



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년11월11일

(11) 등록번호 10-2465491

(24) 등록일자 2022년11월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/08 (2006.01) G01N 33/569 (2017.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 7/08 (2013.01)
C07K 16/2833 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7037215

(22) 출원일자(국제) 2017년06월02일

심사청구일자 2020년04월24일

(85) 번역문제출일자 2018년12월21일

(65) 공개번호 10-2019-0044589

(43) 공개일자 2019년04월30일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2017/063503

(87) 국제공개번호 WO 2017/207775

국제공개일자 2017년12월07일

(30) 우선권주장

16305650.0 2016년06월03일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

WO2014072534 A1*

WO1996031604 A1

SHIROISHI MITSUNORI ET AL: PROCEEDINGS OF THE
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL
ACADEMY OF SCIENCES, vol. 100, no. 15, 22
July 2003

BENSUSSAN A ET AL: PROCEEDINGS OF THE
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL
ACADEMY OF SCIENCES, vol. 92, no. 22, 24
October 1995

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

잉벡퍼스 에스에이에스

프랑스공화국, 에프-75015 빠리, 뒤 뒤 독퍼르 루 28

(72) 발명자

랑그라드 드무아엔 피에르

프랑스 92200 너이-쉬르-센 블라스 드 바가텔 1
위에 티에리프랑스 94130 노장 쉬르 마르 뒤 르게스 21-23
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 21 항

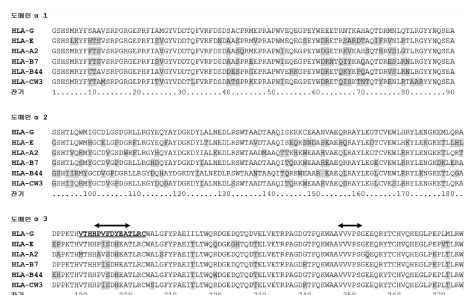
심사관 : 문영준

(54) 발명의 명칭 항 HLA-G 특이적 항체

(57) 요약

본 발명은 인간 백혈구 항원-G (HLA-G) 단백질을 겨냥하고 HLA-G 단백질의 α3 도메인에서 유래된 면역원성 펩티드에 대항하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다. 본 발명은 나아가 면역원성 펩티드, 및 상기 항-HLA-G 특이적 항체의 생산 방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

G01N 33/56983 (2013.01)

G01N 33/574 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

C07K 2317/34 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

G01N 2333/70539 (2013.01)

(72) 발명자

쾨마르뎡 줄리앙

프랑스 78110 르 베지네 뿔라스 뒤 마르쉴 14

루스또 마리아

프랑스 75009 파리 뤼 샤프탈 15

웨흐베 마리아

프랑스 78180 몽띠니-르-브레포뉴 마이 데 뤼야 1

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 항-HLA-G 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

(a) SEQ ID NO: 8 의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HC CDR1), SEQ ID NO: 10 의 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HC CDR2), 및 SEQ ID NO: 12 의 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HC CDR3) 을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH); 및

(b) SEQ ID NO: 2 의 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LC CDR1), 서열 KVS 의 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LC CDR2), 및 SEQ ID NO: 5 의 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LC CDR3) 을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL).

청구항 2

제 1 항에 있어서,

VH 는 SEQ ID NO: 64 를 포함하고;

VL 은 SEQ ID NO: 63 을 포함하는, 항-HLA-G 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

항체가 두 개의 중쇄 및 두 개의 경쇄를 포함하는 전장 면역글로불린 G 인, 항-HLA-G 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 키메라 (chimeric) 또는 인간화된 것인, 항-HLA-G 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 5

제 1 항 또는 제 4 항에 있어서, VH, VL, 또는 VH 및 VL 모두가 인간 면역글로불린 프레임워크 영역 서열을 포함하는 것인, 항-HLA-G 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 6

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 항체가 면역글로불린 불변 영역을 포함하는 것인, 항-HLA-G 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 항원 결합 단편이 Fv, dsFv, scFv, Fab, Fab' 또는 F(ab')₂ 인, 항-HLA-G 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 8

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 항체가 모노클로날인, 항-HLA-G 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 9

세포독성제에 연결된 제 1 항 또는 제 2 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 컨주게이트 (conjugate).

청구항 10

제 1 항 또는 제 2 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 약학적 담체를 포함하는, 암 또는 바이러스 감염의

치료에 사용하기 위한 약학적 조성물.

청구항 11

제 9 항의 컨쥬게이트 및 약학적 담체를 포함하는, 암 또는 바이러스 감염의 치료에 사용하기 위한 약학적 조성물.

청구항 12

제 1 항 또는 제 2 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 VH 및 VL 을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산.

청구항 13

제 12 항의 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 벡터가 발현 벡터인, 벡터.

청구항 15

제 12 항의 핵산을 포함하는 숙주 세포.

청구항 16

제 13 항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 17

항체 또는 이의 항원 결합 단편의 발현을 가능하게 하는 조건 하에서 제 16 항의 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 항-HLA-G 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 생산 방법.

청구항 18

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 암 또는 바이러스 감염의 치료에 사용하기 위한, 항-HLA-G 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 19

제 9 항에 있어서, 암 또는 바이러스 감염의 치료에 사용하기 위한, 컨쥬게이트.

청구항 20

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 생물학적 샘플에서 HLA-G 를 검출 또는 모니터링하기 위한 진단 키트의 제조에 사용되는, 항-HLA-G 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 21

제 1 항 또는 제 2 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 진단 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 백혈구 항원 G (HLA-G) 단백질의 $\alpha 3$ 도메인에서 유도된 면역원성 펩티드에 대항하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암에서, 하나의 주요한 면역 탈출 메카니즘 (immune escape mechanism) 은, T 세포 신호전달을 손상시키는 세포 표면 상의 억제 분자의 발현이다. 이러한 억제 분자 중 다수는 면역 체크 포인트 (Immune Check Point

(ICP))로서 간주되며, 자기 관용 (self-tolerance)을 유지하고 부수적인 조직 손상을 피하기 위해 말초 조직 내 생리학적 면역 반응의 지속기간 및 진폭을 조절하는 것으로 처음으로 입증된 수많은 억제 경로를 나타낸다.

- [0003] HLA-G는 최근, 이의 특이적 수용체와의 상호작용을 통해 면역 세포 서브세트를 침투하는 이펙터 (effector) 기능을 억제하고, 종양 세포에서 빈번하게 상향 조절되는, ICP 분자로서 동정되었다 (Carosella *et al.*, 2015).
- [0004] 나아가, HLA-G는 또한, 동종 이식 후 또는 바이러스 감염, 자가 면역 및 염증성 질환과 같은 병리학적 병태에서 새롭게 발현 (neo-expressed) 및/또는 상향 조절될 수 있다.
- [0005] 예를 들어, HCMV (Human Cytomegalovirus (인간 거대세포 바이러스)), HSV-1 (Herpes Virus Simplex (단순 헤르페스 바이러스)), RABV (Rabies Virus (공수병 바이러스)), HCV (hepatitis C Virus (C형 간염 바이러스)), IAV (Influenza A Virus (A형 인플루엔자 바이러스)) 및 HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus type I (I형 인간 면역결핍 바이러스))과 같은 바이러스는, 감염된 세포가 CTL 및 NK 세포에 의해 인식되고 공격받는 것을 방지하기 위해 HLA-G의 발현을 상향 조절하는 것으로 보인다. HLA-G는 또한, CD8 세포를 아포토시스 (apoptosis)로 유도하고, 이의 세포독성 특성에 영향을 미침으로써, HIV-감염된 세포에 대한 CD8 T 세포 반응을 제어할 수 있다 (Tripathi and Agrawal, 2007).
- [0006] HLA-G는 용모막암종 세포에서 처음으로 동정되었던 비고전적 (non-classical) MHC 클래스 I 분자이다. MHC 클래스 I 항원은 비고전적 항원 HLA-E, HLA-F 및 HLA-G 뿐 아니라, β 2-마이크로글로불린 (β 2M)과 회합된 3개의 세포외 구형 도메인 (α 1, α 2 및 α 3)을 나타내는 고전적 항원 HLA-A, HLA-B 및 HLA-C를 포함한다.
- [0007] 고전적 MHC 클래스 I 분자와 달리, HLA-G는 (i) 제한된 다형성, (ii) 조직 제한적 발현을 특징으로 하며, (iii) 그의 기능에 따라 또한 다르다.
- [0008] HLA-G 분자를 코딩하는 8개의 엑손 유전자는 염색체 6에서 4.4 kb에 걸쳐있다 (Geraghty *et al.*, 1987; Ellis *et al.*, 1990). 엑손 2, 3 및 4는, 각각, α 1, α 2 및 α 3 세포외 도메인을 인코딩한다. 1차 RNA 전사체는 대안적으로 스플라이싱되어, 7개의 동형체 (isoform)의 발현을 유도하며, 상기 동형체 중 4개는 막 결합된 것이고 (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 및 HLA-G4), 3개는 가용성이다 (HLA-G5, HLA-G6 및 HLA-G7). HLA-G1 및 HLA-G5는 항체와 같은 제한된 HLA-G 시약으로 인해 부분적으로 설명될 수 있는 가장 중요한 동형체이다. 이의 구조는 고전적 HLA 클래스 I 분자의 전형: β 2-마이크로글로불린 (β 2M) 및 펩티드에 비(非) 공유결합적으로 회합된 3개의 세포외 구형 도메인으로 구성된 중쇄이며, 반면 다른 동형체들은 보다 짧고, 중쇄의 1 또는 2개의 구형 도메인이 결여되어 있으며, β 2M 회합이 없다.
- [0009] HLA-G의 면역 억제 활성은 3가지 억제성 수용체: 백혈구 면역글로불린-유사 수용체 B1 (LILRB1/ILT2/CD85j), LILRB2 (ILT4/CD85d) 및 KIR2DL4 (또는 CD158d)에 대한 특이적 결합을 통해 일어난다.
- [0010] 고전적 MHC 클래스 I 분자와 반대되는 이러한 수용체와의 상호작용을 통해, HLA-G는 면역계의 주요 기능의 하향 조절제로서 작용하며, 자극성 기능이나 동종이형 HLA-G에 대한 반응은 현재까지 보고된 바 없다 (Carosella *et al.*, 2008a).
- [0011] 다른 MHC 클래스 I 분자와 유사한 방식으로, LILRB 수용체는 HLA-G의 α 3 도메인과 상호작용한다. LILRB1 수용체는 B 세포, 일부 T 세포, 일부 NK 세포 및 모든 APC (단핵구 및 수지상 세포)에서 발현되는 반면, LILRB2 발현은 골수 계통에 제한되며, 단핵구 및 수지상 세포에서만 발현된다.
- [0012] LILRB1 및 LILRB2 수용체는, 각각, α 3 도메인/ β 2M 복합체 또는 오로지 α 3 도메인을 통해 광범위한 고전적 MHC 분자에 결합한다. 실제로, LILRB1은 β 2M-회합된 HLA-G 복합체에만 결합하지만, LILRB2는 β 2M-회합된 (β 2M-associated) 및 β 2M-유리된 (β 2M-free) HLA-G 분자 뿐 아니라, 절단된 α 1- α 3 도메인 동형체를 모두 인식한다.
- [0013] HLA-G는 고전적 MHC 클래스 I 분자와 비교하여, LILRB2 수용체에 대하여 가장 높은 친화성을 갖는 리간드이다. LILRB1 및 LILRB2 수용체에 대한 HLA-G의 보다 높은 친화성은, 종양 세포의 표면에 디스플레이된 HLA-G가, 고전적 MHC 클래스 I 분자가 또한 이의 표면에서 발현되더라도, LILRB1 및/또는 LILRB2 수용체와 관계를 맺을 수 있다는 사실에 의해 특히 예시된다. LILRB 수용체에 대한 HLA-G의 이러한 우선적 상호작용은, 면역 이펙터 세포의 세포용해 기능을 억제하는데 충분하다.
- [0014] LILRB1 및 2 수용체는 동일한 HLA-G 형태에 결합하지 않고, 단량체성 구조보다는 HLA-G 다량체에 대하여 보다 높은 친화성을 나타낸다 (HwangYin *et al.*, 2012). HLA-G에 대한 LILRB 수용체의 이러한 높은 친화성은, 고전적 MHC 클래스 I 분자에는 존재하지 않는, HLA-G의 α 3 도메인 내 방향족 아미노산 Phe195 및 Tyr197의

존재와 관련이 있다는 것이 입증되었다.

- [0015] 이펙터 세포를 억제하기 위해 종양 세포에 의해 이용되는 탈출 메카니즘으로서의 HLA-G 발현의 관련성은 널리 입증되었다 (Loustau *et al.*, 2013). 종양 세포 거부반응을 중재하는 것을 목표로 하는, HLA-G 를 표적으로 하는 몇 가지 접근법이 개발되었다 (Carosella *et al.*, 2008b; Yan, 2011). 항-HLA-G 항체는 거의 생성되지 않았으며, 단지 하나의 차단성 항체만이 이용 가능하다 (87G) (Blaschitz *et al.*, 2000; Menier *et al.*, 2003). 이러한 모노클로날 (monoclonal) 항체, 87G 는, $\beta 2M$ 에 회합된 HLA-G 의 중쇄의 $\alpha 1$ 도메인과 상호작용한다. HLA-G 를 중화시킴으로써, 시험관내 및 생체내 종양 거부반응을 회복시킬 수 있는 것으로 기재되었지만 (Agaugue *et al.*, 2011), HLA-G 는 흔히 $\beta 2M$ -유리된 전장 분자 또는 절단된 동형체로서 발현되기 때문에, 이의 적용 가능성은 절충된다. 이러한 다양한 동형체는 또한 LILRB2 억제성 수용체에 결합할 수 있다.
- [0016] HLA-G 면역화는 현격하게 어렵기 때문에, 특이적 항체를 거의 얻지 못한다. 중화 항체 생성에 대한 이러한 실패의 이유가 밝혀졌다. 신장 이식 환자에서, HLA-G 의 존재가 항체 생산을 선호하지 않는다는 것이 입증되었다 (Qiu *et al.*, 2006). 최근 시험관내 연구는, HLA-G/LILRB1 상호작용이 인간의 B-세포 성숙 및 항체 생산을 방해한다는 것을 확인하였다 (Naji *et al.*, 2014). HLA-G 는 또한, 모노클로날 항체를 생성하는데 통상적으로 사용되는 종인 마우스에서, 관용 기능을 발휘하는 것으로 공지되어 있다 (Favier *et al.*, 2001). HLA-G 는, 쥐와 B-세포에서 발현되며 인간 LILRB1 및 LILRB2 와 기능적으로 상동인, PIR-B 수용체와 상호작용한다 (Lhiang *et al.*, 2002). HLA-G/PIR-B 상호작용은 마우스에서 B-세포 억제를 유도함으로써 항체 생산을 막을 것이다.
- [0017] TP25.99 로 명명된, 고전적 MHC 클래스 I 분자의 $\alpha 3$ 도메인을 명백하게 겨냥하는 모노클로날 항체가 개발되었다 (Tanabe *et al.*, 1992). 하지만, 다른 사람들은, 그것이 HLA-G 의 $\alpha 3$ 도메인에 결합하지 않는다고 제시하였다 (Desai *et al.*, 2000; Moy *et al.*, 2000). 이러한 불일치는 항체 생성에 호의적이지 않은 HLA-G $\alpha 3$ 도메인의 소수성 특징에 의해 설명될 수 있다.
- [0018] 국제 특허 출원 WO2014/072534 에는 HLA-G 의 완전한 $\alpha 3$ 도메인을 이용한 DNA 면역화에 의해 항-HLA-G 항체를 생성 및 발달시키는 방법이 제안되어 있지만, 모든 HLA-G 동형체를 인식하고 HLA-G 에 대하여 개선된 특이성을 나타내는 항-HLA-G 항체에 대한 요구가 여전히 존재한다.

발명의 내용

- [0019] **발명의 개요**
- [0020] 본 발명자들은 이제 HLA-G 단백질의 $\alpha 3$ 도메인으로부터 면역원성 펩티드를 디자인함으로써, 특이적 항-HLA-G 항체를 생성하는 어려움을 회피하는데 성공했다.
- [0021] 본 발명의 제 1 목적은, 서열 X1-THHPVFDYEATLR-X2 (SEQ ID NO: 49) 로 이루어진 단리된 펩티드로서, 여기서 X1 은 부재이거나, 시스테인 또는 발린이거나, 또는 KTHV (SEQ ID NO: 50) 또는 CKTHV (SEQ ID NO: 51) 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 서열이고, X2 는 부재이거나 시스테인인 단리된 펩티드이다.
- [0022] 상기와 같은 펩티드는 HLA-G 단백질 동형체의 $\alpha 3$ 도메인에 대하여 특이적인 항체, 바람직하게는 모노클로날 항체의 생산을 위한 면역원으로서 유용하다.
- [0023] 본 발명의 추가의 목적은, 본원에 정의된 바와 같은 펩티드를 특이적으로 인식하는, 항-HLA-G 항체, 바람직하게는 모노클로날 항체이다.
- [0024] 항체는 전장 항체, 이의 항원 결합 단편, 또는 이중특이적 항체일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 추가의 목적은, 상기와 같은 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물이다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 주제는, 본원에 정의된 바와 같은 항체의, 항체 중쇄 가변 영역 (VH), 항체 경쇄 가변 영역 (VL) 또는 둘 모두를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산이다.
- [0027] 상기 핵산을 포함하는 벡터, 바람직하게는 발현 벡터가 또한 제공된다.
- [0028] 상기 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포가 추가로 기재된다.
- [0029] 항-HLA-G 항체의 생산 방법이 추가로 제공된다. 바람직한 구현예에서, 항체의 발현을 가능하게 하는 조건 하에서 상기 핵산 또는 상기 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 항-HLA-G 모노클로날 항체

의 생산 방법이 개시된다.

[0030] 항체, 핵산 또는 상기 항체를 발현하는 벡터는, 암 또는 바이러스 감염의 치료에 특히 유용하다.

[0031] 본 발명의 추가의 주제는, 생물학적 샘플에서 HLA-G 를 검출 또는 모니터링하기 위한 시험관내 진단 방법에서의, 본원에 기재된 항-HLA-G 항체의 용도이다.

[0032] 상기 항체를 포함하는 진단 키트가 추가로 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1. 면역원의 디자인, 면역화 및 항-HLA-G 항체의 생성. **도 1a.** 인간 HLA-G 단백질과 HLA-E, A2, B7, B44 및 CW3 의 아미노산 서열 정렬. 서열 정렬은 HLA-G 의 3 가지 면역글로불린 도메인: $\alpha 1$, $\alpha 2$ 및 $\alpha 3$ 에 대하여 제공된 것이다. 회색으로 강조 표시된 잔기는 HLA-G 와의 차이를 나타낸다. LILRB1/2 결합에 관여하는 $\alpha 3$ 도메인의 영역은 검은색 이중 화살표로 강조 표시되어 있다. HLA-G 특이적 PC-1 펩티드의 아미노산 서열은 밑줄그어져 있으며, 볼드체로 표시되어 있다. **도 1b.** 면역화된 마우스에서의 항-HLA-G 항체의 생성. 면역화된 BALB/c 마우스 (진한 검은색 선/진한 회색 히스토그램) 및 비(非)면역화된 대조군 마우스 (열은 회색 선 및 히스토그램)로부터, 항-HLA-G 혈청 반응성의 대표적인 유세포 분석 히스토그램. 파선은, 양수로 간주되는 신호 초과 역치를 나타낸다. 혈청을 제조하고, 희석하고, HLA-G5-코팅된 비드와 함께 인큐베이션한 후, FITC-컨쥬게이션된 염소 항-마우스 IgG 2차 항체와 함께 인큐베이션하였다. 형광을 유세포 분석법으로 분석하였다. 혈청의 4 가지 희석액이 제시되어 있다. **도 1c.** 비오틴-커플링된 PC1 펩티드에 대한 R4C-C3 (다이아몬드 기호/점선) 및 R5C-D8 (원 기호/파선) scFv 항체의 반응성을 ELISA 로 평가하였다. ScFv 항체를 순차적으로 희석시키고, 스트렙타비딘 마이크로플레이트 상에 코팅된 비오틴-PC1 을 사용하여 직접 ELISA 로 시험하였다. 비(非)-HLA-G 비오틴화된 펩티드를 대조군 (정사각형 및 삼각형 기호/두꺼운 선) 으로서 사용하였다.

도 2a. 15E7 의 κ 경쇄 가변 영역의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열. 항체의, "상보성 결정 영역 (Complementary Determining Region)" (CDR1, CDR2 및 CDR3) 의 위치 뿐 아니라, "프레임워크 영역 (Framework Region)" (FR1, FR2, FR3 및 FR4) 의 위치가 제시되어 있다. **도 2b.** 15E7 의 κ 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열 및 상응하는 마우스의 생식성 (germinal) 아미노산 유전자의 서열 정렬. 생식계열 서열과 상이한 15E7 κ 경쇄의 서열에서의 아미노산은 볼드체로 표시되어 있다. CDR 의 위치가 표시되어 있다.

도 3a. 15E7 의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열. 항체의, CDR1, CDR2 및 CDR3 서열의 위치 뿐 아니라, FR 의 위치가 표시되어 있다. **도 3b.** 15E7 의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열 및 상응하는 마우스의 생식성 아미노산 유전자의 서열 정렬. 생식계열 서열과 상이한 15E7 중쇄의 서열에서의 아미노산은 볼드체로 표시되어 있다. CDR 의 위치가 표시되어 있다.

도 4a. scFv R4C-C3 의 κ 경쇄 가변 영역의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열. scFv 의, CDR1, CDR2 및 CDR3 서열의 위치 뿐 아니라, FR 의 위치가 표시되어 있다. **도 4b.** scFv R4C-C3 의 κ 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열 및 상응하는 마우스의 생식성 아미노산 유전자의 서열 정렬. 생식계열 서열과 상이한 scFv R4C-C3 κ 경쇄의 서열에서의 아미노산은 볼드체로 표시되어 있다. CDR 의 위치가 표시되어 있다.

도 5a. scFv 항체 R4C-C3 의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열. scFv 항체의, CDR1, CDR2 및 CDR3 서열의 위치 뿐 아니라, FR 의 위치가 표시되어 있다. **도 5b.** scFv 항체 R4C-C3 의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열 및 상응하는 마우스의 생식성 아미노산 유전자의 서열 정렬. 생식계열 서열과 상이한 scFv 항체 R4C-C3 중쇄의 서열에서의 아미노산은 볼드체로 표시되어 있다. CDR 의 위치가 표시되어 있다.

도 6a. 15E7 모노클로날 항체의 SDS-PAGE 분석. 레인 1: 분자량 마커 - 위에서 아래로 순차적으로, 75kDa, 50 kDa, 37 kDa, 25 kDa 및 20 kDa. 레인 2: 대조군으로서의 마우스 IgG. 레인 3: 15E7 모노클로날 항체. 단백질을 SDS-PAGE 로 분리하고, 쿠마시 브릴리언트 블루 (Coomassie brilliant blue) 로 착색시켰다.

도 6b. Blitz 바이오층 간섭법 시스템 (biolayer interferometry system) 을 사용한, PC-1 펩티드에 대한 15E7 모노클로날 항체의 결합의 동역학 분석. 15E7 모노클로날 항체를 아미노 커플링에 의해 AR2G 칩에 고정시켰다. 다양한 농도의 PC-1 펩티드/BSA (5 내지 600 nM) 를 바이오센서 표면에 커플링된 15E7 과 함께 인큐베이션하였다. 분석을 120 초 (회합 단계) 의 지속시간 동안 30 초 시점에서 시작한 후, 완충액만 100 초 동안 인큐베이션하여 15E7 로부터 PC-1/BSA 의 해리를 기록하였다. 점선의 좌측 (150 초에서) 은 회합 동역학을 나타내지만, 우측은 해리 단계를 나타낸다. 상단의 선은 최고 농도의 펩티드 (600 nM) 에 대한

15E7의 결합에 해당하고, 하단의 선은 최저 농도의 펩티드 (5 nM)에 대한 결합에 해당한다. 결합은 펩티드 농도에 대하여 비례하였다 (중간 선들).

도 7. 모노클로날 항체 15E7의 이의 표적에 대한 용량 의존적 결합: cPC-1 펩티드 (도 7a); HLA-G5 재조합 단백질 (도 7b) 또는 HLA-G6 재조합 단백질 (두 가지 단백질 모두 β 2M 회합이 없음) (도 7c). 다양한 일련의 농도의 15E7을 사용하여 용량 의존적 결합 활성을 결정하였다. 결합 검출은 PE-컨쥬게이션된 염소 항-마우스 항체를 사용하여 유세포 분석법으로 수행하였다. 결합은 아이소타입 (isotype) 대조군 (IgG2a)으로의 염색과 비교하여, 15E7를 갖는 양성 라벨된 비드의 백분율로서 제시된다. 15E7의 EC₅₀를 cPC-1 펩티드에 대하여 2 ng/mL에서, HLA-G5에 대하여 28 ng/mL에서 및 HLA-G6 단백질에 대하여 120 ng/mL에서 평가하였다. 측정을 3회 수행하였고 (n = 3); 오차 막대는 SD를 나타낸다. 어두운 선은 리간드 코팅된 비드에 대한 15E7의 결합을 나타내고, 회색 선은 대조군 비드 [돌연변이된 펩티드로 코팅된 비드 (도 7a) 또는 커플링되지 않은 비드 (도 7b 및 7c)]에 대한 15E7의 결합을 나타낸다.

도 8. K562 세포 표면 상에 발현된 β 2M-유리된 HLA-G1에 대한 항-HLA-G 모노클로날 항체 15E7의 용량 의존적 결합. 다양한 농도 (0-80 μ g/mL)의 15E7을 사용하여, HLA-G1 양성 세포 (K562-G1) vs. HLA-G 음성 대조군 세포 (K562-PV)에 대한 15E7의 특이적 용량 의존적 결합 활성을 결정하였다. 15E7의 검출은 PE-컨쥬게이션된 염소 항-마우스 항체를 사용하여 유세포 분석법으로 수행하였다. 15E7은 표적 K562-G1 세포 (검은색 선)에 대하여 용량 의존적 결합을 나타내었지만, 대조군 세포주 K562-PV (회색 선)에 대한 결합은 검출되지 않았다.

도 9. 미처리 또는 산처리된 K562-G1 및 K562-PV 세포 (도 9a, 도 9b) 및 JEG-3 세포 (도 9c)에 대한 표면 HLA-G 항원의 유세포 분석법 분석. 표면 HLA-G 항원을 하기 mAb로 분석하였다: MEM-G/9 (천연 HLA-G 복합체에 대하여 특이적임), 항-h β 2M 및 15E7. 히스토그램: 연회색: 염색되지 않음; 회색: 아이소타입 대조군 (항- β 2M의 경우 IgM, 15E7 mAb의 경우 IgG2a 및 4H84의 경우 IgG1); 진한 회색: 표시된 항체.

도 10. 15E7 모노클로날 항체는 고전적 MHC 클래스 I 분자가 아니라 HLA-G에 특이적으로 결합한다. 15E7의 특이성을 평가하는 이러한 결합 검정을 HLA-G가 아니라 표면에서 인간 고전적 MHC 클래스 I 분자를 발현하는 림프종 세포주 (LCL DES, LCL BRO 및 RPMI8866)를 사용하여 수행하였고, 유세포 분석법으로 분석하였다. 15E7를 최종 농도 20 μ g/mL로 사용하였다. 결합은 아이소타입 대조군 (IgG2a)과 비교하여, 15E7을 갖는 양성 염색된 세포의 백분율로서 제시된다. K562-G1 및 K562-PV 세포를, 각각, 양성 및 음성 대조군으로서 사용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] HLA-G 치료 및 진단용 항체는, B 세포 성숙 및 항체 분비에 대한 HLA-G 관용원성 기능으로 인해 부족한 실정이다. 본 발명자들은 항-HLA-G 특이적 항체를 유도할 수 있는, HLA-G- α 3 도메인에서 유도된 펩티드를 사용함으로써, 이러한 억제제를 우회하도록 조정하였다.
- [0035] 본 발명은, HLA-G에 특이적으로 결합하고 다수의 바람직한 특징을 나타내는, 항-HLA-G 모노클로날 항체를 제공한다. 실제로, 생성된 항-HLA-G 항체는 고전적 MHC 클래스 I 분자와의 교차-반응성 부재 하에서, 재조합 또는 내인성 HLA-G 단백질과 강하게 결합한다.
- [0036] 본 발명은 또한 환자 세포 일부의 표면 상에서, HLA-G의 병리학적 발현으로부터 면역계를 회복시키기 위한, 상기와 같은 항체의 용도에 관한 것이다. 따라서, 항체는, HLA-G 단백질의 존재로 인해, 병태가 환자에서 면역계의 하향 조절을 이용하는 경우, 환자에서 진단된 병태를 치료 또는 완화시키는데 사용하기에 적합하다. 본 발명의 항체는 또한, 환자에서 병태를 진단 또는 모니터링하는데 사용될 수 있다.
- [0037] 정의
- [0038] 항체가 다른 물질에 결합하는 것보다 큰 친화성, 결합능 (avidity)으로, 보다 용이하게 및/또는 더 긴 지속기간으로 결합하는 경우, 이는 표적 항원에 **특이적으로 결합한다**. "특이적 결합" 또는 "우선적 결합"은 배타적인 결합을 (포함할 수는 있지만) 반드시 필요로 하는 것은 아니다. 일반적으로, 반드시 아니지만, 결합에 대한 언급은 우선적 결합을 의미한다. 결합의 친화성은 회합 및 해리 속도 상수, 또는 K_d (평형 해리)로 정의된다. 전형적으로, 항체에 관하여 사용될 때, 특이적으로 결합한다는 것은, 10⁻⁸ M 미만, 예를 들어 10⁻⁹ M 또는 10⁻¹⁰ M 미만의 친화성 (K_d) 값으로, 이의 표적(들)에 특이적으로 결합 ("인식") 하는 항체를 나타낸

다. K_D 값이 작을수록 친화성이 더 크다는 것을 나타내므로 (즉, 보다 강한 결합), 10^{-9} M 의 K_D 값은 10^{-8} M 의 K_D 값보다 큰 결합 친화성을 나타낸다.

[0039] 본 발명의 맥락에서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편에 의한 "HLA-G 단백질 결합" 은, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편이, $\alpha 3$ 도메인을 나타내거나 또는 $\alpha 3$ 도메인과 회합된 것으로 밝혀진 것이면서, 추가로 $\beta 2$ -마이크로글로불린 단백질 또는 이의 단편과 회합되거나 회합되지 않은 것으로 밝혀진 HLA-G 단백질 동형체를 인식하는 것을 의미한다.

[0040] "회합된" 은, 고려된 도메인 또는 도메인들과 단백질 사이의 밀접한 (비공유결합적) 상호작용을 의미하는 것이다. 상기와 같은 상호작용은 수소 결합의 형성, 또는 반데르발스 (van der Waals) 상호작용, 또는 이온 결합에 의해 달성될 수 있다.

[0041] 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 "특이적 결합" 특성은, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이, HLA-G 단백질의 다른 도메인에 대한 결합을 배제하거나 또는 다른 인간 단백질에 대한 결합을 배제하고, 특히 다른 HLA 단백질에 대한 결합을 배제하고, HLA-G 단백질의 $\alpha 3$ 도메인에 직접 결합하는 것을 의미한다. 결합 능력은 본 발명의 업계에 공지된 통상의 시험에 따라, HLA-G 단백질의 $\alpha 3$ 도메인에 대한 결합 친화성의 결정에 의해 측정될 수 있으며, 특히 결합 친화성은 ELISA, 또는 웨스턴 블롯 (Western Blot) 분석으로 검정될 수 있다. 특정 구현예에 있어서, "특이적 결합" 은, 상기와 같은 특이적 결합을 통한 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편과 HLA-G 단백질의 $\alpha 3$ 도메인간의 상호작용이, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편과, 다른 인간 단백질, 또는 다른 HLA-G 도메인 또는 다른 HLA 단백질과의 상호작용보다 안정하다는 것을 의미한다. 안정성은, 항원-항체 복합체의, 시간의 경과에 따른 또는 경쟁 조건 하에서의 지속성을 비교함으로써, 및 특히 HLA-G 단백질의 $\alpha 3$ 도메인을 인식하는 항체의 해리 상수를 측정함으로써 평가될 수 있다.

[0042] "차단 항체" 는, HLA-G 단백질과, 이의 수용체, 예를 들어 LILRB1 수용체 및/또는 LILRB2 수용체의 일부 또는 전부와와 상호작용을 억제하는 항체이다. 따라서, "차단" 은, 전형적으로 $\alpha 3$ 도메인을 통한 HLA-G 단백질과 이의 수용체와의 결합에 따른 생물학적 기능이, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편 존재 하에서 없어지거나 크게 약화되는 것을 의미한다. 이러한 맥락에서 언급되는 생물학적 기능은, 본원에 개시되고 문헌에서 평가된 바와 같이, $\alpha 3$ 도메인을 나타내는 HLA-G 단백질의 면역 억제 활성이다. 따라서, 항체 또는 항원 결합 단편은, 상기와 같은 HLA-G 단백질의 활성을 방해하고/하거나 이의 활성에 적어도 부분적으로 또는 완전히, 직접적으로 또는 간접적으로 대항하기 때문에, HLA-G 단백질의 안타고니스트 작용제, 또는 $\alpha 3$ 도메인을 갖는 HLA-G 단백질의 효과(들)의 안타고니스트 작용제라고 할 수 있다. 바람직하게는, 임의의 또는 모든 HLA-G 수용체와의 상호작용, 즉 결합의 감소는, 적어도 20%, 더욱 바람직하게는 적어도 30%, 더욱 바람직하게는 적어도 40%, 더욱 바람직하게는 적어도 50%, 더욱 바람직하게는 적어도 60%, 더욱 바람직하게는 적어도 70%, 더욱 바람직하게는 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%, 및 가장 바람직하게는 100% 이다. 활성은 당업계에 공지된 결합 검정으로 측정될 수 있다.

[0043] 용어 "Kabat 넘버링 (Kabat numbering)", "Kabat 정의 (Kabat definition)" 및 "Kabat 라벨링 (Kabat labeling)" 은, 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 당업계에서 인식되는 이러한 용어는, 항체 또는 이의 항원 결합 부분의 중쇄 및 경쇄 가변 영역에서의 다른 아미노산 잔기보다 더 가변적인 (즉, 초가변적인 (hypervariable)) 아미노산 잔기의 넘버링 시스템을 나타낸다 (Kabat et al. 1971; Kabat, et al. 1991).

[0044] 본원에 사용된 바, 용어 "CDR" 은, 항체 가변 서열 내 상보성 결정 영역을 나타낸다. 중쇄 및 경쇄의 각각의 가변 영역에는, 각각의 가변 영역에 대하여 CDR1, CDR2 및 CDR3 으로 지정된, 3 개의 CDR 이 존재한다. 본원에 사용된 바, 용어 "CDR 세트" 는, 항원에 결합할 수 있는 단일 가변 영역에서 발생하는 3 개의 CDR 의 그룹을 나타낸다. 이러한 CDR 의 정확한 경계는 상이한 시스템에 따라 상이하게 정의되었다. Kabat 에 의해 기재된 시스템 (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) 및 (1991)) 은, 항체의 임의의 가변 영역에 적용 가능한 모호하지 않은 잔기 넘버링 시스템을 제공할 뿐 아니라, 3 개의 CDR 을 정의하는 정확한 잔기 경계를 제공한다. 이러한 CDR 은 Kabat CDR 로서 언급될 수 있다. Chothia 와 동료들은 (Chothia et al, 1987 및 Chothia et al., 1989), Kabat CDR 내 특정 하위부분이, 아미노산 서열의 수준에서 큰 다양성을 가짐에도 불구하고, 거의 동일한 펩티드 백본 입체형태 (conformation) 를 채택하고 있다는 것을 발견하였다.

[0045] 본 발명의 항체의 "항원 결합 단편" 은, 항체의 일부, 즉 HLA-G 단백질의 $\alpha 3$ 도메인에 대한 항원 결합 능력을 나타내는, 본 발명의 항체의 구조의 일부에 상응하는 분자를 의미한다. 특정 구현예에서, 상기 단편은, 상

기 도메인에 대하여, 전체 항체 구조를 갖는 항체의 항원 결합 능력과 실질적으로 동일한 항원 결합 능력을 나타낸다. 항원 결합 능력은 표적화된 항원에 대한 항체 및 고려된 항원 결합 단편의 친화성을 측정함으로써 결정될 수 있다.

- [0046] 항체의 항원 결합 단편은, 면역원성 펩티드에 대한 인식 부위를 포함하는 CDR 또는 이의 부분(들)로 지정된 초가변 도메인을 포함하는 단편을 포함한다. 4-쇄 면역글로불린의 각각의 경쇄 및 중쇄 (각각 VL 및 VH) 는, 각각, VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3, 및 VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3 으로 지정된, 3 개의 CDR 을 갖는다. 따라서, 본 발명은, VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3, 및 VH-CDR1, VH-CDR2 및 VH-CDR3 중의 CDR, 또는 이의 기능성 부분, 즉 바람직하게는 HLA-G 단백질의 $\alpha 3$ 도메인에 대하여 높은 친화성을 갖는, 목적하는 결합 능력을 나타내는 부분 중에서 선택되는 것 또는 전부를 포함하거나 또는 이로 이루어진, 본 발명의 항체의 단편 (항원 결합 단편) 에 관한 것이다.
- [0047] 용어 "**모노클로날 항체**" 는, 이를 생산하는 방법에 의해서가 아니라, 임의의 진핵 생물, 원핵 생물 또는 파지 클론을 포함하는 단일 클론에서 유도된 항체를 나타낸다. 따라서, 하이브리도마 (hybridoma) 기술을 통해 생산되는 항체에 제한되는 것이 아니다.
- [0048] "**폴리클로날 (polyclonal) 혈청**" 은, 특정 항원에 대항하는 다수의 상이한 항체 또는 이의 단편의 이중 집단을 포함하는, 따라서 상기 특정 항원에서 발견되는 다수의 별개의 항원 결정기에 대하여 특이적인 혈청을 의미한다.
- [0049] 본원에 사용된 바, "**키메라 (chimeric) 항체**" 는, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부는 특정 종에서 유도되거나 또는 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체에서의 상응하는 서열과 동일하거나 상동이지만, 사슬(들)의 나머지는 또 다른 종에서 유도되거나 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체에서의 상응하는 서열과 동일하거나 상동인 항체 뿐 아니라, 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 상기와 같은 항체의 단편을 나타낸다. 본원에 사용된 바, "**인간화 항체**" 는 "키메라 항체"의 서브세트이다.
- [0050] 비(非)인간 (예를 들어, 쥐) 항체의 "**인간화**" 형태는, 비인간 면역글로불린에서 유도된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 하나의 구현예에서, 인간화 항체는, 수용자의 초가변 영역 (HVR) 으로부터 잔기가, 이의 표적에 대하여 목적하는 특이성, 친화성 및/또는 수용력을 갖는 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류와 같은 비인간 종 (공여자 항체) 의 HVR 로부터의 잔기로 대체된, 인간 면역글로불린 (수용자 항체) 이다. 일부 예에서, 인간 면역글로불린의 상보성 결정 영역의 잔기는 상응하는 비인간 잔기로 대체된다. 나아가, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 결합 친화성과 같은 항체 성능을 추가로 개선시킬 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 하나, 및 전형적으로 2 개의 가변 도메인을 실질적으로 전부 포함할 것이며, 여기서 초가변 루프의 전부 또는 실질적으로 전부는 비인간 면역글로불린 서열의 것들에 해당하고, 프레임워크 영역 (FR) 은 결합 친화성, 이성질체화, 면역원성 등과 같은 항체 성능을 개선시키는 하나 이상의 개별적인 FR 잔기 치환을 포함할 수 있지만, 프레임워크 영역 (FR) 의 전부 또는 실질적으로 전부는 인간 면역글로불린 서열의 것들에 해당한다. FR 에서 이러한 아미노산 치환의 수는 전형적으로 H 사슬에서는 6 개 초과이고, L 사슬에서는 3 개 이하이다. 인간화 항체는 임의로 또한 면역글로불린 불변 (constant) 영역 (Fc) 의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로불린의 적어도 일부를 포함할 것이다.
- [0051] "**인간 항체**" 는, 파지 디스플레이 라이브러리 (phage-display library) 를 비롯하여 당업계에서 공지된 인간 항체의 제조 기술 중 임의의 것을 사용하여 제조되고/되거나 인간에 의해 생산된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 보유하는 것이다. 인간 항체의 이러한 정의는 특히 비인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 배제한다.
- [0052] 2 개의 아미노산 서열의 "**백분율 동일성**" 은, Karlin 및 Altschul 의 알고리즘 (1990) (1993 년 Karlin 및 Altschul 에 의해 개정됨) 을 사용하여 결정될 수 있다. 상기와 같은 알고리즘은 Altschul 등 (1990) 의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램 (version 2.0) 으로 통합된다. BLAST 단백질 검색은 관심 단백질 분자와 상동인 아미노산 서열을 수득하기 위해 XBLAST 프로그램 (스코어=50, 단어 길이=3) 을 사용하여 수행될 수 있다. 갭이 2 개의 서열 사이에 존재하는 경우, 1997 년 Altschul 등에 의해 기재된 Gapped BLAST 가 이용될 수 있다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 이용하는 경우, 각각의 프로그램 (예를 들어, XBLAST 및 NBLAST) 의 디폴트 파라미터가 사용될 수 있다.
- [0053] "**보존적 치환**" 은, 변형이 이루어진 분자와 유사한 기능적 및 화학적 특징을 갖는 분자를 생산할 것이다.

예를 들어, "보존적 아미노산 치환" 은, 아미노산 잔기를, 해당 위치에서 아미노산 잔기의 극성 또는 전하에 영향을 미치지 않거나 거의 영향을 미치지 않는 또 다른 잔기로 치환하는 것을 포함할 수 있다. 목적하는 아미노산 치환 (보존적이든 비(非)보존적이든) 은 당업자에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 아미노산 치환은 분자 서열의 중요한 잔기를 동정하거나, 또는 본원에 기재된 분자의 친화성을 증가 또는 감소시키는데 사용될 수 있다. 하나 이상의 보존적 아미노산 치환을 포함하는 변이체는 당업자에게 공지된 폴리펩티드 서열을 변경하는 방법, 예컨대 이러한 방법을 편찬한 참조문헌에서 확인되는 바와 같은 방법에 따라 제조될 수 있다: 예를 들어 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989], 또는 [Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York]. 아미노산의 보존적 치환에는 하기 그룹 내 아미노산 중에서 이루어진 치환이 포함된다: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; 및 (g) E, D.

[0054] 용어 "대상", "개체" 및 "환자" 는, 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 치료를 위해 평가받고/받거나 치료되는 포유류를 나타낸다. 대상은 인간일 수 있으나, 또한 다른 포유류, 특히 인간 질환에 대한 실험실 모델로서 유용한 포유류, 예를 들어 마우스, 래트, 토끼, 개 등도 포함한다.

[0055] 용어 "치료" 또는 "치료하는" 은, 대상 (인간 포함) 이, 직접적으로 또는 간접적으로, 대상의 병태를 개선시킬 목적으로 의료적 도움을 받는 행위, 적용 또는 요법을 나타낸다. 특히, 일부 구현예에서, 상기 용어는 발병률의 감소, 또는 증상의 완화, 재발의 제거, 재발의 방지, 발병의 방지, 증상의 개선, 예후의 개선 또는 이들의 조합을 나타낸다. 당업자는, 치료가 반드시 증상의 완전한 부재 또는 제거를 초래하지 않는다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 암에 관하여, "치료" 또는 "치료하는" 은, 신생물 또는 악성 세포 성장, 증식 또는 전이를 늦추거나, 신생물 또는 악성 세포 성장, 증식 또는 전이의 발달을 방지 또는 지연시키는 것, 또는 이들의 일부 조합을 나타낼 수 있다.

[0056] **면역원성 펩티드**

[0057] 본 발명자들은 고전적 MHC 클래스 I 분자에 대한 교차-반응성이 없는, HLA-G 에 대하여 특이적인 항-HLA-G 항체를 개발하기 위한 면역원성 펩티드를 디자인하였다.

[0058] HLA-G 아미노산 서열은, 도 1a 에 제시된 바와 같이, 다른 MHC 클래스 I 분자 (HLA-E, A2, B7, B44 및 CW3) 와 상이하다. HLA-G 의 서열과 비교하여 MHC 클래스 I 서열의 아미노산에서의 변화는 회색으로 강조 표시되어 있으며, 이는 상이한 도메인 내 다수의 핫스팟 (hotspot) 을 나타낸다. 특히, HLA-G 에 대하여 고도로 특이적인 서열이 α3 도메인 내 194-197 위치에서 동정되었다. HLA-G α3 도메인의 이러한 부분은 HLA-G 와 이의 수용체 간의 상호작용에 필수적인 아미노산을 포함한다 (도 1a).

[0059] 이를 기반으로, 본 발명자들은, 서열 X1-THHPVFDYEATLR-X2 (SEQ ID NO: 49) 로 이루어진 면역원성 펩티드로서, 여기서 X1 은 부재이거나, 시스테인 또는 발린이거나, 또는 KTHV (SEQ ID NO: 50) 또는 CKTHV (SEQ ID NO: 51) 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 서열이고, X2 는 부재이거나 시스테인인 면역원성 펩티드를 디자인하였다.

[0060] 바람직한 구현예에서, 펩티드는 원형이고, 하기의 서열로 이루어지며,

[0061] a. CTHHPVFDYEATLRC (SEQ ID NO: 52),

[0062] b. CKTHVTHHPVFDYEATLRC (SEQ ID NO: 53),

[0063] 여기서 다이술피이드 결합은 N-말단과 C-말단 시스테인 잔기를 연결한다.

[0064] 또 다른 바람직한 구현예에서, 펩티드는 선형이고, 하기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 서열로 이루어진다:

[0065] THHPVFDYEATLR (SEQ ID NO: 54);

[0066] THHPVFDYEATLRC (SEQ ID NO: 55);

[0067] VTHHPVFDYEATLRC (SEQ ID NO: 56);

[0068] VTHHPVFDYEATLR (SEQ ID NO: 57);

[0069] CTHHPVFDYEATLR (SEQ ID NO: 58);

[0070] KTHVTHHPVFDYEATLR (SEQ ID NO: 59);

- [0071] KTHVTHHPVFDYEATLRC (SEQ ID NO: 60) 및
- [0072] CKTHVTHHPVFDYEATLR (SEQ ID NO: 61).
- [0073] 펩티드는 당업계에 공지된 임의의 기술, 예를 들어 화학적 합성 또는 재조합에 의해 생산될 수 있다.
- [0074] 또한, 상기 펩티드를 인코딩하는 핵산이 제공된다.
- [0075] 본 발명은 또한 핵산의 클로닝 및/또는 발현을 위한 벡터, 특히 숙주 세포에서 클로닝 및/또는 발현하는데 적합한 플라스미드에 관한 것이다. 특정 구현예에 있어서, 전사 및 발현을 위한 조절 서열이 부가될 수 있다.
- [0076] 재조합 발현 벡터는 전형적으로 구성적 또는 유도성인 프로모터 (promotor) 에 작동 가능하게 연결되어 발현되는 서열을 인코딩하는 핵산을 함유한다. 벡터는 원핵 생물, 진핵 생물 또는 둘 모두에서 복제 및 통합에 적합할 수 있다. 전형적인 벡터는 상기 면역원성 펩티드를 인코딩하는 핵산의 발현의 조절에 유용한 프로모터, 개시 서열, 및 전사 및 번역 터미네이터 (terminator) 를 함유한다. 벡터는 임의로 적어도 하나 독립적인 터미네이터 서열, 진핵 생물 및 원핵 생물 둘 모두에서 카세트의 복제를 허용하는 서열, 즉 셔틀 (shuttle) 벡터, 및 원핵 생물 및 진핵 생물계 둘 모두에 대한 선택 마커를 함유하는, 일반적인 발현 카세트를 함유한다.
- [0077] 하기에 보다 상세하게 기재되는 바와 같이, 면역원성 펩티드는 면역화에 의한 항-HLA-G 항체의 생산에 유용하다.
- [0078] **항-HLA G 항체**
- [0079] 본 발명은 상기 정의된 면역원성 펩티드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다.
- [0080] 본 발명의 항-HLA-G 항체는 모두 HLA-G 단백질의 $\alpha 3$ 도메인을 인식한다.
- [0081] 특정 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 HLA-G 를 발현하는 세포에서 자연적으로 발견되는 바와 같은 입체형태를 갖는 HLA-G 단백질의 $\alpha 3$ 도메인에 특이적으로 결합한다. 즉, 본 발명의 상기와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 HLA-G 를 발현하는 세포에서 자연적으로 발견되는 바와 같은 HLA-G 의 $\alpha 3$ 도메인의 특정 에피토프를 인식한다.
- [0082] 본 발명의 목적은, $\alpha 3$ 도메인과 회합된 HLA-G 동형체를 인식하거나, 또는 $\alpha 3$ 도메인을 포함하는 HLA-G 동형체에 대하여 특이적인 항-HLA-G 항체를 생산하는 것이다. 따라서, HLA-G 단백질에 대한 결합이 언급될 때, 본 발명은 특히 $\alpha 3$ 도메인을 나타내는 HLA-G 동형체에 대한 결합에 관한 것이다.
- [0083] 특정 구현예에서, HLA-G 의 가용성 형태를 인식하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공된다.
- [0084] 또 다른 구현예에서, HLA-G 의 막 고정된 형태를 인식하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공된다.
- [0085] 가장 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항체는 선형 형태 또는 원형 형태의 면역원성 펩티드 뿐 아니라, 가용성 형태의 HLA-G 단백질 및 세포 표면에 있는 HLA-G 단백질 (즉 천연 입체형태) 을 인식한다.
- [0086] 상기 언급된 바와 같이, HLA-G 단백질은 소위 동형체로 불리는, 몇 가지 구조 (또는 3 차원) 형태로 발견될 수 있다. HLA-G1 및 HLA-G5 는, 각각, $\beta 2$ -마이크로글로불린 단백질과 회합되거나 회합되지 않은 것으로 발견되는, 막 결합된 또는 분비된 HLA-G 단백질이다. 대조적으로, HLA-G2, HLA-G3 및 HLA-G4 는, 동시에 $\alpha 2$ 및 $\alpha 3$ 도메인을 모두 나타내지 않는, 막 결합된 HLA-G 단백질 동형체이다. HLA-G1 동형체는 또한 세포 표면에서 이량체성 형태로 발견될 수 있다. HLA-G6 및 HLA-G7 는, 또한 동시에 $\alpha 2$ 및 $\alpha 3$ 도메인을 모두 나타내지 않는, 분비된 HLA-G 단백질 동형체이다.
- [0087] 유리하게는, 본 발명의 항-HLA-G 항체는 $\alpha 3$ 도메인을 나타내는 HLA-G 의 모든 동형체를 인식한다.
- [0088] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, HLA-G1, HLA-G2, HLA-G5 및 HLA-G6 (단량체성 및 이량체성 동형체) 중에서 선택되는 HLA-G 단백질 동형체 중 적어도 하나 또는 몇 개에 결합한다.
- [0089] 특정 구현예에서, 본 발명의 항-HLA-G 항체는 $\beta 2$ -마이크로글로불린 단백질과 회합되는지 여부에 관계없이, HLA-G 단백질을 인식한다.
- [0090] 하지만, 일부 경우, HLA-G 단백질에 회합된 것으로 발견될 수 있는 $\beta 2$ -마이크로글로불린 단백질은, HLA-G 단백질의 모든 동형체에 체계적으로 존재하지 않는다. 상기 상세화된 바와 같이, 회합된 $\beta 2$ -마이크로글로불린

단백질의 존재는 또한 LILRB2 억제 수용체에 대한 HLA-G 단백질의 결합을 가능하게 하는데 필수적이지 않다.

- [0091] 따라서, 본 발명의 맥락 내에서, " β 2-마이크로글로불린 유리된 HLA-G 단백질"은, β 2-마이크로글로불린 단백질과 회합되지 않은 HLA-G 단백질에 관한 것이다. " β 2-마이크로글로불린 유리된 절단된 HLA-G 단백질 동형체" 또는 " α 3 도메인을 나타내는 β 2-마이크로글로불린 유리된 절단된 HLA-G 단백질 동형체"는, β 2-마이크로글로불린 단백질과 회합되어 있지 않고, HLA-G 단백질에서 발견될 수 있는 모든 도메인을 나타내지 않는 HLA-G 단백질을 언급하는 것이다.
- [0092] 본 발명의 특정 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, HLA-G, 특히 β 2-마이크로글로불린 유리된 HLA-G, 즉 α 3 도메인을 나타내는 β 2-마이크로글로불린 유리된 HLA-G 또는 α 3 도메인을 나타내는 β 2-마이크로글로불린 유리된 절단된 HLA-G 에 존재할 때, α 3 도메인에 특이적으로 결합한다.
- [0093] 특정 구현예에서, 이러한 단백질이 단량체성 또는 이량체성 형태일 때, HLA-G 단백질의 α 3 도메인에 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공된다.
- [0094] 특정 구현예에 있어서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 둘 모두, 상기 단백질이 단량체성 및/또는 이량체성 형태일 때, HLA-G 단백질의 α 3 도메인에 결합하고, β 2-마이크로글로불린 단백질이 회합되는지 여부에 관계없이, HLA-G 단백질에 존재할 때, α 3 도메인에 결합한다.
- [0095] 본 발명의 특정 구현예의 예시를 목적으로, 상기 항체의 CDR 을 포함하는 가변 도메인을 함유하는 항체의 항원 결합 단편은, Fv, dsFv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ (이는 Kabat 및 또한 Roitt I. 등 (Fundamental and Applied Immunology MEDSI/McGraw-Hill) 의 참고문헌에 잘 정의되어 있음) 를 포함한다. Fv 단편은 소수성 상호작용에 의해 함께 회합된 항체의 VL 및 VH 도메인으로 이루어지며, dsFv 단편에서, VH:VL 이중이량체는 다이슬라이드 결합에 의해 안정화되고; scFv 단편에서, VL 및 VH 도메인은 가요성 펩티드 링커를 통해 서로 연결되어 단일 사슬 단백질을 형성한다. Fab 단편은 항체의 파파인 소화에 의해 수득 가능한 단량체성 단편이며; 이는 다이슬라이드 결합을 통해 함께 결합된, 전체 L 사슬 및 H 사슬의 VH-CH1 단편을 포함한다. F(ab')₂ 단편은 힌지 (hinge) 다이슬라이드 아래 항체의 펩신 소화에 의해 생산될 수 있으며; 이는 2 개의 Fab' 단편, 및 부가적으로 면역글로불린 분자의 힌지 영역의 일부를 포함한다. Fab' 단편은 힌지 영역에서 다이슬라이드 결합을 절단함으로써 F(ab')₂ 단편으로부터 수득 가능하다. F(ab')₂ 단편은 2가이며, 즉 이는 천연 면역글로불린 분자와 같이 2 개의 항원 결합 부위를 포함하며; 한편, Fv (Fab 의 가변 부분을 구성하는 VH-VL 이량체), dsFv, scFv, Fab 및 Fab' 단편은 1가이며, 즉 이는 단일 항원 결합 부위를 포함한다.
- [0096] 가장 바람직한 구현예에서, scFv 단편이 제공된다.
- [0097] VH-CDR3 및/또는 VL-CDR3 또는 이의 기능성 부분을 포함하거나 이로 이루어지는 단편은, CDR3 영역이 항원 인식 특이성에서 결정적인 것으로 보이는 경우 특히 바람직하다. 특정한 항원 결합 단편은 항체의 VH 및/또는 VL 의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함한다.
- [0098] 본 발명의 이러한 항원 결합 단편은 디아바디, 트리아바디 또는 테트라바디와 같은 다가 항원 결합 단편을 수득하기 위해 함께 조합될 수 있다. 이러한 다가 항원 결합 단편은 또한 본 발명의 일부이다.
- [0099] 동일하거나 상이한 항원 상의 2 개의 상이한 에피토프를 동시에 결합할 수 있는, 이중특이적 또는 다중특이적 항체가 또한 포함된다. 이중특이적 또는 다중특이적 항체는, 2 개의 항체의 화학적 컨주게이션, 2 개의 항체 생산 세포주의 융합, 또는 재조합 이중특이적 또는 다중특이적 항체 분자를 유도하는 유전자적 접근법과 같은 상이한 생화학적 방법으로 수득될 수 있다.
- [0100] 본 발명의 특정 구현예에서, 본 발명의 항체는 모노클로날 항체이다. 따라서, 본 발명은 또한 모노클로날 항체에 관한 것으로, 이는 이러한 항체의 조성물이, 항원 결합 특이성의 관점에서, 및 따라서 가변 영역 조성의 관점에서 동일한 항체를 포함한다는 것을 의미한다.
- [0101] 본 발명의 추가의 구현예에서, 폴리클로날 혈청으로서 제공되거나 폴리클로날 혈청으로부터 정제된, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공된다.
- [0102] 본 발명에 있어서, 항체는 비인간 포유류 항체, 예를 들어 쥐와 항체, 또는 키메라 항체일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 항체는 인간화될 수 있다. 특정 구현예에서, 인간 항체가 포함된다.
- [0103] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 또한 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 기능적으로 상이한 분자와 컨주게이션된, 본원에 제공된 임의의 정의에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 구성체 (construct) 에

관한 것이다.

- [0104] 본 발명의 구성체는 화학적 또는 생물학적 기 또는 분자, 생체내 프로테아제 절단에 대한 보호, 항체 또는 항원 결합 단편의 안정성 및/또는 반감기의 개선에 적합한 보호 기 또는 분자, 생물학적 활성 분자, 특히 치료적 활성 성분, 예를 들어 독소 또는 세포독성제, 인체의 특정 세포 또는 조직에 대한 항체 또는 항원 결합 단편의 표적화에 적합한 벡터 (특히 단백질 벡터 포함), 또는 라벨, 예를 들어 방사성 원소 (radioelement), 또는 링커 (특히 항체의 단편이 사용되는 경우) 와의 화학적 결합, 그래프팅, 공유결합적 부착을 포함하는 임의의 적합한 형태의 부착으로부터 유래된 컨쥬게이트 또는 융합 단백질일 수 있다.
- [0105] 바람직한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 예가 이하에 기재된다.
- [0106] 특정 구현예에서, 하기를 포함하는 항-HLA-G 항체가 제공된다:
- [0107] (a) SEQ ID NO: 8 의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HC CDR1), 및/또는 SEQ ID NO: 10 의 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HC CDR2), 및/또는 SEQ ID NO: 12 의 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HC CDR3) 을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH); 및/또는
- [0108] (b) SEQ ID NO: 2 의 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LC CDR1), 및/또는 서열 KVS 의 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LC CDR2), 및/또는 SEQ ID NO: 5 의 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LC CDR3) 을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL).
- [0109] 바람직하게는, 상기와 같은 항체는 하기를 포함한다:
- [0110] (a) SEQ ID NO: 8 의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HC CDR1), SEQ ID NO: 10 의 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HC CDR2), 및 SEQ ID NO: 12 의 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HC CDR3) 을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH); 및/또는
- [0111] (b) SEQ ID NO: 2 의 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LC CDR1), 서열 KVS 의 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LC CDR2) 및 SEQ ID NO: 5 의 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LC CDR3) 을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL).
- [0112] 보다 바람직하게는, 상기와 같은 항체는 하기를 포함할 수 있다:
- [0113] (a) SEQ ID NO: 64, 또는 SEQ ID NO: 64 와 80% 초과, 바람직하게는 90% 초과, 보다 바람직하게는 95% 초과와 동일성을 나타내는 상동 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH); 및/또는
- [0114] (b) SEQ ID NO: 63, 또는 SEQ ID NO: 63 과 80% 초과, 바람직하게는 90% 초과, 보다 바람직하게는 95% 초과와 동일성을 나타내는 상동 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL).
- [0115] 특정 구현예에서, 상동 서열은 아미노산의 구성적 치환에 의해서만 상이하다.
- [0116] 또 다른 구현예에서, 상동 서열은 인간화 서열이다.
- [0117] 특정 양태에서, 항체는, SEQ ID NO: 64 를 포함하는 가변 영역 (VH) 을 비롯한 2 개의 중쇄; 및 SEQ ID NO: 63 을 포함하는 가변 영역 (VL) 을 비롯한 2 개의 경쇄를 포함하는, 전장 면역글로불린 G 이다. 상기와 같은 항체는 15E7 로 명명되며, 실험 섹션에 보다 상세하게 기재되어 있다.
- [0118] 또 다른 특정 구현예에서, 하기를 포함하는 항체가 제공된다:
- [0119] (a) SEQ ID NO: 23 의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HC CDR1), 및/또는 SEQ ID NO: 25 의 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HC CDR2), 및/또는 SEQ ID NO: 27 의 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HC CDR3) 를 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH); 및/또는
- [0120] (b) SEQ ID NO: 15 의 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LC CDR1), 및/또는 서열 KVS 의 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LC CDR2), 및/또는 SEQ ID NO: 18 의 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LC CDR3) 을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL).
- [0121] 바람직하게는, 상기와 같은 항체는 하기를 포함한다:
- [0122] (a) SEQ ID NO: 23 의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HC CDR1), SEQ ID NO: 25 의 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HC CDR2), 및 SEQ ID NO: 27 의 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HC CDR3) 을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH); 및/또는
- [0123] (b) SEQ ID NO: 15 의 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LC CDR1), 서열 KVS 의 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LC CDR2), 및 SEQ ID NO: 18 의 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LC CDR3) 을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL).
- [0124] 보다 바람직하게는, 상기와 같은 항체는 하기를 포함할 수 있다:
- [0125] (a) SEQ ID NO: 67, 또는 SEQ ID NO: 67 과 80% 초과, 바람직하게는 90% 초과, 보다 바람직하게는 95% 초과와

동일성을 나타내는 상동 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH); 및/또는

(b) SEQ ID NO: 65, 또는 SEQ ID NO: 65 와 80% 초과, 바람직하게는 90% 초과, 보다 바람직하게는 95% 초과
동일성을 나타내는 상동 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL).

특정 구현예에서, 상동 서열은 아미노산의 구성적 치환에 의해서만 상이하다.

또 다른 구현예에서, 상동 서열은 인간화 서열이다.

바람직한 양태에서, SEQ ID NO: 67 을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 SEQ ID NO: 65 를 포함하는 경쇄 가변
영역 (VL) 을 포함하는, scFv 가 제공된다. 상기와 같은 scFv 단편은 R4C-C3 으로 명명되며, 실험 섹션에
보다 상세하게 기재되어 있다.

또 다른 특정 구현예에서, 하기를 포함하는 항체가 제공된다:

(a) SEQ ID NO: 23 의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HC CDR1), 및/또는 SEQ ID NO: 25 의 중쇄 상보성 결정 영역
2 (HC CDR2), 및/또는 SEQ ID NO: 27 의 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HC CDR3) 을 포함하는 중쇄 가변 영역
(VH); 및/또는

(b) SEQ ID NO: 15 의 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LC CDR1), 및/또는 서열 KVS 의 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LC
CDR2), 및/또는 SEQ ID NO: 20 의 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LC CDR3) 을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL).

바람직하게는, 상기와 같은 항체는 하기를 포함한다:

(a) SEQ ID NO: 23 의 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HC CDR1), SEQ ID NO: 25 의 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HC
CDR2), 및 SEQ ID NO: 27 의 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HC CDR3) 을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH); 및/또는

(b) SEQ ID NO: 15 의 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LC CDR1), 서열 KVS 의 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LC CDR2),
및 SEQ ID NO: 20 의 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LC CDR3) 을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL).

보다 바람직하게는, 상기와 같은 항체는 하기를 포함할 수 있다:

(a) SEQ ID NO: 67, 또는 SEQ ID NO: 67 과 80% 초과, 바람직하게는 90% 초과, 보다 바람직하게는 95% 초과
동일성을 나타내는 상동 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH); 및/또는

(b) SEQ ID NO: 66, 또는 SEQ ID NO: 66 과 80% 초과, 바람직하게는 90% 초과, 보다 바람직하게는 95% 초과
동일성을 나타내는 상동 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL).

특정 구현예에서, 상동 서열은 아미노산의 구성적 치환에 의해서만 상이하다.

또 다른 구현예에서, 상동 서열은 인간화 서열이다.

또 다른 양태에서, SEQ ID NO: 67 을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 SEQ ID NO: 66 을 포함하는 경쇄 가변
영역 (VL) 을 포함하는, scFv 가 제공된다. 상기와 같은 scFv 단편은 R5C-D8 로 명명된다.

항체의 가변 영역의 서열은 서열 목록에 열거되어 있고, 하기와 같이 기재된다.

항체 15E7 의 VL k 사슬:

FR1: DVLMTQIPFSLPVS LGDQASISCRSS (SEQ ID NO: 1)

CDR1: QSI VHRSGNTY (SEQ ID NO: 2)

FR2: LEWYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO: 3)

CDR2: KVS

FR3: NRFSGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDLGVYYC (SEQ ID NO: 4)

CDR3: FQGSHLPPT (SEQ ID NO: 5)

FR4: FGGTTLEIK (SEQ ID NO: 6)

항체 15E7 의 VH 사슬:

FR1: QVQLQQPAELVRPGSSVKLSCKAS (SEQ ID NO: 7)

- [0153] CDR1: GYTFTDYW (SEQ ID NO: 8)
- [0154] FR2: MDWVKQRPQGQLEWIGT (SEQ ID NO: 9)
- [0155] CDR2: IYPSDSST (SEQ ID NO: 10)
- [0156] FR3: HYNQEFKGGKATMTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYC (SEQ ID NO: 11)
- [0157] CDR3: AREGLAGVFYFDY (SEQ ID NO: 12)
- [0158] FR4: WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 13)
- [0159] **scFv R4C-C3 의 VL κ 사슬**
- [0160] FR1: DVLMTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSS (SEQ ID NO: 14)
- [0161] CDR1: QSLVHSNGNTY (SEQ ID NO: 15)
- [0162] FR2: LHWYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO: 16)
- [0163] CDR2: KVS
- [0164] FR3: NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC (SEQ ID NO: 17)
- [0165] CDR3: SQSTHFPPT (SEQ ID NO: 18)
- [0166] FR4: FGGGTKLEII (SEQ ID NO: 19)
- [0167] **scFv R5C-D8 의 VL κ 사슬**
- [0168] FR1: DVLMTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSS (SEQ ID NO:14)
- [0169] CDR1:QSLVHSNGNTY (SEQ ID NO:15)
- [0170] FR2:LHWYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:16)
- [0171] CDR2: KVS
- [0172] FR3: NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC (SEQ ID NO:17)
- [0173] CDR3: SQSTHVPPT (SEQ ID NO:20)
- [0174] FR4: FGAGTKLELK (SEQ ID NO:21)
- [0175] **scFv 의 R4C-C3 & R5C-D8 의 VH 사슬**
- [0176] FR1: QVQLKQSGPQLVRPGASVKIPCKAS (SEQ ID NO: 22)
- [0177] CDR1:GYSFTNYW (SEQ ID NO: 23)
- [0178] FR2:MHWVKQRPQGQLEWIGM (SEQ ID NO: 24)
- [0179] CDR2: IAPSDSDS (SEQ ID NO: 25)
- [0180] FR3: RLNQNFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYC (SEQ ID NO: 26)
- [0181] CDR3: AREGVTMITTGLDY (SEQ ID NO: 27)
- [0182] FR4: WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 28)
- [0183] 부가적인 항체 (N27F12 및 N38F4 로 명명됨) 및 scFv (3157-C57-R6B-C10, 3157-C57-R6B-G3 및 3157-C57-R6B-H10 으로 명명됨) 이 생산되었다. 상기 부가적인 항체 및 scFv 의 가변 영역의 서열은 서열 목록에 열거되어 있고, 하기와 같이 기재된다.
- [0184] 항체 N27F12 의 VL κ 사슬:
- [0185] FR1: ENVLTQSPAIMAASLGEKVTMTCSAS (SEQ ID NO: 68)
- [0186] CDR1: SSVSSNF (SEQ ID NO: 69)

[0187]	FR2: LHWYQQKSGTSPKLWIY (SEQ ID NO: 70)
[0188]	CDR2: GTS
[0189]	FR3: NLASGVPARFSGSGTGISYSLTVSNMEAENDAAYYC (SEQ ID NO: 71)
[0190]	CDR3: QQWNAYPFT (SEQ ID NO: 72)
[0191]	FR4: FGAGTKLELK (SEQ ID NO: 21)
[0192]	항체 N27F12 의 VH 사슬:
[0193]	FR1: EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVAS (SEQ ID NO: 73)
[0194]	CDR1: GFTFSSYW (SEQ ID NO: 74)
[0195]	FR2: LSWVRQSPEKGLEWVAE (SEQ ID NO: 75)
[0196]	CDR2: VRLKSDNYAT (SEQ ID NO: 76)
[0197]	FR3: SYAESVKGKFTISRDDANSRLYLQMNSLRPEDTGIYYC (SEQ ID NO: 77)
[0198]	CDR3: TTGDY (SEQ ID NO: 78)
[0199]	FR4: WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 13)
[0200]	항체 N38F4 의 VL κ 사슬:
[0201]	FR1: DVVMTQIPLSLPVSLGDQASISCRSS (SEQ ID NO: 79)
[0202]	CDR1: QSLVNSNGNTL (SEQ ID NO: 80)
[0203]	FR2: LHWYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO: 16)
[0204]	CDR2: KVS
[0205]	FR3: NRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGVIYFC (SEQ ID NO: 17)
[0206]	CDR3: SQSTHVPWT (SEQ ID NO: 81)
[0207]	FR4: FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 82)
[0208]	항체 N38F4 의 VH 사슬:
[0209]	FR1: EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVAS (SEQ ID NO: 73)
[0210]	CDR1: GLTFSSYW (SEQ ID NO: 83)
[0211]	FR2: MSWVRQSPEKGLEWVAE (SEQ ID NO: 84)
[0212]	CDR2: IRLRSDNYVK (SEQ ID NO: 85)
[0213]	FR3: QYADSVKGRFTISRDDSKGRLYLQMNRLRGDDTGIYFC (SEQ ID NO: 86)
[0214]	CDR3: TTGDY (SEQ ID NO: 78)
[0215]	FR4: WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 13)
[0216]	scFv 3157-C57-R6B-C10 및 3157-C57-R6B-G3 의 VL κ 사슬:
[0217]	FR1: DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS (SEQ ID NO: 14)
[0218]	CDR1: QTIVHSNGNTY (SEQ ID NO: 87)
[0219]	FR2: LEWYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO: 3)
[0220]	CDR2: KVS
[0221]	FR3: NRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGVIYFC (SEQ ID NO: 4)
[0222]	CDR3: FQGSHVPPT (SEQ ID NO: 88)

- [0223] FR4: FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 82)
- [0224] scFv 3157-C57-R6B-C10 의 VH 사슬:
- [0225] FR1: EVQLQQSGAELVKPGTSVKLSCKAS (SEQ ID NO: 89)
- [0226] CDR1: GYTFTRNW (SEQ ID NO: 90)
- [0227] FR2: ITWVRLRPGQGLEWIGD (SEQ ID NO: 91)
- [0228] CDR2: IYPGDAST (SEQ ID NO: 92)
- [0229] FR3: HYNGKFKNKATLTVDTSSSTAYLQVSSLTSEDSAVYYC (SEQ ID NO: 93)
- [0230] CDR3: AREQVQFAMFFDV (SEQ ID NO: 94)
- [0231] FR4: WGTGATVTVSS (SEQ ID NO: 95)
- [0232] scFv 3157-C57-R6B-G3 의 VH 사슬:
- [0233] FR1: QVQLQQPRAELVKPGASVKMSCKAS (SEQ ID NO: 96)
- [0234] CDR1: GYTFARYW (SEQ ID NO: 97)
- [0235] FR2: ISWLKL RPGQGLEWIGD (SEQ ID NO: 98)
- [0236] CDR2: IYPGDDST (SEQ ID NO: 99)
- [0237] FR3: HYNGKFKNKATLTVDTSTSTAYIQLSSLTSEDSAVYYC (SEQ ID NO: 100)
- [0238] CDR3: AREQVQFAMFFDV (SEQ ID NO: 94)
- [0239] FR4: WGTGATVTVSS (SEQ ID NO: 95)
- [0240] scFv 3157-C57-R6B-H10 의 VL κ 사슬:
- [0241] FR1: DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS (SEQ ID NO: 14)
- [0242] CDR1: QSI VHSNGNTY (SEQ ID NO: 101)
- [0243] FR2: LEWYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO: 3)
- [0244] CDR2: KVS
- [0245] FR3: NRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLG VYYC (SEQ ID NO: 4)
- [0246] CDR3: FQGSHPPT (SEQ ID NO: 88)
- [0247] FR4: FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 82)
- [0248] scFv 3157-C57-R6B-H10 의 VH 사슬:
- [0249] FR1: QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKAS (SEQ ID NO: 7)
- [0250] CDR1: GYTFTDYW (SEQ ID NO: 8)
- [0251] FR2: MDWVKRPGQGLEWIGT (SEQ ID NO: 9)
- [0252] CDR2: IYPSDSST (SEQ ID NO: 10)
- [0253] FR3: HYNQEFKGKATMTVDKSSSTAYMHLGSLTSEDSAVYYC (SEQ ID NO: 102)
- [0254] CDR3: AREGLAGVFYFDY (SEQ ID NO: 12)
- [0255] FR4: WQGQTTLTVSS (SEQ ID NO: 13)
- [0256] 본 개시는 또한 항체의 개선된 생물학적 특성, 예컨대 보다 높은 결합 친화성을 갖는, 상기 바람직한 항체의 항체 변이체를 제공한다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체 핵산으로의 적절한 뉴클레오티드 변화 도입에 의해, 또는 펩티드 합성을 통해 제조될 수 있다. 상기과 같은 변형에는, 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 잔기에의 삽입 및/또는 잔기의 치환이 포함된다. 최종 구성체가 목적하는 특징을

보유하는 한, 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 최종 구성체를 달성하기 위해 이루어질 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체를 인코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 이러한 방법에는, 비제한적으로, 항체의 초기 제조된 변이체 또는 비변이체 (천연) 버전의, 올리고뉴클레오타이드-매개 (또는 부위-지향) 돌연변이 유발, PCR 돌연변이 유발, 및 카세트 돌연변이 유발이 포함된다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 항체의 평형 해리 상수 (K_D) 값은 10^{-8} M 미만, 특히 10^{-9} M 또는 10^{-10} M 미만이다. 결합 친화성은 ELISA 또는 생물특이적 상호작용 분석, 또는 당업계에 공지된 다른 기술과 같은 당업계에 공지된 기술을 사용하여 결정될 수 있다.

[0257] 본원에 기재된 임의의 항체는 항원 결합 활성, 항원 결합 특이성 및 생물학적 기능과 같은 이의 특성을 결정하기 위해, 통상적인 방법에 따라 시험될 수 있다.

[0258] 본원에 기재된 임의의 항체는 당업계에 공지되고 용이하게 입수 가능한 부가적인 비(非)단백질성 모이어티를 함유하도록, 예를 들어 폐길화, 글리코실화 등에 의해 변형될 수 있다. 혈청 반감기를 향상시킬 수 있는 변형이 관심 대상이다.

[0259] 면역화에 의한 항-HLA-G 항체의 생산

[0260] 본 발명의 일 양태에서, 상기 기재된 면역원성 펩티드는 HLA-G 단백질의 $\alpha 3$ 도메인에 대하여 특이적인 항체를 생산하기 위한 면역원으로서 유용할 수 있다.

[0261] 예시의 목적으로, 따라서 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 상기 기재된 바와 같은 면역원성 펩티드를 이용한, 포유류, 특히 설치류, 특히 마우스 또는 래트의 면역화를 통해 획득될 수 있다. 다양한 포유류 유전자형이 포유류의 면역화를 통해 본 발명을 구현하는데 적합하다는 결론을 얻을 수 있다.

[0262] 면역화 프로토콜은 하기에 보다 상세하게 기재되는 바와 같은, 프라이밍 (priming) 및 부스팅 (boosting) 단계를 포함할 수 있다.

[0263] 따라서, 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 생산 방법에 관한 것이다:

[0264] a. 비인간 동물에, 상기 기재된 바와 같은 면역원성 펩티드를 투여하는 단계,

[0265] b. 동물에서 획득된 혈청 또는 혈장 샘플로부터 유도된 항체를 회수하고, HLA-G 단백질의 $\alpha 3$ 도메인에 대한 이의 특이성을 확인하는 단계, 및

[0266] c. 임의로, 회수된 항체를 클로닝하는 단계, 및

[0267] d. 임의로, 회수된 항체로부터 항원 결합 단편을 제조하는 단계.

[0268] 투여, 생성된 항체 또는 항원 결합 단편의 회수, 및 후속 클로닝은 당업계에서 통상적인 방법을 통해 달성될 수 있다. 예를 들어 진보된 시퀀싱 방법을 사용하는, 클로닝 전 특징분석 방법이 또한 당업계에 널리 공지되어 있다.

[0269] 회수된 항체로부터의 항원 결합 단편의 제조는 또한 당업계에서 통상적인 방법, 특히 고속 처리 합성 기술을 통해 달성될 수 있다.

[0270] 항체 또는 항원 결합 단편 생산을 위한 숙주 동물은, 인간을 배제한 포유류, 특히 설치류, 특히 마우스일 수 있다.

[0271] 특정 구현예에 있어서, 본원에 개시된 생산 방법은 또한 본 발명의 항체의 생산에 사용되는 숙주 동물을 희생시키는 단계를 포함한다.

[0272] 특정 구현예에 있어서, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 생산 방법은, 단계 a. 에서, 아쥘반트 (adjuvant) 의 동시 투여를 포함하며, 여기서 아쥘반트는 투여된 항원(들) 또는 면역원성 항원 단편(들)과 조합으로 사용되는 경우, 항원-특이적 면역 반응을 보조, 촉진, 연장 또는 증강시키는 작용을 하는 임의의 성분, 특히 화합물로서 정의된다. 아쥘반트는 마찬가지로 면역화 (또는 백신접종) 및 면역 요법 분야에 널리 공지되어 있다.

[0273] 특정 구현예에 있어서, 상기 개시된 방법의 단계 a. 에 따른 투여는, 활성 면역원성 작용제의 제 1 투여 (프라이밍 면역화 또는 프라이밍 투여), 및 이어서 면역화 프로토콜의 과정에서 제 1 투여와 시간적으로 분리되어 있는,

적어도 1 회 추가의 투여 (부스트 면역화 또는 부스트 투여) 를 실시하는, 프라임-부스트 면역화 프로토콜을 사용하여 수행된다. 부스트 면역화는 1 회, 2 회, 3 회 또는 그 이상의 투여를 포함한다.

- [0274] 특정 구현예에서, 사용된 프라임-부스트 면역화 프로토콜은 동종 또는 이종의 면역화 프로토콜이며, 이는 투여된 활성 면역원성 성분 (예를 들어 항체 또는 단편) 이, 프라임 및 부스트 투여에서, 각각, 동일하거나 상이하다는 것을 의미한다.
- [0275] 특정 구현예에서, 상기 언급된 방법의 단계 a. 에서의 활성 면역원성 성분의 투여 (프라임 투여가 수행되는 경우 및/또는 부스트 면역화가 수행되는 경우 포함) 는, 아쥘반트, 예를 들어 프로인트 (Freund) 아쥘반트와 동시에 이루어진다. 아쥘반트는 물론 당업계에 공지된 물질이다.
- [0276] 특정 구현예에서, 아쥘반트 투여는, 특히 폴리펩티드 또는 이의 면역원성 단편이 면역화에 사용되는 경우, 프라임 및 부스트 면역화 둘 모두에서 수행된다.
- [0277] 면역화를 사용하여 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 것을 목표로 하는 면역화 프로토콜을 디자인하기 위한 기초로서 간주되거나 그 자체로 사용될 수 있는 면역화 프로토콜의 세부사항은, 하기 실시예 섹션에 제시되어 있다.
- [0278] 또 다른 구현예에서, 포유류는, 예를 들어 DNA 면역화에 의해, 상기 면역원성 펩티드를 인코딩하는 핵산 또는 벡터로 면역화된다.
- [0279] DNA 를 세포외 공간으로 전달하는, 식염수 중의 핵산 또는 벡터의 근육내 또는 피내 주사와 같은, DNA 면역화를 위한 몇 가지 전달 방법이 통상적으로 이용 가능하다. 이러한 방법은 세포(들) 막(들)을 일시적으로 투과하기 위해 생물학적 조직의 전기적 자극을 사용하는, "전기천공법 (electroporation)" 에 의해 보조될 수 있다. 대안적으로, "유전자-총 (gene-gun) 전달" 이 사용될 수 있으며, 이는 DNA 를 세포(들) 세포질로 직접 전달하는 것을 가능하게 하는, 발리스틱 디바이스 (ballistic device) 를 이용하여, 플라스미드-코팅된 금 입자를 피부에 퍼붓는 것을 포함한다. 대안적으로, 플라스미드 DNA 를 표피 및 진피의 세포 내로 강제로 넣기 위해 압축을 필요로 하는, "무바늘 디바이스 (needle free device)" 가 사용될 수 있다.
- [0280] 폴리클로날 항체 제조의 경우, 혈청을 면역화된 비인간 동물로부터 수득하고, 그 안에 존재하는 항체를 널리 공지된 기술로 분리한다. 혈청은, 항 HLA-G 항체를 수득하기 위해, 고체 지지체와 연결된 상기 기재된 면역원성 펩티드를 사용하여 친화성 정제될 수 있다.
- [0281] 대안적인 구현예에서, 비면역화된 비인간 포유류로부터의 림프구를 분리하고, 시험관내에서 성장시킨 후, 세포 배양에서 면역원에 노출시킨다. 이어서, 림프구를 채취하고, 하기 기재되는 융합 단계를 수행한다.
- [0282] 모노클로날 항체의 경우, 다음 단계는, 면역화된 비인간 포유류로부터의 비장세포의 분리, 및 [Harlow et al., 1988; Hammerling, et al, 1981] 에 기재된 바와 같이 항체 생산 하이브리도마를 형성하기 위한 비장세포와 불멸화된 (immortalized) 세포의 후속 융합이다.
- [0283] 대안적으로, 본 발명의 모노클로날 항체 또는 이의 단편은, 재조합 및 파지 디스플레이 기술, 또는 이들의 조합을 비롯한, 임의의 다른 공지된 기술을 사용하여 제조될 수 있다.
- [0284] 모노클로날 항체 또는 이의 단편의 재조합 생산에는, 하기 기재되는 바와 같이, 적합한 숙주 세포에서 항체 또는 이의 단편을 인코딩하는 핵산을 발현시키는 것을 포함한다.
- [0285] **항-HLA-G 항체의 재조합 생산**
- [0286] 본 발명은 또한, 본원에 개시된 바와 같은, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 인코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다.
- [0287] 특히, 상기 기재된 바와 같은 항-HLA-G 항체의, 항체 중쇄 가변 영역 (VH), 항체 경쇄 가변 영역 (VL) 또는 둘 모두를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산이 제공된다.
- [0288] 본원에 기재된 CDR 의 뉴클레오티드 서열은 용이하게 디자인 또는 시퀀싱될 수 있다.
- [0289] 예시의 목적으로, 모노클로날 항체 15E7 의 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열은, 각각, 도 2a 및 3a 에 제시된, SEQ ID NO: 35 및 SEQ ID NO: 38 이다.
- [0290] scFv R4C-C3 의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열은 도 4a 에 제시된 SEQ ID NO: 41 이며, scFv R4C-C3 중

쇄 뉴클레오티드 서열, 즉 SEQ ID NO: 46 은, 도 5a 에 제시되어 있다.

[0291] 나아가, 제조합 항체 또는 이의 단편의 생산 방법이 기재된다.

[0292] 본 발명의 항체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 핵산은 발현 벡터에 삽입된다. 경쇄 및 중쇄는 동일하거나 상이한 발현 벡터에서 클로닝될 수 있다. 면역글로불린 사슬을 인코딩하는 DNA 세그먼트는, 면역글로불린 폴리펩티드의 발현을 보장하는 발현 벡터(들)에서 제어 서열에 작동 가능하게 연결된다. 상기와 같은 제어 서열에는, 신호 서열, 프로모터, 인핸서 (enhancer) 및 전사 종결 서열이 포함된다. 발현 벡터는 전형적으로 숙주 염색체 DNA 의 필수적 부분 또는 에피솜으로서 숙주 유기체에서 복제 가능하다. 통상적으로, 발현 벡터는 목적하는 DNA 서열로 형질전환된 세포의 검출을 가능하게 하는, 선택 마커, 예를 들어 테트라시클린 또는 네오마이신을 함유할 것이다.

[0293] 일례에서, 중쇄 및 경쇄 코딩 서열은 모두 하나의 발현 벡터에 포함되어 있다. 또 다른 예에서, 항체의 중쇄 및 경쇄는 각각 개별 벡터에 클로닝된다. 이러한 경우, 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 발현 벡터는, 생체내 또는 시험관내에서 손상되지 않은 항체를 형성하기 위해 어셈블링될 수 있는, 두 개의 사슬의 발현을 위한 하나의 숙주 세포에 동시-트랜스펙션 (co-transfection) 될 수 있다. 대안적으로, 중쇄를 인코딩하는 발현 벡터 및 경쇄를 인코딩하는 발현 벡터가, 중쇄 및 경쇄 각각의 발현을 위한 상이한 숙주 세포에 도입될 수 있고, 이는 이어서 시험관내에서 손상되지 않은 항체를 형성하기 위해 정제 및 어셈블링될 수 있다.

[0294] 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 단편은, 박테리아, 이스트, 사상균류, 곤충 및 포유류 세포와 같은, 원핵 생물 또는 진핵 생물 발현 시스템에서 생산될 수 있다. 본 발명의 제조합 항체가 반드시 진핵 생물 세포에서 글리코실화 또는 발현될 필요는 없지만; 포유류 세포에서의 발현이 일반적으로 바람직하다. 유용한 포유류 숙주 세포주의 예는, 인간 배아 신장 세포주 (293 개의 세포), 아기 햄스터 신장 세포 (BHK 세포), 중국 햄스터 난소 세포/- 또는 + DHFR (CHO, CHO-S, CHO-DG44, Flp-in CHO 세포), 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO 세포), 및 인간 간 세포 (Hep G2 세포) 이다.

[0295] 포유류 조직 세포 배양이 폴리펩티드를 발현시키고 생산하는데 바람직한데, 이는 손상되지 않은 면역글로불린을 분비할 수 있는 다수의 적합한 숙주 세포주가 당업계에서 개발되었기 때문이며, 적합한 숙주 세포주에는 CHO 세포주, 각종 Cos 세포주, HeLa 세포, 바람직하게는 골수종 세포주, 또는 형질전환된 B-세포 또는 하이브리도마가 포함된다.

[0296] 이러한 세포에 대한 발현 벡터는, 복제 기점, 프로모터 및 인핸서와 같은 발현 제어 서열, 및 리보솜 결합 부위, RNA 스플라이스 부위, 폴리아데닐화 부위 및 전사 터미네이터 서열과 같은 필요한 프로세싱 정보 부위를 포함할 수 있다. 바람직한 발현 제어 서열은 면역글로불린 유전자, SV40, 아데노바이러스, 소 유두종 바이러스, 거대세포 바이러스 등에서 유도된 프로모터이다.

[0297] 관심 폴리뉴클레오티드 서열 (예를 들어, 중쇄 및 경쇄 인코딩 서열 및 발현 제어 서열) 을 함유하는 벡터는, 세포 숙주의 유형에 따라 달라질 수 있는, 널리 공지된 방법에 의해 숙주 세포 내로 전달될 수 있다. 예를 들어, 칼슘 포스페이트 처리 또는 전기천공법이 다른 세포 숙주에 대하여 사용될 수 있다 (일반적으로 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 2nd ed., 1989)] 참조). 중쇄 및 경쇄가 별도의 발현 벡터에 클로닝되는 경우, 벡터는 손상되지 않은 면역글로불린의 발현 및 어셈블리를 수득하기 위해 동시-트랜스펙션된다.

[0298] 숙주 세포는 벡터로 (예를 들어, 화학적 트랜스펙션 또는 전기천공법에 의해) 형질전환 또는 트랜스펙션되고, 프로모터의 유도, 형질전환체의 선택, 목적하는 서열을 인코딩하는 유전자의 증폭을 위해 통상적인 영양 배지 (또는 적절한 경우 변형된 것) 에서 배양된다.

[0299] 일단 발현되면, 본 발명의 항체 또는 이의 단편은, 추가 검정 및 적용을 위하여 실질적으로 균질한 제제를 수득하기 위해 추가로 단리 또는 정제될 수 있다. 당업계에 공지된 표준 단백질 정제 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 적합한 정제 절차는, 면역친화성 또는 이온-교환 컬럼 상에서의 분별, 에탄올 침전, 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC), 소듐 도데실 술페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE), 암모늄 술페이트 침전 및 겔 여과를 포함할 수 있다 (일반적으로 [Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y., 1982] 참조). 적어도 약 90 내지 95% 동질성의 실질적으로 순수한 면역글로불린이 바람직하고, 약학적 용도로는 98 내지 99% 이상의 동질성이 가장 바람직하다.

[0300] **파지 디스플레이 방법**

- [0301] 목적하는 결합 특징을 갖는 항체는 또한 파지 디스플레이 라이브러리 및 스크리닝을 사용하여 생산될 수 있다.
- [0302] 특정 파지 디스플레이 방법에서, VH 및 VL 유전자의 레파토리는 폴리머라아제 연쇄 반응 (PCR) 에 의해 별도로 클로닝되고, 파지 라이브러리에서 무작위로 재조합되고, 이어서 [Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)] 에 기재된 바와 같은 항원 결합 파지에 대하여 스크리닝될 수 있다. 파지는 전형적으로 항체 단편을, 단일 사슬 Fv (scFv) 단편 또는 Fab 단편으로서 디스플레이한다. 면역화된 공급원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 구성할 필요 없이 면역원에 고친화성 항체를 제공한다. 대안적으로, 나이브 (naive) 레파토리는 항체의 단일 공급원을 임의의 면역화 없이 광범위한 비(非)자기 및 또한 자기-항원에 제공하기 위해 클로닝될 수 있다 (예를 들어, 인간으로부터). 최종적으로, 나이브 라이브러리는, 고도로 가변적인 CDR3 영역을 인코딩하고 시험관내에서 재배열을 달성하기 위해, 줄기 세포로부터 재배열되지 않은 V-유전자 세그먼트를 클로닝하고, 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용함으로써 합성적으로 제조될 수 있다.
- [0303] **치료적 용도**
- [0304] 항 HLA-G 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기와 같은 항체 또는 단편을 인코딩하는 핵산, 또는 이를 발현하는 벡터는, 암 또는 암성 질환 뿐 아니라, 관련 또는 연관 질환 또는 병태와 같은 병리학의 치료에서 (이러한 병리학이 HLA-G 가 관여하는 종양 탈출 메커니즘과 연관되는 경우) 유용하다. 보다 일반적으로, 항-HLA-G 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 숙주에서 HLA-G 단백질의 부적절한 발현을 포함하는 병리학의 치료에서 유용하다.
- [0305] 더욱 특히, 암 또는 바이러스 감염의 치료를 필요로 하는 환자에서의 암 또는 바이러스 감염의 치료 방법으로서, 항-HLA-G 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 상기와 같은 항체 또는 단편을 인코딩하는 핵산, 또는 이를 발현하는 벡터를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는 방법이 본원에서 기재된다.
- [0306] 항-HLA-G 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 단독 활성 성분으로서, 또는 화학요법 치료, 방사선요법 치료, 또는 치료적 백신접종을 포함하는 또 다른 면역요법 치료와 같은 또 다른 치료 방법과 조합으로 사용될 수 있다.
- [0307] 본원에 기재된 항-HLA-G 항체는, 단독으로 또는 다른 요법과 조합으로, HLA-G 와 관련된 면역 탈출 메커니즘에 대응하고, 전체적인 항종양 효과를 부스팅하고, 암 환자에게 이익을 주는데 유용하다.
- [0308] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 차단 항체일 수 있다. "차단 항체" 또는 "중화 항체" 는, 적어도 백혈구 면역글로불린-유사 수용체 B1 (LILRB1/ILT2/CD85j) 또는 LILRB2 (ILT4/CD85d) 에 대한 HLA-G 결합을 억제하는 항체를 나타낸다.
- [0309] 특정 구현예에 있어서, HLA-G1, HLA-G2, HLA-G5 또는 HLA-G6 의 HLA-G 단백질 동형체 중 적어도 하나 또는 몇 개와, $\alpha 3$ 도메인에 의해 인식되는 이의 수용체의 결합이 방지된다.
- [0310] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, LILRB1 또는 LILRB2 수용체 중 적어도 하나에 대한 $\alpha 3$ 도메인을 나타내는 HLA-G 단백질의 결합을 차단하고, 특히 LILRB1 및 LILRB2 수용체 둘 모두에 대한 상기 HLA-G 단백질의 결합을 차단한다.
- [0311] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 세포독성제에 컨쥬게이션될 수 있다. 일부 양태에서, 상기와 같은 구성 (또한 항체-약물 컨쥬게이트 또는 ADC 로 명명됨) 은, 펩티드 링커 또는 비(非)펩티드 링커일 수 있는 적어도 하나 스페이서 또는 링커를 추가로 포함한다. 상기와 같은 링커는 절단 가능하거나 절단 가능하지 않을 수 있다. 세포독성제에 항체를 연결하는 몇 가지 방법이 당업자에게 공지되어 있다. ADC 는, 전형적으로 사슬간 다이설파이드 결합의 환원을 통해 생성된 유리 시스테인 또는 표면-노출된 라이신의 측쇄를 통해, 항체에 세포독성제를 컨쥬게이션함으로써 생산된다.
- [0312] 세포독성제 또는 세포독소는, 세포의 기능을 억제 또는 방지하고/하거나, 세포의 파괴 (세포 사멸) 를 야기하고/하거나, 항-신생물/항-증식성 효과를 발휘하는, 당업계에 공지된 임의의 분자일 수 있다. 많은 부류의 세포독성제가 ADC 분자에서 잠재적인 유용성을 갖는 것으로 공지되어 있다. 이에, 비제한적으로, 아마니틴 (amanitin), 아우리스타틴 (auristatin), 다우노마이신 (daunomycin), 독소루비신 (doxorubicin), 듀오카마이신 (doxorubicin), 돌라스타틴 (dolastatin), 엔디인 (enediynes), 렉시트로핀 (lexitropsin), 택산 (taxan), 퓨로마이신 (puromycin), 마이탄시노이드 (maytansinoid), 빈카 알칼로이드 (vinca alkaloid), 튜불리신 (tubulysin) 및 피롤로벤조디아제핀이 포함된다. 식물 독소 및 박테리아 독소를 포함하는 독소, 예를 들어 과산화물 또는 티프테리아 독소, 리신, 사포닌, 내독소 A 등이, 세포독성제로서 사용될 수 있다.
- [0313] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 방사성핵종에 컨쥬게이션될 수 있다.

- [0314] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 항체-의존적 세포-매개 독성 (ADCC) 또는 보체 의존적 세포독성 (CDC) 을 증강시키는 Fc 영역을 포함하도록 조작 (예를 들어 변형 또는 키메라화) 될 수 있다. 이러한 목적을 위한 Fc 변이체는 이미 기재되어 있다, 예를 들어 [Lazar *et al*, 2006; Moore *et al*, 2010].
- [0315] 상기와 같은 항체 또는 컨쥬게이트는 암의 치료에 유용하다.
- [0316] 암은 임의의 유형의 암을 나타내며, 바람직하게는 방광암, 신장암, 비뇨생식기암 및 흑색종으로부터 선택될 수 있다. 암 질환 또는 신생물성 병태의 다른 비제한적인 예는, 백혈병, 기저 세포 암종, 유방암, 악성 중피종, 광선 각화증, 투명 세포 신장 암종, 망막모세포종, 가시 세포 암종, 원위 암종, 결장직장암, 난소 암종, 피부 T 세포 림프종, 자궁내막 선암종, 고전적 호지킨 (Hodgkin) 림프종, 폐 암종, 피부 B 세포 림프종, 위암, 췌장부암, 담관암, 췌관 선암종, 식도 편평 세포 암종, 포상기태 (hydatidiform mole).
- [0317] 바이러스 감염 동안, HLA-G 발현의 상향 조절은 면역계에 의한 파괴를 탈출하기 위해 일부 바이러스에 의해 사용되는 전략의 일부를 형성한다.
- [0318] 본 발명에 따라 치료될 수 있는 바이러스 감염의 비제한적인 예는, HIV 감염, 공수병 바이러스 감염, 또는 B 형 간염 또는 C 형 간염 바이러스 감염 뿐 아니라, HCMV (인간 거대세포 바이러스), HSV-1 (헤르페스 바이러스 심플렉스) 또는 IAV (인플루엔자 A 바이러스) 에 의한 감염이다.
- [0319] 또 다른 양태에서, 본 발명은 약학적 담체와 함께 제형화된, 본원에 정의된 바와 같은 항체 또는 이의 단편을 함유하는 조성물, 예를 들어 약학적 조성물을 제공한다. 본원에 사용된 바, "약학적 담체" 에는, 생리학적 으로 상용성인, 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항박테리아 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등이 포함된다. 바람직하게는, 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척추 또는 표피 투여 (예를 들어 주사 또는 주입) 에 적합하다.
- [0320] 본 발명의 조성물은 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 투여될 수 있다. 투여의 경로 및/또는 방식은 목적하는 결과에 따라 달라질 것이다.
- [0321] 선택된 투여량 수준은 투여 경로, 치료하고자 하는 환자의 연령, 성별, 체중, 병태, 일반 건강 및 이전의 병력 등을 포함하는 다양한 인자에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 0.2-20 mg/kg 의 투여량으로, 3 회/주 내지 1 회/개월 투여될 수 있다.
- [0322] 또 다른 양태에서, 약제 또는 백신은, 상기 항체 또는 단편을 인코딩하는 핵산, 또는 상기 핵산을 함유하는 벡터를 포함하는 조성물이다.
- [0323] 벡터는 유리하게는, 예를 들어 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 우두 바이러스 벡터, 폭스 바이러스 벡터, 홍역 바이러스 벡터 및 아데노바이러스-관련 벡터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 바이러스 벡터일 수 있다.
- [0324] 핵산, 벡터 또는 조성물은 직접 투여될 수 있거나, 또는 투여 전 리포솜 내 패키징되거나 또는 콜로이드 금 입자 상에 코팅될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 항체를 인코딩하는 핵산은 네이키드 (naked) 형태로 투여될 수 있다.
- [0325] 유전자적 면역화의 경우, 백신 조성물은 바람직하게는 주사 또는 가스 유도 입자 충격 (gas driven particle bombardment) 에 의해, 종양 내에 또는 임의의 유형의 림프 기관에, 피내로, 피하로, 근육내로 투여되고, 숙주 유기체에서 면역 반응을 자극하는데 효과적인 양으로 전달된다. 본 발명의 바람직한 구현예에, 투여는 주사 단계 이외에, 전기천공법 단계 (또한 본원에서 용어 "전자이동 (electrotransfer)" 으로 지정됨) 를 포함한다.
- [0326] 핵산은 또한 리포솜 트랜스펙션, 입자 충격 또는 바이러스 형질도입 (동시-배양 기술 포함) 을 사용하여, 림프 또는 골수 세포로 생체의 투여될 수 있다. 이어서, 처리된 세포는 면역화하고자 하는 대상에 다시 재도입된다.
- [0327] 또 다른 양태에서, 면역원성 펩티드, 상기 펩티드를 인코딩하는 핵산, 또는 상기 펩티드를 발현하는 벡터는, 환자에서 항-HLA-G 항체의 생체내 생산에 사용된다.
- [0328] **진단 방법 및 키트**
- [0329] 본 발명은 또한 HLA-G 단백질의 시험관내 검출, 또는 건강 상태 또는 병리학적 병태의 모니터링 또는 진단에 적

합한 수단 뿐 아니라, 상기와 같은 상태 또는 병태를 나타낼 가능성이 있는 환자에서의 건강 상태 또는 병리학 적 병태의 모니터링 또는 진단을 위한 수단을 제공한다.

[0330]

특정 구현예에서, 병태는 암 또는 바이러스 감염이다.

[0331]

특히, 본 발명은 병리학 적 병태를 가지고 있거나 특정 건강 상태를 나타낼 가능성이 있는 환자로부터 이전에 수득된 샘플의 분석을 통해, 샘플 내 HLA-G 단백질을 검출하고/하거나 건강 상태 또는 병리학 적 병태를 모니터링 또는 진단하기 위한 시험관내 방법으로서, 하기 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다:

[0332]

a. 면역 복합체의 형성을 가능하게 하는 조건 하에서, 샘플을 본원에 개시된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계, 및

[0333]

b. 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편과, HLA-G 단백질 간에 형성된 수득된 면역 복합체를 시험관내에서 검출하는 단계.

[0334]

특정 구현예에 있어서, 본 발명은 샘플, 예를 들어 임신 가능성이 있는 환자로부터 이전에 수득된 샘플, 또는 기관 또는 조직 또는 세포 이식(들)을 받은 환자로부터 수득된 샘플에서의, HLA-G 단백질의 시험관내 검출을 가능하게 한다. 그 결과, 건강 상태, 즉 병리학 적 병태의 존재를 반드시 포함하지 않는 생리학 적 상태의 모니터링이 수행될 수 있다. 따라서, 병리학 적 병태의 존재 또는 부재의 후속 진단이 또한 수행될 수 있다.

[0335]

샘플이 병리학 적 병태를 나타낼 가능성이 있는 환자로부터 이전에 수득되었던 경우, 상기와 같은 병리학 적 병태의 후속 모니터링 또는 진단이 또한 수행될 수 있다. 특정 구현예에서, 언급되는 병리학 적 병태는 상기 개시된 것들이다.

[0336]

본 발명은 또한 상기 개시된 바와 같은 시험관내 검정 또는 진단 방법을 위한 키트로서, 하기를 포함하는 키트에 관한 것이다:

[0337]

a. 본원에 개시된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편,

[0338]

b. a. 의 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 검정하고자 하는 샘플 간 면역 복합체(들)의 형성에 적절한 시약(들);

[0339]

c. 임의로, 단계 b. 의 면역 복합체(들)의 형성을 검출하는데 적절한 시약(들).

[0340]

HLA-G 단백질의 검출은 면역조직화학 또는 ELISA 검정과 같은 액체 상에서의 검출과 같은 당업계에 공지된 임의의 기술에 의해 달성될 수 있다. 특정 구현예에 있어서, 하기를 포함하는 키트가 제공된다: (a) 고정된 항-HLA-G 항체가 결합된 지지체 (여기서 항-HLA-G 항체는 본 발명의 항체임); 및 (b) 리포터 분자가 결합된 이동성 항-HLA-G 항체 (이는 HLA-G 단백질의 또 다른 에피토프에 결합함). 리포터 분자는 정량적 또는 거의 정량적 방식으로 검출 가능한 임의의 분자일 수 있다. 예를 들어, 리포터 분자는 비색제 (colorimetric agent), 형광분석제 (fluorometric agent), 방사성 동위원소, 검출 가능한 종말점을 갖는 효소제 (enzymatic agent) 일 수 있다.

[0341]

본 발명에 따른 방법은 임의로 생물학적 샘플에서 검출된 라벨의 양을 HLA-G 표준과 비교함으로써, HLA-G 를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0342]

본 발명에 따른 방법은 생물학적 샘플을 포함한다. 상기와 같은 샘플은, 비제한적으로, 조직 샘플, 예를 들어 종양 조직 샘플, 혈액 샘플, 조직 샘플과 접촉하는 매질, 및 세포와 접촉하는 매질 (예를 들어 단리된 세포가 사용되는 경우), 양수, 배아와 접촉하는 매질로부터 선택될 수 있다. 본 발명의 방법은 HLA-G 지표 병태를 진단 또는 검출하는데 사용될 수 있다. 이러한 구현예에서, HLA-G 지표 병태에 대한 대조군 값이, 샘플에서 발견되는 HLA-G 의 양과 비교될 수 있다. 특정 병태는, HLA-G 가 낮거나 부재인 경우에 나타날 수 있지만, 다른 병태는 HLA-G 의 증가된 수준에 의해 나타날 수 있다. 당업자는 병태를 진단하는데 유용한 지표 수준을 용이하게 결정할 수 있다. 상기와 같은 HLA-G 지표 병태에는, 비제한적으로, 전자간증 (pre-eclampsia), 전자간증의 위험 증가, 불리한 태아 결과 (adverse fetal outcome), 불리한 태아 결과의 위험 증가, 암, 또는 암 발병의 위험 증가가 포함될 수 있다.

[0343]

가용성 HLA-G (sHLA-G) 는 또한 인간 시험관내 수정 (IVF) 에서 배아의 품질에 대한 바이오마커로서 보고되었다. 따라서, 특정 구현예에서, 본 발명의 항체는 IVF 의 맥락에서 이식의 성공 가능성을 평가하기 위해, 배아 배양 상청액 (ES) 중 HLA-G 단백질의 존재를 모니터링하는데 유용하다.

[0344]	따라서, 일반적으로 상기 기재된 본 발명은, 예시로서 제공되며 본 발명을 제한하려는 의도가 아닌, 하기 실시 예를 참조로 보다 쉽게 이해될 것이다.
[0345]	약어
[0346]	APC: 항원 제시 세포
[0347]	ATCC: 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (American Type Culture Collection)
[0348]	β 2M: 베타-2-마이크로글로불린
[0349]	BSA: 소 혈청 알부민
[0350]	CDR: 상보성 결정 영역
[0351]	CFA: 완전 프로인트 아쥬반트
[0352]	CTL: 세포독성 T 림프구
[0353]	CTLA-4: 세포독성 T-림프구-회합된 항원 4
[0354]	DC: 수지상 세포
[0355]	DIC: 디이소프로필카르보디이미드
[0356]	DNA: 데옥시리보핵산
[0357]	DMEM: 둘베코 (Dulbecco) 변형 이글 배지
[0358]	ELISA: 효소 결합 면역흡착제 검정 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
[0359]	EC: 유효 농도
[0360]	FACS: 형광 활성화 세포 분류
[0361]	FCS: 소 태아 혈청
[0362]	FITC: 플루로레세인 이소티오시아네이트
[0363]	FR: 프레임워크 영역
[0364]	h: 시간
[0365]	HAT: 히포잔틴-아미노프테린-티미딘
[0366]	HES: 히드록시에틸 전분
[0367]	HLA: 인간 백혈구 항원
[0368]	HPLC: 고성능 액체 크로마토그래피
[0369]	HRP: 홀스래디쉬 퍼옥시다아제
[0370]	ICP: 면역 체크 포인트
[0371]	ID: 정체성
[0372]	IFA: 불완전 프로인트 아쥬반트
[0373]	IgG: 면역글로불린 G
[0374]	ILT-2: 면역글로불린-유사 전사체 2
[0375]	ILT-4: 면역글로불린-유사 전사체 4
[0376]	IMDM: 이스코브 (Iscove) 변형 둘베코 배지
[0377]	IP: 복강내
[0378]	IPTG: 이소프로필 β -D-1-티오갈락토피라노시드

[0379]	IV: 정맥내
[0380]	IVF: 시험관내 수정
[0381]	KDa: 킬로 달톤
[0382]	KIR2DL4: 살해 세포 면역글로불린 유사 수용체 2 Ig 도메인 및 긴 세포질 테일 4
[0383]	KLH: 키홀 림펫 (Keyhole Limpet) 헤모시아닌
[0384]	LILRB1: 백혈구 면역글로불린 유사 수용체 B1
[0385]	LILRB2: 백혈구 면역글로불린 유사 수용체 B2
[0386]	M: 몰농도
[0387]	MEM: 최소 필수 배지
[0388]	MHC: 주요 조직적합성 복합체
[0389]	mL: 밀리리터
[0390]	NK: 자연 살해 세포
[0391]	nM: 나노몰농도
[0392]	OD: 광학 밀도
[0393]	ON: 밤새
[0394]	PAGE: 폴리아크릴아미드 겔 전기영동
[0395]	PBS: 포스페이트 완충 식염수
[0396]	PC-1: 구속성 펩티드-1 (Peptide Constrained-1)
[0397]	PCR: 폴리머라아제 연쇄 반응
[0398]	PD-1: 프로그램된 세포 사멸 단백질 1
[0399]	PD-L1: 프로그램된 세포 사멸 리간드 1
[0400]	PE: 피코에리트린
[0401]	PIR-B: 한쌍의 면역글로불린-유사 수용체 B
[0402]	PS: 페니실린/스트렙토마이신
[0403]	RNA: 리보핵산
[0404]	RPM: 분 당 회전수
[0405]	RT: 실온
[0406]	SB: 슈퍼 브로쓰 (Super Broth)
[0407]	scFv: 단쇄 가변 단편
[0408]	SDS: 소듐 도데실 술페이트
[0409]	Sec: 초
[0410]	SEQ: 서열
[0411]	sHLA-G: 가용성 HLA-G
[0412]	TBS: 트리스 완충 식염수
[0413]	TMB: 테트라메틸벤지딘
[0414]	UV: 자외선

- [0415] V: 부피
- [0416] VH: 가변 중쇄
- [0417] VL: 가변 경쇄
- [0418] μ l: 마이크로리터
- [0419] **실시예**
- [0420] **재료 및 방법**
- [0421] **펩티드 합성**
- [0422] 모노클로날 항체를 생성하는데 사용되는 PC-1 펩티드 [VTTHPVPFDYEATLRC (SEQ ID NO:56)] 를, MultiSynTech 사의 Syro 상에서 활성화제로서 DIC 를 사용하여 Fmoc 표준 화학에 따라 합성하고, 이어서 역상 HPLC (RP-HPLC) 로 정제하였다.
- [0423] PC1 펩티드를 액체 크로마토그래피 - 질량 분석법 (LCMS) 으로 분석하였다.
- [0424] **면역원의 제조**
- [0425] PC1 펩티드를 하기와 같이, 측쇄 C-말단 시스테인을 통해 KLH 에 커플링하였다: 5 mg 의 펩티드를 컨쥬게이션에 사용함. PBS 에 용해된 KLH 단백질 (77600, ThermoFisher, Paris, France) 을, sulfo-MBS 링커 (22312, ThermoFisher, Paris, France) 를 이용하여 활성화시켰다. 유리된 링커를 투석으로 제거하였다. PBS 에 용해된 펩티드를 활성화된 KLH 와 함께 인큐베이션하였다. 유리된 펩티드를 투석으로 제거하였다. PC-1-KLH 복합체를 PBS 1X (pH7.2) 중에 용해시키고, -20℃ 에서 보관하였다.
- [0426] **마우스 면역화**
- [0427] Janvier laboratories (Le Genest-St-Isle, France) 에서 구입하여, Pasteur Institute 동물 시설 (Paris, France) 에서 사육한, 2 가지 상이한 마우스 유형 (C57BL/6J 및 BALB/cJ) 을, 면역화에 사용하였다. 마우스는 제 1 면역원 주사 시 7 주령이었다. 이들을 완전 프로인트 아쥬반트 (CFA F5881; Sigma, Lyon, France) (v/v) 와 혼합된 KLH 에 컨쥬게이션된 PC-1 펩티드 50 μ g 의 에멀전으로 복강내 (IP) 면역화시키고, 10 일 후, 불완전 프로인트 아쥬반트 (IFA; F5506; Sigma, Lyon, France) 와 혼합된 PC-1-KLH 50 μ g 으로 1 회 IP 주사하고, 이어서 제 1 주사 후 20, 30 및 185 일차에 PC-1-KLH/IFA 25 μ g 으로 3 회 주사하였다.
- [0428] PC1-KLH/CFA 또는 IFA 에멀전을 암실에서 RT 에서 30 분 동안 볼텍스 (vortex) 로 제조하였다.
- [0429] 항체 반응을 면역화된 마우스의 안구 뒤 출혈에 의해 수득된 혈액으로부터의 혈장에서, 유세포 분석법 (FACS) 및 ELISA 분석 (하기 기재됨) 으로 모니터링하였다.
- [0430] **하이브리도마의 생성**
- [0431] 마우스를 안락사 3 일 전 면역원으로 정맥내 (IV) 부스팅하였다. 비장을 채취하고, 항체 생산 하이브리도마를 수득하기 위하여, 비장세포를 불멸화된 골수종 세포주 sp2/0-Ag14 와의 후속 융합을 위해 정제하였다. 폴리에틸렌 글리콜 기반 표준 프로토콜 (Kohler, G., C. Milstein. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 1975. 256(5517): p.495-7) 을 사용하여 융합을 수행하였다. 이어서, 수득된 하이브리도마를 L-글루타민 (4 mM), 열 불활성화된 FCS (20%), HAT (히포잔틴-아미노프테린-티미딘, 1X), HES (히드록시에틸 전분 130, 2%) 및 페니실린/스트렙토마이신 (1%) 이 보충된 선별 DMEM 배지에서 배양하였다. 하이브리도마를 콜로니 형성 및 항체 생산을 위한 선별 배지에서 7 내지 14 일 동안 성장시켰다. 선형 및 원형 PC-1 펩티드를 특이적으로 인식하는 항체의 생산을, 각각, ELISA 및 유세포 분석법 분석으로 평가하였다. 양성 하이브리도마를 관심 모노클로날 항체를 분비하는 단일-세포 유래 클론을 동정하기 위해 클로닝하고 성장시켰다.
- [0432] **파지 디스플레이 기술**
- [0433] **항-HLA-G 단일 사슬 항체 유전자 라이브러리의 구축**
- [0434] RNA 를 단리하기 위해, Tri Reagent kit (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, USA) 를 제조업자의 지침에 따라 사용하여, 각 동물의 비장을 마지막 부스트 후 샘플링하였다. RNA 를 RT-PCR 로 역전사시키고, 수득한 cDNA 를 젓과 VH, VL κ 및 VL λ 를 인코딩하는 DNA 의 증폭을 위한 프라이머를 사용하여, PCR 로 증폭시

켰다. PCR 생산물을 먼저, pGEM®-T easy vector (Promega, Madison, Wisconsin) 에서 제조업자의 지침에 따라 클로닝하여, 중쇄 (VH) 또는 경쇄 (VL_K + VL_L) 를 인코딩하는 2 개의 항체 유전자 서브라이브러리를 수득하였다.

[0435]

단일 사슬 항체 (scFv) 라이브러리의 구축을 하기와 같이 수행하였다: 먼저, VL (VL_K 및 VL_L) PCR 생산물을 파지미드 (phagemid) 벡터 pTH 에 클로닝하고; 두 번째로, VH PCR 생산물을 VL_K 또는 VL_L 레파토리를 함유하는 pTH 에 클로닝하였다. 클로닝 부위는 VH 및 VL 클로닝을 위한 제한 효소 부위가 측면에 위치하는 (Gly₄Ser)₃ 링커 서열, 이어서 헥사히스티딘 태그 및 c-myc 태그를 함유한다. 플라스미드 및 파지미드를 이 콜라이 (E. coli) XL1-Blue MRF 박테리아 (Stratagene, Amsterdam, Netherlands) 에서 성장시켰다. scFv 유전자 라이브러리를 함유하는 형질전환된 박테리아를 채취하고, 라이브러리로부터의 플라스미드/파지미드를 Nucleobond Plasmid Midi Kit (Macherey-Nagel; Duren, Germany) 를 제조업자의 지침에 따라 사용하여 단리한 후, 분액하고, -80℃ 에서 보관하였다.

[0436]

최종 scFv 라이브러리의 크기는 PCR 에 의해 결정 시 약 93% 실제 크기 삽입물을 함유하는 1.2×10^7 개의 클론으로 구성되어 있었다. 이어서, 박테리아 라이브러리를 헬퍼 파지 M13K07 을 사용하여 파지/scFv 라이브러리로서 패키징하였다. 파지/scFv 를 30℃ 및 250 rpm 에서 16 h 동안 생산하였다. 세포를 원심분리로 펠릿화하고, 파지를 함유하는 상청액을 폴리에틸렌 글리콜 절차를 사용하여 침전시켰다. 침전된 파지를 재현탁시키고, 0.45 μm 필터를 통해 여과하고, 파지 적정 전 4℃ 에서 보관하였다.

[0437]

라이브러리의 스크리닝

[0438]

파지/scFv 라이브러리의 스크리닝을, 스트렙타비딘 ELISA 고용량 플레이트 (15501, Pierce) 상에 코팅된 비오티닌화된-PC1 펩티드 1 μg/mL 을 사용하여 수행하였다. 엄격함 (stringency) 을 증가시키면서 (연속되는 각 차례의 패닝 (panning) 당 2, 4, 8 및 15 회 세척) 5 차례 패닝을 적용하였다. 유리된 HLA-G PC1 펩티드 (TBS-Tween 20 중 10 μg/mL, 0.1%) 를 파지/scFv 용리액에 대한 경쟁자로서 사용하였다. 선택된 파지의 회수 및 증폭을 위해, 기하급수적으로 성장하는 이 콜라이 배양물을, 각 차례의 패닝 후, 용리된 파지 현탁액으로 감염시켰다.

[0439]

선택된 파지의 반응성을 평가하기 위해, 항원으로서 비오티닌화된 HLA-G PC1 펩티드를 사용하는 파지-ELISA 를, 각 차례의 패닝 후 수행하였다. 제 1 및 제 2 차 패닝 후, 신호는 백그라운드와 동일한 수준이었고; 신호는 제 4 차 패닝 후 백그라운드의 3 배까지 증가했다. 파지 디스플레이 기술에 따라, 상기와 같은 신호 증가는 특이적 결합체가 풍부하다는 것에 해당한다. 파지미드 DNA 를 제 5 차 패닝 후 라이브러리로부터 추출하였다. 96 개의 클론을 단리하고, 깊은 웰 마이크로타이터 플레이트 (Maxisorp, Nunc, Denmark) 상에서 생성시켰다. 파지 입자를 함유하는 상청액을 파지-ELISA 방법으로 시험하고, 6 가지 PC1-특이적 결합제를 동정하고 (R4C-C3, R4C-B1, R4C-F2, R4C-F1, R4C-F12 및 R5C-D8), 시퀀싱하였다.

[0440]

scFv 생산

[0441]

단백질 발현을 위하여, 동정된 양성 결합체로부터 단리된 파지미드 DNA 를 비(非)억제자 이 콜라이 균주 HB2151 로 형질전환시켰다. 선택된 플레이트에서 무작위로 선택된 단일 콜로니를, 카르베니실린 및 글루코오스 (1%) 가 보충된 SB 배지 (수퍼 브로쓰) 5 mL 에 접종하였다. 배양액을 37℃ 에서 교반 하에서 밤새 인큐베이션한 후, 보다 큰 규모의 SB 배양액으로 옮겼다 (500 μl 의 배양액을 500 mL 의 새로운 SB 배지에 옮겼다). 배양액의 OD₆₀₀ 가 1 에 도달했을 때, 1 mM IPTG (이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노시드) 를 첨가하여 표적 단백질의 발현을 유도하였다. 세포를 16℃ 에서 밤새 (ON) 성장시킨 후, 원심분리로 채취하였다. 니켈 컬럼 (Ni-NTA 스핀 컬럼, Qiagen, Valencia, CA) 을 제조업자의 지침에 따라 사용하여, scFv 를 추출 및 정제하였다.

[0442]

유세포 분석법 분석

[0443]

세포주

[0444]

K562 세포는 ATCC (아메리칸 타입 컬처 컬렉션 CCL-243) 에서 구입한 인간 백혈병 세포이다. K562 야생형 세포를, HLA-G1 인코딩 벡터 또는 상응하는 모의 (mock) 벡터로 각각 뉴클레오펙션 (nucleofection) 하여, K562-G1 및 K562-PV 를 수득하였다. 이러한 세포주를 10% 열-불활성화된 FCS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 IMDM 배지에서 배양하였다.

- [0445] HLA-G 가 아닌 고전적 MHC 클래스 I 분자를 발현하는 림프아구성 세포주, LCL-DES, LCL-BRO 및 RPMI8866 을, D. Wiels (Institut Gustave Roussy, Villejuif, France) 로부터 받았다. 이러한 세포를 10% 열-불활성화된 FCS, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 10 mM 소듐 피루베이트 및 200 g/L D-글루코오스가 보충된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다.
- [0446] **Bioplex 비드, 수용체 및 모노클로날 항체**
- [0447] Bioplex 비드 (MC10028-01 및 MC10062-01) 를 Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France) 사에서, 및 PE-컨쥬게이션된 마우스 IgG1 (클론 P.3.6.8.2.1. 12-4714) 를 eBiosciences (Paris; France) 사에서, 및 FITC-컨쥬게이션된 래트 IgG2a 를 BD Biosciences (클론: R35-95 553929, Le Pont de Claix; France) 사에서 구입하였다.
- [0448] **HLA-G6 및 HLA-G5 단백질 생산**
- [0449] HLA-G6 의 $\alpha 1\alpha 3$ 도메인 및 HLA-G5 유전자의 $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$ 도메인에 대한 코딩 서열을, pAcGP67 바큇로바이러스 전달 벡터에 클로닝하였다. 상이한 삽입물을 함유하는 pAcGP67 바큇로바이러스 벡터의 유전자 구성체 및 플라스미드 증폭산물을, Genecust (Luxembourg) 로 생산하였다. 플라스미드를 Proteople facility at Institut Pasteur (Paris, France) 에서, DH5 박테리아 숙주에서 증폭시켰다. 전달 벡터 및 AcMNPV 선형화된 DNA (BD 사의 BaculoGoldTM) 를 스포도프테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*) (Sf9) 세포에 동시-트랜스펙션시켜, 상동 부위 사이에서 재조합을 가능하게 함으로써, 삽입물을 전달 벡터에서 AcMNPV DNA 로 옮겼다. 각각의 단백질을 코딩하는 재조합 바이러스를 생산하고, 이후 재조합 단백질을 생산하는 Sf9 세포를 감염시키는데 사용하였다.
- [0450] 재조합 단백질이 발현되면, 세포를 용해시키고, 용해물을 고정된 StrepTactin 친화성 수지 컬럼에 첨가하였다. 비특이적으로 결합된 단백질을 제거하기 위한 수 차례 세척 단계 후, 결합된 StrepTag 단백질을 2.5 mM 테스티오비오틴으로 용리하였다. HLA-G5 의 존재를 확인하기 위해 정제된 용리된 단백질을 SDS-PAGE 로 분석한 후, 분석하고, -20℃ 에서 보관하였다.
- [0451] **Bioplex 비드의 커플링**
- [0452] Bio-Rad (Marnes-la-Coquette; France) 사의 키트를 공급업자의 지침에 따라 사용하여, 표준 아민 커플링 화학 절차에 따라, Bioplex 비드를 재조합 HLA-G5, HLA-G6 단백질, 또는 합성된 원형의 cPC-1 펩티드 (CTHHPVFDYEATLRC, SEQ ID NO: 52) 로 코팅하였다. 특이성 (음성) 대조군으로서, 커플링되지 않은 비드 또는 돌연변이된 펩티드 CTHHPVADAEATLRC (SEQ ID NO: 62) 로 코팅된 비드를, 각각, 사용하였다.
- [0453] 이전의 결정학 연구 (Clements *et al.*, 2005) 에 의해 결정된 HLA-G 의 $\alpha 3$ 도메인 내 189-203 위치에서의 VTHHPVFDYEATLRC (SEQ ID NO: 56) 아미노산 영역의 입체형태 구조를 모방하기 위해, 원형 cPC-1 펩티드를 디자인하였다. PC-1 펩티드의 N-말단 발린 잔기를 시스테인 잔기로 대체하여, N- 및 C-말단 시스테인 잔기 사이에 다이설파이드 결합을 형성함으로써, 입체형태 모방을 수득하였다.
- [0454] **항-HLA-G 혈청 및 모노클로날 항체의 분석**
- [0455] 면역화된 마우스의 혈청 또는 클론원성 하이브리도마 세포 배양액의 상청액에서의 특이적 항-HLA-G 항체의 검출을, 유세포 분석법으로 평가하였다. HLA-G5, HLA-G6 및 cPC-1 펩티드 코팅된 비드를 사용하여 먼저 유세포 분석법을 수행하였다.
- [0456] 비드를 모노클로날 항체를 함유하는 세포 배양 상청액 또는 혈청의 상이한 희석액과 함께 RT 에서 1h 동안 인큐베이션한 후, 2 회 세척하고, PE-컨쥬게이션된 염소 항-마우스 IgG 항체 (405307, Biolegend, USA) 와 함께 RT 에서 30 min 동안 인큐베이션하였다. LSR FORTESSA (Beckton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France) 를 사용하여 유세포 분석법 분석을 수행하고; FlowJo X 소프트웨어 (Tree star, Ashland, USA) 를 사용하여 데이터를 분석하였다. 양성 염색된 비드의 백분율을 결정하기 위해, 전자 게이트를 아이소타입 대조군을 갖는 형광 비드의 99% 를 제외하도록 설정하였다. 따라서, 양성 염색된 비드는 아이소타입 대조군의 99% 가 나타내는 것보다 높은 염색 강도를 갖는 것으로 정의되었다.
- [0457] **ELISA 검증**
- [0458] 96-웰 마이크로플레이트를 PBS (100 μ l/웰) 중 1 μ g/mL 로의 PC-1 펩티드로 코팅하고, RT 에서 밤새 인큐베이션한 후, 150 μ l/웰의 PBS-건조 탈지유를 이용하여 RT 에서 1h 동안 차단하였다. PBS tween 0.05% 를 이용한 1 회 세척 후, 혈청 또는 모노클로날 항체의 희석액을 RT 에서 2h 동안 첨가하였다 (50 μ l/웰). 플레이트를

3 회 세척하고, 퍼옥시다아제 (HRP) 컨쥬게이션된 염소 항-마우스 IgG 를 PBS-tween 0.05%, 1% BSA (50 μ l/웰) 에 1/10000 로 RT 에서 1h 동안 첨가하였다. 3 회 세척 후, 플레이트를 TMB 기질 (KPL, Gaithersburg, USA) 로 염색하고, OD₄₅₀ 에서 판독하였다. 파지 디스플레이의 경우, 펩티드 유리된 또는 BSA 와 커플링된 HLA-G PC1 을 96-웰 마이크로타이터 플레이트 (Maxisorp, Nunc, Denmark) 상에 코팅하였다. 항-히스티딘 태그 항체 (Qiagen, Courtaboeuf, France) 를 사용하여 검출을 평가하였다.

[0459] 모노클로날 항체 15E7 의 추가적인 특징분석

[0460] 아이소타이핑

15E7 아이소타입을 Clonotyping Southern 키트 (Clinisciences, Nanterre, France) 를 사용하여 제조업자의 지침에 따라, ELISA 검정으로 결정하였다. 간략하게, 플레이트를 포획 항체 (각각의 아이소타입에 대하여 특이적임) 로 4°C 에서 밤새 코팅한 후, PBS 0.05% Tween 로 2 회 세척하였다. 이어서, 플레이트를 RT 에서 가온시키고, 15E7 모노클로날 항체를 함유하는 하이브리도마 상청액을 RT 에서 1 h 동안 첨가하였다. 키트에 제공된, HRP-컨쥬게이션된 항-아이소타입 2차 항체는, 1/2000 로 사용하였다. 플레이트를 TMB 기질 (Eurobio/KPL, Gaithersburg, USA) 로 염색하고, OD₄₅₀ 에서 판독하였다.

[0462] 15E7 모노클로날 항체의 생산

15E7 하이브리도마를 마우스에서 복수로 생체내 성장시켰다. 목적하는 모노클로날 항체를 생산하도록 충분히 성장시킨 후, 모노클로날 항체를 함유하는 복수액 (ascites fluid) 을 정제하였다. 정제는 표준 단백질 A-세파로오스 컬럼을 사용하여 크로마토그래피로 수행하였다. 15E7 를 함유하는 용리액 분획을 폴링하고, 투석하고, 필요시 농축시켰다. 농도는 UV 스캔으로 OD₂₈₀ 에서 결정하였고, 2 mg/mL 로 조정하였다.

[0464] 결합 친화성의 결정 (BLITZ 기술)

결합 친화성 및 결합 동역학을 BLITZ 기술로 결정하였다. 15E7 모노클로날 항체를 표준 아민 커플링 화학을 사용하여 1차 아민을 통해 바이오센서 칩 AR2G (Pall ForteBio) 에 공유결합적으로 연결하였다. 결합은 15E7 에 커플링된 칩을, 상이한 농도의 BSA 에 커플링된 PC-1 펩티드와 인큐베이션함으로써 측정하였다. 항원-항체 회합 동역학을 120 초 동안 측정하고, 해리 동역학을 100 초 동안 측정하였다. 회합 및 해리 곡선을 1:1 로 피팅하였다.

[0466] 실시예 1: 마우스에서의 항-HLA-G 항체의 생산

[0467] 면역원의 디자인

본 발명자들은 HLA-G 의 α 3 아미노산 영역 189-203 에 상응하는 고도로 HLA-G 특이적 펩티드 ("구속성 펩티드: PC-1" (도 1a; 볼드체 및 밑줄그림) 로서 언급됨) 를 디자인하고, 마우스를 면역화하는데 사용하였다.

[0469] PC-1 서열: VTHHPVFDYEATLRC (SEQ ID NO: 56)

[0470] PC-1 면역원은, β 2M 회합과 독립적으로 HLA-G α 3-함유 동형체에 대하여 특이적인, 치료에 적합한 항-HLA-G 모노클로날 항체를 생성하는 것으로 예상된다.

[0471] 면역화, 하이브리도마 생성 및 scFv 생산

[0472] KLH 에 커플링된 PC-1 펩티드를 사용하는 면역화 프로토콜은, 재료 및 방법 섹션에 기재되어 있다. C57BL/6 및 BALB/c 마우스를 펩티드 면역화에 사용하였다.

[0473] 간략하게, 마우스를 CFA 에서 PC-1-KLH 컨쥬게이트로 복강내 프라이밍하고, IFA 에서 4 IP 로 부스팅하였다. 면역화된 마우스로부터의 혈청을 면역화 절차에 따라 상이한 시점에서 수집하고, Bioplex-HLA-G5, HLA-G6 및 cPC-1 커플링된 비드를 사용하여 시험하였다. 각각의 실험의 경우, 수득된 폴리클로날 항체의 특이적 친화성을 결정하기 위해 양성 및 음성 대조군을 설정하였다. HLA-G-펩티드 비드가, 비면역화된 마우스로부터의 혈청으로 라벨링된 것들과 비교하여 FACS 에서 피크 시프트를 나타내는 경우, 혈청을 양성으로 간주하였다.

[0474] BALB/c 및 C57BL/6 마우스를 PC-1-KLH 펩티드로 면역화시키는 경우, 각각의 IP 부스트 후, 유의한 수준의 항-HLA-G IgG 항체가 혈청에서 검출되었다. 도 1b 는, 면역화된 Balb/c 마우스 및 비(非)백신접종된 대조군 마우스로부터 수집된 혈청 존재 하에서 수득된 HLA-G5-코팅된 비드의 염색을 나타낸다. 항-HLA-G 항체는 심지어 최저 용량의 혈청 (1/1000 희석) 에서도 용량-의존적 방식으로 유의하게 검출되었다. 대조군의 비커플링

된 비드를 사용한 경우에는 특이적 결합을 검출하지 못했다 (데이터는 표시되지 않음).

- [0475] 최고 항-HLA-G 항체 역가를 갖는 마우스를 하이브리도마 생성 또는 파지 디스플레이에 사용하였다.
- [0476] 융합을 재료 및 방법 섹션에 기재된 바와 같이 수행하였다. 이어서, ELISA 양성 하이브리도마를 클로닝하고, 항-HLA-G 모노클로날 항체를 생산하는 관심 클론을 검출하기 위해 ELISA 로 다시 확인하였다.
- [0477] 파지 디스플레이 프로세스를 재료 및 방법에 상세화된 바와 같이 수행하였다. HLA-G 펩티드에 대한 scFv 클론 R4C-C3, R4C-B1, R4C-F2, R4C-F1 및 R5C-D8 의 반응성을 ELISA 로 평가하였다. R4C-C3 및 R5C-D8 클론 이 비오틴-커플링된 PC1 펩티드에 대하여 높은 반응성을 나타내었다 (도 1c). R4C-C3 은 HLA-G 단백질 동형체와 반응하였다.
- [0478] 추가의 분석을 위해, 하이브리도마 클론 15E7 및 scFv 클론 R4C-C3 을 선택하였다.
- [0479] **실시예 2: 마우스 모노클로날 항체 15E7 및 scFv R4C-C3 의 유전자적 특징분석**
- [0480] 모노클로날 항체 15E7 및 R4C-C3 scFv 의 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 cDNA 서열을, 표준 PCR 및 DNA 시퀀싱 방법을 사용하여 획득하였다.
- [0481] **모노클로날 항체 15E7**
- [0482] 15E7 의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 도 2a 에 제시되어 있다.
- [0483] 15E7 의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 도 3a 에 제시되어 있다.
- [0484] 경쇄 및 중쇄에서의 가장 큰 가변성은 항체의 특이성을 정의하는 상보성 결정 영역 (CDR) 으로 불리는 초가변 영역 내에 주로 위치한다. 15E7 VL 및 VH 서열을 분석하여, 각각, 도 2a 및 3a 에 제시된 바와 같이, 경쇄 및 중쇄의 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 묘사하였다.
- [0485] 15E7 κ 경쇄의 서열을 공지된 마우스 생식계열 면역글로불린 경쇄 서열과 비교하였다 (도 2b). 15E7 경쇄는 마우스 생식계열 IGKV1-117 로부터의 VL 세그먼트 및 마우스 생식계열 IGKJ1 로부터의 JK 세그먼트를 이용한다.
- [0486] 공지된 마우스 생식계열 면역글로불린 중쇄 서열에 대한 15E7 중쇄 (γ) 서열의 비교는, 15E7 중쇄가 마우스 생식계열 IGHV1-61 로부터의 VH 세그먼트, 마우스 생식계열 IGHJ2 로부터의 JH 세그먼트 및 마우스 생식계열 IGHD4-1 로부터의 DH 세그먼트를 이용한다는 것을 입증하였다 (도 3b).
- [0487] 이러한 아미노산 서열 비교는, 상응하는 마우스 생식계열과의, 15E7의 중쇄 (93.1%) 및 경쇄 (94.6%) 서열의 강한 상동성을 강조한다. 경쇄의 서열에서의 가변성은 FR1 및 FR4 뿐 아니라 CDR1 및 CDR3 영역 전반에 걸쳐 분포되어 있지만 (도 2b), 중쇄의 서열에서의 가변성은 주로 CDR 영역 및 FR3 에 한정되어 있다 (도 3b). 따라서, 이러한 결과는, 15E7 모노클로날 항체가, 친화성 성숙 과정을 거쳐, 특정 HLA-G 에피토프에 대한 강한 특이성/친화성을 획득한 마우스 IgG 라는 것을 입증한다.
- [0488] **scFv 클론 R4C-C3**
- [0489] scFv R4C-C3 의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 도 4a 에 제시되어 있다.
- [0490] R4C-C3 중쇄 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 도 5a 에 제시되어 있다. scFv R4C-C3 의 VL 및 VH 서열을 분석하고, 경쇄 및 중쇄의 CDR 영역을 도 4a 및 5a 에 도시된 바와 같이 묘사하였다.
- [0491] scFv R4C-C3 κ 경쇄의 서열을 공지된 마우스 생식계열 면역글로불린 경쇄 서열과 비교하였다. 이러한 정렬은, scFv R4C-C3 경쇄가, 마우스 생식계열 IGKV1-110 으로부터의 VL 세그먼트 및 마우스 생식계열 IGKJ1 로부터의 JK 세그먼트를 이용한다는 것을 입증하였다. scFv R4C-C3 과 이의 상응하는 마우스 생식계열 세그먼트 사이의 서열 정렬은, 도 4b 및 5b 에 제시되어 있다.
- [0492] 공지된 마우스 생식계열 면역글로불린 중쇄 서열에 대한 scFv 중쇄 (γ) 서열의 비교는, 이러한 사슬이 마우스 생식계열 IGHV1S126 으로부터의 VH 세그먼트, 마우스 생식계열 IGHJ2 로부터의 JH 세그먼트 및 마우스 생식계열 IGHD2-12 로부터의 DH 세그먼트를 이용한다는 것을 입증하였다. scFv R4C-C3 VH 와 상응하는 마우스 생식계열 사이의 서열 정렬은 도 5b 에 제시되어 있다. 이러한 아미노산 정렬은, Fv R4C-C3 의 경쇄 및 중쇄의 서열이, 생식계열 서열과 96.4% 및 82.8% 상동이라는 것을 나타냈다. 경쇄 서열에서의 가변성은 CDR3 영역에 주로 위치되어 있지만 (도 4b), 중쇄 서열에서의 가변성은 FR1, FR2, FR3 및 모든 CDR 전반에 걸쳐 분포되어 있

다 (도 5b). 중쇄의 서열에서의 높은 돌연변이율은, scFv R4C-C3 가 친화성 성숙 과정을 거쳐, HLA-G 유래 펩티드에 대하여 강한 친화성을 획득하였다는 것을 입증한다.

[0493] 실시예 3: 항-HLA-G 모노클로날 항체 15E7 의 특징분석

[0494] 단백질 분석

[0495] 15E7 모노클로날 항체를 SDS-PAGE 겔 전기영동으로 분석하였다 (도 6a). 중쇄 분자량은 약 50 kDa 이고, 경쇄 분자량은 약 25 kDa 이다. 각각 2 개의 카피를 갖는 경우, 15E7 의 분자량은 150 kDa 로 추정되는데, 이는 모노클로날 항체 15E7 이 컷과 IgG 2a 클래스에 속한다는 것을 입증한다.

[0496] 아이소타이핑 및 친화성 결정

[0497] 15E7 의 아이소타입을 ELISA 로 평가하였다. 15E7 아이소타입은 IgG2a 로 결정되었다.

[0498] 15E7 의 친화성을 재료 및 방법 섹션에 기재된 바와 같이 BLITZ 기술로 평가하였다. 대표적인 데이터는 도 6b 에 제시되어 있다. 5 내지 600 nM 범위의 다양한 농도의, BSA 에 컨쥬게이션된 PC-1 펩티드를, 바이오센서 칩에 커플링된 15E7 과 함께 인큐베이션하였다. 각각의 농도에 대하여, 회합 (k_a) 및 해리 (k_d) 속도를 측정하고, 친화성 상수 K_D (k_a/k_d) (본원에서 1.57 nM 로 평가됨) 를 계산하는데 사용하였다.

[0499] HLA-G 단백질 및 펩티드에 대한 특이성

[0500] 15E7 과, HLA-G5 및 G6 단백질, 및 cPC-1 펩티드의 반응성을 결정하기 위해, 유세포 분석법 기반 적정을 수행하였다.

[0501] 15E7 항체를 h β 2M-유리된 HLA-G5; HLA-G6 및 cPC-1 펩티드 코팅된 비드 뿐 아니라, 이의 음성 대응물 (커플링되지 않은 비드 또는 돌연변이된 펩티드로 코팅된 비드) 상에서 연속 희석법으로 적정하였다. 도 7a, 7b 및 7c 에 도시된 결과는, 15E7 이, 각각, 2 ng/mL 의 EC_{50} 값으로 cPC-1 펩티드에, 28 ng/mL 의 EC_{50} 값으로 재조합 HLA-G5 단백질에 및 120 ng/mL 의 EC_{50} 으로 재조합 단백질 HLA-G6 에 강하게 결합한다는 것을 보여준다. 이러한 분석은, 상이한 β 2M-유리된 HLA-G 동형체에 특이적으로 결합하는 15E7 의 능력을 입증하였다.

[0502] 세포 표면 상에서 발현되는 β 2M-유리된 HLA-G1 동형체에 결합하는 15E7 의 능력을 또한 평가하였다. 실제로, HLA-G1 유리된 동형체를 발현하는 K562-G1 및 K562-PV 세포를 15E7 항체의 순차적 희석액과 함께 인큐베이션하고, 특이적 결합을 아이소타입 대조군 (IgG2a) 과 비교하여 유세포 분석법으로 분석하였다. 도 8 에 도시된 결과는, 15E7 이, K562-PV 세포가 아니라 K562-G1 세포에 5.0 μ g/mL 의 EC_{50} 값으로 특이적으로 결합한다는 것을 보여준다.

[0503] 온화한 산 처리는, 세포 표면에 부착된 HLA 클래스 I 유리된 중쇄를 남기면서 세포 표면 β 2M 분자를 방출한다 (Polakova *et al.*, 1993; Storkus *et al.*, 1993). 미처리된 및 pH3.0 처리된 K562-G1 세포 상에서의 HLA-G 항원의 발현을, 천연 HLA-G/ β 2M 복합체에 대한 MEM-G/9 mAb 를 사용하여 유세포 분석법으로 분석하였다. 또한, 인간 β 2M 을 겨냥하는 mAb 를 사용하여 실험을 제어하고, 이의 방출을 입증하였다. MEM-G/9 mAb 뿐 아니라 항- β 2M mAb 는 미처리된 K562-G1 세포에 결합하지만, 산 처리는 이들의 결합을 감소시켰다. 대조적으로, 증가된 15E7 mAb 에 의한 마킹은, β 2M 유리된 HLA-G 중쇄를 인식한다는 것을 입증하였다 (도 9a). K562-PV 세포를 음성 대조군으로서 사용하였다 (도 9b).

[0504] 동일한 실험을 내인성 HLA-G1/ β 2M 복합체를 발현하는 JEG-3 세포에 대하여 수행하였다. 15E7 mAb 는 미처리된 JEG-3 세포에 결합하지 않았지만, 산 처리 후 염색은 증가하였고, 반면 MEM-G/9 및 항- β 2M mAb 의 염색은 백그라운드 값 근처로 떨어졌다 (도 9c).

[0505] 이러한 결과는, 15E7 mAb 가, β 2M 부재 하에 세포 표면 HLA-G 상에서 발현된 에피토프 및 면역원성 cPC-1 펩티드를 인식한다는 것을 확인시켜 준다.

[0506] 고전적 MHC 클래스 I 분자에 대한 교차-반응성 없음

[0507] 상기 언급된 바와 같이, 항-HLA-G 모노클로날 항체를 개발하는데 있어서의 주요 관심사 중 하나는, 고전적 MHC 클래스 I (MHC-I) 분자에 대한 교차-반응성이 없는, HLA-G 에 대하여 고도로 특이적 항체를 수득하는 것이었다. HLA-G 에 대한 15E7 의 특이성 및 고전적 MHC-I 분자와의 교차-반응성의 부재를, HLA-G 를 발현하지 않는, 상이한 인간 MHC-I 양성 세포주를 사용하여 유세포 분석법으로 평가하였다.

- [0508] 실제로, 표면 상에서 HLA-G 가 아닌 인간 고전적 MHC-I 분자를 발현하는 인간 림프종 세포주 (LCL-DES, LCL-BRO 및 RPMI8866) 를, 고정된 농도의 15E7 (20 $\mu\text{g/mL}$; 133 nM) 로 염색하였다. 이러한 농도는, K562-G1 세포의 80% 가 염색되었고 아이소타입 대조군과의 비특이적 결합이 이러한 투여량에서 검출되었기 때문에, 사용하였다. K562-G1 및 K562-PV 세포를, 각각, 양성 및 음성 대조군으로서 사용하였다. 도 10 은, 15E7 이 HLA-G1 발현 세포 (K562-G1) 에 강하게 결합하는 반면, 고전적 MHC-I 분자를 발현하는 HLA-G 음성 세포는 염색되지 않았다는 것을 보여준다. 이는, 15E7 모노클로날 항체가 HLA-G 단백질에 대하여 특이적이며, 고전적 MHC 클래스 I 분자에 대하여 어떠한 교차-반응성도 나타내지 않는다는 것을 입증한다.
- [0509] **논의**
- [0510] 본 연구는, HLA-G 펩티드 면역화 접근법을 기반으로 항-HLA-G 항체를 생산하는 방법을 보여준다. 면역화에 사용된 펩티드 (PC-1) 는 고전적 MHC 클래스 I 분자와 비교하여 HLA-G 에 대하여 고도로 특이적이며, 전장 HLA-G 와 이의 수용체 LILRB1 및 LILRB2 의 상호작용에 관여하는 아미노산을 함유하도록 디자인되었다.
- [0511] 본 발명자들은, 이러한 HLA-G $\alpha 3$ 영역의 소수성 특성에도 불구하고, 상이한 기술, 융합 (하이브리도마의 생성) 및 파지 디스플레이를 사용하여 항-HLA-G 모노클로날 항체를 개발할 수 있다는 것을 보여주었다.
- [0512] 상기 기재된 항-HLA-G 항체는 HLA-G 의 몇 가지 동형체를 인식할 수 있다. 이러한 항체는 내인성 세포 표면 $\beta 2\text{M}$ -유리된 HLA-G1 에 결합한다. 이는 고전적 MHC 클래스 I 분자와 교차 반응하지 않기 때문에, 이러한 HLA-G 특이적 항체는 진단 및 치료 목적으로 사용될 수 있다.

[0513]

참고문헌

- Agaugue S, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Role of HLA-G in tumor escape through expansion of myeloid-derived suppressor cells and cytokinic balance in favor of Th2 - versus Th1/Th17. *Blood* 2011; 117: 7021-31.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215:403-10.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:3389-402.
- Blaschitz A, Hutter H, Leitner V, Pilz S, Wintersteiger R, Dohr G, Sedlmayr P. Reaction patterns of monoclonal antibodies to HLA-G in human tissues and on cell lines: a comparative study. *Hum Immunol* 2000; 61: 1074-85.
- Carosella ED, et al., HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends Immunol* 2008; 29:125-32.
- Carosella ED, et al., Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood* 2008; 111:4862-70.
- Carosella ED, et al., HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. *Adv Immunol* 2015; 127:33-144.
- Clements CS, Kjer-Nielsen L, Kostenko L, Hoare HL, Dunstone MA, Moses E, Freed K, Brooks AG, Rossjohn J, McCluskey J. Crystal structure of HLA-G: a nonclassical MHC class I molecule expressed at the fetal-maternal interface. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 3360-5.
- Desai SA, et al., Structural relatedness of distinct determinants recognized by monoclonal antibody TP25.99 on beta 2-microglobulin-associated and beta 2-microglobulin-free HLA class I heavy chains. *J Immunol* 2000; 165:3275-83.
- Ellis SA, Palmer MS, McMichael AJ. Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule. *J Immunol* 1990; 144: 731-5.
- Favier, B., HoWangYin KY, Wu J, Caumartin J, Daouya M, Horuzsko A, Carosella ED, LeMaout J. Tolerogenic function of dimeric forms of HLA-G recombinant proteins: a comparative study in vivo. *PLoS One* 2011; 6: e21011.

[0514]

- Geraghty DE, Koller BH, Orr HR A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9145-9.
- HoWangYin KY, Loustau M, Wu J, Alegre E, Daouya M, Caumartin J, Sousa S, Horuzsko A, Carosella ED, LeMaout J. Multimeric structures of HLA-G isoforms function through differential binding to LILRB receptors. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69:4041-9
- Karlin S, Altschul SF. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:2264-8.
- Karlin S, Altschul SF. Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:5873-7.
- Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, Chan C, Chung HS, Eivazi A, Yoder SC, Vielmetter J, Carmichael DF, Hayes RJ, Dahiyat BI. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 4005–4010.
- Liang S, Baibakov B, Horuzsko A. HLA-G inhibits the functions of murine dendritic cells via the PIR-B immune inhibitory receptor. *Eur J Immunol* 2002; 32: 2418-26.
- Menier C, et al., Characterization of monoclonal antibodies recognizing HLA-G or HLA-E: new tools to analyze the expression of nonclassical HLA class I molecules. *Hum Immunol* 2003; 64:315-26.
- Moore GL, Chen H, Karki S, Lazar GA. Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *MAbs*. 2010 Mar-Apr;2(2):181-9.
- Moy FJ, et al., Analysis by NMR spectroscopy of the structural homology between the linear and the cyclic peptide recognized by anti-human leukocyte antigen class I monoclonal antibody TP25.99*. *J Biol Chem* 2000; 275:24679-85.
- Naji A, et al., Binding of HLA-G to ITIM-bearing Ig-like transcript 2 receptor suppresses B cell responses. *J Immunol* 2014; 192:1536-46.
- Polakova K, Karpatova M, Russ G. Dissociation of beta 2-microglobulin is responsible for selective reduction of HLA class I antigenicity following acid treatment of cells. *Mol Immunol* 1993; 30:1223-30.
- Qiu J, et al., Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance. *Am J Transplant* 2006; 6:2152-6.
- Storkus WJ, Zej HJ, Salter RD, Lotze MT. Identification of T-cell epitopes: rapid isolation of class I-presented peptides from viable cells by mild acid elution. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1993; 14: 94-103.
- Tanabe M, Sekimata M, Ferrone S, Takiguchi M. Structural and functional analysis of monomorphic determinants recognized by monoclonal antibodies reacting with the HLA class I alpha 3 domain. *J Immunol* 1992; 148:3202-9.
- Tripathi P, Agrawal S. The role of human leukocyte antigen E and G in HIV infection. *AIDS* 2007; 21:1395-404
- Yan WH, HLA-G expression in cancers: potential role in diagnosis, prognosis and therapy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2011; 11:76-89

[0515]

[0516]

도면

도면 1a

도메인 α 1

HLA-G GSHSMRYFSAAVSRPGRGEPRFIAMGVDDTQFVRFDSDSACPRMEPRAPWVEQGPYWEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQSEA
HLA-E GSHSLKYFHTSVSRPGRGEPRFTISGVYVDDTQFVRFDNDASPRMVPRAPWMEQEGSYWDRETRSDRTAQIFRNLRTLRGYYNQSEA
HLA-A2 GSHSMRYFFTSVRPGRGEPRFIATAGVYVDDTQFVRFDSDASQRMPEPRAPWIEQEGPYWDEGTRKVKAHQTHRVVDLGTLRGYYNQSEA
HLA-B7 GSHSMRYFYTSVRPGRGEPRFTISGVYVDDTQFVRFDSDASPREPRAPWIEQEGPYWDRNTQIYKAQQTDRSLRNLRGYYNQSEA
HLA-B44 GSHSMRYFCTAVSRPGRGEPRHFIAVGVYVDDTQFVRFDSDDESPPRGPWVERKGPYWDRETQYKYPQQTDRVSLRNLRGYYNQSEA
HLA-CW3 GSHSMRYFYTAMSRPGRGEPRFTIVGVYVDDTQFVRFDSDATSPRKEPRAPWIEQEGPYWDRQTQTSKNTQTFRNLRTAARYYNQSEA
 잔기 1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90

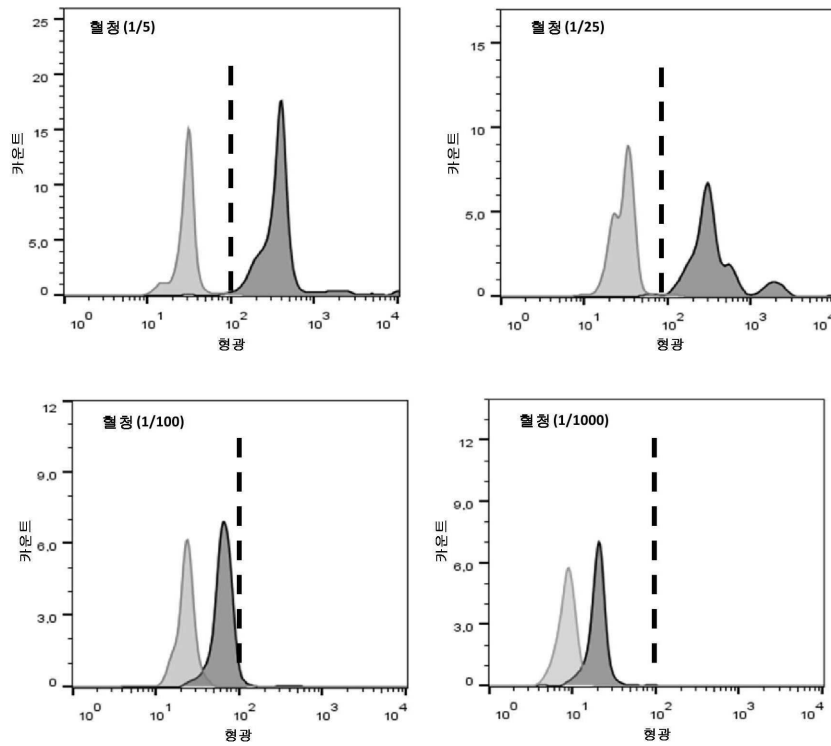
도메인 α 2

HLA-G SSHTLQWMI GCDLGS DGRLLRGYEQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQISKRKCEANVAEQRRAYLEGTQVWHLHRYLENGKEMLQRA
HLA-E GSHTLQWMHGCELGPDGRFLRGYEQYAYDGKDYILNEDLRSWTAADTAAQISEQKSNDASEAHHQAPAYLEDTCVWHLHRYLENGKETLIHL
HLA-A2 GSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTKHKWEAAHVAEQRLRAYLEGTQVWHLHRYLENGKETLQRT
HLA-B7 GSHTLQSMYGCDVGPDGRLLRGHDQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAARAEQRRAYLEGEQVWHLHRYLENGKDKLERA
HLA-B44 GSHITRMYGCDVGPDGRLLRGYDQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAR EAEQRLRAYLEGTQVWHLHRYLENGKETLQGA
HLA-CW3 GSHIIQRMYGCDVGPDGRLLRGYDQYAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAARVAEQDRAYLEGLCVESLRRYLENGKETLQRA
 잔기100.....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180..

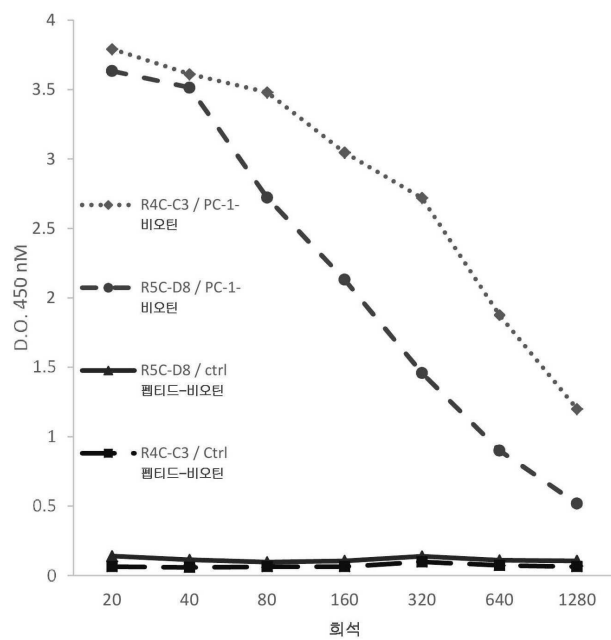
도메인 α 3

HLA-G DPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILTWQDGEDQTDVELVETRPAGDGTQKWAADVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMRWK
HLA-E EPPKTHVTHHPI SDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQDGEDQTDTELVETRPAGDGTQKWAADVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPEPVTLRWK
HLA-A2 DAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQDGEDQTDTELVETRPAGDGTQKWAADVVPVSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE
HLA-B7 DPPKTHVTHHPI SDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQDGEDQTDTELVETRPAGDRTFQKWAADVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE
HLA-B44 EHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQDGEDQTDTELVETRPAGDGTQKWAADVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWE
HLA-CW3 DPPKTHVTHHPI SDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQDGEDQTDTELVETRPAGDRTFQKWAADVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE
 잔기190.....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....

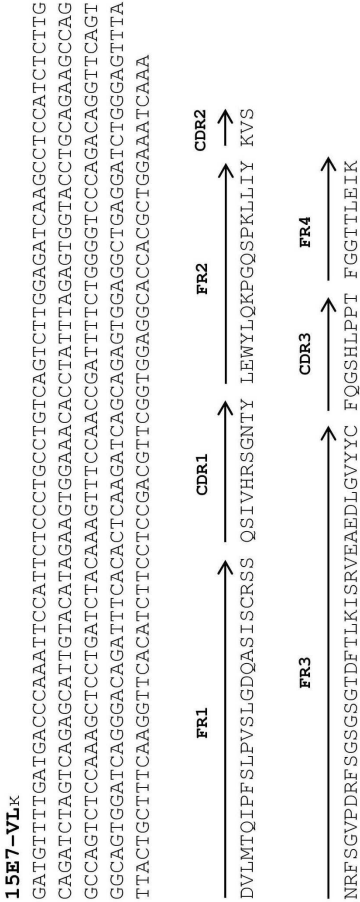
도면1b



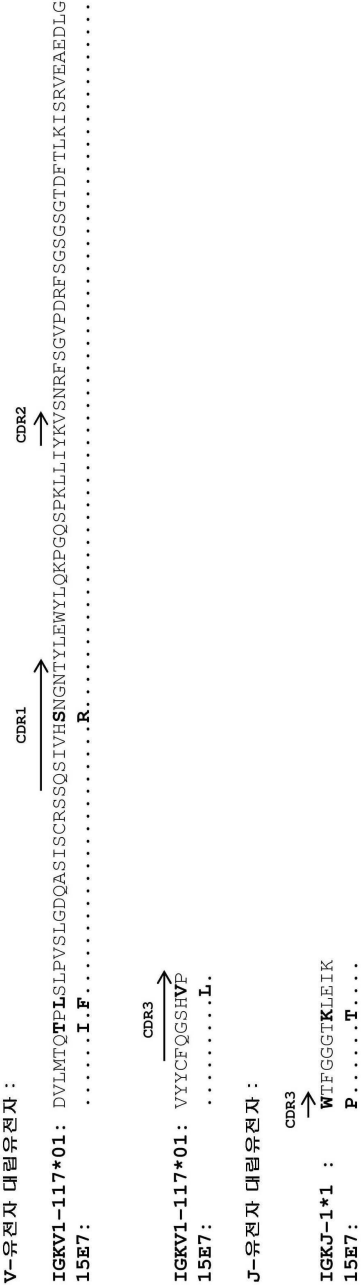
도면1c



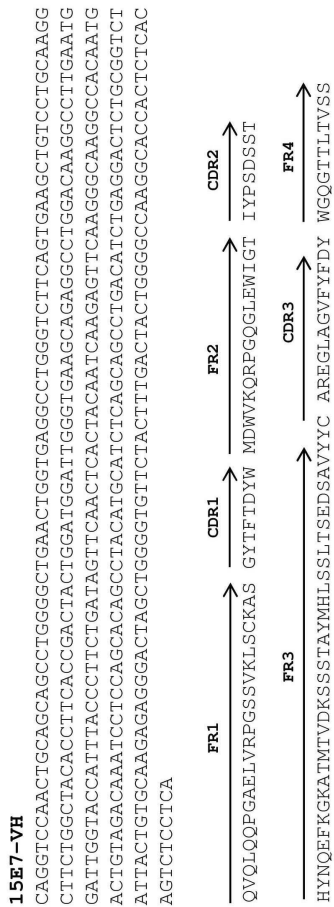
도면2a



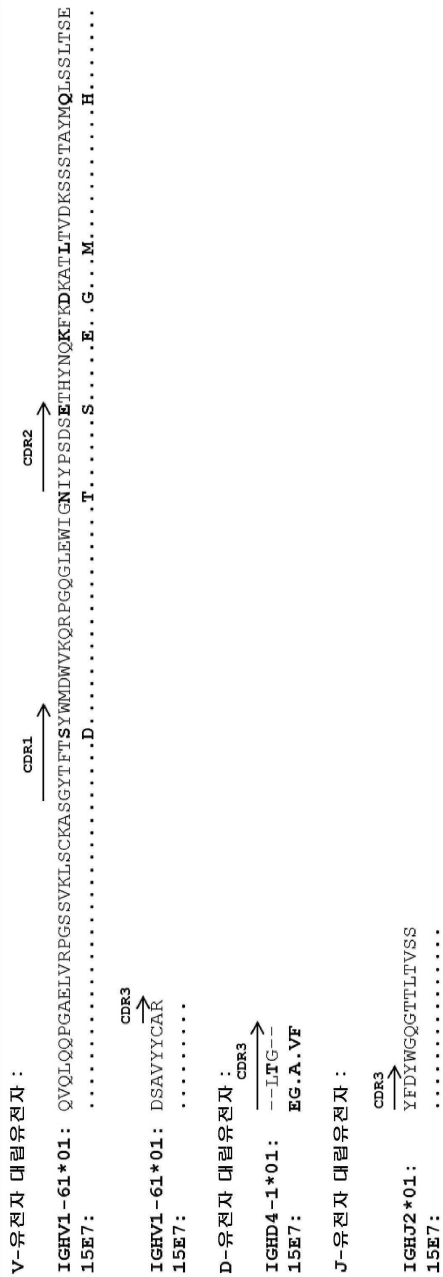
도면2b



도면3a



도면3b



도면4a



도면4b

V-유전자 대립유전자 :

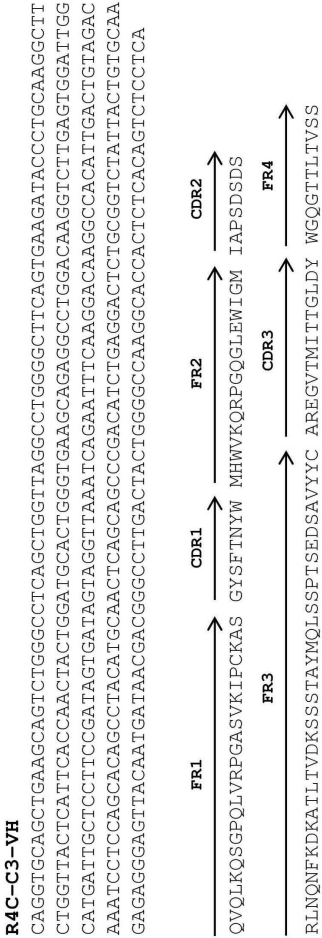
IGKV1-110*01 : DVVMTQTPLSLPVSLGDQASTISCRSSQSLSHSNGNTYLHWYLRKPGQSPKLLIYKVSNRFGVPDRFSGSGSGTDFTLL
R4C-C3 :L.....^{CDR1}.....^{CDR2}.....

IGKV1-110*01 : KISRVEADLGVIYFCSQSTHVP
R4C-C3 :F.....^{CDR3}

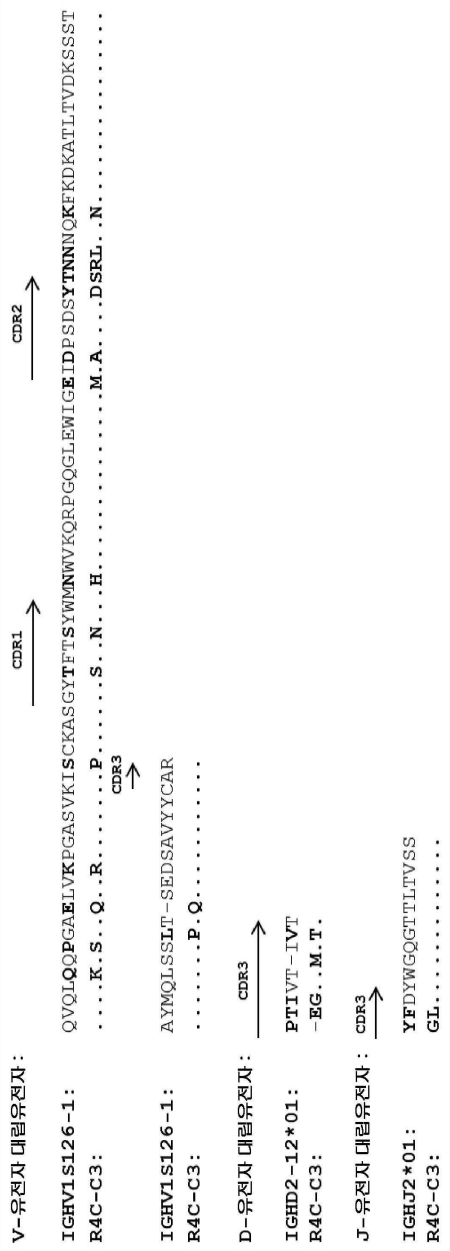
J-유전자 대립유전자 :

IGJJ1*01 : WIFGGGTLKEIK
R4C-C3 : P.....I.....^{CDR3}

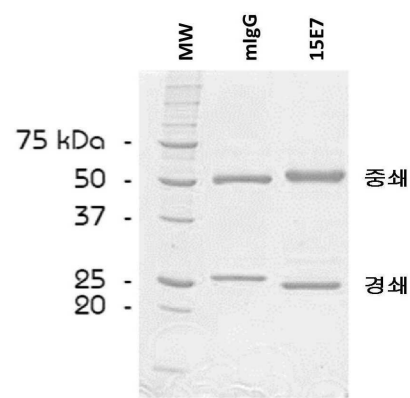
도면5a



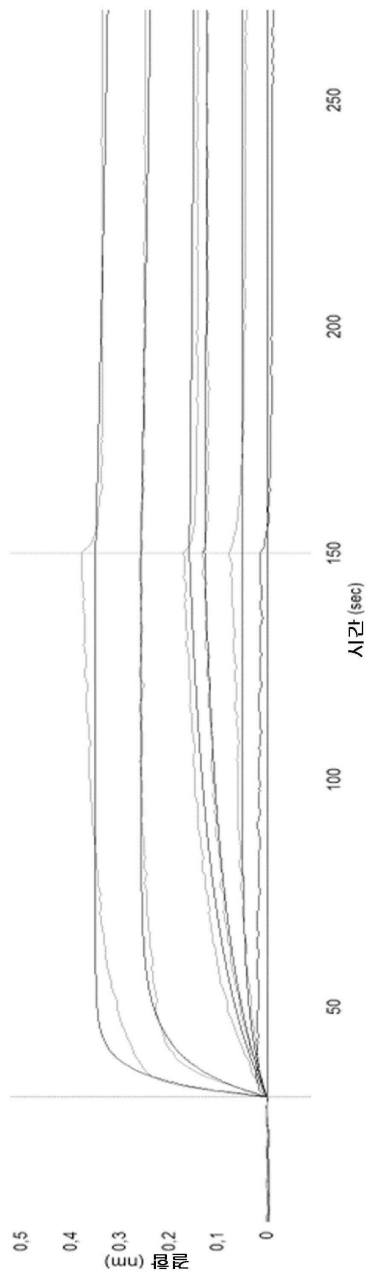
도면5b



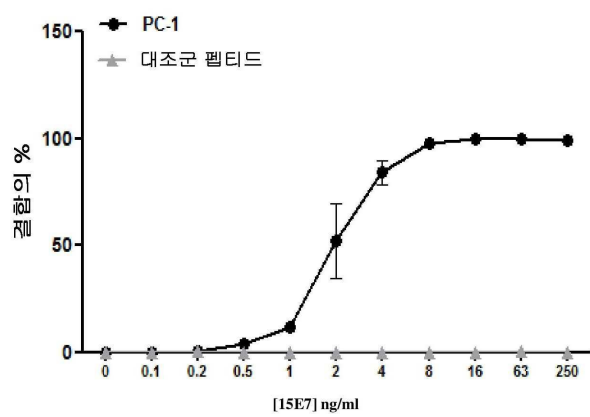
도면6a



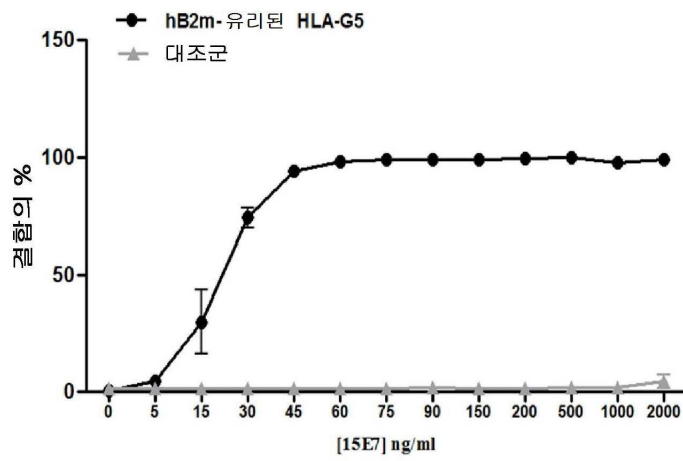
도면6b



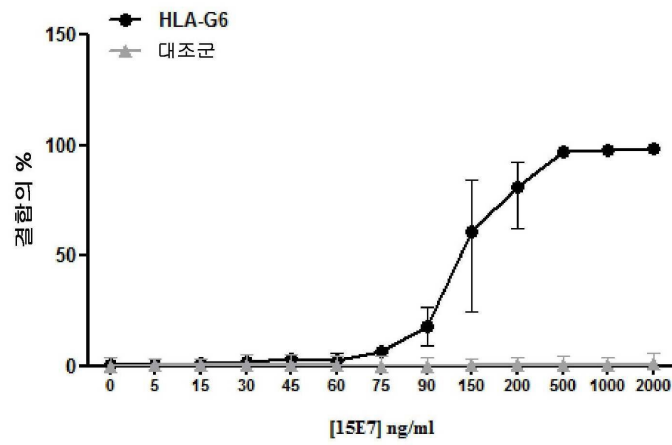
도면7a



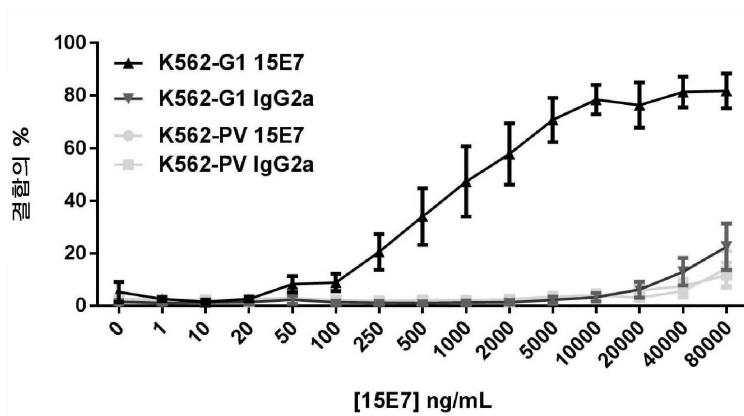
도면7b



도면7c



도면8



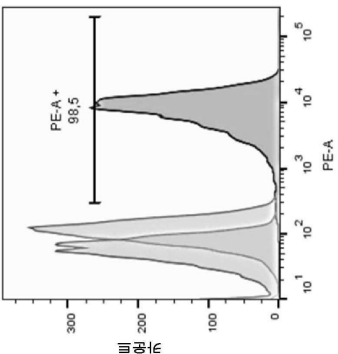
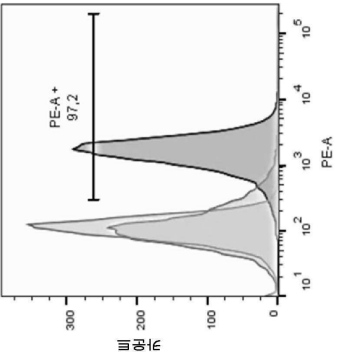
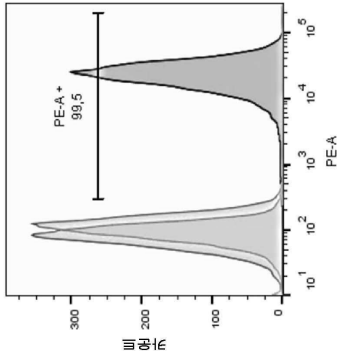
도면9a

K562-G1

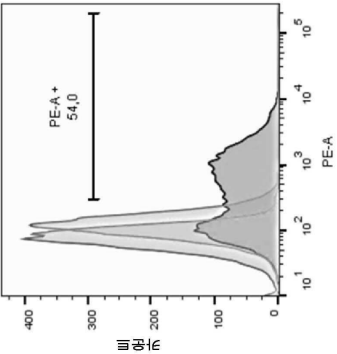
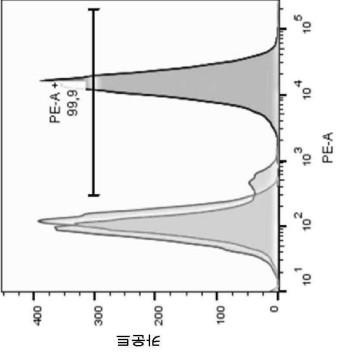
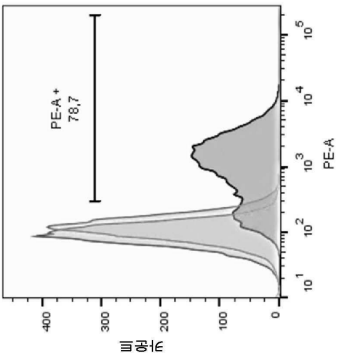
MEM-G/9

15E7

hβ2M



처리 전



처리 후

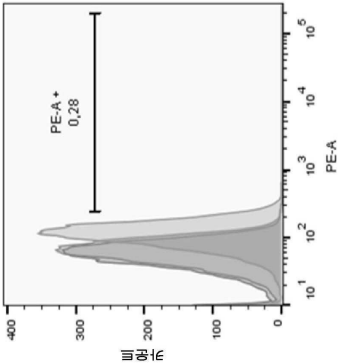
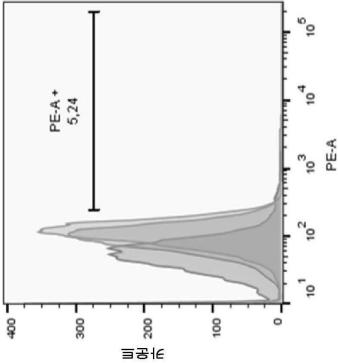
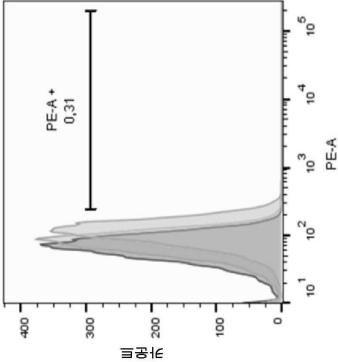
도면9b

K562-PV

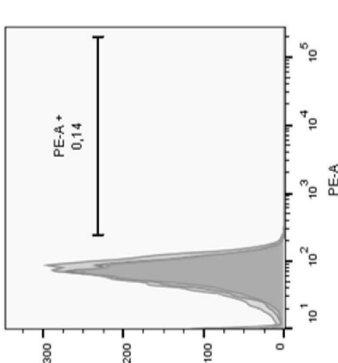
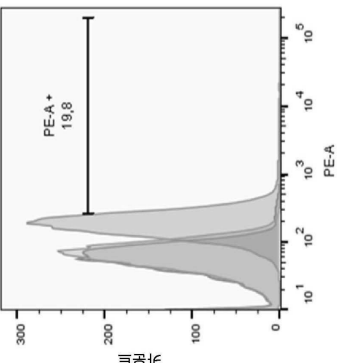
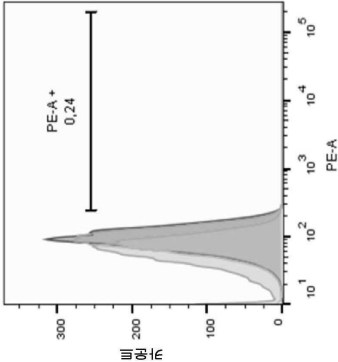
MEM-G/9

15E7

h82M



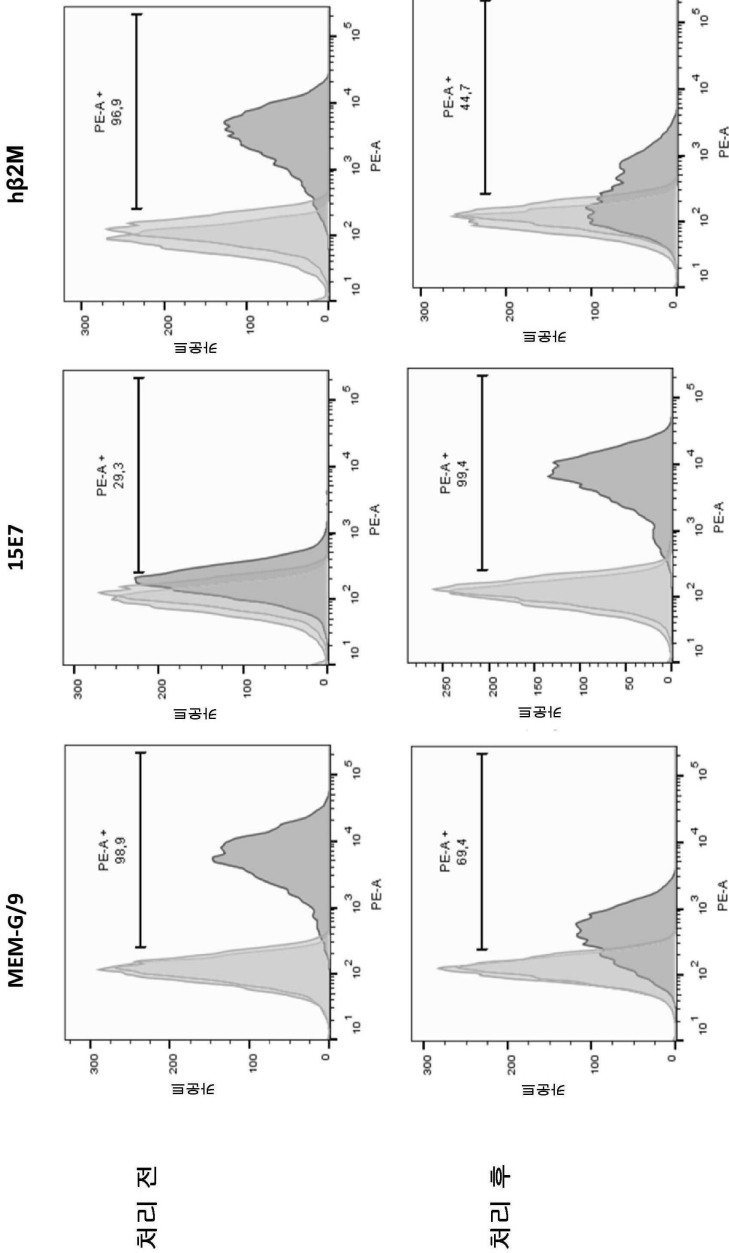
처리 전



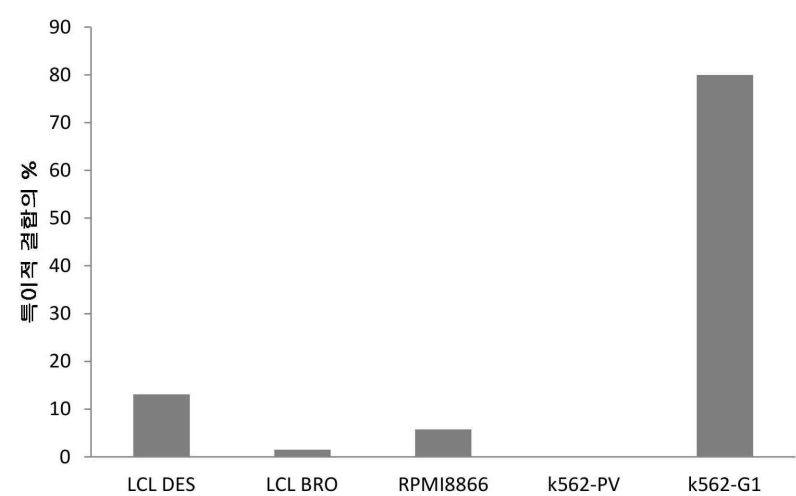
처리 후

도면9c

JEG-3



도면10



서열 목록

<110> INVECTYS

<120> Anti HLA-G specific antibodies

<130> B2258PC00

<160> 102

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 26

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser

20 25

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Gln Ser Ile Val His Arg Ser Gly Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 3

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

<210> 4
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 4

Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly

20 25 30
 Val Tyr Tyr Cys

35
 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 5

Phe Gln Gly Ser His Leu Pro Pro Thr
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 6

Phe Gly Gly Thr Thr Leu Glu Ile Lys
 1 5

<210> 7

<211> 25

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Trp

1 5

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

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

1 5 10 15

Thr

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Ser Thr

1 5

<210> 11

<211> 38
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 11
 His Tyr Asn Gln Glu Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
 20 25 30
 Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 35

<210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 12
 Ala Arg Glu Gly Leu Ala Gly Val Phe Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 13

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 14
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 14
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 20 25

<210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 15

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10

<210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 16

Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 1 5 10 15
 Tyr

<210> 17
 <211> 36
 <212> PRT

<213> Mus musculus
 <400> 17

Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly
 20 25 30

Val Tyr Phe Cys

35
 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 18

Ser Gln Ser Thr His Phe Pro Pro Thr
 1 5

<210> 19

<211> 10

<212>

> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Ile

1 5 10

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr

1 5

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

1 5 10

<210> 22

<211> 25

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Pro Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp

1 5

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

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

1 5 10 15

Met

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Ile Ala Pro Ser Asp Ser Asp Ser

1 5

<210> 26

<211> 38

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

Arg Leu Asn Gln Asn Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys

1 5 10 15

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp

20 25 30

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 27

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

Ala Arg Glu Gly Val Thr Met Ile Thr Thr Gly Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 29

<211> 275

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val Ser Arg Pro Gly

1 5 10 15

Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln

20 25 30

Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser Ala Cys Pro Arg Met Glu Pro Arg

35 40 45

Ala Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Glu Thr

50 55 60

Arg Asn Thr Lys Ala His Ala Gln Thr Asp Arg Met Asn Leu Gln Thr

65 70 75 80

Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Ser Ser His Thr Leu Gln

85 90 95

Trp Met Ile Gly Cys Asp Leu Gly Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly

100 105 110

Tyr Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Ala Leu Asn Glu

115 120 125

Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Lys
130 135 140
Arg Lys Cys Glu Ala Ala Asn Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu
145 150 155 160
Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu His Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
165 170 175
Glu Met Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His
180 185 190
Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe
195 200 205
Tyr Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
210 215 220
Thr Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
225 230 235 240
Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg
245 250 255
Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu
260 265 270
Arg Trp Lys
275
<210> 30
<211> 275
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 30
Gly Ser His Ser Leu Lys Tyr Phe His Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly
1 5 10 15
Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ser Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
20 25 30
Phe Val Arg Phe Asp Asn Asp Ala Ala Ser Pro Arg Met Val Pro Arg
35 40 45
Ala Pro Trp Met Glu Gln Glu Gly Ser Glu Tyr Trp Asp Arg Glu Thr

50 55 60
 Arg Ser Ala Arg Asp Thr Ala Gln Ile Phe Arg Val Asn Leu Arg Thr
 65 70 75 80

 Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Leu Gln
 85 90 95
 Trp Met His Gly Cys Glu Leu Gly Pro Asp Gly Arg Phe Leu Arg Gly
 100 105 110
 Tyr Glu Gln Phe Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Thr Leu Asn Glu
 115 120 125
 Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Val Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Glu
 130 135 140
 Gln Lys Ser Asn Asp Ala Ser Glu Ala Glu His Gln Arg Ala Tyr Leu

 145 150 155 160
 Glu Asp Thr Cys Val Glu Trp Leu His Lys Tyr Leu Glu Lys Gly Lys
 165 170 175
 Glu Thr Leu Leu His Leu Glu Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His
 180 185 190
 Pro Ile Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe
 195 200 205
 Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Gln Asp Gly Glu Gly His
 210 215 220

 Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
 225 230 235 240
 Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg
 245 250 255
 Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Val Thr Leu
 260 265 270
 Arg Trp Lys
 275
 <210> 31
 <211> 275
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly

1 5 10 15
Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
20 25 30
Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg
35 40 45
Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr
50 55 60
Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr
65 70 75 80

Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln
85 90 95
Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly
100 105 110
Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu
115 120 125
Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys
130 135 140
His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu

145 150 155 160
Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
165 170 175
Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His His
180 185 190
Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe
195 200 205
Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
210 215 220

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

225 230 235 240
 Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg
 245 250 255
 Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu
 260 265 270
 Arg Trp Glu
 275
 <210> 32
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 32
 Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Tyr Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly

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

 Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Leu Gln
 85 90 95
 Ser Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Pro Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly
 100 105 110
 His Asp Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu
 115 120 125
 Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Thr Gln
 130 135 140
 Arg Lys Trp Glu Ala Ala Arg Glu Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu

 145 150 155 160

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

Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Arg Thr
225 230 235 240
Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg
245 250 255
Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu
260 265 270

Arg Trp Glu
275

<210> 33
<211> 274
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 33

Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Cys Thr Ala Val Ser Arg Pro Gly

1 5 10 15
Arg Gly Glu Pro His Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
20 25 30
Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Asp Glu Ser Pro Arg Gly Glu Pro Arg
35 40 45
Ala Pro Trp Val Glu Arg Lys Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Arg Glu Thr
50 55 60
Gln Lys Tyr Lys Pro Gln Ala Gln Thr Asp Arg Val Ser Leu Arg Asn
65 70 75 80

Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Ile Ile Arg

85 90 95
Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Pro Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly Tyr
100 105 110
Asp Gln His Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp
115 120 125
Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asn Thr Ala Ala Gln Ile Thr Gln Arg
130 135 140
Lys Trp Glu Ala Ala Arg Glu Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu

145 150 155 160
Gly Leu Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Lys Asn Gly Lys Glu
165 170 175
Thr Leu Gln Gly Ala Glu His Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro
180 185 190
Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr
195 200 205
Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Trp Asp Gly Glu Asp Gln Thr
210 215 220

Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe
225 230 235 240
Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr
245 250 255
Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr Leu Arg
260 265 270
Trp Glu

<210> 34
<211> 275
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 34

Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Tyr Thr Ala Met Ser Arg Pro Gly

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

 Ala Ala Arg Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Ile Ile Gln
 85 90 95
 Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Pro Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly
 100 105 110
 Tyr Asp Gln Asp Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu
 115 120 125
 Asp Leu Ser Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Thr Gln
 130 135 140
 Arg Lys Trp Glu Ala Ala Arg Val Ala Glu Gln Asp Arg Ala Tyr Leu

 145 150 155 160
 Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
 165 170 175
 Glu Thr Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His
 180 185 190
 Pro Ile Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ser Leu Gly Phe
 195 200 205
 Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
 210 215 220

 Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Arg Thr
 225 230 235 240
 Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg
 245 250 255
 Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu
 260 265 270

Arg Trp Glu

275

<210> 35

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 35

gatgttttga tgaccctaat tccattctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagica gagcattgia catagaagtg gaaacaccta tttagagtgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctgggtgcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggcctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatcttcct 300

ccgacgttcg gtggaggcac cagctggaa atcaaa 336

<210> 36

<211> 100

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 36

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser His Val Pro

100

<210> 37

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 37

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 38

<211> 360

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 38

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaggc ctgggtcttc agtgaagctg 60

tcctgcaagg ctcttggtca caccttcacc gactactgga tggattgggt gaagcagagg 120

ccctggacaag gccttgaatg gatttggtacc atttaccctt ctgatagtgc aactcactac 180

aatcaagagt tcaagggcaa ggccacaatg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240

atgcattctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagaggga 300

ctagctgggg tgttctactt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca 360

360

<210> 39

<211> 98

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 39

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65	70	75	80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg			
<210>	40		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	Mus musculus		
<400>	40		
Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser			
1	5	10	15
<210>	41		
<211>	336		
<212>	DNA		
<213>	Mus musculus		
<400>	41		
gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc			60
atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta ttacattgg			120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtctc caaccgattt			180
tctgggtgcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc			240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acattttcct			300
ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcata			336
<210>	42		
<211>	100		
<212>	PRT		
<213>	Mus musculus		
<400>	42		
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser			
	20	25	30

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro
 100

<210> 43
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 43

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10
 <210> 44
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 44

gatgttttga tgacceaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta ttacattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcct 300
 cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaacggg ctgatgctgc accaactgta 360
 tccgcggccg ca 372

<210> 45
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 45

Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

1	5	10	
<210>	46		
<211>	363		
<212>	DNA		
<213>	Mus musculus		
<400>	46		
caggtgcagc tgaagcagtc tgggcctcag ctggtaggc ctggggcttc agtgaagata		60	
ccctgcaagg ctcttggtta ctcttcacc aactactgga tgcactgggt gaagcagagg		120	
cctggacaag gtcttgagtg gattggcatg attgctcctt ccgatatga tagtaggtta		180	
aatcagaatt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac		240	
atgcaactca gcagcccgac atctgaggac tctgcgtctt attactgtgc aagagaggga		300	

gttacaatga taacgacggg ccttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctec	360
tca	363

<210> 47
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 47

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

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

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

Ala Arg

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

Pro Thr Ile Val Thr Ile Val Thr

1 5

<210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Immunogenic peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)

<223> Xaa at position 1 is absent, cysteine or valine or KTHV or CKTHV

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (15)

<223> Xaa at position 15 is absent or cysteine

<400> 49

Xaa Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Xaa

1 5 10 15

<210> 50

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> fragment of immunogenic peptide

<400> 50

Lys Thr His Val

1

<210> 51

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> fragment of immunogenic sequence

<400> 51

Cys Lys Thr His Val

1 5

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> immunogenic peptide

<400> 52

Cys Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys

1 5 10 15

<210> 53

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> immunogenic peptide

<400> 53

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

1 5 10 15

Leu Arg Cys

<210> 54

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg

1 5 10

<210> 55

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys

1 5 10

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Val Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys

1 5 10 15

<210> 57

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Val Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg

1 5 10

<210> 58

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> immunogenic peptide

<400> 58

Cys Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg

1 5 10

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Lys Thr His Val Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu

1 5 10 15

Arg

<210> 60

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Lys Thr His Val Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu

1 5 10 15

Arg Cys

<210> 61

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> immunogenic peptide

<400> 61

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

1 5 10 15

Leu Arg

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutant peptide

<400> 62

Cys Thr His His Pro Val Ala Asp Ala Glu Ala Thr Leu Arg Cys

1 5 10 15

<210> 63

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 63

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser His Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gly Thr Thr Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 64

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 64

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Thr Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Ser Thr His Tyr Asn Gln Glu Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Gly Leu Ala Gly Val Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 65

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 65

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

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

<210> 66

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 66

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

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

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

<210> 67

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 67

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gln Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr

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

Ala Arg Glu Gly Val Thr Met Ile Thr Thr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 68

<211> 26
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 68

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ala Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
 20 25

<210> 69
 <211> 7

<212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 69

Ser Ser Val Ser Ser Asn Phe
 1 5

<210> 70
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 70

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile
 1 5 10 15
 Tyr

<210> 71
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 71

Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Gly
 1 5 10 15

Ile Ser Tyr Ser Leu Thr Val Ser Asn Met Glu Ala Glu Asn Asp Ala
 20 25 30

Ala Tyr Tyr Cys

35

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 72

Gln Gln Trp Asn Ala Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 73

<211> 25

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 73

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

1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser

20 25

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 74

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp

1 5

<210> 75

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 75

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

1 5 10 15

Glu

```

<210>    76
<211>    10
<212>    PRT
<213>    Mus musculus
<
400>    76
Val Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr
    1          5          10
<210>    77
<211>    38
<212>    PRT
<213>    Mus musculus
<400>    77
Ser Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
    1          5          10          15
Ala Asn Ser Arg Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
          20          25          30
Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys
          35
<210>    78
<211>    5
<212>
>    PRT
<213>    Mus musculus
<400>    78
Thr Thr Gly Asp Tyr
    1          5
<210>    79
<211>    26
<212>    PRT
<213>    Mus musculus
<400>    79
Asp Val Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
    1          5          10          15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser

```

20 25

<210> 80

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 80

Gln Ser Leu Val Asn Ser Asn Gly Asn Thr Leu

1 5 10

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 81

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 82

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 82

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 83

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 83

Gly Leu Thr Phe Ser Ser Tyr Trp

1 5

<210> 84

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 84

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

1 5 10 15

Glu

<210> 85

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 85

Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asn Tyr Val Lys

1 5 10

<210> 86

<211> 38

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 86

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

1 5 10 15

Ser Lys Gly Arg Leu Tyr Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Gly Asp Asp

20 25 30

Thr Gly Ile Tyr Phe Cys

35

<210> 87

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 87

Gln Thr Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 88

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr

1 5

<210> 89

<211> 25

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 89

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 90

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 90

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Asn Trp

1 5

<210> 91

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 91

Ile Thr Trp Val Arg Leu Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10 15

Asp

<210> 92

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 92

Ile Tyr Pro Gly Asp Ala Ser Thr

1 5

<210> 93

<211> 38

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 93

His Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 94

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 94

Ala Arg Glu Gln Val Gln Phe Ala Met Phe Phe Asp Val

1 5 10

<210> 95

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 95

Trp Gly Thr Gly Ala Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 96

<211> 25

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 96

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

1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 97

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 97

Gly Tyr Thr Phe Ala Arg Tyr Trp

1 5

<210> 98

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 98

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

1 5 10 15

Asp

<210> 99

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 99

Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Ser Thr

1 5

<210> 100

<211> 38

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 100

His Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 101

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 101

Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 102

<211> 38

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 102

His Tyr Asn Gln Glu Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys

1 5 10 15

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met His Leu Gly Ser Leu Thr Ser Glu Asp

20 25 30

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

35