



등록특허 10-2777002



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월05일
(11) 등록번호 10-2777002
(24) 등록일자 2025년02월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (2006.01) *A61K 35/17* (2025.01)
A61K 47/68 (2017.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01) *C12N 5/0783* (2010.01)
G01N 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/303 (2013.01)
A61K 35/17 (2025.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7006248
- (22) 출원일자(국제) 2016년08월02일
심사청구일자 2021년07월30일
- (85) 번역문제출일자 2018년03월03일
- (65) 공개번호 10-2018-0054590
- (43) 공개일자 2018년05월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2016/092833
- (87) 국제공개번호 WO 2017/020812
국제공개일자 2017년02월09일
- (30) 우선권주장
201510481235.1 2015년08월03일 중국(CN)

(56) 선행기술조사문헌

WO2009012394 A1

WO2012145469 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 49 항

심사관 : 김정아

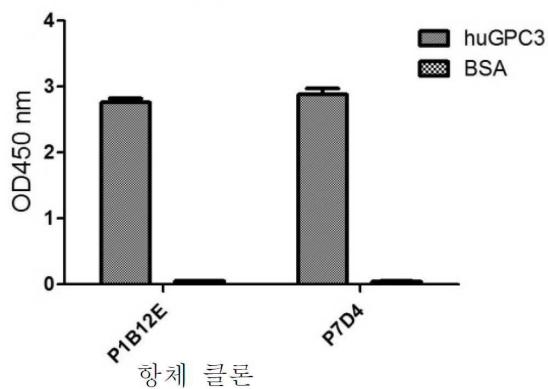
(54) 발명의 명칭 항글리피칸-3 항체 및 이의 응용

(57) 요약

본 발명은 항글리피칸-3(GPC3) 항체 및 이의 응용에 관한 것으로, 상기 항체는 단일 사슬 항체 및 인간화된 항체를 포함한다.

대 표 도 - 도1

파지 ELISA



(52) CPC특허분류

A61K 47/6803 (2023.08)

C07K 16/2809 (2013.01)

C12N 15/86 (2013.01)

C12N 5/0636 (2025.01)

G01N 33/574 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역을 포함하는, 글리피칸-3(GPC3)을 특이적으로 인식하는 항체로서,

중쇄 가변 영역은 서열번호 73으로 표시되는 아미노산 서열의 CDR1, 서열번호 74로 표시되는 아미노산 서열의 CDR2, 및 서열번호 75로 표시되는 아미노산 서열의 CDR3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열번호 76으로 표시되는 아미노산 서열의 CDR1, 서열번호 77로 표시되는 아미노산 서열의 CDR2, 및 서열번호 78로 표시되는 아미노산 서열의 CDR3을 포함하는, 항체.

청구항 2

제1항에 있어서,

서열번호 58로 표시되는 아미노산 서열의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 59로 표시되는 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 3

제1항에 있어서,

항체는 서열번호 81로 표시되는 아미노산 서열의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 82로 표시되는 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 4

제1항에 있어서,

항체는 서열번호 86, 88 또는 90의 제1 내지 243 위치로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는, 항체.

청구항 5

제1항에 있어서,

항체는 인간화된 항체인, 항체.

청구항 6

제1항의 항체를 코딩하는 핵산(nucleic acid).

청구항 7

제6항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 8

발현 벡터 또는 게놈(genome)에 통합된 제6항의 핵산을 포함하는 숙주 세포이고, 상기 발현 벡터는 상기 핵산을 포함하는 숙주 세포.

청구항 9

제1항에 있어서,

글리피칸-3을 발현하는 종양 세포를 특이적으로 타겟팅하는 표적 약물, 항체 약물 접합체(antibody-drug conjugate) 또는 다기능 항체를 제조하거나;

글리피칸-3을 발현하는 종양을 진단하는 시약을 제조하거나;

키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor) 변형된 면역 세포를 제조하는 데 사용하기 위한, 항체.

청구항 10

제1항의 항체; 및

이와 연결되는 기능성 분자를 포함하는 다기능 면역 접합체로서,

상기 기능성 분자는 종양 표면 마커(marker)를 타겟팅하는 분자, 종양을 억제하는 분자, 면역 세포의 표면 마커를 타겟팅하는 분자 또는 검출 가능한 라벨(label)로 이루어진 군으로부터 선택되는, 다기능 면역 접합체.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 종양 표면 마커를 타겟팅하는 분자는 종양 표면 마커와 결합하는 항체 또는 리간드(ligand)이거나;

상기 종양을 억제하는 분자는 항종양 사이토카인(cytokine) 또는 항종양 독소인 것인, 다기능 면역 접합체.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 사이토카인은 IL-12, IL-15, IFN-beta 및 TNF-alpha를 포함하는 것인, 다기능 면역 접합체.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 검출 가능한 라벨은 형광 라벨 또는 빨색 라벨을 포함하는 것인, 다기능 면역 접합체.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 종양 표면 마커와 결합하는 항체는 글리피칸-3 이외의 기타 항원을 인식하는 항체를 의미하고, 상기 기타 항원은 EGFR, EGFRvIII, 메소텔린(mesothelin), HER2, EphA2, Her3, EpCAM, MUC1, MUC16, CEA, 클라우딘(Claudin) 18.2, 엽산(folate) 수용체, 클라우딘 6, WT1, NY-ESO-1, MAGE 3, ASGPR1 또는 CDH16을 포함하는 것인, 다기능 면역 접합체.

청구항 15

제10항에 있어서,

상기 면역 세포의 표면 마커를 타겟팅하는 분자는 T세포 표면 마커와 결합하는 항체이고, 이는 제1항의 항체와 이중특이성 T세포 관여 항체를 형성하는 것인, 다기능 면역 접합체.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 T세포 표면 마커와 결합하는 항체는 항CD3 항체인, 다기능 면역 접합체.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 다기능 면역 접합체는 서열번호 98로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 다기능 면역 접합체.

청구항 18

제10항에 있어서,

상기 면역 세포의 표면 마커를 타겟팅하는 분자는 T세포 표면 마커와 결합하는 항체이고, 이는 제1항의 항체와 이중특이성 T세포 관여 항체를 형성하는 것인,

상기 T세포 표면 마커와 결합하는 항체는 항CD3 항체이고,

상기 다기능 면역 접합체는 융합 폴리펩ти드(polypeptide)이고, 제1항의 항체 및 이와 연결되는 항CD3 항체 사이에 연결 펩티드(peptide)를 더 포함하는 것인, 다기능 면역 접합체.

청구항 19

제10항의 다기능 면역 접합체를 코딩하는 핵산.

청구항 20

제10항에 있어서,

항종양 약물을 제조하거나,

글리피칸-3을 발현하는 종양을 진단하는 시약을 제조하거나;

키메라 항원 수용체 변형된 면역 세포를 제조하는 데 사용하기 위한, 다기능 면역 접합체.

청구항 21

제20항에 있어서,

상기 면역 세포는 T임파구(T lymphocytes), NK세포 또는 NKT임파구를 포함하는, 다기능 면역 접합체.

청구항 22

제1항의 항체를 포함하는 키메라 항원 수용체에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체가 순차적으로 연결된 제1항의 항체, 막 관통 영역, 및 CD3 ζ, Fc ε RI γ, CD27, CD28, CD137, CD134, MyD88, CD40의 세포 내 신호 영역 서열 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포 내 신호 영역을 포함하는 것인, 키메라 항원 수용체.

청구항 23

제22항에 있어서,

상기 막 관통 영역은 CD8 또는 CD28의 막 관통 영역을 포함하는 것인, 키메라 항원 수용체.

청구항 24

제22항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체가 순차적으로 연결된 항체, 막 관통 영역 및 세포 내 신호 영역을 포함하는 키메라 항원 수용체:

제1항의 항체, CD8의 막 관통 영역 및 CD3 ζ;

제1항의 항체, CD8의 막 관통 영역, CD137 및 CD3 ζ;

제1항의 항체, CD28 분자의 막 관통 영역, CD28 분자의 세포 내 신호 영역 및 CD3 ζ; 또는

제1항의 항체, CD28 분자의 막 관통 영역, CD28 분자의 세포 내 신호 영역, CD137 및 CD3 ζ.

청구항 25

제22항에 있어서,

상기 항체는 단일 사슬 항체 또는 도메인(domain) 항체인, 키메라 항원 수용체.

청구항 26

제22항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체가

서열번호 88로 표시되는 아미노산 서열;

서열번호 86으로 표시되는 아미노산 서열; 또는

서열번호 90으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 키메라 항원 수용체.

청구항 27

제22항의 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산.

청구항 28

제27항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 29

제28항의 벡터를 포함하는 바이러스(virus).

청구항 30

제22항에 있어서,

글리피칸-3을 발현하는 종양을 타겟팅하는 유전자 변형된 면역 세포를 제조하는 데 사용하기 위한, 키메라 항원 수용체.

청구항 31

제30항에 있어서,

상기 글리피칸-3을 발현하는 종양은 간암, 흑색종, 난소 투명 세포암, 난황낭종양, 및 신경 모세포종을 포함하는 것인, 키메라 항원 수용체.

청구항 32

제27항에 있어서,

글리피칸-3을 발현하는 종양을 타겟팅하는 유전자 변형된 면역 세포를 제조하는 데 사용하기 위한, 핵산.

청구항 33

제32항에 있어서,

상기 글리피칸-3을 발현하는 종양은 간암, 흑색종, 난소 투명 세포암, 난황낭종양, 및 신경 모세포종을 포함하는 것인, 핵산.

청구항 34

제28항에 있어서,

글리피칸-3을 발현하는 종양을 타겟팅하는 유전자 변형된 면역 세포를 제조하는 데 사용하기 위한, 발현 벡터.

청구항 35

제34항에 있어서,

상기 글리피칸-3을 발현하는 종양은 간암, 흑색종, 난소 투명 세포암, 난황낭종양, 및 신경 모세포종을 포함하는 것인, 발현 벡터.

청구항 36

제29항에 있어서,

글리피칸-3을 발현하는 종양을 타겟팅하는 유전자 변형된 면역 세포를 제조하는 데 사용하기 위한, 바이러스.

청구항 37

제36항에 있어서,

상기 글리피칸-3을 발현하는 종양은 간암, 흑색종, 난소 투명 세포암, 난황낭종양, 및 신경 모세포종을 포함하는 것인, 바이러스.

청구항 38

제22항의 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 발현 벡터 또는 상기 벡터를 포함하는 바이러스가 형질 도입되거나;

표면에 제22항의 키메라 항원 수용체를 발현하는, 유전자 변형된 면역 세포.

청구항 39

제38항에 있어서,

외인성 사이토카인의 코딩 서열을 더 포함하는 것인, 유전자 변형된 면역 세포.

청구항 40

제39항에 있어서,

상기 사이토카인은 IL-12, IL-15 또는 IL-21을 포함하는 것인, 유전자 변형된 면역 세포.

청구항 41

제38항에 있어서,

CD3 ζ 을 포함하지 않지만, CD28의 세포 내 신호 도메인, CD137의 세포 내 신호 도메인 또는 이들의 조합을 포함하는 다른 하나의 키메라 항원 수용체를 추가로 발현하는, 유전자 변형된 면역 세포.

청구항 42

제38항에 있어서,

케모카인(chemokine) 수용체를 더 발현하는 것인, 유전자 변형된 면역 세포.

청구항 43

제42항에 있어서,

상기 케모카인 수용체는 CCR2를 포함하는 것인, 유전자 변형된 면역 세포.

청구항 44

제38항에 있어서,

PD-1 발현을 감소시킬 수 있는 siRNA 또는 PD-L1을 차단시킬 수 있는 단백질을 더 발현하는, 유전자 변형된 면역 세포.

청구항 45

제38항에 있어서,

안전 스위치를 더 발현하는, 유전자 변형된 면역 세포.

청구항 46

제45항에 있어서,

상기 안전 스위치는 iCaspase-9, 절단된(Truancated) EGFR 또는 RQR8을 포함하는 것인, 유전자 변형된 면역 세포.

청구항 47

제38항에 있어서,

T임파구, NK세포 또는 NKT세포를 포함하는, 유전자 변형된 면역 세포.

청구항 48

제38항에 있어서,

글리피칸-3을 발현하는 종양을 억제하는 약물을 제조하는 데 사용하기 위한, 유전자 변형된 면역 세포.

청구항 49

제1항의 항체 또는 상기 항체를 코딩하는 핵산; 또는

다기능 면역 접합체 또는 상기 다기능 면역 접합체를 코딩하는 핵산; 또는

키메라 항원 수용체 또는 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산; 또는

유전자 변형된 면역 세포를 포함하는, 글리피칸-3를 발현하는 종양을 억제하기 위한 약제학적 조성물이고;

상기 다기능 면역 접합체는

제1항의 항체; 및

이와 연결되는 기능성 분자를 포함하고, 상기 기능성 분자는 종양 표면 마커(marker)를 타겟팅하는 분자, 종양을 억제하는 분자, 면역 세포의 표면 마커를 타겟팅하는 분자, 또는 검출 가능한 라벨(label)로 이루어진 군으로부터 선택되고;

상기 키메라 항원 수용체는 순차적으로 연결된 제1항의 항체, 막 관통 영역, 및 세포 내 신호 영역을 포함하고; 상기 세포 내 신호 영역은 CD3 ζ , Fc ϵ RI γ , CD27, CD28, CD137, CD134, MyD88, CD40의 세포 내 신호 영역 서열 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되며; 그리고

상기 유전자 변형된 면역 세포는 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 발현 벡터 또는 상기 벡터를 포함하는 바이러스가 형질 도입되거나; 표면에 상기 키메라 항원 수용체를 발현하는 것인, 약제학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 종양 면역 치료 또는 진단 분야에 속하는 것으로, 더욱 구체적으로, 글리피칸-3(glypican-3, GPC3)을 특이적으로 인식하는 항체 및 이의 응용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현재, 면역 효과 세포에 기반한 입양 면역 요법(adoptive immunotherapy)은 일부 종양에서 일정한 효과를 얻었고, 이러한 면역 치료 방법은 항체 치료의 상기 흥결을 극복할 수 있지만, 대부분 종양에서의 효능이 여전히 만족스럽지 못하다[Grupp SA, et al. Adoptive cellular therapy. CurrTop Microbiol Immunol., 2011; 344:149-72.]. 최근, 타겟 세포에 대한 세포 독성 T임파구(cytotoxic lymphocyte, CTL)의 인식은 T임파구 수용체(T Cell Receptor, TCR)에 특이적으로 의존한다는 발견에 따라, 종양 세포에 관련된 항원에 대한 항체의 scFv와 T임파구 수용체의 CD3 ζ 또는 Fc ϵ RI γ 등 세포 내 신호 활성화 모티프(motifs)를 키메라 항원 수용체(Chimeric antigen receptor, CAR)로 융합시켜, 이를 렌티 바이러스(lentivirus) 감염 등과 같은 방식으로 T임파구 표면에 유전자 변형시킨다. 이러한 CAR T임파구는 주요 조직 적합성 복합체(Major Histocompatibility Complex, MHC) 비제한적 방식으로 T임파구를 선택적으로 종양 세포에 표적화시키면서 특이적으로 종양을 살상할 수 있다. CAR T임파구는 종양 면역 치료 분야의 하나의 새로운 면역 치료 전략이다. CAR 변형된 면역 효과 세포의 설계에 있어서, 특히 T세포일 경우, 타겟팅된 항원 유전자는 실제적으로 관건적인 선택으로써, 체내 유전자 발현의 복잡성과 여러가지 제어 불가능한 요소를 감안하여, CAR에 사용하기 적합한 유전자를 선택하는 것은 매우 어렵다. 또한, 수많은 종양 특이적 항원은 이에 대한 CAR 변형된 면역 효과 세포 구축에 적합한 특이적 분자를 찾기 어렵다.

[0003] 글리피칸-3 (Glypican-3, GPC3, DGSX, GTR2-2, MXR7, OCI-5, SDYS, SGB, SGBS 또는 SGBS1이라고도 함)은 세포

표면 단백질로서, 해파란설페이트프로테오글리칸(heparan sulfate proteoglycan) 패밀리에 속한다. GPC3 유전자는 70-kDa 정도의 전구체 핵심 단백질을 코딩하여 생산하고, 상기 전구체 단백질은 퓨린(furin)에 의해 절단되어 40-kDa 정도의 가용성의 혈액에 진입할 수 있는 아미노기(amino group) 말단(N말단) 웨티드와 30-kDa 정도의 2개의 해파란설페이트(HS) 당사슬을 함유한 막 결합된 카르복시(carboxy group) 말단(C말단) 웨티드를 생성할 수 있다. GPC3 단백질은 글리코실포스파티딜이노시톨(glycosylphosphatidylinositol, GPI)을 통해 세포막에 부착된다.

[0004] GPC3은 태아 간장에 고도로 발현되지만, 정상적인 성인의 간 조직에는 발현되지 않고, 간암의 발생 발전과 아주 밀접하게 관계되며, 간암 발생 초기에 검출률이 높을 뿐만 아니라, 간암의 발전에 따라, 검출률도 따라 높아진다. 그러나, GPC3의 발현은 간선암, 담관세포암, 간전이암과 12가지 일반 고형 종양과 21가지 비간암 세포주에서 모두 검출되지 않았다. 이 외에, GPC3은 예를 들어 흑색종, 난소 투명 세포암, 난황낭종양, 신경 모세포종 등 종양에서도 발현되었다. GPC3이 간암, 흑색종 등 종양에서의 특이적인 높은 발현을 고려하여, 이는 종양 면역 치료의 하나의 후보 표적으로 간주된다.

[0005] 비록, 항GPC3 항체를 이용하여 간암 검출을 진행하고 GPC3 항체를 이용한 항체 의존성(ADCC) 또는 보체 의존성(CDC) 세포 독성 연구 방식이 보도되었지만, 현재 약용 항GPC3 항체가 여전히 없으며, 중국과 외국 제약 회사가 CN200580000807.4에서 공개한 GC33 항체만이 제1기 임상 연구를 진행하고 있고, 임상 적용은 여전히 논의되고 있다.

[0006] 이 외에, 항GPC3 항체는 직접적으로 치료성 항체 뿐만 아니라, 진단, 키메라 항원 수용체 변형(CAR)된 T임파구 등 면역 요법 등등에 사용될 수 있다. 기존 연구에 따르면, 상이한 항체는 상이한 면역 원성을 가질 수 있고, 이러한 면역 원성을 항체 또는 그 유도된 치료 제제의 치료 효과 및 부작용을 초래한다. 예를 들어, 마우스(mouse) 항mesothelin 항체에 기반한 CAR T세포는 이의 인간 체내의 장기 생존에 영향을 미치는 알레르기 반응을 일으킨다. 이러한 고려 사항에 기반하여, 고형 종양의 응용에서 양호한 종양 살상 활성과 극히 우수한 임상 응용 전망을 구비하도록 본 분야에서 새로운 항GPC3 항체를 최적화하고 제조하여, GPC3 항체를 종양의 진단과 치료에 확실하게 사용될 수 있도록 하여, 대다수의 환자에게 혜택을 준다.

발명의 내용

- [0007] 본 발명의 목적은 항글리피칸-3 항체 및 이의 응용을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 제1 양태에 있어서, 경쇄 가변 영역과 중쇄 가변 영역을 포함하고, 경쇄 가변 영역의 CDR1은 서열번호 16, 서열번호 67, 서열번호 69로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산(amino acid) 서열을 포함하며;
- [0009] 경쇄 가변 영역의 CDR2는 서열번호 18, 서열번호 68, 서열번호 70으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고;
- [0010] 경쇄 가변 영역의 CDR3은 서열번호 20인 아미노산 서열을 포함하며;
- [0011] 중쇄 가변 영역의 CDR1은 서열번호 10, 서열번호 60, 서열번호 62, 서열번호 64로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고;
- [0012] 중쇄 가변 영역의 CDR2는 서열번호 12, 서열번호 61, 서열번호 63, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 71로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하며;
- [0013] 중쇄 가변 영역의 CDR3은 서열번호 14, 서열번호 72로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 글리피칸-3(GPC3)을 특이적으로 인식하는 항체를 제공한다.
- [0014] 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 항체는,
- [0015] 경쇄 가변 영역에 서열번호 16으로 표시되는 CDR1, 서열번호 18로 표시되는 CDR2 및 서열번호 20으로 표시되는 CDR3을 포함하거나; 중쇄 가변 영역에 서열번호 10으로 표시되는 CDR1, 서열번호 12로 표시되는 CDR2 및 서열번호 14로 표시되는 CDR3을 포함하는 항체(a)(P7D4);
- [0016] 경쇄 가변 영역에 서열번호 16으로 표시되는 CDR1, 서열번호 18로 표시되는 CDR2 및 서열번호 20으로 표시되는 CDR3을 포함하거나; 중쇄 가변 영역에 서열번호 60으로 표시되는 CDR1, 서열번호 61로 표시되는 CDR2 및 서열번호 14로 표시되는 CDR3을 포함하는 항체(b)(am4);
- [0017] 경쇄 가변 영역에 서열번호 16으로 표시되는 CDR1, 서열번호 18로 표시되는 CDR2 및 서열번호 20으로 표시되는

CDR3을 포함하거나; 중쇄 가변 영역에 서열번호 62로 표시되는 CDR1, 서열번호 63으로 표시되는 CDR2 및 서열번호 14로 표시되는 CDR3을 포함하는 항체(c)(am14);

[0018] 경쇄 가변 영역에 서열번호 16으로 표시되는 CDR1, 서열번호 18로 표시되는 CDR2 및 서열번호 20으로 표시되는 CDR3을 포함하거나; 중쇄 가변 영역에 서열번호 64로 표시되는 CDR1, 서열번호 65로 표시되는 CDR2 및 서열번호 14로 표시되는 CDR3을 포함하는 항체(d)(am20);

[0019] 경쇄 가변 영역에 서열번호 67로 표시되는 CDR1, 서열번호 68로 표시되는 CDR2 및 서열번호 20으로 표시되는 CDR3을 포함하거나; 중쇄 가변 영역에 서열번호 10으로 표시되는 CDR1, 서열번호 66으로 표시되는 CDR2 및 서열번호 14로 표시되는 CDR3을 포함하는 항체(e)(am35);

[0020] 경쇄 가변 영역에 서열번호 69로 표시되는 CDR1, 서열번호 70으로 표시되는 CDR2 및 서열번호 20으로 표시되는 CDR3을 포함하거나; 중쇄 가변 영역에 서열번호 10으로 표시되는 CDR1, 서열번호 66으로 표시되는 CDR2 및 서열번호 14로 표시되는 CDR3을 포함하는 항체(f)(am42);

[0021] 경쇄 가변 영역에 서열번호 16으로 표시되는 CDR1, 서열번호 70으로 표시되는 CDR2 및 서열번호 20으로 표시되는 CDR3을 포함하거나; 중쇄 가변 영역에 서열번호 10으로 표시되는 CDR1, 서열번호 71로 표시되는 CDR2 및 서열번호 72로 표시되는 CDR3을 포함하는 항체(g)(T2-23);

[0022] 항체(a) 내지 항체(g) 중 어느 하나의 항체에 의해 인식된 항원 결정 부위와 동일한 항원 결정 부위를 인식하는 항체(h)를 포함한다.

[0023] 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 글리피칸-3(GPC3)을 특이적으로 인식하는 항체는 단일 사슬 항체(scFV), 단일 클론(monoclonal) 항체, 도메인(domain) 항체, Fab 세그먼트(segment), Fd 세그먼트, Fv 세그먼트, $F(ab') 세그먼트 및 이의 유도체, 또는 기타 형식의 항체일 수 있고; 바람직하게는 단일 사슬 항체이다.$

[0024] 또 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 글리피칸-3(GPC3)을 특이적으로 인식하는 항체는 인간화된 또는 완전히 인간화된 것이고; 바람직하게는 인간화된 것이다.

[0025] 또 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 항체(a)(P7D4)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 4 중 제1 내지 121 위치로 표시되거나; 상기 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 4 중 제137 내지 247 위치로 표시되고;

[0026] 항체(b)(am4)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 25 중 제1 내지 121 위치로 표시되거나; 상기 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 25 중 제137 내지 247 위치로 표시되며;

[0027] 항체(c)(am14)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 27 중 제1 내지 121 위치로 표시되거나; 상기 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 27 중 제137 내지 247 위치로 표시되고;

[0028] 항체(d)(am20)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 29 중 제1 내지 121 위치로 표시되거나; 상기 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 29 중 제137 내지 247 위치로 표시되며;

[0029] 항체(e)(am35)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 31 중 제1 내지 121 위치로 표시되거나; 상기 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 31 중 제137 내지 247 위치로 표시되고;

[0030] 항체(f)(am42)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 33 중 제1 내지 121 위치로 표시되거나; 상기 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 33 중 제137 내지 247 위치로 표시되거나;

[0031] 항체(g)(T2-23)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 35 중 제1 내지 121 위치로 표시되거나; 상기 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열번호 35 중 제137 내지 247 위치로 표시된다.

[0032] 본 발명의 다른 하나의 양태에 있어서, 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역을 포함하는 인간화된 단일 클론 항체이며, 중쇄 가변 영역은 서열번호 73으로 표시되는 아미노산 서열의 CDR1, 서열번호 74로 표시되는 아미노산 서열의 CDR2, 서열번호 75로 표시되는 아미노산 서열의 CDR3을 포함하거나; 경쇄 가변 영역은 서열번호 76으로 표시되는 아미노산 서열의 CDR1, 서열번호 77로 표시되는 아미노산 서열의 CDR2, 서열번호 78로 표시되는 아미노산 서열의 CDR3을 포함하는 글리피칸-3(GPC3)을 특이적으로 인식하는 항체를 제공한다.

[0033] 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 항체는 서열번호 58로 표시되는 아미노산 서열의 중쇄 가변 영역을 포함하거나, 서열번호 59로 표시되는 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역을 포함한다.

- [0034] 본 발명의 또 다른 하나의 양태에 있어서, 상기 어느 하나의 항체를 코딩하는 핵산(nucleic acid)을 제공한다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 하나의 양태에 있어서, 상기 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 하나의 양태에 있어서, 상기 발현 벡터 또는 게놈(genome)에 통합된 상기 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 하나의 양태에 있어서, 글리피칸-3을 발현하는 종양 세포를 특이적으로 타겟팅하는 표적 약물, 항체 약물 접합체(antibody-drug conjugate) 또는 다기능 항체를 제조하거나; 글리피칸-3을 발현하는 종양을 진단하는 시약을 제조하거나; 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor) 변형된 면역 세포를 제조하기 위한 상기 어느 하나의 항체의 용도를 제공한다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 하나의 양태에 있어서, 상기의 어느 하나의 항체; 및 이와 연결되는(공유 결합, 커플링(coupling), 부착, 흡착을 포함) 기능성 분자를 포함하는 다기능 면역 접합체를 제공하며, 기능성 분자는 종양 표면 마커(marker)를 타겟팅하는 분자, 종양을 억제하는 분자, 면역 세포의 표면 마커를 타겟팅하는 분자 또는 검출 가능한 라벨(label)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0039] 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 다기능 면역 접합체에서, 상기 종양 표면 마커를 타겟팅하는 분자는 종양 표면 마커와 결합하는 항체 또는 리간드(ligand)이거나; 상기 종양을 억제하는 분자는 항종양 사이토카인(cytokine) 또는 항종양 독소이고; 바람직하게, 상기 사이토카인은 IL-12, IL-15, IFN-beta, TNF-alpha를 포함한다(하지만 이에 한정되지 않는다).
- [0040] 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 다기능 면역 접합체에서, 상기 검출 가능한 라벨은 형광 라벨, 발색 라벨을 포함한다.
- [0041] 또 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 다기능 면역 접합체에서, 상기 종양 표면 마커와 결합하는 항체는 글리피칸-3 외의 기타 항원을 인식하는 항체를 의미하고, 상기 기타 항원은 EGFR, EGFRvIII, 메소텔린(mesothelin), HER2, EphA2, Her3, EpCAM, MUC1, MUC16, CEA, 클라우딘(Claudin) 18.2, 엽산(folate) 수용체, 클라우딘 6, WT1, NY-ESO-1, MAGE 3, ASGPR1 또는 CDH16을 포함한다.
- [0042] 또 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 다기능 면역 접합체에서, 상기 면역 세포의 표면 마커를 타겟팅하는 분자는 T세포 표면 마커와 결합하는 항체이고, 이는 상기 어느 하나의 항체와 이중특이성 T 세포 관여 항체(Bispecific T cell engager, BiTE)를 형성한다.
- [0043] 또 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 다기능 면역 접합체에서, 상기 면역 세포 표면 마커와 결합하는 항체는 항CD3 항체이다.
- [0044] 또 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 항CD3 항체는 단일 사슬 항체(scFV), 단일 클론 항체, Fab 세그먼트, Fd 세그먼트, Fv 세그먼트, F(ab')₂ 세그먼트 및 이의 유도체, 또는 기타 형식의 항체이고; 바람직하게는 단일 사슬 항체이다.
- [0045] 또 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 항CD3 항체는 인간화의, 키메라의, 완전히 인간화의 또는 쥐의 것이다.
- [0046] 또 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 다기능 면역 접합체는 융합 폴리펩티드(polypeptide)이고, 상기 어느 하나의 항체 및 이와 연결되는 기능성 분자 사이에 연결 펩티드(peptide)(링커(linker)를 더 포함한다.
- [0047] 또 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 연결 펩티드의 서열은 (GlyGlyGlyGlySer)_n이고, 여기서 n은 1 내지 5인 정수이며; 더욱 바람직하게는, n=3이다.
- [0048] 또 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 다기능 면역 접합체는 폴리펩티드 투여 또는 유전자 투여 방식으로 투여된다.
- [0049] 본 발명의 또 다른 하나의 양태에 있어서, 상기 어느 하나의 다기능 면역 접합체를 코딩하는 핵산을 제공한다.
- [0050] 본 발명의 또 다른 하나의 양태에 있어서, 항종양 약물을 제조하거나, 글리피칸-3을 발현하는 종양을 진단하는 시약을 제조하거나; 키메라 항원 수용체 변형된 면역 세포를 제조하기 위한 것이고; 바람직하게, 상기 면역 세포는 T임파구, NK세포 또는 NKT임파구를 포함하는 상기 다기능 면역 접합체의 용도를 제공한다.
- [0051] 본 발명의 또 다른 하나의 양태에 있어서, 순차적으로 연결된 어느 하나의 항체, 막 관통 영역과 CD3 ζ, Fc ε RI

γ, CD27, CD28, CD137, CD134, MyD88, CD40의 세포 내 신호 영역 서열, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포 내 신호 영역을 포함하는 상기 어느 하나의 항체를 포함하는 키메라 항원 수용체(Chimeric antigen receptor, CAR)를 제공한다.

[0052] 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체에서, 상기 막 관통 영역은 CD8 또는 CD28의 막 관통 영역을 포함한다.

[0053] 또 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체에서, 상기 키메라 항원 수용체는, 상기 어느 하나의 항체, CD8 및 CD3 ζ; 상기 어느 하나의 항체, CD8, CD137 및 CD3 ζ; 상기 어느 하나의 항체, CD28 분자의 막 관통 영역, CD28 분자의 세포 내 신호 영역 및 CD3 ζ; 또는 상기 어느 하나의 항체, CD28 분자의 막 관통 영역, CD28 분자의 세포 내 신호 영역, CD137 및 CD3 ζ의 순차적으로 연결된 항체, 막 관통 영역 및 세포 내 신호 영역을 포함한다.

[0054] 또 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체에서, 상기 항체는 단일 사슬 항체 또는 도메인 항체이다. 또 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체는,

[0055] 서열번호 49 또는 그 중 제22 내지 346 위치로 표시되는 아미노산 서열;

[0056] 서열번호 50 또는 그 중 제22 내지 447 위치로 표시되는 아미노산 서열;

[0057] 서열번호 51 또는 그 중 제22 내지 491 위치로 표시되는 아미노산 서열;

[0058] 서열번호 52 또는 그 중 제22 내지 494 위치로 표시되는 아미노산 서열;

[0059] 서열번호 53 또는 그 중 제22 내지 536 위치로 표시되는 아미노산 서열;

[0060] 서열번호 85로 표시되는 아미노산 서열;

[0061] 서열번호 86으로 표시되는 아미노산 서열; 또는

[0062] 서열번호 87로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0063] 본 발명의 또 다른 하나의 양태에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산을 제공한다. 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산은,

[0064] 서열번호 44 또는 그 중 제380 내지 1420 위치 또는 그 중 제443 내지 1420 위치로 표시된 뉴클레오티드(nucleotide) 서열;

[0065] 서열번호 45 또는 그 중 제380 내지 1723 위치 또는 그 중 제443 내지 1723 위치로 표시되는 뉴클레오티드 서열;

[0066] 서열번호 46 또는 그 중 제380 내지 1855 위치 또는 그 중 제443 내지 1855 위치로 표시되는 뉴클레오티드 서열;

[0067] 서열번호 47 또는 그 중 제380 내지 1864 위치 또는 그 중 제443 내지 1864 위치로 표시되는 뉴클레오티드 서열;

[0068] 서열번호 48 또는 그 중 제380 내지 1990 위치 또는 그 중 제443 내지 1990 위치로 표시되는 뉴클레오티드 서열;

[0069] 서열번호 85로 표시되는 뉴클레오티드 서열;

[0070] 서열번호 87로 표시되는 뉴클레오티드 서열; 또는

[0071] 서열번호 89로 표시되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0072] 본 발명의 또 다른 하나의 양태에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 발현 벡터는 렌티 바이러스 플라스미드(plasmid) pWPT (또는 pWPT-eGFP)로부터 유래된다.

[0073] 본 발명의 다른 하나의 양태에 있어서, 상기 벡터를 포함하는 바이러스(virus)를 제공한다.

[0074] 상기 키메라 항원 수용체, 또는 이를 코딩하는 핵산, 또는 상기 핵산을 포함하는 발현 벡터 또는 바이러스의 용도에 있어서, 글리피칸-3을 발현하는 종양을 타겟팅하는 유전자 변형된 면역 세포를 제조하기 위한 것이다.

- [0075] 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 글리피칸-3을 발현하는 종양은 간암, 흑색종, 난소 투명 세포암, 난황 낭종양, 신경 모세포종을 포함한다(하지만 이에 한정되지 않는다).
- [0076] 본 발명의 또 다른 하나의 양태에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산, 또는 상기 핵산을 함유한 발현 벡터 또는 바이러스가 형질 도입되거나; 표면에 상기 키메라 항원 수용체가 발현된 유전자 변형된 면역 세포를 제공한다.
- [0077] 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 면역 세포는 외인성 사이토카인의 코딩 서열을 더 포함하고; 바람직하게, 상기 사이토카인은 IL-12, IL-15 또는 IL-21을 포함한다.
- [0078] 또 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 면역 세포는 CD3 ζ 을 포함하지 않지만, CD28의 세포 내 신호 도메인, CD137의 세포 내 신호 도메인 또는 이들의 조합을 포함하는 다른 하나의 키메라 항원 수용체를 추가로 발현한다.
- [0079] 또 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 면역 세포는 케모카인(chemokine) 수용체를 더 발현하고; 바람직하게, 상기 케모카인 수용체는 CCR2를 포함한다.
- [0080] 또 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 면역 세포는 PD-1 발현을 감소시킬 수 있는 siRNA 또는 PD-L1을 차단시킬 수 있는 단백질을 더 발현한다.
- [0081] 또 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 면역 세포는 안전 스위치를 더 발현하고; 바람직하게, 상기 안전 스위치는 iCaspase-9, 절단된(Truancated) EGFR 또는 RQR8을 포함한다.
- [0082] 또 다른 하나의 바람직한 예에 있어서, 상기 면역 세포는 T임파구, NK세포 또는 NKT세포를 포함한다.
- [0083] 본 발명의 또 다른 하나의 양태에 있어서, 글리피칸-3을 발현하는 종양을 억제하는 약물을 제조하기 위한 상기 유전자 변형된 면역 세포의 용도를 제공한다.
- [0084] 본 발명의 또 다른 하나의 양태에 있어서,
- [0085] 상기 어느 하나의 항체 또는 상기 항체를 코딩하는 핵산; 또는
- [0086] 상기 어느 하나의 면역 접합체 또는 상기 접합체를 코딩하는 핵산; 또는
- [0087] 상기 어느 하나의 키메라 항원 수용체 또는 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산; 또는
- [0088] 상기 어느 하나의 유전자 변형된 면역 세포를 포함하는 약제학적 조성물(약물 또는 진단 시약을 포함)을 제공한다.
- [0089] 본 발명의 다른 양태는 본 발명의 개시 내용으로부터 당업자에게 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0090] 도1은 단일 과지(phage) ELISA 실험에서 인간 GPC3과 대조 BSA에 대한 항체P1B12E와 P7D4의 결합 상황을 나타낸다. 인간 GPC3과 음성 대조 BSA의 간에 대하여 항체P1B12E와 P7D4는 선별된 두 개의 항체가 인간 GPC3에 특이적으로 결합될 수 있는 것을 증명한다.
- 도2는 인간 GPC3의 항체 정제 전기 영동을 나타낸다.
- 도3은 GPC3이 양성을 발현하는 HepG2 세포에 대한 항체scFv-P1B12E-Fc와 scFv-P7D4-Fc의 결합 활성 분석을 나타낸다.
- 도4는 GPC3에 대한 P7D4 계열의 항체 결합 능력의 SPR 분석을 나타낸다.
- 도5는 P7D4 계열 항체가 재조합 인간 GPC3에 특이적으로 결합하는 것을 나타낸다.
- 도6은 발현 정제된 GPC3 단백질의 SDS PAGE 전기 영동 검증을 나타낸다.
- 도7은 인간 GPC3에 대한 항체Y035의 결합 동력학 분석을 나타낸다.
- 도8은 인간 GPC3에 대한 항체5A5의 결합 동력학 분석을 나타낸다.
- 도9는 GPC3이 양성을 발현하는 HepG세포에 특이적으로 결합하는 항체Y035를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0091] 본 발명자는 깊은 연구와 선별을 거쳐, GPC3을 특이적으로 인식하는, 단일 사슬 항체 및 인간화된 항체를 포함하는 항체를 얻었다. 본 발명의 항체는 여러가지 타겟팅 항종양 약물 및 종양을 진단하는 약물의 제조에 응용될 수 있다.
- [0092] 항GPC3 항체
- [0093] 본 발명자는 완전 인간 천연 항체 라이브러리(antibody libraries)에서 선별하여 GPC3에 대하여 결합 성능이 우수한 특이성 항체를 획득하였고, 더 나아가 아미노산(amino acid)을 돌연변이시켜 친화성이 더욱 현저하게 향상된 항GPC3 항체를 얻었으며, 결합 성능을 발휘하는 관건 CDR 영역을 찾았다.
- [0094] 본 발명자는 하이브리도마 기술(hybridoma technique)을 이용하여 항GPC3의 마우스 항체를 얻고, 이를 인간화시키며, 반복 비교를 통해, GPC3에 대하여 결합 성능이 극히 우수한 인간화 항GPC3 항체를 얻고, 결합 성능을 발휘하는 관건 CDR 영역을 찾았다.
- [0095] 본 발명의 항체는 완전한 면역 글로불린(immunoglobulin) 분자일 수 있고, 항원 결합 세그먼트일 수도 있으며, Fab 세그먼트, Fd 세그먼트, Fv 세그먼트, $F(ab')_2$ 세그먼트, 상보성 결정 영역(CDR) 세그먼트, 단일 사슬 항체(scFv), 도메인 항체, 2가 단일 사슬 항체, 단일 사슬 파지 항체, 2중 특이적 2중 사슬 항체, 3중 사슬 항체, 4중 사슬 항체를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0096] 항체의 항원 결합 특성은 중쇄와 경쇄 가변 영역에 위치된 3개 특정된 영역으로 설명되어, 상보성 결정 영역(complementarity determining region, CDR)이라고 지칭하고, 상기 CDR 영역은 가변 영역을 4개의 프레임 워크 영역(FR, framework regions)으로 간격을 두며, 4개의 FR의 아미노산 서열은 비교적 보수적이고, 직접적으로 결합 반응에 참여하지 않는다. 이러한 CDR은 환형 구조를 형성하되, 이 사이의 FR에 의해 형성된 β 폴드는 공간 구조 상에서 서로 가깝고, 중쇄 상의 CDR과 대응되는 경쇄 상의 CDR에 의해 항체의 항원 결합 사이트를 구성하였다. 동일한 유형의 항체의 아미노산 서열을 비교함으로써, 어느 아미노산이 FR 또는 CDR 영역을 구성하였는지를 확정할 수 있다. CDR 영역은 면역학적으로 흥미로운 단백질의 서열이고, 본 발명의 항체의 CDR 영역은 새로운 것이다. 상기 항체는 본 명세서에서 제시하는 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 CDR 영역을 포함할 수 있다.
- [0097] 본 발명의 다른 하나의 양태에 있어서, 본 명세서에서의 상기 항체의 기능적 변이체를 포함한다. 변이체가 부모 항체와 경쟁하여 GPC3과 특이적으로 결합할 수 있고, 종양 세포에 의해 발현된 GPC3을 인식하는 능력이 본 발명의 실시예에서 제공되는 구체적인 항체와 유사하다. 상기 기능 변이체는 뉴클레오티드와 아미노산 치환, 첨가 및 결실을 포함하는 보수적인 서열 변형을 가질 수 있다. 이러한 변형들은 정향 돌연변이 유도와 무작위 PCR 매개 돌연변이 유도와 같은 본 기술분야에 공지된 표준 기술에 의해 도입될 수 있고, 천연 및 비천연 뉴클레오티드와 아미노산을 포함할 수 있다. 바람직하게, 서열의 변형은 상기 항체의 CDR 영역 이외의 영역에서 일어난다.
- [0098] 면역 접합체
- [0099] 본 발명은 다기능 면역 접합체도 제공하는 것으로, 이는 본 발명의 항체를 포함하고 적어도 하나의 다른 유형의 기능성 분자도 포함한다. 상기 기능성 분자는 종양 표면 마커를 타겟팅하는 분자, 종양을 억제하는 분자, 면역 세포의 표면 마커를 타겟팅하는 분자 또는 검출 가능한 라벨로부터 선택되지만 이에 한정되지 않는다. 상기 항체는 공유 결합, 커플링, 부착, 가교 등 방식에 의해 상기 기능성 분자와 접합체를 구성한다.
- [0100] 하나의 바람직한 수단에 있어서, 상기 면역 접합체는 본 발명의 항체 및 적어도 하나의 종양 표면 마커를 타겟팅하는 분자 또는 종양을 억제하는 분자를 포함할 수 있다. 상기 종양을 억제하는 분자는 종양을 억제하는 사이토카인, 또는 항종양 독소일 수 있고; 바람직하게, 상기 사이토카인은 IL-12, IL-15, IFN-beta, TNF-alpha를 포함한다(하지만 이에 한정되지 않는다). 상기 종양 표면 마커를 타겟팅하는 분자는 예를 들어 본 발명의 항체와 협동 작용하여, 종양 세포를 더욱 정확하게 타겟팅할 수 있다.
- [0101] 하나의 바람직한 수단에 있어서, 상기 면역 접합체는 본 발명의 항체 및 검출 가능한 라벨을 포함할 수 있다. 상기 검출 가능한 라벨은 형광 라벨, 발색 라벨을 포함하지만 이에 한정되지 않고; 예를 들어 효소, 보결기, 형광 재료, 발광 재료, 생물 발광 재료, 방사성 재료, 양전자 방출 금속 및 비방사성 상자성 금속 이온을 포함한다. 하나 이상의 라벨도 포함할 수 있다. 검출 및/또는 분석 및/또는 진단 목적으로 항체를 표기하기 위해 사용되는 표기는 사용된 특정 검출/분석/진단 기술 및/또는 방법, 예를 들어, 면역 조직 화학 염색(조직) 샘플, 유동 세포 계측 기술 등에 의존한다. 본 기술분야의 공지된 검출/분석/진단 및/또는 방법에 적합한 표기는 당업자

에게 잘 알려져 있다.

- [0102] 하나의 바람직한 수단에 있어서, 상기 면역 접합체는 본 발명의 항체 및 면역 세포의 표면 마커를 타겟팅하는 분자를 포함할 수 있다. 상기 면역 세포의 표면 마커를 타겟팅하는 분자는 면역 세포를 인식할 수 있고, 이는 본 발명의 항체를 면역 세포에 운반하며, 동시에 본 발명의 항체는 면역 세포를 종양 세포에 타겟팅시켜, 면역 세포가 종양을 특이적으로 살상하도록 한다.
- [0103] 직접적인 또는 간접적인(예를 들어, 링커에 의해) 접합에 의해 면역 접합체를 화학적으로 생성시키는 수단으로서, 상기 면역 접합체는 본 발명의 항체 및 적합한 기타 단백질을 포함하는 융합 단백질로서 생성될 수 있다. 융합 단백질은 본 기술분야에 공지된 방법으로 생성될 수 있고, 예를 들어, 프레임에 부합되는 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 적합한 라벨을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 구축하고 다음 상기 핵산 분자를 발현시킴으로써 재조합적으로 생성된다.
- [0104] 본 발명의 다른 하나의 양태에 있어서, 본 발명의 적어도 하나의 항체, 이의 기능 변이체 또는 면역 접합체를 코딩하는 핵산 분자를 제공한다. 일단 관련 서열을 얻게되면, 재조합 방법으로 관련 서열을 대량으로 얻을 수 있다. 이는 통상적으로 박터에 클로닝(cloning)하고, 다시 세포에 옮긴 후, 통상적인 방법에 의해 증식시킨 후 숙주 세포로부터 분리하여 관련 서열을 얻는다.
- [0105] 본 발명은 또한 상기 적절한 DNA 서열 및 적절한 프로모터(promoters) 또는 제어 서열을 포함하는 박터에 관한 것이다. 이러한 박터는 적절한 숙주 세포를 형질 전환시켜 단백질을 발현할 수 있도록 한다. 숙주 세포는 세균 세포와 같은 원핵 세포; 또는 효모 세포와 같은 하등 진핵 세포; 또는 포유 동물 세포와 같은 고등 진핵 세포일 수 있다.
- [0106] 키메라 항원 수용체 및 유전자 변형된 면역 세포
- [0107] 본 발명은 면역 효과 세포(면역 세포) 표면에 발현되는 키메라 항원 수용체를 제공하는 것으로, 상기 키메라 항원 수용체는 순차적으로 연결된 세포 외 결합 영역, 막 관통 영역과 세포 내 신호 영역을 포함하고, 여기서 상기 세포 외 결합 영역은 본 발명의 항체를 포함한다. 면역 효과 세포가 표면 GPC3의 종양 세포에 대하여 고도의 특이적인 세포 독성을 구비할 수 있도록 상기 키메라 항원 수용체를 면역 효과 세포의 표면에 발현시킨다.
- [0108] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 상기 “면역 세포” 와 “면역 효과 세포” 를 교환하여 사용할 수 있고, 이는 T임파구, NK세포 또는 NKT세포 등을 포함하며, 바람직하게는, NK세포와 T임파구이다.
- [0109] 본 발명의 바람직한 수단에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체에서, 포함되는 항체는 단일 사슬 항체이고, 이는 CD8 경첩 영역을 통해 CD8 또는 CD28의 막 관통 영역에 연결되며, 막 관통 영역 바로 뒤에 세포 내 신호 영역이 있다.
- [0110] 본 발명은 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산도 포함한다. 본 발명은 또한 상기 폴리뉴클레오티드 (polynucleotides)의 변이체에 관한 것으로, 이는 본 발명과 동일한 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드의 세그먼트, 유사물 및 유도체를 코딩한다.
- [0111] 키메라 항원 수용체의 막 관통 영역은 CD8 또는 CD28 등 단백질의 막 관통 영역으로부터 선택될 수 있다. 인간 CD8 단백질은 $\alpha\beta$ 또는 $\gamma\delta$ 두 사슬로 이루어진 이종 이량체이다. 본 발명의 하나의 실시 수단에 있어서, 막 관통 영역은 CD8 α 또는 CD28의 막 관통 영역으로부터 선택된다. 이 외에, CD8 α 경첩 영역(hinge)은 하나의 유연한 영역이므로, CD8 또는 CD28과 막 관통 영역과 경첩 영역은 키메라 항원 수용체CAR의 타겟 인식 도메인scFv 와 세포 내 신호 영역을 연결시키는데 사용된다.
- [0112] 세포 내 신호 영역은 CD3 ζ , Fc ϵ RI γ , CD27, CD28, CD137, CD134, MyD88, CD4 단백질의 세포 내 신호 영역, 및 이들의 조합으로부터 선택될 수 있다. CD3 분자는 5개의 서브유닛(subunits)으로 이루어지고, 여기서 CD3 ζ 서브유닛(또한 CD3 zeta라고 지칭하고, Z라고 약칭함)은 3개의 ITAM 모티프(motifs)를 포함하며, 상기 모티프는 TCR-CD3 복합체의 중요한 신호 형질 도입 영역이다. CD3 δ Z는 절단된 ITAM 모티프를 포함하지 않은 CD3 ζ 서열이고, 본 발명의 실시에서 일반적으로 음성 대조군으로 구축된다. Fc ϵ RI γ 은 주로 비만 세포와 호염기성 세포 표면에 분포되고, 하나의 ITAM 모티프를 포함하며, 구조, 분포 및 기능에서 CD3 ζ 와 유사하다. 이 외에, 상술한 바와 같이, CD28, CD137, CD134는 공동 자극 신호 분자이고, 각각의 리간드에 결합된 후 세포 내 신호 영역에서 생성된 공동 자극 효과는 면역 효과 세포(주로 T임파구)의 지속적인 증식을 일으키며, 면역 효과 세포에 의해 분비되는 IL-2와 IFN- γ 와 같은 사이토카인의 수준을 향상시킬 수 있는 동시에, CAR 면역 효과 세포의 체내에서의 활성 주기와 항종양 효과를 향상시킨다.

- [0113] 본 발명의 키메라 항원 수용체는,
- [0114] 본 발명의 항체, CD8 및 CD3 ζ;
- [0115] 본 발명의 항체, CD8, CD137 및 CD3 ζ;
- [0116] 본 발명의 항체, CD28 분자의 막 관통 영역, CD28 분자의 세포 내 신호 영역 및 CD3 ζ; 또는
- [0117] 본 발명의 항체, CD28 분자의 막 관통 영역, CD28 분자의 세포 내 신호 영역, CD137 및 CD3 ζ과 같은 순서로 연결될 수 있다.
- [0118] 또한, 이 조합에 있어서, 관련 키메라 항원 수용체 단백질에서 CD28a는 CD28 분자의 막 관통 영역을 대표하고, CD28b는 CD28 분자의 세포 내 신호 영역을 대표한다. 상기 다양한 키메라 항원 수용체를 scFv(GPC3)-CAR라고 총칭한다.
- [0119] 본 발명은 상기 면역 효과 세포 표면에 발현되는 키메라 항원 수용체 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 더 제공한다. 하나의 구체적인 실시 수단에 있어서, 본 발명에 사용되는 벡터는 렌티 바이러스 플라스미드 벡터pWPT-eGFP이다. 상기 플라스미드는 제3세대 자가 불활성화 렌티 바이러스 벡터 시스템에 속하는 것으로, 상기 시스템에는, 단백질 Gag/Pol을 코딩하고, Rev 단백질을 코딩하는 포장 플라스미드(packaging plasmid) psPAX2; VSV-G 단백질을 코딩하는 포막 플라스미드(envelope plasmid) PMD2.G; 및 빈 벡터(empty vector) pWPT-eGFP인 모두 3개의 플라스미드가 포함되고, 이를 목적 핵산 서열, 즉 CAR를 코딩하는 핵산 서열을 재조합하는데 사용할 수 있다. 빈 벡터 pWPT-eGFP에서 증가형 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein, eGFP)의 발현은 연장 인자-1 α(elongation factor-1 α, EF-1 α) 프로모터에 의해 조절된다. CAR를 코딩하는 목적 핵산 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터 pWPT-eGFP-F2A-CAR는 구제역 바이러스(food-and-mouth disease virus, FMDV)로부터 유래되는 리보좀 스키핑 서열(ribosomal skipping sequence 2A)(F2A라고 약칭함)에 의해 eGFP와 CAR의 공동 발현을 실현한다.
- [0120] 본 발명은 상기 벡터를 포함하는 바이러스를 더 포함한다. 본 발명의 바이러스는 포장된 후의 감염성이 있는 바이러스를 포함하되, 감염성이 있도록 포장되는 바이러스가 필요로 하는 성분을 포함하는 포장될 바이러스도 포함한다. 외인성 유전자를 면역 효과 세포에 형질 도입시키는데 사용될 수 있는 본 기술분야에서 공지된 기타 바이러스 및 이와 대응되는 플라스미드 벡터도 본 발명에 사용될 수 있다.
- [0121] 본 발명은 본 발명의 핵산이 형질 도입된 유전자 변형된 면역 효과 세포 또는 본 발명의 상기 핵산을 포함하는 상기 재조합 플라스미드 또는 상기 플라스미드를 포함하는 바이러스가 형질 도입된 유전자 변형된 면역 효과 세포도 제공한다. 비바이러스(non-viral) 및 바이러스 형질 도입 방법을 포함하는 본 기술분야의 통상적인 핵산 형질 도입 방법은 모두 본 발명에 사용될 수 있다. 비바이러스 형질 도입에 의한 방법은 전기 천공법과 트랜스포존 방법(transposon methods)을 포함한다. 근래, Amaxa 회사에서 연구 개발한 Nucleofector 핵 형질 감염 장치는 외래 유전자를 세포핵으로 직접 도입시켜 목적 유전자의 고효율적인 형질 도입을 얻을 수 있다. 이 외에, 슬리핑 뷔티 트랜스포존(Sleeping Beauty system) 또는 PiggyBac 트랜스포존 시스템의 형질 도입 효율은 전기 천공법보다 크게 향상되고, nucleofector 형질 감염 장치와 슬리핑 뷔티 트랜스포존 시스템의 병용은 이미 보도되었고[Davies JK., et al. Combining CD19 redirection and alloantigenization to generate tumor-specific human T cells for allogeneic cell therapy of B-cell malignancies. Cancer Res, 2010, 70(10): OF1-10.], 상기 방법은 비교적 높은 형질 도입 효율을 나타낼뿐만 아니라, 목적 유전자의 사이트별 통합도 얻을 수 있다. 본 발명의 하나의 실시 수단에 있어서, 키메라 항원 수용체 유전자에 의해 변형된 면역 효과 세포를 구현하는 형질 도입 방법은 레트로바이러스(retrovirus) 또는 렌티 바이러스와 같은 바이러스에 의한 형질 도입 방법이다. 상기 방법은 형질 도입 효율이 높고, 외인성 유전자의 안정적인 발현이 가능하며, 체외 배양된 면역 효과 세포가 임상급 개수에 도달하는 시간을 단축시킬 수 있는 등 장점이 있다. 상기 유전자 변형 면역 효과 세포 표면에 형질 도입된 핵산은 전사, 번역을 통해 그 표면에 발현될 수 있다. 다양하게 배양된 종양 세포에 대하여 체외 세포 독성 실험을 진행하는 것으로써, 본 발명의 면역 효과 세포가 고도의 특이적 종양 세포 살상 효과(즉 세포 독성)가 있음을 증명하였다. 따라서, 본 발명의 키메라 항원 수용체 단백질을 코딩하는 핵산은, 상기 핵산을 포함하는 플라스미드, 상기 플라스미드를 포함하는 바이러스 및 상기 핵산, 플라스미드 또는 바이러스가 형질 도입된 유전자 변형 면역 효과 세포를 종양의 면역 치료에 효과적으로 사용할 수 있다.
- [0122] 본 발명의 면역 세포는 외인성 사이토카인의 코딩 서열도 포함하고; 상기 사이토카인은 IL-12, IL-15 또는 IL-21 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 이러한 사이토카인은 면역 조절 또는 항종양 활성을 포함하고, T세포 및 활성화된 NK 세포의 기능을 향상시킬 수 있거나, 직접 항종양 작용을 발휘한다. 따라서, 당업자는 이러한

사이토카인의 사용이 상기 면역 세포 작용을 더욱 잘 발휘하는데 도움이 된다는 것을 이해할 수 있다.

[0123] 본 발명의 면역 세포는 상기 키메라 항원 수용체 외의 다른 키메라 항원 수용체도 발현할 수 있고, 상기 수용체는 CD3ζ를 포함하지 않지만, CD28의 세포 내 신호 도메인, CD137의 세포 내 신호 도메인 또는 양자의 조합을 포함한다.

[0124] 본 발명의 면역 세포는 CCR2를 포함하지만 이에 한정되지 않는 케모카인 수용체를 발현할 수도 있다. 당업자는 상기 CCR2케모카인 수용체는 체내의 CCR2와 경쟁적으로 결합할 수 있고, 종양의 전이를 차단하는데 유리하다는 것을 이해할 수 있다.

[0125] 본 발명의 면역 세포는 PD-1에 의해 발현된 siRNA를 감소시키거나 PD-L1을 차단시킬 수 있는 단백질을 더 발현 할 수 있다. 당업자들은, PD-L1과 이의 수용체 PD-1의 상호 작용을 경쟁적으로 차단하는 것은, 항종양 T세포 반응에 유리하여, 종양 성장을 억제하는 것을 이해할 수 있다.

[0126] 본 발명의 면역 세포 안전 스위치를 더 발현할 수 있고; 바람직하게, 상기 안전 스위치는 iCaspase-9, 절단된 (Truancated) EGFR 또는 RQR8을 포함한다.

약제학적 조성물

[0128] 본 발명의 항체, 상기 항체를 포함하는 면역 접합체 및 유전자 변형된 면역 세포를 약제학적 조성물 또는 진단 시약 제조에 응용할 수 있다. 상기 조성물은 유효량의 상기 항체, 면역 접합체 또는 면역 세포를 포함하는 외에, 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함한다. 용어 "약학적으로 허용 가능한"은 분자 자체와 조성물을 동물 또는 사람에게 적절하게 투여할 때, 불리한, 알레르기성 또는 기타 부작용을 일으키지 않는 것을 의미한다.

[0129] 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 이의 성분으로서의 일부 구체적인 예로, 유당(lactose), 포도당(glucose) 및 자당(sucrose)과 같은 당류; 옥수수 전분과 감자 전분(Potato starch)과 같은 전분; 나트륨카르복시메틸셀룰로오스(Sodium carboxymethyl cellulose), 에틸셀룰로오스(Ethyl cellulose) 및 메틸셀룰로오스(methyl cellulose)와 같은 셀룰로오스 및 이의 유도체; 트라가칸트 고무(gum tragacanth) 분말; 맥아(malt); 젤라틴(gelatin); 탈크(talc); 스테아르산(stearic acid) 및 마그네슘스테아르산(magnesium stearate)과 같은 고체 윤활체; 황산칼슘(calcium sulfate); 땅콩유, 면실유, 참기름, 올리브오일, 옥수수기름 및 코코아기름과 같은 식물유; 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 글리세린(glycerin), 소르비톨(sorbitol), 만니톨(mannitol) 및 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol)과 같은 폴리올(polyhydric alcohols); 알긴산(alginic acid); 트윈(Tween β)과 같은 유화제; 라우릴황산나트륨(sodium lauryl sulfate)과 같은 습윤제; 착색제; 향미제; 정제, 안정제; 항산화제; 방부제; 무열원수; 등장 염수(isotonic saline solutions); 및 인산염(phosphate) 완충액 등이 있다.

[0130] 본 발명의 조성물은 수요에 따라 여러가지 제형으로 제조 가능하고, 환자의 유형, 연령, 체중 및 대체적인 질병 상태, 투여 방식 등 요소에 따라 의사에 의해 환자에 투여될 효과적인 유효량을 결정하여 투여할 수 있다. 투여 방식은 예를 들어 주사 또는 기타 치료 방식을 사용할 수 있다.

[0131] 아래, 구체적인 실시예에 결부하여, 본 발명을 더 설명하고자 한다. 이러한 실시예는 단지 본 발명을 설명하기 위한 것이고 본 발명의 범위를 제한하려는 것은 아니라는 것을 이해하여야 한다. 하기 실시예에서 구체적인 조건을 표시하지 않은 실험 방법은, 통상적으로 J. Sambrook et al., , 분자 클로닝 실험 지침, 제3 버전, 과학 출판사, 2002에서의 조건과 같은 통상적인 조건 또는, 제조업체에서 견의하는 조건에 따라 진행한다.

[0132] 실시예1. 인간 GPC3에 결합하는 특이적 단일 사슬 항체(scFv)의 제조

[0133] 1.1 폴리 디스플레이(phage display)에 의한 GPC3 특이적 결합 항체의 선별

[0134] 폴리 디스플레이 기술을 이용하여, 완전 인간 천연 항체 라이브러리에서 인간 GPC3(아래 huGPC3이라고 약칭함) 특이적 항체를 선별한다. 이를 위해, 400 ml의 2×YT/암피실린(ampicillin) 배지에 폴리 디스플레이 완전 인간 단일 사슬 항체 천연 라이브러리의 글리세롤 박테리아(glycerol bacteria)(상해 루이진(Ruijin) 바이오 테크놀로지(biotechnology) 유한회사로부터 구매함)를 접종시켜, 세포 밀도가 OD₆₀₀ = 0.1이 되도록 하고, 37 °C의 온도와 200 rpm 조건 하에서 세포 밀도가 OD₆₀₀ = 0.5에 도달될 때까지 진탕 배양한다. 10¹² pfu의 M13K07 보조파지((helper phage))(Invitrogen로부터 구매함)로 감염시키고, 30 °C의 온도와 50 rpm의 조건 하에서 30분 동안 배양한다. 50 mg/L의 카나마이신(kanamycin)을 넣은 후, 37 °C의 온도와 200 rpm의 조건 하에서 30분 동안 진탕 시킨 후, 원심 분리(15분, 1600×g, 4 °C)에 의해 침전을 분리하고, 400 ml의 2×YT/암피실린/카나마이신 배지

에 재부유시키며, 37 °C의 온도와 200 rpm의 조건 하에서 16시간 동안 진탕 배양한다. 마지막으로 세포는 원심 분리(20분, 5000×g, 4 °C)에 의해 침전을 분리시켜 버리고, 상등액을 0.45 μm 규격의 필터로 여과한 후, 1/4 체적의 20 %(w/v)PEG8000, 2.5 M의 NaCl 용액을 넣어 아이스 배스(ice bath)에서 1시간 동안 보온시켜 과자 과립을 침전시킨다. 이어서, 침전을 원심 분리(20분, 8000×g, 4 °C)시키고, 상등액을 버리며, 과자를 25 ml의 예냉 PBS(137 mM의 NaCl, 2.7 mM의 KCl, 8 mM의 Na₂HPO₄, 2 mM의 KH₂PO₄)에 재부유시키고, 원심 분리(5분, 20000×g, 4 °C)시킨다. 상등액에 1/4 체적의 20 %(w/v)의 PEG8000, 2.5 M의 NaCl 용액을 넣고, 아이스 배스에서 다시 30분 동안 과자 과립을 침전시킨다. 침전을 원심 분리(30분, 20000×g, 4 °C)시키고, 다시 과자 침전을 2 ml의 예냉 PBS에 재부유시키며, 열음 위에 30분 동안 유지시켜 원심 분리(30분, 17000×g, 4 °C)시킨다. 1:1의 비율로 상등액과 4 %(w/v)의 BSA를 함유한 PBS 용액을 혼합하여, 회전 혼합기에 놓고, 실온 하에서 30분 동안 보온시킨 후, 직접 선별에 사용한다.

[0135] 상기 과자 항체 라이브러리를 사용하여, 비오티닐화된(biotinylated) 인간 GPC3 재조합 단백질(상해 루이진 바이오 테크놀로지 유한회사로부터 구매함)에 대하여, 4차례 정향 선별을 실시하고, 선별 방식은 하기와 같다. 상기 과자 항체 라이브러리와 비오티닐화된 항원 GPC3을, 실온 하에서 2시간 동안 보온시킨 후, 밀폐액인 2 %(w/v)의 BSA(소혈청알부민(bovine serum albumin), 상해 생물 공정으로부터 구매함)로 밀폐시킨 스트렙타비딘(streptavidin) 친화 자석 구슬(streptavidin magnetic beads) MyOne C1(Invitrogen으로부터 구매함)로 실온 하에서 30분 동안 보온시킨다. 다음, PBST(0.1 %의 트윈20(tween20)을 함유함) 완충액으로 자석 구슬을 세척하고, 비특이적 결합 또는 결합 능력이 비교적 약한 과자를 제거한다. 결합 능력이 강한 과자를, 글리신-염산(glycine-HCl)(pH 2.2)으로 자석 구슬에서 용출시키고, Tris 중화액(pH 9.1)으로 중화시킨 후, 대수 성장기 중기 단계에 있는 대장균 ER2738을 감염시켜, 다음 선별에 사용된다. 4차례 선별 과정에서, 자석 구슬의 용량은 각각 50 μl, 20 μl, 10 μl와 10 μl이고, 비오틴으로 표기된 항원 GPC3의 농도는 각각 200 nM, 10 nM, 5 nM와 1 nM이며, PBST의 세척 회수는 각각 10번, 10번, 15번과 20번이다.

1.2 GPC3 특이적 결합 항체의 검증

[0136] [0137] 네번쩨 선별에서 얻은 클론에서 무작위로 96개를 선택하여, 단일 과자ELISA(효소 면역 흡착 실험)로 이와 인간 GPC3의 결합 능력을 분석한다. 이를 위해, 각각의 단일 균락을 96웰의 딥웰 배양 플레이트에 300 μl의 2×YT/암페실린 배지(2 %의 포도당을 함유함)로 접종시키고, 37 °C의 온도와 250 rpm의 조건 하에서 16시간 동안 진탕 배양한다. 20 μl의 배양 물질을 500 μl의 2×YT/암페실린 배지(0.1 %의 포도당을 함유함)에 접종시키고, 37 °C의 온도와 250 rpm의 조건 하에서 1.5시간 동안 진탕 배양한다. 보조과자 용액을 준비하고, 75 μl의 M13K07(적 정도는 3×10^{12} pfu/ml임)을 취하여 15 ml의 2×YT 배지에 혼합하며, 50 μl/웰로 배양 플레이트에 첨가한다. 37 °C의 온도와 150 rpm의 조건 하에서 30분 동안 배양한 후, 준비한 카나마이신 용액을 50 μl/웰(180 μl의 50 mg/ml의 카나마이신을 취하여, 15 ml의 2×YT 배지에 첨가함)로 첨가하고, 37 °C의 온도와 250 rpm의 조건 하에서 16시간 동안 진탕 배양한다. 마지막으로 세포를 원심 분리하여 침전시키고(30분, 5000×g, 4 °C), 상등액을 새로운 96웰 딥웰 배양 플레이트에 옮긴다.

[0138] 단일 과자ELISA를 진행하기 위하여, 96웰 MediSorp ELISA 플레이트(Nunc로부터 구매함)에서 각각 100 ng/웰의 항원 GPC3 및 음성 대조 단백질 BSA(100 μl/웰)를 사용하여, 4 °C의 온도 하에서 코팅하여 하룻밤 경과한다. 각각의 웰은 2 %의 BSA(w/v)를 함유한 PBST로 밀봉한다. 이어서, PBST로 웰을 세번 세척하여 깨끗하게 처리한다. 다음, 100 μl/웰 상부에서 제조한 각각의 과자 용액을 플레이트의 각 웰에 넣는다. 37 °C의 온도 하에서 2시간 동안 보온시킨 후, PBST로 웰을 세번 세척한다. 결합된 과자를 검출하기 위해, 항M13 항체 과산화물 디스뮤타아제 접합체(GE Healthcare로부터 구매함)를 1:5000로 PBST에 희석하고, 100 μl를 취하여 각각의 웰에 넣는다. 37 °C에서 1시간 동안 보온시킨 후, PBST로 웰을 세번 헹구고, 다음 PBS로 세번 헹군다. 마지막으로 50 μl의 TMB 기질을 취하여 웰에 넣고, 실온 하에서 10분 동안 발색시킨 후, 각각의 웰에 50 μl의 2 M의 H₂SO₄를 넣어 발색 반응을 중지시킨다. 효소 결합 면역 측정기(Bio-Rad)로 450 nm 하에서 소광 값을 측정한다.

[0139] 시퀀싱(Sequencing) 분석에 결합하여, 두 개의 상이한 단일 사슬 항체 P1B12E(서열번호 1(뉴클레오티드), 2(아미노산))와 P7D4(서열번호 3(뉴클레오티드), 4(아미노산))를 관찰하였고, ELISA 실험에서 인간 GPC3(huGPC3) 결합 신호에 대하여 현저하게 강하되, BSA에 결합되지 않는다(도1).

실시예2. 항GPC3의 단일 사슬 항체의 발현과 정제

[0140] 표준 방식에 따라, 프라이머쌍(Primer pair) V5-P1B12E-F(서열번호 5)와 V5-P1B12E-R(서열번호 6)를 사용하여 선별하여 얻은 P1B12E를 클론하는 플라스미드(pCantab 5E-P1B12E)에서 scFv-P1B12E 세그먼트를 증폭시키고, 프

라이머 쌍 V5-P7D4-F(서열번호 7)와 V5-P7D4-R(서열번호 8)를 사용하여 선별하여 얻은 P7D4를 클론하는 플라스미드(pCantab 5E-P7D4)에서 scFv-P7D4 세그먼트를 증폭시키며, NheI/BamHI (NEB로부터 구매함) 이중 효소로 절단하고, T4 DNA 연결 효소(ligase)(NEB로부터 구매함)를 마찬가지로 NheI/BamHI 이중 효소로 절단하여 벡터 플라스미드 pCMV-V5-Fc(상기 벡터는 다중 클론 사이트 다운 스트림에서 인간 항체 IgG1을 발현하는 Fc 세그먼트를 융합하고, 아래 V5-Fc로 약칭하며, 상해 루이진 바이오 테크놀로지 유한회사로부터 구매함)에 연결시키고 숙주 균주 TOP10에 형질 전환시키며, 클론을 선택하여 PCR 검증 양성 클론을 통과하고 시퀀싱을 통해, 각각 V5-scFv-P1B12E-Fc와 V5-scFv-P7D4-Fc 진핵 발현 플라스미드를 얻은 것을 확인하였다.

[0142] 상기 발현 플라스미드를 각각 성장이 우수한 HEK-293F 세포에 형질 감염시키고, 37 °C의 온도, 5 %의 CO₂, 125 rpm의 조건 하에서 진탕시켜 연속 7일 동안 배양하며, 4000 rpm으로 10분 동안 원심 분리시켜, 침전을 제거하고, 상등액을 수집하여, 0.45 μm의 필터로 여과하며, 처리된 샘플을 protein A (GE로부터 구매함) 친화 컬럼으로 친화 정제시켜, 최종적으로 정제된 항체-Fc 융합 단백질 scFv-P1B12E-Fc와 scFv-P7D4-Fc를 얻고, 검증 결과는 도2에서 나타내는 바와 같으며, 이의 분자량은 50 kD 정도이다.

[0143] 실시예3. 유동 세포학으로 각각 세포주와 항GPC3단일 사슬 항체의 결합 상황을 분석

[0144] 형광 활성 세포 분류기(FACS)(BD회사, FACSCalibur)로 항체 scFv-P1B12E-Fc와 scFv-P7D4-Fc가 각각 GPC3 양성의 간암 HepG2 세포주(ATCC)와의 결합 능력을 분석한다.

[0145] 구체적인 방법은 하기와 같다.

[0146] 1) 대수 성장기에 있는 간암 HepG2 세포주를 취하여 6 cm의 접시에 접종시키고, 접종 세포 밀도는 약 90 %이며, 37 °C의 인큐베이터에서 하룻밤 배양한다.

[0147] 2) 10 mM의 EDTA 소화 세포를 사용하여, 200 g×5분으로 원심 분리하여 세포를 수집한다. 1×10⁶ 내지 1×10⁷/mL의 농도로 소태아 혈청을 함유한 1 %의 인산염 완충액(NBS PBS)에 재부유시키고, 100 uL/튜브의 양으로 유동 전용 튜브에 첨가한다.

[0148] 3) 200 g×5분으로 원심 분리하고, 상등액을 버린다.

[0149] 4) 각각 피시험 항체 scFv-P1B12E-Fc와 scFv-P7D4-Fc를 넣고, 동시에 PBS를 음성 대조로 하며, 항체 최종 농도는 10 μg/mL이고, 각 튜브에 100 uL를 넣는다. 45분 동안 아이스 배스한다.

[0150] 5) 각 튜브에 2 mL의 1 %의 NBS PBS를 넣어, 200 g×5분으로 모두 2번 원심 분리시킨다.

[0151] 6) 상층액을 버리고, 1:50으로 희석한 FITC 형광 표기된 염소 항인간 항체(상해 칭청(康成) 생물 공학 유한회사)를 첨가하며, 각 튜브에 100 uL를 넣는다. 45분 동안 아이스 배스한다.

[0152] 7) 각 튜브에 2 mL의 1 %의 NBS PBS를 넣어, 200 g×5분으로 모두 2번 원심 분리시킨다.

[0153] 8) 상층액을 버리고, 300uL의 1 %의 NBS PBS에 재부유시켜, 유동 세포 장치로 검출한다.

[0154] 9) 유동 세포 장치 데이터 분석 소프트웨어 WinMDI 2.9를 응용하여 데이터를 분석한다.

[0155] 결과는 도3에 표시되는 바와 같고, 유동 세포 분석 결과, 항체 scFv-P7D4-Fc는 GPC3을 발현하는 HepG2 세포를 특이적으로 인식할 수 있고, 항체 scFv-P1B12E-Fc와 HepG2 세포는 결합되지 않는다.

[0156] 실시예4. GPC3 결합 능력이 향상된 P7D4 단일 사슬 항체변이체의 선별과 제조

[0157] GPC3에 대한 P7D4 단일 사슬 항체의 결합 능력을 향상시키기 위하여, 각각 이의 중쇄 CDR1과 CDR2 영역, 또는 경쇄 CDR1과 CDR2의 부분 아미노산을 무작위로 돌연변이시켜, 대응되는 친화성 성숙 라이브러리 H12와 L12를 구축한다.

[0158] 4.1. P7D4 경쇄와 중쇄 및 이의 CDR 영역

[0159] P7D4 scFv뉴클레오티드 서열은 하기와 같다(서열번호 3; 여기서, 제76 내지 105 위치는 중쇄 CDR1이고, 제148 내지 198 위치는 중쇄 CDR2이며, 제295 내지 330 위치는 중쇄 CDR3이고; 제475 내지 516 위치는 경쇄 CDR1이며; 제562 내지 582 위치는 경쇄 CDR2이고, 제679 내지 708 위치는 경쇄 CDR3이며; 여기서, 제1 내지 363 위치는 중쇄 뉴클레오티드 서열이고, 제409 내지 741 위치는 경쇄 뉴클레오티드 서열이며, 제364 내지 408 위치는 (Gly₄Ser)₃ 연결 서열임).

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGAGGCTTAGTTC
 AGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT[GGA]
 TTCACCTTCAGTAGCTATGCTATGCAC[TGGGTCCGCCAGGC
 TCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTCTCA[GCTATTAGTGGTA
 GTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC]CGG
 TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCT
 GCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATT
 ACTGTGCGAAA[GATCGACGAGGGAGCCACGCTGATGCTTT
 [GATGTC]TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT~~GG~~
TGGAGGCGGTTCAAGCGGAGGTGGTTCTGGCGGTGGCGGAT
CGCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCCCTCCCGTCCGGTCTC
 CTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGC[ACTGGAACCAACAGCA
 GACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCC]TGGTACCAACAGTA
 CCCAGGCAAAGCCCCAAACTCCTCATCTAT[GGTAACAGCA
 [ATCGGCCCTCA]GGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAG
 TCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGC
 TGAGGATGGGGCTGATTATTACTGC[CAGTCCTATGACAGCA
 [GCCTGCGTGTGGTA]TTCGGCGGAGGGACCAAGGTCACCGTC
 CTAGGT

[0161]

P7D4 scFv아미노산 서열은 하기와 같다(서열번호 4).

QVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAAS[GFTFSSYAMH]WVR
 QAPGKGLEWVS[AISGGGSTYYADSVKG]RFTISRDNSKNTLYLQ
 MNSLRAEDTAVYYCAK[DRRGSHADAFDV]WGQGTLVTVSSGGG
GSGGGGSGGGGSQSALTQPPSASGSPGQSVTISC[TGTSSDVGGY]
 NYVS[WYQQYPGKAPKLLIY]GNSNRPS[GVPDRFSGSKSGTSASL
 AITGLQAEDGADYYC[QSYDSSLRVV]FGGGTKVTVLG

[0162]

P7D4 VH CDR1:

뉴클레오티드 서열: GGATTCACCTCAGTAGCTATGCTATGCAC (서열번호 9);

아미노산 서열: GFTFSSYAMH (서열번호 10).

P7D4 VH CDR2:

뉴클레오티드 서열: gctattagtggtagtggtagcacatactacgcagactccgtgaagggc (서열번호 11);

아미노산 서열: AISGGGSTYYADSVKG (서열번호 12).

P7D4 VH CDR3:

뉴클레오티드 서열: gatcgacgaggagccacgctgatgctttgatgtc (서열번호 13);

아미노산 서열: DRRGSHADAFDV (서열번호 14).

P7D4 VL CDR1:

뉴클레오티드 서열: actggaaccagcagtgacgttggtggtataactatgtctcc (서열번호 15);

아미노산 서열: TGTSSDVGGNYVS (서열번호 16).

P7D4 VL CDR2:

뉴클레오티드 서열: ggtaacagcaatcgccctca (서열번호 17);

아미노산 서열: GNSNRPS (서열번호 18).

P7D4 VL CDR3:

뉴클레오티드 서열: cagtcctatgacagcagcctgcgtgtggta (서열번호 19);

아미노산 서열: QSYDSSLRVV (서열번호 20).

4.2. H12 친화성 성숙 라이브러리의 구축

P7D4 단일 사슬 항체에 대한 서열 대비 및 분석을 통하여, P7D4 중쇄 첫번째와 두번째 CDR 영역의 부분 아미노산이 선택되고, 프라이머에 의해 인입되어 무작위로 돌연변이되며, 중쇄 친화성 성숙 라이브러리의 구축에 사용된다.

P7D4 돌연변이 라이브러리를 코딩하는 DNA 세그먼트를 제조하기 위하여, 플라스미드 pCantab 5E-P7D4를 주형으로, PCR 방법으로 각각 두 세그먼트의 DNA 세그먼트를 얻은 후, 바이패스(bypass) PCR의 방식으로 연결하여 형성된다. 구체적인 사용 조작 단계는 하기와 같다. 유전자를 합성하기 위하여, 50 μ l의 체적에서 PCR 반응을 진행하고, 각각의 반응에 플라스미드 pCantab 5E-P7D4를 주형으로 사용하며, 각각의 프라이머의 농도는 0.2 μ M이고, 및 5 μ l의 10×KOD Plus 완충액, 4 μ l의 dNTPs(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP, 각각 2 mM), 2 μ l의 25 mM의

$MgSO_4$ 와 1 U의 KOD Plus (Takara에서 구매함)를, 물로 체적을 채운 후, 열순환기에서 PCR 프로그램을 시작한다. 반응은 샘플을 먼저 94 °C까지 가열하여 5분 동안 전변성시킨 후, 25개의 순환 동안 보온시키고, 각각의 순환은 94 °C에서 30초 동안, 56 °C에서 30초 동안 및 68 °C에서 30초 동안 진행한다. 마지막으로 68 °C에서 10분 동안 보온시킨다. 첫번째 세그먼트의 증폭은 프라이머 S1(서열번호 21, CAACGTAAAAATTATTATTCGC)과 74H12F1r (서열번호 22, CCAGCCCCCTGGCTGGAGCCTGGCGGACCCAMNNCATAGCATAMNNACTGAAGGTGAATCCAG)를 사용하고, 두번째 세그먼트는 프라이머 74H12F2f(서열번호 23, GCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCANNKATTAGTNKNKGNNTNNKNNKACATACTACGCAGACTCC)과 S6(서열번호 21, GTAAATGAATTCTGTATGAGG)을 사용한다.

[0184] 예상 PCR 산물을 아가로스겔(agarose gel) 전기 영동 분석으로 검증하고, Wizard SV Gel과 PCR Clean-up(프로메가(Promega)로부터 구매함) 키트(Kit)로 샘플로부터 정제하여 회수한다. 두 개의 세그먼트를 등몰비로 두번째 차례 바이패스(bridge) PCR에 넣어 주형으로 하고, 반응 체계는 여전히 상기에서 언급한 KOD Plus 체계를 사용하며, 반응은 먼저 샘플을 94 °C까지 가열하여 5분 동안 전변성시킨 후, 10개의 순환 동안 보온시키고, 각각의 순환 반응 조건은 94 °C에서 30초, 60 °C에서 30초 및 68 °C에서 30초이다. 마지막으로 68 °C에서 10분 동안 보온시킨다. 이어서 반응 체계에 최종 농도가 0.2 μ M인 프라이머 S1과 S6을 직접 넣어, PCR 프로그램을 시작한다. 반응은 먼저 샘플을 94 °C까지 가열하여 5분 동안 전변성시킨 후, 25개의 순환 동안 보온시키고, 각각의 순환은 94 °C에서 30초 동안, 56 °C에서 30초 동안과 68 °C에서 30초 동안 진행한다. 마지막으로 68 °C에서 10분 동안 보온시킨다. 예상 PCR 산물을 조제 아카로스겔 전기 영동으로 분리하고, Wizard SV Gel과 PCR Clean-up 키트로 제조업체의 설명에 따라 정제하여 회수한다.

[0185] 완전한 라이브러리 DNA 세그먼트 양단에는 각각 *sfiI*와 *NotI* 제한 효소 인식 사이트가 포함되고, 제한 효소 *sfiI/NotI*로 제한적으로 소화시키며, 동일한 이중 효소로 절단된 파지미드(phagemid) 벡터 pCANTAB 5E에 삽입한다. 연결 산물은 Wizard SV Ge과 PCR Clean-up 키트를 사용하여 전기 형질 전환을 위해 샘플 중의 DNA를 분리하고 탈염시킨다. 전기 형질 전환할 때, 전기 형질 전환 컵과 전기 천공기 Gene Pulser II(Bio-Rad로부터 구매함)를 사용하여, 자체적으로 제조한 커퍼턴트 대장균 ER2738(NEB로부터 구매함)에 형질 전환시킨다. 최종적으로 8.9×10^9 개의 돌연변이체를 함유한 라이브러리를 얻은 것을 확인한다.

4.3. L12 친화성 성숙 라이브러리의 구축

[0187] P7D4 단일 사슬 항체에 대한 서열 대비 및 분석을 통하여, P7D4 중쇄 첫번째와 두번째 CDR 영역의 부분 아미노산이 선택되고, 프라이머에 의해 인입되어 무작위로 돌연변이되며, 경쇄 친화성 성숙 라이브러리의 구축에 사용된다.

[0188] P7D4 돌연변이 라이브러리를 코딩하는 DNA 세그먼트를 제조하기 위하여, 플라스미드 pCantab 5E-P7D4를 주형으로, PCR 방법으로 각각 두 세그먼트의 DNA 세그먼트를 얻은 후, 바이패스 PCR의 방식으로 연결하여 형성된다. 구체적인 사용 조작 단계는 하기와 같다. 유전자를 합성하기 위하여, 50 μ l의 체적에서 PCR 반응을 진행하고, 각각의 반응에서 플라스미드 pCantab 5E-P7D4를 주형으로 사용하며, 각 프라이머의 농도는 0.2 μ M이고, 및 5 μ l의 10×KOD Plus 완충액, 4 μ l의 dNTPs(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP, 각각 2 mM), 2 μ l의 25 mM $MgSO_4$ 와 1 U의 KOD Plus를, 물로 체적을 채운 후, 열순환기에서 PCR 프로그램을 시작한다. 반응은 샘플을 먼저 94 °C까지 가열하여 5분 동안 전변성시킨 후, 25개의 순환 동안 보온시키고, 각각의 순환은 94 °C에서 30초 동안, 56 °C에서 30초 동안과 68 °C에서 30초 동안 진행한다. 마지막으로 68 °C에서 10분 동안 보온시킨다. 첫번째 세그먼트의 증폭은 프라이머 S1과 74L12F1r(서열번호 83, GTGGGGGCTTGCCTGGTACTGTTGGTACCAAGGAGACM NNAHNMMNAHNACCAACGTCACTGCTG)를 사용하고, 두번째 세그먼트는 프라이머 74L12F2f(서열번호 84, ACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCCTCATCTATNNKNNKNNKCGGCCCTCAGGGTC)와 S6을 사용한다.

[0189] 예상 PCR 산물을 아가로스겔 전기 영동 분석으로 검증하고, Wizard SV Gel과 PCR Clean-up 키트로 샘플로부터 정제하여 회수한다. 두 개의 세그먼트를 등몰비로 두번째 차례 바이패스 PCR에 넣어 주형으로 하고, 반응 체계는 여전히 상기에서 언급한 KOD Plus 체계를 사용하며, 프라이머가 존재하지 않는 경우, 반응은 먼저 샘플을 94 °C까지 가열하여 5분 동안 전변성시킨 후, 10 개의 순환 동안 보온시키고, 각각의 순환 반응 조건은 94 °C에서 30초, 60 °C에서 30초 및 68 °C에서 30초이다. 마지막으로 68 °C에서 10분 동안 보온시킨다. 이어서 반응 체계에 최종 농도가 0.2 μ M인 프라이머 S1과 S6을 직접 넣어, PCR 프로그램을 시작한다. 반응은 먼저 샘플을 94 °C까지 가열하여 5분 동안 전변성시킨 후, 25개의 순환 동안 보온시키고, 각각의 순환은 94 °C에서 30초 동안, 56 °C에서 30초 동안 및 68 °C에서 30초 동안 진행한다. 마지막으로 68 °C에서 10분 동안 보온시킨다. 예상 PCR 산

물을 조제 아카로스겔 전기 영동으로 분리하고, Wizard SV Gel과 PCR Clean-up 키트로 제조업체의 설명에 따라 정제하여 회수한다.

- [0190] 완전한 라이브러리 DNA 세그먼트 양단에는 각각 *sfi*I와 *Not*I 제한 효소 인식 사이트가 포함되고, 제한 효소 *sfi*I/*Not*I로 제한적으로 소화시키며, 동일한 이중 효소로 절단된 파지미드 벡터 pCANTAB 5E에 삽입한다. 연결 산물은 Wizard SV Gel과 PCR Clean-up 키트를 사용하여 전기 형질 전환을 위해 샘플 중의 DNA를 분리하고 탈염시킨다. 전기 형질 전환할 때, 전기 형질 전환 컵과 전기 천공기 Gene Pulser II를 사용하여, 자체적으로 제조한 컴퍼턴트 대장균 ER2738에 형질 전환시킨다. 최종적으로 1.1×10^{10} 개의 돌연변이체를 함유한 라이브러리를 얻은 것을 확인한다.
- [0191] 이 외에, 본 발명자는 error prone PCR의 전략도 사용하여, 전체 P7D4 세그먼트에 대하여 무작위로 돌연변이시켜, 7.9×10^9 의 용량을 갖는 라이브러리 T2를 구축하였고, 여기서 증폭 프라이머쌍은 S1과 S6이며, 클론과 구축 방식은 상기 H12와 L12와 일치하다.
- [0192] 상기 3개의 친화성 성숙 라이브러리의 선별은 실시예1에서의 선별 과정과 일치하다. 선별을 통하여, 본 발명자는 6개의 높은 친화성 P7D4 계열 돌연변이 클론 am4, am14, am20, am35, am42와 T2-23을 검증하여 얻었고, 이의 서열 정보는 하기와 같다.
- [0193] am4 뉴클레오티드 서열(서열번호 24, 여기서, 제76 내지 105 위치는 중쇄 CDR1이고, 제148 내지 198 위치는 중쇄 CDR2이며, 제295 내지 330 위치는 중쇄 CDR3이고; 제475 내지 516 위치는 경쇄 CDR1이며; 제562 내지 582 위치는 경쇄 CDR2이고, 제679 내지 708 위치는 경쇄 CDR3이며; 여기서, 제1 내지 363 위치는 중쇄 뉴클레오티드 서열이고, 제409 내지 741 위치는 경쇄 뉴클레오티드 서열이며, 제364 내지 408 위치는 (Gly₄Ser)₃ 연결 서열임):

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGAGGCTTAGTTC
 AGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
 TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACACCTTCAGTACGTATG
 CTATGACGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTCTCA[TCTATTAGTA]
 GTAGTGGTGAAAGTACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAG
 ACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG
 TATATTACTGTGCGAAA[GATCGA]
 CGAGGGAGCCACGCTGATGCTTTGATGTCTGGGCC
 AAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
 AGT GGTGGAGGCGGTCAGGCGGAGGTGGTTCTGGCG
GTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTG
 ACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGTCTCCTGGACAGT
 CAGTCACCATCTCCTGC[ACTGGA]
 ACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCC
 GGTACCAACAGTACCCAGGCAAA
 GCCCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGC
 CCTCA[GGGGTCCCTGACCGATTC
 TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCA

TCACTGGGCTCCAGGCTGAGGAT

GGGGCTGATTATTACTGC CAGTCCTATGACAGCAGCC

TGCGTGTGGTATT CGCGGGAGGG

ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT

[0195]

am4 아미노산 서열(서열번호 25):

QVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAAS GFTFSTYAMTWVR

QAPGKGLEWVS SISSSGESTYY

ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK

DRRGSHADAFDVWGQGTLVTVS

SGGGGSGGGSGGGGSQALTQPPSASGSPGQSVTISCT

GTSSDVGGYNYVSWYQQYPGK

APKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAED

GADYYCQSYDSSLRVVFGGG

TKVTVLG

[0197]

중쇄CDR1: GFTFSTYAMT (서열번호 60)

중쇄CDR2: SISSSGESTYYADSVKG (서열번호 61)

중쇄CDR3: DRRGSHADAFDV (서열번호 14)

경쇄CDR1: TGTSSDVGGYNYVS (서열번호 16)

경쇄CDR2: GNSNRPS (서열번호 18)

경쇄CDR3: QSYDSSLRVV (서열번호 20)

여기서, 제1 내지 121 위치는 중쇄 아미노산 서열이고, 제137 내지 247 위치는 경쇄 아미노산 서열이다. 제122 내지 136 위치는 (Gly₄Ser)₃ 연결 서열이다.

[0205]

am14 뉴클레오티드 서열(서열번호 26, 여기서, 제76 내지 105 위치는 중쇄 CDR1이고, 제148 내지 198 위치는 중쇄 CDR2이며, 제295 내지 330 위치는 중쇄 CDR3이고; 제475 내지 516 위치는 경쇄 CDR1이며; 제562 내지 582 위치는 경쇄 CDR2이고, 제679 내지 708 위치는 경쇄 CDR3이며; 여기서, 제1 내지 363 위치는 중쇄 뉴클레오티드 서열이고, 제409 내지 741 위치는 경쇄 뉴클레오티드 서열이며, 제364 내지 408 위치는 (Gly₄Ser)₃연결 서열임):

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGAGGCTTAGTTC

AGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC

TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACTTATG

CTATGGCTTGGGTCCGCCAGGCT

CCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTCTCA[GAAATTAGTA]

GTTCTGGTAGTAGGACATACTAC

GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCACCTCCAGAG

ACAATTCCAAGAACACGCTGTAT

CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCCGAGGACACGGCCG

TATATTACTGTGCGAAA[GATCGA]

CGAGGGAGGCCACGCTGATGCTTTGATGTC[TGGGGCC

AAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG

[0206]

AGT GGTGGAGGC GGTT CAGGC GGAGGT GGTT CTGGCG

GTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTG

ACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGT

CAGTCACCATCTCCTGC ACTGGA

ACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCT

GGTACCAACAGTACCCAGGCAA

GCCCCCAAACTCCTCATCTAT GGTAACAGCAATCGGC

CCTCAGGGGTCCCTGACCGATT

TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCA

TCACTGGGCTCCAGGCTGAGGAT

GGGGCTGATTATTACTGC CAGTCCTATGACAGCAGCC

TGCGTGTGGTATTCGCGGGAGGG

ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT

[0207]

[0208]

am14 아미노산 서열(서열번호 27):

QVQLQESGGGLVQPGRLSRLSCAAS GFTFSTYAMAWVR

QAPGKGLEWVS EISSSGSRTYY

ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK

DRRGSHADAFDWVGQGTLVTVS

SGGGGSGGGSGGGGSQSALTQPPSASGSPGQSVTISCT

GTSSDVGGYNYVSWYQQYPGK

APKLLIY GNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAED

GADYYC QSYDSSLRVVFGGG

TKVTVLG

[0209]

- [0210] 중쇄CDR1: GFTFSTYAMA (서열번호 62)
- [0211] 중쇄CDR2: EISSLGSRTYYADSVKG (서열번호 63)
- [0212] 중쇄CDR3: DRRGSHADAFDV (서열번호 14)
- [0213] 경쇄CDR1: TGTSSDVGGYNYVS (서열번호 16)
- [0214] 경쇄CDR2: GNSNRPS (서열번호 18)
- [0215] 경쇄CDR3: QSYDSSLRVV (서열번호 20)
- [0216] 여기서, 제1 내지 121 위치는 중쇄 아미노산 서열이고, 제137 내지 247 위치는 경쇄 아미노산 서열이며, 제122 내지 136 위치는 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 연결 서열이다.
- [0217] am20 뉴클레오티드 서열(서열번호 28, 제76 내지 105 위치는 중쇄CDR1이고, 제148 내지 198 위치는 중쇄 CDR2이며, 제295 내지 330 위치는 중쇄 CDR3이고; 제475 내지 516 위치는 경쇄 CDR1이고; 제562 내지 582 위치는 경쇄CDR2이며, 제679 내지 708 위치는 경쇄CDR3이고; 여기서, 제1 내지 363 위치는 중쇄 뉴클레오티드 서열이며, 제409 내지 741 위치는 경쇄 뉴클레오티드 서열이다. 제364 내지 408번 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 연결 서열임):

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGAGGCTTAGTTC
 AGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
 TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACGTATG
 CTATGAATGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTCTCA[GCGATTAGTA]
 TGTCTGGTGAATCTACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG
 ACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG
 TATATTACTGTGCGAAA[GATCGA]
 CGAGGGAGCCACGCTGATGCTTTGATGTCTGGGCC
 AAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
 AGTGGTGGAGGCGGTTCAAGCGGAGGTGGTTCTGGCG
GTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTG
 ACTCAGCCTCCCTCCCGTCCGGTCTCCTGGACAGT
 CAGTCACCATCTCCTGC[ACTGGA]
 ACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCT

GGTACCAACAGTACCCAGGCAAA

GCCCCCAAACCTCCTCATCTAT GGTAAACAGCAATCGGC

CCTCAGGGGTCCCTGACCGATT

TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCA

TCACTGGGCTCCAGGCTGAGGAT

GGGGCTGATTATTACTGC CAGTCCTATGACAGCAGCC

TGCGTGTGGTA TTCGGCGGAGGG

ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT

[0219]

am20 아미노산 서열(서열번호 29):

QVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAAS GFTFSTYAMN WVR

QAPGKGLEWVS AISMSGESTYY

ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK

DRRGSHADAFDVWGQGTLVTVS

SGGGGSGGGSGGGGSQSALTQPPSASGSPGQSVTISC T

GTSSDVGGYNYVS WYQQYPGK

APKLLIY GNSRPPS GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAED

GADYYC QSYDSSLRVV FGGG

TKVTVLG

[0221]

중쇄CDR1: GFTFSTYAMA (서열번호 64)

[0222]

중쇄CDR2: AISM**SGESTYY**ADSVKG (서열번호 65)

[0223]

중쇄CDR3: DRRGSHADAFD (서열번호 14)

[0224]

경쇄CDR1: TGTSSDVGGYNYVS (서열번호 16)

[0225]

경쇄CDR2: GNSRPS (서열번호 18)

[0226]

경쇄CDR3: QSYDSSLRVV (서열번호 20)

[0227]

여기서, 제1 내지 121 위치는 중쇄 아미노산 서열이고, 제137 내지 247 위치는 경쇄 아미노산 서열이며, 제122 내지 136 위치는 (Gly₄Ser)₃ 연결 서열이다.

[0229]

am35 뉴클레오티드 서열(서열번호 30, 제76 내지 105 위치는 중쇄 CDR1이고, 제148 내지 198 위치는 중쇄 CDR2이며, 제295 내지 330 위치는 중쇄 CDR3이고; 제475 내지 516 위치는 경쇄 CDR1이며; 제562 내지 582 위치는 경쇄 CDR2이고, 제679 내지 708 위치는 경쇄 CDR3이며; 여기서, 제1 내지 363 위치는 중쇄 뉴클레오티드 서열이고, 제409 내지 741 위치는 경쇄 뉴클레오티드 서열이다. 제364 내지 408 위치는 (Gly₄Ser)₃ 연결 서열임):

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGAGGCTTAGTTC

AGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC

TCCTGTGCAGCCTCT[GGATTCACCTCAGTAGCTATG]

[CTATGCAC]TGGGTCCGCCAGGCT

CCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTCTCA[GCTATTAGTA]

[GTAGTGGTGGTAGCACATACTAC]

[GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG

ACAATTCCAAGAACACCGCTGTAT

CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCCAGGACACGGCCG

TATATTACTGTGCGAAA[GATCGA]

[CGAGGGAGGCCACGCTGATGCTTTGATGTC]TGGGCC

AAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG

AGTGGTGGAGGCCGGTCAGGCAGGTGGTTCTGGCG

GTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTG

ACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGTCTCCTGGACAGT

CAGTCACCATCTCCTGC[ACTGGA]

[ACCAGCAGTGACGTTGGTCATAAGTTCTGTCTCCT]

GGTACCAACAGTACCCAGGCAAA

GCCCCCAAACTCCTCATCTAT[AAGAATCTTTGCCG

[CCTCA]GGGGTCCCTGACCGATT

TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCA

[0230]

TCACTGGGCTCCAGGCTGAGGAT

GGGGCTGATTATTACTGC CAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGTGGTA TTCGGCGGAGGG

ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT

[0231]

[0232]

am35 아미노산 서열(서열번호 31):

QVQLQESGGGLVQPGRLSRLSCAAS GFTFSSYAMH WVRQAPGKGLEWVS AISSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRRGSHADAFDVWGQGTLTVSSGGGGGGGGGGGGSQSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGHKFPVSWYQQYPGKAPKLLIY KNLLRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDGADYYC QSYDSSLRVVFGGG

TKVTVLG

[0233]

중쇄CDR1: GFTFSSYAMH (서열번호 10)

[0234]

중쇄CDR2: AISSGGSTYYADSVKG (서열번호 66)

[0235]

중쇄CDR3: DRRGSHADAFDV (서열번호 14)

[0236]

경쇄CDR1: TGTSSDVGHKFPVS (서열번호 67)

[0237]

경쇄CDR2: KNLLRPS (서열번호 68)

[0238]

경쇄CDR3: QSYDSSLRVV (서열번호 20)

[0239]

여기서, 제1 내지 121 위치는 중쇄 아미노산 서열이고, 제137 내지 247 위치는 경쇄 아미노산 서열이다. 제122 내지 136 위치는 (Gly₄Ser)₃연결 서열이다.

[0240]

am42 뉴클레오티드 서열(서열번호 32, 제76 내지 105 위치는 중쇄 CDR1이고, 제148 내지 198 위치는 중쇄 CDR2이며, 제295 내지 330 위치는 중쇄 CDR3이고; 제475 내지 516 위치는 경쇄 CDR1이며; 제562 내지 582 위치는 경쇄 CDR2이고, 제679 내지 708 위치는 경쇄 CDR3이며; 여기서, 제1 내지 363 위치는 중쇄 뉴클레오티드 서열이고, 제409 내지 741 위치는 경쇄 뉴클레오티드 서열이다. 제364 내지 408 위치는 (Gly₄Ser)₃연결 서열임):

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGAGGCTTAGTTC
 AGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
 TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATG
 CTATGCACGTGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTCTCA[GCTATTAGTA]
 GTAGTGGTAGCACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG
 ACAATTCCAAGAACACCGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG
 TATATTACTGTGCGAAA[GATCGA]
 CGAGGGAGCCACGCTGATGCTTTGATGTC[TGGGGCC
 AAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
 AGTGGTGGAGGCGGTTCAAGCGGAGGTGGTCTGGCG
GTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTG
 ACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGTCTCCTGGACAGT
 CAGTCACCATCTCCTGC[ACTGGA]
 ACCAGCAGTGACGTTGGTCTTATGCATAATGTCTCCT
 GGTACCAACAGTACCCAGGCAAA
 GCCCCCCAAACTCCTCATCTAT[AAGTCTCGTCTCGGC]
 CCTCA[GGGGTCCCTGACCGATT
 TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCA

TCACTGGGCTCCAGGCTGAGGAT

GGGGCTGATTATTACTGC CAGTCCTATGACAGCAGCC

TGC GTGTGGTA TTCGGCGGAGGG

ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT

[0243]

am42 아미노산 서열(서열번호 33):

QVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYAMH WVR

QAPGKGLEWVS AISSSGGSTYY

ADSVKGRFTISRDNSKNTLQLQMNSLRAEDTAVYYCAK

DRRGSHADAFDV WGQGTLVTVS

SGGGGGGGGGGGGGGSQSALTQPPSASGSPGQSVTISC T

GTSSDVGLMHNVS WYQQYPGK

APKLLIY KSSSRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDG

ADYYC QSYDSSLRVV FGGG

TKVTVLG

[0245]

중쇄CDR1: GFTFSSYAMH (서열번호 10)

[0247]

중쇄CDR2: AISSSGGSTYYADSVKG (서열번호 66)

[0248]

중쇄CDR3: DRRGSHADAFDV (서열번호 14)

[0249]

경쇄CDR1: TGTSSDVGLMHNVS (서열번호 69)

[0250]

경쇄CDR2: KSSSRPS (서열번호 70)

[0251]

경쇄CDR3: QSYDSSLRVV (서열번호 20)

[0252]

여기서, 제1 내지 121 위치는 중쇄 아미노산 서열이고, 제137 내지 247 위치는 경쇄 아미노산 서열이다. 제122 내지 136 위치는 (Gly₄Ser)₃연결 서열이다.

[0253]

T2-23 뉴클레오티드 서열(서열번호 34, 제76 내지 105 위치는 중쇄 CDR1이고, 제148 내지 198 위치는 중쇄 CDR2이며, 제295 내지 330 위치는 중쇄 CDR3이고; 제475 내지 516 위치는 경쇄 CDR1이며; 제562 내지 582 위치는 경쇄 CDR2이고, 제679 내지 708 위치는 경쇄 CDR3이며; 여기서, 제1 내지 363 위치는 중쇄 뉴클레오티드 서열이고, 제409 내지 741 위치는 경쇄 뉴클레오티드 서열이다. 제364 내지 408 위치는 (Gly₄Ser)₃연결 서열임):

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGAGGCTAGTTC
 AGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
 TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACACCTTCAGTAGCTATG
 CTATGCAC|TGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTCTCA|GCTATTAGTA
 GTAGTGGTCGTAGCACATACTAC
 GCAGACTCCGTGGAGGGC|CGGTTACCATCTCCAGAG
 ACAATTCCAAGAACACCGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCCAGGACACGGCCG
 TATATTACTGTGCGAAA|GATCGA
 CGAGGGAGCCACGCTGATGCTTAAATGTCTGGGCC
 AAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
 AGTGGTGGAGGCGGTTCAAGCGGAGGTGGTTCTGGCG
GTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTG
 ACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGTCTCCTGGACAGT
 CAGTCACCATCTCCTGC|ACTGGA
 ACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCC
 GGTACCAACAGTACCCAGGAAA
 GCCCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGC
 CCTCA|GGGGTCCCTGACCGATT
 TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCA

TCACTGGGCTCCAGGCTGAGGAT

GGGGCTGATTATTACTGC CAGTCCTATGACAGCAGCC

TGC GTGTGGTATT CGCGGGAGGG

ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT

[0255]

[0256]

T2-23 아미노산 서열(서열번호 35):

QVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYAMH WVR

QAPGKGLEWVS AISSGRSTYY

ADSVEGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKD

RRGSHADALNV WGQGTLVTVS

SGGGGSGGGSGGGGSQSALTQPPSASGSPGQSVTISC T

GTSSDVGGNYVS WYQQYPGK

APKLLIY GNSN RPS GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAED

GADYYC QSYDSSLRVV FGGG

TKVTVLG

[0257]

중쇄CDR1: GFTFSSYAMH (서열번호 10)

[0259]

중쇄CDR2: AISSGRSTYYADSVEG (서열번호 71)

[0260]

중쇄CDR3: DRRGSHADALNV (서열번호 72)

[0261]

경쇄CDR1: TGTSSDVGGNYVS (서열번호 16)

[0262]

경쇄CDR2: KSSSRPS (서열번호 70)

[0263]

경쇄CDR3: QSYDSSLRVV (서열번호 20)

[0264]

여기서, 제1 내지 121 위치는 중쇄 아미노산 서열이고, 제137 내지 247 위치는 경쇄 아미노산 서열이다. 제122 내지 136 위치는 (Gly₄Ser)₃ 연결 서열이다.

[0265]

4.4. GPC3 결합 능력에 대한 P7D4 계열 항체의 SPR 분석

[0266]

P7D4 계열 항체와 GPC3의 결합을 정량적으로 분석하기 위하여, Biacore T200 시스템(GE로부터 구매함)을 사용하여 포집 방법으로 각각 P7D4 계열 단일 사슬 항체의 친화성과 동력학 파라미터를 측정한다. 제조업체의 설명서에 따라, NHS/EDC 커플링(Coupling)을 갖는 일차 아미노기(primary amino)로 항인간IgG(Fc)의 항체(GE로부터 구매함)를 센서 칩 CM5의 카르복시메틸덱스트란(carboxymethyl dextran) 표면에 커플링시킨다. 측정은 25 °C의 온도, 30 μl/min, 1×HBS-EP+의 작업 완충액에서 진행되고, 재생 조건은 3 M의 MgCl₂, 10 μl/min으로 30초 동안 작용시킨다. 각각의 테스트 순환에서, 퍼테스트 항체가 먼저 칩에 포집되고, 일정한 농도의 분석물 GPC3이 칩 표면을 흘러지나가며, 인간 GPC3과 포집된 항체가 상호 작용하여 센서 표면 분자 농도를 변화시켜 SPR신호의 변

화로부터 측정되고, 공명 단위(RU)로 표시한다. 시간 대 공명 단위(RU)로 연속적으로 작도하여, 얻은 센서그램(sensorgram)으로 결합과 해리 과정을 포함하는 전체 반응 과정을 기록하였다(도4). 모든 단일 순환동력학에서, GPC3의 농도는 각각 5 nM, 10 nM, 20 nM, 40 nM과 80 nM이다. Biacore T200 evaluation software 평가에 의해 작용 그래프를 얻고, 친화성과 KD값을 계산한다. 모든 P7D4 계열 단일 사슬 항체가 각각 GPC3에 대한 결합 데이터는 표1에서 나타내는 바와 같다.

[0267] 표1. GPC3에 대한 P7D4 계열 단일 사슬 항체의 결합 데이터

항체 샘플	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
P7D4	9.31E+ 04	6.17E-03	6.64E-08
am4	5.39E+ 05	4.08E-05	7.56E-11
am14	6.73E+ 05	4.43E-05	6.46E-11
am20	2.12E+ 05	6.47E-05	3.06E-10
am35	7.38E+ 05	5.2 E-05	7.14E-11
am42	8.16E+ 05	6.70E-05	8.21E-11
T2-23	8.86E+ 05	5.19E-05	5.85E-11

[0268]

[0269] 표1에서 나타낸 바와 같이, 개조하여 얻은 P7D4 계열 돌연변이 단일 사슬 항체는 우수한 친화성을 포함하고, P7D4 단일 사슬 항체 대비 극히 현저하게 향상되었다.

[0270]

4.5. P7D4 계열 항체의 인식 특이성 분석

[0271]

GPC3 단백질에 대한 P7D4 계열 항체 결합 특이성을 ELISA 실험을 통해 각각 인간 GPC 패밀리 성원에 대한 P7D4 계열 단일 사슬 항체를 각각 측정하고, 재조합 인간 GPC1(rhGPC1), GPC2(rhGPC2), GPC3(rhGPC3), GPC5(rhGPC5) 및 GPC6(rhGPC6)(Andy Biosciences(상해)유한회사로부터 구매함)의 결합 활성을 포함한다.

[0272]

이를 위해, 0.1 M의 NaHCO₃(pH 9.6) 코팅액으로 상기 5가지 항원을 희석하고, 각각의 웰에 100 ng, 50 μ l/웰을 코팅하여, 4 °C에서 코팅하여 하룻밤 경과하고, 2 %(w/v)의 BSA를 함유한 PBST로 실온 하에서 2시간 동안 밀봉한다. 다음, PBST로 플레이트를 세번 세척하여 깨끗하게 처리한다. 다음, 각각의 웰플레이트에 100 ng의 각 항체 단백질의 PBST 용액을 넣으며, 각각의 샘플의 측정에 평행 복합 웰 분석을 사용한다. 37 °C에서 2시간 동안 보온시킨 후, PBST로 세번 세척하고, 다음 1:20000로 희석한 HRP로 표기된 토끼 항인간 Fc항체(상해 루이진 바이오 테크놀로지 유한회사로부터 구매함)를 100 μ l/웰로 넣어 37 °C에서 1시간 동안 반응시킨다. 검출을 위하여, PBST로 세번 세척한 후, PBS로 세번 세척하고, 마지막으로 TMB를 넣어 10분 동안 발색시키며, 각 웰에 50 μ l의 2 M의 H₂SO₄로 발색 반응을 중지시키고, 효소 결합 면역 측정기(Bio-Rad)로 450 nm 하에서 소광 값을 측정한다.

[0273]

결과는 도5에서 나타내는 바와 같고, 모든 P7D4 계열의 단일 사슬 항체는 모두 인간 GPC3에만 특이적으로 결합되며, 인간GPC1, GPC2, GPC5와 GPC6과는 결합되지 않는다.

[0274]

실시예5. 인간 GPC3 항원 및 상기 항원의 인간화 단일 클론 항체의 제조

[0275]

5.1 진핵 발현 시스템에서의 인간 GPC3의 발현 및 정제

[0276] 5.1.1 GPC3 벡터 구축 및 검증

인간 간암 세포주 Huh-7 cDNA를 주형으로, 하기와 같은 프라이머 GPC3-F: GATCGCTAGCACAGCCCCGCCGC (서열번호 54), GPC3-R: GTACGGATCCTTCAGCGGGGAATGAACGTT (서열번호 55)로 PCR 증폭시켜, 양단에 제한 효소 사이트 NheI/BamHI를 갖는 GPC3 세그먼트(1.6kb)를 얻고, 얻은 PCR 세그먼트를 엔도뉴클레아제(endonuclease)NheI/BamHI(Fermentas 회사로부터 구매함)로 이중 절단시키며, 동시에, 플라스미드 벡터 V5H(Raygene로부터 구매함)를 마찬가지로 엔도뉴클레아제NheI/BamHI로 이중 절단시키고, 아가로오스겔 전기 영동을 거친 후 벡터와 삽입된 세그먼트를 회수하며, 다시 T4 DNA ligase(NEB 회사로부터 구매함)로 연결하고 숙주 세포 TOP10(LIFE 회사로부터 구매함)에 형질 전환시키며, 암피실린(ampicillin) 내성으로 선별하고, 클론을 추출하며, 플라스미드 엔도뉴클레아제NheI/BamHI(Fermentas로부터 구매함)에 의해 이중 절단시키고, 삽입된 세그먼트를 함유하는 양성 클론을 검증하여 시퀀싱에 의한 확인을 통해, 정확한 인간 GPC3 유전자 서열을 함유한 진핵 발현 플라스미드 V5H-GPC3을 얻는다.

[0278] 5.1.2 인간 GPC3 단백질의 발현과 정제

[0279] 5.1.2.1. V5H-GPC3 플라스미드의 지질체 형질 감염과 배양

성장이 우수한 HEK293F 세포(HEK293F, LIFE 회사로부터 구매함)를 1×10^6 세포/ml의 밀도로 세포 삼각 배양 플라스크에 접종시키고, 37 °C의 온도, 5 %의 CO₂, 120 rpm의 조건으로 하룻밤 배양하여 사용하며; 상기 단계에서 얻은 플라스미드 V5H-GPC3와 지질체 293Fectin(LIFE 회사로부터 구매함)를 각각 DMEM으로 희석하고 부드럽게 혼합하여, 실온에서 20분 동안 부화시키며, 양호하게 부화된 DNA-지질체 복합물을 293F 세포에 넣어, 37 °C의 온도와 5 %의 CO₂ 및 120 rpm의 조건 하에서 72시간 동안 배양한다. 세포 배양액을 수집하고, 4500 g으로 15분 동안 원심 분리 시켜, 세포를 제거하여, 상등액을 취한다.

[0281] 5.1.2.2. GPC3 단백질 정제

1 ml의 Ni-NTA Agarose 친화성 충진제를 취하여 컬럼에 넣고, Ni-NTA 친화 컬럼을 평형 완충액(50 mM의 PB, 0.3 M의 NaCl, 10 mM의 이미다졸(Imidazole), pH 8.0)으로 10개의 컬럼 체적을 평형화시킨다. 원심 분리시킨 후의 세포 배양액 상등액을 1 ml/min으로 Ni-NTA 친화성 컬럼을 통과시켜, 유출물을 수집하여 4 °C에서 저장한다. 세척 완충액 1(50 mM의 PB, 0.3 M의 NaCl, 20 mM의 이미다졸, pH 8.0)로 10개의 컬럼 체적을 세척하고, 유출물을 수집하여 4 °C에서 저장한다. 용출 완충액(50 mM의 PB, 0.3 M NaCl, 250 mM의 이미다졸, pH 8.0)으로 4 ~ 5개의 컬럼 체적을 세척하고, 용출액을 수집하여, 투석액(50 mM의 PB, pH 7.8, 0.3M의 NaCl, 5 %의 글리세린(glycerin))에서 4 °C에서 하룻밤 투석시켜, 즉 GPC3(H) 단백질을 얻고, 소량 취하여 SDS PAGE 전기 영동을 진행한다(도6).

[0283] 5.2 인간 GPC3 항원 면역

재조합 단백질 면역: 상기 실시예 5.1에서 얻은 1 ml의 정제된 인간 GPC3 단백질 GPC3(H)(1.0mg/mL)을 항원으로 1 mL의 완전 프로인트 보조제(Freund's adjuvant)(Sigma-aldrich 회사로부터 구매함)에 충분히 유화시켜 혼합하고 피하 면역 6 ~ 8주령의 BALB/c 마우스와 혼합하고, 각각의 마우스에 100 µg의 인간 GPC3(H) 단백질 항원을 면역시킨다. 4주 후, 인간 GPC3 항원과 불완전 프로인트 보조제를 유화시켜 혼합하고, 각 마우스에 50 µg으로 마우스에 복강 주사하며, 이 후 2주 간격으로 계속하여 50 µg의 항원을 복강 내 면역화를 위해 복강 내에 투여한다. 제4번째 면역 강화 1주 후, GPC3(H) 단백질로 코팅하고, ELISA법으로 마우스 항혈청 효과를 검출하며, 마우스의 항혈청 효과가 $>10^5$ 될 때까지 계속하여 면역을 강화한다.

마지막 면역 강화 3주 후, 비장에 상기 인간 GPC3(H) 단백질을 20 µg 면역하여 사용한다.

[0286] 5.3 항인간 GPC3 교접 세포주의 구축

마우스는 비장 면역 강화 4일 후, 무균 상항에서 비장을 취하고, 100 메쉬(mesh)의 필터로 임파구를 분리하며, 골수암 세포주 SP2/0과 융합시키고, 히포크산틴, 아미노플린과 티미딘(hypoxathine, aminop terin and thymidine, HAT)으로 선택적으로 3일 동안 배양한 후, HT 배지를 더 넣어, 계속하여 1주 동안 배양한다.

GPC3(H) 항원을 코팅에 사용하고, 양성 클론을 ELISA로 선별하여, 제한적인 희석법에 의해 3회 서브 클로닝하여, 계속하여 2개월 동안 배양하여, 최종적으로 안정적인 교접 세포주(클론 번호를 각각 5A5, 7C9, 11D3으로 명명함)를 얻는다.

[0289] 5.4 복수 생성 및 항체의 정제

[0290] 8 ~ 10주령의 F1 마우스에 100 μ l의 프리스탄(pristane)(Sigma-aldrich 회사로부터 구매함)을 복강 주사하고, 1주 후, 상기 실시예5.4의 교접 세포를 취하여, 5×10^5 세포/마우스의 량으로 마우스 복강에 주사하여 복수를 제조하며, 7일 내지 10일 후 복수를 수집하여, 10000 g을 10분 동안 원심 분리시켜 상등액을 취하여 사용한다. 단백질G 친화성 컬럼(GE회사로부터 구매함)를 취하여 실온까지 회복시키고, PBS(0.01 M PB, 0.15 M NaCl, pH 7.4)로 5개의 컬럼 체적을 평형시킨다. 복수 상등액을 등체적의 PBS(0.01 M의 PB, 0.15 M의 NaCl, pH 7.4)와 혼합하여, 0.22 μ M 필터로 여과하고, 여과된 복수 상등액 상에 단백질G 친화성 컬럼에 의해, PBS로 5개의 컬럼 체적으로 세척한다. 용출 완충액(0.1 M의 Glycine HCl, pH 2.7)으로 용출시키고, 용출액에 1/10체적의 중화 완충액(1 M의 NaH₂PO₄, pH 9.0)을 넣어 중화시킨다. 용액을 PBS(0.01 M의 PB, 0.15 M의 NaCl, pH 7.4)로 투석하고, 이 사이에 액체를 두번 교환하며, 두번의 액체 교환 시간 간격은 5시간보다 크다. 10000 g의 투석 용액을 10분 동안 원심 분리시켜, 상등액을 필터로 여과하여 보존하여, 각 클론에 의해 생성된 항인간 GPC3 단일 항체에 대응되는 정제된 용액을 얻는다. 분석에 따르면, 5A5는 우수한 항원 결합 능력을 구비한다.

[0291] 5.5 GPC3클론 5A5의 인간화

[0292] 5.5.1 5A5 항체의 서열 분석

[0293] 5A5는 우수한 항원 결합 능력을 구비한다. 5A5항체 유전자 가변 영역 VL와 VH를 측정하고, Kabat, Chothia 및 IMGT 등3가지 항체CDRs 영역의 명명 방식을 종합하여, 항체 경쇄와 중쇄의 6개 CDRs 영역 서열을 확정한다.

[0294] 5A5중쇄의 뉴클레오티드 서열(서열번호 56, 여기서, 밑줄친 3개 영역은 순차적으로 CDR1, CDR2, CDR3임):

[0295] CAGGTTCAACTGCAGCAGTCTGGGACTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCTGCAGGCCTTGGGCTACACATTACTGACTATGAAATG
CACTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAGTGGATGGAGCTATTTCATCCAGGAAGTGGTGATACTGCCTACAATCAGAGGTCAAGGGCAAGGCC
ACACTGACTGCAGACAAATCTTCAGCACAGCCTACATGGAGTACAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTACTGTACAAGATTTTTATCCTAT
GCTTACTGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

[0296] 5A5경쇄의 뉴클레오티드 서열(서열번호 57, 여기서, 밑줄친 3개 영역은 순차적으로 CDR1, CDR2, CDR3임):

[0297] GATGTTGTATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGAGATCAAGCCTCCATCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGTACACAGTAATGGA
AACACCTATTTACAGTGGTACCTGCAGAACGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTCCAAATCGATTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAAG
GGCAGAGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTATTCTGCTCAAAGTATATGTTCCGTACACG
TTCGGAGGAGGGACCAAGCTGGAAATAAACCG

[0298] 5A5중쇄의 아미노산 서열(서열번호 81, 여기서, 밑줄친 3개 영역은 순차적으로 CDR1, CDR2, CDR3):

[0299] QVQLQQSGTELVRPGASV~~KL~~SKALGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGAIHPGSGDTAYNQRFKGKATLTADKSSSTAYMEYSSLTSEDSAVYCTRFSY
AYWGQGTLTVSA

[0300] 5A5경쇄의 아미노산 서열(서열번호 82, 여기서, 밑줄친 3개 영역은 순차적으로 CDR1, CDR2, CDR3임):

[0301] DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLQWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGRSGTDFTLKI SRVEAEDLGVYFCSQSIYVPY
EGGGTKLEIKR

[0302] 5.5.2 항체 주형의 선택

[0303] 항체 주형 프레임 영역의 선택에는 주로 면역원성, 항원 결합 특성, 발현 및 안정성의 4가지 중요한 요인이 있다.

[0304] (1) 특히 WO2008021156에 따라 항체 경쇄 및 중쇄 가변 영역에서 항체loop 구조를 지지하는 아미노산 잔기 및 경쇄 및 중쇄 도메인에서의 아미노산 잔기를 확정한다.

[0305] (2) 5A5의 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 전체 길이와 IMGT, V BASE 또는 NCBI로부터 유래되는 항체 종류에 대하여 서열 흡사성 대비를 진행한다.

[0306] (3) 5A5의 경쇄 또는 중쇄 가변 영역에서 CDR 영역의 loop를 지지하는 것과 관련된 아미노산 잔기를 제거한 후, IMGT, V BASE 또는 NCBI로부터 유래되는 항체 종류와 서열 흡사성 대비를 진행한다.

[0307] (4) 5A5의 경쇄 또는 중쇄 가변 영역에서 CDR 영역의 아미노산 잔기를 제거한 후, IMGT, V BASE 또는 NCBI로부터

터 유래되는 항체 종류와 서열 흡사성 대비를 진행한다.

[0308] (5) 5A5의 경쇄 또는 중쇄 서열 중의 loop를 지지하는 것과 관련된 아미노산 잔기만을 보존한 후, IMGT, V BASE 또는 NCBI로부터 유래되는 항체 종류와 서열 흡사성 대비를 진행한다.

[0309] (6) 5A5의 경쇄 또는 중쇄 framework 중 loop를 지지하는 것과 관련된 아미노산 잔기만을 보존한 후, IMGT, V BASE 또는 NCBI로부터 유래되는 항체 종류와 서열 흡사성 대비를 진행한다.

[0310] (7) 서열 흡사성 대비 결과를 종합하여, 흡사도가 가장 높은 항체 종류를 선택하여 항체 주형으로 한다.

[0311] (8) 중쇄의 서열 흡사도 대비 결과: 흡사도에 따라, VH1_69*06 (IMGT, Accession numbers:L22583)을 5A5중쇄의 항체 주형으로 선택한다.

[0312] (9) 경쇄의 서열 흡사도 대비 결과: 흡사도에 따라, VK2D_29*02 (IMGT, Accession numbers:U41644)을 5A5경쇄의 항체 주형으로 선택한다.

5.5.3 CDR 이식

[0314] 5A5항체의 경쇄 또는 중쇄CDR 영역을 항체 주형의 CDR영역으로 대체한다. 최종적으로 인간화 항체(Y035)를 확정 한다. 이의 아미노산 서열은 하기와 같다.

[0315] 인간화 Y035중쇄(서열번호 58):

[0316] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSDYEMHWVRQAPGQGLEWMGAIHPGSGDTAYNQRFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFYSY
AYWGQGTLVTVSA

[0317] 중쇄CDR1아미노산 서열: Asp Tyr Glu Met His (서열번호 73);

[0318] 중쇄CDR2아미노산 서열: Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Arg Phe Lys Gly (서열번호 74);

[0319] 중쇄CDR3아미노산 서열: Phe Tyr Ser Tyr Ala Tyr (서열번호 75).

[0320] 인간화 Y035경쇄(서열번호 59):

[0321] DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLQWYLQKPGQSPQLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSIYVPYT
FGQGTKLEIKR

[0322] 경쇄CDR1아미노산 서열: Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln (서열번호 76);

[0323] 경쇄CDR2아미노산 서열: Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser (서열번호 77);

[0324] 경쇄CDR3아미노산 서열: Ser Gln Ser Ile Tyr Val Pro Tyr Thr (서열번호 78).

5.5.4 인간화된 항체의 발현과 정제

[0326] (1) 인간화된 항체(Y035)의 아미노산 서열에 따라, 뉴클레오티드 서열을 설계하고 합성

[0327] 합성된 경쇄 뉴클레오티드 서열(서열번호 79, 신호 펩티드 코딩 서열을 포함함):

[0328] GGATCGATATCCACCATGGACATGATGGTGTGGCCCAGTTCTGGCTTCTGCTGCTGTGGTCCCAGGGCTAGATGCGACATCGTGTGACCCAGACC
CCCCTGAGCCTGCCGTGACCCCCGGCGAGCCGCCAGCATCAGCTGCCGAGCAGCCAGAGCCTGGTGCACAGCAACGGCAACCTACCTGCAGTGGTAC
CTGCAGAAGCCGCCAGAGCCCCAGCTGCTATCACAGGTGAGCAACCGGTTAGCGGCCAGCCGGTACAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGAC
TTCACCTGAAGATCAGCCGGTGGAGGCCAGGTGGCGTGTACTACTGCAGCCAGAGCATCTACGTGCCCTACACCTCGGCCAGGGCACCAAGCTG
GAGATCAAACGTACGGTGGCT

[0329] 합성된 중쇄 뉴클레오티드 서열(서열번호 80, 신호 펩티드 코딩 서열을 포함함):

[0330] GGATCGATATCTGCGGCCTATCTAGCCACCATGCGGGTGTGATCCTGCTGTGGCTGTTACGCCCTCCCGGCTTCTGAGCGAGGTGCAGCTGGTGCAG
AGCGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCCAGCGTGAAGGTGAGCCTGCAAGGCCAGCGCTACACCTTCAGCGACTACGAGATGCACTGGGTGCGGCAGGGC
CCCGGCCAGGGCTGGAGTGGATGGCGCCATCCACCCGGCAGCGCGACACCGCCTACAACCAGCGTTCAAGGGCCGGGTGACCATCACGCCGACAAG
AGCACCCAGCACCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGCCAGCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCAGCCCTACAGCTACGCCACTGGGCCAGGGC
ACCCGGTGACCGTGAGCGCCGCTAGCACC44

[0331] (2) 합성된 항체 뉴클레오티드 서열(신호 펩티드는 제16 내지 81 위치(경쇄) 제31 내지 84 위치(중쇄)임), 항체

의 가변 영역, 불변 영역을 포유 동물 세포에 삽입시켜 벡터에 발현시킴으로써 중쇄와 경쇄가 함유된 항체 발현 벡터를 구축하여, 시퀀싱을 통해 항체 서열이 설계와 일치한지를 검증한다. 구체적으로, 하기와 같다.

[0332] EcoRV와 BsiWI 이중 절단 합성된 경쇄 및 pIK-hu12L(상해 루이진 바이오 테크놀로지 유한회사로부터 구매함)로, 경쇄를 pIK-hu12L에 삽입시킨다.

[0333] EcoRV와 NheI이중 절단 합성된 중쇄 및 개조된 pIH-hu12H(상해 루이진 바이오 테크놀로지 유한회사로부터 구매하고 CH1에 동일한 돌연변이에 의해 하나의 NheI 절단 효소 사이트를 증가함)로, 중쇄를 pIH-hu12H에 삽입시킨다.

[0334] 효소 절단으로 연결된 벡터를 TOP10 컴피턴트 세포(competent cell)에 형질 전환시키고, PCR로 양성 클론을 검증하며, 시퀀싱에 의해 서열의 정확한 클론을 확정한다. 벡터를 293Fectin으로 순간적으로 293F 세포에 형질 감염시켜 발현시킨다. 원심 분리시켜 293F 배지 상등액을 수습하고, 0.45 μ m의 필터로 여과시키며, Protein A 컬럼 친화성 크로마토그래피를 진행한다. A280은 분광 광도계를 사용하여 정제된 항체의 농도를 결정한다.

[0335] 5.6 인간화 항체Y035가 인간 GPC3 결합 능력에 대한 SPR 분석

[0336] 항체Y035와 항원 단백질 인간 GPC3의 결합을 정량적으로 분석하기 위하여, Biacore T200시스템(GE으로부터 구매함)을 사용하여 다중 순환 동력학 측정 방법으로, 항체Y035의 친화성과 동력학적 파라미터를 측정한다. 제조 업체의 설명서에 따라, NNHS/EDC 커플링을 갖는 일차 아미노기로 항원 단백질 GPC3(상해 루이진 바이오 테크놀로지 유한회사로부터 구매함)을 센서 칩 CM5의 카르복시메틸렉스트란 표면에 커플링시키고, 리간드의 최종 커플링 량은 305 RU이다. 동력학적 측정은 25 °C의 온도, 30 μ l/min, 1×HBS-EP+의 작업 완충액에서 진행되고, 재생 조건은 10 mM의 Glycine-HCl(pH2.5), 10 μ l/min으로 25초 동안 작용시킨다. 각각의 테스트 순환에서, 특정 농도의 항체Y035이 칩 표면을 흘러지나가고, 항체와 칩에 고정된 항원 단백질 인간 GPC3이 상호 작용하여 센서 표면 분자 농도를 변화시켜 SPR신호의 변화로부터 측정되며, 공명 단위(RU)로 표시한다. 시간 대 공명 단위(RU) 연속적인 작도를 통해, 비교정된 항원의 기준 채널의 RU 값을 뺀 후, 얻은 감도로 결합과 해리 과정을 포함하는 전체 반응 과정을 기록한다. 항체Y035 및 항체5A5가 인간 GPC3의 결합 동력학에 대한 분석은 도7 ~ 8에서와 같다. 동력학에서 측정된 상이한 순환 실험에서, 항체Y035의 농도는 각각 6.25 nM, 12.5 nM, 25 nM, 50 nM 및 100 nM이다. Biacore T200 evaluation software평가에 의해 작용 그래프를 얻고, 친화성과 KD값을 계산한다. 동일한 방법에 의해, Y035를 인간화 개조하기 전의 친본 마우스 단일 클론 항체 5A5의 친화성과 동력학 파라미터에 대해서도 측정하고 분석한다. 항체Y035와 5A5는 각각 인간 GPC3 단백질의 결합 데이터를 표2에 나타내고, 인간화 개조된 후의 항체Y035는 인간 GPC3 단백질의 결합 능력이 마우스원의 5A5보다 많이 우수하다.

[0337] 표2. 항체Y035와 5A5가 인간 GPC3에 대한 결합 동력학 파라미터

항체	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Y035	3.96E+ 05	2.51E-05	6.34E-11
5A5	2.80E+ 05	2.30E-05	8.19E-11

[0338]

[0339] 5.7 항체Y035의 세포 결합 활성 FACS 분석

[0340] 형광 활성 세포 분류기(FACS)로 항체Y035와 GPC3 양성의 간암HepG2 세포주(ATCC)의 결합 능력을 분석하고, GPC3으로 음성의 293T(ATCC) 세포로 발현시키며 음성 대조로 한다.

[0341] 구체적인 방법은 하기와 같다.

[0342] 1) 대수 성장기의 세포HepG2와 293T를 각각 취하여 6 cm의 접시에 접종시키고, 접종 세포 밀도는 약 90 %이며, 37 °C의 인큐베이터에서 하룻밤 배양한다.

[0343] 2) 10 mM의 EDTA 소화 세포를 사용하여, 200 g×5분으로 원심 분리하여 세포를 수집한다. 1×10^6 ~ 1×10^7 /mL의 농도로 소태아 혈청을 함유한 1 %의 인산염 완충액(NBS PBS)에 재부유시키고, 100 uL/튜브의 양으로 유동 전용튜브에 첨가한다.

- [0344] 3) 200 g×5분으로 원심 분리하고, 상등액을 버린다.
- [0345] 4) 두 개의 세포주의 실험군에 각각 피시험 항체Y035를 넣고, 다른 하나의 대조는 항체를 넣지 않은 PBS 삼 대조이다. 항체 최종 농도는 20 μ g/ml이고, 각 튜브에 100 μ l를 넣는다. 45분 동안 아이스 배스한다.
- [0346] 5) 각 튜브에 2 ml의 1 %의 NBS PBS를 넣어, 200 g×5분으로 모두 2번 원심 분리한다.
- [0347] 6) 상등액을 버리고, 1:100으로 희석한 염소 항인간 항체-FITC(상해 캉청 생물 공학 유한회사로부터 구매함)를 첨가하며, 각 튜브에 100 μ l를 넣는다. 45분 동안 아이스 배스한다.
- [0348] 7) 각 튜브에 2 ml의 1 %의 NBS PBS를 넣어, 200g×5분으로 모두 2번 원심 분리한다.
- [0349] 8) 상층액을 버리고, 300 μ l의 1 %의 NBS PBS에 재부유시켜, 유동 세포 장치로 검출한다.
- [0350] 유동 세포기 데이터 분석 소프트웨어 Flowjo7.6을 응용하여 데이터를 분석하고, 결과는 도9에서 나타내는 바와 같으며, 유동 세포 분석 결과, 항체Y035는 GPC3을 발현시키는 HepG2 세포를 특이적으로 인식할 수 있고, GPC3과 음성을 발현하는 293T 세포와 결합되지 않는다.
- [0351] 실시예6. P7D4 단일 사슬 항체에 기반한 CAR 발현 벡터를 구축 및 렌티 바이러스 제조
- [0352] 예시적으로, 하기 본 발명의 렌티 바이러스 플라스미드 벡터를 구축하는데 사용된 벡터 시스템은 제3세대 불활성 렌티 바이러스벡터 시스템에 속하고, 상기 시스템은, 단백질Gag/Pol을 코딩하는 코팅 플라스미드pMDLg RRE(addgene로부터 구매함), Rev단백질을 코딩하는 코팅 플라스미드pRSV-REV(addgene로부터 구매함), VSV-G 단백질을 코딩하는 코팅 플라스미드pCMV-VSV-G(addgene로부터 구매함) 및 빈벡터pRRRLSIN-cPPT.PGK-GFP.WPRE(addgene로부터 구매함)에 기반한 목적 유전자 CAR를 코딩하는 재조합 발현 벡터인 모두 4개의 플라스미드를 포함하고, 상기 시스템은 복제 가능한 렌티 바이러스 과립의 형성되는 위험성을 효과적으로 감소시킬 수 있다.
- [0353] 본 시스템에서, 본 발명자는 먼저 통상적인 문자 클론 기술 방식에 의해, 빈 벡터pRRRLSIN-cPPT.PGK-GFP.WPRE를 개조하여, 연장 인자-1 α (elongation factor-1 α , EF-1 α 로 약칭함)의 프로모터로 원래 벡터의 프로모터를 대체하고, 프로모터와 CD8 α sp 신호 휠티드 사이에 MluI 효소 절단 사이트를 증가하였다. 구체적으로, C1aI/SalI (NEB로부터 구매함) 이중 절단 벡터pWPT-EGFP(addgene로부터 구매함)를 사용하여, 1.1 Kb의 DNA 세그먼트를 회수하고, T4 DNA리가제로 C1aI/SalI 이중 절단된 벡터pRRRLSIN-cPPT.PGK-GFP.WPRE에 연결시키고, 숙주 세포균 TOP10에 형질 전환시켜, 클론을 선택하여 균락 PCR을 통해 양성 클론을 검증하며 시퀀싱에 의해 확인하며, 재조합 플라스미드pRRRLSIN-cPPT.EF-1 α -EGFP.WPRE를 얻었다.
- [0354] 전술한 최적화하여 얻은 P7D4 scFv를 사용하여 키메라 항원 수용체를 제조한다. 표3은 본 발명에서 예시하는 키메라 항원 수용체의 각 부분의 연결 순서를 나타낸다.
- [0355] 표3
- | 키메라 항원
수용체 | 세포외 결합 영역-막 관통 영역-세포 내 신호 영역 1-세포 내 신호 영역 2 etc | 서술 |
|------------------|---|--------|
| P7D4- δ Z | P7D4 scFv-CD8-CD3 δ zeta | 음성 대조 |
| P7D4-Z | P7D4 scFv-CD8-CD3 zeta | 제 1 세대 |
| P7D4-BBZ | P7D4 scFv-CD8-CD137-CD3 zeta | 제 2 세대 |
| P7D4-28Z | P7D4 scFv-CD28a-CD28b-CD3 zeta | 제 2 세대 |
| P7D4-28BBZ | P7D4 scFv-CD28a-CD28b-CD137-CD3 zeta | 제 3 세대 |
- [0356]

[0357] 주의: CD28a는 CD28 분자의 막 관통 영역을 대표하고, CD28b는 CD28분자의 세포 내 신호 영역을 대표한다.

[0358] 1. 핵산 세그먼트의 증폭

[0359] (1) scFv 서열의 증폭

[0360] 각각 V5-scFv-P7D4-Fc플라스미드를 주형으로, 정방향 프라이머P7D4fd(서열번호 36, 부분 CD8 signal peptide(CD8sp)의 서열을 포함하고, 프라이머 서열: ctccacgcgcgcaggccgcagggtgcagctgcaggag)과 역방향 프라이머 P7D4re(서열번호 37, 부분 CD8 hinge의 서열을 포함하고, 프라이머 서열: CGGCCTGGCGTCGTGGTACCTAGGACGGTGACCTTGG)를 프라이머쌍으로 사용하여, PCR 증폭시켜 P7D4 scFv 세그먼트를 얻었다.

[0361] (2) 키메라 항원 수용체 기타 부분의 핵산 서열

[0362] 항GPC3 키메라 항원 수용체 단백질의 P7D4 scFv 외의 기타 부분의 핵산 서열은 특히 출원 번호201310164725.X에서 개시한 서열 서열번호 26, 27, 28, 29와 30을 주형으로 PCR 방식에 의해 얻는다.

[0363] 구체적으로, 여기서, CD8a sp 서열을 포함하는 세그먼트F1은 본 실시예에서 구축되는 플라스미드pRRLSIN-cPPT.EF-1 α-EGFP.WPRE를 주형으로, 프라이머쌍 PWXLF(서열번호 38, 프라이머 서열: gcagggaaagaatagttagaca)와PRRL-CD8SP-R1(서열번호 39, 프라이머 서열: CGGCCTGGCGCGTGGAG)로 PCR 증폭시켜 얻는다.

[0364] CD8-CD3 δ zeta(δ Z)를 포함하는 세그먼트F3-δ Z은 출원 특허201310164725.X 중의 서열번호 26플라스미드를 주형으로, 프라이머쌍 PRRL-CD8hinge(서열번호 40, 프라이머 서열: accacgacgcgcagcgccg)와 δ Z re(서열번호 41, 프라이머 서열: GAGGTCGACCTACGCGGGGGCTGCGCTCCTGCTGAACTTCACTCT)로 PCR 증폭시켜 얻는다.

[0365] CD8-CD3 zeta(Z)를 포함하는 세그먼트F3-Z, CD8-CD137-CD3 zeta(BBZ)를 포함하는 세그먼트F3-BBZ, CD28a-CD28b-CD3 zeta(28Z)를 포함하는 세그먼트F3-28Z 및 CD28a-CD28b-CD137-CD3 zeta(28BBZ)를 포함하는 세그먼트F3-28BBZ 서열은 각각 출원 특허 201310164725.X 중의 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29 및 서열번호 30과 대응되는 플라스미드를 주형으로, 프라이머쌍 PRRL-CD8hinge(서열번호 42, 프라이머 서열: accacgacgcgcagcgccg)과 R3R(서열번호 43, 프라이머 서열: aatccagaggttggatgtcgacctagcgaggggcaggcctgc)를 사용하여 PCR 증폭시켜 얻는다.

[0366] 2. 핵산 세그먼트의 연결

[0367] 각각 상기에서 얻은 F1핵산 세그먼트를 등물비의 P7D4 scFv핵산 세그먼트 및 등물비의 F3-δ Z 또는 F3-Z 또는 F3-BBZ 또는 F3-28Z 또는 F3-28BBZ핵산 세그먼트와 3개의 세그먼트 접합 및 PCR을 진행하고, 접합 조건은, 94 °C에서4분 동안 전변성시키고; 94 °C에서 40초 동안 변성시키며; 60 °C에서 40초 동안 어닐링(annealing)하고; 68 °C에서 140초 동안 연장하여, 5회 순환한 후, 68 °C에서 10분 동안 전체 연장하여, DNA중합 효소 및 정방향 프라이머 PWXLF와 역방향 R3R(CD8-CD3 δ zeta와 대응되는 역방향 프라이머는 δ Z re이고, 나머지는 모두 R3R임)를 보충한 후, 30회 동안 PCR 증폭시키며, 증폭 조건은, 94 °C에서4분 동안 전변성시키고; 94 °C에서 40초 동안 변성시키며; 60 °C에서 40초 동안 어닐링하고; 68 °C에서 140초 동안 연장하여, 30회 동안 순환한 후, 68 °C에서 10분 동안 전체 연장한다. 본 실시예에서 구축된 F1 세그먼트, P7D4 scFv 또는 P7D4 돌연변이체 scFv, 및 각종 F3 세그먼트로 이루어진 세그먼트를 CAR 세그먼트라고 약칭 가능하며, 증폭시켜 얻은 세그먼트를 각각:

[0368] P7D4 scFv- δ Z (서열번호 44),

[0369] P7D4 scFv-Z (서열번호 45),

[0370] P7D4 scFv-BBZ (서열번호 46),

[0371] P7D4 scFv-28Z (서열번호 47),

[0372] P7D4 scFv-28BBZ (서열번호 48)이라고 한다.

[0373] 3. 렌티 바이러스 플라스미드 벡터의 구축

[0374] 본 실시예에서 F1 세그먼트, P7D4 scFv, 및 F3 세그먼트 성분(CAR로 약칭)으로 MluI/SalI 제한 엔도뉴클레아제로 이중 절단하여, 동일한 이중 절단된 pRRLSIN-cPPT.EF-1 α-EGFP.WPRE벡터에 결합시킴으로써, 각 키메라 항원 수용체를 발현하는 렌티 바이러스벡터pRRLSIN-cPPT.EF-1 α-CAR를 구축한다. 성공적으로 구축된 벡터는 MluI/SalI 효소 절단 검증 및 시퀀싱으로 측정한 후, 렌티 바이러스 포장에 사용될 수 있다. 상술한 바와 같이,

관련 CAR 유전자는 한가닥의 펩티드 사슬로 전사 번역되고, CD8 α 신호 펩티드의 가이드 하에서, 항GPC3키메라 항원 수용체를 세포막에 위치시킨다.

[0375] 상기 구축을 통해, 각각 5개의 CAR 폴리펩티드 서열을 얻고, 하기와 같이 명명한다.

[0376] P7D4-6Z (서열번호 49);

[0377] P7D4-Z (서열번호 50);

[0378] P7D4-BBZ (서열번호 51);

[0379] P7D4-28Z (서열번호 52);

[0380] P7D4-28BBZ (서열번호 53).

[0381] 4. 폴라스미드로 293T 포장 렌티 바이러스를 형질 감염

[0382] 6×10^6 의 밀도로 제6 ~ 10세대까지 배양한 HEK-293T 세포(ATCC: CRL-11268)를 10 cm의 배양 접시에 접종시키고, 37 °C의 온도, 5 %의 CO₂로 하룻밤 배양하여 형질 감염에 사용한다. 배지는 10 %의 소태아 혈청과 DMEM(모두 Life회사로부터 구매함)를 함유한다.

[0383] 형질 감염 단계는 하기와 같다.

[0384] 4.1 A액체의 배합: 5.2 μ g의 각 목적 유전자 폴라스미드 pRRSIN-cPPT.EF-1 α -CAR를, 각각 6.2 μ g의 포장 폴라스미드pMDLg RRE와 pRSV-REV, 및 2.4 μ g의 포장 폴라스미드pCMV-VSV-G와 함께 800 μ L의 무혈청 DMEM 배양 액에 용해시키고 혼합한다.

[0385] 4.2 B액체 배합: 60 μ g의 PEI(1 μ g/ μ l의 폴리에틸렌이민(polyethylenimine), Polysciences회사로부터 구매함)를 800 μ L의 무혈청 DMEM 배양액에 용해시키고, 천천히 균일하게 혼합하여, 실온에서 5분 동안 부화시킨다.

[0386] 4.3 형질 감염 복합물의 형성: A액체를 B액체에 넣어 천천히 혼합하고, 넣은 후 즉시 와류 혼합하거나 천천히 혼합하여, 실온 하에서 20분 동안 부화시킨다.

[0387] 4.4 1.6 mL 의 형질 감염 복합물을 HEK-293T세포에 적가하고, 4 ~ 5시간 후, 형질 감염된 293T세포를 2 %의 FBS의 DMEM 배지로 교환한다.

[0388] 형질 감염시키고 72시간 동안 부화시킨 후, 0.45 μ m의 여과기(Millipore회사로부터 구매함)를 사용하여 수집한 바이러스를 여과한 후, Beckman Optima L-100XP 고속 원심 분리 장치로 28000rpm로, 4 °C에서 2시간 동안 원심 분리하여, 상등액을 버리고, 원심 분리하여 얻은 침전을 1/10 ~ 1/50 원액 체적의 AIM-V배양액(Invitrogen회사로부터 구매함)으로 재부유시키며, T 임파구의 바이러스 적정 또는 감염을 위해 -80 °C에서 100 μ L/튜브로 아이스 보관한다.

[0389] 실시예7. 재조합 렌티 바이러스로 CTL 세포를 형질 감염

[0390] 건강한 인간 말초 혈액으로부터 밀도 구배 원심 분리법에 의해 인간 말초 혈액 단핵구(상해 혈액 센터에서 제공함)를 얻고, 약 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 의 밀도로 AIM-V 임파구 배지(Invitrogen회사로부터 구매함)로 배양하며, 세포: 자석 구슬을 1:1 비례로 항CD3와 CD28항체가 포장된 자석 구슬(Invitrogen회사로부터 구매함)을 넣는 동시에, 300 U/mL의 농도의 재조합 인간 IL-2(상해 화신 바이오 테크놀로지 유한회사로부터 구매함)로 자극하여 48시간 동안 배양한 후, 상기 재조합 렌티 바이러스(MOI ≈ 10)로 T세포를 감염시킨다. 감염시킨 후의 세포를 격일로 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 의 밀도로 계대하는 동시에, 임파구 배양액에 최종 농도가 300 U/mL인 재조합 인간 IL-2를 보충하여 넣는다.

[0391] 감염된 CTL 세포는 제8일째 배양일에 유동 세포로 각 상이한 항원 수용체 발현을 검출한다. His-tag를 지닌 인간 GPC3재조합 단백질(상해 루이진 바이오 테크놀로지 유한회사로부터 구매함)을 사용하여 FACS검출을 진행하고; 먼저, 세포와 상기 단백질(50 μ g/mL)을 1시간 동안 부화시키며, D-PBS로 두번 세척한 후, 항His-tag의 항체(1: 50로 희석하고, 상해 루이싱 바이오 테크놀로지 유한회사로부터 구매함)를 넣어, 1시간 동안 부화시킨 후, D-PBS로 두번 세척하며, 다음 FITC로 표기된 양항마우스 2차 항체(상해 캉청 생물 공학 유한회사로부터 구매함)를 넣어, 50분 동안 부화시키고, D-PBS로 세번 세척한 후, FACS 검출한다. 감염되지 않은 T임파구를 음성 대조로 하고, 상이한 키메라 항원 수용체를 발현하는 바이러스로 T세포를 감염시키며 이의 양성을 하

기 표4에서 나타내는 바와 같다. 상기 양성을의 결과에 따르면, 렌티 바이러스로 감염하는 방법은 일정한 양성을의 CAR⁺T세포를 얻을 수 있다.

[0392]

표4

하기 CAR 의 감염된 T 세포	T 세포 형질 감염 양성을
P7D4- δ Z (음성 대조)	59 %
P7D4-Z	65 %
P7D4-BBZ	53 %
P7D4-28Z	61 %
P7D4-28BBZ	54 %

[0393]

T세포를 상이한 키메라 항원 수용체가 포장된 바이러스로 각각 감염시킨 후, $5 \times 10^5 / \text{ml}$ 의 세포 밀도로 격일 계대 배양하고, 계수하며, 계대된 세포 배양액에 IL-2(최종 농도는 300 U/ml임)를 보충하여 넣고, 배양 제11번째 날에 약 100 ~ 1000배 증폭되고, 이는 상이한 키메라 항원 수용체를 발현하는 T세포가 체외에서 일정 수량으로 증폭될 수 있음을 나타내는 바, 이 후의 체외 독성 시험 및 체내 시험을 보장한다.

[0395]

실시예8. 키메라 항원 수용체를 발현하는 T임파구의 체외 독성 효과 실험

[0396]

체외 독성 실험에서 하기와 같은 재료를 사용한다.

[0397]

표5에서 표시되는 GPC3 양성 간암 세포(HepG2와 Huh-7) 및 GPC3 음성 간암 세포(SK-HEP-1)를 타겟 세포로 하고, 효과 세포는 실시예7에서 확인된 바와 같은 체외에서 12일 배양된 FACS 검출 결과, 키메라 항원 수용체가 발현된 음성 세포를 키메라 항원 수용체 양성 세포를 키메라 항원 수용체 양성 (CAR⁺)의 CTL로 하고, 효과 타겟비는 각각 3:1, 1:1과 1:3이며, 타겟 세포 수량은 10000개/웰이고, 상이한 효과 타겟비에 따라 효과 세포가 대응된다. 각 군에 모두 5개 복합 웰을 설계하고, 5개의 복합 웰의 평균값을 취한다. 검출 시간은 18시간이다.

[0398]

여기서, 각 실험군과 대조군은 하기와 같다.

[0399]

각 실험군: 각 타겟 세포+상이한 키메라 항원 수용체를 발현하는 CTL,

[0400]

대조군1: 타겟 세포는 락트산 탈수소효소(LDH)를 최대 방출하고,

[0401]

대조군2: 타겟 세포는 락트산 탈수소효소를 자발 방출하며,

[0402]

대조군3: 효과 세포는 락트산 탈수소효소를 자발 방출한다.

[0403]

검출 방법: CytoTox 96 비방사성 세포 독성 검출 키트(Promega회사)를 사용하여 수행한다. 상기 방법은 비색법에 기반한 검출 방법으로서, ^{51}Cr 방출법을 대체할 수 있다. CytoTox 96[®]는 락트산 탈수소효소를 적정량으로 검출한다. 락트산 탈수소효소는 안정한 세포질 효소로, 세포 분열 과정에서 방출되고, 이의 방출 방식은 방사성 분석에서 ^{51}Cr 의 방출 방식과 기본상 동일하다. 방출된 락트산 탈수소효소 배지 상등액은, 락트산 탈수소효소가 테트라졸륨염(INT)을 적색 포르마잔(formazan)으로 전환시키는 30분 결합된 효소 반응에 의해 검출될 수 있다.

생성된 적색 산물의 량은 분열된 세포수와 정비례된다. 구체적으로 CytoTox 96 비방사성 세포 독성 검출 키트 설명서를 참조 바란다.

[0404] 세포 독성 계산 공식:

$$\text{세포 독성 \%} = \frac{\text{실험군-대조군2-대조군3}}{\text{대조군1-대조군2}} \times 100\%$$

[0405]

[0406] 구체적으로, 표5에서 나타내는 바와 같이, 본 발명의 P7D4의 단일 사슬 항체의 CAR는 모두 현저한 GPC3 음성 간암 세포를 살상하는 활성을 포함하고, 여기서, 제2세대와 제3세대의 P7D4 CAR T세포는 제1세대 항종양보다 활성이 조금 강하다. 이 외에, 모든 CAR T세포는 GPC3 음성의 SK-HEP-1 양성 간암 세포에 대하여 모두 살상 활성이 없다. 이런한 결과에 따르면, P7D4는 선택적으로 GPC3 양성의 간암 세포에 대하여, 효과적인 살상 작용을 일으킬 수 있다. 이 외에, 본 발명의 P7D4를 발현하는 제1세대, 제2세대, 제3세대 CAR T는 GPC3 양성 종양 세포에 대하여 효과 타겟비 구배 의존성을 나타내며, 즉 효과 타겟비가 높을 수록 세포 독성 작용이 더욱 강하다.

[0407] 표5. 단일 사슬 항체P7D4를 융합 발현하는CAR T세포의 세포 독성

세포 독성 (%)	P7D4-28BBZ			P7D4-BBZ			P7D4-28Z			P7D4-Z			P7D4-6Z		
	상이한 효과		타겟비	상이한 효과			상이한 효과		타겟비	상이한 효과		타겟비	상이한 효과		타겟비
	3:1	1:1		3:1	1:1	3:1	1:1	3:1		1:1	3:1		1:1		
HuH-7	75.3	48.4	17.2	69.2	32.2	10.2	62.4	31.3	7.8	42.9	20.2	5.6	3.2	1.3	5.3
HepG2	85.8	59.1	21.9	71.3	38.6	13.9	68.2	35.6	6.5	48.5	25.9	7.2	4.8	2.5	3.2
SK-HEP-1	2.5	3.2	3.9	4.5	2.1	3.8	1.9	2.4	3.6	2.3	3.7	4.8	3.1	2.3	1.2

[0408]

[0409] 실시예9. Y035와 GC33에 기반한 CAR-T 세포의 제조와비교

[0410]

실시예6과 실시예7의 조작을 참조하여, Y035의 경쇄 가변 영역과 중쇄 가변 영역에 기반하여, 각각 Y035-BBZ, Y035-28Z과 Y035-28BBZ 두 가지 CAR-T 세포를 제조하여 얻고; GC33의 경쇄 가변 영역과 중쇄 가변 영역에 기반하여, 각각 GC33-28Z와 GC33-28BBZ 두가지 CAR-T 세포를 제조하여 얻으며, 이를 대조로 한다. 키메라 항원 수용체 각 부분의 연결 순서는 하기 표6에서 나타내는 바와 같다.

[0411]

豆6

키메라 항원 수 용체	세포 외 결합 영역-막 관통 영역-세포 내 신호 영역 1-세포 내 신호 영역 2 etc
Y035-BBZ	Y035 scFv-CD8-CD137-CD3 zeta
Y035-28Z	Y035 scFv-CD28a-CD28b-CD3 zeta
Y035-28BBZ	Y035 scFv-CD28a-CD28b-CD137-CD3 zeta
GC33-28Z	GC33 scFv-CD28a-CD28b-CD3 zeta
GC33-28BBZ	GC33 scFv-CD28a-CD28b-CD137-CD3 zeta

[0412]

[0413] 여기서, Y035-BBZ의 뉴클레오티드 서열은 하기와 같다(서열번호 85):

[0414]

[0415]

Y035-BBZ의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열번호 86)

[0416]

EVQLVQSGAEVKPGAVSKVSKASGYTFSDYEMHWQRQAPGQGLEWMGAIHPGSGDTAYNQRFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFYSAYWGQGTLTVSAGGGGGGGGGGGSDIVMTQTPLSLPVTPGEPAISCRSSQLVHSNGNTYLQWYLQKPGQSPQLIYKVSNRFSGVPDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCSQSYVPTYFGQGKLEIKRTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYIWAPLAGTCVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTQEEGDCSCLFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGKPRRNPKQEGLYNLELOKDKMFAAYSEI GMKGERRGKGHDGJYOGI-STATKDTYDAHMOAIPPR

[0417]

Y035-287의 뉴클레오티드의 서열은 하기와 같다(서열번호 87):

[0418]

gcggcggggggcgcagtgcacacgaggggctggacttcgcctgtatttgggtctgggtgttggtggatctggcttgctatagcttgctagta
acagtggccttattatctgggtgaggagaagaggagcaggctcgcacagtgactacatgaacatgactccccggccggccaacccgcaag
cattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcgcctatcgctccagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgctaccagcaggccagac
cagctctataacgagctaacttaggacaagagaggagtacgatgtttggacaagagacgtggccggaccctgagatgggggaaagccgcagagaagg
aagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaagataagatggcggaggctacagtgagattggatgaaaggcgagcgcggagggcaaggg
cagcatggcttaccagggctcagtagccaccaaggacacctacgcgccttacatgcaggccctggccctcgc

Y035-28Z의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열번호 88):

EVQLVQSGAEVKPGAVKSCKASGYTFSDYEMHWVRQAPGQGLEWMGAIHPGSGDTAYNQRFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFYSY
AYWGQGTLTVSAGGGGGGGGGGGSDIVMTQPLSLPVTGEPASI~~CRSSSQLVHSNGNTYLQWYLQKPGQSPQLL~~IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGT
DFTLKISRVEAEDVGVYCSQSIYVPYTFGQGKLEIKRTTTPAPRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLV
TVAFIIFWWRSRKRSRLLHSDYMNMTPRRGPTRKHYQPYAPRDFAA~~YRSRVKF~~SRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDP~~EMGGK~~PQRR
KNPOEGIYNEL~~LODKM~~A~~YSEI~~GMKGERRRGKGHDGLYOGI~~STAT~~KDTYDALHMOALP~~PR~~

Y035-28BBZ의 뉴클레오티드 서열은 하기와 같다(서열번호 89):

Y035-28BBZ의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열번호 90)

EVQLVQSGAEVKPGASVKVSKASGYTFSDYEMHWVRQAPGQGLEWMGAIHPGSGDTAYNQRFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARFYSY
AYWGQGTLTVSAGGGGGGGGGGGGGSDIVMTQTPLSLPVTPGEPASI SCRSSQLVHSNGNTYLQWYLQKPGQSPQLL IYKVSNRFSGVPDFSGSGST
DFTLKISRVEAEDVGVYVYCSQSYVVPYTFGQGKLEIKRTTTPAPRPPPTAPTIAQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLV
TVAFIIFWWRSKRSRLLHSDYMNMTPRPGPTRKHYQPYAPRDFAA YRSKRGKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEDGCSCRFPEEEEGGCERVKFSRSADA
PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKDRRGRDPMEGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDCKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP
R

GPC3 양성 간암 세포 Huh-7를 타겟 세포로 사용하고, 실시예8에서 사용된 체외 독성 실험 방법을 참조하여 체외 시험을 진행하며, 효과 타겟비가 1:3일 경우, Huh-7에 대한 Y035-28Z와 Y035-28BBZ의 살상률은 35 % 이상에 도달하지만, GC33-28Z의 살상률은 6 %이고, GC33-28BBZ의 살상률은 23 %이며, 효과 타겟비가 1:1일 경우, Huh-7에 대한 Y035-28Z의 살상률은 60 % 이상에 도달하지만, GC33-28Z의 살상률은 단지 22 %로, 상기 결과로부터, 본 출원 Y035-CAR T세포의 세포 살상 활성이 GC33-CAR T세포보다 현저하게 우수하다.

실시예10. 이중 톤이적 핵체 BiTE의 제조

(1) Y035단일 사슬 핵체 뉴클레오티드 서열의 제조

단일 클론 항체를 분비하는 교잡 세포주를 대수 성장기까지 배양하여, 세포 계수하고, 1×10^7 의 교잡 세포를 취한다. TRIzol® Plus RNA Purificationkit (Invitrogen, 12183-555) 설명서에 따라 세포 침전으로부터 총 RNA를 추출한다.

RASSSVSYMWNWYQQKSGTSPKRWYDTSKVASGVPYRFSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLEK

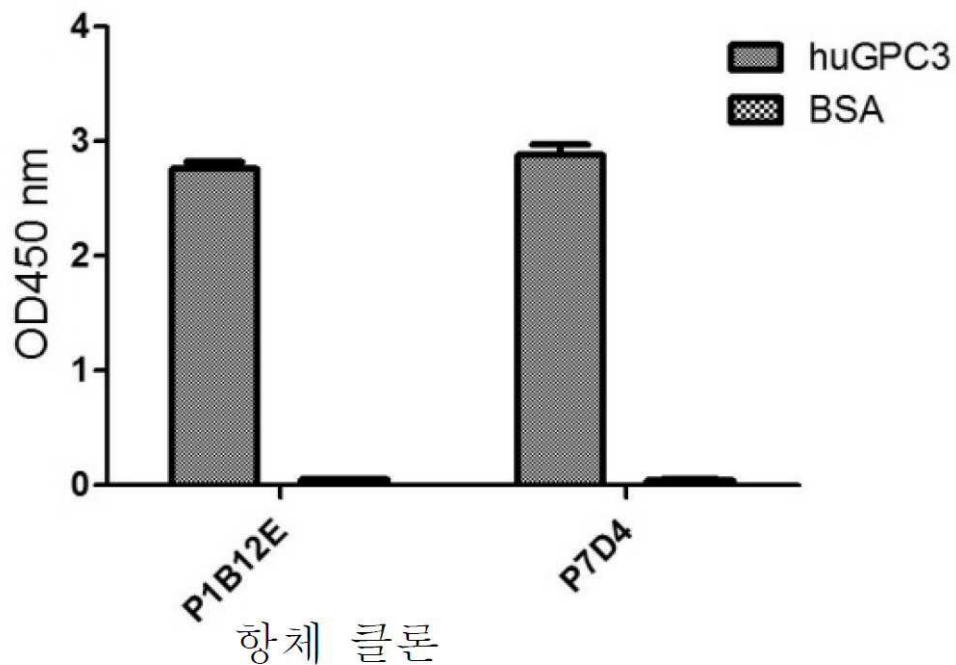
[0443] 양성 GPC3 발현을 갖는 HepG2와 SK-Hep-1 GPC3를 선택하여 타겟 세포로 하고, Y035/CD3 BiTE의 체외에서의 세포 독성 작용을 연구하였으며, 그 결과, HepG2에 대한 0.1ng/ml의 용해도의 Y035/CD3 BiTE의 세포 살상 작용이 약 60 %이고, SK-Hep-1 GPC3에 대한 세포 작용은 약 40 %이다. CN103833852A에 기재된 GPC3/CD3 BiTE 대비, 세포 독성은 현저하게 증가한다.

[0444] 본 발명에서 언급되는 모든 문헌은, 각각의 참조 문헌이 개별적으로 참고 문헌으로 인용된 것처럼, 본원에 참고 문헌으로 인용된다. 이 외에, 상기 교시를 읽은 후에, 당업자는 본 발명에 대한 다양한 수정 및 변형을 진행할 수 있고, 이러한 등가의 형태는 또한 첨부된 청구 범위에서 정의된 범위 내에 속하는 것을 이해하여야 한다.

도면

도면1

과자 ELISA



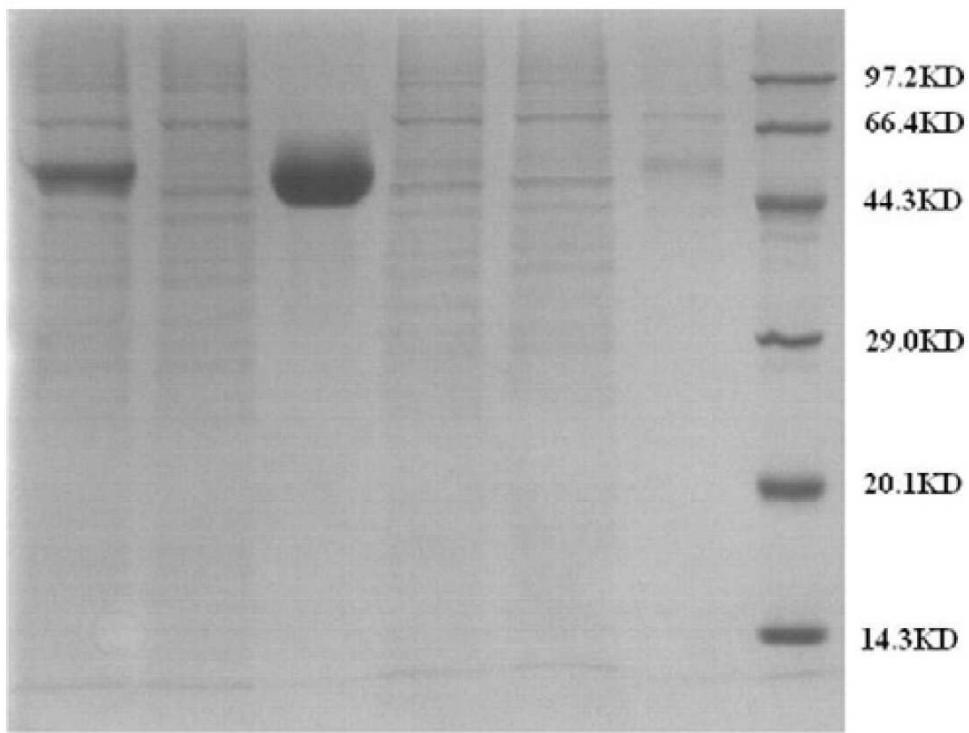
도면2

scFv-P7D4-Fc

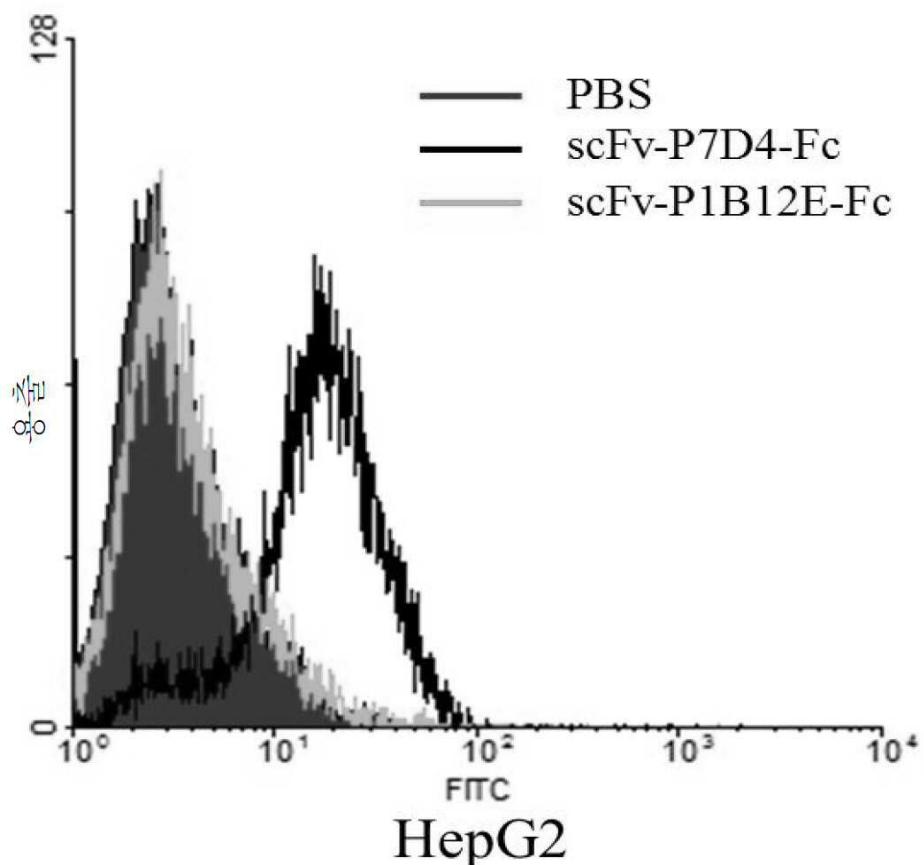
원래 모양유동-관통 용출

scFv-P1B12E-Fc

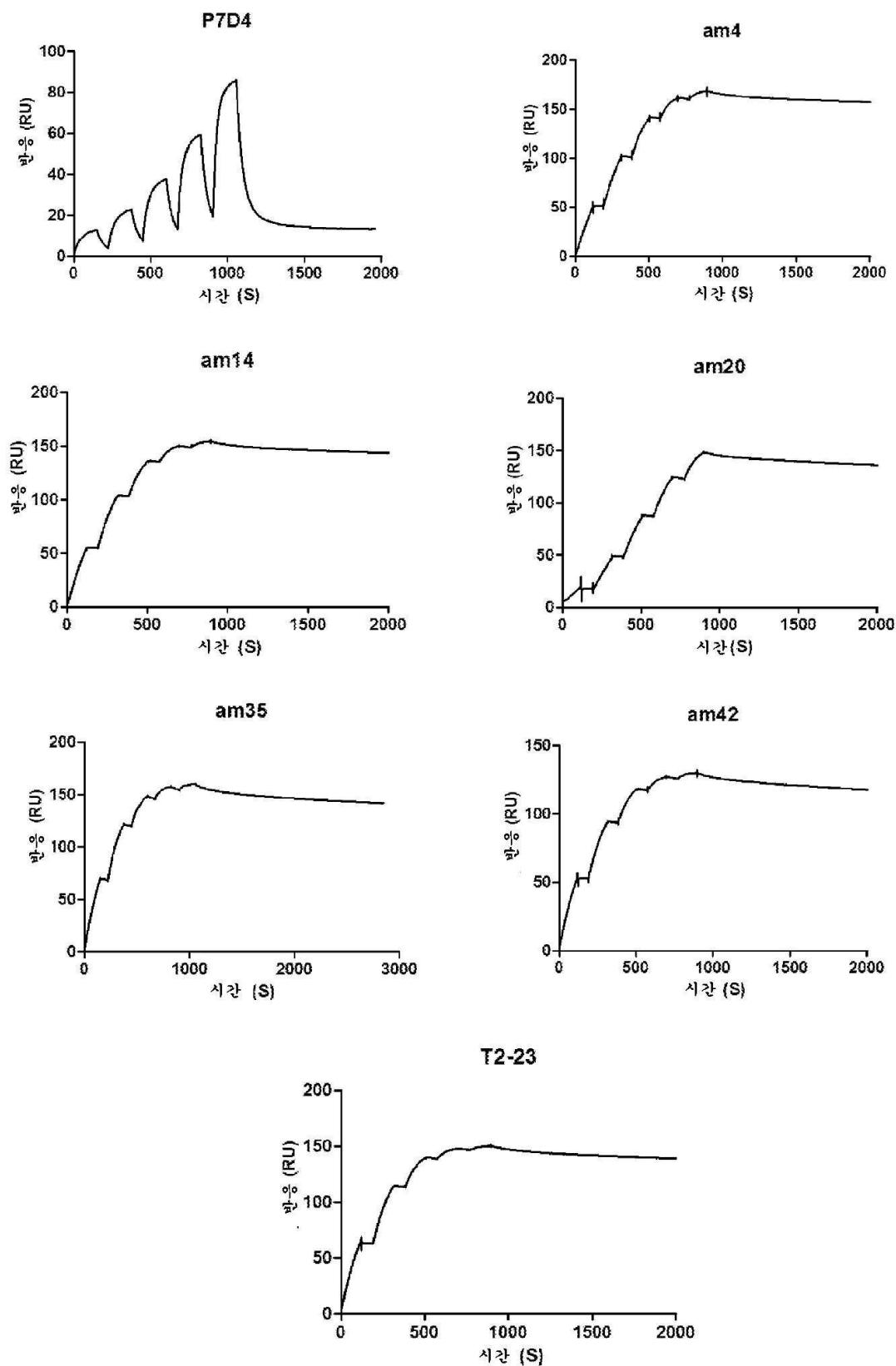
원래 모양유동-관통 용출



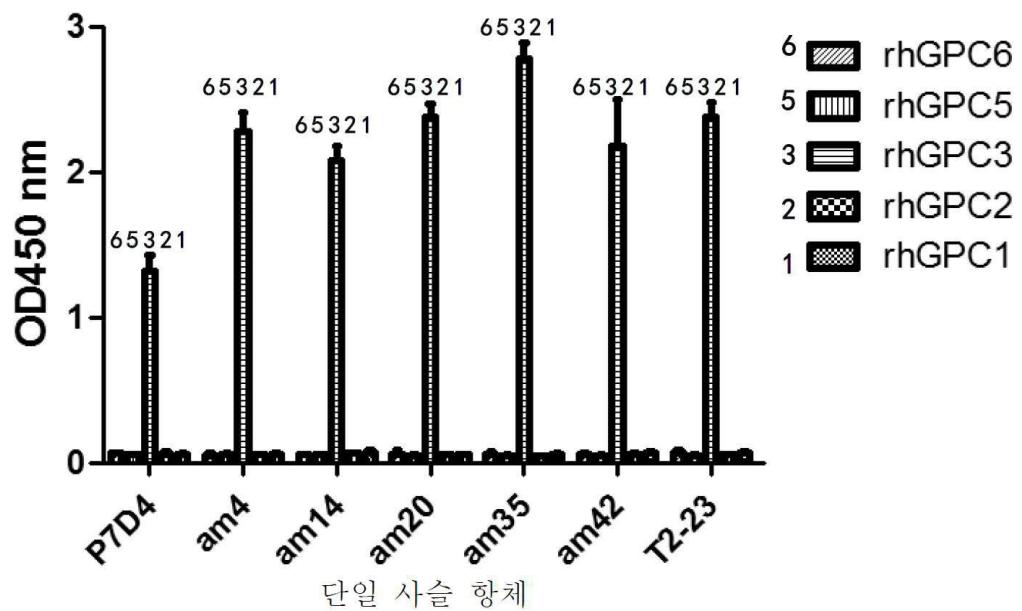
도면3



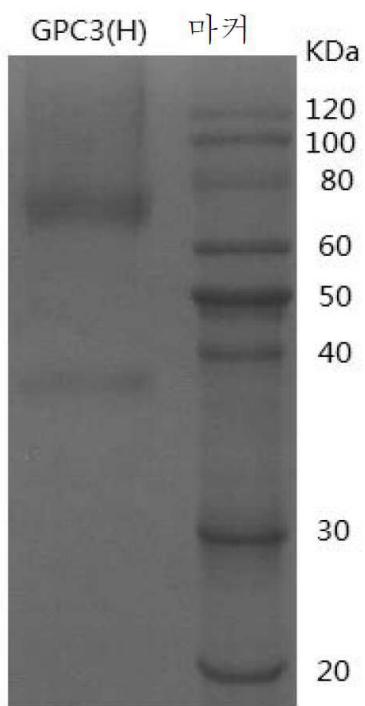
도면4



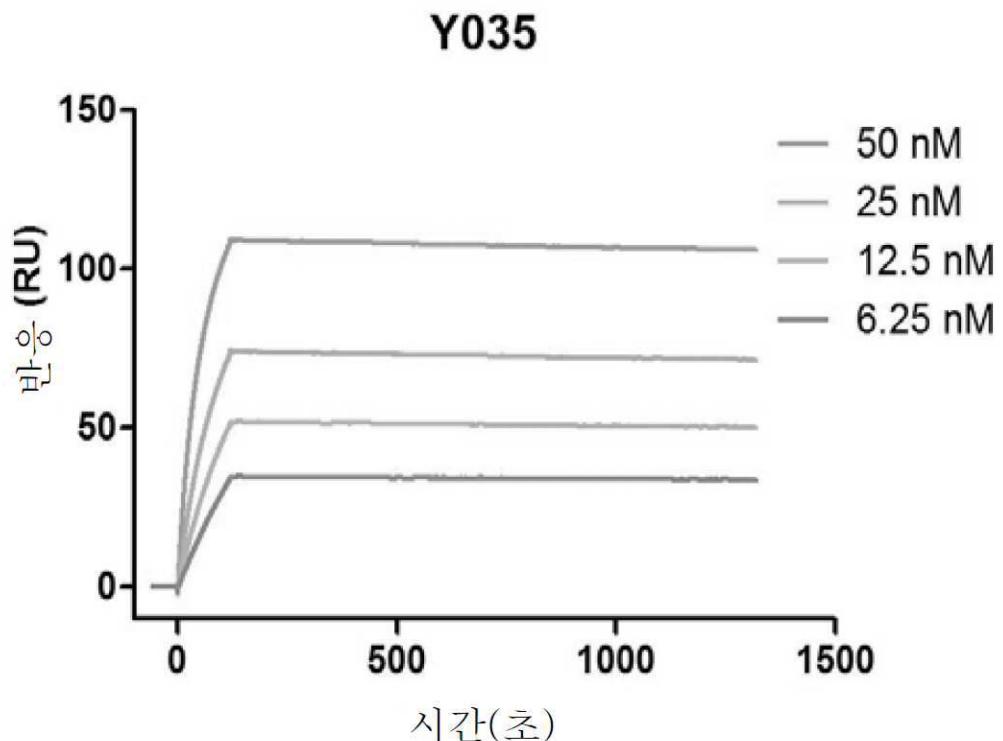
도면5



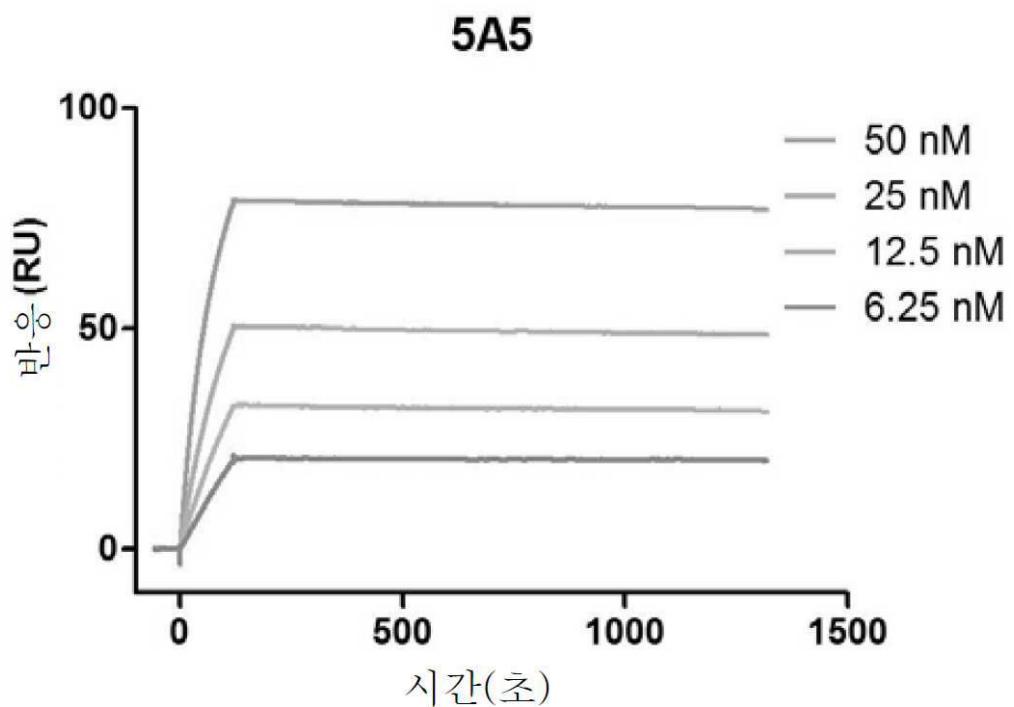
도면6



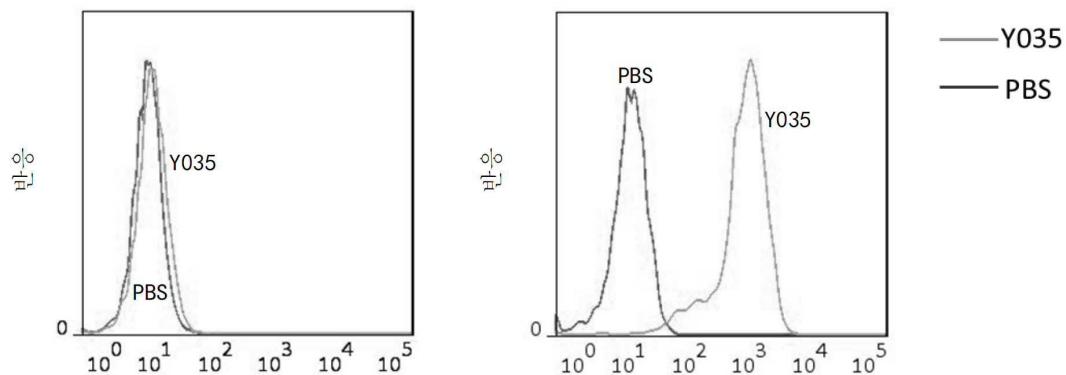
도면7



도면8



도면9



서 열 목 록

<110> Carsgen therapeutics ltd
 <120> ANTIBODY AGAINST GLYPLICAN-3 AND APPLICATION THEREOF
 <130> 165497 PCWO
 <150> 201510481235.1
 <151> 2015-08-03
 <160> 98
 <170> Patent In version 3.3
 <210> 1
 <211> 729
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(729)
 <223> Nucleotide sequence of single chain antibody P1B12E
 <400> 1

cagggtcagc tgggtggaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggc	60
tcctgcaagg ctctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggta agcaaactac	180
gcacagaagt tccaggcagc agtacgatt accgcggacg aatccacgag cacagctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaagtcccc	300
ttagtggga ccccccggga gtactgggc agaggaaccc tggtaaccgt ctcgagtgg	360
ggaggcgggtt caggcggagg tggttctggc ggtggcggat cggaaattgt gttgacacag	420
tctccaggca ccctgtctt atctccaggg gaaagagcca ccctctcctg caggccagt	480

cagagtgtta gcagcaacta cttagcctgg tatcagcaga aacctggcca ggctcccaga 540

ctcctcatct atgggcaccc cgcggggcc actggcatcc cagacaggtt cagttggcagt 600
 gggctggga cagacttcac tctcaccatc agcagatgg agcctgaaga ctttgactg 660
 tatcaactgtc agcagatgg tgcctcacct aagacttcg gccaaggac caagctggag 720
 atcaaacgt 729

<210> 2

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(243)

<223> amino acid sequence of single chain antibody P1B12E

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Ser Pro Phe Ser Gly Thr Pro Gly Glu Tyr Trp Gly Arg Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
 145 150 155 160
 Gln Ser Val Ser Ser Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 165 170 175
 Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Arg Arg Ala Thr Gly
 180 185 190
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 195 200 205
 Thr Ile Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr His Cys Gln
 210 215 220
 Gln Tyr Gly Ala Ser Pro Lys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
 225 230 235 240
 Ile Lys Arg

<210> 3
 <211> 741
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(741)
 <223> Nucleotide sequence of single chain antibody P7D4
 <400> 3
 caggtgcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggagggt cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgcta tgcactgggt ccgcaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggtt gtgggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcga 300
 cgagggagcc acgtgtatgc ttttgcgtc tggggccaag gaaccctggt caccgtctcg 360
 agtgggtggag gcggttcagg cggagggtgg tctggcggtg gcggtcgca gtctgccctg 420
 actcagcctc cctccgcgtc cgggtctctt ggacagttag tcaccatctc ctgcactgga 480
 accaggcagtg acgttgtgg ttataactat gtctcctggt accaacagta cccaggcaaa 540
 gcccccaaac tcctcatcta tggtaacagc aatcgccct caggggtccc tgaccgattc 600

tctggctcca	agtctggcac	ctcagccctcc	ctggccatca	ctgggctcca	ggctgaggat	660
ggggctgatt	attactgcca	gtcctatgac	agcagcctgc	gtgtggtatt	cggcggaggg	720
accaaggta	ccgtcctagg	t				741
<210>	4					
<211>	247					
<212>	PRT					
<213>	Artificial sequence					
<220><221>	MISC_FEATURE					
<222>	(1)..(247)					
<223>	amino acid sequence of single chain antibody P7D4					
<400>	4					

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly

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

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

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

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

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

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

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

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

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

210	215	220
Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val Val Phe Gly Gly Gly		
225	230	235
Thr Lys Val Thr Val Leu Gly		
245		

<210>	5	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<220><221>	misc_feature	
<222>	(1)..(28)	
<223>	Primer	
<400>	5	
acagtgttag cacaggtgca gctggtag		28
<210>	6	
<211>	27	
<212>	DNA	

<213>	Artificial sequence	
<220><221>	misc_feature	
<222>	(1)..(27)	
<223>	Primer	
<400>	6	
ttgtcggatc cacgttgat ctccagc		27
<210>	7	
<211>	1	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	

<220><221> misc_feature		
<222> (1)		
<223> Primer		
<400> 7		
n		1
<210> 8		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220><221> misc_feature		
<222> (1)..(27)		
<223> Primer		
<400> 8		
ttgtcggatc cacctaggac ggtgacc		27
<210> 9		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220><221> misc_feature		
<222> (1)..(30)		
<223> Nucleotide sequence of P7D4 VH CDR1		
<400> 9		
ggattcacct tcagtagcta tgctatgcac		30
<210> 10		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220><221> MISC_FEATURE		
<222> (1)..(10)		
<223> amino acid sequence of P7D4 VH CDR1		
<400> 10		
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His		
1	5	10

<210> 11
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(51)
 <223> Nucleotide sequence of P7D4 VH CDR2
 <400> 11
 gctattatgtg gtatgttgtgg tagcacatac tacgcagact ccgtgaaggg c 51
 <210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><221> MISC_FEATURE
 <
 222> (1)..(17)
 <223> amino acid sequence of P7D4 VH CDR2
 <400> 12
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

 <210> 13
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(36)
 <223> Nucleotide sequence of P7D4 VH CDR3
 <400> 13
 gatcgacgag ggagccacgc tgatgcttt gatgtc 36
 <210> 14
 <211> 12

 <212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(12)

<223> amino acid sequence of P7D4 VH CDR3

<400> 14

Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Phe Asp Val

1 5 10

<210> 15

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> Nucleotide sequence of P7D4 VL CDR1

<400> 15

actggaacca gcagtgacgt tggtggttat aactatgtct cc 42

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(14)

<223> amino acid sequence of P7D4 VL CDR1

<400> 16

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(21)

<223> Nucleotide sequence of P7D4 VL CDR2

<400> 17

ggtaacagca atcgccctc a

21

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> amino acid sequence of P7D4 VL CDR2
<400> 18

Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 19
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(30)
<223> Nucleotide sequence of P7D4 VL CDR3
<400> 19

cagtcctatg acagcagcct gcgtgtggta 30

<210> 20

<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(10)
<223> amino acid sequence of P7D4 VL CDR3
<400> 20

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val Val

1 5 10
<210> 21
<211> 24
<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(24)

<223> Primer

<400> 21

caacgtaaaa aaattattat tcgc

24

<210> 22

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(63)

<223> Primer

<220><221> misc_feature

<222> (33)..(34)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (45)..(46)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 22

ccagcccctt gcctggagcc tggcggaccc amnncatagc atamnnactg aaggtgaatc

60

cag

63

<210> 23

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(72)

<223> Primer

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(32)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (40)..(41)
<223> n is a, c, g, or t
<220><221> misc_feature
<222> (43)..(44)
<223> n is a, c, g, or t
<220><221> misc_feature
<222> (47)
<223> n is a, c, g, or t
<220><221> misc_feature
<222> (49)..(50)
<223> n is a, c, g, or t
<220><221> misc_feature
<222> (52)..(53)

<223> n is a, c, g, or t
<400> 23
gctccaggca aggggctgga gtgggtctca nnkattagtn nknnkgnnn knnkacatac 60
tacgcagact cc 72
<210> 24
<211> 741
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(741)
<223> Nucleotide sequence of am4
<400> 24
caggtgcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acgtatgcta tgacgtgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtctcatct attagtagta gtgggtgaaag tacatactac 180
gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcga 300
cgagggagcc acgctgatgc ttttgcgtc tggggccaag gaaccctggt caccgtctcg 360
agtgggtggag gcggttcagg cggaggtggt tctggcggtg gcgatcgca gtctgccctg 420
actcagectc cctccgcgtc cgggtctct ggacagttagt caccatctc ctgcactgga 480

accagcagtg acgttggtgg ttataactat gtctcctggt accaacagta cccaggcaaa 540

gcccccaaac tcctcatcta tggtaacagc aatcgccct cagggtccc tgaccgattc 600

tctggctcca agtctggcac ctcagcctcc ctggccatca ctggctcca ggctgaggat 660

ggggctgatt attactgcca gtcctatgac agcagcctgc gtgtggatt cggcggaggg 720

accaaggta ccgtcctagg t 741

<210> 25

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(247)

<223> amino acid sequence of am4

<400> 25

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

245

<210> 26

<211> 741

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(741)

<223> Nucleotide sequence of am14

<400> 26

caggtgcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtcagc cctctggatt caccttcagt acttatgcta tggcttgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtctcagaa attagtagtt ctggtagtag gacatactac 180

gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcga 300

cgagggagcc acgctgatgc ttttgcgtc tggggccaag gaaccctggt caccgtctcg 360

agtggtaggag gcggttcagg cggaggtgg tctggcggtg gcggatcgca gtctgccctg 420

actcagcctc cctccgcgtc cgggtctcct ggacagtcag tcaccatctc ctgcactgga 480

accagcagtg acgttggtgg ttataactat gtctcctggt accaacagta cccaggcaaa 540

gcccccaaac tcctcatcta tggtaacagc aatcgccct caggggtccc tgaccgattc 600
 tctggctcca agtctggcac cttagccctcc ctggccatca ctgggctcca ggctgaggat 660
 ggggctgatt attactgcca gtcctatgac agcagcctgc gtgtggtatt cggcggaggg 720
 accaaggtaa ccgtcctagg t 741

<210> 27

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(247)

<223> amino acid sequence of am14

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

245

<210> 28

<211> 741

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(741)

<223> Nucleotide sequence of am20

<400> 28

caggtgcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggaggc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acgtatgcta tgaattgggt ccgcaggct	120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtctcagcg attagtatgt ctggtaatc tacatactac	180
gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcga	300
cgagggagcc acgctgatgc tttgatgtc tggggccaag gaaccctggt caccgtctcg	360
agtggtgag gcggttcagg cggagggttgt tctggcggtg gcgatcgca gtctgccctg	420
actcagectc cctccgcgtc cgggtctcct ggacagttag tcaccatctc ctgcactgga	480
accaggcagtg acgttgtgg ttataactat gtctcctggt accaacagta cccaggcaaa	540

gcccccaaac tcctcatcta tggtaacagc aatcgccct cagggtccc tgaccgattc	600
tctggctcca agtctggcac ctcagcctcc ctggccatca ctgggctcca ggctgaggat	660
ggggctgatt attactgcca gtcctatgac agcagcctgc gtgtggatt cggcggagg	720

accaaggta ccgtcctagg t 741

<210> 29

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(247)

<223> amino acid sequence of am20

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg

180	185	190	
Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser			
195	200	205	
Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Gly Ala Asp Tyr			
210	215	220	
Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val Val Phe Gly Gly			
225	230	235	240
Thr Lys Val Thr Val Leu Gly			
245			
<210> 30			
<211> 741			
<212> DNA			
<213> Artificial sequence			
<220><221> misc_feature			
<222> (1)..(741)			
<223> Nucleotide sequence of am35			
<400> 30			
caggtgcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggaggtc cctgagactc 60			
tcctgtcagc cctctggatt caccttcagt agctatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120			
ccaggcaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtagta gtgggtggtag cacatactac 180			
gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240			
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcga 300			
cgagggagcc acgctgatgc tttgatgtc tggggccaag gaaccctggt caccgtctcg 360			
agtggtgag gcggttcagg cggaggtggt tctggcggtg gcgatcgca gtctgccctg 420			
actcagecctc cctccgcgtc cgggtctctt ggacagtcag tcaccatctc ctgcactgga 480			
accagcagtg acgttggtca taagttcct gtctcctggt accaacagta cccaggcaaa 540			
gcccccaaac tcctcatcta taagaatctt ttgcggccct caggggtccc tgaccgattc 600			
tctggctcca agtctggcac ctcagcctcc ctggccatca ctgggctcca ggctgaggat 660			
ggggctgatt attactgcca gtcctatgac agcagctgc gtgtggtatt cggcggaggg 720			
accaagggtca ccgtccttagg t 741			
<210> 31			
<211> 247			

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(247)

<223> amino acid sequence of am35

<400> 31

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Thr Ser Ser Asp Val Gly His Lys Phe Pro Val Ser Trp Tyr Gln Gln

165 170 175

Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Asn Leu Leu Arg

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

245

<210> 32

<211> 741

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(741)

<223> Nucleotide sequence of am42

<400> 32

cagggtgcagc tgcaggagtc cgggggagggc ttagttcagc ctggggaggc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgcta tgcactgggt ccggccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtagta gtgggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaaggcccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcga 300

cgaggggagcc acgctgatgc ttttgcgttc tgcccggcaag gaaccctgggt caccgtctcg 360

agtgggtggag gcggttcagg cggagggtgt tctggcggtg gcgatcgca gtctgccctg 420

actcagcctc ctcggcgctc cgggtctctt ggacagtcag tcaccatctc ctgcactgga 480

accagcagtg acgttgtct tatgcataat gtctcctgggt accaacagta cccaggcaaa 540

gcccccaaac tcctcatcta taagtcttcg tctcgccct caggggtccc tgaccgattc 600

tctggctcca agtctggcac ctcaaggctcc ctggccatca ctgggtccca ggctgaggat 660

ggggctgatt attactgcctt gtcctatgac agcagcctgc gtgtggattt cggcggaggg 720

accaagggtca ccgtcctagg t 741

<210> 33

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(247)

<223> amino acid sequence of am42

<400> 33

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

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

Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val Val Phe Gly Gly Gly
 225 230 235 240

Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

245

<210> 34

<211> 741

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(741)

<223> Nucleotide sequence of T2-23

<400> 34

caggtgcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtagta gtggtcgttag cacatactac 180

gcagactccg tggagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcga 300

cgagggagcc acgctgatgc ttaaatgtc tggggccaag gaaccctgggt caccgtctcg 360

agtggtgag gcggttcagg cggaggtgg tctggcggtg gcgatcgca gtctgccctg 420

actcagectc cctccgcgtc cgggtctctt ggacagtcag tcaccatctc ctgcactgga 480

accagcagtg acgttggtgg ttataactat gtctcctggt accaacagta cccaggcaaa 540

gcccccaaac tcctcatcta tggtaacagc aatcgccct caggggtccc tgaccgattc 600

tctggctcca agtctggcac ctcagcctcc ctggccatca ctgggctcca ggctgaggat 660

ggggctgatt attactgcca gtcctatgac agcagcctgc gtgtggatt cggcggaggg 720

accaaggta ccgtcctagg t 741

<210> 35

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(247)

<223> amino acid sequence of T2-23

<400> 35

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Glu 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

Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Leu Asn Val Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

245

<210> 36

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(36)

<223> Primer

<400> 36

ctccacgccc ccaggccca ggtgcagctg caggag 36

<210> 37

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> Primer

<400> 37

cggcgctggc gtcgtggtac ctaggacggt gaccttgg 38

<210> 38

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(22)

<223> Primer

<400> 38

gcaggggaaa gaatagtaga ca 22

<210> 39

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(18)

<223> Primer	
<400>	
> 39	
cggcctggcg gcgtggag	18
<210> 40	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(18)	
<223> Primer	
<400> 40	
accacgacgc cagcgccg	18
<210> 41	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(48)	
<223> Primer	
<400> 41	
gaggctcgacc tacgcgggg cgtctgcgct cctgctgaac ttcaactct	48
<210> 42	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(18)	
<223> Primer	
<400> 42	
accacgacgc cagcgccg	18
<210> 43	
<211> 44	
<212> DNA	

<213> Artificial sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(44)

<223> Primer

<400> 43

aatccagagg ttgattgtcg acctagcag gggcagggc ctgc 44

<210> 44

<211> 1442

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1442)

<223> Nucleotide sequence of P7D4 scFv-delta Z

<400> 44

gcaggggaaa gaatagtaga cataatagca acagacatac aaactaaaga attacaaaaa 60

caaattacaa aaattcaaaa ttttatcgat ggctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc 120

acatcgccca cagtccccga gaagttgggg ggaggggtcg gcaattgaac cggtgcctag 180

agaaggtggc gcggggtaaa ctggaaagt gatgtcggt actggctccg ccttttccc 240

gaggggtgggg gagaaccgta tataagtgca gtagtcgcg tgaacgttct tttcgcaac 300

gggtttgccg ccagaacaca ggtgtcgtga cgccgatcca ggcctaagct tacgcgtcct 360

agcgctaccg gtcgccacca tggccttacc agtgaccgccc ttgctcctgc cgctggcctt 420

gctgctccac gccgccaggc cgcagggtgca gctgcaggag tccggggag gcttagttca 480

gcctgggagg tccctgagac ttcctgtgc agcctctgga ttcaccttca gtagctatgc 540

tatgcactgg gtccgccagg ctccaggcaa gggctggag tgggtctcag ctattagttgg 600

tagtgttgtt agcacatact acgcagactc cgtgaaggc cggttccacca tctccagaga 660

caattccaag aacacgctgt atctgcaat gaacagectg agagccgagg acacggccgt 720

atattactgt gcgaaagatc gacgagggag ccacgctgtat gctttgtat tctggggcca 780

aggaaccctg gtacccgtct cgagtggtg aggccgttca ggcggaggtg gttctggcgg 840

tggccgatcg cagtctgccc tgactcagcc tccctccgct tccgggtctc ctggacagtc 900

agtaccatc tcctgcactg gaaccagcag tgacgttgtt ggttataact atgtctctg 960

gtaccaacag taccaggca aagccccaa actcctcatc tatggtaaca gcaatcgcc 1020

ctcaggggtc cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat 1080

cactgggctc caggctgagg atggggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct	1140
gcgtgtggta ttccggcggag ggaccaaggt caccgtccta ggtaccacga cgccagcgcc	1200
gcgaccacca acaccggcgc ccaccatcgc gtcgcagccc ctgtccctgc gcccagaggc	1260
gtgccggcca gcggcggggg ggcgcagtgcac cacgaggggg ctggacttcg cctgtgat	1320
ctacatctgg gccccttgg ccggacttg tgggtccctt ctctgtcac tggttatcac	1380
cagagtgaag ttccggcaggaa ggcgcagacgc ccccgcttag gtcgacaatc aacctctgga	1440
tt	1442
<210> 45	
<211> 1745	
<212> DNA	

<213> Artificial sequence	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(1745)	
<223> Nucleotide sequence of P7D4 scFv-Z	
<400> 45	
gcagggggaaa gaatagtaga cataatagca acagacatac aaactaaaga attacaaaaa	60
caaattacaa aaattcaaaa ttttatcgat ggctccggtg cccgtcagtgc ggcagagcgc	120
acatcgccca cagtccccga gaagttgggg ggaggggtcg gcaattgaac cggtgccat	180
agaagggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt gatgtcgtgt actggctccg ccttttccc	240
gagggtgggg gagaaccgta tataagtgcgtac gtatcgccg tgaacgttct ttttcgcaac	300

gggtttggccg ccagaacaca ggtgtcgtga cgccgatcca ggcctaagct tacgcgtcct	360
agcgctaccg gtcgccacca tggcattacc agtgaccgcc ttgtccctgc cgctggcctt	420
gctgtccac gccgcaggc cgcagggtca gctgcaggag tccggggag gcttagttca	480
gcctgggagg tccctgagac tctcgtgc agcctctgga ttcaccttca gtatgtatgc	540
tatgcactgg gtcggccagg ctccaggca ggggctggag tgggtctcag ctattagtgg	600
tagtgggtgtt agcacatact acgcagactc cgtgaaggc cggttccacca tctccagaga	660
caattccaag aacacgctgt atctgcaaat gaacagcctg agagccgagg acacggccgt	720

atattactgt gcgaaagatc gacgagggag ccacgctgtat gctttgtatg tctggggcca	780
aggaaccctg gtcaccgtct cgagtggatgg aggccgttca ggccggagggtg gttctggcgg	840
tggccgatcg cagtctgccc tgactcagcc tccctccgctc tccgggtctc ctggacagtc	900
agtaccatc tcctgcactg gaaccagcag tgacgttgtt gttataact atgtctcctg	960

gtaccaacag tacccaggca aagcccaa actcctcatc tatggtaaca gcaatcgcc	1020
ctcaggggtc cctgaccat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat	1080
cactgggctc caggctgagg atggggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct	1140
gcgtgtggta ttccggggag ggaccaaggt caccgtccta ggtaccacga cgccagcgcc	1200
gcgaccacca acacccggcgc ccacatcgc gtcgcagccc ctgtccctgc gcccagaggc	1260
gtgccggcca gggcggggg ggcgcagtgcac cacgaggggg ctggacttcg cctgtgatat	1320
ctacatctgg gccccttgg cgggacttg tgggtccctt ctccgtcac tggttatcac	1380
cagagtgaag ttacgcagga ggcgcagacgc ccccgctac cagcaggcc agaaccagct	1440
ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtagcat gtttgaca agagacgtgg	1500
ccgggaccct gagatggggg gaaagccgca gagaaggaag aaccctcagg aaggcctgt	1560
caatgaactg cagaaagata agatggcggaa ggcctacagt gagattggga tgaaaggcga	1620
gcgcggagg gcaaggggc acgatggcct ttaccaggt ctacgtacag ccaccaagga	1680
cacctacgac gcccttcaca tgcaggccct gccccctcgc tagtgcaca atcaacctct	1740
ggatt	1745
<210> 46	
<211> 1877	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(1877)	
<223> Nucleotide sequence of P7D4 scFv-BBZ	
<400> 46	
gcagggaaaa gaatagtaga cataatagca acagacatac aaactaaaga attacaaaa	60
caaattacaa aaattcaaaa ttttatcgat ggctccggtg cccgtcagt ggcagagcgc	120
acatcgccca cagtccccga gaagttgggg ggaggggtcg gcaattgaac cggtgcctag	180
agaagggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt gatgtcggt actggctccg ctttttccc	240
gagggtgggg gagaaccgta tataagtgcac gtatgcggc tgaacgttct ttttcgcaac	300
gggtttgcgc ccagaacaca ggtgtcgta cgccgatcca ggcctaagct tacgcgtcct	360
agcgctaccg gtgcacca tggcattacc agtgaccgc ttgctcctgc cgctggcctt	420
gctgctccac gccgccaggc cgcagggtgca gctgcaggag tccggggag gcttagttca	480
gcctgggagg tccctgagac tctcctgtgc agcctctgga ttcaccttca gtagctatgc	540

tatgcactgg gtccggcagg ctccaggcaa ggggctggag tgggtctcag ctattagtgg	600
tagtggttgt agcacatact acgcagactc cgtgaaggc cggttaccca tctccagaga	660
caattccaag aacacgctgt atctgcaa at gaacagcctg agagccgagg acacggccgt	720
atattactgt gcaaagatc gacgagggag ccacgcgtat gctttgtatg tctggggca	780
aggaaccctg gtaccgtct cgagtggatgg aggccgttca ggccggagggtg gttctggcgg	840
tggcggatcg cagtctgccc tgactcagcc tccctccgctc tccgggtctc ctggacagtc	900
agtaccatc tcctgcactg gaaccagcag tgacgttgtt ggttataact atgtctcctg	960
gtaccaacag tacccaggca aagccccaa actcctcatc tatggtaaca gcaatcgcc	1020
ctcagggtc ccgtaccat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat	1080
cactgggctc caggctgagg atggggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct	1140
gcgtgtggta ttccggggag ggaccaagggt caccgttca ggtaccacga cgccagcgcc	1200
gcgaccacca acaccggcgc ccaccatcgc gtcgcagccc ctgtccctgc gcccagaggc	1260
gtgcggcca gccgggggg ggcgactgca cacgaggggg ctggacttcg cctgtgat	1320
ctacatctgg gccccttgg cgggacttg tgggtcctt ctctgtcac tggttatcac	1380
ccttactgc aaacggggca gaaagaaaact cctgtatata ttcaaaacaac catttatgag	1440
accagtacaa actactcaag aggaagatgg ctgttagctgc cgatttccag aagaagaaga	1500
aggaggatgt gaactgagag tgaagttcag caggagcga gacgcccccg cgtacaagca	1560
ggcccaac cagctctata acgagctaa tctaggacga agagaggagt acgtatgttt	1620
ggacaagaga cgtggccggg accctgagat gggggaaag ccgagaagga agaaccctca	1680
gaaaggctg tacaatgaac tgcagaaaga taagatggcg gaggctaca gtgagattgg	1740
gatgaaaggc gagcgccgga ggggcaaggg gcacgatggc ctttaccagg gtctcgtac	1800
agccaccaag gacacctacg acgccttca catgcaggcc ctgccttc gctaggtcga	1860
caatcaacct ctgggt	1877
<210> 47	
<211> 1886	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(1886)	
<223> Nucleotide sequence of P7D4 scFv-28Z	
<400> 47	
gcagggaaaa gaatagtaga cataatagca acagacatac aaactaaaga attacaaaaa	60

caaattacaa aaattcaaaa ttttatcgat ggctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc	120
acatcgccca cagtccccga gaagttgggg ggaggggtcg gcaattgaac cggtgcctag	180
agaagggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt gatgtcgtgt actggctcg ccttttccc	240
gagggtgggg gagaaccgta tataagtgca gtagtcgccc tgaacgttct ttttcgcaac	300
gggtttgcgg ccagaacaca ggtgtcgtga cgccgtatcca ggcctaagct tacgcgtcct	360
agcgttaccg gtcgccacca tggccttacc agtgcaccgc ttgctcctgc cgctggcctt	420
gctgtccac gccgccaggc cgccagggtca gctgcaggag tccggggag gcttagttca	480
gcctgggagg tccctgagac tctcctgtgc agcctctgga ttcacccatca gtagctatgc	540
tatgcactgg gtccggcagg ctccaggcaa ggggctggag tgggtctcag ctattagtgg	600
tagtgggtgt agcacatact acgcagactc cgtgaaggc cggttaccca tctccagaga	660
caattccaag aacacgctgt atctgcaa at gaacagcctg agagccgagg acacggccgt	720
atattactgt gcgaaagatc gacgaggag ccacgctgtat gctttgtat tctggggcca	780
aggaaccctg gtaccgtct cgagtggtgg aggccgttca ggccggagggtg gttctggcgg	840
tggcggatcg cagtcgtccc tgactcagcc tccctccgcg tccgggtctc ctggacagtc	900
agtaccatc tcctgcactg gaaccagcag tgacgttggt ggttataact atgtctctg	960
gtaccaacag tacccaggca aagccccaa actcctcatc tatggtaaca gcaatcgcc	1020
ctcaggggtc cctgaccgtat tctctggctc caagtcggc acctcagcct ccctggccat	1080
cactgggctc caggctgagg atggggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagecct	1140
gcgtgtggta ttccggag ggaccaaggat caccgttca ggtaccacga cgccagcgc	1200
gcccaccatc accccggcgc ccaccatcgc gtcgcagccc ctgtccctgc gcccagggc	1260
gtgcggcgcg cggccgggg ggcggcgtca cacgaggggg ctggacttcg cctgtgattt	1320
ttgggtgctg gtgggttgtg gtggagtctt ggcttgctat agcttgctag taacagtggc	1380
ctttattatt ttctgggtga ggagtaagag gagcaggctc ctgcacagtg actacatgaa	1440
catgactccc cggccggccgg ggccaaacccg caagcattac cagccatcg ccccaaccacg	1500
cgacttcgca gcctatcgct ccagagtggaa gttcagcagg agcgcagacg ccccccgcgt	1560
ccagcaggcc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta ggacgaagag aggagtacga	1620
tgttttggac aagagacgtg gcccggaccc tgagatgggg gggaaagccgc agagaaggaa	1680
gaaccctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggctacag	1740
ttagatggg atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc tttaccaggg	1800

tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgcccttcac atgcaggccc tgccccctcg	1860
ctaggtcgac aatcaacctc tggatt	1886
<210> 48	
<211> 2012	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(2012)	
<223> Nucleotide sequence of P7D4 scFv-28BBZ	
<400> 48	
gcaggggaaa gaatagtaga cataatagca acagacatac aaactaaaga attacaaaaa	60
caaattacaa aaattcaaaa ttttatcgat ggctccggtg cccgtcagt ggcagagcgc	120
acatcgccca cagtccccga gaagttgggg ggaggggtcg gcaattgaac cggtgcctag	180
agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt gatgtcgtgt actggctccg ccttttccc	240
gagggtgggg gagaaccgta tataagtgca gtagtcgcg tgaacgttct ttttcgcaac	300
gggtttgcgc ccagaacaca ggtgtcgtga cgccgatcca ggcctaagct tacgcgtcct	360
agcgctaccg gtcgccacca tggccttacc agtgaccgccc ttgctcctgc cgctggcctt	420
gctgctccac gccgccaggc cgccagggtca gctgcaggag tccggggag gcttagttca	480
gcctgggagg tccctgagac ttcctgtgc agcctctgga ttcacattca gtatgtatgc	540
tatgcactgg gtccgccagg ctccaggca gggctggag tgggtctcag ctattagttgg	600
tagtggtggt agcacatact acgcagactc cgtgaaggc cggttaccca tctccagaga	660
caattccaag aacacgctgt atctgcaa at gaacagcctg agagccgagg acacggccgt	720
atattactgt gcaaagatc gacgagggag ccacgctgtat gctttgtatc tctggggcca	780
aggaaccctg gtaccgtct cgagtggggagg aggcggttca ggccggagggtg gttctggcgg	840
tggccgatcg cagtctgccc tgactcagcc tccctccgcg tccgggtctc ctggacagtc	900
agtaccatc tcctgcactg gaaccagcag tgacgttgggt ggttataact atgtctcctg	960
gtaccaacag taccaggca aagccccaa actcctcatc tatggtaaca gcaatcgccc	1020
ctcaggggtc cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat	1080
cactgggctc caggctgagg atggggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct	1140
gcgtgtggta ttccggggag ggaccaaggt caccgtccta ggtaccacga cgccagcgc	1200
gcccaccacca acaccggcgc ccaccatcgc gtcgcagccc ctgtccctgc gcccagggc	1260
gtgcccggcca gcccgggggg ggcgcagtgcg cacgaggggg ctggacttcg cctgtgattt	1320

ttgggtgctg gtggtggttg gtggagtcct ggcttgctat agcttgctag taacagtggc	1380
ctttattatt ttctgggtga ggagtaagag gagcaggctc ctgcacagtg actacatgaa	1440

catgactccc cggcccccgg gcccaacccg caagcattac cagccctatg cccaccacg	1500
cgacttcgca gcctatcgct ccaaacgggg cagaaagaaa ctctgtata tattcaaaca	1560
accatttatg agaccagtac aaactactca agaggaagat ggctgtagct gccgattcc	1620
agaagaagaa gaaggaggat gtgaactgag agtgaagttc agcaggagcg cagacgcccc	1680
cgcgtaccag cagggccaga accagctcta taacgagctc aatctaggac gaagagagga	1740
gtacgatgtt ttggacaaga gacgtggccg ggacctgag atgggggaa agccgcagag	1800
aaggaagaac cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc	1860

ctacagttagtggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggcctta	1920
ccagggtctc agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc aggcctgcc	1980
ccctcgctag gtcgacaatc aacctctgga tt	2012

<210> 49

<211> 346

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(346)

<223> amino acid sequence of P7D4-delta Z

<400> 49

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr

65 70 75 80

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

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

340	345		
<210> 50			
<211> 447			
<212> PRT			
<213> Artificial sequence			
<220><221> MISC_FEATURE			
<222> (1)..(447)			
<223> amino acid sequence of P7D4-Z			
<400			
> 50			
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu			
1	5	10	15
His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu			
20	25	30	
Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe			
35	40	45	
Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys			
50	55	60	
Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr			
65	70	75	80
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser			
85	90	95	
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr			
100	105	110	
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala			
115	120	125	
Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly			
130	135	140	
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala			
145	150	155	160
Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr			
165	170	175	
Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val			

180	185	190
Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr		
195	200	205
Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser		
210	215	220
Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu		
225	230	235
Asp Gly Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val		
245	250	255
Val Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Thr Thr Thr Pro		
260	265	270
Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu		
275	280	285
Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His		
290	295	300
Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu		
305	310	315
Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Arg Val		
325	330	335
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn		
340	345	350
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val		
355	360	365
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln		
370	375	380
Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp		
385	390	395
Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg		
405	410	415
Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr		
420	425	430

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

435 440 445

<210> 51

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(491)

<223> amino acid sequence of P7D4-BBZ

<400> 51

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala

115 120 125

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

130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala

145 150 155 160

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

165 170 175

Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val
 180 185 190
 Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 195 200 205
 Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 210 215 220
 Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu
 225 230 235 240
 Asp Gly Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val

 245 250 255
 Val Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Thr Thr Thr Pro
 260 265 270
 Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
 275 280 285
 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
 290 295 300
 Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
 305 310 315 320

 Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
 325 330 335
 Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 340 345 350
 Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
 355 360 365
 Phe Pro Glu Glu Glu Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
 370 375 380
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr

 385 390 395 400
 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 405 410 415
 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 420 425 430

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 435 440 445
 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 450 455 460

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 465 470 475 480
 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

485 490

<210> 52

<211> 494

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(494)

<223> amino acid sequence of P7D4-28Z

<400> 52

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Leu
 20 25 30

Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 35 40 45

Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala
 115 120 125

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

130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Ser Ala

145 150 155 160

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

165 170 175

Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val

180 185 190

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

195 200 205

Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His

290 295 300

Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val

305 310 315 320

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

325 330 335

Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr

340 345 350

Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln

355 360 365

Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys

370	375	380
Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln		
385	390	395
Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu		
405	410	415
Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg		
420	425	430
Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys		
435	440	445

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg		
450	455	460
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys		
465	470	475
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
485	490	
<210> 53		
<211> 536		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220><221> MISC_FEATURE		
<222> (1)..(536)		
<223> amino acid sequence of P7D4-28BBZ		

<400> 53		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
1	5	10
His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Leu		
20	25	30
Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe		
35	40	45
Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys		
50	55	60
Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr		

65	70	75	80
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser			
85	90	95	
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr			
100	105	110	
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala			
115	120	125	
Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly			
130	135	140	
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala			
145	150	155	160
Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr			
165	170	175	
Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val			
180	185	190	
Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr			
195	200	205	
Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser			
210	215	220	
Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu			
225	230	235	240
Asp Gly Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val			
245	250	255	
Val Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Thr Thr Thr Pro			
260	265	270	
Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu			
275	280	285	
Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His			
290	295	300	
Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val			
305	310	315	320
Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile			

325	330	335
Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr		
340	345	350
Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln		
355	360	365
Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Lys Arg Gly		
370	375	380
Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val		
385	390	395
Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu		
400	405	410
Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp		
415	420	425
Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn		
435	440	445
Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg		
450	455	460
Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu		
465	470	475
Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser		
480	485	490
Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly		
495	500	505
Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu		
510	515	520
His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
525	530	535
<210> 54		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220><221> misc_feature		

<222> (1)..(27)

<223> Primer

<400> 54

gatcgctagc acagcccccg ccggccgc 27

<210> 55

<211> 31

<212>

> DNA

<213> Artificial sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(31)

<223> Primer

<400> 55

gtacggatcc ttcagcgaaa aatgaacgtt c 31

<210> 56

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(345)

<223> Nucleotide sequence of 5A5 heavy chain

<400> 56

cagggtcaac tgcagcagtc tgggactgag ctgggtgagcc ctggggcttc agtgaagctg 60

tcctgcaagg ctggggctta cacatttact gactatgaaa tgcactgggt gaagcagaca 120

cctgtgcatg gcctggagtg gattggagct attcatccag gaagtggta tactgcctac 180

aatcagaggt tcaaggcaaa ggccacactg actgcagaca aatcttccag cacagcctac 240

atggagttaca gcagcctgac atctgaggac tctgctgtct attactgtac aagatttat 300

tcctatgctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345

<210> 57

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(339)

<223> Nucleotide sequence of 5A5 light chain

<400> 57

gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaaggctcc 60

atctttgca gatctagtca gagccttgcata cacagtaatg gaaacaccta tttacagtgg 120

tacatgcaga agccaggcca gtctccaaag ctccatgtct acaaaggtttcaatcgattt 180

tctgggtcc cagacaggtt cagtggcaga ggatcaggga cagattcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagttat atatgttccg 300

tacacgttcg gaggagggac caagctggaa ataaaacgg 339

<210> 58

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(115)

<223> Nucleotide sequence of humanized Y035 heavy chain

<400> 58

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Arg Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ala

115

<210> 59
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(113)
 <223> amino acid sequence of humanized Y035 light chain
 <400> 59

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Ile Tyr Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 60
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(10)
 <223> amino acid sequence of am4 heavy chain CDR1
 <400> 60

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Thr

1 5 10

<210> 61

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> amino acid sequence of am4 heavy chain CDR2

<400> 61

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

1 5 10 15

Gly

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(10)

<223> amino acid sequence of am14 heavy chain CDR1

<400> 62

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Ala

1 5 10

<210> 63

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> amino acid sequence of am14 heavy chain CDR2

<400> 63

Glu Ile Ser Ser Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 64
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(10)
 <223> amino acid sequence of am20 heavy chain CDR1
 <400> 64

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Ala

1 5 10

<210> 65
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(17)
 <223> amino acid sequence of am20 heavy chain CDR2

<400> 65

Ala Ile Ser Met Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 66
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(17)
 <223> amino acid sequence of am35 heavy chain CDR2
 <400> 66

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

1 5 10 15

Gly

<210> 67

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(14)

<223> amino acid sequence of am35 light chain CDR1

<400> 67

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

1 5 10

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> amino acid sequence of am35 light chain CDR2

<400> 68

Lys Asn Leu Leu Arg Pro Ser

1 5

<210> 69

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(14)

<223> amino acid sequence of am42 light chain CDR1

<400> 69

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Leu Met His Asn Val Ser

1 5 10

<210> 70
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(7)
 <223> amino acid sequence of am42 light chain CDR2
 <400> 70

Lys Ser Ser Ser Arg Pro Ser

1 5
 <210> 71
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(17)
 <223> amino acid sequence of T2-23 heavy chain CDR2
 <400> 71

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

1 5 10 15
 Gly

<210> 72
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(12)
 <223> amino acid sequence of T2-23 heavy chain CDR3

<400> 72
 Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Leu Asn Val

1 5 10
 <210> 73

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(5)
 <223> amino acid sequence of humanized Y035 heavy chain CDR1
 <400> 73

Asp Tyr Glu Met His

1 5

<210> 74
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(17)
 <223> amino acid sequence of humanized Y035 heavy chain CDR2

<400> 74

Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 75
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(6)
 <223> amino acid sequence of humanized Y035 heavy chain CDR3
 <400> 75

Phe Tyr Ser Tyr Ala Tyr

1 5

<210> 76
 <211> 16
 <212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222>

> (1)..(16)

<223> amino acid sequence of humanized Y035 light chain CDR1

<400> 76

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

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

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> amino acid sequence of humanized Y035 light chain CDR2

<400> 77

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1	5
---	---

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> amino acid sequence of humanized Y035 light chain CDR3

<400> 78

Ser Gln Ser Ile Tyr Val Pro Tyr Thr

1	5
---	---

<210> 79

<211> 429

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(429)

<223> Nucleotide sequence of humanized antibody Y035 light chain

<400> 79

ggatcgatat ccaccatgga catgatggtg ctggcccagt tcctggcctt cctgctgctg 60

tggttcccgag gcgcgttagatg cgacatcgatg atgaccaga ccccccgtg cctgcccgtg 120

accccccggcg agcccgcccg catcgatgc cggagcagcc agagccgtt gcacagcaac 180

ggcaacacct acctgcgtt gtacctgcag aagccggcc agagccccca gctgctgatc 240

tacaaggta gcaaccgggtt cagcggcgtt cccgaccgtt tcagcggcag cggcagcggc 300

accgacttca ccctgaagat cagccgggtt gaggccgagg acgtggcgt gtactactgc 360

agccagagca tctacgtgcc ctacacccatc ggccaggggca ccaagctgga gatcaaacgt 420

acggtggtt 429

<210> 80

<211> 441

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(441)

<223> Nucleotide sequence of humanized antibody Y035 heavy chain

<400> 80

ggatcgatat ctgcggccta tctagccacc atgcgggtgc tgatccgtt gtggctgttt 60

acccgccttcc cccgcgttccct gagcgagggtt cagctgggtgc agagcggcgc cgagggttgaag 120

aagcccgcccg ccagcgtgaa ggtgagctgc aaggccagcg gctacacccatc cagcactac 180

gagatgcact gggtgcggca ggcccccggc caggccctgg agtggatgg cgccatccac 240

ccggcagcg gcgcacccgc ctacaaccag cggtaaagg gccgggtgac catcaccgc 300

gacaagagca ccagcaccgc ctacatggag ctgagcagcc tgccggagcga ggacaccgc 360

gtgtactact gcccgggtt ctacagctac gcctactggg gccagggcac cctggtgacc 420

gtgagcgcgg cttagcacaa a 441

<210> 81

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(115)

<223> amino acid sequence of 5A5 heavy chain

<400> 81

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Arg Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ala

115

<210> 82

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(113)

<223> amino acid sequence of 5A5 light chain

<400> 82

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Arg

<210> 83

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(68)

<223> Primer

<220><221> misc_feature

<222> (42)..(43)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (46)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (48)..(49)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (52)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 83

gtttggggc ttgcctgg tactgttgtt accaggagac mnahnmnna hnaccaacgt 60

cactgctg 68

<210> 84

<211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(59)
 <223> Primer

<220><221> misc_feature

<222> (33)..(34)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220><221> misc_feature
 <222> (36)..(37)

<223> n is a, c, g, or t
 <220><221> misc_feature
 <222> (39)..(40)

<223> n is a, c, g, or t
 <220><221> misc_feature
 <222> (42)..(43)

<223> n is a, c, g, or t
 <400> 84

acccaggcaa agccccaaa ctcctcatct atnnknnknn knnkcgccc tcagggtc 59

<210> 85
 <211> 1398
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><221> misc_feature

<222> (1)..(1398)

<223> Nucleotide sequence of Y035-BBZ

<400> 85
 gaggtgcagc tgggtcagag cggcgccgag gtgaagaagc cggcgccag cgtgaagg 60
 agctgcaagg ccagcgcta caccttcagc gactacgaga tgcactgggt gcggcagg 120
 cccggccagg gcctggagtg gatggcgcc atccaccccg gcagcggcga caccgcctac 180
 aaccagcggt tcaaggccg ggtgaccatc accgcccaca agagcaccag caccgcctac 240
 atggagctga gcagcctgcg gagcgaggac accgcccgtgt actactgcgc ccggttctac 300

agctacgcct	actggggcca	gggcaccctg	gtgaccgtga	gcccgggtgg	aggcggttca	360
ggcgaggtg	gttctggcgg	tggcgatcg	gacatcgta	tgacccagac	ccccctgagc	420
ctgcccgtga	ccccggcga	gcccggcagc	atcagctgcc	ggagcagcca	gagcctggtg	480
cacagcaacg	gcaacaccta	cctgcagtgg	tacctgcaga	agcccgcca	gagccccag	540
ctgtgtatct	acaaggtgag	caaccggttc	agcggcgtgc	ccgaccggtt	cagcggcagc	600
ggcagcggca	ccgacttcac	cctgaagatc	agccgggtgg	aggccgagga	cgtggcgtg	660
tactactgca	gccagagcat	ctacgtgcc	tacacccctcg	gccagggcac	caagctggag	720
atcaaacgta	ccacgacgcc	agcgccgcga	ccaccaacac	cggcgcccac	catcgctcg	780
cagccccgt	ccctgcgccc	agaggcgtgc	cggccagcgg	cggggggcgc	agtgcacacg	840
agggggctgg	acttcgcctg	tgatatctac	atctggcgc	ccttggccgg	gacttgtgg	900
gtccttcctc	tgtcactggt	tatcaccctt	tactgcaaac	ggggcagaaa	gaaactcctg	960
tatataattca	aacaaccatt	tatgagatcca	gtacaaacta	ctcaagagga	agatggctgt	1020
agctgccat	ttccagaaga	agaagaagga	ggatgtgaac	tgagagtgaa	gttcagcagg	1080
agcgcagacg	cccccgctga	caagcaggc	cagaaccagc	tctataacga	gctcaatcta	1140
ggacgaagag	aggagtagcga	tgtttggac	aagagacgtg	gccgggaccc	tgagatgggg	1200
ggaaagccga	gaaggaagaa	ccctcaggaa	ggcctgtaca	atgaactgca	gaaagataag	1260
atggcggagg	cctacagtga	gattggatg	aaaggcgagc	gccggaggg	caagggcac	1320
gatggcctt	accagggtct	cagtacagcc	accaaggaca	cctacgacgc	cttcacatg	1380
cagggccctgc	ccccctgc					1398
<210>	86					
<211>	466					
<212>	PRT					
<213>	Artificial sequence					
<220><221>	MISC_FEATURE					
<222>	(1)..(466)					
<223>	amino acid sequence of Y035-BBZ					
<400>	86					

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

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

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

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

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

35 40 45

Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Arg Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser

210 215 220

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

225 230 235 240

Ile Lys Arg Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro

245 250 255

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

260 265 270

Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp

275 280 285

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu

290 295 300

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

305 310 315 320

Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu

325 330 335

Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys

340 345 350

Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys

355 360 365

Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu

370 375 380

Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly

385 390 395 400

Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu

405 410 415

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly

420 425 430

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser

435 440 445

Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro

450 455 460

Pro Arg

465

<210> 87

<211> 1407

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1407)

<223> Nucleotide sequence of Y035-28Z

<400> 87

gagggtgcagc tgggtcagag cggcgccgag gtgaagaagc cggcgccag cgtgaaggtg	60
agctgcaagg ccagcgcta caccttcagc gactacgaga tgcactgggt gggcaggcc	120
cccgccagg gcctggagtg gatggcgcc atccaccccg gcagcggcga caccgcctac	180
aaccagcggt tcaaggccg ggtgaccatc accgcccaca agagcaccag caccgcctac	240
atggagctga gcagcctgctg gagcgaggac accgcccgtt actactgcgc cgggttctac	300
agctacgcct actggggcca gggcacccctg gtgaccgtga ggcgggtgg aggccgttca	360
ggcggagggt gttctggcgg tggcggatcg gacatcgta tgacccagac cccctgagc	420
ctgcccgtga cccccggcga gcccgcagc atcagctgcc ggagcagcca gagcctggtg	480
cacagcaacg gcaacaccta cctgcagtgg tacctgcaga agcccgcca gagccccag	540
ctgctgatct acaagggtgag caaccggttc agcggcgtgc cggaccggtt cagcggcagc	600
ggcagcggca ccgacttcac cctgaagatc agccgggtgg aggccgagga cgtggcgtg	660
tactactgca gccagagcat ctacgtgcc tacacccctg gccagggcac caagctggag	720
atcaaacgta ccacgacgcc agcggccgca ccaccaacac cggcgcccac catcgctcg	780
cagccctgt ccctgcgcc agaggcgtgc cggccagcgg cggggggcgc agtgcacacg	840
agggggctgg acttcgcctg tgattttgg gtgctgggtt tggttgggtt agtcctggct	900
tgctatagct tgctagtaac agtggcctt attatttct gggtgaggag taagaggagc	960
aggctccitgc acagtgacta catgaacatg actccccccc gccccgggcc aaccgcag	1020
cattaccagc cctatgcccc accacgcgac ttgcagccct atcgctccag agtgaagttc	1080
agcaggagcg cagaccccc cgcgttaccag cagggccaga accagctta taacgagtc	1140
aatctaggac gaagagagga gtacgtt ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag	1200
atggggggaa agccgcagag aaggaagaac cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag	1260
aaagataaga tggcggaggc ctacagttagt attggatga aaggcgagcg cgggaggggc	1320
aaggggcacg atggccttta ccagggtctc agtacagccca ccaaggacac ctacgacgcc	1380
cttcacatgc aggcctgcc ccctcg	1407
<210> 88	
<211> 469	
<212> PRT	
<213> Artificial sequence	
<220><221> MISC_FEATURE	
<222> (1)..(469)	
<223> amino acid sequence of Y035-28Z	

<400> 88

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

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

100 105 110
 Val Ser Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr
 130 135 140
 Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val
 145 150 155 160
 His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
 165 170 175

Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly
 180 185 190
 Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 195 200 205
 Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser
 210 215 220
 Gln Ser Ile Tyr Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
 225 230 235 240

Ile Lys Arg Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro

245 250 255

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

260 265 270

Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp

275 280 285

Phe Trp Val Leu Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu

290 295 300

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser

305 310 315 320

Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly

325 330 335

Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala

340 345 350

Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala

355 360 365

Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg

370 375 380

Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu

385 390 395 400

Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr

405 410 415

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly

420 425 430

Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln

435 440 445

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln

450 455 460

Ala Leu Pro Pro Arg

465

<210> 89

<211> 1533

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1533)

<223> Nucleotide sequence of Y035-28BBZ

<400> 89

gaggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaagc cggcgccag cgtgaaggta	60
agctgcagg ccagcgctt cacccgtc gactacgaga tgcactgggt gcggcaggcc	120
cccgccagg gcctggagggt gatgggcgc atccaccccg gcagcggcga caccgcctac	180
aaccagcggt tcaaggccg ggtgaccatc accgcccaca agagcaccag caccgcctac	240

atggagctga gcagcctgctg gaggcgaggac accggcggtgt actactgcgc cgggttctac	300
agctacgcctt actggggcca gggcacccctg gtgaccgtga ggcgggtgg aggccgttca	360
ggcggagggtg gttctggcg tggcgatcg gacatgtga tgacccagac cccctgagc	420
ctgcccgtga ccccccggcga gcccggcgcg atcagctgcc ggagcagcca gagccgtgg	480
cacagcaacg gcaacaccta cctgcagtgg tacctgcaga agcccgccca gagccccag	540
ctgctgtatct acaagggtgag caaccgggtt acggcggtgc cggaccgggtt cagcgccagc	600
ggcagcggca ccgacttcac cctgaagatc agccgggtgg aggccgagga cgtggcggtg	660

tactactgca gccagagcat ctacgtgccc tacacccgtt ggcaggcac caagctggag	720
atcaaacgtt ccacgacgccc agcggccgca ccaccaacac cggcgcccac catcgctcg	780
cagccctgtt ccctgcgccc agaggcgtgc cggccagcgg cggggggcgc agtgcacacg	840
agggggctgg acttcgcctg tgattttgg gtgctgggtt tggttgggtt agtccctggct	900
tgctatagct tgcttagtaac agtggccctt attatttct gggtgaggag taagaggagc	960
aggctcctgc acagtgacta catgaacatg actccccggcc gccccggcc aacccgcaag	1020
cattaccagc cctatgcccc accacgac ttcgcagcct atcgctccaa acggggcaga	1080

aagaaaactcc tgtatataatt caaacaacca tttatgagac cagtacaac tactcaagag	1140
gaagatggctt gtagctgccc atttccagaa gaagaagaag gaggatgtga actgagatgt	1200
aagttcagca ggagcgcaga cggcccccgcg taccagcagg gccagaacca gctctataac	1260
gagctcaatc taggacgaag agaggagttac gatgtttgg acaagagacg tggccggac	1320
cctgagatgg gggaaagcc gcagagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa	1380
ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac agttagatgtt ggtgaaagg cgagcggcgg	1440

aggggcaagg ggcacgatgg ccttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac 1500

gacgcccttc acatgcaggc cctgccccct cg 1533

<210> 90

<211> 511

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<400> 90

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Arg Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 195 200 205
 Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser
 210 215 220
 Gln Ser Ile Tyr Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
 225 230 235 240
 Ile Lys Arg Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro
 245 250 255
 Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro
 260 265 270
 Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
 275 280 285
 Phe Trp Val Leu Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
 290 295 300
 Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
 305 310 315 320
 Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
 325 330 335
 Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
 340 345 350
 Ala Tyr Arg Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys
 355 360 365
 Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
 370 375 380
 Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Cys Glu Leu Arg Val
 385 390 395 400
 Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gln Asn
 405 410 415
 Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
 420 425 430
 Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln
 435 440 445

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
 450 455 460
 Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
 465 470 475 480

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
 485 490 495
 Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 500 505 510

<210> 91
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(45)
 <223> Primer
 <400> 91

tgctttggtt tccaggtgca agatgtgagg tgcagctggc gcaga 45

<210> 92
 <211> 41
 <212>

> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(41)
 <223> Primer
 <400> 92

tatcgatcc accacccca cggttgcgtt ccagcttggc 41

<210> 93
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(22)
 <223> Primer

<400> 93	
gatataaac tgccggcgtc ag	22
<210> 94	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<	
220><221> misc_feature	
<222> (1)..(22)	
<223> Primer	
<400> 94	
gagaggaggt actcacccca ac	22
<210> 95	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
220><221> misc_feature	
<222> (1)..(22)	
<223> Primer	
<400> 95	
ggcttaactag agaaccact gc	22
<210> 96	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
220><221> misc_feature	
<222> (1)..(25)	
<223> Primer	
<400> 96	
acattttgcac cctggaaacc aaaggc	25
<210> 97	
<211> 1473	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1473)

<223> encoding sequence of Y035/CD3 bispecific antibody

<400> 97

gaggtgcagc tggcagag cggcccgag gtgaagaagc cggcccgag cgtgaaggtg	60
agctgcaagg ccagcgcta caccccgactacgaga tgcactgggt gggcaggcc	120
cccgccagg gcctggatgt gatggcgcc atccaccccg gcagcggcga caccgcctac	180
aaccagcggt tcaagggccg ggtgaccatc accgcccaca agagcaccag caccgcctac	240
atggagctga gcagcctgctg gaggcggacc accgcgtgt actactgcgc cgggttctac	300
agctacgcct actggggcca gggcaccctg gtgaccgtga ggcgcgtgg aggccgttca	360
ggcggagggt gttctggcg tggcgatcg gacatgtga tgacccagac cccctgagc	420
ctgcccgtga ccccccggcga gcccgcgc accagctgcc ggagcagccca gagcctggtg	480
cacagcaacg gcaacaccta cctgcgtgg tacctgcaga agcccgccca gagccccag	540
ctgctgtatct acaaggtagt gacccgggtt acccggttc agcggcgtgc ccgaccgggtt cagcggcagc	600
ggcagcggca ccgacttcac cctgaagatc agccgggtgg aggcggagga cgtggcgtg	660
tactactgca gcacggatcat ctacgtgccc tacacccctcg gccaggccac caagctggag	720
atcaaacgtg gaggtgggtgg atccgatatac aaactgcagc agtcaggggc tgaactggca	780
agacactgggg ctcagtgaa gatgtcctgc aagacttctg gctacacccct tactaggtac	840
acgatgcact gggtaaaaca gaggcctgaa cagggtctgg aatggattgg atacattaa	900
cctagccgtg gttataactaa ttacaatcg aagtcaagg acaaggccac attgactaca	960
gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcaa ctgagcagcc tgacatctga ggactctgca	1020
gtctattact gtgcaagata ttatgtatgtat cattactgcc ttgactactg gggccaaggc	1080
accactctca cagtctccctc agtcgaagggt ggaagtggag gttctgggtgg aagtggaggt	1140
tcaggtggag tcgacgacat tcagctgacc cagtcctccag caatcatgtc tgcatctcca	1200
ggggagaagg tcaccatgac ctgcagagcc agttcaagtg taagttacat gaactggtagc	1260
cagcagaagt caggcaccccccacaaaga tggattatg acacatccaa agtggcttct	1320
ggagtcctt atcgcttcag tggcagtggg tctgggacactatactctc cacaatcagc	1380
agcatggagg ctgaagatgc tgccacttat tactgccaac agtggagtag taacccgctc	1440
acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa	1473
<210> 98	
<211> 491	

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(491)

<223> amino acid sequence of Y035/CD3 bispecific antibody

<400> 98

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Arg Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser
 210 215 220
 Gln Ser Ile Tyr Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
 225 230 235 240
 Ile Lys Arg Gly Gly Ser Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly
 245 250 255
 Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr
 260 265 270
 Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg
 275 280 285
 Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly
 290 295 300
 Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr
 305 310 315 320
 Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser
 325 330 335
 Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr
 340 345 350
 Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Val
 355 360 365
 Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val
 370 375 380
 Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro
 385 390 395 400
 Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr
 405 410 415
 Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile
 420 425 430
 Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly
 435 440 445
 Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala

450

455

460

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

465

470

475

480

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

485

490