



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0100715

(43) 공개일자 2015년09월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류(Coo. Cl.)

C07K 16/2818 (2013.01)

A61K 39/395 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7017825

(22) 출원일자(국제) 2013년12월23일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2015년07월02일

(86) 국제출원번호 PCT/US2013/077586

(87) 국제공개번호 WO 2014/100823

국제공개일자 2014년06월26일

(30) 우선권주장

61/745,296 2012년12월21일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(71) 출원인

애플리문, 인크.

미합중국 메릴랜드주 20878 게터스버그 웨스트 왓
킨스 밀 로드 45

더 존스 홉킨스 유니버시티

미국 메릴랜드주 21218 볼티모어 찰스 스트리트
3400 엔.

(72) 발명자

랭거만, 솔로몬

미국 메릴랜드 21215 볼티모어 크로스 컨트리 블
러바드 6606

리우, 린다

미국 메릴랜드 21029 클라크스빌 티퍼레리 코트
6512

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

박창남, 정대섭

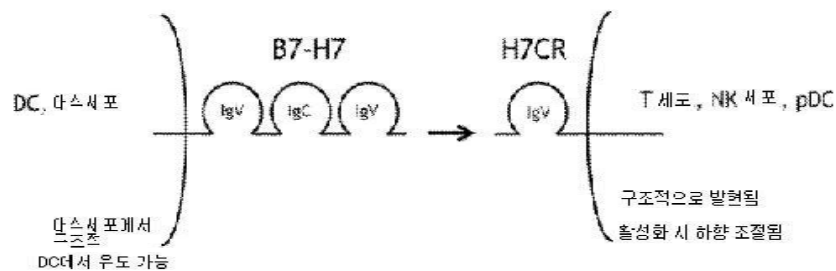
전체 청구항 수 : 총 40 항

(54) 발명의 명칭 항-H7CR 항체

(57) 요약

B7-H7 상대 수용체인 H7CR과 면역 특이적으로 결합할 수 있는 항체 및 이의 인간화 변이형 및 이들의 항원 결합 단편 및 기타 분자들, 그리고 면역 반응의 증진 및 암 및 기타 질병의 치료 및 진단에 있어서 이들의 용도가 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류(Coo. Cl.)

G01N 33/574 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

C07K 2317/74 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

C07K 2319/30 (2013.01)

(72) 발명자

야오, 쑹

미국 메릴랜드 21004 콜롬비아 브라이스 오버룩 코
트 11748

첸, 라이펑

미국 코네티컷 06514 햄던 캔터베리 로드 51

(30) 우선권주장

61/745,312 2012년12월21일 미국(US)

61/827,279 2013년05월24일 미국(US)

61/827,269 2013년05월24일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

항-인간 H7CR 항체 1.3 또는 4.5의 인간화 변이형의 항원 결합 단편을 포함하는 분자로서, 이때, 상기 분자는 인간 H7CR과 면역 특이적으로 결합하고, 이때, 상기 항원 결합 단편은

(A) (1) 항-인간 H7CR 항체 1.3의 인간화 변이형의 경쇄 가변 부위, 이때, 상기 경쇄 가변 부위는 **서열 번호 17-22** 중 임의의 아미노산 서열을 나타냄; 및

(2) 항-인간 H7CR 항체 1.3의 인간화 변이형의 중쇄 가변 부위, 이때, 상기 중쇄 가변 부위는 **서열 번호 23-28** 중 임의의 아미노산 서열을 나타냄;

또는

(B) (1) 항-인간 H7CR 항체 4.5의 인간화 변이형의 경쇄 가변 부위, 이때, 상기 경쇄 가변 부위는 **서열 번호 33-38** 중 임의의 아미노산 서열을 나타냄; 및

(2) 항-인간 H7CR 항체 4.5의 인간화 변이형의 중쇄 가변 부위, 이때, 상기 중쇄 가변 부위는 **서열 번호 39-44** 중 임의의 아미노산 서열을 나타냄;를 포함하는 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 면역 특이적으로 결합된 H7CR은

(A) 살아있는 세포의 표면 상에 어레이되거나;

(B) 내인성 농도로 발현되는 것인 분자.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 살아있는 세포는 T 세포, NK 세포 또는 플라즈마사이토이드 수지상 세포인 것인 분자.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 분자는 H7CR의 B7-H7과의 상호 작용을 실질적으로 차단할 수 없는 분자.

청구항 5

제1항에 있어서, 분자는 H7CR 활성을 조절하거나 항진시키는 분자.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 항체는 이중 특이적, 삼중 특이적 또는 다중 특이적 항체인 것인 분자.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 분자는 검출 가능하게 표지되거나, 콘쥬게이트된 독소, 약물, 수용체, 효소, 수용체 리간드를 포함하는 분자.

청구항 8

치료적으로 유효한 양의 제1항의 분자 및 생리적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물

청구항 9

치료적으로 유효한 양의 제8항의 약학적 조성물을 대상자에게 투여하는 것을 포함하는, 질병의 증상을 나타내는 상기 대상자에서 상기 질병을 치료하는 방법.

청구항 10

치료적으로 유효한 양의 제8항의 약학적 조성물을 대상자에게 투여하는 것을 포함하는, 필요로 하는 대상자에서

면역 반응을 증진시키는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 질병은 암인 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 질병은 감염성 질병인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 감염성 질병은 만성 바이러스 질병인 방법.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 H7CR 기능을 향진시키는 방법.

청구항 15

예방적으로 유효한 양의 제7항의 약학적 조성물을 질병의 증상을 나타내는 대상자에게 미리 투여하는 것을 포함하는, 상기 질병의 예방적 치료 방법.

청구항 16

대상자의 세포가 제1항의 H7CR 결합 분자에 결합할 수 있는 능력을 분석하는 것을 포함하는, 상기 대상자의 질병 진단 방법으로, 이때, 상기 방법은 상기 대상자에서 상기 질병의 존재를 진단하는 세포학적 분석법을 제공하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 질병은 암인 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 질병은 T 세포 수 및 건강에 영향을 미치는 질병인 방법.

청구항 19

H7CR과 면역 특이적으로 결합하는 항체의 항원 결합 단편을 포함하는 분자.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 면역 특이적으로 결합된 H7CR은

(A) 살아있는 세포의 표면 상에 어레이되거나;

(B) 내인성 농도로 발현되는 것인 분자.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 살아있는 세포는 T 세포, NK 세포 또는 플라즈마사이토이드 수지상 세포인 것인 분자.

청구항 22

제19항에 있어서, 상기 분자는 H7CR의 B7-H7과의 상호 작용을 실질적으로 차단할 수 없는 분자.

청구항 23

제19항에 있어서, 상기 분자는 단일 클론성 항체, 인간 항체, 키메라 항체 또는 인간화 항체인 분자.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 항체는 이중 특이적, 삼중 특이적 또는 다중 특이적 항체인 항체.

청구항 25

제19항에 있어서, 상기 항원 결합 단편은 여섯 개의 CDR을 포함하며, 상기 CDR은 항-H7CR 항체 1.3, 4.5 및 7.8의 CDR 중 적어도 하나의 공통 CDR을 포함하며, 모든 나머지 CDR은

- (A) 경쇄 CDR 1 서열 번호 31;
- (B) 경쇄 CDR 2 서열 번호 32;
- (C) 경쇄 CDR 3 서열 번호 48;
- (D) 중쇄 CDR 1 서열 번호 51;
- (E) 중쇄 CDR 2 서열 번호 55; 또는
- (f) 중쇄 CDR 3 서열 번호 59로부터 선택된, 분자.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 여섯 개의 CDR은

- (A) 항-H7CR 항체 1.3의 세 개의 경쇄 및 세 개의 중쇄 CDR 서열 번호 29, 32, 45, 49, 52 및 56;
- (B) 항-H7CR 항체 4.5의 세 개의 경쇄 및 세 개의 중쇄 CDR 서열 번호 30, 32, 46, 50, 53 및 57; 또는
- (C) 항-H7CR 항체 7.8의 세 개의 경쇄 및 세 개의 중쇄 CDR 서열 번호 29, 32, 47, 50, 54 및 58인 분자.

청구항 27

제25항에 있어서, 상기 분자는 단일 클론성 항체, 인간 항체, 키메라 항체 또는 인간화 항체인 분자.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 항체는 이중 특이적, 삼중 특이적 또는 다중 특이적 항체인 항체.

청구항 29

제19항에 있어서, 상기 분자는 검출 가능하게 표지되거나, 콘쥬게이트된 독소, 약물, 수용체, 효소, 수용체 리간드를 포함하는 분자.

청구항 30

치료적으로 유효한 양의 제1항의 분자 및 생리적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 31

치료적으로 유효한 양의 제30항의 약학적 조성물을 대상자에게 투여하는 것을 포함하는, 질병의 증상을 나타내는 상기 대상자에서 상기 질병을 치료하는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 질병은 암인 방법.

청구항 33

제31항에 있어서, 상기 질병은 감염성 질병인 방법.

청구항 34

제31항에 있어서, 상기 감염성 질병은 만성 바이러스 질병인 방법.

청구항 35

제31항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 H7CR 기능을 향진시키는 방법.

청구항 36

예방적으로 유효한 양의 제28항의 약학적 조성물을 질병의 증상을 나타내는 대상자에게 미리 투여하는 것을 포함하는, 상기 질병의 예방적 치료 방법.

청구항 37

대상자의 세포가 제1항의 H7CR 결합 분자에 결합할 수 있는 능력을 분석하는 것을 포함하는, 상기 대상자의 질병 진단 방법으로, 이때, 상기 방법은 상기 대상자에서 상기 질병의 존재를 진단하는 세포학적 분석법을 제공하는 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 질병은 암인 방법.

청구항 39

제37항에 있어서, 상기 질병은 T 세포 수 및 건강에 영향을 미치는 질병인 방법.

청구항 40

H7CR 항체 1.3, 4.5 또는 7.8의 항원 결합 단편을 포함하는 분자로서, 이때, 상기 분자는 인간 H7CR과 면역 특이적으로 결합하고, 이때, 상기 항원 결합 단편은

(A) (1) 항-인간 H7CR 항체 1.3의 경쇄 가변 부위, 이때 상기 경쇄 가변 부위는 **서열 번호 5**의 아미노산 서열을 나타냄; 및

(2) 항-인간 H7CR 항체 1.3의 중쇄 가변 부위, 이때 상기 중쇄 가변 부위는 **서열 번호 6**의 아미노산 서열을 나타냄;

(B) (1) 항-인간 H7CR 항체 4.5의 경쇄 가변 부위, 이때 상기 경쇄 가변 부위는 **서열 번호 7**의 아미노산 서열을 나타냄; 및

(2) 항-인간 H7CR 항체 4.5의 중쇄 가변 부위, 이때 상기 중쇄 가변 부위는 **서열 번호 8**의 아미노산 서열을 나타냄;

또는,

(C) (1) 항-인간 H7CR 항체 7.8의 경쇄 가변 부위, 이때 상기 경쇄 가변 부위는 **서열 번호 9**의 아미노산 서열을 나타냄; 및

(2) 항-인간 H7CR 항체 7.8의 중쇄 가변 부위, 이때 상기 중쇄 가변 부위는 **서열 번호 10**의 아미노산 서열을 나타냄;를 포함하는 분자.

명세서

기술분야

[0001]

<관련 출원에 대한 상호 참조>

[0002]

이 출원은 2012년 12월 21에 출원된 미국 가 특허 출원 번호 61/745,296, 2012년 12월 21에 출원된 미국 임시 특허 출원 번호 61/745,312, 2013년 5월 24일 출원된 미국 임시 특허 출원 번호 61/827,269 및 2013년 5월 24일 출원된 미국 임시 특허 출원 번호 61/827,279의 이익 및 우선권을 주장하는 PCT 출원이며, 이들 전부는 허용되는 경우 그 전체가 참조로써 포함된다.

[0003]

<연방으로부터 후원을 받은 연구 또는 개발에 관한 진술>

[0004]

이 발명은 부분적으로는, 미국 국립보건원(NIH)으로부터 수여 번호 R01 CA097085-10 및 R01 A172592 하에, 그리고 미국 국립암연구소(NCI)로부터 U19 CA113341 하에 미합중국 정부 지원으로 이루어졌다. 미합중국 정부는 본 발명에 일정 권리를 보유할 수 있다.

[0005] <서열 목록에 대한 언급>

[0006] 본 출원은 37 C.F.R. 1.821 이하에 따라 하나 이상의 서열 목록을 포함하며, 하나 이상의 서열 목록은 서면 및 컴퓨터 판독 가능한 매체로 개시되고, 서면 및 컴퓨터 판독 가능한 매체 개시 내용은 그 전체가 참조로써 본 출원에 포함된다.

[0007] <기술분야>

[0008] 본 발명은 B7-H7 상대 수용체인 H7CR과 면역 특이적으로 결합할 수 있는 항체 및 이들의 항원 결합 단편 및 기타 분자들, 그리고 암 및 기타 질병의 치료 및 진단에 있어서 이들의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0009] 인간 및 기타 포유류의 면역 체계는 감염 및 질병에 대한 보호를 제공하는 것을 담당한다. 이러한 보호는 체액성 면역 반응 및 세포 매개성 면역 반응에 의해 제공된다. 체액성 반응은 외래 표적(항원)을 인식하고 중화할 수 있는 항체 및 기타 생물분자들의 생성을 가져온다. 반면, 세포 매개성 면역 반응은 T 세포에 의한, 대식세포, 자연 살해 세포(NK) 및 항원 특이적 세포 독성 T 림프구의 활성화, 그리고 항원의 인식에 대응한 다양한 사이토카인의 방출을 수반한다 (Dong, C. *et al.* (2003) “*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*,” Immunolog. Res. 28(1):39-48).

[0010] 항원에 대한 면역 반응을 최적으로 매개하는 T 세포의 능력은 두 가지의 구별되는 신호 전달 상호 작용을 필요로 한다(Viglietta, V. *et al.* (2007) “*Modulating Co-Stimulation*,” Neurotherapeutics 4:666-675; Korman, A.J. *et al.* (2007) “*Check point Blockade in Cancer Immunotherapy*,” Adv. Immunol. 90:297-339). 먼저, 항원 제시 세포(APC)의 표면에 표현된 항원은 항원 특이적인 미감작(naive) CD4+ T 세포에 제시될 것이다. 이러한 제시는 T 세포가 면역 반응을 개시하도록 지시하는 T 세포 수용체(TCR)를 통해서 신호를 전달하며, 이러한 면역 반응은 제시된 항원에 특이적일 것이다. 둘째, APC와 별개의 T 세포 표면 분자 간 상호 작용을 통해 매개되는 일련의 공동 자극성 및 저해성 신호는 먼저 T 세포의 활성화 및 증식을 촉발하며, 궁극적으로는 이들의 저해를 촉발한다. 따라서, 제1 신호는 면역 반응에 특이성을 부여하는 반면, 제2 신호는 면역 반응의 속성, 규모 및 지속기간을 결정하는 작용을 한다.

[0011] 면역 체계는 공동 자극성 및 공동 저해성 리간드와 수용체에 의해 엄격히 제어된다. 이들 분자는 T 세포 활성화를 위한 제2 신호를 제공하고, 양성 신호와 음성 신호의 균형을 이룬 네트워크를 제공하여 자기 면역성을 제한하면서 감염에 대한 면역 반응을 최대화한다(Wang, L. *et al.* (March 7, 2011) “*VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T Cell Responses*,” J. Exp. Med. 10.1084/jem.20100619:1-16; Lepenies, B. *et al.* (2008) “*The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections*,” Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets 8:279-288). 특히, 항원 제시 세포의 B7.1(CD80) 및 B7.2(CD86) 리간드와 CD4+ T 림프구의 CD28 및 CTLA-4 수용체 사이의 결합이 중요하다(Sharpe, A.H. *et al.* (2002) “*The B7-CD28 Superfamily*,” Nature Rev. Immunol. 2:116-126; Dong, C. *et al.* (2003) “*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*,” Immunolog. Res. 28(1):39-48; Lindley, P.S. *et al.* (2009) “*The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation*,” Immunol. Rev. 229:307-321). B7.1 또는 B7.2와 CD28의 결합은 T 세포 활성화를 자극하고, B7.1 또는 B7.2와 CTLA-4의 결합은 이러한 활성화를 저해한다(Dong, C. *et al.* (2003) “*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*,” Immunolog. Res. 28(1):39-48; Lindley, P.S. *et al.* (2009) “*The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation*,” Immunol. Rev. 229:307-321; Greenwald, R.J. *et al.* (2005) “*The B7 Family Revisited*,” Ann. Rev. Immunol. 23:515-548). CD28은 T 세포의 표면에서 구조적으로 발현되는 반면(Gross, J., *et al.* (1992) “*Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse*,” J. Immunol. 149:380-388), CTLA4 발현은 T 세포 활성화 후 빠르게 상향 조절된다(Linsley, P. *et al.* (1996) “*Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement*,” Immunity 4:535-43). CTLA4는 친화도가 더 높은 수용체이므로(Sharpe, A.H. *et al.* (2002) “*The B7-CD28 Superfamily*,” Nature Rev. Immunol. 2:116-126), 결합은 먼저 (CD28을 통해) T 세포 증식을 개시한 다음, (CTLA4의 초기 발현을 통해) 그것을 저해하여, 증식이 더 이상 필요하지 않을 때 그 효과를 약화시킨다.

[0012] CD28 수용체의 리간드에 대한 추가적인 조사는 일련의 관련된 B7 분자들(“B7 슈퍼패밀리”)의 확인 및 특성화로 이어졌다(Coyle, A.J. *et al.* (2001) “*The Expanding B7 Superfamily: Increasing Complexity In Costimulatory Signals Regulating T Cell Function*,” Nature Immunol. 2(3):203-209; Sharpe, A.H. *et al.*

(2002) “The B7-CD28 Superfamily,” Nature Rev. Immunol. 2:116-126; Greenwald, R.J. et al. (2005) “The B7 Family Revisited,” Ann. Rev. Immunol. 23:515-548; Collins, M. et al. (2005) “The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands,” Genome Biol. 6:223.1-223.7; Loke, P. et al. (2004) “Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And Regulatory T Cells,” Arthritis Res. Ther. 6:208-214; Korman, A.J. et al. (2007) “Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy,” Adv. Immunol. 90:297-339; Flies, D.B. et al. (2007) “The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity,” J. Immunother. 30(3):251-260; Agarwal, A. et al. (2008) “The Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance,” Curr. Opin. Organ Transplant. 13:366-372; Lenschow, D.J. et al. (1996) “CD28/B7 System of T Cell Costimulation,” Ann. Rev. Immunol. 14:233-258; Wang, S. et al. (2004) “Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses,” Microbes Infect. 6:759-766). 현재 패밀리의 구성원 여덟 개가 알려져 있는데, B7.1(CD80), B7.2(CD86), 유도성 공동 자극제 리간드(ICOS-L), 예정사(programmed death)-1 리간드(PD-L1; B7-H1), 예정사-2 리간드(PD-L2; B7-DC), B7-H3, B7-H4(B7x 및 B7S1이라고도 지칭됨; Sica, G.L. et al. (2003) “B7-4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity,” Immunity18:849-861; Zang, X. et al. (2003) B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation,” Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 100:10388-10392; Prasad, D.V. et al. (2003) B7S1, A Novel B7 Family Member That Negatively Regulates T Cell Activation,” Immunity 18:863-873), B7-H6(Collins, M. et al. (2005) “The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands,” Genome Biol. 6:223.1-223.7) 및 B7-H7(Flajnik, M.F. et al. (2012) “Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7’ s Historical Relationship With The MHC,” Immunogenetics 64:571-590)이 그것이다. B7 패밀리 유전자는 적응성 면역 체계의 조절에 필수적이다. 대부분의 B7 패밀리 구성원은 면역 글로불린 슈퍼패밀리(IgSF)의 가변형(V) 도메인 및 불변형(C) 도메인을 함유한다.

[0013]

B7 리간드는 항원 제시 세포(APC)를 포함하는 여러 상이한 세포 유형의 세포 표면에서 발현되며, 그것들의 T 세포 상에서의 수용체 분자들과의 상호 작용은 T 세포 활성화 및 내성을 조절하는 활성화 및/또는 저해 신호를 제공한다(Collins, M. et al. (2005) “The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands,” Genome Biol. 6:223.1-223.7). 일부 저해성 B7 리간드는 중앙 세포 상에서도 발현되어, 면역 반응 억제를 초래한다(Keir, M.E. et al. (2008) “PD-1 And Its Ligands In Tolerance And Immunity,” Annu. Rev. Immunol. 26:677-704; Zou, W. et al. (2008) “Inhibitory B7-Family Molecules In The Tumour Microenvironment,” Nat. Rev. Immunol. 8:467-477). 따라서, B7 리간드와 그것들의 수용체와의 상호 작용을 자극하거나 약화시키는 것은 자가 면역 질환 및 암에 대해 치료 가능성을 보유한다(WO 2011/020024; Flajnik, M.F. et al. (2012) “Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7’ s Historical Relationship With The MHC,” Immunogenetics 64:571-590

[0014]

염증 및 암의 치료에 있어서 모든 이전의 발전에도 불구하고, 그러한 병태의 치료를 위해 강화된 면역 치료법을 제공할 수 있는 조성물에 대한 요구는 여전히 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015]

본 발명의 목적은 암, 감염성 질병, 염증 및 기타 질병 및 병태의 치료를 위한, 강화된 면역 치료법을 제공할 수 있는 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016]

B7-H7 상대 수용체인 H7CR과 면역 특이적으로 결합할 수 있는 항체 및 이들의 항원 결합 단편 및 기타 분자들이 제공된다. B7-H7 상대 수용체는 B7-H7CR 및 CD28H로도 알려져 있다(Yhu, et al., Nature Communications, 4:1-12 (2013)). 또한, 암, 감염성 질병, 염증 및 기타 질병 및 병태의 치료 및 진단에서의 이들의 사용 방법이 제공된다. H7CR 결합 분자는 단일 클론성 항체, 인간 항체, 키메라 항체 또는 인간화 항체일 수 있다.

[0017]

일 구현에는 H7CR 결합 분자를 제공하는데, 이때, 항원 결합 단편은 여섯 개의 CDR을 포함하고, 이러한 CDR은 항-H7CR 항체 1.3, 4.5 및 7.8의 CDR 중 적어도 하나의 CDR, 또는 이의 공통 CDR을 포함하며, 모든 나머지 CDR

은

- [0018] (A) 항-H7CR 항체 1.3의 세 개의 경쇄 및 세 개의 중쇄 CDR;
- [0019] (B) 항-H7CR 항체 4.5의 세 개의 경쇄 및 세 개의 중쇄 CDR; 또는
- [0020] (C) 항-H7CR 항체 7.8의 세 개의 경쇄 및 세 개의 중쇄 CDR로부터 선택된다.
- [0021] 또 다른 구현에는 여섯 개의 CDR이
- [0022] (A) 항-H7CR 항체 1.3의 세 개의 경쇄 및 세 개의 중쇄 CDR;
- [0023] (B) 항-H7CR 항체 4.5의 세 개의 경쇄 및 세 개의 중쇄 CDR; 또는
- [0024] (C) 항-H7CR 항체 7.8의 세 개의 경쇄 및 세 개의 중쇄 CDR인 H7CR 결합 분자를 제공한다.
- [0025] 또 다른 구현에는 항-인간 H7CR 항체 1.3 또는 4.5의 인간화 변이형의 항원 결합 단편이 있는 H7CR 결합 분자를 제공하는데, 이때, 이러한 분자는 인간 H7CR과 면역 특이적으로 결합하고, 항원 결합 단편은
- [0026] (A) (1) 항-인간 H7CR 항체 1.3의 인간화 변이형의 경쇄 가변 부위, 이때, 상기 경쇄 가변 부위는 **서열 번호 17-22** 중 임의의 아미노산 서열을 나타냄; 및
- [0027] (2) 항-인간 H7CR 항체 1.3의 인간화 변이형의 중쇄 가변 부위, 이때, 상기 중쇄 가변 부위는 **서열 번호 23-28** 중 임의의 아미노산 서열을 나타냄;
- [0028] 또는
- [0029] (B) (1) 항-인간 H7CR 항체 4.5의 인간화 변이형의 경쇄 가변 부위, 이때, 상기 경쇄 가변 부위는 **서열 번호 33-38** 중 임의의 아미노산 서열을 나타냄; 및
- [0030] (2) 항-인간 H7CR 항체 4.5의 인간화 변이형의 중쇄 가변 부위, 이때, 상기 중쇄 가변 부위는 **서열 번호 39-44** 중 임의의 아미노산 서열을 나타냄;를 포함한다.
- [0031] 바람직한 구현에는 상기 H7CR 결합 분자가
- [0032] (A) 살아있는 세포의 표면 상에 어레이되거나;
- [0033] (B) 내인성 농도로 발현되는; H7CR과 면역 특이적으로 결합하는 구현예와 관련이 있다.
- [0034] 일 구현예에서, 살아있는 세포는 T 세포, NK 세포 또는 플라즈마사이토이드 수지상 세포이다.
- [0035] 또 다른 구현예에서, 이러한 분자는 H7CR의 B7-H7과의 상호 작용을 실질적으로 차단할 수 없다.
- [0036] 또 다른 구현예에서, 이러한 분자는 H7CR과 결합하여 H7CR 활성을 향진시킬 수 있다.
- [0037] 임의의 항체는 이중 특이적, 삼중 특이적 또는 다중 특이적 항체일 수 있다. 분자는 검출 가능하게 표지될 수 있거나, 콘쥬게이트된 독소, 약물, 수용체, 효소, 수용체 리간드 또는 이의 조합을 포함한다.
- [0038] 또 다른 구현에는 치료적으로 유효한 양의, 임의의 위에 언급된 분자 및 생리적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 함유하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0039] 개시된 조성물은 대상자에게 치료적으로 유효한 양의, 임의의 위에 언급된 약학적 조성물을 투여하여 B7-H7 경로를 활성화하고 면역 반응을 자극함으로써, 질병의 증상을 나타내는 대상자에서 질병을 치료하는 데에 이용될 수 있다. 치료되는 특정 징후는 암, 감염성 질병, 만성 바이러스성 질병, 염증성 병태 또는 자가 면역 질병을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0040] 또한, 약학적 조성물이 H7CR 기능을 향진하는, 질병 치료 방법이 제공된다.
- [0041] 질병을 예방적으로 치료하는 방법은, 예방적으로 유효한 양의, 임의의 위에 언급된 약학적 조성물을, 질병의 증상을 나타내는 대상자에게 미리 투여하는 것을 포함한다.
- [0042] 대상자에서 질병(특히 암 또는 T 세포 수 및 건강에 영향을 미치는 질병)을 진단하는 방법은, 대상자의 세포가 임의의 위에 언급된 H7CR 결합 분자와 결합할 수 있는 능력을 분석하는 것을 포함하며, 이때, 이러한 방법은 대상자에서 면역 반응성 또는 질병의 존재를 진단하는 세포학적 분석법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0043]

도 1은 별개의 세포 상에서 H7CR 및 B7-H7 사이의 구조, 발현 패턴 및 상호 작용을 나타낸 도해이다.

도 2는 H7CR CHO 형질감염체에 대한 항-H7CR 항체 1.3(Kd = 5.9 nM) 및 4.5(Kd = 3.5 nM)의 각각의 결합 친화도를 보여주는, 중간 형광 강도 대 로그 [Ab](nM)의 선 그래프이다.

도 3의 A 및 B는 PBMC로부터의 인간 미감작(CD45RA+) CD4 및 CD8 T 세포에 대한 H7CR mAb 결합 곡선을 보여주는, 중간 형광 강도 대 로그 [Ab](nM)의 선 그래프이다.

도 4의 (A) 내지 (C)는 CHO 형질전환체의 표면 상에서 발현된 인간 H7CR에 결합하는 항체 1.3, 4.5 및 7.8의 능력을 보여주는, 유동 세포계수법 데이터의 히스토그램이다. 데이터는 세포 수 대 Comp PE-A의 형광도 로그값으로 제시하였다. 각 패널의 좌측 피크는 이소형 대조군 항체를 나타내고, 우측 피크는 H7CR 항체를 나타낸다.

도 5의 A 내지 D는 B7-H7Ig 융합 단백질이 H7CR CHO 형질감염체와 결합함을 보여주는 유동 세포계수법 데이터의 히스토그램이다. 데이터는 세포 수 대 Comp APC-A의 형광도 로그값으로 제시하였다. H7CR 형질감염체와, 항체 1.3(도 5B), 4.5(도 5C) 및 7.8(도 5D)의 사전 배양은 각각 B7-H7과 H7CR의 상호 작용을 실질적으로 차단할 수 없는 것으로 나타났다.

도 6은 인간 편도선 조직의 표면 상에 내인성으로 발현된 H7CR과 결합하는, 항-인간 H7CR 항체(H7CR 4.5)의 능력을 보여주는 현미경 사진이다.

도 7(패널 A 내지 C)은 H7CR 발현이 T 세포 및 NK 세포에서 미감작 T 세포 표현형과 관련이 있음을 보여주는, 유동 세포계수법 데이터의 산포도이다. **패널 A**는 CD45RO의 발현에 대한, CD3+ T 세포 상에서의 H7CR의 발현을 보여주는, 네 명의 공여자로부터의 산포도를 나타낸다. 이러한 산포도는 항-H7-CR 항체의 형광도 대 항-CD45RO로부터의 형광도이다. **패널 B**는 CD3 마커와 CD16 마커의 발현을 기초로 한, T 세포와 NK 세포의 게이팅을 보여주는 산포도이다. 이러한 산포도는 항-CD3 항체의 형광도 대 항-CD16 항체로부터의 형광도이다. **패널 C**는 CD45RO의 발현에 대한, CD16+ NK 세포 상에서의 H7CR의 발현을 보여주는, 네 명의 공여자로부터의 산포도를 나타낸다. 이러한 산포도는 항-H7-CR의 형광도 대 항-CD45RO로부터의 형광도이다.

도 8의 A 내지 H는 네 명의 건강한 PMBC 공여자(공여자 1, **도 8의 A 및 B**; 공여자 2, **도 8의 C 및 D**; 공여자 3(**도 8의 E 및 F**) 및 공여자 4(**도 8의 G 및 H**))의 H7CR 및 B7-H7의 발현 프로파일의 유동 세포계수법 산포도이다. **도 8의 A, C, E 및 G**는 항체 1.3을 이용하는 형광도 로그값 대 항-CD3 항체를 이용하는 형광도 로그값의 산포도이다. **도 8의 B, D, F 및 H**는 항-B7H7 항체 2D3 대 항-CD14 항체를 이용하는 형광도 로그값의 산포도이다. 모든 공여자는 CD3 T 세포 상에서 H7CR의 발현을 나타내며, PBMC에서 B7-H7의 최소 발현을 나타낸다.

도 9의 A 내지 H는 네 명의 건강한 PMBC 공여자(공여자 1, **도 9의 A 및 B**; 공여자 2, **도 9의 C 및 D**; 공여자 3, **도 9의 E 및 F**; 및 공여자 4, **도 9의 G 및 H**)의 H7CR 및 B7-H7의 발현 프로파일의 유동 세포계수법 산포도이다. **도 9의 A, C, E 및 G**는 항체 1.3 대 항-CD3 항체를 이용하는 형광도의 산포도이다. **도 9의 B, D, F 및 H**는 항-B7H7 항체 2D3 대 항-CD14 항체를 이용하는 형광도의 산포도이다. 공여자 2, 3, 4는 CD3 T 세포 상에서 H7CR의 발현을 나타내며, PBMC에서 B7-H7의 최소 발현을 나타낸다. 공여자 1은 CD14+ 단핵구 상에서 B7-H7의 높은 발현 수준 및 CD3 T 세포 상에서 낮은 H7CR 발현 수준을 나타낸다.

도 10의 A 내지 D는 인간 단핵구(**도 10의 A, F, K, P, U 및 Z**), CD8+ CD3+ 림프구(**도 10의 B, G, L, Q, V, AA**), CD8- CD3+ 림프구(**도 10의 C, H, M, R, W 및 AB**), CD16+ NK 세포(**도 10의 D, I, N, S, X 및 AC**) 및 CD3- CD8- 세포(**도 10의 E, J, O, T, Y 및 AD**)에 의한 H7CR 및 B7-H7의 발현을 나타내는 유동 세포계수법 히스토그램이다. 항체 18C3(10A-10E) 및 2D3(10F-10J)는 항-B7-H7 단일 클론 항체이다. **도 10의 K 내지 O**는 항 PD-1 항체를 이용한다. **도 10의 P 내지 T**는 항체 1.3을 이용한다. **도 10의 U 내지 Y**는 항체 4.5를 이용한다. **도 10의 Z 내지 AD**는 항체 7.8을 이용한다.

도 11의 A 내지 D는 시노물구스 원숭이 단핵구(**도 11의 A, F, K, P, U 및 Z**), CD8+ CD3+ 림프구(**도 11의 B, G, L, Q, V, AA**), CD8- CD3+ 림프구(**도 11의 C, H, M, R, W 및 AB**), CD16+ NK 세포(**도 11의 D, I, N, S, X 및 AC**) 및 CD3- CD8- 세포(**도 11의 E, J, O, T, Y 및 AD**)에 의한 H7CR 및 B7-H7의 발현을 나타내는 유동 세포계수법 히스토그램이다. 항체 18C3(10A-E) 및 2D3(10F-J)는 항-B7-H7 단일 클론 항체이다. **도 10의 K 내지 O**는 항 PD-1 항체를 이용한다. **도 10의 P 내지 T**는 항체 1.3을 이용한다. **도 10의 U 내지 Y**는 항체 4.5를 이용한다. **도 10의 Z 내지 AD**는 항체 7.8을 이용한다.

도 12의 A 내지 K는 성숙 단핵구 유래 수지상 세포에 의한, B7-H7 및 기타 활성화 마커 발현에 대한 시험관 내 분석법의 유동 세포계수법 히스토그램이다. 도 12의 A는 세포 수 대 항-HLA-ABC 항체를 이용한 Comp-FITC-A 로그값의 히스토그램이다. 도 12의 B는 세포 수 대 항-B7-H1 항체를 이용한 Comp-PE-A 로그값의 히스토그램이다. 도 12의 C는 세포 수 대 항-HLA-DR 항체를 이용한 Comp-PerCP-Cy5-5-A 로그값의 히스토그램이다. 도 12의 D는 세포 수 대 항-CD40 항체를 이용한 Comp-PE-Cy7-A 로그값의 히스토그램이다. 도 12의 E는 세포 수 대 항-CD86 항체를 이용한 Comp-APC-A 로그값의 히스토그램이다. 도 12의 F는 세포 수 대 항-CD83 항체를 이용한 Comp-퍼시픽블루(PacificBlue)-A 로그값의 히스토그램이다. 도 12의 G는 세포 수 대 항-CD80 항체를 이용한 Comp-FITC-A 로그값의 히스토그램이다. 도 12의 H는 세포 수 대 항-B7-DC 항체를 이용한 Comp-PE-A 로그값의 히스토그램이다. 도 12의 I는 세포 수 대 항-CD54 항체를 이용한 Comp-PacificBlue-A 로그값의 히스토그램이다. 도 12의 J는 세포 수 대 항-B7-H7 항체를 이용한 Comp-PerCP-Cy5-5A 로그값의 히스토그램이다. 도 12의 K는 세포 수 대 항-CCR7 항체를 이용한 Comp-APC-A 로그값의 히스토그램이다. 회색 실선은 이소형 대조군을 나타낸다. 파선은 미성숙 수지상 세포를 나타낸다. 점선은 1일 동안 TNF α 및 PGE2로 처리된 세포를 나타낸다. 검은색 실선은 2일 동안 1 ng/ml TNF α 및 1 μ g/ml PGE2로 처리된 세포를 나타낸다.

도 13은 Ct1 Ig(■), H7CR1.3(●), H7CR4.5(▲), H7CR7.8(◆) 및 T 세포 단독(-)에 대한, 분열된 세포의 백분율(CFSE 낮음) 대 일(day)의 선 그래프이며, 항-H7CR 항체가 모델 항원인 파상풍 변독소, 특이적인 T 세포 반응을 촉진함을 보여준다.

도 14의 A 내지 L은 파상풍 변독소 단백질 자극 및 H7CR 항체 또는 대조군 항체 처리를 한 세포에 의해 발현된 사이토카인의 속성 및 수준을 보여주는 막대 그래프이다. 도 14의 A는 Ct1Ig, H7CR1.3, H7CR4.5, H7CR7.8 또는 T 세포 단독으로 처리된 IFN- γ (pg/nl) 세포의 막대 그래프이다. 도 14의 B는 Ct1Ig, H7CR1.3, H7CR4.5, H7CR7.8 또는 T 세포 단독으로 처리된 IL-5 (pg/nl) 세포의 막대 그래프이다. 도 14의 D는 Ct1Ig, H7CR1.3, H7CR4.5, H7CR7.8 또는 T 세포 단독으로 처리된 IL-13 (pg/nl) 세포의 막대 그래프이다. 도 14의 E는 Ct1Ig, H7CR1.3, H7CR4.5, H7CR7.8 또는 T 세포 단독으로 처리된 GM-CSF (pg/nl) 세포의 막대 그래프이다. 도 14의 F는 Ct1Ig, H7CR1.3, H7CR4.5, H7CR7.8 또는 T 세포 단독으로 처리된 IL-10 (pg/nl) 세포의 막대 그래프이다. 도 14의 G는 Ct1Ig, H7CR1.3, H7CR4.5, H7CR7.8 또는 T 세포 단독으로 처리된 IL-6 (pg/nl) 세포의 막대 그래프이다. 도 14H는 Ct1Ig, H7CR1.3, H7CR4.5, H7CR7.8 또는 T 세포 단독으로 처리된 IL-12p70 (pg/nl) 세포의 막대 그래프이다. 도 14의 I는 Ct1Ig, H7CR1.3, H7CR4.5, H7CR7.8 또는 T 세포 단독으로 처리된 MCP-1 (pg/nl) 세포의 막대 그래프이다. 도 14의 J는 Ct1Ig, H7CR1.3, H7CR4.5, H7CR7.8 또는 T 세포 단독으로 처리된 IL-17 (pg/nl) 세포의 막대 그래프이다. 도 14의 AK는 Ct1Ig, H7CR1.3, H7CR4.5, H7CR7.8 또는 T 세포 단독으로 처리된 MIP-1 β (pg/nl) 세포의 막대 그래프이다. 도 14의 L은 Ct1Ig, H7CR1.3, H7CR4.5, H7CR7.8 또는 T 세포 단독으로 처리된 IL-8 (pg/nl) 세포의 막대 그래프이다.

도 15의 A 및 B는 항-H7CR 항체 처리가 항원 특이적인 T 세포에서 증식 및 세포 내 IFN γ 발현을 향상시켰음을 보여주는 유동 세포계수법 산포도이다. 도 15의 A는 Ct1Ig를 이용하는 Comp-PerCP-Cy5-5-A::IFN γ 대 Comp-FITC::CFSE 로그값의 산포도이다. 도 15의 B는 Comp-PerCP-Cy5-5-A::IFN γ 대 Comp-FITC::CFSE 로그값의 산포도이다.

도 16a 및 도 16b는 인간 T 세포 반응에 미치는 항-H7CR 항체의 영향을 보여주는 막대 그래프이다. 도 16a는 항-CD28H 항체(검은색 상자)가 CTLA4-Ig 부재 하에 강하게 증가된 T 세포 증식을 매개함을 보여주는, 분열된 CD4+ T 세포(%)의 막대 그래프이다. 도 16b는 항-CD28H 항체(검은색 상자)가 사이토카인 발현의 증가를 매개함을 보여준다. 도 16b는 대조군(흰색 상자) 또는 항-CD28H(검은색 상자)로 처리된 T 세포로부터의 IFN- γ 의 pg/ml의 막대 그래프인 패널 A를 포함한다. 패널 B는 다음과 같은 사이토카인(검은색 상자)의 pg/ml의 막대 그래프이다: 좌에서 우로 IL-5, IL-10, TNF- α , IL-17. 대조군(흰색 상자).

도 17a 및 도 17b는 항체 1.3의 경쇄(**도 17a**) 및 중쇄(**도 17b**)의 가변 도메인의 콜리어 펄즈(Collier Perles) 2D 표현을 보여준다. 쇠들의 세 개의 CDR 루프는 도해의 상부에 나타내었다. 평행선 무늬의 원은 이 mAb에 대해 없어진 잔기이다. 사각형의 아미노산은 그 위치에서 보존된 아미노산이다.

도 18a 및 도 18b는 항체 4.5의 경쇄(**도 18a**) 및 중쇄(**도 18b**)의 가변 도메인의 콜리어 펄즈(Collier Perles) 2D 표현을 보여준다. 쇠들의 세 개의 CDR 루프는 도해의 상부에 나타내었다. 평행선 무늬의 원은 이 mAb에 대해 없어진 잔기이다. 사각형의 아미노산은 그 위치에서 보존된 아미노산이다.

도 19의 A 내지 D는 항체 1.3이 생체 내에서 인간 CD4+ 및 CD8+ 세포를 확장시킴을 보여주는, 세포 수 대 CFSE의 유동 세포계수법 히스토그램이다. 도 19의 A와 C는 세포 수 대 대조군 항체의 형광도 로그값을 보여주는 대

조준이다. 도 19의 B는 CD4+ 세포 수 대 항-H7CR 항체 1.3을 이용한 형광도 로그값을 보여준다. 도 19의 D는 CD8+ 세포 수 대 항-H7CR 항체 1.3을 이용한 형광도 로그값을 보여준다. 햄스터 IgG 이소형 대조군(바이오레전드(Biolegend))를 대조군 항체로 이용하였다.

도 20의 A 내지 H는 항체 1.3을 주사한 NGS 마우스에서 CD40L, IFN γ 및 CD107a를 발현하는 세포의 증가를 보여주는 유동 세포계수법 산포도이다. 도 20의 A는 항-CD40L 항체 형광도 로그값 대 비처리 CD4+ 세포의 항-CD3 항체 형광도 로그값을 보여준다. 도 20의 B는 항-CD40L 항체 형광도의 로그값 대 항-H7CR 항체 1.3으로 처리된 CD4+ 세포의 항-CD3 항체 형광도의 로그값을 보여준다. 도 20의 C는 항-IFN γ 항체의 형광도 로그값 대 비처리 CD4+ 세포의 항-CD3 항체 형광도 로그값을 보여준다. 도 20의 D는 IFN γ 항체의 형광도 로그값 대 항-H7CR 항체로 처리된 CD4+ 세포의 H의 형광도 로그값을 보여준다. 도 20의 E는 항-CD107a 항체 형광도 로그값 대 비처리 CD8+ 세포의 항-CD3 항체 형광도 로그값을 보여준다. 도 20의 F는 항-CD107a 항체 형광도 로그값 대 항-H7CR 항체 1.3으로 처리된 CD8+ 세포의 항-CD3 항체 형광도 로그값을 보여준다. 도 20의 G는 항-IFN γ 항체의 형광도 로그값 대 비처리 CD8+ 세포의 항-CD3 항체의 형광도 로그값을 보여준다. 도 20의 H는 IFN γ 항체 형광도 로그값 대 항-H7CR 항체로 처리된 CD8+ 세포의 H의 형광도 로그값을 보여준다.

도 21a는 (좌에서 우로) 키메라 쥐 항H7CR 항체(1.3), 음성 대조군(Ct1 Ig), OKT3, OKT3 +CD28, 키메라 쥐 항H7CR 항체(1.3)-고정, 음성 대조군 고정, 및 OKT3-고정으로 자극된, 휴지 중인 인간 PMBC에서 IFN- γ (pg/mL)의 도트 플롯이다. 도 22b는 (좌에서 우로) 키메라 쥐 항H7CR 항체(1.3), 음성 대조군(Ct1 Ig), OKT3, OKT3 +CD28, 키메라 쥐 항H7CR 항체(1.3)-고정, 음성 대조군 고정, 및 OKT3-고정으로 자극된, 활성화된 PMBC에서 IFN- γ 의 도트 플롯이다. 도 21b는 10 μ g/ml 농도에서 밤새 (좌에서 우로) 키메라 쥐 항H7CR 항체(1.3), 음성 대조군(Ct1 Ig), OKT3, OKT3 +CD28, 키메라 쥐 항H7CR 항체(1.3)-고정, 음성 대조군 (Ct1-Ig) 고정, 및 OKT3-고정으로 자극된, 활성화된 PMBC에서 IFN- γ 의 도트 플롯이다.

도 22는 2일 동안 1ng/ml TNF α 및 1 μ g/ml PGE2로 성숙된 단핵구 유래 수지상 세포에 대한 CFSE 희석 T 세포의 백분율의 막대 그래프이다. 수지상 세포를 100 ng/ml 파상풍 변독소와 함께, 2주 동안 CFSE 표지된 자가 T 세포와 함께 배양하였다. 세포를 (좌에서 우로) 10 μ g/ml 가용성 대조군 IgG4, 키메라 쥐 항H7CR 항체(1.3) 및 변이형 V1-V14로 처리하였다(표 10 참조).

도 23은 지시된 중쇄 및 경쇄가 있는 36개의 인간화 H7CR4.5의, 일련의 유동 세포계수법 산포도를 제공한다. 36개의 변이형을 H7CR-GFP 융합 단백질로 형질감염된 CHO 세포와 함께 배양하고, 항-인간 Ig 2차 항체로 염색하였다. X축은 H7CR-GFP 발현을 나타내고, Y 축은 형질감염체에 대한 변이형의 결합을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044]

B7-H7 상대 수용체인 H7CR(B7-H7CR 및 CD28H로도 알려져 있음)과 면역 특이적으로 결합할 수 있는 항체, 항체의 인간화 변이형 및 이의 항원 결합 단편 및 기타 분자, 그리고 암 및 기타 질병의 치료 및 진단에서의 이의 용도가 제공된다.

[0045]

B7-H7은 항원 제시 세포 상에서 발현된다. B7-H7은 대식세포에서 구조적으로 발현되고, 수지상 세포에서 유도 가능하다. B7-H7은 상대 수용체(H7CR)와 상호 작용하여 면역 체계 및 면역 반응을 자극한다(도 1). H7CR은 (특히 비장, 림프절 및 흉선에서) 미감작 T 세포, NK 세포 및 플라스마사이토이드 수지상 세포 상에서 특히 발현되며, 그 발현은 성숙된 세포 또는 활성화된 세포 상에서 하향 조절된다. H7CR의 이러한 하향 조절은 생체 내에서 활성화/기억 T 세포 생존을 약화시켜, 정상적인 개체에서 면역 체계 정지로의 복귀를 초래한다. 따라서, B7-H7 및 H7CR 간의 상호 작용은 생체 내에서 미접촉 T 세포 프라이밍 및 활성화/기억 T 세포 생존에 중요하다. 그러나 H7CR은 또한 만성적으로 항원에 노출된/소모성(exhausted) T 세포에서 하향 조절되는 것으로 보인다. H7CR과 결합할 수 있는, B7-H7 Ig 및 항-H7CR 항체와 같은 분자들은 T 세포 증식 및 사이토카인 생산의 효현제로서 기능할 수 있다. 이러한 분자들은 암, 감염성 질병 및 부적절한 T 세포 반응을 특징으로 하는 질병들의 치료에서 유용성을 나타낸다. 역으로, B7-H7과 H7CR 사이의 상호 작용을 차단할 수 있는, 항-B7-H7 항체 및 H7CR Ig와 같은 분자들은 T 세포 증식 및 사이토카인 생산의 길항제로 기능한다. 이러한 분자들은 염증, 특히, 자가 면역 질환의 치료에서 유용성을 나타낸다.

[0046]

A.B7-H7

[0047]

B7-H7은 제노푸스(*Xenopus*) B7-H4에 유의미한 상동성을 나타냈던 유전자로서 제노푸스 데이터베이스 검색을 통

해 발견되었다. B7-H4 단백질은 282개의 아미노산 잔기를 보유하는데, 이들 잔기들은 아미노 말단 세포 외 도메인, 큰 소수성 막관통 도메인 및 (오로지 2개의 아미노산 잔기로만 이루어지는) 매우 짧은 세포 내 도메인을 가지고 있는 것으로 분류되었다. 다른 B7 패밀리 구성원처럼, B7-H4는 세포 외 도메인에 한 쌍의 Ig 유사 부위를 보유한다. B7-H4 단백질은 I형 막관통 단백질의 전반적인 구조를 나타낸다.

[0048] B7-H7 아미노산 서열은 이전에 발견된 인간 유전자인 HHLA2(인간 내인성 레트로바이러스-H 긴 말단 반복-관련 단백질 2((human endogenous retrovirus-H long terminal repeat-associating protein 2)(HHLA2); Mager, D.L. *et al.* (1999) “*Endogenous Retroviruses Provide The Primary Polyadenylation Signal For Two New Human Genes (HHLA2 And HHLA3,*” Genomics 59:255-263))와 유사한 것으로 밝혀졌으며, 어떠한 알려진 기능이 없다고 밝혀졌다(Flajnik, M.F. *et al.* (2012) “*Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7’ s Historical Relationship With The MHC,*” Immunogenetics 64:571-590).

[0049] 인간 B7-H7 서열은 닭, 주머니쥐, 유제 포유동물(예컨대, 말, 돼지), 연어 및 상어에서 동족체를 가지고 있는 것으로 밝혀졌다. 그러나 현재까지 위유전자만이 설치류(마우스와 랫트)에서 확인되었다. 이러한 유전자의 아미노산 서열은 Ig 슈퍼패밀리 도메인에 대해 정준(canonical) 잔기의 보존과 함께, 모든 종에서 유사한 도메인 구조를 드러낸다.

[0050] 인간 B7-H7 폴리펩티드는 414개 아미노산 길이며, 다음을 함유하는 것으로 보고되었다: 신호 서열, 세포 외 도메인, 3개의 번역 글로불린 유사(Ig 유사) 도메인, 막관통 도메인 및 세포질 도메인. 특히, 인간 B7-H7 폴리펩티드는 Ig 유사 V-1형 도메인, Ig 유사 C-1형 도메인 및 Ig 유사 V-2형 도메인을 함유하는 것으로 보고되었다. B7-H7의 여러 가지 자연적으로 발생하는 변이형이 존재한다(예컨대, 등록번호 Q9UM44-1(호모 사피엔스), NP_009003(GI:5901964, 호모 사피엔스), 및 AAD48396(GI:15726285, 호모 사피엔스); WO 2011/020024 참조).

[0051] 용어 “고유(native) B7-H7”은 미성숙 또는 전구체 및 성숙한 형태를 포함하는, 임의의 자연적으로 발생하는 B7-H7 아미노산 서열을 지칭한다. 성숙한 형태의 B7-H7은 번역 후 변형된 B7-H7 단백질, 예를 들어, 신호 또는 리더 아미노산 서열이 절단된 B7-H7 폴리펩티드를 포함한다. 대표적인 인간 B7-H7, 등록번호 Q9UM44-1의 아미노산 서열은 (서열 번호 1)이다:

[0052] MKAQTALSFF LILITSLSGS QGIFPLAFFI YVPMNEQIVI GRLEDEDIILP

[0053] SSFERGSEVV IHWKYQDSYK VHSYYKGS DH LESQDPRYAN RTSLFYNEIQ

[0054] NGNASLFFRR VSLLEDEGIYT CYVGTAIQVI TNKVVLKGVG FLTPVMKYEK

[0055] RNTNSFLICS VLSVYPRPII TWKMDNTPIS ENNMEETGSL DSFSINSPLN

[0056] ITGSNSSYEC TIENSLKQT WTGRWTMKDG LHKMQSEHVS LSCQPVNDYF

[0057] SPNQDFKVTW SRMKSGTFSV LAYYLSQQN TIINESRFSW NKELINQSD

[0058] SMNLMDLNL SGEYLCNIS SDEYTLTIH TVHVEPSQET ASHNKGLWIL

[0059] VPSAILAAFL LIWSVKCCRA QLEARSRHP ADGAQQRCC VPPGERCP

[0060] PSADNGEENVPL SGKV

[0061] 인간 B7-H7은 인실리코 분석을 기초로 하여, 다음과 같은 예상 도메인을 함유하는 것으로 보고되었다: 서열 번호 1의 아미노산 잔기 1 내지 22의 신호 서열, 서열 번호 1의 아미노산 잔기 61 내지 131의 Ig 유사 V-1형 도메인, 서열 번호 1의 아미노산 잔기 138 내지 222의 Ig 유사 C-1형 도메인, 서열 번호 1의 아미노산 잔기 235 내지 328의 Ig 유사 V-2형 도메인 및 서열 번호 1의 아미노산 잔기 345 내지 365의 막관통 도메인. 인간 B7-H7 폴리펩티드에 대한 예상 이분자체 경계는 서열 번호 1의 아미노산 잔기 141-144, 156, 158, 160, 162, 193-196, 198, 200, 201, 224 및 225이다. 인간 B7-H7 폴리펩티드에 대한 예상 N 연결 글리코실화 자리는 서열 번호 1의 아미노산 잔기 90, 103 및 318이다. 인간 B7-H7 폴리펩티드의 자연적인 변이형은 BOT, N344K 및 S346R(UniProt Q9UM44)를 포함한다(WO 2011/020024 참조, 이 참조 문헌은 인간 B7-H7의 구조 및 서열의 교시를 위해 전체가 참조로써 본 출원에 포함된다).

[0062] 인간 B7-H7(서열 번호 1)을 암호화하는 DNA 서열은 (서열 번호 2)이다:

[0063] atgaaggcac agacagcact gtctttcttc ctcattctca taacatctct
 [0064] gaggatgcat caaggcatat tccctttggc tttcttcatt tatgttccta
 [0065] tgaatgaaca aatcgtcatt ggaagacttg atgaagatat aattctccct
 [0066] tcttcatttg agaggggatc cgaagtcgta atacactgga agtatcaaga
 [0067] tagctataag gttcatagtt actacaaagg cagtgacat ttggaaagcc
 [0068] aagatcccag atatgcaaac aggacatccc tttctataa tgagattcaa
 [0069] aatgggaatg cgtcactatt tttcagaaga gtaagccttc tggacgaagg
 [0070] aatttacacc tgctatgtag gaacagcaat tcaagtgatt acaacaaag
 [0071] tgggtgctaaa ggtgggagtt tttctcacac ccgtgatgaa gtatgaaaag
 [0072] aggaacacaa acagcttctt aatatgcagc gtgttaagtg tttatcctcg
 [0073] tccaattatc acgtggaaaa tggacaacac acctatctct gaaaacaaca
 [0074] tggaagaaac agggctcttg gattcttttt ctattaacag cccactgaat
 [0075] attacaggat caaattcatc ttatgaatgt acaattgaaa attcactgct
 [0076] gaagcaaaca tggacagggc gctggacgat gaaagatggc cttcataaaa
 [0077] tgcaaagtga acacgtttca ctctcatgtc aacctgtaaa tgattatttt
 [0078] tcaccaaacc aagacttcaa agttacttgg tccagaatga aaagtgggac
 [0079] tttctctgtc ctggcttact atctgagctc ctacaaaaat acaattatca
 [0080] atgaatcccg attctcatgg aacaaagagc tgataaacca gagtgacttc
 [0081] tctatgaatt tgatggatct taatctttca gacagtgggg aatatttatg
 [0082] caatatttct tcggatgaat atactttact taccatccac acagtgcata
 [0083] tagaaccgag ccaagaaaca gcttcccata acaaaggctt atggattttg
 [0084] gtgcctctg cgattttggc agcttttctg ctgatttga gcgtaaaaatg
 [0085] ttgcagagcc cagctagaag ccaggaggag cagacaccct gctgatggag
 [0086] cccaacaaga aagatgttgt gtcctctctg gtgagcgctg tcccagtgca
 [0087] cccgataatg gcgaagaaaa tgtgcctctt tcaggaaaag ta

[0088] 널리 발현되는 인간 B7-H4와 대조적으로, 인간 B7-H7은 더욱 한정된 발현을 나타내는 것으로 알려져 있다(예컨대, 소화관, 신장, 폐, 상피 세포 및 림프구에서 발현됨). 인간 HHLA2는 B7.1 및 B7.2에서 가까이 염색체 3q13.33 상에서 발견된다. B7-H7은 대식세포 상에서 구조적으로 발현되고, 수지상 세포(DC) 상에서 유도 가능하다.

[0089] **B.H7CR**

[0090] 본 출원에 사용된 용어 “고유 H7CR”은 B7-H7의, 임의의 자연적으로 발생하는 상대 수용체를 지칭한다. H7CR은 B7-H7CR 및 CD28H으로도 지칭된다. H7CR은 T 세포, NK 세포 및 플라스마사이토이드 수지상 세포에 의해 발현된다. 인간 H7CR 폴리펩티드는 그 외에 문헌/데이터베이스에서 TMIGD2(transmembrane and immunoglobulin domain containing 2)로 지칭되나(Rahimi, N. *et al.* (Epub 2012 Mar 14) “*Identification Of IGPR-1 As A Novel Adhesion Molecule Involved In Angiogenesis*,” Molec. Biol. Cell. 23(9):1646-1656), B7-H7CR의 기능은 이전에는 밝혀지지 않았다. 이러한 고유 H7CR 분자들의 아미노산 서열에 대한 등록번호의 비제한적인 예로는 Q96BF3-1(호모 사피엔스), Q96BF3-2(호모 사피엔스), NP_653216.1(GI:21389429; 호모 사피엔스) 및 NP_653216.2(GI:281306838; 호모 사피엔스)를 포함한다. 고유 H7CR 분자의 대표적인 아미노산 서열(Q96BF3-2)을 **서열 번호 3**으로 아래에 제공하였다:

[0091] MGSPGMVLGL LVQIWALQEA SLSVQQGPN LLQVRQGSQA TLVCQVDQAT
 [0092] AWERLRVKWT KDGAILCQPY ITNGSLSLGV CGPQGRLSWQ APSHLTLQLD
 [0093] PVSLNHSGAY VCWAAVEIPE LEEAEGNITR LFVDPDDPTQ NNRRIASFPG
 [0094] FLFVLLGVGS MGVAIVWGA WFWGRRSCQQ RDSGNSPGNA FYSNVLYRPR
 [0095] GAPKSEDCS GEGKDQRGQS IYSTSFPQPA PRQPHLASRP CPSRPPCPSP
 [0096] RPHHPVSMVR VSPRPSPTQQ PRPKGFPPKG EE
 [0097] 인간 H7CR(서열 번호 3)을 암호화하는 DNA 서열은 (서열 번호 4)이다:

[0098] atgggggtccc cgggcatggt gctgggcctc ctggtgcaga tctgggcctt
 [0099] gcaagaagcc tcaagcctga gcgtgcagca ggggcccac ttgctgcagg
 [0100] tgaggcaggg cagtcaggcg accctggtct gccagggtgga ccaggccaca
 [0101] gcctgggaac ggctccgtgt taagtggaca aaggatgggg ccctcctgtg
 [0102] tcaaccgtac atcaccaacg gcagcctcag cctgggggtc tgcgggcccc
 [0103] agggacggct ctctggcag gcaccagcc atctcaccct gcagctggac
 [0104] cctgtgagcc tcaaccacag cggggcgtag gtgtgctggg cgcccgtaga
 [0105] gattcctgag ttggaggagg ctgagggcaa cataacaagg ctctttgttg
 [0106] acccagatga cccacacag aacagaaacc ggatcgcaag cttcccagga
 [0107] ttcctcttcg tgctgctggg ggtgggaagc atgggtgtgg ctgcgatcgt
 [0108] gtgggggtgcc tggttctggg gccgccgag ctgccagca agggactcag
 [0109] gtaacagccc aggaatgca ttctacagca acgtcctata ccggccccgg
 [0110] ggggccccaa agaagagtga ggactgctct ggagagggga aggaccagag
 [0111] gggccagagc atttattcaa cctccttccc gcaaccggcc ccccgccagc
 [0112] cgcacctggc gtcaagacc tgccccagcc cgagaccctg ccccgccccc
 [0113] agggccggcc acccgtctc tatggtcagg gtctctccta gaccaagccc
 [0114] caccagcag ccgaggccaa aagggttccc caaagtggga gaggag

[0115] C. 정의

[0116] 본 출원에 사용된 바와 같이, 분자가 제2 분자와 “면역 특이적으로 결합” 할 수 있다는 것은 이러한 결합이 그것의 동족 항원에 대해 항체의 특이성 및 친화도를 나타낼 경우를 말한다. 항체가 항원(특히 항원 H7CR)의 표적 부위 또는 입체 형태(“에피토프”)와 “면역 특이적으로 결합” 할 수 있다는 것은 이러한 결합이 면역 글로불린 분자의 항원 인식 부위를 포함하는 경우를 말한다. 특정 항원에 면역 특이적으로 결합하는 항체는, 다른 항원이, 예컨대, 면역분석법, 비아코어(BIACORE®) 분석법 또는 당해 기술 분야에 공지된 기타 분석법에 의해서 결정된 바와 같이, 항원 인식 부위에 의해서 인식되는 일부 서열 또는 입체형태 유사성을 나타낸다면, 더 낮은 친화도로 이러한 다른 항원과 결합할 수 있으나, 전체적으로는 관련 없는 항원과는 결합하지 않을 것이다. 그러나 바람직하게는, 항체(및 이들의 항원 결합 단편)는 다른 항원과 교차 반응하지 않을 것이다. 또한, 항체는 면역 특이적이 아닌 방식으로 Fc 수용체(FcR)와 같은, 다른 분자와, 다른 부위의 결합 도메인/Fc 부위와 같은, 항원 인식 부위를 포함하지 않는 분자의 도메인에 의해 결합할 수 있다.

[0117] 결합 또는 나타난 효과의 맥락에서 사용된 용어 “실질적으로”는 관찰된 효과가 생리적으로 또는 치료적으로 상관성이 있음을 의미하고자 한 것이다. 따라서, 예를 들어, 차단이 정도가 생리적으로 또는 치료적으로 상관성이 있는 경우(예를 들어, 이러한 정도가 60%를 초과하여 완전, 70%를 초과하여 완전, 75%를 초과하여 완전, 80%

를 초과하여 완전, 85%를 초과하여 완전, 90%를 초과하여 완전, 95%를 초과하여 완전, 또는 97%를 초과하여 완전한 경우), 분자는 H7CR의 활성을 실질적으로 차단할 수 있다. 마찬가지로, 분자가 또 다른 분자와 실질적으로 동일한 면역 특이성 및/또는 특성을 보유한다고 하는 것은 이러한 면역 특이성 및 특성이 60%를 초과하여 동일, 70%를 초과하여 동일, 75%를 초과하여 동일, 80%를 초과하여 동일, 85%를 초과하여 동일, 90%를 초과하여 동일, 95%를 초과하여 동일, 또는 97%를 초과하여 동일한 경우를 말한다.

[0118] 본 출원에 사용된 용어 “대상자”는 비 영장류(예컨대, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 랫트 등) 및 영장류(예컨대, 원숭이 및 인간)와 같은 포유동물, 가장 바람직하게는 인간을 의미하고자 한 것이다. 용어 “환자”는 진단, 치료 또는 예방의 목적으로 개시된 조성물을 투여 받는 대상자를 의미하고자 한 것이다.

[0119] 본 출원에 사용된 용어 “항체”는 “가변 부위” 항원 인식 부위를 보유하는 면역 글로불린 분자를 의미하고자 한 것이다. 용어 “가변 부위”는 면역 글로불린의 이러한 도메인을, (항체 Fc 도메인과 같은) 항체들에 의해 광범위하게 공유되는 도메인으로부터 구별하기 위한 것이다. 가변 부위는 잔기들이 항원 결합을 담당하는 “과가변 부위”를 포함한다. 과가변 부위는 “상보성 결정 부위” 또는 “CDR”로부터의 아미노산 잔기(즉, 전형적으로, 경쇄 가변 도메인의 대략 잔기 24-34(L1), 50-56(L2) 및 89-97(L3)와 중쇄 가변 도메인의 대략 잔기 27-35(H1), 50-65(H2) 및 95-102(H3); Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) 및/또는 “과가변 루프”로부터의 잔기(즉, 경쇄 가변 도메인의 잔기 26-32(L1), 50-52(L2) 및 91-96(L3) 및 중쇄 가변 도메인의 잔기 26-32(H1), 53-55(H2) 및 96-101(H3); Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917)를 포함한다. “프레임워크 부위” 또는 “FR” 잔기는 본 출원에 정의된 것과 같은 과가변 부위 잔기들 이외의 가변 도메인 잔기이다. 용어 항체는 단일 클론 항체, 다중 특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 합성 항체, 키메라 항체, 낙타화 항체(예컨대, Muyldermans *et al.*, 2001, *Trends Biochem. Sci.* 26:230; Nuttall *et al.*, 2000, *Cur. Pharm. Biotech.* 1:253; Reichmann and Muyldermans, 1999, *J. Immunol. Meth.* 231:25; 국제 공개 번호 WO 94/04678 및 WO 94/25591; 미국 특허번호 6,005,079 참조), 단일 사슬 Fv(scFv)(예컨대, Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994) 참조), 단일 사슬 항체, 이항화 결합 Fv(sdFv), 인트라바디 및 (예컨대, 본 출원에 개시된 항체에 대한 항-Id 및 항-항-Id 항체를 포함하는) 항-이디오타입(항-Id) 항체를 포함한다. 특히, 이러한 항체는 임의의 유형(예컨대, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 부류(예컨대, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂) 또는 하위 부류의 면역 글로불린 분자를 포함한다.

[0120] 본 출원에 사용된 용어 항체의 “항원 결합 단편”은 항체의 상보성 결정 부위(“CDR”) 및 선택적으로 항체의 “가변 부위” 항원 인식 부위를 포함하는 프레임워크 잔기를 함유하며, 항원과 면역 특이적으로 결합하는 능력을 나타내는, 항체의 하나 이상의 부분을 지칭한다. 이러한 단편은 Fab', F(ab')₂, Fv, 단일 사슬(ScFv) 및 이의 돌연변이, 자연 발생 변이형, 및 항체의 “가변 부위” 항원 인식 부위와 이종성 단백질(예컨대, 독소, 상이한 항원에 대한 항원 인식 부위, 효소, 수용체 또는 수용체 리간드 등)을 포함하는 융합 단백질을 포함한다. 본 출원에 사용된 용어 “단편”은 적어도 5개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 10개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 15개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 20개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 25개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 40개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 50개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 60개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 70개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 80개의 인접한 연속 아미노산 잔기, 적어도 90개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 100개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 125개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 150개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 175개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 200개의 인접한 아미노산 잔기, 또는 적어도 250개의 인접한 아미노산 잔기의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 또는 폴리펩티드를 지칭한다.

[0121] 인간, 키메라 또는 인간화 항체는 특히 인간에서의 생체 내 용도에 바람직하지만, 쥐 항체 또는 기타 종의 항체는 여러 용도에 유리하게 이용될 수 있다(예를 들어, 시험관 내 또는 제자리에서(in situ) 검출 분석법, 급성 생체 내 용도 등). 완전한 인간 항체는 특히 인간 대상자의 치료적 처치에 바람직하다.

[0122] 인간 항체는 인간 면역 글로불린 서열로부터 유래된 항체 라이브러리를 이용하는, 위에 기술된 파지 디스플레이 방법을 포함하는, 당해 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다(미국 특허번호 4,444,887 및 4,716,111; 및 국제 공개 번호 WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 및 WO 91/10741 참조). 인간 항체는 기능적 내인성 면역 글로불린은 발현할 수 없지만 인간 면역 글로불린 유전자는 발현할 수 있는 형질전환 마우스를 이용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 면역 글로불린 유전자 복합체는 마우스 배아 줄기세포에 무작위로 또는 상동 재조합에 의해서 도입될 수 있다. 대

안적으로는, 인간 가변 부위, 불변 부위 및 다양성 부위가 인간 중쇄 및 경쇄 유전자에 더하여 마우스 배아 줄기세포에 도입될 수 있다. 마우스 중쇄 및 경쇄 면역 글로불린 유전자는 상동 재조합에 의한 인간 면역 글로불린 유전자와의 도입과 별도로 또는 동시에 비 기능화될 수 있다. 특히, J_H 부위의 동형 접합성 결실은 내인성 항체 생산을 방지한다. 변형된 배아 줄기세포를 확장시켜 배반포에 미소 주사하여 키메라 마우스를 생산한다. 그런 다음, 키메라 마우스를 번식시켜 인간 항체를 발현하는 동형 접합성 자손을 생산한다. 형질 전환 마우스는 종래의 방법을 이용하여 선택된 항원으로, 예컨대, 폴리펩티드의 전부 또는 일부로 면역화된다. 이러한 항원에 대한 단일 클론성 항체는 종래의 하이브리도마 기술을 이용하여 이러한 면역화된, 형질 전환 마우스로부터 얻어질 수 있다(예컨대, 미국 특허번호 5,916,771 참조). 형질 전환 마우스에 은닉된 인간 면역 글로불린 이식 유전자는 B 세포가 분화하는 동안 재배열되고, 이어서 항체 종류 변환(class switching) 및 체세포 돌연변이를 거친다. 따라서, 이러한 기술을 이용하면 치료적으로 유용한 IgG, IgA, IgM 및 IgE 항체를 제조하는 것이 가능하다. 인간 항체를 제조하는 이 기술에 대한 개략적인 내용은 Lonberg 및 Huszar(1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93, 이는 전체가 본 출원에 참조로 포함된다)를 참조한다. 인간 항체 및 인간 단일 클론성 항체를 제조하는 이 기술과 이러한 항체를 제조하는 프로토콜에 대한 상세한 논의 내용은 예컨대 국제공개번호 WO 98/24893, WO 96/34096 및 WO 96/33735; 및 미국 특허번호 5,413,923, 5,625,126, 5,633,425, 5,569,825, 5,661,016, 5,545,806, 5,814,318 및 5,939,598을 참조하며, 이들은 그 전체가 본 출원에 참조로 포함된다. 또한, 애브제닉스 사(Abgenix, Inc., 미국 캘리포니아 주 프레몬트) 및 메다렉스(Medarex, 미국 뉴저지 주 프린스턴)와 같은 회사는 위에 설명된 것과 유사한 기술을 이용하여 선택된 항원에 대한 인간 항체를 제공하고자 힘쓰고 있다.

[0123]

“키메라 항체”는 항체의 상이한 부분들이, 비 인간 항체로부터 유래된 가변 부위와 인간 면역 글로불린 불변 부위를 가지고 있는 항체들과 같이, 상이한 면역 글로불린 분자로부터 유래되는 분자이다. 키메라 항체를 제조하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 예컨대, *Science* 229:1202; Oi et al., 1986, *BioTechniques* 4:214; Gillies et al., 1989, *J. Immunol. Methods* 125:191-202; 및 미국 특허번호 6,311,415, 5,807,715, 4,816,567 및 4,816,397 참조. 비 인간 중으로부터의 하나 이상의 CDR 및 인간 면역 글로불린 분자로부터의 프레임워크 부위를 함유하는 키메라 항체는 예를 들어 CDR 그래프팅(EP 239,400; 국제공개번호 WO 91/09967; 및 미국 특허번호 5,225,539, 5,530,101 및 5,585,089), 베니어링(veneering) 또는 리서페이싱(resurfacing, EP 592,106; EP 519,596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering* 7:805; 및 Roguska et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:969) 및 체인 서플링(미국 특허번호 5,565,332)을 포함하는, 당해 분야에 공지된 다양한 기술을 이용하여 제조될 수 있다.

[0124]

“인간화 항체”는 당해 분야에 공지되어 있다(예컨대, 유럽 특허번호 EP 239,400, EP 592,106 및 EP 519,596; 국제공개번호 WO 91/09967 및 WO 93/17105; 미국 특허번호 5,225,539, 5,530,101, 5,565,332, 5,585,089, 5,766,886 및 6,407,213; 및 Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering* 7(6):805-814; Roguska et al., 1994, *PNAS* 91:969-973; Tan et al., 2002, *J. Immunol.* 169:1119-1125; Caldas et al., 2000, *Protein Eng.* 13:353-360; Morea et al., 2000, *Methods* 20:267-79; Baca et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684; Roguska et al., 1996, *Protein Eng.* 9:895-904; Couto et al., 1995, *Cancer Res.* 55 (23 Supp):5973s-5977s; Couto et al., 1995, *Cancer Res.* 55:1717-22; Sandhu, 1994, *Gene* 150:409-10; Pedersen et al., 1994, *J. Mol. Biol.* 235:959-973; Jones et al., 1986, *Nature* 321:522-525; Reichmann et al., 1988, *Nature* 332:323-329; and Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 참조). 본 출원에 사용된 용어 “인간화 항체”는 인간 프레임워크 부위와 비 인간(일반적으로 마우스 또는 래트) 면역 글로불린으로부터의 하나 이상의 CDR을 포함하는 면역 글로불린을 지칭한다. CDR을 제공하는 비 인간 면역 글로불린은 “공여자”라 부르고, 프레임워크를 제공하는 인간 면역 글로불린은 “수용자”라 부른다. 불변 부위는 존재할 필요가 없지만, 존재한다면 인간 면역 글로불린 불변 부위와 실질적으로 동일해야 하는데, 즉, 적어도 약 85-90%, 바람직하게는 약 95% 이상 동일해야 한다. 따라서, 아마도 CDR을 제외한, 인간화 면역 글로불린의 모든 부분은 자연적인 인간 면역 글로불린 서열의 상응하는 부분과 실질적으로 동일하다. 인간화 항체는 인간화 경쇄와 인간화 중쇄 면역 글로불린을 함유하는 항체이다. 예를 들어, 인간화 항체는 전형적인 키메라 항체는 포괄하지 않으며, 예컨대, 키메라 항체의 전체 가변 부위는 비 인간 유래의 것이기 때문이다. 공여자 항체는 “인간화” 과정에 의해 “인간화” 되었으며, 그 결과에 따른 인간화 항체는 CDR을 제공하는 공여자 항체와 동일한 항원에 결합할 것으로 예상되기 때문이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는, 수용자의 과가변 부위 잔기가, 원하는 특이성, 친화도 및 용량을 나타내는 마우스, 래트, 토끼 또는 비 인간 영장류와 같은 비 인간 종들(공여자 항체)로부터의 과가변 부위 잔기로 교체된 인간 면역 글로불린(수용자 항체)이다. 일부 예에서, 인간 면역 글로불린의 프레임워크 부위(FR) 잔기는 상응하는 비 인간 잔기로 교체된다. 나아가, 인간화 항체는 수용자 항체나 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 더 개

선하고자 이루어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 하나, 전형적으로 두 개의 가변 도메인의 실질적으로 전부를 포함할 것이며, 여기서 과가변 부위의 전부 또는 실질적으로 전부는 비 인간 면역 글로불린의 그것들에 상응하고, FR의 전부 또는 실질적으로 전부는 인간 면역 글로불린 서열의 그것들이다. 또한, 인간화 항체는 선택적으로, 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 부가(즉, 돌연변이)의 도입에 의해 변경된, 면역 글로불린 불변 부위(Fc)의 적어도 일부분, 전형적으로는 Fc γ RIIB 폴리펩티드와 면역 특이적으로 결합하는 인간 면역 글로불린의 그것들을 포함할 것이다.

[0125]

항-인간 H7CR 항체들의 인간, 키메라 또는 인간화 유도체는 특히 인간에서 생체 내 이용에 바람직하나, 쥐 항체 또는 다른 종들의 항체는 여러 용도를 위해 유리하게 이용될 수 있다(예를 들어, 시험관 내 또는 제자리 검출 분석법, 급성 생체 내 용도 등). 이러한 인간 또는 인간화 항체는 하나 이상의 비 인간 CDR에서 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 부가를 포함한다. 인간화 항체 유도체는 비 유도체 인간화 항체와 비교할 때, 실질적으로 동일한 결합, 더 강한 결합 또는 더 약한 결합을 나타낼 수 있다. 특정 구현예에서, CDR의 하나, 둘, 셋, 넷, 또는 다섯 개의 아미노산 잔기가 치환, 결실 또는 부가되었다(즉, 돌연변이되었다). 완전한 인간 항체는 인간 대상자의 치료적 처치에 특히 바람직하다.

[0126]

이러한 인간 항체는 인간 면역 글로불린 서열로부터 유래된 항체 라이브러리를 이용하여, 파지 디스플레이 방법을 포함하는 당해 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다(미국 특허 번호 4,444,887 및 4,716,111; 및 국제공개번호 WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 및 WO 91/10741 참조). 이러한 인간 항체는 기능적 내인성 면역 글로불린은 발현할 수 없지만 인간 면역 글로불린 유전자는 발현할 수 있는 형질전환 마우스를 이용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 면역 글로불린 유전자 복합체는 마우스 배아 줄기세포에 무작위로 또는 상동 재조합에 의해서 도입될 수 있다. 대안적으로는, 인간 가변 부위, 불변 부위 및 다양성 부위가 인간 중쇄 및 경쇄 유전자에 더하여 마우스 배아 줄기세포에 도입될 수 있다. 마우스 중쇄 및 경쇄 면역 글로불린 유전자는 상동 재조합에 의한 인간 면역 글로불린 유전자좌의 도입과 별도로 또는 동시에 비 기능화될 수 있다. 특히, J μ 부위의 동형 접합성 결실은 내인성 항체 생산을 방지한다. 변형된 배아 줄기세포를 확장시켜 배반포에 미소 주사하여 키메라 마우스를 생산한다. 그런 다음, 키메라 마우스를 번식시켜 인간 항체를 발현하는 동형 접합성 자손을 생산한다. 형질 전환 마우스는 종래의 방법을 이용하여 선택된 항원으로, 예컨대, 폴리펩티드의 전부 또는 일부로 면역화된다. 이러한 항원에 대한 단일 클론성 항체는 종래의 하이브리도마 기술을 이용하여 이러한 면역화된, 형질 전환 마우스로부터 얻어질 수 있다(예컨대, 미국 특허번호 5,916,771 참조). 형질 전환 마우스에 은닉된 인간 면역 글로불린 이식 유전자는 B 세포가 분화하는 동안 재배열되고, 이어서 항체 종류 변환 및 체세포 돌연변이를 거친다. 따라서, 이러한 기술을 이용하면 치료적으로 유용한 IgG, IgA, IgM 및 IgE 항체를 제조하는 것이 가능하다. 인간 항체를 제조하는 이 기술에 대한 개략적인 내용은 Lonberg 및 Huszar(1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93, 이는 전체가 본 출원에 참조로 포함된다)를 참조한다. 인간 항체 및 인간 단일 클론성 항체를 제조하는 이 기술과 이러한 항체를 제조하는 프로토콜에 대한 상세한 논의 내용은 예컨대 국제공개번호 WO 98/24893, WO 96/34096 및 WO 96/33735; 및 미국 특허번호 5,413,923, 5,625,126, 5,633,425, 5,569,825, 5,661,016, 5,545,806, 5,814,318 및 5,939,598을 참조하며, 이들은 그 전체가 본 출원에 참조로 포함된다. 또한, 애브제닉스 사(미국 캘리포니아 주 프레몬트) 및 메다텍스(미국 뉴저지 주 프린스턴)와 같은 회사는 위에 설명된 것과 유사한 기술을 이용하여 선택된 항원에 대한 인간 항체를 제공하고자 힘쓰고 있다.

[0127]

개시된 방법에 이용되는 항체들은 단일 특이적일 수 있다. 또한, 면역 체계의 기타 분자들과 같이, 이중 특이적 항체, 삼중특이적 항체 또는 H7CR 이외의 상이한 표적들에 대해 특이성을 나타내는 보다 큰 다중특이성을 나타내는 항체도 관심의 대상이다. 예를 들어, 이러한 항체들은 H7CR 뿐만 아니라, 특정 세포 유형 또는 조직에 대한 항체를 표적화하는 데 중요한 항원(예를 들어, 치료되는 종양의 암 항원과 관련된 항원)과 결합할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 이러한 다중특이적 항체는 B7-H7 및 H7CR과 결합하여, 이러한 분자들을 보유하는 세포들의 회합을 촉진하는 기능을 함으로써 T 세포 반응을 향진시킨다. 이러한 분자들은 암 및 감염성 질병의 치료에 특별한 유용성을 나타낸다. 또 다른 구현예에서, 이러한 다중특이적인 항체는 면역 조절 효과를 증진시키기 위하여, CTLA4, TIM3, TIM4, OX40, CD40, GITR, 4-1-BB, B7-H4, LIGHT 또는 LAG3와 같은, 대안적인 또는 보충적인 면역 조절 경로에 연루된 분자들(수용체 또는 리간드)과 결합한다. 나아가, 다중특이적인 항체는 특히, 급성 및 만성 면역 반응 모두를 조절하는 것과 관련이 있을 수 있는, 사이토카인(예컨대, IL-7, IL-15, IL-12, IL-4 TGF- β , IL-10, IL-17, IFN γ , Flt3, BLys) 및 케모카인(예컨대, CCL21)과 같은 효과기 분자들과 결합할 수 있다.

[0128]

바람직한 인간 수용자 프레임워크 서열을 암호화하는 DNA 서열은 인간 배선 VH 세그먼트 VH1-18 및 JH6과, 인간

배선 VL 세그먼트 VK-A26 및 JK4로부터의 FR 세그먼트들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특정 구현예에서, CDR 중 하나 이상이 통상적인 재조합 DNA 기법을 이용하여 프레임워크 부위 내로 삽입된다. 프레임워크 부위는 자연적으로 발생하는 또는 공통적인 프레임워크 부위일 수 있으며, 바람직하게는 인간 프레임워크 부위일 수 있다(예컨대, 인간 프레임워크 부위의 목록은 Chothia *et al.*, 1998, “*Structural Determinants In The Sequences Of Immunoglobulin Variable Domain*,” *J. Mol. Biol.* 278: 457-479 참조).

[0129] 개시된 인간화 또는 키메라 항체는 적어도 하나의, 전형적으로 두 개의 가변 도메인의 실질적으로 전부를 함유할 수 있으며, 여기서 CDR 부위의 전부 또는 실질적으로 전부는 비 인간 면역 글로불린(즉, 공여자 항체)의 그것들에 상응하고, 프레임워크 부위의 전부 또는 실질적으로 전부는 인간 면역 글로불린 공통 서열의 그것들에 상응한다. 바람직하게는, 이러한 항체는 또한 면역 글로불린 불변 부위(Fc)의 적어도 일부분을, 전형적으로 인간 면역 글로불린의 그것들을 포함한다. 이러한 항체의 불변 도메인은 항체의 제안된 기능, 특히 요구될 수 있는 효과기 기능과 관련하여 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 항체의 불변 도메인은 인간 IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM 도메인이다(또는 이를 포함한다). 특정 구현예에서, 인간화 항체가 치료적 용도를 목적으로 하며, 항체의존성 세포 매개 세포독성(ADCC) 및 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성과 같은 항체 효과기 기능이 요구되는 경우, 인간 IgG 불변 도메인, 특히 IgG1 및 IgG3 이소형의 인간 IgG 불변 도메인이 이용된다. 대안적인 구현예에서, 항체가 치료적 목적을 위한 것이고, 항체 효과기 기능이 요구되지 않는 경우, IgG2 및 IgG4 이소형이 이용된다. 항체의 Fc 불변 도메인은 미국 출원공개번호 2005/0037000 및 2005/0064514에 개시된 것들과 같은, 항체 효과기 기능들을 변경하는, 하나 이상의 아미노산 변형을 포함할 수 있다.

[0130] 일부 구현예에서, 이러한 항체는 경쇄뿐만 아니라, 중쇄의 적어도 가변 도메인을 함유한다. 다른 구현예에서, 이러한 항체는 중쇄의 CH1, 힌지, CH2, CH3, 및 CH4 부위 중 하나 이상을 더 포함할 수 있다. 이러한 항체는 IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE를 포함하는 임의의 클래스의 면역 글로불린 및 IgG₁, IgG₂, IgG₃ 및 IgG₄를 포함하는 임의의 이소형으로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 불변 도메인은 보체 고정 불변 도메인이며, 여기서, 항체는 세포독성 활성을 나타내고, 그 클래스는 전형적으로 IgG₁인 것이 바람직하다. 다른 구현예에서, 이러한 세포독성 활성이 바람직하지 않은 경우, 불변 도메인은 IgG₂ 클래스일 수 있다. 이러한 항체는 둘 이상의 클래스 또는 이소형으로부터의 서열을 포함할 수 있고, 원하는 효과기 기능을 최적화하기 위하여 특정 불변 도메인을 선택하는 것은 당해 분야의 통상의 기술 범위 내이다.

[0131] 특정 양태에서, 본 개시는 Fc 변이형을 제공하는데, 이때, Fc 부위는 Kabat 등(1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, Va.)에 기재된 EU 인덱스로 번호를 매길 때 228, 234, 235 및 331로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 위치에 적어도 하나의 변형(예컨대, 아미노산 치환, 아미노산 삽입, 아미노산 결실)을 포함한다. 일 양태에서, 이러한 변형은 Kabat에 기재된 EU 인덱스로 번호를 매길 때 228P, 234F, 235E, 235F, 235Y 및 331S로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 치환이다.

[0132] 또 다른 특정 양태에서, 본 개시는 Fc 변이형을 제공하는데, 이때, Fc 부위는 IgG4 Fc 부위이고, Kabat에 기재된 EU 인덱스로 번호를 매길 때, 228 및 235로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 위치에 적어도 하나의 변형을 포함한다. 또 다른 특정 양태에서, Fc 부위는 IgG4 Fc 부위이고, 비 자연적으로 발생하는 아미노산은 Kabat에 기재된 EU 인덱스로 번호를 매길 때 228P, 235E 및 235Y로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0133] 또 다른 특정 양태에서, 본 개시는 Fc 변이형을 제공하는데, 이때, Fc 부위는 Kabat에 기재된 EU 인덱스로 번호를 매길 때 239, 330 및 332로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 위치에 적어도 하나의 비 자연적으로 발생하는 아미노산을 포함한다. 일 양태에서, 이러한 변형은 Kabat에 기재된 EU 인덱스로 번호를 매길 때 239D, 330L, 330Y 및 332E로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 치환이다. 본 출원에 전체가 참조로 포함된 미국 특허번호 7,317,091 참조.

[0134] 특정 양태에서, 본 개시는 Fc 변이형 1을 제공하는데, 이때, Fc 부위는 Kabat에 기재된 EU 인덱스로 번호를 매길 때 252, 254 및 256으로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 위치에 적어도 하나의 비 자연적으로 발생하는 아미노산을 포함한다. 일 양태에서, 이러한 변형은 Kabat에 기재된 EU 인덱스로 번호를 매길 때 252Y, 254T 및 256E로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 치환이다. 본 출원에 전체가 참조로 포함된 미국 특허번호 7,083,784 참조.

[0135] 특정 양태에서, 본 개시는 Fc 변이형을 제공하는데, 이때, Fc 부위는 Kabat에 기재된 EU 인덱스로 번호를 매길

때 428번 위치에 비 자연적으로 발생하는 아미노산을 포함한다. 일 양태에서, 428번 위치에서의 이러한 변형은 Kabat에 기재된 EU 인덱스로 번호를 매길 때 428T, 428L, 428F 및 428S로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 본 출원에 전체가 참조로 포함된 미국 특허번호 7,670,600 참조. 또 다른 양태에서, Fc 변이형은 Kabat에 기재된 EU 인덱스로 번호를 매길 때 434번 위치에 비 자연적으로 발생하는 아미노산을 더 포함할 수 있다. 일 양태에서, 434번 위치에서의 이러한 변형은 Kabat에 기재된 EU 인덱스로 번호를 매길 때 434A, 434S 및 434F로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 또 다른 양태에서, 본 개시는 Fc 변이형을 제공하는데, 이때, Fc 부위는 Kabat에 기재된 EU 인덱스로 번호를 매길 때 428 및 434번 위치에 비 자연적으로 발생하는 아미노산을 포함한다. 특정 양태에서, 이러한 Fc 부위는 428L, 434S를 포함한다. 미국 특허번호 8,088,376 참조.

[0136]

인간화 항체의 프레임워크 및 CDR 부위는 모 서열에 정확히 상응할 필요가 없다. 예컨대, 공여자 CDR 또는 공통 프레임워크는 해당 자리에서 CDR 또는 프레임워크 잔기가 공통 항체 또는 공여자 항체에 상응하지 않도록 적어도 하나의 잔기의 치환, 삽입 또는 결실에 의해 돌연변이화될 수 있다. 그러나 이러한 돌연변이는 바람직하게는 광범위하지는 않다. 일반적으로, 인간화 항체 잔기의 적어도 75%는 모 프레임워크 부위(FR) 및 CDR 서열의 그것들에 상응할 것이며, 더 자주 90%, 가장 바람직하게는 95%를 초과하여 상응할 것이다. 인간화 항체는 CDR 그래프팅(유럽 특허번호 EP 239,400; 국제공개번호 WO 91/09967; 및 미국 특허번호 5,225,539, 5,530,101, 및 5,585,089), 베니어링 또는 리스페이싱(유럽 특허번호 EP 592,106 및 EP 519,596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka *et al.*, 1994, *Protein Engineering* 7(6):805-814; 및 Roguska *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:969-973), 체인 셔플링(미국 특허번호 5,565,332) 및 예컨대 미국 특허번호 6,407,213, 5,766,886, 5,585,089, 국제공개번호 WO 9317105, Tan *et al.*, 2002, *J. Immunol.* 169:1119-25, Caldas *et al.*, 2000, *Protein Eng.* 13:353-60, Morea *et al.*, 2000, *Methods* 20:267-79, Baca *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.* 272:10678-84, Roguska *et al.*, 1996, *Protein Eng.* 9:895-904, Couto *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55 (23 Supp):5973s-5977s, Couto *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55:1717-22, Sandhu, 1994, *Gene* 150:409-10, Pedersen *et al.*, 1994, *J. Mol. Biol.* 235:959-73, Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-525, Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332:323, and Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596에 개시된 기법을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 당해 분야에 공지된 다양한 기법을 이용하여 제조될 수 있다. 자주, 프레임워크 부위의 프레임워크 잔기는 항원 결합을 변경하기 위해서, 바람직하게는 개선하기 위해서 CDR 공여자 항체로부터의 상응하는 잔기로 치환될 것이다. 이들 프레임워크 치환은 당해 분야에 잘 알려져 있는 방법에 의해, 예컨대, 항원 결합에 중요한 프레임워크 잔기를 확인하기 위한 CDR과 프레임워크 잔기의 상호 작용의 모델링 및 특정 위치에서 통례를 벗어난 프레임워크 잔기를 확인하기 위한 서열 비교에 의해서 확인된다(예컨대, Queen *et al.*, 미국 특허번호 5,585,089; 미국 공개 번호 2004/0049014 및 2003/0229208; 미국 특허번호 6,350,861; 6,180,370; 5,693,762; 5,693,761; 5,585,089; 및 5,530,101 및 Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332:323 참조).

[0137]

항체는 폴리펩티드의 제조에 유용한 당해 분야에 공지된 임의의 방법에 의해, 예컨대, 시험관 내 합성, 재조합 DNA 생산 등으로 제조될 수 있다. 바람직하게는, 인간화 항체는 재조합 DNA 기술에 의해 제조된다. 항체는 재조합 면역 글로불린 발현 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 인간화 항체를 포함하는 면역 글로불린 분자의 재조합 생산은 미국 특허번호 4,816,397(Boss 등), 미국 특허번호 6,331,415 및 4,816,567(모두 Cabilly 등), 영국 특허 GB 2,188,638(Winter 등), 및 영국 특허 GB 2,209,757에 기술되어 있다. 인간화 면역 글로불린을 포함하는 면역 글로불린의 재조합 발현을 위한 기법은 Goeddel *et al.*, *Gene Expression Technology Methods in Enzymology* Vol. 185 Academic Press (1991) 및 Borreback, *Antibody Engineering*, W. H. Freeman (1992)에서도 찾아볼 수 있다. 재조합 항체의 생성, 설계 및 발현에 관한 추가적인 정보는 Mayforth, *Designing Antibodies*, Academic Press, San Diego(1993)에서 찾아볼 수 있다.

[0138]

재조합 키메라 항체의 제조를 위한 예시적인 과정은 다음을 포함할 수 있다: a) 종래의 분자생물학 방법에 의해서 쥐의 항-인간 H7CR 단일 클론성 항체의 CDR 및 가변 부위가 인간 면역 글로불린으로부터 유래된 Fc 부위에 융합되는 항체 중쇄를 암호화하고 발현하는 발현 벡터를 구축함으로써, 키메라 항체 중쇄의 발현을 위한 벡터를 제조하는 것; b) 종래의 분자생물학 방법에 의해서 쥐의 항-인간 H7CR 단일 클론성 항체의 항체 경쇄를 암호화하고 발현하는 발현 벡터를 구축함으로써, 키메라 항체 경쇄의 발현을 위한 벡터를 제조하는 것; c) 종래의 분자생물학 방법에 의해서 발현 벡터를 숙주 세포에 전달하여 키메라 항체의 발현을 위한 형질 감염된 숙주 세포를 생산하는 것; 및 d) 종래의 세포 배양 기법에 의해서 형질 감염된 세포를 배양하여 키메라 항체를 생산하는 것.

[0139]

재조합 인간화 항체의 제조를 위한 예시적인 과정은 다음을 포함할 수 있다: a) 종래의 분자생물학 방법에 의해

서 공여자 항체 결합 특이성을 보유하는 데 필요한 가변 부위 프레임워크의 최소 부분 및 CDR이 쥐의 항-인간 H7CR 단일 클론성 항체와 같은 비 인간 면역 글로불린으로부터 유래되고, 항체의 나머지 부분은 인간 면역 글로불린으로부터 유래되는 항-인간 H7CR 항체 중쇄를 암호화하고 발현하는 발현 벡터를 구축함으로써, 인간화 항체 중쇄의 발현을 위한 벡터를 제조하는 것; b) 종래의 분자생물학 방법에 의해서 공여자 항체 결합 특이성을 보유하는 데 필요한 가변 부위 프레임워크의 최소 부분 및 CDR이 쥐의 항-인간 H7CR 단일 클론성 항체와 같은 비 인간 면역 글로불린으로부터 유래되고, 항체의 나머지 부분은 인간 면역 글로불린으로부터 유래되는 항체 경쇄를 암호화하고 발현하는 발현 벡터를 구축함으로써, 인간화 항체 경쇄의 발현을 위한 벡터를 제조하는 것; c) 종래의 분자생물학 방법에 의해서 발현 벡터를 숙주 세포에 전달하여 인간화 항체의 발현을 위한 형질 감염된 숙주 세포를 생산하는 것; 및 d) 종래의 세포 배양 기술에 의해서 형질 감염된 세포를 배양하여 인간화 항체를 생산하는 것.

[0140]

들 중 어느 하나의 예시적인 방법과 관련하여, 상이한 선택 가능한 마커를 함유할 수 있지만, 중쇄 및 경쇄 암호화 서열을 제외하고는 바람직하게는 동일한, 이러한 발현 벡터들로 숙주 세포를 공동 형질 감염시킬 수 있다. 이 과정은 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 동등한 발현을 제공한다. 대안적으로는, 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드를 암호화하는 단일 벡터가 이용될 수 있다. 중쇄 및 경쇄의 암호화 서열은 cDNA 또는 게놈 DNA 또는 이들 모두를 포함할 수 있다. 재조합 항체를 발현하는데 이용되는 숙주 세포는 대장균과 같은 박테리아 세포, 또는 더욱 바람직하게는 진핵 세포(예컨대, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 HEK-293 세포)일 수 있다. 발현 벡터의 선택은 숙주 세포의 선택에 달려 있으며, 선택된 숙주 세포에서 원하는 발현 및 조절 특성을 나타내도록 선택될 수 있다. 이용될 수 있는 기타 세포주로는 CHO-K1, NS0 및 PER.C6(크루셀(Crucell), 네덜란드 레이덴)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0141]

개시된 항체들 중 임의의 항체는 당업자에게 잘 알려져 있는 기법을 이용하여 항-유전형(idiotype) 항체를 생성하는 데 이용될 수 있다(예컨대, Greenspan, N.S. *et al.* (1989) "Idiotypes: Structure And Immunogenicity," FASEB J. 7:437-444; 및 Nisioff, A. (1991) "Idiotypes: Concepts And Applications," J. Immunol. 147(8):2429-2438 참조).

[0142]

개시된 항체들의 결합 특성은, 원한다면, 이러한 원하는 특성을 나타내는 변이형에 대한 스크리닝에 의해서 더 개선될 수 있다. 예를 들어, 이러한 항체는 당해 분야에 공지된 다양한 파지 디스플레이 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 파지 디스플레이 방법에서는, 기능 항체 도메인이 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 지닌 파지 입자의 표면에 디스플레이된다. 특정 구형예에서, 이러한 파지는, 레퍼토리 또는 조합 항체 라이브러리(예컨대, 인간 또는 쥐)로부터 발현된, Fab 및 Fv 또는 이황화 결합 안정화 Fv와 같은, 항원 결합 도메인을 디스플레이하는 데에 활용될 수 있다. 관심 있는 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 발현하는 파지는, 예컨대, 라벨이 부착된 항원 또는 고체 표면이나 비드에 결합되거나 포획된 항원을 이용하여, 항원으로 선택되거나 확인될 수 있다. 이들 방법에 이용되는 파지는 전형적으로 fd 및 M13을 포함하는 사상 파지이다. 항원 결합 도메인은 파지 유전자 III 또는 유전자 VIII 단백질 중 어느 하나에 재조합 융합된 단백질로서 발현된다. 면역 글로불린 또는 이의 단편을 제조하는데 이용될 수 있는 파지 디스플레이 방법의 예로는 Brinkman, U. *et al.* (1995) "Phage Display Of Disulfide-Stabilized Fv Fragments," J. Immunol. Methods, 182:41-50, 1995; Ames, R.S. *et al.* (1995) "Conversion Of Murine Fabs Isolated From A Combinatorial Phage Display Library To Full Length Immunoglobulins," J. Immunol. Methods, 184:177-186; Kettleborough, C.A. *et al.* (1994) "Isolation Of Tumor Cell-Specific Single-Chain Fv From Immunized Mice Using Phage-Antibody Libraries And The Re-Construction Of Whole Antibodies From These Antibody Fragments," Eur. J. Immunol., 24:952-958, 1994; Persic, L. *et al.* (1997) "An Integrated Vector System For The Eukaryotic Expression Of Antibodies Or Their Fragments After Selection From Phage Display Libraries," Gene, 187:9-18; Burton, D.R. *et al.* (1994) "Human Antibodies From Combinatorial Libraries," Adv. Immunol. 57:191-280; PCT 공개 WO 92/001047; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; 및 미국 특허번호 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 및 5,969,108에 개시된 것들을 포함한다.

[0143]

위의 참고문헌에 기술된 바와 같이, 파지 선택 후, 파지로부터 항체를 암호화하는 부위가 분리되어, 인간화 항체 또는 임의의 기타 원하는 단편을 포함하는, 전체 항체를 생성하는 데 이용될 수 있으며, 예컨대, 아래에 상세히 기술된 바와 같이, 포유류 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모 및 박테리아를 포함하는, 임의의 원하는 숙주에서 발현될 수 있다. 예를 들어, Fab, Fab' 및 F(ab')₂ 단편을 재조합 생성하는 기법 또한 (PCT 공개 WO

92/22324; Mullinax, R.L. *et al.* (1992) "Expression Of A Heterodimeric Fab Antibody Protein In One Cloning Step," *BioTechniques*, 12(6):864-869; 및 Sawai *et al.* (1995) "Direct Production Of The Fab Fragment Derived From The Sperm Immobilizing Antibody Using Polymerase Chain Reaction And cDNA Expression Vectors," *Am. J. Reprod. Immunol.* 34:26-34; 및 Better, M. *et al.* (1988) "Escherichia coli Secretion Of An Active Chimeric Antibody Fragment," *Science* 240:1041-1043에 개시된 것들과 같은) 당해 분야에 공지된 방법을 이용하여 사용될 수 있다. 단일 사슬 Fv 및 항체를 생산하는 데 이용될 수 있는 기법들의 예로는 미국 특허번호 4,946,778 및 5,258,498; Huston, J.S. *et al.* (1991) "Protein Engineering Of Single-Chain Fv Analogs And Fusion Proteins," *Methods in Enzymology* 203:46-88; Shu, L. *et al.*, "Secretion Of A Single-Gene-Encoded Immunoglobulin From Myeloma Cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 90:7995-7999; 및 Skerra, A. *et al.* (1988) "Assembly Of A Functional Immunoglobulin Fv Fragment In Escherichia coli," *Science* 240:1038-1040에 기술된 것들을 포함한다.

[0144]

파지 디스플레이 기술은 H7CR에 대한 개시된 항체의 친화도를 증가시키는 데에 이용될 수 있다. 이러한 기법은 조합 방법에 이용될 수 있는 고 친화도 항체를 획득하는 데에 유용하다. 친화도 성숙이라고 지칭되는 이러한 기술은 돌연변이 유발 또는 CDR 위킹 및 초기 항체 또는 모 항체와 비교할 때 항원에 대해 더 높은 친화도로 결합하는 항체들을 식별하기 위하여 이러한 수용체 또는 리간드(또는 이의 세포외 도메인) 또는 이의 항원성 단편을 이용하는 재선택을 이용한다(예컨대, Glaser, S.M. *et al.* (1992) "Antibody Engineering By Codon-Based Mutagenesis In A Filamentous Phage Vector System," *J. Immunol.* 149:3903-3913 참조). 단일 뉴클레오티드 보다는 전체 코돈을 돌연변이 유발하는 것이 아미노산 돌연변이의 반-무작위 레퍼토리를 초래한다. 각각이 단일 CDR에서 단일한 아미노산 변경의 차이가 있고, 각각의 CDR 잔기에 대해 각각이 가능한 아미노산 치환을 나타내는 변이형을 함유하는, 변이형 클론들의 풀로 이루어지는 라이브러리가 구축될 수 있다. 고정된 돌연변이체를 라벨이 부착된 항원과 접촉시킴으로써 항원에 대해 결합 친화도가 증가된 돌연변이체가 스크리닝될 수 있다. 당해 분야에 공지된 임의의 스크리닝 방법은 항원에 대해 증가된 결합 활성을 나타내는 돌연변이 항체를 확인하는 데에 이용될 수 있다(예컨대, ELISA)(예컨대, Wu, H. *et al.* (1998) "Stepwise In Vitro Affinity Maturation Of Vitaxin, An Alphav Beta3-Specific Humanized Mab," *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95(11):6037-6042; Yelton, D.E. *et al.* (1995) "Affinity Maturation Of The BR96 Anti-Carcinoma Antibody By Codon-Based Mutagenesis," *J. Immunol.* 155:1994-2004 참조). 경쇄를 무작위화하는 CDR 위킹이 이용될 수 있다(Schier *et al.* (1996) "Isolation Of Picomolar Affinity Anti-C-ErbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site," *J. Mol. Biol.* 263:551-567 참조).

[0145]

향상된 CDR을 확인하기 위하여 무작위 돌연변이 유발도 이용될 수 있다. 파지 디스플레이 기술은 대안적으로 CDR 친화도를 증가(또는 감소)시키는 데에 이용될 수 있다. 친화도 성숙이라 지칭되는 이러한 기술은 돌연변이 유발 또는 "CDR 위킹"을 이용하고, 재선택은 초기 항체 또는 모 항체와 비교할 때, 항원에 대해 더 높은(또는 더 낮은) 친화도로 결합하는 CDR을 보유하는 항체들을 확인하기 위하여 표적 항원 또는 이의 항원성 단편을 이용한다(예컨대, Glaser, S.M. *et al.* (1992) "Antibody Engineering By Codon-Based Mutagenesis In A Filamentous Phage Vector System," *J. Immunol.* 149:3903-3913 참조). 단일 뉴클레오티드보다는 전체 코돈을 돌연변이 유발하는 것이 아미노산 돌연변이의 반-무작위 레퍼토리를 초래한다. 각각이 단일 CDR에서 단일한 아미노산 변경의 차이가 있고, 각각의 CDR 잔기에 대해 각각이 가능한 아미노산 치환을 나타내는 변이형을 함유하는, 변이형 클론들의 풀로 이루어지는 라이브러리가 구축될 수 있다. 고정된 돌연변이체를 라벨이 부착된 항원과 접촉시킴으로써 항원에 대해 결합 친화도가 증가된(또는 감소된) 돌연변이체가 스크리닝될 수 있다. 당해 분야에 공지된 임의의 스크리닝 방법은 항원에 대해 증가된(또는 감소된) 결합 활성을 나타내는 돌연변이 항체를 확인하는 데에 이용될 수 있다(예컨대, ELISA)(Wu, H. *et al.* (1998) "Stepwise In Vitro Affinity Maturation Of Vitaxin, An Alphav Beta3-Specific Humanized Mab," *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95(11):6037-6042; Yelton, D.E. *et al.* (1995) "Affinity Maturation Of The BR96 Anti-Carcinoma Antibody By Codon-Based Mutagenesis," *J. Immunol.* 155:1994-2004 참조). 경쇄를 무작위화하는 CDR 위킹이 이용될 수 있다(Schier *et al.* (1996) "Isolation Of Picomolar Affinity Anti-C-ErbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site," *J. Mol. Biol.* 263:551-567 참조).

[0146]

이러한 친화도 성숙을 달성하는 방법은 예를 들어, Krause, J.C. *et al.* (2011) "An Insertion Mutation That Distorts 항체 Binding Site Architecture Enhances Function Of A Human Antibody," *MBio.* 2(1) pii: e00345-10. doi: 10.1128/mBio.00345-10; Kuan, C.T. *et al.* (2010) "Affinity-Matured Anti-Glycoprotein

NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas,” Int. J. Cancer 10.1002/ijc.25645; Hackel, B.J. et al. (2010) “*Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder Functionality Landscapes,*” J. Mol. Biol. 401(1):84-96; Montgomery, D.L. et al. (2009) “*Affinity Maturation And Characterization Of A Human Monoclonal Antibody Against HIV-1 gp41,*” MAbs 1(5):462-474; Gustchina, E. et al. (2009) “*Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2 Loop Of A Monoclonal Fab Derived From A Synthetic Naive Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth,*” Virology 393(1):112-119; Finlay, W.J. et al. (2009) “*Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti-RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions,*” J. Mol. Biol. 388(3):541-558; Bostrom, J. et al. (2009) “*Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development,*” Methods Mol. Biol. 525:353-376; Steidl, S. et al. (2008) “*In Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification,*” Mol. Immunol. 46(1):135-144; and Barderas, R. et al. (2008) “*Affinity maturation of antibodies assisted by in silico modeling,*” Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 105(26):9029-9034에 기술되어 있다.

[0147] 위에 기술된 임의의 항체 및 이의 항원 결합 단편의 “유도체”의 제조 및 이용 또한 제공된다.

[0148] 용어 “유도체”는 항원에 면역 특이적으로 결합하지만, “모”(또는 야생형) 분자에 비하여 하나, 둘, 셋, 넷, 다섯 개 이상의 아미노산 치환, 부가, 결실 또는 변형을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 지칭한다. 이러한 아미노산 치환 또는 부가는 자연적으로 발생하는 (즉, DNA 암호화된) 또는 비 자연적으로 발생하는 아미노산 잔기를 도입할 수 있다. 용어 “유도체”는 예를 들어, 항체 1.3, 4.5 또는 7.8 중 임의의 항체의 키메라 또는 인간화 변이형뿐만 아니라, 변경된 CH1, 힌지, CH2, CH3 또는 CH4를 가지고 있는 변이형을 포함하여, 예를 들어, 개선된 또는 손상된 효과기 또는 결합 특성을 나타내는 변이형 Fc 부위를 가지고 있는 항체 등을 형성한다. 용어 “유도체”는 추가적으로 비 아미노산 변형을 포함하며, 예를 들어, 글리코실화(예컨대, 만노오스, 2-N-아세틸글루코사민, 갈락토오스, 펙토오스, 글루코오스, 시알산, 5-N-아세틸뉴라민산, 5-글리코뉴라민산 등의 함량이 변경됨), 아세틸화, 페길화, 포스포릴화, 아미드화, 공지된 보호/차단 기에 의한 유도체화, 단백질 가수 분해 절단, 세포성 리간드 또는 다른 단백질에 연결 등이 될 수 있는 아미노산을 포괄한다. 일부 구현예에서, 변경된 탄수화물 변형은 다음 중 하나 이상을 조절한다: 항체의 가용화, 항체의 세포 이하 수송 및 분비의 촉진, 항체 조립의 촉진, 입체형태적 완전성 및 항체 매개 효과기 기능. 특정 구현예에서, 변경된 탄수화물 변형은 탄수화물 변형을 결여하는 항체에 비해서 항체 매개 효과기 기능을 증진시킨다. 변경된 항체 매개 효과기 기능을 가져오는 탄수화물 변형은 당해 분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, Shields, R.L. et al. (2002) “*Lack Of Fucose On Human IgG N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human FcγRIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity,*” J. Biol. Chem. 277(30): 26733-26740; Davies J. et al. (2001) “*Expression Of GnTIII In A Recombinant Anti-CD20 CHO Production Cell Line: Expression Of Antibodies With Altered Glycoforms Leads To An Increase In ADCC Through Higher Affinity For FC γRIII,*” Biotechnology & Bioengineering 74(4): 288-294 참조). 탄수화물 함량을 변경하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 예컨대, Wallick, S.C. et al. (1988) “*Glycosylation Of A VH Residue Of A Monoclonal Antibody Against Alpha (1-6) Dextran Increases Its Affinity For Antigen,*” J. Exp. Med. 168(3): 1099-1109; Tao, M.H. et al. (1989) “*Studies Of Aglycosylated Chimeric Mouse-Human IgG. Role Of Carbohydrate In The Structure And Effector Functions Mediated By The Human IgG Constant Region,*” J. Immunol. 143(8): 2595-2601; Routledge, E.G. et al. (1995) “*The Effect Of Aglycosylation On The Immunogenicity Of A Humanized Therapeutic CD3 Monoclonal Antibody,*” Transplantation 60(8):847-53; Elliott, S. et al. (2003) “*Enhancement Of Therapeutic Protein In Vivo Activities Through Glycoengineering,*” Nature Biotechnol. 21:414-21; Shields, R.L. et al. (2002) “*Lack Of Fucose On Human IgG N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human FcγRIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity,*” J. Biol. Chem. 277(30): 26733-26740 참조.

[0149] 일부 구현예에서, 인간화 항체는 유도체이다. 이러한 인간화 항체는 하나 이상의 비 인간 CDR에 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 부가를 포함한다. 인간화 항체 유도체는 비 유도체 인간화 항체와 비교할 때 실질적으로 동일한 결합, 더 우수한 결합, 또는 더 나쁜 결합을 나타낼 수 있다. 특정 구현예에서, CDR의 하나, 둘, 셋, 넷 또는 다섯 개의 아미노산 잔기들이 치환, 결실 또는 부가되었다(즉, 돌연변이되었다).

- [0150] 유도체 항체 또는 항체 단편은 특이적 화학적 절단, 아세틸화, 제형화, 투니카마이신의 대사 합성 등을 포함하나 이에 한정되지 않는, 당업자에게 공지된 기법을 이용하여 화학적 변형에 의해서 변형될 수 있다. 일 구현예에서, 항체 유도체는 모 항체와 유사한 또는 동일한 기능을 보유할 것이다. 다른 구현예에서, 항체 유도체는 모 항체에 비해서 변경된 활성을 나타낼 것이다. 예를 들어, 유도체 항체(또는 이의 단편)는 그 에피토프에 더 강하게 결합할 수 있거나, 모 항체보다 단백질 가수분해에 더 내성을 나타낼 수 있다.
- [0151] 유도체화 항체에서 치환, 부가 또는 결실은 항체의 Fc 부위에 있을 수 있으며, 이로써 하나 이상의 Fc γ R에 대한 항체의 결합 친화도를 변경하는 작용을 할 수 있다. 하나 이상의 Fc γ R에 대해 변경된 결합을 나타내도록 항체를 변형하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며, 예컨대, PCT 공개번호 WO 04/029207, WO 04/029092, WO 04/028564, WO 99/58572, WO 99/51642, WO 98/23289, WO 89/07142, WO 88/07089 및 미국 특허번호 5,843,597 및 5,642,821을 참조한다. 일부 구현예는 분자가 감소된 Fc 수용체(FcR) 결합 활성을 나타내거나 Fc 수용체(FcR) 결합 활성을 전혀 나타내지 않거나, 향상된 항체 의존성 세포 매개 세포 독성(ADCC) 또는 보체 의존성 세포 독성(CDC) 활성을 나타내도록 Fc 부위가 결실된 항체(예를 들어, Fab 또는 F(ab)₂ 등) 또는 변경된 항체를 포괄한다. 일부 구현예는 활성화 Fc γ R, 예컨대, Fc γ IIIA에 대해 변경된 친화도를 나타내는 항체들을 포괄한다. 바람직하게는 이러한 변형은 변경된 Fc 매개 효과기 기능도 나타낸다. Fc 매개 효과기 기능에 영향을 미치는 변형은 당해 분야에 잘 알려져 있다(미국 특허번호 6,194,551 및 WO 00/42072 참조). 일 특정 구현예에서, Fc 영역의 변형은 변경된 항체 매개 효과기 기능, 다른 Fc 수용체(예컨대, Fc 활성화 수용체)에 대한 변경된 결합, 변경된 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC) 활성, 변경된 C1q 결합 활성, 변경된 보체 의존성 세포 독성 활성(CDC), 포식 세포성 활성 또는 이의 임의의 조합을 나타내는 항체를 가져온다.
- [0152] 유도체화 항체는 포유류, 바람직하게 인간에서 모 항체의 반감기(예컨대, 혈청 반감기)를 변경하는 데에 이용될 수 있다. 바람직하게는, 이러한 변경은 15일 초과, 바람직하게는 20일 초과, 25일 초과, 30일 초과, 35일 초과, 40일 초과, 45일 초과, 2개월 초과, 3개월 초과, 4개월 초과, 또는 5개월 초과와 반감기를 가져올 것이다. 포유류, 바람직하게는 인간에서, 인간화 항체 또는 이의 단편의 증가된 반감기는 포유류에서 상기 항체 또는 항체 단편의 더 높은 혈청 역가를 가져오며, 따라서 상기 항체 또는 항체 단편의 투여 빈도를 감소시키고/감소시키거나, 투여되는 상기 항체 또는 항체 단편의 농도를 감소시킨다. 증가된 생체 내 반감기를 나타내는 항체 또는 이의 단편은 당업자에게 공지된 기법에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 생체 내 반감기가 증가된 항체 또는 이의 단편은 Fc 도메인과 FcRn 수용체 사이의 상호 작용에 수반되는 것으로 확인된 아미노산 잔기들을 변형함으로써(예컨대, 치환, 결실 또는 부가함으로써) 생성될 수 있다. 인간화 항체는 생물학적 반감기를 증가시키고자 유전자 조작될 수 있다(예컨대, 미국 특허번호 6,277,375 참조). 예를 들어, 인간화 항체는 증가된 생체 내 또는 혈청 반감기를 나타내도록 Fc-헨지 도메인에서 유전자 조작될 수 있다.
- [0153] 생체 내 반감기가 증가된 항체 또는 이의 단편은 상기 항체 또는 항체 단편에 고 분자량 폴리에틸렌글리콜(PEG)과 같은 중합체 분자를 부착함으로써 생성될 수 있다. PEG는 상기 항체 또는 항체 단편에 다기능성 링커로, 또는 다기능성 링커 없이 부착될 수 있는데, 어느 경우든 상기 항체 또는 항체 단편의 N- 또는 C-말단에 대한 PEG의 부위 특이적 공유결합을 통해서 또는 리신 잔기 상에 존재하는 엡실론-아미노기를 통해서 이루어진다. 생물학적 활성이 최소로 상실되는 선형 또는 가지형 중합체 유도체화가 이용될 것이다. 항체에 대한 PEG 분자의 적절한 공유결합을 보장하기 위하여 공유결합 정도를 SDS-PAGE 및 질량 분광분석법에 의해 면밀히 모니터링할 것이다. 반응하지 않은 PEG는 예컨대, 크기 배제 또는 이온 교환 크로마토그래피에 의해 항체-PEG 공유결합으로부터 분리될 수 있다.
- [0154] 또한, 이러한 항체는 실질적으로 면역 반응 없이 포유류 순환계에 주사될 수 있는 조성물을 제공하기 위하여, Davis 등(미국 특허번호 4,179,337 참조)이 기술한 방법 및 커플링제로 변형될 수 있다.
- [0155] 인간화 항체의 프레임워크 잔기들은 변형될 수 있다. 프레임워크 부위의 프레임워크 잔기들은 항원 결합을 변경하기 위하여, 바람직하게는 향상시키기 위하여, CDR 공여자 항체로부터 상응하는 잔기로 치환될 수 있다. 이러한 프레임워크 치환은 당해 분야에 잘 알려져 있는 방법에 의해, 예컨대, 항원 결합에 중요한 프레임워크 잔기를 확인하기 위한 CDR과 프레임워크 잔기의 상호 작용 모델링 및 특정 위치에서 통로를 벗어난 프레임워크 잔기를 확인하기 위한 서열 비교에 의해 확인된다. (예컨대, 미국 특허번호 5,585,089; 및 Riechmann, L. *et al.* (1988) "Reshaping Human Antibodies For Therapy," Nature 332:323-327 참조).
- [0156] 또한, 이중 분자(즉, 관련 없는 분자)에 재조합 융합되거나 화학적으로 공유결합되는(공유적 및 비공유적 공유결합 포함) 항-인간 H7CR 항체 (더욱 바람직하게는, 인간화 항체) 및 이의 항원 결합 단편이 제공된다. 이러한 융합은 반드시 직접적일 필요는 없지만, 링커 서열을 통해 일어날 수 있다.

[0157]

일 구현예에서, 이러한 이중 분자들은 적어도 10개, 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 60개, 적어도 70개, 적어도 80개, 적어도 90개 또는 적어도 100개 아미노산을 가지고 있는 폴리펩티드이다. 이러한 이중 분자는 대안적으로는 (아브린, 리신 A, 슈도모나스 엑소톡신(즉, PE-40), 디프테리아 독소, 리신, 겔로닌, 또는 미국 자리공 항바이러스 단백질과 같은) **독소**, (중양 괴사 인자, 인터페론(예컨대, α -인터페론, β -인터페론), 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장인자, 조직 플라스미노겐 활성화제, 또는 세포자멸제(예를 들어, 중양 괴사 인자- α , 중양 괴사 인자- β)와 같은) **단백질**, (예를 들어, 림포카인(예컨대, 인터류킨-1(“IL-1”), 인터류킨-2(“IL-2”), 인터류킨-6(“IL-6”)), 과립구 대식세포 콜로니 자극인자(“GM-CSF”), 과립구 콜로니 자극인자(“G-CSF”), 또는 대식세포 콜로니 자극인자(“M-CSF”), 또는 성장 인자(예컨대, 성장 호르몬(“GH”))와 같은) **생물학적 반응 변형제**, **세포독소**(예컨대, 세포증식 억제제 또는 살세포제, 파클리탁셀, 시토크알린 B, 그라미시딘 D, 에티뎀 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜치신, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드로록시 안트라신 디온, 미토크산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤 및 류마인 및 이의 유사체 또는 상동체), **항대사물질**(예컨대, 메토포레세이트, 6-메르캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), **알킬화제**(예컨대, 메클로레타민, 티오에파클로람부실, 펠팔란, BiCNU®카무스틴; BSNU) 및 로무스틴(CCNU), 시클로토스파미드, 부설판, 디프로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C 및 시스디클로로디아민 플레티늄(II)(DDP) 시스플라틴), 안트라시클린(예컨대, 다우노루비신(이전에는 다우노마이신) 및 독소루비신), **항생물질**(예컨대, 탁티노마이신(이전에는 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신(AMC)), 또는 **항 유사분열제**(예컨대, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)와 같은, 효소, 호르몬, 세포 표면 수용체, 약물 모이어티일 수 있다.

[0158]

이러한 치료적 모이어티를 항체에 콘주게이트시키는 기법은 잘 알려져 있다. 예컨대, Arnon *et al.*, “*Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy*”, in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), 1985, pp. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom *et al.*, “*Antibodies For Drug Delivery*”, in *Controlled Drug Delivery (2nd Ed.)*, Robinson *et al.* (eds.), 1987, pp. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, “*Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review*”, in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), 1985, pp. 475-506); “*Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy*”, in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), 1985, pp. 303-16, Academic Press; and Thorpe *et al.* (1982) “*The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates*,” *Immunol. Rev.* 62:119-158 참조.

[0159]

일 구현예에서, 항체 또는 융합 분자는 Fc 부분을 포함한다. 이러한 분자의 Fc 부분은 이소형 또는 하위 부류가 다를 수 있고, 키메라 또는 하이브리드일 수 있고/있거나, 예를 들어, 효과기 기능, 반감기 조절, 조직 접근성을 향상시키기 위하여, 안정성과 같은 생물물리적 특성을 증가시키기 위하여, 그리고 생산의 효율성을 향상시키기 위하여(그리고 비용이 덜 들게 하기 위하여) 변형시킬 수 있다. 개시된 융합 단백질의 구축에 유용한 여러 변형 및 그것들을 만드는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, Mueller, J.P. *et al.* (1997) “*Humanized Porcine VCAM-Specific Monoclonal Antibodies With Chimeric IgG2/G4 Constant Regions Block Human Leukocyte Binding To Porcine Endothelial Cells*,” *Mol. Immun.* 34(6):441-452, Swann, P.G. (2008) “*Considerations For The Development Of Therapeutic Monoclonal Antibodies*,” *Curr. Opin. Immun.* 20:493-499 (2008), and Presta, L.G. (2008) “*Molecular Engineering And Design Of Therapeutic Antibodies*,” *Curr. Opin. Immun.* 20:460-470 참조. 일부 구현예에서, Fc 부위는 본래의 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 Fc 부위이다. 일부 구현예에서, Fc 부위는 하이브리드, 예를 들어, IgG2/IgG4 Fc 불변 부위들로 이루어지는 키메라이다. Fc 부위에 대한 변형은 Fc 감마 수용체 및 보체에 대한 결합을 방지하기 위하여 변형된 IgG4, 하나 이상의 Fc 감마 수용체에 대한 결합을 향상시키기 위하여 변형된 IgG1, 효과기 기능(아미노산 변화)을 최소화하기 위하여 변형된 IgG1, (전형적으로는 발현 숙주를 바꿈으로써) 변경된 글리칸/무 글리칸의 IgG1, 그리고 FcRn에 대한 변경된 pH 의존성 결합을 나타내는 IgG1, 및 안정성을 개선하기 위하여 힌지 부위에서 #228에 있는 아미노산의 세린이 프롤린으로 변경된(S228P) IgG4를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. Fc 부위는 전체 힌지 부위, 또는 전체 힌지 부위 미만을 포함할 수 있다.

[0160]

비 호지킨 림프종 또는 발렌스트롬 거대글로불린혈증에 대해, 리투시맵(CD20에 대한 키메라 마우스/인간 IgG1 단일 클론성 항체)으로 치료된 환자에서의 치료 결과는 인간 IgG1의 Fc 도메인에 대해 뚜렷한 고유의 친화도를 나타내는 Fc γ 수용체의 대립 형질 변이형의 개체별 발현과 상관관계가 있었다. 특히, 저 친화도의 활성화 Fc

수용체 CD16A(Fc γ RIIIA)의 고 친화도 대립 형질이 있는 환자들은 더 높은 반응물을 보였고, 비 호지킨 림프종의 경우 무진행 생존을 향상시켰다. 다른 구현예에서, Fc 도메인은 저 친화도의 저해성 Fc 수용체 CD32B(Fc γ RIIB)에 대한 결합을 감소시키고, 저 친화도의 활성화 Fc 수용체 CD16A(Fc γ RIIIA)에 대한 결합의 야생형 수준을 보유하거나 이러한 결합을 증진시키는, 하나 이상의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 함유할 수 있다.

[0161]

또 다른 구현예는 FcR에 대한 결합을 감소시켜 반감기를 증가시키는, IgG2-4 하이브리드 및 IgG4 돌연변이체를 포함한다. 대표적인 IG2-4 하이브리드와 IgG4 돌연변이체는 Angal, S. *et al.* (1993) “A Single Amino Acid Substitution Abolishes The Heterogeneity Of Chimeric Mouse/Human (IgG4) Antibody,” *Molec. Immunol.* 30(1):105-108; Mueller, J.P. *et al.* (1997) “Humanized Porcine VCAM-Specific Monoclonal Antibodies With Chimeric IgG2/G4 Constant Regions Block Human Leukocyte Binding To Porcine Endothelial Cells,” *Mol. Immun.* 34(6):441-452; 및 미국 특허번호 6,982,323에 기술되어 있다. 일부 구현예에서, IgG1 및/또는 IgG2 도메인은 결실되며, 예를 들어, Angal, s. 등은 세린 241이 프롤린으로 교체된 IgG1 및 IgG2를 기술하고 있다.

[0162]

바람직한 구현예에서, Fc 도메인은 CD16A에 대한 결합을 증진시키는 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 함유한다. 인간 IgG1의 Fc 도메인에서 CD16A와의 결합을 증가시키고 CD32B에 대한 결합을 감소시키는 다수의 치환이 당해 분야에 공지되어 있으며, Stavenhagen, J.B. 등(2007) “Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fc γ Receptors,” *Cancer Res.* 57(18):8882-8890에 기술되어 있다. CD32B에 대한 결합이 감소되고/감소되거나 CD16A에 대한 결합이 증가된 인간 IgG1 Fc 도메인의 예시적인 변이형들은 F243L, R929P, Y300L, V305I 또는 P296L 치환을 함유한다. 이들 아미노산 치환은 임의의 조합으로 인간 IgG1 Fc 도메인에 존재할 수 있다. 일 구현예에서, 인간 IgG1 Fc 도메인 변이형은 F243L, R929P 및 Y300L 치환을 함유한다. 다른 구현예에서는, 인간 IgG1 Fc 도메인 변이형은 F243L, R929P, Y300L, V305I 및 P296L 치환을 함유한다. 또 다른 구현예에서는, 인간 IgG1 Fc 도메인 변이형은 N297Q 치환을 함유하며, 이 돌연변이는 FcR 결합을 파괴한다.

[0163]

기술된 분자들 중 임의의 분자는 정제를 촉진하기 위하여 펩티드와 같은 마커 서열에 융합될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 마커 아미노산 서열은 헥사 히스티딘 펩티드인, 헤마글루티닌 “HA” 태그(이는 인플루엔자 헤마글루티닌 단백질로부터 유래된 에피토프에 상응한다)(Wilson, I.A. *et al.* (1984) “The Structure Of An Antigenic Determinant In A Protein,” *Cell*, 37:767-778)와 “플래그” 태그(Knappik, A. *et al.* (1994) “An Improved Affinity Tag Based On The FLAG Peptide For The Detection And Purification Of Recombinant Antibody Fragments,” *Biotechniques* 17(4):754-761)이다.

[0164]

항체 또는 이의 항원 결합 단편은 진단제 또는 치료제 또는 혈청 반감기가 증가되는 것이 바람직한 임의의 기타 분자에 콘주게이트될 수 있다. 항체는 예컨대, 주어진 치료 계획의 효능을 결정하기 위한 임상 시험 과정의 일부로서, 예를 들어 질병, 장애 또는 감염의 발병이나 진행을 모니터링하기 위하여 진단적으로 (생체 내, 체자리에서(*in situ*) 또는 시험관 내에서) 이용될 수 있다. 검출은 항체를 검출 가능한 물질과 결합시킴으로써 촉진될 수 있다. 검출 가능한 물질의 예로는 다양한 효소, 보결 분자단, 형광 물질, 발광 물질, 생물발광 물질, 방사성 물질, 양전자 방출 금속 및 비 방사성 상자성 금속 이온을 포함한다. 검출 가능한 물질은 당해 분야에 공지된 기법을 이용하여 항체에 직접적으로, 또는 (예를 들어, 당해 분야에 공지된 링커와 같은) 중간체를 통해서 간접적으로 결합되거나 콘주게이트될 수 있다. 예를 들어, 진단제로 사용하기 위한 항체에 콘주게이트 될 수 있는 금속 이온에 대해서는 미국 특허번호 4,741,900 참조. 이러한 진단 및 검출은 다양한 효소, 즉, 서양고추냉이 과산화효소, 알칼리성 포스파타아제, 베타 갈락토시다아제 또는 아세틸콜린에스테라아제를 포함하나 이에 제한되지 않는 효소; 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 보결 분자단 복합체; 옴벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 형광 물질; 루미놀과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 발광 물질; 루시페라아제, 루시페린 및 에쿠오린과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 생물 발광 물질; 비스무스(²¹³Bi), 탄소(¹⁴C), 크롬(⁵¹Cr), 코발트(⁵⁷Co), 플루오르(¹⁸F), 가돌리늄(¹⁵³Gd, ¹⁵⁹Gd), 갈륨(⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), 게르마늄(⁶⁸Ge), 홀름(¹⁶⁶Ho), 인듐(¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In), 요오드(¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), 란타늄(¹⁴⁰La), 루테튬(¹⁷⁷Lu), 망간(⁵⁴Mn), 몰리브데늄(⁹⁹Mo), 팔라듐(¹⁰³Pd), 인(³²P), 프라세오디뮴(¹⁴²Pr), 프로메튬(¹⁴⁹Pm), 레늄(¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re), 로듐(¹⁰⁵Rh), 루테튬(⁹⁷Ru), 사마륨(¹⁵³Sm), 스칸듐(⁴⁷Sc), 셀레늄(⁷⁵Se), 스트론튬

(⁸⁵Sr), 황(³⁵S), 테크네튬(⁹⁹Tc), 티타늄(²⁰¹Ti), 주석(¹¹³Sn, ¹¹⁷Sn), 삼중 수소(³H), 제논(¹³³Xe), 이테르븀(¹⁶⁹Yb, ¹⁷⁵Yb), 이트륨(⁹⁰Y), 아연(⁶⁵Zn)과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 방사성 물질; 다양한 양전자 방출 단층촬영을 이용하는 양전자 방출 금속 및 비 방사성 상자성 금속 이온:을 포함하나, 이에 한정되지 않는 검출 가능한 물질을 항체에 결합시켜 달성될 수 있다.

[0165] 미국 특허번호 4,676,980에서 Segal이 기술한 바와 같이, 이러한 분자들은 제2 항체에 콘주게이트되어 항체 헤테로콘주게이트를 형성할 수 있다. 이러한 헤테로콘주게이트 항체들은 추가적으로 (플루오레세인 등과 같은) 햅텐, 또는 세포성 마커(예컨대, 4-1-BB, B7-H4, B7-H7, CD4, CD8, CD14, CD25, CD27, CD40, CD68, CD163, CTLA4, GITR, LAG-3, OX40, TIM3, TIM4, TLR2, LIGHT 등) 또는 사이토카인(예컨대, IL-7, IL-15, IL-12, IL-4 TGF-베타, IL-10, IL-17, IFNγ, Flt3, BLys) 또는 케모카인(예컨대, CCL21) 등과 결합할 수 있다.

[0166] 이러한 분자들은 고체 지지체에 부착될 수 있으며, 고체 지지체는 표적 항원의, 또는 항체 또는 항원 결합 단편과의 결합을 통해 지지체에 고정된 표적 항원과 결합할 수 있는 기타 분자들의, 면역 분석법 또는 정제에 특히 유용하다. 이러한 고체 지지체로는 유리, 셀룰로오스, 폴리아크릴아미드, 나일론, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드 또는 폴리프로필렌을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0167] 임의의 이러한 항체, 융합 단백질 또는 단편을 암호화하는 핵산 분자(DNA 또는 RNA)뿐만 아니라, 그러한 핵산 분자들을 전달하거나 복제하고, 세포주에서 이러한 항체, 융합 단백질 또는 단편을 발현할 수 있는 (플라스미드와 같은) 벡터 분자들 또한 제공된다. 이러한 핵산은 단일 가닥, 이중 가닥일 수 있고, 단일 가닥 부분과 이중 가닥 부분을 모두 함유할 수 있다.

[0168] D. 바람직한 조절제 조성물

[0169] 본 출원에 사용된 용어 “**조절하다**”는 효과 또는 결과를 바꿀 수 있는 능력에 관한 것이다. 특히, 인간 H7CR과 면역 특이적으로 결합하는 항-인간 H7CR 항체의 인간화 변이형 또는 이의 항원 결합 단편 중 임의의 것 또는 H7CR과 생리 특이적으로 결합하는 분자들은 H7CR 및 이의 동족 리간드 사이의 결합을 조절할 수 있고/조절할 수 있거나, H7CR-동족 리간드 결합의 결과로서 발생하는 신호 전달을 조절할 수 있다.

[0170] 이러한 항체는 H7CR을 항진시키는 효현제 항체일 수 있다. 항진 항체는 H7CR과 결합하여, H7CR을 통한 신호 전달을 자극할 수 있다.

[0171] 일 구현예에서, 이러한 항체, 또는 이의 단편, 또는 융합 분자들은 H7CR과 면역 특이적으로 결합하지만, 시험관 내에서 또는 수용 대상자 또는 환자에서 B7-H7과의 H7CR의 상호 작용을 실질적으로는 차단할 수 없다. 본 출원에 사용된 “**B7-H7과의 H7CR의 상호 작용을 실질적으로 차단할 수 없는**” 분자는, 이러한 분자의 존재가 본 출원에 개시된 임의의 분석법으로 측정했을 때 H7CR - B7-H7 상호 작용을 50% 미만, 더욱 바람직하게는 40% 미만, 더욱 더 바람직하게는 30% 미만, 더욱 더 바람직하게는 20% 미만, 더욱 더 바람직하게는 10% 미만, 더욱 더 바람직하게는 5% 미만, 더욱 더 바람직하게는 1% 미만 약화시키며, 가장 바람직하게는 완전히 이러한 상호 작용을 약화시키는 데에 실패하는 것을 의미한다. 이러한 항체, 단편 및 융합 분자들은 치료제로서, 또는 H7CR(또는 B7-H7) 발현에 대한 진단적, 세포학적 및 조직학적 분석에서 특별한 유용성을 나타낸다. 부가적으로, 다중특이적인 항-H7CR 항체, 항-H7CR 항원 결합 단편 및 이들 각각의, B7-H7 또는 기타 세포 리간드 또는 수용체와 결합하는 부가된 능력을 나타내는 융합 생성물은 이러한 리간드 또는 H7CR을 발현하는 세포에 대한 수용체를 발현하는 세포의 공 편재화(co-localization)를 촉진하는 데에 있어서 특별한 유용성을 나타낸다.

[0172] 제2의 구현예에서, 항체, 또는 이의 단편, 또는 융합 분자들은 H7CR과 면역 특이적으로 결합하고, 시험관 내에서, 또는 수용 대상자 또는 환자에서, B7-H7과의 H7CR의 상호 작용을 실질적으로 차단할 수 있다. 본 출원에 사용된 “**B7-H7과의 H7CR의 상호 작용을 실질적으로 차단할 수 있는**” 분자는, 이러한 분자의 제공이 본 출원에 개시된 임의의 분석법으로 측정했을 때 H7CR - B7-H7 상호 작용을 50% 초과, 더욱 바람직하게는 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 99% 초과하여 약화시키거나, 가장 바람직하게는 이러한 상호 작용을 완전히 약화시키는 것을 의미한다. 이러한 항체, 단편 및 융합 분자는 B7-H7 - H7CR 상호 작용의 생물학적 효과를 약화시키는 데에 특별한 유용성을 나타낸다.

[0173] 바람직한 구현예는 인간화 항체 및 단편 또는 인간 항체 및 단편을 제공한다.

[0174] 가장 바람직하게는, 이러한 분자는 내인성 농도로 발현되어, 대상자의 세포 표면에 배열될 때, H7CR과 결합할 수 있는 충분한 친화도 및 결합 활성을 보유할 것이다. 용어 “**내인성 농도**”는 분자가 정상, 암 또는 병원균 감염된 세포에서 본래 (즉, 발현 벡터 또는 재조합 프로모터 부재 하에) 발현되는 수준을 지칭한다.

[0175] (1)바람직한 설치류 항-인간 H7CR 항체 및 이들의 CDR

[0176] 이러한 분자는, 인간 H7CR에 대해 면역 특이적인 항체를 생산하는 것들에 대한 하이브리도마 라인을 스크리닝한 후, 선택적으로 그러한 라인 중에서 조절 활성(예컨대, 중화 활성, 항진 활성, 변경된 신호 전달 활성 등)을 나타내는 것들을 스크리닝함으로써 제조될 수 있다. 일 구현예에서, 이러한 항체는 햄스터 항-인간 H7CR 클론인 1.3, 4.5 및 7.8이다. 이들 항체는 인간 H7CR과 결합할 수 있고, H7CR의 B7-H7과의 상호 작용을 실질적으로 차단할 수 없다. 항-인간 H7CR 클론에 의해 발현된 항체들을 가변 도메인이 드러나도록 시퀀싱하였다. 가변 도메인의 CDR 서열을 굵은 글자체와 밑줄로 나타내었다:

[0177] 항-인간 H7CR 클론 1.3

[0178] 경쇄 가변 부위:

[0179] DIVMTQSPSS LAVSAGEKVT ISCLSSQSLF SSNTNRNYLN WYLQKPGQSP

[0180] KLLIYHASTR LTGVPDRFIG SGSGTDFTLT ISSVQAEDLG DYVCQHHYET

[0181] PLTFGDGTKL EIK (서열 번호 5)

[0182] 중쇄 가변 부위:

[0183] QIQLQESGPG LVKPSQSLSL TCSVTGFSIS TSGYYWTWIR QFPGKRLWWM

[0184] GYINYGGGTS YNPSLKSRIS ITRDTSKNQF LLHLNSVTTE DTATYCCATM

[0185] ADRFAFFDYVW GQGIQVTSS (서열 번호 6)

[0186] 항-인간 H7CR 클론 4.5

[0187] 경쇄 가변 부위:

[0188] DIVMTQSPSS LAVSAGEKVT ISCLSSQSLF SSNTKRNYLN WYLQKPGQSP

[0189] KLLIYHASTR LTGVPGRFIG SGSGTDFTLT VSTVQAEDLG DYFCQQHYET

[0190] PLTFGDGTRL EIK (서열 번호 7)

[0191] 중쇄 가변 부위:

[0192] QIQLQESGPG LVKPSQSLSL TCSVTGFSIT TGGYYWNWIR QFPGKKLEWM

[0193] GYIYTSGRTS YNPSLKSRIS ITRDTSKNQF FLQLNSMTTE DTATYYCADM

[0194] ADKGGWFAYW GQGTLVTVSS (서열 번호 8)

[0195] 항-인간 H7CR 클론 7.8

[0196] 경쇄 가변 부위:

[0197] DIVMTQSPSS LTVSAGEKVT ISCLSSQSLF SSNTNRNYLS WYLQRPQSP

[0198] KLLIYHASTR LTGVPGRFIG SGSGTDFTLT VSTVQAGDLG DYFCQQHYVT

[0199] PLTFGDGTRL EIK (서열 번호 9)

[0200] 중쇄 가변 부위:

[0201] QIQLQESGPG LVKPSQSLSL TCSVTGFSIT TGGYYWNWIR QFPGKKLEWM

[0202] GYIYSSGRTS YNPSLKSRIS ITRDTSKNQF FLQLNSVTTE DTATYYCADM

[0203] ADKGGWFDYW GQGTLVTVSS (서열 번호 10)

[0204] (2)항-인간 H7CR 항체들의 공통 CDR

[0205] 공통 CDR 서열 및 비슷한 결합 속성을 제공하는 개연성 있는 변이형 CDR 서열을 확인하고자 확인된 항체들의 CDR 분석을 수행하였다. 이러한 변이형 CDR을 표 1에 따라 Blosum62.iiij 분석을 이용하여 산출하였다. 표 1은

Blosum62.iiij 치환 점수를 나타낸다. 점수가 높을수록 치환은 더욱 보존적이며, 따라서 치환이 기능에 영향을 미치지 않을 가능성이 더 높다.

표 1

표 1	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	+4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	0	-3	-2	0
R	-1	+5	0	-2	-3	+1	0	-2	0	-3	-2	+2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	+6	+1	-3	0	0	0	+1	-3	-3	0	-2	-3	-2	+1	0	-4	-2	-3
D	-2	-2	+1	+6	-3	0	+2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	+9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	+1	0	0	-3	+5	+2	-2	0	-3	-2	+1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	+2	-4	+2	+5	-2	0	-3	-3	+1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	+6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3
H	-2	0	+1	-1	-3	0	0	-2	+8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	+2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	+4	+2	-3	+1	0	-3	-2	-1	-3	-1	+3
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	+2	+4	-2	+2	0	-3	-2	-1	-2	-1	+1
K	-1	+2	0	-1	-3	+1	+1	-2	-1	-3	-2	+5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	+1	+2	-1	+5	0	-2	-1	-1	-1	-1	+1
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	+6	-4	-2	-2	+1	+3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	+7	-1	-1	-4	-3	-2
S	+1	-1	+1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	+4	+1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	+5	-2	-2	0
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	+1	-4	-3	-2	+11	+2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	+2	-1	-1	-2	-1	+3	-3	-2	-2	+2	+7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	+3	+1	-2	+1	-1	-2	-2	0	-3	-1	+4

1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 변이형 CDR을 가지고 있는 항체 및 항원 결합 단편이 개시된다. 특별히 확인된 CDR의 임의의 변이형에 필요할 가능성이 있는 CDR 잔기를 인식할 수 있게 하는 실질적인 수의 별개의 CDR을 확인하였다. 이러한 잔기들을 표 2와 표 3에 굵은 글자체로 나타내었다. 비교된 CDR 중에서 서로 다른 것으로 밝혀진 잔기들에 대해, 표 1의 치환 점수는 허용된 치환의 본질을 결정하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 특정 CDR의 특정 잔기가 R 또는 S로 달라진다고 밝혀지는 경우, R과 S는 -1의 치환 점수를 나타내므로, -1 이상의 치환 점수를 나타내는 R 또는 S의 임의의 치환은 관찰된 변이형(R 또는 S)만큼 특정 CDR과 충분히 유사한 결합 속성을 나타내는 변이형 CDR을 생성할 가능성이 있어서(또는 R 또는 S보다 더 가능성이 있다), 기능적 항-H7CR 항체 또는 항원 결합 단편을 형성하기 위하여 특정 CDR 대신에 변이형 CDR이 이용될 수 있다. 각 위치에 대해, 더 낮은 치환 점수를 나타내는 잔기를 선택하는 것보다 더 높은 치환 점수를 나타내는 잔기를 선택하는 것이 바람직하다.

표 2는 항-H7CR 항체들의 경쇄 CDR 분석을 나타낸 것으로, 관찰된 및 바람직한 변이형 경쇄(“LC”) 항-H7CR CDR들의 공통 서열을 제공한다.

표 2

표 2: 항-H7CR 경쇄 CDR																				
경쇄 CDR1																				
항체	서열																		서열 번호 NO	
1.3	Q	S	L	F	S	S	N	T	N	R	N	Y								29
4.5	Q	S	L	F	S	S	N	T	K	R	N	Y								30
7.8	Q	S	L	F	S	S	N	T	N	R	N	Y								29
LC CDR1 공통 서열:	Q	S	L	F	S	S	N	T	X ₁	R	N	Y								31
X ₁ 은 N 또는 K 또는 동일하거나 더 큰 치환 점수를 나타내는 치환 (즉, ≥ 0): R, N, Q, E, K, 또는 S																				

X_1 은	T 또는 D 또는 동일하거나 더 큰 치환 점수를 나타내는 치환 (즉, ≥ -1): N, D, Q, E, K, P, S, 또는 T
X_2 는	R 또는 K 또는 동일하거나 더 큰 치환 점수를 나타내는 치환 (즉, $\geq +2$): R, 또는 K
X_3 은	F 또는 G 또는 동일하거나 더 큰 치환 점수를 나타내는 치환 (즉, ≥ -3): A, R, N, D, C, Q, E, G, H, K, M, F, S, T, W, Y, 또는 V
X_4 는	A 또는 G 또는 동일하거나 더 큰 치환 점수를 나타내는 치환 (즉, ≥ 0): A, G, 또는 S
X_5 는	F 또는 W 또는 동일하거나 더 큰 치환 점수를 나타내는 치환 (즉, $\geq +1$): F, W, 또는 Y
X_6 은	A 또는 D 또는 동일하거나 더 큰 치환 점수를 나타내는 치환 (즉, ≥ -4): A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, 또는 V
X_7 은	V 또는 Y 또는 동일하거나 더 큰 치환 점수를 나타내는 치환 (즉, ≥ -2): A, R, N, D, Q, E, G, H, K, P, S, 또는 T

[0212] 따라서, 항-H7CR 항체 1.3, 4.5 및 7.8의 CDR을 보유하는 항체 및 이의 항원 결합 단편에 더하여, 위에 기술된 경쇄 및/또는 중쇄 공통 서열을 가지고 있는 CDR을 보유하는 항체 및 이의 항원 결합 단편도 제공된다.

[0213] 이러한 항체 또는 이의 단편들은 위의 클론들 중 임의의 것에 의해 생산된 햄스터 단일 클론성 항체의 가변 중쇄 및/또는 경쇄의 아미노산 서열과 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 가변 중쇄 및/또는 가변 경쇄의 아미노산 서열을 포함하고, 이들은 H7CR에 대해 면역 특이적인 결합을 나타낸다. 추가적으로, 이러한 항체 또는 이의 단편들은 위에 열거된 클론들의 CDR의 아미노산 서열과 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 CDR을 포함할 수 있고, 이들은 H7CR에 대해 면역 특이적인 결합을 나타낸다. 두 개의 아미노산 서열들의 동일성 퍼센트의 결정은 BLAST 단백질 비교에 의해 결정될 수 있다.

[0214] 특정 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 위에 기술된 바람직한 항체들의 하나, 둘, 셋, 넷, 다섯, 또는 더욱 바람직하게는, 여섯 개 전부의 CDR을 함유하며, 인간 H7CR과 결합할 수 있는 능력을 나타낼 것이다.

[0215] (3)바람직한 인간화 항-인간 H7CR 항체 및 이들의 CDR

[0216] 항-인간 H7CR 항체 1.3과 4.5의 여러 가지 바람직한 경쇄 및 중쇄 인간화 유도체를 제조하였다.

[0217] (a)항-인간 H7CR 항체 1.3의 인간화 변이형

[0218] IGKV4-1*01 수용자 프레임워크로부터 유래된, 항-인간 H7CR 항체 1.3의 바람직한 인간화 변이형의 경쇄 가변 부위의 아미노산 서열들을 아래에 나타내었다(CDR을 밑줄로 표시하였다):

[0219] 1. VL1A IGKV4-1*01 (인간화 1):

[0220] DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLF SSNTNRNYLA WYQQKPGQPP

[0221] KLLIYHASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQHHYET

[0222] PLTFGDGTLK EIK (서열 번호 17)

[0223] 2. VL1B IGKV4-1*01 (인간화 2):

[0224] DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLF SSNTNRNYLN WYQQKPGQSP

[0225] KLLIYHASTR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA DYYCQHHYET

[0226] PLTFGDGTLK EIK (서열 번호 18)

[0227] 3. VL1C IGKV4-1*01 (인간화 3):

[0228] DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCLSSQSLF SSNTNRNYLN WYLQKPGQSP

[0229] KLLIYHASTR LSGVPDRFIG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVG DYYCQHHYET

[0230] PLTFGDGTLK EIK (서열 번호 19)

[0231] IGKV2D-28*01 수용자 프레임워크로부터 유래된 항-인간 H7CR 항체 1.3의 바람직한 인간화 변이형의 경쇄 가변 부위의 아미노산 서열들을 아래에 나타내었다(CDR을 밑줄로 표시하였다):

- [0232] 1. VL2A IGKV2D-28*01 (인간화 1):
- [0233] DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLF SSNTNRNYLD WYLQKPGQSP
- [0234] QLLIYHASNR ASGVDPDRFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG VYYCQHHYET
- [0235] PLTFGDGTKL EIK (서열 번호 20)
- [0236] 2. VL2B IGKV2D-28*01 (인간화 2):
- [0237] DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLF SSNTNRNYLN WYLQKPGQSP
- [0238] KLLIYHASTR ASGVDPDRFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG VYYCQHHYET
- [0239] PLTFGDGTKL EIK (서열 번호 21)
- [0240] 3. VL2C IGKV2D-28*01 (인간화 3):
- [0241] DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCLSSQSLF SSNTNRNYLN WYLQKPGQSP
- [0242] KLLIYHASTR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG DYVCQHHYET
- [0243] PLTFGDGTKL EIK (서열 번호 22)
- [0244] **IGHV4-31*02** 수용자 프레임워크로부터 유래된 항-인간 H7CR 항체 1.3의 바람직한 인간화 변이형의 중쇄 가변 부위의 아미노산 서열들을 아래에 나타내었다(CDR을 밑줄로 표시하였다):
- [0245] 1. VH1A IGHV4-31*02 (인간화 1):
- [0246] QVQLQESGPG LVKPSQTL~~SL~~ TCTVSGFSIS TSGYYWSWIR QHPGKGLEWI
- [0247] GYINYGGGTY YNP~~SL~~KSRVT ISVDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYYCATM
- [0248] ADRFAFFDVW GQGTMTVSS (서열 번호 23)
- [0249] 2. VH1B IGHV4-31*02 (인간화 2):
- [0250] QVQLQESGPG LVKPSQTL~~SL~~ TCTVSGFSIS TSGYYWSWIR QHPGKRLEWI
- [0251] GYINYGGGTS YNP~~SL~~KSRVT ISRDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYCCATM
- [0252] ADRFAFFDVW GQGTMTVSS (서열 번호 24)
- [0253] 3. VH1C IGHV4-31*02 (인간화 3):
- [0254] QVQLQESGPG LVKPSQTL~~SL~~ TCTVSGFSIS TSGYYWSWIR QFPGKRLEWM
- [0255] GYINYGGGTS YNP~~SL~~KSRVT ISRDTSKNQF SLKLSSVTAA DTATYCCATM
- [0256] ADRFAFFDVW GQGTMTVSS (서열 번호 25)
- [0257] **AAV33199.1** 수용자 프레임워크로부터 유래된, 항-인간 H7CR 항체 1.3의 바람직한 인간화 변이형의 중쇄 가변 부위의 아미노산 서열들을 아래에 나타내었다(CDR을 밑줄로 표시하였다):
- [0258] 1. VH2A AAV33199.1 (인간화 1):
- [0259] QVQLQESGPG LVKPAQTL~~SL~~ TCTVSGFSIS TSGYYWSWIR QYPGKGLEWI
- [0260] GYINYGGGTY YNP~~SL~~KSRVT ISVDTSKNQF SLKLTSVTAA DTAVYHCATM
- [0261] ADRFAFFDVW GQGTMTVSS (서열 번호 26)
- [0262] 2. VH2B AAV33199.1 (인간화 2):
- [0263] QVQLQESGPG LVKPAQTL~~SL~~ TCTVSGFSIS TSGYYWSWIR QYPGKRLEWI
- [0264] GYINYGGGTS YNP~~SL~~KSRVT ISRDTSKNQF SLKLTSVTAA DTATYCCATM
- [0265] ADRFAFFDVW GQGTMTVSS (서열 번호 27)

[0266] 3. VH2C AAY33199.1 (인간화 3):

[0267] QVQLQESGPG LVKPAQTLST TCTVSGFSIS TSGYYWSWIR QFPGKRLEWM

[0268] GYINYGGS YNPSLKSRVT ISRDTSKNQF SLKLTSVTAA DTATYCCATM

[0269] ADRFAFFDVW GQGMVTVSS (서열 번호 28)

[0270] 이러한 항체 및 이들의 항원 결합 단편은 위에 기술된 항-인간 H7CR 항체 1.3의 인간화 변이형의 36개 조합 중 임의의 것을 포함할 수 있다. 구체적으로, 이러한 항체들은 표 4에 나타난 조합을 포함한다:

표 4

[0271]

표 4				
항-인간 H7CR 항체 1.3의 인간화 변이형				
인간화 변이형 번호	경쇄	서열 번호 NO.	중쇄	서열 번호 NO.
1	VL1A IGKV4-1*01 (인간화 1)	17	VH1A IGHV4-31*02 (인간화 1)	23
2	VL1A IGKV4-1*01 (인간화 1)	17	VH1B IGHV4-31*02 (인간화 2):	24
3	VL1A IGKV4-1*01 (인간화 1)	17	VH1C IGHV4-31*02 (인간화 3)	25
4	VL1A IGKV4-1*01 (인간화 1)	17	VH2A AAY33199.1 (인간화 1)	26
5	VL1A IGKV4-1*01 (인간화 1)	17	VH2B AAY33199.1 (인간화 2)	27
6	VL1A IGKV4-1*01 (인간화 1)	17	VH2C AAY33199.1 (인간화 3)	28
7	VL1B IGKV4-1*01 (인간화 2)	18	VH1A IGHV4-31*02 (인간화 1)	23
8	VL1B IGKV4-1*01 (인간화 2)	18	VH1B IGHV4-31*02 (인간화 2):	24
9	VL1B IGKV4-1*01 (인간화 2)	18	VH1C IGHV4-31*02 (인간화 3)	25
10	VL1B IGKV4-1*01 (인간화 2)	18	VH2A AAY33199.1 (인간화 1)	26
11	VL1B IGKV4-1*01 (인간화 2)	18	VH2B AAY33199.1 (인간화 2)	27
12	VL1B IGKV4-1*01 (인간화 2)	18	VH2C AAY33199.1 (인간화 3)	28
13	VL1C IGKV4-1*01 (인간화 3)	19	VH1A IGHV4-31*02 (인간화 1)	23
14	VL1C IGKV4-1*01 (인간화 3)	19	VH1B IGHV4-31*02 (인간화 2):	24
15	VL1C IGKV4-1*01 (인간화 3)	19	VH1C IGHV4-31*02 (인간화 3)	25
16	VL1C IGKV4-1*01 (인간화 3)	19	VH2A AAY33199.1 (인간화 1)	26
17	VL1C IGKV4-1*01 (인간화 3)	19	VH2B AAY33199.1 (인간화 2)	27
18	VL1C IGKV4-1*01 (인간화 3)	19	VH2C AAY33199.1 (인간화 3)	28
19	VL2A IGKV2D-28*01 (인간화 1)	20	VH1A IGHV4-31*02 (인간화 1)	23
20	VL2A IGKV2D-28*01 (인간화 1)	20	VH1B IGHV4-31*02 (인간화 2):	24
21	VL2A IGKV2D-28*01 (인간화 1)	20	VH1C IGHV4-31*02 (인간화 3)	25
22	VL2A IGKV2D-28*01 (인간화 1)	20	VH2A AAY33199.1 (인간화 1)	26
23	VL2A IGKV2D-28*01 (인간화 1)	20	VH2B AAY33199.1 (인간화 2)	27
24	VL2A IGKV2D-28*01 (인간화 1)	20	VH2C AAY33199.1 (인간화 3)	28
25	VL2B IGKV2D-28*01 (인간화 2)	21	VH1A IGHV4-31*02 (인간화 1)	23
26	VL2B IGKV2D-28*01 (인간화 2)	21	VH1B IGHV4-31*02 (인간화 2):	24

27	VL2B IGKV2D-28*01 (인간화 2)	21	VH1C IGHV4-31*02 (인간화 3)	25
28	VL2B IGKV2D-28*01 (인간화 2)	21	VH2A AAY33199.1 (인간화 1)	26
29	VL2B IGKV2D-28*01 (인간화 2)	21	VH2B AAY33199.1 (인간화 2)	27
30	VL2B IGKV2D-28*01 (인간화 2)	21	VH2C AAY33199.1 (인간화 3)	28
31	VL2C IGKV2D-28*01 (인간화 3)	22	VH1A IGHV4-31*02 (인간화 1)	23
32	VL2C IGKV2D-28*01 (인간화 3)	22	VH1B IGHV4-31*02 (인간화 2):	24
33	VL2C IGKV2D-28*01 (인간화 3)	22	VH1C IGHV4-31*02 (인간화 3)	25
34	VL2C IGKV2D-28*01 (인간화 3)	22	VH2A AAY33199.1 (인간화 1)	26
35	VL2C IGKV2D-28*01 (인간화 3)	22	VH2B AAY33199.1 (인간화 2)	27
36	VL2C IGKV2D-28*01 (인간화 3)	22	VH2C AAY33199.1 (인간화 3)	28

(b)항-인간 H7CR 항체 4.5의 인간화 변이형

IGKV4-1*01 수용자 프레임워크로부터 유래된, 항-인간 H7CR 항체 4.5의 바람직한 인간화 변이형의 경쇄 가변 부위의 아미노산 서열들을 아래에 나타내었다(CDR을 밑줄로 표시하였다):

1. VL1A IGKV4-1*01 (인간화 1):

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLF SSNTKRNYLA WYQQKPGQPP

KLLIYHASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQQHYET

PLTFGQGTREIK (서열 번호 33)

2. VL1B IGKV4-1*01 (인간화 2):

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLF SSNTKRNYLN WYQQKPGQPP

KLLIYHASTR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA DYFCQQHYET

PLTFGDGTRL EIK (서열 번호 34)

3. VL1C IGKV4-1*01 (인간화 3):

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCLSSQSLF SSNTKRNYLN WYQQKPGQSP

KLLIYHASTR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA DYFCQQHYET

PLTFGDGTRL EIK (서열 번호 35)

IGKV2D-40*01 수용자 프레임워크로부터 유래된, 항-인간 H7CR 항체 4.5의 바람직한 인간화 변이형의 경쇄 가변 부위의 아미노산 서열들을 아래에 나타내었다(CDR을 밑줄로 표시하였다):

1. VL2A IGKV2D-40*01 (인간화 1):

DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLF SSNTKRNYLD WYLQKPGQSP

QLLIYHASYR ASGVPDRFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG VYYCQQHYET

PLTFGQGTREIK (서열 번호 36)

2. VL2B IGKV2D-40*01 (인간화 2):

DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLF SSNTKRNYLN WYLQKPGQSP

KLLIYHASTR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG DYFCQQHYET

- [0294] **PLTFGDGTRL EIK (서열 번호 37)**
- [0295] 3. VL2C IGKV2D-40*01 (인간화 3):
- [0296] DIVMTQTPSS LPVTPGEPAS ISCLSSQSLF SSNTKRNYL N WYLQKPGQSP
- [0297] KLLIYHASTR LSGVPDRFSG SGGTDFTLK ISRVEAEDVG DYFCQQHYET
- [0298] **PLTFGDGTRL EIK (서열 번호 38)**
- [0299] **IGHV4-31*02** 수용자 프레임워크로부터 유래된, 항-인간 H7CR 항체 1.3의 바람직한 인간화 변이형의 중쇄 가변 부위의 아미노산 서열들을 아래에 나타내었다(CDR을 밑줄로 표시하였다):
- [0300] 1. VH1A IGHV4-31*02 (인간화 1):
- [0301] QVQLQESGPG LVKPSQTL~~SL~~ TCTVSGFSIT TGGYYWSWIR QHPGKGLEWI
- [0302] GYIYTSGRTY YNPSLKSRVT ISVDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYYCADM
- [0303] ADKGGWFAYW GQGT~~LV~~TVSS (서열 번호 39)
- [0304] 2. VH1B IGHV4-31*02 (인간화 2):
- [0305] QVQLQESGPG LVKPSQTL~~SL~~ TCTVSGFSIT TGGYYWNWIR QHPGKKLEWI
- [0306] GYIYTSGRTS YNPSLKSRVT ISRDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYYCADM
- [0307] ADKGGWFAYW GQGT~~LV~~TVSS (서열 번호 40)
- [0308] 3. VH1C IGHV4-31*02 (인간화 3):
- [0309] QVQLQESGPG LVKPSQTL~~SL~~ TCTVSGFSIT TGGYYWNWIR QFPGKKLEWM
- [0310] GYIYTSGRTS YNPSLKSRVT ISRDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYYCADM
- [0311] ADKGGWFAYW GQGT~~LV~~TVSS (서열 번호 41)
- [0312] **IGHV2-5*01** 수용자 프레임워크로부터 유래된, 항-인간 H7CR 항체 1.3의 바람직한 인간화 변이형의 중쇄 가변 부위의 아미노산 서열들을 아래에 나타내었다(CDR을 밑줄로 표시하였다):
- [0313] 1. VH2A IGHV2-5*01 (인간화 1):
- [0314] QITLKESGPT LVKPTQTL~~TL~~ TCTFSGFSIT TGGYYVGWIR QPPGKALEWL
- [0315] ALIYTSGRTR YSPSLKSRLT ITKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCADM
- [0316] ADKGGWFAYW GQGT~~LV~~TVSS (서열 번호 42)
- [0317] 2. VH2B IGHV2-5*01 (인간화 2):
- [0318] QITLKESGPT LVKPTQTL~~TL~~ TCTVSGFSIT TGGYYWNWIR QPPGKKLEWL
- [0319] ALIYTSGRTS YNPSLKSRLT ITKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCADM
- [0320] ADKGGWFAYW GQGT~~LV~~TVSS (서열 번호 43)
- [0321] 3. VH2C IGHV2-5*01 (인간화 3):
- [0322] QIQLKESGPT LVKPTQTL~~TL~~ TCTVSGFSIT TGGYYWNWIR QPPGKKLEWM
- [0323] ALIYTSGRTS YNPSLKSRLT ITKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCADM
- [0324] ADKGGWFAYW GQGT~~LV~~TVSS (서열 번호 44)
- [0325] 이러한 항체 및 이들의 항원 결합 단편은 위에 기술된 항-인간 H7CR 항체 4.5의 인간화 변이형의 36개 조합 중 임의의 것을 포함할 수 있다. 구체적으로, 이러한 항체들은 표 5에 나타난 조합을 포함한다:

표 5

[0326]

표 5				
항-인간 H7CR 항체 4.5의 인간화 변이형				
인간화 변이형 번호	경쇄	서열 번 호 NO.	중쇄	서열 번 호 NO.
1	VL1A IGKV4-1*01 (인간화 1)	33	VH1A IGHV4-31*02 (인간화 1)	39
2	VL1A IGKV4-1*01 (인간화 1)	33	VH1B IGHV4-31*02 (인간화 2):	40
3	VL1A IGKV4-1*01 (인간화 1)	33	VH1C IGHV4-31*02 (인간화 3)	41
4	VL1A IGKV4-1*01 (인간화 1)	33	VH2A IGHV2-5*01 (인간화 1)	42
5	VL1A IGKV4-1*01 (인간화 1)	33	VH2B IGHV2-5*01 (인간화 2)	43
6	VL1A IGKV4-1*01 (인간화 1)	33	VH2C IGHV2-5*01 (인간화 3)	44
7	VL1B IGKV4-1*01 (인간화 2)	34	VH1A IGHV4-31*02 (인간화 1)	39
8	VL1B IGKV4-1*01 (인간화 2)	34	VH1B IGHV4-31*02 (인간화 2):	40
9	VL1B IGKV4-1*01 (인간화 2)	34	VH1C IGHV4-31*02 (인간화 3)	41
10	VL1B IGKV4-1*01 (인간화 2)	34	VH2A IGHV2-5*01 (인간화 1)	42
11	VL1B IGKV4-1*01 (인간화 2)	34	VH2B IGHV2-5*01 (인간화 2)	43
12	VL1B IGKV4-1*01 (인간화 2)	34	VH2C IGHV2-5*01 (인간화 3)	44
13	VL1C IGKV4-1*01 (인간화 3)	35	VH1A IGHV4-31*02 (인간화 1)	39
14	VL1C IGKV4-1*01 (인간화 3)	35	VH1B IGHV4-31*02 (인간화 2):	40
15	VL1C IGKV4-1*01 (인간화 3)	35	VH1C IGHV4-31*02 (인간화 3)	41
16	VL1C IGKV4-1*01 (인간화 3)	35	VH2A IGHV2-5*01 (인간화 1)	42
17	VL1C IGKV4-1*01 (인간화 3)	35	VH2B IGHV2-5*01 (인간화 2)	43
18	VL1C IGKV4-1*01 (인간화 3)	35	VH2C IGHV2-5*01 (인간화 3)	44
19	VL2A IGKV2D-40*01 (인간화 1)	36	VH1A IGHV4-31*02 (인간화 1)	39
20	VL2A IGKV2D-40*01 (인간화 1)	36	VH1B IGHV4-31*02 (인간화 2):	40
21	VL2A IGKV2D-40*01 (인간화 1)	36	VH1C IGHV4-31*02 (인간화 3)	41
22	VL2A IGKV2D-40*01 (인간화 1)	36	VH2A IGHV2-5*01 (인간화 1)	42
23	VL2A IGKV2D-40*01 (인간화 1)	36	VH2B IGHV2-5*01 (인간화 2)	43
24	VL2A IGKV2D-40*01 (인간화 1)	36	VH2C IGHV2-5*01 (인간화 3)	44
25	VL2B IGKV2D-40*01 (인간화 2)	37	VH1A IGHV4-31*02 (인간화 1)	39
26	VL2B IGKV2D-40*01 (인간화 2)	37	VH1B IGHV4-31*02 (인간화 2):	40
27	VL2B IGKV2D-40*01 (인간화 2)	37	VH1C IGHV4-31*02 (인간화 3)	41
28	VL2B IGKV2D-40*01 (인간화 2)	37	VH2A IGHV2-5*01 (인간화 1)	42
29	VL2B IGKV2D-40*01 (인간화 2)	37	VH2B IGHV2-5*01 (인간화 2)	43
30	VL2B IGKV2D-40*01 (인간화 2)	37	VH2C IGHV2-5*01 (인간화 3)	44
31	VL2C IGKV2D-40*01 (인간화 3)	38	VH1A IGHV4-31*02 (인간화 1)	39

32	VL2C IGKV2D-40*01 (인간화 3)	38	VH1B IGHV4-31*02 (인간화 2):	40
33	VL2C IGKV2D-40*01 (인간화 3)	38	VH1C IGHV4-31*02 (인간화 3)	41
34	VL2C IGKV2D-40*01 (인간화 3)	38	VH2A IGHV2-5*01 (인간화 1)	42
35	VL2C IGKV2D-40*01 (인간화 3)	38	VH2B IGHV2-5*01 (인간화 2)	43
36	VL2C IGKV2D-40*01 (인간화 3)	38	VH2C IGHV2-5*01 (인간화 3)	44

- [0327] 개시된 항체 또는 이의 단편들은 위의 클론들 중 임의의 것에 의해 생산된 마우스 단일 클론성 항체의 가변 중쇄 및/또는 경쇄의 아미노산 서열과 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 가변 중쇄 및/또는 가변 경쇄의 아미노산 서열을 포함하고, 이들은 인간 H7CR에 대해 면역 특이적인 결합을 나타낸다. 다른 항체들 또는 이의 단편들은 위에 열거된 클론들의 CDR의 아미노산 서열과 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 CDR을 포함하고, 이들은 H7CR에 대해 면역 특이적인 결합을 나타낸다. 두 개의 아미노산 서열들의 동일성 퍼센트의 결정은 BLAST 단백질 비교에 의해 결정될 수 있다.
- [0328] 바람직한 구현예에서, 항체는 하나, 둘 또는 세 개의 경쇄 CDR 및 하나, 둘 또는 세 개의 중쇄 CDR (가장 바람직하게는 세 개의 경쇄 CDR 및 세 개의 중쇄 CDR)을 포함하는 인간화 면역 글로불린 분자(예컨대, 항체, 디아바디, 융합 단백질 등)이고, 이때, **경쇄** CDR은
- [0329] (1) 항-인간 H7CR 항체 1.3의 인간화 변이형의 경쇄 CDR1;
- [0330] (2) 항-인간 H7CR 항체 4.5의 인간화 변이형의 경쇄 CDR2;
- [0331] (3) 항-인간 H7CR 항체 7.8의 인간화 변이형의 경쇄 CDR3;
- [0332] (4) 항-인간 H7CR 항체 1.3, 4.5 또는 7.8의 인간화 변이형의 경쇄 CDR1 및 경쇄 CDR2;
- [0333] (5) 항-인간 H7CR 항체 1.3, 4.5 또는 7.8의 인간화 변이형의 경쇄 CDR1 및 경쇄 CDR3;
- [0334] (6) 항-인간 H7CR 항체 1.3, 4.5 또는 7.8의 인간화 변이형의 경쇄 CDR2 및 경쇄 CDR3;
- [0335] 또는
- [0336] (7) 항-인간 H7CR 항체 1.3, 4.5 또는 7.8의 인간화 변이형의 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2 및 경쇄 CDR3을 포함한다.
- [0337] 대안적인 바람직한 구현예에서, 인간화 면역 글로불린 분자는 하나, 둘 또는 세 개의 경쇄 CDR 및 하나, 둘 또는 세 개의 중쇄 CDR(가장 바람직하게는 세 개의 경쇄 CDR 및 세 개의 중쇄 CDR)를 포함하며, 이때, **중쇄** CDR은
- [0338] (1) 항-인간 H7CR 항체 1.3의 인간화 변이형의 중쇄 CDR1;
- [0339] (2) 항-인간 H7CR 항체 4.5의 인간화 변이형의 중쇄 CDR2;
- [0340] (3) 항-인간 H7CR 항체 7.8의 인간화 변이형의 중쇄 CDR3;
- [0341] (4) 항-인간 H7CR 항체 1.3, 4.5 또는 7.8의 인간화 변이형의 중쇄 CDR1 및 중쇄 CDR2;
- [0342] (5) 항-인간 H7CR 항체 1.3, 4.5 또는 7.8의 인간화 변이형의 중쇄 CDR1 및 중쇄 CDR3;
- [0343] (6) 항-인간 H7CR 항체 1.3, 4.5 또는 7.8의 인간화 변이형의 중쇄 CDR2 및 중쇄 CDR3;
- [0344] 또는
- [0345] (7) 항-인간 H7CR 항체 1.3, 4.5 또는 7.8의 인간화 변이형의 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2 및 중쇄 CDR3을 포함한다.
- [0346] 특히 바람직한 구현예에서, 항체는 하나, 둘 또는 세 개의 경쇄 CDR 및 하나, 둘 또는 세 개의 중쇄 CDR(가장 바람직하게는 세 개의 경쇄 CDR 및 세 개의 중쇄 CDR)을 포함하는 인간화 면역 글로불린 분자이고, 이때, **경쇄** CDR은

- [0347] (1) 항-인간 H7CR 항체 1.3의 인간화 변이형의 경쇄 CDR1;
- [0348] (2) 항-인간 H7CR 항체 4.5의 인간화 변이형의 경쇄 CDR2;
- [0349] (3) 항-인간 H7CR 항체 7.8의 인간화 변이형의 경쇄 CDR3;
- [0350] (4) 항-인간 H7CR 항체 1.3, 4.5 또는 7.8의 인간화 변이형의 경쇄 CDR1 및 경쇄 CDR2;
- [0351] (5) 항-인간 H7CR 항체 1.3, 4.5 또는 7.8의 인간화 변이형의 경쇄 CDR1 및 경쇄 CDR3;
- [0352] (6) 항-인간 H7CR 항체 1.3, 4.5 또는 7.8의 인간화 변이형의 경쇄 CDR2 및 경쇄 CDR3;
- [0353] 또는
- [0354] (7) 항-인간 H7CR 항체 1.3, 4.5 또는 7.8의 인간화 변이형의 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2 및 경쇄 CDR3을 포함하고,
- [0355] 이때, **중쇄** CDR은
- [0356] (1) 항-인간 H7CR 항체 1.3의 인간화 변이형의 중쇄 CDR1;
- [0357] (2) 항-인간 H7CR 항체 4.5의 인간화 변이형의 중쇄 CDR2;
- [0358] (3) 항-인간 H7CR 항체 7.8의 인간화 변이형의 중쇄 CDR3;
- [0359] (4) 항-인간 H7CR 항체 1.3, 4.5 또는 7.8의 인간화 변이형의 중쇄 CDR1 및 중쇄 CDR2;
- [0360] (5) 항-인간 H7CR 항체 1.3, 4.5 또는 7.8의 인간화 변이형의 중쇄 CDR1 및 중쇄 CDR3;
- [0361] (6) 항-인간 H7CR 항체 1.3, 4.5 또는 7.8의 인간화 변이형의 중쇄 CDR2 및 중쇄 CDR3;
- [0362] 또는
- [0363] (7) 항-인간 H7CR 항체 1.3, 4.5 또는 7.8의 인간화 변이형의 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2 및 중쇄 CDR3을 포함한다.
- [0364] 가장 바람직하게는, 이러한 CDR은 각각 항-인간 H7CR 항체 1.3, 4.5 또는 7.8의 동일한 인간화 변이형의 것이다.
- [0365] 구체적인 구현예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 항-인간 H7CR 항체 1.3, 4.5 또는 7.8의 인간화 변이형의 하나, 둘, 셋, 넷, 다섯, 또는 더욱 바람직하게는, 여섯 개 전부의 CDR을 포함할 것이며, 인간 H7CR과 결합하는, 모 항체와 동일한 능력을 나타낼 것이다.

[0366] **E. 바람직한 조성물의 치료적 및 예방적 용도**

[0367] 본 출원에 사용된 용어 “**치료하다**”, “**치료하는**”, “**치료**” 및 “**치료적 용도**”는 증가된 또는 감소된 면역 반응으로부터 이점을 얻는 질병 또는 장애의 하나 이상의 증상의 제거, 감소 또는 개선을 지칭한다. 본 출원에 사용된 “**치료적으로 유효한 양**”은 변경된 면역 반응을 매개하기에 충분한 치료제의 양, 더욱 바람직하게는 질병 또는 병태의 증상의 감소 또는 개선을 매개하기에 충분한, 임상적으로 관련 있는 변경된 면역 반응을 매개하기에 충분한 치료제의 양을 지칭한다. 효과는 그 규모가 수용 대상자의 건강 또는 예후에 영향을 미치기에 충분하다면 임상적으로 관련이 있다. 치료적으로 유효한 양은 질병 진행을 감소시키거나 최소화하기에 충분한, 예컨대, 암의 전파를 지연시키거나 최소화하기에 충분한 치료제의 양을 지칭할 수 있다. 또한, 치료적으로 유효한 양은 질병의 치료 또는 관리에 치료적 유익을 제공하는 치료제의 양을 지칭할 수 있다. 나아가, 치료제와 관련하여 치료적으로 유효한 양은 질병의 치료 또는 관리에 있어서 치료적 유익을 제공하는, 예컨대, 질병을 치료하거나 관리하기에 충분한 치료적 항체의 치료적 효능을 증진시키기에 충분한 치료적 유익을 제공하는, 치료제 단독, 또는 다른 치료법과의 병용 시의 양을 의미한다.

[0368] 본 출원에 사용된 용어 “**예방제**”는 장애 또는 질병의 임의의 증상의 검출 전에, 이러한 장애 또는 질병의 방지에 이용될 수 있는 작용제를 지칭한다. “**예방적으로 유효한**” 양은 이러한 보호를 매개하기에 충분한 예방제의 양이다. 또한, 예방적으로 유효한 양은 질병의 방지에 있어서 예방적 유익을 제공하는 예방제의 양을 지칭할 수 있다. 나아가, 예방제와 관련하여 예방적으로 유효한 양은 질병의 방지에 있어서 예방적 유익을 제공하는, 예방제 단독, 또는 다른 작용제와의 병용 시의 양을 의미한다.

[0369] 본 출원에 제공된 투여량 및 투여 빈도는 용어 “**치료적으로 유효한**” 및 “**예방적으로 유효한**”에 의해 포괄된

다. 또한, 투여량 및 빈도는 전형적으로, 투여된 구체적인 치료제 또는 예방제, 암의 중증도 및 유형, 투여 경로뿐만 아니라, 환자의 연령, 체중, 반응 및 과거 병력에 의존하는, 각 환자에 구체적인 인자들에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자들을 고려하여, 그리고 예를 들어 문헌에 보고되고 *Physician's Desk Reference* (56th Ed., 2002)에 권고된 투여량을 따름으로써, 당업자에 의해 적절한 계획이 선택될 수 있다.

[0370]

1. 면역 체계의 상향 조절제의 이용

[0371]

일 구현예는 H7CR과 결합함으로써 T 세포 증식 및/또는 사이토카인 생산을 향진시키는(즉, 증진시키는), 항-H7CR 항체(및 H7CR과 결합하는 이러한 항체의 단편) 또는 B7-H7 Ig와 같은, H7CR 결합 분자들에 관한 것이다. 대상자에 이러한 분자들을 투여하는 것은 대상자의 면역 체계를 **상향 조절한다**. H7CR 발현은 미감작 T 세포 표현형과 관련이 있으므로, 이러한 분자들의 투여는 T 세포 프라이밍 및 활성화 증진에 효과적이며, 따라서 백신과 병용하기에 좋다. 나아가, 효현적 항-H7CR(및 B7-H7 Ig)는 면역 체크포인트를 표적으로 하고, 면역 반응을 정상적으로 약화시키는 수용체들을 저해하는 분자들인 항-PD-1, 항-B7-H1, 항-CTLA4 등과 병용하기에 매우 좋다. 이러한 항체들은 순차적으로 투여되는 것이 나올 수 있다. 즉, T 세포 프라이밍을 증진시키기 위하여 항-H7CR을 먼저, 이어서 T 세포 소진을 방지하기 위하여, 예컨대 항-PD-1을 투여하는 것이 나올 수 있다. 또한, H7CR 및 면역 체크포인트 차단을 표적으로 하는 이중특이적인 분자들이 고려된다.

[0372]

면역 체계의 상향 조절은 특히 암 및 만성 감염(예컨대, HIV 감염, AIDS 등)의 치료에 있어서 특히 바람직하며, 따라서 개시된 분자들은 이러한 장애들의 치료에서 유용성을 나타낸다. 대식세포는 HIV 감염의 초기 단계에 유의미하게 이바지하는 것으로 밝혀졌다(Carter, C. A. *et al.* (2008) “*Cell Biology Of HIV-1 Infection Of Macrophages*,” *Ann. Rev. Microbiol.* 62:425-443; Noursadeghi, M. *et al.* (2006) “*HIV-1 Infection Of Mononuclear Phagocytic Cells: The Case For Bacterial Innate Immune Deficiency In AIDS*,” *Lancet Infect. Dis.* 6:794-804). 따라서, B7-H7과 결합하는 항체들(특히 독소와 콘주게이트된 경우)은 HIV 감염을 예방하거나 치료하는 데에 유용성을 나타낸다.

[0373]

본 출원에 사용된 용어 “**암**”은 세포의 비정상적인 조절되지 않는 성장으로부터 기인하는 신생물 또는 종양을 지칭한다. 본 출원에 사용된 바와 같이, 암은 명백하게 백혈병과 림프종을 포함한다. 이러한 용어는 먼 부위까지 전이하고, 비 암세포와는 상이한 표현형 특징, 예를 들어, 연한천과 같은 3차원 기질에서 콜로니의 형성 또는 3차원의 기저막 또는 세포외 매트릭스 표본에서 관형 망구조 또는 웹 모양의 매트릭스의 형성을 나타낼 가능성이 있는 세포들을 수반하는 질병을 지칭한다. 비 암세포는 연한천에서 콜로니를 형성하지 않고, 3차원의 기저막 또는 세포외 매트릭스 표본에서 뚜렷한 구체 유사 구조를 형성한다.

[0374]

치료 또는 예방될 수 있는 암 및 관련된 장애로는 다음을 포함하나, 이에 한정되지 않는다: 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 예를 들어, 골수모구성, 전골수성, 골수단구성, 단구성, 적백혈병 백혈병 및 골수형성이상 증후군, 만성 골수성(과립구성) 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 모양 세포성 백혈병과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 만성 백혈병을 포함하나 이에 한정되지 않는 백혈병; 진성적혈구증가증; 호지킨병 또는 비 호지킨병과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 림프종; 무증상 다발성 골수종, 비분비성 골수종, 골경화성 골수종, 형질세포 백혈병, 고립성 형질세포종 및 골수의 형질세포종과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 다발성 골수종; 발덴스트림 거대글로불린혈증; 의미 불명의 단클론성 감마글로불린병증; 양성 단클론성 감마글로불린병증; 중쇄 질병; 뼈 육종, 골육종, 연골육종, 유잉 육종, 악성 거대세포 종양, 뼈의 섬유육종, 척삭종, 골막성 육종, 연조직 육종, 혈관육종, 섬유육종, 카포시 육종, 평활근육종, 지방육종, 림프관육종, 신경초종, 횡문근육종, 활막육종과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 뼈 및 결합조직 육종; 신경교종, 성상세포종, 뇌줄기신경교종, 상의세포종, 핍지교종, 비신경교성 종양, 청신경초종, 두개인두종, 수모세포종, 뇌수막종, 송과체세포종, 송과체모세포종, 원발성 뇌 림프종을 포함하나 이에 한정되지 않는 뇌종양; 선암종, 소엽성(소세포) 암종, 선관내 암종, 수질성 유방암, 점액소성 유방암, 관 유방암, 유두 유방암, 파제트병 및 염증성 유방암을 포함하나 이에 한정되지 않는 유방암; 크롬친화세포종 및 부신피질 암종을 포함하나 이에 한정되지 않는 부신암; 유두성 또는 여포성 갑상선암, 수질성 갑상선암 및 미분화성 갑상선암을 포함하나 이에 한정되지 않는 갑상선암; 인슐린종, 가스트린종, 글루카곤종, 비포파, 소마토스타틴 분비성 종양 및 유암종 또는 섬세포 종양을 포함하나 이에 한정되지 않는 췌장암; 쿠싱병, 프로락틴 분비성 종양, 말단비대증 및 요붕증을 포함하나 이에 한정되지 않는 뇌하수체암; 홍채 흑색종, 맥락막 흑색종 및 섬모체 흑색종과 같은 안구 흑색종 및 망막모세포종을 포함하나 이에 한정되지 않는 안암; 편평세포 암종, 선암종 및 흑색종을 포함하나 이에 한정되지 않는 질암; 편평세포 암종, 흑색종, 선암종, 기저세포 암종, 육종 및 파제트병을 포함하나 이에 한정되지 않는

외음부암; 편평세포 암종 및 선암종을 포함하나 이에 한정되지 않는 자궁경부암; 자궁내막 암종 및 자궁 육종을 포함하나 이에 한정되지 않는 자궁암; 난소 상피 암종, 계계선상 종양, 생식세포 종양 및 기질성 종양을 포함하나 이에 한정되지 않는 난소암; 편평암, 선암종, 선양낭포 암종, 점막표피양 암종, 선편평 암종, 육종, 흑색종, 형질세포종, 우상 암종 및 연맥세포(소세포) 암종을 포함하나 이에 한정되지 않는 식도암; 선암종, 돌출성(용종), 궤양성, 표재 전파성, 확산 전파성, 악성 림프종, 지방육종, 섬유육종 및 암육종을 포함하나 이에 한정되지 않는 위암; 결장암; 직장암; 간세포성 암종 및 간모세포종을 포함하나 이에 한정되지 않는 간암; 선암종을 포함하나 이에 한정되지 않는 담낭암; 유두성, 결절성 및 확산성을 포함하나 이에 한정되지 않는 담관 암종; 비-소세포 폐암, 편평세포 암종(표피양 암종), 선암종, 대세포 암종 및 소세포 폐암을 포함하나 이에 한정되지 않는 폐암; 생식 종양, 정낭피종, 미분화성, 고전적인(전형적인), 정모세포성, 비정낭피종, 배아 암종, 기형암종, 용모암(난황난 종양)을 포함하나 이에 한정되지 않는 고환암; 선암종, 평활근육종 및 횡문근육종을 포함하나 이에 한정되지 않는 전립선암; 음경암; 편평세포 암종을 포함하나 이에 한정되지 않는 구강암; 기저암; 선암종, 점막표피양 암종 및 선양낭성 암종을 포함하나 이에 한정되지 않는 침샘암; 편평세포암 및 우상암을 포함하나 이에 한정되지 않는 인두암; 기저세포 암종, 편평세포 암종 및 흑색종, 표재 전파성 흑색종, 결절성 흑색종, 악성 흑자 흑색종, 선단 흑자성 흑색종을 포함하나 이에 한정되지 않는 피부암; 신장세포암, 선암종, 부신종, 섬유육종, 이행세포암(신우 및/또는 요관)을 포함하나 이에 한정되지 않는 신장암; 윌름스 종양; 이행 세포 암종, 편평 세포 암종, 선암종, 암육종을 포함하나 이에 한정되지 않는 방광암. 또한, 암은 점액육종, 골원성 육종, 내피육종, 림프관내피육종, 중피종, 활막종, 혈관모세포종, 상피암종, 낭종암, 기관지암종, 땀샘 암종, 피지선 암종, 유두 암종 및 유두 선암종을 포함한다(이러한 장애를 검토하기 위해서는 Fishman *et al.*, 1985, *Medicine*, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia and Murphy *et al.*, 1997, *Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery*, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of America 참조).

[0375]

따라서, 개시된 방법 및 조성물은 다음을 포함하는(그러나 이에 한정되지 않는) 다양한 암 또는 기타 비정상적인 증식성 질병의 치료, 억제 또는 예방에도 유용하다: 방광, 유방, 결장, 신장, 간, 폐, 난소, 췌장, 위, 자궁경부, 갑상선 및 피부의 암종, 편평세포 암종을 포함하는 암종; 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, B 세포 림프종, T 세포 림프종, 버킷 림프종을 포함하는 림프양 계통의 조혈성 종양; 급성 및 만성 골수성 백혈병 및 전골수성 백혈병을 포함하는 골수양 계통의 조혈성 종양; 섬유육종 및 횡문근육종을 포함하는 간엽 기원의 종양; 흑색종, 정낭피종, 기형암종, 신경모세포종 및 신경교종을 포함하는 기타 종양; 성상세포종, 신경모세포종, 신경교종 및 신경초종을 포함하는 중추 및 말초 신경계의 종양; 섬유육종, 횡문근육종 및 골육종을 포함하는 간엽 기원의 종양; 및 흑색종, 색소건피증, 각화극세포종, 정낭피종, 갑상선 여포성 암 및 기형암종을 포함하는 기타 종양. 또한, 세포자멸사 이상에 의해서 야기되는 암도 개시된 방법 및 조성물에 의해 치료된다는 점도 고려된다. 이러한 암은 여포성 림프종, p53 돌연변이를 나타내는 암종, 유방, 전립선 및 난소의 호르몬 의존성 종양 및 가족성 대장 용종증과 같은 전암성 병소 및 골수형성이상 증후군을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 특정 구현예에서, 난소, 방광, 유방, 결장, 폐, 피부, 췌장 또는 자궁의, 악성 종양 및 (변질 형성 및 형성 이상과 같은) 이상증식성 변화, 또는 과증식성 장애가 개시된 방법 및 조성물에 의해서 치료 또는 예방된다. 다른 특정 구현예에서, 육종, 흑색종 또는 백혈병이 개시된 방법 및 조성물에 의해서 치료 또는 예방된다.

[0376]

암 세포는 발달하는 동안 다양한 메커니즘을 통합에도 특징적인 일련의 기능적 능력들을 획득한다. 이러한 능력들은 세포자멸사 회피, 성장 신호의 자족성, 항-성장 신호에 대한 무감각성, 조직 침입/전이, 무한한 설명적 가능성 및 지속적 혈관 형성을 포함한다. 용어 “암 세포”는 전 악성 및 악성 암 세포를 모두 포괄하고자 한 것이다. 일부 구현예에서, 암은 국소화되어 유지된 양성 종양을 지칭한다. 다른 구현예에서, 암은 이웃 신체 구조에 침입하여 파괴하고 먼 부위까지 전파된 악성 종양을 지칭한다. 또 다른 구현예에서, 암은 구체적인 암 항원(예컨대, 범 암종 항원(KS 1/4), 난소 암종 항원(CA125), 전립선 특이적 항원(PSA), 암배 항원(CEA), CD19, CD20, HER2/neu 등)과 관련이 있다.

[0377]

위에 논의된 종양에 대한 적용과 유사하게, 독소 또는 자가 항원에 대해 또는 병원균(예컨대, HIV, HTLV, 간염 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 우두 바이러스, 광견병 바이러스와 같은 바이러스; 미코박테리아, 스태필로코시, 스트렙토코시, 뉴모노코시, 메닝고코시, 코노코시, 클렙시엘라, 프로테우스, 세라티아, 슈도모나스, 레지오넬라, 코리네박테리아, 살모넬라, 비브리오, 클로스트리디아, 바실리, 파스테우렐라, 랩토스피로시스, 보르다텔라 같은 박테리아, 그리고 특히 콜레라, 파상풍, 보툴리눔 식중독, 탄저병, 페스트 및 라임병과 관련된 이러한 병원균; 또는 칸디다(알비칸스, 크루세이, 글라브라타, 트로피칼리스 등), 크립토코쿠스, 아스퍼질루스(주미가투스, 니거 등), 뮤코랄레스 속(뮤코, 앵시디아, 리조푸스), 스포로트리क्स(선키), 블라

스토미세스(더마티티디스), 파라코시디오이데스 (브라실리엔시스), 코시디오이데스(이미티스) 및 히스토플라스마(캡슐라툼), 엔타모에바, 히스톨리타, 발란티둠 콜리, 내글레리아 파울레리, 아칸타모에바 sp., 지아디아 람비아, 크립토스포리둠 sp., 뉴모시스티스 카리니, 플라스모둠 비박스, 바베시아 마이크로티, 트리파노소마 브루 세이, 트리파노소마 크루지, 톡소플라즈마 곤디 등), 스포로트릭스, 블라스토미세스, 파라코시디오이데스, 코시 디오이데스, 히스토플라스마, 엔타모에바, 히스톨리타, 발란티둠, 내글레리아, 아칸타모에바, 지아디아, 크립 토스포리둠, 뉴모시스티스, 플라스모둠, 바베시아, 또는 트리파노소마 등과 같은 진균 또는 기생성 병원균)에 대해 면역 반응을 자극하기 위하여 개시된 항체 및 항원 결합 단편은 단독으로, 또는 애주반트로서, 백신과 병 용하여, 또는 항미생물제와 병용하여 이용될 수 있다. 따라서, 항체 및 항원 결합 단편은 감염성 질환의 치료에 있어서 유용성을 나타낸다.

[0378]

항체 및 항원 결합 단편의 또 다른 용도는 T 세포 암을 앓는 환자에서 T 세포를 차단하거나 고갈시키는 것이다. 일 구현예에서, 이러한 차단 또는 고갈은 H7CR의 그 리간드에 대한 결합 자리에 대해 가까운 자리와 결합하여 정상적인 H7CR 기능이 손상되거나 교란되도록 하는 항-H7CR 항체를 이용하여 달성된다. 이러한 교란의 결과로서, T 세포의 유효한 (기능적) 농도가 고갈된다. 바람직한 구현예에서, 이러한 고갈은 독소에 콘주게이트 되어, T 세포에 대한 이들의 결합이 세포의 사망을 초래하도록 하는 항-H7CR 항체를 이용하여 달성된다. 바람직 하게는, 둘 중 어느 구현예에서, 항체의 Fc 부위의 서열은 분자가 감소된 Fc 수용체(FcR) 결합 활성을 나타내거 나 Fc 수용체 결합 활성을 나타내지 않도록, 또는 증진된 항체 의존성 세포 매개 세포 독성(ADCC) 또는 보체 의 존성 세포 독성(CDC) 활성을 나타내도록 결실되거나(예를 들어, Fab 또는 F(ab)₂ 등) 또는 변형되었을 것이다.

[0379]

2. 면역 체계의 하향 조절제의 이용

[0380]

대안적인 구현예는 B7-H7와 결합함으로써 H7CR 기능 및 T 세포 증식 및/또는 사이토카인 생산을 상쇄시키는(즉, 약화시키거나 손상시키는), (B7-H7과 결합하는) 항-B7-H7 항체(및 이러한 항체의 단편) 또는 H7CR Ig와 같은 분 자들에 관한 것이다. 대상자에 이러한 분자들을 투여하는 것은 대상자의 면역 체계를 **하향 조절하며**, 특히 염증 또는 자가 면역의 치료에 유용하다.

[0381]

또 다른 구현예는 H7CR과 결합하여 H7CR과의 리간드 상호 작용을 차단하며, H7CR을 항진시키지 않는 항체를 제 공한다.

[0382]

면역 체계의 하향 조절은 염증성 질병과 자가 면역 질병의 치료에서 바람직하다. 항체를 투여하여 치료될 수 있 는 자가 면역 장애의 예로는

[0383]

원형탈모, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가 면역 에디슨병, 부신의 자가 면역 질병, 자가 면역 용혈성 빈 혈, 자가 면역 간염, 자가 면역 난소염 및 고환염, 자가 면역 혈소판감소증, 베체트병, 수포성 유천포창, 심근 병증, 복강 스프루-피부염, 만성피로 면역 기능장애 증후군(CFIDS), 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증, 처 그-스트라우스 증후군, 반흔성 유천포창, CREST 증후군, 저온응집소병, 크론병, 원판성 루푸스, 필수 혼성 한랭 글로불린혈증, 섬유근육통-섬유근염, 사구체신염, 그레이브스병, 길랑바레 증후군, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐 섬유증, 특발성 혈소판감소증 자반증(ITP), IgA 신경병증, 소아 관절염, 편평태선, 홍반성 루푸스, 메니에르 병, 혼성 결합조직 질병, 다발성 경화증, 시신경 척추염(NMO), 1형 또는 면역 매개성 당뇨병, 중증 근무력증, 심상성 천포창, 악성빈혈, 결절성 다발동맥염, 다발원골염, 다선 증후군, 류마티스성 다발근육통, 다발근염 및 피부근염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담즙성 간경병증, 건선, 건선성 관절염, 레이놀드 현상, 라이터 증후군, 류마티스성 관절염, 유육종증, 피부 경화증, 쇼그렌 증후군, 강직 인간 증후군, 전신 홍반성 루푸스, 홍반성 루푸스, 타카야수 관절염, 측두 동맥염/거대세포 동맥염, 궤양성 대장염, 포도막염, 포진성 피부염 맥관 염, 백반증 및 베게너 육아종증과 같은 맥관염을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0384]

예방, 치료 또는 관리될 수 있는 염증성 장애의 예로는 천식, 뇌염, 염증성 장질환, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 알레르기성 장애, 폐혈성 쇼크, 폐 섬유증, 미분화 척추관절증, 미분화 관절증, 관절염, 염증성 골융해 및 만성 바이러스성 또는 세균성 감염으로 인한 만성 염증을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0385]

기술된 항-H7CR 항체는 항-유전형 펩티드 또는 항체(Wallmann, J. *et al.* (2010) "Anti-Ids in Allergy: Timeliness of a Classic Concept," World Allergy Organiz. J. 3(6):195-201; Nardi, M. *et al.* (2000) "Antiidiotype Antibody Against Platelet Anti-GpIIb/a Contributes To The Regulation Of Thrombocytopenia In HIV-1-ITP Patients," J. Exp. Med. 191(12):2093-2100) 또는 H7CR의 모방제(Zang, Y.C. *et al.* (2003) "Human Anti-Idiotypic T Cells Induced By TCR Peptides Corresponding To A Common CDR3 Sequence Motif In Myelin Basic Protein-Reactive T Cells," Int. Immunol. 15(9):1073-1080; Loiarro, M. *et al.* (Epub

2010 Apr 8) “*Targeting TLR/IL-1R Signalling In Human Diseases*,” *Mediators Inflamm.* 2010:674363)를 생산하는 데에 이용될 수 있다. 이러한 분자는 H7CR에 대해 대항자로서 기능하며, 따라서 대상자에의 이들의 투여는 B7-H7 리간드를 차지하여 B7-H7 리간드가 내인성 H7CR 수용체와 결합하는 것을 방지함으로써 이러한 대상자의 면역 체계를 하향 조절한다. 이러한 분자는 이식편 대 숙주병의 치료에 있어서 유용성을 나타낸다. 마찬가지로, 이러한 항체 및 이러한 수용체/리간드 사이의 결합을 증진시키는 효현제 항체는 H7CR 신호 전달의 효현제로서 유용성을 나타내며, 따라서 염증 및 자가 면역 질병의 치료에 있어서 유용성을 나타낸다.

[0386] 따라서, 항체 및 항원 결합 단편은 염증성 및 자가 면역 질병의 치료에서 유용성을 나타낸다.

[0387] F.투여 방법

[0388] 다양한 전달 체계가 공지되어 있으며, 본 출원에 기술된 치료적 또는 예방적 조성물을 투여하는 데에 이용될 수 있는데, 예컨대, 리포솜 내 캡슐화, 미세입자, 미세캡슐, 항체 또는 용합 단백질을 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체 매개성 세포내 이입(예컨대, Wu and Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 참조), 레트로바이러스 또는 기타 바이러스의 일부로서 핵산의 구축 등이 있다.

[0389] 인간화 항체를 투여하는 방법은 비경구 투여(예컨대, 피부 내, 근육 내, 복강 내, 정맥 내 및 피하), 경막 및 점막(예컨대, 비강 내 및 구강 경로)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특정 구현예에서, 개시된 항체는 근육 내, 정맥 내 또는 피하로 투여된다. 조성물은 임의의 편리한 경로에 의해서, 예를 들어 주입 또는 볼루스 주사에 의해, 상피 또는 점막피부 내막(예컨대, 구강 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있으며, 기타 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신 또는 국소 투여일 수 있다. 또한, 예컨대, 흡입기 또는 분무기 및 에어로졸화제가 있는 제형을 이용하여, 폐 투여도 이용될 수 있다. 예컨대, 미국 특허번호 6,019,968; 5,985, 20; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,913; 5,290,540; 및 4,880,078; 및 PCT 공개번호 WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; 및 WO 99/66903 참조. 특정 구현예에서, 약학적 조성물을 치료가 필요한 영역에 국소 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 이는 예를 들어, 그러나 제한에 의한 것은 아닌, 국소 주입, 주사 또는 이식물에 의해서 달성될 수 있고, 상기 이식물은 실라스트 멤브레인과 같은 막, 또는 섬유를 포함하는 다공성, 비 다공성 또는 젤라틴성 물질이다. 바람직하게는, 하나 이상의 개시된 항체를 투여할 때는 항체 또는 용합 단백질을 흡수하지 않는 물질을 사용하도록 주의가 기울여야 한다.

[0390] 일부 구현예에서, 인간화 또는 키메라 항체는 개시된 항체의 표적화된 전달을 위해 리포솜으로 제형화된다. 리포솜은 수성 상을 캡슐화하는 동심 정렬된 인지질 이중층으로 이루어진 소포이다. 리포솜은 전형적으로 다양한 종류의 지질, 인지질 및/또는 계면활성제를 포함한다. 리포솜의 성분들은 생물학적 막의 지질 배열과 유사한 이중층 구성으로 배열된다. 리포솜은 부분적으로 이들의 생체적합성, 낮은 면역원성 및 낮은 독성으로 인하여, 특히 바람직한 전달 매체이다. 리포솜의 제조 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 예컨대, Epstein *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688; Hwang *et al.*, 1980 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030-4; U.S. Patent Nos. 4,485,045 and 4,544,545 참조.

[0391] 미국 특허번호 5,013,556에 개시된 것들과 같은, 연장된 혈청 반감기, 즉 증진된 순환 기간을 나타내는 리포솜의 제조 방법은 항체 제형을 생산하는 데에 이용될 수 있다. 개시된 방법에 이용되는 바람직한 리포솜은 순환계로부터 신속하게 청소되지 않는다. 즉, 단핵 식세포 체계(MPS)에 흡수되지 않는다. 이러한 리포솜은 당업자에게 공지된 통상의 방법을 사용하여 제조되는 입체 구조적으로 안정화된 리포솜을 포함한다. 특정 작용 메커니즘에 결부시키고자 함은 아니지만, 입체 구조적으로 안정화된 리포솜은 부피가 크고 매우 유연한 친수성 모이어티가 있는 지질 성분을 함유하며, 이는 리포솜과 혈청 단백질의 원치 않는 반응을 감소시키고, 혈청 성분과의 흡수인화를 감소시키고, MPS에 의한 인식을 감소시킨다. 입체 구조적으로 안정화된 리포솜은 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 제조된다. 리포솜 및 입체 구조적으로 안정화된 리포솜의 제조에 대해서는, 예컨대, Bendas *et al.*, 2001 *BioDrugs*, 15(4): 215-224; Allen *et al.*, 1987 *FEBS Lett.* 223: 42-6; Klivanov *et al.*, 1990 *FEBS Lett.*, 268: 235-7; Blum *et al.*, 1990, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1029: 91-7; Torchilin *et al.*, 1996, *J. Liposome Res.* 6: 99-116; Litzinger *et al.*, 1994, *Biochim. Biophys. Acta*, 1190: 99-107; Maruyama *et al.*, 1991, *Chem. Pharm. Bull.*, 39: 1620-2; Klivanov *et al.*, 1991, *Biochim Biophys Acta*, 1062: 142-8; Allen *et al.*, 1994, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 13: 285-309 참조. 특정 장기 표적화(예컨대, 미국 특허번호 4,544,545 참조), 또는 특정 세포 표적화(예컨대, 미국 특허출원 공개번호 2005/0074403 참조)에 적합하도록 한 리포솜도 이용될 수 있다. 조성물 및 방법에 이용하기 위해 특히 유용한 리포솜은, 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG 유도체화된 포스파티딜에탄올아민(PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 이용하는 역상 증발법

에 의해 생성될 수 있다. 리포솜은 원하는 직경의 리포솜을 얻기 위하여 한정된 기공 크기의 필터를 통해서 압출된다. 일부 구현예에서, 항체의 단편, 예컨대, F(ab')은 이전에 기술된 방법을 이용하여 리포솜에 콘주게이트될 수 있다. 예컨대, Martin et al, 1982, J. Biol. Chem. 257:286-288 참조.

[0392]

인간화 또는 키메라 항체는 면역 리포솜으로 제형화될 수도 있다. 면역 리포솜은 항체 또는 이의 단편이 리포솜 표면에 공유적으로 또는 비 공유적으로 연결된, 리포솜 조성물을 지칭한다. 항체와 리포솜 표면을 연결하는 화학은 당해 분야에 공지되어 있다. 예컨대, 미국 특허번호 6,787,153; Allen et al., 1995, Stealth Liposomes, Boca Rotan: CRC Press, 233-44; Hansen et al., 1995, *Biochim. Biophys. Acta*, 1239: 133-144 참조.

[0393]

인간화 또는 키메라 항체는 항체의 양을 표시하는 앰플 또는 샤페(sachette)와 같은, 기밀하게 밀봉된 용기에 포장될 수 있다. 일 구현예에서, 항체는 기밀하게 밀봉된 용기에 담긴, 건조 멸균된 동결건조 분말 또는 무수 농축물로서 공급되며, 예컨대, 물이나 식염수로 대상에 투여하기 위한 적절한 농도로 재구성될 수 있다. 바람직하게는, 항체는 적어도 5 mg, 더욱 바람직하게는 적어도 10 mg, 적어도 15 mg, 적어도 25 mg, 적어도 35 mg, 적어도 45 mg, 적어도 50 mg, 또는 적어도 75 mg의 단위 투여량으로 기밀하게 밀봉된 용기에 건조 멸균된 동결건조 분말로서 제공된다. 동결건조된 항체는 본래의 용기에 2 내지 8℃에 보관되어야 하고, 이러한 항체는 재구성된 후, 12시간 이내, 바람직하게는 6시간 이내, 5시간 이내, 3시간 이내, 또는 1시간 이내에 투여되어야 한다. 대안적인 구현예에서, 항체는 항체, 용합 단백질, 또는 콘주게이트된 분자의 양과 농도를 표시하는, 기밀하게 밀봉된 용기에 액체 형태로 제공된다. 바람직하게는, 항체의 액체 형태는 적어도 1 mg/ml, 더욱 바람직하게는 적어도 2.5 mg/ml, 적어도 5 mg/ml, 적어도 8 mg/ml, 적어도 10 mg/ml, 적어도 15 mg/kg, 적어도 25 mg/ml, 적어도 50 mg/ml, 적어도 100 mg/ml, 적어도 150 mg/ml, 적어도 200 mg/ml의 항체로 기밀하게 밀봉된 용기에 제공된다.

[0394]

또한, 제형에 이용되는 정확한 용량은 투여 경로 및 병태의 중증도에 달려 있을 것이며, 의료 전문가의 판단 및 각 환자의 상황에 따라 결정되어야 한다. 유효 용량은 시험관 내 또는 동물 모델 시험 시스템으로부터 유래된 용량 반응 곡선으로부터 외삽될 수 있다. 개시된 항체의 경우, 환자에 투여되는 투여량은 전형적으로 환자의 체중의 0.0001 mg/kg 내지 100 mg/kg이다. 바람직하게는, 환자에 투여되는 투여량은 환자의 체중의 0.0001 mg/kg 내지 20 mg/kg, 0.0001 mg/kg 내지 10 mg/kg, 0.0001 mg/kg 내지 5 mg/kg, 0.0001 내지 2 mg/kg, 0.0001 내지 1 mg/kg, 0.0001 mg/kg 내지 0.75 mg/kg, 0.0001 mg/kg 내지 0.5 mg/kg, 0.0001 mg/kg 내지 0.25 mg/kg, 0.0001 내지 0.15 mg/kg, 0.0001 내지 0.10 mg/kg, 0.001 내지 0.5 mg/kg, 0.01 내지 0.25 mg/kg 또는 0.01 내지 0.10 mg/kg이다. 일반적으로, 인간 항체는 외래 폴리펩티드에 대한 면역 반응 때문에 다른 종으로부터의 항체보다는 인체 내에서 더 긴 반감기를 나타낸다. 따라서, 더 낮은 투여량의 인간 항체 및 덜 빈번한 투여가 종종 가능하다. 나아가, 항체 또는 이의 단편의 투여량 및 투여 빈도는 예를 들어, 지질화와 같은, 변형에 의해 항체의 흡수 및 조직 투과를 증진시킴으로써 감소될 수 있다.

[0395]

또 다른 구현예에서, 조성물은 제어 방출 또는 지속 방출 시스템으로 전달될 수 있다. 하나 이상의 항체를 포함하는 지속 방출 제형을 생산하기 위하여 당업자에게 공지된 임의의 기법이 이용될 수 있다. 예컨대, 미국 특허번호 4,526,938; PCT 공개 WO 91/05548; PCT 공개 WO 96/20698; Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397; Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," *Pro. Int' l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854; and Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," *Proc. Int' l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760 참조. 일 구현예에서, 제어 방출 시스템에서 펌프가 이용될 수 있다(Langer, 상기; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:20; Buchwald et al., 1980, *Surgery* 88:507; and Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574 참조). 또 다른 구현예에서, 항체의 제어 방출을 달성하기 위하여 고분자성 물질이 이용될 수 있다(예컨대, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, J., *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; See also Levy et al., 1985, *Science* 228:190; During et al., 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.* 71:105); 미국 특허번호 5,679,377; 미국 특허번호 5,916,597; 미국 특허번호 5,912,015; 미국 특허번호 5,989,463; 미국 특허번호 5,128,326; PCT 공개번호 WO 99/15154; 및 PCT 공개번호 WO 99/20253 참조). 지속 방출 제형에 이용되는 고분자의 예로는 폴리(2-하이드

록시 에틸 메타크릴레이트), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(아크릴산), 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트), 폴리(메타크릴산), 폴리글리콜라이드(PLG), 폴리무수물, 폴리(N-비닐피롤리돈), 폴리(비닐알코올), 폴리아크릴아미드, 폴리(에틸렌글리콜), 폴리락티드(PLA), 폴리(락티드-코-글리콜라이드) (PLGA), 및 폴리오르토에스테르를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 또 다른 구현예에서, 제어 방출 시스템은 치료 표적(예컨대, 폐) 가까이에 위치할 수 있으며, 따라서 전신 용량의 일부분만을 필요로 할 수 있다(예컨대, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, 상동, vol. 2, pp. 115-138 (1984) 참조). 또 다른 구현예에서, 제어 방출 이식물로서 유용한 고분자성 조성물이 Dunn 등(미국 5,945,155 참조)에 따라 이용된다. 이 특정 방법은 고분자 시스템으로부터 생물활성 물질의 제자리(in situ) 제어 방출의 치료적 효과를 기초로 한다. 이식은 일반적으로 치료적 처치가 필요한 환자의 신체 내의 어디에서나 일어날 수 있다. 또 다른 구현예에서, 비 고분자성 지속 전달 시스템이 이용되는데, 이에 의해 대상자의 신체에서 비 고분자성 이식물이 약물 전달 시스템으로 이용된다. 신체 이식 시, 이식물의 유기 용매는 조성물로부터 주변 조직 유체로 흡수되거나, 분산 또는 누출될 것이며, 비 고분자성 물질은 점차 응고되거나 침전되어 고형의, 미세다공성 매트릭스를 형성할 것이다(미국 5,888,533 참조). 제어 방출 시스템은 Langer의 리뷰에 논의되어 있다(1990, *Science* 249:1527-1533). 당업자에게 공지된 임의의 기법은 하나 이상의 치료제를 포함하는 지속 방출 제형을 제조하는 데에 이용될 수 있다. 예컨대, 미국 특허 번호 4,526,938; 국제 공제 번호 WO 91/05548 및 WO 96/20698; Ning et al., 1996, *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189; Song et al., 1995, *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397; Cleek et al., 1997, *Pro. Int' l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854; 및 Lam et al., 1997, *Proc. Int' l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760 참조.

[0396] 치료적 또는 예방적 조성물이 개시된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산인 특정 구현예에서, 핵산을 적절한 핵산 발현 벡터의 일부로서 구축하고, 예를 들어 레트로바이러스 벡터의 사용에 의해(미국 특허번호 4,980,286 참조), 또는 직접 주사에 의해, 또는 미세입자 충격(예컨대, 유전자 총; 바이오리스틱(Biolistic), 듀폰(Dupont))의 이용에 의해, 그것이 세포 내 상태가 되도록 투여하는 것, 또는 지질 또는 세포 표면 수용체 또는 형질감염제를 코팅하는 것, 또는 핵으로 진입한다고 알려져 있는 호메오박스 유사 펩티드에 연결된 상태로 그것을 투여하는 것(예컨대, Joliot et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868) 등에 의해, 핵산은 그것의 암호화된 항체의 발현을 촉진하기 위해서 생체 내로 투여될 수 있다. 대안적으로, 핵산은 상동 재조합에 의한 발현을 위하여 세포 내로 도입되어 숙주 세포 DNA 내로 통합될 수 있다.

[0397] 치료적으로 또는 예방적으로 유효한 양의 개시된 항체를 이용한 대상자의 치료는 단일 처치를 포함할 수 있거나, 바람직하게는 일련의 처치를 포함할 수 있다.

[0398] G. 약학적 조성물

[0399] 개시된 조성물은 약학적 조성물(예컨대, 불순한 또는 비 멸균 조성물) 및 단위 투여량 형태의 제제로 이용될 수 있는 약학적 조성물(즉, 대상자 또는 환자에 투여하기에 적합한 조성물)의 제조에 유용한 벌크 약물 조성물을 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 예방적으로 또는 치료적으로 유효한 양의, 본 출원에 개시된 예방제 및/또는 치료제, 또는 이들 제제의 조합 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 이러한 조성물은 예방적으로 또는 치료적으로 유효한 양의 인간화 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다.

[0400] 특정 구현예에서, 용어 “약학적으로 허용 가능한”은 연방 정부 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되었거나 미국 약전 또는 기타 동물용, 더욱 상세하게는 인간용의, 일반적으로 인정되는 약전에 열거되었음을 의미한다. 용어 “담체”는 치료제와 함께 투여되는, 희석제, 에쥔반트(예컨대, 프로인트 에쥔반트(완전 및 불완전)), 부형제 또는 용제를 지칭한다. 이러한 약학적 담체는 물 및 땅콩유, 대두유, 광유, 호마유 등과 같은, 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 오일을 포함하는 오일과 같은 멸균 액체일 수 있다. 약학적 조성물이 정맥 내로 투여될 때, 물이 바람직한 담체이다. 식염수 용액 및 수성 텍스트로오스 및 글리세롤 용액 또한 액체 담체로서, 특히 주사 가능한 용액을 위해 이용될 수 있다. 적절한 약학적 부형제로는 전분, 글루코오스, 락토오스, 수크로오스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화나트륨, 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 원한다면, 조성물은 소량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제도 함유할 수 있다. 이들 조성물은 용액, 현탁액, 에멀전, 정제, 환제, 캡슐제, 분말제, 지속 방출 제형 등의 형태를 취할 수 있다.

[0401] 일반적으로, 조성물의 성분은 활성제의 양을 표시하는 앰플 또는 사세와 같은 기밀하게 밀봉된 용기에 예를 들어, 건조 동결건조 분말 또는 무수 농축물로서, 단위 투여량 형태로 개별적으로 또는 서로 혼합되어 제공될 수

있다. 조성물이 주입에 의해 투여되는 경우, 조성물은 멸균 제약 등급수 또는 식염수를 함유하는 주입 병에 분배될 수 있다. 조성물이 주사에 의해 투여되는 경우, 주사용 멸균수 또는 식염수의 앰플이 제공될 수 있으며, 성분들이 투여 전에 혼합될 수 있다.

[0402] 조성물은 중성 또는 염 형태로 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 염은 염화수소산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 등으로부터 유래된 것들과 같은 음이온으로 형성된 염, 및 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄, 수산화칼슘, 수산화 제2철, 이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유래된 것들과 같은 양이온으로 형성된 염을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0403] **H. 키트**

[0404] 또 다른 구현에는 개시된 인간화 항체로 채워진 하나 이상의 용기를 포함하는 약학적 팩 또는 키트를 제공한다. 추가적으로, 질병의 치료에 유용한, 하나 이상의 기타 예방제 또는 치료제도 약학적 팩 또는 키트에 포함될 수 있다. 약학적 팩 또는 키트는 개시된 약학적 조성물의 성분들 중 하나 이상으로 채워진 하나 이상의 용기를 포함할 수 있다. 선택적으로 이러한 용기(들)와 관련된 내용이 제약 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해서 지시된 형태로 통지될 수 있으며, 이러한 통지는 인체 투여를 위한 제조, 사용 또는 판매 기관에 의한 승인을 반영한다.

[0405] 이러한 키트는 위의 방법에서 이용될 수 있다. 일 구현예에서, 키트는 하나 이상의 개시된 인간화 항체를 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 키트는 하나 이상의 용기에, 암 치료에 유용한 하나 이상의 다른 예방제 또는 치료제를 더 포함한다. 또 다른 구현예에서, 키트는 암과 관련된 하나 이상의 암 항원과 결합하는 하나 이상의 세포 독성 항체를 더 포함한다. 특정 구현예에서, 다른 예방제 또는 치료제는 화학치료제이다. 다른 구현예에서, 예방제 또는 치료제는 생물학적 또는 호르몬 치료제이다.

[0406] **I. 진단 방법**

[0407] 개시된 항체 및 이들의 항원 결합 단편은 H7CR 발현과 관련된 질병, 장애 또는 감염을 검출, 진단 또는 모니터링하는 것과 같은 진단 목적을 위해 이용될 수 있다. 질병, 장애 또는 감염, 특히 자가 면역 질병의 검출 또는 진단은 (a) 이러한 항원에 면역 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체(또는 이의 단편)를 이용하여 대상자의 세포 또는 조직 샘플에서 H7CR의 발현을 분석하고, (b) 항원 수준을 대조군 수준, 예컨대, 정상적인 조직 샘플에서의 수준 또는 다른 시점의 조직에서의 수준과 비교함으로써 수행될 수 있으며, 이에 의해 항원의 대조군 수준과 비교한, 분석된 항원의 수준의 증가 또는 감소가 질병, 장애 또는 감염을 나타낸다. 이러한 항체 및 단편은 바람직하게는 효소 결합 면역 흡착 분석법(ELISA), 방사성 면역 분석법(RIA) 및 형광 활성화 세포 정렬법(FACS)와 같은 면역 분석법에 이용된다.

[0408] 일 양태는 이러한 항체 및 단편의, 특히 인간 H7CR과 결합하는 이러한 항체 및 단편들의, 시험관 내의 세포 또는 제자리에서 조직 샘플 또는 생체 내에서 IHC 분석을 위한 시약으로서의 사용에 관한 것이다. 따라서, 항체 및 항체 단편은 인간에서 질병, 장애 또는 감염의 검출 및 진단에 있어서 유용성을 나타낸다. 일 구현예에서, 이러한 진단은 a) 대상자에게 효소량의, H7CR과 면역 특이적으로 결합하는, 라벨이 부착된 항체 또는 항원 결합 단편을 (예를 들어, 비경구, 피하 또는 복강 내) 투여하고; b) 라벨이 부착된 분자가 H7CR이 발현되는 대상자의 부위에 우선적으로 농축되도록 (그리고 결합되지 않은 라벨이 부착된 분자가 배경값 수준으로 제거되도록) 하기 위해 투여 후 시간 간격 동안 대기하고; c) 배경값 수준을 결정하고; d) 대상자에서 라벨이 부착된 항체를 검출하는 것을 포함하며, 그 결과, 배경값 수준을 초과하는 라벨이 부착된 항체 검출은 대상자가 질병, 장애 또는 감염을 앓고 있음을 나타낸다. 이 구현예에 따라, 항체는 당업자에게 공지된 영상화 시스템을 이용하여 검출 가능한 영상화 모이어티 라벨이 부착된다. 배경값 수준은 검출된 라벨이 부착된 분자의 양을 특정 시스템에 대해 이전에 결정된 표준값과 비교하는 것을 포함하는 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0409] 대상자 및 이용된 영상화 시스템의 규모가 진단 영상의 생산하는 데 필요한 영상화 모이어티의 양을 결정할 것이라는 점은 당해 분야에서 이해될 것이다. 생체 내 종양 영상화는 S.W. Burchiel *et al.*, "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments," (Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel and B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982)에 기술되어 있다.

[0410] 이용된 라벨의 종류 및 투여 방식을 포함하는 몇 가지 변수에 따라, 라벨이 부착된 분자가 우선적으로 대상자의 부위에서 농축되고, 결합되지 않은 라벨이 부착된 분자가 배경값 수준으로 제거되도록 하기 위한 투여 후의 시

간 간격은 6시간 내지 48시간 또는 6시간 내지 24시간 또는 6시간 내지 12시간이다. 또 다른 구현예에서, 투여 후의 시간 간격은 5 내지 20일 또는 5 내지 10일이다.

[0411] 일 구현예에서, 질병, 장애 또는 감염의 모니터링은 예를 들어, 최초 진단 후 1개월, 최초 진단 후 6개월, 최초 진단 후 1년 등에 질병, 장애 또는 감염을 진단하는 방법을 반복함으로써 이루어진다.

[0412] 라벨이 부착된 분자의 존재는 생체 내 스캐닝을 위한, 당해 분야에 공지된 방법을 이용하여 대상자에서 검출될 수 있다. 이들 방법은 이용된 라벨의 종류에 달려 있다. 당업자라면 특정 라벨을 검출하기 위한 적절한 방법을 결정할 수 있을 것이다. 진단 방법에 이용될 수 있는 방법 및 장치는 컴퓨터 단층 촬영(CT), 양전자 방출 단층 촬영(PET)과 같은 전신 스캔, 자기 공명 영상화(MRI) 및 초음파 검사를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0413] 특정 구현예에서, 분자는 방사성 동위원소로 라벨 부착되고, 방사선 반응성 수술 기기를 이용하여 환자에서 검출된다(Thurston 등, 미국 특허번호 5,441,050). 또 다른 구현예에서, 분자는 형광 화합물로 라벨 부착되고, 형광 반응성 스캐닝 기기를 이용하여 환자에서 검출된다. 또 다른 구현예에서, 분자는 양전자 방출 금속으로 라벨 부착되고, 양전자 방출 단층 촬영을 이용하여 환자에서 검출된다. 또 다른 구현예에서, 분자는 상자성 라벨로 표지되고, 자기 공명 영상화(MRI)를 이용하여 환자에서 검출된다.

[0414] 일반적으로 본 발명을 기술하였으며, 이는 예시로서 제공된 것으로 명시되지 않는 한 본 발명을 제한하는 것이 아닌 다음의 실시예를 참조하여 더욱 용이하게 이해될 것이다.

[0415] 실시예 1

[0416] 항-인간 H7CR 항체의 특성화 및 H7CR의 발현 패턴

[0417] 재료 및 방법

[0418] 결합 친화도 추정을 위해, 20만 개의 CHO.hH7CR 형질감염체(도 2), 미감작 CD4+ CD45RA+ T 세포(도 3A) 또는 미감작 CD8+ CD45RA+ T 세포(도 3B)를 100 μ l 유동 세포계수법 완충액(PBS+2%FBS)에 재현탁시켰다. 0, 0.1 ng, 0.3 ng, 1 ng, 3 ng, 10 ng, 30 ng, 100 ng, 300 ng, 1 μ g, 3 μ g 및 10 μ g의 키메라 1.3과 4.5의 계열 희석액을 세포에 첨가하고, 30분 동안 4°C에서 항은 배양하였다. 그런 다음, 세포를 2 ml 유동 세포계수법 완충액으로 2회 세척하고, 100 μ l 유동 세포계수법 완충액에 재현탁시켰다. 1 μ l 항-hIg PE 2차 항체(바이올레전드(Biolegend))를 첨가하고, 세포와 함께 15분 동안 항은 배양하였다. 그런 다음, 샘플을 세척하고, 100 μ l 유동 세포계수법 완충액에 재현탁시켰다. 유동 세포계수법 데이터를 플레이트 포맷으로 BD 칸토(Canto)(BD 바이오사이언스(Biosciences))를 이용하여 획득하고, 플로우조(FlowJo) 소프트웨어로 분석하였다. 그런 다음, 염색 데이터(MFI)를 프리즘(Prism) 5 소프트웨어에 입력하여 결합 곡선을 생성하였다. 1 부위 특이적 결합 알고리즘을 이용하는 곡선 적합은 각 항체에 대해 개별적인 K_D 를 계산한다.

[0419] 5 μ g/ml H7CR 1.3, 4.5 및 7.8 mAb를 이용하여 H7CR 안정적인 형질감염체를 염색시켜 결합 특이성을 나타내었다(도 4). 또한, 10 μ g/ml B7-H7mIg 융합 단백질을 이용하여 H7CR CHO 형질감염체를 염색시켰다. H7CR mAb를 시스템에 첨가하여 B7-H7-H7CR 상호 작용에 미치는 H7CR의 차단 능력을 평가하였다(도 5).

[0420] 인간 편도선 파라핀 포매 박편 상에서 H7CR에 대한 면역 조직 화학 염색법을 표준 프로토콜을 이용하여 5 μ g/ml 농도의 4.5 항체로 수행하였다(도 6). 세포 표면 염색 및 유동 세포계수법에 의한 분석을 위해, 세포를 지시된 mAb와 함께 4°C에서 30분 동안 항은 배양하고, 완충액으로 세척하고, 분석하였다. 인간 및 마우스 PBMC 상에서의 H7CR의 발현을 계통 마커 및 1.3 항체 염색법으로 평가하였다(도 7 내지 도 11). 활성화 단핵구 유래 DC 상에서의 B7-H7의 발현을 항-B7-H7 항체 염색법으로 평가하였다(도 12).

[0421] 결과

[0422] 햄스터 항체 1.3, 4.5 및 7.8은 인간 H7CR과 면역 특이적으로 결합할 수 있는 것으로 나타났다. 도 2는 항-H7CR 항체 1.3 및 4.5의 각각의 결합 친화도를 나타낸다. 항체 4.5는 3.5 nM의 K_D 를 나타내는 것으로 밝혀졌다. 항체 1.3은 5.9 nM의 K_D 를 나타내는 것으로 밝혀졌다. 미감작 CD4 및 CD8 T 세포에 대한 H7CR mAb 결합 곡선은 두 항체에 대한 수용체 포화 용량이 1 μ g/ml임을 나타냈다(도 3, 패널 A 및 패널 B).

[0423] 도 4(패널 A 내지 패널 C)는 항체 1.3, 4.5 및 7.8이 CHO 세포 표면 상에 발현된 인간 H7CR과 결합하는 능력을 나타낸다. 이러한 항체들을 B7-H7-귀 IgG2a 융합 단백질의 존재 하에 H7CR CHO 형질감염체와 배양함으로써 이러한 항체들이 H7CR의 B7-H7과의 상호 작용을 차단하는 능력을 시험하였다. 도 5(패널 A 내지 패널 D)에 나타난

바와 같이, H7CR 항체의 존재는 B7-H7 Ig가 H7CR과 결합하는 능력을 교란하지 않았다. 따라서, 이들 세 항체들은 H7CR의 B7-H7과의 상호 작용을 실질적으로 차단할 수 없었다. 도 6에 나타난 바와 같이, 항-인간 H7CR 항체(클론 4.5)는 인간 편도선 조직의 표면 상에 내인성 발현된 H7CR에 결합할 수 있는 것으로 밝혀졌다.

[0424]

항-H7CR 항체는 H7CR 및 B7-H7의 발현 프로파일의 결정을 가능하게 했다. 도 7은 H7CR 발현이 T 세포 및 NK 세포에서 미감작 T 세포 표현형과 관련이 있음을 보여준다. 도 8(패널 A 내지 패널 H)은 네 명의 건강한 PMBC 공여자의 H7CR 및 B7-H7의 발현 프로파일을 보여준다(공여자 1, 패널 A 및 패널 B; 공여자 2, 패널 C 및 패널 D; 공여자 3(패널 E 및 패널 F) 및 공여자 4(패널 G 및 패널 H)). 도 9(패널 A 내지 패널 H)는 네 명의 건강한 PMBC 공여자의 H7CR 및 B7-H7의 발현 프로파일을 보여준다(공여자 1, 패널 A 및 패널 B; 공여자 2, 패널 C 및 패널 D; 공여자 3(패널 E 및 패널 F) 및 공여자 4(패널 G 및 패널 H)). 도 10(패널 A 내지 패널 AD))은 인간 단핵구, CD8+ CD3+ 림프구, CD8- CD3+ 림프구, CD16+ NK 세포 및 CD3- CD8- 세포에 의한 H7CR 및 B7-H7의 발현을 보여준다. 도 11(패널 A 내지 패널 AD))은 시노물구스 원숭이 단핵구, CD8+ CD3+ 림프구, CD8- CD3+ 림프구, CD16+ NK 세포 및 CD3- CD8- 세포에 의한 H7CR 및 B7-H7의 발현을 보여주며, 시노물구스 원숭이가 생체 내 및 독성학 연구에 적합한 중임을 나타낸다.

[0425]

B7-H7의 발현의 시험관 내 기능 분석을 수행하였다. 성숙 단핵구 유래 수지상 세포를 B7-H7 및 기타 활성화 마커를 발현하는 능력에 대해 평가하였다. 이러한 연구의 결과(도 12, 패널 A 내지 패널 K)는 이러한 마커의 발현을 확인시켜주며, 성숙 수지상 세포가 시험관 내 기능 시험에 적절함을 보여준다.

[0426]

실시예 2

[0427]

항-H7CR 항체는 항원 특이적 기억 T 세포 반응을 촉진한다

[0428]

재료 및 방법

[0429]

항-H7CR 항체를 더 특성화하기 위하여, 과상풍 변독소(TT) 기억 회상 반응 분석법을 수행하였다. 단핵구 유래 미성숙 DC를 1ng/ml TNF α 및 1 μ g/ml PGE2와 2일 동안 배양하여 성숙시키고, DC 성숙의 두 번째 날에 50 μ g/ml 과상풍 변독소(TT)의 존재 하에 밤새 배양하였다. 수지상 세포를 엑스 비보(X-Vivo) 매체로 3회 세척한 다음, 100 ng/ml TT 및 10 μ g/ml H7CR 1.3, 4.5 또는 7.8 단일 클론성 항체(도 13) 또는 인간화 1.3 변이형(도 23)의 존재 하에, 2주 동안, 1:20의 비율로, 카르복시플루오레세인 석신이미딜 에스테르(CFSE) 라벨이 부착된 자가 유래 T 세포의 존재 하에 배양하였다. 유동 세포계수법을 이용하여 CFSE 회식에 의해 세포 증식을 모니터링하였다. 일부 실험에서, 인간 IFN γ 및 TNF α 의 세포 내 염색을 수행하였다. 골지 차단제 브레펠딘(Brefeldin A(eBioscience))를 DC T 세포 배양 시스템에 8시간 동안 첨가하였다. 활성화된 인간 T 세포를 수확하고, 차가운 PBS로 세척하였다. 세포 표면 마커를 먼저 염색하였다. IFN γ 및 TNF α 에 대한 세포 내 염색을 제조업체의 프로토콜(사이토폭스/사이토펜(Cytofix/Cytoperm, BD)에 따라 수행하였다.

[0430]

제조업체의 매뉴얼에 따라 바이오플렉스 프로 인간 사이토카인 17-플렉스(Bio-Plex Pro Human Cytokine 17-Plex) 키트(M5000031YV, BioRad)에 의해 총 사이토카인 분석을 위해 배양 상층액을 다른 시점에서 수집하였다. 바이오플렉스 200 시스템(바이오래드(BioRad))으로 데이터를 수집하고 분석하였다.

[0431]

결과

[0432]

이러한 분석 결과(도 13)는 항-H7CR 항체가 항원 특이적인 기억 T 세포 반응을 촉진함을 보여준다. 세포에 의해 발현된 사이토카인의 속성 및 수준을 결정하기 위하여 7일째의 상층액을 평가하였다. 이러한 분석 결과를 도 14에 나타내었다(패널 A 내지 패널 L). 결과는 항-H7CR 항체 1.3, 4.5 및 7.8이 동일하지 않은 사이토카인 발현 프로파일들을 매개하였음을 보여준다. 특히, 항체 1.3은 높은 수준의 IFN γ , TNF α , GM-CSF 및 IL-10을 매개하였고, 항체 4.5는 높은 수준의 IL-5 및 IL-13을 매개하였다.

[0433]

세포를 (PMA 및 이온마이신 없이) 골지 블록과 5시간 배양 후 세포 내 염색을 수행하였고, 그들의 세포 내 IFN γ 발현 및 카르복시플루오레세인 석신이미딜 에스테르(CFSE) 회식을 평가하였다. 이러한 조사의 결과는 항-H7CR 항체 처리가 항원 특이적인 T 세포에서 CFSE 회식 및 IFN γ 발현에 의해 나타내어진 바와 같이 증식을 증진시켰음을 나타냈다(도 15A 및 도 15B). 분열된 T 세포에서의 IFN γ + 백분율은 0.15%(도 15A; 대조군)에서 0.96%(도 15B; 항체 1.3 처리)까지 증가하였다.

[0434] 1.3 인간화 변이형 가운데(도 23), 변이형 1, 3 및 5는 TT 특이적인 T 세포의 모 키메라 1.3 항체와 비슷한 CFSE 희석의 증진을 보여주었다.

[0435] **실시예 3**

[0436] **B7-H7:H7CR 상호 작용은 항원 특이적인 인간 T 세포 반응을 조절한다**

[0437] 재료 및 방법

[0438] 항원 특이적인 T 세포 반응에 미치는 B7-H7:H7CR 경로의 역할을 결정하기 위하여, 정제된 인간 CD4⁺ T 세포를 CFSE로 표지하고, 항원으로 50 µg/ml 과상표 변독소(“TT”)와 사전 배양시킨 자가 유래의 단핵구 유래 수지상 세포와 배양하였다. 수지상 세포를 엑스 비보 매체로 3회 세척한 다음, 100 ng/ml TT 및 10 µg/ml H7CR 단일 클론성 항체의 존재 하에, 2주 동안, 1:20의 비율로, 카르복시플루오레세인 석신이미딜 에스테르(CFSE) 라벨이 부착된 자가 유래 T 세포의 존재 하에 배양하였다. 세포 증식을 유동 세포계수법을 이용한 CFSE 희석에 의해 모니터링하였다.

[0439] 결과

[0440] TT 특이적인 T 세포 증식은 (T 세포 상에서 H7CR 신호를 증폭시키기 위해) 항진적인 항-H7CR mAb를 배양액 내에 포함시킬 때 강하게 증가되는 것으로 나타났다(도 16A). 세포 배양 개시 전에 B7:CD28 상호 작용을 차단하는 융합 단백질인 CTLA4-Ig를 포함시키자 항진적인 항-H7CR mAb의 존재 하에도 불구하고 T 세포 증식이 크게 저해되었다. 이러한 결과는 H7CR 공동 자극이 내인성 B7:CD28 상호 작용에 의존함을 나타낸다.

[0441] 항진적인 항-H7CR mAb의 존재 하에 배양시킨 세포는 IFN-γ(도 16B, 패널 A) 및 IL-5, IL-10, TNF-α 및 IL-17(도 16B, 패널 B)를 포함하는, 사이토카인 생산의 실질적인 증진을 나타냈다. 이러한 결과는 H7CR 공동 자극이 CD4⁺ T 헬퍼 세포의 하위 집합에 대해 특이적이지 않음을 나타낸다. 종합하자면, 이러한 결과는 H7CR 신호가 CD28 공동 자극과 유사한 특징인, 범 인간 CD4⁺ T 세포의 성장 및 분화를 촉진함을 나타낸다.

[0442] **실시예 4**

[0443] **항-H7CR 항체 1.3 및 4.5의 인간화**

[0444] 상동성 모델화된 항체 3D 구조를 생성하고, 구조 모델링을 기초로 하여 모 항체의 프로파일을 생성하는 것을 포함한 공정을 이용하여 램프터 항-H7CR 항체 1.3 및 4.5를 인간화하였다. 일련의 인간화 중쇄 및 경쇄 가변 부위 서열들을 생성하였는데, 이들 각각은 모 항체 서열의 특정 부위들을 인간 프레임워크 서열의 대부분과 연결시켰다. 총 6개의 인간화 중쇄 서열과 6개의 인간화 경쇄 서열이 생성되었다.

[0445] 항체 1.3의 가변 도메인을 인간 배선 프레임워크 서열 데이터베이스와 비교하는 서열 정렬을 Geneious를 이용하여 생성하였다. 바람직한 수용자 프레임워크를, 프레임워크 전반에 걸친 전체 서열 동일성, 매칭 경계 위치, 비슷하게 분류된 CDR 정준 위치 및 제거되어야 할 N 글리코실화 자리의 존재를 기초로 하여 확인하였다.

[0446] 항체의 가변 경쇄 및 중쇄의 구조적 모델을 디스커버리 스튜디오(Discovery Studio)에서 생성하였다. 1.3 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 서열들로, 그것들의 CDR과 함께, 또는 CDR 없이, PDB 데이터베이스를 검색하여 주형 구조를 확인하였다. 주형에 대한 1.3 서열 정렬 및 상동성을 기초로 한 구조 모델링을 MODELLER를 이용하여 수행하였다(Sali, A. et al. (1993) “Comparative Protein Modelling By Satisfaction Of Spatial Restraints,” J. Molec. Biol. 234(3):779-815).

[0447] 모 항체 서열의 상이한 부위들을 인간 프레임워크와 결합시킨 다수의 하이브리드 서열들을 3D 모델을 이용하여 체계적으로 분석하여 CDR들의 한정된 구조에 최소한의 영향을 미칠 것으로 예상되었던 하이브리드 서열을 확인하였다(Chothia, C. et al. (1987) “Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins,” J. Mol. Biol. 196:901-917; Martin, A.C. et al. (1996) “Structural Families In Loops Of Homologous Proteins: Automatic Classification, Modelling And Application To Antibodies,” J. Molec. Biol. 263(5):800-815). 인간 프레임워크로부터의 아미노산들을 함유한, 베르니에 구역(Vernier zone), VH/VL 쇄간 경계, 또는 CDR 정준 클래스 결정 위치에서 CDR 루프의 5Å 내에 있는 하이브리드 서열들에 특별한

주의를 기울였는데, 이러한 하이브리드 서열들이 그에 따른 인간화 항체의 기능에 해로운 영향을 미칠 가능성이 더 높다고 판단되기 때문이다.

[0448]

CDR 분석 및 구조 모델링을 기초로 하여 모 항체의 프로파일을 생성하였다. 서열 및 상동성 비교를 기초로 하여 인간 수용자 프레임워크를 확인하였다. 모 항체 서열의 부분들을 인간 프레임워크 서열들과 융합하는 다중 하이브리드 서열들을 생성함으로써 인간화 항체를 설계하였다. 3D 모델을 이용하여, 이러한 인간화 서열들을 육안으로, 그리고 컴퓨터 모델링으로 체계적으로 분석하여 항원 결합을 보유했을 가능성이 가장 높은 서열들을 분리하였다. 본래의 항체 특이성을 보유하면서 최종 인간화 항체에서 인간 서열의 양을 최대화하는 것이 목표였다.

[0449]

콜리어 드 펄즈(Collier de Perles)는 가변 도메인의 2D 표현이며, 가변 도메인의 베타 가닥 및 루프의 아미노산 위치에 대한 정보를 제공한다(Ruiz, M. et al. (2002) "IMGT Gene Identification And Colliers de Perles Of Human Immunoglobulins With Known 3D Structures," Immunogenetics 53(10-11):857-883). 항체 1.3 경쇄 및 중쇄 가변 부위의 콜리어 드 펄즈를 각각 도 17A 및 도 17B에 나타내었다. 도 18A 및 도 18B는 각각 항체 4.5 경쇄 및 중쇄 가변 부위의 콜리어 드 펄즈를 보여준다. 쇠들의 세 개의 CDR 루프를 도해 상단에 나타내었다. 가변 경쇄 또는 중쇄 부위에는 자유로운 Cys 잔기 또는 N 연결 글리코실화 자리가 없다.

[0450]

항체 1.3의 인간화

[0451]

햄스터 항체 1.3 가변 도메인을 인간 배선 데이터베이스와 비교하는 서열 정렬을 생성하였다. 전반적인 서열 동일성, 매칭 경계 위치 및 유사하게 분류된 CDR 정준 위치를 기초로 하여, 두 가지 배선 패밀리를 경쇄에 대한 가능성 있는 수용자 프레임워크로 확인하였다: **IGKV4-1*01** 및 **IGKV2D-28*01**. J 세그먼트 유전자를 FR4 및 J 세그먼트에 대해 모 서열과 비교하여, 경쇄에 대해 **IGKJ2*01**을 선택했다. 이들 수용자 프레임워크에 대한 모 1.3 VL 쇠의 정렬을 표 6에 나타내었으며, 동일하지 않은 잔기들은 밑줄로 표시하였다.

표 6

[0452]

표 6		
가변 경쇄	서열 번호 #	서열
		10 20 30 40
햄스터 1.3	60	DIVMTQSPSS LAVSAGEKVT ISCLSSQSLF SSNTNRNYLN
IGKV4-1*01	61	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL YSSNNKNYLA
IGKV2D-28*01	62	DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLH HSN-GYNYLD
		50 60 70 80
햄스터 1.3	63	WYLQKPGQSP KLLIYHASTR LTGVPDRFIG SGSGTDFTLT
IGKV4-1*01	64	WYQKPGQPP KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT
IGKV2D-28*01	65	WYLQKPGQSP QLLIYLGSNR ASGVPDRFSG SGSGTDFTLK
		90 100 110
햄스터 1.3	66	ISSVQAEDLG DYYCQHHYET PLTFGDGTLK EIK
IGKV4-1*01	67	ISSLQAEDVA VYYCQYYST PYT
IGKV2D-28*01	68	ISRVEAEDVG VYYCMAQLQT PYT
IGKJ2*01	69	FGQGTLK EIK

[0453]

햄스터 항체 1.3의 중쇄는 배선 **IGHV4-31*02**와 가장 유사한 것으로 나타났다. 항체 1.3 중쇄에 대한 상위 50개의 가장 근접한 배선에서, CDR H3 중 어느 것도 1.3 중쇄와 동일한 길이를 나타내지 않는다. 따라서, 전반적인 유사성, CDR 길이 및 CDR 정준 구조를 기초로 하여, 재정렬된 중쇄를 제2의 수용자 프레임워크(**AAV33199.1**)로 선택하였다. J 세그먼트 유전자를 FR4 및 J 세그먼트에 대해 모 서열과 비교하여, 중쇄에 대해 **IGHJ3*01**을 선택했다. 이들 수용자 프레임워크에 대한 모 VH 쇠의 정렬을 표 7에 나타내었으며, 동일하지 않은 잔기들은 밑줄로 표시하였다.

표 7

[0454]

표 7		
가변 중쇄	서열 번호 #	서열

		10	20	30	40
햄스터 1.3	70	QIQLESQPG LVKPSQSLSL TCSVTGFSIS TSGYYWTWIR			
IGHV4-31*02	71	QVQLQESQPG LVKPSQTL SL TCTVSGGSIS SGGYYWSWIR			
AAV33199.1	72	QVQLQESQPG LVKPAQTL SL TCTVSGGSIS SVNYYSWIR			
		50	60	70	80
햄스터 1.3	73	QFPGKRLEWM GYINYGGGTS YNPSLKSRI S ITRDTSKNQF			
IGHV4-31*02	74	QHPGKGLEW I GYIYYSGSTY YNPSLKS RV T ISVDTSKNQF			
AAV33199.1	75	QYPGKGLEW I GYIYYRGSTY YNPSLKS RV T ISVDTSKNQF			
		90	100	110	120
햄스터 1.3	76	LLHLNSVTTE DTATYCCATM ADRFAFFDVW GQGIQVTSS			
IGHV4-31*02	77	SLKLSSVTAA DTAVYYCAR			
AAV33199.1	78	SLKLTSVTAA DTAVYHCARE RTMTGAFDIW GQGTMTVSS			
IGHJ3*01	79	DAFDVW GQGTMTVSS			

[0455] 경쇄의 경우, 두 개의 수용자 프레임워크 IGKV4-1*01 및 IGKV2D-28*01 각각에 대해 세 개의 인간화쇄들을 생성하여, 그에 의해 여섯 개의 인간화 1.3 경쇄들을 형성하였다. 각각의 수용자 프레임워크에 대한 제1 인간화쇄(VL1A, VL2A)는 가장 인간적인 프레임워크를 함유한다(인간화 경쇄 1). 각각의 수용자 프레임워크에 대한 제2 인간화쇄(VL1B, VL2B)는 인간 프레임워크 서열과 융합된 모 서열을 약간 함유하며, 이는 본래의 CDR 구조를 보유하는 데 도움을 줄 것이다(인간화 경쇄 2). 각각의 수용자 프레임워크에 대한 제3 인간화쇄(VL1C, VL2C)는 인간 프레임워크와 융합된 모 서열을 훨씬 더 함유하며, 이는 본래의 항체 특이성 및 CDR 구조를 유지하는 데 도움을 줄 것이다(인간화 경쇄 3). 이러한쇄들의 아미노산 서열을 아래에 나타내었다.

[0456] IGKV4-1*01 수용자 프레임워크로부터 유래된, 항-인간 H7CR 항체 1.3의 인간화 변이형의 경쇄 가변 부위의 아미노산 서열(CDR을 밑줄로 표시하였다):

[0457] 1. VL1A IGKV4-1*01 (인간화 1):

[0458] DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLF SSNTNRNYLA WYQQKPGQPP

[0459] KLLIYHASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQHMYET

[0460] PLTFGQGTKL EIK (서열 번호 17)

[0461] 2. VL1B IGKV4-1*01 (인간화 2):

[0462] DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLF SSNTNRNYLN WYQQKPGQSP

[0463] KLLIYHASTR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA DYVCQHMYET

[0464] PLTFGDGTKL EIK (서열 번호 18)

[0465] 3. VL1C IGKV4-1*01 (인간화 3):

[0466] DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCLSSQSLF SSNTNRNYLN WYLQKPGQSP

[0467] KLLIYHASTR LSGVPDRFIG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVG DYVCQHMYET

[0468] PLTFGDGTKL EIK (서열 번호 19)

[0469] IGKV2D-28*01 수용자 프레임워크로부터 유래된, 항-인간 H7CR 항체 1.3의 인간화 변이형의 경쇄 가변 부위의 아미노산 서열(CDR을 밑줄로 표시하였다):

[0470] 1. VL2A IGKV2D-28*01 (인간화 1):

[0471] DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLF SSNTNRNYLD WYLQKPGQSP

[0472] QLLIYHASN~~R~~ ASGVPDRFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG VYYCQHMYET

[0473] PLTFGDGTKL EIK (서열 번호 20)

[0474] 2. VL2B IGKV2D-28*01 (인간화 2):

- [0475] DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLF SSNTNRNYLN WYLQKPGQSP
- [0476] KLLIYHASTR ASGVPDRFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG VYYCQHHYET
- [0477] PLTFGDGTLK EIK (서열 번호 21)
- [0478] 3. VL2C IGKV2D-28*01 (인간화 3):
- [0479] DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCLSSQSLF SSNTNRNYLN WYLQKPGQSP
- [0480] KLLIYHASTR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG DYYCQHHYET
- [0481] PLTFGDGTLK EIK (서열 번호 22)
- [0482] 중쇄의 경우, 위에 확인된 IGHV4-31*02 및 AAY33199.1 수용자 프레임워크 각각에 대해 세 개의 인간화쇄들을 생성하였다. 경제와 비슷한 방식으로, 각각의 수용자 프레임워크에 대한 제1 인간화쇄(VH1A, VH2A)는 가장 인간적인 서열을 함유한다(인간화 1). 각각의 수용자 프레임워크에 대한 제2 인간화쇄(VH1B, VH2B)는 본래의 CDR 구조를 보유하는 데 도움을 줄 것이다(인간화 2). 각각의 수용자 프레임워크에 대한 제3쇄(VH1C, VH2C)는 본래의 항체 특이성 및 CDR 구조를 유지하는 데 도움을 줄 것이다(인간화 3). 이러한쇄들의 아미노산 서열을 아래에 나타내었다.
- [0483] IGHV4-31*02 수용자 프레임워크로부터 유래된, 항-인간 H7CR 항체 1.3의 인간화 변이형의 중쇄 가변 부위의 아미노산 서열(CDR을 밑줄로 표시하였다):
- [0484] 1. VH1A IGHV4-31*02 (인간화 1):
- [0485] QVQLQESGPG LVKPSQTL~~SL~~ TCTVSGFSIS TSGYYWSWIR QHPGKGLEWI
- [0486] GYINYGGGT~~Y~~ YNPSLKSRVT ISVDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYYCATM
- [0487] ADRFAF~~FDV~~W GQGTMTVSS (서열 번호 23)
- [0488] 2. VH1B IGHV4-31*02 (인간화 2):
- [0489] QVQLQESGPG LVKPSQTL~~SL~~ TCTVSGFSIS TSGYYWSWIR QHPGKRLEWI
- [0490] GYINYGGGT~~S~~ YNPSLKSRVT ISRDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYCCATM
- [0491] ADRFAF~~FDV~~W GQGTMTVSS (서열 번호 24)
- [0492] 3. VH1C IGHV4-31*02 (인간화 3):
- [0493] QVQLQESGPG LVKPSQTL~~SL~~ TCTVSGFSIS TSGYYWSWIR QFPGKRLEWM
- [0494] GYINYGGGT~~S~~ YNPSLKSRVT ISRDTSKNQF SLKLSSVTAA DTATYCCATM
- [0495] ADRFAF~~FDV~~W GQGTMTVSS (서열 번호 25)
- [0496] AAY33199.1 수용자 프레임워크로부터 유래된, 항-인간 H7CR 항체 1.3의 인간화 변이형의 중쇄 가변 부위의 아미노산 서열(CDR을 밑줄로 표시하였다):
- [0497] 1. VH2A AAY33199.1 (인간화 1):
- [0498] QVQLQESGPG LVKPAQTL~~SL~~ TCTVSGFSIS TSGYYWSWIR QYPGKGLEWI
- [0499] GYINYGGGT~~Y~~ YNPSLKSRVT ISVDTSKNQF SLKLTSVTAA DTAVYHCATM
- [0500] ADRFAF~~FDV~~W GQGTMTVSS (서열 번호 26)
- [0501] 2. VH2B AAY33199.1 (인간화 2):
- [0502] QVQLQESGPG LVKPAQTL~~SL~~ TCTVSGFSIS TSGYYWSWIR QYPGKRLEWI
- [0503] GYINYGGGT~~S~~ YNPSLKSRVT ISRDTSKNQF SLKLTSVTAA DTATYCCATM
- [0504] ADRFAF~~FDV~~W GQGTMTVSS (서열 번호 27)
- [0505] 3. VH2C AAY33199.1 (인간화 3):

[0506] QVQLQESGPG LVKPAQTL~~SL~~ TCTVSGFSIS TSGYYWSWIR QFPGKRLEWM

[0507] GYIN~~YGGG~~TS YNPSLKSRVT ISRDTSKNQF SLKLTSVTAA DTATYCCATM

[0508] ADRFAFFDVW GQGTMTVSS (서열 번호 28)

[0509] 바람직한 항체 및 이들의 항원 결합 단편들은 항-인간 H7CR 항체 1.3의 위에 기술된 인간화 변이형들의 36개 조합 중 임의의 것을 포함한다. 구체적으로, 이러한 항체는 표 4에 나타난 조합을 함유한다. 항-인간 H7CR 항체 1.3의 모든 36개의 이러한 인간화 변이형들을 대상으로, CHO 세포의 표면 상에서 이소적으로 발현된 인간 H7CR 분자들과 결합하는 능력을 평가하였으며, 36개 중 28개가 이러한 인간 H7CR 분자와 결합할 수 있는 것으로 나타났다.

[0510] 항-H7CR 항체 4.5의 인간화

[0511] 햄스터 항체 4.5 가변 도메인을 인간 배선 데이터베이스와 비교하는 서열 정렬을 생성하였다. 전반적인 서열 동일성, 매칭 경계 위치 및 유사하게 분류된 CDR 정준 위치를 기초로 하여, 두 가지 배선 패밀리를 경계에 대한 가능성 있는 수용자 프레임워크로 확인하였다: IGKV4-1*01 및 IGKV2D-40*01. J 세그먼트 유전자를 FR4 및 J 세그먼트에 대해 모 서열과 비교하여, 경계에 대해 IGKJ5*01을 선택했다. 이들 수용자 프레임워크에 대한 모 1.3 VL 쇠의 정렬을 표 8에 나타내었으며, 동일하지 않은 잔기들은 밑줄로 표시하였다.

표 8

[0512]

표 8		
가변 경쇄	서열 번호 #	서열
		10 20 30 40
햄스터 4.5	80	DIVMTQSPSS LAVSAGEKVT ISCLSSQSLF SSNTKRN YLN
IGKV4-1*01	81	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQS VL YSSNNK NYLA
IGKV2D-40*01	82	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQS LL DSDDGNT YLD
		50 60 70 80
햄스터 4.5	83	WYLQKPGQSP KLLIYHA STR LTGV PGR FIG SGSGTD FTLT
IGKV4-1*01	84	WYQKPGQPP KLLIYWA STR ESGVPDRFSG SGSGTD FTLT
IGKV2D-40*01	85	WYLQKPGQSP QLLIY TL SYR ASGVPDRFSG SGSGTD FTLK
		90 100 110
햄스터 4.5	86	VSTVQAEDLG DYFCQ QHY ET PLTFGD GTRL EIK
IGKV4-1*01	87	ISSLQAEDVA VY YCQ QY ST PYT
IGKV2D-40*01	88	ISRVEAEDVG VY YCM QRIEF P
IGKJ5*01	89	ITF GQ GTRL EIK

[0513] 햄스터 항체 4.5의 중쇄는 배선 IGHV4-31*02와 가장 유사한 것으로 나타났다. 항체 4.5 중쇄에 대한 상위 50개의 가장 근접한 배선에서, 유사한 정준 구조를 나타냈던 제2 수용자 프레임워크는 IGHV2-5*01이다. J 세그먼트 유전자를 FR4 및 J 세그먼트에 대해 모 서열과 비교하여, 중쇄에 대해 IGHJ5*01을 선택했다. 이들 수용자 프레임워크에 대한 모 VH 쇠의 정렬을 표 9에 나타내었으며, 동일하지 않은 잔기들은 밑줄로 표시하였다.

표 9

[0514]

표 9		
가변 중쇄	서열 번호 #	서열
		10 20 30 40
햄스터 4.5	90	QIQLQESGPG LVKPSQSL SL TCSVTGFSIT TGGYYWNWIR
IGHV4-31*02	91	QVQLQESGPG LVKPSQTL SL TCTVSGFSIS SGGYYWSWIR
IGHV2-5*01	92	QITLKESGPT LVKPTQT TL TCTFSGFSL S TSGVGVGWIR
		50 60 70 80
햄스터 4.5	93	QFPGKKLEWM GYIYTSGR TS YNPSLKSRIS ITRDTSKNQF

IGHV4-31*02	94	QHPGKGLEW <u>I</u> GYIYYSGSTY YNPSLKSRV <u>T</u> ISVDTSKNQF
IGHV2-5*01	95	QPPGKALEW <u>L</u> <u>AL</u> IYWDDK <u>R</u> YSPSLKSRL <u>T</u> ITKDTSKNQV
		90 100 110 120
햄스터 4.5	96	FLQLNSMTTE DTATYYCADM ADKGGWFAYW GQGLTVTVSS
IGHV4-31*02	97	SLKLSSVTAA DTAVYYCA-- -- <u>R</u>
IGHV2-5*01	98	<u>VL</u> TMTNMDPV DTATYYCA-- -- <u>HR</u>
IGHJ5*01	99	NWFD <u>SW</u> GQGLTVTVSS

경쇄의 경우, 두 개의 수용자 프레임워크 IGKV4-1*01 및 IGKV2D-40*01 각각에 대해 세 개의 인간화쇄들을 생성하여, 그에 의해 여섯 개의 인간화 4.5 경쇄들을 형성하였다. 각각의 수용자 프레임워크에 대한 제1 인간화쇄(VL1A, VL2A)는 가장 인간적인 프레임워크를 함유한다(인간화 경쇄 1). 각각의 수용자 프레임워크에 대한 제2 인간화쇄(VL1B, VL2B)는 인간 프레임워크 서열과 융합된 모 서열을 약간 함유하며, 이는 본래의 CDR 구조를 보유하는 데 도움을 줄 것이다(인간화 경쇄 2). 각각의 수용자 프레임워크에 대한 제3 인간화쇄(VL1C, VL2C)는 인간 프레임워크와 융합된 모 서열을 훨씬 더 함유하며, 이는 본래의 항체 특이성 및 CDR 구조를 유지하는 데 도움을 줄 것이다(인간화 경쇄 3). 이러한쇄들의 아미노산 서열을 아래에 나타내었다.

IGKV4-1*01 수용자 프레임워크로부터 유래된, 항-인간 H7CR 항체 4.5의 인간화 변이형의 경쇄 가변 부위의 아미노산 서열(CDR을 밑줄로 표시하였다):

1. VL1A IGKV4-1*01 (인간화 1):

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLF SSNTKRNYLA WYQQKPGQPP

KLLIYHASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQQHYET

PLTFGGTRLEIK (서열 번호 33)

2. VL1B IGKV4-1*01 (인간화 2):

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLF SSNTKRNYLN WYQQKPGQPP

KLLIYHASTR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA DYFCQQHYET

PLTFGDGTRL EIK (서열 번호 34)

3. VL1C IGKV4-1*01 (인간화 3):

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCLSSQSLF SSNTKRNYLN WYQQKPGQSP

KLLIYHASTR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA DYFCQQHYET

PLTFGDGTRL EIK (서열 번호 35)

IGKV2D-40*01 수용자 프레임워크로부터 유래된, 항-인간 H7CR 항체 4.5의 인간화 변이형의 경쇄 가변 부위의 아미노산 서열(CDR을 밑줄로 표시하였다):

1. VL2A IGKV2D-40*01 (인간화 1):

DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLF SSNTKRNYLD WYLQKPGQSP

QLLIYHASYR ASGVPDRFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG VYYCQQHYET

PLTFGGTRLEIK (서열 번호 36)

2. VL2B IGKV2D-40*01 (인간화 2):

DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLF SSNTKRNYLN WYLQKPGQSP

KLLIYHASTR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG DYFCQQHYET

PLTFGDGTRL EIK (서열 번호 37)

- [0538] 3. VL2C IGKV2D-40*01 (인간화 3):
- [0539] DIVMTQTPSS LPVTPGEPAS ISCLSSQSLF SSNTKRNYL N WYLQKPGQSP
- [0540] KLLIYHASTR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG DYFCQQHYET
- [0541] PLTFGDGTRL EIK (서열 번호 38)
- [0542] 중쇄의 경우, 위에 확인된 IGHV4-31*02 및 IGHV2-5*01 수용자 프레임워크 각각에 대해 세 개의 인간화쇄들을 생성하였다. 경쇄와 비슷한 방식으로, 각각의 수용자 프레임워크에 대한 제1 인간화쇄(VH1A, VH2A)는 가장 인간적인 서열을 함유한다(인간화 1). 각각의 수용자 프레임워크에 대한 제2 인간화쇄(VH1B, VH2B)는 본래의 CDR 구조를 보유하는 데 도움을 줄 것이다(인간화 2). 각각의 수용자 프레임워크에 대한 제3쇄(VH1C, VH2C)는 본래의 항체 특이성 및 CDR 구조를 유지하는 데 도움을 줄 것이다(인간화 3). 이러한쇄들의 아미노산 서열을 아래에 나타내었다.
- [0543] IGHV4-31*02 수용자 프레임워크로부터 유래된, 항-인간 H7CR 항체 4.5의 인간화 변이형의 중쇄 가변 부위의 아미노산 서열(CDR을 밑줄로 표시하였다):
- [0544] 1. VH1A IGHV4-31*02 (인간화 1):
- [0545] QVQLQESGPG LVKPSQTL SL TCTVSGFSIT TGGYYWSWIR QHPGKGLEWI
- [0546] GYIYTSGRIT YNPSLKSRVT ISVDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYYCADM
- [0547] ADKGGWFAYW GQGT LVT VSS (서열 번호 39)
- [0548] 2. VH1B IGHV4-31*02 (인간화 2):
- [0549] QVQLQESGPG LVKPSQTL SL TCTVSGFSIT TGGYYWNWIR QHPGKLEWI
- [0550] GYIYTSGRIT YNPSLKSRVT ISRDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYYCADM
- [0551] ADKGGWFAYW GQGT LVT VSS (서열 번호 40)
- [0552] 3. VH1C IGHV4-31*02 (인간화 3):
- [0553] QVQLQESGPG LVKPSQTL SL TCTVSGFSIT TGGYYWNWIR QFPGKKLEWM
- [0554] GYIYTSGRIT YNPSLKSRVT ISRDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYYCADM
- [0555] ADKGGWFAYW GQGT LVT VSS (서열 번호 41)
- [0556] IGHV2-5*01 수용자 프레임워크로부터 유래된, 항-인간 H7CR 항체 4.5의 인간화 변이형의 중쇄 가변 부위의 아미노산 서열(CDR을 밑줄로 표시하였다):
- [0557] 1. VH2A IGHV2-5*01 (인간화 1):
- [0558] QITLKESGPT LVKPTQTL TL TCTFSGFSIT TGGYYVGWIR QPPGKALEWL
- [0559] ALIYTSGRIT YSPSLKSRLT ITKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCADM
- [0560] ADKGGWFAYW GQGT LVT VSS (서열 번호 42)
- [0561] 2. VH2B IGHV2-5*01 (인간화 2):
- [0562] QITLKESGPT LVKPTQTL TL TCTVSGFSIT TGGYYWNWIR QPPGKLEWL
- [0563] ALIYTSGRIT YNPSLKSRIT ITKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCADM
- [0564] ADKGGWFAYW GQGT LVT VSS (서열 번호 43)
- [0565] 3. VH2C IGHV2-5*01 (인간화 3):
- [0566] QITLKESGPT LVKPTQTL TL TCTVSGFSIT TGGYYWNWIR QPPGKKLEWM
- [0567] ALIYTSGRIT YNPSLKSRIT ITKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCADM
- [0568] ADKGGWFAYW GQGT LVT VSS (서열 번호 44)

[0569] 바람직한 항체 및 이들의 항원 결합 단편들은 항-인간 H7CR 항체 4.5의 위에 기술된 인간화 변이형들의 36개 조합 중 임의의 것을 포함한다. 구체적으로, 이러한 항체는 표 5에 나타난 조합을 함유한다. 항-인간 H7CR 항체 4.5의 모든 36개의 이러한 인간화 변이형들을 대상으로, 세포의 표면 상에서 내인성으로 발현된 인간 H7CR 분자들과 결합하는 능력을 평가하였으며, 전부가 이러한 인간 H7CR 분자와 결합할 수 있는 것으로 나타났다.

[0570] **실시예 5**

[0571] **항체 1.3은 생체 내에서 T 세포 기능성을 증가시킨다**

[0572] 재료 및 방법

[0573] 1500만~2000만 개의 인간 PBMC 또는 1000만 개의 정제된 민감작 CD4+ 인간 T 세포를 NOD-SCID Il2rg^{-/-} (NSG) 마우스(잭슨 랩(Jackson Lab))에 복강 내로 전달하였다. 0일과 2일, 각 마우스에 300 킬 대조군 또는 H7CR mAb 1.3을 복강 내로 접종하였다. 전달 후 6일, 지라세포를 수확하였다. 인간 CD45, CD3 및 CD8에 대해 염색하여 인간 T 세포를 검출하였다. 세포 분열을 모니터링하기 위하여, 전달 전에 hPBMC를 CFSE로 라벨 부착하였다.

[0574] 결과

[0575] 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포에서 CFSE 희석 집단의 증가된 개체수에 의해 증명되는 바와 같이, 유동 세포계수적 분석법은 항체 1.3이 인간 항-마우스 이중 반응성 T 세포들을 확대시켰음을 보여주었다(도 19A 내지 도 19D).

[0576] **실시예 6**

[0577] **항체 1.3은 생체 내에서 CD40L, IFN γ 및 CD107a 발현을 증가시킨다: 이중 GvDH 모델**

[0578] 재료 및 방법

[0579] 1500만~2000만 개의 인간 PBMC 또는 1000만 개의 정제된 민감작 CD4+ 인간 T 세포를 NOD-SCID Il2rg^{-/-} (NSG) 마우스(잭슨 랩(Jackson Lab))에 복강 내로 전달하였다. 0일과 2일, 각 마우스에 300 킬 대조군 또는 H7CR mAb 1.3을 복강 내로 접종하였다. 전달 후 6일, 지라세포를 수확하였다. 인간 CD45, CD3 및 CD8에 대해 염색하여 인간 T 세포를 검출하였다. IFN- γ 또는 CD107a 생성 세포를 검출하기 위하여 PMA 더하기 이오노마이신으로 시험관 내에서 지라세포를 재자극하였다. 세포 분열을 모니터링하기 위하여, 전달 전에 hPBMC를 CFSE로 라벨 부착하였다.

[0580] 결과

[0581] 도 20A 내지 도 20H는 항체 1.3을 주사한 NSG 마우스에서 CD40L, IFN γ 및 CD107a의 증가된 발현을 나타내는 FACS 분석의 산포도이다. 1.3 항체는 대조군 항체 처리된 마우스와 비교할 때 막 결합 CD40L의 CD4+ T 세포 발현 및 IFN- γ 생산을 유의미하게 증진시켰다. 또한, 1.3 항체 처리는 세포 용해 활성을 나타내는 CD8+ T 세포 상에서의 CD107a의 발현뿐만 아니라, IFN- γ 생산을 증가시켰다. 요약하자면, 1.3 항체 처리는 이중 반응성 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 확대 및 효과기 기능을 촉진하였다.

[0582] **실시예 7**

[0583] **항체 1.3의 변이형의 특성화**

[0584] 재료 및 방법

[0585] PBS에 희석시킨 100 μ l 1 μ g/ml H7CRECD 인간 IgG1 Fc 융합 단백질을 넓은 바닥 96웰 플레이트(코스타(Costar) 9017) 상에 밤새 4℃에서 고정화하였다. 플레이트를 PBS+0.1% PS-20으로 2회 세척하고, 200 μ l/웰 PBS 10% FBS로 실온에서 1시간 동안 차단시켰다. 각 웰에 PBS 10%FBS에 희석시킨 100 μ l 인간 IgG4 Fc 키메라 1.3 및 14개의 선택된 1.3 인간화 변이형을 첨가하고 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 플레이트를 3회 세척하고, 각 웰에 100 μ l 1 μ g/ml 항-인간 IgG4 HRP(서던 바이오테크(Southern Biotech))를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 플레이트를 6회 세척하고, 100 μ l TMB 기질(서모딕스(SurModics))을 각 웰에 5~15분 동안 첨가하였다. 100 μ l의 정지 용액(0.1M 황산)을 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 퍼킨엘머 엔비전

(PerkinElmer Envision) 2104 멀티라벨 판독기로 흡광도 450nm에서 판독하였다.

[0586] H7CR 융합 단백질에 대한 ELISA 분석법을 이용하여 항체 1.3의 14개의 변이형에 대한 결합 친화도를 조사하였다.

[0587] 결과

[0588] 결합 친화도 결과를 표 10에 나타내었다.

표 10

[0589]

항체	중쇄	경쇄	EC ₅₀ (nM)
키메라			0.055
V1	1A 서열 번호 23	1A 서열 번호 17	0.84
V2	1B 서열 번호 24	1A 서열 번호 17	0.23
V3	1C 서열 번호 25	1A 서열 번호 17	0.38
V4	2A 서열 번호 26	1A 서열 번호 17	1.08
V5	2B 서열 번호 27	1A 서열 번호 17	0.28
V6	2C 서열 번호 28	1A 서열 번호 17	0.30
V7	1B 서열 번호 24	1B 서열 번호 18	1.01
V8	1C 서열 번호 25	1B 서열 번호 18	0.74
V9	2B 서열 번호 27	1B 서열 번호 18	2.43
V10	2C 서열 번호 28	1B 서열 번호 18	1.18
V11	1B 서열 번호 24	1C 서열 번호 19	1.04
V12	1C 서열 번호 25	1C 서열 번호 19	0.75
V13	2B 서열 번호 27	1C 서열 번호 19	0.45
V14	2C 서열 번호 28	1C 서열 번호 19	0.32

[0590] 도 21A 및 21B는 (좌에서 우로) 인간화 항체 1.3, 음성 대조군, OKT3, OKT3 +CD28, 인간화 항체-고정, 음성 대조군 고정, 및 OKT3-고정으로 처리된, 휴지 중 또는 자극된 PMBC의 도트 플롯이다. 인간 키메라 1.3 항체에 대한 노출 시, 사이토카인 생산의 통계적으로 유의미한 증가가 전혀 관찰되지 않았다. 그 결과, 1.3 항체 처리는 이러한 시험관 내 셋팅에서는 T 세포 사이토카인 폭풍을 유도하지 않는다.

[0591] 키메라 1.3 항체에 대한 서열은 다음과 같다:

[0592] 중쇄 핵산 서열:

[0593] GTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCAGCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCTAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCAGGAAGA
GATGACCAAGAATCAGGTGTCAGCTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCCGAGAACA
CAAGACCAACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTTCTTCTGTACTCTCGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTGTTCTCCTG
CTCTGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCCCCGGCTGATGA (서열 번호 100).

[0594] 경쇄 핵산 서열:

[0595] ATGTCGGTGCCACCCAGGTGCTGGGATTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGATGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTCCTCCCTGGCTGTGTCTGCTGGCGAGAAAGTGACCATCTCCTGCCTGCTCCTCCAGTCCCTGTTCTCTCCAACCAACCGGAACCTACCTGAAGTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCTAAGTGCTGATCTACCACGCTCCACCAGACTGACCGGCGTCCCCGATAGATTATCGGCTCTGGCTCCGGCACCAGACTTTACCTGACCATCAGCTCCGTGCAGGCCGAGGACCTGGGCGACTACTACTGCCAGCACCCTACGAGACACCCCTGACCTTTGGCGACGGCACCAGCTGGAATCAAGCGGACCGTGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACCTTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCACTCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCAGCACCCTGACCCCTGTCCAAGGCCACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGCGAGTGCTGATGA (서열 번호 101).

[0596] 중쇄 단백질 서열:

[0597] MEWSVVFLLSVTTGVHSQIQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGFSISTSGYYWTWIRQFPGRLEWMGYINYGGGTSYNPSLSKRSISITRDTSKNQFLHLNSVTTEDTATYCCATMADRFAFFDVWGQGIQVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVHLQDNLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTI SAKAGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG** (서열 번호 11).

[0598] 경쇄 단백질 서열:

[0599] MSVPTQVLGLLLLWLTARCDIVMTQSPSSSLAVSAGEKVTISCLSSQSLFSSNTNRNYLNWYLQKPGQSPKLLIYHASTRLTGVPDRFIGSGSGTDFTLTISVQAEDLDGYQCQHHYETPLTFGDGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC** (서열 번호 12).

[0600] 실시예 8

[0601] 인간화 H7CR 항체 4.5 변이형

[0602] 재료 및 방법

[0603] 36개 변이형으로부터 5 µg/ml 항체를 H7CR-GFP 융합 단백질로 형질감염된 CHO 세포와 함께 실온에서 30분 동안 배양하였다. 그런 다음, 세포를 2ml 유동 세포계수법 완충액으로 2회 세척하고, 100 µl 유동 세포계수법 완충액에 재현탁시켰다. 1 µl 항-hIg PE 2차 항체(바이오레전드(Biolegend))를 첨가하고, 세포와 함께 15분 동안 배양하였다. 그런 다음, 샘플을 세척하고, 100 µl 유동 세포계수법 완충액에 재현탁시켰다. 유동 세포계수법 데이터를 플레이트 포맷으로 BD 칸토(Canto)(BD 바이오사이언스(Biosciences))를 이용하여 획득하고, 플로우조(FlowJo) 소프트웨어로 분석하였다. X 축은 H7CR-GFP 발현을 나타내고, Y 축은 형질감염체에 대한 변이형 결합을 나타낸다.

[0604] 결과

[0605] H7CR 항체 4.5의 36개 인간화 변이형을 H7CR에 대한 결합 특이성에 대해 분석하였다. 결과를 도 23에 제시하였다. 모든 36개의 4.5 인간화 변이형은 H7CR에 대해 결합 특이성을 유지한다.

표 11

[0606]

	4.5 인간화 변이형			
변이형 #	중쇄		경쇄	
1	HC1-1	(서열 번호 39)	LC1-1	(서열 번호 33)
2	HC1-1	(서열 번호 39)	LC1-2	(서열 번호 34)
3	HC1-1	(서열 번호 39)	LC1-3	(서열 번호 35)
4	HC1-1	(서열 번호 39)	LC2-1	(서열 번호 36)
5	HC1-1	(서열 번호 39)	LC2-2	(서열 번호 37)
6	HC1-1	(서열 번호 39)	LC2-3	(서열 번호 38)
7	HC1-2	(서열 번호 40)	LC1-1	(서열 번호 33)
8	HC1-2	(서열 번호 40)	LC1-2	(서열 번호 34)
9	HC1-2	(서열 번호 40)	LC1-3	(서열 번호 35)

10	HC1-2	(서열 번호 40)	LC2-1	(서열 번호 36)
11	HC1-2	(서열 번호 40)	LC2-2	(서열 번호 37)
12	HC1-2	(서열 번호 40)	LC2-3	(서열 번호 38)
13	HC1-3	(서열 번호 41)	LC1-1	(서열 번호 33)
14	HC1-3	(서열 번호 41)	LC1-2	(서열 번호 34)
15	HC1-3	(서열 번호 41)	LC1-3	(서열 번호 35)
16	HC1-3	(서열 번호 41)	LC2-1	(서열 번호 36)
17	HC1-3	(서열 번호 41)	LC2-2	(서열 번호 37)
18	HC1-3	(서열 번호 41)	LC2-3	(서열 번호 38)
19	HC2-1	(서열 번호 42)	LC1-1	(서열 번호 33)
20	HC2-1	(서열 번호 42)	LC1-2	(서열 번호 34)
21	HC2-1	(서열 번호 42)	LC1-3	(서열 번호 35)
22	HC2-1	(서열 번호 42)	LC2-1	(서열 번호 36)
23	HC2-1	(서열 번호 42)	LC2-2	(서열 번호 37)
24	HC2-1	(서열 번호 42)	LC2-3	(서열 번호 38)
25	HC2-2	(서열 번호 43)	LC1-1	(서열 번호 33)
26	HC2-2	(서열 번호 43)	LC1-2	(서열 번호 34)
27	HC2-2	(서열 번호 43)	LC1-3	(서열 번호 35)
28	HC2-2	(서열 번호 43)	LC2-1	(서열 번호 36)
29	HC2-2	(서열 번호 43)	LC2-2	(서열 번호 37)
30	HC2-2	(서열 번호 43)	LC2-3	(서열 번호 38)
31	HC2-3	(서열 번호 44)	LC1-1	(서열 번호 33)
32	HC2-3	(서열 번호 44)	LC1-2	(서열 번호 34)
33	HC2-3	(서열 번호 44)	LC1-3	(서열 번호 35)
34	HC2-3	(서열 번호 44)	LC2-1	(서열 번호 36)
35	HC2-3	(서열 번호 44)	LC2-2	(서열 번호 37)
36	HC2-3	(서열 번호 44)	LC2-3	(서열 번호 38)

[0607] 카메라 4.5 항체에 대한 서열 데이터는 다음과 같다:

[0608] 중쇄 핵산 서열:

[0609] GTCCAACAAGGCGCTGCCAGCTCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCTAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCAGGAAGA
GATGACCAAGAATCAGGTGTCAGTGACCTGTCTCGTAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCGAGAACAACTA
CAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTTCTGTACTCTCGCCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTGTCTCTCTG
CTCTGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCCCCGGCTGATGA (서열 번호 13).

[0610] 경쇄 핵산 서열:

[0611] ATGTCCGTGCCACCCAGGTGCTGGGATTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGATGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTCCTCCCTGGCTGTGTCT
GCTGGCGAGAAAGTGACCATCTCCTGCCTGTCTCCAGTCCCTGTTCTCCAGCAACACCAAGCGGAATACCTGAAGTGGTATCTGCAGAACCCCGGCCAG
TCCCTAAGCTGTGATCTACACGCTCCACAGACTGACCGCGTGCCCGGAAGATTATCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGCTTCACCCGTACCGGTGTCT
ACCGTGCAGGCCGAGGACCTGGGCGACTACTTCTGCCAGCAGCACTACGAGACACCCCTGACCTTTGGCGACGGCACCCGGCTGGAATCAAGAGAACCGTG
GCCGCTCCCTCCGTGTTCTATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGTGAAGTCCGGCACCGCTTCTGTCTGTGCCTGTGAACAACCTTCTACCCCGCGAGGCC
AAGGTGACGTGGAAGGTGACAACGCCCTGCAGTCCGGCACTCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACTACTCCCTGTCTCTACC
CTGACCCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGC
GAGTGCTGATGA (서열 번호 14).

[0612] 중쇄 단백질 서열:

[0613] MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQIQLESGLVKPSQSLSLTCSVTGFSITTGYYWNWIRQFPGKKLEWMGYIYTSGRTSYNPSLKSRISTRDTSKNQFFLQ
LNSMTTDTATYYCADMADKGGWFAYWQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHFTFPAVLQSSGLYSL
SSVTVTPSSSLGKTYITCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SAKAGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN

NYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPG** (서열 번호 15).

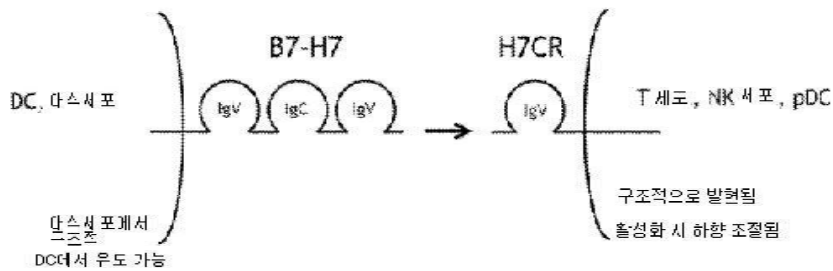
[0614] 경쇄 단백질 서열:

[0615] MSVPTQVLGLLLLWLTARCDIVMTQSPSSLAVSAGEKVTISCLSSQSLFSSNTKRNLYLNWYLQKPGQSPKLLIYHASTRLTGVPGRFIGSGSGTDFTLTVS
TVQAEDLGDFCQGHYETPLTFGDGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSST
LTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC** (서열 번호 16).

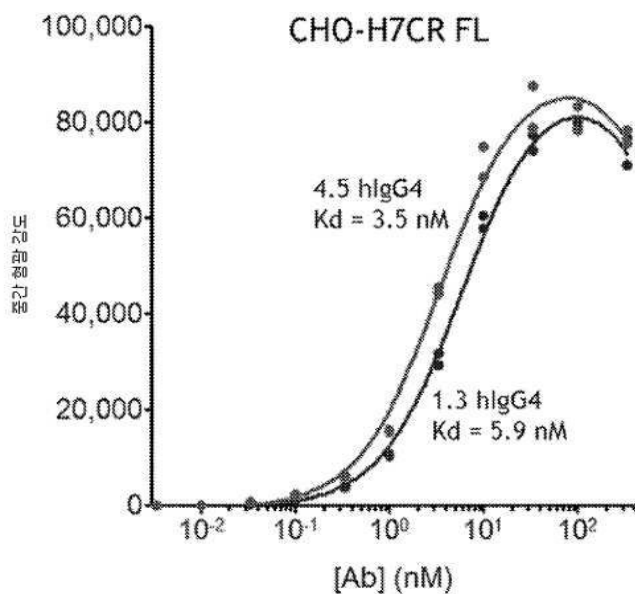
[0616] 이 명세서에 언급된 모든 출판물 및 특허는 각각 개별적인 출판물 또는 특허 출원이 그 전체가 참조로써 포함되도록 구체적으로 그리고 개별적으로 표시된 것과 동일한 정도로 본 출원에 참조로써 포함된다. 본 발명을 이의 구체적인 구현예와 연결하여 설명하였지만, 추가적인 변형이 가능하며, 이 출원은, 일반적으로 발명의 원칙에 따르며, 본 발명이 속한 분야에서 공지된 또는 통상의 실시 범위에 해당하고 본 출원에 이미 기재된 필수적인 특징들에 적용될 수 있는 본 개시로부터의 벗어남을 포함하는, 본 발명의 임의의 변형, 이용 또는 개조를 아우르도록 의도된 것임을 이해할 것이다.

도면

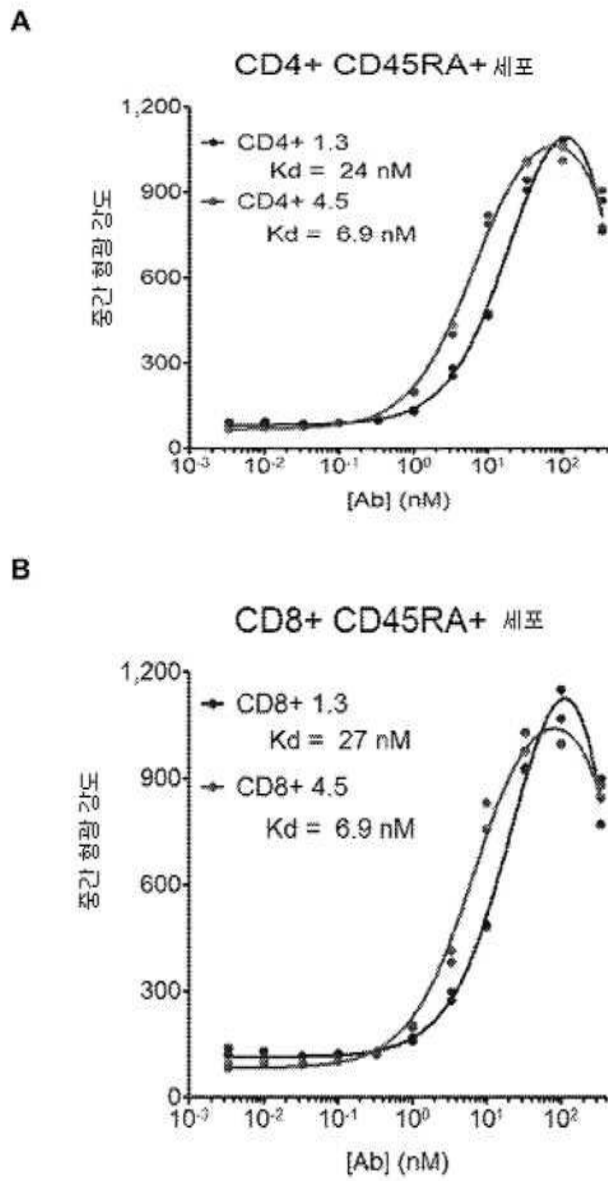
도면1



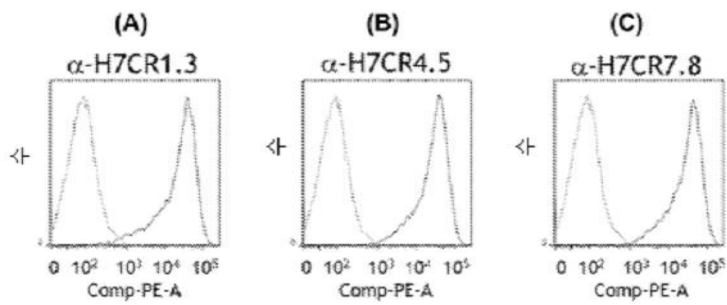
도면2



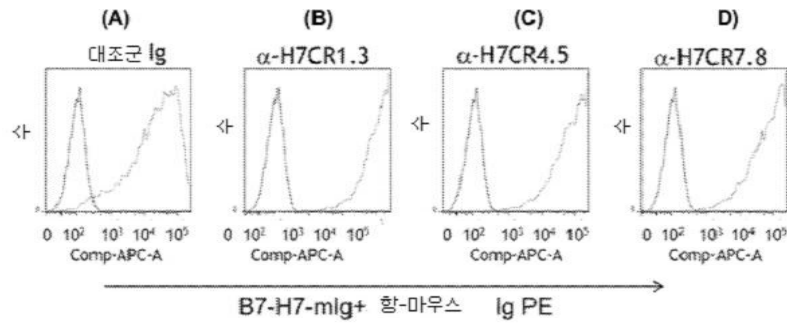
도면3



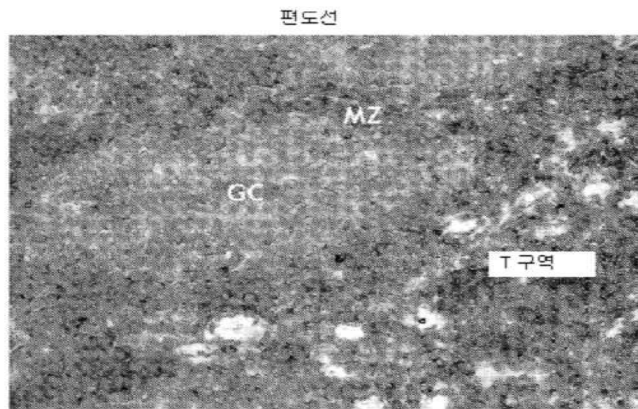
도면4



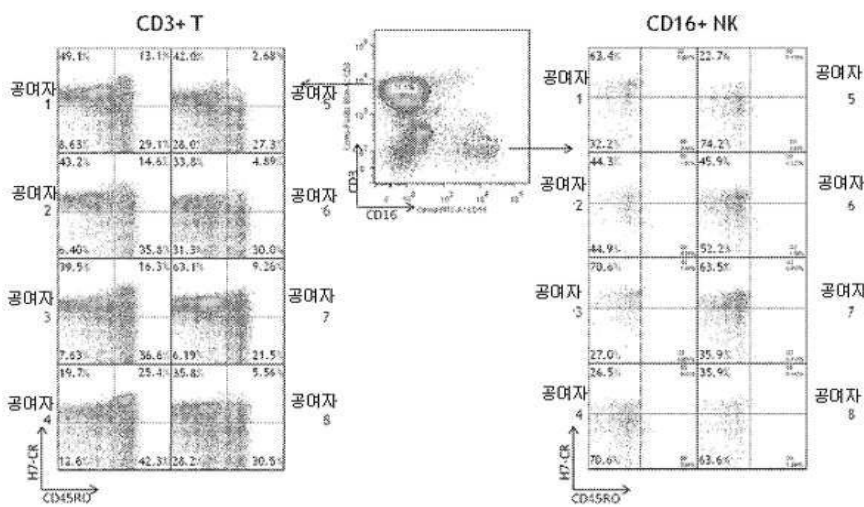
도면5



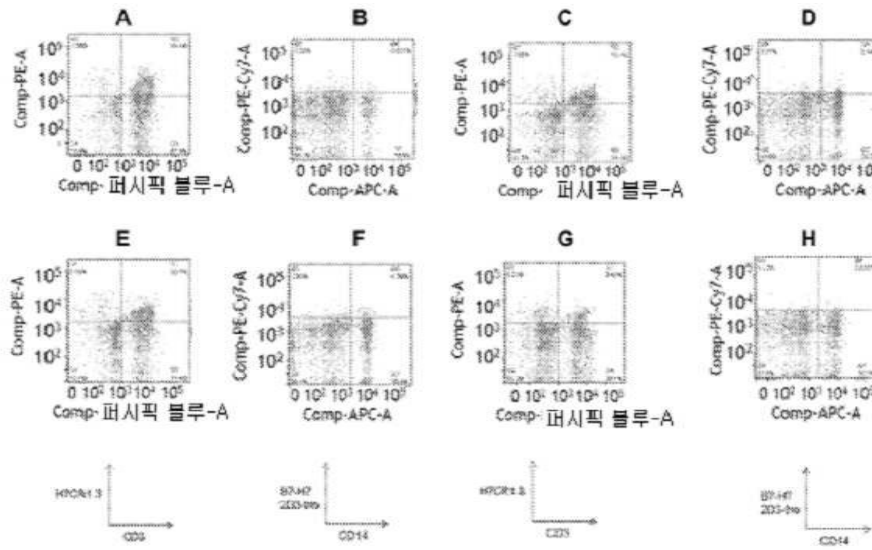
도면6



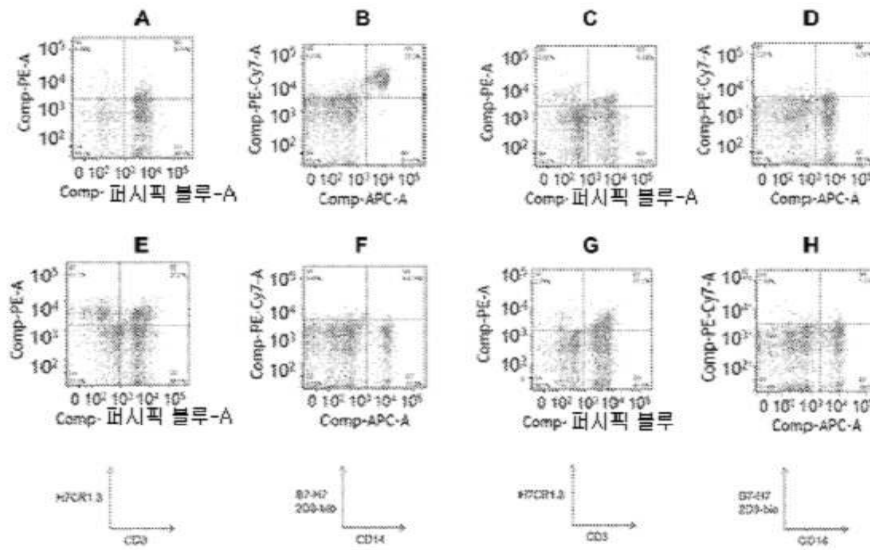
도면7



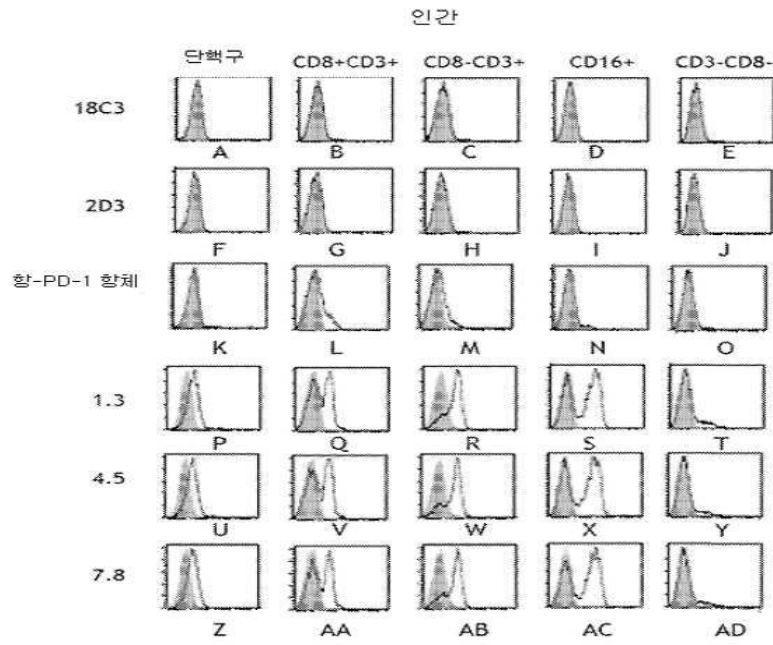
도면8



도면9

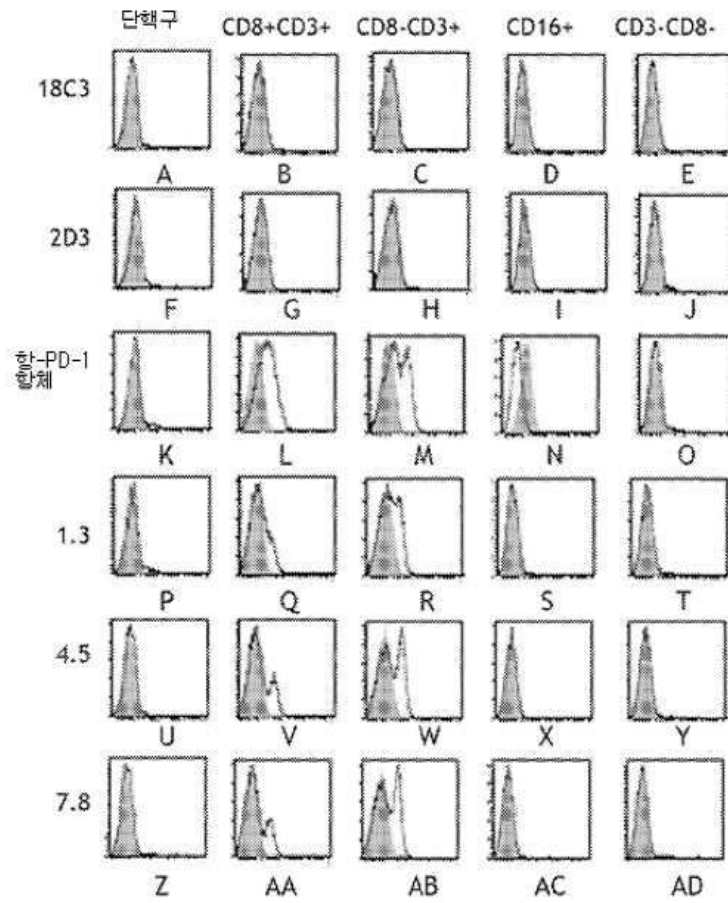


도면10

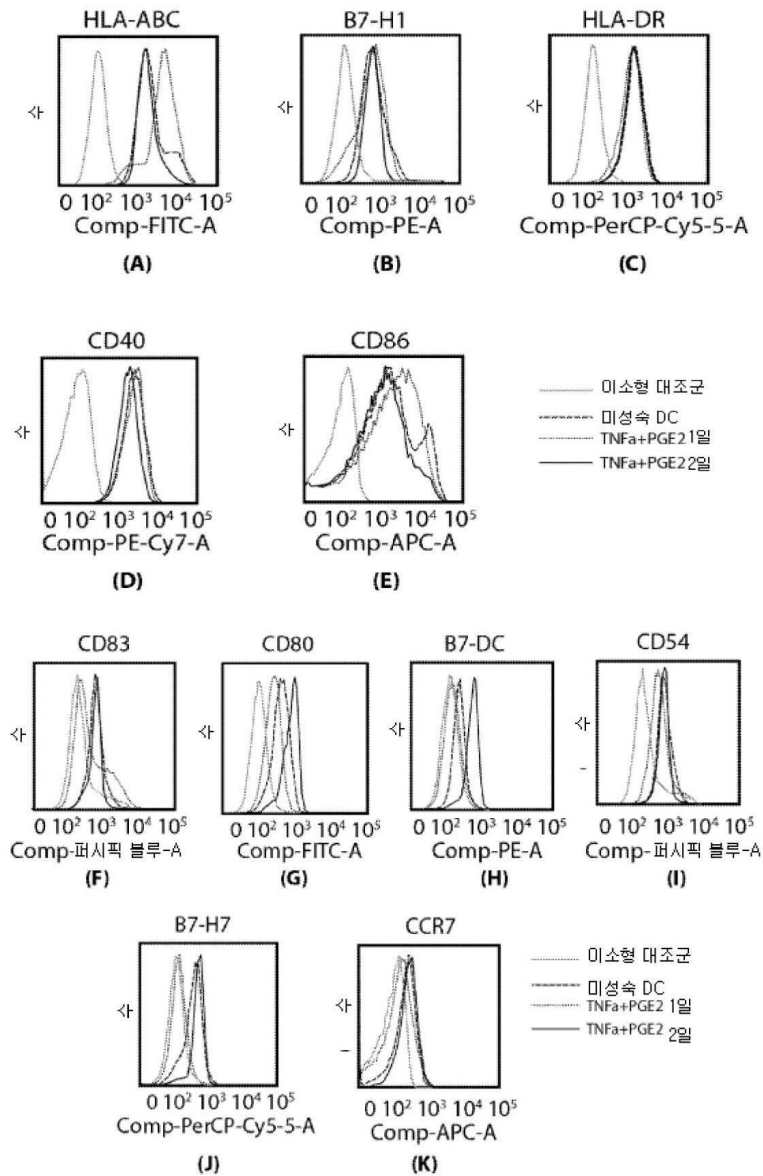


도면11

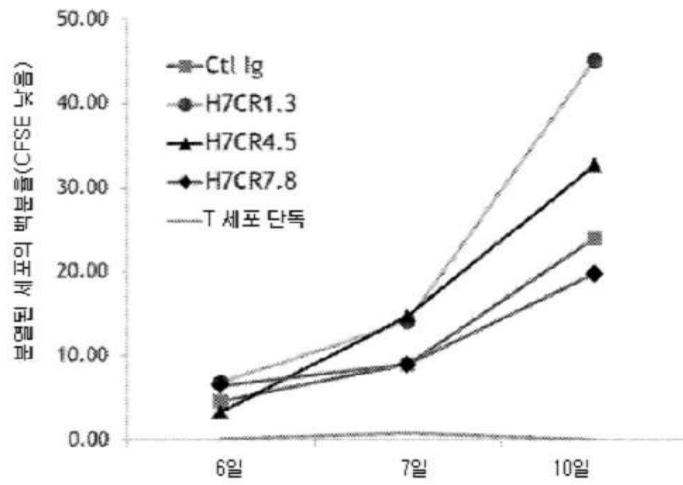
시노물구스 원숭이



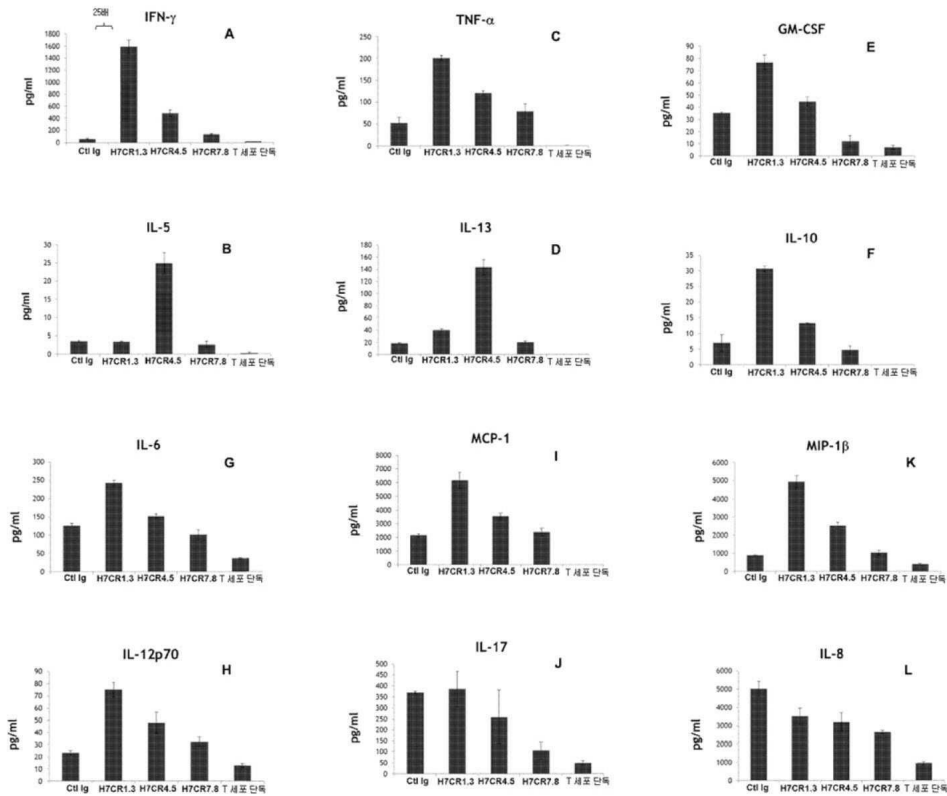
도면12



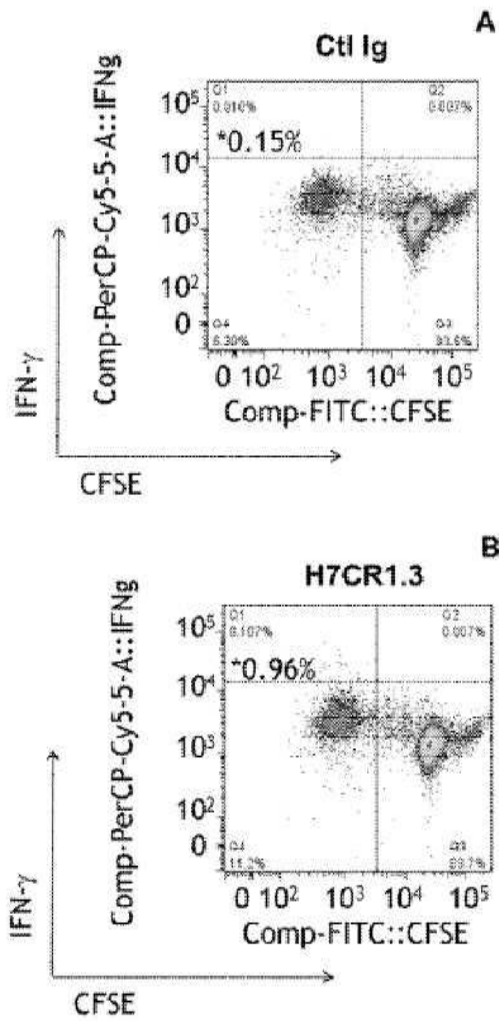
도면13



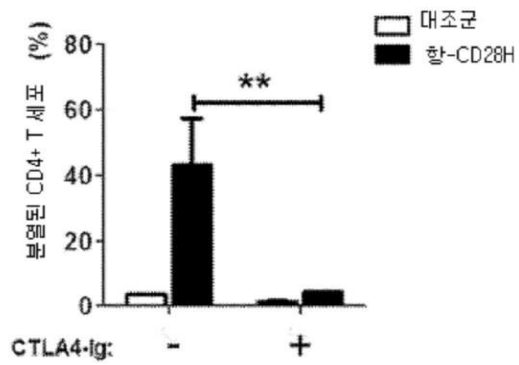
도면14



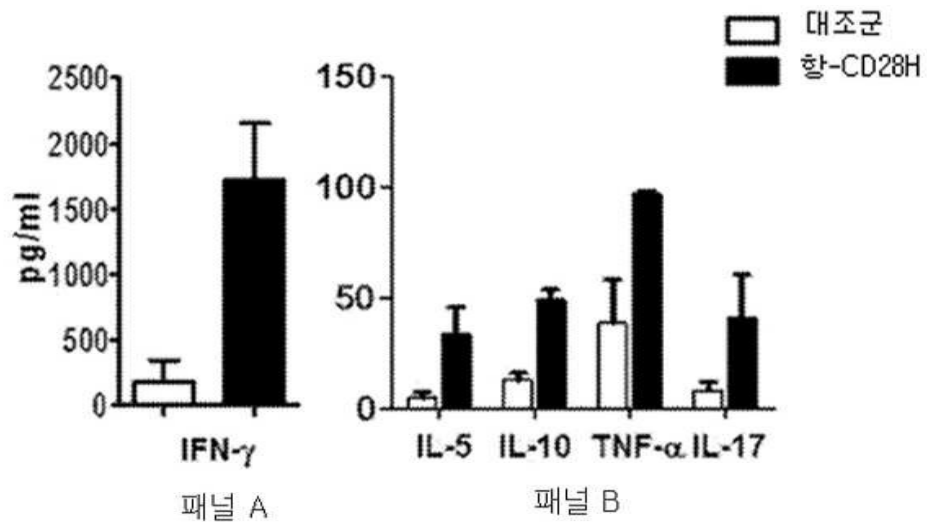
도면15



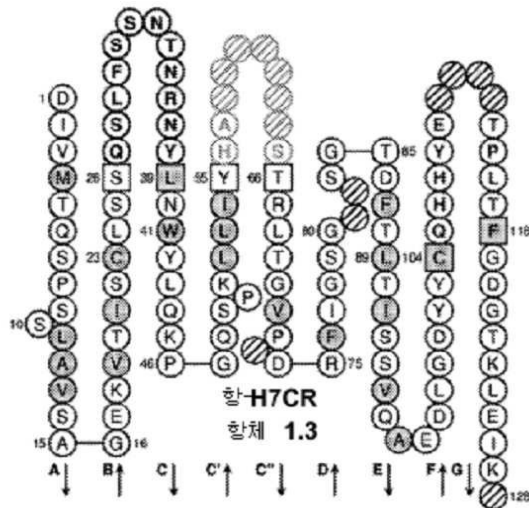
도면16a



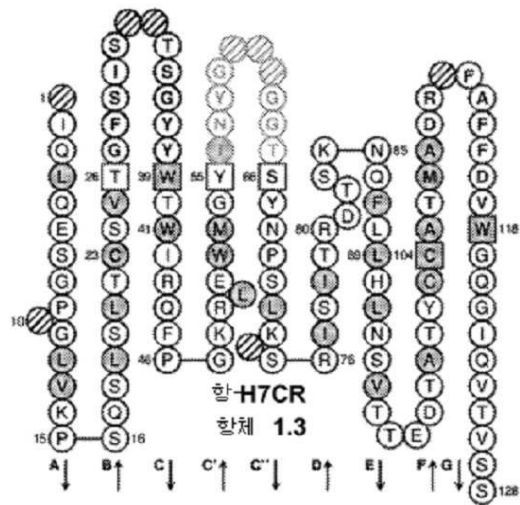
도면16b



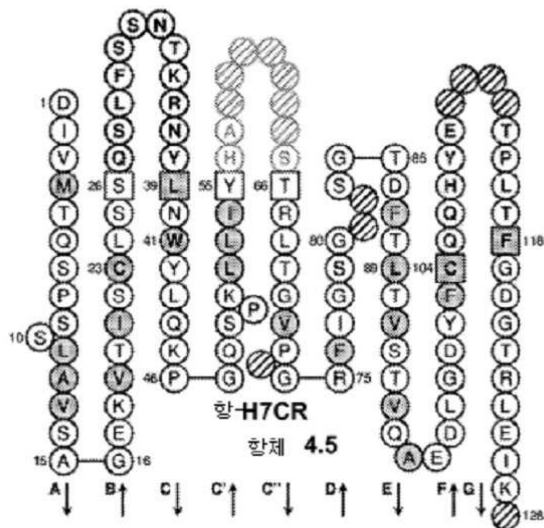
도면17a



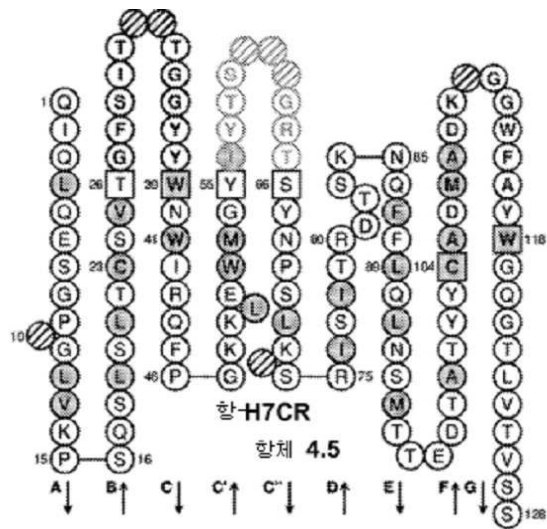
도면17b



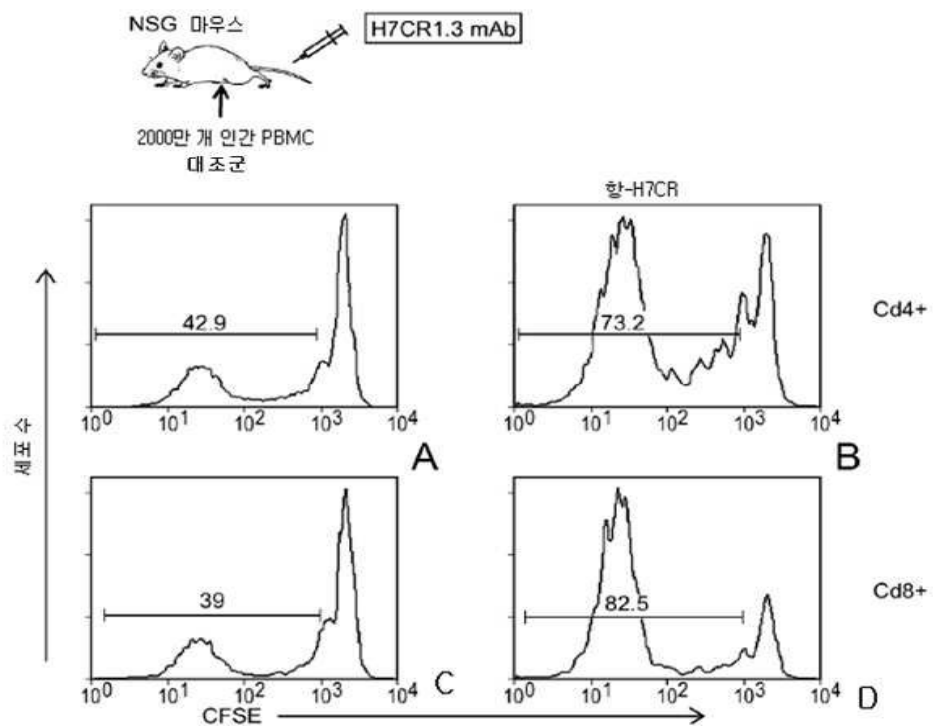
도면18a



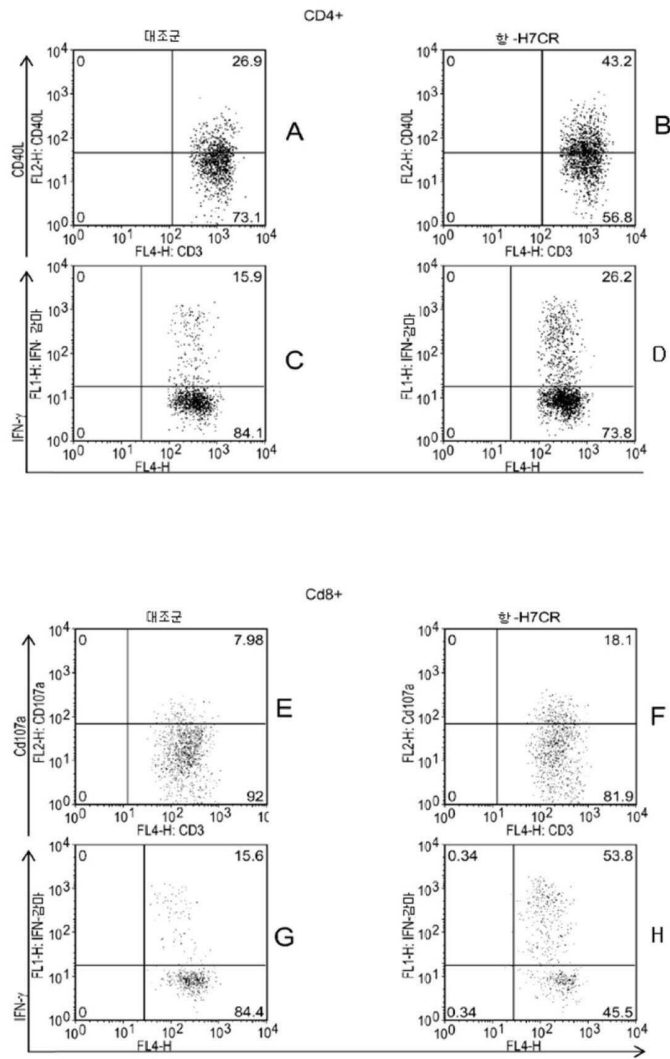
도면18b



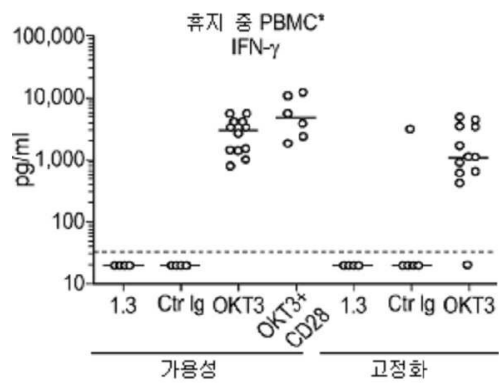
도면19



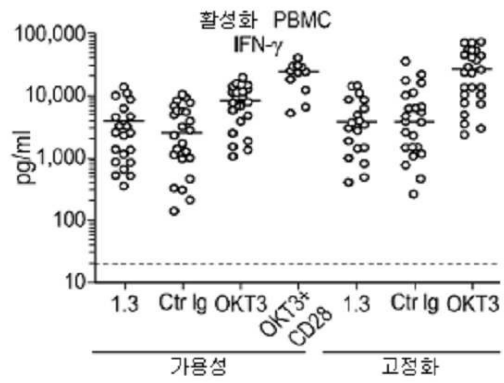
도면20



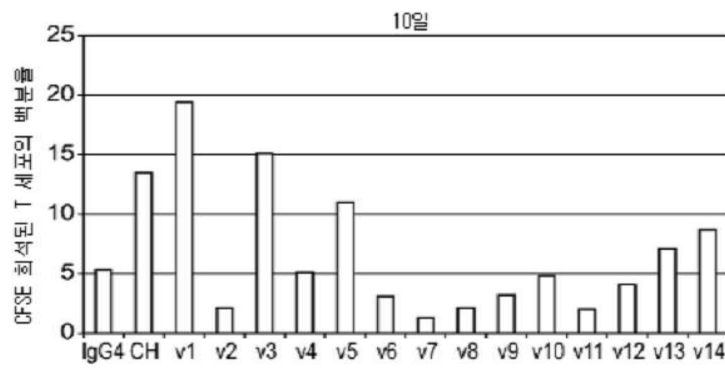
도면21a



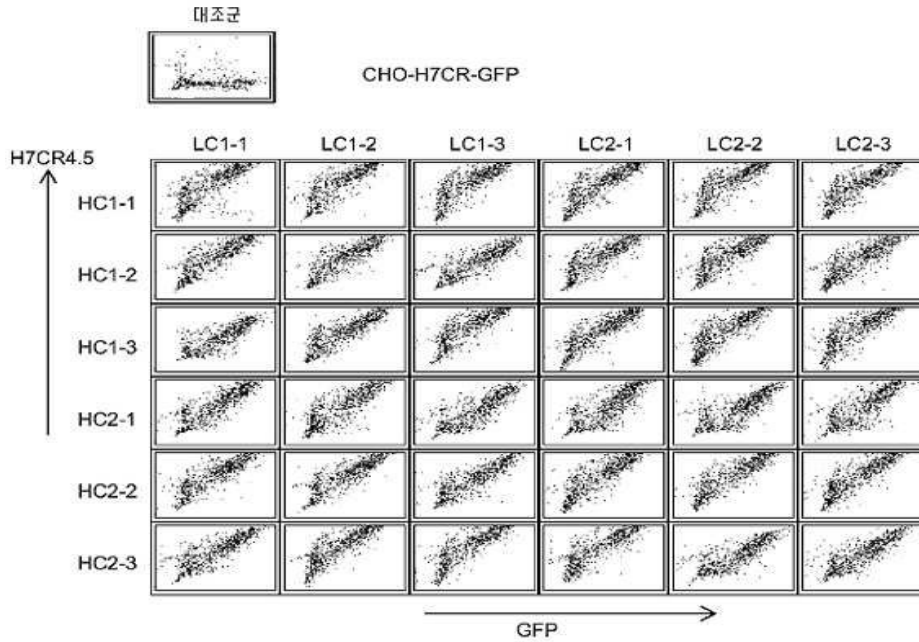
도면21b



도면22



도면23



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Amplimmune, Inc.
 Langermann, Solomon
 Liu, Linda
 Yao, Sheng
 Chen, Lieping
- <120> ANTI-H7CR ANTIBODIES AND THEIR USES
- <130> AMP h932 PCT
- <150> US 61/745,296
- <151> 2012-12-21
- <150> US 61/745,312
- <151> 2012-12-21
- <150> US 61/827,269
- <151> 2013-05-24
- <150> US 61/827,279
- <151> 2013-05-24

<160> 101

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 414

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400

> 1

Met Lys Ala Gln Thr Ala Leu Ser Phe Phe Leu Ile Leu Ile Thr Ser

1 5 10 15

Leu Ser Gly Ser Gln Gly Ile Phe Pro Leu Ala Phe Phe Ile Tyr Val

20 25 30

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

35 40 45

Leu Pro Ser Ser Phe Glu Arg Gly Ser Glu Val Val Ile His Trp Lys

50 55 60

Tyr Gln Asp Ser Tyr Lys Val His Ser Tyr Tyr Lys Gly Ser Asp His

65 70 75 80

Leu Glu Ser Gln Asp Pro Arg Tyr Ala Asn Arg Thr Ser Leu Phe Tyr

85 90 95

Asn Glu Ile Gln Asn Gly Asn Ala Ser Leu Phe Phe Arg Arg Val Ser

100 105 110

Leu Leu Asp Glu Gly Ile Tyr Thr Cys Tyr Val Gly Thr Ala Ile Gln

115 120 125

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

130 135 140

Val Met Lys Tyr Glu Lys Arg Asn Thr Asn Ser Phe Leu Ile Cys Ser

145 150 155 160

Val Leu Ser Val Tyr Pro Arg Pro Ile Ile Thr Trp Lys Met Asp Asn

165 170 175

Thr Pro Ile Ser Glu Asn Asn Met Glu Glu Thr Gly Ser Leu Asp Ser

180 185 190

Phe Ser Ile Asn Ser Pro Leu Asn Ile Thr Gly Ser Asn Ser Ser Tyr
 195 200 205
 Glu Cys Thr Ile Glu Asn Ser Leu Leu Lys Gln Thr Trp Thr Gly Arg
 210 215 220
 Trp Thr Met Lys Asp Gly Leu His Lys Met Gln Ser Glu His Val Ser
 225 230 235 240
 Leu Ser Cys Gln Pro Val Asn Asp Tyr Phe Ser Pro Asn Gln Asp Phe
 245 250 255

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

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

 Gln Gln Glu Arg Cys Cys Val Pro Pro Gly Glu Arg Cys Pro Ser Ala
 385 390 395 400
 Pro Asp Asn Gly Glu Glu Asn Val Pro Leu Ser Gly Lys Val
 405 410

<210> 2

<211> 1242

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgaaggcac agacagcact gtctttcttc ctcattctca taacatctct gagtggatct	60
caaggcatat tccctttggc tttcttcatt tatgttctta tgaatgaaca aatcgtcatt	120
ggaagacttg atgaagatat aattctccct tcttcatttg agaggggatc cgaagtcgta	180
atacactgga agtatcaaga tagctataag gtccatagtt actacaaagg cagtgacat	240
ttggaagacc aagatcccag atatgcaaac aggacatccc tttctataa tgagattcaa	300
aatgggaatg cgtcactatt tttcagaaga gtaagccttc tggacgaagg aatttacacc	360
tgctatgtag gaacagcaat tcaagtgatt acaacaaag tgggtgctaaa ggtgggagtt	420
tttctcacac ccgtgatgaa gtatgaaaag aggaacacaa acagcttctt aatatgcagc	480
gtgttaagtg tttatcctcg tccaattatc acgtggaaaa tggacaacac acctatctct	540
gaaaacaaca tggaagaaac agggctcttg gattcttttt ctattaacag cccactgaat	600
attacaggat caaattcatc ttatgaatgt acaattgaaa attcactgct gaagcaaaca	660
tggacagggc gctggacgat gaaagatggc cttcataaaa tgcaaagtga acacgtttca	720
ctctcatgtc aacctgtaaa tgattatfff tcaccaaacc aagacttcaa agttacttgg	780
tccagaatga aaagtgggac tttctctgtc ctggcttact atctgagctc ctcacaaaat	840
acaattatca atgaatcccg attctcatgg aacaaagagc tgataaacca gagtgacttc	900
tctatgaatt tgatggatct taatctttca gacagtgggg aatatttatg caatatttct	960
tcggatgaat atactttact taccatccac acagtgcacg tagaaccgag ccaagaaaca	1020
gcttcccata acaaaggctt atggattttg gtgcctctcg cgattttggc agcttttctg	1080
ctgattttgga gcgtaaaaat ttgcagagcc cagctagaag ccaggaggag cagacaccct	1140
gctgatggag cccaacaaga aagatgttgt gtcctctctg gtgagcgtg tcccagtgca	1200
cccgataatg gcgaagaaaa tgtgcctctt tcaggaaaag ta	1242

<210> 3

<211> 282

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met	Gly	Ser	Pro	Gly	Met	Val	Leu	Gly	Leu	Leu	Val	Gln	Ile	Trp	Ala
1						5					10				15
Leu	Gln	Glu	Ala	Ser	Ser	Leu	Ser	Val	Gln	Gln	Gly	Pro	Asn	Leu	Leu

20

25

30

Gln Val Arg Gln Gly Ser Gln Ala Thr Leu Val Cys Gln Val Asp Gln
 35 40 45
 Ala Thr Ala Trp Glu Arg Leu Arg Val Lys Trp Thr Lys Asp Gly Ala
 50 55 60
 Ile Leu Cys Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Gly Ser Leu Ser Leu Gly Val
 65 70 75 80
 Cys Gly Pro Gln Gly Arg Leu Ser Trp Gln Ala Pro Ser His Leu Thr
 85 90 95
 Leu Gln Leu Asp Pro Val Ser Leu Asn His Ser Gly Ala Tyr Val Cys
 100 105 110
 Trp Ala Ala Val Glu Ile Pro Glu Leu Glu Glu Ala Glu Gly Asn Ile
 115 120 125
 Thr Arg Leu Phe Val Asp Pro Asp Asp Pro Thr Gln Asn Arg Asn Arg
 130 135 140
 Ile Ala Ser Phe Pro Gly Phe Leu Phe Val Leu Leu Gly Val Gly Ser
 145 150 155 160
 Met Gly Val Ala Ala Ile Val Trp Gly Ala Trp Phe Trp Gly Arg Arg
 165 170 175
 Ser Cys Gln Gln Arg Asp Ser Gly Asn Ser Pro Gly Asn Ala Phe Tyr
 180 185 190
 Ser Asn Val Leu Tyr Arg Pro Arg Gly Ala Pro Lys Lys Ser Glu Asp
 195 200 205
 Cys Ser Gly Glu Gly Lys Asp Gln Arg Gly Gln Ser Ile Tyr Ser Thr
 210 215 220
 Ser Phe Pro Gln Pro Ala Pro Arg Gln Pro His Leu Ala Ser Arg Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Ser Pro Arg Pro Cys Pro Ser Pro Arg Pro Gly His Pro Val
 245 250 255
 Ser Met Val Arg Val Ser Pro Arg Pro Ser Pro Thr Gln Gln Pro Arg
 260 265 270
 Pro Lys Gly Phe Pro Lys Val Gly Glu Glu

275

280

<210> 4

<211> 846

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

atgggggtccc cgggcatggt gctgggcctc ctggtgcaga tctgggcctt gcaagaagcc 60
tcaagcctga gcgtgcagca ggggcccac ttgctgcagg ttaggcaggg cagtcaggcg 120
accttggtct gccaggtgga ccaggccaca gcctgggaac ggctccgtgt taagtggaca 180
aaggatgggg ccatcctgtg tcaaccgtac atcaccaacg gcagcctcag cctgggggtc 240
tgcgggcccc agggacggct ctcttgagc gcacccagcc atctcacct gcagctggac 300
cctgtgagcc tcaaccacag cggggcgtag gtgtgctggg cggccgtaga gattcctgag 360

ttggaggagg ctgagggcaa cataacaagg ctctttgtgg acccagatga cccacacag 420
aacagaaacc ggatcgcaag cttcccagga ttctctctcg tgctgctggg ggtgggaagc 480
atgggtgtgg ctgcgatcgt gtgggggtgcc tggttctggg gccgccgag ctgccagcaa 540
agggactcag gtaacagccc aggaatgca ttctacagca acgtcctata ccggccccgg 600
ggggccccaa agaagagtga ggactgctct ggagagggga aggaccagag gggccagagc 660
atttattcaa cctccttccc gcaaccggcc ccccgccagc cgcacctggc gtcaagaccc 720
tgccccagcc cgagaccctg ccccgcccc agggccggcc acccgtctc tatggtcagg 780

gtctctccta gaccaagccc caccagcag ccgaggccaa aagggttccc caaagtggga 840
gaggag 846

<210> 5

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-Human H7CR Antibody

<400> 5

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys Leu Ser Ser Gln Ser Leu Phe Ser Ser

20 25 30

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

His Tyr Glu Thr Pro Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110
Lys

<210> 6

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-Human H7CR Antibody

<400> 6

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

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

Cys Ala Thr Met Ala Asp Arg Phe Ala Phe Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Ile Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 7

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-Human H7CR Antibody

<400> 7

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys Leu Ser Ser Gln Ser Leu Phe Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Thr Arg Leu Thr Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

His Tyr Glu Thr Pro Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Arg Leu Glu Ile

100 105 110

Lys

<210> 8

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-Human H7CR Antibody

<400> 8

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

1 5 10 15

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

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

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

<210> 9

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-Human H7CR Antibody

<400> 9

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

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

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

85 90 95
His Tyr Val Thr Pro Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Arg Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 10

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-Human H7CR Antibody

<400> 10

Gln Ile Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

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

<210> 11

<211> 465

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 11

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Ile Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Phe Ser Ile
35 40 45

Ser Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys
50 55 60

Arg Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Tyr Gly Gly Gly Thr Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys
85 90 95

Asn Gln Phe Leu Leu His Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala
100 105 110

Thr Tyr Cys Cys Ala Thr Met Ala Asp Arg Phe Ala Phe Phe Asp Val
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Ile Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
210 215 220

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
225 230 235 240

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly

245 250 255
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270

 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 275 280 285
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335

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

 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 420 425 430
 Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460

 Gly
 465
 <210> 12
 <211> 240

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 12

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

1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala

20 25 30

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

35 40 45

Leu Phe Ser Ser Asn Thr Asn Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln

50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Thr Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Cys Gln His His Tyr Glu Thr Pro Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr

115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser

195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His

210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

<210> 13

<211> 1401

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric antibody coding sequence

<400> 13

atggaatggt cctgggtgtt cctgttcttc ctgtccgtga ccaccggcgt gcactcccag 60
atccagctgc aggaatctgg ccttggcctc gtgaagcctt cccagtcctt gtccttgacc 120
tgcagcgtga cgggttctc tatcacaacc ggcggtact actggaactg gatccggcag 180
ttccccggca agaaactgga atggatgggc tacatctata ccagcggcgc gacctctac 240
aaccacagcc tgaagtcccg gatctccatc acccgggaca cctccaagaa ccagttcttt 300

ctgcagctga actccatgac caccgaggac accgccacct actactgcgc cgacatggcc 360
gataaggcgc gatggttcgc ttactggggc cagggcacac tcgtgaccgt gtctctgtct 420
tccaccaagg gccctccgt gtttcctctg gcccttctgt ccagatccac ctccgagtct 480
accgccgtc tgggtctgct cgtgaaagac tacttcccc agcccgtagc agtgtcttgg 540
aactctggcg cctgacctc tggcgtgcac acctttccag ctgtgctgca gtctctccgc 600
ctgtactccc tgtctccgt cgtgactgtg ccctccagct ctctgggcac caagacctac 660
acctgtaacg tggaccacaa gccctccaac accaaggtgg acaagcgggt ggaatctaag 720

tacggccctc cctgccctcc ttgccagcc cctgaatttc tgggcggacc ttctgtgttt 780
ctgttcccc caaagcccaa ggacacctg atgatctccc ggacccccga agtgacctgc 840
gtggtgttgg atgtgtccca ggaagatccc gaggtgcagt tcaatttgta cgtggacggc 900
gtggaagtgc acaacccaa gaccaagcct agagaggaa agttcaactc cacctaccgg 960
gtggtgtccg tgtgaccgt gctgcaccag gattggctga acggcaaaga gtacaagtgc 1020
aaggtgtcca acaaggcct gccagctcc atcgaaaaga ccatctccaa ggctaagggc 1080
cagccccgcg agccccaggt gtacacactg cctccaagcc aggaagagat gaccaagaat 1140

caggtgtcac tgacctgtct cgtgaagggc ttctaccct ccgatatcgc cgtggaatgg 1200
gagtccaacg gccagccga gaacaactac aagaccaccc cccctgtgct ggactccgac 1260
ggctcttct ttctgtactc tcgctgacc gtggacaagt cccggtggca ggaaggcaac 1320
gtgttctct gctctgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagtcctg 1380

agcctgtccc ccgctgatg a 1401

<210> 14

<211> 726

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric antibody coding sequence

<400> 14

atgtccgtgc ccaccaggt gctgggattg ctgctgctgt ggctgaccga cgccagatgc 60

gacatcgtga tgaccagtc cccctcctcc ctggctgtgt ctgctggcga gaaagtgacc 120

atctcctgcc tgtctccca gtccctgttc tccagcaaca ccaagcgga ctacctgaac 180

tggatctgc agaagcccg ccagtcctt aagctgctga tctaccacgc ctccaccaga 240

ctgaccggcg tgcccgaag attcatcggc tctggctctg gcaccgactt caccctgacc 300

gtgtctaccg tgcaggccga ggacctgggc gactacttct gccagcagca ctacgagaca 360

ccctgacct ttggcgacgg caccggctg gaaatcaaga gaacctggc cgctccctcc 420

gtgttcatct tcccacttc cgacgagcag ctgaagtccg gcaccgttc tgtcgtgtgc 480

ctgctgaaca acttctaccc ccgcgagggc aaggtgcagt ggaaggtgga caacgccctg 540

cagtcggca actcccagga atccgtgacc gagcaggact ccaaggacag cacctactcc 600

ctgtcctcta cctgacctt gagcaaggcc gactacgaga agcacaaggt gtacgcctgc 660

gaagtgacct accagggcct gtctagcccc gtgaccaagt ctttcaaccg gggcgagtgc 720

tgatga 726

<210> 15

<211> 465

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric antibody heavy chain sequence

<400> 15

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Phe Ser Ile

35 40 45

Thr Thr Gly Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys
50 55 60

Lys Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Tyr Thr Ser Gly Arg Thr Ser Tyr
65 70 75 80
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys
85 90 95

Asn Gln Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Met Thr Thr Glu Asp Thr Ala
100 105 110
Thr Tyr Tyr Cys Ala Asp Met Ala Asp Lys Gly Gly Trp Phe Ala Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
145 150 155 160
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
210 215 220

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
225 230 235 240

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
275 280 285

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

290 295 300
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320

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

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 420 425 430
 Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460

Gly

465

<210> 16

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric antibody light chain

<400> 16

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

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala

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

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

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

 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235 240
 <210> 17
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 17

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Ser Ser

20 25 30

Asn Thr Asn Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His

85 90 95

His Tyr Glu Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110

Lys

<210> 18

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 18

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Thr Arg Leu Ser Gly Val

50 55 60

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Thr Asn Arg Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His

85 90 95

His Tyr Glu Thr Pro Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110

Lys

<210> 21

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val
50 55 60

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

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

His Tyr Glu Thr Pro Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 22

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 22

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Leu Ser Ser Gln Ser Leu Phe Ser Ser
20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Thr Arg Leu Ser Gly Val
50 55 60

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

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

His Tyr Glu Thr Pro Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 23

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Tyr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Thr Met Ala Asp Arg Phe Ala Phe Phe Asp Val Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 24

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

<210> 25

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 25

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Ile Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Arg Leu Glu
 35 40 45

Trp Met Gly Tyr Ile Asn Tyr Gly Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Cys
 85 90 95

Cys Ala Thr Met Ala Asp Arg Phe Ala Phe Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 26

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Tyr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Thr Met Ala Asp Arg Phe Ala Phe Phe Asp Val Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 27

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 27

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Ile Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Tyr Pro Gly Lys Arg Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Tyr Gly Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Cys
85 90 95

Cys Ala Thr Met Ala Asp Arg Phe Ala Phe Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 28

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ala Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Ile Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Arg Leu Glu
35 40 45

Trp Met Gly Tyr Ile Asn Tyr Gly Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Pro Ser

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

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Cys
85 90 95

Cys Ala Thr Met Ala Asp Arg Phe Ala Phe Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-Human H7CR Antibody

<400> 29

Gln Ser Leu Phe Ser Ser Asn Thr Asn Arg Asn Tyr

1 5 10

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-Human H7CR Antibody

<400> 30

Gln Ser Leu Phe Ser Ser Asn Thr Lys Arg Asn Tyr

1 5 10

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC CDR1 Consensus sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa = N or K or a substitution having an equal or greater
 substitution score

<400> 31

Gln Ser Leu Phe Ser Ser Asn Thr Xaa Arg Asn Tyr

1 5 10

<210> 32

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC CDR2 Consensus Sequence:

<400> 32

His Ala Ser

1

<210> 33

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 33

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Ser Ser

20 25 30

Asn Thr Lys Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

His Tyr Glu Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile

100 105 110

Lys

<210> 34

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 34

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

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

<210> 35

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 35

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

[illegible]

<210> 36

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 36

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

[illegible]

<210> 37

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 37

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Thr Arg Leu Ser Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

His Tyr Glu Thr Pro Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Arg Leu Glu Ile

100 105 110

Lys

<210> 38

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 38

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Leu Ser Ser Gln Ser Leu Phe Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Thr Arg Leu Ser Gly Val
 50 55 60

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

<210> 39

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 39

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

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

115 120

<210> 40

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Lys Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Thr Ser Gly Arg Thr Ser Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Asp Met Ala Asp Lys Gly Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 41

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 41

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

1 5 10 15

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

20 25 30
Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Lys Leu Glu
35 40 45

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 42

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 42

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

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

Cys Ala Asp Met Ala Asp Lys Gly Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 43

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 43

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Thr Ser Gly Arg Thr Ser Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Asp Met Ala Asp Lys Gly Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 44

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 44

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

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

20 25 30
Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Lys Leu Glu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95
Cys Ala Asp Met Ala Asp Lys Gly Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-Human H7CR Antibody

<400> 45

Gln His His Tyr Glu Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-Human H7CR Antibody

<400> 46

Gln Gln His Tyr Glu Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 47
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Anti-Human H7CR Antibody
 <400> 47
 Gln Gln His Tyr Val Thr Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LC CDR3 Consensus Sequence
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa is H or Q or a substitution having an equal or greater
 substitution score (i.e., greater than or equal 0): R, N, Q, E,
 or H
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa is E or V or a substitution having an equal or greater
 substitution score (i.e., greater than or equal to -2): A, Q, E,
 K, M, P, S, T, Y, or V
 <400> 48
 Gln Xaa His Tyr Xaa Thr Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 49
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Anti-Human H7CR Antibody
 <400> 49
 Gly Phe Ser Ile Ser Thr Ser Gly

1 5

<210> 50

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-Human H7CR Antibody

<400> 50

Gly Phe Ser Ile Thr Thr Gly Gly

1 5

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR1 consensus sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is S or T or a substitution having an equal or greater
substitution score (i.e., greater than/equal to +1): S or T

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is S or G or a substitution having an equal or greater
substitution score (i.e., greater than/equal to 0): A, N, G, or S

<400> 51

Gly Phe Asp Ile Xaa Thr Xaa Gly

1 5

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-Human H7CR Antibody

<400> 52

Ile Asn Tyr Gly Gly Gly Thr

1 5

<210> 53

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220
 ><223> Anti-Human H7CR Antibody
 <400> 53
 Ile Tyr Thr Ser Gly Arg Thr
 1 5
 <210> 54
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Anti-Human H7CR Antibody
 <400> 54
 Ile Tyr Ser Ser Gly Arg Thr
 1 5
 <210> 55
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Heavy chain CDR2 Consensus Sequence
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa is N or Y or a substitution having an equal or greater

 substitution score (i.e., greater than/equal to -2): A, R, N, Q,
 E, H, K, M, S, T, Y
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa is Y, T or S or a substitution having an equal or greater
 substitution score (i.e., greater than/equal to -2): A, R, N, C,
 Q, E, H, I, L, K, M, F, S, T, Y, or V
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa is S or G or a substitution having an equal or greater

substitution score (i.e., greater than/equal to 0): A, N, G, or

S

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is G or R or a substitution having an equal or greater
substitution score (i.e., greater than/equal to -2): A, R, N, D,
Q, E, G, H, K, P, S, or T

<400> 55

Ile Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Thr

1 5

<210> 56

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-Human H7CR Antibody

<400> 56

Ala Thr Met Ala Asp Arg Phe Ala Phe Phe Asp Val

1 5 10

<210> 57

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-Human H7CR Antibody

<400> 57

Ala Asp Met Ala Asp Lys Gly Gly Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 58

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-Human H7CR Antibody

<400> 58

Ala Asp Met Ala Asp Lys Gly Gly Trp Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 59

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR3 Consensus Sequence:

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is T or D or a substitution having an equal or greater substitution score (i.e., greater than/equal to -1): N, D, Q, E, K, P, S, or T

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is R or K or a substitution having an equal or greater substitution score (i.e., greater than/equal to +2): R, or K

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is F or G or a substitution having an equal or greater substitution score (i.e., greater than/equal to -3): A, R, N, D, C, Q, E, G, H, K, M, F, S, T, W, Y, or V

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is A or G or a substitution having an equal or greater substitution score (i.e., greater than/equal to 0): A, G, or S

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is F or W or a substitution having an equal or greater substitution score (i.e., greater than/equal to +1): F, W, or Y

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is A or D or a substitution having an equal or greater substitution score (i.e., greater than/equal to): A, R, N, D,

C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, or V

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is A or D or a substitution having an equal or greater substitution score : A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, or V

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa is V or Y or a substitution having an equal or greater substitution score (i.e., greater than/equal to -2): A, R, N, D,

C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, or V

<400> 59

Ala Xaa Met Ala Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa

1 5 10

<210> 60

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized Antibody

<400> 60

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys Leu Ser Ser Gln Ser Leu Phe Ser Ser

20 25 30

Asn Thr Asn Arg Asn Tyr Leu Asn

35 40

<210> 61

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 61

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

1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala
 35 40

<210> 62

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 62

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

<210> 63

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 63

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

<210> 64

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 64

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

35 40

<210> 65

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 65

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys

35 40

<210> 66

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 66

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Gly Asp Tyr Tyr Cys Gln His

1 5 10 15

His Tyr Glu Thr Pro Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Lys Leu Glu Ile

20 25 30

Lys

<210> 67

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 67

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

1 5 10 15

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr

20

<210> 68

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 68

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln

1 5 10 15

Ala Leu Gln Thr Pro Tyr Thr

20

<210> 69

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 69

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 70

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 70

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg

35 40

<210> 71

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 71

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg

35 40

<210> 72

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg

35 40

<210> 73

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 73

Gln Phe Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Tyr Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

35 40

<210> 74

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 74

Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

35 40

<210> 75

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Gln Tyr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

35 40

<210> 76

<211> 40

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 76

Leu Leu His Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Cys

1 5 10 15

Cys Ala Thr Met Ala Asp Arg Phe Ala Phe Phe Asp Val Trp Gly Gln

20 25 30

Gly Ile Gln Val Thr Val Ser Ser

35 40

<210> 77

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 77

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

1 5 10 15

Cys Ala Arg

<210> 78

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

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

1 5 10 15

Cys Ala Arg Glu Arg Thr Met Thr Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln

20 25 30

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

35 40

<210> 79

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 79

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

1 5 10 15

<210> 80

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 80

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys Leu Ser Ser Gln Ser Leu Phe Ser Ser

20 25 30

Asn Thr Lys Arg Asn Tyr Leu Asn

35 40

<210> 81

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 81

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala

35 40

<210> 82

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 82

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp

35 40

<210> 83

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 83

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

35 40

<210> 84

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 84

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

35 40

<210> 85

<211> 40

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 85

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys

35 40

<210> 86

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 86

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

1 5 10 15

His Tyr Glu Thr Pro Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Arg Leu Glu Ile

20 25 30

Lys

<210> 87

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 87

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

1 5 10 15

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr

20

<210> 88

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 88

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln

1 5 10 15

Arg Ile Glu Phe Pro

20

<210> 89

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 89

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 90

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 90

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg

35 40

<210> 91

<211

> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 91

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg

35 40

<210> 92

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 92

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

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg

35 40

<210> 93

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 93

Gln Phe Pro Gly Lys Lys Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Tyr Thr Ser

1 5 10 15

Gly Arg Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr
 20 25 30

Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 35 40

<210> 94

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 94

Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser

1 5 10 15

Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser
 20 25 30

Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 35 40

<210> 95

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<400> 95

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

1 5 10 15

Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr
 20 25 30

Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 35 40

<210> 96

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 96

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

1 5 10 15

Cys Ala Asp Met Ala Asp Lys Gly Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

20 25 30

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

35 40

<210> 97

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<220><221> UNSURE

<222> (19)..(22)

<400> 97

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

1 5 10 15

Cys Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Arg

20

<210> 98

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variant of humanized anti-human H7CR Antibody

<220><221> UNSURE

<222> (19)..(22)

<400> 98

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

1 5 10 15

Cys Ala Xaa Xaa Xaa Xaa His Arg

20

<210> 99

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 99

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

1 5 10 15

<210> 100

<211> 1401

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric antibody chain coding sequence

<400> 100

atggaatggt cctgggtgtt cctgttcttc ctgtccgtga ccaccggcgt gcactcccag	60
atccagctgc aggaatctgg ccctggcctc gtgaagcctt cccagtcctt gtcctgacc	120
tgcagcgtga ccggcttctc catctccacc tccggctact actggacctg gatccggcag	180
tcccttgga agcggctgga atggatgggc tacatcaact acggcggagg cacctctac	240
aacccagcc tgaagtccg gatctccatc acccgggata cctccaagaa ccagttcctg	300
ctgcacctga actccgtgac aaccgaggac accgccacct actgctgcgc taccatggcc	360
gacagattcg ccttcttcga cgtgtggggc cagggcatcc aagtaccgt gtcctccgt	420
tccaccaagg gccctctgt gtttctctg gcccttctg cccggtccac ctctgagtct	480
acagccgtc tgggctgcct cgtgaaagac tacttccccg agcccgtagc agtgtcctgg	540
aactctggcg ctctgacctc tggcgtgcac accttccctg ctgtgctgca gtctagcggc	600
ctgtactccc tgtctccgt cgtgacctg ccttccagct ctctgggcac caagacctac	660
acctgtaacg tggaccacaa gccctcaac accaaggtgg acaagagagt ggaatctaag	720
tacggccctc cctgcccccc ttgtctgccc cctgaatttc tgggcggacc ctccgtgttt	780
ctgttcccc caaagcccaa ggacacctg atgatctccc ggacccccga agtgacctgc	840
gtggtggtgg atgtgtccca ggaagatccc gaggtgcagt tcaattggta cgtggacggc	900
gtggaagtgc acaacgcaa gaccaagcct agagaggaac agttcaactc cacctaccgg	960
gtggtgtccg tgctgacctg gctgcaccag gattggctga acggcaaaga gtacaagtgc	1020
aaggtgtcca acaagggcct gccctccagc atcgaaaaga ccattctcaa ggctaagggc	1080
cagccccgcg agccccaggt gtacacactg cctccaagcc aggaagagat gaccaagaat	1140

caggtgtcac tgacctgtct cgtgaagggc ttctaccct cccatctgc cgtggaatgg 1200
gagtccaacg gccagcccgga gaacaactac aagaccaccc cccctgtgct ggactccgac 1260
ggctccttct ttctgtactc tcgcctgacc gtggacaagt cccgggtggca ggaaggcaac 1320
gtgttctcct gctctgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagtccttg 1380
agcctgtccc cggctgatg a 1401

<210> 101

<211> 726

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric antibody chain coding sequence

<400> 101

atgtccgtgc ccaccaggt gctgggattg ctgctgctgt ggctgaccga cgccagatgc 60
gacatcgtga tgaccagtc cccctcctcc ctgctgtgt ctgctggcga gaaagtgacc 120
atctcctgcc tgcctccca gtcctgttc tctccaaca ccaaccgaa ctacctgaac 180
tggtatctgc agaagcccg ccagtcctc aagctgtga tctaccacgc ctcaccaga 240
ctgaccggcg tgcccgatag attcatcggc tctggctccg gcaccgactt tacctgacc 300
atcagctccg tgcaggccga ggacctgggc gactactact gccagacca ctacgagaca 360
cccctgacct ttggcgacgg caccaagctg gaaatcaagc ggaccgtggc cgtccctcc 420

gtgttcatct tcccacctc cgacgagcag ctgaagtctg gcaccgctc tgtcgtgtgc 480
ctgtgaaca acttctacce ccgcgagcc aaggtgcagt ggaaggtgga caacgccctg 540
cagtcggca actcccagga atccgtgacc gagcaggact ccaaggacag cacctactcc 600
ctgtccagca cctgacct gtccaaggcc gactacgaga agcacaaggt gtacgcctgc 660
gaagtgacct accagggcct gtctagcccc gtgaccaagt ctttcaaccg gggcgagtgc 720
tgatga 726