



등록특허 10-2140984



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년08월06일
(11) 등록번호 10-2140984
(24) 등록일자 2020년07월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (2006.01) *A61K 38/06* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61K 47/68* (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/30 (2013.01)
A61K 38/06 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7017755(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2012년03월28일
심사청구일자 2019년07월19일
- (85) 번역문제출일자 2019년06월20일
- (65) 공개번호 10-2019-0074325
- (43) 공개일자 2019년06월27일
- (62) 원출원 특허 10-2013-7026861
원출원일자(국제) 2012년03월28일
심사청구일자 2017년03월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/CA2012/000296
- (87) 국제공개번호 WO 2012/129668
국제공개일자 2012년10월04일
- (30) 우선권주장
61/470,063 2011년03월31일 미국(US)
61/533,346 2011년09월12일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문현
KR101993259 B1
WO2010060186 A1

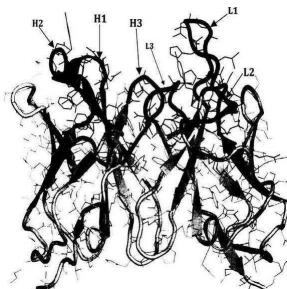
전체 청구항 수 : 총 40 항

심사관 : 최승희

(54) 발명의 명칭 신장 결합 항원 1에 대한 항체 및 이의 항원 결합 단편

(57) 요 약

본 발명은 KAAG1에 특이적으로 결합하는 신규한 항체 및 항원 결합 단편에 관한 것으로, 본원에는 상기 항체 및 항원 결합 단편이 KAAG1-발현 세포를 포함하는 암의 치료, 탐지 및 진단에 사용될 수 있음이 개시되어 있다. 또한 상기 항체 및 항원 결합 단편을 발현하는 세포뿐만 아니라 상기 항체 및 단편을 사용하여 암을 탐지하고 치료(뒷면에 계속)

대 표 도

하는 방법이 개시되어 있다. 이러한 치료 또는 탐지로 인해 유익할 수 있는 암 증상에는 흑색종뿐만 아니라 난소암, 신장암, 폐암, 결장직장암, 유방암, 뇌종양 및 전립선암이 포함된다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/39558 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 47/6861 (2017.08)

C07K 16/00 (2013.01)

C07K 16/18 (2013.01)

C07K 16/28 (2013.01)

C07K 16/3038 (2013.01)

C07K 16/3069 (2013.01)

G01N 33/57484 (2013.01)

(72) 발명자

수리 트라이안

캐나다 에이치9제이 3에이2 케벡 커크랜드 올드 포
레스트 60

필리온 마리오

캐나다 제이4제이 4엠8 케벡 롱게일 메이플 스트리
트 739

명세서

청구범위

청구항 1

신장 결합 항원 1(KAAG1)에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서,
상기 항체가,

- a. SEQ ID NO.:5에 기재된 CDRH1 서열,
 - b. SEQ ID NO.:56에 기재된 CDRH2 서열, 및
 - c. SEQ ID NO.:7에 기재된 CDRH3 서열
- 을 가진, 중쇄 가변 영역; 및
- d. SEQ ID NO.:8에 기재된 CDRL1 서열,
 - e. SEQ ID NO.:9에 기재된 CDRL2 서열, 및
 - f. SEQ ID NO.:10에 기재된 CDRL3 서열

을 가진, 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

신장 결합 항원 1(KAAG1)에 특이적으로 결합할 수 있고, SEQ ID NO.:5에 기재된 CDRH1 아미노산 서열, SEQ ID NO.:6 또는 SEQ ID NO.:56에 기재된 CDRH2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO.:7에 기재된 CDRH3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 SEQ ID NO.:8에 기재된 CDRL1 서열, SEQ ID NO.:9에 기재된 CDRL2 서열 및 SEQ ID NO.:10에 기재된 CDRL3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 가지는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서,

상기 항체 또는 항원 결합 단편이 인간 프레임워크 영역을 포함하고, 선택적으로 경쇄 가변 영역 및/또는 중쇄 가변 영역 내에 하나 이상의 역-돌연변이를 포함하고, 상기 하나 이상의 역-돌연변이가 상기 프레임워크 영역 내에 있고 마우스 모 항체의 SEQ ID NO.:4에 기재된 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열 내 및/또는 SEQ ID NO.:2에 기재된 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열 내에서 발견되는 프레임워크 아미노산에 상응하는 것인,

항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제2항에 있어서, 중쇄 가변 영역 내의 역-돌연변이가 2번 위치에 Ile 및 73번 위치에 Lys을 포함하고, 상기 위치는 Kabat numbering에 따른 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제3항에 있어서, 중쇄 가변 영역 내에 추가적인 역-돌연변이를 포함하고, 상기 추가적인 역-돌연변이가 48번 위치에 Ile, 67번 위치에 Ala, 69번 위치에 Leu 및 71번 위치에 Val을 포함하며, 상기 위치는 Kabat numbering에 따른 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 5

제4항에 있어서, 중쇄 가변 영역 내에 추가적인 역-돌연변이를 포함하고, 상기 추가적인 역-돌연변이가 38번 위치에 Lys 및 66번 위치에 Lys 을 포함하고, 상기 위치는 Kabat numbering에 따른 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 6

제2항에 있어서, 경쇄 가변 영역 내의 역-돌연변이가 2번 위치에 Val 및 45번 위치에 Lys 을 포함하고, 상기 위치는 Kabat numbering에 따른 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 7

제3항에 있어서, 경쇄 가변 영역 내의 역-돌연변이가 2번 위치에 Val 및 45번 위치에 Lys 을 포함하고, 상기 위치는 Kabat numbering에 따른 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 8

제4항에 있어서, 경쇄 가변 영역 내의 역-돌연변이가 2번 위치에 Val 및 45번 위치에 Lys 을 포함하고, 상기 위치는 Kabat numbering에 따른 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 9

제5항에 있어서, 경쇄 가변 영역 내의 역-돌연변이가 2번 위치에 Val 및 45번 위치에 Lys 에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함하고, 상기 위치는 Kabat numbering에 따른 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 치료학적 모이어티(therapeutic moiety)와 컨쥬게이션된 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 치료학적 모이어티가 세포독성체를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 세포독성체가 아우리스타틴을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 아우리스타틴이 모노메틸 아우리스타틴 E 또는 모노메틸 아우리스타틴 F를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 14

제1항 내지 제9항 중 어느 한항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 탐지가능한 모이어티(detectable moiety)와 컨쥬게이션된 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 15

제1항 내지 제9항 중 어느 한항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산.

청구항 16

제1항 내지 제9항 중 어느 한항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산.

청구항 17

a. 제1항 내지 제9항 중 어느 한항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산; 또는

b. 제1항 내지 제9항 중 어느 한항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산

을 포함하는 벡터.

청구항 18

- a. 제1항 내지 제9항 중 어느 한항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산;
- b. 제1항 내지 제9항 중 어느 한항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산;
- c. 제1항 내지 제9항 중 어느 한항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터;
- d. 제1항 내지 제9항 중 어느 한항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터; 또는
- e. 제1항 내지 제9항 중 어느 한항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 단리된 세포.

청구항 19

제1항 내지 제9항 중 어느 한항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편과, 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 종양 또는 암을 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 치료학적 모이어티(therapeutic moiety)와 컨쥬게이션된 것인, 약학적 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 치료학적 모이어티가 세포독성제를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 22

제19항에 있어서, 상기 암이 난소암, 피부암, 신장암, 결장직장암, 육종, 백혈병, 뇌종양, 갑상선암, 유방암, 전립선암, 식도암, 방광암, 폐암, 두경부암, 전이성 난소암, 전이성 피부암, 전이성 신장암, 전이성 결장직장암, 전이성 육종, 전이성 백혈병, 전이성 뇌종양, 전이성 갑상선암, 전이성 유방암, 전이성 전립선암, 전이성 식도암, 전이성 방광암, 전이성 폐암 및 전이성 두경부암으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 치료학적 모이어티(therapeutic moiety)와 컨쥬게이션된 것인, 약학적 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 치료학적 모이어티가 세포독성제를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 25

제1항 내지 제9항 중 어느 한항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편과, 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 종양 또는 암을 탐지하기 위한 약학적 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 탐지가능한 모이어티(detectable moiety)와 컨쥬게이션된 것인, 약학적 조성물

청구항 27

종양의 생체내 탐지 또는 암의 생체내 진단에 사용하기 위한 제1항 내지 제9항 중 어느 한항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서,

상기 종양 또는 암이 KAAG1 또는 KAAG1 변이체를 발현하는 세포를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 탐지가능한 모이어티와 컨쥬게이션된 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 29

KAAG1 또는 KAAG1 변이체를 발현하는 세포를 포함하는 암의 치료에 사용하기 위한 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이, 치료학적 모이어티와 컨쥬게이션된 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 31

제30항에 있어서,

상기 치료학적 모이어티가 세포독성제를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 32

암 또는 종양을 포함하거나 포함하는 것으로 의심되는 샘플을 제1항 내지 제9항 중 어느 한항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계를 포함하는, KAAG1 또는 KAAG1 변이체를 발현하는 세포를 포함하는 암 또는 종양을 탐지하는 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 암이 난소암, 피부암, 신장암, 결장직장암, 육종, 백혈병, 뇌종양, 갑상선암, 유방암, 전립선암, 식도암, 방광암, 폐암, 두경부암, 전이성 난소암, 전이성 피부암, 전이성 신장암, 전이성 결장직장암, 전이성 육종, 전이성 백혈병, 전이성 뇌종양, 전이성 갑상선암, 전이성 유방암, 전이성 전립선암, 전이성 식도암, 전이성 방광암, 전이성 폐암 및 전이성 두경부암으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 34

제1항 내지 제9항 중 어느 한항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암 또는 종양의 치료용 키트.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 치료학적 모이어티(therapeutic moiety)와 컨쥬게이션된 것인, 키트.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 치료학적 모이어티가 세포독성제를 포함하는, 키트.

청구항 37

제1항 내지 제9항 중 어느 한항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 암 또는 종양의 탐지용 키트.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 탐지가능한 모이어티(detectable moiety)와 컨쥬케이션된 것인, 키트.

청구항 39

제1항 내지 제9항 중 어느 한항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조 방법으로서,

- a. 제1항 내지 제9항 중 어느 한항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산;
- b. 제1항 내지 제9항 중 어느 한항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산;
- c. 제1항 내지 제9항 중 어느 한항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터;
- d. 제1항 내지 제9항 중 어느 한항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터; 또는
- e. 제1항 내지 제9항 중 어느 한항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편

을 포함하는 단리된 세포를 배양하여, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 단계를 포함하는, 제조 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편을 치료학적 모이어티, 세포독성제 또는 탐지가능한 모이어티와 컨쥬케이션하는 단계를 더욱 포함하는 것인, 방법.

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 발명의 분야

[0002] 본 발명은 신장 결합 항원 1(kidney associated antigen 1, KAAG1)에 특이적으로 결합하는 특이적 항체 또는 항원 결합 단편, 및 암의 치료, 탐지 및 진단을 위한 이들의 용도에 관한 것이다. 상기 항체 또는 항원 결합 단편을 이용한 세포로의 치료제의 전달이 특히 고려된다.

배경 기술

[0003] 발명의 배경

[0004] 부인과 악성종양 중에서, 난소암은 미국에서 여성에게 있어서 가장 높은 종양-관련 사망률을 차지한다(Jemal et al., 2005). 미국에서 이는 여성에서 암-관련 사망의 네번째의 주요 원인이다(Menon et al., 2005). 미국암학회(American Cancer Society)는 2005년에 총 22,220명의 새로운 환자를 추정하였으며, 16,210명이 상기 질병으로 사망하였다(Bonome et al., 2005). 과거 30년 동안, 난소암이 발생한 여성 대부분이 상기 질병으로 사망한다는 통계가 매우 동일하게 유지되어 왔다(Chambers and Vanderhyden, 2006). 상기 질병은 1:70의 일생위험도(lifetime risk) 및 60%를 초과하는 사망률을 갖는다(Chambers and Vanderhyden, 2006). 높은 사망률은 악성종양이 이미 난소를 넘어 확산된 경우 난소암의 조기 탐지의 어려움으로 인한 것이다. 실제로, 80%를 초과하는 환자가 진행된 단계의 질병(III기 또는 IV기)을 갖는 것으로 진단된다(Bonome et al., 2005). 이를 환자는 80% 내지 90%가 초기에 화학요법에 반응하지만, 45% 미만의 5년 생존률로 반영되는 좋지 않은 예후를 갖는다(Berek et al., 2000). 보다 초기의 20%의 5년 생존률 연도수에 비한 상기 증가된 성공은 적어도 부분적으로는 난소암에 대한 유의한 예후 인자인 난소로 국한되는 경우 종양 조직을 최적으로 감량시키는 능력으로 인한 것이다

(Bristow R. E., 2000; Brown et al., 2004). 초기 질병(I기)으로 진단된 환자에서, 5년 생존은 90을 초과하는 범위이다(Chambers and Vanderhyden, 2006).

[0005] 난소암은 난소의 표면 상피 또는 표면 봉입체로부터 유래되는 종양의 이종성 군을 포함한다. 이들은 여성 생식관의 기관 내의 다양한 유형의 상피에 상응하는 장액, 점액, 자궁내막모양, 투명세포, 및 브렌너(Brenner)(이행) 유형으로 분류된다(Shih and Kurman, 2005). 이들 중, 장액 종양은 진단된 난소암 환자의 ~60%를 차지한다. 각각의 조직학적 하위범주는 임상적 양상을 반영하는 양성(benign), 중간(경계 종양)(borderline tumor) 또는 낮은 악성종양 잠재성(LMP)) 및 악성의 3개의 군으로 추가로 나뉘어진다(Seidman et al., 2002). LMP는 장액 종양으로 진단된 종양의 10% 내지 15%에 해당하며, 이는 비정형 핵 구조 및 전이 양상을 보이기 때문에 난제(conundrum)이나, 이들은 높은 등급의 장액 종양보다 현저히 덜 침습적이다. LMP 종양을 가진 환자에 대한 5년 생존은 동일 기간에 걸친 높은 등급의 질병에 대한 45% 미만의 생존과는 대조적으로 95%이다(Berek et al., 2000).

[0006] 현재, 난소암의 진단은 부분적으로 환자의 의료 병력의 통상적인 분석을 통해, 그리고 신체, 초음파 및 x-선 검사, 및 혈액학적 스크리닝을 수행함으로써 달성된다. 2개의 대안적 전략이 혈청 생체마커의 초기 혈액학적 탐지에 대해 보고되었다. 한 가지 접근은 암의 존재 또는 부재를 탐지하는 공지되지 않은 정체의 단백질 또는 단백질 단편을 찾기 위한 질량분석법에 의한 혈청 샘플의 분석이다(Mor et al., 2005; Kozak et al., 2003). 그러나, 이러한 전략은 고비용이며, 널리 이용가능하지 않다. 대안적으로, 혈청에서의 공지된 단백질/펩티드의 존재 또는 부재를 항체 마이크로어레이, ELISA, 또는 다른 유사한 접근을 이용하여 탐지하고 있다. CA-125(암 항원-125)로 언급되는 단백질 생체마커에 대한 혈청 시험은 난소암에 대한 마커로서 오랫동안 널리 수행되어 왔다. 그러나, 난소암 세포는 과량의 이러한 단백질 분자를 생성시킬 수 있으나, 난관의 암 또는 자궁내막암(자궁의 내충의 암)을 포함하는 일부 다른 암이 있으며, 체장암을 갖는 사람의 60%, 및 다른 악성종양을 갖는 사람의 20% 내지 25%가 CA-125의 상승된 수준을 갖는다. CA-125 시험은 I기 난소암 환자의 약 50%에 대해서만 진짜 양성(true positive) 결과를 보고하고, II기, III기, 및 IV기 난소암 환자로부터 진짜 양성 결과를 보고할 80%의 가능성을 갖는다. 난소암 환자의 나머지 20%는 CA-125 농도에서 어떠한 증가를 나타내지 않는다. 또한, 상승된 CA-125 시험은 암과 관련되지 않은 다른 양성(benign) 활성, 예를 들어, 월경, 임신, 또는 자궁내막증을 나타낼 수 있다. 결과로서, 상기 시험은 여전히 치료가능한 초기 단계 질병의 탐지를 위한 매우 제한된 임상적 적용을 가지며, 10% 미만의 양성예측치(PPV)를 나타낸다. 심지어 CA-125에 대한 초음파 스크리닝의 경우에도, PPV는 단지 약 20%까지 개선된다(Kozak et al., 2003). 따라서, 상기 시험은 효과적인 스크리닝 시험이 아니다.

[0007] 질병의 병인의 개선된 지식, 공격적 세포감퇴수술, 및 현대적 조합 화학요법에도 불구하고, 사망률에서는 거의 변화가 없다. 불리한 결과는 (1) 상기 단계에서의 종상의 단지 미미한 표시와 함께 초기 질병 탐지를 위한 적절한 스크리닝 시험의 결핍(진단은 종종 이후의 단계로의 진행 후에만 이루어지며, 이 지점에서 암의 복막 파종은 효과적인 치료를 제한함), 및 (2) 환자의 5년 생존률에서의 개선을 제한하는 표준 화학요법 방법에 대한 내성의 빈번한 발생에 기인된다. 난소암에 대한 초기 화학요법은 카르보플라틴(carboplatin)(파라플라틴(Paraplatin)) 및 파클리타셀(paclitaxel)(택솔(taxol))의 조합을 포함한다. 수년간의 임상 시험에서 상기 조합이 효과적 수술 후에 가장 효과적인 것으로 증명되었으나(새로이 진단된 난소암을 갖는 여성의 약 80%에서 종양 부피를 감소시키고, 40% 내지 50%가 완전한 회귀를 갖음), 환자 반응을 개선시키는 방법을 찾기 위해 연구가 지속되고 있다. 정맥내 전달과 조합된 도달하기 어려운 세포를 표적으로 하는 화학요법제의 최근의 복부 주입은 효과를 증가시켰다. 그러나, 심각한 부작용이 종종 불완전한 치료 과정을 야기시킬 수 있다. 일부 다른 화학요법제는 독소루비신(doxorubicin), 시스플라틴(cisplatin), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 블레오마이신(bleomycin), 에토포시드(etoposide), 빈블라스틴(vinblastine), 토포테칸 하이드로클로라이드(topotecan hydrochloride), 이포스파미드(ifosfamide), 5-플루오로우라실 및 멜팔란(melphalan)을 포함한다. 더욱 최근에, 임상 시험은 시스플라틴의 복막내 투여가 전신 정맥내 화학요법에 비해 생존 이점을 제공하는 것으로 입증되었다(Cannistra and McGuire, 2007). 화학요법을 받은 초기 단계 질병을 갖는 여성에 대한 우수한 생존률은 난소암의 탐지를 개선시키기 위한 전략을 개발하기 위한 연구 노력에 대한 확실한 이론적 근거를 제공한다. 또한, 새로운 난소암 관련 생체마커의 발견은 난소암의 장래의 치료를 위한 최소의 부작용을 갖는 더욱 효과적인 치료 전략의 개발을 초래할 것이다.

[0008] 난소암에 대한 이해 및 치료에서의 상기 최근의 진전에도 불구하고, 화학요법의 이용은 항상 심각한 부작용과 관련되어, 이들의 사용을 제한한다. 결과로서, 항원 조직 특이성과 모노클로날 항체의 선택성을 조합시키는 것과 같은 더욱 특이적인 전략에 대한 요구로 인해 비-표적(off-target) 관련 부작용은 유의하게 감소하게 될 것이다. 난소암의 요법을 위한 모노클로날 항체의 사용은 진행중인 임상 시험 수의 증가와 함께 출현하기 시작했

다(Oei et al., 2008; Nicodemus and berek, 2005). 상기 임상 시험 대부분은 방사성 동위원소, 예를 들어, 이트륨-90에 친구게이션된 모노클로날 항체, 또는 다른 암 유형에서 이미 확인된 종양 항원을 표적으로 하는 항체의 용도를 시험하였다. 상기의 한 예는 혈관 내피 성장 인자를 표적으로 하는 베바시주맙(bevacizumab)의 용도에 관한 것이다(Burger, 2007). 모노클로날 항체에 대한 치료 표적으로서 현재 연구 중인 매우 소수의 난소암 특이적 항원이 존재한다. 일부 예는 B7-H4로 언급되는 단백질(Simon et al., 2006), 더욱 최근에는 폴레이트 수용체-알파(Ebel et al., 2007)의 용도를 포함하며, 상기 폴레이트 수용체-알파는 최근 II상 임상시험에 진입하였다.

[0009]

신장 결합 항원 1(KAAG1)은 본래 세포독성 T 림프구에 제시되는 항원성 펩티드와 같은 조직적합성 백혈구 항원-B7 신장 암종 세포주로부터 유래된 cDNA 라이브러리로부터 클로닝되었다(Van den Eynde et al., 1999; Genebank accession no. Q9UBP8, SEQ ID NOs.:28; 29). KAAG1을 함유하는 유전자좌는 반대 DNA 가닥 상에서 전사되는 2개의 유전자를 인코딩하는 것으로 밝혀졌다. 센스 가닥은 DCDC2로 언급되는 단백질을 인코딩하는 전사물을 인코딩하는 것으로 밝혀졌다. 상기 문헌의 저자에 의한 발현 연구에서 KAAG1 안티센스 전사물이 종양 특이적이고, 정상 조직에서 매우 적은 발현을 나타내는 반면, DCDC2 센스 전사물은 편재성으로 발현된 것으로 밝혀졌다(Van den Eynde et al., 1999). 암, 특히 난소암, 신장암, 폐암, 결장암, 유방암 및 흑색종에서의 KAAG1 전사물의 발현은 공개된 특허 출원 번호 PCT/CA2007/001134호(이의 전체내용은 참조로서 본원에 포함됨)에 개시되었다. 반 텐 아인데 등(Van den Eynde et al.)은 또한 신장 암종, 결장직장 암종, 흑색종, 육종, 백혈병, 뇌종양, 갑상선 종양, 유방 암종, 전립선 암종, 식도 암종, 방광 종양, 폐 암종 및 두경부 종양에서 RNA 발현을 관찰하였다. 최근에, 연관 불균형 연구를 통해 수득된 확실한 유전학적 증거에서 VMP/DCDC2/KAAG1 유전자좌가 난독증(dyslexia)과 관련된 것이 밝혀졌다(Schumacher et al., 2006; Cope et al., 2005). 상기 보고 중 하나는 난독증 환자에서 컬프릿(culprit)으로서 DCDC2 마커를 지적하였는데, 이는 피질 뉴런 이동에서의 상기 단백질의 기능이 비정상적 뉴런 이동 및 성숙을 종종 나타내는 상기 환자의 증상과 일치하였기 때문이다(Schumacher et al., 2006).

발명의 내용

[0010]

발명의 개요

[0011]

본 발명은 특이적 항-KAAG1 항체 및 항원 결합 단편, 및 KAAG1 또는 KAAG1 변이체를 발현하는 종양 세포를 포함하는 암의 치료, 탐지 및 진단을 위한 이들의 용도에 관한 것이다. 상기 암의 예시적 구현예는, 예를 들어, 난소암, 폐부암, 신장암, 결장직장암, 육종, 백혈병, 뇌암, 갑상선암, 유방암, 전립선암, 식도암, 방광암, 폐암 및 두경부암을 포함한다.

[0012]

항체 또는 항원 결합 단편은 종양 세포의 표면에서 발현된 KAAG1 또는 KAAG1 변이체를 표적으로 하는데 특히 효과적일 수 있다.

[0013]

사실, 본 발명의 항체 및 항원 결합 단편은, 예를 들어, PCT/CA2009/001586호(전체내용이 참조로서 본원에 포함됨)에 개시된 3D3 및 3G10 항체와 비교하여 KAAG1-발현 종양 세포에 결합하는 개선된 능력을 갖는 것으로 보인다. 이들 항체 및 항원 결합 단편은 또한 내재화되며, 따라서 종양 세포로 치료제를 전달하는데 유용할 수 있다. 본 발명의 결과는 요망되는 특징(예를 들어, 개선된 결합 및 내재화)을 갖는 항체 및 항원 결합 단편이 일반적으로 아미노산 61 내지 84에 의해 경계가 정해진 KAAG1의 C-말단 영역에 결합함을 시사한다. 그러나, 3A4 및 3G10 항체 둘 모두가 동일 영역에 결합하지만, 3A4 항체는 3G10 항체보다 더욱 효율적으로 종양 세포의 표면에 결합하는 것으로 보인다. 특히, KAAG1 항원을 발현하는 암세포는 세포의 표면에 대한 항체의 직접적 결합을 측정하는 방법인 유세포분석법 실험에서 3G10에 비해 약 10배 덜한 3A4를 필요로 한다. 또한, 표면 플라즈몬(plasmon) 공명을 이용한 결합 실험에서, KAAG1에 대한 3A4의 친화도 상수(K_D)는 10 피코몰(picomolar) 미만인 반면, 항체 3D3 및 3G10은 200 피코몰을 초과하는 친화도 상수(K_D) (20배 낮은 친화도)를 나타낸 것으로 밝혀졌다. 따라서, 3A4의 결합 능력에서의 상기 증가는 개선된 치료 활성으로 해석될 것으로 기대된다.

[0014]

본 발명은 이의 한 양태에서 KAAG1(SEQ ID NO.:29)의 아미노산 61 내지 84 사이에 위치된 적어도 10개(예를 들어, 10 내지 20개 이상)의 연속적 아미노산과 동일한 서열에 특이적으로 결합할 수 있는 분리되거나 실질적으로 정제된 항체 또는 항원 결합 단편을 제공한다.

[0015]

본 발명은 또한 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편과 경쟁할 수 있는 분리된 항체 또는 항원 결합 단편을 제공한다.

- [0016] 한 추가 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 아미노산 서열을 갖는 특이적 항체 또는 항원 결합 단편에 관한 것이다. 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메릭(chimeric) 항체, 인간화 항체 및 인간 항체(분리된 항체)뿐만 아니라 본원에 기재된 상기 특징을 갖는 항원 결합 단편의 형태일 수 있다. 모노클로날, 키메릭, 인간화 또는 인간 항체 사이에 경쇄 및/또는 중쇄의 과돌연변이(permutation)를 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편이 또한 본원에 포함된다.
- [0017] 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 따라서 인간 불변 영역의 아미노산 및/또는 인간 항체의 프레임워크 (framework) 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0018] 용어 "항체"는 온전한 항체, 모노클로날 또는 폴리클로날 항체를 나타낸다. 용어 "항체"는 또한 이특이적 (bispecific) 항체와 같은 다중특이적(multispecific) 항체를 포함한다. 인간 항체는 보통 가변 영역 및 불변 영역을 각각 포함하는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄로 이루어진다. 경쇄 가변 영역은 프레임워크 영역의 측면에 존재하는 CDRL1 또는 L1, CDRL2 또는 L2 및 CDRL3 또는 L3로 본원에서 확인되는 3개의 CDR을 포함한다. 중쇄 가변 영역은 프레임워크 영역의 측면에 존재하는 CDRH1 또는 H1, CDRH2 또는 H2 및 CDRH3 또는 H3로 본원에서 확인되는 3개의 CDR을 포함한다. 본 발명의 인간화 항체의 CDR(예를 들어, SEQ ID NO.:56으로 기재된 CDRH2)은 케이벳 (Kabat) 및 초티아(Chotia) 정의를 이용하여 확인되었다. 그러나, 다른 문헌(Abhinandan and Martin, 2008)에서는 보다 짧은 CDR(예를 들어, SEQ ID NO.:6으로 기재된 CDRH2)로 묘사되는 케이벳 및 초티아를 염밀하지 않게 기초로 한 변형된 방법을 이용하였다.
- [0019] 본원에서 사용되는 용어 "항원-결합 단편"은 항원(예를 들어, KAAG1, KAAG1의 분비된 형태 또는 이들의 변이체)에 결합하는 능력을 보유한 항체의 하나 이상의 단편을 나타낸다. 항체의 항원-결합 기능이 온전한 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 용어 항체의 "항원-결합 단편" 내에 포함되는 결합 단편의 예는 (i) V_L , V_H , C_L 및 C_{H1} 도메인으로 구성되는 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 헌지 영역에서 이황화 브릿지(disulfide bridge)에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 $F(ab')_2$ 단편; (iii) V_H 및 C_{H1} 도메인으로 구성되는 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암(arm)의 V_L 및 V_H 도메인으로 구성되는 Fv 단편; (v) V_H 도메인으로 구성되는 dAb 단편(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546); 및 (vi) 분리된 상보성 결정 영역(CDR), 예를 들어, V_H CDR3을 포함한다. 또한, Fv 단편, V_L 및 V_H 의 2개의 도메인이 별개의 유전자에 의해 코딩되나, 이들은 V_L 및 V_H 영역이 쌍을 이루어 1가 분자를 형성하는 단일 폴리펩티드 사슬(단체 Fv (scFv)로 공지됨; 예를 들어, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; 및 Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 참조)로 제조되는 것을 가능케 하는 합성 링커에 의해 재조합 방법을 이용하여 연결될 수 있다. 이러한 단체 항체는 또한 용어 항체의 "항원-결합 단편"에 포함되는 것으로 의도된다. 또한, 항원-결합 단편은 (i) 면역글로불린 헌지 영역 폴리펩티드에 융합되는 결합 도메인 폴리펩티드(예를 들어, 중쇄 가변 영역, 경쇄 가변 영역, 또는 링커 웹티드를 통해 경쇄 가변 영역에 융합된 중쇄 가변 영역), (ii) 헌지 영역에 융합된 면역글로불린 중쇄 CH2 불변 영역, 및 (iii) CH2 불변 영역에 융합된 면역글로불린 중쇄 CH3 불변 영역을 포함하는 결합-도메인 면역글로불린 융합 단백질을 포함한다. 헌지 영역은 이합체화를 방지하기 위해 하나 이상의 시스테인 잔기를 세린 잔기로 대체시킴으로써 변형될 수 있다. 이러한 결합-도메인 면역글로불린 융합 단백질은 US 2003/0118592호 및 US 2003/0133939호에 더 개시되어 있다. 이들 항체 단편은 당업자에게 공지된 통상적인 기술을 이용하여 수득되고, 단편은 온전한 항체와 동일한 방식으로 유용성에 대해 스크리닝된다.
- [0020] 용어 "인간화 항체"는 완전히 인간화된 항체(즉, 프레임워크가 100% 인간화됨) 및 부분적으로 인간화된 항체(예를 들어, 적어도 하나의 가변 도메인이 인간 항체로부터의 하나 이상의 아미노산을 함유하는 한편, 다른 아미노산은 비-인간 모(parent) 항체의 아미노산임)를 포함한다. 통상적으로, "인간화 항체"는 비-인간 모 항체(예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 비-인간 영장류 등)의 CDR 및 천연 인간 항체 또는 인간 항체 컨센서스의 프레임워크와 동일한 프레임워크를 함유한다. 상기 예에서, "인간화 항체"는 완전히 인간화된 것을 특징으로 한다. "인간화 항체"는 또한 인간 항체 또는 인간 항체 컨센서스의 아미노산과 어떤 유사성도 갖지 않는 하나 이상의 아미노산 치환을 함유할 수 있다. 이러한 치환은, 예를 들어, 항체 특징(예를 들어, 친화도, 특이성 등)을 보존할 수 있는 역-돌연변이(예를 들어, 비-인간 아미노산의 재-도입)를 포함한다. 이러한 치환은 보통 프레임워크 영역 내에 존재한다. 또한 "인간화 항체"는 통상적으로 인간 항체의 불변 영역(Fc)인 불변 영역의 적어도 일부를 또한 선택적으로 포함한다. 통상적으로, "인간화 항체"의 불변 영역은 인간 항체의 불변 영역과 동일하다.
- [0021] 용어 "천연 인간 항체"는 인간 항체 레퍼토리, 즉, 생식세포(germline) 서열에 의해 인코딩되는(인코딩가능한) 항체를 나타낸다.

- [0022] 용어 "키메릭 항체"는 비-인간 가변 영역(들) 및 인간 불변 영역을 갖는 항체를 나타낸다.
- [0023] 용어 "하이브리드 항체"는 이의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 중 하나(이의 중쇄 또는 경쇄)가 특정 유형의 항체(예를 들어, 인간화 항체)로부터 유래되는 한편, 중쇄 또는 경쇄 가변 영역의 나머지(중쇄 또는 경쇄)가 또 다른 유형(예를 들어, 뮤린, 키메릭)으로부터 유래된 것을 포함하는 항체를 나타낸다.
- [0024] 일부 구현예에서, 인간화 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 프레임워크 영역은 인간화시키려는 비-인간 항체로부터의 1개 내지 30개의 아미노산, 및 천연 인간 항체 또는 인간 항체 컨센서스로부터 유래되는 나머지 부분을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 인간화 항체는 1개 내지 6개의 비-인간 CDR을 포함할 수 있고, 종종 6개의 CDR은 비-인간 CDR이다.
- [0025] 비-인간 모 항체의 인간화를 위해 선택된 천연 인간 항체는 비-인간 모 항체의 (모델링된) 가변 영역(이와 중첩될 수 있는)의 3차원 구조와 유사한 3차원 구조를 갖는 가변 영역을 포함할 수 있다. 이와 같이, 인간화 항체는 비-인간 모 항체의 3차원 구조와 유사한 3차원 구조를 가질 더 많은 가능성을 갖는다.
- [0026] 인간화 목적을 위해 선택된 천연 인간 항체의 경쇄 가변 영역은, 예를 들어, 비-인간 모 항체의 전체와 적어도 70%, 75%, 80% 등의 전체(전체 경쇄 가변 영역에 걸침) 동일성을 가질 수 있다. 대안적으로, 인간화 목적을 위해 선택된 천연 인간 항체의 경쇄 프레임워크 영역은, 예를 들어, 비-인간 모 항체의 경쇄 프레임워크 영역과 적어도 70% 75%, 80%, 85% 등의 서열 동일성을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 인간화 목적을 위해 선택된 천연 인간 항체는 이의 경쇄 상보성 결정 영역 내에서 비-인간 모 항체의 경쇄 상보성 결정 영역의 아미노산과 동일하거나 실질적으로 동일한 수의 아미노산을 가질 수 있다.
- [0027] 인간화 목적을 위해 선택된 천연 인간 항체의 중쇄 가변 영역은, 예를 들어, 비-인간 모 항체의 전체와 적어도 60%, 70%, 75%, 80% 등의 전체(전체 중쇄 가변 영역에 걸침) 동일성을 가질 수 있다. 또한, 본 발명에 따르면, 인간화 항체 중쇄의 인간 프레임워크 영역 아미노산 잔기는 비-인간 모 항체의 중쇄 프레임워크 영역과 적어도 70%, 75%, 89% 등의 동일성을 갖는 천연 인간 항체 중쇄 프레임워크 영역으로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 인간화 목적을 위해 선택된 천연 인간 항체는 이의 중쇄 상보성 결정 영역 내에서 비-인간 모 항체의 중쇄 상보성 결정 영역의 아미노산과 동일하거나 실질적으로 동일한 수의 아미노산을 가질 수 있다.
- [0028] 비-인간 모 항체의 인간화를 위해 선택되는 천연 인간 항체는 비-인간 모 항체의 (모델링된) 가변 영역의 (중첩 가능한) 3차원 구조와 유사한 3차원 구조를 갖는 가변 영역을 포함할 수 있다. 이와 같이, 인간화 또는 하이브리드 항체는 비-인간 모 항체의 3차원 구조와 유사한 3차원 구조를 가질 더 많은 가능성을 갖는다.
- [0029] 예를 들어, 인간화 목적을 위해 선택될 수 있는 천연 인간 항체 중쇄 가변 영역은 a) 비-인간 항체의 중쇄의 3차원 구조와 유사하거나 동일한(중첩가능한) 3차원 구조, 및/또는 b) 비-인간 항체의 중쇄 프레임워크 영역과 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 프레임워크 영역의 특징을 가질 수 있다. 선택적으로, 중쇄 CDR(예를 들어, 3개 모두의 CDR) 내의 (다수의) 아미노산 잔기는 비-인간 중쇄 CDR 아미노산 잔기와 동일하거나 실질적으로 동일하다.
- [0030] 대안적으로, 인간화 목적을 위해 선택될 수 있는 천연 인간 항체 경쇄 가변 영역은 a) 비-인간 항체의 경쇄의 3차원 구조와 유사하거나 동일한(중첩가능한) 3차원 구조, 및/또는 b) 비-인간 항체의 경쇄 프레임워크 영역과 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 프레임워크 영역의 특징을 가질 수 있다. 선택적으로, 경쇄 CDR(예를 들어, 3개 모두의 CDR) 내의 (다수의) 아미노산 잔기는 비-인간 경쇄 CDR 아미노산 잔기와 동일하거나 실질적으로 동일하다.
- [0031] 통상적 항원 결합 부위는 경쇄 면역글로불린 및 중쇄 면역글로불린의 페어링(pairing)에 의해 형성되는 가변 영역으로 구성된다. 항체 가변 영역들의 구조는 매우 일치하고, 매우 유사한 구조를 나타낸다. 이를 가변 영역은 통상적으로 상보성 결정 영역(CDR)으로 언급되는 3개의 과가변 영역 사이에 위치된 비교적 상동성인 프레임워크 영역(FR)으로 구성된다. 항원 결합 단편의 전체 결합 활성은 종종 CDR의 서열에 의해 좌우된다. FR은 종종 최적 항원 결합을 위한 CDR의 3차원의 적절한 위치결정 및 배열에서 일정한 역할을 한다.
- [0032] 본 발명의 항체 및/또는 항원 결합 단편은, 예를 들어, 마우스, 래트 또는 임의의 다른 포유동물, 또는 재조합 DNA 기술을 통하는 바와 같이 다른 공급원으로부터 유래될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 추가 범위, 적용성 및 장점은 하기 제공되는 비제한적인 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다. 그러나, 본 발명의 예시적 구현예를 나타내는 이러한 상세한 설명은 수반하는 도면을 참고로 하여 단지 예로서 제공되는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도면의 간단한 설명

도 1은 재조합 인간 KAAG1의 농도를 증가시키면서 인큐베이션하는 경우 3A4 키메릭 항-KAAG1 항체의 결합과 대조구 항체의 결합을 비교하는 ELISA로부터의 결과를 제시한다. 3A4의 결합 곡선은 보다 밝은 선의 선에 의해 제시된다.

도 2는 3A4 항-KAAG1 항체의 애피토프 특이성을 맵핑하기 위한 ELISA 분석으로부터의 결과를 기재하는 히스토그램(histogram)을 제시한다. 결과는 3A4가 아미노산 61-84 사이에 KAAG1의 카르복시-말단 내에 함유된 아미노산의 서열과 상호작용하는 것을 나타내었다. 3A4의 결합은 KAAG1의 영역 1-35, 36-60, 및 61-84와 각각 상호작용하는 것으로 공지된 3C4, 3D3, 및 3G10 항-KAAG1 항체와 비교하였다.

도 3a는 대조구 IgG(보다 밝은 선)와 비교한 3A4 항-KAAG1 항체(보다 어두운 선)를 이용하여 SKOV-3 및 TOV-21G 난소암세포에 대해 수행된 유세포분석법의 결과를 제시한다.

도 3b는 대조구 IgG(보다 밝은 선)와 비교한 3A4 항-KAAG1 항체(보다 어두운 선)를 이용하여 293E 인간 신장 세포에 대해 수행된 유세포분석법의 결과를 제시한다.

도 4는 3A4 항-KAAG1 항체를 이용한 유세포분석법에 의한 SKOV-3 세포의 표면 상에서의 KAAG1 항원의 탐지를 나타낸다. 세포가 37°C에서 인큐베이션되는 경우 형광 신호는 시간이 지남에 따라 감소하며, 이는 세포가 3A4와 함께 인큐베이션되는 경우 KAAG1/항체 복합체가 인큐베이션 동안에 내재화되었음을 시사한다.

도 5는 3A4 항-KAAG1 항체의 내재화, 및 엔도솜 및 리소좀 막과 결합된 단백질인 LAMP1과의 상기 항체의 공동-국소화를 제시한다.

도 6a 및 6b는 상이한 항-KAAG1 항체에 노출된 종양 세포의 FACS 분석을 나타내는 그래프이다.

도 7은 세포막 내에서의 KAAG1 배향의 2개의 가능한 표현을 나타내는 개략도이다.

도 8은 뮤린 3A4 가변 도메인의 문자 모델(리본 다이어그램(ribbon diagram))이다. CDR 루프는 흑색으로 채색되고, 경쇄 내의 L1, L2 및 L3 및 중쇄 내의 H1, H2 및 H3를 표지하였다. 프레임워크 영역은 회색으로 제시된다.

도 9a는 3A4 가변 도메인의 인간화 항체 Lh1Hh1(즉, 인간화 경쇄 1 및 인간화 중쇄 1)의 문자 모델이다. CDR 루프는 흑색으로 채색되고, 경쇄 내의 L1, L2 및 L3 및 중쇄 내의 H1, H2 및 H3를 표지하였다. 프레임워크 영역은 회색으로 제시된다. 뮤린 프레임워크로부터 인간 프레임워크로 돌연변이된 잔기의 측쇄를 공-막대 표시(ball-and-stick representation)로 렌더링하였다. Lh1은 변이체 1의 인간화 경쇄를 나타내고, Hh1은 변이체 1의 중쇄를 나타낸다.

도 9b는 3A4 가변 도메인의 인간화 항체 Lh1Hh2(즉, 인간화 경쇄 1 및 인간화 중쇄 2)의 문자 모델이다. CDR 루프는 흑색으로 채색되고, 경쇄 내의 L1, L2 및 L3 및 중쇄 내의 H1, H2 및 H3를 표지하였다. 프레임워크 영역은 회색으로 제시된다. 뮤린 프레임워크로부터 인간 프레임워크로 돌연변이된 잔기의 측쇄를 공-막대 표시로 렌더링하였다. Lh1은 변이체 1의 인간화 경쇄를 나타내고, Hh2는 변이체 2의 중쇄를 나타낸다.

도 9c는 3A4 가변 도메인의 인간화 항체 Lh1Hh3(즉, 인간화 경쇄 1 및 인간화 중쇄 3)의 문자 모델이다. CDR 루프는 흑색으로 채색되고, 경쇄 내의 L1, L2 및 L3 및 중쇄 내의 H1, H2 및 H3를 표지하였다. 프레임워크 영역은 회색으로 제시된다. 뮤린 프레임워크로부터 인간 프레임워크로 돌연변이된 잔기의 측쇄를 공-막대 표시로 렌더링하였다. Lh1은 변이체 1의 인간화 경쇄를 나타내고, Hh3은 변이체 3의 중쇄를 나타낸다.

도 9d는 3A4 가변 도메인의 인간화 항체 Lh1Hh4(즉, 인간화 경쇄 1 및 인간화 중쇄 4)의 문자 모델이다. CDR 루프는 흑색으로 채색되고, 경쇄 내의 L1, L2 및 L3 및 중쇄 내의 H1, H2 및 H3를 표지하였다. 프레임워크 영역은 회색으로 제시된다. 뮤린 프레임워크로부터 인간 프레임워크로 돌연변이된 잔기의 측쇄를 공-막대 표시로 렌더링하였다. Lh1은 변이체 1의 인간화 경쇄를 나타내고, Hh4는 변이체 4의 중쇄를 나타낸다.

도 9e는 3A4 가변 도메인의 인간화 항체 Lh2Hh1(즉, 인간화 경쇄 2 및 인간화 중쇄 1)의 문자 모델이다. CDR 루프는 흑색으로 채색되고, 경쇄 내의 L1, L2 및 L3 및 중쇄 내의 H1, H2 및 H3를 표지하였다. 프레임워크 영역은 회색으로 제시된다. 뮤린 프레임워크로부터 인간 프레임워크로 돌연변이된 잔기의 측쇄를 공-막대 표시로 렌더링하였다. Lh2는 변이체 2의 인간화 경쇄를 나타내고, Hh1은 변이체 1의 중쇄를 나타낸다.

도 9f는 3A4 가변 도메인의 인간화 항체 Lh2Hh2(즉, 인간화 경쇄 2 및 인간화 중쇄 2)의 문자 모델이다. CDR 루

프는 흑색으로 채색되고, 경쇄 내의 L1, L2 및 L3 및 중쇄 내의 H1, H2 및 H3를 표지하였다. 프레임워크 영역은 회색으로 제시된다. 뮤린 프레임워크로부터 인간 프레임워크로 돌연변이된 잔기의 측쇄를 공-막대 표시로 렌더링하였다. Lh2는 변이체 2의 인간화 경쇄를 나타내고, Hh2는 변이체 2의 중쇄를 나타낸다.

도 9g는 3A4 가변 도메인의 인간화 항체 Lh2Hh3(즉, 인간화 경쇄 2 및 인간화 중쇄 3)의 분자 모델이다. CDR 루프는 흑색으로 채색되고, 경쇄 내의 L1, L2 및 L3 및 중쇄 내의 H1, H2 및 H3를 표지하였다. 프레임워크 영역은 회색으로 제시된다. 뮤린 프레임워크로부터 인간 프레임워크로 돌연변이된 잔기의 측쇄를 공-막대 표시로 렌더링하였다. Lh2는 변이체 2의 인간화 경쇄를 나타내고, Hh3는 변이체 3의 중쇄를 나타낸다.

도 9h는 3A4 가변 도메인의 인간화 항체 Lh2Hh4(즉, 인간화 경쇄 2 및 인간화 중쇄 4)의 분자 모델이다. CDR 루프는 흑색으로 채색되고, 경쇄 내의 L1, L2 및 L3 및 중쇄 내의 H1, H2 및 H3를 표지하였다. 프레임워크 영역은 회색으로 제시된다. 뮤린 프레임워크로부터 인간 프레임워크로 돌연변이된 잔기의 측쇄를 공-막대 표시로 렌더링하였다. Lh2는 변이체 2의 인간화 경쇄를 나타내고, Hh4는 변이체 4의 중쇄를 나타낸다.

도 10a는 뮤린 및 인간화 경쇄의 3A4 가변 도메인의 아미노산 서열 배열이다. 경쇄는 2개의 인간화 변이체(Lh1 및 Lh2)를 갖는다. CDR은 굵은 글씨로 제시되고, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3에 의해 표시된다. 뮤린 아미노산인 인간 프레임워크 영역 내의 역돌연변이는 인간화 서열 내에서 밑줄로 표시된다.

도 10b는 뮤린 및 인간화 중쇄의 3A4 가변 도메인의 아미노산 서열 배열이다. 중쇄는 4개의 인간화 변이체(Hh1 내지 Hh4)를 갖는다. CDR은 굵은 글씨로 제시되고, CDRH1, CDRH2 및 CDRH3에 의해 표시된다. 뮤린 아미노산인 인간 프레임워크 영역 내의 역돌연변이는 인간화 서열 내에서 밑줄로 표시된다.

도 11a는 ClustalW2 프로그램(Larkin M.A., et al., (2007) ClustalW and ClustalX version 2. Bioinformatics 2007 23(21): 2947-2948)을 이용한 뮤린 3A4 경쇄 가변 영역(SEQ ID NO.:4)과 경쇄 가변 영역 변이체(SEQ ID NO.:33)의 배열이며, 여기서 "*" (별표)는 단일한 완전히 보존된 잔기를 갖는 위치를 나타내고, ":" (콜론)은 Gonnet PAM 250 매트릭스에서 0.5를 초과하는 스코어링의 매우 유사한 특성의 기들(groups) 사이의 보존을 나타내고, ". ." (마침표)는 Gonnet PAM 250 매트릭스에서 0.5 이하의 스코어링의 덜 유사한 특성의 기들 사이의 보존을 나타낸다.

도 11b는 ClustalW2 프로그램(Larkin M.A., et al., (2007) ClustalW and ClustalX version 2. Bioinformatics 2007 23(21): 2947-2948)을 이용한 뮤린 3A4 중쇄 가변 영역(SEQ ID NO.:2)과 경쇄 가변 영역 변이체(SEQ ID NO.:38)의 배열이며, 여기서 "*" (별표)는 단일한 완전히 보존된 잔기를 갖는 위치를 나타내고, ":" (콜론)은 Gonnet PAM 250 매트릭스에서 0.5를 초과하는 스코어링의 매우 유사한 특성의 기들 사이의 보존을 나타내고, ". ." (마침표)는 Gonnet PAM 250 매트릭스에서 0.5 이하의 스코어링의 덜 유사한 특성의 기들 사이의 보존을 나타낸다.

도 12a는 pKCR5-3A4-HC-변이체 1의 플라스미드 지도를 나타낸다. 인간화 3A4 변이체의 중쇄가 동일 방식으로 pK-CR5의 HindIII 부위로 클로닝되었다. 결과로서, 생성된 플라스미드는 중쇄 면역글로불린 가변 도메인의 서열을 제외하고는 pKCR5-3A4-HC 변이체 1과 동일하다.

도 12b는 pMPG-CR5-3A4-LC-변이체 1의 플라스미드 지도를 나타낸다. 3A4 항체의 인간화 변이체 1 및 2의 경쇄가 동일 방식으로 pMPG-CR5의 BamHI 부위로 클로닝되었다. 결과로서, 생성된 플라스미드는 경쇄 면역글로불린 가변 도메인의 서열을 제외하고는 pMPG-CR5-3A4-LC-변이체 1과 동일하다.

도 13은 CHO 세포에서의 일시적 트랜스펙션 후의 항체 생성의 분석을 나타낸다. 인간화 3A4 항체의 경쇄 및 중쇄의 다양한 조합으로 트랜스펙션된 CHOCta 세포의 상충액(트랜스펙션 13일 후)이 웨스턴 블롯에 의해 분석되었다. 상충액에서 생성된 항체의 정량이 공지된 표준(인간 정제된 IgG 항체)의 희석액에 대해 웨스턴 블롯의 밴드를 스캐닝한 후에 결정되었다. Mr 분자량 마커(kDa).

도 14는 재조합 KAAG1 샘플의 Superdex G75 젤 여과의 그래프이다. KAAG1이 젤 여과 동안 주입되었고, 0.4 ml/분으로 분리되었다. 분획 15-19 사이의 가장 큰 피크.

도 15는 3A4 항체의 뮤린 및 인간화 변이체에 대한 속도 및 친화도 상수를 나열하는 표이다.

도 16a는 인간화 항체의 결합 속도(K_a)를 예시하는 히스토그램이다.

도 16b는 인간화 항체의 해리 속도(K_d)를 예시하는 히스토그램이다.

도 16c는 인간화 항체의 친화도 상수(K_D)를 예시하는 히스토그램이다.

도 17a는 ELISA에서 KAAG1에 결합하는 인간화 3A4 변이체를 예시한다. 본 도면은 3A4 인간화 항체 변이체 및 뮤린 3A4의 비교 결합을 제시한다. Lh1 경쇄 변이체와 조립된 인간화 중쇄(Hh1, Hh2, Hh3 및 Hh4)의 농도-의존성 결합 프로파일.

도 17b는 ELISA에서 KAAG1에 결합하는 인간화 3A4 변이체를 예시한다. 본 도면은 3A4 인간화 항체 변이체 및 뮤린 3A4의 비교 결합을 제시한다. Lh2 경쇄 변이체와 조립된 인간화 중쇄(Hh1, Hh2, Hh3 및 Hh4)의 농도-의존성 결합 프로파일.

도 18은 암세포의 표면 상의 KAAG1에 결합하는 인간화된 3A4 변이체를 예시한다. 본 예시는 불투과화된 SKOV-3 난소암세포에서의 인간화 및 뮤린 3A4 항체의 비교 결합 활성을 제시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] **발명의 상세한 설명**

[0036] 암세포에서의 KAAG1의 발현 및 생물학적 활성

본 발명은 다양한 암 유형, 특히 난소암에서 발견되는 표적 종양에 대한 항체의 용도에 관한 것이다. 항체를 종양으로 유도하기 위해, 암세포의 세포 표면에서 발현되는 종양 특이적 항원의 확인이 수행되어야 한다. 종양-특이적 항원을 확인하기 위해 이용가능한 여러 기술이 존재하며, 난소 종양에서 KAAG1을 확인하기 위해 사용된 방법인 mRNA의 공제 전사-기반 증폭(Subtractive Transcription-based Amplification of mRNA, STAR)으로 언급되는 혁신적인 발견 플랫폼이 2007년 12월 27일에 WO/2007/147265호로 공개된 특허 출원 번호 PCT/CA2007/001134 호에 기재되어 있다.

[0038] 난소암 STAR 라이브러리의 분석은 분비 및 세포 표면 단백질을 인코딩하는 많은 유전자를 발생시켰다. AB-0447로 언급되는 상기 유전자 중 하나는 SEQ ID NO.:28로 기재된 뉴클레오티드 서열과 함께 885개 염기쌍의 cDNA에 의해 인코딩된 SEQ ID NO.:29에 해당하는 84개의 아미노산의 폴리펩티드를 인코딩하는 열린해독틀을 함유하였다. 공적으로 이용가능한 데이터베이스의 서치(search)를 통해 AB-0447 뉴클레오티드 서열이 KAAG1으로 언급되는 유전자의 뉴클레오티드 서열과 동일함이 밝혀졌다. 생물정보학 분석은 세포의 구획에 이의 가능적 도메인을 제공하는 막-고정된 단백질을 예측하였다. KAAG1은 본래 세포 표면 항원으로서 신장암 라이브러리로부터 클로닝되었고, 결과로 이의 막 국소화가 확인된다. 또한, 본 발명의 연구는 상기 단백질이 이의 아미노-말단에서 가공된 것을 나타내었고, 이러한 결과는 아미노산 30 및 34에서 또는 아미노산 30 내지 34 사이에서 기능성 신호 펩티드의 절단과 일치하였다. 또한, 전장 cDNA의 일시적 발현은 배양 배지에서 절단된 KAAG1의 탐지를 초래하였다. 이러한 마지막 발견은 상기 막-고정된 단백질이 높은 수준으로 발현되는 경우 세포로부터 췌당(shedding)될 수 있는 것을 나타내었다. 대조적으로, KAAG1의 아미노-트렁케이션된 돌연변이의 발현은 단백질의 세포내 보유를 초래하였다. 이러한 기능에 대해 어떤 실마리를 주는 공개된 보고는 현재 없으며 본 발명에 의해 개시된 바와 같이 난소암에서 KAAG1의 과발현은 이전에 문서화된 적이 없다.

[0039] 따라서, 본 발명자는 KAAG1이 항체-기반 진단학 및 요법에 사용될 수 있는지의 여부를 연구하였다.

[0040] 여러 난소암세포-기반 모델, 예를 들어, TOV-21G, TOV-112D, OV-90 등이 확립되었고, 이들은 당업자에게 친숙하다. 이들 세포는 난소 종양 또는 복수(ascites fluid)를 갖는 환자로부터 유래된 인간 난소암 세포주의 수집물의 일부이다. 이들 세포주에 대해 인간 난소암에 대한 우수한 세포-기반 모델이 되도록 하는 마이크로어레이 상에서의 전체 유전자 발현 패턴을 포함하는 상세한 분석이 수행되었다. 성장 특성, 유전자 발현 패턴, 및 화학요법 약물에 대한 반응은 상기 세포주가 생체내에서 난소 종양 양상을 매우 잘 나타내는 것으로 나타났다(Benoit et al., 2007). 상기 난소암 세포주로부터 분리된 전체 RNA의 RT-PCR 분석은 KAAG1 전사물이 원발성 종양으로부터 유래된 세포주에서 약하게 발현된 것을 나타내었다. 대조적으로, 복수로부터 유래된 세포주는 높은 수준의 KAAG1 발현을 함유하였다. 복수로부터 유래된 세포에서의 KAAG1의 증가된 발현은 세포의 환경이 KAAG1 유전자의 조절에 영향을 미치는 것을 시사하였다. 복수 세포는 진행된 질병과 관련되어 있으며, 이러한 발현 패턴은 증가된 KAAG1 수준이 고정-독립적 성장과 관련되어 있는 것을 암시한다. 상기 후자의 시사점과 일치하여, KAAG1 발현은 상기 세포가 3D 배양에서 구형으로 배양된 경우에 원발성 종양으로부터 유래된 세포주에서 유의하게 증가하는 것으로 밝혀졌다. 이를 구형은 광범위하게 특징규명되었고, 생체내에서 종양과 관련된 많은 특성을 나타내는 것으로 밝혀졌다(Cody et al., 2008). 따라서, KAAG1의 발현은 특히 난소암의 발달 동안 종양 진행을 모방하는 모델에서 현저하게 증가되는 것으로 밝혀졌다.

- [0041] KAAG1 발현이 난소암세포에서 조절된다는 증거와 함께, 난소암세포 양상에서의 상기 유전자의 기능을 세포-기반 검정에서 시험하였다. 이러한 취지로, RNA 간섭(RNAi)을 이용하여 난소암 세포주에서 내인성 KAAG1 유전자의 발현을 낙다운(knock down)시켰고, KAAG1의 감소된 발현이 상처 치유(또는 스크래치(scratch)) 검정에 의해 예시되는 바와 같이 표준 세포 운동 검정에서 결정된 바와 같이 세포의 이동에서 유의한 감소를 초래하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 유형의 검정은 세포가 컨플루언스(confluence) 단층 내의 노출된 영역을 채우는 속도를 측정한다. KAAG1의 감소된 발현은 클론원성 검정, 예를 들어, 콜로니(colony) 생존 검정에 의해 측정된 바와 같이 난소암 세포주의 생존에서 감소를 초래하였다. 당업자는 암세포, 특히, 난소암 세포의 양상에서 KAAG1의 요건을 평가하기 위해 다른 방법을 이용할 수 있다.
- [0042] 많은 비율의 난소 종양에서의 KAAG1의 발현, 정상 조직에서의 이의 제한된 발현, 및 발현 수준과 증가된 악성종양 사이의 일치, 및 난소암 세포주의 양상에서의 KAAG1에 대한 추정적 생물학적 역할을 기초로 하여, KAAG1이 난소암의 탐지, 예방, 및 치료를 위한 항체의 개발을 위한 치료 표적으로 선택되었다. 난소암이 아닌 다른 암에서의 KAAG1의 발현은 또한 본 출원인이 다른 암 종상에 대해 치료 또는 진단 항체를 평가하도록 하였다.
- [0043] 따라서, 본 발명은 KAAG1을 특이적으로 표적화하고, 예를 들어, 항체-약물 컨쥬게이트로 사용될 수 있는 항-KAAG1 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0044] 상기 항체 및 항원 결합 단편은, 예를 들어, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메릭 항체, 인간화 항체, 항체 단편, 단쇄 항체, 도메인 항체, 및 항원 결합 영역을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0045] *KAAG1에 결합하는 항체 및 항원 결합 단편*
- [0046] 항체는 초기에 관심 항원에 대한 이들의 특이성에 대해 Fab 라이브러리로부터 분리되었다.
- [0047] 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편의 가변 영역은 요망되는 종의 불변 영역과 융합될 수 있어, 요망되는 종의 효과기 세포에 의한 항체의 인지를 가능하게 한다. 불변 영역은, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 서브타입으로부터 유래될 수 있다. 가변 영역을 인 프레임(in frame)으로 갖는 불변 영역을 클로닝하거나 합성하는 것은 충분히 당업자의 지식 범위 내에 있고, 예를 들어, 재조합 DNA 기술에 의해 수행될 수 있다. 따라서, 인간 항체의 불변 영역을 포함하는 항체뿐만 아니라 인간 항체의 프레임워크 아미노산을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편이 또한 본 발명에 의해 포함된다.
- [0048] 따라서, 본 발명은 예시적 일 구현예에서,
- [0049] a. SEQ ID NO.:8을 포함하거나, SEQ ID NO.:8로 기재된 바와 같은 CDRL1 서열;
- [0050] b. SEQ ID NO.:9를 포함하거나, SEQ ID NO.:9로 기재된 바와 같은 CDRL2 서열; 또는
- [0051] c. SEQ ID NO.:10을 포함하거나, SEQ ID NO.:10로 기재된 바와 같은 CDRL3 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 항체 또는 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0052] 상기 분리된 항체 또는 항원 결합 단편은 또한,
- [0053] a. SEQ ID NO.:5를 포함하거나, SEQ ID NO.:5로 기재된 바와 같은 CDRH1 서열;
- [0054] b. SEQ ID NO.:6을 포함하거나, SEQ ID NO.:6으로 기재된 바와 같은 CDRH2 서열; 또는
- [0055] c. SEQ ID NO.:7을 포함하거나, SEQ ID NO.:7로 기재된 바와 같은 CDRH3 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.
- [0056] 예시적 일 구현예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 경쇄 가변 영역의 임의의 개별적 CDR 또는 CDR1, CDR2 및/ 또는 CDR3의 조합물을 포함할 수 있다. CDR3이 더욱 특히 선택될 수 있다. 조합물은, 예를 들어, CDRL1 및 CDRL3; CDRL1 및 CDRL2; CDRL2 및 CDRL3; 및 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3을 포함할 수 있다.
- [0057] 또 다른 예시적 구현예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역의 임의의 개별적 CDR 또는 CDR1, CDR2 및/ 또는 CDR3의 조합물을 포함할 수 있다. CDR3이 더욱 특히 선택될 수 있다. 조합물은, 예를 들어, CDRH1 및 CDRH3; CDRH1 및 CDRH2; CDRH2 및 CDRH3; 및 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3을 포함할 수 있다.
- [0058] 본 발명에 따르면, 항체 또는 항원 결합 단편은 CDRL1, CDRL2 또는 CDRL3 중 적어도 2개의 CDR을 포함할 수 있다.
- [0059] 또한, 본 발명에 따르면, 항체 또는 항원 결합 단편은 하나의 CDRL1, 하나의 CDRL2 및 하나의 CDRL3을 포함할

수 있다.

[0060] 추가로, 본 발명에 따르면, 항체 또는 항원 결합 단편은,

[0061] a. CDRL1, CDRL2 또는 CDRL3 중 적어도 2개의 CDR; 및

[0062] b. 하나의 CDRH1, 하나의 CDRH2 또는 하나의 CDRH3 중 적어도 2개의 CDR을 포함할 수 있다.

[0063] 항체 또는 항원 결합 단편은 더욱 바람직하게는 하나의 CDRL1, 하나의 CDRL2 및 하나의 CDRL3을 포함할 수 있다.

[0064] 항체 또는 항원 결합 단편은 또한 더욱 바람직하게는 하나의 CDRH1, 하나의 CDRH2 및 하나의 CDRH3을 포함할 수 있다.

[0065] 본 발명에 따르면, 항체 또는 항원 결합 단편은 하나의 CDRH1, 하나의 CDRH2 또는 하나의 CDRH3을 포함할 수 있다.

[0066] 본 발명에 따르면, 항체 또는 항원 결합 단편은 또한 하나의 CDRH1, 하나의 CDRH2 및 하나의 CDRH3을 포함할 수 있다.

[0067] 경쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역 중 단지 하나가 이용가능한 경우, 항체 또는 항원-결합 단편은 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 상보적 가변 영역의 라이브리리를 스크리닝함으로써 재구성될 수 있다(Portolano et al. The Journal of Immunology (1993) 150:880-887, Clarkson et al., Nature (1991) 352:624-628).

[0068] 본원에 기재된 CDR 중 적어도 하나에서 (본래의 CDR과 비교하여) 적어도 하나의 보존성 아미노산 치환을 갖는 가변 사슬을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체가 또한 본 발명에 의해 포함된다.

[0069] 본 발명은 또한 CDR 중 적어도 2개에서 (본래의 CDR과 비교하여) 적어도 하나의 보존성 아미노산 치환을 갖는 가변 사슬을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체를 포함한다.

[0070] 본 발명은 또한 3개의 CDR에서 (본래의 CDR과 비교하여) 적어도 하나의 보존성 아미노산 치환을 갖는 가변 사슬을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체를 포함한다.

[0071] 본 발명은 또한 CDR 중 적어도 하나에서 (본래의 CDR과 비교하여) 적어도 2개의 보존성 아미노산 치환을 갖는 가변 사슬을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체를 포함한다.

[0072] 본 발명은 또한 CDR 중 적어도 2개에서 (본래의 CDR과 비교하여) 적어도 2개의 보존성 아미노산 치환을 갖는 가변 사슬을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체를 포함한다.

[0073] 본 발명은 또한 3개의 CDR에서 (본래의 CDR과 비교하여) 적어도 2개의 보존성 아미노산 치환을 갖는 가변 사슬을 포함하는 폴리펩티드 또는 항체를 포함한다.

[0074] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편 중 하나의 경쇄 가변 영역의 적어도 하나의 상보성-결정 영역 및 중쇄 가변 영역의 적어도 하나의 상보성-결정 영역을 (단일 폴리펩티드 사슬 상 또는 별개의 폴리펩티드 사슬 상에) 포함하는 폴리펩티드, 항체 또는 항원 결합 단편에 관한 것이다.

[0075] 본 발명은 이의 또 다른 양태에서 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편의 6개 상보성-결정 영역(CDR) 모두를 (단일 폴리펩티드 사슬 상 또는 별개의 폴리펩티드 사슬 상에) 포함할 수 있는 항-KAAG1 항체에 관한 것이다.

변이체 항체 및 항원 결합 단편

[0077] 본 발명은 또한 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편의 변이체를 포함한다. 포함되는 변이체 항체 또는 항원 결합 단편은 아미노산 서열 내에 변화를 갖는 것이다. 예를 들어, 포함되는 변이체 항체 또는 항원 결합 단편은 적어도 하나의 변이체 CDR(2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 변이체 CDR 또는 심지어 12개의 변이체 CDR), 변이체 경쇄 가변 영역, 변이체 중쇄 가변 영역, 변이체 경쇄 및/또는 변이체 중쇄를 갖는 것이다. 본 발명에 포함되는 변이체 항체 또는 항원 결합 단편은, 예를 들어, 본래의 항체 또는 항원 결합 단편에 비해 유사하거나 개선된 결합 친화성을 갖는 것이다.

[0078] 본원에서 사용되는 용어 "변이체"는 본원에 기재된 서열 중 임의의 서열에 적용되고, 이는, 예를 들어, 변이체 CDR(CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 및/또는 CDRH3), 변이체 경쇄 가변 영역, 변이체 중쇄 가변 영역, 변이체 경쇄, 변이체 중쇄, 변이체 항체, 변이체 항원 결합 단편 및 KAAG1 변이체를 포함한다.

- [0079] 본 발명에 의해 포함되는 변이체 항체 또는 항원 결합 단편은 삽입, 결실 또는 아미노산 치환(보존성 또는 비-보존성)을 포함할 수 있는 것이다. 이들 변이체는 이의 아미노산 서열에서 적어도 하나의 아미노산 잔기가 제거될 수 있고, 이의 자리에 다양한 잔기가 삽입될 수 있다.
- [0080] 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 상기 기재된 바와 같은 경쇄 가변 영역 및/또는 중쇄 가변 영역을 가질 수 있고, 불변 영역의 아미노산, 예를 들어, 인간 항체의 불변 영역의 아미노산을 추가로 포함할 수 있다.
- [0081] 예시적 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은, 예를 들어, 인간 IgG1 불변 영역을 포함할 수 있다.
- [0082] 본 발명의 또 다른 예시적 구현예에 따르면, 항원 결합 단편은, 예를 들어, scFv, Fab, Fab' 또는 (Fab')₂일 수 있다.
- [0083] 치환성 돌연변이유발을 위한 관심 부위는 과가변 영역(CDR)을 포함하나, 프레임워크 영역 또는 심지어 불변 영역에서의 변형이 또한 고려된다. 보존성 치환은 하기 나열된 군(군 1 내지 6) 중 하나로부터의 아미노산(CDR, 가변 사슬, 항체 등의 아미노산)을 동일 군의 또 다른 아미노산으로 교환시킴으로써 이루어질 수 있다.
- [0084] 보존성 치환의 다른 예시적 구현예가 "바람직한 치환"이라는 표제로 표 1A에 제시된다. 이러한 치환이 요망되지 않는 특성을 발생시키는 경우, 표 1A에서 "예시적 치환"으로 명명되거나, 아미노산 클래스를 참조로 하여 하기에 추가로 기재되는 바와 같은 더욱 많은 실질적인 변화가 도입될 수 있고, 생성물이 스크리닝될 수 있다.
- [0085] 변이체가 치환성 돌연변이유발에 의해 발생될 수 있고, 본 발명의 폴리펩티드의 생물학적 활성을 보유할 수 있음을 당분야에 공지되어 있다. 이들 변이체는 아미노산 서열에서 적어도 하나의 아미노산 잔기가 제거되고, 이의 자리에 상이한 잔기가 삽입된다. 예를 들어, 치환성 돌연변이유발을 위한 하나의 관심 부위는 다양한 종으로부터 수득되는 특정 잔기가 동일한 부위를 포함할 수 있다. "보존성 치환"으로 확인된 치환의 예는 표 1A에 제시되어 있다. 상기 치환이 요망되지 않는 변화를 발생시키는 경우, 표 1A에서 "예시적 치환"으로 명명되거나, 아미노산 클래스를 참조로 하여 본원에서 추가로 기재되는 바와 같은 다른 유형의 치환이 도입되고, 생성물이 스크리닝된다.
- [0086] 기능 또는 면역학적 동일성의 실질적 변형은 (a) 예를 들어, 시트(sheet) 또는 나선형 형태(conformation)로서 치환 영역 내의 폴리펩티드 골격의 구조, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지시키는 것에 대한 변형의 효과가 유의하게 상이한 치환을 선택함으로써 달성된다. 천연 발생 잔기는 공통의 측쇄 특성을 기초로 하여 하기 군으로 나뉘어진다:
- [0087] (군 1) 소수성: 노르류신, 메티오닌(Met), 알라닌(Ala), 발린(Val), 류신(Leu), 이소류신(Ile)
 - [0088] (군 2) 중성 친수성: 시스테인(Cys), 세린(Ser), 트레오닌(Thr)
 - [0089] (군 3) 산성: 아스파르트산(Asp), 글루탐산(Glu)
 - [0090] (군 4) 염기성: 아스파라긴(Asn), 글루타민(Gln), 히스티딘(His), 리신(Lys), 아르기닌(Arg)
 - [0091] (군 5) 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기: 글리신(Gly), 프롤린(Pro); 및
 - [0092] (군 6) 방향족: 트립토판(Trp), 티로신(Tyr), 페닐알라닌(Phe)
- [0093] 비-보존성 치환은 상기 클래스 중 하나의 일원을 또 다른 일원으로 교환시키는 것을 수반할 것이다.

[0094]

표 1A. 아미노산 치환

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

[0095]

[0096]

변이체 항체 또는 항원 결합 단편은 본래의 항체 또는 항원 결합 단편 아미노산 서열과 비교하여 이의 아미노산 서열에서 실질적인 서열 유사성 및/또는 서열 동일성을 가질 수 있다. 2개의 서열 사이의 유사성의 정도는 동일성(동일한 아미노산) 및 보존성 치환의 백분율을 기초로 한다.

[0097]

일반적으로, 가변 사슬 사이의 유사성 및 동일성의 정도는 디폴트 설정을 이용한 Blast2 서열 프로그램, 즉, blastp 프로그램, BLOSUM62 매트릭스(오픈 갭(open gap) 11 및 연장 갭 폐널티(extension gap penalty) 1; gapx 드롭오프(dropoff) 50, 예상치 10.0, 워드 크기(word size) 3) 및 활성화된 필터를 이용하여 본원에서 결정된다(Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250).

[0098]

따라서, 동일성 퍼센트는 본래의 펩티드와 비교하여 동일하고, 동일하거나 유사한 위치를 차지할 수 있는 아미노산을 나타낼 것이다.

[0099]

유사성 퍼센트는 동일한 아미노산 및 동일하거나 유사한 위치에서 본래의 펩티드와 비교하여 보존성 아미노산 치환으로 대체되는 아미노산을 나타낼 것이다.

[0100]

따라서, 본 발명의 변이체는 본래의 서열 또는 본래의 서열의 일부와 적어도 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있는 변이체를 포함한다.

[0101]

변이체의 예시적 구현예는 본원에 기재된 서열과 적어도 81%의 서열 동일성 및 본래의 서열 또는 본래의 서열의 일부와 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 유사성을 갖는 변이체이다.

[0103]

*변이체의 다른 예시적 구현예는 본원에 기재된 서열과 적어도 82%의 서열 동일성 및 본래의 서열 또는 본래의 서열의 일부와 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 유사성을 갖는 변이체이다.

- [0104] 변이체의 추가의 예시적 구현예는 본원에 기재된 서열과 적어도 85%의 서열 동일성 및 본래의 서열의 일부와 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 유사성을 갖는 변이체이다.
- [0105] 변이체의 다른 예시적 구현예는 본원에 기재된 서열과 적어도 90%의 서열 동일성 및 본래의 서열의 일부와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 유사성을 갖는 변이체이다.
- [0106] 변이체의 추가의 예시적 구현예는 본원에 기재된 서열과 적어도 95%의 서열 동일성 및 본래의 서열의 일부와 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 유사성을 갖는 변이체이다.
- [0107] 변이체의 또 다른 추가의 예시적 구현예는 본원에 기재된 서열과 적어도 97%의 서열 동일성 및 본래의 서열 또는 본래의 서열의 일부와 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 유사성을 갖는 변이체이다.
- [0108] 간결함을 위해, 본 출원인은 본 발명에 의해 포함되는 개별적 변이체의 예시적 구현예를 예시하고, 특정 서열 동일성 % 및 서열 유사성 %를 포함하는 표 1B를 본원에 제공한다. 각각의 "X"는 제공된 변이체를 규정하는 것으로 해석되어야 한다.

표 1B		퍼센트 (%) 서열 동일성																				
		80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
	80	X																				
	81	X	X																			
	82	X	X	X																		
	83	X	X	X	X																	
	84	X	X	X	X	X																
	85	X	X	X	X	X	X															
	86	X	X	X	X	X	X	X	X													
	87	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X											
	88	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X											
	89	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X											
	90	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X											
	91	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X										
	92	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X									
	93	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X									
	94	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X									
	95	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X									
	96	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X									
	97	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X									
	98	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X									
	99	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X									
	100	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X									

- [0109]
- [0110] 본 발명은 본원에 기재된 서열과 적어도 80%의 동일성을 포함하는 CDR, 경쇄 가변 영역, 중쇄 가변 영역, 경쇄, 중쇄, 항체 및/또는 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0111] 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편의 예시적 구현예는 SEQ ID NO.:4와 적어도 70%, 75%, 80% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것이다.
- [0112] 이들 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO.:8과 적어도 80% 동일한 CDRL1 서열, SEQ ID NO.:9와 적어도 80% 동일한 CDRL2 서열 및 SEQ ID NO.:10과 적어도 80% 동일한 CDRL3 서열을 포함할 수 있다.
- [0113] 본 발명의 한 예시적 구현예에서, 본원에 제공된 항체 중 임의의 항체는 SEQ ID NO.:8과 적어도 90% 동일할 수 있는 CDRL1 서열을 포함할 수 있다.
- [0114] 본 발명의 또 다른 예시적 구현예에서, 본원에 제공된 항체 중 임의의 항체는 SEQ ID NO.:8과 100% 동일할 수 있는 CDRL1 서열을 포함할 수 있다.
- [0115] 본 발명의 또 다른 예시적 구현예에서, 본원에 제공된 항체 중 임의의 항체는 SEQ ID NO.:9와 적어도 90% 동일한 CDRL2 서열을 포함할 수 있다.
- [0116] 본 발명의 또 다른 예시적 구현예에서, 본원에 제공된 항체 중 임의의 항체는 SEQ ID NO.:9와 100% 동일할 수 있는 CDRL2 서열을 포함할 수 있다.
- [0117] 본 발명의 또 다른 예시적 구현예에서, 본원에 제공된 항체 중 임의의 항체는 SEQ ID NO.:10과 적어도 90% 동일할 수 있는 CDRL3 서열을 포함할 수 있다.

- [0118] 본 발명의 한 추가의 예시적 구현예에서, 본원에 제공된 항체 중 임의의 항체는 SEQ ID NO.:10과 100% 동일할 수 있는 CDR3 서열을 포함할 수 있다.
- [0119] 한 예시적 구현예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 SEQ ID NO.:2와 적어도 70%, 75%, 80% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.
- [0120] 이들 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO.:5와 적어도 80% 동일한 CDRH1 서열, SEQ ID NO.:6과 적어도 80% 동일한 CDRH2 서열 및 SEQ ID NO.:7과 적어도 80% 동일한 CDRH3 서열을 포함할 수 있다.
- [0121] 본 발명의 한 예시적 구현예에서, 본원에 제공된 항체 중 임의의 항체는 SEQ ID NO.:5와 적어도 90% 동일할 수 있는 CDRH1 서열을 포함할 수 있다.
- [0122] 본 발명의 또 다른 예시적 구현예에서, 본원에 제공된 항체 중 임의의 항체는 SEQ ID NO.:5와 100% 동일할 수 있는 CDRH1 서열을 포함할 수 있다.
- [0123] 본 발명의 또 다른 예시적 구현예에서, 본원에 제공된 항체 중 임의의 항체는 SEQ ID NO.:6과 적어도 90% 동일 할 수 있는 CDRH2 서열을 포함할 수 있다.
- [0124] 본 발명의 한 추가의 예시적 구현예에서, 본원에 제공된 항체 중 임의의 항체는 SEQ ID NO.:6과 100% 동일할 수 있는 CDRH2 서열을 포함할 수 있다.
- [0125] 본 발명의 또 다른 한 추가의 예시적 구현예에서, 본원에 제공된 항체 중 임의의 항체는 SEQ ID NO.:7과 적어도 90% 동일할 수 있는 CDRH3 서열을 포함할 수 있다.
- [0126] 본 발명의 한 추가의 예시적 구현예에서, 본원에 제공된 항체 중 임의의 항체는 SEQ ID NO.:7과 100% 동일할 수 있는 CDRH3 서열을 포함할 수 있다.
- [0127] 일부 예에서, 변이체 항체 중쇄 가변 영역은 아미노산 결실 또는 침가(아미노산 치환과 조합되거나 아미노산 치환을 갖지 않음)를 포함할 수 있다. 종종, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산의 결실 또는 침가가 용인될 수 있다.
- [0128] 변이체 항체 또는 항원 결합 단편의 예시적 구현예는 SEQ ID NO.:30으로 기재된 바와 같은 경쇄 가변 영역을 갖는 것을 포함한다:
- [0129] SEQ ID NO.:30
- ```
DXVMTQTPLSLXVXXGXXASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPXLIHTVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDXGVYYCFQGSHVPLTFGXGTXLEXK,
```
- [0130]
- [0131] 여기서, X로 확인되는 아미노산 중 적어도 하나는 SEQ ID NO.:4로 기재된 폴리펩티드 내의 상응하는 아미노산과 비교하여 아미노산 치환(보존성 또는 비-보존성)이다. 아미노산 치환은, 예를 들어, 천연 인간 항체 또는 인간 항체 컨센서스의 상응하는 위치에서 발견되는 아미노산일 수 있다. 아미노산 치환은, 예를 들어, 보존성이 있다.
- [0132] 변이체 항체 또는 항원 결합 단편의 또 다른 예시적 구현예는 SEQ ID NO.:31로 기재된 바와 같은 경쇄 가변 영역을 갖는 것을 포함한다:
- [0133] SEQ ID NO.:31
- ```
DXa1VMTQTPLSLXa2VXa3Xa4GXa5Xa6ASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSP
Xa7LLIHTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDXa8GVYYCFQGSHVPLTF
GXa9GTXa10LEXa11K,
```
- [0134]
- [0135] 여기서, X_{a1}은 소수성 아미노산일 수 있거나;
- [0136] 여기서, X_{a2}는 A 또는 P일 수 있거나;
- [0137] 여기서, X_{a3}는 중성 친수성 아미노산일 수 있거나;
- [0138] 여기서, X_{a4}는 L 또는 P일 수 있거나;

- [0139] 여기서, X_{a5} 는 산성 아미노산일 수 있거나;
- [0140] 여기서, X_{a6} 는 Q 또는 P일 수 있거나;
- [0141] 여기서, X_{a7} 은 염기성 아미노산일 수 있거나;
- [0142] 여기서, X_{a8} 은 소수성 아미노산일 수 있거나;
- [0143] 여기서, X_{a9} 은 A 또는 Q일 수 있거나;
- [0144] 여기서, X_{a10} 은 염기성 아미노산일 수 있거나;
- [0145] 여기서, X_{a11} 은 소수성 아미노산일 수 있고,
- [0146] 여기서, X로 확인되는 아미노산 중 적어도 하나는 SEQ ID NO.:4로 기재된 폴리펩티드 내의 상응하는 아미노산과 비교하여 아미노산 치환(보존성 또는 비-보존성)이다.
- [0147] 변이체 항체 또는 항원 결합 단편의 한 추가의 예시적 구현예는 SEQ ID NO.:32로 기재된 바와 같은 경쇄 가변 영역을 갖는 것을 포함한다:
- [0148] SEQ ID NO.:32
- DX_{A1}VMTQTPLSLX_{A2}VX_{A3}X_{A4}GX_{A5}X_{A6}ASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSP
X_{A7}LLIHTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKRVEAEDX_{A8}GVYYCFQGSHVPLTF
GX_{A9}GTX_{A10}LEX_{A11}K**
- [0149]
- [0150] 여기서, X_{A1} 은 V 또는 I일 수 있거나;
- [0151] 여기서, X_{A2} 는 A 또는 P일 수 있거나;
- [0152] 여기서, X_{A3} 는 S 또는 T일 수 있거나;
- [0153] 여기서, X_{A4} 는 L 또는 P일 수 있거나;
- [0154] 여기서, X_{A5} 는 D 또는 E일 수 있거나;
- [0155] 여기서, X_{A6} 는 Q 또는 P일 수 있거나;
- [0156] 여기서, X_{A7} 은 K 또는 Q일 수 있거나;
- [0157] 여기서, X_{A8} 은 L 또는 V일 수 있거나;
- [0158] 여기서, X_{A9} 은 A 또는 Q일 수 있거나;
- [0159] 여기서, X_{A10} 은 R 또는 K일 수 있거나;
- [0160] 여기서, X_{A11} 은 L 또는 I일 수 있고,
- [0161] 여기서, X로 확인되는 아미노산 중 적어도 하나는 SEQ ID NO.:4로 기재된 폴리펩티드 내의 상응하는 아미노산과 비교하여 아미노산 치환(보존성 또는 비-보존성)이다.
- [0162] 한 구현예에 따르면, 경쇄 가변 도메인 변이체는 SEQ ID NO.:33 또는 SEQ ID NO.:34로 기재된 바와 같은 서열을 가질 수 있다:
- [0163] SEQ ID NO.:33
- DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK.**
- [0164]

[0165] SEQ ID NO.:34

DVVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVS
NRFSGPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKEIK.

[0166]

[0167] 변이체 항체 또는 항원 결합 단편의 예시적 구현예는 SEQ ID NO.:35로 기재된 바와 같은 중쇄 가변 영역을 갖는 것을 포함한다:

[0168] SEQ ID NO.:35

QXQLVQSGXEXXKPGASVKXSCKASGYTFTDDYMSWVXQXXGXXLEWXGDINPY
NGDTNYNQKFKGXXXXTDXSXSTAYMXLXSLXSEDXAVYYCARDPGAMDYWGQ
GTXVTVSS,

[0169]

[0170] 여기서, X로 확인되는 아미노산 중 적어도 하나는 SEQ ID NO.:2로 기재된 폴리펩티드 내의 상응하는 아미노산과 비교하여 아미노산 치환(보존성 또는 비-보존성)이다. 아미노산 치환은, 예를 들어, 천연 인간 항체 또는 인간 항체 컨센서스의 상응하는 위치에서 발견되는 아미노산일 수 있다. 아미노산 치환은, 예를 들어, 보존성 치환일 수 있다.

[0171] 변이체 항체 또는 항원 결합 단편의 또 다른 예시적 구현예는 SEQ ID NO.:36으로 기재된 바와 같은 중쇄 가변 영역을 갖는 것을 포함한다:

[0172] SEQ ID NO.:36

QX_{b1}QLVQSGX_{b2}EX_{b3}X_{b4}KPGASVKK_{b5}SCKASGYTFTDDYMSWVX_{b6}QX_{b7}X_{b8}GX_{b9}X_{b10}
LEWX_{b11}GDINPYNGDTNYNQKFKGX_{b12}X_{b13}X_{b14}X_{b15}TX_{b16}DX_{b17}SX_{b18}STAYMX_{b19}LX_{b20}
SLX_{b21}SEDX_{b22}AVYYCARDPGAMDYWGQGTX_{b23}VTVSS,

[0173]

[0174] 여기서, X_{b1}은 소수성 아미노산일 수 있거나;

[0175] 여기서, X_{b2}는 P 또는 A일 수 있거나;

[0176] 여기서, X_{b3}는 소수성 아미노산일 수 있거나;

[0177] 여기서, X_{b4}는 V 또는 K일 수 있거나;

[0178] 여기서, X_{b5}는 소수성 아미노산일 수 있거나;

[0179] 여기서, X_{b6}는 염기성 아미노산일 수 있거나;

[0180] 여기서, X_{b7}은 S 또는 A일 수 있거나;

[0181] 여기서, X_{b8}은 H 또는 P일 수 있거나;

[0182] 여기서, X_{b9}은 염기성 아미노산일 수 있거나;

[0183] 여기서, X_{b10}은 S 또는 G일 수 있거나;

[0184] 여기서, X_{b11}은 소수성 아미노산일 수 있거나;

[0185] 여기서, X_{b12}는 염기성 아미노산일 수 있거나;

[0186] 여기서, X_{b13}은 소수성 아미노산일 수 있거나;

[0187] 여기서, X_{b14}은 I 또는 T일 수 있거나;

[0188] 여기서, X_{b15}은 소수성 아미노산일 수 있거나;

- [0189] 여기서, X_{b16} 은 소수성 아미노산일 수 있거나;
- [0190] 여기서, X_{b17} 은 K 또는 T일 수 있거나;
- [0191] 여기서, X_{b18} 은 중성 친수성 아미노산일 수 있거나;
- [0192] 여기서, X_{b19} 은 Q 또는 E일 수 있거나;
- [0193] 여기서, X_{b20} 는 N 또는 S일 수 있거나;
- [0194] 여기서, X_{b21} 은 T 또는 R일 수 있거나;
- [0195] 여기서, X_{b22} 는 중성 친수성 아미노산일 수 있거나;
- [0196] 여기서, X_{b23} 는 S 또는 L일 수 있고,
- [0197] 여기서, X로 확인되는 아미노산 중 적어도 하나는 SEQ ID NO.:2로 기재된 폴리펩티드 내의 상응하는 아미노산과 비교하여 아미노산 치환(보존성 또는 비-보존성)이다.
- [0198] 변이체 항체 또는 항원 결합 단편의 추가의 예시적 일 구현에는 SEQ ID NO.:37로 기재된 바와 같은 중쇄 가변 영역을 갖는 것을 포함한다:
- [0199] SEQ ID NO.:37
- $\text{QX}_{B1}\text{QLVQSGX}_{B2}\text{EX}_{B3}X_{B4}\text{KPGASVKX}_{B5}\text{SCKASGYTFTDDYMSWVX}_{B6}\text{QX}_{B7}X_{B8}\text{GX}_{B9}X_{B10}\text{LEWX}_{B11}\text{GDINPYNGDTNYNQFKGX}_{B12}X_{B13}X_{B14}X_{B15}\text{TX}_{B16}\text{DX}_{B17}\text{SX}_{B18}\text{STAYMX}_{B19}\text{LX}_{B20}\text{SLX}_{B21}\text{SEDX}_{B22}\text{AVYYCARDPGAMDYWGQQGTX}_{B23}\text{VTVSS}$
- [0200] 여기서, X_{B1} 은 I 또는 V일 수 있거나;
- [0201] 여기서, X_{B2} 는 P 또는 A일 수 있거나;
- [0202] 여기서, X_{B3} 는 M 또는 V일 수 있거나;
- [0203] 여기서, X_{B4} 는 V 또는 K일 수 있거나;
- [0204] 여기서, X_{B5} 는 M 또는 V일 수 있거나;
- [0205] 여기서, X_{B6} 는 K 또는 R일 수 있거나;
- [0206] 여기서, X_{B7} 은 S 또는 A일 수 있거나;
- [0207] 여기서, X_{B8} 은 H 또는 P일 수 있거나;
- [0208] 여기서, X_{B9} 은 K 또는 Q일 수 있거나;
- [0209] 여기서, X_{B10} 은 S 또는 G일 수 있거나;
- [0210] 여기서, X_{B11} 은 I 또는 M일 수 있거나;
- [0211] 여기서, X_{B12} 는 K 또는 R일 수 있거나;
- [0212] 여기서, X_{B13} 은 A 또는 V일 수 있거나;
- [0213] 여기서, X_{B14} 은 I 또는 T일 수 있거나;
- [0214] 여기서, X_{B15} 은 L 또는 I일 수 있거나;
- [0215] 여기서, X_{B16} 은 V 또는 A일 수 있거나;

- [0217] 여기서, X_{B17}은 K 또는 T일 수 있거나;
- [0218] 여기서, X_{B18}은 S 또는 T일 수 있거나;
- [0219] 여기서, X_{B19}은 Q 또는 E일 수 있거나;
- [0220] 여기서, X_{B20}는 N 또는 S일 수 있거나;
- [0221] 여기서, X_{B21}은 T 또는 R일 수 있거나;
- [0222] 여기서, X_{B22}는 S 또는 T일 수 있거나;
- [0223] 여기서, X_{B23}는 S 또는 L이고,
- [0224] 여기서, X로 확인되는 아미노산 중 적어도 하나는 SEQ ID NO.:2로 기재된 폴리펩티드 내의 상응하는 아미노산과 비교하여 아미노산 치환(보존성 또는 비-보존성)이다.
- [0225] 한 구현예에 따르면, 중쇄 가변 도메인 변이체는 SEQ ID NO.:38 내지 SEQ ID NO.:41 중 어느 하나로 기재된 바와 같은 서열을 가질 수 있다:
- [0226] SEQ ID NO.:38
- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPY
NGDTNYNQKFGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQG
TLTVVSS.
- [0227] SEQ ID NO.:39
- QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPY
NGDTNYNQKFGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQG
TLTVVSS.
- [0228] SEQ ID NO.:40
- QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYN
GDTNYNQKFGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQG
TLTVVSS.
- [0229] SEQ ID NO.:41
- QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYN
GDTNYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGT
LTVVSS.
- [0230] 세포에서의 항체의 생성
- [0231] 본원에 개시되는 항-KAAG1 항체는 당업자에게 친숙한 다양한 방법, 예를 들어, 하이브리도마 방법 또는 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0232] 본 발명의 한 예시적 구현예에서, 항-KAAG1 항체(예를 들어, 본원에 개시된 항체와 경쟁할 수 있는 항체)는 통상적인 하이브리도마 기술에 의해 생성될 수 있고, 여기서 마우스는 항원으로 면역화되고, 비장 세포는 분리되어 HGPRT 발현이 결여된 골수종 세포와 융합되고, 하이브리드 세포는 하이포잔틴, 아미知己테린 및 티민(HAT) 함유 배지에 의해 선택된다.
- [0233] 본 발명의 한 추가의 예시적 구현예에서, 항-KAAG1 항체는 재조합 DNA 방법에 의해 생성될 수 있다.
- [0234] 항-KAAG1 항체를 발현시키기 위해, 본원에 기재된 경쇄 및 중쇄 면역글로불린 사슬 중 어느 하나를 인코딩할 수 있는 뉴클레오티드 서열 또는 임의의 다른 뉴클레오티드 서열이 발현 벡터, 즉, 특정 숙주에서 삽입된 코딩 서열의 전사 및 번역 조절을 위한 요소를 함유하는 벡터내로 삽입될 수 있다. 이들 요소는 조절 서열, 예를 들어,

인핸서, 항시성 및 유도성 프로모터, 및 5' 및 3' 비번역 영역을 포함할 수 있다. 당업자에게 널리 공지된 방법이 상기 발현 벡터를 작제하는데 사용될 수 있다. 이들 방법은 시험관내 재조합 DNA 기술, 합성 기술, 및 생체내 유전적 재조합을 포함한다.

[0239] 당업자에게 공지된 다양한 발현 벡터/숙주 세포 시스템이 본원에 기재된 경쇄 및 중쇄 면역글로불린 사슬 중 어느 하나를 인코딩할 수 있는 뉴클레오티드 서열로부터 유래된 폴리펩티드 또는 RNA를 발현시키는데 사용될 수 있다. 이들은 재조합 박테리오파지, 플라스미드, 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 세균과 같은 미생물; 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모; 배콜로바이러스 벡터로 감염된 곤충 세포 시스템; 바이러스 또는 세균 발현 벡터로 형질전환된 식물 세포 시스템; 또는 동물 세포 시스템을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 포유동물 시스템에서의 재조합 단백질의 장기간 생성을 위해, 세포주에서의 안정적 발현이 효과적일 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 경쇄 및 중쇄 면역글로불린 사슬 중 어느 하나를 인코딩할 수 있는 뉴클레오티드 서열이 동일 벡터 또는 별개의 벡터 상에 바이러스 복제 기점 및/또는 내인성 발현 요소 및 선택가능한 또는 가시 마커 유전자를 함유할 수 있는 발현 벡터를 이용하여 세포주내로 형질전환될 수 있다. 본 발명은 사용되는 벡터 또는 숙주 세포에 의해 제한되지 않는다. 본 발명의 특정 구현예에서, 본원에 기재된 경쇄 및 중쇄 면역글로불린 사슬 중 어느 하나를 인코딩할 수 있는 뉴클레오티드 서열은 별개의 발현 벡터내로 각각 라이게이션(ligation)될 수 있고, 각각의 사슬은 개별적으로 발현될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 경쇄 및 중쇄 면역글로불린 사슬 중 어느 하나를 인코딩할 수 있는 경쇄 및 중쇄 둘 모두는 단일한 발현 벡터내로 라이게이션될 수 있고, 동시에 발현될 수 있다.

[0240] 대안적으로, RNA 및/또는 폴리펩티드는 시험관내 전사 시스템 또는 커플링된 시험관내 전사/번역 시스템 각각을 이용하여 본원에 기재된 경쇄 및 중쇄 면역글로불린 사슬 중 어느 하나를 인코딩할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터로부터 발현될 수 있다.

[0241] 일반적으로, 본원에 기재된 경쇄 및 중쇄 면역글로불린 사슬 중 어느 하나를 인코딩할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 함유하고/하거나, 본원에 기재된 경쇄 및 중쇄 면역글로불린 사슬 중 어느 하나를 인코딩할 수 있는 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 폴리펩티드 또는 이의 일부를 발현하는 숙주 세포는 당업자에게 공지된 다양한 절차에 의해 확인될 수 있다. 이들 절차는 핵산 또는 아미노산 서열의 탐지 및/또는 정량을 위한 막, 용액, 또는 침 기반 기술을 포함하는 DNA/DNA 또는 DNA/RNA 하이브리드화, PCR 증폭, 및 단백질 생물학적검정 또는 면역검정 기술을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특이적 폴리클로날 또는 모노클로날 항체를 이용하여 폴리펩티드의 발현을 탐지하고 측정하는 면역학적 방법이 당 분야에 공지되어 있다. 상기 기술의 예는 효소-결합 면역흡착측정법(ELISA), 방사면역검정(RIA), 및 형광 활성화 세포 분류(FACS)를 포함한다. 당업자는 이들 방법들을 본 발명에 용이하게 적합화시킬 수 있다.

[0242] 따라서, 본원에 기재된 경쇄 및 중쇄 면역글로불린 사슬 중 어느 하나를 인코딩할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 숙주 세포는 상응하는 RNA(mRNA 등)의 전사 및/또는 세포 배양물로부터 폴리펩티드의 발현을 위한 조건하에서 배양될 수 있다. 세포에 의해 생성되는 폴리펩티드는 분비될 수 있거나, 사용되는 서열 및/또는 벡터에 따라 세포내에 보유될 수 있다. 한 예시적 구현예에서, 본원에 기재된 경쇄 및 중쇄 면역글로불린 사슬 중 어느 하나를 인코딩할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 발현 벡터는 원핵생물 또는 진핵생물 세포막을 통한 폴리펩티드의 분비를 유도하는 신호 서열을 함유하도록 디자인될 수 있다.

[0243] 유전 코드의 고유한 축퇴성으로 인해, 동일하거나, 실질적으로 동일하거나, 기능적으로 동등한 아미노산 서열을 인코딩하는 다른 DNA 서열은, 예를 들어, 본원에 기재된 경쇄 및 중쇄 면역글로불린 사슬 중 어느 하나를 인코딩할 수 있는 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 폴리펩티드를 발현시키기 위해 생성되고 사용될 수 있다. 본 발명의 뉴클레오티드 서열은 유전자 생성물의 클로닝, 프로세싱, 및/또는 발현의 변형을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 목적을 위해 뉴클레오티드 서열을 변경시키기 위해 당 분야에 일반적으로 공지된 방법을 이용하여 조작될 수 있다. 유전자 단편 및 합성 올리고뉴클레오티드의 무작위 단편화 및 PCR 재조립(reassembly)에 의한 DNA 셔플링(DNA shuffling)은 뉴클레오티드 서열을 조작하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드-매개 부위-특이적 돌연변이유발은 새로운 제한 부위를 생성시키고, 당화 패턴을 변경시키고, 코돈선호를 변화시키고, 스플라이스 변이체를 생성시키는 것 등의 돌연변이를 도입시키기 위해 사용될 수 있다.

[0244] 또한, 숙주 세포 균주는 삽입된 서열의 발현을 조절하거나 요망되는 방식으로 발현된 폴리펩티드를 프로세싱하는 이의 능력에 대해 선택될 수 있다. 폴리펩티드의 상기 변형은 아세틸화, 카르복실화, 당화, 인산화, 지질화, 및 아실화를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 한 예시적 구현예에서, 특정 당화 구조 또는 패턴을 함유하는 항-KAAG1 항체가 요망될 수 있다. 폴리펩티드의 "프리프로(propro)" 형태를 절단하는 번역후 프로세싱이 또한

단백질 표적화, 폴딩, 및/또는 활성을 지정하기 위해 이용될 수 있다. 번역후 활성을 위한 특이적 세포 기구 및 특징적 기작을 갖는 상이한 숙주 세포(예를 들어, CHO, HeLa, MDCK, HEK293, 및 W138)는 상업적으로 이용가능하고, 미국 미생물보존센터(American Type Culture Collection, ATCC)로부터 이용가능하며, 발현된 폴리펩티드의 정확한 변형 및 프로세싱을 보장하기 위해 선택될 수 있다.

[0245] 당업자는 천연, 변형, 또는 재조합 핵산 서열이 이종성 서열에 라이게이션되어 상기 언급된 숙주 시스템 중 임의의 숙주 시스템 내에 이종성 폴리펩티드 모이어티를 함유하는 융합 폴리펩티드의 번역을 발생시킬 수 있는 것을 용이하게 인식할 것이다. 이러한 이종성 폴리펩티드 모이어티는 상업적으로 이용가능한 친화도 매트릭스를 이용하여 융합 폴리펩티드의 정제를 촉진할 수 있다. 이러한 모이어티는 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST), 말토스 결합 단백질, 티오레독신, 칼모듈린 결합 웨პ티드, 6-His(His), FLAG, c-myc, 헤마글루ти닌(HA), 및 항체 에피토프, 예를 들어, 모노클로날 항체 에피토프를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0246] 또 다른 한 추가 양태에서, 본 발명은 융합 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 융합 단백질은 본원에 기재된 폴리펩티드(예를 들어, 완전한 경쇄, 완전한 중쇄, 가변 영역, CDR 등)에 융합된 융합 파트너(예를 들어, HA, Fc 등)를 포함할 수 있다.

[0247] 당업자는 또한 핵산 및 폴리펩티드 서열이 당 분야에 널리 공지된 화학적 또는 효소적 방법을 이용하여 전체적으로 또는 부분적으로 합성될 수 있음을 용이하게 인지할 것이다. 예를 들어, 웨პ티드 합성은 다양한 고체-상 기술을 이용하여 수행될 수 있고, ABI 431A 웨პ티드 합성기(PE Biosystems)와 같은 기계가 합성을 자동화시키기 위해 사용될 수 있다. 요망시, 아미노산 서열은 합성 동안 변경될 수 있고/있거나 변이체 단백질을 생성시키기 위해 다른 단백질로부터의 서열과 조합될 수 있다.

항체 컨쥬게이트

[0249] 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 탐지가능한 모이어티(즉, 탐지 또는 진단 목적을 위함) 또는 치료 모이어티(치료 목적을 위함)와 컨쥬게이션될 수 있다.

[0250] "탐지가능한 모이어티"는 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적, 화학적 및/또는 다른 물리적 수단에 의해 탐지가능한 모이어티이다. 탐지가능한 모이어티는 당 분야에 널리 공지된 방법을 이용하여 본 발명의 항체 및 이의 항원 결합 단편에 직접적 및/또는 간접적(예를 들어, 결합, 비제한적인 예로, DOTA 또는 NHS 결합을 통함)으로 커플링될 수 있다. 매우 다양한 탐지가능한 모이어티가 요망되는 민감도, 컨쥬게이션의 용이성, 안정성 필요조건 및 이용가능한 기계설비에 따른 선택과 함께 사용될 수 있다. 적합한 탐지가능한 모이어티는 형광 표지, 방사성 표지(예를 들어, 비제한적인 예로, ¹²⁵I, In¹¹¹, Tc⁹⁹, I¹³¹ 및 PET 스캐너 등에 대해 양전자 방출 동위원소를 포함함), 핵 자기 공명 활성 표지, 발광 표지, 화학발광 표지, 발색단 표지, 효소 표지(예를 들어, 비제한적인 예로, 홀스래디쉬 퍼옥시다제(horseradish peroxidase), 알칼리성 포스파타제 등), 양자 도트(quantum dot) 및/또는 나노입자를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 탐지가능한 모이어티는 탐지가능한 신호를 야기시키고/시키거나 생성시킬 수 있고, 이에 따라 탐지가능한 모이어티로부터의 신호가 탐지가능하도록 한다.

[0251] 본 발명의 또 다른 예시적 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 치료 모이어티(예를 들어, 약물, 세포독성 모이어티, 항암제)와 커플링(변형)될 수 있다.

[0252] 한 예시적 구현예에서, 항-KAAG1 항체 및 항원 결합 단편은 화학요법제, 세포독성제 또는 항암 약물(예를 들어, 저분자)를 포함할 수 있다. 이러한 화학요법제 또는 세포독성제는 이트륨-90, 스칸듐-47, 레늄-186, 요오드-131, 요오드-125, 및 당업자에 의해 인지되는 많은 다른 화학요법제 또는 세포독성제(예를 들어, 루테튬(예컨대, Lu¹⁷⁷), 비스무트(예컨대, Bi²¹³), 구리(예컨대, Cu⁶⁷))를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 다른 예에서, 화학요법제, 세포독성제 또는 항암 약물은 당업자에게 공지된 것 중에서 5-플루오로우라실, 아드리아마이신, 이리노테칸, 탁산, 슈도모나스 내독소, 리신, 아우리스타틴(예를 들어, 모노메틸 아우리스타틴 E, 모노메틸 아우리스타틴 F), 마이탄시노이드(예를 들어, 메르坦신(mertansine)) 및 다른 독소로 구성될 수 있다.

[0253] 대안적으로, 본 발명의 방법 및 당 분야에 공지된 방법을 수행하기 위해, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편(컨쥬게이션되거나 컨쥬게이션되지 않음)이, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편에 특이적으로 결합할 수 있고, 요망되는 탐지가능한 모이어티, 진단 모이어티 또는 치료 모이어티를 가질 수 있는 제2의 분자(예를 들어, 이차 항체 등)와 조합하여 사용될 수 있다.

항체의 약학적 조성물 및 이의 용도

- [0255] 항-KAAG1 항체 또는 항원 결합 단편(컨쥬게이션되거나 컨쥬게이션되지 않음)의 약학적 조성물이 또한 본 발명에 의해 포함된다. 약학적 조성물은 항-KAAG1 항체 또는 항원 결합 단편을 포함할 수 있고, 또한 약학적으로 허용되는 담체를 함유할 수 있다.
- [0256] 본 발명의 다른 양태는 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편 및 담체를 포함할 수 있는 조성물에 관한 것이다.
- [0257] 본 발명은 또한 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0258] 활성 성분에 더하여, 약학적 조성물은 물, PBS, 염 용액, 젤라틴, 오일, 알콜, 및 약학적으로 사용될 수 있는 제조물로의 활성 화합물의 가공을 촉진하는 다른 부형제 및 보조제를 포함하는 약학적으로 허용되는 담체를 함유할 수 있다. 다른 예에서, 이러한 제조물은 멸균될 수 있다.
- [0259] 본원에서 사용되는 "약학적 조성물"은 약학적으로 허용되는 희석제, 보존제, 용해화제, 유화제, 애쥬번트 및/또는 담체와 함께 치료적 유효량의 작용제를 의미한다. 본원에서 사용되는 "치료적 유효량"은 제공된 조건 및 투여 요법에 대해 치료적 효과를 제공하는 양을 나타낸다. 이러한 조성물은 액체이거나 동결건조되거나 달리 건조된 제형이며, 이는 다양한 완충제 함량의 희석제(예를 들어, Tris-HCl., 아세테이트, 포스페이트), pH 및 이온 강도, 첨가제, 예를 들어, 표면으로의 흡수를 방지하는 알부민 또는 젤라틴, 세척제(예를 들어, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, 담즙산 염)를 포함한다. 용해화제(예를 들어, 글리세롤, 폴리에틸렌 글리세롤), 항산화제(예를 들어, 아스코르브산, 소듐 메타바이설파이트), 보존제(예를 들어, 티메로살, 벤질 알콜, 파라벤), 벌킹 물질 또는 긴장성 조절제(예를 들어, 락토스, 만니톨), 단백질에 대한 폴리에틸렌 글리콜과 같은 중합체의 공유 부착, 금속 이온과의 복합체화, 또는 폴리락트산, 폴리글리콜산, 하이드로겔 등과 같은 중합체 화합물의 미립자 제조물내로 또는 상에, 또는 리포솜, 마이크로에멀젼, 미셀(micelle), 단층 또는 다층 소포, 파열 적혈구(erythrocyte ghost), 또는 스페로플라스트(spheroplast)로의 물질의 혼입. 이러한 조성물은 물리적 상태, 용해도, 안정성, 생체내 방출 속도, 및 생체내 제거(clearance)의 속도에 영향을 미칠 것이다. 제어된 또는 지속된 방출 조성물은 친지질성 데포(depot)(예를 들어, 지방산, 왁스, 오일) 중의 제형을 포함한다. 중합체로 코팅된 미립자 조성물(예를 들어, 폴록사미 또는 폴록사민)이 본 발명에 의해 또한 포함된다. 본 발명의 조성물의 다른 구현예는 비경구, 폐내, 비강내, 경구, 질내, 직장 경로를 포함하는 다양한 경로의 투여를 위한 미립자 형태 보호 코팅, 프로테아제 억제제 또는 투과 향상제를 포함한다. 한 구현예에서, 약학적 조성물은 비경구, 암축면(paracancerally), 경점막, 경피, 근내, 정맥내, 피내, 피하, 복막내, 뇌실내, 두개내 및 종양내 투여된다.
- [0260] 추가로, 본원에서 사용되는 "약학적으로 허용되는 담체" 또는 "약학적 담체"는 당 분야에 공지되어 있고, 이는 0.01-0.1M 또는 0.05M 포스페이트 완충액 또는 0.8% 염수를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 추가로, 이러한 약학적으로 허용되는 담체는 수용액 또는 비-수용성 용액, 혼탁액, 및 에멀젼일 수 있다. 비-수용성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일, 예를 들어, 올리브 오일, 및 주사 가능한 유기 에스테르, 예를 들어, 에틸 올레이트이다. 수용성 담체는 물, 알콜성/수용액, 에멀젼 또는 염수 및 완충 매질을 포함하는 혼탁액을 포함한다. 비경구 비히클은 염화나트륨 용액, 링거 벡스트로스(Ringer's dextrose), 벡스트로스 및 염화나트륨, 락테이트화된 링거액 또는 고정유를 포함한다. 정맥내 비히클은 유체 및 영양소 보충물, 전해질 보충물, 예를 들어, 링커 벡스트로스에 기초한 것 등을 포함한다. 보존제 및 다른 첨가제, 예를 들어, 항균제, 항산화제, 콜레이팅 작용제(collating agent), 비활성 가스 등이 또한 존재할 수 있다.
- [0261] 임의의 화합물에 대해, 치료적 유효 용량은 처음에 세포 배양 검정에서 또는 동물 모델, 예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 개, 또는 돼지에서 평가될 수 있다. 동물 모델은 또한 농도 범위 및 투여 경로를 결정하기 위해 이용될 수 있다. 이후, 이러한 정보는 인간에서 유용한 투여 용량 및 투여 경로를 결정하기 위해 이용될 수 있다. 이를 기술은 당업자에게 널리 공지되어 있고, 치료적 유효 용량은 증상 또는 병태를 개선시키는 활성 성분의 양을 나타낸다. 치료 효능 및 독성은 세포 배양물에서 또는 실험 동물을 이용하여 표준 약학적 절차에 의해, 예를 들어, ED₅₀(집단의 50%에서 치료적으로 효과적인 용량) 및 LD₅₀(집단의 50%까지 치사성인 용량) 통계를 계산하고 대조시킴으로써 결정될 수 있다. 상기 기재된 치료 조성물 중 임의의 조성물은, 포유동물, 예를 들어, 개, 고양이, 소, 말, 토끼, 원숭이, 및 인간을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 상기 요법을 필요로 하는 임의의 피침체에 적용될 수 있다.
- [0262] 본 발명에서 이용되는 약학적 조성물은 경구, 정맥내, 근내, 동맥내, 척수내, 수막강내, 뇌실내, 경피, 피하, 복막내, 비강내, 장관, 국소, 설하, 또는 직장 수단을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 임의의 수의 경로에 의

해 투여될 수 있다.

- [0263] 본 개시의 목적을 위해 용어 "치료"는 치료적 치료 및 질병예방적 또는 예방적 조치 모두를 나타내며, 여기서 목적은 표적화된 병리학적 병태 또는 장애를 늦추는(감소시키는) 것이다. 치료를 필요로 하는 사람들은 장애를 이미 갖는 사람들 뿐만 아니라 장애를 갖기 쉬운 사람들 또는 장애가 예방되어야 하는 사람들을 포함한다. 특히, 치료를 필요로 하는 피검체는 하나 이상의 암 마커의 상승된 수준을 갖는 피검체를 포함한다.
- [0264] 항-KAAG1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 다양한 암 유형, 예를 들어, 난소암, 신장암, 결장암, 폐암, 흑색종 등의 치료에서 치료적인 용도를 가질 수 있다. 한 예시적 구현예에서, 항체 및 단편은 난소암에서 치료적인 용도를 가진다. 한 더욱 특정한 구현예에서, 피검체는, 예를 들어, 재발성 난소암을 가질 수 있다. 또 다른 구현 예에서, 피검체는, 예를 들어, 전이성 암을 가질 수 있다.
- [0265] 특정 예에서, 항-KAAG1 항체 및 단편은 KAAG1과 이의 단백질 파트너의 상호작용을 차단할 수 있다. 본 발명의 항-KAAG1 항체는 특히 KAAG1을 발현하는 세포에 치료 모이어티를 전달하는데 사용될 수 있다.
- [0266] 항-KAAG1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 다양한 유형의 난소암의 치료에서 치료적인 용도를 가질 수 있다. 여러 상이한 세포 유형이 상이한 난소암 히스토타입(histotype)을 발생시킬 수 있다. 난소암의 가장 혼란 형태는 난소 또는 난관의 상피 세포 층에서 발생하는 종양으로 구성된다. 이러한 상피 난소암은 장액 종양, 자궁내막모양 종양, 점액 종양, 투명 세포 종양, 및 경계선 종양을 포함한다. 다른 구현예에서, 항-KAAG1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 다른 유형의 난소암, 예를 들어, 생식세포 및 성근 난소암의 치료의 용도를 가진다.
- [0267] 특정 예에서, 항-KAAG1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 동일 병태에 대해 제공되는 다른 치료제와 조합하여 동시에 투여될 수 있다. 이와 같이, 항체는 항-유사분열제(예를 들어, 턱산), 백금-기반 작용제(예를 들어, 시스플라틴), DNA 손상 작용제(예를 들어, 독소루비신) 및 당업자에게 공지되어 있는 다른 항암 요법제와 함께 투여될 수 있다. 다른 예에서, 항-KAAG1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 다른 치료 항체와 함께 투여될 수 있다. 이들은 EGFR, CD-20, 및 Her2를 표적으로 하는 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0268] 본 발명은 이의 한 추가 양태에서 KAAG1-발현 세포의 성장을 억제하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 세포와 유효량의 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편을 접촉시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0269] 본 발명은 또한 포유동물에서 암을 치료하거나 KAAG1 발현 세포의 성장을 억제하는 방법을 포함하며, 상기 방법은, 예를 들어, 본원에 기재된 치료 모이어티와 컨쥬게이션된 항체 또는 항원 결합 단편을 필요로 하는 피검체에 투여하는 것을 포함할 수 있다.
- [0270] 추가 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편을 이용한 치료 방법, 진단 방법 및 탐지 방법, 및 상기 목적을 위한 약학적 조성물 또는 약물의 제조에서의 상기 항체 또는 항원 결합 단편의 용도를 제공한다.
- [0271] 따라서, 본 발명은 암의 치료(암에 대한 약학적 조성물의 제조)에서 본원에 기재된 분리된 항체 또는 항원 결합 단편의 용도에 관한 것이다.
- [0272] 항체 또는 항원 결합 단편은 더욱 특히, 예를 들어, 전이하는 능력을 갖는 악성 종양 및/또는 고정-독립적 성장을 특징으로 하는 종양 세포를 포함하는 악성 종양에 적용될 수 있다.
- [0273] 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편은 또한 암의 진단에서 사용될 수 있다. 암의 진단은 암을 갖거나 암을 갖는 것으로 의심되는 포유동물에 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편을 투여함으로써 생체내에서 수행될 수 있다. 진단은 또한 포유동물로부터 수득된 샘플과 항체 또는 항원 결합 단편을 접촉시키고, KAAG1 또는 KAAG1 변이체를 발현하는 세포(종양 세포)의 존재 또는 부재를 결정함으로써 생체외에서 수행될 수 있다.
- [0274] 따라서, 본 발명은 또한 포유동물에서 암을 탐지하거나 KAAG1 발현 세포를 탐지하는 방법을 포함하며, 상기 방법은 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편을 필요로 하는 피검체에 투여하는 것을 포함할 수 있다.
- [0275] 본 발명은 이의 또 다른 양태에서 KAAG1 또는 KAAG1 변이체를 발현하는 세포를 탐지하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 세포와 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편을 접촉시키고, 항체 및 KAAG1- 또는 KAAG1 변이체-발현 세포에 의해 형성된 복합체를 탐지하는 것을 포함할 수 있다. 탐지 방법에서 사용되는 항체 또는 항원 결합 단편의 예시적 구현예는 KAAG1의 세포외 영역에 결합할 수 있는 것이다.
- [0276] 탐지 방법에서 사용되는 항체 또는 항원 결합 단편의 다른 예시적 구현예는 종양 세포의 표면에서 발현된 KAAG1 또는 KAAG1 변이체에 결합하는 것이다.

- [0277] 본원에 기재된 치료, 탐지 또는 진단 방법으로부터 이득을 얻고자 하는 필요로 하는 피검체는 암, 예를 들어, 난소암(예를 들어, 장액, 자궁내막모양, 투명 세포 또는 점액), 피부암(예를 들어, 흑색종, 편평 세포 암종), 신장암(예를 들어, 유두상 세포 암종, 투명 세포 암종), 결장직장암(예를 들어, 결장직장 암종), 육종, 백혈병, 뇌종양, 갑상선 종양, 유방암(예를 들어, 유선 암종), 전립선암(예를 들어, 전립선 암종), 식도 종양, 방광 종양, 폐 종양(예를 들어, 폐 암종) 또는 두경부 종양을 갖거나 갖는 것으로 의심되는 피검체, 특히 암이 악성종양인 것을 특징으로 하는 경우 및/또는 KAAG1 또는 KAAG1 변이체를 발현하는 세포가 고정-독립적 성장을 특징으로 하는 경우의 피검체이다.
- [0278] 암을 갖는 피검체는 영상법, 조직 생검, 유전적 시험에 의해 확인될 수 있다. 대안적으로, 암을 갖는 피검체는 표준 검정(예를 들어, ELISA 등)을 이용한 피검체의 체액 내의 암 마커의 존재에 의해 확인될 수 있다.
- [0279] 특히, 난소암(예를 들어, 장액, 자궁내막모양, 투명 세포 또는 점액), 피부암(예를 들어, 흑색종, 편평 세포 암종) 또는 신장암(예를 들어, 유두상 세포 암종)을 갖거나 갖는 것으로 의심되는 환자, 특히 암이 악성종양인 것을 특징으로 하는 경우 및/또는 KAAG1 또는 KAAG1 변이체를 발현하는 세포가 고정-독립적 성장을 특징으로 하는 경우의 환자가 본 발명에 의해 포함된다.
- [0280] 본 발명의 또 다른 양태는 KAAG1(SEQ ID NO.:29), SEQ ID NO.:29와 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 KAAG1 변이체 또는 KAAG1 또는 KAAG1 변이체의 순환 형태의 분비 형태를 탐지하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 KAAG1 또는 KAAG1 변이체를 발현하는 세포 또는 KAAG1 또는 KAAG1 변이체를 포함하거나 포함하는 것으로 의심되는 샘플(생검, 혈청, 혈장, 소변 등)과 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편을 접촉시키고, 결합을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 샘플은 암(예를 들어, 난소암, 전이성 암)을 가질 수 있거나, 암(예를 들어, 난소암, 전이성 암)을 갖는 것으로 의심될 수 있는 포유동물(예를 들어, 인간)로부터 유래될 수 있다. 샘플은 포유동물로부터 수득된 조직 샘플 또는 세포 배양 상충액일 수 있다.
- [0281] 본 발명에 따르면, 샘플은 포유동물로부터 수득된 혈청 샘플, 혈장 샘플, 혈액 샘플, 정액 또는 복수일 수 있다. 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 유리하게는 KAAG1의 분비 또는 순환 형태(혈액 중에서 순환)를 탐지할 수 있다.
- [0282] 상기 방법은 KAAG1 또는 KAAG1 변이체에 결합된 항체 또는 항원 결합 단편에 의해 형성된 복합체를 정량하는 것을 포함할 수 있다.
- [0283] 항원에 대한 항체의 결합은 항원의 예상 분자량에서의 증가를 야기시킬 것이다. 따라서, 물리적 변화는 항체 또는 항원 결합 단편과 항원의 특이적 결합에 따라 발생한다.
- [0284] 이러한 변화는, 예를 들어, 전기영동 후 웨스턴 블로트 및 젤 또는 블로트의 착색, 질량분석법, 컴퓨터와 커플링된 HPLC, FACS 등을 이용하여 탐지될 수 있다. 분자량에서의 변화를 계산할 수 있는 장치는 당 분야에 공지되어 있고, 이는, 예를 들어, Phosphor imager™을 포함한다.
- [0285] 항체가, 예를 들어, 탐지 가능한 표지를 포함하는 경우, 항원-항체 복합체는 표지에 의해 방출되는 형광, 표지의 방사선 방출, 표지의 기질과 함께 제공되는 표지의 효소 활성 등에 의해 탐지될 수 있다.
- [0286] 항체 또는 항원 결합 단편과 항원 사이의 결합의 탐지 및/또는 측정은 당 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 수행될 수 있다. 항체 또는 항원 결합 단편과 항원 사이의 결합은 탐지 가능한 표지(방사선 방출, 형광, 색 변화 등)에 의해 방출된 신호를 탐지할 수 있는 장치로 모니터링될 수 있다. 이러한 장치는 결합이 발생한 것을 나타내는 데이터를 제공하며, 이는 또한 항원에 결합된 항체의 양에 관한 표시를 또한 제공할 수 있다. 장치(보통, 컴퓨터와 커플링됨)는 또한 백그라운드 신호(예를 들어, 항원-항체 결합의 부재하에서 수득된 신호) 또는 백그라운드 노이즈와 특이적 항체-항원 결합시에 수득되는 신호 사이의 차이를 계산할 수 있다. 따라서, 이러한 장치는 항원이 탐지되거나 탐지되지 않는지에 대한 표시 및 결론을 사용자에게 제공할 수 있다.
- [0287] 본 발명의 추가 양태는 본원에 기재된 하나 이상의 항체 또는 항원 결합 단편을 함유하는 하나 이상의 용기를 포함할 수 있는 키트에 관한 것이다.
- [0288] 핵산, 벡터 및 세포
- [0289] 항체는 보통 경쇄 및/또는 중쇄를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터(들)로부터 발현된 경쇄 및 중쇄의 발현을 가능케 하는 세포에서 제조된다.
- [0290] 따라서, 본 발명은 본원에 기재된 CDR, 경쇄 가변 영역, 중쇄 가변 영역, 경쇄, 중쇄 중 임의의 것을 인코딩할

수 있는 핵산을 포함한다.

[0291] 따라서, 본 발명은 한 추가 양태에서 KAAG1에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 경쇄 가변 영역 및/또는 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산에 관한 것이다.

[0292] 본 발명의 핵산의 예시적 구현에는,

[0293] a. SEQ ID NO.:8로 기재되거나 SEQ ID NO.:8을 포함하는 CDRL1;

[0294] b. SEQ ID NO.:9로 기재되거나 SEQ ID NO.:9를 포함하는 CDRL2; 또는

[0295] c. SEQ ID NO.:10로 기재되거나 SEQ ID NO.:10을 포함하는 CDRL3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산을 포함한다.

[0296] 본 발명에 따르면, 핵산은 CDRL1, CDRL2 또는 CDRL3 중 적어도 2개의 CDR을 포함할 수 있는 경쇄 가변 영역을 인코딩할 수 있다.

[0297] 또한, 본 발명에 따르면, 핵산은 하나의 CDRL1, 하나의 CDRL2 및 하나의 CDRL3를 포함할 수 있는 경쇄 가변 영역을 인코딩할 수 있다.

[0298] 본 발명은 또한,

[0299] a. SEQ ID NO.:5로 기재되거나 SEQ ID NO.:5를 포함하는 CDRH1 서열;

[0300] b. SEQ ID NO.:6로 기재되거나 SEQ ID NO.:6을 포함하는 CDRH2 서열; 또는

[0301] c. SEQ ID NO.:7로 기재되거나 SEQ ID NO.:7을 포함하는 CDRH3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산에 관한 것이다.

[0302] 본 발명에 따르면, 핵산은 CDRH1, CDRH2 또는 CDRH3 중 적어도 2개의 CDR을 포함할 수 있는 중쇄 가변 영역을 인코딩할 수 있다.

[0303] 본 발명에 따르면, 핵산은 하나의 CDRH1, 하나의 CDRH2 및 하나의 CDRH3를 포함할 수 있는 중쇄 가변 영역을 인코딩할 수 있다.

[0304] 또한, 적어도 하나의 보존성 아미노산 치환을 갖는 항체 변이체를 인코딩하는 핵산이 본 발명에 포함된다.

[0305] 본 발명에 따르면, 핵산은 적어도 하나의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 CDR을 인코딩할 수 있다.

[0306] 본 발명에 따르면, 핵산은 CDR 중 적어도 2개 내에 적어도 하나의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 CDR을 인코딩할 수 있다.

[0307] 본 발명에 따르면, 핵산은 3개의 CDR 내에 적어도 하나의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 CDR을 인코딩할 수 있다.

[0308] 본 발명에 따르면, 핵산은 CDR 중 적어도 하나 내에 적어도 2개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 CDR을 인코딩할 수 있다.

[0309] 본 발명에 따르면, 핵산은 CDR 중 적어도 2개 내에 적어도 2개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 CDR을 인코딩할 수 있다.

[0310] 본 발명에 따르면, 핵산은 3개의 CDR 내에 적어도 2개의 보존성 아미노산 치환을 포함하는 CDR을 인코딩할 수 있다.

[0311] 본 발명의 다른 양태는 SEQ ID NO.:4와 적어도 70%, 75%, 80%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산에 관한 것이다.

[0312] 본 발명의 또 다른 양태는 SEQ ID NO.:2와 적어도 70%, 75%, 80%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산에 관한 것이다.

[0313] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[0314] 본 발명에 따르면, 벡터는 밸런스 벡터일 수 있다.

[0315] 특정 숙주 내에서 삽입된 코딩 서열의 전사 및 번역 조절을 위한 요소를 함유하는 벡터는 당 분야에 공지되어

있다. 이들 요소는 조절 서열, 예를 들어, 인핸서, 항시성 및 유도성 프로모터, 및 5' 및 3' 비변역 영역을 포함할 수 있다. 당업자에게 널리 공지된 방법이 상기 발현 벡터를 작제하는데 이용될 수 있다. 이들 방법은 시험관내 재조합 DNA 기술, 합성 기술, 및 생체내 유전학적 재조합을 포함한다.

[0316] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 핵산, 항체 또는 항원 결합 단편을 포함할 수 있는 분리된 세포에 관한 것이다.

[0317] 분리된 세포는 별개의 벡터 또는 동일 벡터 상에 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산 및 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. 분리된 세포는 또한 별개의 벡터 또는 동일 벡터 상에 경쇄를 인코딩하는 핵산 및 중쇄를 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있다.

[0318] 본 발명에 따르면, 세포는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 발현하고/하거나, 조립하고/하거나, 분비할 수 있다.

[0319] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 항체를 포함할 수 있고/하거나 발현할 수 있는 세포를 제공한다.

[0320] 본 발명에 따르면, 세포는 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산 및 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있다.

[0321] 세포는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 발현하고/하거나, 조립하고/하거나, 분비할 수 있다.

[0322] 하기 실시예는 본 발명의 세부사항을 추가로 개설하기 위해 제시된다.

실시예

실시예 1

[0325] 본 실시예는 KAAG1에 항체 3A4가 결합하는 것을 기술한다.

[0326] KAAG1에 결합하는 항체를 알레르(Alere) 파아지 디스플레이 기술을 사용하여 생성하였다. 이들 항체를 생성하기 위한 상기 기술 및 방법에 대한 상세한 설명은 미국특허번호 6,057,098에서 찾아볼 수 있다. 추가적으로, KAAG1에 대한 항체의 생성에 관한 상세한 설명은 PCT/CA2009/001586에서 찾아볼 수 있다. 간단하게, 상기 기술은 항원 결합 단편(Fab)을 디스플레이하는 파아지 라이브러리의 염중한 패닝을 활용한다. 수 회의 패닝 후에, 옴니클로날(Omnyclonal)이라는 라이브러리가 수득되는데, 상기 라이브러리는 KAAG1에 매우 높은 친화도와 특이성으로 결합하는 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 재조합 Fab가 부화되어 있다. 상기 라이브러리, 더욱 상세히 지정하자면 옴니클로날 AL0003 A2ZB로부터, 96개의 개별적인 재조합 모노클로날 Fab를 이. 콜라이(*E. coli*)로부터 제조하고 KAAG1 결합에 대해 시험하였다. 3A4로 지정된 상기 모노클로날을 난소암세포의 표면에서 재조합 KAAG1에 대한 이의 높은 결합 활성도 및 KAAG1에 대한 이의 친화도에 기초하여 상기 96-웰 플레이트에 담긴 모노클로날 항체로부터 유도하였다.

[0327] 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 사슬의 가변 영역의 뉴클레오티드 서열을 각각 SEQ ID NO.:1 및 SEQ ID NO.:3에 도시하였고 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 사슬의 가변 영역의 폴리펩티드 서열을 각각 SEQ ID NO.:2 및 SEQ ID NO.:4에 도시하였다. 3A4 중쇄 면역글로불린의 상보성 결정 영역(CDR)들은 각각 SEQ ID NO.:5, SEQ ID NO.:6 및 SEQ ID NO.:7에 도시하였고 3A4 경쇄 면역글로불린의 CDR들은 각각 SEQ ID NO.:8, SEQ ID NO.:9 및 SEQ ID NO.:10에 도시하였다.

[0328] Fab 모노클로날과 KAAG1 단백질 사이의 상호작용 연구의 수행 가능성 이외에, Fab의 용도는 상기 항원의 생물학적 기능을 입증하기 위한 의미있는 시험관내(*in vitro*) 및 생체내(*in vivo*) 연구를 수행하는 것에 관하여 제한되어 있다. 따라서, 3A4 Fab에 함유된 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 전체 항체 골격(scaffold)으로 이동시켜 마우스-인간 키메릭(chimeric) IgG1을 생성시킬 필요성이 있었다. i) Fab 발현 벡터의 본래 세균성 신호 펩티드 서열 상류를 포유류 신호 펩티드로 대체하고 ii) 마우스 항체에서 경쇄 및 중쇄 불변 영역을 인간 불변 영역으로 대체함으로써 면역글로불린 경쇄 및 중쇄 둘 모두를 위한 발현 벡터를 작제하였다. 상기 이동을 수행하기 위한 방법은 당업자에게 익숙한 표준 분자생물학 기술을 사용하였다. 상기 방법론에 대한 간단한 개요를 본원에 기술한다.

[0329] 경쇄 발현 벡터 - 293E 일시적 트랜스펙션 시스템에 사용하기 위해 디자인된 pTTVH8G (Durocher et al., 2002)로 불리는 종래의 포유류 발현 플라스미드를 마우스 경쇄 가변 영역에 적용하기 위해 변형시켰다. 수득된 마우스-인간 키메릭 경쇄는 마우스 가변 영역에 이어 인간 카파(kappa) 불변 도메인을 함유하였다. 상기 인간 카파 불변 도메인을 인코딩하는 cDNA 서열을 프라이머 OGS1773 및 OGS1774(각각 SEQ ID NO.:11 및 SEQ ID

NO.:12)를 사용한 PCR에 의해 증폭시켰다. 인간 카파 불변 영역에 대한 뉴클레오티드 서열 및 상응하는 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO.:13 및 SEQ ID NO.:14에 도시되어 있다. 수득된 321개 염기쌍의 PCR 산물을 인간 VEGF A(NM_003376)의 신호 웨티드 서열의 바로 하류에 pTTVH8G 내로 라이게이션시켰다. 또한 상기 클로닝 단계를 통해 마우스 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 cDNA를 정확하게 위치시키도록 해주는 유일한 제한 엔도뉴클레아제 부위가 위치되었다. 최종 발현 플라스미드, 소위 pTTVK1의 서열은 SEQ ID NO.:15에 도시되어 있다. SEQ ID NO.:3에 도시된 3A4 경쇄 가변 서열에 기초하여, 상기 경쇄 가변 영역에 특이적인 PCR 프라이머를, VEGF A 신호 웨티드의 마지막 20개 염기쌍과 동일한 서열이 5'-말단에 혼입하도록 디자인하였다. 상기 프라이머의 서열은 SEQ ID NO.:16에 도시되어 있다. 역방향(reverse) 프라이머(SEQ ID NO.:17)은 인간 카파 불변 도메인의 처음 20개 염기쌍과 동일한 서열을 3'-말단에 혼입하였다. 상기 PCR 단편 및 효소분해된 pTTVK1 둘 모두를 3'-5' 액소뉴클레아제 활성을 가진 T4 DNA 중합효소로 처리하여 어닐링(annealing)에 의해 결합된 상보성 말단들을 수득하였다. 상기 어닐링 반응물을 적격 이. 콜라이 내로 형질전환시키고 상기 발현 플라스미드를 서열분석에 의해 확인함으로써 상기 마우스 경쇄 가변 영역이 pTTVK1 발현 벡터 내로 적절하게 삽입되었음을 확신하였다.

[0330] 중쇄 발현 벡터 - 상기 3A4 중쇄 면역글로불린을 생산하는 발현 벡터를 상기 경쇄 면역글로불린을 생산하기 위해 위에서 기술된 pTTVK1와 유사한 방식으로 디자인하였다. IgG1의 인간 Fc 도메인의 CH2 및 CH3 영역뿐만 아니라 인간 IgGK 신호 웨티드 서열을 함유하는 플라스미드 pYD11(Durocher et al., 2002)을, 인간 불변 CH1 영역을 인코딩하는 cDNA 서열을 라이게이션시킴으로써 변형하였다. 유일한 제한 엔도뉴클레아제 부위를 함유하도록 디자인된 PCR 프라이머 OGS1769 및 OGS1770(SEQ ID NO.:18 및 SEQ ID NO.:19)이, SEQ ID NO.:20 및 SEQ ID NO.:21에 도시된 뉴클레오티드 서열 및 상응하는 아미노산 서열을 함유하는 인간 IgG1 CH1 영역을 증폭시키기 위해 사용되었다. IgGK 신호 웨티드 서열의 바로 하류에 인간 CH1의 309개 염기쌍 단편을 라이게이션시킨 다음에, 상기 변형된 플라스미드(SEQ ID NO.:22)를 pYD15로 지정하였다. 선택된 중쇄 가변 영역을 상기 벡터내로 라이게이션시킨 경우, 수득되는 플라스미드는 인간 불변 영역을 가진 전체 IgG1 중쇄 면역글로불린을 인코딩하고 있다. 항체 3A4의 중쇄 가변 영역(SEQ ID NO.:1)에 특이적인 PCR 프라이머를, IgGK 신호 웨티드의 마지막 20개 염기쌍과 동일한 서열을 이의 5'-말단에 혼입하도록 디자인하였다. 상기 프라이머의 서열은 SEQ ID NO.:23에 도시되어 있다. 역방향 프라이머(SEQ ID NO.:24)는 인간 CH1 불변 도메인의 처음 20개 염기쌍과 동일한 서열을 이의 3'-말단에 혼입하고 있다. 상기 PCR 단편 및 효소분해된 pYD15 둘 모두를 3'-5' 액소뉴클레아제 활성을 가진 T4 DNA 중합효소로 처리함으로써 어닐링에 의해 결합된 상보성 말단들을 수득하였다. 상기 어닐링 반응물을 적격 이. 콜라이내로 형질전환시키고 상기 발현 플라스미드를 서열분석에 의해 확인함으로써 마우스 중쇄 가변 영역이 pYD15 발현 벡터내로 적절하게 삽입되었음을 확신하였다.

[0331] 293E 세포에서 인간 3A4 키메릭 IgG1의 발현 - 상기 경쇄 및 중쇄 면역글로불린을 인코딩하고 있는 위에서 제조된 상기 발현 벡터를 일시적 트랜스펙션 시스템을 사용하여 293E 세포에서 발현시켰다(Durocher et al., 2002). 경쇄 대 중쇄의 비(ratio)를 조직 배양 배지에서 항체의 최고 수율을 달성하도록 최적화하였고 이 비는 9:1(L:H)인 것으로 밝혀졌다.

[0332] KAAG1에 대한 키메릭 3A4의 결합 - 상기 3A4 모노클로날 항체의 상대적인 결합을 측정하기 위해, 대규모 일시적 트랜스펙션 기술을 사용하여 재조합 인간 KAAG1을 293E 세포에서 생산하였다(Durocher et al., 2002; Durocher, 2004). Fc 융합 단백질로서 인간 재조합 KAAG1의 발현 및 정제는 PCT/CA2009/001586에 밝혀져 있다. 상기 항체 제조물에 대한 Fc-KAAG1의 결합을 수행하기 위해, 상기 Fc-KAAG1을 NHS-바이오틴(Pierce, Rockford, IL)으로 바이오틴화시키고 10ng/웰을 실온에서 1시간 동안 스트렙타비딘 96-웰 플레이트에서 코팅시켰다. 정제된 키메릭 3A4를, 농도를 증가시키면서 첨가하고 실온에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. TMB 액체 기질(Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON)의 존재하에 HRP-컨쥬게이션된 인간 항-카파 경쇄 항체를 사용하여, 결합된 항체를 탐지하였고 마이크로타이터(microtiter) 플레이트 판독기로 450nm에서 판독을 수행하였다. 도 1에 도시된 바와 같이, 3A4는 용량-의존적 방식으로 고정된 KAAG1 단백질과 상호작용하였다. 상기 대조구 비관련 IgG를 상기 재조합 KAAG1과 함께 인큐베이션시켰을 때에는, 심지어 극도로 가장 높은 농도에서조차, 어떠한 결합 활성도 관찰되지 않았다. 이러한 결과는, 3A4가 인간 KAAG1에 결합함을 보여주는 것이다. 3A4의 결합은 상이한 에피토프 특이성을 가진 키메릭 3D3의 결합(Tremblay and Filion, 2009에 기술됨)에 필적하였다(실시예 2 참조). 3A4의 결합 활성은 이러한 형태의 검정에서 3D3와 매우 유사하다(도 1 참조).

[0333] 실시예 2

본 실시예는 KAAG1의 어느 영역에 3A4 항체가 결합하는지를 결정하기 위한 에피토프 매핑 연구에 대해 기술한다.

[0335]

상기 3A4 항체에 의해 결합된 KAAG1의 영역을 추가로 설명하기 위해, KAAG1의 트렁케이션된(truncated) 돌연변 이를 발현시켜고 ELISA에서 사용하였다. 전장 KAAG1에 대하여 말하자면, 상기 트렁케이션된 버전을 PCR에 의해 증폭시키고 BamHI/HindIII로 효소분해된 pYD5내로 라이케이션시킨 것이다. 사용된 상기 프라이머를, SEQ ID NO.:25에 도시된 서열을 갖는 정방향(forward) 올리고뉴클레오티드와 함께 SEQ ID NO.:26 및 SEQ ID NO.:27의 프라이머를 조합함으로써, 각각 KAAG1의 아미노산 번호 60 및 35에서 종결되는 Fc-융합된 단편들을 생산하였다. 이들 재조합 돌연변이의 발현을 전장 Fc-KAAG1에 대해 위에서 기술된 바와 같이 수행하였고 단백질-A 아가로오스를 사용하여 정제하였다.

[0336]

문헌(Tremblay and Filion, 2009)의 교시에 근거하여, 다른 항체들이 재조합 KAAG1의 특정 영역과 상호작용함은 공지되어 있었다. 따라서, 항-KAAG1 항체 3C4, 3D3 및 3G10은 각각 KAAG1의 영역 1-35, 36-60 및 61-84와 상호 작용하였다. 이들 결합 결과를 재현시켰고 도 2에 도시하였다. 상기 3A4 항체에 의해 결합된 KAAG1내 영역을 결정하기 위해, 실시예 1에 기술된 유사한 프로토콜에 따라 KAAG1 트렁케이션된 Fc-융합체를 사용하여 ELISA를 수행하였다. 유일하게 변경시킨 것은 상이한 바이오티닐화된 Fc-KAAG1 트렁케이션된 돌연변이를 사용한 것이었다. 상기 결과는 3A4의 결합 특이성이 3G10과 유사함을 보여준다. 아미노산 60을 넘는 아미노산 서열을 가지고 있지 않은 KAAG1 돌연변이에서, KAAG1에 대한 3A4의 결합은 일어나지 않았다. 이는 3A4가 인간 KAAG1의 아미노산 61-84에 의해 설명된 영역과 상호작용함을 나타낸다. 3A4 및 3D3이 ELISA에 의해 측정된 바와 같이 사실상 동일한 결합 활성을 가지지만(실시예 1) 매우 상이한 에피토프 특이성을 가진다는 관찰은 3A4의 상기 결합 특성이 3D3과 뚜렷이 구별됨을 시사한다.

[0337]

실시예 3

[0338]

본 실시예는 암세포주의 표면에서 KAAG1에 결합하는 3A4의 능력에 대해 기술한다.

[0339]

유세포분석법(flow cytometry)을 사용하여 세포주의 표면에서 KAAG1을 탐지하였다. KAAG1 mRNA 특이적 프라이머를 사용한 RT-PCR 별현 분석에 기초하여, 선택된 암세포주는 KAAG1 단백질을 발현할 것으로 예상되었다. 이를 입증하기 위하여, 난소암세포(SKOV-3 및 TOV-21G)와 KAAG1를 거의 발현하지 않는 대조 세포주(293E). 상기 세포들을 5mM EDTA를 사용하여 수화하고, 혈구계(hemocytometer)를 사용하여 계수하고, 2×10^6 세포/ml의 세포 밀도로 FCM 완충액(0.5% BSA, 1x PBS 중의 10 μ g/ml 염소 혈청)에 재현탁시켰다. 키메릭 3A4 또는 대조 IgG를 5 μ g /ml의 최종 농도로 100 μ l의 세포에 첨가하고 2시간 동안 빙상에서 인큐베이션시켰다. 상기 세포를 냉장 PBS에서 세척하여 결합되지 않은 항체들을 제거하고, 2차 항체로서 FITC에 컨쥬게이션된 항-인간 IgG(1:200으로 희석된)를 함유하는 100 μ l FCM 완충액에 재현탁시키고 빙상에서 45분 동안 인큐베이션시켰다. 냉장 PBS에서 또 다른 세척 단계를 후속하고, 상기 세포를 250 μ l FCM 완충액에 재현탁시키고 유세포분석기를 사용하여 분석하였다. 본 실험의 결과를 도 3a 및 도 3b에 도시하였다. 상기 세포주를 상기 대조 항체와 함께 인큐베이션시키는 것은, 상기 항체가 상기 세포로부터 제외되었을 때 전형적으로 얻어지는 상기 신호에 상응하는 히스토그램을 초래하였다. 이는 상기 FCM 값의 백그라운드(background) 신호를 규명한 것이다(도 3a 및 도 3b). 대조적으로, SKOV-3 및 TOV-21G를 3A4 키메릭 항체와 함께 인큐베이션시키는 것은 강한 형광 신호를 초래하였다(도 3a). 이는 상기 항체가 이를 암세포의 표면에서 KAAG1을 효율적으로 탐지함을 나타내는 것이다. 인간 신장 세포주인 293E 세포는 KAAG1을 거의 발현하지 않는 것으로 예상되었고 실제로, FCM 히스토그램은 대조 항체와 비교하여 거의 변화가 없었다(도 3b 참조). 그러므로, 3A4는 암세포의 표면에서 KAAG1을 특이적으로 탐지하였다. 3A4의 활성을 문헌(Tremblay and Filion, 2009)에 교시되어 있는 항-KAAG1 항체인 3D3와 비교하였다. 본 특허 출원에 기초하여, FCM에 의해 측정된 바와 같이 3D3이 암세포의 표면에서 KAAG1을 탐지할 수 있음이 공지되었다. 이는 상기 3D3을 SKOV-3 및 TOV-21G 세포의 존재하에 인큐베이션시켰을 때 확인되었다(도 3a 참조). 상기 형광 신호는 상기 3A4에 비해 높지 않았는데, 이는 3A4가 난소암세포의 표면에서 KAAG1을 탐지하는 상이하고 증가된 능력을 가지고 있음을 나타낸다. 당 실험실에서 수득된 다른 결과들은 본 검정에서 3D3가 어떠한 활성도 보이지 않는 조건 하에서 3A4가 암세포의 표면에서 KAAG1을 탐지할 수 있는 것으로 나타났다(결과 도시하지 않음). 종합하면, 3D3와 비교하여 3A4의 에피토프 특이성에 있어서 이를 관찰 및 차이점을 이들 항체가 명백한 항-KAAG1 특성을 가짐을 시사한다.

[0340]

실시예 4

[0341]

항체 컨쥬게이트로서 3A4 항-KAAG1 항체를 사용하는 방법

[0342]

상기에서 입증된 바와 같이, KAAG1 항원은 유세포분석기를 사용하여 암세포의 표면에서 3A4에 의해 탐지되었다. 세포 표면에서 항체가 항체의 표적에 결합할 때 일어날 수 있는 몇 가지 상이한 문자적 이벤트가 존재한다. 이

에는 i) 또 다른 세포-표면 항원/수용체 또는 리간드에 대한 접근성을 블로킹(blocking), ii) 세포가 ADCC 또는 CDC를 통해 표적화되도록 하는 비교적 안정한 항체-항원 복합체의 형성, iii) 아고니스틱(agonistic) 항체에 의해 예시되는 바와 같이 신호전달(signalling) 이벤트가 일어날 수 있는 것, iv) 상기 복합체가 내재화될 수 있는 것, 또는 v) 상기 복합체가 상기 세포 표면으로부터 쇄딩(shedding)될 수 있는 것이 포함된다. 이 문제를 다루기 위해, 본 발명자들은 상기 세포의 표면에서 상기 3A4 항체-KAAG1 복합체의 양상에 대해 조사하고자 하였다. 실시예 3에 기술된 바와 같이 SKOV-3 세포를 플레이팅하고, 세척하고, 5 μ g/ml 키메릭 3A4 항체와 함께 인큐베이션시켰다. 세척 후에, 완전한 OSE 배지를 첨가하고 상기 세포를 최대 90분 동안 37°C에서 정지시켰다. 상기 세포를 지정된 시간에 회수하여(도 4 참조), 급속히 냉각시키고, FITC-컨쥬게이션된 항-인간 IgG와 함께 세포분석을 위해 준비하였고, 그 결과를 잰존하는 평균 형광 강도의 퍼센트(평균 형광 강도, %)로 표현하였다. 도 4에 도시된 바와 같이, 상기 형광 신호는 30분 내지 45분 구간에 걸쳐 급격히 감소하였다. 이러한 결과는 상기 3A4/KAAG1 복합체가 세포로부터 사라졌음을 나타내며, 이는 상기 복합체의 내재화가 일어났을 수 있음을 나타내는 것이다. 세포-표면 형광에 있어서 이러한 감소의 원인이 되는 메커니즘을 설명하기 위한 예비 연구들을 통하여 상기 복합체가 내재화된 것으로 나타났음이 밝혀진 바 있다.

[0343] 이러한 발견은 상기 내재화가 현미경으로 관찰될 수 있는지를 알아보기 위해 생세포(live cell)상에서 면역형광을 수행함으로써 추가로 확인되었다. SKOV-3 세포를 커버 슬립(cover slip)위에 전체 배지(10% FBS, 2mM 글루타민, 1mM 나트륨-파루브산, 1X 비-필수 아미노산 및 항생제를 함유하는 OSE 배지(Wisent)) 중에 시딩(seed)하였다. 일단 상기 세포가 적절하게 부착되면, 10 μ g/ml로 상기 3A4 항-KAAG1 키메릭 항체를 함유하는 신선한 배지를 첨가하고 4시간 동안 37°C에서 인큐베이션시켰다. 상기 세포를 PBS 중에 세척한 다음 20분 동안 4% 파라포름알데히드(PBS 중의)에서 고정시켰다. 세척 후에, 상기 세포를 5분 동안 PBS 중의 0.1% 트리톤(Triton) X-100을 사용하여 투과시켰다. 1시간 동안 PBS 중의 1.5% 탈지유를 사용하여 블로킹을 수행하였다. 리소좀-결합 막 단백질 1(LAMP 1, Chang et al., 2002)을 2시간 동안 PBS 중의 1.5% 밀크(milk)에 항-LAMP1(Santa Cruz, sc-18821, 1:100으로 희석)과 함께 인큐베이션시킴으로써 탐지하였다. PBS에서 세척 후에, 상기 이차 항체를 1.5% 밀크에 함께 첨가하고 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 상기 항-KAAG1 키메릭 항체에 대한 상기 이차 항체는 1:300으로 희석된 Rhodamine Red-X 컨쥬게이션된 당나귀 항-인간 IgG (H+L)였다. 항-LAMP1 항체에 대한 상기 이차 항체는 1:300으로 희석된 DyLight488-컨쥬게이션된 염소 항-마우스 IgG (H+L)였다. 상기 이차 항체 둘 모두는 Jackson ImmunoResearch사로부터 입수하였다. 상기 커버슬립을 PBS 중에 세척하고 DAPI와 함께 ProLong Gold Antifade 시약 중에 마운팅(mounting)하였다. 도 5A에 도시된 바와 같이, SKOV-3 난소암세포의 존재하에 37°C에서 4시간 인큐베이션시킨 후에, 상기 3A4 항체는 주로 핵주위 지역 근처의 복합체에서 탐지될 수 있었는데(화살표, 도 5A의 좌측 패널에서 빨간색 염색 참조), 이는 전형적인 엔도솜-리소좀-기반 내재화 경로이다. 이러한 관찰은 리소좀 마커, LAMP1이 가시화될 때 추가로 확인되었으며 이들 지역에서 또한 발현되는 것으로 밝혀졌다(화살표, 도 5A의 중앙 패널에서 녹색 염색 참조). 중요하게는, 상기 두 이미지의 병합은 상기 3A4 및 상기 항-LAMP1 항체가 동일한 구조로 존재함을 나타내는 노란색-오렌지색 구조 모양이 되었다(화살표, 도 5A의 우측 패널에서 노란색 염색 참조). 후기 엔도솜/리소좀의 마커인 LAMP1과 함께 암세포의 표면에서 KAAG1과 결합하는 3A4의 공동-국소화(co-localization)는 항체/항원 복합체가 내재화되었고 상기 3A4 항체에 컨쥬게이션될 유상적 재량(payload)의 방출에 대해 처리가능한 경로를 따름을 보여준다. 동일한 결과가 또 다른 암세포주, TOV-21G에서 관찰되었다(도 5B 참조).

[0344] 종합하면, 이들 연구는 3A4와 같은 KAAG1에 특이적인 항체가 항체-약물 컨쥬게이트(ADC)로서의 용도를 가질 수도 있음을 입증하였다. 따라서, 세포에 내재화되는 상기 표적의 능력과 결합된 KAAG1의 높은 수준의 난소암 특이성은 ADC로서의 응용 개발을 뒷받침할 것이다.

실시예 5

[0345] 암세포의 표면에서 KAAG1의 우선적인 탐지

[0346] KAAG1 단백질의 상이한 에피토프들과 상호작용하는 몇몇 항체들이 개발되었음에도 불구하고, KAAG1이 온전한 암 세포의 표면에서 발현될 때 이들 에피토프의 접근성에 대해서는 완전히 밝혀지지 않았다. KAAG1의 일차 아미노산 구조(상기 인간 단백질에서 아미노산의 총 수는 84개이다)에 대한 생물정보학적 분석을 통해 막투과 도메인에 상응할 수도 있는 어떠한 명백한 서열도 밝혀지지 않았고 따라서 어떻게 KAAG1이 세포막에 고정되었는지는 완전히 알려지지 않았었다.

[0347] KAAG1에 대해 생성된 상기 항체들은 상기 KAAG1 단백질에서 3개의 상이한 영역에 결합하는 것으로 밝혀졌다 (PCT/CA2009/001586 참조). 상기 항체 대부분은 상기 KAAG1 단백질에서 아미노산 35-60과 상호작용하고 이는 본

원에서 항체 3D3 및 3G12에 의해 예시되어 있다. 아미노산 61-84 사이인 KAAG1의 카르복시-말단과 상호작용하는 항체들은 항체 3A4에 의해 예시되어 있다. 마지막으로, 3C4에 의해 예시된 바와 같이, 상기 단백질의 아미노-말단 영역과 상호작용하는 항체들은 KAAG1을 발현하는 세포와 거의 결합하지 않는 것으로 나타났다.

[0349] 본원은 KAAG1이 세포에서 발현될 때 상기 카르복시-말단 영역(아미노산 61-84)이 세포외 공간으로 노출되고 상기 영역을 표적화하는 항체들이 KAAG1-양성 세포를 탐지하여 잠재적으로 치료하는데 가장 효율적임을 보여준다. 또한 KAAG1의 중간 영역(아미노산 35-60)에 결합하는 항체들은 상기 세포 표면에서 KAAG1을 탐지할 수 있지만 그 정도는 상기 카르복시-말단과 상호작용하는 항체보다 낮았다.

[0350] SKOV-3와 같은 난소암 세포주는 KAAG1 발현에 대해 양성이다. 세포 표면 단백질의 탐지를 가능하게 해주는 방법이며 당업자에게 널리 공지되어 있는 유세포분석법에 의해 KAAG1 발현을 탐지하기 위해 상기 세포들을 사용하였다. 간단하게, 각 샘플에 대해 1 μ g/ml 농도로 상기 일차 항체(항-KAAG1 또는 상기 대조 항체)와 함께 1시간 동안 빙상에서 100,000개 세포를 인큐베이션시켰다. 빙냉 PBS를 사용하여 수 회 세척한 후에, 염색된 세포를, 상기 세포에 결합된 상기 일차 항체의 존재를 탐지하는 플루오로크롬(FITC)에 컨쥬게이션된 상기 이차 항체와 함께 인큐베이션시켰다. 수 회의 추가적인 세척 후에, 상기 세포를 유세포분석기를 사용하여 분석하였다. 도 6에 도시된 이 결과는 계수(세포)를 나타내는 Y-축과 형광의 양(형광 신호)을 나타내는 X-축을 보여준다. SKOV-3 세포를 상기 3A4 항체와 함께 인큐베이션시켰을 때, 형광에서 큰 변화가 관찰되었는데 이는 상기 세포의 표면에 KAAG1 단백질이 풍부하게 존재하고(도 6a) 상기 항체에 의해 효율적으로 인식되었음을 나타내는 것이다. 동일한 조건하에서, KAAG1의 중간 영역과 상호작용하는 상기 항체들, 3G12 및 3D3(도 6a)은 KAAG1을 탐지하는 효과가 현저하게 낮았다. 상기 세포를 증가된 농도의 3G12 또는 3D3과 함께 인큐베이션시켰을 때, KAAG1은 상기 세포 표면에서 탐지될 수 있었다(도시 안함). 상기 세포를 상기 대조 IgG(도 6a) 또는 KAAG1의 아미노 말단에 대한 항체인 상기 3A4(도 6a)와 함께 인큐베이션시켰을 때, 어떤 신호도 관찰되지 않았다. 이들 결과는 KAAG1의 카르복시-말단과 상호작용하는 항체들이 KAAG1의 다른 영역에 대한 항체들보다 더욱 효율적으로 암세포의 표면에서 상기 항원을 탐지할 수 있음을 나타낸다. 이것은 KAAG1의 카르복시-말단이 상기 세포의 세포외(외부) 공간에 노출되어 있음을 암시한다. 유사한 결과가 KAAG1을 발현하는 다른 암세포주에 대해서 수득되었다.

[0351] 본 실험은 또한 트리톤 X-100을 사용하여 투과될 수 있도록 한 SKOV-3 세포에서 수행되었다. 세포막을 투과할 수 있도록 하고 막단백질을 방출시키기 위해 전형적으로 트리톤 X-100을 사용하였다. 상기 투과가능 세포를 3A4 와 함께 인큐베이션시키고 유세포분석기에서 측정하였을 때(도 6b 참조), 상기 신호는 온전한 세포에서 수득된 신호와 유사하였다. 명백하게도, 상기 투과가능 세포를 KAAG1의 중간 영역에 결합하는 3G12 항체와 함께 인큐베이션시켰을 때(도 6b), 상기 신호는 상기 3A4만큼 강하였다. 이들 결과는 KAAG1의 중간 영역이 상기 세포막 또는 상기 세포의 내부에 존재할 가능성을 나타내는 것이다. 유사한 결과가 또 다른 중간-영역 결합체인 3D3 항체를 사용하여 수득되었으나(도 6b) 3D3에 대해 수득된 신호는 그리 강하지는 않았다. 이전과 같이, IgG 대조구는 본 검정에서 어떠한 탐지가능한 신호도 보이지 않았다(도 6b). 흥미롭게도, 상기 세포를 KAAG1의 아미노 영역에 결합하는 상기 3C4 항체와 함께 인큐베이션시키는 것은 어떠한 탐지가능한 신호도 초래하지 않았다(도 6b). 이러한 마지막 결과는 KAAG1의 아미노 영역이 상기 세포막으로 상기 단백질이 이동하는 동안에 절단될 가능성을 시사하는 것이다.

[0352] 종합하면, 상기 실험들은 KAAG1 항원이 암세포의 표면에서 발현될 때 상기 KAAG1 항원의 구조 및 방향성에 대한 많은 이해를 제공한다. 이들 자료에 기초하여, 상기 세포 표면에서 KAAG1의 구조에 대한 두 가지 모델을 제안한다(도 7). 첫 번째 모델(도 7, 모델 A)에서, 상기 데이터는 상기 중간 부분이, 실제로 세포외 공간에 단지 부분적으로 노출되어 있는 KAAG1의 막투과 영역임을 시사한다. 이는 KAAG1의 상기 카르복시-말단이 용이하게 탐지될 수 있도록 하고 상기 중간 영역이 더욱 결합하기 어렵게 만들 것이다. 두 번째 모델(도 7, 모델 B)에서, KAAG1은, 그 자체가 상기 세포막에 매립되어 있는 또 다른 단백질에 의해 상기 막에 고정되어 있다. 다시 말하면, 상기 카르복시-말단은 3A4와 같은 항체에 의해 용이하게 접근가능할 것이지만 KAAG1과 상기 단백질 파트너 사이의 상호작용은 상기 중간 영역에 접근하는 것을 어렵게 만들 것이다. 결과는 투과가능 세포의 존재하에서 시험된 상기 (3A4에 의해 예시된 바와 같은) 카르복시-말단 결합체 및 (3G12 및 3D3에 의해 예시된 바와 같은) 중간-영역 결합체 둘 모두로 구성된 항체들은 두 모델 모두와 일치하는 것을 보여준다. 온전한 세포 또는 투과가능 세포에서 KAAG1에 결합하는 상기 3C4 항체의 불능은 KAAG1의 성숙한 프로세싱된(processed) 막 형태의 상기 아미노-말단에 포함된 아미노산의 결실로 인한 것으로 보이며 두 모델 모두는 이것과 일치한다.

[0353] 이들 결과는 암세포에서 KAAG1의 상기 카르복시-말단, 특히 아미노산 61-84에 걸쳐 이어지는 상기 영역을 표적화하는 항체들이, KAAG1을 발현하는 암종의 치료를 위해 치료제로서 사용하기 위한 항체의 개발을 위해 가장 적합함을 암시한다. 추가로, 상기 카르복시-말단 영역에 결합하는 상기 KAAG1 항체에 대한 다른 용도에는 KAAG1을

발현하는 암종의 탐지를 위한 진단 시약이 포함된다.

- [0354] 상기 3A4 항체와 유사한 결합 특이성을 가진 항체 또는 항원 결합 단편은 하이브리도마 기술을 포함하는 당 분야에 공지된 방법에 따라 KAAG1의 C-말단 부분을 사용하여 동물을 면역화시키고/시키거나, KAAG1의 상기 C-말단 부분을 사용하여 항체 또는 항원 결합 단편의 라이브러리를 스크리닝하고/하거나 본원에 기술된 상기 3A4 항체를 사용하여 분리된 항체 또는 항원 결합 단편의 경쟁 검정을 수행함으로써 생성되거나 분리될 수도 있다.

[0355] 실시예 6

3A4 마우스 모노클로날 항체의 디자인에 의한 인간화

마우스 3A4 모노클로날 항체의 가변 영역의 3D 모델링

- 본 실시예는 상동성 모델링에 의해 수행되었다. 상기 경쇄 및 중쇄의 뮤린 3A4 가변 영역 서열들(SEQ ID NO.:4 및 SEQ ID NO.: 2)에 대한 가장 유사한 템플릿 구조들을 PDB에 대한 BLAST 서치에 의해 확인하였다. 상기 마우스 3A4 가변 영역의 초기 모델을 수립하기 위해 다음의 템플릿 구조들을 사용하였다(PDB 코드): 상기 경쇄에 대해 2IPU(사슬 L), 및 상기 중쇄에 대해 1F11(사슬 B). 다른 적합한 템플릿은 상기 경쇄에 대해 PDB 엔트리 2DDQ에서, 그리고 상기 중쇄에 대해 PDB 엔트리 3IY3, 1KTR, 2VXT, 1A6T 및 1IGI에서 발견될 수 있다. 요구되는 돌연변이는 상기 뮤린 3A4 서열에 따라 이들 템플릿 구조에 대해 조작되었다: 상기 2IPU 경쇄에서 7개 돌연변이, 및 상기 1F11 중쇄에서 17개 돌연변이에 추가하여 3-잔기 결실. 상기 뮤린 3A4 가변 영역의 중쇄 및 경쇄에 상응하는 상기 돌연변이된 구조를, 상기 각각의 템플릿 구조의 중쇄 및 경쇄를 중첩시킴으로써 2-사슬 항체 구조내로 조립하였다. 상기 조립된 3A4 가변 영역의 수득된 구조를, CDR 루프(loop)를 처음 이완시키는 것부터 마지막 단계가 되어서야 상기 프레임워크(framework) 영역의 골격 중원자(heavy atom)까지 완전히 이완시키는 범위에서, AMBER 힘의 장 및 제약의 단계적 해제와 함께 에너지 최소화에 의해 우선 개선하였다. 그런 다음 각 항체 가변 영역 구조에서 상기 CDR-H3 루프를 몬테-카를로-최소화(Monte-Carlo-minimization)(MCM) 형태적(conformational) 샘플링에 의해 개선하였고, 여기서 상기 CDR-H3 영역에서의 이면각(dihedral angle)은 각각의 MCM 사이클에서 샘플링되었고 상기 CDR-H3 루프의 초기 형태(conformation) 주위를 10 Å 확장한 기정 영역의 에너지 최소화를 후속하였다. 상기 마우스 3A4 항체의 상기 모델링된 가변 영역의 대표적인 것을 도 8에 도시하였다. 또한 각각의 상기 3A4 가변 서열과 가장 유사한 상기 인간 또는 인간화된 가변 서열의 구조를 PDB로부터 확인하였고, 그 다음에 상기 뮤린 3A4 가변 영역의 상기 모델링된 구조 위에 중첩시켰다. 이들 구조는 상기 경쇄에 대해 PDB 엔트리 3QCT, 3AAZ, 1WT5 및 3M80, 및 상기 중쇄에 대해 PDB 엔트리 1I9R, 3NFP, 1T04, 1ZA6, 3HC4, 2D7T 및 1WT5를 포함한다. 이들 구조를, 상기 모델링된 뮤린 3D-구조로부터 시작하여 상기 인간화된 3D-구조를 만들기 위해 상기 프레임워크 영역에서 돌연변이의 모델링 시 조력하기 위해 사용하였다.

상기 마우스 3A4 아미노산 서열 및 모델링된 구조의 특징화

- [0359] 본 단계는 상기 인간성 지수, 항원 접촉 경향 지수를 추정하고, 상기 CDR, 기본형 잔기, 사슬간 팩킹(VH/VL 인터페이스 잔기), 가변-/불변-영역 팩킹(VH/CH 및 VL/CL 인터페이스 잔기), 비정상 프레임워크 잔기, 잠재적 N- 및 O-글리코실화 부위, 매립된 잔기, 베니어 존(Vernier zone) 잔기, 및 CDR에 대한 근접성을 묘사하기 위해 수행되었다. 인터넷으로 이용가능한 자원 및 지역 소프트웨어가 이러한 특성을 평가하기 위해 사용되었다.

상기 마우스 CDR에 대한 최상의 인간 경쇄 및 중쇄 프레임워크의 선택

- [0360] 본 단계는 인간 프레임워크 컨센서스 서열의 세트뿐만 아니라 다른 서열 라이브러리(Genbank 및 SwissProt)에 대해, 인간 생식세포 데이터베이스(VBASE)의 일부분 사본에 대한 표준 서열 상동성 비교에 의해 수행되었다. 상기 CDR 루프의 길이가 일치하면서도 상기 프레임워크 영역에서만 (따라서 CDR을 제외한) 가장 높은 상동성을 가지면서 일치하는 서열을 검색하기 위해 BLAST 서치를 수행하였다. 상기 인간 프레임워크는 상기 k2 및 h1 클래스에 각각 상응하는 상기 3A4 항체의 경쇄 및 중쇄에 대해 확인되었다. 상기 3A4 프레임워크 서열과 가장 유사한 몇몇의 인간 생식세포 프레임워크 서열을 이들 클래스에 대해 상기 인간 컨센서스 서열에 추가하여 존속시켰다.

역-돌연변이에 대한 프레임워크 잔기의 확인 및 다중 인간화된 변이체의 디자인

- [0361] 본 단계는 특히 주의해서 상기 상응하는 인간 서열에 대해 돌연변이되어야 하는 아미노산 잔기들을 표시하는 중요한 단계이다. 이들 잔기는 친화도를 상실한 경우에 상기 마우스 서열에 대한 역-돌연변이를 위한 일차 후보들을 나타낸다. 이것은 특히 상기 항체-항원 복합체의 실험적 구조의 부재시에, 디자인에 의한 인간화에 있어서 가장 곤란하고 예측불가능한 단계이다. 이는 하나 이상의 다음 카테고리에서 잔기들의 확인에 의존한다:

기본형, CDR-H3, 베니어 존, 비정상, CDR-근접성(5Å 이내), 사슬간 팩킹, 및 글리코실화-부위 잔기들. 이러한 잔기들은 항원-결합 부위 및 친화도에 직접적으로 또는 간접적으로 영향을 줄 수 있다. 또한 각 위치의 인간 생식세포 데이터베이스에서 아미노산 존재뿐만 아니라 상기 항원 접촉 경향도 지수는 특정 잔기가 상기 마우스 서열로부터 상기 인간 서열로 안전하게 돌연변이될 수 있는지를 결정하는데에 극히 중요하다. 상기 3A4 항체 경쇄 가변 영역의 인간화는 100% 프레임워크 인간화를 위해 이의 제안된 인간화된 프레임워크에 대해 11개의 돌연변이를 포함한다. 상기 3A4 항체 중쇄 가변 영역의 인간화는 100% 프레임워크 인간화를 위해 이의 제안된 인간화된 프레임워크에 대해 23개의 돌연변이를 포함한다. 이들 100% 인간화된 가변 영역 서열을 각각 Lvh1 및 Hvh1으로 표지하였다(SEQ ID NO.:33 및 SEQ ID NO.:38). 또한 추가적인 인간화된 서열을 디자인하였는데 여기서 상기 3A4 마우스 서열로부터의 몇몇 잔기를, 돌연변이가 이들 위치에 도입되는 경우 항원-결합 친화도를 변경시킬 가능성이 높음을 나타내는 주의깊은 구조적 및 상대적 서열 분석에 기초하여 잔준시켰다. 상기 가변 영역의 서열들을 Lvh2, Hvh2, Hvh3 및 Hvh4로 표지하였다(SEQ ID NO.:34, SEQ ID NO.:39, SEQ ID NO.:40 및 SEQ ID NO.:41).

[0365]

상기 2개의 인간화된 경쇄 변이체(상기 불변 영역을 포함하는)는 본원에서 Lh1(SEQ ID NO.:43) 및 Lh2(SEQ ID NO.:44)로서 확인된다. 상기 4개의 인간화된 중쇄 변이체(상기 불변 영역을 포함하는)는 본원에서 Hh1(SEQ ID NO.:46), Hh2(SEQ ID NO.:47), Hh3(SEQ ID NO.:48) 및 Hh4(SEQ ID NO.:49)로서 확인된다. 상기 2개의 인간화된 경쇄 및 4개의 인간화된 중쇄는 8개의 인간화된 항체로 조립될 수 있다(Lh1Hh1, Lh1Hh2, Lh1Hh3, Lh1Hh4, Lh2Hh1, Lh2Hh2, Lh2Hh3, 및 Lh2Hh4). 이들 조합 모두에 대한 문자적 모델을 상기 뮤린 3A4 가변 영역의 3D 모델로부터 시작하는 상동성 모델링에 의해 작성하였고, 도 9a 내지 도 9h에 도시하였다.

[0366]

3A4 경쇄 인간화된 서열 Lvh2(SEQ ID NO.:34)의 경우에는, 잔기 L2가 절반-매립되어 있고, CDR-L1 및 CDR-L3 둘 모두와 접촉하고 있으며, 항원-접촉 경향을 가지는 반면, 잔기 L45는 상기 중쇄에 접촉하고 있기 때문에 프레임워크 잔기 Val-L2 및 Lys-L45를 상기 마우스 서열로부터 잔준시켰다. 본 발명자들은 이들 뮤린 잔기 모두가 인간 프레임워크에 존재할 수 있음을 알고 있다. 3A4 중쇄 인간화된 서열 Hvh2(SEQ ID NO.:39)의 경우에는, 잔기 H2가 절반-매립되어 있고, CDR-H1 및 CDR-H3 둘 모두와 접촉하고 있으며, 항원-접촉 경향을 가지고 있는 반면, 잔기 H73은 CDR-H2를 지지하는 베니어 존에 속해있기 때문에 프레임워크 잔기 Ile-H2 및 Lys-L73을 상기 마우스 서열로부터 잔준시켰으며, 이들 뮤린 잔기 모두가 인간 프레임워크에 존재할 수도 있다. 3A4 중쇄 인간화된 서열 Hvh3(SEQ ID NO.:40)의 경우에는, 모든 이들 추가적인 뮤린 잔기가 매립된 잔기이고 CDR-H2를 지지하는 베니어 존에 속해있기 때문에 Ile-H2 및 Lys-L73 역-돌연변이를 잔준시켰고 이에 추가하여 프레임워크 잔기 Ile-H48, Ala-H67, Leu-H69 및 Val-H71을 상기 마우스 서열로부터 잔준시켰으며, 또한 뮤린 잔기 H71이 인간 프레임워크에 존재할 수도 있다. 3A4 중쇄 인간화된 서열 Hvh4(SEQ ID NO.:41)의 경우에는, 이들이 CDR-H2에 근접한 절반-매립된 잔기를 나타내기 때문에 상기 Hvh3 인간화된 변이체의 6개의 역-돌연변이 모두를 추가적인 2개의 마우스 프레임워크 잔기 Lys-H38 및 Lys-H66과 함께 포함시켰다. 상기 뮤린 및 인간화된 사슬의 수득된 아미노산 서열을 표 1에 목록화하였다. 상기 뮤린 및 인간화된 경쇄 가변 영역의 배열도 10a에 도시되어 있고 상기 뮤린 및 인간화된 중쇄 가변 영역의 배열은 도 10b에 도시되어 있다.

[0367]

도 11a 및 도 11b는 각각 상기 100% 인간화된 경쇄 가변 영역을 가진 상기 뮤린 경쇄 가변 영역 및 상기 100% 인간화된 중쇄 가변 영역을 가진 상기 뮤린 중쇄 가변 영역의 배열이다. 상기 도면에는 보존된 아미노산과 치환을 위해 선택된 아미노산이 도시되어 있다.

[0368]

실시예 7.

[0369]

3A4 인간화된 변이체 항체의 조립 및 발현

[0370]

이들 조사의 목적은 항-클러스테린(clusterin) 항체의 동역학 파라미터를 결정하는 것, 특히 3A4 항-KAAG1 모노클로날 항체의 인간화가 인간 KAAG1에 대한 이의 결합의 동역학 파라미터에 영향을 끼치는지를 결정하는 것이다. 본 목적을 위해, BioRad사의 ProteOn XPR36 기구를 사용하여 동역학 분석 방법을 개발하였다. 인간 KAAG1을 센서 칩에 고정시켰다. 전장 항체 또는 Fab 단편을 주입하여 상기 고정된 KAAG1과 상호작용하도록 하였다.

[0371]

3A4의 기메릭 (뮤린) 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 플라스미드의 제작

[0372]

상기 키메릭 항체의 중쇄 및 경쇄를 다음의 올리고뉴클레오티드 프라이머 쌍을 사용하여 본래의 뮤린 면역글로불린 사슬로부터 PCR에 의해 증폭시켰다: 중쇄, SEQ ID NO.:50에 의해 인코딩된 5'-올리고 및 SEQ ID NO.:51에 의해 인코딩된 3'-올리고; 경쇄, SEQ ID NO.:52에 의해 인코딩된 5'-올리고 및 SEQ ID NO.:53에 의해 인코딩된

3'-올리고. 수득된 PCR 산물을 HindIII로 효소분해시키고 사전에 HindIII로 효소분해시켜놓은 pK-CR5(SEQ ID NO.:21)내로 클로닝하였다.

[0373] 상기 인간화된 중쇄 3A4 변이체, 1, 2, 3 및 4를 인코딩하는 플라스미드의 작제

[0374] 상기 항체 3A4의 상기 인간화된 중쇄 영역에 대해 코딩하는 상기 단편들(Hh1, Hh2, Hh3 및 Hh4)을 GenScript사(Piscataway, USA)에 주문하였다. 코작(kozak) 및 종결 코돈 서열을 포함하는 상기 DNA 단편을 HindIII로 효소분해하고 재원형화(recircularization)를 방지하기 위해 송아지 장 포스파타아제(calf intestinal phosphatase)(NEB)를 사용하여 사전에 탈인산화시켜놓은 플라스미드 pK-CR5의 HindIII 부위내로 클로닝하였다. 도12a는 상기 플라스미드 pK-CR5-3A4-HC-변이체1의 지도를 도시한 것이다. 상기 인간화된 3A4의 모든 중쇄 변이체를 유사한 방식으로 작제하였다.

[0375] 상기 인간화된 경쇄 3A4 변이체 1 및 2를 인코딩하는 플라스미드의 작제

[0376] 상기 항체 3A4의 상기 인간 경쇄 영역에 대해 코딩하는 단편(Lh1 및 Lh2)을 GenScript사에 주문하였다. 코작 및 종결 코돈 서열을 포함하는 상기 DNA 단편을 BamHI으로 효소분해하고 재원형화를 방지하기 위해 송아지 장 포스파타아제(NEB)를 사용하여 사전에 탈인산화시켜놓은 플라스미드 pMPG-CR5(SEQ ID NO.:55)내로 클로닝하였다. 도12b는 상기 플라스미드 pMPG-CR5-3A4-LC-변이체1의 지도를 도시한 것이다. 상기 인간화된 3A4의 모든 경쇄 변이체를 유사한 방식으로 작제하였다.

[0377] 일시적 트랜스펙션 연구

[0378] 플라스미드 DNA를 제조사의 권고에 따라 Mini-Prep 키트(Qiagen Inc, Mississauga, ON)를 사용하여 이. 콜라이의 소량 배양물로부터 분리하였다. 간단하게, 100 μ g/ml의 암피실린을 함유한 2ml의 LB 배지에 라이케이션 및 형질전환 후 채집된 단일 콜로니를 접종하였다. 상기 배양물을 격렬하게 흔들면서(250 RPM) 밤새 37°C에서 인큐베이션시켰다. 그런 다음 상기 플라스미드를 상기 키트에 의해 제공된 프로토콜, 완충액 및 컬럼을 사용하여 1.5ml의 배양물로부터 분리하였다. 상기 DNA를 50 μ l의 멸균수를 사용하여 용출하였다. 플라스미드 DNA를 제조사의 권고에 따라 Plasmid Plus Maxi 키트(Qiagen Inc, Mississauga, ON)를 사용하여 이. 콜라이의 대량 배양물로부터 분리하였다. 100 μ g/mL 암피실린을 함유한 200mL의 LB 배지에 이. 콜라이의 신선한 단일 콜로니를 접종하고 격렬하게 흔들면서(250 RPM) 밤새 37°C에서 인큐베이션시켰다. 상기 세균(중쇄에 대해 130mL의 배양물 및 경쇄에 대해 180mL의 배양물)을 4°C에서 15분 동안 6000 x g로 원심분리시킴으로써 펠릿화하고 상기 플라스미드를 상기 키트에 의해 제공된 프로토콜, 완충액 및 컬럼을 사용하여 분리하였다. 상기 순수한 플라스미드를 멸균 50mM Tris(pH 8)에 재현탁시키고 260nm에서 광학 밀도를 측정함으로써 정량하였다. 트랜스펙션 전에 상기 정제된 플라스미드를 폐놀/클로로포름을 사용한 추출에 이은 에탄올 침전에 의해 멸균하였다. 상기 플라스미드를 멸균 50mM Tris(pH 8)에 재현탁시키고 260nm에서 광학 밀도에 의해 정량하였다.

[0379] 트랜스펙션 전에, 상기 세포(CHO-cTA)를 PBS를 사용하여 세척하고 혼탁 배양물 중에 텍스트란 설파이트 없이 성장 배지(CD-CHO, Invitrogen)에서 3시간 동안 4.0 X 10⁶ 세포/ml의 농도로 재현탁시켰다. 각 플라스미드 조합에 대해, 45ml의 세포를 10 μ g/ml의 각각의 플라스미드 및 50 μ g/ml의 폴리에틸렌이민(PEI Max; Polysciences)이 보충된 CDCHO 배지 5ml를 천천히 첨가함으로써 트랜스펙션시켰다. 최종 농도는 1 μ g/ml의 각각의 플라스미드 및 5 μ g/ml의 PEI였다. 2시간 후에, 상기 세포를 30°C로 이동시켰다. 다음 날, 50 μ g/ml의 텍스트란 설파이트 및 3.75ml의 각각의 보충제(Efficient Feed A 및 B, Invirogen)를 상기 세포에 첨가하고 이들을 13일 동안 30°C에서 인큐베이션시켰다. 2.5ml의 Feed A 및 2.5ml의 Feed B를 제4일, 제6일, 제8일 및 제11일에 첨가하였다. 제13일에, 상층액을 원심분리에 의해 정화하고 0.22 μ M 필터를 통해 여과시켰다.

[0380] CHO 세포(CHOcTA)를, 상기 CR5 프로모터에 의해 조절되는 상기 3A4 항체의 인간화된 중쇄 및 경쇄의 상이한 변이체를 인코딩하는 플라스미드를 사용하여 트랜스펙션시켰다. 경쇄 및 중쇄의 상이한 조합들을 사용한 트랜스펙션을 수행하였다. 대조구로서, 또한 세포를 상기 키메릭/뮤린 항체를 인코딩하는 플라스미드를 사용하여 트랜스펙션시키셨다.

[0381] 항체의 정제

[0382] 상기 CHO 세포 트랜스펙션으로부터의 상층액 15ml를 1500rpm에서 Amicon Ultra(Ultracel-50k) 카세트를 사용하는 원심분리에 의해 농축하였다. 상기 농축된 항체(550 μ l)를 제조사의 권고에 따라 Nab Spin Kit Protein A Plus(Thermo Scientific)를 사용하여 정제하였다. 그런 다음 상기 정제된 항체를 PBS를 사용하여 탈염시키고 2500rpm에서 Amicon Ultra(Ultracel-10K) 카세트를 사용하여 최종 부피가 250 μ l가 되도록 농축하였다. 상기 정

제된 항체를 Nanodrop 스펙트로포토미터를 사용하여 OD₂₈₀을 판독함으로써 정량하고 -20°C에서 동결 보관하였다. 상기 정제된 항체의 분획물을 동일 부피의 래플리(Laemmli) 2X에 재현탁시키고 5분 동안 95°C에서 가열하고 빙상에서 냉각시켰다. 인간 골수종 혈장으로부터 정제된 인간 IgG1 카파(kappa)(Athens Research)의 공지된 양을 사용하여 표준 곡선을 작도하였다. 상기 샘플을 폴리아크릴아미드 노백스(Novex) 10% 트리스-글리신 겔(Invitrogen Canaga Inc., Burlington, ON)에서 분리시키고 Hybond-N 니트로셀룰로오스 막(Amersham Bioscience Corp., Baie d'Urfé, QC)상에서 275mA에서 1시간 동안 이동시켰다. 상기 막을 0.15% Tween 20, PBS 중의 5% 텔지유에서 1시간 동안 블로킹시키고 Cy5와 컨쥬게이션된 염소 항-인간 IgG(H+L)(Jackson, Cat# 109-176-099)와 함께 1시간 동안 인큐베이션시켰다. Typhoon Trion 스캐너(GE Healthcare)를 사용하여 스캐닝 함으로써 상기 신호를 밝혀내고 정량하였다. 도 13에 도시된 바와 같이, 상기 3A4 인간화된 항체 변이체의 모든 조합들이 CHO 세포에서 발현되었다.

[0383] 실시예 8.

[0384] 뮤린 및 인간화된 3A4 항체의 동역학 분석

[0385] 궁극

[0386] GLM 센서칩, Biorad ProteOn 아민 커플링 키트(EDC, sNHS 및 에탄올아민), 및 10mM 아세트산나트륨 완충액을 바이오-래드 래보래토리즈(Bio-Rad Laboratories)(Mississauga, ON)로부터 구입하였다. HEPES 완충액, EDTA, 및 NaCl을 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)(Oakville, ON)로부터 구입하였다. 10% Tween 20 용액을 테크노바(Teknova)(Hollister, CA)로부터 구입하였다. 염소 항-인간 IgG Fc 단편 특이적 항체를 책슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch)로부터 구입하였다. 겔 여과 컬럼 Superdex 75 10/300 GL을 GE 헬쓰케어(Healthcare)로부터 구입하였다.

[0387] 겔 여과

[0388] 3.114mg/ml의 농도 및 220 μL 부피의 상기 KAAG1 단백질을 상기 Superdex G75 컬럼에 주입하였다. 상기 분리는 Tween 20 없이 HBST 런닝 완충액(하기 참조) 중에 0.4ml/분으로 수행되었다. 수집된 상기 분획의 부피는 500 μL 였다. 각 분획에서의 KAAG1의 농도를 5500의 확장 계수와 8969의 MW를 사용하여 OD₂₈₀에 의해 결정하였다. 도 14는 KAAG1의 상기 겔 여과의 프로파일(profile)을 나타낸다. 잠재적 응집물의 작은 피크(peak)를 약 11ml에서 용출하였다. 13ml에서 용출한 상기 단백질을 SPR 검정을 위한 분석물로서 사용하였다(분획 15-19).

[0389] SPR 바이오센서 검정

[0390] 모든 표면 플라스몬(plasmon) 공명 검정은 25°C의 온도에서 HBST 런닝 완충액(10mM HEPES, 150mM NaCl, 3.4mM EDTA 및 0.05% Tween 20 pH 7.4)을 사용하는 BioRad ProteOn XPR36 기구(Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON)를 사용하여 수행되었다. 상기 항-마우스 Fc 포획 표면을, 상기 분석물(수평) 방향에서 30 μL/분으로 300초 동안 주입된 표준 BioRad sNHS/EDC 용액의 1:5 희석액에 의해 활성화된 GLM 센서칩을 사용하여 생성하였다. 상기 활성화 직후, 10mM NaOAc(pH 4.5)에 특이적인 항-인간 IgG Fc 단편의 13μg/mL 용액을 대략 8000 공명 단위(RU)가 고정될 때까지 25 μL/분의 유속으로 분석물 방향에서 주입하였다. 상기 분석물 방향에서 30 μL/분으로 1M 에탄올아민을 300초 주입함으로써 남아있는 활성기를 퀘칭(quenching)시켰고 이것은 또한 모의-활성화된 인터스폿(interspot)이 블랭크(blank) 참조에 대해 생성되는 것을 확실하게 한다. KAAG1에 결합하는 것에 대한 상기 3A4 변이체의 스크리닝은 두 단계로 일어난다: 상기 리간드 방향(수직)에서 상기 항-인간 IgG Fc 단편 특이적 표면상에서 세포 상층액으로부터 3A4 변이체의 간접적인 포획에 후속하는 상기 분석물 방향에서 KAAG1 주입. 첫째로, 상기 리간드 방향에서 100uL/분으로 30초 동안 하나의 완충액을 주입이 상기 기선(baseline)을 안정화시키기 위해 사용되었다. 각 3A4 포획에 대해, 세포-배양 배지에서 비정제된 3A4 변이체를 HBST 중에 4%로 희석하거나, HBST 중에 약 1.25μg/mL의 정제된 3A4를 사용하였다. 야생형 3A4와 함께 4개 내지 5개의 3A4 변이체를 25 μL/분 흐름으로 240초 동안 개별 리간드 채널에서 동시에 주입하였다. 이는 상기 항-인간 IgG Fc 단편 특이적 표면상에서 약 400 내지 700 RU의 3A4 포획이 포획되게 하였다. 필요한 경우 블랭크(blank) 대조구로서 사용하기 위해 제1 리간드 채널을 비워두었다. 본 3A4 포획 단계에 바로 이어 상기 분석물 방향에서 2회의 베퍼 주입을 후속하여 상기 기저선을 안정화시켰고, 그런 다음 상기 겔 여과 정제된 KAAG1을 주입하였다. 전형적인 스크리닝을 위해, 5개 농도의 KAAG1(8, 2.66, 0.89, 0.29 및 0.098nM) 및 완충액 대조구를 600s 해리상(dissociation phase)과 함께 120초 동안 50 μL/분으로 개별 분석물 채널에 동시에 주입하였고, 그 결과 상기 포획된 3A4 변이체 각각에 대해 완충액 참조와 함께 결합하는 센서그램(sensorgram)의 세트가 수득되었다. 상기 항-인간 IgG Fc 단편 특이적-3A4 복합체를 100 μL/분으로 18초 동안 0.85% 인산의 18초 펄스에 의해

재생하여 다음 주입 사이클을 위한 상기 항-인간 IgG Fc 단편 특이적 표면을 제조하였다. 상기 완충액 블랭크 주입 및 인터스폿을 사용하여 센서그램을 정렬시키고 이중-참조되게 하였고, ProteOn Manager 소프트웨어 v3.0 을 사용하여 상기 수득된 센서그램을 분석하였다. 국소적 R_{max} 를 사용하는 1:1 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델에 대해 상기 참조된 센서그램을 맞춤으로써 상기 동역학 및 친화도 값을 결정하였고, 친화도 상수(K_D M)를 수득된 속도 상수($k_d \text{ s}^{-1} / k_a \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)로부터 유도하였다.

[0391] 속도 및 친화도 상수의 결정

도 15는 정제된 뮤린 3A4, 키메릭으로서 일시적으로 발현된 뮤린 3A4 및 일시적으로 발현된 인간화된 변이체와 KAAG1의 상호작용에 대한 친화도 (K_D , M) 상수 뿐만 아니라 회합 (k_a , 1/Ms) 및 해리 (k_d , 1/s) 속도 상수를 요약한 것이다. 이들 상수를 도 16에 도표로 나타내었다. 상기 회합 속도 상수는 순수한 모(parent), 키메릭 및 인간화된 3A4 변이체들에 대해 매우 유사하였다(도 16a). 상기 해리 속도 상수는 순수한 모 3A4와 비교한 바와 같이 상기 일시적으로 발현된 키메릭에 대해 유사하였으며 이는 상기 트랜스펙션 절차가 상기 항체와 KAAG1의 상호작용의 파라미터를 변경시키지 않았음을 시사한다(도 16b). 그러나 모든 인간화된 변이체들은 다소 변경된 오프 속도, 즉 더 빠른 해리 속도를 갖는 것으로 보인다(도 16b). 이는 상기 친화도 상수에 반영되었다(도 16c). 요약하면, 상기 인간화된 변이체의 결합 친화도($\log K_D$)와 돌연변이의 수가 증가함에 따라 상기 결합 친화도에서의 감소와 함께 상기 모 항체(LcHc)에서 일어난 역-돌연변이의 수 사이에는 선형 상관이 존재한다. 그러나, 결합 친화도에서의 차이는 어떠한 마우스 잔기도 보유하지 않은 최악의 변이체(H1L1, 0.47nM)와 10개의 마우스 잔기를 보유한 최상의 변이체(H4L2, 0.1nM) 사이에 차이는 불과 4배이다. 최종적으로, KAAG1에 대한 모든 변이체의 결합 친화도는 나노몰 이하인 것으로 발견되었고 상기 최상의 변이체(H4L2, 0.1nM)는 상기 뮤린(LcHc, 0.057nM)보다 약 6배 더 약한 친화도를 나타냈다. 종합하면, 이들 결과는 인간화가 KAAG1에 대해 매우 높은 친화도를 나타낸 상기 변이체 모두와 같이 성공적이었음을 나타낸다.

[0393] 실시예 9.

[0394] ELISA에서 KAAG1에 대한 3A4 인간화된 변이체의 결합

상기 뮤린 3A4 항체에 대한 상기 인간화된 3A4 변이체의 결합 활성을 비교하기 위해 ELISA 방법을 또한 사용하였다. 재조합 인간 KAAG1을 밤새 96-웰 플레이트에서 코팅하고, 세척하고 뮤린 또는 인간화된 3A4 변이체의 양을 증가시키면서 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 또 다른 회차의 세척 단계에 후속하여, HRP에 컨쥬게이션된 항-인간 항체를 상기 웰에 첨가하고 결합된 3A4 항체를 Abs_{450} 에서 열량측정법으로 측정하였다. 도 17A에 도시된 바와 같이, 상기 인간화된 변이체들(Lh1Hh1, Lh1Hh2, Lh1Hh3 및 Lh1Hh4)은 상기 뮤린 3A4(LcHc)와 비교했을 때 KAAG1에 대해 매우 유사한 결합을 나타냈다. 이 결과는 4개의 인간화된 중쇄 변이체 모두가, 상기 인간화된 경쇄의 L1 변이체와 조립될 때 본래의 h3A4 중쇄에 필적하는 것으로 나타났다. 도 17b는 상기 중쇄 변이체가 상기 3A4 인간화된 경쇄의 Lh2 변이체와 조립될 때의 결과를 도시한 것이다. 본 예에서는, 상기 변이체의 결합에 있어서 차이가 존재하였다. 예를 들어, Lh2hh4는 상기 뮤린 3A4와 비교하여 가장 가까운 프로파일을 가진 변이체였다. 이것은 SPR 자료(실시예 3 참조)와 일치하는 것이며, 상기 자료는 상기 중쇄의 변이체 4가 KAAG1에 대해 가장 높은 친화도를 가졌음을 보여주었다. 종합하면, 이들 결합 결과는 상기 인간화된 변이체 모두가 본 검정에서 인간 KAAG1과 상호작용함을 보여준다. 어느 정도 미약한 차이는 있지만, ELISA에서의 결합은 상기 SPR 결과와 일치하였다.

[0396] 실시예 10.

[0397] 암세포의 표면에서 3A4 인간화된 변이체의 결합

암세포의 표면에서 발현된 KAAG1과 상호작용하는 상기 인간화된 3A4 변이체의 능력을 평가하기 위해 유세포분석법을 사용하였다. 본 목적을 위해, 이전에 유세포분석법을 통해 3A4에 의해 효율적으로 결합됨을 보였던 SKOV-3 난소암세포를 상기 8개의 인간화된 변이체 및 본래의 뮤린 항체와 함께 인큐ベ이션시켰다. 간단하게, SKOV-3 세포를 EDTA를 사용하여 상기 플레이트로부터 분리(detach)시키고 3.0g/ml, 0.3g/ml 또는 0.3g/ml의 상기 항체와 함께 1시간 동안 냉장에서 인큐베이션시켰다. 3회의 세척 단계 후에, 상기 세포를 이차 항체인 FITC에 컨쥬게이션된 항-인간 IgG와 함께 냉장에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 세포 표면 형광을 유세포분석기에서 측정하고 그 값을 도 18의 히스토그램에 도시하였다. 도시된 바와 같이, 모든 변이체는 투과불가능한 표면에서 KAAG1을 탐지할 수 있고 가장 강한 신호는 가장 높은 농도의 3A4 항체(3mg/ml)에서 수득되었고 상기 항체의 농도가 감

소함에 따라 감소되었다. 상기 상이한 변이체 중에서, 대부분의 뮤린 역-돌연변이를 가진 변이체(도 18, Lh1Hh4 및 Lh2Hh4 참조)는 가장 높은 활성을 가지면서 세포의 표면에서 KAAG1과 상호작용하였다. 실제로, Lh1Hh4 및 Lh2Hh4는 뮤린 3A4 항체(LcHc)와 비교하여 KAAG1에 대해 조금 향상된 세포 표면 결합을 나타냈다.

[0399] 공개문헌(문헌 내용은 본원에 참조로서 포함되어 있다)

- Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ and Thun MJ. Cancer statistics, 2005. CA Cancer J Clin 2005; 55: 10-30.
- Menon U, Skates SJ, Lewis S, Rosenthal AN, Rufford B, Sibley K, Macdonald N, Dawnay A, Jeyarajah A, Bast RC Jr, Oram D and Jacobs IJ. Prospective study using the risk of ovarian cancer algorithm to screen for ovarian cancer. J Clin Oncol. 2005; 23(31):7919-26.
- Bonome T, Lee JY, Park DC, Radonovich M, Pise-Masison C, Brady J, Gardner GJ, Hao K, Wong WH, Barrett JC, Lu KH, Socci AK, Gershenson DM, Mok SC and Birrer MJ. Expression profiling of serous low malignancy potential, low grade, and high-grade tumors of the ovary. Cancer Res 2005; 65: 10602-10612.
- Chambers, A and Vanderhyden, B. Ovarian Cancer Biomarkers in Urine. Clin Cancer Res 2006; 12(2): 323-327.
- Berek et al. Cancer Medicine. 5th ed. London: B.C. Decker, Inc.; 2000. pp. 1687-1720.
- Bristow R.E. Surgical standards in the management of ovarian cancer. Curr Opin Oncol 2000; 12: 474-480.

- [0400]
- Brown E, Stewart M, Rye T, Al-Nafussi A, Williams AR, Bradburn M, Smyth J and Gabra H. Carcinosarcoma of the ovary: 19 years of prospective data from a single center. Cancer 2004; 100: 2148-2153.
 - Shih I-M and Kurman RJ. Molecular Pathogenesis of Ovarian Borderline Tumors: New Insights and Old Challenges. Clin Cancer Res 2005; 11(20): 7273-7279.
 - Seidman JD, Russell P, Kurman RJ. Surface epithelial tumors of the ovary. In: Kurman RJ, editor. Blaustein's pathology of the female genital tract. 5th ed. New York: Springer-Verlag; 2002. pp. 791-904.
 - Cannistra SA and McGuire WP. Progress in the management of gynecologic cancer. J. Clin. Oncol. 2007; 25(20): 2865-2866
 - Oei AL, Sweep FC, Thomas CM, Boerman OC, Massuger LF. The use of monoclonal antibodies for the treatment of epithelial ovarian cancer. Int. J. Oncol. 2008; 32(6): 1145-1157.

[0401]

- Nicodemus CF and Berek JS. Monoclonal antibody therapy of ovarian cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2005; 5(1): 87-96.
- Burger RA. Experience with bevacizumab in the management of epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25(20): 2902-2908.
- Simon I, Zhuo S, Corral L, Diamandis EP, Sarno MJ, Wolfert RL, Kim NW. B7-H4 is a novel membrane-bound protein and a candidate serum and tissue biomarker for ovarian cancer. *Cancer Res.* 2006; 66(3): 1570-1575.
- Ebel W, Routhier EL, Foley B, Jacob S, McDonough JM, Patel RK, Turchin HA, Chao Q, Kline JB, Old LJ, Phillips MD, Nicolaides NC, Sass PM, Grasso L. Preclinical evaluation of MORab-003, a humanized monoclonal antibody antagonizing folate receptor-alpha. *Cancer Immun.* 2007; 7: 6-13.
- Van den Eynde BJ, Gaugler B, Probst-Kepper M, Michaux L, Devuyst O, Lorge F, Weynants P, Boon T. A new antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes on a human kidney tumor results from reverse strand transcription. *J. Exp. Med.* 1999; 190(12): 1793-1799.

- [0402]
- Socknanan R, Tremblay GB, Filion M. Polynucleotides and polypeptide sequences involved in cancer. 2007; PCT/CA2007/001134 published under No. WO/2007/147265 on December 27, 2007.
 - Schumacher J, Anthoni H, Dahdouh F, König IR, Hillmer AM, Kluck N, Manthey M, Plume E, Warnke A, Remschmidt H, Hülsmann J, Cichon S, Lindgren CM, Propping P, Zucchelli M, Ziegler A, Peyrard-Janvid M, Schulte-Körne G, Nöthen MM, Kere J. Strong genetic evidence of *DCDC2* as a susceptibility gene for dyslexia. *Am. J. Hum. Genet.* 2006; 78: 52-62.
 - Cope N, Harold D, Hill G, Moskvina V, Stevenson J, Holmans P, Owen MJ, O'Donovan MC, Williams J. Strong evidence that *KIAA0319* on chromosome 6p is a susceptibility gene for developmental dyslexia. *Am. J. Hum. Genet.* 2005; 76: 581-591.
 - Mor G, Visintin I, Lai Y, Zhao H, Schwartz P, Rutherford T, Yue L, Bray-Ward P and Ward DC Serum protein markers for early detection of ovarian cancer. *PNAS* 2005; 102: 7677-7682.
 - Kozak KR, Amneus MW, Pusey SM, Su F, Luong MN, Luong SA, Reddy ST and Farias-Eisner R. Identification of biomarkers for ovarian cancer using strong
- [0403]

anion-exchange ProteinChips: potential use in diagnosis and prognosis. PNAS 2003; 100: 12343-12348.

- Benoît MH, Hudson TJ, Maire G, Squire JA, Arcand SL, Provencher D, Mes-Masson AM, Tonin PN. Global analysis of chromosome X gene expression in primary cultures of normal ovarian surface epithelial cells and epithelial ovarian cancer cell lines. *Int. J. Oncol.* 2007; 30(1): 5-17.
- Cody NA, Zietarska M, Filali-Mouhim A, Provencher DM, Mes-Masson AM, Tonin PN. Influence of monolayer, spheroid, and tumor growth conditions on chromosome 3 gene expression in tumorigenic epithelial ovarian cancer cell lines. *BMC Med. Genomics* 2008; 1(1) :34.
- Buechler J, Valkirs G, Gray J. Polyvalent display libraries.2000; U.S. 6,057,098.
- Durocher Y, Kamen A, Perret S, Pham PL. Enhanced production of recombinant proteins by transient transfection of suspension-growing mammalian cells. 2002; Canadian patent application No. CA 2446185.
- Durocher Y. Expression vectors for enhanced transient gene expression and mammalian cells expressing them.2004; U.S. patent application No. 60/662,392.

- [0404]
- Tremblay GB, Filion M. Antibodies that specifically block the biological activity of a tumor antigen. 2009; PCT/CA2009/001586.
 - Durocher Y, Kamen A, Perret S, Pham PL. Enhanced production of recombinant proteins by transient transfection of suspension-growing mammalian cells. 2002; Canadian patent application No. CA 2446185.
 - Durocher Y. Expression vectors for enhanced transient gene expression and mammalian cells expressing them.2004; U.S. patent application No. 60/662,392.
 - Chang MH, Karageorgos LE, Meikle PJ. CD107a (LAMP-1) and CD107b (LAMP-2). 2002; *J Biol Regul Homeost Agents.* **16**:147-51.
 - Abhinandan, KR and Martin, ACR. Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains. 2008; *Mol Immunol.* **45**, 3832-3839.
- [0405]

[0406] 본 명세서에 언급된 서열

[0407] SEQ ID NO.:1 - 3A4 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열

CAGATCCAGTTGGTGC~~AATCTGGACCTGAGATGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGTAAG~~
 GCTTCTGGATACACATTCACTGACGACTACATGAGCTGGGTGAAACAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAG
 TGGATTGGAGATATTAATCCTTACAACGGTGATACTA~~ACTACAAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCATA~~
 TTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTAACAGCCTGACATCGGAAGACTCAGCA
 GTCTATTACTGTGCAAGAGACCCGGGGCTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCC
 TCA

[0408]

[0409] SEQ ID NO.:2 - 3A4 중쇄 가변 영역 폴리펩티드 서열

QIQLVQSGPEMVKPGASVKMSCKASGYTFTDDYMSWVKQSHGKSLEWIGDINPYNGDTN~~YNQKPKGKAI~~
 LTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARDPGAMDYWGQGTSVTVSS

[0410]

[0411] SEQ ID NO.:3 - 3A4 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열

GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGGCTGT~~CAGTCTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGC~~
 AGATCTAGTCAGAGCCTCTACATAGTAATGGAAACACCTATTAGAATGGTACCTTCAGAAACCAGGC
 CAGTCTCCAAAGCTCCTGATCCACACAGTTCCAACC~~GATTTCTGGGTCCCAGACAGATTCA~~GTGGC
 AGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTATTAC
 TGCTTTCAAGGTTCACATGTTCCGCTCACGTTGGTGCTGGGACCAGGCTGGAGCTGAAA

[0412]

[0413] SEQ ID NO.:4 - 3A4 경쇄 가변 영역 폴리펩티드 서열

DVVMTQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIHTVSNRFSGPDRFSG
 SGSGTDFTLK1SRVEAE~~DLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTRLELK~~

[0414]

[0415] SEQ ID NO.:5 - 3A4 중쇄 CDR1 폴리펩티드 서열

GYTFTDDYMS

[0416]

[0417] SEQ ID NO.:6 - 3A4 중쇄 CDR2 폴리펩티드 서열

DINPYNGDTN

[0418]

[0419] SEQ ID NO.:7 - 3A4 중쇄 CDR3 폴리펩티드 서열

DPGAMDY

[0420]

[0421] SEQ ID NO.:8 - 3A4 경쇄 CDR1 폴리펩티드 서열

RSSQSLLHSNGNTYLE

[0422]

[0423] SEQ ID NO.:9 - 3A4 경쇄 CDR2 폴리펩티드 서열

TVSNRFS

[0424]

[0425] SEQ ID NO.:10 - 3A4 경쇄 CDR3 폴리펩티드 서열

FQGSHVPLT

[0426]

[0427] SEQ ID NO.:11 - OGS1773

GTAAGCAGCGCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC

[0428]

[0429] SEQ ID NO.:12 - OGS1774

GTAAGCGCTAGCCTAACACTCTCCCTGTTGAAGC

[0430]

[0431] SEQ ID NO.:13 - 인간 카파(kappa) 불변 뉴클레오티드 서열

GCTGTGGCTGACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCT
GTTGTGTGCCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTC
CAATCGGGTAACCTCCAGGAGACTGTACAGAGCAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC
ACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC
CTGAGCTGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGAGACTGTTAG

[0432]

[0433] SEQ ID NO.:14 - 인간 카파 불변 폴리펩티드 서열

AVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS

[0434] TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0435] SEQ ID NO.:15

CTTGAGCCGGCGGATGGTCGAGGTGAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCCAGCTGTTGGGTGAGTACTCCC
TCTCAAAAGCGGGCATTACTCTGCCCTAARGATTGTCAGTTCCAAAAACGAGGAGGATTGATATTCA
CCTGGCCCCATCTGCCATACACTTGAGTGCACATGACATCCACTTGCCTTCTCTCCACAGGTGTCC
ACTCCCAGGTTCAAGTTAACCGATCTCTAGGAATTGATGAACTTCTGCTGCTTGGGTGCATTGG
AGCCTTGCCTTGCTGCTCACCTCCACCATGCCAAGTGGTCCCAGGCTTGAGACGGAGCTTACAGCGCT
GTGGCTGCACCCTGCTCTCATCTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGAACTGCTCTGT
GTGTGCCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGACAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGATAACGCCCTCAA
TCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACACCTACAGCCTCAGCAGCACC
CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCTG
AGCTGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGAGAGTGTAGGGTACCGCGGCCGCTCGAATGAGATC
CCCCGACCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTATTTCTATTGCAATAGTGTGTTGAAATTGTTGT
GTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGAGGGCAATCATTGGTCGAGATCCCTGGAGATCTAGCTA
GAGCCCCGCCGGACGAACATAACCTGACTACGGCATCTGCCCTTCTCGCGGGGCAGTGCATG
TAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACCTGCCAACACTGGGCCCTGTTCCACATGTGACACGGGGGGGACC
AAACACAAAGGGTTCTCTGACTGTAGTTGACATCCTTATAAAATGGATGTGCACTTGCCAACACTGA
GTGGCTTTCATCCTGGAGCAGACTTGCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTGCCCTTATGTGTA
CTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGACATGTACCTCCCAGGGGCCAGGAAGACTACGGGAG
GCTACACCAACGTCAATCAGAGGGCCTGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCTCAAGAGGGCATTAGCA
ATAGTGTATAAGGCCCTTGTAAACCTAAACGGTAGCATATGCTCCCGGGTAGTAGTATATAC
TATCCAGACTAACCTAATTCAATAGCATATGTTACCAACGGGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTT

[0436]

AGTAAAAGGGCTTAAGGAACAGCGATATCTCCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTATTTACATGGGG
TCAGGATTCCACGAGGGTAGTGAACCATTTCAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAAGATCAAGGACCGGGCA
GTGAACTCTCCTGAATCTCGCCTGCTTCTTCATTCTCCTCGTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGT

[0437]

TGTGAACAGTAAGGTGTATCTGAGGTGCTCGAAAACAAGGTTCAGGTGACGCCAGAATAAAATT
 GGACGGGGGGTTCAGTGGTGCATTGTCTATGACACCAATAAACCTCACAAACCCCTGGGCAATA
 AATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATCTTAACAATAGAAATCCATGGGTGGGACAAGCC
 GTAAAGACTGGATGTCCATCTCACACGAATTATGGCTATGGCAACACATAATCCTAGTGCATATGA
 TACTGGGTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCATGTTGTTACACTCTATT
 GTAACAAGGGAAAGAGAGTGGACGCCACAGCAGCGGACTCCACTGGTGTCTAACACCCCCGAAA
 ATTAACGGGCTCCACGCCAATGGGCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTGAAATTG
 TGGAGTGGGGCACCGTCAGCCCCACACGCCCTGGGTTTGACTGTAAAATAAGGTGTAAT
 AACCTGGCTGATTGTAACCCGCTAACCACTGGGTCAAACCACTGCCACAAACCAACTATGGCAC
 CCCGGGAATACCTGCATAAGTAGGTGGCGGCCAAGATAGGGCGGATTGCTGCGATCTGGAGGAC
 AAATTACACACACTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGGTGCCTCATATTACGAGGTCGCTGA
 GAGCACGGTGGGTAATGTTGCCATGGTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCC
 TAATCTATATCTGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATA
 TCTGGTAGTATGCTATCCTAATTATCTGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGTAG
 CATATGCTATCCTAATCTATATCTGGTAGTATGCTATCCTAATCTGTATCCGGTAGCATATGCTA
 TCCTAATAGAGATTAGGGTAGTATGCTATCCTAATTATCTGGTAGCATATACTACCCAAATAT
 CTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGTAGC
 ATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGTAGTATATGCTAT
 CCTAATTATATCTGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGTAGCATATGCTATCCTAATCTA
 TATCTGGTAGTATGCTATCCTAATCTGTATCCGGTAGCATATGCTATCCTACAGATGATAAGCTG

[0438] TCAAACATGAGAATTAAATTCTGAAGACGAAAGGGCTCGTGTACGCCATTAGGTTAATGTC
 ATGATAATAATGGTTCTTAGACGTCAGGTGGACTTTGGGAAATGTGCGGAAACCCCTATTGTT
 TTATTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAATGCTCAATAA
 TATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTCCGTGTCGCCATTCCCTTTGCGGCATT
 TGCCCTCCTGTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGATAAGATGCTGAAGATCAGTTGGTGCA
 CGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGTAAGATCCTGAGAGTTTGGCCGAAGAACGT
 TTCCAAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCGTGTTGACGCCGGCAA
 GAGCAACTCGGTGCCGCATAACTATTCTCAGAATGACTGGTGAGTACTCACCAAGTCACAGAAAAG
 CATCTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCC
 GCCAACTTACTCTGACAACGATGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTGACAAACATGGGGAT
 CATGTAACTCGCCTGATCGTTGGGAAACGGAGCTGAATGAAGCCATAACAAACGACGAGCGTGACACC
 ACGATGCCCTGAGCAATGGCAACACGTTGCCAAACTATTACTGGCAACTACTTACTCTAGCTTCC
 CGGCAACAAATTAAAGACTGGATGGAGGCGATAAAAGTTGCAAGGACCACTCTCGCTGCCCTTCCG
 GCTGGCTGGTTATTGCTGATAATCTGGAGCCGGTGAAGCGTGGGCTCGCGGTATTCAGCACTG
 GGGCCAGATGTAAGCCCTCCGTATCGTAGTTATCTACAGCAGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAA
 CGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCACTGATTAAGCATTGGTAAGTCAGACCAAGTTAC
 TCATATATACCTTAGATTGATTAAAACCTTACCTTAAATTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCTTTT
 GATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTGTCCACTGAGCGTCAGACCCGTAGAAAAG
 ATCAAAGGATCTCTTGAGATCCTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTGCAAAACAAAAACACCG
 CTACCGCGGTGGTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGC

[0439]

AGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCAAGAACTCTGTA
 GCACCGCCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGT
 CTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGTTCG
 TGCACACAGCCCAGCTGGAGCGAACGACCTACACCGAACCTGAGATAACCTACAGCGTGAGCATTGAGAA
 AGGCCACGCTCCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGTAAGGCCAGGGTGGAACAGGGAG
 CGCACGAGGGAGCTCCAGGGGAAACGCCCTGGTATCTTATAGTCCTGCGGGTTGCCACCTCTGA
 CTTGAGCGTCGATTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCC
 TTTTACGGTCTGGCTTTGCTGGCTTTCGTCACATGTTCTGCGTTATCCCCTGATTCT
 GTGGATAACCGTATTACCGCCTTGAGTGAGCTGATACCGCTGCCGAGCCGAAACGACCGAGCGCAGC
 GAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGCAAACGCCCTCCCCCGCGTTGCCGATT
 CATTAATGCAGCTGGCACAGGTTCCGACTGGAAAGCGGCCAGTGAGCGAACGCAATTATGTG
 AGTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTACACTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGGAATT
 GTGAGCGATAACAATTACACAGAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAGCTAGAGGTC
 GACCAATTCTCATGTTGACAGCTTATCATCGCAGATCCGGCAACGTTGCTGCATTGCTGCAGCGCA
 GAACCTGGTAGGTATGGCAGATCTATACATTGAATCAATATTGGCAATTAGCCATTAGTCATTGGTTA
 TATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGCCATTGCATACGTTGATCTATATCATAATATGTACATTAA
 TATTGGCTCATGTCCAATATGACGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAAATAGTAATCAAT
 TACGGGTCATTAGTCATAGCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTACGGTAAATGCCCGCC
 TGGCTGACGCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCATAGTAACGCCAAT
 AGGGACTTCCATTGACGTCAATGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCACTGGCAGTACATCAAGT
 GTATCATATGCCAAGTCCGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGCCCGCCTGGCATTATGCCA

[0440] GTACATGACCTTACGGACTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGT
 GATGCGGTTTGGCACTACACCAATGGCGTGGATAGCGGTTGACTCACGGGATTCCAAGTCTCCA
 CCCCATTGACGTCAATGGAGTTGGCACC AAAATCAACGGACTTCCAAAATGCGTAATAA
 CCCCGCCCCGGTACGCAAATGGCGTAGGGCGTGTACGGTGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTT
 AGTGAACCGTCAGATCCTCACTCTCCGATCGCTGCTGCCAGGGCCAGCTGTTGGCTCGCGGTT
 GAGGACAAACTCTCGCGGTCTTCAGTACTCTGGATCGGAAACCCGTCGCCCTCGAACGGTACTC
 CGCCACCGAGGGACCTGAGCGAGTCCGATCGACCGATCGAAAACCTCTCGAGAAAGCGTCAACC
 AGTCACAGTCGAAGGTAGGCTGAGCACCGTGGCGGGCGCAGCGGGTGGCGGTGGGTTGTTCTGG
 CGGAGGTGCTGCTGATGATGTAATTAAAGTAGGCGGT

[0442] SEQ ID NO.:16 - OGS18500

[0443] ATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGATGTTGATGACCCAAACTCC

[0444] SEQ ID NO.:17 - OGS2084

[0445] GGGAAAGATGAAGACACAGATGGTGCAGCCACACTCCG

[0446] SEQ ID NO.:18 - OGS1769

[0447] GTAAGCGCTAGCGCCTCAACGAAGGGCCATCTGTCTTCCCTGGCCCC

[0448] SEQ ID NO.:19 - OGS1770

[0449] GTAAGCGAATTACAAGATTGGCTCAACTTCTTG

[0450] SEQ ID NO.:20 - 인간 면역글로불린 CH1 영역 뉴클레오티드 서열

GCCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTCCCCCTGGCACCCCTCCAGGACACCCTGGGGCACAGCA
GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTG
ACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG
ACCGTGCCTCCAGCAGCTGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC

AAGGTGGACAAGAAAAGTTGAGCCAAATCTTGT

[0451] SEQ ID NO.:21 - 인간 면역글로불린 CH1 영역 폴리펩티드 서열

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVV

[0452] TVPSSSLGTQTYICNVNHPNTKVDDKVEPKSC

[0453] SEQ ID NO.:22

CTTGAGCCGGCGGATGGTCGAGGTGAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCCAGCTGTTGGGTGAGTACTCCC
TCTCAAAAGCGGGCATTACTTCTGCCTAAGATTGTCAAGTTCACCCAAAACGAGGAGGATTGATATTCA
CCTGGCCCGATCTGCCATACACTTGACTGACAATGACATCCACTTGCCTTCCTCCACAGGTGTCC
ACTCCCAGGTCCAAGTTGCCACCATGGAGACAGACACACTCCCTGCTATGGTACTGCTGCTCTGG
GTTCCAGGTTCCACTGGCGGAGACGGAGCTTACGGGCCATCTGTCTTCCCTGGCCCCCTCCCAA
GAGCACCTCTGGGGCACAGCGGCCCTGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGT
GTCGTGGAACTCAGGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTCCCGCTGCTACAGTCCTCAGGACT
CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT
GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGAATTCACTCACAC
ATGCCAACCGTCCCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTCCTCTTCCCCAAAACCAA
GGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGAGGA
GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCCAGGACTGGCTGAATGGCAA
GGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAA
AGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCCCTGCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCGAGGT
CAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCA
GCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTACAGCAA
GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTATGCTGAGGCTCT
GCACAACCACACCGCAGAAGAGCCTCTCCGTCTCCGGAAATGATCCCCGACCTCGACCTCTG
GCTAATAAAGGAAATTATTTCAATTGCAATAGTGTGGAAATTGGTGTCTCACTCGGAAGGA

CATATGGGAGGGCAAATCATTGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGCCCCGCCGGGACG
AACTAAACCTGACTACGGCATCTCTGCCCTTCTCGCGGGCAGTGCATGTAATCCCTCAGTTGGTT
GGTACAACCTGCCAACCTGAACCCCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGTACTAGTATATACTATCCAG
ACTAACCCCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAAACGGGAACCATATGCTATCGAATTAGGTTAGTAAAA
GGGTCTAAGGAACAGCGATGTAGGTGGCGGGCCAAGATAGGGGCGGATTGCTGCGATCTGGAGGAC
AAATTACACACACTTGGCCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGGTCTCATATTACGAGGTCGCTGA
GAGCACGGTGGCTAATGTTGCCATGGTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCC

[0454]

TAATCTATATCTGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATA
 TCTGGTAGTATATGCTATCCTAATTATATCTGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGTAG
 CATATGCTATCCTAATCTATATCTGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGTAGCATATGCTA
 TCCTAATAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTATCTGGTAGCATATACTACCCAAATAT
 CTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGTAGC
 ATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGTAGTATATGCTAT
 CCTAATTTATATCTGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGTAGCATATGCTATCCTAATCTA
 TATCTGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGTAGCATATGCTATCCTCACGATGATAAGCTG
 TCAACATGAGAATTAAATTCTGAAGACGAAAGGGCTCGTGATACGCCATTTTTAGGTTAATGTC
 ATGATAATAATGGTTCTAGACGTCAGGTGGCACTTTGGGAAATGTGCGCGAACCCCTATTGTC
 TTATTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGATAATGCTCAATAA
 TATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTCCGTGTCGCCCTATTCCCTTTGCGGCATT
 TGCCTTCCTGTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCA
 CGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTAACACAGCGTAAGATCCTTGAGAGTTTCCGGGAAGAACGT
 TTTCCAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCCGGTATTATCCGTGTTGACGCCGGCAA
 GAGCAACTCGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTGGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAG
 CATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCG
 GCCAACTTACTCTGACAACAGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTGACAACATGGGGAT
 CATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGAGCGTGACACC
 ACGATGCCCTGCAGCAATGGCAACACGTTGCCAAACTATTAACTGGCAACTACTACTCTAGCTTCC
 CGGCAACAATTAAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTCTGGCTCGGCCATTCCG

[0457] GCTGGCTGGTTATTGCTGATAAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGCTCGCGGTATCATTGAGCACTG
 GGGCCAGATGTAAGCCCTCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAA
 CGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCTCACTGATTAAGCATTGTAACTGTCAGGCAAGTTTAC
 TCATATATACTTTAGATTGATTAAAACCTCATTAAATTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTT
 GATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCGTAGAAAAG
 ATCAAAGGATCTCTTGAGATCCTTTCTGCGCTAACCTGCTGCTGCAAACAAAAAACCCACCG
 CTACCAAGCGGGTTGGATCAAGAGCTACCAACTCTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGC
 AGAGCGCAGATACCAAATACTGCTCTGCTAACCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGGATAAGTCGT
 GCACCGCCTACATACCTCGCTGCTAACCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGGATAAGTCGT
 CTTACCGGTTGGACTCAACACGATAGTTACCGATAAGCCGAGCGCTGGCTGAACGGGGGTTCG
 TGCACACAGCCCAGCTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTACCTACAGCGTGAGCATTGAGAA
 AGCCGCACGCCAGCTCCGAAGGGAGAAAGCCGAGACAGGTATCCGTAAGCCGAGGTGGAAACAGGAGAG
 CGCACGAGGGAGCTCCAGGGGAAACGCCCTGGTATTTATAGTCCTGCGGGTTGCCACCTCTGA
 CTTGAGCGTCGATTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCC
 TTTTACGGTCCCTGGCTTTGCTGGCTTTGCTCACATGTTCTTCCTGCTTATCCCTGATTCT
 GTGGATAACCGTATTACCGCTTGAGTGAGCTGATACCGCTGCCAGCCGAAACGACCGAGCGCAGC
 GAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGTACATTATATTGGCTCATGTCCTGAAATGACGCCATGTTGACATTGA
 TTATTGACTAGTTATTAAATAGTAATCAATTACGGGTCAATTAGTCATAGGCCATATGGAGTTCCGC
 GTTACATAACTACGGTAAATGCCCGCCTGGCTGACCGCCAAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATA

[0458]

ATGACGTATGTTCCCATAAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGG
 TAAACTGCCCACTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGAC
 GGTAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTACGGGACTTCCACTTGGCAGTACATC
 TAGTATTAGTCATCGTATTACCATGGTATGCAGGTTTGGCAGTACACCAATGGCGTGGATAGCGG
 TTTGACTCACGGGATTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTGTTGGCACCAAAAT
 CAACGGGACTTCCAAAATGTCGAATAACCCGCCGTGACGAAATGGGGTAGGCCTGTACGG
 TGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTAGTGAACCGTCAGATCCTCACTCTCCGCATCGCTGTC
 TGCGAGGCCAGCTGTTGGCTCGCGTTGAGCACAAACTCTCGCGTCTTCCAGTACTCTGGATC
 GGAAACCGTCGGCCTCCGAACGGTACTCCGCCACCGAGGGACCTGAGCGAGTCCGCATCGACCGGATC
 CGAAAAACCTCTCGAGAAAGCGTCTAACCAAGTCACAGTCGAAGGTAGGCTGACCACCGTGGCGGGCGG
 CAGCGGCTGGCGTCGGGTTGTTCTGGCGGAGGTGCTGCTGATGATGTAATTAAAGTAGGCAGG

[0459]

SEQ ID NO.:23 - OGS1879

[0461]

GGGTTCCAGGTTCCACTGGCCAGATCCAGTTGGTGCAATCTGG

[0462]

SEQ ID NO.:24 - OGS1810

[0463]

GGGGCCAGGGGAAAGACAGATGGGCCCTCGTTGAGGC

[0464]

SEQ ID NO.:25

[0465]

GTAAGCGGATCCATGGATGACGACGCCGGCGCCC

[0466]

SEQ ID NO.:26

[0467]

GTAAGCAAGCTTAGGCCGCTGGACAGCGGAGGTGC

[0468]

SEQ ID NO.:27

[0469]

GTAAGCAAGCTTGGCAGCAGCGCCAGGTCCAGC

[0470]

SEQ ID NO.:28

GAGGGGCATCAATCACACCGAGAAGTCACAGCCCTCAACCACTGAGGTGTGGGGGTAGGGATCTGC
 ATTCTTCATATCAACCCACACTATAGGGCACCTAAATGGTGGCGGTGGGGAGACCGACTCACTT
 GAGTTTCTTGAAGGCTTCCCTGGCCTCCAGCCACGTAAATTGCCCCCGCTCTGGATCTGGCTAGCTCCG
 GATTCGGTGGCAGTCCGGGGGTGTAGATGTTCTGACGGCCCAAAGGTGCCTGAACGCCGCCGT
 CACCTCTTCAGGAAGACTCGAACGGACACCTTCTCATGGATGACCGACGCCGCCCGCGTA
 GAAGGGTCCCCGTTGCGGTACACAAGCACGCTTCAACGACGGCTGAGACAGGTGGCTGGACCTGGC
 GCTGCTGCCGCTCATCTTCCCCGCTGGCCCCCCTCAGCTCGCTGTTCGCTGGAGGCACCTCCG
 CTGCCCAGCGGCTCACCGCACCCAGGGCGGGATGCCCTCTGAAACGAACGAGAAACTGACGAAT
 CCACAGGTGAAAGAGAAGTAACGGCGTGCCTAGGCCTCCACCCAGAGGAGACACTAGGAGCTTGCA
 GGACTCGGACTAGACGCTCAAGTTTCAACGCTGGCACAGCCAATCAGGACCCGAGTGCCTGCA
 CCACACCAGGTTCACCTGCTACGGCAGAATCAAGGTGGACAGCTCTGAGCAGGAGCCGAAACGCGC
 GGGCCTCAAACAGGCACGCCAGTGTAGGGCAGGAGAGAGGAGGACGCACACACACACACACAA

ATATGGTAAACCCAATTCTTACATATCTGTGCTACCCCTTCCAAACAGCCTA

[0471]

SEQ ID NO.:29

MDDDAAPRVEGPVAVHKHALHDGLRQVAGPAAAAHLPRWPPPQLAASRREAPPLSQRPHRTQGAGSP

[0473]

PETNEKLTNPQVK

[0474] SEQ ID NO.:30 (변이체 경쇄 가변 영역)

DXVMTQTPLSLX_VX_AASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPX_ALLIHTVSNRFSG

VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDXGVYYCFQGSHVPLTFGX_GT_XLEXK

[0476] 여기서 X로서 확인된 적어도 하나의 아미노산은 SEQ ID NO.:4로 기재된 폴리펩티드에서 상응하는 아미노산과 비교하여 아미노산 치환(보존성 또는 비-보존성)이다. 예를 들어, 상기 아미노산 치환은 보존성일 수 있다.

[0477] SEQ ID NO.:31 (변이체 경쇄 가변 영역)

DX_a1VMTQTPLSLX_a2VX_a3X_a4GX_a5X_a6ASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPX_a7LLIHT
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX_a8GVYYCFQGSHVPLTFGX_a9GT_X_a10LEX_a11

K

[0479] 여기서 X_{a1}은 소수성 아미노산일 수 있거나;

[0480] 여기서 X_{a2}는 A 또는 P일 수 있거나;

[0481] 여기서 X_{a3}는 중립 친수성 아미노산일 수 있거나;

[0482] 여기서 X_{a4}는 L 또는 P일 수 있거나;

[0483] 여기서 X_{a5}는 산성 아미노산일 수 있거나;

[0484] 여기서 X_{a6}는 Q 또는 P일 수 있거나;

[0485] 여기서 X_{a7}은 염기성 아미노산일 수 있거나;

[0486] 여기서 X_{a8}은 소수성 아미노산일 수 있거나;

[0487] 여기서 X_{a9}는 A 또는 Q일 수 있거나;

[0488] 여기서 X_{a10}은 염기성 아미노산일 수 있거나;

[0489] 여기서 X_{a11}은 소수성 아미노산일 수 있고,

[0490] 여기서 X로 확인된 적어도 하나의 아미노산은 SEQ ID NO.:4에 기재된 폴리펩티드에서 상응하는 아미노산과 비교하여 아미노산 치환(보존성 또는 비-보존성)이다

[0491] SEQ ID NO.:32 (변이체 경쇄 가변 영역)

DX_A1VMTQTPLSLX_A2VX_A3X_A4GX_A5X_A6ASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPX_A7LLIHT
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX_A8GVYYCFQGSHVPLTFGX_A9GT_X_A10LEX_A11

K

[0493] 여기서 X_{A1}은 V 또는 I일 수 있거나

[0494] 여기서 X_{A2}는 A 또는 P일 수 있거나

[0495] 여기서 X_{A3}은 S 또는 T일 수 있거나

[0496] 여기서 X_{A4}는 L 또는 P일 수 있거나

[0497] 여기서 X_{A5}는 D 또는 E일 수 있거나

[0498] 여기서 X_{A6}은 Q 또는 P일 수 있거나

[0499] 여기서 X_{A7}은 K 또는 Q일 수 있거나

- [0500] 여기서 X_{A8} 은 L 또는 V일 수 있거나
- [0501] 여기서 X_{A9} 는 A 또는 Q일 수 있거나
- [0502] 여기서 X_{A10} 은 R 또는 K일 수 있거나
- [0503] 여기서 X_{A11} 은 L 또는 I일 수 있고,
- [0504] 여기서 X로 확인된 적어도 하나의 아미노산은 SEQ ID NO.:4로 기재된 폴리펩티드에서 상응하는 아미노산과 비교하여 아미노산 치환(보존성 또는 비-보존성)이다.
- [0505] SEQ ID NO.:33 (변이체 경쇄 가변 영역: Lvh1)
 DIVMTQTPLSLPVTPGEPAISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGV
 PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFQGQGTKLEIK
- [0506] SEQ ID NO.:34 (변이체 2 경쇄 가변 영역: Lvh2)
 DVVMTQTPLSLPVTPGEPAISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRFSG
 VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFQGQGTKLEIK
- [0507] SEQ ID NO.:35 (변이체 중쇄 가변 영역)
 QXQLVQSGXEXXKPGASVKXSCKASGYTFTDDYMSWVXQXXGXXLEWXGDINPYNGDTNY
 NQKFKGXXXXTDXSXSTAYMXLXSLXSEDXAVYYCARDPGAMDYWGQQGTXVTVSS
- [0508] 여기서 X로 확인된 적어도 하나의 아미노산은 SEQ ID NO.:2로 기재된 폴리펩티드에서 상응하는 아미노산과 비교하여 아미노산 치환(보존성 또는 비-보존성)이다. 예를 들어, 상기 아미노산 치환은 보존성일 수 있다.
- [0509] SEQ ID NO.:36 (변이체 중쇄 가변 영역)
 QX_{b1}QLVQSGX_{b2}EX_{b3}X_{b4}KPGASVKX_{b5}SCKASGYTFTDDYMSWVX_{b6}QX_{b7}X_{b8}GX_{b9}X_{b10}LEWX_{b11}GDINPYNGDTNYNQKFKGX_{b12}X_{b13}X_{b14}X_{b15}TX_{b16}DX_{b17}SX_{b18}STAYMX_{b19}LX_{b20}SLX_{b21}SEDX_{b22}AVYYCARDPGAMDYWGQQGTX_{b23}VTVSS
- [0510] 여기서 X_{b1} 은 소수성 아미노산일 수 있거나;
- [0511] 여기서 X_{b2} 는 P 또는 A일 수 있거나;
- [0512] 여기서 X_{b3} 은 소수성 아미노산일 수 있거나;
- [0513] 여기서 X_{b4} 는 V 또는 K일 수 있거나;
- [0514] 여기서 X_{b5} 는 소수성 아미노산일 수 있거나;
- [0515] 여기서 X_{b6} 은 염기성 아미노산일 수 있거나;
- [0516] 여기서 X_{b7} 은 S 또는 A일 수 있거나;
- [0517] 여기서 X_{b8} 은 H 또는 P일 수 있거나;
- [0518] 여기서 X_{b9} 는 염기성 아미노산일 수 있거나;
- [0519] 여기서 X_{b10} 은 S 또는 G일 수 있거나;
- [0520] 여기서 X_{b11} 은 소수성 아미노산일 수 있거나;
- [0521] 여기서 X_{b12} 는 염기성 아미노산일 수 있거나;
- [0522] 여기서 X_{b13} 는 염기성 아미노산일 수 있거나;
- [0523] 여기서 X_{b14} 는 소수성 아미노산일 수 있거나;
- [0524] 여기서 X_{b15} 은 소수성 아미노산일 수 있거나;
- [0525] 여기서 X_{b16} 는 염기성 아미노산일 수 있거나;

- [0526] 여기서 X_{b13} 은 소수성 아미노산일 수 있거나;
- [0527] 여기서 X_{b14} 는 I 또는 T일 수 있거나;
- [0528] 여기서 X_{b15} 는 소수성 아미노산일 수 있거나;
- [0529] 여기서 X_{b16} 은 소수성 아미노산일 수 있거나;
- [0530] 여기서 X_{b17} 은 K 또는 T일 수 있거나;
- [0531] 여기서 X_{b18} 은 중립 친수성 아미노산일 수 있거나;
- [0532] 여기서 X_{b19} 는 Q 또는 E일 수 있거나;
- [0533] 여기서 X_{b20} 은 N 또는 S일 수 있거나;
- [0534] 여기서 X_{b21} 은 T 또는 R일 수 있거나;
- [0535] 여기서 X_{b22} 는 중립 친수성 아미노산일 수 있거나;
- [0536] 여기서 X_{b23} 은 S 또는 L일 수 있고,
- [0537] 여기서 X로 확인된 적어도 하나의 아미노산은 SEQ ID NO.:2로 기재된 폴리펩티드에서 상응하는 아미노산과 비교하여 아미노산 치환(보존성 또는 비-보존성)이다.
- [0538] SEQ ID NO.:37 (변이체 중쇄 가변 영역)
 QX_{B1}QLVQSGX_{B2}EX_{B3}X_{B4}KPGASVKX_{B5}SCKASGYTFTDDYMSWVX_{B6}QX_{B7}X_{B8}GX_{B9}X_{B10}LEW
 X_{B11}GDINPYNGDTNYNQKFKGX_{B12}X_{B13}X_{B14}X_{B15}TX_{B16}DX_{B17}SX_{B18}STAYMX_{B19}LX_{B20}SLX_{B21}SE
 DX_{B22}AVYYCARDPGAMDYWGQGTX_{B23}VTVSS
- [0539]
- [0540] 여기서 X_{B1} 은 I 또는 V일 수 있거나;
- [0541] 여기서 X_{B2} 는 P 또는 A일 수 있거나;
- [0542] 여기서 X_{B3} 은 M 또는 V일 수 있거나;
- [0543] 여기서 X_{B4} 는 V 또는 K일 수 있거나;
- [0544] 여기서 X_{B5} 는 M 또는 V일 수 있거나;
- [0545] 여기서 X_{B6} 은 K 또는 R일 수 있거나;
- [0546] 여기서 X_{B7} 은 S 또는 A일 수 있거나;
- [0547] 여기서 X_{B8} 은 H 또는 P일 수 있거나;
- [0548] 여기서 X_{B9} 는 K 또는 Q일 수 있거나;
- [0549] 여기서 X_{B10} 은 S 또는 G일 수 있거나;
- [0550] 여기서 X_{B11} 은 I 또는 M일 수 있거나;
- [0551] 여기서 X_{B12} 는 K 또는 R일 수 있거나;
- [0552] 여기서 X_{B13} 은 A 또는 V일 수 있거나;
- [0553] 여기서 X_{B14} 는 I 또는 T일 수 있거나;

- [0554] 여기서 X_{B15} 는 L 또는 I일 수 있거나;
- [0555] 여기서 X_{B16} 은 V 또는 A일 수 있거나;
- [0556] 여기서 X_{B17} 은 K 또는 T일 수 있거나;
- [0557] 여기서 X_{B18} 은 S 또는 T일 수 있거나;
- [0558] 여기서 X_{B19} 는 Q 또는 E일 수 있거나;
- [0559] 여기서 X_{B20} 은 N 또는 S일 수 있거나;
- [0560] 여기서 X_{B21} 은 T 또는 R일 수 있거나;
- [0561] 여기서 X_{B22} 는 S 또는 T일 수 있거나;
- [0562] 여기서 X_{B23} 은 S 또는 L일 수 있고,
- [0563] 여기서 X로 확인된 적어도 하나의 아미노산은 SEQ ID NO.:2에 기재된 폴리펩티드에서 상응하는 아미노산과 비교하여 아미노산 치환(보존성 또는 비-보존성)이다.
- [0564] SEQ ID NO.:38 (변이체 1 중쇄 가변 영역: Hvh1)
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTN
 YNQKFGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQQGTLTVSS
- [0565] SEQ ID NO.:39 (변이체 2 중쇄 가변 영역: Hvh2)
 QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTNY
 NQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQQGTLTVSS
- [0566] SEQ ID NO.:40 (변이체 3 중쇄 가변 영역: Hvh3)
 QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNY
 NQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQQGTLTVSS
- [0567] SEQ ID NO.:41 (변이체 4 중쇄 가변 영역: Hvh4)
 QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNY
 NQKFKKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQQGTLTVSS
- [0568] SEQ ID NO: 42 3A4 뮤린 경 (카파) 쇄
 DVVMTQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIHTVSNRFSG
 VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFAGTRLELKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
 SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0569] SEQ ID NO:43 3A4 인간화된 경 (카파) 쇄 변이체 1; Lh1
 DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGV
 PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLS
 KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0570] SEQ ID NO:44 3A4 뮤린 경 (카파) 쇄
 DQVMTQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIHTVSNRFSG
 VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFAGTRLELKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
 SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0571] SEQ ID NO:45 3A4 뮤린 경 (카파) 쇄
 DQVMTQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGV
 PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLS
 KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0572] SEQ ID NO: 46 3A4 뮤린 경 (카파) 쇄
 DQVMTQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSG
 PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFAGTRLELKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
 SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0573] SEQ ID NO:47 3A4 뮤린 경 (카파) 쇄
 DQVMTQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGV
 PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLS
 KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0574] SEQ ID NO:48 3A4 뮤린 경 (카파) 쇄
 DQVMTQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSG
 PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFAGTRLELKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
 SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0575] SEQ ID NO:49 3A4 뮤린 경 (카파) 쇄
 DQVMTQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGV
 PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLS
 KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0576] SEQ ID NO:44 3A4 인간화된 경 (카파) 쇄 변이체 2; Lh2

DVVMQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPLTFQQGTKEIKRTVAAPSVIFPP
SDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0577]

[0578] SEQ ID NO:45 3A4 뮤린 중 (Igg1) 쇄

QIQLVQSGPEMVKPGASVKMSCKASGYTFTDDYMSWVKQSHGKSLEWIGDINPYNGDTNY
NQKFKGKAILTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSA VYYCARDPGAMDYWGQGTSVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH

[0579]

EALHNHYTQKSLSLSPGK

[0580] SEQ ID NO:46 3A4 인간화된 중 (Igg1) 쇄 변이체 1; Hh1

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTN
YNQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
SVVTVPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH

[0581]

HEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0582] SEQ ID NO:47 3A4 인간화된 중 (Igg1) 쇄 변이체 2; Hh2

QIQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTNY
NQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH

[0583]

EALHNHYTQKSLSLSPGK

[0584] SEQ ID NO:48 3A4 인간화된 중 (Igg1) 쇄 변이체 3; Hh3

QIQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNY
NQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS

[0585]

SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPP
 KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
 [0586] HEALHNHYTQKSLSLSPKG

[0587] SEQ ID NO:49 3A4 인간화된 중 (Igg1) 쇄 변이체 4: Hh4

QIQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNY
 NQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLTVSSASTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSL
 SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPP
 KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPVYTLPPSRDELTQNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
 [0588] HEALHNHYTQKSLSLSPKG

[0589] SEQ ID NO:50

ATACCCAAGCTTGCACCACATGGAGACAGACACAC

[0590] SEQ ID NO:51

ATACCCAAGCTTCATTCCCGGGAGACAGGGAG

[0591] SEQ ID NO:52

ATACCCAAGCTGGGCCACCATGAACCTTGCTGTCTTGG

[0592] SEQ ID NO:53

ATACCCAAGCTTCTAACACTCTCCCTGTTGAAG

[0593] SEQ ID NO:54 pK-CR5

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTGTTAAAATTGCGTTAAATTGGTTAAATCAGCTCAT
 TTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGAAAATCCCTATAAAATCAAAGAATAGACCGAGA
 TAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCA
 ACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCCTACGTGAACCATCACCC
 TAATCAAGTTTTGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGAACCCCTAAAGGGAG
 CCCCCGATTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCAACGTGGCAGAAAGGAAGGGAA
 GAAAGCGAAAGGAGCGGGCGTAGGGCGCTGGCAAGTGTACCGGTACGCTGCCGT
 AACCCACACCCGCCGCTTAATGCCCGCTACAGGGCGCTCCATTGCCATT
 AGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCCCTTCGCTATTAGGCCAGC
 TGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCATTAAGTTGGTAACGCCAGGGTTTCCA
 GTCACGACGTTGTAACGACGGCCAGTGAGCGCGCTAATACGACTCACTATAGGGC
 GAATTGGAGCTCCACCGCGTGGCGCGCTAGAACTAGTGATCCACATCGCGC

[0598]

GCCAAATGATTGCCCTCCCATATGTCCTCCGAGTGAGAGACACAAAAAATTCCAACAC
 ACTATTGCAATGAAAATAAATTCTTTATTAGCCAGAGGTGAGATTAAATAAGCTTGC
 TAGCAGATCTTGGACCTGGAGTGGACACCTGTGGAGAGAAAGGCAAAGTGGATGTCA
 TTGTCACTCAAGTGTATGCCAGATCGGCCAGGTGAATATCAAATCCTCGTTTG
 GAAACTGACAATCTTAGCGCAGAAGTAATGCCGCTTGAGAGGGAGTACTCACCCCA
 ACAGCTGGATCTCAAGCCTGCCACACCTCACCTGACCATCCGCCGTCTCAAGACGCC
 TACTTAATTACATCATCAGCAGCACCTCGCCAGAAACAACCCGACCGCCACCGCT
 GCCGCCGCCACGGTGCCTACGCTACCTGCGACTGTGACTGGTTAGACGCCCTTC
 GAGAGGTTTCCGATCCGGTCATGCCGACTCGCTCAGGTCCCTCGTGGCGAGTAC
 CGTCGGAGGCCGACGGGTTCCGATCCAAGAGTACTGGAAAGACCGCGAAGAGTTG
 TCCTCAACCGCGAGCCAACAGCTGCCCTCGCAGACAGCGATGCCAAGAGAGTGAC
 CGCGGAGGCTGGATCGGCCCCGTCTTCTATGGAGGTAAAACAGCGTGGATGGCG
 TCTCCAGGCGATCTGACGGTCACTAAACGAGCTGCTTATAGGCTCCACCGTA
 CACGCCCTACCTCGACCCGGTACCAATCTTATAATACAAACAGACCAATTGTC
 TTATAATACAAACAGACCAATTGTCCTGTTATAATACAAACAGACCAATTGTC
 TTGTTATAATACAAACAGACCAATTGTCCTGTTATAATACAAACAGACCAATTGTC
 TGTTGTTATAATACAAACAGACCAATTGTCCTGTTAAGGTTGCGAGTGAAGACG
 AAAGGGTTATTAAGCGCGCCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGTACCCAGCTT
 TTCCCTTAGTGAGGGTTATTGCGCGCTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTCTGT

[0599] GTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAA
 AGCCTGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTACTGCCG
 CTTCCAGTCGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGG
 GAGAGGCGGTTGCGTATTGGCGCTCTCCGCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCT
 CGTCGTTGGCTGCCGAGCGGTACGCTCACTCAAAGCGGTAAACGGTTATC
 CACAGAATCAGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCC
 AGGAACCGTAAAAGGCCGCGTGGCTGGCTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGA
 GCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCAGACCGACAGGACTATAAGAT
 ACCAGCGTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCGTTCCGACCCCTGCCGCTT
 ACCGGATACCTGTCGCCCTTCTCCCTCGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCAGC
 CTGTAGGTATCTCAGTCGGTGTAGGTCGTCGCTCCAGCTGGCTGTGCACGAAC
 CCCCCGTTAGCCGACCGCTGCCCTATCCGTAACATCGTCTTGAGTCCAAACCCG
 GTAAGACACGACTATGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGA
 GGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGA
 AGGACAGTATTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTCGAAAAAGAGTTGG
 TAGCTCTTGATCCGGAAACAAACCAACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTGTTGCAAGCA
 GCAGATTACGCGCAGAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTGATCTTCTACGGGTC
 TGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTGGTCAATGAGATTATAAG
 GATCTTACCTAGATCCTTAAATTAAAAATGAAGTTAAATCAATCTAAAGTATATG
 AGTAAAACCTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGGCACCTATCTCAGCGATCT

[0600]

GTCTATTCGTTCATCCATAGTTGCCCTGACTCCCCGTCGTAGATAACTACGATACGGG
 AGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATAACCGCAGAGACCCACGCTACCGGC
 TCCAGATTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAGGGCCAGCGCAGAAGTGGTCC
 GCAACTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAAATTGTTGCCGGAGCTAGAGTAAGTAGT
 TCGCCAGTTAATAGTTGCCAACGTTGCTACAGGCATCGTGGTGTACG
 CTCGTCGTTGGTATGGCTTACTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCAGTTACAT
 GATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTCGTCCGATCGTGTAGA
 AGTAAGTTGCCGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACT
 GTCATGCCATCCGTAAGATGCTTCTGTGACTGGTAGTACTCAACCAAGTCATTCTGA
 GAATAGTGTATGCCGCAGCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGC
 GCCACATAGCAGAACTTAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTCGGGCGAAA
 ACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCC
 GATCTTCAGCATCTTTACTTCACCAGCGTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCAA
 ATGCCGAAAAAAGGAATAAGGGCGACACGAAATGTTGAATACTCATACTCTCCTT
 TTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTGAATG
 TATTTAGAAAAATAACAAATAGGGTCCGCGCACATTCCCCGAAAAGTGCCAC

[0601]

SEQ ID NO:55 pMPG-CR5

GTCGACGATACCGTGCACCTAATTAAAGCGCGCTGACCAAATGATTGCCCTCCATATG
 TCCTCCGAGTGAGAGACACAAAAATTCAAACACACTATTGCAATGAAAATAATTCT
 TTATTAGCCAGAGGTGAGGTGGATCCGTTAAACTTGGACCTGGAGTGGACAC
 CTGTGGAGAGAAAGGCAAAGTGGATGTCATTGTCACTCAAGTGTATGCCAGATGGC
 CAGGTGAATATCAAATCCTCCTCGTTTGAAACTGACAATCTAGGCCAGAAGTAATG
 CCCGTTTGAGAGGGAGTACTCACCCCAACAGCTGGATCTCAAGCCTGCCACACCTCA
 CCTCGACCATCCGCCGCTCAAGACCCGCTACTTTAATTACATCATCAGCAGCACCTC
 GCCAGAAACAACCCCGACCGCCACCCGCTGCCGCCACGGTGTCAAGCCTACCTT
 GCGACTGTGACTGGTTAGACGCCCTTCTCGAGAGGTTCCGATCCGGTCATGCCAG
 TCGCTCAGGTCCCTCGTGGCGAGTACCGTTCGGAGGCCACGGTTCCGATCCAA
 GAGTACTGGAAAGACCGCGAAGAGTTGTCTCAACCGCGAGCCAACAGCTGGCCT
 CGCAGACAGCGATGCCAAGAGAGTGACCGCGGAGGCTGGATCGTCCCGGTGTCTT
 CTATGGAGGTAAAACAGCGTGGATGGCTCTCCAGGCGATCTGACGGTTCACTAAC
 AGCTCTGCTTATAGGCCTCCACCGTACACGCCACCTCGACCCGGTACCAATCTT
 ATAATACAAACAGACCAATTGTCGTTGTTATAATACAAACAGACCAATTGTCGTT
 GTTATAATACAAACAGACCAATTGTCGTTGTTATAATACAAACAGACCAATTGTCG
 TTGTTATAATACAAACAGACCAATTGTCGTTGTTATAATACAAACAGACCAATTG
 CTGTTGTTAAGGTTGCGAGTGAAGACGAAAGGTTAATTAGGCAGCCGTCGACTA
 GCTTGGCACGCCAGAAATCCGCGCGTGGTTTGGGGTCGGGGTGTGAGCC
 ACAGACGCCGGTGTGCGCCAGTACATGCCAGGTCATGCCAGGCCATCCAA
 AAACCATGGGCTGTCAGTCAGTCGGACCAAGACCCACGCAACGCCAAAA

[0603]

TAATAACCCCCACGAACCATAAACCATCCCCATGGGGACCCGTCCCTAACCCACGG
 GGCCAGTGGCTATGGCAGGGCCTGCCGCCCCGACGTTGGCTGCAGGCCCTGGCCCT
 CACCCGAACCTGGGGGTGGGGAAAAGGAAGAAACCGCGGGGTATTGGCCCC
 AATGGGGTCTCGGTGGGTATCGACAGAGTGCCAGCCCTGGACCGAACCCCGCGTT
 ATGAACAAACGACCCAACACCCGTGCCTTATTCTGTCTTTATTGCCGTATAGCGC
 GGGTTCCCTCCGGTATTGTCTCCTCCGTGTTCAAGTTAGCCTCCCCATCTCCCTATT
 CCTTGCCCTCGGACGAGTGCTGGGGCGTCGGTTCCACTATCGGCAGTACTTCTACA
 CAGCCATCGGTCCAGACGCCCGCTCTGCCGGGCGATTGTGTACGCCGACAGTCC
 CGGCTCCGGATCGGACGATTGCCTCGCATCGACCCCTGCCAAGCTGCATCATCGAA
 ATTGCCGTCAACCAAGCTCTGATAGAGTTGGTCAAGACCAATGCCGGAGCATATACGCC
 GGAGCCGCGGCGATCCTGCAAGCTCCGGATGCCCTCGCTGAAGTAGCGCGTCTGCTG
 CTCCATACAAGCCAACCACGGCCTCCAGAAGAAGATGTTGGCACCTCGTATTGGAAAT
 CCCCGAACATCGCCTCGCTCCAGTCATGACCGCTGTTATGCCGCCATTGTCGGTCAGG
 ACATTGTTGGAGCCGAAATCCGCGTGCACGAGGTGCCGGACTTCGGGCAGTCCTCGG
 CCCAAAGCATCAGCTCATCGAGAGCCTGCCGACGGACGCACGTACGGTGTCTCCAT
 CACAGTTGCCAGTGATACACATGGGATCAGCAATCGCGCATATGAAATACGCCATG
 TAGTGTATTGACCGATTCCCTGGTCCGAATGGCCGAACCCGCTCGTCTGGCTAAGA
 TCGGCCGCGCAGCGATCGCATCCATGCCCTCGCACCGGCTGCAGAACAGCGGGCAGTT
 CGGTTCAAGGCAGGTCTGCAACGTGACACCCCTGTGCACGGCGGGAGATGCAATAGGT

[0604]
 CAGGCTCTCGCTGAATTCCCCAATGTCAAGCACTCCGAATGGGAGCGCGGCCGAT
 GCAAAGTGCCGATAAACATAACGATCTTGATGAAACCATCGCGCAGCTATTACCCGC
 AGGACATATCCACGCCCTCCTACATCGAAGCTGAAAGCACCGAGATTCTCGCCCTCCGA
 GAGCTGCATCAGGTCCGAGACCGCTGCGAACCTTCGATCAGAAACTCTCGACAGACG
 TCGCGGTGAGTTCAAGGCTTTCATATCTATTGCCGGGATCTGCCGCACGCGTACCTT
 CGCTGTTAACGGGTCGCTGCAGGGTCGCTCGGTGTTCGAGGCCACACGCGTACCTT
 AATATGCGAAGTGGACCTGGACCGCGCCGCCCCGACTGCATCTGGTGTTCGAATT
 GCCAATGACAAGACGCTGGGGGGTTGTGCATCATAGAAACTAAAGACATGCAAATA
 TATTCTCCGGGGACACCGCCAGCAAACGCGAGCAACGGCCACGGGATGAAGCAG
 GGCGATGGGGCCGACCGCGCTGGCTACGTTGCTGGCGTGCACGCGAGGCTGG
 ATGGCCTCCCCATTATGATTCTCTCGCTCCGGCGCATCGGATGCCCGCTTGCA
 GGCGATGCTGTCCAGGCAGGTAGATGACGACCATCAGGGACAGCTCAAGGATCGCTC
 GCGGCTTACCGCTAACCTCGATCACTGGACCGCTGATCGTCACGGGATTTATGC
 CGCCTCGCGAGCACATGGAACGGGTTGGCATGGATTGTAGGCGCCGCCATACCTT
 GTCTGCCTCCCCCGCGTTGCGTCGCGGTGCATGGAGGCCACCTCGACCTGAATGG
 AAGCCGGCGGCACCTCGCTAACGGATTCAACCAAGAATTGGAGCCAATCAATTCT
 TCGGGAGAACTGTGAATGCGCAAACCAACCCCTGGCAGAACATATCCATCGCGTCCGCC
 ATCTCCAGCAGCCGACGCCGGCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGTT
 GCTGGCGTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAA
 GTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACCAAGGCCTGGGTTCCCCCTGGAAAG

[0605]

CTCCCTCGCGCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCCTTC
 TCCCTCGGGAAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTACGCTGTAGGTATCTCAGTCGGTG
 TAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGCTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCT
 GCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTATGCCA
 CTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCCGTGCTACAG
 AGTTCTGAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTGGTATCTGC
 GCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTGATCCGGCAAACA
 AACCAACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAA
 AAGGATCTCAAGAACGATCCTTGATCTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAA
 ACTCACGTTAAGGGATTTGGTCATGAGATTATAAAAAGGATCTCACCTAGATCCTTT
 AAATTAAAAATGAAGTTAAATCAATCTAAAGTATATGAGTAAACTGGTCTGACAGTT
 ACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGCTATTGTTCATCCATAG
 TTGCCTGACTCCCCGTCGTAGATAACTACGATAACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCC
 AGTGCTGCAATGATAACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAAA
 CCAGCCAGCCGGAAAGGGCCAGCGCAGAAGTGGCCTGCAACTTATCCGCCTCCATC
 CAGTCTATTAAATTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGGGTGTACCGCTCGTGTGGTATGGCTC
 ATTCAAGCTCCGGTCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAA
 AGCGGTTAGCTCCTCGGTCCGATCGTTGTAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTAT
 CACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCT

[0606] TTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCCGCACCGA
 GTTGCTCTGCCCGCGTCAACACGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAA
 GTGCTCATCATTGAAAACGTTCTCGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTG
 AGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCACTGATCTCAGCATCTTACTTTC
 ACCAGCGTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGAAATAAG
 GGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTCAATATTATTGAAGCATTAT
 CAGGGTTATTGTCATGAGCGGATACATATTGAATGTATTAGAAAAATAACAAATAG
 GGGTTCCGCGCACATTCCCCAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCA
 TGACATTAACCTATAAAATAGCGTATCACGAGGCCCTTGTCTCAAGAATTCTCAT
 GTTGTACAGCTTATCTCTAGCAGATCCGGAATTCCCCTCCCAATTAAATGAGGACCTA
 ACCTGTGGAAATCTACTGATGTCGGAGGCTGTAAGTACAAACAGAGGTTATTGGAATA
 ACTAGCATGCTAACCTCATGCAGGGTCACAAAAGTGCATGACGATGGTGGAGGAA
 ACCTATTCAAGGCAGTAATTCCACTTCTTGTGTGGAGACCCCTTGGAAATGCA
 GGGAGTGCTAATGAATTACAGGACAAAGTACCCAGATGCTACTATAACCCCTAAACCC
 AACAGCCCAGTCCCAGGTAATGAATACTGACCATAAGGCCTATTGGACAAAAACAATGC
 TTATCCAGTTGAGTGTGGTCTGATCCTAGTAGAAATGAAATACTAGGTATTTGG
 GACTTTCACAGGAGGGAAAATGTTCCCCCAGTACTTCATGTGACCAACACAGCTACCA
 CAGTGTGCTAGATGAACAGGGTGTGGGCCTTTGTAAAGCTGATAGCCTGTATGTT
 CAGCTGCTGATATTGTGGCCTGTTACTAACAGCTCTGGAACACAACAGTGGAGAGGC

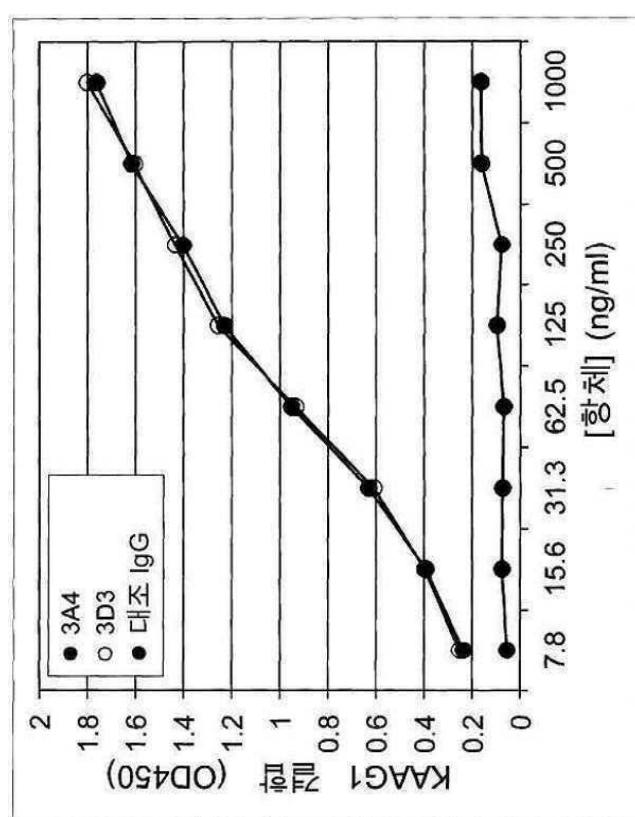
[0607]

CTTGCAAGATATTTAAGATCCGCCTGAGAAAAAGATCTGAAAGAACCTTACCTAATT
 CCTTTTGCTAAGTGACCTATAAACAGGGAGAACCCAGAGAGTGGATGGCAGCCTATG
 TATGGTATGGAATCCCAGGTAGAAGAGGTTAGGGTGTGATGGCACAGAAAGACTTCC
 AGGGGACCCAGATATGATAAGATATATTGACAAACAGGGACAATTGCAAACCAAAATGCT
 TTAAACAGGTGCTTTATTGTACATATACATTAAATAAAATGCTGCTTTGTATAAGCCACT
 TTAAGCTTGTGTTATTGGGGGTGGTGTGTTAGGCCTTAAAACACTGAAAGCCTTAC
 ACAAAATGCAACTCTGACTATGGGGTCTGACCTTGGAAATGTTCAGCAGGGCTGAA
 GTATCTGAGACTTGGGAAGACCATTGTGATTGGGATTCACTGCTTGATCCATGCCAGA
 GTCTTCAGTTCTGAATCCTCTCTTGTAATATCAAGAATACATTCCCCATGCATATAT
 TATATTCATCCTGAAAAAGTACATACATTATCTCAGAATCCAGCCTTCCTCCATTCA
 ACAATTCTAGAAGTTAAAAGTGGGTAGATGCTATTACAGAGGTAGAATGCTTCCTAAAC
 CCAGAAATGGGGATCTGC

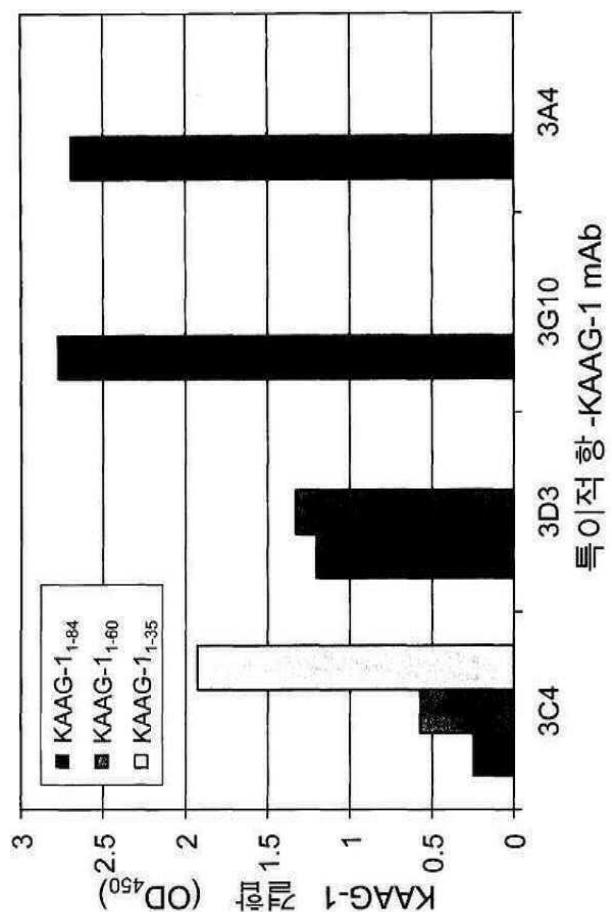
[0608]

[0609] SEQ ID NO.:56 - 3A4 인간화된 중쇄 CDR2 폴리펩티드 서열

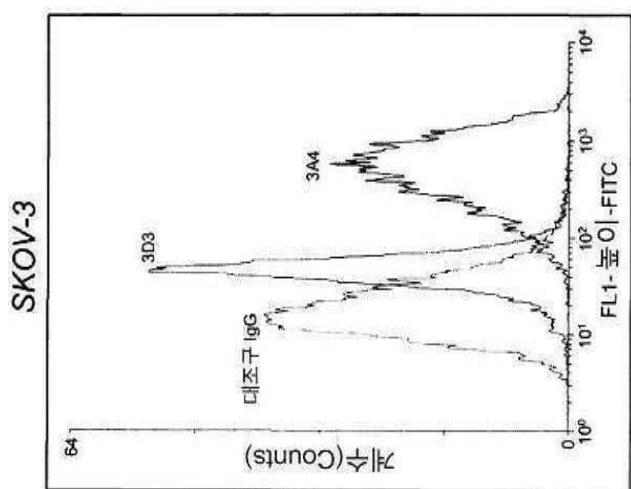
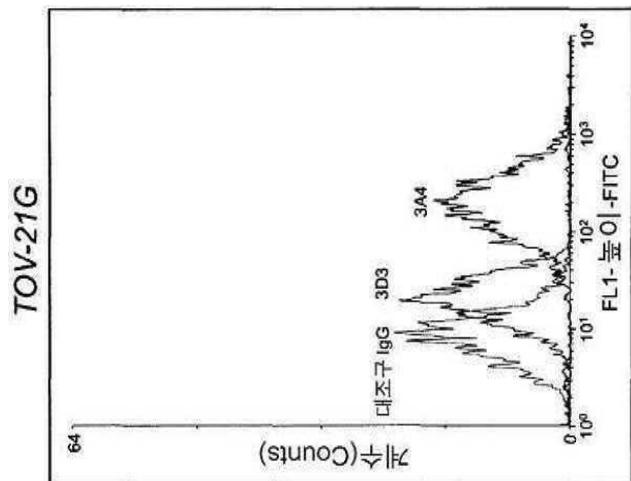
[0610] DINPYNGDTNYNQKFKG

도면**도면1**

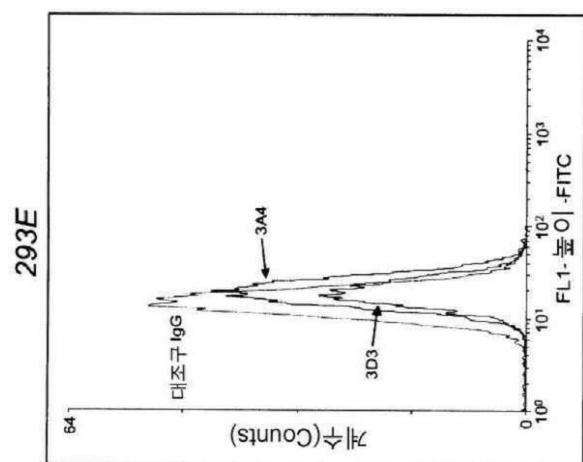
도면2



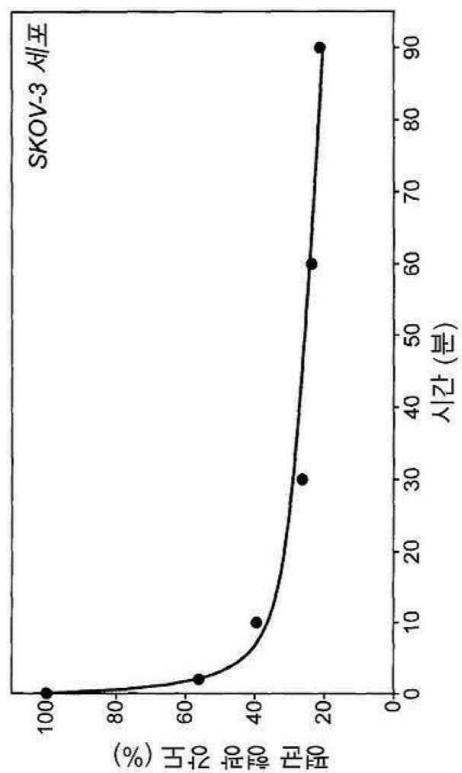
도면3a



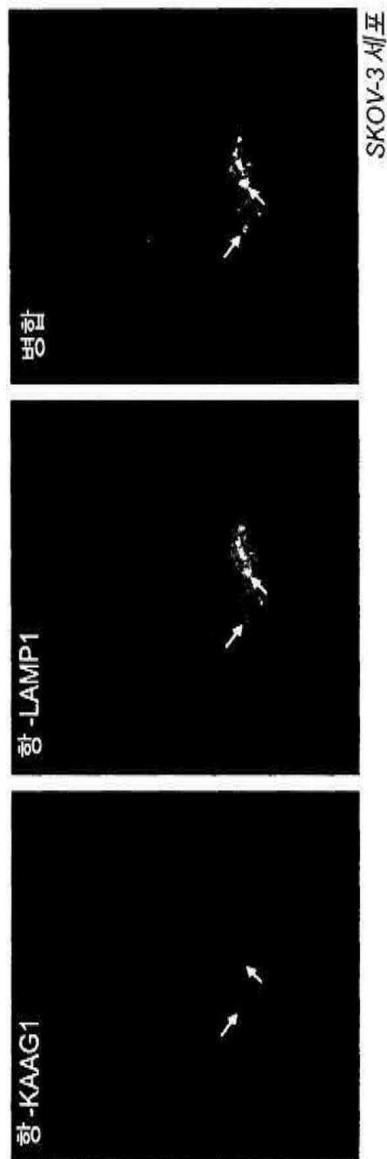
도면3b



도면4



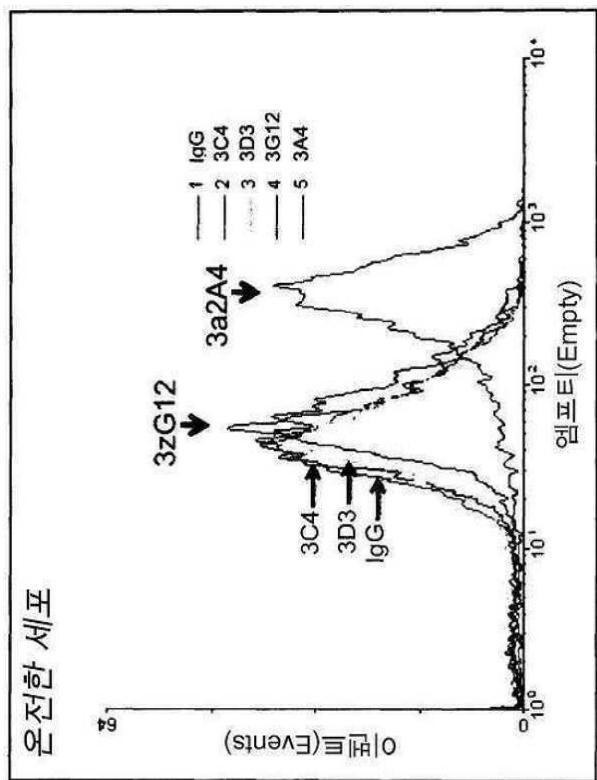
도면5a



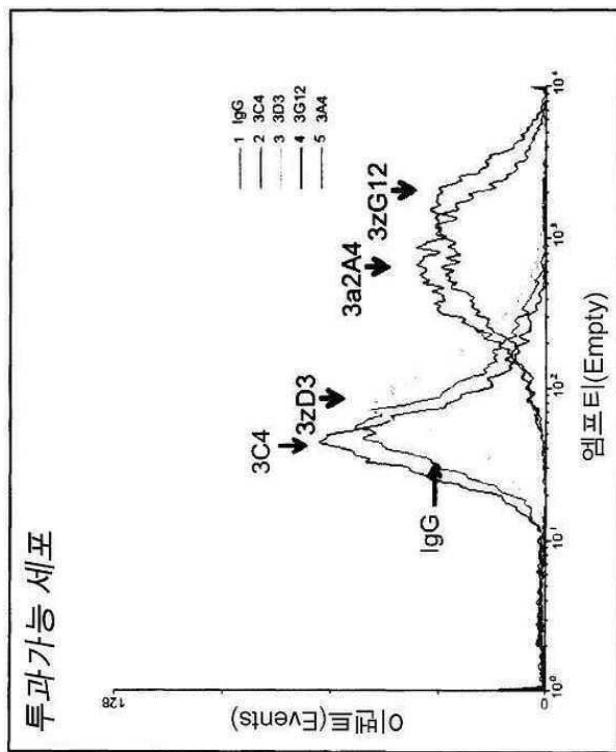
도면 5b



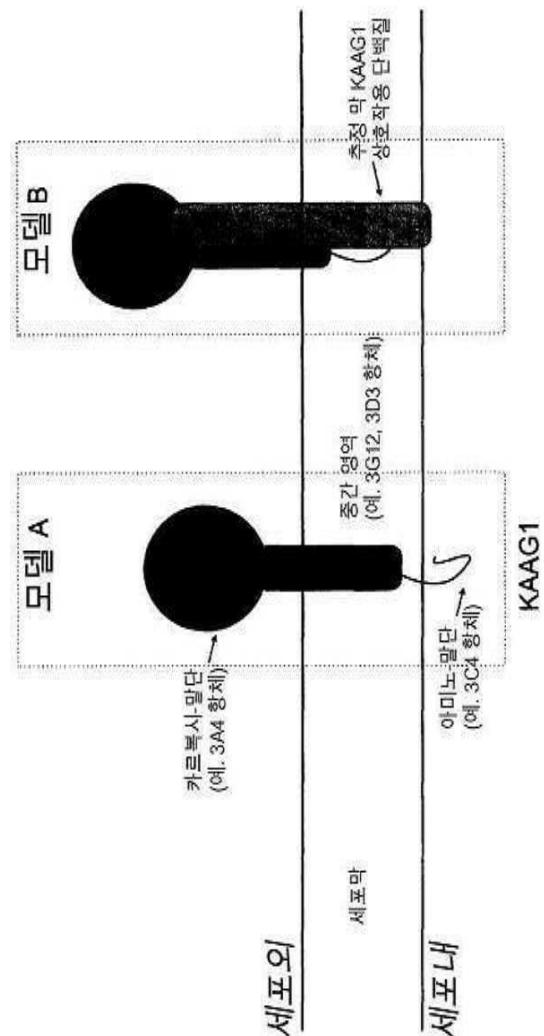
도면 6a



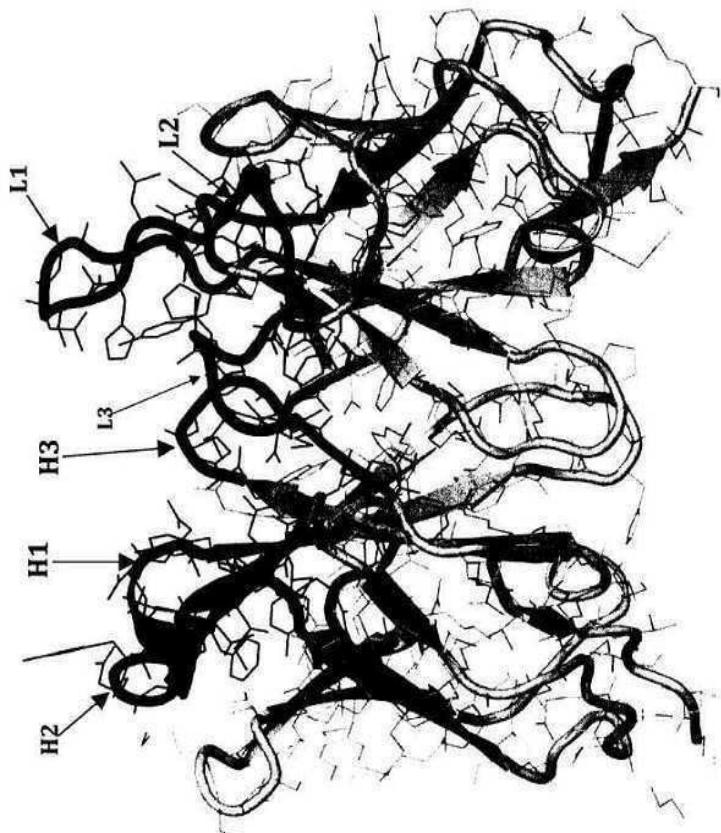
도면 6b



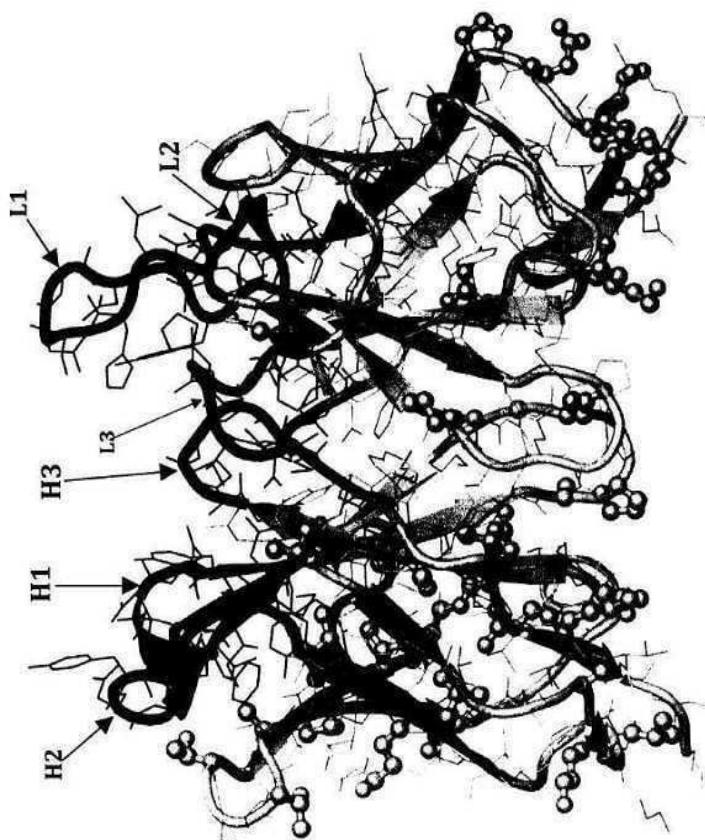
도면7



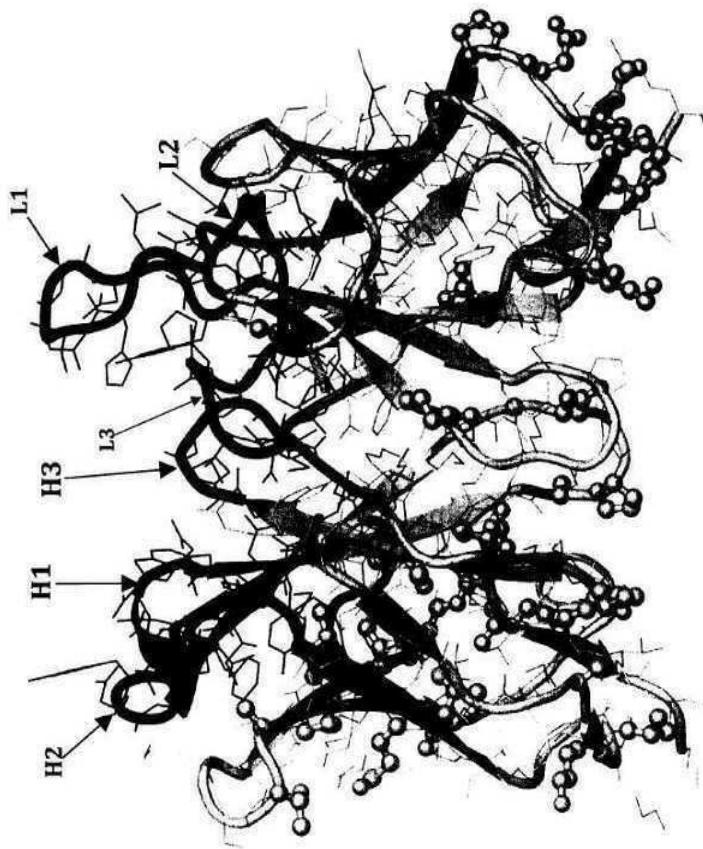
도면8



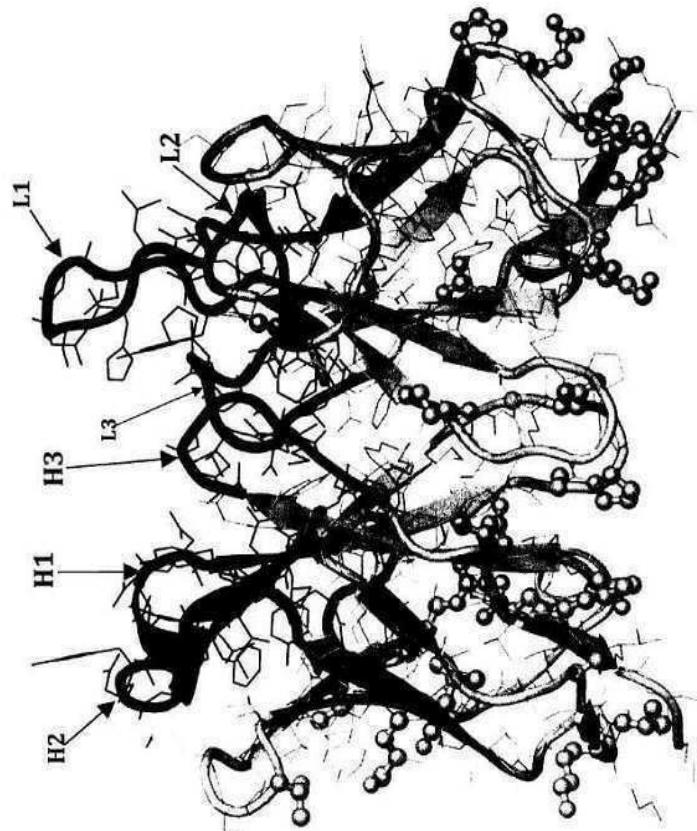
도면9a



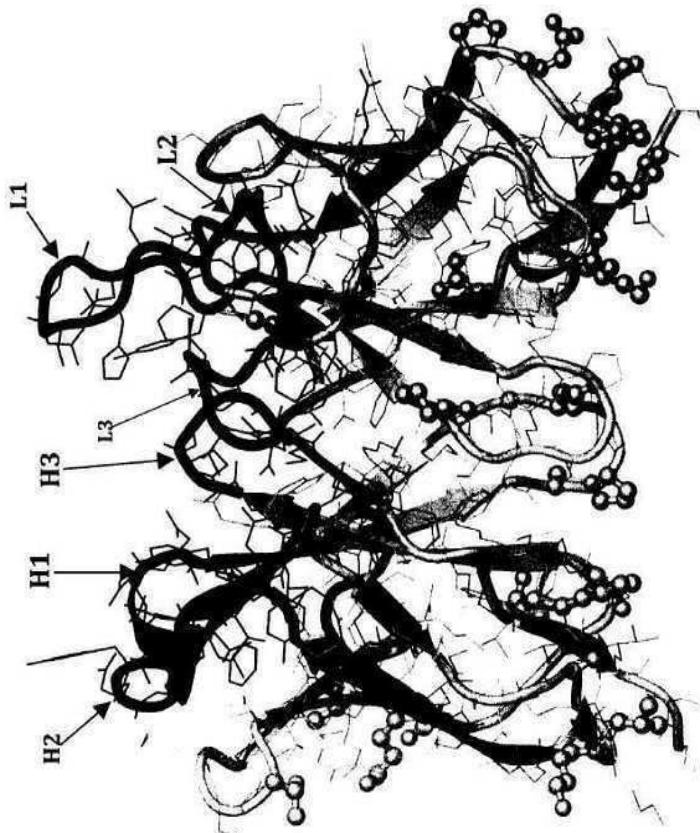
도면 9b



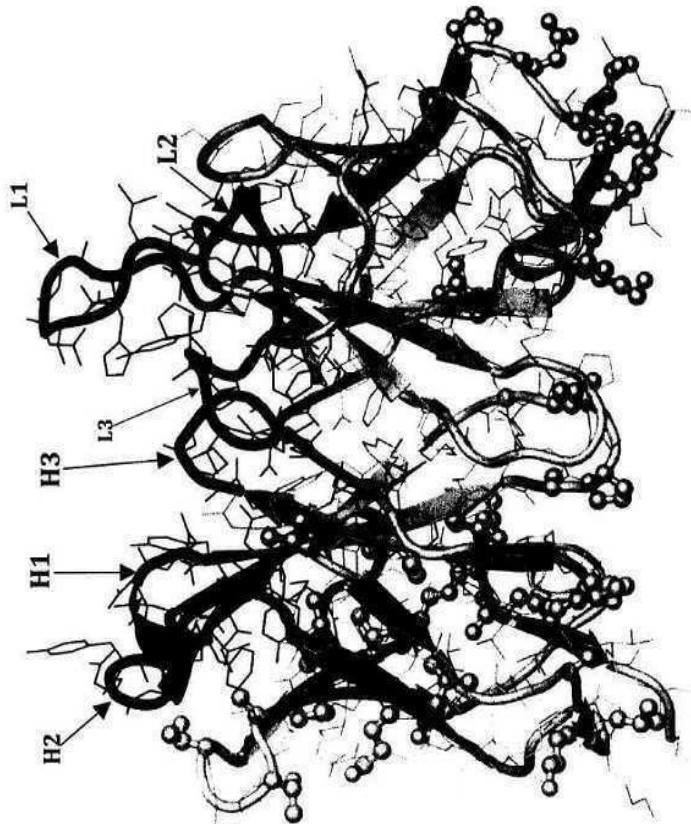
도면 9c



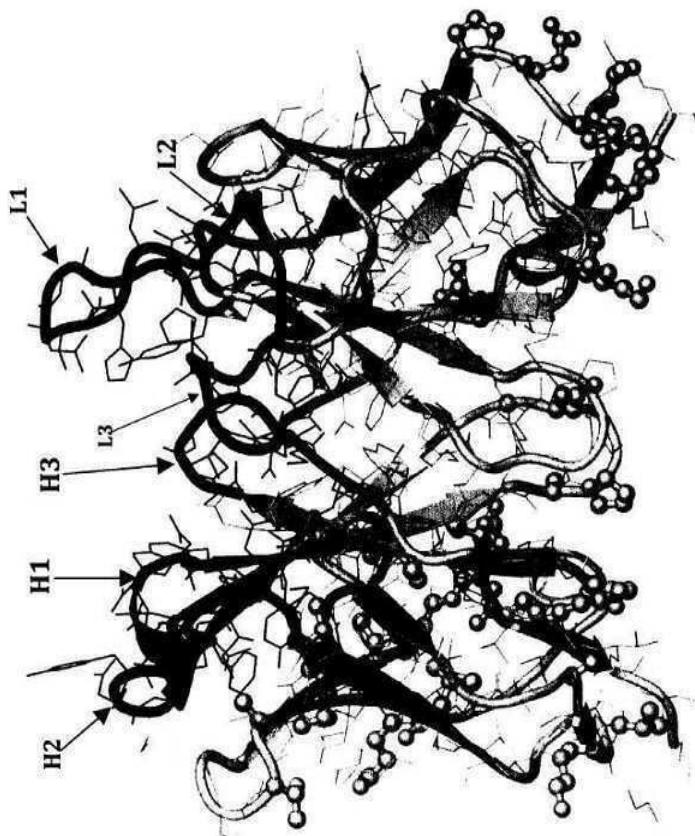
도면9d



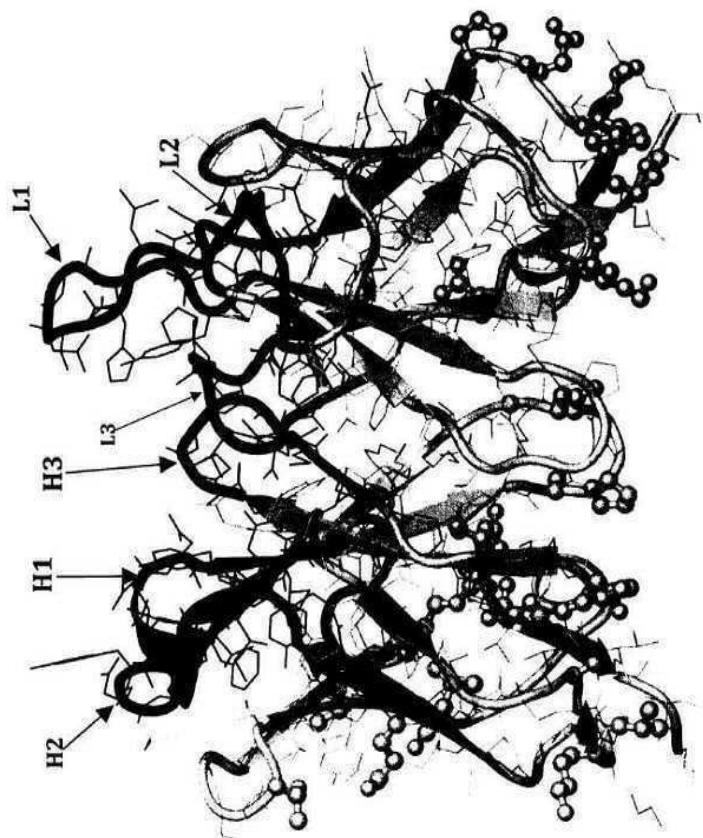
도면9e



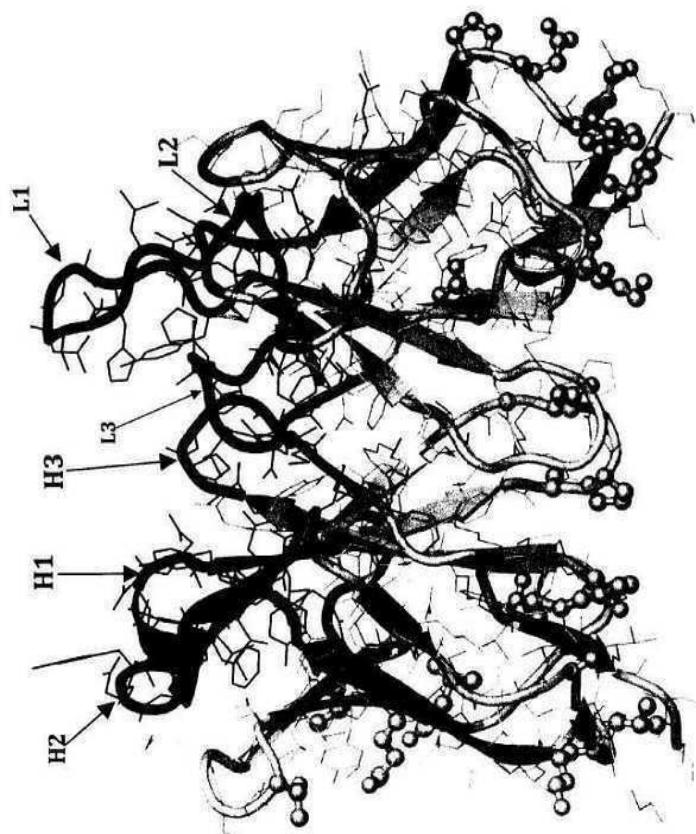
도면9f



도면9g



도면 9h



도면 10a

도면 10b

도면 11a

기사별 경상 배열

마우스 VL
EQ ID NO. 33

마우스 vt
EFO ID No. 33

도면 11b

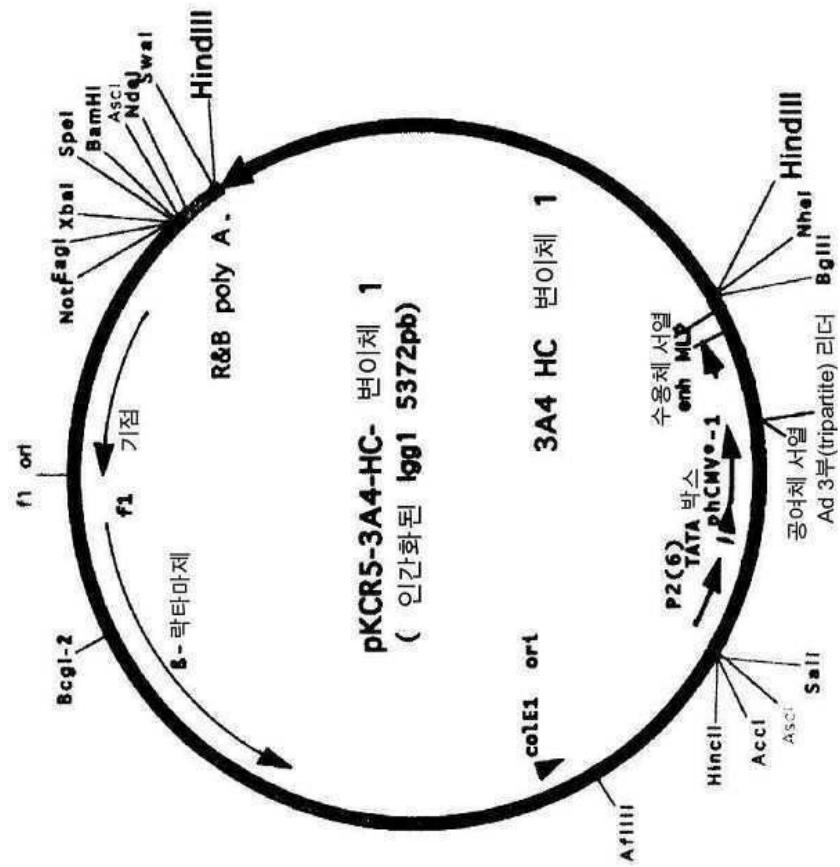
가변주석내역

마우스 VH
VIDEO ID NO. 38

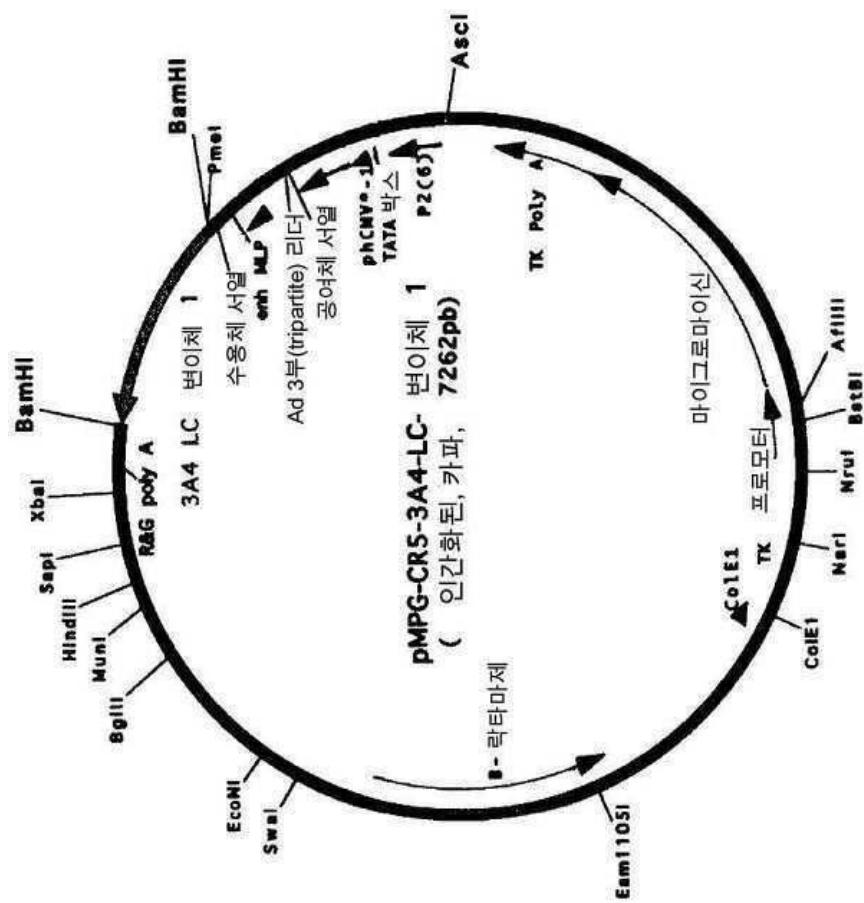
마우스 VH
EQ ID NO. 38

NOKERGRALL/TDKSNSSTAYMOLNLSITSEDAVYCARPDGMADYWGCGTSIVWSS 116
INQERERGRVLTIDTADSTAMELLSRSDEDAVYCARPDGMADYWGCGTSIVWSS 116

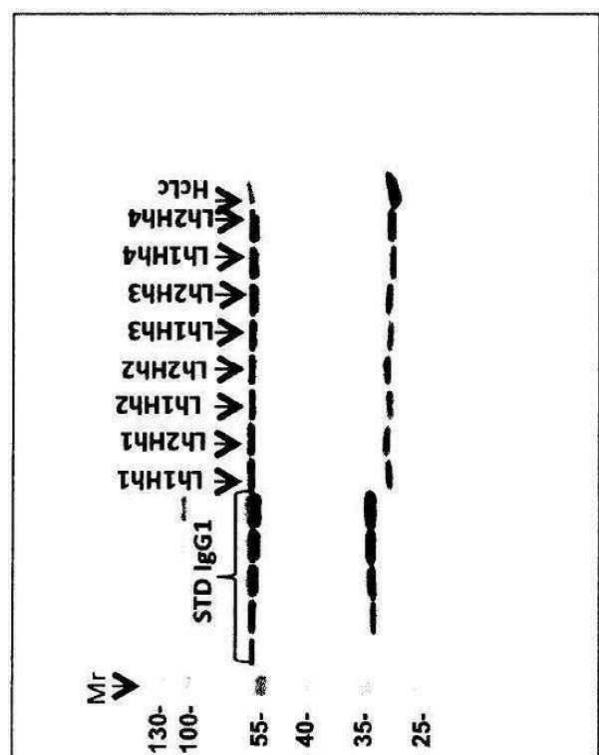
도면 12a



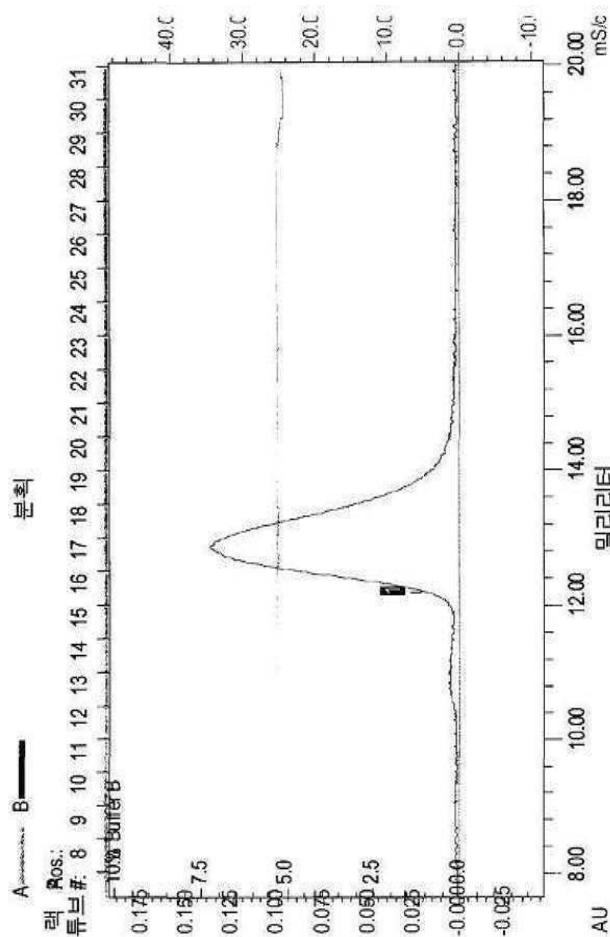
도면 12b



도면 13



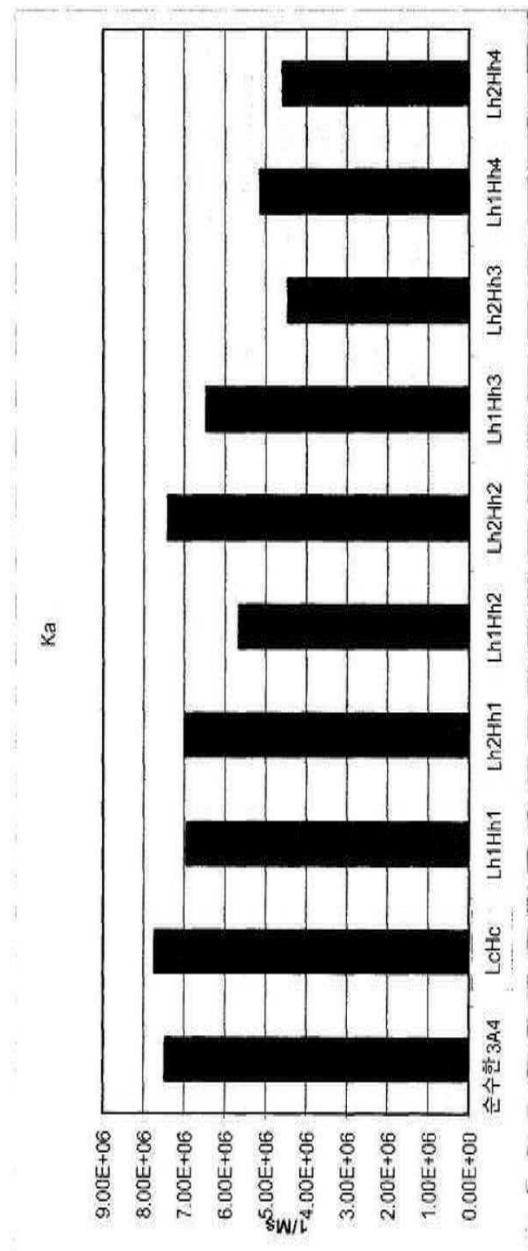
도면14



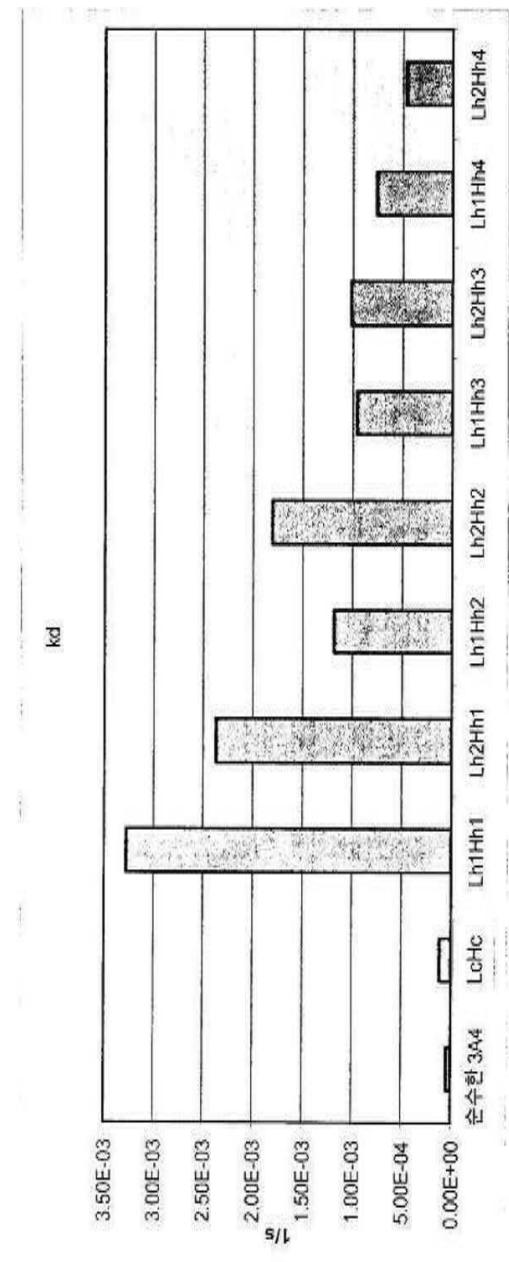
도면15

항체	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)	배수 차
LchC	7.72×10^5	1.21×10^{-4}	0.016	-
Lh1Hh1	6.93×10^5	3.28×10^{-4}	0.474	29.6
Lh2Hh1	6.97×10^5	2.37×10^{-4}	0.341	21.3
Lh1Hh2	5.65×10^5	1.19×10^{-4}	0.211	13.2
Lh2Hh2	7.40×10^5	1.81×10^{-3}	0.245	15.3
Lh1Hh3	6.46×10^5	9.60×10^{-4}	0.149	9.3
Lh2Hh3	4.46×10^5	1.02×10^{-3}	0.228	14.3
Lh1Hh4	5.14×10^5	7.64×10^{-4}	0.149	9.3
Lh2Hh4	4.57×10^5	4.70×10^{-4}	0.103	6.4

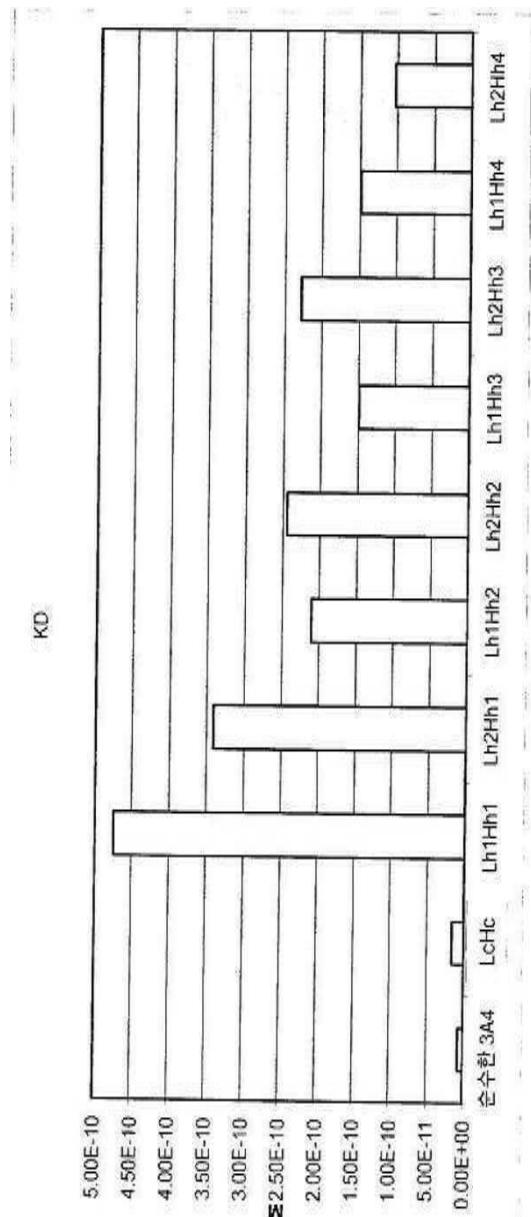
도면 16a



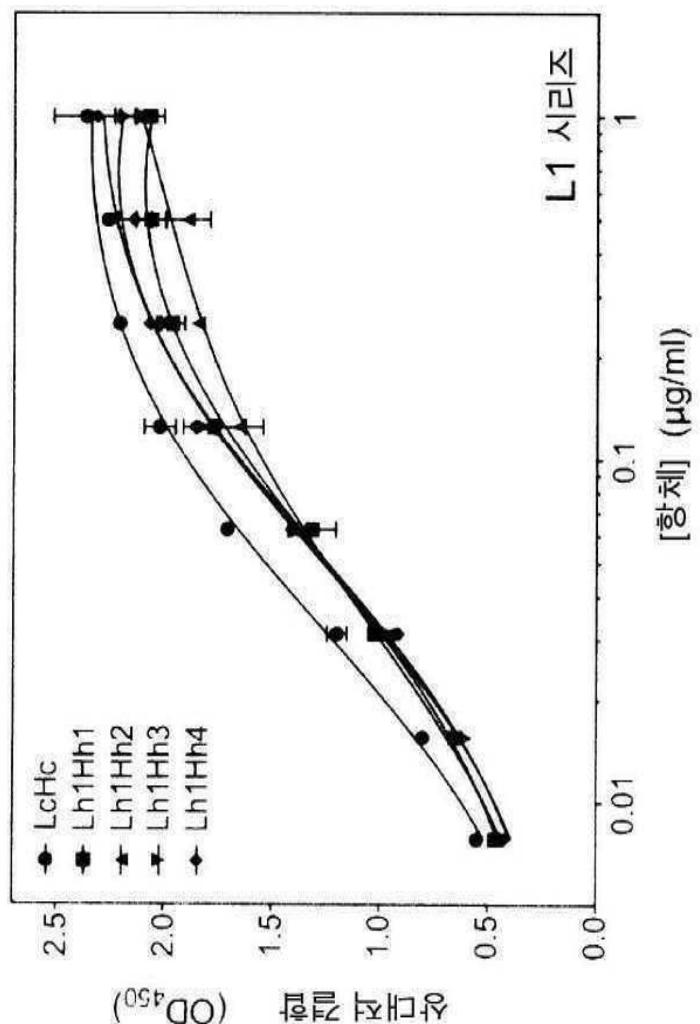
도면 16b



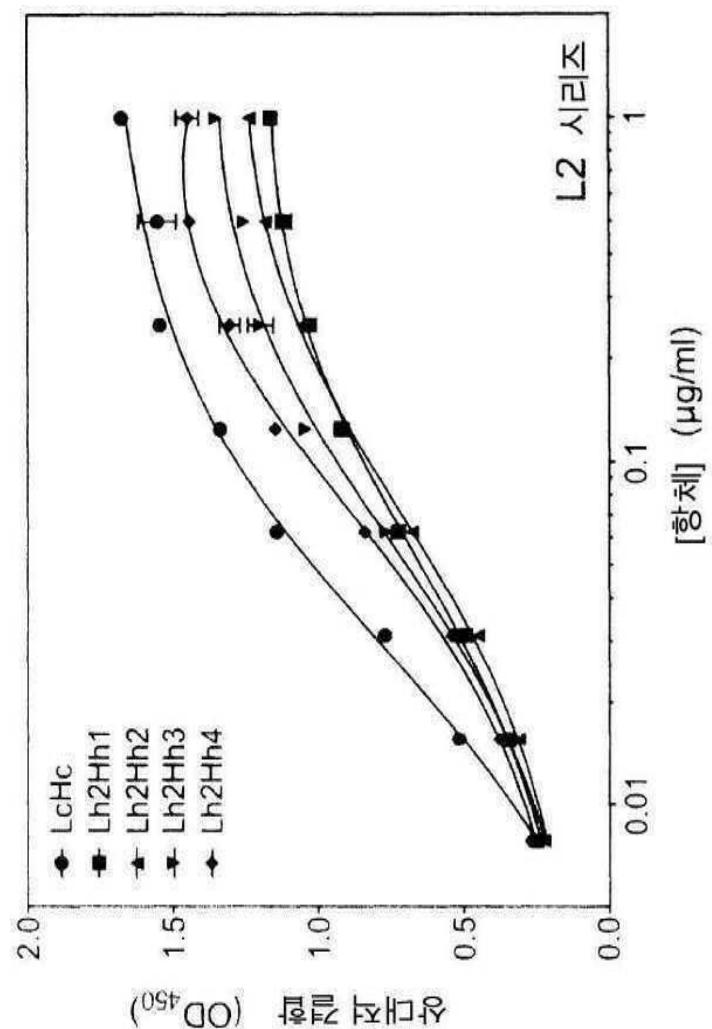
도면 16c



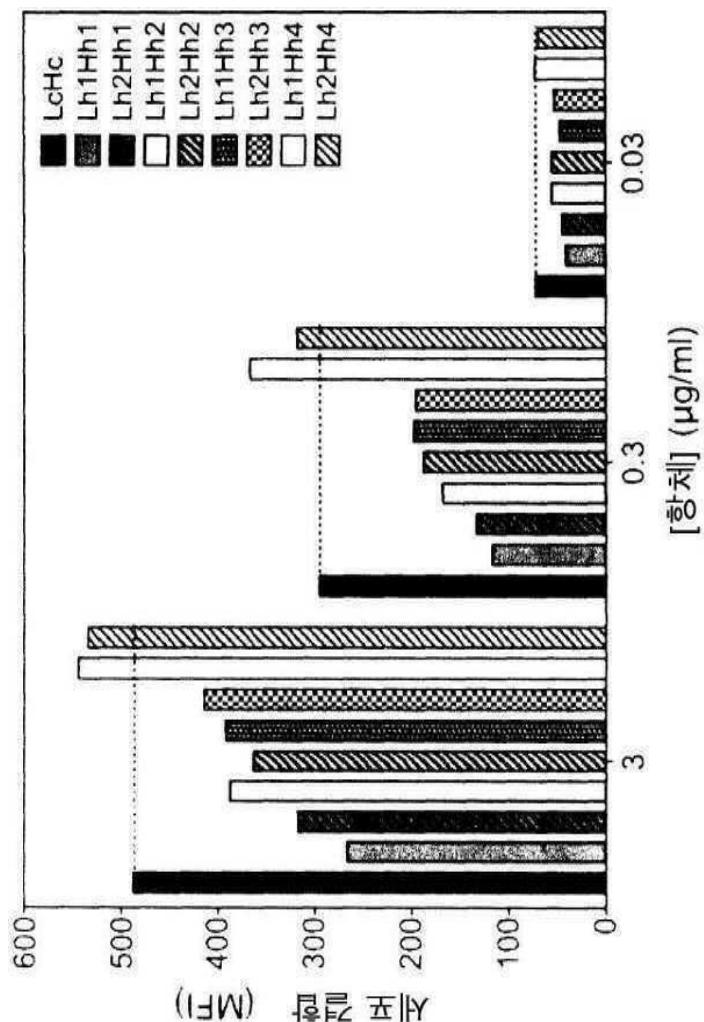
도면 17a



도면 17b



도면18



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Alethia Biotherapeutics Inc.

National Research Council of Canada

Tremblay, Gilles B.

Moraitis, Anna

Filion, Mario

Sulea, Traian

<120> ANTIBODIES AGAINST KIDNEY ASSOCIATED ANTIGEN 1 AND ANTIGEN
BINDING FRAGMENTS THEREOF

<130> 11504-093

<160> 56

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3A4 heavy chain variable region

<400>

> 1

cagatccagt tggtgcaatc tggacctgag atggtaaagg ctggggcttc agtgaagatg	60
tcctgttaagg cttctggata cacattcaact gacgactaca tgagctgggt gaaacagagc	120
catgaaaga gccttgagt gattggagat attaattcctt acaacggtga tactaactac	180
aaccagaagt tcaagggcaa ggccatattg actgttagaca aatcctccag cacagcctac	240
atgcagctca acagcctgac atcggaaagac tcagcagtc attactgtgc aagagacccg	300
ggggctatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcctca	348

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3A4 heavy chain variable region

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 3

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3A4 light chain variable region

<400> 3

gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctggctgtca gtcttgaga tcaagctcc	60
atctttgcata gatctagtca gagccttcta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg	120
tacccatcaga aaccaggcca gtctccaaag ctcctgatcc acacagttc caaccgattt	180
tctgggtcc cagacagatt cagtggcagt ggatcaggga cagattcac actcaagatc	240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttccg	300
ctcacgttcg gtgctggac caggctggag ctgaaa	336

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3A4 light chain variable region

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Leu Lys

100 105 110

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3A4 heavy chain CDR1

<400> 5

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Asp Tyr Met Ser

1 5 10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3A4 heavy chain CDR2

<400> 6

Asp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Asn

1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3A4 heavy chain CDR3

<400> 7

Asp Pro Gly Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3A4 light chain CDR1

<400> 8

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3A4 light chain CDR2

<400> 9

Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> 3A4 light chain CDR3

<400> 10

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 11

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OGS1773 primer

<400> 11

gtaaggcagcg ctgtggctgc accatctgtc ttc

33

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OGS1774 primer

<400> 12

gtaagcgcta gcctaacact ctcccctgtt gaagc

35

<210> 13

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human kappa constant region

<400> 13

gctgtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgcacatctg atgagcagtt gaaatctgga	60
actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg	120
aagggtggata acgcctcca atcggttaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc	180
aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa	240
cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctgccccgt cacaaagagc	300
ttcaacaggg gagagtgtta g	321

<210> 14

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human kappa constant region

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 15

<211> 6385

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pTTVK1 plasmid

<400> 15

ctttagccgg cgatggtcg aggtgagggtg tggcaggctt gagatccagc tggtgggtg	60
agtactccct ctcaaaagcg ggcattactt ctgcgctaag attgtcagtt tccaaaaacg	120
aggaggattt gatattcacc tggcccgatc tggccataca cttgagtgac aatgacatcc	180
acttgcctt tctctccaca ggtgtccact cccaggtcca agtttaaacg gatctctagc	240
gaattcatga actttctgct gtcttgggtg cattggagcc ttgccttgct gctctacctc	300
caccatgcca agtgtccca ggctttagac ggagcttaca ggcgtgtggc tgaccatct	360
gtcttcatct tccggccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tggtgtgtgc	420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc	480
caatcggta actcccgagga gagtgtcaca gaggcaggaca gcaaggacag cacctacagc	540
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc	600
gaagtcaccc atcaggccct gagctcgccc gtcacaaaga gttcaacag gggagagtgt	660
taggttaccg cggccgccttc gaatgagatc cccgcacctc gacctctggc taataaagga	720
aatttatttt cattgcaata gtgtgttggaa atttttgtg tctctcactc ggaaggacat	780
atgggagggc aaatcatttgcgtcgagatcc ctggagatc tctagctaga gccccggcgc	840
cggacgaact aaacctgact acggcatctc tgcccttct tcgcggggca gtgcgttgc	900
tcccttcagt tggttgtac aacttgccaa ctggccctg ttccacatgt gacacggggg	960
gggaccaaac acaaagggt tctctgactg tagttgacat cttataaat ggtgtgcac	1020
atttgccaac actgagtgcc ttcatcctg gagcagactt tgcaactgt ggactgcaac	1080
acaacattgc ctttatgtt aactcttggc tgaagctttt acaccaatgc tggggacat	1140
gtacccatcca gggcccccagg aagactacgg gaggctacac caacgtcaat cagagggcc	1200
tgttagctt ccgataagcg gaccctcaag agggcattag caatagtgtt tataaggccc	1260
ccttggtaac cctaaacggg tagcatatgc ttccggta gtagtatata ctatccagac	1320
taaccctaat tcaatagcat atgttaccca acggaaagca tatgttatcg aattagggtt	1380
agtaaaagggt tcctaaggaa cagcgatatc tcccacccca tgagctgtca cggtttatt	1440
tacatgggtt caggattcca cgagggttagt gaaccatgtt agtcacaagg gcagtggctg	1500
aagatcaagg agcgggcagt gaactctctt gaatcttcgc ctgccttcatttc	1560
gttttagctaa tagataact gctgagttgtt gaacagtaag gtgtatgtga ggtgtcgaa	1620

aacaaggttt caggtgacgc ccccagaata aaattggac ggggggttca gtggtgccat	1680
tgtctatga caccaatata accctcacaa accccttggg caataaatac tagtgttagga	1740
atgaaaacatt ctgaatatct ttaacaatag aaatccatgg ggtggggaca agccgtaaag	1800
actggatgtc cactcacac gaatttatgg ctatggcaa cacataatcc tagtgaata	1860
tgatactggg gttattaaga tgtgtccag gcagggacca agacaggtga accatgttgt	1920
tacactctat ttgtaacaag gggaaagaga gtggacgccc acagcagcgg actccactgg	1980
ttgtctctaa caccggaa aattaaacgg ggctccacgc caatggggcc cataaaca	2040
gacaagtggc cactttttt tttgaaattt tggagtgggg gcacgcgtca gcccccacac	2100
gccgcctgc gttttggac tgtaaaataa gggtaataa acttggctga ttgttaaccc	2160
gctaaccact gcggtaaacac cacttgccca caaaaccact aatggcaccc cgaaaaatac	2220
ctgcataagt aggtggcg gccaagatag gggcgcgatt gctgcgatct ggaggacaaa	2280
ttacacacac ttgcgcctga gcgcagca cagggttggt ggtcctata ttcacgaggt	2340
cgctgagagc acgggtggct aatgttgcca tgggttagcat atactaccca aatactgg	2400
tagcatatgc tatcctaatac tataatctggg tagcatagc tatcctaatac tataatctgg	2460
tagcatatgc tatcctaatac tataatctggg tagtatatgc tatcctaatt tataatctgg	2520
tagcataggc tatcctaatac tataatctggg tagcatatgc tatcctaatac tataatctgg	2580
tagtatatgc tatcctaatac tgtatccggg tagcatatgc tatcctaataa gagattaggg	2640
tagtatatgc tatcctaatt tataatctggg tagcatatac tacccaaata tctggatagc	2700
atatgctatc ctaatctata tctgggttagc atatgctatc ctaatctata tctgggttagc	2760
atagctatc ctaatctata tctgggttagc atatgctatc ctaatctata tctgggttag	2820
atatgctatc ctaattata tctgggttagc ataggtatc ctaatctata tctgggttagc	2880
atatgctatc ctaatctata tctgggttagt atatgctatc ctaatctgtatc tccgggttagc	2940
atatgctatc ctcacgatga taagctgtca aacatgagaa ttaattcttg aagacgaaag	3000
ggcctcgta tacgcatttttataatggtt aatgtcatga taataatggt ttcttagacg	3060
ttaggtggca ctttcgggg aaatgtgcgc ggaacccta tttgtttatt tttctaaata	3120
cattcaaata tgtatccgt catgagacaa taaccctgtat aatgcttca ataatattga	3180
aaaaggaaga gtatgagttat tcaacatttc cgtgtgcggcc ttattccctt ttttgcggca	3240
ttttgccttc ctgttttgc tcacccagaa acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat	3300
cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatccttgag	3360
agttttcgcc cggagaacgt tttccaatg atgagcactt ttaaaggct gctatgtggc	3420
gcggattat cccgtgtga cgccggcaa gagcaactcg gtcggccat acactattct	3480

cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca	3540
gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata acactgcggc caacttacct	3600
ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgctttt tgacacaacat gggggatcat	3660
gtaactcgcc ttgatcgttt ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt	3720
gacaccacga tgcctgcagc aatggcaaca acgttgcgca aactattaac tggcgaacta	3780
cttactctag ctccccggca acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga	3840
ccacttctgc gctcgccct tccggctggc tggttattt ctgataaatac tggagccgg	3900
gagcgtgggt ctgcggat cattgcagca ctggggccag atgtaagcc ctccgtatc	3960
gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct	4020
gagataggtt cctcaactgat taagcattgg taactgtcag accaagtttta ctcatatata	4080
cttagattt attaaaact tcattttaa tttaaagga tctaggtgaa gatcctttt	4140
gataatctca tgacaaaaat cccttaacgt gagtttcgt tccactgagc gtcagacccc	4200
gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ccttttttc tgcgcgtaat ctgctgttg	4260
caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttggatc cgatcaaga gctaccaact	4320
cttttccga aggttaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt cttctagtg	4380
tagccgtat taggccacca cttcaagaac tctgttagcac cgcttacata cctcgcttg	4440
ctaattctgt taccagtggc tgctgccagt ggatcgttac cgggttggac	4500
tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcggtt gaaacggggg ttcgtgcaca	4560
cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaaactgagat acctacagcg tgagcatgaa	4620
gaaagcgcca cgcttccgaa agggagaaag gcggacaggt atccggtaag cgccagggtc	4680
ggaacaggag aggcacacgg ggagcttcca gggggaaacg cctggatct ttatagtct	4740
gtcggtttc gccacctctg acttgagcgt cgattttgt gatgctcgatc agggggcg	4800
agccatggaa aaaacgcccggaaacgcaacggcc tttttacgtt tccgtggctt ttgctggc	4860
tttgctaca tttttttcc tgcgttatcc cctgattctg tggatcaccg tattaccggc	4920
tttgagtgatcgtgatcaccgc tgcggccggc cgaacgaccc agcgcagcga gtcagtggc	4980
gaggaagcgg aagagcgccc aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat	5040
taatgcagct ggcacgacag gttccgcac tggaaagcgg gcagtggcgc caacgcaatt	5100
aatgtgagtt agctcactca ttaggcaccc caggcttac actttatgtt tccggctcgat	5160
atgttggatcgtt gatgttgcggatcggataacaa ttgcacacag gaaacagcta tgaccatgt	5220
tacgccaaggc tctagctaga ggtcgaccaaa ttctcatgtt tgacagctt tcatcgaga	5280
tccggcaac gttttgcatt tgctgcaggc gcagaactgg taggtatggc agatctatac	5340

attgaatcaa tattggcaat tagccatatt agtcatttgt tatatacat aaatcaatat	5400
tggctattgg ccattgcata cggttatct atatcataat atgtacattt atattggctc	5460
atgtccaata tgaccgcat gttgacattt attattgact agttataat agtaatcaat	5520
tacgggtca ttatgtcata gccatataat ggagttccgc gttacataac ttacgtaaa	5580
tggccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc cccgcattt acgtcaataa tgacgtatgt	5640
tcccatagta acgcaatag ggacttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacgta	5700
aactgccac ttggcagttac atcaagtgtt tcataatgcca agtccgcctt ctattgacgt	5760
caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagttac atgaccttac gggactttcc	5820
tactggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtgatgc gggtttggca	5880
gtacaccaat gggcggttggat agcggtttaa ctcacggga ttccaaatgc tccacccat	5940
tgacgtcaat gggagtttgtt ttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgaa	6000
taaccccgcc ccgttgacgc aaatggcg taggcgtta cggtggagg tctatataag	6060
cagagctcggtt ttagtgaacc gtcagatctt cactctctt cgcacatcgctg tctgcgaggg	6120
ccagctgttg ggctcgcggt tgaggacaaa ctcttcggg tctttccagt actcttgat	6180
cggaaaccccg tcggcctccg aacggtactc cgccacccgag ggacctgagc gagtccgcat	6240
cgaccggatc ggaaaacctc tcgagaaagg cgtctaaccat gtacagtcg caaggtggc	6300
tgagcacccgtt ggcggcgcc agcggttggc ggtcggtttt gttctggcg gaggtgcitgc	6360
tgtatgtatgtt attaaatgtt gcggt	6385
<210> 16	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> OGS18500 primer	
<400> 16	
atgccaatgt gtcccaggct gatgttgttga tgacccaaac tcc	43
<210> 17	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> OGS2084 primer	
<400>	
> 17	

gggaagatga agacagatgg tgcagccaca gtccg	35
<210> 18	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> OGS1769 primer	
<400> 18	
gtaagcgcta gcgcctcaac gaagggccca tctgtttc ccctggccc	50
<210> 19	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> OGS1770 primer	
<400> 19	
gtaagcgaat tcacaagatt tgggctcaac tttcttg	37
<210> 20	
<211> 309	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> human immunoglobulin CH1 region	
<400> 20	
gcctccacca agggccatc ggtttcccc ctggcaccc cctccaagag cacctctgg	60
ggcacacgcag ccctgggctg cctggtaag gactacttcc ccgaaccgg gacggtgtcg	120
tggaaactcag ggcgcctgac cagcggcgtg cacaccccttcc cggctgtcct acagtctca	180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgcctcca gcagcttggg cacccagacc	240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	300
aaatcttgt	309
<210> 21	
<211> 103	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> human immunoglobulin CH1 region	
<400> 21	

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

100

<210> 22

<211> 5379

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> plasmid

<400> 22

cttgagccgg cggatggctcg aggtgagggtg tggcaggctt gagatccagc tgggggttg	60
agtactccct ctcaaaagcg ggcattactt ctgcgctaag attgtcagtt tccaaaaacg	120
aggaggattt gatattcacc tggcccgatc tggccataca cttgagtgac aatgacatcc	180
actttgcctt tcttccaca ggtgtccact cccaggtcca agttgccgc caccatggag	240
acagacacac tcctgctatg ggtactgctg ctctgggttc caggttccac tggccgagac	300
ggagcttacg ggcccatctg tcttcccct ggccccctcc tccaagagca cctctggggg	360
cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga ctactcccc gaaccggta cggtgtcgtg	420

gaactcaggg gcctgacca gggcggtgca cacccccc gctgtcctac agtccctagg	480
actctactcc ctacgcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttggca cccagaccta	540
catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag ttgagccaa	600
atcttgtaa ttcaactcaca catgcccacc gtgccagca cctgaactcc tggggggacc	660
gtcagtcttc ctttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga	720

ggtcacatgc gtgggtgtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta	780
cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag	840
cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcacccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga	900
gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa	960
agccaaaggc cagccccc gag aaccacagggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct	1020
gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccc gcgcacatcgc	1080
cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctccctgct	1140
ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca	1200
gcaggggaac gtctctcat gtcgtgtat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca	1260
gaagagcctc tccctgtctc ccggaaatg atccccgac ctgcacctt ggctaataaa	1320
ggaaatttat ttcatcgca atagtgtttt ggaattttt gtgtctctca ctcggaagga	1380
catatgggag ggcaaatcat ttggtcgaga tccctcgag atctctagct agagccccgc	1440
cgccggacga actaaacctg actacggcat ctctgccct tttcgccgg gcagtgcatt	1500
taatcccttc agttggttgg tacaacttgc caactgaacc ctaaacgggt agcatatgct	1560
tcccggttag tagtatatac tatccagact aaccctaatt caatagcata tgttacccaa	1620
cgggaaagcat atgtatcgat attagggtt gtaaaaagggt cctaaggaac agcgatgttag	1680
gtggcgggc caagataggg ggcgcatttc tgcgatctgg aggacaaattt acacacactt	1740
gcccctgagc gccaaggcaca gggttgttgg tcctcatatt cacgaggctcg ctgagagcac	1800
ggtgggctaa ttgtccatg ggttagcatat actacccaaa tatctggata gcatatgcta	1860
tcctaatcta tatctggta gcataggcta tcctaatcta tatctggta gcatatgcta	1920
tcctaatcta tatctggta gtatatgcta tcctaatttat tatctggta gcataggcta	1980
tcctaatcta tatctggta gcatatgcta tcctaatcta tatctggta gtatatgcta	2040
tcctaatctg tatccggta gcatatgcta tcctaataga gattaggta gtatatgcta	2100
tcctaatttat tatctggta gcatatacta cccaaatatac tggatagcat atgtatcct	2160
aatctatatac tggtagcat atgtatcct aatctatatac tggtagcat aggctatcct	2220
aatctatatac tggtagcat atgtatcct aatctatatac tggtagcat atgtatcct	2280
aattttatatac tggtagcat aggctatcct aatctatatac tggtagcat atgtatcct	2340
aatctatatac tggtagcat atgtatcct aatctgtatc cggtagcat atgtatcct	2400
cacgatgata agctgtcaaa catgagaattt aatttttggaa gacgaaaggc ctcgtata	2460

cgcctatTTT tataggttaa tgtcatgata ataatggTTT cttAGACGTC aggtggcact	2520
tttccccggaa atgtgcgcgg aacccttatt tgTTTatTTT tCTAAATACA ttCAATATG	2580
tatccgctca tgAGACAATA accCTGATAA atgCTCAAT aatATTGAAA aAGGAAGAGT	2640
atgAGTATTc AACATTCCG TGTGCCCTT ATTCCCTTT ttGCCGcATT ttGCCCTCCT	2700
gtTTTGCTC ACCAGAAAC gCTGGTgAAA gTAAAGATG CTGAAGATCA gTTGGGTGCA	2760
cgAGTGGGTT acATCGAAct ggATCTCAAC AGCGGTAAAGA TCCTTGAGAG ttTCGCCCC	2820
gaAGAACGTT ttCCAATGAT gAGCAGCTTT aaAGTCTGC tATGTGGCgC gGTATTATCC	2880
cgtGTTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC ACTATTCTCA GAATGACTTG	2940
gtTGAGTACT cACCAGTCAC agAAAAGCAT cTTACGGATG gCATGACAGT aAGAGAATTa	3000
tcgcAGTgCTG ccATAACCAT gAGTgATAAC actGCGGCCA actTACTTCT gACAACGATC	3060
ggAGGACCgA aggAGCTAAC CGCTTTTG cacaACATGG gGGATCATGT aACTCGCCTT	3120
gATCGTTGGG aACCggAGCT gaATGAAGCC atACCAACG acGAGCgTGA cACCACGATG	3180
cCTGcAGCAA tGGCAACAAC gTTGCGCAAa ctATTAACtG gCGAACTACT tactCTAGCT	3240
tcccGGCAAC aATTAATAGA ctGGATGGAG gCGGATAAG ttGAGGACC actTCTGCGC	3300
tcGGCCCTTC cgGCTGGCTG gTTTATTGCT gATAATCTG gagCCGGTGA gCGTGGGTCT	3360
cgcGGTATCA ttGcAGCAct gGGGCCAGAT gGTAAAGCCt cCCGTATCgT agTTATCTAC	3420
acgACGGGGA gTCAGGCAAC tATGGATGAA cGAAATAGAC agATCGCTGA gATAGGTGCC	3480
tcACTGATTA AGCATGGTA ACTGTCAGAC CAAGTTACT cATAATACT tTAGATTGAT	3540
ttaAAACTTC atTTTAATT taaaAGGATC tagGTGAAGA tcTTTTGA taATCTCATG	3600
accAAATCC ctTAACGTGA gTTTCGTTc cACTGAGCgT cAGACCCGT agAAAAGATC	3660
aaAGGATCTT ctTGAGATCC tTTTTCTG CGCGTAATCT gCTGCTGCA aACAAAAAAA	3720
ccACCGCTAC cAGCGGTGgT ttGTTGCGC gATCAAGAGC tacCAACTCT tTTCCGAAG	3780
gtAACTGGCT tcAGCAGAGC gCAGATACCA aATACTGTCC ttCTAGTGTa gCCGTAGTTA	3840
ggCCACCACT tCAAGAACtC tGTAGCACCG CCTACATAcc tCGCTCTGT aATCCTGTtA	3900
ccAGTGGCTG ctGccAGTGG CGATAAGTCG tGTCTTACCG gGTGGACTC aAGACGATAG	3960
ttACCGATA aggCGCAGCG gTCGGGCTGA acGGGGGTT cGTGcacACA gCCCAGCTG	4020
gAGCGAACGA CCTACACCgA ACTGAGATAc CTACAGCgTg AGCATTGAGA aAGGCCACg	4080
ctTCCCGAAG ggAGAAAGGC gGACAGGTAT CGCGTAAGCG gCAGGGTcGG aACAGGAGAG	4140
cgCACGAGGG agTTCCAGG gGGAAACGCC tGGTATCTT ATAGTCTGT CGGGTTcGC	4200

cacctctgac ttgagcgtcg attttgcgttgatgcgttc ctggcccttt gctggcccttt tgctcacatgttcttcgt cgttatcccc tgattctgtg gataaccgtataccgccttgagtgagct gataccgtc gccgcagccg aacgaccgag cgccagcgact cagttagcga ggaagcgtaatccatgtcc aatatgaccg ccatgttgcattgattt gactagttataatgatcaat caattacggg gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga ccgcctaaccg accccgcaccattgacgtca 4260
4320
4380
4440
4500
4560
4620

ataatgacgt atgttccat agtaacgcca ataggactt tccattgacgtcaatggtgagttttac ggttaactgc ccacttggca gtacatcaag tttatcataat gccaagtccgccccctattt acgtcaatga cggtaaatgg cccgcctggc attatgccatgtacatgacc ttacggact ttcttacttg gcagttacatc tacgtttagt tcatcgctat taccatggtagtcggttttt ggcagttacac caatggcggt ggatagcggt ttgactcaccg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt caatggagtttgc accaaaatca acggactttccaaatgtc gtaataaccc cgcggcggttgc acgcaaattgg gcggtaggcgttgtacggtg 4680
4740
4800
4860
4920
4980
5040

gagggtctata taagcagagtcgttttagtg aaccgtcaga tcctcactcttccgcattcgtctgcaggccagct gttgggctcg cgggtttaggcaaaactttc ggggttttc cagttactttt ggatcgaaaa cccgtcgcc tccgaacggtaatccgcac cgaggacactggcgagtcc gcatcgaccg gatcgaaaa cctctcgaga aaggcgctta accagtacatgcgcaaggt aggttggca ccgtggcggttgcggtaggcgttgtttcttgcggaggttgcgttgcgttgatgtatgtatggcggt 5100
5160
5220
5280
5340
5379

<210> 23

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OGS1879 primer

<400> 23

gggttccagg ttccactggc cagatccagt tggtcaatcttgg 43

<210> 24

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OGS1810 primer

<400> 24
 gggccagg gaaagacaga tggcccttc gttgaggc 38
 <210> 25
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 25
 gtaagcggat ccatggatga cgacgcggcg ccc 33
 <210> 26
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 26
 gtaagcaagc ttaggccgt gggacagcgg aggtgc 36
 <210> 27
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 27
 gtaagcaagc ttggcagcag cgccaggtcc agc 33
 <210> 28
 <211> 885
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <300><301> Van den Eynde, B. J. et al.,
 <302> A new antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human
 kidney tumor results from reverse strand transcription
 <303> J. Exp. Med.
 <304> 190
 <305> 12

<306> 1793-1799

<307> 1999-12-20

<308> Q9UBP8

<309> 1999-12-20

<400> 28

gaggggcattc aatcacaccg agaagtaca gcccctaact cactgagggtg tggggggta	60
gggatctgca ttcttcata tcaacccac actataggc acctaaatgg gtggcggtg	120
ggggagaccg actcaattga gtttcttcaa ggcttctgg cctccagcca cgttaattgcc	180
cccgctctgg atctggtcta gcttccggat tcggtgccca gtccgcggg tgttagatgtt	240
cctgacggcc ccaaagggtt cctgaacgcc gccggcaccc tcctttagga agacttgc	300

gctggacacc ttcttctcat ggatgacgac gcggcgcccc gcttggaaagg ggtccccgtt	360
gcggtagaca agcacgctt tcacgacggg ctgagacagg tggctggacc tggcgctgt	420
gccgctcatc ttccccgtg gcccgcct cagctcgctg ctgcgtcg ggaggcacct	480
ccgctgtccc agcggccta ccgcacccag ggcgcggat cgccctctga aacgaacgag	540
aaactgacga atccacaggt gaaagagaag taacggccgt ggccttaggc gtccacccag	600
aggagacact aggagcttgc aggactcgga gtagacgctc aagttttca ccgtggcgt	660
cacagccaat caggacccgc agtgcgcgca ccacaccagg ttccacctgt acggcagaa	720

tcaagggtgga cagttctga gcaggagccg gaaacgcgcg gggccttcaa acaggcacgc	780
ctagtgggg caggagagag gaggacgcac acacacacac acacacaaat atggtaaac	840
ccaaattctt acatcatatc tgtgttaccc ttccaaaca gccta	885

<210> 29

<211> 84

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300><301> Van den Eynde, B. J., et al.,

<302> A new antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human
kidney tumor from reverse strand

<303> J. Exp. Med.

<304> 190

<305> 12

<306> 1793-1799

<307> 1999-12-20

<308> Q9UBP8

<309> 1999-12-20

<400> 29

Met Asp Asp Asp Ala Ala Pro Arg Val Glu Gly Val Pro Val Ala Val

1 5 10 15

His Lys His Ala Leu His Asp Gly Leu Arg Gln Val Ala Gly Pro Gly

20 25 30

Ala Ala Ala Ala His Leu Pro Arg Trp Pro Pro Gln Leu Ala Ala

35 40 45

Ser Arg Arg Glu Ala Pro Pro Leu Ser Gln Arg Pro His Arg Thr Gln

50 55 60

Gly Ala Gly Ser Pro Pro Glu Thr Asn Glu Lys Leu Thr Asn Pro Gln

65 70 75 80

Val Lys Glu Lys

<210> 30

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variant light chain variable region

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa is any amino acid

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(50)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (88)..(88)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (105)..(105)

<

223> Xaa is any amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (108)..(108)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (111)..(111)

<223> Xaa is any amino acid

<400> 30

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

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

Xaa Xaa Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

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

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

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

Pro Xaa Leu Leu Ile His Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

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

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

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

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

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

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Leu Glu Xaa Lys

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

<210> 31

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variant light chain variable region

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is a hydrophobic amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa is A or P

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is a neutral hydrophilic amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> Xaa is L or P

<220><221>

> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa is an acidic amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> Xaa is Q or P

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(50)

<223> Xaa is a basic amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (88)..(88)

<223> Xaa is a hydrophobic amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (105)..(105)

<223> Xaa is A or Q

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (108)..(108)

<223> Xaa is a basic amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (111)..(111)

<223> Xaa is a hydrophobic amino acid

<400> 31

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

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

Xaa Xaa Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

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

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

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

Pro Xaa Leu Leu Ile His Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

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

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

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

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

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

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Leu Glu Xaa Lys

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

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variant light chain variable region

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is V or I

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa is A or P

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is S or T

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> Xaa is L or P

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa is D or E

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> Xaa is Q or P

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(50)

<223> Xaa is K or Q

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (88)..(88)

<223> Xaa is L or V

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (105)..(105)

<223> Xaa is A or Q

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (108)..(108)

<223> Xaa is R or K

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (111)..(111)

<223> Xaa is L or I

<400> 32

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

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

Xaa Xaa Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

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

35 40 45

Pro Xaa Leu Leu Ile His Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Leu Glu Xaa Lys

100 105 110

<210> 33

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variant 1 light chain variable region: Lvhl

<400> 33

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 34

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variant 2 light chain variable region: Lvh2

<400> 34

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 35

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variant heavy chain variable region

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (38)..(38)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (40)..(40)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (41)..(41)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (43)..(43)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (44)..(44)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (48)..(48)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (67)..(67)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (68)..(68)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (69)..(69)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (70)..(70)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (72)..(72)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (74)..(74)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (76)..(76)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (82)..(82)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (84)..(84)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (87)..(87)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (91)..(91)

<223> Xaa is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (111)..(111)

<223> Xaa is any amino acid

<400> 35

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

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

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

20	25	30	35
----	----	----	----

Tyr Met Ser Trp Val Xaa Gln Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Leu Glu Trp Xaa

35	40	45	50
----	----	----	----

Gly Asp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Asp Xaa Ser Xaa Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Pro Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 36

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

variant heavy chain variable region

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is a hydrophobic amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is A or P

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is a hydrophobic amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa is V or K

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa is a hydrophobic amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (38)..(38)

<223> Xaa is a basic amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (40)..(40)

<223> Xaa is S or A

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (41)..(41)

<223> Xaa is H or P

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (43)..(43)

<223> Xaa is a basic amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (44)..(44)

<223> Xaa is S or G

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (48)..(48)

<223> Xaa is a hydrophobic amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (67)..(67)

<223> Xaa is a basic amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (68)..(68)

<223

> Xaa is a hydrophobic amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (69)..(69)

<223> Xaa is I or T

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (70)..(70)

<223> Xaa is a hydrophobic amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (72)..(72)

<223> Xaa is hydrophobic amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (74)..(74)

<223> Xaa is K or T
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (76)..(76)

<223> Xaa is a neutral amino acid
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (82)..(82)

<223> Xaa is Q or E

<220><221>

> MISC_FEATURE

<222> (84)..(84)

<223> Xaa is N or S

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (87)..(87)

<223> Xaa is T or R

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (91)..(91)

<223> Xaa is a neutral hydrophilic amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (111)..(111)

<223> Xaa is S or L

<400> 36

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

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

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

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

Tyr Met Ser Trp Val Xaa Gln Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Leu Glu Trp Xaa

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

Gly Asp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

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

Lys Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Asp Xaa Ser Xaa Ser Thr Ala Tyr

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

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

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

Ala Arg Asp Pro Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 37

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variant heavy chain variable region

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is I or V

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is P or A

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is M or V

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa is V or K

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa is M or V

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (38)..(38)

<223> Xaa is K or R

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (40)..(40)

<223> Xaa is S or A

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (41)..(41)

<223> Xaa is H or P

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (43)..(43)

<223> Xaa is K or Q

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (44)..(44)

<223> Xaa is S or G

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (48)..(48)

<223

> Xaa is I or M

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (67)..(67)

<223> Xaa is K or R

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (68)..(68)

<223> Xaa is A or V

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (69)..(69)

<223> Xaa is I or T

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (70)..(70)

<223> Xaa is L or I

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (72)..(72)

<223> Xaa is V or A

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (74)..(74)

<223> Xaa is K or T

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (76)..(76)

<223> Xaa is S or T

<220

><221> MISC_FEATURE

<222> (82)..(82)

<223> Xaa is Q or E

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (84)..(84)

<223> Xaa is N or S

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (87)..(87)

<223> Xaa is T or R

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (91)..(91)

<223> Xaa is S or T

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (111)..(111)

<223> Xaa is S or L

<400> 37

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Xaa Gln Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Leu Glu Trp Xaa

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Asp Xaa Ser Xaa Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Pro Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 38

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variant 1 heavy chain variable region: Hvhl

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 39

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variant 2 heavy chain variable region: Hvh2

<400> 39

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 40

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variant 3 heavy chain variable region: Hvh3

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg 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 Asp Pro Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 41

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variant 4 heavy chain variable region: Hvh4

<400> 41

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 42

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3A4 murine light (kappa) chain

<400> 42

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50	55	60	
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly			
85	90	95	
Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Leu Lys			
100	105	110	
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu			
115	120	125	
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe			
130	135	140	
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln			
145	150	155	160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser			
165	170	175	
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu			
180	185	190	
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser			
195	200	205	
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210	215		
<210> 43			
<211> 219			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> 3A4 humanized light (kappa) chain variant 1: Lh1			
<400> 43			
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser			
20	25	30	
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			

35 40 45

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215
 <210> 44
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3A4 humanized light (kappa) chain variant 2: Lh2
 <400> 44
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 45
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3A4 murine heavy (Igg1) chain
 <400> 45

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

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

Ala Arg Asp Pro Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245	250	255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val		
260	265	270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
275	280	285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
290	295	300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr Lys Cys		
305	310	315
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
325	330	335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro		
340	345	350
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val		
355	360	365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
370	375	380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
385	390	395
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
405	410	415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
420	425	430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	445
<210> 46		
<211> 446		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> 3A4 humanized heavy (Iggl) chain variant 1: Hh1		
<400> 46		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		

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

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

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

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

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

Gly Asp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

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

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

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

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

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

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

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

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

165	170	175
-----	-----	-----

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

180	185	190
-----	-----	-----

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

195	200	205
-----	-----	-----

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

210	215	220
-----	-----	-----

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

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

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

245	250	255
-----	-----	-----

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

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

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

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

435 440 445

<210> 47

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3A4 humanized heavy (IgG1) chain variant 2: Hh2

<

400> 47

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

1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Asp			
20	25	30	
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
35	40	45	
Gly Asp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe			
50	55	60	
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Asp Pro Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
100	105	110	
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala			
115	120	125	
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu			
130	135	140	
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly			
145	150	155	160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser			
165	170	175	
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu			
180	185	190	
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr			
195	200	205	
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr			
210	215	220	
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe			
225	230	235	240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro			
245	250	255	

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

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

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

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

435 440 445

<210> 48

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3A4 humanized heavy (IgG1) chain variant 3: Hh3

<400> 48

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg 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 Asp Pro Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260	265	270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
275	280	285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
290	295	300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
305	310	315
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
325	330	335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro		
340	345	350
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val		
355	360	365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
370	375	380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
385	390	395
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
405	410	415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
420	425	430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	445
<210> 49		
<211> 446		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> 3A4 humanized heavy (IgG1) chain variant 4: Hh4		
<400> 49		
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Asp		

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

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

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

Gly Asp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

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

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

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

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

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

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

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

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

165	170	175
-----	-----	-----

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

180	185	190
-----	-----	-----

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

195	200	205
-----	-----	-----

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

210	215	220
-----	-----	-----

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

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

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

245	250	255
-----	-----	-----

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

260	265	270
-----	-----	-----

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

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

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420 425 430

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

435 440 445

<210> 50

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 50

atacccaagc ttgccacat ggagacagac acac 34

<210> 51

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 51

atacccaagc ttcat tcc gggagacagg gag 33

<210> 52

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 52

atacccaagc ttgggccacc atgaacttgc tgctgtcttg g 41

<210> 53

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 53

atacccaagc ttctaaca ctccctgtt gaag 34

<210> 54

<211> 3962

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> pK-CR5 plasmid

<400> 54

ctaaattgtt agcgtaata ttttgttaaa attcgctt aattttgtt aaatcgctc 60

attttttaac caataggccg aaatcgcaaa aatcccttat aatcaaaag aatagaccga 120

gatagggttg agtgggttc cagttggaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc 180

caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc 240

ctaatcaagt ttttgggtt cgaggtgccc taaagcacta aatcgaaacc ctaaaggag 300

cccccgattt agagcttgc gggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaaagaa 360

agcgaaagga gccccgcata gggcgctggc aagttagcg gtacacgtgc gcgttaaccac 420

cacacccgcc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgctcc cattcgccat tcaggctg 480

caactgttgg gaaggcgat cggtgcggc ctctcgcta ttacgccagc tggcgaagg	540
gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg tttcccaagt cacgacgttg	600
taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtataa cgactacta tagggcaat tggagctca	660
ccgcggtgtgc gcccgtcta gaacttaggg atccacatcg gcgcgc当地 tgattigccc	720
tcccatatgt cttccgagt gagagacaca aaaaattcca acacactatt gcaatgaaaa	780
taaatttcct ttattagcca gaggtcgaga tttaataag cttgctagca gatcttgaa	840
cctgggagtg gacacctgtg gagagaaagg caaagtggat gtcattgtca ctcaagtgt	900
tggccagatc gggccaggtg aatatcaaat ctcctcgaa tttggaaact gacaatctt	960
gcgcagaagt aaigcccgct tttgagaggg agtactcacc ccaacagctg gatctcaagc	1020
ctgccccacc tcacctcgac catccgcgt ctcaagaccc cctactttaa ttacatcatc	1080
agcagcaccc ccgcagaaa caaccccgac cgccacccgc tgccgc当地 cacgggtc	1140
agcctaccc tgcactgtga ctggtagac gccttctcg agaggtttc cgatccggc	1200
gatgcggact cgctcaggtc ctcgggtggc ggagtaccgt tcggaggccg acgggttcc	1260
gatccaagag tactggaaag accgcgaaga gtttgcctc aaccgcggc ccaacagctg	1320
gcctcgac acagcgatgc ggaagagagt gaccgcggag gctggatcg tcccggtgc	1380
ttctatggag gtcaaaacag cgtggatggc gtctccaggc gatctgacgg ttcactaaac	1440
gagctctgct tatataggcc tcccaccgtt cacgcctacc tgcacccggg taccaatctt	1500
ataataaaaa cagaccagat tgtctgttg ttataataca aacagaccag attgtctgtt	1560
tgttataata caaacagacc agattgtctg tttgttataa tacaacaga ccagattgtc	1620
tgttgttat aatacaaaca gaccgattt tctgtttttt ataataaaaa cagaccagat	1680
tgtctgtttt ttaagggtt cgagtgaaga cgaaagggtt cattaaggcg cgccgtcgac	1740
ctcgaggggg gccccgtac ccagctttt ttcctttag tgagggttaa ttgcgcgtt	1800
ggcgtaatca tggcatagc tggtccgtgt gtggaaatgt tatccgctca caattccaca	1860
caacatacga gccggaaagca taaagtgtaa agcctgggt gcctaattgag tgagctaact	1920
cacattaatt gcgttgcgt cactgcccgc ttcccgatcg gggaaacctgt cgtgccagct	1980
gcattaatga atcggccaac gcgccccggag aggccgtttt cgtattggc gctttccgc	2040
ttcctcgctc actgactcgc tgcgtcggt cggtcggtcg cggcgacgg tatcagctca	2100
ctcaaaggcg gtaatacggt tatccacaga atcagggat aacgcaggaa agaacatgt	2160
agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaggcc gcgttgcgtt cgttttcca	2220
taggtccgc cccccgtac agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggc当地	2280
cccgacagga ctataaagat accaggcggtt tccccctgga agtccctcg tgcgtctcc	2340

tgttccgacc ctgccgccta ccggataacct gtccgcctt ctcccttcgg gaagcgtggc	2400
gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcggtg taggtcggtc gctccaagct	2460
gggcgtgtg cacgaacccc cggttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg	2520
tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag	2580
gattagcaga gcgaggatag taggcgggtgc tacagagttc ttgaagtgg ggcctaacta	2640
cggctacact agaaggacag tatttggat ctgcgtctg ctgaagccag ttacccctgg	2700
aaaaagagtt ggttagcttt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtgggttttt	2760
tgttgcaag cagcagatta cgccgagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt	2820
ttctacgggg tcgtacgctc agtggAACGA aaactcacgt taagggattt tggtcatgag	2880
attatcaaaa aggatctca cctagatcct tttaaattaa aatgaagtt ttaaatcaat	2940
ctaaagtata tatgagtaaa ctgggtctga cagttacca tgcttaatca gtgaggcacc	3000
tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat	3060
aactacgata cgggagggct taccatctgg ccccaagtgc gcaatgatac cgccgagacc	3120
acgctcaccc gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag	3180
aagtggtcct gcaactttat ccgcctccat ccagtcatt aattgttgcc ggaaagctag	3240
agtaagttagt tcgcccagtta atagttgcg caacgttgtt gccattgcta caggcatcgt	3300
ggtgtcacgc tcgtcggtt gtaggtcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg	3360
agttagatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggc ctccgatcgt	3420
tgtcagaagt aagtggccg cagtgttac actcatggtt atggcagcac tgcataattc	3480
tcttactgtc atgcacatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtagt caaccaagtc	3540
attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgtcttcg cccgcgtcaa tacggataa	3600
taccgcgcca catagcagaa cttaaaagt gctcatcatt ggaaacgtt cttcgccgcg	3660
aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaaacca ctcgtgcacc	3720
caactgtatc tcagcatctt ttacttcac cagcgttct gggtgagcaa aaacaggaag	3780
gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataaggc gacacggaaa tggtaatac tcatacttt	3840
ccttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt	3900
tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg gggtccgc acatcccc gaaaagtgcc	3960
ac	3962
<210> 55	
<211> 6530	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> pMPG-CR5 plasmid

<400> 55

```
gtcgacgata ccgtgcactt aatatacgcc gctcgaccaa atgatttgcc ctccccatatg 60  
tcctttccgag tgagagacac aaaaaattcc aacacactat tgcaatggaaa ataaatttcc 120
```

tttattagcc agaggctcgag gtcggggat ccgtttaac ttggacctgg gagtggacac	180
ctgtggagag aaaggcaaag tggatgtcat tgtcaactaa gtgtatggcc agatcggcc	240
aggtaatat caaatcctcc tcgaaaaatgg aaactgacaa tcttagcgca gaagtaatgc	300
ccgcctttga gagggagttac tcacccaaac agctggatct caagcctgcc acacccacc	360
tgcaccatcc gccgtctcaa gaccgctac tttaaattaca tcatcagcag caccccgcc	420
agaaaacaacc ccgaccgcca cccgctgccc cccgccacgg tgctcagcct accttgcac	480
tgtgacttgt tagacgcctt tctcgagagg tttccgatc cggctcgatgc ggactcgctc	540

```
aggcccctcg gtggcggagt accgttcgga ggccgacggg tttccgatcc aagagtactg 600  
gaaagaccgc gaagagtttg tcctcaaccg cgagcccaac agctggccct cgcagacagc 660  
gatgcggaag agagtgaccg cgaggctgg atcggtcccg gtgtttcta tggaggtcaa 720  
aacagcgtgg atggcgttc cagggatct gacggttcac taaacgagct ctgttatata 780  
aggcctccca ccgtacacgc ctacctcgac ccgggttacca atcttataat acaaacagac 840  
cagattgtct gtttgtata atacaacag accagattgt ctgttttta taatacaac 900  
agaccgatt gtctgttgtata atataataaa acagaccaga ttgtctgtttt gttataatac 960
```

aaacagacca gattgtctgt ttgttataat acaaacagac cagattgtct gtttgttaag	1020
gttgtcgagt gaagacgaaa gggtaatta aggccgcgccg tcgactagct tggcacgcca	1080
gaaatccgca cggtggttt tgggggtcg gggtgttgg cagccacaga cggccggtgt	1140
tctgttcgca ccagtacatg cggccatgc ccaggccatc caaaaaccat gggctgtct	1200
gctcagtcca gtcgtggacc agacccacg caacgccccaa aataataacc cccacgaacc	1260
ataaacatt ccccatgggg gacccgtcc ctaacccacg gggccagtgg ctatggcagg	1320
gcctgcgcgc ccgacgttgg ctgcgagccc tggcccttca cccgaacttg ggggggtgggg	1380

tggggaaaag gaagaaacgc gggcgatttgc gccccatgg ggtctcggtg gggtatcgac	1440
agagtgccag ccctgggacc gaaccccgcg tttatgaaca aacgacccaa cacccgtgcg	1500
ttttattctg tcttttatt gccgtcatag cgcggttcc ttccgttatt gtctccttcc	1560
gtgtttcagt tagcctcccc catctccctt attccttgc cctcgacga gtgctggggc	1620
gtcggttcc actatcgccg agtacttcta cacagccatc ggtccagacg gcccgcgttc	1680

tgccggcgtt ttgtgtacgc ccgacagtcc cggtccggta tcggacgatt gcgtcgcatc 1740
gaccctgcgc ccaagctgca tcatgaaat tgccgtcaac caagctctga tagagtttgtt 1800

caagaccaat gcccggacata tacgccccggta gcccggcgta tcctgcaagc tccggatgcc 1860
tccgctcgaa gttagcgcgtc tgctgctcca tacaagccaa ccacggcctc cagaagaaga 1920
tgttggcgac ctctgttattgg gaatccccggta acatgcctc gctccagtca atgaccgttg 1980
tttatgcggcc attgtccgtc aggacattgt tgaggccgaa atccgcgtgc acgagggtgcc 2040
ggacttcggg gcagtcctcg gcccggaaagca tcagctcatc gagagcctgc gcgacggacg 2100
cactgacggt gtcgtccatc acagtttgcc agtgatacac atggggatca gcaatcgcc 2160
atatgaaatc acgccccatgtta gtgtattgac cgattccttg cggtccgaat gggccgaacc 2220

cgctcgctg gctaagatcg gcccggacgta tcgcattccat ggcctccggcg accggctgca 2280
gaacagcggg cagttcggtt tcaggcagggt ctgtcaacgt gacaccctgt gcacggcggg 2340
agatgcaata ggtcaggctc tcgctgaatt ccccaatgtc aagcacttcc ggaatcggg 2400
gcccggccgta tgcaaagtgc cgataaacat aacgatctt gttagaaacca tcggcgcagc 2460
tattttacccg caggacatata ccacggccctc ctacatcgaa gctgaaaagca cgagatttt 2520
cgccctccgta gagctgcatac aggtcgaggta cgctgtcgaa ctttcgatc agaaacttcc 2580
cgacagacgt cgccggtgagt tcaggctttt tcataatctca ttggccggta tctgcggcac 2640

gctgttgacg ctgttaagcg ggtcgctgca gggtcgctcg gtgttcgagg ccacacgcgt 2700
caccttaata tgcgaagtgg acctgggacc gcccggcccc gactgcattc gcgtgttcga 2760
attcgccaaata gacaagacgc tgggggggtt ttgtgtcatc atagaactaa agacatgcaa 2820
atataatttct tccggggaca ccggccagcaa acgcgagcaa cggggccacgg ggatgaagca 2880
ggcgtggcg gcccggacgc tgggtacgt ctgtcgccg ttcgcgcacgc gaggctggat 2940
ggcctccccc attatgattc ttctcgcttc cggccggatc gggatggcccg cggtgcaggc 3000
catgctgtcc aggcaggtag atgacgacca tcagggacag cttcaaggat cgctcgccgc 3060

tcttaccagc ctaacttcga tcactggacc gctgatcgta acggcgattt atgcccgcctc 3120
ggcgagcaca tggaacgggt tggcatggat tggtaggcgc gcccataacc ttgtctgcct 3180
cccccggttg cgctcggtt catggagccg gcccacctcg acctgaatgg aagccggcg 3240
cacctcgcta acggattcac cactccaaga atggagccaa atcaattttt gcggagaact 3300
gtgaatgcgc aaaccaaccc ttggcagaac atatccatcg cgtccgcattt ctccaggacg 3360
cgcacgcggc gcagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgttttcc 3420

ataggctcg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa	3480
acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgcctc	3540
ctgttccgac cctgcccgtt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg	3600
cgccttctca tagtcacgc tgttaggtatc tcagttcggt gtaggtcggt cgctccaagc	3660
tggcgtgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgtg cgcccttatcc ggtaactatc	3720
gtcttgagtc caacccggtt agacacgact tatgccact ggcagcagcc actggtaaca	3780
ggatttagcag agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttaaagtgg tggctaact	3840
acggctacac tagaaggaca gtatttggta tctgcgtct gctgaagcca gttacctcg	3900
aaaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggtttt	3960
ttgtttgcaa gcacgcgatt acgcgcgaaa aaaaaggatc tcaagaagat ccttgatct	4020
tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaaggatt ttggcatga	4080
gattatcaa aaggatctt acctagatcc tttaaatataaaaatgaatgt tttaatcaa	4140
tctaaagtat atatgagtaa acttggctcg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac	4200
ctatctcagc gatctgtcta ttgcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga	4260
taactacgat acgggaggc ttaccatctg gcccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc	4320
cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcga	4380
gaagtggtcc tcaacttta tccgcctca tccagtctat taattttgc cgggaagcta	4440
gagtaagtag ttgcgcagtt aatagttgc gcaacgttgt tgccattgt gcaggcatcg	4500
tgggtgtacg ctcgtcggtt ggtatggtt cattcagctc cggttccaa cgatcaaggc	4560
gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctccctcggt cctccgatcg	4620
ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatgtt tatggcagca ctgcataatt	4680
ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct ttctgtgac tggtgagtac tcaaccaagt	4740
cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctctg cccggcgtca acacggata	4800
ataccgegcc acatagcaga actttaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcgggc	4860
gaaaactctc aaggatctt ccgtgttga gatccagttc gatgtAACCC actcggtcac	4920
ccaactgtatc ttacttca ccagcggttcc tgggtgagca aaaacaggaa	4980
ggcaaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaagg cgacacggaa atgttgaata ctcatactct	5040
tccttttca atattattga agcatttac agggttatgt tctcatgagc ggatacatat	5100
ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggtcccgac cacattccc cgaaaagtgc	5160

cacctgacgt ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaat aggcttatca	5220
cgaggccctt tcgtctcaa gaattctcat gtttgacagc ttatctctag cagatccgga	5280
atccccctcc ccaatttaaa tgaggaccta acctgtggaa atctactgat gtgggaggct	5340
gtaacigtac aaacagaggt tatttgaata actagcatgc ttaacccitca tgcagggtca	5400
caaaaagtgc atgacgatgg tggaggaaaa cctattcaag gcagtaattt ccacttctt	5460
gctgttggtg gagaccctt ggaaatgcag ggagtgcata tgaattacag gacaaagtac	5520
ccagatggta ctataacccc taaaaaccca acagcccagt cccaggtaat gaatactgac	5580

cataaggcct atttggacaa aaacaatgct tatccagttg agtgctgggt tcctgatcct	5640
agttagaaatg aaaatactag gtatttiogg acttcacag gagggaaaa ttttccccca	5700
gtacttcatg tgaccaacac agtaccacca gtgttgcata atgaacaggg tgtgggcct	5760
ctttgtaaag ctgatagcct gtatgttca gctgcata tttgtggcct gtttactaac	5820
agctctggaa cacaacagtg gagaggcctt gcaagatatt ttaagatccg cctgagaaaa	5880
agatctgtaa agaattccta cctaattcc ttttgctaa gtacccctt aaacaggaga	5940
acccagagag tggatggca gcctatgtat ggtatggaaat cccaggtaga agaggtagg	6000

gtgttgatg gcacagaaaag acttccaggg gacccagata tgataagata tattgacaaa	6060
cagggacaat tgcaaaaccaa aatgctttaa acaggtgc ttattgtaca tatacattta	6120
ataaaatgctg ctttgcata agccactttt aagcttgcgt tattttgggg gtgggtttt	6180
aggcctttta aaacactgaa agccttaca caaatgcaac tcttgactat ggggtctga	6240
ccttggaa tggcagcag gggctgaatg atctgagact tggaaagagc attgtgattt	6300
ggattcagtg ctgtatccat gtccagagtc ttcaatgttcaat gatccctt ctctgtat	6360
atcaagaata catccca tgcataatatt atattcatac ctgtaaaaag tatacataact	6420

tatctcagaa tccagcctt cttccattc aacaattcta gaagttaaaa ctgggtaga	6480
tgctattaca gaggtagaat gtttctaaa cccagaaatg gggatctgc	6530

<210> 56

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3A4 heavy chain CDR2

<400> 56

Asp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1

5

10

15

Gly

