



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년05월26일

(11) 등록번호 10-1624587

(24) 등록일자 2016년05월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

C12N 5/078 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/18 (2013.01)

A61K 39/39533 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7004466(분할)

(22) 출원일자(국제) 2006년12월20일

심사청구일자 2015년03월12일

(85) 번역문제출일자 2015년02월23일

(65) 공개번호 10-2015-0031485

(43) 공개일자 2015년03월24일

(62) 원출원 특허 10-2008-7017667

원출원일자(국제) 2006년12월20일

심사청구일자 2011년12월15일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2006/325391

(87) 국제공개번호 WO 2007/072866

국제공개일자 2007년06월28일

(30) 우선권주장

JP-P-2005-366465 2005년12월20일 일본(JP)

(56) 선행기술조사문헌

JOURNAL OF VIROLOGY. FEB 2005, Vol. 79, No. 4, pp. 2251-2260.

J.Virol. FEB 2005, Vol. 79, No. 4, pp2251-2260.

J. Immunol. 1999, Vol. 162, No. 1, pp 5-8.

전체 청구항 수 : 총 1 항

심사관 : 이미옥

(54) 발명의 명칭 항- ILT7 항체

**(57) 요약**

IPC에 결합하는 항체는 면역원으로서 ILT7와 결합하는 세포 막 단백질이 공동발현하는 동물 세포를 이용하므로 수득될 수 있다. 본 발명의 항체는 다른 ILT 패밀리 분자 및 ILT7 사이의 면역학적 차별이 가능하게 높은 특이성을 가진다. 본 발명의 항-ILT7 항체는 IPC에 결합하고, 그의 활성을 억제한다. 본 발명의 항-ILT7 항체와 함께 (뒷면에 계속)

**대 표 도**

## (a) 신호시열

```
MTLITLSSLFFGLSLGPRTTRVQAENLPKPILWAEPGPVITWHNPVTIWCQGTLLEAQGYRL
DKENNSMRHILKTLESNKVKSIPSMWEHAGRYCYCQSPAGWESPSPDLELVVTAY
SRPTLSALPSPVITSGVNVYLRCASRLGLGRFTLIEEGDHLRLSWTILNSHQINHCKFQALF
PMGPLTFNSNGTFRQGYENNTPYVWSEPSDPLQLLYSGVSRKPSLLTQGPVVTGENL
TLQCGSDVYIYTLYKEAGQGLPQPCPQPAQLSQANFTLSPVSRSGQYQVYCAHN
VSENSWAPSPLDLILAQQU5DPSLSPVWPCTVTSCEKFTLLCQWDMPTFLTKEA
AHPPLRLRSMYAHQYKEEPMSPVTAHACTYCYGRSNSPULLSHSPSEPLEVSGA
TETLNPQKSDSKTAPHLQDITVEMIIMQVAGVLFLGILFEQHISRSPPRCSE
ANSRQUNAPFRVIEPMWQI (SEQ ID NO:2) Transmembrane region (TM)
```

## (b)

## N-FLAG ILT7(57KDa)

신호	FLAG	TM	FLAG
사열			

## C-FLAG ILT7(57KDa)

신호	FLAG	TM	FLAG
사열			

IPC 활성이 억제되고, 인터페론 연관 질환이 치료 또는 예방될 수 있다. ILT7 발현은 IFN  $\alpha$ 가 IPC 상에 존재하여도 유지된다. 그러므로 IFN  $\alpha$ 의 증가된 생산으로 인한 자가 면역 질환 환자에서도 항-ILT7 항체에 의한 IPC의 억제 활성을 기재할 수 있다.

(52) CPC특허분류

**C12N 5/0634** (2013.01)

(72) 발명자

**아라이 나오코**

108-0071 일본국 도쿄도 미나토구 시로카네다이  
4-7-4 시로카네다이 에스티빌딩 8층 에스비아이 바  
이오테크 가부시키가이샤 나이

**이시다 코지**

108-0071 일본국 도쿄도 미나토구 시로카네다이  
4-7-4 시로카네다이 에스티빌딩 8층 에스비아이 바  
이오테크 가부시키가이샤 나이

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기 구성성분 중 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 자가면역 질환(autoimmune disease) 치료용 약학적 조성물:

(a) 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2, 및 CDR3로 하기 i) 내지 iii) 중 어느 한 셋트의 아미노산 서열들을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간 ILT7의 세포외 도메인에 결합하는 단일 클론항체 또는 그의 항원 결합 영역을 포함하는 단편:

i) 중쇄 가변 영역의 CDR1:SDYAWN(서열 번호:58);

중쇄 가변 영역의 CDR2: YISYSGSTSYPNPSLCSR(서열 번호:59);, 및

중쇄 가변 영역의 CDR3:SPPYYAMDY(서열 번호:60);

경쇄 가변 영역의 CDR1:KASQDVGTAVA(서열 번호:61);

경쇄 가변 영역의 CDR2:WASTRHT(서열 번호:62); 및

경쇄 가변 영역의 CDR3:QQYSSYPLT(서열 번호:63);

ii) 중쇄 가변 영역의 CDR1:SYWIH(서열 번호:64);

중쇄 가변 영역의 CDR2:RIYPGTGSTYYNEKFKG(서열 번호:65); 및

중쇄 가변 영역의 CDR3:PTYDWWYFDV(서열 번호:66);

경쇄 가변 영역의 CDR1:RASQSIISNYLH(서열 번호:67);

경쇄 가변 영역의 CDR2:YASQSIIS(서열 번호:68);

경쇄 가변 영역의 CDR3:QQSNSWPLT(서열 번호:69);

iii) 중쇄 가변 영역의 CDR1:SDYAWN(서열 번호:70);

중쇄 가변 영역의 CDR2: YISYSGSTSYPNPSLCSR(서열 번호: 71);

중쇄 가변 영역의 CDR3:ALPLPWFAY(서열 번호:72);

경쇄 가변 영역의 CDR1:KASQDVGTAVA(서열 번호:73);

경쇄 가변 영역의 CDR2:WASTRHT(서열 번호:74); 및

경쇄 가변 영역의 CDR3:QQYSSYPYT(서열 번호:75);

(b) (a)에 기재된 단일 클론항체의 상보성-결정 영역이 도입된 면역 글로브린(immunoglobulin) 또는 그의 항원 결합 영역을 포함하는 단편; 및

(c) (a) 또는 (b)에 기재된 구성 성분 중 어느 하나를 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 2

삭제

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 ILT7에 결합하는 항체에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 인터페론  $\alpha$  (IFN  $\alpha$ : 이하 "인터페론"은 INF로 줄여서 기재한다.) 및 인터페론  $\beta$  (INF  $\beta$ )는 항바이러스 활성 또는 항종양 활성을 가지는 타입(type) 1 INF로 알려져 있다. 한편, INF  $\alpha$  자가면역 질환과 연관되어 있다고 밝혀졌다. 예를 들어, 자가면역 환자에서 IFN  $\alpha$ 의 비정상적인 생산이 보고되었다. 이러한 INF  $\alpha$ 의 중화에 의해 자가면역 질환의 증상이 감소될 수 있음이 제시되고 있다.

[0003] 전신성 홍반성 낭창(Shiozawa et al., Arthr. & Rheum. 35, 412, 1992)

[0004] 만성 류머티즘(Hopkins et al., Clin. Exp. Immunol. 73, 88, 1988)

[0005] 재조합 IFN  $\alpha$  2 또는 IFN의 투여에 의해 자가면역 질환 증상이 발현 또는 악화된 증례가 보고되고 있다(Wada et al., Am. J. Gastroenterol. 90, 136, 1995; Perez et al., Am. J. Hematol. 49, 365, 1995; Wilson LE et al., Semin Arthritis. Rheum. 32, 163-173, 2002.).

[0006] 그에 더하여 IFN  $\alpha$ 가 수지상 세포(dendritic cell)의 분화를 유도함이 밝혀지고 있다. 수지상 세포는 항원 제시 세포이기도 하다. 그러므로 수지상 세포의 분화 유도는 자가면역 질환에서 중요한 기작을 구성하고 있다고 생각된다. 실제로 IFN  $\alpha$ 의 수지상 세포의 분화 유도와 전신성 홍반성 낭창의 발병 사이에는 깊은 관련성이 있는 것이 시사되고 있다(Blanco et al., Science, 16:294, 1540-1543, 2001). 이와 같이 IFN  $\alpha$ 는 항종양 활성과 함께 자기면역 질환과의 밀접한 관련성이 지적되고 있다. 그에 더하여 IFN  $\alpha$ 는 건선(psoriasis)의 발병에도 깊게 관련되어 있다(Nestle FO et al., J. Exp. Med. 202, 135-143, 2005).

[0007] 한편, 바이러스 감염을 수반하여 타입 1 INF를 대량으로 생산하는 세포로서 인터페론 생산 세포(Interferon Producing cell : IPC)가 확인되었다. 소수의 IPC들은 혈액 내에 존재한다. 말초혈액 림프구에 차지하는 IPC의 비율은 1% 이하라고 사료된다. 그러나 IPC는 매우 높은 IFN 생산 능력을 가진다. IPC의 IFN 생산 능력은 예를 들면  $3000 \text{ pg/ml}/10^4$  세포에 이른다. 즉, 세포의 수는 적지만, 바이러스 감염시에 생성되는 혈중 IFN  $\alpha$  혹은 IFN  $\beta$ 의 대부분은 IPC에 의해 초래되고 있다고 말해도 좋다.

[0008] 한편 IPC는, 수지상 세포(dendritic cell)의 전구 세포라 사료되는 미분화 림프구계 수지상 세포이다. IPC는 형질세포양 수지상 세포(Plasmacytoid dendritic cell)로 불리기도 한다. IPC는 바이러스 자극에 의해 수지상 세포에 분화되고, T세포에 의한 IFN- $\gamma$  또는 IL-10의 생산을 유도한다. 또한 IPC는 IL-3 자극에 의해도 수지상 세포에로 분화된다. IL-3 자극에 의해 분화된 수지상 세포는 T세포에 의한 Th2 사이토카인(IL-4, IL-5, IL-10)의 생산을 유도한다. 이와 같이 IPC는 자극의 차이에 따라 다른 수지상 세포로 분화하는 성질을 가지고 있다.

[0009] 따라서 IPC는 IFN 생산 세포 및 수지상 세포의 전구체로서의 2가지 측면을 가진다. 두 세포 모두 면역 시스템에 대해 중요한 역할을 담당하고 있다. 즉 IPC는, 여러가지 측면에서 면역 시스템을 지지하는 중요한 세포 중 하나이다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) WO03/12061(U.S. 특허 공개 출원번호 2003-148316)

## 비특허문헌

[0011]

- (비특허문헌 0001) 비특허 문헌 1: Shiozawa et al., Arthr. & Rheum. 35, 412, 1992
- (비특허문헌 0002) 비특허 문헌 2: Hopkins et al., Clin. Exp. Immunol. 73, 88, 1988
- (비특허문헌 0003) 비특허 문헌 3: Wada et al., Am. J. Gastroenterol. 90, 136, 1995
- (비특허문헌 0004) 비특허 문헌 4: Parez et al., Am. J. Hematol. 49, 365, 1995
- (비특허문헌 0005) 비특허 문헌 5: Bianco et al., Science, 16:294, 1540-1543, 2001
- (비특허문헌 0006) 비특허 문헌 6: Ju et al., Gene. 2004 Apr 28; 331: 159-64.
- (비특허문헌 0007) 비특허 문헌 7: Colonna M et al., Seminars in Immunology 12: 121-127, 2000.
- (비특허문헌 0008) 비특허 문헌 8: Nakajima H. et al., J. Immunology 162: 5-8. 1999
- (비특허문헌 0009) 비특허 문헌 9: Wilson LE et al, Semin Arthritis. Rheum. 32, 163-173, 2002
- (비특허문헌 0010) 비특허 문헌 10: Nestle FO et al., J. Exp. Med. 202, 135-143, 2005

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0012]

본 발명의 목적은 면역글로브린-유사 전사체-7(immunoglobulin-Like transcript-7: ILT7)에 결합하는 항체를 제공하고, IPC의 검출, 확인 및 분리하는 것이다. 또한 본 발명의 또 다른 목적은 IPC 활성을 조절하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0013]

IFN과 같은 체액성 인자의 활성을 조절에는 상기 인자를 인식하는 항체의 투여가 유효하다. 예를 들어 인터루킨 (interleukin: IL)-1 또는 IL-4에 대한 항체에 의해 자가면역 질환을 치료하려는 시도가 실용화된 바 있다 (Guler et al., Arthritis Rheum., 44. S307, 2001). 그에 더하여 인터페론에 대한 중성화 항체는 자가면역 질환의 치료제가 될 수 있다고 여겨지고 있다 (Stewart, TA. Cytokine Growth Factor Rev. 14; 139-154, 2003). IPC에 의한 생성되는 IFN에 대해서도 상기의 동일한 접근이 효과적일 것이라고 예측할 수 있다. 그러나 이러한 접근은 상기 인자의 생산 후 체액성 인자의 효과적인 억제를 기반으로 하고 있다. 목적으로하는 체액성 인자의 생산을 직접적으로 제어할 수 있다면, 더욱 본질적인 치료 효과를 달성할 수 있다.

[0014]

인간 IPC를 인지하는 항체는 보고되었다. 예를 들어 항-BDCA-2 단일 클론항체는 인간 IPC-특이적 단일 클론 항체이다 (Dziona A. et al., J Immunol. 165:6037-6046, 2000). 항-BDCA-2 단일 클론 항체는 인간 IPC에 의한 IFN 생산을 효과적으로 억제하는 작용을 가지는 것이 발견되었다 (J. Exp. Med. 194:1823-1834, 2001). 그에 더하여 마우스에서 인터페론-생산 세포를 인지하는 단일 클론 항체가 인터페론의 생산을 억제함이 보고되었다 (Blood 2004 Jun 1;103:11:4201-4206. Epub 2003 Dec). 마우스에서 형질세포양 수지상 세포에 대한 단일 클론 항체에 의해 수지상 세포의 수가 감소가 보고되었다 (J. Immunol. 2003, 171: 6466-6477).

[0015]

이와 유사하게 인간 IPC를 인식하고 그의 활성을 조절할 수 있는 항체가 제공된다면 유용할 것이다. 예를 들어 본 발명자는 Ly49Q를 인지하는 항체가 마우스 IPC에 특이적으로 결합함을 밝혔다. 그러나 Ly49Q에 대한 항체는 마우스 IPC 활성에 간섭하지 않았다 (Blood, 1 April 2005, Vol. 105, No. 7, pp. 2787-2792. ; WO2004/13325). 한편, ILT7은 형질세포양 수지상 세포에서 특이적 발현을 하는 분자로 알려져 있다 (Ju XS et. al. and Gene. 2004 Apr 28;331:159-64.; WO03/12061). 그러나 ILT7에 대한 항체는 수득하지 못하고 있다. 따라서 IPC에 대한 항체의 효과는 알려진 바 없다.

- [0016] ILT7는 면역글로브린의 모티프를 포함하는 막 단백질이다. 골수계 및 림프계의 세포에 발현하고 있는 분자로 보고되었다(Colonna M et al., Seminars in Immunology 12:121-127, 2000.) ILT7과 유사한 구조를 가지는 복수의 분자를 ILT 패밀리라 불린다. ILT 패밀리는 구조적으로도 기능적으로도 KIR(killer cell inhibitory receptors)과 유사하다. ILT7은 다른 ILT 패밀리 분자와 같이 3개의 C-타입 면역글로브린 유사 도메인을 가진다. ILT1, ILT1-유사 단백질, ILT8, LIR6a등과 같이 ILT7도 세포에 활성 신호를 보낸다고 사료된다. ILT 패밀리에 속하는 분자는 혈구계의 세포 세포에서 발현된다(Young et al., Immunogenetics 53:270-278, 2001; "The KIR Gene Cluster." Carrington, Mary and Norman, Paul. Bethesda (MO) : National Library of Medicine (US), NCBI; 2003.).
- [0017] 그 후 ILT7의 고발현이 형질세포양 수지상 세포(Plasmacytoid dendritic cell)에서, ILT7의 저발현이 단핵세포-유래 수지상 세포(monocyte-derived dendritic cell:MDDC)에서 서던 블롯 방법에 의해 검출되었다. ILT2 및 ILT3은 PDC뿐만 아니라 MDCC 또는 CD34 양성 세포로부터 수득된 DC에서도 발현되었다. 그러나 ILT7의 mRNA는 특이적으로 PDC에서 발현하기 때문에 상기 mRNA는 PDC의 마커로 사용될 수 있음이 밝혀졌다. 추가적으로 이때 ILT7의 발현은 CpG의 자극에 의해 ILT7의 발현이 저해하는 것도 밝혀졌다(Ju XS et al. Gene. 2004 Apr 28;331:159-64.; WO03/12061).
- [0018] 본 발명자들은 인간 IPC 연구를 통해 IPC 상의 ILT7의 특이적 발현이 촉진됨을 확인하였다. 이후 본 발명자들은 ILT7의 항체 생성 및 그의 효과를 밝히는 시도를 하였다. 예를 들어, ILT2 및 ILT3와 같은 ILT 패밀리를 구성하는 분자는 특이적으로 세포의 도메인의 아미노산 서열에 높은 보전성을 가진다(도 9). 이러한 ILT 패밀리는 다양한 혈액 세포에서 특이적인 발현 프로필을 나타낸다. 그러므로 다른 ILT 패밀리 분자와 ILT7 사이를 면역학적으로 선별하는 항체는 수득하는 것은 매우 중요한 과제이다. 그러나 실제로는 하기에 기재된 장해물 때문에 면역원으로서 ILT7을 이용하여 인간 IPC에 특이적으로 결합하는 항체를 제조하는데 어려움이 있다.
- [0019] 생체 유래 미량의 단백질을 인식하는 항체를 수득하기 위해서는 일반적으로 유전자 조작 기술에 의해 제작된 단백질이 면역원으로 이용된다. 본 발명자들은 이미 알려진 인간 ILT7의 cDNA의 염기 서열과 그를 암호화하는 아미노산 서열 (GenBankAccession No. NM\_012276)의 정보를 바탕으로 인간 ILT7의 발현을 시도하였다. 그러나 본 발명자들은 정상 조건에서 재조합체로 인간 ILT7을 발현시킬 수 없었다.
- [0020] 단백질 항체를 수득하기 위하여 천연 단백질의 부분 아미노산 서열을 면역원으로 사용하는 것이 자주 시도된다. 그러나 ILT 패밀리같이 아미노산 서열의 상동성이 극히 높은 단백질에 있어서 인간 ILT7에 특이적인 아미노산 서열은 소수에 불과하다. 그와 더불어 항체가 세포 표면의 분자를 인식하기 위해서는 세포 표면 상에 에피토프로서 항체에 인식되는 부분을 구성하는 영역을 선택해야 한다. 따라서 단편 아미노산 서열을 면역원으로 하여 ILT7에 특이적인 항체를 얻는 것은 현실적이지 않다고 사료되었다.
- [0021] 본 발명자들은 이러한 조건 아래서 특수한 면역원을 이용하여 IPC에 결합하는 항체를 수득할 수 있음을 보여주었다. 그에 더하여 본 발명자들은 이와 같이 수득된 항체가 인간 IPC를 특이적으로 인식하고 활성을 조절하는 효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다. 즉 본 발명은 항-ILT7 항체, 그의 제조방법 및 그의 용도에 관한 것이다.

### 발명의 효과

- [0022] 본 발명은 인간 ILT7을 인식하는 항체의 제조에 유용한 면역원과 상기 면역원을 이용한 항-인간 ILT7 항체의 제조방법을 제공한다. ILT7은 ILT 패밀리에 속한 막 단백질이다. 특이적으로 세포외 영역의 아미노산 서열은 ILT 패밀리 사이에 높게 보존되어 있다. 그러므로 일반적인 면역 방법으로 ILT 패밀리를 식별하는 항체를 제조하는 데는 현저한 어려움이 있다. 본 발명자들은 ILT7을 세포막 단백질과 공동발현시킨 동물 세포를 이용하여 인간 ILT7을 식별하는 항체가 쉽게 수득될 수 있음을 밝혔다. 본 발명에 의해 수득될 수 있는 항-ILT7 항체는 다른 ILT 패밀리를 발현하고 있는 세포와 인간 IPC를 식별하는 높은 특이성을 가졌다.

[0023]

[0024]

바람직한 실시태양에 있어서, 본 발명에 의해 제공되는 항-인간 ILT7 항체는 인간 IPC와 결합한다. 그에 더하여 본 발명의 항체는 특이적으로 인간 IPC를 인식한다. 그러므로 IPC 검출 및 분리에 유용한다. IPC는 타입 1 대부분의 인터페론을 생산하는 세포이다. 그러므로 검출 및 분리는 자가면역 질환과 같이 IPC와 연관된 질환의 진단 및 연구에 중요하다. 특히 본 발명자들의 발견에 의하면 IPC 상의 ILT7의 발현은 IFN  $\alpha$ 의 존재 하에서도 저하되지 않는다. 자가면역 질환 환자에 있어서 IFN  $\alpha$  발현은 자주 촉진된다. 이는 본원발명의 항-ILT7 항체가 IFN  $\alpha$ 의 발현으로 인해 촉진되는 자가면역 질환 환자에 있어서 IPC의 검출 및 분리에 이용될 수 있음을 의미한다.

[0025]

본 발명에 의해 제공되는 항-ILT7 항체는 바람직한 실시태양에서 인간 IPC의 활성을 조절하는 효과를 가진다. 그러므로 본 발명의 항-ILT7 항체는 IPC 활성을 억제하는데 이용될 수 있다. 먼저 기재된 바와 같이 IPC 상의 ILT7의 발현은 IFN  $\alpha$ 의 존재 하에서도 저하되지 않는다. 그러므로 본원발명의 항체에 의해 IPC의 활성이 억제를 이용하면 IFN  $\alpha$  발현에 의해 촉진된 자가면역 질환 환자에서 치료 효과를 기대할 수 있다.

[0026]

IPC는 얼마 안되는 세포가 다양한 IFN을 생산한다. IFN의 종화에는 IFN의 분자수에 대응하는 항체가 필요하다. 그러나 본 발명에서는 생산 세포 활성이 직접적으로 억제된다. 그 결과로써 항INF 항체의 종화와 비교할 때 적은 양의 항체를 이용하더라도 IFN의 강력한 억제 효과를 기대할 수 있다. 그에 더하여 IFN이 지속적으로 생산될 경우, IFN 항체의 종화는 일시적인 억제라고 예상된다. 본 발명에서 IPC의 활성이 억제되므로 장기간에 걸쳐 IFN 생성이 억제된다고 기대할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0027]

도 1a는 ILT7 유전자의 mRNA 발현을 RT-PCT 방법으로 실험한 사진이다. 이는 인간 면역세포에서의 ILT7 유전자의 mRNA 발현의 분석된 결과이다.

도 1b는 다양한 인간 조직 및 세포 내에서 ILT7 유전자의 mRNA 발현을 정량 PCR 방법을 이용하여 비교 및 실험한 도이다. 가로축은 실험한 조직 및 세포를 나타내고, 세로축은 GAPDH 유전자의 발현 수준을 표준화된 ILT7의 발현 수준을 보여준다.

도 2는 ILT7 단백질의 구조를 보여주는 도이다. (a)는 ILT7 단백질의 아미노산 서열을 보여주고, 추정되는 분비 신호 서열 및 막통과 영역을 나타낸다. (b)는 구축된 발현 벡터가 암호화하는 ILT7 단백질의 모식도를 나타낸다.

도 3은 ILT7 발현 벡터 및 FcR  $\gamma$  발현 벡터가 도입된 세포 및 ILT7 분자의 세포 표면 발현을 FCM으로 실험한 결과를 보여주는 도이다. 가로축은 항FLAG 항체에 의해 검출된 형광 강도를 나타내는데, 즉, FLAG 태그(tag)된 ILT7 분자의 세포 표면 발현의 강도가 첨부되어 있으며, 세로축은 세포 수를 나타낸다.

도 4는 ILT7 발현 벡터 및 FcR  $\gamma$  발현 벡터가 도입된 세포 및 분자의 결합을 면역침강법(immunoprecipitation) 및 웨스턴 블로트로 분석한 사진이다. 왼쪽 다이아그램은 항-mye 항체와 결합된 FcR  $\gamma$  와 면역침강을 수행 후, 항-FLAG 항체로 ILT7 분자(그림 위)를, 항-mye 항체로 FcR  $\gamma$  분자(그림 아래)를 블로팅한 결과이다. 그와 유사하게 오른쪽은 항-FLAG 항체로 면역침강 후 -FLAGE 항체(위), 항-myc 항체(아래)로 블로팅한 결과이다.

도 5는 ILT7 발현 벡터 및 FcR  $\gamma$  발현 벡터가 도입된 세포 및 N-글리코시다제(N-glycosidase) 처리에 의한 ILT7 분자의 글라이코실화되는 사진이다. 사진의 왼쪽은 N-글리코시다제를 처리하지 않은 경우, 사진의 오른쪽은 N-글리코시다제를 처리한 ILT7의 크기를 나타낸다.

도 6a는 FCM 분석에 의한 제조된 항-ILT7 단일 클론 항체의 반응성을 나타낸 도이다. (a) BDCA-2의 IPC 분획에 항-ILT7 항체의 결합을 인간 말초 혈액 림프구를 이용하여 분석한 결과를 나타내며, 항-ILT7 항체 및 항BDCA-2 항체로 이중 염색하였다. 세로축은 BDCA-2 항체의 반응성을 나타내고, 가로축은 제조된 항-ILT7 항체 각각의 반응성을 나타낸다.

도 6b는 FCM 분석에 의한 제조된 항-ILT7 단일 클론 항체의 반응성을 나타낸 도이다. (b)는 ILT7 분자에 대한

항-ILT7 항체의 결합을 ILT7 및 FcR $\gamma$  발현 벡터가 도입된 293T 세포를 이용하여 분석한 결과를 나타낸다. 세로축은 항FLAG 항체의 반응성을 나타내는데 즉, FLAG 태그된 ILT7 분자 발현의 세기가 첨부되었으며, 가로축은 각각의 항-ILT7 항체의 반응성을 나타낸다.

도 7은 생산된 항-ILT7 단일 클론 항체 중에서, 인간 말초혈액 림프구의 두 종류의 클론의 반응성을 FCM 분석으로 나타낸 도이다. 왼쪽 3개의 그래프는 #11의 결과를 나타내고, 오른쪽 3개의 그래프는 #17의 결과를 나타낸다. 왼쪽 그래프에서 ILT7으로 표시된 각각의 축은 ILT7#11의 반응성을 나타낸다. 동일하게 오른쪽 그래프에서 ILT7으로 표시된 각각의 축은 ILT7#17의 반응성을 나타낸다.

도 8은 생산된 항-ILT7 단일 클론 항체 ILT7#11 및 ILT7#17이 인간 림프구에 결합하는 활성도를 항-BDFA-2 항체와 비교하는 실험 결과이다. 세로축은 항CD123 항체를 나타내고, 가로축은 각 항체의 반응성을 나타낸다. 이에 각 항체는 CD123 양성 세포의 부분에 결합한다. 림프구 세포가 두 종류의 CpG와 IFN $\alpha$ 에 의해 자극받을 때 분석한 반응성 결과를 나타내는 도이다.

도 9a는 ILT7 분자와 높은 상동성을 가지는 패밀리 분자의 아미노산 서열을 나타내는 도이다. 각각의 세포와 영역의 아미노산 서열은 주로 얼라이먼트(alignment)임을 나타낸다.

도 9b는 도 9a의 계속이다.

도 9c는 도 9b의 계속이다.

도 10은 제조된 항-ILT7 단일 클론 항체 ILT7#11 및 ILT7#17이 ILT1, ILT2 및 ILT3 분자에 대한 반응성을 이들의 발현벡터가 도입된 세포를 이용하여 실험한 결과 도이다. 위쪽 도는 FLAG 태그된 ILT7 분자를 FcR $\gamma$ 와 함께 공동발현시킨 세포에서 반응성을 재확인한 결과이다. 아랫쪽 도는 ILT1, ILT2, ILT3 및 FcR $\gamma$ 가 도입(왼쪽 도: ILT7#11, 오른쪽 도: ILT7#17)된 세포에서의 반응성을 나타내는 도이다. 가로축은 항-ILT7 항체 각각의 반응성을 나타낸다.

도 11은 제조된 항-ILT7 단일 클론 항체 ILT7#11 및 ILT7#17이 인간 림프구의 인터페론의 생산 능력에 미치는 영향을 나타내는 도이다. 도상에서, 가로축은 인간 림프구가 인플루엔자 바이러스(influenza virus)로 자극받았을 때 배양 상등액에서의 IFN $\alpha$  농도를 나타내고, 세로축은 처리한 항체를 나타낸다. "감염 없음"은 인플루엔자 바이러스에 의해 자극받지 않은 세포의 결과를 나타낸다.

도 12는 제조된 항-ILT7 단일 클론 항체 ILT7#37, ILT7#28 및 ILT7#33의 CDC 활성도를 나타낸다. 어느 하이브리도마로부터 수득된 항-ILT7 단일 클론 항체를 이용하더라도 항체 농도 0.1  $\mu$ g/ml 또는 그 이상에 대해 80% 이상의 CDC 활성을 나타냈다. 항-ILT7 단일 클론 항체 이외의 다른 항체의 경우 표적 세포에 대한 CDC 활성을 관찰되지 않았다.

도 13은 제조된 항-ILT7 단일 클론 항체 ILT7#17, ILT7#26, ILT7#37, ILT7#28 및 ILT7#33의 표적 세포에 대한 내부화(internalization)를 나타낸다. APC의 형광 강도는 배양(incubation) 전의 세포 표면에 존재하는 ILT7-항-ILT7 항체 면역 복합체의 지표이며, 배양 후에 ILT7-항-ILT7 항체 면역 복합체가 표적 세포 표면 또는 세포내로 통합됨이 검출되었다. 한편 FITC의 형광 강도는 배양 후 세포 표면의 남아있는 ILT7-항-ILT7 항체 면역 복합체의 지표이다. 즉 내부화에 의해 FITC 형광 강도가 감소되었다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 인간 ILT7(immunoglobulin-like transcript-7)은 형질세포양 수지상 세포에서 특이적으로 발현되는 분자임이 보고되었다(Gene. 2004 Apr 28;331:1 59-64.; W003/12061). 대안적으로 인간 ILT7은 림프종(lymphoma)의 예후 예측을 위한 지표로서 사용될 수 있다고 알려져 있다(W02005/24043). 그러나 인간 ILT7를 인지할 수 있는 항체를 제조하는 방법은 확립되지 않았다.

[0029] 인간 ILT7은 서열번호 2에 기재된 499 아미노산 잔기로 구성되어 있고, 구조 중에서 3개의 면역글로브린-유사 도메인 및 하나의 막통과 영역을 포함하는 타입 1 막통과 단백질이다(445-466; 서열 번호 2의 429 부터 450). N-말단을 포함하는 444 아미노산 잔기 중에서 16 아미노산 잔기(서열번호 2의 -15 부터 -1)인 신호 서열 및 17 내지 444 아미노산 잔기(서열 번호 2의 1 부터 428)가 세포외 영역을 구성한다. 한편 C 말단 영역은 세포내 도메인이다. 인간 ILT7의 대부분은 세포외 도메인으로, 세포내 도메인은 33 아미노산 잔기로 구성되어 있다(467 부터 499; 서열번호 2의 451 부터 483). 세포내 도메인에 존재하는 신호 전달과 연관된 모티프는 예측되지 않았다.

다. 인간 ILT7의 전체 길이 아미노산 서열은 서열번호 2로 기재되며, 아미노산 서열을 암호화하는 cDNA의 염기 서열은 서열번호 1로 기재된다. 또한 서열번호 1에 나타난 성숙 웨티드 (72)..(1520)은 종료 및 시작 코돈을 포함하지 않는다. 즉, 서열번호 1에서 종료 및 시작 코돈을 포함하는 단백질 암호화 서열은 24 - 1523 이다.

[0030] 리간드 신호는 신호 전달 분자와 인간 ILT7의 연합을 통해 세포 내로 전달되는 것으로 사료된다. 예를 들어 Fc 수용체  $\gamma$ -쇄(Fc receptor  $\gamma$ -chain) 대부분은 세포 내에 존재한다. 또한 세포내 도메인은 신경 전달과 연관된 ITAM(immunoreceptor tyrosine-based activation motif)를 포함한다. ITAM은 일반적으로 Fc 수용체와 같은 면역수용체에 연합하여 아답터 분자에 공통적인 아미노산 서열 부분이다. 타이로신-인산화를 표적으로 하는 YxxL(서열번호 76)과 같은 모티프는 ITAM에 포함되어 있으며, 신호는 인산화를 통해 전달된다. 세포내 도메인에 ITAM을 포함하는 신호-전달 분자의 알려진 예에는 Fc 수용체  $\gamma$ -쇄 이외에 CD3  $\zeta$  및 DAP12가 포함된다. 이들 신호 절달 분자 중에서 인간 ILT7과 연합하는 분자는 Fc 수용체  $\gamma$ -쇄라고 예측되고 있다. 현재 ILT7에 결합하는 리간드는 알려진 바 없다.

[0031] 본 발명자들은 유전자 발현 분석을 통해 인간 IPC에서 ILT7이 특이적으로 발현됨을 확인하였다. 본 발명자들은 인간 ILT7을 다른 분자와 면역학적으로 식별할 수 있는 항체를 수득한다면 IPC 연구에 유용할 것이라 생각하였다. 그러나 ILT7를 포함한 ILT 패밀리에는 유사한 구조의 많은 분자들이 존재한다. ILT1, ILT2, ILT3, ILT4, ILT5, ILT6 또는 LIR-8과 같은 분자는 특히 세포외 도메인에 높은 상동성의 아미노산 서열을 포함한다. 그러므로 본 발명자들은 면역원으로서 세포외 도메인을 포함하는 부분 아미노산 서열을 포함하는 도메인 웨티드를 이용한 분자로 서로 식별가능한 항체를 수득하는 것은 어려운 일이라고 생각했다. 이에 본 발명자들은 면역원으로서 인간 ILT7을 발현하는 세포를 이용하여 인간 ILT7에 대응하는 항체의 제조를 시도하였다.

[0032] 그러나 일반적인 발현 벡터의 이용은 동물 세포에서 인간 ILT7의 cDNA를 발현시킬 수 없었다. ILT7과 매우 유사한 구조를 가지는 ILT1 분자가 Fc 수용체  $\gamma$ -쇄와 연합함이 보고되었다. 즉, RBL(rat basophilic leukemia) 세포 및 P815(mouse mastocytoma) 세포와 같이 Fc 수용체  $\gamma$ -쇄를 발현하는 세포에 있어서, 세포 표면에 ILT1의 발현이 관찰되었다. 그러나 Fe 수용체  $\gamma$ -쇄를 발현하지 않는 293 세포에서 ILT1을 강제로 발현시켜도 세포 표면의 발현을 관찰할 수 없었다. 한편 ILT1을 Fc 수용체  $\gamma$ -쇄와 공동발현시키면 ILT1의 세포 표면 발현을 확인할 수 있었다(Nakajima H. et al., J. Immunology 162:5-8. 1999). 그러나 ILT7 항체 제조를 위한 면역원의 정보가 없다.

[0033] 이 보고에서는 예를 들어 ILT1 유전자를 도입한 RBL 세포를 면역원으로 이용하여 ILT1 항체를 제조하였다. 본 발명자들은 상기 기재된 동일한 방법으로 ILT7 유전자가 도입된 RBL 세포의 조합을 이용하여 ILT7 항체 제작을 시도하였다. 그러나 ILT7을 RBL 세포(P815)에 강제로 발현시키게 되면 세포 표면의 ILT7 발현을 관찰할 수 없었으므로 이는 면역원으로 이용될 수 없다.

[0034] 본 발명자들은 인간 ILT7을 인식하는 항체를 수득하기 위하여 특정 연구를 구축하였다. 그 결과, 본 발명자들은 수득하고자 하는 항체가 특이적 형질전환 세포를 면역원으로 이용함으로써 제조될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다. 즉 본 발명은 인간 ILT7의 세포외 도메인과 결합하는 단일 클론 항체 및 그의 항원 결합 영역을 포함하는 단편에 관한 것이다.

[0035] 본 발명에 있어서, 인간 ILT7는 인간 IPC에서 발현되는 자연 분자 또는 인간 IPC에서 발현되는 ILT7와 면역학적으로 동일한 분자라 정의할 수 있다. 본 발명에 있어서 인간 ILT7의 항체 결합을 예를 들어 하기와 같이 확인될 수 있다.

[0036] - 인간 세포의 반응성에 근거한 확인

[0037] 본 발명자들의 발견에 의하면, 인간 IPC에서 특이적 인간 ILT7의 발현이 관찰되었다. 원래 인간 ILT7은 형질세포양 수지상 세포에서 유전자 전체 발현을 볼 수 있게 분리되었다(Blood. 2002 100; 3295-3303, Gene. 2004

Apr 28;331:159-64.). 그에 더하여 형질세포양 수지상 세포의 마커로서 이용될 수 있다고 알려졌다 (W003/12061). 형질세포양 수지상 세포 및 IPC는 거의 같은 세포군 혹은 많은 부분이 공통되는 세포군이라고 생각된다. 그러므로 이러한 보고와 본 발명자들의 발견과 모순되지 않는다.

[0038] 인간 ILT7의 발현 프로필을 근거로 할 때, 첫번째로 IPC 또는 형질세포양 수지상 세포의 적어도 일부의 부분집합과의 결합 활성을 본 발명의 인간 ILT에 결합하는 항체에 중요한 특징 중 하나이다. 어느 세포가 IPC 또는 형질세포양 수지상 세포인지 결정하는데 각 세포군에 특이적으로 결합하는 세포 표면 마커를 이용할 수 있다. 예를 들어, 세포 표면 마커에 결합하는 항체와 결합 활성을 확인해야 할 항체에 의한 이중 염색에 의해, 목적으로 하는 세포에 대해 결합하는 것이 확인된다. 즉 본 발명에서 IPC는 예를 들어 BDCA2를 발현하는 세포를 포함한다.

[0039] -인간 ILT7 유전자를 발현하는 형질전환 세포에 대한 반응성에 근거한 확인

[0040] 본 발명자들은 특정한 조건으로 인간 ILT7 유전자를 발현시켰을 때 IPC에서 발현되는 ILT7의 면역학적 특성이 재구축되는 것을 확인하였다. 그러므로 인간 ILT7에 대한 반응성은 또한 ILT7을 암호화하는 유전자가 인공적으로 도입한 세포에 대한 항체의 반응성을 기초로 하여 확인될 수 있다. 즉, 본 발명은 인간 ILT7 세포의 도메인을 구성하는 아미노산 서열을 세포외 도메인을 포함하고, 신호 전달 분자와 공동 발현하고 있는 분자와 결합하는 단일 클론 항체 또는 그의 항원 결합 영역을 포함하는 단편에 관한 것이다. 여기서 세포외 도메인은 서열번호 2에서 나타나는 N 말단 아미노산 서열의 17번째 부터 444번째 위치(서열번호 2에 있어서 1 부터 428)에 해당하는 아미노산 서열로 구성된다.

[0041] 예를 들어 인간 IPC에서 발현되는 ILT7의 면역학적 특성은 인간 ILT7를 암호화하는 DNA를 포함하는 벡터 및 신호-전달 분자를 암호화하는 DNA를 포함하는 벡터의 공동-형질도입된 세포에서 보존된다. 그러므로 인간 ILT7 및 신호 전달 분자가 공동발현되는 형질전환된 세포는 본 발명에 있어서 인간 ILT7의 세포외 도메인에 대한 항체의 결합 친화력을 확인하는데 바람직하다. 본 발명에 있어서, 형질전환세포를 이용하여 항체의 반응성을 확인할 경우 대조군으로서 형질전환되지 않는 세포가 바람직하다. 그에 더하여 신호 전달 분자만을 발현하는 숙주 세포를 대조군으로 하여 항체의 결합이 검출되지 않는 것을 확인하는 것도 중요하다.

[0042] 본 발명에 있어서, 세포 표면에 인간 ILT7의 발현을 유도하는 분자는 공동 발현을 위한 신호 분자로서 이용될 수 있다. 본 발명의 신호전달 분자는 ILT7을 발현하는 세포 상의 최소한 ILT7 분자의 세포외 도메인에 자연 인간 ILT7의 면역학적 특성을 부여할 수 있는 분자로 정의할 수 있다. 본 발명에 있어서 자연 인간 ILT7의 "면역학적 특성"은 인간 IPC에 결합하는 항체에 의해 인식되는 것을 뜻한다.

[0043] 구체적으로, Fc 수용체  $\gamma$ -쇄 또는 DAP12는 신호 전달 분자로서 이용하는 것이 바람직하다. 본 발명에 있어서, 특히 바람직한 신호 전달 분자는 Fc 수용체  $\gamma$ -쇄이다. Fc 수용체  $\gamma$ -쇄는 서열번호 16으로 기재되는 아미노산 서열로 구성된 분자이다. 신호 전달 분자는 공동발현되는 인간 ILT7가 세포 표면에 위치하는 동안 단편일 수 있다. 또는 공동발현되는 인간 ILT7이 세포 표면에 위치하는 동안, 서열번호 16에 기재된 아미노산 서열에서 아미노산 서열의 변이 또는 추가가 허용된다. 즉 본 발명은 하기의 과정을 포함하는 인간 ILT7의 세포외 도메인에 결합하는 단일 클론 항체를 제조하는 세포의 제조 방법을 제공한다:

[0044] (1) 인간 ILT7 세포외 도메인을 포함하는 단백질 및 서열번호 16으로 기재된 아미노산 서열을 포함하는 분자를 외래적으로 발현하는 세포를 면역 동물에게 투여하는 단계; 및

[0045] (2) 면역 동물의 항체 생산 세포로부터 인간 ILT7에 결합하는 항체를 제조하는 항체 생산 세포를 선별하는 단계.

[0046] 이 후, ILT7 이외의 ILT 패밀리를 발현한다고 알려진 세포군과 교차성이 관찰되지 않는 항체는 본 발명의 인간 ILT7에 결합하는 항체로서 바람직하다. 구체적으로 IPC에 대한 결합을 확인한 조건과 동일한 조건 아래에서, ILT7 이외의 ILT 패밀리를 발현한다고 알려진 세포군과의 결합을 확인할 수 없는 항체가 본 발명에서 인간 ILT7에 결합하는 항체로서 바람직하다. 상기 기재와 같이, 예를 들어 ILT2 및 ILT3은 PDC 뿐 아니라 MDDC 또는

CD34 양성 세포에서 수득되는 DC에서도 발현된다(Gene. 2004 Apr 28;331:159-64.). 한편 ILT7의 발현은 IPC로부터 수지상 세포에의 분화에 수반하여 검출될 수 없다. 그러므로 IPC에의 결합을 확인할 수 있는 조건 하에서, MDDC나 CD34 양성 세포로부터 수득되는 DC에 대한 결합을 검출할 수 없는 항체는 본 발명에 있어서의 인간 ILT7에 결합하는 항체에 포함된다.

[0047] 그 외의 ILT 패밀리 분자에 대해서도, 다음과 같은 발현 패턴을 가지는 것이 보고되고 있다("The KIR Gene Cluster" Carrington, Mary and Norman, Paul. Bethesda (MD) :National Library of Medicine (US), NCBI; 2003, Gene. 2004 Apr 28;331:159-64.). 그러므로 인간 IPC 또는 PDC에 결합하고, 하기의 세포에 대한 결합을 확인할 수 없는 항체는, ILT7에 대한 특이성을 가지는 항체에 포함된다:

[0048] ILT1 ; 골수계 세포(단핵 세포, 단핵 세포 유래 DC, 대식세포);

[0049] ILT2 ; PDC, B 세포, CD34 양성 세포, CD34 양성 세포 유래 DC, 및 단핵 세포 유래 DC

[0050] ILT3 ; PDC 및 DC,

[0051] ILT5 ; 단핵 세포, CD34 양성 세포 유래 DC, 및 단핵 세포 유래 DC; 및

[0052] ILT8 ; 단핵 세포계 세포.

[0053] 즉, 본 발명에 있어서 인간 ILT7의 세포외 도메인에 결합하는 단일 클론 항체란, 바람직하게는, 이하의 면역학적 특징을 가지는 단일 클론 항체를 포함한다:

[0054] a) 인간 IPC와 결합하는 단일 클론 항체; 및

[0055] b) 인간 IPC와 결합하는 조건하에서, 단핵 세포, 대식세포, B 세포, CD34 양성 세포 및 상기 세포에 유래하는 수지상 세포로부터 되는 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 세포와의 결합을 확인할 수 없는 단일 클론 항체.

[0056] 특히, 인간 IPC와 결합하는 조건하에서, 단핵 세포, 대식세포, B 세포, CD34 양성 세포 및 상기 세포에 유래하는 수지상 세포와의 결합을 확인할 수 없는 항체는, 본 발명의 단일 클론 항체로서 바람직하다.

[0057] 혹은 본 발명에 있어서 인간 ILT7의 세포외 도메인에 결합하는 단일 클론 항체란, 바람직하게는, 하기의 면역학적 특징을 가지는 단일 클론 항체를 포함한다.

[0058] c) 인간 ILT7를 암호화하는 DNA를 발현 가능하게 보관 유지한 발현 백터와 신호 전달 분자를 암호화하는 DNA를 발현 가능하게 보관 유지한 발현 백터로 공동-형질전환된 형질 전환 세포와 결합하는 단일 클론 항체;

[0059] d) c)의 기재된 공동-형질전환 세포와 결합하는 조건하에서, c)의 공동-형질전환되기 전의 숙주 세포와의 결합을 확인할 수 없다; 또는

[0060] 본 발명의 단일 클론 항체는, 더욱 부가적으로 다음의 면역학적 특징을 가지는 단일 클론 항체를 포함한다:

[0061] e) c)의 공동-형질전환 세포와 결합하는 조건하에서, 상기 신호 전달 분자만을 발현하는 숙주 세포와의 결합을 확인할 수 없다.

[0062] 본 발명에 있어서, 항-ILT7 단일 클론 항체가 ILT 패밀리의 다른 분자와 교차하지 않는다는 사실은 각 ILT 패밀리를 강제 발현시킨 세포를 사용하여 확인할 될 수 없다. 즉 강제 발현에 있어서, 각각의 ILT 패밀리의 아미노산 서열을 암호화하는 cDNA는 적합한 숙주 세포에 도입된다. 수득된 형질전환 세포에 대하여 교차성을 확인해야 할 항-ILT7 단일 클론 항체를 접촉시킨다. ILT7 이외의 ILT 패밀리를 발현하는 세포에 대하여 항체의 결합이 관찰되지 않으면 항체는 ILT7과 다른 ILT 패밀리 분자 간의 면역학적으로 식별할 수 있음을 확인할 수 있다. 예를 들어 하기 기재된 바와 같이 본 발명에서 수득된 항-ILT7 단일 클론 항체는 ILT1, ILT2 및 ILT3와 교차성이 없음이 확인되었다. 그러므로 ILT7과 결합하고, 동일한 조건 하에서 ILT1, ILT2 및 ILT3와의 결합을 검출할 수 없는 단일 클론 항체가 본 발명의 단일 클론 항체의 바람직한 예이다.

[0063] 구체적으로, ILT2 및 ILT3는 IPC에서 유전자 전체 발현이 확인되었다(Ju et al. Gene 331, 159-164, 2004). 그러나 상기 분자들은 각각의 IPC 상의 분화 수준 및 바이러스 또는 다른 싸이토카인의 자극과 같은 조건에 의해 특이적인 발현 프로필을 보인다. ILT7으로부터 ILT 패밀리 분자들을 면역학적으로 식별할 수 있는 항체를 사용하면 ILT7의 발현의 변화를 특이적으로 검출할 수 있다.

[0064] 결합 활성을 확인해야 할 단일 클론 항체와 다양한 세포와의 결합은 예를 들면 유세포 분석기(flow cytometry)의 원리로 확인될 수 있다. 유세포 분석기 원리를 기초로 하는 항체의 반응성 확인을 위해 항체는 검출 가능한 신호를 생성하는 분자 혹은 원자단에 표지해 두는 것이 유리하다. 일반적으로 형광 표지(fluorescent) 또는 발광 표지(luminescent)가 이용된다. 유세포 분석기 원리를 바탕으로 형광표지 항체와 세포와의 결합을 분석하는데 FACS(Fluorescence-activated cell sorter)가 이용될 수 있다. FACS의 이용에 의해 복수의 항체와 복수의 세포와의 결합을 효율적으로 확인할 수 있다.

[0065] 구체적으로, 예를 들어 IPC를 분류할 수 있는 것이 이미 알려진 항체 A와 IPC와 결합 특성을 해석해야 할 항체 B를 IPC를 포함하고 있는 세포군에 동시에 반응시킨다. 두 신호가 같은 세포군에서 검출될 경우 같은 세포군에 이들 항체의 결합하고 있는 것을 확인할 수 있다. 즉 항체 A 및 항체 B가 같은 결합 특성을 가지고 있음을 알 수 있다. 이들이 다른 세포군에 결합할 경우 항체 간의 결합 특성이 다른 것이 분명하다.

[0066] 본 발명의 단일 클론 항체의 바람직한 예로서 하이브리도마 ILT7#11 또는 ILT7#17에 의해 제조된 단일 클론 항체가 있다. 하이브리도마 ILT7#11 및 하이브리도마 ILT7#17은 2005년 10월 21일자로 독립 행정법인 산업기술 종합 연구소 내 특허 생물 기탁 센터에서 수탁번호 FERM BP-10704 및 FERM BP-10705로 기탁되었다.

[0067] 이하 특정 기탁 내용을 기재한다:

[0068] (a) 기탁 기관의 명칭 · 수신인명

[0069] 명칭 : 독립 행정법인 산업기술 종합 연구소 특허 생물 기탁 센터

[0070] 수신인명 : 일본 이바라키현 츠쿠바시동 1쵸메 1번 1호 중앙 제 6(우편 번호305-8566)

[0071] (b) 기탁일 : 2005년 10월 21일

[0072] (c) 수탁 번호: FERM BP-10704 (하이브리도마 ILT7#11)

[0073] (c) 수탁 번호: FERM BP-10705 (하이브리도마 ILT7#17)

[0074] 본 발명의 단일 클론 항체는 그의 항원 결합 영역을 포함하는 단편일 수 있다. 예를 들어 IgG의 효소적 소화에 의해 수득되는 항원 결합 지역을 포함하는 항원 단편이 본 발명의 항체로서 이용될 수 있다. 특이적으로 Fab 및 F(ab')<sub>2</sub>와 같은 항체 단편은 파파인(papain) 또는 펩신(pepsin)에 의해 소화되어 수득될 수 있다. 상기 항체 단편은 항체에 친화력을 가지는 항체 분자로서 이용될 수 있는 것은 이미 알려진 사실이다. 대안적으로, 유전자 재조합에 의해 구축된 항체 또한 만족할만한 항원 결합 활성을 유지하는데 이용될 수 있다. 유전자 재조합에 의해 구축된 항체의 예로는 키메라 항체(chimeric antibody), CDR-이식 항체, 단일 쇄 Fv, 디아바디(diabodies), 직선형 항체 및 항체 단편으로 형성되는 다특이적(polyspecific) 항체를 포함한다. 상기 항체가 단일 클론 항체 또는 상기 항체를 생산하는 항체 생산 세포를 이용하여 상기 항체를 얻는 방법은 이미 공지된 사실이다.

[0075] 본 발명의 단일 클론 항체는 면역원으로서 특이적으로 형질전환된 세포를 이용하여 수득될 수 있다. 즉 본 발명은 인간 ILT7의 세포외 도메인에 결합하는 단일 클론 항체를 생산하는 세포를 제조하는 방법에 관한 것으로 하기의 단계를 포함한다:

- [0076] (1) 인간 ILT7 세포와 도메인 및 인간 ILT7과 결합하는 외래성 분자를 포함하는 외래성 단백질을 발현하는 세포를 면역 동물에 투여하는 단계; 및
- [0077] (2) 상기 면역 동물의 항체 생산 세포로부터 인간 ILT7과 결합하는 항체를 생산하는 항체 생산 세포를 선별하는 단계.
- [0078] 수득된 항체 생산 세포 또는 불멸화된 항체 생산 세포는 배양되고, 원하는 단일 클론 항체는 배양액에서 회수될 수 있다. 항체 생산 세포를 불멸화하는 다양한 방법이 공지되어 있다.
- [0079] 본 발명의 단일 클론 항체를 생산하는 방법에 있어서, 면역원으로 이용될 수 있는 형질전환 세포의 생산을 위해 인간 ILT7과 결합하는 분자의 예로는 세포막 단백질이 포함된다. 이들 중 세포막에 존재하는 신호-전달 분자가 본 발명에 있어서 세포막 단백질로 이용하는 것이 바람직하다. "신호-전달 분자"는 세포와 도메인 내의 단백질 및 수용체 구조를 가지는 세포와 결합하고, 세포의 수용체와 리간드의 결합 자극으로 전달하는 분자를 의미한다. 신호-전달 분자의 예로는 Fc 수용체  $\gamma$ -쇄, DAP12 등이 포함된다. 예를 들어 본원발명에서 Fc 수용체  $\gamma$ -쇄는 세포막 단백질로 이용되는 것이 바람직하다. 인간 DAP12 및 Fc 수용체  $\gamma$ -쇄의 아미노산 서열은 이를 암호화하는 cDNA의 염기서열과 같이 공지되어 있다. 인간 Fc 수용체  $\gamma$ -쇄의 염기 서열 및 상기 염기서열로 암호화된 아미노산 서열은 각각 서열번호 15 및 서열번호 16으로 기재되었다.
- [0080] 본 발명에 있어서, 면역원으로 이용되는 형질전환 세포는 예를 들어 하기 (a) 및 (b)를 발현가능하도록 운반하는 세포를 제조하여 수득될 수 있다:
- [0081] (a) 인간 ILT7의 세포 도메인을 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 외래성 폴리뉴클레오티드; 및
- [0082] (b) Fc 수용체  $\gamma$ -쇄를 암호화하는 외래성 폴리뉴클레오티드.
- [0083] 본 발명에 있어서, 외래성 폴리뉴클레오티드는 숙주세포에 인위적으로 삽입되는 폴리뉴클레오티드를 뜻한다. 세포로서 인간 세포를 이용하는 경우, 인간 세포에 인간 유전자가 도입된다. 이러한 조합에 있어서, 인위적으로 삽입되는 폴리뉴클레오티드는 외래성 폴리뉴클레오티드를 뜻한다. 그러므로 인간 ILT7 또는 Fc 수용체  $\gamma$ -쇄의 이소 발현(ectopic expression)은 외래성 폴리뉴클레오티드의 발현에 포함된다.
- [0084] 본 발명에 있어서, "인간 ILT7의 세포와 도메인"은 세포와 도메인의 아미노산 서열(서열번호 2의 1부터 428) 중, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 17번째부터 444번째 위치의 아미노산 서열을 의미한다. 예를 들어 N 말단으로부터 시작하는 하기의 순서로 각 영역을 포함하는 아미노산 서열은 본 발명의 인간 ILT7의 세포와 도메인을 포함하는 아미노산 서열로 바람직하다:
- [0085] [신호서열 + 세포와 도메인 + 막통과 도메인 + 세포내 영역]
- [0086] 대안적으로, 하기와 같이 세포내 영역이 부분적으로 결실된 아미노산 서열도 본원발명에 있어서 인간 ILT7의 세포와 도메인을 포함하는 아미노산 서열에 포함된다.
- [0087] [신호서열 + 세포와 도메인 + 막통과 도메인 + 세포내 영역의 일부]
- [0088] 더욱이 하기에 언급된 세포내 영역의 결실된 구조는 본원발명에 있어서 인간 ILT7의 세포와 도메인을 포함하는 아미노산 서열에 포함된다.
- [0089] [신호서열 + 세포와 도메인 + 막통과 도메인]
- [0090] 상기 구조에 있어서, 세포와 도메인 이외의 영역은 서열번호 2에 나타난 아미노산 서열로부터 선택된 아미노산 서열일 수 있고, 그 외에 상동인 아미노산 서열을 조합할 수도 있다. 예를 들어, 신호 서열, 막통과 도메인 및 세포내 영역으로 구성된 아미노산 서열은 ILT7 이외의 ILT 패밀리 분자의 아미노산 서열일 수 있다. 또는 인간 이외의 종의 ILT 패밀리의 아미노산 서열을 조합될 수 있다. 더욱이 세포와 도메인 이외의 영역을 구성하는 아미노산 서열은 각각의 영역의 기능을 유지할 수 있는 범위 내에서 돌연변이가 포함될 수 있다. 대안적으로 각각의 영역 사이에 다른 영역을 삽입할 수 있다. 예를 들어, FLAG와 같은 애피토프 태그가 신호 서열과 세포와

영역 사이에 삽입될 수 있다. 특이적으로 신호 서열은 단백질로 번역된 후 세포막 표면에 전송되는 단계에서 제거된다. 그러므로 번역된 단백질의 세포막 통과를 유도하는 임의의 아미노산 서열은 신호 서열로 이용될 수 있다. 보다 특이적으로 인간 ILT7의 아미노산 서열(서열번호 2)은 인간 ILT7의 세포외 도메인을 포함하는 아미노산 서열로 이용하는 것이 바람직하다.

[0091]

[0092]

그러므로 본원발명에서 상기 기재된 구조[신호 서열 + 세포외 도메인 + 막통과 도메인 + 세포내 도메인]로 구성되는 아미노산 서열을 암호화하는 임의의 염기서열은 상기 (a)에 기재된 외래성 폴리뉴클레오티드로 구성되는 폴리뉴클레오티드로 이용될 수 있다. 예를 들어 서열번호 2의 아미노산 서열은 서열번호 1로 기재되는 염기서열로 암호화된다.

[0093]

본 발명에 있어서, 면역원으로써 이용하기 위한 형질전환 세포를 수득하기 위하여 상기 기재된 폴리뉴클레오티드 (a) 및 (b)가 발현가능하게 운반하는 발현 벡터는 적합한 숙주 세포에 도입될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 (a) 및 (b)는 하나의 벡터 또는 다른 벡터에 운반될 수 있다. 각각의 폴리뉴클레오티드가 다른 벡터로 운반될 때 숙주 세포에 두 종류의 벡터가 공동 형질도입된다.

[0094]

바람직하게 본 발명의 숙주세포는 포유동물 세포이다. 특이적으로 숙주 세포는 인간, 원숭이, 마우스(mice) 또는 랫트(rat)에서 유래한 세포이다. 특이적으로 인간에서 유래된 세포가 숙주 세포로서 바람직하다. 예를 들어, 본원발명에서는 숙주세포에 인간으로부터 유래한 293T 세포를 이용하는 것이 바람직하다. 293T 세포는 ATCC CRL-11268로 입수할 수 있다. 그에 더하여 면역 동물에서 유래한 세포 또한 숙주 세포로서 이용될 수 있다. 면역동물에서 유래한 세포를 면역원으로 이용하면 숙주 세포에 대한 면역 응답이 적다. 이와 같은 이유로 외래적으로 발현하는 ILT7의 세포외 도메인에 대한 항체를 효율적으로 수득할 수 있다. 그러므로 예를 들어 마우스를 면역동물로 이용할 때, 마우스에서 유래한 세포가 또한 숙주 세포로 이용될 수 있다.

[0095]

상기 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포에서 발현을 유도할 수 있는 벡터에 운반되어 형질전환 될 수 있다. 포유동물 세포에서 발현을 유도할 수 있는 시판된 벡터가 이용될 수 있다. 본원발명에서는 pCMV-Script(R) Vector, pSG5 Vector (Strata gene), pcDNA3.1(Invitrogen)등의 발현 벡터를 이용할 수 있다.

[0096]

이렇게 수득된 형질전환 세포는 필요에 의해 어쥬번트와 같은 부가 성분과 함께 면역 동물에 투여된다. 어쥬번트의 유용한 예로는 프로인트 컴플리트 어쥬번트(Freund's complete adjuvant) 등이 있다. 면역동물로 마우스를 이용하는 경우, 형질 전환 세포는  $10^4 \sim 10^9$  세포 범위로, 보다 구체적으로  $10^4 \sim 10^6$  세포로 투여될 수 있다. 일반적으로 면역원은 항체값이 상승할 때까지 간격을 두고 여러 차례 투여된다. 예를 들어, 단기간 면역법의 경우, 2 내지 4일, 보다 구체적으로는 3일 간격으로 형질 전환 세포를 투여된다. 2 또는 3회 투여된 후 항체 생산 세포는 회수될 수 있다. 또한 대안적으로 주 1회 정도 간격으로 5 또는 6회 투여 후 항체 생산 세포가 회수될 수 있다.

[0097]

본 발명에 있어서, 단일 클론 항체를 얻기 위하여 회수된 항체 생산 세포는 클로닝된다. 클로닝을 위해 항체 생산 세포는 불멸화되는 것이 바람직하다. 예를 들어 하이브리도마 방법으로 대표되는 세포 융합 방법 또는 EBV(Epstein-Barr virus)에 의한 형질전환되는 방법이 항체 생산 세포의 불멸화 방법으로 이용될 수 있다.

[0098]

항체 생산 세포에 있어서, 하나의 세포는 한 종류의 항체를 생산한다. 그러므로 하나의 세포에서 유래한 세포집단의 확립(즉 클로닝)은 단일 클론 항체를 생산할 수 있다. 하이브리도마 방법은 항체 생산 세포를 적합한 세포주와 융합시켜 불멸화한 후 클로닝하는 방법을 말한다. 불멸화된 항체 생산 세포는 한계 회석법(limiting dilution method)과 같은 기술에 의해 클로닝될 수 있다. 하이브리도마 방법에 유용한 많은 세포주가 알려져 있다. 상기 세포주는 림프구 세포의 불멸화 효율성이 뛰어나고, 성공적으로 융합된 세포를 선별하는데 필요한 다양한 유전 마커를 가지고 있다. 그에 더하여 항체 생산 세포의 생산을 목적으로 하는 경우에는 항체 생산 능

력이 결여된 세포주 도한 이용될 수 있다.

[0099] 예를 들어 마우스 골수종 P3x63Ag8.653(ATCC CRL-1580) 또는 P3x63Ag8U.1(ATCC CRL-1597)은 마우스 또는 래트의 세포 융합법으로 유용한 세포주로서 넓게 이용되고 있다. 일반적으로 하이브리도마 세포는, 동종의 세포의 융합에 의해 생성되지만, 근친의 이종 간으로부터 이질 하이브리도마 세포로부터 단일 클론 항체를 수득할 수 있다.

[0100] 세포 융합의 구체적인 방법은 이미 공지되어 있다. 즉, 면역 동물의 항체 생산 세포를 적합한 융합 파트너와 혼합하여 세포 융합을 수행한다. 항원 생산 세포의 유용한 예로 비장 세포, 림프마디에서 수집한 림프구 세포 및 말초혈액 B 세포가 포함된다. 융합 파트너로서 앞서 기재된 다양한 세포주들이 이용될 수 있다. 폴리에틸렌 글리콜 방법(polyethylene glycol method) 및 전기 융합 방법(electric fusion method)이 세포 융합에 이용될 수 있다.

[0101] 다음으로 융합된 세포의 선택 마커에 근거하여 세포 융합에 성공한 세포가 선별된다. 예를 들어, HAT 감수성 세포주를 세포 융합에 이용했을 경우, 세포 융합에 성공한 세포는 HAT 배지에서 생장하는 세포 선별에 의해 선별된다. 더 나아가 선별된 세포에 의해 생산된 항체가 목적하는 반응성을 가지는 것이 확인되었다.

[0102] 각각의 하이브리도마는 항체의 반응성에 근거하여 스크리닝 된다. 즉, 상기 기재된 방법에 따라 인간 ILT7에 결합하는 항체를 생산하는 하이브리도마가 선별된다. 바람직하게는 선별된 하이브리도마는 서브클론되고 원하는 항체의 생산을 최종적으로 확인되었을 경우에, 확인된 항체는 본원발명의 단일 클론 항체 생산 하이브리도마로 선별된다.

[0103] 구체적으로 상기 기재된 하이브리도마는 인간 세포와의 반응성 또는 인간 ILT7 유전자를 발현하는 형질 전환 세포와의 반응성에 근거하여 선택될 수 있다. 세포와 결합하는 항체는 면역 어세이 원리에 근거하여 검출될 수 있다. 예를 들어 세포를 항원으로 이용하는 ELISA는 목적으로 하는 항체의 검출에 이용될 수 있다. 구체적으로 하이브리도마의 배양 상등액을 인간 IPC 또는 면역원으로 이용하는 형질 전환 세포가 담체에 고정화된 세포와 접촉시킨다. 배양 상등액에 목적하는 항체가 포함되어 있을 경우 항체는 담체에 고정화된 세포에 포착된다. 그 후 고체상은 배양 상등액으로부터 분리하고, 필요하다면 세척한다. 이 후 고체상에 포착된 항체가 검출될 수 있다. 항체를 이식하는 항체는 항체 검출에 이용될 수 있다. 예를 들어 마우스 항체는 항-마우스 면역글로브린 항체를 이용하여 검출될 수 있다. 검출은 항체를 이식하는 항체에 표지화한다면 용이하다. 표지의 유용한 예로는 효소, 형광 색소, 발광 색소 등이 포함된다.

[0104] 한편, 입자 및 마이크로타이터 플레이트(microtiter plate)의 내벽이 세포를 고정화하는 담체로 이용될 수 있다. 세포는 플라스틱으로 제조된 입자 또는 물리적 흡착에 의한 컨테이너의 표면에 고정화될 수 있다. 세포 고정화를 위한 담체의 유용한 예로는 폴리스틸렌(polystyrene)으로 제조된 비드(bead) 및 반응 용기가 포함된다.

[0105] 하이브리도마 선별에 있어서, ILT7이 아니라 면역원으로 이용될 것이라고 예측되는 형질 전환 세포의 속주 세포에 대한 항체 생산은 예측될 수 있다. 예를 들어, 실시예에 나타낸 것처럼, 인간 세포를 면역원으로 이용하고, 마우스를 면역 동물로 이용하는 경우, 인간 세포는 외부 물질로 인지된다. 즉, 외부 물질에 결합하는 항체의 생산이 예측된다. 본 발명에 있어서 인간 ILT7을 인지할 수 있는 항체를 수득하는 것을 목적으로 한다. 그러므로 인간 ILT7 이외의 인간 세포 항원을 인지하는 항체를 수득할 필요는 없다. 이러한 항체를 생산하는 하이브리도마를 스크리닝에서 배제하기 위해서 항체 반응성의 확인에 앞서 목적으로 하지 않는 항체를 미리 흡수할 수 있다.

[0106] 목적하지 않는 항체는 존재가 예측되는 항체가 결합하는 항원에 의해 흡수될 수 있다. 구체적으로는, 예를 들어 인간 ILT7 이외의 인간 세포 항원에 대한 항체는, 인간 ILT7의 발현이 검출할 수 없는 세포에 의해 흡수될 수

있다. 본 발명에 대해, 면역원에 이용한 숙주 세포는, 목적하지 않는 항체를 흡수하기 위한 항원으로 이용하는 것이 바람직하다. 대안적으로 인간 ILT7의 세포외 도메인을 발현하지 않고, ILT7와 결합하는 분자를 발현하는 숙주 세포도, 항체의 흡수를 위한 항원으로서 이용될 수 있다.

항원에 대한 결합활성이 확인된 단일 클론 항체는, 필요에 따라서 IPC의 활성에게 주는 실제적 영향이 확인된다. IPC에 대한 영향은 하기에 기재된 방법에 따라 확인될 수 있다.

본 발명의 단일 클론 항체는 단일 클론 항체를 생산하는 하이브리도마는 배양되고, 본 발명의 단일 클론 항체는 상기 배양액으로부터 회수된다. 하이브리도마는 생체외(*in vitro*) 또는 생체내(*in vivo*)로 배양할 수 있다. 생체외인 경우, 하이브리도마는 RPMI1640과 같은 공지된 배양 배지를 이용하여 배양될 수 있다. 하이브리도마에 의해 분비되는 면역글로브린은 배양 상층액에서 축적된다. 그러므로 본 발명의 단일 클론 항체는 배양 상등액을 수집하여 수득될 수 있고, 필요에 따라 정제할 수 있다. 배양 배지에 혈청을 첨가하지 않을 때 면역글로브린의 정제가 용이하다. 그러나 하이브리도마의 신속한 증식 및 항체 생산의 촉진을 목적으로 하여 배양 배지에 10% 소 태아 혈청이 첨가될 수 있다.

또한 하이브리도마는 생체내에서 배양될 수 있다. 구체적으로 누드 마우스의 복강에 하이브리도마를 접종하므로 써 복각 내에서 하이브리도마를 배양할 수 있다. 단일 클론 항체는 복수 내에서 축적된다. 그러므로 복수를 수득하여 필요에 따라 정제하면 필요한 단일 클론 항체가 생산될 수 있다. 수득된 단일 클론 항체는 목적에 따라 적당하게 변경 또는 가공될 수 있다.

본 발명의 단일 클론 항체는 하이브리도마로부터 항체의 항원 결합 영역을 암호화하는 cDNA를 수득해 이를 적합한 발현 벡터에 삽입하는 것에 의해 발현될 수 있다. 항체의 가변 영역을 코딩하는 cDNA를 수득하여 적합한 숙주 세포에 발현시키는 기술은 공지이다. 그에 더하여 항원 결합 영역을 포함하는 가변 영역을 불변 영역과 결합시켜 키메라 항체로 하는 방법 또한 공지이다.

본 발명의 단일 클론 항체의 바람직한 예는 하이브리도마 #11(수탁번호 FERM BP-10704), 하이브리도마 #17(수탁번호: FERM BP-10705) 또는 하이브리도마 #37에서 생산되는 단일 클론 항체를 포함한다. 이들 단일 클론 항체의 가변 영역을 구성하는 아미노산 서열 및 이를 암호화하는 cDNA 염기서열은 하기와 같다. 그러므로 예를 들어 다른 면역글로브린의 불변 영역과 접합하여 수득되는 키메라 항체는 본 발명에서 바람직하다. 서열목록에 기재된 아미노산 서열에 있어서, 1부터 C 말단까지의 아미노산 서열은 성숙 단백질을 구성한다. 즉, 각각의 아미노산 서열의 1부터 C 말단까지의 연속하는 아미노산 서열은 각각의 아미노산 서열의 성숙 서열이다. 한편 N 말단으로부터 -1 까지의 수치를 표시한 아미노산 서열은 신호서열이다.

서열 번호:38(엮기 서열) 서열 번호:40(엮기 서열)

서열 번호:42(엮기 서열) 서열 번호:44(엮기 서열)

서열 번호:46(염기 서열) 서열 번호:48(염기 서열)

예를 들어, 이러한 가변 영역 유전자를, 각각, 인간 IgG1 중쇄 불변 영역 및 인간 Ig kappa 경쇄 불변 영역을 암호화하는 유전자와 연결하는 것에 의해, 마우스(가변 영역)- 인간(불변 영역) 키메라 항체로 할 수 있다. 이러한 키메라 항체의 아미노산 서열 및 이를 암호화하는 염기 서열은 하기와 같다. 이러한 서열에 의해 특징되는 키메라 항체는, 본 발명에 있어서의 항-ILT7 단일 클론 항체의 바람직한 실시태양의 구성을 보여준다. N 말

단으로부터 -1까지의 아미노산 서열이 신호 서열을, 1부터 C 말단까지의 아미노산 서열은 성숙 단백질에 부합된다. 즉, 각각의 아미노산 서열의 1부터 C 말단까지의 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 키메라 항체는 본 발명에 있어서 바람직하다.

[0120]	중쇄	경쇄	
[0121]	# 11 서열 번호:50(염기 서열)	서열 번호:52(염기 서열)	
[0122]	서열 번호:51(아미노산 서열)	서열 번호:53(아미노산 서열)	
[0123]	#17 서열 번호:54(염기 서열)	서열 번호:56(염기 서열)	
[0124]	서열 번호:55(아미노산 서열)	서열 번호:57(아미노산 서열)	
[0125]	그에 더하여, 단일 클론 항체의 항원 결합 활성은 또한 다른 면역글로브린에 이식될 수 있다. 면역글로브린의 가변 영역은 상보성-결정 영역(complementarity-determining region: CDR) 및 프레임 영역으로 구성되어 있다. 각각의 면역글로브린의 항원 결합 특성은 CDR에 의해 결정되고, 프레임은 항원 결합 영역의 구조를 유지한다. CDR의 아미노산 서열은 다양성에 있어서 매우 풍부하고, 프레임 부분의 아미노산 서열은 고도로 보존되어 있다. CDR을 구성하는 아미노산 서열을 다른 면역글로브린 분자의 프레임 영역을 통합시켜 항원 결합 활성도 이식될 수 있음이 공지되었다. 상기 방법을 이용하여 이종의 면역글로브린이 가지는 항원 결합 특성을 인간 면역글로브린에 이식할 수 있는 방법이 확립되었다. 본 발명에 있어서 "항원 결합 영역"은 프레임에 이식(graft)된 CDR을 포함할 수 있다. 그러므로 "항원 결합영역을 포함하는 단편"이란 해당 단일 클론 항체의 CDR이 이식된 가변 영역을 포함하는 인간 면역글로브린의 단편을 포함한다. 예를 들어, 상기 가변 영역의 아미노산 서열 각각은 하기의 아미노산 서열(서열번호)을 CDR로 포함한다.		
[0126]	CDR1	CDR2	CDR3
[0127]	# 11중쇄 SDYAWN (58)	YISYSGSTSYNPSLCSR (59)	SPPYYAMDY (60)
[0128]	# 11경쇄 KASQDVGTAVA(61)	WASTRHT (62)	QQYSSYPLT(63)
[0129]	#17중쇄 SYWIH (64)	RIYPGTGSTYYNEKFKG(65)	YPTYDWYFDV (66)
[0130]	#17경쇄 RASQSIISNYLH (67)	YASQSIIS (68)	QQSNSWPL T (69)
[0131]	#37중쇄 SDYAWN(70)	YISYSGSTSYNPSLCSR (71)	ALPLPWFAY (72)
[0132]	#37경쇄 KASQDVGTAVA (73)	WASTRHT (74)	QQYSSYPYT (75)
[0133]	상기 언급된 아미노산 서열을 암호화하는 염기 서열 정보와 면역글로브린의 프레임(FR)을 암호화하는 염기 서열의 정보를 근거로 하여, 프라이머를 디자인하고, 두 개의 염기서열을 접합하여 수득된 염기 서열을 가지는 cDNA를 증폭할 수 있다. 이런한 조작을 각 프레임에 대하여 반복하여 마우스의 CDR1, CDR2, 및 CDR3를 인간의 FR로 연결한 가변 영역을 구축할 수 있다. 그에 더하여, 필요에 따라서 인간면역글로브린의 불변 영역을 암호화하는 하는 염기 서열을 접합하면, 불변 영역을 갖춘 인간화 항체를 수득할 수 있다.		
[0134]	상기 기재된 가변 영역을 포함한 키메라 항체 또는 가변 영역을 구성하는 CDR이 이식된 인간화 항체로서 IgG 혹은 IgM 유래의 불변 영역을 가지는 항체는, 본 발명에 있어서의 바람직한 항체에 포함된다. 본 발명자들은 ILT7에 대한 단일 클론 항체가 ILT7 발현 세포에 대한 CDC 작용을 가지는 것을 확인하고 있다. 따라서, IgG 또는 IgM 유래의 불변 영역을 가지는 항체는 CDC 작용에 의한 ILT7 발현 세포에 대한 세포독성을 나타낸다. 상기 항체는 IPC 등의 ILT7 발현 세포의 세포수 억제에 유용하다.		
[0135]	본 발명에 의해 제공되는, ILT7를 인식하는 키메라 항체, 혹은 인간화 항체는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 이용하여 유전자 공학적으로 제조할 수 있다. 예를 들어, 하기 서열번호로 기재된 염기서열 및 각각의 아미노산 서열을 위한 성숙 단백질을 구성하는 아미노산 서열을 함호화하는 폴리뉴클레오티드는 #11 또는 #17의 가변 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드로서 이용될 수 있다. 각각의 아미노산 서열의 1부터 C말단까지 연속하는 아미노산 서열은 성숙 단백질에 대응한다. 각각의 성숙 단백질을 다른 단백질로 발현시키는 경우, 각 아미노산 서열의 N 말단에 분비 신호를 배치하는 것이 바람직하다. 예를 들어 상기 서열 번호에 나타난 아미노산		

서열에 있어서, N 말단부터 -1까지의 아미노산 서열은 동물 세포 상에서 각각의 단백질을 발현될 때 신호 서열로써 이용될 수 있다. 대안적으로 가변 영역은 면역글로브린의 분비가 가능한 임의의 신호 서열을 이용하여 성숙 단백질로 분비시킬 수 있다.

[0136] # 11 서열 번호:50(염기 서열) 서열 번호:52(염기 서열)

[0137] # 17 서열 번호:54(염기 서열) 서열 번호:56(염기 서열)

[0138] 상기 기재된 동일한 방법으로 인간화 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 있어서, N 말단에 추가된 신호 서열을 가지는 단백질을 암호화하는 염기 서열을 이용하여 인간화 항체를 발현하는 폴리뉴클레오티드를 제조할 수 있다. 중쇄 및 경쇄가 분리된 벡터로 전달될 경우, 두 벡터가 동시에 같은 숙주 세포에 공동 형질 감염된다. 각각의 벡터로부터 발현되는 중쇄와 경쇄에 의해, 양자를 갖춘 면역글로브린 분자가 구축된다. 또는, 중쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오티드와 경쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 같은 벡터에 탑재할 수도 있다. 중쇄 및 경쇄가 같이 공동 형질도입되어 발현되는 폴리뉴클레오티드를 탑재한 벡터가 도입된 숙주 세포는 중쇄와 경쇄를 가지는 면역글로브린을 제조한다.

[0139] 이러한 폴리뉴클레오티드는 항체 유전자를 발현할 수 있는 숙주-벡터 시스템을 이용하여 항체를 발현할 수 있다. 그에 더하여, 중쇄 가변 영역을 경쇄 가변 역역과 연결하여 단일 단백질 분자로 발현시키는 경우, 신호 서열은 단백질 분자의 N 말단에 배치될 수 있다. 상기와 같은 항체 분자의 알려진 예로는 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역이 링커로 연결된 scFv 분자가 있다.

[0140] 이와 같이 제조된 단일 클론 항체 각각은 모두 본 발명의 단일 클론 항체에 포함된다. 즉, 해당 단일 클론 항체의 항원 결합 영역을 암호화하는 cDNA에서 유래된 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 항원 결합 영역을 포함하는 면역글로브린으로 구성되는 단일 클론 항체는 본원발명에 있어서 단일 클론 항체에 포함된다.

[0141] 상기 언급한 바와 같이, ILT1 유전자를 강제로 발현시킨 RBL 세포는 ILT1 항체 수득을 위한 면역원으로 이용될 수 있다. 그러나, RBL 세포(P815)의 표면 상의 ILT7 발현은 확인되지 않았으므로 즉 면역원으로 이용될 수 없다. 본 발명자들은 세포 표면의 인간 ILT7의 발현이 인간 ILT7 및 인간 ILT7과 결합하는 다른 세포막 단백질과의 공동 발현에 의해 유도됨을 발견하였다. 또한 본 발명자들은 인간 IPC에 결합하는 항체는 발현이 유도되는 형질전환 세포를 면역원으로 이용하여 수득될 수 있음을 발견하였고, 본 발명을 완성하였다.

[0142] 즉, 본 발명은 (a) 인간 ILT7의 세포외 도메인을 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드; 및 (b) Fc 수용체 γ 쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 외래성에 발현 가능하게 보관 유지하는 동물세포 또는 이의 분획을 포함하는 인간 ILT7의 세포외 도메인에 결합하는 항체를 제조하기 위한 면역원을 제공한다.

[0143] 1998년 인간 ILT7의 구조가 밝혀진 이후 이미 6년 이상이 경과하였으나, 특이적으로 ILT7을 인식할 수 있는 항체는 수득된 바 없다. 인간 ILT7을 인식할 수 있는 항체는 처음으로 본 발명의 면역원에 의해 제공되었다. 즉 본 발명은 하기의 과정을 통해 수득되는 인간 ILT7을 인식할 수 있는 항체를 제공한다:

[0144] (1) 인간 ILT7의 세포외 도메인을 포함한 단백질, 및 인간 ILT7와 결합하는 분자를 외래적으로 발현하는 세포를 면역 동물에 투여하는 단계;

[0145] (2) 상기 면역 동물의 항체 생산 세포로부터 인간 ILT7에 결합하는 항체를 제조하는 항체 생산 세포를 선별하는 단계; 및

[0146] (3) 단계 (2)로부터 선별된 항체 생산 세포를 배양하고, 배양액으로부터 인간 ILT7을 인식할 수 있는 항체를 회수하는 단계.

[0147] 인간 ILT7는 특이적으로 인간 IPC에서 발현됨이 발견되었다. 또한 본 발명자들이 수행한 SAGE에 의한 유전자 발현 분석에 있어서, 인간 IPC 상에서 인간 ILT7이 특이적으로 발현함이 확인되었다. 그러나 과거 보고에서는 ILT7의 발현이 모두 mRNA를 근거하여 분석되었다. 인간 ILT7의 검출 가능한 항체가 제공되지 않았으므로 단백

질의 발현 상태 분석은 종래에는 행해지지 않았다. 본 발명에 의해 제공된 인간 ILT7의 세포외 도메인에 결합하는 항체는 인간 ILT7 단백질의 해석을 실현했다.

- [0148] 본 발명자들은 본 발명에 근거하는 인간 ILT7의 세포외 도메인에 결합하는 단일 클론 항체는 인간 IPC를 특이적으로 검출함을 실제로 확인하였다. 즉 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 인터페론 생산 세포를 검출하는 방법에 관한 것이다: 인간 ILT7의 세포외 도메인에 결합하는 단일 클론 항체 또는 항원 결합 영역을 포함하는 단편과 시험 세포를 접촉시키는 단계; 및 세포에 결합하는 단일 클론 항체 또는 이의 항원 결합 영역을 포함하는 단편을 검출하는 단계.
- [0149] 본 발명에 근거한 인간 ILT7의 검출은 어느 세포가 IPC일지 어떨지를 확인할 수 있게 한다. 즉 본 발명은, 인간 ILT7를 지표로 하는 IPC의 분류 방법을 제공한다. 또는 본 발명에 근거해 인간 ILT7가 검출된 세포를 분리하는 것에 의해, 인간 IPC를 분리할 수 있다. 즉 본 발명은 인간 ILT7를 지표로 하는 IPC의 분리 방법을 제공한다.
- [0150] 인간 ILT7 항체에 의한 분석을 기초로 하여, CpG에 의해 분화유도된 IPC에서의 ILT7의 발현 레벨이 저해됨이 확인되었다. 즉, 분화 이전의 IPC는 ILT7를 지표로 이용하여 특이적으로 검출할 수 있다. 그러므로 본 발명의 단일 클론 항체는 수지상 세포로 분화하기 전의 IPC 검출에 유용하다. 본 발명에서 "분화 전의 IPC"는 인터페론을 생산할 능력을 유지하고 있는 세포 집단이라고 정의할 수 있다.
- [0151] 본 발명에 있어서, 인간 ILT7의 세포외 도메인에 결합하는 단일 클론 항체 또는 그의 항원 결합 영역을 포함하는 단편은 표지될 수 있다. 예를 들어 항체를 발광 색소 또는 형광 색소의 표지를 통해 용이하게 검출될 수 있다. 보다 구체적으로 형광 색소 표지 항체를 IPC를 포함할 가능성이 있는 세포군과 접촉시키고, 형광 색소를 지표자로 이용하여 본 발명의 항체가 결합한 세포를 검출할 수 있다. 그에 더하여 형광 색소가 검출된 세포를 분리하면 IPC를 분리할 수 있다. 상기 일련의 단계는 FACS 원리에 의해 용이하게 실시할 수 있다.
- [0152] 대안적으로, 본 발명의 항체는 자성 입자와 같은 고상 담체에 결합될 수 있다. 고상 담체에 결합된 항체는 인간 ILT7를 인지하고, 고상 담체에 IPC가 포착된다. 그 결과, IPC가 검출 또는 분리될 수 있다.
- [0153] 본 발명에 근거한 IPC 검출 방법에 필요한 항체는 IPC 검출용 시약으로 제공될 수 있다. 즉 본 발명은 인간 ILT7의 세포외 도메인에 결합하는 단일 클론 항체 또는 그의 항원 결합 영역을 포함하는 단편을 포함하는 인터페론 생산 세포의 검출용 시약을 제공한다. 본 발명의 IPC 검출용 시약은 항체 이외에 양성 대조군 또는 음성 대조군과 조합하여 이용될 수 있다. 예를 들어 면역원으로 이용한 인간 ILT7의 세포외 도메인을 발현하는 형질 전환 세포나 인간으로부터 수득된 IPC 등을 양성 대조군으로 이용할 수 있다. 일반적으로 인간 IPC는 말초혈액에서 극히 적은 양이 수득된다. 그러므로 본 발명의 시약의 양성 대조군으로는 형질전환 세포를 이용하는 것이 바람직하다. 반면 인간 IPT7을 발현하지 않는 임의의 세포를 음성 대조군으로 이용할 수 있다.
- [0154] 즉 본 발명은 (a) 인간 ILT7의 세포외 도메인에 결합하는 단일 클론 항체 또는 그의 항원 결합 영역을 포함하는 단편, 및 (b) 인간 ILT7의 세포외 도메인을 포함하는 외래성 단백질 및 인간 ILT7과 결합하는 외래성 분자를 발현하는 세포를 포함하는 인간 IPC 검출용 키트를 제공한다.
- [0155] 본 발명은 인간 ILT7의 세포외 도메인에 결합하는 항체가 IPC 상에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 인간 ILT7의 세포외 도메인에 결합하는 항체는 IPC의 활성을 억제함이 확인되었다. 즉 본 발명은 하기 성분 중 어느 하나와 인터페론 생산 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는 인터페론 생산 세포의 활성 억제 방법에 관한 것이다:

- [0156] (a) 인간 ILT7에 결합하여 인터페론 생산 세포의 활성을 억제하는 단일 클론 항체 또는 그의 항원 결합 영역을 포함하는 단편; 및
- [0157] (b) (a)에 기재된 단일 클론 항체의 상보성 결정 영역이 이식된 면역글로브린 또는 이의 항원 결합 영역을 포함하는 단편.
- [0158] 또는 본 발명은 하기 성분을 생체에 투여하는 단계를 포함하는 생체 내 인터페론 생산 세포의 활성 억제 방법에 관한 것이다:
- [0159] (a) 인간 ILT7과 결합하여 인터페론 생산 세포의 활성을 억제하는 단일 클론 세포 또는 그의 항원 결합 영역을 포함하는 단편;
- [0160] (b) (a)에 기재된 단일 클론 항체의 상보 결정 영역이 이식된 면역글로브린 또는 그의 항원 결합 영역을 포함하는 단편; 및
- [0161] (c) (a) 또는 (b)의 기재된 성분을 암호화하는 폴리뉴클레오티드.
- [0162] 여기에서 "인터페론 생산 세포(Interferon Producing Cell: IPC)"는 IFN을 생산할 수 있고 세포 표면에 ILT7을 발현하는 세포를 의미한다. 이후 별도로 명시되지 않으면, "IPC"는 수지상 세포의 전구 세포뿐만 아니라 IFN을 생산할 수 있으면서 세포 표면에 ILT7을 발현하는 세포를 포함한다. 상기 IPC를 동정하는 방법은 이미 알려져 있다. IPC는 지표로 일부 세포 표면 마커를 이용하여 다른 혈액 세포로부터 구분될 수 있다. 구체적으로 인간 IPC의 세포 표면 프로필은 하기와 기재되어 있다(Shortman, K. and Liu, YU. *Nature Reviews* 2:151-161. 2002). 또한 최근에는 BDCA-2 양성 세포가 IPC로 한정하도록 건의하는 보고가 있었다(Dzionet, A. et al. *J. Immunol.* 165:6037-6046, 2000.).
- [0163] [인간 IPC의 세포 표면 항원 프로필]
- [0164] CD4 양성, CD123 양성,
- [0165] \*혈통(CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56) 음성 및 CD11c 응성
- [0166] 그러므로 IPC는 상기 공지된 마커들의 발현 프로필을 가지며, IFN을 생산할 수 있는 능력을 가지는 세포라 말할 수 있다. 그에 더하여 IFN을 생산할 수 있는 능력을 가진 생체의 세포는 IPC에 포함되며, 만일 세포가 싱기 마커들의 발현 프로필의 *bulbus* 패턴과 다른 패턴을 가진 세포군이라 할지라도 그러하다. 더 나아가 일반적으로 인간 IPC로 보이는 특성의 예들은 하기와 같다:
- [0167] [세포의 형태학적 특성]
- [0168] - 혈장 세포와 유사
- [0169] - 매끄러운 세포 표면을 가진 원형의 세포
- [0170] - 핵이 상대적으로 크다.
- [0171] [세포의 기능적 특성]
- [0172] - 바이러스 감염 중에 짧은 시간 이내에 대량의 타입-1 인터페론을 생산한다.
- [0173] - 바이러스 감염 후에 수지상 세포로 분화된다.
- [0174] 여기서 이용되는 "IPC 활성 억제"는 IPC의 기능 중 최소한 하나를 억제한다는 뜻이다. IPC의 기능의 예로서 IFN 생산 및 세포 생존이 포함된다. 또한 세포 생존은 세포수로 번역될 수 있다. 그러므로 이들의 기능 모두 또는 이들 중 하나를 억제하는 경우 IPC의 활성을 억제하였다고 말할 수 있다. IPC에 의해 생산된 타입-1 IFN은 다양한 질환을 유도한다. 그러므로 IPC의 수 및 인터페론 생산의 억제는 상기 질환들의 의학적 치료 전략에 유용하다.

- [0175] 예를 들어, 자가 면역 질환의 병리학적 상태와 IFN  $\alpha$  사이의 연관관계가 지적되었다. 대부분의 IFN  $\alpha$ 는 IPC에 의해 생산된다. 그러므로 IFN  $\alpha$ 에 의한 병리학적 상태는 IFN  $\alpha$ 의 생산 억제를 통해 완화될 수 있다. 여기서 "IPC의 IFN 생산 억제"는 IPC에 의해 생산되는 최소한 어느 하나의 IFN의 생산 억제를 의미한다. 본 발명에 있어서 바람직한 IFN은 타입 1 IFN이다. 이를 중에서 IFN  $\alpha$ 이 중요하다.
- [0176] 즉 본 발명은 ILT7의 세포외 도메인에 결합하는 항체를 유효성분으로 포함하는 IFN 생산 억제제에 관한 것이다. 또는 본 발명은 ILT7의 세포외 도메인에 결합하는 항체를 투여하는 단계를 포함하는 IFN 생산 억제 방법을 제공한다. 그에 더하여 본 발명은 IFN 생산 억제를 위한 의약적 조성물의 제조에 있어서 ILT7의 세포외 도메인에 결합하는 항체의 용도에 관한 것이다.
- [0177] 적은 수의 세포로 대량의 IFN을 생산하는 세포는 IPC에 포함된다. 예를 들어, 바이러스 등으로 자극받아 수지상 세포의 전구체 세포는 생체 내에서 생산되는 대부분의 IFN을 생산한다. 대량의 IFN을 생산하는 IPC의 수의 억제는 결과적으로 IFN의 생산을 억제한다. 그러므로 IFN  $\alpha$ 에 의한 병리학적 상태는 IPC의 수를 억제함으로써 감소될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시태양에서 항-ILT7 단일 클론 항체는 ILT7이 발현되는 세포에 결합하고, CDC(보체 의존성 세포독성: Complement Dependent Cytotoxicity) 작용에 의해 세포 독성을 주는 것이 확인되었다. CDC 효과는 항체 의약의 중요한 기작 중 하나이다. 또한 본 발명의 항-ILT7 단일 클론 항체는 CDC 작용에 의해 IPC 등과 같은 ILT7 발현 세포에 대한 강한 세포 독성 작용을 가진다. 즉 본 발명의 바람직한 실시태양에서는 항-ILT7 단일 클론 항체는 IFN 생산 억제 기작에 더하여 IPC에 대한 세포독성에 의해서도 IIFN 생성 억제 효과를 기대할 수 있다.
- [0178] 본 발명에서 이용된 인간 ILT7의 세포외 도메인을 인식하는 항체는 상기에 언급한 바와 같은 방법으로 수득될 수 있다. 본 발명의 항체는 임의를 클래스여도 무방하다. 또한 상기 항체가 유래되는 생물 종도 한정되지 않는다. 그에 더하여 항체의 항원 결합 영역을 포함하는 단편은 항체로 이용될 수 있다. 예를 들어 IgG의 효소적인 소화에 의해 생성되는 항원 결합 영역을 포함하는 항체 단편은 본 발명에서 항체로 이용될 수 있다. 구체적으로 Fab 및 F(ab')<sub>2</sub>과 같은 항체 단편은 파파인(papain) 또는 펩신(pepsin)의 소화에 의해 수득될 수 있다. 이러한 항체 단편은 항원과의 결합 친화성을 가지는 항체 분자로서 이용할 수 있는 것은 공지의 사실이다. 대안적으로, 필요한 항원 결합 활성을 유지하는 동안 또한 유전자 조작에 의해 구축된 항체를 이용할 수 있다. 유전자 재조합에 의해 구축된 항체의 예로는 키메라 항체, CDR-이식 항체, 단일 쇄 Fv, 디아바디(diabody), 선형 항체 및 항체 단편로 형성된 다특이성 항체 등이 포함된다. 단일 클론 항체를 기본으로 이러한 상체를 얻는 방법은 공지되었다.
- [0179] 본 발명에 있어서, 필요에 따라 항체는 변형될 수 있다. 본 발명에 의하면 인간 ILT7의 세포외 도메인을 인식하는 항체는 IPC의 활성을 억제하는 효과를 가진다. 즉, 항체 그 자체가 IPC에 대한 세포 독성 작용을 가지고 있을 가능성이 생각되었다. 강한 작동자(effector) 효과를 나타내는 항체의 서브 클래스는 공지이다. 대안적으로 IPC 활성의 억제 효과는 세포독성제(cytotoxic agent)에 의해 항체 변화를 통해 더욱 증강할 수 있다. 세포독성제의 예는 하기와 같다.
- [0180] 독소 : 슈도모나스 독소(Pseudomonas toxinl PE), 디프데리아 독소, 리신
- [0181] 방사성 동위원소 : Tc<sup>99m</sup>, Sr<sup>89</sup>, I<sup>131</sup>, Y<sup>90</sup>
- [0182] 항생제 : 칼리키마이신(calicheamicin), 마이토마이신(mitomycin), 파클리타셀((paclitaxel))
- [0183] 단백질로 구성되는 독소는 두 가지 기능성 시약(bifunctional reagent)과 함께 항체 혹은 그의 단편 등과 결합할 수 있다. 대안적으로 독소를 암호화하는 유전자를 항체를 암호화하는 유전자에 연결하고, 두 유전자의 응합 단백질을 수득할 수 있다. 방사성 동위원소를 항체에 결합하는 방법 또한 이미 공지이다. 예를 들어 퀼레이트 제를 이용하여 방사성 동위원소를 항체에 표지화하는 방법은 공지이다. 그에 더하여 항암제는 당쇄 또는 두 가지 기능성 시약을 이용하여 항체에 결합할 수 있다.

- [0184] 본 발명자들은 세포 막에 발현된 ILT7에 결합하는 단일 클론 항체가 결합 후 세포안으로 받아들여지는 현상(내부화, internalization)을 관찰하였다. 그러므로 이러한 세포독성제를 결합한 본 발명의 단일 클론 항체는 ILT7 발현 세포에 접촉시키는 단계를 통해 세포 내부에 세포독성제를 전달할 수 있다. 즉, 본 발명은 세포독성제를 결합한 항-ILT7 단일 클론 항체를 유효성분으로 포함하는 ILT7 발현 세포의 활성 억제제를 제공한다. 또는 본 발명은 ILT7 발현 세포의 활성 억제제의 제조에 있어서, 세포독성제를 결합한 항-ILT7 단일 클론 항체의 용도에 관한 것이다. 더욱이, 본 발명은 세포독성제가 결합한 항-ILT7 단일 클론 항체를 투여하는 단계를 포함하는 ILT7 발현 세포의 활성을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0185] 본 발명에 있어서, 인위적으로 구조가 변형된 항체는 유효성분으로 이용될 수 있다. 예를 들어, 항체의 세포독성 및 안정성을 개선하기 위한 다양한 변형 방법은 공지이다. 구체적으로 중쇄의 당쇄가 변형된 면역글로브린은 공지이다(Shinkawa, T. et al., J. Biol. Chem. 276; 6591-6604, 2001.). 면역글로브린의 항체 의존성 세포-매개 세포독성(Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity: ADCC) 활성은 당쇄의 변형에 의해 증강되었다. 또는 Fc 영역의 아미노산 서열이 변형된 면역글로브린 또한 공지이다. 즉 면역글로브린과 Fc 수용체의 결합 활성을 인위적으로 증가시키므로써 ADCC 활성이 증강되었다(Shield, RL. et al. J.Biol.Chem. 276;6591-6604, 2001.).
- [0186] Fc 수용체에 결합하는 IgG는 세포 내에 한번에 받아들여진다. 이후 IgG는 엔도솜(endosome)에서 발현되는 Fc 수용체와 결합하여 다시 혈중에 방출되는 현상이 밝혀졌다. Fc 수용체와 높은 결합 활성을 가지는 IgG는 세포내로 들어온 후 다시 혈중으로 방출될 가능성이 높다. 그 결과, 혈중 IgG의 체류 시간이 연장된다(Hinton, PR. et al. J Biol Chem. 279:6213-6216, 2004). 이에 추가적으로 Fc 영역의 아미노산 서열의 변형은 보체 의존성 세포독성(complement dependent cytotoxicity: CDC) 활성의 변화를 가져온다고 말해지고 있다. 상기 변형된 항체는 본 발명에서 항체로 이용될 수 있다.
- [0187] 인간 ILT7의 세포외 도메인에 결합하는 항체는 IPC와 접촉시키면 IPC의 활성이 억제된다. 그러므로, 상기 항체는 IPC 활성 억제제 또는 억제 방법에 이용될 수 있다. 즉 본 발명은 하기 (a) 내지 (c)로 이루어진 군으로부터 선택되는 최소한 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 IPC 활성 억제제를 제공한다. 또한 본 발명은 하기 (a) 내지 (c)로 구성되는 군으로부터 선택된 최소한 어느 하나의 구성성분을 투여하는 단계를 포함하는 IPC 활성 억제 방법에 관한 것이다. 더욱이 본 발명은 하기 (a) 내지 (c)로 구성되는 군으로부터 선택되는 최소한 하나의 구성성분의 IPC 활성 억제제 제조에 있어서의 용도에 관한 것이다:
- [0188] (a) 인간 ILT7에 결합하는 단일 클론 항체 또는 이의 항원 결합 영역을 포함하는 단편;
- [0189] (b) (a)에 기재된 항체의 상보성 결정 영역이 이식된 면역글로브린 또는 그의 항원 결합 영역을 포함하는 단편; 및
- [0190] (c) (a) 또는 (b)에 기재된 구성성분을 암호화하는 폴리뉴클레오티드.
- [0191] 본 발명에 있어서, 인간 ILT7의 세포외 도메인을 인식하는 단일 클론 항체는 IPC 활성을 억제하는 단일 클론 항체로 이용될 수 있다. 본 발명에 있어서, 하나 또는 그 이상의 단일 클론 항체를 이용할 수 있다. 예를 들어 인간 ILT7의 세포외 도메인을 인식하는 하나 또는 그 이상의 단일 클론 항체를 배합하여 본 발명에서 이용할 수 있다.
- [0192] 본 발명에 있어서, IPC에 의한 IFN 생산을 억제하는 효과를 가짐을 하기와 같이 확인되었다. IPC는 바이러스 감염 의해 대량으로 IFN을 생산하다. IPC는 바이러스의 자극 전, 후 또는 바이러스 자극과 동시에 항체를 주어 항체를 주지 않은 IPC를 대조군으로 하여 IFN의 생산을 비교하였다. IFN 생산 능력은 IPC 배양 상등액에 포함된 IFN $\alpha$  또는 IFN $\beta$ 를 측정하므로 평가될 수 있다. 비교 결과, 상등액 내의 IFN의 양이 유의하게 감소하면 시험 항체는 IFN 생산 능력을 저해하는 데 효과적임을 확인할 수 있다. 상기 IFN 측정 방법은 공지이다. IPC는 생체 내의 대부분의 IFN을 생산한다. 그러므로 생체 내의 IFN 생산 단계는 IPC의 IFN 생산 능력을 저해하므로 조절될 수 있다.

- [0193] 본 발명에 있어서, IPC 활성은 IPC 수의 유지가 포함된다. 그러므로 본 발명의 IPC 활성 억제는 IPC 수의 억제를 포함한다. 항체의 존재 하에 IPC의 수가 억제됨이 확인되면, 해당 항체가 IPC의 활성을 억제함을 알 수 있다. 비교대조군으로는 IFN 생산에서 활성을 확인해야 할 항체와 동일한 동물종으로부터 유래한 면역글로브린을 이용할 수 있다. IPC의 수는 세포의 계수에 의해 정량적으로 비교될 수 있다. 세포주는 FACS 또는 현미경에 의해 계수될 수 있다.
- [0194] 더욱이, IPC는 바이러스 등에 의한 감염의 결과로 수지상세포 2(dendritic cell 2: DC2)라 하는 Th2를 유도하는 세포로 분화된다고 말한다. 바이러스 자극에 의한 IPC의 IFN 생산이 억제될 수 있다면 Th2로의 분화 또한 억제될 것이다. 그러므로 IFN 생산을 억제하는 본 발명의 단일 클론 항체는 다양한 알레르기 질환에 치료효과를 가짐을 기대할 수 있다.
- [0195] 인간 ILT7의 세포외 도메인을 인식하는 항체를, 상기 항체가 유래된 생물종과 다른 숙주에 투여하는 경우에는 상기 숙주에 있어 외부 물질로 인식되기 힘든 형태로 가공하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 다음과 같은 분자에 가공하므로써 면역글로브린을 외부 물질로 인식되기 어렵게 할 수 있다. 면역글로브린 분자를 하기와 같이 가공하는 방법은 공지이다.
- [0196] -불변 영역이 결여된 그의 항원 결합 영역을 포함하는 단편(Monoclonal Antibodies : Principles and Practice, third edition, Academic Press Limited. 1995; Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996)
- [0197] - 단일 클론 항체의 항원 결합 영역 및 숙주의 면역글로브린의 불변 영역으로 구성되는 키메라 항체("Gene Expression Experiment Manual", Isao Ishida, Tamie Ando, eds., Kodansha, 1994)
- [0198] -숙주의 면역 글로브린에 있어서 상보성 결정 영역(CDR)을 단일 클론 항체의 CDR에 치환한 CDR 치환 항체("Gene Expression Experiment Manual", Isao Ishida, Tamie Ando, eds., Kodansha, 1994)
- [0199] 대안적으로, 인간 항체 유전자가 병합된 비인간 동물을 면역 동물로써 이용하는 것으로, 비인간 동물을 이용하여 수득될 수 있다. 예를 들어 인간 항체 유전자가 병합된 유전자 도입 마우스는 인간 항체를 제조하기 위한 면역 동물로서 실용화되고 있다(Ishida et al., Clining and Stem Cells, 4:85-95, 2002). 상기 동물의 이용은 상기 기재된 면역원을 이용하여 인간 ILT7을 인식하는 인간 항체를 수득하도록 한다. 인간 항체는 인간에 투여하는 항체로 인식하도록 한다. 이는 인간에 투여하는 인간 항체로 바람직하다.
- [0200] \*대안적으로, 인간 면역글로브린 가변 영역 유전자는 과지 디스플레이 방법(Phage display method)에 의해 수득될 수 있다(McCafferty J. et al., Nature 348:552-554, 1990; Kretzschmar T et al., Curr Opin Biotechnol. 2002 Dec; 13(6): 598-602). 과지 디스플레이 방법에 있어서, 인간 면역글로브린 가변 영역을 암호화하는 유전자는 과지 유전자 안에 병합된다. 또한 과지 라이브러리는 다양한 면역글로브린 유전자를 소스로 제작될 수 있다. 과지는 과지를 구성하는 단백질의 융합 단백질로서 가변 영역을 발현한다. 과지 표면에 과지에 의해 발현된 가변 영역은 항원과의 결합 활성을 유지한다. 그러므로 항원 또는 항원을 발현하는 세포 등에 결합하는 과지는 선별되고, 과지 라이브러리로부터 원하는 결합 활성을 가지는 가변 영역을 발현하는 과지를 선별할 수 있다. 더욱이, 원하는 결합 활성을 가지는 가변 영역을 암호화하는 유전자는 이렇게 선별된 과지 입자 안에 보관 유지되고 있다. 즉 과지 디스플레이 방법에 있어서 원하는 결합 활성을 가지는 가변 영역을 암호화하는 유전자는 가변 영역의 결합 활성을 지표자로 이용하여 수득될 수 있다.
- [0201] 본 발명의 IPC 활성 억제제 또는 IPC 활성을 억제하는 방법에 있어서, 인간 ILT7의 세포외 도메인을 인식하는 항체 또는 최소한 항원 결합 영역을 포함하는 항체 단편은 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드로 투여될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 투여에 있어서, 목적으로 하는 단백질을 발현할 수 있도록 적합한 프로모터의 제어 아래에 목적으로 하는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 배치한 벡터를 이용하는 것이 바

람직하다. 증강자(enhancer) 또는 종결자(terminator) 또한 상기 벡터에 배치할 수 있다. 면역글로브린을 구성하는 중쇄 및 경쇄 유전자를 보관 유지하여 면역글로브린 분자를 발현할 수 있는 벡터는 공지이다.

[0202] 면역글로브린을 발현할 수 있는 벡터는 세포에 도입하므로써 투여될 수 있다. 생체 내에 투여시 생체 내의 투여에 의해 세포를 감염시킬 수 있는 벡터는 직접 투여될 수 있다. 일단 생체로부터 분리된 림프구에 상기 벡터를 도입하여 다시 생체 내로 다시 투여될 수 있다(ex vivo).

[0203] 본 발명에 근거한 IPC 활성 억제제 또는 IPC 활성 억제 방법에 있어서, 생체에 투여되는 단일 클론 항체의 양의 경우, 면역글로브린은 일반적으로 0.5 mg 내지 100 mg 범위로 투여될 수 있고, 예를 들어, 체중 kg 당 1 mg 내지 50 mg, 바람직하게는 2 mg 내지 10 mg 이다. 생체 내에 항체를 투여하는 간격은 치료 기간 중 생체 내의 면역글로브린의 유효 농도를 유지할 수 있도록 적절히 조절될 수 있다. 구체적으로 예를 들면 항체는 1 내지 2 주의 간격으로 투여될 수 있다. 투여 경로는 임의이다. 당업자는 치료시 적합한 투여 경로를 적절히 선택할 수 있다. 구체적인 예에는 경구 또는 비경구적 투여가 포함된다. 항체는 예를 들어 정맥내 주사, 근육내 주사, 복장내 주사 혹은 피하 주사 등을 통해 전신 속은 국소에 투여될 수 있다. 본 발명에 있어서 비경구 투여에 적합한 제재에는 주사제, 좌제, 분무제 등이 포함된다. 항체를 세포에 주는 경우, 면역글로브린은 배양 배지 중에 통상 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 바람직하게는 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 보다 바람직하게는 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 더욱 바람직하게는 0.5 mg/mL 첨가되는 것이다.

[0204] 본 발명의 IPC 활성 억제제 또는 IPC 활성 억제 방법에 있어서, 단일 클론 하에는 임의의 방법에 의해 생체에 투여될 수 있다. 일반적으로 단일 클론 항체는 약학적으로 허용가능한 담체와 배합된다. 필요에 따라 단일 클론 항체는 증점제, 안정제, 방부제 및 가용화제 등의 첨가제와 배합될 수 있다. 이러한 담체 또는 첨가제로는 락토스, 구연산, 스테아린산, 스테아린산 마그네슘, 수크로스, 전분, 탈크, 젤라틴, 아가, 식물유 및 에틸렌 글리콜 등이 포함된다. "약학적으로 허용된다"라는 용어는 각국 정부의 감독 당국에 승인되고 있는지, 약국 또는 일반적으로 인지되고 있는 약국에서 동물, 포유동물 더욱 특이적으로 인간에게 사용에 관해 승인되고 있는 것을 말한다. 또한 본 발명의 IPC의 활성 억제제는 1회 또는 여러 차례의 용량의 동결건조 분말 또는 정제의 형태로 제공될 수 있다. 더욱이 동결건조 분말 또는 정제는 투여 전 원하는 농도의 조성물을 용해하기 위해 주사를 위한 멸균수, 생리식염수 또는 완충액과 조합될 수 있다.

[0205] 더욱이, 단일 클론 항체가 면역글로브린을 발현하는 벡터로 투여될 때, 중쇄 및 경쇄는 다른 플라스미드로 함께 공동 형질도입되고, 각각의 플라스미드는 체중 kg 당 0.1 내지 10 mg, 바람직하게는 1 내지 5 mg 범위로 투여될 수 있다. 시험관 내에서 세포에 플라스미드를 도입시, 1 내지 5  $\mu\text{g}/10^6$  세포의 벡터가 이용된다. 이하 본 발명은 실시예에 근거하여 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다.

[0206] 본 명세서에 대해 인용된 모든 선행 기술 문헌은, 참조로서 본 명세서에 통합된다.

#### [0207] 실시예 1

##### A. ILT7의 발현 분석

###### A-1) SAGE 라이브러리를 이용한 분석

[0210] 인간 단핵 세포, IPC, 및 HSV 처리한 IPC에서의 유전자의 발현을 SAGE(Serial Analysis of Gene Expression) 방법에 의해 비교, 분석했다. 분석 방법은 하기과 같다. 인간 말초혈액에서 BDCA-4 양성 세포로서 단핵 세포를, CD14 양성 세포로서 세포 분별기(cell sorter)를 이용하여 분리하였다. 그에 더하여, IPC를 HSV(Herpes Simplex Virus) 존재하에 12시간 동안 배양하고 분화된 IPC를 준비하였다. 각각의 세포로부터 RNA를 취득하여 I-SAGE™ 키트(Invitrogen 제조)를 이용하여 SAGE 라이브러리를 제조하였다. 수득된 약 10만 태그의 서열 데이터를 SAGE 분석 소프트웨어(Invitrogen)를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 단핵 세포/IPC/IPC+HSV의 스코어값이 0/16/0인 유전자, 즉 IPC 특이적 발현을 보이는 유전자로 알려진 ILT7(GenBank Acc#NM\_012276)을 발견하였다. ILT7은 서열번호 1로 기재된 염기서열에 의해 암호화되는 면역글로브린 도메인을 포함하는 막 단백질이다(도

2(a)). IPC 상에서 발현되는 ILT7의 mRNA는 보고되었다(Blood 100, 3295-3303, 2002).

[0211] A-2) RT-PCR

[0212] 혈구 세포 상의 ILT7의 발현은 보다 상세하게 조사하였다. 각각의 세포는 인간 말초혈액에서 세포 분별기를 통해 분리되었다. 분리된 각 세포군으로부터 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하였다. 수득된 cDNA를 주형으로 하여 정규 방법에 따라 정량 PCR를 수행하여 ILT7의 mRNA 발현 레벨을 분석하였다. 프라이머 염기서열 및 PCR을 위한 조건은 하기와 같다:

[0213] 정방향 프라이머 : 5' CTC CAA CCC CTA CCT GCT GTC 3' (서열번호: 3)

[0214] 역방향 프라이머 : 5' TTC CCA AGG CTC CAC CAC TCT 3' (서열번호: 4)

[0215] 94°C 3분을 1 싸이클,

[0216] [94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 1분]을 25 싸이클,

[0217] 72°C 6분을 1 싸이클.

[0218] 단핵 세포로 자극된 IPC, IPC, HSV 및 CD19 양성 세포 즉 B 세포, CD3 양성 세포 즉 T 세포, PMA로 자극된 T 세포 및 CD56 양성 세포 즉 NK 세포에 대해 실험하였으며, ILT7가 특이적으로 IPC에서 발현됨을 밝혔다(도 1(a)).

[0219] A-3) 정량적 분석

[0220] 그에 더하여, 다른 장기 및 조직에서의 발현은 ABI PRISM 7000(Applied Biosystem)를 이용한 정량 PCR을 실험하였다. cDNA 패널로 BD™ MTC multiple tissue cDNA 패널(Human I; Cat.No.636742, Human Immune; Cat.No.636748, Human blood fractions; Cat.No.636750; 장기 전부는 Becton Dckinson사에서 제조) 및 장기 2)의 동일한 혈구 세포 유래 cDNA를 이용하였다.

[0221] 이용한 프라이머의 염기 서열은 하기와 같다:

[0222] ILT7용 전방향 프라이머 : 5' CCT CAA TCC AGC ACA AAA GAA GT 3' (서열번호 : 5)

[0223] ILT7용 역방향 프라이머 : 5' CGG ATG AGA TTC TCC ACT GTG TAA 3' (서열번호 : 6)

[0224] GAPDH용 전방향 프라이머 : 5' CCA CCC ATG GCA AAT TCC 3' (서열번호 : 7)

[0225] GAPDH용 역방향 프라이머 : 5' TGG GAT TTC CAT TGA TGA CAA G 3' (서열번호 : 8)

[0226] PCR은 ABI PRISM 7000(Applied Biosystem 제조) 및 SYBR green PCR master mix kit(동일 회사 제조)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 서열 검출 시스템 소프트웨어(동일 회사에서 제조)를 이용하여 분석하였다.

[0227] 반응조건은 하기와 같다:

[0228] 단계 1: 50°C, 2분을 1 싸이클

[0229] 단계 2: 95°C, 10분을 1 싸이클

[0230] 단계 3: 95°C, 15분, 60°C, 1분을 40 싸이클

[0231] 항시 발현하고 있다고 공지된 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 유전자의 발현 수준으로 표준화하여 ILT7 유전자의 발현을 각 조직간에 비교하였다. 그 결과, 림프 조직 이외의 장기에서는 발현하고 있지 않고, 특이적으로 IPC에서 발현하고 있음을 확인하였다.

[0232] B. ILT7 및 FcR $\gamma$  발현 벡터의 제조

[0233] 그 후, ILT 단백질을 발현사기 위하여 유전자 클로닝 및 발현 벡터의 제조를 수행하였다.

[0234] B-1) ILT7 유전자의 클로닝

[0235] 인간 말초 혈액에서 분리한 IPC에서 폴리(A)<sup>+</sup> RNA는 추출하였고, 올리고 dT 프라이머 및 Super Script Choice System for cDNA Synthesis kit를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA에 EcoRI 아답터(adapter)와 연결하고, EcoRI로 절단된 pME18S 벡터와 연결하여 인간 IPC cDNA 라이브러리를 제조하였다. 제조된 cDNA 라이브러리를 주형으로 하여 하기의 염기 서열의 프라이머를 이용하여 ILT7 유전자를 PCR 방법으로 증폭하였다. PCR 반응에는 KOD Plus DNA polymerase(TOYOBO CO., LTD. 제조) 1 unit를 이용하였다. 반응 조건은 94°C, 2분간 1 싸이클 후 [94°C, 15초, 55°C에서 30초 및 68°C에서 2분]을 25 싸이클 센트이다.

[0236] 정방향 프라이머 : 5' CAG GGC CAG GAG GAG ATG 3' (서열번호: 9)

[0237] 역방향 프라이머 : 5' TCA GCA GAC ACT TCC CCA ACT 3' (서열번호: 10)

[0238] 증폭된 2 kb의 ILT7 cDNA 단편을 1% 아가로스겔을 이용한 전기영동에 의해 분리 및 회수하였고, Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit(Invitrogen 사 제조)를 이용하여 pCR4 Blunt-TOPO plasmid vector(Invitrogen 사 제조)에 클로닝하였다. 수득된 유전자의 염기 서열을 분석하였고, 서열번호 1로 나타나는 원하는 ILT7 유전자를 수득하였음을 확인하였다.

[0239] B-2) FLAG 태그된 ILT7 발현 벡터 제조

[0240] ILT7의 N 말단 및 C 말단에 각각 FLAG 태그를 융합한 단백질의 발현 플라스미드를 각각 구축하였다. ILT7은 태그와 융합되어 태그 검출에 의해 ILT7 단백질의 발현을 확인할 수 있다. 원하는 서열은 상기 1)에서 기재된 제조된 ILT7 유전자를 주형으로 이용하여 하기 염기 서열의 프라이머를 이용하여 PCR 방법으로 증폭하였다. PCR 반응을 위해 KOD Plus DNA polymerase(TOYOBO CO., LTD 제조) 1 unit을 이용되었다. 반응 조건은 94°C, 2분의 1 싸이클 이후에 [94°C, 15초, 55°C, 30초, 68°C, 2분]을 25 싸이클이다.

[0241] N-FLAG ILT7용

[0242] 전방향 프라이머(서열번호 11): 5' CCG cte gag ATG ACC CTC ATT CTC ACA AGC CTG CTC TTC TTT GGG CTG AGC CTG GGCGAT TAC AAG GAT GA C GAC GAT AAG CCC AGG ACC CGG GTG CAG GCA GAA 3'

[0243] 역방향 프라이머(서열번호 12): 5' C TAG act agt TCA GAT CTG TTC CCA AGG CTC 3'

[0244] C-FAGE ILT7용

[0245] 전방향 프라이머(서열번호 13): 5' CCG cte gag ATG ACC CTC ATT CTC ACA AGC 3'

[0246] 역방향 프라이머(서열번호 14): 5' C TAG act agt TCACTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA ATC GAT CTG TTC CCA AGG CTC 3'

[0247] 상기 염기 서열에 있어서, 팔호 안의 밑줄쳐진 부위는 FLAG 태그를 암호화하는 염기 서열을 나타내고, 소문자는 제한효소 XhoI 또는 SpeI의 절단 부위를 나타낸다.

[0248] PCR에 의해 증폭된 DNA 단편은 XhoI 또는 SpeI으로 절단한 후, 젤 전기 영동을 통해 분리하였다. 2 kb의 DNA 단편을 회수하여 상기 동일한 방법으로 XhoI과 SpeI로 절단된 pME18X 벡터와 연결하였다. 이 후 원하는 융합 단백질을 발현할 수 있는 2 종류의 플라스미드인 pME18X-N-FLAG ILT7과 pME18X-C-FLAG ILT7을 각각 구축하였다.

[0249] B-3) FcR $\gamma$  유전자의 클로닝

[0250] FcR $\gamma$  단백질은 ILT7 단백질과 결합할 수 있는 단백질로 생각되었다. 본 분자는 서열번호 15 및 16의 염기서열 및 아미노산 서열을 가진 유전자(Genebank Acc#NM\_004106, J. Biol. Chem. 265, 6448-6452, (1990))이다. 상기 분자는 고친화성 IgE 수용체인 Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 로 구성되는 분자( $\gamma$  쇄)이다. 비록 Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 라 불리지만 이하 FcR $\gamma$ 라 칭한다. 그와 더불어 본 분자는 또한 Fc $\gamma$ R 또는 Fc $\alpha$ R의 구성분자로 알려져 있다. 본 유전자는 다음에 나타내도록 PCR 방법에 의해 클로닝하여 발현 벡터를 제작하였다. 상기 1)에서 제조된 인간 IPC cDNA 라이브러리를 주형으로 하여 하기 프라이머 서열을 프라이머로 이용하여 FcR $\gamma$  유전자를 PCR 방법으로 증폭하였다. PCR 반응을 위해 KOD Plus DNA polymerase(TOYOBO CO., LTD 제조) 1 unit을 이용하였다. 반응 조건은 94°C, 2분간 1 싸이클 후에 [94°C, 15초, 55°C, 3초 및 68°C, 1분]을 25 싸이클을 수행하였다.

- [0251] 정방향 프라이머 : 5' CCC AAG ATG ATT CCA GCA GTG 3' (서열번호: 17)
- [0252] 역방향 프라이머: 5' GGA AGA ACC AGA AGC CAA AGA 3' (서열번호: 18)
- [0253] 증폭된 0.3 kb의 FcR $\gamma$  cDNA 단편을 2% 아가로스 젤을 이용하여 분리 및 수거하여, Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit(Invitrogen 사)를 이용하여 pCR4 Blunt-TOPo plasmid vector(Invitrogen 사)에 클로닝했다. 수득된 유전자의 염기 서열을 분석하였으며, 서열번호 15에 기재된 원하는 FcR $\gamma$  유전자가 클로닝됨을 확인하였다.
- [0254] B-4) Myc-태그된 FcR $\gamma$  발현 벡터의 제조
- [0255] FcR $\gamma$  단백질의 발현을 확인할 수 있도록 C 말단에 Myc 태그가 부가된 단백질의 발현 플라스미드를 구축하였다. 상기 3)에서 기재된대로 제조된 FcR $\gamma$  유전자를 주형으로 하여 하기 염기서열의 프라이머를 이용하여 PCR 방법으로 원하는 서열을 증폭하였다. PCR 반응을 위해 KOD Plus DNA polymerase(TOYOB0 Co., LTD 제조) 1 unit을 이용하였다. 반응조건은 94°C, 2분간 1 싸이클 후에 [94°C, 15초, 55°C, 3초 및 68°C, 1분]을 25 싸이클 수행하였다.
- [0256] 정방향 프라이머(서열번호 19) : 5' CCG etc gag ATG ATT CCA GCA GTG GTC TTG 3'
- [0257] 역방향 프라이머(서열번호 20) : 5' CTA Gac tag tCT ACA GAT CCT CTT CAG AGA TGA GTT TCT GCT C]CT GTG GTG GTT TCT CAT G 3'
- [0258] 상기 프라이머 서열 중에서, 팔호 안의 밑줄친 부분은 부착된 Myc-태그를 암호화된 염기서열을 나타내고, 소문자는 XhoI 또는 SpeI 제한효소의 절단 자리를 보여준다. PCR 방법으로 증폭된 DNA 단편은 XhoI 또는 SpeI로 절단되고, 젤 전기영동으로 분리하였다. 약 0.3 kb DNA 단편을 수득되었고, 상기와 동일한 방법으로 XhoI 또는 SpeI으로 절단된 pME18X 벡터와 연결하였다. 이후 원하는 융합 단백질을 발현할 능력이 있는 플라스미드인 pME18X-Myc-FcR $\gamma$ 을 구축하였다.
- [0259] C. 동물 세포에서 ILT7의 발현
- [0260] 상기 제작한 벡터를 이용하여 동물세포에서의 ILT7의 발현을 수행하였다.
- [0261] C-1) 293T 세포에서의 발현
- [0262] 하기 5개의 조합으로 구축된 DNA를 effectene transfection kit(Qiagen 제조)를 이용하여  $7 \times 10^5$  개 293T 세포에 도입하였다. 도입하고 2일 후에 FCM 분석(flow cytometry analysis)를 수행하였다.
- [0263] (1) pME18X-N-FLAG ILT7 2  $\mu$ g
- [0264] (2) pME18X-C-FLAG ILT7 2  $\mu$ g
- [0265] (3) pME18X-N-FLAG ILT7 1  $\mu$ g + pME18X-Myc-FcR $\gamma$  1  $\mu$ g
- [0266] (4) pME18X-C-FLAG ILT7 1  $\mu$ g + pME18X-Myc-FcR $\gamma$  1  $\mu$ g
- [0267] (5) pME18X-Myc-FcR $\gamma$  2  $\mu$ g
- [0268] FCM 분석 방법은 하기 실시예 2의 A-4에 기재된 동일한 방법으로 수행되었다. 반응을 위해 Cy3 접합된 항-Flag 항체(Sigma사 제조)를 이용하였고, 분석을 위해 FACScan(Becton Dickinson사 제조)을 이용하였다. 그 결과, ILT7 단독으로 활성될 때 불과 얼마 안되는 ILT7만이 세포 표면에 발현되지만, FcR $\gamma$ 와 공존할 때 세포외에 강하게 발현하는 것을 확인하였다(도 3). 마우스 FcR $\gamma$ 가 인간 FcR $\gamma$ 와 상동성이 높은 것으로 알려져 있다. 그러나, 마우스 FcR $\gamma$ 를 발현하는데 p815 세포를 숙주 세포로 사용했을 경우, ILT7의 발현은 관찰되지 않았다.
- [0269] C-2) 면역침강 및 웨스턴 블로트 방법에 의한 분석
- [0270] 세포 표면상에 ILT7은 FcR $\gamma$ 를 수반하여 발현함을 하기와 같이 확인하였다. 면역침강 후에, 두 유전자를 상기 (1) 내지 (5)에서 기재한 각각의 조합으로 공동발현시킨 각각의 293T 세포에 다양한 항체를 이용하여 분석하였다.

[0271] 상기 1)과 동일하게,  $7 \times 10^5$  개 293T 세포에 DNA를 도입하여, 2일 후에 293T 세포를 회수하였다. 세포 분획을 0.5% Triton, 150 mM NaCl의 세포용해 버퍼(lysis buffer)에 용해하고, 20분간 아이스에 방치하였다. 이후 27G 주사바늘로 여러번 흡입을 반복한 후 15 K rpm으로 20분간 원심분리하였다. 상기 200  $\mu$ g의 결과 생성물의 세포 용해액에 항-myc 항체(2  $\mu$ g, Santa cruz biotechnology 제조) 또는 항-Flag 항체(2  $\mu$ g, Sigma사 제조)를 첨가하고, 4°C에서 4시간 동안 교반하였다. 이후 침전한 분획을 하기의 조성인 세포용해 버퍼로 3회 수행하였다.

[0272] 세포용해 버퍼:

[0273] 0.5% TritonX-100,

[0274] 50 mM HEPES(pH 7.6),

[0275] 150 mM NaCl,

[0276] 1 mM EDTA.

[0277] 10% glycerol.

[0278] 1 mM DTT,

[0279] 2 mM PMSF,

[0280] 1  $\mu$ g/ml Aprotinin,

[0281] 1  $\mu$ g/ml Leupeptin,

[0282] 1  $\mu$ g/ml Pepstatin A,

[0283] 0.1  $\mu$ g/ml Chynostatin,

[0284] 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>,

[0285] 0.1 mM  $\beta$ -glycerophosphate

[0286] SDS-PAGE를 위한 시료 버퍼(sample buffer)는 세척된 침전물에 첨가되었고, 5분 동안 가열하여 원심분리를 수행한 후 10% SDS 젤에서 전기영동을 수행하였다. 시료는 전기영동 이후에 원래 방법대로 젤에서 PVDF 막 (Immobilon-p-transfer membrane : Millipore사 제조)으로 이동시켰다. 블록팅은 항-Flag 항체 및 항-myc 항체와 함께 수행하였다. 각 면역 침전물에서 존재함이 확인되므로, FcR $\gamma$ 와 결합하는 ILT7이 293T 세포에서 발현함이 확인되었다(도 4).

[0287] C-3) 당쇄 분석

[0288] 웨스턴 분석에서 ILT7의 여러 종류의 랜드가 관찰되었으므로, ILT7이 글리코실화되었을 가능성을 실험하였다. N-FLAG ILT7 및 Myc-FcR $\gamma$ 가 발현되는 293T 세포의 용해물 200  $\mu$ g을 상기 1) 및 2)에 기재된 방법으로 항-Flag 항체를 이용하여 면역침강시켰다. 이 후 침강 분획은 하기 조성인 N-글리코시다제 버퍼(N-glycosidase buffer) 60  $\mu$ l로 서스펜드(suspend)시키고, 반응용액 30  $\mu$ l씩 2 투브에 나누였다.

[0289] N-글리코시다제 버퍼:

[0290] 10 mM EDTA,

[0291] 0.2% SDS,

[0292] 0.5% TritonX100,

[0293] 1% 2-mercaptoethanol in PBS(phosphated buffer)

[0294] 한 투브에 N-글리코시다제(#1365177, Roche사 제조) 3  $\mu$ l, 3 unit을 가하고, 37°C에서 15시간 동안 반응시켰다. 여기에 시료 버퍼 7  $\mu$ l를 가하고, 100°C에서 5분간 가열하고 10% SDS 젤에서 전기영동을 수행하였다. 전기영동 후에 젤은 PVDF 막으로 이동시키고, 상기 4)에서 기재된 바와 같이 항-ILT7 다 클론 항체 1  $\mu$ g을 가하고 4°C에서

하룻밤 반응시켰다. 결과 생성물은 TBS-T 버퍼로 세척하고, 100,000배 희석한 HRP-표지 항-래빗-항체(Jackson사 제조)와 실온에서 반응시켰다. 그 결과, N-글리코시다제 처리 수행에 의해 명백히 분자량이 감소하였다. 즉, ILT7에 당쇄가 첨가됨을 기대할 수 있었다(도 4).

[0295] C-4) 항-ILT7 다 클론 항체의 제조

[0296] 상기 3)에 기재된 바와 같이 이용된 항-ILT7 다 클론 항체는 하기와 같이 제조되었다. ILT7의 C 말단에 상응하는 23개의 아미노산(CSQEANSRKDNAPFRWEPWEQI; 서열 번호: 21)의 웨티드를 화학적으로 합성하고 운송자로서 KLH 단백질에 결합시켜 그 결과물을 면역원으로 이용하였다. 면역원과 Freund 캠플리트 어쥬번트와 혼합하여 래빗 피내(intradermally)로 면역하였다. 주 1회 합계 6회 면역화한 후, 혈청 내의 항체값이 증가하는 것을 확인하고 전체 혈액을 수집하였다. 이후 일부 혈청에 동일한 서열의 웨티드 컬럼을 이용하여 친화력으로 정제하였다. 결과 생성물은 항-ILT7 다 클론 항체로 결정되었다.

[0297] 실시예 2

[0298] A. 항-ILT7 단일 클론 항체의 제조

[0299] A-1) 면역원 제조

[0300] 면역원으로 이용되는 세포는 하기에 기재된 바와 같이 293T 세포에 유전자를 도입하므로써 준비되었다. 46.4  $\mu$ g 도입 유전자(pME18X-C-FLAG ILT7 23.2  $\mu$ g 및 pME18X-Myc-FcR  $\gamma$  23.2  $\mu$ g)는 3 ml poti-MEM(GIBCO)가 코팅된 100mm/Collagen Coated Dish(IWAKI) 바닥에 첨가하고 혼합되었다. 이 후, 도입 유전자 용액과는 별도로, 3 ml opti-MEM으로 58  $\mu$ l Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000(Invitrogen)를 희석하여 실온에서 5분간 방치하여 Lipofectamine 용액을 준비하였다. 실온에서 20분간 방치한 후, 10% FBS(fetal bovine serum)이 포함된 DMEM 배양배지(SIGMA)를 이용하여  $1 \times 10^6$  세포/ml에 희석한 293T 세포 10 ml에 첨가하였다. 37°C CO<sub>2</sub> 인큐페이터에서 48시간 동안 정지 배양하고 피펫팅을 통해 세포를 회수하였다. 수득된 세포는 면역원용 형질전환체로 이용되었다.

[0301] A-2) 하이브리도마 제작

[0302] 세포 면역하기 전에 200  $\mu$ l PBS과 200  $\mu$ l 캠플리트 어쥬번트(complete adjuvant: FREUND)(RM606-1, Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc. 제조)를 혼합하여 수득된 에멀젼(emulsion) 500  $\mu$ l를 Balb/c 마우스 암컷(4주령)의 양 다리 뒤에 주입하여 면역하였다. 다음 날  $2 \times 10^7$  세포를 PBS 400  $\mu$ l로 혼탁된 50  $\mu$ l를 면역하였다. 3일 간격으로 2번재 및 3번재 면역을 실시하여, 3번째 면역의 3일 후 하기와 같이 세포 융합을 수행하였다.

[0303] 면역된 마우스의 양다리의 림프절에서 세포를 수득되었다. 10% FBS가 포함된 RPMI1640 배양 배지(SIGMA)에서 배양된 마우스 골수종 세포 P3-X63-Ag8-U1는 림프절에서 유래된 세포 및 림프절 및 골수종에서 유래된 골수종 세포의 비가 2:1 내지 10:1을 혼합하였고, 원심분리를 수행하여 세포를 수거하였다. RPMI1640 배양 배지와 동량으로 희석된 PEG4000(MERCK)을 첨가하여 수득된 세포분획에 첨가하여 세포 융합을 수행하였다. 세포 세척 후에, 서플리먼트(supplement)를 포함하는 15% FBS-HAT-배지 160 ml로 생성물을 혼탁하고, 96-웰 플레이트 16매에 200  $\mu$ l/웰에 나누었다. 배양 배지는 3일 후에 교체하였다. 콜로니 형성이 관찰하고 1 내지 2주 후에 1차 스크리닝을 수행하였다.

[0304] A-3) 세포 ELISA 방법에 의한 하이브리도마 스크리닝

[0305] 표적 항체를 생산하는 하이브리도마는 하기 세포 ELISA로 스크리닝하였다. 상기 1)에 기재된 세포를 96 웰 플레이트 1 매당  $1 \times 10^7$  개를 이용하여, 0.5% BSA/2 mM EDTA/PBS로 혼탁하고, 세포 ELISA용 플레이트(NUNC 249570 96V NW PS)에 100  $\mu$ l/웰로 분주하였다. 시료 배양 상층액은 50  $\mu$ l/웰로 첨가하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 각 웰 당 0.5% BSA/2 mM EDTA/PBS를 각 웰에 첨가하여 2000 rpm로 2분간, 4°C로 원심분리를 수행하고, 상등액을 버리는 작업을 2회 수행하였다. 세척 후에 10000배 희석한 페옥시데이즈-표지된 고트 항-마우스 IgG 항체(IM0819; Beckman coulter) 50  $\mu$ l/웰을 각 웰에 첨가하고, 30분간 반응하였다. 0.5% BSA/2 mM

EDTA/PBS를 이용한 세척 작업을 2회 수행하고, 이 후 발색 용액을 첨가하였다. 이후 OD 450 nm - 620 nm로 측정하여, 태양반응을 나타내는 웰을 선택하였다.

[0306] A-4) FCM(flow cytometry) 분석에 의한 항체 반응성 실험

FCM(flow cytometry) 분석을 통해 하이브리도마 배양 상층액을 분석하였다. 상기 1)의 제조된 세포는 0.5% BSA/2 mM EDTA/PBS로 혼탁하고, 하나의 시료당  $1 \times 10^5$ 개로 원심분리 투브에 옮기고, 각 배양 상등액을 40  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 0.5% BSA/2 mM EDTA/PBS 1  $\text{m}\ell$ 을 각 투브에 첨가하여 12000 rpm으로 3분간 4°C로 원심분리한 후 상층액을 제거하는 세척 작업을 2회 수행하였다. 세척 후 100배 희석된 FITC-표지 고트 항-마우스 IgG 항체(IM0819: Beckman coulter)를 첨가하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 0.5% BSA/2 mM EDTA/PBS를 이용하여 세척 작업을 2회 수행하고, flow cytometry FC500(Beckman coulter)을 이용하여 분석하였다. 숙주 세포만에 반응하지 않고, 유전자가 도입된 세포에 특이적으로 반응하는 항체를 생산하는 하이브리도마를 선별하였다. 선별된 하이브리도마는 한정된 희석 방법에 의해 클로닝되었고, 단일 클론 항체를 생산하는 하이브리도마 #11 및 #17이 수득되었다.

[0308] B. 항-ILT7 항체의 반응성 실험

실시예 1의 C-1)에 기재된 같은 방법으로 N 말단에 FLAG 태그가 부가된 ILT7은 FcR $\gamma$  분자와 공동발현시켰다. 이후 실시예 2에서 수득된 항체의 반응성을 FACScan(Becton Dickinson)을 이용하여 FCM 분석으로 확인하였다. 그 결과, 하이브리도마 #11 및 #17에 의해 생산되는 모든 항체는 ILT7 유전자가 도입되어 인간 ILT7을 발현하는 세포에 반응함을 확인되었다(도 6(b)).

그에 더하여, Ficoll을 이용하여 인간 말초 혈액에서 림프구를 분리하고, 제조된 항-ILT7 항체 및 PE-표지 항-BDCA-2 항체(MILTenyi)로 이중 염색을 수행하였다. 이후 림프구에 대한 반응성을 수행하였다. 그 결과, 하이브리도마 #11 및 #17에 의해 생산되는 단일 클론 항체와 BDCA-2 양성 세포와의 결합이 검출되었다, 즉, 양쪽 단일 클론 항체가 IPC상에 발현하는 ILT7 분자를 인지함을 확인하였다(도 6(a)). 상기 단일 클론 항체는 항-ILT7 항체 #11 및 항-ILT7 항체 #17라 각각 명명하였다. 더욱 상세한 분석을 수행하였다.

[0311] 제조된 항-ILT7 항체, 항-가계(Lineage)-1 항체(항-CD3, CD14, CD16, CD19, CD56 하항체; Becton Dickinson), 항-CD123 항체(Becton Dickinson) 및 항-BDCA-2 항체(MILTenyi)를 이용하여 인간 말초 혈액 림프구의 다중 염색 분석을 수행하였다. ILT7 항체-양성 분획에서, 가계 마커는 양성, CD123은 양성 및 BDCA-2는 양성이었다. 상기 결과로부터 IPC는 오직 ILT7#11 및 ILT7#17만으로 염색됨을 확인하였다(도 7).

그에 더하여, 인간 말초 혈액 림프구를 CpG 또는 IFN $\alpha$ 으로 24시간 동안 자극하고 각종 분자의 발현을 FCM 분석을 통해 수행하였다. IPC로부터 IFN 생산을 유도하는 CpGA로서 CpGODN2216을, 수지상 세포의 성숙을 촉진하는 CpGB로서 CpGODN2006을 이용하였다(Moseman et al. J. Immunology. 173, 4433-4442, 2004). 가계 마커 음성 분획을 게이트로 설정하였다. CD123 양성 세포군에서 항-BDCA-2 항체 및 항-ILT7 항체의 반응성을 분석했을 때, 대부분의 ILT7 양성 분획은 CpG 자극 24시간 후에 소실되었다. 그와는 반대로, 일부 BDCA-2 세포는 CpG 자극 24시간 후에 양성임을 나타냈다(도 8). IPC는 CpG 자극 이후에 즉각적으로 다른 세포로 분화된다고 사료된다. 본 발명의 항-ILT7 항체는 IPC에 대한 단계 특이적 항체로서 유용하다고 사료된다. 그에 더불어 말초혈액 림프구의 IPC는 INF $\alpha$ 의 존재하에는 분화되지 않으며, 이 경우 생존률은 높으나, IPC 상의 ILT7의 발현은 유지되므로, 혈청 내 IFN $\alpha$ 가 높은 상태일 가능성성이 있는 자가면역 질환 등에서 ILT7은 안정적으로 IPC 상에 존재함이 확인되었다.

[0313] C. 항-ILT7 항체의 특이성 실험

ILT7은 ILT/LIR 패밀리에 속하고, 상동성이 높은 분자가 다수 존재하며, 특히 세포외 영역에서 상동성이 높다(도 9). 그 중 ILT2 및 ILT3 등의 분자의 mRNA가 IPC 상에서 특이적으로 발현도미이 보고되었다(Ju et al.

Gene 331, 159-164, 2004). 그러므로 상기 분자의 반응성은 형질도입 세포를 이용하여 확인하였다.

[0315] C-1) ILT1 분자의 클로닝 및 발현 벡터의 제조

[0316] 올리고 dT 프라이머 및 SuperScript Choice System for cDNA Synthesis kit를 이용하여 인간 편도선에서 유래한 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 이후 NotI 아답터를 연결하고, pME18S 벡터를 NotoI으로 절단한 벡터와 연결하고, 인간 편도선 cDNA 라이브러리를 제조하였다.

[0317] C 말단에 FLAG 태그가 부착된 ILT1 유전자는 하기의 염기 서열을 프라이머로 이용하여 제조된 cDNA 라이브러리를 주형으로 하여 PCR 방법으로 증폭되었다. PCR 반응에 KOD Plus DNA polymerase(TOYOB0사 제조) 1 unit을 이용하였다. 반응조건은 94°C, 2분간 1 싸이클 후에 [94°C, 15초, 55°C, 3초 및 68°C, 2분]을 25 싸이클 수행하였다.

[0318] 정방향 프라이머(서열번호 22): 5' CCG etc gag ATG ACC CCC ATC CTC ACG GTC C 3'

[0319] 역방향 프라이머(서열번호 23) : 5' CTA Gac tag tTC A[CT TAT CGT CGT CAT CCT TGT AA T C]CC TCC CGG CTG CAT CTT G 3'

[0320] 상기 프라이머 서열에 있어서, 괄호 안의 밀줄쳐진 염기 서열은 FLAG 태그를 암호화한 염기 서열을 의미하고, 소문자는 XhoI 또는 SphI 제한효소의 절단 자리를 나타낸다. PCR 방법에 의해 증폭된 DNA 단편은 XhoI 및 SpeI로 절단되고, 젤 전기영동으로 분리되었다. 약 2 kb의 DNA 단편은 수거되었고, 상기 기재된 동일한 방법으로 XhoI 및 SpeI로 절단된 pME18X 벡터와 연결하였다. 즉, 원하는 융합 단백질을 발현할 수 있는 플라스미드 pME18X-FLAGILT1을 구축하였다. 상기 염기서열 및 아미노산 서열은 서열번호 24 및 25에 나타낸다.

[0321] C-2) 발현 세포의 제조 및 항체 반응성 실험

[0322] ILT2(서열번호 26) 및 ILT3(서열번호 28)에서, 각각의 유전자가 pcDNA4.1(Invitrogen사 제조)의 XbaI 또는 XhoI 자리에 클로닝된 발현 벡터를 이용하였다. 하기 조합의 DNA는 상기 C-1)과 동일한 방법으로 293T 세포( $7 \times 10^5$  세포)로 도입되었다. 도입되고 2일 후에 FCM 분석을 수행하였으며, 항-ILT7 항체가 분석되었다.

[0323] (1) pME18X-N- FLAG ILT7 1  $\mu$ g + pME18X-Myc-FcR γ 1  $\mu$ g

[0324] (2) pME18X-C-FLAG ILT1 0.5  $\mu$ g + pME18X-Myc-FcR γ 0.5  $\mu$ g + pcDNA4.1-ILT2 0.5  $\mu$ g + pcDNA4.1-ILT3 0.5  $\mu$ g

[0325] 그 결과, 어느 항체도 ILT1을 발현하는 세포에 반응하지 않았다. 그 이유는 항-ILT7 항체는 IPC 상의 ILT7 분자를 특이적으로 인지하기 때문이다(도 10).

[0326] 실시예 3

[0327] 인간 IFN 생산 능력에 있어서 항-INT7 항체의 효과

[0328] 인간 말초 혈액 림프구는  $2 \times 10^5$  세포/웰씩 96웰 플레이트에 배양하고, 다양한 항체 5  $\mu$ g/ml과 37°C에서 반응시켰다. 1시간 배양 후 인플루엔자 바이러스 PR8을 상기에 첨가하였다. 24시간 후, 배양 상등액 내의 IFNα를 ELISA kit(Bender Med System)로 측정하였다. 그 결과, IFN의 생산은 항-ILT7 항체의 첨가로 인해 억제되었다(도 11). 즉, IPC에 의한 IFN 생산은 본 발명의 항-ILT7 항체에 의해 영향을 받음을 확인하였다.

[0329] 실시예 4

[0330] 항-INT7 항체의 CDC 활성

[0331] A. 항-INT7 단일 클론 항체의 생산

[0332] 단일 클론 항체를 생산하는 클론은 실시예 2의 A-1) 내지 A-4)와 동일한 방법으로 수득되었다. 반응성은 상기 실시예 2의 B에 기재된 동일한 방법으로 실험하였다. 그 결과, 뛰어난 반응성 및 특이성을 가지는 항-ILT7 단일 클론 항체를 생산하는 하이브리도마 #37, #28 및 #33를 수득하였다. CDC 활성은 상기 하이브리도마 3 종류에

서 생산한 항-ILT7 단일 클론 항체를 이용하여 하기 기재된 방법으로 측정하였다.

[0333] B. CDC 활성 결정

[0334] B-1) 타겟 세포주(ILT7-CHO 세포주) 제작

[0335] 타겟 세포주(ILT7-CHO 세포주)의 표적 생산의 제조 전날, Effectene Transfection Reagent(QIAGEN사 제조)를 이용하여 하기 DNA를 CHO-k1 세포로 도입하고, 6 cm<sup>2</sup> 디쉬 당  $1 \times 10^5$  개로 배양하고, 제오신(Zeocin, Invitrogen사 제조) 800 µg/ml을 이용하여 저항 균주를 선별하였다.

[0336] 도입된 DNA : pcDNA3.1-C-FLAG ILT7 1 µg + pME18X-Myc FcR γ 2 µg

[0337] 그러므로 ILT7가 높게 발현된 세포주는 세포 분별기(BD FACS Aria, Becton Dickinson 제조)를 수득하였다. ILT7과 높게 발현되는 선별된 세포주는 FCM 분석으로 확인되었다. FCM 분석 실험은 실시예 2의 A-4)에 기재된 방법을 통해 BD FACScaliber(BD 제조)로 FCM에 이용하였다. 하기 항체는 1차 항체 및 2차 항체로 이용되었다.

[0338] 1차 항체 : 5 µg/ml 마우스 항-ILT7 항체(#37),

[0339] 2차 항체 : R-PE(phycoerythrin)-접합 고트 항-마우스 면역글로브린 특이적 다 클론 항체(R-phycoerythrin-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin specific polyclonal antibody, BD)

[0340] B-2) 타겟 세포에 대한 항-ILT7 항체의 반응

[0341] 상기 B-1)에 기재되어 수득된 타겟 세포(ILT7-CHO 세포)는 5 mM EDTA/PBS 용액을 이용하여 수득되었고, 하기 조성의 CDC 배지로 혼탁하여  $4 \times 10^5$  세포/ml 농도가 되게 하였다. 혼탁액은 50 µl/웰로 96웰 플레이트에 나누었다.

[0342] CDC 배지:

[0343] RPMI1640

[0344] 0.1% BSA

[0345] 100 unit/ml 폐니실린

[0346] 100 µg/ml 스트렙토마이신

[0347] 10 mM Hepes(pH 7.6)

[0348] 2 mM L-글루타민

[0349] CDC 배지로 준비된 항-ILT7 항체 용액 50 µl을 각각 웰에 첨가하고, 항체의 최종 농도가 0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml 및 5 µg/ml이 되도록 혼합하였다. 그에 더하여 하기의 조성인 보체가 포함된 CDC 배지 50 µl를 첨가하고, 최종 보체 농도가 6%가 되도록 혼합하고, 37°C에서 2시간 동안 배양하였다.

[0350] 보체를 포함하는 CDC 배지:

[0351] 1 ml 어린 래빗의 보체(complement of juvenile rabbit, Catalog No.: CL3441, CEDARLANE 제조)

[0352] CDC 배지(상기 참조).

[0353] 즉, 혼탁액은 원심분리를 수행하였고(원심분리 조건 : 250 G, 4분), 세포로 오염되지 않도록 주의하면서 상층액을 수득하였다. 상층액 상의 LDH는 원래 방법으로 측정되었고, "보체 활성에 의한 타겟 세포에서의 LDH 누출량(Experimental Sample)"로 결정하였다.

[0354] 또한 하기 파라미터는 CDC 활성 결정을 위해 준비되었다.

- 타겟 세포가 자발적 방출되는 LDH 량(target cell Spontaneous LDH Release) : 타겟 세포만을 시료와 동일한 용량으로 배양하여 조제했다.

[0356] - 타겟 세포가 최대로 방출되는 LDH 양(Target Cell Maximum LDH Release) : 타겟 세포만을 시료와 동일한 용량으로 배양하여 상층액 회수 60분 전에 최종 농도가 08%가 되도록 상기 kit가 포함되어 있는 TritonX-100 용액을 첨하하여 조제했다.

[0357] - 용량 보정용 대조군(Volume Correction Control) : 타겟 세포가 choep로 방출했을 때 LDH 양을 조제하였을 때, 첨가된 TritonX-100와 동일한 양을 시료와 동일한 용량의 배양액에 첨가하여 조제했다.

[0358] - 배양액의 백그라운드 대조군(Culture Medium Background) : 시료로서 동일한 부피의 배양액과 배양액에 보체 함유 CDC 배지를 첨가하여 시료와 같은 동일한 용량을 첨가하여 조제했다.

[0359] Target Maximum 및 Target Spontaneous의 흡광도로부터 시료와 같은 동일한 용량의 배양액을 뺀다. Experimental sample의 흡광도로부터 배양액에 보체 함유 CDC 배지를 더하여 시료와 동일한 용량으로 한 용액을 빼서 보정을 하였다. CDC 활성은 하기 식에 의해서 계산되었다. 그 결과는 표 1 및 도 12에서 나타낸다. 어느 하이브리드로부터 수득된 항-ILT7 단일 클론 항체를 이용했을 경우에도 항체 농도 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상에 있어, 80% 이상의 CDC 활성을 나타낸다.

$$\text{CDC 활성}(\%) = \frac{\text{Experimental Sample} - \text{Target Spontaneous}}{\text{Target maximum} - \text{Volume Control} - \text{Target Spontaneous}} \times 100$$

[0360]

표 1

	항체 농도 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	세포독성 (Aver)	세포독성 (STD)
#37	0.1	14.78	3.16
	0.5	85.50	0.60
	1	86.13	2.93
	5	90.26	1.87
#28	0.1	18.52	0.60
	0.5	80.97	1.62
	1	83.64	1.99
	5	88.17	3.32
#33	0.1	4.42	1.58
	0.5	82.16	3.35
	1	85.39	2.78
	5	86.18	1.71
마우스 IgG2a	0.1	1.53	0.60
	0.5	1.47	2.50
	1	3.68	2.90
	5	3.06	1.72
항체 없음	0	2.10	0.49

[0362]

비교예 1

[0364] 항-ILT7 항체 대신에 마우스 IgG2a를 이용할 때를 제외하고 실시예 3의 B 및 C에 기재된 같은 방법으로 정확하게 동일한 조작을 수행하였다. 그 결과는 도 5 및 도 12와 같이 실시예 4에서 나타냈다. 타겟 세포로의 CDC 활성은 항-ILT7 단일 클론 항체 이외의 항체에서는 관찰되지 않았다.

[0365]

실시예 5

- [0366] 타겟 세포로의 항-ILT7 항체의 내부화(internalization)
- [0367] A. 항-ILT7 단일 클론 항체
- [0368] 하기 항-ILT7 단일 클론 항체가 이용되었다.
- [0369] 항-TL7 단일 클론 항체 : #17, #26, #37, #28 및 #33
- [0370] B. 내부화의 관찰
- [0371] B-1) 타겟 세포주의 제조(ILT7-CHO 세포주)
- [0372] 타겟 세포주(ILT7-CHO 세포주)는 실시예 4의 B-1과 동일한 방법으로 제조되었다.
- [0373] B-2) 타겟 세포와 항-ILT7 항체의 반응
- [0374] 수득된 ILT7-CHO 세포는 하기 조성을 가지는 5 mM EDTA/PBS 용액을 이용하여 얼음으로 냉각된 버퍼(T(-)+10% FBS)로  $1 \times 10^6$  세포/ml가 되도록 혼탁되었다.
- [0375] T(-) 배지:
- [0376] RPMI1640
- [0377] 100 unit/ml 페니실린
- [0378] 10  $\mu$ g/ml 스트렙토마이신
- [0379] 10 mM Hepes(pH 7.6)
- [0380] 2 mM L-글루타민
- [0381] \*1 mM 소디움 피루베이트(sodium pyruvate)
- [0382] 50  $\mu$ M 2-마캡토에탄올(mercaptoethanol)
- [0383] 10% 얼로 불활성화된 FBS(Fetal Bovine Serum)
- [0384] 상기 기재된 1 ml 혼탁액을 15 ml 원심분리용 튜브에 넣고, 원심분리를 수행하여(원심분리 조건 : 1200 rpm, 4 °C, 5분) 상등액을 제거하였다. 항-ILT7 단일 클론 항체 혼탁액(10  $\mu$ g/ml) 200  $\mu$ l를 세포 침전물에 첨가하여 혼합하고 4°C에서 30분간 방치한 후 얼음으로 냉각된 T(-) 배지로 2회 세척하였다(이용된 배지양: 세척에 10 ml, 원심분리 조건 : 1200 rpm, 4°C, 5분).
- [0385] B-3) 타겟 세포 표면에 존재하는 ILT7-항-TIL7 항체 면역 복합체의 변형
- [0386] 그 후, 세포 표면에 존재하는 ILT7-항-ILT7 항체 면역 복합체를 2차 항체로 변형하여 형광에 이해 검출되도록 하였다. 구체적인 방법은 하기와 같다. APC-표지된 고트 항-마우스 IgG 다클론 항체(Catalog number: 55082BD, Bioscience사 제조)를 포함하는 얼음으로 냉각된 T(-) 배지를 B-2)에서 기재되어 수득된 세포 침전물에 첨가하여 4°C에서 차광 배양하고, 얼음 냉각된 T(-) 배지로 2회 세척하였다(이용된 배지양 : 10 ml 세척, 원심분리 조건 : 1200 rpm, 4°C, 5분). 이후 이에 얼음 냉각된 T(-) 배지를 첨가하고  $1 \times 10^6$  세포/ml 혼탁액으로 이용했다.
- [0387] B-4) 37°C 배양에 의한 내부화 유도
- [0388] B-3)로 수득된 혼탁액을 2개의 튜브(튜브 (a) 및 (b))에 동일하게 나누었다. 튜브 (a) 및 (b)는 차광 조건 하에서 60분간 37°C 및 4°C로 각각 배양하였다. 배양 후, 내부화를 멈추게 하기 위하여 1% FBS/PBS(얼음 냉각)를 첨가하였다. 결과 용액은 원심분리를 수행한 후(원심분리 조건: 1200 rpm, 4°C, 5분), 상층액을 버리고 1%

FBS/PBS(얼음 냉각)으로 2회 세척하였다(용액양 : 10 ml 세척, 원심분리 조건 : 1200 rpm, 4°C, 5분).

[0389] B-5) 배양 후 타겟 세포 표면에 잔존하는 ILT7-항-ILT7 면역 복합체의 변형

[0390] 배양 수 타겟 세포 표면에 잔존하는 ILT7-항-ILT7 면역 복합체는 형광에 의한 검출하기 위해 삼차 항체로 변형하였다. 구체적인 방법은 하기와 같다. 3차 항체(FITC-표지된 덩키 항-고트 IgG 항체(FITC-labeled donkey anti-goat IgG antibody, Catalog number: sc-2024, Santa cruz biotechnology 제조))를 포함하는 혼탁액 20 μl를 상기 B-4)에 수거된 세포 침전물에 첨가한 후 혼합하여, 차광 조건 하에서 4°C에서 15분간 정착하였다. 결과 용액은 1% FBS/PBS으로 2회 세척하였다(용액양 : 10 ml 세척, 원심분리 조건 : 1200 rpm, 4°C, 5분).

[0391] B-6) 타겟 세포에 존재하는 항-ILT7 항체의 분석

[0392] 그 후, 상기 B-5)에서 수득된 세포 침전물에 1% FBS/PBS 150 μl를 첨가하고, 혼탁하였고, 1.2 ml 마이크로 투브에 수득하였으며, FCM 분석을 수행하였다. 분석에 있어서, 각 세포의 MPI(mean fluorescence intensity)는 FITC 및 APC로 나누어 분석하였다. 그에 더하여 형광 광도비(%)는 하기의 식으로 계산하였다.

$$\text{형광 광도 비(%)} = \frac{37\text{ }^{\circ}\text{C} \text{에서 } 60\text{분간 배양후 세포의 형광광도값}}{4\text{ }^{\circ}\text{C} \text{에서 } 60\text{분간 배양후 세포의 형광광도값}} \times 100$$

[0393]

[0394] 결과는 표 2, 표 3 및 도 13에 나타냈다.

표 2

[0395]	FITC		형광 광도 비(%)	APC		형광 광도 비(%)		
	형광 광도 값			형광 광도 값				
	배양온도(°C)			배양온도(°C)				
	4	37		4	37			
#17	35.7	15.9	44.5	1384	1320	95.4		
#26	29.8	16.5	55.4	844	816	96.7		
#37	51.0	28.5	55.9	2194	2155	98.2		
#28	40.6	19.3	47.5	1746	1709	97.9		
#33	47.7	22.6	47.4	1882	1845	98.0		
IgG2a	3.7	4.2	116.2	3	3.64	121.3		

표 3

[0396]	1차 항체 종류	형광 광도 비(%)	
		APC	FITC
실시예 5	항-ILT7 항체 #17	95.4	44.5
	항-ILT7 항체 #26	96.7	55.4
	항-ILT7 항체 #37	98.2	55.9
	항-ILT7 항체 #28	97.9	47.5
	항-ILT7 항체 #33	98.0	47.4
비교예 2	마우스 IgG2a	121.3	116.2

[0397] FITC의 형광 광도는 배양 후 세포 표면 상에 잔존하는 ILT7-항-ILT7 항체 면역 복합체 양의 지표이다. 37°C, 60분간 배양을 실시한 세포에서는 4°C로 배양한 세포와 비교하여 FITC의 평균 형광 강도가 약 50%로 저하되었다.

[0398] 한편, APC 형광 광도는 배양 전의 세포 표면에 존재하고 있던 ILT7-항-ILT7 항체의 면역 복합체 양의 지표이다.

배양 후에 ILT-항-ILT7 항체 면역 복합체가 세포 표면에 존재하거나, 세포에 통합되는지 고려하지 않고 검출되었다. 실시예 5에 있어서, 37°C에서 배양한 경우 배양 후 APC 형광 강도가 4°C에서 배양한 세포와 동일하다. 어느 온도에서 배양하여도 ILT7-항-ILT7 항체 면역 복합체는 타켓 세포의 어느 위치에도 존재하는 것을 보여준다. 상기 기재된 바와 같이, 항-ILT7 단일 클론 항체는 37°C 배양에 의해 ILT7의 내부화를 야기한다.

[0399] 비) 교예 2

항-ILT7 항체 대신에 마우스 IgG2a를 이용할 때를 제외하고 상기 실시예 5에 기재된 방법과 동일하게 수행하였다. 실시예 5의 결과는 표 2, 표 3 및 도 13에 나타냈다. 마우스 IgG2a를 이용한 경우, FITC 및 APC의 형광 강도의 변화가 관찰되지 않았으며, 마우스 IgG2a가 ILT7의 내부화를 야기하지 않음을 확인하였다.

[0401] 실시예 6

[0402] 마우스 항-인간 ILT7 단일 클론 항체의 구조에 관하여

[0403] [가변 영역의 서열]

[0404] A. 마우스 항-ILT7 항체의 가변 영역을 암호화하는 cDNA 클로닝

[0405] A-1) 마우스 항-ILT7 항체를 제조하는 하이브리도마에 관하여

[0406] 마우스 항-ILT7 항체를 제조하는 하이브리도마로 이용되는 하이브리도마는 하기와 같다.

[0407] -하이브리도마 #11 (Accession number : FERM BP-10704)

[0408] -하이브리도마 #17 (Accession number : FERM BP-10705)

[0409] A-2) 전체 RNA의 분리

[0410] 전체 RNA는 시판되는 "RNeasy Mini Kit"(Catalog number: 74106, Qiagen 제조)에 첨부된 지시서에 따라 이용하여 A-1)에 기재된 하이브리도마에서 전체 RNA를 분리하였다. 모두,  $1 \times 10^7$ 개의 하이브리도마로부터 약 200  $\mu\text{g}$ 의 전체 RNA가 수득된다.

[0411] A-3) 마우스 중쇄 가변 영역을 암호화하는 cDNA의 증폭 및 단편화

[0412] 마우스 중쇄 가변 영역을 암호화하는 cDNA는 A-2에서 기재되어 분리된 전체 RNA 5  $\mu\text{g}$ 을 이용하여 5'RACE 방법으로 증폭하였다. 증폭에 있어서, 상용화된 키트 "5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA ENDS, Version 2.0 kit"(Catalog number : 18374-058, Invitrogen 제조)를 이용하였다. 구체적으로 하기와 같다. 첫 번째로 역전사 효소를 이용하여 A-2)에서 수득된 전체 RNA로부터 첫 번째 가닥 cDNA를 합성하였다. GSP1의 역방향 프라이머의 염기 서열은 표 4에서 나타나 있다.

**표 4**

마우스 중쇄 가변 영역을 암호화하는 유전자 증폭에 이용된 프라이머

이용된 하이브리도마	프라이머 이름	서열 번호	서열
#11	Mu IgG3VH5RACE-GSP1	30	5' CCA TAG TTC CAT TTT ACA GTT ACC 3' (24-머)
	Mu IgG3VH5RACE-GSP2	31	5' GGG ACC AAG GGA TAG ACA GA 3' (20-머)
#17	Mu IgG2aVH5RACE-GSP1	32	5'TCC AGA GTT CCA GGT CAA GGT CAC 3' (24-머)
	Mu IgG2aVH5RACE-GSP2	33	5'GCC AGT GGA TAG ACC GAT GG 3' (20-머)

[0414] 그 후, RNaseH로 전체 RNA를 분해하여 단일 가닥으로 잔존하는 첫 번째 가닥 cDNA를 1.5% 저용점 아가로스 방법

으로 정제하였다. 그에 더하여, 첫번째 사슬 cDNA의 3' 말단에 TdT(terminal deoxynucleotidyl transferase)를 이용하여 뉴클레오티드 호모폴리머인 dC를 부가하였다. dC(앵커 서열)에 상보적인 뉴클레오티드 폴리머를 3' 말단에 가진 앵커 프라이머(서열번호 34)와 표 4에 나타낸 안티센스 프라이머(GSP2)를 이용하여 PCR 방법으로 cDNA를 증폭하였다. 그에 더하여, 수득된 PCR 생성물을 주형으로 이용하였다. AUAP 프라이머(서열번호 35) 및 표 4에 나타낸 안티센스 프라이머(GSP2)를 이용하여 Nested PCR 방법으로 cDNA를 증폭하였다. 이후 PCR 생성물을 1.5% 저용점 아가로스 방법에 의해 정제되었다.

- [0415] 5' RACE를 위한 앵커 프라이머(서열번호 34)

[0416] 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GI1 GGG I1G-3' (36-머)

[0417] 5' RACE를 위한 AUAP 프라이머(서열번호 35)

[0418] 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3' (20-머)

[0419] A-4) 마우스 경쇄 가변 영역이 암호화된 cDNA 증폭 및 단편화

[0420] A-2)에서 분리된 전체 RNA로부터 A-3)과 동일한 방법으로 마우스 경쇄 가변 영역을 암호화하는 cDNA를 증폭하였다. 이때 사용한 프라이머의 염기서열은 표 5에 나타내었다. 수득된 PCR 생성물은 1.5% 저용점 아가로스 방법에 의해 정제되었다.

五 5

- [0421] 마우스 결 쇄 가변 영역을 암호화하는 유전자의 증폭에 이용된 프라이머

이용된 하이브리도마	프라이머 이름	서열 번호	서열
#11, #17	Mu IgVL5RACE-GSP1	36	5' TTC ACT GCC AAT CTT CCA CTT 3' (24-머)
	Mu IgVL5RACE-GSP2	37	5' GAT GGA TAC AGT TGG TGC AGC 3' (21 머)

- [0422] A-5) cDNA의 염기 서열 확인 및 CDR 영역 결정

[0423] A-3)에서 수득된 중쇄 가변 영역 및 A-4)의 수득된 경쇄 가변 영역의 cDNA 단편은 상업적으로 판매되는 키트인 "Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit"(Catalog number: 1325137, Invitrogen사 제조)를 이용하여 제조사의 지침서를 따라 pCR4 Blunt-TOPO 벡터에 클로닝하였고, 대장균 형질전환체를 제조하기 위하여 대장균 숙주 세포(competent cell)에 도입하였다. 상기 언급한 플라스미드는 형질전환체로부터 수득되었고, 플라스미드의 cDNA 염기서열은 자동 DNA 서열결정기인 "PCR-based ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer"(Applied Biosystems 제조)를 이용하여 확인하였다. 정확한 서열은 상보성 결정 영역(이하 "CDR 영역"이라 칭함) 주변의 프레임 쇼프트(frame shift) 및 넌센스 돌연변이(nonsense mutation)에서 기인하는 비활성 RNA로부터 수득된 전사체를 제외하여 추출되었다. 이 후, 플라스미드 안에 포함되는 cDNA 염기 서열의 상보성은 Kabat 데이터베이스와 비교하였고, 각 가변 영역 안의 CDR 영역 및 가변 영역의 서열이 결정되었다. 또한 실시예 4에서 제조된 하이브리도마 #37에 있어서, 가변 영역에서의 CDR 영역 및 가변 영역의 서열은 하이브리도마 #17을 이용하여 실시예 6의 A-1) 내지 A-5)에 기술된 동일한 방법으로 제조되었다. 각각의 하이브리도마가 생산하는 항-ILT7 단일 클론 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 cDNA 염기 서열 및 상기 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열은 하기 서열번호에 의해 나타냈다.

- |        |                    |                  |
|--------|--------------------|------------------|
| [0424] | 중쇄 가변 영역           | 경쇄 가변 영역         |
| [0425] | #11 서열번호 38(염기 서열) | 서열번호 40(염기 서열)   |
| [0426] | 서열번호 39(아미노산 서열)   | 서열번호 41(아미노산 서열) |
| [0427] | #17 서열번호 42(염기서열)  | 서열번호 44(염기 서열)   |
| [0428] | 서열번호 43(아미노산 서열)   | 서열번호 45(아미노산 서열) |

- [0429] #37 서열번호 46(염기 서열) 서열번호 48(염기 서열)  
 [0430] 서열번호 47(아미노산 서열) 서열번호 49(아미노산 서열)

[0431] [불변 영역의 아이소타입(isotype) 확인]

[0432] 하이브리도마 배양 상층액에서, 제조된 단일 클론 항체의 가변 영역의 아이소타입은 시판된 mouse monoclonal antibody isotyping kit(Catalog number: MMT1, Serotec Product 제조)를 이용하여 확인하였다. 마우스 항-인간 ILT7 항체 #11의 중쇄 불변 영역은 Ig γ 3였고, 경쇄 불변 영역은 Ig κ였다. 이 후 마우스 항-인간 ILT7 항체 #17 및 마우스 항-인간 ILT7 항체 #37의 각 중쇄 불변 영역은 Ig γ 2a였고, 경쇄 불변 영역은 Ig κ였다.

[0433] 실시예 7

[0434] 키메라 항체 생산

[0435] A. 인간 IgG 불변 영역을 암호화하는 cDNA의 클로닝

[0436] 인간 IPC의 cDNA 라이브러리로부터 인간 IgG1 중쇄 불변 영역 및 인간 Ig kappa 경쇄 불변 영역을 선택하였다. 이후 선택된 영역은 시판된 키트인 "zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit"(Catalog number : 1325137, Invitrogen사 제조)를 이용하여 제조사의 지침대로 pCR4 Blunt-TOPO 벡터에 클로닝하였다. 대장균 형질전환체를 제조하기 위해 대장균 숙주세포에 도입하였다. 상기 언급된 플라스미드는 형질전환체로부터 수득되었으며, 플라스미드 아네 포함된 cDNA 염기 서열은 자동 DNA 서열결정기인 "PCR-based ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer"(Applied Biosystems 제조)를 이용하여 확인하였다.

[0437] B. 가변 영역과 불변 영역의 연결 및 크로닝

[0438] A-5)에서 수득된 "#11 및 #17의 중쇄 가변 영역을 암호화하는 cDNA의 플라스미드"는 제한효소 NotI 및 XbaI로 소화한 후, 1.5% 저용점 아가로스 젤 방법으로 정제되었다. 결과 생성물은 하기 조성의 TE 버퍼로 용해하여 100 pmol/μl가 되도록 하여 중쇄 가변 영역을 암호화나느 cDNA 단편을 준비하였다:

[0439] TE 버퍼:

[0440] 10 mM Tris-HCl

[0441] 1 mM EDTA

[0442] pH 7.5 내지 8.0

[0443] 이 후, 상기 B에서 수득된 "중쇄 불변 영역을 암호화하는 cDNA의 플라스미드"은 상기와 동일한 방법으로 처리하여 100 pmol/μl 용액을 준비하였다 그 후, 두 용액을 혼합하고, 처음에는 70°C에서 10분간, 두번째는 37°C에서 5분간 유지하여 양자의 오버랩 영역을 혼성화하였다. 이 후 PCR 방법에 의해 중복된 cDNA 및 수득된 cDNA는 제한효소 NotI 및 XbaI로 소화하여, 1.5% 저용점 아가로스 방법으로 정제하였다.

[0444] C-2) 키메라 ILT7 항체의 경쇄를 암호화하는 cDNA 제조

[0445] 상기 A에서 수득된 경쇄 불변 영역을 암호화하는 cDNA 및 실시예 6의 A-5에서 수득된 경쇄 가변 영역을 암호화하는 cDNA이 각각 이용하였다. 키메라 ILT7 항체의 경쇄를 암호화하는 cDNA는 이들의 cDNA를 이용하여 C-1)과 동일한 방법으로 수득되었다.

[0446] C-3) 클로닝

[0447] C-1)에서 수득된 cDNA는 클로닝 자리로 NotI 및 XbaI을 이용하여 플라스미드 벡터인 pcDNA3.1-zeocin(Invitrogen사 제조)로 클로닝하여 키메라 ILT7 중쇄 발현 벡터를 제조하였다. C-2)에서 수득된 cDNA는 클로닝 자리로 XotI 및 XbaI을 이용하여 플라스미드 벡터 pcDNA3.1-hygromycin(Invitrogen사 제조)에 클로닝하

여 키메라 ILT7 경쇄 발현 벡터를 제조하였다. 각 벡터의 명칭은 표 6에 나타냈다.

### 표 6

#### 플라스미드 벡터의 명칭

	발현을 위한 키메라 ILT7 항체 중쇄	발현을 위한 키메라 ILT7 항체 경쇄
#11	pcDNA-#11VH	pcDNA-#11VL
#17	pcDNA-#17VH	pcDNA-#17VL

[0449] D. 키메라 ILT7 항체의 발현

[0450] D-1) 일시적 형질변환

[0451] 상기 C-3)에서 수득된 키메라 ILT7 항체 중쇄 발현 벡터 1  $\mu$ g 및 키메라 ILT7 항체 경쇄 발현 벡터 1  $\mu$ g를 effection transfection kit(Catalog number: 301427, Qiagen 제조)를 이용하여 293T 세포에 공동-형질도입하였다. 그 후, 결과 생성물은 37°C에서 하기의 조성을 가지는 2% 저농도 IgG FBS-첨가 DMEM 배양 배지를 이용하여 배양하였다.

[0452] 2% 저농도 IgG GBS-첨가 DMEM 배양 배지:

[0453] DMEM 배양 배지(Catalog number : D5796, Sigma 제조)

[0454] 2% 저농도 IgG FBS(Catalog number : SH30151.03, HyClone 제조)

[0455] 2 mM L-글루타민

[0456] 100 U/ml 페니실린

[0457] 100  $\mu$ l/ml 스트렙토마이신

[0458] pH 7.2 내지 pH 7.4

[0459] 상기 백터의 도입 이후에 결과 배지로 96시간 동안 배양되었고, 배양 상층액을 수집하였다. 이후 세포 분획은 원심분리 방법으로 제거되어 정제되지 않은(crude) 항체 용액을 만들었다.

[0460]

[0461] D-2) 항상성 형질전환

[0462] 상기 C-3)에서 수득된 키메라 ILT7 항체 중쇄 발현 벡터 1  $\mu$ g 및 키메라 ILT7 항체 경쇄 발현 벡터 1  $\mu$ g를 effection transfection kit(Catalog number: 301427, Qiagen 제조)를 이용하여 YB 2/0 세포(랫트 골수종에서 유래, ATCT#CRL-1622)에 공동-형질도입하였다. 이용된 플라스미드 벡터 중에서 중쇄 발현을 위한 벡터는 제오신(Zeocin) 내성을, 경쇄 발현을 위한 벡터는 하이그로마이신(hygromycin) 내성을 마커고 하고 있다. 그러므로 두 벡터가 도입된 벡터는 제오신 및 하이그로마이신이 동시에 첨가된 배양 배지에서 생장할 수 있다. 그러므로 제오신 및 하이그로마이신이 RPMI 배양 배지에서 세포를 배양하여 내성 균주를 선별하였다.

[0463] 제오신-하이그로마이신-첨가 RPMI 배양 배지:

[0464] RPMI1640 배양 배지(Catalog number : R8758, Sigma 제조)

[0465] 10% FBS

[0466] 0.01 M HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid)

[0467] 1 mM 소디움 피루베이트

[0468] 2 mM L-글루타민

[0469] 100 U/ml 페니실린

[0470] 100  $\mu$ g/ml 스트렙토마이신

- [0471] 55  $\mu\text{M}$  2-미캡토에탄올
- [0472] 0.5 mg/ml 제오신(Zeocin)
- [0473] 0.5 mg/ml 하이그로마이신(hygromycin)
- [0474] pH 7.2 내지 pH 7.4
- [0475] 3일 후에 배양 상등액 내의 항체 생산량은 ELISA 방법을 통해 검출하였다. 높은 발현 수위를 보이고 세포가 충분히 증가되는 ILT-키메라 항체 생산 세포가 선별되었다. 그에 더하여, 선별된 세포주의 단일 클로닝은 세포 분별기 방법을 통하여 수행되었으며, 하기 세포주들이 수득되었다.
- [0476] #11 ILT7 키메라-항체-생산 세포주 : #11-5 세포주 및 #11-16 세포주
- [0477] #17 키메라-항체-생산 세포주 : #17-24 세포주
- [0478] 상기 세포주(#11-15 세포주, #11-16 세포주 및 #17-24 세포주)는 각각 하기의 조성을 가지는 5% FBS 첨가 RPMI 배양 배지에서 배양하였다. 배양 온도 및 시간은 37°C에서 96시간이다.
- [0479] 5% FBS 첨가 배양 배지:
- [0480] RPMI1640 배양배지(Catalog number : R8758S, Sigma 사 제조)
- [0481] 5% FBS
- [0482] 0.01 M HEPES
- [0483] 1 mM 소디움 피루베이트
- [0484] 2 mM L-글루타민
- [0485] 100 U/ml 페니실린
- [0486] 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  스트렙토마이신
- [0487] 55  $\mu\text{M}$  2-미캡토에탄올
- [0488] pH 7.2 내지 pH 7.4
- [0489] 배양 상등액을 수득하고, 원심 분리를 수행하여 세포 분획을 제거하여 정제되지 않은 항체 용액을 만들었다.

#### E. 항체의 정제

- [0491] D-1 및 D-2에서 수득된 각각의 정제되지 않은 항체 용액은 단백질 A 친화도 컬럼(rProtein A Spharose FF, Catalog number:17-1279-01, Amersham Pharmacia 제조)을 정제하였다. 정제 조건은 하기와 같다. 친화도 정제는 흡착 버퍼로 하기의 조성을 가지는 PBS(-) 버퍼를, 용출 버퍼로 0.1 M 소디움 시트레이트(sodium citrate)(pH 3) 버퍼를 이용하여 제조사의 지시대로 수행하였다. 1 M Tris-HCl(pH 8.0)은 용출된 분획을 약 pH 7.2로 맞추기 위하여 가하였다. OD 450 내지 620 nm에서 측정되었고, 양성 반응을 보이는 웨이 선별되었다. 정제된 항체의 농도를 참조하기 위하여 280 nm에서의 흡광도가 결정되었고, 1.38 OD/ $\text{mg}/\text{ml}$ 를 기준으로 계산되었다. ILT7 항체들 사이의 연관관계, 가변 영역 유전자가 유도된 하이브리도마 및 숙주 세포는 표 7에서 정리하였다.
- [0492] PBS(-) buffer:
- [0493] 0.2 g/l 모노포타슘 디하이드로젠 포스페이트(monopotassium dihydrogen phosphate)
- [0494] 0.2 g/l 포타슘 클로라이드(Potassium chloride)
- [0495] 8 g/l 소디움 클로라이드
- [0496] 1.15 g/l 디소디움 모도하이드로젠 포스페이트 언하이드로스(Disodium monohydrogen phosphate anhydrous)

豆 7

### 제조된 키메라 항체

제조된 키메라 항체의 명칭	이용된 하이브리도마	형질전환 형식	도입된 세포
#11 ILT7 키메라 항체	#11	일시적 방법	293T
#17 ILT7 키메라 항체	#17		
#11-5 ILT7 키메라 항체	#11	항상성	YB 2/0
#11-16 ILT7 키메라 항체	#11		
#17-24 ILT7 키메라 항체	#17		

생산된 키메라 항체의 중쇄 및 경쇄의 cDNA 염기 서열 및 아미노산 서열은 각각 하기와 같다. 각각의 아미노산 서열에 있어서, N 말단부터 -1까지의 아미노산 서열은 신호 서열이고, 1부터 C 말단까지의 아미노산 서열은 성숙 단백질이다. 즉 키메라 항체를 구성하고 있는 중쇄 및 경쇄 서열은 하기의 각 아미노산 서열의 1부터 C 말단의 아미노산 서열로 구성된다.

## 중쇄 경쇄

#11 서열번호 50(엽기 서열) 서열번호 52(엽기 서열)

서열번호 51(아미노산 서열) 서열번호 53(아미노산 서열)

#17 서열번호 54(염기 서열) 서열번호 56(염기 서열)

서열번호 53(아미노산 서열)

서열번호 53(아미노산 서열) 서열번호 57(아미노산 서열)

### 산업상 이용가능성

본 발명은 특이적으로 인간 ILT7을 인식하는 항체를 제공하기 위한 면역원 및 상기 면역원을 이용한 항-ILT7 항체 제조 방법을 제공한다. 본 발명의 인간 ILT7을 특이적으로 인지하는 항체는 ILT 패밀리 존재 하에 특이적으로 ILT7을 인지한다. 그러므로 본 발명의 항체는 인간 ILT7의 겹출 및 분리에 이용될 수 있다. 예를 들어, ILT7의 위치는 본 발명의 항체를 이용하여 분석할 수 있다. ILT7은 IPC 또는 수지상 세포의 분화 및 기능과 가깝게 연관되어 있다고 사료되고 있다. 그러므로 ILT7에 높은 특이성을 가지는 항체는 IPC 또는 수지상 세포의 기능 분석에 유용하다. IPC 유사(BDCA-2를 발현하는 특징을 가짐) 암 세포가 공지되어 있다(Chaper ot L et al., Eur H. Immunol. 34; 418-426, 2004, Maeda T et al., Int. H. Hematol. 81; 148-154, 2005). 상기 세포에서 ILT7의 발현의 확인은 암의 진단 및 치료제로서 이용될 수 있다.

예를 들어 자가면역의 겨우, IPC에 의해 생산되는 IFN $\alpha$ 과 건선과 같은 피부 질환과의 발병 사이에 깊은 연관관계가 있다고 지적되고 있다(Nestle FO et al., J. Exp. Med. 202, 135-143, 2005). 그러므로 건선 환자의 피부 조직에서 IPC를 분류하므로써 건선의 중증도를 검증할 수 있다.

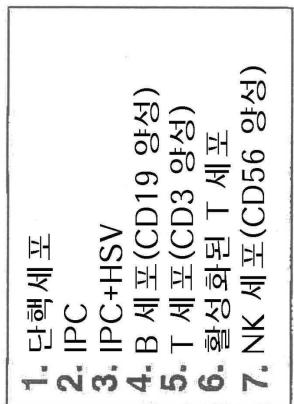
HIV 감염 환자 중 AIDS의 발증의 경우 IPC의 수와 상관이 있다고 공지되어 있다. 즉, 발병하지 않은 환자에 있어 많은 수의 IPC가 관찰되고 발증 시에는 IPC의 감소가 관찰되었다(Soumells V. et al., Blood 98; 906-912, 2001). 그러므로 HIV와 같은 바이러스 감염의 예후 및 예측에 효과적이다.

예를 들어, ILT7은 인간 IPC에 특이적으로 발현되는 분자이다. 그러므로 본 발명의 항-ILT7 항체는 IPC의 검출, 분류 또는 분리에 이용될 수 있다. IPC는 대부분의 타입 1 인터페론을 생산하다. 그러므로 검출, 분류 또는 분리는 타입 1 인터페론이 관여하는 질환의 진단 또는 연구에 있어 중요한 과제이다. 상기 질환에 있어서, 다양한 자가면역 질환 및 인터페론이 병리학적 조건의 형성에 연관된 감염 등을 나타낼 수 있다.

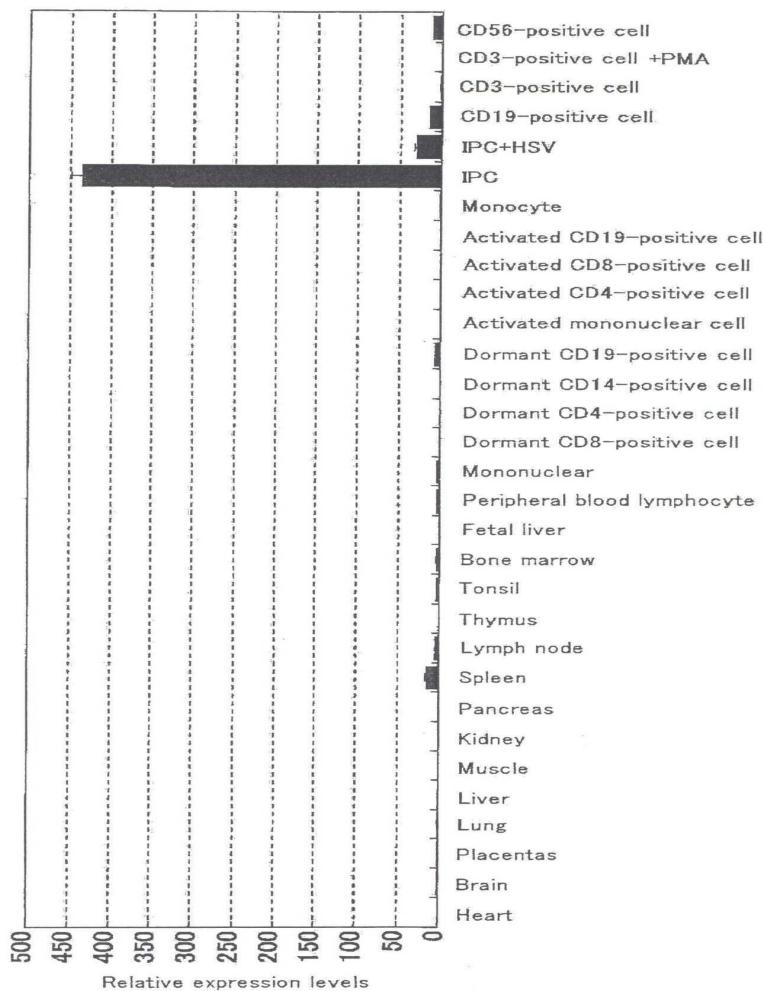
그에 더하여 본 발명의 항-ILT7 항체는 IPC 활성의 억제 효과를 가진다. 그러므로 IPC의 활성을 본 발명의 항-ILT7 항체를 이용하여 억제될 수 있다. 구체적으로 타입 1 인터페론과 연관된 질환은 IPC의 활성을 억제하므로 치료될 수 있다. 구체적으로 본 발명의 항-ILT7 항체는 다양한 자가면역 질환 및 병리학적 조건의 형성에 인터페론이 연관된 감염 등에 유용하다. 특히, 항-ILT7 항체가 높은 특이성을 가지므로 IPC를 효율적으로 제거할 수 있다.

도면

도면 1a



## 도면1b



## 도면2

## (a) 신호서열

MTLITSLFFGLSLCPRTRVQAENLPKPILWAEPGPVITWHINPVTIWCGQTLLEAQGYRL  
 DKEGNMSMSRHLIKTLESENKVKLSIPSMWWEHAGRYHCYQQSPAGWSEPSDPLELWVTA  
 SRPTLSALPSPVITSGVNVLRCASRLGLGRFTLIEEGDHRLSWTLNSHQNHHGKFQALF  
 PMGPLTFSNRGTFRCYGYNENTPYVWSEPSDPLQLLVSGVSRKPSLLTLQGPWTPGENL  
 TLQCGSDVGYIRTYKEADGLPQRPGRPQAGLSQANFTLSPVRSYGGQVRCYGAHN  
 VSEWSAPSDPLDILIAQQISDRPLSLSVQPGPTVTSGEKVTLCLCQSNDPMFTFLLTKEGA  
 AHPPPLRLRSMYGAHKYQAEEFPMSPTVSAHAGTYRCYGSRSSNPYLLSHPSEPLELWVSGA  
 TETLNPAQKKSDFSKTAPHLQDYTVENLIRMGVAGLVLFLGLLFEAQHSQRSPRCSQE  
 ANSRKDNPFRVVEPWEQI (SEQ ID NO:2) Transmembrane region (TM)

(b)

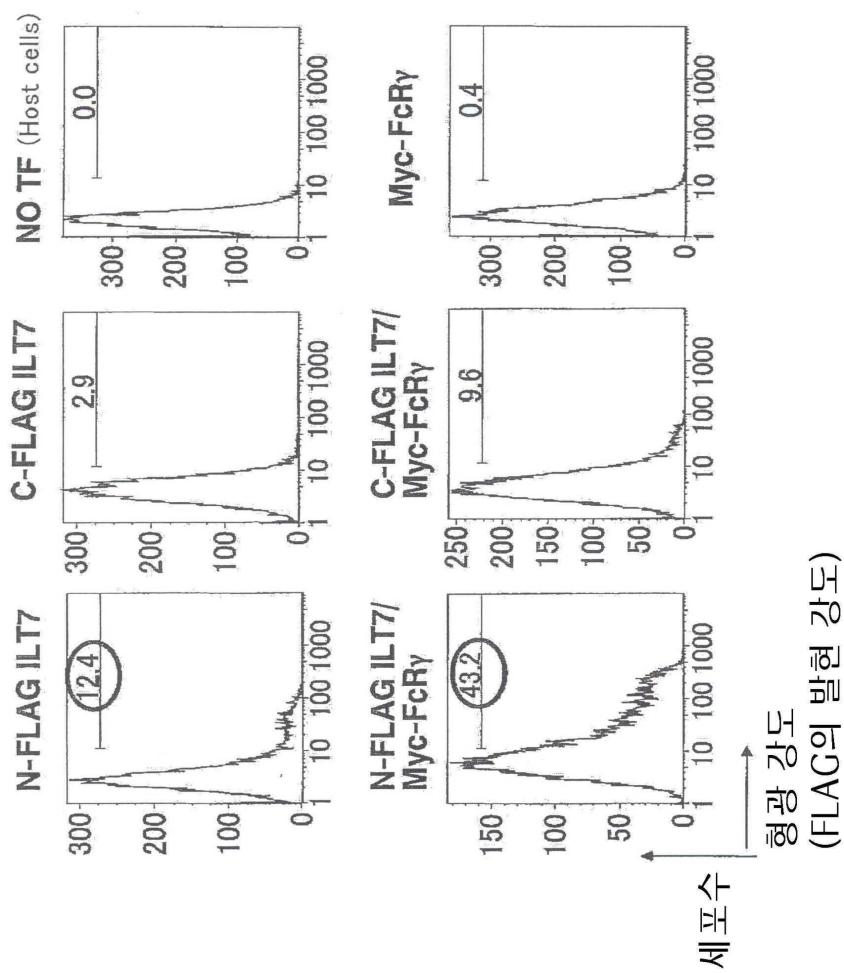
## N-FLAG ILT7(57kDa)

신호	FLAG	TM
서열	태그	

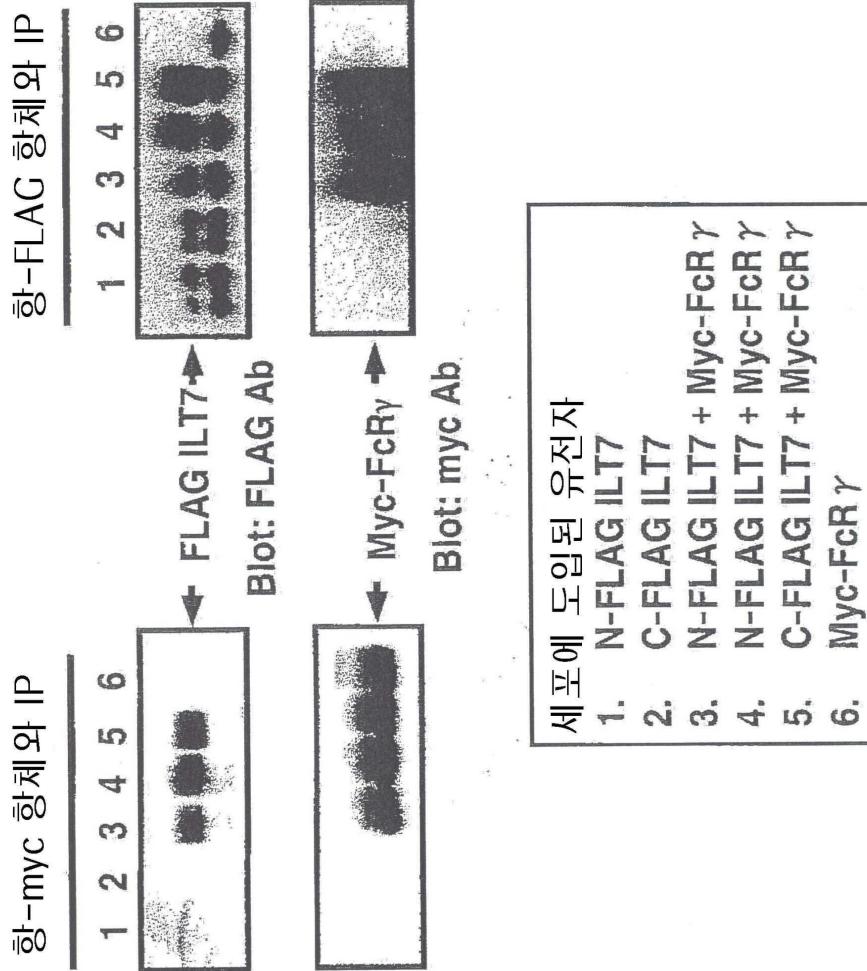
## C-FLAG ILT7(57kDa)

신호	FLAG	TM
서열	태그	

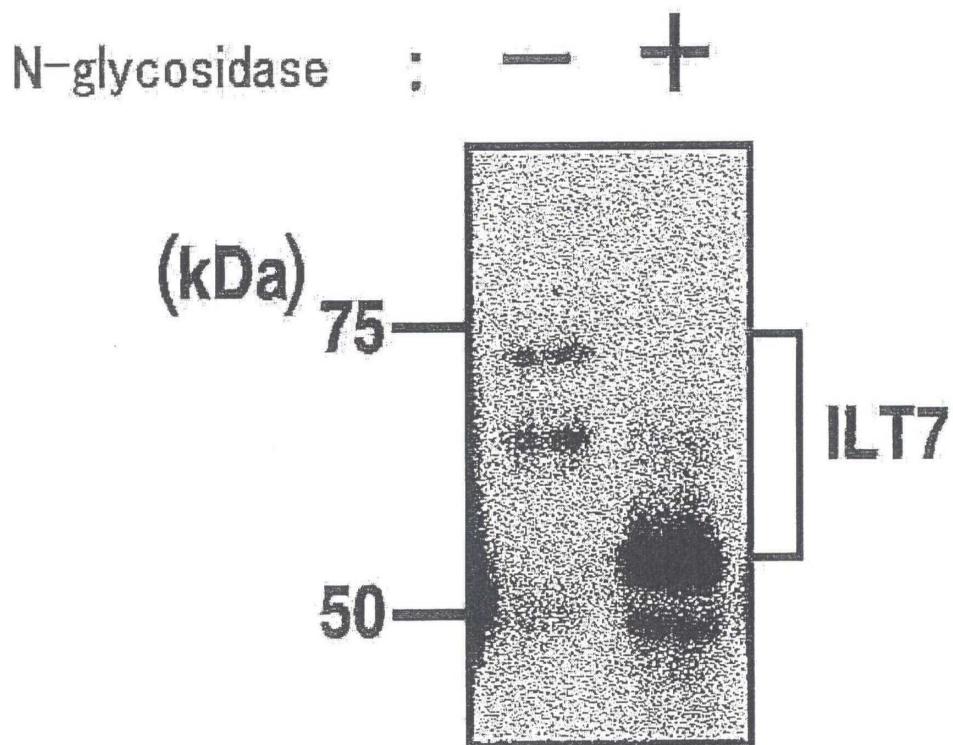
도면3



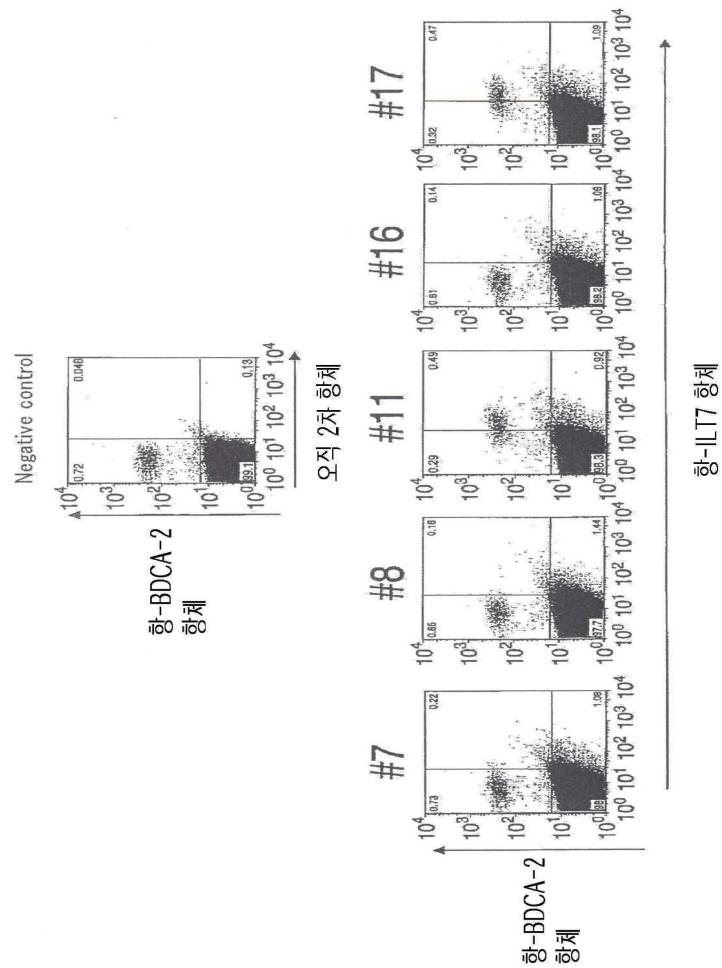
## 도면4



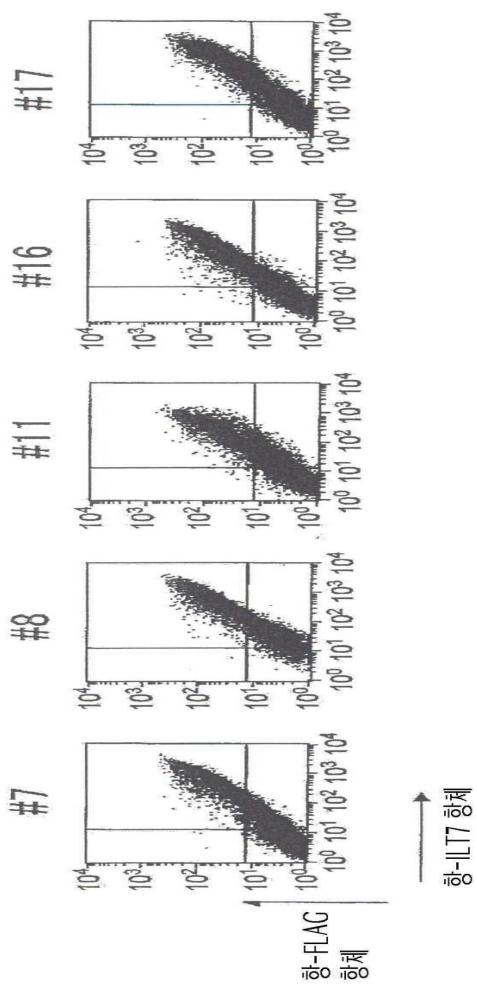
도면5



도면6a

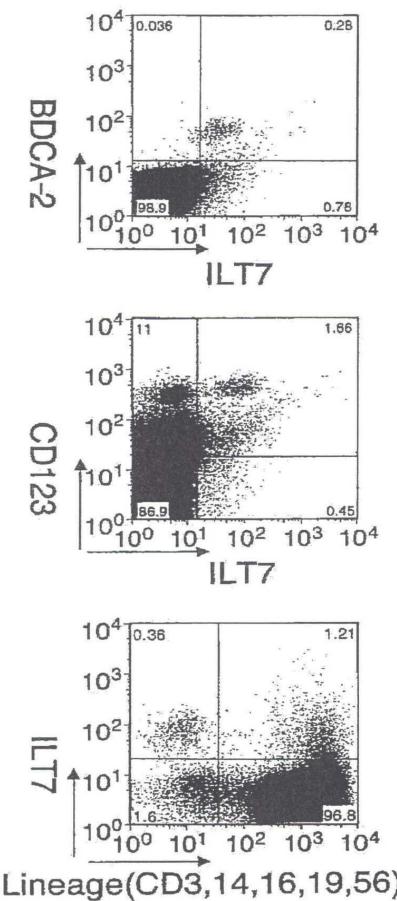


도면6b

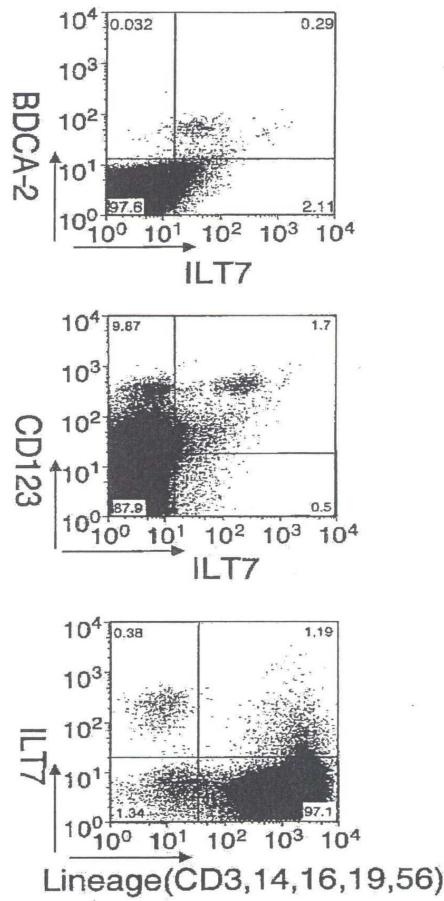


도면7

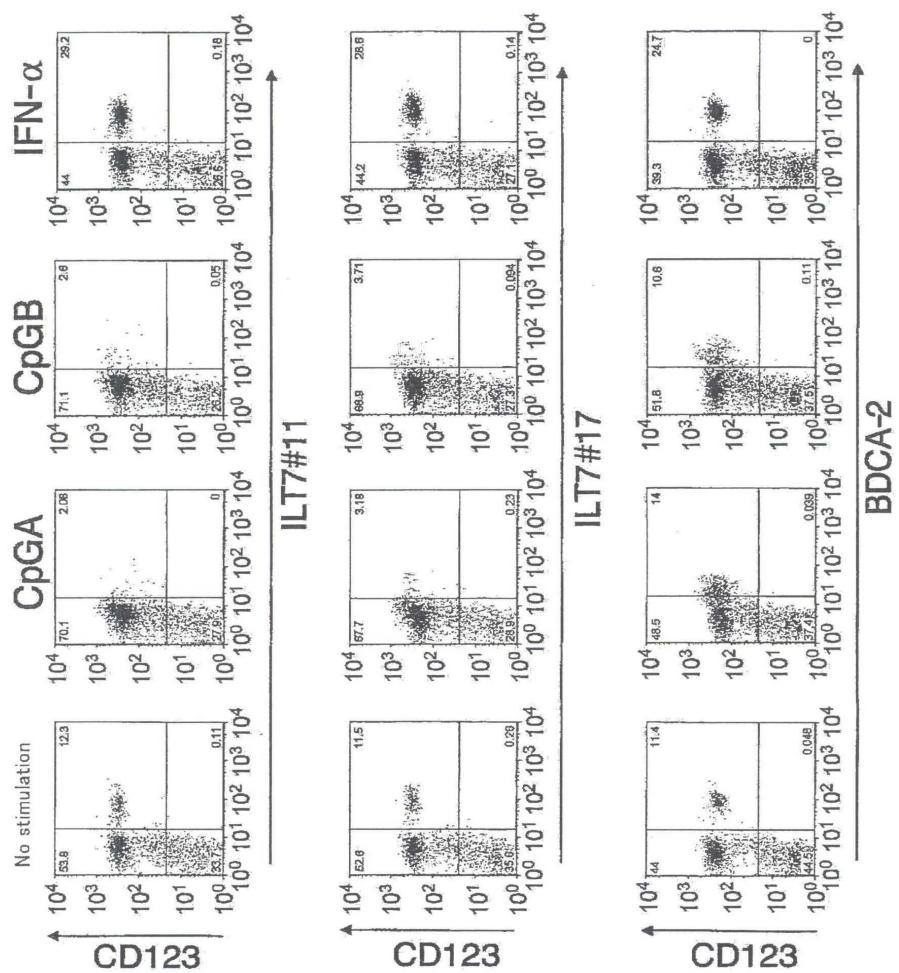
#11



#17



도면8

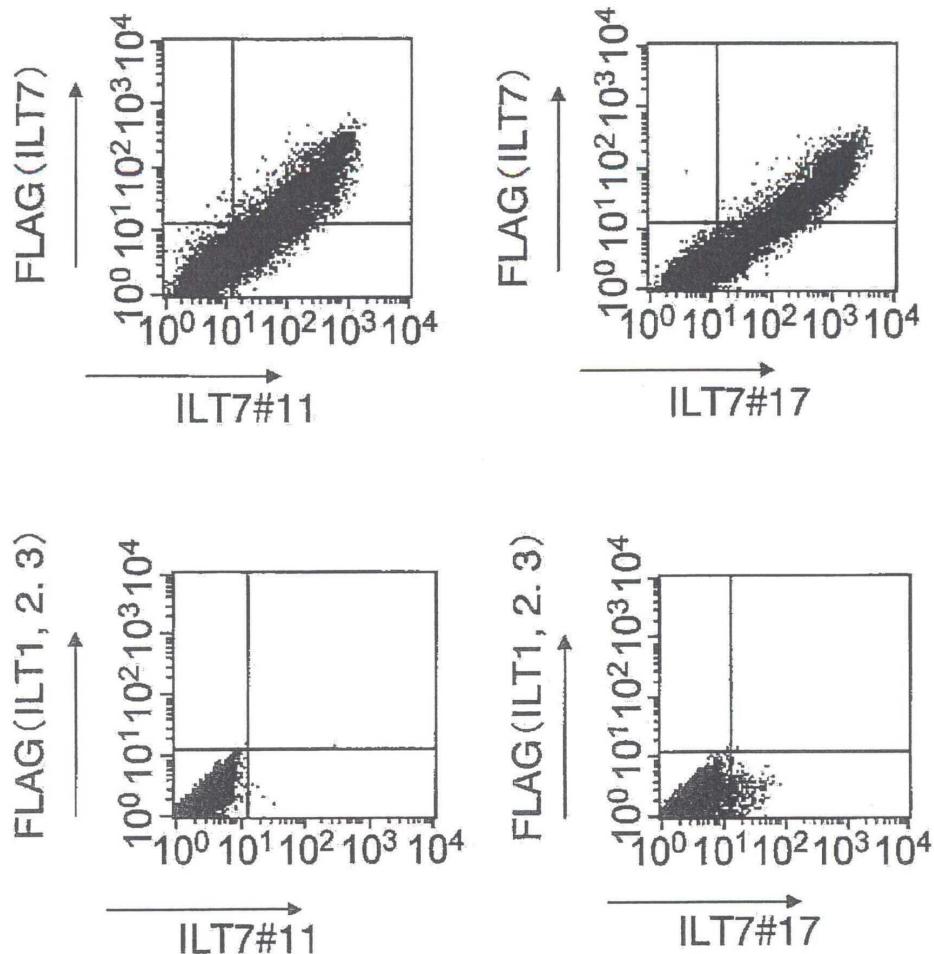


### 도면9a

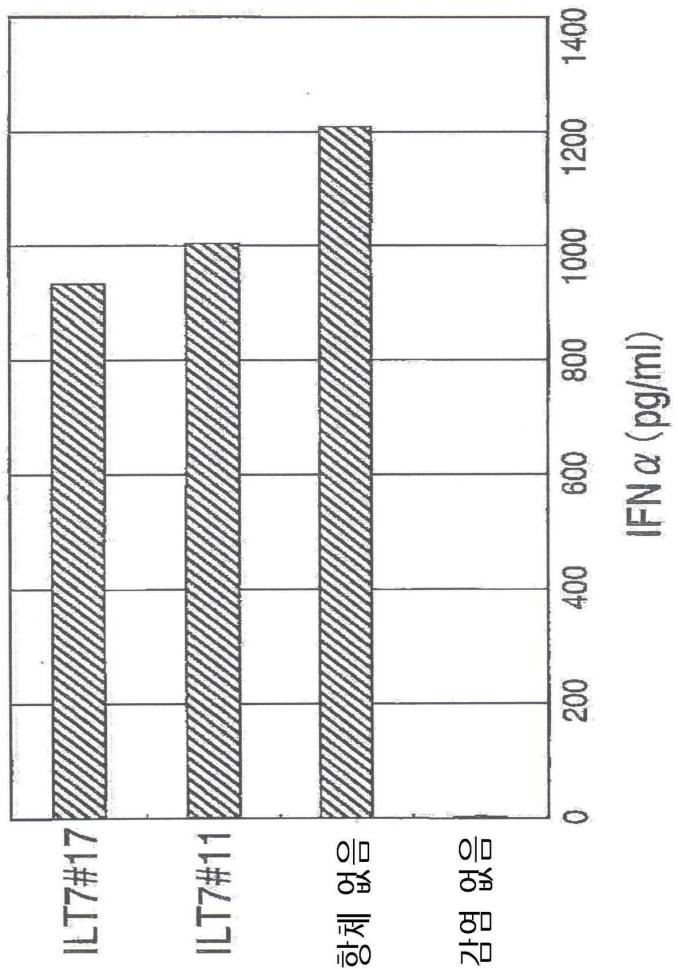
### 도면9b

### 도면9c

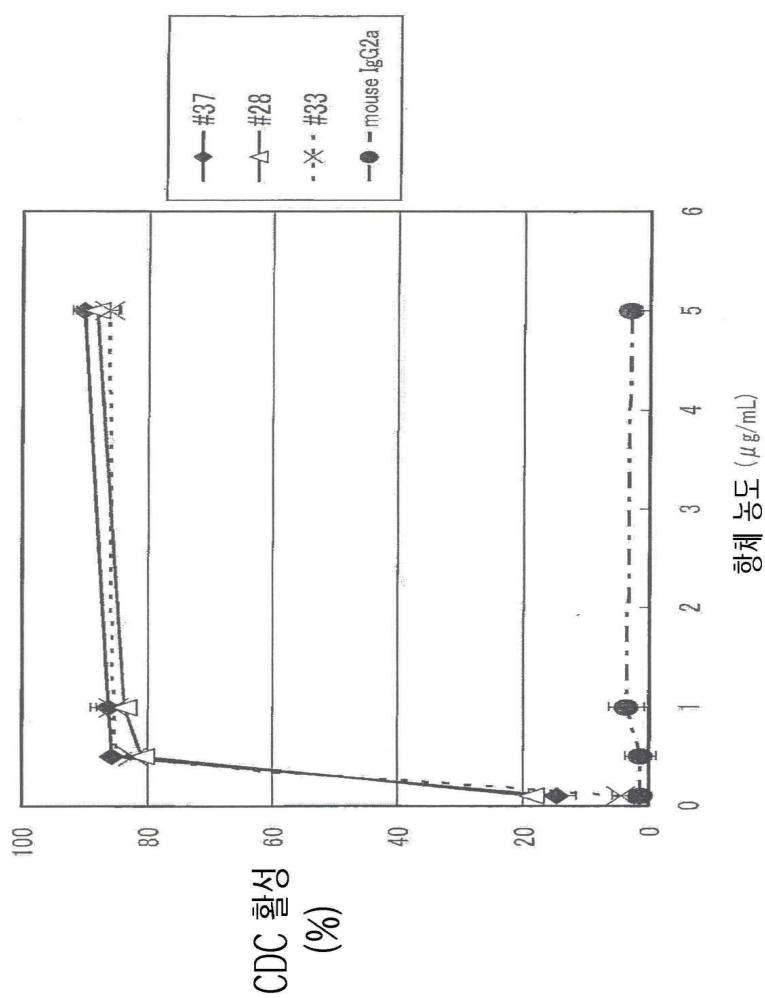
도면10



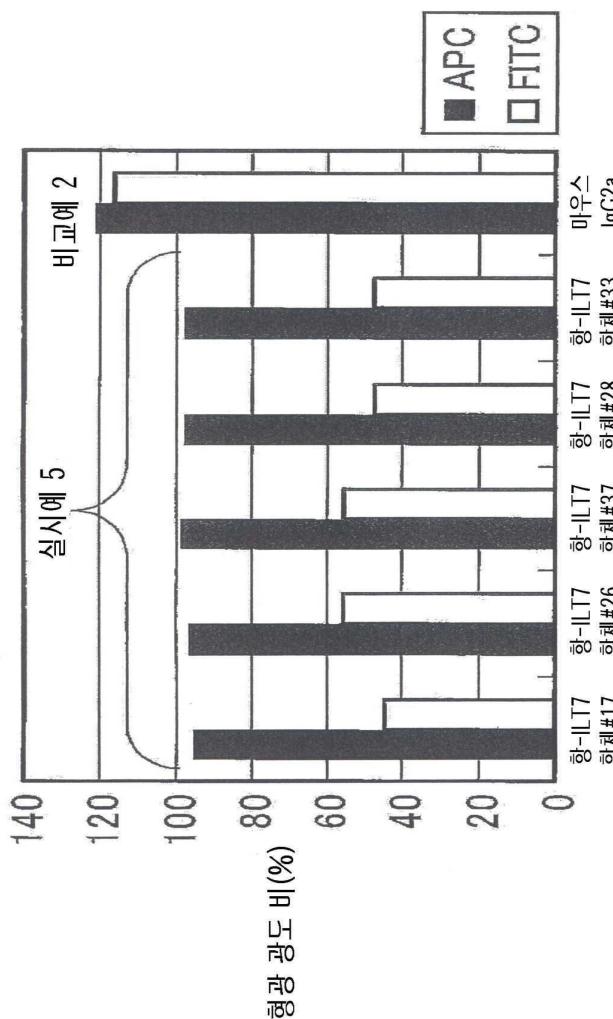
도면11



도면12



## 도면13



1자 항체의 중류

## 서열목록

- <110> GINKGO BIOMEDICAL RESEARCH INSTITUTE CO., LTD.  
<120> Anti-ILT7 antibody  
<130> 15fpi-02-011  
<150> JP 2005-366465  
<151> 2005-12-20  
<150> PCT/JP2006/325391  
<151> 2006-12-20  
<150> KR 10-2008-7017667  
<151> 2008-07-18  
<160> 74  
<170> PatentIn version 3.3  
<210> 1  
<211> 1577

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (24)..(1520)

&lt;220&gt;&lt;221&gt; sig\_peptide

&lt;222&gt; (24)..(71)

&lt;220&gt;&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (72)..(1520)

&lt;400&gt; 1

cagggccagg aggaggagat gcc atg acc ctc att ctc aca agc ctg 47

Met Thr Leu Ile Leu Thr Ser Leu

1 5

ctc ttc ttt ggg ctg agc ctg ggc ccc agg acc cgg gtg cag gca gaa 95

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

10 15 20

aac cta ccc aaa ccc atc ctg tgg gcc gag cca ggt ccc gtg atc acc 143

Asn Leu Pro Lys Pro Ile Leu Trp Ala Glu Pro Gly Pro Val Ile Thr

25 30 35 40

tgg cat aac ccc gtg acc atc tgg tgt cag ggc acc ctg gag gcc cag 191

Trp His Asn Pro Val Thr Ile Trp Cys Gln Gly Thr Leu Glu Ala Gln

45 50 55

ggg tac cgt ctg gat aaa gag gga aac tca atg tcg agg cac ata tta 239

Gly Tyr Arg Leu Asp Lys Glu Gly Asn Ser Met Ser Arg His Ile Leu

60 65 70

aaa aca ctg gag tct gaa aac aag gtc aaa ctc tcc atc cca tcc atg 287

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

75 80 85

atg tgg gaa cat gca ggg cga tat cac tgt tac tat cag agc cct gca 335

Met Trp Glu His Ala Gly Arg Tyr His Cys Tyr Tyr Gln Ser Pro Ala

90 95 100

ggc tgg tca gag ccc agc gac ccc ctg gag ctg gtg gtg aca gcc tac 383

Gly Trp Ser Glu Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Val Val Thr Ala Tyr  
 105 110 115 120  
 agc aga ccc acc ctg tcc gca ctg cca agc cct gtg gtg acc tca gga 431  
 Ser Arg Pro Thr Leu Ser Ala Leu Pro Ser Pro Val Val Thr Ser Gly  
 125 130 135  
 gtg aac gtg acc ctc cggtgt gcc tca cggtgt gga ctg ggc agg ttc 479  
 Val Asn Val Thr Leu Arg Cys Ala Ser Arg Leu Gly Leu Gly Arg Phe  
 140 145 150  
  
 act ctg att gag gaa gga gac cac agg ctc tcc tgg acc ctg aac tca 527  
 Thr Leu Ile Glu Glu Gly Asp His Arg Leu Ser Trp Thr Leu Asn Ser  
 155 160 165  
 cac caa cac aac cat gga aag ttc cag gcc ctg ttc ccc atg ggc ccc 575  
 His Gln His Asn His Gly Lys Phe Gln Ala Leu Phe Pro Met Gly Pro  
 170 175 180  
 ctg acc ttc agc aac agg ggt aca ttc aga tgc tac ggc tat gaa aac 623  
  
 Leu Thr Phe Ser Asn Arg Gly Thr Phe Arg Cys Tyr Gln Tyr Glu Asn  
 185 190 195 200  
 aac acc cca tac gtg tgg tcg gaa ccc agt gac ccc ctg cag cta ctg 671  
 Asn Thr Pro Tyr Val Trp Ser Glu Pro Ser Asp Pro Leu Gln Leu Leu  
 205 210 215  
 gtg tca ggc gtg tct agg aag ccc tcc ctc ctg acc ctg cag ggc cct 719  
 Val Ser Gly Val Ser Arg Lys Pro Ser Leu Leu Thr Leu Gln Gly Pro  
 220 225 230  
  
 gtc gtg acc ccc gga gag aat ctg acc ctc cag tgt ggc tct gat gtc 767  
 Val Val Thr Pro Gly Glu Asn Leu Thr Leu Gln Cys Gly Ser Asp Val  
 235 240 245  
 ggc tac atc aga tac act ctg tac aag gag ggg gcc gat ggc ctc ccc 815  
 Gly Tyr Ile Arg Tyr Thr Leu Tyr Lys Glu Gly Ala Asp Gly Leu Pro  
 250 255 260  
 cag cgc cct ggc cgg cag ccc cag gct ggg ctc tcc cag gcc aac ttc 863  
  
 Gln Arg Pro Gly Arg Gln Pro Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe

265	270	275	280	
acc ctg agc cct gtg agc cgc tcc tac ggg ggc cag tac aga tgc tac				911
Thr Leu Ser Pro Val Ser Arg Ser Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr				
285	290	295		
ggc gca cac aac gtc tcc tcc gag tgg tcg gcc ccc agt gac ccc ctg				959
Gly Ala His Asn Val Ser Ser Glu Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu				
300	305	310		
gac atc ctg atc gca gga cag atc tct gac aga ccc tcc ctc tca gtg				1007
Asp Ile Leu Ile Ala Gly Gln Ile Ser Asp Arg Pro Ser Leu Ser Val				
315	320	325		
cag ccg ggc ccc acg gtg acc tca gga gag aag gtg acc ctg ctg tgt				1055
Gln Pro Gly Pro Thr Val Thr Ser Gly Glu Lys Val Thr Leu Leu Cys				
330	335	340		
cag tca tgg gac ccg atg ttc act ttc ctt ctg acc aag gag ggg gca				1103
Gln Ser Trp Asp Pro Met Phe Thr Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala				
345	350	355	360	
gcc cat ccc ccg ttg cgt ctg aga tca atg tac gga gct cat aag tac				1151
Ala His Pro Pro Leu Arg Leu Arg Ser Met Tyr Gly Ala His Lys Tyr				
365	370	375		
cag gct gaa ttc ccc atg agt cct gtg acc tca gcc cac gcg ggg acc				1199
Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr				
380	385	390		
tac agg tgc tac ggc tca cgc agc tcc aac ccc tac ctg ctg tct cac				1247
Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Arg Ser Ser Asn Pro Tyr Leu Leu Ser His				
395	400	405		
ccc agt gag ccc ctg gag ctc gtg gtc tca gga gca act gag acc ctc				1295
Pro Ser Glu Pro Leu Glu Leu Val Val Ser Gly Ala Thr Glu Thr Leu				
410	415	420		
aat cca gca caa aag aag tca gat tcc aag act gcc cca cac ctc cag				1343
Asn Pro Ala Gln Lys Lys Ser Asp Ser Lys Thr Ala Pro His Leu Gln				
425	430	435	440	

gat tac aca gtg gag aat ctc atc cgc atg ggt gtg gct ggc ttg gtc	1391	
Asp Tyr Thr Val Glu Asn Leu Ile Arg Met Gly Val Ala Gly Leu Val		
445	450	455
ctg ctg ttc ctc ggg att ctg tta ttt gag gct cag cac agc cag aga	1439	
Leu Leu Phe Leu Gly Ile Leu Leu Phe Glu Ala Gln His Ser Gln Arg		
460	465	470
agc ccc cca agg tgc agc cag gag gca aac agc aga aag gac aat gca	1487	
Ser Pro Pro Arg Cys Ser Gln Glu Ala Asn Ser Arg Lys Asp Asn Ala		
475	480	485
ccc ttc aga gtg gtg gag cct tgg gaa cag atc tcatgtatctg aggaggttct	1540	
Pro Phe Arg Val Val Glu Pro Trp Glu Gln Ile		
490	495	
ggaagactgg ggcagcagtt ggggaagtgt ctgctga	1577	
<210> 3		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> an Artificial Sequenceley synthesized primer sequence		
<400> 3		
ctccaacccc tacctgctgt c	21	
<210> 4		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> an Artificial Sequenceley synthesized primer sequence		
<400> 4		
ttcccaaggc tccaccactc t	21	
<210> 5		
<211> 23		
<212> DNA		
<213>		
> Artificial Sequence		
<220><223> an Artificial Sequenceley synthesized primer sequence		

<400>	5	
cctcaatcca gcacaaaaga agt		23
<210>	6	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> an Artificial Sequenceley synthesized primer sequence		
<400>	6	
cgatgagat tctccactgt gtaa		24
<210>	7	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> an Artificial Sequenceley synthesized primer sequence		
<400>	7	
ccacccatgg caaattcc		18
<210>	8	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> an Artificial Sequenceley synthesized primer sequence		
<400>	8	
tgggatttcc attgatgaca ag		22
<210>	9	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> an Artificial Sequenceley synthesized primer sequence		
<400>	9	
caggccagg aggaggagat g		21
<210>	10	
<211>	21	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized primer sequence

<400> 10

tcagcagaca ctccccaaac t 21

<210> 11

<211> 105

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized primer sequence

<400> 11

ccgctcgaga tgaccctcat tctcacaaggc ctgctttct ttgggctgag cctgggcgat 60

tacaaggatg acgacgataa gcccaggacc cgggtgcagg cagaa 105

<210> 12

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized primer sequence

<400> 12

ctagactagt tcagatctgt tcccaaggct c 31

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized primer sequence

<400> 13

ccgctcgaga tgaccctcat tctcacaaggc 30

<210> 14

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> an Artificial Sequencely synthesized primer sequence

<400> 14

ctagactagt tcacttatcg tcgtcatct tgtaatcgat ctgttcccaa ggctc 55

<210> 15  
 <211> 313  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220><221> CDS  
 <222> (7)..(264)  
 <400> 15

cccaag	atg att cca gca gtg gtc ttg ctc tta ctc ctt ttg gtt gaa	48
	Met Ile Pro Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Glu	
1	5	10

caa gca gcg gcc ctg gga gag cct cag ctc tgc tat atc ctg gat gcc	96		
Gln Ala Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala			
15	20	25	30
atc ctg ttt ctg tat gga att gtc ctc acc ctc ctc tac tgt cga ctg	144		
Ile Leu Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu			
35	40	45	
aag atc caa gtg cga aag gca gct ata acc agc tat gag aaa tca gat	192		
Lys Ile Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp			
50	55	60	
ggt gtt tac acg ggc ctg agc acc agg aac cag gag act tac gag act	240		
Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr			
65	70	75	
ctg aag cat gag aaa cca cca cag	290		
Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln			
80	85		
tcttctttgg cttctgggttc ttc	313		

<210> 17  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> an Artificial Sequence  
 <400> 17

cccaagatga ttccagcagt g	21		
<210> 18			
<211> 21			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> an Artificial Sequenceley synthesized primer sequence			
<400> 18			
ggaagaacca gaagccaaag a	21		
<210> 19			
<211> 30			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> an Artificial Sequenceley synthesized primer sequence			
<400> 19			
ccgctcgaga tgattccagc agtggtcttg	30		
<210> 20			
<211> 61			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> an Artificial Sequenceley synthesized primer sequence			
<400> 20			
ctagactagt ctacagatcc tcttcagaga tgagttctg ctcctgtggt ggtttctcat	60		
g	61		
<210> 21			
<211> 23			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> an Artificial Sequenceley synthesized peptide sequence			
<400> 21			
Cys Ser Gln Glu Ala Asn Ser Arg Lys Asp Asn Ala Pro Phe Arg Val			
1	5	10	15
Val Glu Pro Trp Glu Gln Ile			
20			

<210> 22  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> an Artificial Sequenceley synthesized primer sequence  
 <400> 22  
 ccgctcgaga tgaccccat cctcacggtc c 31

<210> 23  
 <211> 55  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> an Artificial Sequencely synthesized primer sequence  
 <400> 23  
 ctagactagt tcacttatcg tcgtcatcct tgtaatccct cccggctgca tcttg 55

<210> 24  
 <211> 1425  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220><221> CDS  
 <222> (1)..(1422)  
 <400> 24  
 atg acc ccc atc ctc acg gtc ctg atc tgt ctc ggg ctg agt ctg ggc 48  
 Met Thr Pro Ile Leu Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

ccc agg acc cac gtg cag gca ggg cac ctc ccc aag ccc acc ctc tgg 96  
 Pro Arg Thr His Val Gln Ala Gly His Leu Pro Lys Pro Thr Leu Trp  
 20 25 30

gct gag cca ggc tct gtg atc atc cag gga agt cct gtg acc ctc agg 144  
 Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Ile Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Arg  
 35 40 45

tgt cag ggg agc ctt cag gct gag gag tac cat cta tat agg gaa aac 192  
 Cys Gln Gly Ser Leu Gln Ala Glu Glu Tyr His Leu Tyr Arg Glu Asn

50	55	60	
aaa tca gca tcc tgg gtt aga cg	ata caa gag cct ggg aag aat ggc		240
Lys Ser Ala Ser Trp Val Arg Arg Ile Gln Glu Pro Gly	Lys Asn Gly		
65	70	75	80
cag ttc ccc atc cca tcc atc acc tgg gaa cac gca ggg cg	tat cac		288
Gln Phe Pro Ile Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Ala Gly Arg Tyr His			
85	90	95	
100	105	110	
tgt cag tac tac agc cac aat cac tca tca gag tac agt gac ccc ctg			336
Cys Gln Tyr Tyr Ser His Asn His Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Pro Leu			
gag ctg gtg gtg aca gga gcc tac agc aaa ccc acc ctc tca gct ctg			384
Glu Leu Val Val Thr Gly Ala Tyr Ser Lys Pro Thr Leu Ser Ala Leu			
115	120	125	
ccc agc cct gtg gtg acc tta gga ggg aac gtg acc ctc cag tgt gtc			432
Pro Ser Pro Val Val Thr Leu Gly Gly Asn Val Thr Leu Gln Cys Val			
130	135	140	
tca cag gtg gca ttt gac ggc ttc att ctg tgt aag gaa gga gaa gat			480
Ser Gln Val Ala Phe Asp Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu Asp			
145	150	155	160
gaa cac cca caa cgc ctg aac tcc cat tcc cat gcc cgt ggg tgg tcc			528
Glu His Pro Gln Arg Leu Asn Ser His Ser His Ala Arg Gly Trp Ser			
165	170	175	
tgg gcc atc ttc tcc gtg ggc ccc gtg agc ccg agt cgc agg tgg tcg			576
Trp Ala Ile Phe Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Ser Arg Arg Trp Ser			
180	185	190	
tac agg tgc tat gct tat gac tcg aac tct ccc tat gtg tgg tct cta			624
Tyr Arg Cys Tyr Ala Tyr Asp Ser Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser Leu			
195	200	205	
ccc agt gat ctc ctg gag ctc ctg gtc cca ggt gtt tct aag aag cca			672
Pro Ser Asp Leu Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys Pro			
210	215	220	

tca ctc tca gtg cag cca ggt cct atg gtg gcc cct ggg gag agc ctg	720
Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Met Val Ala Pro Gly Glu Ser Leu	
225 230 235 240	
acc ctc cag tgt gtc tct gat gtc ggc tac gac aga ttt gtt ctg tat	768
Thr Leu Gln Cys Val Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu Tyr	
245 250 255	
aag gag gga gaa cgt gac ttc ctc cag cgc cct ggt tgg cag ccc cag	816
Lys Glu Gly Glu Arg Asp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Trp Gln Pro Gln	
260 265 270	
gct ggg ctc tcc cag gcc aac ttc acc ctg ggc cct gtg agc ccc tcc	864
Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Pro Ser	
275 280 285	
cac ggg ggc cag tac aga tgc tac agt gca cac aac ctc tcc tcc gag	912
His Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Ser Ala His Asn Leu Ser Ser Glu	
290 295 300	
tgg tcg gcc ccc agt gac ccc ctg gac atc ctg atc aca gga cag ttc	960
Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln Phe	
305 310 315 320	
tat gac aga ccc tct ctc tcg gtg cag ccg gtc ccc aca gta gcc cca	1008
Tyr Asp Arg Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro Val Pro Thr Val Ala Pro	
325 330 335	
gga aag aac gtg acc ctg ctg tgt cag tca cgg ggg cag ttc cac act	1056
Gly Lys Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Arg Gly Gln Phe His Thr	
340 345 350	
ttc ctt ctg acc aag gag ggg gca ggc cat ccc cca ctg cat ctg aga	1104
Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Gly His Pro Pro Leu His Leu Arg	
355 360 365	
tca gag cac caa gct cag cag aac cag gct gaa ttc cgc atg ggt cct	1152
Ser Glu His Gln Ala Gln Gln Asn Gln Ala Glu Phe Arg Met Gly Pro	
370 375 380	
gtg acc tca gcc cac gtg ggg acc tac aga tgc tac agc tca ctc agc	1200

Val Thr Ser Ala His Val Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Ser Leu Ser  
 385 390 395 400  
 tcc aac ccc tac ctg ctg tct ctc ccc agt gac ccc ctg gag ctc gtg 1248  
 Ser Asn Pro Tyr Leu Leu Ser Leu Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Val  
 405 410 415  
  
 gtc tca gca tcc cta ggc caa cac ccc cag gat tac aca gtg gag aat 1296  
 Val Ser Ala Ser Leu Gly Gln His Pro Gln Asp Tyr Thr Val Glu Asn  
 420 425 430  
 ctc atc cgc atg ggt gtg gct ggc ttg gtc ctg gtg gtc ctc ggg att 1344  
 Leu Ile Arg Met Gly Val Ala Gly Leu Val Val Val Leu Gly Ile  
 435 440 445  
 ctg cta ttt gag gct cag cac agc cag agc cta caa gat gca gcc 1392  
  
 Leu Leu Phe Glu Ala Gln His Ser Gln Arg Ser Leu Gln Asp Ala Ala  
 450 455 460  
 ggg agg gat tac aag gat gac gac gat aag tga 1425  
 Gly Arg Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys  
 465 470  
 <210> 26  
 <211> 1953  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220><221> CDS  
 <222> (1)..(1950)  
 <400> 26  
 atg acc ccc atc ctc acg gtc ctg atc tgt ctc ggg ctg agt ctg ggc 48  
  
 Met Thr Pro Ile Leu Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 ccc cgg acc cac gtg cag gca ggg cac ctc ccc aag ccc acc ctc tgg 96  
 Pro Arg Thr His Val Gln Ala Gly His Leu Pro Lys Pro Thr Leu Trp  
 20 25 30  
 gct gaa cca ggc tct gtg atc acc cag ggg agt cct gtg acc ctc agg 144  
 Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Thr Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Arg

35	40	45	
tgt cag ggg ggc cag gag acc cag gag tac cgt cta tat aga gaa aag			192
Cys Gln Gly Gly Gln Glu Thr Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys			
50	55	60	
aaa aca gca ccc tgg att aca cgg atc cca cag gag ctt gtg aag aag			240
Lys Thr Ala Pro Trp Ile Thr Arg Ile Pro Gln Glu Leu Val Lys Lys			
65	70	75	80
ggc cag ttc ccc atc cca tcc atc acc tgg gaa cat gca ggg cgg tat			288
Gly Gln Phe Pro Ile Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Ala Gly Arg Tyr			
85	90	95	
cgc tgt tac tat ggt agc gac act gca ggc cgc tca gag agc agt gac			336
Arg Cys Tyr Tyr Gly Ser Asp Thr Ala Gly Arg Ser Glu Ser Ser Asp			
100	105	110	
ccc ctg gag ctg gtg aca gga gcc tac atc aaa ccc acc ctc tca			384
Pro Leu Glu Leu Val Val Thr Gly Ala Tyr Ile Lys Pro Thr Leu Ser			
115	120	125	
gcc cag ccc agc ccc gtg gtg aac tca gga ggg aat gta acc ctc cag			432
Ala Gln Pro Ser Pro Val Val Asn Ser Gly Gly Asn Val Thr Leu Gln			
130	135	140	
tgt gac tca cag gtg gca ttt gat ggc ttc att ctg tgt aag gaa gga			480
Cys Asp Ser Gln Val Ala Phe Asp Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly			
145	150	155	160
gaa gat gaa cac cca caa tgc ctg aac tcc cag ccc cat gcc cgt ggg			528
Glu Asp Glu His Pro Gln Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly			
165	170	175	
tcg tcc cgc gcc atc ttc tcc gtg ggc ccc gtg agc ccg agt cgc agg			576
Ser Ser Arg Ala Ile Phe Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Ser Arg Arg			
180	185	190	
tgg tgg tac agg tgc tat gct tat gac tcg aac tct ccc tat gag tgg			624
Trp Trp Tyr Arg Cys Tyr Ala Tyr Asp Ser Asn Ser Pro Tyr Glu Trp			

195	200	205		
tct cta ccc agt gat ctc ctg gag ctc ctg gtc cta ggt gtt tct aag			672	
Ser Leu Pro Ser Asp Leu Leu Glu Leu Leu Val Leu Gly Val Ser Lys				
210	215	220		
aag cca tca ctc tca gtg cag cca ggt cct atc gtg gcc cct gag gag			720	
Lys Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Ile Val Ala Pro Glu Glu				
225	230	235	240	
acc ctg act ctg cag tgt ggc tct gat gct ggc tac aac aga ttt gtt			768	
Thr Leu Thr Leu Gln Cys Gly Ser Asp Ala Gly Tyr Asn Arg Phe Val				
245	250	255		
ctg tat aag gac ggg gaa cgt gac ttc ctt cag ctc gct ggc gca cag			816	
Leu Tyr Lys Asp Gly Glu Arg Asp Phe Leu Gln Leu Ala Gly Ala Gln				
260	265	270		
ccc cag gct ggg ctc tcc cag gcc aac ttc acc ctg ggc cct gtg agc			864	
Pro Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser				
275	280	285		
cgc tcc tac ggg ggc cag tac aga tgc tac ggt gca cac aac ctc tcc				912
Arg Ser Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser				
290	295	300		
tcc gag tgg tcg gcc ccc agc gac ccc ctg gac atc ctg atc gca gga			960	
Ser Glu Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Ala Gly				
305	310	315	320	
cag ttc tat gac aga gtc tcc ctc tcg gtg cag ccg ggc ccc acg gtg			1008	
Gln Phe Tyr Asp Arg Val Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val				
325	330	335		
gcc tca gga gag aac gtg acc ctg ctg tgt cag tca cag gga tgg atg			1056	
Ala Ser Gly Glu Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Gln Gly Trp Met				
340	345	350		
caa act ttc ctt ctg acc aag gag ggg gca gct gat gac cca tgg cgt			1104	
Gln Thr Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Ala Asp Asp Pro Trp Arg				

355	360	365	
cta aga tca acg tac caa tct caa aaa tac cag gct gaa ttc ccc atg			
Leu Arg Ser Thr Tyr Gln Ser Gln Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met			
370	375	380	
tgt cct gtg acc tca gcc cat gcg ggg acc tac agg tgc tac ggc tca			
Gly Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser			
385	390	395	400
cag agc tcc aaa ccc tac ctg ctg act cac ccc agt gac ccc ctg gag			
1152			
1200			
1248			
Gln Ser Ser Lys Pro Tyr Leu Leu Thr His Pro Ser Asp Pro Leu Glu			
405	410	415	
ctc gtg gtc tca gga ccg tct ggg ggc ccc agc tcc ccg aca aca ggc			
Leu Val Val Ser Gly Pro Ser Gly Gly Pro Ser Ser Pro Thr Thr Gly			
420	425	430	
ccc acc tcc aca tct ggc cct gag gac cag ccc ctc acc ccc acc ggg			
Pro Thr Ser Thr Ser Gly Pro Glu Asp Gln Pro Leu Thr Pro Thr Gly			
435	440	445	
1344			
1392			
1440			
1488			
tcg gat ccc cag agt ggt ctg gga agg cac ctg ggg gtt gtg atc ggc			
Ser Asp Pro Gln Ser Gly Leu Gly Arg His Leu Gly Val Val Ile Gly			
450	455	460	
atc ttg gtg gcc gtc atc cta ctg ctc ctc ctc ctc ctc ttc			
Ile Leu Val Ala Val Ile Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Phe			
465	470	475	480
ctc atc ctc cga cat cga cgt cag ggc aaa cac tgg aca tcg acc cag			
Leu Ile Leu Arg His Arg Arg Gln Gly Lys His Trp Thr Ser Thr Gln			
485	490	495	
aga aag gct gat ttc caa cat cct gca ggg gct gtg ggg cca gag ccc			
Arg Lys Ala Asp Phe Gln His Pro Ala Gly Ala Val Gly Pro Glu Pro			
500	505	510	
aca gac aga ggc ctg cag tgg agg tcc agc cca gct gcc gat gcc cag			
Thr Asp Arg Gly Leu Gln Trp Arg Ser Ser Pro Ala Ala Asp Ala Gln			
1536			
1584			

515 520 525

gaa gaa aac ctc tat gct gcc gtg aag cac aca cag cct gag gat ggg 1632

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

530 535 540

gtg gag atg gac act cgg agc cca cac gat gaa gac ccc cag gca gtg 1680

Val Glu Met Asp Thr Arg Ser Pro His Asp Glu Asp Pro Gln Ala Val

545 550 555 560

acg tat gcc gag gtg aaa cac tcc aga cct agg aga gaa atg gcc tct 1728

Thr Tyr Ala Glu Val Lys His Ser Arg Pro Arg Arg Glu Met Ala Ser

565 570 575

cct cct tcc cca ctg tct ggg gaa ttc ctg gac aca aag gac aga cag 1776

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

580 585 590

gcg gaa gag gac agg cag atg gac act gag gct gca tct gaa gcc 1824

Ala Glu Glu Asp Arg Gln Met Asp Thr Glu Ala Ala Ser Glu Ala

595 600 605

ccc cag gat gtg acc tac gcc cag ctg cac agc ttg acc ctt aga cgg 1872

Pro Gln Asp Val Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu Thr Leu Arg Arg

610 615 620

aag gca act gag cct cct cca tcc cag gaa ggg ccc tct cca gct gtg 1920

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

625 630 635 640

ccc agc atc tac gcc act ctg gcc atc cac tag 1953

Pro Ser Ile Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His

645 650

<210> 28

<211> 1347

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(1344)

&lt;400&gt; 28

atg atc ccc acc ttc acg gct ctg ctc tgc ctc ggg ctg agt ctg ggc	48
Met Ile Pro Thr Phe Thr Ala Leu Leu Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly	
1 5 10 15	
ccc agg acc gac atg cag gca ggg ccc ctc ccc aaa ccc acc ctc tgg	96

Pro Arg Thr Asp Met Gln Ala Gly Pro Leu Pro Lys Pro Thr Leu Trp	
---	--

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

gct gag cca ggc tct gtg atc agc tgg ggg aac tct gtg acc atc tgg	144
Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Ser Trp Gly Asn Ser Val Thr Ile Trp	
35 40 45	

tgt cag ggg acc ctg gag gct cgg gag tac cgt ctg gat aaa gag gaa	192
Cys Gln Gly Thr Leu Glu Ala Arg Glu Tyr Arg Leu Asp Lys Glu Glu	
50 55 60	

agc cca gca ccc tgg gac aga cag aac cca ctg gag ccc aag aac aag	240
Ser Pro Ala Pro Trp Asp Arg Gln Asn Pro Leu Glu Pro Lys Asn Lys	
65 70 75 80	

gcc aga ttc tcc atc cca tcc atg aca gag gac tat gca ggg aga tac	288
Ala Arg Phe Ser Ile Pro Ser Met Thr Glu Asp Tyr Ala Gly Arg Tyr	
85 90 95	

cgc tgt tac tat cgc agc cct gta ggc tgg tca cag ccc agt gac ccc	336
---	-----

Arg Cys Tyr Tyr Arg Ser Pro Val Gly Trp Ser Gln Pro Ser Asp Pro	
100 105 110	

ctg gag ctg gtg atg aca gga gcc tac agt aaa ccc acc ctt tca gcc	384
Leu Glu Leu Val Met Thr Gly Ala Tyr Ser Lys Pro Thr Leu Ser Ala	
115 120 125	

ctg ccg agt cct ctt gtg acc tca gga aag agc gtg acc ctg ctg tgt	432
Leu Pro Ser Pro Leu Val Thr Ser Gly Lys Ser Val Thr Leu Leu Cys	
130 135 140	

cag tca cgg agc cca atg gac act ttc ctt ctg atc aag gag cgg gca	480
Gln Ser Arg Ser Pro Met Asp Thr Phe Leu Leu Ile Lys Glu Arg Ala	
145 150 155 160	

gcc cat ccc cta ctg cat ctg aga tca gag cac gac gct cag cag cac	528		
Ala His Pro Leu Leu His Leu Arg Ser Glu His Gly Ala Gln Gln His			
165	170	175	
cag gct gaa ttc ccc atg agt cct gtg acc tca gtg cac ggg ggg acc	576		
Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser Pro Val Thr Ser Val His Gly Gly Thr			
180	185	190	
tac agg tgc ttc agc tca cac ggc ttc tcc cac tac ctg ctg tca cac	624		
Tyr Arg Cys Phe Ser Ser His Gly Phe Ser His Tyr Leu Leu Ser His			
195	200	205	
ccc agt gac ccc ctg gag ctc ata gtc tca gga tcc ttg gag ggt ccc	672		
Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Ile Val Ser Gly Ser Leu Glu Gly Pro			
210	215	220	
agg ccc tca ccc aca agg tcc gtc tca aca gct gca ggc cct gag gac			720
Arg Pro Ser Pro Thr Arg Ser Val Thr Ala Ala Gly Pro Glu Asp			
225	230	235	240
cag ccc ctc atg cct aca ggg tca gtc ccc cac agt ggt ctg aga agg	768		
Gln Pro Leu Met Pro Thr Gly Ser Val Pro His Ser Gly Leu Arg Arg			
245	250	255	
cac tgg gag gta ctg atc ggg gtc ttg gtg gtc tcc atc ctg ctt ctc	816		
His Trp Glu Val Leu Ile Gly Val Leu Val Val Ser Ile Leu Leu Leu			
260	265	270	
tcc ctc ctc ctc ttc ctc ctc ctc caa cac tgg cgt cag gga aaa cac	864		
Ser Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu Gln His Trp Arg Gln Gly Lys His			
275	280	285	
agg aca ttg gcc cag aga cag gct gat ttc caa cgt cct cca ggg gct	912		
Arg Thr Leu Ala Gln Arg Gln Ala Asp Phe Gln Arg Pro Pro Gly Ala			
290	295	300	
gcc gag cca gag ccc aag gac ggg ggc cta cag agg agg tcc agc cca			960
Ala Glu Pro Glu Pro Lys Asp Gly Gly Leu Gln Arg Arg Ser Ser Pro			
305	310	315	320
gct gct gac gtc cag gga gaa aac ttc tgt gct gcc gtg aag aac aca	1008		

Ala Ala Asp Val Gln Gly Glu Asn Phe Cys Ala Ala Val Lys Asn Thr  
 325 330 335  
 cag cct gag gac ggg gtg gaa atg gac act cgg cag agc cca cac gat 1056  
  
 Gln Pro Glu Asp Gly Val Glu Met Asp Thr Arg Gln Ser Pro His Asp  
 340 345 350  
 gaa gac ccc cag gca gtg acg tat gcc aag gtg aaa cac tcc aga cct 1104  
 Glu Asp Pro Gln Ala Val Thr Tyr Ala Lys Val Lys His Ser Arg Pro  
 355 360 365  
 agg aga gaa atg gcc tct cct ccc tcc cca ctg tct ggg gaa ttc ctg 1152  
 Arg Arg Glu Met Ala Ser Pro Pro Ser Pro Leu Ser Gly Glu Phe Leu  
 370 375 380  
  
 gac aca aag gac aga cag gca gaa gag gac aga cag atg gac act gag 1200  
 Asp Thr Lys Asp Arg Gln Ala Glu Glu Asp Arg Gln Met Asp Thr Glu  
 385 390 395 400  
 gct gct gca tct gaa gcc ccc cag gat gtg acc tac gcc cgg ctg cac 1248  
 Ala Ala Ala Ser Glu Ala Pro Gln Asp Val Thr Tyr Ala Arg Leu His  
 405 410 415  
 agc ttt acc ctc aga cag aag gca act gag cct cct cca tcc cag gaa 1296  
  
 Ser Phe Thr Leu Arg Gln Lys Ala Thr Glu Pro Pro Pro Ser Gln Glu  
 420 425 430  
 ggg gcc tct cca gct gag ccc agt gtc tat gcc act ctg gcc atc cac 1344  
 Gly Ala Ser Pro Ala Glu Pro Ser Val Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His  
 435 440 445  
 taa 1347  
 <210> 30  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> An Artificial Sequenceley synthesized primer sequence  
 <400> 30  
 ccatagttcc atttacagt tacc 24

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> An Artificial Sequenceley synthesized primer sequence

<400> 31

gggaccaagg gatagacaga 20

<210> 32

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> An Artificial Sequenceley synthesized primer sequence

<400> 32

tccagagttc caggtcaagg tcac 24

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> An Artificial Sequenceley synthesized primer sequence

<400> 33

gccagtggat agaccgatgg 20

<210> 34

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> An Artificial Sequenceley synthesized primer sequence

<220><221> modified\_base

<222> (24)..(25)

<223> I

<220><221> modified\_base

<222> (29)..(30)

<223> I

<220><221> modified\_base

<222>	(34)..(35)	
<223>	I	
<400>	34	
ggccacgcgt cgactagta c gggnnnnnn gggnnng		36
<210>	35	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> An Artificial Sequence		synthesized primer sequence
<400>	35	
ggccacgcgt cgactagta c		20
<210>	36	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213> Artificial Sequence		
<220><223> An Artificial Sequence		synthesized primer sequence
<400>	36	
ttcactgcca tcaatttcc actt		24
<210>	37	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> An Artificial Sequence		synthesized primer sequence
<400>	37	
gatggataca gttgggtgcag c		21
<210>	38	
<211>	408	
<212>	DNA	
<213>	Mus musculus	
<220><221> CDS		
<222> (1)..(408)		
<220><221> sig_peptide		
<222> (1)..(54)		

&lt;220&gt;&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (55)..(408)

&lt;400&gt; 38

atg aga gtg ctt att ctt ttg tgg ctg itc aca gcc ttt cct ggt atc 48

Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile

1 5 10 15

ctg tct gat gtg cag ctt cag gag tcg gga cct ggc ctg gtg aaa cct 96

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

20 25 30

tct cag tct ctg tcc ctc acc tgc act gtc act ggc tac tca atc acc 144

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

35 40 45

agt gat tat gcc tgg aac tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg 192

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu

50 55 60

gag tgg atg ggc tac ata agc tac agt ggt agc act agc tac aac cca 240

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

65 70 75 80

tct ctc aaa agt cga atc tct atc act cga gac aca tcc aag aac cag 288

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

85 90 95

ttc ttc ctg cag ttg aat tct gtg act act gag gac aca gcc aca tat 336

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

100 105 110

tac tgt gca aga tct ccc cct tac tat gct atg gac tac tgg ggt caa 384

Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

115 120 125

gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 408

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

130 135

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 381

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(381)

&lt;220&gt;&lt;221&gt; sig\_peptide

&lt;222&gt; (1)..(60)

&lt;220&gt;&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (61)..(381)

&lt;400&gt; 40

atg gag aca cat tct cag gtc ttt gta tac atg ttg ctg tgg ttg tct 48

Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser

1 5 10 15

ggt gtt gaa gga gac att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc 96

Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser

20 25 30

aca tca gta gga gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat 144

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

35 40 45

gtg ggt act gct gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct 192

Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro

50 55 60

aaa cta ctg att tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat 240

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

65 70 75 80

cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc att agc 288

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

85 90 95

aat gtg cag tct gaa gac ttg gca gat tat ttc tgt cag caa tat agc 336

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser

100 105 110

agc tat cct ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa 381

Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

115 120 125

<210> 42

<211> 414

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> CDS

<222> (1)..(414)

<220><221> sig\_peptide

<222> (1)..(57)

<220><221> mat\_peptide

<222> (55)..(414)

<400> 42

atg gga tgg agc tgg gtc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca ggt 48

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

1 5 10 15

gtc cac tgc cag gtc cag ctg aag cag cag tct gga gct gag ctg gtg agg 96

Val His Cys Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg

20 25 30

cct ggg gct tca gtg aag ctg tcc tgc aag act tct gga tac atc ttc 144

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

35 40 45

acc agc tac tgg att cac tgg gta aaa cag agg tct gga cag ggc ctt 192

Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu

50 55 60

gag tgg att gca agg att tat cct gga act ggt agt act tac tac aat 240

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

65 70 75 80

gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc 288

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser

85 90 95

act gcc tac atg cag ctc agc agc ctg aaa tct gag gac tct gct gtc 336

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Ser Ala Val			
100	105	110	
tat ttc tgt gca aga tac cct acc tac gac tgg tac ttc gat gtc tgg			384
Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Pro Thr Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp			
115	120	125	
ggc gca ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca			414
Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
130	135		
<210> 44			
<211> 381			
<212> DNA			
<213> Mus musculus			
<220><221> CDS			
<222> (1)..(381)			
<220><221> sig_peptide			
<222> (1)..(60)			
<220><221> mat_peptide			
<222> (61)..(381)			
<400> 44			
atg gtt ttc aca cct cag att ctt gga ctt atg ctt ttc tgg att tca			48
Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser			
1	5	10	15
gcc tcc aga ggt gat att gtg cta act cag tct cca gcc acc ctg tct			96
Ala Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser			
20	25	30	
gtg act cca gga gat aga gtc agt ctt tcc tgc agg gcc agt caa agt			144
Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser			
35	40	45	
att agc aac tac cta cac tgg tat caa caa aaa tca cat gag tct cca			192
Ile Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro			
50	55	60	
agg ctt ctc atc aag tat gct tcc cag tcc atc tct ggg atc ccc tcc			240

Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser  
 65 70 75 80  
 agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc act ctc agt atc aac 288

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn  
 85 90 95  
 agt gtg gag act gaa gat ttt gga atg tat ttc tgt caa cag agt aac 336  
 Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn  
 100 105 110  
 agc tgg ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa 381  
 Ser Trp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 115 120 125

<210> 46  
<211> 408  
<212> DNA  
<213> Mus musculus  
<220><221> CDS  
<222> (1)..(408)  
<220><221> sig\_peptide  
<222> (1)..(54)  
<220><221> mat\_peptide  
<222> (55)..(408)  
<400> 46  
atg aga gtg ctg att ctt ttg tgg ctg ttc aca gcc ttt cct ggt atc 48  
Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile  
1 5 10 15  
ctg tct gat gtg cag ctt cag gag tcg gga cct ggc ctg gtg aaa cct 96

Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro  
20 25 30  
tct cag tct ctg tcc ctc acc tgc act gtc act ggc tac tca atc acc 144  
Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr  
35 40 45  
agt gat tat gcc tgg aac tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg 192

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu

50 55 60

gag tgg atg ggc tac ata agc tac agt ggt agc act agc tac aac cca 240

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

65 70 75 80

tct ctc aaa agt cga atc tct atc act cga gac aca tcc aag aac cag 288

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

85 90 95

ttc ttc ctg cag ttg aat tct gtg act act gag gac aca gcc aca tat 336

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

100 105 110

tac tgt gca aga gcc ctc cca tta ccc tgg ttt gct tac tgg ggc caa 384

Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Pro Leu Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

115 120 125

ggg act ctg gtc act gtc tct gca 408

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

130 135

<210> 48

<211> 381

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> CDS

<222> (1)..(381)

<220><221> sig\_peptide

<222> (1)..(60)

<220><221> mat\_peptide

<222> (61)..(381)

<400> 48

atg gag aca cat tct cag gtc ttt gta tac atg ttg ctg tgg ttg tct 48

Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser

1 5 10 15

ggt gtt gaa gga gac att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc	96		
Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser			
20	25	30	
aca tca gta gga gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat	144		
Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp			
35	40	45	
gtg ggt act gct gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct	192		
Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro			
50	55	60	
aaa cta ctg att tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat		240	
Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp			
65	70	75	80
cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc att agc		288	
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
85	90	95	
aat gtg cag tct gaa gac ttg gca gat tat ttc tgt cag caa tat agc	336		
Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser			
100	105	110	
agc tat cct tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa		381	
Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
115	120	125	
<210> 50			
<211> 1401			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> An Artificial Sequenceley synthesized nucleotide sequence			
<220><221>			
> CDS			
<222> (1)..(1398)			
<220><221> sig_peptide			
<222> (1)..(54)			
<220><221> mat_peptide			

&lt;222&gt; (55)..(1398)

&lt;400&gt; 50

atg aga gtg ctg att ctt ttg tgg ctg ttc aca gcc ttt cct ggt atc 48

Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile

1 5 10 15

ctg tct gat gtg cag ctt cag gag tcg gga cct ggc ctg gtg aaa cct 96

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

20 25 30

tct cag tct ctg tcc ctc acc tgc act gtc act ggc tac tca atc acc 144

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

35 40 45

agt gat tat gcc tgg aac tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg 192

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu

50 55 60

gag tgg atg ggc tac ata agc tac agt ggt agc act agc tac aac cca 240

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

65 70 75 80

tct ctc aaa agt cga atc tct atc act cga gac aca tcc aag aac cag 288

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

85 90 95

ttc ttc ctg cag ttg aat tct gtg act act gag gac aca gcc aca tat 336

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

100 105 110

tac tgt gca aga tct ccc cct tac tat gct atg gac tac tgg ggt caa 384

Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

115 120 125

gga acc tca gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc 432

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

130 135 140

ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc 480

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

145	150	155	160	
ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg				528
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser				
165	170	175		
tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc				576
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val				
180	185	190		
cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc				624
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro				
195	200	205		
tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag				672
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys				
210	215	220		
ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac				720
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp				
225	230	235	240	
aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga				768
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly				
245	250	255		
ccg tca gtc ttc ctc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc				816
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile				
260	265	270		
tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gac gtg agc cac gaa				864
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu				
275	280	285		
gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat				912
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His				
290	295	300		
aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt				960
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg				
305	310	315	320	

gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag	325	330	335	1008
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys				
gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag	340	345	350	1056
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu				
aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac	355	360	365	1104
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr				
acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg	370	375	380	1152
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu				
acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg	385	390	395	1200
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp				
gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg	405	410	415	1248
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val				
ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac	420	425	430	1296
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp				
aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat	435	440	445	1344
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His				
gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg	450	455	460	1392
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro				
ggt aaa tg a	465			1401
Gly Lys	<210>	52		

<211> 705  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> An Artificial Sequenceley synthesized nucleotide sequence  
 <220><221> CDS  
 <222> (1)..(702)  
 <220><221> sig\_peptide  
 <222> (1)..(60)  
 <220><221> mat\_peptide  
 <222> (61)..(702)  
 <400> 52  
 atg gag aca cat tct cag gtc ttt gta tac atg ttg ctg tgg ttg tct 48  
  
 Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser  
 1 5 10 15  
 ggt gtt gaa gga gac att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc 96  
 Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser  
 20 25 30  
 aca tca gta gga gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat 144  
 Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
 35 40 45  
  
 gtg ggt act gct gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct 192  
 Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
 50 55 60  
 aaa cta ctg att tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat 240  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp  
 65 70 75 80  
 cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc att agc 288  
  
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 85 90 95  
 aat gtg cag tct gaa gac ttg gca gat tat ttc tgt cag caa tat agc 336  
 Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser  
 100 105 110

act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag	384	
Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg		
115	120	125
ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat	432	
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		
130	135	140
ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg	480	
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		
145	150	155
ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat	528	
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		
165	170	175
ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc	576	
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		
180	185	190
tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa	624	
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		
195	200	205
cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc	672	
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		
210	215	220
gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgc	705	
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
225	230	
<210> 54		
<211> 1407		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
><223> An Artificial Sequenceley synthesized nucleotide sequence		
<220><221> CDS		
<222> (1)..(1404)		

<220><221> sig\_peptide

<222> (1)..(57)

<220><221> mat\_peptide

<222> (55)..(1404)

<400> 54

atg gga tgg agc tgg gtc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca ggt 48  
 Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly  
 1 5 10 15

gtc cac tgc cag gtc cag ctg aag cag tct gga gct gag ctg gtg agg 96

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

cct ggg gct tca gtg aag ctg tcc tgc aag act tct gga tac atc ttc 144  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe  
 35 40 45

acc agc tac tgg att cac tgg gta aaa cag agg tct gga cag ggc ctt 192  
 Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60

gag tgg att gca agg att tat cct gga act ggt agt act tac tac aat 240  
 Glu Trp Ile Ala Arg Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn  
 65 70 75 80

gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc 288  
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser  
 85 90 95

act gcc tac atg cag ctc agc agc ctg aaa tct gag gac tct gct gtc 336

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

tat ttc tgt gca aga tac cct acc tac gac tgg tac ttc gat gtc tgg 384  
 Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Pro Thr Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp  
 115 120 125

ggc gca ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca 432  
 Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

130	135	140	
tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca			
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr			
145	150	155	160
gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg			
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr			
165	170	175	
gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg			
576			
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro			
180	185	190	
gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc			
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr			
195	200	205	
gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat			
624			
Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn			
210	215	220	
cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct			
720			
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser			
225	230	235	240
tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg			
768			
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu			
245	250	255	
ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc			
816			
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu			
260	265	270	
atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gac gtg agc			
864			
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser			
275	280	285	
cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag			
912			
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu			

290	295	300	
gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg			960
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr			
305	310	315	320
tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat			1008
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn			
325	330	335	
ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc			1056
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro			
340	345	350	
atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag			1104
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln			
355	360	365	
gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc			1152
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val			
370	375	380	
agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg			1200
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val			
385	390	395	400
gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct			1248
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro			
405	410	415	
ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc			1296
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr			
420	425	430	
gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg			1344
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val			
435	440	445	
atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg			1392
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu			

450	455	460	
tct ccg ggt aaa			tga
Ser Pro Gly Lys			1407
465			
<210>	56		
<211>	705		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223> An Artificial Sequenceley synthesized nucleotide sequence			
<220><221> CDS			
<222> (1)..(702)			
<220><221> sig_peptide			
<222> (1)..(60)			
<220><221> mat_peptide			
<222> (61)..(702)			
<400> 56			
atg gtt ttc aca cct cag att ctt gga ctt atg ctt ttc tgg att tca			
Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser			
1	5	10	15
gcc tcc aga ggt gat att gtg cta act cag tct cca gcc acc ctg tct			
Ala Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser			
20	25	30	
gtg act cca gga gat aga gtc agt ctt tcc tgc agg gcc agt caa agt			
144			
Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser			
35	40	45	
att agc aac tac cta cac tgg tat caa caa aaa tca cat gag tct cca			
Ile Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro			
50	55	60	
agg ctt ctc atc aag tat gct tcc cag tcc atc tct ggg atc ccc tcc			
240			
Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser			
65	70	75	80

agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc act ctc agt atc aac	288		
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn			
85	90	95	
agt gtg gag act gaa gat ttt gga atg tat ttc tgt caa cag agt aac	336		
Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn			
100	105	110	
agc tgg ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa cga	384		
Ser Trp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg			
115	120	125	
act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag	432		
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln			
130	135	140	
ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat	480		
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr			
145	150	155	160
ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg	528		
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser			
165	170	175	
ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc	576		
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr			
180	185	190	
tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa	624		
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys			
195	200	205	
cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc	672		
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro			
210	215	220	
gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgc	705		
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
225	230		

<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 58

Ser Pro Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 59  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 59

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 60  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 60

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr

1 5

<210> 61  
 <211> 9  
 <212> PRT

<213

> Mus musculus

<400> 61

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 62  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 62

Ser Tyr Trp Ile His

1 5

<210> 63  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 63

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

1 5 10 15  
 Gly

<210> 64  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 64

Tyr Pro Thr Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 65  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 65

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu His

1 5 10

<210> 66  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 66

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser

1 5

<210> 67  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 67

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr

1 5

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 68

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn

1 5

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 69

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

1 5 10 15

Arg

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 70

Ala Leu Pro Leu Pro Trp Phe Ala Tyr

1 5

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 71

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 72

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr

1 5

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 73

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 74

<211> 4

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<220><221> UNSURE

<222> (2)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 74

Tyr Xaa Xaa Leu

1