

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0109552

(43) 공개일자 2021년09월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) *A61K 38/26* (2006.01)*A61K 39/00* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)*A61P 3/10* (2006.01) *C07K 14/605* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/2869 (2013.01)*A61K 38/26* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-7021692

(22) 출원일자(국제) 2019년12월20일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2021년07월09일

(86) 국제출원번호 PCT/CN2019/126903

(87) 국제공개번호 WO 2020/125744

국제공개일자 2020년06월25일

(30) 우선권주장

201811573634.0 2018년12월21일 중국(CN)

201811606887.3 2018년12월27일 중국(CN)

(71) 출원인

지양수 헨그루이 메디슨 컴퍼니 리미티드

중국, 지양수 222047, 리안원강, 이코노믹 앤드
테크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 7 곤룬산 로드

상하이 헨그루이 파마수티컬 컴퍼니 리미티드

중국, 상하이 200245, 민항 디스트릭트, 웬징 로
드, 279

(72) 발명자

카오, 저우샤오

중국, 상하이 200245, 민항 디스트릭트, 웬징 로
드, 279

루오, 샤오

중국, 상하이 200245, 민항 디스트릭트, 웬징 로
드, 279

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

안소영

전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 이중특이적 단백질

(57) 요약

체중 감량 및 당뇨 치료에 이용될 수 있는 인간 GCGR 항체, GLP-1 펩티드 및 이의 돌연변이체, 및 GCGR 항체 및 GLP-1 펩티드의 융합에 의해 형성된 이중특이적 단백질, 및 이의 제조 방법이 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)

A61P 3/10 (2018.01)

C07K 14/605 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

(72) 발명자

허, 닝

중국, 상하이 200245, 민항 디스트릭트, 웬징
로드, 279

후, 치웨이

중국, 상하이 200245, 민항 디스트릭트, 웬징
로드, 279

장, 리안산

중국, 상하이 200245, 민항 디스트릭트, 웬징
로드, 279

타오, 웨이강

중국, 상하이 200245, 민항 디스트릭트, 웬징
로드, 279

명세서

청구범위

청구항 1

항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 다음으로 구성된 군으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 조합을 포함하는 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

- a) 각각 서열번호 48, 49 및 50에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 각각 서열번호 51, 52 및 53에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- b) 각각 서열번호 38, 39 및 54에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 각각 서열번호 55, 56 및 57에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역.

청구항 2

제1항에 있어서, 다음으로 구성된 군으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 조합을 포함하는 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

- i) 각각 서열번호 14, 15 및 16에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 각각 서열번호 17, 18 및 19에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- ii) 각각 서열번호 20, 21 및 22에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 각각 서열번호 23, 24 및 25에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- iii) 각각 서열번호 26, 27 및 28에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 각각 서열번호 29, 30 및 31에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- iv) 각각 서열번호 32, 33 및 34에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 각각 서열번호 35, 36 및 37에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- v) 각각 서열번호 38, 39 및 40에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 각각 서열번호 41, 42 및 43에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및
- vi) 각각 서열번호 38, 39 및 44에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 각각 서열번호 45, 46 및 47에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 무린 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 키메라 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제3항에 있어서, 인간화 항체는 인간 항체로부터 유래한 프레임워크 영역 또는 이의 프레임워크 영역 변이체를 포함하고,

프레임워크 영역 변이체는 각각 인간 항체의 경쇄 프레임워크 영역 및/또는 중쇄 프레임워크 영역의 최대 10개의 아미노산 복귀 돌연변이를 갖고,

바람직하게는, 아미노산 복귀 돌연변이는 다음으로부터 선택되는 것인, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

- aa) 경쇄 가변 영역에 포함된 42G, 44V, 71Y 및 87F 중 1개 이상의 복귀 돌연변이, 및/또는 중쇄 가변 영역에 포함된 38K, 48I, 67A, 69F, 71A, 73P, 78A 및 93S 중 1개 이상의 복귀 돌연변이; 또는
- ab) 경쇄 가변 영역에 포함된 38L, 44V, 59S, 70E 및 71Y 중 1개 이상의 복귀 돌연변이, 및/또는 중쇄 가변 영역에 포함된 38K, 48I, 66K, 67A, 69L, 73R, 78M 및 94S 중 1개 이상의 복귀 돌연변이.

청구항 5

제3항에 있어서, 다음으로 구성된 군으로부터 선택되는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역의 조합을 포함하는 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

- c) 서열이 서열번호 2, 61, 62, 63 및 64 중 어느 하나에 제시된 바와 같거나, 서열번호 2, 61, 62, 63 및 64 중 어느 하나와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열이 서열번호 3, 58, 59 및 60 중 임의의 하나에 제시된 바와 같거나, 서열번호 3, 58, 59 및 60 중 어느 하나와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역;
- d) 서열이 서열번호 4에 제시된 바와 같거나, 서열번호 4와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열이 서열번호 5에 제시된 바와 같거나, 서열번호 5와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역;
- e) 서열이 서열번호 6에 제시된 바와 같거나, 서열번호 6과 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열이 서열번호 7에 제시된 바와 같거나, 서열번호 7과 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역;
- f) 서열이 서열번호 8, 68, 69, 70 및 71 중 어느 하나에 제시된 바와 같거나, 서열번호 8, 68, 69, 70 및 71 중 어느 하나와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열이 서열번호 9, 65, 66 및 67 중 어느 하나에 제시된 바와 같거나, 서열번호 9, 65, 66 및 67 중 어느 하나와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역;
- g) 서열이 서열번호 10에 제시된 바와 같거나, 서열번호 10과 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열이 서열번호 11에 제시된 바와 같거나, 서열번호 11과 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 및
- h) 서열이 서열번호 12에 제시된 바와 같거나, 서열번호 12와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역; 및 서열이 서열번호 13에 제시된 바와 같거나, 서열번호 13과 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 전장 항체이고, 항체 불변 영역을 추가로 포함하며,

바람직하게는, 중쇄 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 불변 영역 및 이의 종래의 변이체로 구성된 군으로부터 선택되고, 경쇄 불변 영역은 인간 항체 κ 및 λ 불변 영역 및 이의 종래의 변이체로 구성된 군으로부터 선택되고,

더욱 바람직하게는, 서열번호 72에 제시된 바와 같은 인간 항체 중쇄 불변 영역 및 서열번호 73에 제시된 바와 같은 인간 항체 경쇄 불변 영역을 포함하는 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 7

제6항에 있어서, 다음으로 구성된 군 중 어느 하나로부터 선택되는 중쇄 및 경쇄의 조합을 포함하는 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

- j) 서열번호 74, 76 또는 78에 제시된 바와 같거나 이와 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 및 서열번호 75, 77 또는 79에 제시된 바와 같거나 이와 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 경쇄;
- k) 서열번호 80에 제시된 바와 같거나 이와 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 및 서열번호 81에 제시된 바와 같거나 이와 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 경쇄;
- l) 서열번호 82에 제시된 바와 같거나 이와 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 및 서열번호 83에 제시된 바와 같거나 이와 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 경쇄;
- m) 서열번호 84에 제시된 바와 같거나 이와 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 및 서열번호 85에 제시된 바와 같거나 이와 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 경쇄;
- n) 서열번호 86에 제시된 바와 같거나 이와 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 및 서열번호 87에 제시된 바와 같거나 이와 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 경쇄; 및
- o) 서열번호 88에 제시된 바와 같거나 이와 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 및 서열번호 89에 제시된 바와 같거나 이와 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 경쇄.

청구항 8

항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 다음으로 구성된 군으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 조합을 포함하는 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

- ac) 서열번호 2에 제시된 중쇄 가변 영역과 동일한 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 3에 제시된 경쇄 가변 영역과 동일한 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- ad) 서열번호 4에 제시된 중쇄 가변 영역과 동일한 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 5에 제시된 경쇄 가변 영역과 동일한 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- ae) 서열번호 6에 제시된 중쇄 가변 영역과 동일한 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 7에 제시된 경쇄 가변 영역과 동일한 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- af) 서열번호 8에 제시된 중쇄 가변 영역과 동일한 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 9에 제시된 경쇄 가변 영역과 동일한 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- ag) 서열번호 10에 제시된 중쇄 가변 영역과 동일한 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 11에 제시된 경쇄 가변 영역과 동일한 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- ah) 서열번호 12에 제시된 중쇄 가변 영역과 동일한 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 13에 제시된 경쇄 가변 영역과 동일한 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, 단쇄 항체, 이량체화 V 영역(디아바디) 및 이황화 안정화 V 영역(dsFv)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 10

GLP-1 펩티드 및 항-GCGR 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 이중특이적 단백질로서, GLP-1 펩티드는 펩티드 결합 또는 링커를 통해 항-GCGR 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 공유결합으로 연결되는 것인 이중특이적 단백질.

청구항 11

제10항에 있어서,

GLP-1 펩티드의 카복시 말단은 펩티드 결합 또는 링커를 통해 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 가변 영역의 아미노 말단에 연결되거나; 또는

GLP-1 펩티드의 카복시 말단은 펩티드 결합 또는 링커를 통해 항-GCGR 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 가변 영역의 아미노 말단에 연결되는 것인 이중특이적 단백질.

청구항 12

제11항에 있어서, 항-GCGR 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 이중특이적 단백질.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

GLP-1 펩티드는 서열번호 91에 제시된 바와 같은 GLP-1 펩티드 또는 이의 변이체이고,

GLP-1 펩티드 변이체는 서열번호 91에 제시된 바와 같은 GLP-1 펩티드에 기반한 Q17E, I23V, K28R 및 G30R 중 1개 이상의 아미노산 돌연변이를 포함하고,

바람직하게는, GLP-1 펩티드 변이체는 Q17E 돌연변이를 포함하거나, 또는 Q17E 및 I23V 돌연변이를 포함하는 것인 이중특이적 단백질.

청구항 14

제13항에 있어서, GLP-1 펩티드 변이체의 서열은 서열번호 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99에 제시된 바와 같은 것인 이중특이적 단백질.

청구항 15

제14항에 있어서, 제1 폴리펩티드 쇠 및 제2 폴리펩티드 쇠를 포함하고, 제1 폴리펩티드 쇠는 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항-GCGR 단클론 항체의 중쇄를 포함하고, 제2 폴리펩티드 쇠는 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항-GCGR 단클론 항체의 경쇄를 포함하고,

(ai) 제1 폴리펩티드 쇠는 서열번호 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107 및 108 중 어느 하나로부터 선택되는 폴리펩티드를 포함하고, 제2 폴리펩티드 쇠는 서열번호 79에 제시된 바와 같은 폴리펩티드를 포함하거나;

(aj) 제1 폴리펩티드 쇠는 서열번호 109에 제시된 바와 같은 폴리펩티드를 포함하고, 제2 폴리펩티드 쇠는 서열번호 81에 제시된 바와 같은 폴리펩티드를 포함하거나;

(ak) 제1 폴리펩티드 쇠는 서열번호 110에 제시된 바와 같은 폴리펩티드를 포함하고, 제2 폴리펩티드 쇠는 서열번호 83에 제시된 바와 같은 폴리펩티드를 포함하거나;

(al) 제1 폴리펩티드 쇠는 서열번호 111에 제시된 바와 같은 폴리펩티드를 포함하고, 제2 폴리펩티드 쇠는 서열번호 85에 제시된 바와 같은 폴리펩티드를 포함하거나;

(am) 제1 폴리펩티드 쇠는 서열번호 112에 제시된 바와 같은 폴리펩티드를 포함하고, 제2 폴리펩티드 쇠는 서열번호 87에 제시된 바와 같은 폴리펩티드를 포함하거나;

(an) 제1 폴리펩티드 쇠는 서열번호 113에 제시된 바와 같은 폴리펩티드를 포함하고, 제2 폴리펩티드 쇠는 서열번호 89에 제시된 바와 같은 폴리펩티드를 포함하는 것인 이중특이적 단백질.

청구항 16

GLP-1 펩티드 변이체로서, 서열번호 91에 제시된 바와 같은 GLP-1 펩티드에 기반한 Q17E, I23V, K28R 및 G30R 중 1개 이상의 아미노산 돌연변이를 포함하고, 바람직하게는 Q17E 돌연변이를 포함하거나, 또는 Q17E 및 I23V 돌연변이를 포함하는 GLP-1 펩티드 변이체.

청구항 17

제16항에 있어서, GLP-1 펩티드 변이체의 서열은 서열번호 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99에 제시된 바와 같은 것인 GLP-1 펩티드 변이체.

청구항 18

제약 조성물로서,

치료적 유효량의, 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 단백질, 또는 제16항 또는 제17항에 따른 GLP-1 펩티드 변이체, 및

1종 이상의 제약상 허용 가능한 담체, 희석제, 완충제 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 단백질, 또는 제16항 또는 제17항에 따른 GLP-1 펩티드 변이체를 암호화하는 단리된 핵산 분자.

청구항 20

제19항의 단리된 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 21

제20항의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주 세포로서, 원핵생물 세포 또는 진핵생물 세포로 구성된 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 진핵생물 세포, 더욱 바람직하게는 포유류 세포 또는 곤충 세포인 숙주 세포.

청구항 22

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 단백질, 또는 제16항 또는 제17항에 따른 GLP-1 펩티드 변이체의 제조 방법으로서,

제21항에 따른 숙주 세포를 배양하여 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 단백질, 또는 제16항 또는 제17항에 따른 GLP-1 펩티드 변이체를 생성하는 단계, 및

배양물로부터 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 이중특이적 단백질, 또는 GLP-1 펩티드 변이체를 회수하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 23

샘플에서 인간 GCGR을 검출하기 위한 시약으로서, 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 시약.

청구항 24

개체의 혈당 농도를 낮추는 방법으로서,

개체에게 치료적 유효량의, 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 단백질, 또는 제16항 또는 제17항에 따른 GLP-1 펩티드 변이체, 또는 제18항에 따른 제약 조성물을 투여하는 단계를 포함하고,

바람직하게는, 치료적 유효량은 단위 용량 내의 0.1 내지 3000 mg의 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 단백질, 또는 제16항 또는 제17항에 따른 GLP-1 펩티드 변이체인 것인 방법.

청구항 25

대사 장애의 치료 방법으로서,

개체에게 치료적 유효량의, 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 단백질, 또는 제16항 또는 제17항에 따른 GLP-1 펩티드 변이체, 또는 제18항에 따른 제약 조성물을 투여하는 단계를 포함하고,

바람직하게는, 대사 장애는 대사 증후군, 비만, 내당능 장애, 당뇨병, 당뇨병 케톤산증, 고혈당증, 고혈당성 고삼투압 증후군, 수술 전후 고혈당증, 고인슐린혈증, 인슐린 저항성 증후군, 공복 혈당 장애, 이상지질혈증, 즉 상동맥경화증 및 당뇨병 전 상태로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2018년 12월 21일 출원된 특허 출원 제201811573634.0호 및 2018년 12월 27일 출원된 특허 출원 제201811606887.3호의 우선권을 주장하며, 두 특허 출원은 본원에 참조로 포함된다.

[0002] [기술분야]

[0003] 본 개시는 인간 GCGR 항체, GLP-1 펩티드 및 이의 돌연변이체 및 GLP-1 펩티드에 융합된 GCGR 항체에 의해 형성된 이중특이적 단백질, 및 이의 제조 방법 및 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] 본원의 설명은 단지 본 개시에 관한 배경 정보를 제공하는 것으로, 반드시 선행 기술을 구성하는 것은 아니다.

- [0005] 당뇨병(diabetes mellitus, DM)은 인슐린 분비의 결함 및/또는 인슐린 기능장애로 인한 높은 혈당 수준을 특징으로 하는 대사 질환이다. 이 질환의 발병은 주로 인슐린과 글루카곤의 공동 작용에 의해 일어난다.
- [0006] GLP-1은 인슐린 분비에 영향을 미치는 가장 중요한 호르몬 중 하나이며, GLP-1과 글루카곤은 모두 프리프로인슐린에서 유래된다. 프리프로인슐린은 약 158개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 다양한 위치에서 다양한 펩티드 사슬로 절단될 수 있다. 인체에서 생물학적으로 활성화된 GLP-1은 주로 GLP-1(7-36) 아미드와 GLP-1(7-37)의 두 가지 형태를 포함한다. GLP-1은 소장 L 세포에 의해 분비되고, 주로 글루코스 농도 의존적 방식으로 인슐린 분비를 촉진하고, 췌도 β 세포를 보호하며, 글루카곤 분비를 억제하여, 유기체의 혈당 수준을 낮춘다. 동시에, GLP-1은 또한 위 배출을 억제하고 식욕을 감소시키는 효과가 있다. 이는 제2형 당뇨병 및 비만의 치료에 임상적으로 유용하다. 천연 활성 GLP-1은 매우 짧은 반감기(2분 미만)로 인해 유기체에서 효소 DPPIV에 의해 쉽게 분해되어 임상적 가치가 없다.
- [0007] GLP-1 약물의 연구 및 개발의 주요 방향은 항상 반감기를 연장하는 것이었다. 현재 둘라글루타이드(dulaglutide) 및 세마글루타이드(semaglutide)와 같은 상업적으로 이용 가능한 GLP-1 효능제가 많다. GLP-1의 효능은 충분히 확인되었지만, 주로 위장관 증상, 저혈당증, 췌장염 및 신장 손상으로 나타나는 많은 부작용이 있다.
- [0008] 글루카곤은 인슐린과 반대되는 효과를 가지며, 주로 유기체의 혈당 수준을 높이는 역할을 한다. 글루카곤은 췌도 α 세포에서 분비되는 29개의 아미노산 펩티드이다. 글루카곤은 주로 하류의 cAMP/PKA 경로를 활성화하여 글리코겐 분해, 지방 분해 및 글루코스 생성을 가속화하여, 간 세포막의 수용체 GCGR에 결합한 후 혈당 수준을 증가시킨다.
- [0009] 연구에 따르면, GCGR 녹아웃 마우스는 GLP-1 증가, 글리코겐 생산량 감소, 지질 대사 증가 및 식욕 감소와 같은 일련의 표현형을 나타내었다. GCGR은 당뇨병 치료를 위한 가장 일반적인 표적 중 하나이지만, 현재 GCGR에 대한 길항제 개발의 진전은 느리다. REMD Biotherapeutics에서 입수 가능한 REMD-477은 현재 가장 최첨단 GCGR 단클론 항체 약물로, 임상 제2상 단계에 있다.
- [0010] GCGR 항체는 CN101589062A, CN101983208A, CN102482350A, CN103314011A, CN105189560A, CN107614695A, US20180273629A1 및 W02013059531A1과 같은 선행 기술에 개시되어 있다. 그러나 새롭고 매우 효율적인 GCGR 항체 및 당뇨병의 치료 방법을 제공할 필요성이 여전히 있다.

발명의 내용

- [0011] 본 개시는 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 GCGR(또는 그 안에 포함된 항원 에피토프)에 결합하는 능력을 갖는다.
- [0012] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음의 a) 또는 b)로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 조합을 포함한다:
- [0013] a) 각각 서열번호 48, 49 및 50에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 각각 서열번호 51, 52 및 53에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0014] b) 각각 서열번호 38, 39 및 54에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 각각 서열번호 55, 56 및 57에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역.
- [0015] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음의 i) 내지 vi) 중 어느 하나로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 조합을 포함한다:
- [0016] i) 각각 서열번호 14, 15 및 16에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 각각 서열번호 17, 18 및 19에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0017] ii) 각각 서열번호 20, 21 및 22에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 각각 서열번호 23, 24 및 25에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0018] iii) 각각 서열번호 26, 27 및 28에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 각각 서열번호 29, 30 및 31에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역;

- [0019] iv) 각각 서열번호 32, 33 및 34에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 각각 서열번호 35, 36 및 37에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0020] v) 각각 서열번호 38, 39 및 40에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 각각 서열번호 41, 42 및 43에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0021] vi) 각각 서열번호 38, 39 및 44에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 각각 서열번호 45, 46 및 47에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역.
- [0022] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 무린 항체, 키메라 항체 또는 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0023] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 인간화 항체는 인간 항체로부터 유래한 프레임워크 영역(들) 또는 이의 프레임워크 영역 변이체를 포함하고, 프레임워크 영역 변이체는 인간 항체의 경쇄 프레임워크 영역을 기반으로 최대 10개의 복귀 돌연변이를 갖고/갖거나, 프레임워크 영역 변이체는 인간 항체의 중쇄 프레임워크 영역을 기반으로 최대 10, 최대 9, 최대 8, 최대 7, 최대 6, 최대 5, 최대 4, 최대 3, 최대 2, 최대 1개의 아미노산 복귀 돌연변이를 갖는다.
- [0024] 일부 구현예에서, 프레임워크 영역 변이체는 다음을 포함한다:
- [0025] aa) 경쇄 가변 영역에 포함된 42G, 44V, 71Y 및 87F 중 1개 이상의 아미노산 복귀 돌연변이(들), 및/또는 중쇄 가변 영역에 포함된 38K, 48I, 67A, 69F, 71A, 73P, 78A 및 93S 중 1개 이상의 아미노산 복귀 돌연변이(들); 또는
- [0026] ab) 경쇄 가변 영역에 포함된 38L, 44V, 59S, 70E 및 71Y 중 1개 이상의 아미노산 복귀 돌연변이(들), 및/또는 중쇄 가변 영역에 포함된 38K, 48I, 66K, 67A, 69L, 73R, 78M 및 94S 중 1개 이상의 아미노산 복귀 돌연변이(들). 나아가, 복귀 돌연변이 부위의 위치는 Kabat 넘버링 기준에 따라 결정된다.
- [0027] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 2, 61, 62, 63 및 64 중 어느 하나에 제시된 바와 같거나, 서열번호 2, 61, 62, 63 및 64 중 어느 하나와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역; 및/또는
- [0028] 서열번호 3, 58, 59 및 60 중 어느 하나에 제시된 바와 같거나, 서열번호 3, 58, 59 및 60 중 어느 하나와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0029] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 63에 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역 및 서열번호 58에 제시된 바와 같은 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0030] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 4에 제시된 바와 같거나, 서열번호 4와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역; 및/또는
- [0031] 서열번호 5에 제시된 바와 같거나, 서열번호 5와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0032] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 6에 제시된 바와 같거나, 서열번호 6과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역; 및/또는
- [0033] 서열번호 7에 제시된 바와 같거나, 서열번호 7과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0034] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 8, 68, 69, 70 및 71 중 어느 하나에 제시된 바와 같거나, 서열번호 8, 68, 69, 70 및 71 중 어느 하나와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역; 및/또는
- [0035] 서열번호 9, 65, 66 및 67 중 어느 하나에 제시된 바와 같거나, 서열번호 9, 65, 66 및 67 중 어느 하나와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

- [0036] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 71에 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역 및 서열번호 67에 제시된 바와 같은 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0037] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 10에 제시된 바와 같거나, 서열번호 10과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역; 및/또는
- [0038] 서열번호 11에 제시된 바와 같거나, 서열번호 11과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0039] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 12에 제시된 바와 같거나, 서열번호 12와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역; 및/또는
- [0040] 서열번호 13에 제시된 바와 같거나, 서열번호 13과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0041] 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 일부 구현예에서, 항체는 항체 불변 영역(들)을 추가로 포함하는 전장 항체이고, 구체적으로, 항체 불변 영역의 중쇄 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 불변 영역 및 이의 종래의 변이체로부터 선택되고, 항체 불변 영역의 경쇄 불변 영역은 인간 항체 κ 및 λ 불변 영역 및 이의 종래의 변이체로부터 선택되고, 더욱 바람직하게는 서열번호 72에 제시된 바와 같은 인간 항체 중쇄 불변 영역 및 서열번호 73에 제시된 바와 같은 인간 경쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0042] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 이때,
- [0043] 중쇄는 서열번호 74, 76 또는 78에 제시된 바와 같거나, 또는 이와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 또는 99%의 서열 동일성을 갖고, 경쇄는 서열번호 75에 제시된 바와 같거나, 또는 이와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 또는 99%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0044] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 이때,
- [0045] 중쇄는 서열번호 74, 76 또는 78에 제시된 바와 같거나, 또는 이와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 또는 99%의 서열 동일성을 갖고, 경쇄는 서열번호 77에 제시된 바와 같거나, 또는 이와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 또는 99%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0046] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 이때,
- [0047] 중쇄는 서열번호 74, 76 또는 78에 제시된 바와 같거나, 또는 이와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 또는 99%의 서열 동일성을 갖고, 경쇄는 서열번호 79에 제시된 바와 같거나, 또는 이와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 또는 99%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0048] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 이때,
- [0049] 중쇄는 서열번호 80에 제시된 바와 같거나, 또는 이와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 또는 99%의 서열 동일성을 갖고, 경쇄는 서열번호 81에 제시된 바와 같거나, 또는 이와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 또는 99%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0050] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 이때,
- [0051] 중쇄는 서열번호 82에 제시된 바와 같거나, 또는 이와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 또는 99%의 서열 동일성을 갖고, 경쇄는 서열번호 83에 제시된 바와 같거나, 또는 이와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 또는 99%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0052] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 이때,

- [0053] 중쇄는 서열번호 84에 제시된 바와 같거나, 또는 이와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖고, 경쇄는 서열번호 85에 제시된 바와 같거나, 또는 이와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0054] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 이때,
- [0055] 중쇄는 서열번호 86에 제시된 바와 같거나, 또는 이와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖고, 경쇄는 서열번호 87에 제시된 바와 같거나, 또는 이와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0056] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 이때,
- [0057] 중쇄는 서열번호 88에 제시된 바와 같거나, 또는 이와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖고, 경쇄는 서열번호 89에 제시된 바와 같거나, 또는 이와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0058] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 78에 제시된 바와 같은 중쇄 및 서열번호 79에 제시된 바와 같은 경쇄를 포함한다.
- [0059] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 84에 제시된 바와 같은 중쇄 및 서열번호 85에 제시된 바와 같은 경쇄를 포함한다.
- [0060] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음의 ac) 내지 ah) 중 어느 하나로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 조합을 포함한다:
- [0061] ac) 서열번호 2에 제시된 중쇄 가변 영역과 동일한 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 3에 제시된 경쇄 가변 영역과 동일한 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0062] ad) 서열번호 4에 제시된 중쇄 가변 영역과 동일한 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 5에 제시된 경쇄 가변 영역과 동일한 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0063] ae) 서열번호 6에 제시된 중쇄 가변 영역과 동일한 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 7에 제시된 경쇄 가변 영역과 동일한 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0064] af) 서열번호 8에 제시된 중쇄 가변 영역과 동일한 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 9에 제시된 경쇄 가변 영역과 동일한 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0065] ag) 서열번호 10에 제시된 중쇄 가변 영역과 동일한 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 11에 제시된 경쇄 가변 영역과 동일한 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0066] ah) 서열번호 12에 제시된 중쇄 가변 영역과 동일한 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 13에 제시된 경쇄 가변 영역과 동일한 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역.
- [0067] 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 일부 구현예에서, 항원 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, 단쇄 항체, 이량체화 V 영역(디아바디) 및 이항화 안정화 V 영역(dsFv)으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0068] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 GCGR(또는 이의 에피토프)에 대한 결합을 위하여 전술한 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 경쟁하는 것을 특징으로 한다.
- [0069] 일부 구현예에서, 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음의 특징 중 적어도 하나를 갖는다:
- [0070] i. 500 nM 미만, 450 nM 미만, 400 nM 미만, 350 nM 미만, 또는 300 nM 미만(바람직하게는 300 nM 미만)의 IC₅₀ 값에서 인간 GCGR이 인간 글루카곤에 결합하는 것을 차단하는 길항 활성;
- [0071] ii. 시노물구스 원숭이 또는 붉은털 원숭이 GCGR이 시노물구스 원숭이 또는 붉은털 원숭이 글루카곤에 결합하는 것을 차단하는 길항 활성;

- [0072] iii. 인간 혈당 농도의 증가 억제; 및
- [0073] iv. 마우스 GCGR이 마우스 글루카곤에 결합하는 것을 차단하는 길항 작용.
- [0074] 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 일부 구현예에서, 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 전술한 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 동일한 항원 에피토프에 결합한다.
- [0075] 또 다른 양태에서, 본 개시는 이중특이적 단백질을 제공한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 이중특이적 단백질은 GLP-1 펩티드 및 GCGR 항체를 포함하고, GLP-1 펩티드는 펩티드 결합 또는 링커를 통해 GCGR 항체의 폴리펩티드 쇄에 공유결합으로 연결된다.
- [0076] 이중특이적 단백질의 일부 구현예에서, GLP-1 펩티드의 카복시 말단은 펩티드 결합 또는 링커를 통해 GCGR 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노 말단에 연결되거나, 또는 GLP-1 펩티드의 카복시 말단은 펩티드 결합 또는 링커를 통해 GCGR 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노 말단에 연결된다.
- [0077] 이중특이적 단백질의 일부 구현예에서, GLP-1 펩티드의 카복시 말단은 펩티드 결합 또는 링커를 통해 GCGR 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노 말단에 연결된다.
- [0078] 이중특이적 단백질의 일부 구현예에서, GLP-1 펩티드의 카복시 말단은 펩티드 결합 또는 링커를 통해 GCGR 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노 말단에 연결된다.
- [0079] 이중특이적 단백질의 일부 구현예에서, GLP-1 펩티드의 카복시 말단은 펩티드 결합 또는 링커를 통해 전장 GCGR 항체의 중쇄의 아미노 말단에 연결된다.
- [0080] 이중특이적 단백질의 일부 구현예에서, GLP-1 펩티드의 카복시 말단은 펩티드 결합 또는 링커를 통해 전장 GCGR 항체의 경쇄의 아미노 말단에 연결된다.
- [0081] 이중특이적 단백질의 일부 구현예에서, GCGR 항체는 전술한 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로부터 선택된다.
- [0082] 이중특이적 단백질의 일부 구현예에서, GLP-1 펩티드는 서열번호 91에 제시된 바와 같은 GLP-1A이거나, 또는 GLP-1 펩티드는 GLP-1A에 기반한 Q17E, I23V, K28R 및 G30R 중 1개 이상의 아미노산 치환을 갖는 GLP-1A 펩티드 변이체이다.
- [0083] 이중특이적 단백질의 일부 구현예에서, GLP-1 펩티드는 서열번호 91에 제시된 바와 같은 GLP-1A이거나, 또는 GLP-1 펩티드는 GLP-1A에 기반한 Q17E를 갖는 GLP-1A 펩티드 변이체이다.
- [0084] 이중특이적 단백질의 일부 구현예에서, GLP-1 펩티드는 서열번호 91에 제시된 바와 같은 GLP-1A이거나, 또는 GLP-1 펩티드는 GLP-1A에 기반한 Q17E 및 I23V, K28R 및 G30R 중 1개 이상의 아미노산 치환을 갖는 GLP-1A 펩티드 변이체이다.
- [0085] 이중특이적 단백질의 일부 구현예에서, GLP-1 펩티드는 서열번호 91에 제시된 바와 같은 GLP-1A이거나, 또는 GLP-1 펩티드는 GLP-1A에 기반한 Q17E 또는 Q17E 및 I23V 둘 모두를 갖는 GLP-1A 펩티드 변이체이다.
- [0086] 이중특이적 단백질의 일부 구현예에서, GLP-1A 펩티드 변이체는 서열번호 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99에 제시된 바와 같은 서열을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0087] 이중특이적 단백질의 일부 구현예에서, GCGR 항체는 전술한 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편 중 어느 하나로부터 선택되고, GLP-1A 펩티드 또는 GLP-1A 펩티드 변이체는 전술한 바와 같은 어느 하나이다.
- [0088] 일부 구현예에서, 이중특이적 단백질은 제1 폴리펩티드 쇄 및 제2 폴리펩티드 쇄를 포함하고, 제1 폴리펩티드 쇄는 서열번호 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107 및 108로 구성된 군으로부터 선택되는 폴리펩티드이고, 제2 폴리펩티드 쇄는 서열번호 79에 제시된 바와 같은 폴리펩티드이다.
- [0089] 일부 구현예에서, 이중특이적 단백질은 GCGR 항체 중쇄를 포함하는 제1 폴리펩티드 쇄 및 GCGR 항체 경쇄를 포함하는 제2 폴리펩티드 쇄를 포함하고, 이때, 제1 폴리펩티드 쇄는 서열번호 109에 제시된 바와 같은 폴리펩티드이고, 제2 폴리펩티드 쇄는 서열번호 81에 제시된 바와 같은 폴리펩티드거나;
- [0090] 일부 구현예에서, 이중특이적 단백질은 GCGR 항체 중쇄를 포함하는 제1 폴리펩티드 쇄 및 GCGR 항체 경쇄를 포함하는 제2 폴리펩티드 쇄를 포함하고, 이때, 제1 폴리펩티드 쇄는 서열번호 110에 제시된 바와 같은 폴리펩티드이고, 제2 폴리펩티드 쇄는 서열번호 83에 제시된 바와 같은 폴리펩티드거나;

- [0091] 일부 구현예에서, 이중특이적 단백질은 GCGR 항체 중쇄를 포함하는 제1 폴리펩티드 쇄 및 GCGR 항체 경쇄를 포함하는 제2 폴리펩티드 쇄를 포함하고, 이때, 제1 폴리펩티드 쇄는 서열번호 111에 제시된 바와 같은 폴리펩티드이고, 제2 폴리펩티드 쇄는 서열번호 85에 제시된 바와 같은 폴리펩티드거나;
- [0092] 일부 구현예에서, 이중특이적 단백질은 GCGR 항체 중쇄를 포함하는 제1 폴리펩티드 쇄 및 GCGR 항체 경쇄를 포함하는 제2 폴리펩티드 쇄를 포함하고, 이때, 제1 폴리펩티드 쇄는 서열번호 112에 제시된 바와 같은 폴리펩티드이고, 제2 폴리펩티드 쇄는 서열번호 87에 제시된 바와 같은 폴리펩티드거나; 또는
- [0093] 일부 구현예에서, 이중특이적 단백질은 GCGR 항체 중쇄를 포함하는 제1 폴리펩티드 쇄 및 GCGR 항체 경쇄를 포함하는 제2 폴리펩티드 쇄를 포함하고, 이때, 제1 폴리펩티드 쇄는 서열번호 113에 제시된 바와 같은 폴리펩티드이고, 제2 폴리펩티드 쇄는 서열번호 89에 제시된 바와 같은 폴리펩티드이다.
- [0094] 또 다른 양태에서, 본 개시는 또한 GLP-1 펩티드 변이체를 제공한다. 일부 구현예에서, GLP-1 펩티드 변이체는 서열번호 91에 제시된 바와 같은 GLP-1A에 기반한 Q17E, I23V, K28R 및 G30R 중 1개 이상의 아미노산 돌연변이(들)를 갖는 돌연변이체이다.
- [0095] 일부 구현예에서, GLP-1 펩티드는 서열번호 91에 제시된 바와 같은 GLP-1A이거나, 또는 GLP-1 펩티드는 GLP-1A에 기반한 Q17E 또는 Q17E 및 I23V 둘 모두를 갖는 GLP-1A 펩티드 변이체이다.
- [0096] 일부 구현예에서, GLP-1 펩티드 변이체는 서열번호 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99에 제시된 바와 같은 서열을 갖는다.
- [0097] 또한, 본 개시는 치료적 유효량의, 전술한 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 전술한 이중특이적 단백질, 또는 전술한 GLP-1 펩티드 변이체, 및 1종 이상의 제약상 허용 가능한 담체, 희석제, 완충제, 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.
- [0098] 또한, 본 개시는 전술한 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 전술한 이중특이적 단백질, 또는 전술한 GLP-1 펩티드 변이체를 암호화하는 단리된 핵산 분자를 제공한다.
- [0099] 본 개시는 전술한 단리된 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0100] 본 개시는 전술한 재조합 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제공하며, 상기 숙주 세포는 원핵생물 세포 및 진핵생물 세포로부터 선택되고, 바람직하게는 진핵생물 세포, 더욱 바람직하게는 포유류 세포 또는 곤충 세포이다.
- [0101] 본 개시는 전술한 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 전술한 이중특이적 단백질, 또는 전술한 GLP-1 변이체의 제조 방법을 제공하며, 방법은 전술한 숙주 세포를 배양 배지에서 배양하여 전술한 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 전술한 이중특이적 단백질, 또는 전술한 GLP-1 변이체를 생성 및 축적하는 단계, 및 배양물로부터 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이중특이적 단백질 또는 GLP-1 펩티드 변이체를 회수하는 단계를 포함한다.
- [0102] 본 개시는 시험관 내에서 인간 GCGR을 검출 또는 측정하는 방법을 제공하며, 방법은 전술한 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 이용하는 단계를 포함한다.
- [0103] 인간 GCGR을 검출하는 키트는 전술한 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0104] 일부 구현예에 따르면, 또한 의료 장치(예컨대, 키트, 어레이, 테스트 종이, 멀티웰 플레이트, 자성 비즈, 코팅된 입자)의 제조에 있어서, 전술한 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 용도를 제공하며, 의료 장치는 전술한 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 예로서, 키트는 전술한 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로 코팅된 멀티웰 플레이트를 포함한다.
- [0105] 본 개시는 인간 GCGR의 검출 또는 측정 시약의 제조에 있어서 전술한 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 용도를 제공한다.
- [0106] 본 개시는 개체의 혈당 농도를 낮추는 방법을 제공하며, 방법은 개체에게 치료적 유효량의, 전술한 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 전술한 이중특이적 단백질, 또는 전술한 GLP-1 펩티드 변이체, 또는 전술한 제약 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0107] 바람직하게는, 치료적 유효량은 단위 용량의 조성물 내의 0.1 내지 3000 mg의 전술한 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 전술한 이중특이적 단백질, 또는 전술한 GLP-1 펩티드 변이체이다.

- [0108] 본 개시는 대사 장애의 치료 방법을 제공하며, 방법은 개체에게 치료적 유효량의, 전술한 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 전술한 이중특이적 단백질, 또는 전술한 GLP-1 펩티드 변이체, 또는 전술한 제약 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 바람직하게는, 대사 장애는 대사 증후군(metabolic syndrome), 비만(obesity), 내당능 장애(impaired glucose tolerance), 당뇨병(diabetes), 당뇨병 케톤산증(diabetic ketoacidosis), 고혈당증(hyperglycemia), 고혈당성 고삼투압 증후군(hyperglycemic hyperosmolar syndrome), 수술 전후 고혈당증(perioperative hyperglycemia), 고인슐린혈증(hyperinsulinemia), 인슐린 저항성 증후군(insulin resistance syndrome), 공복 혈당 장애(impaired fasting glucose), 이상지질혈증(dyslipidemia), 죽상동맥경화증(atherosclerosis) 또는 당뇨병 전 상태(prediabetic condition)이다.
- [0109] 또한, 본 개시는 대사 장애의 치료를 위한 또는 개체의 혈당 농도를 저하시키기 위한 의약의 제조에 있어서 전술한 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 전술한 이중특이적 단백질, 또는 전술한 GLP-1 펩티드, 또는 전술한 제약 조성물의 용도를 제공한다.
- [0110] 바람직하게는, 대사 장애는 대사 증후군, 비만, 내당능 장애, 당뇨병, 당뇨병 케톤산증, 고혈당증, 고혈당성 고삼투압 증후군, 수술 전후 고혈당증, 고인슐린혈증, 인슐린 저항성 증후군, 공복 혈당 장애, 이상지질혈증, 죽상동맥경화증 또는 당뇨병 전 상태이다.
- [0111] 또한, 본 개시는 의약으로서 사용하기 위한, 바람직하게는 대사 장애의 치료를 위한 또는 개체의 혈당 농도를 저하시키기 위한 의약으로서 사용하기 위한, 전술한 항-GCGR 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 전술한 이중특이적 단백질, 또는 전술한 GLP-1 펩티드, 또는 전술한 제약 조성물을 제공한다.
- [0112] 더욱 바람직하게는, 대사 장애는 대사 증후군, 비만, 내당능 장애, 당뇨병, 당뇨병 케톤산증, 고혈당증, 고혈당성 고삼투압 증후군, 수술 전후 고혈당증, 고인슐린혈증, 인슐린 저항성 증후군, 공복 혈당 장애, 이상지질혈증, 죽상동맥경화증 또는 당뇨병 전 상태이다.
- [0113] [발명의 상세한 설명]
- [0114] 용어
- [0115] 본 개시에서 사용되는 아미노산에 대한 세 문자 부호 및 한 문자 부호는 문헌[J. Biol. Chem, 243, p. 3558 (1968)]에 기술되어 있다.
- [0116] 용어 "이중특이적 단백질"은 두 개의 표적 단백질 또는 표적 항원에 결합할 수 있는 단백질 분자를 지칭한다. 본 개시에서 사용되는 이중특이적 단백질은 구체적으로 GCGR 및 GLP-1R(GLP-1 수용체)과 결합할 수 있는 단백질을 지칭하며, GCGR 항체(또는 이의 항원 결합 단편)의 폴리펩티드 체에 융합된 GLP-1 펩티드에 의해 형성된다.
- [0117] "GLP-1 펩티드"는 GLP-1 수용체와 결합하여 활성화시킬 수 있는 펩티드를 지칭한다. 선행 기술의 펩티드는 특허 출원 WO2008/071972, WO2008/101017, WO2009/155258, WO2010/096052, WO2010/096142, WO2011/075393, WO2008/152403, WO2010/070251, WO2010/070252, WO2010/070253, WO2010/070255, WO2011/160630, WO2011/006497, WO2011/117415, WO2011/117416, WO2006/134340, WO1997046584, WO2007124461, WO2017100107, WO2007039140, CN1935261A, CN1935846A, WO2006036834, WO2005058958, WO2002046227, WO1999043705, WO1999043708, WO1999043341, CN102949730, CN104293834, CN104327187, WO2015067716, WO2015049651, WO2014096145, WO2014096148, WO2014096150, WO2014096149에 기술되어 있으며, 이의 내용은 모두 본원에 참조로 포함된다. GLP-1, GLP-1 유사체 및 GLP-1 수용체 펩티드 효능체를 포함한, 일부 특정 GLP-1 펩티드는 예를 들어, 렉시세나타이드(lixisenatide)/AVE0010/ZP10/릭수미아(lyxumia), 엑세나티드(exenatide)/엑센딘(exendin)-4/비에타(byetta)/비두레온(bydureon)/ITCA 650/AC-2993, 리라글루타이드(liraglutide)/빅토자(victoza), 세마글루타이드(semaglutide), 타스포글루타이드(taspoglutide), 신크리아 알비글루타이드(SyncriaAlbiglutide), 둘라글루타이드(dulaglutide), r엑센딘-4, CJC-1134-PC, PB-1023, TTP-054, 란글레나티드(lanlengtide)/HM-11260C, CM-3, GLP-1 엘리젠(eligen), ORMD-0901, NN-9924, NN-9926, NN-9927, 노덱센(nodexen), 비아도르(Viador)-GLP-1, CVX-096, ZYOG-1, ZYD-1, GSK-2374697, DA-3091, MAR-701, MAR709, ZP-2929, ZP-3022, TT-401, BHM-034, MOD-6030, CAM-2036, DA-15864, ARI-2651, ARI-2255, 엑세나티드(exenatide)-XTEN 및 글루카곤-Xten이다. 상기 GLP-1 펩티드 외에도, 본 개시의 서열번호 91에 제시된 바와 같은 GLP-1A 및 (서열번호 92 내지 99에 제시된 바와 같은) 이의 돌연변이체도 포함된다.
- [0118] GPCR, 즉 G 단백질 결합 수용체는 세포질막에서 발현되는 막관통 단백질의 일종이다. GPCR은 800개가 넘는 구성원으로 구성되며, 현재 알려져 있는 포유류 게놈에서 가장 큰 막단백질 패밀리아이다. 인체에서, GPCR 단백질은

기관 및 조직, 예컨대, 중추 신경계, 면역계, 심장 및 혈관 및 망막에 널리 분포되어 있고, 신체 발달 및 정상적인 기능과 관련이 있다.

- [0119] GPCR 단백질의 본체는 세포질막관통 알파 헬릭스 구조의 7개 세그먼트로 구성된다. N 말단 및 세 개의 루프는 세포 외부에 위치하고, 단백질 및 이의 수용체 사이의 상호작용에 관여한다. C 말단 및 세 개의 루프는 세포 내부에 위치하고, 이 중 C 말단 및 세 번째 루프는 GPCR 단백질 및 하류의 G 단백질 사이의 상호작용에 의해 매개되는 세포간 신호전달 과정에서 중요한 역할을 한다.
- [0120] "GCGR"은 글루카곤 수용체이고, GPCR 패밀리의 구성원이다. 글루카곤은 주로 GCGR에 결합할 때 하류의 경로를 활성화하여 글리코젠 분해, 지방 분해 및 글루코스 생성을 가속화하여, 혈당 수준을 증가시킨다.
- [0121] 용어 "항체(Ab)"는 특정 항원(또는 에피토프)(예를 들어, GCGR)과 특이적으로 결합하거나 이와 상호작용(예를 들어, 인식하고/하거나 이와 결합)하는 적어도 하나의 상보성 결정 영역 항원-결합 분자(또는 분자 복합체)를 포함한다.
- [0122] 용어 "항체"는 네 개의 폴리펩티드쇄, 이황화 결합에 의해 연결된 두 개의 중(H)쇄 및 두 개의 경(L)쇄, 및 이의 다량체를 포함하는 면역글로불린 분자(예를 들어, IgM)를 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(이하, HCVR 또는 VH로 약칭함) 및 중쇄 불변 영역(CH)을 포함한다. 이 중쇄 불변 영역은 세 개의 영역(도메인)인 CH1, CH2, 및 CH3을 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(이하, LCVR 또는 VL로 약칭함) 및 경쇄 불변 영역(CL)을 포함한다. VH 및 VL 영역은 상보성 결정 영역(CDR)이라는 과가변 영역으로 더 세분될 수 있고, 이들 사이에는 프레임워크 영역(FR, 프레임워크라고도 함)이라는 더욱 보존된 영역이 산재되어 있다. 각각의 VH 및 VL은 세 개의 CDR 및 네 개의 FR로 구성되며, 아미노 말단으로부터 카복시 말단까지 다음의 순서로 배열된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.
- [0123] 본 개시의 다양한 구현예에서, 항-GCGR 항체(또는 이의 항원 결합 단편)의 FR은 인간 생식선 서열의 것들과 동일할 수 있거나, 또는 자연적으로 또는 인위적으로 변형될 수 있다. 항체는 다양한 하위부류의 항체, 예를 들어, IgG(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 하위부류), IgA1, IgA2, IgD, IgE 또는 IgM 항체일 수 있다.
- [0124] 또한, 용어 "항체"는 전장 항체 분자의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0125] 본원에서 사용되는 용어 항체의 "항원-결합 부분", "항원-결합 도메인", "항원-결합 단편" 등은 항원과 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하는 임의의 자연 발생된, 효소적으로 생성된, 합성에 의해 또는 유전적으로 조작된 폴리펩티드 또는 당단백질을 포함한다. 항체의 항원 결합 단편은 예를 들어, 항체 가변 영역 및 (선택적으로) 불변 영역을 암호화하는 DNA의 조작 및 발현을 관여하는 단백질 가수분해 또는 재조합 유전공학 기술과 같은 임의의 적합한 표준 기술을 사용하여 완전한 항체 분자로부터 유래될 수 있다. DNA는 공지되어 있고/있거나, 예를 들어, 상업적으로 입수 가능한 공급원, DNA 데이터베이스(예를 들어, 파지-항체 데이터베이스 포함)로부터 쉽게 취득할 수 있거나, 합성할 수 있다. DNA는 예를 들어, 하나 이상의 가변 및/또는 불변 영역을 적합한 형태로 배열하고, 코돈을 도입하고, 시스템인 잔기를 생성하고, 아미노산을 변형, 부가 또는 결실시키는 등 화학적으로 또는 분자 생명공학에 의해 서열화하고 조작할 수 있다.
- [0126] 항원 결합 단편의 비-제한적인 예는 다음을 포함한다: (i) Fab 단편; (ii) F(ab')₂ 단편; (iii) Fd 단편; (iv) Fv 단편; (v) 단쇄 Fv(scFv) 분자; 및 (vi) dAb 단편. 영역-특이적 항체, 단일-도메인 항체, 영역-결실된 항체, 키메라 항체, 디아바디, 트리바디, 테트라바디, 미니바디, 나노바디(예를 들어, 1가 나노바디, 2가 나노바디 등), 소형 모듈식 면역의약품(SMIP) 및 상어 가변 IgNAR 영역과 같은 기타 조작 분자가 또한 본원에서 사용되는 용어 "항원 결합 단편"에 포함된다.
- [0127] 항원 결합 단편은 전형적으로 적어도 하나의 가변 영역을 포함할 것이다. 가변 영역은 임의의 크기 또는 아미노산 조성의 영역일 수 있으며, 일반적으로 프레임워크 서열에 인접하거나 그 내부에 하나 이상의 CDR을 포함할 것이다.
- [0128] 일부 구현예에서, 항체의 항원 결합 단편은 가변 영역 및 불변 영역의 임의의 형태일 수 있고, 가변 영역 및 불변 영역은 직접 또는 완전 또는 부분 힌지 또는 링커 영역을 통해 서로 연결될 수 있다. 힌지 영역은 적어도 2개(예를 들어, 5, 10, 15, 20, 40, 60개 이상)의 아미노산으로 구성될 수 있으며, 이는 단일 폴리펩티드 분자 내의 인접한 가변 및/또는 불변 영역 사이에 생성되는 유연성 및 반유연성 연결을 허용한다.
- [0129] 본원에서 사용되는 "유린 항체"는 당해 분야의 지식 및 기술에 따라 제조된 마우스 또는 래트 유래의 단클론

항체를 지칭한다. 제조하는 동안, 테스트 개체에 항원 주사를 놓은 다음, 원하는 서열 또는 기능적 특징을 보유하는 항체를 발현하는 하이브리도마를 단리한다. 주사한 테스트 개체가 마우스인 경우, 생성된 항체는 마우스 유래 항체이고, 주사한 테스트 개체가 래트인 경우, 생성된 항체는 래트 유래 항체이다.

[0130] "키메라 항체"는 제1 종(예컨대, 마우스)의 항체 가변 영역(들)을 제2 종(예컨대, 인간)의 항체 불변 영역(들)에 융합시켜 형성된 항체이다. 키메라 항체를 확립하기 위하여, 제1 종(예컨대, 마우스)의 단클론 항체를 분비하는 하이브리도마를 확립하고, 하이브리도마 세포로부터 가변 영역(들) 유전자를 클로닝한 다음, 필요에 따라 제2 종(예컨대, 인간)의 항체의 불변 영역 유전자(들)를 클로닝할 필요가 있다. 제1 종의 가변 영역 유전자(들)는 제2 종의 불변 영역 유전자(들)에 연결되어 키메라 유전자를 형성한 다음, 발현 벡터에 삽입되고, 마지막으로 키메라 항체 분자는 진핵세포 또는 원핵세포 시스템에서 발현된다.

[0131] 본 개시의 바람직한 구현예에서, 키메라 항체의 항체 경쇄는 인간 카파, 람다 쇠 또는 이의 변이체의 경쇄 불변 영역을 더 포함한다. 키메라 항체의 항체 중쇄는 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 또는 이의 변이체의 중쇄 불변 영역을 더 포함하고, 바람직하게는 인간 IgG1, IgG2 또는 IgG4의 중쇄 불변 영역을 포함하거나, 아미노산 돌연변이(들)(예컨대, YTE 돌연변이 또는 복귀 돌연변이, L234A 및/또는 L235A 돌연변이, 또는 S228P 돌연변이가 있는 인간 IgG1, IgG2 또는 IgG4의 중쇄 불변 영역 변이체를 포함한다.

[0132] CDR 이식 항체를 포함하는 용어 "인간화 항체"는 동물 유래 항체, 예를 들어 무린 항체 CDR 서열을 인간 항체 가변 영역 프레임워크(즉, 프레임워크 영역)에 이식하여 생성된 항체를 지칭한다. 인간화 항체는 다수의 이중 단백질 성분을 보유하는 키메라 항체에 의해 유도되는 이중 유래의 반응을 피할 수 있다. 이러한 프레임워크 서열은 생식선 항체 유전자 서열을 아우르는 공개된 DNA 데이터베이스 또는 공개된 참고문헌으로부터 얻을 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자의 생식선 DNA 서열은 "VBase" 인간 생식선 서열 데이터베이스(<http://www.vbase2.org/>에서 이용 가능함)에서 찾을 수 있고, 문헌[Kabat, E.A., et al. 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed.]에서도 찾을 수 있다.

[0133] 감소된 면역원성에 의해 초래된 활성의 감소를 피하기 위하여, 인간 항체 가변 영역의 프레임워크 서열은 활성을 유지하기 위한 최소한의 역돌연변이 또는 복귀 돌연변이를 거칠 수 있다. 또한, 본 개시의 인간화 항체는 CDR 친화도 성숙이 파지 디스플레이에 의해 수행되는 인간화 항체를 포함한다.

[0134] 항원과 접촉된 잔기로 인해, CDR의 이식은 항원과 접촉된 프레임워크 잔기로 인해 항원에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 친화도를 감소시킬 수 있다. 이러한 상호작용은 고도로 체세포성인 돌연변이로부터 초래될 수 있다. 따라서, 공여자 프레임워크 아미노산을 인간화 항체 프레임워크로 이식하는 것이 여전히 필요할 수 있다. 항원 결합에 관여하며 비 인간 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로부터 유래된 아미노산 잔기는 동물의 단클론 항체 가변 영역의 서열 및 구조를 체크함으로써 확인할 수 있다. 생식선과 상이한 공여자 CDR 프레임워크 아미노산 잔기는 관련이 있다고 간주될 수 있다. 가장 밀접하게 관련된 생식선을 결정하는 것이 불가능한 경우, 서열을 하위유형에 의해 공유된 공통 서열 또는 높은 유사성 백분율을 갖는 동물 항체 서열과 비교할 수 있다. 드문 프레임워크 잔기는 체세포에서의 높은 돌연변이의 결과이며 결합에서 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다.

[0135] 본 개시의 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 또는 무린 κ , λ 쇠 또는 이의 변이체의 경쇄 불변 영역을 더 포함할 수 있거나, 또는 인간 또는 무린 IgG1, IgG2, IgG3, Ig4 또는 이의 변이체의 중쇄 불변 영역을 더 포함한다.

[0136] 인간 항체 중쇄 불변 영역 및 인간 항체 경쇄 불변 영역의 "종래의 변이체"는 항체 가변 영역의 구조 및 기능을 바꾸지 않는 선행 기술에 개시된 인간 중쇄 또는 경쇄 불변 영역의 변이체를 지칭한다. 예시적인 변이체는 부위 지정 변형에 의한 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 중쇄 불변 영역 변이체 및 중쇄 불변 영역의 아미노산 치환을 포함한다. 구체적인 치환은 예를 들어, YTE 돌연변이, L234A 및/또는 L235A 돌연변이, S228P 돌연변이, 또는 (항체 중쇄가 노브-Fc 및 홀-Fc를 형성하게 하는) 노브 인투 홀(knob-into-hole) 구조를 초래하는 돌연변이 등이다. 이들 돌연변이는 항체 가변 영역의 기능을 변화시키지 않고 항체에 새로운 특성을 부여하는 것으로 밝혀졌다.

[0137] "인간 항체" 및 "인간으로부터 유래한 항체"는 상호교환적으로 사용될 수 있고, 인간으로부터 유래된 항체 또는 항원 자극에 반응하여 특이적인 인간 항체를 생산하도록 하는 당해 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 "조작되었고" 생산된 유전자이식 유기체로부터 수득된 항체일 수 있다. 일부 기술에서, 인간 중쇄 및 경쇄 유전자좌의 요소가, 내인성 중쇄 및 경쇄 유전자좌가 파괴를 위해 표적화된 배아 줄기 세포주로부터 유래된 유기체의 세포 계통으로 도입된다. 유전자이식 유기체는 인간 항원에 특이적인 인간 항체를 합성할 수 있고, 유기체는 인간 항

체를 분비하는 하이브리도마를 생산하는 데 이용될 수 있다. 또한, 인간 항체는 중쇄 및 경쇄가 1개 이상의 인간 DNA 기원으로부터 유래된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 항체일 수도 있다. 또한, 완전 인간 항체는 유전자 또는 염색체 형질감염 방법 및 파지 디스플레이 기술에 의해 구축될 수 있거나, 또는 시험관 내에서 활성화된 B 세포로부터 구축될 수 있는데, 이들 모두는 당해 분야에 공지되어 있다.

[0138] "단클론 항체"는 실질적으로 동종의 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭한다. 즉, 가능한 변이체 항체(예를 들어, 자연 발생적인 돌연변이 또는 단클론 항체 제제의 제조 중에 생산되는 돌연변이를 갖는 변이체, 그리고 돌연변이는 보통 최소한의 양으로 존재한다)를 제외하고, 집단을 구성하는 개별 항체가 동일하고/하거나, 동일한 에피토프에 결합한다. 상이한 결정기(에피토프)에 대한 상이한 항체를 일반적으로 함유하는 다클론 항체 제제와 달리, 단클론 항체 제제(제형)의 각 단클론 항체는 항원의 단일한 결정기에 대해 유도된다. 따라서, 수식어 "단클론"은 실질적으로 동종의 항체 집단으로부터 얻은 항체의 특성을 나타내며, 항체를 제조하는 임의의 특정한 방법을 요구하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 예를 들어, 본 개시에 따라 사용되는 단클론 항체는 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파지 디스플레이 방법 및 인간 면역글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부를 갖는 유전자이식 동물을 이용하는 방법을 포함하나 이에 한정되지 않는 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다. 이러한 방법, 및 단클론 항체를 제조하기 위한 다른 예시적인 방법이 본원에 기술되어 있다. 용어 "단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편"에 포함된 단클론 항체는 전장 항체를 지칭한다.

[0139] 용어 "전장 항체", "전체 항체", "전 항체" 및 "완전 항체"는 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 아래에 정의된 항원 결합 단편과 구별되는 바와 같이, 실질적으로 완전한 형태의 항체를 지칭한다. 이 용어는 구체적으로 중쇄가 아미노 말단에서 카복시 말단의 순서로 VH 영역, CH1 영역, 힌지 영역 및 Fc 영역을 포함하고, 경쇄가 아미노 말단에서 카복시 말단의 순서로 VL 영역 및 CL 영역을 포함하는 항체를 지칭한다.

[0140] 또한, Fv 단편의 VL 도메인과 VH 도메인은 두 개의 개별 유전자에 의해 암호화된다. 그러나 이들은 재조합 방법을 사용하여 합성 링커에 의해 연결되어 VL과 VH 도메인을 짝지어 1가 분자가 형성되는 단일 단백질 쇄를 생성할 수 있다(단쇄 Fv(scFv)로 지칭됨, 예를 들어, 문헌[Bird et al. (1988): 423-426; Science 242] 및 문헌[Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA85:5879-5883] 참고). 또한, 이러한 단쇄 항체는 항체의 "항원 결합 단편"의 용어에 포함되도록 의도된다. 이러한 항체는 당해 분야에 공지된 종래의 기법을 이용하여 수득되고, 온전한 항체에 대한 것과 동일한 방법을 사용하여 기능적 단편이 스크리닝된다. 항원 결합 부분은 재조합 DNA 기술 또는 온전한 면역글로불린의 효소적 또는 화학적 파괴에 의해 생산할 수 있다.

[0141] 또한, 항원 결합 단편은 나란한(tandem) Fv 단편 쌍(VH-CH1-VH-CH1)을 포함하는 단쇄 분자 내로 혼입될 수 있고, 나란한 Fv 단편 쌍은 상보적인 경쇄 폴리펩티드와 함께 항원 결합 영역 쌍을 형성한다(문헌[Zapata et al., 1995 Protein Eng. 8(10): 1057-1062; 및 미국 특허 제5,641,870호]).

[0142] Fab는 IgG 항체 분자를 파파인(H 쇄의 224번 위치의 아미노산 잔기를 절단함)으로 처리하여 얻은 항체 단편이고, 항체 단편은 약 50,000의 분자량을 갖고, 항원 결합 활성을 가지며, H 쇄의 N-말단측의 약 절반과 전체 L 쇄가 이황화 결합(들)을 통해 함께 결합된다.

[0143] F(ab')₂는 약 100,000 Da의 분자량을 갖고 항원 결합 활성을 가지며 힌지 위치에서 결합된 두 개의 Fab 영역을 포함하는 항체 단편으로서, IgG 힌지 영역의 두 개의 이황화 결합의 하류에 있는 부분을 펩신으로 소화시켜 제조할 수 있다.

[0144] Fab'는 약 50,000 Da의 분자량을 갖고 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이며, 이는 전술한 F(ab')₂의 힌지 영역에서 이황화 결합을 절단하여 수득된다. Fab'는 항원을 특이적으로 인식하고 결합하는 F(ab')₂를 디티오트레이톨과 같은 환원제로 처리하여 생산할 수 있다.

[0145] 나아가, 항체의 Fab'를 암호화하는 DNA를 원핵생물 발현 벡터 또는 진핵생물 발현 벡터에 삽입하고, 벡터를 원핵생물 또는 진핵생물에 도입하여 Fab'를 발현시킴으로써 Fab'를 생산할 수 있다.

[0146] 용어 "단쇄 항체", "단쇄 Fv" 또는 "scFv"는 링커에 의해 항체 경쇄 가변 도메인(또는 영역; VL)에 연결된 항체 중쇄 가변 도메인(또는 영역; VH)을 포함하는 분자를 지칭한다. 이러한 scFv 분자는 NH₂-VL-링커-VH-COOH 또는 NH₂-VH-링커-VL-COOH의 일반적인 구조를 갖는다. 선행 기술의 적합한 링커는 반복된 GGGGS 아미노산 서열 또는 이의 변이체, 예를 들어, 1 내지 4개(1, 2, 3, 또는 4개)의 반복부의 변이체로 구성된다(문헌[Holliger et al. (1993), Proc Natl Acad Sci USA. 90: 6444-6448]). 본 개시에서 사용될 수 있는 기타 링커는 문헌[Alfthan et al.,(1995), Protein Eng. 8:725-731], 문헌[Choi et al., (2001), Eur J Immuno.31:94-106], 문헌[Hu et

al., (1996), Cancer Res.56:3055-3061], 문헌[Kipriyanov et al., (1999), J Mol Biol. 293:41-56] 및 문헌 [Roovers et al., (2001), Cancer Immunol Immunother. 50:51-59]에 기술되어 있다.

- [0147] "링커"는 단백질 도메인을 연결하는 데 사용되며 보통 어느 정도 유연성이 있는 연결 펩티드 서열을 지칭하며, 링커의 사용은 단백질 도메인이 그의 본래 기능을 상실하게 하지 않을 것이다.
- [0148] 디아바디는 scFv가 이량체화된 항체 단편이고, 2개의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다. 2개의 항원 결합 활성에서, 2개의 항원은 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0149] dsFv는 각각의 VH 및 VL의 하나의 아미노산 잔기를 시스테인 잔기로 치환한 다음, 치환된 폴리펩티드를 2개의 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합을 통해 연결하여 수득된다. 시스테인 잔기로 치환되는 아미노산 잔기는 공지된 방법에 따라 항체의 3차원 구조 예측을 기반으로 선택될 수 있다(문헌[Protein Engineering, 7, 697 (1994)]).
- [0150] 본 개시의 일부 구현예에서, 항원 결합 단편은 다음 단계에 의해 생산될 수 있다: 항원을 특이적으로 인식하고 결합하는 본 개시의 단클론 항체 VH 및/또는 VL을 암호화하는 cDNA, 및 필요에 따라 다른 도메인을 암호화하는 cDNA를 수득하는 단계; 항원 결합 단편을 암호화하는 DNA를 구축하는 단계; DNA를 원핵 또는 진핵 발현 벡터에 삽입한 후, 발현 벡터를 원핵세포 또는 진핵세포에 도입하여 항원 결합 단편을 발현시키는 단계.
- [0151] "Fc 영역"은 자연 발생적인 서열 또는 변이체 Fc 영역일 수 있다. 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 달라질 가능성이 높으나, 인간 IgG 중쇄의 Fc 영역은 보통 위치 Cys226의 아미노산 잔기 또는 Pro230부터 이의 카복시 말단까지 이어지는 것으로 정의된다. Fc 영역의 잔기의 넘버링은 Kabat에서의 EU 인덱스 넘버링에 따른다. 문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991]. 면역글로불린의 Fc 영역은 보통 2개의 불변 영역인 CH2 및 CH3을 갖는다.
- [0152] "노브-Fc"는 항체의 Fc 영역에 점 돌연변이 T366W를 도입하여 형성된 노브 유사 공간 구조를 지칭한다. 이에 따라, "홀-Fc"는 항체의 Fc 영역에 점 돌연변이 T366S, L368A, 및 Y407V를 도입하여 형성된 홀-유사 공간 구조를 지칭한다. 노브-Fc 및 홀-Fc는 입체 장애로 인해 헤테로다이머를 형성할 가능성이 높다. 헤테로다이머의 형성을 더욱 촉진하기 위하여, 점 돌연변이 S354C 및 Y349C를 각각 노브-Fc 및 홀-Fc에 도입하여 이황화 결합을 통해 헤테로다이머의 형성을 더욱 촉진할 수 있다. 한편, 항체 Fc로 인한 ADCC 효과를 제거하거나 완화하기 위하여, 234A 및 235A의 치환 돌연변이가 또한 Fc에 도입될 수 있다. 이중특이적 항체에서, 노브-Fc 또는 홀-Fc는 제1 폴리펩티드 쇄의 Fc 영역 또는 제2 폴리펩티드 쇄의 Fc 영역으로 이용될 수 있다. 단일 이중특이적 항체의 경우, 제1 및 제2 폴리펩티드 쇄의 Fc 영역은 둘 다 노브-Fc 또는 홀-Fc일 수 없다.
- [0153] 용어 "아미노산 차이" 또는 "아미노산 돌연변이"는 본래의 단백질 또는 폴리펩티드와 비교하여, 본래의 단백질 또는 폴리펩티드를 기준으로 하나 이상의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 포함하는 단백질 또는 폴리펩티드 변이체의 아미노산 변화 또는 돌연변이를 지칭한다.
- [0154] 항체의 "가변 영역"은 항체 경쇄 가변 영역(VL) 또는 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 단독으로 또는 조합하여 지칭한다. 당해 분야에서 공지된 바와 같이, 각각의 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 네 개의 프레임워크 영역(FR)에 연결된 세 개의 상보성 결정 영역(CDR)(과가변 영역으로도 지칭됨)으로 구성된다. 각 쇄의 CDR은 FR에 의해 단단히 고정되어 다른 쇄의 CDR과 함께 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다. CDR을 결정하는 적어도 두 가지의 기법이 있다: (1) 교차종 서열 가변성을 기반으로 한 방법(즉, 문헌[Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest (5th edition, 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)]); 및 (2) 항원-항체 복합체의 결정학 연구를 기반으로 한 방법(문헌[Al-Lazikani et al., J. Molec. Biol. 273:927-948 (1997)]). 본원에서 사용되는 바와 같이, CDR은 두 방법 중 어느 하나 또는 두 방법의 조합에 의해 결정된 것들을 지칭할 수 있다.
- [0155] 용어 "항체 프레임워크" 또는 "FR 영역"은 VL 또는 VL의 가변 도메인의 일부분을 지칭하며, 이 가변 도메인의 항원 결합 루프(CDR)에 대한 스캐폴드로서 작용한다. 본질적으로, 이는 CDR이 없는 가변 도메인이다.
- [0156] 용어 "상보성 결정 영역" 및 "CDR"은 항원 결합에 주로 기여하는 항체 가변 도메인에 존재하는 여섯 개의 과가변 영역 중 하나를 지칭한다. 일반적으로, 각각의 중쇄 가변 영역의 3개의 CDR(HCDR1, HCDR2, HCDR3)과 각각의 경쇄 가변 영역의 3개의 CDR(LCDR1, LCDR2, LCDR3)이 있다. CDR의 아미노산 서열 경계는 "Kabat" 넘버링 기준(문헌[Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th edition, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD]) 참고), "Chothia" 넘버링 기준(문헌[Al-

Lazikani et al., (1997) JMB 273:927-948]) 및 ImmunoGenTics(IMG)T) 넘버링 기준(문헌[Lefranc MP, Immunologist, 7, 132-136 (1999)]; 문헌[Lefranc, MP, etc., Dev. Comp. Immunol., 27,55-77 (2003)]) 등을 포함한, 다양한 잘 알려진 체계 중 임의의 것에 의해 결정할 수 있다. 예를 들어, 전통적인 형식의 경우, Kabat 기준에 따르면, 중쇄 가변 도메인(VH)의 CDR 아미노산 잔기는 31~35(HCDR1), 50~65(HCDR2) 및 95~102(HCDR3)로 넘버링되고, 경쇄 가변 도메인(VL)의 아미노산 잔기는 24~34(LCDR1), 50~56(LCDR2), 및 89~97(LCDR3)로 넘버링된다. Chothia 기준에 따르면, VH의CDR 아미노산 잔기는 26~32(HCDR1), 52~56(HCDR2) 및 95~102(HCDR3)로 넘버링되고, VL의 아미노산 잔기는 26~32(LCDR1), 50~52(LCDR2) 및 91~96(LCDR3)으로 넘버링된다. Kabat 및 Chothia를 모두 조합하여 CDR을 정의하면, CDR은 인간 VH의 아미노산 잔기 26~35(HCDR1), 50~65(HCDR2) 및 95~102(HCDR3), 및 인간 VL의 아미노산 잔기 24~34(LCDR1), 50~56(LCDR2) 및 89~97(LCDR3)로 구성된다. IMG)T) 기준에 따르면, VH의 CDR 아미노산 잔기는 대략 26~35(CDR1), 51~57(CDR2) 및 93~102(CDR3)로 넘버링되고, VL의 CDR 아미노산 잔기는 대략 27~32(CDR1), 50~52(CDR2) 및 89~97(CDR3)로 넘버링된다. IMG)T) 기준에 따르면, 항체의 CDR 영역은 IMG)T)/DomainGap 정렬 프로그램을 이용하여 결정할 수 있다.

[0157] "HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역 또는 이의 임의의 변이체"의 "이의 임의의 CDR 변이체"는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 영역 중 임의의 하나, 또는 둘, 또는 셋을 아미노산 돌연변이시켜 수득한 변이체를 지칭한다.

[0158] "항체 불변 영역 도메인"은 상이한 유형의 항체로부터 유래한 CL 및 CH1, CH2, CH3 및 CH4 도메인을 포함하는 항체 경쇄 및 중쇄 불변 영역으로부터 유래한 도메인을 지칭한다.

[0159] "에피토프" 또는 "항원 결정기"는 면역글로불린 또는 항체가 특이적으로 결합하는 항체의 부위를 지칭한다. 에피토프는 고유한 공간 형태에 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 연속 또는 비 인접 아미노산을 일반적으로 포함한다. 예를 들어, 문헌[Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G.E. Morris, Ed. (1996)] 참고.

[0160] 용어 "특이적으로 결합하다", "선택적으로 결합하다", "선택적으로 결합한다" 또는 "특이적으로 결합한다"는 항원 상의 소정의 에피토프에 대한 항체의 결합을 지칭한다. 전형적으로, 항체는 약 10^{-8} M 미만, 예를 들어, 10^{-9} M, 10^{-10} M 또는 10^{-11} M 미만 또는 훨씬 더 낮은 값의 친화도(KD)로 결합한다.

[0161] "경쟁"이라는 용어가 동일한 에피토프에 대해 경쟁하는 항원 결합 단백질(예를 들어, 중화 항원 결합 단백질 또는 중화 항체)의 맥락에서 사용되는 경우, 이는 항원 결합 단백질 사이에 경쟁이 일어남을 의미하고, 이는 분석에 의해 결정되고, 이때, 테스트하려는 항원 결합 단백질(예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편)은 공통 항원에 대한 기준 항원 결합 단백질(예를 들어, 리간드 또는 기준 항체)의 특이적인 결합을 방지 또는 억제한다(예를 들어, 감소시킨다). 항원 결합 단백질이 또 다른 단백질과 경쟁하는지를 결정하기 위하여 다양한 유형의 경쟁적 결합 분석을 사용할 수 있다. 이러한 분석은 예를 들어, 고체상 직접 또는 간접 방사성면역분석(RIA), 고체상 직접 또는 간접 효소면역분석(EIA), 샌드위치 경쟁 분석(예를 들어, 문헌[Stahli et al, 1983, Methods in Enzymology 9: 242-253] 참고); 고체상 직접 비오틴-아비딘 EIA(예를 들어, 문헌[Kirkland et al, 1986, J. Immunol. 137: 3614-3619] 참고), 고체상 직접 라벨링 분석, 고체상 직접 라벨링 샌드위치 분석(예를 들어, 문헌[Harlow and Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press] 참고); I-125 라벨을 이용한 고체상 직접 라벨링 RIA(예를 들어, 문헌[Morel et al, 1988, Molec. Immunol. 25: 7-15] 참고); 고체상 직접 비오틴-아비딘 EIA(예를 들어, 문헌[Cheung, et al, 1990, Virology 176: 546-552] 참고); 및 직접 라벨링 RIA(문헌[Moldenhauer et al, 1990, Scand. J. Immunol. 32: 77-82])이다. 전형적으로, 분석은 라벨링되지 않은 테스트 항원 결합 단백질 및 라벨링된 기준 항원 결합 단백질 둘 다와 결합할 수 있는 정제된 항원의 사용을 수반한다(항원은 고체 표면 또는 세포 표면에 위치한다). 경쟁적 억제는 테스트 항원 결합 단백질의 존재 하에 고체 표면 또는 세포 표면에 결합된 라벨의 양을 측정하여 결정한다. 일반적으로, 테스트 항원 결합 단백질은 과량으로 존재한다. (항원 결합 단백질과 경쟁하는) 경쟁 분석에 의해 확인된 항원 결합 단백질은 다음을 포함한다: 기준 항원 결합 단백질과 동일한 에피토프와 결합하는 항원 결합 단백질; 및 기준 항원 결합 단백질이 결합하는 에피토프에 충분히 가까운 에피토프에 결합하는 항원 결합 단백질. 여기서 2개의 에피토프는 서로 공간적으로 간섭하여 결합을 방해한다. 경쟁적 결합을 결정하는 방법에 관한 추가적인 상세 내용은 본원의 실시예에 제공된다. 전형적으로, 경쟁하는 항원 결합 단백질이 과량으로 존재하는 경우, 이는 공통 항원에 대한 기준 항원 결합 단백질의 특이적 결합을 적어도 40~45%, 45~50%, 50~55%, 55~60%, 60~65%, 65~70%, 70~75% 또는 75%, 또는 훨씬 더 많이 억제할 것이다(예를 들어, 감소시킬 것이다). 일부 예에서, 결합은 적어도 80~85%, 85~90%, 90~95%, 95~97%, 또는 97% 또는 훨씬 더 많이 억제된다.

[0162] 용어 "친화도"는 단일 에피토프에서 항체와 항원 사이의 상호작용의 강도를 지칭한다. 각각의 항원 부위

내에서, 항체 "팔"의 가변 영역은 약한 비 공유적 힘을 통해 여러 아미노산 부위에서 항원과 상호작용하고, 상호작용이 클수록 친화도가 강하다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, Fab 단편)의 "높은 친화도"는 일반적으로 $1E^{-9}$ M 이하의 K_D (예를 들어, $1E^{-10}$ M 이하의 K_D , $1E^{-11}$ M 이하의 K_D , $1E^{-12}$ M 이하의 K_D , $1E^{-13}$ M 이하의 K_D , $1E^{-14}$ M 이하의 K_D 등)의 항체 또는 항원 결합 단편을 지칭한다.

[0163] 용어 "KD" 또는 " K_D "는 특정 항체-항원 상호작용에 대한 해리 평형 상수를 지칭한다. 전형적으로, 항체는 비아 코어(Biacore) 기기에서 표면 플라즈마 공명(SPR)으로 결정할 때 약 $1E^{-8}$ M 미만, 예를 들어, 약 $1E^{-9}$ M, $1E^{-10}$ M 또는 $1E^{-11}$ M 미만 또는 훨씬 더 적은 해리 평형 상수(KD)로 항원에 결합한다. KD 값이 더 작을수록 친화도는 더 크다.

[0164] 용어 "핵산 분자"는 DNA 분자 및 RNA 분자를 지칭한다. 핵산 분자는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있지만, 바람직하게는 이중-가닥 DNA이다. 핵산은 또 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 놓일 때 "작동 가능하게 연결된다". 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 미치는 경우 암호화 서열에 작동 가능하게 연결된다.

[0165] 용어 "벡터"는 하나 이상의 표적 유전자 또는 서열을 전달할 수 있고, 바람직하게는 그것들을 숙주 세포에서 발현시킬 수 있는 구축물을 의미한다. 벡터의 예는 바이러스 벡터, 네이키드 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 플라스미드, 코스미드 또는 파지 벡터, 양이온성 응고제와 관련된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 리포솜에 캡슐화된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 및 예컨대, 생산자 세포와 같은 일부 진핵생물 세포를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0166] 항체 및 항원 결합 단편의 제조 및 정제 방법은 당해 분야에 주지되어 있다. 예를 들어, 문헌[A Laboratory Manual for Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, chapters 5-8 and 15]. 예를 들어, 마우스를 항원 또는 이의 단편으로 면역화할 수 있고, 그 후, 생성된 항체를 재생시키고, 정제하고, 종래의 방법을 이용하여 아미노산 서열에 대해 시퀀싱할 수 있다. 또한, 항원 결합 단편은 종래의 방법에 의해 제조할 수 있다. 본 개시의 항체 또는 항원 결합 단편을 조작하여 하나 이상의 인간 프레임워크 영역을 비 인간 항체로부터 유래한 CDR 영역에 도입한다. 인간 FR 생식선 서열은 IMGT 인간 항체 가변 생식선 유전자 데이터베이스 및 MOE 소프트웨어에 대해 정렬시켜 웹사이트 <http://imgt.cines.fr> 또는 문헌[The Immunoglobulin Facts Book, 2001, ISBN 012441351]으로부터 취득할 수 있다.

[0167] 용어 "숙주 세포"는 발현 벡터가 도입된 세포를 지칭한다. 숙주 세포는 박테리아, 미생물, 식물 또는 동물 세포를 포함할 수 있다. 형질전환에 적합한 박테리아는 장내세균과의 구성원, 예컨대, 대장균(*Escherichia coli*) 또는 살모넬라 균주; 간균과의 구성원, 예컨대, 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*); 폐구균; 연쇄구균 및 헤모필루스 인플루엔자를 포함한다. 적합한 미생물은 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)를 포함한다. 적합한 동물 숙주 세포주는 CHO(중국 햄스터 난소 세포주), HEK293 세포(비 제한적 예, 예컨대, HEK293E 세포), 및 NSO 세포를 포함한다.

[0168] 유전자 조작된 항체 또는 항원 결합 단편은 종래의 방법에 의해 제조 및 정제할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 cDNA 서열을 클로닝하고 GS 발현 벡터로 재조합할 수 있다. 재조합 면역글로불린 발현 벡터는 CHO 세포 내로 안정적으로 형질감염될 수 있다. 대안적인 선행 기술로서, 포유류 발현 시스템은 특히 Fc 영역의 고도로 보존된 N-말단 부위에, 항체의 당화를 초래할 수 있다. 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 발현시켜 안정적인 클론을 획득하였다. 항체 생산을 위하여 생물반응기에서 무혈청 배양 배지 중에서 양성 클론을 확장시킬 수 있다. 항체가 분비된 배양 배지는 종래의 기술에 의해 정제할 수 있다. 예를 들어, 정제는 변형 완충액을 포함하는 단백질 A 또는 단백질 G 세파로스 FF 컬럼에서 수행될 수 있다. 비 특이적인 결합 성분은 세척하여 제거된다. 결합된 항체를 pH 구배에 의해 용리시키고, 항체 단편을 SDS-PAGE로 검출한 다음, 모은다. 일반적인 기법을 이용하여 항체를 여과하고 농축시킬 수 있다. 일반적인 기법, 예컨대, 크기 배제 또는 이온 교환에 의해 가용성 혼합물 및 응집물을 효과적으로 제거할 수 있다. 그에 따른 생성물은 즉시 예컨대, -70°C 에서, 냉동시키거나 동결건조시킬 필요가 있다.

[0169] 동물, 인간, 실험 대상, 세포, 조직, 기관, 또는 생물학적 유체에 적용될 때 "투여", "투여하다", "투약" 및 "치료"는 외인성 약제, 치료제, 진단제, 조성물 또는 인위적 조작(예를 들어, 실시예에서 사용된 바와 같은 "안락사")을 동물, 인간, 대상, 세포, 조직, 기관, 또는 생물학적 유체에 투여하는 것을 의미한다. "투여" 및 "치료"는 예컨대, 치료적, 약물동역학적, 진단적, 연구 및 실험 방법을 지칭할 수 있다. 세포의 처리는 시약을 세포와 접촉시키는 것뿐만 아니라 시약을 유체와 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 유체는 세포와 접촉되어

있다. "투여" 또는 "치료"는 또한 시약, 진단제, 결합 화합물, 또는 다른 세포를 사용한, 예를 들어, 세포의, 시험관 내 또는 생체 외 처리를 의미한다. 인간, 수의학 또는 연구 대상에 적용되는 "치료"는 치료적 처치, 예방적 또는 방지적 조치, 연구 및 진단적 적용을 지칭한다.

[0170] "치료"는 치료제, 예컨대, 본 개시의 임의의 화합물을 포함하는 조성물을, 치료 활성이 있는 작용제가 알려진 하나 이상의 질환 증상을 갖는(또는 가질 것으로 의심되는 또는 가질 수 있는) 개체에게 내부적으로 또는 외부적으로 투여하는 것을 의미한다. 전형적으로, 작용제는 임의의 임상적으로 측정 가능한 정도로 이러한 증상(들)의 퇴행을 유도하거나 진행을 억제하여, 치료될 개체 또는 집단에서 하나 이상의 질환 증상을 효과적으로 완화시키는 양으로 투여된다. 임의의 특정 질환 증상을 완화하는 데 효과적인 치료제의 양("치료적 유효량"이라고도 함)은 다양한 인자, 예컨대, 개체의 질환 상태, 연령 및 체중, 및 개체에서 원하는 반응을 유도하는 약물의 능력에 따라 다를 수 있다. 질환 증상이 완화되었는지는 의료진 또는 다른 숙련된 보건의료 제공자가 전형적으로 사용하는 임의의 임상적 측정에 의해 평가하여 그 증상의 중증도 또는 진행 상태를 평가할 수 있다. 본 개시의 구현예(예를 들어, 치료 방법 또는 제조품)는 모든 개체에서 표적 질환 증상(들)을 완화시키는 데 효과적이지 않지만, 당해 분야에 공지된 임의의 통계학적 검정, 예컨대, 스튜던트 t 검정, 카이 제곱 검정, 만-휘트니(Mann and Whitney)에 따른 U 검정, 크루스칼-왈리스(Kruskal-Wallis) 검정(H 검정), 존키어-테르프스트라(Jonckheere-Terpstra) 검정 및 윌콕슨(Wilcoxon) 검정에 의해 결정할 때 통계적으로 유의한 수의 개체에서 표적 질환 증상(들)을 완화한다.

[0171] "아미노산 보존적 변형" 또는 "아미노산 보존적 치환"은 단백질 또는 폴리펩티드의 아미노산이 유사한 특성(예를 들어, 전하, 측쇄 크기, 소수성/친수성, 백본 형태 및 강성 등)을 갖는 다른 아미노산으로 치환되어, 단백질 또는 폴리펩티드의 생물학적 활성 또는 기타 필요한 특성(예를 들어, 항원에 대한 친화도 및/또는 특이성)을 바꾸지 않고 변형이 자주 이루어질 수 있음을 의미한다. 당업자는 일반적으로 폴리펩티드의 비 필수 영역에서 단일 아미노산 치환이 생물학적 활성을 실질적으로 변경하지 않음을 인식한다(예를 들어, 문헌[Watson et al. (1987) Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)] 참고). 또한, 구조적으로나 기능적으로 유사한 아미노산으로의 치환은 생물학적 활성을 파괴할 가능성이 낮다. 예시적인 아미노산의 보존적 치환은 다음과 같다:

[0172] 본래 잔기 보존적 치환

[0173] Ala (A) Gly; Ser

[0174] Arg (R) Lys; His

[0175] Asn (N) Gln; His; Asp

[0176] Asp (D) Glu; Asn

[0177] Cys (C) Ser; Ala; Val

[0178] Gln (Q) Asn; Glu

[0179] Glu (E) Asp; Gln

[0180] Gly (G) Ala

[0181] His (H) Asn; Gln

[0182] Ile (I) Leu; Val

[0183] Leu (L) Ile; Val

[0184] Lys (K) Arg; His

[0185] Met (M) Leu; Ile; Tyr

[0186] Phe (F) Tyr; Met; Leu

[0187] Pro (P) Ala

[0188] Ser (S) Thr

[0189] Thr (T) Ser

- [0190] Trp (W) Tyr; Phe
- [0191] Tyr (Y) Trp; Phe
- [0192] Val (V) Ile; Leu.
- [0193] "유효량" 또는 "유효 용량"은 어느 하나 이상의 유익하거나 원하는 결과를 얻는 데 필요한 의약, 화합물, 또는 제약 조성물의 양을 지칭한다. 예방적 적용의 경우, 유익하거나 원하는 결과에는 병태가 발달하는 동안, 병태의 생화학적, 조직학적 및 행동 징후, 이의 합병증 및 중간 병리학적 표현형을 포함하여, 위험의 제거 또는 감소, 중증도의 감소, 또는 질환 발병의 지연이 포함된다. 치료적 적용의 경우, 유익하거나 원하는 결과에는 임상 결과, 예를 들어, 본 개시의 표적 항원과 관련된 다양한 병태의 발병률 감소 또는 병태의 1종 이상의 증상의 개선, 병태를 치료하는 데 필요한 다른 작용제의 투여량 감소, 또 다른 작용제의 효능 증진, 및/또는 개체에서 본 개시의 표적 항원과 관련된 병태의 진행의 지연이 포함된다.
- [0194] "외인성"은 상황에 따라 유기체, 세포, 또는 인간 외부에서 생성되는 물질을 지칭한다.
- [0195] "내인성"은 상황에 따라 세포, 유기체, 또는 인체에서 생성되는 물질을 지칭한다.
- [0196] "상동성" 및 "동일성"은 본원에서 상호교환 가능하며, 두 폴리뉴클레오타이드 서열 사이 또는 두 폴리펩티드 서열 사이의 서열 유사성을 지칭한다. 비교되는 두 서열에서의 한 위치를 동일한 염기 또는 아미노산 단량체 서브유닛이 차지할 경우, 예를 들어, 두 개의 DNA 분자 각각의 한 위치를 아데닌이 차지할 경우, 이 분자들은 해당 위치에서 상동성이다. 두 서열 사이의 상동성 백분율은 두 서열에 의해 공유되는 일치하거나 상동인 위치의 수를 비교되는 위치의 수로 나눈 다음, 100을 곱한 값의 함수이다. 예를 들어, 두 개의 서열이 최적으로 정렬된 경우, 두 서열의 10개의 위치 중 6개가 일치하거나 상동인 경우, 두 서열은 60% 상동이다. 두 서열의 100개의 위치 중 95개가 일치하거나 상동인 경우, 두 서열은 95% 상동이다. 일반적으로, 두 서열이 정렬될 때, 최대 상동성 백분율을 제공하도록 비교가 이루어진다. 예를 들어, 비교는 BLAST 알고리즘에 의해 수행될 수 있으며, 이때, 알고리즘의 파라미터는 각 기준 서열의 전체 길이에 걸쳐 각 서열 간의 최대 일치를 제공하도록 선택된다.
- [0197] 다음의 참고문헌은 서열 분석에 자주 사용되는 BLAST 알고리즘에 관한 것이다: BLAST 알고리즘(BLAST ALGORITHMS): Altschul, SF *et al.*, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. *et al.*, (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L. *et al.*, (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. *et al.* (1997) Genome Res. 7:649-656. NCBI BLAST로부터 이용 가능한 것과 같은 다른 종래의 BLAST 알고리즘 또한 당업자에게 주지되어 있다.
- [0198] "단리된"은 "본래의 환경으로부터 분리되어 있는" 상태를 지칭하며, 이 경우, 표시된 분자에 다른 비-표적 생물 분자가 본질적으로 없음을 의미한다. 일반적으로, 용어 "단리된"은, 이들이 본원에 기술된 화합물의 실험적 또는 치료적 용도를 유의미하게 방해하는 양으로 존재하지 않는 한, 이러한 물질의 완전한 부재 또는 물, 완충제 또는 염의 부재를 의미하고자 한 것이 아니다.
- [0199] "선택적인" 또는 "선택적으로"는 뒤따르는 사건 또는 상황이 일어날 수 있지만 반드시 일어나지는 않음을 의미하며, 설명은 사건 또는 상황이 일어나는 경우와 일어나지 않는 경우를 포함한다.
- [0200] "제약 조성물"은 본 개시에 따른 하나 이상의 화합물 또는 생리적으로/제약상 허용 가능한 염 또는 이의 전구약물 및 기타 화학적 성분, 예컨대, 생리적으로/제약상 허용 가능한 담체 및 부형제를 포함하는 혼합물을 지칭한다. 제약 조성물은 유기체에 대한 투여를 촉진하고, 활성 성분의 흡수를 용이하게 하여, 생물학적 활성을 발휘하는 것을 목적으로 한다.
- [0201] 용어 "제약상 허용 가능한 담체"는 항체 또는 항원 결합 단편의 전달을 위한 제형에 사용하기에 적합한 임의의 불활성 물질을 지칭한다. 담체는 부착방지제, 결합제, 코팅제, 붕해제, 충전제 또는 희석제, 보존제(예컨대, 항산화제, 항균제 또는 항진균제), 감미제, 흡수지연제, 습윤제, 유화제, 완충제 등일 수 있다. 적합한 제약상 허용 가능한 담체의 예에는 물, 에탄올, 폴리올(예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등) 텍스트로스, 식물유(예컨대, 올리브유), 식염수, 완충제, 완충 식염수, 및 등장화제, 예컨대, 당, 폴리올, 소르비톨 및 염화나트륨이 포함된다.
- [0202] 용어 "대사 장애"의 구체적인 예는 대사 증후군, 비만, 내당능 장애, 당뇨병, 당뇨병 케톤산증, 고혈당증, 고혈당성 고삼투압 증후군, 수술 후 고혈당증, 고인슐린혈증, 인슐린 저항성 증후군, 공복 혈당 장애, 이상지질혈증, 죽상동맥경화증, 및 당뇨병 전 상태이다.

- [0203] 또한, 본 개시의 또 다른 양태는 활성 성분으로 표적 항원을 특이적으로 인식하고 결합하는 본 개시의 단클론 항체 또는 항체 단편을 포함하는, 표적 항원의 면역검출 또는 결정 방법, 표적 항원의 면역검출 또는 결정을 위한 시약, 표적 항원을 발현하는 세포의 면역검출 또는 결정 방법, 및 표적 항원 양성 세포와 관련된 질환의 진단을 위한 진단제에 관한 것이다.
- [0204] 본 개시에서, 표적 항원의 양을 검출하거나 측정하는 방법은 임의의 공지된 방법일 수 있다. 예를 들어, 이는 면역분석법 또는 면역검출 방법을 포함한다.
- [0205] 면역분석법 또는 면역검출 방법은 항체 또는 항원의 양을 라벨링된 항원 또는 항체로 검출하거나 측정하는 방법이다. 면역분석법 또는 면역검출 방법의 예는 방사능 물질 라벨링된 면역항체 방법(RIA), 효소면역분석(EIA 또는 ELISA), 형광면역분석(FIA), 발광면역분석, 웨스턴 블롯팅, 물리화학적 방법 등을 포함한다.
- [0206] 전술한 표적 항원-양성 세포와 관련된 질환은 본 개시의 항체 또는 항체 단편을 이용하여 표적 항원을 발현하는 세포를 검출하거나 측정함으로써 진단할 수 있다.
- [0207] 폴리펩티드를 발현하는 세포는 공지된 면역검출 방법에 의해, 바람직하게는 면역침전, 형광 세포 염색, 면역조직 염색 등에 의해 검출할 수 있다. 또한, FMAT8100HTS 시스템(Applied Biosystem)을 이용한 형광 항체 염색 방법과 같은 방법을 이용할 수 있다.
- [0208] 본 개시에서, 표적 항원에 대해 검출되거나 측정되는 살아 있는 샘플은 표적 항원을 발현하는 세포를 함유할 수 있는 한 특별히 한정되지 않으며, 예를 들어, 조직 세포, 혈액, 혈장, 혈청, 체액, 소변, 대변, 조직액 또는 배양 배지이다.
- [0209] 요구되는 진단 방법에 따라, 본 개시의 단클론 항체 또는 항체 단편을 포함하는 진단제는 또한 항원-항체 반응을 수행하기 위한 시약 또는 반응을 검출하기 위한 시약을 함유할 수 있다. 항원-항체 반응을 수행하기 위한 시약은 완충제, 염 등을 포함한다. 검출을 위한 시약은 면역분석법 또는 면역검출 방법에서 일반적으로 사용되는 작용제, 예를 들어 단클론 항체, 이의 항체 단편 또는 접합체를 인식하는 라벨링된 2차 항체 및 라벨에 상응하는 기질을 포함한다.
- [0210] 본 개시의 하나 이상의 구현예의 세부 사항은 위의 명세서에 기재되어 있다. 바람직한 방법 및 물질을 아래에 설명하였지만, 본원에 기술된 것들과 유사하거나 동일한 임의의 방법 및 물질이 본 개시의 실시 또는 시험에 사용될 수 있다. 명세서 및 청구범위를 통해, 본 개시의 다른 특징, 목적 및 장점이 명백해질 것이다. 명세서 및 청구범위에서, 단수형은 문맥상 명백하게 달리 지시하지 않는 한, 복수의 측면을 포함한다. 본원에서 명시적으로 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 개시가 속하는 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 명세서에 인용된 모든 특허 및 간행물은 참조로 포함된다. 다음의 실시예는 본 개시의 바람직한 구현예를 추가로 예시하기 위해 제시된다. 이러한 예는 어떠한 방식으로든 본 개시의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 되며, 본 개시의 범위는 청구범위에 의해 정의된다.

도면의 간단한 설명

- [0211] 도 1: 본 개시의 이중특이적 단백질(GLP-1/GCGR 항체)의 구조의 개략도.
- 도 2: GCGR에 대한 이중특이적 단백질 및 GCGR 항체의 길항 활성.
- 도 3: GLP-1R에 대한 이중특이적 단백질 및 돌라글루타이드의 활성화 활성.
- 도 4: ob/ob 마우스에서 무작위 혈당 농도에 미치는 장기적인 투여의 영향, 비히클(빈 벡터)은 인산염 완충 식염수(PBS)를 주사한 대조군 모델이고, hu1803-9D-3mpk, hu1803-9-2.84mpk 및 돌라글루타이드-1.16mpk는 동일한 물 농도의 물질을 지칭한다.
- 도 5: ob/ob 마우스에서 공복 혈당 농도에 미치는 장기적인 투여의 영향. 모든 실험군은 마우스에서 공복 혈당 농도를 현저히 감소시킬 수 있다. 실험군 중에서, hu1803-9D-3mpk 및 hu1803-9-2.84mpk는 혈당 농도를 낮추는 데 가장 강력한 능력을 가지며, hu1803-9D-3mpk는 hu1803-9-2.84mpk보다 혈당을 낮추는 데 우수한 능력을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0212] 실시예

[0213] 실시예 1: GCGR 항원 및 항체의 제조

[0214] 1.1 항원의 구축 및 스크리닝

[0215] 477개 아미노산의 전장 글루카곤 수용체를 암호화하는 인간 GCGR cDNA를 발현 벡터(예컨대, pcDNA3.1)에 서브클로닝하고, CHO-K1 세포로 형질감염시켰다. 스크리닝 및 단일 세포 클로닝 후, 세포 표면의 항원 발현 및 수용체 기반 발현의 특징 연구를 위해 단일 클론을 선택하였다. 구체적으로 표시되어 있지 않는 한, 다음의 GCGR 항원은 인간 GCGR을 지칭한다.

[0216] 전장 GCGR: GCGR 과발현 세포주의 구축에 사용되거나, 면역화 및 후속 검출을 위한 항원으로서 사용됨:

[0217] MPPCQQRPLLLLLLLACQPQVPSAQVMDFLFEKWLYGDQCHHNLSELLPPPTTELVCNRTFDKYSCWPDTPANTTANISCPWYLPWHHKVQHRFVFKRCGP
DGQWVRGPRGQPRDASQCQMDGEEIEVQKEVAKMYSSQVMTVGYSLSLGLALLALAILGGLSKLHCTRNAIHANLFASFVLKASSVLVIDGLLRTRYSQ
KIGDDLVSSTWLSGAVAGRCVAAVFMQYGVANYCWLLVEGLYLHNLLGLATLPERSFFSLYLGIWGWAPMLFVVPWAVVKCLFENVQCWTSNDNMGFWWI
LRFVFLAILINFFIFVRIVQLLVAKLRARQMHTDYKFRKAKSTLTLIPLLVHEVVFVAFVTDEHAQGTLSAKLFFDLFLSSFGQLLVAVLYCFLNKEVQ
SELRWRWHRWRLGKVLWEERNTSNHRASSSPGHGPPSKELQFGRGGGSDSSAETPLAGGLPRLAESPF

[0218] (서열번호 1)

[0219] 1.2 GCGR 하이브리도마 및 재조합 항체의 정제

[0220] (1) 하이브리도마 상청액의 분리 및 정제/단백질 G 친화도 크로마토그래피:

[0221] 마우스 하이브리도마 상청액의 정제의 경우, 단백질 G 친화도 크로마토그래피가 바람직하였다. 수확한 하이브리도마 배양물을 원심분리하고, 상청액을 취하고, 상청액의 부피를 기준으로, 10 내지 15% 부피의 1 M Tris-HCl(pH 8.0~8.5)을 첨가하여 상청액의 pH를 조정하였다. 단백질 G 컬럼을 3~5배 컬럼 부피의 6 M 염산 구아니딘으로 세척한 다음, 3~5배 컬럼 부피의 순수로 세척하였다. 컬럼을 1xPBS(pH7.4) 완충액 시스템과 같은 3~5배 컬럼 부피의 평형 완충액으로 평형화시켰다. 결합을 위하여 세포 상청액을 낮은 유속으로 로딩하고, 체류 시간이 약 1분 이상이 되도록 유속을 제어하였다. UV 흡수가 기준선까지 떨어질 때까지 컬럼을 3~5배 컬럼 부피의 1xPBS(pH 7.4)로 세척하였다. 샘플을 0.1 M 아세트산/아세트산 나트륨(pH 3.0) 완충액으로 용출시키고, 용출 피크를 UV 검출에 따라 모았다. 용출된 생성물을 1 M의 Tris-HCl(pH 8.0)로 pH를 5~6으로 조정한 후 일시적으로 보존하였다. 용출된 생성물은 당업자에게 잘 알려진 방법에 따라, 용액 교체를 수행할 수 있다. 예를 들어, 한외여과 튜브로 한외여과-농축에 의해 원하는 완충액 시스템으로 용액을 교체하거나, 또는 G-25 탈염과 같은 분자 배제를 이용하여 원하는 완충액 시스템으로 용액을 교체하거나, 또는 Superdex 200과 같은 고분해능 분자 배제 컬럼을 이용하여 용출된 생성물에서 응집 성분을 제거하여 샘플의 순도를 개선할 수 있다.

[0222] (2) 단백질 A 친화도 크로마토그래피에 의한 Fc 태그가 달린 이중특이적 단백질 또는 항체의 추출:

[0223] 먼저, Fc 이중특이적 단백질 또는 항체를 함유하는 세포 배양 상청액을 고속으로 원심분리하여 상청액을 수집하였다. 단백질 A 친화도 컬럼을 3~5배 컬럼 부피의 6 M 염산 구아니딘으로 세척한 다음, 3~5배 컬럼 부피의 순수로 세척하였다. 컬럼을 평형 완충액으로서 3~5배 컬럼 부피의 1xPBS(pH7.4) 완충액 시스템으로 평형화시켰다. 결합을 위하여 세포 상청액을 낮은 유속으로 로딩하고, 체류 시간이 약 1분 이상이 되도록 유속을 제어하였다. 결합이 완료된 후, UV 흡수가 기준선까지 떨어질 때까지 컬럼을 3~5배 컬럼 부피의 1xPBS(pH 7.4)로 세척하였다. 샘플을 0.1 M 아세트산/아세트산 나트륨(pH 3.0~3.5) 완충액으로 용출시키고, 용출 피크를 UV 검출에 따라 모았다. 용출된 생성물을 1 M의 Tris-HCl(pH 8.0)로 pH를 5~6으로 조정한 후 일시적으로 보존하였다. 용출된 생성물은 당업자에게 잘 알려진 방법에 따라, 용액 교체를 수행할 수 있다. 예를 들어, 한외여과 튜브로 한외여과-농축에 의해 원하는 완충액 시스템으로 용액을 교체하거나, 또는 G-25 탈염과 같은 분자 배제를 이용하여 원하는 완충액 시스템으로 용액을 교체하거나, 또는 Superdex 200과 같은 고분해능 분자 배제 컬럼을 이용하여 용출된 생성물에서 응집 성분을 제거하여 샘플의 순도를 개선할 수 있다.

[0224] 실시예 2: 항-인간 GCGR 단클론 항체의 제조

[0225] 2.1 면역화

[0226] (1) 마우스 면역화: 마우스를 면역화하여 항-인간 GCGR 단클론 항체를 생산하였다. 6 내지 8주령의 암컷 SJL 흰마우스(Beijing Charles River Experimental Animal Technology Co., Ltd., 동물 생산 면허 번호: SCXK (Jing) 2012-0001)를 실험에 사용하였다. 급이 환경: SPF 수준. 마우스를 구입한 후, 1주일 동안 실험실 환경, 12/12시간의 명암 주기, 20~25℃의 온도, 40~60%의 습도에 적응시켰다. 그 후, 환경에 적응시킨 마우스를 다음의 계획

에 따라 면역화하였다. 면역화를 위한 항원은 GCGR로 안정적으로 형질감염시킨 CHO-K1 세포였다.

[0227] 면역화 계획: 마우스를 복강 내 주사(i.p.), 0.1 ml/마우스(1차 면역화)에 의해 보조제인 TiterMax® Gold Adjuvant(Sigma Cat No. T2684)로 사전 면역화하였다. 15분 후, 마우스에 GCGR CHO-K1 안정적으로 형질감염된 세포(마우스당 1E7개 세포)를 복강 내(i.p.) 주사하였다. 백신접종 시간은 제0일, 제14일, 제28일, 제42일, 제56일, 제70일, 제84일, 제98일 및 112일이었다. 제35일, 제63일, 및 제91일에 혈액 샘플을 채취하였고, 마우스 혈청 내 항체 역가를 ELISA 방법에 의해 결정하였다. 6 내지 9회의 면역화 후, 정체가 되는 경향이 있는 높은 혈청 항체 역가를 가진 마우스를 비장세포 융합을 위해 선택하였다. 비장세포 융합 3일 전에, GCGR CHO-K1 안정적으로 형질감염된 세포를 부스터 면역화를 위하여 마우스당 1E7개 세포로 복강 내(i.p.) 주사하였다.

[0228] (2) 래트 면역화: 6~8주령의 SD 래트를 DNA(전장 hGCGR을 암호화함, 암호화 서열은 Genbank 수탁번호: NM_000160에서 찾을 수 있음)로 면역화하고, 래트 혈청의 항체 역가를 FACS 방법에 의해 결정하였다. 3 내지 4 회의 면역화 후, 정체가 되는 경향이 있는 높은 혈청 항체 역가를 가진 래트를 비장세포 융합을 위해 선택하였다. 비장세포 융합 3일 전에 부스터 면역화를 수행하였다.

[0229] 2.2 비장세포 융합

[0230] 최적화된 PEG-매개성 융합 절차를 이용하여 비장 림프구를 골수종 Sp2/0 세포(ATCC®CRL-8287™)와 융합시켜 하이브리도마 세포를 수득하였다. 융합된 하이브리도마 세포를 완전 배지(20%의 FBS, 1×HAT 및 1×OPI를 포함하는 IMEM 배지)에 0.5~1E6개/ml의 밀도로 재현탁시키고, 96웰 플레이트에 100 µl/웰로 시딩하고, 3 내지 4일 동안 5%의 CO₂에서 37℃에서 인큐베이션한 다음, HAT 완전 배지를 100 µl/웰로 첨가하고, 클론이 형성될 때까지 3 내지 4일 동안 계속하여 배양하였다. 상청액을 제거하고, 200 µl/웰의 HT 완전 배지(20% FBS, 1×HT 및 1×OPI를 포함하는 IMDM 배지)를 각 웰에 첨가하고, 37℃, 5%의 CO₂에서 3일 동안 인큐베이션한 다음, ELISA 검출을 수행하였다.

[0231] 2.3 하이브리도마 세포의 스크리닝

[0232] 하이브리도마 세포의 성장 밀도에 따라, 하이브리도마 배양 상청액을 세포 결합 ELISA 방법에 의해 검출하였다. 양성으로 테스트된 웰의 세포를 적시에 확장시키고, 동결보존하였으며, 단일의 세포 클론을 수득할 때까지 2 내지 3회 서브클로닝시켰다.

[0233] 각각의 서브클로닝 후의 세포를 또한 GCGR 세포 결합 ELISA에 의해 테스트하였다. 하이브리도마 클론을 분석에 의해 스크리닝하였다. 무혈청 세포 배양법에 의해 항체를 추가로 제조하였다. 시험예에 기술된 정제 실시예에 따라 항체를 정제하였다.

[0234] 2.4 양성 하이브리도마 클론의 시퀀싱

[0235] 양성 하이브리도마로부터 서열을 클로닝하는 과정은 다음과 같았다. 대수성장기의 하이브리도마 세포를 수집하였다. RNA를 키트 설명서에 따라 Trizol(Invitrogen, Cat No.15596 -018)로 추출하고, PrimeScript™ 역전사 키트(Takara, Cat No. 2680A)로 역전사시켰다. 역전사로 수득한 cDNA를 마우스 Ig-프라이머 세트(Novagen, TB326 Rev. B 0503)를 이용하여 PCR에 의해 증폭시키고, PCR 증폭 후 시퀀싱하였다.

[0236] 생성된 DNA 서열로부터 양성 클론을 수득하였고, 무혈청 세포 배양법에 의해 항체를 제조하였다. 정제 실시예에 따라 항체를 정제하고, 세포 기반의 GCGR 결합 차단 분석법을 이용하여 여러 차례의 스크리닝을 수행함으로써, 뮤린 하이브리도마 클론 1803, 1805, 1808, 및 1810, 및 래트 하이브리도마 클론 1817 및 1822를 수득하였다.

표 1

[0237] GCGR 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 영역 서열

항체 명칭	중쇄 가변 영역 (서열번호)	경쇄 가변 영역 (서열번호)
m1803	QFQLHQSGAELVKPGASVKLSCKATGYTFTDYWIEWVKRPGHGL EWIGEILPGSTYTNYNKFKGRATFTAEPSSSSAYMQLSGLTTED SAIYYCSRGLSTLMAVDYFDYWGGQTTLTVSS (서열번호 2)	DIQMTQTSSLSASLGDRVTINCRASQDISNYLNWYQQK PDGTVKLLIYYSSTLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISHL EQEDIATYFCQQTNIIPWTFGGGTGLEI (서열번호 3)

m1805	EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKTSGYFTFDYNDWVKQSHGRSL EWIGSIDPDNGGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSED TAVYYCTRDYGGSSWFAYWGQGLTVTVSA (서열번호 4)	DVVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSI SDYLHWYQKK SHESPRLLIKYASQISGIPSRFSGSGSGSDFTLINSV EPEDVGYYCQNGHSFPYTFGGGTKLEIK (서열번호 5)
m1808	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGDTFTNGISWVKQRIGQGL EWIGEIYPRSGNTYYNENFKGKATLTADKSSSTAYMELRRLTSED SAVYFCARSITSVIGADYFDYWGQGTTLTVSS (서열번호 6)	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQKK PDGTVKLLIYYSTLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNL EQEDIATYFCQQGNTFPWTFGGGTKLEIK (서열번호 7)
m1810	QVQLQQSGTELARPGTSVTLSCKASGYFTNYAISWVKQRTGQGL EWIGEIYPTSGNTYYNEKFKGKATLTADRSSKTMELRSLTSDV SAVYFCASGVITTVSTDYFDYWGQGSPLTVSS (서열번호 8)	DIQMTQIPSSLSVSLGDRVTISCRASLDISNYLNWYQLK PDGTVKLLIYYSTLHSGVSSRFSGSGSGTEYSLTISNL EQEDIATYFCQQGNMVPYTFGGGTKLEIK (서열번호 9)
rat1817	EVQLVESGGDLVQPGSRMKLSAASGFTFSNYMAWVRQAPTKGL EWVASISTGGVNTYYRDSVKGRFTISRDNANKNLYLQMSLRSEE TATYYCARHTTADYFYGIYFALDAWGQGTSTVTVSS (서열번호 10)	QFTLTQPKSVSGSLRSTITIPCRSSGDI GDSYVNWYQQ HLGRPPLNVIYADVQRPEVSDRFSGSIDSSSNSASLTI TNLQMDDEADYFCQSYDTNIDIIFGGGTKLTVL (서열번호 11)
rat1822	EVRLVESGGDFVQPGSRVKLSAASGFTFSNYMAWVRQAPTKGL EWVGSISTGGVNTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMSLRSEE TATYYCARHTTADYHYGIYFAMDAWGQGTSTVTVSS (서열번호 12)	QVTLTQPKSVSGSLRSTITIPCRSSGDI GDSYVNWYQQ HLGRPPINVIYADDQRPSEVSDRFSGSIDSSSNSASLTI TNLQVDDEADYFCQSYDSSIDIFFGGGTKLTVL (서열번호 13)

표 2

[0238]

Kabat 넘버링에 따른 CDR 영역 서열

항체 명칭	중쇄 CDR		경쇄 CDR	
m1803	HCDR1	<u>DYWIE</u> (서열번호 14)	LCDR1	<u>RASQDISNYLN</u> (서열번호 17)
	HCDR2	<u>EILPGSTYTYNEKFKG</u> (서열번호 15)	LCDR2	<u>YSSTLHS</u> (서열번호 18)
	HCDR3	<u>GLSTLMAVDYFDY</u> (서열번호 16)	LCDR3	<u>QQTNI FFWT</u> (서열번호 19)
m1805	HCDR1	<u>DYNMD</u> (서열번호 20)	LCDR1	<u>RASQSIDYLH</u> (서열번호 23)
	HCDR2	<u>SIDPDNGGTIYNQKFKG</u> (서열번호 21)	LCDR2	<u>YASQSI S</u> (서열번호 24)
	HCDR3	<u>DYGGSSWFAY</u> (서열번호 22)	LCDR3	<u>QNGHSFPYT</u> (서열번호 25)
m1808	HCDR1	<u>TNGIS</u> (서열번호 26)	LCDR1	<u>RASQDISNYLN</u> (서열번호 29)
	HCDR2	<u>EIYPRSGNTYYNENFKG</u> (서열번호 27)	LCDR2	<u>YSSTLHS</u> (서열번호 30)
	HCDR3	<u>SITSVIGADYFDY</u> (서열번호 28)	LCDR3	<u>QQGNTFPWT</u> (서열번호 31)
m1810	HCDR1	<u>NYAIS</u> (서열번호 32)	LCDR1	<u>RASLDISNYLN</u> (서열번호 35)
	HCDR2	<u>EIYPTSGNTYYNEKFKG</u> (서열번호 33)	LCDR2	<u>YTSTLHS</u> (서열번호 36)
	HCDR3	<u>GVITTVVSTDYFDY</u> (서열번호 34)	LCDR3	<u>QQGNMVPYT</u> (서열번호 37)
rat1817	HCDR1	<u>NYMA</u> (서열번호 38)	LCDR1	<u>ERSSGDI GDSYVN</u> (서열번호 41)
	HCDR2	<u>SISTGGVNTYYRDSVKG</u> (서열번호 39)	LCDR2	<u>ADVQRPS</u> (서열번호 42)
	HCDR3	<u>HTTADYFYGIYFALDA</u> (서열번호 40)	LCDR3	<u>QSYDTNIDI I</u> (서열번호 43)

rat1822	HCDR1	<u>NYYMA</u> (서열번호 38)	LCDR1	<u>ERSSGDIGESYVN</u> (서열번호 45)
	HCDR2	<u>SISTGGVNTYYRDSVKG</u> (서열번호 39)	LCDR2	<u>ADDQRPS</u> (서열번호 46)
	HCDR3	<u>HTTDPDYHYGIYFAMDA</u> (서열번호 44)	LCDR3	<u>QSYDSSIDIF</u> (서열번호 47)

[0239] 서열 정렬 및 컴퓨터 시뮬레이션에 의해, 무린 항체 m1803, m1805, m1808 및 m1810의 경쇄 및 중쇄 CDR 서열이 더 높은 상동성을 가지며, 래트 항체인 rat1817 및 rat1822의 경쇄 및 중쇄 CDR 서열이 더 높은 상동성을 갖는 것으로 확인되었다. 이의 공통 서열을 다음 표에 제시하였다:

표 3

[0240] 중쇄 및 경쇄 CDR 영역의 공통 서열

	중쇄 CDR		경쇄 CDR	
무린 항체	HCDR1	X ₁ X ₂ X ₃ IX ₄ , 이때, X ₁ X ₂ X ₃ 은 DYW, TNG 또는 NYA로부터 선택되고, X ₄ 는 E/S로부터 선택됨. (서열번호 48)	LCDR1	RASX ₁₇ DISNYLN, 이때, X ₁₇ 은 L/Q로부터 선택됨, (서열번호 51)
	HCDR2	EIX ₅ PX ₆ SX ₇ X ₈ TX ₉ YNEX ₃₁ FKG, 이때, X ₅ 는 L/Y로부터 선택되고, X ₆ 는 G/R/T로부터 선택되고, X ₇ 는 T/G로부터 선택되고, X ₈ 는 N/Y로부터 선택되고, X ₉ 는 N/Y로부터 선택되고, X ₃₁ 은 K 또는 N으로부터 선택됨(서열번호 49)	LCDR2	YX ₁₈ STLHS, 이때, X ₁₈ 은 S/T로부터 선택됨 (서열번호 52)
	HCDR3	X ₃₁ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ DYFDY, 이때, X ₁₀ 은 I/L/VI로부터 선택되고, X ₁₁ 은 S/T로부터 선택되고, X ₁₂ 는 S/T로부터 선택되고, X ₁₃ 은 L/V로부터 선택되고, X ₁₄ 는 M/V/I로부터 선택되고, X ₁₅ 는 S/G/A로부터 선택되고, X ₁₆ 는 T/A/V로부터 선택되고, X ₃₁ 은 G 또는 S로부터 선택됨.(서열번호 50)	LCDR3	QQX ₁₉ NX ₂₀ X ₂₁ PX ₂₂ T, 이때, X ₁₉ 는 T/G로부터 선택되고, X ₂₀ 은 M/T/I로부터 선택되고, X ₂₁ 은 F/V로부터 선택되고, X ₂₂ 는 W/Y로부터 선택됨 (서열번호 53)
래트 항체	HCDR1	NYYMA (서열번호 38)	LCDR1	ERSSGDIGX ₂₆ SYVN, 이때, X ₂₆ 은 E/D로부터 선택됨 (서열번호 55)
	HCDR2	SISTGGVNTYYRDSVKG (서열번호 39)	LCDR2	ADX ₂₇ QRPS, 이때, X ₂₇ 은 D/V로부터 선택됨 (서열번호 56)
	HCDR3	HTTX ₂₃ DYX ₂₄ YGIYFAX ₂₅ DA, 이때, X ₂₃ 은 P/A로부터 선택되고, X ₂₄ 는 F/H로부터 선택되고, X ₂₅ 는 L/M으로부터 선택됨(서열번호 54)	LCDR3	QSYDX ₂₈ X ₂₉ IDIX ₃₀ , 이때, X ₂₈ 은 S/T로부터 선택되고, X ₂₉ 는 S/N으로부터 선택되고, X ₃₀ 은 F/I로부터 선택됨(서열번호 57)

[0241] 실시예 3. 무린 항-인간 GCGR 항체의 인간화

[0242] MOE 소프트웨어 분석에 의해 IMGT 인간 항체 중쇄 및 경쇄 가변 영역 생식선 유전자 데이터베이스에 대해 정렬시켜, 무린 항체에 대한 높은 상동성을 갖는 중쇄 및 경쇄 가변 영역 생식선 유전자를 주형으로 선택하였다. 무린 항체의 CDR을 상응하는 인간 주형에 이식하여 가변 영역 서열을 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4의 순서로 형성하였다. 필요에 따라, 프레임워크 서열의 일부 아미노산을 무린 항체에 상응하는 아미노산으로 다시 돌연변이시켜 인간화 항-GCGR 단클론 항체를 획득하였다. CDR 영역의 아미노산 잔기를 결정하고 Kabat 넘버링 시스템에 의해 주석을 달았다.

[0243] 위의 뮤린 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 각각 인간 경쇄 및 중쇄 불변 영역에 연결하여 키메라 항체를 형성하였다. 클론 1803에 상응하는 키메라 항체를 ch1803으로 명명하였고, 다른 항체를 비슷한 방식으로 명명하였다.

[0244] 3.1 하이브리도마 클론 1803의 인간화

[0245] (1) 하이브리도마 클론 1803을 인간화하기 위한 프레임워크의 선택:

[0246] 뮤린 항체 m1803의 경우, 인간화 경쇄 주형은 IGKV1-39*01 및 hjk4.1이었고, 인간화 중쇄 주형은 IGHV1-3*01 및 hjh6.1이었다. 인간화 가변 영역 서열은 다음과 같다:

[0247] hu1803VH-CDR 이식: (서열번호 61)

[0248] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSTYTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGLST
LMAVDYFDYWGQGTTVTVSS;

[0249] hu1803VL-CDR 이식: (서열번호 58)

[0250] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYSSTLHSGVPSRFSSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQTNIFPWTFGGGT
KVEIK;

[0251] 비교: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4의 순서로 배열되었고, 이탤릭체의 서열은 FR을 나타내고, 밑줄친 서열은 CDR을 나타낸다.

[0252] (2) 하이브리도마 클론 1803에 대한 인간화 주형의 선택 및 복귀 돌연변이의 설계를 아래 표에 나타내었다:

표 4

[0253] 주형 선택 및 복귀 돌연변이

hu1803_VL		hu1803_VH	
hu1803_VL.1	이식	hu1803_VH.1	이식
hu1803_VL.1A	K42G, P44V, F71Y, Y87F	hu1803_VH.1A	M69F, R71A, V78A
hu1803_VL.1B	P44V, F71Y	hu1803_VH.1B	M48I, V67A, M69F, R71A, V78A, A93S
		hu1803_VH.1C	R38K, M48I, V67A, M69F, R71A, T73P, V78A, A93S

[0254] 비교: 예를 들어, P44V는 Kabat 넘버링 시스템에 따른 위치 44의 P가 V로 다시 돌연변이됨을 나타낸다. 이식은 뮤린 항체 CDR이 인간 생식선 FR 영역 서열 내로 직접 이식됨을 나타낸다.

[0255] (3) 하이브리도마 클론 1803의 특정 인간화 서열은 다음과 같다:

[0256] >hu1803_VL.1(Hu1803VL-CDR 이식과 동일): (서열번호 58)

[0257] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYSSTLHSGVPSRFSSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQTNIFPWTFGGGT
KVEIK

[0258] > hu1803_VL.1A: (서열번호 59)

[0259] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGGAVKLLIYSSTLHSGVPSRFSSGSGTDYTLTISSLPEDFATYFCQQTNIFPWTFGGGT
KVEIK

[0260] > hu1803_VL.1B: (서열번호 60)

[0261] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYSSTLHSGVPSRFSSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQTNIFPWTFGGGT
KVEIK

[0262] > hu1803_VH.1(Hu1803VH-CDR 이식과 동일): (서열번호 61)

[0263] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSTYTNYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGLST
LMAVDYFDYWGQGTTVTVSS

[0264] > hu1803_VH.1A: (서열번호 62)

[0265] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSTYTNYNEKFKGRVTFTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLST

LMVDYFDYWGQTTVTSS

> hu1803_VH.1B: (서열번호 63)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYWIEIVRQAPQGQLEWIGILPGSTYTNNEKFKGRATFTADTSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCSRGLST
LMVDYFDYWGQTTVTSS

> hu1803_VH.1C: (서열번호 64)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYWIEIVKQAPQGQLEWIGILPGSTYTNNEKFKGRATFTADPSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCSRGLST
LMVDYFDYWGQTTVTSS

(4) 하이브리도마 클론 1803으로부터 유래한 항체의 인간화 항체 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역의 서열 조합은 다음과 같다:

표 5

다양한 인간화 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 조합

	hu1803_VL.1	hu1803_VL.1A	hu1803_VL.1B
hu1803_VH.1	hu1803-1	hu1803-5	hu1803-9
hu1803_VH.1A	hu1803-2	hu1803-6	hu1803-10
hu1803_VH.1B	hu1803-3	hu1803-7	hu1803-11
hu1803_VH.1C	hu1803-4	hu1803-8	hu1803-12

위의 표에 표시된 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 상응하는 항체의 경쇄 및 중쇄 불변 영역에 연결되어 전장 항체를 형성할 수 있다. 본 개시에서 달리 명시되어 있지 않은 한, 전장 항체의 경우, 항체 경쇄는 서열번호 73에 제시된 바와 같은 카파 쇄 불변 영역에 연결된 경쇄 가변 영역에 의해 형성되고, 항체 중쇄는 서열번호 72에 제시된 바와 같은 IgG4-AA에 연결된 중쇄 가변 영역에 의해 형성된다.

3.2 하이브리도마 클론 1810의 인간화

(1) 하이브리도마 클론 1810을 인간화하기 위한 프레임워크의 선택:

뮤린 항체 m1810의 경우, 인간화 경쇄 주형은 IGV1-39*01 및 hJK4.1이었고, 인간화 중쇄 주형은 IGHV1-69*02 및 hJH4.1이었다. 인간화 가변 영역 서열은 다음과 같다:

Hu1810VH-CDR 이식: (서열번호 68)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNYAISIVRQAPQGQLEWMGEIYPTSGNTYYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCARGVIT
TVVSTDYFDYWGQTLVTSS

Hu1810VL-CDR 이식: (서열번호 65)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASLDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYITSTLHSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQGNMVPYTFGGGT
KVEIK

비교: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4의 순서로 배열되었고, 이탤릭체의 서열은 FR을 나타내고, 밑줄친 서열은 CDR을 나타낸다.

(2) 하이브리도마 클론 1810에 대한 인간화 주형의 선택 및 복귀 돌연변이의 설계를 아래 표에 나타내었다:

표 6

주형 선택 및 복귀 돌연변이

hu1810_VL		hu1810_VH	
hu1810_VL.1	이식	hu1810_VH.1	이식
hu1810_VL.1A	P44V, P59S, F71Y	hu1810_VH.1A	K73R, A78M, R94S
hu1810_VL.1B	Q38L, P44V, P59S, D70E, F71Y	hu1810_VH.1B	M48I, V67A, I69L, K73R, A78M, R94S
		hu1810_VH.1C	R38K, M48I, R66K, V67A, I69L, K73R, A78M, R94S

- [0283] 비교: 예를 들어, P44V는 Kabat 넘버링 시스템에 따른 위치 44의 P가 V로 다시 돌연변이됨을 나타낸다. 이식은 무린 항체 CDR이 인간 생식선 FR 영역 서열 내로 직접 이식됨을 나타낸다.
- [0284] (3) 하이브리도마 클론 1810의 특정 인간화 서열은 다음과 같다:
- [0285] > hu1810_VL.1(Hu1810VL-CDR 이식과 동일): (서열번호 65)
- [0286] *DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASLDISNYLNWYQKPGKAPKLLIYITSTLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGNMVPYTFGGGT
KVEIK*
- [0287] > hu1810_VL.1A: (서열번호 66)
- [0288] *DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASLDISNYLNWYQKPGKAVKLLIYITSTLHSGVSSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQGNMVPYTFGGGT
KVEIK*
- [0289] > hu1810_VL.1B: (서열번호 67)
- [0290] *DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASLDISNYLNWYQKPGKAVKLLIYITSTLHSGVSSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCQGNMVPYTFGGGT
KVEIK*
- [0291] > hu1810_VH.1(Hu1810VH-CDR 이식과 동일): (서열번호 68)
- [0292] *QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWMGEIYPTSGNTYYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGVIT
TVVSTDYFDYWGQGTLLTVSS*
- [0293] > hu1810_VH.1A: (서열번호 69)
- [0294] *QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWMGEIYPTSGNTYYNEKFKGRVTITADRSTSTMELSSLRSEDTAVYYCARGVIT
TVVSTDYFDYWGQGTLLTVSS*
- [0295] > hu1810_VH.1B: (서열번호 70)
- [0296] *QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWIGEIYPTSGNTYYNEKFKGRATLTADRSTSTMELSSLRSEDTAVYYCARGVIT
TVVSTDYFDYWGQGTLLTVSS*
- [0297] > hu1810_VH.1C: (서열번호 71)
- [0298] *QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWIGEIYPTSGNTYYNEKFKGKATLTADRSTSTMELSSLRSEDTAVYYCARGVIT
TVVSTDYFDYWGQGTLLTVSS.*
- [0299] (4) 하이브리도마 클론 1810의 인간화 항체 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 서열 조합은 다음과 같다:

표 7

[0300] 다양한 인간화 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 조합

	hu1810_VL.1	hu1810_VL.1A	hu1810_VL.1B
hu1810_VH.1	hu1810-1	hu1810-5	hu1810-9
hu1810_VH.1A	hu1810-2	hu1810-6	hu1810-10
hu1810_VH.1B	hu1810-3	hu1810-7	hu1810-11
hu1810_VH.1C	hu1810-4	hu1810-8	hu1810-12

[0301] 위의 표에 표시된 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 상응하는 항체의 경쇄 및 중쇄 불변 영역에 연결되어 전장 항체를 형성할 수 있다. 본 개시에서 달리 명시되어 있지 않은 한, 전장 항체의 경우, 항체 경쇄는 서열번호 73에 제시된 바와 같은 카파 쇄 불변 영역에 연결된 경쇄 가변 영역에 의해 형성되고, 항체 중쇄는 서열번호 72에 제시된 바와 같은 IgG4-AA에 연결된 중쇄 가변 영역에 의해 형성된다.

[0302] **실시예 4: GCGR 키메라/인간화 항체의 IgG4-AA 형식의 구축 및 발현**

[0303] 전장 항체를 위한 발현 벡터 VH-CH1-FC-pHr/VK-CL-pHr를 구축하기 위하여, 프라이머를 설계하고, 각각의 키메라/인간화 항체의 VH/VK 유전자 단편을 PCR에 의해 증폭시킨 다음, 상동 재조합을 통해 (신호 펩티드 및 불변 영

역 유전자(CH1-FC/CL) 단편이 있는) 발현 벡터 pHr로 삽입하였다. 간단한 점 돌연변이에 의해 IgG4 항체 형식으로부터 IgG4-AA 항체 형식을 획득할 수 있다. IgG4-AA는 돌연변이 F234A, L235A 및 S228P를 나타낸다. F234A 및 L235A의 돌연변이는 IgG4-Fc의 Fc γ R에 대한 결합 능력을 감소시킬 수 있고, ADCC/CDC를 추가로 감소시킬 수 있다. S228P는 야생형 IgG4의 힌지 영역의 위치 228의 아미노산 S가 P로 돌연변이됨을 나타낸다. 이 위치에서의 돌연변이는 천연 IgG4 항체가 생체 내에서 일어나는 Fab 교환에 의해 유발되는 미스매치되는 것을 막을 수 있다.

[0304] ch1803, ch1805, ch1808, ch1810, ch1817 및 ch1822는 동물 유래의 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 각각 인간 항체 카과 쇠 및 인간 항체 IgG4-AA 중쇄 불변 영역과 연결시켜 형성된 키메라 항체이다.

[0305] IgG4-AA의 중쇄 불변 영역 서열은 다음과 같다: (서열번호 72)

[0306] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGLGK;

[0307] 항체의 경쇄(카과 쇠) 불변 영역 서열은 다음과 같다: (서열번호 73)

[0308] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC;

[0309] 구축된 항체의 예시적인 서열은 다음과 같다:

[0310] ch1803: 항체 형식 IgG4AA

[0311] ch1803 중쇄 서열: (서열번호 74)

[0312] QFQLHQSGAELVKPGASVKLSCKATGYTFTDYIEWVKRPGHLEWIGEILPGSTYTNYNEKFKGRATFTAEPSSSSAYMQLSGLTTEDSAIYYCSRGLST LMAVDYFDYWGGTTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK;

[0313] ch1803 경쇄 서열: (서열번호 75)

[0314] DIQMTQTTSSLASLGDRVTINCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYSTLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISHLQEDIAITYFCQQTNIIPWTFGGGT KLEIRTVAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC;

[0315] hu1803-1: 항체 형식 IgG4AA

[0316] hu1803-1: 중쇄 서열: (서열번호 76)

[0317] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSTYTNYNEKFKGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGLST LMAVDYFDYWGGTTVTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK;

[0318] hu1803-1 경쇄 서열: (서열번호 77)

[0319] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPKAPKLLIYYSTLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTNIIPWTFGGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC;

[0320] hu1803-9 중쇄 서열: (서열번호 78)

[0321] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSTYTNYNEKFKGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGLST LMAVDYFDYWGGTTVTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK;

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK;

[0322] hu1803-9 경쇄 서열: (서열번호 79)

[0323] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQKPKGKAVKLLIYYSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQTNIIPWTFGGGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC;

[0324] ch1805 중쇄 서열: (서열번호 80)

[0325] EVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKTSGYFTFDYNDMDVWKQSHGRSLEWIGSIDPDNGGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDATVYYCTRDIYYG
SSSWFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCN
VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKPREEQFNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS
RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK;

[0326] ch1805 경쇄 서열: (서열번호 81)

[0327] DVVMTQSPATLSVTPGDRVLSLSCRASQISDYLHWYQKSHESPRLLIKYASQISGISPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPYTFGGGT
KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC;

[0328] ch1808 중쇄 서열: (서열번호 82)

[0329] QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGDTFTTNGISWVKQRIQGQLEWIGE IYPRSGNTYYNENFKGKATLTADKSSTAYMELRRLTSEDSAVYFCARSITS
VIGADYFDYWGQGLTVTVSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYT
CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKPREEQFNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK;

[0330] ch1808 경쇄 서열: (서열번호 83)

[0331] DIQMTQTTSSLASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQKKPDGTVKLLIYYSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTFPWTFGGGT
KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC;

[0332] hu1810-12 중쇄 서열: (서열번호 84)

[0333] QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGGTFSNYAISWVKQAPGQGLEWIGE IYPTSGNTYYNEKFKGKATLTADRSTSTMYMELSSLRSEDTAVYYCASGVIT
TVVSTDYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKY
TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKPREEQFNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK;

[0334] hu1810-12 경쇄 서열: (서열번호 85)

[0335] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASLDISNYLNWYQKPKGKAVKLLIYYTSTLHSGVSSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNMVPYTFGGGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC;

[0336] ch1817 중쇄 서열: (서열번호 86)

[0337] EVQLVESGGDLVQGRSMKLSCAASGFTFSNYMAWVRQAPTKGLEWVASISTGGVNTYYRDSVKGRFTISRDNKNNLYLQMDSLRSEETATYYCARHTTA
DYFYGIYFALDAWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTK
TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKPREEQFNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK;

[0338] ch1817 경쇄 서열: (서열번호 87)

[0339] QFTLTQPKSVSGSLRSTITIPICERSSGDI GDSYVNWYQQHLGRPPLNVIYADVQRPSEVSDRFSGSIDSSSNSASLTITNLQMDDEADYFCQSYDTNIDIIF
GGGTKLTVLRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC;

[0340] ch1822 중쇄 서열: (서열번호 88)

[0341] EVRLVESGGDFVQGRSVKLSAASGFTFSNYMAWVRQAPTKGLEWVGSISTGGVNTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMDSLRSEETATYYCARHTTP
DYHYGIYFAMDAGQGTSTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTK
TYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKPREEQFNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS
FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG;

[0342] ch1822 경쇄 서열: (서열번호 89)

[0343] QVTLTQPKSVSGSLRSTITIPICERSSGDI GDSYVNWYQQHLGRPPINVIYADDQRPSEVSDRFSGSIDSSSNSASLTITNLQVDDEADYFCQSYDSSIDIF
GGGTKLTVLRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC;

[0344] 양성 대조군: 돌라글루타이드는 이중쇄 형태이고, 단일쇄는 GLP-1/hIgG4 Fc임(서열번호 90)

[0345] HEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGGGGGSGGGGGGGSAESKYGPPCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
QFNWYVDGVEVHNATKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG.

[0346] 실시예 5: 항체 이중특이적 단백질의 클로닝 및 발현

[0347] 인간 GLP-1 펩티드를 이중특이적 단백질의 GLP-1 수용체 효능제 부분으로 사용하였고, GCGR 항체를 이중특이적
단백질의 GCGR 길항제 부분으로 사용하여 GLP-1/GCGR 항체 이중특이적 단백질을 형성하였다.

[0348] 연구에 따르면, GLP-1의 특정 위치(들)에 아미노산 돌연변이(들)(예컨대, Q17E, I23V, K28R 또는 G30R)가 있는
새로운 GLP-1/GCGR 항체 이중특이적 단백질은 증가된 시험관 내 안정성을 가지며, 이때, 안정성은 GLP-1A의 위
치 17의 Q가 E로 돌연변이되고, GLP-1A의 위치 23의 I가 V로 돌연변이될 때(GLP-1C) 가장 높은 것으로
나타났다. 본 개시의 GLP-1 및 이의 돌연변이체 형태의 비 제한적인 예시적인 서열은 다음과 같다:

표 8

[0349] GLP-1A 폴리펩티드 및 이의 변이체 서열

(GLP-1A의 돌연변이 부위에 대한) GLP-1 펩티드 명칭	서열	서열번호
GLP-1A	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGG	91
GLP-1B (Q17E)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLKGGG	92
GLP-1C (Q17E G30R)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLKGRG	93
GLP-1D (Q17E I23V)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLKGGG	94
GLP-1E (Q17E I23V G30R)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLKGRG	95
GLP-1F (Q17E K28R)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVRGGG	96
GLP-1G (Q17E I23V K28R)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLVRGGG	97
GLP-1H (Q17E K28R G30R)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVRGRG	98
GLP-1J (Q17E I23V K28R G30R)	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLVRGRG	99

[0350] 본 개시의 GLP-1 펩티드의 C 말단 아미노산을 상동 재조합 기술을 이용하여 펩티드 결합 또는 링커를 통해 GCGR

항체 중쇄의 N 말단 아미노산에 연결하였다. 293 발현 시스템을 이용하여 발현을 수행하였고, 표 9에 제시된 바와 같은 이중특이적 단백질의 구조적 모델을 획득하였다:

표 9

[0351]

GLP-1/GCGR 이중특이적 단백질의 구조적 모델

이중특이적 단백질의 구조적 모델의 명칭	구조적 모델 GLP-1-링커-Ab*
이중특이적 단백질 1	GLP-1A -링커-Ab
이중특이적 단백질 2	GLP-1B -링커-Ab
이중특이적 단백질 3	GLP-1C -링커-Ab
이중특이적 단백질 4	GLP-1D -링커-Ab
이중특이적 단백질 5	GLP-1E -링커-Ab
이중특이적 단백질 6	GLP-1F -링커-Ab
이중특이적 단백질 7	GLP-1G -링커-Ab
이중특이적 단백질 8	GLP-1H -링커-Ab
이중특이적 단백질 9	GLP-1-I -링커-Ab

[0352]

*비고: Ab는 본 개시에 기술된 바와 같은 GCGR 항체임. GLP-1 펩티드는 GCGR 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노 말단 또는 GCGR 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노 말단에 연결될 수 있다. 이중특이적 단백질은 GLP-1 펩티드가 GCGR 항체 경쇄 가변 영역의 아미노 말단 대신 GCGR 항체 중쇄 가변 영역의 아미노 말단에 연결될 경우 더욱 유리한 안정성을 가짐이 실험에 의해 확인되었다. 본 개시의 GLP-1 펩티드가 GCGR 전장 항체의 중쇄 가변 영역에 연결되는 일부 구현예에서의 이중특이적 단백질 구조의 개략도를 도 1에 도시하였다.

[0353]

다음의 단백질은 상이한 GLP-1 펩티드를 링커(예를 들어, (GGGS)₃)를 통해 상이한 항체의 중쇄 아미노산에 연결하여 형성된다:

표 10

[0354]

이중특이적 단백질 서열

이중특이적 단백질 명칭	(중쇄 부분을 포함하는) 제1쇄(서열번호): GLP-1 펩티드-링커-항체 중쇄(N에서 C로)	제2쇄(경쇄 부분)
hu1803-9A	HGEGTFTSDVSSYLEEQAQKEFI AWLVKGGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSTYTNYNEKFKGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKT YTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호 100)	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITICRASQDIS NYLNWYQQKPKGKAVK LLIYSSSTLHSGVPS RFGSGSGSDTYTLTI SSLQPEDFATYYCQQ TNIFPWTFGGGTKEV IKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFN RGEC (서열번호 79)
hu1803-9B	HGEGTFTSDVSSYLEEQAQKEFI AWLVKGGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSTYTNYNEKFKGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKT YTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호 101)	
hu1803-9C	HGEGTFTSDVSSYLEEQAQKEFI AWLVKGGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPG ASVVSCKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSTYTNYNEKFKGRVTMTRDTSTS TVYMELSSLRSEDTAVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKT TYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호 102)	
hu1803-9D	HGEGTFTSDVSSYLEEQAQKEFI AWLVKGGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSTYTNYNEKFKGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKT YTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호 103)	
hu1803-9E	HGEGTFTSDVSSYLEEQAQKEFI AWLVKGGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPG ASVVSCKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSTYTNYNEKFKGRVTMTRDTSTS TVYMELSSLRSEDTAVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKT TYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호 104)	
hu1803-9F	HGEGTFTSDVSSYLEEQAQKEFI AWLVKGGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSTYTNYNEKFKGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKT YTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호 105)	
hu1803-9G	HGEGTFTSDVSSYLEEQAQKEFI AWLVKGGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSTYTNYNEKFKGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKT YTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호 106)	

hu1803-9H	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFI AWLVRGGGGGGSGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSTYTNYNEKFKGRVTMTTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTKT YTCNVDPKPSNTKVDKRVESEKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호 107)	
hu1803-9J	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLVRGGGGGGSGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTDYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSTYTNYNEKFKGRVTMTTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARGLSTLMAVDYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTKT YTCNVDPKPSNTKVDKRVESEKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호 108)	
ch1805-D	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLKGGGGGGSGGGSGGGGSEVQLQSGPELVKPGA SVKIPCKTSGYTFTDYNDWVKQSHGRSLEWIGSIDPDNGGTIYNQKFKGKATLTVDKSSST AYMELRSLTSEDTAVYYCTRDYGGSSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTKT YTCNVDPKPSNTKVDKRVESEKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV GLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK (서 열번호 109)	ch1805 경쇄 서열: (서열번호 81)
ch1808-D	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLKGGGGGGSGGGSGGGGSEVQLQSGAELARPGA SVKLSCKASGDTFTTNGISWVKQIRIGQGLEWIGE IYPRSGNTYYNENFKGKATLTADKSSST AYMELRRLTSEDSAVYFCARSITSVIGADYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST VSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTKT YTCNVDPKPSNTKVDKRVESEKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호 110)	ch1808 경쇄 서열: (서열번호 83)
hu1810-12D	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLKGGGGGGSGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSNYAISWVKQAPGQGLEWIGE IYPTSGNTYYNEKFKGKATLTADRSTST MYMELSSLRSEDTAVYYCAGVITTVSTDYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST VSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTKT YTCNVDPKPSNTKVDKRVESEKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC VVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호 111)	hu1810-12 경쇄 서열: (서열번호 85)
ch1817-D	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLKGGGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGDLVQGR SMKLSCAASGFTFSNYMAWVRQAPTGLWVASISTGGVNTYYRDSVKGRFTISRDNAAEST LYLQMDSLRSEETATYYCARHTTADYFYGIYFALDAWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG TKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESEKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEV TCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK KVSNGKLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSL GK(서열번호 112)	ch1817 경쇄 서열: (서열번호 87)
ch1822-D	HGEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFVAWLKGGGGGGSGGGSGGGGSEVRLVESGGDFVQGR SVKLSCAASGFTFSNYMAWVRQAPTGLWVGSISTGGVNTYYRDSVKGRFTISRDNAAEST LYLQMDSLRSEETATYYCARHTTPDYHYGIYFAMDAWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG TKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESEKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEV TCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK KVSNGKLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSL GK(서열번호 113)	ch1822 경쇄 서열: (서열번호 89)

[0355]

본원에서, 바람직하게는 링커 (GGGS)₃은 이중특이적 단백질에서 링커로서 이용될 수 있다. 다른 구현예에서, 폴리펩티드의 연결에 종래에 사용되는 펩티드 결합 또는 기타 링커가 이용될 수 있다. 본 개시의 이중특이적 단

백질을 위한 링커는 (GGGGS)₃의 이용에 한정되지 않는다. GLP-1, GCGR 항체, 및 링커 단백질 단편((GGGGS)₃)을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 당해 분야의 종래의 기술적 수단에 의해 획득하였다. GLP-1의 C 말단 뉴클레오타이드를 상동 제조합 기술에 의해 링커 단백질을 통해 GCGR 항체의 N 말단 뉴클레오타이드에 연결하고, Phr-BsmBI 벡터에 클로닝하였다. 제조합 GLP-1/GCGR 항체 이중특이적 단백질을 293 세포에서 발현시키고, 실시예 6의 방법에 의해 정제하였다. 정제된 단백질을 각각의 다음 실시예에서 사용할 수 있다.

[0356] 실시예 6: 항체 이중특이적 단백질의 정제

[0357] 세포 배양 배지를 고속으로 원심분리하고, 상청액을 수집하고, 제1 정제 단계로서 친화도 크로마토그래피를 수행하였다. 크로마토그래피 배지는 Fc 또는 유도체 충전제, 예컨대, Mabselect, GE와 상호작용하는 단백질 A였다. 평형화 완충액은 1xPBS(137 mmol/L의 NaCl, 2.7 mmol/L의 KCl, 10 mmol/L의 Na₂HPO₄, 2 mmol/L의 KH₂PO₄, pH 7.4)였다. 컬럼을 5배의 컬럼 부피로 평형화한 후, 결합을 위해 세포 배양물 상청액을 로딩하고, 컬럼에서 샘플의 체류 시간이 1분 이상이 되도록 유속을 제어하였다. 샘플을 로딩한 후, A280 UV 흡수가 기준선으로 떨어질 때까지 컬럼을 1xPBS(pH 7.4)로 세척하였다. 이후, 0.1 M의 글리신(pH 3.0) 용출 완충액으로 컬럼을 세척하고, A280 UV 흡수 피크를 기준으로 용출 피크를 수집하고, 수집된 용출 샘플을 1 M의 Tris(pH 8.5)로 중화시켰다.

[0358] 중화된 용출 샘플을 한외여과 및 농축한 후, 크기 배제 크로마토그래피를 실시하였다. 이때, 완충액은 1xPBS였고, 크로마토그래피 컬럼은 XK26/60 Superdex200(GE)이었고, 유속은 4 ml/분으로 제어하였고, 로딩 부피는 5 ml 미만이었다. 표적 단백질 피크를 A280 UV 흡수를 기반으로 모았다. 수집한 단백질을 SEC-HPLC로 확인하였으며, 순도는 95%를 초과하였다. LC-MS 확인 후, 원하는 단백질을 사용하기 위하여 분주하였다. GLP-1/GCGR 항체 이중특이적 단백질을 획득하였다.

[0359] 시험예

[0360] 시험예 1: 인간, 마우스 및 시노물구스 원숭이 GCGR에 대한 GCGR 키메라 항체의 결합의 ELISA 분석

[0361] 항-GCGR 항체의 결합 능력을 GCGR을 과발현하는 CHO 세포에 대한 항체의 결합 분석에 의해 테스트하였다. 인간, 마우스, 및 시노물구스 원숭이 GCGR 전장 플라스미드를 각각 형질감염 방법에 의해 CHO 세포 내로 전달하였다. GCGR의 발현 수준을 2주의 압력 스크리닝 후에 검출하였고, GCGR 과발현 세포를 96웰 플레이트의 바닥에 고정시킨 후, 항체를 추가하고, 신호 강도를 사용하여 항체의 GCGR 과발현 CHO 세포에 대한 결합 활성을 측정하였다. 3종의 GCGR에 대한 항체의 결합 능력을 동일한 결합 분석으로 검출하였다. 예로서, 인간 GCGR에 대한 GCGR 항체의 결합을 다음과 같이 구체적으로 기술된 분석에 의해 검출하였다:

[0362] 세포를 0.9~1.0x10⁶/ml의 밀도로 100 µl/웰로 96-웰 플레이트에 시딩하고 밤새 배양하였다. 상청액을 버리고, 플레이트를 PBS로 3회 세척하고, 100 µl/웰의 세포 면역 고정액(Beyotime, Cat No. P0098)을 첨가하여 실온에서 1시간 동안 고정시키고, PBS로 4회 세척하였다. 액체를 버리고, 200 µl/웰의 차단 용액(PBS로 희석된 5%의 탈지 우유(BD 탈지 우유, Cat No. 232100))을 첨가하고, 차단을 위해 37°C에서 3시간 동안 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 차단이 완료된 후, 차단 용액을 버리고, 플레이트를 PBST 완충액(0.05%의 tweenW-20을 포함하는 PBS, pH7.4)으로 3회 세척하고, 50 µl/웰의, 샘플 희석 용액으로 희석한 다양한 농도의 각각의 테스트 항체(하이드로마로부터 정제된 항체, 키메라 항체 또는 인간화 항체)를 첨가하고, 37°C에서 2시간 동안 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션이 종료된 후, 플레이트를 PBST로 3회 세척하고, 샘플 희석액으로 희석한, 50 µl/웰의 HRP 라벨링된 염소 항-마우스 2차 항체(Jackson Immuno Research, Cat No. 115-035-003) 또는 염소 항-인간 2차 항체(Jackson Immuno Research, Cat No. 109-035-003)를 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBST로 3회 세척하고, 50 µl/웰의 TMB 발색 기질(KPL, Cat No. 52-00-03)을 첨가하고, 실온에서 10분 동안 인큐베이션하고, 50 µl/웰의 1 M의 H₂SO₄를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 흡광도 값을 450 nm의 파장에서 마이크로플레이트 판독기(Thermo scientific Multiskan MK3)로 판독하고, 데이터를 GraphPad Prism 5로 분석하였다. GCGR 과발현 CHO 세포에 대한 GCGR 키메라 항체의 결합을 EC50 값으로 계산하였다.

표 11

키메라 항체의 결합 활성

항체 EC50(nM)	ch1803	ch1805	ch1808	ch1810	ch1817	ch1822
인간 GCGR	0.1167	0.2969	0.6769	0.1168	0.1926	0.3834

마우스 GCGR	0.7183	0.3428	1.019	0.4415	0.1638	0.5681
시노물구스 원숭이 GCGR	0.2128	0.3585	0.5356	0.2480	0.2968	0.4280

[0364] 결과는 키메라 항체 ch1803, ch1805, ch1808, ch1810, ch1817 및 ch1822 모두 세포 표면에서 인간 GCGR에 대해 유리한 결합 활성을 가지며, 또한 마우스 및 시노물구스 원숭이 GCGR과 유리한 교차 친화도 활성을 가짐을 보여 준다.

[0365] 시험예 2: GCGR에 대한 GCGR 리간드의 결합을 차단하는 GCGR 키메라 항체의 분석

[0366] 1. 목적:

[0367] GCGR 키메라 항체의 길항 활성을 GCGR에 대한 GCGR 리간드(글루카곤)의 결합을 차단하는 GCGR 키메라 항체의 분석에 의해 평가하였다.

[0368] 2. 테스트 원리:

[0369] CRE 하류에서 루시퍼라제 유전자(루시퍼라제)의 발현은 cAMP의 CRE에 대한 결합에 의해 유도될 수 있다. 루시퍼라제가 이의 기질에 결합함으로써 방출되는 형광 신호의 변화는 억제 효율을 반영할 수 있다. CRE를 루시퍼라제 유전자의 상류에서 클로닝하고, GCGR 유전자를 포함하는 플라스미드로 CHO-K1 세포로 공동 형질감염시켰다. CRE 및 GCGR 둘 다를 발현하는 단클론 세포를 선택하였다. GLP-1/GCGR 항체 이중특이적 단백질을 글루카곤과 경쟁시켜 GCGR에 결합시키고, GCGR의 하류에서 신호 전달을 차단하고, 하류의 cAMP의 발현에 영향을 미칠 수 있다. GCGR에 대한 GLP-1/GCGR 항체 이중특이적 단백질의 길항 활성을 형광 신호의 변화를 측정하여 평가할 수 있다.

[0370] 3. 테스트 샘플:

[0371] 키메라 항체 ch1803, ch1805, ch1808, ch1810, ch1817 및 ch1822.

[0372] 4. 실험 절차

[0373] a. 세포 현탁액을 신선한 세포 배양 배지로 제조하고, 80 μ l의 배양 시스템, 20,000개의 세포/웰의 96-웰 세포 배양 플레이트에 첨가하고, 5% CO₂, 37°C에서 16시간 동안 인큐베이션하였다.

[0374] b. 테스트하려는 각각의 제조된 단백질 10 μ l를 각 웰에 첨가한 후, 제조된 글루카곤 10 μ l를 첨가하고, 5% CO₂, 37°C에서 5시간 동안 인큐베이션하였다.

[0375] c. 100 μ l의 검출 용액 ONE Glo(Promega)를 각 웰에 첨가하고, 7분 동안 실온의 암소에 두었다.

[0376] d. 마이크로플레이트 판독기 Victor3에서 형광을 검출하였고, GCGR 리간드(글루카곤)의 인간, 마우스 및 시노물구스 GCGR에 대한 결합을 차단하는 GCGR 키메라 항체 용해물의 IC₅₀ 값 및 차단 효율 I_{max}를 계산하였다.

표 12

[0377] 키메라 항체의 길항 활성

항체	인간 GCGR		마우스 GCGR	
	IC ₅₀ (nM)	I _{max}	IC ₅₀ (nM)	I _{max} (%)
ch1803	79.3	100%	24.7	93%
ch1805	95.03	91%	18	100%
ch1808	105.2	98%	26.6	100%
ch1810	72.46	100%	검출되지 않음	검출되지 않음
ch1817	59.8	83%	12.8	96%
ch1822	62.48	59%	15.96	87%

[0378] 시험예 3: GCGR에 대한 GCGR 리간드의 결합에 대한 GCGR 인간화 항체의 차단 분석

[0379] GCGR 항체의 길항 활성을 GCGR에 대한 GCGR 리간드(글루카곤)의 결합을 차단하는 항-GCGR 항체의 분석에 의해 평가하였다. 실험 원리 및 단계는 시험예 2와 동일하며, 결과를 다음 표에 제시하였다:

표 13

[0380] 인간화 항체의 길항 활성

항체	인간 GCGR		항체	인간 GCGR	
	IC50(nM)	Imax		IC50(nM)	Imax
hu1803-1	191.1	91.8%	hu1810-1	189.1	83.2%
hu1803-2	137.12	98.5%	hu1810-2	105.9	100%
hu1803-3	109.55	96.7%	hu1810-3	192.2	95.42%
hu1803-4	139.75	100%	hu1810-4	137.5	99.1%
hu1803-5	79.03	100%	hu1810-5	216.4	86.39%
hu1803-6	77.48	100%	hu1810-6	156.8	100%
hu1803-7	73.04	100%	hu1810-7	119.3	100%
hu1803-8	85.92	100%	hu1810-8	132.9	100%
hu1803-9	78.39	100%	hu1810-9	124.7	90.4%
hu1803-10	76.67	100%	hu1810-10	95.56	97.42%
hu1803-11	88.72	100%	hu1810-11	91.32	99.61%
hu1803-12	86.92	100%	hu1810-12	75.91	99.65%

[0381] 시험관 내 생물학적 평가

[0382] 시험예 4: PBS 중에서 GLP-1/GCGR 항체 이중특이적 단백질의 안정성

[0383] 테스트하려는 항체 이중특이적 단백질 200 μ g을 1 ml의 1×PBS(pH 7.4)에 용해시키고, 37℃의 인큐베이터에 보관하였다. 각각 제0일과 제14일에 샘플을 취하고, 온전한 중쇄의 유지를 Agilent 6530 Q-TOF와 함께 LC-MS에 의해 검출하였다. 결과를 아래 표 14에 나타내었다. 돌연변이가 있는 각각의 GLP-1 펩티드 이중특이적 단백질은 GLP-1A(서열번호 91)를 포함하는 이중특이적 단백질과 비교하여 크게 증가된 안정성을 가지며, hu1803-9B, hu1803-9D 및 hu1803-9G는 더 우수한 안정성을 보여준다.

표 14

[0384] GLP-1/GCGR 항체 이중특이적 단백질의 안정성의 검출

단백질	제14일
hu1803-9A	70.12%
hu1803-9B	≥97%
hu1803-9C	93.98%
hu1803-9D	≥97%
hu1803-9E	94.15%
hu1803-9F	94.65%
hu1803-9G	≥97%

[0385] 시험예 5: 세포 기반의 GCGR 결합의 차단 분석

[0386] 실험 원리 및 단계는 시험예 2와 동일하다.

[0387] 테스트 샘플:

[0388] 1) GCGR 항체(hu1803-9, hu1810-12)

[0389] 2) 이중특이적 단백질: hu1803-9B 및 hu1803-9D.

표 15

[0390] GCGR에 대한 이중특이적 단백질의 길항 활성

단백질	인간 GCGR에 대한 길항 활성	
	IC50(nM)	Imax(%)
hu1803-9	54	100
hu1803-9B	67	100
hu1803-9D	79	100

마우스 및 시노몰구스 원숭이 GCGR에 대한 인간화 항체의 길항 활성

[0392]

[0393]

[0394]

[0395]

[0396]

[0397]

[0398]

[0399]

[0400]

[0401]

[0402]

[0403]

[0404]

[0405]

[0406]

단백질	EC50(nM)	Emax(%)
돌라글루타이드	0.21	100
hu1803-9B	0.22	100
hu1803-9D	0.32	100

[0407] 도 3 및 표 17은 hu1803-9B 및 hu1803-9D 모두 GLP-1R을 완전히 활성화시킬 수 있고, 양성 대조군(둘라글루타이드)과 유사한 효능 및 EC50(최대 활성의 50%를 활성화하는 데 필요한 농도)을 가짐을 보여주어, hu1803-9B 및 hu1803-9D는 모두 GLP-1 부분의 완전한 생물학적 활성을 보유함을 나타낸다.

표 18

[0408] 인간 GLP-1R에 대한 이중특이적 단백질의 활성화 활성

샘플	EC50(nM)	Emax(%)
ch1805-D	0.11	108
ch1808-D	0.14	107
ch1817-D	0.30	106

[0409] 표 18은 GLP1 펩티드에 연결된 모든 키메라 항체 ch1805-D, ch1808-D 및 ch1817-D가 GLP-1R을 완전히 활성화시킬 수 있고, 양성 대조군(둘라글루타이드)과 유사한 효능 및 EC50(최대 활성의 50%를 활성화하는 데 필요한 농도)을 가짐을 보여주어, 본원에 개시된 바와 같은 방식으로 GLP1 펩티드에 다양한 GCGR 항체를 연결시켜 형성된 이중특이적 단백질은 GLP1 펩티드의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않음을 보여준다.

[0410] 약동학 평가

[0411] 시험예 7: C57 마우스에서 생체 내 약동학 검출

[0412] 4마리의 암컷 실험실 C57 마우스를 12/12시간 명/암 주기 조절, 24±3℃의 항온, 50~60%의 습도에서 유지시켰고, 물과 식이에 자유롭게 접근하게 하였다. 마우스는 Jiesijie Laboratory Animal Co., Ltd.에서 구입하였다. 테스트 당일, 동물의 hu1803-9D 및 양성 대조군 약물인 둘라글루타이드를 C57 마우스의 꼬리 정맥에 각각 6 mg/kg 및 2.35 mg/kg의 용량으로, 10 ml/kg의 주입 부피로 주사하였다.

[0413] 본 개시의 GLP-1/GCGR 항체 이중특이적 단백질 및 양성 대조군 둘라글루타이드는 모두 마우스와 교차 활성을 가지므로, 마우스에서 약물 대사 시간이 더 짧다. 혈액 수집을 위하여 선택한 시점은 다음과 같다: 투여 후 제1일의 0시간, 1시간, 24시간(제2일), 및 제3일. 마우스의 망막 정맥에서 매회 150 µl의 혈액을 수집하였다(채혈 전에 채혈 튜브에 DPP-4 억제제 1.5 µl를 첨가하였다). 수집한 혈액 샘플을 응고될 때까지 4℃에서 30분 동안 둔 후, 4℃에서 5분 동안 14000xg에서 원심분리하였다. 상청액(약 80 µl)을 수집하여, 즉시 -80℃에 보관하였다.

[0414] 검출 절차를 다음과 같이 설명한다:

[0415] a. 1 µg/mL의 항-GLP1(Novus, NBP1-05180) 항체를 4℃에서 밤새 플레이팅하였다.

[0416] b. 250 µl의 1xPBST로 4회 세척하고, 5%의 우유를 포함하는 200 µl의 PBS를 첨가하고, 37℃에서 3시간 동안 차단하였다.

[0417] c. 250 µl의 1xPBST로 4회 세척하고, 마우스 블랭크 혈청으로 희석한 100 µl의 테스트 약물 구매를 첨가하고, 2시간 동안 37℃에서 인큐베이션하였다.

[0418] d. 250 µl 1xPBST로 3회 세척하였다.

[0419] e. 100 µl의 호스래디시 퍼옥시다제 라벨링된 2차 항체 항-인간 IgG Fc를 각 웰에 첨가하고, 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.

[0420] f. 250 µl 1xPBST로 3회 세척하였다.

[0421] g. 100 µl의 TMB를 각 웰에 첨가하고, 실온에서 10분 동안 인큐베이션한 다음, 100 µl의 1 M의 H₂SO₄를 첨가하여 반응을 정지시켰다.

[0422] h. 흡광도를 마이크로플레이트 판독기에서 450 nm에서 측정하고, 데이터를 Graphpad Prism 5로 분석하였다.

표 19

[0423] 마우스에서 이중특이적 단백질의 T1/2

테스트 약물	투여 방식	T1/2(h)
hu1803-9D	IV (6 mg/kg)	23.4
돌라글루타이드	IV (2.35 mg/kg)	10

[0424] PK 분석 결과는 마우스에서 본 개시의 이중특이적 단백질 hu1803-9D의 반감기가 양성 대조군 약물의 반감기의 2 배인 약 23.4시간임을 보여준다.

[0425] **생체 내 생물학적 활성의 평가**

[0426] **시험예 8: ob/ob 마우스에서 생체 내 약물 효능 테스트**

[0427] 1. 이 테스트에 사용된 마우스 계통은 당뇨병 ob/ob 마우스 및 동일한 연령의 야생형 마우스(Institute of Model Animals, Nanjing University)였다. 목적은 ob/ob 마우스에서 지속적인 투여 후 혈당, 당화 헤모글로빈, 체중 및 먹이 섭취와 같은 당뇨병 관련 지표에 대한 GLP-1/GCGR 항체 이중특이적 단백질의 치료 효과를 관찰하는 것이다.

[0428] 테스트 전, 동물 모델을 각각 테스트 당일 무작위 및 공복 체중, 무작위 및 공복 혈당에 따라 6개의 군으로 나누었다:

[0429] 모델 대조군, 2.84 mg/kg 및 1.42 mg/kg의 GCGR 단클론 항체군(hu1803-9), 1.16 mg/kg의 양성 대조군(돌라글루타이드) 및 3 mg/kg 및 1.5 mg/kg의 hu1803-9D. 대조군의 마우스에게 인산염 완충액을 피하(S.C.) 주사하고, 각 군의 마우스에게 주 1회(오전 9시), 총 4회 피하 주사하였다(표 20).

표 20

[0430] 테스트군 및 투약 상황

군	처리	용량	투약 빈도	투여 방식
1	ob/ob 마우스 모델 대조군	PBS	주 1회×4주	S.C.
2	GCGR 단클론 항체, 저용량군	1.42 mpk	주 1회×4주	S.C.
3	GCGR 단클론 항체, 고용량군	2.84 mpk	주 1회×4주	S.C.
4	양성 대조군, 고용량군	1.16 mpk	주 1회×4주	S.C.
4	hu1803-9D 저용량군	1.5 mpk	주 1회×4주	S.C.
5	hu1803-9D 고용량군	3 mpk	주 1회×4주	S.C.

[0431] 2. 실험 절차

[0432] a. 공복 및 무작위 체중을 주 1회, 먹이와 물 섭취량을 1일 1회 측정하였다.

[0433] b. 최초 투여 전 및 투여 후 제1일, 제2일, 제3일, 및 제7일에 혈당을 무작위로 측정한 후, 이후에는 주 1회 혈당을 측정하였다. 6시간의 금식 후의 혈당을 최초 투여 전과 투여 후 제3일 및 제7일에 측정하였고, 그 후, 공복 혈당을 주 1회 측정하였다.

[0434] c. 투여 제26일에, 동물을 6시간 동안(8:00~14:00) 금식시킨 후, 2 g/kg의 단일 용량의 글루코스 용액을 복강 내 투여하고, 글루코스 투여 시간을 0으로 기록하였다. 동물은 글루코스 투여 전 0분 및 글루코스 투여 후 15, 30, 60, 90 및 120분에 혈당을 테스트하였다. 혈당 데이터 대 시간을 기준으로 글루코스 내성 곡선을 그리고, 곡선 아래 면적(AUC)을 계산하였다.

[0435] d. 실험 후, 마우스를 6시간 동안(8:00~14:00) 금식시킨 후, 안락사시켰다. 심장에서 혈액 샘플을 채취하고, 전혈을 두 부분으로 나누어, 약 30 μ l의 한 부분을 항응고제가 미리 첨가된 원심분리 튜브에 첨가하여 당화 헤모글로빈 측정을 위해 보관하고, 나머지 부분은 벤치에 방치한 후, 원심분리하여 TG, FFA, CHOL, HDL 및 LDL 수준의 결정을 위하여 혈청을 수득하였다.

[0436] e. 데이터를 graphpad Prism 6 소프트웨어에 의해 분석하고, 데이터의 통계 분석을 위하여 스튜던트-t 검정을 이용하였다.

[0437] 3. 실험 결과:

[0438] 1) ob/ob 마우스에서 무작위 혈당 농도에 미치는 장기적인 투여의 영향:

[0439] 도 4에 나타난 바와 같이, 전체 실험 중에, 무작위 혈당은 ob/ob 마우스의 모델 대조군에서 높은 수준으로 유지된다. 각 투여군의 무작위 혈당 수준은 주 1회 상이한 용량으로 각 작용제를 피하 주사한 후 다양한 정도로 감소하여 모델 대조군보다 현저히 낮은 양호한 용량 효율을 보여주었다. 2.84 mg/kg의 hu1803-9 및 3 mg/kg의 hu1803-9D의 투여는 다른 테스트군에 비해 혈당 수준을 낮추는 데 현저하게 개선된 효과를 나타내며, 한편, 제3일, 제6일, 제14일 및 제30일에 투여된 3 mg/kg의 hu1803-9D는 무작위 혈당을 낮추는 데 더 우수한 효과를 보여준다.

[0440] 2) ob/ob 마우스에서 공복 혈당에 미치는 장기적인 투여의 영향:

[0441] 도 5에 나타난 바와 같이, 전체 실험 중에, 무작위 혈당은 ob/ob 마우스의 모델 대조군에서 높은 수준으로 유지되었다. 각 투여군의 공복 혈당 수준은 주 1회 상이한 용량으로 각 작용제를 피하 주사한 후 다양한 정도로 감소하여 모델 대조군보다 현저히 낮은 양호한 용량 효율을 보여주었다. 무작위 혈당 농도의 테스트와 유사하게, 2.84 mg/kg의 hu1803-9 및 3 mg/kg의 hu1803-9D의 투여는 다른 테스트군에 비해 혈당 수준을 낮추는 데 현저하게 개선된 효과를 나타내며, 한편, 제3일, 제6일, 제13일 및 제30일에 투여된 3 mg/kg의 hu1803-9D는 공복 혈당을 낮추는 데 더 우수한 효과를 보여준다.

[0442] 3) ob/ob 마우스에서 당화 헤모글로빈(HbA1c)에 미치는 장기적인 투여의 영향:

[0443] 결과를 표 21에 나타내었다. 각 투여군의 당화 헤모글로빈 수준은 상이한 용량으로 각각의 작용제를 주1회 피하 주사한 후 30일 동안 다양한 정도로 감소하였고, 모델 대조군보다 유의하게 낮았다($P < 0.05$). 3 mg/kg 및 1.5 mg/kg의 hu1803-9D군에서 당화 헤모글로빈 수준은 각각 $5.5 \pm 0.2\%$ 및 $4.7 \pm 0.1\%$ 로, 현저한 용량-효율 관계를 보여주었다. 이들 중, 3 mg/kg의 hu1803-9D군은 등물의 1.16 mg/kg의 양성 대조군 둘라글루타이드 및 2.84 mg/kg의 GCGR 단클론 항체 hu1803-9보다 낮은 수준을 나타낸다($P < 0.05$).

표 21

[0444] ob/ob 마우스에서 HbA1c%에 미치는 장기적인 투여의 영향

군	HbA1c(%)	증가 백분율(%)
ob/ob 모델 대조군	6.3 ± 0.3	-
hu1803-9-1.42 mpk	5.2 ± 0.1	17.46%
hu1803-9-2.84 mpk	5.2 ± 0.1	17.46%
둘라글루타이드-1.16 mpk	5.6 ± 0.1	11.1%
hu1803-9D-1.5 mpk	5.5 ± 0.2	12.7%
hu1803-9D-3 mpk	4.7 ± 0.1	25.4%

[0445] 시험예 9: GCGR 항체의 경쟁적 ELISA 분석

[0446] GCGR 항체에 의해 결합된 GCGR 에피토프를 ELISA 분석에 의해 분류하였는데, GCGR-과발현 CHO 세포에 대한 상이한 농도의 표준 항체와 비오틴 라벨링된 항체의 경쟁적 결합을 검출하였다. 세포 플레이트의 제조 방법은 시험예 1과 동일하였다. 다음의 구체적인 절차는 다음과 같다:

[0447] 항체를 비오틴 라벨링 키트 지침(Dojindo Molecular Technologies, Inc. LK03)에 따라 라벨링하였다. 라벨링되지 않은 테스트 항체를 96-웰 세포 플레이트의 샘플 희석액으로 50 μ l/웰로 다양한 농도로 희석하고, 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션을 완료한 후, 플레이트를 PBST로 3회 세척하고, 샘플 희석액으로 희석한 비오틴-라벨링된 항체 50 μ l/웰을 0.1 μ g/ml의 농도로 첨가하고, 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션하고, 플레이트를 PBST로 3회 세척하고, HRP 라벨링된 염소-항-인간 2차 항체(Jackson Immuno Research, Cat No. 109-035-003)를 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBST로 3회 세척하고, 50 μ l/웰의 TMB 발색 기질(KPL, Cat No. 52 52-00-03)을 첨가하고, 실온에서 10분 동안 인큐베이션하고, 50 μ l/웰의 1 M의 H_2SO_4 를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 흡광도 값을 450 nm의 파장에서 마이크로플레이트 판독기(Thermo scientific Multiskan MK3)로 판독하고, 데이터를 GraphPad Prism 5로 분석하였다.

[0448] 경쟁을 위하여 세포 플레이트에 결합된 비오틴 라벨링된 항체의 농도가 낮을수록 OD 값이 낮아지고, 그 반대의 경우도 마찬가지이다. 경쟁 효율을 다음 식에 따라 계산하였다:

[0449] $IC = (\text{테스트 항체 최고 OD}_{450nm} - \text{테스트 항체 최소 OD}_{450nm}) / (\text{테스트 항체 최고 OD}_{450nm} - \text{라벨링된 항체 최소 OD}_{450nm})$, 결과를 아래 표 22에 제시하였다.

卣 22

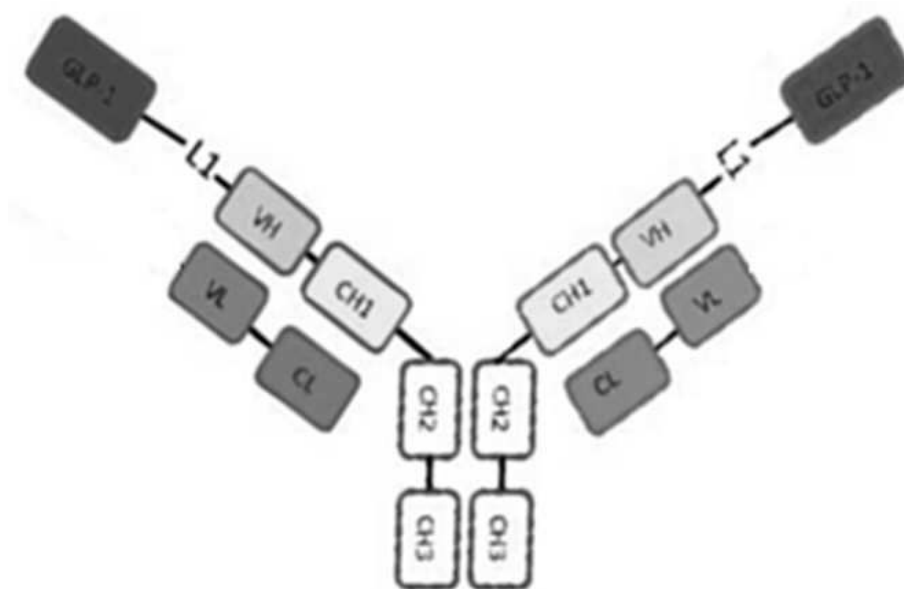
[0450]

	경쟁적 항체				
항체	ch1808	hu1803-9	hu1810-12	ch1817	ch1822
ch1805	100%	100%	100%	-	-
ch1808	100%	46.60%	54.30%	-	-
hu1803-9	100%	100%	100%	-	-
hu1810-12	100%	100%	100%	-	-
ch1817	-	-	-	100%	100%
ch1822	-	-	-	75.40%	100%

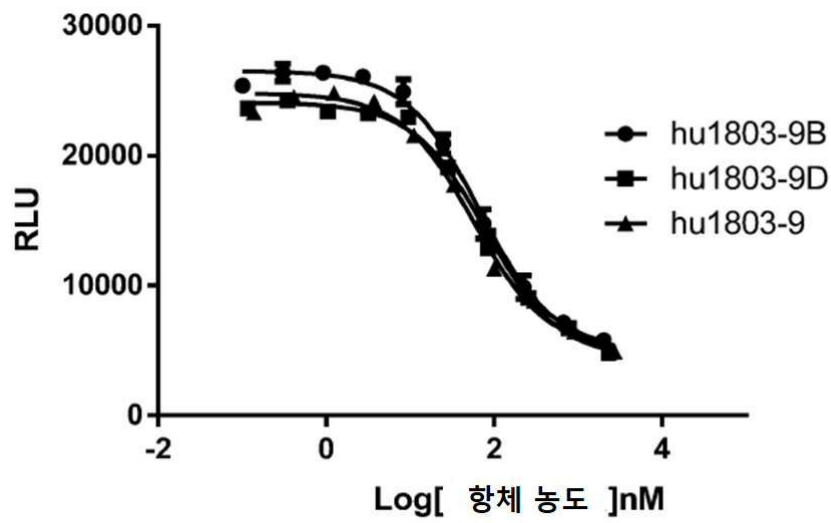
[0451] 결과는 ch1817과 ch1822가 매우 가까운 에피토프를 가지고 있고, ch1808, hu1803-9 및 hu1810-12가 매우 가까운 에피토프를 가지고 있으며, ch1808, hu1803-9 및 hu1810-12에 의해 결합된 에피토프는 ch1805에 의해 결합된 에피토프의 범위 내에 있는 것으로 추정됨을 보여준다.

도면

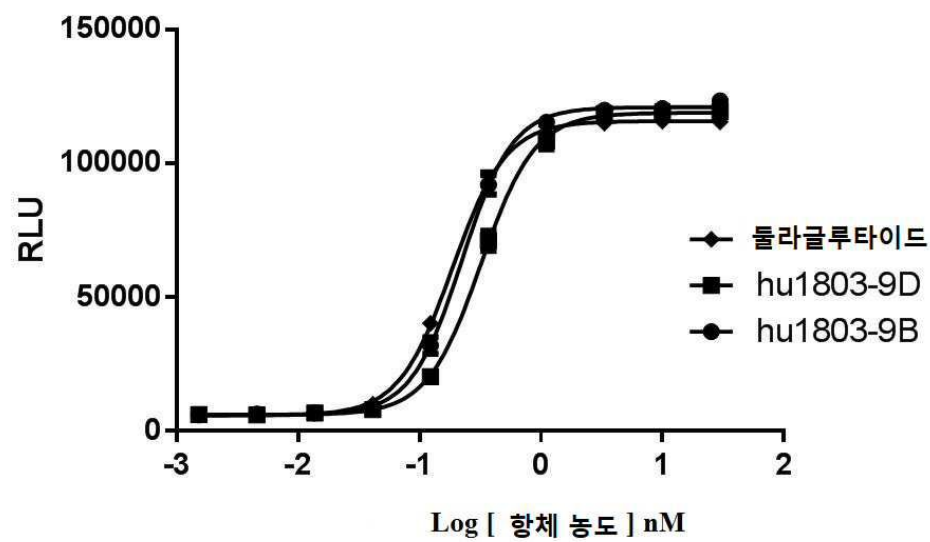
도면1



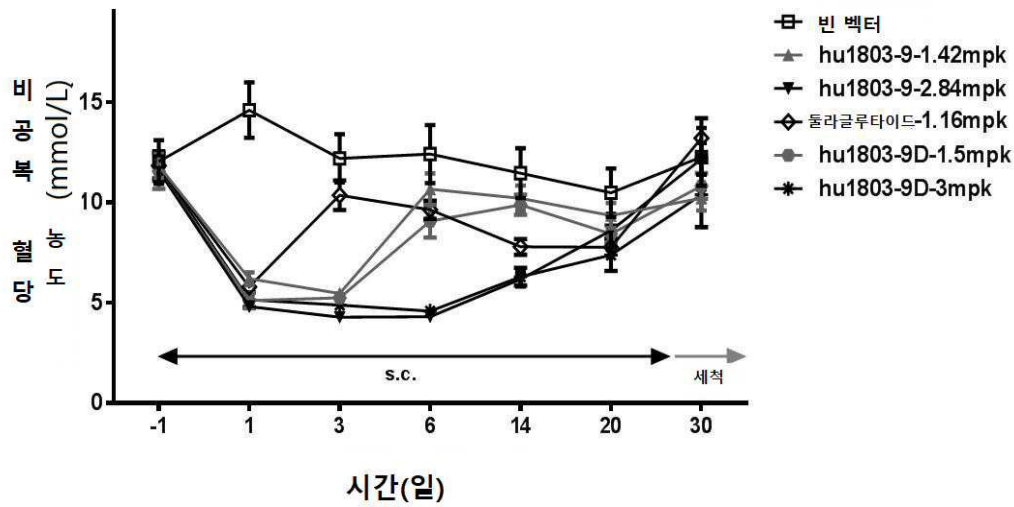
도면2



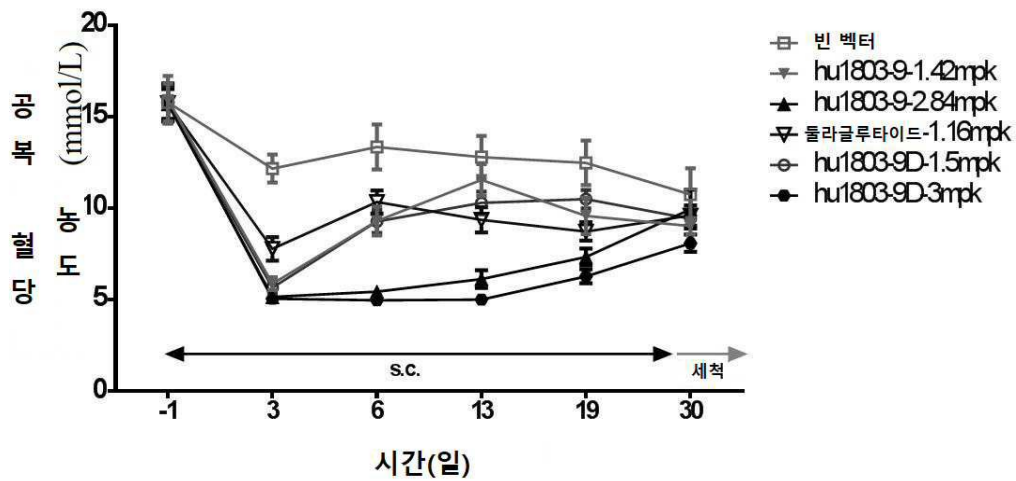
도면3



도면4



도면5



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO.,LTD.,
SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> BISPECIFIC PROTEIN

<160> 113

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 477

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<223> full-length GCGR

<400> 1

Met Pro Pro Cys Gln Pro Gln Arg Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

Leu Ala Cys Gln Pro Gln Val Pro Ser Ala Gln Val Met Asp Phe Leu

20 25 30

Phe Glu Lys Trp Lys Leu Tyr Gly Asp Gln Cys His His Asn Leu Ser

35 40 45

Leu Leu Pro Pro Pro Thr Glu Leu Val Cys Asn Arg Thr Phe Asp Lys

50 55 60

Tyr Ser Cys Trp Pro Asp Thr Pro Ala Asn Thr Thr Ala Asn Ile Ser

65 70 75 80

Cys Pro Trp Tyr Leu Pro Trp His His Lys Val Gln His Arg Phe Val

85 90 95

Phe Lys Arg Cys Gly Pro Asp Gly Gln Trp Val Arg Gly Pro Arg Gly

100 105 110

Gln Pro Trp Arg Asp Ala Ser Gln Cys Gln Met Asp Gly Glu Glu Ile

115 120 125

Glu Val Gln Lys Glu Val Ala Lys Met Tyr Ser Ser Phe Gln Val Met

130 135 140

Tyr Thr Val Gly Tyr Ser Leu Ser Leu Gly Ala Leu Leu Leu Ala Leu

145 150 155 160

Ala Ile Leu Gly Gly Leu Ser Lys Leu His Cys Thr Arg Asn Ala Ile

165 170 175

His Ala Asn Leu Phe Ala Ser Phe Val Leu Lys Ala Ser Ser Val Leu

180 185 190

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

195 200 205

Asp Leu Ser Val Ser Thr Trp Leu Ser Asp Gly Ala Val Ala Gly Cys

210 215 220

Arg Val Ala Ala Val Phe Met Gln Tyr Gly Ile Val Ala Asn Tyr Cys

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

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

 Thr Leu Ile Pro Leu Leu Gly Val His Glu Val Val Phe Ala Phe Val
 355 360 365
 Thr Asp Glu His Ala Gln Gly Thr Leu Arg Ser Ala Lys Leu Phe Phe
 370 375 380
 Asp Leu Phe Leu Ser Ser Phe Gln Gly Leu Leu Val Ala Val Leu Tyr
 385 390 395 400
 Cys Phe Leu Asn Lys Glu Val Gln Ser Glu Leu Arg Arg Arg Trp His
 405 410 415

 Arg Trp Arg Leu Gly Lys Val Leu Trp Glu Glu Arg Asn Thr Ser Asn
 420 425 430
 His Arg Ala Ser Ser Ser Pro Gly His Gly Pro Pro Ser Lys Glu Leu
 435 440 445
 Gln Phe Gly Arg Gly Gly Gly Ser Gln Asp Ser Ser Ala Glu Thr Pro
 450 455 460
 Leu Ala Gly Gly Leu Pro Arg Leu Ala Glu Ser Pro Phe
 465 470 475

<210>

2

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> m1803 heavy chain variable region

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Thr Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Arg Gly Leu Ser Thr Leu Met Ala Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 3

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> m1803 light chain variable region

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

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

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser His Leu Glu Gln

65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Thr Asn Ile Phe Pro Trp

85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105

<210> 4

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> m1805 heavy chain variable region

<400> 4

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

Ser Val Lys Ile Pro Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Arg Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ser Ile Asp Pro Asp Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115 120

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> m1805 light chain variable region

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 6

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> m1808 heavy chain variable region

<400> 6

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> m1808 light chain variable region

<400> 7

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 8

<211> 123

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> m1810 heavy chain variable region

<400> 8

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

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

Trp Gly Gln Gly Ser Pro Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> DOMAIN

<223> m1810 light chain variable region

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 10

<211> 125

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<220><221> DOMAIN

<223> rat1817 heavy chain variable region

<400> 10

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

1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

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

Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 11

<211> 111

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<220><221> DOMAIN

<223> rat1817 light chain variable region

<400> 11

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

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

Asn Ile Asp Ile Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 12

<211> 125

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<220><221> DOMAIN

<223> rat1822 heavy chain variable region

<400> 12

Glu Val Arg Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Phe Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Ser Ile Ser Thr Gly Gly Val Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg His Thr Thr Pro Asp Tyr His Tyr Gly Ile Tyr Phe Ala Met

100 105 110

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

115 120 125

<210> 13

<211> 111

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<220><221> DOMAIN

<223> rat1822 light chain variable region

<400> 13

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

1 5 10 15

Thr Ile Thr Ile Pro Cys Glu Arg Ser Ser Gly Asp Ile Gly Glu Ser

20 25 30

Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Leu Gly Arg Pro Pro Ile Asn Val

35 40 45

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

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

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> m1803 HCDR1

<400> 14

Asp Tyr Trp Ile Glu

1 5

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223>

> m1803 HCDR2

<400> 15

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

1 5 10 15

Gly

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> m1803 HCDR3

<400> 16

Gly Leu Ser Thr Leu Met Ala Val Asp Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> m1803 LCDR1

<

400> 17

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> m1803 LCDR2

<400> 18

Tyr Ser Ser Thr Leu His Ser

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> m1803 LCDR3

<400> 19

Gln Gln Thr Asn Ile Phe Pro Trp Thr

1 5

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> m1805 HCDR1

<400> 20

Asp Tyr Asn Met Asp

1 5

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> m1805 HCDR2

<400> 21

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

1 5 10 15

Gly

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> m1805 HCDR3

<400> 22

Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> m1805 LCDR1

<400> 23

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr Leu His

1 5 10

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> m1805 LCDR2

<400> 24

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser

1 5

<210> 25

<211> 9

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> m1805 LCDR3

<400> 25

Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> m1808 HCDR1

<400> 26

Thr Asn Gly Ile Ser

1 5

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> m1808 HCDR2

<400> 27

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

1 5 10 15

Gly

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> m1808 HCDR3

<400> 28

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

1 5 10

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> m1808 LCDR1

<400> 29

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> m1808 LCDR2

<400> 30

Tyr Ser Ser Thr Leu His Ser

1 5
 <210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> DOMAIN
 <223> m1808 LCDR3
 <400> 31
 Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Trp Thr

1 5
 <210> 32
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> DOMAIN
 <223> m1810 HCDR1
 <400> 32
 Asn Tyr Ala Ile Ser

1 5
 <210> 33
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> DOMAIN
 <223> m1810 HCDR2
 <400> 33
 Glu Ile Tyr Pro Thr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15
 Gly

<210> 34
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> m1810 HCDR3

<400> 34

Gly Val Ile Thr Thr Val Val Ser Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> m1810 LCDR1

<400> 35

Arg Ala Ser Leu Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> m1810 LCDR2

<400> 36

Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> m1810 LCDR3

<400> 37

Gln Gln Gly Asn Met Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> rat1817 HCDR1

<400> 38

Asn Tyr Tyr Met Ala

1 5

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> rat1817 HCDR2

<400> 39

Ser Ile Ser Thr Gly Gly Val Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 40

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> rat1817 HCDR3

<400> 40

His Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Tyr Gly Ile Tyr Phe Ala Leu Asp Ala

1 5 10 15

<210> 41

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> rat1817 LCDR1

<400> 41

Glu Arg Ser Ser Gly Asp Ile Gly Asp Ser Tyr Val Asn

1 5 10

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> rat1817 LCDR2

<400> 42

Ala Asp Val Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 43

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> rat1817 LCDR3

<400> 43

Gln Ser Tyr Asp Thr Asn Ile Asp Ile Ile

1 5 10

<210> 44

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> rat1822 HCDR3

<400> 44

His Thr Thr Pro Asp Tyr His Tyr Gly Ile Tyr Phe Ala Met Asp Ala

1 5 10 15

<210> 45

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> rat1822 LCDR1

<400> 45

Glu Arg Ser Ser Gly Asp Ile Gly Glu Ser Tyr Val Asn

1 5 10

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> rat1822 LCDR2

<400> 46

Ala Asp Asp Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> rat1822 LCDR3

<400> 47

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Ile Asp Ile Phe

1 5 10

<210> 48

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> mouse antibody HCDR1 general formula

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(3)

<223> Xaa-Xaa-Xaa is selected from Asp-Tyr-Trp, Thr-Asn-Gly or Asn-Tyr-Ala.

<220><221> DOMAIN

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is selected from Glu or Ser.

<400> 48

Xaa Xaa Xaa Ile Xaa

1 5

<210> 49

<211> 17

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> mouse antibody HCDR2 general formula

<220><221> DOMAIN

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is selected from Leu or Tyr.

<220><221> DOMAIN

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is selected from Gly, Arg or Thr.

<220><221> DOMAIN

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is selected from Gly or Thr.

<220><221> DOMAIN

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is selected from Tyr or Asn.

<220><221> DOMAIN

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is selected from Asn or Tyr.

<400> 49

Glu Ile Xaa Pro Xaa Ser Xaa Xaa Thr Xaa Tyr Asn Glu Xaa Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 50

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> mouse antibody HCDR3 general formula

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is selected from Gly or Ser.

<220><221> DOMAIN

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is selected from Ile, Leu or Val-Ile.

<220><221> DOMAIN

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is selected from Ser or Thr

<220><221> DOMAIN

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is selected from Ser or Thr

<220><221> DOMAIN

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is selected from Leu or Val.

<220><221> DOMAIN

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is selected from Met, Val or Ile.

<220><221> DOMAIN

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is selected from Ser, Gly or Ala.

<220><221> DOMAIN

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is selected from Thr, Ala or Val.

<400> 50

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> mouse antibody LCDR1 general formula

<220><221> DOMAIN

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is selected from Leu or Gln.

<400> 51

Arg Ala Ser Xaa Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> mouse antibody LCDR2 general formula

<220><221> DOMAIN

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is selected from Ser or Thr.

<400> 52

Tyr Xaa Ser Thr Leu His Ser

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> mouse antibody LCDR3 general formula

<220><221> DOMAIN

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is selected from Thr or Gly.

<220><221> DOMAIN

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is selected from Met, Thr or Ile.

<220><221> DOMAIN

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is selected from Phe or Val.

<220><221> DOMAIN

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is selected from Trp or Tyr.

<400> 53

Gln Gln Xaa Asn Xaa Xaa Pro Xaa Thr

1 5

<210> 54

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> rat antibody HCDR3 general formula

<220><221> DOMAIN

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is selected from Pro or Ala.

<220><221> DOMAIN

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is selected from Phe or His.

<220><221> DOMAIN

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is selected from Leu or Met.

<400> 54

His Thr Thr Xaa Asp Tyr Xaa Tyr Gly Ile Tyr Phe Ala Xaa Asp Ala

1 5 10 15

<210> 55

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> rat antibody LCDR1 general formula

<220><221> DOMAIN

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is selected from Glu or Asp.

<400> 55

Glu Arg Ser Ser Gly Asp Ile Gly Xaa Ser Tyr Val Asn

1 5 10

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> rat antibody LCDR2 general formula

<220><221> DOMAIN

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is selected from Asp or Val.

<400> 56

Ala Asp Xaa Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> rat antibody LCDR3 general formula

<220><221> DOMAIN

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is selected from Ser or Thr.

<220><221> DOMAIN

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is selected from Ser or Asn.

<220><221> DOMAIN

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is selected from Phe or Ile.

<400> 57

Gln Ser Tyr Asp Xaa Xaa Ile Asp Ile Xaa

1 5 10

<210> 58

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> hu1803_VL.1

<400> 58

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 Asn 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 Ser Ser Thr Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ile Phe Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 59

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> hu1803_VL.1A

<400> 59

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 Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gly Ala Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

<210> 60

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> hu1803_VL.1B

<400> 60

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

100 105

<210> 61

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> hu1803_VH.1

<400> 61

Glu 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

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val 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 Gly Leu Ser Thr Leu Met Ala Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 62

<211> 122

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> hu1803_VH.1A

<400> 62

Glu 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
 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Thr Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr 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 Gly Leu Ser Thr Leu Met Ala Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 63

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> hu1803_VH.1B

<400> 63

Glu 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
 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Thr Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr 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
Ser Arg Gly Leu Ser Thr Leu Met Ala Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 64

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> hu1803_VH.1C

<400> 64

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

35 40 45
Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Thr Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Ala Thr Phe Thr Ala Asp Pro 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
Ser Arg Gly Leu Ser Thr Leu Met Ala Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 65

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Hu1810_VL.1

<400> 65

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Met Val Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 66

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Hu1810_VL.1A

<400> 66

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 Leu Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly

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

<210> 67

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Hu1810_VL.1B

<400> 67

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 Leu Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

<210> 68

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Hu1810_VH.1

<400> 68

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 Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 69

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Hu1810_VH.1A

<400> 69

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 Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Thr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Arg Ser Thr Ser Thr Met 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 Ser Gly Val Ile Thr Thr Val Val Ser Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 70

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Hu1810_VH.1B

<400> 70

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 Asn Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45
Gly Glu Ile Tyr Pro Thr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Thr Ser Thr Met 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 Ser Gly Val Ile Thr Thr Val Val Ser Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 71

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> Hu1810_VH.1C

<400> 71

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 Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Thr Ser Thr Met 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 Ser Gly Val Ile Thr Thr Val Val Ser Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 72

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> IgG4-AA heavy chain constant region

<400> 72

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 Pro Cys Pro Ala Pro

100 105 110

Glu Ala Ala 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> 73

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<223> antibody light chain (Kappa chain) constant region

<400> 73

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> 74

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<223> ch1803 heavy chain

<400> 74

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

1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

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

35 40 45
Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Thr Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60
Lys Gly Arg Ala Thr Phe Thr Ala Glu Pro Ser Ser Ser Ser Ala Tyr

65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Thr Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ser Arg Gly Leu Ser Thr Leu Met Ala Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp

100 105 110
Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr

130 135 140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

145 150 155 160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

165 170 175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp

195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 210 215 220
 Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Gln Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe 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 Gly Leu Pro Ser Ser 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 Gln Glu Glu Met 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 Arg Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Glu 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 Leu Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 75

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<223> ch1803 light chain

<400> 75

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser His Leu Glu Gln

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Thr Asn Ile Phe Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile 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> 76

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<223> hu1803-1 heavy chain

<400> 76

Glu 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

Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Thr Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val 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 Gly Leu Ser Thr Leu Met Ala Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro

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

 210 215 220
 Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Gln Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe 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 Gly Leu Pro Ser Ser 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 Gln Glu Glu Met 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 Arg Leu Thr Val Asp Lys

 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu 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 Leu Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 77

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<223> hu1803-1 light chain

<400> 77

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 Asn 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 Ser Ser Thr Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ile Phe Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 78
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> CHAIN
 <223> hu1803-9 heavy chain
 <400> 78
 Glu 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

 Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Thr Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val 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 Gly Leu Ser Thr Leu Met Ala Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Gln Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe 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 Gly Leu Pro Ser Ser 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 Gln Glu Glu Met 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 Arg Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu 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 Leu Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 79

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<223> hu1803-9 light chain

<400> 79

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 Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Ser Ser Thr Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ile Phe Pro Trp
 85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 80

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<223> ch1805 heavy chain

<400> 80

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

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

85								90								95															
Thr	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln																
100								105								110															
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val																
115								120								125															
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	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	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys																
195								200								205															
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro																
210								215								220															
Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val																
225								230								235								240							
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr																
245								250								255															
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu																
260								265								270															
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys																
275								280								285															
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser																
290								295								300															
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys																
305								310								315								320							
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile																
325								330								335															

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 81

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<223> ch1805 light chain

<400> 81

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Tyr

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 82

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<223> ch1808 heavy chain

<400> 82

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

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

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

 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 210 215 220
 Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Gln Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe 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 Gly Leu Pro Ser Ser 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 Gln Glu Glu Met 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 Arg Leu Thr Val Asp Lys

405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu 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 Leu Gly

435 440 445

Lys

<210> 83

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<223> ch1808 light chain

<400> 83

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35

40

45

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

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln

65

70

75

80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Trp

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 84

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<223> hu1810-12 heavy chain

<400>

84

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 Asn Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Thr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Thr Ser Thr Met 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 Ser Gly Val Ile Thr Thr Val Val Ser Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
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 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
195 200 205

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
210 215 220

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

<220><221> CHAIN

<223> hu1810-12 light chain

<400> 85

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 Leu Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Met Val Pro Tyr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 86

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<223> ch1817 heavy chain

<400> 86

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

1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg His Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Tyr Gly Ile Tyr Phe Ala Leu

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His

165 170 175

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

180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys

195 200 205
 Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 210 215 220
 Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

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

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

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

Ser Leu Gly Lys

450

<210> 87

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221>

CHAIN

<223> ch1817 light chain

<400> 87

Gln Phe Thr Leu Thr Gln Pro Lys Ser Val Ser Gly Ser Leu Arg Ser

1 5 10 15

Thr Ile Thr Ile Pro Cys Glu Arg Ser Ser Gly Asp Ile Gly Asp Ser

20 25 30

Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Leu Gly Arg Pro Pro Leu Asn Val

35 40 45

Ile Tyr Ala Asp Val Gln Arg Pro Ser Glu Val Ser Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Thr Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Ile Asp Ile Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu 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> 88

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<223> ch1822 heavy chain

<400> 88

Glu Val Arg Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Phe Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Ser Ile Ser Thr Gly Gly Val Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Ser Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Glu Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Thr Thr Pro Asp Tyr His Tyr Gly Ile Tyr Phe Ala Met
100 105 110

Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
130 135 140

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

 Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 210 215 220
 Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

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

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

385						390												400
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr			
					405				410						415			
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val			
					420				425					430				
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu			
					435				440					445				
Ser	Leu	Gly	Lys															
					450													
<210>	89																	
<211>	218																	
<212>	PRT																	
<213>	Artificial Sequence																	
<220><221>																		
	CHAIN																	
<223>	ch1822 light chain																	
<400>	89																	
Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Gln	Pro	Lys	Ser	Val	Ser	Gly	Ser	Leu	Arg	Ser			
1					5				10					15				
Thr	Ile	Thr	Ile	Pro	Cys	Glu	Arg	Ser	Ser	Gly	Asp	Ile	Gly	Glu	Ser			
					20				25					30				
Tyr	Val	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Leu	Gly	Arg	Pro	Pro	Ile	Asn	Val			
					35				40					45				
Ile	Tyr	Ala	Asp	Asp	Gln	Arg	Pro	Ser	Glu	Val	Ser	Asp	Arg	Phe	Ser			
					50				55					60				
Gly	Ser	Ile	Asp	Ser	Ser	Ser	Asn	Ser	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr	Asn			
65					70						75				80			
Leu	Gln	Val	Asp	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Phe	Cys	Gln	Ser	Tyr	Asp	Ser			
					85						90				95			
Ser	Ile	Asp	Ile	Phe	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	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> 90

<211> 275

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> PEPTIDE

<223> Dulaglutide

<400> 90

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu

35 40 45

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

85 90 95

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

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

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 210 215 220
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
 225 230 235 240
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 245 250 255
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 260 265 270

Ser Leu Gly
 275

<210> 91

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> PEPTIDE

<223> GLP-1A

<400> 91

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly
20 25 30

<210> 92

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> PEPTIDE

<223> GLP-1B

<400> 92

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
1 5 10 15
Glu Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly
20 25 30

<210> 93

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> PEPTIDE

<223> GLP-1C

<400> 93

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

<210> 94

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> PEPTIDE

<223> GLP-1D

<400> 94

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15
 Glu Ala Ala Lys Glu Phe Val Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly
 20 25 30

<210> 95

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221>

PEPTIDE

<223> GLP-1E

<400> 95

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15
 Glu Ala Ala Lys Glu Phe Val Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 96

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> PEPTIDE

<223> GLP-1F

<400> 96

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Gly Gly
 20 25 30

<210> 97

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> PEPTIDE

<223> GLP-1G

<400> 97

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15
 Glu Ala Ala Lys Glu Phe Val Ala Trp Leu Val Arg Gly Gly Gly
 20 25 30

<210> 98

<211

> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> PEPTIDE

<223> GLP-1H

<400> 98

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15
 Glu Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 99

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> PEPTIDE

<223> GLP-1J

<400> 99

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15
 Glu Ala Ala Lys Glu Phe Val Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 100

<211> 495

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<223> hu1803-9A containing heavy chain part

<400> 100

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly Gly

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

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

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

 210 215 220
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 225 230 235 240
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 245 250 255

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
260 265 270

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
275 280 285

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
290 295 300

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
305 310 315 320

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
325 330 335

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
340 345 350

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
355 360 365

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
370 375 380

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
385 390 395 400

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
405 410 415

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
420 425 430

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
435 440 445

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
450 455 460

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
465 470 475 480

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
485 490 495

<210> 101

<211> 495

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<223> hu1803-9B containing heavy chain part

<400> 101

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Trp Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu

115 120 125

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala

180 185 190

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

195 200 205

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

210 215 220

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

225 230 235 240

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys

245 250 255

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro

260 265 270

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val

275 280 285

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

290 295 300

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

305 310 315 320

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

325 330 335

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

340 345 350

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

355 360 365

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

370 375 380

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

385 390 395 400

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

405 410 415

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

420 425 430

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

435 440 445

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

450 455 460
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

465 470 475 480
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

485 490 495

<210> 102

<211> 496

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<223> hu1803-9C containing heavy chain part

<400> 102

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met

115 120 125

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

130 135 140

Arg Gly Leu Ser Thr Leu Met Ala Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

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

 210 215 220
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 225 230 235 240
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 245 250 255
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 260 265 270
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser

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

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

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

405 410 415

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

420 425 430

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

435 440 445

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser

450 455 460

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

465 470 475 480

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

485 490 495

<210> 103

<211> 495

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<223> hu1803-9D containing heavy chain part

<400> 103

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Ala Lys Glu Phe Val Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Trp Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

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

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

 210 215 220
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 225 230 235 240
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 245 250 255
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 260 265 270
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val

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

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

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

465 470 475 480
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
485 490 495

<210> 104

<211> 496

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<223> hu1803-9E containing heavy chain part

<400> 104

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
1 5 10 15
Glu Ala Ala Lys Glu Phe Val Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Gly

20 25 30
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
35 40 45

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser
50 55 60
Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Trp
65 70 75 80
Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
85 90 95
Glu Ile Leu Pro Gly Ser Thr Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
100 105 110
Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met
115 120 125
Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
130 135 140
Arg Gly Leu Ser Thr Leu Met Ala Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
145 150 155 160
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
165 170 175
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
180 185 190
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
195 200 205
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
210 215 220
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
225 230 235 240
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
245 250 255
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
260 265 270
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
275 280 285
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

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

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

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

 465 470 475 480
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 485 490 495
 <210> 105
 <211> 495
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> CHAIN
 <223> hu1803-9F containing heavy chain part
 <400> 105

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Gly Gly Gly
 20 25 30
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
 35 40 45
 Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val
 50 55 60
 Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Trp Ile
 65 70 75 80
 Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Glu
 85 90 95
 Ile Leu Pro Gly Ser Thr Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly
 100 105 110
 Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
 115 120 125
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 130 135 140
 Gly Leu Ser Thr Leu Met Ala Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 145 150 155 160
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 165 170 175
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 180 185 190
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 195 200 205
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 210 215 220
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 225 230 235 240
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys

245 250 255
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 260 265 270
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val

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

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

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

 465 470 475 480
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 485 490 495

<210> 106

<211> 495

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<223> hu1803-9G containing heavy chain part

<400> 106

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Ala Lys Glu Phe Val Ala Trp Leu Val Arg Gly Gly Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Trp Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu

115 120 125

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala

180 185 190

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

195 200 205
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

 210 215 220
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 225 230 235 240
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 245 250 255
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 260 265 270
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val

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

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

 405 410 415
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 420 425 430
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 435 440 445

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
450 455 460

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

465 470 475 480

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
485 490 495

<210> 107
<211> 495
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> CHAIN
<223> hu1803-9H containing heavy chain part
<400> 107

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
35 40 45

Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val
50 55 60

Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Trp Ile
65 70 75 80

Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Glu
85 90 95

Ile Leu Pro Gly Ser Thr Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly
100 105 110

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
115 120 125

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala

180 185 190

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

195 200 205

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

210 215 220

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

225 230 235 240

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys

245 250 255

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro

260 265 270

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val

275 280 285

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

290 295 300

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

305 310 315 320

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

325 330 335

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

340 345 350

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

355 360 365

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

370 375 380

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

385 390 395 400
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

465 470 475 480

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

 485 490 495

<210> 108

<211> 495

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<223> hu1803-9J containing heavy chain part

<400> 108

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
1 5 10 15
Glu Ala Ala Lys Glu Phe Val Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly Gly

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

85	90	95	
Ile Leu Pro Gly Ser Thr Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly			
100	105	110	
Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu			
115	120	125	
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg			
130	135	140	
Gly Leu Ser Thr Leu Met Ala Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln			
145	150	155	160
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val			
165	170	175	
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala			
180	185	190	
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser			
195	200	205	
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val			
210	215	220	
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro			
225	230	235	240
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys			
245	250	255	
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro			
260	265	270	
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val			
275	280	285	
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
290	295	300	
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu			
305	310	315	320
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
325	330	335	

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

340 345 350

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

355 360 365

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

370 375 380

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

385 390 395 400

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

405 410 415

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

420 425 430

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

435 440 445

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

450 455 460

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

465 470 475 480

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

485 490 495

<210> 109

<211> 493

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<223> ch1805-D containing heavy chain part

<400> 109

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Ala Lys Glu Phe Val Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly Gly

20 25 30

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

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

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

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

465 470 475 480
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
485 490

<210> 110

<211> 495

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<223> ch1808-D containing heavy chain part

<400> 110

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Ala Lys Glu Phe Val Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Glu

115 120 125

Leu Arg Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

130 135 140

Ser Ile Thr Ser Val Ile Gly Ala Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala

180 185 190

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

195 200 205

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

210 215 220

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

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

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

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

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

 465 470 475 480

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

485 490 495

<210> 111

<211> 496

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<223> hu1810-12D containing heavy chain part

<400> 111

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Ala Lys Glu Phe Val Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Thr Ser Thr Met Tyr Met Glu

115 120 125

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser

130 135 140

Gly Val Ile Thr Thr Val Val Ser Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

180 185 190
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
195 200 205
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

210 215 220
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
225 230 235 240
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
245 250 255
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
260 265 270
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser

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

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

405 410 415
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
420 425 430

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
435 440 445

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
450 455 460

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

465 470 475 480

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
485 490 495

<210> 112

<211> 498

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<223> ch1817-D containing heavy chain part

<400> 112

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Ala Lys Glu Phe Val Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val

35 40 45

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Met
50 55 60

Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Tyr Met
65 70 75 80

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

85 90 95

Ile Ser Thr Gly Gly Val Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly
100 105 110

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr Leu Gln
115 120 125

Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Glu Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg

130 135 140
 His Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Tyr Gly Ile Tyr Phe Ala Leu Asp Ala

 145 150 155 160
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly

 165 170 175
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser

 180 185 190
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val

 195 200 205
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

 210 215 220
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 225 230 235 240
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val

 245 250 255
 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys

 260 265 270
 Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly

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

 325 330 335
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg

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

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 385 390 395 400
 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

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

465 470 475 480
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 485 490 495
 Gly Lys

<210> 113

<211> 498

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<223> ch1822-D containing heavy chain part

<400> 113

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Ala Lys Glu Phe Val Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly Gly

20 25 30
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
 35 40 45
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Met
 50 55 60
 Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Tyr Met

65						70						75						80
Ala	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Thr	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Ser			
					85						90						95	
Ile	Ser	Thr	Gly	Gly	Val	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Lys	Gly			
					100						105						110	
Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Asn	Leu	Tyr	Leu	Gln			
					115						120						125	
Met	Asp	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Glu	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg			
					130						135						140	
His	Thr	Thr	Ala	Asp	Tyr	Phe	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Phe	Ala	Leu	Asp	Ala			
					145						150						155	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly			
					165						170						175	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser			
					180						185						190	
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val			
					195						200						205	
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe			
					210						215						220	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val			
					225						230						235	
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val			
					245						250						255	
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys			
					260						265						270	
Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly			
					275						280						285	
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile			
					290						295						300	
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu			
					305						310						315	
					320						325						330	

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 325 330 335
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 340 345 350
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 355 360 365
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 370 375 380
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 385 390 395 400
 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 405 410 415
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 420 425 430
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 435 440 445
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 450 455 460
 Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 465 470 475 480
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 485 490 495
 Gly Lys