcggcta ctccttcacc ggctatacaa tgaactgggt gaagcaggcc 120

cacggccaga atctggagtg gatcggcctg atcaaccctt acaatgccgg cacctcttat 180

aaccagaagt ttcagggcaa ggccaccctg acagtggaca agtccacctc tacagcctac 240

atggagctga gctccctgcg gagegaggat acagccgtgt actattgcgc ccggtccgag 300

tacagatatg gcggcgacta ctttgattat tggggccagg gcaccacact gaccgtgtct 360
agcggcctgt acggcctgta cggcctgtac ggccctgtaca gcgagagggg cctgtacggc 420
ctgtacggcc tgtacggcct gtacagcgag aggggcctgt acggcctgta cggcctgtac 480

ggcctgtaca gcgagaggga catcgtgatg acccagtcct caagctccct ggccgtgtct 540
gtgggagagc gggtgacaat ctctgtgaag tctagccagt ctctgtgaa ctctctaat 600
cagaagaact acctggcctg gtatcagcag aagcccgcc aggccctaa gctgctgac 660
tacttcgcct ctaccaggga gagcggagt ccagacagat tctctggcag cggctccggc 720
acagacttca cctgacaat cagctccgtg caggcagagg acgtggcaga ttactattgc 780
cagcagcact acgatacccc ctatacattt ggcgccggca ccaagctgga gatcaag 837

<210> 92

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 92

caggtgcagc tgcagcagtc tggagcagag gtggtgaagc caggagcctc tatgaagatg 60
agctgtaagg ccagcggtca ctcttcacc ggctatacaa tgaactgggt gaagcaggcc 120
cacggccaga atctggagtg gatcgccctg atcaaccctt acaatgccgg cacctcttat 180
aaccagaagt ttcagggcaa ggccaccctg acagtggaca agtccacctc tacagcctac 240
atggagctga gctccctgcg gagcgaggat acagccgtgt actattgcgc ccggtccgag 300
tacagatatg gcggcgacta ctttgattat tggggccagg gcaccacact gaccgtgtct 360

agc 363

<210> 93

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 93

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ala His Gly Gln Asn Leu Glu Trp Ile

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

100 105 110
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 94

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 94

gacatcgtga tgaccagtc cccaagctcc ctggcaatgt ctgtgggaga gagggtgaca 60
atgtcctgta agtctagcca gtctctgctg aactcctcta atcagaagaa ctacctggcc 120
tggatcagc agaagcccg ccaggcccct aagctgctgg tgtactttgc ctctaccagg 180
gagagcggag tgccagacag attctctggc agcggctccg gcacagactt caccctgaca 240

atcagctccg tgcaggcaga ggacctggca gattatttct gccagcagca ctacgatacc 300
ccctatacat ttggcggcgg caccaagctg gagatcaag 339

<210> 95

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 95

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

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

Ala Pro Lys Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

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

Lys

<210> 96

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 96

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

Glu Arg Val Thr Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

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

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln

85

90

95

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

100

105

110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

115

120

125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

130

135

140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215

220

<210> 97

<211

> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 97

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Ala Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Lys Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr 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 Ser Glu Tyr Arg Tyr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 98

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 98

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

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

Lys

<210> 99

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 99

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Lys

<210> 100

<211> 660

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 100

gacatcgtga tgacccagtc cccaagctcc ctggccgtgt ctgtgggaga gcggtgaca 60

atctctgta agtctagcca gtctctgtg aactctcta atcagaagaa ctacctggcc 120

tggtatcagc agaagcccg ccaggcccct aagctgtga tctacttcgc ctctaccagg 180

gagagcggag tgccagacag attctctggc agcggctccg gcacagactt caccctgaca 240

atcagctccg tgcaggcaga ggacgtggca gattactatt gccagcagca ctacgatacc 300

ccctatacat ttggcggcgg caccaagctg gagatcaagc gtacggtggc agcccatct 360

gtcttcattt ttccccctag tgacgagcag ctgaaatccg gaacagcctc tgtggctctgt	420
ctgctgaaca atttctaccc tcgcaagcc aaggtgcagt ggaaagtcga taacgctctg	480
cagagtggca attcacagga gagcgtgact gaacaggact ccaaggattc tacctatagt	540
ctgagctcca ctctgaccct gtccaaagca gattacgaaa agcacaaagt gtatgcctgt	600
gaggtcacc accaggggct gatttctcca gtcaccaa cttcaacag aggcgaatgt	660