



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월05일
(11) 등록번호 10-2763369
(24) 등록일자 2025년01월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2809 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2020-7002328
(22) 출원일자(국제) 2018년06월22일
심사청구일자 2021년06월22일
(85) 번역문제출일자 2020년01월22일
(65) 공개번호 10-2020-0092301
(43) 공개일자 2020년08월03일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/039156
(87) 국제공개번호 WO 2019/005639
국제공개일자 2019년01월03일
(30) 우선권주장
62/524,557 2017년06월25일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
JP2004531263 A*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
시스트리이문, 인코포레이티드
미국, 워싱턴 98052, 레드몬드, 15318 엔이 95 스트리트
바이리-바이오 (청두) 파마슈티칼 컴퍼니, 리미티드
중국, 쓰촨 611130, 청두, 웬 지앙 디스트릭트, 139 바이리 로드
(72) 발명자
주 이
중국, 쓰촨, 청두, 우허우 디스트릭트, 리두 로드, 넘버 6, 빌딩 6, 8-24
울슨 올레
미국, 워싱턴 98208, 에버렛, 5309 117 스트리트
사우스이스트
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 윤소라

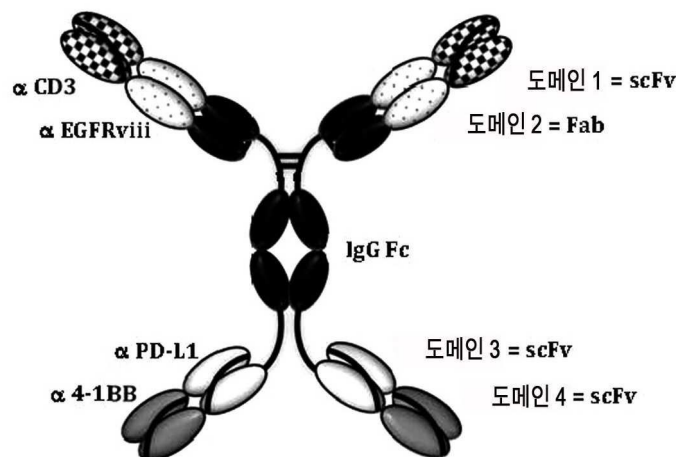
(54) 발명의 명칭 다중-특이적 항체 및 이를 제조하는 방법 및 이의 용도

(57) 요약

본 개시 내용은 N-말단에서 C-말단으로 일렬로 하기를 포함하는, N-말단 및 C-말단을 갖는 사중-특이적 항체 단량체를 제공한다: N-말단에 제1 scFv 도메인, Fab 도메인, Fc 도메인, 제2 scFv 도메인, 및 C-말단에 제3 scFv; 여기서 제1 scFv 도메인, Fab 도메인, 제2 scFv 도메인, 및 제3 scFv 도메인은 각각 상이한 항원에 대해 결합 특이성을 가진다. 일 구현예에서, 항원은 중앙 항원, 면역 신호전달 항원, 또는 이들의 조합이다. 본원에 개시된 사중-특이적 항체를 포함하는 다중-특이적 항체 또한 제공된다.

대표도 - 도1

도 1. 사중-특이적 항체 구조



(52) CPC특허분류

C07K 16/2827 (2013.01)
C07K 16/2863 (2013.01)
C07K 16/2878 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/60 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2319/33 (2013.01)

(72) 발명자

시아 동

미국, 워싱턴 98052, 레드몬드, 17401 노스이스트
 97 웨이

젤리맨 데이비드

미국, 워싱턴 98019, 듀발, 26918 노스이스트 버지
 니아 스트리트

비코바 카트리나

미국, 워싱턴 98125, 시애틀, 12346 36 애비뉴 노
 스이스트

루소 앤-마리

미국, 워싱턴, 시애틀, 11532 데이턴 애비뉴 앤.

브래디 빌

미국, 워싱턴 98021, 보셀, 618 219 플레이스 사우
 스웨스트

렌쇼 블레이어

미국, 워싱턴 98058, 렌튼, 16210 사우스이스트
 166 코트

코바세비치 브라이언

미국, 워싱턴 98296, 스노호미쉬, 13916 233 스트
 리트 사우스이스트

리앙 유

미국, 워싱턴 98052, 레드몬드, 18411 노스이스트
 26 웨이

가오 제렌

미국, 워싱턴 98053, 레드몬드, 9816 229 레인 노
 스이스트

(56) 선행기술조사문헌

JP2006512407 A*
 KR1020080032097 A*
 KR1020160035065 A*
 WO2016105450 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

N-말단 및 C-말단을 갖는 사중-특이적 항체 단량체로서, N-말단에서 C-말단으로 일렬로,

N-말단에 제1 scFv 도메인,

Fab 도메인,

Fc 도메인,

제2 scFv 도메인, 및

C-말단에 제3 scFv 도메인을 포함하고,

상기 제1 scFv 도메인 및 Fc 도메인은 각각 Fab 도메인에 연결되며, 제2 scFv 도메인은 Fc 도메인에 연결되고, 제2 scFv 도메인은 제3 scFv 도메인에 연결되며, 여기서,

a) 제1 scFv 도메인은 CD3에 대해 결합 특이성을 가지며, 서열 번호 2에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 4에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하고; Fab 도메인은 EGFR VIII에 대해 결합 특이성을 가지며, 서열 번호 50에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 52에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하며; 제2 scFv 도메인은 PD-L1에 대해 결합 특이성을 가지며, 서열 번호 14에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 16에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하고; 제3 scFv 도메인은 4-1BB에 결합 특이성을 가지고, 서열 번호 22에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 24에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하거나;

b) 제1 scFv 도메인은 4-1BB에 대해 결합 특이성을 가지며, 서열 번호 30에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 32에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하고; Fab 도메인은 PD-L1에 대해 결합 특이성을 가지며, 서열 번호 10에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 12에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하며; 제2 scFv 도메인은 ROR1에 대해 결합 특이성을 가지며, 서열 번호 38에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 40에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하고; 제3 scFv 도메인은 CD3에 결합 특이성을 가지고, 서열 번호 2에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 4에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하거나;

c) 제1 scFv 도메인은 4-1BB에 대해 결합 특이성을 가지며, 서열 번호 26에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 28에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하고; Fab 도메인은 PD-L1에 대해 결합 특이성을 가지며, 서열 번호 10에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 12에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하며; 제2 scFv 도메인은 ROR1에 대해 결합 특이성을 가지며, 서열 번호 38에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 40에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하고; 제3 scFv 도메인은 CD3에 결합 특이성을 가지고, 서열 번호 2에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 4에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하거나;

d) 제1 scFv 도메인은 PD-1에 대해 결합 특이성을 가지며, 서열 번호 18에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 20에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하고; Fab 도메인은 4-1BB에 대해 결합 특이성을 가지며, 서열 번호 26에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 28에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하며; 제2 scFv 도메인은 CD19에 대해 결합 특이성을 가지며, 서열 번호 54에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 56에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하고; 제3 scFv 도메인은 CD3에 결합 특이성을 가지고, 서열 번호 2에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 4에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하거나;

e) 제1 scFv 도메인은 4-1BB에 대해 결합 특이성을 가지며, 서열 번호 26에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 28에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하고; Fab 도메인은 PD-L1에 대해 결합 특이성을 가지며, 서열 번호 10에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 12에 제시된 아미노산 서열의 3개의

CDR을 포함하며; 제2 scFv 도메인은 CD3에 대해 결합 특이성을 가지며, 서열 번호 2에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 4에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하고; 제3 scFv 도메인은 CD19에 결합 특이성을 가지고, 서열 번호 54에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 56에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하거나;

f) 제1 scFv 도메인은 PD-L1에 대해 결합 특이성을 가지며, 서열 번호 10에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 12에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하고; Fab 도메인은 4-1BB에 대해 결합 특이성을 가지며, 서열 번호 26에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 28에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하며; 제2 scFv 도메인은 CD19에 대해 결합 특이성을 가지며, 서열 번호 54에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 56에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하고; 제3 scFv 도메인은 CD3에 결합 특이성을 가지고, 서열 번호 2에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 4에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하거나;

g) 제1 scFv 도메인은 4-1BB에 대해 결합 특이성을 가지며, 서열 번호 26에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 28에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하고; Fab 도메인은 CD19에 대해 결합 특이성을 가지며, 서열 번호 54에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 56에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하며; 제2 scFv 도메인은 CD3에 대해 결합 특이성을 가지며, 서열 번호 2에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 4에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하고; 제3 scFv 도메인은 PD-L1에 결합 특이성을 가지고, 서열 번호 14에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 16에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하거나; 또는

h) 제1 scFv 도메인은 CD19에 대해 결합 특이성을 가지며, 서열 번호 54에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 56에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하고; Fab 도메인은 CD3에 대해 결합 특이성을 가지며, 서열 번호 2에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 4에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하며; 제2 scFv 도메인은 4-1BB에 대해 결합 특이성을 가지며, 서열 번호 26에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 28에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하고; 제3 scFv 도메인은 PD-L1에 결합 특이성을 가지고, 서열 번호 14에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR, 및 서열 번호 16에 제시된 아미노산 서열의 3개의 CDR을 포함하는,

사중-특이적 항체 단량체.

청구항 2

제1항에 있어서, Fc 도메인이 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는, 사중-특이적 항체 단량체.

청구항 3

제1항에 있어서, 제1 scFv 도메인, 제2 scFv 도메인, 또는 제3 scFv 도메인이 gly-gly-gly-gly-ser(G4S)_n 링커를 포함하고, 여기서 n이 2, 3, 또는 4인, 사중-특이적 항체 단량체.

청구항 4

제1항에 있어서,

a) 제1 scFv 도메인은 서열 번호 2 및 4에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; Fab 도메인은 서열 번호 50 및 52에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 제2 scFv 도메인은 서열 번호 14 및 16에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 제3 scFv 도메인은 서열 번호 22 및 24에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서, 상기 퍼센트 상동성은 98% 이상이거나;

b) 제1 scFv 도메인은 서열 번호 30 및 32에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; Fab 도메인은 서열 번호 10 및 12에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 제2 scFv 도메인은 서열 번호 38 및 40에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 제3 scFv 도메인은 서열 번호 2 및 4에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서, 상기 퍼센트 상동성은 98% 이상이거나;

c) 제1 scFv 도메인은 서열 번호 26 및 28에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; Fab 도메인은 서열 번호 10 및 12에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 제2 scFv 도메인은 서열 번호 38 및 40에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 제3 scFv 도메인은 서열 번호 2 및 4에 대해

퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서, 상기 퍼센트 상동성은 98% 이상이거나;

d) 제1 scFv 도메인은 서열 번호 18 및 20에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; Fab 도메인은 서열 번호 26 및 28에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 제2 scFv 도메인은 서열 번호 54 및 56에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 제3 scFv 도메인은 서열 번호 2 및 4에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서, 상기 퍼센트 상동성은 98% 이상이거나;

e) 제1 scFv 도메인은 서열 번호 26 및 28에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; Fab 도메인은 서열 번호 10 및 12에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 제2 scFv 도메인은 서열 번호 2 및 4에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 제3 scFv 도메인은 서열 번호 54 및 56에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서, 상기 퍼센트 상동성은 98% 이상이거나;

f) 제1 scFv 도메인은 서열 번호 10 및 12에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; Fab 도메인은 서열 번호 26 및 28에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 제2 scFv 도메인은 서열 번호 54 및 56에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 제3 scFv 도메인은 서열 번호 2 및 4에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서, 상기 퍼센트 상동성은 98% 이상이거나;

g) 제1 scFv 도메인은 서열 번호 26 및 28에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; Fab 도메인은 서열 번호 54 및 56에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 제2 scFv 도메인은 서열 번호 2 및 4에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 제3 scFv 도메인은 서열 번호 14 및 16에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서, 상기 퍼센트 상동성은 98% 이상이거나; 또는

h) 제1 scFv 도메인은 서열 번호 54 및 56에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; Fab 도메인은 서열 번호 2 및 4에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며; 제2 scFv 도메인은 서열 번호 26 및 28에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; 제3 scFv 도메인은 서열 번호 14 및 16에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서, 상기 퍼센트 상동성은 98% 이상인,

사중-특이적 항체 단량체.

청구항 5

제1항의 사중-특이적 항체 단량체를 포함하는 사중-특이적 항체.

청구항 6

제5항에 있어서, 서열 번호 66 및 68에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 퍼센트 상동성이 98% 이상인, 사중-특이적 항체.

청구항 7

제1항의 사중-특이적 항체 단량체를 암호화하는 단리된 핵산.

청구항 8

제7항의 단리된 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 9

제7항의 단리된 핵산을 포함하는 단리된 숙주 세포로서, 상기 단리된 숙주 세포가 원핵 세포 또는 진핵 세포인, 단리된 숙주 세포.

청구항 10

사중-특이적 항체 또는 단량체를 제조하는 방법으로서,

사중-특이적 항체 또는 단량체를 암호화하는 DNA 서열이 발현되도록 제7항의 단리된 핵산을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

상기 사중-특이적 항체 또는 단량체를 정제하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 11

약학적으로 허용가능한 담체 및 제5항의 사중-특이적 항체를 포함하는, 암을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 연관 출원의 상호 참조
- [0002] 본 출원은 2017년 6월 25일자로 출원한 미국 가출원 제 62524557호의 이익을 주장하며, 이는 참조를 위해 전체가 본원에 명확히 포함된다.
- [0003] 기술 분야
- [0004] 본 개시 내용은 일반적으로 생물학적 치료제의 기술 분야에 관한 것이며, 특히 다중-특이적 항체를 제조하고 사용하는 것에 관한 것이다.

배경 기술

- [0005] 암 세포는 면역계를 회피하기 위해 다양한 전략을 개발한다. 면역 회피의 기본 메커니즘 중 하나는 면역계에 의한 암 세포의 인식 감소이다. 암 특이적 항원의 결합이 있는 제시 또는 이의 결합은 면역 내성 및 암의 진행을 초래한다. 효과적인 면역 인식의 존재 하에서, 종양은 면역계에 의한 제거를 피하기 위해 다른 메커니즘을 사용한다. 면역적격 종양은 면역 반응을 하향 조절하기 위해 억제성 미세환경을 조성한다. 종양 세포, 조절 T 세포, 골수-유래 억제 세포, 기질 세포, 및 다른 세포 유형을 포함하는, 다수의 플레이어가 억제성 종양 미세환경 형성에 관여한다. 면역 반응의 억제는 면역억제성 사이토카인의 분비 또는 국소 환경으로부터 필수 생존 인자의 제거를 통해, 세포 접촉-의존성 방식뿐만 아니라 접촉-비의존성 방식으로도 수행될 수 있다. 세포 접촉-의존성 억제는 세포 표면에서 발현되는 분자, 예를 들어, 프로그램 세포 사멸 리간드 1(PD-L1), T-림프구-관련 단백질 4(CTLA-4) 등에 의존한다(Dunn, et al., 2004, Immunity, 21(2): 137-48; Adachi & Tamada, 2015, Cancer Sci., 106(8): 945-50).
- [0006] 종양이 면역계에 의한 인식을 회피하는 메커니즘이 더 잘 이해됨에 따라, 이러한 메커니즘을 표적으로 하는 새로운 치료 방식이 최근에 등장하고 있다. 2011년 3월 25일에, 미국 식품 의약국(FDA)은 절제 불가능하거나 전이성인 흑색종의 치료를 위해 이필리무맵(Yervoy, Bristol-Myers Squibb) 주사를 승인했다. 여보이(Yervoy)는 활성화된 T 세포에서 발현되는 세포독성 T-림프구-관련 단백질 4(CTLA-4)에 결합하여, 항원-제시 세포에서 CTLA-4와 CD80/86의 상호작용을 차단함으로써, CTLA-4를 통해 T 세포로 전달되는 음성 또는 억제 신호를 차단하며, 이는 항원-특이적 T 세포의 재-활성화를 초래하여, 다수의 환자에서 종양의 박멸로 이어진다. 몇 년 뒤인 2014년에, FDA는 키트루다(Keytruda; 펌브롤리주맵(Pembrolizumab), Merck) 및 옵디보(Opdivo, 니볼루맵(Nivolumab, Bristol-Myers Squibb)를 진행성 흑색종의 치료를 위해 승인했다. 이 모노클로날 항체들은 활성화되고/되거나 소진된 T 세포에서 발현되는 PD-1에 결합하고, 종양에서 발현되는 PD-L1과 PD-1의 상호작용을 차단함으로써, PD-1을 통해 T 세포 내로 억제 신호를 제거하며, 이는 항원-특이적 T 세포의 재-활성화를 초래하여, 다시 다수의 환자에서 종양의 박멸로 이어진다. 그 이후로, 진행성 흑색종의 치료에 있어서 모노클로날 항체 여보이 단독을 모노클로날 항체 여보이 및 옵디보의 조합과 비교하는 추가 임상 실험이 수행되었고, 이는 항체의 조합으로 치료받은 환자들에게서 전체 생존 및 무진행(progression-free) 생존이 개선되었음을 보여주었다(Hodi et al., 2016, Lancet Oncol. 17(11):1558-1568, Hellman et al., 2018, Cancer Cell 33(5): 853-861). 그러나, 다수의 임상 시험이 하나 이상의 면역 체크포인트 분자에 특이적인 모노클로날 항체로 암 환자를 치료하는 것이 큰 이점이 있음을 보여줌에 따라, 항원-특이적 T 세포에 의해 인식되는 신규한 T 세포 에피토프(들)을 생성하는 높은 돌연변이 부담(burden)을 가진 환자만이 임상 반응을 보인다는 데이터가 나타났다(Snyder et al., 2014, NEJM 371:2189-2199). 낮은 종양 돌연변이 하중을 갖는 환자들은 대부분 객관적인 임상 반응을 보이지 않았다(Snyder et al., 2014, NEJM 371:2189-2199, Hellman et al., 2018, Cancer Cell 33(5): 853-861).
- [0007] 최근에, 다른 그룹은 T 세포를 활성화시키기 위해 항원-제시 세포에 의한 네오에피토프(neoepitope) 제시의 존재를 필요로 하지 않는 대안적인 접근법을 개발하였다. 일 예는 이중-특이적 항체의 개발로서, 이는 종양 관련 항원, 예를 들어 CD19에 특이적인 항체의 결합 도메인이 T 세포 상의 CD3에 특이적인 항체 결합 도메인에 연결되어, 이중-특이적 T 세포 관여자 또는 BiTE 분자를 생성한다. 2014년에, FDA는 전구 B-세포 급성 림프구성 백혈병(Precursor B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia)의 치료를 위해 블리나투모맵(Blinatumomab)이라 불리는 이중-특이적 항체를 승인했다. 블리나투모맵은 백혈병 세포에서 발현된 CD19에 특이적인 scFv를 T 세포에서 발현된 CD3에 특이적인 scFv와 연결시킨다(Bejtnjamin and Stein 2016, Ther Adv Hematol 7(3):142-146). 그러나, 재발 또는 난치성 ALL 환자에서 초기 반응률이 >50%임에도 불구하고, 많은 환자는 블리나투모맵으로의 성공적인 치료 후 블리나투모맵 치료에 내성이 생기거나 재발된다. 블리나투모맵 치료 후 블리나투모맵에 대해 내성이 생긴 사람 또는 재발한 사람은 활성화된 T 세포에서 발현된 PD-1을 통해 억제 신호를 유도하는 PD-L1과 같은 종양

세포에서 발현된 면역 체크포인트 억제 분자의 발현에 기인한다는 증거가 나타나고 있다(Feucht et al., 2016, Oncotarget 7(47):76902-76919). 블리나투모맵 치료에 내성이 있는 환자의 사례 연구에서, 2회차의 블리나투모맵 치료는 PD-1에 특이적이고 T 세포-발현된 PD-1과 종양 세포 발현된 PD-L1의 상호작용을 차단하는 모노클로날 항체, 캄브롤리주맵(Keytruda, Merck)의 첨가와 함께 수행되었으며, 이는 한 환자에서 45%에서 5% 미만으로 골수 내 종양 세포의 극적인 반응 및 감소를 초래하였다(Feucht et al., 2016, Oncotarget 7(47):76902-76919). 이러한 결과들은 이중-특이적 BiTe 분자를 하나 이상의 모노클로날 항체와 조합하는 것이 이들 중 어느 하나인 제제 단독과 비교하여 임상 활성을 상당히 증가시킬 수 있음을 보여준다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 개시 내용은 특히 사중-특이적(tetra-specific) 항체 단량체, 사중-특이적 단량체를 함유하는 항체, 이의 항원-결합 단편, 다중-특이적 항체, 개시된 항체를 포함하는 면역-접합체, 개시된 단량체, 항원-결합 단편, 및 항체의 제조 방법, 및 암을 치료하기 위해 개시된 분자를 사용하는 방법을 제공한다.

[0009] 일 측면에서, 본 출원은 사중-특이적 항체 단량체를 제공한다. 일 구현예에서, 사중-특이적 항체 단량체는 N-말단 및 C-말단을 가지며, N-말단에서 C-말단으로 일렬로(in tandem), N-말단에 제1 scFv 도메인, Fab 도메인, Fc 도메인, 제2 scFv 도메인, 및 C-말단에 제3 scFv 도메인을 포함한다. 제1 scFv 도메인, Fab 도메인, 제2 scFv 도메인, 및 제3 scFv 도메인은 각각 상이한 항원에 대해 결합 특이성을 갖는다.

과제의 해결 수단

[0010] 일 구현예에서, 항원은 종양 항원, 면역 신호전달 항원, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 구현예에서, 제1 scFv 도메인, Fab 도메인, 제2 scFv 도메인, 및 제3 scFv 도메인은 각각 종양 항원 또는 면역 신호전달 항원에 대해 결합 특이성을 갖는다. 일 구현예에서, 제1 scFv 도메인은 종양 항원에 대해 결합 특이성을 갖는다. 일 구현예에서, 제1 scFv 도메인은 면역 신호전달 항원에 대해 결합 특이성을 갖는다. 일 구현예에서, Fab 도메인은 종양 항원에 대해 결합 특이성을 갖는다. 일 구현예에서, Fab 도메인은 면역 신호전달 항원에 대해 결합 특이성을 갖는다. 일 구현예에서, 제2 scFv 도메인은 종양 항원에 대해 결합 특이성을 갖는다. 일 구현예에서, 제2 scFv 도메인은 면역 신호전달 항원에 대해 결합 특이성을 갖는다. 일 구현예에서, 제3 scFv 도메인은 종양 항원에 대해 결합 특이성을 갖는다. 일 구현예에서, 제3 scFv 도메인은 종양 항원에 대해 결합 특이성을 갖는다.

[0011] 일 구현예에서, 사중-특이적 단량체는 scFv 도메인, Fab 도메인, 제2 scFv 도메인, 및 제3 scFv 도메인을 포함하고, 이들은 각각 독립적으로 ROR1, PD-L1, CD3, CD28, 4-1BB, CEA, HER2, EGFR VIII, EGFR, LMP1, LMP2A, 메조텔린(Mesothelin), PSMA, EpCAM, 글리피칸-3, gpA33, GD2, TROP2, NKG2D, BCMA, CD19, CD20, CD33, CD123, CD22, CD30, PD-L1, PD1, OX40, 4-1BB, GITR, TIGIT, TIM-3, LAG-3, CTLA4, CD40, VISTA, ICOS, BTLA, LIGHT, HVEM, CSF1R, CD73, 및 CD39로부터 선택된 항원에 대해 결합 특이성을 갖는다. 일 구현예에서, scFv 도메인, Fab 도메인, 제2 scFv 도메인, 및 제3 scFv 도메인은 각각 독립적으로 ROR1, CEA, HER2, EGFR, EGFR VIII, LMP1, LMP2A, 메조텔린, PSMA, EpCAM, 글리피칸-3, gpA33, GD2, TROP2, BCMA, CD3, CD19, CD20, CD33, CD123, CD22, CD30; 또는 PD-L1, PD1, OX40, 4-1BB, GITR, TIGIT, TIM-3, LAG-3, CTLA4, CD40, VISTA, ICOS, BTLA, Light, HVEM, CD73, CD39 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 면역 체크포인트 조절인자를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 종양 특이적 항원에 대해 결합 특이성을 갖는다. 일 구현예에서, scFv 도메인의 한 세트는 면역 체크포인트 조절인자 또는 종양 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 일 구현예에서, CD3에 특이적인 scFv는 중쇄 또는 경쇄의 C 또는 N 말단 중 하나에 존재할 수 있다.

[0012] 일 구현예에서, 제1 scFv 도메인, Fab 도메인, 제2 scFv 도메인, 및 제3 scFv 도메인은 각각 독립적으로 CD3, EGRF VIII, PD-L1, 및 4-1BB로부터 선택된 항원에 대해 결합 특이성을 갖는다. 일 구현예에서, 제1 scFv 도메인은 CD3에 대해 결합 특이성을 갖는다. 일 구현예에서, Fab 도메인은 EGRF VIII에 대해 결합 특이성을 갖는다. 일 구현예에서, 제2 scFv 도메인은 PD-L1에 대해 결합 특이성을 갖는다. 일 구현예에서, 제3 scFv 도메인은 4-1BB에 대해 결합 특이성을 갖는다. 일 구현예에서, 제1 scFv 도메인은 CD3에 대해 결합 특이성을 갖고, Fab 도메인은 EGRF VIII에 대해 결합 특이성을 갖고, 제2 scFv 도메인은 PD-L1에 대해 결합 특이성을 가지며, 제3 scFv 도메인은 4-1BB에 대해 결합 특이성을 갖는다.

[0013] Fc 도메인은 인간화될 수 있다. 일 구현예에서, Fc 도메인은 인간 IgG1 Fc이다.

[0014] scFv 도메인은 scFv 도메인을 항체의 중쇄 또는 경쇄에 연결하는 링커를 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 링커

는 10개 초과인 아미노산을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 링커는 15개 초과인 아미노산 길이를 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 링커는 20개 미만의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0015] 일 구현예에서, 링커는 gly-gly-gly-gly-ser(G4S)_n 링커를 포함할 수 있고, n은 1 내지 20 사이의 정수일 수 있다. 예를 들어, n은 2, 4, 또는 6일 수 있다. 일 구현예에서, 제1 scFv 도메인, 제2 scFv 도메인, 또는 제3 scFv 도메인은 gly-gly-gly-gly-ser(G45)_n 링커를 포함할 수 있으며, 여기서 n은 2 또는 4이다.

[0016] 일 구현예에서, 본 출원은 서열 번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 및 60에 대해 퍼센트 상동성(percentage homology)을 갖는 아미노산 서열을 갖는 사중-특이적 항체 단량체를 제공한다. 퍼센트 상동성은 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상이다.

[0017] 본 출원은 추가로 항원-결합 단편을 제공한다. 일 구현예에서, 본 출원은 scFv 도메인을 제공한다. 일 구현예에서, scFv 도메인은 서열 번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58 및 60에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 가지며, 여기서 퍼센트 상동성은 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상이다. 일 구현예에서, 본 출원은 Fab 도메인을 제공한다. 일 구현예에서, Fab 도메인은 서열 번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58 및 60에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 퍼센트 상동성은 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상이다. 본원에 개시된 항원-결합 단편은 사중-특이적 항체 단량체 또는 다중-특이적 항체를 구축하는데 사용될 수 있다.

[0018] 일 측면에서, 본 출원은 다중-특이적 항체를 제공한다. 일 구현예에서, 다중-특이적 항체는 사중-특이적 항체 단량체를 포함한다. 일 구현예에서, 다중-특이적 항체는 본원에 개시된 사중-특이적 항체 단량체 2개를 포함한다. 사중-특이적 항체 단량체는 각각 4개의 항원-결합 도메인을 가지므로, 개시된 다중-특이적 항체는 8개의 항원-결합 도메인을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 이러한 다중-특이적 항체의 항원-결합 도메인은 각각 독립적으로 상이한 항원에 대해 결합 특이성을 가져, 팔중-특이적(octa-specific) 항체를 제공한다. 일 구현예에서, 다중-특이적 항체는 오중-특이적(penta-specific) 항체이다. 일 구현예에서, 다중-특이적 항체는 오중-특이적 항체이다. 일 구현예에서, 다중-특이적 항체는 오중-특이적 항체 육중-특이적(hexa-specific) 항체이다. 일 구현예에서, 다중-특이적 항체는 오중-특이적 항체 칠중-특이적(hepta-specific) 항체이다.

[0019] 일 구현예에서, 다중-특이적 항체는 사중-특이적 항체 단량체의 이량체를 포함하여 사중-특이적 항체를 제공한다. 일 구현예에서, 본 출원은 단리되고 정제된, 또는 비자연적으로 존재하는 다중-특이적 항체를 제공한다. 일 구현예에서, 본 출원은 서열 번호 66 및 68에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 사중-특이적 항체를 제공한다. 퍼센트 상동성은 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상이다.

[0020] 본 출원은 사중-특이적 항체 단량체, 다중-특이적 항체, 또는 이들의 항원-결합 단편을 암호화하는 단리된 핵산 서열을 제공한다. 일 구현예에서, 핵산은 서열 번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 및 59를 갖는 사중-특이적 항체 단량체에 대해 퍼센트 상동성을 갖는 아미노산 서열을 암호화한다. 퍼센트 상동성은 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상이다.

[0021] 본 출원은 본원에 개시된 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터 및 숙주 세포를 추가로 제공한다. 일 구현예에서, 숙주 세포는 발현 벡터를 포함한다. 숙주 세포는 원핵 세포 또는 진핵 세포일 수 있다.

[0022] 본 출원은 면역-접합체를 추가로 제공한다. 일 구현예에서, 면역-접합체는 링커를 통해 본원에 개시된 다중-특이적 항체에 연결된 세포독성제 또는 영상화제(imaging agent)를 포함한다.

[0023] 링커는 절단 가능하거나 절단 불가능할 수 있다. 링커는 에스테르 결합, 에테르 결합, 아미드 결합, 이황화 결합, 이미드 결합, 술폰 결합, 포스페이트 결합, 인 에스테르 결합, 펩티드 결합, 또는 이들의 조합과 같은 공유 결합을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 링커는 소수성 폴리(에틸렌 글리콜) 링커를 포함한다.

[0024] 세포독성제는 화학요법제, 성장 억제제, 칼리케아미신(calicheamicin) 부류의 세포독성제, 항유사분열제, 독소, 방사성 동위원소, 치료제, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 세포독성제는 칼리케아미신, 오조가미신(ozogamicin), 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E), 엠탄신(emtansine), 이들의 유도체 또는 조합을 포함한다.

[0025] 영상화제는 이미징 목적에 유용한 임의의 화합물일 수 있다. 일 구현예에서, 영상화제는 방사성 핵종

(radionuclide), 형광제, 퀀텀 닷(quantum dot), 또는 이들의 조합일 수 있다.

- [0026] 본 출원은 약학적 조성물을 추가로 제공한다. 일 구현예에서, 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 및 본원에 개시된 사중-특이적 항체 단량체를 포함한다. 일 구현예에서, 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 및 본원에 개시된 다중-특이적 항체를 포함한다. 일 구현예에서, 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 및 본원에 개시된 항원-결합 단편을 포함한다. 일 구현예에서, 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 및 본원에 개시된 면역-접합체를 포함한다.
- [0027] 일 구현예에서, 약학적 조성물은 치료제를 추가로 포함한다. 예시적인 치료제는 방사성 동위원소, 방사성 핵종, 독소, 화학요법제 또는 이들의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일 구현예에서, 치료제는 항체, 효소, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 구현예에서, 치료제는 항에스트로겐제, 수용체 티로신 키나제 억제제, 키나제 억제제, 세포 주기 억제제, DNA, RNA 또는 단백질 합성 억제제, RAS 억제제, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 구현예에서, 치료제는 체크포인트 억제제를 포함한다. 일 구현예에서, 치료제는 PD1, PDL1, CTLA4, 4-1BB, OX40, GITR, ICOS, LIGHT, TIM3, LAG3, TIGIT, CD40, CD27, HVEM, BTLA, VISTA, B7H4, CSF1R, NKG2D, CD73, 이들의 유도체 또는 조합의 억제제를 포함한다.
- [0028] 추가의 측면에서, 본 출원은 사중-특이적 항체 단량체, 다중-특이적 항체, 이들의 항원-결합 단편, 및 이들의 면역-접합체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0029] 일 구현예에서, 방법은 항체를 암호화하는 DNA 서열이 발현되도록 본원에 개시된 핵산 서열을 함유하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 항체를 정제하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 항체는 사중-특이적 항체이다.
- [0030] 추가의 측면에서, 본 출원은 사중-특이적 항체 단량체, 다중-특이적 항체, 이들의 항원-결합 단편, 및 이들의 면역-접합체를 암의 치료를 위해 사용하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 방법은 사중-특이적 항체 단량체, 다중-특이적 항체, 이들의 항원-결합 단편, 및 이들의 면역-접합체, 또는 이들의 약학적 조성물을 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 방법은 대상체에게 유효량의 사중-특이적 항체를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0031] 일 구현예에서, 방법은 유효량의 다중-특이적 단량체, 다중-특이적 항체, 면역-접합체, 이들의 항원-결합 단편을 종양 부위로 직접 주입하는 단계를 포함한다.
- [0032] 다양한 암이 예방되거나 치료될 수 있다. 일 구현예에서, 암은 ROR1, CEA, HER2, EGFR, EGFR VIII, LMP1, LMP2A, 메조텔린, PSMA, EpCAM, 글리피칸-3, gpA33, GD2, TROP2, NKG2D, BCMA, CD19, CD20, CD33, CD123, CD22, 또는 CD30을 발현하는 세포를 가질 수 있다. 예시적인 암은 유방암, 대장암, 항문암, 췌장암, 담낭암, 담관암, 두경부암, 비인두암, 피부암, 흑색종, 난소암, 전립선암, 요도암, 폐암, 비소세포 폐암(non-small lung cell cancer), 소세포 폐암, 뇌종양, 신경아교종, 신경모세포종, 식도암, 위암, 간암, 신장암, 방광암, 자궁경부암, 자궁내막암, 갑상선암, 눈암, 육종, 골암, 백혈병, 골수종 또는 림프종을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 일 구현예에서, 방법은 유효량의 치료제를 공동-투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 치료제는 항체, 화학요법제, 효소, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 치료제는 항에스트로겐제, 수용체 티로신 키나제 억제제, 키나제 억제제, 세포 주기 억제제, DNA, RNA 또는 단백질 합성 억제제, RAS 억제제, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 치료제는 체크포인트 억제제를 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 치료제는 PD1, PD-L1, CTLA4, 4-1BB, OX40, GITR, ICOS, LIGHT, TIM3, LAG3, TIGIT, CD40, CD27, HVEM, BTLA, VISTA, B7H4, CSF1R, NKG2D, CD73, 이들의 유도체 또는 조합을 포함할 수 있다.
- [0034] 일 구현예에서, 치료제는 카페시타빈, 시스플라틴, 시클로포스파미드, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실, 독소루비신, 시클로포스파미드, 머스틴, 빈크리스틴, 프로카르바진, 프레드니솔론, 블레오마이신, 빈블라스틴, 다카르바진, 에토포시드, 에피루비신, 페메트렉시드, 폴린딘산, 젠시타빈, 옥살리플라틴, 이리노테칸, 토포테칸, 캄프토테신, 도세탁셀, 파클리탁셀, 폴베스트란트, 타목시펜, 레트로졸, 엑세메스탄, 아나스트로졸, 아미노글루테티미드, 테스토라톤, 보로졸, 포르메스탄, 파드로졸, 에를로티닙, 라파티닙, 다사티닙, 제피티닙, 오시머티닙, 반데르타닙(vandertanib), 아파티닙, 이매티닙, 파조피닙(pazopinib), 라파티닙, 수니티닙, 닐로티닙, 소라페닙, 냅-팔리탁셀(nab-palitaxel), 에베롤리무스, 템시롤리무스, 다브라페닙, 베무라페닙, 트라메티닙, 빈타폴라이드, 아파티닙, 크리조티닙, 페리포르신(periforsine), 올라파립, 보르테조미, 토파시티닙, 트라스투주맙, 이들의 유도체 또는 조합을 포함할 수 있다.
- [0035] 대상체는 인간일 수 있다. 일 구현예에서, 대상체는 암을 앓고 있을 수 있다. 본 출원은 본원에 개시된 유효 농

도의 다중-특이적 항체, 단량체, 또는 면역-접합체를 포함하는 용액을 추가로 제공한다. 일 구현예에서, 용액은 대상체의 혈장이다.

[0036]

본 개시 내용의 목적 및 이점은 첨부된 도면과 관련하여 하기의 실시예의 상세한 설명, 이의 구현예로부터 명백해질 수 있다. 또 다른 구현예는 하기의 상세한 설명으로부터 당업자에게 쉽게 명백해질 수 있으며, 고려되는 최상의 모드를 설명하는 방식으로 구현예가 기술된다. 다른 및 상이한 구현예가 가능하고, 구현예의 몇몇 세부 사항들은 그 사상 및 범위를 벗어나지 않고, 다양하고 자명한 관점에서 변형될 수 있다. 따라서, 도면 및 상세한 설명은 사실상 예시적인 것이고 제한적이지 않은 것으로 간주되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0037]

본 개시 내용의 전술한 특징 및 다른 특징은 첨부된 도면과 함께 하기의 설명 및 첨부된 청구범위로부터 보다 완전히 명백해질 수 있다. 도면은 본 개시 내용에 따라 배열된 몇몇 구현예만을 도시하고, 따라서 그 범위를 제한하지 않는 것으로 간주되며, 본 개시 내용은 첨부된 도면을 사용하여 추가적인 특이성 및 세부 사항으로 설명될 수 있음이 이해되어야 한다:

도 1은 항원-결합 도메인으로서 도메인 1 내지 4를 갖는 사중-특이적 항체의 다이어그램이다. CD3 x EGFRvIII x PD-L1 x 4-1BB 사중-특이적 항체는 한 구현예에 따른 예로서 제시된다.

도 2는 EGFRvIII로 형질감염된 정상세포종 세포주 U87에 대해 재지시된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)의 세포독성을 보여주는 실험 결과를 도시한다. 사용된 사중-특이적 항체의 종양 용해 활성은 표 1에 열거되어 있다.

도 3은 급성 림프구성 백혈병 세포주 Kasumi-2에 대해 재지시된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)의 세포독성을 보여주는 실험 결과를 도시한다.

도 4는 EGFRvIII로 형질감염된 정상세포종 세포주 U87에 대해 재지시된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)의 세포독성을 보여주는 실험 결과를 도시한다. 상이한 4-1BB 도메인의 기능적 활성 및 PD-L1 및 4-1BB 도메인의 기능적 영향이 제시된다.

도 5는 일부 구현예에 따라 인간 ROR1으로 형질감염된 CHO 세포에 결합하는 사중-특이적 항체의 FACS 분석을 보여주는 실험 결과를 도시한다.

도 6은 일부 구현예에 따라 인간 4-1BB로 형질감염된 CHO 세포에 결합하는 사중-특이적 항체의 FACS 분석을 보여주는 실험 결과를 도시한다.

도 7은 일부 구현예에 따라 인간 PD-L1으로 형질감염된 CHO 세포에 결합하는 사중-특이적 항체의 FACS 분석을 보여주는 실험 결과를 도시한다.

도 8은 일부 구현예에 따라 이펙터로서 말초 혈액 단핵 세포 및 표적으로서 B-ALL 세포주 Kasumi2를 이용해, ROR1의 Ig 도메인에 특이적인 결합 도메인 323H7을 갖는 사중-특이적 항체에 의해 매개되는, 재지시된 T 세포의 세포독성(RTCC) 분석을 보여주는 실험 결과를 도시한다.

도 9는 일부 구현예에 따라 이펙터로서 CD8+, CD45RO+ 기억 T 세포 및 표적으로서 B-ALL 세포주 Kasumi2를 이용해, ROR1의 Ig 도메인에 특이적인 결합 도메인 323H7을 갖는 사중-특이적 항체에 의해 매개되는, 재지시된 T 세포의 세포독성(RTCC) 분석을 보여주는 실험 결과를 도시한다.

도 10은 일부 구현예에 따라 이펙터로서 CD8+, CD45RA+ 나이브 T 세포(naive T cell) 및 표적으로서 B-ALL 세포주 Kasumi2를 이용해, ROR1의 Ig 도메인에 특이적인 결합 도메인 323H7을 갖는 사중-특이적 항체에 의해 매개되는, 재지시된 T 세포의 세포독성(RTCC) 분석을 보여주는 실험 결과를 도시한다.

도 11은 일부 구현예에 따라 이펙터로서 말초 혈액 단핵 세포 및 표적으로서 B-ALL 세포주 Kasumi2를 이용해, ROR1의 프리즐드(Frizzled) 도메인에 특이적인 결합 도메인 338H4를 갖는 사중-특이적 항체에 의해 매개되는, 재지시된 T 세포의 세포독성(RTCC) 분석을 보여주는 실험 결과를 도시한다.

도 12는 일부 구현예에 따라 이펙터로서 CD8+, CD45RO+ 기억 T 세포 및 표적으로서 B-ALL 세포주 Kasumi2를 이용해, ROR1의 프리즐드 도메인에 특이적인 결합 도메인 338H4를 갖는 사중-특이적 항체에 의해 매개되는, 재지시된 T 세포의 세포독성(RTCC) 분석을 보여주는 실험 결과를 도시한다.

도 13은 일부 구현예에 따라 이펙터로서 CD8+, CD45RA+ 나이브 T 세포 및 표적으로서 B-ALL 세포주 Kasumi2를 이용해, ROR1의 프리즐드 도메인에 특이적인 결합 도메인 338H4를 갖는 사중-특이적 항체에 의해 매개되는, 재

지시된 T 세포의 세포독성(RTCC) 분석을 보여주는 실험 결과를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0038] 하기의 상세한 설명에서, 본원의 일부를 형성하는 첨부된 도면을 참조한다. 도면에서, 맥락이 달리 명시하지 않는 한, 유사한 기호는 전형적으로 유사한 구성요소를 나타낸다. 상세한 설명, 도면, 및 청구범위에 설명된 예시적인 구현에는 제한적인 것으로 의도되지 않는다. 본원에 제시된 청구 대상의 사상 또는 범위를 벗어나지 않고 다른 구현예들이 이용될 수 있고, 다른 변경이 이루어질 수 있다. 본원에 일반적으로 설명되고 도면에 도시된 바와 같이, 본 개시 내용의 양태가 다양하고 상이한 구성으로 배열, 대체, 조합, 분리, 및 설계될 수 있으며, 이들 모두는 본원에 명시적으로 고려된다는 것을 쉽게 이해할 수 있다.
- [0039] 본 개시 내용은 특히 단리된 항체, 이러한 항체의 제조 방법, 사중-특이적 또는 다중-특이적 분자, 항체-약물 접합체 및/또는 이러한 항체 또는 항원-결합 단편으로 구성된 면역-접합체, 항체, 사중-특이적 또는 다중-특이적 분자, 항체-약물 접합체 및/또는 면역-접합체를 함유하는 약학적 조성물, 이들의 제조 방법, 및 암을 치료하기 위해 개시된 분자 또는 조성물을 사용하는 방법을 제공한다.
- [0040] 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되며, 특히 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 항체 단편(예를 들어, Fab, F(ab')₂, 및 Fv) 뿐만 아니라, 단일의 모노클로날 항체(작용제 및 길항제 항체를 포함), 폴리엠페토프 특이성을 갖는 항체 조성물을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 모노클로날, 폴리클로날, 키메라, 단쇄, 사중-특이적 또는 이중-효과적, 유인원의, 인간 및 인간화된 항체뿐만 아니라, 이들의 활성 단편일 수 있다. 공지된 항원에 결합하는 분자의 활성 단편의 예는 Fab 면역글로불린 발현 라이브러리의 생성물 및 상기 언급된 임의의 항체 및 단편의 에피토프-결합 단편을 포함하는, Fab, F(ab')₂, scFv 및 Fv 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적으로 활성인 부분, 즉, 항원에 면역특이적으로 결합하는 결합 부위를 함유하는 분자를 포함할 수 있다. 면역글로불린은 임의의 유형(IgG, IgM, IgD, IgE, IgA 및 IgY) 또는 면역글로불린 분자의 클래스(IgG1, IgG2, IGG3, IGG4, IgA1 및 IgA2) 또는 서브클래스일 수 있다. 일 구현예에서, 항체는 전체 항체 및 전체 항체로부터 유래된 임의의 항원-결합 단편일 수 있다. 전형적인 항체는 전형적으로 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)를 포함하는 이중-사량체 단백질을 지칭한다. 각 중쇄는 중쇄 가변 도메인(VH로 약칭) 및 중쇄 불변 도메인으로 구성된다. 각 경쇄는 경쇄 가변 도메인(VL로 약칭) 및 경쇄 불변 도메인으로 구성된다. VH 및 VL 영역은 초가변(hypervariable) 상보성 결정 영역(CDR)의 도메인, 및 프레임 워크 영역(FR)으로 불리는 보다 보존된 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각 가변 도메인(VH 또는 VL)은 전형적으로 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성되며, 아미노-말단에서 카복시-말단까지 하기 순서로 배열된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 경쇄 및 중쇄의 가변 영역 내에는 항원과 상호작용하는 결합 영역이 존재한다.
- [0041] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종의 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하며, 즉, 집단을 구성하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 자연 발생이 가능한 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원 부위에 대해 지시되고, 고도로 특이적이다. 또한, 전형적으로 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 지시되는 상이한 항체를 포함하는 종래의 (폴리클로날) 항체 제제와 대조적으로, 모노클로날 항체는 각각 항원 상의 단일 결정인자에 대해 지시된다. 이들의 특이성에 더하여, 모노클로날 항체는 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않은 하이브리도마 배양에 의해 합성된다는 점에서 유리할 수 있다. 조절인자 "모노클로날"은 실질적으로 동종의 항체 집단으로부터 수득된 항체의 특성을 나타내며, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 요구하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 예를 들어, 본 개시 내용에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 문헌(Kohler & Milstein, *Nature*, 256:495 (1975))에 의해 처음 기술된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제 4,816,567호).
- [0042] 모노클로날 항체는 "키메라" 항체(면역글로불린)를 포함할 수 있으며, 이는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유래된 항체 또는 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 이에 상동성인 반면, 사슬(들)의 나머지는 이들이 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 또 다른 종으로부터 유래된 항체 또는 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체뿐만 아니라, 이러한 항체의 단편에서 상응하는 서열과 동일하거나 이에 상동성이다(미국 특허 제 4,816,567호; 및 Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 [1984]).
- [0043] 모노클로날 항체는 마우스 하이브리도마 또는 파지 디스플레이(Siegel. *Transfus. Clin. Biol.* 9:15-22 (2002) for a review)를 포함하는 다양한 방법을 사용하거나 또는 직접 1차 B 세포로부터의 항체의 분자 클로닝(Tiller. *New Biotechnol.* 28:453-7 (2011))으로부터 생산될 수 있다. 본 개시 내용에서 항체는 인간 PD-L1 단

백질 및 세포 표면 상에서 일시적으로 인간 PD-L1을 발현하는 세포 둘 다에 의한 토끼의 면역화에 의해 생성되었다. 토끼는 높은 친화성, 다양성 및 특이성의 항체를 생산하는 것으로 알려져 있다(Weber et al. Exp. Mol. Med. 49:e305). 면역화된 동물로부터의 B 세포를 시험관 내에서 배양하고 항-PD-L1 항체의 생산을 위해 스크리닝하였다. 항체 가변 유전자를 재조합 DNA 기술을 사용하여 단리하고, 생성된 항체를 재조합적으로 발현시키고, PD-L1이 PD-1에 결합하는 것을 억제하는 능력, 비인간 영장류 PD-L1에 결합하는 능력 및 인간 T 세포 활성을 강화시키는 능력과 같은 원하는 특징에 대해 추가로 스크리닝하였다. 이 일반적인 항체 발견 방법은 문헌(Seeber et al. PLOS One. 9 : e86184 (2014))에 기술된 것과 유사하다.

[0044] 용어 "항원- 또는 에피토프-결합 부분 또는 단편"은 항원(이 경우 PD-L1)에 결합할 수 있는 항체의 단편을 지칭한다. 이들 단편은 온전한 항체의 항원-결합 기능 및 추가 기능을 수행할 수 있다. 결합 단편의 예는 합성 링커에 의해 단일 폴리펩티드 쇄로 연결된 항체의 단일 암(arm)의 VL 및 VH 도메인으로 구성된 단쇄 Fv 단편(scFv) 또는 VL, 불변 경쇄(CL), VH 및 불변 중쇄 1(CH1) 도메인으로 구성되는 1가 단편인 Fab 단편을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 항체 단편은 훨씬 더 작은 하위-단편일 수 있고, 단일 CDR 도메인만큼 작은 도메인, 특히 VL 및/또는 VH 도메인 중 하나로부터의 CDR3 영역으로 구성될 수 있다(Beiboer et al., J. Mol. Biol. 296:833-49 (2000)). 항체 단편은 당업자에게 공지된 통상적인 방법을 사용하여 제조된다. 항체 단편은 온전한 항체와 함께 사용된 동일한 기술을 사용하여 유용성에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0045] "항원- 또는 에피토프-결합 단편"은 당업계에 공지된 다수의 기술에 의해 본 개시 내용의 항체로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 정제된 모노클로날 항체는 펩신과 같은 효소로 절단되어 HPLC 겔 여과에 적용될 수 있다. 이어서, Fab 단편을 함유하는 적절한 분획을 수집하고 막 여과 등에 의해 농축시킬 수 있다. 항체의 활성 단편의 단리를 위한 일반적인 기술에 대한 추가 설명은 예를 들어, 문헌 (Khaw, B. A. et al. J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982); Rousseaux et al. Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986)를 참조한다.

[0046] 항체의 파파인 소화는 각각 단일 항원 결합 부위를 갖는, "Fab" 단편이라 불리는 2개의 동일한 항원-결합 단편과, 그 명칭이 쉽게 결정화하는 그의 능력을 반영하는 잔여의 "Fc" 단편을 생성한다. 펩신 처리는 2개의 항원 결합 부위를 갖고 여전히 항원을 가교시킬 수 있는 F(ab')₂ 단편을 생성한다.

[0047] Fab 단편은 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)을 함유할 수 있다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터 하나 이상의 시스테인을 포함하는, 중쇄 CH1 도메인의 카복시 말단에서 몇몇 잔기의 첨가로 인해 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 유리 티올기를 갖는 Fab'에 대한 명칭이다. F(ab')₂ 항체 단편은 본래 그들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링도 알려져 있다.

[0048] "Fv"는 완전한 항원 인식 및 결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 영역은 단단한 비-공유 연합으로 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 구성된다. 이러한 구성에서, 각각의 가변 도메인의 3개의 CDR은 VH-VL 이량체의 표면 상에 항원 결합 부위를 정의하기 위해 상호작용한다. 총괄적으로, 6개의 CDR은 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 전체 결합 부위보다 더 낮은 친화성에서도, 단일 가변 도메인(또는 하나의 항원에 특이적인 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)은 항원을 인식하고 이에 결합하는 능력을 갖는다.

[0049] 임의의 척추동물 종으로부터의 항체(면역글로불린)의 "경쇄"는 그들의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여 카파 및 람다(λ)라 불리는 2개의 명확하게 구별되는 유형 중 하나로 지정될 수 있다.

[0050] 이들의 중쇄 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 상이한 클래스로 지정될 수 있다. 면역글로불린에는 5가지 주요 클래스: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 있고, 이들 중 일부는 서브클래스(아이소타입), 예를 들어 IgG-1, IgG-2, IgG-3 및 IgG-4; IgA-1 및 IgA-2로 더 나뉘질 수 있다. 상이한 클래스의 면역글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , 델타, 엡실론, γ , 및 μ 로 불린다. 상이한 클래스의 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 형태가 공지되어 있다.

[0051] "인간화 항체"는 비인간 공여자 면역글로불린으로부터 유래된 이의 CDR를 가지며, 분자의 나머지 면역글로불린-유래 부분은 하나의 인간 면역글로불린(들)로부터 유래된, 조작된 항체의 유형을 지칭한다. 일부 구현예에서, 프레임워크 지지 잔기는 결합 친화성을 유지하기 위해 변경될 수 있다. "인간화 항체"를 얻는 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다(Queen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)).

[0052] 본원에 사용된 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 호환 가능하며 펩티드 결합에 의해 연결된 아미노산

으로 구성된 생체 분자를 의미하는 것으로 정의된다.

- [0053] 본 명세서에서 사용된 용어 "하나(a)", "한(an)", 및 "그(the)"는 "하나 이상"을 의미하는 것으로 정의되며 문맥이 부적절하지 않은 한 복수를 포함한다.
- [0054] "단리된"은 자연적으로 발생하는 성분 중 적어도 일부가 없는 생물학적 분자를 의미한다. 본원에 개시된 다양한 폴리펩티드를 기술하기 위해 사용될 때 "단리된"은 그것이 발현된 세포 또는 세포 배양물로부터 확인되고 분리되고/되거나 회수된 폴리펩티드를 의미한다. 일반적으로, 단리된 폴리펩티드는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 수 있다. "단리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 지칭한다.
- [0055] "제조합"은 외인성 숙주 세포에서 제조합 핵산 기술을 사용하여 항체가 생성됨을 의미한다.
- [0056] 용어 "항원"은 유기체, 특히 동물, 보다 구체적으로 인간을 포함하는 포유동물에서 면역 반응을 유도할 수 있는 개체 또는 이의 단편을 지칭한다. 상기 용어는 항원성 또는 항원 결정인자를 담당하는 면역원 및 이의 영역을 포함한다.
- [0057] 또한 본원에 사용된 용어 "면역원성"은 면역원성 제제(immunogenic agent)에 대해 지시된 항체, T-세포 또는 다른 반응성 면역 세포의 생성을 유도하거나 증강시키고, 인간 또는 동물에서 면역 반응에 기여하는 물질을 지칭한다. 면역 반응은 개체가 치료될 장애를 완화 또는 경감하기 위해 본 개시 내용의 투여된 면역원성 조성물에 대해 충분한 항체, T-세포 및 다른 반응성 면역 세포를 생산할 때 발생한다.
- [0058] 특정 항원 또는 에피토프에 대한 "특이적 결합" 또는 이에 "특이적으로 결합하는" 또는 이에 "특이적인"은 비-특이적 상호작용과는 상당히 다른 결합을 의미한다. 특이적 결합은, 예를 들어, 일반적으로 결합 활성을 갖지 않는 유사한 구조의 분자인 대조 분자(control molecule)의 결합과 비교하여 분자의 결합을 결정함으로써 측정될 수 있다. 예를 들어, 특이적 결합은 표적과 유사한 대조 분자와의 경쟁에 의해 결정될 수 있다.
- [0059] 특정 항원 또는 에피토프에 대한 특이적 결합은, 예를 들어, 적어도 약 10^{-4} M, 적어도 약 10^{-5} M, 적어도 약 10^{-6} M, 적어도 약 10^{-7} M, 적어도 약 10^{-8} M, 적어도 약 10^{-9} M, 대안적으로 적어도 약 10^{-10} M, 적어도 약 10^{-11} M, 적어도 약 10^{-12} M, 또는 그 이상의 항원 또는 에피토프에 대한 KD를 갖는 항체에 의해 나타날 수 있고, 여기서 KD는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 속도를 지칭한다. 전형적으로, 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 그 항원 또는 에피토프에 대해, 대조군 분자에 비해 20-, 50-, 100-, 500-, 1000-, 5,000-, 10,000-배 이상의 더 큰 KD를 가질 수 있다.
- [0060] 또한, 특정 항원 또는 에피토프에 대한 특이적 결합은, 예를 들어, 대조군에 관한 에피토프에 비해 적어도 20-, 50-, 100-, 500-, 1000-, 5,000-배 이상의 더 큰 항원 또는 에피토프에 대한 KA 또는 Ka를 갖는 항체에 의해 나타날 수 있고, 여기서 KA 또는 Ka는 특정 항체-항원 상호작용의 결합 속도를 지칭한다.
- [0061] 두 서열 사이의 "상동성"은 서열 동일성에 의해 결정된다. 서로 비교될 2개의 서열이 길이가 상이한 경우, 서열 동일성은 바람직하게는 더 긴 서열의 뉴클레오타이드 잔기와 동일한 더 짧은 서열의 뉴클레오타이드 잔기의 백분율에 관한 것이다. 서열 동일성은 컴퓨터 프로그램을 사용하여 통상적으로 결정될 수 있다. 주어진 서열과 본 개시 내용의 전술한 서열 사이의 비교에서 나타나는 편차는, 예를 들어 첨가, 결실, 치환, 삽입 또는 제조합에 의해 야기될 수 있다.
- [0062] 일 측면에서, 본 출원은 사중-특이적 항체 단량체, 항원-결합 단편, 및 다중-특이적 항체를 제공한다. 일 구현예에서, 본 출원은 사중-특이적 항체를 제공한다.
- [0063] 일 구현예에서, 본 개시 내용은 4개의 상이한 항원 표적에 대해 결합 특이성을 갖는 사중-특이적 항체를 제공한다. 일 구현예에서, 항원 표적은 종양 특이적 항원, T 세포 수용체 CD3 성분, 또는 면역 체크포인트 분자이다. 사중-특이적 항체는 신체의 내인성 T 세포를 직접 고용하여 항원-특이적 T 세포 수용체에 대한 MHC에 의한 종양 항원 제시와 무관하게 종양 세포를 사멸시킨다. 일부 구현예에서, 사중-특이적 항체의 면역 체크포인트 조절 성분은 면역억제성 종양 미세환경을 극복하여 종양 미세환경 내에서 소진된 T 세포를 완전히 활성화시킬 수 있다.
- [0064] 사중-특이적 항체는 면역 체크포인트를 조절하거나 Treg 또는 다른 억제성 면역 세포를 억제하거나 또는 종양 항원에 대한 성분으로 종양을 표적화하는 동시에, T 세포를 직접 고용하는 독특한 특성을 갖는다. 이는 BiTE 또는 CAR-T 치료가 적합하지 않은 환자에게 도움이 될 수 있다. 일 구현예에서, 사중-특이적 항체는 억제성 종양 미세환경에 의해 부과된 한계로 인해 BiTE-유사 기술 또는 CAR-T 처리가 아직 임상적 이점을 나타내지 않는 고

형 종양에서 임상적 이점을 입증할 수 있다.

- [0065] 일 구현예에서, 본 출원은 4개의 상이한 결합 도메인 또는 "사중-특이적 항체"를 갖는 조작된 항체를 제공한다. 하나의 결합 도메인은 T 세포 상의 CD3에 특이적이고, 제2 결합 도메인은 ROR1, CEA, HER2, EGFR, EGFRvIII, LMP1, LMP2A, 메조텔린, PSMA, EpCAM, 글리피칸-3, gpA33, GD2, TROP2, BCMA, CD19, CD20, CD33, CD123, CD22, CD30을 포함하지만 이에 제한되지 않는 종양 관련 항원에 특이적이고, 제3 및 제4 결합 도메인은 PD-L1, PD-1, OX40, 4-1BB, GITR, TIGIT, TIM-3, LAG-3, CTLA4, CD40, VISTA, ICOS, BTLA, Light, HVEM, CD73, CD39 등과 같은 2개의 구별되는 면역 체크포인트 조절인자에 특이적이다.
- [0066] 본원에 개시된 사중-특이적 분자의 예(도 1)는 인간 ROR1(서열 번호 33 내지 48), 인간 CD19(서열 번호 53 내지 56) 또는 EGFR vIII(서열 번호 49 내지 52)을 종양 관련 항원으로서 표적화한다. 이들 표적화된 사중-특이적 단백질 각각은 또한 항-인간 PD-L1(서열 번호 9 내지 16), 항-인간 4-1BB(서열 번호 21 내지 32) 및 항-인간 CD3 결합 도메인(서열 번호 1 내지 8)을 운반한다. 이들 결합 도메인은 N-말단 도메인 1(D1)에서의 배치를 위해 scFv, VLVH로 전환되었고, 펩티드의 C-말단 도메인 3(D3) 및 4(D4)에서의 배치를 위해 scFv, VHVL로 전환되었다(도 1).
- [0067] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 scFv 분자는 V-영역 배향(LH 또는 HL)에 관계없이, VH 및 VL을 작동가능하게 연결시키는 20개 아미노산 연결 gly-gly-gly-gly-ser(G4S) X4 링커를 함유한다. 사중-특이적 단백질에서의 나머지 위치, 도메인 2(D2)는 IgG1 중쇄, VH-CH1-힌지-CH2-CH3, 및 이에 상응하는 경쇄, VL-CL로 구성되며, 이는 카파 또는 람다 사슬일 수 있다. D1 및 D2는 D2, D3 및 D4처럼 10개 아미노산 (G4S) x 2 링커를 통해 유전적으로 연결되며, 이는 연속적인 ~150 kDa 중쇄 단량체 펩티드를 생성한다. 적절한 경쇄로 공-형질감염(co-transfection)된 경우, 최종 대칭 사중-특이적 펩티드는 IgG1 Fc(단백질 A/단백질 G)를 통해 정제되고 기능적 활성을 평가하기 위해 분석될 수 있다. 중쇄 및 경쇄 유전자 "카세트"는 V-영역이 제한효소 부위(중쇄의 경우 HindIII/NheI 및 경쇄의 경우 HindIII/BsiWI) 또는 Gibson Assembly(SGI-DNA, La Jolla, CA), Infusion(Takara Bio USA) 또는 NEBuilder(NEB, MA, Ipswich, MA)와 같은 "무-제한 클로닝"을 사용하여 클로닝될 수 있도록 이전에 구축되었으며, 본원에서는 후자가 사용되었다.
- [0068] 사중-특이적 단백질은 온전한 분자의 설계, 각 도메인에 대한 뉴클레오타이드 서열의 합성 및 클로닝, 포유동물 세포에서의 발현 및 최종 생성물의 정제를 포함하는 공정을 통해 생성된다. 뉴클레오타이드 서열을 Geneious 10.2.3 소프트웨어 패키지(Biomatters, Auckland, NZ)를 사용하여 조립하고 유전자 합성(Genewiz, South Plainsfield, NJ)을 위한 성분 도메인으로 분리하였다.
- [0069] 이 예시에서, SI-35E18(서열 번호 65 및 67)은 항-4-1BB scFv, VLVH가 D1을 차지하고, 항-인간 PD-L1 클론 PL230C6이 D2(Fab 위치)를 차지하고, 항-인간 ROR1 Ig 도메인-특이적 클론 323H7 VHVL scFv가 D3을 차지하고, 항-인간 CD3 scFv, VHVL이 C-말단 D4를 차지하는, 성분 도메인으로 분리되었다. NEBuilder 웹-기반 도구를 사용하여, 위치-특이적 재조합을 지시하는 20 내지 30개 뉴클레오타이드에 의해 각각의 도메인이 그의 측면 도메인(flanking domain)과 접치도록, 더 큰 단백질에서 이들의 위치에 따라 5' 및 3' 뉴클레오타이드를 각 도메인에 추가함으로써, 단일 유전자 조립 단계에서 각 도메인을 유전적으로 융합시켰다. 사중-특이적 뉴클레오타이드 서열에서 많은 수의 상동성 영역으로 인해, N-말단 도메인 1 및 2는 C-말단 D3 및 D4와 별도로 조립된다. 이어서, N- 및 C-말단 단편을 제2 NEBuilder 반응에서 함께 조립하였다.
- [0070] 소량의 부분표본(aliquot)을 *E.coli* DH10b(Invitrogen, Carlsbad, CA)로 형질전환하고 TB + 카베니실린 100 ug/ml 플레이트(Teknova, Hollister, CA) 상에 도말하고, 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 그 결과로 생긴 콜로니를 선택하고, 밤새 배양한 배양물 2 ml를 TB + 카베니실린에 접종하였다. 밤새 배양한 배양물로부터 DNA를 제조하고(ThermoFisher, Carlsbad, CA), 이어서 각 도메인의 측면에 있는 시퀀싱 프라이머(Sigma, St. Louis, MO)를 사용하여 서열을 분석하였다(Genewiz, South Plainsfield, MO). 일부 구현예에서, DNA 서열을 Geneious에서 조립하고 분석하였다.
- [0071] 다른 측면에서, 본 출원은 다중-특이적 항체 단량체, 다중-특이적 항체, 항원-결합 단편, 및 이의 면역-접합체를 포함하는 약학적 조성물을 제공하고, 암 치료를 위해 개시된 항체 또는 약학적 조성물을 사용하는 방법을 제공한다.
- [0072] 임의의 기존 요법에 비해, 치료 목적으로 개시된 사중-특이적 항체 단량체, 다중-특이적 항체 또는 조성물을 사용하는 것은 특히 다음의 이점을 갖는다: 1) IgG Fc 도메인의 포함은 이중-특이적 BiTe 분자에 비해 혈청에서 더 긴 반감기의 특성을 부여할 수 있고; 2) 면역 체크포인트 조절인자에 특이적이고, 억제 경로를 억제하고, 동

시에 공동-자극 경로에 관여할 수 있는 2개의 결합 도메인을 포함하고; 3) 종양 관련 항원과 T 세포상의 CD3을 가교-결합하여, 환자로부터 T 세포를 제거할 필요 없이 종양을 사멸시키고, 키메라 항원 수용체 T 세포(CAR-T)에 대해 수행된 바와 같이 이들을 환자에게 다시 재-도입하기 전에 종양 세포에 특이적이 되도록 이들을 유전적으로 변형하기 위해, T 세포를 재-지시("re-directing") 함.

[0073] 약학적 조성물의 제제는 당업자에게 공지된 표준 방법에 따라 달성될 수 있다.

[0074] 일 구현예에서, 본 개시 내용에 따른 항체 및 단량체는 생리학적으로 허용가능한 제제로 제조될 수 있고, 공지된 기술을 사용하여 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 및/또는 부형제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 개시 내용에 따르면 본원에 기술된 바와 같은, 임의의 기능적으로 동등한 항체 또는 이의 기능적 부분을 포함하는 모노클로날 항체는 치료학적 조성물을 형성하기 위해 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 및/또는 부형제와 조합된다. 본 개시 내용에 따른 약학적 조성물의 제제는 당업자에게 공지된 표준 방법에 따라 달성될 수 있다.

[0075] 치료가 필요한 인간 환자와 같은 대상체에 투여하기에 적합한 조성물의 제제와 관련하여, 본원에 개시된 항체는 선택된 투여 경로에 따라 당업계에 공지된 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합되거나 조합될 수 있다. 본원에 개시된 항체의 적용 방식에는 특별한 제한이 없으며, 적절한 투여 경로 및 적합한 조성물의 선택은 과도한 실험 없이 당업계에 공지되어 있다.

[0076] 적합한 약학적 담체, 희석제 및/또는 부형제는 당업계에 익히 공지되어 있으며, 예를 들어, 포스페이트 완충 식염수 용액, 물, 오일/물 유제와 같은 유제를 포함한다.

[0077] "약학적으로 허용가능한"은 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 합리적인 이익/위험 비율에 비례하여, 과도한 독성, 자극 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 인간 또는 동물의 조직과의 접촉에 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물, 및 투여 형태를 지칭한다.

[0078] 일 구현예에서, 약학적 조성물은 단백질성 담체, 예를 들어, 혈청 알부민 또는 면역글로불린, 특히 인간 기원의 것을 포함할 수 있다. 추가적인 생물학적 활성제는 의도된 용도에 따라 본 발명의 약학적 조성물에 존재할 수 있다. 일 구현예에서, 단백질성 약학적 활성 물질은 용량 당 1 ng 내지 10 mg의 양으로 존재할 수 있다. 일반적으로, 투여 요법은 본 개시 내용에 따른 항체의 0.1 μ g와 10 mg 사이의 범위, 특히 1.0 μ g와 1.0 mg 사이의 범위, 더욱 특히 1.0 μ g와 100 μ g 사이의 범위이어야 하고, 이들 범위 내에 속하는 모든 개별 숫자도 본 개시 내용의 일부이다. 투여가 연속 주입을 통해 발생하는 경우, 보다 적절한 투여량은 시간 당 체중 킬로그램 당 0.01 μ g와 10 mg 단위 사이의 범위일 수 있으며, 이 범위 내에 속하는 모든 개별 숫자 또한 본 개시 내용의 일부이다.

[0079] 본 개시 내용의 조성물은 대상체에게 고체, 액체 또는 에어로졸 형태로 적합한, 약학적 유효량으로 투여될 수 있다. 고체 조성물의 예는 알약, 크림, 및 이식가능한 투여 단위를 포함한다. 알약은 경구 투여될 수 있다. 치료학적 크림은 국소 적으로 투여될 수 있다. 이식가능한 투여 단위는 국소적으로, 예를 들어, 종양 부위에 투여될 수 있거나, 또는 치료학적 조성물의 전신성 방출을 위해, 예를 들어 피하로 이식될 수 있다. 액체 조성물의 예는 근육 내, 피하, 정맥 내, 동맥 내 주사에 적합한 제제, 및 국소 및 안구 내 투여를 위한 제제를 포함한다. 에어로졸 제제의 예는 폐로 투여하기 위한 흡입기 제제를 포함한다.

[0080] 조성물의 투여량은 치료되는 상태, 사용된 특정 조성물, 및 체중, 크기, 성별 및 환자의 일반적인 건강 상태, 체표면적, 투여될 특정 화합물 또는 조성물, 동시에 투여되는 다른 약물, 및 투여 경로와 같은 기타 임상적 요인과 같은 다양한 요인에 따라 달라진다.

[0081] 용어 "치료학적 유효량" 또는 "유효량"은 인간 또는 동물에게 투여될 때, 상기 인간 또는 동물에서 치료 효과를 초래하는데, 예를 들어, 대상체에서 질병을 완화하는데 충분한 반응을 이끌어내는 항체의 양을 지칭한다. 유효량은 하기의 일상적인 절차에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정된다. 질환이 암인 경우, 약물의 유효량은 암 세포 성장, 암 세포 증식, 암 세포 활동성, 주변 기관으로 암 세포의 침윤, 종양 전이, 및 종양 성장을 포함하지만 이에 제한되지 않는 예시적인 특징 중 하나 이상을 억제(예를 들어, 어느 정도 늦추거나, 억제 또는 중단)시킬 수 있다. 질환이 암인 경우, 유효량의 약물은 대안적으로 대상체에게 투여될 때 다음 중 하나 이상을 수행할 수 있다: 종양 성장 둔화 또는 중지, 종양 크기 감소(예를 들어, 부피 또는 질량), 암과 관련된 하나 이상의 증상을 어느 정도 완화, 무진행 생존 연장, 객관적인 반응 초래(예를 들어, 부분 반응 또는 완전한 반응 포함), 및 전체 생존 시간 증가. 약물이 성장을 예방하고/하거나 기존 암 세포를 사멸시킬 수 있는 한, 이는 세포증식억제성 및/또는 세포독성이다.

- [0082] 당업자는 암과 같은 상태를 효과적으로 치료하기 위해 본원에 개시된 항체의 유효량 또는 농도를 결정할 수 있다. 약학적 조성물에서 다양한 성분의 비율, 투여 량 및 빈도와 같은 다른 파라미터는 과도한 실험 없이 당업자에 의해 수득될 수 있다. 예를 들어, 적합한 주사 용액은 ml 당 약 1 내지 약 20, 약 1 내지 약 10 mg의 항체를 함유할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 용량은 약 0.1 내지 약 20, 약 1 내지 약 5 mg/Kg 체중일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 투여 빈도는 하루에 한 번 또는 일주일에 세 번일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0083] 조성물은 표준 투여 경로에 의해 투여될 수 있다. 일반적으로, 조성물은 국소, 경구, 직장, 코, 피내 (intradermal), 복강내, 또는 비경구(예를 들어, 정맥 내, 피하, 또는 근육 내) 경로에 의해 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물은 생분해성 중합체와 같은 서방성 매트릭스에 통합될 수 있으며, 중합체는 전달이 필요한 부근, 예를 들어 종양 부위에 이식된다. 방법은 단일 용량의 투여, 미리 설정된 시간 간격으로 반복된 용량의 투여, 및 미리 설정된 시간 동안 지속적인 투여를 포함한다.
- [0084] 많은 투여 형태가 가능하지만, 예시적인 투여 형태는 주사용 용액, 특히 정맥 내 또는 동맥 내 주사용 용액일 것이다. 일반적으로, 주사용으로 적합한 약학적 조성물은 약학적으로 적합한 담체 또는 부형제, 예를 들어 완충제, 계면활성제, 또는 안정화제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 완충제는 아세트이트, 포스페이트 또는 시트레이트 완충제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 계면활성제는 폴리소르베이트를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 안정화제는 인간 알부민을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0085] 일 구현예에서, 투여는 비경구, 예를 들어 정맥 내 투여일 수 있다. 비경구 투여를 위한 제조물은 멸균된 수성 또는 비수성 용액, 현탁액 및 유제를 포함한다. 비수성 용매는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 및 에틸 올레이트와 같은 주사가능한 유기 에스테르를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 수성 용매는 물, 알코올/수용액, 식염수 및 완충 배지를 포함하는 유제 또는 현탁액으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 비경구 비히클은 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로스(Ringer's dextrose), 텍스트로스 및 염화나트륨, 젖산화 링거(lactated Ringer's), 또는 고정유를 포함한다. 정맥 내 비히클은 체액 및 영양 보충제, 전해질 보충제(예: 링거 텍스트로스에 기초한 것들) 등을 포함한다. 예를 들어, 항미생물제, 항산화제, 킬레이트제, 불활성 기체 등과 같은 보존제가 존재할 수 있다.
- [0086] 항체 단량체, 항체, 항원-결합 단편 및 이들의 면역-접합체는 치료제 또는 치료 목적을 위한 치료제를 포함하는 조성물과 조합하여 사용될 수 있다.
- [0087] 일부 구현예에서, 다중-특이적 항체 분자는 하나 이상의 추가적인 치료제와 조합하여 유효량으로 사용된다. 추가적인 치료제는 항체, 화학요법제, 효소, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 추가적인 치료제는 항에스트로겐제, 수용체 티로신 키나제 억제제, 키나제 억제제, 세포 주기 억제제, DNA, RNA 또는 단백질 합성 억제제, RAS 억제제, 또는 이들의 조합일 수 있다. 일부 구현예에서, 추가적인 치료제는 체크포인트 억제제일 수 있다. 일부 구현예에서, 치료제는 PD1, PDL1, CTLA4, 4-1BB, OX40, GITR, ICOS, LIGHT, TIM3, LAG3, TIGIT, CD40, CD27, HVEM, BTLA, VISTA, B7H4, CSF1R, NKG2D, CD73, 이들의 유도체 또는 조합의 억제제를 포함한다.
- [0088] 일 구현예에서, 치료제는 카페시타빈, 시스플라틴, 트라스투주맙, 폴베스트 란트, 타목시펜, 레트로졸, 엑세메스탄, 아나스트로졸, 아미노글루테티미드, 테스토라톤, 보로졸, 포르메스탄, 페드로졸, 레트로졸, 에를로티닙, 라파티닙, 다사티 닙, 게피티닙, 이매티닙, 파조피닙(pazopinib), 라파티닙, 수니티닙, 닐로티닙, 소라페닙, 님-팔리탁셀, 이들의 유도체 또는 조합을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 치료제는 카페시타빈, 시스플라틴, 시클로포스파미드, 메토트렉세이트, 5-플루오로 우라실, 독소루비신, 시클로포스파미드, 머스틴, 빈크리스틴, 프로카르바진, 프레드니솔론, 블레오마이신, 빈블라스틴, 다카르바진, 에토포시드, 에피루비신, 페메트렉시드, 폴린딘산, 게미시타빈(gemcitabine), 옥살리플라틴, 이리노테칸, 토포테칸, 캄프토테신, 도세탁셀, 파클리탁셀, 폴베스트란트, 타목시펜, 레트로졸, 엑세메스탄, 아나스트로졸, 아미노글루테티미드, 테스토라톤, 보로졸, 포르메스탄, 페드로졸, 레트로졸, 에를로티닙, 라파티닙(lafatinib), 다사티닙, 게피티닙, 오시머티닙, 반데르타닙(vandertanib), 아파티닙, 이매티닙, 파조피닙(pazopinib), 라파티닙, 수니티닙, 닐로티닙, 소라페닙, 님-팔리탁셀, 에베롤리무스, 템시롤리무스, 다브라페닙, 베무라페닙, 트라메티닙, 빈타폴리드, 아파티닙, 크리조티닙, 페리포르신, 올라파립, 보르테조밐, 토파시티닙, 이들의 유도체 또는 조합을 포함할 수 있다.
- [0089] 유방암, 대장암, 췌장암, 두경부암, 흑색종, 난소암, 전립선암, 비소세포 폐암, 신경교종, 식도암, 비인두암, 항문암, 직장암, 위암, 방광암, 자궁경부암 또는 뇌암을 포함하는 암은 암-관련 유전자를 발현할 수 있다. 특정 모노클로날 항체 또는 항원-결합 단편에 의한 암-관련 활성의 억제는 암에 대해 치료 효과를 가질 수 있다. 또

한, 암-관련 단백질에 특이적인 모노클로날 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 치료학적 유효량의 조성물을 투여하는 것은 세포독성제의 효과를 통해 암을 치료, 예방, 완화할 수 있고, 암의 발달 또는 전이를 지연시킬 수 있다.

[0090] 본 개시 내용은 본원에 포함된 구체적인 구현예 및 실시예의 상세한 설명을 참조함으로써 더 쉽게 이해될 수 있다. 본 개시 내용은 특정 구현예의 특정 상세한 설명을 참조하여 설명되지만, 이러한 상세한 설명은 본 개시 내용의 범위를 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다.

[0091] **실시예**

[0092] 실시예 1: EGFRvIII 항원에 대한 사중-특이적 항체의 결합

[0093] U87 세포주의 표면에서 발현된 EGFRvIII 항원에 대한 표 1에 열거된 사중-특이적 항체의 결합을 FACS 방법을 사용하여 평가하였다. 사중-특이적 항체를 U87 세포주와 함께 인큐베이션 한 다음, Alexa Fluor 647 형광색소에 직접 접합된 이차 항-인간 항체로 검출하였다. 사중-특이적 항체의 세포 결합을 유세포 분석기 BD LSRFortessa로 분석하였다. 시험된 항체 모두 한 자릿수의 서브-나노 몰 농도 범위의 KD로 항원에 결합하였다(표 2). 결합에서 관찰된 차이는 3배 범위 내였고, 인접 도메인과의 상호작용에 의해서 뿐만 아니라 분자 내의 결합 도메인의 위치에 의해서도 유발될 수 있었다.

[0094] 표 1은 EGFRvIII 중앙 항원-결합 도메인을 갖는 사중-특이적 항체의 예를 보여준다. 표 2는 U87 세포주에서 발현된 EGFRvIII 항원에 대한 결합을 보여준다. 표 1에 열거된 사중-특이적 항체의 EGFRvIII 항원에 대한 결합을 유세포 분석으로 평가하였다.

표 1

EGFRvIII 중앙 항원 결합 도메인을 갖는 사중-특이적 항체

항체 ID	항체 도메인 구조						
SI-39E29	806	X	284A10	X	PL221	X	420H5
SI-39E18	284A10	X	806	X	PL221	X	420H5
SI-39E13	420H5	X	PL230	X	284A10	X	806
SI-39E4	PL230	X	806	X	284A10	X	420H5
SI-39E10	420H5	X	PL230	X	806	X	284A10
SI-39E23	PL230	X	806	X	420H5	X	284A10

[0095]

표 2

CHO 세포주에서 발현되는 EGFRvIII 항원에 대한 결합

	CHO-EGFRviii 결합							
항체 ID	항체 도메인 구조							EC50 (nM)
SI-39E29	806	X	284A10	X	PL221	X	420H5	0.489
SI-39E18	284A10	X	806	X	PL221	X	420H5	0.7549
SI-39E13	420H5	X	PL230	X	284A10	X	806	1.244
SI-39E4	PL230	X	806	X	284A10	X	420H5	1.115
SI-39E10	420H5	X	PL230	X	806	X	284A10	1.542
SI-39E23	PL230	X	806	X	420H5	X	284A10	0.9222

[0096]

[0097] 실시예 2: EGFRvIII, 4-1BB, PD-L1 및 CD3 단백질 항원에 대한 사중-특이적 항체의 결합

[0098] 표 1에 열거된 사중-특이적 항체의 이들 각각의 항원에 대한 결합 친화성 및 동역학을 ForteBio Octet RED96 기기에서 표면 플라즈몬 공명을 통해 평가하였다. 항원을 센서 칩 표면에 고정시키고, 시험된 항체를 고정된 항원 위에 흘려 보냈다. 모든 분자는 항원에 높은 결합을 나타냈다(표 3). SI-39E29, SI-39E18 및 SI-39E23은 시험된 다른 항체보다 CD3 e/d 항원에 대한 결합이 낮았다. 표 3은 표 1에 열거된 사중-특이적 항체의 EGFRvIII, 4-1BB, PD-L1 및 CD3 항원에 대한 결합을 보여준다.

표 3

EGFRvIII, 4-1BB, PD-L1 및 CD3 항원에 대한 결합

							EGFRvIII 결합				4-1BB 결합				
항체 ID	항체 도메인 구조						반응	KD (M)	kon (1/Ms)	kdis(1/s)	반응	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	
SI-39E29	806	X	284A10	X	PL221	X	420H5	1.4113	<1.0E-12	1.38E+05	<1.0E-07	1.9181	5.94E-10	2.32E+05	1.38E-04
SI-39E18	284A10	X	806	X	PL221	X	420H5	1.4606	<1.0E-12	1.19E+05	<1.0E-07	2.0165	3.93E-10	2.35E+05	9.24E-05
SI-39E13	420H5	X	PL230	X	284A10	X	806	1.2317	<1.0E-12	9.90E+04	<1.0E-07	2.4703	1.17E-10	2.27E+05	2.65E-05
SI-39E4	PL230	X	806	X	284A10	X	420H5	1.4058	<1.0E-12	8.43E+04	<1.0E-07	2.417	3.54E-10	1.67E+05	5.91E-05
SI-39E10	420H5	X	PL230	X	806	X	284A10	1.1414	<1.0E-12	8.63E+04	<1.0E-07	2.6348	3.56E-11	2.09E+05	7.43E-06
SI-39E23	PL230	X	806	X	420H5	X	284A10	1.3408	<1.0E-12	1.41E+05	<1.0E-07	2.0159	6.96E-10	2.03E+05	1.41E-04

[0099]

								PD-L1 결합				CD3 e/d 결합			
항체 ID	항체 도메인 구조							반응	KD (M)	kon (1/Ms)	kdis(1/s)	반응	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
SI-39E29	806	X	284A10	X	PL221	X	420H5	1.7228	2.83E-10	3.76E+05	1.06E-04	1.8493	4.75E-10	1.66E+05	7.86E-05
SI-39E18	284A10	X	806	X	PL221	X	420H5	1.8256	1.68E-10	3.79E+05	6.37E-05	1.7586	6.32E-10	1.74E+05	1.10E-04
SI-39E13	420H5	X	PL230	X	284A10	X	806	1.9223	8.01E-11	4.15E+05	3.32E-05	1.8019	<1.0E-12	1.04E+05	<1.0E-07
SI-39E4	PL230	X	806	X	284A10	X	420H5	2.1532	7.23E-11	3.33E+05	2.41E-05	1.965	<1.0E-12	8.61E+04	<1.0E-07
SI-39E10	420H5	X	PL230	X	806	X	284A10	1.9364	6.85E-11	3.81E+05	2.61E-05	2.2404	<1.0E-12	1.10E+05	<1.0E-07
SI-39E23	PL230	X	806	X	420H5	X	284A10	1.9024	4.02E-11	4.83E+05	1.94E-05	2.6545	2.07E-10	1.23E+05	2.54E-05

[0100]

[0101] 실시예 3: EGFRvIII로 형질감염된 정상세포종 세포주 U87에 대해 재지시된 PBMC의 세포독성

[0102] EGFRvIII 종양 세포주(U87vIII)로 형질감염된 U87을 용해하도록 PBMC를 재지시하는 표 1에 열거된 사중-특이적 항체의 능력을 평가하였다. 피콜 구배(ficoll gradient)로 PBMC를 분리하였다. U87vIII 종양 세포주는 렌티바이러스 형질도입(Sartorius)을 통해 전달된 핵-국소화된(nucleus-localized) 적색 형광 단백질(RFP)을 안정적으로 발현하였다. U87vIII 종양 세포를 PBMC와 공동-배양 하였다. RFP 표지된 종양 세포 핵을 계수함으로써 종양 세포의 용해를 평가하였다. 살아있는 세포 영상화기 IncuCyte(Sartorius)에서 이미지를 얻었다. SI-39E18 및 SI-39E13 사중-특이적 항체는 96시간 켜에 가장 높은 효능을 보였고 그 다음은 SI-39E10이었다. SI-39E4, SI-39E23 및 SI-39E29는 이 연구에서 표 1에 열거된 다른 항체보다 효능이 더 낮았다(도 2).

[0103] 실시예 4: 급성 림프구성 백혈병 세포주 Kasumi-2에 대해 재지시된 PBMC의 세포독성

[0104] 표 4에 열거된 사중-특이적 항체의 백혈병 세포주 Kasumi-2를 용해시키는 능력을 평가하였다. 피콜 구배에 의해 PBMC를 분리하였다. Kasumi-2 종양 세포를 PBMC와 공동-배양하였다. 96시간의 공동-배양 후 존재하는 살아있는 종양 세포의 수를 계수함으로써 BD LSRFortessa 유세포 분석기로 종양 세포 용해를 평가하였다. 사중-특이적 항체 SI-38E14는 이 연구에서 가장 강력한 활성을 나타냈고 그 다음은 SI-38E38이었다(도 3). 표 4는 CD19 종양 항원 인식 도메인을 갖는 사중-특이적 항체의 예를 보여준다.

표 4

CD19 종양 항원 인식 도메인을 갖는 사중-특이적 항체

항체 ID	항체 도메인 구조
SI-38E14	PL230 x 466F6 x 21D4 x 284A10
SI-38E38	PD224 x 466F6 x 21D4 x 284A10
SI-38E5	466F6 x PL230 x 284A10 x 21D4
SI-38E20	466F6 x 21D4 x 284A10 x PL221
SI-38E35	21D4 x 284A10 x 466F6 x PL221

[0105]

[0106]

실시예 5: EGFRvIII로 형질감염된 정상세포종 세포주 U87에 대해 재지시된 PBMC의 세포독성, 상이한 4-1BB 도메인의 기능적 활성 및 PD-L1 및 4-1BB 도메인의 기능적 영향

[0107]

EGFRvIII 종양 세포주(U87vIII)로 형질감염된 U87을 용해하도록 PBMC를 재지시하는 표 5에 열거된 사중-특이적 항체의 능력을 평가하였다. 피콜 구배에 의해 PBMC를 분리하였다. U87vIII 종양 세포주는 렌티바이러스 형질도입(Sartorius)을 통해 전달된 핵-국소화 적색 형광 단백질(RFP)을 안정적으로 발현하였다. U87vIII 종양 세포를 PBMC와 공동-배양하였다. RFP 표지된 종양 세포 핵을 계수함으로써 종양 세포의 용해를 평가하였다. 살아있는 세포 영상화기 IncuCyte(Sartorius)에서 이미지를 얻었다. 인큐베이션 96시간 후에 항체의 활성을 평가하였다. 상이한 4-1BB 도메인을 갖는 항체: SI-39E4, SI-39E2 및 SI-39E3은 유사한 활성을 나타냈다(도 4). 침묵(기능적이지 않음) FITC 도메인, SI-39E1 및 SI-39E5로 대체된 PD-L1 및 4-1BB 도메인을 갖는 항체는 용해 활성의 감소를 나타냈다. 이 관찰은 4-1BB 및 PD-L1 도메인의 기능적 기여를 확인시켜준다. 표 5는 EGFRvIII 종양 항원-결합 도메인을 갖는 사중-특이적 항체의 예를 보여준다. FITC 대조군 항체.

표 5

EGFRvIII 종양 항원 결합 도메인을 갖는 사중-특이적 항체. FITC 대조군 항체.

항체 ID	항체 도메인 구조						
SI-39E4	PL230	X	806	X	284A10	X	420H5
SI-39E3	PL230	X	806	X	284A10	X	466F6
SI-39E2	PL230	X	806	X	284A10	X	460C3
SI-39E5	FITC	X	806	X	284A10	X	420H5
SI-39E1	PL230	X	806	X	284A10	X	FITC

[0108]

[0109]

실시예 6: 인간 ROR1로 형질감염된 CHO 세포에 결합하는 사중-특이적 항체의 FACS 분석

[0110]

전장 인간 ROR1을 안정적으로 발현하는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에 대한 표 1 및 2에 열거된 사중-특이적 항체의 결합을 시험하였다. 항체를 2X 최종 농도로 제조하고, 50 uL PBS/2% FBS에서 96 웰 플레이트의 3개 웰에 걸쳐 1:5로 적정한 다음, 50 uL PBS/2% FBS에서 5,000개의 ROR1-CHO 세포를 첨가하였다. 이 혼합물을 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하고, 200 uL PBS/2% FBS로 1회 세척한 다음, 스톱의 1:1000 희석에서 2차 항체 PE 염소 항-인간 IgG Fc를 첨가하고, 이 혼합물을 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 2 x 200 uL

PBS/2% FBS로 세척하고, 50 ul PBS/2% FBS에 재현탁시키고, BD LSRForteSSA에서 분석하였으며, 결합 프로파일을 도 5에 나타내었다. ROR1의 Ig 도메인에 특이적인 323H7 결합 도메인을 갖는 사중-특이적 항체 SI-35E18, 19, 및 20은 ROR1의 프리즐드(frizzled) 도메인에 특이적인 338H4 결합 도메인을 갖는 사중-특이적 항체 SI-3521, 22 및 23보다 더 높은 결합을 나타내었고, ROR1의 크링글(kringle) 도메인에 특이적인 330F11 결합 도메인을 갖는 사중-특이적 항체 SI-3524, 25 및 26은 결합하지 않았다.

[0111] 실시예 7: 인간 41BB로 형질감염된 CHO 세포에 결합하는 사중-특이적 항체의 FACS 분석

[0112] 전장 인간 ROR1을 안정적으로 발현하는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에 대한 표 6에 열거된 사중-특이적 항체의 결합을 시험하였다. 항체를 2X 최종 농도로 제조하고 50 ul PBS/2% FBS에서 96 웰 플레이트의 3개 웰에 걸쳐 1:5로 적정한 다음, 50 ul PBS/2% FBS에서 5,000개의 ROR1-CHO 세포를 첨가하였다. 이 혼합물을 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하고, 200 ul PBS/2% FBS로 1회 세척한 다음, 스톱의 1:1000 희석에서 2차 항체 PE 염소 항-인간 IgG Fc를 첨가하고, 이 혼합물을 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 2 x 200 ul PBS/2% FBS로 세척하고, 50 ul PBS/2% FBS에 재현탁시키고, BD LSRFortessa에서 분석하였으며, 결합 프로파일을 도 6에 나타내었다. 대조군 SI-27E12를 제외한 모든 사중-특이적 항체는 41BB 결합 도메인, 460C3, 420H5, 또는 466F6을 함유하고, 다양한 강도로 41BB 발현 CHO 세포에 결합하였다. 표 6은 예시적인 사중-특이적 항체 목록을 보여준다.

표 6

사중-특이적 항체 목록.

ID = SI-xx	도메인 1		도메인 2		Fc	도메인 3		도메인 4	
	LH-scFv	인간화 변이체	Fab	인간화 변이체		HL-scFv	인간화 변이체	HL-scFv	인간화 변이체
39 E02	PL230C6	L2H3	806	-	-	284A10	H1L1	460C3	H1L1
39 E03	PL230C6	L2H3	806	-	-	284A10	H1L1	466F6	H2L5
39 E18	284A10	L1H1	806	-	n2	PL221G5	H1L1	420H5	H3L3
39 E13	420H5	L3H3	PL230C6	H3L2	n2	284A10	H1L1	806	-
39 E10	420H5	L3H3	PL230C6	H3L2	n2	806	-	284A10	H1L1
39 E29	806	-	284A10	H1L1	n2	PL221G5	H1L1	420H5	H3L3
39 E04	PL230C6	L2H3	806	-	n2	284A10	H1L1	420H5	H3L3
39 E23	PL230C6	L2H3	806	-	n2	420H5	H3L3	284A10	H1L1
38 E14	PL230C6	L2H3	466F6	H2L5	n2	21D4	-	284A10	H1L1
38 E38	PD224D1	L2H2	466F6	H2L5	n2	21D4	-	284A10	H1L1
38 E05	466F6	L5H2	PL230C6	H3L2	n2	284A10	H1L1	21D4	-
38 E20	466F6	L5H2	21D4	-	n2	284A10	H1L1	PL221G5	H1L1
39 E05	4-4-20 (FITC)	-	806	-	n2	284A10	H1L1	420H5	H3L3
39 E01	PL230C6	L2H3	806	-	n2	284A10	H1L1	4-4-20 (FITC)	-
35 E02	460C3	L1H1	PL230C6	H3L2	n2	324C6	H2L1	4-4-20 (FITC)	-
35 E12	4-4-20 (FITC)	-	PL230C6	H3L2	n2	324C6	H2L1	480C8	H1L1
35 E13	460C3	L1H1	PL230C6	H3L2	n2	4-4-20 (FITC)	-	480C8	H1L1
35 E15	460C3	L1H1	4-4-20 (FITC)	-	n2	324C6	H2L1	480C8	H1L1
35 E18	460C3	L1H1	PL230C6	H3L2	n2	323H7	H4L1	284A10	H1L1
35 E19	420H5	L3H3	PL230C6	H3L2	n2	323H7	H4L1	284A10	H1L1
35 E20	466F6	L5H2	PL230C6	H3L2	n2	323H7	H4L1	284A10	H1L1
35 E21	460C3	L1H1	PL230C6	H3L2	n2	338H4	H3L4	284A10	H1L1
35 E22	420H5	L3H3	PL230C6	H3L2	n2	338H4	H3L4	284A10	H1L1
35 E23	466F6	L5H2	PL230C6	H3L2	n2	338H4	H3L4	284A10	H1L1
35 E24	460C3	L1H1	PL230C6	H3L2	n2	330F11	H1L1	284A10	H1L1
35 E25	420H5	L3H3	PL230C6	H3L2	n2	330F11	H1L1	284A10	H1L1
35 E26	466F6	L5H2	PL230C6	H3L2	n2	330F11	H1L1	284A10	H1L1
35 E36	4-4-20 (FITC)	-	PL230C6	H3L2	n2	338H4	H3L4	284A10	H1L1
35 E37	460C3	L1H1	4-4-20 (FITC)	-	n2	338H4	H3L4	284A10	H1L1
35 E38	460C3	L1H1	PL230C6	H3L2	n2	4-4-20 (FITC)	-	284A10	H1L1
35 E39	460C3	L1H1	PL230C6	H3L2	n2	338H4	H3L4	4-4-20 (FITC)	-

[0113] 실시예 8: 인간 PD-L1으로 형질감염된 CHO 세포에 결합하는 사중-특이적 항체의 FACS 분석

[0115] 전장 인간 ROR1을 안정적으로 발현하는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에 대한 표 6에 열거된 사중-특이적 항체의 결합을 시험하였다. 항체를 2X 최종 농도로 제조하고 50 ul PBS/2% FBS에서 96 웰 플레이트의 3개 웰에 걸쳐 1:5로 적정한 다음, 50 ul PBS/2% FBS에서 5,000개의 ROR1-CHO 세포를 첨가하였다. 이 혼합물을 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하고, 200 ul PBS/2% FBS로 1회 세척한 다음, 스톱의 1:1000 희석에서 2차 항체 PE 염소 항-인간 IgG Fc를 첨가하고, 이 혼합물을 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 2 x 200 ul PBS/2% FBS로 세척하고, 50 ul PBS/2% FBS에 재현탁시키고, BD LSRFortessa에서 분석하였으며, 결합 프로파일을 도 7에 나타내었다. 대조군 SI-27E15를 제외한 모든 사중-특이적 항체는 동일한 PD-L1 결합 도메인, PL230C6을 함유하고, PD-L1 발현 CHO 세포에 대해 매우 유사한 결합 강도를 나타냈다.

[0116] 실시예 9: 이펙터로서 말초 혈액 단핵 세포 및 표적으로서 B-급성 림프구성 백혈병(B-ALL) 세포주 Kasumi-2를 사용한 재지시된 T 세포 세포독성(RTCC) 분석

[0117] 이펙터로서 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 사용하여 표 6에 열거된 사중-특이적 항체의 B-ALL 세포주

Kasumi 2에 대한 RTCC 활성을 시험하였다. Kasumi 2 표적 세포, 5×10^6 을 37°C 에서 20분 동안 10 ml의 배양 배지에서 $0.5 \mu\text{M}$ 의 CFSE (Invitrogen, #C34554)로 표지하였다. 세포를 10 ml에 재현탁하기 전에, 50 ml의 배양 배지로 3회 세척한 다음 다시 계수하였다. 항체를 2X 최종 농도로 제조하고, 200 μl RPMI + 10% FBS에서 96 웰 플레이트의 10개 웰에 걸쳐 1:3으로 적정하였다. 인간 PBMC를 정상 인간 말초 혈액으로부터 수집된 농축된 백혈구 성분 채집술(leukapheresis) 생성물인 "류코팩(leukopak)"으로부터 표준 피콜 밀도 구배로 정제하였다. 최종 목적지 96 웰 플레이트에서, 100 μl 의 표적 세포(5,000), 50 μl 의 PBMC(25,000) 및 100 μl 의 각 항체 희석액을 분석 웰 각각에 첨가함으로써 표적 세포인 PBMC와 연속 적정된 항체를 조합하였다. 분석 플레이트를 약 72시간 동안 37°C 에서 인큐베이션한 후, 각 분석 웰의 내용물을 수확하고 남아있는 CFSE-표지된 표적 세포의 수를 분석하였다. 도 8에 도시된 바와 같이, 사중-특이적 항체는 모두 동일한 PD-L1 결합 도메인 PL230C6, 동일한 ROR1 결합 도메인 323H7, 및 동일한 CD3 결합 도메인 284A10을 함유하지만, 41BB 결합 도메인 460C3, 420H5 및 466F6 중 하나를 가지며, 41BB 결합 도메인을 갖지 않지만 사중-특이적 항체 SI-35E18, 19 및 20에서와 유사하게 강력한 것으로 보이는 대조군 SI-27E12를 제외하고는, 대조군과 비교하여 더 큰 RTCC 활성을 나타냈다.

[0118] 실시예 10: 이펙터로서 CD8+, CD45RO+ 기억 T 세포, 및 표적으로서 B-급성 림프구성 백혈병(B-ALL) 세포주 Kasumi-2를 사용한 재지시된 T 세포 세포독성(RTCC) 분석

[0119] 이펙터로서 인간 CD8+, CD45RO+ 기억 T 세포를 사용하여 표 6에 열거된 사중-특이적 항체의 B-ALL 세포주 Kasumi 2에 대한 RTCC 활성을 시험하였다. Kasumi 2 표적 세포, 5×10^6 을 37°C 에서 20분 동안 10 ml의 배양 배지에서 $0.5 \mu\text{M}$ 의 CFSE(Invitrogen, #C34554)로 표지하였다. 세포를 10 ml에 재현탁하기 전에, 50 ml의 배양 배지로 3회 세척한 다음 다시 계수하였다. 항체를 2X 최종 농도로 제조하고, 200 μl RPMI + 10% FBS에서 96 웰 플레이트의 10개 웰에 걸쳐 1:3으로 적정하였다. 인간 CD8+, CD45RO+ 기억 T 세포를 제조사 프로토콜에 따라 EasySep™ 인간 기억 CD8+ T 세포 강화 키트(Stemcell Technologies, #19159)를 사용하여 정상 공여자로부터의 말초 혈액 단핵 세포로부터 농축하였다. 최종 세포 집단은 FACS 분석에 의해 98% CD8+, CD45RO+ T 세포인 것으로 결정되었다(데이터는 나타내지 않음). 최종 목적지 96 웰 플레이트에서, 100 μl 의 표적 세포(5,000), 50 μl 의 CD8+, CD45RO+ 기억 T 세포(25,000), 및 100 μl 의 각 항체 희석액을 분석 웰 각각에 첨가함으로써 표적 세포인 T 세포와 연속 적정된 항체를 조합하였다. 분석 플레이트를 약 72시간 동안 37°C 에서 인큐베이션한 후, 각 분석 웰의 내용물을 수확하고, 남아있는 CFSE-표지된 표적 세포의 수를 분석하였다. 도 9에 도시된 바와 같이, 사중-특이적 항체는 모두 동일한 PD-L1 결합 도메인 PL230C6, 동일한 ROR1 결합 도메인 323H7, 및 동일한 CD3 결합 도메인 284A10을 함유하지만, 41BB 결합 도메인 460C3, 420H5, 및 466F6 중 하나를 가지며, 41BB, PD-L1, ROR1, 또는 CD3 결합 도메인 중 하나를 함유하지 않는 대조군과 비교하여 더 큰 RTCC 활성을 나타냈다.

[0120] 실시예 11: 이펙터로서 CD8+, CD45RA+ 나이브 T 세포, 및 표적으로서 B-급성 림프구성 백혈병(B-ALL) 세포주 Kasumi-2를 사용한 재지시된 T 세포 세포독성(RTCC) 분석

[0121] 이펙터로서 인간 CD8+, CD45RA+ 기억 T 세포를 사용하여 표 6에 열거된 사중-특이적 항체의 B-ALL 세포주 Kasumi 2에 대한 RTCC 활성을 시험하였다. Kasumi 2 표적 세포, 5×10^6 을 37°C 에서 20분 동안 10 ml의 배양 배지에서 $0.5 \mu\text{M}$ 의 CFSE(Invitrogen, #C34554)로 표지하였다. 세포를 10 ml에 재현탁하기 전에 50 ml의 배양 배지로 3회 세척한 다음 다시 계수하였다. 항체를 2X 최종 농도로 제조하고 200 μl RPMI + 10% FBS에서 96 웰 플레이트의 10개 웰에 걸쳐 1:3으로 적정하였다. 인간 CD8+, CD45RA+ 기억 T 세포를 제조사 프로토콜에 따라 EasySep™ 인간 나이브 CD8+ T 세포 분리 키트(Stemcell Technologies, #19258)를 사용하여 정상 공여자로부터의 말초 혈액 단핵 세포로부터 농축하였다. 최종 세포 집단은 FACS 분석에 의해 98% CD8+, CD45RA+ T 세포인 것으로 결정되었다(데이터는 나타내지 않음). 최종 목적지 96 웰 플레이트에서, 100 μl 의 표적 세포(5,000), 50 μl 의 CD8+, CD45RO+ T 세포(25,000) 및 100 μl 의 각 항체 희석액을 분석 웰 각각에 첨가함으로써 표적 세포인 T 세포와 연속 적정된 항체를 조합하였다. 분석 플레이트를 약 72시간 동안 37°C 에서 인큐베이션한 후, 각 분석 웰의 내용물을 수확하고, 남아있는 CFSE-표지된 표적 세포의 수를 분석하였다. 도 10에 도시된 바와 같이, 사중-특이적 항체는 모두 동일한 PD-L1 결합 도메인 PL230C6, 동일한 ROR1 결합 도메인 323H7, 및 동일한 CD3 결합 도메인 284A10을 함유하지만, 41BB 결합 도메인 460C3, 420H5, 및 466F6 중 하나를 가지며, 41BB, PD-L1, ROR1, 또는 CD3 결합 도메인 중 하나를 함유하지 않는 대조군과 비교하여 더 큰 RTCC 활성을 나타냈다.

[0122] 실시예 12: 이펙터로서 말초 혈액 단핵 세포, 및 표적으로서 B-급성 림프구성 백혈병(B-ALL) 세포주 Kasumi-2를 사용한 재지시된 T 세포 세포독성(RTCC) 분석

[0123] 이펙터로서 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 사용하여 표 6에 열거된 사중-특이적 항체의 B-ALL 세포주 Kasumi 2에 대한 RTCC 활성을 시험하였다. Kasumi 2 표적 세포, 5×10^6 을 37°C 에서 20분 동안 10 ml의 배양

배지에서 0.5 uM의 CFSE(Invitrogen, #C34554)로 표지하였다. 세포를 10 ml에 재현탁하기 전에, 50 ml의 배양 배지로 3회 세척한 다음 다시 계수하였다. 항체를 2X 최종 농도로 제조하고, 200 ul RPMI + 10% FBS에서 96 웰 플레이트의 10개 웰에 걸쳐 1:3으로 적정하였다. 인간 PBMC를 정상 인간 말초 혈액으로부터 수집된 백혈구 성분 채집술 생성물인 "류코팩"으로부터 표준 피콜 밀도 구배로 정제하였다. 최종 목적지 96 웰 플레이트에서, 100 ul의 표적 세포(5,000), 50 ul의 PBMC(25,000) 및 100 ul의 각 항체 희석액을 분석 웰 각각에 첨가함으로써 표적 세포인 PBMC와 연속 적정된 항체를 조합하였다. 분석 플레이트를 약 72시간 동안 37℃에서 인큐베이션한 후, 각 분석 웰의 내용물을 수확하고, 남아있는 CFSE-표지된 표적 세포의 수를 분석하였다. 도 11에 도시된 바와 같이, 사중-특이적 항체는 모두 동일한 PD-L1 결합 도메인 PL230C6, 동일한 ROR1 결합 도메인 338H4, 및 동일한 CD3 결합 도메인 284A10을 함유하지만, 41BB 결합 도메인 460C3, 420H5, 및 466F6 중 하나를 가지며, 41BB 결합 도메인을 갖지 않지만 사중-특이적 항체 SI-35E18, 19, 및 20에서와 유사하게 강력한 것으로 보이는 대조군 SI-35E36을 제외하고는 대조군과 비교하여 더 큰 RTCC 활성을 나타냈다.

[0124] 실시예 13: 이펙터로서 CD8+, CD45RO+ 기억 T 세포 및 표적으로서 B-급성 림프구성 백혈병(B-ALL) 세포주 Kasumi-2를 사용한 재지시된 T 세포 세포독성(RTCC) 분석

[0125] 이펙터로서 인간 CD8+, CD45RO+ 기억 T 세포를 사용하여 표 6에 열거된 사중-특이적 항체의 B-ALL 세포주 Kasumi 2에 대한 RTCC 활성을 시험하였다. Kasumi 2 표적 세포, 5x10e6을 37℃에서 20분 동안 10 ml의 배양 배지에서 0.5 uM의 CFSE(Invitrogen, #C34554)로 표지하였다. 세포를 10 ml에 재현탁하기 전에 50 ml의 배양 배지로 3회 세척한 다음 다시 계수하였다. 항체를 2X 최종 농도로 제조하고, 200 ul RPMI + 10% FBS에서 96 웰 플레이트의 10개 웰에 걸쳐 1:3으로 적정하였다. 인간 CD8+, CD45RO+ 기억 T 세포를 제조사 프로토콜에 따라 EasySep™ 인간 기억 CD8+ T 세포 강화 키트(Stemcell Technologies, #19159)를 사용하여 정상 공여자로부터의 말초 혈액 단핵 세포로부터 농축하였다. 최종 세포 집단은 FACS 분석에 의해 98% CD8+, CD45RO+ T 세포인 것으로 결정되었다(데이터는 나타내지 않음). 최종 목적지 96 웰 플레이트에서, 100 ul의 표적 세포(5,000), 50 ul의 CD8+, CD45RO+ 기억 T 세포(25,000), 및 100 ul의 각 항체 희석액을 분석 웰 각각에 첨가함으로써 표적 세포인 T 세포와 연속 적정된 항체를 조합하였다. 분석 플레이트를 약 72시간 동안 37℃에서 인큐베이션한 후, 각 분석 웰의 내용물을 수확하고, 남아있는 CFSE-표지된 표적 세포의 수를 분석하였다. 도 12에 도시된 바와 같이, 사중-특이적 항체는 모두 동일한 PD-L1 결합 도메인 PL230C6, 동일한 ROR1 결합 도메인 338H4, 및 동일한 CD3 결합 도메인 284A10을 함유하지만, 41BB 결합 도메인 460C3, 420H5, 및 466F6 중 하나를 가지며, 41BB, PD-L1, ROR1, 또는 CD3 결합 도메인 중 하나를 함유하지 않는 대조군과 비교하여 더 큰 RTCC 활성을 나타냈다.

[0126] 실시예 14: 이펙터로서 CD8+, CD45RA+ 나이브 T 세포, 및 표적으로서 B-급성 림프구성 백혈병(B-ALL) 세포주 Kasumi-2를 사용한 재지시된 T 세포 세포독성(RTCC) 분석

[0127] 이펙터로서 인간 CD8+, CD45RA+ 기억 T 세포를 사용하여 표 6에 열거된 사중-특이적 항체의 B-ALL 세포주 Kasumi 2에 대한 RTCC 활성을 시험하였다. Kasumi 2 표적 세포, 5 x 10e6을 37℃에서 20분 동안 10 ml의 배양 배지에서 0.5 uM의 CFSE(Invitrogen, #C34554)로 표지하였다. 세포를 10 ml에 재현탁하기 전에 50 ml의 배양 배지로 3회 세척한 다음 다시 계수 하였다. 항체를 2X 최종 농도로 제조하고, 200 ul RPMI + 10% FBS에서 96 웰 플레이트의 10개 웰에 걸쳐 1:3으로 적정하였다. 인간 CD8+, CD45RA+ 기억 T 세포를 제조사 프로토콜에 따라 EasySep™ 인간 나이브 CD8+ T 세포 분리 키트(Stemcell Technologies, #19258)를 사용하여 정상 공여자로부터의 말초 혈액 단핵 세포로부터 농축하였다. 최종 세포 집단은 FACS 분석에 의해 98% CD8+, CD45RA+ T 세포인 것으로 결정되었다(데이터는 나타내지 않음). 최종 목적지 96 웰 플레이트에서, 100 ul의 표적 세포(5,000), 50 ul의 CD8+, CD45RO+ T 세포(25,000) 및 100 ul의 각 항체 희석액을 분석 웰 각각에 첨가함으로써 표적 세포인 T 세포와 연속 적정된 항체를 조합하였다. 분석 플레이트를 약 72시간 동안 37℃에서 인큐베이션한 후, 각 분석 웰의 내용물을 수확하고, 남아있는 CFSE-표지된 표적 세포의 수를 분석하였다. 도 13에 도시된 바와 같이, 사중-특이적 항체는 모두 동일한 PD-L1 결합 도메인 PL230C6, 동일한 ROR1 결합 도메인 338H4, 및 동일한 CD3 결합 도메인 284A10을 함유하지만, 41BB 결합 도메인 460C3, 420H5, 및 466F6 중 하나를 가지며, 41BB, PD-L1, ROR1, 또는 CD3 결합 도메인 중 하나를 함유하지 않는 대조군과 비교하여 더 큰 RTCC 활성을 나타내지 않았다. 이는 CD8+, CD45RA+ 나이브 T 세포를 사용한 RTCC 활성을 나타내는 실시예 6에 기재되고 도 10에 도시된 사중-특이적 항체와 대조적이다.

[0128] 본 개시 내용은 특정 구현에 또는 실시예들을 참조하여 설명되었지만, 이들 구현에가 예시적이고 본 개시 내용의 범위가 그에 따라 제한되지 않는 것으로 이해될 수 있다. 본 개시 내용의 대안적인 구현에는 본 개시 내용이 속하는 기술 분야의 당업자에게 명백할 수 있다. 이러한 대안적인 구현에는 본 개시 내용의 범위 내에 포함되는

것으로 간주된다. 따라서, 본 개시 내용의 범위는 첨부된 청구 범위에 의해 정의되고 전술한 설명에 의해 뒷받침된다. 본 명세서에서 인용되거나 언급된 모든 참고 문헌은 그 전체가 참고로 포함된다.

- [0129] **서열 목록**
- [0130] CDR은 아미노산 서열에서 밑줄이 그어져 있다.
- [0131] **>서열 번호:1 항-CD3 284A10 VHv1 nt**
- [0132] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCATCAGTACCAATGCAATG
AGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGAGTCATTACTGGTCGTGATATCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCAGATTCACC
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGCGGACGGTGGATCATCT
GCTATTACTAGTAACAACATTTGGGGCCAAGGAACCTCTGGTCACCGTTTCTTCA
- [0133] **>서열 번호:2 항-CD3 284A10 VHv1 aa**
- [0134] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISTNAMSWVRQAPGKGLEWIGVITGRDITYYASWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGSS
AITSNNIWGQGLTVTVSS
- [0135] **>서열 번호:3 항-CD3 284A10 VLv1 nt**
- [0136] GACGTCGTGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAATTGCCAAGCCAGTGAGAGCATTAGCAGTTGGTTAGCC
TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGAAGCATCCAACTGGCATCTGGGTCCCATCAAGGTTACAGCGCAGTGGATCTGGG
ACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAAGGCTATTTTTATTTTATTAGTCGTACTTATGTAAATCTC
TTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
- [0137] **>서열 번호:4 항-CD3 284A10 VLv1 aa**
- [0138] DVVMTQSPSTLSASVGRVITINCQASESISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYEASKLASGVPSRFSSGSGSGTEFTLTISSLQPDFATYYCQGYFYFISRTYVNS
FGGGTKVEIK
- [0139] **>서열 번호:5 항-CD3 480C8 VHv1 nt**
- [0140] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAATCGACCTCAGTAGCAATGCAATG
AGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGAGTCATTACTGGTCGTGATATCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCAGATTCACC
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGCGGACGGTGGATCATCT
GCTATTAATAGTAAGAACATTTGGGGCCAAGGAACCTCTGGTCACCGTTTCTTCA
- [0141] **>서열 번호:6 항-CD3 480C8 VHv1 aa**
- [0142] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSNAMSWVRQAPGKGLEWIGVITGRDITYYASWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGSS
AINSKNIWGQGLTVTVSS
- [0143] **>서열 번호:7 항-CD3 480C8 VLv1 nt**
- [0144] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAAGCCAGTGAGAGCATTAGCAGTTGGTTAGCC
TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGAAGCATCCAACTGGCATCTGGGTCCCATCAAGGTTACAGCGCAGTGGATCTGGG
ACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAAGGCTATTTTTATTTTATTAGTCGTACTTATGTAAATGCT
TTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
- [0145] **>서열 번호:8 항-CD3 480C8 VLv1 aa**
- [0146] DIQMTQSPSTLSASVGRVITITCQASESISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYEASKLASGVPSRFSSGSGSGTEFTLTISSLQPDFATYYCQGYFYFISRTYVNA
FGGGTKVEIK
- [0147] **>서열 번호:9 항-PD-L1 PL230C6 VHv3 nt**
- [0148] CAGTCGGTGGAGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCCTCTGGAATCGACCTTAATACCTACGACATGATC
TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTAGAGTGGGTGGAATCATTACTTATAGTGGTAGTAGATACTACGCGAACTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATC
TCCAAAGACAATAACGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCCAGAGATTATATGAGTGGTTCC
CACTTGTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCTAGT
- [0149] **>서열 번호:10 항-PD-L1 PL230C6 VHv3 aa**

- [0150] QSVVEESGGGLVQPGGSLRLSCTASGIDLNTYDMIWVRQAPGKGLEWVGIIITYSGSRYANWAKGRFTISKDNTKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYMSGSLHLWGQGTLLTVSS
- [0151] >서열 번호:11 항-PD-L1 PL230C6 VLv2 nt
- [0152] GCCTATGATATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAAGTGTGAGGCCAGTGAGGACATTTATAGCTTCTTGCCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCCATTCTGCATCCTCTCTGGCATCTGGGGTCCCATCAAGGTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGGTTATGGTAAAAATAATGTTGATAATGCTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
- [0153] >서열 번호:12 항-PD-L1 PL230C6 VLv2 aa
- [0154] AYDMTQSPSSVSASVGDRTIKQASEDIYSFLAWYQQKPGKAPKLLIHSASSLASGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQGYGKNNVDNAFGGGTKVEIK
- [0155] >서열 번호:13 항-PD-L1 PL221G5 VHv1 nt
- [0156] GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTAGCGGGTACGACATGTGTCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATGCATTGTCTGTGGTAGTGTGGTATCACTTACGACGCGAACTGGGCGAAAGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGATCGGCGTTTTCTGTTGACTACGCCATGGACCTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
- [0157] >서열 번호:14 항-PD-L1 PL221G5 VHv1 aa
- [0158] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSGYDMCWVRQAPGKGLEWIIACIAAGSAGITYDANWAKGRFTISRDNSKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCARSAFSFDYAMDLLWGQGTLLTVSS
- [0159] >서열 번호:15 항-PD-L1 PL221G5 VLv1 nt
- [0160] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTAGTCCCCTTAAAC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCAAGGTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGGGTTATAGTTGGGGTAATGTTGATAATGTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
- [0161] >서열 번호:16 항-PD-L1 PL221G5 VLv1 aa
- [0162] DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCQASQSISSHLNWIYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTITSSLPDDFATYYCQQGYSWGNVDNVFGGGTKVEIK
- [0163] >서열 번호:17 항-PD-1 PD224D1 VHv2 nt
- [0164] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCCTCTGGATTCTCCCTAAGTAGCTATGCAATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTACATCGGCTACATTGGTGATACTACTGGCATAGCCTACGCGAGCTGGGCGAATGGCAGATTACCATCTCCAAAGACAATACCAAGAACACGGTGGATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTGGTCTACTTACATCTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
- [0165] >서열 번호:18 항-PD-1 PD224D1 VHv2 aa
- [0166] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSYAMSIVVRQAPGKLEYIGYIGDITGIIAYASWANGRFTISKDNTKNTVDLQMNSLRAEDTAVYYCARGWSYLDIWLWGQGTLLTVSS
- [0167] >서열 번호:19 항-PD-1 PD224D1 VLv2 nt
- [0168] GCCCTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCCAGTCAGAACATTTACAGCAATTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGTTCTAAGCTCCTGATCTATCAGGCTCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAGCGGTTATTATAGTGCTGCCCTTAATACTTTTCGGCGGAGGACCAAGGTGGAGATCAAA
- [0169] >서열 번호:20 항-PD-1 PD224D1 VLv2 aa
- [0170] ALVMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQNIYSNLAWYQQKPGKVPKLLIYQASTLASGVPSRFSGSGYGTDFLTITSSLPEDVATYYCQQGYYSALNTFGGGTKVEIK

- [0171] >서열 번호:21 항-4-1BB 420H5 VHv3 nt
- [0172] CAGTCGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTCAGTAGCAACTACTGGATA
TGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGTGGAGTGGATCGCATGCATTTATGTTGGTAGTAGTGGTGACCTTACTACGCGAGCTCCGCGAAAGGCCGG
TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGAGATAGTAGT
AGTTATTATATGTTAACTGTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
- [0173] >서열 번호:22 항-4-1BB 420H5 VHv3 aa
- [0174] QSLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSNYWICWVRQAPGKGLEWIACIYVGSSGDTYYASSAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSS
SYIMFNLWGQGTLTVSS
- [0175] >서열 번호:23 항-4-1BB 420H5 VLv3 nt
- [0176] GCCCTTGTGATGACCCAGTCTCCTTCCACCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTGAGGACATTGATACCTATTTAGCC
TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCTTTATGCATCCGATCTGGCATCTGGGTCCCATCAAGGTCAGCGGCAGTGGATCTGGG
ACAGAATTCACTCTACCATCAGCAGCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAAGGCGTTACTATACTAGTAGTGCTGATACGAGGGGTGCT
TTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
- [0177] >서열 번호:24 항-4-1BB 420H5 VLv3 aa
- [0178] ALVMTQSPSTLSASVGDRTINQASEDIDTYLAWYQKPGKAPKLLIFYASDLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQGGYYTSSADTRGA
FGGGTKVEIK
- [0179] >서열 번호:25 항-4-1BB 466F6 VHv2 nt
- [0180] CGGTCGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCCTCTGGATTACCATCAGTAGCTACCACATGCAG
TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGTGGAGTACATCGGAACCATTAGTAGTGGTGGTAATGTATACTACGCGAGCTCCGCGAGAGGCAGATTCACCATC
TCCAGACCCTCGTCCAAGAACACGGTGGATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGACTCTGGTTATAGTGAT
CCTATGTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
- [0181] >서열 번호:26 항-4-1BB 466F6 VHv2 aa
- [0182] RSLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTISSYHMQWVRQAPGKLEYIGTISSGGNVYYASSARGRFTISRPSSKNTVDLQMNSLRAEDTAVYYCARDSGYSD
PMWGQGTLTVSS
- [0183] >서열 번호:27 항-4-1BB 466F6 VLv5 nt
- [0184] GACGTGTGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACCTGTCAGGCCAGTCAGAACATTAGGACTTACTTATCC
TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCAGCAATCTGGCATCTGGGGTCCCATCAAGGTCAGCGGCAGTGGATCTGGG
ACAGATTTCACTCTACCATCAGCGACCTGGAGCCTGGCGATGCTGCAACTACTATTGTCAGTCTACCTATCTTGGTACTGATTATGTTGGCGGTGCTTTC
GGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
- [0185] >서열 번호:28 항-4-1BB 466F6 VLv5 aa
- [0186] DVVMTQSPSSVSASVGDRTITCQASQNIPTYLSWYQKPGKAPKLLIYAANLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISDLEPGDAATYYCQSTYLGTDYVGGAF
GGGTKVEIK
- [0187] >서열 번호:29 항-4-1BB 460C3 VHv1 nt
- [0188] GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAATCGACTTCAGTAGGAGATACTAC
ATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGTGGAGTGGATCGCATGCATATATACTGGTAGCCGCGATACTCCTCACTACGCGAGCTCCGCGAAAGGC
CGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGAGAAGGT
AGCCTGTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC
- [0189] >서열 번호:30 항-4-1BB 460C3 VHv1 aa
- [0190] EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSRYYMCWVRQAPGKGLEWIACIYTGSRDTPHYASSAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG
SLWGQGTLTVSS
- [0191] >서열 번호:31 항-4-1BB 460C3 VLv1 nt
- [0192] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGTCCAGTCAGAGTGTTTATAGTAACTGGTTC

TCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATTCTGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTGATCT
GGGACAGAATTCCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCACTTATTACTGCGCAGGCGGTTACAATACTGTTATTGATACTTTTGCTTTC
GGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

[0193] >서열 번호:32 항-4-1BB 460C3 VLv1 aa

[0194] DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCQSSQSVYSNWF^{SWYQQKPGKAPKLLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS}SLQPDFATYYCAGGYNTVIDTFAF
GGGKVEIK

[0195] >서열 번호:33 항-ROR1 324C6 VHv2 nt

[0196] CAGTCGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACTGCCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGGTACTACATGACC
TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGAACCATTTATACTAGTGGTAGTACATGGTACGCGAGCTGGACAAAAGGCAGATTCACCATC
TCCAAAGACAATACCAAGAACACGGTGGATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGATCCTATTATGGCGGTGAT
AAGACTGGTTTAGGCATCTGGGGCCAGGGAACCTCTGGTTACCGTCTCTTCA

[0197] >서열 번호:34 항-ROR1 324C6 VHv2 nt

[0198] QSLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSRY^{YMTWVRQAPGKGLEWIGTIY}TSGSTWYASWTKGRFTISKDNTKNTVDLQMNSLRAEDTAVYYCARSYYGGD
KTGLGIWGQGLTVTVSS

[0199] >서열 번호:35 항-ROR1 324C6 VLv1 nt

[0200] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTGATAGTTGGTTATCC
TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATCAGGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTGATCTGGG
ACAGAGTTCCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCACTTATTACTGCCAATCTGCTTATGGTGTTAGTGGTACTAGTAGTTATTTATAT
ACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

[0201] >서열 번호:36 항-ROR1 324C6 VLv1 aa

[0202] DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCQASQSIDSWL^{SWYQQKPGKAPKLLIYQASTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS}SLQPDFATYYCQSAYGVSGTSSVLY
TFGGGKVEIK

[0203] >서열 번호:37 항-ROR1 323H7 VHv4 nt

[0204] GAGGTGCAGTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCATCAGTCGCTACCACATG
ACTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGACATATTTATGTTAATAATGATGACACAGACTACGCGAGCTCCGCGAAAGGCCGGTTC
ACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCGAGATTGGATGTTGGT
GGTGGTGGTGCTTATATTGGGGACATCTGGGGCCAGGGAACCTCTGGTTACCGTCTCTTCA

[0205] >서열 번호:38 항-ROR1 323H7 VHv4 aa

[0206] EVQLLES^{GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISR}YHMTWVRQAPGKLEWIGHI^{YVNDDTDYASSAKGRFTIS}RDN^{SKNTLYLQMN}SLRAEDTATYFCARLDVG
GGGAYIGDIWGQGLTVTVSS

[0207] >서열 번호:39 항-ROR1 323H7 VLv1 nt

[0208] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGTCCAGTCAGAGTGTATATAACAACAACGAC
TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGTTCTAAGCTCCTGATCTATTATGCTTCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGGTTCACTGGCAGTGGA
TCTGGGACAGATTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTGCACTTATTACTGTGCAGGCGGTTATGATACGGATGGTCTTGATACGTTT
GCTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

[0209] >서열 번호:40 항-ROR1 323H7 VLv1 aa

[0210] DIQMTQSPSSLASVGDRTITCQSSQSVYNNNDLAWYQQKPGKVPKLLIYYASTLASGVPSRFSGSGSGTDFLTIS^{SLQPEDVATYYCAGGYD}TDGLDTF
AFGGGKVEIK

[0211] >서열 번호:41 항-ROR1 338H4 VHv3 nt

[0212] GAGGTGCAGTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACTGCCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGCTATGCAATG
AGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAGGGGGCTGGAGTGGATCGGAATCATTTATGCTAGTGGTAGCACATACTACGCGAGCTCGGCGAAAGGCAGATTCACC
ATCTCCAAAGACAATACCAAGAACACGGTGGATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAATTTATGACGGCATG

GACCTCTGGGGCCAGGGAACCTCTGGTTACCGTCTCTCA

[0213] >서열 번호:42 항-ROR1 338H4 VHv3 aa

[0214] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSSYAMSWVRQAPGRGLEWIGIIYASGSTYYASSAKGRFTISKDNTKNTVDLQMNSLRAEDTAVYYCARIYDGM
DLWGQGTLLTVSS

[0215] >서열 번호:43 항-ROR1 338H4 VLv4 nt

[0216] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAACATTACAGCTACTTATCC
TGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGTTCTAAGCGCCTGATCTATCTGGCATCTACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGG
ACAGATTACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTATTACTGTCAAAGCAATTATAACGGTAATTATGGTTTCGGCGGAGGGACC
AAGGTGGAGATCAAA

[0217] >서열 번호:44 항-ROR1 338H4 VLv4 aa

[0218] DIQMTQSPSSLASVGDRTINQASQNIYSYLSWYQKPKGKPKRLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDVATYYCQSNYNGNYFGGGT
KVEIK

[0219] >서열 번호:45 항-ROR1 330F11 VHv1 nt

[0220] GAGGTGCAGTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCAATAACTACTGGATG
AGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGATCGGAACCATTAAGTAGTGGTGCATATACATGGTTCGCCACCTGGGCGACAGGCAGATTCACC
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGATATTCTTCTACTACT
GATTGGACCTACTTTAACATCTGGGGCCAGGGAACCTCTGGTTACCGTCTCTCA

[0221] >서열 번호:46 항-ROR1 330F11 VHv1 aa

[0222] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGFSLSNNYMSWVRQAPGKLEWIGIISSGAYTWFATWATGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYSSTT
DWTYFNIWGQGTLLTVSS

[0223] >서열 번호:47 항-ROR1 330F11 VLv1 nt

[0224] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTAATAACTACTTAGCC
TGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATAGGGCATCCACTCTGGAATCTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGG
ACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTATTACTGCCAAAGCTATAATGGTGTTGGTAGGACTGCTTTCGGCGGAGGG
ACCAAGGTGGAGATCAAA

[0225] >서열 번호:48 항-ROR1 330F11 VLv1 aa

[0226] DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCQASQSINNLYAWYQKPKGKPKLLIYRASLTLESGVPSPRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQSYNGVGRTAFGGG
TKVEIK

[0227] >서열 번호:49 항-EGFRvIII mAb 806 VH nt

[0228] GATGTGCAGTTCAGGAGTCGGGACCTAGCCTGGTGAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACCTGCACTGTCAGTGGCTACTCAATCACCAGTGATTTTGCC
TGGAAGTGGATTTCGGCAGTTTCAGGAAACAAGCTGGAGTGGATGGGTACATAAGTTATAGTGGTAACACTAGGTACAACCCATCTCTCAAAAGTCAATC
TCTATCACTCGCGACACATCCAAGAACCAATTCTCCTGCAGTTGAACCTCTGTGACTATTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGTAAACGGCGGGACGCGGG
TTTCCTTATTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

[0229] >서열 번호:50 항-EGFRvIII mAb 806 VH aa

[0230] DVQLQESGPSLVKPSQSLTCTVTGYSTSDFAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGNTRYNPSLKSRIISITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVTAGRG
FPYWGQGTLLTVSA

[0231] >서열 번호:51 항-EGFRvIII mAb 806 VL nt

[0232] GACATCCTGATGACCAATCTCCATCCTCCATGTCTGTATCTCTGGGAGACACAGTCAGCATCACTTGCCATTCAAGTCAGGACATTAACAGTAATATAGGG
TGGTTGCAGCAGAGACCAGGAAATCATTTAAGGGCCTGATCTATCATGGAACCAACTTGACGATGAAGTTCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGA
GCCGATTATCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAATCTGAAGATTTTGCAACTATTACTGTGTACAGTATGCTCAGTTTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACC
AAGCTGGAAATCAAA

[0233] >서열 번호:52 항-EGFRvIII mAb 806 VL aa

- [0234] DILMTQSPSSMSVSLGDTVSITCHSSQDINSNIGWLQQRPGKSFKGLIYHGTNLDDEVPSRFSGSGSGADYSLTISSLESEDFADYYCVQYAQFPWTFGGGT
KLEIK
- [0235] >서열 번호:53 항-CD19 21D4 VH nt
- [0236] GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAGAAACCAGGAGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTAGCAGTTCATGGATC
GGCTGGGTGCGCCAGGCACCTGGGAAAGGCCTGGAATGGATGGGGATCATCTATCCTGATGACTCTGATACAGATACAGTCCATCCTTCCAAGGCCAGGT
ACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGGACTGCCTACCTGCAGTGGAGTAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCTATGTATTACTGTGCGAGACATGTTACTATG
ATTTGGGGAGTTATTATTGACTTCTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA
- [0237] >서열 번호:54 항-CD19 21D4 VH aa
- [0238] EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFSSWIGWVRQAPGKGLEWMGIYIPDDSDTRYSPSFQGGVTSADKSI RTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHVTM
IWGVIIIDFWGQGTLVTVSS
- [0239] >서열 번호:55 항-CD19 21D4 VL nt
- [0240] GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAACATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCCTTTAGCC
TGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTGGATCTGGG
ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCATTCACCTTCGGCCCTGGGACC
AAAGTGGATATCAAA
- [0241] >서열 번호:56 항-CD19 21D4 VL aa
- [0242] AIQLTQSPSSLASVGDRTVITCRASQGISSALAWYQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPFTFGPGT
KVDIK
- [0243] >서열 번호:57 항-FITC 4-4-20 VH nt
- [0244] GAGGTGAAGCTGGATGAGACTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGGAGGCCATGAAACTCTCCTGTGTTGCCTCTGGATTCACTTTTAGTGACTACTGGATG
AACTGGGTCCGCCAGTCTCCAGAGAAAGGACTGGAGTGGGTAGCACAAATTAGAAACAAACCTTATAATTATGAAACATATTATTCAGATTCTGTGAAAGGC
AGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGTAGTGTCTACCTGCAAAATGAACAACTTAAGAGTTGAAGACATGGGTATCTATTACTGTACGGGTCTTAC
TATGGTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTACCGTCTCCTCA
- [0245] >서열 번호:58 항-FITC 4-4-20 VH aa
- [0246] EVKLDETGGGLVQGRPMKLSVASGFTFSDYWMNVWRQSPEKLEWVAQIRNKPYNYETYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSY
YGM DYWGQTSVTVSS
- [0247] >서열 번호:59 항-FITC 4-4-20 VL nt
- [0248] GATGTCGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCTGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGA
AACACCTATTTACGTGTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCAGTCTCCAAAGTCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCACT
GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTATTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCGTGGACG
TTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATCAAA
- [0249] >서열 번호:60 항-FITC 4-4-20 VL aa
- [0250] DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLRWYLQKPGQSPKVL IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYFCSSQSTHVPWT
FGGGTKLEIK
- [0251] >서열 번호:61 인간 IgG1 null (ADCC/CDC 삭제 돌연변이가 있는 G1m-fa) nt
- [0252] GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC
GAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG
GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAATCT
TGTGACAAAACCTACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATC
TCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAAGTTCAACTGGTACGTGGACGCGGTGGAGGTGCATAATGCC
AAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCAAGGTCCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
GCGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACCCCTGCCCCCATCCCGG
GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCTGACCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC

AACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

[0253] >서열 번호:62 인간 IgG1 null (ADCC/CDC 억제 돌연변이가 있는 G1m-fa) aa

[0254] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS
CDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
AVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

[0255] >서열 번호:63 인간 Ig 카파 nt

[0256] CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAATGCCTCTGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCC
AGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC
AGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTACCCATCAGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC
AACAGGGGAGAGTGT

[0257] >서열 번호:64 인간 Ig 카파 aa

[0258] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

[0259] >서열 번호:65 SI-35E18 (60C3-L1H1-scFv x PL230C6-Fab x 323H7-H4L1-scFv x 284A10-H1L1-scFv) 중쇄 nt

[0260] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTGCCAGTCCAGTCCAGTGTATTATAGTAACTGGTTC
TCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATTCTGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCAAGGTTACAGCGCAGTGGATCT
GGGACAGAATTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGAACCTTATTACTGCGCAGGCGGTTACAATACTGTTATTGATACTTTTGCTTTC
GGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAGGCGGTGGCGGTAGTGGGGGAGGCGGTTCTGGCGGCGGAGGGTCCGCGGTGGAGGATCAGAGTGCAGCTGTTG
GAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAATCGACTTCAGTAGGAGATACTACATGTGCTGGGTCGCG
CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATGATATATACTGGTAGCCGCGATACTCCTACTACGCGAGCTCCGCGAAAGGCCGTTTACCATCTCC
AGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGCGGTATATTACTGTGCGAGAGAAGGTAGCCTGTGGGGCCAG
GGAACCTGGTCAACGCTCTGAGCGCGGTGGAGGTCCGCGGTGGTGGATCCAGTCCGTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGTCC
CTGAGACTCTCCTGTACAGCCTCTGGAATCGACCTTAATACCTACGACATGATCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGGGTAGAGTGGGTGGGAATCATT
ACTTATAGTGGTAGTAGATACTACGCGAACTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAAAGACAATACCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG
AGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCCAGAGATTATATAGTGGTTCCTACTGTGGGGCCAGGGAACCTGGTCAACGCTCTAGTGTAGCACC
AAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCCAAAGACACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG
ACGGTGTCTGGAACCTAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCTGGTGACCGTG
CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTAGGCCAAATCTTGTGACAAA
ACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCGGGGACCGTCACTCTTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACC
CCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCCTGTCACAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGCGGTCTCC
AACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACACAGGTGTATACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTG
ACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGACGCCGAGAACAACTACAAG
ACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTATAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCC
GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTGGCGGTGGAGGGTCCGCGGTGGTGGATCCGAGGTGCAGCTG
TTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCATCAGTCGCTACCACATGACTTGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGACATATTATGTTAATAATGATGACACAGACTACGCGAGTCCGCGAAAGGCCGTTTACCATCTCCAGA
GACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGCGCACCTATTCTGTGCGAGATTGGATGTTGGTGGTGGTGGT
TATATTGGGGACATCTGGGGCCAGGGAACCTGTTTACCGTCTCTTACGGCGGTGGCGGTAGTGGGGAGGCGGTTCTGGCGCGGAGGGTCCGCGGTGGGA
GGATCAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTGCCAGTCCAGTCCAGAGTGTATAACAAC
AACGACTTAGCTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAGTTCTTAAGCTCCTGATCTATTATGCTTCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGGTTCACTGGC
AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTGACGCGGTTATGATACGATGGTCTTGAT
ACGTTTGTCTTTCGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAGCGGTGGAGGGTCCGCGGTGGTGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTG
GTCCAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCATCAGTACCAATGCAATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG
GAGTGGATCGGAGTCATTACTGGTCTGATATCACATACTACGCGAGTGGGCGAAAGGCAGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT

CTTCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGCGGACGGTGGATCATCTGCTATTACTAGTAACAACATTTGGGGCCAAGGA
ACTCTGGTCACCGTTTCTTCAGGCGGTGGCGGTAGTGGGGGAGGCGGTTCTGCGCGCGGAGGGTCCGCGCGGTGGAGGATCAGACGTCGTGATGACCCAGTCT
CCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAATTGCCAAGCCAGTGAGAGCATTAGCAGTTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGG
AAAGCCCCTAAGCTCTGATCTATGAAGCATCCAACTGGCATCTGGGGTCCCATCAAGGTTACGCGGAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATC
AGCAGCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAAGGCTATTTTTATTTTATTAGTCGTACTTATGTAAATCTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTG
GAGATCAAA

- [0261] >서열 번호:66 SI-35E18 (460C3-L1H1-scFv x PL230C6-Fab x 323H7-H4L1-scFv x 284A10-H1L1-scFv) 중쇄 aa
- [0262] DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCQSSQSVYSNWFSWYQKPGKAPKLLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCAGGYNTVIDTFAG
GGGTKVEIK (항-4-1BB 460C3 VLv1)
- [0263] GGGGSGGGSGGGSGGGGS (Gly₄Ser)_{x4} 링커
- [0264] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSRRYYMCWVRQAPGKGLEWIGIAYTGSRDTPHYASSAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG
SLWGQGLTVTVSS (항-4-1BB 460C3 VHv1)
- [0265] GGGGSGGGGS (Gly₄Ser)_{x2} 링커
- [0266] QSVEESGGGLVQPGGSLRLSCTASGIDLNTYDMIWVRQAPGKGLEWVGIIITYSGSRYANWAKGRFTISKDN TKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYMSG
HLWGQGLTVTVSS (항-PD-L1 PL230C6 VHv3)
- [0267] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
CDKTHCTPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKEYKC AVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (인간 IgG1 null)
- [0268] GGGGSGGGGS (Gly₄Ser)_{x2} 링커
- [0269] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISRHHMTWVRQAPGKLEWIGHIYVNNDDTDYASSAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTATYFCARLDV
GGGAYIGDIWGQGLTVTVSS (항-ROR1 323H7 VHv4)
- [0270] GGGGSGGGSGGGSGGGGS (Gly₄Ser)_{x4} 링커
- [0271] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQSSQSVYNNNDLAWYQKPGKVPKLLIYYASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCAGGYD
TDGLDTF AFGGKVEIK (항-ROR1 323H7 VLv1)
- [0272] GGGGSGGGGS (Gly₄Ser)_{x2} 링커
- [0273] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISTNAMS WVRQAPGKLEWIGVITGRDITYYASWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGSS
AITSNNIWGQGLTVTVSS (항-CD3 284A10 VHv1)
- [0274] GGGGSGGGSGGGSGGGGS (Gly₄Ser)_{x4} 링커
- [0275] DVVMTQSPSTLSASVGDRTINCQASESISWLA WYQKPGKAPKLLIYEASKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQGYFYFISRTYVNS
FGGGTKVEIK (항-CD3 284A10 VLv1)
- [0276] >서열 번호:67 SI-35E18 (460C3-L1H1-scFv x PL230C6-Fab x 323H7-H4L1-scFv x 284A10-H1L1-scFv) 경쇄 nt
- [0277] GCCTATGATATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAAGTGTCAGGCCAGTGAGGACATTTATAGCTTCTTGCC
TGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCCATTCTGCATCCTCTCTGGCATCTGGGGTCCCATCAAGGTTACGCGGAGTGGATCTGGG
ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGGTTATGGTAAAAATAATGTTGATAATGCTTTCGGC
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTG
TGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGAC
AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTG
AGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
- [0278] >서열 번호:68 SI-35E18 (460C3-L1H1-scFv x PL230C6-Fab x 323H7-H4L1-scFv x 284A10-H1L1-scFv) 경쇄 aa
- [0279] AYDMTQSPSSVSASVGDRTIKQASEDIYSFLAWYQKPGKAPKLLIHSASSLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGYGKNNVDNAFG

GGTKVEIK (항-PD-L1 PL230C6 VLv2)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC (인간 Ig 카파)

기타 서열:

항원	항체	VH/VL	유기체	특허	서열 ID	회사
FITC	4-4-20	VH	인공	US 2009/0042291 A1	14	Xencor
FITC	4-4-20	VL	인공	US 2009/0042291 A1	13	Xencor
CD19	21D4	VH	인간	US 2009/0142349 A1	1	Medarex
CD19	21D4	VL	인간	US 2009/0142349 A1	9	Medarex
EGFRvIII	mAb 806	VH	쥐	US 2009/0137782 A1	11	Ludwig Institute
EGFRvIII	mAb 806	VL	쥐	US 2009/0137782 A1	12	Ludwig Institute

참조 : C-말단 아르기닌을 상실한 EGFRvIII Systemimmune 서열

서열 인덱스:

서열번호	설명
1	항-CD3 284A10 VHv1 nt
2	항-CD3 284A10 VHv1 aa
3	항-CD3 284A10 VLv1 nt
4	항-CD3 284A10 VLv1 aa
5	항-CD3 480C8 VHv1 nt
6	항-CD3 480C8 VHv1 aa
7	항-CD3 480C8 VLv1 nt
8	항-CD3 480C8 VLv1 aa
9	항-PD-L1 PL230C6 VHv3 nt
10	항-PD-L1 PL230C6 VHv3 aa
11	항-PD-L1 PL230C6 VLv2 nt
12	항-PD-L1 PL230C6 VLv2 aa
13	항-PD-L1 PL221G5 VHv1 nt
14	항-PD-L1 PL221G5 VHv1 aa
15	항-PD-L1 PL221G5 VLv1 nt
16	항-PD-L1 PL221G5 VLv1 aa
17	항-PD-1 PD224D1 VHv2 nt
18	항-PD-1 PD224D1 VHv2 aa
19	항-PD-1 PD224D1 VLv2 nt
20	항-PD-1 PD224D1 VLv2 aa
21	항-4-1BB 420H5 VHv3 nt
22	항-4-1BB 420H5 VHv3 aa

23	항-4-1BB 420H5 VLv3 nt
24	항-4-1BB 420H5 VLv3 aa
25	항-4-1BB 466F6 VHv2 nt
26	항-4-1BB 466F6 VHv2 aa
27	항-4-1BB 466F6 VLv5 nt
28	항-4-1BB 466F6 VLv5 aa
29	항-4-1BB 460C3 VHv1 nt
30	항-4-1BB 460C3 VHv1 aa
31	항-4-1BB 460C3 VLv1 nt
32	항-4-1BB 460C3 VLv1 aa
33	항-ROR1 324C6 VHv2 nt
34	항-ROR1 324C6 VHv2 aa
35	항-ROR1 324C6 VLv1 nt
36	항-ROR1 324C6 VLv1 aa
37	항-ROR1 323H7 VHv4 nt
38	항-ROR1 323H7 VHv4 aa
39	항-ROR1 323H7 VLv1 nt
40	항-ROR1 323H7 VLv1 aa
41	항-ROR1 338H4 VHv3 nt
42	항-ROR1 338H4 VHv3 aa
43	항-ROR1 338H4 VLv4 nt
44	항-ROR1 338H4 VLv4 aa
45	항-ROR1 330F11 VHv1 nt

[0285]

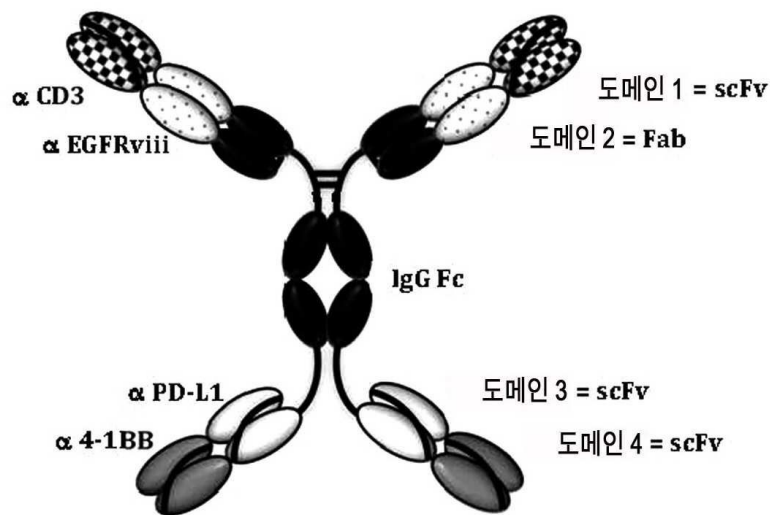
46	항-ROR1 330F11 VHv1 aa
47	항-ROR1 330F11 VLv1 nt
48	항-ROR1 330F11 VLv1 aa
49	항-EGFRvIII mAb 806 VH nt
50	항-EGFRvIII mAb 806 VH aa
51	항-EGFRvIII mAb 806 VL nt
52	항-EGFRvIII mAb 806 VL aa
53	항-CD19 21D4 VH nt
54	항-CD19 21D4 VH aa
55	항-CD19 21D4 VL nt
56	항-CD19 21D4 VL aa
57	항-FITC 4-4-20 VH nt
58	항-FITC 4-4-20 VH aa
59	항-FITC 4-4-20 VL nt
60	항-FITC 4-4-20 VL aa
61	인간 IgG1 null (ADCC/CDC 억제 돌연변이가 있는 G1m-fa) nt
62	인간 IgG1 null (ADCC/CDC 억제 돌연변이가 있는 G1m-fa) aa
63	인간 Ig 카파 nt
64	인간 Ig 카파 aa
65	SI-35E18 (60C3-L1H1-scFv x PL230C6-Fab x 323H7-H4L1-scFv x 284A10-H1L1-scFv) 중쇄 nt
66	SI-35E18 (460C3-L1H1-scFv x PL230C6-Fab x 323H7-H4L1-scFv x 284A10-H1L1-scFv) 중쇄 aa
67	SI-35E18 (460C3-L1H1-scFv x PL230C6-Fab x 323H7-H4L1-scFv x 284A10-H1L1-scFv) 경쇄 nt
68	SI-35E18 (460C3-L1H1-scFv x PL230C6-Fab x 323H7-H4L1-scFv x 284A10-H1L1-scFv) 경쇄 aa

[0286]

도면

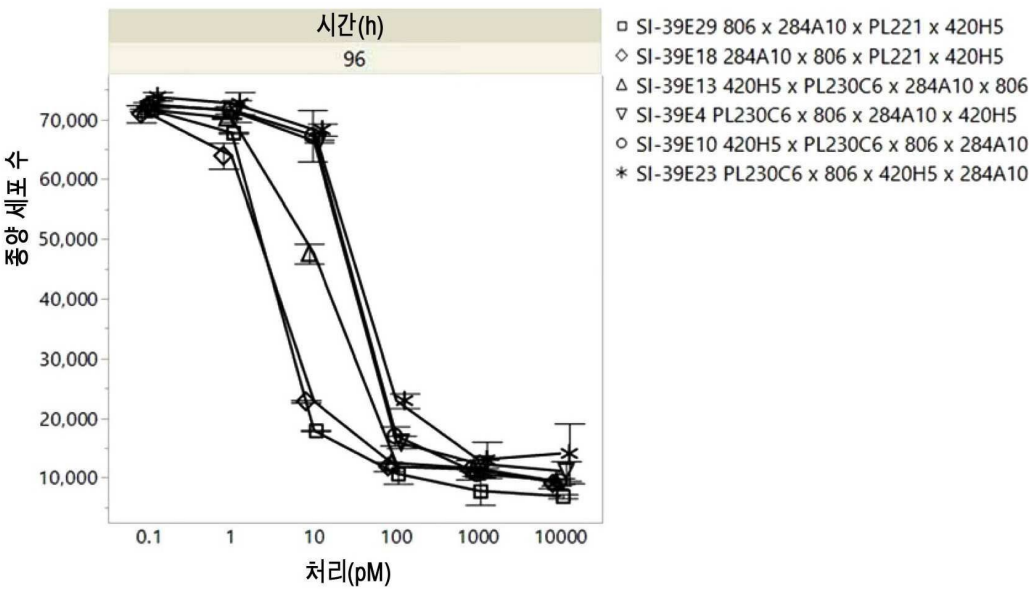
도면1

도 1. 이중-특이적 항체 구조



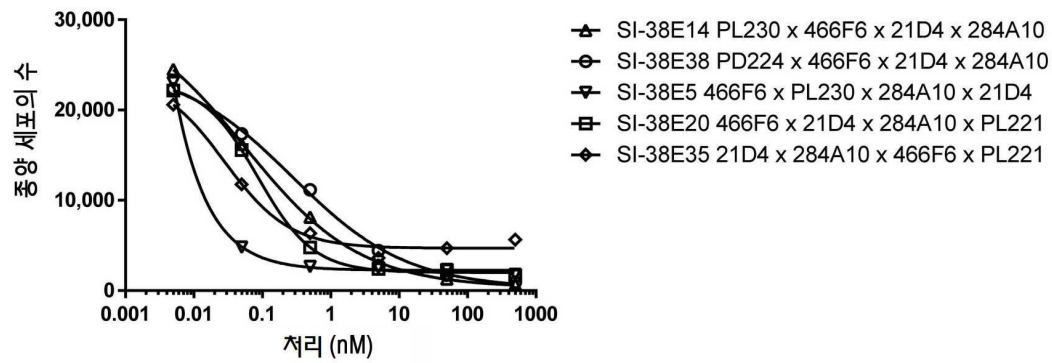
도면2

도 2. EGFRviii로 형질감염된 정상세포종 세포주 U87에 대해 재지시된 PBMC의 세포독성



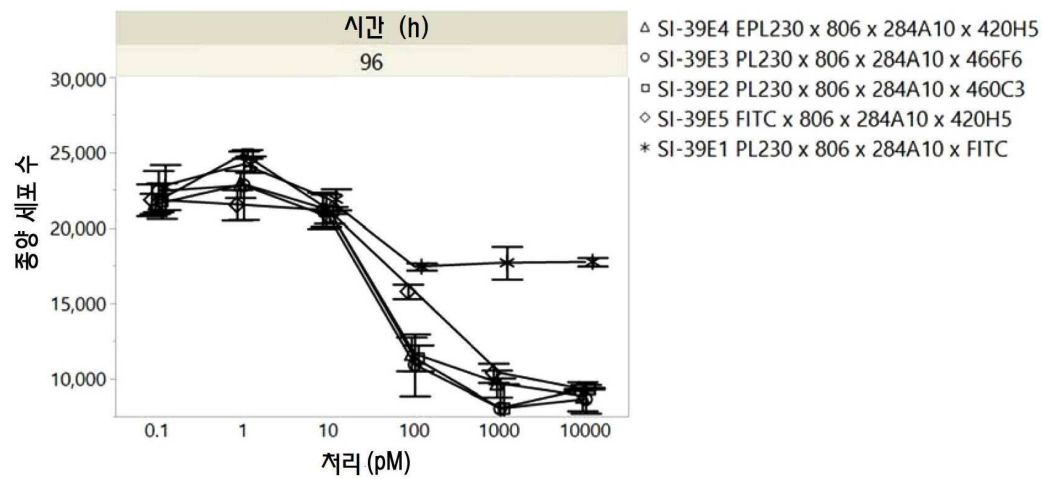
도면3

도 3. 급성 림프구성 백혈병 세포주 Kasumi-2에 대해 재지시된 PBMC의 세포독성



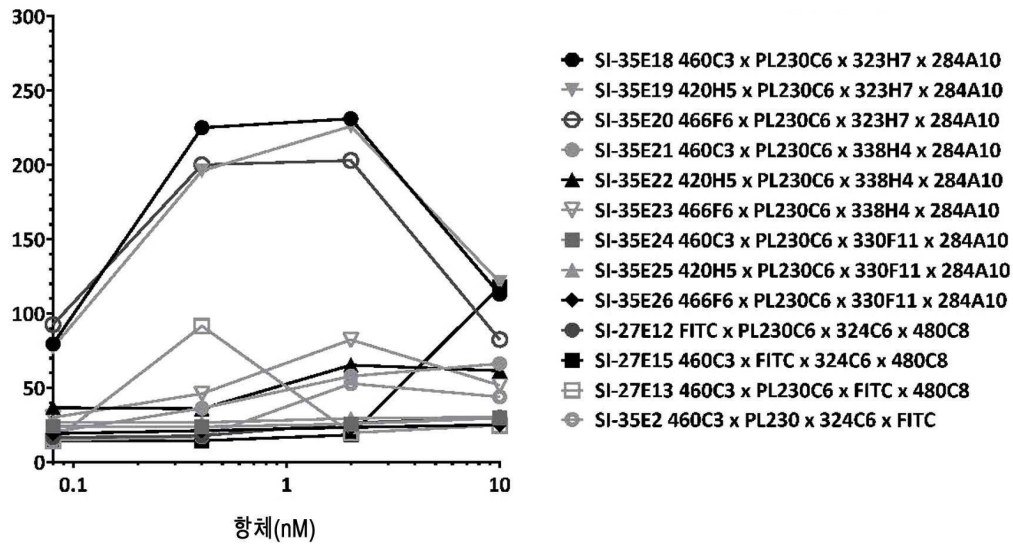
도면4

도 4. EGFRvIII로 형질감염된 정상세포종 세포주 U87에 대해 재지시된 PBMC의 세포독성. 상이한 4-1BB 도메인의 기능적 활성. PD-L1 및 4-1BB 도메인의 기능적 영향



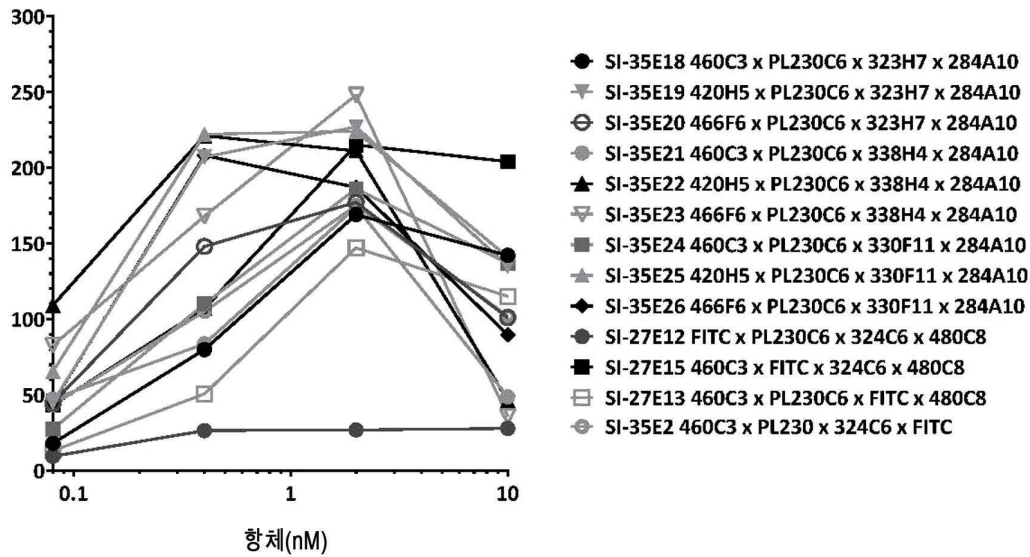
도면5

도 5. 인간 ROR1로 형질감염된 CHO 세포주에 결합한 사중-특이적 항체



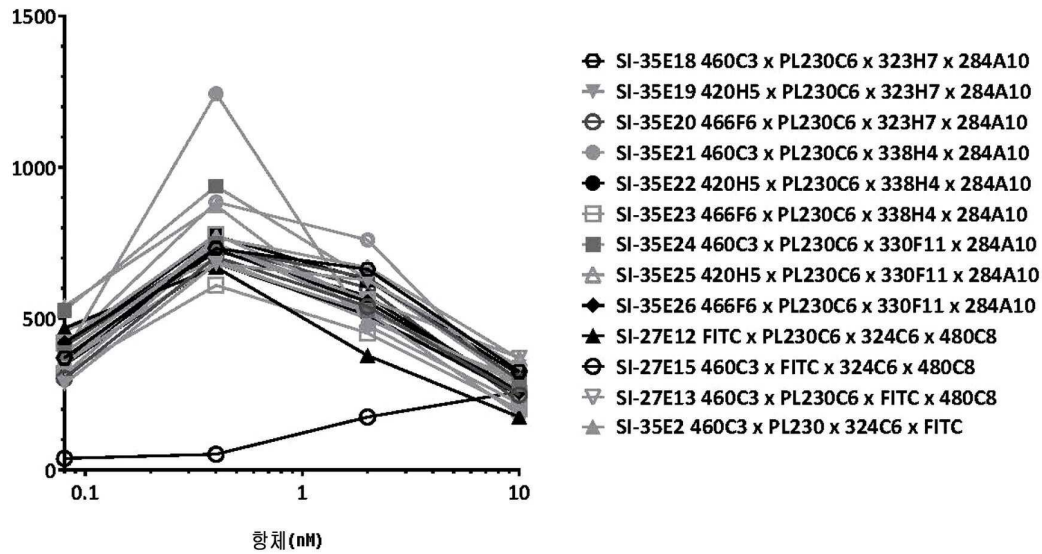
도면6

도 6. 인간 41BB로 형질감염된 CHO 세포에 결합한 사중-특이적 항체



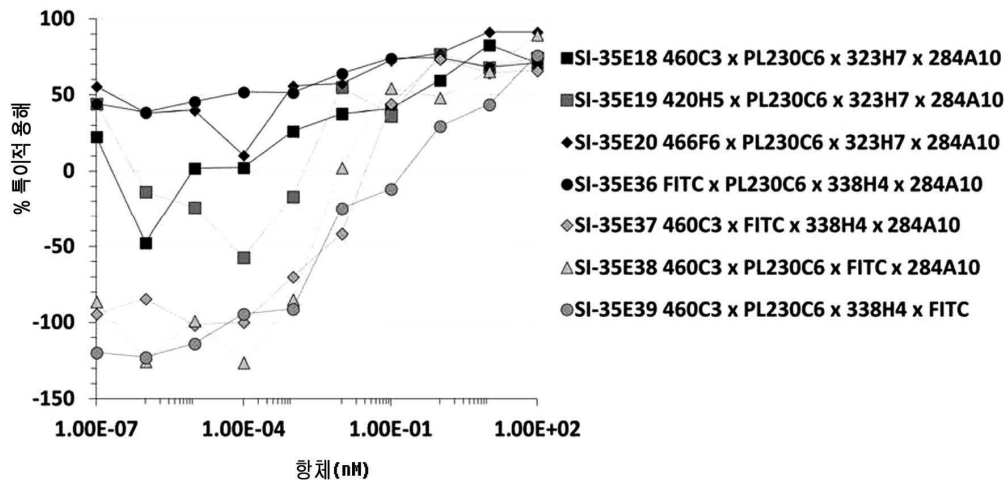
도면7

도 7. 인간 PD-L1로 형질감염된 CHO 세포에 결합한 사중-특이적 항체



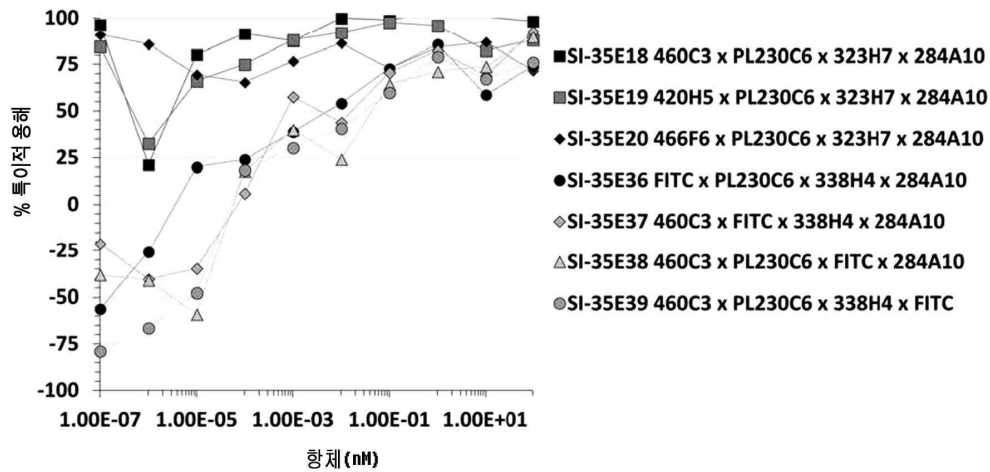
도면8

도 8. ROR1의 Ig 도메인에 특이적인 결합 도메인 323H7을 갖는 사중특이적 항체가 이펙터로서 PBMC를 이용한 B-ALL 세포주 Kasumi2의 RTCC를 매개했다.



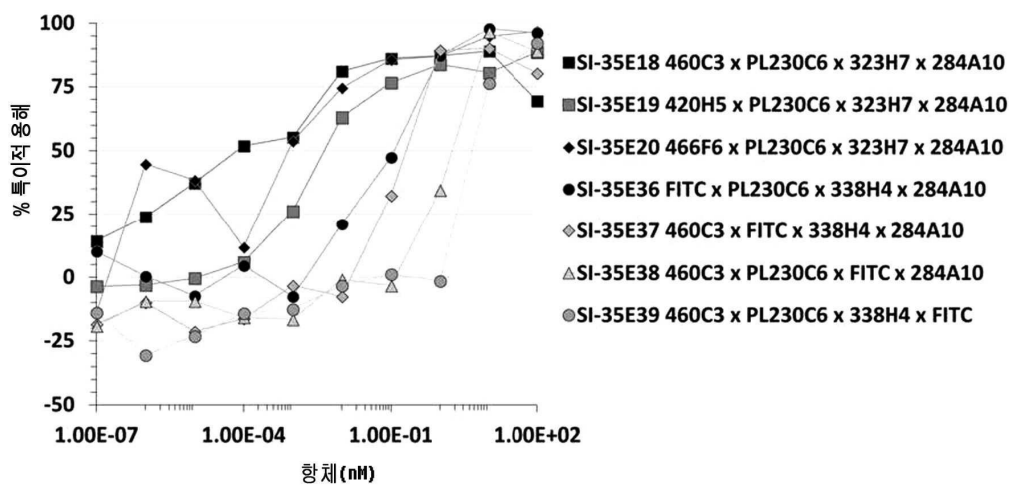
도면9

도 9. ROR1의 Ig 도메인에 특이적인 결합 도메인 323H7을 갖는 사중특이적 항체가 이펙터로서 CD8+, CD45RO+ 기억 T 세포를 이용한 B-ALL 세포주 Kasumi2의 RTCC를 매개했다.



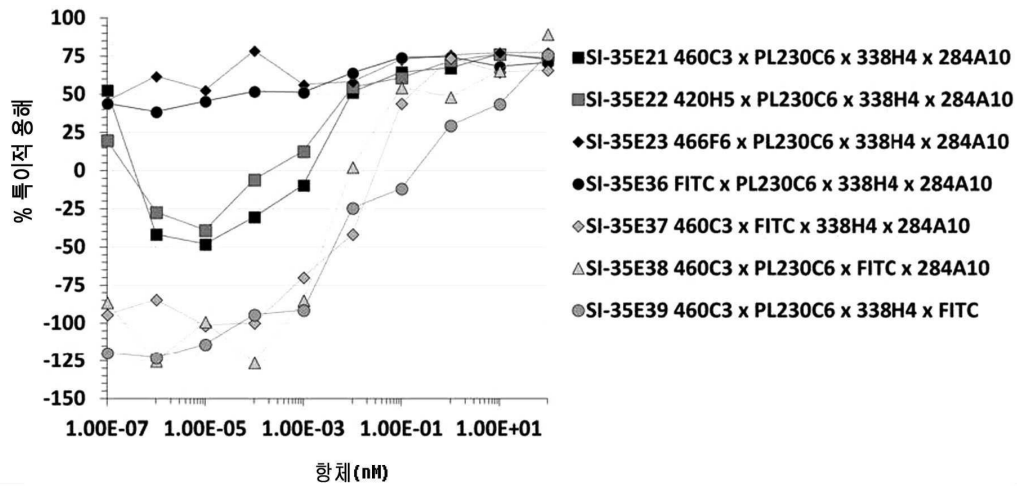
도면10

도 10. ROR1의 Ig 도메인에 특이적인 결합 도메인 323H7을 갖는 사중특이적 항체가 이펙터로서 CD8+, CD45RA+ 나이브 T 세포를 이용한 B-ALL 세포주 Kasumi2의 RTCC를 매개했다.



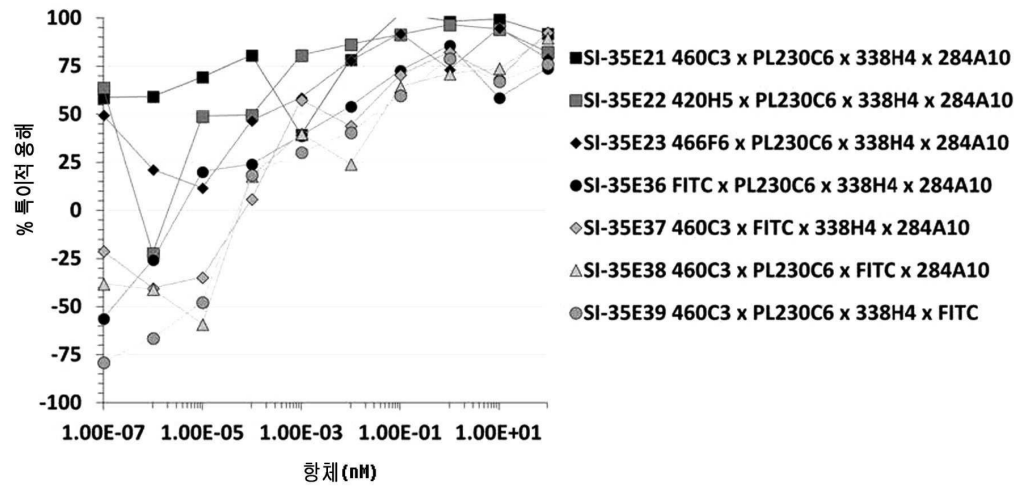
도면11

도 11. ROR1의 프리즐드 도메인에 특이적인 결합 도메인 338H4를 갖는 사중특이적 항체가 이펙터로서 PBMC를 이용한 B-ALL 세포주 Kasumi2의 RTCC를 매개했다.



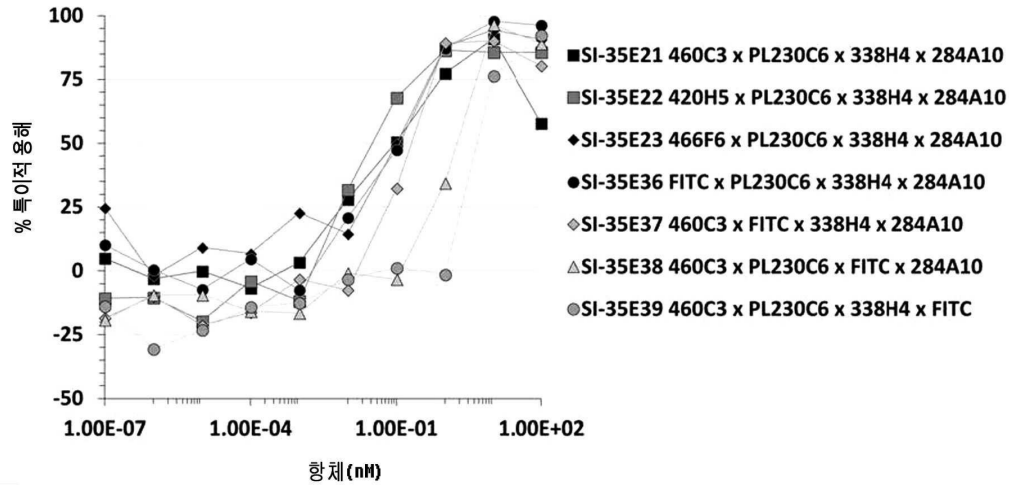
도면12

도 12. ROR1의 프리즐드 도메인에 특이적인 결합 도메인 338H4를 갖는 사중특이적 항체가 이펙터로서 CD8+, CD45RO+ 기억 T 세포를 이용한 B-ALL 세포주 Kasumi2의 RTCC를 매개했다.



도면13

도 13. ROR1의 프리즈드 도메인에 특이적인 결합 도메인 338H4를 갖는 시중특이적 항체가 이펙터로서 CD8+, CD45RA+ 나이브 T 세포를 이용한 B-ALL 세포주 Kasumi2의 RTCC를 매개했다.



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> SYSTIMUNE, INC.

SICHUAN BAILI PHARMACEUTICAL CO. LTD.

<120> MULTI-SPECIFIC ANTIBODIES AND METHODS OF MAKING AND USING THEREOF

<130> SIBA035PCT

<140> PCT/US2018/039156

<141> 2018-06-22

<150> US62524557

<151> 2017-06-25

<160> 68

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 1

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag ccctctggatt caccatcagt accaatgcaa tgagctgggt cgcaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg gatcggagtc attactggtc gtgatcac atactacgcg 180

agctgggcga aaggcagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctt 240

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgcg cgacggtgga 300

tcactgtcta ttactagtaa caacatttgg ggccaaggaa ctctggtcac cgtttcttca 360

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Asp Gly Gly Ser Ser Ala Ile Thr Ser Asn Asn Ile Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 3

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 3

gacgtcgtga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcaattgcc aagccagtga gagcattagc agttggtttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgaa gcatccaaac tggcatctgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gatgatatttg caacttatta ctgccaaggc tatTTTTatt ttattagtcg tacttatgta 300

aattctttcg gcggaggagc caaggtggag atcaaa 336

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Tyr Phe Tyr Phe Ile Ser

85 90 95

Arg Thr Tyr Val Asn Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 5

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 5

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggaat cgacctcagt agcaatgcaa tgagctgggt cgcagcagct 120

ccagggaagg ggctggagtg gatcggagtc attactggtc gtgatatac atactacgcg 180

agctgggcga aaggcagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctt 240

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgcg cgacggtgga 300

tcattctgcta ttaatagtaa gaacatttgg ggccaaggaa ctctgggtcac cgtttcttca 360

<210> 6

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 6

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Asp Gly Gly Ser Ser Ala Ile Asn Ser Lys Asn Ile Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 7

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 7

gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc aagccagtga gagcattagc agttggttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgaa gcatccaaac tggcatctgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagag ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gatgattttg caacttatta ctgccaaggc tatTTTTATT ttattagtcg tacttatgta 300

aatgctttcg gcggagggac caaggtggag atcaaa 336

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 8

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Ser Ser Trp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Tyr Phe Tyr Phe Ile Ser

85 90 95

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

100 105 110

<210> 9

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 9

cagtcggtgg aggagtctgg gggaggcttg gtccagcctg gggggtccct gagactctcc 60

tgtacagcct ctggaatcga ccttaatacc tacgacatga tctgggtccg ccaggtccca 120

ggcaaggggc tagagtgggt tggaatcatt acttatagtg gtagtagata ctacgcgaac 180

tgggcgaaag gccgattcac catctccaaa gacaatacca agaacacggt gtatctgcaa 240

atgaacagcc tgagagctga ggacacggct gtgtattact gtgccagaga ttatatgagt 300

ggttccact tgtggggcca gggaaccctg gtcaccgtct ctagt 345

<210> 10

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 10

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

1 5 10 15
Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Ile Asp Leu Asn Thr Tyr Asp

20 25 30
Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly

35 40 45
Ile Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Arg Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly

50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Thr Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln

65 70 75 80
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

85 90 95
Asp Tyr Met Ser Gly Ser His Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110
Val Ser Ser

115

<210> 11

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 11

gcctatgata tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcaagtgtc aggccagtga ggacatttat agcttcttgg cctggatatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatccattct gcatcctctc tggcatctgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttacta ttgtcaacag ggttatggta aaaataatgt tgataatgct 300

ttcggcggag ggaccaaggt ggagatcaaaa 330

<210> 12

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

His Ser Ala Ser Ser 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 Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Lys Asn Asn

85 90 95

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

100 105 110

<210> 13

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 13

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag ccctctggatt ctccttcagt agcgggtacg acatgtgctg ggtccgccag 120

gctccagggg aggggctgga gtggatcgca tgcattgctg ctggtagtgc tggatcact 180
tacgacgcga actgggcgaa aggccgggttc accatctcca gagacaattc caagaacacg 240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgcgaga 300
tcggcgtttt cgttcgacta cgccatggac ctcctggggcc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
tcgagc 366

<210> 14

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 14

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 15

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400

> 15

gacatccaga tgacccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc aggccagtc gagcattagt tccacttaa actggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcatccactc tggcatctgg ggtcccatca	180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
gatgatattg caacttatta ctgccaacag gggtatagtt ggggtaatgt tgataatgtt	300
ttcggcggag ggaccaaggt ggagatcaaa	330

<210> 16

<211> 110

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

50

55

60

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ser Trp Gly Asn

85

90

95

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

100 105 110

<210> 17

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 17

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtacag cctctggatt ctcctaagt agctatgcaa tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg ggctggagta catcggtac attggtgata ctactggcat agcctacgcg 180
agctgggcga atggcagatt caccatctcc aaagacaata ccaagaacac ggtggatctt 240
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggctggctc 300
tacttagaca tctggggcca agggaccctg gtcaccgtct cgagc 345

<210> 18

<

211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 18

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Gly Asp Thr Thr Gly Ile Ala Tyr Ala Ser Trp Ala Asn

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Gly Trp Ser Tyr Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 19

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 19

gcccttgtga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc aggccagtc gaacatttac agcaatttag cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagttc ctaagctcct gatctatcag gcctccactc tggcatctgg ggtcccatct 180
 cggttcagtg gcagtggata tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatgttg caacttatta ctgtcaaggc ggttattata gtgctgcct taatactttc 300
 ggccggaggga ccaaggtgga gatcaaa 327

<210> 20

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 20

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

50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ser Ala Ala

85 90 95

Leu Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 21

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> synthesized

<400> 21

cagtcgctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gggggtcct gagactctcc 60
tgtgcagcct ctggattctc cttcagtagc aactactgga tatgctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg gatcgcatgc atttatgttg gtagtagtgg tgacacttac 180
tacgcgagct ccgcgaaagg ccggttcacc atctccagag acaattccaa gaacacgctg 240
tatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag gacacggccg tatattactg tgcgagagat 300
agtagtagtt attatatgtt taacttgtgg ggccaggga ccctgggtcac cgtctcgagc 360

<210> 22

<211>

120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

<210> 23

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 23

gcccttgtga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcaattgcc aggccagtga ggacattgat acctatttag cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcttttat gcatccgata tggcatctgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gatgatatttg caacttatta ctgccaaggc ggttactata ctagtagtgc tgatacgagg 300
ggtgctttcg gcggaggag caaggtggag atcaaa 336

<210> 24

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 24

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

50

55

60

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

<210> 25

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 25

cggtcgctgg tggagctcgg gggaggcctg gtcacgcctg gggggccct gagactctcc	60
tgtacagcct ctggattcac catcagtagc taccacatgc agtgggtccg ccaggctcca	120
gggaaggggc tggagtacat cggaaccatt agtagtggtg gtaatgtata ctacgcgagc	180
tccgcgagag gcagattcac catctccaga cctcgtcca agaacacggg ggatcttcaa	240
atgaacagcc tgagagccga ggacacggct gtgtattact gtgcgagaga ctctggttat	300
agtgatccta tgtggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cgagc	345

<210> 26

 $\angle$

211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

$\langle 220 \rangle \langle 223 \rangle$ synthesized

<400> 26

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

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

115

<210> 27

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 27

gacgttgtga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacctgtc aggccagtc gaacattagg acttacttat cctggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcagccaate tggcatctgg ggtcccatca	180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcga cctggagcct	240
ggcgaatgctg caacttacta ttgtcagtct acctatcttg gtactgatta tgttgcggt	300
gctttcggcg gagggaccaa ggtggagatc aaa	333

<210> 28

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 28

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

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

<210> 29

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 29

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggaat cgacttcagt aggagatact acatgtgctg ggtccgccag 120
gtccaggga aggggctgga gtggatcgca tgcataatata ctggtagccg cgataactcct 180
cactacgcga gctccgcgaa aggccgggtc accatctcca gagacaattc caagaacacg 240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatata ctgtgcgaga 300
gaaggtagcc tgtggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cgagc 345

<210> 30

<

211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 30

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

Ile Ala Cys Ile Tyr Thr Gly Ser Arg Asp Thr Pro His Tyr Ala Ser

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

115

<210> 31

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 31

gacatccaga tgacccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc agtcagtc gagtggttat agtaactggg tctcctggta tcagcagaaa 120
ccagggaag ccctaagct cctgatctat tctgcatcca ctctggcacc tgggggccca 180
tcaaggttca gcggcagtg atctgggaca gaattcactc tcaccatcag cagcctgcag 240
cctgatgatt ttgcaactta ttactgcgca ggcgggttaca atactgttat tgatactttt 300
gctttcggcg gagggaccaa ggtggagatc aaa 333

<210> 32

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 32

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Ser Asn
20 25 30

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

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

50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Asn Thr Val
85 90 95

Ile Asp Thr Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 33

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 33

catcgctgg tggagtctgg gggaggcttg gtccagcctg gggggtcct gagactctcc 60
tgtactgcct ctggattctc cctcagtagg tactacatga cctgggtccg ccaggctcca 120
gggaaggggc tggagtggat cggaaccatt tatactagtg gtagtacatg gtacgcgagc 180
tggacaaaag gcagattcac catctccaaa gacaatacca agaacacggt ggatcttcaa 240
atgaacagcc tgagagccga ggacacggct gtgtattact gtgcgagatc ctattatggc 300
ggtgataaga ctggtttagg catctggggc cagggaactc tggttaccgt ctcttca 357

<210> 34

<

211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

<210> 35

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 35

gacatccaga tgacccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc aggccagtc gagcattgat agttggttat cctggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatcag gcattcactc tggcatctgg ggtcccatca	180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagag ttactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
gatgattttg caacttatta ctgccaatct gcttatggtg ttagtggtac tagtagttat	300
ttatatactt tcggcggagg gaccaaggtg gagatcaaa	339

<210> 36

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 36

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

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

<210> 37

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 37

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccatcagt cgctaccaca tgacttgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg gatcgacat atttatgtta ataatgatga cacagactac 180
gcgagctccg cgaaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccacct atttctgtgc gagattggat 300
gttgggtggtg gtggtgctta tattggggac atctggggcc aggggaactct ggttaccgtc 360

tcttca 366

<210> 38

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Leu Asp Val Gly Gly Gly Gly Ala Tyr Ile Gly Asp Ile Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 39

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 39

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc agtccagtc gagtggttat aacaacaacg acttagcctg gtatcagcag 120

aaaccaggga aagttcctaa gctcctgac tattatgctt ccactctggc atctggggtc 180

ccatctcggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 240

cagcctgaag atgttgcaac ttattactgt gcaggcgggt atgatacga tggctttgat 300

acgtttgctt tcggcggagg gaccaagggt gagatcaaa 339

<210> 40

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 40

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn

20 25 30

Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Asp Thr

85 90 95

Asp Gly Leu Asp Thr Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile

100 105 110

Lys

<210> 41

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 41

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtactg cctctggatt ctccctcagt agctatgcaa tgagctgggt ccgccaggct 120

ccaggaggagg ggcctggagtg gatcggaatc atttatgcta gtggtagcac atactacgcg 180

agctcggcga aaggcagatt caccatctcc aaagacaata ccaagaacac ggtggatctt 240

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aatttatgac 300

ggcatggacc tctggggcca gggaactctg gttaccgtct cttca 345

<210> 42

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 42

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Ala Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Ser Ala Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Ile Tyr Asp Gly Met Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 43

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 43

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcaattgcc aggccagtcga gaacatttac agctacttat cctggatatca gcagaaacca 120

gggaaagtgc ctaagcgct gatctatctg gcatctactc tggcatctgg ggtcccatct 180

cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat tacactetca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagatgttg caacttatta ctgtcaaagc aattataacg gtaattatgg tticggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 44

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Asn Tyr Asn Gly Asn Tyr

85 90 95

Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 45

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 45

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag ccctctggatt ctccctcaat aactactgga tgagctgggt cgcgcaggct 120

ccaggaagg ggctggagtg gatcgaacc attagtagtg gtgcgtatac atggttcgcc 180

acctgggcga caggcagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctt 240

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag atattcttct 300

actactgatt ggacctactt taacatctgg ggccagggaa ctctggttac cgtctcttca 360

<210> 46

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Thr Ile Ser Ser Gly Ala Tyr Thr Trp Phe Ala Thr Trp Ala Thr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Tyr Ser Ser Thr Thr Asp Trp Thr Tyr Phe Asn Ile Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 47

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 47

gacatccaga tgaccagtc tccctccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc aggccagtc gagcattaat aactacttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatagg gcattccactc tggaatctgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gatgatatttg caacttatta ctgccaaagc tataatgggtg ttggtaggac tgctttcggc 300

ggagggacca aggtggagat caaa 324

<210> 48

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 48

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asn Gly Val Gly Arg

85 90 95

Thr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 49

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 49

gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctagc ctggtgaaac cttctcagtc tctgtccctc 60

acctgcactg tcaactggcta ctcaatcacc agtgattttg cctggaactg gattcggcag 120

tttcaggaa acaagctgga gtggatgggc tacataagtt atagtggtaa cactaggtac 180

aacccatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgcgaca catccaagaa ccaattcttc 240

ctgcagttga actctgtgac tattgaggac acagccacat attactgtgt aacggcggga 300

cgcgggtttc cttattgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgca 348

<210> 50

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 50

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp

35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Val Ser Ala

115

<210> 51

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 51

gacatcctga tgaccaatc tccatcctcc atgtctgtat ctctgggaga cacagtcagc 60

atcacttgcc attcaagtca ggacattaac agtaatatag ggtggttgca gcagagacca 120
gggaaatcat ttaagggcct gatctatcat ggaaccaact tggacgatga agttccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tggagccgat tattctctca ccatcagcag cctggaatct 240

gaagattttg cagactatta ctgtgtacag tatgctcagt ttccgtggac gttcggtgga 300
ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 52

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 52

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

1 5 10 15

Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Glu Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 53

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 53

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaagaaac caggagagtc tctgaagatc 60

tcctgtaagg gtcttgata cagcttttagc agttcatgga tcggctgggt gcgccaggca 120
 cctgggaaag gcctggaatg gatggggatc atctatcctg atgactctga taccagatac 180
 agtccatcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag gactgcctac 240
 ctgcagtgga gtagcctgaa ggcctcggac accgctatgt attactgtgc gagacatgtt 300

actatgattt ggggagttat tattgacttc tggggccagg gaaccctggc caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 54

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 54

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg His Val Thr Met Ile Trp Gly Val Ile Ile Asp Phe Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 55

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 55

gccatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc agtgcttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactetca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt acccattcac tttcgccct 300

gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 56

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 56

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105

<210> 57

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 57

gaggtgaagc tggatgagac tggaggaggc ttggtgcaac ctgggaggcc catgaaactc	60
tcctgtgttg ccctcggatt cacttttagt gactactgga tgaactgggt cgcagctct	120
ccagagaaag gactggagtg ggtagcaca attagaaaca aaccttataa ttatgaaaca	180
tattattcag attctgtgaa aggagattc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt	240

gtctacctgc aaatgaacaa cttaagagtt gaagacatgg gtatctatta ctgtacgggt	300
tcttactatg gtatggacta ctgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca	354

<210> 58

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 58

Glu Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Met Gly Ile Tyr

85 90 95

Tyr Cys Thr Gly Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 59

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 59

```

gatgtcgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc      60
atctcttgca gatctagtea gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta ttacgttgg      120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag gtctgatctt acaaagtttc caaccgattt      180

tctgggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc      240
agcagagtgg aggcctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttccg      300
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa                                336

```

<210> 60

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 60

```

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

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

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

          85          90          95
Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100         105         110

```

<210> 61

<211> 987

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 61

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacctt cctccaagag cacctctggg	60
ggcacagcgg ccttgggtcg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg	120
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcggtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca	180
ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc	300
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc gcggggggca	360
ccgtcagtct tctcttcccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt	420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcttcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag	600
gagtacaagt gcgcggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	660
aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag	720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg	840
ctggactccg acggtctctt cttctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggt	987

<210> 62

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 62

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

35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

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

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

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

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

325

<210> 63

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 63

cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60

ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120

tggaagggtg ataacgcctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180

agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240

aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300

agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 64

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 64

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
65					70					75					80
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
				85					90					95	

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 65

<211> 3681

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 65

gacatccaga tgaccagctc tctttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc agtcagatca gagtgtttat agtaactggt tctcctggta tcagcagaaa	120
ccagggaag ccctaagct cctgatctat tctgcatcca ctctggcatc tggggctcca	180
tcaaggttca gcggcagtggt atctgggaca gaattcactc tcaccatcag cagcctgcag	240
cctgatgatt ttgcaactta ttactgcgca ggccggttaca ataactgttat tgatactttt	300

gctttcggcg gagggaccaa ggtggagatc aaaggcggtg gcggtagtgg gggaggcgg	360
tctggcggcg gagggctccgg cgggtggagga tcagagggtgc agctgttgga gtctggggga	420
ggcttggtag agcctggggg gtccctgaga ctctcctgtg cagcctctgg aatcgacttc	480
agtaggagat actacatgtg ctgggtccgc caggctccag ggaaggggct ggagtggatc	540
gcatgcataat atactggtag ccgcgatact cctcactacg cgagctccgc gaaaggccgg	600
ttcaccatct ccagagacaa ttccaagaac acgctgtatc tgcaaatgaa cagcctgaga	660
gccgaggaca cggccgtata ttactgtgcg agagaaggta gcctgtgggg ccagggaacc	720

ctggtcaccg	tctcgagcgg	cgggtggaggg	tccggcggtg	gtggatccca	gtcggtgagag	780
gagtcctgggg	gaggcttggg	ccagcctggg	gggtccctga	gactctcctg	tacagcctct	840
ggaatcgacc	ttaataccta	cgacatgata	tgggtccgcc	agggtccagg	caaggggcta	900
gagtggggtg	gaatcattac	ttatagtggg	agtagatact	acgcgaactg	ggcgaaaggc	960
cgattcacca	tctcaaaga	caataccaag	aacacggtgt	atctgcaaat	gaacagcctg	1020
agagctgagg	acacggctgt	gtattactgt	gccagagatt	atatgagtgg	ttcccacttg	1080
tggggccagg	gaaccttggg	caccgtctct	agtgtagca	ccaagggccc	atcggctctt	1140

cccctggcac cctcctccaa gagcacctct gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc	1200
aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc	1260
gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg	1320
accgtgccct ccagcagctt gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc	1380
agcaacacca aggtggacaa gagagttgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc	1440
ccaccgtgcc cagcacctga agccgcgggg gcaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa	1500
cccaaggaca cctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg	1560
agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat	1620
gccaagacaa agccgcggga ggagcagtag aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc	1680
accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcgcggt ctccaacaaa	1740
gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca	1800
caggtgtata cctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc	1860
tgcttggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag	1920
ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc ctctctctc	1980
tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc	2040
gtgatgcatg aggtcttga caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt	2100
ggcggtaggag ggtccggcgg tggtagatcc gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc	2160
ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc tctgtgcag cctctggatt caccatcagt	2220
cgctaccaca tgacttgggt ccgccaggct ccagggaagg ggctggagtg gatcgacat	2280
atttatgtta ataatgatga cacagactac gcgagctccg cgaaaggccg gttcaccatc	2340
tccagagaca attccaagaa cagctgtat ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac	2400
acggccacct atttctgtgc gagattggat gttggtggtg gtggtgctta tattggggac	2460
atctggggcc agggaaactt ggttaccgtc tcttcaggcg gtggcggtag tgggggaggc	2520
ggttctggcg gcggagggtc cggcgggtgga ggatcagaca tccagatgac ccagtctcca	2580
tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga gtcacatca cttgccagtc cagtcagagt	2640
gtttataaca acaacgactt agcctgggat cagcagaaac cagggaagt tcctaagctc	2700
ctgatctatt atgcttccac tctggcatct ggggtcccat ctcggttcag tggcagtgga	2760
tctgggacag atttactct caccatcagc agcctgcagc ctgaagatgt tgcaacttat	2820
tactgtgcag gcggttatga tacggatggt ctgatacgt ttgctttcgg cggagggacc	2880
aaggtggaga tcaaaggcgg tggagggtcc ggcggtggtg gatccgaggt gcagctggtg	2940
gagtctgggg gaggcttggc ccagcctggg gggtccctga gactctctg tgcagcctct	3000

ggattcacca tcagtaccaa tgcaatgagc tgggtccgcc aggctccagg gaaggggctg 3060
gagtggatcg gaggcattac tggctgtgat atcacatact acgcgagctg ggcgaaaggc 3120
agattcacca tctccagaga caattccaag aacacgctgt atcttcaaat gaacagcctg 3180
agagccgagg acacggctgt gtattactgt gcgcgcgacg gtggatcatc tgctattact 3240

agtaacaaca tttggggcca aggaactctg gtcaccgttt cttcaggcgg tggcggtagt 3300
gggggaggcg gttctggcgg cggagggtcc ggcggtggag gatcagacgt cgtgatgacc 3360
cagtctcctt ccaccctgtc tgcattctga ggagacagag tcaccatcaa ttgccaagcc 3420
agtgaagca ttagcagttg gttagcctgg taccagcaga aaccaggga agcccctaag 3480
ctcctgatct atgaagcatc caaactggca tctggggtcc catcaagggt cagcggcagt 3540
ggatctggga cagagttcac tctcaccatc agcagcctgc agcctgatga ttttgcaact 3600
tattactgcc aaggctatct ttattttatt agtcgtactt atgtaaattc tttcggcgga 3660

gggaccaagg tggagatcaa a 3681

<210> 66

<211> 1227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 66

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln

65 70 75 80

Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Asn Thr Val

85 90 95

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

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

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

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

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

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

610 615 620
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
625 630 635 640
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
645 650 655
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
660 665 670
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

675 680 685
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly
690 695 700
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
705 710 715 720
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
725 730 735
Phe Thr Ile Ser Arg Tyr His Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

740 745 750
Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Tyr Val Asn Asn Asp Asp Thr
755 760 765
Asp Tyr Ala Ser Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
770 775 780
Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
785 790 795 800
Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Asp Val Gly Gly Gly Gly Ala

805 810 815
Tyr Ile Gly Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
820 825 830
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
835 840 845

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 850 855 860
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser
 865 870 875 880
 Val Tyr Asn Asn Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 885 890 895
 Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val
 900 905 910
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 915 920 925
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly
 930 935 940
 Gly Tyr Asp Thr Asp Gly Leu Asp Thr Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr
 945 950 955 960
 Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 965 970 975
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 980 985 990
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Thr Asn Ala
 995 1000 1005
 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 1010 1015 1020
 Gly Val Ile Thr Gly Arg Asp Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
 1025 1030 1035
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 1040 1045 1050
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 1055 1060 1065
 Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Ser Ser Ala Ile Thr Ser Asn Asn
 1070 1075 1080
 Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

1085 1090 1095
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 1100 1105 1110
 Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala

1115 1120 1125
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Ser
 1130 1135 1140
 Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 1145 1150 1155
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val
 1160 1165 1170
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu

1175 1180 1185
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 1190 1195 1200
 Gln Gly Tyr Phe Tyr Phe Ile Ser Arg Thr Tyr Val Asn Ser Phe
 1205 1210 1215
 Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1220 1225

<210> 67

<211> 651

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 67

gcctatgata tgaccagtc tccatcttc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcaagtgtc aggccagtga ggacatttat agcttcttgg cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatccattct gcatcctctc tggcatctgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag ggttatggta aaaataatgt tgataatgct 300
 ttcggcggag ggaccaaggt ggagatcaaa cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcac 360

ttccccccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttggtg cctgctgaat 420

aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgcct ccaatcgggt 480

aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540

accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aacacaaaag tctacgcctg cgaagtcacc 600

catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg t 651

<210> 68

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 68

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

His Ser Ala Ser Ser 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 Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Lys Asn Asn

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	
				165					170					175		
Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	
				180					185					190		
Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	
				195					200					205		
Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys								
				210					215							