(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년09월12일
(11) 등록번호 10-2705378
(24) 등록일자 2024년09월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01) *A61P 37/06* (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61P 11/06 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2021-7007520
(22) 출원일자(국제) 2019년09월11일
심사청구일자 2021년03월12일
(85) 번역문제출일자 2021년03월12일
(65) 공개번호 10-2021-0044262
(43) 공개일자 2021년04월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/050511
(87) 국제공개번호 WO 2020/055943
국제공개일자 2020년03월19일
(30) 우선권주장
62/731,204 2018년09월14일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20100178296 A1
US20100178296 A1

(73) 특허권자
일라이 릴리 앤드 캄파니
미국 46285 인디애나주 인디애나폴리스 릴리 코포레이트 센터
(72) 발명자
데마레스트, 스티븐 존
미국 46206-6288 인디애나주 인디애나폴리스 피. 오. 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내
코에스터, 안야
미국 46206-6288 인디애나주 인디애나폴리스 피. 오. 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장덕순, 김영

전체 청구항 수 : 총 29 항 심사관 : 김윤선

(54) 발명의 명칭 **CD200R 효능제 항체 및 그의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 항-인간 CD200R 효능제 항체, 및 아토피성 피부염, 만성 자발성 두드러기, 알러지, 천식, 피부경화증, IBD, SLE, MS, RA, GvHD, 또는 건선과 같은 질환의 치료를 위한 그의 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류
A61P 17/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2023.02)
A61P 37/06 (2018.01)
A61P 37/08 (2018.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/72 (2013.01)
C07K 2317/75 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자
메타, 파얄
미국 46206-6288 인디애나주 인디애나폴리스 피. 오. 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내
포터, 스콧 찰스
미국 46206-6288 인디애나주 인디애나폴리스 피. 오. 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내
루이즈, 다이애나 이사벨
미국 46206-6288 인디애나주 인디애나폴리스 피. 오. 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내
위처, 데릭 라이언
미국 46206-6288 인디애나주 인디애나폴리스 피. 오. 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내
우, 시우펭
미국 46206-6288 인디애나주 인디애나폴리스 피. 오. 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

중쇄 가변 영역 (HCVR) 및 경쇄 가변 영역 (LCVR)을 포함하는, 인간 CD200R에 결합하는 항체이며,

HCVR은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고,

LCVR은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고,

HCDR1의 아미노산 서열은 서열식별번호: 1에 제시되고,

HCDR2의 아미노산 서열은 서열식별번호: 2에 제시되고,

HCDR3의 아미노산 서열은 서열식별번호: 3에 제시되고,

LCDR1의 아미노산 서열은 서열식별번호: 4에 제시되고,

LCDR2의 아미노산 서열은 서열식별번호: 5에 제시되고,

LCDR3의 아미노산 서열은 서열식별번호: 6에 제시되는 것인

항체.

청구항 2

제1항에 있어서, HCVR 및 LCVR을 포함하고,

HCVR의 아미노산 서열이 서열식별번호: 7에 제시되고,

LCVR의 아미노산 서열이 서열식별번호: 8에 제시되는 것인

항체.

청구항 3

제2항에 있어서, 서열식별번호: 7의 위치 1에서 Xaa가 글루타민인 항체.

청구항 4

제2항에 있어서, 서열식별번호: 7의 위치 1에서 Xaa가 피로글루탐산인 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, IgG4P인 항체.

청구항 6

제5항에 있어서, 유의한 시토카인 방출을 초래하지 않는 것인 항체.

청구항 7

제5항에 있어서, CD200R 효능제 항체인 항체.

청구항 8

제5항에 있어서, Fcγ RI, Fcγ RIIA_131H, Fcγ RIIA_131R, Fcγ RIIb 및 Fcγ RIIIA_158V 중 적어도 1개에 결합하는 항체.

청구항 9

제5항에 있어서, Fcγ RI, Fcγ RIIA_131H, Fcγ RIIA_131R, Fcγ RIIb 및 Fcγ RIIIA_158V 중 적어도 2개에 결합하는 항체.

청구항 10

제5항에 있어서, Fcγ RI, Fcγ RIIA_131H, Fcγ RIIA_131R, Fcγ RIIb 및 Fcγ RIIIA_158V 중 적어도 3개에 결합하는 항체.

청구항 11

제5항에 있어서, Fcγ RI, Fcγ RIIA_131H, Fcγ RIIA_131R, Fcγ RIIb 및 Fcγ RIIIA_158V 중 적어도 4개에 결합하는 항체.

청구항 12

제8항에 있어서,

(a) 하기 결합 친화도를 갖고,

(i) Fcγ RI에 대해 70 pM 내지 500 pM;

(ii) Fcγ RIIA_131H에 대해 2 μM 내지 5 μM;

(iii) Fcγ RIIA_131R에 대해 1 μM 내지 5 μM;

(iv) Fcγ RIIb에 대해 1 μM 내지 4 μM; 및

(v) Fcγ RIIIA_158V에 대해 1 μM 내지 6 μM;

(b) Fcγ RIIIA_158F에 대해 9 μM 초과의 결합 친화도로 Fcγ RIIIA_158F에 추가로 결합하는 항체.

청구항 13

제8항에 있어서,

(a) 하기 결합 친화도를 갖고,

(i) Fcγ RI에 대해 400 pM;

(ii) Fcγ RIIA_131H에 대해 4 μM;

(iii) Fcγ RIIA_131R에 대해 2 μM;

(iv) Fcγ RIIb에 대해 2 μM; 및

(v) Fcγ RIIIA_158V에 대해 4 μM;

(b) Fcγ RIIIA_158F에 대해 10 μM 초과의 결합 친화도로 Fcγ RIIIA_158F에 추가로 결합하는 항체.

청구항 14

제12항에 있어서, 결합 친화도가 25℃에서 표면 플라즈몬 공명에 의해 결정되는 것인 항체.

청구항 15

제5항에 있어서, C1q에 결합하지 않는 항체.

청구항 16

제15항에 있어서, C1q와의 결합이 ELISA에 의해 결정되는 것인 항체.

청구항 17

제1항에 있어서, 중쇄 (HC) 및 경쇄 (LC)를 포함하고,

HC의 아미노산 서열이 서열식별번호: 9에 제시되고,

LC의 아미노산 서열이 서열식별번호: 10에 제시되는 것인

항체.

청구항 18

제17항에 있어서,

서열식별번호: 9의 위치 1에서 Xaa가 글루타민이고,

서열식별번호: 9의 위치 446에서 Xaa가 글리신인

항체.

청구항 19

제17항에 있어서,

서열식별번호: 9의 위치 1에서 Xaa가 피로글루탐산이고,

서열식별번호: 9의 위치 446에서 Xaa가 글리신인

항체.

청구항 20

제17항에 있어서,

서열식별번호: 9의 위치 1에서 Xaa가 글루타민이고,

서열식별번호: 9의 위치 446에서 Xaa가 부재하는 것인

항체.

청구항 21

제17항에 있어서,

서열식별번호: 9의 위치 1에서 Xaa가 피로글루탐산이고,

서열식별번호: 9의 위치 446에서 Xaa가 부재하는 것인

항체.

청구항 22

중쇄 가변 영역 (HCVR) 및 경쇄 가변 영역 (LCVR)을 포함하는 CD200R 효능제 항체이며, 상기 항체는 IgG4P이고,

HCVR은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고,

LCVR은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고,

HCDR1의 아미노산 서열은 서열식별번호: 1에 제시되고,

HCDR2의 아미노산 서열은 서열식별번호: 2에 제시되고,

HCDR3의 아미노산 서열은 서열식별번호: 3에 제시되고,

LCDR1의 아미노산 서열은 서열식별번호: 4에 제시되고,

LCDR2의 아미노산 서열은 서열식별번호: 5에 제시되고,

LCDR3의 아미노산 서열은 서열식별번호: 6에 제시되고,

Fcɣ RI, Fcɣ RIIA_131H, Fcɣ RIIA_131R, Fcɣ RIIb, Fcɣ RIIIA_158V, Fcɣ RIIIA_158F, 또는 C1q에 대한 결합이, 상기 CD200R 효능제 항체와 동일한 CDR을 갖는 야생형 IgG1 항체와 비교하여 유의한 시토카인 방출을 초래하지 않는 것인 항체.

청구항 23

제22항에 있어서, Fcɣ RIIIA_158F 또는 C1q에 결합하지 않는 항체.

청구항 24

유효량의 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는, 질환을 가진 환자를 치료하기 위한 제약 조성물이며, 질환이 만성 자발성 두드러기 (CSU), 셀리악 질환, 알러지, 만성 알러지 질환, 음식 알러지, 알러지성 접촉성 피부염, 계절성 알러지, 건초열, 알러지성 비염, 아나필락시스 치료 및 예방, 호산구성 식도염, 대식세포 활성화 증후군 (MAS), 천식, 피부경화증, 수포창, 수포성 유천포창, 과민성 대장 질환 (IBD), 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 다발성 경화증 (MS), 류마티스성 관절염 (RA), 이식편 대 숙주 질환 (GvHD), 건선, 비만세포증, 염증성 피부 질환, 자가면역 수포 질환, 자가면역 간염, 원발성 경화성 담관염, 원발성 담즙성 간경변, 특발성 폐섬유증, 중증 근무력증, 맥관염, 근염, 또는 아토피성 피부염인 제약 조성물.

청구항 25

아미노산 서열이 서열식별번호: 9에 제시된 HC를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는

아미노산 서열이 서열식별번호: 10에 제시된 LC를 코딩하는 폴리뉴클레오티드

를 포함하는 DNA 분자.

청구항 26

제25항에 있어서,

HC를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 서열이 서열식별번호: 12에 제시되거나, 또는

LC를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 서열이 서열식별번호: 13에 제시되는 것인

DNA 분자.

청구항 27

제25항에 있어서,

1) 아미노산 서열이 서열식별번호: 9에 제시된 HC를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및

2) 아미노산 서열이 서열식별번호: 10에 제시된 LC를 코딩하는 폴리뉴클레오티드

를 포함하는 DNA 분자.

청구항 28

제27항에 있어서,

HC를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 서열이 서열식별번호: 12에 제시되고,

LC를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 서열이 서열식별번호: 13에 제시되는 것인

DNA 분자.

청구항 29

제28항의 DNA 분자로 형질전환된 시험관내 포유동물 세포이며, 형질전환된 포유동물 세포가 2개의 HC 및 2개 LC를 포함하는 항체를 발현할 수 있고,

각각의 HC의 아미노산 서열이 서열식별번호: 9에 제시되고,

각각의 LC의 아미노산 서열이 서열식별번호: 10에 제시되는 것인

세포.

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 의약 분야에 관한 것이다. 더욱 특히, 본 발명은 CD200 수용체 (CD200R)에 대한 효능작용 항체, 이러한 CD200R 효능작용 항체를 포함하는 조성물, 및 자가면역 질환, 알러지 질환, 천식, 또는 다른 염증 장애와 같은 장애의 치료를 위해 이러한 CD200R 효능작용 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 면역 체크포인트 경로는 자가면역 반응 및 항암 면역 반응 둘 다를 조절할 수 있다. 자가면역 질환 요법에서는, 면역 반응이 억제되도록, 면역-억제 경로의 효과를 촉진시키는, 즉, 효능화시키는 것이 바람직하다. 반대로, 암 요법에서는, 면역 반응이 활성화되도록 (자극되도록), 면역-억제 경로의 효과를 억제하는, 즉, 길항시키는 것이 바람직하다.

[0003] CD200R은 Ig 수퍼패밀리 구성원이며, 면역 세포 활성화를 부정적으로 조절하는 체크포인트 수용체의 패밀리의 일부이다. CD200R 경로의 활성화는 감소된 세포 기능, 예컨대 감소된 세포 증식 및 염증 시토카인 억제를 유도

한다. CD200R은 선천성 시스템의 세포, 구체적으로 단핵구 계통, 예컨대 대식세포, 비만 세포, 수지상 세포, 뿐만 아니라 활성화된 T 세포 하위 세트, 예컨대 T 기억 세포의 표면 상에서 주로 발현된다. CD200R에 대한 천연 리간드는 림프구를 비롯한 다중 세포 유형에서 더욱 광범위하게 발현되는 CD200이다. CD200R 및 CD200 녹아웃 마우스는 정상 표현형을 갖지만, 자가면역 질환을 더 많이 유도하는 경향이 있다 (예를 들어, [Simelyte et al., Clin Exp Immunol. 162:163-8 (2010)] 참고). 반대로, 마우스에서 CD200 과발현은 동종이계 이식 및 DSS-유도된 대장염에 대한 내성을 제공한다 (Chen et al., PLoS One. 2016;11(2):e0146681. doi:10.1371/journal.pone.0146681).

[0004] 따라서, CD200R 매개된 신호전달의 증가는, 현행 면역조절 요법에 비해 주요 안전성 이점과 함께 현저한 질환 변형 및 반응 지속성을 유도할 수 있는, 자가면역 장애를 관리하기 위한 잠재적인 접근법을 구성한다. 예를 들어, CD200R은 분화되고 조직에 존재하는 세포, 예컨대 대식세포, 비만 세포, 수지상 세포, 및 선천성 림프 세포에서 고도로 발현된다. 이들 세포 유형은 아토피성 피부염과 같은 질환의 병인에 기여하고, 따라서 CD200R 효능제 항체는 아토피성 피부염과 같은 질환에서 이들 세포의 활성을 약화시킬 수 있다.

[0005] 상기 분야는 치료적으로 유효하고 안전한 CD200R 효능작용 항체를 전달하기 위해 노력하였다. 적어도 부분적으로 어려운 점은 생리학적 상황에서 최소한의 안전성 문제와 함께 (예를 들어 시토카인 방출의 유도없이) CD200R 효능작용을 달성하기 위해 필요한 복잡한 세포 상호작용의 결과인 것으로 생각된다.

[0006] 미국 특허 8,212,008은 CD200R 항체, 예컨대 Dx182를 개시한다. Dx182는 CD200R을 효능화시키고 CD200과 CD200R의 결합을 차단하는 인간화 IgG1 항체이다. 그러나, Dx182는 또한 뮤린 비만 세포에서 발현되는 시노몰구스 원숭이 CD200RLa (시노몰구스 원숭이 활성화 형태)에 결합하여 그를 활성화시키고, 이에 따라 시노몰구스 CD200RLa를 통해 이들 세포에서 비만 세포 탈과립화 반응을 유도한다. WO 2015/057906은 또한 CD200R 효능제 항체, 예컨대 H2RM147을 개시한다. H2RM147은 인간 CD200R1에 결합하기 위해 인간 CD200과 경쟁할 가능성이 있다.

[0007] 따라서, 1) 최적의 효능제 활성을 위해 바람직한 회합 및 해리 속도로 인간 CD200R과 결합하고, 2) 면역억제성 반응 및 생체내 효능을 달성하기 위해 인간 CD200R을 효능화시키고, 3) 자가면역 장애, 알러지 질환, 천식, 또는 다른 염증 장애와 같은 장애의 치료 및/또는 예방을 위한 단일요법으로서 충분한 효능을 나타내고, 4) 유의한 시토카인 방출을 초래하지 않고, 5) 인간 CD200 및 인간 CD200R의 결합을 차단하지 않고, 6) CD200RLa와 결합하지 않거나 또는 CD200RLa와 낮은 친화도로 결합하고/거나, 7) 낮은 면역원성 (즉, 시노몰구스 원숭이 및/또는 인간에서 충분히 비면역원성임) 및 생체내 안정성, 물리적 및 화학적 안정성, 예컨대 비제한적으로, 열 안정성, 가용성, 낮은 자가-회합, 및 자가면역 장애, 알러지 질환, 천식, 또는 다른 염증 장애의 치료에서 개발 및/또는 사용을 위해 허용가능한 약동학적 특징을 입증하는 대안적인 CD200R 항체가 요구되고 있다.

발명의 내용

[0008] 따라서, 본 발명은 신규한 항-인간 CD200R 효능제 항체를 제공한다. 본 발명의 항체는 적어도 하기 성질의 측면에서 선행 기술의 CD200R 효능제 항체에 비해 특히 유리하다: 1) 바람직한 회합 및 해리 속도, 2) 면역억제성 반응 및 생체내 효능을 달성하도록 하는 인간 CD200R의 효능작용, 3) 자가면역 장애, 알러지 질환, 천식, 또는 다른 염증 장애의 치료 및/또는 예방을 위한 단일요법으로서 충분히 효능성임, 4) 유의한 시토카인 방출 없음, 5) 인간 CD200과 인간 CD200R의 결합을 차단하지 않고, 선행 기술의 항체와 비교하여 상이한 에피토프에 결합함, 6) 시노 CD200RLa와 결합하지 않거나, 또는 인간 CD200R과의 결합과 비교하여 낮은 친화도로 결합함, 및/또는 7) 낮은 면역원성 (즉, 시노몰구스 원숭이 및/또는 인간에서 충분히 비면역원성임) 및 생체내 안정성, 물리적 및 화학적 안정성, 예컨대 비제한적으로, 열 안정성, 가용성, 낮은 자가-회합, 및 자가면역 장애, 알러지 질환, 천식, 또는 다른 염증 장애의 치료에서 개발 및/또는 사용을 위해 허용가능한 약동학적 특징.

[0009] 본 발명은 유의하게 조작된 항-인간 CD200R 효능제 항체를 사용하는 면역 체크포인트 자극을 통해, 자가면역 및/또는 면역 내성 관련 장애, 알러지 질환, 천식, 또는 다른 염증 장애의 예방, 하향조절 또는 개선에 유용한 조성물 및 방법을 제공함으로써 선행 기술에 비한 진보를 제공한다. 본 발명의 항-인간 CD200R 효능제 항체는 바람직하게는 면역 반응의 선천성 부문의 억제, 항원 특이적 면역 과정의 폐지를 통해 면역 병리학을 개선시키거나 또는 면역 항상성을 복구시킬 수 있고, 이에 따라 기저 질환 병리학을 직접적으로 다룰 수 있다. 이러한 항체의 사용은 임상적으로 치료할 질환(들)의 장기적인 지속성을 유도할 수 있다.

[0010] 따라서, 본 발명은 중쇄 가변 영역 (HCVR) 및 경쇄 가변 영역 (LCVR)을 포함하는 인간 CD200R에 결합하는 항체 (서열식별번호(SEQ ID NO): 15)를 제공하며, HCVR은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, LCVR은 LCDR1, LCDR2

및 LCDR3을 포함하고, HCDR1의 아미노산 서열은 서열식별번호: 1에 제시되고, HCDR2의 아미노산 서열은 서열식별번호: 2에 제시되고, HCDR3의 아미노산 서열은 서열식별번호: 3에 제시되고, LCDR1의 아미노산 서열은 서열식별번호: 4에 제시되고, LCDR2의 아미노산 서열은 서열식별번호: 5에 제시되고, LCDR3의 아미노산 서열은 서열식별번호: 6에 제시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 한 실시양태에서, 본 발명은 HCVR 및 LCVR을 포함하는, 인간 CD200R에 결합하는 항체를 제공하며, HCVR의 아미노산 서열은 서열식별번호: 7에 제시되고, LCVR의 아미노산 서열은 서열식별번호: 8에 제시된다. 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 7의 위치 1에서 Xaa는 글루타민이다. 다른 실시양태에서, 서열식별번호: 7의 위치 1에서 Xaa는 피로글루탐산이다.

[0012] 한 실시양태에서, 본 발명은 중쇄 (HC) 및 경쇄 (LC)를 포함하는, 인간 CD200R에 결합하는 항체를 제공하며, HC의 아미노산 서열은 서열식별번호: 9에 제시되고, LC의 아미노산 서열은 서열식별번호: 10에 제시된다. 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 9의 위치 1에서 Xaa는 글루타민이다. 다른 실시양태에서, 서열식별번호: 9의 위치 1에서 Xaa는 피로글루탐산이다. 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 9의 위치 446에서 Xaa는 글리신이다. 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 9의 위치 446에서 Xaa는 부재한다. 특정 실시양태에서, 서열식별번호: 9의 위치 1에서 Xaa는 글루타민이고, 서열식별번호: 9의 위치 446에서 Xaa는 글리신이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 서열식별번호: 9의 위치 1에서 Xaa는 피로글루탐산이고, 서열식별번호: 9의 위치 446에서 Xaa는 글리신이다. 특정 실시양태에서, 서열식별번호: 9의 위치 1에서 Xaa는 글루타민이고, 서열식별번호: 9의 위치 446에서 Xaa는 부재한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 서열식별번호: 9의 위치 1에서 Xaa는 피로글루탐산이고, 서열식별번호: 9의 위치 446에서 Xaa는 부재한다.

[0013] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 유의한 시토카인 방출을 초래하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 CD200R 효능제 항체이다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 유의한 시토카인 방출을 초래하지 않고, 항체는 CD200R 효능제 항체이다. 이러한 일부 실시양태에서, 항체는 IgG4 아형, 바람직하게는 IgG4P이다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 인간 및 시노몰구스 원숭이 CD200R과 결합한다.

[0014] 본 개시내용은 또한 1) 서열식별번호: 1의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 2) 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하는 LCVR을 포함하는, 항-인간 CD200R 항체를 발현할 수 있는 포유동물 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 1) 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 HCVR; 및 2) 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 LCVR을 포함하는, 항-인간 CD200R 항체를 발현할 수 있는 포유동물 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 1) 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 갖는 중쇄; 및 2) 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하는, CD200R 항체를 발현할 수 있는 포유동물 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 CD200R 항체가 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 각각 갖는 2개의 중쇄, 및 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 각각 갖는 2개의 경쇄로 이루어짐을 제공한다.

[0015] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 유의한 시토카인 방출을 초래하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 CD200R 효능제 항체이다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 유의한 시토카인 방출을 초래하지 않고, 항체는 CD200R 효능제 항체이다. 이러한 일부 실시양태에서, 항체는 IgG4 아형, 바람직하게는 IgG4P이다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 인간 및 시노몰구스 원숭이 CD200R과 결합한다.

[0016] 본 개시내용은 또한 a) 항체를 발현할 수 있는 포유동물 세포를 배양하는 것 - 여기서 항체는 1) 서열식별번호: 1의 아미노산 서열을 갖는 HCDR1, 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 HCDR2, 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 갖는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 2) 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 갖는 LCDR1, 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 갖는 LCDR2, 및 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 갖는 LCDR3을 포함하는 LCVR을 포함함; 및 b) 항체를 회수하는 것을 포함하는, 항-인간 CD200R 항체를 생성하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 a) 항체를 발현할 수 있는 포유동물 세포를 배양하는 것 - 여기서 항체는 1) 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 갖는 HCVR; 및 2) 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 갖는 LCVR을 포함함; 및 b) 항체를 회수하는 것을 포함하는, CD200R 항체를 생성하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 a) 항체를 발현할 수 있는 포유동물 세포를 배양하는 것 - 여기서 항체는 1) 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 갖는 중쇄; 및 2) 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함함; 및 b) 항체를 회수하는 것을 포함하는, 항-인간 CD200R 항체를 생성하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 a) 항체를 발현할 수 있는 포

유동물 세포를 배양하는 것 - 여기서 항체는 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 갖는 2개의 중쇄 및 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 2개의 경쇄로 이루어짐; 및 b) 항체를 회수하는 것을 포함하는, 항-인간 CD200R 항체를 생성하는 방법을 제공한다.

[0017] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 유의한 시토카인 방출을 초래하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 CD200R 효능제 항체이다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 유의한 시토카인 방출을 초래하지 않고, 항체는 CD200R 효능제 항체이다. 이러한 일부 실시양태에서, 항체는 IgG4 아형, 바람직하게는 IgG4P이다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 인간 및 시노몰구스 원숭이 CD200R과 결합한다.

[0018] 본 개시내용은 또한 상기 언급된 방법에 의해 생성된 CD200R 항체를 제공한다. 본 개시내용은 또한 상기 언급된 방법에 의해 생성된 CD200R 항체, 및 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0019] 본 개시내용은 또한 서열식별번호: 12의 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 DNA 분자를 제공한다. 본 개시내용은 또한 서열식별번호: 13의 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 DNA 분자를 제공한다. 본 개시내용은 또한 서열식별번호: 12 및 서열식별번호: 13의 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 DNA 분자를 제공한다. 본 개시내용은 또한 아미노산 서열이 서열식별번호: 9의 서열인 항체 HC를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 DNA 분자를 제공한다. 한 실시양태에서, 항체 HC를 코딩하는 DNA 분자는 서열식별번호: 12에 제시된다. 본 개시내용은 또한 아미노산 서열이 서열식별번호: 10의 서열인 항체 LC를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 DNA 분자를 제공한다. 한 실시양태에서, 항체 LC를 코딩하는 DNA 분자는 서열식별번호: 13에 제시된다.

[0020] 본 개시내용은 또한 서열식별번호: 12의 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 DNA 분자를 포함하는 포유동물 세포를 제공한다. 본 개시내용은 또한 서열식별번호: 13의 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 DNA 분자를 포함하는 포유동물 세포를 제공한다. 본 개시내용은 또한 서열식별번호: 12 및 서열식별번호: 13의 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 DNA 분자를 포함하는 포유동물 세포를 제공한다.

[0021] 본 발명은 또한 본 발명의 항체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명은 또한 질환의 치료가 필요한 환자에게 본 발명의 항체의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 질환을 가진 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 질환은 자가면역 질환, 알러지 질환, 천식, 또는 다른 염증 장애이다.

[0023] 본 발명은 또한 요법에서 사용하기 위한 본 발명의 항체를 제공한다.

[0024] 본 발명은 또한 질환의 치료에서 사용하기 위한 본 발명의 항체를 제공하며, 질환은 자가면역 질환, 알러지 질환, 천식, 또는 다른 염증 장애이다.

[0025] 본 발명은 또한 질환의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본 발명의 항체의 용도를 제공하며, 질환은 자가면역 질환, 알러지 질환, 천식, 또는 다른 염증 장애이다.

[0026] 한 실시양태에서, 질환은 자가면역 질환이다. 또 다른 실시양태에서, 질환은 알러지 질환이다. 또 다른 실시양태에서, 질환은 천식이다. 일부 실시양태에서, 질환은 만성 특발성 두드러기 (본원에서 만성 자발성 두드러기 (CSU)로도 지칭됨), 셀리악 질환 (예컨대, 비제한적으로, 불응성 셀리악 질환 유형 II), 알러지, 만성 알러지 질환, 음식 알러지, 호산구성 식도염, 대식세포 활성화 증후군 (MAS), 천식, 피부경화증, 수포창, 과민성 대장 질환 (IBD), 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 다발성 경화증 (MS), 류마티스성 관절염 (RA), 이식편 대 숙주 질환 (GvHD), 건선, 비만세포증, 염증성 피부 질환, 또는 아토피성 피부염이다. 다른 실시양태에서, 질환은 알러지성 접촉성 피부염, 계절성 알러지, 아나필락시스 치료 및 예방, 수포성 유천포창 및 다른 자가면역 수포 질환, 자가면역 간염, 원발성 경화성 담관염, 원발성 담즙성 간경변, 특발성 폐 섬유증, 중증 근무력증, 맥관염, 및 근염이다. 특정 실시양태에서, 만성 알러지 질환은 건초열 또는 알러지성 비염이다. 바람직한 실시양태에서, 질환은 아토피성 피부염이다.

[0027] 본 발명은 인간 CD200R에 결합하는 항체를 제공하며, 항체는 CD200R 효능제 항체이고, 항체는 유의한 시토카인 방출을 초래하지 않는다. 한 실시양태에서, 항체는 CD200R 효능작용, 및 CD200R 효능작용과 유사한 유의한 시토카인 방출의 결여, 및 항체 I-4P에 의해 입증되는 유의한 시토카인 방출의 결여를 입증한다. 한 실시양태에서, CD200R 효능제 항체는 야생형 (Fc 부분에서 돌연변이가 없음) IgG1 항체 (유의한 시토카인 방출, 특히 IFN-γ의 방출을 초래함)와 비교하여 유의한 시토카인 방출을 초래하지 않는다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 CD200R 효능제 항체를 제공하며, 항체는 CD200R 효능제 항체와 동일한 CDR을 갖는 야생형 IgG1 항체와 비교하여

유의한 시토카인 방출을 초래하지 않는다. 한 실시양태에서, 유의한 시토카인 방출은, 항체와 함께 인큐베이션한 혈액 샘플에 존재하는 시토카인의 양 및 항체와 함께 인큐베이션하지 않은 혈액 샘플에 존재하는 시토카인의 양을 비교하고, 항체와 함께 인큐베이션한 혈액 샘플에 존재하는 시토카인의 양이 항체가 없는 혈액 샘플에 존재하는 시토카인의 양보다 적어도 3배 더 높은 경우에 유의한 시토카인 방출의 존재를 결정함으로써 검출된다.

[0028] 한 실시양태에서, 항체는 HCVR 및 LCVR을 포함하고, HCVR은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, LCVR은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고, HCDR1의 아미노산 서열은 서열식별번호: 1에 제시되고, HCDR2의 아미노산 서열은 서열식별번호: 2에 제시되고, HCDR3의 아미노산 서열은 서열식별번호: 3에 제시되고, LCDR1의 아미노산 서열은 서열식별번호: 4에 제시되고, LCDR2의 아미노산 서열은 서열식별번호: 5에 제시되고, LCDR3의 아미노산 서열은 서열식별번호: 6에 제시된다. 한 실시양태에서, 항체는 HCVR 및 LCVR을 포함하고, HCVR의 아미노산 서열은 서열식별번호: 7에 제시되고, LCVR의 아미노산 서열은 서열식별번호: 8에 제시된다.

[0029] 본 발명은 Fcγ RI, Fcγ RIIA_131H, Fcγ RIIA_131R, Fcγ RIIb, 및 Fcγ RIIIA_158V 중 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 또는 모두와 결합하는 본 발명의 항체를 제공한다.

[0030] 한 실시양태에서, 항체는 Fcγ RI와 약 70 pM 내지 약 500 pM의 결합 친화도로 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 Fcγ RIIA_131H와 약 2 μM 내지 약 5 μM의 결합 친화도로 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 Fcγ RIIA_131R과 약 1 μM 내지 약 5 μM의 결합 친화도로 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 Fcγ RIIb와 약 1 μM 내지 약 4 μM의 결합 친화도로 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 Fcγ RIIIA_158V와 약 1 μM 내지 약 6 μM의 결합 친화도로 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 추가로 Fcγ RIIIA_158F와 9 μM 초과의 결합 친화도로 결합한다.

[0031] 한 실시양태에서, 수용체에 대한 항체의 결합 친화도는 Fcγ RI에 대해 약 70 pM 내지 약 500 pM, Fcγ RIIA_131H에 대해 약 2 μM 내지 약 5 μM, Fcγ RIIA_131R에 대해 약 1 μM 내지 약 5 μM, Fcγ RIIb에 대해 약 1 μM 내지 약 4 μM, Fcγ RIIIA_158V에 대해 약 1 μM 내지 약 6 μM, 및 Fcγ RIIIA_158F에 대해 9 μM 초과이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 수용체에 대한 항체의 결합 친화도는 Fcγ RI에 대해 약 400 pM, Fcγ RIIA_131H에 대해 약 4 μM, Fcγ RIIA_131R에 대해 약 2 μM, Fcγ RIIb에 대해 약 2 μM, Fcγ RIIIA_158V에 대해 약 4 μM, 및 Fcγ RIIIA_158F에 대해 10 μM 초과이다. 추가의 실시양태에서, 항체는 C1q와 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 결합 친화도는 25℃에서 표면 플라즈몬 공명에 의해 결정된다. 다른 실시양태에서, C1q와의 결합은 ELISA에 의해 결정된다.

[0032] 본원에서 사용된 바와 같이, "CD200R"은 CD200 수용체를 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "hCD200R" 또는 "인간 CD200R"은 야생형 인간 CD200R, 바람직하게는 서열식별번호: 15에 제시된 아미노산 서열을 갖는 야생형 인간 CD200R을 지칭한다.

[0033] 용어 "시노", "시노몰구스" 또는 "시노몰구스 원숭이"는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 달리 명시되지 않는다면, CD200R 폴리펩티드와 관련하여 사용될 때, 상기 용어는 야생형 시노몰구스 원숭이 CD200R, 바람직하게는 서열식별번호: 16에 제시된 아미노산 서열을 갖는 야생형 시노몰구스 원숭이 CD200R을 지칭하는 것으로 의도된다. 용어 "CD200RLa" 또는 "활성화 형태"는 서열식별번호: 17에 제시된 아미노산 서열을 갖는 시노몰구스 원숭이 CD200R을 지칭한다. CD200RLa는 인간 CD200R과 밀접한 동족체이지만, 반대의 (활성화) 활성을 갖는다. 따라서, 바람직한 CD200R 효능제 항체는 CD200R에 결합하는 항체와 비교하여 유의하게 감소된 친화도로 CD200RLa와 결합한다.

[0034] 본원에서 사용된 바와 같이, "인간 CD200R 효능제 항체" 또는 "항-인간 CD200R 효능제 항체"는 인간 CD200R에 결합하는 항체를 지칭하고, 시험관내 또는 생체내 투여될 때 면역억제성 반응, 예컨대 적어도 하나의 유의하게 감소된 원하는 활성, 예컨대 IL-8 생성의 원하는 감소를 달성한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "생성" 및 "분비"는 시토카인과 관련하여 상호교환적으로 사용된다.

[0035] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 중쇄 및 경쇄가 디술피드 결합에 의해 상호 연결되도록 2개의 중쇄 (HC) 및 2개의 경쇄 (LC)를 갖는 조작된 비-천연 발생 폴리펩티드 복합체를 지칭하며, 항체는 IgG 이소타입 항체이다. 각각의 중쇄는 N-말단 HCVR 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 각각의 경쇄는 N-말단 LCVR 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 특정한 생물학적 시스템에서 발현되는 경우, 항체는 Fc 영역에서 글리코실화된다. 전형적으로, 글리코실화는 고도로 보존된 N-글리코실화 부위에서 항체의 Fc 영역에서 발생한다. N-글리칸은 전형적으로 아스파라긴에 부착한다. 항체는 다른 위치에서도 글리코실화될 수 있다.

[0036] 본 발명의 항체는 IgG1 또는 IgG4 항체일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 항체는 IgG4 항체이다. IgG4 항

체는 HC 내에 S228P 돌연변이를 가질 수 있고 (즉, IgG4P), 이는 인간 IgG4 하위 부류에서 공통적인 절반-항체 형성을 제거하는 것으로 공지되어 있다.

[0037] 중쇄의 불변 영역은 CH1, CH2 및 CH3 도메인을 함유한다. CH1은 HCVR 뒤에 있고; CH1 및 HCVR은 항원(들)과 결합하는 항체의 부분인 항원-결합 (Fab) 단편의 중쇄 부분을 형성한다. CH2는 힌지 영역 뒤에 및 CH3 앞에 있다. CH3은 CH2 뒤에 있고, 중쇄의 카르복시-말단에 있다. 경쇄의 불변 영역은 1개의 도메인, CL을 함유한다. CL은 LCVR 뒤에 있고; CL 및 LCVR은 Fab의 경쇄 부분을 형성한다.

[0038] 본 발명의 항체의 HCVR 및 LCVR 영역은 프레임워크 영역 ("FR")으로 명명되는 더욱 보존된 영역들 사이에 배치된, 상보성 결정 영역 ("CDR")으로 명명되는 초가변 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 HCVR 및 LCVR은 아미노-말단에서 카르복시-말단으로 하기 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 여기서, 중쇄의 3개의 CDR은 "HCDR1, HCDR2 및 HCDR3"으로 지칭되고, 경쇄의 3개의 CDR은 "LCDR1, LCDR2 및 LCDR3"으로 지칭된다. CDR은 항원과 특이적인 상호작용을 형성하는 잔기의 대부분을 함유한다. 카바트(Kabat) CDR 정의 (Kabat, et al., Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991))는 항체 서열 가변성을 기반으로 한다. 코티아(Chothia) CDR 정의 (Chothia et al., "Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani et al., "Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997))는 항체의 삼차원 구조 및 CDR 루프의 위상 배치를 기반으로 한다. 코티아 CDR 정의는 HCDR1 및 HCDR2를 제외하고는 카바트 CDR 정의와 동일하다. 노쓰(North) CDR 정의 (North et al., "A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations", Journal of Molecular Biology, 406, 228-256 (2011))는 매우 수많은 결정 구조와의 친화도 전파 클러스터화를 기반으로 한다. 본 발명의 목적을 위해, 본 발명의 항체의 LCVR 및 HCVR 영역 내의 CDR 도메인에 대한 아미노산의 할당은 널리 공지된 카바트 넘버링 규칙 및 노쓰 넘버링 규칙을 기반으로 한다. 본 발명의 항체의 경쇄 CDR의 경우, 노쓰 CDR 정의가 사용된다. 중쇄에서, HCDR1 및 HCDR3 둘 다 노쓰 정의를 사용한다. HCDR2는 노쓰 및 카바트 정의의 혼성을 사용한다. 노쓰 정의는 시작 N-말단 부위를 확인하기 위해 사용되는 반면에, 카바트는 마지막 위치를 정의하기 위해 사용된다.

[0039] 본 발명은 본 발명의 항체가 인간 또는 인간화 항체임을 고려한다. 모노클로날 항체의 맥락에서, 용어 "인간" 및 "인간화"는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다 (Weiner LJ, J. Immunother. 2006; 29: 1-9; Mallbris L, et al., J. Clin. Aesthet. Dermatol. 2016; 9: 13-15).

[0040] 본 발명의 DNA 분자는 본 발명의 항체에서 적어도 하나의 폴리펩티드 (예를 들어, 중쇄, 경쇄, 가변 중쇄, 및 가변 경쇄)의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 비-천연 발생 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA 분자이다.

[0041] HCVR 영역을 코딩하는 단리된 DNA는 HCVR-코딩 DNA를 중쇄 불변 영역을 코딩하는 또 다른 DNA 분자에 작동가능하게 연결시킴으로서 전장 중쇄 유전자로 전환될 수 있다. 인간 뿐만 아니라 다른 포유동물 중쇄 불변 영역 유전자의 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 이들 영역을 포함하는 DNA 단편이 예를 들어 표준 PCR 증폭에 의해 수득될 수 있다.

[0042] LCVR 영역을 코딩하는 단리된 DNA는 LCVR-코딩 DNA를 경쇄 불변 영역을 코딩하는 또 다른 DNA 분자에 작동가능하게 연결시킴으로써 전장 경쇄 유전자로 전환될 수 있다. 인간 뿐만 아니라 다른 포유동물 경쇄 불변 영역 유전자의 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 이들 영역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭에 의해 수득될 수 있다. 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 불변 영역일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 항체의 경우, 경쇄 불변 영역은 카파 불변 영역이다.

[0043] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 서열이 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결된 후에 숙주 세포에서 발현될 수 있다. 발현 벡터는 전형적으로 숙주 유기체에서 에피솜으로서 또는 숙주 염색체 DNA의 일체 부분으로서 복제가능하다. 일반적으로, 발현 벡터는 원하는 DNA 서열로 형질전환된 이들 세포의 검출을 허용하도록 선택 마커, 예를 들어 테트라시클린, 네오마이신, 및 디히드로폴레이트 리덕타제를 함유할 것이다.

[0044] 본 발명의 항체는 포유동물 세포에서 용이하게 생성될 수 있고, 그의 비제한적인 예에는 CHO, NSO, HEK293 또는 COS 세포가 포함된다. 숙주 세포는 관련 기술분야에 널리 공지된 기술을 사용하여 배양된다.

[0045] 관심 폴리뉴클레오티드 서열 (예를 들어, 항체 및 발현 조절 서열의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드)

을 함유하는 벡터는 세포 숙주의 유형에 따라 달라지는 널리 공지된 방법에 의해 숙주 세포로 전달될 수 있다.

[0046] 항체를 비롯하여 이로 제한되지 않는 단백질을 정제하기 위해 다양한 단백질 정제 방법을 이용할 수 있고, 이러한 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다.

[0047] 본 발명의 항체, 또는 그를 포함하는 제약 조성물은 비경구 경로에 의해 투여될 수 있고, 그의 비제한적인 예는 피하 투여 및 정맥내 투여이다. 본 발명의 항체는 제약상 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제와 함께 단일 또는 다중 용량으로 환자에게 투여될 수 있다. 본 발명의 제약 조성물은 관련 기술분야에 널리 공지된 방법에 의해 제조될 수 있고 (예를 들어, [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd ed. (2012), A. Loyd et al., Pharmaceutical Press]), 본원에 개시된 항체 및 1종 이상의 제약상 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함한다.

[0048] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "자가면역 질환" 또는 "자가면역 장애"는 상호교환적으로 사용되고, 자가-세포 및/또는 조직 또는 이식된 세포 및/또는 조직에 대해 부적절하거나 원치않는 면역 반응으로부터 발생하는 바람직하지 않은 상태를 지칭한다. 용어 "자가면역 질환" 또는 "자가면역 장애"는 이들이 체액성 또는 세포성 면역 반응에 의해 매개되는지 여부에 관계없이 이러한 상태를 포함하는 것으로 의도된다. "알러지" (또는 "알러지 질환")는 TH2 세포의 활성으로 인해 주로 발달하는 T 헬퍼 2 (TH2)-유도된 질환이다. 본원에 기재된 본 발명의 항체에 의해 치료되는 것으로 고려되는 예시적인 질환에는 만성 특발성 두드러기, 셀리악 질환 (예컨대, 비제한적으로, 불응성 셀리악 질환 유형 II), 알러지, 만성 알러지 질환 (예컨대 건초열 또는 알러지성 비염), 음식 알러지, 호산구성 식도염, MAS, 천식, 피부경화증, 및 또한 수포창, IBD, SLE, MS, RA, GvHD, 건선, 비만세포증, 염증성 피부 질환, 및 아토피성 피부염이 포함된다. 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 본 발명의 항체에 의해 치료되는 것으로 고려되는 질환에는 알러지성 접촉성 피부염, 계절성 알러지, 아나필락시스 치료 및 예방, 수포성 유천포창 및 다른 자가면역 수포 질환, 자가면역 간염, 원발성 경화성 담관염, 원발성 담즙성 간경변, 특발성 폐 섬유증, 중증 근무력증, 맥관염, 및 근염이 포함된다.

[0049] 용어 "만성 특발성 두드러기" 및 "만성 자발성 두드러기 (CSU)"는 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0050] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "선천성 면역"에는 적응성 부문의 면역 반응과는 대조적으로 적응성 면역 반응 (항체 및 T 세포 반응)을 개시하고 유지하기 위해 필요한 부문의 면역 반응이 포함된다.

[0051] 용어 "치료하는" (또는 "치료하다" 또는 "치료")은 기존 증상, 장애, 상태 또는 질환의 진행 또는 중증도를 지연, 중단, 정지, 완화, 중지, 감소 또는 역전시키는 것을 지칭한다.

[0052] "유효량"은 연구자, 의사 또는 다른 임상의가 찾고 있는 조직, 시스템, 동물, 포유동물 또는 인간의 생물학적 또는 의학적 반응 또는 그에 대해 원하는 치료 효과를 유도하는, 본 발명의 항-인간 CD200R 효능제 항체 또는 이러한 항체를 포함하는 제약 조성물의 양을 의미한다. 항체의 유효량은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 원하는 반응을 유도하는 항체의 능력과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 유효량은 또한 치료적으로 유익한 효과가 항체의 임의의 독성 또는 유해한 효과보다 더 큰 것이다. 이러한 이점에는 하기 중 임의의 하나 이상이 포함된다: 이식된 장기의 증가된 면역 내성; 안정화된 자가면역 질환 또는 장애; 또는 자가면역 장애의 징후 또는 증상의 개선 등. 유효량은 관련 기술분야의 기술자에 의해, 공지된 기술의 사용에 의해, 및 유사한 상황하에 수득된 결과를 관찰함으로써 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 항-인간 CD200R 효능제 항체의 유효량은 단일 용량으로 또는 다중 용량으로 투여될 수 있다. 추가로, 본 발명의 항체의 유효량은 1회 초과로 투여하지 않는 경우에 유효량보다 적은 양의 다중 용량으로 투여될 수 있다. 환자에 대한 유효량을 결정하는데 있어서, 수많은 인자들, 예컨대 비제한적으로 환자의 크기 (예를 들어, 체중 또는 질량), 체표면적, 연령, 및 전반적인 건강; 관련된 구체적인 질환 또는 장애; 질환 또는 장애의 정도 또는 관련성 또는 중증도; 개별 환자의 반응; 투여되는 특정 화합물; 투여 방식; 투여되는 제제의 생체이용률 특징; 선택된 용량 레지멘; 병용 의약의 사용; 및 의사에게 공지된 다른 관련 상황이 담당 의사에 의해 고려된다. 매주, 2 주마다, 매달 또는 분기마다 비경구 (예컨대, 비제한적으로, 피하, 근육내 및/또는 정맥내) 용량은 예를 들어 약 50 mg 내지 약 500 mg, 약 75 mg 내지 약 500 mg, 약 100 mg 내지 약 500 mg, 약 125 mg 내지 약 500 mg, 약 250 mg 내지 약 500 mg, 약 300 mg 내지 약 500 mg, 약 350 mg 내지 약 500 mg, 약 400 mg 내지 약 500 mg, 약 450 mg 내지 약 500 mg, 약 50 mg 내지 약 400 mg, 약 75 mg 내지 약 400 mg, 약 100 mg 내지 약 400 mg, 약 125 mg 내지 약 400 mg, 약 250 mg 내지 약 400 mg, 약 300 mg 내지 약 400 mg, 약 350 mg 내지 약 400 mg, 약 50 mg 내지 약 300 mg, 약 75 mg 내지 약 300 mg, 약 100 mg 내지 약 300 mg, 약 125 mg 내지 약 300 mg, 약 150 mg 내지 약 300 mg, 약 175 mg 내지 약 300 mg, 약 200 mg 내지 약 300 mg, 약 250 mg 내지 약 300 mg, 약 50 mg 내지 약 250 mg, 약 75 mg 내지 약 250 mg, 약 100 mg 내지 약 250 mg, 약 125 mg 내지 약 250 mg, 약 150 mg 내지

약 250 mg, 약 175 mg 내지 약 250 mg, 약 200 mg 내지 약 250 mg, 약 75 mg 내지 약 250 mg, 약 50 mg 내지 약 200 mg, 약 75 mg 내지 약 200 mg, 약 100 mg 내지 약 200 mg, 약 125 mg 내지 약 200 mg, 약 150 mg 내지 약 200 mg, 약 175 mg 내지 약 200 mg, 약 50 mg 내지 약 175 mg, 약 75 mg 내지 약 175 mg, 약 100 mg 내지 약 175 mg, 약 125 mg 내지 약 175 mg, 또는 약 150 mg 내지 약 175 mg일 수 있다. 매주, 2 주마다, 매달 또는 분기마다 비경구 (예컨대, 비제한적으로, 피하, 근육내 및/또는 정맥내) 용량은 약 0.5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 2 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 4 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 6 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 7 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 8 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 8 mg/kg, 약 2 mg/kg 내지 약 8 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 8 mg/kg, 약 4 mg/kg 내지 약 8 mg/kg, 약 5 mg/kg 내지 약 8 mg/kg, 약 6 mg/kg 내지 약 8 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 2 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 4 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 5 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 2 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 4 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 4 mg/kg, 약 2 mg/kg 내지 약 4 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 4 mg/kg, 약 3.5 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 또는 약 4 mg/kg 내지 약 5 mg/kg일 수 있다.

[0053] 그러나, 특히 관련 기술분야의 기술자에게 공지된 및/또는 본원에 기재된 용량 고려사항을 고려하여 본원에 언급된 용량보다 적거나 많은 용량이 또한 구상된다. 치료할 환자의 진행은 주기적인 평가에 의해 모니터링될 수 있고, 필요에 따라 상응하게 용량 조정될 수 있다.

[0054] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 치료에 대한 환자의 "효과적인 반응" 또는 환자의 반응성은 본 개시내용의 항체의 투여시 환자에게 부여되는 임상적 또는 치료적 이익을 지칭한다. 이러한 이익에는 하기 중 임의의 하나 이상이 포함된다: 이식된 장기의 증가된 면역 내성; 안정화된 자가면역 질환 또는 장애; 또는 자가면역 장애의 징후 또는 증상의 개선 등.

[0055] 본원에서 사용된 바와 같이, "유의한 시토카인 방출"은 통상의 기술자에게 공지된 방법에 의해 검출될 수 있는 측정가능한 시토카인에서 유의한 증가를 지칭한다. 예를 들어, 유의한 시토카인 방출은 ELISA에 의해 인간 혈액 샘플에서 검출될 수 있고, 비자극 혈액으로부터의 시토카인 수준을 항체와 함께 인큐베이션한 혈액에 의한 시토카인 수준과 비교한다. 이러한 일부 연구에서, 예를 들어, 유의한 시토카인 방출은, IFN-γ의 수준이 비자극 혈액에서의 수준과 비교하여 항체와 함께 인큐베이션한 혈액에서 적어도 3배 더 높은 경우에 검출될 수 있다.

[0056] 본원에 개시된 방법의 잠재적인 이점은 자가면역 장애, 알러지 질환, 천식, 또는 다른 염증 장애를 앓고 있는 환자에서 허용가능한 내약성, 독성 및/또는 유해 사례를 비롯한 허용가능한 안전성 프로파일로 현저한 및/또는 장기간 완화를 생성할 가능성이며, 이에 따라 환자는 전반적인 치료 방법으로부터 이익을 얻는다. 본 개시내용의 치료의 효능은 다양한 자가면역 장애에 대한 치료를 평가하는데 일반적으로 사용되는 다양한 종점, 예컨대 비제한적으로, 미국 류마티스 학회 (American College of Rheumatology, ACR) 20, ACR50, ACR70, 건선 면적 및 중증도 지수 (PASI) 50, PASI75, PASI90, PASI100, 전신 홍반성 루푸스 질환 활성 지수 (SLEDAI)에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어 면역 세포 활성화 마커, 염증의 측정, 세포-주기 의존성 생체마커 측정치 가시화 및/또는 통증 평가를 통한 반응의 측정을 비롯하여 본 발명의 임의의 특정한 요법의 효능을 결정하기 위한 다양한 다른 접근법이 임의적으로 이용될 수 있다.

[0057] **실시예: 항체 발현 및 정제**

[0058] 본 발명의 항-인간 CD200R 효능제 항체를 다음과 같이 발현시키고 정제할 수 있다. 최적의 예정된 HC:LC 벡터 비 (예컨대 1:3 또는 1:2)를 사용하여 항체를 분비시키는 발현 시스템, 또는 HC 및 LC 둘 다를 코딩하는 단일 벡터 시스템에 의해 적절한 숙주 세포, 예컨대 HEK 293 또는 CHO를 일시적으로 또는 안정하게 형질감염시킬 수 있다. 항체가 분비된 정화된 배지를 임의의 여러 일반적으로 사용되는 기술을 이용하여 정제할 수 있다. 예를 들어, 배지를 상용성 완충제, 예컨대 인산염 완충된 식염수 (pH 7.4)로 평형화된 맙셀렉트(MabSelect)® 컬럼 (지이 헬쓰케어(GE Healthcare)), 또는 Fab 단편용 카파셀렉트(KappaSelect) 컬럼 (지이 헬쓰케어)에 편리하게 적용할 수 있다. 컬럼을 비특이적 결합 성분을 제거하기 위해 세척할 수 있다.

[0059] 결합된 항체는 예를 들어 pH 구배 (예컨대 20 mM 트리스(Tris) 완충제, pH 7.0 내지 10 mM 시트르산나트륨 완충제, pH 3.0, 또는 인산염 완충된 식염수 pH 7.4 내지 100 mM 글리신 완충제, pH 3.0)에 의해 용리시킬 수 있다. 항체 분획은 예컨대 SDS-PAGE에 의해 검출될 수 있고, 이어서 풀링될 수 있다. 추가의 정제는 의도된 용도에 따라 임의적이다. 항체는 일반적인 기술을 사용하여 농축 및 또는 멸균 여과시킬 수 있다. 가용성 응집물 및 다합체는 크기 배제, 소수성 상호작용, 이온 교환, 다중 모달, 또는 히드록시아파타이트 크로마토그래피를 비롯

한 일반적인 기술에 의해 용이하게 제거될 수 있다. 이들 크로마토그래피 단계 이후 항체의 순도는 약 95% 내지 약 99%이다.

[0060] 주목할만 하게는, 항체 I-4P의 C-말단 글리신 또는 항체 I-IgG1의 C-말단 리신을 번역 후에 말단절단시킬 수 있다. 추가로, 항체 I-4P 또는 항체 I-IgG1의 N-말단 글루타민을 피로글루탐산으로 전환시킬 수 있다.

[0061] 생성물을 냉장 보관하거나, -70℃에서 즉시 냉동하거나, 또는 동결건조시킬 수 있다. 본 발명의 예시된 인간화 항체에 대한 아미노산 서열식별번호는 하기 표 1에 제시된다.

[0062] 표 1. 예시된 항-인간 CD200R 효능제 항체의 아미노산 서열.

[0063]

항체 SEQ ID NO						
항체	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
항체 I	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6

[0064]

항체	HCVR	LCVR
항체 I	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8

[0065]

항체	HC	LC
항체 I-4P	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10

[0066] **실시예: 항체 I-4P는 인간 및 시노몰구스 원숭이 CD200R과 결합한다**

[0067] 37℃에서 표면 플라즈몬 공명 (SPR)을 수행하여, 인간 CD200R, 시노몰구스 원숭이 CD200R, 및 시노몰구스 원숭이 CD200RLa (본원에서 시노몰구스 원숭이 "활성화 형태"로도 지칭됨)에 대한 항체 I-4P의 결합 역학 및 친화도를 결정한다.

[0068] 비아코어(Biacore)® T100 장비 (지이 헬쓰케어, 뉴저지주 피스카타웨이), 비아코어 시약 및 스크러버(Scrubber)2 비아코어® 평가 소프트웨어 (바이올로직스(Biologics) 2008)를 항체 I-4P 결합의 SPR 분석을 위해 사용한다. CM4 칩 (비아코어 P/N BR-1006-68)을 제조자의 EDC/NHS 아민 커플링 방법 (비아코어 P/N BR-1000-50)을 이용하여 제조한다. 간략히, 10 μL/분에서 7 분 동안 EDC/NHS의 1:1 혼합물을 주사함으로써 4개 모두의 유동 셀 (FC)의 표면을 활성화시킨다. 단백질 A (칼바이오켐(Calbiochem) P/N 539202)를 10 mM 아세테이트, pH 4.5 완충제 중에서 100 μg/mL로 희석하고, 대략 400 RU를 위해 10 μL/분의 유속으로 7 분 주사함으로써 4개 모두의 유동 셀에 고정시킨다. 미반응 부위는 10 μL/분으로 에탄올아민의 7 분 주사에 의해 차단한다. 2 x 10 μL의 글리신 pH 1.5의 주사를 이용하여 임의의 비공유적으로 회합된 단백질을 제거한다. 작동 완충제는 1x HBS EP+ (비아코어 P/N BR-1006-69)이다.

[0069] 인간, 시노몰구스 원숭이 (시노), 및 시노몰구스 원숭이 활성화 CD200 수용체는 IMAC 및 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 정제한다. 마우스 CD200R은 내부에서 제조된 마우스 CD200R Fc 융합 단백질로부터 인자 Xa 절단에 의해 생성된다. 마우스 CD200R 수용체에 대한 최종 마무리 단계는 크기 배제 크로마토그래피이다.

[0070] 인간 및 시노 CD200R 결합을 위해, 항체를 작동 완충제 중에서 2.5 μg/mL로 희석하고, 대략 150 RU의 항체 I-4P가 유동 셀 2 내지 4에서 포획된다 (RU포획). FC1은 기준 유동 셀이며; 따라서, 항체가 FC1에서는 포획되지 않는다. 인간 및 시노 CD200R을 작동 완충제 중에서 500 nM로 희석한 다음, 작동 완충제 중에서 3.9 nM로 2배 연속 희석한다. 모든 FC에 걸쳐 각각의 농도의 2벌식 주사를 250 초 동안 50 μL/분으로 주사한 다음, 1200 초 해리 단계가 이어진다. 재생은 모든 FC에 걸쳐 15 μL의 10 mM 글리신 pH 1.5를 30 μL/분으로 2회 주사함으로써 수행된다. 기준-차감된 데이터를 FC2-FC1, FC3-FC1 및 FC4-FC1로서 수집한다. 측정치는 37℃에서 수득된다. 친화도 (K_D)는 BIA 평가에서 "1:1 (랭뮤어(Langmuir)) 결합" 모델을 이용하여 계산된다.

[0071] 시노 활성화 CD200R 결합을 위해, 항체를 작동 완충제 중에서 2.5 μg/mL로 희석하고, 대략 150 RU의 항체 I-4P

가 유동 셀 2 내지 4에서 포획된다 (RU포획). FC1은 기준 유동 셀이다. 시노 활성화 CD200R을 작동 완충제 중에서 8.1 μM로 희석한 다음, 작동 완충제 중에서 63.2 nM로 2배 연속 희석한다. 모든 FC에 걸쳐 각각의 농도의 2벌식 주사를 250 초 동안 50 μL/분으로 주사한 다음, 1200 초 해리 단계가 이어진다. 재생은 모든 FC에 걸쳐 15 μL의 10 mM 글리신 pH 1.5를 30 μL/분으로 2회 주사함으로써 수행된다. 기준-차감된 데이터를 FC2 FC1, FC3 FC1, 및 FC4-FC1로서 수집한다. 측정치는 37℃에서 수득된다. 친화도 (K_D)는 스크러버 2 비아코어® 평가 소프트웨어에 의해 정상 상태 평형 분석을 이용하여 계산된다.

[0072] 마우스 CD200R 결합을 위해, 항체를 작동 완충제 중에서 2.5 μg/mL로 희석하고, 대략 150 RU의 항체 I-4P가 유동 셀 2 내지 4에서 포획된다 (RU포획). FC1은 기준 유동 셀이다. 마우스 CD200R을 작동 완충제 중에서 10 μM로 희석한 다음, 작동 완충제 중에서 78 nM로 2배 연속 희석한다. 모든 FC에 걸쳐 각각의 농도의 2벌식 주사를 250 초 동안 50 μL/분으로 주사한 다음, 1200 초 해리 단계가 이어진다. 재생은 모든 FC에 걸쳐 15 μL의 10 mM 글리신 pH 1.5를 30 μL/분으로 2회 주사함으로써 수행된다. 기준-차감된 데이터를 FC2 FC1, FC3 FC1, 및 FC4-FC1로서 수집한다. 측정치는 37℃에서 수득된다. 친화도 (K_D)는 스크러버 2 비아코어® 평가 소프트웨어에 의해 정상 상태 평형 분석을 이용하여 계산된다.

[0073] 본질적으로 상기 기재된 절차에 따라, 하기 데이터가 수득되었다. 표 2에 도시된 바와 같이, 항체 I-4P는 인간 CD200R 및 시노몰구스 원숭이 CD200R과 nM 범위의 친화도로 결합하고, 항체 I-4P는 CD200RLa 활성화 수용체와 μM 범위의 친화도로 결합한다. 항체 I-4P는 마우스 CD200R과 > 10 μM의 친화도로 결합한다.

[0074] 표 2. 37℃에서 표면 플라즈몬 공명 (SPR)을 이용하여 측정된 인간, 시노, 시노 활성화 및 마우스 CD200 수용체에 대한 항체 I-4P의 친화도.

[0075]

	수용체	평균 K_D	표준 편차
항체 I-4P	인간	5.6 nM	1.2
	시노몰구스 원숭이	2.3 nM	0.1
	시노몰구스 원숭이 활성화	2.5 μM	0.4
	*마우스 CD200R	> 10 μM	

[0076] n = 검정을 3회 수행하였다; *n = 1회 검정하였다.

[0077] 이들 데이터는 인간 CD200R 및 시노몰구스 원숭이 CD200R에 대한 항체 I-4P 친화도에 비해 감소된 친화도로 항체 I-4P가 CD200RLa 활성화 수용체 및 마우스 CD200R과 결합함을 입증한다.

[0078] 인간 및 시노 CD200R 사이의 교차-반응성의 결여, (LCDR1 (LC D28)에서 아스파르트산 잔기에 의해 주로 유도된) 스트레스 조건하의 이성질체화, 및 HC CDR1 및 CDR2 사이의 비-천연 디술피드 결합과 연관된 중요한 문제를 극복하기 위한 실질적인 조작에도 불구하고, 항체 I-4P는 유리한 결합 프로파일을 입증하였다. 예를 들어, 포유동물 세포 발현을 이용하는 중쇄 및 경쇄 CDR 잔기 포화 돌연변이 유발 절차를 이용하여 인간 및 시노 CD200R 사이의 친화도 갭을 폐쇄하는 CDR 변화를 결정하였다. 이 절차는 또한 친화도를 손상시키지 않고 LC D28에 대한 잔기 대체물을 찾기 위해 이용되었다. 제2 CDR 라이브러리를 파지-기반 과정을 이용하여 스크리닝하였고, 이는 항원 결합 친화도를 손상시키지 않고 비-천연 디술피드에 대한 예상치 못한 비-생식계열의 대체 잔기의 발견으로 이어졌다.

[0079] **실시예: 세포에서 발현된 CD200R에 대한 항체 I-4P의 시험관내 결합**

[0080] CD200R은 "쌍을 형성한 수용체 패밀리"의 구성원이며, 이는 반대의 활성화 활성을 가진 밀접한 동족체가 존재함을 의미한다. 이 형태가 인간에서는 확인되지 않았지만, 낮은 수준의 mRNA 전사체가 시노몰구스 원숭이의 전혈 및 고환에서 설명되었다 (본원에서 시노몰구스 원숭이 "활성화 형태" 또는 "시노몰구스 원숭이 CD200RLa"로 지칭됨). 따라서, 시노몰구스 원숭이 활성화 형태는 시노몰구스 원숭이에서 독성학 연구 동안에 안전성 문제를 나타낼 수 있다.

[0081] 항체 I-4P가 시노몰구스 원숭이, 인간으로부터의 세포-발현되고 막-결합된 CD200R, 및 활성화 형태 시노몰구스 CD200RLa에 결합하는지를 결정하기 위해, 유세포 분석을 이용한다. CHO 세포를 인간 CD200R (서열식별번호: 15), 시노몰구스 원숭이 CD200R (서열식별번호: 16), 또는 시노몰구스 원숭이 활성화 형태 (서열식별번호: 17)로 형질감염시키고, 높은 발현을 위해 선택한다. 세포 (2^e5)를 각각의 세포주에 대해 PBS 중에서 1^e6/50 μL로

현탁시키고, FL4 염료 (멀티사이트(MultiCyt)® 증식 및 엔코더(Encoder) FL4 염료)를 첨가한다. FL4 염료를 인간 및 시노 CD200R을 발현하는 세포에 대해 1:5000, 시노몰구스 원숭이 활성화 형태를 발현하는 세포에 대해 1:700, 및 형질감염되지 않은 세포에 대해 1:50로 희석한다. 염료를 세포와 혼합하고, 혼합물을 어두운 곳에서 4℃에서 30 분 동안 인큐베이션한다. 세포를 10 mL의 PBS로 2회 세척하고, 1200 RPM에서 5 분 동안 회전시킨다. 이어서, 세포를 FACS 완충제 중에서 $8^{e}5$ 세포/50 μL/웰로 혼합한다.

[0082] 세포를 실온에서 30 분 동안 FACS 완충제 중에서 제조된 항체 적정물과 함께 인큐베이션한다. 세포를 FACS 완충제로 1회 세척하고, 100 μL의 PE-접합된 항 인간-Fc 항체를 1:1000 희석으로 어두운 곳에서 4℃에서 15 분 동안 각각의 웰에 첨가한다. 세포를 3회 세척한 다음, 150 μL의 FACS 완충제 중에 재현탁시킨다. 사이톡스 블루(Sytox blue) (2 μL/웰)를 첨가하고, 세포를 FACS 플레이트로 옮기고, 포르테싸(Fortessa) LSRII 세포분석 장비 (비디 바이오사이언시즈(BD Biosciences)) 상에서 작동시킨다. 데이터를 플로우조(FlowJo) (플로우조, 엘엘씨(FlowJo, LLC)) 소프트웨어를 사용하여 분석한다.

[0083] 본질적으로 상기 기재된 절차에 따라, 하기 데이터를 수득하였다. 항체 I-4P는 시노몰구스 원숭이 CD200R 및 인간 CD200R에 결합한다. 항체 I-4P는 비형질감염 대조군 세포와의 결합과 유사하게 시노몰구스 원숭이 활성화 형태에 결합한다. 이들 데이터는 시노몰구스 원숭이 활성화 형태에 대한 항체 I-4P의 결합이 없음을 입증하고; 따라서, 시노몰구스 원숭이에서 독성학 연구 동안에 안전성 문제가 감소될 수 있다.

[0084] **실시예: 항체 I-4P는 CD200R 효능제이다**

[0085] 항체 I-4P의 효능제 활성을 입증하기 위해, 인간 단핵구 세포주 U937 (ATCC, CRL1539.2)을 인간 CD200R에 대한 cDNA로 형질감염시킨다. 이들 세포로부터 IL-8을 비롯한 시토카인 생성은 Fcɣ 수용체에 결합하여 그를 활성화시키는 면역 복합체 (IC)에 의해 유도될 수 있다. IC 자극의 경우, 인간 IgG1 이소타입 대조군 항체를 높은-결합 플레이트에 밤새 코팅한다. 다음 날, $4x10^{5}$ CD200R-발현 U937 세포/웰을 상이한 농도의 항체 I-4P와 함께 1 시간 동안 얼음 상에서 인큐베이션한 후, IC 자극을 위해 사전-코팅된 플레이트에 첨가한 다음, 37℃에서 24 시간 동안 인큐베이션한다. 24 시간 후, 세포를 회전시키고, 상청액을 제거하고, IL-8 농도를 MSD 키트 (메조스케일 다이아그노스틱스(Mesoscale Diagnostics))를 사용하여 측정한다.

[0086] 본질적으로 상기 기재된 절차에 따라, 하기 데이터를 수득하였다. 표 3에 나타낸 바와 같이, 상응하는 농도에서 이소타입 대조군과 비교하여 % 억제로서 항체 I-4P에 의한 IC-유도된 IL-8의 감소. 상대적인 IC_{50}은 농도에 따른 % 억제의 기울기의 4 변수 로지스틱 핏을 기반으로 한다. 3회의 독립적인 실험으로부터의 평균 IC_{50}은 0.2 μg/mL ± 0.02 μg/mL로 결정되었다.

[0087] 표 3. 인간 CD200R을 발현하는 세포에서 면역-복합체 유도된 IL-8 분비의 농도-의존성 억제.

[0088]

항체 I-4P (μg/ml)	평균 % IL-8 억제	SEM
0.01	-2.0	3.1
0.03	2.3	2.9
0.1	14.0	6.0
0.3	24.0	4.2
1	47.1	2.8
3	55.7	2.9
10	67.8	3.3
30	76.2	4.0

[0089] 이들 데이터는 항체 I-4P가 농도-의존성 방식으로 IC-유도된 IL-8 생성을 억제할 수 있음을 입증한다.

[0090] 상이한 이소타입 백본을 갖는 CD200R 효능제 항체가 CD200R을 효능화시키고, 인간 CD200R-발현 U937 세포로부터 면역-복합체 자극된 IL-8 방출을 억제하는 능력 또한 실험한다. 자극을 위해, 인간 IgG1 이소타입 대조군 항체를 높은-결합 플레이트에 10 μg/ml로 밤새 코팅한다. 다음 날, 4×10^{5} CD200R-발현 U937 세포/웰을 상이한 농도의 항체 IgG4PAA (2개의 류신에서 알라닌으로의 치환 (SLL228PAA)은 FcɣR과의 소수성 상호작용을 방해하여 남아있는 이펙터 기능을 제거하는 것으로 공지됨) 또는 항체 I-4P와 함께 1 시간 동안 얼음 상에서 인큐베이션한 후, IC-자극을 위해 사전-코팅된 플레이트에 첨가한 다음, 37℃에서 24 시간 동안 인큐베이션한다. 세포를

회전시키고, 상청액을 제거하고, IL-8 농도를 제조자의 지침에 따라 MSD 키트 (메조스케일 다이아그노스틱스)를 사용하여 측정한다. IL-8 농도를 이소타입 대조군에 대한 % 억제로 전환시킨다. IL-8 농도를 항체 농도에 대해 플롯하고, R 통계 소프트웨어를 사용하여 % 억제 대 로그 농도를 핏팅하기 위해 4 변수 로지스틱 모델을 이용하였다. 본질적으로 상기 기재된 절차에 따라, 하기 데이터 (표 4에 나타냄)가 수득되었다.

[0091] 표 4. IL-8 생성에서 농도-의존성 감소

	IgG4PAA		IgG4SP	
항체 μg/ml	평균 % IL-8 억제	SEM*	평균 % IL-8 억제	SEM*
0.01	-3.2	6.0	15.4	3.7
0.03	-5.0	5.6	35.8	3.6
0.1	-10.4	10.1	44.0	3.0
0.3	15.0	5.3	80.0	2.8
1	16.9	3.9	73.8	1.8
3	35.5	4.1	82.0	2.6
10	45.4	1.7	87.1	1.4
30	53.5	3.2	86.4	1.5

[0092]

[0093] * 평균의 표준 오차

[0094] 이들 데이터는 IgG4PAA가 항체 I-4P (IC_{50} = 0.07 μg/ml)와 비교하여 더 약한 억제 활성 (IC_{50} = 1.45 μg/ml)을 가짐을 입증한다.

[0095] **실시예: Fcγ 수용체 결합은 생체내 효능작용을 위해 필요하다**

[0096] 지질 뗏목에서 Fcγ 수용체를 통한 클러스터화는 염증 세포에 대한 억제 효능을 증가시킬 수 있다. Fcγ 수용체 상호작용이 CD200R을 통한 효능작용에 유익한지 여부를 확인하기 위해, 2개의 마우스 CD200R 항체를 조작하며; 하나는 임의의 Fcγ 수용체 결합을 제거하도록 하고 (mIgG2aAA), 하나는 기능성 Fcγ 수용체 결합을 갖도록 한다 (mIgG2a). 두 분자를 마우스에서 유도된 염증 질환의 2가지 독립적인 모델인 접촉성 피부염 및 CD40-유도된 결장 염증 모델에서 시험한다.

[0097] 접촉성 피부염 모델: 항-인간 CD200R 효능제 항체가 접촉성 피부염을 치료하는 능력을 본질적으로 하기 기재된 바와 같이 수행된 생체내 마우스 모델에 의해 결정할 수 있다 (예를 들어, [Tolstrup et al., Anti-inflammatory effect of a retrovirus-derived immunosuppressive peptide in mouse models, BMC Immunology 2013, 14:51] 참고). 수컷 12 주령의 C57Bl/6J 마우스를 마취시키고, 그들의 복부를 면도하고, 에탄올 중 100 μL의 3% 옥사잘론을 면도 부위에 적용한다. 민감화 7 일 후에, CD200R 효능제 항체 IgG2a 또는 IgG2aAA를 0.1, 1 또는 10 mg/kg으로 피하 (SC) 투여하거나, 또는 비교를 위해 이소타입 대조군 mIgG2a를 10 mg/kg SC로 투여한다. 항체 투여 4 시간 후에, 마우스를 마취시키고, 기준선 귀 두께를 캘리퍼스로 측정하고, 양쪽 귀의 각각의 측에 에탄올 중 10 μL의 2% 옥사잘론을 시도한다. 시도 24 시간 후에, 귀 두께를 다시 측정한다. 시도 전과 시도 24 시간 후 사이의 귀 두께 차이를 측정함으로써 과민성 반응을 평가한다. 이소타입 대조군으로부터의 통계적 차이는 던넷(Dunnett) 사후 검사와 함께 일원 ANOVA를 이용하여 결정한다 (그래프패드 프리즘(GraphPad Prism)).

[0098] CD40-유도된 결장 염증 모델: 항-인간 CD200R 효능제 항체가 CD40-유도된 결장 염증 모델을 치료하는 능력을 본질적으로 하기 기재된 바와 같이 수행된 생체내 마우스 모델에 의해 결정할 수 있다. 암컷 14 주령 RAG2N12 (B6.129S6-Rag2tm1Fwa N12; 타코닉(Taconic))) 마우스에게 100 μg/마우스 항-CD40 항체 (바이옥셀(BioXcel) 클론 FGK4.5)를 주사하여 결장 염증을 유도한다. 질환 유도 1 시간 후에, CD200R 효능제 항체 IgG2a, IgG2aAA, 또는 이소타입 대조군 항체를 0.1, 1 또는 10 mg/kg으로 피하 투여한다. 동물을 6 일 후에 희생시키고, 결장의 길이 및 중량을 측정함으로써 결장 염증을 결정한다. 결장 길이-대-중량 비를 이용하여 결장 염증을 결정한다. 이소타입 대조군으로부터의 통계적 차이는 던넷 사후 검사와 함께 일원 ANOVA를 이용하여 결정한다 (그래프패드 프리즘).

[0099] 본질적으로 상기 기재된 절차에 따라, 하기 데이터를 수득하였다.

[0100] 표 5. 귀 두께 (mm)에서의 변화에 의해 접촉성 피부염 모델에서 측정된 귀 염증

귀 두께 (mm)		
	mIgG2a	**mIgG2aAA**
이소타입 대조군	0.200±0.05	0.200±0.05
10 mg/kg	0.118±0.03**	0.160±0.03*
1.0 mg/kg	0.113±0.06**	0.170±0.04
0.1 mg/kg	0.176±0.05	0.178±00.3

[0101]

[0102] * p<0.05; ** p<0.001. n=5/그룹

[0103] 표 6. 중량-대-길이 비 (mg/cm)에 의해 CD40-유도된 결장 염증 모델에서 측정된 결장 염증

결장 길이 대 중량 비 (mg/cm)		
	mIgG2a	**mIgG2aAA**
이소타입 대조군	37±1.1	37±1.1
10 mg/kg	26±0.8**	33±0.7
1.0 mg/kg	29±1.6*	36±1.9
0.1 mg/kg	32±2.6	36 (n=1)

[0104]

[0105] n=5/그룹, *p<0.05; ** p<0.001.

[0106] 이들 데이터는, 이소타입 대조군과 비교하여, 완전한 이펙터 기능을 갖는 항체 (mIgG2a)가 두 모델 모두에서 면역 억제 기능을 나타내었음을 입증한다. 그러나, Fcγ 수용체 없음 변이체 (mIgG2aAA)는 접촉성 피부염 모델에서 훨씬 덜 강력하였고, 결장 염증 모델에서 거의 효과를 갖지 않았다. Fcγ 수용체-적격성 IgG2a 항체가 독립적인 실험에서 마우스에서 CD200R 발현 세포를 고갈시키지 않는 것으로 입증되었기 때문에, 활성에서의 차이가 CD200R-발현 세포의 고갈로 인한 것이 아니었다 (데이터는 도시되지 않음).

[0107] 이들 데이터는 Fcγ 수용체 결합이 CD200R에 대해 최적의 효능작용을 제공하여 항염증 신호를 매개하기 위해 필요함을 입증한다.

[0108] **실시예: Fcγ 수용체와의 항체 I 결합**

[0109] 항체 Fc가 Fcγ 수용체에 대한 항체 I-4P의 결합 특징에 영향을 미치는지 결정하기 위해, 인간 FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, 및 FcγRIIIa 수용체 세포외 도메인 (ECD)에 대한 항체 I-4P, 항체 I-IgG1 및 항체 I-4PAA의 결합을 25℃에서 SPR에 의해 측정한다. 항체 I-IgG1 및 항체 I-4PAA는 항체 I-4P와 동일한 CDR을 갖는다. 항체 I-IgG1은 항체 I-4P와 동일한 HCVR, LCVR 및 LC를 갖지만, 항체 I-IgG1은 아미노산 서열이 서열식별번호: 11에 제시된 HC를 갖는다. 항체 I-4PAA는 HC에서 SLL228PAA 돌연변이를 갖는다는 점에서 항체 I-4P와 상이하다.

[0110] 비아코어® T100 장비 및 비아코어® 3000 (지이 헬쓰케어, 뉴저지주 피스카타웨이), 비아코어® 시약 및 스크러버2 비아코어® 평가 소프트웨어 (바이올로직스 2008)를 항체 결합의 SPR 분석을 위해 사용한다. CM5 칩 (비아코어® P/N BR-1006-68)을 제조자의 EDC/NHS 아민 커플링 방법 (비아코어® P/N BR-1000-50)을 이용하여 제조한다. 간략히, EDC/NHS의 1:1 혼합물을 10 μL/분으로 7 분 동안 주사함으로써 4개 모두의 FC의 표면을 활성화시킨다. 단백질 A (칼바이오켐 P/N 539202)를 10 mM 아세테이트, pH 4.5 완충제 중에서 100 μg/mL로 희석하고, 대략 400 RU를 위해 10 μL/분의 유속으로 7 분 주사에 의해 4개 모두의 유동 셀에 고정시킨다. 미반응 부위는 10 μL/분으로 에탄올아민의 7 분 주사에 의해 차단한다. 2 x 10 μL의 글리신 pH 1.5의 주사를 이용하여 임의의 비공유적으로 회합된 단백질을 제거한다.

[0111] FcγR ECDs -FcγRI (CD64), FcγRIIA_131R 및 FcγRIIA_131H (CD32a), FcγRIIIA_158V, FcγRIIIA_158F (CD16a) 및 FcγRIIb (CD32b; 억제 수용체) (예를 들어, [Bruhns *et al.*, Blood. 2009 Apr 16;113(16):3716-25] 참고)를 관련 기술분야에 널리 공지된 방법에 따라 안정한 CHO 세포 발현으로부터 생성하고, IgG 세파로스

및 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 정제한다.

[0112] FcγRI 결합을 위해, 항체를 작동 완충제 (1x HBS-EP+ (비아코어® P/N BR-1006-69) 중에서 2.5 μg/mL로 희석하고, 대략 150 RU의 각각의 항체가 유동 셀 2 내지 4에서 포획된다 (RU포획). FC1은 기준 유동 셀이며, 따라서 항체가 FC1에서는 포획되지 않는다. FcγRI ECD를 작동 완충제 중에서 200 nM로 희석한 다음, 작동 완충제 중에서 0.78 nM로 2배 연속 희석한다. 모든 FC에 걸쳐 각각의 농도의 2벌식 주사를 120 초 동안 40 μL/분으로 주사한 다음, 1200 초 해리 단계가 이어진다. 재생은 모든 FC에 걸쳐 15 μL의 10 mM 글리신 pH 1.5를 30 μL/분으로 주사함으로써 수행된다. 기준-차감된 데이터를 FC2-FC1, FC3-FC1, 및 FC4-FC1로서 수집한다. 측정치는 25℃에서 수득된다. 친화도 (K_D)는 스크러버 2 비아코어® 평가 소프트웨어에 의해 정상 상태 평형 분석 또는 BIA 평가에서 "1:1 (랭뮤어) 결합" 모델을 이용하여 계산된다.

[0113] FcγRIIa, FcγRIIb, 및 FcγRIIIa 결합을 위해, 항체를 작동 완충제 중에서 5 μg/mL로 희석하고, 대략 500 RU의 각각의 변이체가 유동 셀 2 내지 4에서 포획된다 (RU포획). FC1은 기준 유동 셀이다. Fcγ 수용체 ECD를 작동 완충제 중에서 10 μM로 희석한 다음, 작동 완충제 중에서 39 nM로 2배 연속 희석한다. 모든 FC에 걸쳐 각각의 농도의 2벌식 주사를 60 초 동안 40 μL/분으로 주사한 다음, 120 초 해리 단계가 이어진다. 재생은 모든 FC에 걸쳐 15 μL의 10 mM 글리신 pH 1.5를 30 μL/분으로 주사함으로써 수행된다. 기준-차감된 데이터를 FC2-FC1, FC3-FC1, 및 FC4-FC1로서 수집한다. 측정치는 25℃에서 수득된다. 친화도 (K_D)는 스크러버 2 비아코어® 평가 소프트웨어에 의해 정상 상태 평형 분석을 이용하여 계산된다.

[0114] 본질적으로 상기 기재된 절차에 따라, 표 7에 나타낸 하기 데이터가 수득되었다.

[0115] 표 7: 25℃에서 SPR을 이용하여 측정된 인간 Fcγ 수용체 ECD에 대한 항체 I-4P, 항체 I-IgG1 및 항체 I-4PAA의 시험관내 결합 변수

샘플	인간 리간드	평균 KD	표준 편차*
IgG1 대조군 항체	FcγRI	56.1 pM	2.2
IgG4 PAA 대조군 항체	FcγRI	229.0 nM	11.5
항체 I-IgG1	FcγRI	48.9 pM	2.2
항체 I-4PAA	FcγRI	273.3 nM	12.6
항체 I-4P	FcγRI	369.3 pM	9.2
IgG1 대조군 항체	FcγRIIA_131H	0.5 μM	0.0
IgG4 PAA 대조군 항체	FcγRIIA_131H	>10 μM	
항체 I-IgG1	FcγRIIA_131H	0.5 μM	0.0
항체 I-4PAA	FcγRIIA_131H	>10 μM	
항체 I-4P	FcγRIIA_131H	3.9 μM	0.3
IgG1 대조군 항체	FcγRIIA_131R	0.6 μM	0.0
IgG4 PAA 대조군 항체	FcγRIIA_131R	>10 μM	
항체 I-IgG1	FcγRIIA_131R	0.6 μM	0.0
항체 I-4PAA	FcγRIIA_131R	>10 μM	
항체 I-4P	FcγRIIA_131R	1.7 μM	0.1
IgG1 대조군 항체	FcγRIIb	2.8 μM	0.1
IgG4 PAA 대조군 항체	FcγRIIb	>10 μM	
항체 I-IgG1	FcγRIIb	2.8 μM	0.1
항체 I-4PAA	FcγRIIb	>10 μM	
항체 I-4P	FcγRIIb	2.2 μM	0.1
IgG1 대조군 항체	FcγRIIIA_158V	0.2 μM	0.0
IgG4 PAA 대조군 항체	FcγRIIIA_158V	8.9 μM	1.1
항체 I-IgG1	FcγRIIIA_158V	0.2 μM	0.0
항체 I-4PAA	FcγRIIIA_158V	>10 μM	
항체 I-4P	FcγRIIIA_158V	4.3 μM	0.4
IgG1 대조군 항체	FcγRIIIA_158F	1.0 μM	0.1
IgG4 PAA 대조군 항체	FcγRIIIA_158F	>10 μM	
항체 I-IgG1	FcγRIIIA_158F	0.9 μM	0.1
항체 I-4PAA	FcγRIIIA_158F	>10 μM	
항체 I-4P	FcγRIIIA_158F	>10 μM	

[0116]

[0117] 검정을 독립적으로 3회 수행하였다.

[0118] * 표준 편차는 >10 μM의 측정치에 대해서는 결정되지 않았다.

[0119] 표 7은 SPR에 의해 측정된 인간 FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb 및 FcγRIIIa 수용체 ECD에 대한 항체 I-IgG1, 항체 I-4PAA 및 항체 I-4P의 친화도 (K_D)를 요약한다. 항체 I-4P의 결합 특징은 실질적으로 IgG1 대조군/항체 I-IgG1과 IgG4 PAA 대조군/항체 I-4PAA의 결합 친화도 사이인 친화도로 Fcγ 수용체에 대한 결합을 입증한다. 예를 들어, 데이터는 항체 I-4P가 항체 I-IgG1 (이는 전혈 검정에서 시토카인 방출에 기여할 수 있음)와 비교하여 FcγRIIIa 수용체 ECD에 대해 감소된 결합을 갖지만, 항체 I-4PAA와 비교하여 FcγRI 및 FcγRIIb 수용체 ECD에 대해 여전히 높은 결합 친화도를 가짐을 입증한다.

[0120] FcγR에 대한 항체 I-4P에 의해 입증된 결합 특징은 유의한 시토카인 방출없이 증진된 생체내 효능에 기여하는 것으로 생각된다.

[0121] **실시예: Fcγ 수용체에 결합하는 IgG1 Fc 돌연변이체**

[0122] IgG1 항체는 시토카인 방출을 유도하는 것으로 공지되어 있다. IgG1-유도된 시토카인 방출에 대한 메카니즘을 결정하기 위해, IgG1-Fc 돌연변이를 생성한다. 이들 CD200R 항체는 항체 I로부터의 상이한 CDR을 갖는다. 표 8에서 항체 (IgG1, 돌연변이 없음, P331S, P331S + S267G, A330S + P331S + S267G, A330S + S267G, K322A, K322A + S267G, 및 N325S + L328F + S267G)는 서로 동일한 CDR을 갖는다. S267G 항체는 다른 항체 돌연변이체 및 항체 I-4P와는 상이한 CDR을 갖는다.

[0123] FcγRIII 결합을 감소시키기 위해 S267G 돌연변이를 생성한다 (EU 넘버링: 예를 들어, [Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); 및 Shields RL et al., High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to Fc gamma R. 2001 J. Biol. Chem. 276, 6591-6604] 참고).

[0124] S267G 돌연변이는 또한 FcγR-결합에 유의한 영향을 미치지 않고 C1q 결합을 감소시키는 돌연변이와 조합된다 (K322A, A330S, 및 P331S; 예를 들어 [Oganesyan V et al., 2008 Structural characterization of a human Fc fragment engineered for lack of effector functions. Acta Crystallogr. D Biol. Chrystallogr. 64, 700-704; Idusogie, E et al., 2000 Mapping of the C1q Binding Site on Rituxan, a Chimeric Antibody with a Human IgG1 Fc. J. of Immunology, 164(8) 4178-4184; 및 Tao M.H. and Morrison M.L. 1993 Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype- specific differences in complement activation. J. of Exp. Med., 178(2), 661-667] 참고). FcγRIIA 및 FcγRIIB와의 결합을 조절하면서 FcγRIII 및 C1q 결합을 감소시키는 추가의 돌연변이 또한 생성된다 (N325S+L328F; 예를 들어, [Shang L et al., 2014 Selective antibody intervention of Toll-like receptor 4 activation through FcγR tethering. J. Biol. Chem. 289, 15309-18; Monnet E *et al.*, 2017 Evidence of NI-0101 pharmacological activity, an anti-TLR4 antibody, in a randomized phase I dose escalation study in healthy volunteers receiving LPS. Clin Pharmacol Ther. 2017 101, 200-208] 참고).

[0125] Fcγ 수용체 결합은 비아코어®에 의해 결정되고, IFNγ는 메조스케일 플랫폼을 기반으로 하는 멀티플렉스 검정에 의해 결정되며, 둘 다 본원에 기재된다. C1q 결합은 ELISA에 의해 결정된다. ELISA의 경우, 96 웰 마이크로플레이트를 DPBS (둘베코 하이클론(Dulbecco's HyClone)) 중에 희석된 100 μL/웰의 각각의 항체로 10 μg/mL 내지 0.19 μg/mL의 농도 범위로 코팅한다. 시험을 2벌식 웰에서 수행한다. 플레이트를 밀봉하고, 밤새 4℃에서 인큐베이션한다. 코팅 시약을 각각의 웰로부터 제거하고, 200 μL/웰의 카세인 차단 시약 (써모(Thermo))을 첨가한다. 플레이트를 밀봉하고, 실온 (RT)에서 2 시간 동안 인큐베이션한다. 각각의 웰을 세척 완충제 (0.05% 트윈(Tween) 20을 갖는 1 x TBE)로 3회 세척한다. 카세인 차단 시약 중에서 희석된 10 μg/mL의 인간 C1q (엠에스 바이오메디컬(MS Biomedical))를 100 μL/웰로 첨가하고, RT에서 3 시간 동안 인큐베이션한다. 이어서, 플레이트를 세척 완충제로 3회 세척한 후, 카세인 차단제 중 양 항-인간 C1q-HRP (아브캄(Abcam) #ab46191)의 1:800 배 희석액을 100 μL/웰로 첨가하고, RT에서 1 시간 동안 인큐베이션한다. 플레이트를 세척 완충제로 6회 세척하고, TMB 기질 (피어스(Pierce))을 100 μL/웰로 각각의 웰에 첨가하고, 7 분 동안 인큐베이션한다. 100 μL의 1 N HCl을 각각의 웰에 첨가하여 반응을 중지시켰다. 광학 밀도는 450 nm로 설정된 비색 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 즉시 측정한다.

[0126] 본질적으로 상기 기재된 절차에 따라, 하기 데이터를 수득하였다 (N=1; 표 8).

[0127] 표 8. IgG1 돌연변이체에 의한 FcγR 및 C1q 결합 및 전혈 시토카인 방출 측정.

돌연변이	FcγRI, pM	FcγRIIA_131H, μM	FcγRIIA_131R, μM	FcγRIIb, μM	FcγRIIIA_158V, μM	FcγRIIIA_158F, μM	C1q Elisa	전혈 IFNγ 방출[a]
Hu IgG1	55.2	0.71	1.03	4.2	0.28	2.59	++	ND
IgG1, 돌연변이 없음	46.4	0.69	1.04	4.23	0.27	2.12	+++	예
P331S	54.3	1.15	1.14	4.64	0.45	3.11	+	예
P331S + S267G	142.4	5.2	0.77	4.38	2.08	>10	-	아니오
A330S + P331S + S267G	511.4	5.1	0.78	4.3	2.48	9.8	-	아니오
A330S + S267G	167.7	3.31	0.82	4.99	1.66	10.83	-	아니오
K322A	30.5	0.98	0.82	3.41	0.28	2.58	-	예
K322A + S267G	70.5	5.02	0.66	4.43	1.65	9.99	-	아니오
N325S + L328F	68.7	2.64	0.06	0.275	7.35	>10	-	아니오
S267G	130.7	3.13	0.53	3.41	0.73	4.5		예
인간 IgG4P 대조군 항체	384.7	5.12	2.89	3.31	5.47	>10	-	아니오

[0128]

[0129] [a] 전혈 내에서 기준선 수준보다 유의하게 높은 임의의 시토카인 방출은 '예'로 기록되지만, 기준선에 비해 정확한 수준은 달라질 수 있다.

[0130] 이들 데이터는 C1q 결합을 감소시키고 FcγR 결합을 변경시키는 돌연변이의 조합이 기준선에 비해 IFNγ 방출을 결여시킴을 입증하고, 이는 환자에게 투여시 더욱 바람직한 안전성 프로파일을 입증한다. 예를 들어, C1q 결합의 감소 및 FCγRIII (또는 FCγRI)에 대한 결합의 감소는 기준선에 비해 IFNγ 방출을 결여시킨다.

[0131] **실시예: 시험관내 시토카인 방출**

[0132] 시토카인 방출 증후군 (CRS)을 비롯한 임상적 독성은 항체의 투여와 연관이 있었다. 모노클로날 항체와 연관된 가장 중증의 유해 사례 중 하나인 CRS는 높은 수준의 면역 세포 활성화 및 염증전 시토카인의 신속한 전신 방출을 특징으로 하고, 잠재적으로 치명적일 수 있다. 중요하게는, 임상전 모델은 CRS에 대한 잠재적인 위험을 적절하게 예측하지 못한다. 결과적으로, 항체 투여 후에 CRS의 잠재적인 위험을 완화시키기 위해, 인간 혈액 세포를 사용하는 시험관내 시토카인 방출 검정을 개발한다. Fcγ 수용체에 결합하는 항체, 특히 IgG1 항체는 원치않는 시토카인 방출을 초래할 수 있다.

[0133] 항체 I-4P 또는 항체 I-IgG1이 비자극 인간 전혈로부터 시토카인 방출을 유도하는지 여부를 결정하기 위해, 시험관내 시토카인 방출 연구를 수행한다. 6명의 건강한 인간으로부터 새로 수집한 전혈을 100 μg/ml의 항체 I-4P, 항체 I-IgG1, 또는 대조군 IgG1 항체와 함께 24 시간 동안 인큐베이션한다. 양성 대조군은 임상에서 시토카인 방출 증후군을 초래하는 것으로 공지된 캄파쓰(Campath)-1H (항-CD52) IgG1 항체의 동족체이다. 음성 대조군은 시토카인 방출을 초래하지 않는 hIgG1 항체이다. 메조스케일 플랫폼을 기반으로 하는 상업적으로 입수가능한 멀티플렉스 검정을 이용하여, IFN-γ, IL-2, IL-6, IL-13, IL-8, IL-12p70, IL-10, 및 TNF-α를 비롯한 10가지 시토카인을 세포 배양물 상청액에서 측정한다.

[0134] 본질적으로 상기 기재된 절차에 따라, 하기 데이터를 수득하였다. 표 9에 나타낸 바와 같이, 10 μg/ml 양성 대조군 항체와 함께 전혈의 인큐베이션은 대부분의 공여자에서 분석된 10가지 시토카인 중 9가지에 대해 강력한 시토카인 생성을 나타내었다. 항체 I-IgG1과 함께 전혈의 인큐베이션은 IFN-γ의 유의한 방출을 유도하였다. 100 μg/ml 항체 I-4P 또는 100 μg/ml 음성 대조군 IgG1과 함께 전혈의 인큐베이션은 평가된 임의의 시토카인의 유의한 수준을 나타내지 않았다.

[0135] 표 9. 기준선 (PBS 대조군 샘플)에 비한 배수 변화; 중간값± SEM

시토카인	항체 I-IgG1	항체 I-4P	음성 대조군	양성 대조군
IFN-γ	10 ± 19	0.9 ±0.08	0.8 ± 0.06	612 ±431
IL-1β	1.8 ±3	1.19 ± 2	1.04 ± 1.4	3 ±5
IL-2	0.36 ± 0.14	1.7 ±0.133	1.9 ± 0.86	1.33 ±1.3
IL-4	0.96 ± 1.4	1.08 ±0.42	0.83 ±0.73	10 ± 24
IL-6	1.25 ±1.8	1.17 ± 0.17	1.03 ±0.13	15 ±18
IL-8	1.1 ± 0.58	1.2 ±0.08	1.25 ± 0.24	8.8 ± 5
IL-10	0.88 ± 0.11	1.25 ± 0.15	1.26 ±0.3	3.9 ±2.6
IL-12p70	0.97 ±0.37	0.63 ± 0.19	0.49 ±0.5	7 ± 11
IL-13	1.18 ±0.27	1.18 ± 0.12	1.1 ± 0.24	5.5 ± 1.89
TNF-α	1.37 ± 0.4	1.1 ± 0.05	0.96 ±0.07	20 ± 17

[0136]

[0137] 이들 데이터는 항체 I-4P가 유의한 시토카인 방출을 초래하지 않음을 입증하고, 항체 I-4P의 투여 후에 임상에서 시토카인 방출 위험이 낮음을 시사한다.

[0138] **실시예: 항체 I은 CD200R에 대한 CD200의 결합을 차단하지 않는다**

[0139] CD200 및 CD200R 둘 다 세포-발현된 분자이며, 2개의 Ig-유사 도메인을 함유한다. 이들은 골수 세포와 다른 CD200-발현 세포 사이에서 발생하는 면역학적 시냅스-유사 상호작용과 상용성인 그들의 NH2 말단 도메인을 통해 상호작용한다. 리간드의 존재하에 항체 I-4P가 CD200R과 결합하는지를 결정하기 위해, CD200R을 발현하는 인간 적아구종 세포주인 HEL92.7.1 세포에 대해 공동-결합 실험을 유세포 분석에 의해 수행한다. 연구를 위해, 2^{e5} 세포를 300 nM의 CD200Fc (알디 시스템즈(RD Systems); 이뮤노글로불린 1 Fc 영역과 CD200의 융합 단백질), 항체 I-4P, 이소타입 대조군 항체, 또는 PBS와 함께 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션 (전처리)한다. 세포를 3회 세척하고, Fc 블록 (밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotec))과 함께 실온에서 20 분 동안 인큐베이션한다. 세포를 다양한 농도의 AF647-표지된 항체 I-4P로 실온에서 1 시간 동안 염색한 다음, 세포를 세척하고, 유세포 분석에 의한 분석을 위해 FACS 완충제 중에 현탁시킨다.

[0140] 중간 형광 강도 (MFI)를 각각의 농도의 AF647-표지된 항체 I-4P에 대해 결정하고, MFI는 리간드의 존재하에 결합의 양을 나타낸다. 본질적으로 상기 기재된 절차에 따라, 표 10의 데이터를 수득하였다.

[0141] 표 10. CD200의 존재하에 항체 결합.

균주	전처리 없음	전처리		
항체 I-4P-AF647 (ug/mL)	전처리 없음 (MFI)	이소타입 대조군 (MFI)	항체 I-4P (MFI)	CD200-Fc (MFI)
0	49.1	49.1	49.1	49.1
0.4	416	399	70.4	230
0.8	694	664	76.3	370
1.6	1184	1154	96.9	630
3.125	1979	1914	133	1068
6.25	3097	2987	200	1728
12.5	4216	4105	319	2641
25	5137	4916	496	3421
50	5651	5515	745	3957

[0142]

[0143] 이들 데이터는 항체 I-4P가 CD200 리간드와 인간 CD200R의 결합을 차단하지 않음을 입증한다 (이소타입 대조군 및 전처리 없음 데이터와 비교한 인간 CD200-Fc 데이터). 항체 I-4P 전처리 데이터는 대조군으로 작용하고, 항체 I-4P로 전처리한 후에 감소된 표지된 항체 I-4P 결합을 입증한다.

[0144] 항체 I-4P에 대한 에피토프는 CD200R의 도메인 2 상에서 세포 막에 가까운 것으로 결정되었다 (데이터는 도시되지 않음).

[0145] **실시예: 항체 I-4P는 인간화 마우스에서 접촉 과민성을 억제한다**

[0146] 항체 I-4P의 항염증 효과를 입증하기 위해, 20 주령의 암컷 huNOG-EXL 마우스 (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Sug} Tg(SV40/HTLV-IL3,CSF2)10-7Jic/JicTac)를 타코닉 바이오사이언시즈(Taconic Biosciences)로부터 구입하고, 1

주 넘게 적응시킨다. 마우스를 12시간 명암 주기하에 22℃에서 케이지당 4 마리의 마우스로 하우징하고, 음식물 및 물을 자유롭게 허용한다. 0 일째에, 마우스를 5% 이소플루란에 의해 마취시키고, 그들의 복부를 면도하고, 에탄올 중 100 μL의 3% 옥사잘론을 면도된 영역에 적용한다. 민감화 5 일 후에, 항체 I-4P를 1 또는 10 mg/kg 피하 (SC)로 투여하고; 비교를 위해 IgG4P 이소타입 대조군을 10 mg/kg SC로 투여한다. 항체 투여 4 시간 후에, 마우스를 5% 이소플루란에 의해 마취시키고, 귀 두께를 캘리퍼스로 측정하고, 양쪽 귀의 각각의 측에 에탄올 중 10 μL의 2% 옥사잘론을 시도한다. 시도 절차를 10 및 14 일째에 반복한다. 시도 전과 시도 24 시간 후 사이의 귀 두께 차이를 측정함으로써 과민성 반응을 평가한다.

[0147] 통계: 염증은 각각의 시도에 대해 시도 전과 시도 24 시간 후 사이의 귀 두께 차이를 측정함으로써 결정한다. % 억제는 0% 억제로 설정된 이소타입 대조군의 평균 귀 두께로부터 계산된다. 이소타입 대조군으로부터의 통계적 차이는 적절한 경우 던넷 사후 검사와 함께 일원 또는 이원 ANOVA를 이용하여 결정한다 (그래프패드 프리즘).

[0148] 본질적으로 상기 기재된 절차에 따라, 하기 데이터를 수득하였다. 하기 표에 나타낸 바와 같이, 첫번째 시도하기 4 시간 전에 1 또는 10 mg/kg SC의 항체 I-4P로의 단일 처리는 이소타입-처리된 마우스와 비교하여 3번째 시도 이후에 염증 반응을 유의하게 개선시켰다.

[0149] 표 11.

처리	델타 귀 두께 (mm) ± SEM	이소타입의 % 억제	p-값
이소타입 대조군	0.108±0.005	N/A	
항체 **I-4P** **10 mg/kg**	0.056±0.008	47.9±7.8	0.0001
항체 **I-4P** **1 mg/kg**	0.064±0.007	41.4±6.4	0.0001

[0150]

[0151] **서열**

[0152] **항체 I-4P 및 항체 I-IgG1의 HCDR1 (서열식별번호: 1)**

[0153] KASGFSFSSGYYMA

[0154] **항체 I-4P 및 항체 I-IgG1의 HCDR2 (서열식별번호: 2)**

[0155] LIGVGSGSLWYAQKFQG

[0156] **항체 I-4P 및 항체 I-IgG1의 HCDR3 (서열식별번호: 3)**

[0157] ARHFALSDPFNL

[0158] **항체 I-4P 및 항체 I-IgG1의 LCDR1 (서열식별번호: 4)**

[0159] QASESIDSYLL

[0160] **항체 I-4P 및 항체 I-IgG1의 LCDR2 (서열식별번호: 5)**

[0161] KQASTLAS

[0162] **항체 I-4P 및 항체 I-IgG1의 LCDR3 (서열식별번호: 6)**

[0163] QNYYDISSND

[0164] **항체 I-4P 및 항체 I-IgG1의 항체 HCVR (서열식별번호: 7)**

XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSFSSGYYMAWVRQAPGQGLEWMGLI
GVGSGSLWYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARHFALSDP
[0165] FNLWGQGTLVTVSS

[0166] 여기서, 위치 1에서 Xaa는 글루타민 또는 피로글루탐산이다.

[0167] **항체 I-4P 및 항체 I-IgG1의 항체 LCVR (서열식별번호: 8)**

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCQASESIDSYLLWYQQKPDQSPKLLIKQASTLASG
[0168] VPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQNYYDISSNDFGGGTKVEIK

[0169] **항체 I-4P의 항체 중쇄 (서열식별번호: 9)**

XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSFSSGYYMAWVRQAPGQGLEWMGLI
GVGSGSLWYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARHFALSDP
FNLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDK
RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN
[0170] HYTQKSLSLSLX

[0171] 여기서, 위치 1에서 Xaa는 글루타민 또는 피로글루탐산이고; 위치 446에서 Xaa는 글리신이거나 또는 부재한다.

[0172] **항체 I-4P 및 항체 I-IgG1의 항체 경쇄 (서열식별번호: 10)**

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCQASESIDSYLLWYQQKPDQSPKLLIKQASTLASG
VPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQNYYDISSNDFGGGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
[0173] SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0174] **항체 I-IgG1의 항체 중쇄 (서열식별번호: 11)**

XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSFSSGYYMAWVRQAPGQGLEWMGLI
GVGSGSLWYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARHFALSDP
FNLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
[0175] ALHNHYTQKSLSLSPGX

[0176] 여기서, 위치 1에서 Xaa는 글루타민 또는 피로글루탐산이고; 위치 450에서 Xaa는 리신이거나 또는 부재한다.

[0177] 항체 I-4P의 중쇄를 코딩하는 DNA (서열식별번호: 12)

caggtgcagctggtgcagtctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtttcctgcaaggcatctggattctcc
ttcagtagcggctactacatggcatgggtgcggcaggcccctggacaagggcttgagtggatgggactgattggtgttggtagt
ggtagcctatggtacgcgcagaagttccaaggccgggtcaccatgaccagggacacgtccacgagcacagtctacatggagct
gagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtgcgagacattttgctctgtctgatccctttaacttgtggggccagg
gcacactcgtcaccgtctcctcagctagcaccaagggcccatcggtcttcccccctggcaccctgctccaggagcacctccgaga
gcacagccgccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccag
cggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttg
ggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagtccaaatatggtc
ccccatgcccaccctgcccagcacctgagttcctgggggggaccatcagtcttcctgttcccccaaaacccaaggacactctcat
gatctcccggacccctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagccaggaagaccccgaggtccagttcaactggtacgtgg
atggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcac
cgtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaaggcctcccgtcctccatcgagaaaa
ccatctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacaccctgcccccatcccaggaggagatgaccaagaacc
aggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggaaagcaatgggcagccggagaa
caactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggtg
gcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctctg
ggt

[0178]

[0179] 항체 I-4P 및 항체 I-IgG1의 경쇄를 코딩하는 DNA (서열식별번호: 13)

gaaattgtgctgactcagtctccagactttcagtctgtgactccaaaggagaaagtcaccatcacctgccaggccagtgagtcgat
tgatagctatttactgtggtaccagcagaaaccagatcagtctccaaagctcctcatcaagcaggcatccactctggcatctgggg
tcccctcgaggttcagtggcagtggatctgggacagatttcaccctcaccatcaatagcctggaagctgaagatgctgcaacgtat
tactgtcaaaactattatgatattagtagtaatgatttcggcggagggaccaaggtggagatcaaacggaccgtggctgcaccatc
tgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagagg
ccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggaca
gcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcaccca
tcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgc

[0180]

[0181] 항체 I-IgG1의 중쇄를 코딩하는 DNA (서열식별번호: 14)

caggtgcagctggtgcagtctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtttcctgcaaggcatctggattctcc
ttcagtagcggctactacatggcatgggtgcggcaggcccctggacaagggcttgagtggatgggactgattggtgttggtagt
ggtagcctatggtacgcgcagaagttccaaggccgggtcaccatgaccagggacacgtccacgagcacagtctacatggagct
gagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtgcgagacattttgctctgtctgatccctttaacttgtggggccagg
gcacactcgtcaccgtctcctcagctagcaccaagggcccatcggtcttcccctggcaccctcctccaagagcacctctgggg
gcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccag
cggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttg
ggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtga
caaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaagga
caccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactg
gtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcag
cgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccca
tcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgac
caagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcag
ccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaag
agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcc
ctgtctccgggtaag

[0182]

[0183] 인간 CD200R (서열식별번호: 15)

MLCPWRTANLGLLLILTIFLVAEAEGAAQPNNSLMLQTSKENHALASSSLCMDE
KQITQNYSKVLAEVNTSWPVKMATNAVLCCPPIALRNLIIITWEIILRGQPSCTKA
YRKETNETKETNCTDERITWVSRPDQNSDLQIRPVAITHDGYYRCIMVTPDGNFH
RGYHLQVLVTPELTLFQNRNRTAVCKAVAGKPAAQISWIPEGDCATKQEYWSN
GTVTVKSTCHWEVHNVSTVTCHVSHLTGNKSLYIELLPVPGAKKSAKLYIPYIILT
IIILTIVGFIWLLKVNGCRKYKLNKTESTPVVEEDEMQPYASYTEKNNPLYDTTNK
VKASQALQSEVDTDLHTL

[0184]

[0185] 시노몰구스 원숭이 CD200R (서열식별번호: 16)

MLCPWRTANLGLLLILAVFLVAEAEGAAQSNNSLMLQTSKENHTLASNSLCMDE
KQITQNHSKVLAEVNISWPVQMARNAVLCCPPIEFRNLIVITWEIILRGQPSCTKT
YRKDTNETKETNCTDERITWVSTPDQNSDLQIHPVAITHDGYYRCIMATPDGNFH
RGYHLQVLVTPEVTLFESRNRTAVCKAVAGKPAAQISWIPAGDCAPTEQEYWGN
GTVTVKSTCHWEGHNVSTVTCHVSHLTGNKSLYIELLPVPGAKKSAKLYMPYVI
LTIIILTIVGFIWLLKISGCRKYNLNKTESTSVVEEDEMQPYASYTEKNNPLYDTTN
KVKASQALQSEVGTDLHTL

[0186]

[0187] 시노몰구스 원숭이 CD200RLa (서열식별번호: 17)

MHTLGKMSASRLLISIIIMVSASSSSCMDGKQMTQNYSKMSAEGNISQPVLMDTN
AMLCCPPIEFRNLIVIVWEIIIRGQPSCTKAYRKETNETKETNCTDERITWVSTPDQ
NSDLQIHPVAITHDGYYRCIMATPDGNFHRGYHLQVLVTPEVTLFQSRNRTAVCK
AVAGKPAAQISWIPAGDCAPTEHEYWGNGTVTVESMCHWGDHNASTMTCHVS
HLTGNKSLYIKLNSGLRTSGSPALDLLIILYVKLSLFVVILVTTGFVFFQRINYVRK
SL

[0188]

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Eli Lilly and Company

<120> CD200R AGONIST ANTIBODIES AND USES THEREOF

<130> X21772

<150> US 62/731204

<151> 2018-09-14

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 1

Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Tyr Met Ala

1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 2

Leu Ile Gly Val Gly Ser Gly Ser Leu Trp Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 3

Ala Arg His Phe Ala Leu Ser Asp Pro Phe Asn Leu

1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 4

Gln Ala Ser Glu Ser Ile Asp Ser Tyr Leu Leu

1 5 10

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 5

Lys Gln Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 6

Gln Asn Tyr Tyr Asp Ile Ser Ser Asn Asp

1 5 10

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa at position 1 is either glutamine or pyroglutamic acid

<400> 7

Xaa 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 Phe Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Leu Ile Gly Val Gly Ser Gly Ser Leu Trp Tyr Ala Gln Lys
50 55 60

Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val
65 70 75 80

Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg His Phe Ala Leu Ser Asp Pro Phe Asn Leu Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 8

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Asp Ser Tyr
20 25 30

Leu Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Gln Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

<210> 9

<211
> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa at position 1 is either glutamine or pyroglutamic acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (446)..(446)

<223> Xaa at position 446 is either glycine or absent

<400> 9

Xaa 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 Phe Ser Phe Ser Ser Gly

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

85 90 95
Cys Ala Arg His Phe Ala Leu Ser Asp Pro Phe Asn Leu Trp Gly Gln
100 105 110

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

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro

210 215 220

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

225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Xaa

435 440 445

<210> 10

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequences

<400> 10

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Asp Ser Tyr

20 25 30

Leu Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Asp Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala

100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser

115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu

130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 11

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa at position 1 is either glutamine or pyroglutamic acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (450)..(450)

<223> Xaa at position 450 is either lysine or absent

<400> 11

Xaa 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 Phe Ser Phe Ser Ser Gly

20 25 30

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

35 40 45

Met Gly Leu Ile Gly Val Gly Ser Gly Ser Leu Trp Tyr Ala Gln Lys

50 55 60

Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val
65 70 75 80

Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg His Phe Ala Leu Ser Asp Pro Phe Asn Leu Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Xaa
450

<210> 12
<211> 1338
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct

<400> 12
caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcctgcaagg catctggatt ctccttcagt agcggctact acatggcatg ggtgcggcag 120
gcccctggac aagggcttga gtggatggga ctgattggtg ttggtagtgg tagcctatgg 180
tacgcgcaga agttccaagg ccgggtcacc atgaccaggg acacgtccac gagcacagtc 240
tacatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg tgtattactg tgcgagacat 300
tttgctctgt ctgatccctt taacttgtgg ggccagggca cactcgtcac cgtctcctca 360

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct gctccaggag cacctccgag 420

agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 600

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 660

aaatatggtc ccccatgccc accctgccca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 720

ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 780

tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 840

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 900

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960

tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020

gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 1080

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1140

tgggaaagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200

gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 1260

aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 1320

ctctccctgt ctctgggt 1338

<210> 13

<211> 645

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 13

gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60

atcacctgcc aggccagtga gtcgattgat agctatttac tgtggtacca gcagaaacca 120

gatcagtctc caaagctcct catcaagcag gcatccactc tggcatctgg ggtcccctcg 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240

gaagatgctg caacgtatta ctgtcaaaac tattatgata ttagtagtaa tgatttcggc 300

ggagggacca aggtggagat caaacggacc gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgc 645

<210> 14

<211> 1350

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 14

caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60

tcctgcaagg catctggatt ctccttcagt agcggctact acatggcatg ggtgcggcag 120

gcccctggac aagggcttga gtggatggga ctgattggtg ttggtagtgg tagcctatgg 180

tacgcgcaga agttccaagg ccgggtcacc atgaccaggg acacgtccac gagcacagtc 240

tacatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg tgtattactg tgcgagacat 300

tttgctctgt ctgatccctt taacttgtgg ggccagggca cactcgtcac cgtctcctca 360

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420

ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660

aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 720

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaag 1350

<210> 15

<211> 348

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Leu Cys Pro Trp Arg Thr Ala Asn Leu Gly Leu Leu Leu Ile Leu
1 5 10 15

Thr Ile Phe Leu Val Ala Glu Ala Glu Gly Ala Ala Gln Pro Asn Asn
20 25 30

Ser Leu Met Leu Gln Thr Ser Lys Glu Asn His Ala Leu Ala Ser Ser
35 40 45

Ser Leu Cys Met Asp Glu Lys Gln Ile Thr Gln Asn Tyr Ser Lys Val
50 55 60

Leu Ala Glu Val Asn Thr Ser Trp Pro Val Lys Met Ala Thr Asn Ala
65 70 75 80

Val Leu Cys Cys Pro Pro Ile Ala Leu Arg Asn Leu Ile Ile Ile Thr
85 90 95

Trp Glu Ile Ile Leu Arg Gly Gln Pro Ser Cys Thr Lys Ala Tyr Arg
100 105 110

Lys Glu Thr Asn Glu Thr Lys Glu Thr Asn Cys Thr Asp Glu Arg Ile
115 120 125

Thr Trp Val Ser Arg Pro Asp Gln Asn Ser Asp Leu Gln Ile Arg Pro
130 135 140

Val Ala Ile Thr His Asp Gly Tyr Tyr Arg Cys Ile Met Val Thr Pro
145 150 155 160

Asp Gly Asn Phe His Arg Gly Tyr His Leu Gln Val Leu Val Thr Pro
165 170 175

Glu Leu Thr Leu Phe Gln Asn Arg Asn Arg Thr Ala Val Cys Lys Ala
180 185 190

Val Ala Gly Lys Pro Ala Ala Gln Ile Ser Trp Ile Pro Glu Gly Asp
195 200 205

Cys Ala Thr Lys Gln Glu Tyr Trp Ser Asn Gly Thr Val Thr Val Lys
210 215 220

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

Val Asn Gly Cys Arg Lys Tyr Lys Leu Asn Lys Thr Glu Ser Thr Pro
290 295 300
Val Val Glu Glu Asp Glu Met Gln Pro Tyr Ala Ser Tyr Thr Glu Lys
305 310 315 320
Asn Asn Pro Leu Tyr Asp Thr Thr Asn Lys Val Lys Ala Ser Gln Ala
325 330 335
Leu Gln Ser Glu Val Asp Thr Asp Leu His Thr Leu
340 345

<210> 16

<211

> 349

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 16

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

50 55 60

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

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

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

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345

<210> 17

<211> 278

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 17

Met His Thr Leu Gly Lys Met Ser Ala Ser Arg Leu Leu Ile Ser Ile

1 5 10 15

Ile Ile Met Val Ser Ala Ser Ser Ser Ser Cys Met Asp Gly Lys Gln

20 25 30

Met Thr Gln Asn Tyr Ser Lys Met Ser Ala Glu Gly Asn Ile Ser Gln

35 40 45

Pro Val Leu Met Asp Thr Asn Ala Met Leu Cys Cys Pro Pro Ile Glu

50 55 60

Phe Arg Asn Leu Ile Val Ile Val Trp Glu Ile Ile Ile Arg Gly Gln

65 70 75 80

Pro Ser Cys Thr Lys Ala Tyr Arg Lys Glu Thr Asn Glu Thr Lys Glu

85 90 95

Thr Asn Cys Thr Asp Glu Arg Ile Thr Trp Val Ser Thr Pro Asp Gln

100 105 110

Asn Ser Asp Leu Gln Ile His Pro Val Ala Ile Thr His Asp Gly Tyr

115 120 125

Tyr Arg Cys Ile Met Ala Thr Pro Asp Gly Asn Phe His Arg Gly Tyr

130 135 140

His Leu Gln Val Leu Val Thr Pro Glu Val Thr Leu Phe Gln Ser Arg

145 150 155 160

Asn Arg Thr Ala Val Cys Lys Ala Val Ala Gly Lys Pro Ala Ala Gln

165 170 175

Ile Ser Trp Ile Pro Ala Gly Asp Cys Ala Pro Thr Glu His Glu Tyr
180 185 190
Trp Gly Asn Gly Thr Val Thr Val Glu Ser Met Cys His Trp Gly Asp
195 200 205

His Asn Ala Ser Thr Met Thr Cys His Val Ser His Leu Thr Gly Asn
210 215 220
Lys Ser Leu Tyr Ile Lys Leu Asn Ser Gly Leu Arg Thr Ser Gly Ser
225 230 235 240
Pro Ala Leu Asp Leu Leu Ile Ile Leu Tyr Val Lys Leu Ser Leu Phe
245 250 255
Val Val Ile Leu Val Thr Thr Gly Phe Val Phe Phe Gln Arg Ile Asn
260 265 270

Tyr Val Arg Lys Ser Leu
275