



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0004838
(43) 공개일자 2024년01월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-7041484
(22) 출원일자(국제) 2022년05월02일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년11월30일
(86) 국제출원번호 PCT/IL2022/050453
(87) 국제공개번호 WO 2022/234571
국제공개일자 2022년11월10일
(30) 우선권주장
63/183,635 2021년05월04일 미국(US)

(71) 출원인
임퓨노라이즌 엘티디.
이스라엘, 7670104 레호보트, 사이언스 파크, 4
오펜하이머 스트리트
(72) 발명자
보긴 오렌
이스라엘, 6941602 텔-아비브, 2 메노라 스트리트
다싸 리앗
이스라엘, 6941509 텔 아비브, 9 알터만 나탄 스
트리트
(74) 대리인
특허법인한얼

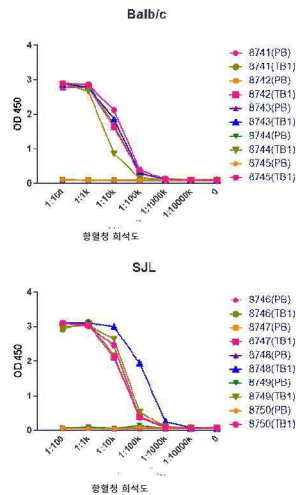
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 항-NKG2D 항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 개시내용은 다수의 항-NKG2D 항체를 기재한다. 일부 실시양태에서, 특정 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 항-NKG2D 항체가 개시되어 있다. 본원에 개시된 항-NKG2D 항체는 암과 같은 다양한 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C07K 16/2809 (2013.01)

C07K 16/30 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

중쇄 상의 3개의 상보성 결정 영역(complementarity determining region; CDR)(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3) 및 경쇄 상의 3개의 CDR(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 포함하는 단리된 항-NKG2D 항체로서, 여기서

- (i) HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열 번호 12-14의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열 번호 16-18의 아미노산 서열을 포함하거나;
- (ii) HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열 번호 20-22의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열 번호 24-26의 아미노산 서열을 포함하거나;
- (iii) HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열 번호 28-30의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열 번호 32-34의 아미노산 서열을 포함하거나;
- (iv) HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열 번호 36-38의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열 번호 40-42의 아미노산 서열을 포함하는, 단리된 항-NKG2D 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 항체가 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역이 서열 번호 11 및 15; 서열 번호 19 및 23; 서열 번호 27 및 31; 또는 서열 번호 35 및 39의 아미노산 서열을 포함하는, 단리된 항-NKG2D 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 IgG, Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, 미니바디(minibody), 디아바디, 트리아바디, 나노바디, 이중특이 항체(bispecific antibody), 또는 단일 도메인 항체인, 단리된 항-NKG2D 항체.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 IgG가 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4인, 단리된 항-NKG2D 항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항-NKG2D 항체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 항-NKG2D 항체가 중쇄 상의 3개의 상보성 결정 영역(CDR) (HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3) 및 경쇄 상의 3개의 CDR(LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)을 포함하고, 여기서

- (i) HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열 번호 12-14의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열 번호 16-18의 아미노산 서열을 포함하거나;
- (ii) HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열 번호 20-22의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열 번호 24-26의 아미노산 서열을 포함하거나;
- (iii) HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열 번호 28-30의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열 번호 32-34의 아미노산 서열을 포함하거나;
- (iv) HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열 번호 36-38의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열 번호 40-42의 아미노산 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 항-NKG2D 항체가 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역 및 경쇄

가변 영역이 서열 번호 11 및 15; 서열 번호 19 및 23; 서열 번호 27 및 31; 또는 서열 번호 35 및 39의 아미노산 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 8

제1항 또는 제2항의 항-NKG2D 항체를 암호화(encoding)하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 서열.

청구항 9

제8항의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터(vector).

청구항 10

제9항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 11

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항-NKG2D 항체의 유효량을 포함하는 조성물을 대상체(subject)에게 투여하는 단계를 포함하여, 대상체에서 질환을 치료하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 질환이 암(cancer), 자가면역 질환(autoimmune disease), GvHD, 바이러스 감염, 박테리아 감염, 또는 NKG2D와 관련된 질환인, 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 항-NKG2D 항체가 중쇄 상의 3개의 상보성 결정 영역(CDR) (HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3) 및 경쇄 상의 3개의 CDR(LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)을 포함하고, 여기서

(i) HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열 번호 12-14의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열 번호 16-18의 아미노산 서열을 포함하거나;

(ii) HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열 번호 20-22의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열 번호 24-26의 아미노산 서열을 포함하거나;

(iii) HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열 번호 28-30의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열 번호 32-34의 아미노산 서열을 포함하거나;

(iv) HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열 번호 36-38의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열 번호 40-42의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 항-NKG2D 항체가 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역이 서열 번호 11 및 15; 서열 번호 19 및 23; 서열 번호 27 및 31; 또는 서열 번호 35 및 39의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 서열 목록 진술

[0002] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출되고 전문이 본원에 참고로 포함된 서열 목록을 포함한다. 2022년 5월 2일에 생성된 상기 ASCII 사본의 이름은 P-604135-PC_SL.txt이고 크기는 21킬로바이트이다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 개시내용은 일반적으로 항체에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 본 개시내용은 NKG2D에 대한 항체의 제조 및 사용을 기재한다.

배경 기술

- [0005] NKG2D(Nature Killer Group 2, Member D)는 세포독성 면역 세포에서 주로 발현되는 활성화 세포 표면 단백질이다. NKG2D는 모든 NK 세포, NKT 세포 및 $\gamma \delta$ T 세포의 하위세트에 풍부하게 존재한다. 천연 인간 CD8⁺ T 세포는 NKG2D를 발현하지만, 마우스에서 이들은 활성화 후에만 발현을 상향조절한다. CD4⁺ T 세포는 일반적으로 활성화 후에도 NKG2D를 발현하지 않지만, 인간에서 이의 발현은 크론병(Crohn's disease), 소아 발병 루푸스(juvenile-onset lupus), 시토메갈로바이러스 감염(cytomegalovirus infection)과 같은 특정 병리학적 조건하에서 유도될 수 있다. NKG2D의 분자 구조는 구조적으로 상이한 다수의 MHC-I-유사 리간드와 결합할 수 있도록 한다. NKG2D 리간드는 항상성 조건하에서 이들의 발현이 일반적으로 낮다는 공통점을 갖는다. 대조적으로, 감염 또는 발암 변형과 같은 세포 스트레스시, 이들의 발현이 크게 유도될 수 있다. 인간에서, NKG2D 리간드는 MICA, MICB, 및 ULBP 계열의 6개 구성원이다.
- [0006] NKG2D는 신호전달 특성을 갖는 얇은 매우 짧은 세포내 도메인을 갖는 두 개의 디설파이드-결합된 막관통 단백질의 동중이량체이다. 마우스에서, NKG2D는 어댑터 분자 DAP10 및 DAP12를 사용하여 이의 신호를 전달하는 반면, 인간에서 NKG2D는 DAP10과만 결합한다. DAP10 및 DAP12는 상이한 신호전달 캐스케이드를 개시한다. DAP10은 포스포티딜이노시톨-3 키나제(PI3K)의 p85를 결합할 수 있는 YINM 모티프를 가지고 있다. 또한 DAP10은 Vav1과 연결된 Grb2를 결합한다. DAP12는 NKG2D 촉발시 Src-키나제에 의해 인산화되는 면역 수용체 티로신-기반 활성화 모티프를 함유한다. 이러한 이벤트는 티로신 키나제, Syk 및 Zap70의 결합 및 활성화를 가능하게 한다.
- [0007] NKG2D는 잠재적으로 위험한 세포를 인식하고 제거하는 데 중요한 역할을 한다. 이것은 종양, 바이러스 감염된 세포 및 장기 이식물에 대한 면역 반응을 중재하는 것으로 나타났다. 이러한 이유로, NKG2D는 원래 스트레스를 받는 표적 세포에서 리간드의 대면(encounter)에 대한 반응으로 직접적인 세포독성을 주로 매개하는 것으로 생각되었다. 그러나, 대부분의 경우, NKG2D는 염증 상황 내에서 발생하는 경우에만 면역 세포 활성화를 매개할 수 있다. NK 세포 및 T 세포 둘 다는 일반적으로 NKG2D가 측정 가능한 효과를 매개할 수 있기 전에 2차 신호를 필요로 한다. 따라서 NKG2D의 주요 기능은 다른 수용체를 통한 신호전달의 조절인 것으로 보인다. 이것의 독특한 특징은 존재론적으로 구별되는 다수의 면역 세포 하위집합에서 조절 발달, 프라이밍 및 이펙터 반응과 같은 면역 세포의 수명주기의 상이한 단계 동안 다수의 수용체의 신호전달을 억제하고 강화할 수 있다는 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] NKG2D는 암(cancer)과 같은 중요한 질환에 대한 세포용해(cytolytic) 면역 반응을 강화하는 효능을 가지고 있기 때문에 치료 표적으로서 큰 잠재력을 갖는다. NKG2D의 중요한 역할을 고려할 때, NKG2D의 치료적 용도를 연구하기 위해 항-NKG2D 항체를 개발할 필요가 있다.

과제의 해결 수단

- [0009] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 다수의 항-NKG2D 항체를 제공한다. 한 실시양태에서, 각각의 항-NKG2D 항체는 중쇄 상의 3개의 상보성 결정 영역(complementarity determining region; CDR)(HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3) 및 경쇄 상의 3개의 CDR(LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)을 포함하고, 여기서
- [0010] HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열 번호 12-14의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열 번호 16-18의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0011] HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열 번호 20-22의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열 번호 24-26의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0012] HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열 번호 28-30의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열 번호 32-34의 아미노산 서열을 포함하거나;
- [0013] HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열 번호 36-38의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열 번호 40-42의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0014] 한 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 각각은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역에 대한 아미노산 서열은 다음 쌍 중 하나일 수 있다: 서열 번호 11 및 15; 서열 번호 19

및 23; 서열 번호 27 및 31; 또는 서열 번호 35 및 39.

- [0015] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 약제학적으로 허용되는 담체 및 본원에 개시된 항-NKG2D 항체를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 개시내용은 또한 본원에 개시된 항-NKG2D 항체를 암호화(encoding)하는 폴리뉴클레오티드 서열 뿐만 아니라 이러한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터(vector) 및 숙주 세포를 제공한다.
- [0017] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 항-NKG2D 항체는 암, 자가면역 질환(autoimmune disease), GvHD, 바이러스 감염 또는 박테리아 감염과 같은 질환을 치료하는데 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 항-NKG2D 항체는 NKG2D와 관련된 질환을 치료하는데 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 항-NKG2D 항체는 NKG2D의 과발현과 관련된 질환을 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0018] 항-NKG2D 항체의 이러한 측면 및 다른 측면들은 항-NKG2D 항체에 대한 도면의 후속 설명 및 상세한 설명으로부터 이해될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 항-NKG2D 항체의 일부 실시양태 및 이의 용도는 단지 예로서, 첨부된 도면을 참조하여 본원에 기재된다. 이하에서 상세히 도면을 구체적으로 참조하여, 도시된 세부사항은 예시로서 그리고 항-NKG2D 항체 및 이의 용도의 실시양태에 대한 예시적인 논의를 위한 것임을 강조한다. 이에 관해, 도면과 함께 취해진 설명은 항-NKG2D 항체 및 이의 용도의 실시양태가 어떻게 실행될 수 있는지를 당업계의 숙련자들에게 명백하게 한다.

도 1a-1b는 재조합 인간 NKG2D-ECD-Fc(인간 Fc에 융합된 NKG2D의 세포외 도메인)에 대한 면역화 후 시험 채혈된(TB) 또는 면역화 전 사전-채혈된(PB) 마우스 혈청의 결합을 보여준다. **도 1a**는 Balb/c 마우스(마우스 #8741, 8741, 8743, 8744, 8745) 또는 SJL 마우스(마우스 #8746, 8747, 8748, 8749, 8750)로부터의 혈청의 ELISA 결합의 결과를 보여준다. **도 1b**는 CHO 세포에서 과발현된 인간-NKG2D/Dap10에 대해 또는 CHO 세포에서 과발현된 cyno-NKG2D/Dap10에 대해 Balb/c 마우스(마우스 #8741, 8741, 8743, 8744, 8745) 및 SJL 마우스(마우스 #8746, 8747, 8748, 8749, 8750)로부터의 혈청의 FACS 결합을 보여주며, CHO 모세포에서는 반응성이 관찰되지 않았다. hIgG1: 음성 인간 IgG 대조군. mIgG1: 음성 마우스 IgG 대조군. NKG2D Ab: 양성 대조군 hIgG mAb.

도 2는 선택된 마우스 하이브리도마 클론의 정체를 열거한다.

도 3은 ELISA에 의한 NKG2D-ECD-Fc 항원에 대한 선택된 정제된 mAb(mAb001 내지 mAb020)의 결합을 보여준다.

도 4a-4c는 인간 또는 cyno NKG2D/Dap10을 과발현하는 CHO 세포에 대한 선택된 정제된 mAb(mAb001 내지 mAb020)의 FACS 결합을 보여준다. **도 4a**는 인간 NKG2D/Dap10을 과발현하는 CHO 세포에 대한 결합을 보여준다. **도 4b**는 cyno NKG2D/Dap10을 과발현하는 CHO 세포에 대한 결합을 보여준다. **도 4c**는 일차 NK 세포에 대한 결합을 나타내며, 모든 mAb(100nM, 각 mAb에 대한 왼쪽 막대; 또는 10nM, 각 mAb에 대한 오른쪽 막대)에서의 용량 의존적 결합과 다양한 평균 형광 강도(MFI)를 보여준다. Tab KYK2.0은 Fc에 LALA P329G 돌연변이를 갖는 양성 항 NKG2D-인간 IgG1 항체이다. 인간 IgG1LALA P328G는 Fc에 LALA P329G 돌연변이를 갖는 인간 IgG 음성 대조군 Ab이다.

도 5는 ELISA에 의해 수행된 에피토프 비닝 분석을 요약한 것이며, 다음과 같이 4개의 상이한 그룹을 보여준다: 그룹1(직사각형 연속선)은 mAb001, 002, 003, 004, 005, 006, 008, 011, 013, 015, 017, 018, 020을 모은다. 그룹 2(원 연속선)는 mAb007, 010, 014를 모은다. 그룹 3(직사각형 파선)은 mAb012, 016, 019를 모은다. 그룹 4(원 파선)는 mAb009를 모은다.

도 6a-6b는 100nM(각 mAb에 대해 왼쪽 막대) 또는 10nM(각 mAb에 대해 오른쪽 막대)에서 정제된 항-NKG2D mAb(mAb001 내지 mAb020)의 결합시 NK 세포의 활성화를 나타낸다. **도 6a**는 CD107a 활성화 마커의 축적을 보여준다. APC CD107A는 항 NKG2D mAb 클론 결합이 없는 항 CD107A 항체 염색이며, APC mIgG는 음성 대조군 마우스 IgG 항체이다. IM-1060은 양성 대조군 Tribody이고, IM-1091은 음성 대조군 Tribody이다. **도 6b**는 IFN-감마 분비를 보여준다. IM-1091은 음성 대조군 Tribody이다.

도 7은 선택된 정제된 mAb(mAb001 내지 mAb020)에 의한 NKG2D-MICA(MICA - MHC 클래스 I 폴리펩티드-관련 서열 A) 상호작용의 억제를 보여준다.

도 8a는 Tribody 구조의 한 실시양태를 보여준다. **도 8b**는 ProTribody 구조의 한 실시양태를 보여준다. **도 8c**는

다양한 Tribody 분자의 정체를 열거한다.

도 9는 SDS-PAGE에 의한 Tribody 단백질(IM1244 내지 IM1251) 특성화를 보여준다.

Ab ID	Ab 명칭	중쇄	경쇄
IM1244	CD3x5T4x NKG2D-cl-1 (L-H)	h1F3.5Fd-NKG2D_cl1_ScFv(L-H)	1F3.1λ-5T4IM53_HuCL16-13 (BM7)
IM1245	CD3x5T4x NKG2D-cl-1 (H-L)	h1F3.5Fd-NKG2D_cl1_ScFv(H-L)	1F3.1λ-5T4IM53_HuCL16-13 (BM7)
IM1246	CD3x5T4x NKG2D-cl-9 (L-H)	h1F3.5Fd-NKG2D_cl9_ScFv(L-H)	1F3.1λ-5T4IM53_HuCL16-13 (BM7)
IM1247	CD3x5T4x NKG2D-cl-9 (H-L)	h1F3.5Fd-NKG2D_cl9_ScFv(H-L)	1F3.1λ-5T4IM53_HuCL16-13 (BM7)
IM1248	CD3x5T4x NKG2D-cl-10 (L-H)	h1F3.5Fd-NKG2D_cl10_ScFv(L-H)	1F3.1λ-5T4IM53_HuCL16-13 (BM7)
IM1249	CD3x5T4x NKG2D-cl-10 (H-L)	h1F3.5Fd-NKG2D_cl10_ScFv(H-L)	1F3.1λ-5T4IM53_HuCL16-13 (BM7)
IM1250	CD3x5T4x NKG2D-cl-19 (L-H)	h1F3.5Fd-NKG2D_cl19_ScFv(L-H)	1F3.1λ-5T4IM53_HuCL16-13 (BM7)
IM1251	CD3x5T4x NKG2D-cl-19 (H-L)	h1F3.5Fd-NKG2D_cl19_ScFv(H-L)	1F3.1λ-5T4IM53_HuCL16-13 (BM7)
IM1060	CD3/5T4/NKG2D(VL-VH)	h1F3.5Fd- KYK-2.0_ScFv(L-H)	h1F3.1λ-ScFv(L-H)
IM1091	CD3/5T4/NKG2D mut(VL-VH)	h1F3.5Fd- KYK-2.0 mut_ScFv(L-H)	h1F3.1λ-ScFv(L-H)

도 10a-10h는 분석적 SEC에 의한 Tribody 단백질(IM1244 내지 IM1251) 특성화를 보여준다.

도 11은 ELISA에 의한 NK2G 단백질에 대한 Tribody 단백질(IM1244 내지 IM1251, IM1060 및 IM1091)의 결합을 보여준다. IM-1060은 양성 대조군 Tribody, IM-이코단백질(IM1244 - IM1251, IM1060 및 IM1091)의 결합을 보여준다. IM-1060은 양성 대조군 Tribody이고, IM-1091은 음성 대조군 Tribody이다.

도 12a-12b는 인간 NK2G 단백질을 과발현하는 CHO 세포(도 12a) 또는 cyno NKG2D를 과발현하는 CHO 세포(도 12b)에 대한 Tribody 단백질(IM1244 내지 IM1251, IM1060 및 IM1091)의 결합을 보여준다. IM-1060은 양성 대조군 Tribody이고, IM-1091은 음성 대조군 Tribody이다.

도 13은 300nM, 60nM, 12nM 및 2.4nM(막대, 왼쪽에서 오른쪽으로)에서 Tribody 단백질(IM1245, IM1246, IM1249, IM1250, IM1060 및 IM1091)에 의한 NK 세포 활성화를 보여준다. E+T APC-CD107은 NKG2D mAb의 부재하에서의 CD107a 염색이다. E APC-CD107은 NKG2D mAb 및 표적 세포의 부재하에서의 CD107 염색이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020]

본 개시내용은 단리된 항-NKG2D 항체를 제시하며, 여기서 항-NKG2D mAb의 독특한 CDR 서열은 인간화된 프레임워크(키메라 항체; 인간화 항체) 내에 제공된다. 또한, 다가 항체 작제물에 대한 이들 항-NKG2D 항체의 NKG2D 항원 결합 영역의 혼입이 입증된다. 본원에 개시된 항-NKG2D 항체는 의학적 상태, 예를 들어 암에 대한 면역요법 치료제로서 잠재적으로 사용될 수 있다.

[0021]

본원에 사용된 용어 "항체"는 용어 "면역글로불린"과 상호교환 가능하게 사용될 수 있으며, 모두 동일한 특성 및 의미를 갖는다. 항체 결합 도메인 또는 항원 결합 부위는 항체의 단편 또는 항체의 하나 이상의 단편의 유전자 조작 산물일 수 있으며, 이 단편은 표적 항원과의 특이적 결합에 관여한다. "특이적 결합"은 결합이 관심 항원에 대해 선택적이며 원치 않거나 비특이적 상호작용과는 구별될 수 있음을 의미한다. 예를 들어, 항체는 평형 해리 상수가 $\leq 10^{-5}$, 10^{-6} , 또는 10^{-7} M일 때 NKG2D 에피토프에 특이적으로 결합한다고 한다. 일부 실시양태에서, 평형 해리 상수는 $\leq 10^{-8}$ M 또는 10^{-9} M일 수 있다. 일부 추가의 실시양태에서, 평형 해리 상수는 $\leq 10^{-10}$ M, 10^{-11} M, 또는 10^{-12} M일 수 있다. 일부 실시양태에서, 평형 해리 상수는 $\leq 10^{-5}$ M 내지 10^{-12} M의 범위일 수 있다.

[0022]

절반 최대 유효 농도(EC₅₀)는 지정된 노출 시간 후 기준선과 최대 반응 사이의 중간 반응을 유도하는 약물, 항체 또는 독성 물질의 농도를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 반응은 결합 친화도를 포함한다. 일부 실시양태에서, 반응은 기능적 반응, 예를 들어 효능제 반응을 포함한다. 숙련가는, 특정 실시양태에서 본원에 사용된 바와 같이, 본원에 개시된 항-NKG2D 항체의 EC₅₀ 측정이 NKG2D 항원에 대한 항-NKG2D 항체의 반-최대 결합(EC₅₀ 결합)의 척도를 제공한다는 것을 인지할 것이다. 숙련가는, 특정 실시양태에서 본원에 사용된 바와 같이, 본원에 개시된

항-NKG2D 항체의 EC_{50} 측정은 효능제 반응(EC_{50} 기능적 효능작용)을 유도하기 위한 항-NKG2D 항체의 절반-최대 유효 농도의 척도를 제공한다는 것을 인지할 것이다.

[0023] 일부 실시양태에서, EC_{50} 은 항체 결합시 관찰될 수 있는 50% 효능제 반응을 수득하기 위해 요구되는 항체의 농도를 포함한다. 특정 실시양태에서, EC_{50} 의 측정은 약물의 효능의 척도로서 통상적으로 사용되며, 일부 실시양태에서, 수용체에 대한 항체의 결합을 반영할 수 있다. 일부 실시양태에서, 나노몰 EC_{50} 결합 농도 측정치를 갖는 항-NKG2D 항체는 밀착 결합 항-NKG2D 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 나노몰 EC_{50} 기능적 효능작용 농도 측정치를 갖는 항-NKG2D 항체는 기능적으로 효과적인 효능제 항체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 항-NKG2D 항체는 NKG2D 분자에 대한 밀착 결합제를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 항-NKG2D 항체는 NKG2D 분자에 대한 효능제를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 항-NKG2D 항체는 NKG2D 분자에 대한 밀착 결합 효능제를 포함한다.

[0024] 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 나노몰 범위이다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 0.05-100 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 0.05-50 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 0.05-20 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 0.05-10 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 0.1-100 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 0.1-50 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 0.1-20 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 0.1-10 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 1-100 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 1-20 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 20-40 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 40-60 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 60-80 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 80-100 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 1-40 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 1-60 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 1-80 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 1-50 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 0.05-5 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 0.1-5 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 0.05-20 nM의 범위를 포함한다.

[0025] 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 $EC(50)$ 은 약 0.05-5 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 0.1-5 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 1-5 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 0.05-10 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 0.1-10 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 1-10 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 5-10 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 0.05-15 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 0.01-15 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 결합 EC_{50} 은 약 1-15 nM의 범위를 포함한다.

[0026] 일부 실시양태에서, 기능적 효능작용(functional agonism)을 측정하는 EC_{50} 은 본원에서 함수 EC_{50} 으로 지칭되며, 모두 동일한 특성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 나노몰 범위이다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 0.05-100 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 0.05-50 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 0.05-20 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 0.05-10 nM의 범위를 포

함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 0.1-100 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 0.1-50 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 0.1-20 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 0.1-10 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 1-100 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 1-20 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 20-40 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 40-60 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 60-80 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 80-100 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 1-40 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 1-60 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 1-80 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 0.05-5 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 0.1-5 nM. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 0.05-20 nM의 범위를 포함한다.

[0027] 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 0.05-5 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 0.1-5 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 1-5 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 0.05-10 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 0.1-10 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 1-10 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 5-10 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 0.05-15 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 0.01-15 nM의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체의 기능적 EC_{50} 은 약 1-15 nM의 범위를 포함한다.

[0028] 본원에 사용된 용어 "항체"는 IgG, 중쇄 가변 영역(VH), 경쇄 가변 영역(VL), Fab 단편, F(ab')₂ 단편, scFv 단편, Fv 단편, 나노바디, 미니바디(minibody), 디아바디, 트리아바디(triobody), 테트라바디, 및 단일 도메인 항체(예를 들어, 참조: Hudson and Souriau, Nature Med. 9: 129-134 (2003))를 포함하지만 이에 제한되지 않는 결합 특이성을 보유하는 항체 단편 또는 단편들을 포함한다. 또한 인간화(humanized), 영장류화(primatized), 및 키메라 항체(chimeric antibodies)가 포함되며, 이러한 용어들은 당업계에 일반적으로 이해된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 전구체 작제물을 포함하며, 여기서 항원 결합 부위는 조절 도메인에 의해 차단될 수 있고, 여기서 결합 부위의 노출은 환경 조건에 기반한 조절된 노출, 예를 들어 이에 제한되지 않지만 중앙 미세환경에의 노출을 포함한다.

[0029] 본원에 사용된 용어 "중쇄 가변 영역"은 용어 "VH 도메인" 또는 용어 "VH"와 상호 교환적으로 사용될 수 있으며, 모두 동일한 의미 및 특성을 갖는다. 본원에 사용된 용어 "경쇄 가변 영역"은 용어 "VL 도메인" 또는 용어 "VL"과 상호 교환적으로 사용될 수 있으며, 모두 동일한 의미 및 특성을 갖는다. 숙련가는 항체와 관련하여 "중쇄 가변 영역" 또는 "VH"가 프레임워크 영역으로 알려진 측면 스트레치(flanking stretch) 사이에 삽입된 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 중쇄의 단편을 포함한다는 것을 인지할 것이다. 프레임워크 영역은 CDR보다 더 매우 보존되며 CDR을 지원하기 위한 스캐폴드를 형성한다. 유사하게, 숙련가는 또한 항체와 관련하여 "경쇄 가변 영역" 또는 "VL"이 프레임워크 영역 사이에 삽입된 3개의 CDR을 포함하는 경쇄의 단편을 포함한다는 것을 인지할 것이다.

[0030] 본원에 사용된 용어 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 중쇄 또는 경쇄 가변 영역의 초가변 영역(들)을 지칭한다. N-말단으로부터 진행하여, 중쇄 또는 경쇄 폴리펩티드의 각각은 "CDR1", "CDR2" 및 "CDR3"으로 표시된 3개의 CDR을 갖는다. 다수의 항원-항체 복합체의 결정학적 분석은 CDR의 아미노산 잔기가 결합된 항원과 광범위한 접촉을 형성한다는 것을 입증하였다. 따라서, CDR 영역은 주로 항원-결합 부위의 특이성을 담당한다. 한 실시양태에서, 항원-결합 부위는 중쇄 및 경쇄 가변 영역 각각으로부터의 CDR을 포함하여 6개의 CDR을 포함한다.

- [0031] 본원에 사용된 용어 "프레임워크 영역" 또는 "FR"은 중쇄 또는 경쇄 가변 영역의 CDR을 프레임하는 4개의 측면 아미노산 서열을 지칭한다. 일부 FR 잔기는 결합 항원과 접촉할 수 있다; 그러나, FR 잔기는 주로 가변 영역을 항원-결합 부위로 폴딩하는 역할을 한다. 일부 실시양태에서, 가변 영역을 폴딩하는 것을 담당하는 FR 잔기는 CDR에 직접 인접한 잔기를 포함한다. FR 내에서, 특정 아미노 잔기 및 특정 구조적 특징은 매우 높게 보존된다. 이와 관련하여, 모든 가변 영역 서열은 약 90개의 아미노산 잔기의 내부 이황화 루프를 함유한다. 가변 영역이 항원 결합 부위로 폴딩될 때, CDR은 항원-결합 표면을 형성하는 돌출 루프 모티프로 표시된다. 정확한 CDR 아미노산 서열에 관계없이 특정 "표준" 구조로의 CDR 루프의 폴딩된 형상에 영향을 미치는 FR의 보존된 구조 영역이 있는 것으로 일반적으로 인식된다. 또한, 특정 FR 잔기는 항체 중쇄 및 경쇄의 상호작용을 안정화하는 비공유 도메인 간 접촉에 관여하는 것으로 알려져 있다.
- [0032] 항체는 상보성 결정 영역(CDR), 가변 영역(Fv), VH 도메인, VL 도메인, 단일 쇄 가변 영역(scFv), 및 Fab 단편을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 형태로 존재하거나 다양한 도메인을 가질 수 있다.
- [0033] 당업계의 통상의 숙련가는 scFv가 짧은 링커 펩티드에 의해 연결된 면역글로불린의 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL) 영역을 포함하는 융합 폴리펩티드를 인지할 것이다. 링커는, 예를 들어, 10 내지 약 25개의 아미노산을 가질 수 있다.
- [0034] 숙련가는 또한 항체와 관련하여 용어 "Fab"는 일반적으로 이황화 결합에 의해 단일 중쇄의 가변 영역 및 제1 불변 영역에 결합된 단일 경쇄(가변 및 불변 영역 둘 다)로 구성되는 항체의 해당 부분을 포함하는 반면, $F(ab')_2$ 는 VH 도메인을 포함하는 중쇄 및 VL 도메인을 포함하는 경쇄의 단편을 포함한다는 것을 인지할 것이다.
- [0035] 일부 실시양태에서, 항체는 단클론 및 다클론 항체를 포함하는 전체 항체 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 가변 중쇄(VH) 단편, 가변 경쇄(VL) 단편, Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, scFv 단편, Fv 단편, 미니바디, 디아바디, 트리아바디, 및 테트라바디를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 결합 특이성을 보유하는 항체 단편 또는 단편들을 포함한다.
- [0036] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 항-NKG2D 항체는 이중특이 항체(bispecific antibody)의 일부로서 혼입될 수 있다. 당업계에 일반적으로 공지된 바와 같이, 이중특이 항체는 2개의 상이한 단클론 항체의 항원-결합 단편을 포함하는 재조합 단백질이며, 이에 따라 2개의 상이한 항원과 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항-NKG2D 항체는 NKG2D에 대해 2가이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항-NKG2D 항체는 NKG2D 결합에 대해 1가이다.
- [0037] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 항-NKG2D 항체는 다중-특이 항체의 일부로서 혼입될 수 있다. 한 실시양태에서, 다중-특이 항체는 적어도 2개의 상이한 단클론 항체, 예를 들어 2개, 3개 또는 4개의 상이한 단클론 항체의 항원-결합 단편을 포함하는 재조합 단백질이다. 한 실시양태에서, 본원에 개시된 항-NKG2D 항체는 삼중-특이 항체의 일부로서 혼입될 수 있다.
- [0038] 일부 실시양태에서, 이중특이, 삼중특이, 또는 다중-특이 항체는 하나 이상의 항원 표적, 예를 들어, 이에 제한되지 않지만 세포독성 T 세포(CTL) 뿐만 아니라 종양 관련 항원(TAA)을 동시에 표적화하거나, 또는 CTL 수용체 성분, 예를 들어 CD3, 이펙터 자연 살해(NK) 세포, 및 종양 관련 항원(TAA)을 동시에 표적화함으로써 암 면역요법에 사용된다.
- [0039] **항-NKG2D 항체**
- [0040] 본 개시내용은 다수의 항-NKG2D 항체를 제공한다. 한 실시양태에서, 항-NKG2D 항체 각각은 중쇄 상의 3개의 상보성 결정 영역(CDR)의 세트(HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3) 및 경쇄 상의 3개의 CDR의 세트(LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)를 포함한다.
- [0041] 한 실시양태에서, HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열 번호 12-14의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열 번호 16-18의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0042] 한 실시양태에서, HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열 번호 20-22의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열 번호 24-26의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0043] 한 실시양태에서, HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열 번호 28-30의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열 번호 32-34의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0044] 한 실시양태에서, HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열 번호 36-38의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2, 및

LCDR3은 서열 번호 40-42의 아미노산 서열을 포함한다.

- [0045] 또 다른 실시양태에서, 항-NKG2D 항체는 상기 제시된 아미노산 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 동일한 중쇄 및 경쇄 CDR 서열을 포함한다.
- [0046] 한 실시양태에서, 본원에 제시된 항-NKG2D 항체 각각은 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 여기서 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역에 대한 아미노산 서열은 다음 쌍 중 하나일 수 있다: 서열 번호 11 및 15; 서열 번호 19 및 23; 서열 번호 27 및 31; 또는 서열 번호 35 및 39. 또 다른 실시양태에서, 항-NKG2D 항체는 상기 제시된 아미노산 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 동일한 VH 및 VL 서열을 포함한다.
- [0047] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역에 대한 서열을 고려하여, 당업계의 통상의 숙련가는 당업계에 공지된 표준 기술을 용이하게 사용하여 항-NKG2D scFv를 작제할 수 있을 것이다.
- [0048] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 적절한 조건하에서 이량체화될 수 있는 VH 및 VL 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다. 예를 들어, VH 및 VL 도메인을 적절한 완충액에서 조합하고 소수성 상호작용과 같은 적절한 상호작용을 통해 이량체화할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, VH 및 VL 도메인을 VH 및 VL 도메인의 이량체화를 촉진할 수 있는 효소 및/또는 보조인자를 함유하는 적절한 완충액에 조합할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, VH 및 VL 도메인을 적절한 시약 및/또는 촉매의 존재하에서 이들이 서로 반응할 수 있게 하는 적합한 비히클에서 조합할 수 있다.
- [0049] 특정 실시양태에서, VH 및 VL 도메인은 예를 들어, 불변 영역, 힌지 영역, 링커 영역, Fc 영역, 또는 이황화 결합 영역, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는 더 긴 폴리펩티드 서열 내에 포함될 수 있다. 불변 도메인은 면역글로불린 분자의 불변 부분의 면역글로불린 접합 단위이며, 불변 영역의 도메인(예를 들어, CH1, CH2, CH3, CH4, Cκ, Cλ)이라고도 한다. 일부 실시양태에서, 더 긴 폴리펩티드는 본원에 개시된 방법에 따라 생성된 VH 및 VL 도메인 중 하나 또는 둘 다의 다수의 카피를 포함할 수 있다; 예를 들어, 본원에서 생성된 폴리펩티드가 디아바디 또는 트리아바디를 형성하는 데 사용되는 경우.
- [0050] 한 실시양태에서, 본원에 제시된 항-NKG2D 항체는 IgG, Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, 미니바디, 디아바디, 트리아바디, 나노바디, 이중특이 항체, 삼중특이 항체, 다중특이 항체, 또는 단일 도메인 항체일 수 있다. 예를 들어, 항-NKG2D 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4와 같은 IgG일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체는 IgG1을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체는 IgG2를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체는 IgG3를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-NKG2D 항체는 IgG4를 포함한다.
- [0051] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 NKG2D에 높은 친화도로 결합하는 항체를 제공한다. 한 실시양태에서, 결합 친화도는 Frankel 등(Mol. Immunol., 16:101-106, 1979)에 의해 기재된 바와 같은 Scatchard 방법의 변형에 의해 계산된다. 또 다른 실시양태에서, 결합 친화도는 항원/항체 해리 속도에 의해 측정된다. 또 다른 실시양태에서, 결합 친화도는 경쟁 방사면역검정에 의해 측정된다. 또 다른 실시양태에서, 결합 친화도는 ELISA에 의해 측정된다. 또 다른 실시양태에서, 항체 친화도는 유세포 분석에 의해 측정된다.
- [0052] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 바와 같은 중쇄 및 경쇄 CDR을 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드 서열을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 이러한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 제공한다. 본원에 개시된 아미노산 서열에 비추어, 당업계의 통상의 숙련가는 아미노산 서열을 암호화하기 위해 벡터 또는 플라스미드를 용이하게 작제할 수 있을 것이다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 본원에 제공된 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 용도 및 실험 조건에 따라, 당업계의 숙련가는 상기한 폴리뉴클레오티드 서열을 지니고/지니거나 발현시키기 위해 적합한 숙주 세포를 용이하게 사용할 수 있을 것이다.
- [0053] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드 서열을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 이러한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 제공한다. 본원에 개시된 아미노산 서열에 비추어, 당업계의 통상의 숙련가는 아미노산 서열을 암호화하기 위해 벡터 또는 플라스미드를 용이하게 작제할 수 있을 것이다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 본원에 제공된 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 용도 및 실험 조건에 따라, 당업계의 숙련가는 상기한 폴리뉴클레오티드 서열을 지니고/지니거나 발현시키기 위해 적합한 숙주 세포를 용이하게 사용할 수 있을 것이다.

[0054] 아래 표(표 1)는 항-NKG2D 항체 클론의 명칭, 및 상응하는 VH, VL 및 CDR에 대한 서열 번호를 열거한다.

[0055] [표 1]

[0056] 서열 번호, 클론 명칭, 및 이의 Ab 성분.

[0057]

서열 번호	명칭	Ab 성분
	NKG2D	
1	NKG2D (KYK2.0)	VH
2		CDR1
3		CDR2
4		CDR3
5		VL
6		CDR1
7		CDR2
8		CDR3
9	NKG2D(KYK2.0)mut	VH
10		VL
11	IM, NKG2D 마우스 하이브리도마 cl- 1	VH
12		CDR1
13		CDR2
14		CDR3
15		VL

서열 번호	명칭	Ab 성분
16		CDR1
17		CDR2
18		CDR3
19	IM, NKG2D 마우스 하이브리도마 cl- 9	VH
20		CDR1
21		CDR2
22		CDR3
23		VL
24		CDR1
25		CDR2
26		CDR3
27	IM, NKG2D 마우스 하이브리도마 cl- 10	VH
28		CDR1
29		CDR2
30		CDR3
31		VL
32		CDR1
33		CDR2
34		CDR3
35	IM, NKG2D 마우스 하이브리도마 cl- 19	VH
36		CDR1
37		CDR2
38		CDR3
39		VL
40		CDR1
41		CDR2
42		CDR3

[0058]

[0059] 사용을 위한 조성물

[0060] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 본원에 개시된 항-NKG2D 항체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 약제학적으로 허용되는 사용 담체는 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 문헌

[Remington's Pharmaceutical Sciences, by E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition, 1975]은 본원에 개시된 항체의 약제학적 전달에 적합한 조성물 및 제형을 설명한다. 한 실시양태에서, 조성물은 중쇄 상의 3개의 상보성 결정 영역(CDR)의 세트(HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3) 및 경쇄 상의 3개의 CDR의 세트(LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)를 포함하는 항-NKG2D 항체를 포함한다.

- [0061] 조성물의 일부 실시양태에서, HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열 번호 12-14의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열 번호 16-18의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0062] 조성물의 일부 실시양태에서, HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열 번호 20-22의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열 번호 24-26의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0063] 조성물의 일부 실시양태에서, HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열 번호 28-30의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열 번호 32-34의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0064] 조성물의 일부 실시양태에서, HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3은 서열 번호 36-38의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3은 서열 번호 40-42의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0065] 또 다른 실시양태에서, 조성물은 상기 제시된 아미노산 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 동일한 중쇄 및 경쇄 CDR 서열을 갖는 항-NKG2D 항체를 포함한다.
- [0066] 또 다른 실시양태에서, 조성물은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 하기 쌍 중 하나를 갖는 항-NKG2D 항체를 포함한다: 서열 번호 11 및 15; 서열 번호 19 및 23; 서열 번호 27 및 31; 또는 서열 번호 35 및 39.
- [0067] 또 다른 실시양태에서, 조성물은 상기 제시된 아미노산 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 동일한 VH 및 VL 서열을 갖는 항-NKG2D 항체를 포함한다.
- [0068] 조성물의 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 접합체의 형태일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "접합체"는 이펙터 분자 또는 제2 단백질(예를 들어 제2 항체)에 공유결합된 항체 또는 항체 단편(예를 들어 항원-결합 단편)이다. 이펙터 분자는, 예를 들어, 약물, 독소, 치료제, 검출 가능한 표지, 단백질, 핵산, 지질, 나노입자, 탄수화물 또는 제조합 바이러스일 수 있다. 항체 접합체는 "면역접합체"라고도 한다. 접합체가 약물(예를 들어, 세포독성제)에 결합된 항체를 포함하는 경우, 접합체는 "항체-약물 접합체"로 지칭될 수 있다. 다른 항체 접합체는, 예를 들어, 다중특이(예를 들어, 이중특이 또는 삼중특이) 항체 및 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함한다.
- [0069] 항-NKG2D 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 조성물은 대상체(subject)(예를 들어, 인간 또는 동물)에게 단독으로 투여될 수 있거나, 또는 담체, 즉, 약제학적으로 허용되는 담체와 조합하여 투여될 수 있다. 약제학적으로 허용된다는 것은 생물학적으로 또는 달리 바람직한 물질을 의미하며, 즉 물질은 임의의 바람직하지 않은 생물학적 효과를 유발하지 않거나 이것이 함유된 약제학적 조성물의 임의의 다른 성분과 유해한 방식으로 상호작용하지 않으면서 대상체에게 투여될 수 있다. 당업계의 통상의 숙련가에게 잘 알려진 바와 같이, 담체는 본원에 개시된 폴리펩티드의 임의의 분해를 최소화하고 대상체에서 임의의 부작용을 최소화하기 위해 선택된다. 약제학적 조성물은 약학 기술분야에서 잘 알려진 방법론에 의해 제조될 수 있다.
- [0070] 본원에 개시된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물은 국소 또는 전신 치료가 바람직한지의 여부에 따라 임의의 적절한 방식으로 (예를 들어, 포유류, 세포, 또는 조직에) 투여될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 국소(예를 들어, 안과, 질, 직장, 비강내, 경피 등), 경구, 흡입, 또는 비경구(정맥 점적 또는 피하, 강내, 복강내, 피내, 또는 근육내 주사를 포함함)로 투여될 수 있다. 국소 비강내 투여는 콧구멍 중 하나 또는 둘 다를 통한 코 및 비강으로의 조성물의 전달을 지칭한다. 조성물은 분무 메카니즘 또는 액적 메카니즘에 의해, 또는 에어로졸화를 통해 전달될 수 있다. 대안적으로, 투여는 종양내, 예를 들어, 국소 또는 정맥내 주사일 수 있다.
- [0071] 조성물을 비경구 투여하고자 하는 경우, 투여는 일반적으로 주사에 의해 이루어진다. 주사제는 통상의 형태로, 액체 용액 또는 현탁액, 주사 전 액체에 현탁하기에 적합한 고체 형태로서 또는 에멀전으로서 제조될 수 있다. 또한, 비경구 투여는 일정한 투여량을 유지하기 위해 서방출 또는 지속-방출 시스템의 준비를 수반할 수 있다.
- [0072] **사용 방법**
- [0073] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 항-NKG2D 항체는 암, 자가면역 질환, GvHd, 바이러스 감염 또는 박테리아 감염과 같은 질환을 치료하는데 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 항-NKG2D 항체는 NKG2D와 관

련된 질환을 치료하는데 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 항-NKG2D 항체는 NKG2D의 과발현과 관련된 질환을 치료하는데 사용될 수 있다.

- [0074] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항-NKG2D 항체는 세포독성 활성을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항-NKG2D 항체는 암 또는 종양 세포에 대해 세포독성이다.
- [0075] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항-NKG2D 항체는 암 또는 종양에 대한 방법에서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 암 또는 종양은 고형 암 또는 종양을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암 또는 종양은 비-고형(미만성) 암 또는 종양을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암 또는 종양은 암 또는 종양의 전이를 포함한다.
- [0076] 본원에 사용된 용어 "방법"은 화학, 약리학, 생물학, 생화학 및 의학의 실무자에게 알려져 있거나 이들에 의해 알려진 방식, 수단, 기술 및 절차로부터 쉽게 개발되는 방식, 수단, 기술 및 절차를 포함하지만 이에 제한되지 않는 주어진 작업을 수행하기 위한 방식, 수단, 기술 및 절차를 지칭한다.
- [0077] 본원에 사용된 용어 "치료하다", "치료", 또는 "치료법"(뿐만 아니라 이의 상이한 형태들)은 예방적 또는 방지적 조치를 포함하는 치료적 치료를 지칭하며, 여기서 목적은 질환 또는 병태와 관련된 바람직하지 않은 생리학적 변화를 예방하거나 늦추는(감소시키는) 것이다. 유익하거나 원하는 임상 결과는, 검출 가능하던 검출 가능하지 않던 간에, 증상의 완화, 질환 또는 병태의 정도의 감소, 질환 또는 병태의 안정화(즉, 질환 또는 병태가 악화되지 않는 경우), 질환 또는 병태의 진행 지연 또는 둔화, 질환 또는 병태의 개선 또는 완화, 및 질환 또는 병태의 관해(부분적이든 또는 전체적이든)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 치료를 필요로 하는 사람은 이미 질환 또는 병태를 가지고 있는 사람 뿐만 아니라 질환 또는 병태에 걸리기 쉬운 사람 또는 질환 또는 병태를 예방하고자 하는 사람을 포함한다.
- [0078] 용어 "대상체", "개체" 및 "환자"는 본원에서 상호 교환적으로 사용되며, 본 발명의 항-NKG2D 항체에 따른 조성물 또는 제형으로의 치료가 제공되는 인간 또는 비인간 동물을 지칭한다. 용어 "비-인간 동물" 및 "비-인간 포유류"는 본원에서 상호 교환적으로 사용되며, 모든 척추동물, 예를 들어, 포유류, 예를 들어 비-인간 영장류(예를 들어, 고등 영장류), 양, 개, 설치류(예를 들어, 마우스 또는 래트), 기니피그, 염소, 돼지, 고양이, 토끼, 소, 말, 또는 비-포유류, 예를 들어 파충류, 양서류, 닭 및 칠면조를 포함한다. 본원에 기재된 조성물은 영장류, 예를 들어 원숭이 및 인간, 말, 소, 고양이, 개, 토끼, 및 설치류, 예를 들어 래트 및 마우스를 포함하는 임의의 적합한 포유류를 치료하는데 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 치료될 포유류는 인간이다. 인간은 모든 연령대의 인간일 수 있다. 한 실시양태에서, 인간은 성인이다. 또 다른 실시양태에서, 인간은 어린이이다. 인간은 남성, 여성, 임산부, 중년, 청소년 또는 노인일 수 있다.
- [0079] 본원에 개시된 방법에 사용하기에 적합한 약제학적 조성물은 활성 성분이 의도된 목적을 달성하기에 효과적인 양으로 함유된 조성물을 포함한다. 한 실시양태에서, 치료적 유효량은 질환의 증상을 예방, 완화 또는 개선하거나 치료받는 대상체의 생존을 연장시키는데 효과적인 활성 성분의 양을 의미한다. 치료적 유효량의 결정은 당업계의 숙련가들의 능력 내에 있다.
- [0080] 본원에 사용된 바와 같이, "조절"은 분자 표적 또는 경로의 활성을 "자극" 또는 "억제"하는 것을 지칭한다. 예를 들어, 조성물이 조성물의 존재만이 결여된 동일한 조건하에서의 분자 표적 또는 경로의 활성에 비해 적어도 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 또는 약 99% 또는 그 이상까지 분자 표적 또는 경로의 활성을 자극하거나 억제하는 경우 조성물은 분자 표적 또는 경로의 활성을 조절한다. 또 다른 예에서, 조성물이 조성물의 존재만이 결여된 동일한 조건하에서의 분자 표적 또는 경로의 활성에 비해 적어도 2배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 50배, 적어도 100배까지 분자 표적 또는 경로의 활성을 자극하거나 억제하는 경우 조성물은 분자 표적 또는 경로의 활성을 조절한다. 분자 표적 또는 경로의 활성은 임의의 재현 가능한 수단에 의해 측정될 수 있다. 분자 표적 또는 경로의 활성은 시험관내 또는 생체내 측정될 수 있다. 예를 들어, 분자 표적 또는 경로의 활성은 활성을 측정하는 당업계에 공지된 적절한 분석에 의해 시험관내 또는 생체내에서 측정될 수 있다. 대조군 샘플(조성물로 처리되지 않음)에는 100%의 상대 활성 값이 할당될 수 있다.
- [0081] 한 실시양태에서, 상기 방법은 본원에 개시된 항-NKG2D 항체의 유효량을 포함하는 조성물을 대상자에게 투여하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 중쇄 및 경쇄 CDR 서열을 갖는 항-NKG2D 항체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 VH 및 VL 서열을 갖는 항-NKG2D 항체를 포함한다.

- [0082] 당업계 숙련가는 일부 실시양태에서, 면역 반응의 조절이 본원에 기재된 항-NKG2D 항체를 사용하지 않고 예상되는 결과가 얻어졌을 상황에서의 면역의 감소 또는 면역의 제거를 포함한다는 것을 인지할 것이다. 당업계의 숙련가는 또한 일부 실시양태에서, 종양 또는 암을 치료하는 것이, 본원에 기재된 항-NKG2D 항체를 사용하지 않은 결과와 비교하여, 종양 크기, 성장, 및/또는 종양 또는 암의 확산의 감소를 포함한다는 것을 인지할 것이다.
- [0083] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 항-NKG2D 항체의 유효량을 포함하는 조성물을 대상자에게 투여하는 단계를 포함하여, 대상체에서 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 중쇄 및 경쇄 CDR 서열을 갖는 항-NKG2D 항체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 VH 및 VL 서열을 갖는 항-NKG2D 항체를 포함한다.
- [0084] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 대상체에서 질환을 치료하기 위한 항-NKG2D 항체를 포함하는 조성물의 용도를 제공한다. 한 실시양태에서, 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 중쇄 및 경쇄 CDR 서열을 갖는 항-NKG2D 항체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 VH 및 VL 서열을 갖는 항-NKG2D 항체를 포함한다.
- [0085] 한 실시양태에서, 목적하는 효과를 유도하기 위해 요구되는 본 발명의 폴리펩티드 또는 이의 조성물의 정확한 양은 대상체의 종, 연령, 성별, 체중 및 일반적인 상태, 특정 폴리펩티드, 투여 경로, 및 다른 약물이 요법에 포함되는지 여부에 따라 대상체마다 달라질 것이다. 따라서 모든 조성물에 대해 정확한 양을 지정할 수는 없다. 그러나, 적절한 양은 당업계의 통상의 숙련가에 의해 일반적인 실험을 사용하여 결정될 수 있다. 투여량은 다양할 수 있으며, 폴리펩티드는 1일 이상 동안 매일 1회 이상(예를 들어, 2회 이상, 3회 이상, 4회 이상, 또는 5회 이상)의 용량으로 투여될 수 있다. 항체에 대한 적절한 용량 선택에 대한 지침은 문헌에서 쉽게 찾을 수 있다.
- [0086] 한 실시양태에서, 질환은 바이러스 감염, 박테리아 감염, 암, 자가면역 질환 또는 면역 질환일 수 있다. 한 실시양태에서, 질환은 상부 호흡기 바이러스 감염, 초기 폐 감염, 또는 후기 폐 감염일 수 있다. 많은 질환 및 암이 바이러스에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다. 질환-유발 바이러스의 예는 노로바이러스; 로타바이러스; 간염 바이러스 A, B, C, D 또는 E; 광견병 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 엔테로바이러스, 에코바이러스, 콕사키바이러스, 단순 헤르페스 바이러스(HSV), HSV-2, 수두-대상포진 바이러스, 모기-매개 바이러스, 아르보바이러스, 세인트 루이스 뇌염 바이러스, 캘리포니아 뇌염 바이러스, 림프구성 맥락 뇌막염 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 폴리오바이러스, 지카 바이러스, 풍진 바이러스, 시토크로바이러스, 인유두종 바이러스(HPV), 엔테로바이러스 D68, 중증급성 호흡기 증후군(SARS) 코로나바이러스, 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스, SARS 코로나바이러스 2, 엡스타인-바 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 폴리오마 바이러스(예를 들어 JC 바이러스, BK 바이러스), 에볼라 바이러스, 뎅기열 바이러스 또는 이들의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0087] 또 다른 실시양태에서, 상기 질환은 암종(carcinoma), 육종(sarcoma), 림프종(lymphoma), 백혈병(leukemia), 생식 세포 종양(germ cell tumor), 모세포종(blastoma), 연골육종(chondrosarcoma), 유잉 육종(Ewing's sarcoma), 뼈의 악성 섬유 조직구종(malignant fibrous histiocytoma), 골육종(osteosarcoma), 횡문근육종(rhabdomyosarcoma), 심장암(heart cancer), 뇌암(brain cancer), 성상세포종(astrocytoma), 신경교종(glioma), 수모세포종(medulloblastoma), 신경모세포종(neuroblastoma), 유방암(breast cancer), 수질 암종(medullary carcinoma), 부신피질 암종(adrenocortical carcinoma), 갑상선암(thyroid cancer), 메르켈 세포 암종(Merkel cell carcinoma), 안구암(eye cancer), 위암(gastrointestinal cancer), 대장암(colon cancer), 담낭암(gallbladder cancer), 위암(gastric (stomach) cancer), 위장 카르시노이드 종양(gastrointestinal carcinoid tumor), 간세포암(hepatocellular cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 직장암(rectal cancer), 방광암(bladder cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 난소암(ovarian cancer), 신세포 암종(renal cell carcinoma), 전립선암(prostate cancer), 고환암(testicular cancer), 요도암(urethral cancer), 자궁육종(uterine sarcoma), 질암(vaginal cancer), 두부암(head cancer), 경부암(neck cancer), 비인두 암종(nasopharyngeal carcinoma), 조혈암(hematopoietic cancer), 비호지킨 림프종(Non-Hodgkin lymphoma), 피부암(skin cancer), 기저-세포 암종(basal-cell carcinoma), 흑색종(melanoma), 소세포 폐암(small cell lung cancer), 비-소세포 폐암(non-small cell lung cancer), 또는 이들의 조합일 수 있지만 이에 제한되지 않는 암이다.
- [0088] 자가면역 질환 또는 장애의 예는 관절염(류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 예를 들어 급성 관절염(acute arthritis), 만성 류마티스 관절염(chronic rheumatoid arthritis), 통풍(gout) 또는 통풍성 관절염(gouty arthritis), 급성 통풍성 관절염(acute gouty arthritis), 급성 면역학적 관절염(acute immunological

arthritis), 만성 염증성 관절염(chronic inflammatory arthritis), 퇴행성 관절염(degenerative arthritis), 제2형 콜라겐-유도된 관절염(type II collagen-induced arthritis), 감염성 관절염(infectious arthritis), 라임 관절염(Lyme arthritis), 증식성 관절염(proliferative arthritis), 건선성 관절염(psoriatic arthritis), 스틸병(Still's disease), 척추 관절염(vertebral arthritis) 및 소아-발병 류마티스 관절염(juvenile-onset rheumatoid arthritis), 골관절염(osteoarthritis), 만성 의학진행성 관절염(arthritis chronica progrediente), 변형성 관절염(arthritis deformans), 원발성 만성 다발성 관절염(polyarthritis chronica primaria), 반응성 관절염(reactive arthritis), 및 강직성 척추염(ankylosing spondylitis)), 염증성 과증식성 피부 질환(inflammatory hyperproliferative skin disease), 건선(psoriasis), 예를 들어 판상 건선(plaque psoriasis), 구타테 건선(guttate psoriasis), 농포성 건선(pustular psoriasis), 손발톱 건선 등의 건선, 건조열(hay fever) 및 조브 증후군(Job's syndrome)과 같은 아토피 질환을 포함한 아토피, 접촉성 피부염(contact dermatitis), 만성 접촉성 피부염(chronic contact dermatitis), 박리성 피부염(exfoliative dermatitis), 알레르기성 피부염(allergic dermatitis), 알레르기성 접촉성 피부염(allergic contact dermatitis), 포진성 피부염(dermatitis herpetiformis), 화폐상 피부염(nummular dermatitis), 지루성 피부염(seborrheic dermatitis), 비특이 피부염(non-specific dermatitis), 원발성 자극성 접촉성 피부염(primary irritant contact dermatitis), 및 아토피성 피부염(atopic dermatitis)을 포함한 피부염, X-연동 하이퍼 IgM 증후군(x-linked hyper IgM syndrome), 알레르기성 안구 내 염증성 질환(allergic intraocular inflammatory disease), 두드러기(urticaria), 예를 들어 만성 알레르기성 두드러기(chronic allergic urticaria) 및 만성 자가면역성 두드러기(chronic autoimmune urticaria)를 포함한 만성 특발성 두드러기(chronic idiopathic urticaria), 근염(myositis), 다발성 근염(polymyositis)/피부근염(dermatomyositis), 소아 피부근염(juvenile dermatomyositis), 독성 표피 괴사증(toxic epidermal necrolysis), 경피증(scleroderma)(전신 경피증 포함), 경화증(sclerosis), 예를 들어 전신 경화증(systemic sclerosis), 다발성 경화증(multiple sclerosis)(MS), 예를 들어 척추-광학적 MS(spino-optical MS), 원발성 진행성 MS(primary progressive MS)(PPMS), 및 재발성 경감 MS(relapsing remitting MS)(RRMS), 진행성 전신 경화증(progressive systemic sclerosis), 죽상동맥경화증(atherosclerosis), 동맥경화증(arteriosclerosis), 파종성 경화증(sclerosis disseminata), 실조성 경화증(ataxic sclerosis), 시신경척수염(neuromyelitis optica)(NMO), 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease)(IBD)(예를 들어, 크론병(Crohn's disease), 자가면역-매개 위장관 질환(autoimmune-mediated gastrointestinal disease), 대장염, 예를 들어 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 궤양성 대장염(colitis ulcerosa), 현미경적 대장염(microscopic colitis), 콜라겐성 대장염(collagenous colitis), 용종성 대장염(colitis polyposa), 괴사성 장염(necrotizing enterocolitis), 및 경벽성 대장염(transmural colitis), 및 자가면역 염증성 장 질환(autoimmune inflammatory bowel disease)), 장 염증(bowel inflammation), 괴저성 농피증(pyoderma gangrenosum), 결절성 홍반(erythema nodosum), 원발성 경화성 담관염(primary sclerosing cholangitis), 성인 또는 급성 호흡곤란 증후군(ARDS)을 포함한 호흡곤란 증후군(respiratory distress syndrome), 뇌수막염(meningitis), 포도막(uvea)의 전체 또는 일부의 염증, 홍채염(iritis), 맥락막염(choroiditis), 자가면역성 혈액 질환(autoimmune hematological disorder), 류마티스 척추염(rheumatoid spondylitis), 류마티스 활막염(rheumatoid synovitis), 유전성 혈관부종(hereditary angioedema), 뇌수막염에 서와 같은 뇌신경 손상(cranial nerve damage), 임신 포진(herpes gestationis), 천포창성 임신증(pemphigoid gestationis), 소양성 음낭증(pruritis scroti), 자가면역 조기 난소부전(autoimmune premature ovarian failure), 자가면역 질환으로 인한 돌발성 난청(sudden hearing loss), IgE-매개 질환, 예를 들어 아나필락시스(anaphylaxis) 및 알레르기성 및 아토피성 비염, 뇌염(encephalitis), 예를 들어 라스무센 뇌염(Rasmussen's encephalitis) 및 변연계 및/또는 뇌간 뇌염(limbic and/or brainstem encephalitis), 포도막염(uveitis), 예를 들어 전방 포도막염(anterior uveitis), 급성 전방 포도막염(acute anterior uveitis), 육아종성 포도막염(granulomatous uveitis), 비육아종성 포도막염(nongranulomatous uveitis), 수정체 항원성 포도막염(phacoantigenic uveitis), 후방 포도막염(posterior uveitis) 또는 자가면역 포도막염(autoimmune uveitis), 신증후군(nephrotic syndrome)을 동반하거나 동반하지 않은 사구체신염(glomerulonephritis)(GN), 예를 들어 만성 또는 급성 사구체신염, 예를 들어 원발성 GN, 면역-매개 GN, 막성 GN(막성 신병증), 특발성 막성 GN 또는 특발성 막성 신증증(idiopathic membranous nephropathy), I형 및 II형을 포함한 막성 또는 막 증식성 GN(MPGN), 및 급속 진행성 GN, 증식성 신장염(proliferative nephritis), 자가면역 다선 내분비 부전(autoimmune polyglandular endocrine failure), 형질세포성 국한성 귀두염(balanitis circumscripta plasmacellularis)을 포함한 귀두염(balanitis), 귀두포피염(balanoposthitis), 원심성 환상 홍반(erythema annulare centrifugum), 고정 이색소성 홍반(erythema dyschromicum perstans), 다형성 홍반(eythema multiform), 환상 육아종(granuloma annulare), 광택 태선(lichen nitidus), 경화성 위축성 태선(lichen

sclerosus et atrophicus), 만성 단순 태선(lichen simplex chronicus), 극상 태선(lichen spinulosus), 편평 태선(lichen planus), 층판상 어린선(lamellar ichthyosis), 표피박리과다각화증(epidermolytic hyperkeratosis), 전암성 각화증(premalignant keratosis), 괴저성 농피증(pyoderma gangrenosum), 알레르기 질환 및 반응(allergic conditions and responses), 알레르기 반응(allergic reaction), 알레르기성 또는 아토피성 습진(allergic or atopic eczema)을 포함한 습진, 건조 습진(asteatotic eczema), 한포진(dyshidrotic eczema), 및 수포성 손바닥 발바닥 습진(vesicular palmoplantar eczema), 천식, 예를 들어 기관지 천식(asthma bronchiale), 기관지 천식(bronchial asthma), 및 자가면역 천식(auto-immune asthma), T 세포의 침윤 및 만성 염증 반응을 수반한 질환, 외부 항원에 대한 면역 반응, 예를 들어 임신 중 태아 A-B-O 혈액형, 만성 폐 염증성 질환(chronic pulmonary inflammatory disease), 자가면역성 심근염(autoimmune myocarditis), 백혈구 부착 결핍증(leukocyte adhesion deficiency), 루푸스 신염(lupus nephritis), 뇌 루푸스(lupus cerebritis), 소아 루푸스(pediatric lupus), 비-신장 루푸스(non-renal lupus), 신장-외 루푸스(extra-renal lupus), 원판상 루푸스(discoid lupus) 및 원판상 홍반성 루푸스(discoid lupus erythematosus), 탈모증 루푸스(alopecia lupus), 전신 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus)(SLE), 예를 들어 피부 SLE 또는 아급성 피부 SLE, 신생아 루푸스 증후군(neonatal lupus syndrome)(NLE) 및 과종성 홍반성 루푸스(lupus erythematosus disseminatus)를 포함한 루푸스, 소아 인슐린-의존성 당뇨병(pediatric insulin-dependent diabetes mellitus)(IDDM)을 포함한 청소년 발병(제1형) 당뇨병(juvenile onset (Type I) diabetes mellitus), 및 성인 발병 당뇨병(adult onset diabetes mellitus)(제2형 당뇨병)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 또한 사이토카인 및 T-림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연성 과민증과 관련된 면역 반응, 사르코이드증(sarcoidosis), 림프종 육아종증(lymphomatoid granulomatosis), 베게너 육아종증(Wegener's granulomatosis)을 포함한 육아종증, 과립구감소증(agranulocytosis), 혈관염(vasculitis), 대혈관 혈관염(large-vessel vasculitis)(류마티스성 다발근통(polymyalgia rheumatica) 및 거대 세포(다카야수) 동맥염(giant cell (Takayasu's) arteritis) 포함), 중혈관 혈관염(medium-vessel vasculitis)(가와사키병(Kawasaki's disease) 및 결절성 다발성 동맥염(polyarteritis nodosa)/결절성 동맥주위염(periarteritis nodosa) 포함), 현미경적 다발성 동맥염(microscopic polyarteritis), 면역혈관염(immunovascularitis), CNS 혈관염, 피부 혈관염(cutaneous vasculitis), 과민성 혈관염(hypersensitivity vasculitis), 괴사성 혈관염(necrotizing vasculitis), 예를 들어 전신 괴사성 혈관염(systemic necrotizing vasculitis), 및 ANCA-관련 혈관염, 예를 들어 척-스트라우스 혈관염 또는 증후군(Churg-Strauss vasculitis or syndrome)(CSS) 및 ANCA-관련 소혈관 혈관염, 측두동맥염(temporal arteritis)을 포함한 혈관염, 재생불량성 빈혈(aplastic anemia), 자가면역성 재생불량성 빈혈(autoimmune aplastic anemia), 콤즈 양성 빈혈(Coombs positive anemia), 다이아몬드 블랙팬 빈혈(Diamond Blackfan anemia), 용혈성 빈혈(hemolytic anemia) 또는 자가면역 용혈성 빈혈(autoimmune hemolytic anemia)(AIHA)을 포함하는 면역성 용혈성 빈혈(immune hemolytic anemia), 애디슨병(Addison's disease), 자가면역성 호중구감소증(autoimmune neutropenia), 범혈구감소증(pancytopenia), 백혈구감소증(leukopenia), 백혈구 혈구유출(leukocyte diapedesis)을 수반한 질환, CNS 염증성 질환(CNS inflammatory disorder), 알츠하이머 병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 패혈증, 외상 또는 출혈에 이차적인 것과 같은 다발성 장기 손상 증후군(multiple organ injury syndrome), 항원-항체 복합체-매개 질환(antigen-antibody complex-mediated disease), 항사구체 기저막 질환(anti-glomerular basement membrane disease), 항인지질 항체 증후군(anti-phospholipid antibody syndrome), 알레르기성 신경염(allergic neuritis), 베체트병/증후군(Behcet's disease/syndrome), 캐슬만 증후군(Castleman's syndrome), 굿파스처 증후군(Goodpasture's syndrome), 레이노 증후군(Reynaud's syndrome), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 스티븐스-존슨 증후군(Stevens-Johnson syndrome), 유천포창(pemphigoid), 예를 들어 수포성 유천포창(pemphigoid bullous) 및 피부 유천포창(skin pemphigoid), 천포창(pemphigus)(심상성 천포창(pemphigus vulgaris), 낙엽성 천포창(pemphigus foliaceus), 천포창 점막 유천포창(pemphigus mucus-membrane pemphigoid), 및 홍반성 천포창(pemphigus erythematosus) 포함), 자가면역성 다발성 내분비병증(autoimmune polyendocrinopathies), 라이터병 또는 증후군(Reiter's disease or syndrome), 온열 손상(thermal injury), 자간전증(preeclampsia), 면역 복합 질환(immune complex disorder), 예를 들어 면역 복합 신장염(immune complex nephritis), 항체-매개 신장염(antibody-mediated nephritis), 다발성 신경병증(polyneuropathies), 만성 신경병증(chronic neuropathy), 예를 들어 IgM 다발성 신경병증(IgM polyneuropathies) 또는 IgM-매개 신경병증(IgM-mediated neuropathy), 자가면역 또는 면역-매개 혈소판 감소증(autoimmune or immune-mediated thrombocytopenia), 예를 들어 만성 또는 급성 ITP를 포함한 특발성 혈소판 감소성 자반병(idiopathic thrombocytopenic purpura)(ITP), 공막염(scleritis), 예를 들어 특발성 세라토-공막염(idiopathic cerato-scleritis), 상공막염(episcleritis), 자가면역 고환염 및 난소염(autoimmune orchitis and oophoritis)을 포함한 고환 및 난소의 자가면역 질환, 원발성

갑상선기능저하증(primary hypothyroidism), 부갑상선기능저하증(hypoparathyroidism), 갑상선염을 포함한 자가면역 내분비 질환(autoimmune endocrine disease), 예를 들어 자가면역성 갑상선염(autoimmune thyroiditis), 하시모토병(Hashimoto's disease), 만성 갑상선염(chronic thyroiditis)(하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis)), 또는 아급성 갑상선염(subacute thyroiditis), 자가면역성 갑상선 질환(autoimmune thyroid disease), 특발성 갑상선기능저하증(idiopathic hypothyroidism), 그레이브스병(Grave's disease), 다선 증후군(polyglandular syndrome), 예를 들어 자가면역 다선 증후군(autoimmune polyglandular syndrome)(또는 다선성 내분비병증 증후군(polyglandular endocrinopathy syndrome)), 램베르트-이튼 근무력 증후군(Lambert-Eaton myasthenic syndrome) 또는 이튼-램베르트 증후군(Eaton-Lambert syndrome)과 같은 신경학적 부종양 증후군(neurologic paraneoplastic syndrome)을 포함한 부종양 증후군(paraneoplastic syndrome), 강직 인간 증후군(stiff-man or stiff-person syndrome), 뇌척수염(encephalomyelitis), 예를 들어 알레르기성 뇌척수염(allergic encephalomyelitis) 또는 알레르기성 뇌척수염(encephalomyelitis allergica) 및 실험적 알레르기성 뇌척수염(experimental allergic encephalomyelitis)(EAE), 중증 근무력증(myasthenia gravis), 예를 들어 흉선종-관련 중증 근무력증(thymoma-associated myasthenia gravis), 소뇌 퇴화(cerebellar degeneration), 신경근 긴장증(neuromyotonia), 안구간대경련 또는 안구간대경련 근간대경련 증후군(opsoclonus or opsoclonus myoclonus syndrome)(OMS), 및 감각 신경병증(sensory neuropathy), 다초점 운동 신경병증(multifocal motor neuropathy), 시한 증후군(Shy's syndrome), 자가면역 간염(autoimmune hepatitis), 만성 간염(chronic hepatitis), 루프이드 간염(lupoid hepatitis), 거대 세포 간염(giant cell hepatitis), 만성 활동성 간염(chronic active hepatitis) 또는 자가면역 만성 활동성 간염(autoimmune chronic active hepatitis), 림프성 간질성 폐렴(lymphoid interstitial pneumonitis)(LIP), 폐쇄 세기관지염(bronchiolitis obliterans)(비이식) vs NSIP, 길랑-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 버거병(Berger's disease)(IgA 신병증), 특발성 IgA 신병증(idiopathic IgA nephropathy), 선형 IgA 피부병(linear IgA dermatosis), 급성 열성 호중구성 피부병(acute febrile neutrophilic dermatosis), 각막하 농포성 피부병(subcorneal pustular dermatosis), 일과성 가시세포분리 피부병(transient acantholytic dermatosis), 간경변증(cirrhosis), 예를 들어 원발성 담즙성 간경변증(primary biliary cirrhosis) 및 폐경변증(pneumonocirrhosis), 자가면역 장병증 증후군(autoimmune enteropathy syndrome), 셀리악병 또는 체강 질환(Celiac or Coeliac disease), 셀리악 스프루(celiac sprue)(글루텐 장병증(gluten enteropathy)), 난치성 스프루(refractory sprue), 특발성 스프루(idiopathic sprue), 한랭글로불린혈증(cryoglobulinemia), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis)(ALS; 루게릭병(Lou Gehrig's disease)), 관상 동맥 질환(coronary artery disease), 자가면역성 귀 질환(autoimmune ear disease), 예를 들어 자가면역성 내이 질환(autoimmune inner ear disease)(AIED), 자가면역성 난청(autoimmune hearing loss), 다발성 연골염(polychondritis), 예를 들어 난치성 또는 재발된 또는 재발성 다발성 연골염(refractory or relapsed or relapsing polychondritis), 폐포 단백증(pulmonary alveolar proteinosis), 코간증후군(Cogan's syndrome)/비매독성 간질성 각막염(nonsyphilitic interstitial keratitis), 벨 마비(Bell's palsy), 스위트병/증후군(Sweet's disease/syndrome), 자가면역 주사(rosacea autoimmune), 대상포진-관련 통증(zoster-associated pain), 아밀로이드증(amyloidosis), 비암성 림프구증가증(non-cancerous lymphocytosis), 단클론 B 세포 림프구증가증(monoclonal B cell lymphocytosis)(예를 들어 양성 단클론 감마글로불린병증(benign monoclonal gammopathy) 및 의미 불명 단클론 감마글로불린병증(monoclonal gammopathy of undetermined significance), MGUS)을 포함한 원발성 림프구증가증(primary lymphocytosis), 말초 신경병증(peripheral neuropathy), 부종양 증후군(paraneoplastic syndrome), 이온통로병증(channelopathies), 예를 들어 간질(epilepsy), 편두통(migraine), 부정맥(arrhythmia), 근육 장애(muscular disorder), 난청(deafness), 실명(blindness), 주기적 마비(periodic paralysis) 및 CNS의 이온통로병증, 자폐증(autism), 염증성 근병증(inflammatory myopathy), 국소 또는 분절 또는 국소 분절 사구체경화증(focal segmental glomerulosclerosis)(FSGS), 내분비 안병증(endocrine ophthalmopathy), 포도막망막염(uveoretinitis), 맥락막망막염(chorioretinitis), 자가면역 간 질환(autoimmune hepatological disorder), 섬유근육통(fibromyalgia), 다발성 내분비 부전(multiple endocrine failure), 슈미트 증후군(Schmidt's syndrome), 부신염(adrenalitis), 위점막 위축(gastric atrophy), 노인성 치매(presenile dementia), 탈수초성 질환(demyelinating disease), 예를 들어 자가면역성 탈수초성 질환(autoimmune demyelinating disease) 및 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy), 드레슬러 증후군(Dressler's syndrome), 대탈모증(alopecia areata), 전두탈모증(alopecia totalis), CREST 증후군(석회증(calcinosis), 레이노 현상(Raynaud's phenomenon), 식도 운동성 장애(esophageal dysmotility), 수지경화증 및 모세혈관 확장증(telangiectasia)), 남성 및 여성 자가면역 불임, 예를 들어 항-정자 항체(anti-spermatozoan antibody)로 인한 불임, 혼합 결합 조직 질환(mixed

connective tissue disease), 샤가스병(Chagas' disease), 류마티스 열(rheumatic fever), 재발성 낙태(recurrent abortion), 농부 폐(farmer's lung), 다형 홍반(erythema multiforme), 심절개술-후 증후군(post-cardiotomy syndrome), 쿠싱 증후군(Cushing's syndrome), 조류 애호가 폐(bird-fancier's lung), 알레르기성 육아종성 혈관염(allergic granulomatous angiitis), 양성 림프구성 혈관염(benign lymphocytic angiitis), 알포트 증후군(Alport's syndrome), 폐포염(alveolitis), 예를 들어 알레르기성 폐포염(allergic alveolitis) 및 섬유성 폐포염(fibrosing alveolitis), 간질성 폐질환(interstitial lung disease), 수혈 반응(transfusion reaction), 나병(leprosy), 말라리아(malaria), 기생충 질환(parasitic disease), 예를 들어 리슈만편모충증(leishmaniasis), 키파노소마증(kypanosomiasis), 주혈흡충증(schistosomiasis), 아스카라증(ascariasis), 아스페르길루스증(aspergillosis), 샘터 증후군(Sampter's syndrome), 캐플란 증후군(Caplan's syndrome), 뎅기 열(dengue), 심내막염(endocarditis), 심내막심근 섬유증(endomyocardial fibrosis), 미만성 간질성 폐 섬유증(diffuse interstitial pulmonary fibrosis), 간질성 폐 섬유증(interstitial lung fibrosis), 폐 섬유증(pulmonary fibrosis), 특발성 폐 섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis), 낭포성 섬유증(cystic fibrosis), 내안구염(endophthalmitis), 자구성 융기성 홍반(erythema elevatum et diutinum), 태아 적아구증(erythroblastosis fetalis), 호산구성 근막염(eosinophilic facitis), 술만 증후군(Shulman's syndrome), 펠티 증후군(Felty's syndrome), 플라리아증(flariasis), 모양체염(cyclitis), 예를 들어 만성 모양체염(chronic cyclitis), 비동시성 모양체염(heterochronic cyclitis), 홍채모양체염(iritocyclitis)(급성 또는 만성) 또는 푸치 모양체염(Fuch's cyclitis), 헤노흐-셴라인 자반병(Henoch-Schonlein purpura), 인간 면역 결핍 바이러스(human immunodeficiency virus, HIV) 감염, SCK), 후천성 면역 결핍 증후군(acquired immune deficiency syndrome)(AIDS), 에코바이러스 감염(echovirus infection), 패혈증(sepsis), 내독소혈증(endotoxemia), 췌장염(pancreatitis), 갑상선중독증(thyrotoxicosis), 파보바이러스 감염(parvovirus infection), 풍진 바이러스 감염(rubella virus infection), 예방접종-후 증후군(post-vaccination syndromes), 선천성 풍진 감염(congenital rubella infection), 엡스타인-바 바이러스 감염(Epstein-Barr virus infection), 볼거리(mumps), 에반 증후군(Evan's syndrome), 자가면역 생식선 부전(autoimmune gonadal failure), 시드남 무도병(Sydenham's chorea), 연쇄상구균 감염후 신장염(post-streptococcal nephritis), 폐쇄성 혈전성 혈관염(thromboangitis obliterans), 갑상선 중독증(thyrotoxicosis), 척수 매독(tabs dorsalis), 맥락막염(chorioiditis), 거대 세포 다발성 근육통(giant cell polymyalgia), 만성 과민성 폐렴(chronic hypersensitivity pneumonitis), 건성 각결막염(keratoconjunctivitis sicca), 유행성 각결막염(epidemic keratoconjunctivitis), 특발성 신증후군(idiopathic nephritic syndrome), 미세 변화 신병증(minimal change nephropathy), 양성 가족성 및 허혈-재관류 손상(benign familial and ischemia-reperfusion injury), 이식 장기 재관류(transplant organ reperfusion), 망막 자가면역(retinal autoimmunity), 관절 염증(joint inflammation), 기관지염(bronchitis), 만성 폐쇄성 기도/폐 질환(chronic obstructive airway/pulmonary disease), 규폐증(silicosis), 아프타(apthae), 아프타성 구내염(aphthous stomatitis), 동맥경화성 질환(arteriosclerotic disorder), 아스페르니오제네시스(asperniogenesis), 자가면역 용혈(autoimmune hemolysis), 뵈크 질환(Boeck's disease), 한랭글로불린혈증(cryoglobulinemia), 듀프이트렌 구축(Dupuytren's contracture), 내안구염(endophthalmia phacoanaphylactica), 알레르기 장염(enteritis allergica), 나성 결절성 홍반(erythema nodosum leprosum), 특발성 안면 마비(idiopathic facial paralysis), 만성 피로 증후군(chronic fatigue syndrome), 열성 류마티스(febris rheumatica), 함만-리치병(Hamman-Rich's disease), 감각 신경성 난청(sensoneural hearing loss), 발작성 헤모글로빈뇨증(haemoglobinuria paroxysmatica), 성선기능저하증(hypogonadism), 편발성 회장염(ileitis regionalis), 백혈구감소증(leucopenia), 단핵구 감염증(mononucleosis infectiosa), 횡단 척수염(traverse myelitis), 원발성 특발성 점액수종(primary idiopathic myxedema), 신증(nephrosis), 교감성 안염(ophthalmia sympathica), 육아종성 고환염(orchitis granulomatosa), 췌장염(pancreatitis), 급성 다발성 신경근염(polyradiculitis acuta), 괴저성 농피증(pyoderma gangrenosum), 드퀘르벵 갑상선염(Quervain's thyroiditis), 후천성 비장 위축(acquired splenic atrophy), 비-악성 흉선종(non-malignant thymoma), 백반증(vitiligo), 독성-쇼크 증후군(toxic-shock syndrome), 식중독(food poisoning), T 세포의 침윤을 수반한 병태, 백혈구-부착 결핍(leukocyte-adhesion deficiency), 사이토카인 및 T 림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연성 과민증과 관련된 면역 반응, 백혈구 혈구유출(leukocyte diapedesis)을 수반한 질환, 다발성 장기 손상 증후군(multiple organ injury syndrome), 항원-항체 복합체-매개 질환(antigen-antibody complex-mediated disease), 항사구체 기저막 질환(antiglomerular basement membrane disease), 알레르기성 신경염(allergic neuritis), 자가면역성 다발성 내분비병증(autoimmune polyendocrinopathies), 난소염(oophoritis), 원발성 점액부종(primary myxedema), 자가면역성 위축성 위염(autoimmune atrophic gastritis), 교감성 안염(sympathetic ophthalmia), 류머티즘 질환

(rheumatic disease), 혼합 결합 조직병(mixed connective tissue disease), 신증후군(nephrotic syndrome), 인슐린염(insulinitis), 다발성 내분비 부전(polyendocrine failure), 자가면역 다선 증후군 I형(autoimmune polyglandular syndrome type I), 성인-발병 특발성 부갑상선기능저하증(adult-onset idiopathic hypoparathyroidism)(AOIH), 심근병증, 예를 들어 확장성 심근병증(dilated cardiomyopathy), 후천성 수포성 표피박리증(epidermolysis bullosa acquisita)(EBA), 혈액소 침착증(hemochromatosis), 심근염(myocarditis), 신증후군(nephrotic syndrome), 원발성 경화성 담관염(primary sclerosing cholangitis), 화농성 또는 비화농성 부비동염(purulent or nonpurulent sinusitis), 급성 또는 만성 부비동염(acute or chronic sinusitis), 사골(ethmoid), 전두동염, 상악동염 또는 접협동염(frontal, maxillary, or sphenoid sinusitis), 호산구-관련 질환(eosinophil-related disorder), 예를 들어 호산구증가증(eosinophilia), 폐 침윤성 호산구증가증(pulmonary infiltration eosinophilia), 호산구증가증-근육통 증후군(eosinophilia-myalgia syndrome), 로플러 증후군(Löffler's syndrome), 만성 호산구성 폐렴(chronic eosinophilic pneumonia), 열대성 폐 호산구증가증(tropical pulmonary eosinophilia), 기관지폐렴 아스페르길루스증(bronchopneumonic aspergillosis), 아스페르길루스증(aspergilloma), 또는 호산구를 함유한 육아종(granulomas containing eosinophils), 아나필락시스(anaphylaxis), 혈청반응음성 척추관절염(seronegative spondyloarthritides), 다발성 내분비 자가면역 질환(polyendocrine autoimmune disease), 경화성 담관염(sclerosing cholangitis), 공막(sclera), 상공막(episclera), 만성 점막피부 칸디다증(chronic mucocutaneous candidiasis), 브루튼 증후군(Bruton's syndrome), 유아기 일과성 저감마글로불린혈증(transient hypogammaglobulinemia of infancy), 위스콧-알드리치 증후군(Wiskott-Aldrich syndrome), 모세혈관 확장성 실조증 증후군(ataxia telangiectasia syndrome), 혈관확장증(angiectasis), 콜라겐 질환과 관련된 자가면역 질환(autoimmune disorders associated with collagen disease), 류머티즘(rheumatism), 신경 질환(neurological disease), 림프절염(lymphadenitis), 혈압 반응 감소(reduction in blood pressure response), 혈관 기능 장애(vascular dysfunction), 조직 손상(tissue injury), 심혈관 허혈(cardiovascular ischemia), 통각과민증(hyperalgesia), 신장 허혈(renal ischemia), 뇌 허혈(cerebral ischemia) 및 혈관신생을 동반한 질환(disease accompanying vascularization), 알레르기 과민 장애(allergic hypersensitivity disorder), 사구체신염(glomerulonephritide), 재관류 손상(reperfusion injury), 허혈성 재관류 장애(ischemic re-perfusion disorder), 심근 또는 기타 조직의 재관류 손상, 림프종 기관지염(lymphomatous tracheobronchitis), 염증성 피부병(inflammatory dermatoses), 급성 염증성 성분을 동반한 피부병(dermatoses with acute inflammatory components), 다발성 장기 부전(multiple organ failure), 수포성 질환(bullous disease), 신장 피질 괴사(renal cortical necrosis), 급성 화농성 뇌수막염(acute purulent meningitis) 또는 기타 중추 신경계 염증성 질환, 안구 및 안와 염증성 질환(ocular and orbital inflammatory disorder), 과립구 수혈-관련 증후군(granulocyte transfusion-associated syndrome), 사이토카인-유도된 독성(cytokine-induced toxicity), 기면증(narcolepsy), 급성 중증 염증(acute serious inflammation), 만성 난치성 염증(chronic intractable inflammation), 신우염(pyelitis), 동맥 내막 비대증(endarterial hyperplasia), 소화성 궤양(peptic ulcer), 판막염(valvulitis), 및 자궁내막증(endometriosis)이 고려된다.

- [0089] 일부 실시양태에서, 상기 질환은 이식편대숙주병(graft-versus-host disease, GVHD)과 같은 이식-관련 질환이다. 한 실시양태에 따르면, GVHD는 급성 GVHD이다. 또 다른 실시양태에 따르면, GVHD는 만성 GVHD이다.
- [0090] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 상기한 바와 같은 질환 또는 병태를 치료하기 위해 폴리뉴클레오티드를 사용하는 방법을 제공하고, 여기서 폴리뉴클레오티드는 본원에 기재된 바와 같은 항-NKG2D 항체를 암호화한다.
- [0091] 본원에 사용된 용어 "포함하다(comprise)", "포함한다(comprises)", "포함하는(comprising)", "포함한다(includes)", "포함하는(including)", "갖는(having)" 및 이들의 활용형은 "포함하지만 이에 제한되지 않는(including but not limited to)"을 의미한다.
- [0092] 본원에 사용된 단수형 "a", "an" 및 "the"는 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수 참조대상을 포함한다. 예를 들어, 용어 "항체(an antibody)" 또는 "적어도 하나의 항체(at least one antibody)"는 복수의 항체를 포함할 수 있다.
- [0093] 본 출원 전반에 걸쳐, 본 개시내용의 다양한 실시양태들이 범위 형식으로 제시될 수 있다. 범위 형식의 설명은 단지 편의와 간결성을 위한 것이며, 항-NKG2D 항체 및 이의 사용의 범위에 대한 융통성 없는 제한으로 해석되어서는 안 된다. 따라서, 범위에 대한 설명은 그 범위 내의 개별적인 숫자 값 뿐만 아니라 가능한 모든 하위범위들을 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 1 내지 6과 같은 범위에 대한 설명은, 예를 들어, 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등과 같은 하위범위 뿐만 아니라 그 범위 내의

개별 숫자들, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 및 6을 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 이는 범위의 폭에 관계없이 적용된다.

[0094] 숫자 범위가 본원에 표시될 때마다, 이는 표시된 범위 내의 임의의 인용된 숫자(분수 또는 정수)를 포함하는 것을 의미한다. 제1 표시 숫자와 제2 표시 숫자의 "범위/사이의 범위(ranging/ranges between)", 및 제1 표시 숫자로부터 제2 표시 숫자까지의 "범위"는 본원에서 상호 교환적으로 사용되며, 제1 및 제2 표시된 숫자, 및 그 사이의 모든 분수 및 정수 숫자를 포함하는 것을 의미한다.

[0095] 값들이 근사치로서 표현될 때, 선행어 "약(about)"의 사용에 의해, 특정 값이 또 다른 실시양태를 형성하는 것으로 이해된다. 모든 범위는 포괄적이며 조합 가능하다. 한 실시양태에서, 용어 "약"은 표시된 숫자 또는 숫자의 범위로부터 0.1-5% 사이의 편차를 지칭한다. 또 다른 실시양태에서, 용어 "약"은 표시된 숫자 또는 숫자의 범위로부터 1 내지 10% 사이의 편차를 지칭한다. 또 다른 실시양태에서, 용어 "약"은 표시된 숫자 또는 숫자의 범위로부터 최대 20%의 편차를 지칭한다. 한 실시양태에서, 용어 "약"은 표시된 숫자 또는 숫자의 범위로부터 $\pm 10\%$ 의 편차를 지칭한다. 또 다른 실시양태에서, 용어 "약"은 표시된 숫자 또는 숫자의 범위로부터 $\pm 5\%$ 의 편차를 지칭한다.

[0096] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및/또는 과학적 용어는 항-NKG2D 항체 및 이의 용도가 속하는 기술 분야의 통상의 숙련가에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 재료가 항-NKG2D 항체 및 이의 용도의 실시양태의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 방법 및/또는 재료가 이하에서 설명된다. 충돌하는 경우, 정의를 포함한 특허 명세서가 우선한다. 또한, 재료, 방법 및 실시예는 예시일 뿐이며 반드시 제한하려는 것은 아니다. 본원에 언급된 각 참고 문헌 또는 다른 인용은 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0097] 본원에 제시된 설명에서, 항-NKG2D 항체 또는 이의 변이를 제조하고 사용하는 각각의 단계가 기재된다. 본 설명은 제한하려는 것이 아니며, 성분들의 변화, 단계들의 순서, 및 다른 변형들은 본 발명의 항-NKG2D 항체 및 이의 용도의 범위 내에 있는 것으로 이해될 것이다.

[0098] 명확성을 위해, 별개의 실시양태의 맥락에서 기재되는 항-NKG2D 항체 및 이의 용도의 특정 특징이 또한 단일 실시양태에서 조합하여 제공될 수 있는 것으로 이해된다. 반대로, 간결함을 위해, 단일 실시양태의 맥락에서 기재되는 항-NKG2D 항체 및 이의 용도의 다양한 특징은 또한 별도로 또는 임의의 적절한 하위조합으로 또는 항-NKG2D 항체 및 이의 용도의 임의의 다른 기재된 실시양태에 적합한 것으로 제공될 수 있다. 다양한 실시양태의 맥락에서 기재되는 특정 특징들은, 실시양태가 이러한 요소들 없이 동작할 수 없는 한, 이러한 실시양태의 본질적인 특징인 것으로 간주되어서는 안 된다.

[0099] 상기 본원에 기술된 바와 같고 아래의 청구항 섹션에 청구된 바와 같은 본 발명의 항-NKG2D 항체의 다양한 실시양태 및 측면들은 하기 실시예에서 실험적으로 뒷받침된다.

[0100] 실시예

[0101] 실시예 1

[0102] NKG2D에 대한 마우스 하이브리도마 단클론 항체 생성

[0103] **목적:** 마우스 하이브리도마 기술을 사용하여 NKG2D에 대한 단클론 항체를 생성하기 위한.

[0104] **방법:** 마우스 하이브리도마 항-NKG2D 항체의 생성. 항-NKG2D 항체는 Balb/c 및 SJL 마우스를 NKG2D-ECD-hFc(인간 Fc에 융합된 NKG2D의 세포외 도메인)로 면역화함으로써 개발되었다. 동물을 채혈하고 ELISA에 의해 항체 역가를 시험하였다(시험-채혈 1 및 시험-채혈 -2). 높은 역가를 갖는 면역화된 마우스로부터의 비장 세포를 분리하고 표준 융합 절차에 의해 융합하여 특이적 항체를 생산하는 하이브리도마를 생성하였다. 이들 세포의 풀에 의해 생성된 항체를 함유하는 상청액을 인간 Fc에 융합된 NKG2D-ECD 단백질(NKG2D-ECD-hFc)과의 반응성에 대해 ELISA에 의해 1차 스크리닝하고 NKG2D 과발현 세포와의 반응성에 대해 FACS에 의해 2차 스크리닝하였다. 스크리닝을 위해, FACS에 의한 표적 항체 활성화에 대해 다수의 하이브리도마 상청액을 시험하였다.

[0105] 표적 과발현 세포를 96웰 환저 폴리스티렌 플레이트에 넣고 하이브리도마 배양물로부터의 깔끔한 상청액과 함께 배양하였다. 그후 세포를 세척하고, 형광 표지된 2차 항체와 함께 배양하였다. 음성 참조로서, 비표적 단백질 유전자 형질감염된 부모 세포를 사용하여 상청액을 검사하여(음성으로 판명됨) 반응성 항체가 표적 단백질을 특이적으로 인식하는지를 확인하였다. 양성 풀을 확인하고 제한 희석에 의해 클로닝하였다. 1-2회 융합 후, 특

이 항체를 생산하는 양성 클론을 확인하고 ELISA 및 FACS에 의해 선택하였다.

[0106] **결과:** 동물 면역화 후, 혈청을 ELISA 및 FACS에 의해 재조합 인간 NKG2D-ECD-Fc(인간 Fc에 융합된 NKG2D의 세포외 도메인)에의 결합에 대해 시험하였다(도 1). 도 1a에 나타난 바와 같이, Balb/c 동물 또는 SJL 동물의 시험 채혈(TB) 1온 - 다양한 희석액에서 채혈-전(PB) 샘플과 비교하여 ELISA에 의해 인간 NKG2D-ECD-Fc에 대해 양성 역가를 보였다. 도 1b는 CHO 세포에서 과발현된 인간-NKG2D/Dap10 및 CHO 세포에서 과발현된 cyno-NKG2D/Dap10에 대한 시험 채혈 1 역가의 연속 희석을 입증하는 반면 CHO 모세포에서는 반응성이 없었다. SJL 마우스는 NKG2D/Dap10 CHO 세포에 대한 결합을 시험했을 때 Balb/c 마우스에 비해 더 강한 면역 반응을 보였다. 유사한 관찰(데이터는 표시되지 않음)을 가진 시험-채혈 2에 이어, 동물 SJL#8748 및 #8749를 융합을 위해 선택하였다. 1차 스크린은 재조합 인간 NKG2D-ECD-Fc에 대한 ELISA에 의한 양성 클론을 식별하기 위해 전기융합 후 수득되었으며, 인간 Fc가 음성 대조군으로 작용하였다. 교차 반응성 클론을 식별하기 위해 인간-NKG2D/Dap10 또는 cyno-NKG2D/Dap10을 발현하는 CHO 세포에 대해 2차 스크린을 수득하였으며, CHO 부모 세포가 음성 대조군으로 작용하였다. 1차 스크린에서, 2차 스크리닝을 위해 103개의 클론을 선택하였다. 2차 스크린에서는 추가로 서브클로닝된 클론이 밝혀졌으며, 최종적으로 18개의 클론에 대해 200ml 발현 및 단백질 A 정제를 진행하였다. 도 2는 선택한 클론의 정제를 나타낸다.

[0107] **요약:** 인간 NKG2D 단백질에 대한 마우스 단클론 하이브리도마 생성은 ELISA 및 FACS에 의한 1차 및 2차 스크리닝 후 인간 및 cyno NKG2D에 대한 특이적 결합체로 확인된 20개의 클론을 생성하였다. 이들 클론을 추가로 발현, 정제 및 분석하고, 결합 효능을 특성화하였다.

[0108] 실시예 2

[0109] 인간-NKG2D에 대한 마우스 하이브리도마 단클론 항체의 결합 특성화

[0110] **목적:** 결합에 의한 NKG2D에 대한 마우스 단클론 Ab를 발현, 정제 및 특성화하기 위함.

[0111] **방법:** 하이브리도마 클론의 발현 및 정제. 간단히 말해서, $\sim 0.25-0.5 \times 10^7$ 개 세포를 100mL 항체 생산 배지(하이브리도마-SFM + 2.5% FBS(Low IgG))로 미리 충전된 롤러 병에 접종하고, 37°C에서 14-16일 동안 300r/h 속도로 롤러 배양 장치에서 CO2 조건 없이 배양하였다. 그후, 세포 현탁액을 350mL 원심분리기 병에 옮기고 3,220g, 4°C에서 15분 동안 원심분리한 다음 0.45 μ m 여과 캡슐로 여과하여 세포 및 세포 파편을 제거하였다. 그후 배양 상청액을 친화성 정제를 위해 사전-평형화된 단백질 A 친화성 컬럼 상에 부하하였다. 항체를 5CV(컬럼 용적)의 용출 완충액(0.1M 시트르산나트륨 완충액, pH 3.0)으로 컬럼에서 용출시키고, Trizma 염기로 최종 pH 7.0으로 중화시킨 다음 2-8°C에서 밤새 100배 용출 용적의 PBS, pH 7.4에 대해 투석하고, 생물 안전 캐비닛에서 0.22 μ m 주사기 필터로 멸균 여과하였다. 그후 정제된 항체를 분취하여 사용시까지 -20°C 또는 -80°C에서 저장하였다.

[0112] **표적 단백질에 대한 ELISA 결합.** 간단히 말해서, 표적 단백질 NKG2D-ECD-Fc를 0.7 μ g/mL의 최종 농도로 PBS에 희석시키고 ELISA 플레이트(cat: 9018, 공급업체 Corning) 상에 100 μ L/웰을 코팅한다. O/N, 4°C에서 배양한다. 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 PBST 중의 1% BSA 250 μ L로 차단하고, Biotek(Elx 405)을 사용하여 PBST로 4회 세척한다. 모든 Ab를 연속 희석하고, 100 μ L/웰 희석된 항체를 플레이트에 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 배양하고, PBST로 4회 세척한다. 100 μ L/웰 염소 항-마우스 IgG(Fab 특이적)-HRP, (SIGMA A3682) 1:10000을 첨가하고, 37°C에서 0.5시간 동안 배양하였다. PBST로 4회 세척한 후, 100 μ L/웰의 TMB 기질을 첨가하고 실온에서 5분 동안 배양하였다. 반응을 종료하기 위해 100 μ L/웰의 1N HCl을 첨가하였다. 플레이트를 450nm 파장에서 ELISA 플레이트 판독기를 사용하여 판독하였다(기기 SpectraMax M5e). 데이터 분석은 비선형 회귀(곡선 적합)를 사용함으로써 Graphpad prism 5 소프트웨어를 사용하여 수행하였다: 로그(효능제) vs. 반응, 효능제는 항체 농도(nM)이고, 반응은 OD 값이다.

[0113] **세포에 대한 FACS 결합.** 간단히 말해서, 현탁 배양된 세포를 직접 수확하거나 TrypLE 발현 효소(cat: 12604-013, 공급업체 Life technologies)가 수확 전에 부착 세포를 소화시킨다. 1000rpm에서 5분 동안 원심분리하고 상청액을 버린다. 세포를 FACS 완충액(PBS 중의 2% FBS)에 2×10^6 /mL의 농도로 현탁시키고 플레이트에 100 μ L/웰의 세포 현탁액을 첨가한다(cat#3799, 공급업체 Corning). 플레이트를 2000rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액은 버렸다. 그후 100 μ L/웰의 Tribody 세트 항체(400nM 시작, 4배 희석, 0점을 포함한 8점)에 세포를 재현탁시키고 4°C에서 60분 동안 플레이트를 배양하였다. 플레이트를 2000rpm, 4°C에서 5분 동안 원심분리하고 상청액은 버렸다. 그후 170 μ L FACS 완충액으로 세포를 3회 세척하고, 2차 항체를 사용하여 100 μ L/웰로 재현탁시키고 어두운 곳에서 4°C에서 30분 동안 배양하였다. 플레이트를 2000rpm, 4°C에서 5분 동안 원심분리하고 상청

액은 버렸다. 그후 FACS 완충액으로 세포를 3회 세척하고 FACS verse로 분석하였다.

[0114] *ELISA에 의한 에피토프 비닝*. 간단히 말해서, 표적 항체를 1 µg/ml의 최종 농도로 PBS에 희석하고 ELISA 플레이트(cat: 9018, 공급업체 Corning) 상에 100 µL/웰을 코팅한다. 0/N, 4℃에서 배양한다. 37℃에서 1시간 동안 PBST 중의 1% BSA 250 µL로 차단한 후, 일련의 농도의 비오틴화 항원 hNKG2D-ECD-Fc를 첨가한다. 37℃에서 1.5 시간 동안 배양한 후 PBST로 플레이트를 3회 세척한 다음 각 웰에 100 µL의 스트렙타비딘-HRP(cat: S5512, 공급업체 Sigma, 1:10000)를 첨가한다. 37℃에서 1시간 동안 배양한 후, PBST로 플레이트를 4회 세척한다. 100 µL/웰의 TMB 기질을 첨가하고 실온에서 5분 동안 배양하고, 100 µL/웰의 1N HCL로 반응을 종료하였다. 플레이트를 450nm 파장에서 ELISA 플레이트 판독기를 사용하여 판독하였다. Graphpad prism 5 소프트웨어를 사용하여 항원의 EC80을 찾는다.

[0115] 다음은 mAb 코팅된 플레이트에 결합하기 전에 단백질과 혼합된 mAb의 연속 희석 설정에 대해 설명한다. 항-인간 NKG2D의 표적 항체를 1 µg/mL의 최종 농도로 PBS에 희석시키고 ELISA 플레이트(cat: 9018, 공급업체 Corning)에 100 µL/웰을 코팅한다. 0/N, 4℃에서 배양한다. 37℃에서 1시간 동안 PBST 중의 1% BSA 250 µL로 차단한 후, EC80의 비오틴화 항원(2배 제제, 50 µL 첨가)과 경쟁 항체(40-80배 제제, 50 µL 첨가)의 혼합물을 첨가한다. 37℃에서 1.5시간 동안 배양한 후 PBST로 플레이트를 3회 세척한 다음 각 웰에 100 µL의 스트렙타비딘-HRP(cat: S5512, 공급업체 Sigma, 1:10000)를 첨가한다. 37℃에서 1시간 동안 배양한 후, PBST로 플레이트를 4회 세척한다. 100 µL/웰의 TMB 기질을 첨가하고 실온에서 5분 동안 배양한다. 100 µL/웰의 1N HCL로 반응을 종료한다. 플레이트를 450nm 파장에서 ELISA 플레이트 판독기를 사용하여 판독하였다.

[0116] **결과:** 도 3은 ELISA에 의한 NKG2D-ECD-Fc 항원에 대한 정제된 mAb의 결합을 나타낸다. mAb 019를 제외하고, 이들 항체들 사이에서 0.03nM 내지 0.6nM의 EC80 값 범위가 관찰되었다.

[0117] **도 4**는 건강한 기증자의 PBMC로부터 정제된 1차 NK 세포 뿐만 아니라 인간/cyno NKG2D/Dap10을 과발현하는 CHO에 대한 선택된 정제된 mAb의 FACS 결합을 나타낸다. **도 4**에 나타낸 바와 같이, 정제된 모든 mAb는 다양한 범위의 친화도 및 효능으로 CHOK1-hNKG2D, CHOK1-cNKG2D 및 일차 NK 세포에 대해 결합 활성을 보였다.

[0118] 인간 NKG2D/Dap10을 과발현하는 CHO 세포에 대한 ~0.4-3.8nM 결합의 EC50 값 범위가 관찰되었다(**도 4a**). 유사하게, cynoNKG2D/Dap10을 과발현하는 CHO 세포에 대한 ~0.7-8nM 결합의 EC50 값 범위가 관찰되었다(**도 4b**). 1차 NK 세포에 대한 결합을 위해 시험된 두 가지 농도는 다양한 MFI로 모든 mAb에서 용량 의존적 결합을 보였다(**도 4c**). CHO 부모 세포에서는 결합이 관찰되지 않았다(데이터는 표시되지 않음).

[0119] **도 5**는 ELISA에 의해 수행된 에피토프 비닝 분석을 요약한 것이다. ELISA 분석은 다음과 같이 이들의 에피토프 빈에서 분화되는 4개의 그룹을 제안한다: 그룹 1(정사각형 연속선)은 mAb001, 002, 003, 004, 005, 006, 008, 011, 013, 015, 017, 018, 020을 모은다. 그룹 2(원 연속선)는 mAb007, 010, 014를 모은다. 그룹 3(정사각형 파선)은 mAb012, 016, 019를 모은다. 그룹 4(원 파선)는 mAb009를 모은다. 양성 대조군 Ab는 모든 그룹과는 상이하다.

[0120] **요약:** 인간 NKG2D에 대한 단클론 항체(mAb)는 하이브리도마 기술을 사용하여 성공적으로 생성되었다. 20개의 클론을 확인하고 특성화하였다. 선택된 mAb를 추가로 발현하고 하이브리도마 클론에 의해 생산하였다. mAb를 추가로 정제하고, MS(Mass-Spec)로 분석하고, NKG2D-ECD-Fc 항원에 대한 ELISA 결합 뿐만 아니라 인간 및 cyno NKG2D/Dap10을 발현하는 세포에 대한 FACS 결합에 대해 특성화하고, 마지막으로 ELISA에 의한 에피토프 비닝에 대해 시험하여 4개의 빈 그룹을 생성하였다.

[0121] **실시예 3**

[0122] **마우스 하이브리도마 단클론 항체의 시험관내 기능적 평가**

[0123] **목적:** CD107a 및 IFNγ 상향조절에 의한, 1차 NK 세포에 대한 항 NKG2D mAb 결합시 *시험관내* NK 세포 활성화를 평가하기 위함.

[0124] **방법:** 간단히 말해서 EasySep™ 인간 NK 세포 분리 키트(STEMCELL, Cat-17955)를 사용하여 건강한 기증자로부터 수집된 PBMC로부터 NK 세포를 분리한다. 10%FBS 및 100ng/mL hIL-2(R&D SYSTEMS, cat-219-IL)를 함유한 RPMI 1640(Gibco, Cat-A10491-01)으로 NK 세포를 2일 동안 현탁시킨다. 항체를 96웰 플레이트(Cat-3599, Corning)에 코팅하여 이를 가교결합시킨 다음 4℃에서 밤새 배양한다. 코팅된 플레이트로부터 상청액을 제거한 다음 200 µL PBS로 플레이트를 두 번 세척한다. 자극된 NK세포를 500g에서 5분간 원심분리하여 수확하고, NK 세포 자극 배지(RPMI 1640 + 10%FBS + 20 ng/mL hIL-2)로 세포 농도를 5×10^5 /mL로 조절한 다음 200 µL/웰 NK 세포를 Ab 코팅

된 플레이트에 첨가한다. APC-항-CD107a(Biolegend, cat: 328620) 및 대조군(0.5 µL/test)을 각각 NK 세포에 별도로 첨가한다. 플레이트를 가습된 5% CO₂ 대기에서 37°C에서 4시간 동안 배양한다. IFN-감마 측정을 위한 상청액 및 CD107a 측정을 위한 세포를 각각 수집한다. CD107a 측정: 세포를 FACS 플레이트(Cat-3799, Corning)로 옮긴다. 200 µL FACS 완충액(PBS 중의 2% FBS)으로 세포를 두 번 세척한다. APC-항-CD107a, FITC-항-CD3 (Invitrogen, cat: 17-0037-41) 및 BV421-항-CD56 (BioLegend, cat: 318328) 및 대조군을 각각 NK 세포 현탁액에 첨가하고, 4°C에서 1시간 동안 세포를 배양한다. 200 µL FACS 완충액으로 2x 세척한 후, 100 µL 냉각 PBS에 셀을 재현탁시킨다. 세포를 어둡게 유지하고 FACS(FACS Canto II, BD Biosciences) 분석을 위해 세포를 제출한다. IFN-감마 측정: IFN-감마는 인간 INF 감마 DuoSet ELISA 키트(R&D, DY285)의 프로토콜에 따라 측정하였다. 간단히 말해서, PBS 중의 작동 농도의 포획 항체를 96웰 마이크로플레이트(Cat-9018, Corning)에 코팅하고 RT에서 밤새 배양한다. 3x 세척 후, 300 µL의 시약 희석제(PBS 중의 1% BSA)로 플레이트를 RT에서 적어도 1시간 동안 차단한다. 3x 세척 후, 시약 희석제 중의 적절한 희석을 갖는 100 µL 샘플 또는 표준물질을 첨가하고, RT에서 2시간 동안 배양한다. 3회 세척 후, 희석된 검출 항체 100 µL를 첨가하고, RT에서 2시간 동안 배양한다. 3회 세척 후, 스트렙타비딘-HRP B의 작업 희석액 100 µL를 첨가하고 RT에서 20분 동안 배양한다. 3회 세척 후, 100 µL의 기질 용액을 첨가하고 RT에서 20분 동안 배양한다. 50 µL의 정지 용액을 첨가한다. 마이크로플레이트 판독기(Molecular Device, cat: Spectra Max M5e)를 사용하여 OD50을 판독한다.

[0125] **결과:** 도 6은 CD107a 활성화 마커의 측정에 의해 또는 IFN-감마 분비에 의해 결정된 바와 같은 정제된 항 NKG2D mAb(10nM 또는 100nM)의 결합시 NK 세포의 활성화를 나타낸다. 분석 타당성은 IM-1060 양성 대조군 Tribody 및 IM-1091음성 대조군 Tribody에 의해 결정된 창에 의해 확인되었다. 용량 의존적 CD107a⁺NK 세포 측정은 마우스 IgG 대조군과 비교하여 FACS에 의한 mAb 결합시 측정되었다(도 6a). 시험된 mAb 중 10개는 ELISA에 의해 상청액에서 측정된 IFN-감마 분비를 자극하였다(도 6b).

[0126] **요약:** 20개의 정제된 항-NKG2D mAb를 결합 및 활성화에 의해 특성화하였다. Ab를 이들의 결합 활성 뿐만 아니라 NK 활성화 활성을 기준으로 순위를 매겼다. 각 빈에서 하나씩 4개의 mAb(mAb 001, mAb009, mAb010 및 mAb019)를 Mass-Spec으로 확인하고(데이터는 표시하지 않음), Tribody 작제물에 도입하고 평가하기 위해 표시된 이들의 특성에 기반하여 추가로 선택하였다.

[0127] **실시예 4**

[0128] **마우스 하이브리도마 단클론 항체에 의한 NKG2D-MICA 상호작용 차단 실험관내 평가**

[0129] **목적:** 수용체-리간드 NKG2D-MICA 상호작용에 대한 정제된 mAb의 차단 활성을 실험관내 평가하기 위함.

[0130] **방법:** 경쟁 ELISA 기반 RBA: 표적 단백질(NKG2D-ECD-hFc, 로트: 20200413002, CP)을 1 µg/ml의 최종 농도로 PBS에 희석하고 ELISA 플레이트(cat: 9018, 공급업체 Corning)에 100 µL/ 웰을 코팅한다. 0/N, 4°C에서 배양한다. PBST 중의 1% BSA 250 µL로 37°C에서 1시간 동안 차단한 후, 300nM에서 1:5로 희석한 Mab의 연속 농도(600nM 제제, 50 µL 첨가) 및 EC80의 인간 MICA-His(2배 제제, 50 µL 첨가)의 혼합물을 첨가한다. 37°C에서 1.5시간 동안 배양한 후 PBST로 플레이트를 3회 세척한 다음 각 웰에 100 µL의 항-His-HRP(1:5000)를 첨가한다. 37°C에서 1시간 동안 배양한 후, PBST로 플레이트를 4회 세척한다. 100 µL/ 웰의 TMB 기질을 첨가하고 실온에서 5분 동안 배양한다. 100 µL/ 웰의 1N HCl로 반응을 종료한다. 플레이트를 450nm 파장에서 ELISA 플레이트 판독기를 사용하여 판독하였다.

[0131] **결과:** mAb를 NKG2D-MICA 상호작용을 차단하는 능력에 대해 분석하였다. 도 7에 나타낸 바와 같이, IC50 값으로 입증된 억제율의 범위는 1.4nM-8nM인 반면, mIgG1 음성 대조군에서는 억제 활성이 관찰되지 않았다.

[0132] **결론:** 시험된 모든 mAb는 NKG2A-MICA 수용체-리간드 상호작용에 대한 차단 활성을 나타내었다.

[0133] **실시예 5**

[0134] **인간-NKG2D에 대한 마우스 하이브리도마 클론으로부터 유래된 항 인간 NKG2D를 사용한 키메라 Tribody의 재조합 생산**

[0135] **목적:** 도 8a-b에 각각 예시되고 전문이 본원에 포함된 제WO 2020/225805호에 이전에 기재된 바와 같이, 선택된 항-인간 NKG2D mAb(mAb 001, mAb009, mAb010 및 mAb019)의 마우스 CDR 서열을 Tribody/ProTribody 작제물에 도입하여 항 CD3 Fab, 항 NKG2D mAb의 단일쇄 및 항 NKG2D의 단일쇄로 구성된 삼중특이 키메라 Ab를 생성한다.

[0136] **방법:** 하이브리도마 시퀀싱. 간단히 말해서, 선택된 양성 단클론 하이브리도마 세포(~1×10⁷)를 NucleoZOL 시약

(MACHEREY-NAGEL, 740404.200)의 프로토콜에 따라 전체 RNA 단리를 위해 수집하였다. SMARTer® RACE 5'/3'의 키트 매뉴얼에 따라 cDNA 합성을 위해 전체 RNA를 사용하였고, 제1 가닥 cDNA의 합성을 위해 무작위 프라이머를 사용하였다. PCR로 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 증폭시키기 위해, 합성 cDNA를 주형으로 사용하고, 마우스 Ig-프라이머 세트(Novagen, 69831-3)로부터의 프라이머를 유전자-특이적 프라이머(GSP)로 사용하였다. 적절한 크기를 갖는 PCR 산물을 수집하고 키트의 매뉴얼에 따라 NucleoSpin® Gel 및 PCR Clean-up(Macherey-Nagel, 740609.250)으로 정제하고, TA 클로닝 및 시퀀싱에 적용하였다. NKG2D-mAb의 중쇄 및 경쇄 가변 영역(VH 및 VL)을 아래 기재된 바와 같이 Tribody 작제물로 클로닝한 다음 ELISA 및 FACS에 의해 NKG2D에 대한 결합에 대해 특성화하였다.

[0137] 유전자 합성 및 플라스미드 작제. 삼중특이 항체의 중쇄(HC) 및 경쇄(LC)에 대한 코딩 서열을 DNA 합성 및 PCR에 의해 생성하고, 이어서 포유류 세포 시스템에서 단백질 발현을 위해 pCDNA3.4-기반 플라스미드(Invitrogen)로 서브클로닝하였다. 마지막으로, 발현 벡터의 유전자 서열을 DNA 시퀀싱에 의해 확인하였다.

[0138] 삼중특이 항체 작제물의 발현. Tribody/Pro-Tribody 항체의 일시적 발현은 PEI 방법을 사용하여 쌍을 이룬 HC 및 LC 작제물(Tribody 형식의 경우 1:1 HC/LC 비율 또는 ProTribody 형식의 경우 2.5:1 HC/LC 비율)을 CHO 세포로 공동-형질감염시켜 수행하였다. 간단하게 말해서, 3L 진탕 플라스크에 약 5.5×10^6 /ml의 CHO 세포 1L를 숙주로 사용하고, 100ml OptiMEM 배지(Invitrogen) 중의 총 DNA 1mg과 PEI 4mg의 혼합물을 세포에 첨가하고 부드럽게 혼합함으로써 형질감염을 개시하였다. 그후 세포를 120rpm, 37°C 및 8% CO₂에서 배양기 진탕기에서 8-10일 동안 배양하였다. 펩톤 및 글루코스의 공급은 세포 밀도 및 생존력에 따라 24시간 후 및 그 후 2-3일마다 수행하였다. 세포 배양은 세포 생존율이 <80%로 감소한 8-10일째에 종료하였다. 조정 배지를 단백질 정제를 위해 수확하였다.

[0139] 삼중특이 항체 작제물의 정제. 친화성 크로마토그래피 및 SEC에 의한 단백질 정제는 AKTA 순수 기기(GE Lifesciences)를 사용하여 수행하였다. Tribody의 친화성 포획은 수확한 상청액을 CaptureSelect™ CH1-XL 친화성 매트릭스(Thermo Scientific)의 컬럼에 통과시켜 달성하였다. 완충액 A(25mM Tris, 150mM NaCl, 5mM EDTA, pH 7.5)로 컬럼을 세척한 후, 단백질을 완충액 B(50mM 시트르산나트륨, 150mM NaCl, pH 3.0)로 용출시키고, 즉시 1/6 용적의 완충액 D(1M 아르기닌, 400mM 숙신산, pH 9.0)로 중화시켰다. 그후 친화성 정제된 단백질을 Amicon 30kD 농축기(Merck Millipore)를 사용하여 5-10mg/ml로 농축하고, SEC 완충액(200mM 아르기닌, 137mM 숙신산, 0.05%Tween-80, 150mM NaCl, pH5.0)로 평형화된 Superdex200 컬럼(GE Lifesciences)에서 SEC 정제를 실시하였다. 표적 Tribody 분획을 수집한 다음 5% 트레할로스(146mM)를 첨가하였다. 표적 Tribody를 SDS-PAGE 및 HPLC-SEC를 사용하여 분석하였다.

[0140] 삼중특이 항체 작제물의 SDS-PAGE 분석. tribody의 SDS-PAGE 분석은 예비-주조된 폴리아크릴아미드 겔에서 환원 및 비환원 조건하에 수행하였다. 간단히 말해서, 2ug Tribody 샘플을 70mM DTT를 첨가하거나 첨가하지 않고서 NuPAGE™ LDS 샘플 완충액(thermofisher-NP0008)에 의해 혼합하였다. 25°C 또는 90°C에서 10분 동안 배양한 후, 샘플 및 염색되지 않은 단백질 표준물질(BIO RAD-161-0363)을 겔에 부하하였다. 전기영동은 120V의 일정한 전압에서 1× 트리스-글리신-SDS 실행 완충액을 사용하여 수행하였다. 전기영동 후, 쿠마시 블루(Coomassie blue)를 사용하여 겔을 밤새 염색하고 탈염색 용액(10% 아세트산, 40% 메탄올 및 50% 물)으로 탈염색하였다. 탈염색된 겔을 겔 이미징 시스템(Tanon-2500R)으로 스캔하였다.

[0141] 삼중특이 항체 작제물의 SEC-HPLC 분석. 분석적 SEC-HPLC는 Shimadzu LC-10 HPLC 기기(Shimadzu Corp.)를 사용하여 수행하였다. 1mg/ml의 20 µl 샘플을 Superdex 200 Increase 5/150GL 컬럼(GE Lifesciences)에 부하한다. 이동상은 0.3ml/min, 15min의 유속으로 2*PBS였다.

[0142] Tribody 작제물의 LC-MS 분석. Tribody를 실온에서 ACQUITY UPLC BEH200 Å, SEC 컬럼(Waters 1.7 µm, 4.6×300mm)으로 분리하고 ESI-MS(Thermo, MS-B20-03)로 검출하였다. 이동상은 0.1% 포름산: 아세토니트릴(75:25, v/v)이고 유속은 0.2mL/분이었다. 질량 분석법은 양이온에서 수행하였다. 질량 분석법의 다른 매개변수는 다음과 같았다: 분해능 17500, 스캔 범위 1000-5000m/z, 소스 내 CID 60eV, 피복 가스 유량 30L/min, 모세관 온도 350°C, 분무 전압 2.5KV.

[0143] **결과:** 선택된 각 mAb 클론의 두 가지 변이체(IM-1244/5로 대표되는 mAb001, IM-1246/7로 대표되는 mAb009, IM-1248/9로 대표되는 mAb010 및 IM-1250/1로 대표되는 mAb019)를 나타내는 8개의 Tribody 작제물은, 조절 도메인의 존재(도 8a) 또는 부재(도 8b) 하에 도 8에 예시된 바와 같이, 항 CD3 Fab, 항 NKG2D의 단일 쇄, 및 항 NKG2D의 단일 쇄로 구성된 삼중특이 키메라 Ab를 생성하도록 설계되었다. 도 8c는 생성된 Ab 정체를 자세히 설

명하며, 여기서 L-H는 항 NKG2D 가변 중쇄의 상류에 융합된 항 NKG2D 가변 경쇄를 나타내고, H-L은 항 NKG2D 가변 중쇄의 하류에 융합된 항 NKG2D 가변 경쇄를 나타낸다. 각 Tribody 분자의 발현된 HC 및 LC Tribody 작제물을 결합하여 단일 분자를 형성하며, 이것은 비환원(NR) 조건에서 SDS-PAGE에서 관찰된 단일 주요 ~100kDa 대역 및 환원(R) 조건에서 ~50kDa의 이중 대역으로 표시된다(도 9). 도 9는 각각 IM-1244-IM1251의 SDA-PAGE 분석을 나타내며, 여기서 왼쪽 레인은 kDa(M) 단위의 마커를 나타내고, 중간 레인은 환원된 조건(R)을 나타내고, 오른쪽 레인은 비-환원된 조건(NR)을 나타낸다. 도 10a-h는 각각 IM-1244-IM1251의 SEC-HPLC 분석을 나타내며, 질량 보정 곡선을 기반으로 한 예상 Mw의 예상 체류 시간과 일치하는 ~6분의 체류 시간에서의 단일 피크를 입증한다.

[0144] **결론:** 삼중특이 Tribody 변이체가 성공적으로 발현되고 정제되었다.

[0145] **실시예 6**

[0146] **NKG2D 재조합 단백질에 대한 Tribody 항체 작제물의 결합**

[0147] **목적:** ELISA에 의한 NKG2D 재조합 단백질에 대한 및 FACS에 의한 막 결합된 NKG2D 단백질을 발현하는 세포에 대한, 마우스 하이브리도마 클론으로부터 유래된 항 5T4ScFv 도메인, 항 CD3ε Fab 도메인 및 항 인간NKG2D로 구성된 다양한 Tribody 항체 작제물의 결합 효능을 연구하기 위함. 다양한 형식들은 CAP 마스킹 서열, 절단 가능한 링커, 비-절단 링커, 뿐만 아니라 특정 인게이지에 대한 결합 활성이 부족하고 Tribody/Protribody 형식에 대한 음성 대조군으로 작용하는 점-돌연변이된 인게이지 서열로 구성될 수 있다.

[0148] **방법:** 상기 실시예 2에 기재된 바와 같은 항원 또는 세포에 대한 Tribody 항체 작제물의 ELISA 및 FACS 결합.

[0149] **결과:** 도 11은 ELISA에 의한 NKG2D-ECD-Fc 단백질에 대한 결합에 대해 발현된 삼중특이 작제물 분석을 입증한다. NKG2D-ECD-Fc 단백질에 대한 결합 EC50은 IM-1244(작은 원)의 경우 2.6nM, IM-1245(작은 사각형)의 경우 1.1nM, IM-1248(작은 마름모)의 경우 1.7nM, IM-1249(큰 원)의 경우 0.7nM인 반면, 예상된 바와 같이 음성 대조군 Tribody IM-1091 NKG2D 돌연변이 변이체(큰 마름모)에 대해서는 결합이 관찰되지 않았다(도 11).

[0150] **도 12**는 FACS에 의한 NKG2D-단백질을 발현하는 세포에 대한 결합에 대해 발현된 삼중특이 작제물 분석을 입증한다. 인간 NKG2D를 과발현하는 CHO 세포에 대한 결합 EC50은 IM-1244(작은 원), IM-1245(작은 사각형), IM-1246(작은 상향 삼각형), IM-1247(작은 하향 삼각형), IM-1248(작은 마름모), IM-1249(큰 원) 및 IM-1250(큰 사각형)에 대해 각각 8.6, 7, 12, 2.5, 4.9, 4.7nM이었다(도 12a). cynoNKG2D를 과발현하는 CHO 세포에 대한 결합 EC50은 IM-1244(작은 원), IM-1245(작은 사각형), IM-1246(작은 상향 삼각형), IM-1247(작은 하향 삼각형), IM-1248(작은 마름모), IM-1249(큰 원) 및 IM-1250(큰 사각형)에 대해 각각 21, 13, 15, 30, 5.9, 5.3 및 2.3nM이었다(도 12b). IM-1251 EC50 값(큰 상향 삼각형)은 적용 가능하지 않았지만, 예상대로 음성 대조군 Tribody IM-1091 NKG2D 돌연변이 변이체(큰 마름모)에 대한 결합은 관찰되지 않았다. IM-1060 (큰 하향 삼각형)은 양성 대조군 Tribody로서 사용되었다. CHO 부모 세포에 대한 결합은 검출되지 않았다(데이터 표시 안 됨).

[0151] **결론:** 선택된 하이브리도마 클론으로부터 서열분석된 마우스 가변 경쇄 및 중쇄를 확인하고 scFv로 전환하고 Tribody 작제물에 도입하여 키메라 TriBody 분자를 형성하였다. 이들 분자를 발현, 정제 및 결합 분석에 의해 추가로 특성화하였으며, 인간 NKG2D에 대한 결합 특성이 유지됨을 보여주었다.

[0152] **도 11**에 나타난 바와 같이, TriBody 형식 내에서 항 NKG2D로 구성된 키메라 Tribody의 결합은 NKG2D 단백질에 대한 결합을 유지하였다. 유사하게, 도 12에 나타난 바와 같이, 세포 표면에서 인간 및 cyno NKG2D를 모두 과발현하는 세포에서도 결합이 확인되었다. 각각 mAb 001, mAb 009, mAb 010 및 mAb 019를 나타내는 Tribody IM-1245, IM-1246, IM-1249 및 IM-1250은 시험관내 기능적 활성을 위해 추가로 선택되었다.

[0153] **실시예 7**

[0154] **Tribody 항체 작제물의 시험관내 기능적 평가**

[0155] **목적:** 암세포의 존재하에서 건강한 기증자로부터의 1차 PBMC에 대한 Tribody 변이체에 의한 시험관내 용량 의존적 NK-세포 활성화를 평가하기 위함.

[0156] **방법:** 표적 세포의 존재하에서 NK 세포 활성화. PBMC를 10%FBS 및 100ng/mL hIL-2(R&D SYSTEMS, cat-219-IL)를 함유한 RPMI 1640(Gibco, Cat-A10491-01)로 2일 동안 현탁시킨다. 자극 후, 500g에서 5분 동안 원심분리하여 PBMC 및 표적 세포 NCI-H226을 수확하고, 분석 완충액(RPMI 1640 + 5%FBS + 10ng/mL hIL-2)을 사용하여 세포

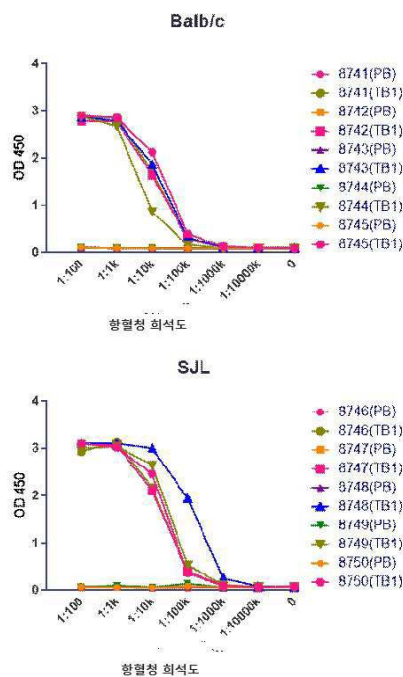
농도를 각각 $4 \times 10^6/\text{mL}$ 및 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 로 조정 한 다음 ET 비율을 20:1로 하여 환저 96웰 플레이트에 각각 50 μL PBMC 현탁액 및 50 μL NCI-H226 현탁액을 첨가한다. 분석 완충액에 희석된 항체(2*)를 준비하고, 100 μL /웰을 첨가하고, 충분히 혼합한다. APC 항-CD107a(Biolegend, cat: 328620) 및 대조군(0.5 μL /시험)을 샘플에 별도로 첨가한다. 플레이트를 가습된 5% CO₂ 대기에서 37℃에서 4시간 동안 배양한다. 배양 후, 플레이트를 250g에서 4℃에서 4분 동안 원심분리하고, 상청액은 버리고, FACS 완충액(PBS+2% FBS)을 사용하여 모든 세포를 FACS 플레이트로 옮긴다. FACS 완충액으로 2회 세척한 후, 100 μL FACS 완충액 내에 FITC-항-CD3, BV421-항-CD56 및 APC-CD107a를 첨가하고 어두운 곳에서 4℃에서 45분 동안 플레이트를 배양한다. FACS 완충액으로 2회 세척한 후, 100 μL 냉각 PBS로 세포를 재현탁시킨다. 다색 FACS 분석을 위해 세포를 제출한다.

[0157] **결과:** 300nM, 60nM, 12nM 및 2.4nM(왼쪽에서 오른쪽으로)의 다양한 Tribody(IM-1245, IM-1246, IM-1249, IM-1250)의 존재하에서, 건강한 기증자로부터 유래된 PBMC, 및 5T4 단백질을 발현하는 NCI-H226 표적 세포를 공동-배양한 후 CD56+gated NK 세포 집단에서 CD107a MFI에 의해 측정된 바와 같은 60-70%의 활성화가 관찰된 반면 Tribody의 부재하에서는 30%의 기저 활성화가 관찰되었다. NKG2D에 대한 결합이 부족한 음성 대조군 Tribody IM-1091 NKG2D 돌연변이 변이체에서는 35-40%의 보다 낮은 활성화가 관찰되었다. IM-1060은 양성 대조군 Tribody로 작용하였다(도 13).

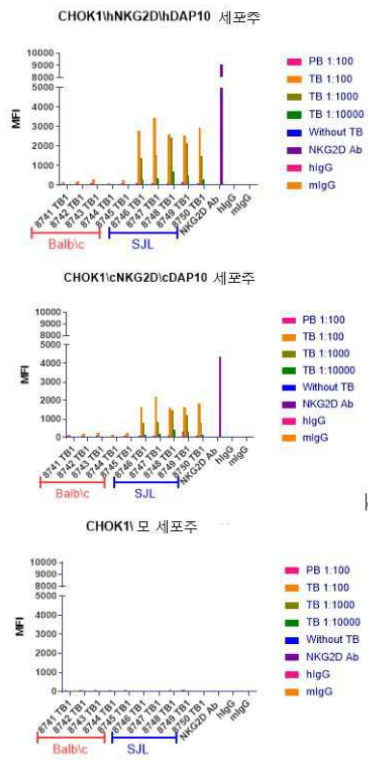
[0158] **결론:** 4개의 빈(bin)으로부터, 마우스 항 인간 NKG2D mAb 클론 염기서열로 구성된 4개의 선택된 Tribody가 시험관내에서 NK 세포를 활성화하는 것으로 나타났다.

도면

도면1a



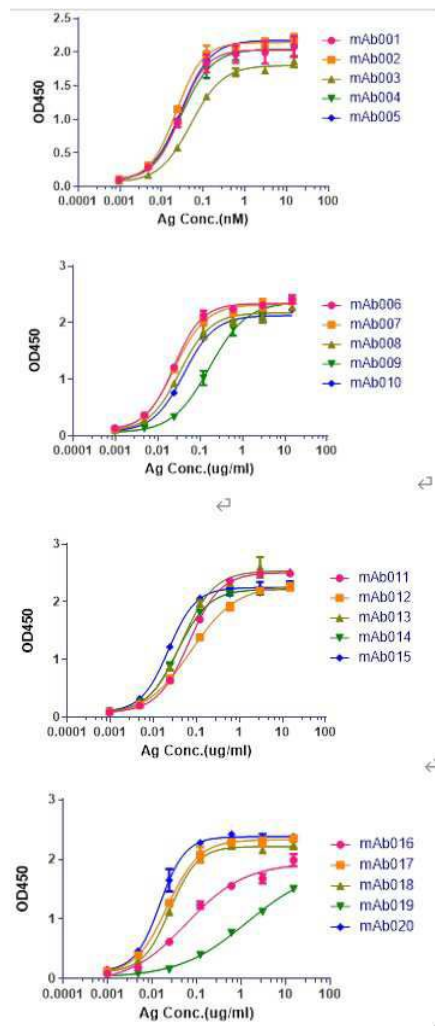
도면1b



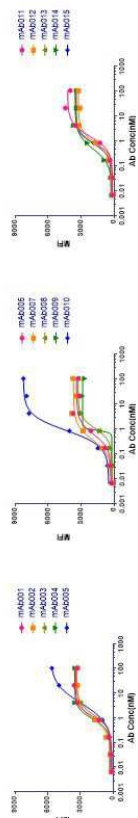
도면2

mAb No.	클론 정체
1	19D4C6
2	20F11F1
3	22B3E3
4	26G9D9
5	38E1D12
6	3H8D8
7	6D11G9
8	9E8B12
9	19C12E8
10	19G2F5
11	20D5F4
12	38H4H8
13	13G5G9
14	25E2F4
15	1H4H8
16	17A2E2
17	33F10D6A9
18	4C12A11
19	31H4C2
20	20B4F3

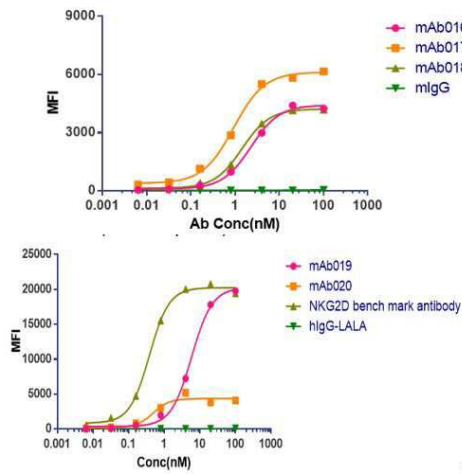
도면3



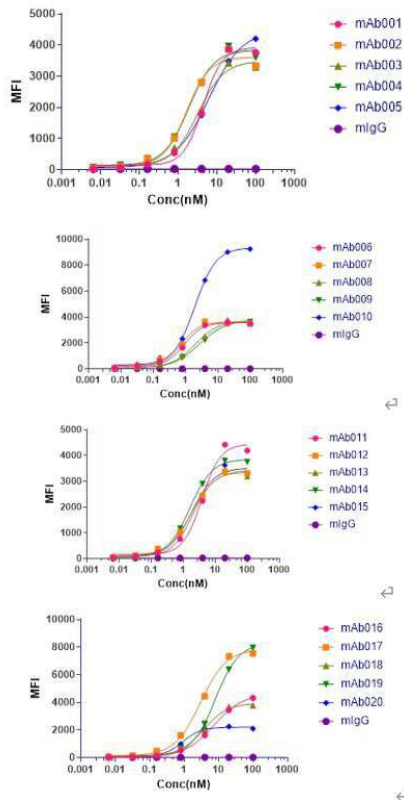
도면4a



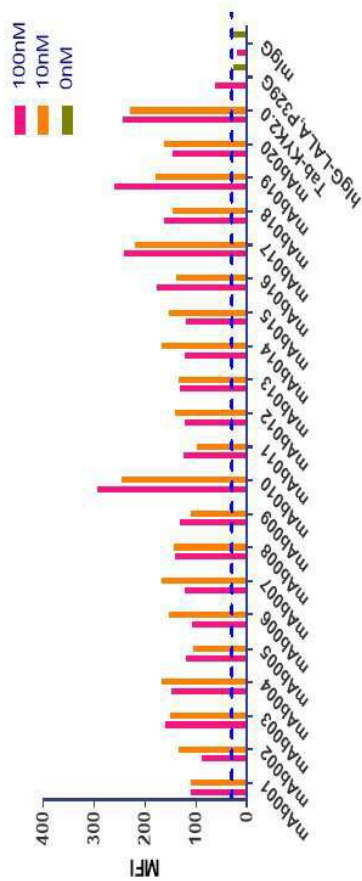
도면4aa



도면4b



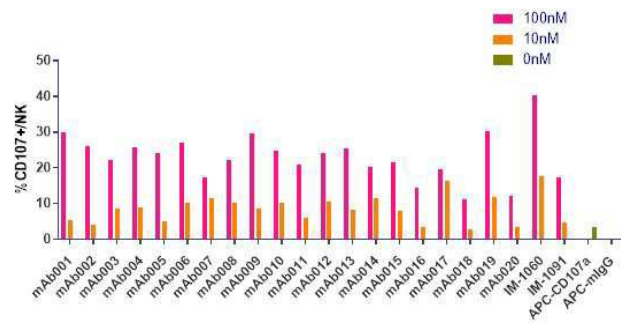
도면4c



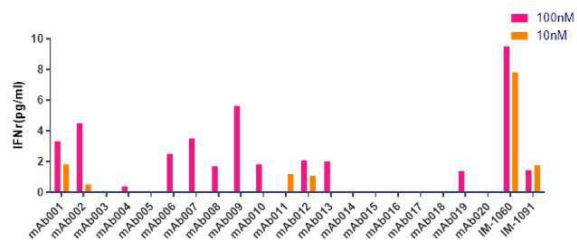
도면5

row	col001	col002	col003	col004	col005	col006	col007	col008	col009	col010	col011	col012	col013	col014	col015	col016	col017	col018	col019	col020	col021	col022	col023	col024	col025	col026	col027	col028	col029	col030	col031	col032	col033	col034	col035	col036	col037	col038	col039	col040	col041	col042	col043	col044	col045	col046	col047	col048	col049	col050	col051	col052	col053	col054	col055	col056	col057	col058	col059	col060	col061	col062	col063	col064	col065	col066	col067	col068	col069	col070	col071	col072	col073	col074	col075	col076	col077	col078	col079	col080	col081	col082	col083	col084	col085	col086	col087	col088	col089	col090	col091	col092	col093	col094	col095	col096	col097	col098	col099	col100	col101	col102	col103	col104	col105	col106	col107	col108	col109	col110	col111	col112	col113	col114	col115	col116	col117	col118	col119	col120	col121	col122	col123	col124	col125	col126	col127	col128	col129	col130	col131	col132	col133	col134	col135	col136	col137	col138	col139	col140	col141	col142	col143	col144	col145	col146	col147	col148	col149	col150	col151	col152	col153	col154	col155	col156	col157	col158	col159	col160	col161	col162	col163	col164	col165	col166	col167	col168	col169	col170	col171	col172	col173	col174	col175	col176	col177	col178	col179	col180	col181	col182	col183	col184	col185	col186	col187	col188	col189	col190	col191	col192	col193	col194	col195	col196	col197	col198	col199	col200	col201	col202	col203	col204	col205	col206	col207	col208	col209	col210	col211	col212	col213	col214	col215	col216	col217	col218	col219	col220	col221	col222	col223	col224	col225	col226	col227	col228	col229	col230	col231	col232	col233	col234	col235	col236	col237	col238	col239	col240	col241	col242	col243	col244	col245	col246	col247	col248	col249	col250	col251	col252	col253	col254	col255	col256	col257	col258	col259	col260	col261	col262	col263	col264	col265	col266	col267	col268	col269	col270	col271	col272	col273	col274	col275	col276	col277	col278	col279	col280	col281	col282	col283	col284	col285	col286	col287	col288	col289	col290	col291	col292	col293	col294	col295	col296	col297	col298	col299	col300	col301	col302	col303	col304	col305	col306	col307	col308	col309	col310	col311	col312	col313	col314	col315	col316	col317	col318	col319	col320	col321	col322	col323	col324	col325	col326	col327	col328	col329	col330	col331	col332	col333	col334	col335	col336	col337	col338	col339	col340	col341	col342	col343	col344	col345	col346	col347	col348	col349	col350	col351	col352	col353	col354	col355	col356	col357	col358	col359	col360	col361	col362	col363	col364	col365	col366	col367	col368	col369	col370	col371	col372	col373	col374	col375	col376	col377	col378	col379	col380	col381	col382	col383	col384	col385	col386	col387	col388	col389	col390	col391	col392	col393	col394	col395	col396	col397	col398	col399	col400	col401	col402	col403	col404	col405	col406	col407	col408	col409	col410	col411	col412	col413	col414	col415	col416	col417	col418	col419	col420	col421	col422	col423	col424	col425	col426	col427	col428	col429	col430	col431	col432	col433	col434	col435	col436	col437	col438	col439	col440	col441	col442	col443	col444	col445	col446	col447	col448	col449	col450	col451	col452	col453	col454	col455	col456	col457	col458	col459	col460	col461	col462	col463	col464	col465	col466	col467	col468	col469	col470	col471	col472	col473	col474	col475	col476	col477	col478	col479	col480	col481	col482	col483	col484	col485	col486	col487	col488	col489	col490	col491	col492	col493	col494	col495	col496	col497	col498	col499	col500	col501	col502	col503	col504	col505	col506	col507	col508	col509	col510	col511	col512	col513	col514	col515	col516	col517	col518	col519	col520	col521	col522	col523	col524	col525	col526	col527	col528	col529	col530	col531	col532	col533	col534	col535	col536	col537	col538	col539	col540	col541	col542	col543	col544	col545	col546	col547	col548	col549	col550	col551	col552	col553	col554	col555	col556	col557	col558	col559	col560	col561	col562	col563	col564	col565	col566	col567	col568	col569	col570	col571	col572	col573	col574	col575	col576	col577	col578	col579	col580	col581	col582	col583	col584	col585	col586	col587	col588	col589	col590	col591	col592	col593	col594	col595	col596	col597	col598	col599	col600	col601	col602	col603	col604	col605	col606	col607	col608	col609	col610	col611	col612	col613	col614	col615	col616	col617	col618	col619	col620	col621	col622	col623	col624	col625	col626	col627	col628	col629	col630	col631	col632	col633	col634	col635	col636	col637	col638	col639	col640	col641	col642	col643	col644	col645	col646	col647	col648	col649	col650	col651	col652	col653	col654	col655	col656	col657	col658	col659	col660	col661	col662	col663	col664	col665	col666	col667	col668	col669	col670	col671	col672	col673	col674	col675	col676	col677	col678	col679	col680	col681	col682	col683	col684	col685	col686	col687	col688	col689	col690	col691	col692	col693	col694	col695	col696	col697	col698	col699	col700	col701	col702	col703	col704	col705	col706	col707	col708	col709	col710	col711	col712	col713	col714	col715	col716	col717	col718	col719	col720	col721	col722	col723	col724	col725	col726	col727	col728	col729	col730	col731	col732	col733	col734	col735	col736	col737	col738	col739	col740	col741	col742	col743	col744	col745	col746	col747	col748	col749	col750	col751	col752	col753	col754	col755	col756	col757	col758	col759	col760	col761	col762	col763	col764	col765	col766	col767	col768	col769	col770	col771	col772	col773	col774	col775	col776	col777	col778	col779	col780	col781	col782	col783	col784	col785	col786	col787	col788	col789	col790	col791	col792	col793	col794	col795	col796	col797	col798	col799	col800	col801	col802	col803	col804	col805	col806	col807	col808	col809	col810	col811	col812	col813	col814	col815	col816	col817	col818	col819	col820	col821	col822	col823	col824	col825	col826	col827	col828	col829	col830	col831	col832	col833	col834	col835	col836	col837	col838	col839	col840	col841	col842	col843	col844	col845	col846	col847	col848	col849	col850	col851	col852	col853	col854	col855	col856	col857	col858	col859	col860	col861	col862	col863	col864	col865	col866	col867	col868	col869	col870	col871	col872	col873	col874	col875	col876	col877	col878	col879	col880	col881	col882	col883	col884	col885	col886	col887	col888	col889	col890	col891	col892	col893	col894	col895	col896	col897	col898	col899	col900	col901	col902	col903	col904	col905	col906	col907	col908	col909	col910	col911	col912	col913	col914	col915	col916	col917	col918	col919	col920	col921	col922	col923	col924	col925	col926	col927	col928	col929	col930	col931	col932	col933	col934	col935	col936	col937	col938	col939	col940	col941	col942	col943	col944	col945	col946	col947	col948	col949	col950	col951	col952	col953	col954	col955	col956	col957	col958	col959	col960	col961	col962	col963	col964	col965	col966	col967	col968	col969	col970	col971	col972	col973	col974	col975	col976	col977	col978	col979	col980	col981	col982	col983	col984	col985	col986	col987	col988	col989	col990	col991	col992	col993	col994	col995	col996	col997	col998	col999	col1000
row001	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%</																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									

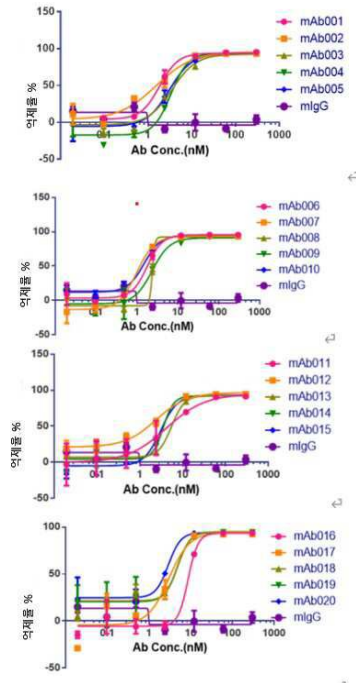
도면6a



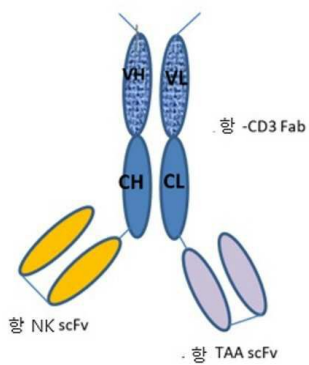
도면6b



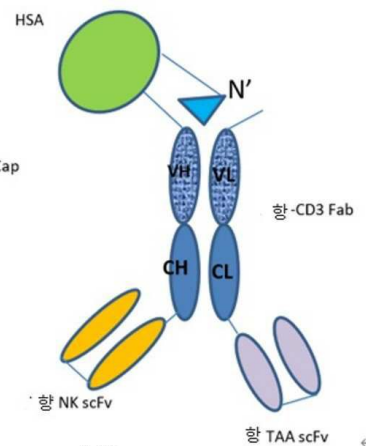
도면7



도면8a



도 8a

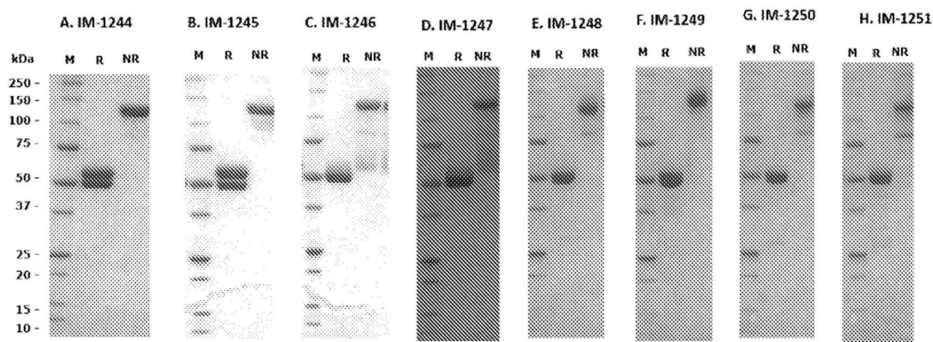


도 8b

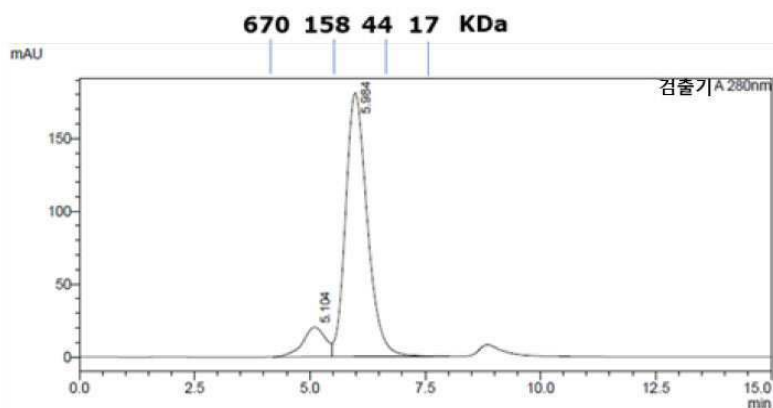
도면8c

IM1244	CD3x5T4x NKG2D-cl-1 (L-H)
IM1245	CD3x5T4x NKG2D-cl-1 (H-L)
IM1246	CD3x5T4x NKG2D-cl-9 (L-H)
IM1247	CD3x5T4x NKG2D-cl-9 (H-L)
IM1248	CD3x5T4x NKG2D-cl-10 (L-H)
IM1249	CD3x5T4x NKG2D-cl-10 (H-L)
IM1250	CD3x5T4x NKG2D-cl-19 (L-H)
IM1251	CD3x5T4x NKG2D-cl-19 (H-L)

도면9



도면10a

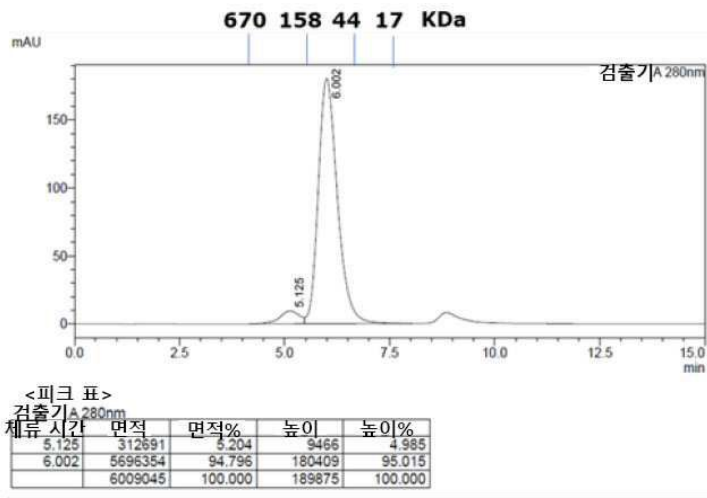


IM1244

<피크 표>

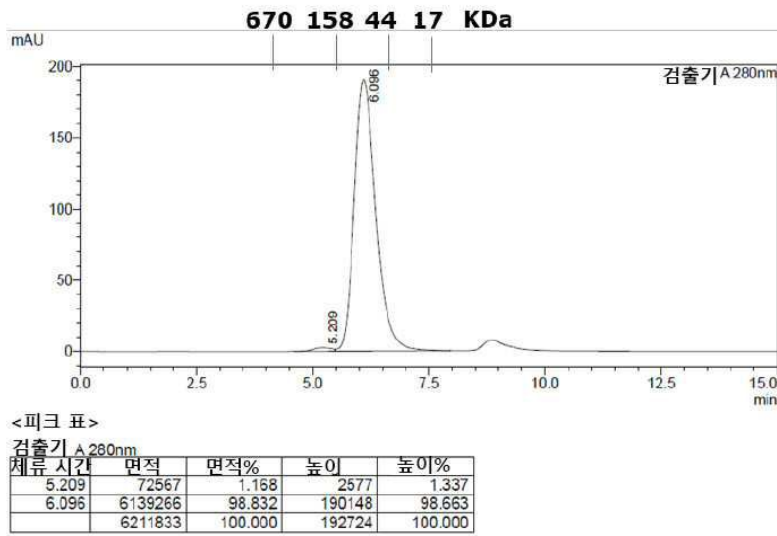
검출기 A 280nm	면적	면적%	높이	높이%
5.104	692450	10.466	20330	10.096
5.984	5923577	89.534	181039	89.904
	6616027	100.000	201369	100.000

도면10b



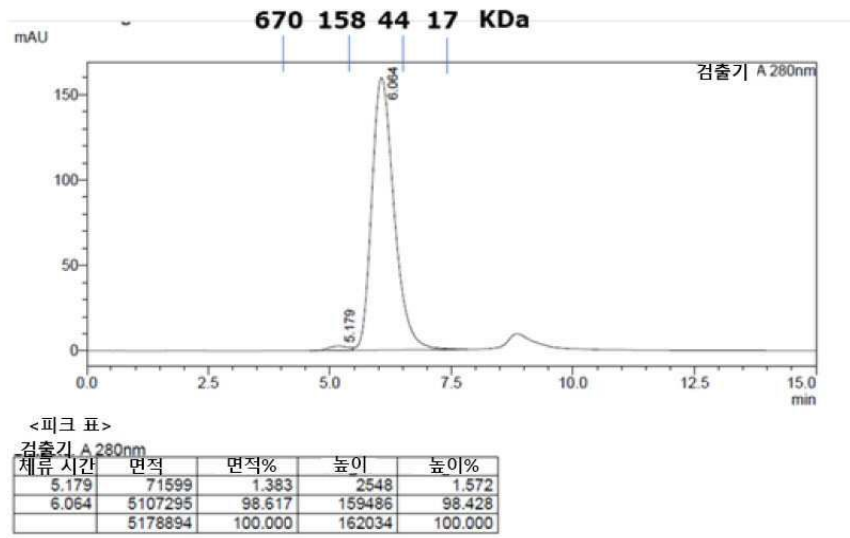
IM1245

도면10c



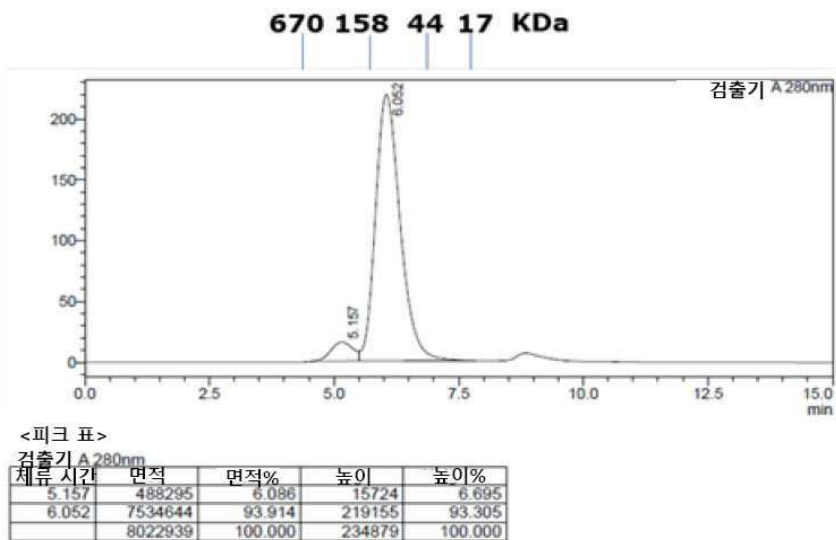
IM1246

도면10d



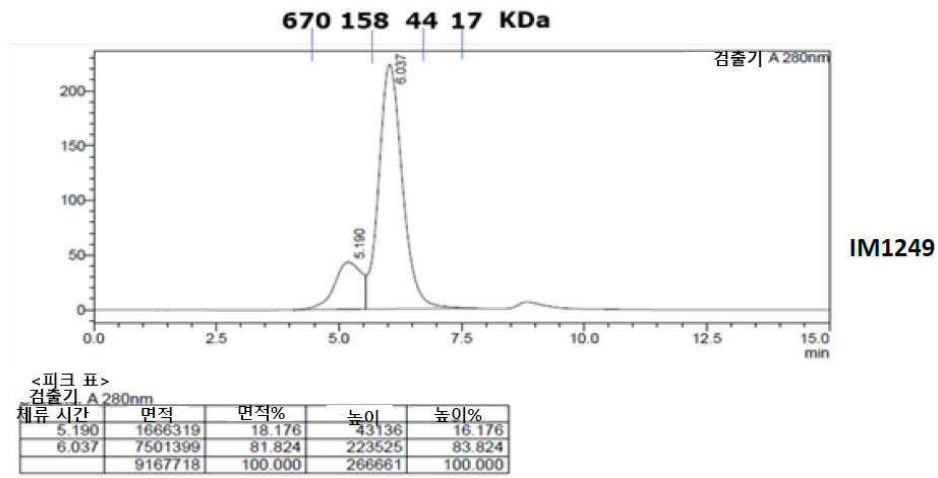
IM1247

도면10e

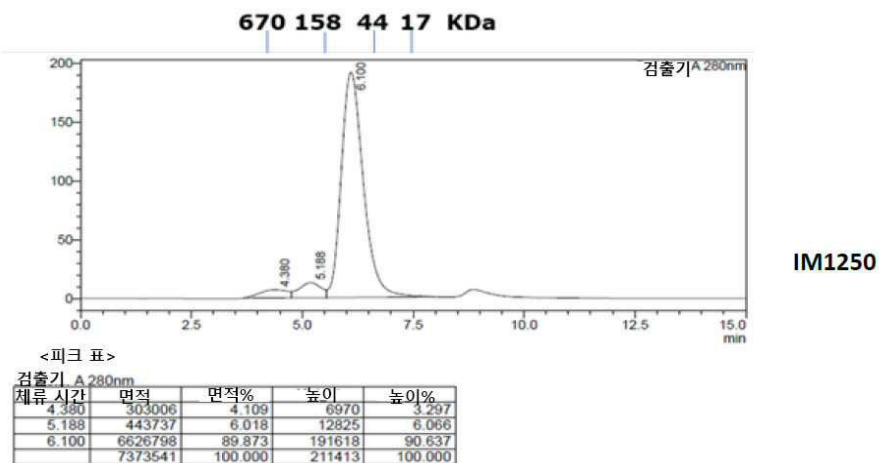


IM1248

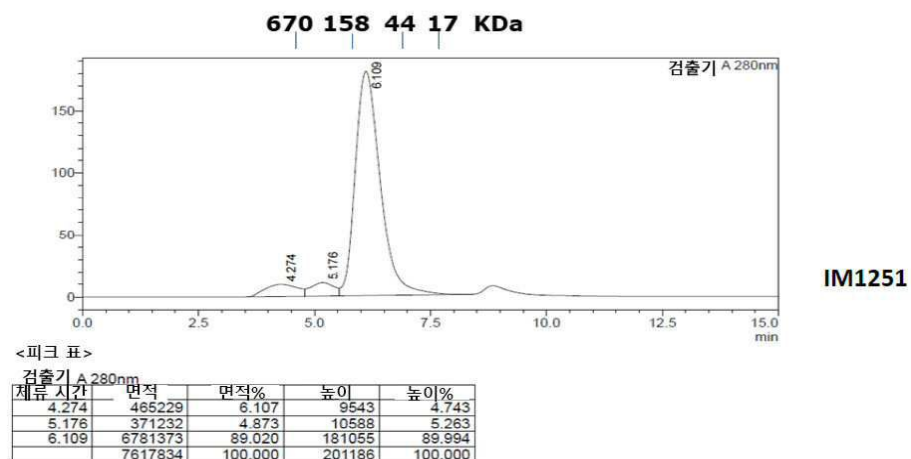
도면10f



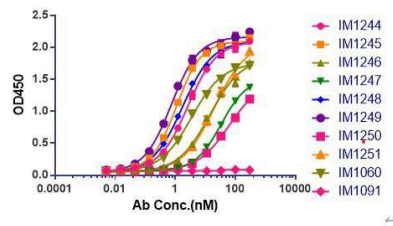
도면10g



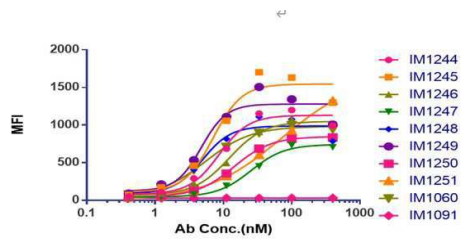
도면10h



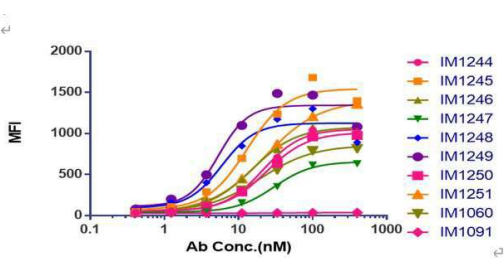
도면11



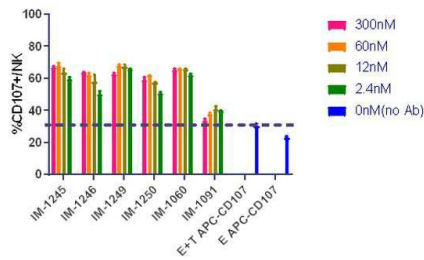
도면12a



도면12b



도면13



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> IMMUNORIZON LTD.

<120> NKG2D ANTIBODIES AND USES THEREOF

<130> P-604135-USP

<140><141><160> 42

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

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

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

 $\langle 210 \rangle$ 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

pept i de

 $\langle 400 \rangle$ 2

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His

1 5

 $\langle 210 \rangle$ 3

<211

$$> 14$$

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

pept i de

 $\langle 400 \rangle$ 3

Trp Val Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 4

Lys Asp Arg Gly Leu Gly Asp Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 5

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 5

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

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Phe Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu

85 90 95

Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 6

Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Ala Val Asn

1 5 10

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 7

Leu Leu Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ser

1 5 10

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 8

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro

1 5 10

<210> 9

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

Ala Lys Asp Ala Gly Glu Gly Asp Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 10

 $\langle 211 \rangle$ 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 10

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

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Phe Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu

85 90 95

Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 11

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Arg Ile Phe Asp Ser Tyr Tyr Val Asp Ser Met Asp Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 12

Ala Phe Asn Phe Thr Ser Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 13

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 13

Trp Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asp Thr Lys Tyr

1 5 10

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 14

Arg Asn Arg Ile Phe Asp Ser Tyr Tyr Val Asp Ser Met Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 15

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Val Asp Glu Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg

85 90 95

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

100 105 110

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 16

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

1 5 10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 17

Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Val

1 5 10

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 18

Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Phe

1 5

<210> 19

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 19

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Asp Leu Ser Arg Tyr

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Ser

65 70 75 80

Leu Gln Met Arg Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Phe Cys

85 90 95

Ile Arg Arg Arg Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 20

Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Trp Met Ser

1 5

<210>

> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 21

Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala
1 5 10 15

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 22

Ile Arg Arg Arg Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10 15

<210> 23

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 23

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Thr
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 Arg Val Phe Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu 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 Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 24

Gln Ser Ile Val His Thr Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 25

Leu Leu Ile Tyr Arg Val Phe Asn Arg Phe Ser
 1 5 10

<210> 26

<211>

> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 26

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe
 1 5

<210> 27

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Val Tyr Asp Gly Tyr Tyr Val Gly Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 28

Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp Ile Gln

1 5

<210>

> 29

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 29

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

1 5 10

<210> 30

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 30

Arg Gly Val Tyr Asp Gly Tyr Tyr Val Gly Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 31

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 31

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

1 5 10 15

Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ile Met

20 25 30

Gly Thr Asn Leu Ile Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Gln Pro Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly Arg

85 90 95

Lys Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 32

Glu Ser Val Ser Ile Met Gly Thr Asn Leu Ile Asn

1 5 10

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 33

Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Asn Leu Glu Thr

1 5 10

<210> 34

<211> 8

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 34

Leu Gln Gly Arg Lys Ile Pro Arg

1 5

<210> 35

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 35

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

1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Phe Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Cys Leu

35 40 45

Gly Val Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Val Phe Lys

50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Lys Gly Asp Glu Gly Tyr Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 36

Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Ala Ile Ser

1 5

<210> 37

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 37

Cys Leu Gly Val Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr

1 5 10

<210> 38

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 38

Ala Arg Lys Gly Asp Glu Gly Tyr Trp Gly Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 39

<211>

> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 39

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser

20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Val Ser Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln His Ser Asn Arg Trp Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100

105

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 40

Gln Ser Ile Gly Thr Ser Ile His

1

5

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 41

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser

1

5

10

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 42

Gln His Ser Asn Arg Trp Pro Leu

1

5