



등록특허 10-2830926



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년07월08일
(11) 등록번호 10-2830926
(24) 등록일자 2025년07월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/2878 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7017368
- (22) 출원일자(국제) 2016년12월14일
심사청구일자 2021년12월10일
- (85) 번역문제출일자 2018년06월19일
- (65) 공개번호 10-2018-0086219
- (43) 공개일자 2018년07월30일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/066698
- (87) 국제공개번호 WO 2017/106372
국제공개일자 2017년06월22일
- (30) 우선권주장
62/267,735 2015년12월15일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문현
US20060165706 A1
- (73) 특허권자
온코씨4, 아이앤씨.
미국, 메릴랜드 20850, 롤빌, 메디칼 센터 드라이브 9640
- (72) 발명자
리우, 양
미국, 20002 워싱턴 D.C., 워싱턴, 502 E 스트리트 NE
웡, 판
미국, 20002 워싱턴 D.C., 워싱턴, 502 E 스트리트 NE
데븐포트, 마틴
미국, 20878 메릴랜드, 게이더스버그, 614 스톤 크리크 레인
- (74) 대리인
신관호

전체 청구항 수 : 총 16 항

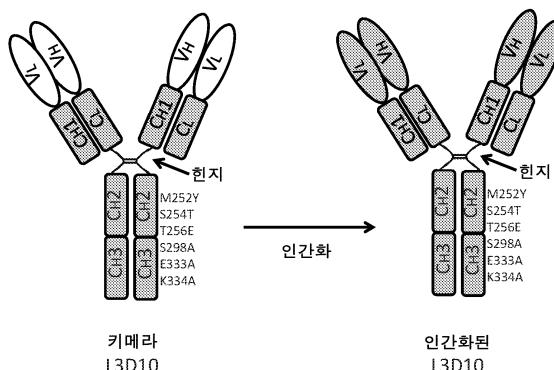
심사관 : 김윤선

(54) 발명의 명칭 키메라 및 인간화된 항-인간 CTLA4 단클론 항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 인간 CTLA4 분자에 결합하는 키메라 및 인간화된 항체의 조성물 및 암 면역요법에서의 이의 용도 및 다른 면역요법제와 비교되는 자가면역 부작용의 감소에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/507 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/72 (2013.01)
C07K 2317/732 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(30) 우선권주장

62/309,169 2016년03월16일 미국(US)
62/359,036 2016년07월06일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

(a) (i) 서열번호 21에 개시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR)1, (ii) 서열번호 36, 37 또는 38에 개시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및 (iii) 서열번호 23에 개시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및

(b) (i) 서열번호 24에 개시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, (ii) 서열번호 33, 34 또는 35에 개시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및 (iii) 서열번호 26에 개시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하며, 인간 CTLA-4에 결합하는, 항-CTLA-4 항체.

청구항 2

제1 항에 있어서,

(a) 중쇄가 서열번호 62, 63 또는 64에 개시된 아미노산 서열을 포함하며; 및

(b) 경쇄가 서열번호 70, 71 또는 72에 개시된 아미노산 서열을 포함하는, 항-CTLA-4 항체.

청구항 3

제1 항에 있어서,

(a) 경쇄 CDR2가 서열번호 37에 개시된 아미노산 서열을 포함하고 중쇄 CDR2가 서열번호 35에 개시된 아미노산 서열을 포함하며; 및

(b) 경쇄 CDR2가 서열번호 37에 개시된 아미노산 서열을 포함하고 중쇄 CDR2가 서열번호 33에 개시된 아미노산 서열을 포함하며; 또는

(c) 경쇄 CDR2가 서열번호 38에 개시된 아미노산 서열을 포함하고 중쇄 CDR2가 서열번호 35에 개시된 아미노산 서열을 포함하는, 항-CTLA-4 항체.

청구항 4

제3 항에 있어서,

경쇄가 서열번호 71에 개시된 아미노산 서열을 포함하고 중쇄가 서열번호 64에 개시된 아미노산 서열을 포함하는, 항-CTLA-4 항체.

청구항 5

제3 항에 있어서,

경쇄가 서열번호 71에 개시된 아미노산 서열을 포함하고 중쇄가 서열번호 62에 개시된 아미노산 서열을 포함하는, 항-CTLA-4 항체.

청구항 6

제3 항에 있어서,

경쇄가 서열번호 72에 개시된 아미노산 서열을 포함하고 중쇄가 서열번호 64에 개시된 아미노산 서열을 포함하는, 항-CTLA-4 항체.

청구항 7

제1 항 내지 제6 항 중 어느 한 항에 있어서,

항체가 가용성 CTLA4에 대한 감소된 결합을 특징으로 하는, 항-CTLA-4 항체.

청구항 8

제1 항 내지 제6 항 중 어느 한 항에 따른 항-CTLA-4 항체의 항원 결합 단편.

청구항 9

치료적으로 유효한 양의 제1 항의 항-CTLA-4 항체 및 생리학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 암 치료용인, 약학적 조성물.

청구항 10

제9 항에 있어서,

항-PD-1 항체 및 항-4-1BB 항체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 추가의 제제로 사용되는, 약학적 조성물.

청구항 11

제10 항에 있어서,

상기 항-PD-1 또는 항-4-1BB 항체와 항-CTLA4 항체가 이중-특이적 항체로서 단일 분자 내에서 조합되는, 약학적 조성물.

청구항 12

제9 항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 종양 미세환경 내에서 Treg의 강한 결실 및 국소적 T 세포 활성화를 유도하지만, 전신 T 세포 활성화를 최소한으로 유도하는, 약학적 조성물.

청구항 13

제9 항에 있어서,

상기 암은 전립선, 난소, 방광, 유방, 결장, 폐, 피부, 췌장, 자궁, 육종, 흑색종 및 백혈병으로 구성된 그룹으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

청구항 14

서열번호 17에 개시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열번호 13에 개시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는, 항-CTLA-4 항체.

청구항 15

제14 항의 항-CTLA-4 항체 및 생리학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 암 치료용인, 약학적 조성물.

청구항 16

제15 항에 있어서,

상기 암은 전립선, 난소, 방광, 유방, 결장, 폐, 피부, 췌장, 자궁, 육종, 흑색종 및 백혈병으로 구성된 그룹으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 CTLA4 분자에 결합하는 키메라 및 인간화된 항체 및, 이의 사용방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인간 및 다른 포유동물의 면역 체계는 감염과 질병으로부터 보호를 제공할 책임을 진다. 이러한 보호는 체액성 면역 반응 및 세포-매개 면역 반응 둘다에 의해 제공된다. 체액성 반응은 외래 표적(항원)을 인식하고, 중화할 수 있는 항체 및 기타 생체분자를 생산한다. 대조적으로, 세포-매개 면역 반응은 T 세포에 의한 대식세포, 호중구, 자연 살해 세포(NK) 및 항원-특이적 세포독성 T-림프구의 활성화, 및 항원의 인식에 대한 반응으로 다양한 사이토카인의 방출을 포함한다.

[0003] T 세포가 항원에 대한 면역 반응을 최적으로 매개하는 능력은 두가지 별개의 신호전달 상호작용(signaling interaction)을 필요로 한다. 첫째, 항원-제시 세포(APC) 표면 상에 배열된 항원은 MHC:펩타이드 복합체(1,2)의 형태로 항원-특이적 나이브(naive) T 세포에 제시되어야 한다. 상기 제시는 제시된 항원에 특이적이 될 면역 반응을 개시하도록 T 세포를 유도하는 T 세포 수용체(TCR)를 통해 신호를 전달한다. 둘째, APC와 별개의 T 세포 표면 분자 사이의 상호작용을 통해 매개된 일련의 동시-자극 신호가 T 세포의 활성화와 증식을 먼저 유발하고, 궁극적으로 그들의 억제를 유발한다(3-5). 따라서, 제1 신호가 면역 반응에 대한 특이성을 부여하는 반면, 제2 신호는 자체 면역력을 제한하면서 반응의 특성, 크기 및 기간을 결정하는 역할을 한다. 상기 제2 신호 분자 중에서 특히 중요한 것은, 항원 제시 세포의 B7.1(CD80)(6) 및 B7.2(CD86)(7-9) 리간드와 T-림프구의 CD28 및 CTLA4 수용체(10-12) 사이의 결합이다.

[0004] 세포독성 T 림프구 항원-4(CTLA4)는 말초 내성의 유지 및 긴급한 T 세포 반응의 레퍼토리 형성에 중추적인 역할을 하는, 적응성 면역 반응의 주요 조절제로서 인식되고, 따라서 암과 염증의 치료를 위한 치료적 표적이 된다. 항-CTLA4 항체에 의한 치료는 전임상 모델에서 항-종양 면역력을 강화시키는 강력한 도구임이 입증되었다(10). CTLA4에 대한 항체에 의한 단독요법은 다양한 기원의 이식가능한 종양의 거부반응을 촉진시켰다.

[0005] 유망한 전임상 종양 모델 연구에 근거하여, CTLA4에 대한 항체의 임상 잠재력은 다른 사람의 악성 종양에서 탐구되었다. 항-CTLA4(Yervoy로 시판되는 이필리무맙(Ipilimumab))가 흑색종 치료에 효능을 입증했지만, CTLA4의 치료 및 표적화는 자가면역 유사 독성과 관련되어 있다. CTLA4의 억제로 인한 특징적인 부작용은 일반적으로 면역-관련 부작용(irAEs)이라고 하며, 가장 일반적인 irAE는 피부 발진, 간염, 대장염 및 내분비 병증, 특히 뇌하수체 기능저하증이다. 따라서, 관련 irAE를 감소시키면서 효능을 증가시킴으로써 항-CTLA4 항체의 치료 잠재력을 개선하고자 하는 욕구가 있다.

[0006] 면역요법 및 종양의 치료 분야에 대한 또 다른 초점은 특히 면역원성이 낮은 종양에 대한 항-종양 활성을 높이기 위한, 다양한 면역 검사 억제제의 조합이다. 그러나, 이 접근법은 자가면역력을 강화시키지 않으면서 암 면역력을 선택적으로 조절할 필요성을 추가로 강조하는, 자가면역 부작용을 추가로 증가시킬 위험과 관련이 있다.

[0007] CD28 수용체의 리간드에 대한 추가 연구는 관련 B7 분자 세트("B7 상과(Superfamily)")의 동정 및 특징 분석을 이끌어냈다(32-33). 현재는 여러 공지된 패밀리 구성원들이 있다: B7.1(CD80), B7.2(CD86), 유도성 동시-자극자 리간드(ICOS-L), 프로그램된 사멸-1 리간드(PD-L1; B7-H1), 프로그램된 사멸-2 리간드(PD-L2; B7-DC), B7-H3, B7-H4 및 B7-H6(35-36).

[0008] B7-H1은 심장, 태반, 근육, 태아 간, 비장, 림프절 및 흉선과 같은 다양한 인간 및 마우스 두 조직에서 광범위하게 발현되며, 마우스에서만 간, 폐, 및 신장에서 발현된다(37). B7-H1(PD-L1, CD274)은 종양에 대한 면역 반응의 형성에 중추적으로 관여하기 때문에, B7 상과의 특히 중요한 구성원이다(38; 미국특허 제6,803,192호; 제7,794,710호; 미국특허출원 공보 제2005/0059051호; 제2009/0055944호; 제2009/0274666호; 제2009/0313687호; PCT 공개번호 WO 01/39722; WO 02/086083).

[0009] 프로그램된 사멸-1("PD-1")은 B7-DC뿐만 아니라 B7-H1의 수용체이다. PD-1은 T 세포 조절제의 확장된 CD28/CTLA4 패밀리의 타입 I 막 단백질 구성원이다(39; 미국특허출원 공보 제2007/0202100호; 제2008/0311117호; 제2009/00110667호; 미국특허 제6,808,710호; 제7,101,550호; 제7,488,802호; 제7,635,757호; 제7,722,868호; PCT 공개 번호 WO 01/14557). CTLA4와 비교하여, PD-1은 더 광범위하게 면역 반응을 음성적으로 조절한다. PD-1은 활성화된 T 세포, B 세포 및 단핵구(40-41) 상에서 및 자연 살해 세포(NK) T 세포(42-43)에서 저수준으로 발현된다.

- [0010] B7-H1과 PD-1의 상호작용은 T 세포와 B 세포에 중요한 음성적인 동시-자극 신호를 제공하고(43), 세포 사멸 유도제로 기능하는(39) 것으로 밝혀졌다. T 세포 활성화 및 증식을 억제하는데 있어서 B7-H1 및 PD-1의 역할은 상기 생체분자가 염증 및 암의 치료를 위한 치료 표적이 될 수 있다고 제안했다. 결과적으로, 감염 및 종양을 치료하고 적응 면역 반응을 상향-조절하기 위한 항-PD1 및 항-B7-H1 항체의 사용이 제안되어, 다수의 인간 종양의 치료에 효과적임이 입증되었다. 그러나 모든 개체가 항-PD1 또는 항-B7-H1 치료에 반응하거나 완전한 반응을 보인 것은 아니므로, 항-종양 활성을 강화하기 위해 항-PD1 또는 항-B7-H1 항체를 다른 면역 검사 억제제와 조합시키는 것에 큰 관심이 있다.
- [0011] 4-1BB(CD137 및 TNFRSF9라고도 알려져 있음)는 또 다른 면역 체크포인트 분자이다. CD137의 가장 특징적인 활성은 활성화된 T 세포에 대한 보조자극 활성이다. CD137의 교차결합은 T 세포 증식, IL-2 분비, 생존 및 세포용해 활성을 향상시킨다. 또한, 항-CTLA4와 마찬가지로, 항-4-1BB 항체는 마우스에서 종양을 제거하기 위해 면역 활성을 증진시킬 수 있다(27-29). 그러나, 항-CTLA4 항체가 자가면역 질병을 악화시키는 경향과 달리, 암 치료용 항-4-1BB mAbs는 루푸스 경향 마우스에서 자가면역 질병의 발병을 막는 것으로 나타났는데, 이들은 항-dsDNA 항체 생산을 억제하고, 신장 병리를 감소시켰다(25,26). 이전의 데이터는 항-종양 활성을 향상시키면서, 항-CTLA4의 치료를 항-4-1BB 항체와 조합함으로써, 마우스 대장암 종양 모델에서의 항-CTLA4 치료의 자가면역 부작용을 감소시킬 수 있음을 증명하였다(19). 이것은 항-CTLA4 종양 치료의 자가면역 부작용을 상쇄하는 것이 가능함을 입증한다.
- [0012] 항-마우스 CTLA4 항체에 의한 경험에 의해 입증된 바와 같이, 시험관내 면역학적 상관이 때때로 가치가 없기 때문에 항-인간 CTLA4 항체의 전임상 스크리닝은 어려움이 따른다. 생체내에서 강력한 항-종양 면역력을 유도하는 동일한 항-마우스 CTLA4 항체는 시험관내에서 T 세포에 가변적인 효과를 가질 수 있다. 항-CTLA4 항체는 동종항원에 반응하여 T 세포 증식을 증가시키지만, 항-CD 28에 의한 보조자극에 반응하여 T 세포 증식을 억제하였다(30,31). 또한, 항체와의 CTLA4 결합은 동일한 배양에서 T 세포의 상이한 서브세트의 증식을 촉진하거나 억제할 수 있었다(32). 상기 합병증은 설치류 모델에서 인간 T 세포 반응을 연구할 수 있다면 극복될 수 있다.
- [0013] 면역 반응을 강화시키고 항-종양 요법에 사용하기 위해 사용될 때, 감소된 자가면역 부작용을 갖는 항-CTLA4 항체가 본원에 기술되어있다. 또한, 상기 항체는 항-PD-1 및 항-4-1BB와 같은 다른 체크포인트 억제제와 조합하여 사용되어, 자가면역 부작용을 억제하면서 항-종양을 향상시킬 수 있다.
- [0014] **발명의 요약**
- [0015] 본 발명은 인간 CTLA4 분자에 결합하는 항체 조성을 및 그의 항원-결합 단편 및 자가면역 부작용이 감소된 암 면역요법을 위한 그의 용도에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 CTLA4 리간드 B7.1 및 B7.2에 대한 강화된 CTLA4 차단 활성, 향상된 이펙터 기능, 또는 막 결합 또는 고정화된 CTLA4에 대한 가용성 CTLA4에 대한 결합 감소를 갖는 항체에 관한 것이다.
- [0016] 항체는 서열번호: 1에 개시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 아미노산 서열 및 서열번호: 2에 개시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 항체는 서열번호: 27, 28 또는 29에 개시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 아미노산 서열 및 서열번호: 30, 31 또는 32에 개시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 상기 항체는 서열번호: 21, 22 및 23에 개시된 CDR 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 및 서열번호: 24, 25 및 26에 개시된 CDR 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 항체는 서열번호: 33, 34 또는 35에 개시된 CDR2 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열번호: 36, 37 또는 38에 개시된 CDR 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.
- [0017] 항체의 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 서열번호: 3 또는 4에 개시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 항체의 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 또한 돌연변이를 포함할 수 있다. 서열번호: 3의 hIgG1 백본의 서열과 관련하여, 돌연변이는 M135Y, S137T, T139E, S181A, E216A 또는 K217A 또는 이들의 조합일 수 있다. 바람직하게는, 항체의 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 6개의 모든 돌연변이를 포함할 수 있다. 항체는 서열번호: 6에 개시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호: 8에 개시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 항체는 또한 서열번호: 9, 11 또는 13에 개시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호: 15, 17 또는 19에 개시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 항체는 인간 CTLA4에 결합할 수 있다. 항체는 또한 B7-1 또는 B7-2에 대한 인간 CTLA4의 결합을 억제할 수 있다.
- [0018] 본원에 기술된 항체의 항원 결합 단편이 본원에 제공된다.

- [0019] 또한, 본원에 기술된 항체의 치료적 유효량을 포함하는 약학적 조성물이 본원에 제공된다. 약학적 조성물은 생리학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다.
- [0020] 또 다른 양태에서, 본원에 기술된 항-CTLA4 항체 조성물 및 약학적 조성물을 그것을 필요로 하는 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 하나 이상의 면역 기능 또는 반응을 증진시키는 방법이 본원에 제시된다. 특정 구현예에서는, 하나 이상의 면역 기능 또는 반응을 활성화시키거나 강화시키는 것이 바람직한 질병의 예방, 치료 및/또는 관리 방법이 본원에 제시된다. 이 질병은 암일 수 있으며, 인간 악성 종양일 수 있다. 특히, 인간 악성 종양은 흑색종, 폐암, 유방암, 간세포암종, 난소암종, 전립선암종, 호지킨 또는 비호지킨 림프종, 급성골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병 또는 신세포암종일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 치료될 질병은 감염성 질병이다. 본원에 기술된 방법은 면역요법과 관련된 자가면역 부작용을 최소화할 수 있다.
- [0021] 다른 특정 구현예에서, 본 방법은 본원에 기술된 항-CTLA4 항체 조성물이 하나 이상의 면역 기능 또는 반응을 활성화시키거나 증강시킬 수 있는 다른 치료법과 함께 개체에게 투여되는 조합 요법을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기술된 항-CTLA4 항체 조성물은 항원성 조성물과 함께 보조제로서 투여된다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 항-CTLA4 항체 조성물은 백신 조성물과 조합하여 투여되어, 백신 조성물에 의해 유도된 면역 반응을 유도하거나 활성화시키거나 증강시킨다.
- [0022] 특정 구현예에서, 본원에 기술된 항-CTLA4 항체 조성물은 상이한 면역조절 경로를 표적으로 하는 하나 이상의 다른 치료법과 조합하여 개체에게 투여된다. 바람직한 구현예에서, 상이한 면역조절 경로를 표적으로 하는 치료 활성은 본원에 기술된 항-CTLA4 항체 조성물과 함께 상보적이거나 시너지 효과를 갖는다. 일례에서, 본원에 기술된 항-CTLA4 항체 조성물은 다른 체크포인트 억제제 또는 인돌레아민 2,3-디옥시게나제(IDO) 억제제와 같은 작은 온코면역학적 조절제(oncoimmunological modulator)와 조합하여 투여된다. 또 다른 예에서, 본원에 기술된 항-CTLA4 항체 조성물은 면역 자극 분자와 함께 투여된다. 특정 구현예는 본원에 기술된 항-CTLA4 항체 조성물을 항-PD-1(펨브롤리주맙(pembrolizumab)(Keytruda) 또는 니볼루맙(Nivolumab)(Opdivo)), 항-B7-H1(아테졸리주맙(atezolizumab)(Tecentriq) 또는 두르발루맙(durvalumab)), 항-B7-H3, 항-B7-H4, 항-LAG3, 항-Tim3, 항-CD40, 항-OX40, 항-BTLA, 항-CD27, 항-ICOS 또는 항-41BB와 조합하는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기술된 항-CTLA4 항체 조성물 및 제2 면역 자극 분자는 단일 이중-특이적 항체에서 조합된다.
- [0023] 다른 구현예에서, 본원에 기술된 항-인간 CTLA4 항체는 가용성 CTLA4 분자에 의해 세포 표면 상에 발현된 인간 CTLA-4에 우선적으로 결합할 수 있다. 항-인간 CTLA4 항체는 인간 CTLA4에 결합할 수 있고, 생체내에서 B7.1 또는 B7.2의 발현을 우선적으로 상향조절한다. 항체는 면역 반응 조절(면역요법) 및 암 치료에 사용하기 위한 조성물에 함유될 수 있다.
- [0024] 본 발명은 또한 바람직한 활성을 갖는 항-인간 CTLA4 mAbs를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다. 항-인간 CTLA4 mAbs에 대한 전임상 스크리닝은 암 면역력 및 자가면역 부작용에 대한 시험관내 면역학적 상관관계가 정의되어 있지 않기 때문에 어려움이 따른다. 특히 항-PD-1과 조합했을 때 인간 항-CTLA4(이필리무맙(Ipilimumab))를 이용한 임상 시험에서 현저한 자가면역 부작용이 관찰되었다. 감소된 면역 관련 독성을 갖는 항-CTLA4 항체를 동정하기 위하여, 인간화된 마우스에서 항-종양 활성을 나타내는 항체가 인간 CTLA4 유전자 노크-인(knock-in) 마우스를 사용하여 생체내에서의 자가면역 부작용을 감소시키는 능력에 대해 스크리닝될 수 있다.
- [0025] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 항-종양 효과가 향상된 항-인간 CTLA4 mAbs를 스크리닝하는 방법에 관한 것으로, 상기 항체는 종양 환경에서 Treg 세포의 증강된 국소 소모를 입증한다.
- [0026] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 항원 제시 세포(APC)와 같은 면역 세포에서 B7.1 및 B7.2의 발현 수준을 모니터링함으로써 생체내에서 항-CTLA4 항체의 차단 효과를 모니터링하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 생체내에서 항-CTLA4 항체의 생물학적 활성을 측정하고, 생체내 면역 세포상에서의 B7.1 및 B7.2 발현 수준을 측정함으로써 항-CTLA4 치료에 대한 전용 반응을 모니터링하기 위한 바이오마커를 추가로 고려한다.
- [0027] L3D10 모 항체의 CTLA4 결합 에피토프와 인간화된 변이체인 PP4631 및 PP4637을 매핑하기 위해, 마우스 및 인간 CTLA4 단백질이 항-CTLA-4 항체가 아닌 B7-1과 교차-반응한다는 사실이 이용되었다. 따라서, 다수의 인간 CTLA-4Fc 단백질의 변이체는 인간 CTLA-4 단백질의 아미노산 클러스터가 뮤린 Ctla-4 단백질로부터의 아미노산으로 대체되도록 설계되었다. 이 연구에서 사용된 항-CTLA-4 항체가 뮤린 Ctla-4에 결합하지 않기 때문에, 항체 결합 에피토프의 중요한 잔기가 뮤린 아미노산으로 대체될 때 항-인간 CTLA-4 항체의 결합은 폐지될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028]

도 1. IgG1 Fc 영역에서 새로운 돌연변이 조합을 갖는, 키메라(왼쪽) 및 인간화된(오른쪽) L3D10 항체의 개략도. Fc 영역의 돌연변이 위치는 그의 아미노산 위치 번호로 식별되며, 아미노산은 단일 문자 코드로 식별되며, 숫자 앞의 문자는 치환된 아미노산을 나타내며, 숫자 뒤의 문자는 도입된 아미노산을 나타낸다. 항체의 가변 영역은 개방 타원형으로 표시되고, 인간 서열은 회색 직사각형으로 표시된다. V = 가변 영역; C = 불변 영역; L = 경쇄; H = 중쇄.

도 2. ELISA에 의해 측정된 바와 같은, 플레이트 고정화 CTLA4에 대한 키메라 L3D10 및 10D1의 CTLA4 결합. ELISA 플레이트를 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 CTLA4-His 단백질(Sino Biological, China)로 코팅하였다. 주어진 농도의 비오틴 결합된 결합 단백질을 첨가하고, HRP-접합된 스트렙타비딘을 사용하여 결합을 측정하였다. 10D1-1 및 10D1-2는 동일한 항체의 2개의 독립적인 재료 로트이다. B7.1-Fc는 양성 대조군이고, Fc는 음성 대조군이다.

도 3. L3D10 경쟁 분석. 10D1은 키메라 L3D10보다 CTLA4에 결합하는 키메라 L3D10을 차단하는데 덜 효율적이다. 실험은 ELISA 플레이트에 첨가하기 전에 비오틴결합된 키메라 L3D10을 주어진 농도의 비표지된 CTLA4-결합 단백질 또는 CTLA4-Fc와 혼합한 것을 제외하고는, 도 2에서와 같이 수행되었다. 10D1보다 비표지된 L3D10에 의한 차단이 훨씬 우수하다는 점에 유의하며, 이는 상기 항체 결합 부위가 동일하지 않다는 것을 시사한다.

도 4. 플레이트 고정화된 B7.1에 대한 CTLA4 결합 차단. B7.1Fc 단백질을 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 ELISA 플레이트 상에 코팅하였다. 세척 및 차단 후, 주어진 농도의 경쟁 단백질의 존재하에 비오틴결합된 CTLA4-Fc 단백질을 $0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 첨가하였다. 제시된 데이터는 405nM 에서의 이중 광학 밀도를 의미한다. B7.1-Fc, 키메라 L3D10 및 CTLA4-Fc가 모두 투여량-의존적 방법으로 CTLA4:B7.1 상호작용을 차단하는 반면, 시험된 모든 투여량에서 두개의 별도의 10D1 항체 로트(lot)가 차단되지 못했다. 10D1의 두 로트가 비오틴결합된 CTLA4에 대한 강한 결합을 나타내므로, CTLA4의 비오틴화는 CTLA4상의 10D1 에피토프를 파괴하지 않는다(데이터는 나타내지 않음).

도 5. 플레이트 고정화된 B7.2에 대한 CTLA4 결합 차단. B7.2Fc 단백질을 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 ELISA 플레이트 상에 코팅하였다. 세척 및 블로킹 후, 주어진 농도의 경쟁 단백질의 존재하에 비오틴결합된 CTLA4-Fc 단백질을 $0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 첨가하였다. 키메라 L3D10이 CTLA4:B7.2 상호작용을 투여량-의존적 방식으로 차단하는 반면, 2개의 별도의 10D1 항체 로트는 가장 높은 농도에서도 CTLA4:B7.2 상호작용을 완전히 차단하지 못했다.

도 6. 10D1 및 L3D10 모두 가용성 B7-1 및 B7-2 및 고정화된 CTLA4-Fc를 사용하여 B7-CTLA4 상호작용을 강력하게 차단한다. 다양한 양의 항-인간 CTLA4 mAb를 $0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 비오틴결합된 인간 CTLA4-Fc와 함께 첨가되어, 인간 B7-1Fc로 플레이트 코팅하였다. 플레이트에 결합된 CTLA4의 양은 HRP-접합된 스트렙타비딘을 사용하여 측정되었다. 나타낸 데이터는 이중을 의미하며, 두개의 독립적인 실험을 나타낸다.

도 7. 세포 표면 발현된 B7.1에 대한 CTLA4 결합을 차단. 비오틴결합된 CTLA4-Fc 단백질을 주어진 농도의 경쟁 단백질의 존재하에 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 CHO 세포를 발현하는 B7.1에 첨가하였다. 마우스 또는 인간 B7-1 및 B7-2로 형질감염된 CHO 세포에 비오틴결합된 융합 단백질의 결합은 유동 세포분석에 의해 검출하였다. 결합된 수용체의 양은 피코에리토린-접합된 스트렙타비딘을 사용하여 측정하였다. 나타낸 데이터는 3개의 샘플의 평균 형광 강도이다. 키메라 L3D10이 CTLA4:B7.1 상호작용을 투여량-의존적 방식으로 차단하는 반면, 2개의 별도의 10D1 항체 로트는 시험된 모든 투여량에서 차단되지 못했다.

도 8. 세포 표면 발현된 뮤린 B7.1에 대한 CTLA4 결합 차단. mB7-1이 CHO 세포 상에서 발현될 때 10D1에 의한 마우스 B7-1-인간 CTLA4 상호작용의 보통이지만 검출 가능한 차단. 마우스 B7-1을 발현하는 CHO 세포에 다양한 투여량의 항-인간 CTLA4 mAb가 $0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 인간 CTLA4-Fc와 함께 첨가되었다. 나타낸 데이터는 평균 및 SEM 또는 3개의 데이터이며, 두개의 독립적인 실험을 대표한다.

도 9. 세포 표면 발현된 B7.2에 대한 CTLA4 결합의 차단. 비오틴결합된 CTLA4-Fc 단백질은 주어진 농도의 경쟁 단백질 존재하에 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 CHO 세포 발현 B7.2에 첨가하였다. 키메라 L3D10이 CTLA4:B7.2 상호작용을 투여량-의존적 방식으로 차단하는 반면, 2개의 별도의 10D1 항체 로트는 가장 높은 농도에서도 CTLA4:B7.2 상호작용을 완전히 차단하지 못했다. 본 도면에 나타낸 데이터는 적어도 5회 반복되었다.

도 10. 10D1은 L3D10보다 우수한 비오틴결합된 인간 CTLA4-Fc에 결합한다. 다양한 양의 항-인간 CTLA4 mAbs 또는 대조군 IgG를 플레이트 상에 코팅하였다. 비오틴결합된 CTLA4-Fc를 $0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 첨가하였다. 플레이트에 결합된 CTLA4의 양은 HRP-접합된 스트렙타비딘을 사용하여 측정하였다. 나타낸 데이터는 2개의 평균이며, 두개의 독립적인 실험을 나타낸다.

도 11. 10D1이 아니라 L3D10은 폴리히스티딘 태그된 CTLA4와 CHO 세포 발현 인간 B7-1 사이의 상호작용을 차단한다. CHO 세포 발현 인간 B7-1은 주어진 양의 항체와 함께 폴리히스티딘-태그된 CTLA4와 함께 배양하고, CTLA4-Fc의 양이 PE-스트렙타비딘에 의해 검출되고, FACSCanto II에 의해 측정되었다. 나타낸 데이터는 3개의 샘플의 평균 형광 강도를 의미하며, 2개의 독립적인 실험을 나타낸다.

도 12. 키메라 L3D10은 동종 MC38 모델에서 확립된 종양의 완전한 차도를 유도한다. 상부 패널은 실험적 설계를 도시하고, 하부 패널은 대조군 IgG(하부 좌측 패널, n=6) 또는 키메라 L3D10(하부 우측 패널, n=5)을 수용한 마우스내 MC38 종양의 성장 동역학을 나타낸다.

도 13. MC38 종양 모델에서 키메라 L3D10 및 10D1의 치료 효과. 약 20 g의 체중을 갖는 인간 CTLA4-노크-인 마우스를 연구에 사용하였다. 1×10^6 MC38 종양 세포가 Ct1a4^{h/h} 마우스에 피하 주사되었으며, 종양이 직경 0.5cm 크기에 도달했을 때, 종양 보유 마우스는 각각 5 또는 6마리의 마우스로 3그룹으로 무작위 추출하였다. 화살표로 표시한 바와 같이, 마우스를 7, 10, 13, 및 16일에 10D1, 키메라 L3D10 또는 대조군 hIgGFc의 100 µg/주사로 처리(복강내)하였다. 두 실험의 결과가 도시되어 있으며(좌측 및 우측 패널), 나타낸 데이터는 종양 크기의 평균 및 S.D.(좌측 패널에서 그룹당 n=6, 우측 패널에서 그룹당 n=5)이다. L3D10 및 10D1은 이 모델에서 유사한 치료 효과를 가지며, 확립된 종양의 완전한 차도를 유도할 수 있다. 종양의 직경(d)은 다음 식을 사용하여 계산되었다: D = $\sqrt{(ab)}$, V = $ab^2/2$, 여기서 a는 긴 직경인 반면, b는 짧은 직경이다. 통계 분석은 양방향 반복 측정 ANOVA(치료 X 시간)에 의해 수행되었다. 좌측 패널의 경우: P=10D1 대 hIgGFc: 5.71e-07; L3D10 대 hIgGFc: P=5.53e-07; 10D1 대 L3D10: P=0.869.

도 14는 CTLA4^{h/m} 마우스에서 항-CTLA-4 mAbs에 의한 MC38의 효과적인 거부. 이형접합성 CTLA4^{h/m} 마우스가 사용된다는 것을 제외하고는 도 13에서와 같다. 나타낸 데이터는 종양 직경의 평균 및 SEM이다(그룹당 6마리의 마우스); 10D1 대 hIgGFc: P=0.0011; L3D10 대 hIgGFc: P=5.55e-05; 10D1 대 L3D10: P=0.0346.

도 15. B16-F1 흑색종 종양 모델에서 키메라 L3D10 및 10D1의 치료 효과. 약 20 g의 체중을 갖는 인간 CTLA4-노크인 마우스를 연구에 사용하였다. 화살표는 치료 시간(50 µg/마우스/치료)을 나타낸다. 나타낸 데이터는 종양 크기의 평균 및 S.D.(그룹당 n=4)이다. L3D10은 이 모델에서 유사한 치료 효과를 가지며, 이 공격적이고 면역원성이 낮은 종양 모델에서 종양 성장을 지연시킬 수 있다.

도 16. 생체내에서 CTLA4 차단을 측정하기 위한 분석. B7.1 또는 B7.2는 수지상 세포에 결합하여 T 세포 표면상의 CTLA4에 결합하고, CTLA4에 의해 하향-조절된다. 그러나, 차단 항-CTLA4 항체의 결합은 CTLA4에 대한 B7.1/B7.2 결합을 방지하고, 따라서 B7.1 및 B7.2의 하향조절을 방지하여, B7.1/B7.2 발현의 순 증가를 초래한다. 그러나, 인간 및 마우스 CTLA4 모두를 발현하는 키메라 T 세포의 경우, 인간 CTLA4에 결합하는 항체는 뮤린 CTLA4에 대한 B7.1/B7.2 결합을 방지하지 못하며, 이는 B7.1/B7.2 억제를 회복시킨다.

도 17a-f. 10D1은 생체내에서 B7-CTLA4 상호작용을 차단하지 않는다. 도 11에서 설명한 분석법을 사용하여, B7.1 및 B7.2 발현을 분석하기 위해, 항-CTLA4 항체로 처리된 마우스로부터의 세포를 사용하였다. 도 17a는 실험 설계도를 도시한다. 간단히 말해, 연령과 성별이 일치하는 마우스에 500 µg의 항체를 투여하거나, 그 대조군은 복강내 투여하였다. 주사 후 24시간에, 마우스를 희생시키고, 그의 비장 세포를 항-CD11c, CD11b, 항-B7-1 및 항-B7-2 mAb로 염색하였다. 도 17b는 B7 발현에 대해 분석된 CD11c^{hi} DC의 표현형을 나타내는 대표적인 데이터를 나타낸다. 도 17c는 대조군 IgG1-Fc, L3D10 또는 10D1을 투여받은 마우스의 DC에서 B7-1의 수준을 도시하는 대표적인 히스토그램을 나타낸다. 상부 패널의 데이터는 동형접합성 노크인 마우스에서의 항체 효과를 나타내지만, 하부 패널에서의 데이터는 이형접합성 마우스에서의 항체 효과를 나타낸다. 도 17d는 B7-2의 발현이 도시된 것을 제외하고는 도 17c에 도시된 것과 동일하다. 도 17c 및 d에 도시된 데이터는 그룹당 3마리의 마우스를 대표하고, 그룹당 3마리의 마우스로 1회 반복하였다. 도 17e는 인간 CTLA4 동형접합성 마우스에서 10D1이 아닌 L3D10은 B7-1(좌측 패널) 및 B7-2(우측 패널)의 발현을 유도한다는 것을 보여준다. 도시된 데이터는 그룹당 총 6마리의 마우스를 포함하는 2가지 실험으로부터 요약된다. 각 실험에서 대조군 마우스의 평균 데이터는 인위적으로 100%로 정의되고, 실험 그룹의 데이터는 대조군에 대해 표준화된다. 도 17f는 이형접합성 마우스가 사용된다는 것을 제외하고는 도 17e와 동일하다. L3D10 또는 10D1 모두 마우스 및 인간 Ct1a4 유전자를 모두 우성적으로 발현하는 마우스에서 B7-CTLA4 상호작용을 차단하지 않는다.

도 18. L3D10은 마우스 CTLA4에는 결합하지 않지만 인간에 결합한다. 도시하는 데이터는 Ct1a4^{h/h}(상부) 또는 Ct1a4^{m/m}(하부) 마우스의 비장 세포를 사용하여 게이트 Cd3⁺ Cd4⁺ 세포 중 CTLA4의 세포내 염색의 도트 플롯이다.

항-마우스 CTLA4 mAb 4F10을 대조군으로 사용하였다.

도 19. CTLA4^{h/m} 마우스에서의 키메라 L3D10 및 10D1의 치료 효과. 상부 패널은 실험 설계를 도시한다. *Ct1a4*^{h/h} 마우스에게 결장암 세포주 MC38을 투여하였고, 종양의 직경이 약 5 mm에 이르면 마우스를 대조군 인간 IgG-Fc, L3D10 또는 10D1로 4회 처리하고, 종양 크기를 6주 기간에 걸쳐 관찰하였다. 하부 패널은 대조군 IgG, 키메라 L3D10 또는 10D1(그룹당 n=6)을 투여한 마우스에서 MC38 종양의 성장 동역학을 나타낸다. 도 16에 도시된 바와 같이, 생체내에서 CTLA4 차단 활성의 명백한 차이에도 불구하고, L3D10 및 10D1 모두 키메라 CTLA4^{m/h} 마우스에서 MC38 모델에 대해 강한 항-종양 활성을 나타낸다.

도 20a-b. 10D1 및 L3D10은 B16 흑색종 성장과 유사한 치료 효과를 갖는다. 1×10^5 B16 종양 세포가 *Ct1a4*^{h/h} 마우스(n=4-5)에 주사(피하)되고, 화살표로 표시한 바와 같이, 11일, 14일, 17일(도 20a) 또는 2일, 5일 및 8일(도 20b)에 100 µg(도 20a) 또는 250 µg(도 20b)의 10D1, L3D10 또는 대조군 IgG-Fc로 처리(복강내)하였다. 도 20a의 경우, 10D1 대 hIgG-Fc: P=0.0265; L3D10 대 hIgG-Fc: 10D1 대 L3D10: P=0.0487; P=0.302. 도 20b의 경우, 10D1 대 hIgG-Fc: P=0.00616; L3D10 대 hIgG-Fc: P=0.0269; 10D1 대 L3D10: P=0.370,. 데이터는 그룹당 4-5마리의 마우스의 평균±SEM을 나타낸다. 통계 분석은 양방향 반복 측정 ANOVA에 의해 수행되었다.

도 21a-b. 종양 미세환경 내에서 Treg의 소모량을 평가하기 위해 완료시 거부하기 전에 종결된 마우스에서의 *Ct1a4*^{h/h}(도 21a) 및 *Ct1a4*^{m/h}(도 21b)에서 L3D10과 10D1 사이의 면역치료 효과. 나타낸 데이터는 그룹당 5마리의 마우스를 포함하는, 2개의 독립적인 실험의 종양 직경의 평균 및 SEM이다.

도 22a-f. B7-CTLA4 상호작용을 차단하는 것이 항-CTLA4 mAb의 암 면역치료 활성에 기여하지 않는다. 도 22a는 2개의 항-CTLA4 mAb에 의한 매우 다른 차단 활성에도 불구하고 비교가능한 면역치료 효과를 나타낸다. 5×10^5 MC38 종양 세포는 *Ct1a4*^{h/h} 마우스(n=6)에 주사(피하)되고, 화살표로 표시한 바와 같이, 7, 10, 13 및 16일에 100 µg 10D1, L3D10 또는 대조군 hIgG-Fc로 처리(복강내)하였다. 데이터는 그룹당 6마리의 마우스의 평균±SEM을 나타낸다. 통계 분석은 양방향 반복 측정 ANOVA(치료×시간)에 의해 수행되었다. 10D1 대 hIgG-Fc: P=5.71^{e-}⁰⁷; L3D10 대 hIgG-Fc: P=5.53e⁻⁰⁷; 10D1 대 L3D10: P=0.869. 데이터는 3가지 독립적인 실험을 대표한다. 도 22b. 항체가 B7-CTLA4 상호작용을 차단하지 않는 마우스에서는 모두 강력한 종양 거부를 유도한다. 마우스 및 인간 CTLA4 모두를 발현하는 이형접합성 마우스가 사용되는 것을 제외하고는 도 22a에서와 동일하다. 10D1 대 hIgG-Fc: P=0.0011; L3D10 대 hIgG-Fc: P=5.55e⁻⁰⁵; 10D1 대 L3D10: P=0.0346. 데이터는 3가지 독립적인 실험을 대표한다.

도 22c-f, B7-CTLA4 상호작용을 차단하는 것은 종양 미세환경에서 Treg의 선택적 소모에 기여하지 않는다. 도 22c-d. B7-CTLA4 상호작용을 차단하는 능력에 관계없이, L3D10 및 10D1은 비장에서 Treg를 제거하지 않는다. 나타낸 데이터는 *Ct1a4*^{h/h}(도 22c) 및 *Ct1a4*^{m/h}(도 22d) 마우스에서 비장 CD4 T 세포 중 Foxp3+ 세포의 %이다. n=6. e 및 f에서, L3D10 및 10D1 둘다 *Ct1a4*^{h/h}(도 22e) 및 *Ct1a4*^{m/h}(도 22f) 마우스에서 종양 침윤성 CD4 T 세포 중 Treg를 제거한다. c-f에 나타낸 데이터는 종양 세포 도전 후 17일(실험 1) 또는 19일(실험 2)에, 및 4가지 항-CTLA4 mAb 치료를 개시한 후 10 또는 12일에 화살표로 표시된 바와 같이 Treg의 %이다.

도 23a-f. 일반적으로 사용되는 항-마우스 CTLA4 mAb 9H10 및 9D9의 차단 활성 평가. 또한, 도 23a 및 b는 B7-1(도 23a) 및 B7-2(도 23b)가 플레이트 상에 코팅되는 경우 9H10이 B7-CTLA4 상호작용을 차단하지 않는다는 것을 보여준다. 비오틴결합된 마우스 CTLA4-Fc 융합 단백질을 주어진 농도의 대조군 IgG 또는 항-마우스 CTLA4 mAb 9D9 및 9H10의 존재하에 B7-코팅된 플레이트와 함께 배양하였다. CTLA4 결합은 HRP-접합된 스트렙타비딘에 의해 검출된다. 나타낸 데이터는 2개의 평균이며, 두개의 독립적인 실험을 대표한다. 도 23c 및 23d는 9D9 및 9H10이 가용성 물질(도 23c) 및 플레이트 결합된 CTLA4-Fc(도 23d)에 대한 차등 결합을 나타낸다는 것을 보여준다. 나타낸 데이터는 2개의 평균이며, 적어도 두개의 독립적인 실험을 대표한다. 도 23e 및 23f는 500 µg 항체로 복강내(i.p.) 치료한지 24시간 후 WT(*Ct1a4*^{m/m}) 비장 세포로부터의 CD11c^{hi} DC에서 B7-1(도 23e) 및 B7-2(도 23f)의 수준에 대한 항-마우스 CTLA4 mAbs 9D9 및 9H10의 효과를 나타낸다. 데이터는 그룹당 3마리의 마우스를 포함하는 2회의 독립적인 실험에서 그룹당 6마리의 독립적인 마우스로부터 요약된다.

도 24a-d. 항-마우스 CTLA4 mAb 4F10의 분명한 생체내 및 생체내 차단 활성. 도 24a 및 b는 플레이트-코팅된

B7-1(도 24a) 또는 B7-2(도 24b)에 대한 CTLA4-Fc의 상호작용에 대한 4F10의 효과를 나타낸다. 비오틴결합된 마우스 CTLA4-Fc 융합 단백질을 주어진 농도의 대조군 IgG 또는 항-마우스 CTLA4 mAb 4F10의 존재하에 B7-코팅된 플레이트와 함께 배양하였다. CTLA4 결합은 HRP-접합된 스트렙타비딘에 의해 검출된다. 나타낸 데이터는 2개의 평균이며, 두개의 독립적인 실험을 대표한다. 도 24c 및 d는 B7-1 및 B7-2 발현에 대한 4F10의 영향을 나타낸다. 그룹당 6마리 마우스의 B7-1(도 24c) 및 B7-2(도 24d)의 요약 데이터. 대조군 IgG-처리된 그룹의 B7 수준은 인위적으로 100%로 정의된다.

도 25. 항-PD-1과 조합한 키메라 L3D10 및 10D1의 부작용. 상부 패널은 실험 디자인을 도시한다. 체중이 4 g을 초과하는 10일된 암컷만의 인간 CTLA4-노크인 마우스를 연구에 사용하였다. 그들은 지시된 단백질 또는 그들의 조합을 투여받았다. 화살표는 치료 시간(100 μg/마우스/치료)을 나타낸다. 나타낸 데이터는 체중 증가율(%)의 평균 및 S.D.이다. 키메라 L3D10 및 10D1은 성체 마우스에서 비교가능한 암 치료 효과를 나타내지만(도 13), 10D1이 항-PD-1 mAb와 조합될 때 명백한 부작용이 나타난다.

도 26. 항-PD-1과 조합한 키메라 L3D10 및 10D1의 부작용. 그래프는 대조군 IgG, 10D1 + 항-PD-1 또는 키메라 L3D10 + 항-PD-1(그룹당 n=5)를 투여받은, 도 25에 개략적으로 나타낸 실험으로부터 마우스의 42일째의 최종 체중을 나타낸다. 항-PD-1 + 키메라 L3D10 조합에서는 보이지 않은, 항-PD1 + 10D1 조합에서는 체중이 유의하게 감소되었다.

도 27. 항-PD-1과 조합한 키메라 L3D10 및 10D1의 병리학적 효과. 항-PD-1과 조합 투여시, 10D1과 비교하여 L3D10의 상대적인 독성을 추가로 조사하기 위해, 본 발명자들은 상기 도 26에 기술된 마우스의 육안 해부학을 관찰하였다. 자궁/난소/방광과 흉선은 10D1 + PD-1로 처리한 마우스에서 눈에 띄게 작아진 반면, L3D10 + 항-PD-1로 처리한 마우스의 기관은 hIgG 대조군과 비슷했다. 대조적으로, 10D1로 치료받은 마우스로부터 해부된 심장은 눈에 띄게 하얀 외관을 가진 더 큰 크기로 나타났다.

도 28a-d. 항-PD-1과 조합하여 10D1에 의해 치료하면, 비정상적인 적혈구생성을 초래한다. 도 27에서 관찰된 심장의 차이를 감안할 때, 본 발명자들은 마우스 내에서 적혈구생성을 관찰한 결과, 상당히 유사했던 L3D10 + 항-PD-1 또는 대조군 항체(hIgG)로 처리한 그룹과 비교하여 10D1 + 항-PD-1로 처리한 마우스의 경우 분명한 차이가 관찰되었다. 10D1 + 항-PD-1로 처리된 마우스로부터의 골수는 눈에 띄게 흰색을 띠며(도 28a), 분리된 혈액은 거의 완전히 흰색이었다(도 28b). 이에 따라, CD119 및 CD71 마커의 분포를 이용하여 적혈구의 분화를 분석하였을때, 10D1 + 항-PD-1 처리된 마우스에서 4단계 발달중인 세포의 수에 통계적으로 유의한 감소가 관찰되었다. 대표적인 FACS 프로파일은 도 28c에 도시된 반면, 도 28d에 요약 데이터가 도시되어있다.

도 29는 항-적혈구 항체의 유동 세포계측법 분석. NOD.SCID.II2rg-/(NSG) 마우스의 혈액 샘플을 주산기 기간동안 항체 치료를 받은 마우스의 혈장 샘플에 의해 염색하였다. NSG 마우스의 혈청과 혈청없는 것을 음성 대조군으로 사용하였다. 모든 혈청을 1:50으로 희석하여 사용하였다. 이러한 데이터는 마우스가 항-적혈구 항체를 생성하지 않았다는 것을 보여준다.

도 30. 항-PD-1과 조합하여 키메라 L3D10 및 10D1로 처리된 마우스의 심장 병리학. 항-PD-1과 함께 L3D10 대 10D1의 독성학을 추가로 결정하기 위해, 본 발명자들은 도 26에 기술된 마우스에서 심장의 조직학적 분석을 수행하였다. 10D1 + 항-PD-1로 처리된 마우스는 L3D10 + 항-PD-1로 처리된 마우스 또는 인간 IgG 대조군으로 처리된 마우스에서 관찰되지 않은 높은 수준의 T 세포 침윤을 나타냈다.

도 31. 항-PD-1과 조합하여 키메라 L3D10 및 10D1로 처리한 마우스의 폐 병리학. 항-PD-1과 조합하여 L3D10 대 10D1의 독성학을 추가로 결정하기 위해, 본 발명자들은 도 26에 기술된 마우스에서 폐의 조직학적 분석을 수행하였다. 10D1 + 항-PD-1로 처리된 마우스는 L3D10 + 항-PD-1로 처리된 마우스 또는 인간 IgG 대조군으로 처리된 마우스에서 관찰되지 않은 높은 수준의 T 세포 침윤을 나타냈다.

도 32. 항-PD-1과 조합하여 키메라 L3D10 및 10D1로 처리된 마우스의 타액선의 병리학. 항-PD-1과 조합하여 L3D10 대 10D1의 독성학을 추가로 결정하기 위해, 본 발명자들은 도 26에 기술된 마우스에서 타액의 조직학적 분석을 수행하였다. 10D1 + 항-PD-1로 처리된 마우스는 L3D10 + 항-PD-1로 처리된 마우스 또는 인간 IgG 대조군으로 처리된 마우스에서 관찰된 것보다 훨씬 높은 수준의 T 세포 침윤을 나타냈다.

도 33a-f. 항-PD-1과 조합하여 키메라 L3D10 및 10D1로 처리된 마우스의 신장 및 간의 병리학. 항-PD-1과 조합하여 L3D10 대 10D1의 독성학을 추가로 결정하기 위해, 본 발명자들은 도 26에 기술된 마우스에서 신장 및 간의 조직학적 분석을 수행하였다. 도 33a-c는 신장으로부터의 단면이고, 33d-e는 간으로부터 취한 단면이다. 10D1 + 항-PD-1로 처리된 마우스는 L3D10 + 항-PD-1로 처리된 마우스 또는 인간 IgG 대조군으로 처리된 마우스에서 관

찰된 것보다 높은 수준의 T 세포 침윤을 나타냈다.

도 34. 항-PD-1과 조합하여 키메라 L3D10 및 10D1로 처리한 마우스의 독성 점수. 도 30 내지 33에 도시된 이 조직 데이터는 요약되어, hIgG 대조군 마우스 그룹보다 약간 높은 점수를 갖는 L3D10 + 항-PD-1에 비해 10D1 + 항-PD-1로 처리된 마우스의 높은 독성 점수를 나타낸다.

도 35. 주산기 기간동안 항체 치료를 받은 마우스에서 정상 체중 증가로 입증된 바와 같이 10D1 + 항-PD-1은 Ct1a4^{h/m} 마우스에서 유의한 독성을 갖지 않았다. 마우스는 10일, 13일, 16일, 19일 및 22일 복강내(100 μg/마우스/주사/항체)에 주어진 항체 또는 조합으로 치료를 받았다. 마우스는 3일마다 적어도 1회 무게를 측정하였다.

도 36. L3D10 및 10D1은 플레이트 고정화된 CTLA4에 대한 유사한 결합 패턴을 나타낸다. ELISA 플레이트를 1 μg/ml의 CTLA4-His 단백질(Sino Biological, China)에 의해 코팅하였다. 주어진 농도의 비오틴결합된 결합 단백질을 첨가하고, HRP-접합된 스트렙타비딘을 사용하여 결합을 측정하였다. 10D1-1 및 10D1-2는 동일한 항체의 2 개의 독립적인 재료 로트이다. hIgG-Fc는 인간 Ig 음성 대조군이다.

도 37. L3D10은 감소된 결합 가용성 CTLA4를 나타낸다. 주어진 농도의 항-인간 CTLA4 mAb를 밤새 상기 플레이트 상에 코팅하고, 소 혈청 일부만으로 세척하고 차단한 후, 비오틴결합된 CTLA4-Fc를 0.25 μg/ml로 첨가하였다. 배양 및 세척 후에, HRP-표지된 스트렙타비딘을 사용하여 포획된 CTLA4-Fc의 양을 측정하였다.

도 38. 모(parental) L3D10 항체 서열을 갖는 인간화된 항체 가변 영역의 정렬. 인간화된 항체 서열의 중쇄 가변 영역(상부)(서열번호: 62 내지 64) 및 경쇄 가변 영역(하부)(서열번호: 70 내지 72))은 모 L3D10 항체(중쇄: 서열번호: 57, 경쇄: 서열번호: 65) 및 각각의 인간 항체 프레임워크(중쇄: 서열번호: 58 내지 61; 경쇄: 서열번호: 66 내지 69)와의 정렬이다. 마우스의 모체 서열에 대한 복귀 돌연변이는 노란색으로 강조 표시된다. 신규한 아미노산, 즉 모 항체 서열 또는 각각의 인간 항체 프레임워크에 존재하지 않는 아미노산 잔기는 녹색으로 강조 표시된다. CDR 서열에 도입된 돌연변이는 보라색으로 표시된다. CDR 서열은 www.bioinf.org.uk/abs/에 기초하여 적색으로 표시된다.

도 39a-b. 10D1과 비교되는 인간화된 L3D10 항체의 항-종양 활성. 인간 CTLA4 노크인 마우스에서 MC38 마우스 종양 모델을 사용하여, 본 발명자들은 키메라 L3D10 항체 및 10D1과 비교되는, 인간화된 L3D10 항체의 항-종양 활성을 관찰하였다. 상부 패널은 생체내 실험의 치료 일정을 보여주며; 마우스는 접종 후 7일째부터 3일마다 항체를 총 4회 투여받았다. 모든 인간화된 항체(그룹당 n=6)는 종양을 완전히 박멸하고, 10D1(하부 패널)과 유사했다.

도 40. CTLA4^{h/m} 마우스에서의 인간화된 L3D10 항체의 항-종양 활성. 상부 패널은 생체내 실험의 치료 일정을 보여주며; Ct1a4^{h/m} 마우스는 MC38 종양 주사 후 표시된 날짜에 주입 당 30(-30, 실선), 10(-10, 점선) mg의 투여량으로 대조군 hIg 또는 세가지 다른 항-인간 CTLA4 mAbs 중 하나를 투여받았다. 종양 크기는 3일에 한번씩 측정하였다.

도 41. 최소의 질병 B16-F1 종양 모델에서 항-CTLA4 mAb의 치료 효과. 인간 CTLA4 노크인 마우스에서 B16-F1 마우스 종양 모델을 사용하여, 본 발명자들은 인간화된 L3D10 항체의 항-종양 활성을 관찰하였다. 1×10^5 B16 종양 세포를 Ct1a4^{h/h} 마우스(n=5-6)에 (피하) 주사하였다. 2, 5 및 8일에 마우스를 대조군 Ig, 10D1, 키메라 L3D10 또는 PP4637 및 PP4638(250 μg/마우스, 복강내)로 처리하였다. 종양 발생 및 크기는 매일 측정되었다. 10D1 대 hIgGFc: P=0.00616; L3D10 대 hIgGFc: P=0.0269; 10D1 대 L3D10: P=0.370; PP4637 대 hIgGFc: P=0.0005; PP4637 대 10D1: P=0.805; PP4638 대 hIgGFc: P=0.0016; PP4638 대 10D1: P=0.856. 데이터는 그룹당 5 내지 6마리의 마우스의 평균±SEM을 나타낸다. 종양의 크기는 결코 종양이 발생하지 않은 마우스의 경우 0으로 간주되었다.

도 42. 항-PD-1 mAb와의 복합 독성에 대하여 10D1, PP4631 및 PP4637 암컷 간의 비교. 설명문에 명시된대로, 암컷 CTLA4^{h/h} 마우스를 출생 후 10일 또는 11일째에 항체(100 μg/마우스/주사, 3일에 1회) 또는 대조군 Fc에서 4회 주사하여 치료하였다. 마우스는 3일에 한번씩 무게를 측정하였다. 나타낸 데이터는 30일 동안의 체중 증가%의 평균 및 SEM이다. 조직학적 분석을 위해 모든 마우스를 43일째에 희생시켰다. 그룹당 사용된 마우스의 수는 라벨의 팔호 안에 표시된다.

도 43. 10D1과 항-PD-1 조합 요법은 빈혈의 원인이 되는 반면, PP4631 + 항-PD-1 또는 PP4637 + 항-PD-1 조합

요법은 그렇지 않다. 나타낸 데이터는 11일, 14일, 17일 및 20일에 100 μg /마우스/항체의 투여량으로 4회 항체 치료를 받은 43일된 마우스의 혈마토크립트(hematocrit)이다.

도 44a-44b. 10D1 + 항-PD-1 조합 요법은 전신성 T 세포 활성화를 일으키는 반면, PP4631 + 항-PD-1 또는 PP4637 + 항-PD-1 조합 요법은 그렇지 않다. 나타낸 데이터는 말초 혈액(도 44a) 또는 비장(도 44b)에서의 나이 브(CD44^{lo}CD62L^{hi}), 중앙 기억(CD44^{hi}CD62L^{hi}) 및 이펙터 메모리(CD44^{hi}CD62L1^{lo}) T 세포의 표현형을 갖는 CD4(상부 패널) 및 CD8 T 세포(하부 패널)의 %이다. 상기 세포를 43일된 마우스로부터 채취하고, 상기 마우스는 11일, 14일, 17일 및 20일에 100 μg /마우스/항체의 투여량으로 4회 항체치료를 받았다.

도 45. L3D10의 인간화는 고정화된 CTLA4에 대한 결합에 영향을 미치지 않는다. 고정화된 CTLA4에 결합하는 인간화된 L3D10 항체의 능력은 도 36에 기술된대로 측정되었다. X-축은 용액에 첨가된 항-CTLA-4 mAbs의 농도를 나타낸다. 인간화는 고정화된 CTLA4에 대한 결합에 영향을 미치지 않으며, 모든 3가지 인간화된 항체는 모체 키메라 L3D10 항체 및 10D1과 유사한 결합을 나타내었다. CTLA-4-his 대신에 CTLA4-Ig를 사용한 경우에도 유사한 패턴이 관찰되었다.

도 46. 인간화는 가용성 CTLA4에 대한 L3D10 결합을 더욱 감소시킨다. 가용성 CTLA4에 결합하는 인간화된 L3D10 항체의 능력은 도 37에 기술된대로 측정되었다. X-축은 ELISA 플레이트 상에 코팅된 항-CTLA-4 mAbs의 농도를 나타낸다. 인간화는 모체 L3D10 키메라 항체에 비해 가용성 CTLA4에 대한 결합을 더욱 감소시킨다. CTLA-4-his 대신에 CTLA4-Ig를 사용한 경우에도 유사한 패턴이 관찰되었다.

도 47a-b. PP4631, PP4638 및 PP4637은 시험관내에서 B7-CTLA-4 상호작용을 차단하지 않는다. 도 47a는 항-인간 CTLA-4 mAb 10D1, PP4631, PP4637 및 L3D10에 의한 B7-1-CTLA-4 상호작용의 차단을 나타낸다. B7-1Fc는 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 고정화되었다. 비오틴결합된 CTLA4-Fc를 주어진 용량의 항체와 함께 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 첨가하였다. 제시된 데이터는 405 nM에서의 2회 광학 밀도의 평균이다. 도 47b는 항-인간 CTLA-4 mAb 10D1 및 L3D10에 의한 B7-2-CTLA-4 상호작용의 차단을 나타낸다. B7-2-Fc가 고정화된 것을 제외하고는 도 47a에서와 같다.

도 48. PP4631 및 PP4637은 수지상 세포에서의 B7-1 및 B7-2 발현에 대한 효과의 결여로 입증된 바와 같이, 생체내에서 B7-CTLA-4 상호작용을 차단하지 않는다. 그룹당 3마리의 마우스로부터의 B7-1(a) 및 B7-2(b) 수준에 대한 데이터를 요약한다. 대조군 IgG-처리군의 B7 수준은 인위적으로 100%로 정의된다.

도 49. 항-PD-1 mAb와 조합하여 최상의 안전성 프로파일을 나타내는 PP4637(도 42 참조)은 가장 낮은 치료 용량에서 종양 거부에 기초하여 종양 거부를 일으키는 가장 유력한 것이다. Ctl4a4^{h/m} 마우스는 지시된 날짜에 주사당 30(-30, 실선) 또는 10(-10, 점선) μg 의 투여량으로 대조군 IgFc 또는 세가지 다른 항-인간 CTLA4 mab 중 하나를 투여받았다. 종양 크기는 3일에 한번씩 측정하였다. 10 $\mu\text{g}/\text{주사}$ 에서, PP4637(HL32)은 종양 거부를 유도하는 데 가장 효율적이다.

도 50. 인간화된 항체 순도 평가. 일시적으로 발현된 인간화된 L3D10 항체를 단백질 A 크로마토그래피로 정제하고, 모든 3가지 항체의 샘플을 환원성 및 비-환원성 SDS-PAGE로 평가하였다. 정제된 단백질은 환원 및 비-환원 조건 하에서 항체 분자의 크기를 나타내는 겔 랜드를 생성하였다. "유출(Flow out)" 레인은 단백질 A 칼럼 흐름을 나타내며, 이는 항체 단백질의 대부분이 단백질 A 칼럼에 부착되었음을 나타낸다.

도 51. 일시적으로 발현된 단백질의 크기 배제 크로마토그래피(SE-HPLC). 각 인간화된 항체에 대한 단백질 샘플을 단일 단계 단백질 A 크로마토그래피 후 SE-HPLC로 분석하였다. 상부 패널: 항체 PP4631. 중간 패널: 항체 PP4637. 하부 패널: 항체 PP4638.

도 52. 일시적으로 발현된 단백질의 CE-SDS 분석. 각 인간화된 항체에 대한 단백질 샘플을 단일 단계 단백질 A 크로마토그래피 후 CE-SDS로 분석하였다. 왼쪽 패널은 비-환원성 조건 하에서의 결과를 표시하고, 오른쪽 패널은 환원성 조건 하에서의 결과를 표시한다. 상부 패널: 항체 PP4631. 중간 패널: 항체 PP4637. 하부 패널: 항체 PP4638.

도 53a-c. 모세관 등전점 포커싱(capillary isoelectric focusing, cIEF)에 의해 측정된, 인간화된 L3D10 항체의 전하 이소형(charge isoform) 프로필 및 탈아미드화. 높은 pH 스트레스 하에서의 단백질 탈아미드화 수준은 2가지 상이한 시간(5시간 및 12.5시간)에 걸쳐 높은 pH 스트레스 처리 전후의 인간화된 L3D10 항체를 비교함으로써 측정되었고, cIEF 분석에 의해 분석되었다. 도 53a 내지 도 53c는 각각 항체 PP4631, PP4637 및 PP4638에 대한 프로파일을 도시한다.

도 54a-c. 인간화된 L3D10 항체의 시차 주사 열량계(DSC) 열 분석. 상이한 항체의 열 안정성 및 용융 온도를 측정하기 위해, 이들은 시차 주사 열량계(DSC) 열 분석을 받았다. 도 54a 내지 c는 각각 항체 PP4631, PP4637 및 PP4638에 대한 표준화된 DSC 곡선을 도시한다.

도 55. 인간, 마카크(macaque) 및 마우스 CTLA-4 세포와 도메인의 정렬. 인간(Hm, 적색으로 표시)(서열번호: 73), 마카크(Mk, 흑색으로 표시) 및 마우스(Ms, 녹색으로 표시) CTLA-4 단백질 세포와 도메인의 아미노산 서열을 정렬하고, (인간 서열과 관련된) 보존된 아미노산은 대시(-)로 표시된다. 정렬을 돋기 위해 마우스 서열은 노란색으로 강조 표시된 위치에 (인간 및 원숭이 서열과 관련된) 결실 및 삽입을 가진다. 공지된 B7-1Ig 결합 부위는 굵은 글씨 및 밑줄이 그어져 있다. 서열은 인간 및 원숭이 서열이 많이 보존되는 반면, 마우스 서열은 다수의 아미노산 차이를 갖는다는 것을 입증한다. 이 서열 정렬에 기초하여, 뮤린 특이적 아미노산을 포함하는 11개의 변이체(M1-M11)(서열번호: 40-50) 인간 CTLA-4Fc 단백질을 설계하였다 - 각 변이체 단백질에 포함된 아미노산은 청색으로 표시되어 있다.

도 56a-b. WT 및 변이체 CTLA-4Fc 단백질의 아미노산 서열 조성. 뮤린 Ct1a-4 아미노산을 포함하는 WT CTLA-4Fc 단백질(서열번호: 39) 및 11개의 변이체 단백질(서열번호: 40-50)을 코딩하는 DNA 구조물을 도시된 바와 같이 설계하였다. 아미노산 서열은 IgG1 Fc 부분을 포함하는 성숙 단백질을 위한 것이지만, 신호 웨타이드는 포함하지 않는다. 알려진 B7-1Ig 결합 부위는 청색 대문자와 이중 밑줄로 표시된다. 변이체에서 대체된 뮤린 아미노산 잔기는 적색 소문자로 표시된다. 단백질의 IgG1 Fc 부분은 밑줄이 그어져 있다.

도 57. M11(AA103-106, YLGI>fcGm)의 돌연변이는 인간 CTLA-4에 결합하는 항체를 선택적으로 파괴시킨다. 나타낸 데이터는 플레이트-코팅된 hCTLA4-Fc(개방 원), mCTLA4-Fc(채워진 삼각형), M11(채워진 원) 및 IgG1-Fc(개방 삼각형)에 결합하는 B7-1Fc(a), L3D10(b), PP4631(c) 및 PP4637(d)의 결합을 도시하는, 2개의 평균이다.

도 58. B7-1-CTLA4 복합체의 3-D 구조에서 B7-1 결합 부위에 인접한 에피토프에 L3D10, PP4631 및 PP4637을 매핑. B7-1 결합 모티프는 적색으로 채색되어 있는 반면, 항체 에피토프는 보라색으로 채색되어 있다. B7-1은 공간이 채워진 리본이 있는 CTLA4 위에 도시되어 있으며, CTLA-4는 채워지지 않은 리본으로 도시되어 있다.

도 59. WT(서열번호: 39) 및 변이체 CTLA-4Fc 단백질, M12-M17(서열번호: 51-56)의 아미노산 서열 조성. 뮤린 Ct1a-4 아미노산을 포함하는 6개의 변이체 CTLA-4Fc 단백질인 M12-M17을 코딩하는 DNA 구조물을 도시된 바와 같이 설계하였다. 아미노산 서열은 IgG1 Fc 부분을 포함하는 성숙 단백질을 위한 것이지만, 신호 웨타이드는 포함하지 않는다. 알려진 B7-1Ig 결합 부위는 청색 대문자와 이중 밑줄로 표시된다. 변이체에서 대체된 뮤린 아미노산 잔기는 적색 소문자로 표시된다. 단백질의 IgG1 Fc 부분은 밑줄그어져 있다.

도 60a-c. 돌연변이 분석은 CTLA-4에 대한 10D1(도 60A), PP4631(도 60B) 및 PP4637(도 60C)의 경우 분명한 결합 요건들을 보여준다. CTLA-4Fc 변이체를 $1 \mu\text{m}/\text{ml}$ 로 4°C 에서 밤새 코팅하였다. BSA로 차단한 후, 주어진 농도의 비오틴결합된 항-CTLA-4 mAb를 첨가하고, 2시간 동안 배양하였다. 결합되지 않은 항체를 세척한 후, 결합된 항체를 HRP-표지된 스트렙타비딘으로 검출하였다.

도 61a-b. 최소 질병(도 61a) 및 확립된 종양(도 61b) 모델 모두에서 항-4-1BB 및 항-CTLA-4 항체의 치료 효과. 도 61a는 최소 질병의 치료를 보여준다. C57BL/6 마우스에게 5×10^5 MC38 세포를 피하 접종하였다. 종양 세포 주입 후 2, 9 및 16일에 대조군 햄스터 및 래트 IgG, 항-CTLA-4 및/또는 항-4-1BB 항체가 주입되었다. 종양의 크기는 신체 검사로 측정하였다. 나타낸 데이터는 종양의 성장 동역학이며, 각 라인은 하나의 마우스에서 종양 성장을 나타낸다. 제시된 크기는 종양의 긴 직경과 짧은 직경의 산물이다. 도 61b는 확립된 종양의 치료를 나타낸다. 도 61a에서와 같이, 종양 투여 후 14일째 치료가 시작되었다는 것을 제외하고; 모든 마우스는 mAb 치료를 시작하기 전에 크기가 $9-60 \text{ mm}^2$ 의 범위인 종양을 확립했다. 확립된 종양에 대한 두 항체의 조합된 효과는 3회 반복되었다.

도 62. CD4 또는 NK 세포가 아닌, CD8 T 세포는 항체-유도된 종양 거부에 필수적이다. 종양 보유 마우스는 종양 세포 접종(*) 후 9, 12, 16일에 CD4, CD8 또는 NK1.1에 특이적인 항체를 3회 주사하여 CD4, CD8 또는 NK 세포를 소모시켰다. 치료 항체(항-CTLA-4 + 항-4-1BB)를 9, 16 및 23일에 주사하였다(수직 화살표). 나타낸 데이터는 종양 크기의 평균 및 SEM이다($n=3$). 다른 그룹(+)과 대조되는 CD8-소모된 그룹에 대해서는 $P < 0.05$.

도 63a-b. 조합 요법은 항-CTLA-4 항체에 대한 숙주 반응을 감소시켰다. 햄스터-항-마우스-CTLA-4(도 63a) 또는 래트-항-마우스-4-1BB(도 63b) 항체를 ELISA 플레이트에 코팅하였다. 5마리의 마우스의 그룹으로부터의 혈청의 상이한 희석액을 플레이트에 첨가하였다. 결합된 항체의 상대적인 양은 2차 단계 시약(흡수에 의해 래트 및 햄

스터 IgG에 대한 반응성이 소모된 비오틴결합된 염소 항-마우스 항체)를 사용하여 측정하였다. 제시된 데이터는 490 nm에서의 광학 밀도의 평균 및 SEM이다. 종양이 없는 마우스를 동일한 항체로 처리하였을 때 항-CTLA-4 및 4-1BB에 대한 숙주 항체 반응의 유사한 감소가 관찰되었다(데이터는 나타내지 않음).

도 64a-b. 인간 CTLA-4 유전자 노크-인 마우스에서 항-4-1BB 및 L3D10(항-인간-CTLA4) 항체와의 조합 요법. 도 64a는 치료 효과를 나타낸다. 인간 CTLA4 노크인 마우스에게 5×10^5 MC38 종양 세포를 피하접종하였다. 2일 후, 7마리의 마우스 그룹을 화살표로 표시된 바와 같이, 래트 및 마우스 IgG, 항-4-1BB 및 마우스 IgG, L3D10 및 래트 IgG, 또는 L3D10 및 항-4-1BB로 처리하였다. 데이터는 평균 종양 부피와 SEM(n=7)이다. 모든 치료법은 종양 성장을 유의하게 감소시켰고(P <0.001), 이중 항체 처리 그룹은 대조군(P <0.0001) 또는 L3D10 항체(P=0.0007) 또는 항-4-1BB 항체 치료군(P=0.03)과 비교할때 유의하게 감소된 종양 크기를 나타낸다. 모든 종양 보유 마우스는 대조군 IgG-처리된 그룹이 초기 제거 기준에 도달할 때 희생되었다. 도 64b는 조합 요법을 받은 마우스에서 오래-지속된 면역력을 나타낸다. 이중 항체-처리된 그룹에서 종양이 없는 마우스는 MC38 종양에 대하여 오래 지속되는 면역력을 나타내었다. 첫 번째 종양 세포 챌린지후 110일 후, 이중 항체-처리된, 무종양 마우스 또는 대조군 나이브 마우스에게 5×10^5 종양 세포를 피하 투여하였다. 종양의 성장은 신체 검사를 통해 모니터링되었다. 첫 번째 라운드에서 종양을 거부한 모든 마우스는 재감염에 완전히 내성이었으며, 모든 나이브 마우스는 점진적인 종양 성장을 보였다는 것을 주목한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

[0029] 본원에 사용된 용어 "항체"는 "가변 영역" 항원 인식 부위를 갖는 면역글로불린 분자를 의미한다. 용어 "가변 영역"은 면역글로불린의 상기 도메인을 항체와 광범위하게 공유되는 도메인(예를 들어, 항체 Fc 도메인)과 구별하기 위한 것이다. 가변 영역은 그의 잔기가 항원 결합을 담당하는 "초가변 영역"을 포함한다. 초가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기(즉, 일반적으로 경쇄 가변 도메인에서 대략 잔기 24-34(L1), 50-56(L2) 및 89-97(L3) 및 중쇄 가변 도메인에서 대략 잔기 27-35(H1), 50-65(H2) 및 95-102(H3); 참고문헌 44) 및/또는 "초가변 루프"로부터의 잔기(즉, 경쇄 가변 도메인에서 잔기 26-32(L1), 50-52(L2) 및 91-96(L3), 및 중쇄 가변 도메인에서 26-32(H1), 53-55(H2) 및 96-101(H3), 참고문헌 45). "프레임워크 영역" 또는 "FR" 잔기는 본원에서 정의된 바와 같은 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다. 항체라는 용어는 단클론 항체, 다중-특이성 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, 합성 항체, 키메라 항체, 카멜 항체, 단일 사슬 항체, 이황화 결합된 Fvs(sdFv), 세포내항체(intrabody) 및 항-이디오타입(항-Id) 항체(예를 들어, 본 발명의 항체에 대한 항-Id 및 항-항-Id 항체를 포함함)를 포함한다. 특히, 이러한 항체는 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 클래스(예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂) 또는 서브클래스의 면역글로불린 분자를 포함한다.

[0031] 본원에 사용된 바와 같이, 항체의 "항원 결합 단편"이라는 용어는 항체의 상보성 결정 영역("CDR") 및, 선택적으로 항체의 "가변 영역" 항원 인식 부위를 포함하고 항원에 면역특이적으로 결합하는 능력을 나타내는 프레임워크 잔기를 함유하는 항체의 하나 이상의 부분을 지칭한다. 상기 단편은 Fab', F(ab').sub.2, Fv, 단일 사슬(ScFv) 및 이의 변이체, 천연 변이체 및, 항체의 "가변 영역" 항원 인식 부위 및 이종 단백질(예를 들어, 독소, 상이한 항원에 대한 항원 인식 부위, 효소, 수용체 또는 수용체 리간드 등)을 포함하는 융합 단백질을 포함한다. 본원에서 사용된 용어 "단편"은 적어도 5개의 연속적인(contiguous) 아미노산 잔기, 적어도 10개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 15개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 20개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 25개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 40개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 50개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 60개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 70개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 80개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 90개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 100개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 125개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 150개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 175개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 200개의 연속적인 아미노산 잔기 또는 적어도 250개의 연속적인 아미노산 잔기의 아미노산 서열을 포함하는 웹타이드 또는 폴리웹타이드를 지칭한다.

[0032] 인간, 키메라 또는 인간화된 항체는 인간에서의 생체내 사용에 특히 바람직하지만, 뮤린 항체 또는 다른 종의 항체는 많은 용도(예를 들어, 시험관내 또는 원위치 검출 분석, 급성 생체내 사용 등)에 유리하게 사용될 수 있다.

[0033] "키메라 항체"는 항체의 상이한 부분이 비-인간 항체로부터 유도된 가변 영역 및 인간 면역글로불린 불변 영역

을 갖는 항체와 같은 상이한 면역글로불린 분자로부터 유래된 분자이다. 비-인간 종으로부터의 하나 이상의 CDR 및 인간 면역글로불린 분자로부터의 프레임워크 영역을 포함하는 키메라 항체는 예를 들어, CDR-이식(EP 239,400; 국제 공개 번호 WO 91/09967; 및 미국 특허 제5,225,539호, 제5,530,101호 및 제5,585,089호), 베니 어링(veneering) 또는 리서페이싱(resurfacing)(EP 592,106; EP 519,596; 46-48) 및 사슬 셔플링(chain shuffling)(미국 특허 제5,565,332호)를 포함하는 당 분야에 공지된 여러 기술들을 사용하여 제조될 수 있다.

[0034] 본 발명은 특히 "인간화된 항체"에 관한 것이다. 본원에 사용된 용어 "인간화된 항체"는 인간 프레임워크 영역 및 비인간(통상 마우스 또는 래트) 면역글로불린 유래의 하나 이상의 CDR을 포함하는 면역글로불린을 지칭한다. CDR을 제공하는 비-인간 면역글로불린을 "공여자(donor)"라고 하며, 이 프레임워크를 제공하는 인간 면역글로불린을 "수혜자(acceptor)"라고 한다. 불변 영역은 존재할 필요는 없지만, 존재한다면, 이들은 적어도 약 85 내지 90%, 바람직하게는 약 95% 이상 동일한 인간 면역글로불린 불변 영역과 실질적으로 동일해야한다. 따라서, 가능하다면 CDR을 제외한 인간화된 면역글로불린의 모든 부분은 천연 인간 면역글로불린 서열의 상응하는 부분과 실질적으로 동일하다. 인간화된 항체는 인간화된 경쇄 및 인간화된 중쇄 면역글로불린을 포함하는 항체이다. 예를 들어, 키메라 항체의 전체 가변 영역이 비-인간(non-human)이기 때문에, 인간화된 항체는 전형적인 키메라 항체를 포함하지 않을 것이다. 수득된 인간화된 항체가 CDR을 제공하는 공여자 항체와 동일한 항원에 결합할 것으로 예상되기 때문에 공여자 항체가 "인간화" 과정에 의해 "인간화"되었다고 한다. 대부분의 경우, 인간화된 항체는 수혜자의 초가변 영역 잔기가 원하는 특이성, 친화성 및 수용량을 갖는 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류와 같은 비-인간 종(공여자 항체)으로부터의 초가변 영역 잔기로 치환된 인간 면역글로불린(수혜 항체)이다. 일부의 경우, 인간 면역글로불린의 프레임워크 영역(FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기로 치환된다. 또한, 인간화된 항체는 수혜자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 더욱 개선시킨다. 일반적으로, 인간화된 항체는 실질적으로 모든 하나 이상의, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 포함할 것이고, 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 영역은 비-인간 면역글로불린의 영역들에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 면역글로불린 서열의 FR이다. 또한, 인간화된 항체는 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 부가의 도입(즉, 돌연변이)에 의해 변형된 Fc γ RIIB 폴리펩타이드에 면역특이적으로 결합하는 인간 면역글로불린의 영역이다.

발명의 상세한 설명

[0035] 인간 CTLA4 단백질에 대한 항체, 이필리무맙은 유일한 면역요법제 또는, 예를 들어 제한없이 항-PD-1 항체(13-15)와 같은 다른 치료제와의 조합물로서, 암 환자의 생존율을 증가시키는 것으로 나타났다. 그러나, 치료 효과는 중대한 부작용(13-18)과 관련되어 있다. 보다 우수한 치료 효과 및/또는 적은 자가면역 부작용을 달성하기 위해 신규한 항-CTLA4 항체를 개발할 필요가 크다.

[0036] [0037] 본 발명자들은 놀랍게도 면역요법과 관련된 자가면역 부작용을 감소시키면서 암 거부를 유도하는데 사용될 수 있는 항-CTLA4 항체를 발견하였다.

[0038] 본원에는 그러한 문제의 항체 조성을 및 이의 항원-결합 단편이 제공된다. 본 발명은 또한, 분자가 단클론 항체, 인간 항체, 키메라 항체 또는 인간화된 항체인 상기 분자의 구현예에 관한 것이다.

[0039] 상세하게, 본 발명은 바람직하게는 내인성 또는 형질감염된 농도로 생 세포의 표면 상에 발현된, CTLA4 및 특히 인간 CTLA4에 면역특이적으로 결합하는 항체의 항원-결합 단편을 포함하는 분자를 제공한다. 본 발명은 특히, 항원-결합 단편이 CTLA4에 결합하고, 생 세포가 T 세포인 분자의 구현예에 관한 것이다.

[0040] 본 발명은 CTLA4에 면역특이적으로 결합할 수 있는 항체 및 이의 항원-결합 단편에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 이러한 분자는 B7.1 및 B7.2의 CTLA4에 대한 결합을 추가로 차단할 수 있다.

[0041] 본 발명은 또한 분자가 단클론 항체, 인간 항체, 키메라 항체 또는 인간화된 항체인 상기 분자의 구현예에 관한 것이다. 본 발명은 이러한 항체가 단일특이적, 이중특이적, 삼특이적 또는 다중특이적인 구현예를 포함한다.

[0042] 본 발명은 또한 CTLA4에 결합하는 분자 또는 항체의 구현예에 관한 것이며, 그의 항원-결합 단편은 6개의 CDR을 포함하며, 상기 CDR은 항-CTLA4 항체 L3D10의 CDR을 포함한다. 구체적으로, 상기 항체는 항-CTLA4 항체 L3D10의 3개의 경쇄 및 3개의 중쇄 CDR을 포함한다.

[0043] 본 발명은 또한 항체가 검출가능하게 표지되거나, 접합된 독소, 약물, 수용체, 효소, 수용체 리간드를 포함하는 상기 항체의 구현예에 관한 것이다.

[0044] 본 발명은 또한 상기 항체 조성을의 임의의 치료적 유효량 및 생리학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포

함하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 바람직하게는, 본 발명의 조성물은 예방적으로 또는 치료학적으로 유효한 양의 본 발명의 인간화된 항체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다.

[0045] 특정 구현예에서, "약학적으로 허용가능한"이란 용어는 동물에서, 특히 인간에서 사용하기 위해 연방 정부 또는 주정부의 규제 기관에 의해 승인되거나 미국 약전 또는 일반적으로 인정되는 다른 약전에 등록된 것을 의미한다. "담체"라는 용어는 희석제, 보조제(예를 들어, 프로인트 항원보강제(Freund's adjuvant)(완전 및 불완전)), 부형제 또는, 치료제가 투여되는 비히클을 지칭한다. 이러한 약학적 담체는 물 및 오일과 같은 무균 액체일 수 있으며, 땅콩오일, 대두유, 미네랄 오일, 참기름 등과 같은 오일, 동물성, 식물성 또는 합성 유래의 오일을 포함한다. 물은 약학적 조성물을 정맥내 투여할 때 바람직한 담체이다. 식염수 용액 및 수성 텍스트로스 및 글리세롤 용액은 또한, 주사용액을 위한 액체 담체로서 사용될 수 있다. 적당한 약학적 부형제는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 초크, 실리카겔, 스테아르산 나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화나트륨, 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 조성물은 소량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제를 함유할 수 있다. 이러한 조성물은 용액, 혼탁액, 에멀젼, 정제, 환제, 캡슐, 분말, 서방형 제형 등의 형태를 취할 수 있다.

[0046] 일반적으로, 본 발명의 조성물의 성분은 개별적으로 공급되거나, 단위 용량 형태로, 예를 들어 활성제의 정량을 가리키는 앰풀 또는 사셋(sachette)과 같은 밀폐밀봉된 용기 내에서 동결건조된 분말 또는 무수분 농축물로서 함께 혼합될 수 있다. 조성물이 주입에 의해 투여되는 경우, 무균 의약 등급의 물 또는 식염수를 함유하는 주입병으로 분배될 수 있다. 조성물을 주사에 의해 투여하는 경우, 투여하기 전에 성분이 혼합될 수 있도록 주사용 멸균수 또는 식염수의 앰풀을 제공할 수 있다.

[0047] 본 발명의 조성물은 중성 또는 염 형태로 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 염은 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 등으로부터 유래된 것과 같은 음이온으로 형성된 염들, 및 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 수산화 제2철, 이소프로필아민, 트리에틸아미노, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유도된 것과 같은 양이온으로 형성된 염들을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0048] 본 발명은 또한 면역 반응의 상향조절을 위한 본원에 기술된 항체 조성물 및 이의 약학적 조성물의 용도에 관한 것이다. 면역계의 상향-조절은 특히 암 및 만성 감염의 치료에 바람직하며, 따라서 본 발명은 이러한 장애의 치료에 유용하다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "암"은 세포의 비정상적 제어되지 않은 성장으로 인한 신생물 또는 종양을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 암은 백혈병 및 림프종을 분명하게 포함한다. 이 용어는 말초 부위로 전이할 가능성 있는 세포를 포함하는 질병을 의미한다.

[0049] 따라서, 본 발명의 방법 및 조성물은 또한 하기를 포함하는(그러나, 하기에 한정되지는 않음), 다양한 암 또는 다른 비정상적인 증식성 질병의 치료 또는 예방에 유용할 수 있다: 방광암, 유방암, 대장암, 신장암, 간암, 폐암, 난소암, 췌장암, 위암, 자궁 경부암, 갑상선암 및 피부암을 포함하는 암종; 편평 세포 암종; 백혈병, 급성 림프성 백혈병, 급성 림프모구 백혈병, B-세포 림프종, T-세포 림프종, 버켓(Berketts) 림프종을 포함하는 림프계 계통의 조혈 종양; 급성 및 만성 골수성 백혈병 및 전 골수성 백혈병을 포함하는 골수 계통의 조혈 종양; 섬유 육종 및 횡문근육종을 포함하는 간엽 기원의 종양; 흑색종, 정상피종, 기형암종(tetratocarcinoma), 신경모세포종 및 신경교종을 포함한 다른 종양; 성상 세포종, 신경모세포종, 신경교종 및 신경초종을 포함한 중추 및 말초 신경계의 종양; 섬유 육종, 횡문근육종 및 골육종을 포함하는 중간엽 기원의 종양; 및 흑색종, 색소성 건피증(xenoderma pigmentosum), 각질가시세포종(keratoactantoma), 정상피종(seminoma), 갑상선 여포암 및 기형암종(teratocarcinoma)을 포함하는 다른 종양. 세포자멸사의 이상에 의해 야기된 암은 또한 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 치료될 것으로 생각된다. 상기 암은 여포성 림프종, p53 돌연변이를 갖는 암종, 유방, 전립선 및 난소의 호르몬 의존성 종양, 및 가족성 선종성 폴립증과 같은 전암 병변 및 골수이형성 증후군을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 특정 구현예에서, 난소, 방광, 유방, 결장, 폐, 피부, 췌장 또는 자궁에서 악성 또는 이상증식성(dysproliferative) 변화(예컨대, 화생(metaplasia) 및 형성이상(dysplasia)) 또는 과증식성 장애가 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 치료 또는 예방된다. 다른 특정 구현예에서, 육종, 흑색종 또는 백혈병은 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 치료 또는 예방된다.

[0050] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 항체 조성물 및 이의 항원 결합 단편은 현재 표준 및 실험 화학요법, 호르몬 요법, 생물학적 요법, 면역요법, 방사선 요법 또는 수술을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 다른 항-종양 요법과 함께 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 분자는 치료적 또는 예방적 유효량의 하나 이상의 제제, 치료용 항체 또는, 암, 자가면역 질병, 전염병 또는 중독의 치료 및/또는 예방을 위한 당업자에게 공지된 다른 제제와 조합하여 투여될 수 있다. 상기 제제는 예를 들어, 상기-논의된 생물학적 반응 변형제, 세포독소, 대사길

항물질, 알킬화제, 항생제 또는 항-유사 분열제 뿐만 아니라 면역치료제 중 임의의 제제를 포함한다.

[0051] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 항체 조성을 및 그의 항원 결합 단편은 다른 항-종양 면역요법과 함께 사용될 수 있다. 상기 구현예에서, 본 발명의 분자는 면역조절 효과를 향상시키기 위해, 대안적인 면역조절 경로(예컨대, TIM3, TIM4, OX40, CD40, GITR, 4-1-BB, B7-H1, PD-1, B7-H3, B7-H4, LIGHT, BTLA, ICOS, CD27 또는 LAG3)를 과과하거나 증강시키는, 또는 사이토킨(예를 들어, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, GF-베타, IFNg, Flt3, BLys) 및 캐모카인(예를 들어, CCL21)과 같은 이펙터 분자의 활성을 조절하는 분자와 조합하여 투여된다. 특정 구현예는 본원에 기술된 항-CTLA4 항체 조성을 및 항-PD-1(펨브롤리주맙(pembrolizumab)(Keytruda) 또는 니볼루맙(Nivolumab)(Opdivo)), 항-B7-H1(아테졸리주맙(atezolizumab)(Tecentriq) 또는 두르발루맙(durvalumab)), 항-B7-H3, 항-B7-H4, 항-LIGHT, 항-LAG3, 항-TIM3, 항-TIM4 항-CD40, 항-OX40, 항-GITR, 항-BTLA, 항-CD27, 항-ICOS 또는 항-4-1BB를 포함하는 이중-특이적 항체를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 분자는 보다 넓은 면역 반응을 달성하기 위해 면역 반응의 상이한 단계 또는 양상을 활성화시키는 분자와 조합하여 투여된다. 보다 바람직한 구현예에서, 항체 조성을 및 이의 항원 결합 단편은 자가면역 부작용을 악화시키지 않으면서, 항-PD-1 또는 항-4-1BB 항체와 조합된다.

[0052] 본 발명의 또 다른 구현예는 다른 면역 자극 분자를 결합시키는 항체에 브릿지된 CTLA4에 결합하는 항체를 포함하는 이중-특이적 항체를 포함한다. 특정 구현예는 본원에 기술된 항-CTLA4 항체 조성을 및 항-PD-1, 항-B7-H1, 항-B7-H3, 항-B7-H4, 항-LIGHT, 항-LAG3, 항-TIM3, 항-TIM4 항-CD40, 항-OX40, 항-GITR, 항-BTLA, 항-CD27, 항-ICOS 또는 항-4-1BB를 포함하는 이중-특이적 항체를 포함한다. 본 발명은 또한, 암 치료를 위한 상기 항체의 용도에 관한 것이다.

[0053] 본 발명의 항체 조성을 투여하는 방법은 비경구 투여(예를 들어, 피내, 근육내, 복강내, 정맥내 및 피하), 경막외 및 점막(예를 들어, 비강내 및 구강 경로)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 특정 구현예에서, 본 발명의 항체는 근육 내, 정맥내 또는 피하로 투여된다. 상기 조성을은 임의의 편리한 경로, 예를 들어, 주입 또는 볼루스 주사, 상피 또는 점막피부 라이닝(예를 들어, 구강 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있고, 다른 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신 또는 국소일 수 있다.

[0054] 본 발명의 또 다른 구현예는 항원 제시 세포(APC)와 같은 면역 세포 상에서 B7.1 및 B7.2의 발현 수준을 모니터링함으로써 생체내 항-CTLA4 항체의 차단 효과를 모니터링하는 것에 관한 것이다. CTLA4는 주로 수지상 세포와 같은 APC에서 B7-1 및 B7-2 발현을 하향-조절하여 자가면역 질병을 억제하는 경우 Treg 중에서 우선적으로 발현된다. 따라서, B7 분자, B7.1 및 B7.2의 상향조절은 B7-CTLA4 상호작용의 생체내 차단을 위한 리드아웃(readout)으로 될 수 있다. 특정 구현예에서, 말초 또는 종양내 면역 세포가 항-CTLA4 처리 전후에 개체로부터 제거되고, 면역 세포의 표면상에서 B7.1 및/또는 B7.2의 수준을 감소시키기 위해 생체외에서 분석되며, 차단하는 항-CTLA4 항체의 존재는 내인성 CTLA4에 의한 B7.1/B7.2 결합을 방지하고, B7.1과 B7.2의 하향조절을 차례로 방지하여, B7.1/B7.2 발현의 순 증가를 초래한다. 바람직한 구현예에서, B7.1 및 B7.1의 수준은 항원 제시 세포 상에서 측정된다. 가장 바람직한 구현예에서, B7.1 및 B7.1의 수준은 수지상 세포 상에서 측정된다.

[0055] 추가의 구현예에서, 항-CTLA4 처리 후 면역 세포상의 B7.1 및 B7.2에서의 변화(감소)는 생체내 항-CTLA4 항체의 생물학적 활성을 측정하고, 면역 세포상의 B7.1 및/또는 B7.2 발현 수준을 측정하고 처리 전후의 발현 수준을 비교하여, 항-CTLA4 처리에 대한 모체 반응을 모니터링하기 위한 바이오마커로서 사용된다. 바람직한 구현예에서, B7.1 및/또는 B7.2 발현 수준은 항-CTLA4 치료 과정 중에 시간에 걸쳐 모니터링된다.

실시예

실시예 1. 키메라 항-CTLA4 항체의 생성

[0058] 인간 CTLA4 유전자 노크-인 마우스 및 hu-PBL-Scid 마우스를 사용하여, 마우스 항-인간 CTLA4 항체가 종양 성장을 감소시키고, 시험된 mAbs의 패널 중에서 L3D10이 가장 효과적인 것으로 확인되었음이 사전 입증되었다. 그러나, 비교적 높은 용량(> 10mg/kg)으로 사용하거나 종양 세포를 접종한 후 만질 수 있는 종양이 형성되기 전에도 (2일 초), 상기 얻어진 항체들 어떤 것도 완전한 종양 거부를 얻을 수 없었다(19-21).

[0059] 마우스 항체가 강한 항체-의존성 세포독성(ADCC)을 갖지 않는 IgG1 서브클래스이고, ADCC가 종양 거부에 관여할 수 있기 때문에, mAb의 Fc는 몇 가지 방법으로 개선되어, 더 양호한 면역치료 효과가 달성된다. 첫째, ADCC가 약한 마우스 IgG1을 치환하여 강력한 ADCC 활성을 갖는 인간 IgG1을 갖는 키메라 항체를 생성시켰다. 둘째, 참고 문헌(22)의 공지된 기술에 기초하여, ADCC 활성을 증가시키기 위해 3가지 돌연변이(S298A, E333A 및 K334A)를 CH에 도입하였다. 셋째, 생체내 항체의 반감기를 증가시키기 위해 3가지 돌연변이(M252Y, S254T 및 T256E)를 도

입하였다(23). 새로운 키메라 항체의 디자인이 도 1의 왼쪽 패널에 도시되어 있다.

[0060] 항체를 조작하기 위해, L3D10 하이브리도마의 가변 영역을 당 분야에 공지된 표준 방법을 사용하여 DNA 시퀀싱을 통해 제일 먼저 동정하였다. 뉴클레오타이드 서열은 서열번호: 1 및 서열번호: 2에 기술된 아미노산으로 번역되었다. 정상 인간 IgG1 Fc 서열 및 변이체 Fc 서열은 각각 서열번호: 3 및 서열번호: 4에 개시되어 있다. 중쇄 및 경쇄 서열의 아미노산 및 코돈 최적화 뉴클레오타이드 서열은 서열번호: 5 내지 8에 개시되어 있다.

[0061] 서열번호: 5 및 서열번호: 7에 상응하는 DNA를 합성하여 밸현 벡터에 삽입하고, 상기 벡터를 설계된 서열에 의해 HEK293 세포로 형질감염시켰다. 간략하게, HEK293 세포를 형질감염하기 하루 전에 진탕 플라스크에 시딩하고, 무혈청 화학적으로 한정된 배지를 사용하여 성장시켰다. DNA 밸현 구조물을 일시적 형질감염을 위한 표준 조작 절차를 사용하여 0.5 리터의 혼탁 HEK293 세포에 일시적으로 형질감염시켰다. 20시간 후, 세포를 샘플링하여 생존력 및 생존 세포 수를 얻고, 역가를 측정하였다(Octet QKe, ForteBio). 일시적인 형질감염 생산 실행을 통해 추가적인 판독을 취했다. 배양액을 5일째에 수확하였다. L3D10의 조건 배지를 수확하고, 원심분리 및 여과에 의해 일시적인 형질감염 생산 실행으로부터 정화되었다. 상동액을 단백질 A 컬럼 상에 옮기고, 저 pH 원총액으로 용출시켰다. 0.2 μm 멤브레인 필터를 사용하는 여과를 분취(aliquoting) 전에 수행하였다. 정제 및 여과 후, 단백질 농도는 OD280 및 흡광 계수로부터 계산되었다. 총 43.2mg의 Ig 단백질이 한 차례의 형질감염으로부터 수득되었다.

실시예 2. 키메라 L3D10 항체 결합 부위는 10D1과 부분적으로만 중첩된다

[0063] 클리닉에서, 항-CTLA4 항체인 이필리무맙은 암 환자의 생존율을 향상시키지만 심각한 자가면역 부작용을 유발하는 것으로 나타났다. 키메라 L3D10 항체 및 10D1의 비교 결합 부위를 평가하기 위해, CTLA4에 대한 결합 및, CTLA4에 대한 결합에 대해 항체가 경쟁하는 능력을 비교하였다. 두 항체 모두 필적하는 효능으로 고정된 CTLA4 단백질에 결합하지만(도 2), 10D1은 CTLA4에 결합하는 키메라 L3D10을 완전히 차단하지 못한다(도 3). 예상한 바와 같이, 표지되지 않은 L3D10은 표지된 L3D10 결합을 완전히 차단하여, L3D10 및 10D1의 항체 결합 부위가 부분적으로 만 중첩되는 것을 나타낸다.

실시예 3. 10D1에 의한 것보다 더 효율적인, 키메라 L3D10 항체에 의한 CTLA4:B7.1 및 CTLA4:B7.2 상호작용 차단

[0065] 가용성 B7-1 및 B7-2가 고정화된 CTLA4와 상호작용하는데 사용되는 경우(49), 항-인간 CTLA4 mAb, 10D1은 B7-CTLA4 상호작용을 차단할 수 있다고 보고되었다. B7-1과 B7-2가 세포 표면 동시-자극 분자로서 기능하기 때문에, 본 발명자들은 고정화된 B7-1과 B7-2를 사용하여 B7-CTLA4 상호작용을 차단하는 항-CTLA4 항체의 능력을 평가했다. 경쟁력있는 ELISA 분석법 포맷을 사용하여, 플레이트-고정화된- 및 세포막-밸현된 B7.1 및 B7.2에 대한 CTLA4 융합 단백질, CTLA4-Ig의 결합을 차단하는 L3D10 및 10D1의 능력. 상기 실험을 위해, 10D1(4nM)(49)와 유사한 친화성(2.3nM)을 갖는 키메라 항-인간 CTLA4-mAb를 사용하였다. 플레이트 고정화 분석의 경우, B7.1Fc 또는 B7.2Fc를 ELISA 플레이트 상에 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 4°C에서 밤새 또는 37°C에서 2시간 동안 코팅하였다. 비오틴결합된 CTLA4-Fc를 주어진 농도의 B7.1-Fc, 10D1 또는 키메라 L3D10과 혼합하였다. 플레이트상의 B7.1에 결합된 CTLA4-Fc의 양은 홀스-래디쉬 퍼옥시다제-접합된 스트렙타비딘을 사용하여 측정한다. 도 4에 도시된 바와 같이, 키메라 L3D10, B7.1Fc 및 CTLA4-Fc는 모두 CTLA4-Fc:B7.1 상호작용을 효율적으로 차단하였지만, 10D1의 별개의 두 물질 로트는 상호작용을 차단하지 못했다. L3D10은 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 낮은 농도에서 플레이트-고정화된 B7.1 결합의 상당한 차단을 보여주며, 약 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 50% 억제(IC_{50})를 달성한다. 유사하게, L3D10은 0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 IC_{50} 으로 플레이트 고정화된 B7.2에 결합하는 CTLA4-Fc의 결합을 차단하였지만, 2개의 상이한 물질 로트로부터의 10D1은 약 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 IC_{50} 으로 최소 차단을 나타내었다(도 5). 그러나, 이전의 보고(49)와 일치하여, 항체 10D1은 플레이트 고정화된 CTLA4가 가용성 B7-1과 상호작용하는데 사용될 때 역 실험에서 B7-1-CTLA4 상호작용을 강력하게 억제하였다(도 6).

[0066] 세포막 단백질 결합 실험의 경우, B7.1이 CHO 세포의 표면 상에서 발현될 때, L3D10이 CTLA4-Fc의 결합을 차단하지만, 2개의 상이한 물질 로트로부터의 10D1은 심지어 512 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 사용될 때에도 차단하지 않았다(도 7). L3D10보다 훨씬 덜 강력한 반면, 10D1의 고용량은 인간 CTLA4와 마우스 B7-1 사이에서 약 25% 차단을 달성하였다(도 8). CHO 세포 표면 상에서 발현된 B7.2의 경우, L3D10은 다시 차단된 반면, 10D1은 부분적으로만 차단되었으며, 10D1이 512 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 사용되더라도 50% 미만의 억제가 관찰되었다(도 9).

[0067] 비오틴결합이 CTLA4-Fc에 대한 10D1의 결합에 영향을 미쳤을 수 있다는 것은 잠재적인 주의사항이다. 이 문제를 해결하기 위해 본 발명자들은 차단 연구에 사용한 비오틴결합된 CTLA4-Fc에 대한 L3D10 및 10D1의 결합을 비교

했다. 도 10에 도시된 바와 같이, 10D1은 비오틴결합된 CTLA4-Fc를 결합하는데 L3D10보다 효과적이다. 따라서, 10D1에 의한 차단 실패는 비오틴결합된 CTLA4-Fc에 대한 불충분한 결합으로 인한 것이 아니었다. 폴리히스티딘-태그된 CTLA4가 인간 B7-1 형질감염된 CHO 세포와 상호작용하는데 사용될 때 유사한 패턴이 관찰된다(도 11). 종합하면, 본 데이터는 B7-CTLA4 상호작용을 차단하는 항체 10D1의 능력이 사용된 분석법에 매우 의존적인데, B7-1 및 B7-2가 고정화된 경우, 차단 활성이 최소 내지 전혀 검출되지 않은 반면, 항체 L3D10은 B7 단백질이 고정화되어 있는지 여부에 관계없이 B7-CTLA4 상호작용에 대해 강력한 차단제이라는 것을 제시한다.

[0068] 실시예 4. 키메라 L3D10 항체는 종양 거부를 유발하는 변형되지않은 L3D10보다 더 효율적이다

마우스 L3D10이 심각한 지연이 관찰되더라도 MC38 종양의 완전한 완화를 일으키지 못했다고 이전에 보고되었다 (19,20). 키메라 L3D10이 동종 마우스에서 완전한 완화를 일으킬 수 있는지를 결정하기 위해, 1×10^6 MC38 종양 세포를 동종 C57BL/6 마우스에 이식하였다. 1주일 후, 종양이 직경 약 5 mm에 이르면, 마우스를 대조군 IgG 또는 키메라 L3D10 mAb로 마우스 L3D10에 대한 이전의 연구에서 사용된 것의 절반에 불과한 용량으로 처리하였다. 도 12에 도시된 바와 같이, 인간 Ig 서열의 가능한 면역원성에도 불구하고, 키메라 L3D10은 시험된 모든 마우스에서 완전한 완화를 유발한다는 것이 밝혀졌다. 종양이 만져지지 않을 때보다 훨씬 어려운, 큰 종양 부담이 확립되었을 때 치료가 시작되었으므로(19), 이 실험은 키메라 L3D10이 변형되지않은 L3D10보다 더 효율적임을 보여준다.

[0070] 실시예 5. 키메라 L3D10 항체는 종양 거부를 유발하는데 있어서 10D1과 균등한 활성을 갖는다

인간 CTLA4 유전자 노크인 마우스(20)의 유용성은 키메라 항-인간 CTLA-4 항체의 생물학적 활성을 임상적으로 사용된 항-CTLA-4 mAb인 10D1로 시험할 수 있는 전례없는 기회를 제공하였다. 이 인간화된 마우스 모델에서, 인간 CTLA-4 단백질과 100% 동일성을 갖는 생성물을 코딩하는 CTLA4 유전자는 내인성 마우스 *Ctla4* 좌위의 조절하에 발현된다. 키메라 L3D10 및 10D1의 항-종양 활성이 인간 CTLA4-노크인 마우스에서 MC38 종양 모델에서 직접 비교되는 경우, 두 항체 모두 종양 거부반응을 유발하는데 있어서 비슷한 반면, 종양은 IgG 대조군에서 점차적으로 증가하는 것이 분명하다. 도 13은 복제물 실험으로부터의 종양 크기에 대한 항체 처리 결과를 나타낸다.

흥미로운 질문은 면역요법 효과를 발휘하기 위해 항-CTLA-4 mAb가 모든 CTLA-4와 상호작용할 필요가 있는지(즉, 표적 포화를 달성할 필요가 있는지) 여부이다. CTLA4^{h/h} 및 CTLA4^{m/m} 마우스로부터의 F1 마우스는 마우스 및 인간 CTLA-4 단백질을 공-우성 방식으로 발현한다. 흥미롭게도, 도 14에 도시된 바와 같이, CTLA-4 단백질(즉, 단백질의 뮤린 버전)의 약 50%가 항-인간 CTLA-4 mAb에 결합될 수 없어도, 키메라 L3D10 및 10D1 둘다 종양 거부를 효과적으로 유도하였다. 중요하게는, L3D10은 이 설정, 즉 유전자 투여량이 제한적일 때($P < 0.05$) 10D1보다 치료학적으로 더욱 효과적이다.

이전의 연구들은 항-마우스 *Ctla4* mAb가 다른 치료 양식과의 조합없이, 흑색종 세포주 B16-F1의 거부를 유도할 수 없다는 것을 입증했다. 따라서, 키메라 L3D10 및 10D1 항체의 항-종양 효과는 또한 인간 CTLA4 노크인 마우스에서 보다 도전적인 B16 종양 모델을 사용하여 시험하였다. 도 15에 도시된 바와 같이, 반면에 L3D10 또는 이 필리무맙 두 종양 모두 확립된 종양의 거부를 유발할 수 없어서, 통계적으로 유의한 종양 성장 지연을 일으키는 반면, 다른 항체 간의 차이는 통계적으로 유의하지 않다.

[0074] 실시예 6 : 생체내 CTLA4 차단

CTLA4는 수지상 세포에서 B7-1 및 B7-2 발현을 하향-조절하여 자가면역 질병을 억제하는 Treg 중에서 주로 발현된다(50). *Ctla4*(50)의 표적 돌연변이 및 차단 항-CTLA4 mAb(51)에 의한 처리가 수지상 세포에서 B7-1 및 B7-2의 발현을 상향조절하기 때문에, Treg에 대한 CTLA4의 생리학적 기능은 DC에서 B7을 하향조절한다고 제시되었다. 따라서, B7의 상향조절은 B7-CTLA4 상호작용의 생체내 차단을 위한 리드아웃으로 사용되었고, 인간 CTLA4 유전자의 동형접합성 노크인을 갖는 *Ctla4*^{h/h} 마우스의 T 세포를 사용하는 분석법을 개발하였다.

도 16에 개략적으로 도시된 바와 같이, 표면 발현된 B7.1 또는 B7.2는 T 세포의 표면 상에 CTLA4를 결합하여 B7.1 및 B7.2 발현의 하향조절을 유도한다. 그러나 차단 항-CTLA4 항체의 결합은 B7.1/B7.2 결합을 방지하며, 이는 B7.1 및 B7.2의 하향조절을 방지하며, 그에 따라 B7.1/B7.2 발현의 순 증가를 초래한다. 그러나, 인간 및 마우스 CTLA4 모두를 발현하는 키메라 T 세포의 경우, 인간 CTLA4에 결합하는 항체는 뮤린 CTLA4에 대한 B7.1/B7.2의 결합을 방지하지 못하여, B7.1/B7.2 억제를 회복시킨다.

내인성 마우스 *Ctla4* 좌위의 조절하에 인간 CTLA4 단백질에 대해 100% 동일성을 갖는 CTLA4 유전자를 발현하는

CTLA4 인간화된 마우스가 기술되어 있다(20). 동종접합성 노크-인 마우스($CTLA4^{h/h}$)는 최소한 10세대 동안 C57BL/6 배경으로 교잡되었다. $CTLA4^{h/h}$ 마우스를 WT BALB/c 마우스와 교차시킴으로써 이종접합성 마우스 ($CTLA4^{h/m}$)를 제조하였다.

[0078] 임상적으로 입증된 치료제인 항-CTLA4 mAb인 10D1을 테스트하기 위해, 본 발명자들은 매우 높은 용량의 항-CTLA4 mAb(500 μ g/마우스, 약 25 mg/kg 또는 클리닉에서 사용된 최대 용량의 8배)를 $Ctla4^{h/h}$ 또는 $Ctla4^{m/h}$ 마우스에 주사하고, 비장 세포를 수확하여 주사 후 24시간에 CD11c^{hi} DC상의 B7-1 및 B7-2의 수준을 측정하였다(도 17a-b). 도 17c-e에 도시된 바와 같이, 인간 IgG1-Fc를 투여받은 $Ctla4^{h/h}$ 마우스와 비교하여, 키메라 L3D10 처리된 마우스로부터의 DC는 인간 CTLA4를 발현하는 T 세포에서 B7.1 발현이 통계적으로 유의하게 증가했지만, 인간 및 마우스 CTLA4를 모두 발현하는 T 세포에서는 그렇지 않았다. 도 17c-e에 도시된 바와 같이 B7.2에 대해서도 유사한 결과가 나타났다. B7-2에서의 상향조절의 크기는 인간 Treg-DC 동시 배양에서 차단 항-CTLA4 mAb를 사용하여 달성된 것과 비슷하다(66).

[0079] 생체내 분석의 특이성을 추가로 확인하기 위해, 본 발명자들은 마우스 및 인간 CTLA4가 공유성적으로 발현되는 $Ctla4^{m/h}$ 마우스에서 L3D10이 B7을 상향조절할 수 있는지 여부를 시험하였다. CTLA4의 50% 이상이 항-인간 CTLA4 항체에 결합하지 않기 때문에, B7-CTLA4 상호작용을 차단하는데 덜 효과적일 것으로 예상된다. 실제로, 어느 항체도 $Ctla4^{m/h}$ 마우스로부터의 DC에서 B7-1 및 B7-2의 상향조절을 유발하지 않았다(도 17c, d, f). $Ctla4^{m/h}$ 마우스에서 L3D10에 의한 차단의 완전한 결여는 L3D10에 결합하지 않는(도 18) 마우스 대립유전자에 의해 코딩된 CTLA4가 B7 발현을 하향조절하기에 충분함을 시사한다. 따라서, 본 발명자들의 데이터에 따르면, 임상에서 사용된 최대 용량의 8배 이상인 용량에서 10D1은 생체내에서 및 시험관내에서 B7이 플레이트에 고정되거나 세포막에 고정되어 있을 때 B7-CTLA4 상호작용을 차단하지 않는다는 사실이 입증되었다.

[0080] $Ctla4^{m/h}$ 마우스에서 L3D10에 의한 차단의 완전한 결여는 L3D10에 결합하지 않는(도 18) 마우스 대립유전자에 의해 코딩된 CTLA4가 B7 발현을 하향조절하기에 충분함을 시사한다. 대조적으로, 10D1은 B7.1 또는 B7.2 발현을 증가시키지 않았다. 상기 모델에 따르면, 이것은 L3D10이 생체내 CTLA4 활성을 차단하는 반면, 10D1은 CTLA4 활성을 차단하지 않는다는 것을 시사한다.

[0081] 그러나, 차단 활성의 이러한 뚜렷한 차이에도 불구하고, L3D10 및 10D1은 모두 도 19에 도시된 바와 같이 키메라 CTLA4^{m/h} 마우스에서 MC38 모델에 대해 강한 항-종양 활성을 나타낸다. 종양이 대조군 Ig-처리된 마우스에서 점진적으로 성장하는 동안, 항-CTLA4 mAb에 의한 완전한 거부가 달성되었다. 여러 실험에서, 두 항체는 종양 거부반응을 일으키는데 있어서 유사하다. B16 흑색종인 다른 종양 모델에서, 어느 항체에 의해서도 완전한 거부가 달성되지 않았지만, 두 항체는 종양 성장의 유사한 지연을 유도하였다(도 20).

실시예 7: 항-종양 효과는 종양내 Treg 소모와 관련되어 있다

[0083] 생체내에서의 면역조절은 면역 세포 활성화와 면역 체크포인트 사이의 균형에 기인한다. 특히, 조절 T 세포(Tregs)는 면역 체계를 조절하고, 자가-항원에 대한 내성을 유지하며, 자가면역 질병을 퇴치하는 T 세포의 하위 집단이다. 최근 연구에 따르면, 항-마우스 CTLA4 mAb의 치료 효능은 종양 미세환경 내에서 선택적으로 Treg의 항체-의존성 세포독성에 차례로 영향을 미치는 Fc 하위클래스와 숙주 Fc 수용체에 의해 영향을 받는다는 사실이 입증되었다(52, 53). 생체내 차등 CTLA4 차단 활성이 항-종양 활성의 차이로 해석되지 않는 것처럼, 본 발명자들은 종양 미세환경 내에서 항-종양이 발생하고 Treg를 관찰하는 작용 기전을 확립하려고 시도했다. 이를 위해, 본 발명자들은 거부 반응이 완료되기 전에 MC38 종양-보유 마우스를 희생시켰고(도 21), 대조군 Ig, 10D1 또는 L3D10을 투여한 $Ctla4^{h/h}$ 노크인 마우스에서 Treg의 빈도를 분석하였다. 어느 항체도 비장에서 Treg를 감소시키지 않았지만(도 22c), 둘 다 종양 미세환경에서 Treg를 감소시켰다(도 22e). 흥미롭게도, L3D10이 아닌 10D1이 비장에서 Treg를 확장시켰다. 비장에서 10D1에 의한 Treg의 확장은 이필리무맙이 말초 혈액 백혈구에 의한 FOXP3 발현을 증가시킨다는 임상적 발견을 개괄한다(54). 차단 및 비-차단 항체는 종양 미세환경에서 Treg 소모와 유사하기 때문에, B7-CTLA4 상호작용의 차단은 Treg 소모에 기여하지 않는다. 10D1은 생체내에서 B7-CTLA4 상호작용을 차단하지 못하고 $Ctla4^{h/h}$ 마우스 및 흑색종 환자에서 치료 효과를 부여하기 때문에, 이 상호작용의 차단은 치료 효과를 위해 요구되지 않는다. 또한, 현저하게 상이한 차단 효과를 갖는 2개의 mAb는 비교가능한 치료 효과 및 종양 미세환경에서의 선택적 Treg 소모를 갖기 때문에, CTLA4-B7 상호작용을 차단하는 것은 항체

의 치료 효과를 향상시키지 못한다.

[0084] 이 관찰을 입증하기 위해, 본 발명자들은 항-인간 CTLA4 mAb가 CTLA4 분자의 최대 50%에서 결합할 수 있고 어느 항체도 B7-CTLA4 상호작용을 차단하여 수지상 세포에서 B7의 상향조절을 달성할 수 없는, Ctl4^{m/h} 마우스에서 2 개의 항-CTLA4 mAb의 치료 효과를 시험하였다(도 16). 또한, L3D10이 10D1보다 다소 효과적이지만(도 22b), 두 항체 모두 MC38 종양의 신속한 거부를 유발한다. 그에 상응하여, 두 항체 모두 종양 미세환경에서 Treg를 선택적으로 소모시켰다(도 22d 및 21f). 이 유전적 데이터는 CTLA4 차단이 종양 거부 및 국소적 Treg 소모와 무관함을 추가로 입증하며, 따라서 항-CTLA4 mAb가 B7-CTLA4 상호작용(10)을 차단함으로써 암 면역력을 유발한다는 가설을 반박한다.

실시예 8. 일반적으로 사용되는 항-마우스 CTLA4 mAb 9H10 및 9D9의 차단 활성 평가

[0085] CTLA4가 T 세포 조절을 위한 세포-내재적 음성 조절제라는 개념은 2개의 항-마우스 CTLA4 mAb(30, 31), 4F10 및 9H10의 손상되지 않은 및 Fab의 자극 효과에 기초하여 제안되었지만, 이들 항체가 B7-CTLA4 상호작용을 차단한다는 것을 입증하는 데이터는 제시되지 않았다. 보다 최근에는 세 번째 항-마우스 CTLA4 mAb인 9D9가 종양 보유 마우스에서 치료 효과를 나타내며, 종양 미세환경에서 Treg를 국소적으로 소모시키는 것으로 보고되었다(52). 따라서 본 발명자들은 생리적으로 관련된 구성 하에서 B7-CTLA4 상호작용을 차단하는 능력으로 종양 거부를 유도하는 것으로 밝혀진 상업적으로 이용가능한 3종의 항-마우스 CTLA4 mAb를 모두 시험하기로 결정했다. 첫 번째 테스트로서 비오틴결합된 CTLA4-Fc와 플레이트-고정화 B7-1 및 B7-2의 결합을 차단하기 위해 증가하는 양의 항-CTLA4 mAb(CTLA4-Fc보다 2,000배 이하의 몰 과량)를 사용했다. 도 23a에 도시된 바와 같이, 항-마우스 CTLA4 mAb 9H10은 시험한 최고 농도에서도 B7-1-CTLA4 상호작용을 차단하지 않았지만, 9D9가 매우 높은 농도로 사용되었을 때 보통의 차단이 관찰되었다. mAb 9D9가 B7-2-CTLA4 상호작용을 효과적으로 차단하는 반면, 9H10은 그렇게 하지 못했다(도 23b). 흥미롭게도, 9D9가 가용성 CTLA4-Fc에 대한 강한 결합을 나타내지만, 9H10은 고정화된 마우스 CTLA4-Fc 결합에서 9D9보다 더 강력함에도 불구하고(도 23d), 빈약한 결합을 나타냈다(도 23c). 이 분석에서 9H10에 의한 어떠한 차단 활성의 부족도 가용성 CTLA4-Fc에 대한 나쁜 결합을 간단하게 반영할 수 있으므로, 본 발명자들은 WT 마우스(CTLA4^{m/m})의 수지상 세포에 대한 B7-1 및 B7-2의 상향조절을 다시 사용하여 B7-CTLA4 상호작용의 생체내 차단을 측정하였다. 도 23e 및 도 23f에 도시된 바와 같이, 9H10은 DC 상에서 B7-1 발현을 상향조절하지 않았고, 9D9는 B7-1 수준을 15% 증가시켰다($P < 0.05$). 흥미롭게도, 9D9가 DC 상에서 B7-2를 명확히 상향조절한 반면, 9H10은 그렇지 않았다. 따라서, 가장 많이 연구된 종양 면역치료용 항-CTLA4 mAb인 9H10은 B7-CTLA4 상호작용을 차단하지 못한다. 따라서, B7-CTLA4 상호작용을 차단하는 것은 항-마우스 CTLA4 mAb에 의한 항-종양 면역력의 유도에 기여하지 않는다. 두 mAb 모두 비슷한 면역요법 효과와 종양 미세환경에서 Treg의 비슷한 결실을 보여주기 때문에(52), B7-CTLA4 상호작용의 차단보다는 Treg의 국소적 결실이 항-마우스 CTLA4 mAb의 치료 효과에 대한 통합 설명을 제공한다. 흥미롭게도, 4F10이 시험관내에서 B7-CTLA4 상호작용을 차단하였지만, 생체내 DC에서 B7의 상향조절을 유도하는데 실패하였다(도 24).

[0087] 이와 함께, 본 발명자들은 임상적으로 입증된 치료용 항-인간 CTLA4 mAb(10D1) 및 2종의 항-마우스 CTLA4 mAb(9H10 및 4F10)가 생리학적으로 관련있는 조건 하에 B7-CTLA4 상호작용을 차단하지 않으면서 면역요법 효과를 부여한다는 것을 증명하였다. 더욱이, 상기 차단은 B7-CTLA4 상호작용을 강력하게 차단할 수 있는 mAb(L3D10)에 대해서도 종양 거부에 필수적이지 않았다. 치료 효과는 B7-CTLA4 상호작용 차단에서 1000배의 차이를 갖는 항체에 대해 실질적으로 동일하기 때문에, 상기 차단은 항-CTLA4 mAb의 암 치료 효과에 기여하지 않는다. 이 데이터는 항-CTLA4 mAb가 체크포인트 차단(55)을 통해 면역치료 효과를 부여한다는 가설을 반박한다. 지배적인 가설을 논박함으로써, 본 발명자들의 데이터는 항-CTLA4의 mAb의 차단 활성을 개선함으로써 항-CTLA4 mAb의 치료 효과를 최적화할 수 없음을 시사한다. 이런 맥락에서, B7-CTLA4 상호작용(56) 차단이 우수한 트레멜리무맙(Tremelimumab)은 3상 임상 시험(57)에서 임상적 체크포인트에 도달하지 못했다는 점에 유의하는 것이 특히 중요하다. 한편, 국소 Treg 소모의 종양 거부 사이의 강한 상관관계를 입증함으로써, 및 종양 면역력에서의 B7-CTLA4 상호작용 차단의 관련성을 논박함으로써, 본 연구는 종양 환경 내에서 Treg의 국소적 결실이 치료용 CTLA4 mAb의 주된 메커니즘이라는 가설을 선호하며, 따라서 암 면역요법을 위한 차세대 항-CTLA4 mAb를 개발하기 위한 새로운 접근법을 제안한다.

[0088] 마지막으로, 마우스에 유전적 데이터를 축적하는 것은 CTLA4가 T 세포 활성화를 음성적으로 조절하고 SHP-2(58, 59)를 통해 그러한 조절이 달성되었다는 원래의 개념(30, 31)이 재검토될 필요가 있음을 시사한다(60). 따라서, Ctl4^{-/-} 마우스의 중증 자가면역 질병은 CTLA4가 T 세포 활성화를 위한 세포-고유의 음성 조절인자라는 개념을 뒷받침하는 데 사용되어 왔으며(61, 62), 이러한 관점과 일치하지 않는 적어도 세 줄의 유전적 정보가 이후에

생겨났다. 먼저, 이펙터 T 세포내에서가 아닌, Treg내에서 Ct1a4 유전자의 계통-특이적 결실은 Ct1a4 유전자의 생식선 결실이 있는 마우스에서 관찰된 자가면역 표현형을 재현하기에 충분하다(50). 이러한 데이터는 Ct1a4^{-/-} 마우스의 자가면역이 이펙터 T 세포에서 세포-고유의 음성 조절인자 CTLA4의 결핍으로 인한 것이 아님을 시사한다. 둘째, WT 및 Ct1a4^{-/-} T 세포 모두로 구성된 키메라 마우스에서, WT T 세포의 공존으로 자가면역 표현형이 예방되었다(63). 이 데이터는 자가면역 질병이 세포-고유의 음성 조절인자의 결핍으로 인한 것이 아니라고 강하게 주장했다. 세포-고유의 음성 조절인자 효과가 없다는 사실은 또한 키메라 마우스에서 바이러스 감염동안 Ct1a4^{-/-} T 세포의 우선적 확장이 관찰되지 않았다는 사실에 의해 증명되었다(64).셋째, CTLA4의 음성 조절(58, 59)을 매개하는 것으로 제안된 Shp2의 T-세포 특이적 결실은 T 세포 활성화를 향상시키기보다는 감소시키는 것으로 밝혀졌다(65). T 세포 활성화에 대한 음성 조절인자로서 CTLA4가 제안된 아래로 보고된 이러한 유전적 데이터의 맥락에서, 본 연구의 데이터는 암 면역요법에서 CTLA4 체크포인트 차단의 재평가를 요구하고 있다.

[0089] 실시예 9. 키메라 L3D10은 다른 면역요법 항체와 조합하여 사용될 때 감소된 면역 부작용을 입증한다

최근의 임상 연구에 따르면 항-PD-1과 항-CTLA4 mAb 사이의 조합 요법이 말기 흑색종 환자의 생존을 더욱 증가시킨다는 것이 밝혀졌다. 그러나, 조합 요법을 받은 환자의 55%에서 3 및 4 등급의 면역 관련 부작용(irAEs)이 발생했다. 따라서, 독성이 적은 항체를 개발하는 것이 중요하다. 본 발명자들은 임상에서 관찰된 항-CTLA-4 및 항-PD-1 mAb의 조합요법과 관련된 irAEs를 개괄하는 생체내 모델을 개발했다. 이 모델에서 본 발명자들은 높은 용량의 항-PD-1 및 항-CTLA4-4 mAb로 주산기 기간동안 인간 CTLA4 유전자 노크인 마우스(*CTLA4*^{h/h})를 처리하였다. 본 발명자들은 어린 마우스가 개별적인 mAb의 치료를 용인하는 반면, 심각하게 성장을 저해한, 도 25에 도시된 바와 같이, 항-PD-1 및 10D1의 조합 요법이 다발성 기관 염증, 빈혈을 갖는 심각한 irAE를 유발한다는 것을 발견하였다. 대조적으로, 항-PD-1과 조합된 경우, 키메라 L3D10은 정상 체중 증가에 의해 입증된 바와 같이 경미한 irAE만을 나타낸다.

항-PD-1과 조합 투여시 10D1과 비교하여 키메라 L3D10의 상대적 독성을 더 조사하기 위해, 본 발명자들은 투여 후 42일째 CTLA4^{h/h} 노크인 마우스에서의 병리학적 효과를 관찰하였다. 도 26에 도시된 바와 같이, L3D10 + 항-PD-1로 처리된 마우스의 최종 체중(42일째)은 hIgG 음성 대조군 항체로 처리한 마우스와 유사하였다. 그러나, 비교에 의하면, 10D1 + 항-PD-1로 처리된 마우스의 중량은 훨씬 낮았다. 따라서, 우리가 상기 마우스의 육안해부학을 관찰할 때, 자궁/난소/방광 및 흉선은 10D1 + PD-1로 처리된 마우스에서 현저하게 작았다(도 27). 다시, L3D10 + 항-PD-1로 처리된 마우스의 기관은 hIgG 대조군에 필적했다. 대조적으로, 10D1로 치료한 마우스에서 해부된 심장은 눈에 띄게 하얀 외관을 가진 약간 큰 크기로 나타났다. 결과적으로 본 발명자들은 마우스 내에서 적혈구 생성을 관찰하기로 결정하고, 상당히 유사한, L3D10 + 항-PD-1 또는 대조군 항체로 처리한 그룹과 비교하여 10D1 + 항-PD-1로 처리한 마우스에서 명백한 차이를 관찰하였다. 도 27a에 도시된 바와 같이, 10D1 + 항-PD-1로 처리된 마우스로부터의 골수는 뚜렷하게 백색을 띠고, 분리된 혈액은 거의 완전히 백색이었다(도 28b). 이에 따라, 본 발명자들은 CD71 및 CD119 마커를 사용하여 혈액 발생의 다른 단계를 거친 세포를 면밀히 관찰했다. 대표적인 FACS 프로파일은 도 28c에 도시되어 있는 반면, 요약 데이터가 도 28d에 도시되어 있다. 이를 데이터는 10D1 + 항-PD-1 처리 마우스에서 4 단계 발달을 겪은 세포 수의 통계적으로 유의한 감소를 나타내었다(도 28d).

10D1-처리된 마우스에서 잠재적인 빈혈 메커니즘을 탐색하기 위해, 본 발명자들은 10D1 + PD-1 처리가 항-적혈구 항체를 유도하는지 테스트했다. 도 29에 도시된 바와 같이, 항-적혈구 항체는 검출되지 않았다. 따라서, 적혈구-특이적 자가 항체의 발달은 항-PD-1 + 10D1-처리된 마우스의 빈혈에 책임이 없다.

항-PD-1과 조합하여 L3D10 대 10D1의 독성을 추가로 측정하기 위해, 본 발명자들은 심장(도 30), 폐(도 31), 타액선(도 32) 및 신장 및 간(도 33)의 조직학적 분석을 수행하고, 그후 적어도 24시간 동안 10% 포르말린에서 고정시켰다. 연구된 각 조직에서, 10D1 + 항-PD-1로 처리된 마우스는 높은 수준의 T 세포 침윤을 나타냈다. 염증의 중증도에 기초한 독성 점수가 도 34에 요약되어 있으며, 이는 hIgG 대조군 마우스 그룹보다 아주 미미하게 더 높은 점수를 갖는 L3D10 + 항-PD-1과 비교하여, 10D1 + 항-PD-1로 처리된 마우스의 높은 독성 점수를 나타낸다.

[0094] 실시예 10: L3D10은 가용성 CTLA4에 대한 결합을 감소시켰다.

L3D10 및 10D1은 플레이트 고정화된 CTLA4에 대한 유사한 결합 패턴을 나타낸다(도 36). 10D1에 비해 L3D10의 감소된 독성, 특히 10D1과 관련된 증가된 T 세포 침윤/활성에 대한 가능한 설명으로서, 본 발명자들은 가용성 CTLA4에 대한 결합을 조사하기로 결정했다. 본 발명자들은 CTLA4 다형성과 다발성 자가면역 질병 사이의 연관성

이 가용성 CTLA4(nature 2003, 423: 506-511)의 생산에 관련되어 있고, 마우스에서 sCTLA4 이소형의 유전적 침묵이 제1형 당뇨병의 발병을 증가시켰기 때문에(당뇨병 2011, 60:1955-1963 참조), 이것을 조사하였다. 또한, 가용성 CTLA4(아바타셉트(abatacept) 및 벨라타셉트(belatacept))가 면역 억제를 위해 널리 사용된 약물이다. 본 사상에 따라, 본 발명자들이 가용성 CTLA4에 대한 상대적 결합을 조사했을 때, 본 발명자들은 L3D10의 결합이 뚜렷하게 감소하는 것을 관찰하였다(도 37).

[0096] 본 발명자들은 CTLA-4 분자의 50%만이 항-인간 CTLA-4 mAb에 결합할 수 있는 이형접합성 Ct1a4^{h/m} 마우스에서 항-CTLA-4 mAb가 강력한 종양 주사를 유도한다는 것을 증명했다. CTLA-4의 50%의 결합이 irAE를 유도하기에 충분한지를 결정하기 위해, 본 발명자들은 Ct1a4^{h/m} 마우스를 항-PD-1 + 10D1로 처리하였다. 도 35에 도시된 바와 같이, 항-PD-1 + 10D1은 Ct1a4^{h/m} 마우스에서 체중 감소를 유도하지 못했다. 따라서, irAE와 암 면역력을 유전적으로 분리될 수 있다.

[0097] 생체내 활성을 L3D10 항체가 항-종양 활성을 유지하지만 10D1과 같은 다른 면역요법 항체에서 관찰된 감소된 자가면역 부작용을 나타냈으며, 이는 자가면역 부작용을 악화시키지 않으면서 항-종양 활성을 증진시킬 수 있음을 보여준다. 따라서, 자가면역 부작용은 암 면역력에 필요한 가치가 아니며, 이러한 두 가지 활성을 분리할 수 있다. L3D10의 특성은 CTLA4와 B7.1 및 B7.2의 상호작용을 차단하는 능력이 10D1에 의한 것보다 효과적이며, 이는 항체 간의 CTLA4 결합 부위의 차이와 관련이 있음을 입증했다. 또한, L3D10은 항체의 치료 효과를 향상시키는 강한 ADCC 활성을 부여하는 돌연변이를 갖는, 변형된 인간 IgG1 Fc 도메인에 융합되었다. 추가 특성분석은 L3D10 및 10D1이 유사한 결합 프로파일을 갖는 고정화된 CTLA4에 결합함을 입증한다. 그러나, L3D10은 10D1보다 가용성 CTLA4에 대해 훨씬 낮은 결합 친화력을 나타낸다. 종합하면, 본 데이터는 항체 L3D10이 덜 심각한 부작용이 있는 암 환자를 치료하는데 임상적으로 유용한 가능성이 있음을 보여준다.

실시예 11. L3D10의 인간화

[0099] 인간화 과정은 상동성 모델링된 항체 3D 구조를 생성하고, 구조 모델링에 기반한 모(parental) 항체의 프로파일을 생성함으로써 시작된다. 활용할 수 있는 수용체 프레임워크는 프레임워크 전반의 전반적인 서열 동일성, 일치하는 인터페이스 위치, 유사하게 분류된 CDR 표준 위치 및 제거되어야 할 N-글리코실화 부위의 존재에 기초하여 동정되었다. 인간화 디자인을 위해 하나의 경쇄(LC) 및 중쇄(HC) 프레임워크를 선택하였다.

[0100] 인간화된 항체는 CDR 서열을 수용체 프레임워크에 이식하는 것을 포함하여, 인간 프레임워크 서열과 모 항체 서열의 선택된 부분을 융합시키는 다중 하이브리드 서열을 생성시킴으로써 고안되었다. 모 항체 L3D10의 예측된 CDR 서열은 하기 표 1A에 나타낸 바와 같이 서열번호: 21 내지 26으로 제공된다:

표 1A: 모 항체 L3D10의 예측된 CDR 서열

항체 사슬	CDR	SEQ ID NO
가변 경쇄	1	21
	2	22
	3	23
가변 중쇄	1	24
	2	25
	3	26

[0101] [0102] 3D 모델을 사용하여 이러한 인간화된 서열을 눈과 컴퓨터 모델링을 통해 체계적으로 분석하여 항원 결합을 유지할 가능성이 가장 높은 서열을 분리했다. 목표는 원래의 항체 특이성을 유지하면서 최종 인간화된 항체에서 인간 서열의 양을 최대화하는 것이었다.

[0103] 선택된 수용기 프레임워크를 기반으로 3개의 인간화된 경쇄(LC1, LC2 및 LC3) 및 3개의 인간화된 중쇄(HC1, HC2 및 HC3)를 설계하였다. 3개의 HC 또는 3개의 LC 서열 각각은 동일한 생식선에서 유래한 것으로, 도 38에 도시된 바와 같이 유린 모체 서열과는 다른 복귀 돌연변이를 갖는다. 인간화된 가변 영역 아미노산 서열 및 그의 최적

화된 코딩 뉴클레오타이드 서열은 서열번호: 9 내지 20에 열거되어 있다. 인간화된 중쇄 및 경쇄 모두의 CDR2 서열은 모 L3D10 항체 서열에 비해 아미노산 변화를 포함하며, 하기 표 1B에 나타낸 바와 같이 서열번호: 33 내지 38에 열거되어 있다.

표 1B: 인간화된 항체 가변 영역의 CDR2 서열.

항체 서열	CDR2 서열	SEQ ID NO
HC1	YIWYDGNTNFHPSLKSR	33
HC2	YIWYDGNTNFHSSLKSR	34
HC3	YIWYDGNTNFHSPLKSR	35
LC1	AATNLQS	36
LC2	AATNLQD	37
LC3	AATSLQS	38

[0104]

인간화된 경쇄 및 중쇄는 이제 변형된 완전히 인간화된 항체를 생성하기 위해 조합될 수 있다. 인간화된 경쇄 및 중쇄의 모든 가능한 조합을 그들의 발현 수준 및 항원 결합 친화력에 대해 시험하여 모 항체와 유사하게 수행하는 항체를 확인하였다.

[0105]

단클론 항체(24)에 대한 인간성 점수를 계산하는 새로운 도구가 사용되었다. 이 점수는 인간-유사 항체 가변 영역 서열이 어떻게 보이는지를 나타내며, 항체를 인간화할 때 중요한 요소이다. 모 항체 및 인간화된 항체에 대한 인간성 점수는 하기 표 2 및 3에 개시되어 있다. 본 방법에 따르면, 중쇄의 경우 79점 이상의 점수는 인간과 비슷한 것으로 나타나며; 경쇄의 경우 86점 이상의 점수가 인간과 비슷한 것으로 나타난다.

표 2: 인간화 경쇄 정보 및 인간성 점수.

사슬명칭	노트	전장(프레임워크+CDR)	프레임워크만
		컷오프 = 86	컷오프 = 90
L2872 (카메라 모체)	경쇄	71.3	78.2
L3106 (LC1)	정기적 인간화됨	86.5	96.8
L3107 (LC2)	정기적 인간화됨	83.6	94.0
L3108 (LC3)	정기적 인간화됨	88.8	98.1

[0106]

표 3: 인간화 중쇄 정보 및 인간성 점수.

사슬명칭	노트	전장(프레임워크+CDR)	프레임워크만
		컷오프 = 79	컷오프 = 84
H2872 (카메라 모체)	모체	62.0	70.3
H3106 (HC1)	정기적 인간화됨	80.4	90.7
H3107 (HC2)	정기적 인간화됨	78.9	89.4
H3108 (HC3)	정기적 인간화됨	80.5	93.0

[0107]

[0109]

가변 영역 서열을 먼저 합성함으로써 전장 항체 유전자를 구성하였다. 상기 서열은 포유류 세포에서의 발현을 위해 최적화되었다. 이어서, 상기 가변 영역 서열을 이미 인간 Fc 도메인을 함유하는 발현 벡터에 클로닝하고; 중쇄의 경우, hIgG1(M252Y, S254T, T256E, S298A, E333A, K334A) 백본을 사용하였다. 또한, 비교를 위해, 키메라 모 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 동일한 백본 Fc 서열을 사용하여 전장 키메라 사슬로 구성하였다.

[0110]

9개의 모든 인간화된 항체는 0.01리터 소규모 생산을 거쳤다. 키메라 모 항체도 또한 직접 비교를 위해 스케일-업되었다. 지시된 중쇄 및 경쇄에 대한 플라스미드를 혈청 부재하에 화학적으로 한정된 배지를 사용하여 혼탁 HEK293 세포 내로 형질감염시켜 항체를 제조하였다. 조건화된 배지의 전체 항체는 MabSelect SuRe 단백질 A 배지(GE Healthcare)를 사용하여 정제했다. 시험된 10개의 항체를 하기 표 4에 나타내었다.

표 4: HEK293 세포내에서 일시적으로 생성된 10 개의 항체

항체 명칭	중쇄	경쇄	PP #	생산량 (mg/L)
인간화된 HC1 + LC1	H3106	L3106	4630	54
인간화된 HC1 + LC2	H3106	L3107	4631	50
인간화된 HC1 + LC3	H3106	L3108	4632	45
인간화된 HC2 + LC1	H3107	L3106	4633	37
인간화된 HC2 + LC2	H3107	L3107	4634	44
인간화된 HC2 + LC3	H3107	L3108	4635	40
인간화된 HC3 + LC1	H3108	L3106	4636	46
인간화된 HC3 + LC2	H3108	L3107	4637	55
인간화된 HC3 + LC3	H3108	L3108	4638	53
키메라 모체	H2872	L2872	4629	28

[0111]

항원(huCTLA4)에 대한 9개의 인간화된 항체 조합 및 키메라 모 항체의 친화력을 옥텟(Octet)에 의해 평가하였다. 다중-농도 동역학 실험은 Octet Red96 시스템(ForteBio)에서 수행되었다. 항-hIgG Fc 바이오센서 (ForteBio, #18-5064)를 샘플 희석액(PBS내 0.1% BSA 및 0.02% Tween 20)에서 수화시키고, pH 1.7 글리신에서 전처리하였다. 항원을 샘플 희석제로 600 nM에서 시작하는 7-포인트, 2배 일련 희석을 사용하여 희석시켰다. 모든 항체를 샘플 희석액으로 10 µg/ml로 희석한 다음, 항-hIgG Fc 바이오센서 상에 120초 동안 고정시켰다. 샘플 희석제내에서 60초 동안 기준(baseline)을 확립한 후, 바이오센서를 관련 농도를 측정하기 위해 일련의 농도로 항원을 함유하는 웰로 옮겼다. 연관성을 120초 동안 관찰하였고, 샘플 희석제에서 관심있는 각 단백질에 대해 해리를 180초 동안 관찰하였다. 결합 친화력은 1가 결합 모델(1:1 결합)에 동역학 센서그램을 맞춤으로써 특징 분석되었다. 전체 동역학 측정은 하기 표 5에 요약되어 있다.

표 5: 인간화된 항체 및 모체 항체의 동역학 측정

로딩 샘플 ID	샘플 ID	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	전체 X^2	전체 R^2
PP4629	huCTLA4	2.3E-09	3.5E+05	8.0E-04	0.0033	0.9981
PP4630	huCTLA4	1.3E-08	1.3E+05	1.8E-03	0.0127	0.9848
PP4631	huCTLA4	6.9E-09	2.4E+05	1.6E-03	0.0120	0.9918
PP4632	huCTLA4	1.2E-08	1.6E+05	1.9E-03	0.0109	0.9915
PP4633	huCTLA4	7.1E-09	2.0E+05	1.4E-03	0.0106	0.9933
PP4634	huCTLA4	6.8E-09	2.8E+05	1.9E-03	0.0116	0.9866
PP4635	huCTLA4	8.4E-09	2.4E+05	2.0E-03	0.0077	0.9934
PP4636	huCTLA4	8.7E-09	2.5E+05	2.2E-03	0.0111	0.9905
PP4637	huCTLA4	6.4E-09	3.2E+05	2.1E-03	0.0173	0.9884
PP4638	huCTLA4	8.1E-09	2.9E+05	2.3E-03	0.0122	0.9920

[0113]

실시예 12. 인간화된 항-CTLA4 항체의 항-종양 활성

[0114] 상대적 결합 친화도 및 인간성 점수에 기초하여, 본 발명자들은 추가 평가를 위해 3가지 항체를 선택했다:

[0115] PP4631 - 높은 친화성과 우수한 발현

[0116] PP4637 - 높은 친화성과 우수한 발현

[0117] PP4638 - 친화력은 약간 낮지만, 인간화 점수가 가장 높음

[0118] [0119] 상기 각각의 항체에 대한 물질은 HEK293 세포에서의 0.1 리터 스케일로 일시적인 생산에 이어 단백질 A 정제에 의해 생성되었다. 정제된 항체의 결합 친화도를 하기 표 6에 나타낸 바와 같이 옥텟 분석에 의해 확인하였다.

표 6. 인간화된 항체 및 모체 항체의 동역학 측정

복제물	로딩 샘플 ID	샘플 ID	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	전체 X^2	전체 R^2
1	PP4631	huCTLA4	7.2E-09	2.3E+05	1.6E-03	0.0274	0.9894
1	PP4637	huCTLA4	7.1E-09	2.7E+05	1.9E-03	0.0294	0.9899
1	PP4638	huCTLA4	9.4E-09	2.3E+05	2.1E-03	0.0211	0.9919
2	PP4631	huCTLA4	7.4E-09	2.3E+05	1.7E-03	0.0191	0.9919
2	PP4637	huCTLA4	8.4E-09	2.6E+05	2.2E-03	0.0248	0.9899
2	PP4638	huCTLA4	1.1E-08	2.1E+05	2.2E-03	0.0150	0.9934

[0120]

[0121] 본 발명자들은 상기 실시예 5에 기술된 인간 CTLA4-노크인 마우스에서 등족 MC38 마우스 종양 모델을 사용하여 10D1 및 키메라 L3D10 항체와 비교하여 상기 3가지 인간화된 항체의 항-종양 활성을 평가하였다. 도 39a는 생체내 실험의 처리 스케줄을 도시하며; 마우스에게 접종 후 7일째부터 3일마다 항체를 총 4회 투여하였다. 도 39b에 도시된 바와 같이, 모든 인간화된 항체는 종양을 완전히 박멸하고, 10D1에 필적했다.

[0122]

또 다른 실험에서, 본 발명자들은 실시예 5(도 14)에 기술된 이형접합성 Ct1a4^{h/m} 마우스에서 동종 MC38 마우스 종양 모델을 사용하여 10D1 및 키메라 L3D10 항체와 비교한 인간화된 항체 PP4631 및 PP4637의 항-종양 활성을 2개의 다른 투여량으로 평가하였다. 도 40에 도시된 바와 같이, 모든 mAb는 30 mcg/마우스/주사(1.5 mg/kg)에서 사용했을 때 구별할 수 없는 반면, PP4637는 10 mcg/마우스/주사(0.5 mg/kg)에서 더 효과적이었지만, PP4631과 10D1은 비슷한 활성을 나타냈다.

[0123]

10D1 및 키메라 L3D10 항체와 비교된 인간화된 항체의 항-종양 활성은 또한도 41에 도시된 바와 같이 인간

CTLA4-노크인 마우스에서 동족 B16-F1 흑색종 마우스 종양 모델을 사용하여 입증되었다. 마우스는 접종 후 2일 째부터 3일마다 총 3회 항체를 투여받았다. 도 41에 도시된 바와 같이, L3D10 및 인간화된 항체는 종양 성장을 지연시켰고, 10D1에 필적했다.

[0124] **실시예 13. L3D10의 인간화된 클론은 10D1보다 우수한 안전성 프로파일을 유지한다.**

[0125] 인간화 후에도 L3D10의 우수한 안전성 프로파일을 유지할 수 있는지 테스트하기 위해, 항-PD-1과 조합하여 사용 할 때 그들의 부작용에 대하여, PP4631과 PP4637을 10D1과 비교하였다. 도 42에 도시된 바와 같이, PP4631 및 PP4637은 항-PD-1과 함께 조합하여 사용될 때 10D1보다 독성이 적다.

[0126] 도 28에 기술된 결합 적혈구 생성과 일치하여, 10D1 + 항-PD-1로 처리된 마우스는 완전한 혈구 수(CBC)에 기초 한 빈혈인 반면에, 항-PD-1 + PP4631 및 항-PD-1 + PP4637을 받은 마우스는 도 43에 도시된 바와 같이 주로 정 상 CBC 프로파일을 갖는다. 또한, PBL에서의 T 세포 프로파일의 분석은 10D1 + 항-PD-1을 투여받은 마우스에서 CD4 및 CD8 T 세포의 강력한 전신 활성화를 나타내지만, 항-PD-1 + PP4631 또는 항-PD-1 + PP4637를 투여받은 마우스는 그렇지 않았으며(도 44), 이는 L3D10-기반 항-CTLA-4 mAb가 전신 T 세포 활성화를 일으키지 않는다는 개념을 뒷받침한다.

[0127] **실시예 14. 인간화된 항-CTLA4 항체의 결합 특성**

[0128] 인간화된 항체가 그들의 CTLA4 결합 특성을 보유함을 확인하기 위해, 본 발명자들은 고정화되고 플레이트 결합 된 CTLA4에 대한 결합을 관찰하였다. 도 45에 도시된 바와 같이, 인간화는 고정화된 CTLA4에 대한 결합에 영향 을 주지 않으며, 모든 3가지 인간화된 항체는 모체 키메라 L3D10 항체와 유사한 결합을 입증하였다. 그러나, 인간화는 도 46에 도시된 바와 같이 가용성 CTLA4에 대한 L3D10의 결합을 더욱 감소시킨다. 가용성 CTLA4에 대한 감소된 결합에 기초하여, 3가지 인간화된 항체가 L3D10보다 적은 자가면역 부작용으로 동일한 종양 거부를 유도 할 것으로 예상된다.

[0129] 본 발명자들은 키메라 L3D10이 10D1보다 1000배 더 높은 차단 활성을 갖는다는 것을 입증했다. 이것은 B7-CTLA-4 상호작용을 차단하는 것이 irAE의 결핍을 설명할 수 있다는 흥미로운 가능성을 제기했다. 도 47 및 도 48에 도시된 바와 같이, PP4631 및 PP4637은 모두 시험관내 및 생체내에서 B7-CTL-A4 상호작용을 차단하지 않았다. PP4631과 PP4637이 감소된 irAE를 나타낸다는 사실은 B7-CTLA-4 상호작용을 차단하는 것이 L3D10의 항상된 안전 성에 책임이 없다는 개념을 지지했다.

[0130] 자가면역 질병 예방에 CTLA-4가 제안된 역할을 감안할 때, 본 발명자들은 개선된 안전성 프로파일을 위한 기본 메커니즘으로서 가용성 CTLA-4에 대한 결합 감소를 제안했다. 이 가설을 시험하기 위해, 본 발명자들은 irAE의 기본 지표로서 주산기 기간동안 항-PD-1 + 항-CTLA4-4 mAb를 투여받은 암컷 마우스의 성장 무게 증가를 사용했다. 도 42에 도시된 바와 같이, 10D1 및 항-PD-1을 모두 투여받은 마우스에서 체중 증가의 심각한 감소가 관찰 되었지만, PP4637 + 항-PD-1을 투여받은 마우스는 irAE가 가장 낮았고, 이어서 PP4631 및 L3D10이 나타났다. sCTLA-4에 대한 감소된 결합과의 염격한 역 상관관계는 중심 가설과 일치한다.

[0131] **실시예 15. 인간화된 항-CTLA4 항체의 가공성 평가**

[0132] 세가지 인간화된 항체의 개발 및 제조 잠재성을 평가하기 위해, 다른 항체를 특성화하기 위해 다양한 분석 방법 을 수행했다.

특징	방법
제조	HEK293 세포에서 일시적 발현후, 1-단계 단백질 A 정제
순도	크기 배제 크로마토그래피(SEC)
순도	모세관 전기영동(환원성 및 비-환원성)
비-글리코	모세관 전기영동(환원성)
탈아미드화	모세관 등전점 포커싱(cIEF) 및 액체크로마토그래피-질량 분석법(LC-MS) 후 DM 스트레스 처리
열안정성	시차 주사 열량계(DSC)
산화	펩타이드 매핑
결합 특이성	CHO, 293 블랭크 세포 FACS

[0133]

[0134] 초기 평가로서, 3가지 선도 후보 항체의 예측 분자량 및 등전점을 아미노산 서열에 기초하여 계산하였다. 표 7에 나타낸 바와 같이, 항체는 약간 더 낮은 PI를 가졌지만, 모든 항체는 상당히 유사했다.

표 7: 3 개의 인간화된 항체의 이론적 매개변수

단백질 명칭	이론적 MW (Da)	이론적 PI
PP4631	(49647.8 + 23483.1) X 2 = 96614.0	7.9
PP4637	(49644.9 + 23483.1) X 2 = 96611.1	7.65
PP4638	(49644.9 + 23311.9) X 2 = 96568.7	7.9

[0135]

제품 수득량 평가

[0136] [0137] 상이한 항체의 생산성을 평가하기 위해, HEK293 세포를 상이한 항체의 중쇄 및 경쇄를 발현하는 벡터로 일시적으로 형질감염시켰다. 이 세포를 무-혈청 배지를 사용하여 6일 동안 진탕 플라스크에서 배양하였다. 6일 후, 상등액을 수집하고, 항체를 1단계 단백질 A 크로마토그래피로 정제하였다. 하기 표 8에서 알 수 있는 바와 같이, 항체 PP4631 및 PP4637은 유사한 단백질 수율을 나타내었지만, 항체 PP4638은 훨씬 낮은 상대적 수율로 생성되었다.

표 8: 인간화된 항체 생성 생산량 평가.

항체	농도 (mg/mL)	OD 260/280	생산량 (mg/L)
PP4631	1.280	0.53	126
PP4637	4.532	0.53	118
PP4638	0.729	0.57	56

[0138]

[0139] 일시적으로 발현된 항체의 순도를 평가하기 위해, 샘플을 환원성 및 비-환원성 SDS-PAGE로 분석하였다. 도 50에 도시된 바와 같이, 3가지 항체 모두로부터의 샘플은 항체 분자를 나타내는 겔 랜드를 생성하고, 샘플은 단백질 A 정제 후 상대적으로 순수하다는 것을 보여 주었다.

크기 배제 크로마토그래피

[0140] [0141] 일시적인 발현 후 다른 항체의 순도와 응집을 추가로 조사하기 위해, 본 발명자들은 정제된 단백질의 크기 배제 크로마토그래피를 수행했다. 간단히 말하면, TOSOH G3000 SWx1 5 μm 컬럼을 사용하는 SE-HPLC 분리를 위해 50 μg의 여과된(0.22 μm 필터 사용) 샘플을 사용했다. PBS pH 7.4를 이동 상으로 사용하였다. 하기 표 9에 나타낸

바와 같이, 모든 인간화된 항체는 단백질 A 정제 후 > 90% 순도를 나타낸다. 항체 PP4631 및 PP4637은 주요 피크 내에서 대부분의 단백질을 갖는 항체 샘플과 함께 유사하게, 낮은 수준의 고 분자량(MW) 응집체 및 분해를 입증했다. 반대로, 항체 PP4638은 높은 수준의 응집 및 일부 분해를 보였다. SE-HPLC 크로마토그램을 도 51에 나타내었다.

표 9: 크기 배제 크로마토그래피

항체	응집율	주요 피크	분해율
PP4631	2.6%	97.4%	0
PP4637	3.0%	97.0%	0
PP4638	6.5%	92.4%	1.1%

[0142]

모세관 전기영동(CE)

[0143]

모세관 전기영동은 글리코실화되지 않은 중쇄 단백질의 양 뿐만 아니라 환원 및 비-환원 조건 하에서 피크 밴드 내의 단백질 양을 정량하는데 사용되었다. 간단히 말하자면, 10 kDa 표준 단백질 2 μ l와 함께 100 μ g의 샘플을 로도아세타미드(비-환원 조건) 또는 β -메칠토에탄올(환원 조건)과 함께 CE-SDS 샘플 원총액으로 희석시켰다. 그후, 샘플을 70°C에서 10분 동안 처리하였다. 분리를 위해, PA-800, 50 μ m I.D. 베어-융합(bare-fused) 실리카 모세관을 사용하였다; 러닝 길이 20.2cm; 분리 전압 15kV; 검출을 위한 OD₂₂₀. 하기 표 10에 나타낸 바와 같이, 3가지 단백질 모두 높은 수준의 순도를 보였으나, SDS-PAGE와 일치하고, 모두 매우 글리코실화했다. CE-SDS 크로마토그램을 도 52에 나타낸다.

표 10: 모세관 전기영동

항체	비-환원율 %	환원율 %	글리코실화되지 않은 중쇄
PP4631	97.3	99.5	0.3
PP4637	97.2	99.5	0.4
PP4638	96.9	99.4	0.4

[0144]

탈아미드화: 모세관 등전점 포커싱(cIEF) 및 액체 크로마토그래피-질량 분광분석(LC-MS)

[0145]

높은 pH 스트레스 하에서의 단백질 탈아미드화의 수준은 2가지 상이한 시간(5시간 및 12.5시간)에 걸쳐 높은 pH 스트레스 처리가 있거나 없는 항체를 비교하고, 이어서 cIEF 및 LC-MS 분석에 의해 측정되었다.

[0146]

상이한 항체의 전하 이소형태 프로파일 및 등전점은 모세관 등전점 포커싱(cIEF)에 의해 측정되었다. 간단히 말하면, 샘플을 20 mM Tris pH 8.0으로 원총액 교환한 다음 100 μ g의 샘플 단백질을 양성 전해질인 메틸 셀룰로오스와 PI 7.05 및 PI 9.77 마커와 함께 혼합하였다. iCE3™을 분석에 사용하였으며, 100 μ m I.D. 모세관; 1.5kV + 3kV; 검출을 위한 OD₂₈₀. 탈아미드화 스트레스 처리를 위해, 샘플을 500 mM NaHCO₃로 5시간 또는 12.5시간 처리한 다음, cIEF 및 LC-MS로 검사하였다. 분석 결과를 하기 표 11에 나타내었고, LC-MS 그래프를 도 53에 나타내었다. 모든 3가지 항체는 스트레스 조건 및 주요 피크의 상응하는 저하로 탈아미드화된 종의 양의 예측된 증가를 나타낸다. 아미노산 서열로부터 예측한 바와 같이, 항체 PP4637의 PI는 PP4631 및 PP4638보다 약간 낮고 (표 7), 예측된 PI와 비교하여 더 높은 관찰된 PI는 아마도 글리코실화를 나타낸다.

표 11: 등전점 포커싱 및 탈아미드화

항체	피크 PI	DM 처리 시간	DM %	주요 피크 %	기본 %
PP4631	8.28	처리되지않음	17.3	71.9	3.0
		5 h	27.1	65.4	3.0
		12.5 h	40.3	53.2	2.5
PP4637	8.11	처리되지않음	18.1	79.0	2.9
		5 h	31.5	65.7	2.8
		12.5 h	44.0	53.8	2.2
PP4638	8.36	처리되지않음	22.5	69.6	2.3
		5 h	34.4	57.6	2.7
		12.5 h	45.9	46.5	2.3

[0149]

시차 주사 열량계(DSC) 열 분석

[0150]

상이한 항체의 열 안정성 및 용융 온도를 측정하기 위해, 이들은 시차 주사 열량계(DSC) 열 분석을 받았다. 간단히 말하면, PBS pH 7.4에서 2 mg/mL 샘플을 15°C 내지 105°C까지 1°C/분의 속도로 온도 상승시킨다. 온도와 함께 변화하는 Cp는 샘플과 완충액 모두에 대해(배경으로서) 모니터링되었다. 배경 공제(background subtraction)로 Cp 대 온도 곡선을 얻었고, 피크는 분석물의 T_m을 나타냈다. 하기 표 12에 나타낸 바와 같이, 3 가지 항체 모두 유사하게 높은 용융 온도를 나타내었다. 3가지 항체에 대한 DSC 곡선을 도 54에 나타내었다.

표 12: 크기 배제 크로마토그래피

항체	T _m (°C)
PP4631	75.6
PP4637	76.2
PP4638	76.6

[0151]

산화: 웹타이드 매핑

[0152]

인간화된 항체의 산화적 변형은 산화적 스트레스가 있거나 없는 LC-MS를 이용한 웹타이드 매핑에 의해 평가하였다. 샘플을 6M GnCl 및 5mM β-ME의 존재 하에서 65°C에서 변성시킨 다음 요오드아세트아미드로 아세틸화시켰다. 처리된 샘플을 55°C에서 트립신(Promega, 시퀀싱 등급)으로 분해하고, C18 역상 LC 컬럼(ACQUITY UPLC BEH130 C18, 2.1×100mm, 1.7 μm)으로 분리하여, 질량 분석법(Waters XEVO-G2S QTOF)에 의해 Masslynx 및 Biophatlynx 분석 도구를 사용하여 분석하였다. 산화적 스트레스 분석을 위해, 샘플을 0.05% 또는 0.1% H₂O₂로 1시간 동안 처리한 후 LC-MS로 검사하였다. 그 결과를 하기 표 13 내지 16에 나타낸다.

표 13. 메티오닌 부위에서 인간화된 항체의 산화. 상부 패널: 항체 PP4631. 중간 패널: 항체 PP4637. 하부 패널:
항체 PP4638.

변형제	단편 번호	개시	밀단	변형 부위	서열	PP4631 산화율 (%)	
						산화 0h	0.05% H ₂ O ₂ 산화 1h
산화 M(1)	1:T001	1	18	4	DIQMTQSPSSLSASVGDR	0.4	0.5
	2:T037	425	447	436	WQQGNVFSQCSVVMHEALHNHYTQK	0.6	1.6

변형제	단편 번호	개시	밀단	변형 부위	서열	PP4637 산화율 (%)	
						산화 0h	0.05% H ₂ O ₂ 산화 1h
산화 M(1)	1:T001	1	18	4	DIQMTQSPSSLSASVGDR	0.4	0.5
	2:T036	425	447	436	WQQGNVFSQCSVVMHEALHNHYTQK	0.7	1.7

변형제	단편 번호	개시	밀단	변형 부위	서열	PP4638 산화율 (%)	
						산화 0h	0.05% H ₂ O ₂ 산화 1h
산화 M(1)	1:T001	1	18	4	DIQMTQSPSSLSASVGDR	0.7	0.7
	2:T036	425	447	436	WQQGNVFSQCSVVMHEALHNHYTQK	0.9	1.6

표 14. 트립토판 부위에서 인간화된 항체 PP4631의 산화. 적색 숫자는 발견된 단편화 증거를 가리키며; “—”는 아무것도 탐지되지 않았음을 가리키며; “0”은 매우 낮은 수준에서 탐지됨을 가리킨다.

변형제	단편 번호	개시 말단	변형 부위	시열	PP4631 산화율 (%)	
					산화 0h	0.05% H ₂ O ₂ 산화 1h
	1:T003	25	39	35 ASENIYSNLAWYQQK	0.2	0.2
	1:T007	62	103	92 FSGSGSGTDTLTISSLQPEDFATYFCQHIL WGTPYTFGQQGTK	--	0
	1:T013	146	149	148 VQWK	0.2	0.2
	2:T001	1	38	36 QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLT SYGLSWIR	0	--
	2:T003	44	64	47/52 GLEWIGYIWYDGNTNFHPSLK	0	0.2
산화 W(1)	2:T009	98	129	115 TEGHYYGSNYGGYALDYWGQQGTSVTVS SASTK	0	0.2
	2:T012	156	218	166 DYPPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPPSSSLGTQTYICNVNHNKP SNTK	0.1	0.1
	2:T020	283	296	285 FNWYYVDGVEVHNAK	4.5	3.9
	2:T023	310	325	321 VVSVLTVLHQDWLNKG	0	0
	2:T033	379	400	389 GFYPSDIAVIEWEWSNGQPENNYK	2.2	2.7
	2:T037	425	447	425 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK	0.1	0.1

표 15. 트립토판 부위에서 인간화된 항체 PP4637 의 산화. 적색 숫자는 발견된 단편화 증거를 가리키며; “—”는 아무것도 탐지되지 않음을 가리키며; “0”은 매우 낮은 수준에서 탐지됨을 가리킨다.

변형제	단편 번호	개시	말단	변형 부위	서열	PP4637 산화율 (%)		
						산화 0h	0.05% H ₂ O ₂ 산화 1h	0.1% H ₂ O ₂ 산화 1h
	1:T003	25	39	35	ASENIYSNLAWYQQK	0.2	0.2	0.2
	1:T007	62	103	92	FSGSGSGGTIDYTLTISSLQPEDFATYFCQHQ LWGTPYTFGQGTK	--	--	0
	1:T013	146	149	148	VQWK	0.1	0.1	0.1
	2:T001	1	38	36	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSL TSYGLSWIR	--	0.1	--
	2:T003	44	64	47/52	GLEWIGIYIWYDGNTNFHSPLK	0	0	0.1
산화 W(1)	2:T008	98	129	115	TEGHYYGSNYGGYALDYWGQGTLVTVS SASTK	0.2	0.2	0.1
	2:T011	156	218	166	DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTK	--	0	0
	2:T019	283	296	285	FNWYYVDGVEVHNAK	4.0	4.0	4.0
	2:T022	310	325	321	VVSVLTVLHQDWLNGK	0	0	0
	2:T032	379	400	389	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	2.5	2.5	2.7
	2:T036	425	447	425	WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK	0.2	0	0.1

표 16. 트립토판 부위에서 인간화된 항체 PP4638의 산화, 적색 숯자는 발견된 단편화 증거를 가리키며; “—”는 아무것도 탐지되지 않음을 가리키며; “0”은 매우 낮은 수준에서 탐지됨을 가리킨다.

변형제	단편 번호	개시	말단	위치	서열	PP4638 산화율 (%)		
						산화 0h	0.05% H ₂ O ₂ 산화 1h	0.1% H ₂ O ₂ 산화 1h
산화 W(1)	1:T003	25	42	35	ASENIYSNLAWYQQKPGK	--	--	--
	1:T006	62	103	92	FSGSGSGTIDFTLTISSSLQPEDFATYYCQH LWGTPYTFGGGTK	0	0	0
	1:T012	146	149	148	VQWK	0.1	--	--
	2:T001	1	38	36	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSL TSYGLSWIR	0	--	--
	2:T003	44	64	47/52	GLEWIGIYIWYDGNTNFHSPLK	0.1	0.2	0.2
	2:T008	98	129	115	TEGHYYGSNYGYYALDYWGQGTLVTVS SASTK	0.3	0.3	0.4
	2:T011	156	218	166	DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTK	0	0	0.2
	2:T019	283	296	285	FNWYVVDGVEVHNAK	3.7	4.1	4.1
	2:T022	310	325	321	VVSVLTVLHQDWLNCK	0	0	0
	2:T032	379	400	389	GFYPSPDIAVIEWESNGQPENNYK	2.6	2.9	2.7
	2:T036	425	447	425	WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK	0	0	0

[0158]

[0159] 결합 특이성

[0160]

상이한 항체의 결합 특이성은 2가지 상이한 농도에서 10D1에 비해 CTLA4를 발현하지 않는 2가지 상이한 세포주 (CHO 및 HEK293)에 대한 비-특이적 결합을 검출하는 능력을 평가함으로써 결정되었다. 간단히 말하면, PBS 중의 100 $\mu\text{g/mL}$ 또는 20 $\mu\text{g/mL}$ 샘플(또는 기준 mAb)을 3×10^6 세포/mL(CHO 또는 HEK293)와 함께 배양하였다. FITC로 표지된 토끼-항-인간-IgG 항체(Boster, Wuhuan, China)를 검출에 사용하고, 세포에 대한 표적 mAb의 결합을 FACS로 측정하였다. 하기 표 17에 나타낸 바와 같이, 항체 PP4631 및 PP4637은 매우 낮은 결합성과 우수한 특이성을 나타냈지만, 항체 PP4638은 대조군 세포주에 대한 비-특이적 결합 활성을 나타냈다.

표 17: CHO 및 HEK293 세포주에 대한 결합 특이성

샘플	MFI	
	CHO	HEK 293
CELL 단독	3.50583	4.16546
2 nd Ab 단독	4.00062	4.68083
10D1 (100ug/ml)	3.82459	5.49435
10D1 (20ug/ml)	3.70334	4.95407
PP4631 (100ug/ml)	10.8065	7.76113
PP4631 (20ug/ml)	5.03402	5.5862
PP4637 (100ug/ml)	15.0944	10.5987
PP4637 (20ug/ml)	5.89652	5.78233
PP4638 (100ug/ml)	83.4742	36.8002
PP4638 (20ug/ml)	15.3381	9.86523

[0161]

실시예 16. L3D10 및 인간화된 항체의 에피토프 매핑

[0163]

L3D10 모 항체의 CTLA-4 결합 에피토프와 인간화된 변이체인 PP4631 및 PP4637을 매핑하기 위해, 본 발명자들은 마우스 및 인간 CTLA4 단백질이 B7-1과 교차 반응하지만 항-CTLA-4 항체와는 하지 않는다는 사실의 잇점을 취하였다. 따라서 본 발명자들은 인간 CTLA-4 단백질로부터의 아미노산 클러스터가 뮤린 Ct1a-4 단백질로부터의 아미노산으로 치환된, 인간 CTLA-4Fc 단백질의 여러 변이체를 설계했다. 이 연구에서 사용된 항-CTLA-4 항체는 뮤린 Ct1a-4에 결합하지 않기 때문에, 항체 결합 에피토프의 주요 잔기가 뮤린 아미노산으로 치환될 때 항-인간 CTLA-4 항체의 결합은 폐지되어야 한다.

[0164]

야생형 인간 CTLA-4Fc 서열을 기초로 하여 11개의 CTLA-4Fc 돌연변이 단백질(M1-M111)(서열번호: 40 내지 50)을 코딩하는 DNA 벡터를 제조하고, 단백질을 0.01 mL 규모의 HEK293에서 일시적 형질감염하고, 이어서 1-단계 단백질 A 크로마토그래피 정제에 의해 제조하였다.

[0165]

CTLA4Fc 단백질에 대한 항-CTLA4 항체의 결합은 ELISA에 의해 수행되었다. 플레이트를 1 µg/mL의 CTLA-4Fc 단백질로 코팅하고, 비오틴결합된 항체 또는 B7-1Fc 융합 단백질을 결합 분석에서 가용성 상으로 사용하고, 홀스-래디쉬 페옥시다제(HRP)-접합된 스트렙타비딘을 사용하여, 결합된 단백질의 양을 측정하였다.

[0166]

항-인간 CTLA-4 항체는 뮤린 Ct1a-4와 교차 반응하지 않으며, 이것은 아마도 세포외 도메인에서 인간과 마우스 CTLA-4 사이의 아미노산 서열의 차이를 반영한다. 도 55는 인간, 마카크 및 마우스 CTLA-4 세포외 도메인의 정렬을 도시하고, 인간과 마카크 사이의 서열 보존을 강조하면서, 뮤린 및 영장류 서열 간의 수많은 차이점을 보여준다. MYPPPY 결합 모티프의 보존으로 인해, 마우스 및 인간 CTLA4 단백질은 B7-1(72)에 대해 교차-반응성이 있다.

[0167]

항-인간 CTLA-4 항체의 결합 에피토프를 매핑하기 위해, 본 발명자들은 뮤린-특이적 아미노산 클러스터를 인간 CTLA-4 서열에 통합시킨 다수의 중첩되지 않는 CTLA-4Fc 돌연변이 단백질을 생성하였다. 11개의 변이체의 각각에 혼입된 아미노산을 도 55에 나타내고, WT 및 변이체 CTLA-4Fc 단백질의 아미노산 서열을 도 56에 나타내었다. 이를 단백질은 HEK293 세포에서 일시적 형질감염에 의해 생성되었으며, 수득량은 표 18에 제공된다. 많은 돌연변이는 WT 인간 CTLA-4Fc 단백질에 비해 수득량에 의해 표시되는 단백질 발현에 영향을 주는 것으로 보인다.

표 18: HEK293 세포에서 일시적으로 생성된 WT 및 변이체 CTLA-4Fc 단백질

단백질 명칭	수득량 (mg)
CTLA-4Fc WT 대조군	0.72
변이체 1	1.29
변이체 2	0.03
변이체 3	0.21
변이체 4	0.11
변이체 5	1.89
변이체 6	0.38
변이체 7	0.25
변이체 8	1.61
변이체 9	0.01
변이체 10	0.04
변이체 11	1.70

[0168]

[0169]

이어서, 고정화된 CTLA-4Fc 변이체 구조물을 결합시키는 키메라 L3D10 및 인간화된 항체 PP4631 및 PP4637의 능력을 ELISA에 의해 측정하고, 플레이트를 CTLA-4 변이체 구조물 및 비오틴결합된 항-CTLA-4 항체, 또는 B7-1 Ig 대조군 단백질로 코팅하고, 첨가하고 HRP-접합된 스트렙타비딘을 사용하여 결합을 측정하였다. 결합 분석의 결과를 표 19 내지 22에 나타내었다. 예상한 바와 같이, 4가지 결합 단백질 모두 WT CTLA-4Fc 단백질에 대한 우수한 투여량-의존성 결합을 나타내었다. 그러나, M9 및 M10 단백질에 도입된 돌연변이는 전체 구조를 변화시키는 것으로 보이며, 이러한 변이체는 B7-1Fc에 결합하지 못했다. 또한, M2 및 M4에 도입된 돌연변이는 WT 단백질에 비해 결합이 감소하여 CTLA-4 형태를 부분적으로 변경시켰다. 이 개념과 일치하여, 상기 4개의 변이체(M2, M4, M9 및 M10) 모두 훨씬 낮은 수득량으로 발현되었다(표 18). 대조적으로, WT CTLA-4Fc 단백질에 대한 결합 및 B7-1Fc 단백질의 결합을 참고로 사용하여, M11은 잘 발현되고, B7-1Fc를 효율적으로 결합하지만 2개의 인간화된 항-CTLA-4 항체에 결합하지 못한 단백질로서 분명하게 우수하다. 원래의 L3D10과의 결합 또한 약 100배 감소했다(표 20). 예상대로 전체 확인에 영향을 미치는 돌연변이는 항-CTLA4 항체와의 결합에도 영향을 미쳤다.

표 19: CTLA4Ig 변이체의 B7-1 Ig 융합 단백질에 대한 결합으로 표시된 완전성. CTLA4Fc 단백질에 대한 결합은 ELISA에 의해 수행되었으며, 결합된 비오딘 결합된 단백질의 양은 헐스-래디쉬 페록시다제(HRP)-접합된 스토렙타비단에 의해 측정되었다. 개시된 값들은 OD450 측정치이다. WT = 야생형 CTLA4Fc. M1 - M11은 CTLA4Fc 변이체 단백질이다.

단백질 농도	WT	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
0	0.193	0.196	0.202	0.184	0.182	0.184	0.185	0.18	0.172	0.175	0.174	
0	0.19	0.182	0.177	0.175	0.171	0.173	0.17	0.168	0.164	0.162	0.163	
10ng/ml	0.259	0.328	0.204	0.267	0.199	0.286	0.255	0.218	0.293	0.166	0.167	0.22
10ng/ml	0.257	0.311	0.187	0.249	0.184	0.271	0.244	0.22	0.276	0.154	0.159	0.217
100ng/ml	1.137	1.594	0.316	1.087	0.359	1.513	1.093	0.785	1.468	0.164	0.164	0.884
100ng/ml	1.111	1.553	0.299	1.082	0.34	1.221	1.049	0.695	1.375	0.155	0.15	1.045
1ug/ml	2.813	3.147	1.179	3.147	1.375	2.877	3.053	2.703	3.253	0.199	0.171	3.053
1ug/ml	2.651	3.053	0.986	2.864	1.413	3.025	2.983	2.716	2.93	0.218	0.172	3.159

표 20: 키메라 L3D10 형체의 에피토프 매핑. CTLA4Fc 단백질에 대한 결합은 ELISA에 의해 수행되었으며, 결합된 비오틴결합된 단백질의 양은 훌스-레디슈 페옥시다제(HRP)-접합된 스트렙타비단에 의해 측정되었다. 개시된 값들은 OD450 측정치이다. WT = 야생형 CTLA4Fc. M1 - M11은 CTLA4Fc 변이체 단백질이다.

단백질 농도	WT	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
0	0.202	0.196	0.2	0.187	0.184	0.189	0.192	0.198	0.187	0.179	0.179	0.183
0	0.195	0.187	0.185	0.18	0.176	0.176	0.176	0.176	0.17	0.166	0.166	0.167
10ng/ml	1.433	2.47	0.375	0.62	0.507	1.539	1.033	0.714	1.233	0.18	0.18	0.202
10ng/ml	1.518	2.432	0.317	0.587	0.356	1.366	0.976	0.738	1.237	0.171	0.169	0.203
100ng/ml	3.053	3.253	1.384	2.318	2.142	2.841	2.699	2.495	2.909	0.295	0.215	0.635
100ng/ml	3.025	3.239	1.164	2.354	1.409	2.991	2.771	2.483	2.841	0.304	0.216	0.759
1ug/ml	3.373	3.268	2.387	3.184	2.651	3.025	3.092	3.147	3.136	0.916	0.804	2.841
1ug/ml	3.114	2.967	2.619	3.124	2.659	3.034	3.072	2.991	3.034	0.916	0.868	2.983

표 21: 인간화된 항체 PP4631 의 에피토프 매핑. CTLA4Fc 단백질에 대한 결합은 ELISA 에 의해 수행되었으며, 결합도 비오턴결합된 단백질의 양은 훌스-래디수 페록시다제(HRP)-접합된 스토렙타비딘에 의해 측정되었다. 개시된 값들은 OD450 측정치이다. WT = 야생형 CTLA-4Fc. M1 - M11 은 CTLA-4Fc 변이체 단백질이다.

단백질 농도	WT	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
10ng/ml	0.312	2.264	0.207	0.198	0.194	0.407	0.22	0.194	0.247	0.177	0.181	0.172
10ng/ml	0.29	2.297	0.184	0.178	0.174	0.378	0.202	0.185	0.222	0.154	0.16	0.164
100ng/ml	1.077	2.827	0.203	0.27	0.219	1.371	0.459	0.281	0.725	0.171	0.17	0.172
100ng/ml	0.841	3.061	0.194	0.264	0.208	1.589	0.42	0.277	0.801	0.154	0.155	0.159
1ug/ml	2.51	2.881	0.339	0.882	0.473	2.79	1.992	1.169	2.33	0.175	0.17	0.178
1ug/ml	2.471	2.958	0.263	1.121	0.573	2.795	2.016	1.243	2.642	0.167	0.169	0.185

표 22: 인간화된 항체 PP4637 의 에피토프 매핑. CTLA4Fc 단백질에 대한 결합은 ELISA 에 의해 수행되었으며, 결합된 비오틴결합된 단백질의 양은 흘소-레디수 퍼옥시다제(HRP)-접합된 스트렙타비딘에 의해 측정되었다. 개시된 값들은 OD450 측정치이다. WT = 야생형 CTLA4Fc. M1 - M11 은 CTLA4Fc 변이체 단백질이다.

단백질 농도	WT	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
10ng/ml	0.597	2.307	0.195	0.544	0.189	1.239	0.603	0.19	0.5	0.373	0.169	0.157
10ng/ml	0.535	2.244	0.162	0.195	0.435	1.188	0.516	0.535	0.47	0.148	0.15	0.152
100ng/ml	1.947	2.632	0.182	0.389	0.248	2.601	1.296	0.521	2.001	0.15	0.15	0.152
100ng/ml	2.229	2.186	0.175	0.364	0.221	2.425	0.875	0.405	2	0.137	0.139	0.148
1ug/ml	2.724	2.05	0.259	1.662	0.725	2.654	2.355	1.418	2.548	0.157	0.151	0.162
1ug/ml	2.742	2.297	0.274	1.549	0.724	2.84	2.374	1.369	2.69	0.147	0.143	0.165

표 23: M11에서만 항원 에피토프의 특이적 순상을 나타내는 반복 연구로부터의 원 데이터. 추가의 대조군이 결합 특이성을 나타내도록 포함된 것 외에는, 표 2-5에서와 같다.

05/03/2016	Ab Conc	hCTLA4-Fc	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
	0	0.18	0.187	0.377	0.183	0.22	0.177	0.183	0.186	0.368	0.15	0.215	0.171
	0	0.177	0.222	0.538	0.167	0.18	0.229	0.177	0.142	0.293	0.114	0.114	0.155
	10ng/ml	1.705	2.692	0.469	0.623	0.217	1.853	1.244	0.837	1.27	0.158	0.169	0.19
	10ng/ml	1.799	2.779	0.333	0.593	0.563	1.802	1.331	0.884	1.454	0.213	0.157	0.194
	100ng/ml	3.316	3.195	1.313	2.244	2.233	2.51	3.032	2.672	3.015	0.419	0.26	0.752
	100ng/ml	3.458	3.567	1.37	2.535	2.556	3.316	3.032	2.875	3.157	0.346	0.272	0.746
	1000ng/ml	3.567	3.509	2.833	3.333	3.08	3.413	3.282	3.299	3.352	1.124	0.945	2.888
	10000ng/ml	3.672	3.509	2.755	3.299	3.145	3.537	3.316	3.352	3.435	1.181	0.941	2.914
	0	0.195	0.2	0.202	0.193	0.192	0.197	0.195	0.198	0.192	0.186	0.185	0.186
	0	0.192	0.185	0.181	0.192	0.178	0.178	0.178	0.187	0.173	0.169	0.168	0.161
	10ng/ml	0.316	0.37	0.216	0.304	0.22	0.345	0.279	0.258	0.326	0.177	0.176	0.239
	10ng/ml	0.31	0.356	0.21	0.414	0.26	0.334	0.279	0.253	0.297	0.159	0.167	0.236
	100ng/ml	1.581	1.882	0.333	1.245	0.527	1.813	1.235	0.889	1.557	0.176	0.172	1.092
	100ng/ml	1.525	1.928	0.323	1.345	0.489	1.735	1.385	0.987	1.643	0.162	0.155	1.283
	1000ng/ml	3.76	3.6	1.167	3.435	1.973	3.316	3.413	3.413	3.635	0.232	0.185	3.568
	1000ng/ml	3.6	3.673	1.316	3.51	2.009	3.459	3.183	3.183	3.635	0.215	0.181	3.673
	10ng/ml	0.451	2.812	0.207	0.202	0.194	0.626	0.23	0.207	0.327	0.197	0.205	0.181
	10ng/ml	0.417	2.693	0.181	0.179	0.177	0.642	0.22	0.195	0.32	0.158	0.182	0.162
	100ng/ml	1.868	3.568	0.212	0.29	0.256	2.618	0.589	0.345	1.532	0.172	0.174	0.171
	100ng/ml	1.938	3.317	0.203	0.274	0.247	2.126	0.571	0.305	1.419	0.155	0.155	0.162
	1000ng/ml	2.99	3.568	0.268	1.181	0.712	2.922	2.187	1.329	2.817	0.181	0.17	0.177
	10000ng/ml	3.033	3.51	0.268	1.184	0.759	3.071	2.358	1.475	2.869	0.144	0.171	0.187
	10ng/ml	0.983	2.654	0.202	0.218	0.197	1.409	0.429	0.218	0.727	0.176	0.176	0.17
	10ng/ml	0.955	2.604	0.184	0.2	0.168	1.359	0.389	0.21	0.761	0.148	0.154	0.152
	100ng/ml	2.669	3.007	0.232	0.534	0.319	2.908	1.839	0.523	2.669	0.145	0.161	0.16
	100ng/ml	2.741	3.158	0.203	0.554	0.374	2.895	1.741	0.478	2.604	0.145	0.148	0.157
	1000ng/ml	3.183	3.146	0.327	1.837	1.019	2.966	2.817	1.72	3.042	0.173	0.163	0.174
	10000ng/ml	3.209	3.316	0.321	1.867	1.015	3.196	2.857	1.766	3.051	0.143	0.163	0.187
	Ab conc	mCTLA4-Fc	비오픈-L3D10	비오픈-hB7-1	비오픈-hB7-1	비오픈-HL12							
	0	0.19	0.19	0.198	0.202	0.191	0.185	0.179	0.179	0.183	0.185	0.179	0.179
	0	0.189	0.184	0.18	0.185	0.181	0.181	0.179	0.179	0.183	0.185	0.181	0.181
	10ng/ml	0.201	0.201	0.201	0.338	0.181	0.164	0.165	0.162	0.171	0.176	0.176	0.176
	100ng/ml	0.303	0.315	0.182	0.318	0.176	0.171	0.177	0.177	0.163	0.165	0.171	0.171
	1000ng/ml	0.314	0.326	0.18	1.668	0.165	0.162	0.177	0.182	0.184	0.184	0.183	0.183
	10000ng/ml	0.942	1.385	0.94	1.475	3.353	0.179	0.172	0.177	0.176	0.187	0.187	0.187
	mCTLA4	hIgG	mCTLA4	hIgG	mCTLA4	hIgG	mCTLA4	hIgG	mCTLA4	hIgG	mCTLA4	hIgG	mCTLA4
	비오픈-L3D10	비오픈-hB7-1	비오픈-HL12	비오픈-HL12	비오픈-HL12	비오픈-HL12	비오픈-HL12	비오픈-HL12	비오픈-HL12	비오픈-HL12	비오픈-HL12	비오픈-HL12	비오픈-HL12

[0174]

[0175]

L3D10은 M11과 유의한 결합을 유지했으므로, 본 발명자들은 이 결합이 특이적인지 여부를 테스트했다. 본 발명자들은 인간 CTLA4-Fc(hCTLA4Fc), 마우스 CTLA4-Fc(mCTLA4-Fc), 대조군 IgG1-Fc 또는 모든 변이체 hCTLA4-Fc를 플레이트를 코팅하고, L3D10, PP4631 및 PP4637과 함께 B7-1Fc에 대한 이들의 결합을 측정하였다. 대량의 데이터를 표 23에 나타낸다. 도 57에 도시된 바와 같이, 비오픈결합된 B7-1은 hCTLA-4, mCTLA-4 및 M11을 동등하게 결합시킨다. 분석의 특이성은 IgG1-Fc에 결합하지 않음으로 입증된다. 흥미로운 것은 M11에 대한 L3D10-결합이 IgG1-Fc 및 mCTLA4-Fc에 대한 결합보다 강하고, IgG1-Fc에 대한 중요한 결합은 M11에 결합하는 키메라 항체가 비특이적일 수 있음을 시사한다. 대조적으로, 인간화된 항체들 중 어느 것도 M11, mCTLA-4 및 IgG1-Fc 대조군에 결합하지 않는다. 이러한 데이터는 M11에 도입된 돌연변이가 CTLA-4에 결합하는 L3D10, PP4631 및 PP4637을 선택적으로 제거함을 입증한다.

[0176]

공지된 복잡한 구조 133을 사용하여, 본 발명자들은 3-D 구조에서 CTLA-4 에피토프를 매핑시켰다. 도 58에 도시된 바와 같이, 에피토프는 B7-1에 의해 커버되는 영역 내에 위치하는 이들 mAb에 의해 인식된다. 이와 같이, CTLA-4에 결합하는 L3D10, PP4631 및 PP4637은 B7-1의 결합과 상호 배타적이다. 부족한 차단 PP4631 및 PP4637은 특유의 결합 도메인보다는 결합능이 낮기 때문이다.

[0177] 마우스 및 인간 CTLA4 단백질이 B7-1과 교차 반응성이지만, 항-인간 CTLA-4 항체가 뮤린 Ct1a-4 단백질과 교차 반응하지 않는다는 사실을 이용하여, 본 발명자들은 ELISA에 의한 L3D10 유래 항체의 결합 에피토프를 매핑할 수 있었다. 인간 CTLA-4 단백질의 아미노산 클러스터가 뮤린 Ct1a-4 단백질의 아미노산으로 치환된 인간 CTLA-4Fc 단백질의 여러 변이체를 사용하여, 본 발명자들은 4개의 아미노산을 치환할 때 직후 CTLA-4의 알려진 B7-1 결합 도메인을 따르면, 항체의 용량-의존성 결합이 크게 폐지된다는 것을 분명하게 입증한다. 결합 에피토프가 B7-1 결합 도메인에 직접적으로 인접하여 매핑한다는 사실은 시험관내 및 생체내에서 B7-CTLA-4 상호작용을 차단하는 L3D10 항체의 입증된 능력과 서로 관련된다. 세포외 IgV 도메인의 C-말단 아미노산이 세포내 도메인에 융합되어 가용성 CTLA4가 생성되므로, 다형성 C-말단 도메인 잔기(C-말단으로부터 18 아미노산만)에 결합하는 항체가 가용성 CTLA-4에 대한 반응성을 잃을 가능성이 더 크다고 추측되며, 큰 세포내 도메인이 세포외 도메인의 C-말단에 융합된다.

[0178] 항-CTLA4 항체의 결합 도메인을 추가로 조사하기 위해, M12-M17(서열번호: 51-56)로 명명된 6개의 부가적인 변이체 CTLA4-Fc 융합 단백질을 설계하고(도 59), 항-CTLA4 항체 10D1(도 60a), PP4631(도 60b) 및 PP4637(도 60c)의 결합을 비교하는데 사용하였다. 도 60에 도시된 바와 같이, 위치 $Y^{103}L^{104}I^{106}$ 에 있는 M11의 돌연변이는 10D1, PP4631 및 PP4637에 대한 결합을 폐지하여, 10D1, PP4631 및 PP4637에 대한 결합 부위가 잔기 $Y^{103}L^{104}I^{106}$ 을 포함함을 입증한다. 중요한 점은 A29> Y의 추가 돌연변이가 PP4631과 PP4637에 대한, $Y^{103}L^{104}I^{106}$ 의 돌연변이를 갖는 CTLA-4의 결합을 복원한다는 것이다. 이들 데이터는 CTLA4에서의 위치 A²⁹가 10D1이 아닌, 항체 PP4631 및 PP4637의 결합에 중요하다.

실시예 17. 항-CTLA-4 mAb는 종양 거부를 유도하는데 항-4-1BB와 상승작용한다

[0180] 동물 모델에 대한 연구에 따르면, 항-CTLA-4 단클론 항체(mAb)에 의해 유발된 항-종양 반응은 정상적인 "자가" 분화 항원에 대한 항원-특이적 T 세포 반응으로 인해 적어도 부분적으로 나타났다(73, 74). 자가면역 질환을 악화시키는 항-CTLA-4 항체의 경향은 마우스에 대하여 잘 문서화되어 있다(75-78). 이 개념은 더욱 확증되었고, 환자가 치료 중단을 요구하는 심각한 자가면역 증상을 보인 최근의 인체 시험에서 큰 한계가 되었다(79). 한편, 암 치료용 항-4-1BB mAb는 루푸스 경향 마우스에서 자가면역 질환의 발병을 막는 것으로 나타났다(24, 25).

[0181] 항-4-1BB mAb가 항-종양 반응을 자극하고 자가면역 징후를 감소시킬 수 있다는 사실은 이 항체와 항-CTLA-4 mAb의 조합이 자가면역없이 암 거부를 유발할 수 있다는 흥미로운 가능성을 제기한다. 이 연구에서 항-CTLA-4와 항-4-1BB는 조합하여, 대형 종양의 거부 반응을 유도했다.

CD8 T 세포-매개된 종양 거부의 유도에 있어서, 항-뮤린-CTLA-4 및 항-뮤린-4-1BB 항체의 조합 효과.

[0183] 하나는 최소 질병이고, 다른 하나는 확립된 큰 종양인 두가지 모델을 사용하여, 항-뮤린-4-1BB와 항-뮤린-CTLA-4 mAb 치료를 조합하는 항-종양 효과를 시험하였다. C57BL/6 마우스를 MC38 결장암 세포의 피하 접종으로 도전시키고, 종양 세포 접종 후 다른 시간에 항체를 종양-도전된 마우스에 주사하고, 종양 크기 및 발병률을 신체 검사로 모니터링하였다.

[0184] 최소 질병 모델에서 마우스를 종양 세포의 접종 후 48 시간 후에 시작하여, 햄스터 IgG + 래트 IgG, 항-4-1BB + 햄스터 IgG(항-4-1BB 단독 그룹), 항-CTLA-4 + 래트 IgG(항-CTLA-4 단독 그룹), 또는 항-CTLA4에 조합된 4-1BB로 처리하였다. 항체를 2일, 9일 및 16일에 복강내(ip) 투여하였다. 항-4-1BB 또는 항-CTLA4 mAb 단독으로 처리한 결과, 종양을 거부하는 각 그룹에서 5마리 마우스 중 1마리에서 종양 성장이 지연된 반면, 항-CTLA-4 및 항-4-1BB mAb 모두로 처리된 5마리의 마우스 중 4 마리는 실험의 종결시 종양이 없었다. 도 61a는 각 마우스의 종양 성장 측정값을 표시한다. 그룹 간의 성장률을 비교하기 위해, 선형 임의-효과 모델을 데이터에 적용하였다. 조합 요법은 종양 크기의 일일 성장을 항-CTLA-4 단독보다 $4.6 \text{ mm}^2/\text{일}$ 종양 크기로 1일 성장을 크게 감소시켰다 ($p=0.0094$). 그리고, 조합 요법은 항-4-1BB 단독보다 $8.4 \text{ mm}^2/\text{일}$ 로 성장을 크게 감소시켰다($p=0.0006$). 성장률에 더해, 실제 종양 크기를 초기 종양 도전후 6주에 치료 그룹들 사이에서 비교하였다. 6주에 평균종양 크기는 항-CTLA-4(137.8 mm^2 , $P=0.0251$) 또는 항-4-1BB(287.6 , $P=0.0006$)를 개별적으로 투여한 마우스와 비교할 때 조합 요법(27.5 mm^2)을 받은 마우스의 경우 상당히 더 작았다. 따라서, 최소의 종양-부담의 설정에서, 항-4-1BB 및 항-CTLA-4의 조합은 별도로 주어진 항-4-1BB 또는 항-CTLA-4에 비해 종양 성장에서 유의한 지연을 초래한다.

[0185] 작은 종양 부담에 대한 조합 mAb 치료의 항-종양 효과가 더 큰 종양 부담에 대한 치료 적용으로 확대될 수 있는

지를 결정하기 위해, 확립된 종양을 갖는 마우스를 항체로 처리하였다. 암생형 C57BL/6 마우스에 MC38 결장암 세포의 피하 접종을 시도하였다. 종양을 14일 동안 성장시킨 다음, 종양이 확립된 마우스(대개 직경 > 7mm)를 선택하여 무작위로 4개의 치료군으로 나누었다: 햄스터 IgG + 래트 IgG, 항-4-1BB + 햄스터 IgG, 항-CTLA-4 + 래트 IgG, 및 항-CTLA-4 mAb와 조합된 항-4-1BB mAb. 항체를 종양 투여 후 14일, 21일 및 28일에 복강내(i.p.) 투여하였다. 도 61b에 도시된 바와 같이, 대조군 IgG 치료와 비교하여 항-CTLA-4 mAb 치료로 종양 성장을 저해하지는 않았지만, 그룹내 8마리의 마우스 중 1마리에서 거부 반응이 관찰되었다. 항-4-1BB mAb를 사용한 치료는 종양 성장을 다소 느리게 하였지만, 8마리 중 1마리만 종양을 거부하였다. 대조적으로, 항-CTLA-4 및 항-4-1BB mAb와의 조합 요법은 8마리 마우스 중 7마리에서 종양을 박멸하고, 나머지 마우스에서 추가의 종양 성장을 예방했다. 위와 같이 그룹간에 성장률을 선형 임의-효과 모델을 데이터에 적용하여 비교하였다. 조합 요법은 종양 크기의 1일 성장을 항-CTLA-4 단독보다 $10.6 \text{ mm}^2/\text{일}$ 유의하게 감소시켰다($p < 0.0001$). 또한, 조합 요법은 항-4-1BB 단독에 비해 $6.2 \text{ mm}^2/\text{일}$ 로 성장을 유의하게 감소시켰다($p=0.0002$). 성장률에 더해, 실제 종양 크기는 초기 종양 투여 후 8주에 처리 그룹간에 비교하였다. 8주에서의 추정된 평균 종양 크기는 별도로 항-CTLA-4(404.9 mm^2 , 95% CI: $285.4, 524.4 \text{ mm}^2$; $p < 0.0001$) 또는 항-4-1BB(228.4 mm^2 , 95% CI: $200.4, 689.9 \text{ mm}^2$; $p=0.0004$)를 투여받은 마우스에 비해 조합 요법(-1.7 mm^2 , 95% CI: $-10.8, 7.5 \text{ mm}^2$)을 투여받은 마우스의 경우 유의하게 작았다. 따라서, 조합 mAb는 또한 더 큰 종양 부담에서 별도로 항-CTLA-4 또는 항-4-1BB보다 종양 성장을 유의하게 저연시키는 것으로 보인다.

[0186] MC38은 간 전이를 일으키는 것으로 알려져 있다.⁸⁰ 간 전이에 대한 치료 항체의 효과를 평가하기 위해, 실험에 등록된 모든 마우스를 조직학에 의해 간 전이를 분석하였다. 표 24에 나타난 바와 같이, 대조군 IgG처리된 마우스의 약 60%는 간에서 미세-전이를 보였다. 항-CTLA-4 또는 항-4-1BB 항체 단독으로 치료하면, 전이 속도가 다소 감소했지만, 감소가 통계적으로 유의하지는 않았다. 놀랍게도, 두 항체로 치료한 그룹의 1/22 마우스에서만 간 전이가 있었다. 로지스틱 회귀 모델을 사용하여, 본 발명자들은 항-4-1BB만을 투여받은 마우스의 간 전이 확률이 항-4-1BB와 항-CTLA-4(95% CI: 1.6, 13.7; $p=0.0050$)를 투여한 마우스의 확률보다 약 4.7배 높았다. 유사하게, 간 전이 확률은 두 치료(95% CI: 1.3, 10.2; $p=0.0174$)를 받은 마우스에 비해 항-CTLA-4를 투여한 마우스의 경우 3.6배 더 높았다. 따라서, 조합 요법은 항체 단독으로 치료하는 경우와 비교할 때 MC38에 의한 간 전이를 상당히 감소시킨다.

표 24: 조합 요법은 간 전이를 실질적으로 감소시킨다*

그룹	처리	n	전이를 갖는 마우스의 수 (%)	그룹 비교 p-값
G1	햄스터 IgG+Rat IgG	19	11 (57.8%)	
G2	항-CTLA-4+래트 IgG	18	6 (33.3%)	vs.G1: 0.1383
G3	항-4-1BB+ 햄스터 IgG	21	8 (38.1%)	vs.G1: 0.2136
G4	항-CTLA-4+ 항-4-1BB	22	1 (4.5%)	vs.G1: 0.0007 vs.G2: 0.0174 vs.G3: 0.0050

* 데이터는 4 개의 독립적인 실험으로부터 요약된다. H&E 염색후 간 당

적어도 2 개의 섹션들이 조사되었다.

[0187] 면역 세포의 서브세트가 조합 mAb 치료에 의해 유발된 항-종양 효과에 기여하는지를 측정하기 위해, 램프구의 주요 서브세트를 단클론 항체로 소모시켰다. MC38 종양 세포를 피하 주사하였다. 종양이 만져지면 종양-보유 마우스를 4개의 그룹으로 나누었다. 각 그룹은 일련의 복강내 항체 주사를 통해 면역 세포의 상이한 서브세트를 소모시키며, 정상 래트 IgG에 의한 소모 없음, 항-CD4 mAb(GK1.5)에 의한 CD4 T 세포 소모, 항-CD8 mAb(2.4.3)에 의한 CD8 T 세포 소모, 항-NK1.1 mAb(PK136)에 의한 NK 세포 소모를 포함한다. 또한, 모든 그룹의 모든 마우스를 항-CTLA-4와 항-4-1BB mAb로 매주 한 번씩 3주 동안 치료하였다. 면역 세포 서브세트의 적절한 소모는

실험 완료 직전 마우스로부터 취한 말초 혈액의 유동 세포계측법에 의해 평가하였다(데이터는 나타내지 않음). 예상한 바와 같이, 면역 세포 소모가 없는 마우스는 항-4-1BB mAb와 조합된 항-CTLA-4에 의한 치료에 반응하였다(도 62). 유사하게, NK 세포 및 CD4 T 세포의 소모는 조합된 항-CTLA-4 + 항-4-1BB mAb 치료법의 항-종양 활성에 영향을 미치지 않았다. 그러나, CD8 T 세포의 소모는 조합 항체 요법의 항-종양 활성을 폐지했다. 28일째에, CD8 T 세포(92.3 mm^2 , 95% CI: 64.5, 120.1 mm^2)의 소모가 있는 마우스의 평균 종양 크기는 면역 세포 결핍이 없는 마우스(28.7 mm^2 , 95% CI: -17.1, 74.4 mm^2), CD4 T 세포가 소모된 마우스(16.7 mm^2 , 95% CI: 1.0, 32.4 mm^2) 및 NK 세포가 소모된 마우스(9.3 mm^2 , 95% CI: -8.3, 26.9 mm^2)의 경우 평균 종양 크기보다 유의하게 커졌다. 이러한 데이터는 항-CTLA-4 및 항-4-1BB mAb 치료의 종양-제거 효과가 CD8 T 세포-의존성을 입증한다.

[0189] 항-4-1BB 항체는 이종 항-CTLA-4 항체에 대한 항체 반응을 감소시켰다.

[0190] 반복되는 항체 요법의 장애물 중 하나는 치료용 항체에 대한 숙주 항체 반응의 향상이다.⁸¹ 4-1BB는 단백질에 대한 항체 반응을 감소시키는 것으로 알려져 있으므로, 본 발명자들은 항-4-1BB 항체가 항-CTLA4 항체에 대한 숙주 반응에 미치는 영향을 평가했다. 도 63에 도시된 바와 같이, 항-항체 반응이 대조군 IgG 또는 항-4-1BB로 처리된 마우스에서 검출된 경우는 거의 없었다. 항-CTLA-4 mAb가 CD4 T 세포 반응을 촉진시키는 능력과 일치하여,⁸² 항-CTLA-4 + 래트 IgG로 치료한 마우스는 투여된 4F10 항체 및 래트 IgG에 대한 강한 숙주 항체 반응을 생성하였다(도 63a-b). 이 반응은 항-4-1BB가 항-CTLA-4 mAb와 함께 투여되었을 때 30배 이상 감소되었다. 이러한 데이터는 항-4-1BB 항체가 치료제에 대한 숙주 반응을 감소시킴으로써 다른 동시-투여된 치료 단백질의 지속 기간을 잠재적으로 증가시킬 수 있음을 시사한다.

[0191] 인간 CTLA-4 노크-인 마우스에서, 항-마우스 4-1BB 및 항-인간 CTLA-4 항체의 조합은 종양 거부 및 오래 지속되는 암 면역력을 유도하였다.

[0192] 항-4-1BB가 항-CTLA4 항체에 대한 항체 생성을 감소시키기 때문에, 항-4-1BB에 의한 종양 거부의 증진이 항체 반응을 억제하는 효과에 단독으로 기인하는 것인지는 흥미로운 문제이다. 이 인간 CTLA4 유전자 노크-인 마우스는 항-인간 CTLA4 항체의 항-종양 효과가 항-4-1BB 항체에 의해 증진될 수 있는지를 시험할 수 있게 하였다. 도 64a에 도시된 바와 같이, 항-인간 CTLA-4(L3D10) 및 항-4-1BB 항체(2A)만이 종양 성장을 지연시켰지만, 두 항체의 조합은 가장 중요한 종양 거부를 초래하였다. 항-CTLA-4, 4-1BB 또는 두 항체로 처리된 그룹에서 각각 1/7, 2/7, 5/7 마우스는 종양을 발생시키지 않았고, 처리되지 않은 그룹의 모든 마우스는 종양을 발생시켰다. 항-인간 CTLA-4 항체는 마우스 기원이기 때문에, 4-1BB 항체의 영향은 치료용 항-CTLA-4 항체에 대한 항체의 억제에 기인할 수 없다. 또한, 본 발명자들의 데이터는 조합 요법의 우수한 효과가 항-인간 CTLA-4 항체-기반 면역요법에 적용될 수 있을 것임을 입증하였다.

[0193] 이종 항체 처리된 마우스가 종양 세포의 추가 도전에 면역이 되는지 여부를 테스트하기 위해, 첫 번째 종양 세포 도전 후 110일째에 종양 세포로 도전시켰다. 도 64b에 도시된 바와 같이, 제1 라운드에서 종양 세포를 거부한 5개의 이종 항체-처리된 마우스는 모두 종양이 없는 반면, 대조군의 나이브 마우스는 진행성 종양 성장을 보였다. 따라서, 조합 요법은 또한 암세포에 오래 지속되는 면역력을 유도했다.

[0194] 단백질-기반 면역요법의 장애물 중 하나는 치료용 단백질에 대한 숙주 면역력이다. 항체의 경우, 숙주는 이종형(xenotypic), 동형(allotypic) 및 이디오타입(idiotypic) 에피토프에 대한 항체를 탑재할 수 있다.⁸¹ 다른 항체 반응에는 특별한 고려가 필요하지만, 이종형 반응은 완전한 인간화에 의해 제거될 수 있다. 장애물은 항-CTLA-4 항체가 자체의 보조제이기 때문에 항-CTLA-4 항체의 경우 더 분명하다는 점이다. Mittler 등의 종래 문헌은 T-세포 의존성 채액 면역 반응의 상당한 억제를 입증하였다.⁸³ 본 발명의 데이터는 항-4-1BB 항체의 동시-투여가 항-CTLA-4 항체에 대한 숙주 반응을 감소시킨다는 것을 입증하며, 이는 항-CTLA-4 및 항-4-1BB 항체를 사용하는 조합 요법의 또 다른 이점을 시사한다.

[0195] 함께, 본 발명의 데이터는 항-CTLA-4와 항-4-1BB 항체와의 조합 요법이 암 면역력에 있어서 증가 효과, 자가면역 부작용의 상호 억제, 및 항-항체 반응의 개선의 세가지 주요 이점을 제공한다는 것을 증명한다.

[0196] 본 명세서에 언급된 모든 공보 및 특허는 각각의 공보 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 참조로서 그의 전문이 포함되는 것과 동일한 범위에서 본원에 참고로 포함된다. 본 발명은 특정 구현예와 관련하여 설명되었지만, 본 발명은 추가의 변형이 가능하며, 본 출원은 일반적으로 본 발명의 원리를 따르는 본 발명의 임의의 변형, 사용 또는 적용을 포함하는 것으로 의도되며, 본 발명이 속하는 기술 분야 내에서 공지된 또는 통상적인

관행에 속하고 본원에서 설명된 본질적인 특징에 적용될 수 있는 본 발명으로부터의 이탈을 포함하는 것으로 이해될 것이다.

[0197] **인용된 참고 문헌.**

- [0198] 1. Townsend ARM, Tothbard J, Gotch FM, Bahadur G, Wraith D, McMichael AJ. 세포독성 램프구에 의해 인식되는 인플루엔자 핵단백질의 에피토프는 짧은 합성 웹타이드로 정의될 수 있다. *Cell.* 1986;44:959-68.
- [0199] 2. Zinkernagel RM, Doherty PC. 동종 또는 반동종 시스템내 램프구성 맥락수막염에서의 시험관내 T 세포-매개된 세포독성의 제한. *Nature.* 1974;248:701-2.
- [0200] 3. Lafferty KJ, Prowse SJ, Simeonovic CJ, Warren HS. 조직 이식의 면역생물학: 일파성(passenger) 백혈구 개념으로의 복귀. *Annu Rev Immunol.* 1983;1:143-73.
- [0201] 4. Liu Y, Linsley PS. T-세포 성장의 상호자극. *Curr Opin Immunol.* 1992;4(3):265-70.
- [0202] 5. Schwartz RH. T 램프구의 상호자극 : 인터루킨-2 생산 및 면역 요법에서 CD28, CTLA4 및 B7/BB1의 역할. *Cell.* 1992;71(7):1065-8.
- [0203] 6. Freeman GJ, Freedman AS, Segil JM, Lee G, Whitman JF, Nadler LM. B7, 활성화 및 신생 B 세포에 대한 독특한 발현을 갖는 Ig 슈퍼페밀리의 새로운 구성원. *J Immunol.* 1989;143(8):2714-22.
- [0204] 7. Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA, Ng JW, Restivo VA, Jr., Lombard LA, 등 B7-2의 클로닝: 인간 T 세포 증식을 동시자극하는 CTLA4 카운터-수용체 [코멘트 참조]. *Science.* 1993;262(5135):909-11.
- [0205] 8. Hathcock KS, Laszlo G, Dickler HB, Bradshaw J, Linsley P, Hodes RJ. T 세포 활성화에 대한 대안적인 CTLA4 리간드 동시자극의 확인 [코멘트 참조]. *Science.* 1993;262(5135):905-7.
- [0206] 9. Wu Y, Guo Y, Liu Y. 항원 제시 세포상의 주요 보조자극 분자인 CTLA4 리간드 A는 B7과 구별된다. *J Exp Med.* 1993;178(5):1789-93.
- [0207] 10. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. CTLA4 차단에 의한 항 종양 면역력 강화 [코멘트 참조]. *Science.* 1996;271(5256):1734-6.
- [0208] 11. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. CTLA4는 B 세포 활성화 항원 B7의 두번째 수용체이다. *J Exp Med.* 1991;174(3):561-9.
- [0209] 12. Linsley PS, Clark EA, Ledbetter JA. T-세포 항원 CD28은 활성화 항원 B7/BB-1과 상호 작용하여 B 세포와의 부착을 매개한다. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(13):5031-5.
- [0210] 13. Hodi FS, Mihm MC, Soiffer RJ, Haluska FG, Butler M, Seiden MV, 등 이전에 백신접종을 받은 전이성 흑색종 및 난소암 환자에서 세포독성 T 램프구-관련된 항원 4 항체 차단의 생물학적 활성. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(8):4712-7. PubMed PMID: 12682289.
- [0211] 14. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, 등 전이성 흑색종 환자에서 이필리무맙에 의한 증진된 생존율. *N Engl J Med.* 2010;363(8):711-23. Epub 2010/06/08. doi: 10.1056/NEJMoa1003466. PubMed PMID: 20525992; PubMed Central PMCID: PMC3549297.
- [0212] 15. Larkin J, Chiarioti-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, 등 치료되지 않은 흑색종에서의 니볼루맙 및 이필리무맙 또는 단일 요법의 조합. *N Engl J Med.* 2015;373(1):23-34. Epub 2015/06/02. doi: 10.1056/NEJMoa1504030. PubMed PMID: 26027431.
- [0213] 16. Ribas A, Hodi FS, Callahan M, Konto C, Wolchok J. 베무라페닙 및 이필리무맙의 조합으로 인한 간독성. *N Engl J Med.* 2013;368(14):1365-6. Epub 2013/04/05. doi: 10.1056/NEJMcl302338. PubMed PMID: 23550685.
- [0214] 17. Delyon J, Mateus C, Lambert T. 이필리무맙에 의해 유도된 혈우병 A. *N Engl J Med.* 2011;365(18):1747-8. Epub 2011/11/04. doi: 10.1056/NEJMcl1110923. PubMed PMID: 22047582.
- [0215] 18. Fadel F, El Karoui K, Knebelmann B. 항-CTLA4 항체-유도성 루푸스 신염. *N Engl J Med.* 2009;361(2):211-2. Epub 2009/07/10. doi: 10.1056/NEJMco0904283. PubMed PMID: 19587352.

- [0216] 19. Kocak E, Lute K, Chang X, May KF, Jr., Exten KR, Zhang H, 등 항-CTL 항원-4 및 항-4-1BB 항체와의 조합 요법은 암 면역력을 증진시키고, 자가면역력을 감소시킨다. *Cancer Res.* 2006;66(14):7276-84. Epub 2006/07/20. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2128. PubMed PMID: 16849577.
- [0217] 20. Lute KD, May KF, Lu P, Zhang H, Kocak E, Mosinger B, 등 인간 CTLA4-노크-인 마우스는 종양 면역력과 항-CTLA4 항체에 의해 유도된 자가면역력 사이의 정량적인 관계를 밝힌다. *Blood.* 2005. PubMed PMID: 16037385.
- [0218] 21. May KF, Roychowdhury S, Bhatt D, Kocak E, Bai XF, Liu JQ, 등 항-인간 CTLA4 단클론 항체는 hu-PBL-SCID 모델에서 T 세포 팽창 및 면역을 촉진시킨다: 상호작용 단클론 항체의 전임상 스크리닝을 위한 새로운 방법. *Blood.* 2005;105:1114-20. PubMed PMID: 15486062.
- [0219] 22. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, 등 Fc γ RII, Fc γ RIII, Fc γ RIII 및 FcRn에 대한 인간 IgG1상의 결합 부위의 고해상도 매팅 및 Fc γ R에 대한 개선된 결합을 갖는 IgG1 변이체의 설계. *R. J Biol Chem.* 2001;276(9):6591-604. Epub 2000/11/30. doi: 10.1074/jbc.M009483200. PubMed PMID: 11096108.
- [0220] 23. Dall'Acqua WF, Woods RM, Ward ES, Palaszynski SR, Patel NK, Brewah YA, 등 신생아 Fc 수용체에 대한 인간 IgG1의 친화도 증가: 생물학적 결과. *J Immunol.* 2002;169(9):5171-80. Epub 2002/10/23. PubMed PMID: 12391234.
- [0221] 24. Gao SH, Huang K, Tu H, Adler AS. 단클론 항체 인간성 점수와 그의 용도. *BMC 생명 공학.* 2013;13:55. Epub 2013/07/06. doi: 10.1186/1472-6750-13-55. PubMed PMID: 23826749; PubMed Central PMCID: PMC3729710.
- [0222] 25. Sun Y, Chen HM, Subudhi SK, 등 자발적 자가면역 질병의 동시자극 분자-표적 항체 치료법. *Nat Med* 2002.8: 1405-13
- [0223] 26. Foell J, Strahotin S, O'Neil SP, 등 CD137 동시자극 T 세포 수용체 작용은 루푸스-경향의 NZB x NZW F1 마우스에서 급성 질병을 역전시킨다. *J Clin Invest* 2003.111: 1505-18
- [0224] 27. Melero I, Shuford WW, Newby SA, 등 4-1BB T-세포 활성화 분자에 대한 단클론 항체는 확립된 종양을 박멸한다. *Nat Med* 1997.3: 682-5
- [0225] 28. May KF, Jr., Chen L, Zheng P and Liu Y 항-4-1BB 단클론 항체는 종양-특이적 CD8 + T 세포의 클론성 확장은 아니지만 생존을 촉진함으로써 큰 종양 부담의 거부를 증진시킨다. *Cancer Res* 2002.62: 3459-65
- [0226] 29. Ye Z, Hellstrom I, Hayden-Ledbetter M, 등 4-1BB에 특이적인 단일-사슬 Fv 단편을 사용한 암 유전자 치료법. *Nat Med* 2002.8: 343-8
- [0227] 30. Walunas, T.L., 등, CTLA4는 T 세포 활성화의 음성 조절인자로서 기능할 수 있다. *Immunity*, 1994. 1(5): p. 405-13.
- [0228] 31. Krummel, M.F. and J.P. Allison, CD28 및 CTLA4는 자극에 대한 T 세포의 반응에 반대 효과를 갖는다. *J Exp Med*, 1995. 182(2): p. 459-65.
- [0229] 32. Anderson, D.E., 등, CTLA4 차단에 대한 T-세포 기능의 역설적 억제; 인간 T-세포 집단 내의 이종성. *Nat Med*, 2000. 6(2): p. 211-4.
- [0230] 33. Coyle, A. J. 등 (2001) "확장 B7 초계열: T 세포 기능을 조절하는 동시자극 신호의 복잡성 증가" *Nature Immunol.* 2(3):203-209.
- [0231] 34. Sharpe, A. H. 등 (2002) "B7-CD28 초계열," *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126.
- [0232] 35. Collins, M. 등 (2005) "면역-조절 리간드의 B7 계열," *Genome Biol.* 6:223.1-223.7.
- [0233] 36. Flajnik, M. F. 등 (2012) "B7 계열의 진화: B7H6과 Nkp30의 공동 진화, 새로운 B7 계열 구성원, B7H7의 동정, 및 B7의 MHC와의 역사적인 관계," *Immunogenetics* epub doi.org/10.1007/s00251-012-0616-2.
- [0234] 37. Martin-Orozco, N. 등 (2007) "억제성 동시자극 및 항-종양 면역," *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298.

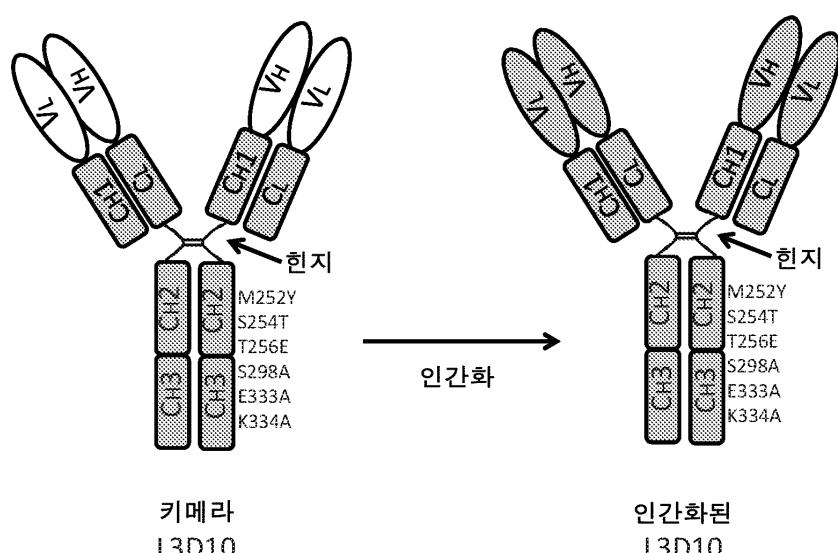
- [0235] 38. Flies, D. B. 등 (2007) "새로운 B7s: 종양 면역에 있어서 중요한 역할을 함," *J. Immunother.* 30(3):251-260
- [0236] 39. Ishida, Y. 등 (1992) "PD-1의 유도된 발현, 프로그램된 세포 사멸시 면역글로불린 유전자 초계열의 새로운 구성원," *EMBO J.* 11:3887-3895.
- [0237] 40. Agata, Y. 등 (1996) "자극된 마우스 T 및 B 림프구의 표면 상에서 PD-1 항원의 발현," *Int. Immunol.* 8(5):765-772.
- [0238] 41. Yamazaki, T. 등 (2002) "뮤린 T 세포 및 APC에 의한 프로그램된 사멸 1 리간드의 발현," *J. Immunol.* 169:5538-5545.
- [0239] 42. Nishimura, H. 등 (2000) "PD-1 결핍 마우스의 흉선에서 베타 선택의 촉진 및 양성 선택의 변경," *J. Exp. Med.* 191:891-898.
- [0240] 43. Martin-Orozco, N. 등 (2007) "액체성 동시자극 및 항-종양 면역," *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298.
- [0241] 44. Kabat 등, 면역학적 관심의 단백질 서열, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991).
- [0242] 45 Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917.
- [0243] 46. Padlan, 1991, 분자 면역학 28(4/5):489-498.
- [0244] 47. Studnicka 등, 1994, 단백질 공학 7:805.
- [0245] 48. Roguska 등, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:969
- [0246] 49. Keler, T. 등 사이노몰구스 마카크에서 백신과 조합된 CTLA4 차단의 활성 및 안전성. *J. Immunol.* 171, 6251-6259 (2003).
- [0247] 50. Wing, K. 등 Foxp3 + 조절 T 세포 기능에 대한 CTLA4 조절. *Science* 322, 271-275, doi:10.1126/science.1160062 (2008).
- [0248] 51. Schwartz, R. S. 새로운 면역학-면역억제 약물 치료의 끝? *N. Engl. J. Med.* 340, 1754-1756, doi:10.1056/NEJM199906033402209 (1999).
- [0249] 52. Simpson, T. R. 등 종양-침윤 조절 T 세포의 Fc-의존성 소모는 흑색종에 대한 항-CTLA4 치료법의 효능을 공동으로 정의한다. *J. Exp. Med.* 210, 1695-1710, doi:10.1084/jem.20130579 (2013).
- [0250] 53. Selby, M. J. 등 IgG2a 이소타입의 항-CTLA-4 항체는 종양내 조절 T 세포의 감소를 통해 항 종양 활성을 강화시킨다. *Cancer immunology research* 1, 32-42, doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0013 (2013).
- [0251] 54. Maker, A. V., Attia, P. & Rosenberg, S. A. CTLA4 차단으로 치료받은 환자의 항종양 반응 및 자가면역의 세포 기전 분석. *J. Immunol.* 175, 7746-7754 (2005).
- [0252] 55. Korman, A. J., Peggs, K. S. & Allison, J. P. 암 면역 요법에서 체크포인트 차단. *Adv. Immunol.* 90, 297-339, doi:10.1016/S0065-2776(06)90008-X (2006).
- [0253] 56. Ribas, A. 등 Tremelimumab (CP-675,206), 암 환자의 임상 개발에서 단클론 항체를 차단하는 세포 독성 T 림프구 관련 항원 4. *Oncologist* 12, 873-883, doi:10.1634/theoncologist.12-7-873 (2007).
- [0254] 57. Ribas, A. 등 진행성 흑색종 환자에서 트레멜리무맙과 표준-치료 화학요법을 비교하는 3상 무작위 임상 시험. *J. Clin. Oncol.* 31, 616-622, doi:10.1200/JCO.2012.44.6112 (2013).
- [0255] 58. Lee, K. M. 등 CTLA4에 의한 T 세포 불활성화의 분자 기전 [과정 인용]. *Science* 282, 2263-2266 (1998).
- [0256] 59. Marengere, L. E. 등 티로신 포스파타아제 SYP에 의한 CTLA4와의 연관성에 의한 T 세포 수용체 신호전달의 조절 [발표된 정오표는 Science 1996 Dec 6;274(5293)1597 및 1997 Apr 4;276(5309):21에 게재됨]. *Science* 272, 1170-1173 (1996).

- [0257] 60. Liu, Y. Is CTLA4는 T-세포 활성화에 대한 음성 조절인자입니까? *Immunol. Today* 18, 569-572 (1997).
- [0258] 61. Tivol, E. A. 등 CTLA4의 결실은 대규모의 림프증식 및 치명적인 다기관 조직 파괴로 이어져 CTLA4의 중요한 음성 조절 역할을 나타낸다. *Immunity* 3, 541-547 (1995).
- [0259] 62. Waterhouse, P. 등 CTLA4가 결핍된 마우스에서 초기 치사율을 가진 림프증식성 질환 [코멘트 참조]. *Science* 270, 985-988 (1995).
- [0260] 63. Bachmann, M. F., Kohler, G., Ecabert, B., Mak, T. W. & Kopf, M. 최첨단: CTLA4가 없는 림프증식성 질병은 T 세포 자율성이 아니다. *J. Immunol.* 163, 1128-1131 (1999).
- [0261] 64. Bachmann, M. F. 등 CTLA4-결핍된 T 세포에 의해 정상적인 병원체-특이적 면역 반응이 형성됨: 폐리다임의 재검토. *Eur. J. Immunol.* 31, 450-458 (2001).
- [0262] 65. Nguyen, T. V., Ke, Y., Zhang, E. E. & Feng, G. S. 흥선 세포에서 Shp2 티로신 포스파타아제의 조건적 결실은 전-TCR 및 TCR 신호를 억제한다. *J. Immunol.* 177, 5990-5996 (2006).
- [0263] 66. Qureshi, O. S. 등 CD80 및 CD86의 트랜스-엔도시토시스: CTLA-4의 세포-외인성 기능에 대한 분자적 기초. *Science* 332, 600-603, doi:10.1126/science.1202947 (2011).
- [0264] 67. Ueda, H. 등 T-세포 조절 유전자 CTLA4와 자가면역 질병의 감수성 연관성. *Nature* 423, 506-511 (2003).
- [0265] 68. Magistrelli, G. 등 선택적 스플라이싱에 의해 생성된 CTLA-4의 가용성 형태는 자극받지 않은 인간 T 세포에 의해 발현된다. *Eur. J. Immunol.* 29, 3596-3602, doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199911)29:11<3596::AID-IMMU3596>;3.0.CO;2-Y (1999).
- [0266] 69. Kremer, J. M. 등 융합 단백질 CTLA4Ig에 의한 T-세포 활성화의 선택적 억제에 의한 류마티스 관절염 치료. *N. Engl. J. Med.* 349, 1907-1915, doi:10.1056/NEJMoa035075 (2003).
- [0267] 70. Abrams, J. R. 등 CTLA4Ig-매개된 심상성 건선 환자에서 T-세포 동시자극의 차단. *J. Clin. Invest.* 103, 1243-1252, doi:10.1172/JCI5857 (1999).
- [0268] 71. Gerold, K. D. 등 가용성 CTLA-4 스플라이스 변이체는 제1형 당뇨병으로부터 보호하고, 조절 T-세포 기능을 강화시킨다. *당뇨병* 60, 1955-1963, doi:10.2337/db11-0130 (2011).
- [0269] 72. Peach RJ, Bajorath J, Brady W, Leytze G, Greene J, Naemura J, 등 CTLA-4 및 CD28의 상보성 결정 영역 1(CDR1)- 및 CDR3-유사 영역은 B7-1에 대한 결합을 결정한다. *J Exp Med.* 1994;180(6):2049-58.
- [0270] 73. van Elsas, A., Hurwitz, A. A. & Allison, J. P. 항-세포독성 T 림프구-관련 항원 4(CTLA-4) 및 과립 구/대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)-생성 백신을 이용한 B16 흑색종의 조합 면역요법은 자가면역성 탈색을 동반한 피하 및 전이성 종양의 거부 반응을 유도한다. *J. Exp. Med.* 190, 355-366 (1999).
- [0271] 74. van Elsas, A. 등 B16 흑색종 백신과 조합하여 세포독성 T 림프구 항원-4 차단을 기반으로 한 치료의 자가면역 및 항 종양 효과기 메커니즘을 해독하는 것: 예방과 치료의 비교. *J. Exp. Med.* 194, 481-489. (2001).
- [0272] 75. Karandikar, N. J., Vanderlugt, C. L., Walunas, T. L., Miller, S. D. & Bluestone, J. A. CTLA-4: 자가면역 질병의 음성 조절인자. *J. Exp. Med.* 184, 783-788 (1996).
- [0273] 76. Luhder, F., Chambers, C., Allison, J. P., Benoist, C. & Mathis, D. T 세포 동시자극 수용체 CTLA-4가 당뇨병성 T 세포를 감쇠시키는 데 관여해야 할 때를 지적. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 12204-12209 (2000).
- [0274] 77. Hurwitz, A. A., Sullivan, T. J., Sobel, R. A. & Allison, J. P. 실험적 자가면역 뇌척수염(EAE)-내성 BALB/c 마우스에서 뇌염유발성 T 세포의 확장을 제한한다. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 3013-3017 (2002).
- [0275] 78. Piganelli, J. D., Poulin, M., Martin, T., Allison, J. P. & Haskins, K. 세포독성 T 림프구 항원 4(CD152)는 BALB/c에서 자기-반응성 T 세포를 조절하지만, 자가면역 NOD 마우스에서는 조절하지 않는다. *J. Autoimmun.* 14, 123-131 (2000).

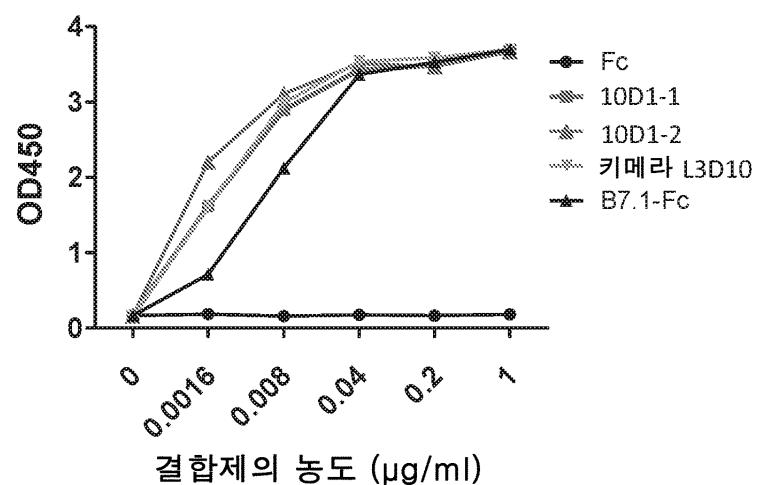
- [0276] 79. Phan, G. Q. 등 전이성 흑색종 환자에서 세포독성 T 림프구-관련 항원-4 차단에 의해 유발된 암 퇴행 및 차가면역. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 100, 8372-8377 (2003).
- [0277] 80. Eisenthal, A. 등 진핵 세포에서 발현된 재조합 인터루킨-6의 항 종양 효과. Cancer Immunol. Immunother. 36, 101-107 (1993).
- [0278] 81. Schroff, R. W., Foon, K. A., Beatty, S. M., Oldham, R. K. & Morgan, A. C., Jr. 단클론 항체 치료를 받는 환자에서의 인간 항-뮤린 면역글로불린 반응. Cancer Res. 45, 879-885 (1985).
- [0279] 82. Kearney, E. R. 등 생체내 항원-특이적 CD4+ T 세포의 미량 집단의 항원-의존성 클론성 확장은 CD28 동 시자극에 의존하고, CTLA-4에 의해 억제된다. J. Immunol. 155, 1032-1036 (1995).
- [0280] 83. Mittler, R. S., Bailey, T. S., Klussman, K., Trailsmith, M. D. & Hoffmann, M. K. 항-4-1BB 단클론 항체는 헬퍼 T 세포 아네르기 유발을 통해 생체 내 T 세포-의존성 체액성 면역 반응을 억제한다. J. Exp. Med. 190, 1535-1540 (1999).

도면

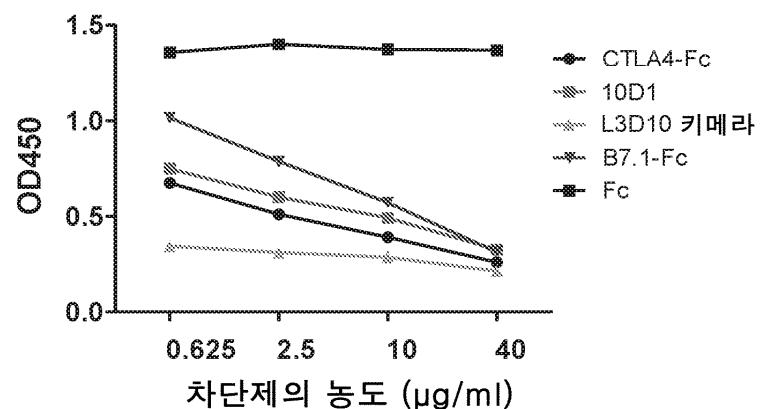
도면1



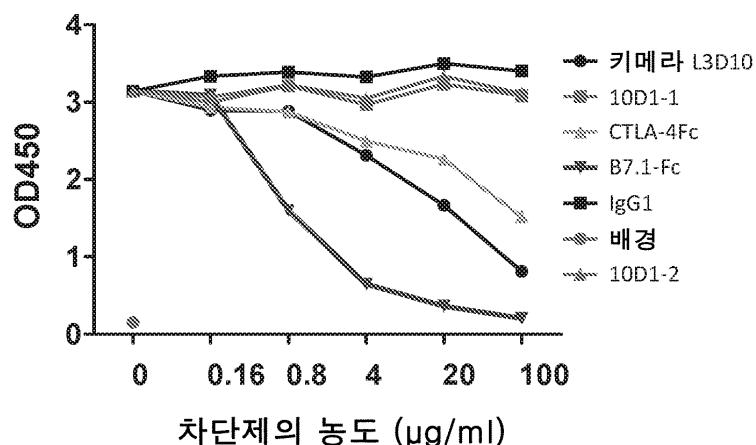
도면2



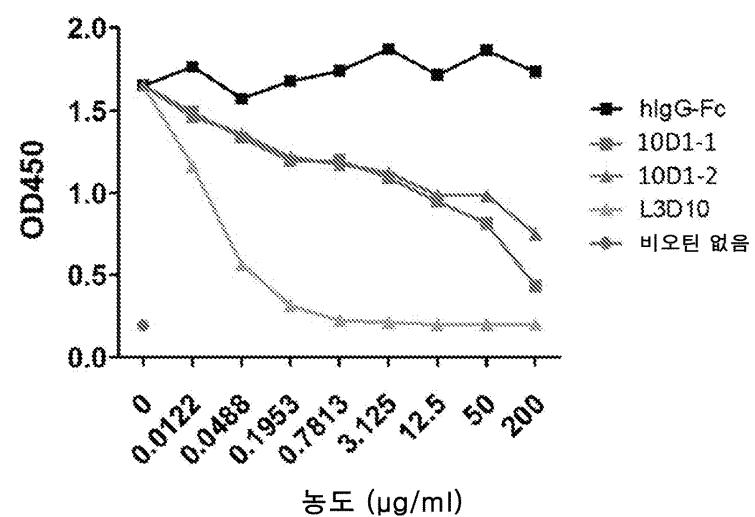
도면3



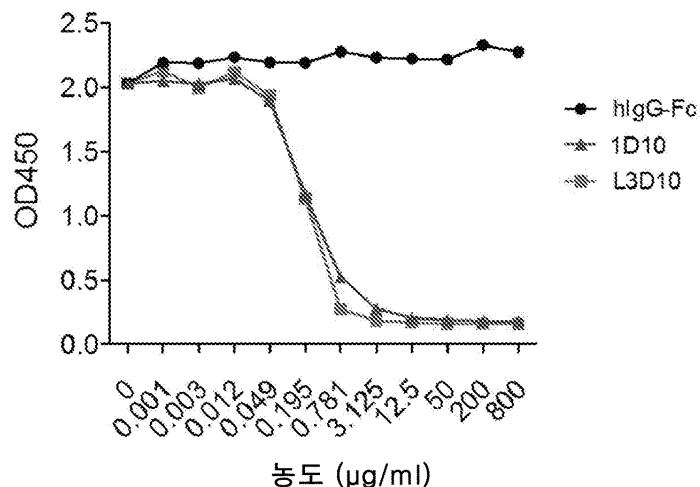
도면4



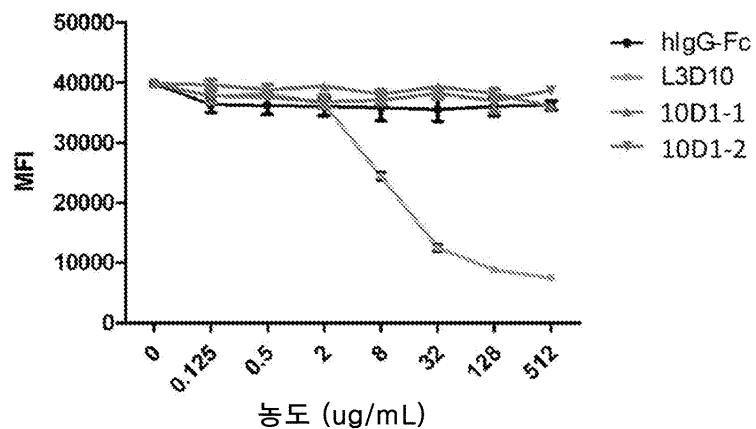
도면5



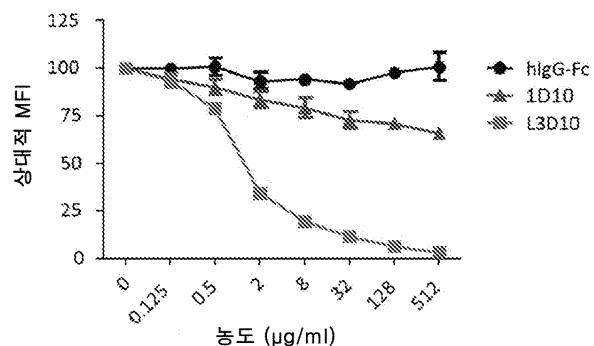
도면6



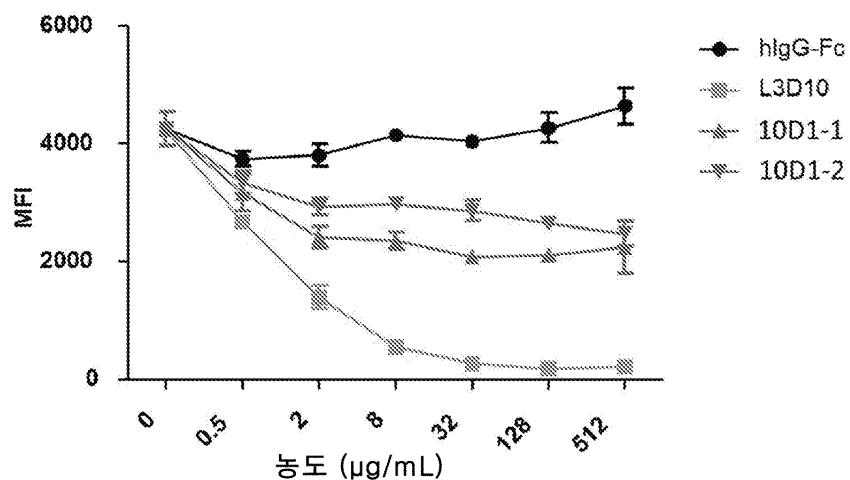
도면7



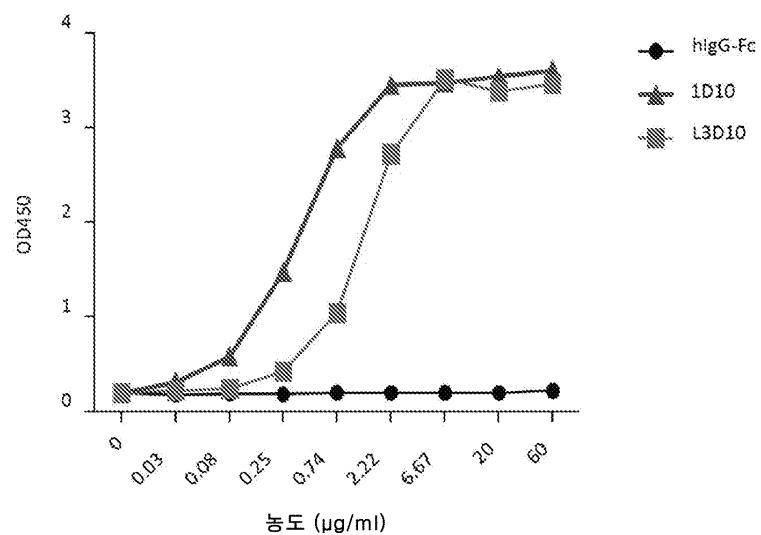
도면8



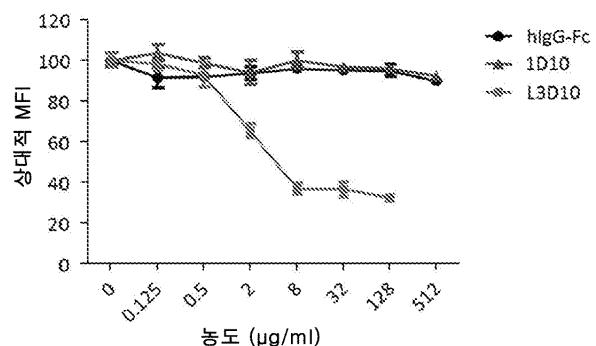
도면9



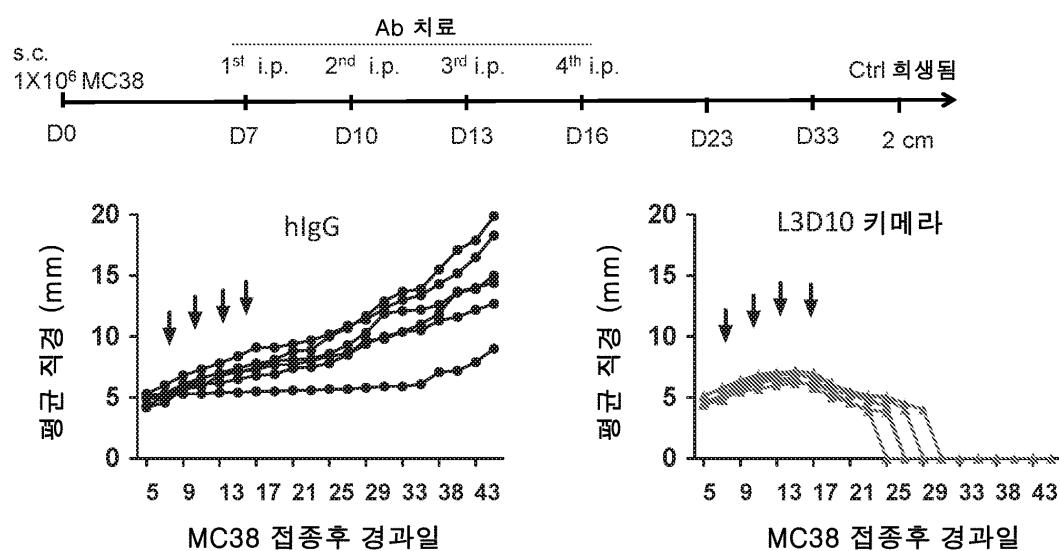
도면10



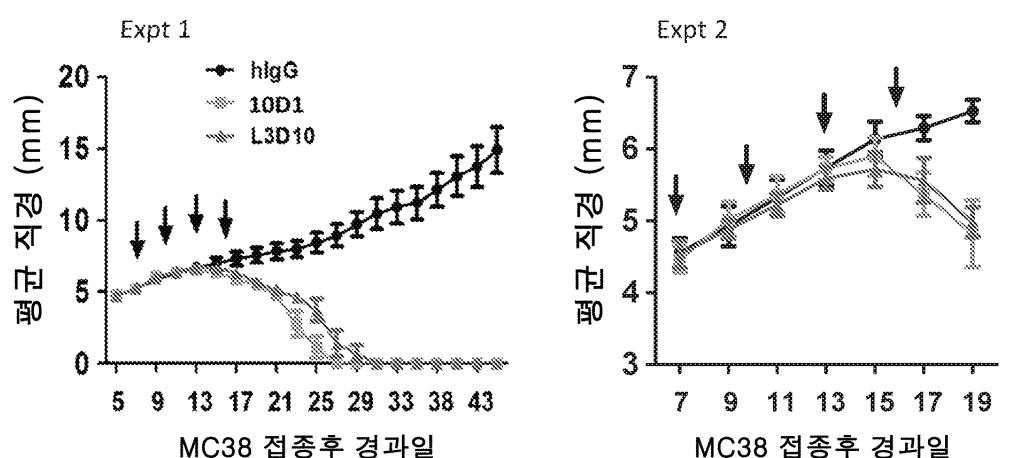
도면11



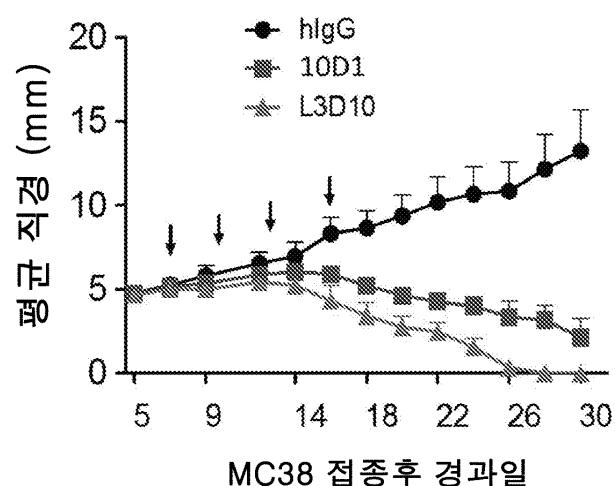
도면12



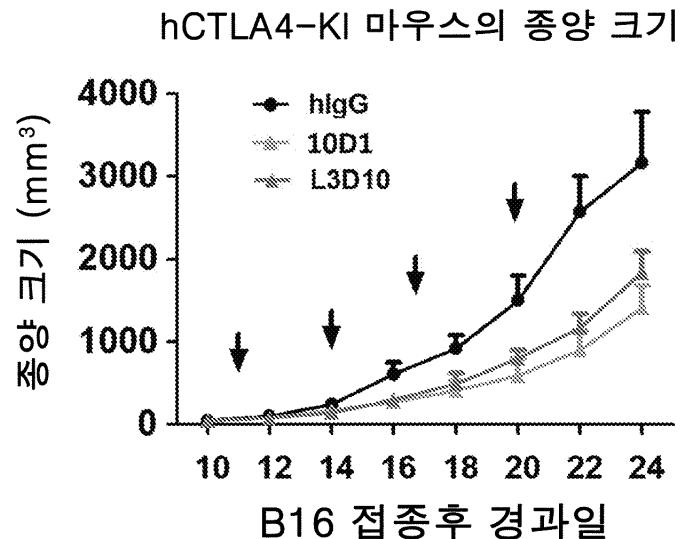
도면13



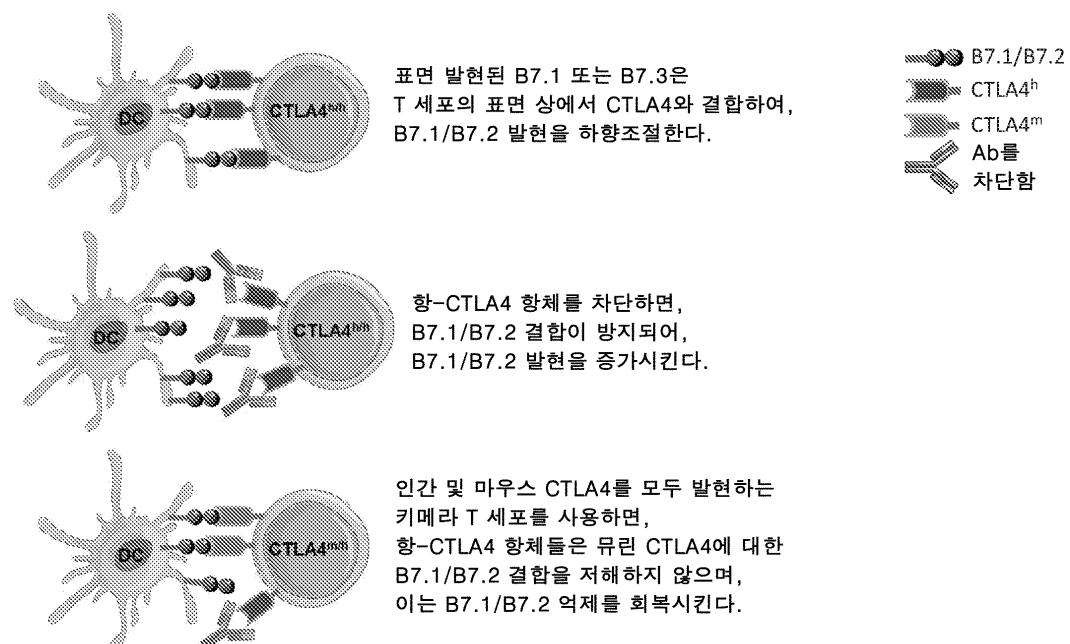
도면14

CTLA4^{h/m} 마우스의 종양 크기

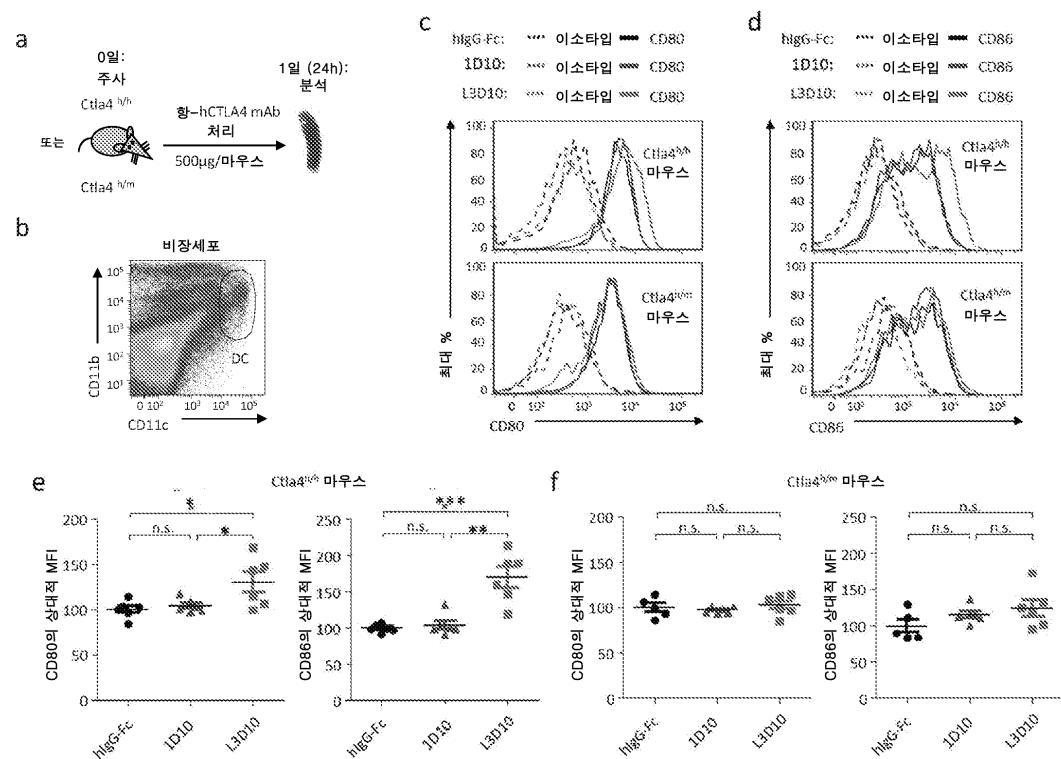
도면15



도면16

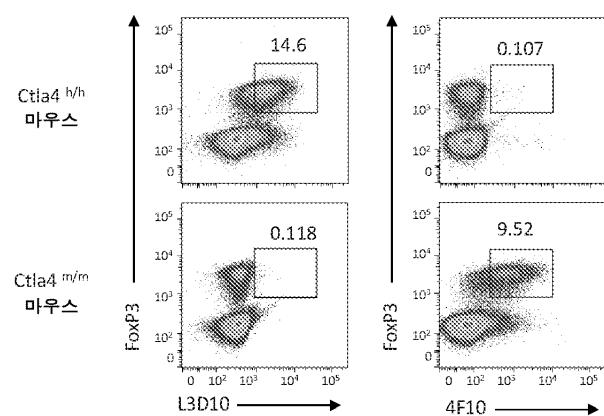


도면17

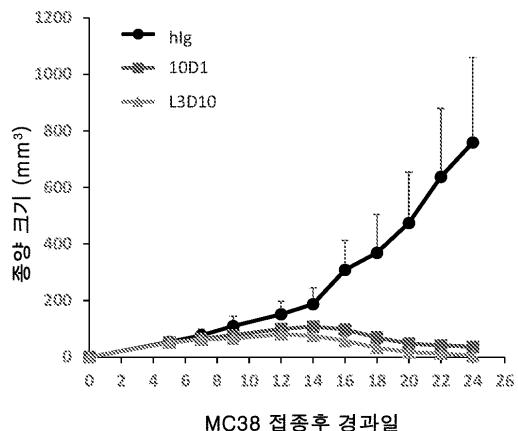
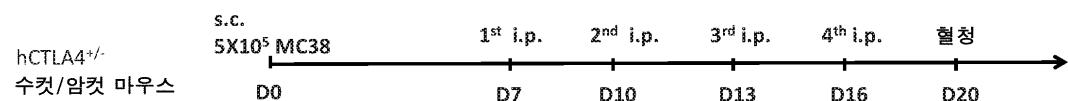


도면 18

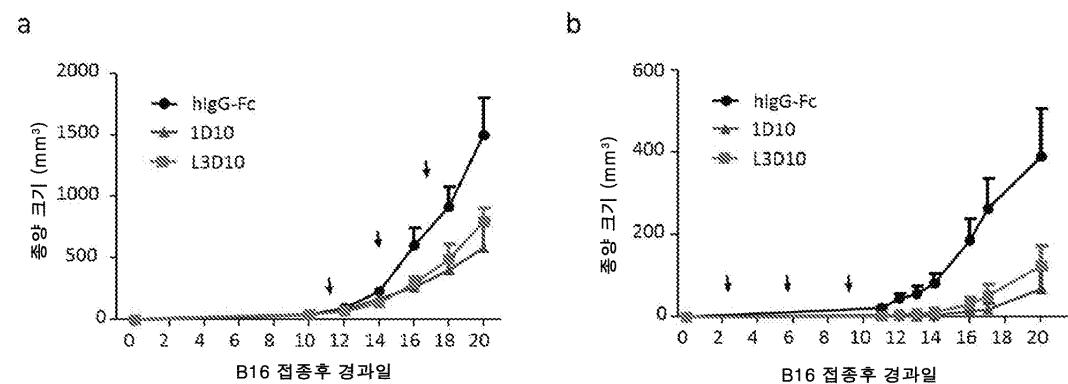
$CD3^+CD4^+$ 비장세포 상에서 게이팅됨



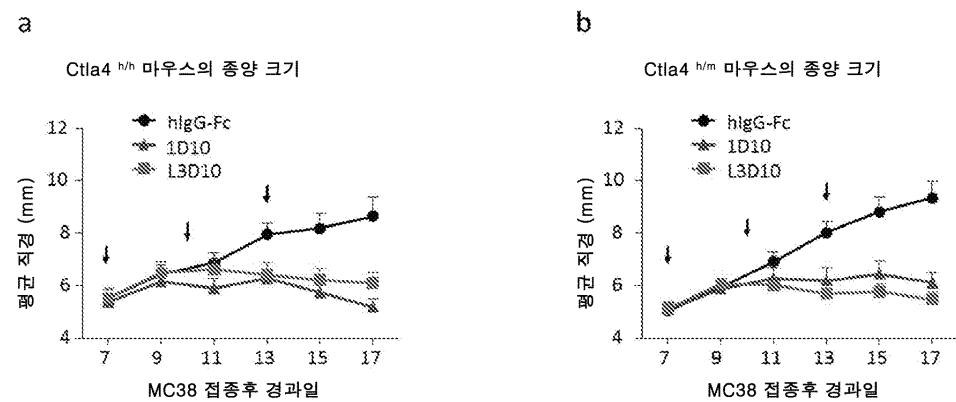
도면 19



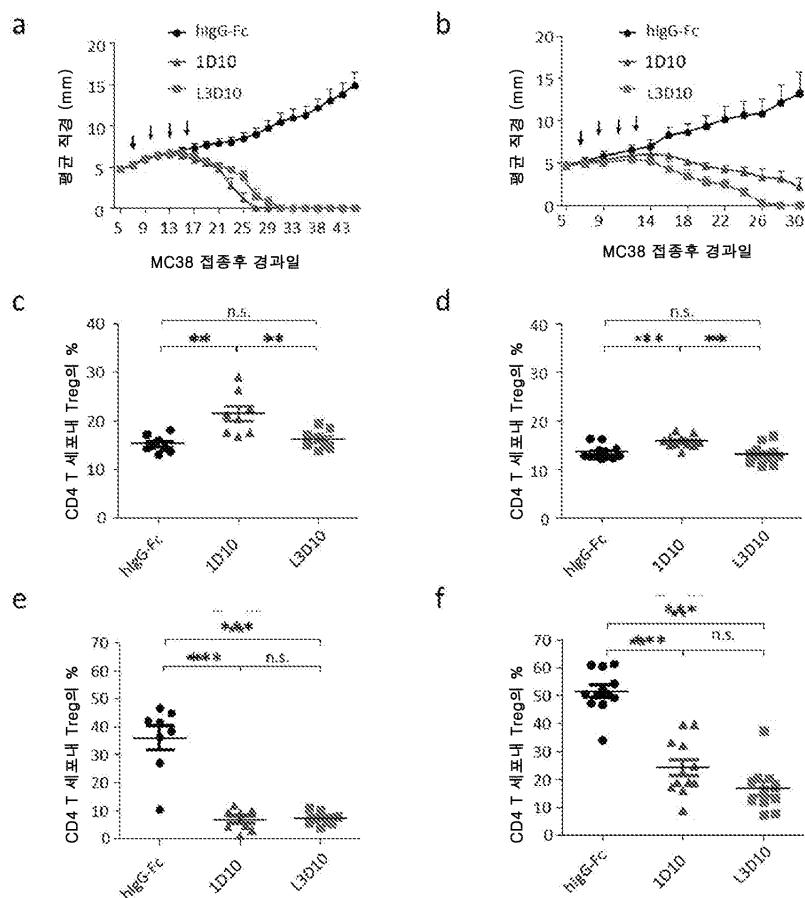
도면20



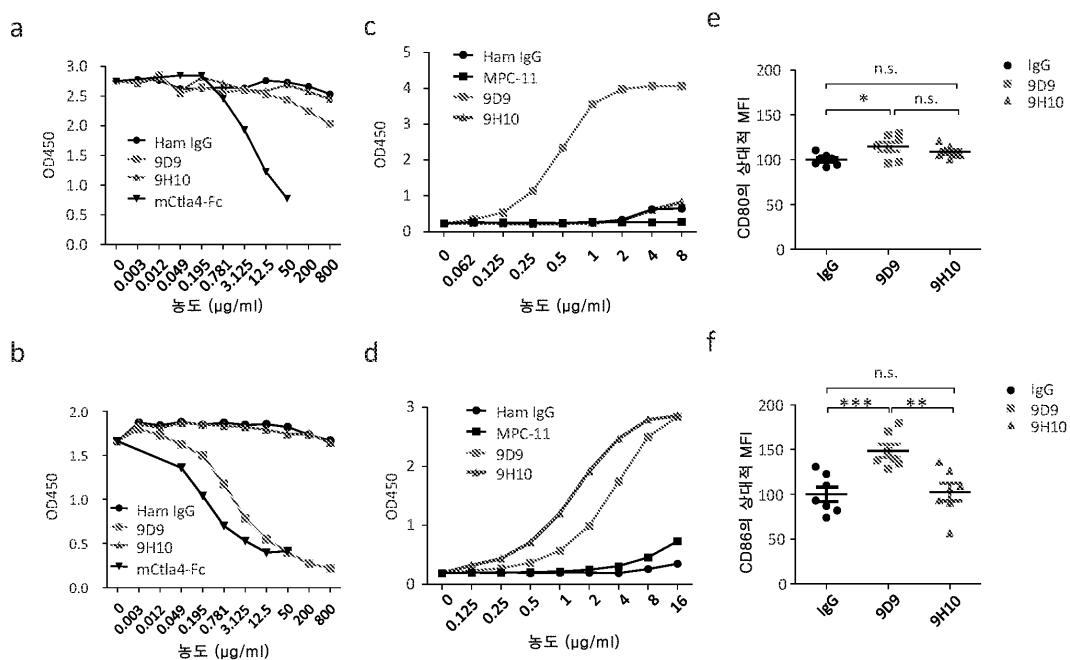
도면21



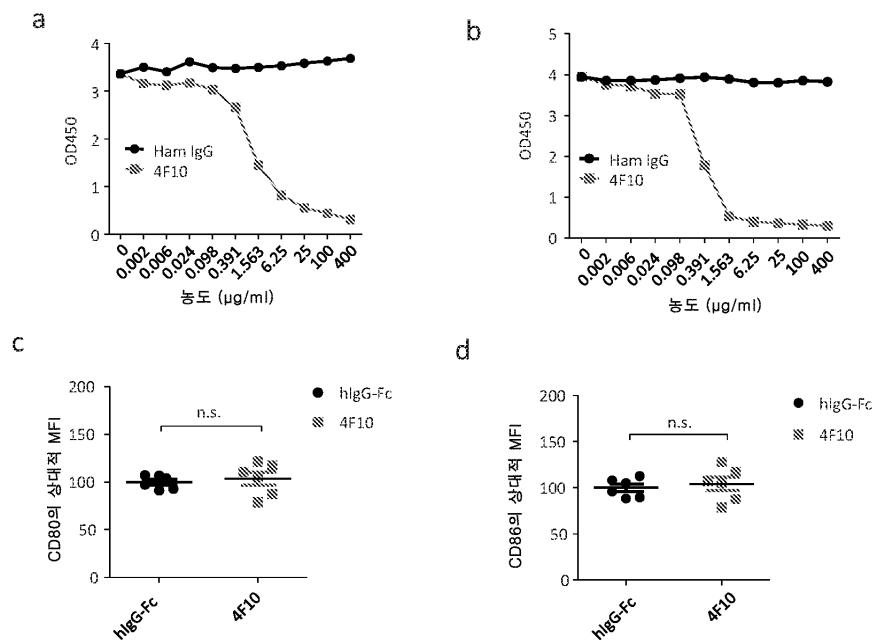
도면22



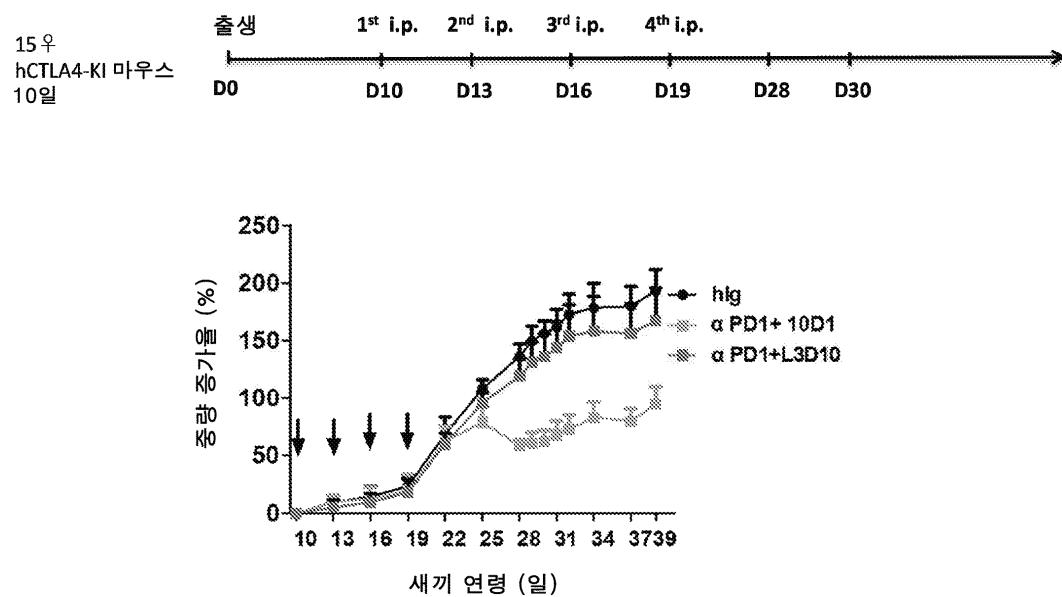
도면23



도면24

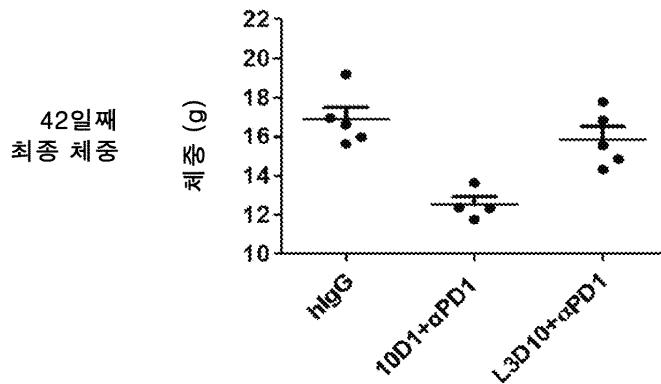


도면25

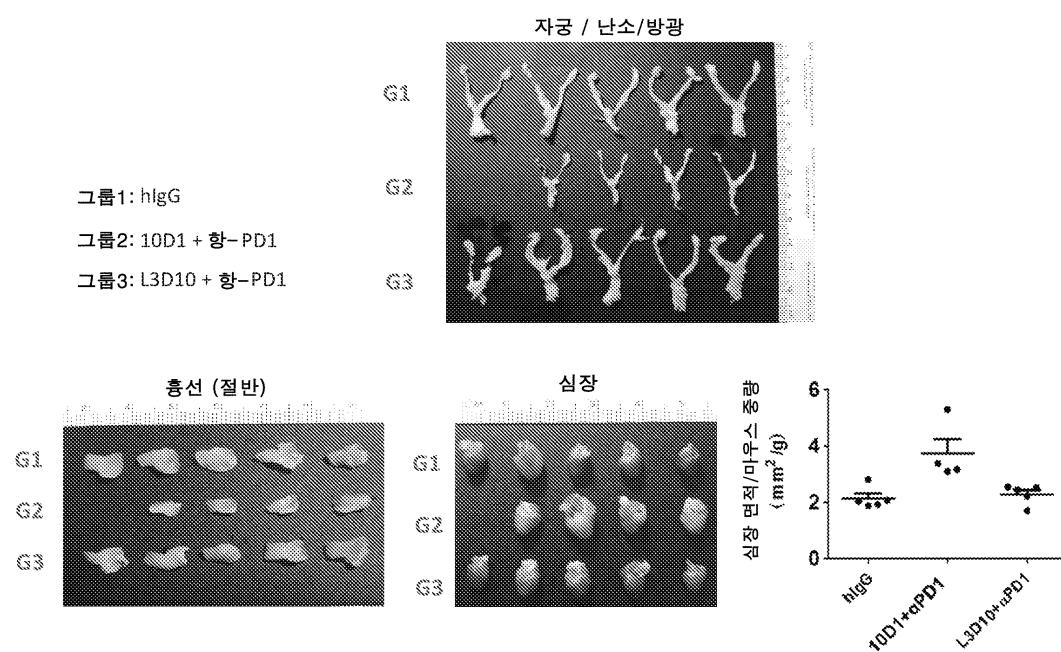


도면26

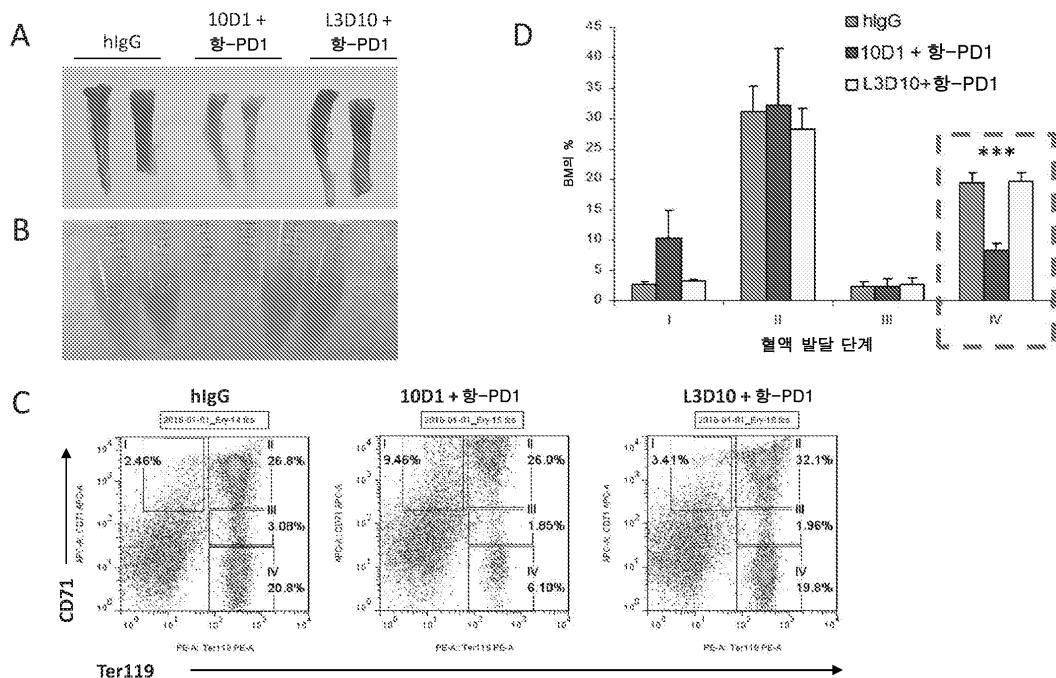
hCTLA4-KI 마우스의 중량 (12.30.15~42일)



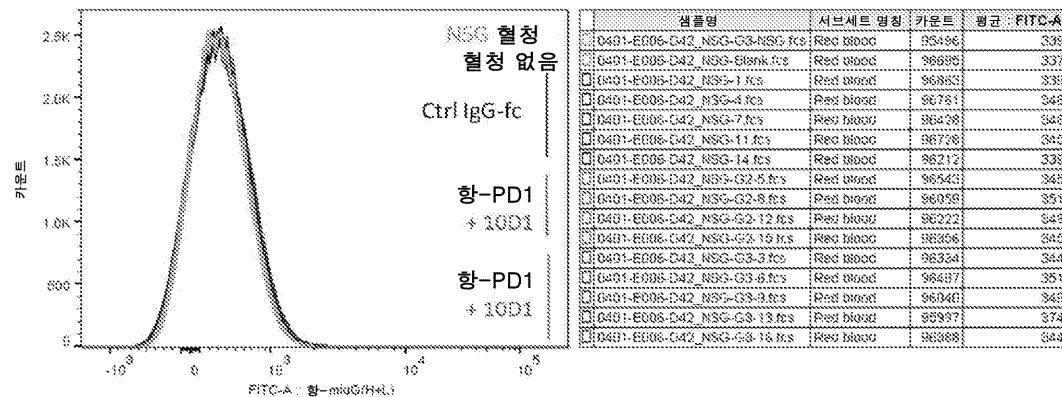
도면27



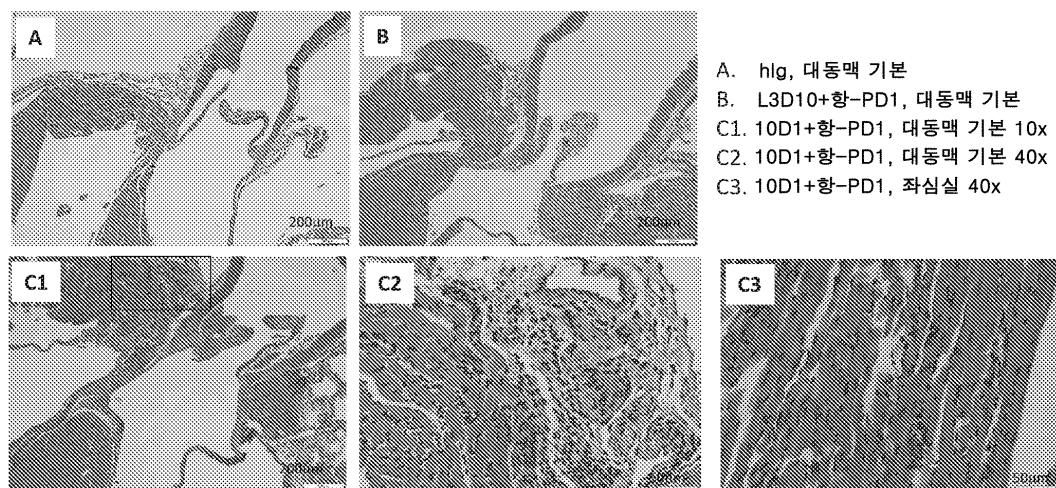
도면28



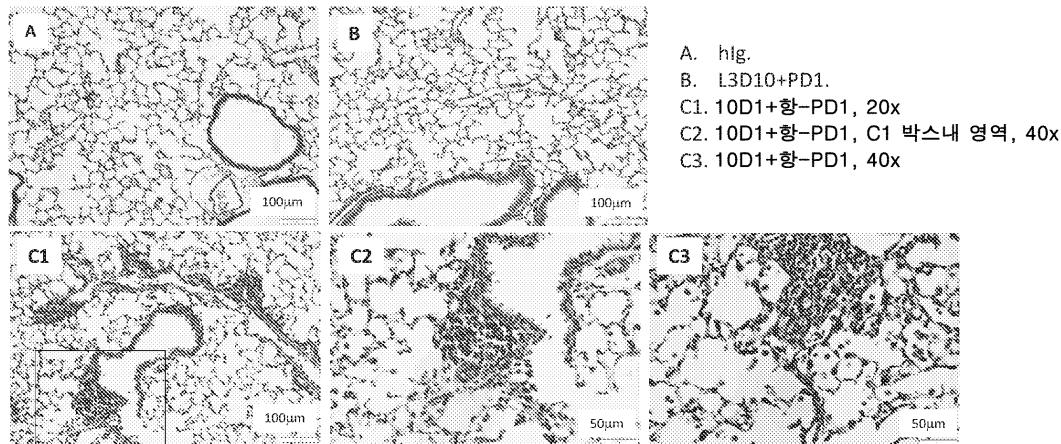
도면29



도면30

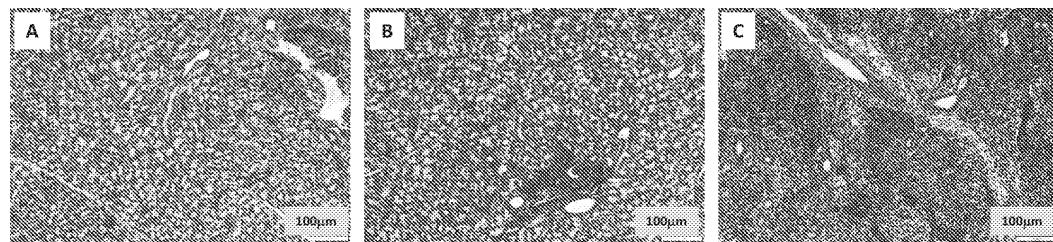


도면31



도면32

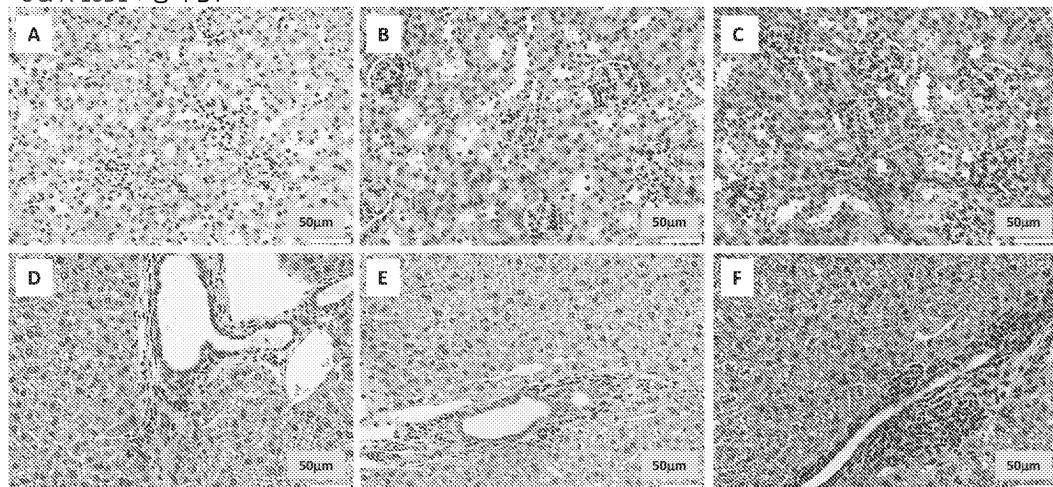
- A. hlg
B. L3D10 + 항-PD1
C. 10D1 + 항-PD1



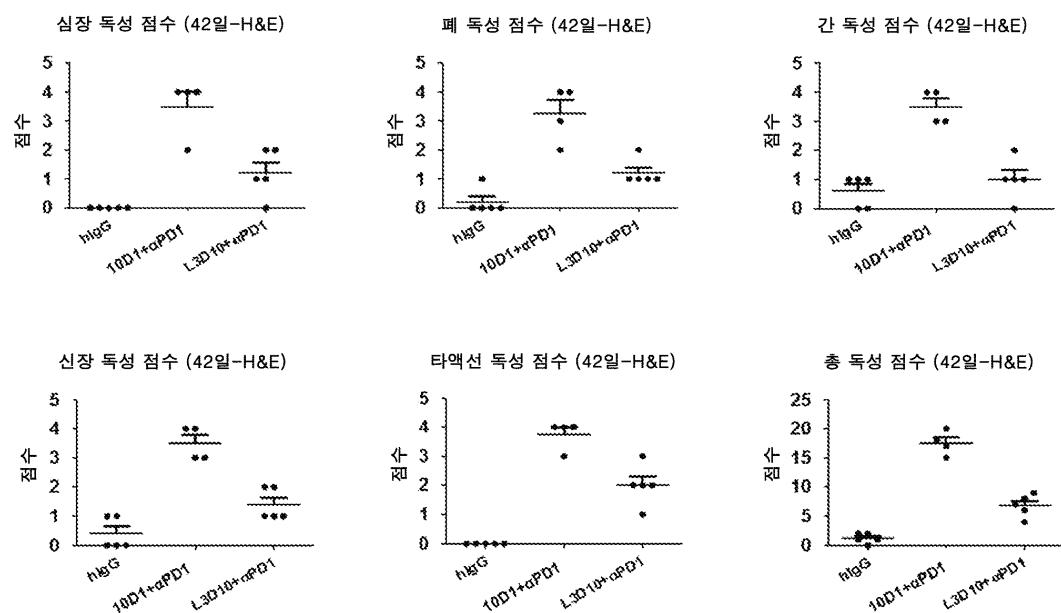
도면33

A-C: 신장
D-F: 간

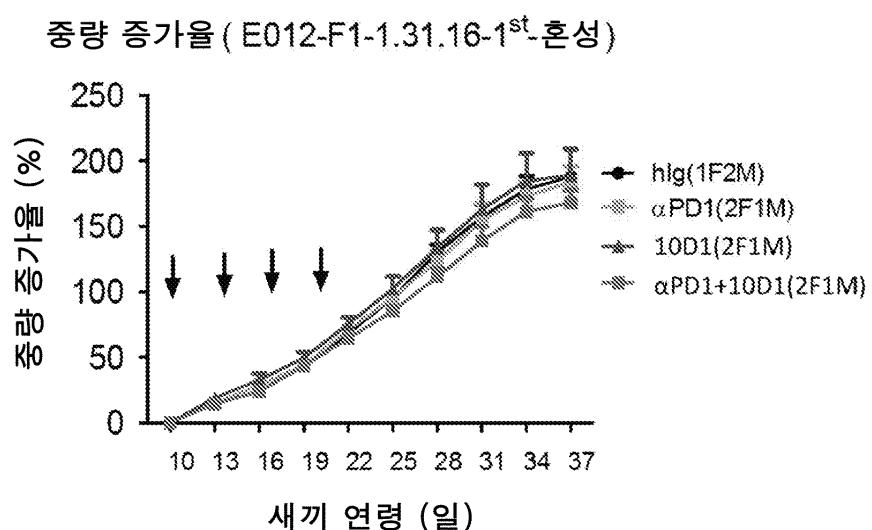
- A & D: hlg
B & E: L3D10 + 항-PD1
C & F: 10D1 + 항-PD1



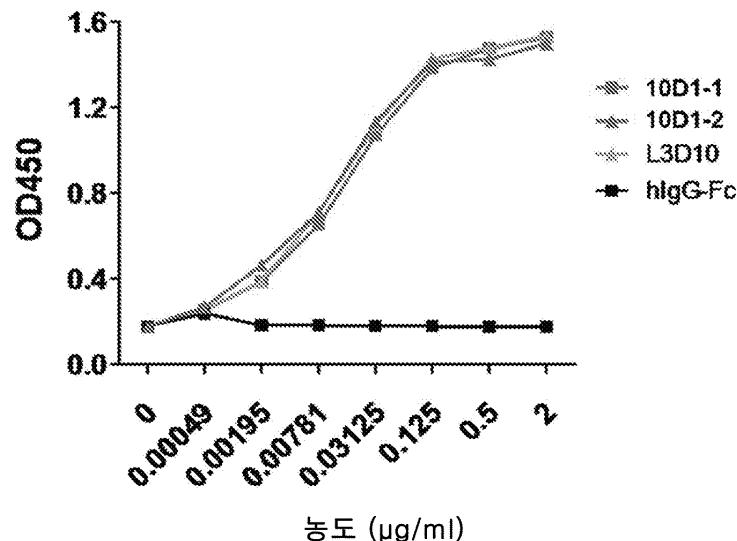
도면34



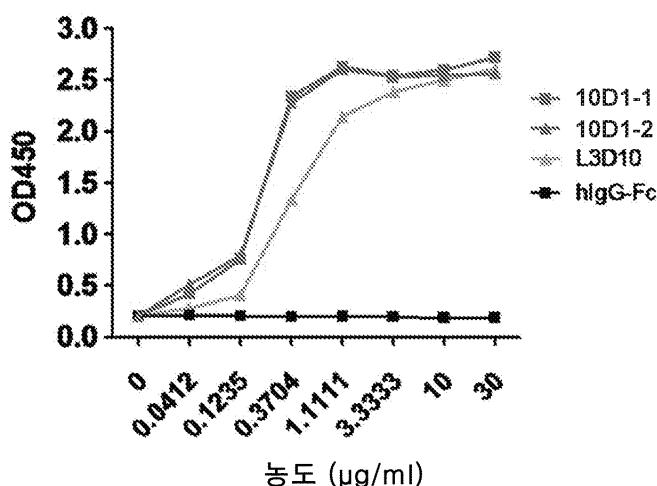
도면35



도면36



도면37



도면38

L3D10 VH 아미노산 서열 (모체)

QVQLKESGPGLVAPSLQSLITCTVSGPSLTSVGLSWVRQPPGKGLEWLGVYKHYGGNQHNSALRSLTISKDNSKSQVFLNLSLTDDTATYYCAKTEGHYYQGSNVYYAIDXWQGQTSVTVSS

경색 프레임워크

QVQLOESGPGLVKPSETLSLTCTVS

WIRQPPGKLEWIG

VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR

WGQGTIVTVSS

인간화된 VH 아미노산 서열 1 (HC1)

QVQLOESGPGLVKPSETLSLTCTVSGPSLTSVGLSWIRQPPGKGLEWIGVYKHYGGNQHNSALRSLTISKDTSKQFSLKLSVTAADTAVYYCARTEGHYVGENYGTIVLQDWQGQTSVTVSS

인간화된 VH 아미노산 서열 2 (HC2)

QVQLOESGPGLVKPSETLSLTCTVSGPSLTSVGLSWIRQPPGKGLEWIGVYKHYGGNQHNSALRSLTISKDTSKQFSLKLSVTAADTAVYYCARTEGHYVGENYGTIVLQDWQGQTSVTVSS

인간화된 VH 아미노산 서열 3 (HC3)

QVQLOESGPGLVKPSETLSLTCTVSGPSLTSVGLSWIRQPPGKGLEWIGVYKHYGGNQHNSALRSLTISKDTSKQFSLKLSVTAADTAVYYCARTEGHYVGENYGTIVLQDWQGQTSVTVSS

L3D10 VL 아미노산 서열 (모체)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAENIYENLAWYQQKPGKSPOLLVYNNNTNLASGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGTYPCQHNGTPTFPGGTTKLETIK

경색 프레임워크

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAENIYENLAWYQQKPGKAPKLII

WYQQKPGKAPKLII

GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHNGTPTFPGGTTKLETIK

FGQSTKLEIK

인간화된 VL 아미노산 서열 1 (LC1)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAENIYENLAWYQQKPGKAPKLIIYEAATHLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHNGTPTFPGGTTKLETIK

인간화된 VL 아미노산 서열 2 (LC2)

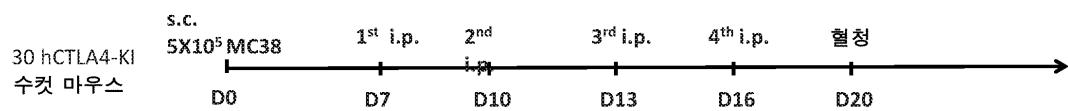
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAENIYENLAWYQQKPGKAPKLIIYEAATHLQSGVPSRFSGSGSGTDXLTISLQPEDFATYYCQHNGTPTFPGGTTKLETIK

인간화된 VL 아미노산 서열 3 (LC3)

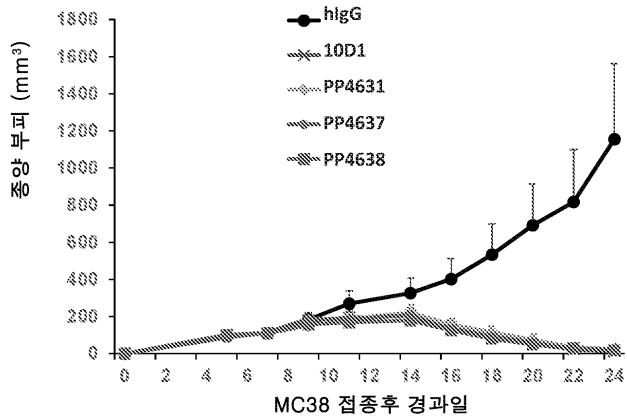
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAENIYENLAWYQQKPGKAPKLIIYEAATHLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHNGTPTFPGGTTKLETIK

도면39

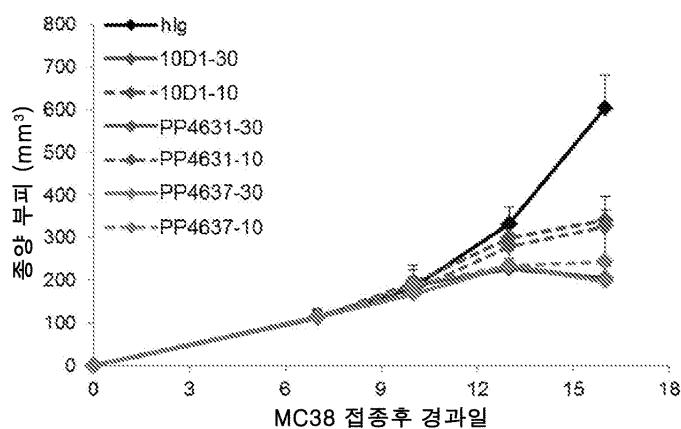
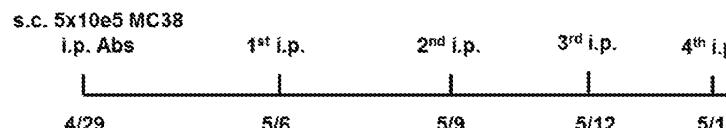
A.



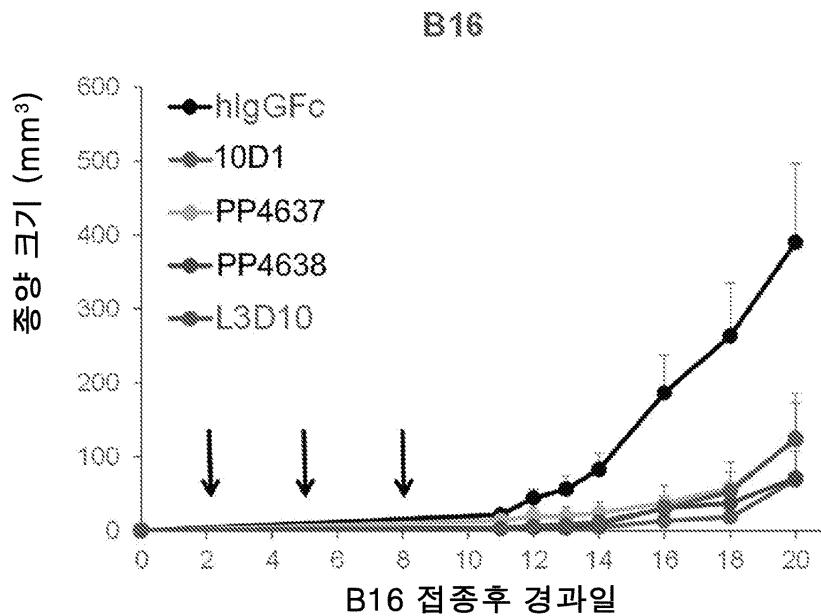
B.



도면40

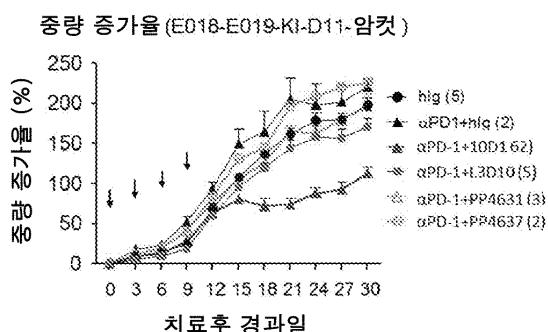


도면41

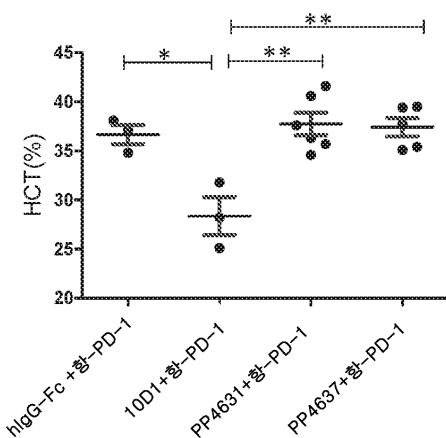


도면42

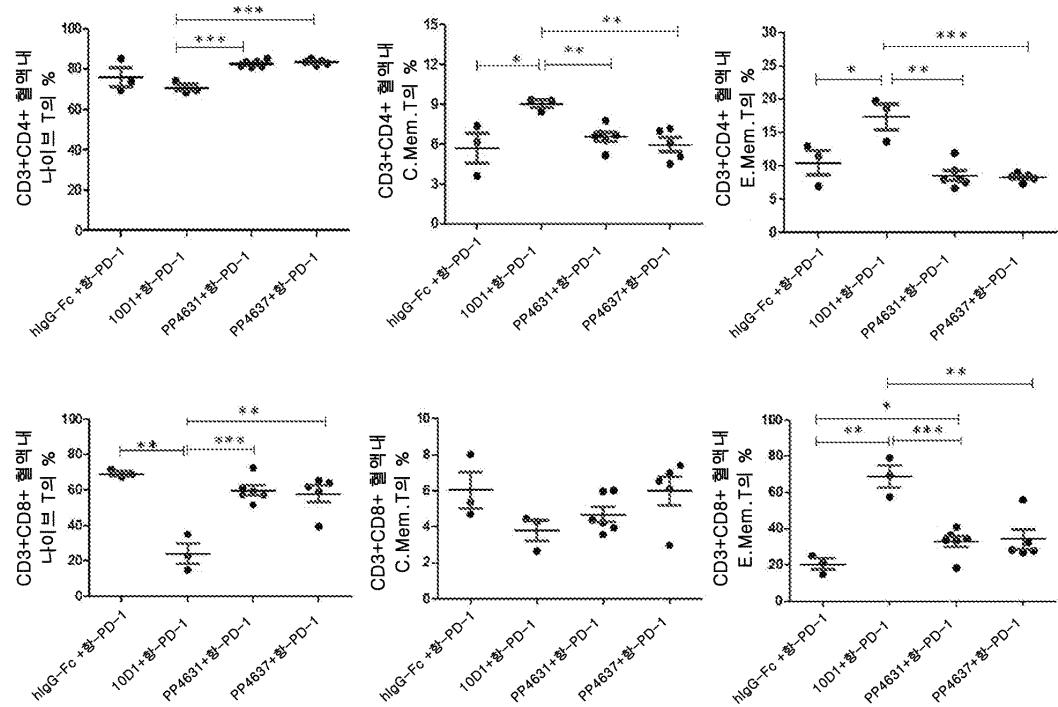
hIg VS αPD1+L3D10	P 값 = 0.16
hIg VS αPD1+hIg	P 값 = 0.0384*
hIg VS αPD1+10D1	P 값 = <2e-18***
hIg VS αPD1+PP4631	P 값 = 0.16
hIg VS αPD1+PP4637	P 값 = 0.000207**
αPD1+L3D10 VS αPD1+hIg	P 값 = 0.00054***
αPD1+L3D10 VS αPD1+10D1	P 값 = <2e-18***
αPD1+L3D10 VS αPD1+PP4631	P 값 = 0.492
αPD1+L3D10 VS αPD1+PP4637	P 값 = 0.000124***
αPD1+hIg VS αPD1+10D1	P 값 = <2e-18***
αPD1+hIg VS αPD1+PP4631	P 값 = 0.0579
αPD1+hIg VS αPD1+PP4637	P 값 = 0.409
αPD1+10D1 VS αPD1+PP4631	P 값 = <2e-18***
αPD1+10D1 VS αPD1+PP4637	P 값 = <2e-18***
αPD1+PP4631 VS αPD1+PP4637	P 값 = 0.000446***



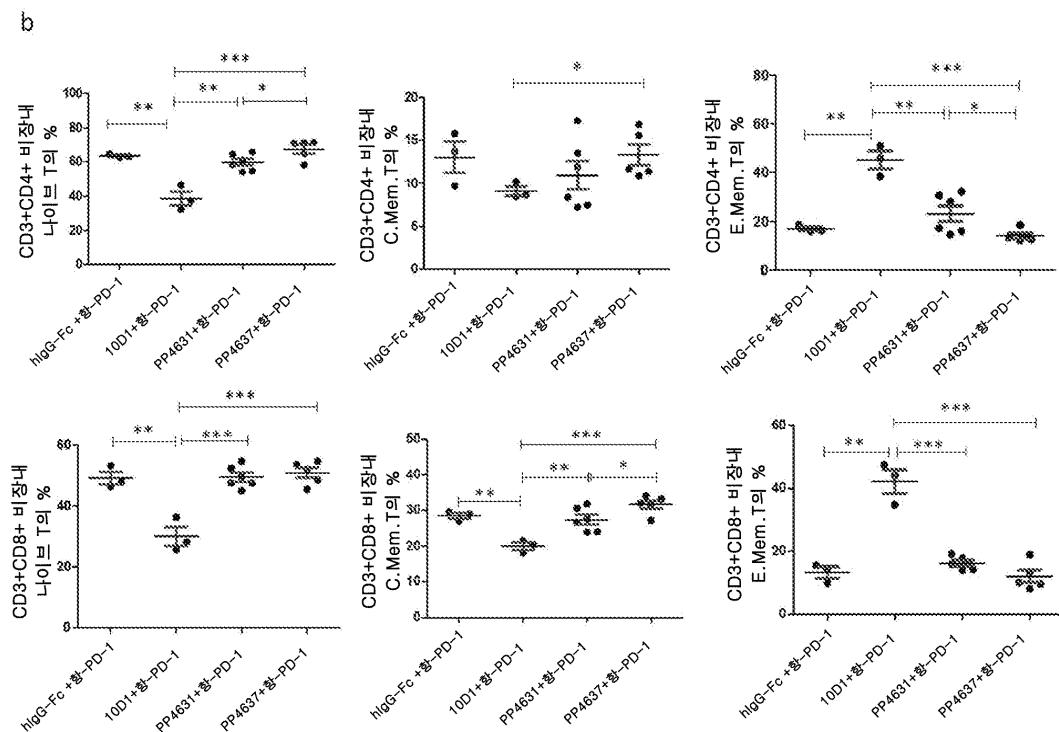
도면43



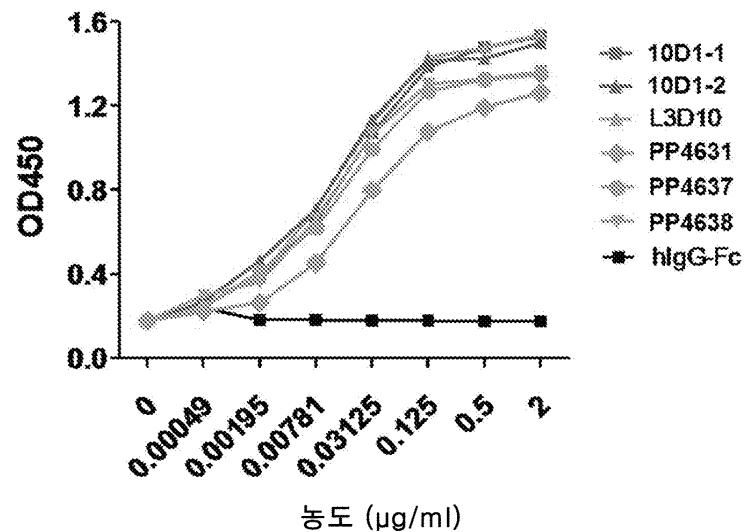
도면44a



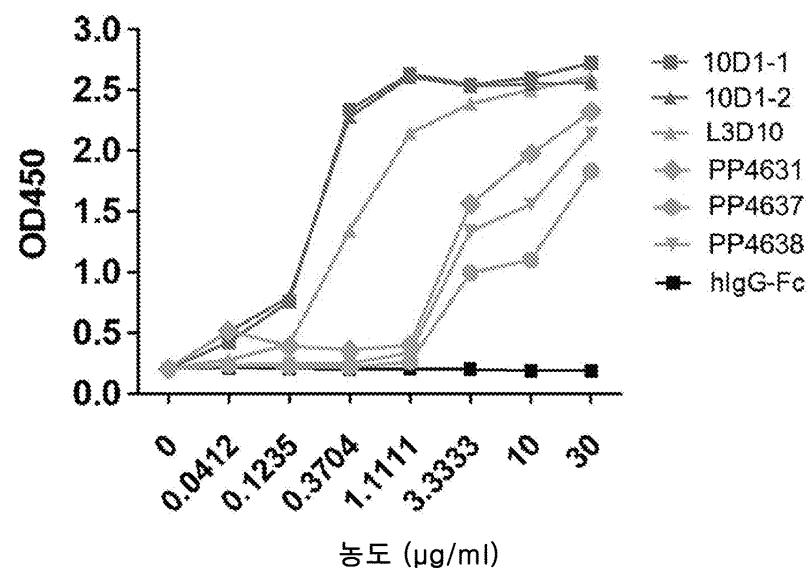
도면44b



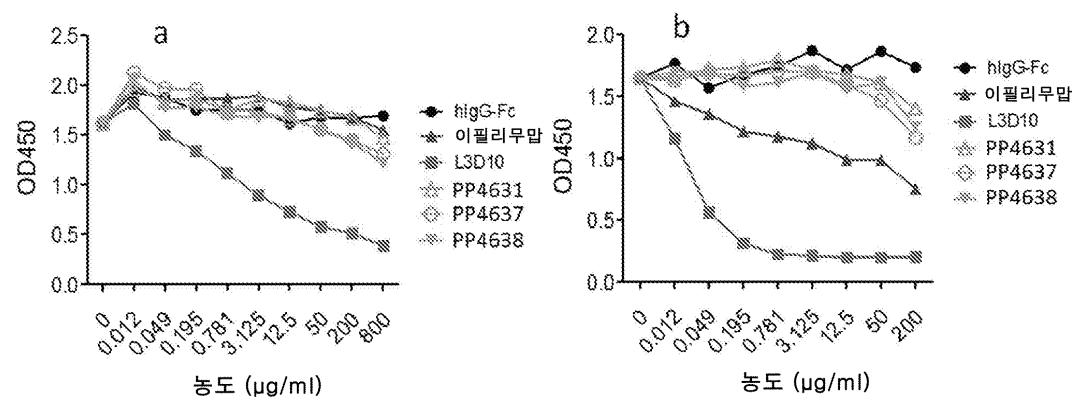
도면45



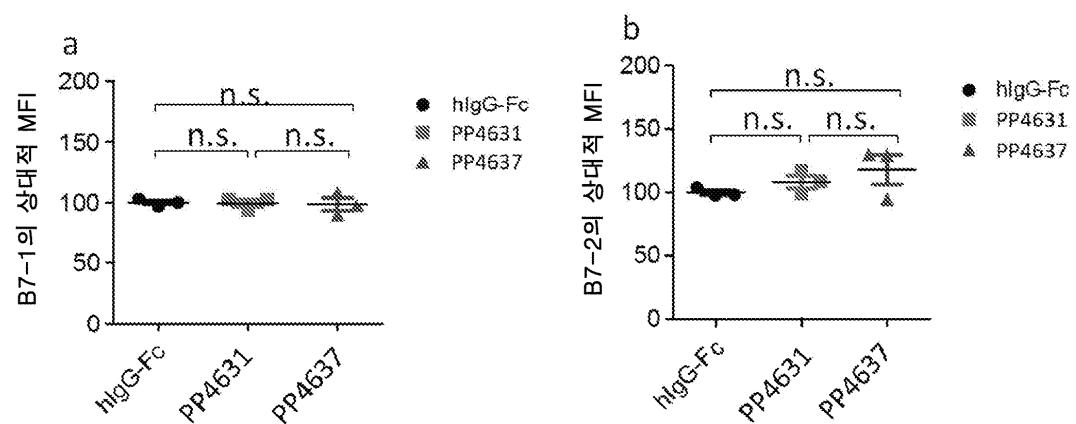
도면46



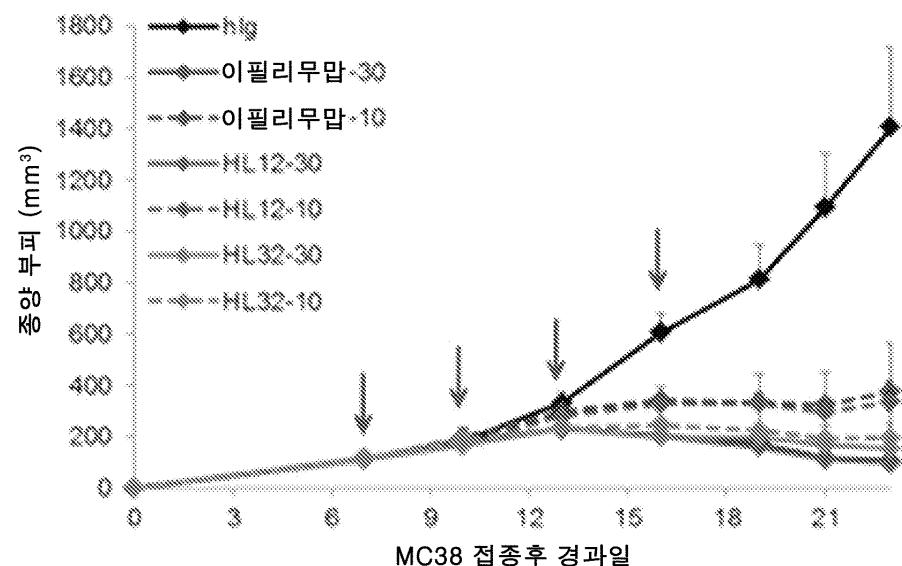
도면47



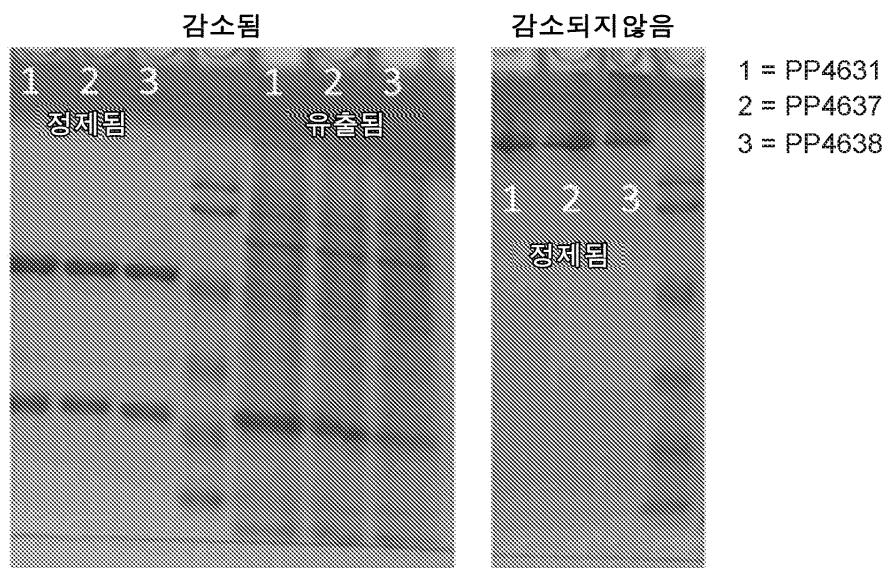
도면48



도면49

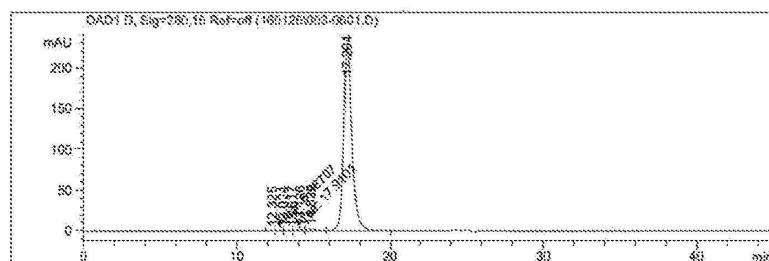


도면50

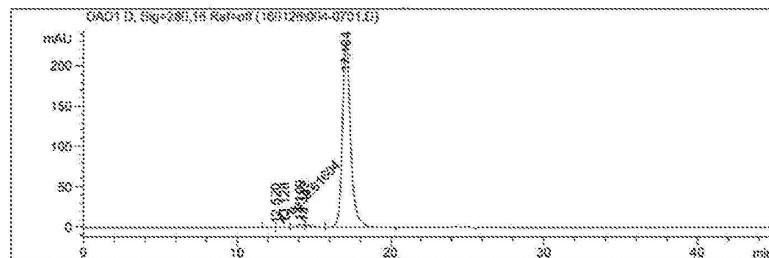


도면51

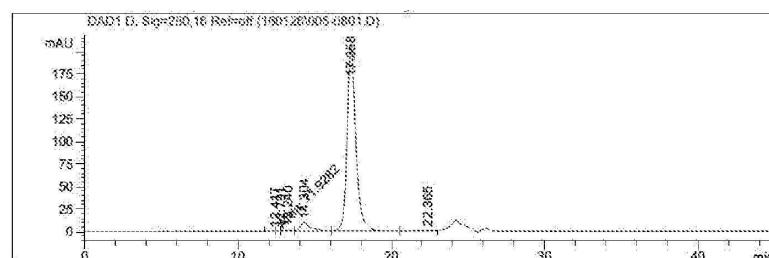
PP4631



PP4637

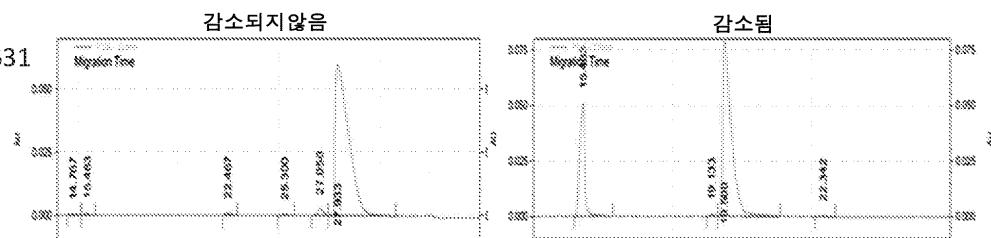


PP4638

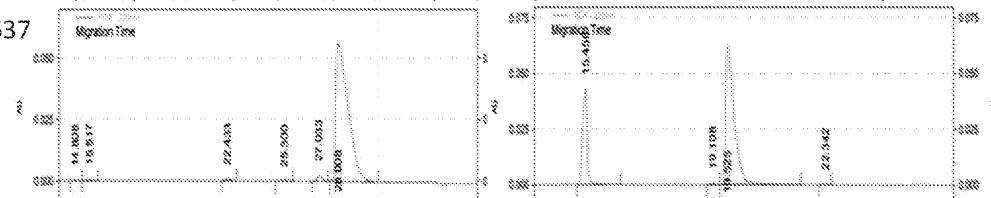


도면52

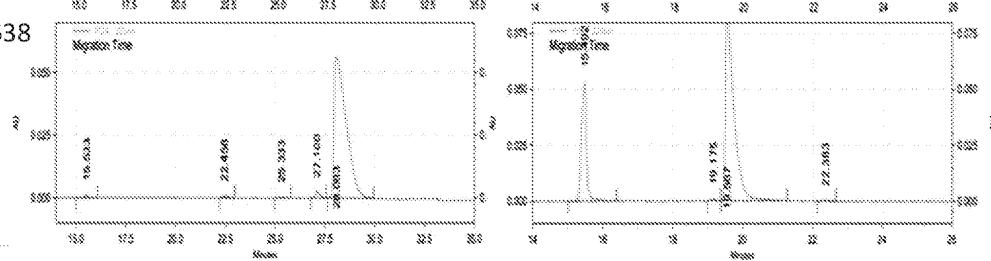
PP4631



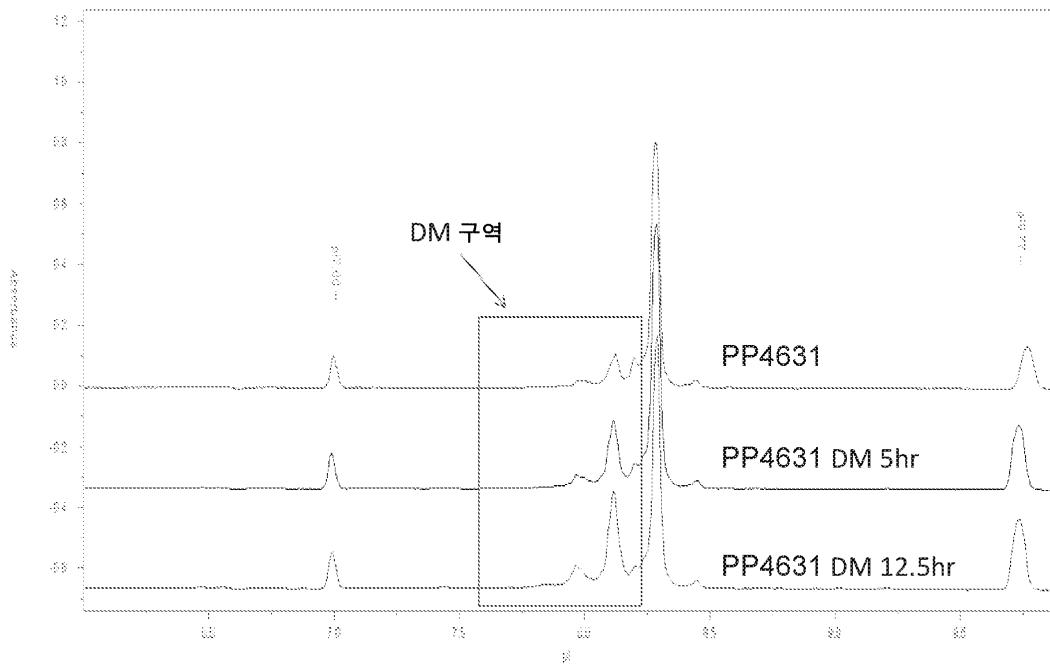
PP4637



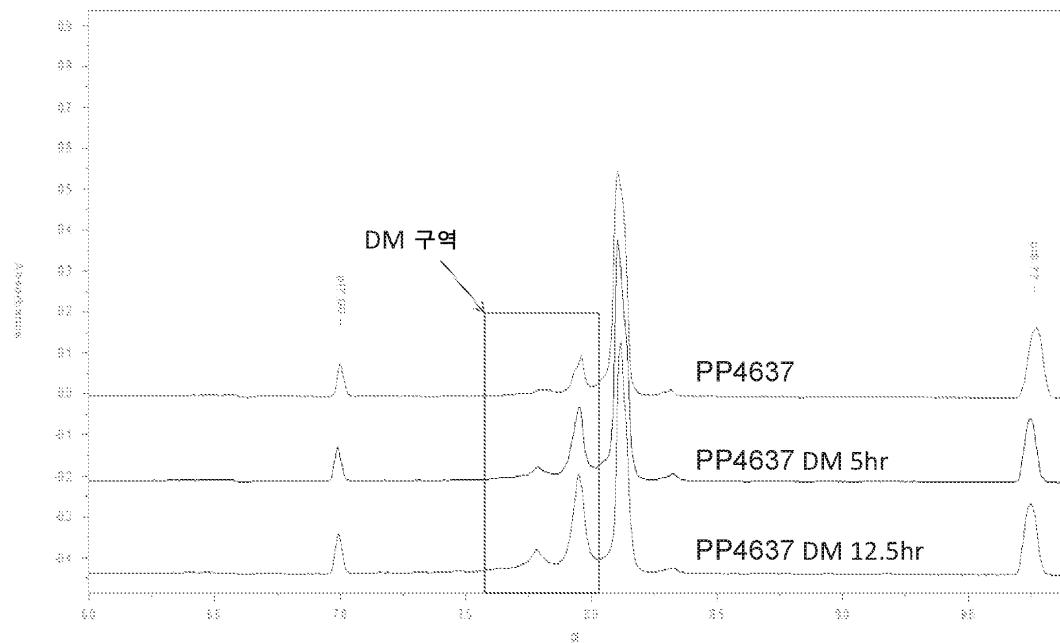
PP4638



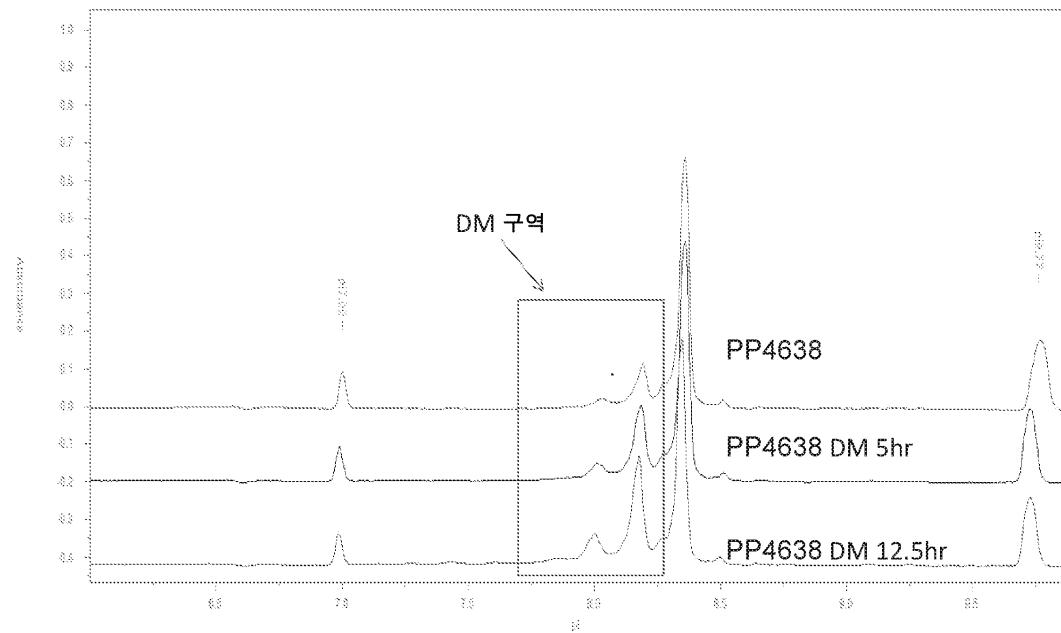
도면53a



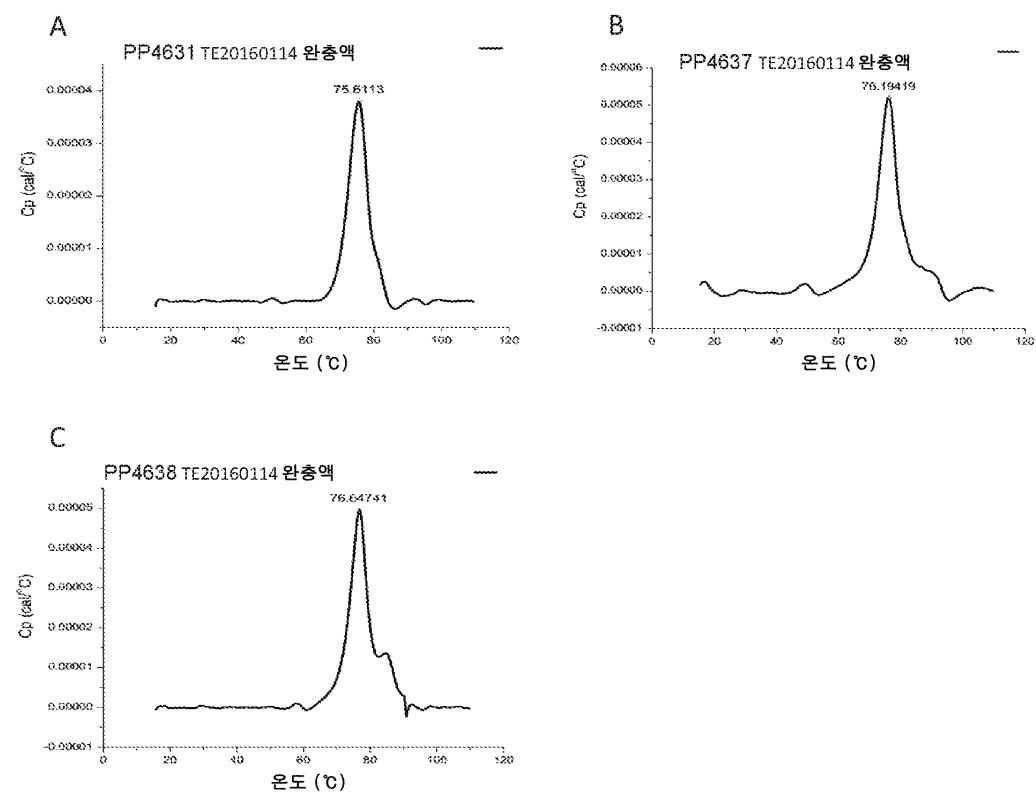
도면53b



도면53c



도면54



도면55

1.....10.....20.....30.....40.....50.....60
 Km MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLROADSQTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELNNRRXYLGGNGTQIYVIDPEPCP
 Mk -----n-----
 Ms Iq...t...s...n...v...p...g...sh...s...t...d...m...t...f...k...t...v...
 Mut M1 M2 M3 M4 M5 M6 M7 M8 M9 M10 M11
70.....80.....90.....100.....110.....120
 Km LDQSICCTGTESGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELNNRRXYLGGNGTQIYVIDPEPCP
 Mk -----m-----
 Ms yof...s...f...s...r...v...l...
 Mut M7 M8 M9 M10 M11
 ...124
 Km PDSD
 Mk -----
 Ms -----

도면56a

CTLA-4Fc WT
 AMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLROADSQTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELNNRRXYLGGNGTQIYVIDPEPCP
 DSDQEPKSSDKHTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHDPEVKFNWYDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISAKGOPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSILTCIVKGFYPSDIAVEWEENGOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK
 CTLA-4Fc M1
 AMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLROADSQTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELNNRRXYLGGNGTQIYVIDPEPCP
 DSDQEPKSSDKHTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHDPEVKFNWYDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISAKGOPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSILTCIVKGFYPSDIAVEWEENGOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK
 CTLA-4Fc M2
 AMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLROADSQTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELNNRRXYLGGNGTQIYVIDPEPCP
 DSDQEPKSSDKHTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHDPEVKFNWYDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISAKGOPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSILTCIVKGFYPSDIAVEWEENGOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK
 CTLA-4Fc M3
 AMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLROADSQTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELNNRRXYLGGNGTQIYVIDPEPCP
 DSDQEPKSSDKHTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHDPEVKFNWYDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISAKGOPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSILTCIVKGFYPSDIAVEWEENGOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK
 CTLA-4Fc M4
 AMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLROADSQTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELNNRRXYLGGNGTQIYVIDPEPCP
 DSDQEPKSSDKHTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHDPEVKFNWYDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISAKGOPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSILTCIVKGFYPSDIAVEWEENGOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK
 CTLA-4Fc M5
 AMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLROADSQTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELNNRRXYLGGNGTQIYVIDPEPCP
 DSDQEPKSSDKHTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHDPEVKFNWYDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISAKGOPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSILTCIVKGFYPSDIAVEWEENGOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK

도면56b

CTLA-4Fc M6

AMHVAQPAVVLASSRGIAFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELNXXRLGIGNGTQIYVIDPEPCP
DSDDEPKSSDNTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDRGEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHODWLNGKEYCKVSNKALPAPIE
KTISSAKGOPREPOVYTLPSSBDELTKNOVSITC1VKGPYPBSDIAVEWESENOPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWDOGNVPSCSVNHEALHNHYTOKSLSLSPGK

CTLA-4Fc M7

AMHVAQPAVVLASSRGIAFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELNXXRLGIGNGTQIYVIDPEPCP
DSDDEPKSSDNTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDRGEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHODWLNGKEYCKVSNKALPAPIE
KTISSAKGOPREPOVYTLPSSBDELTKNOVSITC1VKGPYPBSDIAVEWESENOPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWDOGNVPSCSVNHEALHNHYTOKSLSLSPGK

CTLA-4Fc M8

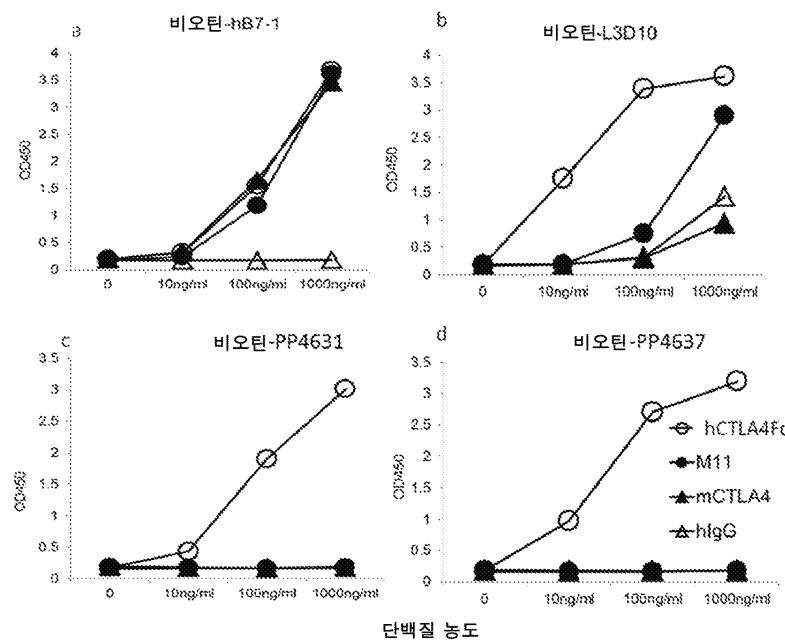
AMHVAQPAVVLASSRGIAFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELNXXRLGIGNGTQIYVIDPEPCP
DSDDEPKSSDNTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDRGEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHODWLNGKEYCKVSNKALPAPIE
KTISSAKGOPREPOVYTLPSSBDELTKNOVSITC1VKGPYPBSDIAVEWESENOPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWDOGNVPSCSVNHEALHNHYTOKSLSLSPGK

CTLA-4Fc M9

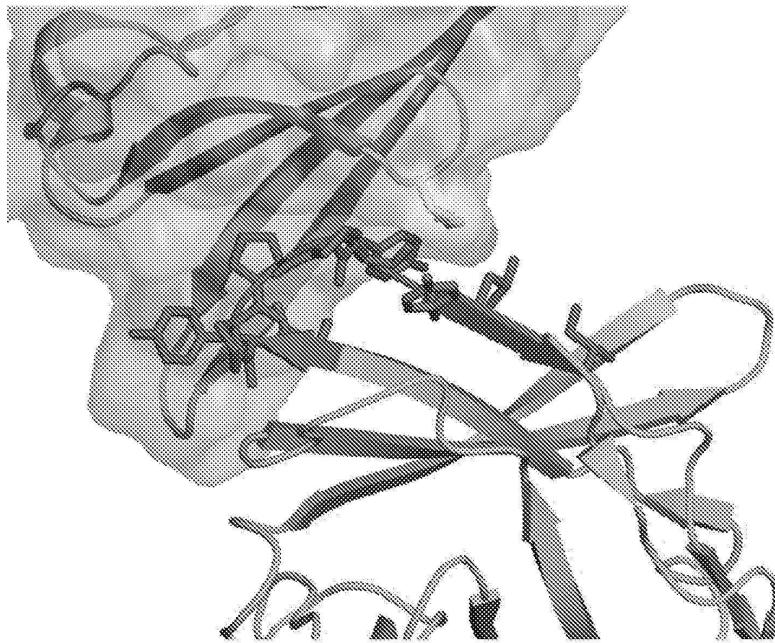
AMHVAQPAVVLASSRGIAFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELNXXRLGIGNGTQIYVIDPEPCP
DSDDEPKSSDNTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDRGEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHODWLNGKEYCKVSNKALPAPIE
KTISSAKGOPREPOVYTLPSSBDELTKNOVSITC1VKGPYPBSDIAVEWESENOPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWDOGNVPSCSVNHEALHNHYTOKSLSLSPGK

CTLA-4Fc M10

AMHVAQPAVVLASSRGIAFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELNXXRLGIGNGTQIYVIDPEPCP
DSDDEPKSSDNTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDRGEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHODWLNGKEYCKVSNKALPAPIE
KTISSAKGOPREPOVYTLPSSBDELTKNOVSITC1VKGPYPBSDIAVEWESENOPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWDOGNVPSCSVNHEALHNHYTOKSLSLSPGK

도면57

도면58



도면59

CTLA-4Fc WT

CTLA-4Fc M12

lqptqPqVVLLASRGIASFVCEYASPGKATEVRVTLRQADSVTVEVCAATfeknrtvgFLDDSDCTGTfneewvNLTIQGLRAMPTGlyICKVElXNUNENFvGqGNGTQIVVIDPECPDSDQEPFKSDDKTHTSPSPEAPELLGGGSVFLPFKPKDRMLTSKPTEVTCVWVNSHDEPFEVKFNWVYDGVVHNAAKTCERFGNYNTSYVVEUPLTWLHQdEJYKFCVKSNLPAIEKTEIHKAGKBCRFPOVATLPSEBDLNUKRNQSTC1LWLGFBYDSDIAVEWVSNCGOPENNYKTTPEVLDSDGFFPSLYKLTKWDPSBRCOGNVEF5CSM/HBPAEHNHYTOKSL3LSGK

CTLA-4Fc M13

MHVAQPAVVIASSRGIAFSCVEYASPQK/TEVRVTVLQRQADSQVTECAATYMMGNELTFLLDDSTCGTSSGQNQVNLTIIQGLRAMPDTGYIICKVLENNKQDQX/GKGNGTQIYVIDPEPCPDSDQEPKRSDDKTHTSPSPAEPELGGSSVFLPFPKPDKLMTSKTPETVTCVVVDVSHEDPEVKRNFWYDVGEVHNAAKTKEREEQYNSTYPVSVSLTVLHQDYLWLEKEYKCKVSNSKALPAEIEKTISAKKGQP/PEQPYVTLPPSRSDELTKNQVSLTCILVKGFYPSDIJAVEWESNQGPENNYKTT/PVLDSDGSFLYSLTKTVDKSRMQZQGNFVTSCSVNHEALHNHYTOKSLSLSPGK

Page 18 of 29

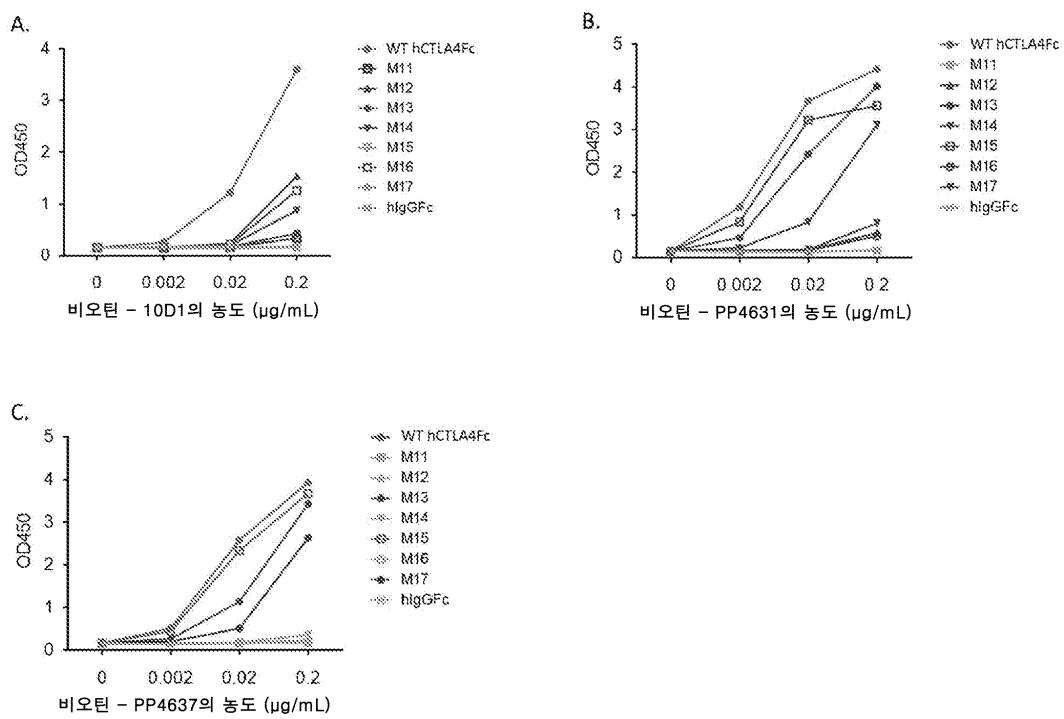
SDQEPKSSDNTHTSPDPAPELIGGSVFLFFPKPKDTLMTRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNARTKREEQYNSTYVVSVITVLHQDWLNGKEYKCKVSNRALKPAPIEKTISIKAKGQPREGPVQYTLLPPSRDELTKNQVSITCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFPLYSKLTVDK3RWQOQGN/FSCSVNHEALHNHYTQKSLISLSPGK

SDQEPKSSDKTH

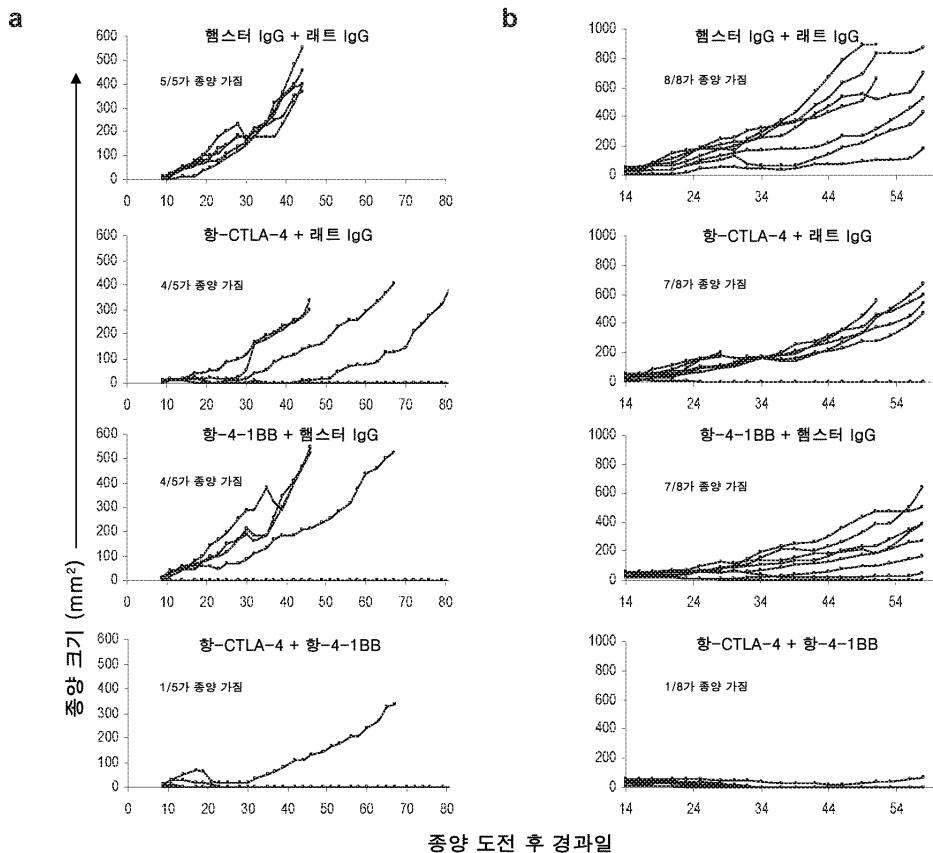
TISKAKGØPRED

CTLA-4Fc M17
MHQAQPAVWLSRSSGIGASFVCEYASPGKTVETRVTVLQRADSQTVECAATYMMNGNELTDDDSITGTSSGNQVNLTIGRLRNDTGLYICKVELN
SDQPCPKSSEDTTSSPAPPELGGSPVLEPPPKPDKLMSRPTPEVTCVVVDSVSHFNNWVYDGNSHARTRKPREEQYNTSYREVSVTILVHLLKGYEKKQYKQVNSDPLAPIEFK
TISKARGKCPREPVPTTQPSRDELTKHNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWENSGQPFENNYKTTPPYLDSDGFFFLYSKLTVDEKSPWQOGNVTSFCSVWHEALHNHYTOKSLSSLSPGK

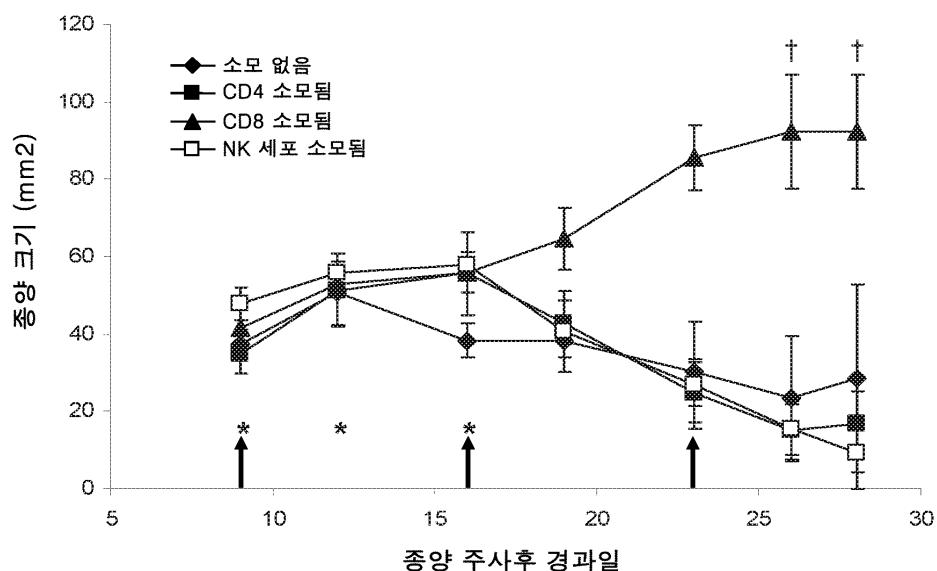
도면60



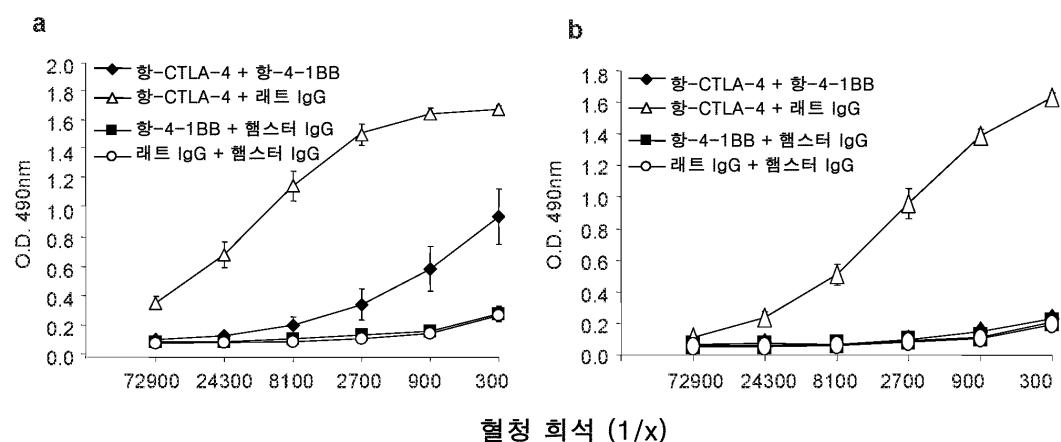
도면61



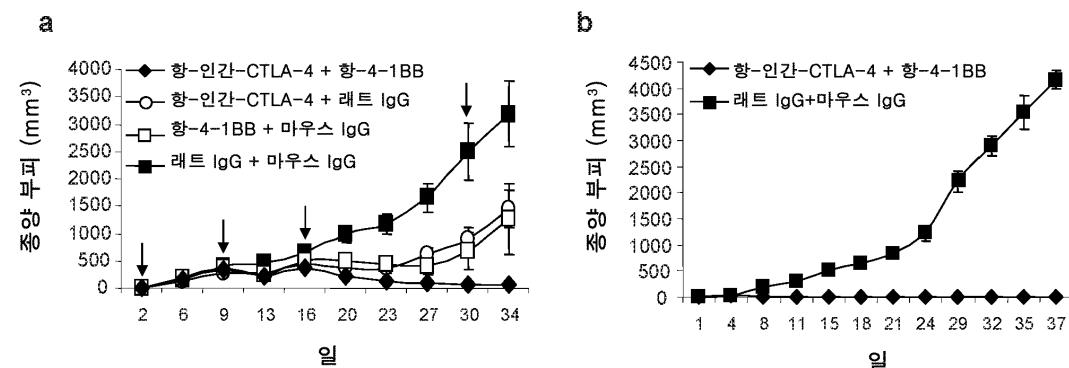
도면62



도면63



도면64



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> OncoImmune, Inc.

Liu, Yang

Zheng, Pan

Devenport, Martin

<120> Chimeric and humanized anti-human CTLA4 monoclonal antibodies and
uses thereof

<130> 060275.0600.03PC00

<150> 62/267,735

<151> 2015-12-15

<150> 62/359,036

<151> 2016-07-06

<150> 62/309,169

<151> 2016-03-16

<160> 73

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

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

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Phe Cys Gln His Leu Trp Gly Thr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 2

<211> 125

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

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

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Tyr Asp Gly Asn Thr Asn Phe His Ser Ala Leu Ile

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 3

<211> 329

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

290	295	300	
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
305	310	315	320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
325			
<210> 4			
<211> 329			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Engineered fragment			
<400>			
> 4			
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys			
1	5	10	15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
20	25	30	
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
35	40	45	
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
50	55	60	
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
65	70	75	80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
85	90	95	
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
100	105	110	
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
115	120	125	
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys			
130	135	140	
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			

165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
180	185	190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
195	200	205	
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
210	215	220	
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			
225	230	235	240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
245	250	255	

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
260	265	270	
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
275	280	285	
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
290	295	300	
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
305	310	315	320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

325

<210> 5

<211> 1437

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Optimized fragment

<400> 5

atggaccca agggcagcct gagctggaga atcctgctgt tcctgagcct ggccttcgag	60
ctgagctacg gccaggtgca gctgaaagag tctggccctg gcctggtggc cccttcccag	120
tccctgtcta tcacctgtac cgtgtccggc ttctccctga ctcctacgg cctgtctgg	180
gtgcgacagc ctccctggcaa gggcctggaa tggctggag tgatttgta cgacggcaac	240

accaacttcc actccgcct gatctccgg ctgaccatct ccaaggacaa ctccaagtcc 300

caggtgttcc tggaaactgaa ctccctgcag accgacgaca ccgccaccta ctactgcgt 360
 aagaccgagg gccactacta cggctccaac tacggctact acgcccgttga ctattgggc 420
 cagggcacct ccgtgaccgt gtcctctgt agcacaagg gccccagcgt gttccctctg 480
 gccccagca gcaagagcac cagcgccgaa accgcccgttga ggtgaaggac 540
 tacttccccg agccgtgac cgtgtcctgg aacagcgccg ctctgaccag cggagtgac 600
 accttccctg ccgtgctgca gagcagcgcc ctgtactccc tgagcagcgt ggtgaccgt 660
 cccagcagca gcctggcac ccagacctac atctgcaacg tgaaccacaa gccctccaac 720

accaagggtgg acaagaaggt ggagcctaag agctgcgaca agacccacac ctgcctccc 780
 tgcccgcccc ccgagctgct gggcgaccc agcgtgttcc tggccctcc caagcccaag 840
 gacacctgt acatcacccg cgaacccgag gtgacctgctg tgggtgttga cgtgagccac 900
 gaggaccccg aggtgaagtt caactggtaac gtggacggcg tggaggtgca caacgccaag 960
 accaagcctc gggaggagca gtacaacgc acctaccgctg tggtagcgt gctgaccgt 1020
 ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgc aggtgagcaa caaggccctg 1080
 cccgctccca tcgcagccac catcagcaag gccaaggggc agcccccgggaa gcctcaggtg 1140

tacacctgc cccccagccg cgacgagctg accaagaacc aggtgagcct gacccgttgc 1200
 gtgaaggct tctaccctc cgacatcgcc gtggagtggg agagcaacgg ccagccctgag 1260
 aacaactaca agaccacccc tcccggtctg gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc 1320
 aagctgaccg tggacaagtc cgggtggcag cagggcaacg tggtagcgt cagcgtgatg 1380
 cacgaggccc tgccacaacca ctacacccag aagacccctga gcctgagccc cggatag 1437

<210> 6

<211> 478

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Optimized fragment

<400> 6

Met Asp Pro Lys Gly Ser Leu Ser Trp Arg Ile Leu Leu Phe Leu Ser

1 5 10 15

Leu Ala Phe Glu Leu Ser Tyr Gly Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly

20 25 30

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

35	40	45
Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Pro		
50	55	60
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Tyr Asp Gly Asn		
65	70	75
Thr Asn Phe His Ser Ala Leu Ile Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp		
85	90	95
Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Glu Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp		
100	105	110
Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys Thr Glu Gly His Tyr Tyr Gly		
115	120	125
Ser Asn Tyr Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser		
130	135	140
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu		
145	150	155
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys		
165	170	175
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser		
180	185	190
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser		
195	200	205
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser		
210	215	220
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn		
225	230	235
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His		
245	250	255
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val		
260	265	270
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu		
275	280	285

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 290 295 300
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 305 310 315 320
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser
 325 330 335
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 340 345 350
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile
 355 360 365
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 370 375 380
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 385 390 395 400
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 405 410 415
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 420 425 430
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 435 440 445
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 450 455 460
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 465 470 475
 <210> 7
 <211> 705
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Optimized fragment
 <400> 7
 atggagaccc acaccctgct gctctgggtg ctgctgcct gggtgcccg ctccaccgg 60
 gacatccaga tgacccagtc ccccgccctcc ctgtctgtgt ctgtggcga gacagtgacc 120

atcacctgtc	gggcctccga	gaacatctac	tccaacctgg	cctggtatca	gcagaaggcag	180										
ggcaagtccc	ctcagctgct	ggtgtacgcc	gccaccaatc	tggctgatgg	cgtgccctcc	240										
agattctccg	gctctggctc	tggcacccag	tactccctga	agatcaactc	cctgcagtc	300										
gaggacttcg	gcacctaatt	ttgccagcac	ctgtggggca	ccccctacac	cttggcggc	360										
ggaacaaagg	tggaaatcaa	gcggaccgtg	gccgcgcgc	gcgtgtcat	cttcctccc	420										
agcgacgac	agctgaagtc	tggcaccgccc	agcgtggtgt	gcctgctgaa	caacttctac	480										
cccccgcgagg	ccaaggtgca	gtggaaggtg	gacaacgccc	tgcagagcgg	caacagccag	540										
gagagcgtga	ccgagcagga	ctccaaggac	agcacctaca	gcctgagcag	caccctgacc	600										
ctgagcaagg	ccgactacga	gaagcacaag	gtgtacgcct	gcgaggtgac	ccaccaggga	660										
ctgtcttagcc	ccgtgaccaa	gagcttcaac	cggggcgagt	gctaa		705										
<210>	8															
<211>	234															
<212>	PRT															
<213>	Artificial Sequence															
<220><223>	Chimeric															
<400>	8															
Met	Glu	Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro	
1																
	5															
		10														
			15													
Gly	Ser	Thr	Gly	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	
		20														
				25												
					30											
Val	Ser	Val	Gly	Glu	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asn	
		35														
			40													
					45											
Ile	Tyr	Ser	Asn	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Gln	Gly	Lys	Ser	Pro	
		50														
			55													
				60												
Gln	Leu	Leu	Val	Tyr	Ala	Ala	Thr	Asn	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	
		65														
			70													
				75												
					80											
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ile	Asn	
		85														
			90													
				95												
Ser	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Phe	Gly	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	His	Leu	Trp	
		100														
			105													
				110												
Gly	Thr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg		

115	120	125
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln		
130	135	140
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		
145	150	155
160		
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		
165	170	175
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		
180	185	190
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		
195	200	205
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		
210	215	220
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
225	230	
<210> 9		
<211> 478		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Humanized antibody fragment		
<400> 9		
Met Asp Pro Lys Gly Ser Leu Ser Trp Arg Ile Leu Leu Phe Leu Ser		
1	5	10
15		
Leu Ala Phe Glu Leu Ser Tyr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly		
20	25	30
Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val		
35	40	45
Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Leu Ser Trp Ile Arg Gln Pro		
50	55	60
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Trp Tyr Asp Gly Asn		
65	70	75
80		
Thr Asn Phe His Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp		

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

Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala

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

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Thr Glu Gly His Tyr Tyr Gly

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

Ser Asn Tyr Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu

275	280	285
-----	-----	-----

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

290	295	300
-----	-----	-----

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

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

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

325	330	335
-----	-----	-----

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475

<210> 10

<211> 1440

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody fragment

<400> 10

atggacccca	agggcagcct	gagctggaga	atcctgctgt	tcctgagcct	ggccttcgag	60
ctgagctacg	gccaggtgca	gctgcaggaa	tctggccctg	gcctcgtaa	gccctccgag	120
acactgtctc	tgacctgcac	cgtgtccggc	ttctccctga	cctcctacgg	cctgtcttgg	180
atcagacagc	cccctggcaa	gggcctggaa	tggatcggt	acatttgta	cgacggcaac	240
accaacttcc	accccagcct	gaagtccaga	gtgaccatct	ccaaggacac	ctccaagaac	300
cagtctctc	tgaagctgtc	ctccgtgacc	gccgctgaca	ccgcccgtgt	ctaactgtgt	360

aagacccgagg	gccactacta	cggctccaac	tacggctact	acgccttgaa	ctattggggc	420
-------------	------------	------------	------------	------------	------------	-----

cagggcacct ctgtgaccgt gtcctctgt agcaccaagg gccccagcgt gttcccttg	480
gcccccagca gcaagagcac cagcggcgga accgcggccc tggctgcct ggtgaaggac	540
tacttccccg agcccggtac cgtgtctgg aacagcggcg ctctgaccag cggagtgac	600
accttccctg ccgtgctgca gagcagcggc ctgtactccc tgagcagcgt ggtgaccgt	660
cccagcagca gcctggcac ccagacctac atctgcaacg tgaaccacaa gccctccaac	720
accaagggtgg acaagaaggt ggagcctaag agctgcgaca agacccacac ctgcctccc	780

tgccccggcc ccgagctgct gggcggaccc agcgtgttcc tggccctcc caagcccaag	840
gacacctgt acatcacccg cgaacccgag gtgacctgct tgggtgtgg cgtgagccac	900
gaggaccccg aggtaagtt caactggtaac gtggacggcg tggaggtgca caacgccaag	960
accaagcctc gggaggagca gtacaacgcc acctaccgct tggtagcgt gctgaccgt	1020
ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgcg aggtgagcaa caaggccctg	1080
cccgctccca tcgcagccac catcagcaag gccaaaggcc agcccccgggaa gcctcaggt	1140
tacaccctgc ccccccagccg cgacgagctg accaagaacc aggtgagcct gaccccttg	1200

gtgaagggct tctaccctc cgacatcgcc gtggagtggg agagcaacgg ccagccctgag	1260
aacaactaca agaccacccc tcccggtgctg gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc	1320
aagctgaccg tggacaagtc ccgggtggcg cagggcaacg tggtagcgt cagcgtgatg	1380
cacgaggccc tgacacaacca ctacacccag aagagcctga gcctgagccc cggatagtaa	1440

<210> 11

<211> 478

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody fragment

<400> 11

Met Asp Pro Lys Gly Ser Leu Ser Trp Arg Ile Leu Leu Phe Leu Ser

1 5 10 15

Leu Ala Phe Glu Leu Ser Tyr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Leu Ser Trp Ile Arg Gln Pro

50 55 60

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Trp Tyr Asp Gly Asn

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

Thr Asn Phe His Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp

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

Thr Ser Lys Ser Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala

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

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Thr Glu Gly His Tyr Tyr Gly

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

Ser Asn Tyr Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu

275	280	285
-----	-----	-----

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

290	295	300
-----	-----	-----

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

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475

<210> 12

<211> 1440

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 12

atggacccca agggcagcct gagctggaga atcctgctgt tcctgagcct ggccttcgag 60

ctgagctacg gccaggtgca gctgcaggaa tctggccctg gcctcgtaa gcccctccgag 120

acactgtctc tgacctgcac cgtgtccggc ttctccctga cctcctacgg cctgtcttgg 180

atcagacagc cccctggcaa gggcctggaa tggatcggtt acatttggta cgacggcaac 240

accaacttcc actcctccct gaagtccaga gtgaccatct ccaaggacac ctccaagtcc 300

cagggtgtctc tgaagctgtc ctccgtgacc gccgctgaca ccggcggtgtatctgtgtc	360
aagaccgagg gccactacta cggctccaac tacggctact acgcgcctggatattggggc	420
cagggcaccc tcgtgaccgt gtcctctgtatgcaccaagg gccccagcgt gttcccttg	480
gccccccagca gcaagagcac cagcggcgaa accggcccctggctgtgaaggac	540
tacttccccg agcccggtac cgtgtctgg aacagcggcg ctgtgaccag cgaggtgcac	600
accttccctg ccgtgctgca gagcagcggc ctgtactccc tgaggcagcgt ggtgaccgtg	660

cccagcagca gcctggcac ccagacctac atctcaacgtgaaccacaa gcccctccaac	720
accaagggtgg acaagaaggt ggagcctaag agctgcgaca agacccacac ctgcctccc	780
tgccccccc ccgagctgct gggcgaccc agcggtttcc tttccctcc caagcccaag	840
gacaccctgt acatcacccg cgaacccgag gtgacctgctg tgggtggtaa cgtgagccac	900
gaggaccccg aggtgaagtt caactggtaatgtggacggcg tggaggtgca caacgccaag	960
accaaggcctc gggaggagca gtacaacgcc acctaccgctg tggtagcgt gctgaccgtg	1020
ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgcagtgaa caaggccctg	1080

cccgctccca tcgcagccac catcagcaag gccaaggggcc agccccggga gcctcaggta	1140
tacaccctgc cccccagcccg cgacgagctg accaagaacc aggtgagcct gacctgcctg	1200
gtgaagggtct tctacccttc cgacatcgcc gtggagtggg agagcaacgg ccagcctgag	1260
aacaactaca agaccacccc tccctgtctg gacagcgcacg gcagttctt cctgtacagc	1320
aagctgaccg tggacaagtc ccgggtggcag caggcaacgtgtttagctg cagcgtgtatg	1380
cacgaggccc tgacacaacca ctacacccag aagagcctgac gcctgagccc cgatagtaa	1440

<210> 13

<211> 478

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 13

Met Asp Pro Lys Gly Ser Leu Ser Trp Arg Ile Leu Leu Phe Leu Ser

1 5 10 15

Leu Ala Phe Glu Leu Ser Tyr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Leu Ser Trp Ile Arg Gln Pro

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

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 305 310 315 320

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser
 325 330 335

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 340 345 350

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile
 355 360 365

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 370 375 380

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 385 390 395 400

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 405 410 415

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 420 425 430

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 435 440 445

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 450 455 460

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 465 470 475

<210> 14

<211> 1440

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 14

atggacccca agggcagcct gagctggaga atcctgctgt tcctgagcct ggccttcgag	60
ctgagctacg gccaggtgca gctgcaggaa tctggccctg gcctcgtaa gccctccgag	120

acactgtctc tgacctgcac cgtgtccggc ttctccctga cctcctacgg cctgtttgg	180
------------------------------------------------------------------	-----

atcagacagc cccctggcaa gggcctggaa tggatcggt acatttgta cgacggcaac	240
accaacttcc actccccact gaagtccaga gtgaccatct ccgtggacac ctccaagaac	300
cagttctctc tgaagctgtc ctccgtgacc gccgctgaca ccgccgtgt a 360	
aagaccgagg gccactacta cggctccaac tacggctact acgcccgtgt caatgggc	420
cagggcaccc tcgtgaccgt gtcctctgt agcacaagg gccccagcgt gttccctgt	480
gccccccagca gcaagagcac cagcggcga accggccccc tggctgcct ggtgaaggac	540

tacttccccg agcccggtgac cgtgtcctgg aacagcggcg ctctgaccag cggagtgac	600
accttccctg ccgtgctgca gagcagcggc ctgtactccc tgagcagcgt ggtgaccgtg	660
cccgccggca gccctggcac ccagacctac atctgcaacg tgaaccacaa gccctccaac	720
accaagggtgg acaagaaggt ggagcctaag agctgcgaca agacccacac ctgcctccc	780
tgccccggcc ccgagctgtc gggcggaccc agcgtgttcc tgcccttcc caagcccaag	840
gacaccctgt acatcacccg cgaacccgag gtgacactggtc tgggtgggttca cgtgagccac	900
gaggaccccg aggtgaagtt caactgggtac gtggacggcg tggaggtgca caacgccaag	960

accaaggctc gggaggagca gtacaacgcc acctaccggtc tggtgagcgt gctgaccgtg	1020
ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgcg aggtgagcaaa caaggccctg	1080
cccgctccca tcgcagccac catcagcaag gccaaaggcc agcccccggga gcctcagggtg	1140
tacaccctgc ccccccagccg cgacgagctg accaagaacc aggtgagcct gacccctgc	1200
gtgaagggtct tctacccttc cgacatcgcc gtggagtgg agagcaacgg ccagccgtgag	1260
aacaactaca agaccacccccc tcccggtgtc gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc	1320
aagctgaccg tggacaagtc cccgtggcag caggcaacg tggcgtgtc cagcgtgtat	1380

cacgaggccc tgacacaacca ctacacccag aagagcctga gcctgagccc cggatagtaa	1440
--------------------------------------------------------------------	------

<210> 15

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 15

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Trp

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230

<210> 16

<211> 705

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 16

atggagacg acaccctgct gctctgggtg ctgctgcct gggtgcccg ctccaccgga	60
gacatccaga tgacctcagtc cccctccagg ctgtctgcct ctgtggcgaa cagagtgacc	120
atcacctgtc gggctccga gaacatctac tccaacctgg ccggatcatca gcagaagccc	180
ggcaaggccc ctaagctgct gctgtacgccc gccaccaatc tgcatctgg cgtccctcc	240
agattctccg gctctggctc tggcaccgac tttaccctga ccatcagctc cctgcagccc	300
gaggacttcg ccacctaacta ctgccagcat ctgtggggca cccctacac ctttggcgga	360

ggcaccaagc tggaaatcaa gcggaccgtg gccgccccca gcgtgttcat cttccctccc	420
agcgacgagc agctgaagtc tggcaccgccc agcggtgtgt gcctgcgtaa caacttctac	480
ccccgcgagg ccaaggtgca gtggagggtg gacaacgcgg tgcagagcgg caacagccag	540
gagagcgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc	600
ctgagcaagg ccgactacgaa gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccaggga	660
ctgtctagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gctaa	705

<210> 17

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized Antibody

<400> 17

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Leu Trp

100	105	110
Gly Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
115	120	125

130	135	140
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln		
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		
145	150	155
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		
165	170	175
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		
180	185	190

195	200	205
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		
210	215	220
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
225	230	

<210> 18
<211> 705
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Humanized antibody
<400> 18

atggagacg acaccctgct gctctgggtg ctgctgctct gggtgcccg ctccaccgga	60
-----------------------------------------------------------------	----

gacatccaga tgacctcagtc cccctccagg ctgtctgcct ctgtggcga cagagtgacc	120
atcacctgtc gggctccga gaacatctac tccaacctgg cctggtatca gcagaagcag	180
ggcaaggccc ctaagctgct gctgtacgcc gccaccaatc tgcaggatgg cgtccctcc	240
agattctcg gctctggctc tggcaccgac tacaccctga ccatcagctc cctgcagccc	300
gaggacttcg ccacctactt ttgccagcat ctgtgggca ccccctacac cttggccag	360
ggcaccaagc tggaaatcaa gcgaccgtg gccgccccca gcgtgttcat ctccctccc	420
agcgacgagc agctgaagtc tggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac	480

ccccgcgagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag
 gagagcgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc
 ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccaggga
 ctgtcttagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gctaa 540
 600
 660
 705

<210> 19

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 19

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Trp

100 105 110

Gly Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230

<210> 20

<211> 705

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 20

atggagaccg acaccctgct gctctgggtg ctgctgcct gggtccccgg ctccacccga 60

gacatccaga tgaccaggc cccctccagc ctgtctgcct ctgtggcga cagagtgacc 120

atcacctgtc ggcctccga gaacatctac tccaacctgg cctggtatca gcagaagccc 180

ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgcc gccaccaggc tgcagtcgtt cgtccctcc 240

agattctccg gctctggctc tggcaccgac tttaccctga ccatcagctc cctgcageccc 300

gaggacttcg ccacctaacta ctgccagcat ctgtggggca ccccctacac ctttggcgga 360

ggcaccaagg tggaaatcaa gcgaccgtg gccgcggcc gcggtttcat cttccctccc 420

agcgacgacg acgtgaagtc tggcaccgac agcggttgtt gcctgctgaa caacttctac 480

ccccgcgagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 540

gagagcgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc 600

ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccaggga 660

ctgtcttagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gctaa 705

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide fragment

<400> 21

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide fragment

<400> 22

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide fragment

<400> 23

Gln His Leu Trp Gly Thr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide fragment

<400> 24

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Leu Ser

1 5 10

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide fragment

<400> 25

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Asn Thr Asn Phe His Ser Ala Leu Ile Ser

1 5 10 15

Arg

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide fragment

<400> 26

Thr Glu Gly His Tyr Tyr Gly Ser Asn Tyr Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp

1 5 10 15

Tyr

<210> 27

<211> 149

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 27

Met Asp Pro Lys Gly Ser Leu Ser Trp Arg Ile Leu Leu Phe Leu Ser

1 5 10 15

Leu Ala Phe Glu Leu Ser Tyr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Leu Ser Trp Ile Arg Gln Pro

50 55 60

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Trp Tyr Asp Gly Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala

100 105 110

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Thr Glu Gly His Tyr Tyr Gly

115 120 125

Ser Asn Tyr Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

130 135 140

Val Thr Val Ser Ser

145

<210> 28

<211> 149

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 28

Met Asp Pro Lys Gly Ser Leu Ser Trp Arg Ile Leu Leu Phe Leu Ser

1 5 10 15

Leu Ala Phe Glu Leu Ser Tyr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Leu Ser Trp Ile Arg Gln Pro

50 55 60

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Trp Tyr Asp Gly Asn

65 70 75 80

Thr Asn Phe His Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp

85 90 95

Thr Ser Lys Ser Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala

100 105 110

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Thr Glu Gly His Tyr Tyr Gly

115 120 125

Ser Asn Tyr Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

130 135 140

Val Thr Val Ser Ser

145

<210> 29

<211> 149

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 29

Met Asp Pro Lys Gly Ser Leu Ser Trp Arg Ile Leu Leu Phe Leu Ser

1	5	10	15
Leu Ala Phe Glu Leu Ser Tyr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly			
20	25	30	
Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val			
35	40	45	
Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Leu Ser Trp Ile Arg Gln Pro			
50	55	60	
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Trp Tyr Asp Gly Asn			
65	70	75	80
Thr Asn Phe His Ser Pro Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp			
85	90	95	
Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala			
100	105	110	
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Thr Glu Gly His Tyr Tyr Gly			
115	120	125	
Ser Asn Tyr Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu			
130	135	140	
Val Thr Val Ser Ser			

145

<210> 30

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 30

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Trp

100 105 110

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

115 120 125

<210> 31

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 31

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Leu Trp
 100 105 110

Gly Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 32

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 32

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn
 35 40 45

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Trp
 100 105 110

Gly Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide fragment

<400> 33

Tyr Ile Trp Tyr Asp Gly Asn Thr Asn Phe His Pro Ser Leu Lys Ser

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

Arg

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide fragment

<400> 34

Tyr Ile Trp Tyr Asp Gly Asn Thr Asn Phe His Ser Ser Leu Lys Ser

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

Arg

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide fragment

<400> 35

Tyr Ile Trp Tyr Asp Gly Asn Thr Asn Phe His Ser Pro Leu Lys Ser

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

Arg

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide fragment

<400> 36

Ala Ala Thr Asn Leu Gln Ser

1 5

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 37

Ala Ala Thr Asn Leu Gln Asp

1 5

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 38

Ala Ala Thr Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 39

<211>

358

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fusion protein

<400> 39

Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Cys Ala Ala Thr Tyr Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp

50 55 60

Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile

65 70 75 80

Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu
 85 90 95
 Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln
 100 105 110
 Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro
 115 120 125
 Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu
 130 135 140
 Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 145 150 155 160
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 165 170 175
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 180 185 190
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 195 200 205
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 210 215 220
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 225 230 235 240
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 245 250 255
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 260 265 270
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 275 280 285
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 290 295 300
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 305 310 315 320
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

325	330	335
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
340	345	350
Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
355		
<210> 40		
<211> 357		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Fusion protein		
<400> 40		
Ile Gln Val Thr Gln Pro Ser Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile		
1	5	10
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val		
20	25	30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys		
35	40	45
Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser		
50	55	60
Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln		
65	70	75
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu		
85	90	95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile		
100	105	110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys		
115	120	125
Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu		
130	135	140
Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
145	150	155
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		

165	170	175
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
180	185	190
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
195	200	205
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
210	215	220
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
225	230	235
240		
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
245	250	255
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln		
260	265	270
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
275	280	285
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
290	295	300
305		
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
310	315	320
325		
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
330	335	340
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
345	350	355
Leu Ser Pro Gly Lys		
<210> 41		
<211> 358		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Fusion protein		
<400> 41		
Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser His Gly		

1	5	10	15
Leu Ala Ser Phe Pro Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu			
20	25	30	
Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val			
35	40	45	
Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp			
50	55	60	
Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile			
65	70	75	80
Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu			
85	90	95	
Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln			
100	105	110	
Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro			
115	120	125	
Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu			
130	135	140	
Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Asp			
145	150	155	160
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp			
165	170	175	
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly			
180	185	190	
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn			
195	200	205	
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp			
210	215	220	
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro			
225	230	235	240
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu			
245	250	255	

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

325 330 335

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

340 345 350

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

355

<210> 42

<211> 359

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fusion protein

<400> 42

Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly

1 5 10 15

Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Ser His Asn Thr Asp

20 25 30

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

35 40 45

Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

165 170 175

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

180 185 190

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

195 200 205

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

210 215 220

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

290 295 300

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

305 310 315 320

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

325 330 335

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

340 345 350

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

355

<210> 43

<211> 358

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fusion protein

<400> 43

Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Arg Val Thr Val Leu Arg Thr Asn Asp Gln Met Val Thr Glu Val

35 40 45

Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp

50 55 60

Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile

65 70 75 80

Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu

85 90 95

Leu Met Tyr Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln

100 105 110

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

115 120 125

Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu

130 135 140

Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

145 150 155 160

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

325 330 335

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

340 345 350

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

355

<210> 44

<211> 358

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fusion protein

<400> 44

Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly

1	5	10	15
Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu			
20	25	30	
Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val			
35	40	45	
Cys Ala Ala Thr Phe Thr Glu Lys Asn Thr Val Gly Phe Leu Asp Asp			
50	55	60	
Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile			
65	70	75	80
Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu			
85	90	95	
Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln			
100	105	110	
Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro			
115	120	125	
Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu			
130	135	140	
Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp			
145	150	155	160
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp			
165	170	175	
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly			
180	185	190	
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn			
195	200	205	
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp			
210	215	220	
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro			
225	230	235	240
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu			
245	250	255	

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

325 330 335

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

340 345 350

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

355

<210> 45

<211> 358

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fusion protein

<400> 45

Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Cys Ala Thr Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp

50 55 60

Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile

65 70 75 80

Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu

85	90	95	
Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln			
100	105	110	
Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro			
115	120	125	
Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu			
130	135	140	
Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp			
145	150	155	160
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp			
165	170	175	
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly			
180	185	190	
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn			
195	200	205	
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp			
210	215	220	
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro			
225	230	235	240
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu			
245	250	255	
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn			
260	265	270	
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Phe Tyr Pro Ser Asp Ile			
275	280	285	
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr			
290	295	300	
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys			
305	310	315	320
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys			
325	330	335	

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

340 345 350

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

355

<210> 46

<211> 358

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fusion protein

<400> 46

Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Tyr

50 55 60

Pro Phe Cys Ser Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile

65 70 75 80

Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu

85 90 95

Leu Met Tyr Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln

100 105 110

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

115 120 125

Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu

130 135 140

Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

145 150 155 160

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

165	170	175
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
180	185	190
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn		
195	200	205
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp		
210	215	220
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro		
225	230	235
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
245	250	255
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn		
260	265	270
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
275	280	285
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
290	295	300
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		
305	310	315
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
325	330	335
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
340	345	350
Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
355		

<210> 47

<211> 358

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fusion protein

<400> 47

Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly

1	5	10	15
Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu			
20	25	30	
Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val			
35	40	45	
Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp			
50	55	60	
Ser Ile Cys Thr Gly Thr Phe Asn Glu Ser Arg Val Asn Leu Thr Ile			
65	70	75	80
Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu			
85	90	95	
Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln			
100	105	110	
Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro			
115	120	125	
Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu			
130	135	140	
Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp			
145	150	155	160
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp			
165	170	175	
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly			
180	185	190	
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn			
195	200	205	
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp			
210	215	220	
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro			
225	230	235	240
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu			
245	250	255	

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

325 330 335

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

340 345 350

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

355

<210> 48

<211> 359

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fusion protein

<400> 48

Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp

50 55 60

Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr
 100 105 110
 Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu
 115 120 125
 Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro
 130 135 140
 Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 145 150 155 160
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 165 170 175
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 180 185 190
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 195 200 205
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 210 215 220
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 225 230 235 240
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 245 250 255
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 260 265 270
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 275 280 285
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 290 295 300
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 305 310 315 320
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 325 330 335
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

340	345	350
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
355		
<210> 49		
<211> 359		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Fusion protein		
<400> 49		
Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly		
1	5	10
Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu		
20	25	30
Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val		
35	40	45
Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp		
50	55	60
Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile		
65	70	75
Gln Gly Leu Arg Ala Met Met Asp Thr Gly Leu Tyr Leu Cys Lys Val		
85	90	95
Glu Leu Met Tyr Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr		
100	105	110
Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu		
115	120	125
Pro Lys Ser Ser Asp Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro		
130	135	140
Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
145	150	155
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
165	170	175
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		

180	185	190
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		
195	200	205
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
210	215	220
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		
225	230	235
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
245	250	255
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys		
260	265	270
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
275	280	285
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
290	295	300
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
305	310	315
320		
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		
325	330	335
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
340	345	350
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
355		
<210> 50		
<211> 358		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Fusion protein		
<400> 50		
Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly		
1	5	10
Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu		

20	25	30
Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val		
35	40	45
Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp		
50	55	60
Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile		
65	70	75
Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu		
85	90	95
Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Phe Val Gly Met Gly Asn Gly Thr Gln		
100	105	110
Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro		
115	120	125
Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu		
130	135	140
Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
145	150	155
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
165	170	175
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
180	185	190
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn		
195	200	205
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp		
210	215	220
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro		
225	230	235
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
245	250	255
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn		
260	265	270

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 275 280 285
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 290 295 300
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 305 310 315 320
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 325 330 335
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 340 345 350
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355

<210> 51
<211> 357
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Fusion protein
<400> 51

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

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

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys

115 120 125

Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Leu Ser Pro Gly Lys

355

<210> 52

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fusion protein

<400> 52

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu

85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Phe Val Gly Met Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys

115 120 125

Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Leu Ser Pro Gly Lys

355

<210> 53

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fusion protein

<400> 53

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

1 5 10 15

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

20	25	30
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys		
35	40	45
Ala Ala Thr Phe Thr Glu Lys Asn Thr Val Gly Phe Leu Asp Asp Ser		
50	55	60
Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln		
65	70	75
Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu		
85	90	95
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Phe Val Gly Met Gly Asn Gly Thr Gln Ile		
100	105	110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys		
115	120	125
Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu		
130	135	140
Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
145	150	155
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
165	170	175
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
180	185	190
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
195	200	205
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
210	215	220
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
225	230	235
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
245	250	255
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln		
260	265	270

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

275

280

285

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

290

295

300

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

305 310 315 320

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

325

330

335

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

340

345

350

Leu Ser Pro Gly Lys

355

<210> 54

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fusion protein

<400> 54

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

1 5 10 15

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

20

25

30

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

35

40

45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50

55

60

Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu

85

90

95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100	105	110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys		
115	120	125
Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu		
130	135	140
Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
145	150	155
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
165	170	175
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
180	185	190
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
195	200	205
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
210	215	220
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
225	230	235
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
245	250	255
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln		
260	265	270
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
275	280	285
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
290	295	300
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
305	310	315
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
325	330	335
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
340	345	350
Leu Ser Pro Gly Lys		

355

<210

> 55

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fusion protein

<400> 55

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Ala Thr Phe Thr Glu Lys Asn Thr Val Gly Phe Leu Asp Asp Ser

50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Phe Asn Glu Ser Arg Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu

85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Phe Val Gly Met Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys

115 120 125

Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

165 170 175

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

180 185 190

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 195 200 205
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 210 215 220
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 225 230 235 240
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

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

 305 310 315 320
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 325 330 335
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 340 345 350
 Leu Ser Pro Gly Lys
 355
 <210> 56
 <211> 357
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Fusion protein
 <400> 56
 Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

1 5 10 15
 Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val
 20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 35 40 45
 Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser
 50 55 60
 Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
 65 70 75 80
 Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
 85 90 95
 Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Phe Glu Gly Met Gly Asn Gly Thr Gln Ile
 100 105 110
 Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys
 115 120 125
 Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu
 130 135 140
 Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 145 150 155 160
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 165 170 175
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 180 185 190
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 195 200 205
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 210 215 220
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 225 230 235 240
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 245 250 255
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 260 265 270
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

275

280

285

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

290

295

300

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

305 310 315 320

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

325

330

335

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

340

345

350

Leu Ser Pro Gly Lys

355

<210> 57

<211> 125

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 57

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

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

35

40

45

Gly Val Ile Trp Tyr Asp Gly Asn Thr Asn Phe His Ser Ala Leu Ile

50

55

60

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

65 70 75 80

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

85

90

95

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

100

105

110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

120

125

<210> 58

<211> 25

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 58

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

1 5 10

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser

20 25

<210> 59

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 59

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

1 5 10

<210> 60

<211> 31

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 60

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

1 5 10 15

Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 61

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 61

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 62

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized

<400> 62

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Trp Tyr Asp Gly Asn Thr Asn Phe His Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 63

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized

<400> 63

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Trp Tyr Asp Gly Asn Thr Asn Phe His Ser Ser Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Ser Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

<210> 64

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized

<400> 64

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Trp Tyr Asp Gly Asn Thr Asn Phe His Ser Pro Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115	120	125
<210> 65		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> Mus musculus		
<400> 65		

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Phe Cys Gln His Leu Trp Gly Thr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 66

<211> 23

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 66

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 67

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 67

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

1 5 10 15

<210> 68

<211> 32

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 68

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

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210

> 69

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 69

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 70

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized

<400> 70

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50	55	60													
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65															
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Leu	Trp	Gly	Thr	Pro	Tyr
85															

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100	105	
-----	-----	--

<210> 71

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized

<400> 71

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

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

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

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

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Leu Trp Gly Thr Pro Tyr

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100	105	
-----	-----	--

<210> 72

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized

<400> 72

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Trp Gly Thr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 73

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu

85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
100 105 110
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
115 120