

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0061516
(43) 공개일자 2022년05월13일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/32 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/283 (2013.01)
C07K 16/32 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-0147590
- (22) 출원일자 2020년11월06일
심사청구일자 2022년05월04일
기술이전 희망 : 기술양도
- (71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
- (72) 발명자
정상택
서울특별시 강남구 선릉로69길 20, 112동 702호(역삼동, 역삼 e-편한세상)
- 이지선
서울특별시 은평구 은평로 220, 106동 1505호(응암동, 녹번역e편한세상캐슬아파트)
- (74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 47 항

(54) 발명의 명칭 Fc 알파 수용체 결합 항체

(57) 요약

본 발명은 인간 Fc알파 수용체 결합 항체 및 이를 이용한 항체의 작용기작 극대화 기술에 관한 것으로, 본 발명에 따른 Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 IgG 형태로 효과기(effector) 세포들, 특히, 포유류에서 가장 높은 비율을 차지하는 호중구의 Fc 알파 수용체와 결합함으로써 종래의 IgA 항체의 단점들을 극복하면서 다양한 항체 치료제에 효과기 기능을 극대화하여 항체의 작용기작 (ADCC 및 ADCP)를 극대화시키는 효과가 있으므로, 이를 다양한 Fc-융합 단백질 치료제로서 유용하게 활용할 수 있다.

대표도 - 도3

FR1	CDRH1	FR2	CDRH2	FR3	CDRH3	FR4
1. EVQLVGGGGVQPGKSLRLSCAAS--GFNFDHHA-MHWVRQAPGKGLWVSS-IGSGGDT-YYADSVKGRFTIARDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVIYC-ATEARGLAH-----WGQSTLVTVSS						
2. EVQLVESGGPGVKPSETLSLTCSVS--GGSISSRDW-WGWVRQPPGEGLEWIGE-IYHSGETT--NINPSLKSRVTMSMDTSKQQLSLKLTGVTAVDTAVIYC-VTYSASDAAFDS---WGQSTLVTVSS						
3. EVQLVESGGPGVKPSETLSLTCSVS--GGSISSRDW-WGWVRQPPGEGLEWIGE-IYHSGETT--NINPSLKSRVTMSMDTSKQQLSLKLTGVTAVDTAVIYC-VTYSATDAAFDS---WGQSTLVTVSS						
4. QVQLQESGGGLVQPGGSLRLACAGS--GFTFSNFA-MAWVRQAPGKGLWVSG-ISDDGTIT-DYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVIYC-VKVPSPAPMQGPDH-WGQSTTVTVSS						
5. QVQLQESGGGLVQPGGSLRLACAGS--GFTFSNFA-MAWVRQAPGKGLWVSG-ISDDGTIT-DYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVIYC-VKVPSPAPMQGPDY-WGQSTTVTVSS						
6. QVQLQESGGGLVQPGGSLRLACAGS--GFTFSNFA-MAWVRQAPGKGLWVSG-ISDDGTIT-DYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVIYC-VKVPSPAPMQGPDY-WGQSTTVTVSS						

FR1	CDRL1	FR2	CDRL2	FR3	CDRL3	FR4
1. SSELQDPAVSVALGQTASITCSGH--KLGERIACWY--QQKPGQSPFLVIT--QDTKRPSGI-PERFSGSNTGNTATLTITGTQAMDEADYIC-QANDSSTTV-----FGGGTKLVLG						1. JSA-9
2. ETTLTQSPSSLSASVEDRITITCRAS-QSISTCLNWI--QQKPKKAPKSLIY-GASILQSGVS-SQFSGSGPGTDFTLTISLQPEGFATYYC-QQGNVPLT-----FGGGTKVDIKR						2. JSA-30
3. ETTLTQSPSSLSASVEDRITITCRAS-QSISTYLSWI--QQKPKKAPKSLIY-GASNLQSGVS-SQFSGSGPGTDFTLTISLQPEGFATYYC-QQGNVPLT-----FGGGTKVDIKR						3. JSA-41
4. QSALTQPPSASGTPGQRTVITSCSSSS-SNIGSNTVARY--QQLPQTPAKLLIY-SDNQRPSGVP-DRFSGSGSSTASLAISGLQSEDEADYIC-AVWDDSLNGPGYV-FGTGTVKVIKR						4. JSA-19
5. DVVMTQSPSAMSASVEDRITITCRAS-QGISNYLAWF--QQKPKKAPKSLIY-AASNLQSGVP-SRFRGSGSDTFTLSISCLQSEDFATYYC-QQYHSYPLT-----FGGGTKLSVLG						5. JSA-40
6. ETTLTQSPSSLSASVEDRITITCRAS-QSISTYLSWI--QQKPKKAPKSLIY-GASNLQSGVS-SQFSGSGPGTDFTLTISLQPEGFATYYC-QQGNVPLT-----FGGGTKVDIKR						6. JSA-48

(52) CPC특허분류

C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711119984
과제번호	2020M3E5E2037775
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발사업
연구과제명	포유류 세포 디스플레이, 차세대 염기서열분석 및 Fc repertoire 분석을 기반으로
한 치료용 항체의 표적세포	살상 작용 기작 극대화 기반 기술 개발
기 여 율	1/3
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.07.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711104009
과제번호	2019R1F1A1059834
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초연구지원사업 (기본연구)
연구과제명	인간 Fc감마 수용체 엔지니어링을 이용한 단백질 치료제의 혈중 지속성 연장 기술
개발	
기 여 율	1/3
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2019.06.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711098515
과제번호	2019R1A4A1029000
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초연구지원사업 (기초연구실)
연구과제명	면역관문 억제 항체치료 불응암 통합 제어 연구실
기 여 율	1/3
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2019.09.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

GFX₁FX₂X₃X₄A 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH(Complementarity determining regions Heavy chain)1,

ISX₅X₆GX₇X₈T 또는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH2; 및

VTYSAX₉DAAFDs, VKVPSPAPMQGPDx₁₀ 또는 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3를 포함하는 중쇄가변 영역을 포함하는, Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

(1)X₁은 N 또는 T, X₂는 D 또는 S, X₃는 D 또는 N, X₄는 H 또는 F이며,

(2)X₅는 G 또는 D, X₆은 S 또는 D, X₇은 G 또는 T, X₈는 D 또는 I이며,

(3)X₉는 S 또는 Y, X₁₀은 H 또는 Y임.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 중쇄가변 영역은,

1)서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29 또는 서열번호 30으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR1;

2)서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33 또는 서열번호 34로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR2;

3)서열번호 35, 서열번호 36 또는 서열번호 37로 표시되는 아미노산 서열로 표시되는 FR3; 및

4)서열번호 38로 표시되는 FR4;를 포함하는, Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 중쇄가변 영역은 서열번호 58, 서열번호 60, 서열번호 62, 서열번호 64, 서열번호 66 또는 서열번호 68로 표시되는 서열과 90% 이상 상동성을 갖는 것인, Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 중쇄가변 영역은 서열번호 58, 서열번호 60, 서열번호 62, 서열번호 64, 서열번호 66 또는 서열번호 68로 표시되는 서열을 포함하는, Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 CDRH1은 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 서열을 포함하는 것이며,

상기 CDRH2는 서열번호 4, 서열번호 5 또는 서열번호 6으로 표시되는 서열을 포함하는 것이며,

상기 CDRH3는 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10 또는 서열번호 11로 표시되는 서열을 포함하는 것인, Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 CDRH1은 서열번호 1로 표시되는 서열을 포함하며,
 상기 CDRH2는 서열번호 4로 표시되는 서열을 포함하며,
 상기 CDRH3는 서열번호 7로 표시되는 서열을 포함하는, Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 7

제 6항에 있어서,
 서열번호 27로 표시되는 FR1;
 서열번호 31로 표시되는 FR2;
 서열번호 35로 표시되는 FR3; 및
 서열번호 38로 표시되는 FR4를 더 포함하는, Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 8

제 5항에 있어서,
 상기 CDRH1은 서열번호 2로 표시되는 서열을 포함하며,
 상기 CDRH2는 서열번호 5로 표시되는 서열을 포함하며,
 상기 CDRH3는 서열번호 8로 표시되는 서열을 포함하는, Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 9

제 8항에 있어서,
 서열번호 28로 표시되는 FR1;
 서열번호 32로 표시되는 FR2;
 서열번호 36로 표시되는 FR3; 및
 서열번호 38로 표시되는 FR4를 더 포함하는, Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 10

제 5항에 있어서,
 상기 CDRH1은 서열번호 2로 표시되는 서열을 포함하며,
 상기 CDRH2는 서열번호 5로 표시되는 서열을 포함하며,
 상기 CDRH3는 서열번호 9로 표시되는 서열을 포함하는, Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 11

제 10항에 있어서,
 서열번호 28로 표시되는 FR1;
 서열번호 32로 표시되는 FR2;
 서열번호 36로 표시되는 FR3; 및
 서열번호 38로 표시되는 FR4를 더 포함하는, Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진

단편.

청구항 12

제 5항에 있어서,

상기 CDRH1은 서열번호 3로 표시되는 서열을 포함하며,

상기 CDRH2는 서열번호 6로 표시되는 서열을 포함하며,

상기 CDRH3는 서열번호 10으로 표시되는 서열을 포함하는, Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 13

제 12항에 있어서,

서열번호 29로 표시되는 FR1;

서열번호 33로 표시되는 FR2;

서열번호 37로 표시되는 FR3; 및

서열번호 38로 표시되는 FR4를 더 포함하는, Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 14

제 1항에 있어서, 상기 Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 경쇄가변 영역을 포함하며,

상기 경쇄가변 영역은 서열번호 12의 아미노산 서열, 서열번호 15의 아미노산 서열 또는 QX₁₁ISX₁₂X₁₃LX₁₄WX₁₅ 을 포함하는 CDRL(Complementarity determining regions Light chain)1,

GASX₁₆LQSGVS, 서열번호 18의 아미노산 서열, 서열번호 21의 아미노산 서열 또는 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2; 및

QQX₁₇X₁₈SYPLT, 서열번호 23 아미노산 서열 또는 서열번호 25를 포함하는 CDRL3를 포함하는 경쇄가변 영역을 포함하는,

Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

(1)X₁₁은 S 또는 G, X₁₂는 N 또는 T, X₁₃는 C 또는 Y, X₁₄는 A, S 또는 N, X₁₅은 F 또는 Y이며,

(2)X₁₆는 I 또는 N이며,

(3)X₁₇는 G 또는 Y, X₁₈은 N 또는 H임.

청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 경쇄가변 영역은,

1)서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42 또는 서열번호 43으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR1;

2)서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46 또는 서열번호 47로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR2;

3)서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50 또는 서열번호 51, 서열번호 52 또는 서열번호 53으로 표시되는 아미노산 서열로 표시되는 FR3; 및

4)서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56 또는 서열번호 57로 표시되는 FR4;를 포함하는, Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 16

제 14항에 있어서, 상기 경쇄가변 영역은 서열번호 59, 서열번호 61, 서열번호 63, 서열번호 65, 서열번호 67 또는 서열번호 69로 표시되는 서열과 90% 이상 상동성을 갖는 것인, Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 17

제 14항에 있어서, 상기 경쇄가변 영역은 서열번호 59, 서열번호 61, 서열번호 63, 서열번호 65, 서열번호 67 또는 서열번호 69로 표시되는 서열인 것인, Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 18

제 14항에 있어서, 상기 CDRL1은 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16 또는 서열번호 17로 표시되는 서열을 포함하는 것이며,

상기 CDRL2는 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21 또는 서열번호 22로 표시되는 서열을 포함하는 것이며,

상기 CDRL3는 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25 또는 서열번호 26으로 표시되는 서열을 포함하는 것인, Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 19

제 18항에 있어서, CDRL1은 서열번호 12로 표시되는 서열을 포함하며,

CDRL2는 서열번호 18로 표시되는 서열을 포함하며,

CDRL3는 서열번호 23으로 표시되는 서열을 포함하는 것인, Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 20

제 19항에 있어서, 상기 경쇄 가변영역은, 서열번호 39로 표시되는 FR1;

서열번호 44로 표시되는 FR2;

서열번호 48로 표시되는 FR3; 및

서열번호 54로 표시되는 FR4를 포함하는 것인, Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 21

제 18항에 있어서, CDRL1은 서열번호 13로 표시되는 서열을 포함하며,

CDRL2는 서열번호 19로 표시되는 서열을 포함하며,

CDRL3는 서열번호 24로 표시되는 서열을 포함하는 것인, Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 22

제 21항에 있어서, 상기 경쇄 가변영역은, 서열번호 40으로 표시되는 FR1;

서열번호 45로 표시되는 FR2;

서열번호 49로 표시되는 FR3; 및

서열번호 55로 표시되는 FR4를 포함하는 것인, Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 23

제 18항에 있어서, CDRL1은 서열번호 14로 표시되는 서열을 포함하며,
CDRL2는 서열번호 20으로 표시되는 서열을 포함하며,
CDRL3은 서열번호 24로 표시되는 서열을 포함하는 것인, Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 24

제 23항에 있어서, 상기 경쇄 가변영역은, 서열번호 40으로 표시되는 FR1;
서열번호 45로 표시되는 FR2;
서열번호 50으로 표시되는 FR3; 및
서열번호 55로 표시되는 FR4를 포함하는 것인, Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 25

제 18항에 있어서,
CDRL1은 서열번호 15로 표시되는 서열을 포함하며,
CDRL2는 서열번호 21로 표시되는 서열을 포함하며,
CDRL3은 서열번호 25로 표시되는 서열을 포함하는 것인, Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 26

제 25항에 있어서, 상기 경쇄 가변영역은,
서열번호 41로 표시되는 FR1;
서열번호 45로 표시되는 FR2;
서열번호 51로 표시되는 FR3; 및
서열번호 56으로 표시되는 FR4를 포함하는 것인, Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 27

서열번호 12의 아미노산 서열, 서열번호 15의 아미노산 서열 또는 QX₁₁ISX₁₂X₁₃LX₁₄WX₁₅ 을 포함하는 CDRL(Complementarity determining regions Light chain)1,
GASX₁₆LQSGVS, 서열번호 18의 아미노산 서열, 서열번호 21의 아미노산 서열 또는 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2; 및
QQX₁₇X₁₈SYPLT, 서열번호 23 아미노산 서열 또는 서열번호 25를 포함하는 CDRL3를 포함하는 경쇄가변 영역을 포함하는,
Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.
(1)X₁₁은 S 또는 G, X₁₂는 N 또는 T, X₁₃는 C 또는 Y, X₁₄는 A, S 또는 N, X₁₅은 F 또는 Y이며,
(2)X₁₆는 I 또는 N이며,
(3)X₁₇는 G 또는 Y, X₁₈은 N 또는 H임.

청구항 28

제 27항에 있어서, 상기 경쇄가변 영역은,

- 1)서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42 또는 서열번호 43으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR1 서열;
- 2)서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46 또는 서열번호 47로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR2 서열;
- 3)서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50 또는 서열번호 51, 서열번호 52 또는 서열번호 53으로 표시되는 아미노산 서열로 표시되는 FR3; 및
- 4)서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56 또는 서열번호 57로 표시되는 FR4;를 포함하는, Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 29

제 27항에 있어서, 상기 경쇄가변 영역은 서열번호 59, 서열번호 61, 서열번호 63, 서열번호 65, 서열번호 67 또는 서열번호 69로 표시되는 서열과 90% 이상 상동성을 갖는 것인, Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 30

제 27항에 있어서, 상기 경쇄가변 영역은 서열번호 59, 서열번호 61, 서열번호 63, 서열번호 65, 서열번호 67 또는 서열번호 69로 표시되는 서열인 것인, Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 31

제 27항에 있어서, 상기 Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 중쇄가변 영역을 포함하며,

상기 중쇄가변 영역은,

GFX₁FX₂X₃X₄A 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH(Complementarity determining regions Heavy chain)1,

ISX₅X₆GX₇X₈T 또는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH2; 및

VTYSAX₉DAAFD, VKVPSPAPMQGPD_{X10} 또는 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3를 포함하는 중쇄가변 영역을 포함하는, Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

(1)X₁은 N 또는 T, X₂는 D 또는 S, X₃는 D 또는 N, X₄는 H 또는 F이며,

(2)X₅는 G 또는 D, X₆은 S 또는 D, X₇은 G 또는 T, X₈는 D 또는 I이며,

(3)X₉는 S 또는 Y, X₁₀은 H 또는 Y임.

청구항 32

중쇄가변 영역 및 경쇄가변 영역을 포함하는, Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편으로,

중쇄가변 영역은,

(1)GFX₁FX₂X₃X₄A 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH(Complementarity determining regions Heavy chain)1,

(2)ISX₅X₆GX₇X₈T 또는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH2; 및

(3)VTYSAX₉DAAFD₅, VKVPSPAPMQGPD₁₀ 또는 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3를 포함하는 중쇄가변 영역을 포함하며,

경쇄가변 영역은,

(4)서열번호 12의 아미노산 서열, 서열번호 15의 아미노산 서열 또는 QX₁₁ISX₁₂X₁₃LX₁₄WX₁₅ 을 포함하는 CDRL(Complementarity determining regions Light chain)1,

(5)GASX₁₆LQSGV₅, 서열번호 18의 아미노산 서열, 서열번호 21의 아미노산 서열 또는 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2; 및

(6)QQX₁₇X₁₈SYPLT, 서열번호 23 아미노산 서열 또는 서열번호 25를 포함하는 CDRL3를 포함하는 경쇄가변 영역을 포함하는,

Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

(a)X₁은 N 또는 T, X₂는 D 또는 S, X₃는 D 또는 N, X₄는 H 또는 F이며,

(b)X₅는 G 또는 D, X₆은 S 또는 D, X₇은 G 또는 T, X₈는 D 또는 I이며,

(c)X₉는 S 또는 Y, X₁₀은 H 또는 Y임.

(d)X₁₁은 S 또는 G, X₁₂는 N 또는 T, X₁₃는 C 또는 Y, X₁₄는 A, S 또는 N, X₁₅은 F 또는 Y이며,

(e)X₁₆는 I 또는 N이며,

(f)X₁₇는 G 또는 Y, X₁₈은 N 또는 H임.

청구항 33

제 32항에 있어서, 상기 중쇄가변 영역은,

(1)서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29 또는 서열번호 30으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR1 서열;

(2)서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33 또는 서열번호 34로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR2 서열;

(3)서열번호 35, 서열번호 36 또는 서열번호 37로 표시되는 아미노산 서열로 표시되는 FR3 서열; 및

(4)서열번호 38로 표시되는 FR4 서열;를 포함하며,

상기 경쇄가변 영역은,

(5)서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42 또는 서열번호 43으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR1 서열;

(6)서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46 또는 서열번호 47로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR2 서열;

(7)서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50 또는 서열번호 51, 서열번호 52 또는 서열번호 53으로 표시되는 아미노산 서열로 표시되는 FR3; 및

(8)서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56 또는 서열번호 57로 표시되는 FR4;를 포함하는, Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 34

제 32항에 있어서, 상기 중쇄가변 영역은 서열번호 58, 서열번호 60, 서열번호 62, 서열번호 64, 서열번호 66 또는 서열번호 68로 표시되는 서열을 포함하고,

상기 경쇄가변 영역은 서열번호 59, 서열번호 61, 서열번호 63, 서열번호 65, 서열번호 67 또는 서열번호 69로 표시되는 서열인 것인, Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편. Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 35

제 32항에 있어서, 상기 중쇄가변 영역은 서열번호 58, 서열번호 60, 서열번호 62, 서열번호 64, 서열번호 66 또는 서열번호 68로 표시되는 서열과 90%로 상동성을 갖는 서열을 포함하고,

상기 경쇄가변 영역은 서열번호 59, 서열번호 61, 서열번호 63, 서열번호 65, 서열번호 67 또는 서열번호 69로 표시되는 서열과 90% 상동성을 갖는 서열을 포함하는 것인, Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편. Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 36

제 1항 내지 제35항 중 어느 한항에 있어서, 상기 면역학적 활성을 가진 단편은 Fab, Fd, Fab', dAb, F(ab'), F(ab')₂, scFv(single chain fragment variable), Fv, 단일쇄 항체, Fv 이량체, 상보성 결정 영역 단편, 인간화 항체, 키메라 항체 및 디아바디(diabody)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, Fc 알과 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편.

청구항 37

Fc 알과 수용체에 결합하는 제1항원 결합 부위 및 Fc 알과 수용체 이외의 표적 항원에 결합하는 제2항원 결합 부위를 포함하는, 이중특이적 또는 다중특이적 항체로서,

제1항원 결합부위는 제 1항 내지 제 35항 중 어느 한항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편의 가변 부위를 포함하는, 이중특이적 또는 다중특이적 항체.

청구항 38

제 37항에 있어서, 상기 항원에 결합하는 부분은 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편인 것인, 이중특이적 또는 다중 특이적 항체.

청구항 39

제 37항에 있어서, 표적 항원은 17-1A 항원, GD3 갱글리오시드 R24, EGFRvIII, PSMA, PSCA, HLA-DR, EpCAM, MUC1 코어 단백질, 이상 글리코실화 MUC1, ED-B 도메인을 함유하는 피브로넥틴 이형, HER2/neu, 암종배아성 항원(CEA), 가스트린-방출 펩티드(GRP) 수용체 항원, 뮤신(mucine) 항원, 표피 성장 인자 수용체(EGF-R), HER3, HER4, MAGE 항원, SART 항원, MUC1 항원, c-erb-2 항원, TAG 72, 탄산 무수화효소 IX(carbonic anhydrase IX), 알파-태아단백질(alpha-fetoprotein), A3, A33 항체에 특이적인 항원, Ba 733, BrE3-항원, CA125, CD1, CD1a, CD3, CD5, CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD33, CD38, CD40, CD45, CD52, CD74, CD79a, CD80, CD138, 결합-특이적 항원-p(CSAp), CSAp, EGP-1, EGP-2, Ep-CAM, Flt-1, Flt-3, 폴산염 수용체(folate receptor), HLA-DR, 인간 융모성 성선자극호르몬(HCG) 및 그 소단위체들, 저산소증 유도 인자(HIF-I), Ia, IL-2, IL-6, IL-8, 인슐린 성장 인자-1(IGF-1), KC4-항원, KS-1-항원, KS1-4, Le-Y, 대식세포 억제 인자(MIF), MAGE, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, NCA66, NCA95, NCA90, PAM-4 항체에 특이적인 항원, 태반 성장 인자, p53, 전립선 산성 포스파타제(prostatic acid phosphatase), PSA, RS5, S100, TAC, 테나신(tenascin), TRAIL 수용체들, Tn 항원, 톰슨-프리덴라이히(Thomson-Friedenreich) 항원들, 종양 괴사 항원들, VEGF, ED-B 피브로넥틴(fibronectin), 혈관형성 표지(angiogenesis marker), 종양유전자 표지(oncogene marker) 또는 종양유전자 생성물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 이중특이적 또는 다중특이적 항체.

청구항 40

제 39항에 있어서, 종양유전자는 SEPTIN9, ACOD1, ACTN4, ADAM28, ADAM9, ADGRF1, ADRBK2, AFF1, AFF3, AGAP2, AGFG1, AGRN, AHCYL1, AH11, AIMP2, AKAP13, AKAP9, AKIRIN2, AKTIP, ALDH1A1, ALL1, ANIB1, ANP32C, ANP32D, AQP1, ARAF, ARHGEF1, ARHGEF2, ARHGEF5, ASPSCR1, AURKA, BAALC, BAIAP2L1, BANP, BCAR4, BCKDHB, BCL9, BCL9L, BCR, BMI1, BMP7, BOC, BRD4, BRF2, CABIN1, CAMK1D, CAPG, CBF, CBLB, CBL1, CBX7, CBX8, CCDC28A, CCDC6, CCNB1, CCNB2, CCND1, CCNE1, CCNL1, CD24, CDC25C, CDC6, CDH17, CDK1, CDK14, CDK4, CDK5R2, CDK6, CDK8, CDKN1B, CDKN3, CDON, CEACAM6, CENPW, CHD1L, CHIC1, CHL1, CKS1B, CMC4, CNTN2, COPS3, COPS5, CRKL, CRLF2, CROT, CRTCL1, CRYAB, CSF1R, CSF3, CSF3R, CSNK2A1, CSNK2A2, CT45A1, CTBP2, CTNND2, CTSZ, CUL7, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CYGB, CYP24A1, DCD, DCUN1D1DDB2, DDHD2, DDX6, DEK, DIS3, DNPH1, DPPA2, DPPA4,

DSG3, DUSP12, DUSP26, ECHS1, ECT2, EEF1A1, EEF1A2, EEF1D, EIF3E, EIF3I, EIF4E, EIF5A2, ELAVL1, ELL, EML4, EMSY, ENTPD5, EPCAM, EPS8, ERAS, ERGIC1, ERVW-1, EVI2A, EVI5, EWSR1, EZH2, FAM189B, FAM72A, FAM83D, FASN, FDPS, FGF10, FGF3, FGF5, FGF8, FR1OP, FHL2, FIP1L1, FNDC3B, FRAT1, FUBP1, FUS, FZD2, GAB2, GAEC1, GALNT10, GALR2, GLO1, GMNN, GNA12, GNA13, GNAI2, GNAQ, GNAS, GOLPH3, GOPC, GPAT4, GPM6A, GPM6B, GPR132, GREM1, GRM1, GSK3A, GSM1, H19, HAS1, HAX1, HDGFRP2, HMG5, HNRNPA1, HOTAIR, HOTTIP, HOXA-AS2, HRAS, HSPA1A, HSPA4, HSPB1, HULC, IDH1, IFNG, IGF2BP1, IKBKE, IL7R, INPPL1, INTS1, INTS2, INTS3, INTS4, INTS5, INTS7, INTS8, IRS2, IST1, JUP, KDM4C, KIAA0101, KIAA1524, KIF14, KRAS, KSR2, LAMTOR5, LAPTM4B, LCN2, LDHB, LETMD1, LIN28A, LIN28B, LMO1, LMO2, LMO3, LMO4, LSM1, LUADT1, MACC1, MACROD1, MAGEA11, MALAT1, MAML2, MAP3K8, MAPRE1, MAS1, MCC, MCF2, MCF2L, MCTS1, MEFV, MFHAS1, MFNG, MIEN1, MINA, MKL2, MLANA, MLLT1, MLLT11, MLLT3, MLLT4, MMP12, MMS22L, MN1, MNAT1, MOS, MPL, MPST, MRAS, MRE11A, MSI1, MTCPI, MTDH, MTOR, MUC1, MUC4, MUM1, MYD88, NAAA, NANOGP8, NBPFI2, NCOA4, NEAT1, NECTIN4, NEDD4, NEDD9, NET1, NINL, NME1, NOTCH1, NOTCH4, NOV, NSD1, NUAKE2, NUP214, NUP98, NUTM1, OLR1, PA2G4, PADI2, PAK7, PARK7, PARM1, PBK, PCAT1, PCAT5, PDGFA, PDZK1IP1, PELP1, PFN1P3, PIGU, PIK3CA, PIK3R1, PIM1, PIM2, PIM3, PIR, PIWIL1, PLAC8, PLK1, PPM1D, PPP1R10, PPP1R14A, PPP2R1A, PRAME, PRDM12, PRMT5, PSIP1, PSMD10, PTCH2, PTMA, PTP4A1, PTP4A2, PTP4A3, PTTG1, PTTG1IP, PTTG2, PVT1, RAB11A, RAB18, RAB22A, RAB23, RAB8A, RALGDS, RAP1A, RASSF1, RBM14, RBM15, RBM3, RBMY1A1, RFC3, RGL4, RGR, RHO, RING1, RINT1, RIT1, RNF43, RPL23, RRAS, RRAS2, RSF1, RUNX1T1, S100A4, S100A7, S100A8, SAG, SART3, SBSN, SEA, SEC62, SERTAD1, SERTAD2, SERTAD3, SET, SETBP1, SETDB1, SGK1, SIRT1, SIRT6, SKI, SKIL, SKP2, SLC12A5, SLC3A2, SMR3B, SMURF1, SNCG, SNORA59A, SNORA80E, SPAG9, SPATA4, SPRY2, SQSTM1, SRSF1, SRSF2, SRSF3, SRSF6, SS18, SSX1, SSX2, SSX2B, STIL, STMN1, STRA6, STYK1, SUZ12, SWAP70, SYT1, TAC1, TACSTD2, TAF15, TALDO1, TAZ, TBC1D1, TBC1D15, TBC1D3, TBC1D3C, TBC1D7, TCL1A, TCL1B, TCL6, TCP1, TFG, TGM3, TINCR, TKTL1, TLE1, TMEM140, TMPPO2, TMPRSS2, TNS4, TPD52, TPR, TRE17, TREH, TRIB1, TRIB2, TRIM28, TRIM32, TRIM8, TRIO, TRIP6, TSPAN1, TSPY1, TXN, TYMS, TYRP1, UBE2C, UBE3C, UCA1, UCHL1, UHRF1, URI1, USP22, USP4, USP6, VAV1, VAV2, VAV3, VIM, WAPL, WHSC1, WHSC1L1, WISP1, WNT1, WNT10A, WNT10B, WNT2, WNT3, WNT5A, WWTR1, XCL1, XIAP, YAP1, YEATS4, YY1AP1, ZEB1-AS1, ZFAND4, ZFAS1, ZMYM2, ZNF703 및 ZNHIT6로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 이중특이적 또는 다중특이적 항체.

청구항 41

제 37항에 있어서, 표적 항원은 세포 표면 항원인, 이중특이적 또는 다중특이적 항체.

청구항 42

제 41항에 있어서, 세포 표면 항원은 CEA, ED-B 피브로넥틴, CD20, CD22, CD19, EGFR, IGF1R, VEGFR1/F1t-1, VEGFR2/KDR, VEGFR3/F1t-4, HER2/neu, CD30, CD33, CD3, CD16, CD64, CD89, CD2, 아테노바이러스 섬유 농, PfMSP-1, HN/NDV, EpCAM/17-1A, hTR, IL-2R/Tac, CA19-9, MUC1, HLA 클래스 II, GD2, G250, TAG-72, PSMA, CEACAM6, HMWMAA, CD40, M13 외피 단백질 및 GPIIb/IIIa로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 이중특이적 또는 다중특이적 항체.

청구항 43

제 37항에 있어서, 표적 항원은 HER-2인 것인, 이중특이적 또는 다중특이적 항체.

청구항 44

제 43항에 있어서, HER-2를 표적화 하는 영역은 트라스트주맙(Trastuzumab)으로 부터 유래된 가변영역을 포함하는 것인, 이중특이적 또는 다중특이적 항체.

청구항 45

제 1항 내지 36항의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편 또는 제37항 내지 제44항의 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 코딩하는 핵산 분자.

청구항 46

제 45항의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 47

제 46항의 벡터로 형질전환된 숙주 세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 Fc알파 수용체 결합 항체 및 이를 이용한 항체의 작용기작 극대화 기술에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 항체는 체액성 및 세포성 면역계 사이의 연결고리를 제공하며, 항체의 Fab 영역이 항원을 인식하는 반면, Fc 부분은 모든 면역 적격 세포에 의해 차별적으로 발현되는 Fc 수용체 (FcR)에 결합한다. 다가 항원/항체 복합체에 의한 수용체의 가교로, 표적 세포의 탈과립화, 세포용해 또는 포식작용 및 사이토카인-암호화 유전자의 전사-활성화가 촉발된다 (Deo, Y.M. et al., Immunol. Today 18(3):127-135 (1997)). 항체는, 항체 Fc 영역 상의 Fc 수용체 결합 부위가 세포 상의 Fc 수용체 (FcR)에 결합함으로써 Fc 영역을 통해 세포에 결합한다. 면역글로불린의 Fc 영역에 대한 수용체는 단핵구, 대식세포 및 다형핵 세포의 많은 방어적 기능을 촉발하는 데 중요하다. 이들 세포 상의 면역글로불린에 대한 수용체 (Fc 수용체 또는 FcR)들은 광범위하게 연구되었으며, 이들 수용체에 대한 모노클로날 항체를 발생시켜 이것이 치료적으로 유효하다는 것을 밝혔다. 항체가 세포 표면 상의 Fc 수용체에 결합하면 항체-코팅 입자의 포식 및 파괴, 면역 복합체의 제거, 살세포에 의한 항체-코팅 표적 세포의 용해 (항체-의존적 세포-매개 세포독성, 또는 ADCC라 알려짐), 염증 매개체의 방출, 태반 이동 및 면역글로불린 생성의 제어를 포함하여 중요하고도 다양한 여러 생물학적 반응을 촉발한다.

[0003] IgG (감마 수용체), IgE (엡실론 수용체), IgA (알파 수용체) 및 IgM (뮤 수용체)를 포함하는 상이한 종류의 항체에 특이적인 몇 가지 Fc 수용체가 존재한다. 이 중, IgA 수용체 (Fcα 수용체 또는 CD89)는 효과기(effector) 세포의 기능을 증진시킬 수 있다. 리간드가 Fcα 수용체에 결합하면 백혈구 및 Fcα 수용체-보유 세포주의 식세포작용(antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP)과 항체-매개성 세포독성작용(antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC)이 촉발된다. 또한, Fcα 수용체는 효과기 세포 상의 IgG에 대한 수용체와 협력하여 표적 세포에 대한 식세포작용을 강화시킬 수 있다. 항체 Fc 영역에 의해 매개되는 효과기 기능(effector function)은 두 카테고리 나눌 수 있다: (1) 항체가 항원에 결합한 후 작동하는 효과기 기능 (이러한 기능은, 예컨대 보체 연쇄증폭반응에의 관여 또는 Fc 수용체 (FcR)-보유 세포를 포함함); 및 (2) 항원 결합과는 별개로 작동하는 효과기 기능 (이러한 기능은, 예컨대 트랜스사이토시스(transcytosis)에 의해 세포 장벽을 가로질러 이동하는 능력 및 순환 중 지속성을 부여함). 예를 들어, 보체의 C1 성분이 항체에 결합하면 보체 시스템이 활성화된다. 보체의 활성화는 세포 병원체의 흡수인화 및 용해에 있어 중요하다. 보체의 활성화는 또한 염증 반응을 자극하며 자가면역 과민증에 관련될 수도 있다. 이와 같이, Fcα 수용체 또는 CD89는 IgA의 Fc 부분과 결합하는 수용체이며 (Kerr, M. A. 1990, Biochem. J. 271: 285-296), 주로 다형핵 백혈구 (PMN), 단핵구, 대식세포, 호중구 및 호산구를 비롯한 세포독성 면역 효과기 세포상에서 항상 발현된다 (Morton, H. C., et al., 1996, Critical Reviews in Immunology 16: 423). 또한, Fcα 수용체가 림프구 아개체군 상에서 발현 (Morton, H. C., et al., 1996, Critical Reviews in Immunology 16: 423)되고, 사구체 혈관사이 세포(mesangial cell) 상에서도 발현되는 것이 보고되었다 (Gomez-Guerrero, C., et al., 1996, J. Immunol. 156: 4369-4376). 인간 Fcα 수용체의 α-쇄는 많이 글리코실화되어 있고, IgG 및 IgE에 대한 수용체도 포함하는 Ig 슈퍼-유전자 군에 속하는 타입 I 막형단 분자이다. 19번 염색체 상에 위치한 1개의 유전자는 FcαRI 알파쇄의, 다양하게 스플라이싱(splicing)된 다수의 이소타입들을 코딩한다 (55 내지 110 kDa; Morton, H. C., et al., 1996, Critical Reviews in Immunology 16: 423). 골수세포성 Fcα 수용체는, Fcα 수용체 신호 전달에 역할을 하는 FcR γ-쇄와 연관되어 있는 것으로 밝혀졌다 (Morton, H. C. et al. 1995, J. Biol. Chem. 270: 29781; Pfeifferkorn, L. C., et al. 1995, J. Immunol. 153: 3228-3236; Saito, K. et al., 1995, J. Allergy Clin. Immunol. 96: 1152). Fcα 수용체는 항원이 결합된 IgA1 및 IgA2, 및 모노머성 IgA1 및 IgA2에 모두 결합하며 (Mazangera, R. L. et al., 1990, Biochem. J. 272: 159-165), 이것은 FcγR 및 FcεRI이 각각 IgG 및 IgE로 포화되는 것과 같은 동일한 방법으로 생체내에서 상기 수용체가 모노머성 IgA 항원으로 포화되어 있는 것과 일치한다. 골수 효과기 세포 상의 Fcα 수용체와, 중합성 IgA, IgA 면역 복합체, 또는 리간드 결합 도메인 내부 또는 외부의 에피토프에 대해 특이적인 mAb의 교차 결합은 탈과립화, 과산화물 방출, 염증성 사이토카인의 분비, 내포작용(endocytosis) 및 식세포작용을 자극한다 (Patty, C.,A. Herbelin, A. Lihuen, J. F. Bach, and R. C.

Monteiro, 1995, Immunology 86: 1-5; Stewart, W. W., R. L. MazYegera, L. Shen, and M. A. Kerr, 1994, J. Leucocyte Biology 56: 481-487; Stewart, W. W., and M. A. Kerr, 1990, Immunology 71: 328-334; Shen, L., 1992, J. Leucocyte Biology 51: 373-378). Fc α 수용체에 의해 촉발된 이러한 생리학적 반응은 점막 표면 상에서 제1선의 체액성 방어에 중요할 수 있다 (Morton, H. C., M. van Egmond, and J. G. J. van de Winkel, 1996, Critical Reviews in Immunology 16: 423).

[0004] 한편, 다수의 연구 결과는 Fc-수용체-의존성 메카니즘이 종양에 대한 세포독성 항체의 작용에 실질적인 원인이 됨을 시사하며, 종양에 대한 최적 항체는 활성화 Fc 수용체에 우선적으로 결합한다는 것을 보여준다 (Clynes, R. A., et al., Nature Medicine 6(4):443-446 (2000); Kalergis, A. M., and Ravetch, J. V., J. Exp. Med. 195 (12):1653-1659 (2002년 6월). 종종, 성공적인 항암 단일클론 항체는, ADCC 외에, 세포 신호전달 캐스케이드를 활성화시키거나 또는 성장 인자에의 접근을 차단하여 표적 세포 생존, 증식 또는 세포사를 조절하는 Fc-독립적인 직접적 신호전달 메카니즘을 유도한다. (Selenko, N., et al., J Clin. Immunol. 22 (3):124-130 (2002)). 예를 들어, CD20⁺ B 세포를 리툽시맙으로 처리하면 Mab-유도된 세포자가사멸(apoptosis)의 유도 및 보체 매개된 세포용해와 ADCC를 유도하는 것으로 확인된 바 있다. (Selenko, N., et al., J. Clin. Immunol. 22 (3):124-130 (2002)). 또한, 림프종 세포의 리툽시맙 유도된 세포자가사멸은 세포를 죽일 뿐 아니라 항원 제시수지상 세포(DC)에 의한 림프종 세포 유도된 펩티드의 흡수 및 교차 제시를 촉진하며, DC의 성숙을 유도하고, 특이적 세포독성 T 림프구(CTL)를 생성한다.

[0005] 그러나, 이와 같이 포유류에서 가장 높은 비율을 가지는 백혈구의 효과기 기능을 이용하는 IgA는 이합체 형태가 존재할뿐만 아니라, 복잡한 글리코실화, 테일피스(tailpiece) 등을 거쳐 IgG보다 생산성이 현저히 떨어지며, 체내에서 항체의 재활용(recycle)에 관여한다고 알려진 FcRn에 결합하지 못해 3주의 반감기를 가지는 IgG와 비교하여 짧은 1주의 반감기를 가진다는 매우 큰 단점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명에서는 치료용 단백질 의약품의 효과기 기능을 극대화시키기 위해, Fc 알파 수용체에 결합하는 신규한 항체를 제공하고, 상기 항체를 치료용 항체로 활용하기 위하여 다양한 형태의 이중 또는 다중 항체 플랫폼을 제시하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 항체를 코딩하는 단리된 핵산 분자, 이를 포함하는 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 제조하는 방법을 제공한다.

[0012] 아울러, 본 발명은 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 제조하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 IgG 형태로 효과기(effector) 세포들, 특히, 포유류에서 가장 높은 비율을 차지하는 호중구의 Fc 알파 수용체와 결합함으로써 종래의 IgA 항체의 단점들을 극복하면서 다양한 항체 치료제에 효과기 기능을 극대화하여 항체의 작용기작(ADCC 및 ADCP)를 극대화시키는 효과가 있으므로, 이를 다양한 Fc-융합 단백질 치료제로서 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 제작된 이합체 Fc 알파 수용체-ECD 영역 항원 단백질 및 사합체 Fc 알파 수용체-ECD 영역 항원 단백질의

벡터 및 이의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 유세포 분석기를 이용한 항체 탐색 모식도를 나타낸 도이다.

도 3은 Fc 알파 수용체-ECD에 높은 결합 친화도를 보이는 scFv 인간 항체 변이체 6종의 아미노산 서열 분석결과를 나타낸 도이다.

도 4는 6종의 scFv 항체 변이체의 Fc 알파 수용체 결합력 분석 결과이다.

도 5는 6종의 scFv 항체 변이체를 각각 포함하는 IgG (JSA-9, JSA-19, JSA-30, JSA-40, JSA-41 및 JSA-48)들의 벡터, 및 발현 및 정제 후 SDS-PAGE 젤 사진을 나타낸 도이다.

도 6은 6종의 scFv 항체 변이체를 각각 포함하는 IgG 항체 (JSA-9, JSA-30, JSA-40, JSA-41 및 JSA-48)들의 항원 결합력을 확인한 도이다.

도 7은 IgG 항체 JSA-40 및 JSA-48와 트라스트주맵을 이용하여 제작한 2종의 항원 (Fc 알파 수용체 및 Her-2)에 결합하는 이중 항체들 (8 종)의 발현 벡터를 나타낸 도이다.

도 8은 동물세포 발현 및 정제한 8종의 이중 항체들의 SDS-PAGE 젤 사진을 나타낸 도이다.

도 9는 이중 항체의 항체 2종에 대한 결합력을 확인한 도이다:

A 및 B: Fc 알파 수용체에 대한 결합력; 및

C 및 D: Her-2에 대한 결합력.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0016] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0017] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib(α -아미노이소부티르산), Sar(*N*-methylglycine) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 발명에서 약어로 언급된 아미노산은 하기와 같이 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다:
- [0018] 알라닌: A, 아르기닌: R, 아스파라긴: N, 아스파르트산: D, 시스테인: C, 글루탐산: E, 글루타민: Q, 글리신: G, 히스티딘: H, 이소류신: I, 류신: L, 리신: K, 메티오닌: M, 페닐알라닌: F, 프롤린: P, 세린: S, 트레오닌: T, 트립토판: W, 티로신: Y 및 발린: V.
- [0020] 일 측면에서, 본 발명은 Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편에 관한 것이다.
- [0021] 일 구현예에서, 상기 항체는 IgG일 수 있다. 상기 IgG는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4를 포함한다.
- [0022] 일 구현예에서, 중쇄 가변 부위는 $GFX_1FX_2X_3X_4A$ 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH(Complementarity determining regions Heavy chain)1, $ISX_5X_6GX_7X_8T$ 또는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH2; 및 $VTYSAX_9DAAFD$ S, $VKVSPAPMQGPDX_{10}$ 또는 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3를 포함하는 중쇄가변 영역을 포함할 수 있다.
- [0023] 상기, (1) X_1 은 N 또는 T, X_2 는 D 또는 S, X_3 는 D 또는 N, X_4 는 H 또는 F이며,

- [0024] (2) X_5 는 G 또는 D, X_6 은 S 또는 D, X_7 은 G 또는 T, X_8 는 D 또는 I이며,
- [0025] (3) X_9 는 S 또는 Y, X_{10} 은 H 또는 Y일 수 있다.
- [0026] 일 구현예에서, 상기 중쇄가변 영역은, 1)서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29 또는 서열번호 30으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR1 서열; 2)서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33 또는 서열번호 34로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR2 서열; 3)서열번호 35, 서열번호 36 또는 서열번호 37로 표시되는 아미노산 서열로 표시되는 FR3; 및 4)서열번호 38로 표시되는 FR4를 포함하는, Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편일 수 있다.
- [0027] 일 구현예에서, 중쇄가변 영역은 서열번호 58, 서열번호 60, 서열번호 62, 서열번호 64, 서열번호 66 또는 서열번호 68로 표시되는 서열과 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상, 또는 99%이상의 상동성을 갖는 것일 수 있다.
- [0028] 일 구현예에서, 상기 중쇄가변 영역은 서열번호 58, 서열번호 60, 서열번호 62, 서열번호 64, 서열번호 66 또는 서열번호 68로 표시되는 서열을 포함할 수 있다.
- [0029] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 CDRH(Complementarity determining regions Heavy chain)1, 서열번호 4 내지 6의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 CDRH2, 및 서열번호 7 내지 11의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 CDRH3를 포함하는 VH 도메인을 포함할 수 있다.
- [0030] 일 구현예에서, 중쇄 가변영역의 CDRH1은 서열번호 1로 표시되는 서열을 포함하며, 상기 CDRH2는 서열번호 4로 표시되는 서열을 포함하며, 상기 CDRH3는 서열번호 7로 표시되는 서열을 포함할 수 있다.
- [0031] 일 구현예에서, 중쇄가변 영역은 서열번호 27로 표시되는 FR1; 서열번호 31로 표시되는 FR2; 서열번호 35로 표시되는 FR3; 및 서열번호 38로 표시되는 FR4를 더 포함할 수 있다.
- [0032] 일 구현예에서, 중쇄가변 영역의 CDRH1은 서열번호 2로 표시되는 서열을 포함하며, CDRH2는 서열번호 5로 표시되는 서열을 포함하며, CDRH3는 서열번호 8로 표시되는 서열을 포함할 수 있다.
- [0033] 일 구현예에서, 중쇄가변 영역은 서열번호 28로 표시되는 FR1; 서열번호 32로 표시되는 FR2; 서열번호 36로 표시되는 FR3; 및 서열번호 38로 표시되는 FR4를 더 포함할 수 있다.
- [0034] 일 구현예에서, 중쇄가변 영역의 CDRH1은 서열번호 2로 표시되는 서열을 포함하며, CDRH2는 서열번호 5로 표시되는 서열을 포함하며, CDRH3는 서열번호 9로 표시되는 서열을 포함할 수 있다.
- [0035] 일 구현예에서, 중쇄가변 영역은 서열번호 28로 표시되는 FR1; 서열번호 32로 표시되는 FR2; 서열번호 36로 표시되는 FR3; 및 서열번호 38로 표시되는 FR4를 더 포함할 수 있다.
- [0036] 일 구현예에서, 중쇄가변 영역의 CDRH1은 서열번호 3로 표시되는 서열을 포함하며, CDRH2는 서열번호 6로 표시되는 서열을 포함하며, CDRH3는 서열번호 10으로 표시되는 서열을 포함할 수 있다.
- [0037] 일 구현예에서, 중쇄가변 영역은 서열번호 29로 표시되는 FR1; 서열번호 33로 표시되는 FR2; 서열번호 37로 표시되는 FR3; 및 서열번호 38로 표시되는 FR4를 더 포함할 수 있다.
- [0038] 일 구현예에서, 경쇄가변 영역은 서열번호 12의 아미노산 서열, 서열번호 15의 아미노산 서열 또는 $QX_{11}ISX_{12}X_{13}LX_{14}WX_{15}$ 을 포함하는 CDRL(Complementarity determining regions Light chain)1, $GASX_{16}LQSGVS$, 서열번호 18의 아미노산 서열, 서열번호 21의 아미노산 서열 또는 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2; 및 $QQX_{17}X_{18}SYPLT$, 서열번호 23 아미노산 서열 또는 서열번호 25를 포함하는 CDRL3를 포함하는 경쇄가변 영역을 포함할 수 있다.
- [0039] 상기, (1) X_{11} 은 S 또는 G, X_{12} 는 N 또는 T, X_{13} 는 C 또는 Y, X_{14} 는 A, S 또는 N, X_{15} 은 F 또는 Y이며,
- [0040] (2) X_{16} 는 I 또는 N이며,
- [0041] (3) X_{17} 는 G 또는 Y, X_{18} 은 N 또는 H일 수 있다.

- [0042] 일 구현예에서, 경쇄가변 영역은, 1)서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42 또는 서열번호 43으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR1; 2)서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46 또는 서열번호 47로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR2 서열; 3)서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50 또는 서열번호 51, 서열번호 52 또는 서열번호 53으로 표시되는 아미노산 서열로 표시되는 FR3; 및
- [0043] 4)서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56 또는 서열번호 57로 표시되는 FR4;를 포함할 수 있다.
- [0044] 일 구현예에서, 경쇄가변 영역은 서열번호 59, 서열번호 61, 서열번호 63, 서열번호 65, 서열번호 67 또는 서열번호 69로 표시되는 서열과 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 이상 상동성을 갖는 것일 수 있다.
- [0045] 일 구현예에서, 경쇄가변 영역은 서열번호 59, 서열번호 61, 서열번호 63, 서열번호 65, 서열번호 67 또는 서열번호 69로 표시되는 서열일 수 있다.
- [0046] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 12 내지 17의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 CDRL1, 서열번호 18, 19, 21 및 22의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 CDRL2, 및 서열번호 23, 25 및 26의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 CDRL3를 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [0047] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 39 내지 43의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 FR1, 서열번호 44, 45, 46 및 47의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 FR2, 서열번호 48 내지 53의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 FR3 및 서열번호 54, 55, 56 및 57의 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 FR4를 포함하는 VL 도메인을 포함할 수 있다.
- [0048] 일 구현예에서, 경쇄가변 영역의 CDRL1은 서열번호 12로 표시되는 서열을 포함하며, CDRL2는 서열번호 18로 표시되는 서열을 포함하며, CDRL3은 서열번호 23으로 표시되는 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0049] 일 구현예에서, 경쇄가변 영역은 서열번호 39로 표시되는 FR1; 서열번호 44로 표시되는 FR2;
- [0050] 서열번호 48로 표시되는 FR3; 및 서열번호 54로 표시되는 FR4를 포함하는 것일 수 있다.
- [0051] 일 구현예에서, 경쇄가변 영역의 CDRL1은 서열번호 13로 표시되는 서열을 포함하며, CDRL2는 서열번호 19로 표시되는 서열을 포함하며, CDRL3은 서열번호 24로 표시되는 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0052] 일 구현예에서, 경쇄가변 영역은, 서열번호 40으로 표시되는 FR1; 서열번호 45로 표시되는 FR2; 서열번호 49로 표시되는 FR3; 및 서열번호 55로 표시되는 FR4를 포함할 수 있다.
- [0053] 일 구현예에서, 경쇄가변 영역의 CDRL1은 서열번호 14로 표시되는 서열을 포함하며, CDRL2는 서열번호 20으로 표시되는 서열을 포함하며, CDRL3은 서열번호 24로 표시되는 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0054] 일 구현예에서, 경쇄가변 영역은, 서열번호 40으로 표시되는 FR1; 서열번호 45로 표시되는 FR2; 서열번호 50으로 표시되는 FR3; 및 서열번호 55로 표시되는 FR4를 포함하는 것일 수 있다.
- [0055] 일 구현예에서, 경쇄가변 영역의 CDRL1은 서열번호 15로 표시되는 서열을 포함하며, CDRL2는 서열번호 21로 표시되는 서열을 포함하며, CDRL3은 서열번호 25로 표시되는 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0056] 일 구현예에서, 경쇄가변 영역은, 서열번호 41로 표시되는 FR1; 서열번호 45로 표시되는 FR2; 서열번호 51로 표시되는 FR3; 및 서열번호 56으로 표시되는 FR4를 포함하는 것일 수 있다.
- [0057] 일 구현예에서, Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 중쇄가변 영역 및 경쇄가변 영역을 포함하며, 중쇄가변 영역은, (1)GFX₁FX₂X₃X₄A 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH(Complementarity determining regions Heavy chain)1, (2)ISX₅X₆GX₇X₈T 또는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH2; 및 (3)VTYSAX₉DAAFDS, VKVPSPAPMQGPD₁₀ 또는 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3를 포함하는 중쇄가변 영역을 포함하며,
- [0058] 경쇄가변 영역은, (4)서열번호 12의 아미노산 서열, 서열번호 15의 아미노산 서열 또는 QX₁₁ISX₁₂X₁₃LX₁₄WX₁₅을 포함하는 CDRL(Complementarity determining regions Light chain)1, (5)GASX₁₆LQSGVS, 서열번호 18의 아미노산

서열, 서열번호 21의 아미노산 서열 또는 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2; 및 (6)QQX₁₇X₁₈SYPLT, 서열번호 23 아미노산 서열 또는 서열번호 25를 포함하는 CDRL3를 포함하는 경쇄가변 영역을 포함할 수 있다.

[0059] (a)X₁은 N 또는 T, X₂는 D 또는 S, X₃는 D 또는 N, X₄는 H 또는 F이며,

[0060] (b)X₅는 G 또는 D, X₆은 S 또는 D, X₇은 G 또는 T, X₈는 D 또는 I이며,

[0061] (c)X₉는 S 또는 Y, X₁₀은 H 또는 Y임.

[0062] (d)X₁₁은 S 또는 G, X₁₂는 N 또는 T, X₁₃는 C 또는 Y, X₁₄는 A, S 또는 N, X₁₅은 F 또는 Y이며,

[0063] (e)X₁₆는 I 또는 N이며,

[0064] (f)X₁₇는 G 또는 Y, X₁₈은 N 또는 H임.

[0065] 일 구현예에서, Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 중쇄가변 영역 및 경쇄가변 영역을 포함하며, 상기 중쇄가변 영역은, (1)서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29 또는 서열번호 30으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR1; (2)서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33 또는 서열번호 34로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR2; (3)서열번호 35, 서열번호 36 또는 서열번호 37로 표시되는 아미노산 서열로 표시되는 FR3; 및 (4)서열번호 38로 표시되는 FR4;를 포함하며,

[0066] 상기 경쇄가변 영역은, (5)서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42 또는 서열번호 43으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR1; (6)서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46 또는 서열번호 47로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR2; (7)서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50 또는 서열번호 51, 서열번호 52 또는 서열번호 53으로 표시되는 아미노산 서열로 표시되는 FR3; 및 (8)서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56 또는 서열번호 57로 표시되는 FR4;를 포함할 수 있다.

[0067] 일 구현예에서, Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 중쇄가변 영역 및 경쇄가변 영역을 포함하며, 상기 중쇄가변 영역은 서열번호 58, 서열번호 60, 서열번호 62, 서열번호 64, 서열번호 66 또는 서열번호 68로 표시되는 서열을 포함하고, 상기 경쇄가변 영역은 서열번호 59, 서열번호 61, 서열번호 63, 서열번호 65, 서열번호 67 또는 서열번호 69로 표시되는 서열인 것일 수 있다.

[0068] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 서열번호 70 내지 73의 CL, CH1, CH2 및 CH3 서열을 포함할 수 있다.

[0069] 일 구현예에서, 본 발명의 면역학적 활성을 가진 단편은 Fab, Fd, Fab', dAb, F(ab'), F(ab')₂, scFv(single chain fragment variable), Fv, 단일쇄 항체, Fv 이량체, 상보성 결정 영역 단편, 인간화 항체, 키메라 항체 및 디아바디(diabody)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0070] 일 구현예에서, 본 발명의 Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 효과기 작용을 증가시킬 수 있으며, 백혈구 및 CD89-보유 세포주의 식세포작용 (antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP) 또는 항체-매개성 세포독성작용 (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC)을 증가시킬 수 있다.

[0071] 본 발명에서 용어, "Fc 알파 수용체(Fc α 수용체)"는 IgA 수용체 또는 CD89로도 혼용될 수 있다.

[0072] 상기 항체는 전체(whole) 항체 형태일 뿐 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 전체 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄(light chain) 및 2개의 전체 길이의 중쇄(heavy chain)를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합(disulfide bond)으로 연결되어 있다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, 항체 단편의 예는 (i) 경쇄의 가변영역(VL) 및 중쇄의 가변영역(VH)과 경쇄의 불변영역(CL) 및 중쇄의 첫번째 불변 영역(CH1)으로 이루어진 Fab 단편; (ii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iii) 단일 항체의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (iv) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편(Ward ES et al., Nature 341:544-546 (1989)); (v) 분리된 CDR 영역; (vi) 2개의 연결된 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (vii) VH 도메인 및 VL 도메인이 항원 결합 부위를 형성하도록 결합시키는 펩타이드 링커에 의해 결합된 단일쇄 Fv 분자(scFv); (viii) 이특이적인 단일쇄 Fv 이량체(PCT/US92/09965) 및 (ix) 유전자 융합에 의해 제작된 다가 또는 다특이적인 단편인 디아바디(diabody) W094/13804) 등을 포함한다.

- [0073] 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 동물 유래 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 및 이들의 면역학적 활성을 가진 단편으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 상기 항체는 재조합적 또는 합성적으로 생산된 것일 수 있다.
- [0074] 원하는 항원을 피면역 동물에게 면역시켜 생산하는 동물 유래 항체는 일반적으로 치료 목적으로 인간에 투여시 면역거부반응이 일어날 수 있으며, 이러한 면역거부반응을 억제하고자 키메라 항체(chimeric antibody)가 개발되었다. 키메라 항체는 유전공학적 방법을 이용하여 항-아이소타입(anti-isotype) 반응의 원인이 되는 동물 유래 항체의 불변 영역을 인간 항체의 불변 영역으로 치환한 것이다. 키메라 항체는 동물 유래 항체에 비하여 항-아이소타입 반응에 있어서 상당 부분 개선되었으나, 여전히 동물 유래 아미노산들이 가변 영역에 존재하고 있어 잠재적인 항-이디오타입(anti-idiotypic) 반응에 대한 부작용을 내포하고 있다. 이러한 부작용을 개선하고자 개발된 것이 인간화 항체(humanized antibody)이다. 이는 키메라 항체의 가변 영역 중 항원의 결합에 중요한 역할을 하는 CDR(complementarity determining regions) 부위를 인간 항체 골격(framework)에 이식하여 제작된다.
- [0075] 인간화 항체를 제작하기 위한 CDR 이식(grafting) 기술에 있어서 가장 중요한 것은 동물 유래 항체의 CDR 부위를 가장 잘 받아들일 수 있는 최적화된 인간 항체를 선정하는 것이며, 이를 위하여 항체 데이터베이스의 활용, 결정구조(crystal structure)의 분석, 분자모델링 기술 등이 활용된다. 그러나, 최적화된 인간 항체 골격에 동물 유래 항체의 CDR 부위를 이식할지라도 동물 유래 항체의 골격에 위치하면서 항원 결합에 영향을 미치는 아미노산이 존재하는 경우가 있기 때문에, 항원 결합력이 보존되지 못하는 경우가 상당수 존재하므로, 항원 결합력을 복원하기 위한 추가적인 항체 공학 기술의 적용은 필수적이라고 할 수 있다.
- [0076] 상기 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편은 생체에서 분리된 (생체에 존재하지 않는) 것 또는 비자연적으로 생산(non-naturally occurring)된 것일 수 있으며, 예컨대, 합성적 또는 재조합적으로 생산된 것일 수 있다.
- [0077] 본 발명에서 "항체"라 함은, 면역계 내에서 항원의 자극에 의하여 만들어지는 물질을 의미하는 것으로서, 그 종류는 특별히 제한되지 않으며, 자연적 또는 비자연적(예컨대, 합성적 또는 재조합적)으로 얻어질 수 있다. 항체는 생체 외뿐 아니라 생체 내에서도 매우 안정하고 반감기가 길기 때문에 대량 발현 및 생산에 유리하다. 또한, 항체는 본질적으로 다이머(dimer) 구조를 가지므로 접착능(avidity)이 매우 높다. 완전한 항체는 2개의 전장(full length) 경쇄 및 2개의 전장 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합으로 연결되어 있다. 항체의 불변 영역은 중쇄 불변 영역과 경쇄 불변 영역으로 나뉘어지며, 중쇄 불변 영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고, 서브클래스로 감마1($\gamma 1$), 감마2($\gamma 2$), 감마3($\gamma 3$), 감마4($\gamma 4$), 알파1($\alpha 1$) 및 알파2($\alpha 2$)를 가진다. 경쇄의 불변 영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.
- [0078] 본 발명에서 용어, "중쇄(heavy chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위해 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 V_H 및 3개의 불변 영역 도메인 C_{H1} , C_{H2} 및 C_{H3} 과 힌지(hinge)를 포함하는 전장 중쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다. 또한, 용어 "경쇄(light chain)"는 항원에 특이성을 부여하기 위해 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 V_L 및 불변 영역 도메인 C_L 을 포함하는 전장 경쇄 및 이의 단편을 모두 포함하는 의미로 해석된다.
- [0079] 본 발명에서 용어, "가변 영역(variable region) 또는 가변 부위 (variable domain)"는 항원과 특이적으로 결합하는 기능을 수행하면서 서열상의 많은 변이를 보이는 항체 분자의 부분을 의미하고, 가변 영역에는 상보성 결정 영역인 CDR1, CDR2 및 CDR3가 존재한다. 상기 CDR 사이에는 프레임 워크 영역(framework region, FR) 부분이 존재하여 CDR 고리를 지지해주는 역할을 한다. 상기 "상보성 결정 영역"은 항원의 인식에 관여하는 고리 모양의 부위로서 이 부위의 서열이 변함에 따라 항체의 항원에 대한 특이성이 결정된다.
- [0080] 본 발명에서 사용되는 용어 "scFv(single chain fragment variable)"는 유전자 재조합을 통해 항체의 가변영역만을 발현시켜 만든 단쇄항체를 말하며, 항체의 V_H 영역과 V_L 영역을 짧은 펩티드 사슬로 연결한 단일쇄 형태의 항체를 말한다. 상기 용어 "scFv"는 달리 명시되지 않거나, 문맥상 달리 이해되는 것이 아니라면, 항원 결합 단편을 비롯한 scFv 단편을 포함하고자 한다. 이는 통상의 기술자에게 자명한 것이다.
- [0081] 본 발명에서 용어, "상보성결정영역(complementarity determining region, CDR)"은 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 고가변 영역(hypervariable region)의 아미노산 서열을 의미한다. 중쇄 및 경쇄는 각각 3개의 CDR을 포함할 수 있다 (CDRH1, CDRH2, CDRH3 및 CDRL1, CDRL2, CDRL3). 상기 CDR은 항체가 항원 또는 항원결정부위에 결합하는 데 있어서 주요한 접촉 잔기를 제공할 수 있다.

- [0082] 본 발명에서, 용어, "특이적으로 결합" 또는 "특이적으로 인식"은 당업자에게 통상적으로 공지되어 있는 의미와 동일한 것으로서, 항원 및 항체가 특이적으로 상호작용하여 면역학적 반응을 하는 것을 의미한다.
- [0083] 본 발명에서 용어, "항원결합단편"은 면역글로불린 전체 구조에 대한 그의 단편으로, 항원이 결합할 수 있는 부분을 포함하는 폴리펩타이드의 일부를 의미한다. 예를 들어, scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab' 또는 F(ab')₂ 일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 항원결합단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(C_{H1})을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 C_{H1} 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 당업계에 널리 공지되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변 부위와 경쇄 가변 부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 단쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 상기 링커는 1 내지 100개 또는 2 내지 50개의 임의의 아미노산으로 이루어진 펩타이드 링커일 수 있으며, 당업계에 적절한 서열이 알려져 있다. 상기 항원결합단편은 단백질 가수분해 효소를 이용하여 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.
- [0084] 본 발명에서 용어 "힌지 영역(hinge region)"은 항체의 중쇄에 포함되어 있는 영역으로서, C_{H1} 및 C_{H2} 영역 사이에 존재하며, 항체 내 항원 결합 부위의 유연성(flexibility)을 제공하는 기능을 하는 영역을 의미한다. 예컨대, 상기 힌지는 인간 항체로부터 유래한 것일 수 있으며, 구체적으로, IgA, IgE, 또는 IgG, 예컨대, IgG1, IgG2, IgG 3, 또는 IgG4로부터 유래한 것일 수 있다.
- [0086] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 및 Fc 알파 수용체 이외의 표적 항원에 결합하는 부분을 포함하는 이중특이적 또는 다중특이적 항체에 관한 것이다.
- [0087] 일 구현예에서, 표적 항원에 결합하는 부분이 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 포함할 수 있으며, 면역학적 활성을 가진 단편은 Fab, Fd, Fab', dAb, F(ab'), F(ab')₂, scFv, Fv, 단일쇄 항체, Fv 이량체, 상보성 결정 영역 단편, 인간화 항체, 키메라 항체 및 디아바디(diabody)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있고, scFv 또는 Fab인 것이 더욱 바람직하다.
- [0088] 일 구현예에서, 표적 항원은 17-1A 항원, GD3 갱글리오시드 R24, EGFRvIII, PSMA, PSCA, HLA-DR, EpCAM, MUC1 코어 단백질, 이상 글리코실화 MUC1, ED-B 도메인을 함유하는 피브로넥틴 이형, HER2/neu, 암종배아성 항원(CEA), 가스트린-방출 펩티드(GRP) 수용체 항원, 뮤신(mucine) 항원, 표피 성장 인자 수용체(EGF-R), HER3, HER4, MAGE 항원, SART 항원, MUC1 항원, c-erb-2 항원, TAG 72, 탄산 무수화효소 IX(carbonic anhydrase IX), 알파-태아단백질(alpha-fetoprotein), A3, A33 항체에 특이적인 항원, Ba 733, BrE3-항원, CA125, CD1, CD1a, CD3, CD5, CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD33, CD38, CD40, CD45, CD52, CD74, CD79a, CD80, CD138, 결합-특이적 항원-p(CSAp), CSAp, EGP-1, EGP-2, Ep-CAM, Flt-1, Flt-3, 폴산염 수용체(folate receptor), HLA-DR, 인간 융모성 성선자극호르몬(HCG) 및 그 소단위체들, 저산소증 유도 인자(HIF-1), Ia, IL-2, IL-6, IL-8, 인슐린 성장 인자-1(IGF-1), KC4-항원, KS-1-항원, KS1-4, Le-Y, 대식세포 억제 인자(MIF), MAGE, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, NCA66, NCA95, NCA90, PAM-4 항체에 특이적인 항원, 태반 성장 인자, p53, 전립선 산성 포스파타제(prostatic acid phosphatase), PSA, RS5, S100, TAC, 테나신(tenascin), TRAIL 수용체들, Tn 항원, 톰슨-프리덴라이히(Thomson-Friedenreich) 항원들, 종양 괴사 항원들, VEGF, ED-B 피브로넥틴(fibronectin), 혈관형성 표지(angiogenesis marker), 종양유전자 표지(oncogene marker) 또는 종양유전자 생성물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 종양유전자는 아포토시스(Apoptosis) 관련 유전자, 전사인자(Transcription Factor) 유전자, 전이(Metastasis) 관련 유전자, 혈관신생(Angiogenesis) 관련 유전자 또는 티로신-카이네이즈(Tyrosine-Kinase) 유전자일 수 있다.
- [0089] 일 구현예에서, 상기 아포토시스 관련 유전자는 ABL1, AKT1, AKT2, BARD1, BAX, BCL11B, BCL2, BCL2A1, BCL2L1, BCL2L12, BCL3, BCL6, BIRC2, BIRC3, BIRC5, BRAF, CARD11, CAV1, CBL, CDC25A, CDKN1A, CFLAR, CNR2, CTNNB1, CUL4A, DAXX, DDIT3, E2F1, E2F3, E2F5, ESPL1, FOXO1, HDAC1, HSPA5, IGF1R, IGF2, JUN,

JUNB, JUND, MALT1, MAP3K7, MCL1, MDM2, MDM4, MYB, MYC, NFKB2, NPM1, NTRK1, PAK1, PAX3, PML, PRKCA, PRKCE, PTK2B, RAF1, RHOA, TGFB1, TNFRSF1B, TP73, TRAF6, YWHAG, YWHAQ 또는 YWHAZ일 수 있으며; 상기 전사 인자 유전자는 AR, ARID3A, ASCL1, ATF1, ATF3, BCL11A, BCL11B, BCL3, BCL6, CDC5L, CDX2, CREB1, CUX1, DDIT3, DLX5, E2F1, E2F3, E2F5, ELF4, ELK1, ELK3, EN2, ERG, ETS1, ETS2, ETV1, ETV3, ETV4, ETV6, FEV, FEZF1, FLI1, FOS, FOSL1, FOXA1, FOXG1, FOXM1, FOXO1, FOXP1, FOXQ1, GATA1, GATA6, GFI1, GFI1B, GLI1, GLI2, GLI3, HES6, HHEX, HLF, HMGA1, HMGA2, HOXA1, HOXA9, HOXD13, HOXD9, ID1, ID2, IKZF1, IRF2, IRF4, JUN, JUNB, JUND, KAT6A, KDM2A, KDM5B, KLF2, KLF4, KLF5, KLF6, KLF8, KMT2A, LEF1, LHX1, LMX1B, MAF, MAFA, MAFB, MBD1, MECOM, MEF2C, MEIS1, MITF, MYB, MYC, MYCL, MYCN, NANOG, NCOA3, NFIB, NFKB2, NKX2-1, OTX2, PATZ1, PAX2, PAX3, PAX4, PAX8, PBX1, PBX2, PITX2, PLAG1, PLAGL2, PPARG, PPP1R13L, PRDM10, PRDM13, PRDM14, PRDM15, PRDM16, PRDM6, PRDM8, PRDM9, RARA, REL, RERE, RUNX1, RUNX3, SALL4, SATB1, SFPQ, SIX1, SNAI1, SOX2, SOX4, SPI1, SREBF1, STAT3, TAF1, TAL1, TAL2, TBX2, TBX3, TCF3, TFCP2, TFE3, THRA, TLX1, TP63, TP73, TWIST1, WT1, YBX1, YY1, ZBTB16, ZBTB7A, ZIC2, ZNF217 또는 ZNF268일 수 있고; 상기 전이 관련 유전자는 AKT1, AKT2, AR, CBL, CDH1, CRK, CSF1, CTNNB1, CTTN, CXCR4, EGFR, FGFR1, FLT3, FYN, GLI1, ILK, ITGA3, JAK2, MET, PDGFRB, PLXNB1, PRKCI, PTCH1, PTPN11, RAC1, RHOA, RHOC, ROCK1, SMO, SNAI1, SRC, TCF3 또는 WT1일 수 있으며; 상기 혈관신생 관련 유전자는 BRAF, CAV1, CTGF, EGFR, ERBB2, ETS1, FGF4, FGF6, FGFR1, FGFR3, FGFR4, ID1, NRAS, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB 또는 SPARC일 수 있고; 상기 티로신-카 이네이즈 유전자는 ABL1, ABL2, ALK, AXL, BLK, EGFR, EPHA2, ERBB2, ERBB3, ERBB4, FES, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FGR, FLT3, FYN, ITK, JAK1, JAK2, KIT, LCK, MERTK, MET, MST1R, NTRK1, NTRK3, PDGFRA, PDGFRB, PTK2B, PTK7, RET, ROS1, SRC, SYK, TEC 또는 YES1일 수 있다.

[0090]

일 구현예에서, 종양유전자는 SEPTIN9, ACOD1, ACTN4, ADAM28, ADAM9, ADGRF1, ADRBK2, AFF1, AFF3, AGAP2, AGFG1, AGRN, AHCYL1, AHI1, AIMP2, AKAP13, AKAP9, AKIRIN2, AKTIP, ALDH1A1, ALL1, ANIB1, ANP32C, ANP32D, AQP1, ARAF, ARHGEF1, ARHGEF2, ARHGEF5, ASPSCR1, AURKA, BAALC, BAIAP2L1, BANP, BCAR4, BCKDHB, BCL9, BCL9L, BCR, BMI1, BMP7, BOC, BRD4, BRF2, CABIN1, CAMK1D, CAPG, CBF, CBLB, CBLL1, CBX7, CBX8, CCDC28A, CCDC6, CCNB1, CCNB2, CCND1, CCNE1, CCNL1, CD24, CDC25C, CDC6, CDH17, CDK1, CDK14, CDK4, CDK5R2, CDK6, CDK8, CDKN1B, CDKN3, CDON, CEACAM6, CENPW, CHD1L, CHIC1, CHL1, CKS1B, CMC4, CNTN2, COPS3, COPS5, CRKL, CRLF2, CROT, CRTC1, CRYAB, CSF1R, CSF3, CSF3R, CSNK2A1, CSNK2A2, CT45A1, CTBP2, CTNND2, CTSZ, CUL7, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CYGB, CYP24A1, DCD, DCUN1D1DB2, DDHD2, DDX6, DEK, DIS3, DNPH1, DPPA2, DPPA4, DSG3, DUSP12, DUSP26, ECHS1, ECT2, EEF1A1, EEF1A2, EEF1D, EIF3E, EIF3I, EIF4E, EIF5A2, ELAVL1, ELL, EML4, EMSY, ENTPD5, EPCAM, EPS8, ERAS, ERGIC1, ERVW-1, EVI2A, EVI5, EWSR1, EZH2, FAM189B, FAM72A, FAM83D, FASN, FDPS, FGF10, FGF3, FGF5, FGF8, FR1OP, FHL2, FIP1L1, FNDC3B, FRAT1, FUBP1, FUS, FZD2, GAB2, GAEC1, GALNT10, GALR2, GLO1, GMNN, GNA12, GNA13, GNAI2, GNAQ, GNAS, GOLPH3, GOPC, GPAT4, GPM6A, GPM6B, GPR132, GREM1, GRM1, GSK3A, GSM1, H19, HAS1, HAX1, HDGFRP2, HMG5, HNRNPA1, HOTAIR, HOTTIP, HOXA-AS2, HRAS, HSPA1A, HSPA4, HSPB1, HULC, IDH1, IFNG, IGF2BP1, IKBKE, IL7R, INPPL1, INTS1, INTS2, INTS3, INTS4, INTS5, INTS7, INTS8, IRS2, IST1, JUP, KDM4C, KIAA0101, KIAA1524, KIF14, KRAS, KSR2, LAMTOR5, LAPTM4B, LCN2, LDHB, LETMD1, LIN28A, LIN28B, LMO1, LMO2, LMO3, LMO4, LSM1, LUADT1, MACC1, MACROD1, MAGEA11, MALAT1, MAML2, MAP3K8, MAPRE1, MAS1, MCC, MCF2, MCF2L, MCTS1, MEFV, MFHAS1, MFNG, MIEN1, MINA, MKL2, MLANA, MLLT1, MLLT11, MLLT3, MLLT4, MMP12, MMS22L, MN1, MNAT1, MOS, MPL, MPST, MRAS, MRE11A, MSI1, MTCP1, MTDH, MTOR, MUC1, MUC4, MUM1, MYD88, NAAA, NANOGP8, NBPF12, NCOA4, NEAT1, NECTIN4, NEDD4, NEDD9, NET1, NINL, NME1, NOTCH1, NOTCH4, NOV, NSD1, NUA2, NUP214, NUP98, NUTM1, OLR1, PA2G4, PADI2, PAK7, PARK7, PARM1, PBK, PCAT1, PCAT5, PDGFA, PDZK1IP1, PELP1, PFN1P3, PIGU, PIK3CA, PIK3R1, PIM1, PIM2, PIM3, PIR, PIWIL1, PLAC8, PLK1, PPM1D, PPP1R10, PPP1R14A, PPP2R1A, PRAME, PRDM12, PRMT5, PSIP1, PSMD10, PTCH2, PTMA, PTP4A1, PTP4A2, PTP4A3, PTTG1, PTTG1IP, PTTG2, PVT1, RAB11A, RAB18, RAB22A, RAB23, RAB8A, RALGDS, RAP1A, RASSF1, RBM14, RBM15, RBM3, RBMY1A1, RFC3, RGL4, RGR, RHO, RING1, RINT1, RIT1, RNF43, RPL23, RRAS, RRAS2, RSF1, RUNX1T1, S100A4, S100A7, S100A8, SAG, SART3, SBSN, SEA, SEC62, SERTAD1, SERTAD2, SERTAD3, SET, SETBP1, SETDB1, SGK1, SIRT1, SIRT6, SKI, SKIL, SKP2, SLC12A5, SLC3A2, SMR3B, SMURF1, SNG, SNORA59A, SNORA80E, SPAG9, SPATA4, SPRY2, SQSTM1, SRSF1, SRSF2, SRSF3, SRSF6, SS18, SSX1, SSX2, SSX2B, STIL, STMN1, STRA6, STYK1, SUZ12, SWAP70, SYT1, TAC1, TACSTD2, TAF15, TALDO1, TAZ, TBC1D1, TBC1D15, TBC1D3, TBC1D3C, TBC1D7, TCL1A, TCL1B, TCL6, TCP1, TFG, TGM3, TINCR, TKTL1, TLE1, TMEM140, TMPOP2, TMPRSS2, TNS4, TPD52, TPR, TRE17, TREH, TRIB1, TRIB2, TRIM28, TRIM32, TRIM8, TRIO, TRIP6, TSPAN1, TSPY1, TXN, TYMS, TYRP1, UBE2C, UBE3C, UCA1, UCHL1, UHRF1, URI1, USP22,

USP4, USP6, VAV1, VAV2, VAV3, VIM, WAPL, WHSC1, WHSC1L1, WISP1, WNT1, WNT10A, WNT10B, WNT2, WNT3, WNT5A, WWTR1, XCL1, XIAP, YAP1, YEATS4, YY1AP1, ZEB1-AS1, ZFAND4, ZFAS1, ZMYM2, ZNF703 또는 ZNHIT6일 수 있다.

[0091] 일 구현예에서, 표적 항원은 세포 표면 항원 또는 자가항원일 수 있으며, 세포 표면 항원은 CEA, ED-B 피브로넥틴, CD20, CD22, CD19, EGFR, IGF1R, VEGFR1/Flt-1, VEGFR2/KDR, VEGFR3/Flt-4, HER2/neu, CD30, CD33, CD3, CD16, CD64, CD89, CD2, 아데노바이러스 섬유 농, PfMSP-1, HN/NDV, EpCAM/17-1A, hTR, IL-2R/Tac, CA19-9, MUC1, HLA 클래스 II, GD2, G250, TAG-72, PSMA, CEACAM6, HMWMAA, CD40, M13 외피 단백질 및 GPIIb/IIIa로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0092] 일 구현예에서, 표적 항원은 HER-2일 수 있으며, 표적 항원을 특이적으로 인식하는 부위는 트라스트주맙에서 유래할 수 있다.

[0093] 본 발명의 트라스트주맙은 뮤린 HER2 항체 4D5의 재조합 인간화된 버전 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, 트라스트주맙 또는 헤르셉틴(HERCEPTIN)®; 미국 특허 제5,821,337호)은 HER2를 과다발현하는 전이성 유방암 환자에서 임상적으로 활성을 띤다 (문헌 [Baselga et al., J. Clin. Oncol. 14:737-744(1996)]). 트라스트주맙은 그의 중앙이 HER2 단백질을 과다발현하는 전이성 유방암 환자의 치료를 위해 1998년 9월 25일자로 식품 의약국에서 시판을 승인받았다.

[0094] 본 발명에서는 HER-2에 특이적으로 인식하는 부위는 트라스트주맙 외 다른 공지된 항체 또는 이의 단편을 이용 가능하다.

[0096] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 본 발명의 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 코딩하는 단리된 핵산 분자, 이를 포함하는 벡터, 및 이로 형질전환된 숙주 세포에 관한 것이다.

[0097] 본 발명의 핵산 분자는 단리된 것이거나 재조합된 것일 수 있으며, 단일쇄 및 이중쇄 형태의 DNA 및 RNA뿐만 아니라 대응하는 상보성 서열이 포함된다. 단리된 핵산은 천연 생성 원천에서 단리된 핵산의 경우, 핵산이 단리된 개체의 게놈에 존재하는 주변 유전 서열로부터 분리된 핵산이다. 주형으로부터 효소적으로 또는 화학적으로 합성된 핵산, 예컨대 PCR 산물, cDNA 분자, 또는 올리고뉴클레오타이드의 경우, 이러한 절차로부터 생성된 핵산이 단리된 핵산분자로 이해될 수 있다. 단리된 핵산분자는 별도 단편의 형태 또는 더 큰 핵산 구축물의 성분으로서의 핵산 분자를 나타낸다. 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 작동가능하게 연결된다. 예를 들면, 전서열 또는 분비 리더(leader)의 DNA는 폴리펩타이드가 분비되기 전의 형태인 전단백질(preprotein)로서 발현되는 경우 폴리펩타이드의 DNA에 작동가능하게 연결되고, 프로모터 또는 인핸서는 폴리펩타이드 서열의 전사에 영향을 주는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되며, 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 촉진하도록 배치될 때 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로 작동가능하게 연결된 연결된 DNA 서열들이 인접하여 위치함을 의미하며, 분비 리더의 경우 인접하여 동일한 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나 인핸서는 인접하여 위치할 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커를 통상적인 방법에 따라 사용한다.

[0098] 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 본 발명의 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 코딩하는 단리된 핵산 분자는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 항체를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 코딩영역으로부터 발현되는 항체의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고, 코딩영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있으며, 그러한 변형 유전자 역시 본 발명의 범위에 포함됨을 당업자는 잘 이해할 수 있을 것이다. 즉, 본 발명의 핵산 분자는 이와 동등한 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 한, 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 이들 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 이러한 핵산 분자의 서열은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자 또는 RNA(mRNA)분자일 수 있다.

[0099] 본 발명에 따른 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 본 발명의 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 코딩하는 단리된 핵산 분자는 단백질 발현을 위해 발현벡터에 삽입될 수 있다. 발현벡터는, 통상 조절 또는 제어 (regulatory) 서열, 선별마커, 임의의 융합 파트너, 및/또는 추가적 요소와 작동가능하게 연결된, 즉, 기능적 관계에 놓인 단백질을 포함한다. 적절한 상태에서, 핵산으로 형질전환된 숙주세포, 바람직하게

는, 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 본 발명의 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 코딩하는 단리된 핵산 분자 함유 발현벡터를 배양하여 단백질 발현을 유도하는 방법에 의해 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 또는 본 발명의 이중특이적 또는 다중특이적 항체가 생산될 수 있다. 포유류 세포, 박테리아, 곤충 세포, 및 효모를 포함하는 다양한 적절한 숙주세포가 사용될 수 있으나, 이에 제한하는 것은 아니다. 외인성 핵산을 숙주세포에 도입하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 사용되는 숙주세포에 따라 달라질 것이다. 바람직하게는, 생산비가 저렴하여 산업적 이용가치가 높은 대장균을 숙주세포로 생산할 수 있다.

[0100] 본 발명의 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 상기 시그널 서열에는 숙주가 에셰리키아속(*Escherichia* sp.)균인 경우에는 PhoA 시그널 서열, OmpA 시그널 서열 등이, 숙주가 바실러스속(*Bacillus* sp.)균인 경우에는 α -아밀라아제 시그널 서열, 서브틸리신 시그널 서열 등이, 숙주가 효모(*yeast*)인 경우에는 MF α 시그널 서열, SUC2 시그널 서열 등이, 숙주가 동물세포인 경우에는 인슐린 시그널 서열, α -인터페론 시그널 서열, 항체 분자 시그널 서열 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함할 수 있고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.

[0101] 본 발명에서 용어, "벡터"는 핵산 서열을 복제할 수 있는 세포로의 도입을 위해서 핵산 서열을 삽입할 수 있는 전달체를 의미한다. 핵산 서열은 외생 (exogenous) 또는 이종 (heterologous)일 수 있다. 벡터로서는 플라스미드, 코즈미드 및 바이러스(예를 들면 박테리오파지)를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 당업자는 표준적인 재조합 기술에 의해 벡터를 구축할 수 있다(Maniatis, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; 및 Ausubel et al., In: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994 등).

[0102] 일 구현예에서, 상기 벡터의 제작 시, 상기 항체를 생산하고자 하는 숙주세포의 종류에 따라 프로모터(promoter), 종결자(terminator), 인핸서(enhancer) 등과 같은 발현조절 서열, 막 표적화 또는 분비를 위한 서열 등을 적절히 선택하고 목적에 따라 다양하게 조합할 수 있다.

[0103] 본 발명에서, 용어 "발현 벡터"는 전사되는 유전자 산물 중 적어도 일부분을 코딩하는 핵산 서열을 포함한 벡터를 의미한다. 일부의 경우에는 그 후 RNA 분자가 단백질, 폴리펩타이드, 또는 펩타이드로 번역된다. 발현 벡터에는 다양한 조절서열을 포함할 수 있다. 전사 및 번역을 조절하는 조절서열과 함께 벡터 및 발현 벡터에는 또 다른 기능도 제공하는 핵산 서열도 포함될 수 있다.

[0104] 본 발명에서, 용어 "숙주세포"는 진핵생물 및 원핵생물을 포함하며, 상기 벡터를 복제할 수 있거나 벡터에 의해 코딩되는 유전자를 발현할 수 있는 임의의 형질 전환 가능한 생물을 의미한다. 숙주세포는 상기 벡터에 의해 형질감염(transfected) 또는 형질전환(transformed) 될 수 있으며, 이는 외생의 핵산분자가 숙주세포 내에 전달되거나 도입되는 과정을 의미한다.

[0105] 일 구현예에서, 상기 숙주 세포는 박테리아 또는 동물세포일 수 있으며, 동물 세포주는 CHO 세포, HEK 세포 또는 NSO 세포일 수 있고, 박테리아는 대장균일 수 있다.

[0106] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 및 Fc 알파 수용체 이외의 표적 항원에 결합하는 부분을 포함하는 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 유효성분으로 포함하는 암, 자가면역 질환, 퇴행성신경 질환(neurodegenerative disease), 알츠하이머병, 대사 질환(metabolic disease), 심혈관 질환(cardiovascular disease), 죽상동맥경화증(atherosclerosis), 기관 이식 거부반응, 진균, 바이러스, 박테리아 또는 기생충에 의하여 유발되는 질환 또는 증상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질병 또는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0107] 일 구현예에서, 상기 암은 뇌종양, 흑색종, 골수종, 비소세포성폐암, 구강암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종,

척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

- [0108] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 질병 또는 질환의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0109] 본 발명에서 사용된 용어 "치료"란 본 발명에 따른 조성물의 투여로 질병 또는 질환 및 이로 인한 합병증의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.
- [0110] 본 발명에서 유효성분과 결합하여 사용된 "치료학적으로 유효한 양"이란 용어는 질병 또는 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 양을 의미하며, 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack PublishingCo.에 기술되어있다.
- [0111] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 질병 또는 질환의 종류, 질병 또는 질환의 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0112] 본 발명의 약학적 조성물은 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 파립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack PublishingCompany, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0113] 일 구현예에서, 상기 약학적 조성물은 경구형 제형, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 및 분무제를 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있으며, 경구형 또는 주사 제형이 더욱 바람직하다.
- [0114] 본 발명에서 사용되는 용어, "투여"란, 임의의 적절한 방법으로 개체 또는 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 주사 제형으로 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다. 본 발명의 약학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제 (예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레

술, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있다.

[0115] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란, 상기 질병 또는 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 박쥐, 낙타, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함한 모든 동물을 의미하고, "검체"란 이로부터 분리한 비말, 가래, 전혈, 혈장, 혈청, 뇨 또는 타액일 수 있다.

[0116] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0117] 일 측면에서, 본 발명은 검체로부터 분리된 시료를 본 발명의 이중특이적 또는 다중특이적 항체와 접촉시켜 항원-항체 복합체를 형성시키는 단계; 및 상기 복합체의 형성을 검출하는 단계를 포함하는, 암, 자가면역 질환, 퇴행성신경 질환, 알츠하이머병, 대사 질환, 심혈관 질환, 죽상동맥경화증, 기관 이식 거부반응, 진균, 바이러스, 박테리아 또는 기생충에 의하여 유발되는 질환 또는 증상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질병 또는 질환의 진단에 관한 정보를 제공하는 방법.

[0118] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 코딩하는 단리된 핵산 분자를 포함하는 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 숙주 세포 배양물로부터 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 회수하는 단계를 포함하는 Fc 알파 수용체에 특이적인 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0119] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 코딩하는 단리된 핵산 분자를 포함하는 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 숙주 세포 배양물로부터 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 회수하는 단계를 포함하는 Fc 알파 수용체 및 Fc 알파 수용체 이외의 표적 항원에 결합하는 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0121] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0123] 실시예 1. Fc 알파 수용체를 이용한 항원 제작

[0124] Fc 알파 수용체와 결합하여 효과기 기능(effector function)을 갖는 IgG를 발굴하기 위하여 Fc 알파 수용체의 세포외부영역(Extra Cellular Domain, ECD)을 항원으로 준비하였다. 또한, 유세포 분리기를 이용하여 항체를 스크리닝하기에 적합한 항원을 제작하고자 GST(Glutathione-S-transferase) 태그를 융합(fusion)한 이합체(dimeric) 형태 및 스트렙타비딘(Streptavidin) 태그를 융합한 사합체(tetrameric) 형태의 항원을 생산할 동물 세포 발현용 벡터를 제작하였다 (도 1). 그 후, 2×10^6 cells/ml의 밀도로 하루 동안 배양한 Expi293F 세포에 PEI (Polyscience, 23966)을 이용하여 트랜스펙션하였다. 그 후 진탕배양기에서 37°C, 125 rpm 및 8 % CO₂의 조건으로 7일간 배양한 후 원심 분리하여 상등액만 취하였다. 상등액을 25x PBS를 이용해 평형을 맞춘 뒤 바틀 탭 필터를 이용해 0.2 µm 필터 (Merck Millipore)로 여과하였다. 여과된 배양액에 각각 GSH 레진(resin) 및 Ni-NTA 레진 1 ml를 넣어 주고 4 °C에서 16 시간 교반한 뒤 컬럼을 통해 레진을 회수 한 후 5 ml PBS로 세척하고 pH 8.0의 50 mM Tris-HCl & 10 mM 환원된 글루타치온 (SIGMA) 4 ml와 250 mM 이미다졸로 용출하였다. Centrifugal filter units 3K (Merck Millipore)을 사용하여 PBS로 버퍼 교체한 후 SDS-PAGE를 통해 각각 정제된 2종 항원 단백질 (GST-ECD 및 스트렙타비딘-ECD)의 크기와 순도를 분석하였다 (도 1).

[0126] 실시예 2. 초고속 탐색 시스템을 이용한 인간 항체 스크리닝

[0127] 유세포 분리기를 이용한 스크리닝에 이용하기 위해 상기 실시예에서 준비한 항원 단백질 중 스트렙타비딘이 용

합된 항원 단백질에 Alexa488 형광분자를 표지화하였다. 이 후, 본 발명자들이 구축한 박테리아 디스플레이된 인간 scFv 항체 라이브러리를 이용하여 Fc 알파 수용체의 ECD 영역에 결합하는 인간 항체 스크리닝을 진행하였다. 구체적으로, 라이브러리 세포 1 ml을 2% 글루코스 및 40 µg/ml의 클로람페니콜(chloramphenicol)이 포함된 25 ml TB 배지에서 37℃에서 250 rpm으로 4시간 배양한 뒤, 배양된 세포를 40 µg/ml의 클로람페니콜이 포함된 100 ml의 TB 배지에 1:100 비율로 OD600=0.5까지 배양하고 20분간 25℃ 및 250 rpm에서 쿨링(cooling)한 후 1 mM IPTG를 첨가하여 25℃ 및 250 rpm로 5시간 동안 인덕션(Induction)하여 단백질이 과발현된 대장균을 OD600=8을 기준으로 수득(harvest)하였다. 세포들을 유세포 분리기를 이용한 스크리닝에 적합한 스페로플라스트(spheroplasts) 형태로 만들기 위해 세포를 1ml의 10Mm Tris-HCl (pH 8.0)을 사용하여 채부유하여 2번 세척하여 잔여 배지를 제거한 뒤, 1 ml의 STE [0.5 M sucrose, 10 Mm Tris-HCl 및 10 Mm EDTA (pH 8.0)] 용액에서 37℃로 30분간 로테이션하여 삼투압 충격(osmotic shock)을 주는 방법으로 세포 외막을 제거하였다. 그 후 1 ml의 Solution A 및 50 mg/ml lysozyme solution 20 µl를 혼합한 용액에서 37℃로 15분간 로테이션하여 펩티도글리칸(peptidoglycan) 층을 제거하였고 1 ml의 PBS로 세척한 뒤 300 µl를 700 µl의 PBS와 200 nM (monomer 기준)의 Fc 알파 수용체-ECD-스트렙타비딘-Alexa488 프로브를 넣고 상온에서 1시간 동안 로테이션하여 스페로플라스트에 형광 프로브를 표지하였다. 이 후 항원 결합력 증가로 높은 형광을 보이는 클론들을 유세포분리기를 이용하여 회수하였으며, 회수된 클론들에서 scFv 유전자들을 PCR방법으로 증폭하고, 배양, 발현유도, 세포외막 및 펩티도글리칸 층을 제거하는 스페로플라스팅(spheroplasting) 과정, 항원 표지 및 유세포 분석의 선택적인 게이팅(gating)을 통해 Fc 알파 수용체-ECD 영역에 높은 친화도를 보이는 스페로플라스트들을 선별하는 과정을 반복하였다. 유세포 분석기를 이용한 선별 과정 및 선별 순도(purity)를 높이기 위한 재선별 과정 후에, 농축 과정, PCR 증폭을 통한 선별된 scFv 변이체 유전자 확보 과정, 서브클로닝 과정, 및 트랜스포메이션 과정을 거치고, 원하는 클론들을 증폭(enrich)하기 위해 다음 라운드의 선별 과정을 수행하였다 (도 2). 이와 같은 반복되는 여러 회차(round)의 탐색 과정으로 Fc 알파 수용체-ECD 영역에 결합력이 우수한 scFv 변이체 클론들을 확보하였다.

[0129] 실시예 3. Fc 알파 수용체 결합 항체 변이체들의 유전자 서열 확인

[0130] 상기 실시예 2에서 확보한 scFv 변이체 클론들의 유전자 서열을 확인하기 위하여 Sanger sequencing으로 DNA 염기 서열을 분석하였으며, 분석을 통해 항체 서열을 갖는 scFv 항체 변이체 6종 JSA-9, JSA-19, JSA-30, JSA-40, JSA-41 및 JSA-48을 선별하였다 (도 3). 또한, 상기 6종의 scFv 변이체들의 VH 및 VL 아미노산 서열과 각 변이체들의 VH의 FR1, CDRH1, FR2, CDRH2, FR3, CDRH3 및 FR4의 아미노산 서열 및 VL의 FR1, CDRL1, FR2, CDRL2, FR3, CDRL3 및 FR4의 아미노산 서열을 확인하였다(표 1).

표 1

변이체의 부분 서열			
VH	변이체 번호	서열	서열번호
FR1	9	EVQLVGGGVVQPGRLRLSCAAS	27
	30, 41	EVQLVESGPGQVKPSETLSLTCSVS	28
	19, 40	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLACAGS	29
	48	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCAGS	30
CDRH1	9	GFNFDDHA	1
	30, 41	GGSISSRDW	2
	19, 40, 48	GFTFSNFA	3
FR2	9	MHWVRQAPGKGLEWVSS	31
	30, 41	WGWVRQPPGEGLEWIGE	32
	19	MAWVRQAPGKGLEWVSG	33
	40, 48	MAWVRLAPGKGLEWVSG	34
CDRH2	9	ISGSGGDT	4
	30, 41	IYHSGTT	5
	19, 40, 48	ISDDGTIT	6
FR3	9	YYADSVKGRFTIARDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	35
	30, 41	NYNPSLKSRTVMSMDTSKNQLSLKLTGVTAVDTAVYYC	36

	19, 40, 48	DYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	37
CDRH3	9	ATEARGLAH	7
	30	VTYSASDAAFDS	8
	41	VTYSAYDAAFDS	9
	19	VKVPSPAPMQGPDH	10
	40, 48	VKVPSPAPMQGPDY	11
FR4	9, 30, 41, 19, 40, 48	WGQGTILTVSS	38
VL			
FR1	9	SSELTQDPAVSVALGQTASITCSGH	39
	30, 41	ETTLTQSPSSLSASVGDRITITCRAS	40
	19	QSALTQPPSASGTPGQRTITCSGS	41
	40	DVVMTQSPSAMSASVGDRVTITCRAS	42
	48	ETTLTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS	43
CDRL1	9	KLGERYACWY	12
	30	QSISTCLNWF	13
	41	QSISTYLSWY	14
	19	SSNIGSNTVNRV	15
	40	QGISNYLAWF	16
	48	QSISTYLNWF	17
FR2	9	QKPGQSPVLVIY	44
	30, 41, 48	QKPGKAPKSLIY	45
	19	QQLPGTAPKLLIY	46
	40	QKPGKVPKRLIY	47
CDRL2	9	QDTRKPSGI	18
	30	GASILQSGVS	19
	41, 48	GASNLQSGVS	20
	19	SDNQRPSGVP	21
	40	AASSLQSGVP	22
FR3	9	PERFSGSNTGNTATLTITGTQAMDEADYYC	48
	30	SQFSGSGPGTDFTLTIGSLQPEGFATYYC	49
	41	SQFRGSGPGTDFTLTISLQPEDFATYYC	50
	19	DRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC	51
	40	SRFRGRSGTDFTLTISLQSEDFATYYC	52
	48	SQFSGRSGPGTDFTLTISLQPEDFATYYC	53
CDRL3	9	QAWDSSTVV	23
	30, 41, 48	QQGNSVPLT	24
	19	AVWDDSLNGPGYV	25
	40	QQYHSYPLT	26
FR4	9	FGGGTKLTVLG	54
	30, 41, 48	FGGGTKVDIKR	55
	19	FGTGTKVEIKR	56
	40	FGGGTKLSVLG	57
변이체 전체 서열, VH 및 VL 서열			
JSA-9	VH _EVQLVGGSGGVVQGRSLRLSCAAS~GFNFDHA~~MHVVRQAPGKGLEWVSS~ISGSGGDT~YYADSVKGRF TIARDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC~ATEARGLAH~~~~WGQGTILTVSS VL _SSELTQDPAVSVALGQTASITCSGH~~KLGERYACWY~~~QKPGQSPVLVIY~~~QDTRKPSGI~~~PERF SGSNTGNTATLTITGTQAMDEADYYC~~~QAWDSSTVV~~FGGGTKLTVLG		58, 59
JSA-30	VH _EVQLVESGPGQVKPSETLSLTCSVS~GGSISSRDW~WGVRQPPGEGLEWIGE~IYHSGT~NYPNLSKSRV TMSMDTSKNQLSLKLTGVTAVDTAVYYC~VTYSASDAAFDS~~WGQGTILTVSS VL _ETTLTQSPSSLSASVGDRITITCRAS~QSISTCLNWF~~~QKPGKAPKSLIY~~~GASILQSGVS~~~SQFS GSGPGTDFTLTIGSLQPEGFATYYC~~~QQGNSVPLT~~~FGGGTKVDIKR		60, 61

JSA-41	VH _EVQLVESGPGVKPSETLSLTCSVS~GGSISSRDW~WGVRQPPGEGLEWIGE~IYHSGTT~NYPNLSKSRV TMSMDTSKNQLSLKLTGVTAVDTAVYYC~VTYSAYDAAFDS~~~WGQGLTVTVSS ETTLTQSPSSLSASVGDRTITCRAS~~~QSIISTYLSWY~~~QKPGKAPKSLIY~~~GASNLQSGVS~~~SQFRG SGPGTDFTLTISLQPEDFATYYC~~~QQGNSVPLT~~~FGGGTKVDIKR	62, 63
JSA-19	VH _QVQLQESGGGLVQPGGSLRLACAGS~GFTFSNFA~~MAWVRQAPGKGLEWVSG~ISDDGTIT~DYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC~VKVPSPAPMQGPDH~WGQGTITVTVSS VL _QSALTQPPSASGTPGQRTVITSCSGS~~~SSNIGSNTVNRV~~~QQLPGTAPKLLIY~~~SDNQRPSGVP~~~DR FSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC~~~AVWDDSLNGPGYVFGTGTKVEIKR	64, 65
JSA-40	VH _QVQLQESGGGLVQPGGSLRLACAGS~GFTFSNFA~~MAWVRLAPGKGLEWVSG~ISDDGTIT~DYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC~VKVPSPAPMQGPDY~WGQGTITVTVSS VL _DVVMTQSPSAMSASVGDRTVITCRAS~~~QGISNYLAWF~~~~~QKPGKVPKRLIY~~~AASSLQSGVP~~~SR FRGRGSGTDFTLISLQSEDFATYYC~~~QQYHSYPLT~~~FGGGTKLSVLG	66, 67
JSA-48	VH _QVQLQESGGGLVQPGGSLRLACAGS~GFTFSNFA~~MAWVRLAPGKGLEWVSG~ISDDGTIT~DYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC~VKVPSPAPMQGPDY~WGQGTITVTVSS VL _ETTLTQSPSSLSASVGDRTVITCRAS~~~QSIISTYLNWY~~~QKPGKAPKSLIY~~~GASNLQSGVS~~~SQ FSGRGPSTDFTLTISLQPEDFATYYC~~~QQGNSVPLT~~~FGGGTKVDIKR	68, 69
IgG 제작 서열		
CL_서열번호 70 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC CH(CH1+CH2+CH3)_서열번호 71 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP PKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK		

[0133]

실시예 4. Fc 알파 수용체 ECD 영역에 대한 결합력 분석

[0134]

상기 실시예 3에서 선별한 6종 scFv 항체 변이체들의 Fc 알파 수용체 ECD 영역에 대한 결합력을 확인하기 위해 유세포 분석기를 이용한 결합력 분석을 진행하였다. 이를 위하여 상기 실시예에서 사용된 방식으로 각각의 변이체와 대조군으로 사용될 Fc (야생형)들을 스페로플라스트들로 제조하였다. 준비된 스페로플라스트들에 Fc 알파 수용체-ECD-스트렙타비딘-Alexa488 항원을 50 nM의 농도로 결합시키고 상온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후 비특이적 결합을 제거하기 위해 PBS로 두 차례 세척하고 유세포 분석기를 이용하여 Fc 알파 수용체 ECD 영역에 대한 결합력을 분석하였다. 그 결과, 6종의 scFv 변이체들이 대조군인 IgG_Fc 및 IgA_Fc에 비해 월등히 증가된 형광 신호를 나타냈으며 (도 4), 이를 통해 Fc 알파 수용체 ECD 영역에 결합하는 scFv 항체 변이체들을 검증하였다.

[0136]

실시예 5. scFv 변이체 포함 항체 IgG 생산 및 정제

[0137]

상기 실시예 3에서 선별한 6종의 scFv 항체 변이체가 IgG 형태로도 Fc 알파 수용체와의 결합력을 가지는지를 확인하기 위하여 6종의 scFv의 중쇄(heavy chain) 및 경쇄(light chain) 발현 벡터를 각각 제작한 뒤, Freestyle 293 expression 배양액 (Gibco, 12338-018) 100 ml에 각 변이체들의 중쇄유전자와 경쇄유전자를 1:1의 비율로 먼저 섞고 PEI:변이체유전자=4:1의 비율로 섞어 상온에서 20 분간 두었다가 전날 2×10^6 cells/ml의 밀도로 계대 배양해 놓은 Expi293F 세포에 트랜스펙션하였다. 그 후 진탕배양기에서 37 °C, 125 rpm 및 8 % CO₂의 조건으로 7일간 배양하고 원심 분리하여 상등액만 취하였다. 상등액을 25x PBS를 이용해 평형을 맞춘 뒤 바틀탑 필터를 이용해 0.2 µm 필터 (Merck Millipore)로 여과하였다. 여과된 배양액에 Protein A 레진 500 µl을 넣어 주고 4 °C에서 16 시간 교반한 뒤 컬럼을 통해 레진을 회수 한 후 5 ml PBS로 세척하고 pH 2.7의 100 mM 글리신 (glycine) 버퍼 3 ml로 용출하고 1M Tris-HCl pH 8.0을 이용하여 중화하였다. Centrifugal filter units 3K (Merck Millipore)을 사용하여 PBS로 버퍼 교체한 후 정제된 6종의 scFv 항체 변이체를 각각 포함하는 IgG (JSA-9, JSA-19, JSA-30, JSA-40, JSA-41 및 JSA-48)들의 크기와 순도를 SDS-PAGE를 통해 분석하였다 (도 5).

[0139]

실시예 6. scFv 변이체 포함 항체들의 Fc 알파 수용체에 대한 결합력 분석

[0140] 상기 실시예 5에서 제작한 scFv 변이체 포함 항체들 JSA-9, JSA-30, JSA-40, JSA-41 및 JSA-48의 Fc 알파 수용체에 대한 항체 결합력을 측정하기 위하여 ELISA 실험을 진행하였다. 구체적으로, pH 9.6의 0.05 M Na₂CO₃ 용액 내의 스트렙타비딘 태그를 융합한 사합체 형태의 Fc 알파 수용체 (항원) 4 µg/ml을 50 µl씩 Flat Bottom Polystyrene High Bind 96웰 마이크로플레이트 (costar)에 4℃에서 16 시간 동안 고정화한 후 100 µl의 4% 스킴밀크 (GenomicBase) (in 0.05% PBST pH 6.0/pH 7.4)로 상온에서 2 시간 동안 블로킹하였다. 0.05% PBST 180 µl로 4 회씩 세척한 뒤 1% 스킴밀크 (in 0.05% PBST)로 연속 희석한 항체 JSA-9, JSA-30, JSA-40, JSA-41 및 JSA-48를 50 µl씩 각 웰에 분주하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 세척 과정 후 50 µl의 항-인간 IgG(H+L)-HRP 컨쥬게이트 (Jackson ImmunoResearch)과 상온에서 1 시간 동안 각각 항체 반응을 진행하고 세척하였다. 그 후 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution(Thermo Fisher Scientific)를 50 µl씩 첨가해 발색한 뒤 50 µl의 2 M H₂SO₄를 첨가하여 반응을 종료시킨 다음 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek)을 이용해 각 항체의 항원인 Fc 알파 수용체에 대한 결합력을 분석하였다 (도 6).

[0142] 실시예 7. 이중 항체 생산 및 정제

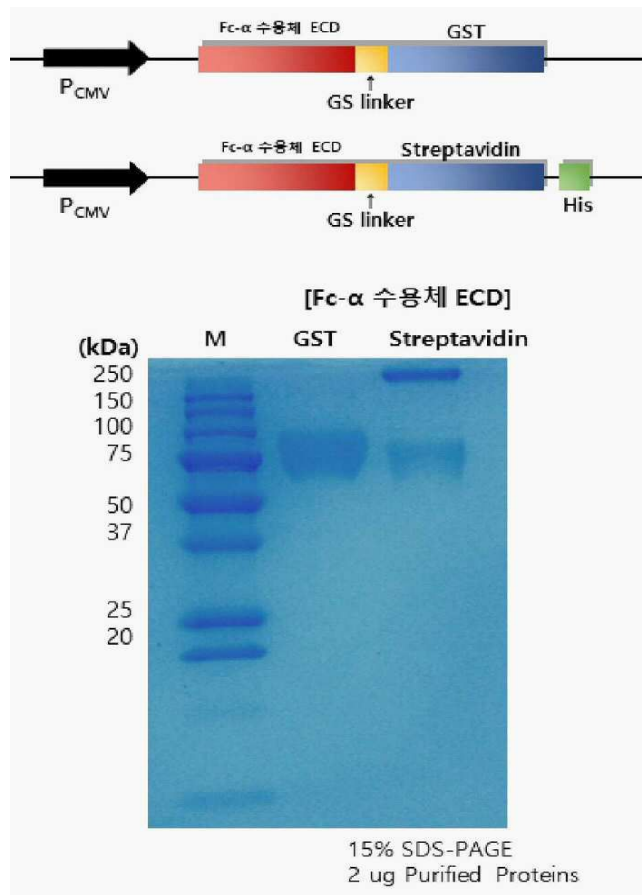
[0143] Fc 알파 수용체에 결합하는 항체를 이용하여 호중구의 효과기 기능을 극대화하는 치료용 항체를 제작하기 위해, 상기 실시예에서 Fc 알파 수용체와 결합력이 높았던 JSA-40 항체 및 JSA-48 항체를 각각 이중 항체 형태로 제작하였다. 구체적으로, 각각 JSA-40, JSA-48 및 Her-2를 타겟으로 하는 트라스트주맵(Trastuzumab)을 각각 scFv 및 Fab 형태로 하여 Fc에 Knob(T366W) 및 Hole(T366S, L368A, Y407V)가 도입된 4종의 이중항체들, JSB-40-1 (JSA-40 Fab + 트라스트주맵의 scFv), JSB-48-1 (JSA-48 Fab + 트라스트주맵의 scFv), JSB-40-2 (JSA-40 scFv + 트라스트주맵의 Fab) 및 JSB-48-2 (JSA-48 scFv + 트라스트주맵의 Fab)를 제작하였으며, JSA-40, JS-48 및 트라스트주맵이 각각의 항체의 Fc 말단에 scFv 형태로 연결되어 있는 4종의 이중항체 JSC-40-1 (JSA-40 IgG + 트라스트주맵 scFv), JSC-48-1 (JSA-48 IgG + 트라스트주맵 scFv), JSC-40-2 (트라스트주맵 IgG + JSA-40 scFv) 및 JSC-48-2 (트라스트주맵 IgG + JSA-48 scFv)를 제작하기 위해, 8종의 항체의 중쇄 및 경쇄 발현 벡터를 각각 제작하였다 (도 7). 그 후, 상기 실시예 5에서와 같이 항체들을 발현 및 정제한 JSB-40-1, JSB-40-2, JSB-48-1, JSB-48-2는 anti-C_κ resin, JSC-40-1, JSC-40-2, JSC-48-1 및 JSC-48-2들의 크기와 순도를 SDS-PAGE로 분석하였다 (도 8).

[0145] 실시예 8. 이중 항체의 두 가지 항원에 대한 결합력 분석

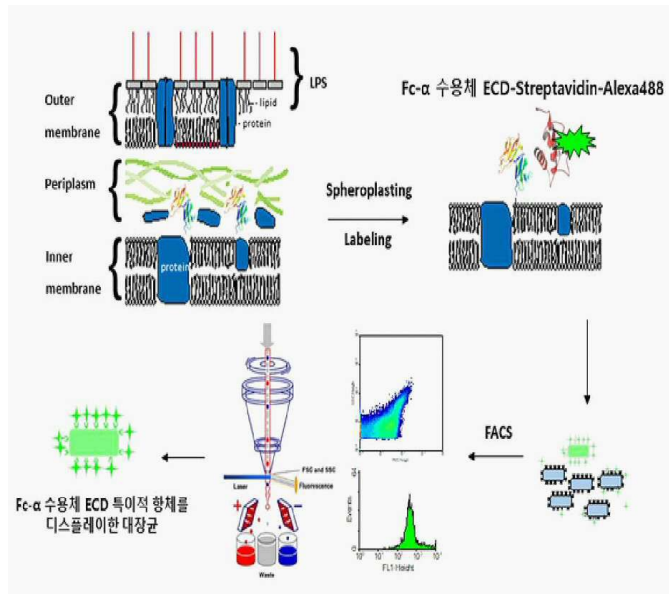
[0146] 상기 실시예 7에서 제작한 이중 항체들의 두가지 항원인 Fc 알파 수용체 및 Her-2에 대한 결합력을 측정해 보기 위하여 앞선 실험과 동일한 조건으로 ELISA 분석을 진행하였다. 구체적으로, 상기 이중 항체들을 연속 희석하여 반응시킨 뒤 세척한 후 50 µl의 Protein L-HRP 컨쥬게이트 (GenScript)와 상온에서 1 시간 동안 각각 항체 반응을 진행하고 세척하였다. 그 후 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution(Thermo Fisher Scientific)를 50 µl씩 첨가해 발색한 뒤 50 µl의 2 M H₂SO₄를 첨가하여 반응을 종료시킨 다음 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek)을 이용해 각 항체의 항원인 Fc 알파 수용체에 대한 결합력을 분석하였다. 그 결과, 이중 항체들 모두 Her-2 항원 및 Fc 알파 수용체에 우수한 결합력을 보였으며, 다양한 이중항체 포맷(format)들은 결합력의 차이가 있지만 모두 두 항원에 특이적으로 결합하였다 (도 9).

도면

도면1



도면2

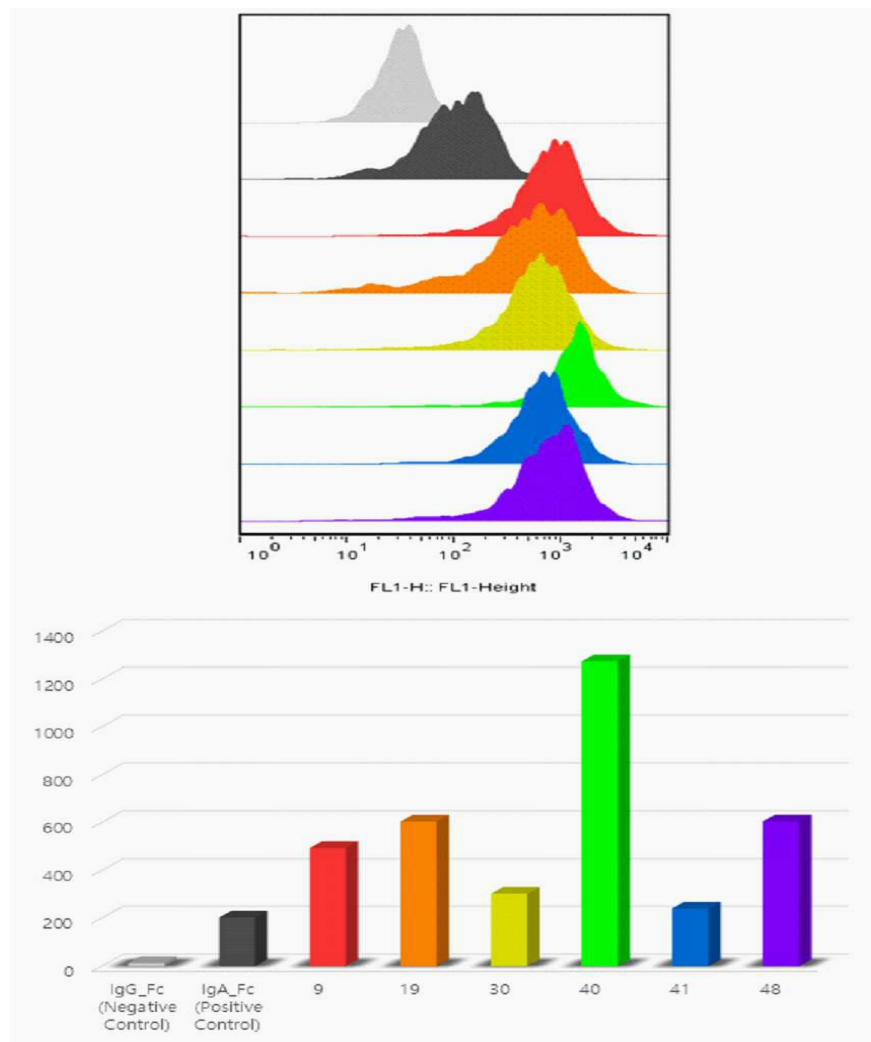


도면3

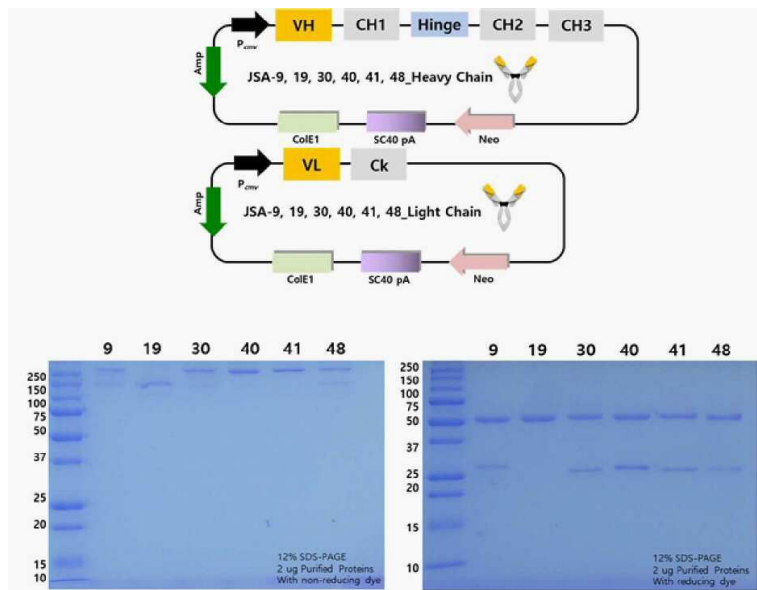
FR1	CDRH1	FR2	CDRH2	FR3	CDRH3	FR4
1. EVQLVGGSGGVVQPGSRRLSCAAS--GFNFDHHA-MHWVRQAPGKGLEWVSS-IGSGGDT-YYADSVKGRFTIARDNSKNVLYLQMNSLRAEDTAVIYC-ATEARGLAH~~~~WGQSTLTVTVSS						
2. EVQLVESGPQVKPSETLSITCSVS--GGSSISRDW-MGWVRQPPGEGLEWIGE-IYHSGTT--NYPNPKSRVTMSMDTSKNQLSLKLTGVTAVDTAVIYC-VTYSASDAAFDS~~~WGQSTLTVTVSS						
3. EVQLVESGPQVKPSETLSITCSVS--GGSSISRDW-MGWVRQPPGEGLEWIGE-IYHSGTT--NYPNPKSRVTMSMDTSKNQLSLKLTGVTAVDTAVIYC-VTYSAYDAAFDS~~~WGQSTLTVTVSS						
4. QVQLQESGGGLVQPGGSLRLACAGS--GFTFSNFA-MAWVRQAPGKGLEWVSG-ISDDGTIT-DYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVIYC-VKVPSPAPMQGPDH-WGQSTTVTVSS						
5. QVQLQESGGGLVQPGGSLRLACAGS--GFTFSNFA-MAWVRQAPGKGLEWVSG-ISDDGTIT-DYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVIYC-VKVPSPAPMQGPDY-WGQSTTVTVSS						
6. QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCAGS--GFTFSNFA-MAWVRLAPGKGLEWVSG-ISDDGTIT-DYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVIYC-VKVPSPAPMQGPDY-WGQSTLTVTVSS						

FR1	CDRL1	FR2	CDRL2	FR3	CDRL3	FR4
1. SSELTPDAVSVLQGTASITCSGH--KLGERVACWY--QKPKQSPVLVIY-QDTKRPSEI-PERFSGSNTGNTATLTITGTQAMDEADYYC-QANDSSTVV~~~~FGGQTKLTVLQ						1. JSA-9
2. ETTLTQSPSSLSASVGRITITCRAS-QSISTCLNWI--QKPKGKAPKSLIY-GASILQSGVS-SQFSGSGPDTFTLTIGSLQPEGATYYC-QQGNVPLT~~~~FGGQTKVDIKR						2. JSA-30
3. ETTLTQSPSSLSASVGRITITCRAS-QSISTYLSWY--QKPKGKAPKSLIY-GASNLQSGVS-SQFRSGSGPDTFTLTISLQPEDATYYC-QQGNVPLT~~~~FGGQTKVDIKR						3. JSA-41
4. QSALTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSS-SNIGSNTVWRY-QQLPGTAPKLLIY-SDNQRPSGVP-DRFSGSKSSTASLAISGLQSEDEADYYC-AVNDDSLNGPGYV-FGTGKVEIKR						4. JSA-19
5. DVVMTQSPSAMSASVGRVITITCRAS-QGISNYLAWF--QKPKGKVEKRLIY-AASSLQSGVP-SRFGRSGSDTFTLSISCLQSEDATYYC-QQYHSYPLT~~~~FGGQTKLSVLQ						5. JSA-40
6. ETTLTQSPSSLSASVGRVITITCRAS-QSISTYLNWI--QKPKGKAPKSLIY-GASNLQSGVS-SQFSGSGPDTFTLTISLQPEDATYYC-QQGNVPLT~~~~FGGQTKVDIKR						6. JSA-48

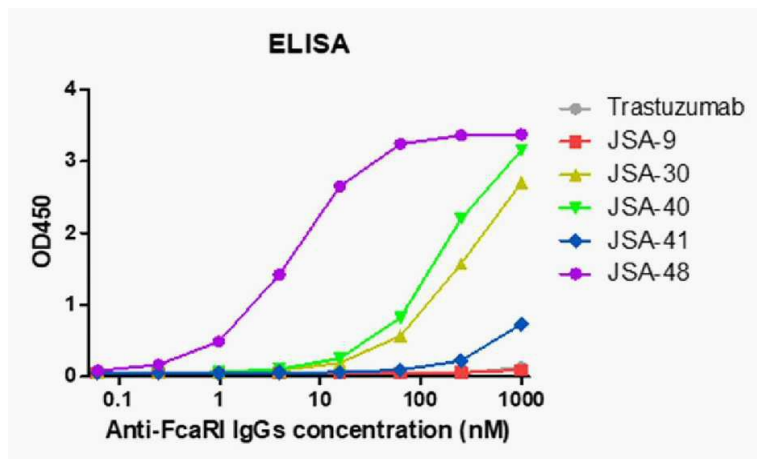
도면4



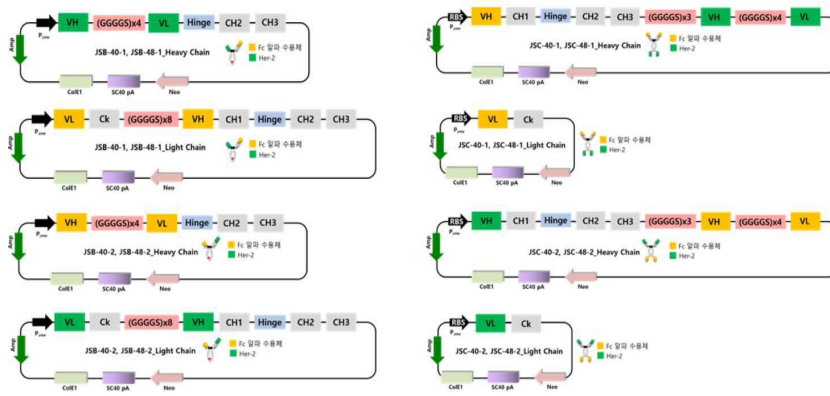
도면5



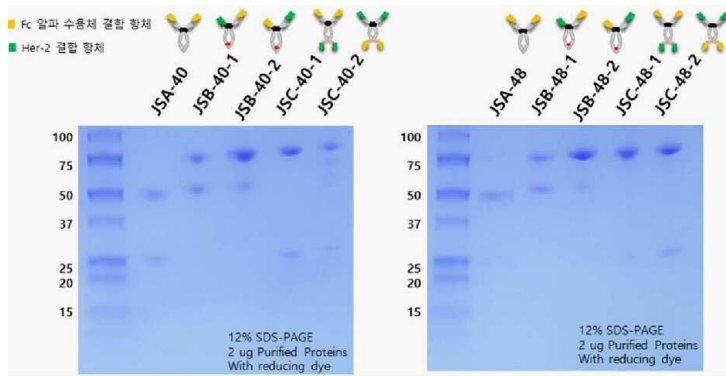
도면6



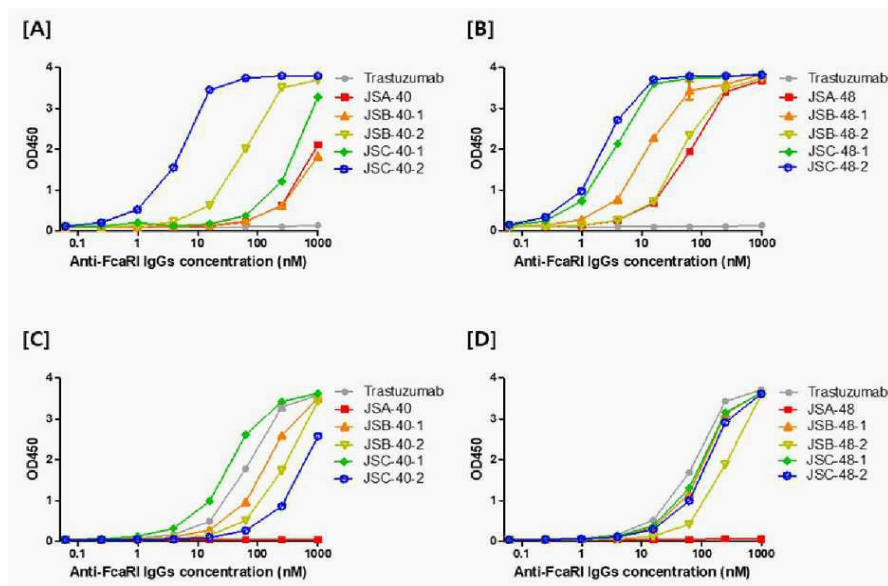
도면7



도면8



도면9



서열 목록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> ANTIBODIES FOR BINDING TO Fc ALPHA RECEPTOR

<130> D-2020-0504

<160> 71

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH1-JSA-9

<400> 1

Gly Phe Asn Phe Asp Asp His Ala

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH1-JSA-30 or JSA41

<400> 2

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Arg Asp Trp

1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH1_JSA-19 or 40 or 48

<400> 3

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Ala

1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH2_JSA-9

<400> 4

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Asp Thr

1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH2_JSA-30 or 41

<400> 5

Ile Tyr His Ser Gly Thr Thr

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH2_JSA-19 or 40 or 48

<400> 6

Ile Ser Asp Asp Gly Thr Ile Thr

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH3_JSA-9

<400> 7

Ala Thr Glu Ala Arg Gly Leu Ala His

1 5

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH3_JSA-30

<400> 8

Val Thr Tyr Ser Ala Ser Asp Ala Ala Phe Asp Ser

1 5 10
 <210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDRH3_JSA-41
 <400> 9

Val Thr Tyr Ser Ala Tyr Asp Ala Ala Phe Asp Ser

1 5 10
 <210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDRH3_JSA-19
 <400> 10

Val Lys Val Pro Ser Pro Ala Pro Met Gln Gly Pro Asp His

1 5 10
 <210> 11
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDRH3_JSA-40 or 48
 <400> 11

Val Lys Val Pro Ser Pro Ala Pro Met Gln Gly Pro Asp Tyr

1 5 10
 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDRL1_JSA-9
 <400> 12

Lys Leu Gly Glu Arg Tyr Ala Cys Trp Tyr

1 5 10
 <210> 13

<211
> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CDRL1_JSA-30
<400> 13
Gln Ser Ile Ser Thr Cys Leu Asn Trp Tyr
1 5 10
<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CDRL1_JSA-41
<400> 14
Gln Ser Ile Ser Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr
1 5 10
<210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CDRL1_JSA-19
<400> 15
Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn Arg Tyr
1 5 10
<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CDRL1_JSA-40
<400> 16
Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Ala Trp Phe
1 5 10
<210> 17
<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL1_JSA-48

<400> 17

Gln Ser Ile Ser Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr

1 5 10

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL2_JSA-9

<400> 18

Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile

1 5

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL2_JSA-30

<400> 19

Gly Ala Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Ser

1 5 10

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL2_JSA-41 or 48

<400> 20

Gly Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Ser

1 5 10

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL2_JSA-19

<400> 21

Ser Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro

1 5 10

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL2_JSA-40

<400> 22

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro

1 5 10

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL3_JSA-9

<400> 23

Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Val Val

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL3_JSA-30, 41 or 48

<400> 24

Gln Gln Gly Asn Ser Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL3_JSA-19

<400> 25

Ala Val Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Gly Tyr Val

1 5 10

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL3_JSA-40

<400> 26

Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 27

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-9_VH_FR1

<400> 27

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 28

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-30 or 41_VH_FR1

<400> 28

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser

20 25

<210> 29

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-19 or 40_VH_FR1

<400> 29

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Gly Ser

20 25

<210> 30

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-48_VH_FR1

<400> 30

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Thr Cys Ala Gly Ser

20 25

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-9_VH_FR2

<400> 31

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

1 5 10 15

Ser

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-30 or 41_VH_FR2

<400> 32
 Trp Gly Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10 15
 Glu

<210> 33
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JSA-19_VH_FR2

<400>
 33
 Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Gly

<210> 34
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JSA-40 or 48_VH_FR2
 <400> 34

Met Ala Trp Val Arg Leu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Gly

<210> 35
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JSA-9_VH_FR3

<400> 35
 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ala Arg Asp Asn
 1 5 10 15

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 36

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-30 or 41_VH_FR3

<400> 36

Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Met Asp Thr
1 5 10 15

Ser Lys Asn Gln Leu Ser Leu Lys Leu Thr Gly Val Thr Ala Val Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 37

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-19, 40, 48_VH_FR3

<400> 37

Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
1 5 10 15

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-9, 30, 19, 40, 41, 48_VH_FR4

<400> 38

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 39

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-9_VL_FR1

<400> 39

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

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His

20 25

<210> 40

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-30 or 41_VL_FR1

<400> 40

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

1 5 10 15

Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

20 25

<210> 41

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-19_VL_FR1

<400> 41

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser

20 25

<210> 42
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JSA-40_VL_FR1
 <400> 42
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 20 25

<210> 43
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JSA-48_VL_FR1
 <400> 43
 Glu Thr Thr Leu 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
 20 25

<210> 44
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JSA-9_VL_FR2
 <400> 44
 Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 1 5 10

<210> 45
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JSA-30 or 41 or 48_VL_FR2

<400> 45

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

1 5 10

<210> 46

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-19_VL_FR2

<400> 46

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

1 5 10

<210> 47

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-40_VL_FR2

<400> 47

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Arg Leu Ile Tyr

1 5 10

<210> 48

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-9_VL_FR3

<400> 48

Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Thr Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr

1 5 10 15

Ile Thr Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 49

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-30_VL_FR3

<400> 49

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

1 5 10 15

Gly Ser Leu Gln Pro Glu Gly Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25

<210> 50

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-41_VL_FR3

<400> 50

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 51

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-19_VL_FR3

<400> 51

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

1 5 10 15

Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys

20 25

<210> 52

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-40_VL_FR3

<400> 52

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

1 5 10 15
 Ser Cys Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25
 <210> 53
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JSA-48_VL_FR3
 <400> 53
 Ser Gln Phe Ser Gly Arg Gly Pro Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

1 5 10 15
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25
 <210> 54
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JSA-9_VL_FR4
 <400> 54
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

1 5 10
 <210> 55
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JSA-30, 41, 48_VL_FR4
 <400> 55
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg

1 5 10
 <210> 56
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-19_VL_FR4

<400> 56

Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 57

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-40_VL_FR4

<400> 57

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Ser Val Leu Gly

1 5 10

<210> 58

<211> 116

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> JSA-9_VH

<400> 58

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asp Asp His

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Thr Glu Ala Arg Gly Leu Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115
 <210> 59
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JSA-9_VL

<400> 59
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly His Lys Leu Gly Glu Arg Tyr Ala
 20 25 30
 Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Thr Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Val Val
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105

<210> 60
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JSA-30_VH
 <400> 60
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Gln Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Arg
 20 25 30
 Asp Trp Trp Gly Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp

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

85 90 95
 Val Thr Tyr Ser Ala Ser Asp Ala Ala Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115
 <210> 61
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-30_VL

<400> 61
 Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Cys

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
 100 105

<210> 62

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-41_VH

<400> 62

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Arg

20 25 30

Asp Trp Trp Gly Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Met Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 63

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-41_VL

<400> 63

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

1 5 10 15

Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Pro 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 Gln Gly Asn Ser Val Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg

100 105

<210> 64

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-19_VH

<400> 64

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Lys Val Pro Ser Pro Ala Pro Met Gln Gly Pro Asp His Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 65

<211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-19_VL

<400> 65

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30
 Thr Val Asn Arg Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Ser Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

<210> 66
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-40_VH

<400> 66

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
 20 25 30
 Ala Met Ala Trp Val Arg Leu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Asp Asp Gly Thr Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Lys Val Pro Ser Pro Ala Pro Met Gln Gly Pro Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 67
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-40_VL

<400> 67
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Ser Val Leu Gly
 100 105
 <210> 68

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-48_VH

<400> 68

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Lys Val Pro Ser Pro Ala Pro Met Gln Gly Pro Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 69

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> JSA-48_VL

<400> 69

Glu Thr Thr Leu 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 Gln Ser Ile Ser Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Ser Ser Gln Phe Ser Gly
50 55 60
Arg Gly Pro 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 Gln Gly Asn Ser Val Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
100 105

<210> 70
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CL
<400> 70

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

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

<210> 71
<211> 331
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> CH

<400> 71

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

145 150 155 160
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
165 170 175
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
180 185 190
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
195 200 205
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
210 215 220

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

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

 290 295 300
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 305 310 315 320
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330