

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷

C12N 15/13
C12N 5/10
A61K 39/395
C12P 21/08

(11) 공개번호 10-2005-0107399
(43) 공개일자 2005년11월11일

(21) 출원번호 10-2005-7013393

(22) 출원일자 2005년07월20일

번역문 제출일자 2005년07월20일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2004/000549

(87) 국제공개번호 WO 2004/072286

국제출원일자 2004년01월22일

국제공개일자 2004년08월26일

(30) 우선권주장 JP-P-2003-00014793 2003년01월23일 일본(JP)

(71) 출원인 오노 야쿠히 고토 가부시키키가이샤
일본국오사카후오사카시츄오쿠도쇼마치2 쯔메1반5고
혼조 다스쿠
일본 교토후 교토시 사쿄쿠 아와쿠라 오사기쵸 19-4

(72) 발명자 혼조 다스쿠
일본 교토후 교토시 사쿄쿠 아와쿠라 오사기쵸 19-4
시바야마 시로
일본 오사카후 미시마군 시마모토쵸 사쿠라이 3-1-1 오노 야쿠히고교
가부시키키가이샤 미나세 소고 겐큐쇼 나이
다케다 가즈히코
일본 오사카후 미시마군 시마모토쵸 사쿠라이 3-1-1 오노 야쿠히고교
가부시키키가이샤 미나세 소고 겐큐쇼 나이
마츠오 마사요시
일본 오사카후 미시마군 시마모토쵸 사쿠라이 3-1-1 오노 야쿠히고교
가부시키키가이샤 미나세 소고 겐큐쇼 나이
요시다 다카오
일본 오사카후 미시마군 시마모토쵸 사쿠라이 3-1-1 오노 야쿠히고교
가부시키키가이샤 미나세 소고 겐큐쇼 나이
미야모토 마사카즈
일본 오사카후 미시마군 시마모토쵸 사쿠라이 3-1-1 오노 야쿠히고교
가부시키키가이샤 미나세 소고 겐큐쇼 나이

(74) 대리인 김진희
강승욱

심사청구 : 없음

(54) 인간 P D-1에 대하여 특이성을 갖는 물질

요약

본 발명은 인간 PD-1을 인식하는 부분, 인간 PD-1이 발현하고 있는 세포막에 존재하는 막단백질을 인식하는 부분 및 링커로 이루어지는 인간 PD-1에 대하여 특이성을 갖는 물질에 관한 것이다. 본 발명의 인간 PD-1에 대한 특이성을 갖는 물질은 인간 PD-1 및 인간 PD-1이 발현하고 있는 세포의 막에 존재하는 막단백을 선택적으로 인식하여, 인간 PD-1의 억제 시그널을 전달할 수 있어, 면역 이상에 의한 질환의 치료 및/또는 예방에 유용하다.

명세서

기술분야

본 발명은 인간 PD-1에 대하여 특이성을 갖는 항체, 인간 T 세포 수용체 복합체 혹은 인간 B 세포 수용체 복합체에 대한 항체로 이루어지는 이특이성(bispecific) 항체, 그것을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 그 이특이성 항체의 용도에 관한 것이다.

배경기술

면역 시스템은 다양한 외래 항원에 대하여 응답할 수 있는 기구를 획득하였다. 그 기구란 T 세포, B 세포에 있어서 V(D)J 단편의 재조합에 의하여 항원 수용체의 다양성을 가져오는 것이다. 이 기구는 동시에 자가 반응성 림프구를 산출하는 결과로 되었지만, 이들 자가 반응성 림프구는 흉선이나 골수에 있어서의 마이너스의 선택에 의해서 제외되며, 또한 말초에 있어서도 클론 제거나 아네르기라는 자가 면역 관용 기구에 의해 제어되고 있다.

자가 면역 질환은 자가 면역 관용의 혼란에 의해 발증한다고 생각되는데, 그 발증 기서의 해명에 여러 가지 질환 모델 마우스를 이용한 연구가 이루어져 왔다. 그러나, 자가 면역 질환의 병인학적 해명이나 자가 면역 관용의 분자 기구에 관해서는 여전히 불분명한 점이 많다. 이러한 상황에 있어서, 단일 유전자 결손으로 자가 면역 질환을 발증하는 마우스의 존재는 분자생물학적인 관점에서 병인학적 고찰을 도모하는 데에 있어서 매우 중요하다. 치사성 전신성 림프구 침윤을 일으키는 CTLA4^{-/-}마우스(사이언스(Science), 1995년, 제270권, 제5238호, p.985~988, 이뮤니티(Immunity), 1995년, 제3권, 제5호, p.541~547 참조), SHP-1 결손 mothaten mice(셀(Cell), 1993년, 제73권, 제7호, p.1445~1454, 네이처(Nature), 1992년, 제359권, 제6397호, p.693~699 참조)나, 사구체신염을 발증하는 lyn^{-/-}마우스(셀(Cell), 1995년, 제83권, 제2호, p.301~311 참조) 및 FCRIIB^{-/-}마우스(이뮤니티(Immunity), 2000년, 제13권, 제2호, p.277~285 참조) 등은 그 대표이며, 이들 분자와 자가 면역 관용과의 관련이 연구되고 있다.

PD-1은 면역 글로불린 패밀리에 속하는 55kD의 I형 막단백이다. 인간 PD-1은 마우스 PD-1과 마찬가지로 288개의 아미노산으로 이루어지며, N 말단의 시그널 펩티드(20 아미노산)와 중간 부위에 세포막 관통 영역인 소수성 영역을 갖는다(더 엠보 저널(The EMBO Journal), 1992년, 제11권, 제11호, p.3887~3895, 일본 특허 공개 평5-336973호 공보, EMBO/GenBank/DDBJ Acc. No. NM_005018, 일본 특허 공개 평7-291996호 공보(미국 특허 제5629204호 명세서) 참조).

PD-1의 발현은 흉선 세포에 있어서는 CD4-CD8-로부터 CD4+ CD8+ 세포로 분화될 때에 인정된다(인터내셔널 이뮤놀로지(International Immunology), 1996년, 제8권, 제5호, p.773~780, 저널 오브 익스페리멘탈 메디슨(Journal of Experimental Medicine), 2000년, 제191권, 제5호, p.891~898 참조). 또한, 말초에 있어서 PD-1의 발현은 항원 수용체로부터의 자극에 의해 활성화한 T 세포, B 세포(인터내셔널 이뮤놀로지(International Immunology), 1996년, 제8권, 제5호, p.765~772 참조) 및 활성화 대식세포를 포함하는 골수 세포에 인정된다.

PD-1은 그 세포내 영역에 ITIM(Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif)을 지니고, 따라서 면역 반응에 있어서의 마이너스의 제어 인자라고 생각된다. PD-1 결손 마우스에 있어서 사구체신염, 관절염과 같은 루푸스양 자가면역 병(C57BL/6 유전자 배경)(인터내셔널 이뮤놀로지(International Immunology), 1998년, 제10권, 제10호, p.1563~1572, 이뮤니티(Immunity), 1999년, 제11권, 제2호, p.141~151 참조)이나, 확장성심근증양 질환(BALB/c 유전자 배경)(사이언스(Science), 2001년, 제291권, 제5502호, p.319~322 참조)을 발증하므로, PD-1이 자가 면역 질환 발증의, 특히 말초 자가 면역 관용의 제어 인자임이 분명하게 되었다. 또한, PD-1 시그널의 저해에 의해서 이식편 거부 반응이 억제되는 것도 보고되어 있다(저널 오브 이뮤놀로지(Journal of Immunology), 2000년, 제169권, 제11호, p.6543~6553 참조).

발명의 상세한 설명

PD-1은 여러 가지 자가 면역 질환의 제어 인자이며, 자가 면역 질환의 원인 유전자의 하나라고 생각된다. PD-1의 기능을 제어함으로써, 면역 기능의 저하 또는 항진, 감염증, 이식시의 거부 반응, 종양 등의 치료나 진단을 할 수 있다고 생각하여 예의 검토를 거듭한 결과, 본 발명자들은 PD-1의 기능을 제어하는 물질에 관한 본 발명에 도달하였다.

면역을 담당하는 림프구에의 자극은 주로 T 세포의 경우 T 세포 수용체(TCR)를, B 세포의 경우 B 세포 수용체(BCR)를 통하여 전해지며, 그 분자 기구에는 세포내 인산화 반응이 중요한 역할을 담당하고 있다.

PD-1이 면역계에 있어서 림프구나 골수계 세포 등 여러 가지 면역 담당 세포를 마이너스로 제어하고 있는 것이 분명하게 되고, 또한 PD-1의 세포내 영역에 ITIM(Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif)을 지니므로, 본 발명자들은 PD-1의 억제성 시그널 전달에 있어서의 분자 기구는 탈인산화 효소의 리쿠르트라고 생각했다. 따라서, TCR이나 BCR의 근방에 PD-1을 위치시킴으로써, PD-1의 기능을 발현시킬 수 있다고 생각하기에 이르렀다.

본 발명자들은 PD-1과 TCR 혹은 BCR을 물리적으로 접근시키는 물질에 의해서 PD-1의 억제성 시그널이 전해지는 것을 확인하였다. 본 발명자들은 우선 항 PD-1 항체와 항 인간 CD3 항체를 이용하여 상기한 생각이 옳다는 것을 확인하였다. CD3이란 T 세포에 발현하는 막단백으로, TCR을 구성하는 복합체의 하나이다. 그리고, 항 인간 PD-1 항체를 코딩하는 cDNA 및 항 인간 TCR 항체를 코딩하는 cDNA를 각각 단리하여, 양 항체의 항원 인식 부위로 이루어지는 융합 단백질을 발현하는 발현 벡터를 구축하여, 적당히 산생시킬 수 있는 이특이성 항체를 제작하여, 본 발명을 완성하였다.

본 발명은,

1. 인간 PD-1을 인식하는 부분, 인간 PD-1이 발현하고 있는 세포막에 존재하는 막단백질을 인식하는 부분 및 링커로 이루어지는 인간 PD-1에 대하여 특이성을 갖는 물질,
2. 인간 PD-1을 인식하는 부분이, 인간 PD-1에 대한 항체 혹은 그 부분 단편인 상기 1에 기재한 인간 PD-1에 대하여 특이성을 갖는 물질,
3. 인간 PD-1이 발현하고 있는 세포막에 존재하는 막단백질을 인식하는 부분이, 그 막단백질에 대한 항체 혹은 그 부분 단편인 상기 1에 기재한 인간 PD-1에 대하여 특이성을 갖는 물질,
4. 인간 PD-1에 대한 항체 혹은 그 부분 단편과, 인간 PD-1이 발현하고 있는 세포막에 존재하는 막단백질에 대한 항체 혹은 그 부분 단편 및 링커로 이루어지는 상기 1에 기재한 인간 PD-1에 대하여 특이성을 갖는 물질,
5. 막단백질이, T 세포 수용체 복합체 또는 B 세포 수용체 복합체인 상기 1, 3 또는 4에 기재한 인간 PD-1에 대하여 특이성을 갖는 물질,
6. 링커가 펩티드인 상기 1 또는 4에 기재한 인간 PD-1에 대하여 특이성을 갖는 물질,
7. 인간 PD-1에 대한 항체 혹은 그 부분 단편과, T 세포 수용체 복합체에 대한 항체 혹은 그 부분 단편 및 링커로 이루어지는 이특이성 항체,
8. 인간 PD-1에 대한 항체 혹은 그 부분 단편과, B 세포 수용체 복합체에 대한 항체 혹은 그 부분 단편 및 링커로 이루어지는 이특이성 항체,
9. 링커가 펩티드인 상기 7 또는 8에 기재한 이특이성 항체,
10. 인간 PD-1에 대한 항체를 구성하는 폴리펩티드로서, 실질적으로 순수한 형태인 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드 또는 그 상동체(homolog), 그 단편 또는 그 단편의 상동체, 또는 그 폴리펩티드의 1~10개의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드,
11. 인간 PD-1에 대한 항체를 구성하는 폴리펩티드로서, 실질적으로 순수한 형태인 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드 또는 그 상동체, 그 단편 또는 그 단편의 상동체, 또는 그 폴리펩티드의 1~10개의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드,

12. 상기 10 및 11에 기재한 폴리펩티드로 이루어지는 폴리펩티드 복합체,
13. 실질적으로 순수한 형태인 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드 또는 그 상동체, 그 단편 또는 그 단편의 상동체, 또는 그 폴리펩티드의 1~10개의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드,
14. 상기 7 내지 9 중 어느 것에 기재한 이특이성 항체로서, 실질적으로 순수한 형태인 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드 또는 그 상동체, 그 단편 또는 그 단편의 상동체, 또는 그 폴리펩티드의 1~10개의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드,
15. 상기 10, 11, 13 또는 14에 기재한 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 그 상동체 또는 그 상보쇄 폴리뉴클레오티드, 그 단편 또는 그 단편의 상동체,
16. 서열번호 1, 서열번호 3 또는 서열번호 9에 제시된 염기 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드, 그 상동체 또는 그 상보쇄 폴리뉴클레오티드, 그 단편 또는 그 단편의 상동체,
17. 상기 15 또는 16에 기재한 폴리뉴클레오티드로 이루어지는 복제 또는 발현 벡터,
18. 상기 17에 기재한 복제 또는 발현 벡터에 의해서 형질 전환된 숙주 세포,
19. 상기 1 내지 6 중 어느 것에 기재한 물질을 발현시키기 위한 조건 하에서 상기 18에 기재한 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는 물질의 제조 방법,
20. 상기 7 내지 9 중 어느 것에 기재한 이특이성 항체를 발현시키기 위한 조건 하에서 상기 18에 기재한 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는 이특이성 항체의 제조 방법,
21. 상기 10 내지 14 중 어느 것에 기재한 폴리펩티드를 발현시키기 위한 조건 하에서 상기 18에 기재한 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법,
22. 상기 1 내지 6 중 어느 것에 기재한 물질, 상기 7 내지 9 중 어느 것에 기재한 이특이성 항체, 상기 12에 기재한 폴리펩티드 복합체, 또는 상기 13 또는 14에 기재한 폴리펩티드를, 인간 PD-1이 관여하는 질환의 치료 및/또는 예방에 유효한 양으로 함유하는 약학적 조성물,
23. 인간 PD-1이 관여하는 질환이, 신경 변성 질환, 자가 면역 질환, 교원병, 장기 이식편 거부 반응, 종양 및 감염증으로 이루어지는 군에서 선택되는 질환인 상기 22에 기재한 약학적 조성물,
24. 신경 변성 질환이, 노년기 치매, 알츠하이머병, 다운증, 파킨슨병, 크로이츠펠트-야콥병, 근위축성척수측색경화증, 당뇨병성 신경장해, 파킨슨증후군, 헌팅턴병, 마샤도조세프(Machado-Joseph)병, 근위축성측색경화증 및 크로이츠펠트-야콥병으로 이루어지는 군에서 선택되는 질환인 상기 22에 기재한 약학적 조성물, 및
25. 자가 면역 질환이, 사구체신염, 관절염, 확장성심근증양 질환, 궤양성대장염, 췌그렌증후군, 크론병, 전신성예리테마토데스, 만성관절류마티스, 다발성경화증, 건선, 알레르기성접촉성피부염, 다발성근염, 강피증, 결절성동맥주위염, 류마티스열, 심상성백반, 인슐린의존성당뇨병, 베타병, 교본병, 에디슨병, 피부근염, 중증근무력증, 라이터증후군, 그레브스병, 악성빈혈, 구드패스츄어(Goodpasture)증후군, 불임증, 만성활동성간염, 천포창, 자가면역성혈소판감소성자반병, 자가면역성용혈성빈혈 및 혈관염으로 이루어지는 군에서 선택되는 질환인 상기 22에 기재한 약학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명에서의 인간 PD-1을 인식하는 부분이란, 인간 PD-1을 인식하는 물질이면 되며, 예컨대, 항 인간 PD-1 항체, 항 인간 PD-1 항체의 단편, 인간 PD-1 자체, 인간 PD-1의 단편, 인간 PD-1의 리간드(인간 PD-L1(Freeman, GJ. 외 18명, 저널 익스페리멘탈 메디슨(Journal Experimental Medicine), 2000년, 제19권, 제7호, p.1027~1034), 인간 PD-L2, 인간 PD-H3 등), 이들의 단편, 저분자 유기 화합물 등을 들 수 있다.

인간 PD-1에 대한 항체 혹은 그 부분 단편이란, 항 인간 PD-1 항체 혹은 항 인간 PD-1 항체의 단편을 포함하며, 완전형의 폴리클로날 또는 모노클로날 항체, 인간화 항체, 완전 인간 항체 또는 그 단축형(예컨대 F(ab')₂, Fab', Fab, Fv) 항체 등의 어느 쪽의 형태라도 좋다.

보다 구체적으로는, 2002년12월19일부로 일본국 이바라키현 쓰쿠바시 히가시 1초메 1반치 1중앙 제6, 독립행정법인산업기술종합연구소 특허생물기탁센터에 기탁되어(수탁 번호: FERM P-19162), 2003년6월5일부로 국제 기탁으로 이관되어 있는(국제 수탁 번호: FERM BP-8392) 「J110」 이라고 명명한 하이브리도마가 생성하는 모노클로날 항 인간 PD-1 항체이다. 보다 바람직하게는, 이 항체의 F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 항체 단편 등이지만, 이것에 한정되는 것은 아니다.

F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 항체 단편은 완전형 항체를 프로테아제 효소에 의해 처리하여, 경우에 따라 환원하여 얻을 수 있다. 또한, 항체를 생성하는 하이브리도마로부터, 그 cDNA를 단리하고, 유전자 개변에 의해서 제작된 발현 벡터를 이용하여, 항체 또는 그 항체의 단편 혹은 항체의 단편과 별도의 단백질과의 융합 단백질로서 생성할 수 있다.

인간 PD-1이 발현하고 있는 세포막에 존재하는 막단백질이란, 인간 PD-1이 발현하고 있는 세포와 동일한 세포의 세포막 상에 발현하고 있는 막단백질을 의미하며, 인간 PD-1을 발현하고 있는 인간 유래 초대 배양 세포 혹은 인간 세포주에 연유되는 세포막에 존재하는 막단백질의 어느 것이나 포함된다. 예컨대, T 세포 수용체 복합체 또는 B 세포 수용체 복합체가 바람직하다.

인간 PD-1이 발현하고 있는 세포막에 존재하는 막단백질을 인식하는 부분이란, 인간 PD-1이 발현하고 있는 세포와 동일한 세포의 세포막 상에 발현하고 있는 막단백질을 인식하는 물질이면 된다. 예컨대, 막단백질에 대한 항체, 그 항체의 단편, 막단백질 자체, 막단백질의 단편, 막단백질의 리간드, 그 리간드의 단편, 막단백질에 결합하는 저분자 유기 화합물 등을 들 수 있다.

인간 PD-1이 발현하고 있는 세포막에 존재하는 막단백질에 대한 항체 혹은 그 부분 단편이란, 인간 PD-1이 발현하고 있는 세포와 동일한 세포의 세포막 상에 발현하고 있는 막단백질에 대한 항체 혹은 그 항체의 부분 단편이며, 완전형의 폴리클로날 또는 모노클로날 항체, 인간화 항체, 완전 인간 항체 또는 이들의 단축형(예컨대, F(ab')₂, Fab', Fab, Fv) 항체 등의 어느 형태라도 좋다.

T 세포 수용체 복합체란, 적어도, α 서브유닛과 β 서브유닛으로 구성되는 T 세포 수용체와, γ 서브유닛, δ 서브유닛, ε 서브유닛 및 ζ 서브유닛으로 구성되는 CD3으로 구성되는 복합체이다.

B 세포 수용체 복합체란, 적어도, 막결합형 면역 글로불린과 CD79α 서브유닛 및 CD79β 서브유닛으로 구성되는 복합체이다.

T 세포 수용체 복합체에 대한 항체 혹은 그 부분 단편이란, T 세포 수용체 복합체를 인식하는 항체 혹은 그 항체의 부분 단편이라면 어느 것이라도 좋고, 또한 T 세포 수용체 복합체를 구성하는 T 세포 수용체와 CD3의 각각의 서브유닛에 대한 항체 혹은 그 항체의 부분 단편도 포함하며, 완전형의 폴리클로날 또는 모노클로날 항체, 인간화 항체, 완전 인간 항체 또는 이들의 단축형(예컨대, F(ab')₂, Fab', Fab, Fv) 항체 등의 어느 형태라도 좋다. 예컨대, CD3에 대한 모노클로날 항체는 이미 확립되어 있는 하이브리도마를 이용하여 생성하는 것도 가능하다. 또한, 시판되고 있는 항 CD3 항체(α-CD3εmAb, 파민젠(Pharmingen)사 제조)를 입수할 수 있다.

B 세포 수용체 복합체에 대한 항체 혹은 그 부분 단편이란, B 세포 수용체 복합체를 인식하는 항체 혹은 그 항체의 부분 단편이라면 어느 것이라도 좋으며, 또한 B 세포 수용체 복합체를 구성하는 막결합형 면역 글로불린과 CD79의 각각의 서브유닛에 대한 항체 혹은 그 항체의 부분 단편도 포함하고, 완전형의 폴리클로날 또는 모노클로날 항체, 인간화 항체, 완전 인간 항체 또는 이들의 단축형(예컨대, F(ab')₂, Fab', Fab, Fv) 항체 등의 어느 형태라도 좋다. 구체적으로는, 시판되고 있는 항 BCR 항체를 사용할 수 있고, 예컨대, 항 IgG(H+L) 폴리클로날 항체(젠메드(Zymed)사 제조)를 입수할 수 있다.

인간 PD-1을 인식하는 부분 및 인간 PD-1이 발현하고 있는 세포막에 존재하는 막단백질을 인식하는 부분으로 이루어지는 물질이란, 동일한 세포의 세포막 상에 발현하고 있는 인간 PD-1의 세포외 도메인과 막단백질의 세포외 도메인에 동

시에 결합할 수 있는 물질을 의미한다. 구체적으로는, 인간 PD-1에 특이적인 항체 혹은 항체의 부분 단편 및 인간 PD-1이 발현하고 있는 세포막에 존재하는 막단백질에 특이적인 항체 혹은 항체의 부분 단편으로 이루어지는 이특이성 항체를 들 수 있다.

이특이성 항체란, 2개의 다른 항원 특이성을 갖는 2개의 독립된 항원 인식 부위를 가지고 있었던 비대칭의 항체이다. 이 특이성 항체의 제조법은 이미 공지된 화학적 방법(Nisonoff, A. 외 1명, 아카이브스 오브 바이오키미스트리 앤드 바이오피직스(Archives of biochemistry and biophysics.), 1961년, 제90권, p.460~462, Brennan, M. 외 2명, 사이언스(Science), 1985년, 제299권, p.81~83)이 잘 알려져 있다. 이들 방법은 우선 2종류의 항체를 효소에 의해 각각 가수분해한 후, 항체의 H쇄의 디설피드 결합을 환원제로 절단하고, 이어서 이종의 항체를 혼합하고 재산화함으로써 2가 반응성 항체를 얻는 것이다. 최근에는, 글루탈알데히드나 카르보디이미드 등의 가교제를 이용한 조제 방법도 개시되어 있다(일본 특허 공개 평2-1556호 공보).

또한, 유전자 조직 전환 기술을 이용하여 직접 이특이성 항체를 제작하는 기술이 알려져 있다. 예컨대, Alt, 페브스 레터(FEBS Letter), 1999년, 제454권, 제90호에서는, 암 태아 항원 및 대장균 β -갈락토시다아제에 대한 이특이성 항체(싱글 체인다이아보디라고 불림)의 제작이 보고되어 있다. 그 단편은 동일쇄 상의 2개의 연속된 도메인 사이에서 대합(對合)하기 때문에, 링커에 의해서 한 쪽의 중쇄 가변 도메인(VH)과 다른 쪽의 경쇄 가변 도메인(VL)이 연결되어 있다. 그 때문에, 그 단편의 VH 및 VL 도메인은 다른 단편의 상보적 VL 및 VH 도메인과 대합하는 것이 부득이하게 되고, 이에 따라 2개의 항원 결합 부위를 형성한다. 펩티드 링커는 3-12 아미노산 잔기가 바람직하지만, 서열은 특별히 한정되지 않는다(Hudson, PJ. 외 1명, 저널 오브 이뮤놀로지 메디슨(Journal of Immunology Medicine), 1999년, 제231권, 제1-2호, p.177~189).

하이브리도마를 이용한 이특이성 항체의 제조에서는, 리딩(Reading) 등의 방법, 즉 모노클로날 항체를 산생하는 2종류의 하이브리도마를 더욱 융합하여 하이브리드 하이브리도마를 제작하여, 목적으로 하는 이특이성 항체를 산생하는 하이브리드 하이브리도마를 선택하는 방법이 있다(미국 특허 제4474893호 명세서).

인간 PD-1에 대한 항체 혹은 그 부분 단편 및 인간 PD-1이 발현하고 있는 세포막에 존재하는 막단백질에 대한 항체 혹은 그 부분 단편으로 이루어지는 이특이성 항체란, 동일한 세포의 세포막 상에 발현하고 있는 인간 PD-1의 세포외 도메인과 막단백질의 세포외 도메인에 동시에 결합할 수 있는 항체이다. 이특이성 항체는 이하의 제작법에 의해서 제작할 수 있다.

- (1) 인간 PD-1 혹은 인간 유래의 막단백질을 면역 항원으로 하여, 동물에게 감작하고,
 - (2) 감작 동물의 폐 세포와 감작 동물 유래의 골수종 세포를 세포 융합하고,
 - (3) 얻어진 하이브리도마로부터, 감작 항원(인간 PD-1 혹은 인간 유래의 막단백질)에 대한 모노클로날 항체를 산생하는 세포를 스크리닝하고,
 - (4) 목적으로 하는 항체 산생 하이브리도마를 클로닝하고,
 - (5) 클론화된 항체 산생 하이브리도마를 증식시키고,
 - (6) 산생된 항체를 분리 정제하고,
 - (7) 얻어진 항 인간 PD-1 항체와 항 인간 유래 막단백 항체를 링커로 가교하여 제작할 수 있다.
- 혹은,
- (8) $F(ab')_2$ 를 얻기 위해서, 또한 펩신 처리를 하여, 분리 정제하고,
 - (9) 조제한 각각의 $F(ab')_2$ 를 환원하여, 분리 정제하고,
 - (10) 조제한 각각의 Fab_{SH} 를 링커로 가교하여 제작할 수 있다.

링커는 상기한 인간 PD-1을 인식하는 부분 및 인간 PD-1이 발현하고 있는 세포막에 존재하는 막단백을 인식하는 부분을 적절한 거리를 유지하여 이을 수 있는 것이라면 특별히 한정되지 않는다. 보다 구체적으로는, 펩티드, 아미드 등을 들 수 있다.

링커는 시판되고 있는 것을 사용할 수 있으며, 예컨대, 페닐렌디말레이미드(Phenylenedimaleimide, Aldrich사 제조)를 입수할 수 있다.

인간 PD-1과 인간 PD-1이 발현하고 있는 세포막에 존재하는 막단백질을 각각 인식하는 물질로서, 양쪽 혹은 한쪽이 저분자 유기 화합물인 경우는,

(11) 상기한 수법으로 제작한 항체를 이용하여, 각각의 항원인 인간 PD-1 혹은 인간 유래의 막단백과의 결합을 적당한 검출 장치에 의해서 측정함으로써 그 결합을 저해하는 저분자를 알아내고,

(12) 그 저분자끼리 혹은 항체 또는 Fab를 링커에 의해서 가교하여 제작할 수 있다.

각 공정을 이하에 의해 구체적으로 설명한다.

(1) 감작의 공정에서는, 인간 PD-1 혹은 인간 유래의 막단백을 감작 동물에 복강내 투여 혹은 발(뿔파트)에 투여하는 것이 바람직하다. 또한 감작 동물은 마우스, 래트 등 일반적으로 모노클로날 항체를 얻을 수 있는 동물이라면 특별히 한정되지 않는다. 항원의 투여량은 예컨대 마우스의 경우, 1회에 10~200 μ g을 투여하면 충분하다.

(2)의 세포 융합은 (1)에서 면역 감작한 감작 동물 중, 항체가 충분히 상승해 온 감작 동물의 비장을 적출하여, 통상의 방법에 따라서, 폐 세포의 현탁액을 조제하고, 이어서 얻어진 폐 세포와 감작 동물 유래의 골수종 세포와의 혼합물에 37°C에서 폴리에틸렌글리콜(바람직하게는, PEG4000)을 가함으로써 이루어진다. 마우스 골수종 세포에는 P3 \times 63Ag8, P3/NS1/1-Ag4-1, SP-2/0-Ag-14 등 여러 종류가 알려져 있으며, 모두 용이하게 입수할 수 있다.

골수종 세포는 HAT 배지(하이포크산틴, 아미놉테린 및 티미딘을 포함하는 배지)에서는 생존할 수 없는 HGPRT(하이포크산틴·구아닌·포스포리보실·트랜스퍼라아제) 결손 세포주가 유용하며, 또한 골수종 세포 자신이 항체를 분비하지 않는 세포주인 것이 바람직하다. 적합하게는 SP-2/0-Ag-14가 이용된다.

이어서, 얻어진 세포 융합의 혼합물을, 낮은 세포 밀도로 96 마이크로 웰 플레이트에 분주하여, HAT 배지로 배양한다. 1~2주간의 배양으로 미융합의 골수종 세포, 골수종 세포끼리의 하이브리도마, 또한 미융합의 폐 세포, 폐 세포끼리의 하이브리도마는 생존 조건이 만족되지 않기 때문에 사멸되고, 폐 세포와 골수종 세포와의 하이브리도마만이 증식해 온다.

(3)의 스크리닝은 하이브리도마 배양 상청과 고상화된 항원을 반응시켜, 항원에 특이적으로 흡착한 상청 중의 항체를, 표지된 제2 항체를 이용하여 정량함으로써, 인간 PD-1 혹은 인간 유래의 막단백에 대한 항체를 산생하고 있는 하이브리도마인지의 여부를 판정한다.

(4)의 공정은 항체 산생 하이브리도마를 연한천배양법(모노클로날 안티보디(Monoclonal Antibodies), 1980년, 제372권)에 따라서 클로닝함으로써 이루어진다. 이 때, 한계희석법을 이용하는 것도 가능하다.

(5)의 공정은 클론화된 하이브리도마를 통상의 배지로 배양하여, 그 배양 상청으로부터 분리 정제함으로써 얻어지는데, 보다 대량의 항체를 효율적으로 얻기 위해서는 하이브리도마를 마우스 복강 내에 투여하여 증식시켜, 그 복수 중에서 분리 정제하는 방법이 이용된다.

(6)의 공정은 통상의 방법, 예컨대 염색, 이온 교환 크로마토그래피, 겔 여과, 소수성 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등에 의해 정제할 수 있는데, 보다 효과적으로는 단백질A-세파로스CL-4B(아마삼바이오사이언스사 제조)를 이용한 친화성 크로마토그래피가 이용된다.

본 발명의 특이성 항체는 인간 PD-1을 특이적으로 인식하기 때문에, 인간 PD-1의 정제 및 농축, 예컨대 친화성 크로마토그래피 등에 이용할 수 있다.

(7)의 공정은 가교제로서, 예컨대 설포-EMCS(N-(6-말레이미드카프록시)설포숙신이미드나트륨염)을 항체의 아미드기 또는 SH(메르캅토)기에 결합시킴으로써 가교할 수 있다. 어느 한 쪽의 항체를 우선 설포-EMCS와 아미드 커플링 결합시켜, 미반응의 설포-EMCS를 겔 여과로 분리하고, 2-메르캅토에틸아민 등으로 환원한 다른 쪽의 항체의 SH(메르캅토)기와 최초의 항체에 결합한 설포-EMCS의 말레이미드기를 반응시켜, 겔 여과로 2종의 항체끼리가 가교된 것을 분취한다.

(8)의 공정은 공정 (6)에서 얻어진 각각의 항체에 펩신을 가하여, 37°C에서 48시간 소화한다. 펩신 소화된 F(ab')₂는 통상의 방법, 예컨대 염석, 이온 교환 크로마토그래피, 겔 여과, 소수성 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등에 의해 정제할 수 있지만, 보다 효과적으로는 세파크틸S-200(아마삼바이오사이언스사 제조)을 이용한 겔 여과가 이용된다.

(9)의 공정은 F(ab')₂에 2-메르캅토에탄올을 가하여, 30°C에서 30분간 환원한다. 환원된 Fab_{SH}는 통상의 방법, 예컨대 염석, 이온 교환 크로마토그래피, 겔 여과, 소수성 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등에 의해 정제할 수 있지만, 보다 효과적으로는 세파크틸S-200을 이용한 겔 여과가 이용된다.

(10)의 공정은 한 쪽의 항체의 Fab_{SH} 획분에 링커를 결합시킨다. 가교제로서는 Fab_{SH}의 메르캅토(SH)기에 결합할 수 있는 것이면 되고, 예컨대 페닐렌디말레이미드를 가하여, 실온에서 30분간 반응시킨다. 이어서, 다른 쪽의 Fab_{SH}를 1.3배량 가하여, 실온에서 4시간 반응시킨다. 얻어지는 2가의 특이성을 갖는 물질은 통상의 방법, 예컨대 염석, 이온 교환 크로마토그래피, 겔 여과, 소수성 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등에 의해 정제할 수 있지만, 보다 효과적으로는 세파크틸S-200을 이용한 겔 여과가 이용된다.

(11)의 공정은 공정 (6)에서 얻어진 항체를 그대로 이용하거나, 통상의 방법에 의해 적당히 표지(예컨대, 비오틴화 표지, FITC 표지 등)하여 이용할 수 있다. ELISA 법을 이용하는 경우는, 통상의 방법에 의해 항원을 고상화하여, 항체를 첨가한다. 이어서 효소 표지한 2차 항체, 비오틴화 표지한 항체를 이용하는 경우는, 효소 표지한 스트렙트아비딘을 첨가한 후, 항체와 항원과의 특이적 결합을, 크로모포어 산생 물질 존재 하에서 흡광 광도계에 의해 측정한다. 이 분석계를 이용함으로써, PD-1 혹은 막단백을 특이적으로 인식하는 저분자를 얻을 수 있다.

(12)의 공정은 한 쪽이 항체 혹은 Fab인 경우, 얻어진 저분자에 적당한 관능기를 도입함으로써, 항체 혹은 Fab와 결합시킬 수 있다. 예컨대, 말레이미드기를 도입하면, 항체 혹은 Fab의 메르캅토(SH)기에 결합시키는 것이 가능하다. 또한, 저분자끼리라면, 양 물질을 포함하는 분자를 합성하는 것이 가능하다.

한편, 각각의 항원에 대한 모노클로날 항체를 산생하는 하이브리도마로부터, 각각의 항체 cDNA를 단리하여, 유전자 조환에 의해서 양 cDNA 혹은 그 cDNA 부분 단편을 융합시키고, 제작된 DNA를 삽입한 발현 벡터를 이용하여, 적당한 숙주 세포를 형질 전환시킴으로써, 그 숙주 세포로부터 이특이성 항체를 산생시킬 수 있다.

구체적으로는, 인간 PD-1에 대한 항체 혹은 그 부분 단편 및 인간 PD-1이 발현하고 있는 세포막에 존재하는 막단백에 대한 항체 혹은 그 부분 단편으로 이루어지는 이특이성 항체의 제작은,

(1) 항 인간 PD-1모노클로날 항체, 항 막단백질 모노클로날 항체를 산생하는 각각의 하이브리도마로부터 항체 유전자를 단리하고,

(2) 항 인간 PD-1 모노클로날 항체 유전자의 가변 영역을 코딩하는 DNA와 항 막단백질 모노클로날 항체 유전자의 가변 영역을 코딩하는 DNA를 링커 DNA를 이용하여 연결하고, 연결한 DNA 단편을 발현 벡터에 삽입하여, 적당한 숙주 세포에 도입하고,

(3) 적당한 배양 조건 하에서 배양함으로써, 산생된 단백을 분리 정제하여 행할 수 있다.

각 공정을 이하에 의해 구체적으로 설명한다.

(1)의 공정은 하이브리도마 세포로부터 RNA를 단리하여, 항체 유전자 또는 그 부분 펩티드를 코딩하는 cDNA를 단리하는 공정으로 이루어진다.

하이브리도마 세포로부터 전체 RNA(total RNA) 또는 mRNA를 단리하는 공정은 공지 방법(이하, 공지 방법은 특별히 기재가 없으면 Sambrook, J. 외 2명 저, *몰레큘러 클로닝(Molecular Cloning)*, 1989년, Cold Spring Harbor Laboratory 또는 F. M. Ausubel 외 2명 편, *커런트 프로토콜 인 몰레큘러 바이올로지(Current Protocol in Molecular Biology)*에 기재한 방법)에 따라서 행할 수 있다.

본 발명의 항체 유전자 또는 그 부분 펩티드를 코딩하는 cDNA의 클로닝 수단으로서, 본 발명의 항체 단백질의 부분 염기 서열을 갖는 합성 DNA 프라이머를 이용하여, 폴리머라제 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction; 이하, PCR법이라 약기함)에 의해서 증폭하거나, 또는 적당한 벡터에 내장한 cDNA를 본 발명의 항체 단백질의 일부 혹은 전체 영역을 코딩하는 DNA 단편 혹은 합성 DNA를 이용하여 표지한 것과의 하이브리드화에 의해서 선별할 수 있다. 하이브리드화 방법은 공지 방법에 따라서 행할 수 있다. 항체 유전자는 전체 RNA(total RNA) 또는 mRNA를 이용하여 직접, 역전사 효소 폴리머라제 연쇄 반응(Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction; 이하, RT-PCR법이라 약기함)에 의해서 증폭할 수도 있다.

(2) 본 발명의 이특이성 항체를 산생하는 방법으로서는,

i) 펩티드 합성하는 방법, 또는

ii) 유전자 조직 전환 기술을 이용하여 생산하는 방법,

등을 들 수 있지만, 공업적으로는 ii)에 기재한 방법이 바람직하다.

유전자 조직 전환 기술을 이용하여 펩티드를 생산하기 위한 발현계(숙주-벡터계)로서는 예컨대, 세균, 효모, 곤충 세포 및 포유 동물 세포의 발현계를 들 수 있다.

벡터계로서는, 대장균 유래의 플라스미드(예컨대, pBR322, pBR325, pUC12, pUC13), 고초균 유래의 플라스미드(예, pUB110, pTP5, pC194), 효모 유래 플라스미드(예컨대, pSH19, pSH15), λ 파지 등의 박테리오파지, 레트로바이러스, 백시니아바이러스, 바칼로바이러스 등의 동물 바이러스 등 외에, pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neo 등이 이용된다.

본 발명에서 이용되는 프로모터로서는, 유전자의 발현에 이용하는 숙주에 대응한 적절한 프로모터라면 어떠한 것이라도 좋다. 예컨대, 동물 세포를 숙주로서 이용하는 경우는, SRa 프로모터, SV40 프로모터, LTR 프로모터, CMV 프로모터, HSV-TK 프로모터 등을 들 수 있다. 이들 중, CMV(사이토메갈로바이러스) 프로모터, SRa 프로모터 등을 이용하는 것이 바람직하다. 숙주가 에스케리치아(*Escherichia coli*)속 균인 경우는, trp 프로모터, lac 프로모터, recA 프로모터, λ PL 프로모터, lpp 프로모터, T7 프로모터 등이 바람직하며, 숙주가 바실러스속 균인 경우는, SPO1 프로모터, SPO2 프로모터, penP 프로모터 등이 바람직하고, 숙주가 효모인 경우는, PHO5 프로모터, PGK 프로모터, GAP 프로모터, ADH 프로모터 등이 바람직하다. 숙주가 곤충 세포인 경우는, 폴리헤드린 프로모터, P10 프로모터 등이 바람직하다.

발현 벡터에는, 이상의 것 외에, 원하는 바에 따라 인헨서, 스플라이싱 시그널, 폴리 A 부가 시그널, 선택 마커, SV40 복제 오리진(이하, SV40ori라 약기하는 경우가 있음) 등을 함유하고 있는 것을 이용할 수 있다. 선택 마커로서는 예컨대, 디히드로엽산 환원 효소(이하, dhfr이라 약기하는 경우가 있음) 유전자(메소트렉세이트(MTX) 내성), 암피실린 내성 유전자(이하, Ampr이라 약기하는 경우가 있음), 네오마이신 내성 유전자(이하, Neor이라 약기하는 경우가 있음. G418 내성) 등을 들 수 있다. 특히, dhfr 유전자 결손 차이니스 햄스터 세포를 이용하여 dhfr 유전자를 선택 마커로서 사용하는 경우, 목적 유전자를 티미딘을 포함하지 않는 배지에 의해서도 선택할 수 있다. 또한, 필요에 따라서, 숙주에 맞는 시그널 서열을, 본 발명의 단백질의 N 단말 측에 부가한다. 숙주가 에스케리치아속 균인 경우는 PhoA·시그널 서열, OmpA·시그널 서열 등, 숙주가 바실러스속 균인 경우는 α -아밀라아제·시그널 서열, 서브틸리신·시그널 서열 등이, 숙주가 효모인 경우는 MFa·시그널 서열, SUC2·시그널 서열 등, 숙주가 동물 세포인 경우에는, 인슐린·시그널 서열, α -인터페론·시그널 서열, 항체 분자·시그널 서열 등을 각각 이용할 수 있다. 이와 같이 하여 구축된 본 발명의 단백질을 코딩하는 DNA를 함유하는 벡터를 이용하여, 형질 전환체를 제조할 수 있다.

발현 벡터로 형질 전환한 에스케리치아속 균을 적당한 배지로 배양하여, 그 균체로부터 목적으로 하는 펩티드를 얻을 수 있다. 또한, 박테리아의 시그널 펩티드(예컨대, pelB의 시그널 펩티드)를 이용하면, 페리플라즘 중에 목적으로 하는 펩티

드를 분비할 수도 있다. 또한, 다른 펩티드와의 융합 단백질을 생산할 수도 있다. 또한, 포유동물 세포로 발현시키는 경우에는 예컨대, 목적으로 하는 단백질을 코딩한 cDNA를 적당한 발현 벡터를 이용하여, 숙주 세포로서 적당한 포유동물 세포를 형질 전환하고, 형질 전환체를 적당한 배지로 배양함으로써, 그 배양액 중에 목적으로 하는 펩티드가 분비된다.

숙주 세포로서는 예컨대, 에스케리치아속 균, 바실러스속 균, 효모, 곤충 세포, 곤충, 동물 세포 등이 이용된다. 에스케리치아속 균의 구체예로서는, 예컨대, 에스케리치아-콜라이K12, DH1, JM103, JA221, HB101, C600, JM109, DH5, DH5a 등이 이용된다. 바실러스속 균으로서는 예컨대, 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis) MI114 등이 이용된다. 효모로서는 예컨대, 사카로미세스 세레비시예(Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R-, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, 시조사카로미세스 폼베(Saccharomyces pombe) NCYC1913, NCYC2036, 피키아 파스토리스(Pichia pastoris) KM71 등이 이용된다. 곤충 세포로서는 예컨대, 바이러스가 AcNPV인 경우는, 밤도독나방의 유충 유래 주화 세포(Spodoptera frugiperda Cell; Sf 세포), Trichoplusia ni의 중장 유래의 MG1 세포, Trichoplusia ni의 알 유래의 High Five TM 세포, Mamestra brassicae 유래의 세포 또는 Estigmene acrea 유래의 세포 등이 이용된다. 바이러스가 BmNPV인 경우는 누에 유래 주화 세포(Bombyx moriN 세포; BmN 세포) 등이 이용된다. 이 Sf 세포로서는 예컨대, Sf9 세포(ATCC CRL1711), Sf21 세포(Vaughn, J. L., 인 비보(In Vivo), 1977년, 제13권, p.213~217) 등이 이용된다. 곤충으로서는 예컨대, 누에의 유충 등이 이용된다. 동물 세포로서는 예컨대, 원숭이 COS-1 세포, COS-7 세포, Vero, 차이나이즈 햄스터 세포 CHO(이하, CHO 세포라 약기함), dhfr 유전자 결손 차이나이즈 햄스터 세포 CHO(이하, CHO(dhfr-) 세포라 약기함), 마우스 L 세포, 마우스 AtT-20, 마우스 골수종 세포, 래트 GH3, HEK293T 세포, 인간 FL 세포 등이 이용된다.

에스케리치아속 균을 형질 변환하는 경우에는, 예컨대, 프로시딩즈 오브 더 내셔널 아카데미 오브 사이언시즈 오브 더 유에스에이(Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)), 1972년, 제69권, 제2110호에 기재한 방법에 따라서 행할 수 있다. 바실러스속 균을 형질 전환하기 위해서는 예컨대, 몰레큘러 앤드 제너럴 제네틱스(Molecular & General Genetic), 1979년, 제168권, 제111호에 기재의 방법에 따라서 행할 수 있다. 효모를 형질 전환하려면 예컨대, Becker, DM. 외 1명, 메소즈 인 엔자이몰로지(Methods in Enzymology), 1991년, 제194권, p.182~187, 프로시딩즈 오브 더 내셔널 아카데미 오브 사이언시즈 오브 유에스에이(Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)), 1978년, 제75권, 제1929호에 기재한 방법에 따라서 행할 수 있다. 곤충 세포 또는 곤충을 형질 전환하기 위해서는, 예컨대, 바이오/테크놀러지(Bio/Technology), 1988년, 제6권, p.47~55에 기재한 방법에 따라서 행할 수 있다. 동물 세포를 형질 전환하는 경우에는, 예컨대, 「세포공학별책8 신세포 공학 실험 프로토콜」, 슈준샤(秀潤社), 1995년, 제263호나 바이롤로지(Virology), 1973년, 제52권, 제456호에 기재한 방법에 따라서 행할 수 있다.

(3) 이상과 같이 하여 얻어진 펩티드는 통상의 방법, 예컨대 염석, 이온 교환 크로마토그래피, 겔 여과, 소수성 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등에 의해 정제할 수 있다.

본 발명의 실질적으로 순수한 형태인 서열번호 2, 서열번호 4 또는 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드란, 일반적으로 생산시의 폴리펩티드의 90% 이상, 예컨대, 95, 98 또는 99% 이상 상동인 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이다.

실질적으로 순수한 형태인 서열번호 2, 서열번호 4 또는 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드의 상동체란, 일반적으로 적어도 20개, 바람직하게는 적어도 30개, 예컨대 40, 60 또는 100개의 연속된 아미노산 영역에서, 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80 또는 90%, 보다 바람직하게는 95% 이상 상동성인 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이다.

또한, 실질적으로 순수한 형태인 서열번호 2, 서열번호 4 또는 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드의 단편이란, 적어도 10 아미노산, 바람직하게는 적어도 15 아미노산, 예컨대 20, 25, 30, 40, 50 또는 60 아미노산 부분을 포함하는 폴리펩티드이며, 이들의 상동체란, 일반적으로 적어도 10 아미노산, 바람직하게는 적어도 15 아미노산, 예컨대 20, 25, 30, 40, 50 또는 60개의 연속된 아미노산 영역에서, 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80 또는 90%, 보다 바람직하게는 95% 이상 상동성인 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이다.

실질적으로 순수한 형태인 서열번호 2, 서열번호 4 또는 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드의 1 혹은 수개의 아미노산이 결실된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드란, 아미노산 서열 중의 1 혹은 2개 이상(바람직하게는, 1~25개 정도, 바람직하게는 1~10개 정도, 더욱 바람직하게는 수(1~5)개)의 아미노산이 결실된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다.

실질적으로 순수한 형태인 서열번호 2, 서열번호 4 또는 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드의 1 혹은 수개의 아미노산이 치환된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드란, 아미노산 서열에 1 또는 2개 이상(바람직하게는, 1~25개 정도, 바람직하게는 1~10개 정도, 더욱 바람직하게는 수(1~5)개의 아미노산이 치환된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다.

실질적으로 순수한 형태인 서열번호 2, 서열번호 4 또는 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드의 1 혹은 수개의 아미노산이 부가된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드란, 아미노산 서열에 1 또는 2개 이상(바람직하게는, 1~25개 정도, 바람직하게는 1~10개 정도, 더욱 바람직하게는 수(1~5)개의 아미노산이 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다.

서열번호 1, 서열번호 3 또는 서열번호 9에 제시된 DNA 염기 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드의 상동체란, 일반적으로, 적어도 20개, 바람직하게는 적어도 30개, 예컨대 40, 60 또는 100개의 연속된 염기 서열 영역에서, 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80 또는 90%, 보다 바람직하게는 95% 이상 상동인 폴리뉴클레오티드이다.

서열번호 1, 서열번호 3 또는 서열번호 9에 제시된 DNA 염기 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드의 단편이란, 적어도 20 염기, 바람직하게는 적어도 30 염기, 예컨대 40, 50, 60 또는 100 염기 부분으로 이루어지는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것이다. 또는, 그 단편의 상동체란, 일반적으로, 적어도 20개, 바람직하게는 적어도 30개, 예컨대 40, 60 또는 100개의 연속된 염기 서열 영역에서, 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80 또는 90%, 보다 바람직하게는 95% 이상 상동인 폴리뉴클레오티드이다.

서열번호 1, 서열번호 3 또는 서열번호 9에 제시된 염기 서열을 함유하는 DNA와 고 엄중 조건 하에서 하이브리드하는 DNA로서는 예컨대, 각각 서열번호 1, 서열번호 3 혹은 서열번호 9에 제시된 염기 서열과 약 70% 이상, 바람직하게는 약 80% 이상, 더욱 바람직하게는 약 90% 이상, 가장 바람직하게는 약 95% 이상의 상동성을 갖는 염기 서열을 함유하는 DNA가 포함된다. 하이브리드화는 공지된 방법 혹은 그것에 준하는 방법, 예컨대, J. Sambrook 저, *분자 클로닝(Molecular Cloning)* 2판, 콜드 스프링 하버 래보러토리(Cold Spring Harbor Laboratory)에 기재한 방법 등에 따라서 실시할 수 있다. 또한, 시판되는 라이브러리를 사용하는 경우, 첨부한 사용설명서에 기재된 방법에 따라서 실시할 수 있다. 보다 바람직하게는, 고 엄중 조건에 따라서 실시할 수 있다. 고 엄중 조건이란, 예컨대, 나트륨 농도가 약 19~40 mM, 바람직하게는 약 19~20 mM이고, 온도가 약 50~70°C, 바람직하게는 약 60~65°C인 조건을 나타낸다. 특히, 나트륨 농도가 약 19 mM이고 온도가 약 65°C인 경우가 가장 바람직하다.

산업상 이용 가능성

[의약품에의 적용]

본 발명의 인간 PD-1에 대하여 특이성을 갖는 물질은 하기 질환의 치료 및/또는 예방에 이용할 수 있다.

본 발명의 인간 PD-1에 대하여 특이성을 갖는 물질은 예컨대, 신경 변성 질환(노년기 치매, 알츠하이머병, 다운증, 파킨슨병, 크로이츠펠트-야콥병, 근위축성척수축색경화증, 당뇨병성 신경장해, 파킨슨증후군, 헌팅턴병, 마사도조세프병, 근위축성척색경화증 및 크로이츠펠트-야콥병 등)의 질환의 치료 및/또는 예방에 유용하다.

또한, 본 발명의 인간 PD-1에 대하여 특이성을 갖는 물질은 PD-1이 관여하며, 면역 반응이 항진함에 의한 질환, 예컨대, 자가 면역 질환(사구체신염, 관절염, 확장성심근증양 질환, 췌양성대장염, 췌그렌증후군, 크론병, 전신성예리테마토데스, 만성관절류마티스, 다발성경화증, 건선, 알레르기성접촉성피부염, 다발성근염, 강피증, 결절성동맥주위염, 류마티스열, 심상성백반, 인슐린의존성당뇨병, 베켓병, 교본병, 에디슨병, 피부근염, 중증근무력증, 라이터증후군, 그레브스병, 악성빈혈, 구드패스츄어증후군, 불임증, 만성활동성간염, 천포창, 자가면역성혈소판감소성자반병, 자가면역성용혈성빈혈 및 혈관염 등)의 치료 및/또는 예방에 유용하다.

또한, 본 발명의 인간 PD-1에 대하여 특이성을 갖는 물질은 교원병(전신성예리테마토데스, 만성관절류마티스, 범발성강피증, 전신성진행성경화증, 피부근염, 다발성근염, 췌그렌증후군, 혼합성결합조직병, 결절성다발성동맥염, 류마티스열 등)의 질환의 치료 및/또는 예방에 유용하다.

또한, 본 발명의 인간 PD-1에 대하여 특이성을 갖는 물질은 장기 이식편 거부 반응, 알레르기 질환, 또한, PD-1이 관여하며, 면역 반응이 저하함으로써 야기되는 질환, 예컨대, 종양, 감염증 등의 질환의 치료 및/또는 예방에 유용하다.

본 발명의 인간 PD-1에 대한 특이성을 갖는 물질을 상기한 목적으로 이용하는 경우에는, 통상 전신적 또는 국소적으로, 경구 또는 비경구의 형태로 투여한다.

투여량은 연령, 체중, 증상, 치료 효과, 투여 방법, 처리 시간 등에 따라 다르지만, 통상 성인 1인당, 1회에, 0.1 mg에서 100 mg의 범위에서, 하루 1회에서 수회 경구 투여되거나, 또는 성인 1인당, 1회에, 0.01 mg에서 30 mg의 범위에서, 하루 1회부터 수회 비경구 투여(바람직하게는, 정맥내 투여)되거나, 또는 하루 1시간부터 24시간의 범위에서 정맥 내에 지속 투여한다.

물론 상기한 것과 같이, 투여량은 여러 가지 조건에 따라 변동되기 때문에, 상기 투여량보다 적은 양으로 충분한 경우도 있고, 또한 범위를 넘어서 필요한 경우도 있다.

본 발명 화합물을 투여할 때는, 경구 투여를 위한 내복용 고형제, 내복용 액제 및 비경구 투여를 위한 주사제, 외용제, 좌제 등으로서 이용된다.

경구 투여를 위한 내복용 고형제에는 정제, 환제, 캡슐제, 산제, 과립제 등이 포함된다. 캡슐제에는 하드캡슐 및 소프트캡슐이 포함된다.

이러한 내복용 고형제에 있어서는, 하나 또는 그 이상의 활성 물질이 그대로나, 또는 부형제(락토스, 만니톨, 글루코오스, 미결정 셀룰로오스, 전분 등), 결합제(히드록시프로필셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 메타규산알루미늄산마그네슘 등), 붕괴제(섬유소 글리콜산칼슘 등), 활택제(스테아린산마그네슘 등), 안정제, 용해보조제(글루타민산, 아스파라긴산 등) 등과 혼합되어, 통상의 방법에 따라서 제제화하여 이용된다. 또한, 필요에 따라 코팅제(백당, 젤라틴, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스프탈레이트 등)로 피복하고 있더라도 좋고, 또한 2 이상의 층으로 피복하고 있더라도 좋다. 또한 젤라틴과 같은 흡수될 수 있는 물질의 캡슐도 포함된다.

경구 투여를 위한 내복용 액제는 약제적으로 허용되는 수제, 현탁제, 유제, 시럽제, 엘릭시르제 등을 포함한다. 이러한 액제에 있어서는 하나 또는 그 이상의 활성 물질이, 일반적으로 이용되는 희석제(정제수, 에탄올 또는 이들의 혼합액 등)에 용해, 현탁 또는 유화된다. 또한 이 액제는 습윤제, 현탁화제, 유화제, 감미제, 풍미제, 방향제, 보존제, 완충제 등을 함유하고 있더라도 좋다.

비경구 투여를 위한 주사제로서는 용액, 현탁액, 유탁액 및 용시 용제에 용해 또는 현탁하여 이용하는 고형의 주사제를 포함한다. 주사제는 하나 또는 그 이상의 활성 물질을 용제에 용해, 현탁 또는 유화시켜 이용된다. 용제로서, 예컨대 주사용 증류수, 생리식염수, 식물유, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 에탄올과 같은 알코올류 등 및 이들의 조합이 이용된다. 또한 이 주사제는, 안정제, 용해보조제(글루타민산, 아스파라긴산, 폴리솔베이트80(등록상표) 등), 현탁화제, 유화제, 무통화제, 완충제, 보존제 등을 포함하고 있더라도 좋다. 이들은 최종 공정에 있어서 멸균하거나 무균 조작법에 의해서 조제된다. 또한 무균의 고형제, 예컨대 동결 건조품을 제조하여, 그 사용전에 무균화 또는 무균의 주사용 증류수 또는 다른 용제에 용해하여 사용할 수도 있다.

비경구 투여를 위한 그 밖의 제제로서는 하나 또는 그 이상의 활성 물질을 포함하며, 통상의 방법에 의해 처방되는 외용액제, 연고제, 도포제, 흡입제, 스프레이제, 좌제 및 질내 투여를 위한 페서리 등이 포함된다.

스프레이제는 일반적으로 이용되는 희석제 이외에 아황산수소나트륨과 같은 안정제와 등장성을 부여하는 완충제, 예컨대 염화나트륨, 시트르산나트륨 혹은 시트르산과 같은 등장제를 함유하고 있더라도 좋다. 스프레이제의 제조 방법은, 예컨대 미국 특허 제2868691호 명세서 및 미국 특허 제3095355호 명세서에 자세히 기재되어 있다.

PD-1은 면역 반응에 관여하고 있으므로, 본 발명의 인간 PD-1에 대한 특이성을 갖는 물질을 이용하여 인간 PD-1의 발현을 측정함으로써, 면역 반응에 관여하는 물질의 스크리닝 등에도 이용할 수 있다.

본 발명의 인간 PD-1에 대한 특이성을 갖는 물질은, 인간 PD-1을 인식하는 부분, 인간 PD-1이 발현하고 있는 세포막에 존재하는 막단백을 인식하는 부분 및 링커로 이루어지며, 인간 PD-1 및 막단백을 특이적으로 인식하여, 인간 PD-1 시그널을 전달할 수 있는 우수한 물질이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 이특이성 항체 발현 벡터의 구성을 도시한 도면이다.

도 2는 A 및 B는, 각각 이특이성 항체의, (CD3(-)/PD-1(+))세포를 강제 발현시킨 X63 세포 표면 항원 및 (CD3(+)/PD-1(-)세포)으로 한 인간 말초혈 단핵구 세포(PBMC) 표면 항원에 대한 반응성을 나타낸다. 도면에서, 막대그래프의 충전 영역은 컨트롤 IgG을 나타내고, 개구 영역은 PD-1 혹은 CD3 양성 세포 분포를 나타내는 그래프이다.

도 3은 이특이성 항체의 활성화 인간 말초혈 T 세포의 증식 반응에 대한 효과를 나타내는 그래프이다. 도면에서 "-"은 컨트롤 IgG 첨가군, "BsAb"는 이특이성 항체 첨가군을 나타내고, 종축은 측정 흡광도를 나타내고, **는 유의차 검정에서의 $P < 0.05$ 를 나타낸다.

실시예

이하에 실시예를 들어 본 발명을 보다 구체적으로 설명하지만, 이들은 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

실시예 1

항 인간 PD-1 항체, 항 인간 CD3 항체를 각각 코딩하는 DNA를 취득하기 위해서, J110(식별을 위한 표시: 국제 수탁 번호 FERM PB-8392) 하이브리도마 세포, CD3 항체 하이브리도마(ATCC로부터 분양: ATCC 번호: CRL-8001) 세포로부터, 각각의 전체 RNA(total RNA)를 조제하였다. 조제에는 SV total Isolation System(상품명: 프로메가로부터 구입)을 이용하고, 조작은 첨부서에 따라서 실시하였다.

J110 하이브리도마 cDNA 라이브러리 및 CD3 항체 하이브리도마 cDNA 라이브러리의 제작은 Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads(상품명: 아마삼파마시아로부터 구입)를 이용하여, 전체 RNA(total RNA)로부터 올리고 dT 프라이밍법에 의해 cDNA를 제작하였다. 조작 및 순서는 첨부서를 따랐다.

항 인간 PD-1 항체, 항 인간 CD3 항체의 각각의 IgG 중쇄 및 IgG 경쇄의 가변 영역의 cDNA의 단리는 Heavy Primers 및 Light Primers(상품명: 아마삼파마시아로부터 구입)를 각각 이용하여 PCR 반응에 의해서 실시하였다. PCR 반응은 최초 95°C 하에서 2분간 유지하고, 이어서 95°C 하에서 30초간, 50°C 하에서 30초간, 72°C 하에서 40초간의 온도 조정을 30회 반복하고, 마지막으로 72°C 하에서 5분간 유지하여 행하였다.

PCR 반응으로 증폭된 DNA를 아가로스 겔 전기영동에 의해서 분리한 후, 예측되는 사이즈의 DNA 단편을 회수하여, 이것을 pGEM-T Easy Vector(상품명: 프로메가로부터 구입)에 연결시켰다. 또한, 이 플라스미드로 대장균 DH5a를 형질 전환시킨 후, 플라스미드를 정제하여, 항 인간 PD-1 항체의 IgG 중쇄(서열번호 1) 및 IgG 경쇄(서열번호 3), 인간 CD3 항체의 IgG 중쇄(서열번호 5) 및 IgG 경쇄(서열번호 7)의 각각의 cDNA의 염기 서열을 결정하였다.

실시예 2

이특이성 항체를 코딩하는 DNA는 실시예 1에서 각각 단리한 cDNA를 연결함으로써 제작하였다. 항 인간 PD-1 항체 IgG 중쇄 cDNA(서열번호 1)와 항 인간 CD3 항체 IgG 경쇄 cDNA(서열번호 7)의 연결은 링커 No.1(서열번호 19) 및 No.2(서열번호 20) 및 프라이머 No.1(서열번호 14) 및 No.2(서열번호 15)를 이용한 PCR 반응에 의해 실시하여, 단편 1을 제작하였다(도 1). 이어서, 항 인간 CD3 항체 IgG 중쇄 cDNA와 항 인간 PD-1 항체 IgG 경쇄 cDNA의 연결은 링커 No.3(서열번호 21) 및 No.4(서열번호 22) 및 프라이머 No.3(서열번호 16) 및 No.4(서열번호 17)를 이용한 PCR 반응에 의해 실시하여, 단편 2를 제작하였다(도 1). 또한, 단편 1과 단편 2의 연결은 링커 No.5(서열번호 23) 및 No.6(서열번호 24) 및 프라이머 No.5(서열번호 18) 및 No.4(서열번호 22)를 이용한 PCR 반응에 의해 실시하여, 단편 3을 제작하고(도 1), 그 염기 서열을 결정하였다(서열번호 9).

각각의 PCR 반응은 2회로 나눠 실시하였다. 1회제의 PCR 반응은 94°C 하에서 30초간, 40°C 하에서 30초간, 72°C 하에서 50초간의 온도 조정을 20회 반복하여 실시하고, 2회제의 PCR 반응은 1회제의 PCR 반응 용액을 주형 샘플로서 이용하여, 94°C 하에서 30초간, 50°C 하에서 30초간, 72°C 하에서 50초간의 온도 조정을 30회 반복하여 실시하였다.

프라이머 No.1

5'-TTTTTTAAGCTTACAGGTCCAGCTGCAGGAGTCA-3'(서열번호 14)

프라이머 No.2

5'-TTTTTTGCGGCCGCCCGGTTTATTTCCAACCTTG-3'(서열번호 15)

프라이머 No.3

5'-TTTTTTAAGCTTACAGGTCCAGCTGCAGCAGTCT-3'(서열번호 16)

프라이머 No.4

5'-TTTTTTGCGGCCGCCCGTGTGATTTCCAGCTTGG-3'(서열번호 17)

프라이머 No.5

5'-ATGAACTGGTACCAGCAGAAG-3'(서열번호 18)

링커 No.1

5'-AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTCAAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAG-3'(서열번호 19)

링커 No.2

5'-CTGGAGACTGGGTGAGAACAATTTGTGAACCGCCTCCACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCT-3'(서열번호 20)

링커 No.3

5'-AGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTCCAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCAG-3'(서열번호 21)

링커 No.4

5'-CTGGAGACTGGGTGATCTGGATGTCTGAACCGCCTCCACCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCCT-3'(서열번호 22)

링커 No.5

5'-
GGGGACAAAGTTGGAAATAAACCGGGGTGGAGGCGGTTCCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGGTCCAA
3'(서열번호 23)

링커 No.6

5'-
CCCCAGACTGCTGCAGCTGGACCTGCGATCCGCCACCGCCAGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCCCGGTTTAT
3'(서열번호 24)

상기 방법으로 제작한 이특이성 항체를 코딩하는 DNA를 구성하는 DNA를 발현 벡터 pSecTag2/HygroA(상품명: 인비트로젠으로부터 구입)에 연결하였다. 우선, 단편 1 및 단편 3의 각각을 제한 효소 HindIII 및 KpnI, KpnI 및 NotI의 조합으로 소화하여, 아가로스 겔 전기영동에 의해서 정제한 DNA 단편을 얻었다. 이어서, 제한 효소 HindIII 및 NotI로 소화, 정제한 pSecTag2/HygroA에 연결하였다. 최종적으로, 제작된 플라스미드를 이용하여 대장균 DH5a를 형질 전환시킨 후, 이로부터 플라스미드를 추출, 정제하여, 이특이성 항체의 발현 플라스미드 J110-CD3scDb-pSec/hygroA를 얻었다(도 1).

실시예 3

이특이성 항체의 발현은 LipofectAMINE-plus(상품명: 인비트로젠으로부터 구입)를 이용하여 J110-CD3scDb-pSec/hygroA를 유전자 도입한 인간 신장 세포주 293T(ATCC 번호: CRL-11268)를 이용하여 실시하였다. 동 발현 벡터 유전자 도입 후 4일간 배양하여, 그 배양 상청을 회수하였다. 이 배양 상청을 0.22 μ m PVDF 필터로 여과 멸균하고, 40% PEG20000 용액 속에서 투석하여 농축하였다. 이 농축한 상청을 HiTrap Chelating HP column(상품명: 아마삼파마시아로부터 구입)을 이용하여 정제하였다.

실시예 4

이특이성 항체의 세포 표면 항원(PD-1 및 CD3)에 대한 반응성을 FACScan에 의해서 확인하였다.

PD-1 양성·CD3 음성 세포(CD3(-)/PD-1(+))세포로 한, 인간 PD-1을 강제 발현시킨 X63 세포주 및 PD-1 음성 CD3 양성 세포(CD3(+)/PD-1(-))세포로 한 인간 말초혈 단핵구 세포(이하, PBMC라 약기함)의 각각에, 1 또는 10 μ g의 이특이성 항체를 첨가하여, 일시 얼음 위에 정치한 후, 이어서, 이차 항체를 첨가하여 얼음 위에서 30분간 정치하였다. 그 후, 이들을 FACScan을 이용하여 해석하였다. 결과를 도 2에 도시한다.

이특이성 항체는 PD-1 및 CD3에 반응하는 것을 확인하였다.

실시예 5

이특이성 항체의 활성 확인은 활성화 인간 말초혈 T 세포의 증식 반응에 대한 효과로서 평가하였다.

구체적으로는, 건강한 보통 사람 인간 말초혈로부터 Lymphoprep Tube(상품명: HYCOMED PHARMA로부터 구입)를 이용하여 PBMC를 조제하였다. 조작 및 순서는 첨부서를 따랐다. 이에 따라 분리한 세포를 용혈 완충액(0.8% NH_4Cl , 0.1% KCO_3 , 1 mM EDTA)에 현탁시켜, 적혈구를 용혈시켰다. 이어서, Nylon Fiber ColumnT(상품명: 로슈로부터 구입)를 이용하여 정제한 T 세포를, 배지(10% 소 태아 혈청을 포함하는 RPMI1640 배지)에 현탁하였다.

미리, 5 μ g/ml의 항 인간 $\alpha\beta$ TCR 항체(클론명: T10B9.1A-31, Pharmingen으로부터 구입)를 코트한 24 웰 플레이트에, 먼저 조제한 T 세포를 2×10^6 개/ml/웰의 비율로 파종하였다. 이어서, 1 μ g/ml의 항 인간 CD28 항체(클론명: CD28.2, Pharmingen으로부터 구입)를 포함하는 배지 1 ml 첨가하여, 60시간 배양하였다. 항체 자극한 세포를 회수하여, 무자극 하에서 12시간 배양한 후, 미리, 0.1 μ g/ml의 항 $\alpha\beta$ TCR 항체를 코트해 둔 96 웰 플레이트에, T 세포를 1×10^6 세포/웰/100 μ l로 뿌리고, 이것에 이특이성 항체를 1 μ g/웰로 첨가하여 배양하였다. 48시간 후에, Cell Proliferation ELISA(상품명: 로슈로부터 구입)를 이용하여, BrdU의 취득을 지표로 하여 증식을 측정하였다. 결과를 도 3에 도시한다.

이특이성 항체는 활성화한 인간 말초혈 T 세포의 증식 활성을 의미있게 저하시켰다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

인간 PD-1을 인식하는 부분, 인간 PD-1이 발현하고 있는 세포막에 존재하는 막단백질을 인식하는 부분 및 링커로 이루어지는 인간 PD-1에 대하여 특이성을 갖는 물질.

청구항 2.

제1항에 있어서, 인간 PD-1을 인식하는 부분이 인간 PD-1에 대한 항체 혹은 그 부분 단편인 인간 PD-1에 대하여 특이성을 갖는 물질.

청구항 3.

제1항에 있어서, 인간 PD-1이 발현하고 있는 세포막에 존재하는 막단백질을 인식하는 부분이 그 막단백질에 대한 항체 혹은 그 부분 단편인 인간 PD-1에 대하여 특이성을 갖는 물질.

청구항 4.

제1항에 있어서, 인간 PD-1에 대한 항체 혹은 그 부분 단편, 인간 PD-1이 발현하고 있는 세포막에 존재하는 막단백질에 대한 항체 혹은 그 부분 단편 및 링커로 이루어지는 인간 PD-1에 대하여 특이성을 갖는 물질.

청구항 5.

제1항, 제3항 및 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 막단백질이 T 세포 수용체 복합체 또는 B 세포 수용체 복합체인 인간 PD-1에 대하여 특이성을 갖는 물질.

청구항 6.

제1항 또는 제4항에 있어서, 링커가 펩티드인 인간 PD-1에 대하여 특이성을 갖는 물질.

청구항 7.

인간 PD-1에 대한 항체 혹은 그 부분 단편, T 세포 수용체 복합체에 대한 항체 혹은 그 부분 단편 및 링커로 이루어지는 이특이성(bispecific) 항체.

청구항 8.

인간 PD-1에 대한 항체 혹은 그 부분 단편, B 세포 수용체 복합체에 대한 항체 혹은 그 부분 단편 및 링커로 이루어지는 이특이성 항체.

청구항 9.

제7항 또는 제8항에 있어서, 링커가 펩티드인 이특이성 항체.

청구항 10.

인간 PD-1에 대한 항체를 구성하는 폴리펩티드로서, 실질적으로 순수한 형태인 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드 또는 그 상동체(homolog), 그 단편 또는 그 단편의 상동체, 또는 그 폴리펩티드의 1~10개의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드.

청구항 11.

인간 PD-1에 대한 항체를 구성하는 폴리펩티드로서, 실질적으로 순수한 형태인 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드 또는 그 상동체, 그 단편 또는 그 단편의 상동체, 또는 그 폴리펩티드의 1~10개의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드.

청구항 12.

제10항 또는 제11항에 기재한 폴리펩티드로 이루어지는 폴리펩티드 복합체.

청구항 13.

실질적으로 순수한 형태인 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드 또는 그 상동체, 그 단편 또는 그 단편의 상동체, 또는 그 폴리펩티드의 1~10개의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드.

청구항 14.

제7항 내지 제9항 중의 어느 한 항에 기재한 특이성 항체로서, 실질적으로 순수한 형태인 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드 또는 그 상동체, 그 단편 또는 그 단편의 상동체, 또는 그 폴리펩티드의 1~10개의 아미노산이 결실, 치환 및/또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩티드.

청구항 15.

제10항, 제11항, 제13항 및 제14항 중의 어느 한 항에 기재한 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 그 상동체 또는 그 상보체 폴리뉴클레오티드, 그 단편 또는 그 단편의 상동체.

청구항 16.

서열번호 1, 서열번호 3 또는 서열번호 9에 제시된 염기 서열로 이루어지는 폴리뉴클레오티드, 그 상동체 또는 그 상보체 폴리뉴클레오티드, 그 단편 또는 그 단편의 상동체.

청구항 17.

제15항 또는 제16항에 기재한 폴리뉴클레오티드로 이루어지는 복제 또는 발현 벡터.

청구항 18.

제17항에 기재한 복제 또는 발현 벡터에 의해서 형질 전환된 숙주 세포.

청구항 19.

제1항 내지 제6항 중의 어느 한 항에 기재한 물질을 발현시키기 위한 조건 하에서 제18항에 기재한 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는 물질의 제조 방법.

청구항 20.

제7항 내지 제9항 중의 어느 한 항에 기재한 이특이성 항체를 발현시키기 위한 조건 하에서 제18항에 기재한 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는 이특이성 항체의 제조 방법.

청구항 21.

제10항 내지 제14항 중의 어느 한 항에 기재한 폴리펩티드를 발현시키기 위한 조건 하에서 제18항에 기재한 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 22.

제1항 내지 제6항 중의 어느 한 항에 기재한 물질, 제7항 내지 제9항 중의 어느 한 항에 기재한 이특이성 항체, 제12항에 기재한 폴리펩티드 복합체, 또는 제13항 또는 제14항에 기재한 폴리펩티드를, 인간 PD-1이 관여하는 질환의 치료 및/또는 예방에 유효한 양으로 함유하는 약학적 조성물.

청구항 23.

제22항에 있어서, 인간 PD-1이 관여하는 질환이 신경 변성 질환, 자가 면역 질환, 교원병, 장기 이식편 거부 반응, 종양 및 감염증으로 이루어지는 군에서 선택되는 질환인 약학적 조성물.

청구항 24.

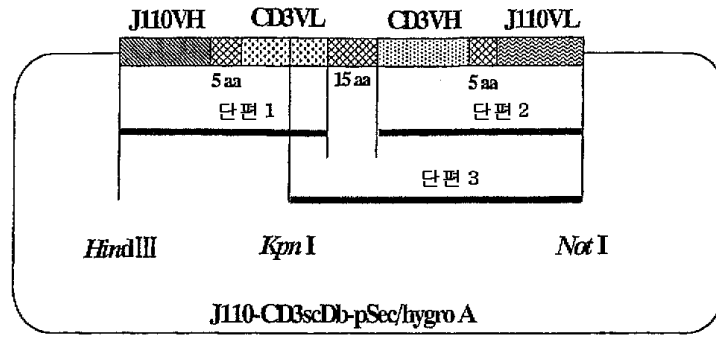
제22항에 있어서, 신경 변성 질환이 노년기 치매, 알츠하이머병, 다운증, 파킨슨병, 크로이츠펠트-야콥병, 근위축성척수측색경화증, 당뇨병성 신경장해, 파킨슨증후군, 헌팅턴병, 마샤도조세프(Machado-Joseph)병, 근위축성측색경화증 및 크로이츠펠트-야콥병으로 이루어지는 군에서 선택되는 질환인 약학적 조성물.

청구항 25.

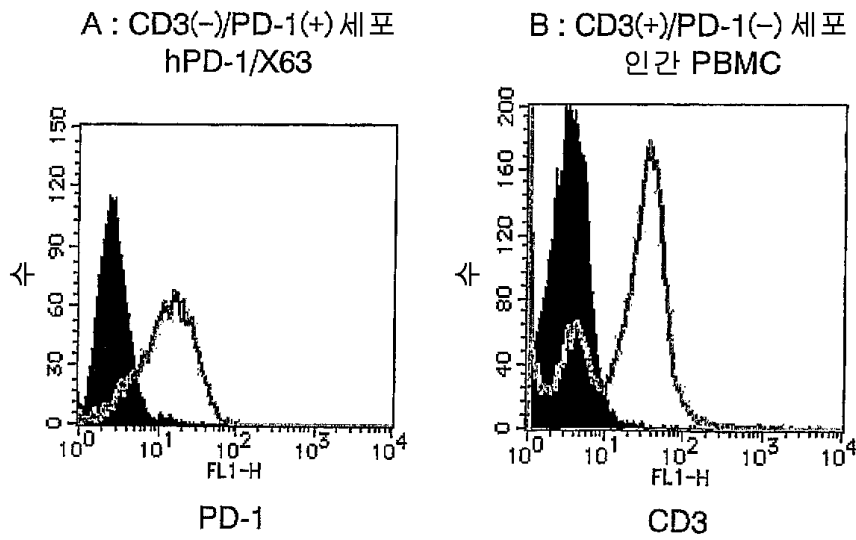
제22항에 있어서, 자가 면역 질환이 사구체신염, 관절염, 확장성심근증양 질환, 궤양성대장염, 췌그렌증후군, 크론병, 전신성예리테마토데스, 만성관절류마티스, 다발성경화증, 건선, 알레르기성접촉성피부염, 다발성근염, 강피증, 결절성동맥주위염, 류마티스열, 심상성백반, 인슐린의존성당뇨병, 베팅병, 교분병, 에디슨병, 피부근염, 중증근무력증, 라이터증후군, 그레브스병, 악성빈혈, 구드패스츄어(goodpasture)증후군, 불임증, 만성활동성간염, 천포창, 자가면역성혈소판감소성자반병, 자가면역성용혈성빈혈 및 혈관염으로 이루어지는 군에서 선택되는 질환인 약학적 조성물.

도면

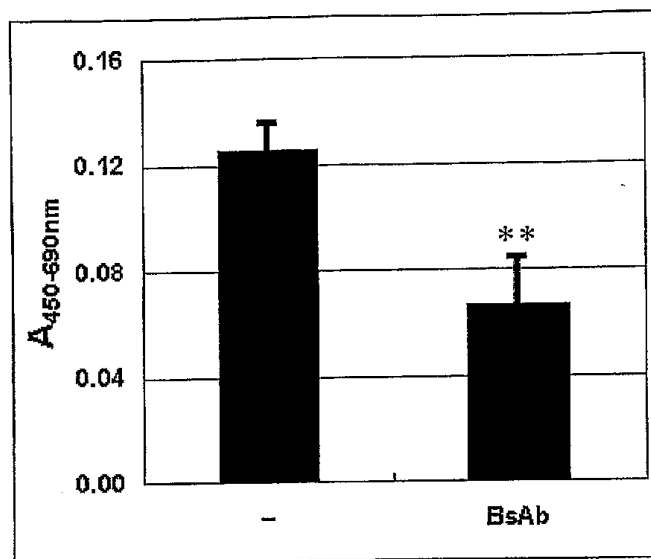
도면1



도면2



도면3



SEQUENCE LISTING

<110> ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.
HONJO, Tasuku

<120> Substances which specifically recognize human PD-1

<130> ONF-4846PCT

<150> JP 2003-14793

<151> 2003-01-23

<160> 26

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 357

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

cagggtccagc	tgaggagtc	aggacctggc	ctgggtgaaac	cttctcagtc	tctgtccctc	60
acctgcactg	tcactggcca	ctcaatcacc	agtgattatg	cctggaactg	gatccggcag	120
tttccaggag	acaaactgga	gtggatgggc	tacataagct	acagtgggta	cactacctac	180
aaccatctc	tgaaaagtcg	agtctctatc	actcgagaca	catccaagaa	ccagttcttc	240
ctgcagttga	attctgtgac	tactgaggac	acagccacat	acttctgtgc	aagagacctt	300
gattacggcc	cctggtttgc	ttactggggc	caagggacca	cggtcaccgt	ctcctca	357

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

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

<210> 3

<211> 324

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3
gacatccaga tgaccagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60
ctcacatgtc gagcaagtga gaatattcac aattatttag catgggatca gcagaaacag 120
ggaaaatctc ctcagctcct ggtctataat gtaaaaacct tagcagatgg tgtgccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc aggaacacaaa tattctctca agatcaacag cctgcagcct 240
gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat ttttggagta gtccgtggac gttcgggtgga 300
ggcaccaagc tggaaatcaa acgg 324

<210> 4
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile His Asn Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45
Tyr Asn Val Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ser Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 5
<211> 357
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 5
caggtccagc tgcagcagtc tggggctgaa ctggcaagac ctggggcctc agtgaagatg 60
tcttgcaagg cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt aaaacagagg 120
cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtggtta tactaattac 180
aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actacagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatattat 300
gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctca 357

<210> 6
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 7
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 7
 caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
 atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgaact ggtaccagca gaagtcaggc 120
 acctcccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcac 180
 ttcaggggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagcggcat ggaggctgaa 240
 gatgctgcca cttattactg ccagcagtgagg agtagtaacc cattcacggt cggctcgggg 300
 acaaagttgg aaataaacgg g 321

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg
 100 105

<210> 9
 <211> 1982
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> Polynucleotide sequence coding bispecific antidody

<400> 9
aatgggagtt tgttttggca caaaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg taacaactcc 60
gccccattga cgaaaatggg cggtaggcgt gtacgggtggg aggtctatat aagcagagct 120
ctctggctaa ctagagaacc cactgcttac tggcttatcg aaattaatac gactcactat 180
agggagacc aagctggcta gccaccatgg agacagacac actcctgcta tgggtactgc 240
tgctctgggt tccaggttcc actggtgacg cggcccagcc ggccagggcg gccgtacgaa 300
gcttacaggt ccagctgcag gagtcaggac ctggcctggg gaaaccttct cagtctctgt 360
ccctcacctg cactgtcact ggccactcaa tcaccagtga ttatgcctgg aactggatcc 420
ggcagtttcc aggagacaaa ctggagtgga tgggctacat aagctacagt ggttacacta 480
cctacaacc atctctgaaa agtcgagtct ctatcactcg agacacatcc aagaaccagt 540
tcttcctgca gttgaattct gtgactactg aggacacagc cacatacttc tgtgcaagag 600
accttgatta cgccccctgg tttgcttact ggggccaagg gaccacggtc accgtctcct 660
caggtggagg cggttcacaa attgttctca cccagtctcc agcaatcatg tctgcatctc 720
caggggagaa ggtcaccatg acctgcagtg ccagctcaag tgtaagttac atgaactggg 780
accagcagaa gtcaggcacc tccccaaaa gatggattta tgacacatcc aaactggctt 840
ctggagtccc tgctcacttc aggggcagtg ggtctgggac ctcttactct ctcaaatca 900
gcgcatgga ggctgaagat gctgccactt attactgcca gcagtggagt agtaaccat 960
tcaggttcgg ctcggggaca aagttggaaa taaaccgggg tggaggcggg tcaggcggag 1020
gtggctctgg cgggtggcga tcgcaggtcc agctgcagca gtctggggct gaactggcaa 1080
gacctggggc ctcagtgaag atgtcctgca aggttctggt ctacacctt actaggtaca 1140
cgatgcactg ggtaaaacag aggcctggac agggcttggga atggattgga tacattaatc 1200
ctagccgtgg ttataactaat tacaatcaga agttcaagga caaggccaca ttgactacag 1260
acaaatcctc cagcacagcc tacatgcaac tgagcagcct gacatctgag gactctgcag 1320
tctattactg tgcaagatat tatgatgatc attactgcct tgactactgg ggccaaggca 1380
ccactctcac agtctcctca ggtggaggcg gttcagacat ccagatgacc cagtctccag 1440
cctccctatc tgcatctgtg ggagaaactg tcaccctcac atgtcgagca agtgagaata 1500
ttcacaatta tttagcatgg tatcagcaga aacagggaaa atctcctcag ctctgggtct 1560
ataatgtaaa aaccttagca gatggtgtgc catcaagggt cagtggcagt ggatcaggaa 1620
cacaatattc tctcaagatc aacagcctgc agcctgaaga ttttgggagt tattactgtc 1680
aacatthttg gagtagtccg tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacggg 1740
cggccgctcg aggaggccc gaacaaaaac tcactctcaga agaggatctg aatagcgccg 1800
tcgaccatca tcatcatcat cattgagttt aaaccgctg atcagcctcg actgtgcctt 1860
ctagttgcca gccatctgtt gtttgccct ccccgctgcc ttccttgacc ctggaagggtg 1920
ccactcccac tgtcctttcc taataaaatg aggaaattgc atcgcattgt ctgagtaggt 1980
gt 1982

<210> 10

<211> 1982

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (207)..(1823)

<223> Polynucleotide and polypeptide sequence coding bispecific antidody

<400> 10

aatgggagtt tgttttggca caaaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg taacaactcc 60
gccccattga cgaaaatggg cggtaggcgt gtacgggtggg aggtctatat aagcagagct 120
ctctggctaa ctagagaacc cactgcttac tggcttatcg aaattaatac gactcactat 180
agggagacc aagctggcta gccacc atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg 233

	270		275		280	
cag ctg cag cag tct ggg gct gaa ctg gca aga cct ggg gcc tca gtg						1097
Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val						
	285		290		295	
aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttt act agg tac acg atg						1145
Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met						
	300		305		310	
cac tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt ctg gaa tgg att gga tac						1193
His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr						
	315		320		325	
att aat cct agc cgt ggt tat act aat tac aat cag aag ttc aag gac						1241
Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp						
	330		335		340	345
aag gcc aca ttg act aca gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac atg caa						1289
Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln						
	350		355		360	
ctg agc agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt gca aga						1337
Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg						
	365		370		375	
tat tat gat gat cat tac tgc ctt gac tac tgg ggc caa ggc acc act						1385
Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr						
	380		385		390	
ctc aca gtc tcc tca ggt gga ggc ggt tca gac atc cag atg acc cag						1433
Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln						
	395		400		405	
tct cca gcc tcc cta tct gca tct gtg gga gaa act gtc acc ctc aca						1481
Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr						
	410		415		420	425
tgt cga gca agt gag aat att cac aat tat tta gca tgg tat cag cag						1529
Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile His Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln						
	430		435		440	
aaa cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc tat aat gta aaa acc tta						1577
Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr Asn Val Lys Thr Leu						
	445		450		455	
gca gat ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc agt gga tca gga aca caa						1625
Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln						
	460		465		470	
tat tct ctc aag atc aac agc ctg cag cct gaa gat ttt ggg agt tat						1673
Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr						
	475		480		485	
tac tgt caa cat ttt tgg agt agt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc						1721
Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr						
	490		495		500	505
aag ctg gaa atc aaa cgg gcg gcc gct cga gga ggg ccc gaa caa aaa						1769
Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Arg Gly Gly Pro Glu Gln Lys						
	510		515		520	
ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac cat cat cat cat						1817
Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His						
	525		530		535	
cat cat tgagtttaaaa cccgctgatac agcctcgact gtgccttcta gttgccagcc						1873
His His						
atctgttgtt tgcccctccc ccgtgccttc cttgaccctg gaaggtgcca ctcccactgt						1933


```

gatcattact gccttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctcaggtgga 1200
ggcggttcag acatccagat gacccagtct ccagcctccc tatctgcatc tgtgggagaa 1260
actgtcacc ctcacatgtcg agcaagtgag aatattcaca attatttagc atggtatcag 1320
cagaaacagg gaaaatctcc tcagctcctg gtctataatg taaaaacctt agcagatggg 1380
gtgccatcaa ggttcagtgg cagtggatca ggaacacaat attctctcaa gatcaacagc 1440
ctgcagcctg aagattttgg gagttattac tgtcaacatt tttggagtag tccgtggagc 1500
ttcggtggag gcaccaagct ggaaatcaaa cgggcggccg ctcgaggagg gcccgaaaca 1560
aaactcatct cagaagagga tctgaatagc gccgtcgacc atcatcatca tcatcat 1617

```

```

<210> 13
<211> 1434
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<223> Polynucleotide sequence coding bispecific antibody

```

```

<400> 13
caggtccagc tgcaggagtc aggacctggc ctggtgaaac cttctcagtc tctgtccctc 60
acctgcactg tcaactggcca ctcaatcacc agtgattatg cctggaactg gatccggcag 120
tttccaggag acaaactgga gtggatgggc tacataagct acagtgggta cactacctac 180
aaccatctc tgaaaagtcg agtctctatc actcgagaca catccaagaa ccagttcttc 240
ctgcagttga attctgtgac tactgaggac acagccacat acttctgtgc aagagacctt 300
gattacggcc cctggtttgc ttactggggc caagggacca cggtcaccgt ctccctcaggt 360
ggaggcgggt cacaaattgt tctcaccag tctccagcaa tcatgtctgc atctccaggg 420
gagaaggcca ccatgacctg cagtgccagc tcaagtgtaa gttacatgaa ctggtaccag 480
cagaagttag gcacctcccc caaagatgg atttatgaca catccaaact ggcttctgga 540
gtccctgctc acttcagggg cagtgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcggc 600
atggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccagcagc ggagtagtaa cccattcacg 660
ttcggctcgg ggacaaagtt ggaaataaac cgggggtggag gcggttcagg cggagggtggc 720
tctggcgggt gcggatcgca ggtccagctg cagcagctct gggctgaact ggcaagacct 780
ggggcctcag tgaagatgtc ctgcaaggct tctggctaca ctttactag gtacacgatg 840
cactgggtaa aacagaggcc tggacagggt ctggaatgga ttggatacat taatcctagc 900
cgtgggtata ctaattaca tcaagaagtc aaggacaagg ccacattgac tacagacaaa 960
tctccagca cagcctacat gcaactgagc agcctgacat ctgaggactc tgcagtctat 1020
tactgtgcaa gatattatga tgatcattac tgcccttgact actggggcca aggcaccact 1080
ctcacagtct cctcaggtgg aggcggttca gacatccaga tgaccagtc tccagcctcc 1140
ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc ctcacatgtc gagcaagtga gaatattcac 1200
aattatttag catggtatca gcagaaacag ggaaaatctc ctcagctcct ggtctataat 1260
gtaaaaacct tagcagatgg tgtgccatca aggttcagtg gcagtggatc aggaacacaa 1320
tattctctca agatcaacag cctgcagcct gaagatcttg ggagttatta ctgtcaacat 1380
ttttggagta gtccgtggac gttcgggtgga ggcaccaagc tggaaatcaa acgg 1434

```

```

<210> 14
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<223> PCR primer oligonucleotide

```

```

<400> 14
ttttttaagc ttacaggtcc agctgcagga gtca 34

```

```

<210> 15
<211> 34

```

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> PCR primer oligonucleotide

 <400> 15
 ttttttgcg cgcgccggtt tatttccaac ttg 34

 <210> 16
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> PCR primer oligonucleotide

 <400> 16
 ttttttaagc ttacaggtcc agctgcagca gtct 34

 <210> 17
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> PCR primer oligonucleotide

 <400> 17
 ttttttgcg cgcgccggtt gatttccagc ttgg 34

 <210> 18
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> PCR primer oligonucleotide

 <400> 18
 atgaactggt accagcagaa g 21

 <210> 19
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> Linker oligonucleotide

 <400> 19
 agggaccacg gtcaccgtct cctcaggtgg aggcggttca caaattgttc tcaccagtc 60
 tccag 65

 <210> 20
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> Linker oligonucleotide

 <400> 20
 ctggagactg ggtgagaaca atttgtgaac cgctccacc tgaggagacg gtgaccgtgg 60

tccct 65
 <210> 21
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> Linker oligonucleotide
 <400> 21
 aggcaccact ctcacagtct cctcaggtgg aggcggttca gacatccaga tgaccagtc 60
 tccag 65
 <210> 22
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> Linker oligonucleotide
 <400> 22
 ctggagactg ggatcatctgg atgtctgaac cgctccacc tgaggagact gtgagagtgg 60
 tgcct 65
 <210> 23
 <211> 95
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> Linker oligonucleotide
 <400> 23
 ggggacaaag ttgaaaataa accggggtgg aggcggttca ggcggaggtg gctctggcgg 60
 tggcgatcg caggtccagc tgcagcagtc tgggg 95
 <210> 24
 <211> 95
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> Linker oligonucleotide
 <400> 24
 cccagactg ctgcagctgg acctgcgac cgccaccgcc agagccacct ccgcctgaac 60
 cgctccacc ccggtttatt tccaactttg tcccc 95
 <210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <223> Linker polypeptide
 <400> 25
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 26
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<223> Linker polypeptide

<400> 26
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15