(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년06월21일
(11) 등록번호 10-2677704
(24) 등록일자 2024년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/24 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/248 (2013.01)
G01N 33/6869 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7021187(분할)
(22) 출원일자(국제) 2013년05월30일
심사청구일자 2022년07월20일
(85) 번역문제출일자 2022년06월22일
(65) 공개번호 10-2022-0092644
(43) 공개일자 2022년07월01일
(62) 원출원 특허 10-2020-7035121
원출원일자(국제) 2013년05월30일
심사청구일자 2021년01월04일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2013/064975
(87) 국제공개번호 WO 2013/180200
국제공개일자 2013년12월05일
(30) 우선권주장
JP-P-2012-123781 2012년05월30일 일본(JP)
JP-P-2012-177311 2012년08월09일 일본(JP)
(56) 선행기술조사문헌
US20060141456 A1*
US20110305714 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
추가이 세이야쿠 가부시키가이샤
일본국 도쿄도 기타쿠 우키마 5쵸메 5반 1고
(72) 발명자
이가와 도모유키
일본국 시즈오카 고템바시 고마카도 1쵸메 135 추가이 세이야쿠 가부시키가이샤 내
담바 시게로
일본국 시즈오카 고템바시 고마카도 1쵸메 135 추가이 세이야쿠 가부시키가이샤 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

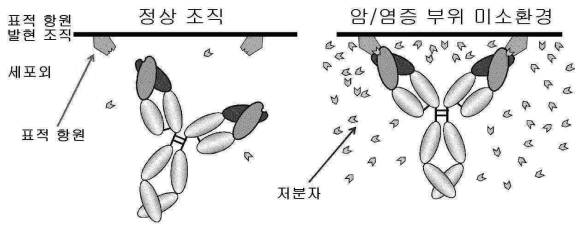
전체 청구항 수 : 총 36 항 심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 **표적 조직 특이적 항원 결합 분자**

(57) 요 약

본 발명자들은 표적 조직 특이적인 화합물의 농도에 의존하여 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 분자를 창작함으로써 상기 과제를 해결할 수 있는 것을 발견하였다. 본원 발명의 항원 결합 분자를 사용함으로써 표적 조직에 기인하는 각종 질환을 표적 조직 특이적으로 치료하는 것이 가능해진다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자
다츠미 가나코
일본국 시즈오카 고텐바시 고마카도 1쵸메 135 추가이 세이야쿠 가부시키가이샤 내
시미즈 슌
일본국 시즈오카 고텐바시 고마카도 1쵸메 135 추가이 세이야쿠 가부시키가이샤 내
가도노 쇼지로
일본국 가나가와 가마쿠라시 가지와라 200 추가이 세이야쿠 가부시키가이샤 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

이하 (a) 내지 (c)의 공정:

(a) 표적 조직 특이적인 화합물의 제1 농도에서 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 얻는 공정,

(b) 상기 제1 농도와 상이한, 표적 조직 특이적인 화합물의 제2 농도에서 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 얻는 공정, 및

(c) 상기 표적 조직 특이적인 화합물의 제1 및 제2 농도에서 항원 결합 활성이 상이한 항원 결합 도메인을 선택하는 공정을 포함하는,

표적 조직 특이적인 화합물의 농도에 따라 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 분자의 스크리닝방법으로서,

상기 항원 결합 분자는 항체 또는 항체 단편이고, 상기 표적 조직 특이적인 화합물은 아데노신, 아데노신 3인산, 이노신, 알라닌, 글루타민산, 아스파라긴산, 키누레닌, 프로스타글란딘 E2, 숙신산, 구연산 및 1-메틸니코틴아미드로부터 선택되는 하나 이상의 화합물인, 스크리닝방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 제2 농도가 제1 농도보다 높은 농도인, 스크리닝방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 제1 농도가 0인, 스크리닝방법.

청구항 4

이하 (a) 내지 (c)의 공정:

(a) 표적 조직 특이적인 화합물의 제1 농도에서 항원 결합 도메인 또는 그들의 라이브러리를 항원에 접촉시키는 공정,

(b) 상기 공정(a)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인을 상기 제1 농도와 상이한 표적 조직 특이적인 화합물의 제2 농도에 두는 공정, 및

(c) 상기 공정(b)에서 해리된 항원 결합 도메인을 단리하는 공정을 포함하는,

표적 조직 특이적인 화합물의 농도에 따라 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 분자의 스크리닝방법으로서,

상기 항원 결합 분자는 항체 또는 항체 단편이고, 상기 표적 조직 특이적인 화합물은 아데노신, 아데노신 3인산, 이노신, 알라닌, 글루타민산, 아스파라긴산, 키누레닌, 프로스타글란딘 E2, 숙신산, 구연산 및 1-메틸니코틴아미드로부터 선택되는 하나 이상의 화합물인, 스크리닝방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 제2 농도가 제1 농도보다 높은 농도인, 스크리닝방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 제1 농도가 0인, 스크리닝방법.

청구항 7

이하 (a) 내지 (d)의 공정:

(a) 표적 조직 특이적인 화합물의 제1 농도에서 항원 결합 도메인 또는 그들의 라이브러리를 항원에 접촉시키는 공정,

(b) 상기 공정(a)에서 항원에 결합하지 않는 항원 결합 도메인 또는 그들의 라이브러리를 선택하는 공정,

(c) 상기 공정(b)에서 선택된 항원 결합 도메인 또는 그들의 라이브러리를 상기 제1 농도와는 상이한 표적 조직 특이적인 화합물의 제2 농도에서 항원에 결합시키는 공정, 및

(d) 상기 공정(c)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인을 단리하는 공정을 포함하는,

표적 조직 특이적인 화합물의 농도에 따라 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 분자의 스크리닝방법으로서,

상기 항원 결합 분자는 항체 또는 항체 단편이고, 상기 표적 조직 특이적인 화합물은 아데노신, 아데노신 3인산, 이노신, 알라닌, 글루타민산, 아스파라긴산, 키누레닌, 프로스타글란딘 E2, 숙신산, 구연산 및 1-메틸니코틴아미드로부터 선택되는 하나 이상의 화합물인, 스크리닝방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 제2 농도가 제1 농도보다 높은 농도인, 스크리닝방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 제1 농도가 0인, 스크리닝방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

항원 결합 분자가 항체 중쇄 가변 영역(VH) 및 항체 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는, 스크리닝방법.

청구항 15

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

항원 결합 분자가 중화 활성을 갖는, 스크리닝방법.

청구항 16

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

항원 결합 분자가 세포상해 활성을 갖는, 스크리닝방법.

청구항 17

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

항원 결합 분자가 Fc영역을 포함하는, 스크리닝방법.

청구항 18

제 17 항에 있어서,

상기 Fc영역이 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8에 기재된 정상영역(constant region)에 포함되는 Fc영역인, 스크리닝방법.

청구항 19

제 17 항에 있어서,

상기 Fc영역이 천연형 인간 IgG의 Fc영역의 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성보다도 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성이 높은 FcγR 결합 개변 Fc영역을 포함하고, 상기 Fc 영역이,

상기 FcγR 결합 개변 Fc영역의 아미노산 서열 중, EU 넘버링으로 표시되는 ;

221번 위치의 아미노산이 Lys 또는 Tyr,

222번 위치의 아미노산이 Phe, Trp, Glu 또는 Tyr,

223번 위치의 아미노산이 Phe, Trp, Glu 또는 Lys,

224번 위치의 아미노산이 Phe, Trp, Glu 또는 Tyr,

225번 위치의 아미노산이 Glu, Lys 또는 Trp,

227번 위치의 아미노산이 Glu, Gly, Lys 또는 Tyr,

228번 위치의 아미노산이 Glu, Gly, Lys 또는 Tyr,

230번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Gly 또는 Tyr,

231번 위치의 아미노산이 Glu, Gly, Lys, Pro 또는 Tyr,

232번 위치의 아미노산이 Glu, Gly, Lys 또는 Tyr,

233번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

234번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

235번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

236번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

237번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

238번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

239번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

240번 위치의 아미노산이 Ala, Ile, Met 또는 Thr,

241번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Leu, Arg, Trp 또는 Tyr,

243번 위치의 아미노산이 Leu, Glu, Leu, Gln, Arg, Trp 또는 Tyr,

244번 위치의 아미노산이 His,

245번 위치의 아미노산이 Ala,

246번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, His 또는 Tyr,

247번 위치의 아미노산이 Ala, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Thr, Val 또는 Tyr,

249번 위치의 아미노산이 Glu, His, Gln 또는 Tyr,

250번 위치의 아미노산이 Glu 또는 Gln,

251번 위치의 아미노산이 Phe,

254번 위치의 아미노산이 Phe, Met 또는 Tyr,

255번 위치의 아미노산이 Glu, Leu 또는 Tyr,

256번 위치의 아미노산이 Ala, Met 또는 Pro,

258번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, His, Ser 또는 Tyr,

260번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, His 또는 Tyr,

262번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Phe, Ile 또는 Thr,

263번 위치의 아미노산이 Ala, Ile, Met 또는 Thr,

264번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr,

265번 위치의 아미노산이 Ala, Leu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

266번 위치의 아미노산이 Ala, Ile, Met 또는 Thr,

267번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

268번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Thr, Val 또는 Trp,

269번 위치의 아미노산이 Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

270번 위치의 아미노산이 Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr,

271번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

272번 위치의 아미노산이 Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

273번 위치의 아미노산이 Phe 또는 Ile,

274번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

275번 위치의 아미노산이 Leu 또는 Trp,

276번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

278번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val 또는

Trp,

279번 위치의 아미노산이 Ala,

280번 위치의 아미노산이 Ala, Gly, His, Lys, Leu, Pro, Gln, Trp 또는 Tyr,

281번 위치의 아미노산이 Asp, Lys, Pro 또는 Tyr,

282번 위치의 아미노산이 Glu, Gly, Lys, Pro 또는 Tyr,

283번 위치의 아미노산이 Ala, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Arg 또는 Tyr,

284번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Leu, Asn, Thr 또는 Tyr,

285번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Lys, Gln, Trp 또는 Tyr,

286번 위치의 아미노산이 Glu, Gly, Pro 또는 Tyr,

288번 위치의 아미노산이 Asn, Asp, Glu 또는 Tyr,

290번 위치의 아미노산이 Asp, Gly, His, Leu, Asn, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr,

291번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Gly, His, Ile, Gln 또는 Thr,

292번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Pro, Thr 또는 Tyr,

293번 위치의 아미노산이 Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

294번 위치의 아미노산이 Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

295번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

296번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr 또는 Val,

297번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

298번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Met, Asn, Gln, Arg, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

299번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp 또는 Tyr,

300번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val 또는 Trp,

301번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, His 또는 Tyr,

302번 위치의 아미노산이 Ile,

303번 위치의 아미노산이 Asp, Gly 또는 Tyr,

304번 위치의 아미노산이 Asp, His, Leu, Asn 또는 Thr,

305번 위치의 아미노산이 Glu, Ile, Thr 또는 Tyr,

311번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Asn, Thr, Val 또는 Tyr,

313번 위치의 아미노산이 Phe,

315번 위치의 아미노산이 Leu,

317번 위치의 아미노산이 Glu 또는 Gln,

318번 위치의 아미노산이 His, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val 또는 Tyr,

320번 위치의 아미노산이 Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Asn, Pro, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

322번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Pro, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

323번 위치의 아미노산이 Ile,

324번 위치의 아미노산이 Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Arg, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

325번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

326번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

327번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

328번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

329번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

330번 위치의 아미노산이 Cys, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

331번 위치의 아미노산이 Asp, Phe, His, Ile, Leu, Met, Gln, Arg, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

332번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

333번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Ser, Thr, Val 또는 Tyr,

334번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Phe, Ile, Leu, Pro 또는 Thr,

335번 위치의 아미노산이 Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Val, Trp 또는 Tyr,

336번 위치의 아미노산이 Glu, Lys 또는 Tyr,

337번 위치의 아미노산이 Glu, His 또는 Asn,

339번 위치의 아미노산이 Asp, Phe, Gly, Ile, Lys, Met, Asn, Gln, Arg, Ser 또는 Thr,

376번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Val,

377번 위치의 아미노산이 Gly 또는 Lys,

378번 위치의 아미노산이 Asp,

379번 위치의 아미노산이 Asn,

380번 위치의 아미노산이 Ala, Asn 또는 Ser,

382번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Ile,

385번 위치의 아미노산이 Glu,

392번 위치의 아미노산이 Thr,

396번 위치의 아미노산이 Leu,

421번 위치의 아미노산이 Lys,

427번 위치의 아미노산이 Asn,

428번 위치의 아미노산이 Phe 또는 Leu,

429번 위치의 아미노산이 Met,

434번 위치의 아미노산이 Trp,

436번 위치의 아미노산이 Ile, 및

440번 위치의 아미노산이 Gly, His, Ile, Leu 또는 Tyr

의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산을 포함하는, 스크리닝방법.

청구항 20

제 17 항에 있어서,

상기 Fc영역이 Fc영역의 EU 넘버링 297번 위치에 결합한 당쇄의 조성이 푸코오스 결손 당쇄를 결합한 Fc영역의 비율이 높아지도록, 또는 바이섹팅 N-아세틸글루코사민이 부가된 Fc영역의 비율이 높아지도록 수식된 Fc영역인, 스크리닝방법.

청구항 21

제 17 항에 있어서,

상기 Fc영역의 pH 산성역 조건하에서의 FcRn에 대한 결합 활성이 서열번호 : 5, 6, 7 및 8 중 어느 하나로 표시되는 Fc영역의 FcRn에 대한 결합 활성보다 증강되어 있는 Fc영역이고,

상기 Fc영역이 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8에 기재된 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 서열 중, EU 넘버링으로 표시되는 238번 위치, 244번 위치, 245번 위치, 249번 위치, 250번 위치, 251번 위치, 252번 위치, 253번 위치, 254번 위치, 255번 위치, 256번 위치, 257번 위치, 258번 위치, 260번 위치, 262번 위치, 265번 위치, 270번 위치, 272번 위치, 279번 위치, 283번 위치, 285번 위치, 286번 위치, 288번 위치, 293번 위치, 303번 위치, 305번 위치, 307번 위치, 308번 위치, 309번 위치, 311번 위치, 312번 위치, 314번 위치, 316번 위치, 317번 위치, 318번 위치, 332번 위치, 339번 위치, 340번 위치, 341번 위치, 343번 위치, 356번 위치, 360번 위치, 362번 위치, 375번 위치, 376번 위치, 377번 위치, 378번 위치, 380번 위치, 382번 위치, 385번 위치, 386번 위치, 387번 위치, 388번 위치, 389번 위치, 400번 위치, 413번 위치, 415번 위치, 423번 위치, 424번 위치, 427번 위치, 428번 위치, 430번 위치, 431번 위치, 433번 위치, 434번 위치, 435번 위치, 436번 위치, 438번 위치, 439번 위치, 440번 위치, 442번 위치 및 447번 위치의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산이 치환되어 있는 Fc영역인, 스크리닝방법.

청구항 22

제 21 항에 있어서,

상기 Fc영역이 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8에 기재된 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 서열 중, EU 넘버링으로 표시되는 ;

238번 위치의 아미노산이 Leu,

244번 위치의 아미노산이 Leu,

245번 위치의 아미노산이 Arg,

249번 위치의 아미노산이 Pro,

250번 위치의 아미노산이 Gln 또는 Glu,

251번 위치의 아미노산이 Arg, Asp, Glu 또는 Leu,

252번 위치의 아미노산이 Phe, Ser, Thr 또는 Tyr,

254번 위치의 아미노산이 Ser 또는 Thr,

255번 위치의 아미노산이 Arg, Gly, Ile 또는 Leu,

256번 위치의 아미노산이 Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Pro 또는 Thr,

257번 위치의 아미노산이 Ala, Ile, Met, Asn, Ser 또는 Val,

258번 위치의 아미노산이 Asp,

260번 위치의 아미노산이 Ser,

262번 위치의 아미노산이 Leu,

270번 위치의 아미노산이 Lys,

272번 위치의 아미노산이 Leu 또는 Arg,

279번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Gly, His, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr,

283번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr,

285번 위치의 아미노산이 Asn,

286번 위치의 아미노산이 Phe,

288번 위치의 아미노산이 Asn 또는 Pro,

293번 위치의 아미노산이 Val,

307번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Gln 또는 Met,

311번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Ile, Lys, Leu, Met, Ser, Val 또는 Trp,

309번 위치의 아미노산이 Pro,

312번 위치의 아미노산이 Ala, Asp 또는 Pro,

314번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Leu,

316번 위치의 아미노산이 Lys,

317번 위치의 아미노산이 Pro,

318번 위치의 아미노산이 Asn 또는 Thr,

332번 위치의 아미노산이 Phe, His, Lys, Leu, Met, Arg, Ser 또는 Trp,

339번 위치의 아미노산이 Asn, Thr 또는 Trp,

341번 위치의 아미노산이 Pro,

343번 위치의 아미노산이 Glu, His, Lys, Gln, Arg, Thr 또는 Tyr,

375번 위치의 아미노산이 Arg,

376번 위치의 아미노산이 Gly, Ile, Met, Pro, Thr 또는 Val,

377번 위치의 아미노산이 Lys,

378번 위치의 아미노산이 Asp, Asn 또는 Val,

380번 위치의 아미노산이 Ala, Asn, Ser 또는 Thr,

382번 위치의 아미노산이 Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

385번 위치의 아미노산이 Ala, Arg, Asp, Gly, His, Lys, Ser 또는 Thr,

386번 위치의 아미노산이 Arg, Asp, Ile, Lys, Met, Pro, Ser 또는 Thr,

387번 위치의 아미노산이 Ala, Arg, His, Pro, Ser 또는 Thr,

389번 위치의 아미노산이 Asn, Pro 또는 Ser,

423번 위치의 아미노산이 Asn,

427번 위치의 아미노산이 Asn,

428번 위치의 아미노산이 Leu, Met, Phe, Ser 또는 Thr,

430번 위치의 아미노산이 Ala, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val 또는 Tyr,

431번 위치의 아미노산이 His 또는 Asn,

433번 위치의 아미노산이 Arg, Gln, His, Ile, Lys, Pro 또는 Ser,

434번 위치의 아미노산이 Ala, Gly, His, Phe, Ser, Trp 또는 Tyr,

436번 위치의 아미노산이 Arg, Asn, His, Ile, Leu, Lys, Met 또는 Thr,

438번 위치의 아미노산이 Lys, Leu, Thr 또는 Trp,

440번 위치의 아미노산이 Lys,

442번 위치의 아미노산이 Lys, 및

308번 위치의 아미노산이 Ile, Pro 또는 Thr

의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산인, 스크리닝방법.

청구항 23

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항원 결합 도메인이 다중 특이성 또는 다중 파라토픽 항원 결합 도메인인, 스크리닝방법.

청구항 24

제 23 항에 있어서,

상기 항원 결합 도메인 중 하나 이상의 항원 결합 도메인이 결합하는 항원이 암세포의 세포막에 발현하는 막형 분자 및 하나 이상의 항원 결합 도메인이 결합하는 항원이 이펙터 세포의 세포막에 발현하는 막형 분자인, 스크리닝방법.

청구항 25

제 24 항에 있어서,

상기 이펙터 세포가 NK세포, 마크로파지 또는 T세포인, 스크리닝방법.

청구항 26

제 24 항에 있어서,

상기 이펙터 세포의 세포막에 발현하는 막형 분자가 TCR을 구성하는 폴리펩티드, CD2, CD3, CD28, CD44, CD16, CD32, CD64 또는 NKG2D인, 스크리닝방법.

청구항 27

제 23 항에 있어서,

상기 항원 결합 도메인 중 하나 이상의 항원 결합 도메인이 결합하는 항원이 암세포의 세포막에 발현하는 막형 분자 및 하나 이상의 항원 결합 도메인이 결합하는 항원이 세포상해성 물질인, 스크리닝방법.

청구항 28

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

항원이 가용형 분자인, 스크리닝방법.

청구항 29

제 28 항에 있어서,

항원 결합 분자가 중화 활성을 갖는, 스크리닝방법.

청구항 30

제 28 항에 있어서,

Fc영역을 포함하는, 스크리닝방법.

청구항 31

제 30 항에 있어서,

상기 Fc영역이 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8에 기재된 정상영역에 포함되는 Fc영역인, 스크리닝방법.

청구항 32

제 30 항에 있어서,

상기 Fc영역의 pH 산성역 조건하에서의 FcRn에 대한 결합 활성이 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8에 기재된 정상영역에 포함되는 Fc영역의 FcRn에 대한 결합 활성보다 증강되어 있는 Fc영역이고, 상기 Fc영역이 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8에 기재된 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 서열 중, EU 넘버링으로 표시되는 238번 위치, 244번 위치, 245번 위치, 249번 위치, 250번 위치, 251번 위치, 252번 위치, 253번 위치, 254번 위치, 255번 위치, 256번 위치, 257번 위치, 258번 위치, 260번 위치, 262번 위치, 265번 위치, 270번 위치, 272번 위치, 279번 위치, 283번 위치, 285번 위치, 286번 위치, 288번 위치, 293번 위치, 303번 위치, 305번 위치, 307번 위치, 308번 위치, 309번 위치, 311번 위치, 312번 위치, 314번 위치, 316번 위치, 317번 위치, 318번 위치, 332번 위치, 339번 위치, 340번 위치, 341번 위치, 343번 위치, 356번 위치, 360번 위치, 362번 위치, 375번 위치, 376번 위치, 377번 위치, 378번 위치, 380번 위치, 382번 위치, 385번 위치, 386번 위치, 387번 위치, 388번 위치, 389번 위치, 400번 위치, 413번 위치, 415번 위치, 423번 위치, 424번 위치, 427번 위치, 428번 위치, 430번 위치, 431번 위치, 433번 위치, 434번 위치, 435번 위치, 436번 위치, 438번 위치, 439번 위치, 440번 위치, 442번 위치 및 447번 위치의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산이 치환되어 있는 Fc영역인, 스크리닝방법.

청구항 33

제 32 항에 있어서,

상기 Fc영역이 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8에 기재된 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 서열 중, EU 넘버링으로 표시되는 ;

238번 위치의 아미노산이 Leu,

244번 위치의 아미노산이 Leu,

245번 위치의 아미노산이 Arg,

249번 위치의 아미노산이 Pro,

250번 위치의 아미노산이 Gln 또는 Glu,

251번 위치의 아미노산이 Arg, Asp, Glu 또는 Leu,

252번 위치의 아미노산이 Phe, Ser, Thr 또는 Tyr,

254번 위치의 아미노산이 Ser 또는 Thr,

255번 위치의 아미노산이 Arg, Gly, Ile 또는 Leu,

256번 위치의 아미노산이 Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Pro 또는 Thr,

257번 위치의 아미노산이 Ala, Ile, Met, Asn, Ser 또는 Val,

258번 위치의 아미노산이 Asp,

260번 위치의 아미노산이 Ser,

262번 위치의 아미노산이 Leu,

270번 위치의 아미노산이 Lys,

272번 위치의 아미노산이 Leu 또는 Arg,

279번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Gly, His, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr,

283번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr,

285번 위치의 아미노산이 Asn,

286번 위치의 아미노산이 Phe,

288번 위치의 아미노산이 Asn 또는 Pro,

293번 위치의 아미노산이 Val,

307번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Gln 또는 Met,

311번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Ile, Lys, Leu, Met, Ser, Val 또는 Trp,

309번 위치의 아미노산이 Pro,

312번 위치의 아미노산이 Ala, Asp 또는 Pro,

314번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Leu,

316번 위치의 아미노산이 Lys,

317번 위치의 아미노산이 Pro,

318번 위치의 아미노산이 Asn 또는 Thr,

332번 위치의 아미노산이 Phe, His, Lys, Leu, Met, Arg, Ser 또는 Trp,

339번 위치의 아미노산이 Asn, Thr 또는 Trp,

341번 위치의 아미노산이 Pro,

343번 위치의 아미노산이 Glu, His, Lys, Gln, Arg, Thr 또는 Tyr,

375번 위치의 아미노산이 Arg,

376번 위치의 아미노산이 Gly, Ile, Met, Pro, Thr 또는 Val,

377번 위치의 아미노산이 Lys,

378번 위치의 아미노산이 Asp, Asn 또는 Val,

380번 위치의 아미노산이 Ala, Asn, Ser 또는 Thr,

382번 위치의 아미노산이 Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

385번 위치의 아미노산이 Ala, Arg, Asp, Gly, His, Lys, Ser 또는 Thr,

386번 위치의 아미노산이 Arg, Asp, Ile, Lys, Met, Pro, Ser 또는 Thr,

387번 위치의 아미노산이 Ala, Arg, His, Pro, Ser 또는 Thr,

389번 위치의 아미노산이 Asn, Pro 또는 Ser,

423번 위치의 아미노산이 Asn,

427번 위치의 아미노산이 Asn,

428번 위치의 아미노산이 Leu, Met, Phe, Ser 또는 Thr,

430번 위치의 아미노산이 Ala, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val 또는 Tyr,

431번 위치의 아미노산이 His 또는 Asn,

433번 위치의 아미노산이 Arg, Gln, His, Ile, Lys, Pro 또는 Ser,

434번 위치의 아미노산이 Ala, Gly, His, Phe, Ser, Trp 또는 Tyr,

436번 위치의 아미노산이 Arg, Asn, His, Ile, Leu, Lys, Met 또는 Thr,

438번 위치의 아미노산이 Lys, Leu, Thr 또는 Trp,

440번 위치의 아미노산이 Lys,

442번 위치의 아미노산이 Lys, 및

308번 위치의 아미노산이 Ile, Pro 또는 Thr

의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산인, 스크리닝방법.

청구항 34

제 30 항에 있어서,

상기 Fc영역의 pH 중성역 조건하에서의 FcRn에 대한 결합 활성이 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8에 기재된 정상영역에 포함되는 Fc영역의 FcRn에 대한 결합 활성보다 증강되어 있는 Fc영역이고, 상기 pH 중성역 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성이 증강되어 있는 Fc영역이 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8에 기재된 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 서열 중, EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치, 248번 위치, 250번 위치, 252번 위치, 254번 위치, 255번 위치, 256번 위치, 257번 위치, 258번 위치, 265번 위치, 286번 위치, 289번 위치, 297번 위치, 298번 위치, 303번 위치, 305번 위치, 307번 위치, 308번 위치, 309번 위치, 311번 위치, 312번 위치, 314번 위치, 315번 위치, 317번 위치, 332번 위치, 334번 위치, 360번 위치, 376번 위치, 380번 위치, 382번 위치, 384번 위치, 385번 위치, 386번 위치, 387번 위치, 389번 위치, 424번 위치, 428번 위치, 433번 위치, 434번 위치 및 436번 위치의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산이 치환되어 있는 Fc영역인, 스크리닝방법.

청구항 35

제 34 항에 있어서,

상기 Fc영역이 서열번호 : 5, 6, 7 및 8 중 어느 하나로 표시되는 Fc영역의 아미노산 서열 중, EU 넘버링으로 표시되는 ;

237번 위치의 아미노산이 Met,

248번 위치의 아미노산이 Ile,

250번 위치의 아미노산이 Ala, Phe, Ile, Met, Gln, Ser, Val, Trp 또는 Tyr,

252번 위치의 아미노산이 Phe, Trp 또는 Tyr,

254번 위치의 아미노산이 Thr,

255번 위치의 아미노산이 Glu,

256번 위치의 아미노산이 Asp, Asn, Glu 또는 Gln,

257번 위치의 아미노산이 Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr 또는 Val,

258번 위치의 아미노산이 His,

265번 위치의 아미노산이 Ala,

286번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Glu,

289번 위치의 아미노산이 His,

297번 위치의 아미노산이 Ala,

303번 위치의 아미노산이 Ala,

305번 위치의 아미노산이 Ala,

307번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp

또는 Tyr,

308번 위치의 아미노산이 Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Gln 또는 Thr,

309번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Pro 또는 Arg,

311번 위치의 아미노산이 Ala, His 또는 Ile,

312번 위치의 아미노산이 Ala 또는 His,

314번 위치의 아미노산이 Lys 또는 Arg,

315번 위치의 아미노산이 Ala, Asp 또는 His,

317번 위치의 아미노산이 Ala,

332번 위치의 아미노산이 Val,

334번 위치의 아미노산이 Leu,

360번 위치의 아미노산이 His,

376번 위치의 아미노산이 Ala,

380번 위치의 아미노산이 Ala,

382번 위치의 아미노산이 Ala,

384번 위치의 아미노산이 Ala,

385번 위치의 아미노산이 Asp 또는 His,

386번 위치의 아미노산이 Pro,

387번 위치의 아미노산이 Glu,

389번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Ser,

424번 위치의 아미노산이 Ala,

428번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr,

433번 위치의 아미노산이 Lys,

434번 위치의 아미노산이 Ala, Phe, His, Ser, Trp 또는 Tyr, 및

436번 위치의 아미노산이 His, Ile, Leu, Phe, Thr 또는 Val

의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산인, 스크리닝방법.

청구항 36

제 30 항에 있어서,

상기 Fc영역이 활성형 Fcɣ 수용체에 대한 결합 활성보다도 억제형 Fcɣ 수용체에 대한 결합 활성이 높은 Fc영역이고, 상기 Fc영역의 EU 넘버링으로 표시되는 238번 위치 또는 328번 위치의 아미노산이 천연형 인간 IgG의 Fc영역의 아미노산과 상이한 아미노산을 포함하는, 스크리닝방법.

청구항 37

제 36 항에 있어서,

상기 억제형 Fcɣ 수용체가 인간 FcɣRIIb인, 스크리닝방법.

청구항 38

제 36 항에 있어서,

상기 활성형 Fcɣ 수용체가 인간 FcɣRIa, 인간 FcɣRIIa(R), 인간 FcɣRIIa(H), 인간 FcɣRIIIa(V) 또는 인간 FcɣRIIIa(F)인, 스크리닝방법.

청구항 39

제 36 항에 있어서,

상기 Fc영역의 EU 넘버링으로 표시되는 238번 위치의 아미노산이 Asp 또는 328번 위치의 아미노산이 Glu인, 스크리닝방법.

청구항 40

제 36 항에 있어서,

상기 Fc영역의 아미노산 서열 중, EU 넘버링으로 표시되는 ;

233번 위치의 아미노산이 Asp,

234번 위치의 아미노산이 Trp 또는 Tyr,

237번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Leu, Met, Phe, Trp 또는 Tyr,

239번 위치의 아미노산이 Asp,

267번 위치의 아미노산이 Ala, Gln 또는 Val,

268번 위치의 아미노산이 Asn, Asp 또는 Glu,

271번 위치의 아미노산이 Gly,

326번 위치의 아미노산이 Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, Leu, Met, Ser 또는 Thr,

330번 위치의 아미노산이 Arg, Lys 또는 Met,

323번 위치의 아미노산이 Ile, Leu 또는 Met, 및

296번 위치의 아미노산이 Asp

의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산인, 스크리닝방법.

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 표적 조직 특이적인 화합물의 농도에 따라 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 분자, 당해 항원 결합 분자의 제조방법 및 스크리닝방법, 및 당해 항원 결합 분자를 포함하는 의약 조성물을 제공한다.

배 경 기 술

[0002] 항체는 혈장 중에서의 안정성이 높고, 부작용도 적은 것으로부터 의약품으로서 주목되고 있다. 그 중에서도 IgG 형의 항체 의약은 다수 시판되고 있고, 현재도 수 많은 항체 의약이 개발되고 있다(비특허문헌 1 및 비특허문헌 2).

[0003] 항체 의약을 사용한 암치료제로서 지금까지의 CD20 항원에 대한 리툭산(Rituxan), EGFR 항원에 대한 세툭시맵, HER2 항원에 대한 허셉틴 등이 승인되어 있다(비특허문헌 3). 이들 항체 분자는 암세포에 발현되고 있는 항원에 대해 결합하여 ADCC 등에 의해 암세포에 대한 상해 활성을 발휘한다. 이러한 ADCC 등에 의한 세포상해 활성은 치료용 항체의 표적 세포에 발현하는 항원의 수에 의존하는 것이 알려져 있기 때문에(비특허문헌 4), 표적이 되는 항원의 발현량이 높은 것이 치료용 항체 효과의 관점에서는 바람직하다. 그러나 항원의 발현량이 높아도 정상 조직에 항원이 발현되고 있으면 정상세포에 대해 ADCC 등의 상해 활성을 발휘하게 되기 때문에 부작용이 커다란 문제가 된다. 이 때문에 암치료제로서 치료용 항체가 표적으로 하는 항원은 암세포에 특이적으로 발현되고 있는 것이 바람직하다. 예를 들면 암 항원으로서 알려져 있는 EpCAM 항원에 대한 항체 분자는 암치료제로서 유망한 것으로 생각되고 있었으나, EpCAM 항원은 췌장에도 발현되고 있는 것이 알려져 있고, 실제로 임상시험에 있어서 항EpCAM 항체를 투여함으로써 췌장에 대한 세포상해 활성에 의혜 췌염의 부작용이 보이는 것이 보고되어 있다(비특허문헌 5).

[0004] ADCC 활성에 의한 세포상해 활성을 발휘하는 항체 의약의 성공으로 인해, 천연형 인간 IgG1의 Fc영역의 N형 당쇄의 푸코오스를 제거하는 것에 의한 ADCC 활성의 증강(비특허문헌 6), 천연형 인간 IgG1의 Fc영역의 아미노산 치환에 의해 FcγRIIIa로의 결합을 증강시키는 것에 의한 ADCC 활성의 증강(비특허문헌 7) 등에 의해 강력한 세포상해 활성을 발휘하는 제2 세대의 개량 항체 분자가 보고되어 있다. 전술한 NK세포가 개재하는 ADCC 활성 이외의 메커니즘으로 암세포에 상해 활성을 발휘하는 항체 의약으로서, 강력한 세포상해 활성이 있는 약물을 항체와 콘쥬게이트한 Antibody Drug Conjugate(ADC)(비특허문헌 8) 및 T세포를 암세포에 리쿠르트함으로써 암세포에 대한 상해 활성을 발휘하는 저분자 항체(비특허문헌 9) 등의 보다 강력한 세포상해 활성을 발휘하는 개량 항체 분자도 보고되어 있다.

[0005] 이러한 보다 강력한 세포상해 활성을 발휘하는 항체 분자는 항원의 발현이 많지는 않은 암세포에 대해서도 세포상해 활성을 발휘하는 것이 가능한 한편으로, 항원의 발현이 적은 정상 조직에 대해서도 마찬가지로 세포상해

활성을 발휘하게 된다. 실제로 EGFR 항원에 대한 천연형 인간 IgG1인 세툭시맵과 비교하여, CD3와 EGFR에 대한 이중 특이성 항체인 EGFR-BiTE는 T세포를 암세포에 리쿠르트함으로써 암세포에 대해 강력한 세포상해 활성을 발휘하여 항종양 효과를 발휘할 수 있다. 한편으로 EGFR은 정상 조직에 있어서도 발현되고 있기 때문에, EGFR-BiTE를 게잡이원숭이에 투여했을 때에 심각한 부작용이 나타나는 것도 확인되고 있다(비특허문헌 10). 또한 암세포에서 고발현되고 있는 CD44v6에 대한 항체에 mertansine을 결합시킨 ADC인 bivatuzumab mertansine은 CD44v6가 정상 조작에 있어서도 발현되고 있는 것으로부터, 임상에 있어서 심각한 피부 독성 & 간 독성이 확인되고 있다(비특허문헌 11).

[0006] 이와 같이 항원의 발현이 적은 암세포에 대해서도 강력한 세포상해 활성을 발휘하는 것이 가능한 항체를 사용한 경우, 표적 항원이 매우 암 특이적으로 발현되고 있을 필요가 있는데, 허셉틴의 표적 항원인 HER2나 세툭시맵의 표적 항원인 EGFR은 정상 조직에도 발현되고 있는 바와 같이, 극도로 암 특이적으로 발현되고 있는 암 항원의 수는 한정되어 있는 것으로 생각된다. 이 때문에 암에 대한 세포상해 활성을 강화시키는 것은 가능하지만, 정상 조직에 대한 세포상해작용에 의한 부작용이 문제가 될 수 있다.

[0007] 또한 최근 암에 있어서의 면역 억제에 기여하고 있는 CTLA4를 저해함으로써 종양면역을 증강시키는 이필리무맵(ipilimumab)이 전이성 멜라노머에 대해 Overall survival을 연장시키는 것이 나타내어졌다(비특허문헌 12). 그러나 이필리무맵은 CTLA4를 전신적으로 저해하기 때문에 종양면역이 증강되는 한편으로, 전신적으로 면역이 활성화되는 것에 의한 자기면역질환 유사의 심각한 부작용을 나타내는 것이 문제가 되고 있다(비특허문헌 13).

[0008] 한편 암 이외의 질환에 대한 항체 의약으로서 염증성·자기면역질환에 있어서 염증 사이토카인을 저해함으로써 치료효과를 발휘하는 항체 의약이 알려져 있다(비특허문헌 14). 예를 들면 TNF를 표적으로 하는 레미케이드(Remicade)나 휴미라(Humira) 및 IL-6R을 표적으로 하는 액템라(Actemra)는 류머티스성 관절염에 대해 높은 치료효과를 발휘하는 한편, 이들의 사이토카인을 전신적으로 중화함으로써 감염증의 부작용이 보이는 것도 알려져 있다(비특허문헌 15).

[0009] 제2 세대의 항체 의약에 적용 가능한 기술로서 다양한 기술이 개발되어 있어, 이펙터 기능, 항원 결합능, 약물동태, 안정성을 향상시키거나 또는 면역원성 리스크를 저감시키는 기술 등이 보고되어 있는데(비특허문헌 16), 상기와 같은 부작용을 해결하기 위한 항체 의약을 표적 조직에 특이적으로 작용 가능하게 하는 기술은 거의 보고되어 있지 않다. 예를 들면 암조직이나 염증성 조직과 같은 병변 부위에 대해서는 이들 표적 조직에 있어서의 pH가 산성 조건인 것을 이용한 pH 의존성 항체가 보고되어 있다(특허문헌 1, 및 2). 그러나 암조직이나 염증성 조직에 있어서의 정상 조직과 비교한 pH의 저하(즉, 수소이온 농도의 상승)는 미미하여, 분자량이 매우 작은 수소이온 농도의 미미한 상승을 검지하여 작용하는 항체를 제작하는 것은 곤란한 동시에, 파골세포 골흡수와영역(osteoclastic bone resorption region) 등 정상 조직이나 대상으로 하는 병변 이외의 조직에서도 pH가 산성 조건인 경우도 있어, pH의 조건이 병변 부위에 특이적인 환경 인자로서 이용하기에는 많은 과제가 있는 것으로 생각되었다. 한편 암조직이나 염증성 조직과 같은 병변 부위에서 발현되는 프로테아제로 절단됨으로써 비로소 항원 결합 활성을 발휘하는 항체를 제작하는 방법이 보고되어 있다(특허문헌 3). 그러나 프로테아제에 의한 항체의 절단은 불가역적이기 때문에, 당해 병변 부위에서 절단된 항체가 정상 조직에 혈류를 타고 되돌아감으로써 정상 조직에서도 항원에 결합하게 되어 버리는 것이 과제로 생각되었다. 또한 그러한 프로테아제의 암 특이성에도 과제가 있다고 생각되었다. 이 때문에 부작용을 회피하면서 약효를 발휘하기 위해, 정상 조직이나 혈액 중에 있어서 전신적으로 작용하지 않고 병변 부위인 암이나 염증 부위에 있어서 가역적으로 작용하는 기술은 알려져 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 국제공개 제WO2003/105757호

(특허문헌 0002) 국제공개 제WO2012/033953호

(특허문헌 0003) 국제공개 제WO2010/081173호

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) Monoclonal antibody successes in the clinic. Janice M Reichert, Clark J

Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz, Nat. Biotechnol. (2005) 23, 1073 - 1078

(비특허문헌 0002) The therapeutic antibodies market to 2008. Pavlou AK, Belsey MJ., Eur. J. Pharm. Biopharm. (2005) 59 (3), 389-396

(비특허문헌 0003) Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. Weiner LM, Surana R, Wang S., Nat. Rev. Immunol. (2010) 10 (5), 317-327

(비특허문헌 0004) Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C, Shepard HM, Cancer Immunol. Immunotherapy (1993) 37, 255-263

(비특허문헌 0005) ING-1, a monoclonal antibody targeting Ep-CAM in patients with advanced adenocarcinomas. de Bono JS, Tolcher AW, Forero A, Vanhove GF, Takimoto C, Bauer RJ, Hammond LA, Patnaik A, White ML, Shen S, Khazaeli MB, Rowinsky EK, LoBuglio AF, Clin. Cancer Res. (2004) 10 (22), 7555-7565

(비특허문헌 0006) Non-fucosylated therapeutic antibodies as next-generation therapeutic antibodies. Satoh M, Iida S, Shitara K., Expert Opin. Biol. Ther. (2006) 6 (11), 1161-1173

(비특허문헌 0007) Optimizing engagement of the immune system by anti-tumor antibodies: an engineer's perspective. Desjarlais JR, Lazar GA, Zhukovsky EA, Chu SY., Drug Discov. Today (2007) 12 (21-22), 898-910

(비특허문헌 0008) Antibody-drug conjugates: targeted drug delivery for cancer. Alley SC, Okeley NM, Senter PD., Curr. Opin. Chem. Biol. (2010) 14 (4), 529-537

(비특허문헌 0009) BiTE: Teaching antibodies to engage T-cells for cancer therapy. Baeuerle PA, Kufer P, Bargou R., Curr. Opin. Mol. Ther. (2009) 11 (1), 22-30

(비특허문헌 0010) T cell-engaging BiTE antibodies specific for EGFR potently eliminate KRAS- and BRAF-mutated colorectal cancer cells. Lutterbuese R, Raum T, Kischel R, Hoffmann P, Mangold S, Rattel B, Friedrich M, Thomas O, Lorenczewski G, Rau D, Schaller E, Herrmann I, Wolf A, Urbig T, Baeuerle PA, Kufer P., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2010) 107 (28), 12605-12610

(비특허문헌 0011) Phase I trial with the CD44v6-targeting immunoconjugate bivatuzumab mertansine in head and neck squamous cell carcinoma. Riechelmann H, Sauter A, Golze W, Hanft G, Schroen C, Hoermann K, Erhardt T, Gronau S., Oral Oncol. (2008) 44 (9), 823-829

(비특허문헌 0012) Ipilimumab in the treatment of melanoma. Trinh VA, Hwu WJ., Expert Opin. Biol. Ther., (2012) Apr 14 (doi:10.1517/14712598.2012.675325)

(비특허문헌 0013) IPILIMUMAB - A NOVEL IMMUNOMODULATING THERAPY CAUSING AUTOIMMUNE HYPOPHYSITIS: A CASE REPORT AND REVIEW. Juszczak A, Gupta A, Karavitaki N, Middleton MR, Grossman A., Eur. J. Endocrinol. (2012) Apr 10 (doi: 10.1530/EJE-12-0167)

(비특허문헌 0014) The Japanese experience with biologic therapies for rheumatoid arthritis. Takeuchi T, Kameda H., Nat. Rev. Rheumatol. (2010) 6 (11), 644-652

(비특허문헌 0015) Current evidence for the management of rheumatoid arthritis with biological disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of RA. Nam JL, Winthrop KL, van Vollenhoven RF, Pavelka K, Valesini G, Hensor EM, Worthy G, Landewe R, Smolen JS, Emery P, Buch MH., Ann. Rheum. Dis. (2010) 69 (6), 976-986

(비특허문헌 0016) Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. Kim SJ, Park Y, Hong HJ., Mol. Cells. (2005) 20 (1), 17-29

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 이러한 정황을 감안하여 이루어진 것으로, 그 목적은 표적 조직에 기인하는 질환의 치료에 유용한 의약 조성물 및 그 유효 성분을 제공하는 것에 있다. 또한 이와 함께 당해 의약 조성물 및 당해 유효 성분의 스크리닝방법 및 제조방법을 제공하는 것에 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명자들은 상기 목적을 달성하기 위해 예의 연구를 진행시킨 결과, 표적 조직 특이적인 화합물의 농도에 따라 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 분자를 창작하였다. 또한 본 발명자들은 당해 항원 결합 분자 또는 당해 항원 결합 분자를 포함하는 의약 조성물이 표적 조직에 기인하는 질환의 치료에 유용한 것을 발견하는 동시에, 당해 항원 결합 분자를 투여하는 것을 포함하는 표적 조직에 기인하는 질환의 치료에 유용한 것, 및 표적 조직에 기인하는 질환의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 당해 항원 결합 분자가 유용한 것을 발견하였다. 또한 본 발명자들은 당해 항원 결합 분자의 스크리닝방법 및 제조방법을 창작하여 본 발명을 완성시켰다.

[0014] 즉, 본 발명은 이하 ;

[0015] (1) 표적 조직 특이적인 화합물의 농도에 따라 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 분자,

[0016] (2) 표적 조직이 암조직인 (1)에 기재된 항원 결합 분자,

[0017] (3) 상기 암조직 특이적인 화합물이 암세포 특이적 대사산물, 암조직에 침윤되어 있는 면역세포 특이적 대사산물, 암조직의 스트로마 세포(stromal cell) 특이적 대사산물인 (2)에 기재된 항원 결합 분자,

[0018] (4) 표적 조직이 염증성 조직인 (1)에 기재된 항원 결합 분자,

[0019] (5) 상기 염증 조직 특이적인 화합물이 염증성 조직에 침윤되어 있는 면역세포 특이적 대사산물, 염증 조직에 있어서 상해를 받고 있는 정상세포 특이적 대사산물인 (4)에 기재된 항원 결합 분자,

[0020] (6) 상기 표적 조직 특이적 대사산물이 푸린 고리 구조를 갖는 뉴클레오시드, 아미노산과 그의 대사산물, 지질과 그의 대사산물, 당대사의 1차 대사산물, 니코틴아미드와 그의 대사산물로부터 선택되는 하나 이상의 화합물인 (1)에 기재된 항원 결합 분자,

[0021] (7) 상기 표적 조직 특이적 대사산물이 아데노신, 아데노신 3인산, 이노신, 알라닌, 글루타민산, 아스파라긴산, 키누레닌, 프로스타글란딘 E2, 숙신산, 구연산 또는 1-메틸니코틴아미드로부터 선택되는 하나 이상의 화합물인 (6)에 기재된 항원 결합 분자,

[0022] (8) 항원이 막형 분자인 (1) 내지 (7) 중 어느 하나에 기재된 항원 결합 분자.

[0023] (9) 중화 활성을 갖는 항원 결합 분자인 (1) 내지 (8) 중 어느 하나에 기재된 항원 결합 분자,

[0024] (10) 세포상해 활성을 갖는 항원 결합 분자인 (1) 내지 (9) 중 어느 하나에 기재된 항원 결합 분자,

[0025] (11) Fc영역을 포함하는 (1) 내지 (10) 중 어느 하나에 기재된 항원 결합 분자,

[0026] (12) 상기 Fc영역이 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8에 기재된 정상영역에 포함되는 Fc영역인 (11)에 기재된 항원 결합 분자,

[0027] (13) 상기 Fc영역이 천연형 인간 IgG의 Fc영역의 FcɣR 수용체에 대한 결합 활성보다도 FcɣR 수용체에 대한 결합 활성이 높은 FcɣR 결합 개변 Fc영역을 포함하는 (11)에 기재된 항원 결합 분자,

[0028] (14) 상기 FcɣR 결합 개변 Fc영역의 아미노산 서열 중, EU 넘버링으로 표시되는 221번 위치, 222번 위치, 223번 위치, 224번 위치, 225번 위치, 227번 위치, 228번 위치, 230번 위치, 231번 위치, 232번 위치, 233번 위치, 234번 위치, 235번 위치, 236번 위치, 237번 위치, 238번 위치, 239번 위치, 240번 위치, 241번 위치, 243번 위치, 244번 위치, 245번 위치, 246번 위치, 247번 위치, 249번 위치, 250번 위치, 251번 위치, 254번 위치, 255번 위치, 256번 위치, 258번 위치, 260번 위치, 262번 위치, 263번 위치, 264번 위치, 265번 위치, 266번 위치, 267번 위치, 268번 위치, 269번 위치, 270번 위치, 271번 위치, 272번 위치, 273번 위치, 274번

위치, 275번 위치, 276번 위치, 278번 위치, 279번 위치, 280번 위치, 281번 위치, 282번 위치, 283번 위치, 284번 위치, 285번 위치, 286번 위치, 288번 위치, 290번 위치, 291번 위치, 292번 위치, 293번 위치, 294번 위치, 295번 위치, 296번 위치, 297번 위치, 298번 위치, 299번 위치, 300번 위치, 301번 위치, 302번 위치, 303번 위치, 304번 위치, 305번 위치, 311번 위치, 313번 위치, 315번 위치, 317번 위치, 318번 위치, 320번 위치, 322번 위치, 323번 위치, 324번 위치, 325번 위치, 326번 위치, 327번 위치, 328번 위치, 329번 위치, 330번 위치, 331번 위치, 332번 위치, 333번 위치, 334번 위치, 335번 위치, 336번 위치, 337번 위치, 339번 위치, 376번 위치, 377번 위치, 378번 위치, 379번 위치, 380번 위치, 382번 위치, 385번 위치, 392번 위치, 396번 위치, 421번 위치, 427번 위치, 428번 위치, 429번 위치, 434번 위치, 436번 위치 또는 440번 위치의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산이 천연형 인간 IgG의 Fc영역의 아미노산과 상이한 아미노산을 포함하는 (13)에 기재된 항원 결합 분자,

[0029] (15) 상기 FcγR 결합 개변 Fc영역의 아미노산 서열 중, EU 넘버링으로 표시되는 ;

[0030] 221번 위치의 아미노산이 Lys 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0031] 222번 위치의 아미노산이 Phe, Trp, Glu 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0032] 223번 위치의 아미노산이 Phe, Trp, Glu 또는 Lys 중 어느 하나,

[0033] 224번 위치의 아미노산이 Phe, Trp, Glu 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0034] 225번 위치의 아미노산이 Glu, Lys 또는 Trp 중 어느 하나,

[0035] 227번 위치의 아미노산이 Glu, Gly, Lys 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0036] 228번 위치의 아미노산이 Glu, Gly, Lys 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0037] 230번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Gly 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0038] 231번 위치의 아미노산이 Glu, Gly, Lys, Pro 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0039] 232번 위치의 아미노산이 Glu, Gly, Lys 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0040] 233번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0041] 234번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0042] 235번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0043] 236번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0044] 237번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0045] 238번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0046] 239번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0047] 240번 위치의 아미노산이 Ala, Ile, Met 또는 Thr 중 어느 하나,

[0048] 241번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Leu, Arg, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0049] 243번 위치의 아미노산이 Leu, Glu, Leu, Gln, Arg, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0050] 244번 위치의 아미노산이 His,

[0051] 245번 위치의 아미노산이 Ala,

[0052] 246번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, His 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0053] 247번 위치의 아미노산이 Ala, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Thr, Val 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0054] 249번 위치의 아미노산이 Glu, His, Gln 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0055] 250번 위치의 아미노산이 Glu 또는 Gln 중 어느 하나,

[0056] 251번 위치의 아미노산이 Phe,

[0057] 254번 위치의 아미노산이 Phe, Met 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0058] 255번 위치의 아미노산이 Glu, Leu 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0059] 256번 위치의 아미노산이 Ala, Met 또는 Pro 중 어느 하나,

[0060] 258번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, His, Ser 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0061] 260번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, His 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0062] 262번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Phe, Ile 또는 Thr 중 어느 하나,

[0063] 263번 위치의 아미노산이 Ala, Ile, Met 또는 Thr 중 어느 하나,

[0064] 264번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0065] 265번 위치의 아미노산이 Ala, Leu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0066] 266번 위치의 아미노산이 Ala, Ile, Met 또는 Thr 중 어느 하나,

[0067] 267번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0068] 268번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Thr, Val 또는 Trp 중 어느 하나,

[0069] 269번 위치의 아미노산이 Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0070] 270번 위치의 아미노산이 Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0071] 271번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0072] 272번 위치의 아미노산이 Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0073] 273번 위치의 아미노산이 Phe 또는 Ile 중 어느 하나,

[0074] 274번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0075] 275번 위치의 아미노산이 Leu 또는 Trp 중 어느 하나,

[0076] 276번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0077] 278번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val 또는 Trp 중 어느 하나,

[0078] 279번 위치의 아미노산이 Ala,

[0079] 280번 위치의 아미노산이 Ala, Gly, His, Lys, Leu, Pro, Gln, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0080] 281번 위치의 아미노산이 Asp, Lys, Pro 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0081] 282번 위치의 아미노산이 Glu, Gly, Lys, Pro 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0082] 283번 위치의 아미노산이 Ala, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Arg 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0083] 284번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Leu, Asn, Thr 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0084] 285번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Lys, Gln, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0085] 286번 위치의 아미노산이 Glu, Gly, Pro 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0086] 288번 위치의 아미노산이 Asn, Asp, Glu 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0087] 290번 위치의 아미노산이 Asp, Gly, His, Leu, Asn, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0088] 291번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Gly, His, Ile, Gln 또는 Thr 중 어느 하나,

[0089] 292번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Pro, Thr 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0090] 293번 위치의 아미노산이 Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0091] 294번 위치의 아미노산이 Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0092] 295번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0093] 296번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr 또는 Val 중 어느 하나,

[0094] 297번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0095] 298번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Met, Asn, Gln, Arg, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0096] 299번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0097] 300번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val 또는 Trp 중 어느 하나,

[0098] 301번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, His 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0099] 302번 위치의 아미노산이 Ile,

[0100] 303번 위치의 아미노산이 Asp, Gly 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0101] 304번 위치의 아미노산이 Asp, His, Leu, Asn 또는 Thr 중 어느 하나,

[0102] 305번 위치의 아미노산이 Glu, Ile, Thr 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0103] 311번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Asn, Thr, Val 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0104] 313번 위치의 아미노산이 Phe,

[0105] 315번 위치의 아미노산이 Leu,

[0106] 317번 위치의 아미노산이 Glu 또는 Gln,

[0107] 318번 위치의 아미노산이 His, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0108] 320번 위치의 아미노산이 Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Asn, Pro, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0109] 322번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Pro, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0110] 323번 위치의 아미노산이 Ile,

[0111] 324번 위치의 아미노산이 Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Arg, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0112] 325번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0113] 326번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0114] 327번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0115] 328번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0116] 329번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0117] 330번 위치의 아미노산이 Cys, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0118] 331번 위치의 아미노산이 Asp, Phe, His, Ile, Leu, Met, Gln, Arg, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0119] 332번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0120] 333번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Ser, Thr, Val 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0121] 334번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Phe, Ile, Leu, Pro 또는 Thr 중 어느 하나,

[0122] 335번 위치의 아미노산이 Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0123] 336번 위치의 아미노산이 Glu, Lys 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0124] 337번 위치의 아미노산이 Glu, His 또는 Asn 중 어느 하나,

[0125] 339번 위치의 아미노산이 Asp, Phe, Gly, Ile, Lys, Met, Asn, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[0126] 376번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Val 중 어느 하나,

[0127] 377번 위치의 아미노산이 Gly 또는 Lys 중 어느 하나,

[0128] 378번 위치의 아미노산이 Asp,

[0129] 379번 위치의 아미노산이 Asn,

[0130] 380번 위치의 아미노산이 Ala, Asn 또는 Ser 중 어느 하나,

[0131] 382번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Ile 중 어느 하나,

[0132] 385번 위치의 아미노산이 Glu,

[0133] 392번 위치의 아미노산이 Thr,

[0134] 396번 위치의 아미노산이 Leu,

[0135] 421번 위치의 아미노산이 Lys,

[0136] 427번 위치의 아미노산이 Asn,

[0137] 428번 위치의 아미노산이 Phe 또는 Leu 중 어느 하나,

[0138] 429번 위치의 아미노산이 Met,

[0139] 434번 위치의 아미노산이 Trp,

[0140] 436번 위치의 아미노산이 Ile, 또는

[0141] 440번 위치의 아미노산이 Gly, His, Ile, Leu 또는 Tyr 중 어느 하나

[0142] 의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산을 포함하는 (14)에 기재된 항원 결합 분자,

[0143] (16) 상기 Fc영역이 Fc영역의 EU 넘버링 297번 위치에 결합한 당쇄의 조성이 푸코오스 결손 당쇄를 결합한 Fc영역의 비율이 높아지도록, 또는 바이섹팅 N-아세틸글루코사민이 부가된 Fc영역의 비율이 높아지도록 수식된 Fc영역인 (11)에 기재된 항원 결합 분자,

[0144] (17) 상기 Fc영역의 pH 산성역 조건하에서의 FcRn에 대한 결합 활성이 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8 중 어느 하나로 표시되는 Fc영역의 결합 활성보다 증강되어 있는 Fc영역인 (11), (13) 내지 (16) 중 어느 하나에 기재된 항원 결합 분자,

[0145] (18) 상기 Fc영역이 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8에 기재된 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 서열 중, EU 넘버링으로 표시되는 238번 위치, 244번 위치, 245번 위치, 249번 위치, 250번 위치, 251번 위치, 252번 위치, 253번 위치, 254번 위치, 255번 위치, 256번 위치, 257번 위치, 258번 위치, 260번 위치, 262번 위치, 265번 위치, 270번 위치, 272번 위치, 279번 위치, 283번 위치, 285번 위치, 286번 위치, 288번 위치, 293번 위치, 303번 위치, 305번 위치, 307번 위치, 308번 위치, 309번 위치, 311번 위치, 312번 위치, 314번 위치, 316번 위치, 317번 위치, 318번 위치, 332번 위치, 339번 위치, 340번 위치, 341번 위치, 343번 위치, 356번 위치, 360번 위치, 362번 위치, 375번 위치, 376번 위치, 377번 위치, 378번 위치, 380번 위치, 382번 위치, 385번 위치, 386번 위치, 387번 위치, 388번 위치, 389번 위치, 400번 위치, 413번 위치, 415번 위치, 423번 위치, 424번 위치, 427번 위치, 428번 위치, 430번 위치, 431번 위치, 433번 위치, 434번 위치, 435번 위치, 436번 위치, 438번 위치, 439번 위치, 440번 위치, 442번 위치 또는 447번 위치의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산이 치환되어 있는 Fc영역인 (17)에 기재된 항원 결합 분자,

[0146] (19) 상기 Fc영역이 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8에 기재된 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 서열 중, EU 넘버링으로 표시되는 ;

[0147] 238번 위치의 아미노산이 Leu,

[0148] 244번 위치의 아미노산이 Leu,

[0149] 245번 위치의 아미노산이 Arg,

[0150] 249번 위치의 아미노산이 Pro,

[0151] 250번 위치의 아미노산이 Gln 또는 Glu 중 어느 하나, 또는

[0152] 251번 위치의 아미노산이 Arg, Asp, Glu 또는 Leu 중 어느 하나,

[0153] 252번 위치의 아미노산이 Phe, Ser, Thr 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0154] 254번 위치의 아미노산이 Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[0155] 255번 위치의 아미노산이 Arg, Gly, Ile 또는 Leu 중 어느 하나,

[0156] 256번 위치의 아미노산이 Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Pro 또는 Thr 중 어느 하나,

[0157] 257번 위치의 아미노산이 Ala, Ile, Met, Asn, Ser 또는 Val 중 어느 하나,

[0158] 258번 위치의 아미노산이 Asp,

[0159] 260번 위치의 아미노산이 Ser,

[0160] 262번 위치의 아미노산이 Leu,

[0161] 270번 위치의 아미노산이 Lys,

[0162] 272번 위치의 아미노산이 Leu 또는 Arg 중 어느 하나,

[0163] 279번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Gly, His, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0164] 283번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0165] 285번 위치의 아미노산이 Asn,

[0166] 286번 위치의 아미노산이 Phe,

[0167] 288번 위치의 아미노산이 Asn 또는 Pro 중 어느 하나,

[0168] 293번 위치의 아미노산이 Val,

[0169] 307번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Gln 또는 Met 중 어느 하나,

[0170] 311번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Ile, Lys, Leu, Met, Ser, Val 또는 Trp 중 어느 하나,

[0171] 309번 위치의 아미노산이 Pro,

[0172] 312번 위치의 아미노산이 Ala, Asp 또는 Pro 중 어느 하나,

[0173] 314번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Leu 중 어느 하나,

[0174] 316번 위치의 아미노산이 Lys,

[0175] 317번 위치의 아미노산이 Pro,

[0176] 318번 위치의 아미노산이 Asn 또는 Thr 중 어느 하나,

[0177] 332번 위치의 아미노산이 Phe, His, Lys, Leu, Met, Arg, Ser 또는 Trp 중 어느 하나,

[0178] 339번 위치의 아미노산이 Asn, Thr 또는 Trp 중 어느 하나,

[0179] 341번 위치의 아미노산이 Pro,

[0180] 343번 위치의 아미노산이 Glu, His, Lys, Gln, Arg, Thr 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0181] 375번 위치의 아미노산이 Arg,

[0182] 376번 위치의 아미노산이 Gly, Ile, Met, Pro, Thr 또는 Val 중 어느 하나,

[0183] 377번 위치의 아미노산이 Lys,

[0184] 378번 위치의 아미노산이 Asp, Asn 또는 Val 중 어느 하나,

[0185] 380번 위치의 아미노산이 Ala, Asn, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[0186] 382번 위치의 아미노산이 Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0187] 385번 위치의 아미노산이 Ala, Arg, Asp, Gly, His, Lys, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[0188] 386번 위치의 아미노산이 Arg, Asp, Ile, Lys, Met, Pro, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[0189] 387번 위치의 아미노산이 Ala, Arg, His, Pro, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[0190] 389번 위치의 아미노산이 Asn, Pro 또는 Ser 중 어느 하나,

[0191] 423번 위치의 아미노산이 Asn,

[0192] 427번 위치의 아미노산이 Asn,

[0193] 428번 위치의 아미노산이 Leu, Met, Phe, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[0194] 430번 위치의 아미노산이 Ala, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0195] 431번 위치의 아미노산이 His 또는 Asn 중 어느 하나,

[0196] 433번 위치의 아미노산이 Arg, Gln, His, Ile, Lys, Pro 또는 Ser 중 어느 하나,

[0197] 434번 위치의 아미노산이 Ala, Gly, His, Phe, Ser, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0198] 436번 위치의 아미노산이 Arg, Asn, His, Ile, Leu, Lys, Met 또는 Thr 중 어느 하나,

[0199] 438번 위치의 아미노산이 Lys, Leu, Thr 또는 Trp 중 어느 하나,

[0200] 440번 위치의 아미노산이 Lys, 또는

[0201] 442번 위치의 아미노산이 Lys, 308번 위치의 아미노산이 Ile, Pro 또는 Thr 중 어느 하나

[0202] 의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산인 (18)에 기재된 항원 결합 분자,

[0203] (20) 상기 항원 결합 도메인이 다중 특이성 또는 다중 파라토픽 항원 결합 도메인인 (1) 내지 (19) 중 어느 하나에 기재된 항원 결합 분자,

[0204] (21) 상기 항원 결합 도메인 중 하나 이상의 항원 결합 도메인이 결합하는 항원이 암세포의 세포막에 발현하는 막형 분자 및 하나 이상의 항원 결합 도메인이 결합하는 항원이 이펙터 세포의 세포막에 발현하는 막형 분자인 (20)에 기재된 항원 결합 분자,

[0205] (22) 상기 이펙터 세포가 NK세포, 마크로파지 또는 T세포인 (21)에 기재된 항원 결합 분자,

[0206] (23) 상기 이펙터 세포의 세포막에 발현하는 막형 분자가 TCR을 구성하는 폴리펩티드, CD2, CD3, CD28, CD44, CD16, CD32, CD64 또는 NKG2D인 (21) 또는 (22)에 기재된 항원 결합 분자,

[0207] (24) 상기 항원 결합 도메인 중 하나 이상의 항원 결합 도메인이 결합하는 항원이 암세포의 세포막에 발현하는 막형 분자 및 하나 이상의 항원 결합 도메인이 결합하는 항원이 세포상해성 물질인 (20)에 기재된 항원 결합 분자,

[0208] (25) 상기 항원 결합 분자가 항체 단편인 (20) 내지 (24) 중 어느 하나에 기재된 항원 결합 분자,

[0209] (26) 상기 항원 결합 분자가 항체인 (1) 내지 (24) 중 어느 하나에 기재된 항원 결합 분자,

[0210] (27) 항원이 가용형 분자인 (1) 내지 (7) 중 어느 하나에 기재된 항원 결합 분자,

[0211] (28) 중화 활성을 갖는 항원 결합 분자인 (27)에 기재된 항원 결합 분자,

[0212] (29) Fc영역을 포함하는 (27) 또는 (28)에 기재된 항원 결합 분자,

[0213] (30) 상기 Fc영역이 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8에 기재된 정상영역에 포함되는 Fc영역인 (29)에 기재된 항원 결합 분자,

[0214] (31) 상기 Fc영역의 pH 산성역 조건하에서의 FcRn에 대한 결합 활성이 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8에 기재된 정상영역에 포함되는 Fc영역의 FcRn에 대한 결합 활성보다 증강되어 있는 Fc영역인 (29)에 기재된 항원 결합 분자,

[0215] (32) 상기 Fc영역이 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8에 기재된 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 서열 중, EU 넘버링으로 표시되는 238번 위치, 244번 위치, 245번 위치, 249번 위치, 250번 위치, 251번 위치, 252번 위치, 253번 위치, 254번 위치, 255번 위치, 256번 위치, 257번 위치, 258번 위치, 260번 위치, 262번 위치, 265번 위치, 270번 위치, 272번 위치, 279번 위치, 283번 위치, 285번 위치, 286번 위치, 288번 위치, 293번 위치, 303번 위치, 305번 위치, 307번 위치, 308번 위치, 309번 위치, 311번 위치, 312번 위치, 314번 위치, 316번 위치, 317번 위치, 318번 위치, 332번 위치, 339번 위치, 340번 위치, 341번 위치, 343번 위치, 356번 위치, 360번 위치, 362번 위치, 375번 위치, 376번 위치, 377번 위치, 378번 위치, 380번 위치, 382번 위치, 385번 위치, 386번 위치, 387번 위치, 388번 위치, 389번 위치, 400번 위치, 413번 위치, 415번 위치, 423번 위치, 424번 위치, 427번 위치, 428번 위치, 430번 위치, 431번 위치, 433번 위치, 434번 위치, 435번 위치, 436번 위치, 438번 위치, 439번 위치, 440번 위치, 442번 위치 또는 447번 위치의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산이 치환되어 있는 Fc영역인 (31)에 기재된 항원 결합 분자,

[0216] (33) 상기 Fc영역이 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8에 기재된 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 서열 중, EU 넘버링으로 표시되는 ;

[0217] 238번 위치의 아미노산이 Leu,

[0218] 244번 위치의 아미노산이 Leu,

[0219] 245번 위치의 아미노산이 Arg,

[0220] 249번 위치의 아미노산이 Pro,

[0221] 250번 위치의 아미노산이 Gln 또는 Glu 중 어느 하나, 또는

[0222] 251번 위치의 아미노산이 Arg, Asp, Glu 또는 Leu 중 어느 하나,

[0223] 252번 위치의 아미노산이 Phe, Ser, Thr 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0224] 254번 위치의 아미노산이 Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[0225] 255번 위치의 아미노산이 Arg, Gly, Ile 또는 Leu 중 어느 하나,

[0226] 256번 위치의 아미노산이 Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Pro 또는 Thr 중 어느 하나,

[0227] 257번 위치의 아미노산이 Ala, Ile, Met, Asn, Ser 또는 Val 중 어느 하나,

[0228] 258번 위치의 아미노산이 Asp,

[0229] 260번 위치의 아미노산이 Ser,

[0230] 262번 위치의 아미노산이 Leu,

[0231] 270번 위치의 아미노산이 Lys,

[0232] 272번 위치의 아미노산이 Leu 또는 Arg 중 어느 하나,

[0233] 279번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Gly, His, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0234] 283번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0235] 285번 위치의 아미노산이 Asn,

[0236] 286번 위치의 아미노산이 Phe,

[0237] 288번 위치의 아미노산이 Asn 또는 Pro 중 어느 하나,

[0238] 293번 위치의 아미노산이 Val,

[0239] 307번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Gln 또는 Met 중 어느 하나,

[0240] 311번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Ile, Lys, Leu, Met, Ser, Val 또는 Trp 중 어느 하나,

[0241] 309번 위치의 아미노산이 Pro,

[0242] 312번 위치의 아미노산이 Ala, Asp 또는 Pro 중 어느 하나,

[0243] 314번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Leu 중 어느 하나,

[0244] 316번 위치의 아미노산이 Lys,

[0245] 317번 위치의 아미노산이 Pro,

[0246] 318번 위치의 아미노산이 Asn 또는 Thr 중 어느 하나,

[0247] 332번 위치의 아미노산이 Phe, His, Lys, Leu, Met, Arg, Ser 또는 Trp 중 어느 하나,

[0248] 339번 위치의 아미노산이 Asn, Thr 또는 Trp 중 어느 하나,

[0249] 341번 위치의 아미노산이 Pro,

[0250] 343번 위치의 아미노산이 Glu, His, Lys, Gln, Arg, Thr 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0251] 375번 위치의 아미노산이 Arg,

[0252] 376번 위치의 아미노산이 Gly, Ile, Met, Pro, Thr 또는 Val 중 어느 하나,

[0253] 377번 위치의 아미노산이 Lys,

[0254] 378번 위치의 아미노산이 Asp, Asn 또는 Val 중 어느 하나,

[0255] 380번 위치의 아미노산이 Ala, Asn, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[0256] 382번 위치의 아미노산이 Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0257] 385번 위치의 아미노산이 Ala, Arg, Asp, Gly, His, Lys, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[0258] 386번 위치의 아미노산이 Arg, Asp, Ile, Lys, Met, Pro, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[0259] 387번 위치의 아미노산이 Ala, Arg, His, Pro, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[0260] 389번 위치의 아미노산이 Asn, Pro 또는 Ser 중 어느 하나,

[0261] 423번 위치의 아미노산이 Asn,

[0262] 427번 위치의 아미노산이 Asn,

[0263] 428번 위치의 아미노산이 Leu, Met, Phe, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[0264] 430번 위치의 아미노산이 Ala, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0265] 431번 위치의 아미노산이 His 또는 Asn 중 어느 하나,

[0266] 433번 위치의 아미노산이 Arg, Gln, His, Ile, Lys, Pro 또는 Ser 중 어느 하나,

[0267] 434번 위치의 아미노산이 Ala, Gly, His, Phe, Ser, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0268] 436번 위치의 아미노산이 Arg, Asn, His, Ile, Leu, Lys, Met 또는 Thr 중 어느 하나,

[0269] 438번 위치의 아미노산이 Lys, Leu, Thr 또는 Trp 중 어느 하나,

[0270] 440번 위치의 아미노산이 Lys, 또는

[0271] 442번 위치의 아미노산이 Lys, 308번 위치의 아미노산이 Ile, Pro 또는 Thr 중 어느 하나

[0272] 의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산인 (32)에 기재된 항원 결합 분자,

[0273] (34) 상기 Fc영역의 pH 중성역 조건하에서의 FcRn에 대한 결합 활성이 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8에 기재된 정상영역에 포함되는 Fc영역의 FcRn에 대한 결합 활성보다 증강되어 있는 Fc영역인 (29)에 기재된 항원 결합 분자,

[0274] (35) 상기 Fc영역이 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8에 기재된 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 서열 중, EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치, 248번 위치, 250번 위치, 252번 위치, 254번 위치, 255번 위치, 256번 위치, 257번 위치, 258번 위치, 265번 위치, 286번 위치, 289번 위치, 297번 위치, 298번 위치, 303번 위치, 305번 위치, 307번 위치, 308번 위치, 309번 위치, 311번 위치, 312번 위치, 314번 위치, 315번 위치, 317번 위치, 332번 위치, 334번 위치, 360번 위치, 376번 위치, 380번 위치, 382번 위치, 384번 위치, 385번 위치, 386번 위치, 387번 위치, 389번 위치, 424번 위치, 428번 위치, 433번 위치, 434번 위치 또는 436번 위치의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산이 치환되어 있는 Fc영역인 (34)에 기재된 항원 결합 분자,

[0275] (36) 상기 Fc영역이 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8에 기재된 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 서열 중, EU 넘버링으로 표시되는 ;

[0276] 237번 위치의 아미노산이 Met,

[0277] 248번 위치의 아미노산이 Ile,

[0278] 250번 위치의 아미노산이 Ala, Phe, Ile, Met, Gln, Ser, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0279] 252번 위치의 아미노산이 Phe, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0280] 254번 위치의 아미노산이 Thr,

[0281] 255번 위치의 아미노산이 Glu,

[0282] 256번 위치의 아미노산이 Asp, Asn, Glu 또는 Gln 중 어느 하나,

[0283] 257번 위치의 아미노산이 Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr 또는 Val 중 어느 하나,

[0284] 258번 위치의 아미노산이 His,

[0285] 265번 위치의 아미노산이 Ala,

[0286] 286번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Glu 중 어느 하나,

[0287] 289번 위치의 아미노산이 His,

[0288] 297번 위치의 아미노산이 Ala,

[0289] 303번 위치의 아미노산이 Ala,

[0290] 305번 위치의 아미노산이 Ala,

[0291] 307번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0292] 308번 위치의 아미노산이 Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Gln 또는 Thr 중 어느 하나,

[0293] 309번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Pro 또는 Arg 중 어느 하나,

[0294] 311번 위치의 아미노산이 Ala, His 또는 Ile 중 어느 하나,

[0295] 312번 위치의 아미노산이 Ala 또는 His 중 어느 하나,

[0296] 314번 위치의 아미노산이 Lys 또는 Arg 중 어느 하나,

[0297] 315번 위치의 아미노산이 Ala, Asp 또는 His 중 어느 하나,

[0298] 317번 위치의 아미노산이 Ala,

[0299] 332번 위치의 아미노산이 Val,

[0300] 334번 위치의 아미노산이 Leu,

[0301] 360번 위치의 아미노산이 His,

[0302] 376번 위치의 아미노산이 Ala,

[0303] 380번 위치의 아미노산이 Ala,

[0304] 382번 위치의 아미노산이 Ala,

[0305] 384번 위치의 아미노산이 Ala,

[0306] 385번 위치의 아미노산이 Asp 또는 His 중 어느 하나,

[0307] 386번 위치의 아미노산이 Pro,

[0308] 387번 위치의 아미노산이 Glu,

[0309] 389번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Ser 중 어느 하나,

[0310] 424번 위치의 아미노산이 Ala,

[0311] 428번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0312] 433번 위치의 아미노산이 Lys,

[0313] 434번 위치의 아미노산이 Ala, Phe, His, Ser, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나, 또는

[0314] 436번 위치의 아미노산이 His, Ile, Leu, Phe, Thr 또는 Val

[0315] 의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산인 (35)에 기재된 항원 결합 분자,

[0316] (37) 상기 Fc영역이 활성형 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성보다도 억제형 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성이 높은 Fc영역인 (29) 또는 (31) 내지 (36) 중 어느 하나에 기재된 항원 결합 분자,

[0317] (38) 상기 억제형 Fcγ 수용체가 인간 FcγRIIb인 (37)에 기재된 항원 결합 분자,

[0318] (39) 상기 활성형 Fcγ 수용체가 인간 FcγRIa, 인간 FcγRIIa(R), 인간 FcγRIIa(H), 인간 FcγRIIIa(V) 또는 인간 FcγRIIIa(F)인 (37) 또는 (38)에 기재된 항원 결합 분자,

[0319] (40) 상기 Fc영역의 EU 넘버링으로 표시되는 238번 위치 또는 328번 위치의 아미노산이 천연형 인간 IgG의 Fc영역의 아미노산과 상이한 아미노산을 포함하는 (37) 내지 (39) 중 어느 하나에 기재된 항원 결합 분자,

[0320] (41) 상기 Fc영역의 EU 넘버링으로 표시되는 238번 위치의 아미노산이 Asp 또는 328번 위치의 아미노산이 Glu인 (40)에 기재된 항원 결합 분자,

[0321] (42) 상기 Fc영역의 아미노산 서열 중, EU 넘버링으로 표시되는 ;

[0322] 233번 위치의 아미노산이 Asp,

[0323] 234번 위치의 아미노산이 Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0324] 237번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Leu, Met, Phe, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0325] 239번 위치의 아미노산이 Asp,

[0326] 267번 위치의 아미노산이 Ala, Gln 또는 Val 중 어느 하나,

[0327] 268번 위치의 아미노산이 Asn, Asp 또는 Glu 중 어느 하나,

[0328] 271번 위치의 아미노산이 Gly,

[0329] 326번 위치의 아미노산이 Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, Leu, Met, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[0330] 330번 위치의 아미노산이 Arg, Lys 또는 Met 중 어느 하나,

[0331] 323번 위치의 아미노산이 Ile, Leu 또는 Met 중 어느 하나, 또는

[0332] 296번 위치의 아미노산이 Asp

[0333] 의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산인 (40) 또는 (41)에 기재된 항원 결합 분자,

[0334] (43) 상기 항원 결합 분자가 항체인 (27) 내지 (42) 중 어느 하나에 기재된 항원 결합 분자,

[0335] (44) 표적 조직 특이적인 화합물의 농도에 따라 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 도메인을 선택하는 것을 포함하는 (1) 내지 (43) 중 어느 하나에 기재된 항원 결합 분자의 제조방법,

[0336] (45) 표적 조직 특이적인 화합물의 농도에 따라 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 도메인을 선택하는 것을 포함하는 (1) 내지 (43) 중 어느 하나에 기재된 항원 결합 분자의 스크리닝방법,

[0337] (46) (1) 내지 (43) 중 어느 하나에 기재된 항원 결합 분자를 포함하는 의약 조성물

[0338] 을 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0339] 도 1은 저분자가 존재하지 않는 정상의 환경에 있어서는 저분자 스위치 항체(Small molecule switch antibody)가 항원에 결합하지 않고, 저분자가 고농도로 존재하는 표적 조직에서는 항원에 결합하는 것을 나타내는 도면이다.

도 2는 저분자 항체와 항원의 복합체 사이에 끼임으로써 저분자가 스위치 기능을 하는 것을 나타내는 도면이다. 저분자가 존재하지 않으면 항체와 항원과의 상호작용이 불충분해져 항체는 항원에 결합하는 것이 불가능하나, 저분자가 존재하면 항체와 항원 사이에 끼임으로써 항체는 항원에 결합하는 것이 가능해진다.

도 3은 항체의 인간 IL-6에 대한 결합 ELISA의 결과를 나타내는 도면이다. 세로축은 각 저분자의 유무에 따라 각 항체의 인간 IL-6로의 결합 활성을 평가한 흡광도의 값이다.

도 4는 100 μmol/L kynurenine 존재하, 비존재하에 있어서의 A11과 4 μmol/L 인간 IL-6의 상호작용의 센서그

램이다.

도 5는 1 μmol/L의 IL-6를 애널라이트로서 60초간 상호작용시켰을 때의 센서칩 CM5 상에 고정화한 A11에 대한 결합의 리스폰스의 변화를 평가한 그래프이다. 세로축은 IL-6 상호작용 전후에서의 리스폰스의 변화(RU), 가로축은 그때의 용액 중에 포함되는 kynurenine 농도(μmol/L)를 나타낸다.

도 6은 1 μmol/L의 IL-6를 애널라이트로서 60초간 상호작용시켰을 때의 센서칩 CM5 상에 고정화한 H01에 대한 리스폰스를 평가한 그래프이다. 세로축은 IL-6 상호작용 전후에서의 리스폰스의 변화(RU), 가로축은 그때의 용액 중에 포함되는 kynurenine 농도(μmol/L)를 나타낸다.

도 7은 0.1 μmol/L의 A11을 애널라이트로서 60초간 상호작용시키고, 센서칩 CM5 상에 고정화한 IL-6에 대한 리스폰스를 평가한 그래프이다. 세로축은 A11 상호작용 전후에서의 리스폰스의 변화(RU), 가로축은 용액 중에 포함되는 kynurenine 농도(μmol/L)를 나타낸다.

도 8은 센서칩 CM5에 고정화한 IL-6에 대해 100 μmol/L kynurenine 존재하에서 A11을 상호작용시키고, 그 후 100 μmol/L kynurenine을 포함하는 버퍼 또는 kynurenine을 포함하지 않는 버퍼 조건하에 있어서의 A11의 IL6로부터의 해리를 관찰한 그래프이다. 도면의 세로축은 100 μmol/L kynurenine 존재하에서의 A11의 결합량을 100으로 하여 정규화(normalize)한 값을, 가로축은 상호작용 개시 후부터의 경과시간(초)을 나타낸다.

도 9는 센서칩 상에 고정화한 IL-6에 대해 800, 400, 200, 100, 50, 25 nmol/L의 kynurenine을 상호작용시켰을 때에 얻어진 센서그램이다. 세로축은 kynurenine의 IL-6에 대한 결합량의 변화(RU)를 나타내고(상호작용 실험 개시시의 리스폰스를 0으로 하였다), 가로축은 상호작용 실험 개시시로부터의 경과시간을 나타낸다.

도 10은 토끼에 대한 면역에 사용한 아데노신 아날로그인 2'-Adenosine-PEG-peptide의 구조를 나타내는 도면이다.

도 11은 토끼에 대한 면역에 사용한 아데노신 아날로그인 5'-Adenosine-PEG-peptide의 구조를 나타내는 도면이다.

도 12는 토끼에 대한 면역에 사용한 아데노신 아날로그의 펩티드 부분을 비오틴으로 치환한 2'-Adenosine-PEG-biotin의 구조를 나타내는 도면이다.

도 13은 토끼에 대한 면역에 사용한 아데노신 아날로그의 펩티드 부분을 비오틴으로 치환한 5'-Adenosine-PEG-biotin의 구조를 나타내는 도면이다.

도 14는 각 항체를 2'-Adenosine-PEG-Biotin과 상호작용시켰을 때의 결합량을 각 항체의 캡쳐량(RU)으로 나눈 값(N_binding_100)을 세로축에, 2'-Adenosine-PEG-Biotin의 상호작용 후에 각 항체로부터 2'-Adenosine-PEG-Biotin이 해리된 60초 후의 값을 각 항체의 캡쳐량(RU)으로 나눈 값(N_stability_100)을 가로축에 나타내는 도면이다.

도 15a는 클론 SMB0002가 아데노신에 결합하는 것(상호작용)을 나타내는 표면 플라즈몬 공명 분석의 센서그램이다. 센서그램은 아래부터 순서대로 7.81, 31.3, 125, 500 nM의 항원과 SMB0002의 상호작용을 나타내고 있다.

도 15b는 클론 SMB0002가 ATP에 결합하는 것(상호작용)을 나타내는 표면 플라즈몬 공명 분석의 센서그램이다. 센서그램은 아래부터 순서대로 78.1, 313, 1250, 5000 nM의 항원과 SMB0002의 상호작용을 나타내고 있다.

도 15c는 클론 SMB0089가 아데노신에 결합하는 것(상호작용)을 나타내는 표면 플라즈몬 공명 분석의 센서그램이다. 센서그램은 아래부터 순서대로 7.81, 31.3, 125, 500 nM의 항원과 SMB0089의 상호작용을 나타내고 있다.

도 15d는 클론 SMB0089가 ATP에 결합하는 것(상호작용)을 나타내는 표면 플라즈몬 공명 분석의 센서그램이다. 센서그램은 아래부터 순서대로 78.1, 313, 1250, 5000 nM의 항원과 SMB00089의 상호작용을 나타내고 있다.

도 15e는 클론 SMB0104가 아데노신에 결합하는 것(상호작용)을 나타내는 표면 플라즈몬 공명 분석의 센서그램이다. 센서그램은 아래부터 순서대로 7.81, 31.3, 500 nM의 항원과 SMB0104의 상호작용을 나타내고 있다.

도 15f는 클론 SMB0104가 ATP에 결합하는 것(상호작용)을 나타내는 표면 플라즈몬 공명 분석의 센서그램이다. 센서그램은 아래부터 순서대로 78.1, 313, 1250, 5000 nM의 항원과 SMB0104의 상호작용을 나타내고 있다.

도 16은 클론 SMB0171이 ATP에 결합하는 것(상호작용)을 나타내는 표면 플라즈몬 공명 분석의 센서그램이다. 센서그램은 아래부터 순서대로 5, 50 μM의 항원과 SMB0171의 상호작용을 나타내고 있다.

도 17은 클론 SMB0002가 아데노신 및 ATP에 결합하는 것을 나타태는 경합 ELISA의 결과를 나타내는 도면이다.

도 18은 ATNLSA1-4_D12의 비오틴 표지 항원(5'-Adenosine-PEG-biotin, ATP-PEG-biotin의 혼합) 결합에 대한 ATP에 의한 저해능을 평가한 도면이다.

도 19는 아데노신 또는 ATP가 항체와 항원 사이에 끼여 항원과 접하는 항체 가변영역 부분을 라이브러리화함으로써 임의의 항원에 대해 아데노신/ATP 스위치 항체를 취득할 수 있는 합리적 디자인 항체 라이브러리(rationally designed antibody library)의 콘셉트를 나타내는 도면이다.

도 20은 아데노신 또는 ATP가 항체와 항원 사이에 끼여, 임의의 항원에 대해 아데노신/ATP 스위치 항체를 취득할 수 있는 아데노신 면역 토끼 항체 라이브러리의 콘셉트를 나타내는 도면이다.

도 21은 항체의 인간 IL-6에 대한 결합 ELISA의 결과를 나타내는 도면이다. 세로축은 450 nm 파장의 흡광도의 값으로 표시되는, 아미노산 및 아미노산 대사물(키누레닌, 트립토판, 페닐알라닌, 안트라닐산 및 3-히드록시키누레닌, 키누렌산)의 유무에 따른 각 항체의 인간 IL-6에 대한 결합 활성을 나타낸다.

도 22는 항체의 인간 IL-6에 대한 결합 ELISA의 결과를 나타내는 도면이다. 세로축은 450 nm 파장의 흡광도로부터 산출된 비활성(specific activity)의 값으로 표시되는, 각 저분자(ATP, 아데노신, 이노신, PGE2, 숙신산, 락트산, 키누레닌, 저분자 칵테일)의 유무에 따른 I6NMSC1-3_#03 항체의 인간 IL-6에 대한 결합 활성을 나타낸다.

도 23은 항체의 인간 IL-6에 대한 결합 ELISA의 결과를 나타내는 도면이다. 세로축은 450 nm 파장의 흡광도로부터 산출된 비활성의 값으로 표시되는, 각 저분자(ATP, 아데노신, 이노신, PGE2, 숙신산, 락트산, 키누레닌, 저분자 칵테일)의 유무에 따른 I6NMSC1-3_#17 항체의 인간 IL-6에 대한 결합 활성을 나타낸다.

도 24는 항체의 HSA에 대한 결합 ELISA의 결과를 나타내는 도면이다. 세로축은 450 nm 파장의 흡광도의 값으로 표시되는, 각 저분자(ATP, 아데노신, 이노신, PGE2, 숙신산, 락트산, 키누레닌, 저분자 칵테일)의 유무에 따른 HSNMSC1-4_#22 항체의 HSA에 대한 결합 활성을 나타낸다.

도 25는 합리적 디자인 항체 라이브러리로부터 얻어진 클론 I6DL2C5-4_076의 인간 IL-6에 대한 ATP 및/또는 Adenosine 1 mM의 존재/비존재하에 있어서의 ELISA의 결과를 나타내는 도면이다. 세로축은 항체의 인간 IL-6로의 결합 활성을 평가한 흡광도의 값이다. 음성 대조(Negative Control)는 M13KO7 Helper Phage를 사용했을 때의 결과를 나타낸다.

도 26은 합리적 디자인 항체 라이브러리로부터 얻어진 클론 HSDL3C5-4_015의 Human Serum Albumin에 대한 ATP 및/또는 Adenosine 1 mM의 존재/비존재하에 있어서의 ELISA의 결과를 나타내는 도면이다. 세로축은 항체의 Human Serum Albumin으로의 결합 활성을 평가한 흡광도의 값이다. 음성 대조(Negative Control)는 M13KO7 Helper Phage를 사용했을 때의 결과를 나타낸다.

도 27은 합리적 디자인 항체 라이브러리로부터 얻어진 클론 6RAD2C1-4_011, 및 6RAD2C1-4_076의 인간 IL-6 Receptor에 대한 ATP 및/또는 Adenosine(ADO로 기재되어 있다) 1 mM의 존재 또는 비존재하, 및 저분자 칵테일(SC)의 존재 또는 비존재하에 있어서의 ELISA의 결과를 나타내는 도면이다. 세로축은 항체의 인간 IL-6 Receptor로의 결합 활성을 평가한 흡광도의 값이다. 음성 대조(Negative Control)는 M13KO7 Helper Phage를 사용했을 때의 결과를 나타낸다.

도 28은 클론 6RNMSC1-2_F02의 인간 IL-6R에 대한 결합 ELISA의 결과를 나타내는 도면이다. 세로축은 각 저분자의 유무에 따라 항체의 인간 IL-6R로의 결합 활성을 평가한 흡광도의 값이다.

도 29는 클론 6RNMSC1-3_G02의 인간 IL-6R에 대한 결합 ELISA의 결과를 나타내는 도면이다. 세로축은 각 저분자의 유무에 따라 항체의 인간 IL-6R로의 결합 활성을 평가한 흡광도의 값이다.

도 30은 항체의 인간 IL-6R에 대한 결합 ELISA의 결과를 나타내는 도면이다. 세로축은 각 아미노산 또는 아미노산 대사물의 유무에 따라 항체의 인간 IL-6R로의 결합 활성을 평가한 흡광도의 값이다.

도 31은 100 μmol/L kynurenine 존재하, 10 mmol/L ATP 존재하, kynurenine, ATP 비존재하에 있어서의 6RNMSC1-2_F02와 1 μmol/L IL-6R의 상호작용의 센서그램이다. 실선은 kynurenine 존재하의 상호작용, 점선은 ATP 존재하의 상호작용 및 파선은 이들 비존재하의 상호작용을 나타낸다.

도 32는 센서칩 CM5에 고정화한 IL-6R에 대해 100 μmol/L kynurenine 존재하에서 6RNMSC1-2_F02를 상호작용시키고, 그 후 100 μmol/L kynurenine을 포함하는 버퍼 또는 kynurenine을 포함하지 않는 버퍼 조건하에 있어서

의 6RNMSC1-2_F02의 IL-6R로부터의 해리를 관찰한 그래프이다. 도면의 세로축은 100 μmol/L kynurenine 존재하에서의 6RNMSC1-2_F02의 결합량을 100으로 하여 normalize한 값을, 가로축은 상호작용 개시 후로부터의 경과 시간(초)을 나타낸다. 실선은 kynurenine 존재하에 있어서의 6RNMSC1-2_F02의 IL-6R로부터의 해리, 점선은 kynurenine 비존재하에 있어서의 6RNMSC1-2_F02의 IL-6R로부터의 해리를 나타낸다.

도 33은 5 μg/L의 6RNMSC1-2_F02를 애널라이트로서 180초간 상호작용시키고, 센서칩 CM5 상에 고정화한 IL-6R에 대한 리스폰스를 평가한 그래프이다. 세로축은 6RNMSC1-2_F02를 상호작용시킨 전후에서의 리스폰스의 변화(RU), 가로축은 용액 중에 포함되는 kynurenine 농도(μmol/L)를 나타낸다.

도 34는 항체의 막형 인간 IL-6R에 대한 결합을 FCM으로 평가한 도면이다. 상단은 Kynurenine 존재하, 하단은 Kynurenine 비존재하에서의 결과이다. 가로축은 형광강도를, 세로축은 세포 수를 나타내고 있다.

도 35a는 저분자 존재하에서 항원에 결합하는 항체에 따른 항원을 발현하는 세포에 대한 ADCC 활성을 나타내는 도면이다. kynurenine 존재하에서 hIL-6R에 결합하는 클론 6RNMSC1-2_F02에 따른 kynurenine 존재하(삼각) 또는 비존재하(동그라미)에서의 hIL-6R을 발현하는 BaF세포에 대한 ADCC 활성을 나타내는 도면이다. 흰색이 개별 측정값, 검정색이 평균값을 나타낸다.

도 35b는 저분자 존재하에서 항원에 결합하는 항체에 따른 항원을 발현하는 세포에 대한 ADCC 활성을 나타내는 도면이다. kynurenine의 유무에 상관없이 hIL-6R에 결합하는 MRA에 따른 kynurenine 존재하(삼각) 또는 비존재하(동그라미)에서의 hIL-6R을 발현하는 BaF세포에 대한 ADCC 활성을 나타내는 도면이다. 흰색이 개별 측정값, 검정색이 평균값을 나타낸다.

도 36은 저분자 존재하에서 항원에 결합하는 항체에 따른 항원을 발현하는 세포에 대한 ADCC 활성을 나타내는 도면이다. kynurenine 존재하에서 hIL-6R에 결합하는 클론 6RNMSC1-2_F02의 존재하(삼각) 또는 비존재하(동그라미)에서의 hIL-6R을 발현하는 BaF세포에 대한 클론 6RNMSC1-2_F02에 따른 ADCC 활성을 나타내는 도면이다. 가로축은 키누레닌 농도를 나타내고, 세로축은 ADCC 활성(%)을 나타낸다. ADCC 활성은 평균값과 표준편차를 나타낸다.

도 37은 클론 6RNMSC1-2_F02의 마우스 혈청 중에 있어서의 인간 IL-6R에 대한 결합 ELISA의 결과를 나타내는 도면이다. 세로축은 Kynurenine의 유무에 따라 항체의 인간 IL-6R로의 결합 활성을 평가한 흡광도의 값이다.

도 38은 합리적 디자인 항체 라이브러리로부터 얻어진 클론 I6RLSA1-6_011의 인간 IL-6에 대한 ATP 및 Adenosine 10 mM의 존재 또는 비존재하에 있어서의 ELISA의 결과를 나타내는 도면이다. 세로축은 항체의 인간 IL-6로의 결합 활성을 평가한 흡광도의 값이다. 양성 대조(Positive Control)는 합리적 디자인 항체 라이브러리로부터 얻어진 저분자의 유무에 상관없이 인간 IL-6에 결합 활성을 나타내는 클론을 사용했을 때의 결과를 나타낸다. 음성 대조(Negative Control)는 M13KO7 Helper Phage를 사용했을 때의 결과를 나타낸다.

도 39는 합리적 디자인 항체 라이브러리로부터 얻어진 클론 6RRLSA1-6_037, 6RRLSA1-6_045의 인간 IL-6 Receptor에 대한 ATP 및 Adenosine 10 mM의 존재 또는 비존재하에 있어서의 ELISA의 결과를 나타내는 도면이다. 세로축은 항체의 인간 IL-6 Receptor로의 결합 활성을 평가한 흡광도의 값이다. 음성 대조(Negative Control)는 M13KO7 Helper Phage를 사용했을 때의 결과를 나타낸다.

도 40은 합리적 디자인 항체 라이브러리에 대해서 인간 IgA-Fc에 대해 항체 다가 제시 파지디스플레이에 의한 패닝을 4회 실시하여 얻어진 96 클론의 ELISA의 결과를 나타내는 도면이다. 세로축은 ATP 및 아데노신 비존재하, 가로축은 존재하에서의 항체의 인간 IgA-Fc로의 결합 활성을 평가한 흡광도의 값이다.

도 41은 합리적 디자인 항체 라이브러리에 대해서 인간 IgA-Fc에 대해 항체 1가 제시 파지디스플레이에 의한 패닝을 4회 실시하여 얻어진 96 클론의 ELISA의 결과를 나타내는 도면이다. 세로축은 ATP 및 아데노신 비존재하, 가로축은 존재하에서의 항체의 인간 IgA-Fc로의 결합 활성을 평가한 흡광도의 값이다.

도 42는 합리적 디자인 항체 라이브러리로부터 얻어진 클론 IADL3C5-4_048의 인간 IgA-Fc에 대한 ATP 및 Adenosine 1 mM의 존재 또는 비존재하에 있어서의 ELISA의 결과를 나타내는 도면이다. 세로축은 항체의 인간 IgA-Fc로의 결합 활성을 평가한 흡광도의 값이다. 양성 대조(Positive Control)는 합리적 디자인 항체 라이브러리로부터 얻어진 저분자의 유무에 상관없이 인간 IgA-Fc에 결합 활성을 나타내는 클론을 사용했을 때의 결과를 나타낸다. 음성 대조(Negative Control)는 M13KO7 Helper Phage를 사용했을 때의 결과를 나타낸다.

도 43은 센서칩 CM5 상에 고정화한 IL-6R에 대한 각 저분자 1 mM 존재하·비존재하에서 각 클론 1 μM를 120초

간 상호작용시켰을 때의 결합량(Binding response(RU))을 나타내는 그래프이다.

도 44a는 저분자 존재하에서 항원에 결합하는 항체에 따른 항원을 발현하는 세포에 대한 ADCC 활성을 나타내는 도면이다. ATP 존재하에서 hIL-6R에 결합하는 클론 6RAD2C1-4_030에 의한 ATP 존재하(삼각) 또는 비존재하(동그라미)에서의 hIL-6R을 발현하는 CHO세포에 대한 ADCC 활성을 나타내는 도면이다. 흰색이 개별 측정값, 검정색이 평균값을 나타낸다.

도 44b는 저분자 존재하에서 항원에 결합하는 항체에 따른 항원을 발현하는 세포에 대한 ADCC 활성을 나타내는 도면이다. ATP 존재하에서 hIL-6R에 결합하는 클론 6RAD2C1-4_011에 의한 ATP 존재하(삼각) 또는 비존재하(동그라미)에서의 hIL-6R을 발현하는 CHO세포에 대한 ADCC 활성을 나타내는 도면이다. 흰색이 개별 측정값, 검정색이 평균값을 나타낸다.

도 44c는 저분자 존재하에서 항원에 결합하는 항체에 따른 항원을 발현하는 세포에 대한 ADCC 활성을 나타내는 도면이다. ATP의 유무에 상관없이 hIL-6R에 결합하는 MRA에 의한 ATP 존재하(삼각) 또는 비존재하(동그라미)에서의 hIL-6R을 발현하는 CHO세포에 대한 ADCC 활성을 나타내는 도면이다. 흰색이 개별 측정값, 검정색이 평균값을 나타낸다.

도 45는 합리적 디자인 항체 라이브러리로부터 얻어진 클론 HSADSA1-6_020의 HSA에 대한 ATP 및 Adenosine 10 mM의 존재 또는 비존재하에 있어서의 ELISA의 결과를 나타내는 도면이다. 세로축은 항체의 HSA로의 결합 활성을 평가한 흡광도의 값이다. 양성 대조(Positive Control)는 합리적 디자인 항체 라이브러리로부터 얻어진 저분자의 유무에 상관없이 HSA에 결합 활성을 나타내는 클론을 사용했을 때의 결과를 나타낸다. 음성 대조(Negative Control)는 M13KO7 Helper Phage를 사용했을 때의 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0340] 아래의 정의 및 상세한 설명은 본 명세서에 있어서 설명하는 본 발명의 이해를 용이하게 하기 위해 제공된다.

[0341] 아미노산

[0342] 본 명세서에 있어서 예를 들면 Ala/A, Leu/L, Arg/R, Lys/K, Asn/N, Met/M, Asp/D, Phe/F, Cys/C, Pro/P, Gln/Q, Ser/S, Glu/E, Thr/T, Gly/G, Trp/W, His/H, Tyr/Y, Ile/I, Val/V로 나타내어지는 바와 같이, 아미노산은 1문자 코드 또는 3문자 코드 또는 그 양쪽으로 표기되고 있다.

[0343] 아미노산의 개변

[0344] 항원 결합 분자의 아미노산 서열 중의 아미노산의 개변을 위해서는 부위 특이적 변이 유발법(Kunkel 등(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492))이나 Overlap extension PCR 등의 공지의 방법이 적절히 채용될 수 있다. 또한 천연의 아미노산 이외의 아미노산으로 치환하는 아미노산의 개변방법으로서, 복수의 공지의 방법도 또한 채용될 수 있다(Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006) 35, 225-249, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100(11), 6353-6357). 예를 들면 종지 코돈의 하나인 UAG 코돈(앰버 코돈)의 상보적 앰버서프레서 tRNA에 비천연 아미노산이 결합된 tRNA가 포함되는 무세포 번역계 시스템(Clover Direct(Protein Express)) 등도 적합하게 사용된다.

[0345] 본 명세서에 있어서 아미노산의 개변 부위를 나타낼 때 사용되는 「및/또는」의 용어의 의의는 「및」과 「또는」이 적절히 조합된 모든 조합을 포함한다. 구체적으로는, 예를 들면 「33번 위치, 55번 위치 및/또는 96번 위치의 아미노산이 치환되어 있는」이란 아래의 아미노산의 개변의 변형이 포함된다 ;

[0346] (a) 33번 위치, (b) 55번 위치, (c) 96번 위치, (d) 33번 위치 및 55번 위치, (e) 33번 위치 및 96번 위치, (f) 55번 위치 및 96번 위치, (g) 33번 위치, 55번 위치 및 96번 위치.

[0347] 본 명세서에 있어서 또한 아미노산의 개변을 나타내는 표현으로서, 특정 위치를 나타내는 숫자 전후에 개변 전과 개변 후의 아미노산의 1문자 코드 또는 3문자 코드를 병기한 표현이 적절히 사용될 수 있다. 예를 들면 항체 가변영역에 포함되는 아미노산의 치환을 가할 때에 사용되는 N100bL 또는 Asn100bLeu라는 개변은 Kabat 넘버링으로 표시되는 100b번 위치의 Asn의 Leu로의 치환을 나타낸다. 즉, 숫자는 Kabat 넘버링으로 표시되는 아미노산의 위치를 나타내고, 그 앞에 기재되는 아미노산의 1문자 코드 또는 3문자 코드는 치환 전의 아미노산, 그 뒤에 기재되는 아미노산의 1문자 코드 또는 3문자 코드는 치환 후의 아미노산을 나타낸다. 마찬가지로 항체 정상영역에 포함되는 Fc영역에 아미노산의 치환을 가할 때에 사용되는 P238D 또는 Pro238Asp라는 개변은 EU 넘버링으로 표시되는 238번 위치의 Pro의 Asp로의 치환을 나타낸다. 즉, 숫자는 EU 넘버링으로 표시되는 아미노산의 위치를

나타내고, 그 앞에 기재되는 아미노산의 1문자 코드 또는 3문자 코드는 치환 전의 아미노산, 그 뒤에 기재되는 아미노산의 1문자 코드 또는 3문자 코드는 치환 후의 아미노산을 나타낸다.

[0348] 항원

[0349] 본 명세서에 있어서 「항원」은 항원 결합 도메인이 결합하는 에피토프를 포함하는 한 그 구조는 특정 구조에 한정되지 않는다. 다른 의미로는 항원은 무기물일 수도 있고 유기물일 수도 있다. 항원으로서는 하기와 같은 분자 ; 17-IA, 4-1 BB, 4Dc, 6-케토-PGF1a, 8-이소-PGF2a, 8-옥소-dG, A1 아데노신 수용체, A33, ACE, ACE-2, 액티빈, 액티빈 A, 액티빈 AB, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 RIA, 액티빈 RIA ALK-2, 액티빈 RIB ALK-4, 액티빈 RIIA, 액티빈 RIIB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, 아드레신(Addressins), aFGF, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, 알파-1-안티트립신, 알파-V/베타-1 안타고니스트, ANG, Ang, APAF-1, APE, APJ, APP, APRIL, AR, ARC, ART, 아르테민, 항Id, ASPARTIC, 심방성 나트륨 이뇨인자, av/b3 인테그린, Axl, b2M, B7-1, B7-2, B7-H, B-림프구 자극인자(BlyS), BACE, BACE-1, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bcl, BCMA, BDNF, b-ECGF, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, BMP, BMP-2 BMP-2a, BMP-3 오스테오게닌(Osteogenin), BMP-4 BMP-2b, BMP-5, BMP-6 Vgr-1, BMP-7(OP-1), BMP-8(BMP-8a, OP-2), BMPR, BMPR-IA(ALK-3), BMPR-IB(ALK-6), BRK-2, RPK-1, BMPR-II(BRK-3), BMP, b-NGF, BOK, 봄베신, 골 유래 신경 영양인자(Bone-derived neurotrophic factor), BPDE, BPDE-DNA, BTC, 보체인자 3(C3), C3a, C4, C5, C5a, C10, CA125, CAD-8, 칼시토닌, cAMP, 암 태아성 항원(CEA), 암 관련 항원, 카텝신 A, 카텝신 B, 카텝신 C/DPPI, 카텝신 D, 카텝신 E, 카텝신 H, 카텝신 L, 카텝신 O, 카텝신 S, 카텝신 V, 카텝신 X/Z/P, CBL, CCI, CCK2, CCL, CCL1, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCR, CCR1, CCR10, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27L, CD28, CD29, CD30, CD30L, CD32, CD33(p67 단백질), CD34, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD49a, CD52, CD54, CD55, CD56, CD61, CD64, CD66e, CD74, CD80(B7-1), CD89, CD95, CD123, CD137, CD138, CD140a, CD146, CD147, CD148, CD152, CD164, CEACAM5, CFTR, cGMP, CINC, 보툴리눔 독소(Botulinum toxin), 웰치균 독소(Clostridium perfringens toxin), CKb8-1, CLC, CMV, CMV UL, CNTF, CNTN-1, COX, C-Ret, CRG-2, CT-1, CTACK, CTGF, CTLA-4, PD1, PDL1, LAG3, TIM3, galectin-9, CX3CL1, CX3CR1, CXCL, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, 사이토케라틴 종양 관련 항원, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, 보체 제어인자(Decay accelerating factor), des(1-3)-IGF-I(뇌 IGF-1), Dhh, 디곡신, DNAM-1, Dnase, Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR(ErbB-1), EMA, EMMPRIN, ENA, 엔도텔린 수용체, 엔케팔리나제, eNOS, Eot, 에오탁신 1, EpCAM, 에프린 B2/EphB4, EPO, ERCC, E-셀렉틴, ET-1, 팩터 IIa, 팩터 VII, 팩터 VIIIc, 팩터 IX, 섬유아세포 활성화 단백질(FAP), Fas, FcR1, FEN-1, 페리틴, FGF, FGF-19, FGF-2, FGF3, FGF-8, FGFR, FGFR-3, 피브린, FL, FLIP, Flt-3, Flt-4, 난포 자극 호르몬, 프랙탈카인, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, G250, Gas6, GCP-2, GCSF, GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-3(Vgr-2), GDF-5(BMP-14, CDMP-1), GDF-6(BMP-13, CDMP-2), GDF-7(BMP-12, CDMP-3), GDF-8(미오스타틴), GDF-9, GDF-15(MIC-1), GDNF, GDNF, GFAP, GFRa-1, GFR-알파 1, GFR-알파 2, GFR-알파 3, GITR, 글루카곤, Glut4, 당단백질IIb/IIIa(GPIIb/IIIa), GM-CSF, gp130, gp72, GRO, 성장 호르몬 방출인자, 합텐(NP-cap 또는 NIP-cap), HB-EGF, HCC, HCMV gB 엔벨로프 당단백질, HCMV gH 엔벨로프 당단백질, HCMV UL, 조혈 성장 인자(HGF), Hep B gp120, 헤파라나제, Her2, Her2/neu(ErbB-2), Her3(ErbB-3), Her4(ErbB-4), 단순 헤르페스 바이러스(HSV) gB 당단백질, HSV gD 당단백질, HGFA, 고분자량 흑색종 관련 항원(HMW-MAA), HIV gp120, HIV IIIB gp 120 V3 루프, HLA, HLA-DR, HM1.24, HMFG PEM, HRG, Hrk, 인간 심장 미오신, 인간 사이토메갈로바이러스(HCMV), 인간 성장 호르몬(HGH), HVEM, I-309, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-3, ICE, ICOS, IFNg, Ig, IgA 수용체, IgE, IGF, IGF 결합 단백질, IGF-1R, IGFBP, IGF-I, IGF-II, IL, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-5R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-18R, IL-21, IL-23, IL-27, 인터페론(INF)-알파, INF-베타, INF-감마, 인히빈, iNOS, 인슐린 A쇄, 인슐린 B쇄, 인슐린 유사 증식 인자 1, 인테그린 알파 2, 인테그린 알파 3, 인테그린 알파 4, 인테그린 알파 4/베타 1, 인테그린 알파 4/베타 7, 인테그린 알파 5(알파 V), 인테그린 알파 5/베타 1, 인테그린 알파 5/베타 3, 인테그린 알파 6, 인테그린 베타 1, 인테그린 베타 2, 인터페론 감마, IP-10, I-TAC, JE, 칼리크레인 2, 칼리크레인 5, 칼리크레인 6, 칼리크레인 11, 칼리크레인 12, 칼리크레인 14, 칼리크레인 15, 칼리크레인 L1, 칼리크레인 L2, 칼리크레인 L3, 칼리크레인 L4, KC, KDR, 케라티노사이트 증식 인자(KGF), 라미닌 5, LAMP, LAP, LAP(TGF-1), 잠재적

TGF-1, 잠재적 TGF-1 bp1, LBP, LDGF, LECT2, 레프티, 루이스-Y 항원, 루이스-Y 관련 항원, LFA-1, LFA-3, Lfo, LIF, LIGHT, 리포단백질, LIX, LKN, Lptn, L-셀렉틴, LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, 폐 표면, 황체 형성 호르몬, 림포톡신 베타 수용체, Mac-1, MAdCAM, MAG, MAP2, MARC, MCAM, MCAM, MCK-2, MCP, M-CSF, MDC, Mer, METALLOPROTEASES, MGDF 수용체, MGMT, MHC(HLA-DR), MIF, MIG, MIP, MIP-1-알파, MK, MMAC1, MMP, MMP-1, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-2, MMP-24, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MPIF, Mpo, MSK, MSP, 뮤신(Muc1), MUC18, 뮬러리안 억제 물질, Mug, MuSK, NAIP, NAP, NCAD, N-C 아드헤린, NCA 90, NCAM, NCAM, 네프릴리신, 뉴로트로핀-3, -4, 또는 -6, 뉴르투린, 신경 성장 인자(NGF), NGFR, NGF-베타, nNOS, NO, NOS, Npn, NRG-3, NT, NTN, OB, OGG1, OPG, OPN, OSM, OX40L, OX40R, p150, p95, PADPr, 부갑상선 호르몬, PARC, PARP, PBR, PBSF, PCAD, P-카드헤린, PCNA, PDGF, PDGF, PDK-1, PECAM, PEM, PF4, PGE, PGF, PGI2, PGJ2, PIN, PLA2, 태반성 알칼리포스파타아제(PLAP), PlGF, PLP, PP14, 프로인슐린, 프로릴랙신(prorelaxin), 프로테인 C, PS, PSA, PSCA, 전립선 특이적 막항원(PSMA), PTEN, PTHrp, Ptk, PTN, R51, RANK, RANKL, RANTES, RANTES, 릴랙신 A쇄, 릴랙신 B쇄, 레닌, 호흡기 다핵체 바이러스(RSV)F, RSV Fgp, Ret, 류머티즘 인자, RLIP76, RPA2, RSK, S100, SCF/KL, SDF-1, SERINE, 혈청 알부민, sFRP-3, Shh, SIGIRR, SK-1, SLAM, SLPI, SMAC, SMDF, SMOH, SOD, SPARC, Stat, STEAP, STEAP-II, TACE, TACI, TAG-72(종양 관련 당단백질-72), TARC, TCA-3, T세포 수용체(예를 들면 T세포 수용체 알파/베타), TdT, TECK, TEM1, TEM5, TEM7, TEM8, TERT, 고환 PLAP 유사 알칼리포스파타아제, TfR, TGF, TGF-알파, TGF-베타, TGF-베타 Pan Specific, TGF-베타RI(ALK-5), TGF-베타RII, TGF-베타RIIb, TGF-베타RIII, TGF-베타 1, TGF-베타 2, TGF-베타 3, TGF-베타 4, TGF-베타 5, 트롬빈, 흉선 Ck-1, 갑상선 자극 호르몬, Tie, TIMP, TIQ, 조직인자, TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, TNF, TNF-알파, TNF-알파베타, TNF-베타 2, TNFc, TNF-RI, TNF-RII, TNFRSF10A(TRAIL R1 Apo-2, DR4), TNFRSF10B(TRAIL R2 DR5, KILLER, TRICK-2A, TRICK-B), TNFRSF10C(TRAIL R3 DcR1, LIT, TRID), TNFRSF10D(TRAIL R4 DcR2, TRUNDD), TNFRSF11A(RANK ODF R, TRANCE R), TNFRSF11B(OPG OCIF, TR1), TNFRSF12(TWEAK R FN14), TNFRSF13B(TACI), TNFRSF13C(BAFF R), TNFRSF14(HVEM ATAR, HveA, LIGHT R, TR2), TNFRSF16(NGFR p75NTR), TNFRSF17(BCMA), TNFRSF18(GITR AITR), TNFRSF19(TROY TAJ, TRADE), TNFRSF19L(RELT), TNFRSF1A(TNF RI CD120a, p55-60), TNFRSF1B(TNF RII CD120b, p75-80), TNFRSF26(TNFRH3), TNFRSF3(LTbR TNF RIII, TNFC R), TNFRSF4(OX40 ACT35, TXGP1 R), TNFRSF5(CD40 p50), TNFRSF6(Fas Apo-1, APT1, CD95), TNFRSF6B(DcR3 M68, TR6), TNFRSF7(CD27), TNFRSF8(CD30), TNFRSF9(4-1BB CD137, ILA), TNFRSF21(DR6), TNFRSF22(DcTRAIL R2 TNFRH2), TNFRST23(DcTRAIL R1 TNFRH1), TNFRSF25(DR3 Apo-3, LARD, TR-3, TRAMP, WSL-1), TNFSF10(TRAIL Apo-2 리간드, TL2), TNFSF11(TRANCE/RANK 리간드 ODF, OPG 리간드), TNFSF12(TWEAK Apo-3 리간드, DR3 리간드), TNFSF13(APRIL TALL2), TNFSF13B(BAFF BLYS, TALL1, THANK, TNFSF20), TNFSF14(LIGHT HVEM 리간드, LTg), TNFSF15(TL1A/VEGI), TNFSF18(GITR 리간드 AITR 리간드, TL6), TNFSF1A(TNF-a 코넥틴(Conectin), DIF, TNFSF2), TNFSF1B(TNF-b LTa, TNFSF1), TNFSF3(LTb TNFC, p33), TNFSF4(OX40 리간드 gp34, TXGP1), TNFSF5(CD40 리간드 CD154, gp39, HIGM1, IMD3, TRAP), TNFSF6(Fas 리간드 Apo-1 리간드, APT1 리간드), TNFSF7(CD27 리간드 CD70), TNFSF8(CD30 리간드 CD153), TNFSF9(4-1BB 리간드 CD137 리간드), TP-1, t-PA, Tpo, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANCE, 트랜스페린 수용체, TRF, Trk, TROP-2, TLR1 (Toll-like receptor 1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TSG, TSLP, 종양 관련 항원 CA125, 종양 관련 항원 발현 루이스 Y 관련 탄수화물, TWEAK, TXB2, Ung, uPAR, uPAR-1, 우로키나아제, VCAM, VCAM-1, VECAD, VE-Cadherin, VE-cadherin-2, VEFGR-1(flt-1), VEGF, VEGFR, VEGFR-3(flt-4), VEGI, VIM, 바이러스 항원, VLA, VLA-1, VLA-4, VNR 인테그린, 폰빌레브란트 인자, WIF-1, WNT1, WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, XCL1, XCL2, XCR1, XCR1, XEDAR, XIAP, XPD, HMGB1, IgA, Aβ, CD81, CD97, CD98, DDR1, DKK1, EREG, Hsp90, IL-17/IL-17R, IL-20/IL-20R, 산화 LDL, PCSK9, prekallikrein, RON, TMEM16F, SOD1, Chromogranin A, Chromogranin B, tau, VAP1, 고분자 키니노겐, IL-31, IL-31R, Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9, EPCR, C1, C1q, C1r, C1s, C2, C2a, C2b, C3, C3a, C3b, C4, C4a, C4b, C5, C5a, C5b, C6, C7, C8, C9, factor B, factor D, factor H, properdin, sclerostin, fibrinogen, fibrin, prothrombin, thrombin, 조직인자, factor V, factor Va, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor VIIIa, factor IX, factor IXa, factor X, factor Xa, factor XI, factor XIa, factor XII, factor XIIa, factor XIII, factor XIIIa, TFPI, antithrombin III, EPCR, 트롬보모듈린, TAPI, tPA, plasminogen, plasmin, PAI-1, PAI-2, GPC3, Syndecan-1, Syndecan-2, Syndecan-3, Syndecan-4, LPA, S1P, 호르몬 및 성장 인자를 위한 수용체가 예시될 수 있다. 항원으로서는 암조직 또는 염증성 조직에 있어서의 암세포·면역세포·스트로마 세포 등에 발현하는 항원이 바람직하다.

[0350] 상기 항원의 예시에는 수용체도 기재되나, 이들 수용체가 생체액 중에 가용형으로 존재하는 경우에도 본 발명의 표적 조직 특이적인 화합물의 농도에 따라 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 분자가 결합하는 항원으로서 사용될 수 있다. 그러한 가용형 수용체의 비한정의 일태양으로서 예를 들면 Mullberg 등(J. Immunol. (1994) 152 (10), 4958-4968)에 의해 기재되어 있는 가용형 IL-6R인 서열번호 : 1로 표시되는 IL-6R 폴리펩티드 서열 중 1 내지 357번째의 아미노산으로 이루어지는 단백질이 예시될 수 있다.

[0351] 상기 항원의 예시에는 세포막에 발현하는 막형 분자 및 세포로부터 세포외로 분비되는 가용형 분자가 포함된다. 본 발명의 표적 조직 특이적인 화합물의 농도에 따라 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 분자가, 세포로부터 분비된 가용형 분자에 결합하는 경우, 당해 항원 결합 분자로서는 후술되는 바와 같이 중화 활성을 가지고 있는 것이 적합하다.

[0352] 가용형 분자가 존재하는 용액에 한정은 없고 생체액, 즉 생체내의 맥관 또는 조직·세포 사이를 채우는 모든 액체에 본 가용형 항원은 존재할 수 있다. 비한정의 일태양에서는 본 발명의 항원 결합 분자가 결합하는 가용형 분자는 세포외액에 존재할 수 있다. 세포외액이란 척추동물에서는 혈장, 조직간액, 림프액, 빽빽한 결합조직, 뇌척수액, 수액, 천자액 또는 관절액 등의 뼈 및 연골 중의 성분, 폐포액(기관지 폐포 세정액), 복수, 흉수, 심낭수, 낭포액 또는 수양액(aqueous humor) 등의 세포 투과액(세포의 능동 수송·분비 활동의 결과 생긴 각종 선강내의 액 및 소화관강 기타 체강내액)의 총칭을 말한다.

[0353] 본 발명의 표적 조직 특이적인 화합물의 농도에 따라 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 분자가, 세포막에 발현하는 막형 분자에 결합하는 경우, 당해 항원 결합 분자의 적합한 예로서, 후술되는 바와 같이 세포상해 활성을 가지고 있거나 또는 세포상해성 물질을 결합하거나 또는 결합하는 능력을 가지고 있는 항원 결합 분자를 적합하게 들 수 있다. 또한 세포상해 활성을 가지고 있거나 또는 세포상해성 물질을 결합하거나 또는 결합하는 능력을 가지고 있다고 하는 성질 대신에 또는 당해 성질에 더하여 중화 활성을 가지고 있는 항원 결합 분자도 또한 비한정의 일태양으로서 적합하게 들 수 있다.

[0354] 에피토프

[0355] 항원 중에 존재하는 항원 결정기를 의미하는 에피토프는, 본 명세서에 있어서 개시되는 항원 결합 분자 중의 항원 결합 도메인이 결합하는 항원 상의 부위를 의미한다. 따라서, 예를 들면 에피토프는 그 구조에 의해 정의될 수 있다. 또한 당해 에피토프를 인식하는 항원 결합 분자 중의 항원에 대한 결합 활성에 따라서도 당해 에피토프가 정의될 수 있다. 항원이 펩티드 또는 폴리펩티드인 경우에는 에피토프를 구성하는 아미노산 잔기에 의해 에피토프를 특정하는 것도 가능하다. 또한 에피토프가 당쇄인 경우에는 특정 당쇄 구조에 의해 에피토프를 특정하는 것도 가능하다.

[0356] 직선상 에피토프는 아미노산 1차 서열이 인식된 에피토프를 포함하는 에피토프이다. 직선상 에피토프는 전형적으로는 3개 이상 및 가장 보통으로는 5개 이상, 예를 들면 약 8 내지 약 10개, 6 내지 20개의 아미노산이 고유의 서열에 있어서 포함된다.

[0357] 입체구조 에피토프는 직선상 에피토프와는 대조적으로, 에피토프를 포함하는 아미노산의 1차 서열이 인식된 에피토프의 단일 규정 성분이 아닌 에피토프(예를 들면 아미노산의 1차 서열이 반드시 에피토프를 규정하는 항체에 의해 인식되는 것은 아닌 에피토프)이다. 입체구조 에피토프는 직선상 에피토프에 대해 증대된 수의 아미노산을 포함할 지도 모른다. 입체구조 에피토프의 인식에 관하여, 항체는 펩티드 또는 단백질의 3차원 구조를 인식한다. 예를 들면 단백질 분자가 폴딩되어 3차원 구조를 형성하는 경우에는, 입체구조 에피토프를 형성하는 어떤 아미노산 및/또는 폴리펩티드 주쇄는 병렬로 되어 항체가 에피토프를 인식하는 것을 가능하게 한다. 에피토프의 입체구조를 결정하는 방법에는, 예를 들면 X선 결정학, 2차원 핵자기공명 분광학 및 부위 특이적인 스핀 표지 및 전자 상자성 공명 분광학이 포함되는데, 이들에는 한정되지 않는다. 예를 들면 Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology(1996), 제66권, Morris(편)를 참조.

[0358] 에피토프에 결합하는 항원 결합 도메인의 구조는 파라토프라 불린다. 에피토프와 파라토프 사이에 작용하는 수소 결합, 정전기력, 반데르발스의 힘, 소수 결합 등에 의해 에피토프와 파라토프는 안정하게 결합한다. 이 에피토프와 파라토프 사이의 결합력은 어피니티(affinity)로 불린다. 복수의 항원과 복수의 항원 결합 분자가 결합할 때의 결합력의 총합은 어비디티(avidity)로 불린다. 복수의 항원 결합 도메인을 포함하는(즉, 다가의) 항체 등이 복수의 에피토프에 결합할 때에는 결합력(affinity)이 상승적으로 작용하기 때문에 어비디티는 어피니티보다도 높아진다.

[0359] 결합 활성

[0360] 하기에 IL-6R에 대한 항원 결합 도메인을 포함하는 피험 항원 결합 분자에 의한 에피토프로의 결합의 확인방법이 예시되는데, IL-6R 이외의 항원에 대한 항원 결합 도메인을 포함하는 피험 항원 결합 분자에 의한 에피토프로의 결합의 확인방법도 하기의 예시에 준하여 적절히 실시될 수 있다.

[0361] 예를 들면 IL-6R에 대한 항원 결합 도메인을 포함하는 피험 항원 결합 분자가 IL-6R 분자 중에 존재하는 선상 에피토프를 인식하는 것은 예를 들면 다음과 같이 하여 확인할 수 있다. 상기 목적을 위해 IL-6R의 세포외 도메인을 구성하는 아미노산 서열로 이루어지는 선상의 펩티드가 합성된다. 당해 펩티드는 화학적으로 합성될 수 있다. 또는 IL-6R의 cDNA 중의 세포 도메인에 상당하는 아미노산 서열을 코드하는 영역을 이용하여 유전자 공학적 수법에 의해 얻어진다. 다음으로, 세포 도메인을 구성하는 아미노산 서열로 이루어지는 선상 펩티드와 IL-6R에 대한 항원 결합 도메인을 포함하는 피험 항원 결합 분자의 결합 활성이 평가된다. 예를 들면 고정화된 선상 펩티드를 항원으로 하는 ELISA에 의해 당해 펩티드에 대한 당해 항원 결합 분자의 결합 활성이 평가될 수 있다. 또는 IL-6R 발현 세포에 대한 당해 항원 결합 분자의 결합에 있어서의 선상 펩티드에 의한 저해 레벨을 토대로 선상 펩티드에 대한 결합 활성이 명확해질 수 있다. 이들 시험에 의해 선상 펩티드에 대한 당해 항원 결합 분자의 결합 활성이 명확해질 수 있다.

[0362] 또한 IL-6R에 대한 항원 결합 도메인을 포함하는 피험 항원 결합 분자가 입체구조 에피토프를 인식하는 것은 다음과 같이 확인될 수 있다. 상기 목적을 위해 IL-6R을 발현하는 세포가 조제된다. IL-6R에 대한 항원 결합 도메인을 포함하는 피험 항원 결합 분자가 IL-6R 발현 세포에 접촉했을 때에 당해 세포에 강하게 결합하는 한편으로, 당해 항원 결합 분자가 고정화된 IL-6R의 세포외 도메인을 구성하는 아미노산 서열로 이루어지는 선상 펩티드에 대해 실질적으로 결합하지 않을 때 등을 들 수 있다. 여기서 실질적으로 결합하지 않는다는 것은 인간 IL-6R 발현 세포에 대한 결합 활성의 80% 이하, 통상 50% 이하, 바람직하게는 30% 이하, 특히 바람직하게는 15% 이하의 결합 활성을 말한다.

[0363] IL-6R에 대한 항원 결합 도메인을 포함하는 피험 항원 결합 분자의 IL-6R 발현 세포에 대한 결합 활성을 측정하는 방법으로서는, 예를 들면 Antibodies A Laboratory Manual 기재의 방법(Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory(1988) 359-420)을 들 수 있다. 즉 IL-6R 발현 세포를 항원으로 하는 ELISA나 FACS(fluorescence activated cell sorting)의 원리에 의해 평가될 수 있다.

[0364] ELISA 포맷에 있어서 IL-6R에 대한 항원 결합 도메인을 포함하는 피험 항원 결합 분자의 IL-6R 발현 세포에 대한 결합 활성은, 효소반응에 의해 생성되는 시그날 레벨을 비교함으로써 정량적으로 평가된다. 즉, IL-6R 발현 세포를 고정화한 ELISA 플레이트에 피험 폴리펩티드 회합체를 첨가하여, 세포에 결합한 피험 항원 결합 분자가 피험 항원 결합 분자를 인식하는 효소 표지 항체를 이용하여 검출된다. 또는 FACS에 있어서는 피험 항원 결합 분자의 희석계열을 제작하여 IL-6R 발현 세포에 대한 항체 결합 역가(titer)를 결정함으로써, IL-6R 발현 세포에 대한 피험 항원 결합 분자의 결합 활성이 비교될 수 있다.

[0365] 완충액 등에 현탁한 세포 표면 상에 발현되고 있는 항원에 대한 피험 항원 결합 분자의 결합은 플로우 사이토미터에 의해 검출할 수 있다. 플로우 사이토미터로서는 예를 들면 다음과 같은 장치가 알려져 있다.

[0366] FACSCanto™ II

[0367] FACSAria™

[0368] FACSArray™

[0369] FACSVantage™ SE

[0370] FACSCalibur™(모두 BD Biosciences사의 상품명)

[0371] EPICS ALTRA HyPerSort

[0372] Cytomics FC 500

[0373] EPICS XL-MCL ADC EPICS XL ADC

[0374] Cell Lab Quanta/Cell Lab Quanta SC(모두 Beckman Coulter사의 상품명)

[0375] 예를 들면 IL-6R에 대한 항원 결합 도메인을 포함하는 피험 항원 결합 분자의 항원에 대한 결합 활성의 적합한 측정방법의 일례로서 다음의 방법을 들 수 있다. 먼저, IL-6R을 발현하는 세포와 반응시킨 피험 항원 결합 분자

를 인식하는 FITC 표지한 2차 항체로 염색한다. 피험 항원 결합 분자를 적당히 적합한 완충액으로 희석함으로써 당해 항원 결합 분자가 목적하는 농도로 조제하여 사용된다. 예를 들면 10 ㎍/㎖부터 10 ng/㎖까지 사이 중 어느 하나의 농도로 사용될 수 있다. 다음으로, FACSCalibur(BD사)에 의해 형광강도와 세포수가 측정된다. 당해 세포에 대한 항체의 결합량은 CELL QUEST Software(BD사)를 사용하여 해석함으로써 얻어진 형광강도, 즉 Geometric Mean의 값에 반영된다. 즉, 당해 Geometric Mean의 값을 얻음으로써 피험 항원 결합 분자의 결합량으로 표시되는 피험 항원 결합 분자의 결합 활성이 측정될 수 있다.

[0376] IL-6R에 대한 항원 결합 도메인을 포함하는 피험 항원 결합 분자가 어떤 항원 결합 분자와 에피토프를 공유하는 것은 양자의 동일한 에피토프에 대한 경합에 의해 확인될 수 있다. 항원 결합 분자 간의 경합은 교차 블로킹 어세이 등에 의해 검출된다. 예를 들면 경합 ELISA 어세이는 바람직한 교차 블로킹 어세이이다.

[0377] 구체적으로는, 교차 블로킹 어세이에 있어서는 마이크로타이터 플레이트의 웰 상에 코트한 IL-6R 단백질이 후보가 되는 경합 항원 결합 분자의 존재하 또는 비존재하에서 프리인큐베이트된 후에 피험 항원 결합 분자가 첨가된다. 웰 중의 IL-6R 단백질에 결합한 피험 항원 결합 분자의 양은 동일한 에피토프로의 결합에 대해 경합하는 후보가 되는 경합 항원 결합 분자의 결합능에 간접적으로 상관하고 있다. 즉 동일 에피토프에 대한 경합 항원 결합 분자의 친화성이 커지면 커질수록, 피험 항원 결합 분자의 IL-6R 단백질을 코트한 웰에 대한 결합 활성은 저하된다.

[0378] IL-6R 단백질을 매개로 웰에 결합한 피험 항원 결합 분자의 양은 사전에 항원 결합 분자를 표지해 둠으로써 용이하게 측정될 수 있다. 예를 들면 비오틴 표지된 항원 결합 분자는 아비딘페록시다아제 콘쥬게이트와 적절한 기질을 사용함으로써 측정된다. 페록시다아제 등의 효소 표지를 이용한 교차 블로킹 어세이는 특히 경합 ELISA 어세이라 불린다. 항원 결합 분자는 검출 또는 측정이 가능한 다른 표지 물질로 표지될 수 있다. 구체적으로는 방사 표지 또는 형광 표지 등이 공지이다.

[0379] 후보의 경합 항원 결합 분자 회합체의 비존재하에서 실시되는 대조 시험에 있어서 얻어지는 결합 활성과 비교하여, 경합 항원 결합 분자가 IL-6R에 대한 항원 결합 도메인을 포함하는 피험 항원 결합 분자의 결합을 20% 이상, 바람직하게는 20-50% 이상, 더욱 바람직하게는 50% 이상 블록할 수 있다면, 당해 피험 항원 결합 분자는 경합 항원 결합 분자와 실질적으로 동일한 에피토프에 결합하거나 또는 동일한 에피토프로의 결합에 대해 경합하는 항원 결합 분자이다.

[0380] IL-6R에 대한 항원 결합 도메인을 포함하는 피험 항원 결합 분자가 결합하는 에피토프의 구조가 동정되어 있는 경우에는, 피험 항원 결합 분자와 대조 항원 결합 분자가 에피토프를 공유하는 것은 당해 에피토프를 구성하는 펩티드에 아미노산 변이를 도입한 펩티드에 대한 양자의 항원 결합 분자의 결합 활성을 비교함으로써 평가될 수 있다.

[0381] 이러한 결합 활성을 측정하는 방법으로서는 예를 들면 상기의 ELISA 포맷에 있어서 변이를 도입한 선상의 펩티드에 대한 피험 항원 결합 분자 및 대조 항원 결합 분자의 결합 활성을 비교함으로써 측정될 수 있다. ELISA 이외의 방법으로서는, 칼럼에 결합한 당해 변이 펩티드에 대한 결합 활성을 당해 칼럼에 피험 항원 결합 분자와 대조 항원 결합 분자를 유하(流下)시킨 후에 용출액 중에 용출되는 항원 결합 분자를 정량함으로써도 측정될 수 있다. 변이 펩티드를 예를 들면 GST와의 융합 펩티드로서 칼럼에 흡착시키는 방법은 공지이다.

[0382] 동정된 에피토프가 입체 에피토프인 경우에는, 피험 항원 결합 분자와 대조 항원 결합 분자가 에피토프를 공유하는 것은 다음의 방법으로 평가될 수 있다. 먼저, IL-6R을 발현하는 세포와 에피토프에 변이가 도입된 IL-6R을 발현하는 세포가 조제된다. 이들 세포가 PBS 등의 적절한 완충액에 현탁된 세포 현탁액에 대해 피험 항원 결합 분자와 대조 항원 결합 분자가 첨가된다. 이어서, 적당히 완충액으로 세정된 세포 현탁액에 대해 피험 항원 결합 분자와 대조 항원 결합 분자를 인식할 수 있는 FITC 표지된 항체가 첨가된다. 표지 항체에 의해 염색된 세포의 형광강도와 세포수가 FACSCalibur(BD사)에 의해 측정된다. 피험 항원 결합 분자와 대조 항원 결합 분자의 농도는 적합한 완충액에 의해 적당히 희석함으로써 목적하는 농도로 조제하여 사용된다. 예를 들면 10 ㎍/㎖부터 10 ng/㎖까지의 사이 중 어느 하나의 농도로 사용된다. 당해 세포에 대한 표지 항체의 결합량은 CELL QUEST Software(BD사)를 사용하여 해석함으로써 얻어진 형광강도, 즉 Geometric Mean의 값에 반영된다. 즉, 당해 Geometric Mean의 값을 얻음으로써 표지 항체의 결합량으로 표시되는 피험 항원 결합 분자와 대조 항원 결합 분자의 결합 활성을 측정할 수 있다.

[0383] 본 방법에 있어서, 예를 들면 「변이 IL-6R 발현 세포에 실질적으로 결합하지 않는」다는 것은, 아래의 방법에 의해 판단할 수 있다. 먼저 변이 IL-6R을 발현하는 세포에 대해 결합한 피험 항원 결합 분자와 대조 항원 결합

분자가 표지 항체로 염색된다. 이어서 세포의 형광강도가 검출된다. 형광 검출에 플로우 사이토메트리로서 FACSCalibur를 사용한 경우, 얻어진 형광강도는 CELL QUEST Software를 사용하여 해석될 수 있다. 폴리펩티드 회합체 존재하 및 비존재하에서의 Geometric Mean의 값으로부터, 이 비교값(△Geo-Mean)을 하기의 식 1을 토대로 산출함으로써, 항원 결합 분자의 결합에 의한 형광강도의 증가비율을 구할 수 있다.

[0384] (식 1)

[0385] △Geo-Mean=Geo-Mean(폴리펩티드 회합체 존재하)/Geo-Mean(폴리펩티드 회합체 비존재하)

[0386] 해석에 의해 얻어지는 피험 항원 결합 분자의 변이 IL-6R 발현 세포에 대한 결합량이 반영된 Geometric Mean 비교값(변이 IL-6R 분자 △Geo-Mean값)을, 피험 항원 결합 분자의 IL-6R 발현 세포에 대한 결합량이 반영된 △Geo-Mean 비교값과 비교한다. 이 경우에 있어서, 변이 IL-6R 발현 세포 및 IL-6R 발현 세포에 대한 △Geo-Mean 비교값을 구할 때 사용하는 피험 항원 결합 분자의 농도는 서로 동일 또는 실질적으로 동일 농도로 조제되는 것이 특히 바람직하다. 사전에 IL-6R 중의 에피토프를 인식하고 있는 것이 확인된 항원 결합 분자가 대조 항원 결합 분자로서 이용된다.

[0387] 피험 항원 결합 분자의 변이 IL-6R 발현 세포에 대한 △Geo-Mean 비교값이 피험 항원 결합 분자의 IL-6R 발현 세포에 대한 △Geo-Mean 비교값의 80% 이상, 바람직하게는 50%, 더욱 바람직하게는 30%, 특히 바람직하게는 15% 보다 작으면 「변이 IL-6R 발현 세포에 실질적으로 결합하지 않는」 것으로 한다. Geo-Mean값(Geometric Mean)을 구하는 계산식은 CELL QUEST Software User's Guide(BD biosciences사)에 기재되어 있다. 비교값을 비교함으로써 그것이 실질적으로 동일하다고 볼 수 있는 정도라면 피험 항원 결합 분자와 대조 항원 결합 분자의 에피토프는 동일하다고 평가될 수 있다.

[0388] 표적 조직

[0389] 본 명세서 중에서 사용되는 용어 「표적 조직」이란, 본 발명의 항원 결합 분자가 화합물 의존적으로 결합하는 항원이 존재하는 세포를 포함하는 조직으로서, 당해 항원 결합 분자의 당해 세포에 발현하고 있는 막형 분자에 대한 결합 또는 당해 조직에 존재하는 가용형 분자에 대한 결합이 당해 조직을 포함하는 생체에 있어서 양의 약리작용을 초래하는 조직을 말한다. 이 경우에 있어서 「양의 약리작용」이란, 표적 조직을 포함하는 병적 부위가 당해 조직을 포함하는 생체에 대해 초래하는 증상의 경감, 완화, 관해 또는 치유를 초래하는 작용을 말한다. 그러한 약리작용을 초래하는 비한정의 메커니즘의 일태양으로서, 예를 들면 암 등의 악성 종양이 초래하는 증상의 경우에는 암세포에 대한 세포상해 활성, 증식 억제 및 암조직에 있어서의 면역 활성화 등이 예시된다. 이러한 비한정의 메커니즘의 일태양으로서, 예를 들면 염증성 질환의 경우에는 염증 조직에 있어서의 염증성 사이토카인의 작용의 차단 활성이나 면역 억제 등이 예시된다.

[0390] 암조직 특이적 화합물

[0391] 본 명세서 중에서 사용되는 용어 「암조직 특이적인 화합물(암조직 특이적 화합물)」이란, 비 암조직과 비교하여 암조직 중에 차시적으로(differentially) 존재하는 화합물을 말한다. 본 명세서에 있어서 「암」이라는 용어는 일반적으로 악성 신생물을 나타내기 위해 사용되고, 이는 전이성 또는 비전이성이어도 된다. 예를 들면 소화관이나 피부 등의 상피 조직으로부터 발생한 암종의 비한정의 예로서, 뇌종양, 피부암, 경두부암, 식도암, 폐암, 위암, 십이지장암, 유방암, 전립선암, 자궁경부암, 자궁체암, 췌장암, 간장암, 대장암, 결장암, 방광암 및 난소암 등이 예시된다. 또한 근육 등의 비상피성 조직(간질)로부터 발생한 육종의 비한정의 예로서, 골육종, 연골육종, 횡문근육종, 평활근육종, 지방육종 및 혈관육종 등이 예시된다. 또한 조혈기 유래의 혈액암의 비한정의 예로서, 호지킨림프종(Hodgkin's lymphoma) 및 비호지킨림프종(non Hodgkin's lymphoma)을 포함하는 악성 림프종, 급성(acute myelocytic leukemia) 또는 만성 골수성 백혈병(chronic myelocytic leukemia), 및 급성(acute lymphatic leukemia) 또는 만성 림프성 백혈병(chronic lymphatic leukemia)을 포함하는 백혈병, 및 다발성 골수종(multiple myeloma)이 예시된다. 본 명세서에서 널리 사용되는 「신생물」이라는 용어는 새롭게 생성된 어떠한 병적 조직 종양도 의미한다. 본 발명에 있어서는 신생물은 종양의 형성을 발생시키고, 이는 부분적으로 혈관 형성을 특징으로 한다. 신생물은 예를 들면 혈관종, 신경교종, 기형종 등의 양성(良性) 또는 예를 들면 암종, 육종, 교세포종, 성상 교세포종, 신경아세포종, 망막아종 등의 악성일 수 있다.

[0392] 용어 「암조직」이란 하나 이상의 암세포를 포함하는 조직을 의미한다. 따라서 예를 들면 암조직이 암세포와 혈관을 포함하고 있는 바와 같이, 암세포 및 내피세포를 포함하는 종유(腫瘤, tumor mass)의 형성에 기여하는 모든 세포형을 말한다. 본 명세서에 있어서 종유란 종양 조직편(a foci of tumor tissue)을 말한다. 「종양」이라는 용어는 일반적으로 양성 신생물 또는 악성 신생물을 의미하기 위해 사용된다.

[0393] 예를 들면 몇 가지 실시형태에서는 암조직 특이적 화합물은 암조직에 존재하나 비 암조직에는 존재하지 않거나 또는 암조직에는 존재하지 않으나 비 암조직에는 존재하고 있는 등의 정성적(定性的)인 암조직 특이성으로 규정되는 화합물일 수 있다. 다른 실시형태에서는 암조직 특이적 화합물은 비 암조직과 비교하여 상이한 농도(예를 들면 고농도 또는 저농도)로 암조직에 존재하고 있는 등의 정량적인 암조직 특이성으로 규정되는 화합물일 수 있다. 예를 들면 암조직 특이적 화합물은 임의의 농도로 차시적으로 존재한다. 그러나 일반적으로 암조직 특이적 화합물은 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 100%, 적어도 110%, 적어도 120%, 적어도 130%, 적어도 140%, 적어도 150%, 적어도 2배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 10^3배, 적어도 10^4배, 적어도 10^5배, 적어도 10^6배 또는 그 이상으로서, 무한대(즉, 비 암조직에 존재하지 않는 경우)까지의 증가하는 농도로 존재하는 것이 가능하며, 또는 일반적으로 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 100%(즉, 존재하지 않음을 나타낸다)까지 감소하는 농도로 존재하는 것이 가능하다. 암조직 특이적 화합물은 통계적으로 유의한 농도(즉, 웰치의 t검정 또는 윌콕슨의 순위합 검정 중 어느 하나를 사용하여 결정되는 바와 같이, p값은 0.05 미만 및/또는 q값은 0.10 미만)로, 바람직하게는 차시적으로 존재한다. 암조직 특이적 화합물의 비한정의 일태양으로서는 아래와 같은 암조직에 포함되는 암세포, 면역세포, 스트로마 세포에 특유의 대사 활성에 의해 생산된 암조직 특이적인 대사산물(암조직 특이적 대사산물 ; 암세포 특이적 대사산물, 암조직에 침윤되어 있는 면역세포 특이적인 대사산물, 암 스트로마 세포 특이적 대사산물)인 화합물이 예시될 수 있다.

[0394] 암조직 특이적 대사산물

[0395] 용어 「대사」는 생물의 조직내에서 발생하는 화학변화를 말하고, 「동화(同化)」 및 「이화(異化)」가 포함된다. 동화란 분자의 생합성 또는 축적을 말하고, 이화는 분자의 분해를 말한다. 「대사산물」은 물질대사에 기인하는 중간체 또는 생성물이다. 「1차 대사산물」이란 세포 또는 생물의 성장 또는 번식 과정에 직접 관여하는 대사산물을 가리키고, 「2차 대사산물」이란 그들의 성장 또는 번식 과정에는 직접 관여하지 않고, 세포 또는 생물에 공통인 생명현상에 직접 관여하지 않는 물질을 생합성하는 대사의 결과 생성되는 항생물질이나 색소 등의 생산물을 말한다. 대사산물은 「생체 고분자」의 대사산물일 수도 있고, 「저분자」의 대사산물일 수도 있다. 「생체 고분자」란 1종류 이상의 반복 단위로 이루어지는 고분자이다. 생체 고분자는 일반적으로 생물계에서 발견되며, 생물을 조직하는 세포 및 그것에 부착되는 세포 간 매트릭스, 조직 간 매트릭스 등의 구조물을 형성하는 분자량이 대략 5,000 이상인 분자, 특히 다당류(탄수화물 등) 및 펩티드(이 용어는 폴리펩티드 및 단백질을 포함하도록 하여 사용된다) 및 폴리뉴클레오티드, 마찬가지로 그들의 유사체, 예를 들면 아미노산 유사체 또는 비아미노산기로 구성 또는 포함하는 그들의 화합물을 들 수 있다. 「저분자」는 생체에 존재하는 「생체 고분자」 이외의 천연의 화학물질을 말한다. 본 명세서에 기재되는 비한정의 일태양인 암조직 특이적 대사산물로서, 암세포 특이적인 저분자 대사산물을 적합하게 들 수 있다(Eva Gottfried, Katrin Peter and Marina P. Kreutz, From Molecular to Modular Tumor Therapy (2010) 3 (2), 111-132). 더 나아가서는 암조직에 침윤되는 면역세포가 높게 생산되는 대사산물이나 암세포의 생존 및/또는 성장을 서포트하는 스트로마 세포(암 스트로마 세포 또는 암 간질 섬유아세포(CAF))가 높게 생산되는 대사산물도 포함된다. 침윤되는 면역세포로서는 수상세포, 억제성 수상세포, 억제성 T세포, 피폐 T세포(exhausted T cell), 골수계 유래 억제세포(myeloma derived suppressor cell, MDSC) 등이 예시된다. 또한 본 발명에 있어서의 대사산물에는 암조직에 존재하는 세포(암세포, 면역세포, 스트로마 세포)가, 아포토시스나 네크로시스 등에 의해 세포사되었을 때에 세포내로부터 세포외로 방출되는 화합물도 포함된다.

[0396] 암세포 특이적 대사산물을 동정하기 위해 트랜스크립톰(transcriptome)·레벨에서의 해석(예를 들면 Dhanasekaran 등(Nature (2001) 412, 822-826), Lapointe 등(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2004) 101, 811-816 또는 Perou 등(Nature (2000) 406, 747-752 등이 예시된다) 또는 프로테옴(proteome)·레벨에서의 해석(예를 들면 Ahram 등(Mol. Carcinog. (2002) 33, 9-15, Hood 등(Mol. Cell. Proteomics (2005) 4, 1741-1753) 외에, 대사학적 프로파일링을 중심으로 하는 대사학(metabolomics) 해석이 적절히 사용된다. 즉, 피험 시료 중의 대사산물을 동정하기 위해 고압 액체크로마토그래피(HPLC), 핵 자기 공명(NMR)(Brindle 등(J. Mol. Recognit. (1997) 10, 182-187), 질량분석법(Gates 및 Sweeley(Clin. Chem. (1978) 24, 1663-1673)(GC/MS 및 LC/MS)) 및 ELISA 등을 단독으로 및/또는 조합해서 사용하는 대사학적 프로파일링이 적절히 사용될 수 있다.

[0397] 이들 연구에 의해 암세포가 낮은 산소압 조건하에서 성육하는 것을 가능하게 하는 대사산물(예를 들면 포도당 또는 산소) 및 생장인자의 농도 구배를 변경함으로써 구성된 종양 내의 이질성이 명확해졌다(Dang 및 Semenza(Trends Biochem. Sci. (1999) 24, 68-72)). 이들 연구에 있어서는 종양의 악성도가 상이한 정도에 따른 에너지 이용 경로의 변화를 이해하기 위해 세포주 모델도 사용되고 있다(Vizan 등(Cancer Res. (2005) 65, 5512-5515). 대사학 플랫폼의 기술적 구성요소의 비한정의 일태양으로서 Lawton 등(Pharmacogenomics (2008) 9, 383)에 기재된 시료 추출, 분리, 검출, 분광분석, 데이터 정규화, 클래스 특이적 대사산물의 묘사, 경로 맵핑, 확인 및 후보 대사산물의 기능적 특징 부여가 예시된다. 이들 방법에 의해 목적하는 암조직에 있어서의 암세포 특이적 대사산물을 동정하는 것이 가능하다.

[0398] 본 발명에서 사용되는 암조직 특이적 화합물 또는 암조직 특이적 대사산물의 비한정의 일태양으로서 아래의 화합물로부터 선택되는 하나 이상의 화합물을 적합하게 들 수 있다. 하나 이상의 화합물이란 후술하는 동일 항원 결합 도메인에 의한 항원에 대한 결합 활성이 일종의 암조직 특이적 화합물 또는 암조직 특이적 대사산물에 의존적일 뿐 아니라, 복수의 종류의 암조직 특이적 화합물 또는 암조직 특이적 대사산물에 의존적인 경우를 포함하는 것을 의미한다.

[0399] (1) 락트산, 숙신산, 구연산 등의 해당계(glycolytic system) 또는 크레브스 회로(Krebs cycle)의 1차 대사산물

[0400] 본 발명에서 사용되는 암조직 특이적 화합물, 특히 암세포 특이적 대사산물의 비한정의 일태양으로서 락트산, 숙신산, 구연산 등의 주위에 존재하는 비 암부 조직보다도 암조직에 있어서 고농도로 존재하는 글루코오스 대사의 결과 생성되는 1차 대사산물을 적합하게 들 수 있다. 피루빈산키나아제, 헥소키나아제 및 락트산 탈수소효소(LDH) 등의 해당계(Embden-Myerhof 경로) 효소의 상방 조절(업레귤레이션)로서 특징 지어지는 해당계 표현형은 Warburg 효과로서 고형 종양의 특징인 것이 종래부터 알려져 있다.

[0401] 즉, 종양세포의 경우는 M1 아이소형이 아니라 혐기 조건하에서의 해당(erobic glycolysis)에 필요한 M2 아이소형의 피루빈산키나아제가 고발현하고 있는 것으로부터, 생체내에 있어서의 종양세포의 생육에 유리하게 작용하고 있는 것으로 생각되고 있다(Christofk 등(Nature (2008) 452, 230-233). 피루빈산키나아제에 의해 생성된 피루빈산은 혐기 조건하에 있어서의 락트산 탈수소효소(LDH)에 의한 평형반응의 결과 생성되는 락트산에 의해 피드백 저해를 받는다. 당해 피드백 저해에 의해 미토콘드리아에 있어서의 호흡(크레브스 회로)의 촉진 및 세포증식 억제가 생기기 때문에, LDH, 헥소키나아제 및 글루코오스트랜스포터(GLUT)의 상방 조절이 종양세포의 증식에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다(Fantin 등(Cancer Cell (2006) 9, 425-434)). 글루코오스는 해당계에서 대사되고, 그 최종 대사산물인 락트산이 종양의 주위에 프로톤과 함께 공수송되는 결과, 종양 주위 조직의 pH는 산성 조건으로 변화하는 것으로 알려져 있다. 해당계의 최종 산물인 락트산, 미토콘드리아에 있어서의 호흡의 촉진에 의해 생성되는 숙신산 및 구연산이 암조직에 있어서 축적되고 있는 것이 알려져 있다(Teresa 등(Mol. Cancer (2009) 8, 41-59)). 본 발명에서 사용되는 암조직 특이적 화합물, 특히 암세포 특이적 대사산물의 비한정의 일태양으로서 이러한 해당계의 대사에 의해 생성되는 1차 대사산물인 락트산, 숙신산, 구연산 등을 적합하게 들 수 있다. 또한 세포사에 의해 세포내에 고농도로 존재하는 숙신산이 세포외로 누출되는 것이 알려져 있다(Nature Immunology, (2008) 9, 1261-1269). 이 때문에 세포사가 빈번하게 일어나고 있는 암조직에 있어서 숙신산의 농도가 상승하고 있는 것으로 생각된다.

[0402] (2) 알라닌, 글루타민산, 아스파라긴산 등의 아미노산

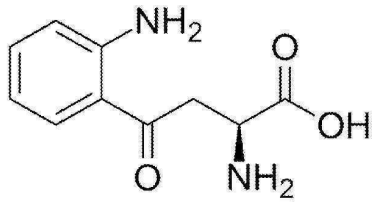
[0403] 전술된 글루코오스 대사 이외에도 혐기 조건하에 있어서의 생체 고분자의 생합성에 필요한 필수 아미노산 및 비필수 아미노산의 연속 공급이 필요한 종양세포의 경우는 아미노산 대사도 변화되고 있는 것이 알려져 있다. 글루타민은 그 측쇄에 2개의 질소를 포함하는 질소 운반체로서 작용하는, 생체에 있어서 가장 광범위하게 분포하는 아미노산이다. 글루타민의 세포내로의 흡수속도가 상승하고 있는 종양세포는 글루타민 트랩(glutamine trap)으로서 기능하고 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 글루타민의 흡수와 글루타민산 및 락트산으로 변환되는 활성의 상승은 「글루타민 분해(glutaminolysis)」로 불리며, 형질전환된 (종양)세포의 특징으로 생각되고 있다(Mazurek 및 Eigenbrodt(Anticancer Res. (2003) 23, 1149-1154, 및 Mazurek 등(J. Cell. Physiol. (1999) 181, 136-146)). 그 결과, 암환자는 혈장 중의 글루타민 레벨이 감소되는 한편으로 글루타민산 농도의 증대를 나타낸다(Droge 등(Immunobiology (1987) 174, 473-479). 그리고 폐암조직의 ^{13}C 방사 표지된 글루코오스의 대사 연구에 의해 ^{13}C 표지 숙신산, ^{13}C 표지 알라닌, ^{13}C 표지 글루타민산, 및 ^{13}C 표지 구연산의 농도 간에서 상관이 관찰되었다. 본 발명에서 사용되는 암조직 특이적 화합물의 비한정의 일태양으로서 이러한 굴루타민 분해 등

에 의해 암조직에 있어서 고농도로 축적되는 알라닌, 글루타민산, 아스파라긴산 등을 적합하게 들 수 있다.

[0404] (3) 키누레닌(kynurenine) 등의 아미노산의 대사산물

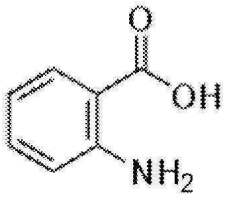
[0405] 인돌아민 2,3-디옥시게나아제(IDO)는 멜라노머, 결장암 및 신장암 등의 많은 암에서 고발현되고 있는 트립토판 대사효소로(Uyttenhove 등(Nat. Med. (2003) 9, 1269-127), 2개의 아이소폼이 존재하는 것이 알려져 있다(Lob 등(Cancer Immunol. Immunother. (2009) 58, 153-157)). IDO는 트립토판의 키누레닌(화학식 1로 표시된다)으로의 변환을 촉매하여 니코틴아미드 뉴클레오티드(NAD)의 신생경로의 최초의 효소이다. 또한 IDO를 발현하지 않는 글리오머의 경우는 간장의 트립토판 2,3-디옥시게나아제(TDO)에 의해 트립토판으로부터 키누레닌이 생성된다(Opitz 등(Nature (2011) 478, 7368, 197-203)). 또한 IDO는 암조직에 침윤되어 있는 수상세포에도 발현되고 있어, 수상세포도 키누레닌을 생산한다(J. Immunol. (2008) 181, 5396-5404). 또한 IDO는 암조직의 골수계 유래 억제 세포(MDSC)에도 발현되고 있어, MDSC도 키누레닌을 생산한다(Yu 등(J. Immunol. (2013) 190, 3783-3797)).

화학식 1

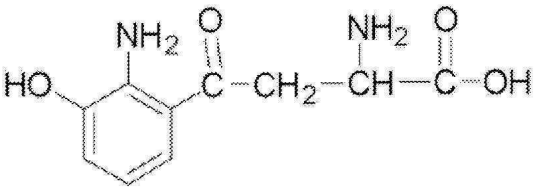
[0406] 

[0407] 키누레닌은 동종 T세포 응답을 억제하는 것이 알려져 있어(Frumento 등(J. Exp. Med. (2002) 196, 459-468), 이러한 억제를 통해 종양세포가 항종양 면역응답을 빠져나오는 동시에, 글리오마에 발현하는 알릴 탄화수소 수용체의 내인성 리간드로서 키누레닌이 작용하는 오토크라인 증식 메커니즘을 통해 글리오마 세포의 증식이 촉진되는 메커니즘이 제창되어 있다(Opitz 등(위에 게재)). 키누레닌은 키누레니다아제에 의해 안트라닐산(화학식 2로 표시된다)으로, 키누레닌 3-히드록시라아제에 의해 3-히드록시키누레닌(화학식 3으로 표시된다)으로 변환된다. 안트라닐산 및 3-히드록시키누레닌은 모두 NAD의 전구체가 되는 3-히드록시안트라닐산으로 변환된다.

화학식 2

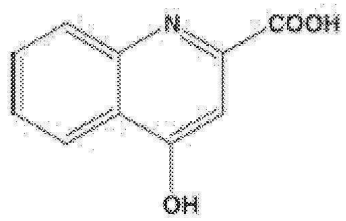
[0408] 

화학식 3

[0409] 

[0410] 키누레닌은 키누레닌아미노트랜스페라아제에 의해 키누렌산(화학식 4로 표시된다)으로 변환된다. 본 발명에서 사용되는 암조직 특이적 화합물, 특히 암세포 특이적 대사산물의 비한정의 일태양으로서, 이러한 키누레닌 및 그의 대사산물인 안트라닐산, 3-히드록시키누레닌 및 키누렌산 등의 아미노산의 대사산물을 적합하게 들 수 있다.

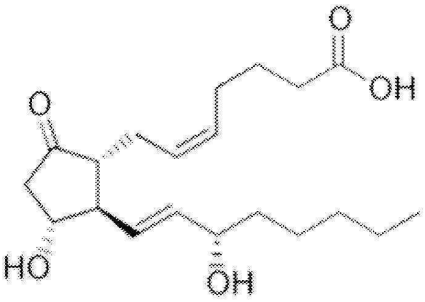
화학식 4

[0411] 

[0412] (4) 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2) 등의 아라키돈산의 대사산물

[0413] 프로스타글란딘 E2(PGE2)(화학식 5)는 시클로옥시게나아제(COX)-1/2에 의해 합성되는 프로스타글란딘 및 트롬복산을 포함하는 프로스타노이드(prostanoid)라 불리는 아라키돈산의 대사물이다(Warner 및 Mitchell(FASEB J. (2004) 18, 790-804)). PGE2 결장암 세포의 증식을 촉진하여 그의 아포토시스를 억제한다(Sheng 등(Cancer Res. (1998) 58, 362-366)). 많은 암세포에서는 시클로옥시게나아제의 발현이 변화되어 있는 것이 알려져 있다. 즉, COX-1은 거의 모든 조직에 있어서 구성적으로 발현되고 있는 것에 대해 COX-2는 종양에 있어서 어떤 종의 염증성 사이토카인 및 암 유전자에 의해 유도되는 것이 주로 발견되고 있다(Warner 및 Mitchell(앞에 게재)). COX-2의 과잉 발현은 유방암의 예후의 나쁨(Denkert 등(Clin. Breast Cancer (2004) 4, 428-433) 및 난소암의 급속한 질환의 진행(Denker 등(Mod. Pathol. (2006) 19, 1261-1269)과 관련성이 있는 것도 보고되어 있다. 또한 암조직에 침윤되어 있는 억제성 T세포도 프로스타글란딘 E2를 생산하고 있다(Curr. Med. Chem. (2011) 18, 5217-5223). 아라키돈산의 대사물인 프로스타글란딘, 류코트리엔 등의 저분자가 암의 오토크라인 및/또는 파라크라인 증식을 제어하는 자극 인자로서 작용하고 있는 것이 알려져 있다(Nat. Rev. Cancer (2012) 12 (11) 782-792). 본 발명에서 사용되는 암조직 특이적 화합물, 특히 암세포 특이적 대사산물이나 암조직에 침윤되어 있는 면역세포 특이적 대사물의 비한정의 일태양으로서, 이러한 프로스타글란딘 E2 등의 아라키돈산의 대사산물을 적합하게 들 수 있다. 프로스타글란딘 E2 이외에도 트롬복산 A2(TXA2)가 대장암 등의 암조직에서 생산이 항진되어 있어(J. Lab. Clin. Med. (1993) 122, 518-523), 본 발명의 아라키돈산의 대사산물의 비한정의 일태양으로서 적합하게 들 수 있다.

화학식 5

[0414] 

[0415] (5) 아데노신, 아데노신 3인산(ATP), 아데노신 2인산(ADP), 아데노신 1인산(AMP) 등의 푸린 고리 구조를 갖는 뉴클레오시드

[0416] 암세포가 세포사되면 세포내의 대량의 ATP가 세포외로 누출되는 것이 알려져 있다. 이 때문에 암조직에 있어서의 ATP 농도는 정상 조직과 비교하여 현저히 높다(PLoS One. (2008) 3, e2599). 복수의 형의 세포가 ATP, ADP 및 AMP의 형의 아데닌 뉴클레오티드를 유리(遊離)한다. 세포외-5'-뉴클레오티다아제(eco-5'-nucleotidase)(CD73)와 같은 세포 표면의 세포외 효소에 의해 대사된다(Resta 및 Thompson(Immunol. Rev. (1998) 161, 95-109) 및 Sadej 등(Melanoma Res. (2006) 16, 213-222). 아데노신은 저농도로 세포외 환경에 구성적으로 존재하는 푸린 뉴클레오시드인데, 고형암에서 발견되는 저산소 조직에서는 세포외 아데노신 농도의 현저한 증가가 보고되어 있다(Blay 및 Hoskin(Cancer Res. (1997) 57, 2602-2605). CD73는 종양 및 면역세포의 표면에 발현되고 있어(Kobie 등(J. Immunol. (2006) 177, 6780-6786), 유방암(Canbolat 등(Breast Cancer Res.

Treat. (1996) 37, 189-193), 위암(Durak 등(Cancer Lett. (1994) 84, 199-202), 췌장암(Flocke 및 Mannherz(Biochim. Biophys. Acta (1991) 1076, 273-281) 및 신경교아종(glioblastoma)(Bardot 등(Br. J. Cancer (1994) 70, 212-218))에 있어서 활성의 상승이 발견되고 있다. 암조직에 있어서의 아데노신의 축적은 세포질의 5'-뉴클레오티다아제에 의한 AMP의 탈인산에 의해 세포내 아데노신 생성이 증가하는 것에 기인하고 있을 가능성이 제창되고 있다(Headrick 및 Willis(Biochem. J. (1989) 261, 541-550). 또한 암조직에 침윤되어 있는 억제성 T세포 등도 ATP 분해효소를 발현하고 있어, 아데노신을 생산하고 있다(Proc. Natl. Acad. Sci. (2006) 103 (35), 13132-13137, Curr. Med. Chem. (2011) 18, 5217-5223). 생산된 아데노신은 A2A 수용체 등의 아데노신 수용체를 매개로 암조직을 면역 억제적인 환경으로 하고 있는 것으로 생각되고 있다(Curr. Med. Chem. (2011),18,5217-23). 본 발명에서 사용되는 암조직 특이적 화합물의 비한정의 일태양으로서, 이러한 ATP 등의 푸린 뉴클레오티드의 대사에 의해 암조직에 있어서 고농도로 축적되는 ATP, ADP, AMP 또는 아데노신 등을 적합하게 들 수 있다. 또한 아데노신은 adenosine deaminase에 의해 이노신으로 분해되기 때문에 이노신이 고농도로 축적된다.

[0417] (6) 요산

[0418] 요산은 생체내에 있어서의 푸린 뉴클레오시드의 대사경로의 산물로, 혈액 또는 간질강 등의 세포외로 유리된다. 또한 최근 들어서는 암조직 등의 병변 부위에 존재하는 사세포로부터 유리되는 것이 명확해져 있다(Nat. Med. (2007) 13, 851-856). 본 발명에서 사용되는 암조직 특이적 화합물의 비한정의 일태양으로서, 이러한 ATP 등의 푸린 뉴클레오티드의 대사에 의해 암조직에 있어서 고농도로 축적되는 요산도 적합하게 들 수 있다.

[0419] (7) 1-메틸 니코틴아미드

[0420] 복수의 인간 암조직에 있어서 효소 니코틴아미드 N-메틸트랜스페라아제가 고발현되고 있는 것이 알려져 있다. 본 효소가 니코틴아미드로부터 안정적인 대사물인 1-메틸니코틴아미드를 생산할 때, 메틸 공여체가 되는 S-아데노실메티오닌(SAM)의 메틸기를 소비하기 위해, 암세포에 있어서의 SAM 농도의 감소에 수반된 DNA의 메틸화능을 손상시키는 메커니즘을 통해 니코틴아미드 N-메틸트랜스페라아제의 고발현이 종양화(tumorigenesis)에 기여하고 있는 것이 제창되고 있다(Ulanovskaya 등(Nat. Chem. Biol. (2013) 9 (5) 300-306)). 본 효소의 안정적인 대사산물인 1-메틸 니코틴아미드는 암세포의 세포외로 분비되는 것이 알려져 있어(Yamada 등(J. Nutr. Sci. Vitaminol. (2010) 56, 83-86)), 본 발명에서 사용되는 암조직 특이적 화합물의 비한정의 일태양으로서, 이러한 니코틴아미드의 대사에 의해 암조직에 있어서 고농도로 축적되는 1-메틸 니코틴아미드 등도 적합하게 들 수 있다.

[0421] 염증 조직 특이적 화합물

[0422] 본 명세서 중에서 사용되는 용어 「염증 조직 특이적인 화합물(염증 조직 특이적 화합물)」이란 비염증 조직과 비교하여 염증 조직 중에 차시적으로 존재하는 화합물을 말한다. 본 명세서에 있어서 「염증 조직」이란,

[0423] 류머티스성 관절염이나 변형성 관절증에 있어서의 관절

[0424] 기관지천식이나 COPD에 있어서의 폐(폐포)

[0425] 염증성 장질환이나 클론병이나 궤양성 대장염에 있어서의 소화기관

[0426] 간장, 신장, 폐에 있어서의 섬유화증에 있어서의 섬유화 조직

[0427] 장기 이식에 있어서의 거부반응이 일어난 조직

[0428] 동맥경화나 심부전에 있어서의 혈관, 심장(심근)

[0429] 대사증후군에 있어서의 내장지방

[0430] 아토피성 피부염, 기타 피부염에에 있어서의 피부 조직

[0431] 추간판 탈출증이나 만성 요통에 있어서의 척추신경

[0432] 등이 적합하게 예시된다.

[0433] 염증 조직 특이적 대사산물

[0434] 염증 조직 특이적 대사산물이란 염증성 조직에 침윤되어 있는 면역세포가 높게 생산되는 대사산물 및 염증 조직에 있어서 상해를 받고 있는 정상세포가 특이적으로 높게 생산되는 대사산물이다. 침윤되는 면역세포로서는 이

펙터 T세포, 성숙 수상세포, 호중구, 과립세포(비만세포), 호염기구 등이 예시된다. 또한 본 발명에 있어서의 대사산물에는 염증 조직에 존재하는 세포(면역세포, 정상세포)가 아포토시스나 네크로시스 등에 의해 세포사했을 때, 세포내로부터 세포외로 방출되는 화합물도 포함된다.

[0435] 본 발명에서 사용되는 염증 조직 특이적 화합물 또는 염증 조직 특이적 대사산물의 비한정의 일태양으로서 아래의 화합물로부터 선택되는 하나 이상의 화합물을 적합하게 들 수 있다. 하나 이상의 화합물이란 후술하는 동일 항원 결합 도메인에 의한 항원에 대한 결합 활성이 1종의 염증 조직 특이적 화합물 또는 염증 조직 특이적 대사산물에 의존적일 뿐 아니라, 복수 종류의 염증 조직 특이적 화합물 또는 염증 조직 특이적 대사산물에 의존적인 경우를 포함하는 것을 의미한다.

[0436] (1) 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2) 등의 아라키돈산의 대사산물

[0437] 류머티스성 관절염이나 변형성 관절증에 있어서 PGE2 농도가 높은 것이 알려져 있다(Eur. J. Clin. Pharmacol. (1994) 46, 3-7., Clin. Exp. Rheumatol. (1999) 17, 151-160, Am. J. Vet. Res. (2004) 65, 1269-1275.). 본 발명에서 사용되는 염증 조직 특이적 화합물, 특히 염증세포 특이적 대사산물이나 염증 조직에 침윤되는 면역세포 특이적 대사물의 비한정의 일태양으로서, 이러한 프로스타글란딘 E2 등의 아라키돈산의 대사산물을 적합하게 들 수 있다.

[0438] (2) 아데노신, 아데노신 3인산(ATP), 아데노신 2인산(ADP), 아데노신 1인산(AMP) 등의 푸린 고리 구조를 갖는 뉴클레오시드

[0439] 기관지천식에 기인하는 염증이 일어난 폐포에 있어서 ATP 농도가 높은 것이 알려져 있다(Nat. Med. (2007) 13, 913-919). 또한 COPD에 기인하는 염증이 일어난 폐포에 있어서 ATP 농도가 높은 것도 또한 알려져 있다(Am. J. Respir. Crit. Care Med. (2010) 181, 928-934). 또한 류머티스성 관절염 환자의 관절액 중에서 아데노신 농도가 높은 것이 관찰되고 있다(Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (2004) 36 877-882). 또한 GVHD에 의해 거부반응이 일어난 조직에 있어서 ATP 농도가 높은 것이 알려져 있다(Nat. Med. (2010) 16, 1434-1438). 또한 폐, 간장, 신장에 있어서의 섬유화 조직에 있어서 아데노신 농도가 항진되어 있는 것도 알려져 있다(FASEB J. (2008) 22, 2263-2272, J. Immunol. (2006) 176, 4449-4458, J. Am. Soc. Nephrol. (2011) 22 (5), 890-901, PLoS ONE J. (2010) 5 (2), e9242). 또한 폐 섬유증 환자의 섬유화 조직에 있어서 ATP 농도가 상승되어 있는 것이 관찰되어 있다(Am. J. Respir. Crit. Care Med. (2010) 182, 774-783). 본 발명에서 사용되는 염증성 조직 특이적 화합물의 비한정의 일태양으로서, 이러한 ATP 등의 푸린 뉴클레오티드의 대사에 의해 염증 조직에 있어서 고농도로 축적되는 ATP, ADP, AMP 또는 아데노신 등을 적합하게 들 수 있다. 또한 아데노신은 adenosine deaminase에 의해 이노신으로 분해되기 때문에 이노신이 고농도로 축적된다.

[0440] (3) 요산

[0441] 요산은 생체내에 있어서의 푸린 뉴클레오시드의 대사경로의 산물로, 혈액 또는 간질강 등의 세포외로 유리된다. 또한 최근 들어서는 괴사(necrosis)를 진행시키는 세포로부터 유리되는 요산이 염증성 응답을 촉진시키는 것이 명확해져 있다(J. Clin. Invest. (2010) 120 (6), 1939-1949). 본 발명에서 사용되는 염증 조직 특이적 화합물의 비한정의 일태양으로서, 이러한 ATP 등의 푸린 뉴클레오티드의 대사에 의해 염증성 조직에 있어서 고농도로 축적되는 요산도 적합하게 들 수 있다.

[0442] 항원 결합 도메인

[0443] 본 명세서에 있어서 「항원 결합 도메인」은 목적으로 하는 항원에 결합하는 한 어떠한 구조의 도메인도 사용될 수 있다. 그러한 도메인의 예로서, 예를 들면 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변영역, 생체내에 존재하는 세포막 단백인 Avimer에 포함되는 35 아미노산 정도의 A 도메인으로 불리는 모듈(국제공개 WO2004/044011, WO2005/040229), 세포막에 발현하는 당단백질인 fibronectin 중의 단백질에 결합하는 도메인인 10Fn3 도메인을 포함하는 Adnectin(국제공개 WO2002/032925), ProteinA의 58 아미노산으로 이루어지는 3개의 헬릭스의 다발(bundle)을 구성하는 IgG 결합 도메인을 scaffold로 하는 Affibody(국제공개 WO1995/001937), 33 아미노산 잔기를 포함하는 턴과 2개의 역병행 헬릭스 및 루프의 서브유닛이 반복해서 겹쳐 쌓아진 구조를 갖는 안키린 반복(ankyrin repeat : AR)의 분자 표면에 노출되는 영역인 DARPins(Designed Ankyrin Repeat proteins)(국제공개 WO2002/020565), 호중구 겔라티나아제 결합 리포칼린(neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL)) 등의 리포칼린 분자에 있어서 고도로 보존된 8개의 역병행 스트랜드가 중앙방향으로 비틀어진 배럴 구조의 편측을 지지하는 4개의 루프영역인 Anticalin 등(국제공개 WO2003/029462), 칠성장어, 먹장어 등 무악류의 획득 면역 시스템으로서 이뮤노 글로불린의 구조를 갖지 않는 가변성 림프구 수용체(variable lymphocyte receptor(VLR))

의 류신 잔기가 풍부한 리피트(leucine-rich-repeat(LRR)) 모듈이 반복해서 겹쳐 쌓아진 편자모양의 구조 내부의 병행형 시트 구조의 움푹 들어간 영역(국제공개 WO2008/016854)을 바람직하게 들 수 있다. 본 발명의 항원 결합 도메인의 적합한 예로서, 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변영역을 포함하는 항원 결합 도메인을 들 수 있다. 이러한 항원 결합 도메인의 예로서는, 「scFv(single chain Fv)」, 「단일 사슬 항체(single chain antibody)」, 「Fv」, 「scFv2(single chain Fv2)」, 「Fab」 또는 「F(ab')2」 등을 적합하게 들 수 있다.

[0444] 본 발명의 항원 결합 분자에 있어서의 항원 결합 도메인은, 동일 에피토프에 결합할 수 있다. 여기서 동일 에피토프는, 예를 들면 서열번호 : 1에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 단백질 중에 존재할 수 있다. 또는 본 발명의 항원 결합 분자에 있어서의 항원 결합 도메인은 서로 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 여기서 상이한 에피토프는, 예를 들면 서열번호 : 1에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는 단백질 중에 존재할 수 있다.

[0445] 특이적

[0446] 특이적이란 특이적으로 결합하는 분자의 한쪽 분자가 그 하나 또는 복수의 결합하는 상대방 분자 이외의 분자에 대해서는 실질적으로 결합하지 않는 상태를 말한다. 또한 항원 결합 도메인이 어떤 항원 중에 포함되는 복수의 에피토프 중 특정 에피토프에 대해 특이적인 경우에도 사용된다. 또한 항원 결합 도메인이 결합하는 에피토프가 복수의 상이한 항원에 포함되는 경우에는, 당해 항원 결합 도메인을 갖는 항원 결합 분자는 당해 에피토프를 포함하는 다양한 항원과 결합할 수 있다. 여기서 실질적으로 결합하지 않는다는 것은 상기 결합 활성의 항목에서 기재한 방법에 준하여 결정되며, 상기 상대방 이외의 분자에 대한 특이적 결합 분자의 결합 활성이 상기 상대방 분자에 대한 결합 활성의 80% 이하, 통상 50% 이하, 바람직하게는 30% 이하, 특히 바람직하게는 15% 이하의 결합 활성을 나타내는 것을 말한다.

[0447] 세포상해 활성

[0448] 본 발명의 비한정의 일태양에서는 암조직 특이적 화합물의 농도에 따라 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 도메인을 포함하고, 막형 분자를 그 세포막에 발현하는 세포에 대한 세포상해 활성을 갖는 항원 결합 분자, 및 당해 항원 결합 분자를 유효 성분으로서 포함하는 의약 조성물이 제공된다. 본 발명에 있어서 세포상해 활성이란, 예를 들면 항체 의존성 세포 개재성 세포상해(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity : ADCC) 활성, 보체 의존성 세포상해(complement-dependent cytotoxicity : CDC) 활성 및 T세포에 의한 세포상해 활성 등을 들 수 있다. 본 발명에 있어서 CDC 활성이란 보체계에 의한 세포상해 활성을 의미한다. 한편 ADCC 활성이란 표적 세포의 세포막에 발현된 막형 분자에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 분자의 Fc 영역에 면역세포 등이 당해 면역세포에 발현된 Fcγ 수용체를 매개로 결합하고, 당해 면역세포가 표적 세포에 상해를 주는 활성을 의미한다. 목적의 항원 결합 분자가 ADCC 활성을 갖는지 여부 또는 CDC 활성을 갖는지 여부는 공지의 방법으로 측정될 수 있다(예를 들면 Current protocols in Immunology, Chapter7. Immunologic studies in humans, Coligan 등 편저(1993) 등).

[0449] 구체적으로는, 먼저 이펙터 세포, 보체 용액, 표적 세포의 조제가 실시된다.

[0450] (1) 이펙터 세포의 조제

[0451] CBA/N 마우스 등으로부터 적출된 비장으로부터 RPMI1640배지(Invitrogen) 중에서 비장세포가 분리된다. 10% 소태아 혈청(FBS, HyClone)을 포함하는 동 배지에서 세정된 당해 비장세포의 농도를 5×10^{6}/mL로 조제함으로써 이펙터 세포가 조제될 수 있다.

[0452] (2) 보체 용액의 조제

[0453] 10% FBS 함유 배지(Invitrogen)에 의해 Baby Rabbit Complement(CEDARLANE)를 10배로 희석함으로써 보체 용액이 조제될 수 있다.

[0454] (3) 표적 세포의 조제

[0455] 항원을 발현하는 세포를 0.2 mCi의 ^{51}Cr-크롬산나트륨(GE 헬스케어 바이오사이언스)과 함께 10% FBS 함유 DMEM 배지 중에서 37℃로 1시간 배양함으로써 그 표적 세포가 방사성 표지될 수 있다. 방사성 표지 후, 10% FBS 함유 RPMI1640 배지에서 3회 세정된 세포의 농도를 2×10^{5}/mL로 조제함으로써 당해 표적 세포가 조제될 수 있다.

[0456] ADCC 활성 또는 CDC 활성은 하기에 기술하는 방법으로 측정될 수 있다. ADCC 활성 측정의 경우는 96웰 U바닥 플레이트(Becton Dickinson)에 첨가된 각 50 μl씩의 표적 세포와 항원 결합 분자가 실온에서 15분간 반응된다. 그

후, 이펙터 세포 100 ㎕가 첨가된 당해 플레이트가 탄산가스 인큐베이터 내에서 4시간 정치된다. 항원 결합 분자의 최종농도는 예를 들면 0 또는 10 ㎍/㎖ 등의 농도가 설정될 수 있다. 정치 후, 각 웰로부터 회수된 100 ㎕의 상청의 방사 활성이 감마 카운터(COBRAII AUTO-GAMMA, MODEL D5005, Packard Instrument Company)를 사용해서 측정된다. 측정값을 사용하여 세포상해 활성(%)이 (A-C)/(B-C)×100의 계산식에 기초하여 계산될 수 있다. A는 각 시료에 있어서의 방사 활성(cpm), B는 1% NP-40(nacalai tesque)을 첨가한 시료에 있어서의 방사 활성(cpm), C는 표적 세포만을 포함하는 시료의 방사 활성(cpm)을 나타낸다.

[0457] 한편 CDC 활성 측정의 경우는, 96웰 평저 플레이트(Becton Dickinson)에 첨가된 각 50 ㎕씩의 표적 세포와 항원 결합 분자가 빙상에서 15분간 반응된다. 그 후, 보체 용액 100 ㎕가 첨가된 당해 플레이트가 탄산가스 인큐베이터 내에서 4시간 정치된다. 항원 결합 분자의 최종농도는 예를 들면 0 또는 3 ㎍/mL 등의 농도가 설정될 수 있다. 정치 후, 각 웰로부터 회수된 100 ㎕의 상청의 방사 활성이 감마 카운터를 사용해서 측정된다. 세포상해 활성은 ADCC 활성의 측정과 동일하게 계산될 수 있다.

[0458] 또한 후술되는 화학요법제, 독성 펩티드 또는 방사성 화학물질 등의 세포상해성 물질이 결합된 수식 항원 결합 분자 수식물도 본 발명의 세포상해 활성을 갖는 항원 결합 분자로서 적합하게 사용될 수 있다. 이러한 수식 항원 결합 분자(이하, 항원 결합 분자 약물 콘쥬게이트라 칭한다.)는 얻어진 항원 결합 분자를 화학적으로 수식함으로써 취득될 수 있다. 또한 항원 결합 분자의 수식방법으로서 항체 약물 콘쥬게이트 등의 분야에 있어서 이미 확립되어 있는 방법이 적절히 사용될 수 있다. 또한 독성 펩티드가 결합된 수식 항원 결합 분자는 당해 독성 펩티드를 코드하는 유전자와 본 발명의 항원 결합 분자를 코드하는 유전자가 인프레임으로 연결된 융합 유전자를 적절한 숙주세포 중에서 발현시킨 후에, 당해 세포의 배양액으로부터 단리함으로써 취득될 수 있다.

[0459] 중화 활성

[0460] 본 발명의 비한정의 일태양에서는 암조직 특이적 화합물의 농도에 따라 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 도메인을 포함하고, 당해 막형 분자에 대한 중화 활성을 갖는 항원 결합 분자를 유효성분으로서 포함하는 면역응답을 유도하는 의약 조성물이 제공된다. 본 발명의 비한정의 다른 일태양에서는, 암조직 특이적 화합물의 농도에 따라 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 도메인을 포함하고, 막형 분자를 그의 세포막에 발현하는 세포에 대한 세포상해 활성에 더하여, 당해 막형 분자에 대한 중화 활성을 갖는 항원 결합 분자를 유효성분으로서 포함하는 면역응답을 유도하는 의약 조성물이 제공된다. 일반적으로 중화 활성이란 바이러스나 독소 등 세포에 대해 생물학적 활성을 갖는 리간드의 당해 생물학적 활성을 저해하는 활성을 말한다. 즉, 중화 활성을 갖는 물질이란 당해 리간드 또는 당해 리간드가 결합하는 수용체에 결합하여 당해 리간드와 수용체의 결합을 저해하는 물질을 가리킨다. 중화 활성에 의해 리간드와의 결합을 저지당한 수용체는 당해 수용체를 통한 생물학적 활성을 발휘할 수 없게 된다. 항원 결합 분자가 항체인 경우, 이러한 중화 활성을 갖는 항체는 일반적으로 중화항체라 불린다. 어떤 피검물질의 중화 활성은 리간드의 존재하에 있어서의 생물학적 활성을 그 피검물질의 존재 또는 비존재하의 조건 간에 비교함으로써 측정될 수 있다.

[0461] 예를 들면 IL-6 수용체의 주요한 리간드로서 생각되고 있는 것은 서열번호：27로 표시되는 IL-6를 적합하게 들 수 있다. 그 아미노 말단이 세포외 도메인을 형성하는 I형 막단백질인 IL-6 수용체는 IL-6에 의해 이량체화가 유도된 gp130 수용체와 함께 헤테로 사량체를 형선한다(Heinrich 등(Biochem. J. (1998) 334, 297-314)). 당해 헤테로 사량체의 형성에 의해 gp130 수용체에 회합해 있는 Jak가 활성화된다. Jak는 자기 인산화와 수용체의 인산화를 행한다. 수용체 및 Jak의 인산화 부위는 Stat3와 같은 SH2를 갖는 Stat 패밀리에 대한 분자나, MAP 키나아제, PI3/Akt, 그 밖의 SH2를 갖는 단백질이나 어댑터에 대해 결합 부위의 역할을 한다. 다음으로 gp130 수용체에 결합한 Stat가 Jak에 의해 인산화된다. 인산화된 Stat는 이량체를 형성하고 핵내로 이행하여, 표적 유전자의 전사를 조절한다. Jak 또는 Stat는 다른 클래스의 수용체를 매개로 시그날 캐스케이드에 관여하는 것도 가능하다. 탈제어된 IL-6의 시그날 캐스케이드는 자기 면역 질환의 병태나 염증, 다발성 골수종이나 전립선암 등의 암에서 관찰된다. 암 유전자로서 작용할 수 있는 Stat3는 많은 암에 있어서 항상적으로 활성화되어 있다. 전립선암과 다발성 골수종에서는 IL-6 수용체로부터의 시그날 캐스케이드와 상피 성장인자 수용체(EGFR) 패밀리 멤버로부터의 시그날 캐스케이드 사이에 크로스토크가 있다(Ishikawa 등(J. Clin. Exp. Hematopathol. (2006) 46 (2), 55-66)).

[0462] 이러한 세포내의 시그날 캐스케이드는 세포종별로 상이하기 때문에 목적으로 하는 표적 세포별로 적절히 표적분자를 설정할 수 있고, 상기 인자에 한정되는 것은 아니다. 생체내 시그날의 활성화를 측정함으로써 중화 활성을 평가할 수 있다. 또한 생체내 시그날 캐스케이드의 하류에 존재하는 표적 유전자에 대한 전사 유도 작용을 지표로 하여, 생체내 시그날의 활성화를 검출하는 것도 가능하다. 표적 유전자의 전사 활성의 변화는 리포터 어세이

의 원리에 의해 검출할 수 있다. 구체적으로는, 표적 유전자의 전사인자 또는 프로모터 영역의 하류에 GFP(Green Fluorescence Protein)나 루시페라아제 등의 리포터 유전자를 배치하고, 그 리포터 활성을 측정함으로써 전사 활성의 변화를 리포터 활성으로서 측정할 수 있다. 생체내 시그날의 활성화의 측정 키트는 시판의 것을 적절히 사용할 수 있다(예를 들면 Mercury Pathway Profiling Luciferase System(Clontech) 등).

[0463] 또한 통상은 세포 증식을 촉진하는 방향으로 작용하는 시그날 캐스케이드에 작용하는 EGF 수용체 패밀리 등의 수용체 리간드의 중화 활성을 측정하는 방법으로서, 표적으로 하는 세포의 증식 활성을 측정함으로써 항원 결합 분자의 중화 활성을 평가할 수 있다. 예를 들면 HB-EGF 등 그 증식이 EGF 패밀리의 성장 인자에 의해 촉진되는 세포의 증식에 대한 항HB-EGF 항체의 중화 활성에 기초하는 억제 효과를 평가 또는 측정하는 방법으로서, 아래의 방법이 적합하게 사용된다. 시험관 내에 있어서 당해 세포 증식 억제 활성을 평가 또는 측정하는 방법으로서는, 배지 중에 첨가한 [^{3}H] 라벨한 티미딘의 생세포에 의한 흡수를 DNA 복제능력의 지표로서 측정하는 방법이 사용된다. 보다 간편한 방법으로서 트리판블루 등의 색소를 세포외로 배제하는 능력을 현미경하에서 계측하는 색소 배제법이나 MTT법이 사용된다. 후자는 생세포가 테트라졸륨염인 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)를 청색의 포르마잔 산물로 전환하는 능력을 갖는 것을 이용하고 있다. 보다 구체적으로는, 피검세포의 배양액에 리간드와 함께 피검항체를 첨가하여 일정 시간을 경과한 후에, MTT용액을 배양액에 첨가하여 일정 시간 정치함으로써 MTT를 세포에 흡수시킨다. 그 결과, 황색의 화합물인 MTT가 세포내의 미토콘드리아내의 숙신산 탈수소효소에 의해 청색의 화합물로 변환된다. 이 청색 생성물을 용해하여 정색(呈色)시킨 후에 그 흡광도를 측정함으로써 생세포 수의 지표로 하는 것이다. MTT 이외에 MTS, XTT, WST-1, WST-8 등의 시약도 시판되고 있어(nacalai tesque 등) 적합하게 사용할 수 있다. 활성의 측정시에는 대조 항체로서 항HB-EGF 항체와 동일 아이소타입을 갖는 항체로 당해 세포 증식 억제 활성을 갖지 않는 결합 항체를 항HB-EGF 항체와 동일하게 사용하여 항HB-EGF 항체가 대조 항체보다도 강한 세포 증식 억제 활성을 나타냄으로써 활성을 판정할 수 있다.

[0464] 활성을 평가하기 위한 세포로서, 예를 들면 그 증식이 HB-EGF에 의해 촉진되는 세포인, 난소암세포인 RMG-1 세포주나 인간 EGFR의 세포외 도메인과 마우스 G-CSF 수용체의 세포내 도메인을 인프레임으로 융합한 융합 단백질인 hEGFR/mG-CSFR을 코드하는 유전자를 발현하도록 결합한 벡터에 의해 형질전환된 마우스 Ba/F3세포 등도 적합하게 사용될 수 있다. 이와 같이 당업자는 활성을 평가하기 위한 세포를 적절히 선택함으로써 상기 세포 증식 활성의 측정에 사용하는 것이 가능하다.

[0465] 항체

[0466] 본 명세서에 있어서 항체란, 천연의 것이거나 또는 부분적 또는 완전 합성에 의해 제조된 면역 글로불린을 말한다. 항체는 그것이 천연으로 존재하는 혈장이나 혈청 등의 천연 자원이나 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 배양상청으로부터 단리될 수 있고, 또는 유전자 재조합 등의 수법을 사용함으로써 부분적으로 또는 완전히 합성될 수 있다. 항체의 예로서는 면역 글로불린의 아이소타입 및 그들 아이소타입의 서브클래스를 적합하게 들 수 있다. 인간의 면역 글로불린으로서, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgM의 9종류의 클래스(아이소타입)가 알려져 있다. 본 발명의 항체에는, 이들 아이소타입 중 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4가 포함될 수 있다. 인간 IgG1, 인간 IgG2, 인간 IgG3, 인간 IgG4 정상영역으로서는 유전자 다형에 의한 복수의 알로타입 서열이 Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242에 기재되어 있는데, 본 발명에 있어서는 그 중 어느 것이어도 된다. 특히 인간 IgG1의 서열로서는 EU 넘버링으로 표시되는 356-358번 위치의 아미노산 서열이 DEL이어도 되고 EEM이어도 된다. 또한 인간 Igκ(Kappa) 정상영역과 인간 Igλ(Lambda) 정상영역으로서는 유전자 다형에 의한 복수의 알로타입 서열이 Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242에 기재되어 있는데, 본 발명에 있어서는 그 중 어느 것이어도 된다.

[0467] 목적하는 결합 활성을 갖는 항체를 제작하는 방법은 당업자에게 있어서 공지이다. 아래에 IL-6R에 결합하는 항체(항IL-6R 항체)를 제작하는 방법이 예시된다. IL-6R 이외의 항원에 결합하는 항체도 하기의 예시에 준하여 적당히 제작될 수 있다.

[0468] 항IL-6R 항체는 공지의 수단을 사용하여 다중클론 또는 단일클론 항체로서 취득될 수 있다. 항IL-6R 항체로서는, 포유동물 유래의 단일클론 항체가 적합하게 제작될 수 있다. 포유동물 유래의 단일클론 항체에는, 하이브리도마에 의해 생산되는 것 및 유전자 공학적 수법에 의해 항체 유전자를 포함하는 발현 벡터로 형질전환한 숙주세포에 의해 생산되는 것 등이 포함된다. 또한 본원 발명의 단일클론 항체에는 「인간화 항체」나 「키메라 항체」가 포함된다.

[0469] 단일클론 항체 생산 하이브리도마는 공지기술을 사용함으로써, 예를 들면 아래와 같이 제작될 수 있다. 즉, IL-

6R 단백질을 감작 항원으로서 사용하여 통상의 면역방법에 따라 포유동물이 면역된다. 얻어지는 면역세포가 통상의 세포융합법에 의해 공지의 친세포와 융합된다. 다음으로, 통상의 스크리닝법에 의해, 단일클론 항체 생산 세포를 스크리닝함으로써 항IL-6R 항체를 생산하는 하이브리도마가 선택될 수 있다.

[0470] 구체적으로는, 단일클론 항체의 제작은 예를 들면 아래에 나타내는 바와 같이 행해진다. 먼저, 서열번호 : 2에 그의 뉴클레오티드 서열이 개시된 IL-6R 유전자를 발현함으로써, 항체 취득의 감작 항원으로서 사용되는 서열번호 : 1로 표시되는 IL-6R 단백질이 취득될 수 있다. 즉, IL-6R을 코드하는 유전자 서열을 공지의 발현 벡터에 삽입함으로써 적당한 숙주세포가 형질전환된다. 당해 숙주세포 중 또는 배양상청 중으로부터 목적하는 인간 IL-6R 단백질이 공지의 방법으로 정제된다. 배양상청 중으로부터 가용형의 IL-6R을 취득하기 위해서는, 예를 들면 Mullberg 등(J. Immunol. (1994) 152 (10), 4958-4968)에 의해 기재되어 있는 바와 같은 가용형 IL-6R인, 서열번호 : 1로 표시되는 IL-6R 폴리펩티드 서열 중, 1부터 357번째의 아미노산으로 이루어지는 단백질이, 서열번호 : 1로 표시되는 IL-6R 단백질 대신에 발현된다. 또한 정제한 천연의 IL-6R 단백질도 또한 동일하게 감작 항원으로서 사용될 수 있다.

[0471] 포유동물에 대한 면역에 사용하는 감작 항원으로서 당해 정제 IL-6R 단백질을 사용할 수 있다. IL-6R의 부분 펩티드도 또한 감작 항원으로서 사용할 수 있다. 이때, 당해 부분 펩티드는 인간 IL-6R의 아미노산 서열로부터 화학합성으로도 취득될 수 있다. 또한 IL-6R 유전자의 일부를 발현 벡터에 삽입하여 발현시킴으로써도 취득될 수 있다. 더 나아가서는 단백질 분해효소를 사용하여 IL-6R 단백질을 분해함으로써도 취득될 수 있으나, 부분 펩티드로서 사용되는 IL-6R 펩티드의 영역 및 크기는 특별한 태양에 한정되지 않는다. 바람직한 영역은 서열번호 : 1의 아미노산 서열에 있어서 20-357번째의 아미노산에 상당하는 아미노산 서열로부터 임의의 서열이 선택될 수 있다. 감작 항원으로 하는 펩티드를 구성하는 아미노산의 수는 적어도 5 이상, 예를 들면 6 이상, 또는 7 이상인 것이 바람직하다. 보다 구체적으로는 8~50, 바람직하게는 10~30 잔기의 펩티드가 감작 항원으로서 사용될 수 있다.

[0472] 또한 IL-6R 단백질의 목적하는 부분 폴리펩티드나 펩티드를 상이한 폴리펩티드와 융합한 융합 단백질이 감작 항원으로서 이용될 수 있다. 감작 항원으로서 사용되는 융합 단백질을 제조하기 위해, 예를 들면 항체의 Fc 단편이나 펩티드 태그 등이 적합하게 이용될 수 있다. 융합 단백질을 발현하는 벡터는 목적하는 2종류 또는 그 이상의 폴리펩티드 단편을 코드하는 유전자가 인프레임으로 융합되고, 당해 융합 유전자가 상기와 같이 발현 벡터에 삽입됨으로써 제작될 수 있다. 융합 단백질의 제작방법은 Molecular Cloning 2nd ed. (Sambrook,J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58(1989)Cold Spring Harbor Lab. press)에 기재되어 있다. 감작 항원으로서 사용되는 IL-6R의 취득방법 및 그것을 이용한 면역방법은 국제공개 WO2003/000883, WO2004/022754, WO2006/006693 등에도 구체적으로 기재되어 있다.

[0473] 당해 감작 항원으로 면역되는 포유동물로서는 특정 동물에 한정되는 것은 아니나, 세포융합에 사용하는 친세포와의 적합성을 고려하여 선택하는 것이 바람직하다. 일반적으로는 설치류의 동물, 예를 들면 마우스, 랫트, 햄스터 또는 토끼, 원숭이 등이 적합하게 사용된다.

[0474] 공지의 방법에 따라 상기 동물이 감작 항원에 의해 면역된다. 예를 들면 일반적인 방법으로서, 감작 항원이 포유동물의 복강내 또는 피하에 주사에 의해 투여됨으로써 면역이 실시된다. 구체적으로는, PBS(Phosphate-Buffered Saline)나 생리식염수 등으로 적당한 희석배율로 희석된 감작 항원이 목적하는 바에 따라 통상의 애쥬번트, 예를 들면 프로인트 완전 애쥬번트와 혼합되어 유화된 후에, 그 감작 항원이 포유동물에 4~21일마다 수회 투여된다. 또한 감작 항원의 면역시에는 적당한 담체가 사용될 수 있다. 특히 분자량이 작은 부분 펩티드가 감작 항원으로서 사용되는 경우에는, 알부민, 키홀 림펫 헤모시아닌 등의 담체 단백질과 결합한 그 감작 항원 펩티드를 면역하는 것이 바람직한 경우도 있다.

[0475] 또한 목적하는 항체를 생산하는 하이브리도마는 DNA 면역을 사용하여 아래와 같이 해서도 제작될 수 있다. DNA 면역이란, 면역동물 중에서 항원 단백질을 코드하는 유전자가 발현될 수 있는 태양으로 구축된 벡터 DNA가 투여된 당해 면역동물 중에서, 감작 항원이 당해 면역동물의 생체내에서 발현됨으로써, 면역자극이 부여되는 면역방법이다. 단백질 항원이 면역동물에 투여되는 일반적인 면역방법과 비교하여, DNA 면역에는 다음과 같은 우위성이 기대된다.

[0476] -IL-6R과 같은 막단백질의 구조를 유지하여 면역자극이 부여될 수 있다

[0477] -면역항원을 정제할 필요가 없다

[0478] DNA 면역에 의해 본 발명의 단일클론 항체를 얻기 위해, 먼저 IL-6R 단백질을 발현하는 DNA가 면역동물에 투여

된다. IL-6R을 코드하는 DNA는 PCR 등의 공지의 방법에 의해 합성될 수 있다. 얻어진 DNA가 적당한 발현 벡터에 삽입되어 면역동물에 투여된다. 발현 벡터로서는, 예를 들면 pcDNA3.1 등의 시판의 발현 벡터가 적합하게 이용될 수 있다. 벡터를 생체에 투여하는 방법으로서, 일반적으로 사용되고 있는 방법이 이용될 수 있다. 예를 들면 발현 벡터가 흡착된 금 입자가 gene gun으로 면역동물 개체의 세포내에 도입됨으로써 DNA 면역이 행해진다. 또한 IL-6R을 인식하는 항체의 제작은 국제공개 WO2003/104453에 기재된 방법을 사용해도 제작될 수 있다.

[0479] 이와 같이 포유동물이 면역되고, 혈청 중에 있어서의 IL-6R에 결합하는 항체 역가의 상승이 확인된 후에, 포유동물로부터 면역세포가 채취되어 세포융합에 제공된다. 바람직한 면역세포로서는, 특히 비장세포가 사용될 수 있다.

[0480] 상기 면역세포와 융합되는 세포로서, 포유동물의 골수종 세포가 사용된다. 골수종 세포는 스크리닝을 위한 적당한 선택 마커를 구비하고 있는 것이 바람직하다. 선택 마커란, 특정 배양 조건하에서 생존할 수 있는(또는 할 수 없는) 형질을 가리킨다. 선택 마커로는, 히포크산틴-구아닌-포스포리보실트랜스페라아제 결손(이하 HGPRT 결손으로 생략한다) 또는 티미딘키나아제 결손(이하 TK 결손으로 생략한다) 등이 공지이다. HGPRT나 TK의 결손을 갖는 세포는 히포크산틴-아미노프테린-티미딘 감수성(이하 HAT 감수성으로 생략한다)을 갖는다. HAT 감수성의 세포는 HAT 선택 배지 중에서 DNA 합성을 행할 수 없어 사멸되지만, 정상의 세포와 융합하면 정상세포의 샐비지 회로를 이용하여 DNA의 합성을 계속할 수 있기 때문에 HAT 선택 배지 중에서도 증식되게 된다.

[0481] HGPRT 결손이나 TK 결손의 세포는 각각 6 티오구아닌, 8 아자구아닌(이하 8AG로 생략한다) 또는 5'브로모데옥시우리딘을 포함하는 배지에서 선택될 수 있다. 이들의 피리미딘 아날로그를 DNA 중에 흡수하는 정상의 세포는 사멸된다. 한편, 이들의 피리미딘 아날로그를 흡수할 수 없는 이들의 효소를 결손한 세포는 선택 배지 중에서 생존할 수 있다. 이 밖에 G418 내성으로 불리는 선택 마커는 네오마이신 내성 유전자에 의해 2-데옥시스트렙타민계 항생물질(겐타마이신 유사체)에 대한 내성을 부여한다. 세포융합에 적합한 각종의 골수종 세포가 공지이다.

[0482] 이러한 골수종 세포로서, 예를 들면 P3(P3x63Ag8.653)(J. Immunol.(1979)123 (4), 1548-1550), P3x63Ag8U.1(Current Topics in Microbiology and Immunology(1978)81, 1-7), NS-1(C. Eur. J. Immunol.(1976)6 (7), 511-519), MPC-11(Cell(1976)8 (3), 405-415), SP2/0(Nature(1978)276 (5685), 269-270), FO(J. Immunol. Methods(1980)35 (1-2), 1-21), S194/5.XX0.BU.1(J. Exp. Med.(1978)148 (1), 313-323), R210(Nature(1979)277 (5692), 131-133) 등이 적합하게 사용될 수 있다.

[0483] 기본적으로는 공지의 방법, 예를 들면 쾰러와 밀스테인 등의 방법(Methods Enzymol.(1981)73, 3-46) 등에 준하여 상기 면역세포와 골수종 세포의 세포융합이 행해진다.

[0484] 보다 구체적으로는, 예를 들면 세포융합 촉진제의 존재하에서 통상의 영양배양액 중에서 상기 세포융합이 실시될 수 있다. 융합 촉진제로서는, 예를 들면 폴리에틸렌글리콜(PEG), 센다이 바이러스(HVJ) 등이 사용되고, 추가로 융합효율을 높이기 위해 목적하는 바에 따라 디메틸설폭시드 등의 보조제가 첨가되어 사용된다.

[0485] 면역세포와 골수종 세포의 사용비율은 임의로 설정될 수 있다. 예를 들면 골수종 세포에 대해 면역세포를 1~10배로 하는 것이 바람직하다. 상기 세포융합에 사용하는 배양액으로서는, 예를 들면 상기 골수종 세포주의 증식에 적합한 RPMI1640 배양액, MEM 배양액, 기타, 이 종의 세포배양에 사용되는 통상의 배양액이 사용되고, 추가로 소 태아 혈청(FCS) 등의 혈청 보액이 적합하게 첨가될 수 있다.

[0486] 세포융합은 상기 면역세포와 골수종 세포의 소정량을 상기 배양액 중에서 잘 혼합하여, 사전에 37℃ 정도로 가온된 PEG 용액(예를 들면 평균 분자량 1000~6000 정도)이 통상 30~60%(w/v)의 농도로 첨가된다. 혼합액이 완만하게 혼합됨으로써 목적하는 융합세포(하이브리도마)가 형성된다. 이어서, 상기에 예로 든 적당한 배양액이 축차 첨가되고, 원심하여 상청을 제거하는 조작을 반복함으로써 하이브리도마의 생육에 바람직하지 않은 세포융합제 등이 제거될 수 있다.

[0487] 이와 같이 하여 얻어진 하이브리도마는 통상의 선택 배양액, 예를 들면 HAT 배양액(히포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함하는 배양액)으로 배양함으로써 선택될 수 있다. 목적하는 하이브리도마 이외의 세포(비융합세포)가 사멸되기에 충분한 시간(통상, 이러한 충분한 시간은 수일 내지 수 주간이다) 상기 HAT 배양액을 사용한 배양이 계속될 수 있다. 이어서, 통상의 한계희석법에 의해, 목적하는 항체를 생산하는 하이브리도마의 스크리닝 및 단일 클로닝이 실시된다.

[0488] 이와 같이 하여 얻어진 하이브리도마는 세포융합에 사용된 골수종이 갖는 선택 마커에 따른 선택 배양액을 이용함으로써 선택될 수 있다. 예를 들면 HGPRT나 TK의 결손을 갖는 세포는 HAT 배양액(히포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함하는 배양액)으로 배양함으로써 선택될 수 있다. 즉, HAT 감수성의 골수종 세포를 세포융합에

사용한 경우, HAT 배양액 중에서 정상세포와의 세포융합에 성공한 세포가 선택적으로 증식될 수 있다. 목적하는 하이브리도마 이외의 세포(비융합세포)가 사멸되기에 충분한 시간, 상기 HAT 배양액을 사용한 배양이 계속된다. 구체적으로는, 일반적으로 수일 내지 수 주간의 배양에 의해 목적하는 하이브리도마가 선택될 수 있다. 이어서, 통상의 한계희석법에 의해 목적하는 항체를 생산하는 하이브리도마의 스크리닝 및 단일 클로닝이 실시될 수 있다.

[0489] 목적하는 항체의 스크리닝 및 단일 클로닝이 공지의 항원 항체 반응에 기초하는 스크리닝방법에 의해 적합하게 실시될 수 있다. 예를 들면 IL-6R에 결합하는 단일클론 항체는 세포 표면에 발현된 IL-6R에 결합할 수 있다. 이러한 단일클론 항체는, 예를 들면 FACS(fluorescence activated cell sorting)에 의해 스크리닝될 수 있다. FACS는 형광 항체와 접촉시킨 세포를 레이저광으로 해석하여, 개개의 세포가 발하는 형광을 측정함으로써 세포 표면에 대한 항체의 결합을 측정하는 것을 가능하게 하는 시스템이다.

[0490] FACS에 의해 본 발명의 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마를 스크리닝하기 위해서는 먼저 IL-6R을 발현하는 세포를 조제한다. 스크리닝하기 위한 바람직한 세포는 IL-6R을 강제 발현시킨 포유동물세포이다. 숙주세포로서 사용한 형질전환되어 있지 않은 포유동물세포를 대조로서 사용함으로써, 세포 표면의 IL-6R에 대한 항체의 결합 활성이 선택적으로 검출될 수 있다. 즉, 숙주세포에 결합하지 않고, IL-6R 강제 발현 세포에 결합하는 항체를 생산하는 하이브리도마를 선택함으로써 IL-6R 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마가 취득될 수 있다.

[0491] 또는 고정화한 IL-6R 발현 세포에 대한 항체의 결합 활성이 ELISA의 원리를 토대로 평가될 수 있다. 예를 들면 ELISA 플레이트의 웰에 IL-6R 발현 세포가 고정화된다. 하이브리도마의 배양상청을 웰 내의 고정화 세포에 접촉시켜 고정화 세포에 결합하는 항체가 검출된다. 단일클론 항체가 마우스 유래인 경우, 세포에 결합한 항체는 항마우스 이뮤노 글로불린 항체에 의해 검출될 수 있다. 이들의 스크리닝에 의해 선택된, 항원에 대한 결합능을 갖는 목적하는 항체를 생산하는 하이브리도마는 한계희석법 등에 의해 클로닝될 수 있다.

[0492] 이와 같이 하여 제작되는 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마는 통상의 배양액 중에서 계대배양될 수 있다. 또한 그 하이브리도마는 액체질소 중에서 장기에 걸쳐 보존될 수 있다.

[0493] 당해 하이브리도마를 통상의 방법에 따라 배양하고, 그 배양상청으로부터 목적하는 단일클론 항체가 취득될 수 있다. 또는 하이브리도마를 이것과 적합성이 있는 포유동물에 투여하여 증식시키고, 그의 복수로부터 단일클론 항체가 취득될 수 있다. 전자의 방법은 고순도의 항체를 얻기에 적합한 것이다.

[0494] 당해 하이브리도마 등의 항체 생산 세포로부터 클로닝되는 항체 유전자에 의해 코드되는 항체도 적합하게 이용될 수 있다. 클로닝한 항체 유전자를 적당한 벡터에 삽입하여 숙주에 도입함으로써, 당해 유전자에 의해 코드되는 항체가 발현된다. 항체 유전자의 단리와 벡터로의 도입, 그리고 숙주세포의 형질전환을 위한 방법은 예를 들면 Vandamme 등에 의해 이미 확립되어 있다(Eur.J. Biochem.(1990)192 (3), 767-775). 하기에 기술하는 바와 같이 재조합 항체의 제조방법도 또한 공지이다.

[0495] 예를 들면 항IL-6R 항체를 생산하는 하이브리도마 세포로부터 항IL-6R 항체의 가변영역(V 영역)을 코드하는 cDNA가 취득된다. 그 때문에 통상 먼저 하이브리도마로부터 전체 RNA가 추출된다. 세포로부터 mRNA를 추출하기 위한 방법으로서, 예를 들면 다음과 같은 방법을 이용할 수 있다.

[0496] -구아니딘 초원심법(Biochemistry (1979) 18 (24), 5294-5299)

[0497] -AGPC법(Anal. Biochem. (1987) 162 (1), 156-159)

[0498] 추출된 mRNA는 mRNA Purification Kit(GE 헬스케어 바이오사이언스 제조) 등을 사용하여 정제될 수 있다. 또는 QuickPrep mRNA Purification Kit(GE 헬스케어 바이오사이언스 제조) 등과 같이 세포로부터 직접 전체 mRNA를 추출하기 위한 키트도 시판되고 있다. 이러한 키트를 사용하여 하이브리도마로부터 mRNA가 취득될 수 있다. 얻어진 mRNA로부터 역전사효소를 사용하여 항체 V 영역을 코드하는 cDNA가 합성될 수 있다. cDNA는 AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit(생화학 공업사 제조) 등에 의해 합성될 수 있다. 또한 cDNA의 합성 및 증폭을 위해 SMART RACE cDNA 증폭 키트(Clontech 제조) 및 PCR을 사용한 5'-RACE법(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85 (23), 8998-9002, Nucleic Acids Res. (1989) 17 (8), 2919-2932)이 적당히 이용될 수 있다. 또한 이러한 cDNA의 합성과정에 있어서 cDNA의 양말단에 후술하는 적절한 제한효소 사이트가 도입될 수 있다.

[0499] 얻어진 PCR 산물로부터 목적으로 하는 cDNA 단편이 정제되고, 이어서 벡터 DNA와 연결된다. 이와 같이 재조합 벡터가 제작되고, 대장균 등에 도입되어 콜로니가 선택된 후에, 그 콜로니를 형성한 대장균으로부터 목적하는

재조합 벡터가 조제될 수 있다. 그리고, 그 재조합 벡터가 목적으로 하는 cDNA의 염기서열을 가지고 있는지 여부에 대해서 공지의 방법, 예를 들면 디데옥시뉴클레오티드 체인 터미네이션법 등에 의해 확인된다.

[0500] 가변영역을 코드하는 유전자를 취득하기 위해서는 가변영역 유전자 증폭용 프라이머를 사용한 5'-RACE법을 이용하는 것이 간편하다. 먼저 하이브리도마 세포로부터 추출된 RNA를 주형으로 하여 cDNA가 합성되고, 5'-RACE cDNA 라이브러리가 얻어진다. 5'-RACE cDNA 라이브러리의 합성에는 SMART RACE cDNA 증폭 키트 등 시판의 키트가 적당히 사용된다.

[0501] 얻어진 5'-RACE cDNA 라이브러리를 주형으로 하여 PCR법에 의해 항체 유전자가 증폭된다. 공지의 항체 유전자 서열을 토대로 마우스 항체 유전자 증폭용 프라이머가 디자인될 수 있다. 이들 프라이머는 이뮤노 글로불린의 서브클래스별로 상이한 염기서열이다. 따라서, 서브클래스는 사전에 Iso Strip 마우스 단일클론 항체 아이소타이핑 키트(로슈 다이어그노스틱스) 등의 시판 키트를 사용하여 결정해 두는 것이 바람직하다.

[0502] 구체적으로는, 예를 들면 마우스 IgG를 코드하는 유전자의 취득을 목적으로 할 때는, 중쇄로서 γ1, γ2a, γ2b, γ3, 경쇄로서 κ쇄와 λ쇄를 코드하는 유전자의 증폭이 가능한 프라이머가 이용될 수 있다. IgG의 가변영역 유전자를 증폭하기 위해서는, 일반적으로 3'측의 프라이머에는 가변영역에 가까운 정상영역에 상당하는 부분에 어닐링하는 프라이머가 이용된다. 한편 5'측의 프라이머에는 5'RACE cDNA 라이브러리 제작 키트에 부속되는 프라이머가 이용된다.

[0503] 이렇게 하여 증폭된 PCR 산물을 이용하여 중쇄와 경쇄의 조합으로 이루어지는 이뮤노 글로불린이 재구성될 수 있다. 재구성된 이뮤노 글로불린의 IL-6R에 대한 결합 활성을 지표로 하여 목적하는 항체가 스크리닝될 수 있다. 예를 들면 IL-6R에 대한 항체의 취득을 목적으로 할 때, 항체의 IL-6R에 대한 결합은 특이적인 것이 더욱 바람직하다. IL-6R에 결합하는 항체는, 예를 들면 다음과 같이 하여 스크리닝될 수 있다;

[0504] (1) 하이브리도마로부터 얻어진 cDNA에 의해 코드되는 V 영역을 포함하는 항체를 IL-6R 발현 세포에 접촉시키는 공정,

[0505] (2) IL-6R 발현 세포와 항체의 결합을 검출하는 공정, 및

[0506] (3) IL-6R 발현 세포에 결합하는 항체를 선택하는 공정.

[0507] 항체와 IL-6R 발현 세포의 결합을 검출하는 방법은 공지이다. 구체적으로는, 앞서 기술한 FACS 등의 수법에 의해 항체와 IL-6R 발현 세포의 결합이 검출될 수 있다. 항체의 결합 활성을 평가하기 위해 IL-6R 발현 세포의 고정 표본이 적당히 이용될 수 있다.

[0508] 결합 활성을 지표로 하는 항체의 스크리닝방법으로서 파지 벡터를 이용한 패닝법도 적합하게 사용된다. 다중클론 항체 발현 세포군으로부터 항체 유전자를 중쇄와 경쇄의 서브클래스의 라이브러리로서 취득한 경우에는, 파지 벡터를 이용한 스크리닝방법이 유리하다. 중쇄와 경쇄의 가변영역을 코드하는 유전자는 적당한 링커 서열로 연결함으로써 싱글 체인 Fv(scFv)을 형성할 수 있다. scFv를 코드하는 유전자를 파지 벡터에 삽입함으로써 scFv를 표면에 발현하는 파지가 취득될 수 있다. 이 파지와 목적하는 항원의 접촉 후에 항원에 결합한 파지를 회수함으로써 목적의 결합 활성을 갖는 scFv를 코드하는 DNA가 회수될 수 있다. 이 조작을 필요에 따라 반복함으로써 목적하는 결합 활성을 갖는 scFv가 농축될 수 있다.

[0509] 목적으로 하는 항IL-6R 항체의 V 영역을 코드하는 cDNA가 얻어진 후에, 당해 cDNA의 양말단에 삽입한 제한효소 사이트를 인식하는 제한효소에 의해 그 cDNA가 소화된다. 바람직한 제한효소는 항체 유전자를 구성하는 염기서열에 출현하는 빈도가 낮은 염기서열을 인식하여 소화한다. 또한 1 카피의 소화 단편을 벡터에 바른 방향으로 삽입하기 위해서는, 부착 말단을 부여하는 제한효소의 삽입이 바람직하다. 상기와 같이 소화된 항IL-6R 항체의 V 영역을 코드하는 cDNA를 적당한 발현 벡터에 삽입함으로써 항체 발현 벡터가 취득될 수 있다. 이때, 항체 정상영역(C 영역)을 코드하는 유전자와 상기 V 영역을 코드하는 유전자가 인프레임으로 융합되면 키메라 항체가 취득된다. 여기서 키메라 항체란, 정상영역과 가변영역의 유래가 상이한 것을 말한다. 따라서, 마우스-인간 등의 이종(異種) 키메라 항체에 더하여 인간-인간 동종(同種) 키메라 항체도 본 발명에 있어서의 키메라 항체에 포함된다. 사전에 정상영역을 갖는 발현 벡터에 상기 V 영역 유전자를 삽입함으로써 키메라 항체 발현 벡터가 구축될 수 있다. 구체적으로는, 예를 들면 목적하는 항체 정상영역(C 영역)을 코드하는 DNA를 보유한 발현 벡터의 5'측에, 상기 V 영역 유전자를 소화하는 제한효소의 제한효소 인식서열이 적당히 배치될 수 있다. 동일한 조합의 제한효소로 소화된 양자가 인프레임으로 융합됨으로써 키메라 항체 발현 벡터가 구축된다.

[0510] 항IL-6R 단일클론 항체를 제조하기 위해 항체 유전자가 발현 제어영역에 의한 제어하에서 발현되도록 발현 벡터

에 삽입된다. 항체를 발현하기 위한 발현 제어영역이란, 예를 들면 인핸서나 프로모터를 포함한다. 또한 발현된 항체가 세포외로 분비되도록 적절한 시그날 서열이 아미노 말단에 부가될 수 있다. 후술되는 실시예에서는 시그날 서열로서 아미노산 서열 MGWSCIILFLVATATGVHS(서열번호 : 3)를 갖는 펩티드가 사용되고 있는데, 이것 이외에도 적합한 시그날 서열이 부가된다. 발현된 폴리펩티드는 상기 서열의 카르복실 말단 부분에서 절단되고, 절단된 폴리펩티드가 성숙 폴리펩티드로서 세포외로 분비될 수 있다. 이어서, 이 발현 벡터에 의해 적당한 숙주세포가 형질전환됨으로써 항IL-6R 항체를 코드하는 DNA를 발현하는 재조합 세포가 취득될 수 있다.

[0511] 항체 유전자 발현을 위해, 항체 중쇄(H쇄) 및 경쇄(L쇄)를 코드하는 DNA는 각각 다른 발현 벡터에 삽입된다. H쇄와 L쇄가 삽입된 벡터에 의해 동일 숙주세포에 동시에 형질전환(co-transfect)됨으로써 H쇄와 L쇄를 구비한 항체 분자가 발현될 수 있다. 또는 H쇄 및 L쇄를 코드하는 DNA가 단일의 발현 벡터에 삽입됨으로써 숙주세포가 형질전환될 수 있다(국제공개 WO1994/011523을 참조할 것).

[0512] 단리된 항체 유전자를 적당한 숙주에 도입함으로써 항체를 제작하기 위한 숙주세포와 발현 벡터의 많은 조합이 공지이다. 이들의 발현계는, 모두 본 발명의 항원 결합 도메인을 단리하는데 응용될 수 있다. 진핵세포가 숙주세포로서 사용되는 경우, 동물세포, 식물세포, 또는 진균세포가 적당히 사용될 수 있다. 구체적으로는, 동물세포로서는, 다음과 같은 세포가 예시될 수 있다.

[0513] (1) 포유류세포 : CHO(Chinese hamster ovary cell line), COS(Monkey kidney cell line), 골수종(Sp2/0, NS0 등), BHK (baby hamster kidney cell line), Hela, Vero 등, HEK293(human embryonic kidney cell line with sheared adenovirus (Ad)5 DNA), PER.C6 cell (human embryonic retinal cell line transformed with the Adenovirus Type 5 (Ad5) E1A and E1B genes) 등(Current Protocols in Protein Science (May, 2001, Unit 5.9, Table 5.9.1))

[0514] (2) 양서류세포 : 아프리카 발톱개구리 난모세포 등

[0515] (3) 곤충세포 : sf9, sf21, Tn5 등

[0516] 또는 식물세포로서는, 니코티아나 타바쿰(Nicotiana tabacum) 등의 니코티아나(Nicotiana)속 유래의 세포에 의한 항체 유전자의 발현계가 공지이다. 식물세포의 형질전환에는, 캘러스 배양한 세포가 적당히 이용될 수 있다.

[0517] 또한 진균세포로서는, 다음과 같은 세포를 이용할 수 있다.

[0518] -효모 : 사카로미세스 세레비시애(Saccharomyces serevisiae) 등의 사카로미세스(Saccharomyces)속, 메탄올 자화 효모(Pichia pastoris) 등의 Pichia속

[0519] -사상균 : 아스퍼질러스 니거(Aspergillus niger) 등의 아스퍼질러스(Aspergillus)속

[0520] 또한 원핵세포를 이용한 항체 유전자의 발현계도 공지이다. 예를 들면 세균세포를 사용하는 경우, 대장균(E. coli), 고초균 등의 세균세포가 적당히 이용될 수 있다. 이들 세포 중에, 목적으로 하는 항체 유전자를 포함하는 발현 벡터가 형질전환에 의해 도입된다. 형질전환된 세포를 in vitro에서 배양함으로써, 당해 형질전환 세포의 배양물로부터 목적하는 항체가 취득될 수 있다.

[0521] 재조합 항체의 생산에는 상기 숙주세포에 더하여 형질전환 동물도 이용될 수 있다. 즉 목적하는 항체를 코드하는 유전자가 도입된 동물로부터 당해 항체를 얻을 수 있다. 예를 들면 항체 유전자는, 유즙 중에 고유하게 생산되는 단백질을 코드하는 유전자의 내부에 인프레임으로 삽입함으로써 융합 유전자로서 구축될 수 있다. 유즙 중에 분비되는 단백질로서, 예를 들면 염소 β카제인 등을 이용할 수 있다. 항체 유전자가 삽입된 융합 유전자를 포함하는 DNA 단편은 염소의 배(胚)로 주입되고, 당해 주입된 배가 암컷의 염소로 도입된다. 배를 수용한 염소로부터 태어나는 형질전환 염소(또는 그의 자손)가 생산하는 유즙으로부터는, 목적하는 항체가 유즙 단백질과의 융합 단백질로서 취득될 수 있다. 또한 형질전환 염소로부터 생산되는 목적하는 항체를 포함하는 유즙량을 증가시키기 위해, 호르몬이 형질전환 염소에 대해 투여될 수 있다(Bio/Technology (1994), 12 (7), 699-702).

[0522] 본 명세서에 있어서 기재되는 항원 결합 분자가 인간에게 투여되는 경우, 당해 항원 결합 분자에 있어서의 항원 결합 도메인으로서, 인간에 대한 이종 항원성을 저하시키는 것 등을 목적으로 인위적으로 개변한 유전자 재조합형 항체 유래의 항원 결합 도메인이 적당히 채용될 수 있다. 유전자 재조합형 항체에는, 예를 들면 인간화(Humanized) 항체 등이 포함된다. 이들 개변 항체는, 공지의 방법을 사용하여 적당히 제조된다.

[0523] 본 명세서에 있어서 기재되는 항원 결합 분자에 있어서의 항원 결합 도메인을 제작하기 위해 사용되는 항체의 가변영역은, 통상, 4개의 프레임워크영역(FR) 사이에 끼인 3개의 상보성 결정영역(complementarity-determining

region;CDR)으로 구성되어 있다. CDR은 실질적으로 항체의 결합 특이성을 결정하고 있는 영역이다. CDR의 아미노산 서열은 다양성이 풍부하다. 한편 FR을 구성하는 아미노산 서열은, 상이한 결합 특이성을 갖는 항체 사이에서도 높은 동일성을 나타내는 것이 많다. 그 때문에, 일반적으로 CDR의 이식에 의해 어떤 항체의 결합 특이성을 다른 항체에 이식할 수 있는 것으로 되어 있다.

[0524] 인간화 항체는 재구성(reshaped) 인간 항체라고도 칭해진다. 구체적으로는, 인간 이외의 동물, 예를 들면 마우스 항체의 CDR을 인간 항체에 이식한 인간화 항체 등이 공지이다. 인간화 항체를 얻기 위한 일반적인 유전자 재조합 수법도 알려져 있다. 구체적으로는, 마우스의 항체의 CDR을 인간의 FR에 이식하기 위한 방법으로서, 예를 들면 Overlap Extension PCR이 공지이다. Overlap Extension PCR에 있어서는, 인간 항체의 FR을 합성하기 위한 프라이머에 이식 대상 마우스 항체의 CDR을 코드하는 염기서열이 부가된다. 프라이머는 4개의 FR의 각각에 대해서 준비된다. 일반적으로, 마우스 CDR의 인간 FR에 대한 이식에 있어서는, 마우스의 FR과 동일성이 높은 인간 FR을 선택하는 것이 CDR의 기능 유지에 있어서 유리하다고 되어 있다. 즉, 일반적으로 이식 대상 마우스 CDR에 인접해 있는 FR의 아미노산 서열과 동일성이 높은 아미노산 서열로 이루어지는 인간 FR을 이용하는 것이 바람직하다.

[0525] 또한 연결되는 염기서열은 서로 인프레임으로 접속되도록 디자인된다. 각각의 프라이머에 의해 인간 FR이 개별적으로 합성된다. 그 결과, 각 FR에 마우스 CDR을 코드하는 DNA가 부가된 산물이 얻어진다. 각 산물의 마우스 CDR을 코드하는 염기서열은 서로 오버랩되도록 디자인되어 있다. 계속해서, 인간 항체 유전자를 주형으로 하여 합성된 산물의 오버랩된 CDR 부분을 서로 어닐링시켜서 상보가닥 합성반응이 행해진다. 이 반응에 의해, 인간 FR이 마우스 CDR의 서열을 매개로 연결된다.

[0526] 최종적으로 3개의 CDR과 4개의 FR이 연결된 V 영역 유전자는, 그의 5'말단과 3'말단에 어닐링하여 적당한 제한효소 인식서열이 부가된 프라이머에 의해 그의 전장이 증폭된다. 상기와 같이 얻어진 DNA와 인간 항체 C 영역을 코드하는 DNA를 인프레임으로 융합하도록 발현 벡터 중에 삽입함으로써, 인간형 항체 발현용 벡터를 제작할 수 있다. 당해 삽입 벡터를 숙주에 도입하여 재조합 세포를 수립한 후에, 당해 재조합 세포를 배양하고 당해 인간화 항체를 코드하는 DNA를 발현시킴으로써 당해 인간화 항체가 당해 배양세포의 배양물 중에 생산된다(유럽 특허공개 EP239400, 국제공개 WO1996/002576호 참조).

[0527] 상기와 같이 제작된 인간화 항체의 항원에 대한 결합 활성을 정성적 또는 정량적으로 측정하고, 평가함으로써, CDR을 매개로 연결되었을 때 그 CDR이 양호한 항원 결합 부위를 형성하는 인간 항체의 FR을 적합하게 선택할 수 있다. 필요에 따라, 재구성 인간 항체의 CDR이 적절한 항원 결합 부위를 형성하도록 FR의 아미노산 잔기를 치환하는 것도 가능하다. 예를 들면 마우스 CDR의 인간 FR에 대한 이식에 사용한 PCR법을 응용하여 FR에 아미노산 서열의 변이를 도입할 수 있다. 구체적으로는, FR에 어닐링하는 프라이머에 부분적인 염기서열의 변이를 도입할 수 있다. 이러한 프라이머에 의해 합성된 FR에는 염기서열의 변이가 도입된다. 아미노산을 치환한 변이형 항체의 항원에 대한 결합 활성을 상기 방법으로 측정하여 평가함으로써 목적하는 성질을 갖는 변이 FR 서열이 선택될 수 있다(Cancer Res., (1993) 53, 851-856).

[0528] 또한 인간 항체 유전자의 모든 레퍼토리를 갖는 형질전환 동물(국제공개 WO1993/012227, WO1992/003918, WO1994/002602, WO1994/025585, WO1996/034096, WO1996/033735 참조)을 면역동물로 하여, DNA 면역에 의해 목적하는 인간 항체가 취득될 수 있다.

[0529] 또한 인간 항체 라이브러리를 사용하여 패닝에 의해 인간 항체를 취득하는 기술도 알려져 있다. 예를 들면 인간 항체의 V 영역이 단일 사슬 항체(scFv)로서 파지디스플레이법에 의해 파지의 표면에 발현된다. 항원에 결합하는 scFv를 발현하는 파지가 선택될 수 있다. 선택된 파지의 유전자를 해석함으로써 항원에 결합하는 인간 항체의 V 영역을 코드하는 DNA 서열을 결정할 수 있다. 항원에 결합하는 scFv의 DNA 서열을 결정한 후, 당해 V 영역 서열을 목적하는 인간 항체 C 영역의 서열과 인프레임으로 융합시킨 후에 적당한 발현 벡터에 삽입함으로써 발현 벡터가 제작될 수 있다. 당해 발현 벡터를 상기에 예로 든 바와 같은 적합한 발현 세포 중에 도입하고, 그 인간 항체를 코드하는 유전자를 발현시킴으로써 당해 인간 항체가 취득된다. 이들 방법은 이미 공지이다(국제공개 WO1992/001047, WO1992/020791, WO1993/006213, WO1993/011236, WO1993/019172, WO1995/001438, WO1995/015388 참조).

[0530] 또한 항체 유전자를 취득하는 방법으로서 Bernasconi 등(Science (2002) 298, 2199-2202) 또는 국제공개 WO2008/081008에 기재된 바와 같은 B세포 클로닝(각각의 항체의 코드 서열의 동정 및 클로닝, 그의 단리 및 각각의 항체(특히, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4)의 제작을 위한 발현 벡터 구축을 위한 사용 등)의 수법이 상기 외에 적당히 사용될 수 있다.

[0531] EU 넘버링 및 Kabat 넘버링

[0532] 본 발명에서 사용되고 있는 방법에 의하면, 항체의 CDR과 FR에 할당되는 아미노산 위치는 Kabat에 따라 규정된다(Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institute of Health, Bethesda, Md., 1987년 및 1991년). 본 명세서에 있어서 항원 결합 분자가 항체 또는 항원 결합 단편인 경우, 가변영역의 아미노산은 Kabat 넘버링에 따라, 정상영역의 아미노산은 Kabat의 아미노산 위치에 준한 EU 넘버링에 따라 표시된다.

[0533] 표적 조직 특이적 화합물에 의존적인 항원 결합 도메인

[0534] 표적 조직 특이적인 화합물의 농도에 따라, 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자), 즉, 표적 조직 특이적인 화합물 의존적인 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)을 취득하기 위해, 상기 결합 활성 항목에서 나타내어진 수법 등이 적절하게 적용될 수 있다. 비한정의 일태양으로서 아래에 그 구체예가 몇 가지 예시된다. 예를 들면 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서의 항원에 대한 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)의 결합 활성보다도 당해 화합물의 존재하에 있어서의 항원에 대한 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)의 결합 활성쪽이 높게 변화하는 것을 확인하기 위해서는, 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하 및 존재하에 있어서의 또는 저농도 존재하 및 고농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)의 결합 활성이 비교된다. 다른 비한정의 일태양에서는, 예를 들면 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)의 결합 활성보다도 당해 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)의 결합 활성쪽이 높게 변화하는 것을 확인하기 위해서는, 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하 및 고농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)의 결합 활성이 비교된다.

[0535] 또한 본 발명에 있어서 「표적 조직 특이적인 화합물의 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 비존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 높다」는 표현은, 「항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)의 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 낮다」고 표현하는 것도 가능하다. 또한 본 발명에 있어서는 「항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)의 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 낮다」를 「항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)의 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 약하다」고 기재하는 경우도 있다.

[0536] 또한 본 발명에 있어서 「표적 조직 특이적인 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 저농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 높다」는 표현은, 「항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)의 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 낮다」고 표현하는 것도 가능하다. 또한 본 발명에 있어서는 「항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)의 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 낮다」를 「항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)의 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 약하다」고 기재하는 경우도 있다.

[0537] 항원에 대한 결합 활성을 측정할 때의 표적 조직 특이적인 화합물의 농도 이외의 조건은 당업자가 적절히 선택하는 것이 가능하고 특별히 한정되지 않는다. 예를 들면 HEPES 버퍼, 37℃의 조건에 있어서 측정하는 것이 가능하다. 예를 들면 Biacore(GE Healthcare) 등을 사용해서 측정하는 것이 가능하다. 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)과 항원의 결합 활성의 측정은 항원이 가용형 분자인 경우는 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)을 고정화한 칩으로 항원을 애널라이트로서 흘림으로써 가용형 분자에 대한 결합 활성을 평가하는 것이 가능하고, 항원이 막형 분자인 경우는 항원을 고정화한 칩으로 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)을 애널라이트로서 흘림으로써 막형 분자에 대한 결합 활성을 평가하는 것이 가능하다.

[0538] 본 발명의 항원 결합 분자에 포함되는 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)의 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 표적 조직 특이적인 화합물의 존재하에

있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 약한 한, 당해 화합물의 비존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성과 당해 화합물의 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성의 비는 특별히 한정되지 않으나, 바람직하게는 항원에 대한 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서의 KD(Dissociation constant : 해리상수)와 존재하에 있어서의 KD의 비인 KD(화합물 비존재하)/KD(화합물 존재하)의 값이 2 이상이고, 더욱 바람직하게는 KD(화합물 비존재하)/KD(화합물 존재하)의 값이 10 이상이며, 더욱 바람직하게는 KD(화합물 비존재하)/KD(화합물 존재하)의 값이 40 이상이다. KD(화합물 비존재하)/KD(화합물 존재하)의 값의 상한은 특별히 한정되지 않고, 당업자의 기술에 있어서 제작 가능한 한 400, 1000, 10000 등 어떠한 값이어도 된다. 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서 항원에 대한 결합 활성이 관찰되지 않는 경우에는 이 상한은 무한대의 수치가 된다.

[0539] 본 발명의 항원 결합 분자에 포함되는 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)의 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 표적 조직 특이적인 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 약한 한, 당해 화합물의 저농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성과 당해 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성의 비는 특별히 한정되지 않으나, 바람직하게는 항원에 대한 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에 있어서의 KD(Dissociation constant : 해리상수)와 고농도 존재하에 있어서의 KD의 비인 KD(화합물 저농도 존재하)/KD(화합물 고농도 존재하)의 값이 2 이상이고, 더욱 바람직하게는 KD(화합물 저농도 존재하)/KD(화합물 고농도 존재하)의 값이 10 이상이며, 더욱 바람직하게는 KD(화합물 저농도 존재하)/KD(화합물 고농도 존재하)의 값이 40 이상이다. KD(화합물 저농도 존재하)/KD(화합물 고농도 존재하)의 값의 상한은 특별히 한정되지 않고, 당업자의 기술에 있어서 제작 가능한 한 400, 1000, 10000 등 어떠한 값이어도 된다. 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에 있어서 항원에 대한 결합 활성이 관찰되지 않는 경우에는 이 상한은 무한대의 수치가 된다.

[0540] 항원에 대한 결합 활성의 값으로서 항원이 가용형 분자인 경우는 KD(해리상수)를 사용하는 것이 가능한데, 항원이 막형 분자인 경우는 겉보기 KD(Apparent dissociation constant : 겉보기 해리상수)를 사용하는 것이 가능하다. KD(해리상수) 및 겉보기 KD(겉보기 해리상수)는 당업자 공지의 방법으로 측정하는 것이 가능하며, 예를 들면 Biacore(GE healthcare), 스캐차드 플롯, 플로우 사이토미터 등을 사용하는 것이 가능하다.

[0541] 또한 본 발명의 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)의 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성과 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성의 비를 나타내는 다른 지표로서, 예를 들면 해리속도상수인 kd(Dissociation rate constant : 해리속도상수)도 또한 적합하게 사용될 수 있다. 결합 활성의 비를 나타내는 지표로서 KD(해리상수) 대신에 kd(해리속도상수)를 사용하는 경우, 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서의 항원에 대한 kd(해리속도상수)와 당해 화합물의 존재하에 있어서의 kd(해리속도상수)의 비인 kd(화합물 비존재하)/kd(화합물 존재하)의 값은 바람직하게는 2 이상이고, 더욱 바람직하게는 5 이상이며, 더욱 바람직하게는 10 이상이고, 보다 바람직하게는 30 이상이다. Kd(화합물 비존재하)/kd(화합물 존재하)의 값의 상한은 특별히 한정되지 않고 당업자의 기술상식에 있어서 제작 가능한 한 50, 100, 200 등 어떠한 값이어도 된다. 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서 항원에 대한 결합 활성이 관찰되지 않는 경우에는 해리도 발생하지 않기 때문에 이 상한은 무한대의 수치가 된다.

[0542] 또한 본 발명의 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)의 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성과 고농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성의 비를 나타내는 다른 지표로서, 예를 들면 해리속도상수인 kd(Dissociation rate constant : 해리속도상수)도 또한 적합하게 사용될 수 있다. 결합 활성의 비를 나타내는 지표로서 KD(해리상수) 대신에 kd(해리속도상수)를 사용하는 경우, 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 kd(해리속도상수)와 당해 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 kd(해리속도상수)의 비인 kd(화합물 저농도 존재하)/kd(화합물 고농도 존재하)의 값은 바람직하게는 2 이상이고, 더욱 바람직하게는 5 이상이며, 더욱 바람직하게는 10 이상이고, 보다 바람직하게는 30 이상이다. Kd(화합물 저농도 존재하)/kd(화합물 고농도 존재하)의 값의 상한은 특별히 한정되지 않고, 당업자의 기술상식에 있어서 제작 가능한 한 50, 100, 200 등 어떠한 값이어도 된다. 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에 있어서 항원에 대한 결합 활성이 관찰되지 않는 경우에는 해리도 발생하지 않기 때문에 이 상한은 무한대의 수치가 된다.

[0543] 항원 결합 활성의 값으로서 항원이 가용형 분자인 경우는 kd(해리속도상수)를 사용하는 것이 가능하고, 항원이 막형 분자인 경우는 겉보기 kd(Apparent dissociation rate constant : 겉보기 해리속도상수)를 사용하는 것이 가능하다. kd(해리속도상수) 및 겉보기 kd(겉보기 해리속도상수)는 당업자 공지의 방법으로 측정하는 것이 가능하고, 예를 들면 Biacore(GE healthcare), 플로우 사이토미터 등을 사용하는 것이 가능하다. 또한 본 발명에 있어서 표적 조직 특이적인 화합물의 어떤 농도에 있어서의 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원

결합 분자)의 항원에 대한 결합 활성을 측정할 때는 당해 화합물의 농도 이외의 조건은 동일하게 하는 것이 바람직하다.

[0544] 예를 들면 본 발명이 제공하는 하나의 태양인, 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 낮은 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)은, 아래의 공정 (a) 내지 (c)를 포함하는 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)의 스크리닝에 의해 취득될 수 있다.

[0545] (a) 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서의 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)의 항원 결합 활성을 얻는 공정,

[0546] (b) 표적 조직 특이적인 화합물의 존재하에 있어서의 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)의 항원 결합 활성을 얻는 공정,

[0547] (c) 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서의 항원 결합 활성이 당해 화합물의 존재하에 있어서의 항원 결합 활성보다 낮은 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 선택하는 공정.

[0548] 예를 들면 본 발명이 제공하는 하나의 태양인, 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 낮은 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)은, 아래의 공정 (a) 내지 (c)를 포함하는 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)의 스크리닝에 의해 취득될 수 있다.

[0549] (a) 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에 있어서의 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)의 항원 결합 활성을 얻는 공정,

[0550] (b) 표적 조직 특이적인 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)의 항원 결합 활성을 얻는 공정,

[0551] (c) 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에 있어서의 항원 결합 활성이 당해 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 항원 결합 활성보다 낮은 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 선택하는 공정.

[0552] 또한 본 발명이 제공하는 하나의 태양인, 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 낮은 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)은, 아래의 공정 (a) 내지 (c)를 포함하는 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자) 또는 그들의 라이브러리의 스크리닝에 의해 취득될 수 있다.

[0553] (a) 표적 조직 특이적인 화합물의 존재하에 있어서의 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자) 또는 그들의 라이브러리를 항원에 접촉시키는 공정,

[0554] (b) 상기 공정(a)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 당해 화합물의 비존재하에 두는 공정,

[0555] (c) 상기 공정(b)에서 해리된 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 단리하는 공정.

[0556] 또한 본 발명이 제공하는 하나의 태양인, 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 낮은 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)은, 아래의 공정 (a) 내지 (c)를 포함하는 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자) 또는 그들의 라이브러리의 스크리닝에 의해 취득될 수 있다.

[0557] (a) 표적 조직 특이적인 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자) 또는 그들의 라이브러리를 항원에 접촉시키는 공정,

[0558] (b) 상기 공정(a)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 당해 화합물의 저농도 존재하에 두는 공정,

[0559] (c) 상기 공정(b)에서 해리된 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 단리하는 공정.

[0560] 또한 본 발명이 제공하는 하나의 태양인, 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 낮은 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)은, 아래의 공정 (a) 내지 (d)를 포함하는 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분

자) 또는 그들의 라이브러리의 스크리닝에 의해 취득될 수 있다.

[0561] (a) 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에서 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)의 라이브러리를 항원에 접촉시키는 공정,

[0562] (b) 상기 공정(a)에서 항원에 결합하지 않는 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 선택하는 공정,

[0563] (c) 상기 공정(b)에서 선택된 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 당해 화합물의 존재하에서 항원에 결합시키는 공정,

[0564] (d) 상기 공정(c)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 단리하는 공정.

[0565] 또한 본 발명이 제공하는 하나의 태양인, 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 낮은 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)은, 아래의 공정 (a) 내지 (d)를 포함하는 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자) 또는 그들의 라이브러리의 스크리닝에 의해 취득될 수 있다.

[0566] (a) 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에서 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)의 라이브러리를 항원에 접촉시키는 공정,

[0567] (b) 상기 공정(a)에서 항원에 결합하지 않는 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 선택하는 공정,

[0568] (c) 상기 공정(b)에서 선택된 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 당해 화합물의 고농도 존재하에서 항원에 결합시키는 공정,

[0569] (d) 상기 공정(c)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 단리하는 공정.

[0570] 또한 본 발명이 제공하는 하나의 태양인, 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 낮은 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)은, 아래의 공정 (a) 내지 (c)를 포함하는 스크리닝방법에 의해 취득될 수 있다.

[0571] (a) 항원을 고정한 칼럼에 표적 조직 특이적인 화합물의 존재하에서 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)의 라이브러리를 접촉시키는 공정,

[0572] (b) 상기 공정(a)에서 칼럼에 결합한 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 당해 화합물의 비존재하에서 칼럼으로부터 용출하는 공정,

[0573] (c) 상기 공정(b)에서 용출된 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 단리하는 공정.

[0574] 또한 본 발명이 제공하는 하나의 태양인, 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 낮은 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)은, 아래의 공정 (a) 내지 (c)를 포함하는 스크리닝방법에 의해 취득될 수 있다.

[0575] (a) 항원을 고정한 칼럼에 표적 조직 특이적인 화합물의 고농도 존재하에서 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)의 라이브러리를 접촉시키는 공정,

[0576] (b) 상기 공정(a)에서 칼럼에 결합한 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 당해 화합물의 저농도 존재하에서 칼럼으로부터 용출하는 공정,

[0577] (c) 상기 공정(b)에서 용출된 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 단리하는 공정.

[0578] 또한 본 발명이 제공하는 하나의 태양인, 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 낮은 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)은, 아래의 공정 (a) 내지 (d)를 포함하는 스크리닝방법에 의해 취득될 수 있다.

[0579] (a) 항원을 고정한 칼럼에 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에서 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)의 라이브러리를 통과시키는 공정,

[0580] (b) 상기 공정(a)에서 칼럼에 결합하지 않고 용출된 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 회수하는 공정,

[0581] (c) 상기 공정(b)에서 회수된 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 당해 화합물의 존재하에서 항원에 결합시키는 공정,

[0582] (d) 상기 공정(c)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 단리하는 공정.

[0583] 또한 본 발명이 제공하는 하나의 태양인, 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 낮은 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)은, 아래의 공정 (a) 내지 (d)를 포함하는 스크리닝방법에 의해 취득될 수 있다.

[0584] (a) 항원을 고정한 칼럼에 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에서 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)의 라이브러리를 통과시키는 공정,

[0585] (b) 상기 공정(a)에서 칼럼에 결합하지 않고 용출된 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 회수하는 공정,

[0586] (c) 상기 공정(b)에서 회수된 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 당해 화합물의 고농도 존재하에서 항원에 결합시키는 공정,

[0587] (d) 상기 공정(c)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 단리하는 공정.

[0588] 또한 본 발명이 제공하는 하나의 태양인, 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 낮은 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)은, 아래의 공정 (a) 내지 (d)를 포함하는 스크리닝방법에 의해 취득될 수 있다.

[0589] (a) 표적 조직 특이적인 화합물의 존재하에서 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)의 라이브러리를 항원에 접촉시키는 공정,

[0590] (b) 상기 공정(a)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 취득하는 공정,

[0591] (c) 상기 공정(b)에서 취득한 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 화합물의 비존재하에 두는 공정,

[0592] (d) 상기 공정(c)에서 항원 결합 활성이 상기 공정(b)에서 선택한 기준보다 약한 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 단리하는 공정.

[0593] 또한 본 발명이 제공하는 하나의 태양인, 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 낮은 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)은, 아래의 공정 (a) 내지 (d)를 포함하는 스크리닝방법에 의해 취득될 수 있다.

[0594] (a) 표적 조직 특이적인 화합물의 고농도 존재하에서 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)의 라이브러리를 항원에 접촉시키는 공정,

[0595] (b) 상기 공정(a)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 취득하는 공정,

[0596] (c) 상기 공정(b)에서 취득한 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 화합물의 저농도 존재하에 두는 공정,

[0597] (d) 상기 공정(c)에서 항원 결합 활성이 상기 공정(b)에서 선택한 기준보다 약한 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 단리하는 공정.

[0598] 또한 상기 공정은 2회 이상 반복되어도 된다. 따라서 본 발명에 의해 전술한 스크리닝방법에 있어서 (a) 내지 (c) 또는 (a) 내지 (d)의 공정을 2회 이상 반복하는 공정을 추가로 포함하는 스크리닝방법에 의해 취득된, 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 낮은 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자) 또는 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 낮은 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)이 제공된다. (a) 내지 (c) 또는 (a) 내지 (d)의 공정이 반복되는 횟수는 특별히 한정되지 않으나, 통상 10회 이내이다.

[0599] 본 발명의 스크리닝방법에 있어서 표적 조직 특이적 화합물은 비표적 조직과 비교하여 상이한 농도(예를 들면 고농도 또는 저농도)로 표적 조직에 존재하고 있는 등의 정량적인 표적 조직 특이성으로 규정되는 화합물일 수 있다. 예를 들면 표적 조직 특이적 화합물은 임의의 농도로 차시적으로 존재한다. 그러나 일반적으로 표적 조직 특이적 화합물은 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%,

적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 100%, 적어도 110%, 적어도 120%, 적어도 130%, 적어도 140%, 적어도 150%, 적어도 2배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 10^3배, 적어도 10^4배, 적어도 10^5배, 적어도 10^6배 또는 그 이상이며, 무한대(즉, 비표적 조직에 존재하지 않는 경우)까지의 증가하는 농도로 존재하는 것이 가능하다.

[0600] 저농도 및 고농도를 구별하는 역치는 화합물에 따라 적절히 설정하는 것이 가능하다. 예를 들면 ATP 또는 아데노신의 역치의 비한정의 일태양에서는 역치로서 저농도 조건은 10 nM, 1 nM, 100 pM, 10 pM, 1 pM 또는 0 M의 값으로부터 적절히 설정될 수 있다. 설정된 역치에 따라 고농도 조건은 각 역치의 적어도 110%, 적어도 120%, 적어도 130%, 적어도 140%, 적어도 150%, 적어도 2배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 10^3배, 적어도 10^4배, 적어도 10^5배, 적어도 10^6배의 값으로부터 적절히 설정될 수 있다. 또한 PGE2의 비한정의 일태양에서는 역치로서 저농도 조건은 10 pM, 1 pM, 100 fM, 10 fM, 1 fM 또는 0 M의 값으로부터 적절히 설정될 수 있다. 설정된 역치에 따라 고농도 조건은 각 역치의 적어도 110%, 적어도 120%, 적어도 130%, 적어도 140%, 적어도 150%, 적어도 2배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 10^3배, 적어도 10^4배, 적어도 10^5배, 적어도 10^6배의 값으로부터 적절히 설정될 수 있다. 또한 Kynurenine의 비한정의 일태양에서는 역치로서 저농도 조건은 10 μM, 1 μM, 100 nM, 10 nM, 1 nM 또는 0 M의 값으로부터 적절히 설정될 수 있다. 설정된 역치에 따라 고농도 조건은 각 역치의 적어도 110%, 적어도 120%, 적어도 130%, 적어도 140%, 적어도 150%, 적어도 2배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 10^3배, 적어도 10^4배, 적어도 10^5배, 적어도 10^6배의 값으로부터 적절히 설정될 수 있다.

[0601] 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)의 항원 결합 활성은 당업자에게 공지의 방법으로 측정하는 것이 가능하고, 표적 조직 특이적인 화합물의 농도 이외의 조건에 대해서는 당업자가 적절히 결정하는 것이 가능하다. 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)의 항원 결합 활성은 KD(Dissociation constant : 해리상수), 겉보기 KD(Apparent dissociation constant : 겉보기 해리상수), 해리속도인 kd(Dissociation rate : 해리속도상수), 또는 겉보기 kd(Apparent dissociation : 겉보기 해리속도상수) 등으로서 평가하는 것이 가능하다. 이들은 당업자 공지의 방법으로 측정하는 것이 가능하며, 예를 들면 Biacore(GE healthcare), 스캐차드 플롯, FACS 등을 사용하는 것이 가능하다.

[0602] 본 발명에 있어서 표적 조직 특이적인 화합물의 존재하에 있어서의 항원 결합 활성이 당해 화합물의 비존재하에 있어서의 항원 결합 활성보다 높은 항원 결합 도메인 또는 항체를 선택하는 공정은, 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서의 항원 결합 활성이 당해 화합물의 존재하에 있어서의 항원 결합 활성보다 낮은 항원 결합 도메인 또는 항체를 선택하는 공정과 같은 의미이다.

[0603] 또한 본 발명에 있어서 표적 조직 특이적인 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 항원 결합 활성이 당해 화합물의 저농도 존재하에 있어서의 항원 결합 활성보다 높은 항원 결합 도메인 또는 항체를 선택하는 공정은, 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서의 항원 결합 활성이 당해 화합물의 존재하에 있어서의 항원 결합 활성보다 낮은 항원 결합 도메인 또는 항체를 선택하는 공정과 같은 의미이다.

[0604] 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 낮은 한, 당해 화합물의 존재하에 있어서의 항원 결합 활성과 비존재하에 있어서의 항원 결합 활성의 차는 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 당해 화합물의 존재하에 있어서의 항원 결합 활성이 비존재하에 있어서의 항원 결합 활성의 2배 이상이고, 더욱 바람직하게는 10배 이상이며, 보다 바람직하게는 40배 이상이다. 당해 항원 결합 활성의 차의 상한은 특별히 한정되지 않고, 당업자의 기술에 있어서 제작 가능한 한 400배, 1000배, 10000배 등 어떠한 값이어도 된다. 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서 항원에 대한 결합 활성이 관찰되지 않는 경우에는 이 상한은 무한대의 수치가 된다.

[0605] 상기 스크리닝방법에 의해 스크리닝되는 본 발명의 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)은 어떠한 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)이어도 되고, 예를 들면 전술한 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 스크리닝하는 것이 가능하다. 예를 들면 천연의 서열을 갖는 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 스크리닝해도 되고, 아미노산 서열이 치환된 항원 결합 도메인(또는 항원 결합 분자)을 스크리닝해도 된다.

[0606] 라이브러리

[0607] 어떤 일태양에 의하면, 본 발명의 항원 결합 도메인(또는 당해 도메인을 포함하는 항원 결합 분자)은, 표적 조직 특이적 화합물에 의존적인 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 하나 이상의 아미노산 잔기가 항원 결합 도메인에 포함되어 있는 서로 서열이 상이한 복수의 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리로부터 취득될 수 있다. 당해 화합물의 예로서는 (1) 락트산, 숙신산, 구연산 등의 해당계 또는 크레브스 회로의 1차 대사산물, (2) 알라닌, 글루타민산 또는 아스파라긴산 등의 아미노산, (3) 키누레닌 및 그의 대사산물인 안트라닐산, 3-히드록시키누레닌 및 키누렌산 등의 아미노산의 대사산물, (4) 프로스타글란딘 E2 등의 아라키돈산의 대사산물 및 (5) 아데노신, 아데노신 3인산(ATP), 아데노신 2인산(ADP), 아데노신 1인산(AMP) 등의 푸린 고리 구조를 갖는 뉴클레오시드 등이 예시된다. 이하에서는 그러한 표적 조직 특이적 화합물로서 아데노신 및/또는 ATP에 의존적인 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 하나 이상의 아미노산 잔기가 항원 결합 도메인에 포함되어 있는 서로 서열이 상이한 복수의 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리에 대해서 예시된다.

[0608] 본 명세서에 있어서 「라이브러리」란 복수의 항원 결합 분자 또는 항원 결합 분자를 포함하는 복수의 융합 폴리펩티드, 또는 이들의 서열을 코드하는 핵산, 폴리뉴클레오티드를 말한다. 라이브러리 중에 포함되는 복수의 항원 결합 분자 또는 항원 결합 분자를 포함하는 복수의 융합 폴리펩티드의 서열은 단일 서열이 아니라 서로 서열이 상이한 항원 결합 분자 또는 항원 결합 분자를 포함하는 융합 폴리펩티드이다.

[0609] 본 명세서에 있어서는 서로 서열이 상이한 복수의 항원 결합 분자라는 기재에 있어서의 「서로 서열이 상이한」이라는 용어는, 라이브러리 중의 개개의 항원 결합 분자의 서열이 상호 상이한 것을 의미한다. 즉, 라이브러리 중에 있어서의 서로 상이한 서열의 수는 라이브러리 중의 서열이 상이한 상이한 독립 클론의 수가 반영되어, 「라이브러리 사이즈」로 지칭되는 경우도 있다. 통상의 파지 디스플레이 라이브러리의 경우는 10^{6} 내지 10^{12}이고, 리보솜 디스플레이법 등의 공지의 기술을 적용함으로써 라이브러리 사이즈를 10^{14}까지 확대하는 것이 가능하다. 그러나 파지 라이브러리의 패닝 선택시에 사용되는 파지 입자의 실제 수는 통상 라이브러리 사이즈보다도 10 내지 10,000배 크다. 이 과잉 배수는 「라이브러리 당량수」로도 불리는데, 같은 아미노산 서열을 갖는 개개의 클론이 10 내지 10,000 존재할 수 있는 것을 나타낸다. 따라서 본 발명에 있어서의 「서로 서열이 상이한」이라는 용어는 라이브러리 당량수가 제외된 라이브러리 중의 개개의 항원 결합 분자의 서열이 상호 상이한 것, 보다 구체적으로는 서로 서열이 상이한 항원 결합 분자가 10^{6} 내지 10^{14} 분자, 바람직하게는 10^{7} 내지 10^{12} 분자, 더욱 바람직하게는 10^{8} 내지 10^{11}, 특히 바람직하게는 10^{8} 내지 10^{10} 존재하는 것을 의미한다.

[0610] 또한 본 발명의 복수의 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리라는 기재에 있어서의 「복수의」라는 용어는, 예를 들면 본 발명의 항원 결합 분자, 융합 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 분자, 벡터 또는 바이러스는 통상 그 물질의 2개 이상의 종류의 집합을 가리킨다. 예를 들면 어떤 2개 이상의 물질이 특정 형질에 관하여 서로 상이하다면, 그 물질에는 2종류 이상이 존재하는 것을 나타낸다. 예로서는, 아미노산 서열 중의 특정 아미노산 위치에서 관찰되는 변이체 아미노산을 들 수 있다. 예를 들면 플렉시블 잔기 이외 또는 표면에 노출된 매우 다양한 아미노산 위치의 특정 변이체 아미노산 이외는 실질적으로 동일한, 바람직하게는 동일 서열인 본 발명의 2개 이상의 항원 결합 분자가 있는 경우, 본 발명의 항원 결합 분자는 복수 개 존재한다. 다른 예에서는 플렉시블 잔기를 코드하는 염기 이외 또는 표면에 노출된 매우 다양한 아미노산 위치의 특정 변이체 아미노산을 코드하는 염기 이외는 실질적으로 동일한, 바람직하게는 동일 서열인 본 발명의 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 분자가 있다면, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 분자는 복수 개 존재한다.

[0611] 또한 본 발명의 복수의 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리라는 기재에 있어서의 「로 주로 이루어지는」이라는 용어는 라이브러리 중의 서열이 상이한 독립 클론의 수 중, 표적 조직 특이적 화합물의 농도 조건에 따라 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성이 상이한 항원 결합 분자의 수가 반영된다. 구체적으로는, 그러한 결합 활성을 나타내는 항원 결합 분자가 라이브러리 중에 적어도 10^{4} 분자 존재하는 것이 바람직하다. 또한 보다 바람직하게는 본 발명의 항원 결합 도메인은 그러한 결합 활성을 나타내는 항원 결합 분자가 적어도 10^{5} 분자 존재하는 라이브러리로부터 취득될 수 있다. 더욱 바람직하게는 본 발명의 항원 결합 도메인은 그러한 결합 활성을 나타내는 항원 결합 분자가 적어도 10^{6} 분자 존재하는 라이브러리로부터 취득될 수 있다. 특히 바람직하게는 본 발명의 항원 결합 도메인은 그러한 결합 활성을 나타내는 항원 결합 분자가 적어도 10^{7} 분자 존재하는 라이브러리로부터 취득될 수 있다. 또한 바람직하게는 본 발명의 항원 결합 도메인은 그러한 결합 활성을 나타내는 항원 결합 분자가 적어도 10^{8} 분자 존재하는 라이브러리로부터 취득될 수 있다. 다른 표현으로는 라이브러

리 중의 서열이 상이한 독립 클론 수 중, 아데노신 및/또는 ATP의 존재 또는 비존재에 따라 항원에 대한 항원 결합 도메인의 결합 활성이 상이한 항원 결합 분자의 비율로서도 적합하게 표현될 수 있다. 구체적으로는, 본 발명의 항원 결합 도메인은 그러한 결합 활성을 나타내는 항원 결합 분자가 라이브러리 중의 서열이 상이한 독립 클론 수의 0.1% 내지 80%, 바람직하게는 0.5% 내지 60%, 보다 바람직하게는 1% 내지 40%, 더욱 바람직하게는 2% 내지 20%, 특히 바람직하게는 4% 내지 10% 포함되는 라이브러리로부터 취득될 수 있다. 융합 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 분자 또는 벡터의 경우도 상기와 마찬가지로, 분자의 수나 분자 전체에 있어서의 비율로 표현될 수 있다. 또한 바이러스의 경우도 상기와 마찬가지로, 바이러스 개체의 수나 개체 전체에 있어서의 비율로 표현될 수 있다.

[0612] 아데노신 및/또는 ATP의 존재 또는 비존재에 따라 항원에 대한 항원 결합 도메인의 결합 활성을 변화시키는 아미노산

[0613] 상기 스크리닝방법에 의해 스크리닝되는 본 발명의 항원 결합 도메인 또는 항체는 어떻게 조제되어도 되고, 사전에 존재하고 있는 항체, 사전에 존재하고 있는 라이브러리(파지 라이브러리 등), 동물에 대한 면역으로부터 얻어진 하이브리도마나 면역동물로부터의 B세포로부터 제작된 항체 또는 라이브러리, 아데노신 또는 ATP와 적절히 연결된 면역원성이 높은 T세포 에피토프 펩티드와 같은 애쥬번트 작용제와의 연결제(conjugate)에 의해 면역된 동물의 B세포 등의 면역세포로부터 제작된 항체 또는 라이브러리 등을 사용하는 것이 가능하다. 당해 T세포 에피토프 펩티드의 비한정의 일례로서, Tetanus toxin 유래의 p30 헬퍼 펩티드(서열번호 : 4로 표시되고, Fragment C(FrC)로도 지칭된다) 등을 적합하게 들 수 있다.

[0614] 상기와 같이 아데노신 및/또는 ATP의 존재 또는 비존재에 따라 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 아미노산으로서는, 아데노신 및/또는 ATP 결합 모티브를 형성하는 아미노산이 예시될 수 있다. 상기 아미노산이 포함되는 항원 결합 도메인 중의 아미노산의 위치는 특정 위치에 한정되지 않고, 아데노신 및/또는 ATP의 존재 또는 비존재에 따라 항원에 대한 항원 결합 도메인의 결합 활성을 변화시키는 한, 항원 결합 도메인을 형성하는 중쇄 가변영역 또는 경쇄 가변영역 중 어느 위치일 수도 있다. 즉, 본 발명의 항원 결합 도메인은 아데노신 및/또는 ATP의 존재 또는 비존재에 따라 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 아미노산이 중쇄의 항원 결합 도메인에 포함되어 있는 서로 서열이 상이한 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리로부터 취득될 수 있다. 비한정의 일태양에서는 본 발명의 항원 결합 도메인은 아데노신 및/또는 ATP의 존재 또는 비존재에 따라 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 아미노산이 중쇄의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3에 포함되어 있는 서로 서열이 상이한 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리로부터 취득될 수 있다. 비한정의 다른 일태양에서는, 본 발명의 항원 결합 도메인은 아데노신 및/또는 ATP의 존재 또는 비존재에 따라 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 아미노산이 중쇄의 FR1, FR2, FR3 및/또는 FR4에 포함되어 있는 서로 서열이 상이한 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리로부터 취득될 수 있다.

[0615] 또한 본 발명의 일태양에서는, 본 발명의 항원 결합 도메인은 아데노신 및/또는 ATP의 존재 또는 비존재에 따라 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 아미노산이 중쇄 및/또는 경쇄의 항원 결합 도메인에 포함되어 있는 서로 서열이 상이한 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리로부터 취득될 수 있다. 비한정의 일태양에서는 본 발명의 항원 결합 도메인은 아데노신 및/또는 ATP의 존재 또는 비존재에 따라 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 아미노산이 중쇄 및/또는 경쇄의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3에 포함되어 있는 서로 서열이 상이한 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리로부터 취득될 수 있다. 비한정의 다른 일태양에서는, 본 발명의 항원 결합 도메인은 아데노신 및/또는 ATP의 존재 또는 비존재에 따라 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 아미노산이 중쇄 및/또는 경쇄의 FR1, FR2, FR3 및/또는 FR4에 포함되어 있는 서로 서열이 상이한 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리로부터 취득될 수 있다.

[0616] 그러한 아미노산의 비한정의 일태양으로서, 중쇄 가변영역에 포함되는 52번 위치, 52a번 위치, 53번 위치, 96번 위치, 100a번 위치 또는 100c번 위치의 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산 등이 예시될 수 있다. 또한 이러한 아미노산의 비한정의 일태양으로서, 중쇄 가변영역에 포함되는 52번 위치의 Ser, 52a번 위치의 Ser, 53번 위치의 Arg, 96번 위치의 Gly, 100a번 위치의 Leu, 100c번 위치의 Trp 등의 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산이 예시될 수 있다.

[0617] 항원 결합 분자의 경쇄 및/또는 중쇄 가변영역의 프레임워크 서열은 아데노신 및/또는 ATP의 존재 또는 비존재에 따라 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 아미노산이 중쇄 및/또는 경쇄의 항원 결합 도메인에 포함되어 있는 한, 어떠한 프레임워크 서열도 사용될 수 있다. 프레임워크 서열의 기원은 한정되지 않으나 비인간 동물의 임의의 생물 또는 인간으로부터 취득될 수 있다. 바람직하게는 임의의 생물로서는 마우스, 랫

트, 기니피그, 햄스터, 게르빌루스쥐, 고양이, 토끼, 개, 염소, 양, 소, 말, 낙타 및 비인간 영장류로부터 선택되는 생물을 적합하게 들 수 있다. 특히 적합한 실시형태에서는, 항원 결합 분자의 경쇄 및/또는 중쇄 가변영역의 프레임워크 서열은 인간의 생식세포계 프레임워크 서열을 가지고 있는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명의 일태양에 있어서 프레임워크 서열이 완전히 인간의 서열이라면, 인간에게 투여(예를 들면 질병의 치료)된 경우, 본 발명의 항원 결합 분자는 면역원성반응을 거의 또는 전혀 일으키지 않을 것으로 생각된다. 상기의 의미로부터 본 발명의 「생식세포계열의 서열을 포함한다」는 것은, 본 발명의 프레임워크 서열의 일부가 어느 하나의 인간의 생식세포계 프레임워크 서열의 일부와 동일한 것을 의미한다. 예를 들면 본 발명의 항원 결합 분자의 중쇄 FR2의 서열이 복수의 상이한 인간의 생식세포계 프레임워크 서열의 중쇄 FR2 서열이 조합된 서열인 경우도, 본 발명의 「생식세포계열의 서열을 포함하는」 항원 결합 분자이다. 또한 본 발명의 항원 결합 분자의 프레임워크 서열이 치환되어 있는 서열인 경우도, 본 발명의 「생식세포계열의 서열을 포함하는」 항원 결합 분자이다. 그러한 치환되어 있는 서열의 예로서, 특히 인간의 생식세포계 프레임워크 서열의 일부 아미노산이 아데노신 및/또는 ATP의 존재 또는 비존재에 따라 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 아미노산으로 치환되어 있는 서열을 들 수 있다.

[0618] 프레임워크의 예로서는, 예를 들면 V-Base(http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/) 등의 웹사이트에 포함되어 있는 현재 알려져 있는 완전히 인간형인 프레임워크영역의 서열을 적합하게 들 수 있다. 이들 프레임워크영역의 서열이 본 발명의 항원 결합 분자에 포함되는 생식세포계열의 서열로서 적절히 사용될 수 있다. 생식세포계열의 서열은 그 유사성을 토대로 분류될 수 있다(Tomlinson 등(J. Mol. Biol. (1992) 227, 776-798) Williams 및 Winter(Eur. J. Immunol. (1993) 23, 1456-1461) 및 Cox 등(Nat. Genetics (1994) 7, 162-168)). 7개의 서브그룹으로 분류되는 Vκ, 10개의 서브그룹으로 분류되는 Vλ, 7개의 서브그룹으로 분류되는 VH로부터 적합한 생식세포계열의 서열이 적절히 선택될 수 있다.

[0619] 완전히 인간형인 VH 서열은 하기로만 한정되는 것은 아니나, 예를 들면 VH1서브그룹(예를 들면 VH1-2, VH1-3, VH1-8, VH1-18, VH1-24, VH1-45, VH1-46, VH1-58, VH1-69), VH2 서브그룹(예를 들면 VH2-5, VH2-26, VH2-70), VH3 서브그룹(VH3-7, VH3-9, VH3-11, VH3-13, VH3-15, VH3-16, VH3-20, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-33, VH3-35, VH3-38, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH3-64, VH3-66, VH3-72, VH3-73, VH3-74), VH4 서브그룹(VH4-4, VH4-28, VH4-31, VH4-34, VH4-39, VH4-59, VH4-61), VH5 서브그룹(VH5-51), VH6 서브그룹(VH6-1), VH7 서브그룹(VH7-4, VH7-81)의 VH서열 등을 적합하게 들 수 있다. 이들은 공지 문헌(Matsuda 등(J. Exp. Med. (1998) 188, 1973-1975)) 등에도 기재되어 있어, 당업자는 이들 서열정보를 토대로 본 발명의 항원 결합 분자를 적절히 설계하는 것이 가능하다. 이들 이외의 완전히 인간형인 프레임워크 또는 프레임워크의 준영역도 적합하게 사용될 수 있다.

[0620] 완전히 인간형인 Vκ서열은 하기로만 한정되는 것은 아니나, 예를 들면 Vk1 서브그룹으로 분류되는 A20, A30, L1, L4, L5, L8, L9, L11, L12, L14, L15, L18, L19, L22, L23, L24, O2, O4, O8, O12, O14, O18, Vk2 서브그룹으로 분류되는 A1, A2, A3, A5, A7, A17, A18, A19, A23, O1, O11, Vk3 서브그룹으로 분류되는 A11, A27, L2, L6, L10, L16, L20, L25, Vk4 서브그룹으로 분류되는 B3, Vk5 서브그룹으로 분류되는 B2(본 명세서에 있어서는 Vk5-2로도 지칭된다)), Vk6 서브그룹으로 분류되는 A10, A14, A26 등(Kawasaki 등(Eur. J. Immunol. (2001) 31, 1017-1028), Schable 및 Zachau(Biol. Chem. Hoppe Seyler (1993) 374, 1001-1022) 및 Brensing-Kuppers 등(Gene (1997) 191, 173-181))을 적합하게 들 수 있다.

[0621] 완전히 인간형인 Vλ서열은 하기로만 한정되는 것은 아니나, 예를 들면 VL1 서브그룹으로 분류되는 V1-2, V1-3, V1-4, V1-5, V1-7, V1-9, V1-11, V1-13, V1-16, V1-17, V1-18, V1-19, V1-20, V1-22, VL1 서브그룹으로 분류되는 V2-1, V2-6, V2-7, V2-8, V2-11, V2-13, V2-14, V2-15, V2-17, V2-19, VL3 서브그룹으로 분류되는 V3-2, V3-3, V3-4, VL4 서브그룹으로 분류되는 V4-1, V4-2, V4-3, V4-4, V4-6, VL5 서브그룹으로 분류되는 V5-1, V5-2, V5-4, V5-6 등(Kawasaki 등(Genome Res. (1997) 7, 250-261))을 적합하게 들 수 있다.

[0622] 통상 이들의 프레임워크 서열은 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기의 상위로 인해 서로 상이하다. 이들 프레임워크 서열은 본 발명의 「아데노신 및/또는 ATP의 존재 또는 비존재에 따라 항원에 대한 항원 결합 도메인의 결합 활성을 변화시키는 하나 이상의 아미노산 잔기」와 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 「아데노신 및/또는 ATP의 존재 또는 비존재에 따라 항원에 대한 항원 결합 도메인의 결합 활성을 변화시키는 하나 이상의 아미노산 잔기」와 함께 사용되는 완전히 인간형인 프레임워크의 예로서는 이들에만 한정되는 것은 아니나, 그 밖에도 KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY, POM 등을 들 수 있다(예를 들면 상기 Kabat 등(1991) 및 Wu 등(J. Exp. Med. (1970) 132, 211-250)).

[0623] 본 발명은 특정 이론에 구속되는 것은 아니나, 생식세포계 서열의 사용이 대부분의 개인에 있어서 유해한 면역반응을 배제할 것으로 기대되고 있는 하나의 이유는, 아래와 같다고 생각하고 있다. 통상의 면역반응 중에 발생하는 친화성 성숙 스텝의 결과, 면역글로불린의 가변영역에 체세포의 돌연변이가 빈번하게 생긴다. 이들 돌연변이는 주로 그 서열이 초가변적인 CDR의 주변에 생기는데, 프레임워크영역의 잔기에도 영향을 미친다. 이들 프레임워크의 돌연변이는 생식세포계 유전자에는 존재하지 않고, 또한 환자의 면역원성이 될 가능성은 적다. 한편 통상의 인간의 집단은 생식세포계 유전자에 의해 발현되는 프레임워크 서열의 대다수에 노출되어 있어, 면역관용의 결과, 이들 생식세포계 프레임워크는 환자에게 있어서 면역원성이 낮거나 또는 비면역원성인 것으로 예상된다. 면역관용의 가능성을 최대로 하기 위해 가변영역을 코드화하는 유전자가 보통으로 존재하는 기능적인 생식세포계 유전자의 집합으로부터 선택될 수 있다.

[0624] 본 발명의 아데노신 및/또는 ATP의 존재 또는 비존재에 따라 항원에 대한 항원 결합 도메인의 결합 활성을 변화시키는 아미노산이 상기 가변영역 서열의 서열, 중쇄 가변영역 또는 경쇄 가변영역의 서열, 또는 CDR서열 또는 프레임워크 서열에 포함되는 항원 결합 분자를 제작하기 위해 부위 특이적 변이유발법(Kunkel 등(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1985) 82, 488-492))이나 Overlap extension PCR 등의 공지의 방법이 적절히 채용될 수 있다.

[0625] 예를 들면 아데노신 및/또는 ATP의 존재 또는 비존재에 따라 항원에 대한 항원 결합 도메인의 결합 활성을 변화시키는 하나 이상의 아미노산 잔기가 사전에 포함되어 있는 CDR서열 및/또는 프레임워크 서열로서 선택된 경쇄 가변영역과, 랜덤화 가변영역 서열 라이브러리로서 제작된 중쇄 가변영역을 조합시킴으로써 본 발명의 복수의 서로 서열이 상이한 항원 결합 분자를 포함하는 라이브러리가 제작될 수 있다.

[0626] 또한 상기 아데노신 또는 ATP의 존재 또는 비존재에 따라 항원에 대한 항원 결합 도메인의 결합 활성을 변화시키는 하나 이상의 아미노산 잔기가 사전에 포함되어 있는 CDR서열 및/또는 프레임워크 서열로서 선택된 중쇄 및/또는 경쇄 가변영역의 서열에, 당해 아미노산 잔기 이외의 잔기로서 다양한 아미노산이 포함되도록 설계하는 것도 가능하다. 본 발명에 있어서 그러한 잔기는 플렉시블 잔기로 지칭된다. 본 발명의 항원 결합 분자의 항원에 대한 결합 활성이 조직 특이적 화합물의 농도 조건에 따라 변화하는 한, 당해 플렉시블 잔기의 수 및 위치는 특정 태양으로 한정되는 경우는 없다. 즉, 중쇄 및/또는 경쇄의 CDR서열 및/또는 FR서열에 하나 또는 그 이상의 플렉시블 잔기가 포함될 수 있다. 플렉시블 잔기 및 그 잔기를 다른 어떤 아미노산으로 치환하여 라이브러리화할 수 있는지는 아데노신 및/또는 ATP와 항체의 복합체의 결정 구조 해석이나 변이 도입에 의해 동정할 수 있다. 예를 들면 아데노신 및/또는 ATP와 항체의 복합체의 결정 구조 해석으로부터 아데노신 및/또는 ATP의 결합에 관여하고 있지 않은 항체의 잔기를 동정할 수 있다. 아데노신 및/또는 ATP의 결합에 관여하고 있지 않은 것으로 동정된 잔기를 다른 아미노산으로 치환해도 화합물로의 결합을 적절한 정도로 유지할 수 있는 아미노산을 선택할 수 있다. 이에 의해 선택된 잔기에 있어서 선택된 아미노산이 출현하는 라이브러리를 설계할 수 있다. 이 경우에 있어서 아데노신 및/또는 ATP의 결합에 관여하고 있지 않은 것으로 동정된 잔기가 서로 상이한 아미노산으로 치환된 항원 결합 분자의 집합이 되도록, 복수의 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리를 설계하는 것이 가능하다. 즉, 서로 상이한 아미노산으로 치환된 개개의 플렉시블 잔기를 조합함으로써 당해 플렉시블 잔기가 포함되는 항원 결합 분자의 서열의 다양성이 초래된다.

[0627] 또한 아데노신 및/또는 ATP의 결합에 관여하는 것으로 동정된 잔기의 적어도 하나는 당해 잔기 및 당해 잔기와 상이한 잔기로부터 선택되는 임의의 잔기가 되도록, 이들 잔기를 포함하는 항원 결합 분자가 디자인될 수 있다. 아데노신 및/또는 ATP의 결합에 관여하는 것으로 동정되는 아미노산의 비한정의 일태양으로서, 중쇄 가변영역에 포함되는 52번 위치, 52a번 위치, 53번 위치, 96번 위치, 100a번 위치 또는 100c번 위치의 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산 등이 예시될 수 있다. 또한 이러한 아미노산의 비한정의 일태양으로서, 중쇄 가변영역에 포함되는 52번 위치의 Ser, 52a번 위치의 Ser, 53번 위치의 Arg, 96번 위치의 Gly, 100a번 위치의 Leu, 100c번 위치의 Trp 등의 아미노산 중 어느 하나 이상의 아미노산이 예시될 수 있다. 예를 들면 상기 100a번 위치의 Leu가 아데노신 및/또는 ATP의 결합에 관여하는 것으로 동정되는 경우, 라이브러리에 포함되는 항원 결합 분자의 100a번 위치의 아미노산 잔기는 Leu에 더하여 His, Met, Leu, Arg, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나의 플렉시블 잔기로부터 선택되는 아미노산 잔기일 수 있다.

[0628] 상기 플렉시블 잔기의 비한정의 일태양으로서, 중쇄 가변영역에 포함되는 31번 위치, 32번 위치, 33번 위치, 35번 위치, 50번 위치, 55번 위치, 56번 위치, 57번 위치, 58번 위치, 59번 위치, 95번 위치, 96번 위치, 97번 위치, 98번 위치, 99번 위치, 100번 위치, 100a번 위치 및 100b번 위치의 아미노산이 예시될 수 있다. 그러한 아미노산의 다른 비한정의 일태양으로서, 경쇄 가변영역에 포함되는 26번 위치, 27번 위치, 27a번 위치, 27b번 위치, 27c번 위치, 28번 위치, 29번 위치, 31번 위치, 32번 위치, 50번 위치, 51번 위치, 52번 위치, 53번 위

치, 54번 위치, 55번 위치, 89번 위치, 90번 위치, 91번 위치, 92번 위치, 93번 위치, 94번 위치, 95a번 위치, 96번 위치 및 97번 위치의 아미노산이 예시될 수 있다.

[0629] 상기 플렉시블 잔기의 비한정의 일태양으로서, 중쇄 가변영역에 포함되는 아미노산으로서 ;

[0630] 31번 위치의 아미노산이 Asp, Gly, Asn, Ser, Arg 또는 Thr 중 어느 하나,

[0631] 32번 위치의 아미노산이 Ala, Phe, His, Asn, Ser 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0632] 33번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Asp, Gly, Phe, Ile, His, Lys, Met, Leu, Asn, Gln, Pro, Ser, Arg, Trp, Val, Tyr 또는 Thr 중 어느 하나,

[0633] 35번 위치의 아미노산이 His, Ser, Thr, Tyr 또는 Asn 중 어느 하나,

[0634] 50번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Asp, Gly, Phe, Ile, His, Lys, Met, Leu, Asn, Gln, Pro, Arg, Thr, Trp, Val, Tyr 또는 Ser 중 어느 하나,

[0635] 55번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Asp, Gly, Leu, Thr, Ser, Arg 또는 Asn 중 어느 하나,

[0636] 56번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Asp, Gly, Phe, Ile, His, Lys, Met, Leu, Gln, Pro, Ser, Thr, Trp, Val 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0637] 57번 위치의 아미노산이 Ala, Lys, Arg, Thr 또는 Ile 중 어느 하나,

[0638] 58번 위치의 아미노산이 Asp, Gly, Phe, His, Ser, Thr, Tyr 또는 Asn 중 어느 하나,

[0639] 59번 위치의 아미노산이 Leu 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0640] 95번 위치의 아미노산이 Ala, Ile, Lys, Met, Leu, Arg, Trp, Val, Tyr 또는 Phe 중 어느 하나,

[0641] 96번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Asn 또는 Ser 중 어느 하나,

[0642] 97번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Gly, Ile, His, Lys, Met, Leu, Asn, Ser, Val, Tyr 또는 Arg 중 어느 하나,

[0643] 98번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Asp, Gly, Phe, Ile, His, Met, Leu, Asn, Gln, Pro, Ser, Arg, Thr, Trp, Val, Tyr 또는 Lys 중 어느 하나,

[0644] 99번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Asp, Phe, His, Lys, Asn, Gln, Ser, Arg, Trp, Val, Tyr 또는 Gly 중 어느 하나,

[0645] 100번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Gly, Phe, Ile, His, Lys, Met, Leu, Asn, Gln, Pro, Ser, Arg, Thr, Trp, Val, Tyr 또는 Asp 중 어느 하나,

[0646] 100a번 위치의 아미노산이 Ala, Phe, Ile, His, Lys, Met, Arg, Trp, Val 또는 Tyr 중 어느 하나, 또는

[0647] 100b번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Asp, Gly, Phe, Ile, His, Lys, Met, Leu, Gln, Pro, Ser, Arg, Thr, Trp, Val, Tyr 또는 Asn 중 어느 하나

[0648] 의 아미노산이 예시될 수 있다.

[0649] 상기 플렉시블 잔기의 비한정의 일태양으로서, 경쇄 가변영역에 포함되는 아미노산으로서 ;

[0650] 26번 위치의 아미노산이 Ala, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[0651] 27번 위치의 아미노산이 Thr 또는 Ser 중 어느 하나,

[0652] 27a번 위치의 아미노산이 Gly, Asn, Thr 또는 Ser 중 어느 하나,

[0653] 27b번 위치의 아미노산이 Asn 또는 Asp 중 어느 하나,

[0654] 27c번 위치의 아미노산이 Ile 또는 Val 중 어느 하나,

[0655] 28번 위치의 아미노산이 Asp 또는 Gly 중 어느 하나,

[0656] 29번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Ser, Arg, Thr, Tyr 또는 Gly 중 어느 하나,

[0657] 31번 위치의 아미노산이 Glu, Asp, Lys 또는 Asn 중 어느 하나,

[0658] 32번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Ser, Thr 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0659] 50번 위치의 아미노산이 Asp, Gly, Lys, Asn, Gln, Ser, Arg, Tyr 또는 Glu 중 어느 하나,

[0660] 51번 위치의 아미노산이 Asp, Gly, Lys, Asn, Thr 또는 Val 중 어느 하나,

[0661] 52번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Asn, Thr 또는 Ser 중 어느 하나,

[0662] 53번 위치의 아미노산이 Glu, Asp, His, Asn, Gln, Ser, Tyr 또는 Lys 중 어느 하나,

[0663] 54번 위치의 아미노산이 Lys 또는 Arg 중 어느 하나,

[0664] 55번 위치의 아미노산이 Leu 또는 Pro 중 어느 하나,

[0665] 89번 위치의 아미노산이 Ala, Gly, Phe, Leu, Asn, Gln, Thr, Val, Tyr 또는 Ser 중 어느 하나,

[0666] 90번 위치의 아미노산이 Ala, Leu, Thr, Val 또는 Ser 중 어느 하나,

[0667] 91번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, His, Lys, Asn, Ser, Arg, Thr, Trp, Val 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0668] 92번 위치의 아미노산이 Glu, Asp, Ser, Arg, Thr, Val, Tyr 또는 Ala 중 어느 하나,

[0669] 93번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Ile, Asn, Ser, Arg, Thr, Val, Tyr 또는 Gly 중 어느 하나,

[0670] 94번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Gly, Ile, Asn, Arg, Thr 또는 Ser 중 어느 하나,

[0671] 95번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Asp, Gly, Phe, Ile, His, Lys, Met, Leu, Gln, Pro, Ser, Arg, Thr, Trp, Val, Tyr 또는 Asn 중 어느 하나,

[0672] 95a번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Asp, Gly, Ile, His, Lys, Leu, Gln, Pro, Ser, Arg, Thr, Tyr 또는 Asn 중 어느 하나,

[0673] 96번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Gly, Phe, His, Lys, Leu, Asn, Gln, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr 또는 Val 중 어느 하나, 또는

[0674] 97번 위치의 아미노산이 Ala, Gly, Ile, Met, Leu, Ser 또는 VaL 중 어느 하나

[0675] 의 아미노산이 예시될 수 있다.

[0676] 본 명세서에 있어서는 플렉시블 잔기란 공지의 및/또는 천연 항체 또는 항원 결합 도메인의 아미노산 서열을 비교한 경우에, 그 위치에서 제시되는 몇 가지의 상이한 아미노산을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변영역 상의 아미노산이 매우 다양한 위치에 존재하는 아미노산 잔기의 변형을 말한다. 매우 다양한 위치는 일반적으로 CDR영역에 존재한다. 일태양에서는 공지의 및/또는 천연 항체의 매우 다양한 위치를 결정할 때는 Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institute of Health Bethesda Md.) (1987년 및 1991년)가 제공하는 데이터가 유효하다. 또한 인터넷 상의 복수의 데이터베이스(http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/, http://www.bioinf.org.uk/abs/index.html)에서는 수집된 다수의 인간 경쇄 및 중쇄의 서열과 그의 배치가 제공되어 있어, 이들 서열과 그 배치의 정보는 본 발명에 있어서의 매우 다양한 위치의 결정에 유용하다. 본 발명에 따르면, 아미노산이 어떤 위치에서 바람직하게는 약 2 내지 약 20, 바람직하게는 약 3 내지 약 19, 바람직하게는 약 4 내지 약 18, 바람직하게는 5 내지 17, 바람직하게는 6 내지 16, 바람직하게는 7 내지 15, 바람직하게는 8 내지 14, 바람직하게는 9 내지 13, 바람직하게는 10 내지 12개의 가능한 상이한 아미노산 잔기의 다양성을 갖는 경우는, 그 위치는 매우 다양하다고 할 수 있다. 몇 가지의 실시형태에서는, 어떤 아미노산 위치는 바람직하게는 적어도 약 2, 바람직하게는 적어도 약 4, 바람직하게는 적어도 약 6, 바람직하게는 적어도 약 8, 바람직하게는 약 10, 바람직하게는 약 12의 가능한 상이한 아미노산 잔기의 다양성을 가질 수 있다.

[0677] 또한 상기 아데노신 및/또는 ATP의 존재 또는 비존재에 따라 항원에 대한 항원 결합 도메인의 결합 활성을 변화시키는 하나 이상의 아미노산 잔기가 도입된 경쇄 가변영역과 랜덤화 가변영역 서열 라이브러리로서 제작된 중쇄 가변영역을 조합시킴으로써도 본 발명에 있어서의 복수의 서로 서열이 상이한 항원 결합 분자를 포함하는 라이브러리가 제작될 수 있다. 마찬가지로 상기 아데노신 및/또는 ATP의 존재 또는 비존재에 따라 항원에 대한 항원 결합 도메인의 결합 활성을 변화시키는 하나 이상의 아미노산 잔기가 도입되고, 그 이외의 아미노산 잔기를 플렉시블 잔기로서 설계된 중쇄 가변영역과 조합시킴으로써도 본 발명에 있어서의 복수의 서로 서열이 상이한

항원 결합 분자를 포함하는 라이브러리가 제작될 수 있다.

[0678] 상기 표적 조직 특이적 화합물의 농도 조건에 따라 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 하나 이상의 아미노산 잔기가 도입된 경쇄 가변영역과 랜덤화 가변영역 서열 라이브러리로서 제작된 중쇄 가변영역을 조합시키는 경우에도, 상기와 마찬가지로 플렉시블 잔기가 당해 경쇄 가변영역의 서열에 포함되도록 설계하는 것도 가능하다. 본 발명의 항원 결합 분자의 항원에 대한 결합 활성이 아데노신 및/또는 ATP의 존재 또는 비존재에 따라 변화하는 한, 당해 플렉시블 잔기의 수 및 위치는 특정 태양에 한정되는 경우는 없다. 즉, 중쇄 및/또는 경쇄의 CDR서열 및/또는 FR서열에 하나 또는 그 이상의 플렉시블 잔기가 포함될 수 있다.

[0679] 조합되는 중쇄 가변영역의 예로서, 랜덤화 가변영역 라이브러리를 적합하게 들 수 있다. 랜덤화 가변영역 라이브러리의 제작방법은 공지의 방법이 적절히 조합된다. 본 발명의 비한정의 일태양에서는 특정 항원으로 면역된 동물, 감염증 환자나 백신을 접종하여 혈중 항체가가 상승한 인간, 암 환자, 자기면역질환의 림프구 유래의 항체 유전자를 토대로 구축된 면역 라이브러리가 랜덤화 가변영역 라이브러리로서 적합하게 사용될 수 있다.

[0680] 또한 본 발명의 비한정의 일태양에서는 게놈 DNA에 있어서의 V 유전자나 재구축되어 기능적인 V 유전자의 CDR서열이 적당한 길이의 코돈 세트를 코드하는 서열을 포함하는 합성 올리고 뉴클레오티드 세트로 치환된 합성 라이브러리도 또한 랜덤화 가변영역 라이브러리로서 적합하게 사용될 수 있다. 이 경우, 중쇄의 CDR3의 유전자 서열의 다양성이 관찰되는 것으로부터, CDR3의 서열만을 치환하는 것도 또한 가능하다. 항원 결합 분자의 가변영역에 있어서 아미노산의 다양성을 만들어내는 기준은 항원 결합 분자의 표면에 노출된 위치의 아미노산 잔기에 다양성을 부여하는 것이다. 표면에 노출된 위치란 항원 결합 분자의 구조, 구조 어셈블 및/또는 모델화된 구조에 기초하여 표면 노출이 가능 및/또는 항원과의 접촉이 가능하다고 판단되는 위치를 말하는데, 일반적으로는 그의 CDR이다. 바람직하게는 표면에 노출된 위치는 InsightII 프로그램(Accelrys)과 같은 컴퓨터 프로그램을 사용하여 항원 결합 분자의 3차원 모델로부터의 좌표를 사용하여 결정된다. 표면에 노출된 위치는 당 기술분야에서 공지인 알고리즘(예를 들면 Lee 및 Richards(J. Mol. Biol. (1971) 55, 379-400), Connolly(J. Appl. Cryst. (1983) 16, 548-558))을 사용하여 결정될 수 있다. 표면에 노출된 위치의 결정은 단백질 모델링에 적합한 소프트웨어 및 항체로부터 얻어지는 3차원 구조 정보를 사용하여 행해질 수 있다. 이러한 목적을 위해 이용할 수 있는 소프트웨어로서 SYBYL 생체 고분자 모듈 소프트웨어(Tripos Associates)를 적합하게 들 수 있다. 일반적으로 또한 바람직하게는 알고리즘이 유저의 입력 사이즈 파라미터를 필요로 하는 경우는, 계산에 있어서 사용되는 프로브의 「사이즈」는 반지름 약 1.4 옹스트롬 이하로 설정된다. 또한 PC용 소프트웨어를 사용한 표면에 노출된 영역 및 에어리어의 결정법이 Pacios(Comput. Chem. (1994) 18 (4), 377-386 및 J. Mol. Model. (1995) 1, 46-53)에 기재되어 있다.

[0681] 또한 본 발명의 비한정의 일태양에서는 항체의 안정성을 향상시키기 위해 CDR영역 및/또는 프레임워크영역을 포함하는 가변영역의 아미노산을 적절히 개변하는 것도 가능하다. 그러한 아미노산의 비한정의 일태양으로서, 1번 위치, 5번 위치, 10번 위치, 30번 위치, 48번 위치, 58번 위치의 아미노산이 예시될 수 있다. 보다 구체적으로는 1번 위치의 Gln, 5번 위치의 Gln, 10번 위치의 Asp, 30번 위치의 Asn, 48번 위치의 Leu, 58번 위치의 Asn이 예시될 수 있다. 항체의 안정성을 향상시키기 위해 이들 아미노산을 생식세포계열의 서열에 포함되어 있는 대응하는 아미노산으로 치환하는 것이 가능하다. 그러한 생식세포계열의 비한정의 일태양의 서열로서 VH3-21의 서열이 예시될 수 있다. 이 경우에 있어서 1번 위치의 Gln이 Glu로, 5번 위치의 Gln이 Val로, 10번 위치의 Asp가 Gly로, 30번 위치의 Asn이 Ser로, 48번 위치의 Leu가 Val로, 58번 위치의 Asn이 Tyr로 치환될 수 있다.

[0682] 또한 본 발명의 비한정의 일태양에서는 건강한 정상인의 림프구 유래의 항체 유전자로부터 구축되고, 그 레퍼토리에 바이어스를 포함하지 않는 항체 서열인 나이브 서열로 이루어지는 나이브 라이브러리도 또한 랜덤화 가변영역 라이브러리로서 특히 적합하게 사용될 수 있다(Gejima 등(Human Antibodies (2002) 11, 121-129) 및 Cardoso 등(Scand. J. Immunol. (2000) 51, 337-344)). 본 발명에서 기재되는 나이브 서열을 포함하는 아미노산 서열이란 이러한 나이브 라이브러리로부터 취득되는 아미노산 서열을 말한다.

[0683] Fc영역

[0684] Fc영역은 항체 중쇄의 정상영역에 유래하는 아미노산 서열을 포함한다. Fc영역은 EU 넘버링으로 표시되는 대략 216번 위치의 아미노산에 있어서의 파파인 절단 부위의 힌지영역의 N말단으로부터 당해 힌지, CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 항체의 중쇄 정상영역의 부분이다. Fc영역은 인간 IgG1으로부터 취득될 수 있는데, IgG의 특정 서브클래스에 한정되는 것도 아니다. 당해 Fc영역의 적합한 예로서, 후술되는 바와 같이 pH 산성역에 있어서의 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 Fc영역을 들 수 있다. 또한 당해 Fc영역의 적합한 예로서, 후술되는 바와 같이 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성을 갖는 Fc영역을 들 수 있다. 그러한 Fc영역의 비한정의 일태양으로서 인간

IgG1(서열번호 : 5), IgG2(서열번호 : 6), IgG3(서열번호 : 7) 또는 IgG4(서열번호 : 8)로 표시되는 Fc영역이 예시된다.

[0685] Fcγ 수용체(FcγR)

[0686] Fcγ 수용체(FcγR로도 기재된다)란 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 단일클론항체의 Fc영역에 결합할 수 있는 수용체를 말하고, 실질적으로 Fcγ 수용체 유전자에 코드되는 단백질의 패밀리 모든 멤버를 의미한다. 인간의 경우는, 이 패밀리에는 아이소폼 FcγRIa, FcγRIb 및 FcγRIc를 포함하는 FcγRI(CD64) ; 아이소폼 FcγRIIa(알로타입 H131 및 R131을 포함한다. 즉, FcγRIIa (H) 및 FcγRIIa (R)), FcγRIIb(FcγRIIb-1 및 FcγRIIb-2를 포함한다) 및 FcγRIIc를 포함하는 FcγRII(CD32) ; 및 아이소폼 FcγRIIIa(알로타입 V158 및 F158을 포함한다. 즉, FcγRIIIa (V) 및 FcγRIIIa (F)) 및 FcγRIIIb(알로타입 FcγRIIIb-NA1 및 FcγRIIIb-NA2를 포함한다)를 포함하는 FcγRIII(CD16), 및 어떠한 미발견의 인간 FcγR류 또는 FcγR 아이소폼 또는 알로타입도 포함되는데, 이들에 한정되는 것은 아니다. FcγR은 인간, 마우스, 랫트, 토끼 및 원숭이를 포함하는데, 이들에 한정되는 것은 아니고, 어떠한 생물 유래여도 된다. 마우스 FcγR류에는 FcγRI(CD64), FcγRII(CD32), FcγRIII(CD16) 및 FcγRIII-2(FcγRIV, CD16-2), 및 어떠한 미발견의 마우스 FcγR류 또는 FcγR 아이소폼 또는 알로타입도 포함되는데, 이들에 한정되지 않는다. 이러한 Fcγ 수용체의 적합한 예로서는 인간 FcγRI(CD64), FcγRIIa(CD32), FcγRIIb(CD32), FcγRIIIa(CD16) 및/또는 FcγRIIIb(CD16)를 들 수 있다. 인간 FcγRI의 폴리뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 : 9(NM_000566.3) 및 10(NP_000557.1)에, 인간 FcγRIIa(알로타입 H131)의 폴리뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 : 11(BC020823.1) 및 12(AAH20823.1)에(알로타입 R131은 서열번호 : 12의 166번째의 아미노산이 Arg로 치환되어 있는 서열이다), FcγRIIb의 폴리뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 : 13(BC146678.1) 및 14(AAI46679.1)에, FcγRIIIa의 폴리뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 : 15(BC033678.1) 및 16(AAH33678.1)에, 및 FcγRIIIb의 폴리뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 : 17(BC128562.1) 및 18(AAI28563.1)에 기재되어 있다(괄호 안은 RefSeq 등의 데이터베이스 등록번호를 나타낸다). Fcγ 수용체가 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 단일클론항체의 Fc영역에 결합 활성을 갖는지 여부는 상기에 기재되는 FACS나 ELISA 포맷 외에 ALPHA 스크린(Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay)이나 표면 플라즈몬 공명(SPR) 현상을 이용한 BIACORE법 등에 의해 확인될 수 있다(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2006) 103 (11), 4005-4010).

[0687] FcγRIa, FcγRIb 및 FcγRIc를 포함하는 FcγRI(CD64) 및 아이소폼 FcγRIIIa(알로타입 V158 및 F158을 포함한다) 및 FcγRIIIb(알로타입 FcγRIIIb-NA1 및 FcγRIIIb-NA2를 포함한다)를 포함하는 FcγRIII(CD16)는 IgG의 Fc영역과 결합하는 α쇄와 세포내에 활성화 시그날을 전달하는 ITAM을 갖는 공통 γ쇄가 회합한다. 한편 아이소폼 FcγRIIa(알로타입 H131 및 R131을 포함한다) 및 FcγRIIc를 포함하는 FcγRII(CD32) 자신의 세포질 도메인에는 ITAM이 포함되어 있다. 이들 수용체는 마크로파지나 마스트 세포, 항원제시세포 등의 많은 면역세포에 발현되고 있다. 이들 수용체가 IgG의 Fc영역에 결합함으로써 전달되는 활성화 시그날에 의해, 마크로파지의 탐식능이나 염증성 사이토카인의 생산, 마스트 세포의 탈과립, 항원제시세포의 기능 항진이 촉진된다. 상기와 같이 활성화 시그날을 전달하는 능력을 갖는 Fcγ 수용체는 본 명세서에 있어서 활성형 Fcγ 수용체라 불린다.

[0688] 한편 FcγRIIb(FcγRIIb-1 및 FcγRIIb-2를 포함한다) 자신의 세포질내 도메인에는 억제형 시그날을 전달하는 ITIM이 포함되어 있다. B세포에서는 FcγRIIb와 B세포 수용체(BCR)의 가교에 의해 BCR로부터의 활성화 시그날이 억제되는 결과 BCR의 항체 생산이 억제된다. 마크로파지의 경우는 FcγRIII와 FcγRIIb의 가교에 의해 탐식능이나 염증성 사이토카인의 생산능이 억제된다. 상기와 같이 억제화 시그날을 전달하는 능력을 갖는 Fcγ 수용체는 본 명세서에 있어서 억제형 Fcγ 수용체라 불린다.

[0689] FcγR에 대한 Fc영역의 결합 활성

[0690] 전술한 바와 같이, 본 발명의 항원 결합 분자에 포함되는 Fc영역으로서 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성을 갖는 Fc영역을 들 수 있다. 그러한 Fc영역의 비한정의 일태양으로서, 인간 IgG1(서열번호 : 5), IgG2(서열번호 : 6), IgG3(서열번호 : 7) 또는 IgG4(서열번호 : 8)로 표시되는 Fc영역이 예시된다. Fcγ 수용체가 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 단일클론항체의 Fc영역에 결합 활성을 갖는지 여부는 상기에 기재되는 FACS나 ELISA 포맷 외에 ALPHA 스크린(Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay)이나 표면 플라즈몬 공명(SPR) 현상을 이용한 BIACORE법 등에 의해 확인될 수 있다(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2006) 103 (11), 4005-4010).

[0691] ALPHA 스크린은 도너와 액셉터의 2개의 비드를 사용하는 ALPHA 테크놀로지에 의해 하기 원리를 토대로 실시된다. 도너 비드에 결합한 분자가 액셉터 비드에 결합한 분자와 생물학적으로 상호작용하여, 2개의 비드가 근접한 상태일 때만 발광 시그날이 검출된다. 레이저에 의해 여기된 도너 비드 내의 감광제(photosensitizer)는

주변의 산소를 여기상태의 일중항산소로 변환한다. 일중항산소는 도너 비드 주변에 확산되어 근접해 있는 액셉터 비드에 도달하면 비드 내의 화학발광 반응을 일으켜 최종적으로 빛이 방출된다. 도너 비드에 결합한 분자와 액셉터 비드에 결합한 분자가 상호작용하지 않을 때는 도너 비드가 생산하는 일중항산소가 액셉터 비드에 도달하지 않기 때문에 화학발광 반응은 일어나지 않는다.

[0692] 예를 들면 도너 비드에 비오틴 표지된 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자가 결합되고, 액셉터 비드에는 글루타티온 S 트랜스페라아제(GST)로 태그화된 Fcγ 수용체가 결합된다. 경합하는 Fc영역 개변체를 포함하는 항원 결합 분자의 비존재하에서는 천연형 Fc영역을 갖는 항원 결합 분자와 Fcγ 수용체는 상호작용하여 520-620 nm의 시그날을 발생시킨다. 태그화되어 있지 않은 Fc영역 개변체를 포함하는 항원 결합 분자는 천연형 Fc영역을 갖는 항원 결합 분자와 Fcγ 수용체 간의 상호작용과 경합한다. 경합 결과 나타나는 형광의 감소를 정량함으로써 상대적인 결합 친화성이 결정될 수 있다. 항체 등의 항원 결합 분자를 Sulfo-NHS-비오틴 등을 사용하여 비오틴화하는 것은 공지이다. Fcγ 수용체를 GST로 태그화하는 방법으로서는 Fcγ 수용체를 코드하는 폴리뉴클레오티드와 GST를 코드하는 폴리뉴클레오티드를 인프레임으로 융합한 융합 유전자가 작동 가능하게 연결된 벡터에 보유된 세포 등에 있어서 발현되고, 글루타티온 칼럼을 사용하여 정제하는 방법 등이 적절히 채용될 수 있다. 얻어진 시그날은 예를 들면 GRAPHPAD PRISM(GraphPad사, San Diego) 등의 소프트웨어를 사용하여 비선형 회귀 해석을 이용하는 1부위 경합(one-site competition) 모델에 적합시킴으로써 적합하게 해석된다.

[0693] 상호작용을 관찰하는 물질의 한쪽(리간드)을 센서칩의 금박막 상에 고정하고, 센서칩의 이면측으로부터 금박막과 유리의 경계면에서 전반사되도록 빛을 조사하면, 반사광의 일부에 반사강도가 저하된 부분(SPR 시그날)이 형성된다. 상호작용을 관찰하는 물질의 다른 쪽(애널라이트)을 센서칩의 표면에 흘려 리간드와 애널라이트가 결합하면, 고정화되어 있는 리간드 분자의 질량이 증가하여 센서칩 표면의 용매의 굴절률이 변화된다. 이 굴절률의 변화에 의해 SPR 시그날의 위치가 시프트된다(반대로 결합이 해리되면 시그날의 위치는 되돌아간다). Biacore 시스템은 상기의 시프트되는 양, 즉 센서칩 표면에서의 질량 변화를 세로축에 취하고, 질량의 시간 변화를 측정 데이터로서 표시한다(센서그램). 센서그램의 커브로부터 키네틱스 : 결합속도상수(ka)와 해리속도상수(kd)가, 당해 상수의 비로부터 어피니티(KD)가 구해진다. BIACORE법에서는 저해 측정법도 적합하게 사용된다. 저해 측정법의 예는 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2006) 103 (11), 4005-4010에 있어서 기재되어 있다.

[0694] <u>Fcγ 수용체(FcγR) 결합 개변 Fc영역</u>

[0695] 본 발명이 포함하는 Fc영역으로서 인간 IgG1(서열번호 : 5), IgG2(서열번호 : 6), IgG3(서열번호 : 7) 또는 IgG4(서열번호 : 8)로 표시되는 Fc영역 외에, 천연형 인간 IgG의 Fc영역의 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성보다도 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성이 높은 FcγR 결합 개변 Fc영역도 적절히 사용될 수 있다. 본 명세서에 있어서 「천연형 인간 IgG의 Fc영역」이란, 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8로 예시되는 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 Fc영역의 EU 넘버링 297번 위치에 결합한 당쇄가 푸코오스 함유 당쇄인 Fc영역을 의미한다. 그러한 FcγR 결합 개변 Fc영역은 천연형 인간 IgG의 Fc영역의 아미노산을 개변함으로써 제작될 수 있다. FcγR 결합 개변 Fc영역의 FcγR에 대한 결합 활성이 천연형 인간 IgG의 Fc영역의 FcγR에 대한 결합 활성보다 높은지 여부는 상기 결합 활성 항목에서 기재된 방법을 사용하여 적절히 실시될 수 있다.

[0696] 본 발명에 있어서 Fc영역의 「아미노산의 개변」 또는 「아미노산 개변」이란, 출발 Fc영역의 아미노산 서열과는 상이한 아미노산 서열로 개변하는 것을 포함한다. 출발 Fc영역의 수식 개변체가 pH 중성역에 있어서 인간 Fcγ 수용체에 결합하는 것이 가능한 한, 어느 Fc영역도 출발 Fc영역으로서 사용될 수 있다. 또한 이미 개변이 가해진 Fc영역을 출발 Fc영역으로 하여 추가적인 개변이 가해진 Fc영역도 본 발명의 Fc영역으로서 적합하게 사용될 수 있다. 출발 Fc영역이란, 폴리펩티드 그 자체, 출발 Fc영역을 포함하는 조성물 또는 출발 Fc영역을 코드하는 아미노산 서열을 의미할 수 있다. 출발 Fc영역에는 항체 항목에서 개설된 재조합에 의해 생산된 공지의 Fc영역이 포함될 수 있다. 출발 Fc영역의 기원은 한정되지 않지만 비인간 동물의 임의의 생물 또는 인간으로부터 취득될 수 있다. 바람직하게는 임의의 생물로서는 마우스, 랫트, 기니피그, 햄스터, 게르빌루스쥐, 고양이, 토끼, 개, 염소, 양, 소, 말, 낙타 및 비인간 영장류로부터 선택되는 생물을 적합하게 들 수 있다. 다른 태양에 있어서 출발 Fc영역은 또한 게잡이원숭이, 마모셋, 빨간털원숭이, 침팬지 또는 인간으로부터 취득될 수 있다. 바람직하게는 출발 Fc영역은 인간 IgG1으로부터 취득될 수 있는데, IgG의 특정 클래스에 한정되는 것도 아니다. 이는 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 Fc영역을 출발 Fc영역으로서 적절히 사용할 수 있는 것을 의미한다. 마찬가지로 본 명세서에 있어서 상기 임의의 생물로부터의 IgG의 임의의 클래스 또는 서브클래스의 Fc영역을 바람직하게는 출발 Fc영역으로서 사용할 수 있는 것을 의미한다. 천연에 존재하는 IgG의 변형체(variant) 또는 조작된 형의 예는 공지의 문헌(Curr. Opin. Biotechnol. (2009) 20 (6), 685-91, Curr. Opin. Immunol. (2008) 20 (4), 460-470, Protein Eng. Des. Sel. (2010) 23 (4), 195-202, 국제공개 WO2009/086320, WO2008/092117,

WO2007/041635 및 WO2006/105338)에 기재되는데 그것들에 한정되지 않는다.

[0697] 개변의 예로서는 하나 이상의 변이, 예를 들면 출발 Fc영역의 아미노산과는 상이한 아미노산 잔기로 치환된 변이, 또는 출발 Fc영역의 아미노산에 대해 하나 이상의 아미노산 잔기의 삽입 또는 출발 Fc영역의 아미노산으로부터 하나 이상의 아미노산의 결실 등이 포함된다. 바람직하게는 개변 후의 Fc영역의 아미노산 서열에는 천연으로 생기지 않는 Fc영역의 적어도 부분을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 그러한 변종은 필연적으로 출발 Fc영역과 100% 미만의 서열 동일성 또는 유사성을 갖는다. 바람직한 실시형태에 있어서 변종은 출발 Fc영역의 아미노산 서열과 약 75%~100% 미만의 아미노산 서열 동일성 또는 유사성, 보다 바람직하게는 약 80%~100% 미만, 보다 바람직하게는 약 85%~100% 미만, 보다 바람직하게는 약 90%~100% 미만, 가장 바람직하게는 약 95%~100% 미만의 동일성 또는 유사성의 아미노산 서열을 갖는다. 본 발명의 비한정의 일태양에 있어서 출발 Fc영역 및 본 발명의 FcγR 결합 개변 Fc영역 사이에는 하나 이상의 아미노산의 차가 있다. 출발 Fc영역과 본 발명의 FcγR 결합 개변 Fc영역의 아미노산의 차이는 특히 전술한 EU 넘버링으로 특정되는 아미노산 잔기의 위치가 특정된 아미노산의 차이로도 적합하게 특정 가능하다. 그러한 변종의 제작방법은 「아미노산의 개변」의 항목에 예시되어 있다.

[0698] 본 발명의 항원 결합 분자에 포함되는 천연형 인간 IgG의 Fc영역의 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성보다도 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성이 높은 FcγR 결합 개변 Fc영역(FcγR 결합 개변 Fc영역)은 어떠한 방법으로도 취득될 수 있는데, 구체적으로는 출발 Fc영역으로서 사용되는 인간 IgG형 면역글로불린의 아미노산의 개변에 의해 당해 FcγR 결합 개변 Fc영역이 취득될 수 있다. 개변을 위한 바람직한 IgG형 면역글로불린의 Fc영역으로서는, 예를 들면 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8로 예시되는 인간 IgG(IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 및 그들의 개변체)의 Fc영역을 들 수 있다.

[0699] 다른 아미노산으로의 개변은 천연형 인간 IgG의 Fc영역의 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성보다도 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성이 높은 한, 어떠한 위치의 아미노산도 개변될 수 있다. 항원 결합 분자가 인간 Fc영역으로서 인간 IgG1의 Fc영역을 포함하고 있는 경우, EU 넘버링 297번 위치에 결합한 당쇄가 푸코오스 함유 당쇄인 천연형 인간 IgG의 Fc영역의 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성보다도 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성이 높은 효과를 초래하는 개변이 포함되어 있는 것이 바람직하다. 이러한 아미노산의 개변으로서는, 예를 들면 국제공개 WO2007/024249, WO2007/021841, WO2006/031370, WO2000/042072, WO2004/029207, WO2004/099249, WO2006/105338, WO2007/041635, WO2008/092117, WO2005/070963, WO2006/020114, WO2006/116260 및 WO2006/023403 등에 있어서 보고되어 있다.

[0700] 그러한 개변이 가능한 아미노산으로서, 예를 들면 EU 넘버링으로 표시되는 221번 위치, 222번 위치, 223번 위치, 224번 위치, 225번 위치, 227번 위치, 228번 위치, 230번 위치, 231번 위치, 232번 위치, 233번 위치, 234번 위치, 235번 위치, 236번 위치, 237번 위치, 238번 위치, 239번 위치, 240번 위치, 241번 위치, 243번 위치, 244번 위치, 245번 위치, 246번 위치, 247번 위치, 249번 위치, 250번 위치, 251번 위치, 254번 위치, 255번 위치, 256번 위치, 258번 위치, 260번 위치, 262번 위치, 263번 위치, 264번 위치, 265번 위치, 266번 위치, 267번 위치, 268번 위치, 269번 위치, 270번 위치, 271번 위치, 272번 위치, 273번 위치, 274번 위치, 275번 위치, 276번 위치, 278번 위치, 279번 위치, 280번 위치, 281번 위치, 282번 위치, 283번 위치, 284번 위치, 285번 위치, 286번 위치, 288번 위치, 290번 위치, 291번 위치, 292번 위치, 293번 위치, 294번 위치, 295번 위치, 296번 위치, 297번 위치, 298번 위치, 299번 위치, 300번 위치, 301번 위치, 302번 위치, 303번 위치, 304번 위치, 305번 위치, 311번 위치, 313번 위치, 315번 위치, 317번 위치, 318번 위치, 320번 위치, 322번 위치, 323번 위치, 324번 위치, 325번 위치, 326번 위치, 327번 위치, 328번 위치, 329번 위치, 330번 위치, 331번 위치, 332번 위치, 333번 위치, 334번 위치, 335번 위치, 336번 위치, 337번 위치, 339번 위치, 376번 위치, 377번 위치, 378번 위치, 379번 위치, 380번 위치, 382번 위치, 385번 위치, 392번 위치, 396번 위치, 421번 위치, 427번 위치, 428번 위치, 429번 위치, 434번 위치, 436번 위치 및 440번 위치의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산을 들 수 있다. 이들 아미노산의 개변에 의해 천연형 인간 IgG의 Fc영역의 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성보다도 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성이 높은 Fc영역(FcγR 결합 개변 Fc영역)을 취득할 수 있다.

[0701] 본 발명에 사용하기 위해 특히 바람직한 개변으로서는, 예를 들면 Fc영역의 EU 넘버링으로 표시되는 ;

[0702] 221번 위치의 아미노산이 Lys 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0703] 222번 위치의 아미노산이 Phe, Trp, Glu 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0704] 223번 위치의 아미노산이 Phe, Trp, Glu 또는 Lys 중 어느 하나,

[0705] 224번 위치의 아미노산이 Phe, Trp, Glu 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0706] 225번 위치의 아미노산이 Glu, Lys 또는 Trp 중 어느 하나,

[0707] 227번 위치의 아미노산이 Glu, Gly, Lys 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0708] 228번 위치의 아미노산이 Glu, Gly, Lys 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0709] 230번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Gly 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0710] 231번 위치의 아미노산이 Glu, Gly, Lys, Pro 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0711] 232번 위치의 아미노산이 Glu, Gly, Lys 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0712] 233번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0713] 234번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0714] 235번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0715] 236번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0716] 237번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0717] 238번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0718] 239번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0719] 240번 위치의 아미노산이 Ala, Ile, Met 또는 Thr 중 어느 하나,

[0720] 241번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Leu, Arg, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0721] 243번 위치의 아미노산이 Leu, Glu, Leu, Gln, Arg, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0722] 244번 위치의 아미노산이 His,

[0723] 245번 위치의 아미노산이 Ala,

[0724] 246번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, His 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0725] 247번 위치의 아미노산이 Ala, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Thr, Val 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0726] 249번 위치의 아미노산이 Glu, His, Gln 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0727] 250번 위치의 아미노산이 Glu 또는 Gln 중 어느 하나,

[0728] 251번 위치의 아미노산이 Phe,

[0729] 254번 위치의 아미노산이 Phe, Met 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0730] 255번 위치의 아미노산이 Glu, Leu 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0731] 256번 위치의 아미노산이 Ala, Met 또는 Pro 중 어느 하나,

[0732] 258번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, His, Ser 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0733] 260번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, His 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0734] 262번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Phe, Ile 또는 Thr 중 어느 하나,

[0735] 263번 위치의 아미노산이 Ala, Ile, Met 또는 Thr 중 어느 하나,

[0736] 264번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0737] 265번 위치의 아미노산이 Ala, Leu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0738] 266번 위치의 아미노산이 Ala, Ile, Met 또는 Thr 중 어느 하나,

[0739] 267번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0740] 268번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Thr, Val 또는 Trp 중 어느 하나,

[0741] 269번 위치의 아미노산이 Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0742] 270번 위치의 아미노산이 Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0743] 271번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0744] 272번 위치의 아미노산이 Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0745] 273번 위치의 아미노산이 Phe 또는 Ile 중 어느 하나,

[0746] 274번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0747] 275번 위치의 아미노산이 Leu 또는 Trp 중 어느 하나,

[0748] 276번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0749] 278번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val 또는 Trp 중 어느 하나,

[0750] 279번 위치의 아미노산이 Ala,

[0751] 280번 위치의 아미노산이 Ala, Gly, His, Lys, Leu, Pro, Gln, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0752] 281번 위치의 아미노산이 Asp, Lys, Pro 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0753] 282번 위치의 아미노산이 Glu, Gly, Lys, Pro 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0754] 283번 위치의 아미노산이 Ala, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Arg 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0755] 284번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Leu, Asn, Thr 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0756] 285번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Lys, Gln, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0757] 286번 위치의 아미노산이 Glu, Gly, Pro 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0758] 288번 위치의 아미노산이 Asn, Asp, Glu 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0759] 290번 위치의 아미노산이 Asp, Gly, His, Leu, Asn, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0760] 291번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Gly, His, Ile, Gln 또는 Thr 중 어느 하나,

[0761] 292번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Pro, Thr 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0762] 293번 위치의 아미노산이 Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어

느 하나,

[0763] 294번 위치의 아미노산이 Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0764] 295번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0765] 296번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr 또는 Val 중 어느 하나,

[0766] 297번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0767] 298번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Met, Asn, Gln, Arg, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0768] 299번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0769] 300번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val 또는 Trp 중 어느 하나,

[0770] 301번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, His 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0771] 302번 위치의 아미노산이 Ile,

[0772] 303번 위치의 아미노산이 Asp, Gly 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0773] 304번 위치의 아미노산이 Asp, His, Leu, Asn 또는 Thr 중 어느 하나,

[0774] 305번 위치의 아미노산이 Glu, Ile, Thr 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0775] 311번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Asn, Thr, Val 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0776] 313번 위치의 아미노산이 Phe,

[0777] 315번 위치의 아미노산이 Leu,

[0778] 317번 위치의 아미노산이 Glu 또는 Gln,

[0779] 318번 위치의 아미노산이 His, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0780] 320번 위치의 아미노산이 Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Asn, Pro, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0781] 322번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Pro, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0782] 323번 위치의 아미노산이 Ile,

[0783] 324번 위치의 아미노산이 Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Arg, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0784] 325번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0785] 326번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0786] 327번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0787] 328번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0788] 329번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp

또는 Tyr 중 어느 하나,

[0789] 330번 위치의 아미노산이 Cys, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0790] 331번 위치의 아미노산이 Asp, Phe, His, Ile, Leu, Met, Gln, Arg, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0791] 332번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0792] 333번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Ser, Thr, Val 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0793] 334번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Phe, Ile, Leu, Pro 또는 Thr 중 어느 하나,

[0794] 335번 위치의 아미노산이 Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0795] 336번 위치의 아미노산이 Glu, Lys 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0796] 337번 위치의 아미노산이 Glu, His 또는 Asn 중 어느 하나,

[0797] 339번 위치의 아미노산이 Asp, Phe, Gly, Ile, Lys, Met, Asn, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[0798] 376번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Val 중 어느 하나,

[0799] 377번 위치의 아미노산이 Gly 또는 Lys 중 어느 하나,

[0800] 378번 위치의 아미노산이 Asp,

[0801] 379번 위치의 아미노산이 Asn,

[0802] 380번 위치의 아미노산이 Ala, Asn 또는 Ser 중 어느 하나,

[0803] 382번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Ile 중 어느 하나,

[0804] 385번 위치의 아미노산이 Glu,

[0805] 392번 위치의 아미노산이 Thr,

[0806] 396번 위치의 아미노산이 Leu,

[0807] 421번 위치의 아미노산이 Lys,

[0808] 427번 위치의 아미노산이 Asn,

[0809] 428번 위치의 아미노산이 Phe 또는 Leu 중 어느 하나,

[0810] 429번 위치의 아미노산이 Met,

[0811] 434번 위치의 아미노산이 Trp,

[0812] 436번 위치의 아미노산이 Ile, 또는

[0813] 440번 위치의 아미노산이 Gly, His, Ile, Leu 또는 Tyr 중 어느 하나

[0814] 의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산의 개변을 들 수 있다. 또한 개변되는 아미노산의 수는 특별히 한정되지 않고, 1개소만의 아미노산이 개변될 수 있으며, 2개소 이상의 아미노산이 개변될 수 있다. 2개소 이상의 아미노산의 개변의 조합으로서는, 예를 들면 표 1(표 1-1~표 1-3)에 기재되는 조합을 들 수 있다.

[0815] [표 1-1]

아미노산의 조합	아미노산의 조합
K370E/P396L/D270E	S239Q/I332Q
Q419H/P396L/D270E	S267D/I332E
V240A/P396L/D270E	S267E/I332E
R255L/P396L/D270E	S267L/A327S
R255L/P396L/D270E	S267Q/A327S
R255L/P396L/D270E/R292G	S298A/I332E
R255L/P396L/D270E	S304T/I332E
R255L/P396L/D270E/Y300L	S324G/I332D
F243L/D270E/K392N/P396L	S324G/I332E
F243L/R255L/D270E/P396L	S324I/I332D
F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L	S324I/I332E
F243L/R292P/Y300L/P396L	T260H/I332E
F243L/R292P/Y300L	T335D/I332E
F243L/R292P/P396L	V240I/V266I
F243L/R292P/V305I	V264I/I332E
F243L/R292P	D265F/N297E/I332E
S298A/E333A/K334A	D265Y/N297D/I332E
E380A/T307A	F243L/V262I/V264W
K326M/E333S	N297D/A330Y/I332E
K326A/E333A	N297D/T299E/I332E
S317A/K353A	N297D/T299F/I332E
A327D/I332E	N297D/T299H/I332E
A330L/I332E	N297D/T299I/I332E
A330Y/I332E	N297D/T299L/I332E
E258H/I332E	N297D/T299V/I332E
E272H/I332E	P230A/E233D/I332E
E272I/N276D	P244H/P245A/P247V
E272R/I332E	S239D/A330L/I332E
E283H/I332E	S239D/A330Y/I332E
E293R/I332E	S239D/H268E/A330Y
F241L/V262I	S239D/I332E/A327A
F241W/F243W	S239D/I332E/A330I

[0816]

[0817] 표 1-2는 표 1-1의 계속되는 표이다.

[0818] [표 1-2]

F243L/V264I	S239D/N297D/I332E
H268D/A330Y	S239D/S298A/I332E
H268E/A330Y	S239D/V264I/I332E
K246H/I332E	S239E/N297D/I332E
L234D/I332E	S239E/V264I/I332E
L234E/I332E	S239N/A330L/I332E
L234G/I332E	S239N/A330Y/I332E
L234I/I332E	S239N/S298A/I332E
L234I/L235D	S239Q/V264I/I332E
L234Y/I332E	V264E/N297D/I332E
L235D/I332E	V264I/A330L/I332E
L235E/I332E	V264I/A330Y/I332E
L235I/I332E	V264I/S298A/I332E
L235S/I332E	Y296D/N297D/I332E
L328A/I332D	Y296E/N297D/I332E
L328D/I332D	Y296H/N297D/I332E
L328D/I332E	Y296N/N297D/I332E
L328E/I332D	Y296Q/N297D/I332E
L328E/I332E	Y296T/N297D/I332E
L328F/I332D	D265Y/N297D/T299L/I332E
L328F/I332E	F241E/F243Q/V262T/V264E
L328H/I332E	F241E/F243R/V262E/V264R
L328I/I332D	F241E/F243Y/V262T/V264R
L328I/I332E	F241L/F243L/V262I/V264I
L328M/I332D	F241R/F243Q/V262T/V264R
L328M/I332E	F241S/F243H/V262T/V264T
L328N/I332D	F241W/F243W/V262A/V264A
L328N/I332E	F241Y/F243Y/V262T/V264T
L328Q/I332D	I332E/A330Y/H268E/A327A
L328Q/I332E	N297D/I332E/S239D/A330L
L328T/I332D	N297D/S298A/A330Y/I332E
L328T/I332E	S239D/A330Y/I332E/K326E
L328V/I332D	S239D/A330Y/I332E/K326T
L328V/I332E	S239D/A330Y/I332E/L234I
L328Y/I332D	S239D/A330Y/I332E/L235D

[0819]

[0820] 표 1-3은 표 1-2의 계속되는 표이다.

[0821] [표 1-3]

L328Y/I332E	S239D/A330Y/I332E/V240I
N297D/I332E	S239D/A330Y/I332E/V264T
N297E/I332E	S239D/A330Y/I332E/V266I
N297S/I332E	S239D/D265F/N297D/I332E
P227G/I332E	S239D/D265H/N297D/I332E
P230A/E233D	S239D/D265I/N297D/I332E
Q295E/I332E	S239D/D265L/N297D/I332E
R255Y/I332E	S239D/D265T/N297D/I332E
S239D/I332D	S239D/D265V/N297D/I332E
S239D/I332E	S239D/D265Y/N297D/I332E
S239D/I332N	S239D/I332E/A330Y/A327A
S239D/I332Q	S239D/I332E/H268E/A327A
S239E/D265G	S239D/I332E/H268E/A330Y
S239E/D265N	S239D/N297D/I332E/A330Y
S239E/D265Q	S239D/N297D/I332E/K326E
S239E/I332D	S239D/N297D/I332E/L235D
S239E/I332E	S239D/V264I/A330L/I332E
S239E/I332N	S239D/V264I/S298A/I332E
S239E/I332Q	S239E/V264I/A330Y/I332E
S239N/I332D	F241E/F243Q/V262T/V264E/I332E
S239N/I332E	F241E/F243R/V262E/V264R/I332E
S239N/I332N	F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E
S239N/I332Q	F241R/F243Q/V262T/V264R/I332E
S239Q/I332D	S239D/I332E/H268E/A330Y/A327A
S239Q/I332E	S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E
S239Q/I332N	F241Y/F243Y/V262T/V264T/N297D/I332E
S267E/L328F	G236D/S267E
S239D/S267E	

[0822]

[0823] 본 발명의 항원 결합 분자에 포함되는 FcγR 결합 도메인과 FcγR 결합 활성을 측정하는 pH의 조건은 pH 산성역 내지 pH 중성역의 조건이 적절히 사용될 수 있다. 본 발명의 항원 결합 분자에 포함되는 FcγR 결합 도메인과 FcγR 결합 활성을 측정하는 조건으로서의 pH 산성역 내지 pH 중성역이란, 통상 pH 5.8~pH 8.0을 의미한다. 바람직하게는 pH 6.0~pH 7.4의 임의의 pH값으로 나타내어지는 범위이고, 바람직하게는 pH 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3 및 7.4로부터 선택되며, 특히 바람직하게는 암조직의 pH에 가까운 pH 6.15~7.4이다(Vaupel 등(Cancer Res. (1989) 49, 6449-6665)). 측정 조건에 사용되는 온도로서 FcγR 결합 도메인과 인간 FcγR 결합 어피니티는 10℃~50℃의 임의의 온도에서 평가될 수 있다. 바람직하게는 인간 FcγR 결합 도메인과 FcγR 결합 어피니티를 결정하기 위해 15℃~40℃의 온도가 사용된다. 보다 바람직하게는 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 및 35℃ 중 어느 하나인 20℃에서 35℃까지의 임의의 온도도 마찬가지로 FcγR 결합 도메인과 FcγR 결합 어피니티를 결정하기 위해 사용된다. 25℃라는 온도는 본 발명의 태양의 비한정의 일례이다.

[0824] 본 명세서에 있어서 FcγR 결합 개변 Fc영역의 FcγR 결합 활성이 천연형 Fc영역의 FcγR 결합 활성보다도 높다는 것은, FcγR 결합 개변 Fc영역의 FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa 및/또는 FcγRIIIb 중 어느 하나의 인간 FcγR 결합 활성이 이들 인간 FcγR 결합 활성에 대한 천연형 Fc영역의 결합 활성보다도 높은 것을 말한다. 예를 들면 상기 해석방법을 토대로 대조로 하는 인간 IgG의 천연형 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자의 결합 활성과 비교하여 FcγR 결합 개변 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자의 결합 활성이 105% 이상, 바람직하게는 110% 이상, 115% 이상, 120% 이상, 125% 이상, 특히 바람직하게는 130% 이상, 135% 이상, 140% 이상, 145% 이상, 150% 이상, 155% 이상, 160% 이상, 165% 이상, 170% 이상, 175% 이상, 180% 이상, 185% 이상, 190% 이상, 195% 이상, 2배 이상, 2.5배 이상, 3배 이상, 3.5배 이상, 4배 이상,

4.5배 이상, 5배 이상, 7.5배 이상, 10배 이상, 20배 이상, 30배 이상, 40배 이상, 50배 이상, 60배 이상, 70배 이상, 80배 이상, 90배 이상, 100배 이상의 결합 활성을 나타내는 것을 말한다. 천연형 Fc영역으로서는 출발 Fc영역도 사용될 수 있고, 동일한 서브클래스의 항체의 천연형 Fc영역도 사용될 수 있다.

[0825] 본 발명에서는 대조로 하는 인간 IgG의 천연형 Fc영역으로서 EU 넘버링으로 표시되는 297번 위치의 아미노산에 결합한 당쇄가 푸코오스 함유 당쇄인 천연형 인간 IgG의 Fc영역이 적합하게 사용된다. EU 넘버링으로 표시되는 297번 위치의 아미노산에 결합한 당쇄가 푸코오스 함유 당쇄인지 여부는 비특허문헌 6에 기재된 수법이 사용될 수 있다. 예를 들면 하기와 같은 방법으로 천연형 인간 IgG의 Fc영역에 결합한 당쇄가 푸코오스 함유 당쇄인지 여부를 판정하는 것이 가능하다. 피험 천연형 인간 IgG에 N-Glycosidase F(Roche diagnostics)를 반응시킴으로써 피험 천연형 인간 IgG로부터 당쇄가 유리된다(Weitzhandler 등(J. Pharma. Sciences (1994) 83, 12, 1670-1675). 다음으로 에탄올을 반응시켜 단백질이 제거된 반응액(Schenk 등(J. Clin. Investigation (2001) 108 (11) 1687-1695)의 농축 건고물이 2-아미노피리딘에 의해 형광 표지된다(Bigge 등(Anal. Biochem. (1995) 230 (2) 229-238). 셀룰로오스 카트리지를 사용한 고상 추출에 의해 탈시약된, 형광 표지된 2-AB화 당쇄가 순상(順相) 크로마토그래피에 의해 해석된다. 검출되는 크로마토그램의 피크를 관찰함으로써 인간 IgG의 천연형 Fc영역에 결합한 당쇄가 푸코오스 함유 당쇄인지 여부를 판정하는 것이 가능하다.

[0826] 대조로 하는 동일한 서브클래스의 항체의 천연형 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자로서는 IgG 단일클론항체의 Fc영역을 갖는 항원 결합 분자가 적절히 사용될 수 있다. 당해 Fc영역의 구조는 서열번호 : 5(데이터베이스 등록번호 AAC82527.1의 N말단에 A 부가), 6(데이터베이스 등록번호 AAB59393.1의 N말단에 A 부가), 7(데이터베이스 등록번호 CAA27268.1) 및 8(데이터베이스 등록번호 AAB59394.1의 N말단에 A 부가)에 기재한다. 또한 어떤 특정 아이소타입 항체의 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자를 피검물질로서 사용하는 경우에는, 당해 특정 아이소타입의 IgG 단일클론항체의 Fc영역을 갖는 항원 결합 분자를 대조로서 사용함으로써 피험 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자에 의한 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성의 효과가 검증된다. 상기와 같이 하여 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성이 높은 것이 검증된 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자가 적절히 선택된다.

[0827] 선택적인 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성을 갖는 Fc영역

[0828] 또한 본 발명에 있어서 적합하게 사용되는 Fcγ 수용체 결합 도메인의 예로서, 특정 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성이 그 밖의 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성보다도 높은 성질을 갖는 Fcγ 수용체 결합 도메인(선택적인 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성을 갖는 Fcγ 수용체 결합 도메인)도 또한 적합하게 들 수 있다. 항원 결합 분자로서 항체가(Fcγ 수용체 결합 도메인으로서 Fc영역이) 사용되는 경우에는, 1분자의 항체는 1분자의 Fcγ 수용체와만 결합할 수 있기 때문에 1분자의 항원 결합 분자는 억제형 Fcγ 수용체에 결합한 상태로 다른 활성형 FcγR에 결합하는 것은 불가능하고, 활성형 Fcγ 수용체에 결합한 상태로 다른 활성형 Fcγ 수용체나 억제형 Fcγ 수용체에 결합하는 것은 불가능하다.

[0829] 활성형 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성이 억제형 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성보다도 높은 Fc영역

[0830] 상기한 바와 같이, 활성형 Fcγ 수용체로서는 FcγRIa, FcγRIb 및 FcγRIc를 포함하는 FcγRI(CD64), FcγRIIa 및 FcγRIIIa(알로타입 V158 및 F158을 포함한다) 및 FcγRIIIb(알로타입 FcγRIIIb-NA1 및 FcγRIIIb-NA2를 포함한다)를 포함하는 FcγRIII(CD16)를 적합하게 들 수 있다. 또한 FcγRIIb(FcγRIIb-1 및 FcγRIIb-2를 포함한다)를 억제형 Fcγ 수용체의 적합한 예로서 들 수 있다.

[0831] 본 명세서에 있어서 특정 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성이 그 이외의 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성보다도 높은 예로서, 예를 들면 활성형 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성이 억제형 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성보다도 높은 경우를 들 수 있다. 이 경우, Fc영역의 FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIIa 및/또는 FcγRIIIb 중 어느 하나의 인간 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성이 FcγRIIb에 대한 결합 활성보다도 높은 것을 말한다. 예를 들면 상기의 해석방법을 토대로, Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자의 FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIIa 및/또는 FcγRIIIb 중 어느 하나의 인간 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성이 FcγRIIb에 대한 결합 활성의 105% 이상, 바람직하게는 110% 이상, 120% 이상, 130% 이상, 140% 이상, 특히 바람직하게는 150% 이상, 160% 이상, 170% 이상, 180% 이상, 190% 이상, 200% 이상, 250% 이상, 300% 이상, 350% 이상, 400% 이상, 450% 이상, 500% 이상, 750% 이상, 10배 이상, 20배 이상, 30배 이상, 40배 이상, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배 이상의 결합 활성을 나타내는 것을 말한다. 활성형 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성이 억제형 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성보다도 높은 Fc영역은 항원 결합 도메인이 막형 분자에 결합하는 본 발명의 항원 결합 분자에 적합하게 포함될 수 있다. 이러한 Fc영역을 포함하는 IgG1 항체는 후술하는 ADCC 활성이 증강되어 있는 것이 알려져 있는 것으로부터, 당해 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자는 본 발명의 의약 조성물에 포함되는 항원 결합 분자로서도 유용하다.

[0832] 본 발명의 비한정의 일태양에서는 활성형 FcγR 수용체에 대한 결합 활성이 억제형 FcγR 수용체에 대한 결합 활성보다도 높은(억제형 FcγR 수용체에 대한 선택적인 결합 활성을 갖는) Fc영역의 예로서, 전술된 EU 넘버링으로 표시되는 221번 위치, 222번 위치, 223번 위치, 224번 위치, 225번 위치, 227번 위치, 228번 위치, 230번 위치, 231번 위치, 232번 위치, 233번 위치, 234번 위치, 235번 위치, 236번 위치, 237번 위치, 238번 위치, 239번 위치, 240번 위치, 241번 위치, 243번 위치, 244번 위치, 245번 위치, 246번 위치, 247번 위치, 249번 위치, 250번 위치, 251번 위치, 254번 위치, 255번 위치, 256번 위치, 258번 위치, 260번 위치, 262번 위치, 263번 위치, 264번 위치, 265번 위치, 266번 위치, 267번 위치, 268번 위치, 269번 위치, 270번 위치, 271번 위치, 272번 위치, 273번 위치, 274번 위치, 275번 위치, 276번 위치, 278번 위치, 279번 위치, 280번 위치, 281번 위치, 282번 위치, 283번 위치, 284번 위치, 285번 위치, 286번 위치, 288번 위치, 290번 위치, 291번 위치, 292번 위치, 293번 위치, 294번 위치, 295번 위치, 296번 위치, 297번 위치, 298번 위치, 299번 위치, 300번 위치, 301번 위치, 302번 위치, 303번 위치, 304번 위치, 305번 위치, 311번 위치, 313번 위치, 315번 위치, 317번 위치, 318번 위치, 320번 위치, 322번 위치, 323번 위치, 324번 위치, 325번 위치, 326번 위치, 327번 위치, 328번 위치, 329번 위치, 330번 위치, 331번 위치, 332번 위치, 333번 위치, 334번 위치, 335번 위치, 336번 위치, 337번 위치, 339번 위치, 376번 위치, 377번 위치, 378번 위치, 379번 위치, 380번 위치, 382번 위치, 385번 위치, 392번 위치, 396번 위치, 421번 위치, 427번 위치, 428번 위치, 429번 위치, 434번 위치, 436번 위치 및 440번 위치의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산이 천연형 Fc영역과 상이한 아미노산으로 개변되어 있는 Fc영역을 적합하게 들 수 있다.

[0833] 본 발명의 비한정의 일태양에서는 활성형 FcγR 수용체에 대한 결합 활성이 억제형 FcγR 수용체에 대한 결합 활성보다도 높은(억제형 FcγR 수용체에 대한 선택적인 결합 활성을 갖는) Fc영역의 예로서, 표 1-1 내지 1-3에 기재되는 복수의 아미노산이 천연형 Fc영역과 상이한 아미노산으로 개변되어 있는 Fc영역을 적합하게 들 수 있다.

[0834] 억제형 FcγR 수용체에 대한 결합 활성이 활성형 FcγR 수용체에 대한 결합 활성보다도 높은 Fc영역

[0835] 본 명세서에 있어서 특정 FcγR 수용체에 대한 결합 활성이 그 이외의 FcγR 수용체에 대한 결합 활성보다도 높은 예로서, 예를 들면 억제형 FcγR 수용체에 대한 결합 활성이 활성형 FcγR 수용체에 대한 결합 활성보다도 높은 경우를 들 수 있다. 이 경우, Fc영역의 FcγRIIb에 대한 결합 활성이 FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIIa 및/또는 FcγRIIIb 중 어느 하나의 인간 FcγR 수용체에 대한 결합 활성보다도 높은 것을 말한다. 예를 들면 상기의 해석 방법을 토대로, Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자의 FcγRIIb에 대한 결합 활성이 FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIIa 및/또는 FcγRIIIb 중 어느 하나의 인간 FcγR 수용체에 대한 결합 활성의 105% 이상, 바람직하게는 110% 이상, 120% 이상, 130% 이상, 140% 이상, 특히 바람직하게는 150% 이상, 160% 이상, 170% 이상, 180% 이상, 190% 이상, 200% 이상, 250% 이상, 300% 이상, 350% 이상, 400% 이상, 450% 이상, 500% 이상, 750% 이상, 10배 이상, 20배 이상, 30배 이상, 40배 이상, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배 이상의 결합 활성을 나타내는 것을 말한다. 억제형 FcγR 수용체에 대한 결합 활성이 활성형 FcγR 수용체에 대한 결합 활성보다도 높은 Fc영역은 항원 결합 도메인이 가용형 분자에 결합하는 본 발명의 항원 결합 분자에 적합하게 포함될 수 있다.

[0836] 본 발명의 비한정의 일태양에서는 억제형 FcγR 수용체에 대한 결합 활성이 활성형 FcγR 수용체에 대한 결합 활성보다도 높은(억제형 FcγR 수용체에 대한 선택적인 결합 활성을 갖는) Fc영역의 예로서, 상기 Fc영역의 아미노산 중 EU 넘버링으로 표시되는 238 또는 328의 아미노산이 천연형 Fc영역과 상이한 아미노산으로 개변되어 있는 Fc영역을 적합하게 들 수 있다.

[0837] 또한 본 발명의 비한정의 일태양에서는 억제형 FcγR 수용체에 대한 결합 활성이 활성형 FcγR 수용체에 대한 결합 활성보다도 높은(억제형 FcγR 수용체에 대한 선택적인 결합 활성을 갖는) Fc영역의 예로서, 상기 Fc영역의 EU 넘버링으로 표시되는 아미노산으로서 EU 넘버링으로 표시되는 238의 아미노산이 Asp 또는 328의 아미노산이 Glu 중 어느 하나 이상으로 개변되어 있는 Fc영역을 적합하게 들 수 있다. 또한 억제형 FcγR 수용체에 대한 선택적인 결합 활성을 갖는 Fc영역으로서 US2009/0136485에 기재되어 있는 Fc영역 또는 개변도 적절하게 선택할 수 있다.

[0838] 또한 본 발명의 비한정의 일태양에서는, 상기 Fc영역의 EU 넘버링으로 표시되는 아미노산으로서 EU 넘버링으로 표시되는 238의 아미노산이 Asp 또는 328의 아미노산이 Glu 중 어느 하나 이상으로 개변되어 있는 Fc영역을 적합하게 들 수 있다.

[0839] 또한 본 발명의 비한정의 일태양에서는, PCT/JP2012/054624에서 예시되는 EU 넘버링으로 표시되는 238번 위치의 Pro의 Asp로의 치환 및 EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치의 아미노산이 Trp, EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치의 아미노산이 Phe, EU 넘버링으로 표시되는 267번 위치의 아미노산이 Val, EU 넘버링으로 표시되는 267번

위치의 아미노산이 Gln, EU 넘버링으로 표시되는 268번 위치의 아미노산이 Asn, EU 넘버링으로 표시되는 271번 위치의 아미노산이 Gly, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Leu, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Gln, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Glu, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Met, EU 넘버링으로 표시되는 239번 위치의 아미노산이 Asp, EU 넘버링으로 표시되는 267번 위치의 아미노산이 Ala, EU 넘버링으로 표시되는 234번 위치의 아미노산이 Trp, EU 넘버링으로 표시되는 234번 위치의 아미노산이 Tyr, EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치의 아미노산이 Ala, EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치의 아미노산이 Asp, EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치의 아미노산이 Glu, EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치의 아미노산이 Leu, EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치의 아미노산이 Met, EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치의 아미노산이 Tyr, EU 넘버링으로 표시되는 330번 위치의 아미노산이 Lys, EU 넘버링으로 표시되는 330번 위치의 아미노산이 Arg, EU 넘버링으로 표시되는 233번 위치의 아미노산이 Asp, EU 넘버링으로 표시되는 268번 위치의 아미노산이 Asp, EU 넘버링으로 표시되는 268번 위치의 아미노산이 Glu, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Asp, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Ser, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Thr, EU 넘버링으로 표시되는 323번 위치의 아미노산이 Ile, EU 넘버링으로 표시되는 323번 위치의 아미노산이 Leu, EU 넘버링으로 표시되는 323번 위치의 아미노산이 Met, EU 넘버링으로 표시되는 296번 위치의 아미노산이 Asp, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Ala, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Asn, EU 넘버링으로 표시되는 330번 위치의 아미노산이 Met 중 어느 하나 이상으로 개변되어 있는 Fc영역을 적합하게 들 수 있다.

[0840] 당쇄가 수식된 Fc영역

[0841] 본 발명이 제공하는 항원 결합 분자에 포함되는 Fc영역으로서, Fc영역에 결합한 당쇄의 조성이 푸코오스 결손 당쇄를 결합한 Fc영역의 비율이 높아지도록, 또는 바이섹팅 N-아세틸글루코사민이 부가된 Fc영역의 비율이 높아지도록 수식된 Fc영역도 포함될 수 있다. 항체 Fc영역에 결합하는 N-글리코시드 결합 복합형 당쇄 환원 말단의 N-아세틸글루코사민으로부터 푸코오스 잔기를 제거하면 FcγRIIIa에 대한 친화성이 증강되는 것이 것이 알려져 있다(비특허문헌 6). 이러한 Fc영역을 포함하는 IgG1 항체는 후술하는 ADCC 활성이 증강되어 있는 것이 알려져 있는 것으로부터, 당해 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자는 본 발명의 의약 조성물에 포함되는 항원 결합 분자로서도 유용하다. 항체 Fc영역에 결합하는 N-글리코시드 결합 복합형 당쇄 환원 말단의 N-아세틸글루코사민으로부터 푸코오스 잔기가 제거된 항체로서는, 예를 들면 다음과 같은 항체 ;

[0842] 글리코실화가 수식된 항체(국제공개 WO1999/054342 등),

[0843] 당쇄에 부가하는 푸코오스가 결손된 항체(국제공개 WO2000/061739, WO2002/031140, WO2006/067913 등),

[0844] 보다 구체적으로는 항체 Fc영역에 결합하는 N-글리코시드 결합 복합형 당쇄 환원 말단의 N-아세틸글루코사민으로부터 푸코오스 잔기가 제거된 항체의 다른 비한정의 일태양으로서, 당쇄에 부가하는 푸코오스가 결손된 항체(국제공개 WO2000/061739, WO2002/031140, WO2006/067913 등)을 제작하기 위해, 당쇄 수식을 받는 폴리펩티드의 당쇄 구조를 형성하는 활성이 개변된 결과, 당쇄에 푸코오스를 부가하는 능력이 낮은 숙주세포가 제작된다. 당해 숙주세포에 있어서 목적하는 항체 유전자를 발현함으로써, 당해 숙주세포의 배양액으로부터 그 당쇄 중의 푸코오스가 결손된 당해 항체가 회수될 수 있다. 폴리펩티드의 당쇄 구조를 형성하는 활성으로서, 푸코실 트랜스페라아제(EC 2.4.1.152), 푸코오스 트랜스포터(SLC35C1), GMD(GDP-만노오스 4,6-디히드라타아제)(EC 4.2.1.47), Fx(GDP-케토-6-데옥시만노오스 3,5-에피머라아제, 4-리덕타아제)(EC 1.1.1.271) 및 GFPP(GDP-β-L-푸코오스 피로포스포릴라아제)(EC 2.7.7.30)로 이루어진 군으로부터 선택되는 효소 또는 트랜스포터의 활성을 비한정의 적합한 예로서 들 수 있다. 이들 효소 또는 트랜스포터는 그 활성을 발휘할 수 있다면 반드시 그 구조가 특정되는 것은 아니다. 본 명세서에 있어서는 이들 활성을 발휘하는 것이 가능한 단백질을 기능성 단백질이라 한다. 이들 활성을 개변하는 방법의 비한정의 일태양으로서 이들 활성의 결실을 들 수 있다. 이들 활성이 결실된 숙주세포를 제작하기 위해 이들 기능성 단백질의 유전자를 기능 불능으로 파괴하는 방법 등 공지의 방법이 적절히 채용될 수 있다(국제공개 WO2000/061739, WO2002/031140, WO2006/067913 등). 그러한 활성이 결실된 숙주세포는 CHO 세포, BHK 세포, NS0 세포, SP2/0 세포, YO 골수종세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포, HEK293 세포 또는 하이브리도마 세포 등에 내재성인 이들 기능성 단백질의 유전자를 기능 불능으로 파괴하는 방법 등에 의해 제작될 수 있다.

[0845] 바이섹팅 GlcNAc을 갖는 당쇄를 갖는 항체(국제공개 WO2002/079255 등)가 공지이다. 비한정의 일태양에서는 바이섹팅 GlcNAc을 갖는 당쇄를 갖는 항체를 제작하기 위해, GnTIII(β-1,4-만노실-글리코프로테인, 4-β-N-아세틸글루코사미닐트랜스페라아제)(EC 2.4.1.144) 활성 또는 GalT(β-1,4-갈락토실트랜스페라아제)(EC 2.4.1.38)

활성을 갖는 기능성 단백질을 코드하는 유전자를 발현하는 숙주세포가 제작된다. 다른 비한정의 적합한 일태양에서는 상기 기능성 단백질에 더하여 인간 ManII(만노시다아제 II)(3.2.1.114) 활성을 갖는 기능성 단백질을 코드하는 유전자, GnTI(β-1,2-아세틸글루코사미닐트랜스페라아제 I)(EC 2.4.1.94) 활성을 갖는 기능성 단백질을 코드하는 유전자, GnTII(β-1,2-아세틸글루코사미닐트랜스페라아제 II)(EC 2.4.1.143) 활성을 갖는 기능성 단백질을 코드하는 유전자, ManI(만노시다아제)(EC 3.2.1.113) 활성을 갖는 기능성 단백질을 코드하는 유전자 및 α-1,6-푸코실트랜스페라아제(EC 2.4.1.68)와 공발현하는 숙주세포가 제작된다(국제공개 WO2004/065540).

[0846] 상기와 같은 당쇄에 푸코오스를 부가하는 능력이 낮은 숙주세포 및 바이섹팅 GlcNAc 구조를 포함하는 당쇄를 형성하는 활성을 갖는 숙주세포에 항체 유전자를 포함하는 발현 벡터를 형질 도입함으로써, 항체 Fc영역에 결합하는 N-글리코시드 결합 복합형 당쇄 환원 말단의 N-아세틸글루코사민으로부터 푸코오스 잔기가 제거된 항체 및 바이섹팅 GlcNAc을 갖는 당쇄를 갖는 항체가 각각 제작될 수 있다. 이들 항체의 제조방법은 본 발명의 Fc영역에 결합한 당쇄의 조성이 푸코오스 결손 당쇄를 결합한 Fc영역의 비율이 높아지도록, 또는 바이섹팅 N-아세틸글루코사민이 부가된 Fc영역의 비율이 높아지도록 수식된 개변 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자의 제조방법에도 적용하는 것이 가능하다. 이러한 제조방법에 의해 제작된 본 발명의 항원 결합 분자에 포함되는 Fc영역에 결합한 당쇄의 조성은 상기 「Fcγ 수용체(FcγR) 결합 개변 Fc영역」에서 기재된 방법에 의해 확인될 수 있다.

[0847] 다중 특이성 항원 결합 분자 또는 다중 파라토픽 항원 결합 분자(multiparatopic antigen-binding molecules)

[0848] 그 하나 이상의 항원 결합 도메인이 항원 분자 중의 제1 에피토프에 결합하고, 그 하나 이상의 다른 항원 결합 도메인이 항원 분자 중의 제2 에피토프에 결합하는 특징을 갖는 2개 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 분자는 그 반응의 특이성이라는 관점에서 다중 특이성 항원 결합 분자라 불린다. 1분자의 항원 결합 분자에 포함되는 2종류의 항원 결합 도메인에 의해 당해 항원 결합 분자가 2개의 상이한 에피토프에 결합하는 경우, 당해 항원 결합 분자는 이중 특이성 항원 결합 분자라 불린다. 또한 1분자의 항원 결합 분자에 포함되는 3종류의 항원 결합 도메인에 의해 당해 항원 결합 분자가 3개의 상이한 에피토프에 결합하는 경우, 당해 항원 결합 분자는 삼중 특이성 항원 결합 분자라 불린다.

[0849] 항원 분자 중의 제1 에피토프에 결합하는 항원 결합 도메인 중의 파라토프와 제1 에피토프와 구조가 상이한 제2 에피토프에 결합하는 항원 결합 도메인 중의 파라토프는 그 구조가 서로 상이하다. 이 때문에 그 하나 이상의 항원 결합 도메인이 항원 분자 중의 제1 에피토프에 결합하고, 그 하나 이상의 다른 항원 결합 도메인이 항원 분자 중의 제2 에피토프에 결합하는 특징을 갖는 2개 이상의 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 분자는 그 구조의 특이성이라는 관점에서 다중 파라토픽 항원 결합 분자라 불린다. 1분자의 항원 결합 분자에 포함되는 2종류의 항원 결합 도메인에 의해 당해 항원 결합 분자가 2개의 상이한 에피토프에 결합하는 경우, 당해 항원 결합 분자는 이중 파라토픽 항원 결합 분자라 불린다. 또한 1분자의 항원 결합 분자에 포함되는 3종류의 항원 결합 도메인에 의해 당해 항원 결합 분자가 3개의 상이한 에피토프에 결합하는 경우, 당해 항원 결합 분자는 삼중 파라토픽 항원 결합 분자라 불린다.

[0850] 하나 또는 복수의 항원 결합 도메인을 포함하는 다가의 다중 특이성 또는 다중 파라토픽 항원 결합 분자와 그의 조제방법은 Conrath 등(J.Biol.Chem. (2001) 276 (10) 7346-7350), Muyldermans(Rev. Mol. Biotech. (2001) 74, 277-302) 및 Kontermann R.E. (2011) Bispecific Antibodies(Springer-Verlag) 등의 비특허문헌 및 국제공개 WO1996/034103 또는 WO1999/023221 등의 특허문헌 등에도 기재되어 있다. 이들에 기재된 다중 특이성 또는 다중 파라토픽 항원 결합 분자와 그의 조제방법을 사용함으로써, 본 발명의 항원 결합 분자를 제작하는 것이 가능하다.

[0851] 이중 특이성 항체와 그의 제작방법

[0852] 상기와 같은 다중 특이성 또는 다중 파라토픽 항원 결합 분자와 그의 조제방법의 일태양으로서, 이중 특이성 항체와 그의 제작방법이 하기에 예시된다. 이중 특이성 항체란, 상이한 에피토프에 대해 특이적으로 결합하는 2종류의 가변영역을 포함하는 항체이다. IgG형의 이중 특이성 항체는 IgG 항체를 생산하는 하이브리도마 2종을 융합함으로써 생성되는 hybrid hybridoma(quadroma)에 의해 분비시키는 것이 가능하다(Milstein 등(Nature (1983) 305, 537-540).

[0853] 이중 특이성 항체를 상기 항체의 항목에서 기재된 바와 같은 재조합 수법을 사용하여 제조하는 경우, 목적의 2종의 가변영역을 포함하는 중쇄를 코드하는 유전자를 세포에 도입하여 그들을 공발현시키는 방법이 채용될 수 있다. 그러나 이러한 공발현시키는 방법에 있어서의 중쇄의 조합을 고려하는 것만으로도, (i) 제1 에피토프에 결합하는 가변영역을 포함하는 중쇄와 제2 에피토프에 결합하는 가변영역을 포함하는 중쇄가 한쌍이 된 중쇄의

조합, (ii) 제1 에피토프에 결합하는 가변영역을 포함하는 중쇄만이 한쌍이 된 중쇄의 조합, (iii) 제2 에피토프에 결합하는 가변영역을 포함하는 중쇄만이 한쌍이 된 중쇄의 조합이 2 : 1 : 1의 분자 수의 비율로 존재하는 혼합물이 된다. 이들 3종류의 중쇄의 조합의 혼합물로부터 목적의 중쇄의 조합을 포함하는 항원 결합 분자를 정제하는 것은 곤란하다.

[0854] 이러한 재조합 수법을 사용하여 이중 특이성 항체를 제조할 때, 중쇄를 구성하는 CH3 도메인에 적당한 아미노산 치환의 개변을 가함으로써 헤테로 조합의 중쇄를 포함하는 이중 특이성 항체가 우선적으로 분비될 수 있다. 구체적으로는, 한쪽 중쇄의 CH3 도메인에 존재하는 아미노산 측쇄를 보다 큰 측쇄(knob(「돌기」의 의미))로 치환하고, 다른 한쪽 중쇄의 CH3 도메인에 존재하는 아미노산 측쇄를 보다 작은 측쇄(hole(「공극」의 의미))로 치환함으로써, 돌기가 공극 내에 배치될 수 있도록 하여 이종(異種)의 중쇄 형성의 촉진 및 동종(同種)의 중쇄 형성의 저해를 일으키는 방법이다(국제공개 WO1996027011, Ridgway 등(Protein Engineering (1996) 9, 617-621), Merchant 등(Nat. Biotech. (1998) 16, 677-681)).

[0855] 또한 폴리펩티드의 회합 또는 폴리펩티드에 의해 구성되는 이종 다량체 회합의 제어방법을 중쇄의 회합에 이용함으로써 이중 특이성 항체를 제작하는 기술도 알려져 있다. 즉, 중쇄 내의 계면을 형성하는 아미노산 잔기를 개변함으로써 동일 서열을 갖는 중쇄의 회합이 저해되어, 서열이 상이한 2개의 중쇄가 형성되도록 제어하는 방법이 이중 특이성 항체의 제작에 채용될 수 있다(국제공개 WO2006/106905). 이러한 방법도 이중 특이성 항체를 제조할 때 채용될 수 있다.

[0856] 본 발명의 비한정의 일태양에 있어서의 항원 결합 분자에 포함되는 Fc영역으로서는, 상기 이중 특이성 항체를 기원으로 하는 Fc영역을 형성하는 2개의 폴리펩티드가 적절히 사용될 수 있다. 보다 구체적으로는, Fc영역을 형성하는 2개의 폴리펩티드로서 그 한쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 349의 아미노산이 Cys, 366의 아미노산이 Trp이고, 다른 쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 356의 아미노산이 Cys, 366의 아미노산이 Ser, 368의 아미노산이 Ala, 407의 아미노산이 Val인 것을 특징으로 하는 2개의 폴리펩티드가 적합하게 사용된다.

[0857] 그 밖의 본 발명의 비한정의 일태양에 있어서의 Fc영역으로서는, Fc영역을 형성하는 2개의 폴리펩티드로서 그 한쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 409의 아미노산이 Asp이고, 다른 쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 399의 아미노산이 Lys인 것을 특징으로 하는 2개의 폴리펩티드가 적합하게 사용된다. 상기 태양에서는 409의 아미노산은 Asp 대신에 Glu, 399의 아미노산은 Lys 대신에 Arg일 수도 있다. 또한 399의 아미노산인 Lys에 더하여 360의 아미노산으로서 Asp 또는 392의 아미노산으로서 Asp도 적합하게 추가될 수 있다.

[0858] 본 발명의 다른 비한정의 일태양에 있어서의 Fc영역으로서는, Fc영역을 형성하는 2개의 폴리펩티드로서 그 한쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 370의 아미노산이 Glu이고, 다른 쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 357의 아미노산이 Lys인 것을 특징으로 하는 2개의 폴리펩티드가 적합하게 사용된다.

[0859] 본 발명의 또 다른 비한정의 일태양에 있어서의 Fc영역으로서는, Fc영역을 형성하는 2개의 폴리펩티드로서 그 한쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 439의 아미노산이 Glu이고, 다른 쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 356의 아미노산이 Lys인 것을 특징으로 하는 2개의 폴리펩티드가 적합하게 사용된다.

[0860] 본 발명의 다른 비한정의 일태양에 있어서의 Fc영역으로서는, 이들이 조합된 아래의 태양 중 어느 하나 ;

[0861] (i) Fc영역을 형성하는 2개의 폴리펩티드로서 그 한쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 409의 아미노산이 Asp, 370의 아미노산이 Glu이고, 다른 쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 399의 아미노산이 Lys, 357의 아미노산이 Lys인 것을 특징으로 하는 2개의 폴리펩티드(본 태양에서는 EU 넘버링으로 표시되는 370의 아미노산인 Glu 대신에 Asp여도 되고, EU 넘버링으로 표시되는 370의 아미노산인 Glu 대신에 392의 아미노산인 Asp여도 된다),

[0862] (ii) Fc영역을 형성하는 2개의 폴리펩티드로서 그 한쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 409의 아미노산이 Asp, 439의 아미노산이 Glu이고, 다른 쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 399의 아미노산이 Lys, 356의 아미노산이 Lys인 것을 특징으로 하는 2개의 폴리펩티드(본 태양에서는 EU 넘버링으로 표시되는 439의 아미노산인 Glu 대신에 360의 아미노산인 Asp, EU 넘버링으로 표시되는 392의 아미노산인 Asp 또는 439의 아미노산인 Asp여도 된다),

[0863] (iii) Fc영역을 형성하는 2개의 폴리펩티드로서 그 한쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 370의 아미노산이 Glu, 439의 아미노산이 Glu이고, 다른 쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 357의 아미노산이 Lys, 356의 아미노산이 Lys인 것을 특징으로 하는 2개의 폴리펩티드, 또는

[0864] Fc영역을 형성하는 2개의 폴리펩티드로서 그 한쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 409의 아미노산이 Asp, 370의 아미노산이 Glu, 439의 아미노산이 Glu이고, 다른 쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 399의 아미노산이 Lys, 357의 아미노산이 Lys, 356의 아미노산이 Lys인 것을 특징으로 하는 2개의 폴리펩티드(본 태양에서는 EU 넘버링으로 표시되는 370의 아미노산을 Glu로 치환하지 않아도 되고, 또한 370의 아미노산을 Glu로 치환하지 않고 439의 아미노산인 Glu 대신에 Asp 또는 439의 아미노산인 Glu 대신에 392의 아미노산인 Asp여도 된다.)

[0865] 가 적합하게 사용된다.

[0866] 또한 본 발명의 다른 비한정의 일태양에 있어서, Fc영역을 형성하는 2개의 폴리펩티드로서 그 한쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 356의 아미노산이 Lys이고, 다른 쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 435의 아미노산이 Arg, 439의 아미노산이 Glu인 것을 특징으로 하는 2개의 폴리펩티드도 적합하게 사용된다.

[0867] 또한 본 발명의 다른 비한정의 일태양에 있어서, Fc영역을 형성하는 2개의 폴리펩티드로서 그 한쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 356의 아미노산이 Lys, 357의 아미노산이 Lys이고, 다른 쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 370의 아미노산이 Glu, 435의 아미노산이 Arg, 439의 아미노산이 Glu인 것을 특징으로 하는 2개의 폴리펩티드도 적합하게 사용된다.

[0868] 또한 상기 이종의 중쇄의 회합기술 외에, 제1 에피토프에 결합하는 가변영역을 형성하는 경쇄 및 제2 에피토프에 결합하는 가변영역을 형성하는 경쇄를 각각 제1 에피토프에 결합하는 가변영역을 형성하는 중쇄 및 제2 에피토프에 결합하는 가변영역을 형성하는 중쇄에 회합시키는 이종의 경쇄의 회합기술로서 알려지는 CrossMab 기술(Scaefer 등(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (2011) 108, 11187-11192))도 본 발명이 제공하는 다중 특이성 또는 다중 파라토픽 항원 결합 분자를 제작하기 위해 사용될 수 있다. 또한 상이한 IgG4의 중쇄끼리의 교환이 일어나는 것을 이용하여 제1 에피토프에 결합하는 가변영역을 형성하는 중쇄 및 제2 에피토프에 결합하는 가변영역을 형성하는 중쇄를 회합시키는 이종의 중쇄의 회합기술로서 알려지는 Fab-Arm Exchange(Labrijn 등(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2013) 110, 5145-5150), WO2008119353)도 본 발명이 제공하는 다중 특이성 또는 다중 파라토픽 항원 결합 분자를 제작하기 위해 사용될 수 있다.

[0869] 이펙터 세포(Effector cells)

[0870] 본 발명에 있어서 「이펙터 세포」란, T세포($CD4^+$(헬퍼 림프구) T세포 및/또는 $CD8^+$(세포상해성) T세포), 다핵백혈구(호중구, 호산구, 호염기구, 비만세포), 단구, 마크로파지, 조직구 또는 내츄럴 킬러세포(NK세포), NK 유사 T세포, 쿠퍼세포, 랑게르한스 세포 또는 림포카인 활성화 킬러세포(LAK세포) 등의 백혈구, B 림프구 또는 수상 세포 또는 마크로파지 등의 항원 제시 세포를 포함하는 가장 넓은 의미로 사용될 수 있는데, 적합한 이펙터 세포의 예로서는 $CD8^+$(세포상해성) T세포, NK세포 또는 마크로파지를 들 수 있다. 이펙터 세포의 세포막에 발현하는 막형 분자라면, 본 발명의 항원 결합 분자에 포함되는 하나 이상의 항원 결합 도메인이 결합하는 항원으로서 사용될 수 있는데, 적합한 막형 분자로서는 TCR을 구성하는 폴리펩티드, CD3, CD2, CD28, CD44, CD16, CD32, CD64 또는 NKG2D 또는 NK세포 활성화 리간드가 비한정의 예로서 예시될 수 있다.

[0871] 세포상해성 물질

[0872] 본 발명의 항원 결합 분자가 암세포에 결합하여 세포상해 활성을 발휘하기 위해 항원 결합 분자에 세포상해성 물질이 결합되어 있어도 된다. 세포상해성 물질로서는 아래에 예시되는 화학요법제여도 되고, 또한 Curr Opin Chem Biol (2010) 14, 529-37이나 국제공개 2009/140242에 개시되어 있는 화합물이어도 되며, 이들 화합물이 적절한 링커 등으로 항원 결합 분자에 결합된다. 본 발명의 항원 결합 분자가 의약 조성물로서 사용되는 경우, 대상(피험자, 환자 등)에 당해 항원 결합 분자를 투여하기 전에 이들 세포상해성 물질을 결합시키는 것도 가능하고, 투여 전후 또는 동시에 투여하는 것도 가능하다.

[0873] 또한 후술되는 화학요법제, 독성 펩티드 또는 방사성 화학물질 등의 세포상해성 물질이 결합된 수식 항원 결합 분자 수식물도 본 발명의 세포상해 활성을 갖는 항원 결합 분자로서 적합하게 사용될 수 있다. 이러한 수식 항원 결합 분자(이하, 항원 결합 분자 약물 콘쥬게이트라 칭한다.)는 얻어진 항원 결합 분자를 화학적으로 수식함

으로써 취득될 수 있다. 또한 항원 결합 분자의 수식방법으로서 항체 약물 콘쥬게이트 등의 분야에 있어서 이미 확립되어 있는 방법이 적절히 사용될 수 있다. 또한 독성 펩티드가 결합된 수식 항원 결합 분자는 당해 독성 펩티드를 코드하는 유전자와 본 발명의 항원 결합 분자를 코드하는 유전자가 인프레임으로 연결된 융합 유전자를 적절한 숙주세포 중에서 발현시킨 후에, 당해 세포의 배양액으로부터 단리함으로써 취득될 수 있다.

[0874] 본 발명의 항원 결합 분자에 결합되는 화학요법제가 예시될 수 있다 : 아자리빈(azaribine), 아나스트로졸(anastrozole), 아자시티딘(azacytidine), 블레오마이신(bleomycin), 보르테조밉(bortezomib), 브리오스타틴-1(bryostatin-1), 부설판(busulfan), 캄토테신(camptothecin), 10-히드록시캄토테신(10-hydroxycamptothecin), 카르무스틴(carmustine), 셀레브렉스(celebrex), 클로람부실(chlorambucil), 시스플라틴(cisplatin), 이리노테칸(irinotecan), 카르보플라틴(carboplatin), 클라드리빈(cladribine), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 시타라빈(cytarabine), 다카르바진(dacarbazine), 도세탁셀(docetaxel), 닥티노마이신(dactinomycin), 다우노마이신 글루쿠로니드(daunomycin glucuronide), 다우노루비신(daunorubicin), 덱사메타손(dexamethasone), 디에틸스틸베스트롤(diethylstilbestrol), 독소루비신(doxorubicin), 독소루비신 글루쿠로니드(doxorubicin glucuronide), 에피루비신(epirubicin), 에티닐 에스트라디올(ethinyl estradiol), 에스트라무스틴(estramustine), 에토포시드(etoposide), 에토포시드 글루쿠로니드(etoposide glucuronide), 플록수리딘(floxuridine), 플루다라빈(fludarabine), 플루타미드(flutamide), 플루오로우라실(fluorouracil), 플루옥시메스테론(fluoxymesterone), 겜시타빈(gemcitabine), 히드록시프로게스테론 카프로에이트(hydroxyprogesterone caproate), 히드록시우레아(hydroxyurea), 이다루비신(idarubicin), 이포스파미드(ifosfamide), 류코보린(leucovorin), 롬스틴(lomustine), 마이탄시노이드(maytansinoid), 메클로레타민(mechlorethamine), 메드록시프로게스테론 아세테이트(medroxyprogesterone acetate), 메게스테롤 아세테이트(megestrol acetate), 멜팔란(melphalan), 메르캅토푸린(mercaptopurine), 메토트렉세이트(methotrexate), 미톡산트론(mitoxantrone), 미트라마이신(mithramycin), 미토마이신(mitomycin), 미토탄(mitotane), 페닐부티레이트(phenylbutyrate), 프레드니손(prednisone), 프로카르바진(procarbazine), 파클리탁셀(paclitaxel), 펜토스타틴(pentostatin), 세무스틴(semustine), 스트렙토조신(streptozocin), 타목시펜(tamoxifen), 탁산류(taxanes), 탁솔(taxol), 테스토스테론 프로피오네이트(testosterone propionate), 탈리도마이드(thalidomide), 티오구아닌(thioguanine), 티오테파(thiotepa), 테니포시드(teniposide), 토포테칸(topotecan), 우라실 머스타드(uracil mustard), 빈블라스틴(vinblastine), 비노렐빈(vinorelbine), 빈크리스틴(vincristine).

[0875] 본 발명에 있어서 바람직한 화학요법제는 저분자의 화학요법제이다. 저분자의 화학요법제는 본 발명의 항원 결합 분자가 결합한 후에도 항원 결합 분자의 기능에 간섭할 가능성이 낮다. 본 발명에 있어서 저분자의 화학요법제는 통상 100~2000, 바람직하게는 200~1000의 분자량을 갖는다. 여기에 예시한 화학요법제는 모두 저분자의 화학요법제이다. 이들 본 발명에 있어서의 화학요법제는 생체내에서 활성인 화학요법제로 변환되는 프로드러그를 포함한다. 프로드러그의 활성화는 효소적인 변환일 수 있고, 비효소적인 변환일 수도 있다.

[0876] 또한 본 발명의 항원 결합 분자에 결합되는 세포상해물질로서는, Pseudomonas exotoxin A, Saporin-s6, Diphtheria toxin, Cnidarian toxin 등의 독성 펩티드(톡신)나 Radioiodine, Photosensitizer도 예시될 수 있다. 독성 펩티드의 예로서는, 예를 들면 다음의 것을 적합하게 들 수 있다.

[0877] 디프테리아 톡신 A쇄(Diphtheria toxin A Chain)(Langone 등(Methods in Enzymology (1983) 93, 307-308)) ;

[0878] 슈도모나스 엔도톡신(Pseudomonas Exotoxin)(Nature Medicine (1996) 2, 350-353) ;

[0879] 리신 사슬(Ricin A Chain)(Fulton 등(J. Biol. Chem. (1986) 261, 5314-5319), Sivam 등(Cancer Res. (1987) 47, 3169-3173), Cumber 등, (J. Immunol. Methods (1990) 135,15-24, Wawrzynczak 등(Cancer Res. (1990) 50, 7519-7562) 및 Gheeite 등(J. Immunol.Methods (1991) 142,223-230)) ;

[0880] 무당쇄 리신 A쇄(Deglicosylated Ricin A Chain)(Thorpe 등(Cancer Res. (1987) 47, 5924-5931)) ;

[0881] 아브린 A쇄(Abrin A Chain)(Wawrzynczak 등(Br. J. Cancer (1992) 66, 361-366), Wawrzynczak 등(Cancer Res. (1990) 50, 7519-7562), Sivam 등(Cancer Res. (1987) 47, 3169-3173) 및 Thorpe 등(Cancer Res. (1987) 47, 5924-5931)) ;

[0882] 겔로닌(Gelonin)(Sivam 등(Cancer Res. (1987) 47, 3169-3173), Cumber 등(J. Immunol. Methods (1990) 135, 15-24), Wawrzynczak 등(Cancer Res., (1990) 50, 7519-7562) 및 Bolognesi 등(Clin. exp. Immunol. (1992) 89, 341-346)) ;

[0883] 포크위드 항바이러스 단백(PAP-s; Pokeweed anti-viral protein fromseeds)(Bolognesi 등(Clin. exp. Immunol.

(1992) 89, 341-346));

[0884] 브리오딘(Briodin)(Bolognesi 등(Clin. exp. Immunol. (1992) 89, 341-346));

[0885] 사포린(Saporin)(Bolognesi 등(Clin. exp. Immunol. (1992) 89, 341-346));

[0886] 모모르딘(Momordin)(Cumber 등(J. Immunol. Methods (1990) 135, 15-24);Wawrzynczak 등(Cancer Res. (1990) 50, 7519-7562) 및 Bolognesi 등(Clin. exp. Immunol. (1992) 89, 341-346));

[0887] 모모르코킨(Momorcochin)(Bolognesi 등(Clin. exp. Immunol. (1992) 89, 341-346));

[0888] 디안틴 32(Dianthin 32)(Bolognesi 등(Clin. exp. Immunol. (1992) 89, 341-346));

[0889] 디안틴 30(Dianthin 30)(Stirpe F., Barbieri L.(FEBS letter (1986) 195, 1-8));

[0890] 모덱신(Modeccin)(Stirpe F., Barbieri L.(FEBS letter (1986) 195, 1-8));

[0891] 비스쿠민(Viscumin)(Stirpe F., Barbieri L.(FEBS letter (1986) 195, 1-8));

[0892] 볼케신(Volkesin)(Stirpe F., Barbieri L.(FEBS letter (1986) 195, 1-8));

[0893] 도데칸드린(Dodecandrin)(Stirpe F., Barbieri L.(FEBS letter (1986) 195, 1-8));

[0894] 트리틴(Tritin)(Stirpe F., Barbieri L.(FEBS letter (1986) 195, 1-8));

[0895] 루핀(Luffin)(Stirpe F., Barbieri L.(FEBS letter (1986) 195, 1-8)); 및

[0896] 트리코키린(Trichokirin)(Casellas 등(Eur. J. Biochem. (1988) 176, 581-588) 및 Bolognesi 등(Clin. exp. Immunol., (1992) 89, 341-346)).

[0897] 항원 결합 분자

[0898] 본 발명에 있어서 표적 조직 특이적인 화합물의 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 비존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 높은 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 분자는 가장 넓은 의미로서 사용되고 있고, 구체적으로는, 그들이 항원에 대한 결합 활성을 나타내는 한 다양한 분자형이 포함된다. 예를 들면 항원 결합 도메인이 Fc영역과 결합한 분자의 예로서 항체를 들 수 있다. 항체에는 단일의 단일 클론항체(아고니스트 및 안타고니스트 항체를 포함한다), 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체 등이 포함될 수 있다. 또한 항체의 단편으로서 사용되는 경우로서는 항원 결합 도메인 및 항원 결합 단편(예를 들면 Fab, F(ab')2, scFv 및 Fv)을 적합하게 들 수 있다. 기존의 안정한 α/β 배럴 단백질 구조 등의 입체구조가 scaffold(토대)로서 사용되고, 그 일부분의 구조만이 항원 결합 도메인의 구축을 위해 라이브러리화된 스캐폴드 분자도 본 발명의 항원 결합 분자에 포함될 수 있다.

[0899] 본 발명의 항원 결합 분자는 Fcγ 수용체에 대한 결합 및/또는 FcRn에 대한 결합을 매개하는 Fc영역의 적어도 부분을 포함할 수 있다. 예를 들면 비한정의 일태양에서는 항원 결합 분자는 항체 또는 Fc융합 단백질일 수 있다. 융합 단백질이란 천연에서는 그것이 자연히 연결되지 않는 제2 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드에 연결된 제1 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 말한다. 예를 들면 융합 단백질은 Fc영역의 적어도 부분(예를 들면 Fcγ 수용체에 대한 결합을 부여하는 Fc영역의 부분 및/또는 FcRn에 대한 결합을 부여하는 Fc영역의 부분)을 코드하는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 아미노산 서열은 함께 융합 단백질에 운반되는 각각의 단백질에 존재할 수 있거나 또는 그들은 통상은 동일 단백질에 존재할 수 있는데, 융합 폴리펩티드 중의 새로운 재편성에 들어간다. 융합 단백질은 예를 들면 화학합성에 의해 또는 펩티드영역이 목적하는 관계로 코드된 폴리뉴클레오티드를 제작하고, 그것을 발현하는 유전자 재조합 수법에 의해 제작될 수 있다.

[0900] 본 발명의 각 도메인은 폴리펩티드 결합에 의해 직접 연결될 수 있고, 링커를 매개로 연결될 수 있다. 링커로서는 유전자공학에 의해 도입 가능한 임의의 펩티드 링커 또는 합성 화합물 링커(예를 들면 Holliger 등(Protein Engineering (1996) 9 (3), 299-305))에 개시되는 링커 등이 사용될 수 있는데, 본 발명에 있어서는 펩티드 링커가 바람직하다. 펩티드 링커의 길이는 특별히 한정되지 않고, 목적에 따라 당업자가 적절히 선택하는 것이 가능한데, 바람직한 길이는 5 아미노산 이상(상한은 특별히 한정되지 않으나, 통상 30 아미노산 이하, 바람직하게는 20 아미노산 이하)이고, 특히 바람직하게는 15 아미노산이다.

[0901] 예를 들면 펩티드 링커의 경우 :

[0902] Ser

[0903] Gly · Ser

[0904] Gly · Gly · Ser

[0905] Ser · Gly · Gly

[0906] Gly · Gly · Gly · Ser(서열번호 : 19)

[0907] Ser · Gly · Gly · Gly(서열번호 : 20)

[0908] Gly · Gly · Gly · Gly · Ser(서열번호 : 21)

[0909] Ser · Gly · Gly · Gly · Gly(서열번호 : 22)

[0910] Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser(서열번호 : 23)

[0911] Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly(서열번호 : 24)

[0912] Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser(서열번호 : 25)

[0913] Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly(서열번호 : 26)

[0914] (Gly · Gly · Gly · Gly · Ser(서열번호 : 21))n

[0915] (Ser · Gly · Gly · Gly · Gly(서열번호 : 22))n

[0916] [n은 1 이상의 정수이다] 등을 적합하게 들 수 있다. 단, 펩티드 링커의 길이나 서열은 목적에 따라 당업자가 적절히 선택할 수 있다.

[0917] 합성 화학물 링커(화학 가교제)는 펩티드의 가교에 통상 사용되고 있는 가교제, 예를 들면 N-히드록시숙신이미드(NHS), 디숙신이미딜수베레이트(DSS), 비스(설포숙신이미딜)수베레이트(BS3), 디티오비스(숙신이미딜프로피오네이트)(DSP), 디티오비스(설포숙신이미딜프로피오네이트)(DTSSP), 에틸렌글리콜비스(숙신이미딜숙시네이트)(EGS), 에틸렌글리콜비스(설포숙신이미딜숙시네이트)(설포-EGS), 디숙신이미딜 타르타르산염(DST), 디설포숙신이미딜 타르타르산염(설포-DST), 비스 [2-(숙신이미드옥시카르보닐옥시)에틸] 설폰(BSOCOES), 비스 [2-(설포숙신이미드옥시카르보닐옥시)에틸] 설폰(설포-BSOCOES) 등이며, 이들 가교제는 시판되고 있다.

[0918] 각 도메인을 연결하는 링커가 복수 사용되는 경우에는, 모두 동종의 링커가 사용될 수 있고, 이종의 링커도 사용될 수 있다. 또한 상기 기재에서 예시되는 링커 외에, 예를 들면 His 태그, HA 태그, myc 태그, FLAG 태그 등의 펩티드 태그를 갖는 링커도 적절히 사용될 수 있다. 또한 수소 결합, 디설피드 결합, 공유 결합, 이온성 상호작용 또는 이들 결합의 조합에 의해 서로 결합하는 성질도 또한 적합하게 이용될 수 있다. 예를 들면 항체의 CH1과 CL 간의 친화성이 이용되거나, 헤테로 Fc영역의 회합시에 전술한 이중 특이성 항체를 기원으로 하는 Fc영역이 사용되거나 한다. 또한 도메인 간에 형성되는 디설피드 결합도 또한 적합하게 이용될 수 있다.

[0919] 각 도메인을 펩티드 결합으로 연결하기 위해 당해 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드가 인프레임으로 연결된다. 폴리뉴클레오티드를 인프레임으로 연결하는 방법으로서는, 제한 단편의 라이게이션이나 퓨전 PCR, 오버랩 PCR 등의 수법이 공지이고, 본 발명의 항원 결합 분자의 제작에도 적절히 이들 방법이 단독 또는 조합으로 사용될 수 있다. 본 발명에서는 용어 「연결되고」, 「융합되고」, 「연결」 또는 「융합」은 상호 교환적으로 사용된다. 이들 용어는 상기의 화학 결합 수단 또는 재조합 수법을 포함한 모든 수단에 의해 둘 이상의 폴리펩티드 등의 엘리먼트 또는 성분을 하나의 구조를 형성하도록 연결하는 것을 말한다. 인프레임으로 융합한다는 것은, 둘 이상의 엘리먼트 또는 성분이 폴리펩티드인 경우에 당해 폴리펩티드의 바른 리딩 프레임을 유지하도록 연속된 보다 긴 리딩 프레임을 형성하기 위한 둘 이상의 리딩 프레임 단위의 연결을 말한다. 두 분자의 Fab가 항원 결합 도메인으로서 사용된 경우, 당해 항원 결합 도메인과 Fc영역을 포함하는 정상영역이 링커를 매개로 하지 않고 펩티드 결합에 의해 인프레임으로 연결된 본 발명의 항원 결합 분자인 항체는 본 발명의 적합한 항원 결합 분자로서 사용될 수 있다.

[0920] 저분자화 항체

[0921] 본 발명에서 사용되는 항체는 항체의 전장 분자에 한정되지 않고, 저분자화 항체 또는 그의 수식물이어도 된다. 저분자화 항체는 전장 항체(예를 들면 whole IgG 등의 whole antibody)의 일부분이 결손되어 있는 항체 단편을 포함하고, 항원에 대한 결합 활성을 가지고 있으면 특별히 한정되지 않는다. 본 발명의 저분자화 항체는 전장

항체의 일부분이라면 특별히 한정되지 않으나, 중쇄 가변영역(VH) 또는/및 경쇄 가변영역(VL)을 포함하고 있는 것이 바람직하다. VH 또는 VL의 아미노산 서열은 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입되어 있어도 된다. 또한 항원에 대한 결합 활성을 갖는 한, VH 또는/및 VL의 일부를 결손시켜도 된다. 또한 가변영역은 키메라화나 인간화되어 있어도 된다. 항체 단편의 구체예로서는, 예를 들면 Fab, Fab', F(ab')2, Fv 등을 들 수 있다. 또한 저분자화 항체의 구체예로서는, 예를 들면 Fab, Fab', F(ab')2, Fv, scFv(single chain Fv), Diabody, sc(Fv)2(single chain (Fv)2) 등을 들 수 있다. 이들 항체의 다량체(예를 들면 다이머, 트리머, 테트라머, 폴리머)도 본 발명의 저분자화 항체에 포함된다.

[0922] 항체 단편은 항체를 효소, 예를 들면 파파인, 펩신으로 처리함으로써 생성될 수 있고, 또는 이들 항체 단편을 코드하는 유전자를 구축하고 이를 발현 벡터에 도입한 후, 적당한 숙주세포에서 발현될 수 있다(예를 들면 Co 등(J. Immunol.(1994)152, 2968-2976), Better 및 Horwitz(Methods in Enzymology(1989)178, 476-496), Plueckthun 및 Skerra 등(Methods in Enzymology(1989)178, 476-496), Lamoyi(Methods in Enzymology(1989)121, 652-663), Rousseaux 등(Methods in Enzymology(1989)121, 663-669) 및 Bird 등(TIBTECH(1991)9, 132-137)을 참조).

[0923] Diabody는 유전자 융합에 의해 구축된 2가(bivalent)의 저분자화 항체를 가리킨다(Holliger 등(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6444-6448 (1993), 유럽 공개공보 EP404097 및 PCT 공개공보 WO1993/011161 등). Diabody는 2개의 폴리펩티드 사슬로 구성되는 다이머로, 통상 폴리펩티드 사슬은 각각 같은 사슬 중에서 VL 및 VH가 서로 결합 불가능한 정도로 짧은, 예를 들면 5잔기 정도의 링커에 의해 결합되어 있다. 동일 폴리펩티드 사슬 상에 코드되는 VL과 VH는 그 사이의 링커가 짧아 경쇄 가변영역 프래그먼트를 형성하는 것이 불가능하여 이량체를 형성하기 때문에, Diabody는 2개의 항원 결합부위를 갖게 된다.

[0924] scFv는 항체의 H쇄 V영역과 L쇄 V영역을 연결함으로써 얻어진다. 이 scFv에 있어서 H쇄 V영역과 L쇄 V영역은 링커, 바람직하게는 펩티드 링커를 매개로 연결된다(Huston 등(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883). scFv에 있어서의 H쇄 V영역 및 L쇄 V영역은 본 명세서에 항체로서 기재된 것 중 어느 항체 유래여도 된다. V영역을 연결하는 펩티드 링커로서는 특별히 제한은 없지만, 예를 들면 3 내지 25잔기 정도로 이루어지는 임의의 단일 사슬 펩티드, 또한 후술하는 펩티드 링커 등을 사용할 수 있다. V영역의 연결방법으로서는 상기와 같은 PCR법을 이용할 수 있다. 상기 항체의 H쇄 또는 H쇄 V영역을 코드하는 DNA 서열 및 L쇄 또는 L쇄 V영역을 코드하는 DNA 서열 중 전부 또는 목적하는 아미노산 서열을 코드하는 DNA 부분을 주형으로 하여, 그 양단의 서열에 대응하는 서열을 갖는 프라이머의 한쌍을 사용한 PCR법에 의해 scFv를 코드하는 DNA를 증폭할 수 있다. 이어서 펩티드 링커 부분을 코드하는 DNA 및 그 양단이 각각 H쇄, L쇄와 연결되도록 설계된 서열을 갖는 프라이머의 한쌍을 조합하여 PCR 반응을 행함으로써 목적하는 서열을 갖는 DNA를 취득할 수 있다. 또한 일단 scFv를 코드하는 DNA가 제작되면 그들을 함유하는 발현 벡터 및 당해 발현 벡터에 의해 형질전환된 재조합 세포를 통상의 방법에 따라 취득할 수 있으며, 또한 그 결과 얻어지는 재조합 세포를 배양하여 당해 scFv를 코드하는 DNA를 발현시킴으로써 당해 scFv를 취득할 수 있다.

[0925] sc(Fv)2는 2개의 VH 및 2개의 VL을 링커 등으로 결합하여 단일 사슬로 한 저분자화 항체이다(Hudson 등(J. Immunol. Methods (1999) 231, 177-189). sc(Fv)2는 예를 들면 scFv를 링커로 연결함으로써 제작할 수 있다.

[0926] 또한 2개의 VH 및 2개의 VL이 단일 사슬 폴리펩티드의 N말단측을 기점으로 하여 VH, VL, VH, VL([VH] 링커 [VL] 링커 [VH] 링커 [VL])의 순으로 나열되어 있는 것을 특징으로 하는 항체가 바람직하다. 2개의 VH와 2개의 VL의 순서는 특별히 상기 배치에 한정되지 않고, 어떠한 순서로 나열되어 있어도 된다. 예를 들면 아래와 같은 배치도 들 수 있다.

[0927] - [VL] 링커 [VH] 링커 [VH] 링커 [VL]

[0928] - [VH] 링커 [VL] 링커 [VL] 링커 [VH]

[0929] - [VH] 링커 [VH] 링커 [VL] 링커 [VL]

[0930] - [VL] 링커 [VL] 링커 [VH] 링커 [VH]

[0931] - [VL] 링커 [VH] 링커 [VL] 링커 [VH]

[0932] 항체의 가변영역을 결합하는 링커로서는, 상기 항원 결합 분자의 항목에서 기재된 링커와 동일한 링커가 사용될 수 있다. 예를 들면 본 발명에 있어서 특히 바람직한 sc(Fv)2의 태양으로서는, 예를 들면 아래의 sc(Fv)2를 들 수 있다.

[0933] - [VH] 펩티드 링커(15 아미노산) [VL] 펩티드 링커(15 아미노산) [VH] 펩티드 링커(15 아미노산) [VL]

[0934] 4개의 항체 가변영역을 결합하는 경우에는 통상 3개의 링커가 필요해지는데, 모두 동일한 링커를 사용해도 되고, 상이한 링커를 사용해도 된다. 본 발명에 있어서 비한정의 저분자화 항체의 일태양으로 서로 상이한 파라토프로서, 한쪽 파라토프가 암세포의 세포막에 결합하는 막형 분자에 존재하는 에피토프에 결합하고, 다른 한쪽 파라토프가 이펙터 세포의 세포막에 발현하는 막형 분자 중에 존재하는 에피토프에 결합하는 Diabody 또는 sc(Fv)2가 예시될 수 있다. 상기 Diabody 또는 sc(Fv)2에서는 암세포의 세포막에 결합하는 막형 분자에 존재하는 에피토프에 대한 한쪽 파라토프의 결합 활성이 암조직 특이적 화합물에 의존적일 수 있고, 이펙터 세포의 세포막에 결합하는 막형 분자에 존재하는 에피토프에 대한 한쪽 파라토프의 결합 활성이 암조직 특이적 화합물에 의존적일 수 있으며, 또한 양쪽 파라토프의 결합 활성이 암조직 특이적 화합물에 의존적일 수 있다.

[0935] 본 발명에 있어서 비한정의 저분자화 항체의 일태양으로서 서로 상이한 파라토프로서, 한쪽 파라토프가 암세포의 세포막에 결합하는 막형 분자에 존재하는 에피토프에 결합하고, 다른 한쪽 파라토프가 세포상해성 물질에 존재하는 에피토프에 결합하는 Diabody 또는 sc(Fv)2가 예시될 수 있다. 상기 Diabody 또는 sc(Fv)2에서는 암세포의 세포막에 결합하는 막형 분자에 존재하는 에피토프에 대한 한쪽 파라토프의 결합 활성이 암조직 특이적 화합물에 의존적일 수 있고, 세포상해성 물질에 존재하는 에피토프에 대한 한쪽 파라토프의 결합 활성이 암조직 특이적 화합물에 의존적일 수 있으며, 또한 양쪽 파라토프의 결합 활성이 암조직 특이적 화합물에 의존적일 수 있다.

[0936] 이러한 저분자화 항체를 얻기 위해서는 항체를 효소, 예를 들면 파파인, 펩신 등으로 처리하여 항체 단편을 생성시키거나 또는 이들 항체 단편 또는 저분자화 항체를 코드하는 DNA를 구축하고, 이를 발현 벡터에 도입한 후, 적당한 숙주세포에서 발현시키면 된다(예를 들면 Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137 참조).

[0937] FcRn

[0938] 면역글로불린 슈퍼패밀리에 속하는 Fcɣ 수용체와 달리, 인간 FcRn은 구조적으로는 주요 조직 부적합성 복합체(MHC) 클래스 I의 폴리펩티드와 구조적으로 유사하여 클래스 I의 MHC 분자와 22 내지 29%의 서열 동일성을 갖는다(Ghetie 등, Immunol. Today (1997) 18 (12), 592-598). FcRn은 가용성 β 또는 경쇄(β2 마이크로글로불린)와 복합체화된 막관통 α 또는 중쇄로 이루어지는 헤테로다이머로서 발현된다. MHC와 같이 FcRn의 α쇄는 3개의 세포외 도메인(α1, α2, α3)으로 이루어지고, 짧은 세포질 도메인은 단백질을 세포 표면에 표면에 계류한다. α1 및 α2도메인이 항체의 Fc영역 중의 FcRn 결합 도메인과 상호작용한다(Raghavan 등(Immunity (1994) 1, 303-315).

[0939] FcRn은 포유동물의 모성 태반 또는 난황낭에서 발현되고, 그것은 모친으로부터 태아로의 IgG의 이동에 관여한다. 이에 더하여 FcRn이 발현하는 설치류 신생아의 소장에서는, FcRn이 섭취된 초유 또는 젖으로부터 모성 IgG의 쇄자연(brush border) 상피를 가로지르는 이동에 관여한다. FcRn은 다수의 종에 걸쳐 다수의 다른 조직 및 각종 내피세포계에 있어서 발현되고 있다. 그것은 인간 성인 혈관내피, 근육혈관계 및 간장 동양 모세혈관(hepatic sinusoidal capillaries)에서도 발현된다. FcRn은 IgG에 결합하여 그것을 혈청에 리사이클함으로써, IgG의 혈장 중 농도를 유지하는 역할을 하고 있는 것으로 생각되고 있다. FcRn의 IgG 분자로의 결합은 통상 엄격하게 pH에 의존적이며, 최적 결합은 7.0 미만의 pH 산성역에 있어서 확인된다.

[0940] 서열번호 : 28로 표시된 시그날 서열을 포함하는 폴리펩티드를 전구체로 하는 인간 FcRn은, 생체내에서(서열번호 : 29에 시그날 서열을 포함하는 그의 폴리펩티드가 기재되어 있는) 인간 β2-마이크로글로불린과의 복합체를 형성한다. β2-마이크로글로불린과 복합체를 형성하고 있는 가용형 인간 FcRn이 통상의 재조합 발현수법을 사용함으로써 제조된다. 이러한 β2-마이크로글로불린과 복합체를 형성하고 있는 가용형 인간 FcRn에 대한 본 발명의 Fc영역의 결합 활성이 평가될 수 있다. 본 발명에 있어서, 특별히 기재가 없는 경우는, 인간 FcRn은 본 발명의 Fc영역에 결합 가능한 형태인 것을 가리키고, 예로서 인간 FcRn과 인간 β2-마이크로글로불린의 복합체를 들 수 있다.

[0941] FcRn, 특히 인간 FcRn에 대한 Fc영역의 결합 활성

[0942] 본 발명에 의해 제공되는 Fc영역의 FcRn, 특히 인간 FcRn에 대한 결합 활성은 상기 결합 활성의 항목에서 기술

된 바와 같이, 당업자에게 공지의 방법으로 측정하는 것이 가능하고, pH 이외의 조건에 대해서는 당업자가 적절히 결정하는 것이 가능하다. 항원 결합 분자의 항원 결합 활성과 인간 FcRn 결합 활성은 KD(Dissociation constant : 해리상수), 겉보기 KD(Apparent dissociation constant : 겉보기 해리상수), 해리속도인 kd(Dissociation rate : 해리속도), 또는 겉보기 kd(Apparent dissociation : 겉보기 해리속도) 등으로서 평가될 수 있다. 이들은 당업자 공지의 방법으로 측정될 수 있다. 예를 들면 Biacore(GE healthcare), 스캐차드 플롯, 플로우 사이토미터 등이 사용될 수 있다.

[0943] 본 발명의 Fc영역의 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 측정할 때의 pH 이외의 조건은 당업자가 적절히 선택하는 것이 가능하며, 특별히 한정되지 않는다. 예를 들면 국제공개 WO2009/125825에 기재되어 있는 바와 같이 MES 버퍼, 37℃의 조건에 있어서 측정될 수 있다. 또한 본 발명의 Fc영역의 인간 FcRn에 대한 결합 활성의 측정은 당업자 공지의 방법에 의해 행하는 것이 가능하며, 예를 들면 Biacore(GE Healthcare) 등을 사용해서 측정될 수 있다. 본 발명의 Fc영역과 인간 FcRn의 결합 활성의 측정은 Fc영역 또는 Fc영역을 포함하는 본 발명의 항원 결합 분자 또는 인간 FcRn을 고정화한 칩으로, 각각 인간 FcRn 또는 Fc영역 또는 Fc영역을 포함하는 본 발명의 항원 결합 분자를 애널라이트로서 흘림으로써 평가될 수 있다.

[0944] 본 발명의 항원 결합 분자에 포함되는 Fc영역과 FcRn의 결합 활성을 갖는 조건으로서의 pH 중성역이란, 통상 pH 6.7~pH 10.0을 의미한다. pH 중성역이란, 바람직하게는 pH 7.0~pH 8.0의 임의의 pH값으로 나타내어지는 범위이고, 바람직하게는 pH 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9 및 8.0으로부터 선택되며, 특히 바람직하게는 생체내의 혈장 중(혈중) pH에 가까운 pH 7.4이다. pH 7.4에서의 인간 FcRn 결합 도메인과 인간 FcRn의 결합 어피니티가 낮기 때문에 그 결합 어피니티를 평가하는 것이 곤란한 경우에는 pH 7.4 대신에 pH 7.0을 사용할 수 있다. 본 발명에 있어서 본 발명의 항원 결합 분자에 포함되는 Fc영역과 FcRn의 결합 활성을 갖는 조건으로서의 pH 산성역이란, 통상 pH 4.0~pH 6.5를 의미한다. 바람직하게는 pH 5.5~pH 6.5를 의미하고, 특히 바람직하게는 생체내의 조기 엔도솜 내의 pH에 가까운 pH 5.8~pH 6.0을 의미한다. 측정조건으로 사용되는 온도로서 인간 FcRn 결합 도메인과 인간 FcRn의 결합 어피니티는 10℃~50℃의 임의의 온도에서 평가해도 된다. 바람직하게는 인간 FcRn 결합 도메인과 인간 FcRn의 결합 어피니티를 결정하기 위해 15℃~40℃의 온도가 사용된다. 보다 바람직하게는 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 및 35℃ 중 어느 하나와 같은 20℃에서 35℃까지의 임의의 온도도 마찬가지로, 인간 FcRn 결합 도메인과 인간 FcRn의 결합 어피니티를 결정하기 위해 사용된다. 25℃라는 온도는 본 발명의 태양의 비한정의 일례이다.

[0945] The Journal of Immunology (2009) 182, 7663-7671에 의하면 천연형 인간 IgG1의 인간 FcRn 결합 활성은 pH 산성역(pH 6.0)에서 KD 1.7 μM인데, pH 중성역에서는 활성을 거의 검출하지 못하고 있다. 따라서 바람직한 태양에 있어서는 pH 산성역에 있어서의 인간 FcRn에 대한 결합 활성이 KD 20 μM 또는 그보다 강한 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자가 스크리닝될 수 있다. 보다 바람직한 태양에 있어서는 pH 산성역에 있어서의 인간 FcRn에 대한 결합 활성이 KD 2.0 μM 또는 그보다 강한 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자가 스크리닝될 수 있다. 더욱 보다 바람직한 태양에 있어서는 pH 산성역에 있어서의 인간 FcRn에 대한 결합 활성이 KD 0.5 μM 또는 그보다 강한 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자가 스크리닝될 수 있다. 상기 KD값은 The Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671에 기재된 방법(항원 결합 분자를 칩에 고정하고 애널라이트로서 인간 FcRn을 흘림)으로 결정된다.

[0946] <u>pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 Fc영역</u>

[0947] 본 발명이 제공하는 항원 결합 분자에 포함되는 Fc영역으로서 pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 Fc영역도 적합하게 사용될 수 있다. 일반적으로 IgG 항체는 FcRn에 결합함으로써 긴 혈장 중 체류성을 갖는 것이 알려져 있다. IgG와 FcRn의 결합은 산성 조건하(pH 6.0)에 있어서만 확인되고, 중성 조건하(pH 7.4)에 있어서 거의 결합은 확인되지 않는다. IgG 항체는 비특이적으로 세포에 흡수되는데, 엔도솜 내의 산성 조건하에 있어서 엔도솜 내의 FcRn에 결합함으로써 세포 표면 상으로 되돌아가, 혈장 중의 중성 조건하에 있어서 FcRn으로부터 해리된다. IgG의 Fc영역에 변이를 도입하여 pH 산성역의 조건하에 있어서의 FcRn에 대한 결합을 상실시키면 엔도솜 내로부터 혈장 중으로 리사이클되지 않게 되기 때문에, 항체의 혈장 중 체류성은 현저히 손상된다. IgG 항체의 혈장 중 체류성을 개선하는 방법으로서, pH 산성역의 조건하에 있어서의 FcRn에 대한 결합을 향상시키는 방법이 보고되어 있다. IgG 항체의 Fc영역에 아미노산 치환을 도입하여 pH 산성역의 조건하에 있어서의 FcRn에 대한 결합을 향상시킴으로써 엔도솜 내로부터 혈장 중으로의 리사이클 효율이 상승하고, 그 결과 혈장 중 체류성이 개선된다.

[0948] 본 발명은 특정 이론에 구속되는 것은 아니나, 예를 들면 본 발명이 제공하는 항원 결합 분자가 암조직에 포함

되는 암세포에 발현하는 막형 항원에 결합하는 경우 등에는 아래와 같이 암세포의 증식을 지속적으로 억제하는 것이 가능하다고도 생각된다. 암조직 특이적인 화합물의 고농도 존재하에 있어서 본 발명의 항원 결합 분자가 결합된 막형 분자가 발현하는 암세포가 당해 항원 결합 분자에 의해 개재되는 세포상해 활성에 의해 상해된 후에도, 당해 항원 결합 분자에 포함되는 항원 결합 도메인에 그 항원이 결합된 상태인 것으로 생각된다. 비특이적으로 세포에 흡수된 당해 항원 결합 분자로부터, 암조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에서 항원을 유리한 당해 항원 결합 분자는 엔도솜 내의 산성 조건하에 있어서 엔도솜 내의 FcRn에 결합함으로써 세포 표면 상으로 되돌아가, 혈장 중의 중성 조건하에 있어서 FcRn으로부터 해리된다. 이와 같이 하여 리사이클된 본 발명의 항원 결합 분자는 암조직 특이적인 화합물의 고농도 존재하에 있어서 그 항원인 암세포에 발현하는 막형 분자에 재차 결합할 수 있을 것으로 생각된다.

[0949] 본 발명은 특정 이론에 구속되는 것은 아니나, 예를 들면 본 발명이 제공하는 항원 결합 분자가 결합하는 가용형 항원이 표적 조직에 포함되는 표적 세포의 증식 또는 염증세포의 활성화를 양으로 조절하는 리간드의 경우 등에는 아래와 같이 표적 세포의 증식 또는 염증세포의 활성화를 억제하는 것이 가능하다고도 생각된다. 이들 표적 조직 특이적인 화합물의 고농도 존재하에 있어서 그 항원인 가용형 분자에 결합한 본 발명의 항원 결합 분자가 비특이적으로 세포에 흡수된 후, 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에서 항원을 유리한 당해 항원 결합 분자는 엔도솜 내의 산성 조건하에 있어서 엔도솜 내의 FcRn에 결합함으로써 세포 표면 상으로 되돌아가, 혈장 중의 중성 조건하에 있어서 FcRn으로부터 해리된다. 이와 같이 하여 리사이클된 본 발명의 항원 결합 분자는 표적 조직 특이적인 화합물의 고농도 존재하에 있어서 그 항원인 가용형 분자에 재차 결합할 수 있는 것으로 생각된다. 한편 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에서 항원 결합 분자로부터 유리된 항원은 리소좀 중에서 분해된다. 그 결과 가용형 항원의 농도는 상기 리사이클의 단계를 거침에 따라 감소하는 것으로부터 암세포의 증식 또는 염증세포의 활성화를 억제할 수 있는 것으로 생각된다.

[0950] 본 발명에 있어서는 pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 Fc영역이 바람직하다. 당해 도메인은 사전에 pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성을 가지고 있는 Fc영역이라면 그대로 사용될 수 있다. 당해 도메인이 pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성이 없거나 또는 약한 경우에는, 항원 결합 분자 중의 아미노산을 개변함으로써 목적하는 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 Fc영역이 취득될 수 있는데, Fc영역 중의 아미노산을 개변함으로써 pH 산성역의 조건하에서 목적하는 FcRn에 대한 결합 활성을 갖거나 또는 증강된 Fc영역도 적합하게 취득될 수 있다. 그러한 목적하는 결합 활성을 초래하는 Fc영역의 아미노산 개변은 아미노산 개변 전과 개변 후의 pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성을 비교함으로써 발견될 수 있다. 상기 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성을 개변하기 위해 사용되는 수법과 동일한 공지의 수법을 사용하여 당업자는 적절히 아미노산의 개변을 실시할 수 있다.

[0951] 본 발명의 항원 결합 분자에 포함되는 pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 Fc영역은 어떠한 방법으로도 취득될 수 있는데, 구체적으로는 출발 Fc영역으로서 사용되는 인간 IgG형 면역글로불린의 아미노산의 개변에 의해 pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성을 갖거나 또는 증강된 FcRn 결합 도메인이 취득될 수 있다. 개변을 위한 바람직한 IgG형 면역글로불린의 Fc영역으로서는, 예를 들면 인간 IgG(IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 및 그들의 개변체)의 Fc영역을 들 수 있다. 다른 아미노산으로의 개변은 pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성을 갖거나 또는 산성역의 조건하에서 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 높일 수 있는 한, 어떠한 위치의 아미노산도 개변될 수 있다. 항원 결합 분자가 Fc영역으로서 인간 IgG1의 Fc영역을 포함하고 있는 경우, pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 증강되는 효과를 초래하는 개변이 포함되어 있는 것이 바람직하다. 그러한 개변이 가능한 아미노산으로서, 예를 들면 국제공개 WO1997/034631에 기재되어 있는 바와 같이, EU 넘버링으로 표시되는 252번 위치, 254번 위치, 256번 위치, 309번 위치, 311번 위치, 315번 위치, 433번 위치 및/또는 434번 위치 및 이들 아미노산에 조합시키는 253번 위치, 310번 위치, 435번 위치 및/또는 426번 위치의 아미노산을 들 수 있다. 국제공개 WO2000/042072에 기재되어 있는 바와 같이, EU 넘버링으로 표시되는 238번 위치, 252번 위치, 253번 위치, 254번 위치, 255번 위치, 256번 위치, 265번 위치, 272번 위치, 286번 위치, 288번 위치, 303번 위치, 305번 위치, 307번 위치, 309번 위치, 311번 위치, 312번 위치, 317번 위치, 340번 위치, 356번 위치, 360번 위치, 362번 위치, 376번 위치, 378번 위치, 380번 위치, 382번 위치, 386번 위치, 388번 위치, 400번 위치, 413번 위치, 415번 위치, 424번 위치, 433번 위치, 434번 위치, 435번 위치, 436번 위치, 439번 위치 및/또는 447번 위치의 아미노산을 적합하게 들 수 있다. 마찬가지로, 그러한 개변이 가능한 아미노산으로서, 예를 들면 국제공개 WO2002/060919에 기재되어 있는 바와 같이, EU 넘버링으로 표시되는 251번 위치, 252번 위치, 254번 위치, 255번 위치, 256번 위치, 308번 위치, 309번 위치, 311번 위치, 312번 위치, 385번 위치, 386번 위치, 387번 위치, 389번 위치, 428번 위치, 433번 위치, 434번 위치 및/또는 436번 위치의 아미노산도 적합하게 들 수 있다. 또한 그러한 개변이 가능한 아

미노산으로서, 국제공개 WO2004/092219에 기재되어 있는 바와 같이, EU 넘버링으로 표시되는 250번 위치, 314번 위치 및 428번 위치의 아미노산도 들 수 있다. 이에 더하여 그러한 개변이 가능한 아미노산으로서, 예를 들면 국제공개 WO2006/020114에 기재되어 있는 바와 같이, 238번 위치, 244번 위치, 245번 위치, 249번 위치, 252번 위치, 256번 위치, 257번 위치, 258번 위치, 260번 위치, 262번 위치, 270번 위치, 272번 위치, 279번 위치, 283번 위치, 285번 위치, 286번 위치, 288번 위치, 293번 위치, 307번 위치, 311번 위치, 312번 위치, 316번 위치, 317번 위치, 318번 위치, 332번 위치, 339번 위치, 341번 위치, 343번 위치, 375번 위치, 376번 위치, 377번 위치, 378번 위치, 380번 위치, 382번 위치, 423번 위치, 427번 위치, 430번 위치, 431번 위치, 434번 위치, 436번 위치, 438번 위치, 440번 위치 및/또는 442번 위치의 아미노산도 적합하게 들 수 있다. 또한 그러한 개변이 가능한 아미노산으로서, 예를 들면 국제공개 WO2010/045193에 기재되어 있는 바와 같이, EU 넘버링으로 표시되는 251번 위치, 252번 위치, 307번 위치, 308번 위치, 378번 위치, 428번 위치, 430번 위치, 434번 위치 및/또는 436번 위치의 아미노산도 적합하게 들 수 있다. 이들 아미노산의 개변에 의해 IgG형 면역글로불린의 Fc영역의 pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합이 증강된다.

[0952] Fc영역으로서 인간 IgG1의 Fc영역을 포함하고 있는 경우, pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 증강되는 효과를 초래하는 개변의 비한정의 일태양에서는 EU 넘버링으로 표시되는,

[0953] 251번 위치의 아미노산이 Arg 또는 Leu 중 어느 하나,

[0954] 252번 위치의 아미노산이 Phe, Ser, Thr 또는 Tyr 중 어느 하나,

[0955] 254번 위치의 아미노산이 Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[0956] 255번 위치의 아미노산이 Arg, Gly, Ile 또는 Leu 중 어느 하나,

[0957] 256번 위치의 아미노산이 Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu 또는 Thr 중 어느 하나,

[0958] 308번 위치의 아미노산이 Ile 또는 Thr 중 어느 하나,

[0959] 309번 위치의 아미노산이 Pro,

[0960] 311번 위치의 아미노산이 Glu, Leu 또는 Ser 중 어느 하나,

[0961] 312번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Asp 중 어느 하나,

[0962] 314번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Leu 중 어느 하나,

[0963] 385번 위치의 아미노산이 Ala, Arg, Asp, Gly, His, Lys, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[0964] 386번 위치의 아미노산이 Arg, Asp, Ile, Lys, Met, Pro, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[0965] 387번 위치의 아미노산이 Ala, Arg, His, Pro, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[0966] 389번 위치의 아미노산이 Asn, Pro 또는 Ser 중 어느 하나,

[0967] 428번 위치의 아미노산이 Leu, Met, Phe, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[0968] 433번 위치의 아미노산이 Arg, Gln, His, Ile, Lys, Pro 또는 Ser 중 어느 하나,

[0969] 434번 위치의 아미노산이 His, Phe 또는 Tyr 중 어느 하나, 또는

[0970] 436번 위치의 아미노산이 Arg, Asn, His, Lys, Met 또는 Thr 중 어느 하나

[0971] 의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산의 개변을 들 수 있다. 또한 개변되는 아미노산의 수는 특별히 한정되지 않고, 1개소만의 아미노산이 개변될 수 있으며, 2개소 이상의 아미노산이 개변될 수 있다.

[0972] Fc영역으로서 인간 IgG1의 Fc영역을 포함하고 있는 경우, pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 증강되는 효과를 초래하는 개변의 비한정의 일태양은 EU 넘버링으로 표시되는 308번 위치의 아미노산이 Ile, 309번 위치의 아미노산이 Pro 및/또는 311번 위치의 아미노산이 Glu를 포함하는 개변일 수 있다. 또한 당해 개변의 다른 비한정의 일태양은 308번 위치의 아미노산이 Thr, 309번 위치의 아미노산이 Pro, 311번 위치의 아미노산이 Leu, 312번 위치의 아미노산이 Ala 및/또는 314번 위치의 아미노산이 Ala를 포함하는 개변일 수 있다. 또한 당해 개변의 또 다른 비한정의 일태양은 308번 위치의 아미노산이 Ile 또는 Thr, 309번 위치의 아미노산이 Pro, 311번 위치의 아미노산이 Glu, Leu 또는 Ser, 312번 위치의 아미노산이

Ala 및/또는 314번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Leu를 포함하는 개변일 수 있다. 당해 개변의 다른 비한정의 일태양은 308번 위치의 아미노산이 Thr, 309번 위치의 아미노산이 Pro, 311번 위치의 아미노산이 Ser, 312번 위치의 아미노산이 Asp 및/또는 314번 위치의 아미노산이 Leu를 포함하는 개변일 수 있다.

[0973] Fc영역으로서 인간 IgG1의 Fc영역을 포함하고 있는 경우, pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 증강되는 효과를 초래하는 개변의 비한정의 일태양은 EU 넘버링으로 표시되는 251번 위치의 아미노산이 Leu, 252번 위치의 아미노산이 Tyr, 254번 위치의 아미노산이 Ser 또는 Thr, 255번 위치의 아미노산이 Arg 및/또는 256번 위치의 아미노산이 Glu를 포함하는 개변일 수 있다.

[0974] Fc영역으로서 인간 IgG1의 Fc영역을 포함하고 있는 경우, pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 증강되는 효과를 초래하는 개변의 비한정의 일태양은 EU 넘버링으로 표시되는, 428번 위치의 아미노산이 Leu, Met, Phe, Ser 또는 Thr 중 어느 하나, 433번 위치의 아미노산이 Arg, Gln, His, Ile, Lys, Pro 또는 Ser 중 어느 하나, 434번 위치의 아미노산이 His, Phe 또는 Tyr 중 어느 하나 및/또는 436번 위치의 아미노산이 Arg, Asn, His, Lys, Met 또는 Thr 중 어느 하나를 포함하는 개변일 수 있다. 또한 당해 개변의 다른 비한정의 일태양은 428번 위치의 아미노산이 His 또는 Met 및/또는 434번 위치의 아미노산이 His 또는 Met를 포함하는 개변일 수 있다.

[0975] Fc영역으로서 인간 IgG1의 Fc영역을 포함하고 있는 경우, pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 증강되는 효과를 초래하는 개변의 비한정의 일태양은 EU 넘버링으로 표시되는 385번 위치의 아미노산이 Arg, 386번 위치의 아미노산이 Thr, 387번 위치의 아미노산이 Arg 및/또는 389번 위치의 아미노산이 Pro를 포함하는 개변일 수 있다. 또한 당해 개변의 다른 비한정의 일태양은 385번 위치의 아미노산이 Asp, 386번 위치의 아미노산이 Pro 및/또는 389번 위치의 아미노산이 Ser을 포함하는 개변일 수 있다.

[0976] 또한 Fc영역으로서 인간 IgG1의 Fc영역을 포함하고 있는 경우, pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 증강되는 효과를 초래하는 개변의 비한정의 일태양에서는 EU 넘버링으로 표시되는,

[0977] 250번 위치의 아미노산이 Gln 또는 Glu 중 어느 하나, 또는

[0978] 428번 위치의 아미노산이 Leu 또는 Phe 중 어느 하나

[0979] 의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산의 개변을 들 수 있다. 또한 개변되는 아미노산의 수는 특별히 한정되지 않고, 1개소만의 아미노산이 개변될 수 있으며, 2개소의 아미노산이 개변될 수 있다.

[0980] Fc영역으로서 인간 IgG1의 Fc영역을 포함하고 있는 경우, pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 증강되는 효과를 초래하는 개변의 비한정의 일태양은 EU 넘버링으로 표시되는 250번 위치의 아미노산이 Gln 및/또는 428번 위치의 아미노산이 Leu 또는 Phe 중 어느 하나를 포함하는 개변일 수 있다. 또한 당해 개변의 다른 비한정의 일태양은 250번 위치의 아미노산이 Glu 및/또는 428번 위치의 아미노산이 Leu 또는 Phe 중 어느 하나를 포함하는 개변일 수 있다.

[0981] Fc영역으로서 인간 IgG1의 Fc영역을 포함하고 있는 경우, pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 증강되는 효과를 초래하는 개변의 비한정의 일태양에서는 EU 넘버링으로 표시되는,

[0982] 251번 위치의 아미노산이 Asp 또는 Glu 중 어느 하나,

[0983] 252번 위치의 아미노산이 Tyr,

[0984] 307번 위치의 아미노산이 Gln,

[0985] 308번 위치의 아미노산이 Pro,

[0986] 378번 위치의 아미노산이 Val,

[0987] 380번 위치의 아미노산이 Ala,

[0988] 428번 위치의 아미노산이 Leu,

[0989] 430번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Lys 중 어느 하나,

[0990] 434번 위치의 아미노산이 Ala, His, Ser 또는 Tyr 중 어느 하나, 또는

[0991] 436번 위치의 아미노산이 Ile

[0992] 의 군으로부터 선택되는 적어도 2개 이상의 아미노산의 개변을 들 수 있다. 또한 개변되는 아미노산의 수는 특별히 한정되지 않고, 2개소만의 아미노산이 개변될 수 있고, 3개소 이상의 아미노산이 개변될 수 있다.

[0993] Fc영역으로서 인간 IgG1의 Fc영역을 포함하고 있는 경우, pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 증강되는 효과를 초래하는 개변의 비한정의 일태양은 EU 넘버링으로 표시되는 307번 위치의 아미노산이 Gln 및 434번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Ser 중 어느 하나를 포함하는 개변일 수 있다. 또한 당해 개변의 다른 비한정의 일태양은 308번 위치의 아미노산이 Pro 및 434번 위치의 아미노산이 Ala를 포함하는 개변일 수 있다. 또한 당해 개변의 또 다른 비한정의 일태양은 252번 위치의 아미노산이 Tyr 및 434번 위치의 아미노산이 Ala를 포함하는 개변일 수 있다. 당해 개변의 다른 비한정의 일태양은 378번 위치의 아미노산이 Val 및 434번 위치의 아미노산이 Ala를 포함하는 개변일 수 있다. 당해 개변의 또 다른 비한정의 일태양은 428번 위치의 아미노산이 Leu 및 434번 위치의 아미노산이 Ala를 포함하는 개변일 수 있다. 또한 당해 개변의 또 다른 비한정의 일태양은 434번 위치의 아미노산이 Ala 및 436번 위치의 아미노산이 Ile를 포함하는 개변일 수 있다. 또한 당해 개변의 또 하나의 비한정의 일태양은 308번 위치의 아미노산이 Pro 및 434번 위치의 아미노산이 Tyr을 포함하는 개변일 수 있다. 또한 당해 개변의 또 다른 하나의 비한정의 일태양은 307번 위치의 아미노산이 Gln 및 436번 위치의 아미노산이 Ile를 포함하는 개변일 수 있다.

[0994] Fc영역으로서 인간 IgG1의 Fc영역을 포함하고 있는 경우, pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 증강되는 효과를 초래하는 개변의 비한정의 일태양은 EU 넘버링으로 표시되는 307번 위치의 아미노산이 Gln, 380번 위치의 아미노산이 Ala 및 434번 위치의 아미노산이 Ser 중 어느 하나를 포함하는 개변일 수 있다. 또한 당해 개변의 다른 비한정의 일태양은 307번 위치의 아미노산이 Gln, 380번 위치의 아미노산이 Ala 및 434번 위치의 아미노산이 Ala를 포함하는 개변일 수 있다. 또한 당해 개변의 또 다른 비한정의 일태양은 252번 위치의 아미노산이 Tyr, 308번 위치의 아미노산이 Pro 및 434번 위치의 아미노산이 Tyr을 포함하는 개변일 수 있다. 당해 개변의 다른 비한정의 일태양은 251번 위치의 아미노산이 Asp, 307번 위치의 아미노산이 Gln 및 434번 위치의 아미노산이 His를 포함하는 개변일 수 있다.

[0995] Fc영역으로서 인간 IgG1의 Fc영역을 포함하고 있는 경우, pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 증강되는 효과를 초래하는 개변의 비한정의 일태양에서는 EU 넘버링으로 표시되는,

[0996] 238번 위치의 아미노산이 Leu,

[0997] 244번 위치의 아미노산이 Leu,

[0998] 245번 위치의 아미노산이 Arg,

[0999] 249번 위치의 아미노산이 Pro,

[1000] 252번 위치의 아미노산이 Tyr,

[1001] 256번 위치의 아미노산이 Pro,

[1002] 257번 위치의 아미노산이 Ala, Ile, Met, Asn, Ser 또는 Val 중 어느 하나,

[1003] 258번 위치의 아미노산이 Asp,

[1004] 260번 위치의 아미노산이 Ser,

[1005] 262번 위치의 아미노산이 Leu,

[1006] 270번 위치의 아미노산이 Lys,

[1007] 272번 위치의 아미노산이 Leu 또는 Arg 중 어느 하나,

[1008] 279번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Gly, His, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1009] 283번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1010] 285번 위치의 아미노산이 Asn,

[1011] 286번 위치의 아미노산이 Phe,

[1012] 288번 위치의 아미노산이 Asn 또는 Pro 중 어느 하나,

[1013] 293번 위치의 아미노산이 Val,

[1014] 307번 위치의 아미노산이 Ala, Glu 또는 Met 중 어느 하나,

[1015] 311번 위치의 아미노산이 Ala, Ile, Lys, Leu, Met, Val 또는 Trp 중 어느 하나,

[1016] 312번 위치의 아미노산이 Pro,

[1017] 316번 위치의 아미노산이 Lys,

[1018] 317번 위치의 아미노산이 Pro,

[1019] 318번 위치의 아미노산이 Asn 또는 Thr 중 어느 하나,

[1020] 332번 위치의 아미노산이 Phe, His, Lys, Leu, Met, Arg, Ser 또는 Trp 중 어느 하나,

[1021] 339번 위치의 아미노산이 Asn, Thr 또는 Trp 중 어느 하나,

[1022] 341번 위치의 아미노산이 Pro,

[1023] 343번 위치의 아미노산이 Glu, His, Lys, Gln, Arg, Thr 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1024] 375번 위치의 아미노산이 Arg,

[1025] 376번 위치의 아미노산이 Gly, Ile, Met, Pro, Thr 또는 Val 중 어느 하나,

[1026] 377번 위치의 아미노산이 Lys,

[1027] 378번 위치의 아미노산이 Asp 또는 Asn 중 어느 하나,

[1028] 380번 위치의 아미노산이 Asn, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[1029] 382번 위치의 아미노산이 Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1030] 423번 위치의 아미노산이 Asn,

[1031] 427번 위치의 아미노산이 Asn,

[1032] 430번 위치의 아미노산이 Ala, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1033] 431번 위치의 아미노산이 His 또는 Asn 중 어느 하나,

[1034] 434번 위치의 아미노산이 Phe, Gly, His, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1035] 436번 위치의 아미노산이 Ile, Leu 또는 Thr 중 어느 하나,

[1036] 438번 위치의 아미노산이 Lys, Leu, Thr 또는 Trp 중 어느 하나,

[1037] 440번 위치의 아미노산이 Lys, 또는

[1038] 442번 위치의 아미노산이 Lys

[1039] 의 군으로부터 선택되는 적어도 2개 이상의 아미노산의 개변을 들 수 있다. 또한 개변되는 아미노산의 수는 특별히 한정되지 않고, 2개소만의 아미노산이 개변될 수 있고, 3개소 이상의 아미노산이 개변될 수 있다.

[1040] Fc영역으로서 인간 IgG1의 Fc영역을 포함하고 있는 경우, pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 증강되는 효과를 초래하는 개변의 비한정의 일태양은 EU 넘버링으로 표시되는 257번 위치의 아미노산이 Ile 및 311번 위치의 아미노산이 Ile를 포함하는 개변일 수 있다. 또한 당해 개변의 다른 비한정의 일태양은 257번 위치의 아미노산이 Ile 및 434번 위치의 아미노산이 His를 포함하는 개변일 수 있다. 또한 당해 개변의 또 다른 비한정의 일태양은 376번 위치의 아미노산이 Val 및 434번 위치의 아미노산이 His를 포함하는 개변일 수 있다.

[1041] pH 중성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 Fc영역

[1042] 또한 다른 비한정의 일태양에서는 상기에 기재된 pH 산성역에 있어서의 인간 FcRn에 대한 결합 활성이라는 특징 대신에, pH 중성역에 있어서의 인간 FcRn에 대한 결합 활성이라는 특징을 갖는 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자도 또한 스크리닝될 수 있다. 보다 바람직한 태양에 있어서는 pH 중성역에 있어서의 인간 FcRn 결합 활성이 KD 40 μM 또는 그보다 강한 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자가 스크리닝될 수 있다. 더욱이 보다 바람직한 태양에 있어서는 pH 중성역에 있어서의 인간 FcRn에 대한 결합 활성이 KD 15 μM 또는 그보다 강한 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자가 스크리닝될 수 있다.

[1043] 또한 다른 비한정의 일태양에서는 상기에 기재된 pH 산성역에 있어서의 인간 FcRn에 대한 결합 활성이라는 특징에 더하여, pH 중성역에 있어서의 인간 FcRn에 대한 결합 활성이라는 특징을 갖는 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자도 또한 스크리닝될 수 있다. 보다 바람직한 태양에 있어서는, pH 중성역에 있어서의 인간 FcRn 결합 활성이 KD 40 μM 또는 그보다 강한 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자가 스크리닝될 수 있다. 더욱이 보다 바람직한 태양에 있어서는 pH 중성역에 있어서의 인간 FcRn에 대한 결합 활성이 KD 15 μM 또는 그보다 강한 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자가 스크리닝될 수 있다.

[1044] 본 발명에 있어서 pH 산성역 및/또는 pH 중성역에 있어서 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 Fc영역이 바람직하다. 당해 Fc영역은 사전에 pH 산성역 및/또는 pH 중성역에 있어서 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 가지고 있는 Fc영역이라면 그대로 사용될 수 있다. 당해 Fc영역이 pH 산성역 및/또는 pH 중성역에 있어서 인간 FcRn 결합 활성이 없거나 약한 경우에는, 항원 결합 분자에 포함되는 Fc영역 중의 아미노산을 개변함으로써 목적하는 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자가 취득될 수 있는데, 인간 Fc영역 중의 아미노산을 개변함으로써 pH 산성역 및/또는 pH 중성역에 있어서의 목적하는 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 Fc영역도 적합하게 취득될 수 있다. 또한 사전에 pH 산성역 및/또는 pH 중성역에 있어서 인간 FcRn 결합 활성을 가지고 있는 Fc영역 중의 아미노산의 개변에 의해 목적하는 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자도 취득될 수 있다. 그러한 목적하는 결합 활성을 초래하는 인간 Fc영역의 아미노산 개변은 아미노산 개변 전과 개변 후의 pH 산성역 및/또는 pH 중성역에 있어서의 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 비교함으로써 발견될 수 있다. 공지의 수법을 사용하여 당업자는 적절히 아미노산의 개변을 실시할 수 있다.

[1045] 본 발명에 있어서 Fc영역의 「아미노산의 개변」 또는 「아미노산 개변」이란, 출발 Fc영역의 아미노산 서열과는 상이한 아미노산 서열로 개변하는 것을 포함한다. 출발 Fc영역의 수식 개변체가 pH 산성역에 있어서 인간 FcRn에 결합할 수 있는 한(따라서 출발 Fc영역은 pH 중성역 조건하에 있어서의 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 반드시 필요로 하는 것은 아니다), 어느 Fc영역도 출발 도메인으로서 사용될 수 있다. 출발 Fc영역의 예로서는, IgG 항체의 Fc영역, 즉 천연형 Fc영역을 적합하게 들 수 있다. 또한, 이미 개변이 가해진 Fc영역을 출발 Fc영역으로서 추가적인 개변이 가해진 개변 Fc영역도 본 발명의 개변 Fc영역으로서 적합하게 사용될 수 있다. 출발 Fc영역이란, 폴리펩티드 그 자체, 출발 Fc영역을 포함하는 조성물, 또는 출발 Fc영역을 코드하는 아미노산 서열을 의미할 수 있다. 출발 Fc영역에는, 항체의 항목에서 개설된 재조합에 의해 생산된 공지의 IgG 항체의 Fc영역이 포함될 수 있다. 출발 Fc영역의 기원은 한정되지 않지만, 비인간 동물의 임의의 생물 또는 인간으로부터 취득될 수 있다. 바람직하게는, 임의의 생물로서는, 마우스, 랫트, 기니피그, 햄스터, 황무지쥐, 고양이, 토끼, 개, 염소, 양, 소, 말, 낙타 및 비인간 영장류로부터 선택되는 생물을 적합하게 들 수 있다. 다른 태양에 있어서, 출발 Fc영역은 또한, 게잡이원숭이, 마모셋, 빨간털원숭이, 침팬지 또는 인간으로부터 취득될 수 있다. 바람직하게는 출발 Fc영역은 인간 IgG1으로부터 취득될 수 있지만, IgG의 특정 클래스에 한정되는 것도 아니다. 이는, 인간 IgG1(서열번호:5), IgG2(서열번호:6), IgG3(서열번호:7) 또는 IgG4(서열번호:8)로 표시되는 Fc영역을 출발 Fc영역으로서 적절히 사용할 수 있는 것을 의미한다. 마찬가지로, 본 명세서에 있어서, 상기 임의의 생물로부터의 IgG의 임의의 클래스 또는 서브클래스의 Fc영역을, 바람직하게는 출발 Fc영역으로서 사용할 수 있는 것을 의미한다. 천연에 존재하는 IgG의 변이체 또는 조작된 유형의 예는, 공지의 문헌(Curr. Opin. Biotechnol. (2009) 20 (6), 685-91, Curr. Opin. Immunol. (2008) 20 (4), 460-470, Protein Eng. Des. Sel. (2010) 23 (4), 195-202, 국제공개 WO2009/086320, WO2008/092117, WO2007/041635 및 WO2006/105338)에 기재되지만 그들에 한정되지 않는다.

[1046] 개변의 예로서는 하나 이상의 변이, 예를 들면 출발 Fc영역의 아미노산과는 상이한 아미노산 잔기로 치환된 변이, 또는 출발 Fc영역의 아미노산에 대해 하나 이상의 아미노산 잔기의 삽입 또는 출발 Fc영역의 아미노산으로부터 하나 이상의 아미노산의 결실 등이 포함된다. 바람직하게는 개변 후의 Fc영역의 아미노산 서열에는, 천연으로 생기지 않는 Fc영역의 적어도 부분을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 그러한 변종은 필연적으로 출발 Fc영역과 100% 미만의 서열 동일성 또는 유사성을 갖는다. 바람직한 실시형태에 있어서, 변종은 출발 Fc영역의

아미노산 서열과 약 75%~100% 미만의 아미노산 서열 동일성 또는 유사성, 보다 바람직하게는 약 80%~100% 미만, 보다 바람직하게는 약 85%~100% 미만의, 보다 바람직하게는 약 90%~100% 미만, 가장 바람직하게는 약 95%~100% 미만의 동일성 또는 유사성의 아미노산 서열을 갖는다. 본 발명의 비한정의 일태양에 있어서, 출발 Fc영역 및 본 발명의 개변된 Fc영역 사이에는 하나 이상의 아미노산의 차가 있다. 출발 Fc영역과 개변 Fc영역의 아미노산의 차이는, 특히 전술한 EU 넘버링으로 표시되는 아미노산 잔기의 위치가 특정된 아미노산의 차이에 따라서도 적합하게 특정 가능하다. 그러한 변종의 제작방법은 「아미노산의 개변」 항목에 예시되어 있다.

[1047] 본 발명의 항원 결합 분자에 포함되는 pH 중성역에 있어서의 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 Fc영역은 어떠한 방법으로도 취득될 수 있는데, 구체적으로는 출발 Fc영역으로서 사용되는 인간 IgG형 면역글로불린의 아미노산의 개변에 의해 pH 중성역에 있어서의 인간 FcRn에 대한 결합 활성이 KD 20 μM 또는 그보다 강한 Fc영역, 보다 바람직한 태양에 있어서는 pH 중성역에 있어서의 인간 FcRn에 대한 결합 활성이 KD 2.0 μM 또는 그보다 강한 Fc영역, 더욱이 보다 바람직한 태양에 있어서는 pH 중성역에 있어서의 인간 FcRn에 대한 결합 활성이 KD 0.5 μM 또는 그보다 강한 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자가 스크리닝될 수 있다. 개변을 위한 바람직한 IgG형 면역글로불린의 Fc영역으로서는, 예를 들면 서열번호 : 5, 서열번호 : 6, 서열번호 : 7 또는 서열번호 : 8로 각각 표시되는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 등의 인간 IgG 및 그들의 개변체의 Fc영역을 들 수 있다.

[1048] 항원 결합 분자가 Fc영역으로서 인간 IgG1의 Fc영역을 포함하고 있는 경우, pH 중성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합이 출발 Fc영역으로서 사용되는 인간 IgG형 면역글로불린의 아미노산의 개변에 의해 상기 목적하는 효과를 초래하는 개변이 가능한 아미노산으로서, 예를 들면 국제공개 WO2000/042072에 기재되어 있는 바와 같이, EU 넘버링으로 표시되는 238번 위치, 252번 위치, 253번 위치, 254번 위치, 255번 위치, 256번 위치, 265번 위치, 272번 위치, 286번 위치, 288번 위치, 303번 위치, 305번 위치, 307번 위치, 309번 위치, 311번 위치, 312번 위치, 317번 위치, 340번 위치, 356번 위치, 360번 위치, 362번 위치, 376번 위치, 378번 위치, 380번 위치, 382번 위치, 386번 위치, 388번 위치, 400번 위치, 413번 위치, 415번 위치, 424번 위치, 433번 위치, 434번 위치, 435번 위치, 436번 위치, 439번 위치 및/또는 447번 위치의 아미노산을 적합하게 들 수 있다. 마찬가지로 그러한 개변이 가능한 아미노산으로서, 예를 들면 국제공개 WO2002/060919에 기재되어 있는 바와 같이, EU 넘버링으로 표시되는 251번 위치, 252번 위치, 254번 위치, 255번 위치, 256번 위치, 308번 위치, 309번 위치, 311번 위치, 312번 위치, 385번 위치, 386번 위치, 387번 위치, 389번 위치, 428번 위치, 433번 위치, 434번 위치 및/또는 436번 위치의 아미노산도 적합하게 들 수 있다. 또한 그러한 개변이 가능한 아미노산으로서, 국제공개 WO2004/092219에 기재되어 있는 바와 같이, EU 넘버링으로 표시되는 250번 위치, 314번 위치 및 428번 위치의 아미노산도 들 수 있다. 또한 그러한 개변이 가능한 아미노산으로서, 예를 들면 국제공개 WO2010/045193에 기재되어 있는 바와 같이, EU 넘버링으로 표시되는 251번 위치, 252번 위치, 307번 위치, 308번 위치, 378번 위치, 428번 위치, 430번 위치, 434번 위치 및/또는 436번 위치의 아미노산도 적합하게 들 수 있다. 이들 아미노산의 개변에 의해 IgG형 면역글로불린의 Fc영역의 pH 중성역의 조건하에 있어서의 FcRn에 대한 결합이 증강된다.

[1049] 출발 Fc영역으로서 사용되는 인간 IgG형 면역글로불린의 아미노산의 개변에 의해 pH 중성역에 있어서의 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 Fc영역도 또한 취득될 수 있다. 개변을 위한 바람직한 IgG형 면역글로불린의 Fc영역으로서는, 예를 들면 서열번호 : 5, 서열번호 : 6, 서열번호 : 7 또는 서열번호 : 8로 각각 표시되는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 등의 인간 IgG 및 그들의 개변체의 Fc영역을 들 수 있다. 다른 아미노산으로의 개변은 pH 중성역에 있어서의 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 갖거나 또는 중성역에 있어서의 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 높일 수 있는 한, 어떠한 위치의 아미노산도 개변될 수 있다. 항원 결합 분자가 인간 Fc영역으로서 인간 IgG1의 Fc영역을 포함하고 있는 경우, pH 중성역에 있어서의 인간 FcRn에 대한 결합이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 증강되는 효과를 초래하는 개변이 포함되어 있는 것이 바람직하다. 그러한 개변이 가능한 아미노산으로서, 예를 들면 EU 넘버링 221번 위치~225번 위치, 227번 위치, 228번 위치, 230번 위치, 232번 위치, 233번 위치~241번 위치, 243번 위치~252번 위치, 254번 위치~260번 위치, 262번 위치~272번 위치, 274번 위치, 276번 위치, 278번 위치~289번 위치, 291번 위치~312번 위치, 315번 위치~320번 위치, 324번 위치, 325번 위치, 327번 위치~339번 위치, 341번 위치, 343번 위치, 345번 위치, 360번 위치, 362번 위치, 370번 위치, 375번 위치~378번 위치, 380번 위치, 382번 위치, 385번 위치~387번 위치, 389번 위치, 396번 위치, 414번 위치, 416번 위치, 423번 위치, 424번 위치, 426번 위치~438번 위치, 440번 위치 및 442번 위치의 아미노산을 들 수 있다. 이들 아미노산의 개변에 의해 IgG형 면역글로불린의 Fc영역의 pH 중성역에 있어서의 인간 FcRn에 대한 결합이 증강된다.

[1050] 본 발명에 사용하기 위해 이들 개변 중 pH 중성역에 있어서도 인간 FcRn에 대한 결합을 증강시키는 개변이 적절히 선택된다. 특히 바람직한 Fc영역 개변체의 아미노산으로서, 예를 들면 EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치,

248번 위치, 250번 위치, 252번 위치, 254번 위치, 255번 위치, 256번 위치, 257번 위치, 258번 위치, 265번 위치, 286번 위치, 289번 위치, 297번 위치, 298번 위치, 303번 위치, 305번 위치, 307번 위치, 308번 위치, 309번 위치, 311번 위치, 312번 위치, 314번 위치, 315번 위치, 317번 위치, 332번 위치, 334번 위치, 360번 위치, 376번 위치, 380번 위치, 382번 위치, 384번 위치, 385번 위치, 386번 위치, 387번 위치, 389번 위치, 424번 위치, 428번 위치, 433번 위치, 434번 위치 및 436번 위치의 아미노산을 들 수 있다. 이들 아미노산으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환함으로써, 항원 결합 분자에 포함되는 Fc영역의 pH 중성역에 있어서의 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 증강시킬 수 있다.

[1051] 특히 바람직한 개변으로서는, 예를 들면 Fc영역의 EU 넘버링으로 표시되는

[1052] 237번 위치의 아미노산이 Met,

[1053] 248번 위치의 아미노산이 Ile,

[1054] 250번 위치의 아미노산이 Ala, Phe, Ile, Met, Gln, Ser, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1055] 252번 위치의 아미노산이 Phe, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1056] 254번 위치의 아미노산이 Thr,

[1057] 255번 위치의 아미노산이 Glu,

[1058] 256번 위치의 아미노산이 Asp, Asn, Glu 또는 Gln 중 어느 하나,

[1059] 257번 위치의 아미노산이 Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr 또는 Val 중 어느 하나,

[1060] 258번 위치의 아미노산이 His,

[1061] 265번 위치의 아미노산이 Ala,

[1062] 286번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Glu 중 어느 하나,

[1063] 289번 위치의 아미노산이 His,

[1064] 297번 위치의 아미노산이 Ala,

[1065] 303번 위치의 아미노산이 Ala,

[1066] 305번 위치의 아미노산이 Ala,

[1067] 307번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1068] 308번 위치의 아미노산이 Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Gln 또는 Thr 중 어느 하나,

[1069] 309번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Pro 또는 Arg 중 어느 하나,

[1070] 311번 위치의 아미노산이 Ala, His 또는 Ile 중 어느 하나,

[1071] 312번 위치의 아미노산이 Ala 또는 His 중 어느 하나,

[1072] 314번 위치의 아미노산이 Lys 또는 Arg 중 어느 하나,

[1073] 315번 위치의 아미노산이 Ala, Asp 또는 His 중 어느 하나,

[1074] 317번 위치의 아미노산이 Ala,

[1075] 332번 위치의 아미노산이 Val,

[1076] 334번 위치의 아미노산이 Leu,

[1077] 360번 위치의 아미노산이 His,

[1078] 376번 위치의 아미노산이 Ala,

[1079] 380번 위치의 아미노산이 Ala,

[1080] 382번 위치의 아미노산이 Ala,

[1081] 384번 위치의 아미노산이 Ala,

[1082] 385번 위치의 아미노산이 Asp 또는 His 중 어느 하나,

[1083] 386번 위치의 아미노산이 Pro,

[1084] 387번 위치의 아미노산이 Glu,

[1085] 389번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Ser 중 어느 하나,

[1086] 424번 위치의 아미노산이 Ala,

[1087] 428번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1088] 433번 위치의 아미노산이 Lys,

[1089] 434번 위치의 아미노산이 Ala, Phe, His, Ser, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나, 또는

[1090] 436번 위치의 아미노산이 His, Ile, Leu, Phe, Thr 또는 Val

[1091] 을 들 수 있다. 또한 개변되는 아미노산의 수는 특별히 한정되지 않고, 1개소만의 아미노산이 개변될 수 있으며, 2개소 이상의 아미노산이 개변될 수 있다. 이들 아미노산의 개변의 조합으로서는, 예를 들면 표 2-1~2-33에 나타내는 아미노산의 개변을 들 수 있다.

[1092] [표 2-1]

개변체	KD (M)	아미노산 개변 부위
F1	8.10E-07	N434W
F2	3.20E-06	M252Y/S254T/T256E
F3	2.50E-06	N434Y
F4	5.80E-06	N434S
F5	6.80E-06	N434A
F7	5.60E-06	M252Y
F8	4.20E-06	M252W
F9	1.40E-07	M252Y/S254T/T256E/N434Y
F10	6.90E-08	M252Y/S254T/T256E/N434W
F11	3.10E-07	M252Y/N434Y
F12	1.70E-07	M252Y/N434W
F13	3.20E-07	M252W/N434Y
F14	1.80E-07	M252W/N434W
F19	4.60E-07	P257L/N434Y
F20	4.60E-07	V308F/N434Y
F21	3.00E-08	M252Y/V308P/N434Y
F22	2.00E-06	M428L/N434S
F25	9.20E-09	M252Y/S254T/T256E/V308P/N434W
F26	1.00E-06	I332V
F27	7.40E-06	G237M
F29	1.40E-06	I332V/N434Y
F31	2.80E-06	G237M/V308F
F32	8.00E-07	S254T/N434W
F33	2.30E-06	S254T/N434Y
F34	2.80E-07	T256E/N434W
F35	8.40E-07	T256E/N434Y
F36	3.60E-07	S254T/T256E/N434W
F37	1.10E-06	S254T/T256E/N434Y
F38	1.00E-07	M252Y/S254T/N434W
F39	3.00E-07	M252Y/S254T/N434Y
F40	8.20E-08	M252Y/T256E/N434W
F41	1.50E-07	M252Y/T256E/N434Y

[1093]

[1094] 표 2-2는 표 2-1의 계속되는 표이다.

[1095] [표 2-2]

F42	1.00E-06	M252Y/S254T/T256E/N434A
F43	1.70E-06	M252Y/N434A
F44	1.10E-06	M252W/N434A
F47	2.40E-07	M252Y/T256Q/N434W
F48	3.20E-07	M252Y/T256Q/N434Y
F49	5.10E-07	M252F/T256D/N434W
F50	1.20E-06	M252F/T256D/N434Y
F51	8.10E-06	N434F/Y436H
F52	3.10E-06	H433K/N434F/Y436H
F53	1.00E-06	I332V/N434W
F54	8.40E-08	V308P/N434W
F56	9.40E-07	I332V/M428L/N434Y
F57	1.10E-05	G385D/Q386P/N389S
F58	7.70E-07	G385D/Q386P/N389S/N434W
F59	2.40E-06	G385D/Q386P/N389S/N434Y
F60	1.10E-05	G385H
F61	9.70E-07	G385H/N434W
F62	1.90E-06	G385H/N434Y
F63	2.50E-06	N434F
F64	5.30E-06	N434H
F65	2.90E-07	M252Y/S254T/T256E/N434F
F66	4.30E-07	M252Y/S254T/T256E/N434H
F67	6.30E-07	M252Y/N434F
F68	9.30E-07	M252Y/N434H
F69	5.10E-07	M428L/N434W
F70	1.50E-06	M428L/N434Y
F71	8.30E-08	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434W
F72	2.00E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434Y
F73	1.70E-07	M252Y/M428L/N434W
F74	4.60E-07	M252Y/M428L/N434Y
F75	1.40E-06	M252Y/M428L/N434A
F76	1.00E-06	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434A
F77	9.90E-07	T256E/M428L/N434Y
F78	7.80E-07	S254T/M428L/N434W

[1096]

[1097] 표 2-3은 표 2-2의 계속되는 표이다.

[1098] [표 2-3]

F79	5.90E-06	S254T/T256E/N434A
F80	2.70E-06	M252Y/T256Q/N434A
F81	1.60E-06	M252Y/T256E/N434A
F82	1.10E-06	T256Q/N434W
F83	2.60E-06	T256Q/N434Y
F84	2.80E-07	M252W/T256Q/N434W
F85	5.50E-07	M252W/T256Q/N434Y
F86	1.50E-06	S254T/T256Q/N434W
F87	4.30E-06	S254T/T256Q/N434Y
F88	1.90E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434W
F89	3.60E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y
F90	1.90E-08	M252Y/T256E/V308P/N434W
F91	4.80E-08	M252Y/V308P/M428L/N434Y
F92	1.10E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434W
F93	7.40E-07	M252W/M428L/N434W
F94	3.70E-07	P257L/M428L/N434Y
F95	2.60E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434F
F99	6.20E-07	M252Y/T256E/N434H
F101	1.10E-07	M252W/T256Q/P257L/N434Y
F103	4.40E-08	P238A/M252Y/V308P/N434Y
F104	3.70E-08	M252Y/D265A/V308P/N434Y
F105	7.50E-08	M252Y/T307A/V308P/N434Y
F106	3.70E-08	M252Y/V303A/V308P/N434Y
F107	3.40E-08	M252Y/V308P/D376A/N434Y
F108	4.10E-08	M252Y/V305A/V308P/N434Y
F109	3.20E-08	M252Y/V308P/Q311A/N434Y
F111	3.20E-08	M252Y/V308P/K317A/N434Y
F112	6.40E-08	M252Y/V308P/E380A/N434Y
F113	3.20E-08	M252Y/V308P/E382A/N434Y
F114	3.80E-08	M252Y/V308P/S424A/N434Y
F115	6.60E-06	T307A/N434A
F116	8.70E-06	E380A/N434A
F118	1.40E-05	M428L
F119	5.40E-06	T250Q/M428L

[1099]

[1100] 표 2-4는 표 2-3의 계속되는 표이다.

[1101] [표 2-4]

F120	6.30E-08	P257L/V308P/M428L/N434Y
F121	1.50E-08	M252Y/T256E/V308P/M428L/N434W
F122	1.20E-07	M252Y/T256E/M428L/N434W
F123	3.00E-08	M252Y/T256E/V308P/N434Y
F124	2.90E-07	M252Y/T256E/M428L/N434Y
F125	2.40E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434Y
F128	1.70E-07	P257L/M428L/N434W
F129	2.20E-07	P257A/M428L/N434Y
F131	3.00E-06	P257G/M428L/N434Y
F132	2.10E-07	P257I/M428L/N434Y
F133	4.10E-07	P257M/M428L/N434Y
F134	2.70E-07	P257N/M428L/N434Y
F135	7.50E-07	P257S/M428L/N434Y
F136	3.80E-07	P257T/M428L/N434Y
F137	4.60E-07	P257V/M428L/N434Y
F139	1.50E-08	M252W/V308P/N434W
F140	3.60E-08	S239K/M252Y/V308P/N434Y
F141	3.50E-08	M252Y/S298G/V308P/N434Y
F142	3.70E-08	M252Y/D270F/V308P/N434Y
F143	2.00E-07	M252Y/V308A/N434Y
F145	5.30E-08	M252Y/V308F/N434Y
F147	2.40E-07	M252Y/V308I/N434Y
F149	1.90E-07	M252Y/V308L/N434Y
F150	2.00E-07	M252Y/V308M/N434Y
F152	2.70E-07	M252Y/V308Q/N434Y
F154	1.80E-07	M252Y/V308T/N434Y
F157	1.50E-07	P257A/V308P/M428L/N434Y
F158	5.90E-08	P257T/V308P/M428L/N434Y
F159	4.40E-08	P257V/V308P/M428L/N434Y
F160	8.50E-07	M252W/M428I/N434Y
F162	1.60E-07	M252W/M428Y/N434Y
F163	4.20E-07	M252W/M428F/N434Y
F164	3.70E-07	P238A/M252W/N434Y
F165	2.90E-07	M252W/D265A/N434Y

[1102]

[1103] 표 2-5는 표 2-4의 계속되는 표이다.

[1104] [표 2-5]

F166	1.50E-07	M252W/T307Q/N434Y
F167	2.90E-07	M252W/V303A/N434Y
F168	3.20E-07	M252W/D376A/N434Y
F169	2.90E-07	M252W/V305A/N434Y
F170	1.70E-07	M252W/Q311A/N434Y
F171	1.90E-07	M252W/D312A/N434Y
F172	2.20E-07	M252W/K317A/N434Y
F173	7.70E-07	M252W/E380A/N434Y
F174	3.40E-07	M252W/E382A/N434Y
F175	2.70E-07	M252W/S424A/N434Y
F176	2.90E-07	S239K/M252W/N434Y
F177	2.80E-07	M252W/S298G/N434Y
F178	2.70E-07	M252W/D270F/N434Y
F179	3.10E-07	M252W/N325G/N434Y
F182	6.60E-08	P257A/M428L/N434W
F183	2.20E-07	P257T/M428L/N434W
F184	2.70E-07	P257V/M428L/N434W
F185	2.60E-07	M252W/I332V/N434Y
F188	3.00E-06	P257I/Q311I
F189	1.90E-07	M252Y/T307A/N434Y
F190	1.10E-07	M252Y/T307Q/N434Y
F191	1.60E-07	P257L/T307A/M428L/N434Y
F192	1.10E-07	P257A/T307A/M428L/N434Y
F193	8.50E-08	P257T/T307A/M428L/N434Y
F194	1.20E-07	P257V/T307A/M428L/N434Y
F195	5.60E-08	P257L/T307Q/M428L/N434Y
F196	3.50E-08	P257A/T307Q/M428L/N434Y
F197	3.30E-08	P257T/T307Q/M428L/N434Y
F198	4.80E-08	P257V/T307Q/M428L/N434Y
F201	2.10E-07	M252Y/T307D/N434Y
F203	2.40E-07	M252Y/T307F/N434Y
F204	2.10E-07	M252Y/T307G/N434Y
F205	2.00E-07	M252Y/T307H/N434Y
F206	2.30E-07	M252Y/T307I/N434Y

[1105]

[1106] 표 2-6은 표 2-5의 계속되는 표이다.

[1107] [표 2-6]

F207	9.40E-07	M252Y/T307K/N434Y
F208	3.90E-07	M252Y/T307L/N434Y
F209	1.30E-07	M252Y/T307M/N434Y
F210	2.90E-07	M252Y/T307N/N434Y
F211	2.40E-07	M252Y/T307P/N434Y
F212	6.80E-07	M252Y/T307R/N434Y
F213	2.30E-07	M252Y/T307S/N434Y
F214	1.70E-07	M252Y/T307V/N434Y
F215	9.60E-08	M252Y/T307W/N434Y
F216	2.30E-07	M252Y/T307Y/N434Y
F217	2.30E-07	M252Y/K334L/N434Y
F218	2.60E-07	M252Y/G385H/N434Y
F219	2.50E-07	M252Y/T289H/N434Y
F220	2.50E-07	M252Y/Q311H/N434Y
F221	3.10E-07	M252Y/D312H/N434Y
F222	3.40E-07	M252Y/N315H/N434Y
F223	2.70E-07	M252Y/K360H/N434Y
F225	1.50E-06	M252Y/L314R/N434Y
F226	5.40E-07	M252Y/L314K/N434Y
F227	1.20E-07	M252Y/N286E/N434Y
F228	2.30E-07	M252Y/L309E/N434Y
F229	5.10E-07	M252Y/R255E/N434Y
F230	2.50E-07	M252Y/P387E/N434Y
F236	8.90E-07	K248I/M428L/N434Y
F237	2.30E-07	M252Y/M428A/N434Y
F238	7.40E-07	M252Y/M428D/N434Y
F240	7.20E-07	M252Y/M428F/N434Y
F241	1.50E-06	M252Y/M428G/N434Y
F242	8.50E-07	M252Y/M428H/N434Y
F243	1.80E-07	M252Y/M428I/N434Y
F244	1.30E-06	M252Y/M428K/N434Y
F245	4.70E-07	M252Y/M428N/N434Y
F246	1.10E-06	M252Y/M428P/N434Y
F247	4.40E-07	M252Y/M428Q/N434Y

[1108]

[1109] 표 2-7은 표 2-6의 계속되는 표이다.

[1110] [표 2-7]

F249	6.40E-07	M252Y/M428S/N434Y
F250	2.90E-07	M252Y/M428T/N434Y
F251	1.90E-07	M252Y/M428V/N434Y
F252	1.00E-06	M252Y/M428W/N434Y
F253	7.10E-07	M252Y/M428Y/N434Y
F254	7.50E-08	M252W/T307Q/M428Y/N434Y
F255	1.10E-07	M252W/Q311A/M428Y/N434Y
F256	5.40E-08	M252W/T307Q/Q311A/M428Y/N434Y
F257	5.00E-07	M252Y/T307A/M428Y/N434Y
F258	3.20E-07	M252Y/T307Q/M428Y/N434Y
F259	2.80E-07	M252Y/D270F/N434Y
F260	1.30E-07	M252Y/T307A/Q311A/N434Y
F261	8.40E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F262	1.90E-07	M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F263	1.10E-07	M252Y/T307Q/Q311H/N434Y
F264	2.80E-07	M252Y/E382A/N434Y
F265	6.80E-07	M252Y/E382A/M428Y/N434Y
F266	4.70E-07	M252Y/T307A/E382A/M428Y/N434Y
F267	3.20E-07	M252Y/T307Q/E382A/M428Y/N434Y
F268	6.30E-07	P238A/M252Y/M428F/N434Y
F269	5.20E-07	M252Y/V305A/M428F/N434Y
F270	6.60E-07	M252Y/N325G/M428F/N434Y
F271	6.90E-07	M252Y/D376A/M428F/N434Y
F272	6.80E-07	M252Y/E380A/M428F/N434Y
F273	6.50E-07	M252Y/E382A/M428F/N434Y
F274	7.60E-07	M252Y/E380A/E382A/M428F/N434Y
F275	4.20E-08	S239K/M252Y/V308P/E382A/N434Y
F276	4.10E-08	M252Y/D270F/V308P/E382A/N434Y
F277	1.30E-07	S239K/M252Y/V308P/M428Y/N434Y
F278	3.00E-08	M252Y/T307Q/V308P/E382A/N434Y
F279	6.10E-08	M252Y/V308P/Q311H/E382A/N434Y
F280	4.10E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N434Y
F281	9.20E-08	M252Y/V308P/E382A/M428F/N434Y
F282	2.90E-08	M252Y/V308P/E382A/M428L/N434Y

[1111]

[1112] 표 2-8은 표 2-7의 계속되는 표이다.

[1113] [표 2-8]

F283	1.00E-07	M252Y/V308P/E382A/M428Y/N434Y
F284	1.00E-07	M252Y/V308P/M428Y/N434Y
F285	9.90E-08	M252Y/V308P/M428F/N434Y
F286	1.20E-07	S239K/M252Y/V308P/E382A/M428Y/N434Y
F287	1.00E-07	M252Y/V308P/E380A/E382A/M428F/N434Y
F288	1.90E-07	M252Y/T256E/E382A/N434Y
F289	4.80E-07	M252Y/T256E/M428Y/N434Y
F290	4.60E-07	M252Y/T256E/E382A/M428Y/N434Y
F292	2.30E-08	S239K/M252Y/V308P/E382A/M428I/N434Y
F293	5.30E-08	M252Y/V308P/E380A/E382A/M428I/N434Y
F294	1.10E-07	S239K/M252Y/V308P/M428F/N434Y
F295	6.80E-07	S239K/M252Y/E380A/E382A/M428F/N434Y
F296	4.90E-07	M252Y/Q311A/M428Y/N434Y
F297	5.10E-07	M252Y/D312A/M428Y/N434Y
F298	4.80E-07	M252Y/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
F299	9.40E-08	S239K/M252Y/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
F300	8.30E-08	S239K/M252Y/V308P/D312A/M428Y/N434Y
F301	7.20E-08	S239K/M252Y/V308P/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
F302	1.90E-07	M252Y/T256E/T307P/N434Y
F303	6.70E-07	M252Y/T307P/M428Y/N434Y
F304	1.60E-08	M252W/V308P/M428Y/N434Y
F305	2.70E-08	M252Y/T256E/V308P/E382A/N434Y
F306	3.60E-08	M252W/V308P/E382A/N434Y
F307	3.60E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/N434Y
F308	1.90E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/M428Y/N434Y
F310	9.40E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/M428I/N434Y
F311	2.80E-08	S239K/M252W/V308P/M428F/N434Y
F312	4.50E-07	S239K/M252W/E380A/E382A/M428F/N434Y
F313	6.50E-07	S239K/M252Y/T307P/M428Y/N434Y
F314	3.20E-07	M252Y/T256E/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
F315	6.80E-07	S239K/M252Y/M428Y/N434Y
F316	7.00E-07	S239K/M252Y/D270F/M428Y/N434Y
F317	1.10E-07	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428Y/N434Y
F318	1.80E-08	S239K/M252Y/V308P/M428I/N434Y

[1114]

[1115] 표 2-9는 표 2-8의 계속되는 표이다.

[1116] [표 2-9]

F320	2.00E-08	S239K/M252Y/V308P/N325G/E382A/M428I/N434Y
F321	3.20E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/N434Y
F322	9.20E-08	S239K/M252Y/D270F/T307P/V308P/N434Y
F323	2.70E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/N434Y
F324	2.80E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/N434Y
F325	2.10E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F326	7.50E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/N434Y
F327	6.50E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/T307Q/Q311A/N434Y
F328	1.90E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428I/N434Y
F329	1.20E-08	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/N434Y
F330	3.60E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/N434Y
F331	3.00E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/P387E/N434Y
F333	7.40E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/L309E/Q311A/N434Y
F334	1.90E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/M428I/N434Y
F335	1.50E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/M428I/N434Y
F336	1.40E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F337	5.60E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F338	7.70E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/M428I/N434Y
F339	1.90E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/M428I/N434Y
F343	3.20E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428L/N434Y
F344	3.00E-08	S239K/M252Y/V308P/M428L/N434Y
F349	1.50E-07	S239K/M252Y/V308P/L309P/M428L/N434Y
F350	1.70E-07	S239K/M252Y/V308P/L309R/M428L/N434Y
F352	6.00E-07	S239K/M252Y/L309P/M428L/N434Y
F353	1.10E-06	S239K/M252Y/L309R/M428L/N434Y
F354	2.80E-08	S239K/M252Y/T307Q/V308P/M428L/N434Y
F356	3.40E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/P387E/N434Y
F357	1.60E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/N325G/M428I/N434Y
F358	1.00E-07	S239K/M252Y/T307Q/N434Y
F359	4.20E-07	P257V/T307Q/M428I/N434Y
F360	1.30E-06	P257V/T307Q/M428V/N434Y
F362	5.40E-08	P257V/T307Q/N325G/M428L/N434Y
F363	4.10E-08	P257V/T307Q/Q311A/M428L/N434Y
F364	3.50E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428L/N434Y

[1117]

[1118] 표 2-10은 표 2-9의 계속되는 표이다.

[1119] [표 2-10]

F365	5.10E-08	P257V/V305A/T307Q/M428L/N434Y
F367	1.50E-08	S239K/M252Y/E258H/D270F/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F368	2.00E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/E382A/M428I/N434Y
F369	7.50E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428I/N434Y
F372	1.30E-08	S239K/M252W/V308P/M428Y/N434Y
F373	1.10E-08	S239K/M252W/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
F374	1.20E-08	S239K/M252W/T256E/V308P/M428Y/N434Y
F375	5.50E-09	S239K/M252W/N286E/V308P/M428Y/N434Y
F376	9.60E-09	S239K/M252Y/T256E/D270F/N286E/V308P/N434Y
F377	1.30E-07	S239K/M252W/T307P/M428Y/N434Y
F379	9.00E-09	S239K/M252W/T256E/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
F380	5.60E-09	S239K/M252W/T256E/N286E/V308P/M428Y/N434Y
F381	1.10E-07	P257V/T307A/Q311A/M428L/N434Y
F382	8.70E-08	P257V/V305A/T307A/M428L/N434Y
F386	3.20E-08	M252Y/V308P/L309E/N434Y
F387	1.50E-07	M252Y/V308P/L309D/N434Y
F388	7.00E-08	M252Y/V308P/L309A/N434Y
F389	1.70E-08	M252W/V308P/L309E/M428Y/N434Y
F390	6.80E-08	M252W/V308P/L309D/M428Y/N434Y
F391	3.60E-08	M252W/V308P/L309A/M428Y/N434Y
F392	6.90E-09	S239K/M252Y/N286E/V308P/M428I/N434Y
F393	1.20E-08	S239K/M252Y/N286E/V308P/N434Y
F394	5.30E-08	S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F395	2.40E-08	S239K/M252Y/T256E/V308P/N434Y
F396	2.00E-08	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F397	4.50E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/P387E/M428I/N434Y
F398	4.40E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F399	6.50E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/V308P/M428I/N434Y
F400	6.10E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F401	6.90E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/P387E/M428I/N434Y
F402	2.30E-08	P257V/T307Q/M428L/N434W
F403	5.10E-08	P257V/T307A/M428L/N434W
F404	9.40E-08	P257A/T307Q/L309P/M428L/N434Y
F405	1.70E-07	P257V/T307Q/L309P/M428L/N434Y

[1120]

[1121] 표 2-11은 표 2-10의 계속되는 표이다.

[1122] [표 2-11]

F406	1.50E-07	P257A/T307Q/L309R/M428L/N434Y
F407	1.60E-07	P257V/T307Q/L309R/M428L/N434Y
F408	2.50E-07	P257V/N286E/M428L/N434Y
F409	2.00E-07	P257V/P387E/M428L/N434Y
F410	2.20E-07	P257V/T307H/M428L/N434Y
F411	1.30E-07	P257V/T307N/M428L/N434Y
F412	8.80E-08	P257V/T307G/M428L/N434Y
F413	1.20E-07	P257V/T307P/M428L/N434Y
F414	1.10E-07	P257V/T307S/M428L/N434Y
F415	5.60E-08	P257V/N286E/T307A/M428L/N434Y
F416	9.40E-08	P257V/T307A/P387E/M428L/N434Y
F418	6.20E-07	S239K/M252Y/T307P/N325G/M428Y/N434Y
F419	1.60E-07	M252Y/T307A/Q311H/K360H/N434Y
F420	1.50E-07	M252Y/T307A/Q311H/P387E/N434Y
F421	1.30E-07	M252Y/T307A/Q311H/M428A/N434Y
F422	1.80E-07	M252Y/T307A/Q311H/E382A/N434Y
F423	8.40E-08	M252Y/T307W/Q311H/N434Y
F424	9.40E-08	S239K/P257A/V308P/M428L/N434Y
F425	8.00E-08	P257A/V308P/L309E/M428L/N434Y
F426	8.40E-08	P257V/T307Q/N434Y
F427	1.10E-07	M252Y/P257V/T307Q/M428V/N434Y
F428	8.00E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F429	3.70E-08	M252Y/P257V/T307Q/N434Y
F430	8.10E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428Y/N434Y
F431	6.50E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428F/N434Y
F432	9.20E-07	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428V/N434Y
F433	6.00E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/N434Y
F434	2.00E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428Y/N434Y
F435	2.50E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428F/N434Y
F436	2.50E-07	P257A/T307Q/M428V/N434Y
F437	5.70E-08	P257A/T307Q/N434Y
F438	3.60E-08	P257A/T307Q/M428Y/N434Y
F439	4.00E-08	P257A/T307Q/M428F/N434Y
F440	1.50E-08	P257V/N286E/T307Q/Q311A/N325G/M428L/N434Y

[1123]

[1124] 표 2-12는 표 2-11의 계속되는 표이다.

[1125] [표 2-12]

F441	1.80E-07	P257A/Q311A/M428L/N434Y
F442	2.00E-07	P257A/Q311H/M428L/N434Y
F443	5.50E-08	P257A/T307Q/Q311A/M428L/N434Y
F444	1.40E-07	P257A/T307A/Q311A/M428L/N434Y
F445	6.20E-08	P257A/T307Q/Q311H/M428L/N434Y
F446	1.10E-07	P257A/T307A/Q311H/M428L/N434Y
F447	1.40E-08	P257A/N286E/T307Q/M428L/N434Y
F448	5.30E-08	P257A/N286E/T307A/M428L/N434Y
F449	5.70E-07	S239K/M252Y/D270F/T307P/N325G/M428Y/N434Y
F450	5.20E-07	S239K/M252Y/T307P/L309E/N325G/M428Y/N434Y
F451	1.00E-07	P257S/T307A/M428L/N434Y
F452	1.40E-07	P257M/T307A/M428L/N434Y
F453	7.80E-08	P257N/T307A/M428L/N434Y
F454	9.60E-08	P257I/T307A/M428L/N434Y
F455	2.70E-08	P257V/T307Q/M428Y/N434Y
F456	3.40E-08	P257V/T307Q/M428F/N434Y
F457	4.00E-08	S239K/P257V/V308P/M428L/N434Y
F458	1.50E-08	P257V/T307Q/V308P/N325G/M428L/N434Y
F459	1.30E-08	P257V/T307Q/V308P/Q311A/N325G/M428L/N434Y
F460	4.70E-08	P257V/T307A/V308P/N325G/M428L/N434Y
F462	8.50E-08	P257A/V308P/N325G/M428L/N434Y
F463	1.30E-07	P257A/T307A/V308P/M428L/N434Y
F464	5.50E-08	P257A/T307Q/V308P/M428L/N434Y
F465	2.10E-08	P257V/N286E/T307Q/N325G/M428L/N434Y
F466	3.50E-07	T256E/P257V/N434Y
F467	5.70E-07	T256E/P257T/N434Y
F468	5.70E-08	S239K/P257T/V308P/M428L/N434Y
F469	5.60E-08	P257T/V308P/N325G/M428L/N434Y
F470	5.40E-08	T256E/P257T/V308P/N325G/M428L/N434Y
F471	6.60E-08	P257T/V308P/N325G/E382A/M428L/N434Y
F472	5.40E-08	P257T/V308P/N325G/P387E/M428L/N434Y
F473	4.50E-07	P257T/V308P/L309P/N325G/M428L/N434Y
F474	3.50E-07	P257T/V308P/L309R/N325G/M428L/N434Y
F475	4.30E-08	T256E/P257V/T307Q/M428L/N434Y

[1126]

[1127] 표 2-13은 표 2-12의 계속되는 표이다.

[1128] [표 2-13]

F476	5.50E-08	P257V/T307Q/E382A/M428L/N434Y
F477	4.30E-08	P257V/T307Q/P387E/M428L/N434Y
F480	3.90E-08	P257L/V308P/N434Y
F481	5.60E-08	P257T/T307Q/N434Y
F482	7.00E-08	P257V/T307Q/N325G/N434Y
F483	5.70E-08	P257V/T307Q/Q311A/N434Y
F484	6.20E-08	P257V/V305A/T307Q/N434Y
F485	9.70E-08	P257V/N286E/T307A/N434Y
F486	3.40E-07	P257V/T307Q/L309R/Q311H/M428L/N434Y
F488	3.50E-08	P257V/V308P/N325G/M428L/N434Y
F490	7.50E-08	S239K/P257V/V308P/Q311H/M428L/N434Y
F492	9.80E-08	P257V/V305A/T307A/N325G/M428L/N434Y
F493	4.90E-07	S239K/D270F/T307P/N325G/M428Y/N434Y
F497	3.10E-06	P257T/T307A/M428V/N434Y
F498	1.30E-06	P257A/M428V/N434Y
F499	5.20E-07	P257A/T307A/M428V/N434Y
F500	4.30E-08	P257S/T307Q/M428L/N434Y
F506	1.90E-07	P257V/N297A/T307Q/M428L/N434Y
F507	5.10E-08	P257V/N286A/T307Q/M428L/N434Y
F508	1.10E-07	P257V/T307Q/N315A/M428L/N434Y
F509	5.80E-08	P257V/T307Q/N384A/M428L/N434Y
F510	5.30E-08	P257V/T307Q/N389A/M428L/N434Y
F511	4.20E-07	P257V/N434Y
F512	5.80E-07	P257T/N434Y
F517	3.10E-07	P257V/N286E/N434Y
F518	4.20E-07	P257T/N286E/N434Y
F519	2.60E-08	P257V/N286E/T307Q/N434Y
F521	1.10E-08	P257V/N286E/T307Q/M428Y/N434Y
F523	2.60E-08	P257V/V305A/T307Q/M428Y/N434Y
F526	1.90E-08	P257T/T307Q/M428Y/N434Y
F527	9.40E-09	P257V/T307Q/V308P/N325G/M428Y/N434Y
F529	2.50E-08	P257T/T307Q/M428F/N434Y
F533	1.20E-08	P257A/N286E/T307Q/M428F/N434Y
F534	1.20E-08	P257A/N286E/T307Q/M428Y/N434Y

[1129]

[1130] 표 2-14는 표 2-13의 계속되는 표이다.

[1131] [표 2-14]

F535	3.90E-08	T250A/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F538	9.90E-08	T250F/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F541	6.00E-08	T250I/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F544	3.10E-08	T250M/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F549	5.40E-08	T250S/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F550	5.90E-08	T250V/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F551	1.20E-07	T250W/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F552	1.10E-07	T250Y/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F553	1.70E-07	M252Y/Q311A/N434Y
F554	2.80E-08	S239K/M252Y/S254T/V308P/N434Y
F556	1.50E-06	M252Y/T307Q/Q311A
F559	8.00E-08	M252Y/S254T/N286E/N434Y
F560	2.80E-08	M252Y/S254T/V308P/N434Y
F561	1.40E-07	M252Y/S254T/T307A/N434Y
F562	8.30E-08	M252Y/S254T/T307Q/N434Y
F563	1.30E-07	M252Y/S254T/Q311A/N434Y
F564	1.90E-07	M252Y/S254T/Q311H/N434Y
F565	9.20E-08	M252Y/S254T/T307A/Q311A/N434Y
F566	6.10E-08	M252Y/S254T/T307Q/Q311A/N434Y
F567	2.20E-07	M252Y/S254T/M428I/N434Y
F568	1.10E-07	M252Y/T256E/T307A/Q311H/N434Y
F569	2.00E-07	M252Y/T256Q/T307A/Q311H/N434Y
F570	1.30E-07	M252Y/S254T/T307A/Q311H/N434Y
F571	8.10E-08	M252Y/N286E/T307A/Q311H/N434Y
F572	1.00E-07	M252Y/T307A/Q311H/M428I/N434Y
F576	1.60E-06	M252Y/T256E/T307Q/Q311H
F577	1.30E-06	M252Y/N286E/T307A/Q311A
F578	5.70E-07	M252Y/N286E/T307Q/Q311A
F580	8.60E-07	M252Y/N286E/T307Q/Q311H
F581	7.20E-08	M252Y/T256E/N286E/N434Y
F582	7.50E-07	S239K/M252Y/V308P
F583	7.80E-07	S239K/M252Y/V308P/E382A
F584	6.30E-07	S239K/M252Y/T256E/V308P
F585	2.90E-07	S239K/M252Y/N286E/V308P

[1132]

[1133] 표 2-15는 표 2-14의 계속되는 표이다.

[1134] [표 2-15]

F586	1.40E-07	S239K/M252Y/N286E/V308P/M428I
F587	1.90E-07	M252Y/N286E/M428L/N434Y
F592	2.00E-07	M252Y/S254T/E382A/N434Y
F593	3.10E-08	S239K/M252Y/S254T/V308P/M428I/N434Y
F594	1.60E-08	S239K/M252Y/T256E/V308P/M428I/N434Y
F595	1.80E-07	S239K/M252Y/M428I/N434Y
F596	4.00E-07	M252Y/D312A/E382A/M428Y/N434Y
F597	2.20E-07	M252Y/E382A/P387E/N434Y
F598	1.40E-07	M252Y/D312A/P387E/N434Y
F599	5.20E-07	M252Y/P387E/M428Y/N434Y
F600	2.80E-07	M252Y/T256Q/E382A/N434Y
F601	9.60E-09	M252Y/N286E/V308P/N434Y
F608		G236A/S239D/I332E
F611	2.80E-07	M252Y/V305T/T307P/V308I/L309A/N434Y
F612	3.60E-07	M252Y/T307P/V308I/L309A/N434Y
F613		S239D/A330L/I332E
F616		S239D/K326D/L328Y
F617	7.40E-07	S239K/N434W
F618	6.40E-07	S239K/V308F/N434Y
F619	3.10E-07	S239K/M252Y/N434Y
F620	2.10E-07	S239K/M252Y/S254T/N434Y
F621	1.50E-07	S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F622	3.50E-07	S239K/M252Y/T256Q/N434Y
F623	1.80E-07	S239K/M252W/N434W
F624	1.40E-08	S239K/P257A/N286E/T307Q/M428L/N434Y
F625	7.60E-08	S239K/P257A/T307Q/M428L/N434Y
F626	1.30E-06	V308P
F629	3.90E-08	M252Y/V279L/V308P/N434Y
F630	3.70E-08	S239K/M252Y/V279L/V308P/N434Y
F633	2.40E-08	M252Y/V282D/V308P/N434Y
F634	3.20E-08	S239K/M252Y/V282D/V308P/N434Y
F635	4.50E-08	M252Y/V284K/V308P/N434Y
F636	4.80E-08	S239K/M252Y/V284K/V308P/N434Y
F637	1.50E-07	M252Y/K288S/V308P/N434Y

[1135]

[1136] 표 2-16은 표 2-15의 계속되는 표이다.

[1137] [표 2-16]

F638	1.40E-07	S239K/M252Y/K288S/V308P/N434Y
F639	2.70E-08	M252Y/V308P/G385R/N434Y
F640	3.60E-08	S239K/M252Y/V308P/G385R/N434Y
F641	3.00E-08	M252Y/V308P/Q386K/N434Y
F642	3.00E-08	S239K/M252Y/V308P/Q386K/N434Y
F643	3.20E-08	L235G/G236R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F644	3.00E-08	G236R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F645	3.30E-08	S239K/M252Y/V308P/L328R/N434Y
F646	3.80E-08	S239K/M252Y/N297A/V308P/N434Y
F647	2.90E-08	P238D/M252Y/V308P/N434Y
F648		P238D
F649	1.20E-07	S239K/M252Y/N286E/N434Y
F650	1.70E-07	S239K/M252Y/T256E/N434Y
F651	1.80E-07	S239K/M252Y/Q311A/N434Y
F652	2.40E-07	P238D/M252Y/N434Y
F654	3.20E-08	L235K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F655	3.40E-08	L235R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F656	3.30E-08	G237K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F657	3.20E-08	G237R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F658	3.20E-08	P238K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F659	3.00E-08	P238R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F660	3.10E-08	S239K/M252Y/V308P/P329K/N434Y
F661	3.40E-08	S239K/M252Y/V308P/P329R/N434Y
F663	6.40E-09	S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F664	3.90E-08	M252Y/N286A/V308P/N434Y
F665	2.00E-08	M252Y/N286D/V308P/N434Y
F666	2.10E-08	M252Y/N286F/V308P/N434Y
F667	3.00E-08	M252Y/N286G/V308P/N434Y
F668	4.00E-08	M252Y/N286H/V308P/N434Y
F669	3.50E-08	M252Y/N286I/V308P/N434Y
F670	2.10E-07	M252Y/N286K/V308P/N434Y
F671	2.20E-08	M252Y/N286L/V308P/N434Y
F672	2.40E-08	M252Y/N286M/V308P/N434Y
F673	2.30E-08	M252Y/N286P/V308P/N434Y

[1138]

[1139] 표 2-17은 표 2-16의 계속되는 표이다.

[1140] [표 2-17]

F674	3.20E-08	M252Y/N286Q/V308P/N434Y
F675	5.10E-08	M252Y/N286R/V308P/N434Y
F676	3.20E-08	M252Y/N286S/V308P/N434Y
F677	4.70E-08	M252Y/N286T/V308P/N434Y
F678	3.30E-08	M252Y/N286V/V308P/N434Y
F679	1.70E-08	M252Y/N286W/V308P/N434Y
F680	1.50E-08	M252Y/N286Y/V308P/N434Y
F681	4.90E-08	M252Y/K288A/V308P/N434Y
F682	8.20E-08	M252Y/K288D/V308P/N434Y
F683	5.00E-08	M252Y/K288E/V308P/N434Y
F684	5.10E-08	M252Y/K288F/V308P/N434Y
F685	5.30E-08	M252Y/K288G/V308P/N434Y
F686	4.60E-08	M252Y/K288H/V308P/N434Y
F687	4.90E-08	M252Y/K288I/V308P/N434Y
F688	2.80E-08	M252Y/K288L/V308P/N434Y
F689	4.10E-08	M252Y/K288M/V308P/N434Y
F690	1.00E-07	M252Y/K288N/V308P/N434Y
F691	3.20E-07	M252Y/K288P/V308P/N434Y
F692	3.90E-08	M252Y/K288Q/V308P/N434Y
F693	3.60E-08	M252Y/K288R/V308P/N434Y
F694	4.70E-08	M252Y/K288V/V308P/N434Y
F695	4.00E-08	M252Y/K288W/V308P/N434Y
F696	4.40E-08	M252Y/K288Y/V308P/N434Y
F697	3.10E-08	S239K/M252Y/V308P/N325G/N434Y
F698	2.20E-08	M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F699	2.30E-08	S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F700	5.20E-08	M252Y/V308P/L328E/N434Y
F705	7.10E-09	M252Y/N286E/V308P/M428I/N434Y
F706	1.80E-08	M252Y/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F707	5.90E-09	M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F708	4.10E-09	M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F709	2.00E-08	S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F710	1.50E-08	P238D/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F711	6.50E-08	S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y

[1141]

[1142] 표 2-18은 표 2-17의 계속되는 표이다.

[1143] [표 2-18]

F712	6.00E-08	P238D/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F713	2.00E-08	P238D/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F714	2.30E-07	P238D/M252Y/N325S/N434Y
F715	2.30E-07	P238D/M252Y/N325M/N434Y
F716	2.70E-07	P238D/M252Y/N325L/N434Y
F717	2.60E-07	P238D/M252Y/N325I/N434Y
F718	2.80E-07	P238D/M252Y/Q295M/N434Y
F719	7.40E-08	P238D/M252Y/N325G/N434Y
F720	2.40E-08	M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F721	1.50E-08	M252Y/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F722	2.70E-07	P238D/M252Y/A327G/N434Y
F723	2.80E-07	P238D/M252Y/L328D/N434Y
F724	2.50E-07	P238D/M252Y/L328E/N434Y
F725	4.20E-08	L235K/G237R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F726	3.70E-08	L235K/P238K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F729	9.20E-07	T307A/Q311A/N434Y
F730	6.00E-07	T307Q/Q311A/N434Y
F731	8.50E-07	T307A/Q311H/N434Y
F732	6.80E-07	T307Q/Q311H/N434Y
F733	3.20E-07	M252Y/L328E/N434Y
F734	3.10E-07	G236D/M252Y/L328E/N434Y
F736	3.10E-07	M252Y/S267M/L328E/N434Y
F737	3.10E-07	M252Y/S267L/L328E/N434Y
F738	3.50E-07	P238D/M252Y/T307P/N434Y
F739	2.20E-07	M252Y/T307P/Q311A/N434Y
F740	2.90E-07	M252Y/T307P/Q311H/N434Y
F741	3.10E-07	P238D/T250A/M252Y/N434Y
F744	9.90E-07	P238D/T250F/M252Y/N434Y
F745	6.60E-07	P238D/T250G/M252Y/N434Y
F746	6.00E-07	P238D/T250H/M252Y/N434Y
F747	2.80E-07	P238D/T250I/M252Y/N434Y
F749	5.10E-07	P238D/T250L/M252Y/N434Y
F750	3.00E-07	P238D/T250M/M252Y/N434Y
F751	5.30E-07	P238D/T250N/M252Y/N434Y

[1144]

[1145] 표 2-19는 표 2-18의 계속되는 표이다.

[1146] [표 2-19]

F753	1.80E-07	P238D/T250Q/M252Y/N434Y
F755	3.50E-07	P238D/T250S/M252Y/N434Y
F756	3.70E-07	P238D/T250V/M252Y/N434Y
F757	1.20E-06	P238D/T250W/M252Y/N434Y
F758	1.40E-06	P238D/T250Y/M252Y/N434Y
F759		L235K/S239K
F760		L235R/S239K
F761	1.10E-06	P238D/N434Y
F762	3.60E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F763	3.50E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F764	6.30E-07	P238D/T307Q/Q311A/N434Y
F765	8.50E-08	P238D/M252Y/T307Q/L309E/Q311A/N434Y
F766	6.00E-07	T307A/L309E/Q311A/N434Y
F767	4.30E-07	T307Q/L309E/Q311A/N434Y
F768	6.40E-07	T307A/L309E/Q311H/N434Y
F769	4.60E-07	T307Q/L309E/Q311H/N434Y
F770	3.00E-07	M252Y/T256A/N434Y
F771	4.00E-07	M252Y/E272A/N434Y
F772	3.80E-07	M252Y/K274A/N434Y
F773	3.90E-07	M252Y/V282A/N434Y
F774	4.00E-07	M252Y/N286A/N434Y
F775	6.20E-07	M252Y/K338A/N434Y
F776	3.90E-07	M252Y/K340A/N434Y
F777	3.90E-07	M252Y/E345A/N434Y
F779	3.90E-07	M252Y/N361A/N434Y
F780	3.90E-07	M252Y/Q362A/N434Y
F781	3.70E-07	M252Y/S375A/N434Y
F782	3.50E-07	M252Y/Y391A/N434Y
F783	4.00E-07	M252Y/D413A/N434Y
F784	5.00E-07	M252Y/L309A/N434Y
F785	7.40E-07	M252Y/L309H/N434Y
F786	2.80E-08	M252Y/S254T/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F787	8.80E-08	M252Y/S254T/T307Q/L309E/Q311A/N434Y
F788	4.10E-07	M252Y/N315A/N434Y

[1147]

[1148] 표 2-20은 표 2-19의 계속되는 표이다.

[1149] [표 2-20]

F789	1.50E-07	M252Y/N315D/N434Y
F790	2.70E-07	M252Y/N315E/N434Y
F791	4.40E-07	M252Y/N315F/N434Y
F792	4.40E-07	M252Y/N315G/N434Y
F793	3.30E-07	M252Y/N315I/N434Y
F794	4.10E-07	M252Y/N315K/N434Y
F795	3.10E-07	M252Y/N315L/N434Y
F796	3.40E-07	M252Y/N315M/N434Y
F798	3.50E-07	M252Y/N315Q/N434Y
F799	4.10E-07	M252Y/N315R/N434Y
F800	3.80E-07	M252Y/N315S/N434Y
F801	4.40E-07	M252Y/N315T/N434Y
F802	3.30E-07	M252Y/N315V/N434Y
F803	3.60E-07	M252Y/N315W/N434Y
F804	4.00E-07	M252Y/N315Y/N434Y
F805	3.00E-07	M252Y/N325A/N434Y
F806	3.10E-07	M252Y/N384A/N434Y
F807	3.20E-07	M252Y/N389A/N434Y
F808	3.20E-07	M252Y/N389A/N390A/N434Y
F809	2.20E-07	M252Y/S254T/T256S/N434Y
F810	2.20E-07	M252Y/A378V/N434Y
F811	4.90E-07	M252Y/E380S/N434Y
F812	2.70E-07	M252Y/E382V/N434Y
F813	2.80E-07	M252Y/S424E/N434Y
F814	1.20E-07	M252Y/N434Y/Y436I
F815	5.50E-07	M252Y/N434Y/T437R
F816	3.60E-07	P238D/T250V/M252Y/T307P/N434Y
F817	9.80E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F819	1.40E-07	P238D/M252Y/N286E/N434Y
F820	3.40E-07	L235K/S239K/M252Y/N434Y
F821	3.10E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y
F822	1.10E-06	P238D/T250Y/M252Y/W313Y/N434Y
F823	1.10E-06	P238D/T250Y/M252Y/W313F/N434Y
F828	2.50E-06	P238D/T250V/M252Y/I253V/N434Y

[1150]

[1151] 표 2-21은 표 2-20의 계속되는 표이다.

[1152] [표 2-21]

F831	1.60E-06	P238D/T250V/M252Y/R255A/N434Y
F832	2.60E-06	P238D/T250V/M252Y/R255D/N434Y
F833	8.00E-07	P238D/T250V/M252Y/R255E/N434Y
F834	8.10E-07	P238D/T250V/M252Y/R255F/N434Y
F836	5.00E-07	P238D/T250V/M252Y/R255H/N434Y
F837	5.60E-07	P238D/T250V/M252Y/R255I/N434Y
F838	4.30E-07	P238D/T250V/M252Y/R255K/N434Y
F839	3.40E-07	P238D/T250V/M252Y/R255L/N434Y
F840	4.20E-07	P238D/T250V/M252Y/R255M/N434Y
F841	1.10E-06	P238D/T250V/M252Y/R255N/N434Y
F843	6.60E-07	P238D/T250V/M252Y/R255Q/N434Y
F844	1.30E-06	P238D/T250V/M252Y/R255S/N434Y
F847	3.40E-07	P238D/T250V/M252Y/R255W/N434Y
F848	8.30E-07	P238D/T250V/M252Y/R255Y/N434Y
F849	3.30E-07	M252Y/D280A/N434Y
F850	2.90E-07	M252Y/D280E/N434Y
F852	3.30E-07	M252Y/D280G/N434Y
F853	3.20E-07	M252Y/D280H/N434Y
F855	3.20E-07	M252Y/D280K/N434Y
F858	3.20E-07	M252Y/D280N/N434Y
F860	3.30E-07	M252Y/D280Q/N434Y
F861	3.20E-07	M252Y/D280R/N434Y
F862	3.00E-07	M252Y/D280S/N434Y
F863	2.70E-07	M252Y/D280T/N434Y
F867	2.80E-07	M252Y/N384A/N389A/N434Y
F868	2.00E-08	G236A/S239D/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F869		G236A/S239D
F870	7.30E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F871	7.10E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F872	1.30E-07	L235K/S239K/M252Y/N286E/N434Y
F873	1.20E-07	L235R/S239K/M252Y/N286E/N434Y
F875	4.80E-07	M252Y/N434Y/Y436A
F877	8.30E-07	M252Y/N434Y/Y436E
F878	1.90E-07	M252Y/N434Y/Y436F

[1153]

[1154] 표 2-22는 표 2-21의 계속되는 표이다.

[1155] [표 2-22]

F879	9.20E-07	M252Y/N434Y/Y436G
F880	3.90E-07	M252Y/N434Y/Y436H
F881	3.10E-07	M252Y/N434Y/Y436K
F882	1.30E-07	M252Y/N434Y/Y436L
F883	2.10E-07	M252Y/N434Y/Y436M
F884	4.00E-07	M252Y/N434Y/Y436N
F888	4.80E-07	M252Y/N434Y/Y436S
F889	2.20E-07	M252Y/N434Y/Y436T
F890	1.10E-07	M252Y/N434Y/Y436V
F891	1.70E-07	M252Y/N434Y/Y436W
F892	7.10E-08	M252Y/S254T/N434Y/Y436I
F893	9.80E-08	L235K/S239K/M252Y/N434Y/Y436I
F894	9.20E-08	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436I
F895	2.10E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N315E/N434Y
F896	2.00E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N315E/N434Y
F897	9.70E-08	M252Y/N315D/N384A/N389A/N434Y
F898	1.70E-07	M252Y/N315E/N384A/N389A/N434Y
F899	1.10E-07	M252Y/N315D/G316A/N434Y
F900	1.70E-07	M252Y/N315D/G316D/N434Y
F901	1.30E-07	M252Y/N315D/G316E/N434Y
F902	2.20E-07	M252Y/N315D/G316F/N434Y
F903	2.30E-07	M252Y/N315D/G316H/N434Y
F904	1.00E-07	M252Y/N315D/G316I/N434Y
F905	1.30E-07	M252Y/N315D/G316K/N434Y
F906	1.50E-07	M252Y/N315D/G316L/N434Y
F907	1.30E-07	M252Y/N315D/G316M/N434Y
F908	1.50E-07	M252Y/N315D/G316N/N434Y
F909	1.30E-07	M252Y/N315D/G316P/N434Y
F910	1.40E-07	M252Y/N315D/G316Q/N434Y
F911	1.30E-07	M252Y/N315D/G316R/N434Y
F912	1.20E-07	M252Y/N315D/G316S/N434Y
F913	1.10E-07	M252Y/N315D/G316T/N434Y
F914	1.50E-07	M252Y/N315D/G316V/N434Y
F915	2.30E-07	M252Y/N315D/G316W/N434Y

[1156]

[1157] 표 2-23은 표 2-22의 계속되는 표이다.

[1158] [표 2-23]

F917	2.50E-07	M252Y/N286S/N434Y
F918	2.80E-07	M252Y/D280E/N384A/N389A/N434Y
F919	3.30E-07	M252Y/D280G/N384A/N389A/N434Y
F920	2.50E-07	M252Y/N286S/N384A/N389A/N434Y
F921	1.20E-07	M252Y/N286E/N384A/N389A/N434Y
F922	5.90E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/N434Y/Y436I
F923	6.00E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/N434Y/Y436I
F924	3.40E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F925	3.20E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F926	1.10E-07	L235K/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436I
F927	1.00E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436I
F928	2.90E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F929	2.90E-08	M252Y/S254T/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F930	1.40E-07	P238D/T250V/M252Y/N286E/N434Y
F931	1.20E-07	P238D/T250V/M252Y/N434Y/Y436I
F932	3.20E-07	T250V/M252Y/N434Y
F933	3.00E-07	L234R/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F934	3.10E-07	G236K/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F935	3.20E-07	G237K/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F936	3.20E-07	G237R/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F937	3.10E-07	P238D/S239K/T250V/M252Y/N434Y
F938	1.60E-07	L235K/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F939	1.50E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F940	1.50E-07	P238D/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F941	1.20E-08	M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F942	4.20E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F943	4.00E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F944	1.70E-07	T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F945	1.70E-08	T250V/M252Y/V308P/N434Y/Y436V
F946	4.30E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F947	1.10E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F954	5.30E-07	M252Y/N434Y/H435K/Y436V
F957	7.70E-07	M252Y/N434Y/H435N/Y436V
F960	8.00E-07	M252Y/N434Y/H435R/Y436V

[1159]

[1160] 표 2-24는 표 2-23의 계속되는 표이다.

[1161] [표 2-24]

F966	3.10E-07	M252Y/S254A/N434Y
F970	2.50E-06	M252Y/S254G/N434Y
F971	2.60E-06	M252Y/S254H/N434Y
F972	2.60E-07	M252Y/S254I/N434Y
F978	1.30E-06	M252Y/S254Q/N434Y
F980	1.80E-07	M252Y/S254V/N434Y
F987	4.00E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F988	6.90E-08	P238D/T250V/M252Y/N286E/N434Y/Y436V
F989	1.40E-08	L235R/S239K/M252Y/V308P/N434Y/Y436V
F990	9.40E-09	L235R/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F991	1.30E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F992	5.10E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F993	3.80E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F994	2.80E-07	M252Y/N325G/N434Y
F995	2.90E-07	L235R/P238D/S239K/M252Y/N434Y
F996	1.30E-07	L235R/P238D/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F997	3.80E-07	K248I/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F998	8.50E-07	K248Y/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F999	2.10E-07	T250V/M252Y/E258H/N434Y/Y436V
F1005		N325G
F1008	1.70E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F1009	1.20E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1010	1.90E-07	L235R/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F1011	4.50E-08	T250V/M252Y/V308P/N434Y
F1012	4.70E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/V308P/N434Y
F1013	3.00E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1014	3.20E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1015	2.20E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1016	3.80E-09	T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1017	4.20E-09	L235R/S239K/T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1018	3.20E-09	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1019	3.40E-07	P238D/T250V/M252Y/N325G/N434Y
F1020	8.50E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N325G/N434Y

[1162]

[1163] 표 2-25는 표 2-24의 계속되는 표이다.

[1164] [표 2-25]

F1021	3.30E-07	P238D/T250V/M252Y/N325A/N434Y
F1022		K326D/L328Y
F1023	4.40E-08	S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1024	4.00E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/K326D/L328Y/N434Y/Y436V
F1025	3.60E-08	S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/K326D/L328Y/N434Y/Y436V
F1026	8.40E-08	M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V
F1027	8.60E-08	L235R/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V
F1028	4.60E-08	G236A/S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1029	5.10E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/I332E/N434Y/Y436V
F1030		I332E
F1031	5.30E-08	G236A/S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/I332E/N434Y/Y436V
F1032	4.30E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N325G/N434Y/Y436V
F1033	1.00E-06	P238D/N434W
F1034	1.50E-08	L235K/S239K/M252Y/V308P/N434Y/Y436V
F1035	1.00E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1036	1.40E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1037	6.10E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F1038	2.80E-07	L235K/P238D/S239K/M252Y/N434Y
F1039	1.30E-07	L235K/P238D/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F1040	2.00E-07	L235K/S239K/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F1041	1.40E-08	L235K/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1042	2.00E-07	L235K/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F1043	5.20E-08	L235K/S239K/T250V/M252Y/V308P/N434Y
F1044	3.50E-08	L235K/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1045	2.50E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1046	4.50E-09	L235K/S239K/T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1047	3.40E-09	L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1048	9.90E-08	L235K/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V
F1050	3.50E-09	T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F1051	3.90E-09	L235R/S239K/T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F1052	3.20E-09	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y/Y436V

[1165]

[1166] 표 2-26은 표 2-25의 계속되는 표이다.

[1167] [표 2-26]

F1053	4.23E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1058	1.31E-07	M252Y/Q386E/N434Y/Y436V
F1059	1.39E-07	M252Y/Q386R/N434Y/Y436V
F1060	1.43E-07	M252Y/Q386S/N434Y/Y436V
F1061	1.19E-07	M252Y/P387E/N434Y/Y436V
F1062	1.2E-07	M252Y/P387R/N434Y/Y436V
F1063	1.43E-07	M252Y/P387S/N434Y/Y436V
F1064	1.32E-07	M252Y/V422E/N434Y/Y436V
F1065	1.38E-07	M252Y/V422R/N434Y/Y436V
F1066	1.45E-07	M252Y/V422S/N434Y/Y436V
F1067	1.26E-07	M252Y/S424E/N434Y/Y436V
F1068	1.69E-07	M252Y/S424R/N434Y/Y436V
F1069	1.39E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438E
F1070	1.73E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R
F1071	1.24E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438S
F1072	1.35E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440E
F1073	1.34E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440R
F1074	1.32E-07	S239D/M252Y/N434Y/Y436V
F1075	1.4E-07	M252Y/K326D/L328Y/N434Y/Y436V
F1076	1.27E-07	S239D/M252Y/K326D/L328Y/N434Y/Y436V
F1077	2.03E-06	K248N/M252Y/N434Y
F1078	4.7E-07	M252Y/E380N/E382S/N434Y
F1079	3.44E-07	M252Y/E382N/N384S/N434Y
F1080	3.19E-07	M252Y/S424N/N434Y
F1081	6.2E-07	M252Y/N434Y/Y436N/Q438T
F1082	2.76E-07	M252Y/N434Y/Q438N
F1083	3.45E-07	M252Y/N434Y/S440N
F1094	2.6E-07	M252Y/N434Y/S442N
F1095	2.86E-07	M252Y/S383N/G385S/N434Y
F1096	2.72E-07	M252Y/Q386T/N434Y
F1097	2.82E-07	M252Y/G385N/P387S/N434Y
F1098	2.58E-07	S239D/M252Y/N434Y
F1099	2.57E-07	M252Y/K326D/L328Y/N434Y
F1100	2.41E-07	S239D/M252Y/K326D/L328Y/N434Y
F1101	6.59E-08	S239D/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F1102	6.46E-08	M252Y/T307Q/Q311A/K326D/L328Y/N434Y
F1103	6.11E-08	S239D/M252Y/T307Q/Q311A/K326D/L328Y/N434Y
F1104	1.77E-07	M252Y/V422E/S424R/N434Y/Y436V
F1105	1.54E-07	M252Y/V422S/S424R/N434Y/Y436V
F1106	1.42E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1107	1.23E-07	M252Y/V422D/N434Y/Y436V

[1168]

[1169] 표 2-27은 표 2-26의 계속되는 표이다.

[1170] [표 2-27]

F1108	1.26E-07	M252Y/V422K/N434Y/Y436V
F1109	1.27E-07	M252Y/V422T/N434Y/Y436V
F1110	1.33E-07	M252Y/V422Q/N434Y/Y436V
F1111	1.65E-07	M252Y/S424K/N434Y/Y436V
F1112	1.23E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438K
F1113	1.18E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440D
F1114	1.31E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440Q
F1115	1.35E-07	M252Y/S424N/N434Y/Y436V
F1116	7.44E-08	M252Y/T307Q/Q311A/S424N/N434Y
F1117	4.87E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/S424N/N434Y/Y436V
F1118	1.32E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/S424N/N434Y/Y436V
F1119	1.03E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/V422E/N434Y/Y436V
F1120	1.04E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/S424R/N434Y/Y436V
F1121	1.04E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/V422E/S424R/N434Y/Y436V
F1122	1.37E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R
F1123	9.55E-09	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/S440E
F1124	1.22E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1125	5.18E-08	M252Y/T307Q/N434Y/Y436V
F1126	8.95E-08	M252Y/T307A/N434Y/Y436V
F1127	7.94E-08	M252Y/Q311A/N434Y/Y436V
F1128	1.17E-07	M252Y/Q311H/N434Y/Y436V
F1129	4.48E-08	M252Y/T307Q/Q311H/N434Y/Y436V
F1130	5.54E-08	M252Y/T307A/Q311A/N434Y/Y436V
F1131	1.29E-07	L235R/S239K/M252Y/V422E/N434Y/Y436V
F1132	1.4E-07	L235R/S239K/M252Y/V422S/N434Y/Y436V
F1133	1.58E-07	L235R/S239K/M252Y/S424R/N434Y/Y436V
F1134	1.66E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R
F1135	1.26E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/S440E
F1136	1.63E-07	L235R/S239K/M252Y/V422E/S424R/N434Y/Y436V
F1137	1.58E-07	L235R/S239K/M252Y/V422S/S424R/N434Y/Y436V
F1138	1.65E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1139	1.52E-07	L235R/S239K/M252Y/S424N/N434Y/Y436V
F1140	1.62E-07	M252Y/V422E/S424R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1141	1.77E-07	M252Y/V422S/S424R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1142	1.87E-07	L235R/S239K/M252Y/V422E/S424R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1143	1.98E-07	L235R/S239K/M252Y/V422S/S424R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1144	1.44E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1145	5.23E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1146	6.24E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1147	7.19E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Q438R/S440E

[1171]

[1172] 표 2-28은 표 2-27의 계속되는 표이다.

[1173] [표 2-28]

F1148	7.63E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Q438R/S440E
F1151	2.51E-07	L235R/S239K/M252Y/S424N/N434Y
F1152	7.38E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/S424N/N434Y
F1153	4.85E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/S424N/N434Y/Y436V
F1154	1.34E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/S424N/N434Y/Y436V
F1157	2.09E-07	M252Y/N434Y/Q438R/S440E
F1158	2.44E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Q438R/S440E
F1159	4.79E-07	S424N/N434W
F1160	2.88E-07	V308F/S424N/N434Y
F1161	1.07E-06	I332V/S424N/N434Y
F1162	3.43E-07	P238D/T250Y/M252Y/N434Y/Y436V
F1163	1.54E-07	P238D/T250Y/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F1164	6.96E-08	P238D/T250Y/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1165	1.63E-08	P238D/T250Y/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1174	4.9E-07	P257I/N434H
F1176	1.98E-06	V308F
F1178	8.72E-07	V259I/V308F/M428L
F1183	1.28E-06	E380A/M428L/N434S
F1184	1E-06	T307A/M428L/N434S
F1185	9.17E-07	T307A/E380A/M428L/N434S
F1188	1.72E-06	T307A/E380A/N434H
F1189	1.57E-07	M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1190	2.4E-07	M252Y/H433E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1191	2.11E-07	M252Y/N434Y/Y436V/T437A/Q438R/S440E
F1192	1.27E-07	M252Y/N434Y/Y436V/T437G/Q438R/S440E
F1194	1.55E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/K439D/S440E
F1195	1.76E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E/L441A
F1196	1.51E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E/L441E
F1197	9.46E-08	M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1198	7.83E-08	M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1199	6.25E-08	M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1200	1.26E-07	T250V/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1201	1.07E-07	T250V/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1202	8.81E-08	T250V/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1203	1.52E-07	M252Y/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1204	1.18E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1205	1.98E-07	T250V/M252Y/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1206	1.69E-07	T250V/M252Y/S254T/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1207	1.11E-06	I332E/M428L/N434S
F1208	5.71E-07	L251A/M252Y/N434Y/Y436V
F1211	1.23E-06	L251H/M252Y/N434Y/Y436V

[1174]

[1175] 표 2-29는 표 2-28의 계속되는 표이다.

[1176] [표 2-29]

F1213	6.33E-07	L251N/M252Y/N434Y/Y436V
F1216	1.16E-06	L251S/M252Y/N434Y/Y436V
F1217	1.14E-06	L251T/M252Y/N434Y/Y436V
F1218	2.51E-07	L251V/M252Y/N434Y/Y436V
F1229	2.81E-06	M252Y/I253V/N434Y/Y436V
F1230	1.12E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1231	9.73E-08	M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1232	9.79E-08	M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1243	1.25E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1244	1.02E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1245	8.2E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1246	1.73E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1247	1.45E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1248	1.2E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1249	2.06E-07	L235R/S239K/M252Y/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1250	1.66E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1251	2.77E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1252	2.33E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/S254T/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1253	1.12E-07	L235R/S239K/M252Y/T307A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1254	6.42E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1255	1.11E-07	L235R/S239K/M252Y/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1256	1.56E-07	L235R/S239K/M252Y/Q311H/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1257	7.81E-08	L235R/S239K/M252Y/T307A/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1258	1.05E-07	L235R/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1259	4.46E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1260	6.53E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311H/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1261	1.35E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1262	1.26E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1263	1.24E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1264	1.27E-07	L235R/S239K/M252Y/T256A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1265	1.57E-07	L235R/S239K/M252Y/T256G/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1266	9.99E-08	L235R/S239K/M252Y/T256N/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1267	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/S254A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1268	2E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1269	1.69E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1270	1.18E-07	L235R/S239K/M252Y/S254A/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1271	2.05E-07	L235R/S239K/M252Y/S254A/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1272	1.71E-07	L235R/S239K/M252Y/S254A/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1273	1.53E-07	L235R/S239K/M252Y/T256Q/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1274	2.48E-07	L235R/S239K/M252Y/T256Q/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1275	2.09E-07	L235R/S239K/M252Y/T256Q/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D

[1177]

[1178] 표 2-30은 표 2-29의 계속되는 표이다.

[1179] [표 2-30]

F1276	1.02E-07	L235R/S239K/M252Y/T256A/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1277	1.69E-07	L235R/S239K/M252Y/T256A/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1278	1.4E-07	L235R/S239K/M252Y/T256A/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1279	1.23E-07	L235R/S239K/M252Y/T256G/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1280	2.09E-07	L235R/S239K/M252Y/T256G/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1281	1.74E-07	L235R/S239K/M252Y/T256G/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1282	7.69E-08	L235R/S239K/M252Y/T256N/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1283	1.34E-07	L235R/S239K/M252Y/T256N/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1284	1.12E-07	L235R/S239K/M252Y/T256N/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1285	9.36E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1286	1.57E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1287	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1288	7.95E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1289	1.33E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1290	1.11E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1291	1.51E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V
F1292	4.24E-07	L235R/S239K/H433D/N434W/Y436V/Q438R/S440E
F1293	1.61E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Q438R/S440E
F1294	2E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1295	9.84E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1296	2.27E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Q438R/S440E
F1297	2.5E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1298	1.47E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1299	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Q438K/S440D
F1300	1.63E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1301	8.3E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436F/Q438K/S440D
F1302	2.15E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Q438K/S440D
F1303	2.1E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1304	1.24E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440D
F1305	2.05E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1306	1.92E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1307	1.44E-07	L235R/S239K/M252Y/V422A/S424A/N434Y/Y436V
F1308	2.06E-07	L235R/S239K/M252Y/V422L/S424L/N434Y/Y436V
F1309	1.26E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438A/S440A
F1310	2.28E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438L/S440L
F1311	1.69E-07	L235R/S239K/M252Y/V422A/S424A/H433D/N434Y/Y436V
F1312	1.79E-07	L235R/S239K/M252Y/V422L/S424L/H433D/N434Y/Y436V
F1313	1.77E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438A/S440A
F1314	2.27E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438L/S440L
F1315	1.52E-07	G237K/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F1316	1.49E-07	G237R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V

[1180]

[1181] 표 2-31은 표 2-30의 계속되는 표이다.

[1182] [표 2-31]

F1317	1.38E-07	S239K/M252Y/P329K/N434Y/Y436V
F1318	1.43E-07	S239K/M252Y/P329R/N434Y/Y436V
F1319	2.67E-07	M252Y/L328Y/N434Y
F1320	1.22E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1321	1.03E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1322	1.6E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1323	1.49E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1324	1.32E-07	L234A/L235A/M252Y/N434Y/Y436V
F1325	2.13E-07	L234A/L235A/M252Y/N297A/N434Y/Y436V
F1326	1.09E-08	L234A/L235A/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1327	1.41E-08	L234A/L235A/T250V/M252Y/N297A/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1328	1.52E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1329	1.29E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1330	1.03E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1331	7.75E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1333	1.23E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F1334	1.04E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1335	8.78E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1336	7.18E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1337	7.41E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1338	1.04E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1339	2.51E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1340	5.58E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1341	3.22E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1342	2.51E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1343	2.01E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1344	3.96E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1345	1.05E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1346	8.59E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1347	7.14E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1348	5.52E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1349	3.36E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1350	1.18E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1351	1.62E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1352	3.93E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1353	4.33E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1354	2.29E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1355	2.47E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1356	1.58E-07	G236R/M252Y/L328R/N434Y/Y436V
F1357	2.81E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1358	9.07E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436F/Q438K/S440E

[1183]

[1184] 표 2-32는 표 2-31의 계속되는 표이다.

[1185] [표 2-32]

F1359	1.28E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1360	3.12E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1361	3.52E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1362	1.41E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1363	1.9E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1364	7.49E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1365	3.14E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1366	1.17E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1367	1.79E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1368	5.49E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1369	7.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1370	9.14E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1371	1.09E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1372	2.28E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1373	8.67E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1374	1.2E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1375	1.03E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V
F1376	9.09E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V
F1377	8.27E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V
F1378	3.61E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T
F1379	2.85E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F
F1410	1.90E-06	V308P/I332V
F1411	1.70E-07	V308P/I332V/M428L/N434S
F1413	3.70E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/T307Q/Q311A/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1414	5.60E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/T307Q/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1415	5.90E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/Q311A/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1416	1.30E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1417	5.90E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434W/Y436V/Q438K/S440E
F1418	7.50E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434W/Y436V/Q438R/S440E
F1419	1.50E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434W/Y436V/Q438R/S440E
F1420	1.30E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434W/Y436V/Q438K/S440E
F1421	3.20E-08	V308P/M428L/N434W
F1422	1.90E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1423	1.60E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V302D/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1424	1.60E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V302E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

[1186]

[1187] 표 2-33은 표 2-32의 계속되는 표이다.

[1188] [표 2-33]

F1425	1.90E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V303D/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1426	1.80E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V303E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1428	1.30E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/S304E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1430	3.10E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V305E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1433	4.30E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/T307D/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1434	3.60E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/T307E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

[1189]

[1190] 2분자의 FcRn 및 1분자의 활성형 Fcγ 수용체의 4자를 포함하는 헤테로 복합체

[1191] FcRn과 IgG 항체의 결정학적 연구에 의해 FcRn-IgG 복합체는 2분자의 FcRn에 대해 1분자의 IgG로부터 구성되고, IgG의 Fc영역의 양측에 위치하는 CH2 및 CH3 도메인의 접촉면 부근에 있어서 2분자의 결합이 일어나는 것으로 생각되고 있다(Burmeister 등(Nature (1994) 372, 336-343). 한편 PCT/JP2012/058603의 실시예 3에 있어서 확인된 바와 같이, 항체의 Fc영역이 2분자의 FcRn 및 1분자의 활성형 Fcγ 수용체의 4자를 포함하는 복합체를 형성할 수 있는 것이 명확해졌다(PCT/JP2012/058603). 이 헤테로 복합체의 형성은 pH 중성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자의 성질에 대해서 해석을 진행한 결과 명확해진 현상이다.

[1192] 본 발명은 특정 이론에 구속되는 것은 아니나, 항원 결합 분자에 포함되는 Fc영역과 2분자의 FcRn 및 1분자의 활성형 Fcγ 수용체의 4자를 포함하는 헤테로 복합체의 형성에 의해 항원 결합 분자가 생체내에 투여되었을 때의 항원 결합 분자의 당해 생체내에 있어서의 약물동태(혈장 중 체류성) 및 투여된 항원 결합 분자에 대한 면역응답(면역원성)에 대해 아래와 같은 영향이 초래되는 것도 생각할 수 있다. 면역세포 상에는 각종 활성형 Fcγ 수용체에 더하여 FcRn이 발현되고 있어, 항원 결합 분자가 면역세포 상에서 이러한 4자 복합체를 형성하는 것은 면역세포에 대한 친화성을 향상시키고, 또한 세포내 도메인을 회합화시킴으로써 내재화 시그날을 증강시켜, 면역세포로의 흡수가 촉진되는 것이 시사된다. 항원 제시 세포에 있어서도 마찬가지로, 항원 제시 세포의 세포막 상에서 4자 복합체를 형성함으로써 항원 결합 분자가 항원 제시 세포로 흡수되기 쉬워질 가능성이 시사된다. 일반적으로 항원 제시 세포에 흡수된 항원 결합 분자는 항원 제시 세포내의 리소좀에 있어서 분해되어, T세포로 제시된다. 결과적으로 항원 제시 세포의 세포막 상에서 상기 4자 복합체를 형성함으로써, 항원 결합 분자에 대한 항원 제시 세포로의 흡수가 촉진됨으로써 항원 결합 분자의 혈장 중 체류성이 악화될 가능성도 있다. 또한 마찬가지로 면역응답이 유기될(더 악화될) 가능성이 있다.

[1193] 이 때문에 이러한 4자 복합체를 형성하는 능력이 저하된 항원 결합 분자가 생체에 투여된 경우, 당해 항원 결합 분자의 혈장 중 체류성이 향상되고, 당해 생체에 의한 면역응답의 유기가 억제되는 것으로 생각될 수 있다. 이러한 항원 제시 세포를 포함하는 면역세포 상에 있어서의 당해 복합체의 형성을 저해하는 항원 결합 분자의 바람직한 양태로서 아래의 3종류를 들 수 있다.

[1194] 헤테로 복합체의 형성을 저해하는 항원 결합 분자

[1195] (양태 1) pH 중성역 조건하에서의 FcRn에 대한 결합 활성을 갖고, 활성형 FcγR에 대한 결합 활성이 천연형 Fc영역의 활성형 FcγR에 대한 결합 활성보다 낮은 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자

[1196] 양태 1의 항원 결합 분자는 2분자의 FcRn에 결합함으로써 3자 복합체를 형성하는데, 활성형 FcγR을 포함한 복합체는 형성하지 않는다. 활성형 FcγR에 대한 결합 활성이 천연형 Fc영역의 활성형 FcγR에 대한 결합 활성보다 낮은 Fc영역은 상기와 같이 천연형 Fc영역의 아미노산을 개변함으로써 제작될 수 있다. 개변 Fc영역의 활성형 FcγR에 대한 결합 활성이 천연형 Fc영역의 활성형 FcγR에 대한 결합 활성보다 낮은지 여부는 상기 결합 활성의 항목에서 기재된 방법을 사용하여 적절히 실시될 수 있다.

[1197] 활성형 Fcγ 수용체로서는 FcγRIa, FcγRIb 및 FcγRIc를 포함하는 FcγRI(CD64), FcγRIIa(알로타입 R131 및 H131을 포함한다) 및 아이소폼 FcγRIIIa(알로타입 V158 및 F158을 포함한다) 및 FcγRIIIb(알로타입 FcγRIIIb-NA1 및 FcγRIIIb-NA2를 포함한다)를 포함하는 FcγRIII(CD16)를 적합하게 들 수 있다.

[1198] 본 명세서에 있어서 Fc영역 개변체의 활성형 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성이 천연형 Fc영역의 활성형 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성보다도 낮다는 것은, Fc영역 개변체의 FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa 및/또는 FcγRIIIb 중 어느 하나의 인간 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성이 이들 인간 Fcγ 수용체에 대한 천연형 Fc영역의 결합 활성보다도 낮은 것을 말한다. 예를 들면 상기의 해석방법을 토대로, 대조로 하는 천연형 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자의 결합 활성과 비교하여 Fc영역 개변체를 포함하는 항원 결합 분자의 결합 활성이 95% 이하, 바람직하게는 90% 이하, 85% 이하, 80% 이하, 75% 이하, 특히 바람직하게는 70% 이하, 65% 이하, 60% 이하, 55% 이하, 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 1% 이하의 결합 활성을 나타내는 것을 말한다. 천연형 Fc영역으로서는 출발 Fc영역도 사용될 수 있고, 야생형 항체의 상이한 아이소타입의 Fc영역도 사용될 수 있다.

[1199] 또한 천연형의 활성형 FcγR에 대한 결합 활성이란 인간 IgG1의 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성인 것이 바람직하고, Fcγ 수용체에 대한 결합 활성을 저감시키기 위해서는 상기 개변 이외에도 인간 IgG2, 인간 IgG3, 인간

IgG4에 아이소타입을 변경하는 것으로도 달성할 수 있다. 또한 FcγR 수용체에 대한 결합 활성을 저하시키는 것은 상기 개변 이외에도 FcγR 수용체에 대한 결합 활성을 갖는 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자를 대장균 등의 당쇄를 부가하지 않는 숙주에서 발현시킴으로써도 얻을 수 있다.

[1200] 대조로 하는 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자로서는, IgG 단일클론항체의 Fc영역을 갖는 항원 결합 분자가 적절히 사용될 수 있다. 당해 Fc영역의 구조는 서열번호 : 5(RefSeq 등록번호 AAC82527.1의 N말단에 A 부가), 6(RefSeq 등록번호 AAB59393.1의 N말단에 A 부가), 7(RefSeq 등록번호 CAA27268.1), 8(RefSeq 등록번호 AAB59394.1의 N말단에 A 부가)에 기재되어 있다. 또한 어떤 특정 아이소타입 항체의 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자를 피검물질로서 사용하는 경우에는 당해 특정 아이소타입의 IgG 단일클론항체의 Fc영역을 갖는 항원 결합 분자를 대로조서 사용함으로써 당해 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자에 의한 FcγR 수용체에 대한 결합 활성의 효과가 검증된다. 상기와 같이 하여 FcγR 수용체에 대한 결합 활성이 높은 것이 검증된 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자가 적절히 선택된다.

[1201] 본 발명의 비한정의 일태양에서는, 활성형 FcγR에 대한 결합 활성이 천연형 Fc영역의 활성형 FcγR에 대한 결합 활성보다 낮은 Fc영역의 예로서,

[1202] 상기 Fc영역의 아미노산 중 EU 넘버링으로 표시되는 234, 235, 236, 237, 238, 239, 270, 297, 298, 325, 328 및 329 중 어느 하나 이상의 아미노산이 천연형 Fc영역과 상이한 아미노산으로 개변되어 있는 Fc영역을 적합하게 들 수 있는데, Fc영역의 개변은 상기 개변에 한정되지 않고, 예를 들면 Cur. Opin. in Biotech. (2009) 20 (6), 685-691에 기재되어 있는 탈당쇄(N297A, N297Q), IgG1-L234A/L235A, IgG1-A325A/A330S/P331S, IgG1-C226S/C229S, IgG1-C226S/C229S/E233P/L234V/L235A, IgG1-L234F/L235E/P331S, IgG1-S267E/L328F, IgG2-V234A/G237A, IgG2-H268Q/V309L/A330S/A331S, IgG4-L235A/G237A/E318A, IgG4-L236E 등의 개변 및 국제공개 WO2008/092117에 기재되어 있는 G236R/L328R, L235G/G236R, N325A/L328R, N325L/L328R 등의 개변 및 EU 넘버링 233번 위치, 234번 위치, 235번 위치, 237번 위치에 있어서의 아미노산의 삽입, 국제공개 WO2000/042072에 기재되어 있는 개소의 개변이어도 된다.

[1203] 또한 본 발명의 비한정의 일태양에서는, 상기 Fc영역의 EU 넘버링으로 표시되는 아미노산으로서 ;

[1204] 234번 위치의 아미노산을 Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr 또는 Trp 중 어느 하나,

[1205] 235번 위치의 아미노산을 Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Val 또는 Arg 중 어느 하나,

[1206] 236번 위치의 아미노산을 Arg, Asn, Gln, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1207] 237번 위치의 아미노산을 Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Val, Tyr 또는 Arg 중 어느 하나,

[1208] 238번 위치의 아미노산을 Ala, Asn, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Thr, Trp 또는 Arg 중 어느 하나,

[1209] 239번 위치의 아미노산을 Gln, His, Lys, Phe, Pro, Trp, Tyr 또는 Arg 중 어느 하나,

[1210] 265번 위치의 아미노산을 Ala, Arg, Asn, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr 또는 Val 중 어느 하나,

[1211] 266번 위치의 아미노산을 Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1212] 267번 위치의 아미노산을 Arg, His, Lys, Phe, Pro, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1213] 269번 위치의 아미노산을 Ala, Arg, Asn, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr 또는 Val 중 어느 하나,

[1214] 270번 위치의 아미노산을 Ala, Arg, Asn, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr 또는 Val 중 어느 하나,

[1215] 271번 위치의 아미노산을 Arg, His, Phe, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1216] 295번 위치의 아미노산을 Arg, Asn, Asp, Gly, His, Phe, Ser, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1217] 296번 위치의 아미노산을 Arg, Gly, Lys 또는 Pro 중 어느 하나,

[1218] 297번 위치의 아미노산을 Ala,

[1219] 298번 위치의 아미노산을 Arg, Gly, Lys, Pro, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1220] 300번 위치의 아미노산을 Arg, Lys 또는 Pro 중 어느 하나,

[1221] 324번 위치의 아미노산을 Lys 또는 Pro 중 어느 하나,

[1222] 325번 위치의 아미노산을 Ala, Arg, Gly, His, Ile, Lys, Phe, Pro, Thr, Trp, Tyr, 또는 Val 중 어느 하나,

[1223] 327번 위치의 아미노산을 Arg, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr 또는 Val 중 어느 하나,

[1224] 328번 위치의 아미노산을 Arg, Asn, Gly, His, Lys 또는 Pro 중 어느 하나,

[1225] 329번 위치의 아미노산을 Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val 또는 Arg 중 어느 하나,

[1226] 330번 위치의 아미노산을 Pro 또는 Ser 중 어느 하나,

[1227] 331번 위치의 아미노산을 Arg, Gly 또는 Lys 중 어느 하나, 또는

[1228] 332번 위치의 아미노산을 Arg, Lys 또는 Pro 중 어느 하나

[1229] 중 어느 하나 이상으로 개변되어 있는 Fc영역을 적합하게 들 수 있다.

[1230] (양태 2) pH 중성역 조건하에서의 FcRn에 대한 결합 활성을 갖고, 억제형 FcγR에 대한 결합 활성이 활성형 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성보다도 높은 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자

[1231] 양태 2의 항원 결합 분자는 2분자의 FcRn과 1분자의 억제형 FcγR에 결합함으로써 이들 4자를 포함하는 복합체를 형성할 수 있다. 그러나 1분자의 항원 결합 분자는 1분자의 FcγR과만 결합할 수 있기 때문에, 1분자의 항원 결합 분자는 억제형 FcγR에 결합한 상태로 다른 활성형 FcγR에 결합하는 것은 불가능하다. 또한 억제형 FcγR에 결합한 상태로 세포내로 흡수된 항원 결합 분자는 세포막 상으로 리사이클되어 세포내에서의 분해를 회피하는 것이 보고되어 있다(Immunity (2005) 23, 503-514). 즉, 억제형 FcγR에 대한 선택적 결합 활성을 갖는 항원 결합 분자는 면역응답의 원인이 되는 활성형 FcγR 및 2분자의 FcRn을 포함한 헤테로 복합체를 형성할 수 없는 것으로 생각된다.

[1232] 활성형 Fcγ 수용체로서는 FcγRIa, FcγRIb 및 FcγRIc를 포함하는 FcγRI(CD64), FcγRIIa(알로타입 R131 및 H131을 포함한다) 및 아이소폼 FcγRIIIa(알로타입 V158 및 F158을 포함한다) 및 FcγRIIIb(알로타입 FcγRIIIb-NA1 및 FcγRIIIb-NA2를 포함한다)를 포함하는 FcγRIII(CD16)를 적합하게 들 수 있다. 또한 FcγRIIb(FcγRIIb-1 및 FcγRIIb-2를 포함한다)를 억제형 Fcγ 수용체의 적합한 예로서 들 수 있다.

[1233] 본 명세서에 있어서 억제형 FcγR에 대한 결합 활성이 활성형 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성보다도 높다는 것은, Fc영역 개변체의 FcγRIIb에 대한 결합 활성이 FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa 및/또는 FcγRIIIb 중 어느 하나의 인간 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성보다도 높은 것을 말한다. 예를 들면 상기의 해석방법을 토대로, Fc영역 개변체를 포함하는 항원 결합 분자의 FcγRIIb에 대한 결합 활성이 FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa 및/또는 FcγRIIIb 중 어느 하나의 인간 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성의 105% 이상, 바람직하게는 110% 이상, 120% 이상, 130% 이상, 140% 이상, 특히 바람직하게는 150% 이상, 160% 이상, 170% 이상, 180% 이상, 190% 이상, 200% 이상, 250% 이상, 300% 이상, 350% 이상, 400% 이상, 450% 이상, 500% 이상, 750% 이상, 10배 이상, 20배 이상, 30배 이상, 40배 이상, 50배 이상의 결합 활성을 나타내는 것을 말한다.

[1234] FcγRIIb에 대한 결합 활성이 FcγRIa, FcγRIIa(알로타입 R131 및 H131을 포함한다) 및 FcγRIIIa(알로타입 V158 및 F158을 포함한다)보다도 모두 높은 것이 가장 바람직하다. FcγRIa는 천연형 IgG1에 대한 어피니티가 매우 높은 것으로부터, 생체내에 있어서는 대량의 내인성 IgG1에 의해 결합이 포화되어 있는 것으로 생각되기 때문에, FcγRIIb에 대한 결합 활성은 FcγRIIa 및 FcγRIIIa보다도 높고, FcγRIa보다는 낮아도 당해 복합체의 형성 저해는 가능한 것으로 생각된다.

[1235] 대조로 하는 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자로서는 IgG 단일클론항체의 Fc영역을 갖는 항원 결합 분자가 적절히 사용될 수 있다. 당해 Fc영역의 구조는 서열번호 : 5(RefSeq 등록번호 AAC82527.1의 N말단에 A 부가),

6(RefSeq 등록번호 AAB59393.1의 N말단에 A 부가), 7(RefSeq 등록번호 CAA27268.1), 8(RefSeq 등록번호 AAB59394.1의 N말단에 A 부가)에 기재되어 있다. 또한 어떤 특정 아이소타입 항체의 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자를 피검물질로서 사용하는 경우에는, 당해 특정 아이소타입의 IgG 단일클론항체의 Fc영역을 갖는 항원 결합 분자를 대조로서 사용함으로써 당해 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자에 의한 Fcɣ 수용체에 대한 결합 활성의 효과가 검증된다. 상기와 같이 하여, Fcɣ 수용체에 대한 결합 활성이 높은 것이 검증된 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자가 적절히 선택된다.

[1236] 본 발명의 비한정의 일태양에서는, 억제형 FcɣR에 대한 선택적인 결합 활성을 갖는 Fc영역의 예로서, 상기 Fc영역의 아미노산 중 EU 넘버링으로 표시되는 238 또는 328의 아미노산이 천연형 Fc영역과 상이한 아미노산으로 개변되어 있는 Fc영역을 적합하게 들 수 있다. 또한 억제형 Fcɣ 수용체에 대한 선택적인 결합 활성을 갖는 Fc영역으로서 US2009/0136485에 기재되어 있는 Fc영역 또는 개변도 적절히 선택할 수 있다.

[1237] 또한 본 발명의 비한정의 일태양에서는, 상기 Fc영역의 EU 넘버링으로 표시되는 아미노산으로서 EU 넘버링으로 표시되는 238의 아미노산이 Asp 또는 328의 아미노산이 Glu 중 어느 하나 이상으로 개변되어 있는 Fc영역을 적합하게 들 수 있다.

[1238] 또한 본 발명의 비한정의 일태양에서는, EU 넘버링으로 표시되는 238번 위치의 Pro의 Asp로의 치환 및 EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치의 아미노산이 Trp, EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치의 아미노산이 Phe, EU 넘버링으로 표시되는 267번 위치의 아미노산이 Val, EU 넘버링으로 표시되는 267번 위치의 아미노산이 Gln, EU 넘버링으로 표시되는 268번 위치의 아미노산이 Asn, EU 넘버링으로 표시되는 271번 위치의 아미노산이 Gly, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Leu, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Gln, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Glu, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Met, EU 넘버링으로 표시되는 239번 위치의 아미노산이 Asp, EU 넘버링으로 표시되는 267번 위치의 아미노산이 Ala, EU 넘버링으로 표시되는 234번 위치의 아미노산이 Trp, EU 넘버링으로 표시되는 234번 위치의 아미노산이 Tyr, EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치의 아미노산이 Ala, EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치의 아미노산이 Asp, EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치의 아미노산이 Glu, EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치의 아미노산이 Leu, EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치의 아미노산이 Met, EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치의 아미노산이 Tyr, EU 넘버링으로 표시되는 330번 위치의 아미노산이 Lys, EU 넘버링으로 표시되는 330번 위치의 아미노산이 Arg, EU 넘버링으로 표시되는 233번 위치의 아미노산이 Asp, EU 넘버링으로 표시되는 268번 위치의 아미노산이 Asp, EU 넘버링으로 표시되는 268번 위치의 아미노산이 Glu, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Asp, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Ser, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Thr, EU 넘버링으로 표시되는 323번 위치의 아미노산이 Ile, EU 넘버링으로 표시되는 323번 위치의 아미노산이 Leu, EU 넘버링으로 표시되는 323번 위치의 아미노산이 Met, EU 넘버링으로 표시되는 296번 위치의 아미노산이 Asp, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Ala, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Asn, EU 넘버링으로 표시되는 330번 위치의 아미노산이 Met 중 어느 하나 이상으로 개변되어 있는 Fc영역을 적합하게 들 수 있다.

[1239] (양태 3) Fc영역을 구성하는 2개의 폴리펩티드의 한쪽이 pH 중성역 조건하에서의 FcRn에 대한 결합 활성을 갖고, 다른 쪽이 pH 중성역 조건하에서의 FcRn에 대한 결합능 활성을 갖지 않는 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자

[1240] 양태 3의 항원 결합 분자는 1분자의 FcRn과 1분자의 FcɣR에 결합함으로써 3자 복합체를 형성할 수 있는데, 2분자의 FcRn과 1분자의 FcɣR의 4자를 포함하는 헤테로 복합체는 형성하지 않는다. 본 양태 3의 항원 결합 분자에 포함되는 Fc영역을 구성하는 2개의 폴리펩티드의 한쪽이 pH 중성역 조건하에서의 FcRn에 대한 결합 활성을 갖고, 다른 쪽의 폴리펩티드가 pH 중성역 조건하에서의 FcRn에 대한 결합능 활성을 갖지 않는 Fc영역으로서 이중 특이성 항체(bispecific 항체)를 기원으로 하는 Fc영역도 적절히 사용될 수 있다. 이중 특이성 항체란 상이한 항원에 대해 특이성을 갖는 2종류의 항체이다. IgG형의 이중 특이성 항체는 IgG 항체를 생산하는 하이브리도마 2종을 융합함으로써 생성되는 hybrid hybridoma(quadroma)에 의해 분비시키는 것이 가능하다(Milstein 등(Nature (1983) 305, 537-540).

[1241] 상기 양태 3의 항원 결합 분자를 상기 항체의 항목에서 기재된 바와 같은 재조합 수법을 사용하여 제조하는 경우, 목적의 2종의 Fc영역을 구성하는 폴리펩티드를 코드하는 유전자를 세포에 도입하여 그들을 공발현시키는 방법이 채용될 수 있다. 그러나 제조되는 Fc영역은 Fc영역을 구성하는 2개의 폴리펩티드의 한쪽이 pH 중성역 조건하에서의 FcRn에 대한 결합 활성을 갖고, 다른 쪽의 폴리펩티드가 pH 중성역 조건하에서의 FcRn에 대한 결합능

활성을 갖지 않는 Fc영역과, Fc영역을 구성하는 2개의 폴리펩티드의 양쪽이 pH 중성역 조건하에서의 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 Fc영역과, Fc영역을 구성하는 2개의 폴리펩티드의 양쪽이 pH 중성역 조건하에서의 FcRn에 대한 결합 활성을 갖지 않는 Fc영역이 2：1：1의 분자 수의 비율로 존재하는 혼합물이 된다. 3종류의 IgG로부터 목적의 조합의 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자를 정제하는 것은 곤란하다.

[1242] 이러한 재조합 수법을 사용하여 양태 3의 항원 결합 분자를 제조할 때, Fc영역을 구성하는 CH3 도메인에 적당한 아미노산 치환의 개변을 가함으로써 헤테로 조합의 Fc영역을 포함하는 항원 결합 분자가 우선적으로 분비될 수 있다. 구체적으로는, 한쪽 중쇄의 CH3 도메인에 존재하는 아미노산 측쇄를 보다 큰 측쇄(knob(「돌기」의 의미))로 치환하고, 다른 한쪽 중쇄의 CH3 도메인에 존재하는 아미노산 측쇄를 보다 작은 측쇄(hole(「공극」의 의미))로 치환함으로써 돌기가 공극 내에 배치될 수 있도록 하여 이종 H쇄 형성의 촉진 및 동종 H쇄 형성의 저해를 일으키는 방법이다(국제공개 WO1996027011, Ridgway 등(Protein Engineering (1996) 9, 617-621), Merchant 등(Nat. Biotech. (1998) 16, 677-681)).

[1243] 또한 폴리펩티드의 회합 또는 폴리펩티드에 의해 구성되는 이종 다량체의 회합의 제어방법을 Fc영역을 구성하는 2개의 폴리펩티드의 회합에 이용함으로써 이중 특이성 항체를 제작하는 기술도 알려져 있다. 즉, Fc영역을 구성하는 2개의 폴리펩티드 내의 계면을 형성하는 아미노산 잔기를 개변함으로써 동일 서열을 갖는 Fc영역을 구성하는 폴리펩티드의 회합이 저해되어, 서열이 상이한 2개의 Fc영역을 구성하는 폴리펩티드 회합체가 형성되도록 제어하는 방법이 이중 특이성 항체의 제작에 채용될 수 있다(국제공개 WO2006/106905). 구체적으로는 상기 이중 특이성 항체와 그의 제작방법의 항목에서 기재된 방법이 본 발명의 양태 3의 항원 결합 분자를 제조할 때 비한정의 일태양으로서 채용될 수 있다.

[1244] 이들 양태 1~3의 항원 결합 분자는 4자 복합체를 형성 가능한 항원 결합 분자와 비교하여 모두 면역원성을 저하시키고, 또한 혈장 중 체류성을 향상시키는 것이 가능할 것으로 기대된다.

[1245] 항원 결합 도메인의 제조방법

[1246] 본 발명은 표적 조직 특이적인 화합물의 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 비존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 높은 항원 결합 도메인의 제조방법을 제공한다.

[1247] 즉, 본 발명은 아래의 (a) 내지 (e)의 공정 ;

[1248] (a) 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서의 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 얻는 공정,

[1249] (b) 표적 조직 특이적인 화합물의 존재하에 있어서의 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 얻는 공정,

[1250] (c) 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서의 항원 결합 활성이 당해 화합물의 존재하에 있어서의 항원 결합 활성보다 낮은 항원 결합 도메인을 선택하는 공정,

[1251] (d) (c)에서 선택된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포를 배양하는 공정, 및

[1252] (e) (d)에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 도메인을 회수하는 공정

[1253] 을 포함하는 항원 결합 도메인의 제조방법을 제공한다.

[1254] 또한 본 발명은 아래의 (a) 내지 (e)의 공정 ;

[1255] (a) 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에 있어서의 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 얻는 공정,

[1256] (b) 표적 조직 특이적인 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 얻는 공정,

[1257] (c) 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에 있어서의 항원 결합 활성이 당해 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 항원 결합 활성보다 낮은 항원 결합 도메인을 선택하는 공정,

[1258] (d) (c)에서 선택된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포를 배양하는 공정, 및

[1259] (e) (d)에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 도메인을 회수하는 공정

[1260] 을 포함하는 항원 결합 도메인의 제조방법을 제공한다.

[1261] 또한 본 발명은 아래의 (a) 내지 (e)의 공정 ;

[1262] (a) 표적 조직 특이적인 화합물의 존재하에 있어서의 항원 결합 도메인 또는 그들의 라이브러리를 항원에 접촉시키는 공정,

[1263] (b) 상기 공정(a)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인을 당해 화합물의 비존재하에 두는 공정,

[1264] (c) 상기 공정(b)에서 해리된 항원 결합 도메인을 단리하는 공정,

[1265] (d) (c)에서 선택된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포를 배양하는 공정, 및

[1266] (e) (d)에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 도메인을 회수하는 공정

[1267] 을 포함하는 항원 결합 도메인의 제조방법을 제공한다.

[1268] 또한 본 발명은 아래의 (a) 내지 (e)의 공정;

[1269] (a) 표적 조직 특이적인 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 항원 결합 도메인 또는 그들의 라이브러리를 항원에 접촉시키는 공정,

[1270] (b) 상기 공정(a)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인을 당해 화합물의 저농도 존재하에 두는 공정,

[1271] (c) 상기 공정(b)에서 해리된 항원 결합 도메인을 단리하는 공정,

[1272] (d) (c)에서 선택된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포를 배양하는 공정, 및

[1273] (e) (d)에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 도메인을 회수하는 공정

[1274] 을 포함하는 항원 결합 도메인의 제조방법을 제공한다.

[1275] 또한 본 발명은 아래의 (a) 내지 (f)의 공정;

[1276] (a) 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에서 항원 결합 도메인의 라이브러리를 항원에 접촉시키는 공정,

[1277] (b) 상기 공정(a)에서 항원에 결합하지 않는 항원 결합 도메인을 선택하는 공정,

[1278] (c) 상기 공정(b)에서 선택된 항원 결합 도메인을 당해 화합물의 존재하에서 항원에 결합시키는 공정,

[1279] (d) 상기 공정(c)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인을 단리하는 공정,

[1280] (e) (d)에서 선택된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포를 배양하는 공정, 및

[1281] (f) (e)에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 도메인을 회수하는 공정

[1282] 을 포함하는 항원 결합 도메인의 제조방법을 제공한다.

[1283] 또한 본 발명은 아래의 (a) 내지 (f)의 공정;

[1284] (a) 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에서 항원 결합 도메인의 라이브러리를 항원에 접촉시키는 공정,

[1285] (b) 상기 공정(a)에서 항원에 결합하지 않는 항원 결합 도메인을 선택하는 공정,

[1286] (c) 상기 공정(b)에서 선택된 항원 결합 도메인을 당해 화합물의 고농도 존재하에서 항원에 결합시키는 공정,

[1287] (d) 상기 공정(c)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인을 단리하는 공정,

[1288] (e) (d)에서 선택된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포를 배양하는 공정, 및

[1289] (f) (e)에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 도메인을 회수하는 공정

[1290] 을 포함하는 항원 결합 도메인의 제조방법을 제공한다.

[1291] 또한 본 발명은 아래의 (a) 내지 (e)의 공정;

[1292] (a) 항원을 고정한 칼럼에 표적 조직 특이적인 화합물의 존재하에서 항원 결합 도메인의 라이브러리를 접촉시키

는 공정,

[1293] (b) 상기 공정(a)에서 칼럼에 결합한 항원 결합 도메인을 당해 화합물의 비존재하에서 칼럼으로부터 용출하는 공정,

[1294] (c) 상기 공정(b)에서 용출된 항원 결합 도메인을 단리하는 공정,

[1295] (d) (c)에서 선택된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포를 배양하는 공정, 및

[1296] (e) (d)에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 도메인을 회수하는 공정

[1297] 을 포함하는 항원 결합 도메인의 제조방법을 제공한다.

[1298] 또한 본 발명은 아래의 (a) 내지 (e)의 공정 ;

[1299] (a) 항원을 고정한 칼럼에 표적 조직 특이적인 화합물의 고농도 존재하에서 항원 결합 도메인의 라이브러리를 접촉시키는 공정,

[1300] (b) 상기 공정(a)에서 칼럼에 결합한 항원 결합 도메인을 당해 화합물의 저농도 존재하에서 칼럼으로부터 용출하는 공정,

[1301] (c) 상기 공정(b)에서 용출된 항원 결합 도메인을 단리하는 공정,

[1302] (d) (c)에서 선택된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포를 배양하는 공정, 및

[1303] (e) (d)에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 도메인을 회수하는 공정

[1304] 을 포함하는 항원 결합 도메인의 제조방법을 제공한다.

[1305] 또한 본 발명은 아래의 (a) 내지 (f)의 공정 ;

[1306] (a) 항원을 고정한 칼럼에 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에서 항원 결합 도메인의 라이브러리를 통과시키는 공정,

[1307] (b) 상기 공정(a)에서 칼럼에 결합하지 않고 용출된 항원 결합 도메인을 회수하는 공정,

[1308] (c) 상기 공정(b)에서 회수된 항원 결합 도메인을 당해 화합물의 존재하에서 항원에 결합시키는 공정,

[1309] (d) 상기 공정(c)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인을 단리하는 공정,

[1310] (e) (d)에서 선택된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포를 배양하는 공정, 및

[1311] (f) (e)에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 도메인을 회수하는 공정

[1312] 을 포함하는 항원 결합 도메인의 제조방법을 제공한다.

[1313] 또한 본 발명은 아래의 (a) 내지 (f)의 공정 ;

[1314] (a) 항원을 고정한 칼럼에 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에서 항원 결합 도메인의 라이브러리를 통과시키는 공정,

[1315] (b) 상기 공정(a)에서 칼럼에 결합하지 않고 용출된 항원 결합 도메인을 회수하는 공정,

[1316] (c) 상기 공정(b)에서 회수된 항원 결합 도메인을 당해 화합물의 고농도 존재하에서 항원에 결합시키는 공정,

[1317] (d) 상기 공정(c)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인을 단리하는 공정,

[1318] (e) (d)에서 선택된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포를 배양하는 공정, 및

[1319] (f) (e)에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 도메인을 회수하는 공정,

[1320] 을 포함하는 항원 결합 도메인의 제조방법을 제공한다.

[1321] 또한 본 발명은 아래의 (a) 내지 (f)의 공정;

[1322] (a) 표적 조직 특이적인 화합물의 존재하에서 항원 결합 도메인의 라이브러리를 항원에 접촉시키는 공정,

[1323] (b) 상기 공정(a)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인을 취득하는 공정,

[1324] (c) 상기 공정(b)에서 취득한 항원 결합 도메인을 화합물의 비존재하에 두는 공정,

[1325] (d) 상기 공정(c)에서 항원 결합 활성이 상기 공정(b)에서 선택한 기준보다 약한 항원 결합 도메인을 단리하는 공정,

[1326] (e) (d)에서 선택된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포를 배양하는 공정, 및

[1327] (f) (e)에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 도메인을 회수하는 공정

[1328] 을 포함하는 항원 결합 도메인의 제조방법을 제공한다.

[1329] 또한 본 발명은 아래의 (a) 내지 (f)의 공정;

[1330] (a) 표적 조직 특이적인 화합물의 고농도 존재하에서 항원 결합 도메인의 라이브러리를 항원에 접촉시키는 공정,

[1331] (b) 상기 공정(a)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인을 취득하는 공정,

[1332] (c) 상기 공정(b)에서 취득한 항원 결합 도메인을 화합물의 저농도 존재하에 두는 공정,

[1333] (d) 상기 공정(c)에서 항원 결합 활성이 상기 공정(b)에서 선택한 기준보다 약한 항원 결합 도메인을 단리하는 공정,

[1334] (e) (d)에서 선택된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포를 배양하는 공정, 및

[1335] (f) (e)에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 도메인을 회수하는 공정

[1336] 을 포함하는 항원 결합 도메인의 제조방법을 제공한다.

[1337] 「세포」, 「세포계」 및 「세포배양」은 본 명세서에서는 동일한 정의로 사용되고, 그러한 호칭에는 세포 또는 세포계의 모든 자손이 포함될 수 있다. 이와 같이, 예를 들면 「형질전환체」 및 「형질전환 세포」와 같은 용어에는 계대 수에 관계없이 그들에 유래하는 1차 대상 세포 및 배양물이 포함된다. 또한 고의 또는 우발적인 돌연변이에 의해 모든 자손에 있어서 DNA의 내용이 정확하게 동일하다는 것은 아닌 것도 또한 이해된다. 당초의 형질전환 세포에서 스크리닝된 바와 같은 실질적으로 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 변이체의 자손도 포함될 수 있다. 상이한 호칭을 의도하는 기재인 경우는, 당해 기재의 전후관계로부터 그러한 의도는 명백해질 것이다. 사용되는 세포로서는 전술한 「항체」의 항목에서 기재된 세포 중에서 적절한 것이 적절히 선택된다.

[1338] 코드 서열의 발현에 언급하는 경우의 제어서열이란, 특정 숙주생물에서 작동 가능하게 연결한 코드 서열의 발현을 위해 필요한 DNA 염기서열을 말한다. 예를 들면 원핵생물에 적합한 제어서열로는 프로모터, 경우에 따라서는 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합 부위 및 아마도 아직 잘 이해되지 않은 다른 서열이 포함된다. 진핵세포에서는 코드 서열의 발현을 위해 프로모터, 폴리아데닐화 시그날 및 인핸서를 이용하는 것이 공지이다.

[1339] 핵산에 관하여 「작동 가능하게 연결했다」는 것은 그 핵산이 다른 핵산 서열과 기능적인 관계에 있는 것을 의미한다. 예를 들면 프리시퀀스(presequence) 또는 분비 리더의 DNA는 어떤 폴리펩티드의 분비에 관여하고 있는 전구체 단백질로서 발현하는 경우는, 그 폴리펩티드의 DNA와 작동 가능하게 결합되어 있다. 프로모터 또는 인핸서는 그것이 어떤 코드 서열의 전사에 영향을 미치는 경우는 그 서열과 작동 가능하게 연결되어 있다. 또는 리보솜 결합부는 그것이 번역을 용이하게 하는 위치에 있는 경우는 작동 가능하게 코드 서열과 연결되어 있다. 통상 「작동 가능하게 되었다」는 것은 결합된 DNA 서열이 연속되어 있어, 분비 리더의 경우는 연속해서 리딩 프레임 내에 있는 것을 의미한다. 그러나 인핸서는 연속될 필요는 없다. 연결은 적절한 제한부위에서 라이게이션에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고 뉴클레오티드 어댑터 또는 링커가 종래의 관행에 따라 사용된다. 또한 상기 Overlap Extension PCR의 수법으로도 연결된 핵산이 제작될 수 있다.

[1340] 「라이게이션」은 2개의 핵산 단편 사이에서 인산 디에스테르 결합을 형성하는 방법이다. 2개의 단편의 라이게이션을 위해 단편의 말단은 서로 적합해 있어야만 한다. 경우에 따라서는 이 말단은 엔도뉴클레아제 소화 후에

바로 적합성을 갖는다. 그러나 라이게이션에 적합하게 하기 위해 먼저 엔도뉴클레아제 소화 후에 일반적으로 형성되는 부착 말단은 평활 말단으로 바뀌어질 필요가 있다. 평활 말단으로 하기 위해서는 DNA가 적절한 완충액 중에서 15℃에서 적어도 15분간, 4개의 데옥시리보뉴클레오티드 3인산의 존재하에서 DNA 폴리머라아제 I 또는 T4DNA 폴리머라아제의 클레노우 단편의 약 10 단위로 처리된다. 다음으로 DNA가 페놀클로로포름 추출과 에탄올 침전 또는 실리카 정제에 의해 정제된다. 연결해야 하는 DNA 단편이 용액에 등몰량 첨가된다. 이 용액에는 ATP, 리가아제 완충에 더하여 T4DNA 리가아제와 같은 리가아제가 DNA 0.5 ㎍에 대해 약 10 단위 포함된다. DNA를 벡터에 연결하는 경우는 벡터는 적당한 제한 엔도뉴클레아제에 의한 소화작용으로 먼저 선형상이 된다. 선형상으로 된 단편을 다음으로 세균의 알칼리포스파타아제 또는 송아지 장관의 포스파타아제로 처리함으로써 라이게이션의 스텝 사이의 당해 단편의 셀프라이게이션이 예방된다.

[1341] 본 발명의 제조방법에 있어서는 상기 「표적 조직 특이적 화합물에 의존적인 항원 결합 도메인」의 항목에서 설명되는 방법에 의해 선택된, 표적 조직 특이적인 화합물의 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 비존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 높은 항원 결합 도메인이 단리된다. 예를 들면 이와 같이 단리된 항원 결합 도메인이 라이브러리로부터 선택된 경우에는, 후술하는 실시예에 기재되어 있는 바와 같이, 당해 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드는 파지 등의 바이러스로부터 통상의 유전자 증폭에 의해 단리된다. 또한 이와 같이 단리된 항원 결합 도메인 또는 항체가 하이브리도마 등의 세포의 배양액으로부터 선택된 경우에는, 상기 항체의 항목에서 나타낸 바와 같이 당해 세포로부터 항체 유전자 등이 통상의 유전자 증폭에 의해 단리된다.

[1342] 항원 결합 분자의 제조방법

[1343] 본 발명은 표적 조직 특이적인 화합물의 존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성이 당해 화합물의 비존재하에 있어서의 항원에 대한 결합 활성보다도 높은 항원 결합 분자의 제조방법을 제공한다.

[1344] 즉, 본 발명은 아래의 (a) 내지 (f)의 공정 ;

[1345] (a) 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서의 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 얻는 공정,

[1346] (b) 표적 조직 특이적인 화합물의 존재하에 있어서의 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 얻는 공정,

[1347] (c) 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에 있어서의 항원 결합 활성이 당해 화합물의 존재하에 있어서의 항원 결합 활성보다 낮은 항원 결합 도메인을 선택하는 공정,

[1348] (d) (c)에서 선택된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드를 Fc영역을 포함하는 폴리펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드에 연결시키는 공정,

[1349] (e) (d)에서 얻어진 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포를 배양하는 공정, 및

[1350] (f) (e)에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 분자를 회수하는 공정

[1351] 을 포함하는 항원 결합 분자의 제조방법을 제공한다.

[1352] 또한 본 발명은 아래의 (a) 내지 (f)의 공정 ;

[1353] (a) 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에 있어서의 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 얻는 공정,

[1354] (b) 표적 조직 특이적인 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 얻는 공정,

[1355] (c) 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에 있어서의 항원 결합 활성이 당해 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 항원 결합 활성보다 낮은 항원 결합 도메인을 선택하는 공정,

[1356] (d) (c)에서 선택된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드를 Fc영역을 포함하는 폴리펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드에 연결시키는 공정,

[1357] (e) (d)에서 얻어진 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포를 배양하는 공정, 및

[1358] (f) (e)에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 분자를 회수하는 공정

[1359] 을 포함하는 항원 결합 분자의 제조방법을 제공한다.

[1360] 또한 본 발명은 아래의 (a) 내지 (f)의 공정 ;

[1361] (a) 표적 조직 특이적인 화합물의 존재하에 있어서의 항원 결합 도메인 또는 그들의 라이브러리를 항원에 접촉

시키는 공정,

[1362] (b) 상기 공정(a)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인을 당해 화합물의 비존재하에 두는 공정,

[1363] (c) 상기 공정(b)에서 해리된 항원 결합 도메인을 단리하는 공정,

[1364] (d) (c)에서 선택된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드를 Fc영역을 포함하는 폴리펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드에 연결시키는 공정,

[1365] (e) (d)에서 얻어진 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포를 배양하는 공정, 및

[1366] (f) (e)에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 분자를 회수하는 공정

[1367] 을 포함하는 항원 결합 분자의 제조방법을 제공한다.

[1368] 또한 본 발명은 아래의 (a) 내지 (f)의 공정 ;

[1369] (a) 표적 조직 특이적인 화합물의 고농도 존재하에 있어서의 항원 결합 도메인 또는 그들의 라이브러리를 항원에 접촉시키는 공정,

[1370] (b) 상기 공정(a)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인을 당해 화합물의 저농도 존재하에 두는 공정,

[1371] (c) 상기 공정(b)에서 해리된 항원 결합 도메인을 단리하는 공정,

[1372] (d) (c)에서 선택된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드를 Fc영역을 포함하는 폴리펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드에 연결시키는 공정,

[1373] (e) (d)에서 얻어진 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포를 배양하는 공정, 및

[1374] (f) (e)에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 분자를 회수하는 공정

[1375] 을 포함하는 항원 결합 분자의 제조방법을 제공한다.

[1376] 또한 본 발명은 아래의 (a) 내지 (g)의 공정 ;

[1377] (a) 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에서 항원 결합 도메인의 라이브러리를 항원에 접촉시키는 공정,

[1378] (b) 상기 공정(a)에서 항원에 결합하지 않는 항원 결합 도메인을 선택하는 공정,

[1379] (c) 상기 공정(b)에서 선택된 항원 결합 도메인을 당해 화합물의 존재하에서 항원에 결합시키는 공정,

[1380] (d) 상기 공정(c)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인을 단리하는 공정,

[1381] (e) (d)에서 선택된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드를 Fc영역을 포함하는 폴리펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드에 연결시키는 공정,

[1382] (f) (e)에서 얻어진 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포를 배양하는 공정, 및

[1383] (g) (f)에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 분자를 회수하는 공정

[1384] 을 포함하는 항원 결합 분자의 제조방법을 제공한다.

[1385] 또한 본 발명은 아래의 (a) 내지 (g)의 공정 ;

[1386] (a) 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에서 항원 결합 도메인의 라이브러리를 항원에 접촉시키는 공정,

[1387] (b) 상기 공정(a)에서 항원에 결합하지 않는 항원 결합 도메인을 선택하는 공정,

[1388] (c) 상기 공정(b)에서 선택된 항원 결합 도메인을 당해 화합물의 고농도 존재하에서 항원에 결합시키는 공정,

[1389] (d) 상기 공정(c)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인을 단리하는 공정,

[1390] (e) (d)에서 선택된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드를 Fc영역을 포함하는 폴리펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드에 연결시키는 공정,

[1391] (f) (e)에서 얻어진 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포를 배양하는 공정, 및

[1392] (g) (f)에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 분자를 회수하는 공정

[1393] 을 포함하는 항원 결합 분자의 제조방법을 제공한다.

[1394] 또한 본 발명은 아래의 (a) 내지 (f)의 공정 ;

[1395] (a) 항원을 고정한 칼럼에 표적 조직 특이적인 화합물의 존재하에서 항원 결합 도메인의 라이브러리를 접촉시키는 공정,

[1396] (b) 상기 공정(a)에서 칼럼에 결합한 항원 결합 도메인을 당해 화합물의 비존재하에서 칼럼으로부터 용출하는 공정,

[1397] (c) 상기 공정(b)에서 용출된 항원 결합 도메인을 단리하는 공정,

[1398] (d) (c)에서 선택된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드를 Fc영역을 포함하는 폴리펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드에 연결시키는 공정,

[1399] (e) (d)에서 얻어진 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포를 배양하는 공정, 및

[1400] (f) (e)에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 분자를 회수하는 공정

[1401] 을 포함하는 항원 결합 분자의 제조방법을 제공한다.

[1402] 또한 본 발명은 아래의 (a) 내지 (f)의 공정 ;

[1403] (a) 항원을 고정한 칼럼에 표적 조직 특이적인 화합물의 고농도 존재하에서 항원 결합 도메인의 라이브러리를 접촉시키는 공정,

[1404] (b) 상기 공정(a)에서 칼럼에 결합한 항원 결합 도메인을 당해 화합물의 저농도 존재하에서 칼럼으로부터 용출하는 공정,

[1405] (c) 상기 공정(b)에서 용출된 항원 결합 도메인을 단리하는 공정,

[1406] (d) (c)에서 선택된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드를 Fc영역을 포함하는 폴리펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드에 연결시키는 공정,

[1407] (e) (d)에서 얻어진 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포를 배양하는 공정, 및

[1408] (f) (e)에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 분자를 회수하는 공정

[1409] 을 포함하는 항원 결합 분자의 제조방법을 제공한다.

[1410] 또한 본 발명은 아래의 (a) 내지 (g)의 공정 ;

[1411] (a) 항원을 고정한 칼럼에 표적 조직 특이적인 화합물의 비존재하에서 항원 결합 도메인의 라이브러리를 통과시키는 공정,

[1412] (b) 상기 공정(a)에서 칼럼에 결합하지 않고 용출된 항원 결합 도메인을 회수하는 공정,

[1413] (c) 상기 공정(b)에서 회수된 항원 결합 도메인을 당해 화합물의 존재하에서 항원에 결합시키는 공정,

[1414] (d) 상기 공정(c)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인을 단리하는 공정,

[1415] (e) (d)에서 선택된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드를 Fc영역을 포함하는 폴리펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드에 연결시키는 공정,

[1416] (f) (e)에서 얻어진 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포를 배양하는 공정, 및

[1417] (g) (f)에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 분자를 회수하는 공정

[1418] 을 포함하는 항원 결합 분자의 제조방법을 제공한다.

[1419] 또한 본 발명은 아래의 (a) 내지 (g)의 공정 ;

[1420] (a) 항원을 고정한 칼럼에 표적 조직 특이적인 화합물의 저농도 존재하에서 항원 결합 도메인의 라이브러리를 통과시키는 공정,

[1421] (b) 상기 공정(a)에서 칼럼에 결합하지 않고 용출된 항원 결합 도메인을 회수하는 공정,

[1422] (c) 상기 공정(b)에서 회수된 항원 결합 도메인을 당해 화합물의 고농도 존재하에서 항원에 결합시키는 공정,

[1423] (d) 상기 공정(c)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인을 단리하는 공정,

[1424] (e) (d)에서 선택된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드를 Fc영역을 포함하는 폴리펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드에 연결시키는 공정,

[1425] (f) (e)에서 얻어진 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포를 배양하는 공정, 및

[1426] (g) (f)에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 분자를 회수하는 공정

[1427] 을 포함하는 항원 결합 분자의 제조방법을 제공한다.

[1428] 또한 본 발명은 아래의 (a) 내지 (g)의 공정 ;

[1429] (a) 표적 조직 특이적인 화합물의 존재하에서 항원 결합 도메인의 라이브러리를 항원에 접촉시키는 공정,

[1430] (b) 상기 공정(a)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인을 취득하는 공정,

[1431] (c) 상기 공정(b)에서 취득한 항원 결합 도메인을 화합물의 비존재하에 두는 공정,

[1432] (d) 상기 공정(c)에서 항원 결합 활성이 상기 공정(b)에서 선택한 기준보다 약한 항원 결합 도메인을 단리하는 공정,

[1433] (e) (d)에서 선택된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드를 Fc영역을 포함하는 폴리펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드에 연결시키는 공정,

[1434] (f) (e)에서 얻어진 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포를 배양하는 공정, 및

[1435] (g) (f)에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 분자를 회수하는 공정

[1436] 을 포함하는 항원 결합 분자의 제조방법을 제공한다.

[1437] 본 발명은 아래의 (a) 내지 (g)의 공정 ;

[1438] (a) 표적 조직 특이적인 화합물의 고농도 존재하에서 항원 결합 도메인의 라이브러리를 항원에 접촉시키는 공정,

[1439] (b) 상기 공정(a)에서 항원에 결합한 항원 결합 도메인을 취득하는 공정,

[1440] (c) 상기 공정(b)에서 취득한 항원 결합 도메인을 화합물의 저농도 존재하에 두는 공정,

[1441] (d) 상기 공정(c)에서 항원 결합 활성이 상기 공정(b)에서 선택한 기준보다 약한 항원 결합 도메인을 단리하는 공정,

[1442] (e) (d)에서 선택된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드를 Fc영역을 포함하는 폴리펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드에 연결시키는 공정,

[1443] (f) (e)에서 얻어진 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포를 배양하는 공정, 및

[1444] (g) (f)에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 분자를 회수하는 공정

[1445] 을 포함하는 항원 결합 분자의 제조방법을 제공한다.

[1446] 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드에 대해 그 폴리뉴클레오티드 서열이 연결되는 Fc영역의 비한정의 일태양으로서, 인간 IgG1(서열번호 : 5), IgG2(서열번호 : 6), IgG3(서열번호 : 7) 또는 IgG4(서열번호 : 8)로 표시되는 항체의 정상영역에 포함되는 Fc영역이 예시된다. Fc영역은 EU 넘버링으로 표시되는 대략 216번 위치의 아미노산에 있어서의 파파인 절단 부위의 힌지영역의 N말단으로부터 당해 힌지, CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 항체의 중쇄 정상영역의 부분이다. Fc영역은 인간 IgG1으로부터 취득될 수 있는데, IgG의 특정 서브클래스에 한정되는 것도 아니다.

[1447] 또한 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드에 대해 그 폴리뉴클레오티드 서열이 연결되는 Fc영역의 비한정의 일태양으로서, 천연형 인간 IgG의 Fc영역의 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성보다도 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성이 높은 Fc영역도 예시된다. 그러한 Fc영역으로서 EU 넘버링으로 표시되는 221번 위치, 222번 위치, 223

번 위치, 224번 위치, 225번 위치, 227번 위치, 228번 위치, 230번 위치, 231번 위치, 232번 위치, 233번 위치, 234번 위치, 235번 위치, 236번 위치, 237번 위치, 238번 위치, 239번 위치, 240번 위치, 241번 위치, 243번 위치, 244번 위치, 245번 위치, 246번 위치, 247번 위치, 249번 위치, 250번 위치, 251번 위치, 254번 위치, 255번 위치, 256번 위치, 258번 위치, 260번 위치, 262번 위치, 263번 위치, 264번 위치, 265번 위치, 266번 위치, 267번 위치, 268번 위치, 269번 위치, 270번 위치, 271번 위치, 272번 위치, 273번 위치, 274번 위치, 275번 위치, 276번 위치, 278번 위치, 279번 위치, 280번 위치, 281번 위치, 282번 위치, 283번 위치, 284번 위치, 285번 위치, 286번 위치, 288번 위치, 290번 위치, 291번 위치, 292번 위치, 293번 위치, 294번 위치, 295번 위치, 296번 위치, 297번 위치, 298번 위치, 299번 위치, 300번 위치, 301번 위치, 302번 위치, 303번 위치, 304번 위치, 305번 위치, 311번 위치, 313번 위치, 315번 위치, 317번 위치, 318번 위치, 320번 위치, 322번 위치, 323번 위치, 324번 위치, 325번 위치, 326번 위치, 327번 위치, 328번 위치, 329번 위치, 330번 위치, 331번 위치, 332번 위치, 333번 위치, 334번 위치, 335번 위치, 336번 위치, 337번 위치, 339번 위치, 376번 위치, 377번 위치, 378번 위치, 379번 위치, 380번 위치, 382번 위치, 385번 위치, 392번 위치, 396번 위치, 421번 위치, 427번 위치, 428번 위치, 429번 위치, 434번 위치, 436번 위치 및 440번 위치의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산이 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8로 표시되는 항체의 정상영역에 포함되는 Fc영역의 대응하는 EU 넘버링의 아미노산 잔기와 상이한 Fc영역도 예시된다.

[1448] 또한 상기 Fc영역의 비한정의 일태양으로서, 예를 들면 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8로 표시되는 항체의 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 잔기 중 EU 넘버링으로 표시되는 ;

[1449] 221번 위치의 아미노산이 Lys 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1450] 222번 위치의 아미노산이 Phe, Trp, Glu 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1451] 223번 위치의 아미노산이 Phe, Trp, Glu 또는 Lys 중 어느 하나,

[1452] 224번 위치의 아미노산이 Phe, Trp, Glu 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1453] 225번 위치의 아미노산이 Glu, Lys 또는 Trp 중 어느 하나,

[1454] 227번 위치의 아미노산이 Glu, Gly, Lys 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1455] 228번 위치의 아미노산이 Glu, Gly, Lys 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1456] 230번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Gly 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1457] 231번 위치의 아미노산이 Glu, Gly, Lys, Pro 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1458] 232번 위치의 아미노산이 Glu, Gly, Lys 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1459] 233번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1460] 234번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1461] 235번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1462] 236번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1463] 237번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1464] 238번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1465] 239번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1466] 240번 위치의 아미노산이 Ala, Ile, Met 또는 Thr 중 어느 하나,

[1467] 241번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Leu, Arg, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1468] 243번 위치의 아미노산이 Leu, Glu, Leu, Gln, Arg, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1469] 244번 위치의 아미노산이 His,

[1470] 245번 위치의 아미노산이 Ala,

[1471] 246번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, His 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1472] 247번 위치의 아미노산이 Ala, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Thr, Val 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1473] 249번 위치의 아미노산이 Glu, His, Gln 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1474] 250번 위치의 아미노산이 Glu 또는 Gln 중 어느 하나,

[1475] 251번 위치의 아미노산이 Phe,

[1476] 254번 위치의 아미노산이 Phe, Met 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1477] 255번 위치의 아미노산이 Glu, Leu 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1478] 256번 위치의 아미노산이 Ala, Met 또는 Pro 중 어느 하나,

[1479] 258번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, His, Ser 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1480] 260번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, His 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1481] 262번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Phe, Ile 또는 Thr 중 어느 하나,

[1482] 263번 위치의 아미노산이 Ala, Ile, Met 또는 Thr 중 어느 하나,

[1483] 264번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1484] 265번 위치의 아미노산이 Ala, Leu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1485] 266번 위치의 아미노산이 Ala, Ile, Met 또는 Thr 중 어느 하나,

[1486] 267번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1487] 268번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Thr, Val 또는 Trp 중 어느 하나,

[1488] 269번 위치의 아미노산이 Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1489] 270번 위치의 아미노산이 Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1490] 271번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1491] 272번 위치의 아미노산이 Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1492] 273번 위치의 아미노산이 Phe 또는 Ile 중 어느 하나,

[1493] 274번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1494] 275번 위치의 아미노산이 Leu 또는 Trp 중 어느 하나,

[1495] 276번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1496] 278번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val 또는 Trp 중 어느 하나,

[1497] 279번 위치의 아미노산이 Ala,

[1498] 280번 위치의 아미노산이 Ala, Gly, His, Lys, Leu, Pro, Gln, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1499] 281번 위치의 아미노산이 Asp, Lys, Pro 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1500] 282번 위치의 아미노산이 Glu, Gly, Lys, Pro 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1501] 283번 위치의 아미노산이 Ala, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Arg 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1502] 284번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Leu, Asn, Thr 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1503] 285번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Lys, Gln, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1504] 286번 위치의 아미노산이 Glu, Gly, Pro 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1505] 288번 위치의 아미노산이 Asn, Asp, Glu 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1506] 290번 위치의 아미노산이 Asp, Gly, His, Leu, Asn, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1507] 291번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Gly, His, Ile, Gln 또는 Thr 중 어느 하나,

[1508] 292번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Pro, Thr 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1509] 293번 위치의 아미노산이 Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1510] 294번 위치의 아미노산이 Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1511] 295번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1512] 296번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr 또는 Val 중 어느 하나,

[1513] 297번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1514] 298번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Met, Asn, Gln, Arg, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1515] 299번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1516] 300번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val 또는 Trp 중 어느 하나,

[1517] 301번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, His 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1518] 302번 위치의 아미노산이 Ile,

[1519] 303번 위치의 아미노산이 Asp, Gly 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1520] 304번 위치의 아미노산이 Asp, His, Leu, Asn 또는 Thr 중 어느 하나,

[1521] 305번 위치의 아미노산이 Glu, Ile, Thr 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1522] 311번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Asn, Thr, Val 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1523] 313번 위치의 아미노산이 Phe,

[1524] 315번 위치의 아미노산이 Leu,

[1525] 317번 위치의 아미노산이 Glu 또는 Gln,

[1526] 318번 위치의 아미노산이 His, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Thr, Val 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1527] 320번 위치의 아미노산이 Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Asn, Pro, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1528] 322번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Pro, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1529] 323번 위치의 아미노산이 Ile,

[1530] 324번 위치의 아미노산이 Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Arg, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1531] 325번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1532] 326번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1533] 327번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1534] 328번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1535] 329번 위치의 아미노산이 Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1536] 330번 위치의 아미노산이 Cys, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1537] 331번 위치의 아미노산이 Asp, Phe, His, Ile, Leu, Met, Gln, Arg, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1538] 332번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1539] 333번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Pro, Ser, Thr, Val 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1540] 334번 위치의 아미노산이 Ala, Glu, Phe, Ile, Leu, Pro 또는 Thr 중 어느 하나,

[1541] 335번 위치의 아미노산이 Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1542] 336번 위치의 아미노산이 Glu, Lys 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1543] 337번 위치의 아미노산이 Glu, His 또는 Asn 중 어느 하나,

[1544] 339번 위치의 아미노산이 Asp, Phe, Gly, Ile, Lys, Met, Asn, Gln, Arg, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[1545] 376번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Val 중 어느 하나,

[1546] 377번 위치의 아미노산이 Gly 또는 Lys 중 어느 하나,

[1547] 378번 위치의 아미노산이 Asp,

[1548] 379번 위치의 아미노산이 Asn,

[1549] 380번 위치의 아미노산이 Ala, Asn 또는 Ser 중 어느 하나,

[1550] 382번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Ile 중 어느 하나,

[1551] 385번 위치의 아미노산이 Glu,

[1552] 392번 위치의 아미노산이 Thr,

[1553] 396번 위치의 아미노산이 Leu,

[1554] 421번 위치의 아미노산이 Lys,

[1555] 427번 위치의 아미노산이 Asn,

[1556] 428번 위치의 아미노산이 Phe 또는 Leu 중 어느 하나,

[1557] 429번 위치의 아미노산이 Met,

[1558] 434번 위치의 아미노산이 Trp,

[1559] 436번 위치의 아미노산이 Ile, 또는

[1560] 440번 위치의 아미노산이 Gly, His, Ile, Leu 또는 Tyr 중 어느 하나

[1561] 의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산의 개변을 포함하는 Fc영역을 들 수 있다. 또한 개변되는 아미노산의 수는 특별히 한정되지 않고, 1개소만의 아미노산이 개변될 수 있으며, 2개소 이상의 아미노산이 개변될 수 있다. 2개소 이상의 아미노산의 개변의 조합으로서는, 예를 들면 표 1(표 1-1~표 1-3)에 기재되는 조합을 들 수 있다.

[1562] 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드에 대해 그 폴리뉴클레오티드 서열이 연결되는 Fc영역의 비한정의 일태양으로서, 억제형 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성이 활성형 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성보다도 높은 Fc영역이 예시된다. 구체적으로는, 그러한 Fc영역의 비한정의 일태양으로서, FcγRIIb에 대한 결합 활성이 FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIIa 및/또는 FcγRIIIb 중 어느 하나의 인간 Fcγ 수용체에 대한 결합 활성보다도 높은 Fc영역이 예시된다.

[1563] 또한 상기 Fc영역의 비한정의 일태양으로서, 예를 들면 서열번호：5, 6, 7 또는 8로 표시되는 항체의 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 잔기 중 EU 넘버링으로 표시되는 238 또는 328의 아미노산이 천연형 Fc영역과 상이한 아미노산으로 개변되어 있는 Fc영역을 적합하게 들 수 있다. 그러한 Fc영역의 예로서, 상기 Fc영역의 EU 넘버링으로 표시되는 아미노산으로서 EU 넘버링으로 표시되는 238의 아미노산이 Asp 또는 328의 아미노산이 Glu 중 어느 하나 이상으로 개변되어 있는 Fc영역을 적합하게 들 수 있다.

[1564] 또한 상기 Fc영역의 비한정의 일태양에서는 PCT/JP2012/054624에서 예시되는 EU 넘버링으로 표시되는 238번 위치의 Pro의 Asp로의 치환 및 EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치의 아미노산이 Trp, EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치의 아미노산이 Phe, EU 넘버링으로 표시되는 267번 위치의 아미노산이 Val, EU 넘버링으로 표시되는 267번 위치의 아미노산이 Gln, EU 넘버링으로 표시되는 268번 위치의 아미노산이 Asn, EU 넘버링으로 표시되는 271번 위치의 아미노산이 Gly, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Leu, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Gln, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Glu, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Met, EU 넘버링으로 표시되는 239번 위치의 아미노산이 Asp, EU 넘버링으로 표시되는 267번 위치의 아미노산이 Ala, EU 넘버링으로 표시되는 234번 위치의 아미노산이 Trp, EU 넘버링으로 표시되는 234번 위치의 아미노산이 Tyr, EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치의 아미노산이 Ala, EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치의 아미노산이 Asp, EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치의 아미노산이 Glu, EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치의 아미노산이 Leu, EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치의 아미노산이 Met, EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치의 아미노산이 Tyr, EU 넘버링으로 표시되는 330번 위치의 아미노산이 Lys, EU 넘버링으로 표시되는 330번 위치의 아미노산이 Arg, EU 넘버링으로 표시되는 233번 위치의 아미노산이 Asp, EU 넘버링으로 표시되는 268번 위치의 아미노산이 Asp, EU 넘버링으로 표시되는 268번 위치의 아미노산이 Glu, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Asp, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Ser, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Thr, EU 넘버링으로 표시되는 323번 위치의 아미노산이 Ile, EU 넘버링으로 표시되는 323번 위치의 아미노산이 Leu, EU 넘버링으로 표시되는 323번 위치의 아미노산이 Met, EU 넘버링으로 표시되는 296번 위치의 아미노산이 Asp, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Ala, EU 넘버링으로 표시되는 326번 위치의 아미노산이 Asn, EU 넘버링으로 표시되는 330번 위치의 아미노산이 Met 중 어느 하나 이상으로 개변되어 있는 Fc영역을 적합하게 들 수 있다.

[1565] 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드에 대해 그 폴리뉴클레오티드 서열이 연결되는 Fc영역의 비한정의 일태양으로서, pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 Fc영역이 예시된다. 그러한 개변이 가능한 아미노산으로서, 예를 들면 국제공개 WO1997/034631에 기재되어 있는 바와 같이, EU 넘버링으로 표시되는 252번 위치, 254번 위치, 256번 위치, 309번 위치, 311번 위치, 315번 위치, 433번 위치 및/또는 434번 위치

및 이들 아미노산에 조합시키는 253번 위치, 310번 위치, 435번 위치 및/또는 426번 위치의 아미노산을 들 수 있다. 국제공개 WO2000/042072에 기재되어 있는 바와 같이, EU 넘버링으로 표시되는 238번 위치, 252번 위치, 253번 위치, 254번 위치, 255번 위치, 256번 위치, 265번 위치, 272번 위치, 286번 위치, 288번 위치, 303번 위치, 305번 위치, 307번 위치, 309번 위치, 311번 위치, 312번 위치, 317번 위치, 340번 위치, 356번 위치, 360번 위치, 362번 위치, 376번 위치, 378번 위치, 380번 위치, 382번 위치, 386번 위치, 388번 위치, 400번 위치, 413번 위치, 415번 위치, 424번 위치, 433번 위치, 434번 위치, 435번 위치, 436번 위치, 439번 위치 및/또는 447번 위치의 아미노산을 적합하게 들 수 있다. 마찬가지로, 그러한 개변이 가능한 아미노산으로서, 예를 들면 국제공개 WO2002/060919에 기재되어 있는 바와 같이, EU 넘버링으로 표시되는 251번 위치, 252번 위치, 254번 위치, 255번 위치, 256번 위치, 308번 위치, 309번 위치, 311번 위치, 312번 위치, 385번 위치, 386번 위치, 387번 위치, 389번 위치, 428번 위치, 433번 위치, 434번 위치 및/또는 436번 위치의 아미노산도 적합하게 들 수 있다. 또한 그러한 개변이 가능한 아미노산으로서, 국제공개 WO2004/092219에 기재되어 있는 바와 같이, EU 넘버링으로 표시되는 250번 위치, 314번 위치 및 428번 위치의 아미노산도 들 수 있다. 이에 더하여 그러한 개변이 가능한 아미노산으로서, 예를 들면 국제공개 WO2006/020114에 기재되어 있는 바와 같이, 238번 위치, 244번 위치, 245번 위치, 249번 위치, 252번 위치, 256번 위치, 257번 위치, 258번 위치, 260번 위치, 262번 위치, 270번 위치, 272번 위치, 279번 위치, 283번 위치, 285번 위치, 286번 위치, 288번 위치, 293번 위치, 307번 위치, 311번 위치, 312번 위치, 316번 위치, 317번 위치, 318번 위치, 332번 위치, 339번 위치, 341번 위치, 343번 위치, 375번 위치, 376번 위치, 377번 위치, 378번 위치, 380번 위치, 382번 위치, 423번 위치, 427번 위치, 430번 위치, 431번 위치, 434번 위치, 436번 위치, 438번 위치, 440번 위치 및/또는 442번 위치의 아미노산도 적합하게 들 수 있다. 또한 그러한 개변이 가능한 아미노산으로서, 예를 들면 국제공개 WO2010/045193에 기재되어 있는 바와 같이, EU 넘버링으로 표시되는 251번 위치, 252번 위치, 307번 위치, 308번 위치, 378번 위치, 428번 위치, 430번 위치, 434번 위치 및/또는 436번 위치의 아미노산도 적합하게 들 수 있다.

[1566] 상기 Fc영역의 비한정의 일태양으로서, 예를 들면 서열번호：5, 6, 7 또는 8로 표시되는 항체의 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 잔기 중 EU 넘버링으로 표시되는,

[1567] 251번 위치의 아미노산이 Arg 또는 Leu 중 어느 하나,

[1568] 252번 위치의 아미노산이 Phe, Ser, Thr 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1569] 254번 위치의 아미노산이 Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[1570] 255번 위치의 아미노산이 Arg, Gly, Ile 또는 Leu 중 어느 하나,

[1571] 256번 위치의 아미노산이 Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu 또는 Thr 중 어느 하나,

[1572] 308번 위치의 아미노산이 Ile 또는 Thr 중 어느 하나,

[1573] 309번 위치의 아미노산이 Pro,

[1574] 311번 위치의 아미노산이 Glu, Leu 또는 Ser 중 어느 하나,

[1575] 312번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Asp 중 어느 하나,

[1576] 314번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Leu 중 어느 하나,

[1577] 385번 위치의 아미노산이 Ala, Arg, Asp, Gly, His, Lys, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[1578] 386번 위치의 아미노산이 Arg, Asp, Ile, Lys, Met, Pro, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[1579] 387번 위치의 아미노산이 Ala, Arg, His, Pro, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[1580] 389번 위치의 아미노산이 Asn, Pro 또는 Ser 중 어느 하나,

[1581] 428번 위치의 아미노산이 Leu, Met, Phe, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[1582] 433번 위치의 아미노산이 Arg, Gln, His, Ile, Lys, Pro 또는 Ser 중 어느 하나,

[1583] 434번 위치의 아미노산이 His, Phe 또는 Tyr 중 어느 하나, 또는

[1584] 436번 위치의 아미노산이 Arg, Asn, His, Lys, Met 또는 Thr 중 어느 하나

[1585] 의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산의 개변을 포함하는 Fc영역을 들 수 있다. 상기의 개변되는 아미노산의 수는 특별히 한정되지 않고, 1개소만의 아미노산이 개변될 수 있으며, 2개소 이상의 아미노산이 개변될 수 있다.

[1586] 상기 pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 강한 Fc영역의 비한정의 다른 일태양으로서, 예를 들면 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8로 표시되는 항체의 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 잔기 중 EU 넘버링으로 표시되는 308번 위치의 아미노산이 Ile, 309번 위치의 아미노산이 Pro 및/또는 311번 위치의 아미노산이 Glu인 Fc영역을 들 수 있다. 또한 당해 Fc영역의 다른 비한정의 일태양은 308번 위치의 아미노산이 Thr, 309번 위치의 아미노산이 Pro, 311번 위치의 아미노산이 Leu, 312번 위치의 아미노산이 Ala 및/또는 314번 위치의 아미노산이 Ala를 포함하는 Fc영역을 들 수 있다. 또한 당해 개변의 또 다른 비한정의 일태양은 308번 위치의 아미노산이 Ile 또는 Thr, 309번 위치의 아미노산이 Pro, 311번 위치의 아미노산이 Glu, Leu 또는 Ser, 312번 위치의 아미노산이 Ala 및/또는 314번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Leu를 포함하는 Fc영역을 들 수 있다. 당해 개변의 다른 비한정의 일태양은 308번 위치의 아미노산이 Thr, 309번 위치의 아미노산이 Pro, 311번 위치의 아미노산이 Ser, 312번 위치의 아미노산이 Asp 및/또는 314번 위치의 아미노산이 Leu를 포함하는 Fc영역을 들 수 있다.

[1587] 상기 pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 강한 Fc영역의 비한정의 다른 일태양으로서, 예를 들면 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8로 표시되는 항체의 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 잔기 중 EU 넘버링으로 표시되는 251번 위치의 아미노산이 Leu, 252번 위치의 아미노산이 Tyr, 254번 위치의 아미노산이 Ser 또는 Thr, 255번 위치의 아미노산이 Arg 및/또는 256번 위치의 아미노산이 Glu를 포함하는 Fc영역을 들 수 있다.

[1588] 상기 pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 강한 Fc영역의 비한정의 다른 일태양으로서, 예를 들면 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8로 표시되는 항체의 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 잔기 중 EU 넘버링으로 표시되는 428번 위치의 아미노산이 Leu, Met, Phe, Ser 또는 Thr 중 어느 하나, 433번 위치의 아미노산이 Arg, Gln, His, Ile, Lys, Pro 또는 Ser 중 어느 하나, 434번 위치의 아미노산이 His, Phe 또는 Tyr 중 어느 하나 및/또는 436번 위치의 아미노산이 Arg, Asn, His, Lys, Met 또는 Thr 중 어느 하나를 포함하는 Fc영역을 들 수 있다. 또한 당해 개변의 다른 비한정의 일태양은 428번 위치의 아미노산이 His 또는 Met 및/또는 434번 위치의 아미노산이 His 또는 Met를 포함하는 Fc영역을 들 수 있다.

[1589] 상기 pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 강한 Fc영역의 비한정의 또 다른 일태양으로서, 예를 들면 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8로 표시되는 항체의 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 잔기 중 EU 넘버링으로 표시되는 385번 위치의 아미노산이 Arg, 386번 위치의 아미노산이 Thr, 387번 위치의 아미노산이 Arg 및/또는 389번 위치의 아미노산이 Pro를 포함하는 개변일 수 있다. 또한 당해 개변의 다른 비한정의 일태양은 385번 위치의 아미노산이 Asp, 386번 위치의 아미노산이 Pro 및/또는 389번 위치의 아미노산이 Ser을 포함하는 Fc영역을 들 수 있다.

[1590] 상기 pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 강한 Fc영역의 비한정의 다른 일태양으로서, 예를 들면 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8로 표시되는 항체의 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 잔기 중 EU 넘버링으로 표시되는,

[1591] 250번 위치의 아미노산이 Gln 또는 Glu 중 어느 하나, 또는

[1592] 428번 위치의 아미노산이 Leu 또는 Phe 중 어느 하나

[1593] 의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산을 포함하는 Fc영역을 들 수 있다.

[1594] 상기 pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 강한 Fc영역의 비한정의 다른 일태양으로서, 예를 들면 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8로 표시되는 항체의 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 잔기 중 EU 넘버링으로 표시되는 250번 위치의 아미노산이 Gln 및/또는 428번 위치의 아미노산이 Leu 또는 Phe 중 어느 하나를 포함하는 Fc영역을 들 수 있다. 또한 당해 개변의 다른 비한정의 일태양으로서, 250번 위치의 아미노산이 Glu 및/또는 428번 위치의 아미노산이 Leu 또는 Phe 중 어느 하나를 포함하는 Fc영역을 들 수 있다.

[1595] 상기 pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 강한 Fc영역의 비한정의 다른 일태양으로서, 예를 들면 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8로 표시되는 항체의 정상영역에 포함되는

Fc영역의 아미노산 잔기 중 EU 넘버링으로 표시되는,

[1596] 251번 위치의 아미노산이 Asp 또는 Glu 중 어느 하나,

[1597] 252번 위치의 아미노산이 Tyr,

[1598] 307번 위치의 아미노산이 Gln,

[1599] 308번 위치의 아미노산이 Pro,

[1600] 378번 위치의 아미노산이 Val,

[1601] 380번 위치의 아미노산이 Ala,

[1602] 428번 위치의 아미노산이 Leu,

[1603] 430번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Lys 중 어느 하나,

[1604] 434번 위치의 아미노산이 Ala, His, Ser 또는 Tyr 중 어느 하나, 또는

[1605] 436번 위치의 아미노산이 Ile

[1606] 의 군으로부터 선택되는 적어도 2개 이상의 아미노산을 포함하는 Fc영역을 들 수 있다.

[1607] 상기 pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 강한 Fc영역의 비한정의 다른 일태양으로서, 예를 들면 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8로 표시되는 항체의 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 잔기 중 EU 넘버링으로 표시되는 307번 위치의 아미노산이 Gln 및 434번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Ser 중 어느 하나를 포함하는 Fc영역을 들 수 있다. 또한 당해 Fc영역의 다른 비한정의 일태양으로서, 308번 위치의 아미노산이 Pro 및 434번 위치의 아미노산이 Ala를 포함하는 Fc영역을 들 수 있다. 또한 당해 Fc영역의 또 다른 비한정의 일태양으로서, 252번 위치의 아미노산이 Tyr 및 434번 위치의 아미노산이 Ala를 포함하는 Fc영역을 들 수 있다. 당해 Fc영역의 다른 비한정의 일태양으로서, 378번 위치의 아미노산이 Val 및 434번 위치의 아미노산이 Ala를 포함하는 Fc영역을 들 수 있다. 당해 Fc영역의 또 다른 비한정의 일태양으로서, 428번 위치의 아미노산이 Leu 및 434번 위치의 아미노산이 Ala를 포함하는 개변을 들 수 있다. 또한 당해 Fc영역의 또 다른 비한정의 일태양으로서, 434번 위치의 아미노산이 Ala 및 436번 위치의 아미노산이 Ile를 포함하는 Fc영역을 들 수 있다. 또한 당해 개변의 또 하나의 비한정의 일태양으로서, 308번 위치의 아미노산이 Pro 및 434번 위치의 아미노산이 Tyr을 포함하는 Fc영역을 들 수 있다. 또한 당해 개변의 또 다른 하나의 비한정의 일태양으로서, 307번 위치의 아미노산이 Gln 및 436번 위치의 아미노산이 Ile를 포함하는 Fc영역을 들 수 있다.

[1608] 상기 pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 강한 Fc영역의 비한정의 다른 일태양으로서, 예를 들면 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8로 표시되는 항체의 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 잔기 중 EU 넘버링으로 표시되는 307번 위치의 아미노산이 Gln, 380번 위치의 아미노산이 Ala 및 434번 위치의 아미노산이 Ser 중 어느 하나를 포함하는 Fc영역을 들 수 있다. 또한 당해 Fc영역의 다른 비한정의 일태양으로서, 307번 위치의 아미노산이 Gln, 380번 위치의 아미노산이 Ala 및 434번 위치의 아미노산이 Ala를 포함하는 Fc영역을 들 수 있다. 또한 당해 Fc영역의 또 다른 비한정의 일태양으로서, 252번 위치의 아미노산이 Tyr, 308번 위치의 아미노산이 Pro 및 434번 위치의 아미노산이 Tyr을 포함하는 Fc영역을 들 수 있다. 당해 Fc영역의 다른 비한정의 일태양으로서, 251번 위치의 아미노산이 Asp, 307번 위치의 아미노산이 Gln 및 434번 위치의 아미노산이 His를 포함하는 Fc영역을 들 수 있다.

[1609] 상기 pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 강한 Fc영역의 비한정의 다른 일태양으로서, 예를 들면 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8로 표시되는 항체의 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 잔기 중 EU 넘버링으로 표시되는,

[1610] 238번 위치의 아미노산이 Leu,

[1611] 244번 위치의 아미노산이 Leu,

[1612] 245번 위치의 아미노산이 Arg,

[1613] 249번 위치의 아미노산이 Pro,

[1614] 252번 위치의 아미노산이 Tyr,

[1615] 256번 위치의 아미노산이 Pro,

[1616] 257번 위치의 아미노산이 Ala, Ile, Met, Asn, Ser 또는 Val 중 어느 하나,

[1617] 258번 위치의 아미노산이 Asp,

[1618] 260번 위치의 아미노산이 Ser,

[1619] 262번 위치의 아미노산이 Leu,

[1620] 270번 위치의 아미노산이 Lys,

[1621] 272번 위치의 아미노산이 Leu 또는 Arg 중 어느 하나,

[1622] 279번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Gly, His, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1623] 283번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1624] 285번 위치의 아미노산이 Asn,

[1625] 286번 위치의 아미노산이 Phe,

[1626] 288번 위치의 아미노산이 Asn 또는 Pro 중 어느 하나,

[1627] 293번 위치의 아미노산이 Val,

[1628] 307번 위치의 아미노산이 Ala, Glu 또는 Met 중 어느 하나,

[1629] 311번 위치의 아미노산이 Ala, Ile, Lys, Leu, Met, Val 또는 Trp 중 어느 하나,

[1630] 312번 위치의 아미노산이 Pro,

[1631] 316번 위치의 아미노산이 Lys,

[1632] 317번 위치의 아미노산이 Pro,

[1633] 318번 위치의 아미노산이 Asn 또는 Thr 중 어느 하나,

[1634] 332번 위치의 아미노산이 Phe, His, Lys, Leu, Met, Arg, Ser 또는 Trp 중 어느 하나,

[1635] 339번 위치의 아미노산이 Asn, Thr 또는 Trp 중 어느 하나,

[1636] 341번 위치의 아미노산이 Pro,

[1637] 343번 위치의 아미노산이 Glu, His, Lys, Gln, Arg, Thr 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1638] 375번 위치의 아미노산이 Arg,

[1639] 376번 위치의 아미노산이 Gly, Ile, Met, Pro, Thr 또는 Val 중 어느 하나,

[1640] 377번 위치의 아미노산이 Lys,

[1641] 378번 위치의 아미노산이 Asp 또는 Asn 중 어느 하나,

[1642] 380번 위치의 아미노산이 Asn, Ser 또는 Thr 중 어느 하나,

[1643] 382번 위치의 아미노산이 Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1644] 423번 위치의 아미노산이 Asn,

[1645] 427번 위치의 아미노산이 Asn,

[1646] 430번 위치의 아미노산이 Ala, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1647] 431번 위치의 아미노산이 His 또는 Asn 중 어느 하나,

[1648] 434번 위치의 아미노산이 Phe, Gly, His, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1649] 436번 위치의 아미노산이 Ile, Leu 또는 Thr 중 어느 하나,

[1650] 438번 위치의 아미노산이 Lys, Leu, Thr 또는 Trp 중 어느 하나,

[1651] 440번 위치의 아미노산이 Lys, 또는

[1652] 442번 위치의 아미노산이 Lys

[1653] 의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산의 개변을 들 수 있다. 또한 개변되는 아미노산의 수는 특별히 한정되지 않고, 2개소만의 아미노산이 개변될 수 있고, 3개소 이상의 아미노산이 개변될 수 있다.

[1654] 상기 pH 산성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성이 인간 IgG1의 출발 Fc영역의 결합 활성보다 강한 Fc영역의 비한정의 다른 일태양으로서, 예를 들면 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8로 표시되는 항체의 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 잔기 중 EU 넘버링으로 표시되는 257번 위치의 아미노산이 Ile 및 311번 위치의 아미노산이 Ile를 포함하는 Fc영역을 들 수 있다. 또한 당해 Fc영역의 다른 비한정의 일태양으로서, 257번 위치의 아미노산이 Ile 및 434번 위치의 아미노산이 His를 포함하는 Fc영역을 들 수 있다. 또한 당해 Fc영역의 또 다른 비한정의 일태양은 376번 위치의 아미노산이 Val 및 434번 위치의 아미노산이 His를 포함하는 Fc영역을 들 수 있다.

[1655] 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드에 대해 그 폴리뉴클레오티드 서열이 연결되는 Fc영역의 비한정의 일태양으로서, pH 중성역의 조건하에서 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 Fc영역이 예시된다. pH 중성역에 있어서의 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 가지고 있는 Fc영역으로서, 예를 들면 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8로 표시되는 항체의 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 잔기 중 EU 넘버링으로 표시되는 221번 위치~225번 위치, 227번 위치, 228번 위치, 230번 위치, 232번 위치, 233번 위치~241번 위치, 243번 위치~252번 위치, 254번 위치~260번 위치, 262번 위치~272번 위치, 274번 위치, 276번 위치, 278번 위치~289번 위치, 291번 위치~312번 위치, 315번 위치~320번 위치, 324번 위치, 325번 위치, 327번 위치~339번 위치, 341번 위치, 343번 위치, 345번 위치, 360번 위치, 362번 위치, 370번 위치, 375번 위치~378번 위치, 380번 위치, 382번 위치, 385번 위치~387번 위치, 389번 위치, 396번 위치, 414번 위치, 416번 위치, 423번 위치, 424번 위치, 426번 위치~438번 위치, 440번 위치 및 442번 위치의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산이 치환되어 있는 Fc영역이 예시된다.

[1656] 상기 pH 중성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 Fc영역의 비한정의 다른 일태양으로서, 예를 들면 서열번호 : 5, 6, 7 또는 8로 표시되는 항체의 정상영역에 포함되는 Fc영역의 아미노산 잔기 중 EU 넘버링으로 표시되는 237번 위치, 248번 위치, 250번 위치, 252번 위치, 254번 위치, 255번 위치, 256번 위치, 257번 위치, 258번 위치, 265번 위치, 286번 위치, 289번 위치, 297번 위치, 298번 위치, 303번 위치, 305번 위치, 307번 위치, 308번 위치, 309번 위치, 311번 위치, 312번 위치, 314번 위치, 315번 위치, 317번 위치, 332번 위치, 334번 위치, 360번 위치, 376번 위치, 380번 위치, 382번 위치, 384번 위치, 385번 위치, 386번 위치, 387번 위치, 389번 위치, 424번 위치, 428번 위치, 433번 위치, 434번 위치 및 436번 위치의 아미노산이 치환되어 있는 Fc영역이 예시된다. 이들 아미노산으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환함으로써, 항원 결합 분자에 포함되는 Fc영역이 pH 중성역에 있어서 인간 FcRn에 대해 결합할 수 있다.

[1657] 상기 pH 중성역의 조건하에서 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 Fc영역의 비한정의 다른 일태양으로서, EU 넘버링으로 표시되는,

[1658] 237번 위치의 아미노산이 Met,

[1659] 248번 위치의 아미노산이 Ile,

[1660] 250번 위치의 아미노산이 Ala, Phe, Ile, Met, Gln, Ser, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1661] 252번 위치의 아미노산이 Phe, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1662] 254번 위치의 아미노산이 Thr,

[1663] 255번 위치의 아미노산이 Glu,

[1664] 256번 위치의 아미노산이 Asp, Asn, Glu 또는 Gln 중 어느 하나,

[1665] 257번 위치의 아미노산이 Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr 또는 Val 중 어느 하나,

[1666] 258번 위치의 아미노산이 His,

[1667] 265번 위치의 아미노산이 Ala,

[1668] 286번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Glu 중 어느 하나,

[1669] 289번 위치의 아미노산이 His,

[1670] 297번 위치의 아미노산이 Ala,

[1671] 303번 위치의 아미노산이 Ala,

[1672] 305번 위치의 아미노산이 Ala,

[1673] 307번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1674] 308번 위치의 아미노산이 Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Gln 또는 Thr 중 어느 하나,

[1675] 309번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Pro 또는 Arg 중 어느 하나,

[1676] 311번 위치의 아미노산이 Ala, His 또는 Ile 중 어느 하나,

[1677] 312번 위치의 아미노산이 Ala 또는 His 중 어느 하나,

[1678] 314번 위치의 아미노산이 Lys 또는 Arg 중 어느 하나,

[1679] 315번 위치의 아미노산이 Ala, Asp 또는 His 중 어느 하나,

[1680] 317번 위치의 아미노산이 Ala,

[1681] 332번 위치의 아미노산이 Val,

[1682] 334번 위치의 아미노산이 Leu,

[1683] 360번 위치의 아미노산이 His,

[1684] 376번 위치의 아미노산이 Ala,

[1685] 380번 위치의 아미노산이 Ala,

[1686] 382번 위치의 아미노산이 Ala,

[1687] 384번 위치의 아미노산이 Ala,

[1688] 385번 위치의 아미노산이 Asp 또는 His 중 어느 하나,

[1689] 386번 위치의 아미노산이 Pro,

[1690] 387번 위치의 아미노산이 Glu,

[1691] 389번 위치의 아미노산이 Ala 또는 Ser 중 어느 하나,

[1692] 424번 위치의 아미노산이 Ala,

[1693] 428번 위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1694] 433번 위치의 아미노산이 Lys,

[1695] 434번 위치의 아미노산이 Ala, Phe, His, Ser, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나, 또는

[1696] 436번 위치의 아미노산이 His, Ile, Leu, Phe, Thr 또는 Val

[1697] 의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산을 포함하는 Fc영역을 들 수 있다. 또한 개변되는 아미노산의 수는 특별히 한정되지 않고, 1개소만의 아미노산이 개변될 수 있으며, 2개소 이상의 아미노산이 개변될 수 있다. 이들 아미노산의 개변의 조합으로서는, 예를 들면 표 2-1~2-33에 나타내는 아미노산의 개변을 들 수 있다.

[1698] 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드에 대해 그 폴리뉴클레오티드 서열이 연결되는 Fc영역의 비한정의 일태양으로서, 활성형 FcγR에 대한 결합 활성이 천연형 Fc영역의 활성형 FcγR에 대한 결합 활성보다 낮은 Fc영역이 예시된다. 당해 Fc영역의 비한정의 다른 일태양으로서, EU 넘버링으로 표시되는 234, 235, 236, 237, 238, 239, 270, 297, 298, 325, 328 및 329 중 어느 하나 이상의 아미노산이 예를 들면 서열번호：5, 6, 7 또는 8로 표시되는 천연형 Fc영역과 상이한 아미노산으로 개변되어 있는 Fc영역을 적합하게 들 수 있는데, Fc영역의 개변은 상기 개변에 한정되지 않고, 예를 들면 Cur. Opin. in Biotech. (2009) 20 (6), 685-691에 기재되어 있는 탈당쇄(N297A, N297Q), IgG1-L234A/L235A, IgG1-A325A/A330S/P331S, IgG1-C226S/C229S, IgG1-C226S/C229S/E233P/L234V/L235A, IgG1-L234F/L235E/P331S, IgG1-S267E/L328F, IgG2-V234A/G237A, IgG2-H268Q/V309L/A330S/A331S, IgG4-L235A/G237A/E318A, IgG4-L236E 등의 개변 및 국제공개 WO2008/092117에 기재되어 있는 G236R/L328R, L235G/G236R, N325A/L328R, N325L/L328R 등의 개변 및 EU 넘버링 233번 위치, 234번 위치, 235번 위치, 237번 위치에 있어서의 아미노산의 삽입, 국제공개 WO2000/042072에 기재되어 있는 개소의 개변이어도 된다.

[1699] 상기 활성형 FcγR에 대한 결합 활성이 천연형 Fc영역의 활성형 FcγR에 대한 결합 활성보다 낮은 Fc영역의 비한정의 다른 일태양으로서, EU 넘버링으로 표시되는,

[1700] 234번 위치의 아미노산을 Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr 또는 Trp 중 어느 하나,

[1701] 235번 위치의 아미노산을 Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Val 또는 Arg 중 어느 하나,

[1702] 236번 위치의 아미노산을 Arg, Asn, Gln, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1703] 237번 위치의 아미노산을 Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Val, Tyr 또는 Arg 중 어느 하나,

[1704] 238번 위치의 아미노산을 Ala, Asn, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Thr, Trp 또는 Arg 중 어느 하나,

[1705] 239번 위치의 아미노산을 Gln, His, Lys, Phe, Pro, Trp, Tyr 또는 Arg 중 어느 하나,

[1706] 265번 위치의 아미노산을 Ala, Arg, Asn, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr 또는 Val 중 어느 하나,

[1707] 266번 위치의 아미노산을 Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1708] 267번 위치의 아미노산을 Arg, His, Lys, Phe, Pro, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1709] 269번 위치의 아미노산을 Ala, Arg, Asn, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr 또는 Val 중 어느 하나,

[1710] 270번 위치의 아미노산을 Ala, Arg, Asn, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr 또는 Val 중 어느 하나,

[1711] 271번 위치의 아미노산을 Arg, His, Phe, Ser, Thr, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1712] 295번 위치의 아미노산을 Arg, Asn, Asp, Gly, His, Phe, Ser, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1713] 296번 위치의 아미노산을 Arg, Gly, Lys 또는 Pro 중 어느 하나,

[1714] 297번 위치의 아미노산을 Ala,

[1715] 298번 위치의 아미노산을 Arg, Gly, Lys, Pro, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,

[1716] 300번 위치의 아미노산을 Arg, Lys 또는 Pro 중 어느 하나,

[1717] 324번 위치의 아미노산을 Lys 또는 Pro 중 어느 하나,

[1718] 325번 위치의 아미노산을 Ala, Arg, Gly, His, Ile, Lys, Phe, Pro, Thr, Trp, Tyr, 또는 Val 중 어느 하나,

[1719] 327번 위치의 아미노산을 Arg, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr 또는 Val 중 어느 하나,

[1720] 328번 위치의 아미노산을 Arg, Asn, Gly, His, Lys 또는 Pro 중 어느 하나,

[1721] 329번 위치의 아미노산을 Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val 또는 Arg 중 어느 하나,

[1722] 330번 위치의 아미노산을 Pro 또는 Ser 중 어느 하나,

[1723] 331번 위치의 아미노산을 Arg, Gly 또는 Lys 중 어느 하나, 또는

[1724] 332번 위치의 아미노산을 Arg, Lys 또는 Pro 중 어느 하나

[1725] 의 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 아미노산을 포함하는 Fc영역을 들 수 있다. 또한 개변되는 아미노산의 수는 특별히 한정되지 않고, 1개소만의 아미노산이 개변될 수 있으며, 2개소 이상의 아미노산이 개변될 수 있다.

[1726] 본 발명의 비한정의 일태양에 있어서의 항원 결합 분자에 포함되는 Fc영역으로서는, 상기 이중 특이성 항체를 기원으로 하는 Fc영역을 형성하는 2개의 폴리펩티드가 적절히 사용될 수 있다. 보다 구체적으로는, Fc영역을 형성하는 2개의 폴리펩티드로서 그 한쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 349의 아미노산이 Cys, 366의 아미노산이 Trp이고, 다른 쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 356의 아미노산이 Cys, 366의 아미노산이 Ser, 368의 아미노산이 Ala, 407의 아미노산이 Val인 것을 특징으로 하는 2개의 폴리펩티드가 적합하게 사용된다.

[1727] 그 밖의 본 발명의 비한정의 일태양에 있어서의 Fc영역으로서는, Fc영역을 형성하는 2개의 폴리펩티드로서 그 한쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 409의 아미노산이 Asp이고, 다른 쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 399의 아미노산이 Lys인 것을 특징으로 하는 2개의 폴리펩티드가 적합하게 사용된다. 상기 태양에서는 409의 아미노산은 Asp 대신에 Glu, 399의 아미노산은 Lys 대신에 Arg일 수도 있다. 또한 399의 아미노산인 Lys에 더하여 360의 아미노산으로서 Asp 또는 392의 아미노산으로서 Asp도 적합하게 추가될 수 있다.

[1728] 본 발명의 다른 비한정의 일태양에 있어서의 Fc영역으로서는, Fc영역을 형성하는 2개의 폴리펩티드로서 그 한쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 370의 아미노산이 Glu이고, 다른 쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 357의 아미노산이 Lys인 것을 특징으로 하는 2개의 폴리펩티드가 적합하게 사용된다.

[1729] 본 발명의 또 다른 비한정의 일태양에 있어서의 Fc영역으로서는, Fc영역을 형성하는 2개의 폴리펩티드로서 그 한쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 439의 아미노산이 Glu이고, 다른 쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 356의 아미노산이 Lys인 것을 특징으로 하는 2개의 폴리펩티드가 적합하게 사용된다.

[1730] 본 발명의 다른 비한정의 일태양에 있어서의 Fc영역으로서는, 이들이 조합된 아래의 태양 중 어느 하나 ;

[1731] (i) Fc영역을 형성하는 2개의 폴리펩티드로서 그 한쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 409의 아미노산이 Asp, 370의 아미노산이 Glu이고, 다른 쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 399의 아미노산이 Lys, 357의 아미노산이 Lys인 것을 특징으로 하는 2개의 폴리펩티드(본 태양에서는 EU 넘버링으로 표시되는 370의 아미노산인 Glu 대신에 Asp여도 되고, EU 넘버링으로 표시되는 370의 아미노산인 Glu 대신에 392의 아미노산인 Asp여도 된다),

[1732] (ii) Fc영역을 형성하는 2개의 폴리펩티드로서 그 한쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 409의 아미노산이 Asp, 439의 아미노산이 Glu이고, 다른 쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 399의 아미노산이 Lys, 356의 아미노산이 Lys인 것을 특징으로 하는 2개의 폴리펩티드(본 태양에서는 EU 넘버링으로 표시되는 439의 아미노산인 Glu 대신에 360의 아미노산인 Asp, EU 넘버링으로 표시되는 392의 아미노산인 Asp 또는 439의 아미노산인 Asp여도 된다),

[1733] (iii) Fc영역을 형성하는 2개의 폴리펩티드로서 그 한쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 370의 아미노산이 Glu, 439의 아미노산이 Glu이고, 다른 쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 357의 아미노산이 Lys, 356의 아미노산이 Lys인 것을 특징으로 하는 2개의 폴리펩티드, 또는

[1734] Fc영역을 형성하는 2개의 폴리펩티드로서 그 한쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 409의 아미노산이 Asp, 370의 아미노산이 Glu, 439의 아미노산이 Glu이고, 다른 쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중

EU 넘버링으로 표시되는 399의 아미노산이 Lys, 357의 아미노산이 Lys, 356의 아미노산이 Lys인 것을 특징으로 하는 2개의 폴리펩티드(본 태양에서는 EU 넘버링으로 표시되는 370의 아미노산을 Glu로 치환하지 않아도 되고, 또한 370의 아미노산을 Glu로 치환하지 않고 439의 아미노산인 Glu 대신에 Asp 또는 439의 아미노산인 Glu 대신에 392의 아미노산인 Asp여도 된다),

[1735] 가 적합하게 사용된다.

[1736] 또한 본 발명의 다른 비한정의 일태양에 있어서, Fc영역을 형성하는 2개의 폴리펩티드로서 그 한쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 356의 아미노산이 Lys이고, 다른 쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 435의 아미노산이 Arg, 439의 아미노산이 Glu인 것을 특징으로 하는 2개의 폴리펩티드도 적합하게 사용된다.

[1737] 또한 본 발명의 다른 비한정의 일태양에 있어서, Fc영역을 형성하는 2개의 폴리펩티드로서 그 한쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 356의 아미노산이 Lys, 357의 아미노산이 Lys이고, 다른 쪽 폴리펩티드의 아미노산 서열 중 EU 넘버링으로 표시되는 370의 아미노산이 Glu, 435의 아미노산이 Arg, 439의 아미노산이 Glu인 것을 특징으로 하는 2개의 폴리펩티드도 적합하게 사용된다.

[1738] 상기에 기재한 바와 같이 연결된 항원 결합 도메인을 코드하는 폴리뉴클레오티드 및 Fc영역을 포함하는 폴리펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 목적하는 발현 벡터에 의해 형질전환된 세포의 배양액으로부터 본 발명의 항원 결합 분자가 단리된다.

[1739] 본 발명의 항원 결합 분자에 포함되는 Fc영역이 당해 Fc영역에 결합한 당쇄의 조성이 푸코오스 결손 당쇄를 결합한 Fc영역의 비율이 높아지도록, 또는 바이섹팅 N-아세틸글루코사민이 부가된 Fc영역의 비율이 높아지도록 수식된 Fc영역인 경우, 상기 형질전환된 세포로서, 당쇄 수식을 받는 폴리펩티드의 당쇄 구조를 형성하는 활성이 개변된 결과, 당쇄에 푸코오스를 부가하는 능력이 낮은 숙주세포가 적절히 사용된다(국제공개 WO2000/061739, WO2002/031140, WO2006/067913 등). 당해 숙주세포의 비한정의 일태양으로서, 푸코실 트랜스페라아제(EC 2.4.1.152), 푸코오스 트랜스포터(SLC35C1), GMD(GDP-만노오스 4,6-디히드라타아제)(EC 4.2.1.47), Fx(GDP-케토-6-데옥시만노오스 3,5-에피머라아제, 4-리덕타아제)(EC 1.1.1.271) 및 GFPP(GDP-β-L-푸코오스 피로포스포릴라아제)(EC 2.7.7.30)로 이루어진 군으로부터 선택되는 효소 또는 트랜스포터의 활성이 결실된 숙주세포가 적절히 사용된다(국제공개 WO2000/061739, WO2002/031140, WO2006/067913 등). 그러한 활성이 결실된 숙주세포는 CHO 세포, BHK 세포, NS0 세포, SP2/0 세포, YO 골수종세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포, HEK293 세포 또는 하이브리도마 세포 등에 내재성인 이들 기능성 단백질의 유전자를 기능 불능으로 파괴하는 방법 등에 의해 제작될 수 있다.

[1740] 본 발명의 항원 결합 분자에 포함되는 Fc영역이 바이섹팅 GlcNAc을 갖는 당쇄를 갖는 Fc영역인 경우, 상기 형질전환된 세포로서 바이섹팅 GlcNAc을 갖는 당쇄를 갖는 항체를 제작하기 위해, GnTIII(β-1,4-만노실-글리코프로테인, 4-β-N-아세틸글루코사미닐트랜스페라아제)(EC 2.4.1.144) 활성 또는 GalT(β-1,4-갈락토실트랜스페라아제)(EC 2.4.1.38) 활성을 갖는 기능성 단백질을 코드하는 유전자를 발현하는 숙주세포가 적절히 사용된다(국제공개 WO2002/079255 등). 다른 비한정의 적합한 일태양에서는 상기 기능성 단백질에 더하여 인간 ManII(만노시다아제 II)(3.2.1.114) 활성을 갖는 기능성 단백질을 코드하는 유전자, GnTI(β-1,2-아세틸글루코사미닐트랜스페라아제 I)(EC 2.4.1.94) 활성을 갖는 기능성 단백질을 코드하는 유전자, GnTII(β-1,2-아세틸글루코사미닐트랜스페라아제 II)(EC 2.4.1.143) 활성을 갖는 기능성 단백질을 코드하는 유전자, ManI(만노시다아제)(EC 3.2.1.113) 활성을 갖는 기능성 단백질을 코드하는 유전자 및 α-1,6-푸코실트랜스페라아제(EC 2.4.1.68)와 공발현하는 숙주세포가 적절히 사용된다(국제공개 WO2004/065540).

[1741] 상기 세포의 배양액으로부터 단리하는 등의 상기 항체의 항목에서 기재된 항체의 제조방법에 준한 방법을 사용하여, 본 발명의 항원 결합 분자가 제조된다. 상기 Fc영역을 포함하는 폴리펩티드의 비한정의 일태양으로서, 예를 들면 서열번호：5, 6, 7 또는 8로 표시되는 항체의 정상영역이 예시된다. 또한 본 발명의 항원 결합 분자의 비한정의 일태양으로서 전장 항체 분자를 들 수 있다.

[1742] 의약 조성물

[1743] 본 발명에 의해 부작용을 회피하면서 약효를 발휘하기 위해 정상 조직이나 혈액 중에 있어서 전신적으로 작용하지 않고, 병변 부위인 암이나 염증 부위에 있어서 작용하는 항원 결합 분자를 포함하는 의약 조성물이 제공된다. 본 발명의 의약 조성물에 포함되는 항원 결합 분자는 암조직에 있어서의 암세포·면역세포·스트로마 세포 등에 발현하는 항원, 암조직에 분비되고 있는 항원 또는 염증성 조직에 있어서의 면역세포 등에 발현하는

항원, 염증성 조직에 분비되고 있는 항원에 결합하고, 정상 조직에 발현하고 있는 항원에 결합하는 것이 불가능하기 때문에, 정상 조직에 대한 세포상해작용이나 중화작용 등에 의한 부작용을 회피하면서, 암에 대한 강력한 세포상해작용이나 증식억제작용, 면역항진작용 등 또는 염증성 조직에 있어서의 염증성 세포에 대한 면역억제효과 등을 발휘한다. 예를 들면 암조직 특이적 화합물에 의존적으로 T세포에 발현하는 CD3에 결합하는 항원 결합 도메인과, 암세포에 발현하는 EGFR에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 이중 특이성 항원 결합 분자 또는 이중 파라토픽 항원 결합 분자는 정상 조직에 발현하는 EGFR에 결합하지 않고, 암세포에 발현하고 있는 EGFR에 결합하기 때문에 부작용을 회피하면서 강력한 항종양 효과를 발휘한다. 즉, 암세포 근방에 있는 T세포에 발현하고 있는 CD3에는 암조직 특이적 화합물에 의존적으로 결합하는데, 암세포 근방 이외에 있는 T세포에 발현하고 있는 CD3에 결합하지 않기 때문에, 암세포 근방에 있는 T세포를 활성화하여 부작용을 회피하면서 강력한 항종양 효과를 발휘한다.

[1744] 이와 같이 표적 조직에 있어서 항원에 결합하고, 그 이외의 정상 조직이나 혈액 중에서는 항원에 결합하지 않는 항원 결합 분자는 부작용을 회피하면서 약효를 발휘한다. 본 발명이 제공하는 생체내의 표적 조직에 있어서 고농도로 존재하는 저분자를 스위치로서 항원에 결합하는 항원 결합 분자, 즉, 저분자 스위치 항원 결합 분자(Small molecule switch antigen binding molecule)는 당해 저분자가 존재하지 않는 정상의 환경에서는 항원에 결합하지 않고, 당해 저분자가 고농도로 존재하는 표적 조직에서는 항원에 결합하는 것이 가능하다.

[1745] 이러한 저분자 스위치 항원 결합 분자의 비한정의 일태양으로서, 먼저 암조직이나 염증성 조직에 있어서 고농도로 존재하고, 스위치로서 기능할 수 있는 암조직 또는 염증성 조직 특이적 화합물인 아데노신(adenosine), 아데노신 3인산(adenosine 5'-triphosphate; ATP), 이노신(inosine), 키누레닌(kynurenine), 프로스타글란딘E2(prostaglandin E2; PGE2), 숙신산(succinic acid), 락트산(lactic acid)이 본 발명의 항원 결합 분자(에 포함되는 파라토프)와 항원(에 포함되는 에피토프) 사이에 끼여 스위치 기능을 하는 암조직 또는 염증성 조직 특이적인 화합물 의존적인 항원 결합 분자가 예시된다. 당해 화합물이 존재하지 않으면 본 발명의 항원 결합 분자에 포함되는 파라토프와 항원에 포함되는 에피토프의 상호작용이 불충분해져 본 발명의 항원 결합 분자는 항원에 결합하는 것이 불가능하나, 당해 화합물이 존재하면 본 발명의 항원 결합 분자에 포함되는 파라토프와 항원에 포함되는 에피토프 사이에 끼임으로써, 당해 화합물이 고농도로 존재하는 암조직 또는 염증성 조직 등의 표적 조직에 있어서 항원에 결합한 당해 항원 결합 분자가 당해 항원을 발현하는 세포에 대해 약효를 발휘하는 것이 가능하다. 또한 이 스위치가 되는 화합물의 결합은 가역적이기 때문에 이들 화합물의 스위치에 의한 본 발명의 항원 결합 분자의 항원에 대한 결합의 제어는 가역적이라 생각된다. 이와 같이 암조직 또는 염증성 조직 등의 병변 부위에 있어서 암조직 또는 염증성 조직에 있어서의 암세포나 면역세포 등의 병적 세포에 결합하거나 또는 암조직 또는 염증성 조직에 있어서 분비된 항원에 결합하여 약효를 발휘하는 것이 가능한 본 발명의 항원 결합 분자는 의약 조성물로서 유용하다. 본 발명의 의약 조성물에는 의약적으로 허용되는 담체가 포함될 수 있다.

[1746] 본 발명에 있어서의약 조성물이란 통상 질환의 치료 또는 예방, 또는 검사·진단을 위한 약제를 말한다. 또한 본 발명에 있어서 「표적 조직 특이적 화합물의 농도에 따라 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자를 포함하는 의약 조성물」이라는 용어는, 「표적 조직 특이적 화합물의 농도에 따라 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자를 치료 대상에 투여하는 것을 포함하는 질환의 치료방법」으로 바꿔말하는 것이 가능하고, 「질환을 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서의 표적 조직 특이적 화합물의 농도에 따라 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자의 사용」으로 바꿔말하는 것도 가능하다. 또한 「표적 조직 특이적 화합물의 농도에 따라 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자를 포함하는 의약 조성물」이라는 용어를, 「질환을 치료하기 위한 표적 조직 특이적 화합물의 농도에 따라 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자의 사용」으로 바꿔말하는 것도 가능하다.

[1747] 본 발명의 의약 조성물은 당업자에게 공지의 방법을 사용하여 제제화될 수 있다. 예를 들면 물 또는 그 이외의 약학적으로 허용 가능한 액과의 무균성 용액 또는 현탁액제의 주사제의 형태로 비경구적으로 사용될 수 있다. 예를 들면 약리학상 허용되는 담체 또는 매체, 구체적으로는, 멸균수나 생리식염수, 식물유, 유화제, 현탁제, 계면활성제, 안정제, 향미제, 부형제, 비히클, 방부제, 결합제 등과 적절히 조합하여 일반적으로 확인된 제약실시에 요구되는 단위 용량 형태로 혼화함으로써 제제화될 수 있다. 이들 제제에 있어서의 유효 성분량은 지시된 범위의 적당한 용량이 얻어지도록 설정된다.

[1748] 주사를 위한 무균 조성물은 주사용 증류수와 같은 비히클을 사용하여 통상의 제제 실시에 따라 처방될 수 있다. 주사용 수용액으로서는, 예를 들면 생리식염수, 포도당이나 기타 보조제(예를 들면 D-소르비톨, D-만노오스, D-만니톨, 염화나트륨)을 포함하는 등장액을 들 수 있다. 적절한 용해 보조제, 예를 들면 알코올(에탄올 등), 폴

리알코올(프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 등), 비이온성 계면활성제(폴리소르베이트 80(TM), HCO-50 등)가 병용될 수 있다.

[1749] 유성액으로서는 참기름, 대두유를 들 수 있고, 용해 보조제로서 안식향산벤질 및/또는 벤질알코올도 병용될 수 있다. 또한 완충제(예를 들면 인산염 완충액 및 초산나트륨 완충액), 무통화제(예를 들면 염산프로카인), 안정제(예를 들면 벤질알코올 및 페놀), 산화방지제와 배합될 수 있다. 조제된 주사액은 통상 적절한 앰플에 충전된다.

[1750] 본 발명의 의약 조성물은 바람직하게는 비경구 투여에 의해 투여된다. 예를 들면 주사제형, 경비 투여제형, 경폐 투여제형, 경피 투여형의 조성물이 투여된다. 예를 들면 정맥내 주사, 근육내 주사, 복강내 주사, 피하 주사 등에 의해 전신 또는 국부적으로 투여될 수 있다.

[1751] 투여방법은 환자의 연령, 증상에 따라 적절히 선택될 수 있다. 항원 결합 분자를 함유하는 의약 조성물의 투여량은, 예를 들면 1회에 대해 체중 1 ㎏당 0.0001 ㎎~1000 ㎎의 범위로 설정될 수 있다. 또는 예를 들면 환자당 0.001~100000 ㎎의 투여량이 설정될 수 있는데, 본 발명은 이들 수치에 반드시 제한되는 것은 아니다. 투여량 및 투여방법은 환자의 체중, 연령, 증상 등에 따라 변동되는데, 당업자라면 그들 조건을 고려하여 적당한 투여량 및 투여방법을 설정하는 것이 가능하다.

[1752] 또한 본 발명에 기재하는 아미노산 서열에 포함되는 아미노산은 번역 후에 수식(예를 들면 N말단의 글루타민의 피로글루타밀화에 의한 피로글루타민산으로의 수식은 당업자에게 잘 알려진 수식이다)을 받는 경우도 있는데, 이와 같이 아미노산이 번역 후 수식된 경우라도 당연히 본 발명에 기재하는 아미노산 서열에 포함된다.

[1753] 또한 본 명세서에 있어서 인용된 모든 선행기술문헌은 참조로써 본 명세서에 포함된다.

[1754] 아래에 본 발명을 실시예에 의해 구체적으로 설명하나, 본 발명은 이들 실시예에 제한되는 것은 아니다.

[1755] **실시예**

[1756] [실시예 1] 표적 조직에 있어서 고농도로 존재하는 저분자를 스위치로서 항원에 결합하는 항체의 콘셉트

[1757] 부작용을 회피하면서 약효를 발휘하기 위해, 정상 조직이나 혈액 중에 있어서 전신적으로 작용하지 않고, 병변부위인 암이나 염증 부위에 있어서 작용하는 창약기술이 요구되고 있다. 투여된 후에 암세포에 발현하고 있는 항원에 결합하고, 정상 조직에 발현하고 있는 항원에 결합하는 것이 불가능한 항체 분자는 정상 조직에 대한 세포상해작용에 의한 부작용을 회피하면서 암에 대한 강력한 세포상해작용을 발휘하는 것이 가능하다. 예를 들면 상기 EGFR-BiTE(비특허문헌 9)가 개변된 항원 결합 분자로서, 정상 조직에 발현하는 EGFR에는 결합하지 않고, 암세포에 발현하고 있는 EGFR에 결합하는 것이 가능한 분자는 부작용을 회피하면서 강력한 항종양 효과를 발휘하는 것이 가능하다. 또한 BiTE는 CD3를 매개로 T세포를 리쿠르트하여 활성화함으로써 항종양 효과를 발휘(비특허문헌 8)하기 때문에, EGFR-BiTE에 대해 암세포 근방에 있는 T세포에 발현하고 있는 CD3에는 결합하지만, 암세포 근방 이외에 있는 T세포에 발현하고 있는 CD3에 결합하지 않는 성질을 부여할 수 있다면, 그러한 성질을 부여받은 개변 EGFR-BiTE는 암에 있어서 T세포를 활성화하는 것이 가능하여, 부작용을 회피하면서 강력한 항종양 효과를 발휘하는 것이 가능해진다.

[1758] 암에 대한 항체 의약에 한정되지 않고, 항체 분자가 류머티스성 관절염에 있어서 염증이 일어난 관절의 활액 중에서 사이토카인에 결합하여 그 작용을 저해하고, 전신적으로는 저해하지 않는다면 전신적인 사이토카인의 중화에 의한 감염증의 리스크의 증대를 회피하면서, 류머티스성 관절염 등의 염증성 질환·자기면역질환에 대해 높은 치료효과를 발휘하는 것이 가능할 것으로 생각되었다.

[1759] 이와 같이 암조직에 있어서 항원에 결합하고, 그 이외의 정상 조직이나 혈액 중에서는 항원에 결합하지 않는 항체는 부작용을 회피하면서 약효를 발휘하는 것이 가능하다. 그러나 지금까지 이러한 특성을 갖는 이상적인 항체는 보고되어 있지 않다. 이에 생체내의 암조직에 있어서 고농도로 존재하는 저분자를 스위치로서 항원에 결합하는 항체 분자, 즉, 저분자 스위치 항체(Small molecule switch antibody)는 도 1에 나타내는 바와 같이 저분자가 존재하지 않는 환경에서는 항원에 결합하지 않고, 저분자가 고농도로 존재하는 표적 조직에서는 항원에 결합하는 것이 가능하다.

[1760] 이러한 저분자 스위치 항체를 창제하는데 있어서, 먼저 암조직에 있어서 고농도로 존재하고, 스위치로서 사용할 수 있을 것으로 생각되는 저분자가 탐색되었다. 그 결과, 아데노신(adenosine), 아데노신 3인산(adenosine 5'-triphosphate; ATP), 이노신(inosine), 키누레닌(kynurenine), 프로스타글란딘 E2(prostaglandin E2; PGE2), 숙신산(succinic acid), 락트산(lactic acid)이 스위치로서 유망하였다. 이들 저분자는 모두 암세포 자체로부터

생산되거나 또는 세포사된 암세포로부터 방출되거나 또는 암조직에 침윤되어 있는 면역세포 등으로부터 생산됨으로써 암조직에 있어서 고농도로 존재하며, 정상 조직이나 혈액 중에서는 암조직과 비교하여 저농도로 존재하고 있다. 이들 저분자가 도 2에 나타내는 바와 같이 항체와 항원의 복합체 사이에 끼이는 것이 가능하다면, 당해 저분자는 스위치 기능을 하는 것이 가능하다. 즉, 저분자가 존재하지 않으면 항체와 항원의 상호작용이 불충분해져 항체는 항원에 결합하는 것이 불가능하나, 저분자가 존재하면 항체와 항원 사이에 끼임으로써 항체는 항원에 결합하는 것이 가능해진다. 바꿔말하면 저농도의 저분자 존재하에서는 항체와 항원의 상호작용이 불충분해져 항체는 항원에 결합하는 것이 불가능하나, 고농도의 저분자 존재하에서는 항체와 항원 사이에 끼임으로써 항체는 항원에 결합하는 것이 가능해진다. 또한 이 스위치가 되는 저분자의 결합은 가역적이기 때문에, 이들 저분자 스위치에 의한 항원 결합의 제어는 가역적이다.

[1761] 이에 먼저 암세포의 증식에 관여하고 있는 것이 보고되어 있는 IL-6(Br. J. Haematol. (2011) 152 (5), 579-92)에 대한 저분자 스위치 항체의 취득이 시도되었다.

[1762] [실시예 2] 파지 디스플레이 기술을 사용한 인간 항체 라이브러리로부터의 저분자 존재하에 있어서 인간 IL-6에 결합하는 항체의 취득

[1763] (2-1) 나이브 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리의 제작

[1764] 인간 PBMC로부터 제작한 폴리 A RNA나 시판되고 있는 인간 폴리 A RNA 등을 주형으로 하여 당업자에게 공지의 방법에 따라 서로 상이한 인간 항체 서열의 Fab 도메인을 제시하는 복수의 파지로 이루어지는 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리가 구축되었다.

[1765] (2-2) 비드 패닝에 의한 라이브러리로부터의 저분자 존재하에 있어서 인간 IL-6에 결합하는 항체의 취득

[1766] (2-1)에서 구축된 나이브 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리로부터 저분자 존재하에서 항원에 대한 결합 활성을 나타내는 항체의 스크리닝이 행해졌다. 즉, 비드에 캡쳐된 항원에 대해 저분자 존재하에서 결합 활성을 나타내는 항체를 제시하고 있는 파지가 모아졌다. 저분자 비존재의 조건에서 비드로부터 용출된 파지 용출액으로부터 파지가 회수되었다. 본 취득방법에서는 항원으로서 비오틴 표지된 인간 IL-6가 사용되었다.

[1767] 구축된 파지 디스플레이용 파지미드를 보유한 대장균으로부터 생산된 파지는 일반적인 방법에 의해 정제되었다. 그 후 TBS로 투석 처리된 파지 라이브러리액이 얻어졌다. 다음으로 파지 라이브러리액에 최종농도 4%가 되도록 BSA가 첨가되었다. 자기 비드에 고정화된 항원을 사용한 패닝이 실시되었다. 자기 비드로서 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 또는 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)가 사용되었다.

[1768] 암조직에 있어서 스위치의 역할을 할 수 있는 저분자에 의존적인 저분자 스위치 항체를 효율적으로 취득하기 위해 이들 저분자(아데노신(adenosine), 아데노신 3인산(adenosine 5'-triphosphate; ATP), 이노신(inosine), 키누레닌(kynurenine), 프로스타글란딘 E2(prostaglandin E2; PGE2), 숙신산(succinic acid), 락트산(lactic acid))의 혼합액(이하, SC(small molecule cocktail)로 표기된다)의 존재하에서 항원에 결합하고, SC 비존재하에서는 항원에 결합하지 않는 항체를 농축하는 패닝이 실시되었다.

[1769] 구체적으로는, 조제된 파지 라이브러리액에 250 pmol의 비오틴 표지 항원과 함께 각 최종농도가 1 mM인 아데노신 3인산나트륨염(ATP-Na), 아데노신(Adenosine), 이노신(Inosine), 숙신산(Succinic acid) 및 락트산(Lactic acid), 최종농도가 1 μM인 프로스타글란딘 E2(PGE2) 및 최종농도가 100 μM인 키누레닌(Kynurenine)으로 이루어지고 NaOH에 의해 그 pH가 7.4로 조제된 SC를 당해 파지 라이브러리액과 실온에서 60분간 접촉시켰다. 다음으로 파지 라이브러리액에 BSA로 블로킹된 자기 비드가 첨가되고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비드와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비드는 SC/TBS(SC를 포함하는 TBS)로 1회 세정되었다. 그 후, 1 mg/mL의 트립신용액 0.5 mL가 첨가된 비드는 실온에서 15분 현탁된 후, 그 자리에서 자기 스탠드를 사용하여 분리된 비드로부터 파지용액이 회수되었다. 회수된 파지용액이 대수증식기(OD600이 0.4-0.7)가 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37℃에서 1시간 완만하게 상기 대장균의 교반배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염시킨 대장균은 225 ㎜×225 ㎜의 플레이트에 파종되었다. 다음으로 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리액이 조제되었다.

[1770] 1회째의 패닝에서는 저분자 존재하에서 결합 가능한 파지의 회수가 행해졌으나, 2회째 이후의 패닝에서는 SC 존재하에서 항원에 대해 결합 가능한 파지의 농축이 행해졌다. 구체적으로는, 조제한 파지 라이브러리액에 40 pmol의 비오틴 표지 항원 및 SC, NaOH를 첨가함으로써 파지 라이브러리를 실온에서 60분간 항원 및 저분자와 접촉시켰다. BSA로 블로킹된 자기 비드가 첨가되고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비드와 실온에서 15분간 결합시

켰다. 비드는 1 mL의 SC/TBST와 SC/TBS로 세정되었다. 그 후 0.5 mL의 TBS가 첨가된 비드는 실온에서 현탁된 후, 그 자리에서 자기 스탠드를 사용하여 분리된 비드로부터 파지용액이 회수되었다. 이 작업이 재차 반복된 후, 2회로 나눠 용출된 파지액이 혼합되었다. 또한 남은 비드에 대해 0.5 mL의 TBS가 첨가되고 당해 비드는 실온에서 5분간 교반되었다. 자기 스탠드를 사용하여 분리된 비드로부터 파지용액이 회수되었다. 회수된 파지용액에 100 ㎎/mL의 트립신 5 μL를 첨가함으로써 Fab를 제시하지 않는 파지의 pIII 단백질(헬퍼 파지 유래의 pIII 단백질)이 절단되고, Fab를 제시하지 않는 파지의 대장균에 대한 감염능이 상실되었다. 트립신 처리된 파지용액으로부터 회수된 파지가 대수증식기(OD600이 0.4-0.7)가 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37℃에서 1시간 완만하게 상기 대장균의 교반배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염시킨 대장균은 225 ㎜×225 ㎜의 플레이트에 파종되었다. 2회째의 패닝에 의해 얻어진 2종류의 감염 대장균은 이 시점에서 등량씩 혼합되고, 다음으로 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리액이 회수되었다. SC 재하에서 항원에 대한 결합 활성을 갖는 항체를 취득하는 패닝이 3회 반복되었다.

[1771] (2-3) 음성 선별법을 이용한 라이브러리로부터의 저분자 존재하에 있어서 인간 IL-6에 결합하는 항체의 취득

[1772] 구축된 나이브 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리로부터, 항원에 대해 저분자가 존재하는 조건하에서 항원에 대한 결합 활성을 나타내는 항체의 스크리닝이 행해졌다. 스크리닝을 위해 먼저 나이브 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리를 저분자 비존재하에서 비오틴 표지 항원-스트렙토아비딘과 접촉시켜 저분자 비존재하에서도 항원에 대해 결합 활성을 갖는 항체를 제시하고 있는 파지가 제거되었다. 계속하여 저분자의 존재하에서 동일하게 패닝을 행함으로써 저분자가 존재하는 조건하에서 항원에 대해 결합 활성을 갖는 항체의 스크리닝이 실시되었다. 항원으로서 비오틴 표지된 IL-6가 사용되었다.

[1773] 구축한 파지 디스플레이용 파지미드를 보유한 대장균으로부터 파지가 생산되었다. 생산된 파지는 일반적인 방법으로 정제된 후 TBS에 대해 투석 처리된 파지 라이브러리액이 얻어졌다. 다음으로 파지 라이브러리액에 최종농도 4%가 되도록 BSA가 첨가되었다. 자기 비드로서 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 또는 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)를 사용하여 자기 비드에 고정화된 항원을 사용한 패닝이 실시되었다.

[1774] 조제된 파지 라이브러리액에 250 pmol의 비오틴 표지 항원과 함께 각 최종농도가 1 mM인 ATP-Na, Adenosine, Inosine, Succinic acid 및 Lactic acid, 최종농도 1 μM의 PGE2 및 최종농도 100 μM의 Kynurenine으로 이루어지고 NaOH에 의해 그 pH가 7.4로 조제된 SC를 첨가함으로써 당해 파지 라이브러리액과 실온에서 60분간 접촉시켰다. 다음으로 파지 라이브러리액에 BSA로 블로킹된 자기 비드가 첨가되고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비드와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비드는 SC/TBS로 1회 세정되었다. 그 후 1 ㎎/mL의 트립신용액 0.5 mL가 첨가된 비드는 실온에서 15분 현탁된 후, 그 자리에서 자기 스탠드를 사용하여 분리된 비드로부터 파지용액이 회수되었다. 회수된 파지용액이 대수증식기(OD600이 0.4-0.7)가 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37℃에서 1시간 완만하게 상기 대장균의 교반배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염시킨 대장균은 225 ㎜×225 ㎜의 플레이트에 파종되었다. 다음으로 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리액이 조제되었다.

[1775] 1회째의 패닝에서는 SC 존재하에서 결합 가능한 파지의 회수가 행해졌는데, 2회째 이후의 패닝에서는 SC 존재하에서 항원에 대해 결합 가능한 파지의 농축이 행해졌다. 구체적으로는, BSA로 블로킹된 Sera-Mag NeutrAvidin 비드에 250 pmol 비오틴화 항원을 첨가하여 실온에서 15분간 결합시켰다. TBS로 3회 세정된 비드에 대해 BSA로 블로킹이 행해진 파지 라이브러리액을 첨가하여 실온에서 1시간 결합시켰다. 자기 스탠드를 사용하여 비드를 분리함으로써 항원 및 비드에 결합하지 않는 파지가 회수되었다. 회수된 파지에 대해 40 pmol의 비오틴 표지 항원 및 SC, NaOH를 첨가함으로써 파지 라이브러리를 실온에서 60분간 항원 및 SC에 포함되는 저분자와 접촉시켰다. 다음으로 표지 항원, SC 및 파지 라이브러리의 혼합액에 BSA로 블로킹된 자기 비드를 첨가하여 실온에서 15분간, 항원과 파지의 복합체를 자기 비드와 결합시켰다. 비드는 1 mL의 SC/TBST와 SC/TBS로 세정되었다. 그 후 1 ㎎/mL의 Trypsin용액 0.5 mL가 당해 혼합액에 첨가되었다. 당해 혼합액은 실온에서 20분간 교반된 후, 자기 스탠드를 사용하여 분리된 비드로부터 파지가 회수되었다. 회수된 파지는 대수증식기(OD600이 0.4-0.7)가 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37℃에서 1시간 완만하게 상기 대장균의 교반배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염시킨 대장균은 225 ㎜×225 ㎜의 플레이트에 파종되었다. SC 존재하에서 항원에 대해 결합 활성을 갖는 항체를 취득하는 패닝이 3회 반복되었다.

[1776] (2-4) 파지 ELISA에 의한 저분자 존재하에 있어서의 결합 활성의 평가

[1777] 상기 방법으로 얻어진 대장균의 싱글 콜로니로부터 통상의 방법(Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145)에

따라 파지 함유 배양상청이 회수되었다. NucleoFast 96(MACHEREY-NAGEL)을 사용하여 회수된 배양상청은 한외여과되었다. 배양상청 각 100 μL가 각 웰에 어플라이된 NucleoFast 96을 원심분리(4,500 g, 45분간)함으로써 통과액(flow-through)이 제거되었다. 100 μL의 H_2O가 각 웰에 첨가된 당해 NucleoFast 96이 재차 원심분리(4,500 g, 30분간 원심)에 의해 세정되었다. 마지막으로 TBS 100 μL가 첨가되고, 실온에서 5분간 정치된 당해 NucleoFast 96의 각 웰의 상청에 포함되는 파지액이 회수되었다.

[1778] TBS 또는 SC/TBS가 첨가된 정제 파지가 아래의 절차로 ELISA에 제공되었다. StreptaWell 96 마이크로타이터 플레이트(Roche)가 비오틴 표지 항원을 포함하는 100 μL의 TBS로 하룻밤 코트되었다. 당해 플레이트의 각 웰을 TBST로 세정함으로써 항원이 제거된 후, 당해 웰이 250 μL의 2% SkimMilk-TBS로 1시간 이상 블로킹되었다. 2% SkimMilk-TBS를 제거한 후, 각 웰에 조제된 정제 파지가 첨가된 당해 플레이트를 37℃에서 1시간 정치함으로써 파지를 제시하는 항체를 각 웰에 존재하는 항원에 SC 비존재/존재하에 있어서 결합시켰다. TBST 또는 SC/TBST로 세정된 각 웰에 TBS 또는 SC/TBS에 의해 희석된 HRP 결합 항M13 항체(Amersham Pharmacia Biotech)가 첨가된 플레이트를 1시간 인큐베이트시켰다. TBST 또는 SC/TBST로 세정 후, TMB single용액(ZYMED)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후, 450 nm의 흡광도에 의해 당해 발색이 측정되었다.

[1779] 단리된 96 클론을 사용하여 파지 ELISA를 행함으로써 저분자 칵테일 존재하에서 항원인 인간 IL-6에 대해 결합활성을 갖는 클론 「I6NMSC1-3_A11」이 얻어졌다.

[1780] 〔실시예 3〕 저분자 존재하에서 항원에 결합하는 항체의 평가

[1781] (3-1) 인간 IL-6에 결합하는 항체의 발현과 정제

[1782] 실시예 2 파지 ELISA로 나타내어진 SC 존재하에서 항원에 대한 결합 활성을 갖는 것으로 판단된 클론 I6NMSC1-3_A11로부터 특이적인 프라이머(서열번호 : 110 및 112)를 사용하여 증폭된 유전자의 염기서열이 해석되었다(중쇄의 서열은 서열번호 : 30 및 경쇄의 서열은 서열번호 : 31로 표시된다). I6NMSC1-3_A11의 가변영역을 코드하는 유전자는 인간 IgG1/Lambda의 동물 발현용 플라스미드로, 기지의 항인간 IL-6 항체 CLB8-F1(중쇄는 서열번호 : 32, 경쇄는 서열번호 : 33) 및 음성 대조인 항인간 글리피칸3 항체 GC413(중쇄는 서열번호 : 34, 경쇄는 서열번호 : 35)의 가변영역을 코드하는 유전자는 각각 인간 IgG1/kappa의 동물 발현용 플라스미드로 삽입되었다. 아래의 방법을 사용하여 항체가 발현되었다. FreeStyle 293 Expression Medium 배지(Invitrogen)에 1.33×10^6 세포/mL의 세포밀도로 현탁되어, 6 well plate의 각 웰에 3 mL씩 파종된 인간 태아 신장세포 유래 FreeStyle 293-F주(Invitrogen)에 대해 조제된 플라스미드가 리포펙션법에 의해 도입되었다. CO_2 인큐베이터(37℃, 8% CO_2, 90 rpm)에서 4일간 배양된 배양상청으로부터, rProtein A Sepharose™ Fast Flow(Amersham Biosciences)를 사용하여 당업자 공지의 방법으로 항체가 정제되었다. 분광광도계를 사용하여 정제된 항체용액의 280 nm에서의 흡광도가 측정되었다. 얻어진 측정값으로부터 PACE법에 의해 산출된 흡광계수를 사용하여 정제된 항체의 농도가 산출되었다(Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

[1783] (3-2) 취득된 항체의 인간 IL-6에 대한 결합에 필요한 저분자의 동정

[1784] 취득된 I6NMSC1-3_A11(이하, A11로 약칭)과 대조의 CLB8-F1 및 GC413의 3종류의 항체가 표 3에 나타내는 9 조건하에서 ELISA에 제공되었다. 또한 표 4에 나타내는 Buffer로 각 저분자가 표 3에 나타내어지는 농도로 적절히 조제되었다. 항원으로서 비오틴 표지된 인간 IL-6가 사용되었다.

표 3

조건	저분자 (small molecule)	농도
1	ATP-Na	1mM
2	Adenosine	1mM
3	Inosine	1mM
4	PGE2	1 μ M
5	Succinic acid	1mM
6	Lactic acid	1mM
7	Kynurenine	100 μ M
8	ATP 1mM, Adenosine 1mM, Inosine 1mM, PGE2 1 μ M, Succinic acid 1mM, Lactic acid 1mM, Kynurenine 100 μ M	
9	-	-

[1785]

표 4

Wash buffer	10 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween20、pH7.4
Blocking Buffer	10 mM ACES、150 mM NaCl、2%BSA、pH7.4
Sample Buffer	10 mM ACES、150 mM NaCl、각 Small molecule、pH7.4

[1786]

[1787] 먼저 StreptaWell 96 마이크로타이터 플레이트(Roche)가 비오틴 표지 항원을 포함하는 100 μL의 PBS로 실온에서 1시간 이상 코트되었다. 당해 플레이트의 각 웰을 Wash buffer로 세정함으로써 플레이트로 결합되지 않은 항원이 제거된 후, 당해 웰이 Blocking Buffer 250 μL로 1시간 이상 블로킹되었다. Blocking Buffer가 제거된 각 웰에 표 3의 최종농도로 저분자를 포함하는 Sample Buffer로 2.5 μg/mL로 조제된 정제 IgG의 각 100 μL가 첨가된 당해 플레이트를 실온에서 1시간 정치함으로써 각 IgG를 각 웰에 존재하는 항원에 결합시켰다. 표 3의 최종농도로 저분자를 포함하는 Wash Buffer로 세정된 후에, 동 저분자가 든 Sample Buffer로 희석된 HRP 결합 항인간 IgG 항체(BIOSOURCE)가 각 웰에 첨가된 플레이트가 1시간 인큐베이트되었다. 각 저분자를 포함하는 Wash Buffer로 세정 후, TMB single용액(ZYMED)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후, 450 nm의 흡광도에 의해 당해 발색이 측정되었다.

[1788] 측정된 결과를 도 3에 나타내었다. CLB8-F1은 저분자의 종류 및 존재의 유무에 상관없이 흡광도가 동일한 것에 대해 I6NMSC1-3_A11은 조건 8(모든 저분자 칵테일용액)에 있어서의 흡광도와 비교하여 조건 9(저분자 없음)에 있어서의 흡광도는 현저히 낮은 결과가 되었다. 이 결과로부터 I6NMSC1-3_A11은 저분자의 유무로 항원의 결합이 변화하는 성질을 갖는 것이 파지 ELISA와 동일하게 확인되었다. 또한 I6NMSC1-3_A11은 조건 7(Kynurenine 100 μM 존재하)에 있어서 조건 8과 동등한 흡광도를 나타내고, 그 밖의 조건하에서는 흡광도가 현저히 낮은 결과였던 것으로부터 Kynurenine 존재하에서 항원인 인간 IL-6와 결합하고, Kynurenine 비존재하에서 IL-6에 결합하지 않는 항체인 것이 나타내어졌다.

[1789] 〔실시예 4〕 표면 플라즈몬 공명에 의한 인간 IL6에 대한 결합의 kynurenine 영향의 평가

[1790] (4-1) 인간 IL-6 결합에 대한 kynurenine의 스위치 기능의 평가

[1791] Biacore T200(GE Healthcare)을 사용하여 A11과 인간 IL-6(가마쿠라 테크노사이언스)의 항원 항체 반응의 상호작용이 해석되었다. 아민커플링법으로 protein A/G(Invitrogen)된 적당량 고정화된 Sensor chip CM5(GE Healthcare)에 목적의 항체를 캡쳐시켜 항원인 IL-6를 상호작용시켰다. 러닝 버퍼에는 10 mmol/L ACES, 150

mmol/L NaCl, 0.05% (w/v) Tween20, 100 μmol/L kynurenine, pH 7.4 또는 10 mmol/L ACES, 150 mmol/L NaCl, 0.05% (w/v) Tween20, pH 7.4의 2종류가 사용되었다. 항원인 IL-6와의 상호작용은 37℃에서 측정되고, IL-6의 희석에는 러닝 버퍼와 동일한 버퍼가 사용되었다.

[1792] 인간 IL-6 희석액과 블랭크인 러닝 버퍼를 유속 5 μL/min로 3분간 인젝트하고, 센서칩 상에 캡쳐시킨 A11에 인간 IL-6를 상호작용시켰다. 그 후 유속 5 μL/min로 3분간 러닝 버퍼를 흘려 인간 IL-6의 항체로부터의 해리가 관찰된 후, 10 mmol/L Glycine-HCl, pH 1.5를 유속 30 μL/min로 30초간 인젝트하여 센서칩이 재생되었다. 측정으로 얻어진 센서그램으로부터 산출된 키네틱스 파라미터인 결합속도상수 ka(1/Ms) 및 해리속도상수 kd(1/s)를 토대로 A11의 인간 IL-6에 대한 해리상수 K_D(M)가 산출되었다. 각 파라미터의 산출에는 Biacore T200 Evaluation Software(GE Healthcare)가 사용되었다.

[1793] 이 측정으로 취득된 100 μmol/L kynurenine 존재하 또는 비존재하에 있어서의 A11과 4 μmol/L의 인간 IL-6의 상호작용의 센서그램을 도 4에 나타내었다. 도 4에 나타내어진 바와 같이, A11은 100 μmol/L의 kynurenine 존재하에서는 IL-6에 결합하나, kynurenine 비존재하에서는 IL-6에 대한 결합이 관찰되지 않았다. 이 사실로부터 A11은 kynurenine을 스위치로서 IL-6에 결합하는 성질을 갖는 것이 확인되었다. 또한 100 μmol/L kynurenine 존재하에서의 A11의 해리상수 K_D는 $1.0E^{-6}$ mol/L였다.

[1794] (4-2) 인간 IL-6 결합에 대한 kynurenine 농도가 미치는 영향의 평가

[1795] 다음으로 Biacore T200(GE Healthcare)을 사용하여 A11과 인간 IL-6의 항원 항체 반응의 kynurenine 농도의 영향이 평가되었다. 러닝 버퍼로서 10 mmol/L ACES, 150 mmol/L NaCl, 0.05% (w/v) Tween20, pH 7.4가 사용되고, A11과 인간 IL-6의 항원 항체 반응이 25℃에서 측정되었다. 센서칩 CM5 상에 아민커플링에 의해 A11을 고정화하고, 각종 농도로 조제된 kynurenine을 포함하는 10 mmol/L ACES, 150 mmol/L NaCl, 0.05% (w/v) Tween20, pH 7.4로 희석된 1 μmol/L의 IL-6를 애널라이트로서 60초간 상호작용시켜 그 결합량의 변화가 관찰되었다. 그 결과를 도 5에 나타내었다. 이 결과로부터 스위치가 되는 kynurenine 농도가 높을수록 IL-6는 A11에 대해 보다 많이 결합하는 것이 명확해졌다.

[1796] 다음으로 센서칩 CM5 상에 고정화된 A11의 kynurenine 스위치 기능의 대조인 라이브러리 유래의 인간 IL-6에 결합하는 H01 항체(중쇄는 서열번호：36, 경쇄는 서열번호：37)에 대한 인간 IL-6와의 항원 항체 반응의 kynurenine 농도의 영향을 평가하기 위해 상기와 동일한 실험이 행해졌다. 그 결과를 도 6에 나타내었다. 이 결과로부터 라이브러리 유래의 대조군의 항IL-6 항체인 H01은 kynurenine 농도가 변화되어도 IL-6에 대한 결합은 변화되지 않는 것이 확인되었다.

[1797] 다음으로 Biacore T200(GE Healthcare)을 사용하여 A11이 IL-6에 대해 2가로 결합한 경우의 스위치인 kynurenine의 농도가 그 결합에 미치는 영향이 평가되었다. 러닝 버퍼에는 10 mmol/L ACES, 150 mmol/L NaCl, 0.05% (w/v) Tween20, pH 7.4가 사용되고, A11과 인간 IL-6의 항원 항체 반응이 25℃에서 측정되었다. 센서칩 CM5 상에 아민커플링에 의해 IL-6를 고정화하고, 각종 농도로 조제된 kynurenine을 포함하는 10 mmol/L ACES, 150 mmol/L NaCl, 0.05% (w/v) Tween20, pH 7.4로 희석된 0.1 μmol/L의 A11을 애널라이트로서 60초간 상호작용시켜, 2가로 결합한 경우의 A11의 IL-6에 대한 결합량의 변화가 관찰되었다. 그 결과를 도 7에 나타내었다. 이 평가 시스템에서는 IL-6가 센서칩 상에 고정화되어 있기 때문에, A11이 2가로 결합하는 것으로 생각된다. 이러한 A11이 IL-6를 2가로 인식하는 평가 시스템에 있어서도 kynurenine 농도가 높을수록 A11의 IL-6의 결합량이 증가하는 것이 관찰되었다. 이 결과로부터 2가로의 결합에 있어서도 A11이 IL-6에 대해 kynurenine을 스위치로서 결합하는 성질을 갖는 것이 명확해졌다.

[1798] (4-3) 항체의 인간 IL-6로부터의 해리에 대한 kynurenine 스위치의 효과

[1799] Biacore T200(GE Healthcare)을 사용하여 kynurenine 존재하에서 IL-6에 대해 결합한 A11이 kynurenine 비존재하에서 kynurenine 농도 의존적으로 해리되는지가 평가되었다. 러닝 버퍼로서 10 mmol/L ACES, 150 mmol/L NaCl, 0.05% (w/v) Tween20, pH 7.4 및 10 mmol/L ACES, 150 mmol/L NaCl, 0.05% (w/v) Tween20, pH 7.4, 100 μmol/L kynurenine이 사용되고, 25℃에서 측정되었다. 아민커플링에 의해 IL-6가 고정화된 센서칩 CM5에 100 μmol/L의 kynurenine을 포함하는 10 mmol/L ACES, 150 mmol/L NaCl, 0.05% (w/v) Tween20, pH 7.4로 희석된 0.1 μmol/L의 A11을 애널라이트로서 60초간 상호작용시킨 후, 각 러닝 버퍼 조건하에 있어서의 IL-6의 해리 모습이 관찰되었다. 각 러닝 버퍼 조건하에서의 해리 정도를 비교하기 위해, 100 μmol/L의 kynurenine 존재하에서의 IL-6에 대한 A11의 결합량을 100으로 하여 표준화(normalize)된 값이 비교되었다. 이 표준화된 후의 A11과 IL-6의 상호작용 모습을 나타낸 센서그램을 도 8에 나타내었다. 도 8의 결과로부터 A11은 kynurenine 존재하에

서 IL-6와 결합한 후, kynurenine이 존재하지 않게 되면 IL-6를 신속하게 해리하는 성질을 갖는 것이 명확해졌다. 즉, 항체의 인간 IL-6에 대한 결합에 미치는 kynuerenine에 의한 제어는 완전히 가역적인 것이 확인되었다.

[1800] 이들 결과로부터 A11은 kynurenine을 스위치로 하여 kynuerenine 존재하에서 IL-6에 결합하고, kynurenine 비존재하에서는 IL-6로부터 해리되는 항체인 것이 명확해졌다. 또한 A11은 kynurenine 비존재하에서는 전혀 인간 IL-6에 결합 활성을 나타내지 않는 완전한 ON/OFF 제어가 가능한 것이 확인되어, 도 2에 나타내는 바와 같은 양태로 스위치 기능을 하고 있는 것이 추찰되었다.

[1801] (4-4) 인간 IL-6에 대한 kynurenine의 결합성 평가

[1802] Biacore T200(GE Healthcare)을 사용하여 IL-6(가마쿠라 테크노사이언스)와 kynurenine의 상호작용이 해석되었다. 아민커플링법으로 IL-6가 약 5000 RU 고정화된 Sensor chip CM5(GE Healthcare)에 800, 400, 200, 100, 50, 25 nmol/L의 kynurenine을 상호작용시켰다. 러닝 버퍼로서 10 mmol/L ACES, 150 mmol/L NaCl, 0.05% (w/v) Tween20, pH 7.4가 사용되었다. 상기 상호작용은 모두 25℃에서 측정되었다. kynurenine의 희석에는 러닝 버퍼가 사용되었다. 취득된 IL-6와 kynurenine의 상호작용의 센서그램을 도 9에 나타내었다.

[1803] 상기 실험에서는 IL-6가 약 5000 RU 고정화되었다. IL-6의 분자량이 약 20,000 g/mol이고, kynurenine의 분자량이 약 200 g/mol인 것으로부터, kynurenine은 최대 50 RU 정도 상호작용하는 것이 기대되었다. 그러나 금번 측정 조건에 있어서는 최대농도인 800 nmol/L의 kynurenine을 상호작용시키더라도 IL-6와의 명확한 상호작용을 관찰하는 것은 불가능하였다.

[1804] 상기 실시예의 결과로부터 A11, IL-6 및 kynurenine을 포함하는 복합체의 형성에 있어서의 kynurenine의 KD는 수십 nM 내지 수 nM로 추정된다. 이 사실로부터도 가령 kynurenine이 IL-6와 직접 상호작용하는 것이라면 800 nmol/L로 kynurenine을 상호작용시킴으로써 명확한 상호작용이 관찰될 것으로 생각된다. 이 결과로부터 kynurenine은 IL-6와 직접 상호작용하는 것이 아니라 A11과 상호작용하거나 또는 A11과 IL-6의 복합체에 대해 수십 nM에서 상호작용하고 있을 가능성이 시사되었다.

[1805] 〔실시예 5〕 토끼 B세포 클로닝에 의한 항아데노신 항체의 취득

[1806] (5-1) 아데노신 결합 라이브러리 제작을 위한 면역원의 디자인

[1807] 토끼에 면역하는 면역원으로서 도 10에 나타낸 2'-Adenosine-PEG-Tetanus toxin p30 helper peptide(2'-Adenosine-PEG-peptide) 및 도 11에 나타낸 5'-Adenosine-PEG-Tetanus toxin p30 helper peptide(5'-Adenosine-PEG-peptide)가 사용되었다. Tetanus toxin p30 helper peptide는 FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE(서열번호 : 4)의 아미노산 서열로 이루어지고, 헬퍼 T세포 상에 발현하는 T세포 수용체의 에피토프로서 동정된 펩티드이다(Eur. J. Immunol. (1989) 19, 2237-2242). 항체 생산을 활성화하는 것이 알려져 있어(J. Immunol. (1992) 149, 717-721), 아데노신과 연결시킴으로써 애쥬번트로서 작용하여 아데노신에 대한 항체 생산을 항진시키는 것이 기대된다. 생산되는 항체의 에피토프가 아데노신과 함께 Tetanus toxin p30 helper peptide를 포함하기 어렵도록 아데노신과 Tetanus toxin p30 helper peptide의 연결에는 PEG를 사이에 두도록 디자인되었다. 아데노신은 ATP의 대사물인데, ATP의 인산기는 아데노신의 5' 위치 수산기에 부가되어 있는 것으로부터, 아데노신의 5' 위치 수산기를 에피토프로 하지 않는 항체는 아데노신에 더하여 ATP에도 결합할 가능성이 생각된다. 즉, 5'-Adenosine-PEG-Tetanus toxin p30 helper peptide를 면역원으로서 사용함으로써 아데노신과 ATP의 양쪽에 결합할 수 있는 항체가 얻어지기 쉬워져, 2'-Adenosine-PEG-Tetanus toxin p30 helper peptide를 면역원으로서 사용함으로써 아데노신에 결합하고 ATP에는 결합하지 않는 항체가 얻어지기 쉬워질 것으로 상정되는 것으로부터, 아데노신의 2' 위치 또는 5' 위치에 연결하는 Tetanus toxin p30 helper peptide를 포함하는 2종류의 면역원이 (5-2)에 기재된 바와 같이 제작되었다.

[1808] 이에 더하여, Tetanus toxin p30 helper peptide 대신에 비오틴을 콘쥬게이트시킨 2'-Adenosine-PEG-biotin(도 12) 및 5'-Adenosine-PEG-biotin(도 13)이 아래와 같이 제작되었다. 이들 2종류의 Adenosine-PEG-biotin에 대한 결합을 검증함으로써 Tetanus toxin p30 helper peptide를 에피토프로서 포함하는 항체가 아닌 것을 판별하는 것이 가능해진다.

[1809] (5-2) 아데노신 결합 라이브러리 제작을 위한 면역원의 합성

[1810] 2'-Adenosine-PEG-peptide(adenosine 2'-PEG-peptide conjugate 또는 2'-(PEG-peptide)adenosine) 및 2'-Adenosine-PEG-biotin(adenosine 2'-PEG-biotin conjugate 또는 2'-(PEG-biotin)adenosine)은 아래와 같이 합성되었다. 또한 합성된 2'-Adenosine-PEG-peptide 또는 2'-Adenosine-PEG-biotin은 아래의 조건으로 분석 또는

분취되었다.

[1811] LCMS의 분석조건은 하기와 같다.

표 5

[1812]

분석조건	장치	칼럼(길이 mm)	이동상	구배(A/B)	유속 (ml/분)	칼럼온도 (℃)	파장
SQDAA05	Acquity UPLC/SQD	Aldrich Ascentis Express C18 (2.1 x 50)	A) 10mM AcONH4, H2O B) MeOH	95/5 => 0/100 (1.0분간)=> 0/100(0.4분간)	1.0	35	210-400nm PDA total
SQDAA50	Acquity UPLC/SQD	Aldrich Ascentis Express C18 (2.1 x 50)	A) 10mM AcONH4, H2O B) MeOH	50/50 => 0/100 (0.7분간)=> 0/100(0.7분간)	1.0	35	210-400nm PDA total
SQDFA05	Acquity UPLC/SQD	Aldrich Ascentis Express C18 (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H2O B) 0.1% FA CH3CN	95/5 => 0/100 (1.0분간)=> 0/100(0.4분간)	1.0	35	210-400nm PDA total
SQDFA50	Acquity UPLC/SQD	Aldrich Ascentis Express C18 (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H2O B) 0.1% FA CH3CN	50/50 => 0/100 (0.7분간)=> 0/100(0.7분간)	1.0	35	210-400nm PDA total

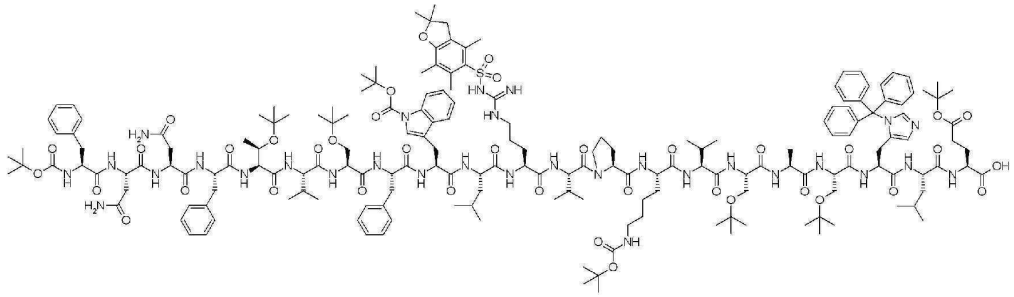
[1813] HPLC의 분석조건은 하기와 같다.

표 6

[1814]

분취조건	장치	칼럼(길이 mm)	이동상	구배(A/B)	유속 (ml/분)	칼럼온도 (℃)	파장
A	Preparative HPLC system with injection/fractionation (Gilson, Inc.)	Aldrich Ascentis RP-Amide (21.2x150mm 5μm)	A) 0.1%FA H2O B) 0.1%FA MeCN	isocratic(A/B):15/85	20.0	40	254, 258nm
B	Preparative HPLC system with injection/fractionation (Gilson, Inc.)	YMC Actus ODS-A (20x100mm 5μm)	A) 20mM AcONH4 H2O B) 20mM AcONH4 MeOH/MeCN(1/1)	isocratic(A/B):47/53	20.0	40	254, 258nm

[1815] (5-2-1) 화합물 006(Boc-Phe-Asn-Asn-Phe-Thr(tBu)-Val-Ser(tBu)-Phe-Trp(Boc)-Lue-Arg(Pbf)-Val-Pro-Lys(Boc)-Val-Ser(tBu)-Ala-Ser(tBu)-His(Trt)-Leu-Glu(tBu)-OH)의 합성

[1816] 

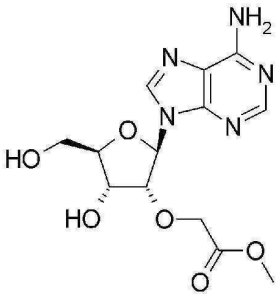
[1817] 펩티드 합성기(Multipep RS; Intavis)를 사용하여 Fmoc법에 의해 펩티드 합성이 행해졌다. 모든 Fmoc 아미노산은 와타나베 화학공업으로부터 구입되었다. 또한 조작의 상세한 절차는 합성기 부속의 매뉴얼에 따랐다.

[1818] 합성기에 C말단의 Fmoc-Glu(tBu)-OH가 결합한 2-클로로트리틸레진(1 칼럼당 250 mg, 30 칼럼, 11.7 mmol), 각종 Fmoc 아미노산(0.6 mol/L)과 1-히드록시-7-아자벤조트리아졸(0.375 mol/L)의 N,N-디메틸포름아미드용액, 및 디이소프로필카르보디이미드의 N,N-디메틸포름아미드용액(10% v/v)을 세팅하고, Fmoc 탈보호용액으로서 5%(wt/v)의 요소를 포함하는 피페리딘의 N,N-디메틸포름아미드용액(20% v/v)을 사용하여 합성 반응이 행해졌다. 레진은 N,N-디메틸포름아미드로 세정한 후, Fmoc 탈보호에 이어 Fmoc 아미노산의 축합 반응을 1 사이클로 하여, 이 사이클을 반복함으로써 레진 표면 상에 펩티드를 신장시켰다. 신장 종료 후, 레진을 트리플루오로에탄올로 세정하고, 트리플루오로에탄올/디클로로메탄(=1/1)을 첨가하여 레진으로부터 펩티드의 절단을 행해 화합물 006(7.2 g)이 조생성물로서 얻어졌다.

[1819] LCMS(ESI) m/z＝1185(M+3H) 3+

[1820] 유지시간 : 1.24분(분석조건 SQDAA05)

[1821] (5-2-2) 화합물 007의 합성



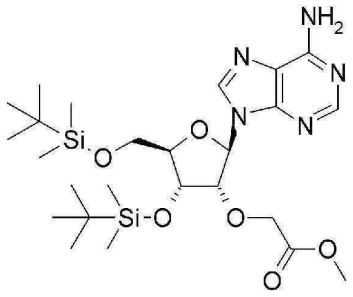
[1822]

[1823] 0℃로 냉각된 아데노신(2.00 g, 7.48 mmol)의 N,N-디메틸포름아미드(40 ㎖) 현탁액에 60% 수소화나트륨(0.42 g, 10.48 mol)이 첨가된 반응액이 0℃에서 1시간 교반되었다. 브로모초산메틸(0.76 ㎖, 8.01 mmol)이 첨가된 당해 반응액이 실온에서 5시간 교반되었다. 초산(1 ㎖) 및 메탄올(3 ㎖)이 첨가된 반응 혼합물이 감압 농축되었다. 얻어진 잔사가 순상 실리카겔 칼럼크로마토그래피(디클로로메탄/메탄올)로 정제되어 화합물 007(0.93 g, 37%)이 얻어졌다.

[1824] LCMS(ESI) m/z＝340(M+H)+

[1825] 유지시간 : 0.27분(분석조건 SQDFA05)

[1826] (5-2-3) 화합물 008의 합성



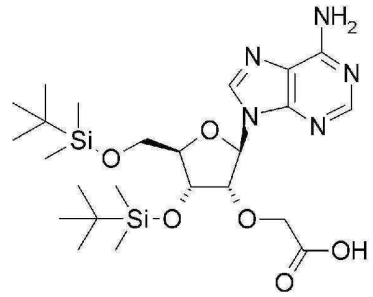
[1827]

[1828] t-부틸디메틸실릴클로라이드(999 mg, 6.63 mol) 및 이미다졸(722 mg, 10.61 mol)이 첨가된 화합물 007(900 mg, 2.65 mmol)의 피리딘(8 ㎖)용액이 실온에서 4시간 교반되었다. 반응 혼합물로부터 초산에틸/물로 추출된 유기층이 포화식염수로 세정되었다. 무수 황산나트륨으로 건조된 유기층이 여과 후 감압 농축되었다. 얻어진 잔사가 순상 실리카겔 칼럼크로마토그래피(디클로로메탄/메탄올)로 정제되어 화합물 008(1.17 g, 78%)이 얻어졌다.

[1829] LCMS(ESI)m/z＝568(M+H)+

[1830] 유지시간 : 1.10분(분석조건 SQDFA05)

[1831] (5-2-4) 화합물 009의 합성



[1832]

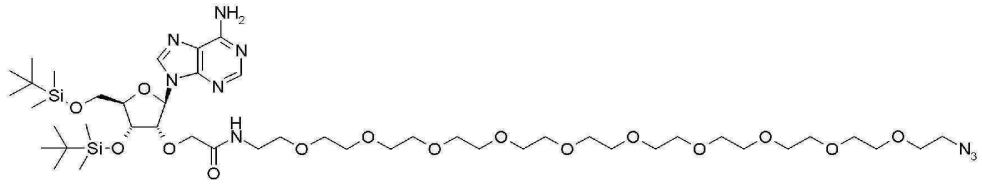
[1833] 물(0.17 ㎖)에 용해시킨 수산화리튬(61 mg, 2.55 mol)이 첨가된 화합물 008(290 mg, 0.511 mmol)의 메탄올(0.34 ㎖)/테트라히드로푸란(0.34 ㎖)용액이 실온에서 30분간 교반되었다. 1M 염산으로 중화된 반응 혼합물이

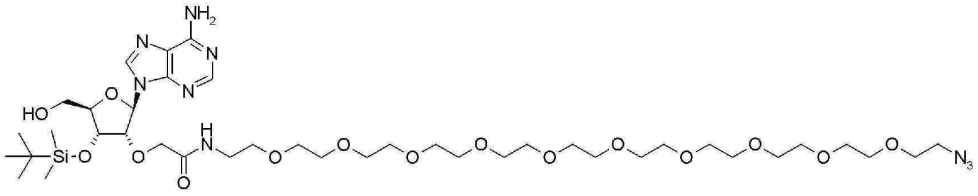
감압 농축되었다. 농축 잔사로부터 초산에틸/물로 추출된 유기층이 포화식염수로 세정되었다. 무수 황산나트륨으로 건조시킨 유기층은 여과 후 감압 농축되어 화합물 009(319 mg, 90%)가 얻어졌다.

[1834] LCMS(ESI)m/z＝552(M-H)-

[1835] 유지시간 : 0.97분(분석조건 SQDFA05)

[1836] (5-2-5) 화합물 010 및 화합물 011의 합성

[1837] 

[1838] 

[1839] 1-히드록시벤조트리아졸(75 mg, 0.553 mol) 및 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 염산염(106 mg, 0.553 mol)이 첨가된 화합물 009(255 mg, 0.460 mmol)의 N,N-디메틸포름아미드(1.5 mℓ)용액이 실온에서 3분간 교반되었다. O-(2-아미노에틸)-O'-2-아지도에틸)노나에틸렌글리콜(291 mg, 0.553 mmol)이 첨가된 반응액이 실온에서 3시간 교반되었다. 감압 농축된 반응 혼합물의 잔사가 역상 실리카겔 칼럼크로마토그래피(10 mM 초산암모늄 수용액/메탄올)로 정제되어 화합물 010(177 mg, 42%) 및 011(72 mg, 19%)이 얻어졌다.

[1840] 화합물 010

[1841] LCMS(ESI)m/z＝1063(M+H)+

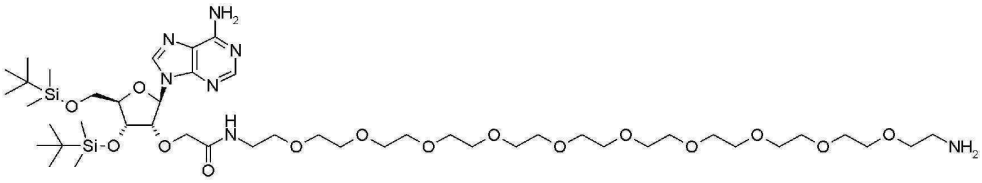
[1842] 유지시간 : 0.98분(분석조건 SQDFA05)

[1843] 화합물 011

[1844] LCMS(ESI)m/z＝949(M+H)+

[1845] 유지시간 : 0.67분(분석조건 SQDFA05)

[1846] (5-2-6) 화합물 012의 합성

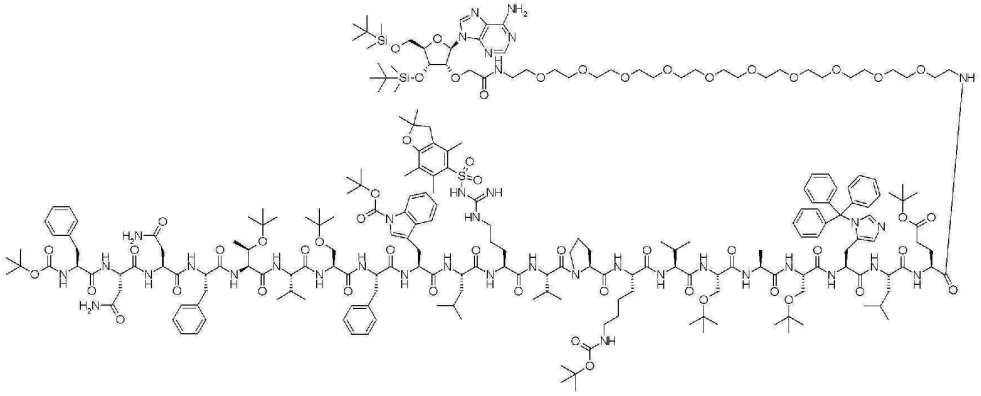
[1847] 

[1848] 10% 팔라듐 탄소(34 mg)가 첨가된 화합물 010(170 mg, 0.160 mmol)의 에탄올(1 mℓ)용액이 수소분위기하에서 2시간 교반되었다. 추가로 10% 팔라듐 탄소(34 mg)를 첨가하고 수소 분위기하에서 2시간 교반하고 반응을 완결시켰다. 반응액의 여액이 감압 농축되어 화합물 012(34 mg, 95%)가 얻어졌다.

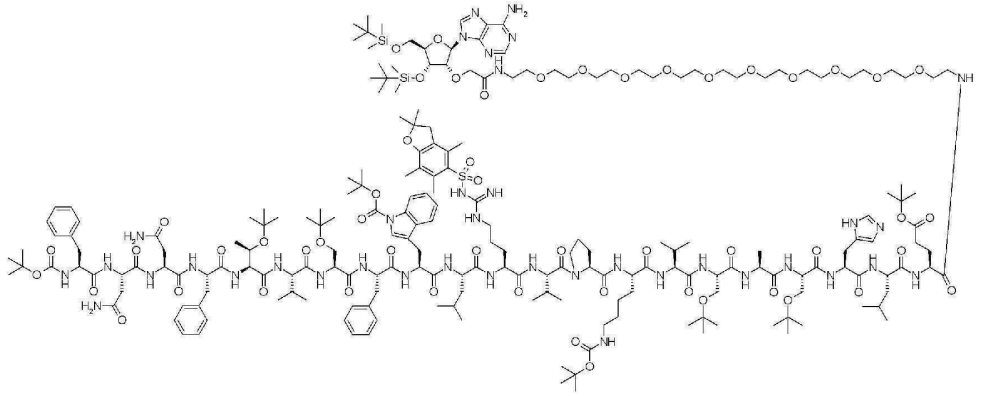
[1849] LCMS(ESI)m/z＝1037(M+H)+

[1850] 유지시간 : 0.70분(분석조건 SQDFA05)

[1851] (5-2-7) 화합물 013 및 화합물 014의 합성



[1852]



[1853]

[1854] 화합물 006(354 mg, 0.110 mmol), 1-히드록시벤조트리아졸(13 mg, 0.100 mol) 및 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 염산염(19 mg, 0.100 mol)이 첨가된 화합물 012(86 mg, 0.083 mmol)의 N,N-디메틸포름아미드(1.5 ㎖)용액이 실온에서 2시간 교반되었다. 반응 혼합물의 여액이 표 6에 기재되는 분취조건 A로 정제되어 화합물 013 및 014의 혼합물(72 mg)이 얻어졌다.

[1855] 화합물 013

[1856] LCMS(ESI)m/z＝1525(M+3H)3+, 1144(M+4H)4+

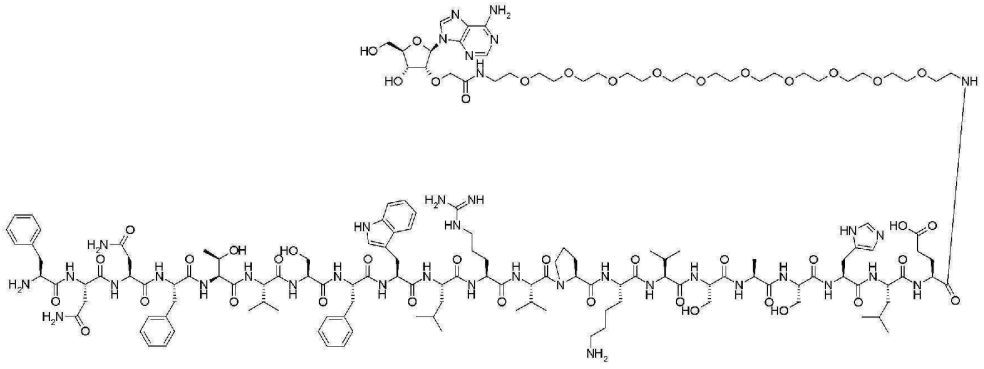
[1857] 유지시간 : 1.13분(분석조건 SQDAA50)

[1858] 화합물 014

[1859] LCMS(ESI)m/z＝1444(M+3H)3+, 1083(M+4H)4+

[1860] 유지시간 : 1.02분(분석조건 SQDAA50)

[1861] (5-2-8) 2'-Adenosine-PEG-peptide(adenosine 2'-PEG-peptide conjugate 또는 2'-(PEG-peptide)adenosine)(화합물 015)의 합성



[1862]

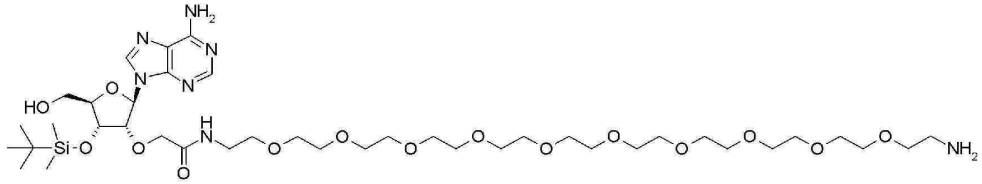
[1863] 트리플루오로초산(16 ㎖), 디클로로메탄(8 ㎖), 물(1.3 ㎖) 및 테트라이소프로필실란(1.3 ㎖)이 첨가된 화합물

013 및 014의 혼합물(42 mg)이 실온에서 6시간 교반되었다. 감압 농축된 반응 혼합물의 잔사가 표 6에 기재된 분취조건 B로 정제되어 화합물 015(10 mg)가 얻어졌다.

[1864] LCMS(ESI)m/z＝1090(M+3H)3+, 818(M+4H)4+

[1865] 유지시간 : 0.52분(분석조건 SQDAA50)

[1866] (5-2-9) 화합물 016의 합성

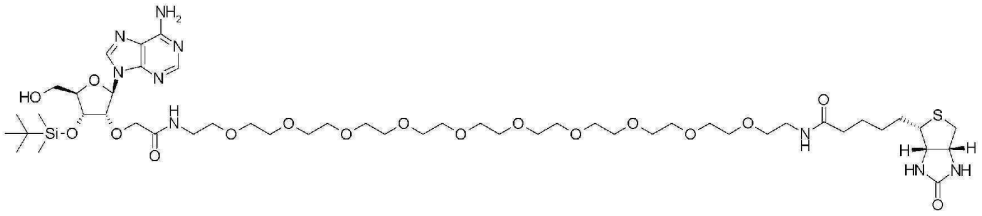
[1867] 

[1868] 10% 팔라듐 탄소(34 mg)가 첨가된 화합물 011(70 mg, 0.074 mmol)의 에탄올(1 ㎖)용액이 수소 분위기하에서 5시간 교반되었다. 반응액의 여액이 감압 농축되어 화합물 016(58 mg, 85%)이 얻어졌다.

[1869] LCMS(ESI)m/z＝923(M+H)+

[1870] 유지시간 : 0.50분(분석조건 SQDFA05)

[1871] (5-2-10) 화합물 017의 합성

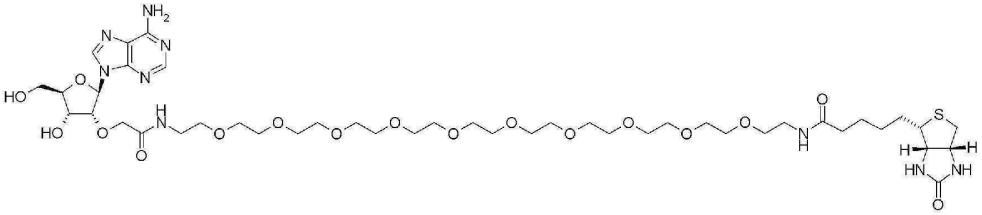
[1872] 

[1873] D-비오틴 N-숙신이미딜(24 mg, 0.069 mmol) 및 트리에틸아민(13 ㎕, 0.094 mol)이 첨가된 화합물 016(58 mg, 0.063 mmol)의 N,N-디메틸포름아미드(1 ㎖)용액이 실온에서 2시간 교반되었다. 추가로 D-비오틴 N-숙신이미딜(5 mg, 0.015 mmol)이 첨가된 후, 실온에서 1.5시간 교반시켜 반응을 완결시켰다. 반응 혼합물이 역상 실리카겔 칼럼크로마토그래피(10 mM 초산암모늄 수용액/메탄올)로 정제되어 화합물 017(50 mg, 69%)이 얻어졌다.

[1874] LCMS(ESI)m/z＝1149(M+H)+

[1875] 유지시간 : 1.04분(분석조건 SQDFA05)

[1876] (5-2-11) 2'-Adenosine-PEG-biotin(adenosine 2'-PEG-biotin conjugate 또는 2'-(PEG-biotin)adenosine)(화합물 018)의 합성

[1877] 

[1878] 1M 플루오르화 테트라-n-부틸암모늄테트라히드로푸란용액(65 ㎕, 0.065 mmol)이 첨가된 화합물 017(62 mg, 0.054 mmol)의 테트라히드로푸란(2 ㎖)용액이 실온에서 1시간 교반되었다. 추가로 1M 플루오르화 테트라-n-부틸암모늄테트라히드로푸란용액(20 ㎕, 0.020 mmol)을 첨가하고 실온에서 1시간 교반시켜 반응을 완결시켰다. 감압 농축된 반응액의 잔사가 역상 실리카겔 칼럼크로마토그래피(0.1% 포름산 수용액/0.1% 포름산 아세토니트릴)로 정제되어 화합물 018(12 mg, 21%)이 얻어졌다.

[1879] LCMS(ESI)m/z＝1035(M+H)+

[1880] 유지시간 : 0.71분(분석조건 SQDAA05)

[1881] 또한 5'-Adenosine-PEG-peptide 및 5'-Adenosine-PEG-biotin도 동일한 반응을 사용해서 합성되었다.

[1882] (5-3) 동물에 의한 Adenosine 결합 항체 제작 및 항체의 스크리닝

[1883] 토끼가 통상의 방법으로 2'-Adenosine-PEG-peptide 및/또는 5'-Adenosine-PEG-peptide로 면역되었다. autoMACS Pro Separator와 FACSAria(BD)를 사용한 Adenosine-PEG-biotin 결합성과 토끼 IgG의 발현을 지표로 면역된 토끼의 혈액으로부터 채취된 세포 현탁액으로부터 Adenosine 결합 활성을 갖는 세포의 후보가 선발되었다. 다음으로 선택된 세포의 배양상청 중에 분비된 항체가 스크리닝되었다. 스크리닝으로서 Adenosine-PEG-biotin에 대한 결합 활성을 갖는지 여부가 ELISA법에 의해 평가되었다. 또한 Adenosine을 Adenosine-PEG-biotin과 함께 1000배 이상 첨가하면 Adenosine-PEG-biotin에 대한 결합이 억제되는지 여부도 ELISA법으로 평가되었다. Adenosine-PEG-biotin에 대한 결합 활성을 가져 Adenosine-PEG-biotin과 함께 Adenosine을 첨가한 경우에 Adenosine-PEG-biotin에 대한 결합이 억제되는 것을 지표로 하여 선발된 세포로부터 PCR법을 사용하여 H쇄 가변영역 및 L쇄 가변영역이 취득되었다. 취득된 가변영역을 인간 IgG1 중쇄 정상영역 및 인간 경쇄 정상영역과 조합해서 발현시켰다.

[1884] (5-4) Adenosine 결합 면역 라이브러리 제작을 위한 B세포의 취득

[1885] 2'-Adenosine-PEG-Tetanus toxin peptide 및 5'-Adenosine-PEG-Tetanus toxin peptide로 면역된 토끼의 비장으로부터 채취된 세포 현탁액으로부터 autoMACS Pro Separator와 FACSAria(BD)를 사용하여 Adenosine-PEG-biotin 결합성과 토끼 IgG 또는 IgM의 발현을 지표로 Adenosine 결합 활성을 갖는 세포의 후보가 선발되었다. PBS(-)로 세정된 상기 선발 세포로부터 조제된 세포 펠릿이 면역 라이브러리의 제작에 제공되었다.

[1886] [실시예 6] 토끼 B세포 클로닝으로부터 얻어진 클론의 평가

[1887] (6-1) 토끼 B세포 클로닝으로부터 얻어진 클론의 2'-Adenosine-PEG-Biotin에 대한 결합 활성의 평가

[1888] 토끼 B세포 클로닝법에 의해 얻어진 클론의 아데노신에 대한 결합 활성이 SPR법을 사용해서 평가되었다. Biacore 4000(GE Healthcare)을 사용하여 상기 클론과 2'-Adenosine-PEG-Biotin의 항원 항체 반응이 속도론적으로 해석되었다. 아민커플링법으로 적절한 양의 protein A/G(Invitrogen)가 고정화된 Sensor chip CM5(GE Healthcare)에 목적의 항체를 캡쳐시켰다. 다음으로 애널라이트로서 100 nmol/L의 2'-Adenosine-PEG-Biotin을 60초간 상호작용시킨 후 애널라이트의 해리가 60초간 추적하여 측정되었다. 러닝 버퍼에는 HBS-P+(GE Healthcare)가 사용되었다. 측정은 모두 25℃에서 실시되고, 애널라이트의 희석에는 러닝 버퍼가 사용되었다.

[1889] 2'-Adenosine-PEG-Biotin을 상호작용시켰을 때의 결합량을 각 항체의 캡쳐량(RU)으로 나눈 값(N_binding_100)과, 2'-Adenosine-PEG-Biotin의 상호작용 후에 각 항체로부터 2'-Adenosine-PEG-Biotin이 해리된 60초 후의 값을 각 항체의 캡쳐량(RU)으로 나눈 값(N_stability_100)을 지표로 함으로써 각 항체의 2'-Adenosine-PEG-Biotin에 대한 결합 활성이 비교되었다. 다만 캡쳐량이 1500 RU 이하인 항체는 결합이 충분히 관찰되지 않았기 때문에 검토하는 대상에서 제외되었다. 이 결과를 도 14에 나타내었다. 도 14의 결과로부터 B세포 클로닝법에 의해 아데노신에 대해서 다양한 affinity로 결합하는 클론이 취득된 것이 명확해졌다.

[1890] (6-2) 2'-Adenosine-PEG-Biotin 결합 클론의 아데노신 및 ATP에 대한 결합 활성의 평가 및 그의 서열 해석

[1891] 2'-Adenosine-PEG-Biotin에 대한 결합이 확인된 클론의 아데노신 또는 ATP에 대한 결합이 SPR법 및 경합 ELISA법에 의해 평가되었다.

[1892] (6-2-1) 2'-Adenosine-PEG-Biotin 결합 클론의 SPR법에 의한 아데노신 또는 ATP에 대한 결합의 평가

[1893] Biacore T200(GE Healthcare)을 사용하여 B cell cloning법에 의해 얻어진 항체 SMB0002, SMB0089, SMB0104의 아데노신, ATP와의 항원 항체 반응의 상호작용이 해석되었다. Sensor chip CM5(GE Healthcare) 상에 아민커플링법으로 적절한 양 고정화된 protein A/G(Invitrogen)에 목적의 항체를 캡쳐시켜 항원인 아데노신 또는 ATP를 상호작용시켰다. 러닝 버퍼에는 10 mmol/L ACES, 150 mmol/L NaCl, 0.05% (w/v) Tween20, pH 7.4가 사용되었다. 측정은 모두 25℃에서 실시되고, 항원의 희석에는 러닝 버퍼가 사용되었다.

[1894] SMB0002, SMB0089, SMB0104에 대해서는 항원 희석액과 블랭크인 러닝 버퍼를 유속 20 μL/min로 2분간 인젝트하여 센서칩 상에 캡쳐시킨 항체에 각 항원을 상호작용시켰다. 그 후 유속 20 μL/min로 3분간 러닝 버퍼를 흘리고 항원의 항체로부터의 해리가 관찰되었다. 그 후 10 mmol/L Glycine-HCl, pH 1.5를 유속 30 μL/min로 30초간 인젝트하여 센서칩이 재생되었다. 측정으로 얻어진 센서그램으로부터 키네틱스 파라미터인 결합속도상수 ka(1/Ms) 및 해리속도상수 kd(1/s)가 산출되었다. 이들 상수를 토대로 해리상수 KD(M)가 산출되었다. 각 파라미터의 산출에는 Biacore T200 Evaluation Software(GE Healthcare)가 사용되었다.

[1895] 그 결과, SMB0002를 비롯하여 SMB0089, SMB0104 등의 복수의 클론이 아데노신과 ATP 양쪽에 대해 결합하는 것이 발견되었다. 각 클론을 아데노신 500, 125, 31.3, 7.81 nM 및 ATP 5000, 1250, 313, 78.1 nM의 농도에서 결합을 평가했을 때 관찰된 센서그램을 도 15에 정리하였다. 도 15에 나타내는 바와 같이 SMB0002, SMB0089, SMB0104의 아데노신과 ATP 양쪽에 대한 결합이 확인되었다. SMB0002, SMB0089, SMB0104의 아데노신에 대한 KD는 각각 $9.3E^{-9}$, $6.9E^{-9}$ 및 $4.1E^{-8}$(mol/L)이고, SMB0002, SMB0089, SMB0104의 ATP에 대한 KD는 각각 $1.0E^{-5}$, $8.8E^{-7}$, $1.4E^{-7}$(mol/L)였다.

[1896] 동일하게 해서 Biacore 4000(GE Healthcare)을 사용하여 B cell cloning법에 의해 얻어진 항체 SMB0171의 아데노신, ATP와의 항원 항체 반응의 상호작용이 해석되었다. Sensor chip CM5(GE Healthcare) 상에 아민커플링법으로 적절한 양 고정화된 protein A/G(Invitrogen)에 목적의 항체를 캡쳐시켜 항원인 아데노신 또는 ATP를 상호작용시켰다. 러닝 버퍼에는 HBS-P+(GE Healthcare)가 사용되었다. 측정은 모두 25℃에서 실시되고, 항원의 희석에는 러닝 버퍼가 사용되었다.

[1897] SMB0171에 대해서는 항원 희석액과 블랭크인 러닝 버퍼를 유속 10 μL/min로 1분간 인젝트하여 센서칩 상에 캡쳐시킨 항체에 각 항원을 상호작용시켰다. 그 후 유속 10 μL/min로 3분간 러닝 버퍼를 흘려 항원의 항체로부터의 해리가 관찰되었다. 그 후 10 mmol/L Glycine-HCl, pH 1.5를 유속 30 μL/min로 30초간 인젝트하여 센서칩이 재생되었다. 측정으로 얻어진 센서그램으로부터 키네틱스 파라미터인 결합속도상수 ka(1/Ms) 및 해리속도상수 kd(1/s)가 산출되었다. 이들 상수를 토대로 해리상수 KD(M)가 산출되었다. 각 파라미터의 산출에는 Biacore 4000 Evaluation Software(GE Healthcare)가 사용되었다.

[1898] 그 결과, SMB0171에서는 ATP에 대해 결합하는 것이 발견되었다. 각 클론을 ATP 50, 5 μM의 농도로 결합을 평가했을 때에 관찰된 센서그램을 도 16에 나타내었다. 도 16에 나타내는 바와 같이 SMB0171의 ATP에 대한 결합이 확인되었다. SMB0171의 ATP에 대한 KD는 $5.9E^{-6}$(mol/L)였다.

[1899] (6-2-2) 2'-Adenosine-PEG-Biotin 결합 클론의 경합 ELISA법에 의한 아데노신 및 ATP로의 결합 평가

[1900] 2'-Adenosine-PEG-Biotin에 대한 결합이 확인된 항체를 1 ㎍/mL가 되도록 PBS로 희석하여 384 well의 MAXISorp(Nunc)의 각 웰에 첨가하고, 실온에서 1시간 이상 방치하여 플레이트에 결합시켰다. 플레이트의 각 웰 중의 PBS로 희석한 항체가 제거된 후, 1% BAS를 포함하는 TBS가 첨가된 당해 플레이트는 1시간 이상 방치되었다. 그 후 1% BAS를 포함하는 TBS pH 7.4를 제외하고, PBS로 희석한 50 nM의 2'-Adenosine-PEG-Biotin, PBS로 희석한 50 nM의 2'-Adenosine-PEG-Biotin과 500 μM의 Adenosine의 혼합물, PBS로 희석한 50 nM의 2'-Adenosine-PEG-Biotin과 500 μM의 ATP의 혼합물 또는 PBS만의 어느 하나가 첨가된 당해 플레이트가 실온에서 1시간 방치되었다. 그 후 당해 플레이트의 각 웰이 0.05% Tween-20을 포함하는 PBS 80 μL로 3회 세정되었다. 그 후 PBS로 20000배로 희석된 Streptavidine-HRP(Thermo fisher scientific)가 각 웰에 첨가된 플레이트는 실온에서 1시간 이상 방치되었다. 0.05% Tween-20을 포함하는 PBS 80 μL로 3회 세정된 당해 플레이트의 각 웰에 발색기질(ABTS peroxidase substrate)이 첨가되었다. 1시간 당해 플레이트가 인큐베이트된 후에 각 웰 중의 용액의 발색이 Molecular Device사 제조 SpectraMax로 405 nm의 흡광도가 측정되었다.

[1901] 그 결과, 도 17에 나타내는 바와 같이 SMB0002는 아데노신과 ATP를 과잉량 첨가함으로써 2'-Adenosine-PEG-Biotin에 대한 결합이 저해된 것으로부터, 이들 클론은 2'-Adenosine-PEG-Biotin뿐 아니라 아데노신과 ATP 양쪽에 결합하는 항체인 것이 확인되었다.

[1902] (6-2-3) SPR법에 의해 아데노신 및 ATP에 결합하는 것으로 동정된 클론의 서열 해석

[1903] Adenosine과 ATP 양쪽에 대해 결합이 확인된 클론의 아미노산 서열은 표 7에 나타내는 바와 같았다.

표 7

[1904]

클론명	중쇄 서열번호	경쇄 서열번호
SMB0002	서열번호 : 38	서열번호 : 39
SMB0089	서열번호 : 40	서열번호 : 41
SMB0104	서열번호 : 42	서열번호 : 43
SMB0171	서열번호 : 44	서열번호 : 45

[1905] [실시예 7] 파지 디스플레이 기술을 사용한 인간 항체 라이브러리로부터의 아데노신 및/또는 ATP에 결합하는 항체의 취득

[1906] (7-1) 나이브 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리의 제작

[1907] 인간 PBMC로부터 제작한 폴리 A RNA나 시판되고 있는 인간 폴리 A RNA 등을 주형으로 하여 당업자에게 공지의 방법에 따라, 서로 상이한 인간 항체 서열의 Fab 도메인을 제시하는 복수의 파지로 이루어지는 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리가 구축되었다.

[1908] (7-2) 비드 패닝에 의한 라이브러리로부터의 아데노신 및/또는 ATP에 결합하는 항체의 취득

[1909] (7-1)에서 구축된 나이브 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리로부터 항원에 대한 결합 활성을 나타내는 항체의 스크리닝이 행해졌다. 즉, 비드에 캡쳐된 항원에 대해 결합 활성을 나타내는 항체를 제시하고 있는 파지가 모아졌다. 항원으로서 비오틴화 ATP, 2'-Adenosine-PEG-Biotin 및 5'-Adenosine-PEG-Biotin이 사용되었다.

[1910] 구축된 파지 디스플레이용 파지미드를 보유한 대장균으로부터 생산된 파지는 일반적인 방법에 의해 정제되었다. 그 후 TBS로 투석 처리된 파지 라이브러리액이 얻어졌다. 다음으로 파지 라이브러리액에 최종농도 4%가 되도록 BSA가 첨가되었다. 자기 비드에 고정화된 항원을 사용한 패닝이 실시되었다. 자기 비드로서 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 또는 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)가 사용되었다.

[1911] 그 후 조제된 파지 라이브러리액과 250 pmol의 비오틴화 ATP, 2'-Adenosine-PEG-Biotin 및 5'-Adenosine-PEG-Biotin을 첨가함으로써 당해 파지 라이브러리액과 아데노신 및 ATP를 실온에서 60분간 접촉시켰다. 다음으로 파지 라이브러리액에 BSA로 블로킹된 자기 비드가 첨가되고, 아데노신 및/또는 ATP와 파지의 복합체를 자기 비드와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비드는 TBS로 1회 세정되었다. 그 후 1 mg/mL의 트립신용액 0.5 mL가 첨가된 비드는 실온에서 15분 현탁된 후, 그 자리에서 자기 스탠드를 사용하여 분리된 비드로부터 파지용액이 회수되었다. 회수된 파지용액이 대수증식기(OD600이 0.4-0.7)가 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37℃에서 1시간 완만하게 상기 대장균의 교반배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염시킨 대장균은 225 ㎜×225 ㎜의 플레이트에 파종되었다. 다음으로 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리액이 조제되었다.

[1912] 2회째의 패닝에 있어서도 아데노신 및/또는 ATP에 대해 결합 가능한 파지의 농축이 행해졌다. 얻어진 파지 라이브러리액에 각 50 pmol의 비오틴화 ATP, 2'-Adenosine-PEG-Biotin 및 5'-Adenosine-PEG-Biotin을 첨가함으로써 당해 파지 라이브러리액을 아데노신 및 ATP와 실온에서 60분간 접촉시켰다. 다음으로 파지 라이브러리액에 BSA로 블로킹된 자기 비드가 첨가되고, 아데노신 및/또는 ATP와 파지의 복합체를 자기 비드와 실온에서 15분간 결합시켰다. TBST로 3회, TBS로 비드는 2회 세정되었다. 그 후 1 mg/mL의 트립신용액 0.5 mL가 첨가된 비드는 실온에서 15분 현탁된 후, 그 자리에서 자기 스탠드를 사용하여 분리된 비드로부터 파지용액이 회수되었다. 회수된 파지용액이 대수증식기(OD600이 0.4-0.7)가 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가된다. 37℃에서 1시간 완만하게 상기 대장균의 교반배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염시킨 대장균은 225 ㎜×225 ㎜의 플레이트에 파종되었다. 다음으로 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리액이 조제되었다.

[1913] 동일한 절차로 아데노신 및/또는 ATP에 대해 결합 가능한 항체를 취득하는 패닝이 3회 반복되었다. 4회째의 패닝은 TBST, TBS 모두 5회 세정이 실시되었다.

[1914] (7-3) 파지 ELISA에 의한 아데노신 및 ATP 결합성의 평가

[1915] 전술한 실시예에서 나타내어진 Panning법에 의해 얻어진 대장균의 싱글 콜로니로부터 정법(Method Mol. Biol. (2002) 178, 133-145)에 따라 파지 함유 배양상청이 회수되었다. NucleoFast 96(MACHERY-NAGEL)을 사용하여 회수된 배양상청이 한외여과되었다. 배양상청 각 100 μL가 NucleoFast 96의 각 웰에 어플라이되고, 4,500 g, 45분간 원심분리를 행하여 통과액이 제거되었다. H_2O 100 μL를 첨가하고 재차 4,500 g, 30분간 원심분리에 의한 세정이 행해졌다. 그 후 TBS 100 μL를 첨가하고 실온에서 5분간 정치한 후 상청에 포함되는 파지액이 회수되었다.

[1916] TBS가 첨가된 정제 파지가 아래의 절차로 ELISA에 제공되었다. StreptaWell 96 마이크로타이터 플레이트(Roch

e)가 비오틴 표지 항원(2'-Adenosine-PEG-biotin, 5'-Adenosine-PEG-biotin 및 ATP-PEG-biotin을 등량씩 혼합)을 포함하는 100 μL의 TBS로 실온에서 1시간 코트되었다. 당해 플레이트의 각 웰을 TBST(0.1% Tween20을 포함하는 TBS)로 세정함으로써 항원이 제거된 후, 당해 웰이 1시간 이상 250 μL의 2% SkimMilk-TBS로 블로킹되었다. 2% SkimMilk-TBS를 제거하고, 그 후 각 웰에 조제된 정제 파지가 첨가된 당해 플레이트를 실온에서 1시간 정치함으로써 파지를 제시하는 항체를 각 웰에 존재하는 항원에 결합시켰다. TBST로 세정된 각 웰에 TBS에 의해 희석된 HRP 결합 항M13 항체(Amersham Pharmacia Biotech)가 첨가된 플레이트를 1시간 인큐베이트시켰다. TBST로 세정 후, TMB single용액(ZYMED)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후, 450 nm의 흡광도에 의해 당해 발색이 측정되었다.

[1917] 파지 ELISA를 실시한 192 클론 중에서 2'-Adenosine-PEG-biotin, 5'-Adenosine-PEG-biotin, ATP-PEG-biotin 중 어느 하나, 어느 둘 또는 3개 모두에 결합능을 갖는 106의 클론이 얻어졌다.

[1918] 다음으로 이들 클론이 2'-Adenosine-PEG-biotin, 5'-Adenosine-PEG-biotin, ATP-PEG-biotin 중 어느 항원에 대해 결합능을 가지고 있는지를 확인할 목적으로 같은 정제 파지가 TBS로 희석된 후에 아래의 절차로 ELISA에 제공되었다. StreptaWell 96 마이크로타이터 플레이트(Roche)가 비오틴 표지 항원(2'-Adenosine-PEG-biotin, 5'-Adenosine-PEG-biotin, ATP-PEG-biotin) 중 어느 하나를 포함하는 100 μL의 TBS로 실온에서 1시간 코트되었다. 당해 플레이트의 각 웰을 TBST로 세정함으로써 항원이 제거된 후, 당해 웰이 1시간 이상 250 μL의 2% SkimMilk-TBS로 블로킹되었다. 2% SkimMilk-TBS를 제거하고, 그 후 각 웰에 조제된 정제 파지가 첨가된 당해 플레이트를 실온에서 1시간 정치함으로써 파지를 제시하는 항체를 각 웰에 존재하는 항원에 결합시켰다. TBST로 세정된 각 웰에 TBS에 의해 희석된 HRP 결합 항M13 항체(Amersham Pharmacia Biotech)가 첨가된 플레이트를 1시간 인큐베이트시켰다. TBST로 세정 후, TMB single용액(ZYMED)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후, 450 nm의 흡광도에 의해 당해 발색이 측정되었다. 파지 ELISA의 결과가 아래의 표 8에 기재되어 있다.

표 8

[1919]

농축 지표		항원 결합능(S/N비 > 1.5)
패닝 횟수		4
ELISA 실시 클론 수		192
ELISA 양성 클론 수	2'-Adenosine-PEG-biotin, 5'-Adenosine-PEG-biotin, ATP-PEG-biotin 혼합	106
	2'-Adenosine-PEG-biotin	0
	5'-Adenosine-PEG-biotin	6
	ATP-PEG-biotin	76
	2'-Adenosine-PEG-biotin, 5'-Adenosine-PEG-biotin, ATP-PEG-biotin 중 2자 이상에 결합	1

[1920] 파지 ELISA를 실시한 클론 중 항원 2종류 이상에 결합이 확인된 것은 1 클론으로, 본 항체 단편을 주형으로 하여 특이적인 프라이머에 의해 증폭된 유전자의 염기서열 해석이 행해졌다. 본 클론은 5'-Adenosine-PEG-biotin, ATP-PEG-biotin의 2자에 결합능을 갖는 클론으로, ATNLSA1-4_D12로 명명되었다. ATNLSA1-4_D12 항체의 중쇄 가변영역의 서열은 서열번호 : 46에, 경쇄 가변영역의 서열은 서열번호 : 47에 기재되어 있다.

[1921] (7-4) 파지 경합 ELISA에 의한 아데노신 또는 ATP 결합성의 평가

[1922] 파지 ELISA의 결과, 5'-Adenosine-PEG-biotin 및 ATP-biotin의 양자에 결합능이 있는 것으로 판단된 클론, ATNLSA1-4_D12(중쇄 가변영역 서열 : 46, 경쇄서열 : 47)는 5'-Adenosine-PEG-biotin, ATP-PEG-biotin의 구조상, 비오틴 태그 또는 PEG영역을 인식하고 있을 가능성이 남아 있다. 이에 비오틴 태그나 PEG 인식 항체가 아닌 것을 나타내기 때문에, ATNLSA1-4_D12 및 음성 대조(Negative control)로서 준비된 IL-6R 결합 클론 PF1(중쇄서열 : 48, 경쇄서열 : 49)을 사용하여 아데노신 또는 ATP로 항원과의 결합이 저해되는지 여부가 파지 ELISA로 확인되었다. ATNLSA1-4_D12 및 PF1은 각각 TBS로 희석되어 아래의 절차로 ELISA에 제공되었다.

[1923] StreptaWell 96 마이크로타이터 플레이트(Roche)가 비오틴 표지 항원(5'-Adenosine-PEG-biotin, ATP-PEG-biotin의 혼합)을 포함하는 100 μL의 TBS로 실온에서 1시간 코트되었다. 당해 플레이트의 각 웰을 TBST로 세정함으로써 항원이 제거된 후, 당해 웰이 1시간 이상 250 μL의 2% SkimMilk-TBS로 블로킹되었다. 2% SkimMilk-TBS를 제거하고, 그 후 각 웰에 조제된 정제 파지가 첨가된 당해 플레이트를 실온에서 1시간 정치함으로써 파지

가 제시하는 항체를 각 웰에 존재하는 항원에 결합시켰다. 다음으로 항원 없음 및 항원과 등량 내지 10,000배량까지의 ATP의 희석 계열을 포함하는 TBS가 당해 웰에 첨가되었다. 실온에서 1시간 당해 플레이트를 정치함으로써 고정화되어 있는 항원과 ATP가 경합되었다. 그 후 TBST로 세정된 각 웰에 TBS에 의해 희석된 HRP 결합 항M13 항체(Amersham Pharmacia Biotech)가 첨가된 플레이트를 1시간 인큐베이트시켰다. TBST로 세정 후, TMB single 용액(ZYMED)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후, 450 nm의 흡광도에 의해 당해 발색이 측정되었다.

[1924] 측정된 결과를 도 18에 나타내었다. ATNLSA1-4_D12는 ATP 농도가 높아짐에 따라 과잉량의 ATP 존재하에서 발색값이 작아져 있는 것이 확인되어, ATP 농도 의존적으로 ATNLSA1-4_D12와 항원의 결합이 저해되어 있는 것이 확인되었다. 또한 음성 대조로서 비교실험이 행해진 PF1은 ATP 농도에 관계없이 항원과의 결합은 확인되지 않았다. 이 사실로부터 ATNLSA1-4_D12는 ATP 결합능을 갖는 항체로, 비오틴 태그나 PEG를 인식하는 항체가 아닌 것이 확인되었다.

[1925] (7-5) ATP 및 adenosine에 결합하는 항체의 발현과 정제

[1926] 실시예 7의 파지 ELISA로 나타내어진 ATP 및 adenosine에 결합 활성을 갖는 것으로 판단된 클론 ATNLSA1-4_D12로부터 특이적인 프라이머를 사용하여 증폭된 유전자의 염기서열이 해석되었다(중쇄의 서열은 서열번호 : 46 및 경쇄의 서열은 서열번호 : 47로 표시된다). ATNLSA1-4_D12의 가변영역을 코드하는 유전자는 인간 IgG1/Lambda의 동물 발현용 플라스미드로 삽입되었다. 아래의 방법을 사용하여 항체가 발현되었다. FreeStyle 293 Expression Medium배지(Invitrogen)에 1.33×10^{6} 세포/mL의 세포밀도로 현탁되어 6 well plate의 각 웰로 3 mL씩 파종된 인간 태아 신장세포 유래 FreeStyle 293-F주(Invitrogen)에 대해 조제된 플라스미드가 리포펙션법에 의해 도입되었다. CO_2 인큐베이터(37℃, 8% CO_2, 90 rpm)에서 4일간 배양된 배양상청으로부터, rProtein A Sepharose™ Fast Flow(Amersham Biosciences)를 사용하여 당업자 공지의 방법으로 항체가 정제되었다. 분광광도계를 사용하여 정제된 항체용액의 280 nm에서의 흡광도가 측정되었다. 얻어진 측정값으로부터 PACE법에 의해 산출된 흡광계수를 사용하여 정제된 항체의 농도가 산출되었다(Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

[1927] (7-6) 표면 플라즈몬 공명을 이용한 ATP, adenosine 결합 항체의 ATP, adenosine 결합의 평가

[1928] Biacore T200(GE Healthcare)을 사용하여 ATP 및 Adenosine 결합 활성이 있는 클론 ATNLSA1-4_D12의 가변영역이 IgG의 정상영역에 연결된 D12의 항원 항체 반응의 상호작용이 해석되었다. 아민커플링법으로 적절한 양의 protein A(Life technologies)가 고정화된 Sensor chip CM5 또는 CM4(GE Healthcare)에 목적의 항체를 캡쳐시켜 항원인 ATP(Wako), Adenosine(Wako), ADP(adenosine diphosphate)(Wako)를 상호작용시켰다. 러닝 버퍼에는 50 mM Tris-HCl(Takara, T903), 500 mM NaCl, 0.01%(w/v) Tween20이 사용되었다. 항원은 유속 30 μL/min로 30초간 상호작용시키고, 30초간 해리시켰다. 항원과의 상호작용은 15℃에서 측정되고, 항원의 희석에는 러닝 버퍼와 동일한 버퍼가 사용되었다.

[1929] 측정으로 얻어진 센서그램으로부터 산출된 키네틱스 파라미터인 결합속도상수 ka(1/Ms) 및 해리속도상수 kd(1/s)를 토대로 해리상수 K_D(M)가 산출되었다. 또는 평형상태 해석법(Steady state analysis)을 사용하여 해리상수 K_D(M)가 산출되었다. 각 파라미터의 산출에는 Biacore T200 Evaluation Software(GE Healthcare)가 사용되었다.

[1930] adenosine에 대한 K_D를 산출하기 위해 각 농도의 adenosine 존재하에서의 결합 리스폰스가 20 μmol/L ADP 존재하 및 비존재하에 있어서 취득되고, 또한 별도로 20 μmol/L ADP 존재하에서의 결합 리스폰스가 취득되었다. 비특이적 결합 성분으로 추정되는 ADP 존재하에 있어서의 각 농도의 adenosine에 대한 결합 리스폰스로부터 ADP 단독 존재하에서의 리스폰스를 뺀 값을 ADP 비존재하에 있어서의 adenosine에 대한 결합 리스폰스의 값으로부터 뺌으로써, adenosine에 대한 특이적 결합의 리스폰스(R)가 취득되었다. adenosine 농도가 X축에, 식 2에 의해 산출되는 R이 Y축에 플롯된 곡선에 대해 최소제곱법을 Office Excel 2007(Microsoft)의 솔버기능을 사용해서 적용함으로써 adenosine에 대한 K_D값이 결정되었다.

[1931] (식 2)

[1932] $$R = Rmax \times conc / (K_D + conc)$$

[1933] 식 2에 있어서, conc는 adenosine 농도(mol/L)를 의미하고, Rmax는 항체에 대해 adenosine이 가장 결합되었을

때에 기대되는 리스폰스의 값을 의미한다. 실측된 리스폰스의 값의 추출에는 Scrubber2(BioLogics. Inc)가 사용되었다.

[1934] 이 측정으로 취득된 D12의 ATP에 대한 KD는 8.5 μmol/L, ADP에 대한 KD는 0.25 μmol/L, Adenosine에 대한 KD는 1100 μmol/L였다. 이 사실로부터 D12는 ATP, ADP, Adenosine에 대해 결합 활성을 갖고, 또한 AMP(adenosine monophosphate) 및 cAMP(cyclinc adenosine monophosphate)에 대해서도 결합 활성을 갖는 것으로 생각되었다.

[1935] 〔실시예 8〕 항ATP/아데노신 항체를 이용한 ATP/아데노신 스위치 항체 취득용 라이브러리의 설계

[1936] 암조직 및 염증성 조직에 있어서는 아데노신뿐 아니라 ATP의 농도도 높은 것이 알려져 있다. 이 때문에 아데노신 또는 ATP 중 어느 하나만을 스위치로서 이용하는 항체뿐 아니라, 아데노신 및 ATP의 양자(본 실시예에 있어서 ATP/아데노신으로 기재된다)를 스위치로서 이용할 수 있는 항체(즉, 아데노신 또는 ATP 중 어느 쪽인가가 고농도로 존재하고 있으면 항원에 결합할 수 있는 항체)도 유용하다. 실시예 7-4에 나타내어진 ATNLSA1-4_D12는 ATP/아데노신에 결합하는 항체로, 당해 항체는 도 19에 나타낸 바와 같이 ATP/아데노신이 항체와 표적 항원 사이에 끼어 표적 항원과 접하는 항체 가변영역을 포함하는 것으로 생각되었다. 이에 이와 같이 표적 항원과 접할 수 있어 ATP/아데노신으로의 결합을 유지할 수 있는 항체 가변영역 부분을 라이브러리화함으로써 임의의 항원에 대해 ATP/아데노신의 유무에 따라 임의의 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 ATP/아데노신 스위치 항체를 취득할 수 있는 합성 항체 라이브러리를 제작할 수 있을 것으로 생각되었다.

[1937] 실시예 7-4에 있어서 인간 항체 라이브러리로부터 취득된 ATP/아데노신 항체 ATNLSA1-4_D12와 ATP의 복합체의 결정구조가 해석되었다. 결정구조 해석의 결과로부터 당해 항체가 인식하는 아데노신(및 ATP)의 인식 양식 및 아데노신(및 ATP)으로의 결합에 크게 관여하고 있지 않은 것으로 상정되는 항체 가변영역의 아미노산 잔기가 동정되었다. 아데노신(ATP)으로의 결합에 주로 관여하고 있는 아미노산 잔기는 중쇄에 있어서의 Ser52, Ser52a, Arg53, Gly96, Leu100a, Trp100c(Kabat 넘버링)로 동정되었다.

[1938] 라이브러리의 설계에 있어서 아래의 조건 중 적어도 하나를 충족시키는 부위가 라입러리화 가능 부위로서 선정되었다.

[1939] 조건 1) ATP에 대한 결합에 크게 관여하고 있지 않은 부위 또는 결합에 관여하고 있더라도 ATP에 대한 결합을 저하시키지 않는 천연 서열 이외의 아미노산이 존재하는 부위,

[1940] 조건 2) 인간 항체의 레퍼토리로서 어느 정도 아미노산 출현 빈도의 다양성이 있는 부위,

[1941] 조건 3) Canonical structure의 형성에 중요하지 않은 부위.

[1942] 중쇄, 경쇄 모두 상기 조건을 충족시키는 부위로서, ATNLSA1-4_D12의 서열에 포함되는 부위 중 CDR1 및 CDR2의 부위에 관하여는 생식세포계열에서의 출현 빈도가 2% 이상인 아미노산으로, CDR3의 부위에 관하여는 생식세포계열에서의 출현 빈도가 1% 이상인 아미노산으로 망라적으로 치환되어, 이들 치환이 조합된 ATNLSA1-4_D12의 개변체가 복수 제작되었다.

[1943] 중쇄 부위 중 개변된 부위(표 중 「Kabat」로 기재되는 Kabat 넘버링으로 표시되는 부위) 및 당해 부위에 있어서의 개변 전의 아미노산(표 중 「천연 서열」로 기재되는 아미노산) 및 개변 후의 아미노산(표 중 「개변 아미노산」으로 기재되는 아미노산)은 표 9에 나타내었다.

표 9

		HCDR1			HCDR2			HCDR3				
	Kabat	31	32	35	55	57	58	96	97	99	100	100a
	천연 서열	T	Y	N	N	I	N	G	R	G	D	L
개변 아미노산	A		A		A	A		A	A	A	A	A
	C											
	E				E							
	D	D			D		D	D	D	D		
	G	G			G		G					
	F		F				F					F
	I											I
	H		H	H			H					
	K					K				K	K	K
	M											M
	L				L							
	N	N	N					N	N	N	N	
	Q											
	P											
	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	
	R	R			R	R						R
	T			T	T	T	T					
	W											W
	V								V	V	V	V
	Y			Y			Y		Y	Y	Y	Y

[1944]

[1945] 경쇄 부위 중 개변된 부위(표 중 「Kabat」로 기재되는 Kabat 넘버링으로 표시되는 부위) 및 당해 부위에 있어서의 개변 전의 아미노산(표 중 「천연 서열」로 기재되는 아미노산) 및 개변 후의 아미노산(표 중 「개변아미노산」으로 기재되는 아미노산)은 표 10에 나타내었다.

표 10

		LCDR1									LCDR2						LCDR3								
	Kabat	26	27	27a	27b	27c	28	29	31	32	50	51	52	53	54	55	89	90	91	92	93	94	95a	96	97
	천연 서열	T	S	S	D	V	G	G	N	Y	E	V	S	K	R	P	S	S	Y	A	G	S	N	V	V
개변 아미노산	A	A						A		A			A				A	A	A		A	A	A	A	A
	C																								
	E								E					E						E			E		
	D						D	D	D	D	D	D	D	D					D	D	D	D	D	D	
	G			G							G	G					G					G	G	G	G
	F							F									F		F					F	
	I					I															I	I	I		I
	H													H					H				H	H	
	K								K		K	K			K				K				K	K	
	M																								M
	L															L	L	L					L	L	L
	N			N	N						N	N	N	N			N		N		N	N		N	
	Q										Q			Q			Q						Q	Q	
	P																						P	P	
	S	S						S		S	S			S					S	S	S		S	S	S
	R							R			R								R	R	R	R	R		
	T		T	T				T		T		T	T				T	T	T	T	T	T	T	T	
	W																		W					W	
	V																V	V	V	V	V				
	Y							Y			Y			Y			Y			Y	Y		Y	Y	

[1946]

[1947] 실시예 7-1에서 나타내어진 방법으로 발현 및 정제된 각 개변체의 ATP 및 아데노신으로의 결합이 실시예 7-6에서 나타내어진 Biacore를 사용한 측정방법과 동일한 방법으로 측정되었다. 측정 결과, 각 개변체의 ATP에 대한 Affinity가 KD값으로서 산출되었다. 중쇄의 부위로서는 개변에 의해 ATP 결합능이 ATNLSA1-4_D12의 1/5의 결합능을 밑돌지 않는 것(즉, KD값이 42.5 μmol/L보다 작은 것) 및 경쇄의 부위로서는 ATNLSA1-4_D12의 결합능을

윗도는 것(즉, KD값이 8.5 μmol/L보다 작은 것)이 개변 가능 부위로 판정되어, 당해 부위에 있어서 치환된 아미노산은 라이브러리화가 가능한 아미노산(라이브러리에 있어서 출현시키는 플렉시블 잔기)으로 판정되었다.

[1948] 각 개변체의 ATP 결합능의 평가 결과로부터 각 부위를 라이브러리화함으로써 ATP로의 결합능은 저하되는 것이 예상되었다. 이에 ATP로의 결합에 관여하고 있는 것으로 추찰되는 부위의 주변 부위가 치환되고, 이들 치환이 조합된 각종 개변체를 망라적으로 평가함으로써, ATP로의 결합능을 증강시키는 효과가 기대되는 개변을 동정하는 것이 가능한지 여부가 검증되었다. 이와 같이 개변된 부위(표 중 「Kabat」로 기재되는 Kabat 넘버링으로 표시되는 부위) 및 당해 부위에 있어서의 개변 전의 아미노산(표 중 「천연 서열」로 기재되는 아미노산) 및 개변 후의 아미노산(표 중 「개변 아미노산」으로 기재되는 아미노산)은 표 11에 나타내었다.

표 11

[1949]

	HCDR1	HCDR2		HCDR3			LCDR3
Kabat	33	50	56	95	98	100b	95
천연 서열	T	S	Y	F	K	N	N
개변 아미노산 A	A	A	A	A	A	A	A
C							
E	E	E	E		E	E	E
D	D	D	D		D	D	D
G	G	G	G		G	G	G
F	F	F	F		F	F	F
I	I	I	I	I	I	I	I
H	H	H	H		H	H	H
K	K	K	K	K		K	K
M	M	M	M	M	M	M	M
L	L	L	L	L	L	L	L
N	N	N			N		
Q	Q	Q	Q		Q	Q	Q
P	P	P	P		P	P	P
S	S		S		S	S	S
R	R	R		R	R	R	R
T		T	T		T	T	T
W	W	W	W	W	W	W	W
V	V	V	V	V	V	V	V
Y	Y	Y		Y	Y	Y	Y

[1950] 실시예 7-1에서 나타내어진 방법으로 발현 및 정제된 각 개변체의 ATP 및 아데노신으로의 결합이 실시예 7-6에서 나타내어진 Biacore를 사용한 측정방법과 동일한 방법으로 측정되었다. 측정 결과, ATP 및 아데노신으로의 결합 증강이 기대되는 개변은 Kabat 넘버링으로 표시되는 56번 위치, 100b번 위치 등의 부위(예를 들면 Tyr56His, Asn100bLeu 등의 아미노산의 개변)로, 당해 부위에 있어서 치환된 아미노산도 라이브러리화가 가능한 아미노산(라이브러리에 있어서 출현하는 플렉시블 잔기)으로 판정되었다.

[1951] ATNLSA1-4_D12의 CDR의 부위에 있어서, 상기 개변체의 해석으로부터 선출된 라이브러리화 가능한 아미노산(라이브러리에 있어서 출현하는 플렉시블 아미노산 잔기) 및 당해 아미노산으로 개변 전의 아미노산(즉, ATNLSA1-4_D12의 천연 서열에 포함되는 아미노산)을 포함하는 아미노산 레퍼토리와 당해 레퍼토리를 포함하는 부위를 설계함으로써, ATP/아데노신 스위치 항체 취득용 라이브러리가 구축되었다. 아미노산 레퍼토리에 포함되는 각 아미노산의 출현 빈도는 동일해지도록(예를 들면 아미노산 레퍼토리가 10종류인 경우는 각 아미노산은 각각 10% 출현하도록) 라이브러리가 구축되었다.

[1952] 중쇄에 있어서의 아미노산 레퍼토리를 포함하는 부위(표 중 「Kabat」로 기재되는 Kabat 넘버링으로 표시되는 부위) 및 당해 부위에 있어서의 아미노산 레퍼토리는 표 12에 나타내었다. 경쇄에 있어서의 아미노산 레퍼토리를 포함하는 부위(표 중 「Kabat」로 기재되는 Kabat 넘버링으로 표시되는 부위) 및 당해 부위에 있어서의 아미

노산 레퍼토리는 표 13에 나타내었다.

표 12

		HCDR1			HCDR2					HCDR3						
	Kabat	31	32	35	55	56	57	58	59	95	97	98	99	100	100a	100b
	천연 서열	T	Y	N	N	Y	I	N	Y	F	R	K	G	D	L	N
개변 아미노산	A				17%		25%				11%			5%		
	C															
	E												9%	5%		
	D							13%					9%	5%		
	G	33%			17%			13%			11%		9%	5%		
	F		33%					13%		50%			9%	5%		
	I						25%				11%			5%		
	H		33%	50%		50%		13%			11%		9%	5%	17%	
	K						25%				11%	33%	9%	5%		
	M										11%			5%	17%	
	L								50%		11%	33%		5%	17%	50%
	N			50%	17%			13%					9%	5%		50%
	Q												9%	5%		
	P													5%		
	S	33%			17%			13%						5%		
	R				17%		25%				11%	33%	9%	5%	17%	
	T	33%			17%			13%						5%		
	W												9%	5%	17%	
	V										11%			5%		
	Y		33%			50%		13%	50%	50%			9%	5%	17%	

[1953]

표 13

		LCDR1		LCDR2			LCDR3								
	Kabat	27a	29	50	51	54	90	91	92	93	94	95	95a	96	97
	천연 서열	S	S	E	V	R	S	Y	A	G	S	N	N	V	V
개변 아미노산	A		17%						17%	14%	13%	6%			17%
	C														
	E			14%					17%			6%			
	D		17%	14%						14%	13%	6%	11%		
	G		17%	14%	25%					14%	13%	6%	11%		17%
	F		17%									6%			
	I									14%	13%	6%	11%		
	H											6%	11%		
	K			14%		50%		14%				6%			
	M											6%			17%
	L						25%					6%	11%	33%	17%
	N				25%			14%			13%	6%	11%		
	Q			14%								6%	11%		
	P											6%		33%	
	S	50%	17%	14%			25%		17%	14%	13%	6%	11%		17%
	R					50%		14%	17%		13%	6%			
	T	50%	17%		25%		25%	14%	17%	14%	13%	6%			
	W							14%				6%			
	V				25%		25%	14%						33%	17%
	Y			14%				14%	17%	14%		6%	11%		

[1954]

[1955] 서열 해석 결과로부터 ATNLSA1-4_D12의 프레임워크는 VH3-21 생식세포계열 유래인 것으로 추찰되었다. 이에 항체의 안정성 향상을 목적으로 ATNLSA1-4_D12의 프레임워크 서열을 VH3-21 생식세포계열 서열로 되돌리기 위해 Gln01Glu, Gln05Val, Asp10Gly, Asn30Ser, Leu48Val, Asn58Tyr(숫자는 Kabat 넘버링을 나타낸다)의 개변이 ATNLSA1-4_D12의 프레임워크 서열에 도입되었다. 실시예 7-1에서 나타내어진 방법으로 발현 및 정제된 ATNLSA1-4_D12의 개변체의 Tm이 DSC에 의해 측정되었다. DSC에 의한 측정은 당업자 공지의 방법으로 실시되었다. 이들의 개변이 가해진 ATNLSA1-4_D12의 개변체의 Tm은 74.37℃에서 81.44℃로 대폭 향상되어, 그 구조의 안정화가 확인되었다. 항체 라이브러리로서 안정성이 높은 프레임워크를 사용하는 것도 바람직한 경우가 있는 것으로부터, 상기 개변이 가해진 프레임워크 서열이 라이브러리의 프레임워크 서열로서 사용되었다. 라이브러리에 사용된 프레임워크는 표 14에 나타내었다.

표 14

[1956]

프레임워크	서열번호	서열
중쇄 프레임워크 1	56	EVQLVESGGGLVKPGGFLRLSCAASGFTFS
중쇄 프레임워크 2	57	WVRQAPGKGLEWVS
중쇄 프레임워크 3	58	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
중쇄 프레임워크 4	59	WGQGTLVTVSS
경쇄 프레임워크 1	60	QSALTQPPSASGSPGQTVTISC
경쇄 프레임워크 2	61	SWYQQHPGKAPKLMIY
경쇄 프레임워크 3	62	GVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYFC
경쇄 프레임워크 4	63	FGGGTKLTVL

[1957] 이렇게 하여 설계된 라이브러리에 포함되는 개개의 서열을 포함하는 유전자가 합성되고(DNA2.0), 이들 개개의 유전자의 집합체(라이브러리)를 주형으로서 사용하여 VH 및 VL을 각각 증폭시키는 것이 가능한 프라이머에 의해 유전자 라이브러리가 증폭되었다. 또한 VL 증폭용 프라이머의 서열은 서열번호 : 102 및 103에 기재되고, VH 증폭용 프라이머의 서열은 서열번호 : 104 및 105에 각각 기재되어 있다. 증폭된 합리적 디자인(rational design) 인간 항체 중쇄 가변영역의 유전자 라이브러리와 인간 항체 경쇄 가변영역의 유전자 라이브러리는 인간 IgG 유래 CH1서열 및 인간 IgG 유래 경쇄 정상영역 서열 양쪽을 갖는 적절한 파지미드 벡터로 도입되었다. 이 파지미드 벡터를 전기천공법에 의해 대장균으로 도입함으로써 인간 항체가변영역-정상영역으로 이루어지는 Fab 도메인을 제시하고, 아데노신 또는 ATP를 스위치로서 항원에 결합할 수 있는 항체를 취득할 수 있는 합리적 디자인 라이브러리가 구축되었다. 이와 같이 다양한 아데노신 또는 ATP 결합 활성을 갖는 H쇄 및 L쇄로 구성된 합리적 디자인 라이브러리는 도 19에 나타낸 바와 같이 아데노신 또는 ATP가 항체와 항원 사이에 끼어, 임의의 항원에 대한 ATP/아데노신 스위치 항체를 효율적으로 취득할 수 있는 인간 항체가 포함되는 라이브러리로서 유용할 것으로 생각되었다. 또한 전술한 바와 같이 ATNLSA1-4_D12는 아데노신과 ATP뿐 아니라 ADP에도 결합하는 하는 것으로부터 ATP, ADP 및 아데노신에 그 구조가 유사한 AMP 및 cAMP에도 결합 활성을 가질 것으로 예상되었다. 이 때문에 본 라이브러리는 ATP, ADP, AMP, cAMP 또는 아데노신 중 어느 하나 이상의 저분자의 유무에 따라 임의의 표적 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 스위치 항체를 취득하는 것에 유용할 것으로 생각되었다.

[1958] 〔실시예 9〕 항ATP/아데노신 항체 레퍼토리를 포함하는 아데노신/ATP 스위치 항체 취득용 면역 라이브러리의 구축

[1959] 실시예 5-4에 있어서 MACS 및 FACS를 사용한 선발에 의해 아데노신-PEG-비오틴 결합 항체를 발현하고 있는 B세포군으로부터 회수된 mRNA를 주형으로 하여, 토끼 항체 서열로 이루어지는 Fab 도메인을 제시하는 복수의 토끼 항체 파지 디스플레이 라이브러리가 구축되었다. 구축방법으로서 Rader(Methods Mol. Biol. (2009) 525, 101-28)가 참조되었다.

[1960] 보다 구체적으로는, 9마리의 면역된 토끼로부터 선발된 600,000 세포의 상기 B세포로부터 회수된 mRNA를 주형으로 하는 역전사 반응에 의해 cDNA가 조제되었다. 이 cDNA를 주형으로 하여 표 15에 기재된 프라이머를 사용한 PCR 반응에 의해 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역-정상영역 서열이 적절한 조건하에서 PCR에 의해 증폭되었다.

표 15

프라이머명	서열번호	서열
primer 1	64	TATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCAGCCWTC GANWTGACCCAGACT
primer 2	65	TATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCAGCCTAT GATNTGACCCAGACT
primer 3	66	TATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCAGCBCAA GTGCTGACCCAGACT
primer 4	67	TATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCAGCCMTY GTGATGACCCAGACT
primer 5	68	TATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCAGCCGCC GTGCTGACCCAGACT
primer 6	69	TATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCGGCTGAC ATTGTGATGACCCAG
primer 7	70	TATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCGCCGAY RTYGTGATGACCCAG
primer 8	71	CTCTTCTAGAACGCGTCTAAGCGTCACCCCTATTGA AGCTC
primer 9	72	TATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCGCAGCYY GTGCTGACTCAGTCGCCCTC
primer 10	73	CTCTTCTAGAACGCGTCTAAGCTTCTGCAGGGGCCA GGCTCTTC
primer 11	74	TTCCGCCTCGGCGCTAGCCCAGGAGCAGSTGGWGG AGTCC
primer 12	75	TTCCGCCTCGGCGCTAGCCCAGTCNNTGGAGGAGT CCGGG
primer 13	76	TTCCGCCTCGGCGCTAGCCCAGTCGNNGGAGGAGT CCGGG
primer 14	77	TTCCGCCTCGGCGCTAGCCCAGCAGCAGCTGGWGG AGTCC

[1961]

[1962] 증폭된 토끼 항체 중쇄 가변영역의 유전자 라이브러리와 토끼 항체 경쇄 가변영역-정상영역의 유전자 라이브러리의 조합이 토끼 IgG 유래 CH1서열을 갖는 적절한 파지미드 벡터로 도입되었다. 이 파지미드 벡터를 전기천공법에 의해 대장균으로 도입함으로써 토끼 항체 가변영역-정상영역으로 이루어지는 Fab 도메인을 제시하고, 아데노신 또는 ATP를 스위치로서 항원에 결합할 수 있는 항체를 취득할 수 있는 토끼 항체 파지 디스플레이 라이브러리(이하 아데노신 면역 토끼 항체 라이브러리)가 구축되었다. 이와 같이 다양한 아데노신 결합성을 발휘하는 H쇄 및 L쇄로 구성된 아데노신 면역 라이브러리는 도 20에 나타낸 바와 같이 아데노신(또는 ATP)이 항체와 항원 사이에 끼여, 임의의 항원에 대해 아데노신/ATP 스위치 항체를 취득할 수 있는 면역 라이브러리로서 유용할 것으로 생각되었다.

[1963] 〔실시예 10〕 파지 디스플레이 기술을 사용한 항체 라이브러리로부터의 아데노신, ATP 존재하에 있어서 항원에 결합하는 항체의 취득

[1964] (10-1) 아데노신 및 ATP의 혼합물을 이용한 라이브러리로부터의 저분자 존재하에 있어서 항원에 결합하는 항체의 취득

[1965] 구축된 아데노신 면역 토끼 항체 파지 디스플레이 라이브러리, 합리적 디자인 항체 파지 디스플레이 라이브러리로부터 아데노신 및/또는 ATP 존재 조건하에서 항원에 대한 결합 활성을 나타내는 항체가 취득되었다. 취득을 위해 아데노신 및 ATP 존재하에서 비드에 캡쳐된 항원에 대해 결합능을 나타내는 항체를 제시하고 있는 파지가 회수되고, 그 후 아데노신 및 ATP의 비존재 조건하에서 비드로부터 용출된 용출액 중에 파지가 회수되었다.

[1966] 구축된 파지 디스플레이용 파지미드를 보유하는 대장균으로부터 파지가 생산되었다. 파지 생산이 행해진 대장균의 배양액에 2.5M NaCl/10% PEG를 첨가함으로써 침전시킨 파지의 집단을 TBS로 희석함으로써 파지 라이브러리액이 얻어졌다. 다음으로 당해 파지 라이브러리액에 최종농도 4%가 되도록 BSA가 첨가되었다. 자기 비드에 고정화

된 항원을 사용하여 패닝이 실시되었다. 자기 비드로서 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 또는 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)가 사용되었다.

[1967] 조제된 파지 라이브러리액에 500 pmol의 비오틴 표지 항원, 각 최종농도 1 mM의 ATP-Na 및 아데노신을 첨가함으로써 당해 파지 라이브러리액을 실온에서 60분간 항원, 아데노신 및 ATP와 접촉시킨다. 당해 파지 라이브러리액에 BSA로 블로킹된 자기 비드가 첨가되고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비드와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비드는 ATP 및 아데노신을 용해한 TBS로 1회 세정되었다. 그 후 1 ㎎/mL의 트립신 0.5 mL가 첨가된 비드는 실온에서 15분 현탁된 후, 그 자리에서 자기 스탠드를 사용하여 분리된 비드로부터 파지용액이 회수되었다. 회수된 파지용액이 대수증식기(OD600이 0.4-0.7)가 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37℃에서 1시간 완만하게 상기 대장균의 교반배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염시킨 대장균은 225 ㎜×225 ㎜의 플레이트에 파종되었다. 다음으로 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리액이 조제되었다.

[1968] 1회째의 패닝에서는 아데노신 및 ATP 존재하에서 항원에 대해 결합 가능한 파지의 회수가 행해졌는데, 2회째 이후의 패닝에서는 아데노신 및 ATP 존재하에서만 항원에 대해 결합 가능한 파지의 농축이 행해졌다. 구체적으로는, 조제된 파지 라이브러리액에 40 pmol의 비오틴 표지 항원 및 각 최종농도 1 mM의 아데노신 및 ATP를 첨가함으로써 파지 라이브러리를 실온에서 60분간 항원, 아데노신 및 ATP와 접촉시켰다. BSA로 블로킹된 자기 비드가 첨가되고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비드와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비드는 1 mL의 아데노신 및 ATP를 용해한 TBST(이하, (아데노신+ATP)/TBST라 불린다)와 아데노신, 아데노신 및 ATP를 용해하는 TBS(이하, (아데노신+ATP)/TBS라 불린다)로 세정되었다. 그 후 0.5 mL의 TBS가 첨가된 비드가 실온에서 현탁된 후, 그 자리에서 자기 스탠드를 사용하여 분리된 비드로부터 파지용액이 회수되었다. 이 작업이 재차 반복된 후 2회로 나눠 용출된 파지액이 혼합되었다. 회수된 파지용액에 100 ㎎/mL의 트립신 5 μL를 첨가함으로써 Fab를 제시하지 않는 파지의 pIII 단백질(헬퍼 파지 유래의 pIII 단백질)이 절단되고, Fab를 제시하지 않는 파지의 대장균에 대한 감염능이 상실되었다. 트립신 처리된 파지용액으로부터 회수되는 파지가 대수증식기(OD600이 0.4-0.7)가 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37℃에서 1시간 완만하게 상기 대장균의 교반배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염시킨 대장균은 225 ㎜×225 ㎜의 플레이트에 파종되었다. 다음으로 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리액이 회수되었다. 아데노신 및 ATP 존재하에서 항원에 대한 결합 활성을 갖는 항체를 취득하는 패닝이 3회 반복되었다.

[1969] (10-2) 음성 선별법을 이용한 항체 라이브러리로부터의 아데노신, ATP 존재하에 있어서 항원에 결합하는 항체의 취득

[1970] 아데노신이 면역된 토끼로부터 구축된 항체 파지 디스플레이 라이브러리 또는 합리적 디자인 항체 파지 디스플레이 라이브러리로부터, 항원에 대해 아데노신 및/또는 ATP가 존재하는 조건하에서 항원에 대한 결합 활성을 나타내는 항체의 스크리닝이 행해졌다. 스크리닝을 위해 먼저 항체 파지 디스플레이 라이브러리를 아데노신 및 ATP 비존재하에서 비오틴 표지 항원-스트렙트아비딘과 접촉시켜, 아데노신 및 ATP 비존재하에서도 항원에 대해 결합 활성을 갖는 항체를 제시하고 있는 파지가 제거되었다. 계속해서 아데노신 및 ATP가 존재하는 조건하에서 동일하게 패닝을 행함으로써 아데노신 및 ATP가 존재하는 조건하에서 항원에 대해 결합 활성을 갖는 항체의 스크리닝이 실시되었다.

[1971] 구축한 파지 디스플레이용 파지미드를 보유한 대장균으로부터 파지가 생산되었다. 파지 생산이 행해진 대장균의 배양액에 2.5M NaCl/10% PEG를 첨가함으로써 침전시킨 파지의 집단을 TBS로 희석함으로써 파지 라이브러리액이 얻어졌다. 다음으로 파지 라이브러리액에 최종농도 4%가 되도록 BSA가 첨가되었다. 자기 비드로서 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 또는 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)를 사용하고, 비드에 고정화되는 항원을 사용하는 패닝이 실시되었다.

[1972] 조제된 파지 라이브러리액에 250 pmol의 비오틴 표지 항원과 함께 각 최종농도가 1 mM인 아데노신 및 ATP의 혼합액을 첨가함으로써 당해 파지 라이브러리액과 항원, 아데노신 및 ATP를 실온에서 60분간 접촉시켰다. 다음으로 파지 라이브러리액에 BSA로 블로킹된 자기 비드가 첨가되고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비드와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비드는 (아데노신+ATP)/TBS로 1회 세정되었다. 그 후 1 ㎎/mL의 트립신용액 0.5 mL가 첨가된 비드는 실온에서 15분 현탁된 후, 그 자리에서 자기 스탠드를 사용하여 분리된 비드로부터 파지용액이 회수되었다. 회수된 파지용액이 대수증식기(OD600이 0.4-0.7)가 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37℃에서 1시간 완만하게 상기 대장균의 교반배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염시킨 대장균은 225 ㎜×225 ㎜의 플레이트에 파종되었다. 다음으로 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라

이브러리액이 조제되었다.

[1973] 1회째의 패닝에서는 아데노신 및 ATP 존재하에서 결합 가능한 파지의 회수가 행해지는데, 2회째 이후의 패닝에서는 아데노신 및 ATP 존재하에서만 항원에 대해 결합 가능한 파지의 농축이 행해졌다. 구체적으로는, BSA로 블로킹된 Sera-Mag NeutrAvidin 비드에 250 pmol 비오틴화 항원을 첨가하고 실온에서 15분간 결합시켰다. TBS로 3회 세정된 비드에 대해 BSA로 블로킹이 행해진 파지 라이브러리액을 첨가하여 실온에서 1시간 결합시켰다. 자기 스탠드를 사용하여 비드를 분리함으로써 항원 및 비드에 결합하지 않는 파지가 회수되었다. 회수된 파지에 대해 40 pmol의 비오틴 표지 항원 및 각 최종농도 1 mM의 아데노신 및 ATP를 첨가함으로써 파지 라이브러리를 실온에서 60분간 항원, 아데노신 및 ATP와 접촉시켰다. 다음으로 당해 표지 항원, 아데노신 및 ATP와 파지 라이브러리의 혼합액에 BSA로 블로킹된 자기 비드를 첨가하여 실온에서 15분간 항원과 파지의 복합체를 자기 비드와 결합시켰다. 비드는 1 mL의 (아데노신+ATP)/TBST와 (아데노신+ATP)/TBS로 세정되었다. 그 후 1 ㎎/mL의 Trypsin용액 0.5 mL가 당해 혼합액에 첨가되었다. 당해 혼합액은 실온에서 20분간 교반된 후, 자기 스탠드를 사용하여 분리된 비드로부터 파지가 회수되었다. 회수된 파지는 대수증식기(OD600이 0.4-0.7)가 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37℃에서 1시간 완만하게 상기 대장균의 교반배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염시킨 대장균은 225 ㎜×225 ㎜의 플레이트에 파종되었다. 아데노신 및 ATP가 존재하는 조건하에서 항원에 대한 결합 활성을 갖는 항체를 취득하는 패닝이 3회 반복되었다.

[1974] (10-3) 교호(交互) 패닝법을 이용한 항체 라이브러리로부터의 아데노신, ATP 존재하에 있어서 항원에 결합하는 항체의 취득

[1975] 아데노신이 면역된 토끼로부터 구축되는 항체 파지 디스플레이 라이브러리 또는 합리적 디자인 항체 파지 디스플레이 라이브러리로부터, 항원에 대해 아데노신 및/또는 ATP가 존재하는 조건하에서 항원에 대한 결합 활성을 나타내는 항체의 스크리닝이 행해진다. 스크리닝을 위해 먼저 항체 파지 디스플레이 라이브러리를 비표지 항원이 존재하는 조건하에서 비오틴화 아데노신 및 ATP-NeutrAvidin과 접촉시켜 항원 존재하에서 아데노신 및/또는 ATP에 결합하는 항체 파지 디스플레이 라이브러리가 회수된다. 다음으로 당해 항체 파지 디스플레이 라이브러리를 아데노신 및 ATP가 존재하는 조건하에서 비오틴화 항원-스트렙트아비딘과 접촉시켜 아데노신 및 ATP 존재하에서 항원에 결합하는 항체가 회수된다. 이러한 패닝을 번갈아 행함으로써 아데노신 및 ATP가 존재하는 조건하에서 항원에 대해 결합 활성을 갖는 항체의 스크리닝이 실시된다.

[1976] 구축되는 파지 디스플레이용 파지미드를 보유하는 대장균으로부터 파지가 생산된다. 파지 생산이 행해진 대장균의 배양액에 2.5M NaCl/10% PEG를 첨가함으로써 침전시킨 파지의 집단을 TBS로 희석함으로써 파지 라이브러리액이 얻어진다. 다음으로 파지 라이브러리액에 최종농도 4%가 되도록 BSA가 첨가된다. 자기 비드로서 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 또는 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)를 사용하여 자기 비드에 고정화되는 항원을 사용하는 패닝이 실시된다.

[1977] 조제된 파지 라이브러리액에 250 pmol의 비오틴화 ATP, 2'-Adenosine-PEG-Biotin 및 5'-Adenosine-PEG-Biotin과 함께 1000 pmol의 비표지 항원을 첨가함으로써 당해 파지 라이브러리액과 항원, 아데노신 및 ATP를 실온에서 60분간 접촉시킨다. 다음으로 파지 라이브러리액에 BSA로 블로킹된 자기 비드가 첨가되고, 항원, 아데노신 및/또는 ATP와 파지의 복합체를 자기 비드와 실온에서 15분간 결합시킨다. 비드는 1000 pmol의 항원을 포함하는 TBS로 1회 세정된다. 그 후 1 ㎎/mL의 트립신용액 0.5 mL가 첨가되는 비드는 실온에서 15분 현탁된 후, 그 자리에서 자기 스탠드를 사용하여 분리되는 비드로부터 파지용액이 회수된다. 회수되는 파지용액이 대수증식기(OD600이 0.4-0.7)가 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가된다. 37℃에서 1시간 완만하게 상기 대장균의 교반배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시킨다. 감염시킨 대장균은 225 ㎜×225 ㎜의 플레이트로 파종된다. 다음으로 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리액이 조제된다.

[1978] 2회째의 패닝에서는 아데노신 및 ATP가 존재하는 조건하에서 비오틴화 항원에 대해 결합 가능한 파지의 농축이 행해진다. 구체적으로는, 조제되는 파지 라이브러리액에 40 pmol의 비오틴화 항원 및 최종농도 1 mM의 아데노신 및 ATP를 첨가함으로써 당해 파지 라이브러리액을 항원, 아데노신 및 ATP와 실온에서 60분간 접촉시킨다. 다음으로 파지 라이브러리액에 BSA로 블로킹된 자기 비드가 첨가되고, 항원, 아데노신 및/또는 ATP와 파지의 복합체를 자기 비드와 실온에서 15분간 결합시킨다. 최종농도 1 mM의 아데노신 및 ATP를 포함하는 TBST로 3회, 최종농도 1 mM의 아데노신 및 ATP를 포함하는 TBS로 비드는 2회 세정된다. 그 후 1 ㎎/mL의 트립신용액 0.5 mL가 첨가되는 비드는 실온에서 15분 현탁된 후, 그 자리에서 자기 스탠드를 사용하여 분리되는 비드로부터 파지용액이 회수된다. 회수되는 파지용액이 대수증식기(OD600이 0.4-0.7)가 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가된다. 37℃에서 1시간 완만하게 상기 대장균의 교반배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시킨다. 감염시킨 대장균은

225 ㎜×225 ㎜의 플레이트로 파종된다. 다음으로 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리액이 조제된다.

[1979] 그 후, 짝수회의 패닝에 있어서는 2회째 패닝과 동일한 조건에 의한 패닝이 반복 실시된다. 다만 4회째 이후의 패닝에서는 (아데노신+ATP)/TBST 및 (아데노신·ATP)/TBS에 의한 비드의 세정은 모두 5회로 늘려 실시된다.

[1980] 3회째의 패닝에서는 재차 항원의 존재하에서 비오틴화 아데노신 및 ATP에 대해 결합 가능한 파지의 농축이 행해진다. 구체적으로는, 조제되는 파지 라이브러리액에 250 pmol의 비오틴화 ATP, 2'-Adenosine-PEG-Biotin 및 5'-Adenosine-PEG-Biotin과 함께 1000 pmol의 비표지 항원을 첨가함으로써 당해 파지 라이브러리액과 항원, 아데노신 및 ATP를 실온에서 60분간 접촉시킨다. 다음으로 파지 라이브러리액에 BSA로 블로킹된 자기 비드가 첨가되고, 항원, 아데노신 및/또는 ATP와 파지의 복합체를 자기 비드와 실온에서 15분간 결합시킨다. 비드는 1000 pmol의 항원을 포함하는 TBST로 3회 및 1000 pmol의 항원을 포함하는 TBS로 2회 세정된다. 그 후 1 mg/mL의 트립신용액 0.5 mL가 첨가되는 비드는 실온에서 15분 현탁된 후, 그 자리에서 자기 스탠드를 사용하여 분리되는 비드로부터 파지용액이 회수된다. 회수되는 파지용액이 대수증식기(OD600이 0.4-0.7)가 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가된다. 37℃에서 1시간 완만하게 상기 대장균의 교반배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시킨다. 감염시킨 대장균은 225 ㎜×225 ㎜의 플레이트로 파종된다. 다음으로 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리액이 조제된다.

[1981] 그 후, 홀수회의 패닝에 있어서는 3회째의 패닝과 동일한 조건에 의한 패닝이 반복 실시된다. 다만 항원을 포함하는 TBST 및 항원을 포함하는 TBS에 의한 비드의 세정은 4회째 이후의 패닝에서는 모두 5회로 늘려 실시된다. 또는 3회째 이후의 패닝은 짝수회, 홀수회에 상관없이 이후 모두 3회째의 패닝과 동일한 조건에 의한 패닝이 반복 실시된다. 다만 항원을 포함하는 TBST 및 항원을 포함하는 TBS에 의한 비드의 세정은 4회째 이후의 패닝에서는 모두 5회로 늘려 실시된다.

[1982] (10-4) 파지 ELISA에 의한 아데노신 및/또는 ATP의 존재하 및 비존재하에 있어서의 결합 활성 평가

[1983] 상기 방법에 의해 얻어진 대장균의 싱글 콜로니로부터 통상의 방법(Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145)에 따라 파지 함유 배양상청이 회수되었다. NucleoFast 96(MACHEREY-NAGEL)을 사용하여 회수된 배양상청이 한외여과되었다. 배양상청 각 100 μL가 각 웰에 어플라이된 NucleoFast 96을 원심분리(4,500 g, 45분간)함으로써 통과액이 제거되었다. 100 ㎕의 H_2O각 각 웰에 첨가된 당해 NucleoFast 96이 재차 원심분리(4,500 g, 30분간)에 의해 세정되었다. 마지막으로 TBS 100 ㎕가 첨가되고, 실온에서 5분간 정치된 당해 NucleoFast 96의 각 웰의 상청에 포함되는 파지액이 회수되었다.

[1984] TBS 또는 (아데노신+ATP)/TBS가 첨가된 정제 파지가 아래의 절차로 ELISA에 제공되었다. StreptaWell 96 마이크로타이터 플레이트(Roche)가 비오틴 표지 항원을 포함하는 100 μL의 TBS로 하룻밤 코트되었다. 당해 플레이트의 각 웰을 TBST로 세정함으로써 항원이 제거된 후, 당해 웰이 250 μL의 2% SkimMilk-TBS로 1시간 이상 블로킹되었다. 2% SkimMilk-TBS를 제거하고, 그 후 각 웰에 조제된 정제 파지가 첨가된 당해 플레이트를 37℃에서 1시간 정치함으로써, 항체를 제시한 파지를 각 웰에 존재하는 항원에 아데노신 및/또는 ATP의 비존재하 및 존재하에 있어서 결합시켰다. TBST 또는 (아데노신+ATP)/TBST로 세정된 각 웰에 TBS 또는 (아데노신+ATP)/TBS에 의해 희석된 HRP 결합 항M13 항체(Amersham Pharmacia Biotech)가 첨가된 플레이트를 1시간 인큐베이트시켰다. TBST 또는 (아데노신+ATP)/TBST로 세정 후, TMB single용액(ZYMED)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후, 450 nm의 흡광도에 의해 당해 발색이 측정되었다. 그 결과, 인간 IL6, 인간 IL6 Receptor, HSA(Human Serum Albumin)의 세 항원에 대해 저분자 존재하에서 결합하는 항체가 복수 확인되었다. 인간 나이브 항체 라이브러리로부터도 ATP 존재하에서 결합하는 항체는 취득되고 있는데, 그 보다도 높은 효율로 인간 IL6, 인간 IL6 Receptor, HSA에 대한 스위치 항체를 취득할 수 있었다. 파지 ELISA의 결과를 표 16에 나타내었다.

표 16

[1985]

	human IL6	human IL6R		HSA
패닝 횟수	4	3	4	4
ELISA 실시 클론 수	96	96	96	96
양성 클론 수 (S/N 비>10)	35	23	64	52
의존성 클론 수 (SM+/- 비>2)	18	22	64	50
의존성 클론 서열 수	2	17	35	5

[1986] (10-5) 아데노신 및 ATP의 유무에 따라 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 스위치 항체의 결합능의 평가 및 서열 해석

[1987] (10-4)에서 나타내어지는 파지 ELISA의 결과, 아데노신 또는 ATP가 존재하는 조건하에서 항원에 대한 결합 활성이 있는 것으로 판단된 클론으로부터 특이적인 프라이머(서열번호 : 111 및 112)를 사용하여 증폭된 유전자의 염기서열이 해석되었다. 해석 결과, 항원 human IL6, HSA, human IL6R에 대해 결합하는 복수의 서로 상이한 서열을 갖는 항체가 취득되었다. human IL6에 대한 항체인 I6DL2C1-4_076, HSA에 대한 항체인 HSDL3C5-4_015 및 human IL-6R에 대한 항체인 6RAD2C1-4_011과 6RAD2C1-4_076의 아미노산 서열을 표 17에 나타내었다.

표 17

[1988]

클론명	중쇄 서열번호	경쇄 서열번호
I6DL2C5-4_076	서열번호 : 78	서열번호 : 79
HSDL3C5-4_015	서열번호 : 80	서열번호 : 81
6RAD2C1-4_011	서열번호 : 82	서열번호 : 83
6RAD2C1-4_076	서열번호 : 84	서열번호 : 85

[1989] (10-6) 취득된 항체의 항원에 대한 결합에 필요한 저분자의 동정

[1990] 취득된 I6DL2C1-4_076, HSDL3C5-4_015, 6RAD2C1-4_011, 6RAD2C1-4_076의 각 항체가 ELISA에 제공되었다. 저분자로서는 1 mM ATP, 아데노신 및 그의 혼합물이 사용되었다. 항원으로서 비오틴 표지된 인간 IL6, 인간 IL6R, HSA가 사용되었다.

[1991] 먼저 StreptaWell 96 마이크로타이터 플레이트(Roche)가 비오틴 표지 항원을 포함하는 100 μL의 TBS로 실온에서 1시간 이상 코트되었다. 당해 플레이트의 각 웰을 TBST로 세정함으로써 플레이트로 결합되어 있지 않은 비오틴 표지 항원이 제거된 후, 당해 웰이 2% Skimmilk/TBS 250 μL로 1시간 이상 블로킹되었다. 2% Skimmilk/TBS가 제거된 각 웰에 항체를 제시한 파지 50 μL가 첨가된 당해 플레이트를 실온에서 1시간 정치함으로써 각 파지를 각 웰에 존재하는 비오틴 표지 항원에 ATP 및/또는 아데노신의 존재하 및 비존재하에 있어서 결합시켰다. ATP 및/또는 아데노신을 포함하는 TBST 또는 포함하지 않는 TBST로 세정된 후에 TBS 또는 (아데노신 및/또는 ATP)/TBS에 의해 해석된 HRP 결합 항M13 항체(Amersham Pharmacia Biotech)각 각 웰에 첨가된 플레이트가 1시간 인큐베이트되었다. 각 저분자를 포함하는 TBST 및 포함하지 않는 TBST로 세정 후, TMB single용액(ZYMED)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후, 450 nm의 흡광도에 의해 당해 발색이 측정되었다(도 25, 26, 27).

[1992] [실시예 11] 실시예 2에서 취득된 항체의 키누레닌(Kynurenine) 이외의 아미노산 대사물의 존재하에서의 인간 IL-6에 대한 결합 활성

[1993] 실시예 2-4에서 취득된 저분자 존재하에서 인간 IL-6에 결합하는 항체 I6NMSC1-3_A11은 실시예 3-2에 나타내어지는 바와 같이, 키누레닌 존재하에서 인간 IL-6에 결합하는 항체이다. 키누레닌은 트립토판 대사물이고, 또한 키누레닌은 키누레니나제에 의해 안트라닐산으로, 및 키누레닌 3-히드록시라제에 의해 3-히드록시키누레닌으로, 키누레닌아미노트랜스페라아제에 의해 키누렌산으로 변환된다(Stefan Lob et. Al. Nat Rev Cancer. (2009) 9 (6), 445-452). 이러한 일련의 트립토판 대사물 등의 아미노산 대사물이 본 발명에서 사용되는 암조직 특이적 화합물, 특히 암세포 특이적 대사산물의 비한정의 일태양으로서 적합한지 여부가 검증되었다.

[1994] 실시예 3-2에서 나타내어진 키누레닌 존재하에서 항원에 대한 결합 활성을 갖는 항체 I6NMSC1-3_A11, 기지의 항인간 IL-6 항체 CLB8-F1 및 음성 대조로서 GC413은 표 18에 나타내는 7 조건하에서 ELISA에 제공되었다. 또한 표 4에 나타내는 Buffer로 각 아미노산 및 그의 대사물이 표 18에 나타내어지는 농도로 적절히 조제되었다. 항원으로서 비오틴 표지된 인간 IL-6가 사용되었다.

표 18

조건	저분자(Small molecule)	농도
1	키누레닌(Kynurenine)	100 μM
2	트립토판(Tryptophan)	100 μM
3	페닐알라닌(Phenylalanine)	100 μM
4	안트라닐산(Anthranilic acid)	100 μM
5	3-히드록시키누레닌(3-Hydroxykynurenine)	100 μM
6	키누렌산(Kynurenic acid)	100 μM
7	-	-

[1995]

[1996] 먼저 StreptaWell 96 마이크로타이터 플레이트(Roche)가 비오틴 표지 항원을 포함하는 100 μL의 PBS로 실온에서 1시간 이상 코트되었다. 당해 플레이트의 각 웰을 Wash buffer로 세정함으로써 플레이트로 결합되어 있지 않은 항원이 제거된 후, 당해 웰이 Blocking Buffer 250 μL로 1시간 이상 블로킹되었다. Blocking Buffer가 제거된 각 웰에 표 18의 최종농도로 저분자를 포함하는 Sample Buffer로 2.5 μg/mL로 조제된 정제 IgG의 각 100 μL가 첨가된 당해 플레이트를 실온에서 1시간 정치함으로써 각 IgG를 각 웰에 존재하는 항원에 결합시켰다. 표 18의 최종농도로 아미노산 및 아미노산 대사물을 포함하는 Wash Buffer로 세정된 후에, 아미노산 및 아미노산 대사물을 포함하는 Sample Buffer에 의해 해석된 HRP 결합 항인간 IgG 항체(BIOSOURCE)가 각 웰에 첨가된 플레이트가 1시간 인큐베이트되었다. 각 아미노산 및 아미노산 대사물을 포함하는 Wash Buffer로 세정 후, TMB single용액(ZYMED)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후, 450 nm의 흡광도에 의해 당해 발색이 측정되었다. 또한 Bufferr로서는 표 4에 기재된 조성을 포함하는 Buffer가 사용되었다.

[1997] 측정된 결과를 도 21에 나타내었다. CLB8-F1은 저분자의 종류 및 그 유무에 상관없이 흡광도가 동일한 것에 대해 I6NMSC1-3_A11은 조건 1(키누레닌용액)에 있어서의 흡광도와 비교하여 조건 7(저분자 없음)에 있어서의 흡광도는 현저히 낮았다. 또한 마찬가지로 조건 2(트립토판용액)와 조건 5(3-히드록시키누레닌용액)에 있어서의 흡광도도 조건 1과 동일한 높은 흡광도를 나타낸 것으로부터, I6NMSC1-3_A11은 키누레닌뿐 아니라 키누레닌의 전구체인 아미노산(트립토판) 및 키누레닌의 대사물 존재하에서도 항원인 인간 IL-6에 결합하는 항체인 것이 나타내어졌다.

[1998] 이 사실로부터 동일한 방법을 사용함으로써 1종류의 아미노산 대사물뿐 아니라 구조가 상이한 복수의 종류의 아미노산 또는 아미노산 대사물 존재하에 있어서 목적의 항원에 결합하는 항체를 취득하는 것이 가능한 것으로 생각되었다.

[1999] [실시예 12] 파지 디스플레이 기술을 사용한 인간 항체 라이브러리로부터의 저분자 존재하에 있어서 인간 IL-6에 결합하는 항체의 취득

[2000] (12-1) 비드 패닝 또는 음성 선별법을 이용한 라이브러리로부터의 저분자 존재하에 있어서 인간 IL-6에 결합하는 항체의 취득

[2001] 실시예 2-1에서 구축된 나이브 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리로부터, 2-2 및 2-3에서 나타내어진 방법과 동일한 방법에 의해 저분자 존재하에서 항원에 대한 결합 활성을 나타내는 항체의 스크리닝이 행해졌다.

[2002] (12-2) 파지 ELISA에 의한 저분자 존재하에 있어서의 결합 활성의 평가

[2003] 실시예 2-4에 나타내어진 방법과 동일한 방법에 의해 얻어진 대장균의 싱글 콜로니로부터 파지 함유 배양상청이 회수되고 정제 파지가 ELISA에 제공되었다. 단리된 768 클론을 사용하여 파지 ELISA를 행함으로써 저분자 칵테일 존재하에서 항원인 인간 IL-6에 대해 결합 활성을 갖는 클론 「I6NMSC1-3_#03」 및 「I6NMSC1-3_#17」이 새롭게 얻어졌다.

[2004] (12-3) 인간 IL-6에 결합하는 항체의 발현과 정제

[2005] 파지 ELISA로 나타내어진 SC 존재하에서 항원에 대한 결합 활성을 갖는 것으로 판단된 클론 I6NMSC1-3_#03 및 I6NMSC1-3_#17로부터 특이적인 프라이머(서열번호 : 110 및 112)를 사용하여 증폭된 유전자의 염기서열이 해석되었다. I6NMSC1-3_#03의 중쇄의 서열은 서열번호 : 50 및 경쇄의 서열은 서열번호 : 51이었다. 또한 I6NMSC1-3_#17의 중쇄의 서열은 서열번호 : 52 및 경쇄의 서열은 서열번호 : 53이었다. I6NMSC1-3_#17의 가변영역을 코드하는

유전자서열이 인간 IgG1/Lambda의 동물 발현용 플라스미드로 삽입되고, I6NMSC1-3_#03, 기지의 항인간 IL-6 항체인 CLB8-F1(중쇄는 서열번호 : 32, 경쇄는 서열번호 : 33으로 각각 표시된다) 및 음성 대조인 항인간 글리피칸 3 항체 GC413(중쇄는 서열번호 : 34, 경쇄는 서열번호 : 35로 각각 표시된다)의 가변영역을 코드하는 유전자 서열은 인간 IgG1/Kappa의 동물 발현용 플라스미드로 삽입되었다. 발현된 항체는 실시예 3에 기재된 방법으로 정제되었다.

[2006] (12-4) I6NMSC1-3_#03 항체의 인간 IL-6에 대한 결합에 필요한 저분자의 동정

[2007] I6NMSC1-3_#03은 표 3에 나타내어지는 9 조건하에서 ELISA에 제공되었다. 또한 표 4에 나타내는 Buffer로 각 저분자가 표 3에 나타내어지는 농도로 적절히 조제되었다. 항원으로서 비오틴 표지된 인간 IL-6가 사용되었다.

[2008] 먼저 StreptaWell 96 마이크로타이터 플레이트(Roche)가 비오틴 표지 항원을 포함하는 100 μL의 PBS로 실온에서 1시간 이상 코트되었다. 당해 플레이트의 각 웰을 Wash buffer로 세정함으로써 플레이트로 결합되어 있지 않은 항원이 제거된 후, 당해 웰이 Blocking Buffer 250 μL로 1시간 이상 블로킹되었다. Blocking Buffer가 제거된 각 웰에 표 3의 최종농도로 저분자를 포함하는 Sample Buffer로 2.5 ㎍/mL로 조제된 정제 IgG의 각 100 μL가 첨가된 당해 플레이트를 실온에서 1시간 정치함으로써 각 IgG를 각 웰에 존재하는 항원에 결합시켰다. 표 3의 최종농도로 저분자를 포함하는 Wash Buffer로 세정된 후에, 동 저분자가 들어 있는 Sample Buffer에 의해 해석된 HRP 결합 항인간 IgG 항체(BIOSOURCE)가 각 웰에 첨가된 플레이트가 1시간 인큐베이트되었다. 각 저분자를 포함하는 Wash Buffer로 세정 후, TMB single용액(ZYMED)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후, 450 nm의 흡광도에 의해 당해 발색이 측정되었다. 또한 Bufferr로서는 표 4에 기재된 조성을 포함하는 Buffer가 사용되었다.

[2009] 측정된 결과를 도 22에 나타내었다. I6NMSC1-3_#03은 조건 8(모든 저분자 칵테일용액)에 있어서의 흡광도와 비교하여 조건 9(저분자 없음)에 있어서의 흡광도는 낮은 결과가 되었다. 이 결과로부터 I6NMSC1-3_#03은 저분자의 유무에 따라 항원의 결합이 변화하는 성질을 갖는 것이 파지 ELISA와 마찬가지로 확인되었다. 또한 I6NMSC1-3_#03은 조건 7(Kynurenine 100 uM)에 있어서 조건 8과 동등한 흡광도를 나타내고, 그 밖의 조건하에서는 흡광도가 낮은 결과였던 것으로부터 실시예 3에 기재된 I6NMSC1-3_A11과 마찬가지로 Kynurenine 존재하에서 항원인 인간 IL-6와 결합하는 항체인 것이 나타내어졌다. I6NMSC1-3_#03은 I6NMSC1-3_A11과 상이한 아미노산 서열을 가지고 있어, 이러한 방법을 사용함으로써 저분자 존재하에서 항원에 결합하는 항체를 복수 종류 취득하는 것이 가능한 것이 나타내어졌다.

[2010] (12-5) I6NMSC1-3_#17 항체의 인간 IL-6에 대한 결합에 필요한 저분자의 동정

[2011] 취득된 I6NMSC1-3_#17과 대조의 CLB8-F1 및 음성 대조인 GC413의 3종류의 항체가 표 3에 나타내어지는 9 조건하에서 ELISA에 제공되었다. 또한 표 4에 나타내는 Buffer로 각 저분자가 표 3에 나타내어지는 농도로 적절히 조제되었다. 항원으로서 비오틴 표지된 인간 IL-6가 사용되었다.

[2012] 먼저 StreptaWell 96 마이크로타이터 플레이트(Roche)가 비오틴 표지 항원을 포함하는 100 μL의 PBS로 실온에서 1시간 이상 코트되었다. 당해 플레이트의 각 웰을 Wash buffer로 세정함으로써 플레이트로 결합되어 있지 않은 항원이 제거된 후, 당해 웰이 Blocking Buffer 250 μL로 1시간 이상 블로킹되었다. Blocking Buffer가 제거된 각 웰에 표 3의 최종농도로 저분자를 포함하는 Sample Buffer로 0.15 ㎍/mL로 조제된 정제 IgG의 각 100 μL가 첨가된 당해 플레이트를 실온에서 1시간 정치함으로써 각 IgG를 각 웰에 존재하는 항원에 결합시켰다. 표 3의 최종농도로 저분자를 포함하는 Wash Buffer로 세정된 후에, 같은 저분자가 들어 있는 Sample Buffer에 의해 해석된 HRP 결합 항인간 IgG 항체(BIOSOURCE)가 각 웰에 첨가된 플레이트가 1시간 인큐베이트되었다. 각 저분자를 포함하는 Wash Buffer로 세정 후, TMB single용액(ZYMED)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후, 450 nm의 흡광도에 의해 당해 발색이 측정되었다. 또한 Bufferr로서는 표 4에 기재된 조성을 포함하는 Buffer가 사용되었다.

[2013] 측정된 결과를 도 23에 나타내었다. CLB8-F1은 저분자의 종류 및 존재 유무에 상관없이 흡광도가 동일한 것에 대해 I6NMSC1-3_#17은 조건 8(모든 저분자 칵테일용액)에 있어서의 흡광도와 비교하여 조건 9(저분자 없음)에 있어서의 흡광도는 낮은 결과가 되었다. 이 결과로부터 I6NMSC1-3_#17은 저분자의 유무에 따라 항원의 결합이 변화하는 성질을 갖는 것이 파지 ELISA와 마찬가지로 확인되었다. 또한 I6NMSC1-3_#17은 조건 1(ATP-Na 1 mM) 및 조건 5(Succinic acid 1mM)에 있어서 조건 8과 동등한 흡광도를 나타내고, 그 밖의 조건하에서는 흡광도가 낮은 결과였던 것으로부터. ATP-Na 또는 Succinic acid 중 어느 한쪽이 존재하는 조건하에서 항원인 인간 IL-6와 결합하는 항체인 것이 나타내어졌다. ATP는 암세포로부터 방출되는 것이 알려져 있는데, succinic acid에

관하여도 암세포 특이적으로 세포 내외에 있어서 축적되어 있는 것이 알려져 있다. 암세포가 호기적 환경하에서도 산화적 인산화보다도 오히려 해당계 의존적으로 대사를 행하는 것은 바르부르크 효과로서 알려져 있는데, 빈혈성 암종에 있어서는 만성적인 혈류 부족에 의해 해당도 산화적 인산화도 만성적으로 제한되어, 보다 열악한 환경하에서 에너지를 얻고 있다. 이러한 빈혈성 암종은 푸마르산 호흡에 의존한 에너지 대사를 행하고 있는 것이 알려져 있어, 그 결과로서 푸마르산 대사물인 숙신산(Succinic acid)이 축적된다(Cancer Res. (2009) 69 (11), 4918-4925).

[2014] 이러한 방법을 사용함으로써 Kynurenine 이외의 저분자 존재하에서 항원에 결합하는 항체를 취득하는 것이 가능한 것이 나타내어졌다. 또한 ATP-Na와 Succinic acid는 복수의 음전하를 갖는다는 공통된 특징을 갖는데, 그 구조가 서로 상이한 저분자의 각 존재하에서 항원에 결합하는 항체를 취득하는 것이 가능한 것이 나타내어졌다.

[2015] 〔실시예 13〕 파지 디스플레이 기술을 사용한 인간 항체 라이브러리로부터의 저분자 존재하에 있어서 인간 혈청 알부민(Human Serum Albumin, 이하 HSA로도 불린다)에 결합하는 항체의 취득

[2016] (13-1) 비드 패닝에 의한 라이브러리로부터의 저분자 존재하에 있어서 HSA에 결합하는 항체의 취득

[2017] 실시예 2에서 구축된 나이브 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리로부터 저분자 존재하에서 HSA에 대한 결합 활성을 나타내는 항체의 스크리닝이 행해졌다. 즉, 비드에 캡쳐된 HSA에 대해 저분자 존재하에서 결합 활성을 나타내는 항체를 제시하고 있는 파지가 모아졌다. 저분자 비존재 조건에서 비드로부터 용출된 파지 용출액으로부터 파지가 회수되었다. 본 취득방법에서는 항원으로서 비오틴 표지된 HSA가 사용되었다.

[2018] 구축된 파지 디스플레이용 파지미드를 보유한 대장균으로부터 생산된 파지는 일반적인 방법에 의해 정제되었다. 그 후 TBS로 투석 처리된 파지 라이브러리액이 얻어졌다. 다음으로 파지 라이브러리액에 최종농도 3%가 되도록 스킴밀크가 첨가되었다. 자기 비드에 고정화된 항원을 사용한 패닝이 실시되었다. 자기 비드로서 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 또는 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)가 사용되었다.

[2019] 암조직에 있어서 스위치 역할을 할 수 있는 저분자에 의존적인 저분자 스위치 항체를 효율적으로 취득하기 위해, 이들 저분자(아데노신(adenosine), 아데노신 3인산(adenosine 5'-triphosphate; ATP), 이노신(inosine), 키누레닌(kynurenine), 프로스타글란딘 E2(prostaglandin E2; PGE2), 숙신산(succinic acid), 락트산(lactic acid))의 혼합액(이하, SC(small molecule cocktail)로 표기된다)의 존재하에서 항원에 결합하고, SC 비존재하에서는 항원에 결합하지 않는 항체를 농축하는 패닝이 실시되었다.

[2020] 구체적으로는, 조제된 파지 라이브러리액에 250 pmol의 비오틴 표지 항원과 함께 각 최종농도가 1 mM인 아데노신 3인산나트륨염(ATP-Na), 아데노신(Adenosine), 이노신(Inosine), 숙신산(Succinic acid) 및 락트산(Lactic acid), 최종농도가 1 μM인 프로스타글란딘 E2(PGE2) 및 최종농도가 100 μM인 키누레닌(Kynurenine)으로 이루어지고 NaOH에 의해 그 pH가 7.4로 조제된 SC가 첨가되어 실온에서 60분간 접촉시켰다. 다음으로 파지 라이브러리액에 스킴밀크로 블로킹된 자기 비드가 첨가되고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비드와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비드는 SC/TBS(SC를 포함하는 TBS)로 1회 세정되었다. 그 후 1 mg/mL의 트립신용액 0.5 mL가 첨가된 비드는 실온에서 15분 현탁된 후, 그 자리에서 자기 스탠드를 사용하여 분리된 비드로부터 파지용액이 회수되었다. 회수된 파지용액이 대수증식기(OD600이 0.4-0.7)가 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37℃에서 1시간 완만하게 상기 대장균의 교반배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염시킨 대장균은 225 ㎜×225 ㎜의 플레이트에 파종되었다. 다음으로 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리액이 조제되었다.

[2021] 1회째의 패닝에서는 저분자 존재하에서 결합 가능한 파지의 회수가 행해졌는데, 2회째 이후의 패닝에서는 저분자 존재하에서 항원에 대해 결합 가능한 파지의 농축이 행해졌다. 구체적으로는, 조제한 파지 라이브러리액에 40 pmol의 비오틴 표지 항원 및 SC, NaOH를 첨가함으로써 파지 라이브러리를 실온에서 60분간 항원 및 저분자와 접촉시켰다. 스킴밀크로 블로킹된 자기 비드가 첨가되고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비드와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비드는 1 mL의 SC/TBST와 SC/TBS로 세정되었다. 그 후 0.5 mL의 TBS가 첨가된 비드는 실온에서 현탁된 후, 그 자리에서 자기 스탠드를 사용하여 분리된 비드로부터 파지용액이 회수되었다. 이 작업이 재차 반복된 후, 2회로 나눠 용출된 파지액이 혼합되었다. 추가로 남은 비드에 대해 0.5 mL의 TBS가 첨가되고, 당해 비드는 실온에서 5분간 교반되었다. 자기 스탠드를 사용하여 분리된 비드로부터 파지용액이 회수되었다. 회수된 파지용액에 100 mg/mL의 트립신 5 μL를 첨가함으로써 Fab를 제시하지 않는 파지의 pIII 단백질(헬퍼 파지 유래의 pIII 단백질)이 절단되고, Fab를 제시하지 않는 파지의 대장균에 대한 감염능이 상실되었다. 트립신 처리된 파

지용액으로부터 회수된 파지가 대수증식기(OD600이 0.4-0.7)가 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37℃에서 1시간 완만하게 상기 대장균의 교반배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염시킨 대장균은 225 ㎜×225 ㎜의 플레이트에 파종되었다. 2회째의 패닝에 의해 얻어진 2종류의 감염 대장균은 이 시점에서 등량씩 혼합되고, 다음으로 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리액이 회수되었다. 저분자 존재하에서 항원에 대한 결합 활성을 갖는 항체를 취득하는 패닝이 3회 반복되었다.

[2022] (13-2) 음성 선별법을 이용한 라이브러리로부터의 저분자 존재하에 있어서 HSA에 결합하는 항체의 취득

[2023] 구축된 나이브 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리로부터 HSA에 대해 저분자가 존재하는 조건하에서 HSA에 대한 결합 활성을 나타내는 항체의 스크리닝이 행해졌다. 스크리닝을 위해 먼저 나이브 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리를 저분자 비존재하에서 비오틴 표지 항원-스트렙트아비딘과 접촉시켜, 저분자 비존재하에서도 HSA에 대해 결합 활성을 갖는 항체를 제시하고 있는 파지가 제거되었다. 계속해서 저분자의 존재하에서 동일하게 패닝을 행함으로써, 저분자가 존재하는 조건하에서 HSA에 대해 결합 활성을 갖는 항체의 스크리닝이 실시되었다. 항원으로서 비오틴 표지된 HSA가 사용되었다.

[2024] 구축한 파지 디스플레이용 파지미드를 보유한 대장균으로부터 파지가 생산되었다. 생산된 파지는 일반적인 방법에 의해 정제된 후, TBS에 대해 투석 처리된 파지 라이브러리액이 얻어졌다. 다음으로 파지 라이브러리액에 최종농도 3%가 되도록 스킴밀크가 첨가되었다. 자기 비드로서 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 또는 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)를 사용하여, 자기 비드에 고정화된 비오틴 표지 HSA를 사용한 패닝이 실시되었다.

[2025] 조제된 파지 라이브러리액에 250 pmol의 비오틴 표지 HSA와 함께 각 최종농도가 1 mM인 ATP-Na, Adenosine, Inosine, Succinic acid 및 Lactic acid, 최종농도 1 μM의 PGE2 및 최종농도 100 μM의 Kynurenine으로 이루어지고 NaOH에 의해 그 pH가 7.4로 조제된 SC를 첨가함으로써 당해 파지 라이브러리액과 실온에서 60분간 접촉시켰다. 다음으로 파지 라이브러리액에 스킴밀크로 블로킹된 자기 비드가 첨가되고, 비오틴 표지 HSA와 파지의 복합체를 자기 비드와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비드는 SC/TBS로 1회 세정되었다. 그 후 1 mg/mL의 트립신 용액 0.5 mL가 첨가된 비드는 실온에서 15분 현탁된 후, 그 자리에서 자기 스탠드를 사용하여 분리된 비드로부터 파지용액이 회수되었다. 회수된 파지용액이 대수증식기(OD600이 0.4-0.7)가 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37℃에서 1시간 완만하게 상기 대장균의 교반배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염시킨 대장균은 225 ㎜×225 ㎜의 플레이트에 파종되었다. 다음으로 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리액이 조제되었다.

[2026] 1회째의 패닝에서는 저분자 존재하에서 결합 가능한 파지의 회수가 행해졌는데, 2회째 이후의 패닝에서는 저분자 존재하에서 비오틴 표지 HSA에 대해 결합 가능한 파지의 농축이 행해졌다. 구체적으로는, 스킴밀크로 블로킹된 Sera-Mag NeutrAvidin 비드에 250 pmol 비오틴 표지 HSA를 첨가하여 실온에서 15분간 결합시켰다. TBS로 3회 세정된 비드에 대해 스킴밀크로 블로킹이 행해진 파지 라이브러리액을 첨가하여 실온에서 1시간 결합시켰다. 자기 스탠드를 사용하여 비드를 분리함으로써 비오틴 표지 HSA 및 비드에 결합하지 않는 파지가 회수되었다. 회수된 파지에 대해 40 pmol의 비오틴 표지 HSA 및 SC, NaOH를 첨가함으로써 파지 라이브러리를 실온에서 60분간 비오틴 표지 HSA 및 SC에 포함되는 저분자와 접촉시켰다. 다음으로 비오틴 표지 HSA, SC 및 파지 라이브러리의 혼합액에 스킴밀크로 블로킹된 자기 비드를 첨가하여 실온에서 15분간, 비오틴 표지 HSA와 파지의 복합체를 자기 비드와 결합시켰다. 비드는 1 mL의 SC/TBST와 SC/TBS로 세정되었다. 그 후 1 mg/mL의 Trypsin용액 0.5 mL가 당해 혼합액에 첨가되었다. 당해 혼합액은 실온에서 20분간 교반된 후, 자기 스탠드를 사용하여 분리된 비드로부터 파지가 회수되었다. 회수된 파지는 대수증식기(OD600이 0.4-0.7)가 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37℃에서 1시간 완만하게 상기 대장균의 교반배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염시킨 대장균은 225 ㎜×225 ㎜의 플레이트에 파종되었다. 저분자 존재하에서 비오틴 표지 HSA에 대해 결합 활성을 갖는 항체를 취득하는 패닝이 3회 반복되었다.

[2027] (13-3) 파지 ELISA에 의한 저분자 존재하에 있어서의 결합 활성의 평가

[2028] 상기 방법에 의해 얻어진 대장균의 싱글 콜로니로부터 통상의 방법(Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145)에 따라 파지 함유 배양상청이 회수되었다. NucleoFast 96(MACHEREY-NAGEL)을 사용하여 회수된 배양상청은 한외여과되었다. 배양상청 각 100 μL가 각 웰에 어플라이된 NucleoFast 96을 원심분리(4,500 g, 45분간)함으로써 통과액이 제거되었다. 100 μL의 H_2O가 각 웰에 첨가된 당해 NucleoFast 96이 재차 원심분리(4,500 g, 30분간 원심)에 의해 세정되었다. 마지막으로 TBS 100 μL가 첨가되고, 실온에서 5분간 정치된 당해 NucleoFast 96

의 각 웰의 상청에 포함되는 파지액이 회수되었다.

[2029] TBS 또는 SC/TBS가 첨가된 정제 파지가 아래의 절차로 ELISA에 제공되었다. StreptaWell 96 마이크로타이터 플레이트(Roche)가 비오틴 표지 HSA를 포함하는 100 μL의 TBS로 하룻밤 코트되었다. 당해 플레이트의 각 웰을 TBST로 세정함으로써 비오틴 표지 HSA가 제거된 후, 당해 웰이 250 μL의 2% 스킴밀크-TBS로 1시간 이상 블로킹되었다. 2% 스킴밀크-TBS를 제거하고, 그 후 각 웰에 조제된 정제 파지가 첨가된 당해 플레이트를 실온에서 1시간 정치함으로써 파지를 제시하는 항체를 각 웰에 존재하는 비오틴 표지 HSA에 SC 비존재/존재하에 있어서 결합시켰다. TBST 또는 SC/TBST로 세정된 각 웰에 TBS 또는 SC/TBS에 의해 해석된 HRP 결합 항M13 항체(Amersham Pharmacia Biotech)가 첨가된 플레이트를 1시간 인큐베이트시켰다. TBST 또는 SC/TBST로 세정 후, TMB single 용액(ZYMED)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후, 450 nm의 흡광도에 의해 당해 발색이 측정되었다.

[2030] 단리된 782 클론을 사용하여 파지 ELISA를 행함으로써 저분자 칵테일 존재하에서 항원인 HSA에 대해 결합 활성을 갖는 클론 HSNMSC1-4_#22가 얻어졌다.

[2031] (13-4) HSA에 결합하는 항체의 발현과 정제

[2032] (13-3)에서 기재된 파지 ELISA로 나타내어진 SC 존재하에서 비오틴 표지 HSA에 대한 결합 활성을 갖는 것으로 판단된 클론 HSNMSC1-4_#22로부터 특이적인 프라이머(서열번호 : 110 및 112)를 사용하여 증폭된 유전자의 염기 서열이 해석되었다(중쇄의 서열은 서열번호 : 54 및 경쇄의 서열은 서열번호 : 55로 표시된다). HSNMSC1-4_#22의 가변영역을 코드하는 유전자가 인간 IgG1/Lambda의 동물 발현용 플라스미드로 삽입되었다. 또한 음성 대조인 항인간 글리피칸 3 항체 GC413(중쇄는 서열번호 : 34, 경쇄는 서열번호 : 35)의 가변영역을 코드하는 유전자는 인간 IgG1/Kappa의 동물 발현용 플라스미드로 삽입되었다. 발현된 항체는 실시예 3에 기재된 방법으로 정제되었다.

[2033] (13-5) 취득된 항체의 HSA에 대한 결합에 필요한 저분자의 동정

[2034] 취득된 HSNMSC1-4_#22와 GC413의 2종류의 항체가 표 3에 나타내는 9 조건하에서 ELISA에 제공되었다. 또한 표 19에 나타내는 Buffer로 각 저분자가 표 3에 나타내어지는 농도로 적절히 조제되었다. 항원으로서 비오틴 표지된 HSA가 사용되었다.

표 19

[2035]

Wash buffer	10 mM ACES, 150 mM NaCl,0.05% Tween20, pH7.4
Blocking Buffer	10 mM ACES, 150 mM NaCl, 2%SkimMilk, pH7.4
Sample Buffer	10 mM ACES, 150 mM NaCl, 저분자 (Small molecule), pH7.4

[2036] 먼저 StreptaWell 96 마이크로타이터 플레이트(Roche)가 비오틴 표지 HSA를 포함하는 100 μL의 PBS로 실온에서 1시간 이상 코트되었다. 당해 플레이트의 각 웰을 Wash buffer로 세정함으로써 플레이트로 결합되어 있지 않은 비오틴 표지 HSA가 제거된 후, 당해 웰이 Blocking Buffer 250 μL로 1시간 이상 블로킹되었다. Blocking Buffer가 제거된 각 웰에 표 3의 최종농도로 저분자를 포함하는 Sample Buffer로 2.5 ㎍/mL로 조제된 정제 IgG의 각 100 μL가 첨가된 당해 플레이트를 실온에서 1시간 정치함으로써 각 IgG를 각 웰에 존재하는 비오틴 표지 HSA에 결합시켰다. 표 3의 최종농도로 저분자를 포함하는 Wash Buffer로 세정된 후에, 같은 저분자가 들어 있는 Sample Buffer에 의해 해석된 HRP 결합 항인간 IgG 항체(BIOSOURCE)가 각 웰에 첨가된 플레이트가 1시간 인큐베이트되었다. 각 저분자를 포함하는 Wash Buffer로 세정 후, TMB single용액(ZYMED)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후, 450 nm의 흡광도에 의해 당해 발색이 측정되었다. 또한 Bufferr로서는 표 19에 기재된 조성을 포함하는 Buffer가 사용되었다.

[2037] 측정된 결과를 도 24에 나타내었다. HSNMSC1-4_#22는 조건 8(모든 저분자 칵테일용액)에 있어서의 흡광도와 비교하여 조건 9(저분자 없음)에 있어서의 흡광도는 현저히 낮은 결과가 되었다. 이 결과로부터 HSNMSC1-4_#22는 저분자의 유무에 따라 항원의 결합이 변화하는 성질을 갖는 것이 파지 ELISA와 동일하게 확인되었다. 또한 HSNMSC1-4_#22는 조건 2(Adenosine 1mM)에 있어서 조건 8과 동등한 흡광도를 나타내고, 그 밖의 조건하에서는 흡광도가 현저히 낮은 결과였던 것으로부터, Adenosine 존재하에서 항원인 HSA와 결합하는 항체인 것이 나타내

어졌다. 이러한 방법을 사용함으로써 Kynurenine 이외의 저분자의 존재하에서 항원에 결합하는 항체를 취득하는 것이 가능한 것이 나타내어졌다.

[2038] 〔실시예 14〕파지 디스플레이 기술을 사용한 인간 항체 라이브러리로부터의 저분자 존재하에 있어서 인간 IL-6 수용체(hIL-6R)에 결합하는 항체의 취득

[2039] (14-1) 비드 패닝에 의한 나이브 인간 항체 라이브러리로부터의 저분자 존재하에 있어서 hIL-6R에 결합하는 항체의 취득

[2040] 실시예 2에서 구축된 나이브 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리로부터, 저분자 존재하에서 hIL-6R에 대한 결합 활성을 나타내는 항체가 스크리닝되었다. 즉, 비드에 캡쳐된 hIL-6R에 대해 저분자 존재하에서 결합 활성을 나타내는 항체를 제시하고 있는 파지가 모아졌다. 저분자 비존재의 조건에서 비드로부터 용출된 파지 용출액으로부터 파지가 회수되었다. 본 취득방법에서는 항원으로서 비오틴 표지된 hIL-6R이 사용되었다.

[2041] 구축된 파지 디스플레이용 파지미드를 유지한 대장균으로부터 생산된 파지는 일반적인 방법에 의해 정제되었다. 그 후 TBS로 투석 처리된 파지 라이브러리액이 얻어졌다. 다음으로 파지 라이브러리액에 최종농도 4%가 되도록 BSA가 첨가되었다. 자기 비드에 고정화된 항원을 사용한 패닝이 실시되었다. 자기 비드로서 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 또는 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)가 사용되었다.

[2042] 암조직에 있어서 스위치의 역할을 할 수 있는 저분자에 의존적인 저분자 스위치 항체를 효율적으로 취득하기 위해, (2-2)에 기재된 SC의 존재하에서 항원에 결합하고, SC 비존재하에서는 항원에 결합하지 않는 항체를 농축하는 패닝이 실시되었다.

[2043] 구체적으로는, 조제된 파지 라이브러리액에 250 pmol의 비오틴 표지 항원과 함께, (2-2)에 기재된 바와 같이 조제된 SC가 첨가되어 실온에서 60분간 접촉시켰다. 다음으로 BSA로 블로킹된 자기 비드에 파지 라이브러리액이 첨가되고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비드와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비드는 SC/TBS(SC를 포함하는 TBS)로 1회 세정되었다. 그 후 1 mg/mL의 트립신용액 0.5 mL가 첨가된 비드는 실온에서 15분 현탁된 후, 그 자리에서 자기 스탠드를 사용하여 분리된 비드로부터 파지용액이 회수되었다. 회수된 파지용액이 대수증식기(OD600이 0.4-0.7)가 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37℃에서 1시간 완만하게 상기 대장균의 교반 배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염시킨 대장균은 225 ㎜×225 ㎜의 플레이트에 파종되었다. 다음으로 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리액이 조제되었다.

[2044] Fab를 제시하지 않는 파지의 pIII 단백질(헬퍼 파지 유래의 pIII 단백질)을 절단하고, Fab를 제시하지 않는 파지의 대장균에 대한 감염능을 상실시키기 위해 100 mg/mL의 트립신 10 μL를 첨가하는 이외는 (2-2)에 기재된 패닝이 실시되었다.

[2045] (14-2) 음성 선별법을 이용한 나이브 인간 항체 라이브러리로부터의 저분자 존재하에 있어서 hIL-6R에 결합하는 항체의 취득

[2046] 구축된 나이브 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리로부터, hIL-6R에 대해 저분자가 존재하는 조건하에서 hIL-6R에 대한 결합 활성을 나타내는 항체가 스크리닝되었다. 스크리닝을 위해 먼저 나이브 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리를 저분자 비존재하에서 비오틴 표지 항원-스트렙트아비딘과 접촉시켜, 저분자 비존재하에서도 hIL-6R에 대해 결합 활성을 갖는 항체를 제시하고 있는 파지가 제거되었다. 계속해서 저분자의 존재하에서 동일하게 패닝을 행함으로써 저분자가 존재하는 조건하에서 hIL-6R에 대해 결합 활성을 갖는 항체가 스크리닝되었다. 항원으로서 비오틴 표지된 hIL-6R이 사용되었다. 다음으로 항원으로서 비오틴 표지 hIL-6R이 사용된 (2-3)에 기재된 방법에 의해 파지 라이브러리액이 조제되었다.

[2047] (14-3) 파지 ELISA에 의한 저분자 존재하에 있어서의 결합 활성의 평가

[2048] (14-2)에서 얻어진 대장균의 싱글 콜로니로부터 통상의 방법(Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145)에 따라 파지 함유 배양상청이 회수되었다. (2-4)에 기재된 방법으로 정제된 정제 파지가 아래의 절차로 ELISA에 제공되었다. StreptaWell 96 마이크로타이터 플레이트(Roche)가 비오틴 표지 hIL-6R을 포함하는 100 μL의 TBS로 하룻밤 코트되었다. 당해 플레이트의 각 웰을 TBST로 세정함으로써 비오틴 표지 hIL-6R이 제거된 후, 당해 웰이 250 μL의 2% 스킴밀크-TBS로 1시간 이상 블로킹되었다. 2% 스킴밀크-TBS를 제거하고, 그 후 각 웰에 조제된 정제 파지가 첨가된 당해 플레이트를 실온에서 1시간 정치함으로써 파지를 제시하는 항체를 각 웰에 존재하는 비오틴 표지 hIL-6R에 SC 비존재/존재하에 있어서 결합시켰다. TBST 또는 SC/TBST로 세정된 각 웰에 TBS 또는

SC/TBS에 의해 해석된 HRP 결합 항M13 항체(Amersham Pharmacia Biotech)가 첨가된 플레이트를 1시간 인큐베이트시켰다. TBST 또는 SC/TBST로 세정 후, TMB single용액(ZYMED)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후, 450 nm의 흡광도에 의해 당해 발색이 측정되었다.

[2049] 단리된 960 클론을 사용하여 파지 ELISA를 행함으로써 저분자 칵테일 존재하에서 항원인 hIL-6R에 대해 결합 활성을 갖는 클론 6RNMSC1-2_F02 및 6RNMSC1-3_G02가 얻어졌다.

[2050] (14-4) hIL-6R에 결합하는 항체의 발현과 정제

[2051] (14-3)에서 기재된 파지 ELISA로 나타내어진 SC 존재하에서 비오틴 표지 hIL-6R에 대한 결합 활성을 갖는 것으로 판단된 클론 6RNMSC1-2_F02 및 6RNMSC1-3_G02로부터 특이적인 프라이머(서열번호 : 110 및 112)를 사용하여 증폭된 유전자의 염기서열이 해석되었다(6RNMSC1-2_F02 : 중쇄의 서열은 서열번호 : 86 및 경쇄의 서열은 서열번호 : 87, 6RNMSC1-3_G02 : 중쇄의 서열은 서열번호 : 88 및 경쇄의 서열은 서열번호 : 89로 표시된다). 6RNMSC1-2_F02, 6RNMSC1-3_G02 및 음성 대조인 항인간 글리피칸 3 항체 GC413(중쇄는 서열번호 : 34, 경쇄는 서열번호 : 35)의 가변영역을 코드하는 유전자는 인간 IgG1/Kappa의 동물 발현용 플라스미드로 삽입되었다. 발현된 항체는 실시예 3에 기재된 방법으로 정제되었다.

[2052] (14-5) 취득된 항체의 hIL-6R에 대한 결합에 필요한 저분자의 동정

[2053] 취득된 6RNMSC1-2_F02 및 6RNMSC1-3_G02와 GC413의 3종류의 항체가 표 3에 나타내는 9 조건하에서 ELISA에 제공되었다. 또한 표 19에 나타내는 Buffer로 각 저분자가 표 3에 나타내어지는 농도로 적절히 조제되었다. 항원으로서 비오틴 표지된 hIL-6R이 사용되었다.

[2054] 먼저 StreptaWell 96 마이크로타이터 플레이트(Roche)가 비오틴 표지 hIL-6R을 포함하는 100 μL의 PBS로 실온에서 1시간 이상 코트되었다. 당해 플레이트의 각 웰을 Wash buffer로 세정함으로써 플레이트로 결합되어 있지 않은 비오틴 표지 hIL-6R이 제거된 후, 당해 웰이 Blocking Buffer 250 μL로 1시간 이상 블로킹되었다. Blocking Buffer가 제거된 각 웰에 표 3의 최종농도로 저분자를 포함하는 Sample Buffer로 2.5 μg/mL로 조제된 정제 IgG의 각 100 μL가 첨가된 당해 플레이트를 실온에서 1시간 정치함으로써 각 IgG를 각 웰에 존재하는 비오틴 표지 hIL-6R에 결합시켰다. 표 3의 최종농도로 저분자를 포함하는 Wash Buffer로 세정된 후에, 같은 저분자가 들어 있는 Sample Buffer에 의해 해석된 HRP 결합 항인간 IgG 항체(BIOSOURCE)가 각 웰에 첨가된 플레이트가 1시간 인큐베이트되었다. 각 저분자를 포함하는 Wash Buffer로 세정 후, TMB single용액(ZYMED)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후, 450 nm의 흡광도에 의해 당해 발색이 측정되었다. 또한 Bufferr로서는 표 19에 기재된 조성을 포함하는 Buffer가 사용되었다.

[2055] 측정된 결과를 도 28과 도 29에 나타내었다. 6RNMSC1-2_F02 및 6RNMSC1-3_G02가 사용된 경우, 조건 8(모든 저분자 칵테일용액)에 있어서의 흡광도와 비교하여 조건 9(저분자 없음)에 있어서의 흡광도는 현저히 낮다는 결과가 얻어졌다. 이 결과로부터 6RNMSC1-2_F02 및 6RNMSC1-3_G02는 저분자의 유무에 따라 항원과의 결합이 변화하는 성질을 갖는 것이 확인되었다. 또한 6RNMSC1-2_F02가 사용된 경우, 조건 7(Kynurenine 100 uM)에 있어서 조건 8과 동등한 흡광도를 나타내고, 그 밖의 조건하에서는 흡광도가 현저히 낮은 결과였던 것으로부터, 6RNMSC1-2_F02는 Kynurenine 존재하에서 항원인 hIL-6R과 결합하는 항체인 것이 나타내어졌다(도 28). 또한 6RNMSC1-3_G02가 사용된 경우, 조건 1(ATP-Na 1 mM)에 있어서 조건 8과 동등한 흡광도를 나타내고, 그 밖의 조건하에서는 흡광도가 현저히 낮은 결과였던 것으로부터, 6RNMSC1-3_G02는 ATP 존재하에서 항원인 hIL-6R과 결합하는 항체인 것이 나타내어졌다(도 29). 이러한 방법을 사용함으로써, 상이한 저분자의 존재하에서 항원으로의 결합능이 변화하는 항체를 한번에 복수 취득하는 것이 가능한 것이 나타내어졌다.

[2056] [실시예 15] 6RNMSC1-2_F02 항체의 캐릭터리제이션(characterization)

[2057] (15-1) ELISA에 의한 키누레닌 이외의 아미노산 및 아미노산 대사물 존재하에 있어서의 hIL6R에 대한 결합 활성의 평가

[2058] 실시예 14에서 취득된 저분자 존재하에서 hIL-6R에 결합하는 항체 6RNMSC1-2_F02는 키누레닌 존재하에서 hIL-6R에 결합하는 항체이다. 실시예 11에서 기재된 일련의 트립토판 대사물 등의 아미노산 대사물이 본 발명에서 사용되는 암조직 특이적 화합물, 특히 암세포 특이적 대사산물의 비한정의 일태양으로서 적합한지 여부가 검증되었다.

[2059] 실시예 14에서 나타내어진 키누레닌 존재하에서 항원에 대한 결합 활성을 갖는 항체 6RNMSC1-2_F02 및 음성 대조로서 GC413은 표 18에 나타내는 7 조건하에서 ELISA에 제공되었다. 또한 표 4에 나타내는 Buffer로 각 아미노

산 및 그 대사물이 표 18에 나타내어지는 농도로 적절히 조제되었다. 항원으로서 비오틴 표지된 hIL-6R이 사용되었다. ELISA는 실시예 11에 기재된 방법이 사용되었다.

[2060] 측정된 결과를 도 30에 나타내었다. 6RNMSC1-2_F02가 사용된 경우, 조건 1(키누레닌용액)에 있어서의 흡광도와 비교하여 조건 7(저분자 없음)에 있어서의 흡광도는 현저히 낮았다. 또한 마찬가지로 조건 5(3-히드록시키누레닌용액)에 있어서의 흡광도도 조건 1과 동일한 높은 흡광도를 나타낸 것으로부터, 6RNMSC1-2_F02는 키누레닌뿐 아니라 키누레닌의 대사물 존재하에서도 항원인 hIL-6R에 결합하는 항체인 것이 나타내어졌다. 또한 그 밖의 조건에서는 현저히 낮은 흡광도였던 것으로부터, 6RNMSC1-2_F02는 키누레닌의 전구체인 트립토판이 존재하고 있더라도 항원인 hIL-6R에 결합하지 않는 항체인 것이 나타내어졌다. 암 미소환경에 있어서는 트립토판을 대사하여 키누레닌을 생산하는 효소인 IDO의 발현이 상승되고 있는 것으로부터, 트립토판 존재하에서는 항원에 결합하지 않고, 키누레닌 및 그의 대사물 존재하에서 항원에 결합하는 항체인 것이 암 미소환경하에 있어서만 항원에 결합하는 항체로서 중요하다고 생각되었다. 또한 이 사실로부터 동일한 방법을 사용함으로써 1종류의 아미노산 대사물뿐 아니라 구조가 상이한 복수의 종류의 아미노산 대사물 존재하에 있어서 목적의 항원에 결합하는 항체를 취득하는 것이 가능할 것으로 생각되었다.

[2061] (15-2) 표면 플라즈몬 공명에 의한 인간 IL6 수용체에 대한 결합의 kynurenine의 영향 평가

[2062] Biacore T200(GE Healthcare)을 사용하여 6RNMSC1-2_F02와 인간 IL-6 수용체(IL-6R)의 항원 항체 반응의 상호작용이 해석되었다. 아민커플링법으로 protein A(Invitrogen)가 적당량 고정화된 Sensor chip CM5(GE Healthcare)에 목적의 항체를 캡처시켜 항원인 IL-6R을 상호작용시켰다. 러닝 버퍼에는 20 mmol/L ACES, 150 mmol/L NaCl, 0.05% (w/v) Tween20, pH 7.4가 사용되었다. 항원인 IL-6R과의 상호작용은 25℃에서 측정되고, IL-6R의 희석에는 러닝 버퍼, 러닝 버퍼에 100 μmol/L kynurenine을 첨가한 버퍼, 또한 비교 대조를 위해 러닝 버퍼에 10 mmol/L ATP를 첨가한 버퍼가 사용되었다.

[2063] IL-6R 희석액과 블랭크인 러닝 버퍼를 유속 10 μL/min로 1 분간 인젝트하여 센서칩 상에 캡처시킨 6RNMSC1-2_F02에 IL-6R을 상호작용시켰다. 그 후 유속 10 μL/min로 1 분간 러닝 버퍼를 흘려 IL-6R의 항체로부터의 해리가 관찰된 후, 10 mmol/L Glycine-HCl, pH 1.5를 유속 30 μL/min로 30초간 인젝트하여 센서칩이 재생되었다. 측정으로 얻어진 센서그램으로부터 산출된 키네틱스 파라미터인 결합속도상수 ka(1/Ms) 및 해리속도상수 kd(1/s)를 토대로 6RNMSC1-2_F02의 IL-6R에 대한 해리상수 K_D(M)가 산출되었다. 각 파라미터의 산출에는 Biacore T200 Evaluation Software(GE Healthcare)가 사용되었다.

[2064] 이 측정으로 취득된 100 μmol/L kynurenine 존재하, 10 mmol/L ATP 존재하 또는 비존재하에 있어서의 6RNMSC1-2_F02와 1 μmol/L의 IL-6R의 상호작용의 센서그램을 도 31에 나타내었다. 도 31에 나타내어진 바와 같이, 6RNMSC1-2_F02는 100 μmol/L의 kynurenine 존재하에서는 IL-6R에 결합하나, kynurenine 비존재하에서는 IL-6R에 대한 결합이 관찰되지 않았다. 이 사실로부터 6RNMSC1-2_F02는 kynurenine을 스위치로서 IL-6R에 결합하는 성질을 갖는 것이 확인되었다. 또한 100 μmol/L kynurenine 존재하에서의 6RNMSC1-2_F02의 해리상수 K_D는 1.5 μmol/L였다.

[2065] (15-3) 항체의 IL-6R로부터의 해리에 대한 kynurenine 스위치의 효과

[2066] Biacore T200(GE Healthcare)을 사용하여 kynurenine 존재하에서 IL-6R에 대해 결합한 6RNMSC1-2_F02가 kynurenine 존재하에서 kynurenine 농도 의존적으로 해리되는지가 평가되었다. 러닝 버퍼로서 20 mmol/L ACES, 150 mmol/L NaCl, 0.05% (w/v) Tween20, pH 7.4 및 20 mmol/L ACES, 150 mmol/L NaCl, 0.05% (w/v) Tween20, pH 7.4, 100 μmol/L kynurenine이 사용되고, 25℃에서 측정되었다. 아민커플링에 의해 IL-6R이 고정화된 센서칩 CM5에 100 μmol/L의 kynurenine을 포함하는 20 mmol/L ACES, 150 mmol/L NaCl, 0.05% (w/v) Tween20, pH 7.4로 희석된 5 μg/mL의 6RNMSC1-2_F02를 애널라이트로서 180초간 상호작용시킨 후, 각 러닝 버퍼 조건하에 있어서의 IL-6R의 해리의 모습이 관찰되었다. 각 러닝 버퍼 조건하에서의 해리 정도를 비교하기 위해 100 μmol/L kynurenine 존재하에서의 IL-6R에 대한 6RNMSC1-2_F02의 결합량을 100으로 하여 표준화(normalize)된 값이 비교되었다. 이 표준화된 후의 6RNMSC1-2_F02와 IL-6R의 상호작용의 모습을 나타낸 센서그램을 도 32에 나타내었다. 도 32의 결과로부터 6RNMSC1-2_F02는 kynurenine 존재하에서 IL-6R과 결합한 후, kynurenine이 존재하지 않게 되면 IL-6R을 신속하게 해리하는 성질을 갖는 것이 명확해졌다. 즉, 항체의 IL-6R에 대한 결합에 미치는 kynuerenine에 의한 제어는 가역적인 것이 확인되었다.

[2067] (15-4) IL-6R 결합에 대한 kynurenine 농도가 미치는 영향의 평가

[2068] 다음으로 Biacore T200(GE Healthcare)을 사용하여 6RNMSC1-2_F02와 IL-6R의 항원 항체 반응에 있어서의 kynurenine 농도의 영향이 평가되었다. 러닝 버퍼로서 20 mmol/L ACES, 150 mmol/L NaCl, 0.05% (w/v) Tween20, pH 7.4가 사용되고, 6RNMSC1-2_F02와 인간 IL-6R의 항원 항체 반응이 25℃에서 측정되었다. 센서칩 CM5 상에 아민커플링에 의해 IL-6R을 고정화하고, 각종 농도로 조제된 kynurenine을 포함하는 20 mmol/L ACES, 150 mmol/L NaCl, 0.05% (w/v) Tween20, pH 7.4로 희석된 1 μg/mL의 6RNMSC1-2_F02를 애널라이트로서 180초간 상호작용시켜 그 결합량의 변화가 관찰되었다. 그 결과를 도 33에 나타내었다. 이 결과로부터 스위치가 되는 kynurenine 농도가 높을수록, 6RNMSC1-2_F02는 IL-6R에 대해 보다 많이 결합하는 것이 명확해졌다.

[2069] 또한 이 평가 시스템에서는 IL-6R이 센서칩 상에 고정화되어 있기 때문에 6RNMSC1-2_F02가 2가로 결합하는 것으로 생각된다. 이러한 6RNMSC1-2_F02가 IL-6R을 2가로 인식하는 평가 시스템에 있어서도 kynurenine 농도가 높을수록 6RNMSC1-2_F02의 IL-6R의 결합량이 증가하는 것이 관찰되었다. 이 결과로부터 2가로의 결합에 있어서도 6RNMSC1-2_F02가 IL-6R에 대해 kynurenine을 스위치로서 결합하는 성질을 갖는 것이 명확해졌다.

[2070] 이들 결과로부터 6RNMSC1-2_F02는 kynurenine을 스위치로서 kynuerenine 존재하에서 IL-6R에 결합하고, kynurenine 비존재하에서는 IL-6R로부터 해리되는 항체인 것이 명확해졌다. 또한 6RNMSC1-2_F02는 kynurenine 비존재하에서는 IL-6R에 결합 활성을 나타내지 않는 완전한 ON/OFF 제어가 가능한 것이 확인되어, 도 2에 나타내는 바와 같은 양태로 스위치 기능을 하고 있는 것이 추찰되었다.

[2071] (15-5) 6RNMSC1-2_F02의 ADCC 활성에 대한 Kynurenine의 영향

[2072] 실시예 14에서 결정된 6RNMSC1-2_F02의 가변영역을 코드하는 유전자는 서열번호 : 90을 포함하는 중쇄 항체 정상영역과 서열번호 : 91을 포함하는 경쇄 kappa 정상영역 서열을 포함하는 인간 IgG1/Kappa의 동물 발현용 플라스미드로 삽입되었다. (중쇄의 서열은 서열번호 : 92로 표시되고, 경쇄의 서열은 서열번호 : 93으로 표시되는) 기지의 항인간 IL-6R 항체 MRA의 가변영역을 코드하는 유전자도, 상기(서열번호 : 90 및 91)의 정상영역을 갖는 인간 IgG1/Kappa의 동물 발현용 플라스미드로 각각 삽입되었다. 아래의 방법을 사용하여 항체가 발현되었다. FreeStyle 293 Expression Medium배지(Invitrogen)에 1.33×10^{6} 세포/mL의 세포밀도로 현탁되어, 6 well plate의 각 웰로 3 mL씩 파종된 인간 태아 신장세포 유래 FreeStyle 293-F주(Invitrogen)에 대해 리포펙션법에 의해 조제된 플라스미드가 도입되었다. CO_2 인큐베이터(37℃, 8% CO_2, 90 rpm)에서 4일간 배양된 배양상청으로부터, rProtein A Sepharose™ Fast Flow(Amersham Biosciences)를 사용하여 당업자 공지의 방법으로 항체가 정제되었다. 분광광도계를 사용하여 정제된 항체용액의 280 nm에서의 흡광도가 측정되었다. 얻어진 측정값으로부터 PACE법에 의해 산출된 흡광계수를 사용하여 정제된 항체의 농도가 산출되었다(Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

[2073] 실시예 14에서 나타내어진 키누레닌 존재하에서 항원에 대한 결합 활성을 갖는 항체 6RNMSC1-2_F02는 지금까지 가용형의 hIL-6R에 대한 결합이 평가되었다. 6RNMSC1-2_F02의 hIL-6R 발현 세포에 대한 ADCC 활성을 평가하기 위해 먼저 6RNMSC1-2_F02가 hIL-6R 발현 세포에 발현하는 막형 hIL-6R로의 결합능도 가지고 있는지 여부가 평가되었다. 구체적으로는 BaF/hIL-6R 세포주(WO2012/073992)에 대한 6RNMSC1-2_F02의 결합이 Flow cytometer를 사용하여 측정 및 해석되었다. 적절한 세포 수로 조제된 BaF/hIL-6R은 2% FBS in PBS로 얼음 위에서 1시간 이상 블로킹되었다. 블로킹된 세포는 원심분리에 의해 상청이 제거되고, 6RNMSC1-2_F02 또는 대조 항체 MRA(중쇄의 서열은 서열번호 : 92로 표시되고, 경쇄의 서열은 서열번호 : 93으로 표시된다)가 최종농도 100 μM의 Kynurenine 존재 또는 비존재하의 2개의 조건에서 100 μL 첨가되었다. 이때 얼음 위에서 30분간 항체를 세포막 상의 hIL-6R과 접촉시켰다. 세포와 항체의 복합체가 Kynurenine을 포함하는 Wash Buffer 또는 포함하지 않는 Wash Buffer로 세정되고, 다음으로 동 복합체와 항체의 정상영역을 인식하는 2차 항체(Beckman Coulter IM1627)를 Kynurenine의 존재하 또는 비존재하에서 접촉시켰다. 얼음 위에서 30분간 항체와 반응 후, 세포가 재차 Wash Buffer로 세정된 후 2% FBS in PBS에 재현탁되었다. 조제된 세포에 대한 6RNMSC1-2_F02의 결합이 BD FACS cant II Flow Cytometer(BD)로 측정 및 해석되었다.

[2074] 측정 결과를 도 34에 나타내었다. 대조 항체인 MRA는 Kynurenine의 존재 유무에 상관없이 형광 발색이 확인되는 것에 대해, 6RNMSC1-2_F02는 Kynurenine 100 μM 존재하에서 처음으로 형광의 시프트가 보이고, Kynurenine 비존재하에서는 형광의 발색이 확인되지 않는 것으로부터, 6RNMSC1-2_F02는 Kynurenine 존재하에서는 세포막 상에 발현하고 있는 hIL-6R에 대해 결합능을 갖는 항체인 것이 나타내어졌다.

[2075] 통상 천연형 항체는 표적 세포 상의 항원과 항체의 Fab가 직접 결합하고 또한 이펙터 세포 상의 FcγR과 항체의 Fc가 결합함으로써, 이펙터 세포로부터 표적 세포에 대해 세포상해 활성(ADCC 활성)이 유도된다. 이에 6RNMSC1-

2_F02가 Kynurenine 존재하에서 hIL-6R에 결합함으로써 hIL-6R을 발현하는 세포에 대해 ADCC 활성이 발휘되는지가 아래의 방법으로 검증되었다.

[2076] 6RNMSC1-2_F02의 이펙터 작용 증강 개변체(중쇄의 서열은 서열번호 : 94, 경쇄 서열번호 : 91로 표시된다)가 사용되었다. 참고예 1의 방법에 따라 Kynurenine의 존재 또는 비존재하에 있어서의 hIL-6R을 발현하는 세포에 대한 상이한 농도의 6RNMSC1-2_F02에 의한 ADCC 활성이 측정되었다. 측정된 결과를 도 35에 나타내었다.

[2077] 측정 결과, hIL-6R을 발현하는 세포에 대한 Kynurenine 존재하에 있어서6RNMSC1-2_F02에 의한 항체 농도 의존적인 ADCC 활성이 확인되었다. 이 결과로부터 Kynurenine을 매개로 한 항원과 항체의 결합에 의해 당해 항체에 따른 항원을 발현하는 세포에 대한 ADCC 활성이 유도되는 것으로부터, 스위치가 되는 저분자 분자 존재하에서 항원과 결합하는 항체가 ADCC 활성 등의 항종양 활성이라는 기능도 또한 스위치가 되는 저분자의 유무로 제어하는 것이 가능한 것이 명확해졌다.

[2078] 또한 정상 조직 중의 Kynurenine 농도와 종양 조직 중의 그것에 농도차가 있는 것으로부터, 종양 조직 중 Kynurenine 농도에서만 항원을 발현하는 종양세포에 대해 항체에 의한 ADCC 활성이 발휘되고, 정상 조직 중의 농도에서는 ADCC 활성이 발휘되지 않거나 또는 감약되는 것이 바람직하다. 이에 참고예 2의 방법에 따라 상이한 Kynurenine 농도에 있어서의 6RNMSC1-2_F02에 의한 hIL-6R을 발현하는 세포에 대한 ADCC 활성이 측정되었다. 측정 결과를 도 36에 나타내었다. 측정 결과, Kynurenine 농도 의존적으로 hIL-6R을 발현하는 세포에 대한 6RNMSC1-2_F02에 의한 ADCC 활성이 확인되었다. 또한 정상 조직 중의 Kynurenine 농도로서 생각되는 4~6 μM에서는 ADCC 활성이 약 10%인 것에 대해 종양 조직 중의 Kynurenine 농도로서 생각되는 30~40 μM에서는 ADCC 활성이 약 25%였다.

[2079] 이들 결과로부터 Kynurenine 농도가 낮은 정상 조직에서는 hIL-6R을 발현하는 세포에 대한 6RNMSC1-2_F02에 의한 ADCC 활성은 약하고, 농도가 높은 종양 조직에서는 hIL-6R을 발현하는 세포에 대한 6RNMSC1-2_F02에 의한 ADCC 활성은 보다 강하였다. 이상으로부터 Kynurenine을 스위치로 하는 항체를 투여함으로써 표적 항원이 발현되고 있는 종양 조직에 대한 약효가 유지되는 한편으로, 표적 항원이 발현되고 있는 정상 조직에 대한 독성이 경감될 수 있는 것이 나타내어졌다.

[2080] (15-6) IgG ELISA에 의한, 취득된 항체의 마우스 혈청 중에 있어서의 hIL-6R에 대한 결합 활성의 평가

[2081] 실시예 14에서 취득된 저분자 존재하에서 hIL-6R에 결합하는 항체 6RNMSC1-2_F02는 키누레닌 존재하에서 hIL-6R에 결합하는 항체이다. 지금까지 6RNMSC1-2_F02는 PBS 또는 TBS 등의 버퍼 중에서 항원으로의 결합능이 평가되어 왔다. 마우스 혈청 중에는 아미노산을 비롯하여 미지의 저분자가 다수 존재하는 것으로 생각되어, 그들 저분자에 의해 6RNMSC1-2_F02의 항원 결합에 영향을 미칠 가능성은 부정할 수 없다. 이에 마우스 혈청 중에 있어서의 6RNMSC1-2_F02의 항원 결합능이 평가되었다.

[2082] 실시예 14에서 나타내어진 키누레닌 존재하에서 항원에 대한 결합 활성을 갖는 항체 6RNMSC1-2_F02 및 기지의 항hIL-6R 항체 MRA는 표 20에 나타내어지는 2개의 조건하에서 ELISA에 제공되었다. 항원으로서 비오틴 표지된 hIL-6R이 사용되었다.

표 20

[2083]

조건	Buffer 조성
1	마우스 혈청
2	마우스 혈청, 100μM Kynurenine

[2084] 먼저 StreptaWell 96 마이크로타이터 플레이트(Roche)가 비오틴 표지 항원을 포함하는 100 μL의 PBS로 실온에서 1시간 이상 코트되었다. 당해 플레이트의 각 웰을 Wash buffer로 세정함으로써 플레이트로 결합되어 있지 않은 항원이 제거된 후, 당해 웰이 Blocking Buffer 250 μL로 1시간 이상 블로킹되었다. Blocking Buffer가 제거된 각 웰에 표 20에 나타내어지는 조건 2로 2.5 μg/mL로 조제된 정제 IgG의 각 100 μL가 첨가된 당해 플레이트를 실온에서 1시간 정치함으로써 각 IgG를 각 웰에 존재하는 항원에 결합시켰다. 100 μM의 Kynurenine을 포함하는 Wash Buffer로 세정된 후에, Kynurenine을 포함하는 Sample Buffer에 의해 해석된 HRP 결합 항인간 IgG 항체(BIOSOURCE)가 각 웰에 첨가된 플레이트가 1시간 인큐베이트되었다. Kynurenine을 포함하는 Wash Buffer로 세정 후, TMB single용액(ZYMED)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후, 450

nm의 흡광도에 의해 당해 발색이 측정되었다.

[2085] 측정된 결과를 도 37에 나타내었다. MRA가 사용된 경우 Kynurenine의 유무에 상관없이 흡광도가 동일한 것에 대해, 6RNMSC1-2_F02가 사용된 경우 표 20에 나타내어지는 조건 2(키누레닌이 존재하는 마우스 혈청)에 있어서의 흡광도와 비교하여 조건 1(키누레닌이 존재하지 않는 마우스 혈청)에 있어서의 흡광도는 현저히 낮았다. 이 사실로부터 6RNMSC1-2_F02는 마우스 혈청 중의 미지의 저분자에 영향을 받지 않고, 키누레닌 존재하에서 항원인 hIL-6R에 결합하는 항체인 것이 나타내어졌다.

[2086] 〔실시예 16〕파지 디스플레이 기술을 사용한 항체 라이브러리로부터의 아데노신, ATP 비존재하에 있어서 항원에 결합하는 항체의 취득

[2087] (16-1) 아데노신 및 ATP의 혼합물을 이용한 라이브러리로부터의 저분자 존재하에 있어서 항원으로의 결합이 저해되는 항체의 취득

[2088] 전술한 실시예에 있어서 스위치가 되는 저분자의 존재하에서 표적 항원에 결합하는 항체가 취득되었다. 본 실시예에 있어서는 저분자 비존재하에 있어서 표적 항원에 결합하는 항체의 취득이 시도되었다.

[2089] 구축된 합리적 디자인 항체 파지 디스플레이 라이브러리로부터, 항원에 대해 아데노신 및/또는 ATP 비존재 조건하에서 항원에 대한 결합 활성을 나타내고 존재하에서 결합능이 감쇠하는 항체가 취득되었다. 취득을 위해 먼저 항체 파지 디스플레이 라이브러리를 비오틴화 아데노신 및 ATP-NeutrAvidin과 접촉시켜, 아데노신 및/또는 ATP에 결합하는 항체 파지 디스플레이 라이브러리가 회수되었다. 다음으로 당해 항체 파지 디스플레이 라이브러리를 아데노신 및 ATP 비존재 조건하에서 비오틴화 항원-스트렙트아비딘과 접촉시켜, 아데노신 및 ATP 비존재하에서 항원에 결합하는 항체가 회수되었다. 이러한 패닝을 번갈아 행함으로써 아데노신 및/또는 ATP와, 항원의 양자에 대해 결합 활성을 갖는 항체가 스크리닝되었다. 이러한 성질을 갖는 항체는 아데노신 및 ATP 존재하에 있어서는 아데노신 및/또는 ATP의 항체로의 결합에 의해 항체의 항원으로의 결합이 저해되는 것이 기대되었다.

[2090] 구축된 파지 디스플레이용 파지미드를 보유하는 대장균으로부터 파지가 생산되었다. 파지 생산이 행해진 대장균의 배양액에 2.5M NaCl/10% PEG를 첨가함으로써 침전시킨 파지의 집단을 TBS로 희석함으로써 파지 라이브러리액이 얻어졌다. 다음으로 파지 라이브러리액에 최종농도 4%가 되도록 BSA가 첨가되었다. 자기 비드로서 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 또는 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)를 사용하고, 자기 비드에 고정화된 항원을 사용하는 패닝이 실시되었다.

[2091] 조제된 파지 라이브러리액에 500 pmol의 비오틴화 ATP, 2'-Adenosine-PEG-Biotin 및 5'-Adenosine-PEG-Biotin을 첨가함으로써 당해 파지 라이브러리액과 아데노신 및 ATP를 실온에서 60분간 접촉시켰다. 다음으로 파지 라이브러리액에 BSA로 블로킹된 자기 비드가 첨가되고, 아데노신 및/또는 ATP와 파지의 복합체를 자기 비드와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비드는 TBS로 1회 세정되었다. 그 후 1 mg/mL의 트립신용액 0.5 mL가 첨가되었다.

[2092] 비드는 실온에서 15분 현탁된 후, 그 자리에서 자기 스탠드를 사용하여 분리된 비드로부터 파지용액이 회수되었다. 회수된 파지용액이 대수증식기(OD600이 0.4-0.7)가 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37℃에서 1시간 완만하게 상기 대장균의 교반배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염시킨 대장균은 225 mm×225 mm의 플레이트에 파종되었다. 다음으로 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리액이 조제되었다.

[2093] 2회째의 패닝에서는 아데노신 및 ATP 비존재 조건하에서 비오틴화 항원에 대해 결합 가능한 파지의 농축이 행해졌다. 구체적으로는, 조제된 파지 라이브러리액에 250 pmol의 비오틴화 항원을 첨가함으로써 당해 파지 라이브러리액을 항원과 실온에서 60분간 접촉시켰다. 다음으로 파지 라이브러리액에 BSA로 블로킹된 자기 비드가 첨가되고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비드와 실온에서 15분간 결합시켰다. TBST로 2회, TBS로 비드는 1회 세정되었다. 그 후 1 mg/mL의 트립신용액 0.5 mL가 첨가된 비드는 실온에서 15분 현탁된 후, 그 자리에서 자기 스탠드를 사용하여 분리된 비드로부터 파지용액이 회수되었다. 회수된 파지용액이 대수증식기(OD600이 0.4-0.7)가 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37℃에서 1시간 완만하게 상기 대장균의 교반배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염시킨 대장균은 225 mm×225 mm의 플레이트에 파종되었다. 다음으로 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리액이 조제되었다.

[2094] 그 후, 홀수회의 패닝에 있어서는 1회째의 패닝과 동일한 조건에 의한 패닝이 반복 실시되었다. 다만 TBST 및 TBS에 의한 비드의 세정은 각각 3회, 2회로 늘려 실시되었다.

[2095] 그 후, 짝수회의 패닝에 있어서는 2회째의 패닝과 동일한 조건에 의한 패닝이 반복 실시되었다. 다만 4회째 이후의 패닝에서는 비오틴화 항원을 40 pmol로 줄이고, TBST 및 TBS에 의한 비드의 세정은 각각 3회, 2회로 늘려 실시되었다.

[2096] (16-2) 파지 ELISA에 의한 저분자 존재하에 있어서의 결합 활성의 평가

[2097] 상기 방법에 의해 얻어진 대장균의 싱글 콜로니로부터 통상의 방법(Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145)에 따라 파지 함유 배양상청이 회수되었다. NucleoFast 96(MACHEREY-NAGEL)을 사용하여 회수된 배양상청은 한외여과되었다. 배양상청 각 100 μL가 각 웰에 어플라이된 NucleoFast 96을 원심분리(4,500 g, 45분간)함으로써 통과액이 제거되었다. 100 μL의 H_2O가 각 웰에 첨가된 당해 NucleoFast 96이 재차 원심분리(4,500 g, 30분간 원심)에 의해 세정되었다. 마지막으로 TBS 100 μL가 첨가되고, 실온에서 5분간 정치된 당해 NucleoFast 96의 각 웰의 상청에 포함되는 파지액이 회수되었다.

[2098] TBS 또는 ATP 및 아데노신/TBS가 첨가된 정제 파지가 아래의 절차로 ELISA에 제공되었다. StreptaWell 96 마이크로타이터 플레이트(Roche)가 비오틴 표지 항원을 포함하는 100 μL의 TBS로 하룻밤 코트되었다. 당해 플레이트의 각 웰을 TBST로 세정함으로써 항원이 제거된 후, 당해 웰이 250 μL의 2% SkimMilk-TBS로 1시간 이상 블로킹되었다. 2% SkimMilk-TBS를 제거하고, 그 후 각 웰에 조제된 정제 파지가 첨가된 당해 플레이트를 37℃에서 1시간 정치함으로써, 파지를 제시하는 항체를 각 웰에 존재하는 항원에 아데노신 및 ATP 10 mM 존재하 또는 비존재하에 있어서 결합시켰다. TBST 또는 10 mM ATP 및 아데노신/TBST로 세정된 각 웰에 TBS 또는 10 mM ATP 및 아데노신/TBS에 의해 해석된 HRP 결합 항M13 항체(Amersham Pharmacia Biotech)가 첨가된 플레이트를 1시간 인큐베이트시켰다. TBST 또는 10 mM ATP 및 아데노신/TBST로 세정 후, TMB single용액(ZYMED)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후, 450 nm의 흡광도에 의해 당해 발색이 측정되었다.

[2099] 단리된 96 클론을 사용하여 파지 ELISA를 행함으로써 합리적 디자인 항체 라이브러리로부터, ATP 및 아데노신 비존재하에서 항원인 인간 IL-6에 대해 결합 활성을 나타내는 클론 「I6RLSA1-6_011」, ATP 및 아데노신 비존재하에서 항원인 Human Serum Albumin(HSA)에 대해 결합 활성을 나타내는 클론 「HSADSA1-6_020」,및 ATP 및 아데노신 비존재하에서 인간 IL-6 receptor에 대해 결합 활성을 나타내는 클론 「6RRLSA1-6_037」, 「6RRLSA1-6_045」가 얻어졌다(도 38, 39, 45).

[2100] (16-3) 아데노신 및 ATP를 스위치로 하는 항체의 서열 해석

[2101] (16-2)에서 나타내어지는 파지 ELISA의 결과, 아데노신 또는 ATP의 비존재 조건하에서 항원에 대한 결합 활성이 있는 것으로 판단된 클론으로부터 특이적인 프라이머(서열번호 : 111 및 112)를 사용하여 증폭된 유전자의 염기서열이 해석되었다. 해석의 결과에 대해서 아래의 표 21에 아미노산 서열을 나타내었다.

표 21

[2102]

클론명	중쇄 서열번호	경쇄 서열번호
I6RLSA1-6_011	서열번호 : 95	서열번호 : 96
HSADSA1-6_020	서열번호 : 97	서열번호 : 98
6RRLSA1-6_037	서열번호 : 106	서열번호 : 107
6RRLSA1-6_045	서열번호 : 108	서열번호 : 109

[2103] 〔실시예 17〕 다가 제시 파지 디스플레이 기술을 사용한 항체 라이브러리로부터의 아데노신, ATP 존재하에 있어서 항원에 결합하는 항체의 취득

[2104] (17-1) 다가 제시를 이용한 라이브러리로부터의 저분자 존재하에 있어서 항원에 결합하는 항체의 취득

[2105] 파지로의 항체의 다가 제시를 이용하여 합리적 디자인 항체 파지 디스플레이 라이브러리로부터 항원에 대해 아데노신 및/또는 ATP 존재하에 있어서 결합 활성을 나타내는 항체가 취득되었다. 라이브러리로부터의 항체 취득에 있어서 저분자 존재하와 비존재하에 있어서의 항원으로의 결합능비가 클수록 취득 확률이 높아진다. 이에 저분자 존재하에 있어서 결합능을 갖는 항체를 효율적으로 회수하기 위해 겉보기 결합능의 증강을 이용한 패닝이 실시되었다. 보다 구체적으로는, 파지에 대해 항체를 다가로 제시시킴으로써 어비디티 효과(다가에 의한 항원으

로의 결합 효과)에 의해 겉보기 결합능이 증강되었다. 먼저 합리적 디자인 항체 파지 디스플레이 라이브러리를 아데노신 및 ATP 존재하에서 비오틴화 항원에 접촉시켜, 아데노신 및 ATP 존재하에서 항원에 결합하는 항체 파지 디스플레이 라이브러리가 회수되었다. 다음으로 Rondot(Nat. Biotechnol. (2001) 19, 75-78)에 기재된 방법을 참조하여 회수된 항체 파지 디스플레이 라이브러리를 감염시킨 대장균에 대해 pIII를 코드하는 유전자를 결실시킨 헬퍼 파지를 감염시켜, 모든 pIII에 항체가 제시되어 있는 항체 다가 제시 파지 디스플레이 라이브러리가 조제되었다. 이 항체 다가 제시 파지 디스플레이 라이브러리를 아데노신 및 ATP 존재 조건하에서 비오틴화 항원-스트렙트아비딘과 접촉시켜서 회수한 후, 아데노신 및 ATP 비존재 조건하에서 비드로부터 용출된 용출액 중에 파지가 회수되었다. 이러한 파지 조제 및 패닝을 복수 회 행함으로써 아데노신 및/또는 ATP 존재하에서만 항원에 결합 활성을 갖는 항체가 스크리닝되었다.

[2106] 구축된 파지 디스플레이용 파지미드를 보유하는 대장균에 헬퍼 파지 M13KO7을 감염시키고 30℃에서 하룻밤 배양함으로써 항체 1가 제시 파지 디스플레이 라이브러리가 생산되었다. 파지 생산이 행해진 대장균의 배양액에 2.5M NaCl/10% PEG를 첨가함으로써 침전시킨 파지의 집단을 TBS로 희석함으로써 파지 라이브러리액이 얻어졌다. 다음으로 파지 라이브러리액에 최종농도 4%가 되도록 BSA가 첨가되었다. 자기 비드로서 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 또는 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)를 사용하여 자기 비드에 고정화되는 항원을 사용하는 패닝이 실시되었다.

[2107] 조제된 파지 라이브러리액에 항원으로서 500 pmol의 비오틴 표지 인간 IgA-Fc(서열번호 : 99) 및 각 최종농도 1 mM의 ATP-Na 및 아데노신을 첨가함으로써 당해 파지 라이브러리액을 실온에서 60분간 항원, 아데노신 및 ATP와 접촉시켰다. 당해 파지 라이브러리액에 BSA로 블로킹된 자기 비드가 첨가되고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비드와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비드는 ATP 및 아데노신을 용해한 TBS로 1회 세정되었다. 그 후 1 mg/mL의 트립신 0.5 mL가 첨가된 비드는 실온에서 15분 현탁된 후, 그 자리에서 자기 스탠드를 사용하여 분리된 비드로부터 파지용액이 회수되었다. 회수된 파지용액이 대수증식기(OD600이 0.4-0.7)가 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37℃에서 1시간 완만하게 상기 대장균의 교반배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염시킨 대장균은 225 mm×225 mm의 플레이트에 파종되었다. 다음으로 파종된 대장균의 배양액에 대해 헬퍼 파지 M13KO7 또는 M13KO7△pIII(하이퍼파지로 호칭된다)(PROGEN Biotechnik)를 감염시켜 30℃에서 하룻밤 배양한 상청으로부터 파지를 회수함으로써, 각각 항체 1가 제시 파지 라이브러리 및 항체 다가 제시 파지 라이브러리액이 조제되었다.

[2108] 1회째의 패닝에서는 아데노신 및 ATP 존재하에서 항원에 대해 결합 가능한 파지의 회수가 행해졌는데, 2회째 이후의 패닝에서는 아데노신 및 ATP 존재하에서만 항원에 대해 결합 가능한 파지의 농축이 행해졌다. 구체적으로는, 조제된 파지 라이브러리액에 250 pmol의 비오틴 표지 항원 및 각 최종농도 1 mM의 아데노신 및 ATP를 첨가함으로써 파지 라이브러리를 실온에서 60분간 항원, 아데노신 및 ATP와 접촉시켰다. BSA로 블로킹된 자기 비드가 첨가되고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비드와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비드는 1 mL의 아데노신 및 ATP를 용해하는 TBST(이하, (아데노신+ATP)/TBST라 불린다)와 아데노신 및 ATP를 용해하는 TBS(이하, (아데노신+ATP)/TBS라 불린다)로 세정되었다. 그 후 0.5 mL의 TBS가 첨가된 비드가 실온에서 현탁된 후, 그 자리에서 자기 스탠드를 사용하여 분리된 비드로부터 파지용액이 회수되었다. 이 작업이 재차 반복된 후, 2회로 나눠 용출된 파지액이 혼합되었다. 회수된 파지용액에 100 mg/mL의 트립신 5 μL를 첨가함으로써 Fab를 제시하지 않는 파지의 pIII 단백질(헬퍼 파지 유래의 pIII 단백질)이 절단되고, Fab를 제시하지 않는 파지의 대장균에 대한 감염능이 상실되었다. 트립신 처리된 파지용액으로부터 회수된 파지가 대수증식기(OD600이 0.4-0.7)가 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37℃에서 1시간 완만하게 상기 대장균의 교반배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염시킨 대장균은 225 mm×225 mm의 플레이트에 파종되었다. 다음으로 파종된 대장균의 배양액으로부터 1회째의 패닝과 동일하게 파지를 회수함으로써, 항체 1가 제시 파지 라이브러리 및 항체 다가 제시 파지 라이브러리액이 회수되었다. 아데노신 및 ATP 존재하에서 항원에 대한 결합 활성을 갖는 항체를 취득하는 패닝이 3회 반복되었다. 다만 3회째 이후의 패닝에서는 비오틴화 항원은 40 pmol 사용되었다.

[2109] (17-2) 파지 ELISA에 의한 아데노신 및/또는 ATP의 존재 및 비존재하에 있어서의 결합 활성 평가

[2110] 상기 방법에 의해 얻어진 대장균의 싱글 콜로니로부터 통상의 방법(Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145)에 따라 파지 함유 배양상청이 회수되었다. NucleoFast 96(MACHEREY-NAGEL)을 사용하여 회수된 배양상청이 한외여과되었다. 배양상청 각 100 μL가 각 웰에 어플라이된 NucleoFast 96을 원심분리(4,500 g, 45분간)함으로써 통과액이 제거되었다. 100 $\mu\ell$의 H_2O가 각 웰에 첨가된 당해 NucleoFast 96이 재차 원심분리(4,500 g, 30분간)에 의해 세정되었다. 마지막으로 TBS 100 μL가 첨가되어 실온에서 5분간 정치된 당해 NucleoFast 96의

각 웰의 상청에 포함되는 파지액이 회수되었다.

[2111] TBS 또는 (아데노신+ATP)/TBS가 첨가된 정제 파지가 아래의 절차로 ELISA에 제공되었다. StreptaWell 96 마이크로타이터 플레이트(Roche)가 비오틴 표지 항원을 포함하는 100 μL의 TBS로 하룻밤 코트되었다. 당해 플레이트의 각 웰을 TBST로 세정함으로써 항원이 제거된 후, 당해 웰이 250 μL의 2% SkimMilk-TBS로 1시간 이상 블로킹되었다. 2% SkimMilk-TBS를 제거하고, 그 후 각 웰에 조제된 정제 파지가 첨가된 당해 플레이트를 1시간 정치함으로써 항체를 제시한 파지를 각 웰에 존재하는 항원에 아데노신 및 ATP의 비존재 및 존재하에 있어서 결합시켰다. TBST 또는 (아데노신+ATP)/TBST로 세정된 각 웰에 TBS 또는 (아데노신+ATP)/TBS에 의해 해석된 HRP 결합 항M13 항체(Amersham Pharmacia Biotech)가 첨가된 플레이트를 1시간 인큐베이트시켰다. TBST 또는 (아데노신+ATP)/TBST로 세정 후, TMB single용액(ZYMED)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후, 450 nm의 흡광도에 의해 당해 발색이 측정되었다. 그 결과, 항체 다가 제시 파지 디스플레이 라이브러리에 있어서 저분자 존재하에서 결합 활성을 갖는 항체가 보다 많이 취득되었다(도 40, 41). 이 사실로부터 항체 다가 제시 파지 디스플레이법을 사용함으로써 보다 효율적으로 저분자 존재하에서 결합 활성을 갖는 항체가 취득 가능한 것이 시사되었다. 파지 ELISA의 결과를 아래의 표 22에 나타내었다.

표 22

[2112]

	1가 제시	다가 제시
패닝 횟수	4	4
ELISA 실시 클론 수	96	96
양성 클론 수(흡광도 >0.1)	6	28
의존성 클론 수 (SM+/-비>1.3)	1	19
의존성 클론 서열 수	1	5

[2113] (17-3) 아데노신 및 ATP를 스위치로 하는 항체의 결합능의 평가 및 서열 해석

[2114] (17-2)에서 나타내어지는 파지 ELISA의 결과, 아데노신 및 ATP가 존재하는 조건하에서 항원에 대한 결합 활성이 있는 것으로 판단된 클론으로부터 특이적인 프라이머(서열번호 : 111 및 112)를 사용하여 증폭된 유전자의 염기서열이 해석되었다. 그 결과, 아데노신 및 ATP 존재하에서 항원에 대한 결합 활성을 나타내는 클론 「IADL3C5-4_048(중쇄서열번호 : 100, 경쇄서열번호 : 101)」이 취득되었다(도 42).

[2115] [실시예 18] 라이브러리로부터 취득된 ATP/아데노신 의존성 항체의 캐릭터리제이션

[2116] (18-1) 라이브러리로부터 취득된 ATP/아데노신 의존성 항체의 조제

[2117] 실시예 10에서 취득된 ATP 또는 아데노신 존재하에서 비오틴 표지 hIL-6R에 대한 결합 활성을 갖는 것으로 판단된 클론 6RAD2C1-4_001, 6RAD2C1-4_005, 6RAD2C1-4_011, 6RAD2C1-4_026, 6RAD2C1-4_030, 6RAD2C1-4_042, 6RAD2C1-4_076, 6RDL3C1-4_085, 6RDL3C5-4_011로부터 특이적인 프라이머를 사용하여 증폭된 유전자의 염기서열이 해석되었다(표 23).

표 23

클론명	중쇄 서열번호	경쇄 서열번호
6RAD2C1-4_001	서열번호 : 113	서열번호 : 114
6RAD2C1-4_005	서열번호 : 115	서열번호 : 116
6RAD2C1-4_011	서열번호 : 82	서열번호 : 83
6RAD2C1-4_026	서열번호 : 117	서열번호 : 118
6RAD2C1-4_030	서열번호 : 119	서열번호 : 120
6RAD2C1-4_042	서열번호 : 121	서열번호 : 122
6RAD2C1-4_076	서열번호 : 84	서열번호 : 85
6RDL3C1-4_085	서열번호 : 123	서열번호 : 124
6RDL3C5-4_011	서열번호 : 125	서열번호 : 126

[2118]

[2119] 6RAD2C1-4_001, 6RAD2C1-4_005, 6RAD2C1-4_011, 6RAD2C1-4_026, 6RAD2C1-4_030, 6RAD2C1-4_042, 6RAD2C1-4_076, 6RDL3C1-4_085, 6RDL3C5-4_011의 가변영역 서열은 서열번호 : 90을 갖는 중쇄 항체 정상영역과 서열번호 : 91을 갖는 경쇄 kappa 정상영역 서열을 갖는 인간 IgG1/Kappa의 동물 발현용 플라스미드로 삽입되었다. 아래의 방법을 사용하여 항체가 발현되었다. FreeStyle 293 Expression Medium배지(Invitrogen)에 1.33×10^{6} 세포/mL의 세포밀도로 현탁되어 6 well plate의 각 웰로 3 mL씩 파종된 인간 태아 신장세포 유래 FreeStyle 293-F주(Invitrogen)에 대해 조제된 플라스미드가 리포펙션에 의해 도입되었다. CO_2 인큐베이터(37℃, 8% CO_2, 90 rpm)에서 4일간 배양된 배양상청으로부터 rProtein A Sepharose™ Fast Flow(Amersham Biosciences)를 사용하여 당업자 공지의 방법으로 항체가 정제되었다. 분광광도계를 사용하여 정제된 항체용액의 280 nm에서의 흡광도가 측정되었다. 얻어진 측정값으로부터 PACE법에 의해 산출된 흡광계수를 사용하여 정제된 항체의 농도가 산출되었다(Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

[2120] (18-2) 표면 플라즈몬 공명에 의한 인간 IL6 수용체에 대한 결합의 각종 저분자의 영향 평가

[2121] Biacore T200(GE Healthcare)을 사용하여 라이브러리로부터 취득된 ATP/아데노신 의존성 항체 9 클론(6RAD2C1-4_001, 6RAD2C1-4_005, 6RAD2C1-4_011, 6RAD2C1-4_026, 6RAD2C1-4_030, 6RAD2C1-4_042, 6RAD2C1-4_076, 6RDL3C1-4_085, 6RDL3C5-4_011)과 IL-6R의 항원 항체 반응에 있어서의 각종 저분자의 영향이 평가되었다. 러닝 버퍼로서 20 mmol/L ACES, 150 mmol/L NaCl, 0.05% (w/v) Tween20, pH 7.4가 사용되고, 25℃에서 측정되었다. 센서칩 CM5 상에 아민커플링에 의해 IL-6R을 고정화하고 항체를 애널라이트로서 120초간 상호작용시켜 그 결합량의 변화가 관찰되었다. 항체의 희석은 러닝 버퍼 및 러닝 버퍼에 ATP, ADP, AMP, cAMP 또는 아데노신(ADO) 중 어느 하나가 각각 첨가된 버퍼가 사용되어, 각 저분자의 최종농도가 1 mM, 항체의 최종농도가 1 μM가 되도록 조제되었다. 또한 1 mM ATP 조건하에서는 여러 단계의 항체의 농도 계열을 측정하여, 항체 농도에 대한 평형값의 플롯으로부터 각 클론의 IL-6R에 대한 해리상수 K_D(mol/L)가 산출되었다. 파라미터의 산출에는 Biacore T200 Evaluation Software(GE Healthcare)가 사용되었다. 1 mM ATP 존재하에서의 각 클론의 해리상수 K_D를 표 24에 나타내었다.

표 24

[2122]

클론명	해리상수 K_D (mol/L)
6RAD2C1-4_01	3.0E-07
6RAD2C1-4_05	3.4E-07
6RAD2C1-4_11	2.3E-07
6RAD2C1-4_26	2.1E-07
6RAD2C1-4_30	3.3E-07
6RAD2C1-4_42	2.5E-07
6RAD2C1-4_76	2.5E-07
6RDL3C1-4_85	3.9E-07
6RDL3C5-4_11	1.3E-07

[2123] 이 측정으로 취득된 1 mM의 각 저분자 존재하 또는 비존재하에 있어서의 각 클론의 IL-6R에 대한 결합량을 도 43에 나타내었다. 도 43에 나타내어진 바와 같이, 각 클론은 1 mM ATP 존재하에서는 IL-6R에 결합하나, ATP 비존재하에서는 IL-6R에 대한 결합이 관찰되지 않았다. 이 사실로부터 ATP를 스위치로서 IL-6R에 결합하는 성질을 갖는 것이 확인되었다. ATP 이외의 저분자에 있어서는 전체 클론에 있어서 ADP 존재하에서 결합이 관찰되고, 일부의 클론에 있어서 AMP 및 cAMP 존재하에서의 결합도 관찰되었다. ADO 존재하에서는 IL-6R로의 결합은 관찰되지 않았다.

[2124] 합리적 디자인 라이브러리를 사용함으로써 ATP, ADP, AMP, cAMP의 하나 또는 어느 하나의 존재하에서 표적 항원에 결합하는 항체를 취득하는 것이 가능한 것이 나타내어졌다. 본 실시예에 있어서는 디자인 라이브러리의 설계 시에 참조된 항체인 ATNLSA1-4_D12가 결합하는 ATP와 ADO 공존하에서 패닝이 행해졌는데, 그 결과, ATNLSA1-4_D12가 보다 강하게 결합하는 ATP 존재하에서 표적 항원에 강하게 결합하는 항체가 취득되고, ATNLSA1-4_D12가 ATP보다 약하게 결합하는 ADO 존재하에서 표적 항원에 강하게 결합하는 항체가 취득되지 않았다. 목적하는 저분자만 존재하는 조건하에서 항원과 라이브러리를 접촉시켜서 항원에 결합하는 항체를 단리함으로써 당해 저분자에만 의존하여 항원에 결합하는 항체를 취득하는 것이 가능하다. 예를 들면 ADO만의 존재하에서 패닝함으로써 본 라이브러리로부터 ADO 존재하에서 결합하는 항체를 효율적으로 취득하는 것이 가능할 것으로 생각된다.

[2125] (18-3) 취득된 항체의 ADCC 활성에 대한 ATP의 영향

[2126] 취득된 항체 6RAD2C1-4_030, 6RAD2C1-4_011이 Adenosine Triphosphate(ATP) 존재하에서 hIL-6R에 결합함으로써, hIL-6R을 발현하는 세포에 대해 ADCC 활성이 발휘되는지가 아래의 방법에 의해 검증되었다. 본 검증에는 실시예 18-1에서 제작된 6RAD2C1-4_030의 이펙터 작용 증강 개변체(중쇄 항체 가변영역 : 서열번호 119, 경쇄 항체 가변영역 : 서열번호 120, 중쇄 항체 정상영역 : 서열번호 90, 경쇄 항체 정상영역 : 서열번호 91), 6RAD2C1-4_011의 이펙터 작용 증강 개변체(중쇄 항체 가변영역 : 서열번호 82, 경쇄 항체 가변영역 : 서열번호 83, 중쇄 항체 정상영역 : 서열번호 90, 경쇄 항체 정상영역 : 서열번호 91), 및 실시예 15-5에서 제작된 기지의 항인간 IL-6R 항체 MRA(중쇄 항체 가변영역 : 서열번호 92, 경쇄 항체 가변영역 : 서열번호 92, 중쇄 항체 정상영역 : 서열번호 90, 경쇄 항체 정상영역 : 서열번호 91)가 사용되었다. 참고예 3의 방법에 따라 ATP 존재 또는 비존재하에 있어서의 hIL-6R을 발현하는 세포에 대한, 상이한 항체 농도의 6RAD2C1-4_030, 6RAD2C1-4_011, MRA에 의한 ADCC 활성이 측정되었다. 측정된 결과를 도 44에 나타내었다.

[2127] 측정 결과, ATP 존재하에 있어서 6RAD2C1-4_030, 6RAD2C1-4_011에 의한 항체 농도 의존적인 ADCC 활성이 확인되었다. 이 결과로부터 Kynurenine뿐 아니라 ATP를 매개로 한 항원과 항체의 결합에 의해서도 당해 항체에 따른 항원을 발현하는 세포에 대한 ADCC 활성이 유도되는 것으로부터, 스위치가 되는 저분자 분자 존재하에서 항원과 결합하는 항체가 ADCC 활성 등의 항종양 활성이라는 기능도 또한 스위치가 되는 저분자에 의해 제어하는 것이 가능한 것이 명확해졌다.

[2128] 이들 결과로부터 ATP 농도가 낮은 정상 조직에서는 hIL-6R을 발현하는 세포에 대한 ADCC 활성이 약하고, 농도가 높은 종양 조직에서는 hIL-6R을 발현하는 세포에 대한 ADCC 활성을 강하게 유도하는 것으로 생각된다. 이상으로

부터 ATP를 스위치로 하는 항체를 투여함으로써 표적 항원이 발현되고 있는 종양 조직에 대한 약효가 유지되는 한편으로, 표적 항원이 발현되고 있는 정상 조직에 대한 독성이 경감될 수 있는 것이 시사되었다.

[2129] 〔참고예 1〕 인간 말초혈 단핵구를 이펙터 세포로서 사용한 피험항체의 ADCC 활성

[2130] 아래의 방법에 따라 Kynurenine 의존적으로 항원에 결합하는 항체에 의한 항원을 발현하는 세포에 대한 상이한 항체 농도에서의 ADCC 활성이 측정되었다. 인간 말초혈 단핵구(이하, 인간 PBMC로 지칭된다.)를 이펙터 세포로서 사용하여 각 피험항체에 의한 ADCC 활성이 아래와 같이 측정되었다.

[2131] (1) 인간 PBMC용액의 조제

[2132] 1000 단위/㎖의 헤파린용액(노보 · 헤파린 주사 5천 단위, 노보 · 노르딕스)이 사전에 200 ㎕ 주입된 주사기를 사용하여, 추가이 세이야쿠 가부시키가이샤 소속의 건강한 정상인 자원자(성인 남성)로부터 말초혈 50 ㎖가 채취되었다. PBS(-)를 사용하여 2배로 희석된 후에 4등분된 당해 말초혈이 15 ㎖의 Ficoll-Paque PLUS가 사전에 주입되어 원심분리 조작이 행해진 Leucosep 림프구 분리관(Greiner bio-one)에 첨가되었다. 당해 말초혈이 분주된 후에 2150 rpm의 속도로 10분간 실온에서 원심분리의 조작에 제공된 분리관으로부터 단핵구 분획층이 분취되었다. 10% FBS를 포함하는 RPMI-1640(nacalai tesque)(이하 10% FBS/RPMI라 불린다.)에 의해 1회 세정된 당해 분획층에 포함되는 세포가 10% FBS/RPMI 중에 그 세포밀도가 1×10^{7} 세포/㎖가 되도록 현탁되었다. 당해 세포 현탁액이 인간 PBMC용액으로서 이후의 실험에 제공되었다.

[2133] (2) 표적 세포의 조제

[2134] Ba/F3에 인간 IL-6 receptor를 강제 발현시킨 BaF/hIL6R(Mihara 등(Int. Immunopharmacol. (2005) 5, 1731-40) 3×10^{6} 세포에 0.74 MBq의 Cr-51이 첨가되었다. 그 후 5% 탄산가스 인큐베이터 중에 있어서 37℃에서 1시간 인큐베이트된 당해 세포가 10% FBS/RPMI로 3회 세정된 후, 10% FBS/RPMI 중에 그 세포밀도가 2×10^{5} 세포/㎖가 되도록 현탁되었다. 당해 세포 현탁액이 표적 세포로서 이후의 실험에 제공되었다.

[2135] (3) Kynurenine용액의 조제

[2136] PBS(-)를 사용하여 5 mM로 희석된 L-Kynurenine(sigma)이 10% FBS/RPMI를 사용하여 400 μM의 농도로 조제되었다. 당해 용액이 Kynurenine용액으로서 이후의 시험에 제공되었다.

[2137] (4) 크롬 유리(遊離) 시험(ADCC 활성)

[2138] ADCC 활성이 크롬 릴리스법을 사용한 특이적 크롬 유리율로 평가되었다. 먼저 각 농도(0, 0.04, 0.4, 4, 40 ㎍/㎖)로 조제된 항체용액이 96 웰 U바닥 플레이트의 각 웰 중에 50 ㎕씩 첨가되었다. 다음으로 당해 웰에 (2)에서 조제된 표적 세포가 50 ㎕씩 파종되었다(1×10^{4} 세포/웰). 추가로 당해 웰에 (3)에서 조제된 Kynurenine용액이 50 ㎕씩 첨가된 플레이트가 실온에서 15분간 정치되었다. 다음으로 그 각 웰 중에 (1)에서 조제된 인간 PBMC용액 각 50 웰(5×10^{5} 세포/웰)이 첨가되고, 5% 탄산가스 인큐베이터 중에 있어서 37℃에서 4시간 정치된 당해 플레이트가 원심분리 조작에 제공되었다. 당해 플레이트의 각 웰 중의 100 ㎕의 배양상청의 방사 활성이 감마 카운터를 사용하여 측정되었다. 아래의 식을 토대로 특이적 크롬 유리율이 산출되었다.

[2139] $$\text{크롬 유리율}(\%) = (A-C)\times100/(B-C)$$

[2140] 상기 식에 있어서, A는 각 웰 중의 100 ㎕의 배양상청의 방사 활성(cpm)의 평균값을 나타낸다. 또한 B는 표적 세포에 대해 50 ㎕의 4% NP-40 수용액(Nonidet P-40, 나칼라이테스크) 및 100 ㎕의 10% FBS/RPMI가 첨가된 웰 중의 100 ㎕의 배양상청의 방사 활성(cpm)의 평균값을 나타낸다. 또한 C는 표적 세포에 대해 150 ㎕의 10% FBS/RPMI 또는 100 ㎕의 10% FBS/RPMI 및 50 ㎕의 Kynurenine용액이 첨가된 웰 중의 100 ㎕의 배양상청의 방사 활성(cpm)의 평균값을 나타낸다. 시험은 duplicate로 실시되고, 각 피험항체의 ADCC 활성이 반영되는 상기 시험에 있어서의 특이적 크롬 유리율(%)의 평균값이 산출었다.

[2141] 〔참고예 2〕 인간 말초혈 단핵구를 이펙터 세포로서 사용한 각 피험항체의 ADCC 활성

[2142] 아래의 방법에 따라 Kynurenine 의존적으로 항원에 결합하는 항체에 의한 항원을 발현하는 세포에 대한 상이한 Kynurenine 농도에서의 ADCC 활성이 측정되었다. 인간 말초혈 단핵구를 이펙터 세포로서 사용하여 각 피험항체에 의한 ADCC 활성이 아래와 같이 측정되었다. 또한 인간 PBMC용액 및 표적 세포는 참고예 1과 동일한 방법으로

조제되었다.

[2143] (1) Kynurenine용액의 조제

[2144] PBS(-)를 사용하여 5 mM로 희석된 L-Kynurenine(sigma)이 10% FBS/RPMI를 사용하여 400, 133, 44, 14.8, 4.9 μM의 농도로 조제되었다. 당해 용액이 Kynurenine용액으로서 이후의 시험에 제공되었다.

[2145] (2) 크롬 유리 시험(ADCC 활성)

[2146] ADCC 활성이 크롬 릴리스법에 의한 특이적 크롬 유리율로 평가되었다. 먼저 200 ㎍/㎖로 조제된 항체용액이 96 웰 U 바닥 플레이트의 각 웰 중에 50 ㎕씩 첨가되었다. 다음으로 당해 웰에 상기 표적 세포가 50 ㎕씩 파종되었다(1×10^4 세포/웰). 다음으로 당해 웰에 (1)에서 조제된 각 농도의 Kynurenine용액이 50 ㎕씩 첨가된 플레이트가 실온에서 15분간 정치되었다. 다음으로 각 웰 중에 상기 인간 PBMC용액 각 50 ㎕(5×10^5 세포/웰)가 첨가되고, 5% 탄산가스 인큐베이터 중에 있어서 37℃에서 4시간 정치된 플레이트가 원심분리 조작에 제공되었다. 당해 플레이트의 각 웰 중의 100 ㎕의 배양상청의 방사 활성이 감마 카운터를 사용하여 측정되었다. 참고예 1에 기재된 식을 토대로 특이적 크롬 유리율이 구해졌다.

[2147] [참고예 3] 인간 NK세포주 NK92를 이펙터 세포로서 사용한 각 피험항체의 ADCC 활성

[2148] 아래의 방법에 따라, ATP 의존적으로 항원에 결합하는 항체에 의한 항원을 발현하는 세포에 대한 상이한 항체 농도에서의 ADCC 활성이 측정되었다. 인간 NK세포주 NK92에 인간 FcgRIIIa를 강제 발현시킨 NK92-CD16(V)을 이펙터 세포로서 사용하여 각 피험항체에 의한 ADCC 활성이 아래와 같이 측정되었다.

[2149] (1) NK92-CD16(V)의 조제

[2150] NK92-CD16(V)을 10% FBS/RPMI 중에 그 세포밀도가 1×10^7 세포/㎖가 되도록 현탁되었다. 당해 세포 현탁액이 NK92-CD16(V)용액으로서 이후의 실험에 제공되었다.

[2151] (2) 표적 세포의 조제

[2152] CHO에 인간 IL-6 receptor를 강제 발현시킨 CHO/hIL6R 3×10^6 세포에 0.74 MBq의 Cr-51이 첨가되었다. 그 후 5% 탄산가스 인큐베이터 중에 있어서 37℃에서 1시간 인큐베이트된 당해 세포가 10% FBS/RPMI로 3회 세정된 후, 10% FBS/RPMI 중에 그 세포밀도가 2×10^5 세포/㎖가 되도록 현탁되었다. 당해 세포 현탁액이 표적 세포로서 이후의 실험에 제공되었다.

[2153] (3) ATP용액의 조제

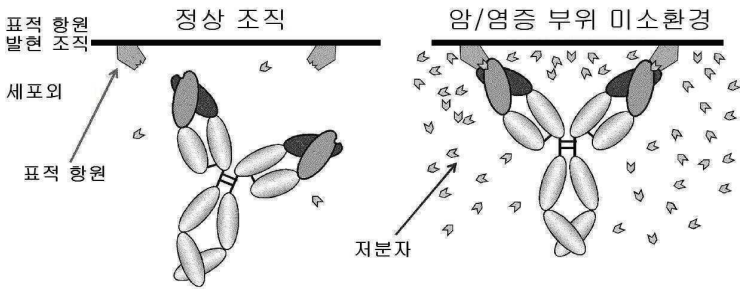
[2154] 10% FBS/RPMI를 사용하여 100 mM로 희석된 ATP(sigma)가 4 mM의 농도로 조제되었다. 당해 용액이 ATP용액으로서 이후의 시험에 제공되었다.

[2155] (4) 크롬 유리 시험(ADCC 활성)

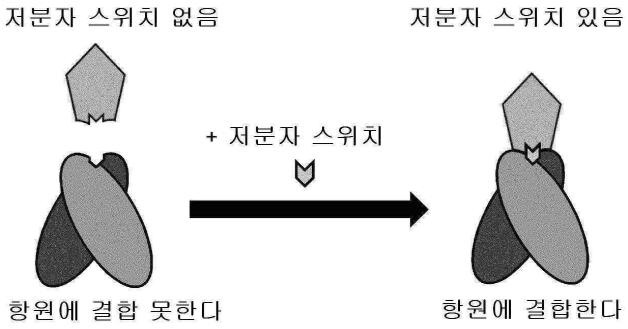
[2156] ADCC 활성이 크롬 릴리스법을 사용한 특이적 크롬 유리율로 평가되었다. 먼저 각 농도(0, 0.04, 0.4, 4, 40 ㎍/㎖)로 조제된 항체용액이 96 웰 U 바닥 플레이트의 각 웰 중에 50 ㎕씩 첨가되었다. 다음으로 당해 웰에 (2)에서 조제된 표적 세포가 50 ㎕씩 파종되었다(1×10^4 세포/웰). 추가로 당해 웰에 (3)에서 조제된 ATP용액이 50 ㎕씩 첨가된 플레이트가 실온에서 15분간 정치되었다. 다음으로 그 각 웰 중에 (1)에서 조제된 NK92-CD16(V)용액 각 50 ㎕(5×10^5 세포/웰)가 첨가되고, 5% 탄산가스 인큐베이터 중에 있어서 37℃에서 4시간 정치된 당해 플레이트가 원심분리 조작에 제공되었다. 당해 플레이트의 각 웰 중의 100 ㎕의 배양상청의 방사 활성이 감마 카운터를 사용하여 측정되었다. 참고예 1에 기재된 식을 토대로 특이적 크롬 유리율이 구해졌다.

도면

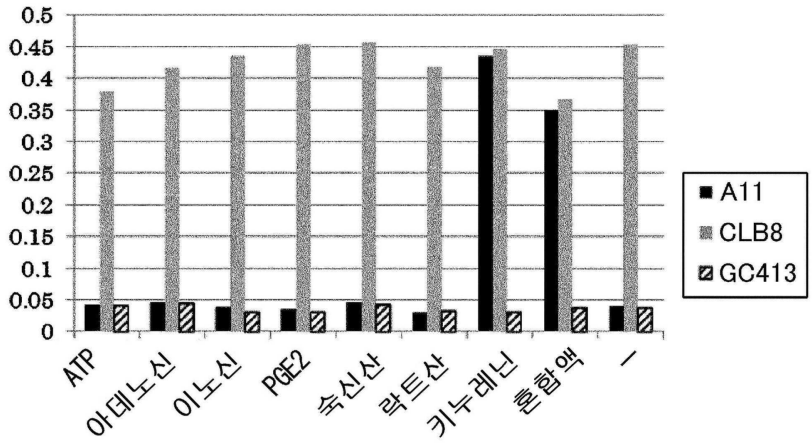
도면1



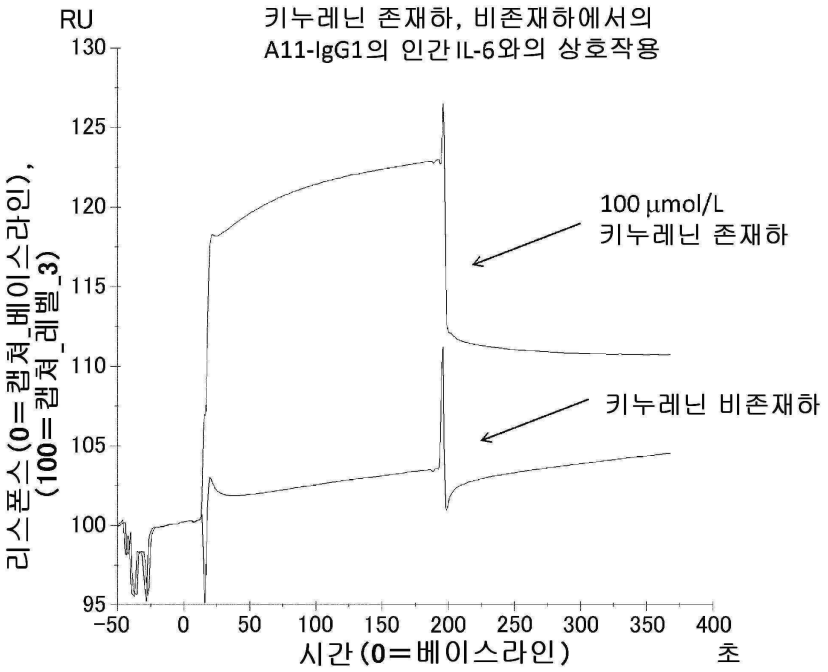
도면2



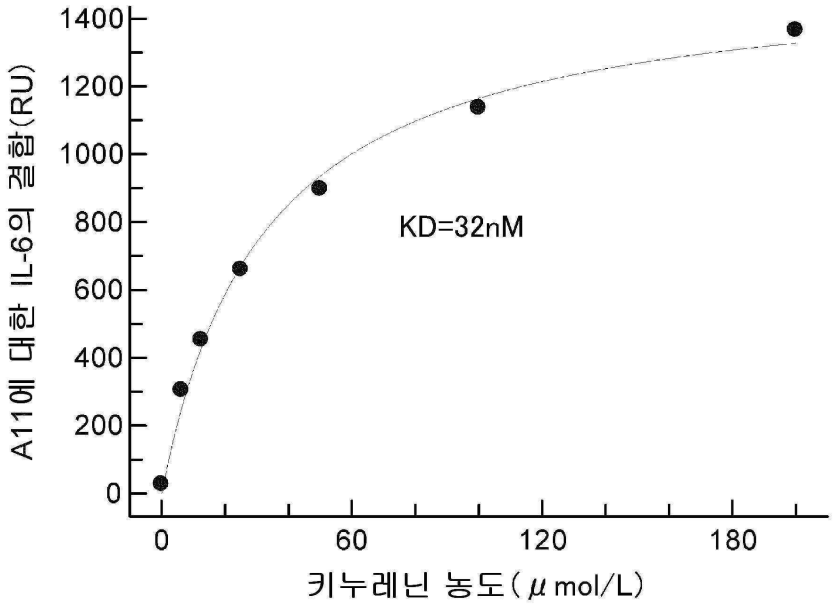
도면3



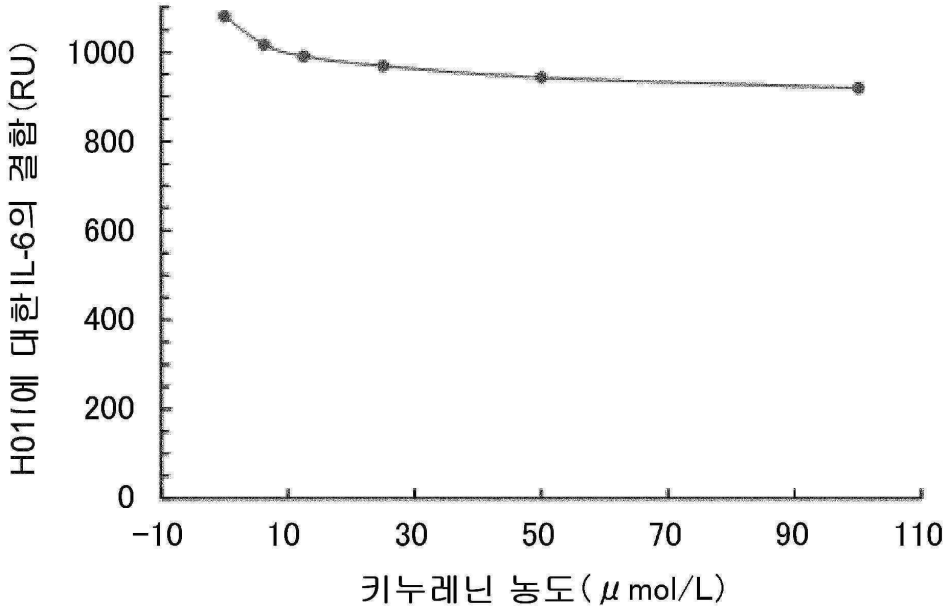
도면4


RU
키누레닌 존재하, 비존재하에서의
A11-IgG1의 인간 IL-6와의 상호작용
리스폰스 (0=캡쳐_베이스라인),
(100=캡쳐_레벨_3)
130
125
120
115
110
105
100
95
100 μmol/L
키누레닌 존재하
키누레닌 비존재하
−50
0
50
100
150
200
250
300
350
400
시간 (0=베이스라인)
초

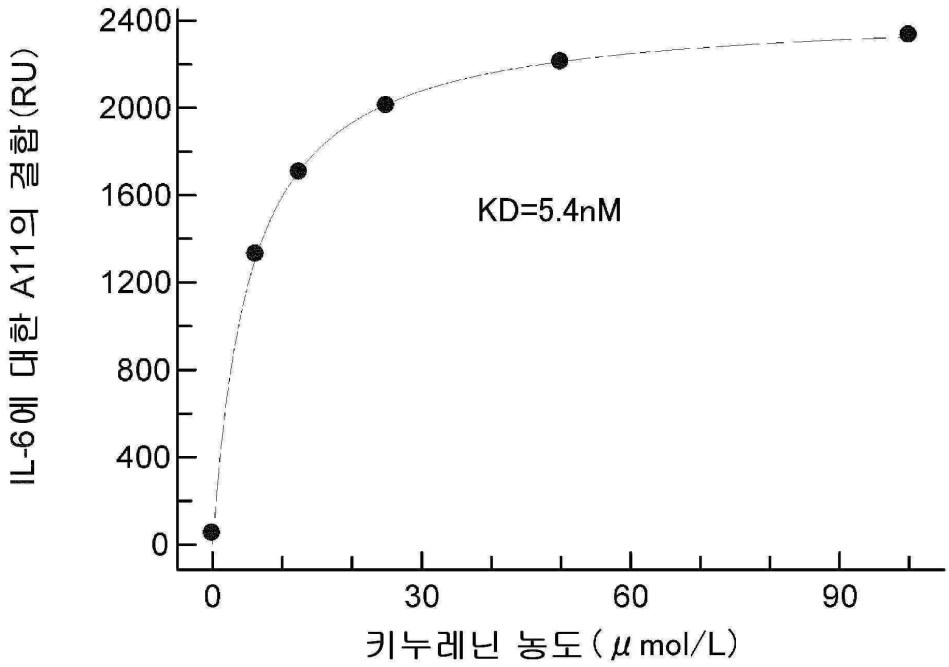
도면5


A11에 대한 IL-6의 결합(RU)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
KD=32nM
0
60
120
180
키누레닌 농도 (μmol/L)

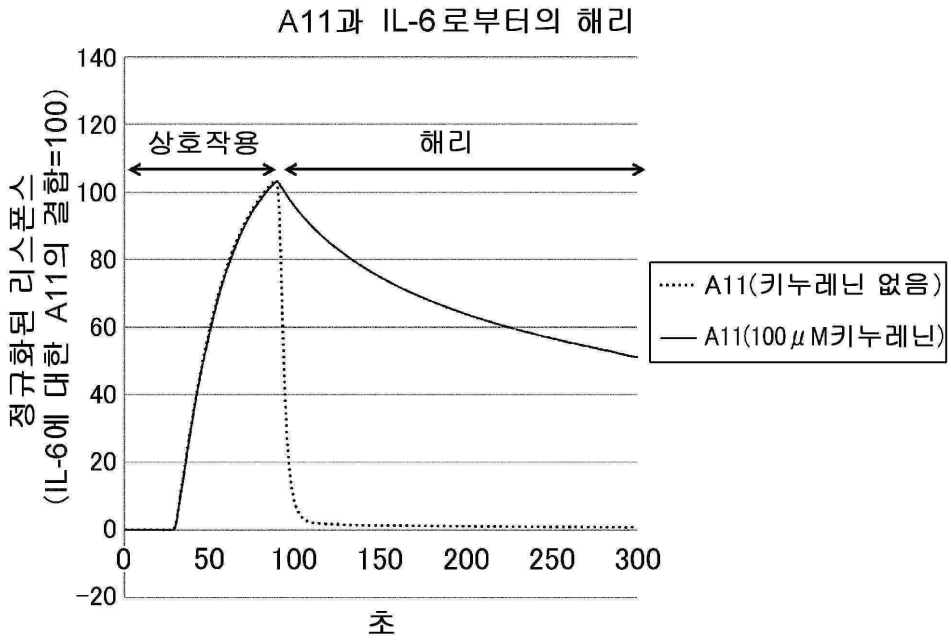
도면6


H011에 대한IL-6의 결합(RU)
1000
800
600
400
200
0
-10
10
30
50
70
90
110
키누레닌 농도(μmol/L)

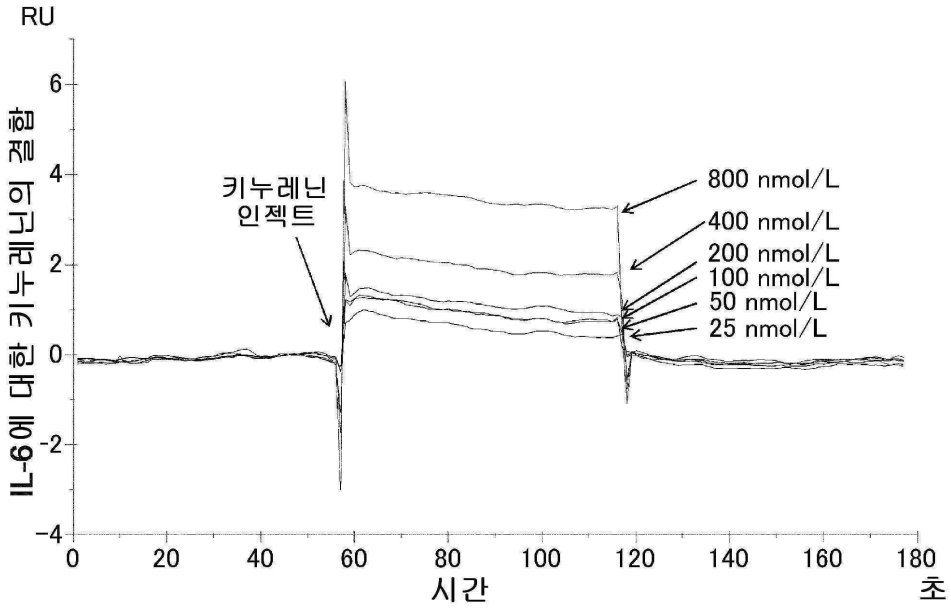
도면7


IL-6에 대한 A11의 결합(RU)
2400
2000
1600
1200
800
400
0
KD=5.4nM
0
30
60
90
키누레닌 농도(μmol/L)

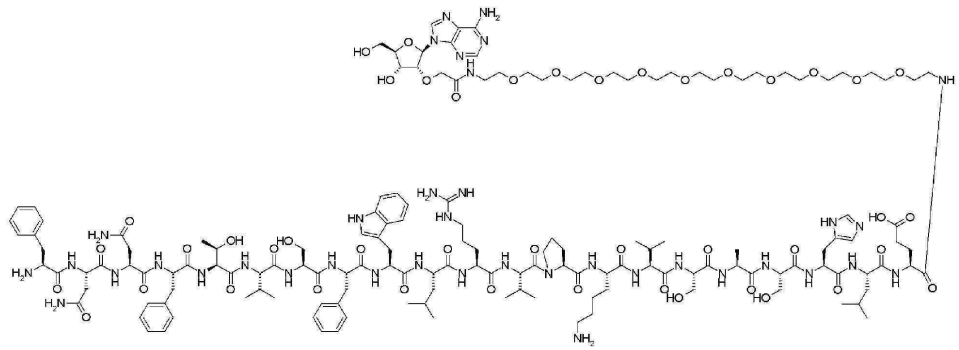
도면8


A11과 IL-6로부터의 해리
정규화된 리스폰스
(IL-6에 대한 A11의 결합=100)
상호작용
해리
A11(키누레닌 없음)
A11(100μM키누레닌)
초

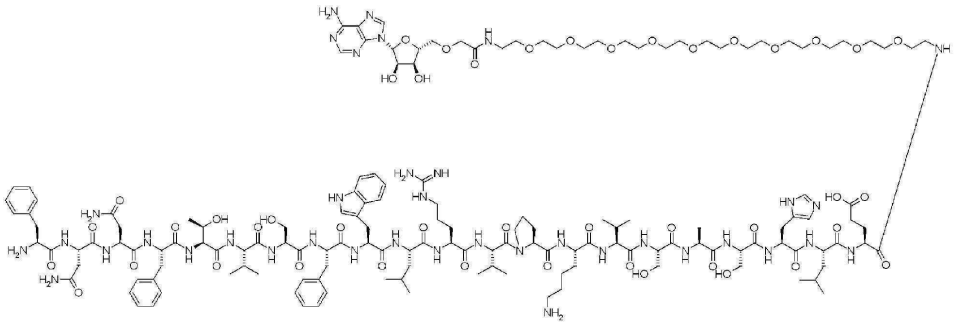
도면9


RU
IL-6에 대한 키누레닌의 결합
키누레닌
인젝트
800 nmol/L
400 nmol/L
200 nmol/L
100 nmol/L
50 nmol/L
25 nmol/L
시간
초

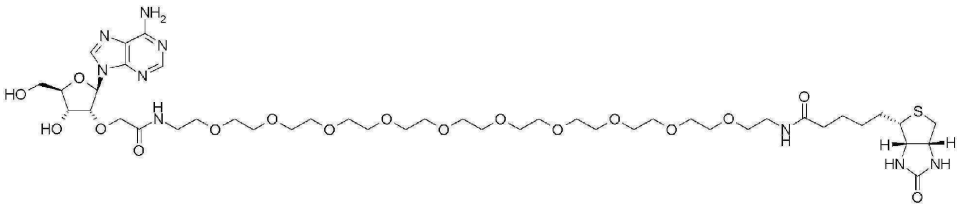
도면10



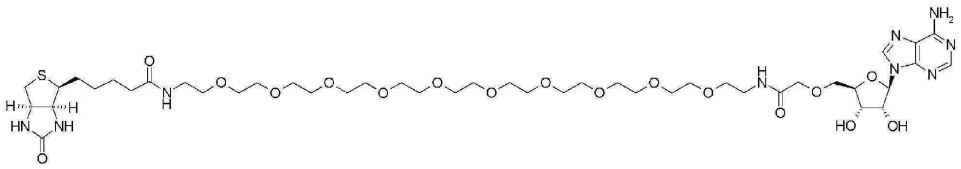
도면11



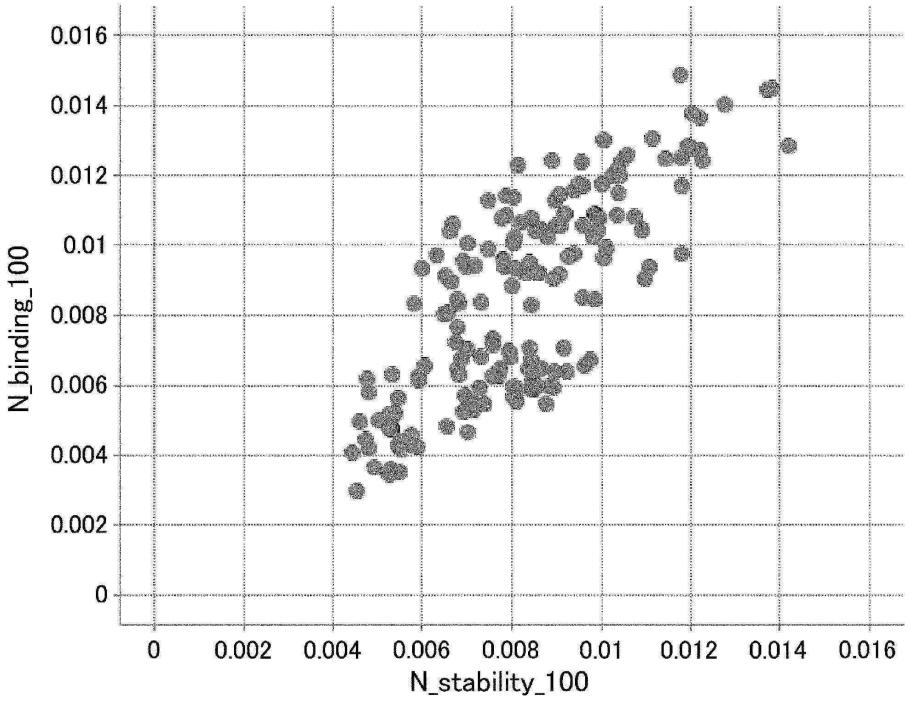
도면12



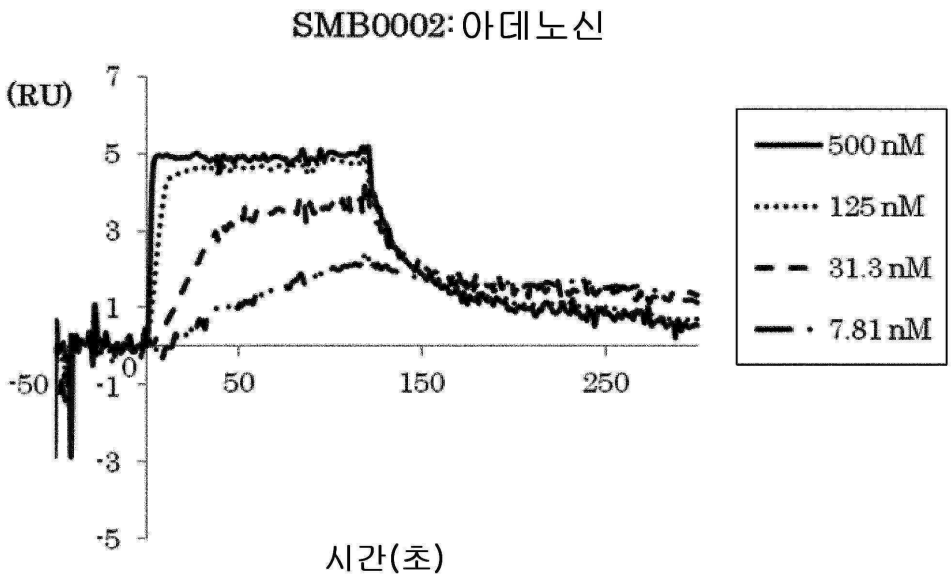
도면13



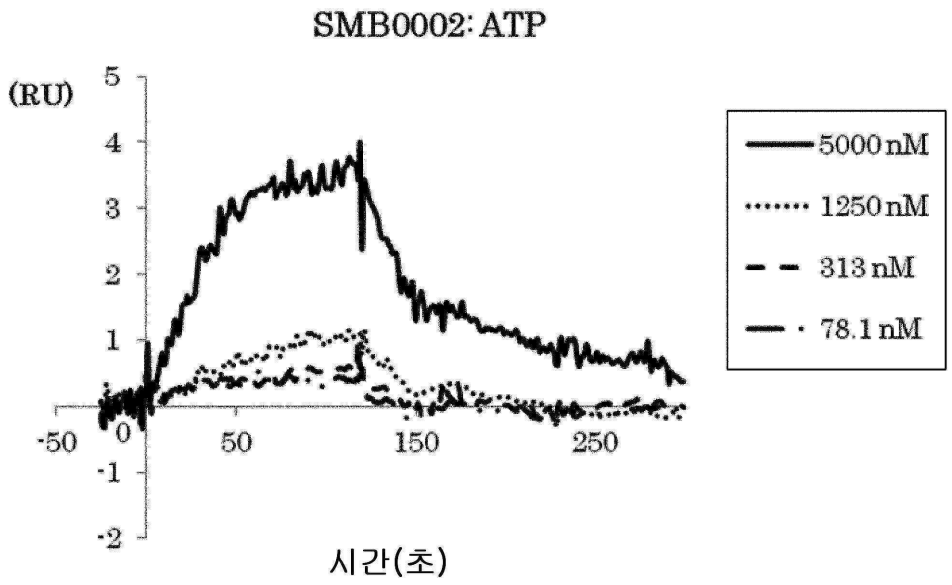
도면14



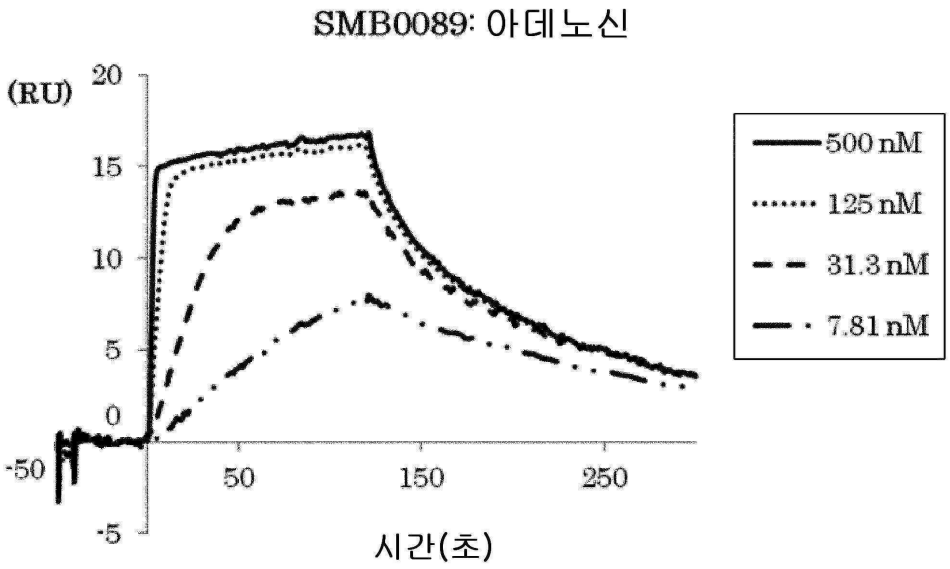
도면15a


SMB0002: 아데노신
(RU)
7
5
3
1
-1
-3
-5
-50
0
50
150
250
시간(초)
500 nM
125 nM
31.3 nM
7.81 nM

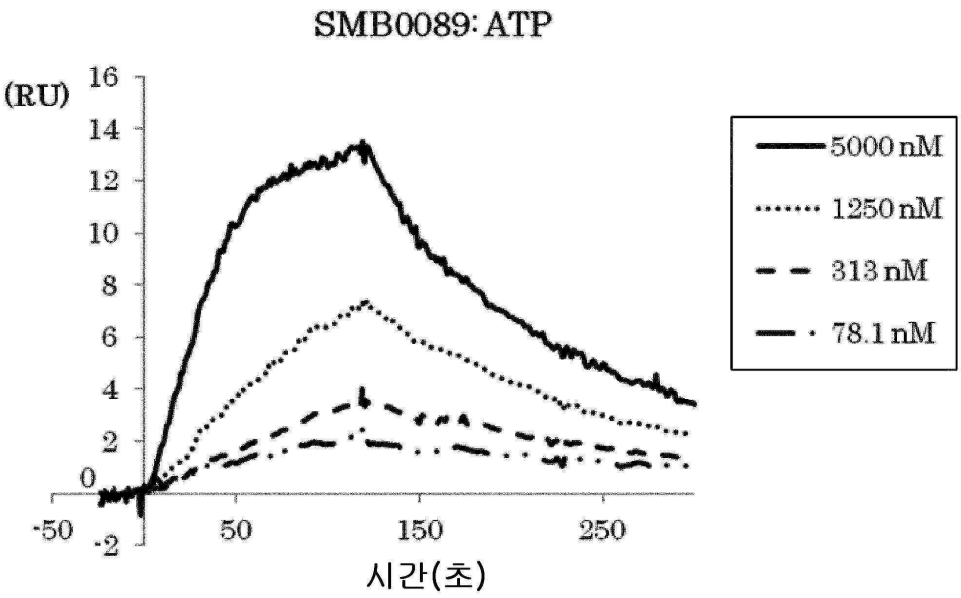
도면15b


SMB0002: ATP
(RU)
5
4
3
2
1
-1
-2
-50
0
50
150
250
시간(초)
5000 nM
1250 nM
313 nM
78.1 nM

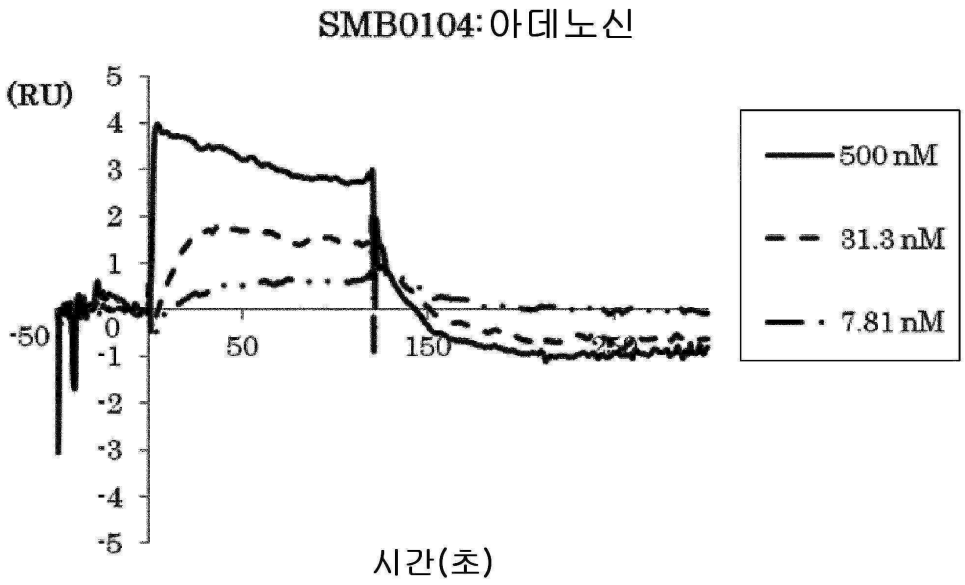
도면15c


SMB0089: 아데노신
(RU)
20
15
10
5
0
-5
-50
50
150
250
시간(초)
500 nM
125 nM
31.3 nM
7.81 nM

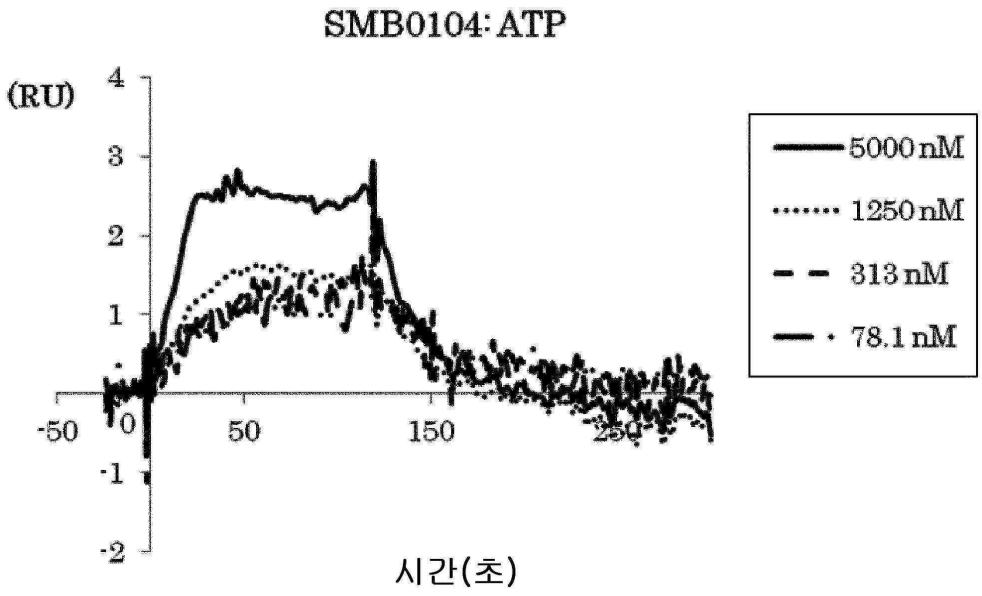
도면15d


SMB0089: ATP
(RU)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
-50
50
150
250
시간(초)
5000 nM
1250 nM
313 nM
78.1 nM

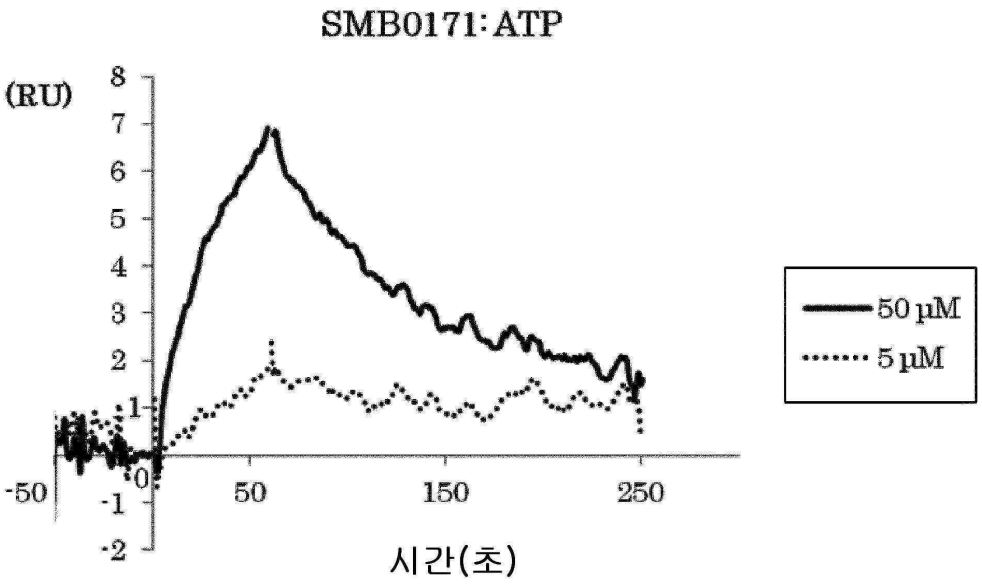
도면15e


SMB0104: 아데노신
(RU)
5
4
3
2
1
0
-1
-2
-3
-4
-5
-50
50
150
500 nM
31.3 nM
7.81 nM
시간(초)

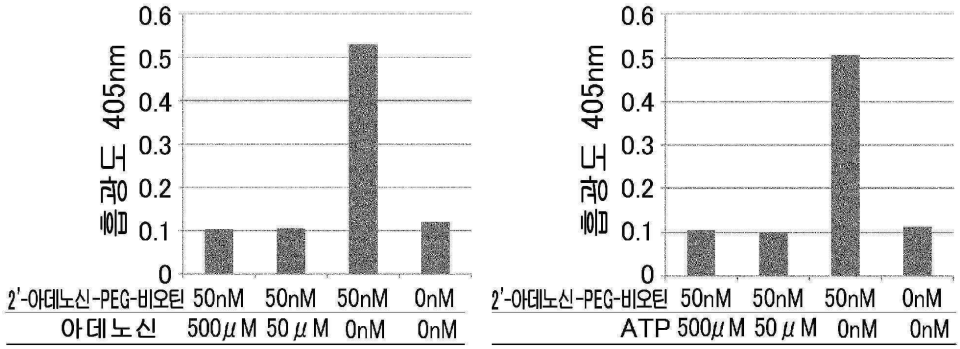
도면15f


SMB0104: ATP
(RU)
4
3
2
1
0
-1
-2
-50
50
150
5000 nM
1250 nM
313 nM
78.1 nM
시간(초)

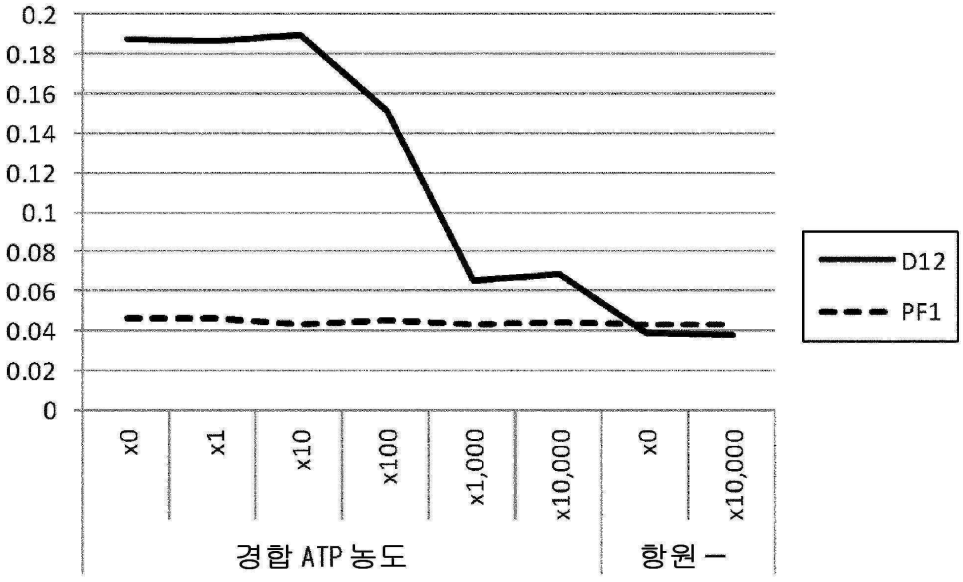
도면16



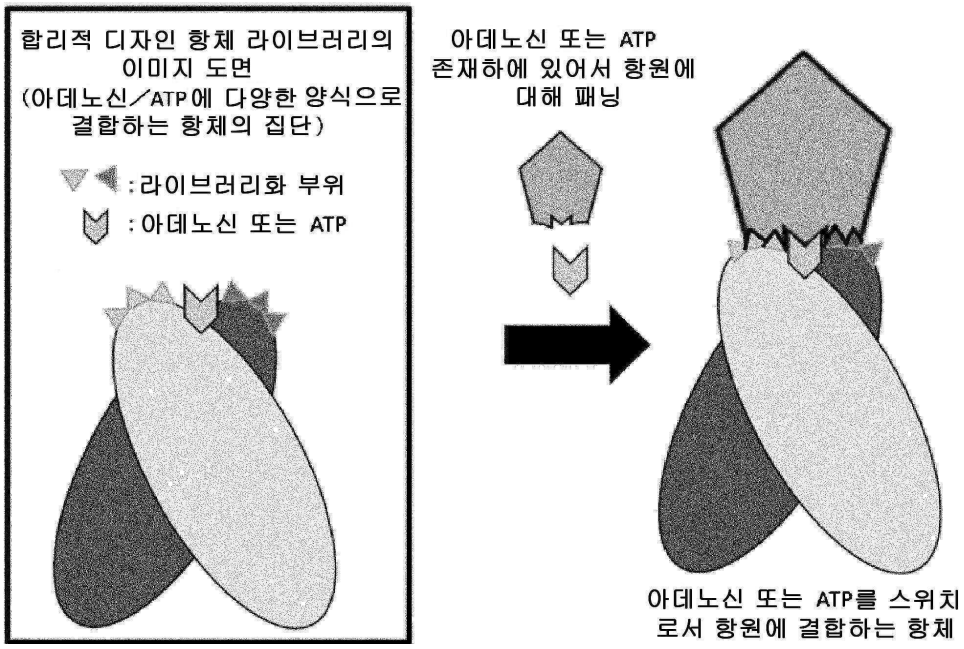
도면17



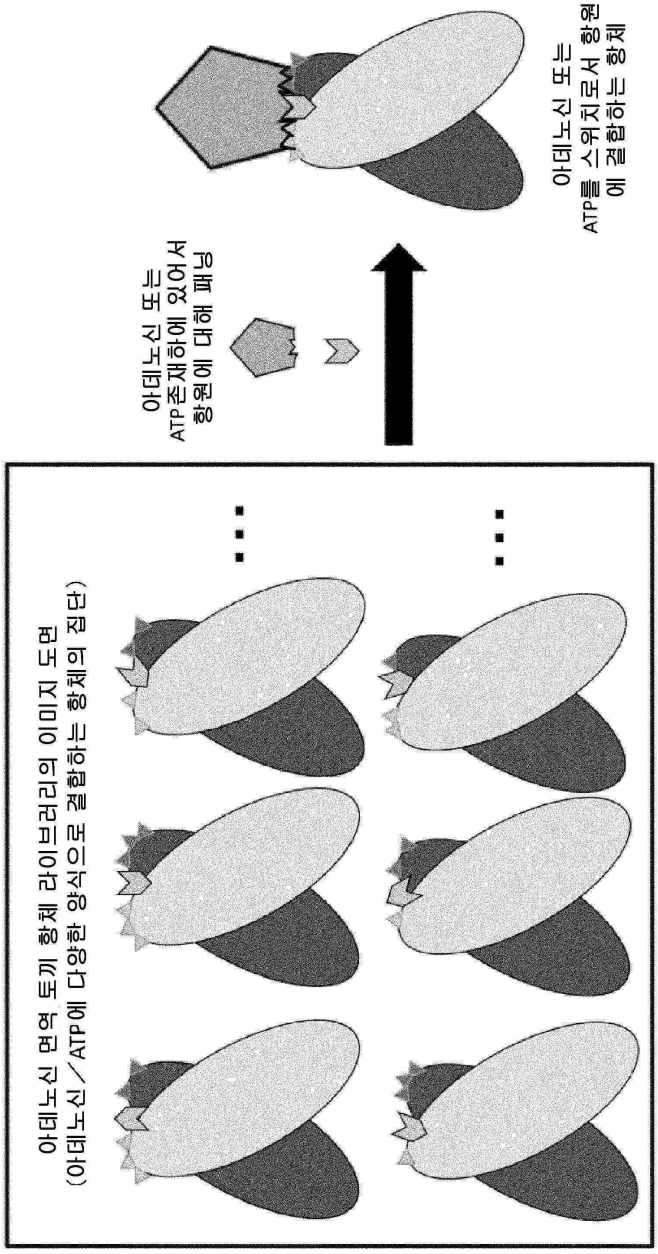
도면18



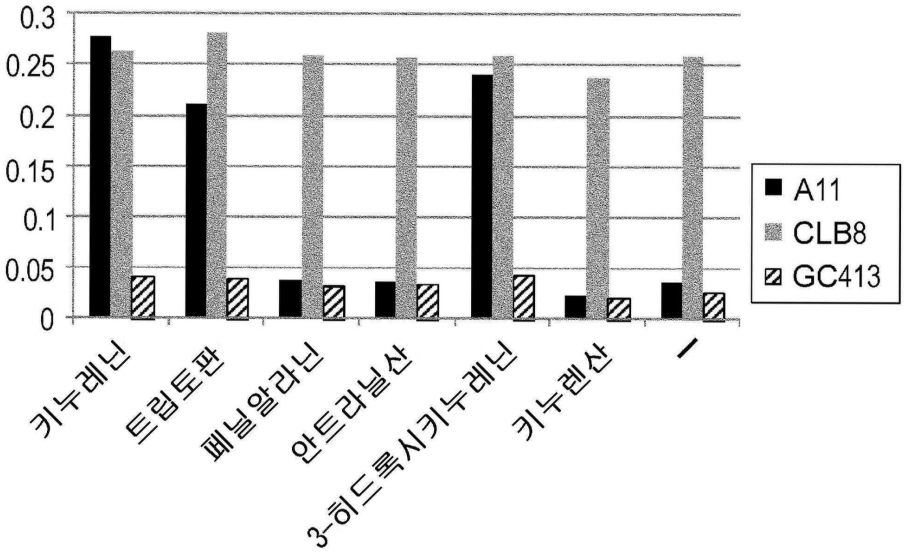
도면19


합리적 디자인 항체 라이브러리의
이미지 도면
(아데노신/ATP에 다양한 양식으로
결합하는 항체의 집단)
:라이브러리화 부위
:아데노신 또는 ATP
아데노신 또는 ATP
존재하에 있어서 항원에
대해 패닝
아데노신 또는 ATP를 스위치
로서 항원에 결합하는 항체

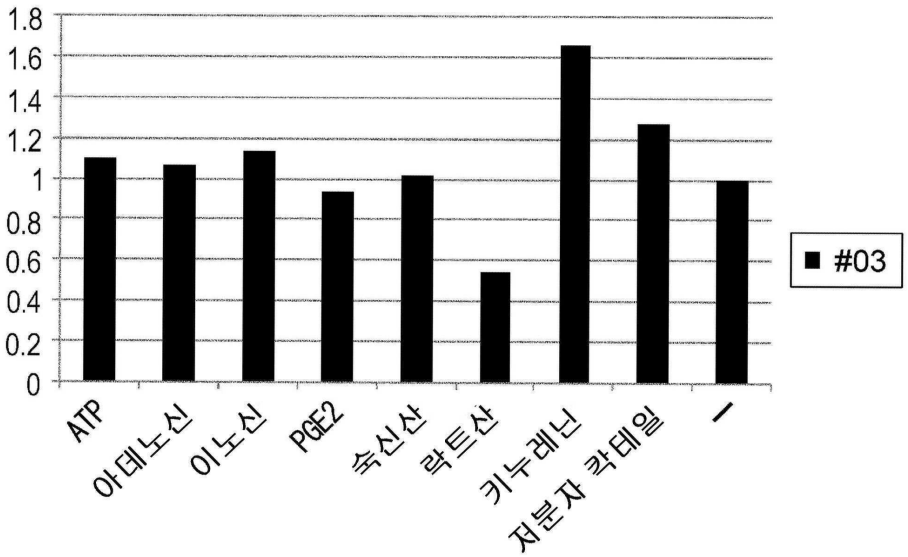
도면20


아데노신 면역 토끼 항체 라이브러리의 이미지 도면
(아데노신/ATP에 다양한 양식으로 결합하는 항체의 집단)
아데노신 또는
ATP존재하에 있어서
항원에 대해 패닝
아데노신 또는
ATP를 스위치로서 항원
에 결합하는 항체

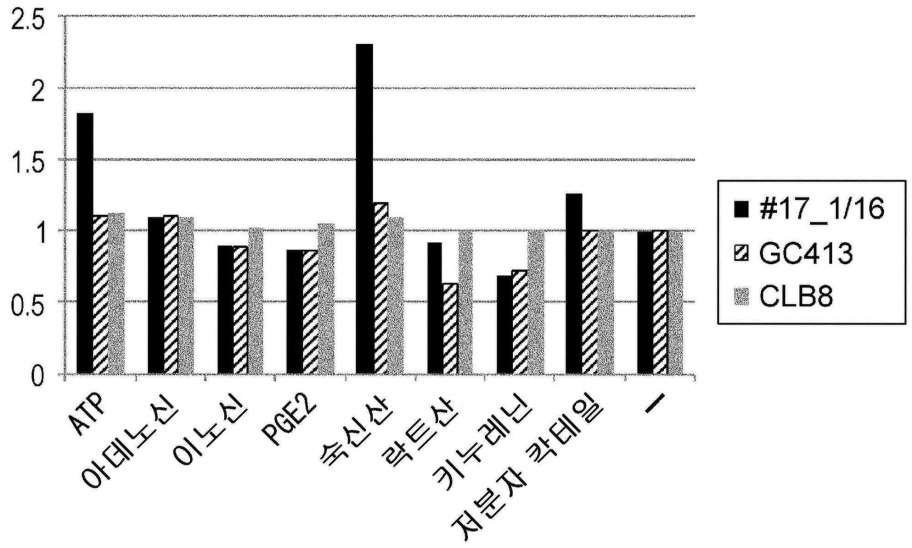
도면21


0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
A11
CLB8
GC413
키누레닌
트립토판
페닐알라닌
안트라닐산
3-히드록시키누레닌
키누렌산
–

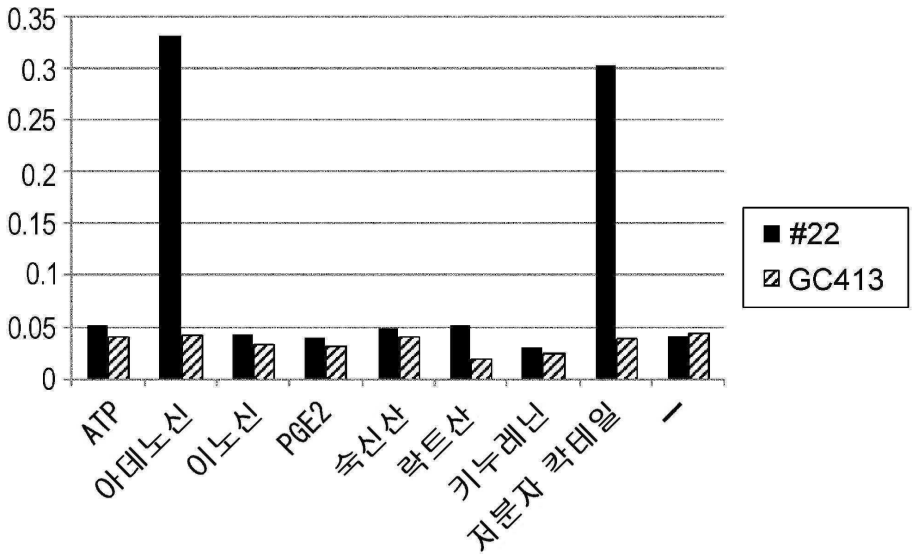
도면22


1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
#03
ATP
아데노신
이노신
PGE2
숙신산
락트산
키누레닌
지문자 칵테일
–

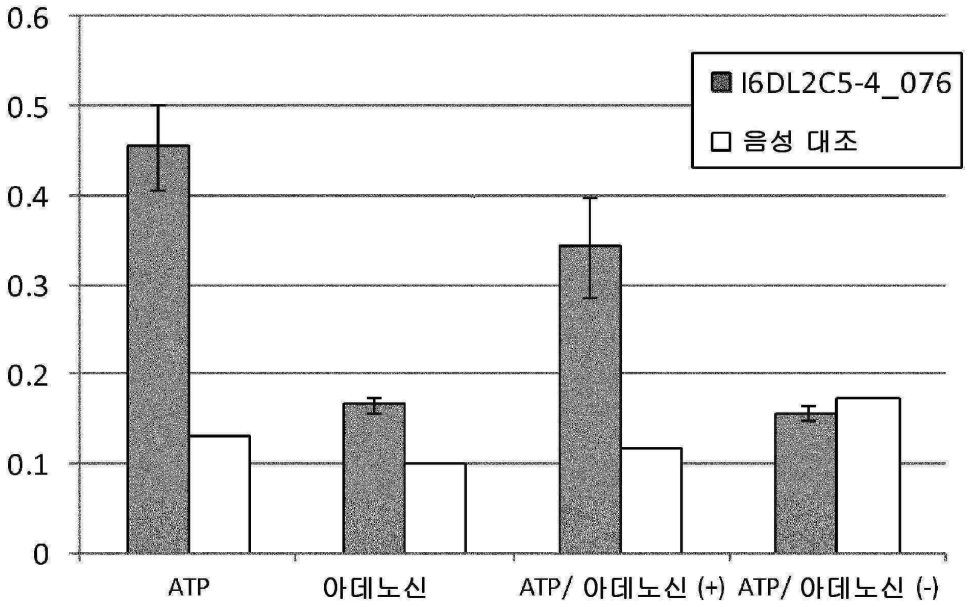
도면23


2.5
2
1.5
1
0.5
0
ATP
아데노신
이노신
PGE2
숙신산
락트산
키누레닌
저분자 칵테일
-
#17_1/16
GC413
CLB8

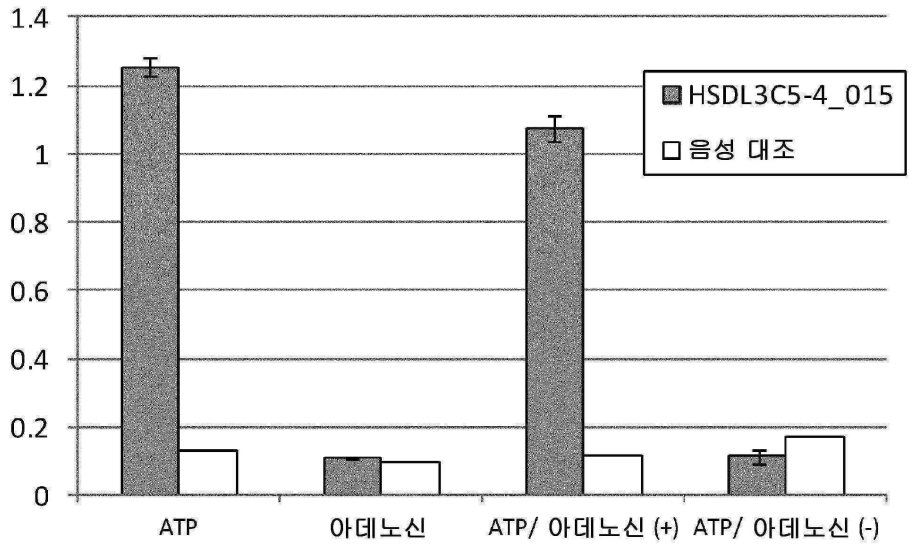
도면24


0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
ATP
아데노신
이노신
PGE2
숙신산
락트산
키누레닌
저분자 칵테일
-
#22
GC413

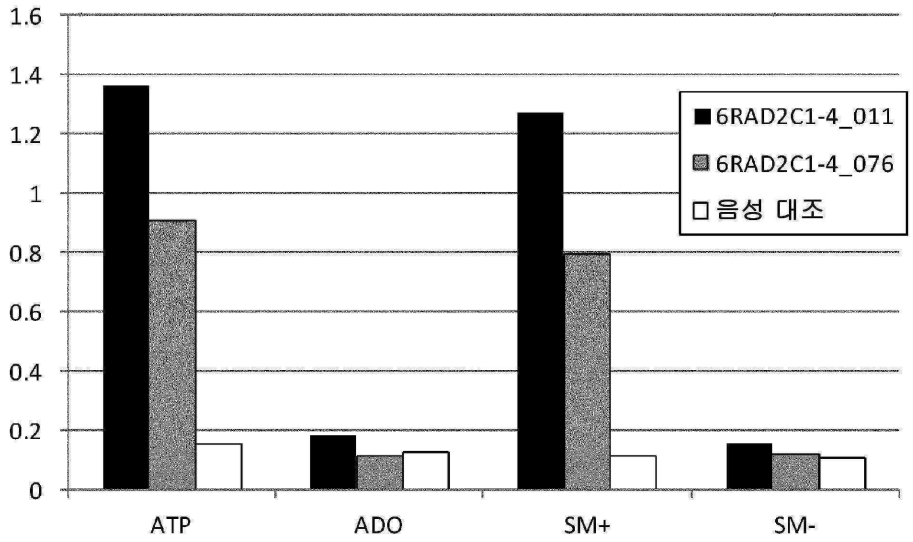
도면25


0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
I6DL2C5-4_076
음성 대조
ATP
아데노신
ATP/ 아데노신 (+)
ATP/ 아데노신 (-)

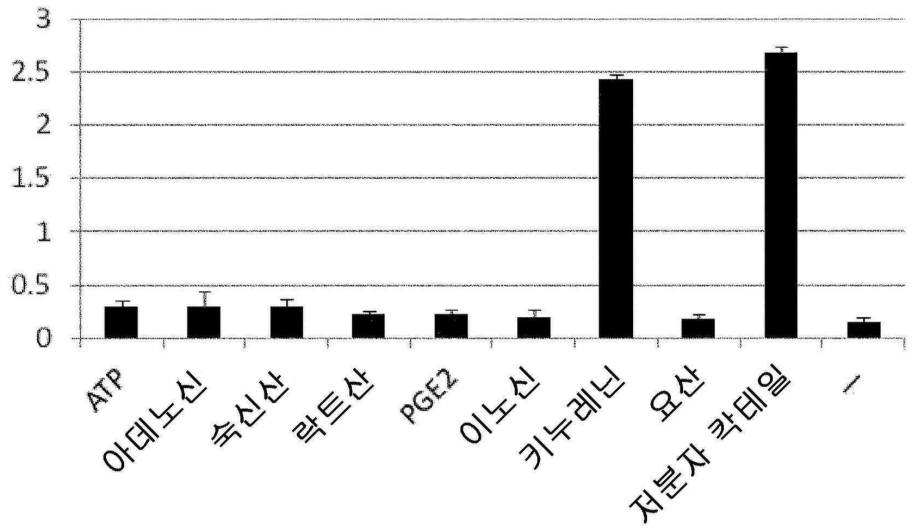
도면26


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
HSDL3C5-4_015
음성 대조
ATP
아데노신
ATP/ 아데노신 (+)
ATP/ 아데노신 (-)

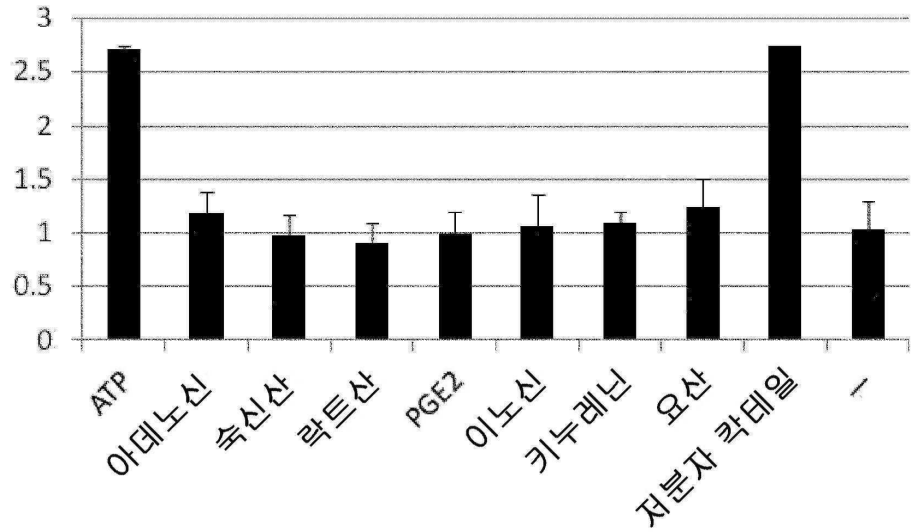
도면27



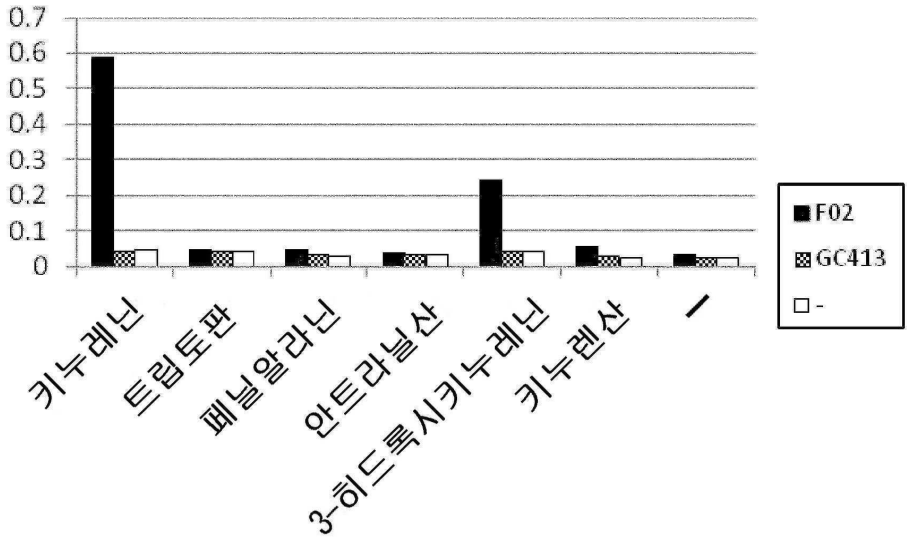
도면28



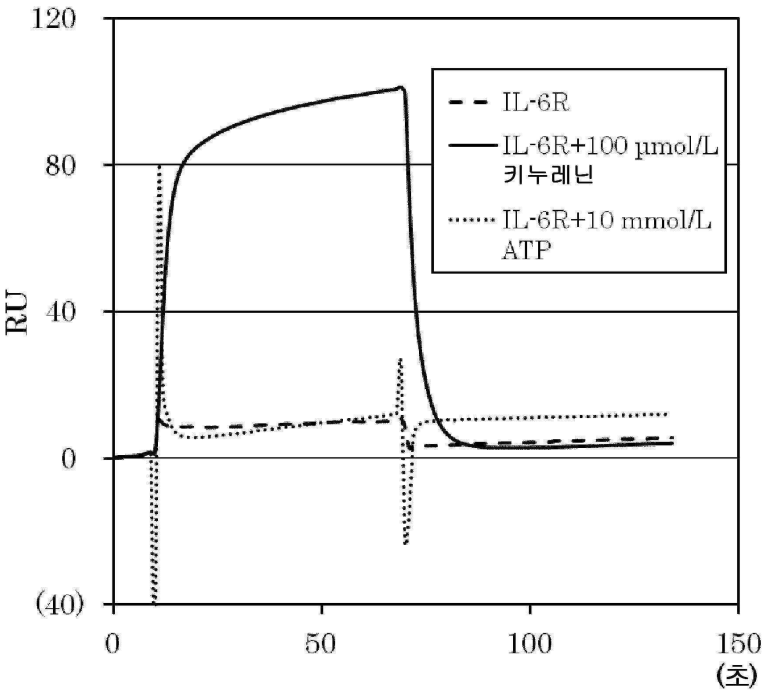
도면29



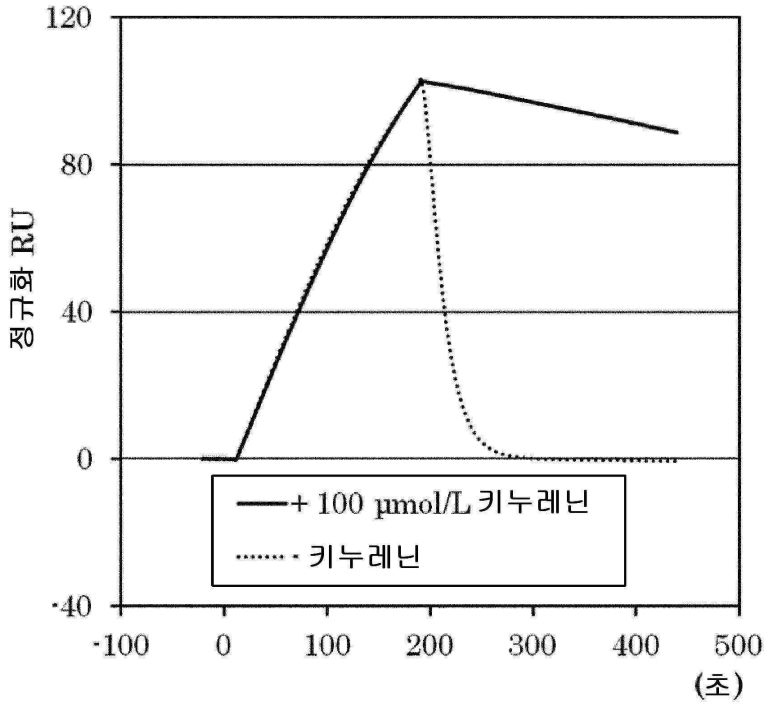
도면30


0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
F02
GC413
-
키누레닌
트립토판
페닐알라닌
안트라닐산
3-히드록시키누레닌
키누렌산

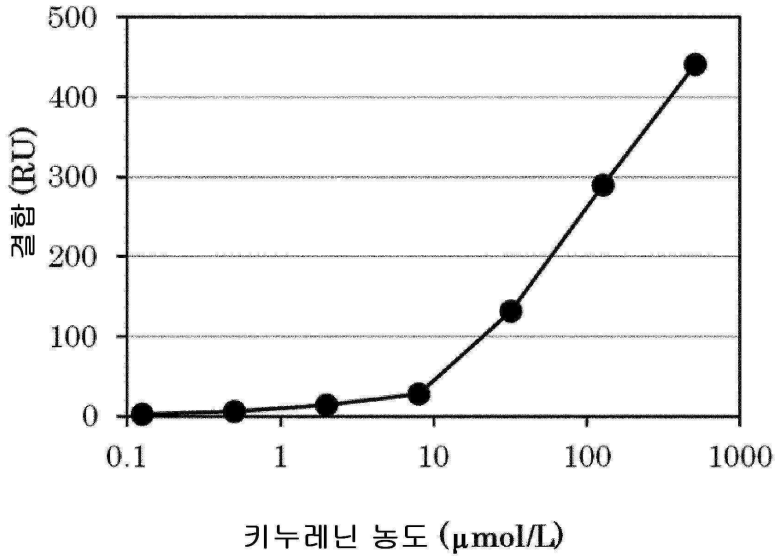
도면31


120
80
40
0
(40)
RU
0
50
100
150
(초)
IL-6R
IL-6R+100 μmol/L 키누레닌
IL-6R+10 mmol/L ATP

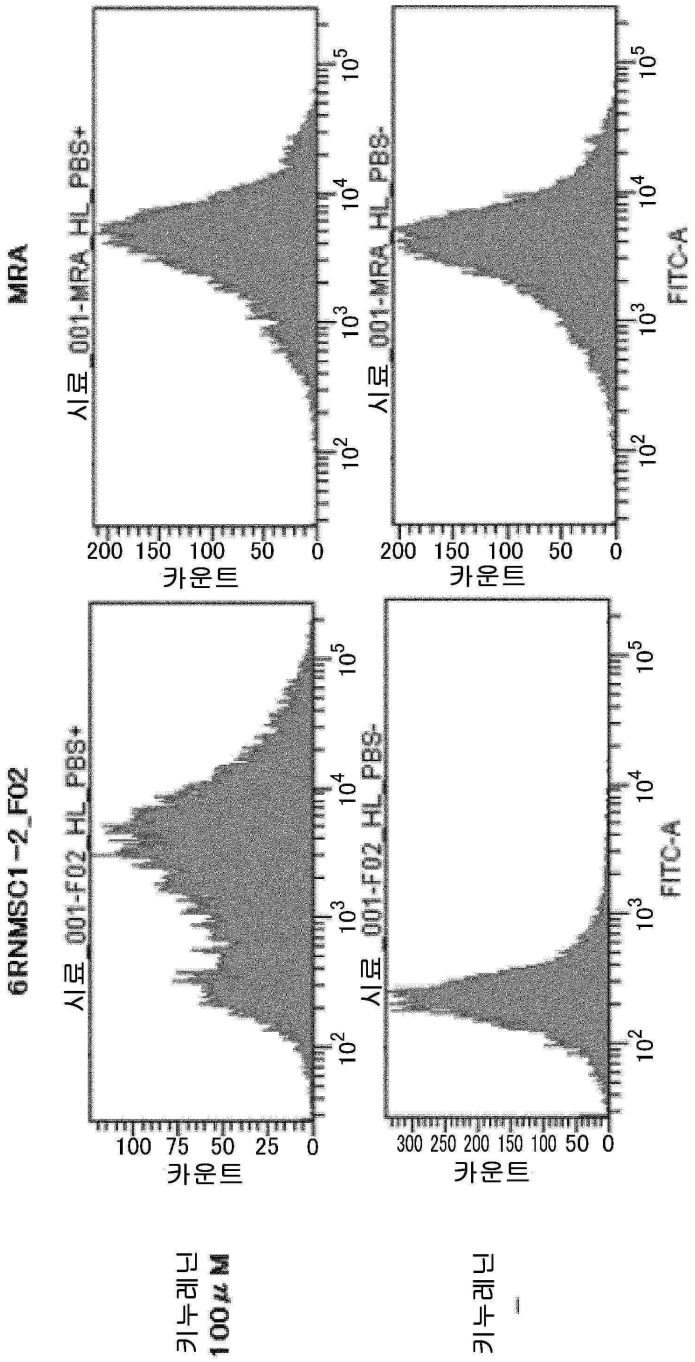
도면32


120
80
40
0
-40
정규화 RU
+ 100 μmol/L 키누레닌
키누레닌
-100
0
100
200
300
400
500
(초)

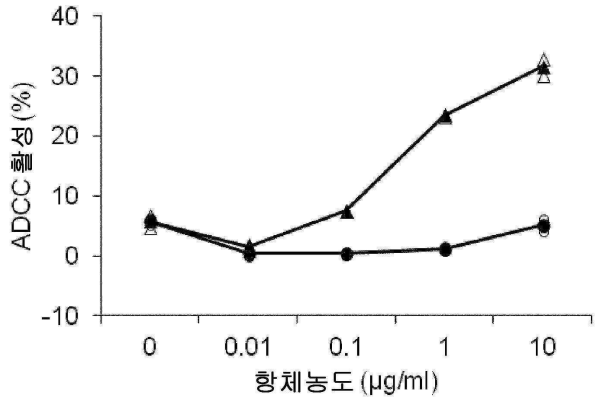
도면33


500
400
300
200
100
0
결합 (RU)
0.1
1
10
100
1000
키누레닌 농도 (μmol/L)

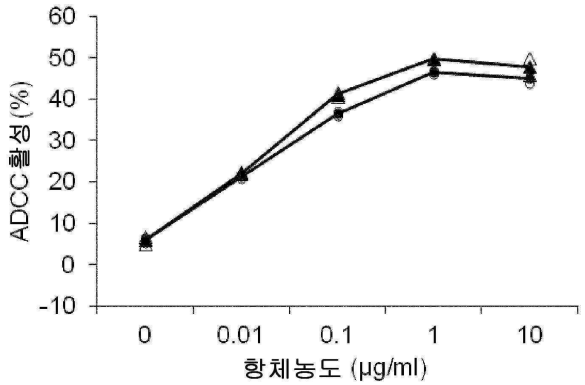
도면34


MRA
6RNMSC1-2_F02
시료_001-MRA_HL_PBS+
시료_001-MRA_HL_PBS-
시료_001-F02_HL_PBS+
시료_001-F02_HL_PBS-
카운트
FITC-A
키누레닌 100μM
키누레닌 -

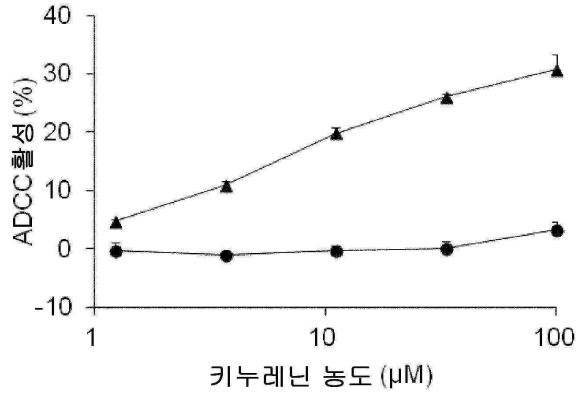
도면35a



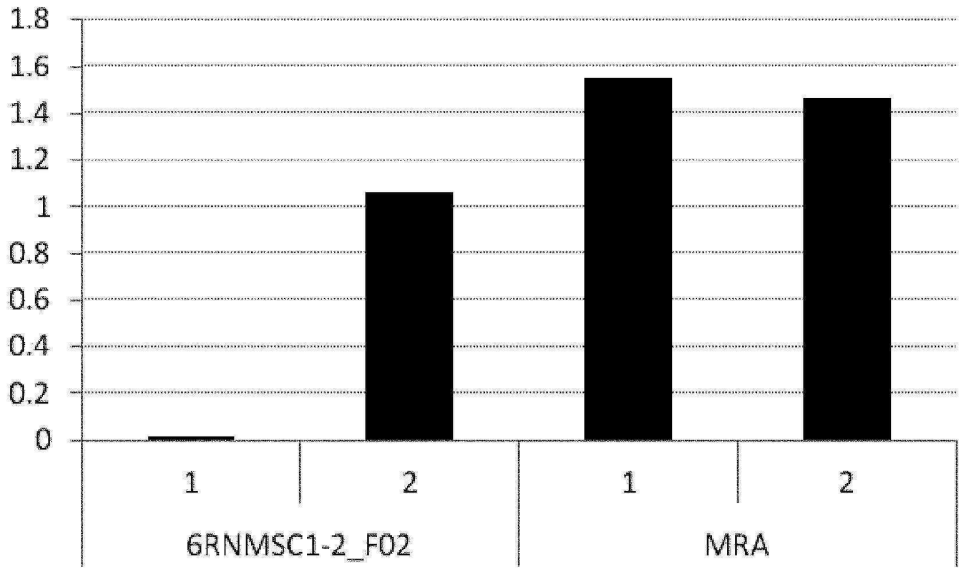
도면35b



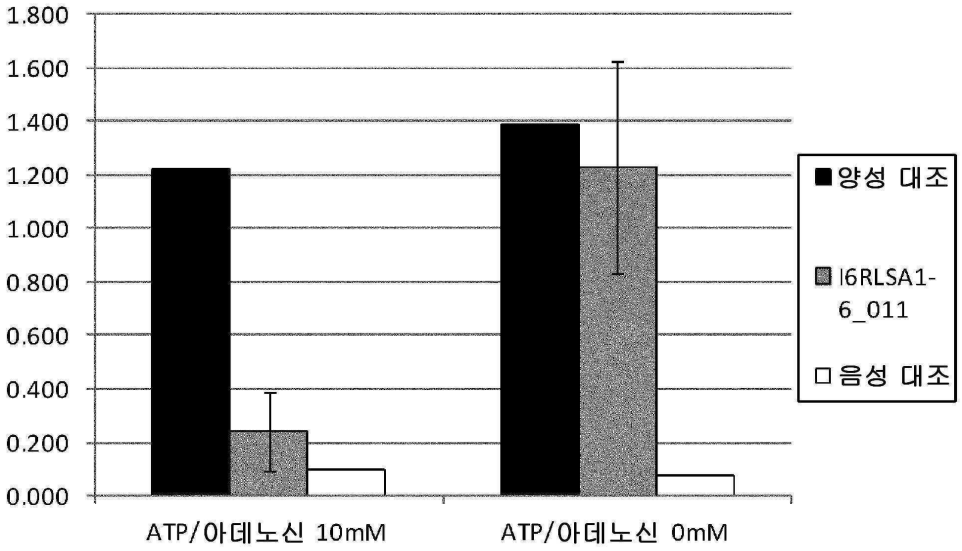
도면36



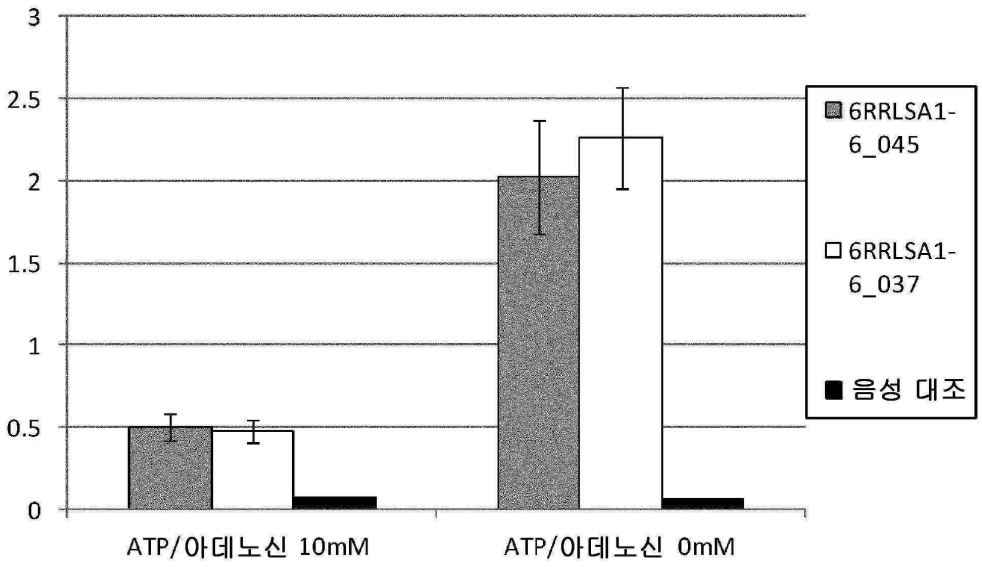
도면37


1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1
2
1
2
6RNMSC1-2_F02
MRA

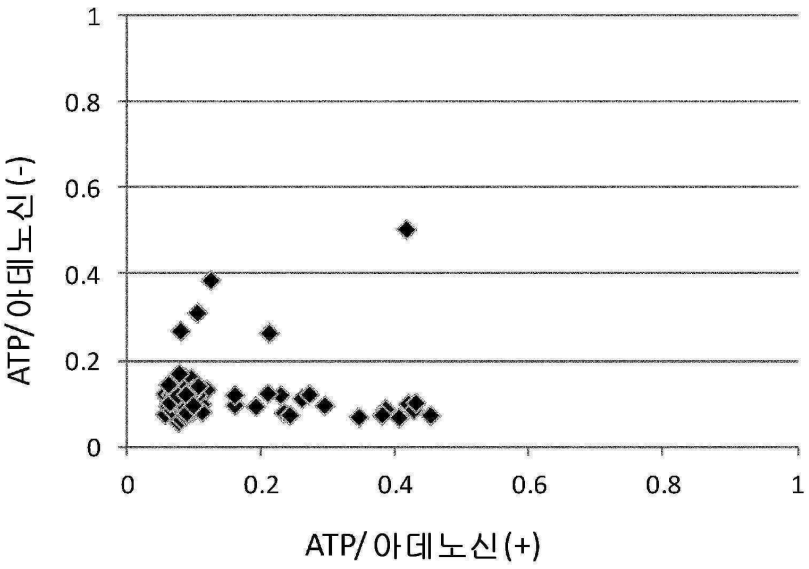
도면38


1.800
1.600
1.400
1.200
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
ATP/아데노신 10mM
ATP/아데노신 0mM
양성 대조
I6RLSA1-6_011
음성 대조

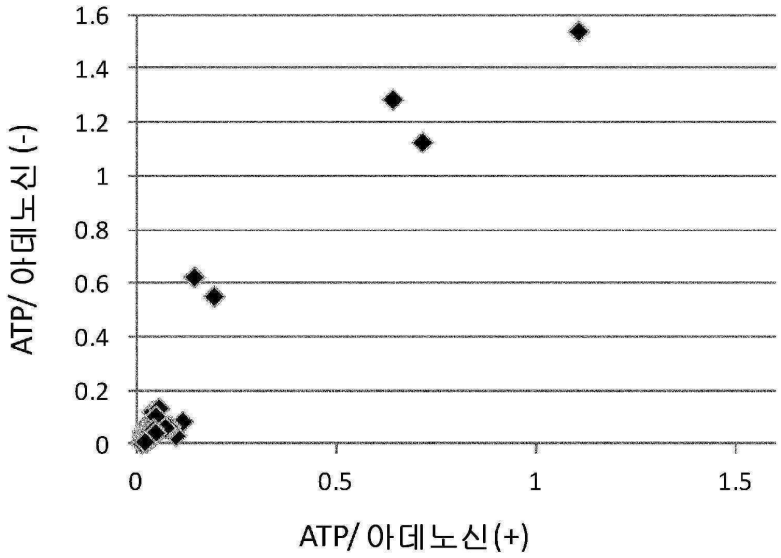
도면39


3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
ATP/아데노신 10mM
ATP/아데노신 0mM
6RRLSA1-6_045
6RRLSA1-6_037
음성 대조

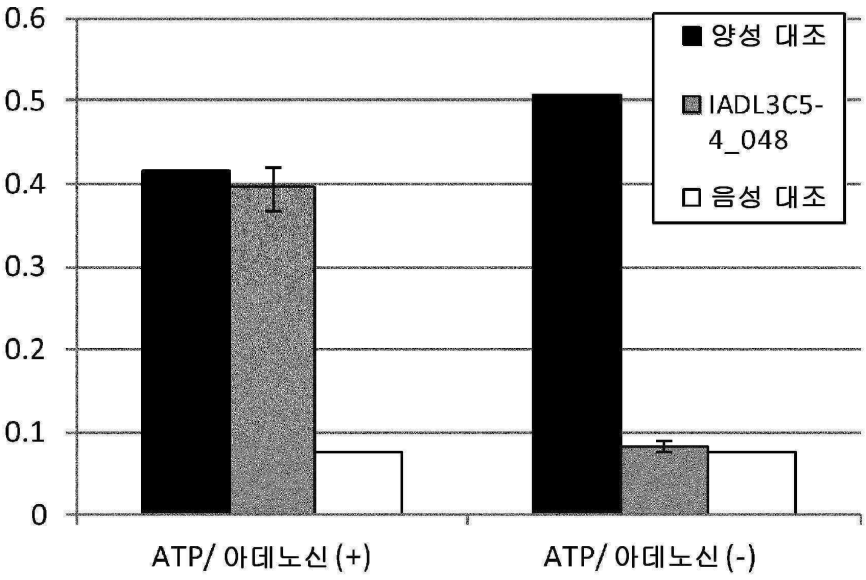
도면40


1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
ATP/아데노신(-)
ATP/아데노신(+)

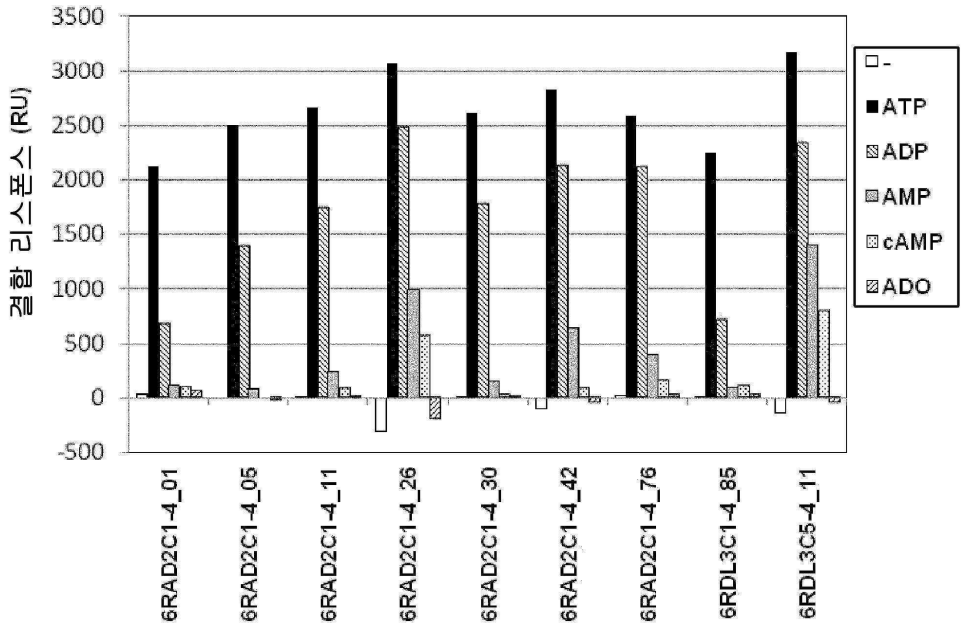
도면41


1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
ATP/ 아데노신 (-)
0
0.5
1
1.5
ATP/ 아데노신 (+)

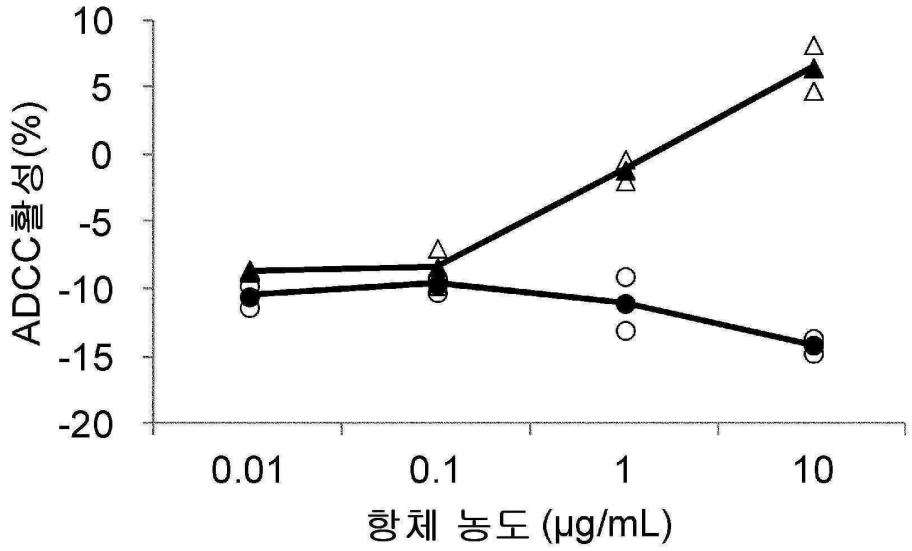
도면42


0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
양성 대조
IADL3C5-4_048
음성 대조
ATP/ 아데노신 (+)
ATP/ 아데노신 (-)

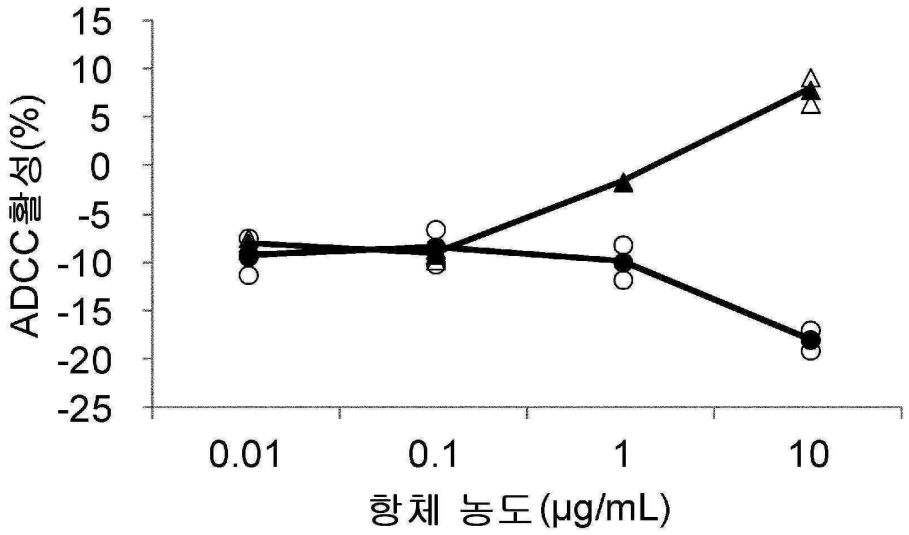
도면43


결합 리스폰스 (RU)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
-500
-
ATP
ADP
AMP
cAMP
ADO
6RAD2C1-4_01
6RAD2C1-4_05
6RAD2C1-4_11
6RAD2C1-4_26
6RAD2C1-4_30
6RAD2C1-4_42
6RAD2C1-4_76
6RDL3C1-4_85
6RDL3C5-4_11

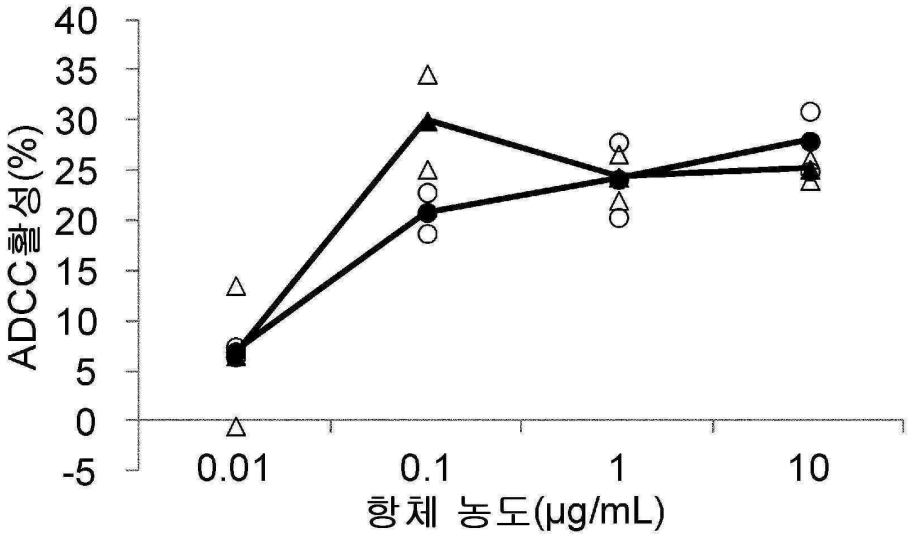
도면44a


ADCC활성(%)
10
5
0
-5
-10
-15
-20
0.01
0.1
1
10
항체 농도 (μg/mL)

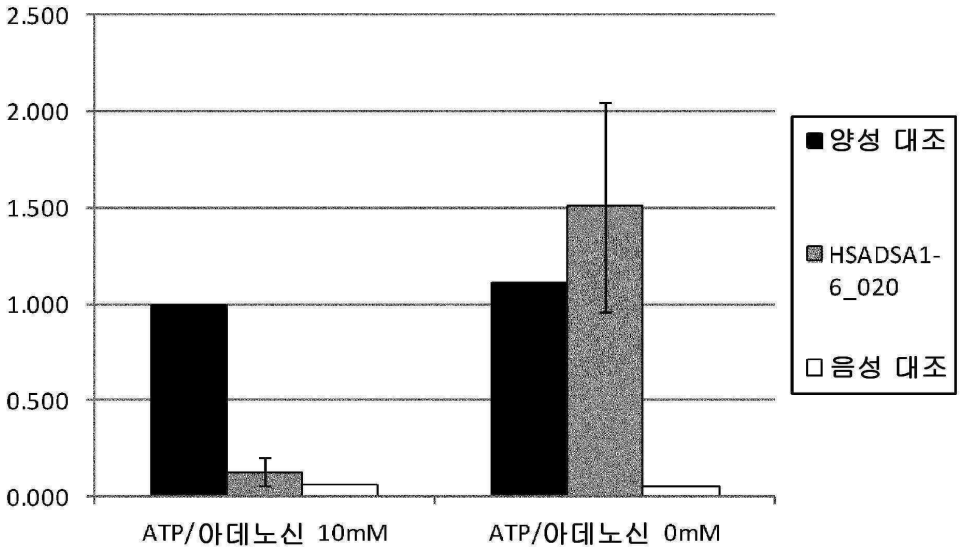
도면44b



도면44c



도면45



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> ANTIGEN BINDING MOLECULES SPECIFIC AT TARGET TISSUES

<130> C1-A1204Y1P

<150> JP 2012-123781

<151> 2012-05-30

<150> JP 2012-177311

<151> 2012-08-09

<160> 126

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 468

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Pro
1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Val Leu Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Pro
35 40 45

Gly Val Glu Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys
50 55 60

Pro Ala Ala Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg
65 70 75 80

Leu Leu Leu Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys

85 90 95

Tyr Arg Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val
100 105 110

Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser
115 120 125

```
Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr
    130                 135                 140
Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp

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

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

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

            340                 345                 350
Ser Leu Pro Val Gln Asp Ser Ser Ser Val Pro Leu Pro Thr Phe Leu
        355                 360                 365
Val Ala Gly Gly Ser Leu Ala Phe Gly Thr Leu Leu Cys Ile Ala Ile
```

370 375 380

Val Leu Arg Phe Lys Lys Thr Trp Lys Leu Arg Ala Leu Lys Glu Gly

385 390 395 400

Lys Thr Ser Met His Pro Pro Tyr Ser Leu Gly Gln Leu Val Pro Glu

405 410 415

Arg Pro Arg Pro Thr Pro Val Leu Val Pro Leu Ile Ser Pro Pro Val

420 425 430

Ser Pro Ser Ser Leu Gly Ser Asp Asn Thr Ser Ser His Asn Arg Pro

435 440 445

Asp Ala Arg Asp Pro Arg Ser Pro Tyr Asp Ile Ser Asn Thr Asp Tyr

450 455 460

Phe Phe Pro Arg

465

<210> 2

<211> 1407

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgctggccg tcggctgcgc gctgctggct gccctgctgg ccgcgccggg agcggcgctg 60

gccccaaggc gctgccctgc gcaggaggtg gcgagaggcg tgctgaccag tctgccagga 120

gacagcgtga ctctgacctg cccgggggta gagccggaag acaatgccac tgttcactgg 180

gtgctcagga agccggctgc aggctcccac cccagcagat gggctggcat gggaaggagg 240

ctgctgctga ggtcggtgca gctccacgac tctggaaact attcatgcta ccgggccggc 300

cgcccagctg ggactgtgca cttgctggtg gatgttcccc ccgaggagcc ccagctctcc 360

tgcttccgga agagcccccc cagcaatgtt gtttgtgagt ggggtcctcg gagcacccca 420

tccctgacga caaaggctgt gctcttggtg aggaagtttc agaacagtcc ggccgaagac 480

ttccaggagc cgtgccagta ttcccaggag tcccagaagt tctcctgcca gttagcagtc 540

ccggagggag acagctcttt ctacatagtg tccatgtgcg tcgccagtag tgtcgggagc 600

aagttcagca aaactcaaac ctttcagggt tgtggaatct tgcagcctga tccgcctgcc 660

aacatcacag tcactgccgt ggccagaaac ccccgctggc tcagtgtcac ctggcaagac 720

ccccactcct ggaactcatc tttctacaga ctacggtttg agctcagata tcgggctgaa 780

cggtcaaaga cattcacaac atggatggtc aaggacctcc agcatcactg tgtcatccac 840

gacgcctgga gcggcctgag gcacgtggtg cagcttcgtg cccaggagga gttcgggcaa 900

ggcgagtgga gcgagtggag cccggaggcc atgggcacgc cttggacaga atccaggagt 960

cctccagctg agaacgaggt gtccaccccc atgcaggcac ttactactaa taaagacgat 1020

gataatattc tcttcagaga ttctgcaaat gcgacaagcc tcccagtgca agattcttct 1080

tcagtaccac tgcccacatt cctggttgct ggagggagcc tggccttcgg aacgctcctc 1140

tgcattgcca ttgttctgag gttcaagaag acgtggaagc tgcgggctct gaaggaaggc 1200

aagacaagca tgcatccgcc gtactctttg gggcagctgg tcccggagag gcctcgaccc 1260

accccagtgc ttgttcctct catctcccca ccggtgtccc ccagcagcct ggggtctgac 1320

aatacctcga gccacaaccg accagatgcc agggacccac ggagcccttа tgacatcagc 1380

aatacagact acttcttccc cagatag 1407

<210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 3

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

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 4

<211> 21

<212> PRT

<213> Clostridium sp.

<400> 4

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser

1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu

20

<210> 5

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 5

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

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

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

<210> 6
<211> 326
<212> PRT

<213> Artificial sequence
<220><223> an artificially synthesized sequence
<400> 6
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

100 105 110

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

115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp

180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro

195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu

210 215 220

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

225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

245 250 255

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

260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys

275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 7

<211> 377

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
210 215 220

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

225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn

305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile

340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln

355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

370 375

<210> 8

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro

100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe

165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu

195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys

225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 9
<211> 1125
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> CDS
<222> (1)..(1125)
<400> 9

atg tgg ttc ttg aca act ctg ctc ctt tgg gtt cca gtt gat ggg caa 48

Met Trp Phe Leu Thr Thr Leu Leu Leu Trp Val Pro Val Asp Gly Gln
1 5 10 15
gtg gac acc aca aag gca gtg atc act ttg cag cct cca tgg gtc agc 96
Val Asp Thr Thr Lys Ala Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser
20 25 30
gtg ttc caa gag gaa acc gta acc ttg cac tgt gag gtg ctc cat ctg 144
Val Phe Gln Glu Glu Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val Leu His Leu

35 40 45
cct ggg agc agc tct aca cag tgg ttt ctc aat ggc aca gcc act cag 192
Pro Gly Ser Ser Ser Thr Gln Trp Phe Leu Asn Gly Thr Ala Thr Gln
50 55 60
acc tcg acc ccc agc tac aga atc acc tct gcc agt gtc aat gac agt 240
Thr Ser Thr Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Ser Ala Ser Val Asn Asp Ser
65 70 75 80

ggt gaa tac agg tgc cag aga ggt ctc tca ggg cga agt gac ccc ata 288
Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Arg Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Pro Ile
85 90 95
cag ctg gaa atc cac aga ggc tgg cta cta ctg cag gtc tcc agc aga 336

```
Gln Leu Glu Ile His Arg Gly Trp Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Arg
            100                 105                 110
gtc ttc acg gaa gga gaa cct ctg gcc ttg agg tgt cat gcg tgg aag        384

Val Phe Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Ala Trp Lys
        115                 120                 125
gat aag ctg gtg tac aat gtg ctt tac tat cga aat ggc aaa gcc ttt        432
Asp Lys Leu Val Tyr Asn Val Leu Tyr Tyr Arg Asn Gly Lys Ala Phe
    130                 135                 140
aag ttt ttc cac tgg aat tct aac ctc acc att ctg aaa acc aac ata        480
Lys Phe Phe His Trp Asn Ser Asn Leu Thr Ile Leu Lys Thr Asn Ile

145                 150                 155                 160
agt cac aat ggc acc tac cat tgc tca ggc atg gga aag cat cgc tac        528
Ser His Asn Gly Thr Tyr His Cys Ser Gly Met Gly Lys His Arg Tyr
                165                 170                 175
aca tca gca gga ata tct gtc act gtg aaa gag cta ttt cca gct cca        576
Thr Ser Ala Gly Ile Ser Val Thr Val Lys Glu Leu Phe Pro Ala Pro
            180                 185                 190

gtg ctg aat gca tct gtg aca tcc cca ctc ctg gag ggg aat ctg gtc        624
Val Leu Asn Ala Ser Val Thr Ser Pro Leu Leu Glu Gly Asn Leu Val
        195                 200                 205
acc ctg agc tgt gaa aca aag ttg ctc ttg cag agg cct ggt ttg cag        672
Thr Leu Ser Cys Glu Thr Lys Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu Gln
    210                 215                 220
ctt tac ttc tcc ttc tac atg ggc agc aag acc ctg cga ggc agg aac        720

Leu Tyr Phe Ser Phe Tyr Met Gly Ser Lys Thr Leu Arg Gly Arg Asn
225                 230                 235                 240
aca tcc tct gaa tac caa ata cta act gct aga aga gaa gac tct ggg        768
Thr Ser Ser Glu Tyr Gln Ile Leu Thr Ala Arg Arg Glu Asp Ser Gly
                245                 250                 255
tta tac tgg tgc gag gct gcc aca gag gat gga aat gtc ctt aag cgc        816
```

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

260 265 270

agc cct gag ttg gag ctt caa gtg ctt ggc ctc cag tta cca act cct 864

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

275 280 285

gtc tgg ttt cat gtc ctt ttc tat ctg gca gtg gga ata atg ttt tta 912

Val Trp Phe His Val Leu Phe Tyr Leu Ala Val Gly Ile Met Phe Leu

290 295 300

gtg aac act gtt ctc tgg gtg aca ata cgt aaa gaa ctg aaa aga aag 960

Val Asn Thr Val Leu Trp Val Thr Ile Arg Lys Glu Leu Lys Arg Lys

305 310 315 320

aaa aag tgg gat tta gaa atc tct ttg gat tct ggt cat gag aag aag 1008

Lys Lys Trp Asp Leu Glu Ile Ser Leu Asp Ser Gly His Glu Lys Lys

325 330 335

gta att tcc agc ctt caa gaa gac aga cat tta gaa gaa gag ctg aaa 1056

Val Ile Ser Ser Leu Gln Glu Asp Arg His Leu Glu Glu Glu Leu Lys

340 345 350

tgt cag gaa caa aaa gaa gaa cag ctg cag gaa ggg gtg cac cgg aag 1104

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

355 360 365

gag ccc cag ggg gcc acg tag 1125

Glu Pro Gln Gly Ala Thr

370

<210> 10

<211> 374

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Trp Phe Leu Thr Thr Leu Leu Leu Trp Val Pro Val Asp Gly Gln

1 5 10 15

Val Asp Thr Thr Lys Ala Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser

```
            20                  25                  30
Val Phe Gln Glu Glu Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val Leu His Leu
        35                  40                  45

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

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

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

Thr Ser Ser Glu Tyr Gln Ile Leu Thr Ala Arg Arg Glu Asp Ser Gly
                245                 250                 255
Leu Tyr Trp Cys Glu Ala Ala Thr Glu Asp Gly Asn Val Leu Lys Arg
            260                 265                 270
```

Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln Val Leu Gly Leu Gln Leu Pro Thr Pro
275 280 285

Val Trp Phe His Val Leu Phe Tyr Leu Ala Val Gly Ile Met Phe Leu
290 295 300

Val Asn Thr Val Leu Trp Val Thr Ile Arg Lys Glu Leu Lys Arg Lys
305 310 315 320

Lys Lys Trp Asp Leu Glu Ile Ser Leu Asp Ser Gly His Glu Lys Lys
325 330 335

Val Ile Ser Ser Leu Gln Glu Asp Arg His Leu Glu Glu Glu Leu Lys
340 345 350

Cys Gln Glu Gln Lys Glu Glu Gln Leu Gln Glu Gly Val His Arg Lys
355 360 365

Glu Pro Gln Gly Ala Thr
370

<210> 11

<211> 951

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(951)

<400> 11

atg act atg gag acc caa atg tct cag aat gta tgt ccc aga aac ctg 48
Met Thr Met Glu Thr Gln Met Ser Gln Asn Val Cys Pro Arg Asn Leu
1 5 10 15

tgg ctg ctt caa cca ttg aca gtt ttg ctg ctg ctg gct tct gca gac 96
Trp Leu Leu Gln Pro Leu Thr Val Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ala Asp
20 25 30

agt caa gct gct ccc cca aag gct gtg ctg aaa ctt gag ccc ccg tgg 144
Ser Gln Ala Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Pro Trp
35 40 45

atc aac gtg ctc cag gag gac tct gtg act ctg aca tgc cag ggg gct 192
Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Gln Gly Ala

50 55 60

cgc agc cct gag agc gac tcc att cag tgg ttc cac aat ggg aat ctc 240
Arg Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu
65 70 75 80
att ccc acc cac acg cag ccc agc tac agg ttc aag gcc aac aac aat 288
Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn
85 90 95
gac agc ggg gag tac acg tgc cag act ggc cag acc agc ctc agc gac 336

Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp
100 105 110
cct gtg cat ctg act gtg ctt tcc gaa tgg ctg gtg ctc cag acc cct 384
Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro
115 120 125
cac ctg gag ttc cag gag gga gaa acc atc atg ctg agg tgc cac agc 432
His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Met Leu Arg Cys His Ser

130 135 140
tgg aag gac aag cct ctg gtc aag gtc aca ttc ttc cag aat gga aaa 480
Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys
145 150 155 160
tcc cag aaa ttc tcc cat ttg gat ccc acc ttc tcc atc cca caa gca 528
Ser Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr Phe Ser Ile Pro Gln Ala
165 170 175

aac cac agt cac agt ggt gat tac cac tgc aca gga aac ata ggc tac 576
Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr
180 185 190
acg ctg ttc tca tcc aag cct gtg acc atc act gtc caa gtg ccc agc 624
Thr Leu Phe Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Val Pro Ser
195 200 205
atg ggc agc tct tca cca atg ggg gtc att gtg gct gtg gtc att gcg 672

Met Gly Ser Ser Ser Pro Met Gly Val Ile Val Ala Val Val Ile Ala

210 215 220

act gct gta gca gcc att gtt gct gct gta gtg gcc ttg atc tac tgc 720

Thr Ala Val Ala Ala Ile Val Ala Ala Val Val Ala Leu Ile Tyr Cys

225 230 235 240

agg aaa aag cgg att tca gcc aat tcc act gat cct gtg aag gct gcc 768

Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Asn Ser Thr Asp Pro Val Lys Ala Ala

245 250 255

caa ttt gag cca cct gga cgt caa atg att gcc atc aga aag aga caa 816

Gln Phe Glu Pro Pro Gly Arg Gln Met Ile Ala Ile Arg Lys Arg Gln

260 265 270

ctt gaa gaa acc aac aat gac tat gaa aca gct gac ggc ggc tac atg 864

Leu Glu Glu Thr Asn Asn Asp Tyr Glu Thr Ala Asp Gly Gly Tyr Met

275 280 285

act ctg aac ccc agg gca cct act gac gat gat aaa aac atc tac ctg 912

Thr Leu Asn Pro Arg Ala Pro Thr Asp Asp Asp Lys Asn Ile Tyr Leu

290 295 300

act ctt cct ccc aac gac cat gtc aac agt aat aac taa 951

Thr Leu Pro Pro Asn Asp His Val Asn Ser Asn Asn

305 310 315

<210> 12

<211> 316

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

1 5 10 15

Trp Leu Leu Gln Pro Leu Thr Val Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ala Asp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Arg Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu
65 70 75 80
Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn
85 90 95
Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp
100 105 110
Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro
115 120 125

His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Met Leu Arg Cys His Ser
130 135 140
Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys
145 150 155 160
Ser Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr Phe Ser Ile Pro Gln Ala
165 170 175
Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr
180 185 190

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

Gln Phe Glu Pro Pro Gly Arg Gln Met Ile Ala Ile Arg Lys Arg Gln
260 265 270
Leu Glu Glu Thr Asn Asn Asp Tyr Glu Thr Ala Asp Gly Gly Tyr Met
275 280 285
Thr Leu Asn Pro Arg Ala Pro Thr Asp Asp Asp Lys Asn Ile Tyr Leu
290 295 300

Thr Leu Pro Pro Asn Asp His Val Asn Ser Asn Asn

305 310 315

<210> 13

<

211> 876

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(876)

<400> 13

atg gga atc ctg tca ttc tta cct gtc ctt gcc act gag agt gac tgg 48

Met Gly Ile Leu Ser Phe Leu Pro Val Leu Ala Thr Glu Ser Asp Trp

1 5 10 15

gct gac tgc aag tcc ccc cag cct tgg ggt cat atg ctt ctg tgg aca 96

Ala Asp Cys Lys Ser Pro Gln Pro Trp Gly His Met Leu Leu Trp Thr

20 25 30

gct gtg cta ttc ctg gct cct gtt gct ggg aca cct gca gct ccc cca 144

Ala Val Leu Phe Leu Ala Pro Val Ala Gly Thr Pro Ala Ala Pro Pro

35 40 45

aag gct gtg ctg aaa ctc gag ccc cag tgg atc aac gtg ctc cag gag 192

Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu

50 55 60

gac tct gtg act ctg aca tgc cgg ggg act cac agc cct gag agc gac 240

Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Gly Thr His Ser Pro Glu Ser Asp

65 70 75 80

tcc att cag tgg ttc cac aat ggg aat ctc att ccc acc cac acg cag 288

Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile Pro Thr His Thr Gln

85 90 95

ccc agc tac agg ttc aag gcc aac aac aat gac agc ggg gag tac acg 336

Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr

100 105 110

tgc cag act ggc cag acc agc ctc agc gac cct gtg cat ctg act gtg 384

```
Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val
        115                 120                 125
ctt tct gag tgg ctg gtg ctc cag acc cct cac ctg gag ttc cag gag        432
Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu
    130                 135                 140

gga gaa acc atc gtg ctg agg tgc cac agc tgg aag gac aag cct ctg        480
Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu
145                 150                 155                 160
gtc aag gtc aca ttc ttc cag aat gga aaa tcc aag aaa ttt tcc cgt        528
Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg
                165                 170                 175
tcg gat ccc aac ttc tcc atc cca caa gca aac cac agt cac agt ggt        576

Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly
            180                 185                 190
gat tac cac tgc aca gga aac ata ggc tac acg ctg tac tca tcc aag        624
Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser Lys
        195                 200                 205
cct gtg acc atc act gtc caa gct ccc agc tct tca ccg atg ggg atc        672
Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Gly Ile

    210                 215                 220
att gtg gct gtg gtc act ggg att gct gta gcg gcc att gtt gct gct        720
Ile Val Ala Val Val Thr Gly Ile Ala Val Ala Ala Ile Val Ala Ala
225                 230                 235                 240
gta gtg gcc ttg atc tac tgc agg aaa aag cgg att tca gcc aat ccc        768
Val Val Ala Leu Ile Tyr Cys Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Asn Pro
                245                 250                 255

act aat cct gat gag gct gac aaa gtt ggg gct gag aac aca atc acc        816
Thr Asn Pro Asp Glu Ala Asp Lys Val Gly Ala Glu Asn Thr Ile Thr
            260                 265                 270
tat tca ctt ctc atg cac ccg gat gct ctg gaa gag cct gat gac cag        864
Tyr Ser Leu Leu Met His Pro Asp Ala Leu Glu Glu Pro Asp Asp Gln
```

275 280 285

aac cgt att tag 876

Asn Arg Ile

290

<210> 14

<211> 291

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Gly Ile Leu Ser Phe Leu Pro Val Leu Ala Thr Glu Ser Asp Trp

1 5 10 15

Ala Asp Cys Lys Ser Pro Gln Pro Trp Gly His Met Leu Leu Trp Thr

20 25 30

Ala Val Leu Phe Leu Ala Pro Val Ala Gly Thr Pro Ala Ala Pro Pro

35 40 45

Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu

50 55 60

Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Gly Thr His Ser Pro Glu Ser Asp

65 70 75 80

Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile Pro Thr His Thr Gln

85 90 95

Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr

100 105 110

Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val

115 120 125

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

130 135 140

Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu

145 150 155 160

Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg

165 170 175

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

225 230 235 240
Val Val Ala Leu Ile Tyr Cys Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Asn Pro
245 250 255
Thr Asn Pro Asp Glu Ala Asp Lys Val Gly Ala Glu Asn Thr Ile Thr
260 265 270
Tyr Ser Leu Leu Met His Pro Asp Ala Leu Glu Glu Pro Asp Asp Gln
275 280 285
Asn Arg Ile
290

<210> 15
<211> 765

<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> CDS
<222> (1)..(765)
<400> 15
atg tgg cag ctg ctc ctc cca act gct ctg cta ctt cta gtt tca gct 48
Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
1 5 10 15
ggc atg cgg act gaa gat ctc cca aag gct gtg gtg ttc ctg gag cct 96
Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
20 25 30

caa tgg tac agg gtg ctc gag aag gac agt gtg act ctg aag tgc cag 144
Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
35 40 45

```
gga gcc tac tcc cct gag gac aat tcc aca cag tgg ttt cac aat gag        192
Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
    50                  55                  60
agc ctc atc tca agc cag gcc tcg agc tac ttc att gac gct gcc aca        240

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
65                  70                  75                  80
gtt gac gac agt gga gag tac agg tgc cag aca aac ctc tcc acc ctc        288
Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
                85                  90                  95
agt gac ccg gtg cag cta gaa gtc cat atc ggc tgg ctg ttg ctc cag        336
Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln

            100                 105                 110
gcc cct cgg tgg gtg ttc aag gag gaa gac cct att cac ctg agg tgt        384
Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
        115                 120                 125
cac agc tgg aag aac act gct ctg cat aag gtc aca tat tta cag aat        432
His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
    130                 135                 140

ggc aaa ggc agg aag tat ttt cat cat aat tct gac ttc tac att cca        480
Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
145                 150                 155                 160
aaa gcc aca ctc aaa gac agc ggc tcc tac ttc tgc agg ggg ctt gtt        528
Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
                165                 170                 175
ggg agt aaa aat gtg tct tca gag act gtg aac atc acc atc act caa        576

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
            180                 185                 190
ggt ttg tca gtg tca acc atc tca tca ttc ttt cca cct ggg tac caa        624
Gly Leu Ser Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln
        195                 200                 205
gtc tct ttc tgc ttg gtg atg gta ctc ctt ttt gca gtg gac aca gga        672
```

Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly

210 215 220

cta tat ttc tct gtg aag aca aac att cga agc tca aca aga gac tgg 720

Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp

225 230 235 240

aag gac cat aaa ttt aaa tgg aga aag gac cct caa gac aaa tga 765

Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys

245 250

<210> 16

<211> 254

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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

1 5 10 15

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro

20 25 30

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln

35 40 45

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu

85 90 95

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln

100 105 110

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys

115 120 125

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn

130 135 140

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

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

245 250

<210> 17
<211> 702
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> CDS
<222> (1)..(702)
<400> 17
atg tgg cag ctg ctc ctc cca act gct ctg cta ctt cta gtt tca gct 48
Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
1 5 10 15
ggc atg cgg act gaa gat ctc cca aag gct gtg gtg ttc ctg gag cct 96
Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro

20 25 30
caa tgg tac agc gtg ctt gag aag gac agt gtg act ctg aag tgc cag 144
Gln Trp Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
35 40 45
gga gcc tac tcc cct gag gac aat tcc aca cag tgg ttt cac aat gag 192
Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu

50 55 60

agc ctc atc tca agc cag gcc tcg agc tac ttc att gac gct gcc aca 240
Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
65 70 75 80
gtc aac gac agt gga gag tac agg tgc cag aca aac ctc tcc acc ctc 288
Val Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
85 90 95
agt gac ccg gtg cag cta gaa gtc cat atc ggc tgg ctg ttg ctc cag 336

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
100 105 110
gcc cct cgg tgg gtg ttc aag gag gaa gac cct att cac ctg agg tgt 384
Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
115 120 125
cac agc tgg aag aac act gct ctg cat aag gtc aca tat tta cag aat 432
His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn

130 135 140
ggc aaa gac agg aag tat ttt cat cat aat tct gac ttc cac att cca 480
Gly Lys Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro
145 150 155 160
aaa gcc aca ctc aaa gat agc ggc tcc tac ttc tgc agg ggg ctt gtt 528
Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
165 170 175

ggg agt aaa aat gtg tct tca gag act gtg aac atc acc atc act caa 576
Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
180 185 190
ggt ttg gca gtg tca acc atc tca tca ttc tct cca cct ggg tac caa 624
Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Tyr Gln
195 200 205
gtc tct ttc tgc ttg gtg atg gta ctc ctt ttt gca gtg gac aca gga 672

Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly

210 215 220

cta tat ttc tct gtg aag aca aac att tga 702

Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile

225 230

<210> 18

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

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

1 5 10 15

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro

20 25 30

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

35 40 45

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu

85 90 95

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln

100 105 110

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys

115 120 125

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn

130 135 140

Gly Lys Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly

210 215 220

Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile

225 230

<210> 19

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 19

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 20

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><

223> an artificially synthesized sequence

<400> 20

Ser Gly Gly Gly

1

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 21

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 22

Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223

> an artificially synthesized sequence

<400> 23

Gly Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 24

Ser Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 25

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 26

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 27

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 28

<211> 365

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Gly Val Pro Arg Pro Gln Pro Trp Ala Leu Gly Leu Leu Leu Phe

1 5 10 15

Leu Leu Pro Gly Ser Leu Gly Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr
20 25 30
His Leu Thr Ala Val Ser Ser Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp
35 40 45
Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu

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

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

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

245 250 255
Phe His Ala Ser Ser Ser Leu Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His

260 265 270

Tyr Cys Cys Ile Val Gln His Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val

275 280 285

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

290 295 300

Ile Gly Val Leu Leu Leu Thr Ala Ala Ala Val Gly Gly Ala Leu Leu

305 310 315 320

Trp Arg Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Ile Ser Leu Arg

325 330 335

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

340 345 350

Ala Asp Leu Lys Asp Val Asn Val Ile Pro Ala Thr Ala

355 360 365

<210> 29

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser

35 40 45

Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu

50 55 60

Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp

65 70 75 80

Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp

85 90 95

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

100 105 110

Val Lys Trp Asp Arg Asp Met

115

<210> 30

<211> 451

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Ala Val Thr Gly Asp Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

195 200 205

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

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

245 250 255

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

260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435 440 445

Pro Gly Lys

450

<210> 31

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr

35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His

85 90 95

Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly

145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala

165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser

180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210

<210> 32

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 32

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

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

20 25 30

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

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

Leu Glu Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

145 150 155 160

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

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

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

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

405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

<210> 33

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 33

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 34

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

420 425 430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

<210> 35
<211> 219
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> an artificially synthesized sequence
<400> 35
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
35 40 45
Pro Arg 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
85 90 95

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

145 150 155 160

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

<210> 36
<211> 453

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 36
Gln Val Gln Leu Val Leu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Met Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Pro Gln Ser Gly Asp Thr His Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Val Ser Thr Gly Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Gly Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Ser Leu Ile Thr Ala Ala Gly Pro Pro Pro Phe Glu His
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

130 135 140

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

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

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

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

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

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

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

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

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

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

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 37
<211> 213
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 37
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Met Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Ala Thr Met Pro Cys Ser Gly Asn Gly Leu Gly Asp Lys Phe Val
20 25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly His Ser Pro Val Ala Val Ile Tyr
35 40 45

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

Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala
115 120 125
Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala

130 135 140

Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val
145 150 155 160

Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser
165 170 175

Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr
180 185 190

Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala
195 200 205

Pro Thr Glu Cys Ser
210

<210> 38

<211> 446

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 38

Cys Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr
1 5 10 15

Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Gly Ala Asp Ser Ser Thr Trp Tyr Pro Ser Trp Val Lys
50 55 60

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

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

Arg Phe Val Gly Tyr Thr Asn Ala Phe Asp Pro Trp Gly Pro Gly Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 39

<211> 220

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 39

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

1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Trp Asn Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

195 200 205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 40
<211> 452
<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus
<400> 40
Cys Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr
1 5 10 15
Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Lys Ser Tyr Val Asn Ser Asn Gly Tyr Phe Ile Phe Ser Arg Leu Asp
100 105 110
Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

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

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

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

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
355 360 365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro
450

<210> 41
<211> 218
<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus
<400> 41

Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Ala Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Lys Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30

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

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

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

Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Ser Gly
85 90 95

Ile Pro Ile Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 42
<211> 446
<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus
<400> 42
Cys Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr
1 5 10 15
Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Asn
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

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

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

355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 43
<211> 219
<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus
<400> 43

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

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

100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 44

<211> 443

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 44

Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Met Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Phe Ile Asp Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Val Asn Val Asp Tyr Tyr Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

405 410 415

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

420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440

<210> 45

<211> 217

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 45

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

1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Ile Gly Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Arg Thr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 46

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Phe Gly Arg Lys Gly Asp Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 47

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Tyr Ala Gly Ser

85 90 95

Asn Asn Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 48

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 48

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 49

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 49

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu

100 105

<210> 50

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Pro Leu Val Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445
Lys

<210> 51

<211> 219

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Leu Ser Leu Leu Asn Arg
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Asn Arg Val Glu Ala Asp Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 52

<211> 450

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Arg Gly Met Gly Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

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

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

385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Lys
450

<210> 53

<211> 216

<212

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr His Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 54

<211> 456

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Trp Asn Asp Ala Ser Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Glu Gly Ser Ser Pro Lys Thr Pro Thr Ser Thr Trp Ser Ser

100 105 110

Leu Glu Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 55

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

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

Met Ile His Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
85 90 95

Thr Thr Pro Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu

195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 56

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 57

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

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

1 5 10

<210> 58

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 60

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys

20

<210> 61

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

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

1 5 10 15

<210>

62

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

1 5 10

<210> 64

<211> 50

<

212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<220><221> misc_feature

<222> (38)..(38)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 64

tattactcgc ggcccagccg gccatggcag ccwtcganwt gacccagact 50

<210> 65

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<220><221> misc_feature

<222> (39)..(39)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 65

tattactcgc ggcccagccg gccatggcag cctatgatnt gacccagact 50

<210> 66

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 66

tattactcgc ggcccagccg gccatggcag cbcaagtgct gacccagact 50

<210> 67

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 67

tattactcgc ggcccagccg gccatggcag ccmtygtgat gacccagact 50

<210> 68

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 68

tattactcgc ggcccagccg gccatggcag ccgccgtgct gacccagact 50

<210> 69

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 69

tattactcgc ggcccagccg gccatggcgg ctgacattgt gatgacccag 50

<210> 70

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 70

tattactcgc ggcccagccg gccatggccg ccgayrtygt gatgacccag 50

<210> 71

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 71

ctcttctaga acgcgtctaa gcgtcacccc tattgaagct c 41

<210> 72

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 72

tattactcgc ggcccagccg gccatggcgc agcyygtgct gactcagtcg ccctc 55

<210> 73

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 73

ctcttctaga acgcgtctaa gcttctgcag gggccaggct cttc 44

<210> 74

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 74

ttccgcctcg gcgctagccc aggagcagst ggwggagtcc 40

<210> 75

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<220><221> misc_feature

<222> (25)..(26)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 75

ttccgcctcg gcgctagccc agtcnntgga ggagtccggg 40

<210> 76

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(27)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 76

ttccgcctcg gcgctagccc agtcgnngga ggagtccggg 40

<210> 77

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 77

ttccgcctcg gcgctagccc agcagcagct ggwggagtcc 40

<210> 78

<211> 122

<

212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Thr His Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Arg Arg Trp Ala Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 79

<211> 110

<212

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Met Ile Tyr Gly Gly Ser Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Leu Lys Ser Tyr Ala

85 90 95

Glu Gly Pro Met Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 80

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn His Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Tyr Gly His Arg Arg Asp Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 81

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Met Ile Tyr Gly Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 82

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

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

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

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

<210> 83
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 83
Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Arg Ser Ser Ser

85 90 95

Met Asn Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 84

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Ala Leu Gly Gln Arg Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 85

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Met Ile Tyr Gln Thr Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

His Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 86

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Ala Pro Val Val Ala Arg Pro Arg Gly Ala Phe Asp Ile

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 87

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile His Glu Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gln Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 88

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Val Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 89

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Trp Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 90

<211> 328

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

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

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

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

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

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

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

325

<210> 91

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 92

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
35 40 45

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

50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 93

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 94

<211> 328

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 94

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 95
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 95
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
20 25 30
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 96
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 96
Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30
Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

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

100 105 110

<210> 97
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 97

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

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Phe Gly Lys Lys Gly Arg Tyr Leu Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 98
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 98

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

35 40 45

Met Ile Tyr Tyr Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 99

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400

> 99

Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu

1 5 10 15

Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp

20 25 30

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

35 40 45

Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val Ser

50 55 60

Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr Phe

65 70 75 80

Thr Cys Thr Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala Thr

85 90 95

Leu Ser Lys Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro

100 105 110

Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys

115 120 125

Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln

130 135 140

Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg
145 150 155 160

Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu
165 170 175

Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met
180 185 190

Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp
195 200 205

Arg Leu Ala Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe
210 215 220

Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
225 230

<210> 100

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

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

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly His
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn His Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Gly Arg Lys Phe Met Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 101

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Phe Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Gln Asn Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Leu Ser Pro Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 102

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 102

actcgcggcc cagccggcca tggcg 25

<210> 103

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 103

taggacggtc agcttggtac ctccgcc 27

<210> 104

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 104

gcgcagccgg cgctagcc 18

<210> 105

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 105

tgggcccttg gtcgacgc 18

<210> 106

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Gly His Arg His Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Lys Lys Gly Asn Arg Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 107

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Met Ile Tyr Ser Thr Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 108

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400

> 108

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn His Arg Ser Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Phe Gly Lys Arg Phe Asp Arg Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 109

<211> 110

<212

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Met Ile Tyr Lys Thr Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Arg Arg Tyr Arg

85 90 95

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

100 105 110

<210> 110

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 110

cgcaacgcaa ttaatgtgag 20

<210> 111

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 111

gcgtcacact ttgctatg 18

<210> 112

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 112

tgagttccac gacaccgtca c 21

<210> 113

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

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

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly His
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Gly Arg Leu His Asp Arg Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 114
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 114
Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Asp Tyr
20 25 30
Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45
Met Ile Tyr Gln Val Ser Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Arg Ser Tyr Gly
85 90 95
Ala Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110
<210> 115
<211> 122
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400

> 115

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Phe Gly Lys Leu Gly Glu Arg Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 116

<211> 110

<212

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

His Gly Pro Met Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 117

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Ala His Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Arg Leu Gly Asp Arg Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 118

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Met Ile Tyr Lys Val Ser Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gly Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 119

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 119

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Gly Tyr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Phe Gly Ala Leu Asn Thr Leu Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 120

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Met Ile Tyr Gln Val Ser Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gly Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 121

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Ala Ser Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Arg Leu Asn Ser His Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 122

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Met Ile Tyr Gln Gly Ser Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Thr Arg Ala Thr Thr

85 90 95

Lys Gly Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 123

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

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

Gly Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly His
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Gly Arg Leu His Asp Arg Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 124

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Asp Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Gln Val Ser Lys Lys Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 125

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Ser Gly Tyr Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Phe Gly Lys Leu Asn His Met Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 126

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Gly Thr Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Gln Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Thr Arg Ala Ile Thr
85 90 95

Arg Gly Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110