



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년04월14일
(11) 등록번호 10-2100419
(24) 등록일자 2020년04월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 39/39591 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7009436
(22) 출원일자(국제) 2013년09월13일
심사청구일자 2018년06월26일
(85) 번역문제출일자 2016년04월08일
(65) 공개번호 10-2016-0044063
(43) 공개일자 2016년04월22일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2013/083467
(87) 국제공개번호 WO 2015/035606
국제공개일자 2015년03월19일
(56) 선행기술조사문헌
국내공개특허공보 10-2008-0011428
(2008.02.04.)*
국내공개특허공보 10-2010-0054780
(2010.05.25.)*
국제공개특허공보 WO 2008/145142 A1
(2008.12.04.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
베이진 스위찰랜드 게엠베하
스위스, 4051 바젤, 에센포슈타트 4, 비셔 아게
내
(72) 발명자
송, 징
중국, 베이징 102206, 창핑, 중관춘 라이프 사이
언스 파크, 사이언스 파크 로드 넘버 30
리, 강
중국, 베이징 102206, 창핑, 중관춘 라이프 사이
언스 파크, 사이언스 파크 로드 넘버 30
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **항-PD1 항체 및 이의 치료 및 진단 용도**

(57) 요약

예정 세포사-1 (Programmed Death-1: PD1, Pdc1 또는 CD279)에 특이적으로 결합하고, 면역세포에서 PD-1 매개 세포 신호 및 활성을 억제하는 항체, 리간드 결합에 요구되는 아미노산 잔기 세트에 결합하는 항체 및 암, 감염성 질환 또는 PD-1 매개 기능에 의해 조절되는 기타 병리학적 질환을 치료 또는 진단에 사용되는 이러한 항체의 용도를 제공한다.

(52) CPC특허분류

C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/567 (2013.01)
C07K 2317/569 (2013.01)
C07K 2317/70 (2013.01)
C07K 2317/71 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/90 (2013.01)

(72) 발명자

장, 통

중국, 베이징 102206, 창핑, 종관춘 라이프 사이언스 파크, 사이언스 파크 로드 넘버 30

슈, 란란

중국, 베이징 102206, 창핑, 종관춘 라이프 사이언스 파크, 사이언스 파크 로드 넘버 30

리우, 쿨

중국, 베이징 102206, 창핑, 종관춘 라이프 사이언스 파크, 사이언스 파크 로드 넘버 30

펑, 하오

중국, 베이징 102206, 창핑, 종관춘 라이프 사이언스 파크, 사이언스 파크 로드 넘버 30

명세서

청구범위

청구항 1

인간 PD-1에 특이적으로 결합하고 다음을 포함하는 항체 항원 결합 도메인을 포함하는 항체:

하기 3개의 상보성 결정 영역(CDRs)을 포함하는 중쇄 가변 영역 (Vh); 및

- (a) 서열번호 31의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H1,
- (b) 서열번호 32의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H2, 및
- (c) 서열번호 33의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H3

하기 3개의 상보성 결정 영역(CDRs)을 포함하는 경쇄 가변 영역 (Vk):

- (d) 서열번호 34의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1,
- (e) 서열번호 35의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L2, 및
- (f) 서열번호 36의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L3.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (Vh)을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (Vk)을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (Vh); 및 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (Vk);을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 다음의 인간 PD-1 잔기에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 항체:

- (a) 서열번호 2에서 K58 및 I106; 또는
- (b) 서열번호 2에서 I106, L108 및 P110.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 서열번호 83 내지 서열번호 88로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 IgG4 불변 도메인(IgG4 constant domain)을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 7

제6항에 있어서, 서열번호 87 또는 서열번호 88의 아미노산 서열을 포함하는 IgG4 불변 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 8

제1항의 항체의 F(ab) 또는 F(ab)₂.

청구항 9

제1항의 항체를 포함하는 암 또는 바이러스 감염 치료용 약학 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 예정 세포사-1 (Programmed Death-1: PD1, Pcd-1 또는 CD279)에 특이적으로 결합하고, 면역세포에서 PD-1 매개 세포 신호 및 활성을 억제하는 항체, 리간드 결합에 요구되는 아미노산 잔기 세트에 결합하는 항체 및 암, 감염성 질환 또는 PD-1 매개 기능에 의해 조절되는 기타 병리학적 질환의 치료 또는 진단에 사용되는 항체의 용도를 제공한다.

배경기술

[0002] PD-1 (CD279로도 명명됨)은 CD28/CTLA4 공동 자극/억제 수용체 패밀리 (co-stimulatory/inhibitory receptor family)와 관련된 55 KD의 수용체 단백질이다 (Blank et al., 2005 Cancer Immunol Immunother 54:307-314). PD-1을 코딩하는 유전자 및 cDNA를 클로닝하여 마우스 및 인간에서의 특징을 살펴본 바 있다 (Ishida et al., 1992 EMBO J 11:3887-3395; Shinohara et al., 1994 Genomics 23:704-706). 전장 PD-1은 288개의 아미노산 잔

기 (NCBI accession number: NP_005009)를 포함한다. 세포의 도메인은 1-167 아미노산 잔기로 구성되고, 세포질 C-말단 꼬리는 191-288 잔기를 포함하며, 이는 2개의 가설적 면역-조절 모티프인 면역수용체 티로신 기반 저해 모티프 (ITIM; Vivier et al., 1997 Immunol Today 18:286-291) 및 면역수용체 티로신 스위치 모티프 (ITSM; Chemnitz et al., 2004 J Immunol 173:945-954)를 포함한다.

[0003] 지금까지, 2개의 서열 관련 리간드 PD-L1 (B7-H1) 및 PD-L2 (B7-DC)는 PD-1과 특이적으로 상호작용하여 세포 내 신호전달을 유도하고, CD3 및 CD28 매개 T-세포 활성화를 저해하는 것으로 확인되었으며 (Riley, 2009 Immunol Rev 229:114-125), 결국 T-세포 활성을 조절 예를 들어, 기타 성장 인자 및 싸이토카인 분비 뿐 아니라, 세포 성장, IL-2 및 IFN- γ 분비를 감소시키는 것이다.

[0004] PD-1의 발현은 T-세포, B-세포, 단핵세포 및 자연살해(NK) 세포와 같은 면역세포에서 빈번하게 확인된다. 기타 인간 조직, 예를 들어 근육, 상피, 신경 조직 등에서는 거의 발현되지 않는다. 또한, 고레벨의 PD-1 발현은 종종 면역세포의 활성화와 관련이 있다. 예를 들어, 인간 T-세포주인 Jurkat이 PHA (phytohaemagglutinin) 또는 포르볼 에스테르 (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate 또는 TPA)에 의해 활성화되면, 웨스턴 블랏에서 보이는 바와 같이 PD-1의 발현이 상향 조절되었다 (Vibharka et al., 1997 Exp Cell Res 232:25-28). 항-CD3 항체의 자극에 의해, 자극된 마우스 T- 및 B-림프구와 1차 인간 CD4⁺ T 세포에서 동일한 현상이 관찰되었다 (Agata et al., 1996 Int Immunol 8:765-772; Bennett et al., 2003 J Immunol 170:711-118). PD-1 발현 증가에 의해 효과 T세포를 자극하고, 활성화된 효과 T세포를 고갈 및 감소된 면역활성 방향으로 다시 안내한다. 따라서, PD-1 매개 저해 신호는 면역 관용에 중요한 역할을 한다 (Bour-Jordan et al., 2011 Immunol Rev 241:180-205).

[0005] 다양한 암에서 종양 침윤 림프구 (tumor-infiltrating lymphocytes: TILs)의 PD-1 발현 및 종양 세포의 PD-1 리간드 발현 증가가 보고되었고, 다른 유형의 조직 및 기관 예를 들어 폐 (Konishi et al., 2004 Clin Cancer Res 10:5094-5100), 간 (Shi et al., 2008 Int J Cancer 128:887-896; Gao et al., 2009 Clin Cancer Res 15:971-979), 위 (Wu et al., 2006 Acta Histochem 108:19-24), 신장 (Thompson et al., 2004 Proc Natl Acad Sci 101:17174-17179; Thompson et al., 2007 Clin Cancer Res 13:1757-1761), 유방 (Ghebeh et al., 2006 Neoplasia 8:190-198), 난소 (Hamanishi et al. 2007 Proc Natl Acad Sci 104:3360-3365), 췌장 (Nomi et al., 2007 Clin Cancer Res 13:2151-2157), 멜라노사이트 (Hino et al., 2010 Cancer 116:1757-1766) 및 식도 (Ohigashi et al., 2005 Clin Cancer Res 11:2947-2953)가 포함된다. 더욱 빈번하게, 이러한 암에서 PD-1 및 PD-L1의 발현은 환자 생존 결과에 대한 좋지 못한 예후와 연관된다. PD-1 유전자를 녹아웃하여 이종이식 (Xenograft) 암 세포 성장을 억제한 형질전환 마우스를 통해, 암 제거 또는 관용을 위한 면역 시스템 조절에서의 PD-1 신호전달에 대한 중요성을 더욱 자세히 설명하였다 (Zhang et al., 2009 Blood 114:1545-1552).

[0006] PD-1 신호전달의 상향 조절에 의해 면역 관용의 암 증식으로 이어질 뿐 아니라, 인간의 바이러스 감염 및 확장으로도 이어진다. 유행성 간 감염 바이러스 HBV 및 HCV는 간세포에서 PD-1 리간드의 과발현을 유도하고 효과 T 세포에서 PD-1 신호전달을 활성화하여, 바이러스 감염에 대한 T-세포 고갈 및 관용을 야기한다 (Boni et al., 2007 J Virol 81:4215-4225; Golden-Mason et al., 2008 J Immunol 180:3637-3641). 마찬가지로, HIV 감염은 유사한 기작으로 인간 면역 시스템을 빈번하게 회피한다. 길항 분자에 의해 PD-1 신호전달을 치료적으로 조절하여 관용으로부터 면역세포를 회복할 수 있고, 재활성시켜 암 및 만성 바이러스 감염을 제거할 수 있다 (Blank et al., 2005 Cancer Immunol Immunother 54:307-314; Okazaki et al., 2007 Int Immunol 19:813-824).

발명의 내용

[0007] 본 발명은 PD-1의 면역 억제를 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 일 측면에서, 본 발명은 인간 PD-1에 특이적으로 결합하는 항체의 항원 결합 도메인이고, 서열번호 11-22, 31-42 및 59-63에서 선택된 서열을 가지는 상보성 결정 영역 (complementarity determining region : CDR)을 포함하는 도메인을 제공한다.

[0008] 상기 CDR은 중쇄 가변영역 (Vh) 및 경쇄 가변영역 (Vk)으로 재조합할 수 있고, (CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3)와 (CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3) 서열 각각을 포함하며, PD-1 특이적 결합 및/또는 기능을 보유한다.

[0009] 구체적 구현예에서, 상기 도메인은 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역 (Vh) 또는 경쇄 가변 영역 (Vk)을 포함한다:

<p>a) CDR-H1 (서열번호11, 17, 31 또는 37), b) CDR-H2 (서열번호12, 18, 32 또는 38), c) CDR-H3 (서열번호13, 19, 33 또는 39);</p>	<p>d) CDR-L1 (서열번호14, 20, 34 또는 40), e) CDR-L2 (서열번호15, 21, 35 또는 41), 또는 f) CDR-L3 (서열번호16, 22, 36 또는 42).</p>
--	---

[0010]

[0011] 구체적 구현예에서, 상기 도메인은 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역 (Vh) 또는 경쇄 가변 영역 (Vk)을 포함한다:

[0012] a) mu317 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3(서열번호11-13); 또는

[0013] CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 (서열번호14-16);

[0014] b) mu326 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3(서열번호17-19); 또는

[0015] CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3(서열번호20-22);

[0016] c) 317-4B6 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3(서열번호31-33); 또는

[0017] CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3(서열번호34-36);

[0018] d) 326-4A3 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3(서열번호37-39); 또는

[0019] CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3(서열번호40-42);

[0020] e) 317-1H CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 (서열번호11, 59, 13); 또는

[0021] CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3(서열번호14-16);

[0022] f) 317-4B2 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3(서열번호11, 60, 13); 또는

[0023] CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3(서열번호61, 15, 16);

[0024] g) 317-4B5 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3(서열번호11, 60, 13); 또는

[0025] CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3(서열번호61, 15, 16);

[0026] h) 317-4B6 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3(서열번호11, 32, 13); 또는

[0027] CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3(서열번호61, 15, 16);

[0028] i) 326-1 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3(서열번호17, 62, 19); 또는

[0029] CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3(서열번호20-22);

[0030] j) 326-3B1 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3(서열번호17, 62, 19); 또는

[0031] CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3(서열번호20-22);

[0032] k) 326-3G1 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3(서열번호17, 62, 19); 또는

[0033] CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 (서열번호20-22).

[0034] 구체적 구현예에서, 상기 도메인은 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역 (Vh) 또는 경쇄 가변 영역 (Vk)을 포함한다:

[0035] (a) CDR-H1 (서열번호 31), CDR-H2 (서열번호 12, 32, 59 또는 60) 및 CDR-H3 (서열번호 33),

[0036] CDR-L1 (서열번호 14, 34 또는 61), CDR-L2 (서열번호 35) 및 CDR-L3 (서열번호 36); 또는

[0037] (b) CDR-H1 (서열번호 37), CDR-H2 (서열번호 18, 38 또는 62) 및 CDR-H3 (서열번호 39),

[0038] CDR-L1 (서열번호 40), CDR-L2 (서열번호 41) 및 CDR-L3 (서열번호 42).

[0039] 구체적 구현예에서, 상기 도메인은 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역 (Vh) 또는 경쇄 가변 영역 (Vk)을 포함한다:

a) mu317 (서열번호 4 또는 6);	p) 317-3H1 (서열번호 69);
b) mu326 (서열번호 8 또는 10);	q) 317-3I1 (서열번호 70);
c) 317-4B6 (서열번호 24 또는 26);	
d) 326-4A3 (서열번호 28 또는 30);	r) 317-4B1 (서열번호 71);
e) 317-4B2 (서열번호 43 또는 44);	s) 317-4B3 (서열번호 72);
f) 317-4B5 (서열번호 45 또는 46);	t) 317-4B4 (서열번호 73);
g) 317-1 (서열번호 48 또는 50);	u) 317-4A2 (서열번호 74);
h) 326-3B1 (서열번호 51 또는 52);	v) 326-3A1 (서열번호 75);
i) 326-3G1 (서열번호 53 또는 54);	w) 326-3C1 (서열번호 76);
j) 326-1(서열번호 56 또는 58);	x) 326-3D1 (서열번호 77);
k) 317-3A1 (서열번호 64);	y) 326-3E1 (서열번호 78);
l) 317-3C1 (서열번호 65);	z) 326-3F1 (서열번호 79);
m) 317-3E1 (서열번호 66);	aa) 326-3B N55D (서열번호 80);
n) 317-3F1 (서열번호 67);	ab) 326-4A1 (서열번호 81); 또는
o) 317-3G1 (서열번호 68);	ac) 326-4A2 (서열번호 82).

[0040]

[0041]

구체적 구현예에서, 상기 도메인은 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역 (Vh) 또는 경쇄 가변 영역 (Vk)을 포함한다:

a) mu317 (서열번호 4 또는 6);	p) 317-3H1 (서열번호 69);
b) mu326 (서열번호 8 또는 10);	q) 317-3I1 (서열번호 70);
c) 317-4B6 (서열번호 24 또는 26);	
d) 326-4A3 (서열번호 28 또는 30);	r) 317-4B1 (서열번호 71);
e) 317-4B2 (서열번호 43 또는 44);	s) 317-4B3 (서열번호 72);
f) 317-4B5 (서열번호 45 또는 46);	t) 317-4B4 (서열번호 73);
g) 317-1 (서열번호 48 또는 50);	u) 317-4A2 (서열번호 74);
h) 326-3B1 (서열번호 51 또는 52);	v) 326-3A1 (서열번호 75);
i) 326-3G1 (서열번호 53 또는 54);	w) 326-3C1 (서열번호 76);
j) 326-1(서열번호 56 또는 58);	x) 326-3D1 (서열번호 77);
k) 317-3A1 (서열번호 64);	y) 326-3E1 (서열번호 78);
l) 317-3C1 (서열번호 65);	z) 326-3F1 (서열번호 79);
m) 317-3E1 (서열번호 66);	aa) 326-3B N55D (서열번호 80);
n) 317-3F1 (서열번호 67);	ab) 326-4A1 (서열번호 81); 또는
o) 317-3G1 (서열번호 68);	ac) 326-4A2 (서열번호 82).

[0042]

[0043]

구체적 구현예에서, 상기 도메인은 PD1 잔기에 특이적으로 결합한다: (a) K45 및 I93 (2008 PNAS에 기인한 AA 넘버링, 105:10483; 서열번호 2 중 K58 및 I106에 대응됨); 또는 (b) I93, L95 및 P97 (2008 PNAS에 기인한 AA 넘버링, 105:10483; 서열번호 2 중 I106, L108 및 P110에 대응됨).

[0044]

구체적 구현예에서, 상기 도메인은 HEK293/OS8/PD-L1 세포 또는 EK293/OS8/PD-L2 세포와 공배양된 HuT78/PD-1 세포에서 IL-2 방출을 유도하고/유도하거나, HEK293/PD-L1 세포 또는 HEK293/PD-L2 세포와 공배양된 HuT78/P3Z 세포에서 IL-2 방출을 억제한다.

[0045]

본 발명은 또한, 서열번호 83-88 중 임의의 서열, 특히 서열번호 87 또는 88을 포함하는 항체 IgG4 중쇄 효과기

(effector) 또는 불변 도메인을 제공한다.

- [0046] 본 발명은 또한, 표적 PD-1 결합 도메인을 포함하는 항체, F(ab) 또는 F(ab)₂를 제공한다.
- [0047] 본 발명은 또한, 표적 PD-1 결합 도메인 및 서열번호 83-88, 특히 서열번호 87 또는 88을 포함하는 IgG4 중쇄 효과기 또는 불변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0048] 본 발명은 또한, 표적 PD-1 결합 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 특히, cDNA 서열을 제공한다.
- [0049] 본 발명은 상기 도메인을 암 또는 바이러스 감염 또는 기타 PD-1 길항작용이 요구되는 것으로 결정된 환자에 투여하는 단계를 포함하는 상기 표적 도메인을 사용하는 방법을 제공한다.
- [0050] 본 발명은 또한, (a) 마우스 CD8 α의 C-말단 도메인 (113-220)에 융합된 항-인간 CD3 mAb OKT3의 단일쇄 가변영역 (single chain variable fragment : scFv) (서열번호 89); 또는 (b) 인간 CD3 ζ 쇄의 세포질 도메인에 융합된 인간 PD-1의 세포외 및 막관통 도메인 (서열번호 90)을 포함하는 융합 단백질을 제공한다.
- [0051] 본 발명은 또한, 상기 융합 단백질을 발현하는 세포주로 어세이, 스크리닝 또는 항-PD-1 항체를 선별하는 것을 포함하는 표적 융합 단백질을 사용하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0052] 도 1. PD-1/Fc (상단) 및 PD-1/His (하단)에 대한 개략도이다. ECD: 세포외 도메인. L: 링커. H: His 태그. Fc: 인간 IgG4의 γ 4Fc 단편. N: N-말단. C: C-말단.
- 도 2. ELISA 중 인간 PD-1에 결합하는 마우스 mAb의 투여량 의존성 반응 곡선. 각 도면의 상단-왼쪽 코너는 마우스 mAb를 의미한다. MAb 317 및 517은 중쇄 및 경쇄 가변영역에 대한 높은 정도의 상동성을 공유한다. 결합 신호 강도는 직접적인 OD₄₅₀ 읽기에 의해 표시된다. 50 마이크로리터의 부피로 웰당 70 나노그램 미만까지 증가하는 농도로 항원 PD-1/His를 코팅하였다. 실시예 1에 방법이 기술되어 있다.
- 도 3은 FACS 분석을 통해 살아있는 세포에 발현되는 인간 PD-1에 결합하는 마우스 mAb에 대한 투여량 의존성 반응 곡선. 각 패널에 마우스 항체 코드와 EC₅₀이 표시되어 있다. MFI는 평균 형광 강도를 나타낸다. HuT78/PD-1 세포를 웰당 5X10⁴ 세포로 96 웰 플레이트에 FACS를 위해 서스펜션하였다. 실시예 1에 기술된 바와 같이 세포 표면 표적에 결합하는 PD-1 mAb 및 FACS 검출을 수행하였다.
- 도 4. 항-PD-1 mAb의 기능 활성을 어세이하는데 사용되는 세포 공배양 시스템의 개략도이다. T-세포 (CD4⁺ 또는 CD8⁺)는 HuT78/PD-1 또는 PBMC 중 1차 T-세포를 나타낸다. TCR: T-세포 수용체. N: 핵. C: 세포질
- 도 5. HEK293/OS8/PD-L1 세포와 공배양된 HuT78/PD-1 세포에서 마우스 mAb에 의해 유도된 IL-2 분비에 대한 투여량 의존성 반응 곡선이다. 기준선: 모든 테스트 농도에서 mIgG에 의해 유도된 평균 IL-2 방출. 상단선: Prizm Software에 의한 회귀 계산에 기초한 최고 IL-2 방출.
- 도 6. (A) 세포주 HEK293/OS8/PD-L1와 공배양된 PBMC (공여체-19)에서 항-PD-1 mAb에 의해 유도된 IFN-γ 분비를 보여주는 히스토그램. (B) 세포주 HEK293/OS8/PD-L1와 공배양된 PBMC (공여체-20)에서 항-PD-1 mAb에 의해 유도된 IFN-γ 분비를 보여주는 히스토그램.
- 도 7. (A) 및 (B)는 효과 세포 (NK92MI/PD-1)와 표적 세포 (HuT78/PD-1)의 공배양에 의한 항-PD-1 mAb의 ADCC 활성. 대표성 있는 실험 결과에 대한 2개의 데이터 포인트로부터 평균을 계산하였다. mAb를 10 μg/ml의 농도로 첨가하였다. 실시예 9에 기술된 바와 같이 실험을 수행하였다.
- 도 8. ELISA (상단 패널) 및 웨스턴 블랏 (하단 패널)을 통해 항-PD-1 mAb에 대한 결합 에피토프를 매핑. WT 또는 Mt PD-1을 포함하는 조건 배지를 사용하여 ELISA 및 웨스턴 블랏을 통해 결합 활성을 평가하였다. **는 mAb 결합 활성이 WT PD-1의 25-50%로 감소한 AA 잔기를 의미한다. ***는 mAb 결합 활성이 WT PD-1의 25% 미만으로 감소한 AA 잔기를 의미한다.
- 도 9. HEK293/OS8/PD-L1 세포와 공배양된, 다른 건강한 공여자로부터의 1차 인간 PBMC 중 인간화 항-PD-1 mAb에 의해 유도된 IFN-γ 방출.
- 도 10. 인간화 항-PD-1 mAb, hu317(A) 및 hu326(B)에 의해 향상된 NK92MI/PD-1 세포의 세포독성. 실시예 12에

기술한 바와 같이, 표적 폐암 세포 SK-MES-1/PD-L1을 1:2의 비율 (T:E)로 효과 세포와 공배양하였다.

도 11. 3개의 치료군인 비히클 (PBS), 인간 IgGs (huIgGs) 및 항-PD-1 mAb (hu317-1/IgG4mt2)에서의 개별적 종양 증식 곡선. 각 곡선은 종양 증식 경로, 각 폐년의 우측에 기재된 숫자로 코드된 종양 포함 마우스를 나타낸다. 1일차에 Hep3B/OS8/PD-L1 세포 (간세포 암종주 Hep3B에서 정립됨)를 접종하였고, 15일차에 PBMC를 이식하였으며, 18일, 28일 및 38일차 각각에 3회 투여량의 hu317-1/IgG4mt2를 주사하였다. 실시예 12에 방법을 기술하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0053] PD-1은 리간드인 PD-L1 또는 PD-L2에 결합시, 면역세포에서 저해 신호전달을 개시한다. 암 성장 및 바이러스 감염의 경우에, PD-1 신호전달의 활성이 면역 관용을 증진시켜, 암 또는 바이러스 감염 세포가 면역 감시 및 암 전이 또는 바이러스 부하 증가로부터 피하도록 한다. 치료제에 의한 PD-1 매개 세포 신호전달 억제는 T-세포, B-세포 및 NK 세포를 포함하는 면역 세포를 활성화시켜, 암 세포 성장 또는 바이러스 감염을 억제하는 면역 세포 기능을 향상시키고, 면역 감시 및 면역 기억 기능을 회복하여 이러한 인간의 질환을 치료한다.
- [0054] 본 발명은 항체를 제공하고, 상기 항체의 기능은 면역세포에서 리간드 유도 및 PD-1 매개 세포 신호전달에 길항적인 것이다. 마우스 항-PD-1 항체를 인간화하여, 골격영역 부위에서 인간 항체와 고도로 유사하도록 하였다. 변형된 인간 IgG4 변이체 포맷으로 제조된 전장 항체는 효과기 기능 및 물리화학적 특성 측면에서 고유한 세트의 특징을 가진다. 개시된 항-PD-1 항체는 암 치료, 바이러스 감염 제어 및 악화된 면역 관용과 기작론적으로 연관된 기타 인간 질병에 대한 치료적 용도에 적합하다.
- [0055] 정의
- [0056] 문맥상 달리 명시되지 않는 한, 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로 항체 (전장 단클론항체) 및 PD-1을 인식하는 한 항체 단편을 포함한다. 항체 분자는 대체적으로 단일특이성이나, 독점특이성, 이중특이성, 또는 다가특이성으로 설명될 수 있다. 항체 분자는 특이적 결합 사이트를 통해 항원의 특이적 항원 결정 영역 또는 에피토프에 결합한다. "항체 단편"은 전장 항체의 일부, 일반적으로 이의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예시로는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다가특이적 항체가 포함된다.
- [0057] 단클론항체 (MAbs)는 당업자에 알려진 방법에 의해 획득할 수 있다. 예를 들어, Kohler et al (1975); U.S. Pat. No. 4,376,110; Ausubel et al (1987-1999); Harlow et al (1988); 및 Colligan et al (1993)을 참조할 수 있다. 본 발명의 mAbs는 IgG, IgM, IgE, IgA 및 이들의 임의의 서브 클래스를 포함하는 임의의 면역글로불린 클래스를 가질 수 있다. mAb를 생산하는 하이브리도마를 in vitro 또는 in vivo로 배양할 수 있다. 고역가의 mAb는 in vivo 생산을 통해 획득될 수 있고, 개별적 하이브리도마 유래 세포를 예를 들어 고유하게 프라이밍된 Balb/c 마우스 (pristine-primed Balb/c mice)와 같은 마우스에 복강내 주입하면 목적하는 mAb가 고농도로 포함된 복수액이 생산된다. 이러한 복수액 또는 배양 상등액으로부터 당업자에 잘 알려진 컬럼 크로마토그래피법을 사용하여 이소타입 IgM 또는 IgG의 mAb를 정제할 수 있다.
- [0058] "분리된 폴리뉴클레오티드"는 자연적으로 발생하는 상태의 플랭크 (flank)된 서열에서 분리된 폴리뉴클레오티드 세그먼트 또는 단편을 의미하고, 예를 들어 일반적으로 단편에 인접한 서열 예를 들어, 자연적으로 존재하는 게놈 중 단편에 인접한 서열로부터 제거된 DNA 단편이다. 이에 따라, 상기 용어는 예를 들어 벡터, 자체 복제 플라스미드 또는 바이러스, 또는 원핵생물 또는 진핵생물의 게놈 DNA에 도입되는 재조합 DNA, 기타 서열과 독립적인 별도 분자 (예를 들어, cDNA로, 또는 PCR 또는 제한 효소 분해에 의해 생산되는 게놈 또는 cDNA 단편)로 존재할 수 있다. 재조합 DNA를 포함하며, 이는 추가 폴리펩티드 서열을 코딩하는 하이브리드 유전자의 일부이다.
- [0059] "구조체"는 플라스미드, 코스미드, 자체 복제 폴리뉴클레오티드 분자, 파지 또는 선형 또는 환형 단일 가닥 또는 이중가닥 DNA 또는 RNA 폴리뉴클레오티드 분자와 같은 임의의 재조합 폴리뉴클레오티드 분자를 의미하고, 임의의 소스 유래일 수 있으며, 게놈 통합 또는 자체 복제가 가능하고, 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 분자가 기능적으로 작동 가능한 방식으로 연결 즉, 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 분자를 포함한다. 재조합 구조체는 일반적으로 목적하는 숙주세포에서 폴리뉴클레오티드의 전사를 지시할 전사 개시 조절 서열에 작동가능하게 연결된 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함할 것이다. 외인성 및 비-외인성 (즉, 내인성) 프로모터 둘 다 사용하여 본 발명의 핵산 발현이 진행되도록 할 수 있다.
- [0060] "벡터"는 형질전환의 목적, 즉 외인성 DNA를 숙주세포에 도입하기 위해 사용될 수 있는 임의의 재조합 폴리뉴클

레오티드 구조체를 의미한다. 벡터의 한 종류는 "플라스미드"이고, 추가 DNA 세그먼트가 라이게이션될 수 있는 환형 이중 가닥 DNA 림을 의미한다. 벡터의 다른 종류는 바이러스 벡터이고, 추가 DNA 세그먼트가 바이러스 게놈으로 라이게이션될 수 있다. 일종의 벡터는 도입된 숙주세포에서 자체 복제 가능하다 (예를 들어, 박테리아 복제 개시점을 가지는 박테리아 벡터 및 에피솜 동물벡터). 기타 벡터 (예를 들어, 비에피솜 동물 벡터)는 숙주 세포로 도입시 숙주세포의 게놈에 통합되어, 숙주 게놈과 함께 복제된다. 더욱이, 일종의 벡터는 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 본 명세서에서 이러한 벡터는 "발현벡터"를 의미한다.

[0061] 본 명세서에서 사용되는 "발현벡터"는 숙주세포에 형질전환, 형질감염 또는 형질도입되었을 때 목적하는 유전자의 복제와 발현을 가능하도록 하는 핵산 분자를 의미한다. 발현벡터는 하나 이상의 선별가능한 표현형 마커 및 벡터의 지속성을 확보하고 목적한다면 숙주 내 증폭을 제공하기 위해 복제 개시점을 포함한다. 발현벡터는 세포 내의 폴리펩티드 발현을 유도하기 위한 프로모터를 추가로 포함한다. 적합한 발현벡터는 플라스미드 예를 들어, pBR322 유래이거나, 각종 pUC 플라스미드일 수 있으며, 상업적으로 입수가능하다. 기타 발현 벡터는 박테리오파지, 파지미드 유래이거나, 또는 코스미드 발현벡터일 수 있다.

[0062] 본 발명의 추가 구현예

[0063] 구체적 구현예에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같이 마우스 하이브리도마 클론을 스크리닝하여 확인한 마우스 단클론항체를 제공한다.

[0064] 다른 구현예에서, 본 발명은 다음의 폴리뉴클레오티드 및 단백질 서열의 조성물을 제공한다:

[0065] a) cDNA 서열, 서열번호 3, 마우스 mAb 317의 중쇄 가변 영역을 코딩;

[0066] b) 마우스 mAb 317의 중쇄 가변 영역 또는 mu317_Vh에 대한 단백질 서열 (서열번호 4);

[0067] c) CDNA 서열, 서열번호 5, 마우스 mAb 317의 경쇄 가변 영역을 코딩;

[0068] d) 마우스 mAb 317의 경쇄 가변 영역 또는 mu317_Vk에 대한 단백질 서열 (서열번호 6);

[0069] e) CDNA 서열, 서열번호 7, 마우스 mAb 326의 중쇄 가변 영역을 코딩;

[0070] f) mAb 326의 중쇄 가변 영역 단백질 서열 또는 mu326_Vh (서열번호 8);

[0071] g) CDNA 서열, 서열번호 9, 마우스 mAb 326의 경쇄 가변 영역 코딩;

[0072] h) 마우스 mAb 326의 경쇄 가변 영역에 대한 단백질 서열 또는 mu326_Vk (서열번호 10).

[0073] 일 측면에서, 본 발명은 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 포함하는 조성물을 제공하고, 표적 항원인 PD-1에의 결합을 매개하며, mu317 및 m326의 CDR 서열을 포함한다:

[0074] a) mu317 중쇄 CDR1 (mu317 H-CDR1)은 GFSLTSYGVH (서열번호 11)의 아미노산 서열을 포함한다;

[0075] b) mu317 H-CDR2는 VIWAGGSTNYNSALMS (서열번호 12)의 아미노산 서열을 포함한다;

[0076] c) mu317 H-CDR3는 ARAYGNWYIDV (서열번호 13)의 아미노산 서열을 포함한다;

[0077] d) mu317 경쇄 CDR1 (mu317 L-CDR1)은 KASQSVSNDVA (서열번호 14)의 아미노산 서열을 포함한다;

[0078] e) mu317 L-CDR2는 YAFHRFT (서열번호 15)의 아미노산 서열을 포함한다;

[0079] f) mu317 L-CDR3는 HQAYSSPYT (서열번호 16)의 아미노산 서열을 포함한다;

[0080] g) mu326 H-CDR1은 GYTFNYGMN (서열번호 17)의 아미노산 서열을 포함한다;

[0081] h) mu326 H-CDR2는 WINNNGEPTYAEFKG (서열번호 18)의 아미노산 서열을 포함한다;

[0082] i) mu326 H-CDR3는 ARDVMY (서열번호 19)의 아미노산 서열을 포함한다;

[0083] j) mu326 L-CDR1은 RASESVDNYGYSFMH (서열번호 20)의 아미노산 서열을 포함한다;

[0084] k) mu326 L-CDR2는 RASNLES (서열번호 21)의 아미노산 서열을 포함한다;

[0085] l) mu326 L-CDR3는 QQSKEYPT (서열번호 22)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0086] 다른 구현예에서, 본 발명은 마우스 mAbs mu317 및 mu326에서 유래한 인간화 단클론항체의 서열을 포함하는 조성물을 제공하며, 다음을 포함한다:

- [0087] a) 인간화 mAb hu317-4B6은 서열번호 24의 중쇄 가변 영역에 대한 단백질 서열을 포함하며, 다음에 의해 코딩된다
- [0088] b) hu317-4B6_Vh (서열번호 23)의 cDNA;
- [0089] c) 인간화 mAb hu317-4B6 또한 서열번호 26의 경쇄 가변 영역에 대한 단백질 서열을 포함하며, 다음에 의해 코딩된다
- [0090] d) hu317-4B6 (서열번호 25)의 cDNA;
- [0091] e) 인간화 mAb hu326-4A3은 서열번호 28의 Vh 단백질 서열을 포함하며, 다음에 의해 코딩된다
- [0092] f) hu326-4A3-Vh (서열번호 27)의 cDNA;
- [0093] g) 인간화 mAb hu326-4A3은 또한 서열번호 30의 Vk 단백질 서열을 포함하며, 다음에 의해 코딩된다
- [0094] h) hu326-4A3_Vk (서열번호 29)의 cDNA;
- [0095] i) hu317-4B2_Vh (서열번호 43) 및 hu317-4B2_Vk (서열번호 44)의 단백질 서열;
- [0096] j) hu317-4B5_Vh (서열번호 45) 및 hu317-4B5_Vk (서열번호 46)의 단백질 서열;
- [0097] k) hu317-1_Vh (서열번호 48)의 단백질 서열 및 hu317-1_Vk (서열번호 47)를 코딩하는 cDNA;
- [0098] l) hu317-1_Vk (서열번호 50)의 단백질 서열 및 hu317-1_Vk (서열번호 49)를 코딩하는 cDNA;
- [0099] m) hu326-3B1_Vh (서열번호 51) 및 hu326-3B1_Vk (서열번호 52)의 단백질 서열;
- [0100] n) hu326-3G1_Vh (서열번호 53) 및 hu326-3G1_Vk (서열번호 54)의 단백질 서열;
- [0101] o) hu326-1_Vh (서열번호 56)의 단백질 서열 및 hu326-1_Vk (서열번호 55)를 코딩하는 cDNA;
- [0102] p) hu326-1_Vk (서열번호 58)의 단백질 서열 및 hu326-1_Vk (서열번호 57)를 코딩하는 cDNA;
- [0103] q) mu317 (서열번호 63-74)에서 유래한 기타 인간화 mAb의 단백질 서열;
- [0104] r) mu326 (서열번호 75-82)에서 유래한 기타 인간화 mAb의 단백질 서열;
- [0105] 일 측면에서, 본 발명은 인간화 단클론항체의 CDR 서열을 포함하는 조성물을 제공한다. CDR은 동일 시리즈의 인간화 mAb 예를 들어 hu317 또는 hu326 사이에서 공유될 수 있다 (표 15-16 참조). 하기와 같이 중복되지 않은 CDR을 나열하였다:
- [0106] a) H-CDR1 서열 GFSLTSYGVH (서열번호 31)로, 인간화 mAb hu317 및 mu317 중쇄 전체에서 공유;
- [0107] b) H-CDR3 서열 ARAYGNYWYIDV (서열번호 33), 인간화 mAb hu317 및 mu317 중쇄 전체에서 공유;
- [0108] c) L-CDR1 서열 KSSESVSNDVA (서열번호 34), 인간화 mAb hu317-4B2, hu317-4B5 및 hu317-4B6 경쇄 전체에서 공유;
- [0109] d) L-CDR2 서열 YAFHRFT (서열번호 35), 인간화 mAb hu317 및 mu317 경쇄 전체에서 공유;
- [0110] e) L-CDR3 서열 HQAYSSPYT (서열번호 36), 인간화 mAb hu317 및 mu317 경쇄 전체에서 공유;
- [0111] f) hu317-4B6_Vh 중 H-CDR2 서열 VIYADGSTNYNPSLKS (서열번호 32);
- [0112] g) hu317-4B2_Vh 및 hu317-4B5_Vh 중 H-CDR2 서열 VIYAGGSTNYNPSLKS (서열번호 60);
- [0113] h) hu317-1_Vh 중 H-CDR2 서열 VIWAGGSTNYNPSLKS (서열번호 59);
- [0114] i) hu317-1_Vk 중 L-CDR1 서열 KASQSVSNDVA (서열번호 11);
- [0115] j) H-CDR1 서열 GYTFTNYGMN (서열번호 37), 인간화 mAb hu326 및 mu326 중쇄 전체에서 공유;
- [0116] k) H-CDR3 서열 ARDVMDY (서열번호 39), 인간화 mAb hu326 및 mu326 중쇄 전체에서 공유;
- [0117] l) L-CDR1 서열 RASESVDNYGYSFMH (서열번호 40), 인간화 mAb hu326 및 mu326 경쇄 전체에서 공유;
- [0118] m) L-CDR2 서열 RASNLES (서열번호 41), 인간화 mAbs hu326 및 mu326 경쇄 전체에서 공유;

- [0119] n) L-CDR3 서열 QQSKEYPT (서열번호 42), 인간화 mAbs hu326 및 mu326 경쇄 전체에서 공유;
- [0120] o) hu326_4A3_Vh 중 H-CDR2 서열 WINNNNAEPTYAQDFRG (서열번호 38);
- [0121] p) hu326_1 및 기타 hu317 mAbs의 Vh 중 H-CDR2 서열 WINNNNGEPTYAQGFRG (서열번호 62).
- [0122] 다른 측면에서, 본 발명은 인간화 항-PD-1 mAb의 항원에 대한 특정 결합 에피토프 및 이의 기능적 용도를 제공한다. 리간드가 결합하기 위한 PD-1 중 6개의 중요한 아미노산 (AA) 잔기를 개별적으로 변이시키고, 변이 및 야생형 PD-1 단백질을 사용하여 결합 에피토프를 평가하였다. 항체 결합을 현저하게 방해하는 변이를 가지는 잔기를 키 또는 주요한 결합 에피토프로 인식한다. hu317-4B5 및 hu317-4B6 mAb의 주요 결합 에피토프는 K45 및 I93 (2008 PNAS에 기인한 AA 넘버링, 105:10483; 서열번호 2 중 K58 및 I106에 대응됨)이고; hu326-3B1 및 hu317-4A3 mAb의 주요 결합 에피토프는 I93, L95 및 P97이다 (2008 PNAS에 기인한 AA 넘버링, 105:10483; 서열번호 2 중 I106, L108 및 P110에 대응됨).
- [0123] 추가 측면에서, 본 발명은 재조합 인간 IgG4 변이체의 불변 영역 서열을 포함하는 조성물을 제공하고, 인간화 항-PD-1 mAbs를 포함하는 대상 항체의 가변 영역에 연결될 수 있으며, 바람직한 효과기 기능 및 물리화학적 특성을 나타내었다. 서열은 다음과 같다:
- [0124] IgG4mt10의 불변 영역 서열 (서열번호 88);
- [0125] a) IgG4mt1의 참조서열 (서열번호 83);
- [0126] b) IgG4mt2의 참조서열 (서열번호 84);
- [0127] c) IgG4mt6의 참조서열 (서열번호 85);
- [0128] d) IgG4mt8의 참조서열 (서열번호 86);
- [0129] e) IgG4mt9의 참조서열 (서열번호 87).
- [0130] 다른 구현예에서, 본 발명은 항-PD-1 항체 기능을 어세이하는 방법을 제공하며, 재조합 융합 단백질을 발현하는 플라스미드 OS8을 사용하여 안정한 세포주 HEK293/OS8/PD-L1 또는 HEK293/OS8/PD-L2를 생산하며, OS8 (T 세포-활성분자) 및 PD-1 리간드를 공동발현한다. 세포주를 사용하여 T-세포 및 PBMC를 공동배양으로 결합시켜, 항-PD-1 mAb의 기능을 평가한다 (실시예 3 및 실시예 4 참조). 경우에 따라서, 재조합 융합 단백질을 발현하는 다른 플라스미드를 사용하여 안정한 세포주 HuT78/P3Z를 생산할 수 있고, 여기서 P3Z는 분자 센서 및 신호 전달 매개체 역할을 한다. P3Z가 PD-1 리간드에 결합되면, 세포내 신호를 전달하여 HuT78 세포 중 IL-2 방출을 활성화할 것이다. 시스템을 사용하여 항-PD-1 mAb의 저해 효과를 평가할 수 있다 (실시예 3 참조).
- [0131] 일 측면에서, 본 발명은 하기와 같은 재조합 융합 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 조성물을 제공한다:
- [0132] a) OS8 (서열번호 89)의 단백질 서열;
- [0133] b) P3Z (서열번호 90)의 단백질 서열.
- [0134] 다른 측면에서, 본 발명은 명세서에 기술된 재조합 융합 단백질을 발현하는 안정한 세포주를 생산하는 방법 및 항-PD-1 mAb의 기능적 활성을 정량적으로 어세이하기 위해 상기 시스템을 사용하는 방법을 제공한다.
- [0135] 다른 구현예에서, 본 발명은 대상 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 발현을 위해 외인성 전사 조절 서열에 작동가능하게 연결될 수 있고, 벡터, 세포 등에 도입될 수 있다.
- [0136] 다른 구현예에서, 본 발명은 마우스 항-PD-1 항체 및 인간화 버전의 항-PD-1 항체를 제공하고, hu317-4B6, hu317-4B5, hu317-4B2 등 및 hu326-4A3, hu326-3B1, hu326-3G1 등을 포함하며, PD-1 매개 신호전달을 억제하고, 면역 세포 활성화하여 암 세포와 같은 표적 세포에 대한 사이토카인 분비 및 세포독성을 포함하는 면역반응 캐스케이드를 유발하며, 항체의 이러한 기능적 용도를 제공한다.
- [0137] 일 측면에서, 본 발명은 PD-1을 발현하는 수종의 면역세포를 활성화하는 인간화 항-PD-1 항체 및 상기 항체의 기능적 용도를 제공하고, 상기 면역세포는 인간 T-세포, NK-세포 및 PBMCs를 포함하며, 이의 기능은 면역 반응 신호를 증폭하고, 면역 시스템을 고정하며, 암 세포 및 바이러스 감염을 제거하기 위한 면역 효과 세포로 작용하도록 한다.
- [0138] 다른 측면에서, 상기 인간화 항-PD-1 mAb를 치료제로 사용하여 PD-1 매개 세포내 신호전달에 의한 면역세포의

억제로 질병 악화 특히 암 및 바이러스 감염 유도과 관련된 인간 질병을 치료한다.

[0139] 본 발명의 상기 조성물은 암, 신경 퇴행성 및 감염성 특히 바이러스성 질환과 인간 PD-1의 부적절 또는 장애 발현에 의한 기타 증상 및/또는 증상의 병리학 또는 병리학적인 구성을 치료하기 위해 사용된다. 이에 따라, 본 발명은 대상 항-PD-1 단백질로 필요로 하는 개체의 암 치료 또는 암 진행을 억제하는 방법을 제공한다. 본 발명은 추가로, 암 치료 또는 암 진행을 억제하기 위한 약제를 제조하기 위한 대상 폴리뉴클레오티드의 용도를 제공한다.

[0140] 본 발명은 언급한 구체적 구현예의 모든 조합을 포함한다. 추가 구현예 및 본 발명의 전 범위에 대한 응용은 이하에서 주어진 상세한 설명에 의해 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명의 바람직한 구현예를 기재한 반면, 본 발명의 본질 및 범위 내 다양한 변경과 변형은 이러한 상세한 설명으로부터 당업자에 명확하게 될 것이므로, 상세한 설명 및 구체적 실시예는 예시로 주어진 것으로 이해되어야 할 것이다. 본 명세서에서 인용된 모든 공개물, 특허 및 특허출원, 이에 포함된 인용은 목적에 무관하게 전체로 참조하여 도입될 수 있다.

[0141] 실시예

[0142] 실시예 1: 항-PD-1 단클론항체의 생산

[0143] 종래의 하이브리도마 융합 기술 (Kohler and Milstein 1976 Eur J Immunol 6:511-519; de St Groth and Sheidegger 1980, J Immunol Methods 35:1-21; Mechetner 2007 Methods Mol Biol 378:1-13)을 약간 변경한 것에 기초하여 항-PD-1 단클론항체 (mAb)를 생산하였다. 추가 검증을 위해 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 및 FACS (fluorescence-activated cell sorting) 어세이로 높은 결합 활성을 가진 mAb를 선별하였다.

[0144] *면역화를 위한 PD-1 재조합 단백질 및 결합 어세이*

[0145] Origene에서 전장 인간 PD-1 cDNA 포함 발현 플라스미드를 입수하였다 (Cat. No. SC117011, NCBI Accession No: NM_005018.1, Beijing, China). PD-1의 1-168 아미노산으로 구성된 세포외 도메인 (서열번호 1, 서열번호 2)을 PCR로 증폭하고, C-말단을 His₆ 태그 또는 인간 IgG4 중쇄의 γ Fc 영역 어느 하나에 융합하고, pcDNA3.1 기반 발현 벡터 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 서브클로닝하여, 2개의 재조합 단백질 발현 플라스미드인 PD-1-EC/His 및 PD-1-EC/Fc (PD-1/His 및 PD-1/Fc으로 약칭됨)를 제조하였다. 면역원/항원 단백질의 개략도는 도 1에 나타내었다. 재조합 융합 단백질 생산을 위해, 1-3리터 배지(Invitrogen)의 293-F 세포에 PD-1/His 및 PD-1/Fc 플라스미드를 일시적으로 형질감염하였고, 회전 셰이커가 장착된 CO₂ 인큐베이터에서 5-7일 동안 배양하였다. 재조합 단백질을 포함한 상등액을 수집하고 15000g에서 30분 동안 원심분리하여 제거하였다. Ni-세파로스 패스트 플로우 (Cat. No. 17531801, GE Lifesciences, Shanghai, China)를 사용하여 고정 금속 친화 크로마토그래피를 통해 정제한 다음, 하이로드 16/60 슈퍼텍스 200 컬럼 (Cat. No. 17106901, GE Lifesciences, Shanghai, China)을 사용하여 크기 배제 크로마토그래피를 통해 PD-1/His를 정제하였다. 프로틴 G 세파로스 패스트 플로우 컬럼 (Cat. No. 17061805, GE Lifesciences)을 사용하여 PD-1/Fc를 정제하였다. PD-1/His 및 PD-1/Fc 단백질 모두 PBS (phosphate buffered saline)로 희석하고, 작게 분주하여 -80°C 냉동기에 보관하였다.

[0146] 공지의 서열(NCBI Accession No. NM_014143)에 기반하여 Genescript (Nanjing, China)로 인간 PD-L1 코딩 cDNA를 화학적 합성하였다. Origene (Cat. No. SC108873, NCBI Accession No. NM_025239.2, Beijing, China)에서 PD-L2 발현 플라스미드를 구입하였다. 두 cDNA 모두 pcDNA3.1/하이그로마이신 (Cat. No. V870-20, Invitrogen) 및 pcDNA3.1/V5-His (Cat. No. V810-20, Invitrogen) 각각에 클로닝하였다.

[0147] *안정한 세포주 발현*

[0148] PD-1, PD-L1 및 PD-L2 포함 pcDNA3.1 플라스미드를 HUT78 (ATCC, Manassas, VA, USA) 및 HEK293 (ATCC) 각각에 형질감염시키고, 하이그로마이신 200 마이크로그램 (Cat. No. 10687-010, Invitrogen) 또는 G418 (Sigma) 밀리미터당 1 mg 포함 배지로 선별하여, 인간 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2을 발현하는 안정한 세포주를 정립하였다. 종래 방법인 한계희석 또는 배양 웰 표면에서 단일 콜로니를 픽업하여 단일 클론을 분리하였다. 항-PD-1, PD-L1 및 PD-L2 항체 (Cat. No. 12-9969, 17-5983, 12-5888, eBioscience, San Diego, USA) 각각을 사용하여 웨스턴 블랏 및 FACS 분석을 통해 모든 클론을 스크리닝하였고, 하이브리도마 단클론항체를 스크리닝하기 위한 FACS 결합 어세이를 위해 발현이 가장 우수한 발현 클론을 선별하거나, 기능 어세이에 사용하였다.

[0149] *면역화, 하이브리도마 융합 및 클로닝*

- [0150] 5 마이크로그램의 PD-1/Fc 포함 보강제 (Cat. No. KX0210041, KangBiQuan, Beijing, China) 100ul를 피하 투여하여 8-12주령 Balb/c 마우스 (BEIJING HFK BIO SCIENCE CO.,LTD, Beijing, China)를 면역화하였다. 앞서 언급한 면역원으로 3주 차이를 두고 2회 주사하여 면역화를 수행하였다. 2회차 면역화 2주 후, FACS (다음 섹션)로 PD-1 결합을 평가하였다. 혈청 중 고역가 항-PD-1 항체 포함 마우스를 선별하여 임의의 보강제 없이 PD-1/Fc 50 마이크로그램을 복강내 주입하여 부스팅하였다. 부스팅 3일 후, 비장세포를 분리하고 표준 기술(Gefer, M.L. et al., 1977 Somat Cell Genet, 3:231-236)을 사용하여 마우스 골수종 세포주, SP2/0 세포 (ATCC)에 융합하였다.
- [0151] *ELISA 및 FACS에 의한 항체의 PD-1 결합 활성 평가*
- [0152] "Flanagan, M.L. et al. 2007 Methods in Molecular Biology 378:33-52"에 기술된 방법에 몇몇 변형을 포함하여, ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay)로 하이브리도마 클론의 상등액을 처음 스크리닝하였다. 간략하게, 96웰 플레이트의 각 웰 기저를 50 마이크로리터의 PBS (phosphate buffered saline) 중 50-200 나노그램의 PD-1/His 또는 PD-1/Fc 단백질로 코팅하였다. HRP-연결 항-마우스 IgG 항체 (Cat. No. 7076S, Cell Signaling Technology, USA and Shanghai, China) 및 화학발광 제제 (Cat. No. PA107-01, TIANGEN, China)를 사용하여 ELISA 신호를 검출하고 현상하였으며, 450 nm 파장에서 플레이트 리더(PHREASTAR FS, BMG LABTECH, Germany)에 의해 읽혔다. 종래 방법을 사용하여 FACS (fluorescence-activated cell sorting)를 통해 ELISA-양성 항체 생산 클론을 추가로 검증하였다. 앞서 언급한 PD-1 안정 발현 세포주, HuT78/PD-1 (10^5 세포/웰)를 V-하단 96-웰 플레이트 (Cat. No. 3897, Corning, USA and Shanghai, China)의 항-PD-1 하이브리도마 유래 상층액과 함께 염색하였다. 인간 Fc 수용체를 차단하기 위해, 세포를 인간 IgG (20 µg/ml) (Cat. No. H11296, LifeHolder, USA and Shanghai, China)와 함께 사전 인큐베이션하였다. Dylight™ 649-라벨링된 염소 항-마우스 IgG 항체 (Cat. No. 405312, Biolegend, San Diego, USA)로 PD-1 항체를 검출하였고, 유세포 분석기 (flow cytometer: Guava easyCyte 8HT, Merck-Millipore, USA and Shanghai, China)를 사용하여 세포 형광을 모니터링하였다.
- [0153] ELISA 및 FACS 어레이 둘 다에서 양성 신호를 보였던 하이브리도마 세포의 조건화된 배지를 기능 어세이에 사용하여, 인간 면역세포-기반 어레이 (본 명세서)에서 우수한 기능적 활성을 가지는 항체를 동정하였다. 양성 기능적 활성을 가진 항체를 추가로 서브클로닝하고 검정하였다.
- [0154] *서브클로닝 및 무혈청 또는 낮은 혈청 배지로 조정*
- [0155] ELISA, FACS 및 기능 어세이를 통해 1차 스크리닝한 양성 하이브리도마 클론을 한계 희석법의 종래 방법으로 서브클로닝하였다. 양성 클론 각각을 96-웰 플레이트에 평판도말하였고, CO₂ 인큐베이터에서 10% 우태아혈청 (FBS, Cat. No. SH30084.03, Hyclone, Beijing, China) 포함 RPMI1640 배지 (Cat. No. SH30809.01B, Hyclone, Shanghai, China) 중에 배양하였다. 각각의 한계 희석 플레이트에서 3개의 서브클론을 선별하여 FACS 및 기능 어세이로 검정하였다. 기능 어세이를 통해 선별된 서브클론을 단클론항체로 정의하였다. 최상단의 서브클론을 1-3% FBS를 포함한 CDM4MAb 배지 (Cat. No. SH30801.02, Hyclone) 중에서 성장하도록 적응시켰다.
- [0156] *단클론항체의 발현과 정제*
- [0157] CDM4MAb 배지 (Cat. No. SH30801.02, Hyclone) 또는 Freestyle293 발현 배지 (Cat. No. 12338018, Invitrogen) 각각에 마우스 단클론항체 생산 하이브리도마 세포 또는 재조합 항체 플라스미드 형질감염된 293-F 세포 (Cat. No. R79007, Invitrogen)를 CO₂ 인큐베이터에서 37°C로 5-7일 동안 배양하였다. 10,000g에서 30분 동안 원심분리하여 조건화된 배지를 수집하고, 모든 세포 및 세포 잔해를 제거하였으며, 정제 전 0.22 µm 막을 통해 필터링하였다. 마우스 또는 재조합 항체를 적용하여 제조사의 지시에 따라 단백질 A 컬럼 (Cat. No. 17127901, GE Life Sciences)에 결합시키고, PBS로 세척하였으며, 20mM 구연산염, 150mM NaCl 포함 버퍼로 pH 3.5에서 용출하였다. 용출된 물질을 1M Tris pH8.0로 중화하였고, 일반적으로 90% 이상의 순도를 가지는 항체가 포함된다. 단백질 A-친화성 정제된 항체를 PBS로 투석하거나 하이로드 16/60 슈퍼팩스 200 컬럼 (Cat. No. 17531801, GE Life Sciences)을 사용하여 추가 정제함으로써 응집체를 제거하였다. 280nm에서의 흡광도를 측정하거나, 한정농도의 소 IgG (Cat. No. 23212, Thermo Scientific)를 표준으로 사용하는 브래포드 어세이 (Bradford assay: Cat. No. 1856210, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 통해 단백질 농도를 측정하였다. 정제된 항체를 분주하여 -80°C 냉동기에 보관하였다.

[0158]

실시에 2. 항-PD-1 항체 사이의 결합 활성 비교

[0159]

수천개의 하이브리도마 클론 스크리닝을 통해, 몇몇 최상 단클론항체 (mAb)를 동정하였으며, 인간 PD-1에 높은 특이도 및 강도로 결합한다. ELISA 어세이 (도 2)에서 나타난 바와 같이, 최상 항체 중 3개는 이러한 결합 강도 및 특이도를 나타내었다. FACS 분석 결과에 의해, 선별된 단클론항체가 세포 표면에서 발현되는 천연 PD-1 단백질에 결합함을 입증하였다. 마우스 mAb317 (mu317), mu326 및 mu150는 농도 의존적 결합 활성을 나타내었고, 이들의 결합 EC₅₀ (50% 활성에 효과가 있는 농도)은 대조군 mu55보다 현저히 낮았다 (도 3).

[0160]

SPR(Surface Plasmon Resonance)에 의한 mAb 결합 친화도 평가

[0161]

ELISA 및 FACS에서 높은 결합 활성을 나타낼 뿐 아니라 세포-기반 어세이에서 효능을 가지는 mAb (명세서에 언급)에 대하여, 실시간 결합 반응에서의 결합 동역학 상수를 검증하였다. 단백질 A 플로우 컬럼 (Cat. No. 17531801, GE Life Sciences)를 사용한 다음 하이로드 16/60 슈퍼텍스 200 컬럼 (Cat. No. 17106901, GE Life Sciences)을 사용한 크기 배제 크로마토그래피를 통해 하이브리도마 상층액에서 마우스 항-PD-1 mAb를 정제하였다. 정제된 항-PD-1 항체를 PBS 중에 0.5-1 mg/mL로 농축하고, 분주하여 -80°C 냉동기에서 보관하였다.

[0162]

PD-1 mAb에 대한 결합 친화도를 측정하기 위해, BIAcore™ T-200 기기 (GE Life Sciences)를 사용하여 HBS-N 버퍼 (10 mM HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% v/v 계면활성제 P20, GE Healthcare)에서 SPR 측정을 수행하였다. 표준 1차 아민 커플링 프로토콜을 사용하여 항-마우스 Fc CM5 바이오센서 칩(GE Healthcare)을 생산하였다. 1분 동안 10 µl/min로 0.3 µg/ml의 PD-1 mAb를 항-마우스 Fc 표면 상에 포획하였다. 3.3nM 내지 120nM 까지 연속 희석한 PD-1/Fc를 항체 결합 표면에 3분간 30 µl/min로 주사한 다음, 10분의 해리 단계를 거쳤다. 일대일 랭뮤어 결합 모델 (BIA Evaluation Software, GE Life Sciences)을 사용하여 결합 속도 (K_a 또는 k_{on}) 및 해리 속도 (K_d 또는 k_{off})를 계산하였다. k_{off}/k_{on} 비율로 평형 해리 상수 (K_D)를 계산하였다.

[0163]

표 1에 나타난 바와 같이, mu326 및 mu517 둘 다 mu317과 관련된 동족 서열 패밀리 멤버로, 0.324 nM 및 0.289 nM 정도의 나노몰 이하 K_D를 가지며, mu134에 비해 현저히 우수하였다. 표 1에 리스트한 3개의 mAb 사이에서 K_{on} 속도는 유사하였고, 그럼에도 K_{off} 속도는 현저히 달랐으며, mu134에서 훨씬 빠른 해리 속도가 관찰되었다.

[0164]

표 1. 일종의 최상에 대한 결합상수

mAbs	K _{on} (M ⁻¹ , s ⁻¹)	K _{off} (s)	K _D (M)
mu326	2.4 x 10 ⁵	7.79 x 10 ⁻⁵	3.24 x 10 ⁻¹⁰
mu517	1.96 x 10 ⁵	5.66 x 10 ⁻⁵	2.89 x 10 ⁻¹⁰
mu134	1.1 x 10 ⁵	3.69 x 10 ⁻⁴	3.35 x 10 ⁻⁹

[0165]

SPR을 통한 항-PD-1 Fab의 친화도 측정

[0167]

PCR에 의해 항-PD-1 mAb를 Fab 버전으로 변환하여, 중쇄 및 경쇄의 가변영역을 인간 IgG2-CH1 및 카파 체인의 불변 영역 N-말단에 융합하고, pcDNA3.1 벡터 (Invitrogen)에 서브클로닝하였다. 항체 전체의 일시적 발현과 유사한 일시적 형질감염 프로토콜을 사용하여, 293-F 세포에서 발현 벡터를 둘 다 함께 발현시켰다. 간략하게, Fab 카파 체인을 PCR 증폭하고 pcDNA3.1 기반 발현벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 서브클로닝하였다. 별개의 플라스미드에서, 인간 IgG2 유래 CH1 코딩 서열과 함께 중쇄 가변영역 (VH)을 중첩 PCR에 의해 C-말단 c-Myc-His₈ 태그와 융합한 다음, 발현벡터에 서브클로닝하였다. IgG2 중쇄에 C232S 및 C233S (Kabat 잔기 넘버링, Kabat et al. Sequence of proteins of immunologic interest, 5th ed Bethesda, MD, NIH 1991) 변이를 도입하여, 이황화 결합 교환을 방지하고 IgG2-A 입체구조 내 인간 IgG2를 안정화하였다 (Lightle et al. 2010 Protein Sci 19(4): 753-762). 두 구조체 모두 Fab 성숙 서열의 업스트림에 신호 펩티드를 포함하였다. 위 2개의 플라스미드를 293-F 세포에 공동-형질감염시켜 Fab가 분비 발현되도록 하였고, 형질감염 6-7일 후 세포 배양 상등액을 수확하였다. Ni-세파로스 패스트 플로우 컬럼 (Cat. No. 17531801, GE Life Sciences)을 사용한 다음 하이로드 16/60 슈퍼텍스 200 컬럼 (Cat. No. 17106901, GE Life Sciences)을 사용한 크기 배제 크로마토그래피를 통해, 세포 배양 상등액으로부터 His₈-태깅된 Fab를 정제하였다. 정제된 Fab를 PBS에 0.5-5 mg/mL로 농축하고 분주하여 -80°C 냉동기에서 보관하였다.

- [0168] 항-PD-1 Fabs의 친화도 측정을 위해, BIAcore™ T-200 기기 (GE Life Sciences)로 SPR 에세이를 사용하였다. 간략하게, 인간 PD-1/His 또는 시노몰구스 원숭이 PD-1/His는 활성화된 CM5 바이오센서 칩 (Cat. No. BR100530, GE Life Sciences)과 커플링되어, 약 100-200 반응 단위 (response units: RU)를 달성한 다음, 1M 에탄올아민으로 반응하지 않은 군을 차단하였다. 0.12nM에서 90nM까지 증가하는 농도의 Fab 샘플을 SPR 러닝 버퍼 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH7.4)에 30 μ L/minute로 주입하고, 공백 유동세포에서 RU를 차감하여 인간 PD-1/His 또는 원숭이 PD-1/His에 대한 결합 반응을 계산하였다. 일대일 랭뮤어 결합 모델 (BIA Evaluation Software, GE Life Sciences)을 사용하여 결합 속도 (K_a 또는 k_{on}) 및 해리 속도 (K_d 또는 k_{off})를 계산하였다. k_{off}/k_{on} 비율로 평형 해리 상수 (K_D)를 계산하였다.
- [0169] SPR로 측정된 항-PD-1 Fab의 결합 친화도를 표 18에 나타내었다. 각 항-PD-1 Fab는 인간 PD-1에 고친화도($K_d = 0.15^{-1}$ nM)로 결합하였다. 326-3G1을 제외한 모든 Fab는 약간 낮으나 시노몰구스 원숭이 PD-1에 상응하는 친화도 (K_d 에서 5배 이내)로 결합하였다.
- [0170] 실시예 3. 인간 T 세포에서 항-PD-1 항체의 기능적 활성
- [0171] *안정한 세포주 생산*
- [0172] ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD)에서 레트로바이러스 팩킹 세포주 PT67, 인간 T 세포주 HuT78 및 HEK293을 획득하였다. 앞서 언급한 프로토콜 (Zhang et al. 2005 Blood 106: 1544-1551)에 따라 PD-1 유전자 포함 pFB-네오 벡터 (Stratagene/Agilent Tech, Santa Clara, CA)를 사용하여 레트로바이러스 형질도입에 의해 PD-1을 발현하는 HuT78 계대세포주 HuT78/PD-1를 생산하였다. 항-인간 CD3 mAb OKT3의 단일쇄 가변 단편(scFv) (Kipriyanov et al. 1997, PDS 10:445-453)을 힌지, 막관통 및 세포질 도메인을 포함하는 마우스 CD8 α (NCBI Accession No: NP_001074579.1)의 C-말단에 융합하여 T 세포 접합자인 막 고정 키메라 Ab (OS8)를 구축하였다. 이와 같이 함으로써, 항-CD3 scFv는 세포 표면에 T 세포 활성 인자로 고정된다. pcDNA3.1 벡터에 인간 PD-L1, PD-L2 및 OS8 cDNA를 서브클로닝하였다. HEK293 및 Hep3B 세포 (ATCC)를 쌍을 이루는 플라스미드와 함께 공동-형질감염시킨 다음, 10-14일 동안 하이그로마이신 또는 G418로 선별하여, OS8 및 PD-L1 또는 PD-L2 cDNA를 둘 다 공동발현하는 안정화 세포주 HEK293/OS8/PD-L1, Hep3B/OS8/PD-L1 및 HEK293/OS8/PD-L2를 생산하였다. 이후 세포주를 앞서 언급한 바와 같이 한계희석으로 클로닝하였다 (Fuller SA, et al. Curr Protoc Mol Biol. Chapter 11:Unit11.8., 2001). 인간 PD-1의 세포외 및 막관통 도메인을 인간 CD3 ζ 쇄 (NCBI Accession No. NP_932170.1)의 세포질 도메인에 융합하여, P3Z로 명명된 키메라 PD-1 수용체를 구축하였다. P3Z 코딩 cDNA 서열을 pFB-네오에 클로닝하였고, 레트로바이러스 형질도입을 통해 HuT78 세포에 전달하여 HuT78/P3Z 세포를 생산하였다.
- [0173] *HuT78/PD-1 세포 중 IL-2 방출에 의해 PD-1 항체 기능 측정*
- [0174] 항-PD-1 항체가 PD-L1 유도 PD-1 신호전달의 상호작용을 차단할 수 있는지 확인하기 위하여, 웰당 RPMI1640 성장 배지 200 μ l를 피딩한 평바닥 플레이트에서 HEK293/OS8/PD-L1 또는 HEK293/OS8/PD-L2 세포 (웰당 4×10^4)와 37°C에서 공동 배양하기 전에, HuT78/PD-1 세포 (96웰 플레이트에서 웰 당 1.5×10^4 세포)를 하이브리도마 상등액 또는 PD-1 항체와 15분 동안 사전 인큐베이션하였다. 16-18시간 이후, 공동 배양 상등액을 수집하였다. 인간 IL-2 Ready-Set-Go! ELISA 키트 (Cat. No. 88-7025, eBiosciences, San Diego, CA)를 사용하여 ELISA를 통해 IL-2를 어세이하였다. 이번 어세이에서, 항-PD-1 항체로 PD-1 신호전달이 차단되어, 향상된 TCR 신호전달 및 IL-2 생산을 나타내었다 (도 4).
- [0175] 도 5 및 표 2에 나타낸 바와 같이, 마우스 항-PD-1 mAb, mu317 및 mu326는 mu30보다 현저히 더 높은 기능적 활성을 유도하고, PD-L1-유도 PD-1 신호전달을 억제하여, 증가된 IL-2 분비를 유도하였다. 둘 다 각각 675 및 634 pg/ml로 더 높은 IL-2 분비를 나타내었고 (상단선, 표 2), 둘 다 mu30 항체보다 더 낮은 EC_{50} (50% 수준의 IL-2 분비 유도에서 mAb의 유효 농도)을 나타내었다.

[0176] 표 2. HEK293/OS8/PD-L1 세포와 공배양된 HuT78/PD-1 세포 중 항-PD-1 mAb에 의해 유도된 IL-2 방출

항체	기준선 (pg/ml)	상단선 (pg/ml)	EC ₅₀ (μg/ml)
mu30	95	527	0.229
mu317	95	675	0.083
mu326	95	634	0.053
mIgGs	95	N/A	N/A

기준선: 모든 시험 농도에서 mIgG에 의해 유도된 평균 IL-2 방출, 도 4 참조
 상단선: Prism Software에 의한 회귀 계산에 기반한 가장 높은 IL-2 방출, 도 4.
 N/A: 해당없음

[0177]

[0178] 항-PD-1 mAbs의 HuT78/PD-1 세포 접합에 의한 PD-L1 유도 T-세포 활성화 차단 뿐 아니라, PD-L2 유래 IL-2 방출을 차단하였다. 표 3은 IL-2 분비 파라미터 (EC₅₀)로 명시된 바와 같이, mu476에 비해 mu317 및 mu326이 T-세포 활성화에 훨씬 더 높은 효능을 가짐을 보여주는 데이터를 제시하였다.

[0179] 표 3. HEK293/OS8/PD-L2 세포와 공배양된 HuT78/PD-1 세포 중 항-PD-1 mAbs에 의해 유도되는 IL-2 방출

항체	기준선 (pg/ml)	상단선 (pg/ml)	EC ₅₀ (μg/ml)
476	180	599	0.183
317	192	563	0.032
326	218	635	0.038

기준선: S자형 반응 곡선 중 하단 말미부에서 유도된 평균 IL-2 방출
 상단선: S자형 반응 곡선 중 평단부에서 유도된 평균 IL-2 방출

[0180]

[0181] HuT78/P3Z 세포에서 IL-2 방출의 역방향 신호 전달에 의한 PD-1 항체 기능 측정

[0182] 키메릭 수용체 P3Z에서, PD-1 신호전달 도메인을 CD3ζ의 세포질 도메인으로 교체하였다. 따라서, P3Z는 원래 PD-1 수용체로서 억제보다는 PD-L1과의 접합에 따른 활성을 매개한다. 이번 어세이에서, 96웰 평바닥 플레이트 (총 부피 200 μl/웰)에서 HEK293/PD-L1 또는 HEK293/PD-L2 세포 (5x10⁴/웰)와 37°C에서 공동 배양하기 전에, HuT78/P3Z 세포 (3x10⁴/웰)를 하이브리도마 상등액 또는 PD-1 항체와 15분 동안 사전 인큐베이션하였다. 16-18시간 이후, 공동 배양 상등액을 수집하였고, 앞서 언급한 바와 같이 ELISA로 IL-2 생산을 어세이하였다.

[0183] 위에서 언급한 역방향 신호 전달 어세이에서 T 세포 활성을 직접 읽어 도출하는 것을 통해, 마우스 항-PD-1 mAbs의 기능적 활성을 추가로 확인하였다. 앞서 기술한 결과와 일치하게, 스크리닝한 mAb 중 mu317 및 mu326이 가장 우수한 기능적 활성을 나타내었다. 표 4 및 표 5에 나타낸 바와 같이, mu317 및 mu326이 낮은 활성의 mAb 중 하나인 mu37에 비해, IC₅₀ 및 최대 억제 측면에서 훨씬 더 효능이 있었다.

[0184] 표 4. HEK293/PD-L1 세포와 공배양된 HuT78/P3Z 세포 중 항-PD-1 mAb에 의한 IL-2 분비 억제

항체	IC ₅₀ (μg/ml)	최대 억제, %
37	0.287	86.9
317	0.083	99.3
326	0.039	97.6

최대 억제는 배양액 중 최고 수준인 10 μg/ml로 첨가된 항-PD-1 mAb를 통한 억제 백분율 (%)로 계산하였다.

[0185]

[0186] 표 5. HEK293/PD-L2 세포와 공배양된 HuT78/P3Z 세포 중 항-PD-1 mAb에 의한 IL-2 분비 억제

항체	IC ₅₀ (μg/ml)	최대 억제, %
37	0.127	43.3
317	0.020	94.3
326	0.018	93.4

최대 억제는 배양액 중 최고 수준인 10 μg/ml로 첨가된 항-PD-1 mAb를 통한 억제 백분율 (%)로 계산하였다.

[0187]

[0188] 실시예 4. HEK293/OS8/PD-L1 세포와 공배양된 1차 인간 PBMC 중 항-PD-1 mAb에 의한 IFN-γ 분비 활성화

[0189] 선별된 PD-1에 대한 가장 우수한 mAb가 1차 인간 면역세포에 대한 기능적 효과도 나타내는지 검증하기 위하여, T-세포 (50-70%), B-세포와 NK 세포 (15-30%), 및 단핵세포 (2-10%)로 주로 구성되고, 신선하게 분리된 PBMC (peripheral blood mononuclear cell)를 사용하여, 항체 기능을 어세이하였다. 제조사의 지시에 따라 피콜 림 프구 분리 배지 (Histopaque-1077; Sigma-Aldrich, MO)를 사용하여 밀도 기울기 원심분리를 통해, 건강한 공여 자로부터 인간 PBMC를 분리하였다. 모든 인간 혈액 수집은 Beigene의 내부 절차를 따랐다. 이후 항-CD3 mAb (40 ng/mL) OKT3 (Cat. No. 16-0037, eBioscience, CA)로 어세이 전 3일 동안 PBMC를 자극하였다. 활성화된 PBMC (1차 T 세포) 상에서의 PD-1 발현은 개별 공여자에 따라 다양한 정도로 증가하였음을 FACS 분석 (실시예 1)을 통해 나타내었다 (표 6). TCR/CD3 복합체의 접합에 따라 PD-1 리간드-양성 종양세포에 대한 사전 활성화된 T 세포의 응답을 측정하기 위하여, 96웰 평바닥 플레이트에서 15-18시간 동안 HEK293/OS8/PD-L1 또는 HEK293/OS8/PD-L2 세포 (3x10⁴) 중 어느 하나와 PBMC (1x10⁴)를 공배양하였다. Ready-Set-Go! ELISA 키트 (Cat. No. 88-7316, eBiosciences)를 사용하여 ELISA로 세포 미포함 상등액 중 IFN-γ 레벨에 대하여 어세이하였으며, 이는 기타 면역 세포 활성화 뿐 아니라 T-세포 활성화의 가장 중요한 표지자이다 (Thakur A. et al. 2012 Vaccine, 30:4907-4920).

PBMC 및 처리	작동된 PD-1 염색 양성세포 vs. 총 염색 PMBC 백분율	
	공여자-3	공여자-4
PBMC, 미자극/PD-1 Ab로 염색	12.0%	3.2%
PBMC, 자극/PD-1 Ab로 염색	40.0%	38.1%
PBMC, 미자극/대조군 Ab로 염색	≤ 0.5%	≤ 0.5%
PBMCs, 자극/대조군 Ab로 염색	≤ 0.5%	≤ 0.5%

자극: 항-CD3 항체, OKT3 및 IL-2 존재하에서 신선하게 분리된 PBMC를 3일 동안 배양하였다.
미자극: 신선한 PBMC를 항체 염색하고, FACS 분석하였다.

[0190]

[0191] 도 6은 사전 활성화된 PBMC와 HEK293/OS8/PD-L1의 공배양 중 mAb mu317 및 mu326의 존재에 의해 IFN-γ 축적이 투여량 의존적 방식으로 증가됨을 나타낸다. 다른 공여자 사이에서 마우스 IgG 처리에 대한 IFN-γ의 기본 레벨은 다양하나, mu317 및 mu326으로 처리된 PBMC에서 IFN-γ 분비 증가는 0.1 내지 10 μg/ml의 항체 처리 범위에서 통계적으로 유의하다. mIgG로 처리된 PBMC에 상응하는 레벨과 비교하여, 0.1 to 10 μg/ml 농도 레벨 사이에서 mu317 및 mu326에 의해 유도된 IFN-γ 분비는 각각 공여자-19 유래 PBMC에서 2.5 내지 3.2배 증가하였고, 공여자-20 유래 PBMC에서 1.4 내지 2.3배 증가하였다.

[0192] 실시예 5. anti-PD1 mAbs에 의한 인간 NK 세포 활성화

[0193] NK 세포에서의 기능적 어세이를 위한 안정한 세포주

[0194] 이전에 1차 인간 NK 세포는 IL-2 처리에 대한 응답으로 PD-1 단백질을 발현하고, PD-1 매개 신호전달 억제는 NK 세포의 세포독성을 향상시킨다는 것이 보고되었다 (2010 Blood, 116: 2286). NK 세포에서 항-PD-1 mAb에 의해 유도되는 기능적 효과를 정량적으로 어세이하기 위해, 인간 NK 세포주 NK92MI (ATCC) 및 폐암 세포주 SK-Mes-1 (ATCC)를 엔지니어링하여, 이전에 언급된 프로토콜 (Zhang et al. 2005, Blood 106: 1544-1551, Zhang et al. 2006, Cancer Res, 66: 5927)에 따라 레트로바이러스 형질도입을 통해 인간 PD-1 및 PD-L1 각각을 안정적으로 발현하도록 하였다. 2개의 안정적 세포주를 NK92MI/PD-1 및 SK-Mes-1/PD-L1로 명명하였다.

[0195] 항-PD-1 Ab는 NK92MI/PD-1 세포에서 IFN- γ 생산 및 분비를 증진시킨다

[0196] 웰당 총 6×10^4 세포를 포함하는 96웰 평바닥 플레이트에 1:2의 비율로 폐암 세포주 SK-MES-1/PD-L1와 공배양된 NK92MI/PD-1 세포에서 IFN- γ 생산 및 분비를 정량적으로 측정하여, NK 세포에 대한 항-PD-1 mAb의 기능적 활성을 어세이하였다. 공동 배양 시작 15분 전, NK92MI/PD-1 세포에 항-PD-1 mAb를 첨가하였고, 이후 세포를 CO₂ 인큐베이터에서 밤새 공배양하였다. 실시예 4에 기술된 바와 같이 ELISA로 무세포 상등액 중 IFN- γ 레벨에 대하여 어세이하였다.

[0197] 낮은 농도의 항체 처리에 해당하는 기준선에서 고농도의 항체 처리에 해당하는 상단선까지 모든 항-PD-1 mAb는 유의한 IFN- γ 생산 증가를 유도하였다. 2개의 최상 항체인 mu317 및 mu326는 비교항체 5C에 비해 더 낮은 EC₅₀을 보였으며, 이는 NK 세포에 대하여 더 우수한 효능의 활성 효과를 가짐을 의미한다 (표 7).

[0198] 표 7. 항-PD-1 mAb 및 SK-MES-1/PD-L1 세포 존재하에 NK92MI/PD-1 세포에 의해 배지 (pg/ml) 중 분비된 IFN- γ

항체	기준선 (pg/ml)	상단선 (pg/ml)	EC ₅₀ (μ g/ml)
317	28	532	0.40
326	15	509	0.20
5C	20	535	1.17
기준선: S자형 반응 곡선 중 하단 말미부에서 유도된 평균 IFN- γ 방출. 상단선: S자형 반응 곡선 중 평단부에서 유도된 평균 IFN- γ 방출			

[0199] 항-PD-1 Ab는 NK92MI/PD-1 세포에 의해 매개된 암 세포 살해를 향상시킨다

[0200] CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 키트 (Promega, Madison, WI)를 사용하여 LDH (lactate dehydrogenase) 방출 어세이로 SK-MES-1/PD-L1 세포에 대한 NK92MI/PD-1 세포의 세포독성을 측정하였다. 간략하게, 항-PD-1 mAb와 함께 최종 농도 0.004-10 μ g/ml 범위 내로 NK92MI/PD-1 세포 (10^5)를 15분 동안 사전 인큐베이션하였고, 96-웰 V-바닥 플레이트에 배양된 면역세포에 효과기 세포 : 종양세포 (E:T) 5:1의 비율로 SK-MES-1/PD-L1 세포 (2×10^4)를 첨가한 다음, 5시간 동안 공배양하였다. 종양 세포의 완전한 용해를 최대 세포 살해로 설정하고, 각 샘플의 LDH-방출 어세이 결과를 최대 세포 살해의 백분율로 계산하였다. 공통된 표준값으로 10% 기준선을 사용하여, 플레이트 전체 모든 샘플의 세포 살해(%)를 정규화하였다.

[0202] 앞서 설정된 특정 세포독성 어세이 중, 선별된 항-PD-1 mAb는 고농도 투입 mAb에서 19% 내지 20.2%의 범위로 순종양 세포 살해 (net tumor cell killing: = 상단선-기준선)를 야기하였다. Mu317 및 mu326는 mu336보다 더 낮은 EC₅₀을 나타내었고, 이는 NK92MI/PD-1 세포-매개 종양 세포 살해를 유도할 더 나은 효능을 의미한다 (표 8).

[0203] 표 8. 항-PD-1 mAb에 의해 유도된 종양세포에 대한 NK92MI/PD-1 세포의 세포독성

항체	기준선 (%)	상단선 (%)	EC ₅₀ (μg/ml)
317	10	29.06	0.50
326	10	30.19	0.37
336	10	29.72	1.52

기준선: 항-PD-1 mAb의 효과가 아닌 것에 의해 살해된 종양세포의 백분율, 플레이트 전체에 대하여 10%로 정규화.
 상단선: 최고 농도의 mAbs, 즉 3 μg/ml 및 10 μg/ml 존재하에서 살해된 종양의 평균 백분율

[0204]

[0205] 실시예 6. PD-1 mAb의 클로닝 및 서열 분석

[0206] 100mm-조직 배양 디쉬에 특이적 mAb를 분비하는 마우스 하이브리도마 클론을 3 내지 10 X 10⁶ 세포 밀도로 배양하였고, 스윙 버킷 로터 (swing bucket rotor)에서 1500 rpm으로 원심분리하여 세포를 수확하였다. Ultrapure RNA 키트 (Cat. No. CW0581, CWBIOTECH, Beijing, China)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 총 세포 RNA를 분리하였다. 이중 탈이온수에 RNA를 재서스펜션하였고, NanoDrop (ThermoFisher, Shanghai, China)으로 농도를 측정하였다.

[0207] 이전에 보고된 서열 (Brocks et al. 2001 Mol Med 7:461-469)에 기초하여 mAb cDNA 클로닝에 사용되는 PCR 프라이머를 Invitrogen (Beijing, China)을 통해 합성하였다. 역방향 전사효소 (Cat. No. AH301-02, Transgen Biotech, Beijing, China)를 사용하여 제1 가닥 cDNA를 합성하였다. PCR 제제 키트 (Cat. No. Ap221-12, TransGen Biotech, Beijing, China)를 사용하고 제조사의 프로토콜에 따라, 특이적 mAb cDNA의 PCR 증폭을 수행하였다. PCR 산물은 서비스 제공자 (GeneWiz, Beijing, China)를 통해 직접 서열분석하거나 pCR 벡터 (Invitrogen)에 서브클로닝한 이후 서열분석 (GeneWiz) 하였다.

[0208] 서열 상동성 얼라인먼트에 의해 마우스 mAb의 단백질 서열을 분석하였다. 서열 상동성 및 에피토프 매핑 결과에 기초하여 mAb를 분류하였다 (실시예 13). Kabat (Wu, T.T. and Kabat, E.A., 1970 J. Exp. Med. 132: 211-250) 및 IMGT 시스템 (Lefranc M.-P. et al., 1999 Nucleic Acids Research, 27, 209-212)에 기초하여, 서열 해석 및 인터넷 기반 서열 분석 ([http:// www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/index.html](http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/index.html) 및 [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/))을 통해 상보성 결정 영역 (CDR)을 동정하였다. 표 9에 나타낸 바와 같이, mu317 및 mu326의 CDR은 서열 길이 및 일치성에서 매우 상이하였다.

[0209] 표 9. mu317 및 mu326의 CDR

항체	CDR1	서열번호	CDR2	서열번호	CDR3	서열번호
mu317, HC	<u>GFSLTISYGVH</u>	11	<u>VIWAGGSTINYSALMS</u>	12	<u>ARAYGNYWYI</u> <u>DY</u>	13
mu317, LC	<u>KASQSVSNDVA</u>	14	<u>YAFHRFT</u>	15	<u>HQAYSSPYT</u>	16
mu326, HC	<u>GYIFINYGMN</u>	17	<u>WINNNGEPTYAEFEK</u> <u>G</u>	18	<u>ARDVMDY</u>	19
mu326, LC	<u>RASESVDNYGYS</u> <u>FMH</u>	20	<u>RASNLES</u>	21	<u>OOSKEYPT</u>	22

비고: 굵은 글자체의 CDR은 카바트 시스템에 기초한 것이다; 밑줄친 CDR은 IMGT 시스템에 기초한 것이다.

[0210]

[0211] 실시예 7. 마우스 Ab의 인간화

[0212] 항체 3D 구조 시뮬레이션

[0213] CDR 룩 구조를 지지하는데 중요할 수 있는 골격영역 잔기를 동정하기 위해 mu317 및 mu326의 가변 도메인에 대한 3차원 구조를 시뮬레이션하였다. 1회차 항체 인간화에서 효능에 중요한 골격영역 잔기는 원래의 마우스 잔기로 유지하였다. 항체에 대하여 종래 정립된 구조 모델링법 (Morea et al. Methods 2000 20:267-279)을 채용하

고, 항체의 알려진 정규 구조 (Al-Lazikani et al. 1997 Journal of Molecular Biology 273:927-948)에 기초하여 항-PD-1 mAb의 3D 구조를 시뮬레이션하였다. 간략하게, 마우스 항체의 각 가변영역 (Vk 및 Vh) 서열을 PDB 데이터베이스 (Protein Data Bank, [http:// blast.ncbi.nlm.nih.gov/](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/))에서 블라스트하여, 공지된 고해상도 구조 (2.5 옹스트롱 미만의 해상도)와 가장 상동성 높은 항체 서열을 확인하였다. mu317 및 mu326을 모델링하기 위한 선별된 구조 템플레이트는 모델링될 표적 항체에 대하여 L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1 및 H-CDR2에서 동일한 부류의 정규 립 구조를 가졌다. Vk 및 Vh에 대한 템플레이트가 다른 이뮤노글로불린에서 왔다면, 주요 쇄 원자의 최소자승법 (least-squares fit)으로 패킹하여 Vk-Vh 계면 잔기의 하이브리드 구조를 형성하였고, 이는 스위스-모델 프로그램 (Kiefer et al. 2009 Nucleic Acids Research 37, D387-D392)에 의한 구조 상동성 모델링에 대하여 템플레이트로 사용되었다. 일종의 결쇄 입체구조를 적용하는 반면, 주요 쇄 입체구조는 유지하였다. 모구조 및 모델링된 구조가 동일한 잔기를 가지는 지점에서, 결쇄 입체구조를 유지하였다. 잔기가 다른 지점에서, 템플레이트 구조, 로타머 라이브러리 (rotamer library) 및 패키징 고려사항에 기반하여 결쇄 입체구조를 모델링하였다. 상동성 모델링 후, PLOP 프로그램 (Jacobson et al. 2002 Journal of Physical Chemistry 106:11673-11680)을 사용하여, 모든 원자 에너지를 최소화하고 Vk 및 Vh 계면을 최적화하기 위해 상동성 모델을 정제하였다. 이러한 단계는 특히, 상이한 항체 유래 세그먼트 구조가 함께 연결되는 영역에서 입체화학이 향상 되도록 수행되었다.

[0214] 표 10. 항체 구조 시뮬레이션에 사용된 구조 템플레이트

항체 쇄	템플레이트 구조의 PDB 코드 (H-CDR3에 대한 PDB 템플레이트)	서열 일치도	서열 유사도
mu317 Vk	3MXV	87%	92%
mu317 Vh	3VFG	83%	91%
mu326 Vk	1EJO	92%	94%
mu326 Vh	1NCA	88%	90%
317-1 Vk	4HJJ	90%	95%
317-1 Vh	3VFG (1AY1)	75%	87%
326-1 Vk	1EJO	87%	92%
326-1 Vh	3T2N (3CXD)	84%	86%

[0215]

[0216]

인간화 정도를 향상 및/또는 항체 안정성을 향상시키기 위한 추가 라운드의 항체 엔지니어링을 가이드하기 위해, CDR 그래프트된 317-1 및 326-1에 대한 구조를 시뮬레이션 하였다. 선별된 구조 템플레이트를 표 10에 나타내었다. 가능한 H-CDR3 입체구조를 317-1에 대하여는 PDB 템플레이트 1AY1 및 326-1에 대하여는 3CXD에서 각각 가져왔다는 것을 제외하면, 앞선 절차와 동일한 방법으로 구조 시뮬레이션을 수행하였고, 유사한 크기 및 몸통 부위의 H-CDR3을 포함하였다. 그래프트된 H-CDR3 잔기에 대한 에너지 최소화는 PLOP 사용하여 수행하였다.

[0217]

인간화

[0218]

항-PD-1 mAb의 인간화를 위해, IMGT ([http:// www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/index.html](http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/index.html)) 및 NCBI ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/)) 웹사이트에서 인간 이뮤노글로불린 유전자 데이터베이스를 블라스트하여, mu317 및 mu326 가변 영역의 cDNA 서열에 상동성인 인간 생식세포 IgG 유전자를 탐색하였다. PD-1 mAb에 높은 상동성을 가지는 인간 IGHV 및 IGV를 인간화를 위한 템플레이트로 선별하였다.

[0219]

원칙대로 CDR-그래프팅을 통해 인간화를 수행하였다. 인간화의 1회차 라운드에서, 시뮬레이션된 3D 구조를 통해 가변영역의 골격영역 서열 중 마우스 아미노산 잔기가 인간 아미노산 잔기로 변이되도록 가이드하였고, 변화에도 항체 전반 및 립 구조는 보유하고, 단지 마우스 아미노산 잔기만 앞서 언급한 바와 같이 인간 서열로 변이하였다. 인간화 mAb의 초기 버전은 hu317-1 (서열번호 47-50) 및 hu326-1 (서열번호 55-58)이고, 인간화 가변 중쇄가 인간 IgG2 불변영역 (NCBI accession No. P01859)에 융합된 중쇄 및 인간화 가변 경쇄 카파 (Vκ)가 인간 Ig 카파 C-영역 (NCBI Accession No. P01834)에 융합된 경쇄를 포함한다. 마찬가지로, mu317 및 mu326 유래 키메릭 항체를 생산하였으며, 인간 IgG2 불변영역에 융합된 마우스 VH, 인간 Ig 카파 C-영역에 융합된 마우스 Vk

로 구성된다. 전장 키메릭 항체는 각각 ch317 및 ch326로 명명된다. 모든 재조합 mAb는 실시예 1에 기술된 바와 같이 발현시키고 정제하였다.

[0220] FACS 및 기능 어세이를 통해 mAb hu317-1이 mu317 및 ch317와 거의 동일한 결합 활성 및 기능 활성을 보유하였음을 확인하였다. FACS에서 2개의 상이한 검출 항체인 염소 항-마우스 IgG 및 염소 항-인간 IgG가 사용되었다는 사실을 통해 mu317 vs. ch317와 hu317-1 사이의 FACS 분석에서 EC₅₀ 차이가 해석될 수 있다. 2개의 기능 어세이에서, 3가지 버전의 317 모두 더 동일하게 처리되었고, 결과 또한 서로 근접하였다 (표 11).

[0221] mu326에 대한 초기 라운드의 인간화 결과로, FACS 결합 어세이 및 HuT78/PD-1 세포 기반 IL-2 방출 어세이에서 기능적 활성이 ch326보다 약간 더 낮을 수 있을지라도, mAb hu326-1은 모항체 ch326 및 mu326과 유사한 기능적 특징을 보유하였다 (표 12).

[0222] 표 11. FACS 및 기능 어세이에 의한 mu317, ch317 및 hu317-1 비교

어세이/파라미터		mu317	ch317	hu317-1
FACS	EC ₅₀ (µg/ml)	0.11	0.36	0.46
	최대 MFI*	205	217	203
어세이-1	EC ₅₀ (µg/ml)	0.11	0.08	0.09
	상단선 (pg/ml)	346	294	386
	기준선 (pg/ml)	98	82	91
어세이-2	IC ₅₀ (µg/ml)	0.11	0.10	0.11
	최대 억제	99.5%	99.0%	99.8%

*MFI: FACS 분석 중 평균 형광 강도
 어세이-1: HEK293/OS8/PD-L1 세포와 공배양된 HuT78/PD-1 세포에서 mAb에 의해 유도된 IL-2 방출
 어세이-2: HEK293/PD-L1 세포와 공배양된 HuT78/P3Z 세포에서 mAb에 의해 유도된 IL-2 방출

[0223] 표 12. FACS 및 기능 어세이에 의한 mu326, ch326 및 hu326-1 비교

어세이/파라미터		mu326	ch326	hu326-1
FACS	EC ₅₀ (µg/ml)	0.126	0.072	0.117
	최대 MFI	195	163	129
어세이-1	EC ₅₀ (µg/ml)	0.038	0.074	0.112
	상단선 (pg/ml)	1149	1057	1143
	기준선 (pg/ml)	242	250	283
어세이-2	IC ₅₀ (µg/ml)	0.14	0.12	0.10
	최대 억제	96.9%	81.0%	84.4%

어세이-1: HEK293/OS8/PD-L1 세포와 공배양된 HuT78/PD-1 세포에서 mAb에 의해 유도된 IL-2 방출
 어세이-2: HEK293/PD-L1 세포와 공배양된 HuT78/P3Z 세포에서 mAb에 의해 유도된 IL-2 방출

[0225] 1회차 라운드의 인간화에 기초하여, 항체 기능에 대한 영향을 평가하기 위해 hu317-1_{Vh} 및 V_K 개별적으로 골격영역 (FR)에 존재하는 기타 마우스 아미노산(AA)를 추가로 변이시켰다. 표 13에 나타난 바와 같이, hu317-1의 V_h 중 7개의 개별적 변이 및 V_K에서 1개의 변이 모두 유사한 기능적 활성을 가진다. 변이 중 약간 더 약한 저

해 기능을 가지는 hu317-2_K71V와 같이, 몇몇 Vh 변이에서는 약간의 변화만 관찰되었다. 그러나, 모든 마우스 아미노산 잔기가 인간으로 한꺼번에 변이(hu317-3A)되면, 나머지 변이보다 FACS 및 IL-2 방출 어세이에서 기능이 명확하게 더 약하다.

[0227] 앞서 언급한 초기 시도에서, 남은 몇 개의 마우스 AA 잔기를 제외하고 hu326-1은 FR에서 상당한 인간화 수준에 도달하였다. 그럼에도 불구하고, mu326 보다 더 약한 기능을 가진다. 따라서, mAb326 기능에 대한 각 개별 AA의 공헌도를 탐색하기 위해, 마우스 잔기로 역방향 변이하거나, 인간 잔기로 정방향 변이하는 것 중 어느 하나로 더욱 개별적인 변이를 제작하였다. 표 14는 hu326-1_Vh 템플레이트 (서열번호 56, 서열번호 57) 기반하여 제작된 모든 개별 AA 변이 및 기능 어세이 결과를 나타낸 것이다. 원래의 mu326 mAb와 매칭하여, 대부분의 변이들이 hu326-1 보다 더 나은 기능적 활성을 나타내었다. 복수의 변이 (E46K 및 F95Y)가 EC₅₀ 또는 IC₅₀에서 약간 더 낮은 약효를 나타내었으며, 이는 항체 구조 및 기능에서 이러한 잔기의 역할을 의미한다.

[0228] 표 13. hu317-1 골격영역에서 인간화 변이를 포함하는 Fab의 기능적 활성 비교

Fab 및 구성		FACS, EC ₅₀	HuT78/P3Z에서 IL-2 방출	
Vh	Vk		최대 억제, %	EC ₅₀
hu317-1_Vh	hu317-1_Vk	0.19	98.78	0.30
hu317-2_L48I	hu317-1_Vk	0.14	98.51	0.37
hu317-2_L67V	hu317-1_Vk	0.15	98.57	0.30
hu317-2_K71V	hu317-1_Vk	0.18	96.55	0.48
hu317-2_N73T	hu317-1_Vk	0.15	98.29	0.31
hu317-2_S76N	hu317-1_Vk	0.13	98.56	0.28
hu317-2_V78F	hu317-1_Vk	0.18	98.03	0.38
hu317-2_M82L	hu317-1_Vk	0.13	98.47	0.27
hu317-1_Vh	HU317-2_G100Q	0.21	98.86	0.27
hu317-3A	hu317-1_Vk	0.32	79.66	0.35

참고: EC₅₀에 대한 단위는 µg/ml; 변이된 아미노산 잔기 넘버링은 hu317-1에 대하여 나열된 서열에서와 동일함; hu317-3A은 모두 인간으로 변이된 골격영역 서열을 가짐.

[0229]

[0230] 표 14. hu326-1 골격영역에서 변이를 포함하는 mAb의 기능적 활성 비교

항체	FACS, EC ₅₀ μg/ml	HuT78/P3Z에서 IL-2 방출		HuT78/PD-1에서 IL-2 방출	
		최대 억제, %	IC ₅₀ , μg/ml	상단선, pg/ml	EC ₅₀ , μg/ml
ch326	0.118	93.05	0.074	993	0.135
hu326-1	0.317	92.38	0.087	987	0.213
hu326-2 S9P ^B	0.145	96.04	0.075	1022	0.136
hu326-2 A16E ^B	0.155	96.33	0.078	1048	0.126
hu326-2 E46K ^B	0.132	95.25	0.079	1244	0.259
hu326-2 G63D ^B	0.139	96.44	0.064	1069	0.120
hu326-2 A76V ^F	0.102	96.65	0.071	1002	0.112
hu326-2 S84N ^B	0.131	96.52	0.060	1015	0.126
hu326-2 S85N ^B	0.110	95.62	0.093	932	0.104
hu326-2 T88N ^B	0.098	95.85	0.102		
hu326-2 F95Y ^F	0.097	95.62	0.166	1028	0.135

^B: 마우스 아미노산으로 역방향 변이; ^F: 인간 아미노산으로 정방향 변이.
모든 변이는 hu326-1_Vh (서열번호 56) 및 이와 쌍을 이루는 hu326-1_Vk (서열번호 58)에 포함되었다.

[0231]

[0232]

인간에서 치료제로 사용될 수 있는 mAbs 317 및 326에 대한 가능한 가장 우수한 Vh 및 Vk 서열 조성을 확인하기 위해, FR에서 인간화 정도, 기능적 활성, 물리화학적 특성, 항체 의존적 세포 매개 세포독성 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC) 및 보체 의존성 세포독성 (complement-dependent cytotoxicity: CDC)와 같은 항체 특성을 고려하여, 다양한 조합의 변이 (CDR 서열에서 몇몇 변이 포함)를 제작하였다. 변이 대부분은 자격 기준을 통과하지 못하는 것으로 간주되었다. 엔지니어링 과정을 통해, 효능 치료 용도로 6개의 인간화 재조합 mAb를 선별하였다: hu317-4B2 (서열번호 43-44), hu317-4B5 (서열번호 45-46), hu317-4B6 (서열번호 23-26), hu326-3B1 (서열번호 51-52), hu326-3G1 (서열번호 53-54) 및 hu326-4A3 (서열번호 27-30). 표 15 및 표 16에 나타난 바와 같이, mAb의 CDR을 원래의 마우스 항체의 CDR과 비교하였다.

[0233]

6개의 mAb 중, hu317-4B2, hu317-4B5 및 hu317-4B6은 서열에서 서로 근접하게 연관되고, 기능적 활성 및 길이에 매우 유사하다. 한편, hu326-3B1, hu326-3G1 및 hu326-4A3은 서로 서열 및 기능에서 상당히 근접하다 (표 17-18). 2그룹의 각 mAb 내에서 몇몇 작은 차이가 있긴 하나, 서열 및 기능 뿐 아니라 많은 다른 특성, 예를 들어 물리화학적 특성 및 결합 에피토프 (실시에 10 및 11에 기술됨)를 공유하였다.

[0234]

표 15. mAbs 317의 다른 버전 사이에서 CDR 비교

mAbs	CDR1	서열번호	CDR2	서열번호	CDR3	서열번호
mu317, HC	GFSLTS YGVH	11	VIWAGGSTN YNSALMS	12	ARAYGNY WYIDV	13
hu317-1, HC	GFSLTS YGVH	11	VIWAGGSTN YNPSLKS	59	ARAYGNY WYIDV	13
hu317-4B2, HC	GFSLTS YGVH	11	VIYAGGSTN YNPSLKS	60	ARAYGNY WYIDV	13
hu317-4B5, HC	GFSLTS YGVH	11	VIYAGGSTN YNPSLKS	60	ARAYGNY WYIDV	13
hu317-4B6, HC	GFSLTS YGVH	11	VIYADGSTN YNPSLKS	32	ARAYGNY WYIDV	13
mu317, LC	EASQS VSNDV A	14	YAFHRFT	15	HQAYSSPY I	16
hu317-1, LC	EASQS VSNDV A	14	YAFHRFT	15	HQAYSSPY I	16
hu317-4B2, LC	KSSSESV SNDVA	61	YAFHRFT	15	HQAYSSPY I	16
hu317-4B5, LC	KSSSESV SNDVA	61	YAFHRFT	15	HQAYSSPY I	16
hu317-4B6, LC	KSSSESV SNDVA	61	YAFHRFT	15	HQAYSSPY I	16

참고: 밑줄의 AA 잔기는 마우스 서열에서 인간 항체 서열로 변경되거나, 물리화학적 특성 향상을 위해 변경된 것임.

[0235]

[0236] 표 16. mAbs 326의 다른 버전 사이에서 CDR 비교

mAbs	CDR1	서열 번호	CDR2	서열 번호	CDR3	서열 번호
mu326, HC	GYTFTNYGMN	17	WINNNNGEPTYAEEFK G	18	ARDVMD Y	19
hu326-1, HC	GYTFTNYGMN	17	WINNNNGEPTYAQQFR G	62	ARDVMD Y	19
hu326-3B1, HC	GYTFTNYGMN	17	WINNNNGEPTYAQDFR G	62	ARDVMD Y	19
hu326-3G1, HC	GYTFTNYGMN	17	WINNNNGEPTYAQDFR G	62	ARDVMD Y	19
hu326-4A3, HC	GYTFTNYGMN	17	WINNNNAEPTYAQDFR G	38	ARDVMD Y	19
mu326, LC	RASEVDNYGYSFM H	20	RASNLES	21	QQSKEYP I	22
hu326-1, LC	RASEVDNYGYSFM H	20	RASNLES	21	QQSKEYP I	22
hu326-3B1, LC	RASEVDNYGYSFM H	20	RASNLES	21	QQSKEYP I	22
hu326-3G1, LC	RASEVDNYGYSFM H	20	RASNLES	21	QQSKEYP I	22
hu326-4A3, LC	RASEVDNYGYSFM H	20	RASNLES	21	QQSKEYP I	22

참고: 밑줄의 AA 잔기는 마우스 서열에서 인간 항체 서열로 변경되거나, 물리화학적 특성 향상을 위해 변경된 것임.

[0237]

[0238] 표 17. ELISA 및 FACS에 의해 어세이된 인간화 mAb의 결합 활성

mAbs	ELISA, EC ₅₀ µg/ml	FACS, EC ₅₀ µg/ml
hu317-4B2	0.066	0.129*
hu317-4B5	0.057	0.115*
hu317-4B6	0.061	0.092*
hu326-3B1	0.092	0.165
hu326-3G1	0.088	0.190
hu326-4A3	0.091*	0.142*

* 정규화 없이 항체의 Fab 버전을 사용한 FACS 데이터.
** 브릿징 연구 (bridging study) 및 정규화한 데이터.

[0239]

[0240] 표 18. SPR에 의해 어세이된 Fab의 결합 친화도

Fab	K _{on} (M ⁻¹ , s ⁻¹)	K _{off} (s)	K _D (M)
hu317-4B5	3.89 x 10 ⁵	9.07 x 10 ⁻⁵	2.33 x 10 ⁻¹⁰
hu317-4B6	5.71 x 10 ⁵	8.37 x 10 ⁻⁵	1.47 x 10 ⁻¹⁰
hu326-3B1	2.18 x 10 ⁵	1.90 x 10 ⁻⁴	8.70 x 10 ⁻¹⁰
hu326-3G1	2.00 x 10 ⁵	2.01 x 10 ⁻⁴	1.00 x 10 ⁻⁹

[0241]

[0242] SPR에 의한 인간화 항-PD-1 Fab의 친화도 측정

[0243] PCR에 의해 항-PD-1 mAb를 Fab 버전으로 변환하여, 중쇄 및 경쇄 가변영역을 인간 IgG2-CH1의 N-말단 및 카파쇄의 불변영역에 각각 융합시키고, pcDNA3.1 벡터 (Invitrogen)에 서브클로닝하였다. 전장 항체의 일시적 발현과 유사한 일시적 형질감염 프로토콜을 사용하여 293-F 세포에서 발현벡터 둘 다를 공동 발현하였다. 간략하게, Fab 카파쇄를 PCR 증폭하고, pcDNA3.1-기반 발현벡터 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 서브클로닝하였다. 별개의 플라스미드에 중쇄 가변영역 (VH)과 함께, 오버 인간 IgG2로부터 CH1 코딩 서열을 중첩 PCR에 의해 C-말단 c-Myc-His8 태그에 융합시킨 다음, 발현벡터에 서브클로닝하였다. C232S 및 C233S (Kabat 잔기 넘버링, Kabat et al. Sequence of proteins of immunologic interest, 5th ed Bethesda, MD, NIH 1991) 변이를 IgG2

중쇄에 도입하여, 이황화 결합 교환을 방지하고 IgG2-A 입체구조 중 인간 IgG2를 안정화하였다 (Lightle et al. 2010 Protein Sci 19(4): 753-762). 두 가지 구조체 모두 Fab 성숙 서열의 업스트림에 신호 펩타이드를 포함하였다. 앞선 2개의 플라스미드를 293-F 세포에 공동 형질감염시켜 Fab의 분비된 발현을 수행하였고, 형질감염 6-7일 이후 세포 배양 상등액을 수확하였다. Ni-세파로스 패스트 플로우 컬럼 (Cat. No. 17531801, GE Life Sciences)을 사용한 다음, 하이로드 16/60 슈퍼팩스 200 컬럼 (Cat. No. 17106901, GE Life Sciences)을 사용하여 크기 배제 크로마토그래피하여 His8 태깅된 Fab를 세포 배양 상등액에서 정제하였다. PBS 중에 0.5-5 mg/mL로 정제된 Fab를 농축하고, 분주하여 -80°C 냉동기에 보관하였다.

[0244] 항-PD-1 Fab의 친화도 측정을 위해, BIAcore™ T-200 기기 (GE Life Sciences)와 함께 SPR 어세이를 사용하였다. 간략하게, 인간 PD-1/His 또는 시노몰구스 원숭이 PD-1/His를 커플링하여 CM5 바이오센서 칩 (Cat. No. BR100530, GE Life Sciences)을 활성화함으로써, 약 100-200 응답 단위 (response units: RU)를 달성한 다음 1M 에탄올아민으로 미반응 그룹을 차단하였다. 0.12nM에서 90nM까지 증가하는 농도의 Fab 샘플을 SPR 러닝버퍼 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH7.4)에 30 μL/분으로 주입하고, 공백 유동세포에서 RU를 차감하여 인간 PD-1/His 또는 원숭이 PD-1/His에 대한 결합 응답을 계산하였다. 일대일 랭뮤어 결합 모델 (BIA Evaluation Software, GE Life Sciences)을 사용하여 결합 속도 (k_{on}) 및 해리 속도 (k_{off})를 계산하였다. k_{off}/k_{on} 비율로 평형 해리상수 (K_d)를 계산하였다.

[0245] SPR로 측정된 항-PD-1 Fab의 결합 친화도를 표 18에 나열하였다. 각각의 항-PD-1 Fab는 인간 PD-1에 높은 친화도 ($K_d = 0.15-1$ nM)로 결합하였다. 326-3G1를 제외한 모든 Fab는 시노몰구스 원숭이 PD-1에 대하여 약간 더 낮지만, 상당한 친화도 (K_d 로 5배 이내)로 결합하였다.

[0246] 실시예 8. 변형된 인간 IgG4 불변영역을 포함한 재조합 항-PD-1 mAb의 제조 및 발현

[0247] PD-1은 일차적으로 활성화된 T-세포에서 발현되므로, 자연적으로 발현된 유형의 IgG-γFc 모이어티가 연결된 PD-1 차단 항체는 IgG 서브클래스에 따라 다양한 정도로 γFc-매개 효과기 기능 예를 들어 ADCC 및 CDC를 유도할 것으로 예상되고, 이는 활성화된 T 세포를 제거한다 (Natsume A, et al, 2009 Drug Des Devel Ther. 3: 7-16). 이전 다수의 보고에서 인간 항체 서브클래스 IgG4는 보통의 ADCC를 가지고, CDC 효과기 기능은 거의 없는 것으로 보여진다 (Moore GL, et al. 2010 MABs, 2:181-189). 한편, 자연적 IgG4는 산성 버퍼 또는 증가하는 온도와 같은 스트레스 조건에서 덜 안정한 것이 밝혀졌다 (Angal, S. 1993 Mol Immunol, 30:105-108; Dall'Acqua, W. et al, 1998 Biochemistry, 37:9266-9273; Aalberse et al. 2002 Immunol, 105:9-19). PD-1⁺ T 세포가 살해되는 것을 피하고, 항-PD-1 항체의 물리화학적 특성을 향상시키기 위하여, 변이 조합에 의해 엔지니어링된 IgG4를 인간화된 mAb에 연결하였고, FcγR 결합 또는 C1q 결합 활성이 감소되거나 없도록 함으로써, 이에 따라 ADCC 및 CDC 효과기 기능이 조절 또는 제거되는 것이다. 생물학적 제제로서 항체의 물리화학적 특성을 고려하면, IgG4의 덜 바람직한 고유 특성 중 하나는 용액 중 2개의 중쇄에 대한 역동적 분리, 절반 항체를 형성하며, "Fab 암 교환 (Fab arm exchange)"이라 불리는 과정을 통해 *in vivo*에서 생성된 이중특이적 항체를 야기한다 (Van der Neut Kolfshoten M, et al. 2007 Science, 317:1554-157). 228 (EU 넘버링 시스템) 위치에서 세린을 프롤린으로 변이시키면 IgG4 중쇄 분리를 저해하는 것으로 보인다 (Angal, S. 1993 Mol Immunol, 30:105-108; Aalberse et al. 2002 Immunol, 105:9-19). 힌지 및 γFc 영역에서 몇몇 아미노산 잔기는 Fcγ 수용체와 항체 상호작용에 대한 영향을 가지는 것으로 보고되었다 (Chappel SM, et al. 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9036-9040; Mukherjee, J. et al., 1995 FASEB J, 9:115-119; Armour, K.L. et al., 1999 Eur J Immunol, 29:2613-2624; Clynes, R.A. et al., 2000 Nature Medicine, 6:443-446; Arnold J.N., 2007 Annu Rev Immunol, 25:21-50). 더욱이, 인간 집단에서 거의 발생하지 않는 몇몇 IgG4 아이소폼 (isoform)은 다른 물리화학적 특성을 나타낼 수 있다 (Brusco, A. et al. 1998 Eur J Immunogenet, 25:349-55; Aalberse et al. 2002 Immunol, 105:9-19). 그러나, 이전에 발견된 모든 변이 및 아이소폼을 특정 항체로 집중시키는 것이 앞서 언급한 치료제에 대한 모든 특징을 공유하는 이상적 항체 분리를 보장하는 것은 아니며, 이는 조합된 변이의 상반된 효과에서 야기될 수 있고, 효과기 기능에 대한 가변영역의 효과 및 항체의 물리화학적 특성으로부터 야기될 수 있다 (Igawa T. et al., 2010 Prot Eng Design Select, 23:385-392; Perchiacca J.M. and Tessier P.M., 2012 Ann Rev Biomol Eng 3:263-286).

[0248] 가장 낮은 ADCC, CDC 및 불안정을 나타내는 항-PD-1 mAb를 제조하기 위해, 복수 조합의 변이를 도입하여 힌지 및 IgG4의 γFc 영역을 변형하였고, IgG4mt1 내지 IgG4mt12를 제조하였다. 몇몇 변형 IgG4 변이체는 어세이 결

과에서 지적된 바와 같이 명확하게 덜 바람직하였고, 몇몇 관련 IgG4 변이체 및 변형 서열들은 표 19에 나타내었다. 이러한 항체에 대한 평가는 아래에 기술한다.

[0249] 표 19. IgG4 변이체의 서열 변형

IgG4 및 변이체	아미노산 잔기*																
	...	228	229	230	231	232	233	234	235	236	...	265	...	309	...	409	...
IgG4	...	S	C	P	A	P	E	F	L	G	...	D	...	L	...	R	...
IgG4mt1	...	P	C	P	A	P	E	F	L	G	...	D	...	L	...	R	...
IgG4mt2	...	P	C	P	A	P	P	Y	A	G	...	D	...	L	...	R	...
IgG4mt6	...	P	C	P	A	P	P	Y	A	G	...	A	...	L	...	R	...
IgG4mt8	...	P	C	P	A	P	P	Y	A	G	...	I	...	L	...	R	...
IgG4mt9	...	P	C	P	A	P	P	Y	A	G	...	A	...	L	...	K	...
IgG4mt10	...	P	C	P	A	P	P	Y	A	G	...	A	...	Y	...	K	...

[0250] * 아미노산 넘버링은 EU 시스템에 기초한 것임. 변이는 밑줄로 표시됨.

[0251] 실시예 9. IgG4mt10은 Fc γ R에 결합하지 않고, 가장 낮은 ADCC 및 CDC 효과기 기능을 가짐

[0252] ADCC는 항체가 세포 표면 표적 단백질에 결합한 다음 효과기 세포에 발현된 Fc γ 수용체 (Fc γ R)에 연결되면 개시된다. 인간 IgG1이 IgG2 및 IgG4에 비해 Fc γ R에 상당히 더 높은 결합 효과를 가지며, 특히 ADCC를 활성화하는 IgG1의 강도와 연관된 Fc γ R-I 및 Fc γ R-IIIA에 결합함이 잘 기록되어 있다. ADCC에 이어, 항체가 세포 표면 표적 및 C1q 단백질에 교차연결되면 CDC가 활성화된 다음 보체 복합체의 형성에 대한 캐스케이드 반응 (cascade reaction) 및 표적 세포 용해가 일어난다. ADCC 및 CDC를 대신하여, Fc γ R 및 C1q에 결합하는 항체에 대한 어세이가 ADCC 및 CDC의 근본적 표지자 역할을 할 수 있다. 따라서, 모든 주요 Fc γ R에 결합하는 mAb를 체계적으로 평가하였다.

[0253] Fc γ R 결합

[0254] Fc γ R에 대한 다양한 IgG4 변이의 결합을 유세포 분석에 의해 측정하였다. 간략하게, 인간 Fc γ R을 발현하는 연속적 HEK293형질감염체를 구축하였다. 이러한 형질감염체는 Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB 또는 Fc γ RIIIA를 발현하였다. 복합 Fc γ R 서브유닛 (i.e., Fc γ RI 및 Fc γ RIIIA)은 FcR γ 로 공동발현되었다. 다형성 변이체 (i.e., Fc γ RIIA H131 및 R131, Fc γ RIIIA F158 및 V158) 또한 포함되었다. 2차 항체 (염소 항-인간 IgG F(ab)²-Alexa Fluor 488, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)를 사용하여 변형된 IgG4 변이체 (표 19)를 포함하는 항-PD-1 mAb가 Fc γ R⁺ HEK293 세포에 결합하는지 검출하였다. 예상한 바와 같이, IgG1포맷의 항-PD-1 mAb(hu317-1/IgG1 및 hu317-4B6/IgG1)는 Fc γ RI, Fc γ RIIA (H131 및 R131 대립유전자), Fc γ RIIB, 및 Fc γ RIIIA (V158 및 F158 대립유전자)을 포함하는 모든 Fc γ R에 강하게 결합하였다 (표 20). 흥미롭게도, 2개의 다른 버전의 인간화 mAb hu317-1 및 hu317-4B6 (Vh 및 V_K 둘 다에서 차이가 있음)을 동일한 IgG4 변이체 포맷 예를 들어 IgG4mt1 또는 IgG4mt6 포맷으로 제작하면, 결합강도 (MFI)는 2배 내지 100배에 근접한 범위로 다양하다 (e.g. 455.2/115.7 = 3.9배; 13.6/1.0 = 13.6 배; 434.6/4.9 = 88.7 배; 및 기타, 표 20 참고). 이는 항체의 가변영역은 FcR에의 결합에 상당한 영향을 가져서, ADCC와 같은 효과기 기능에 대한 영향을 미친다는 다른 연구에 의한 결과에 상응한다 (Igawa T. et al., 2010 Prot Eng Design Select, 23:385-392; Perchiacca J.M. and Tessier P.M., 2012 Ann Rev Biomol Eng 3:263-286).

[0255] 표 20에 기재된 바와 같이, IgG4mt10 포맷의 hu317-4B6 및 hu326-4A3이 제작되면, 표에 기재된 PD-1 mAb와 IgG 변이체 포맷 뿐 아니라, 연구에서 시험하였던 많은 다른 인간화 mAb 및 IgG 포맷의 Fc γ R에 대한 가장 낮은 결합 활성을 가진다. 이와 관련하여 IgG4mt10 포맷의 hu317-4B6 및 hu326-4A3의 특이성은 앞서 언급한 hu317-1과 같이 다소 상이한 서열 상동성을 가지는 동일한 패밀리의 인간화 mAb에까지 연장되지 않을 수 있다.

[0256] 표 20. FACS에 의해 측정된 Fc γ R에 대한 항-PD-1 mAb의 결합 강도 (MFI*)

mAbs	Fc γ RI	Fc γ RIIA (H131)	Fc γ RIIA (R131)	Fc γ RIIB	Fc γ RIIA (F158)	Fc γ RIIA (V158)
hu317-1 /IgG1	2152.9	168.7	139.6	442.4	99.7	277.2
hu317-4B6 /IgG1	2771.7	1.7	0.6	1.9	28.0	293.7
hu317-1 /gG4mt1	455.2	21.3	21.9	434.6	0.6	20.7
hu317-4B6 /IgG4mt1	115.7	0.2	0.0	4.9	0	6.1
hu317-1 /IgG4mt6	13.6	1.0	0.8	1.8	0.9	1.1
hu317-4B6 /IgG4mt6	1.0	0	0	0	0	0
hu317-4B6 /IgG4mt10	0.4	0	0	0	0	0
hu326-4A3 /IgG4mt10	0.5	0	0	0	0	0
* MFI: FACS 분석으로부터 평균 형광 강도						

[0257]

[0258] ADCC

[0259] 전형적 ADCC는 Fc γ RIIA 또는 CD16에 결합하는 항체에 의한 NK 세포의 활성화에 관여한다. 인간화 항-PD-1 mAb가 ADCC를 유도하는지 검증하기 위하여, *CD16* (V158 대립유전자) 및 *FcR γ* 유전자를 포함하는 발현 플라스미드를 공동 형질도입하여 NK92MI 세포 (ATCC)로부터 생성된 NK92MI/CD16V 세포를 효과기 세포로 사용하였고, PD-1 발현 T 세포주, HuT78/PD-1을 표적 세포로 사용하였다. 96-웰 V-바닥 플레이트에서 5시간 동안 HuT78/PD-1 세포와 동일한 숫자로 NK92MI/CD16V 세포 (4×10^4)를 공동 배양하였다. 앞선 항목에 기술된 LDH 방출 어세이로 세포 독성을 측정하였다. hu317-4B2/IgG4mt6, hu317-4B6/IgG4mt6, hu317-4B6/IgG4mt10 및 hu326-4A3/IgG4mt10 모두 양성대조군과 비교하여 기본 수준의 ADCC를 가짐을 확인하였다 (도 7). 4개의 mAb 사이의 ADCC에서 작은 차이점은 실험적 오류가 원인일 수 있다 (도 7의 오차바 참조).

[0260] CDC

[0261] 일반적으로 인간 IgG4 항체는 전형적 경로를 통해서 어떠한 CDC도 유도하지 못한다. IgG4mt10포맷의 항-PD-1 mAb가 CDC를 유도할 것인지 PD-1-발현 T 세포주 Hut78/PD-1 및 건강한 공여자로부터의 신선한 인간 혈청을 사용하여 평가하였다. Celltiter glo 어세이 키트 (Promega, Beijing, China)를 통해 CDC에 의한 세포 용해를 측정하였다. 간략하게, 정상 인간 혈청 (normal human serum : NHS)을 첨가하기 전, 무혈청 RPMI1640 (Invitrogen)의 HuT78/PD-1 세포 (2×10^4)를 항-PD-1 항체 (10 μ g/ml)와 함께 37°C에서 15분 동안 총 부피 120 μ l에서 96-웰 평판-바닥 플레이트 중 15% 또는 50%의 최종 농도로 인큐베이션하였다. 37°C에서 밤새 인큐베이션 한 후, 세포를 용해하고 ATP 농도에 대하여 어세이하였다. IgG4mt10포맷의 인간화 항-PD-1 mAb가 CDC를 통해 PD-1⁺ T 세포를 살해할 수 있는지 시험하기 위하여, 항-PD-1 Ab플러스 NHS와 공배양 전 3일 동안 항-CD3 Ab OKT3 (40 ng/ml)로 건강한 공여자에서 분리된 PBMC를 사전 활성화하였다. ATP의 양은 배양액에 존재하는 세포의 수와 직접적으로 비례한다. 96-웰 형광 강도 측정기 (PHERA Star FS, BMG LABTECH)를 사용하여 형광을 측정하였다. 생존 세포의 숫자에 비례하는 상대적 형광 단위 (relative fluorescence units : RFU)로 결과를 표시하였다. 다음과 같이 CDC 활성의 백분율을 계산하였다: % CDC 활성 = [(RFU 시험 - RFU 배경) / (총 세포 용해물에서 RFU -

RFU 배경)] x 100. 일반적으로, 활성화된 PMBC에 결합하는 IgG4mt10포맷의 항-PD-1 mAb에 의해 매개되는 어떠한 ADCC도 검출할 수 없다. 과민성 실험 조건 예를 들어, PD-1 고발현 세포주, 높은 혈청 및 항체 농도를 사용하여 몇몇 경우에 극히 낮은 수준의 CDC를 검출하였고, 다른 버전과 항-PD-1 mAb 사이에 큰 차이점은 없었으며, 이는 IgG4 변이체 포맷의 항-PD-1 mAb는 통상적 형태의 IgG4와 같이 낮은 CDC 활성 또는 CDC 활성을 나타내지 않는다는 특징을 보유하고 있음을 의미한다.

[0262] 실시예 10. IgG4mt10포맷의 인간화된 항-PD-1 mAbs는 스트레스 조건에서 향상된 안정성을 가진다

[0263] 고온 및 산성 조건에서 항-PD-1 항체의 안정성

[0264] 안정성 연구에 사용되는 항-PD-1 항체는 모두 앞선 항목에서 기술한 바와 같이, 단백질 A 컬럼에서 정제한다음, 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)로 정제하였다. 정제 이후, 분석적 SEC-HPLC (size exclusion chromatography-high performance liquid chromatography)로 정제된 항체 샘플 중 응집체의 함량을 모니터링하였고, 0%-0.5% 범위 내에 해당하였다.

[0265] SEC-HPLC 분석을 위해, TSKgel G3000 SWXL 컬럼 (7.8x300 mm, Cat. No. 08541, Tosoh Bioscience, Shanghai, China)를 사용하여 등용매 용출 조건 (용출 버퍼 0.2M 소듐 포스페이트, pH 7.2)하에서 항체 샘플을 분석하였고, 이후 UV-215nm에서 검출하였다. 각 회차의 실시 중, 10 마이크로리터의 항체 샘플을 컬럼에 로딩하고 1mL/분의 유속으로 용출하였다. 단일 물질로부터 항체의 이합체 또는 더 큰 응집체 물질을 분리하고, 이합체 또는 응집체의 백분율은 UV 궤적에서 합산 피크 영역에 기초하여 측정하였다.

[0266] 속도가 향상된 선반 안정성 연구를 위해, 항-PD-1 항체 (PBS 중 10-40mg/mL)를 고온 조건에서 항체의 안정성을 시험하기 위해 인큐베이터에서 40-50°C로 4-7일간 보관하였다. 이후 항체 샘플을 SEC-HPLC로 열 유도에 의해 형성된 이합체 및 응집체에 대하여 분석하였다. 분석된 항-PD-1 항체 각각에 대하여, 2% 미만인 더 큰 분자량 물질 (이합체 및 응집체)이 되었고, 이는 고온 조건에서 항-PD-1 항체가 우수한 안정성을 가짐을 의미한다.

[0267] 산성 조건에서 항체의 안정성은 다운스트림 제조 공정에서 주요한 문제가 되어왔다 (Liu et al. 2010 mAbs 2:480-499). 단백질 A로부터 항체 용출 및 바이러스 불활성화는 대개 낮은 pH (2.5-4) 조건에서 항체의 인큐베이션을 요구한다. 그러나, 이러한 산성 조건은 잠재적으로 항체의 변형 및 응집을 야기할 수 있다. 인간 IgG4는 IgG1 및 IgG2 보다 덜 안정적인 것으로 알려져 있다 (2002 Immunology 105:9). 따라서, 다양한 IgG4 변이 형태로 제작된 인간화 mAb를 어세이하였다. 간략하게, 50 mM 소듐 사이트레이트, 100mM NaCl을 포함하는 낮은 pH 버퍼를 각 항체 샘플 (PBS 중 10 mg/mL)과 1:1 부피로 혼합하여, pH 3.6, 3.3, 3.0 또는 2.7각각에서 낮은 pH 조건 중 항체 안정성을 연구하였다. 실온에서 1시간 인큐베이션 한 후, 0.2M 소듐 포스페이트를 포함하는 1:5로 희석한 pH7.2 SEC-HPLC 용출 버퍼로 낮은 pH 조건의 항체 샘플을 중화하였다. 앞서 언급한 바와 같이 SEC-HPLC 분석을 수행하였고, 낮은 pH 조건에 의해 유도된 이합체 및 응집체의 백분율을 정량하였다. IgG1포맷의 항-PD-1 mAb 317-4B6이 바이오공정 관련 산성 조건에 가장 안정하였고, 심지어 pH값이 2.7로 낮아진 경우에도 안정하였다. 제조된 수개의 IgG4 변이체의 항-PD-1 mAb 중에서, 산 유도 응집체가 항-PD-1 mAb의 IgG1 포맷 317-4B6 및 326-4A3에 상응하는 정도로 현저하게 감소, 즉 수용성 응집체가 2% 미만 (표 21)이기 때문에, hu317-4B6/IgG4mt10 및 hu326-4A3/IgG4mt10이 산성 버퍼 조건에서 가장 안정하였다 (표 21).

[0268] 표 21. 산성 버퍼에서 형성된 이합체 및 수용성 응집체 및 SEC-HPLC로 어세이

항-PD-1 mAb	이합체 및 응집체 %				
	pH7.2	pH3.6	pH3.3	pH3.0	pH2.7
317-4B6/IgG1	0.0%	0.0%	0.2%	0.1%	0.2%
317-4B6/IgG4mt1	0.0%	1.0%	11.0%	49.0%	48.0%
317-4B6/IgG4mt3	0.0%	13.0%	31.0%	>50%	>50%
317-4B6/IgG4mt6	0.0%	4.0%	41.0%	>50%	>50%
317-4B6/IgG4mt9	0.0%	0.5%	2.1%	3.3%	2.0%
317-4B6/IgG4mt10	0.0%	0.2%	0.6%	0.6%	1.4%
326-4A3/IgG4mt10	0.0%	0.0%	0.4%	0.5%	1.2%

[0269]

[0270] 실시예 11. 항-PD-1 mAb의 결합 에피토프 매핑

[0271]

PD-1/PD-L1 및 PD-1/PD-L2 복합체의 결정 구조에 대한 이전 보고는 리간드 결합에 요구되는 PD-1의 주요 아미노산 잔기를 명확하게 이해할 수 있게 하였다 (Zhang et al. 2004 Immunity, 20:337-347; Lin D.Y. et al. 2008 PNAS 105:3011-3016; Lazar-Molnar E. et al. 2008 PNAS, 105:10483-10488). 실제로, 이러한 아미노산 잔기 중 6개는 PD-L1 결합에 요구되는 점 변이 분석을 통해 수용체 상에서 확인되었다. 6개의 AA 잔기 중 5개도 PD-L2 결합에 필요하였다 (Lin D.Y. et al. 2008 PNAS 105:3011-3016). 구조 유래 변이 분석으로부터의 정보에 기반하여, 기능적 mAb가 PD-1 매개 신호를 차단하도록 하기 위한 가장 효과적인 방법은 6개의 주요 AA 잔기에 결합하여 PD-1 리간드와 경쟁함으로써, 리간드 결합에 요구되는 결합 에피토프를 차지하는 것으로 가설을 세웠다. 가설을 검증하고 기능적 PD-1 항체에 의한 활성 메커니즘을 이해하기 위하여, 6개의 주요 AA 각각을 Ala으로 치환하여 즉, K45A, I93A, L95A, P97A, I101A 및 E103A (Lin D.Y. et al. 2008 PNAS 105:3011-3016에 근거한 AA 잔기 넘버링)의 6개 PD-1 변이체를 제작하였다. Fast Mutagenesis System (Cat. No. FM111, Transgen Biotech, Beijing, China)을 사용한 PCR-가이드 변이법 또는 롤링 서클 변이법 (rolling-circle mutagenesis)을 위해 변이 PD-1/Fc 및 PD-1/His (도 1)을 템플레이트로 사용하였다. pcDNA-기반 발현벡터에 모든 변이를 서브클로닝하고, 시퀀싱에 의해 검증하였다. 변이된 PD-1 단백질 및 야생형 PD-1 단백질은 일시적 형질감염에 의해 발현되었고 (실시예 1에 기술됨), 배양 4-6일 후에 준비하였다. 웨스턴 블랏으로 CM (conditioned media)을 분석하여 정량 및 정성 측면에서 PD-1 단백질 발현을 검증하였다. 세포 잔해물을 제거한 후, 상등액 (CM)을 에피토프 매핑을 위해 ELISA 분석 또는 웨스턴 블랏에 바로 사용하였다.

[0272]

인간화 항-PD-1 mAb의 결합 에피토프를 연구하기 위해, 야생형 (WT)과 변이 (Mt) PD-1을 사용하여 ELISA 어세이를 수행하여, hu317-4B5, hu317-4B6, hu326-3B1 및 hu326-4A3의 결합 활성을 평가하였다. 항체 결합 특징의 고유성을 검토하기 위한 비교를 위해, 2개의 레퍼런스 항체 (US8008449B2 및 US8168757B2 각각으로부터 레퍼런스 Ab-1 및 레퍼런스 Ab-2)를 연구에 포함하였다. 동일 ELISA 어세이에서 모든 mAb를 위해, 96-웰 플레이트에 WT 또는 Mt PD-1을 포함하는 동일 부피의 CM을 코팅하였다. WT PD-1 결합 신호의 평균 ELISA 리딩값을 표준으로 사용하여, 모든 ELISA 결과를 정규화하였다. 특정 Mt PD-1에 대한 ELISA 결합 신호는 가장 높은 항체 결합 리딩값 (100%로 설정)에 대하여 추가로 정규화하였다. 데이터 분석의 편의성을 위하여, 특정 변이에 대한 mAb의 ELISA 결합 신호가 WT PD-1에 대하여 50% 미만으로 떨어지면, 아미노산 잔기는 변이에 의해 항체 결합이 현저하게 제거된 것이므로, 중요한 결합 에피토프로 정의된다. 마찬가지로, 특정 변이에 대한 mAb의 ELISA 결합 신호가 25% 미만으로 떨어지면, 매우 중요한 것으로 정의된다. 도 8에 나타난 바와 같이, PD-1에서 2개의 주요 AA 잔기인 K45 및 I93은 mAbs hu317-4B5 및 hu317-4B6 결합에 중요한 또는 매우 중요한 에피토프이고, 3개의 AA 잔기 I93, L95 및 P97은 hu326-3B1 및 hu326-4A3에 대하여 중요한 또는 매우 중요한 에피토프이다. 한편, 2개의 레퍼런스 항체는 구별되는 결합 에피토프를 가지며, P97은 레퍼런스 Ab-1에 대하여 중요한 반면, L95와 P97은 레퍼런스 Ab-2에 대하여 중요하다.

[0273]

흥미롭게도, 웨스턴 블랏에서 PD-1 단백질이 변형되면, mAb hu317-4B5와 -4B6는 주요 결합 에피토프 (K45 및 I93)가 서로 근접하지 않음 (비선형)에도, WT PD-1에 여전히 결합 가능하다. PD-1 단백질은 웨스턴 블랏 과정의

SDS-PAGE에서 변형된 후에 어느 정도 복원됨을 의미하며, 항-PD-1 mAb가 이를 인지하고 결합할 수 있도록 한다. 이러한 관찰 결과를 활용하기 위해, 위 ELISA 연구에 사용된 모든 6가지 항체에 대한 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다. 웨스턴 블랏에서의 전반적 결과는 ELISA 결과와 매우 잘 보완되었고, 즉 중요하거나 매우 중요한 에피토프가 변이되면 ELISA에서 낮은 결합 신호가 야기되고, 기타 변이 PD-1에의 결합과 비교하여 가장 약한 웨스턴 블랏 밴드를 나타낸다 (도 8). ELISA와 웨스턴 블랏 사이에 작은 몇몇 차이도 관찰되었고, 예를 들어 레퍼런스 Ab-2에 의한 I93A 및 E103A에 대한 ELISA 결합 신호는 웨스턴 블랏에서보다 상대적으로 더 강하였다. 이러한 AA 잔기는 또한 스트레스 조건 (즉, 변형 또는 원래의 입체구조 소실)일지라도 변이에 의해 결합에 영향을 미칠 수 있기 때문에 결합에 기여할 수 있음을 의미할 수 있다. 표 22에 요약된 바와 같이, 본 발명에서의 항-PD-1 mAb는 다른 항-PD-1 항체와 상이한 식별가능한 결합 에피토프를 가진다.

[0274] 표 22. 항-PD-1 mAb에 대한 주요 에피토프 요약

	K45A	I93A	L95A	P97A	I101A	E103A
hu317-4B5	***	**				
hu317-4B6	***	**				
hu326-3B1		**	**	**		
hu326-4A3		***	**	**		
Ref. Ab-1				**		
Ref. Ab-2			**	**		
* 도 8 기반						

[0275]

[0276] 실시예 12. 항-PD-1 mAb는 1차 인간 PBMC 활성화하고 이종이식 마우스 모델에서 종양 성장을 억제한다

[0277] 인간화 항-PD-1 mAb는 인간 PBMC를 활성화한다

[0278] 인간화 과정을 통해, ELISA, FACS 및 면역세포 기반 사이토카인 방출 어세이에 의해 평가된 바와 같이, 다양한 단계에서의 인간화 항-PD-1 mAb는 유사한 기능적 활성을 보유하였다. 최종 버전의 인간화 mAb에 대한 기능을 확인하기 위해, 1차 인간 PBMC를 사용하여 hu317-4B5, hu317-4B6, hu326-3B1 및 hu326-4A3의 활성화 기능을 어세이하였다. 그 결과에 의해, 개인의 유전적 배경에서의 차이로 인한 4명 공여자 사이의 활성화 정도가 다를지라도, 이러한 mAb가 인간화 과정에서 1차 PBMC를 활성화하는 원래의 마우스 mAb 기능을 유지함을 입증하였다 (도 9).

[0279] 인간화 항-PD-1 mAb는 암 세포에 대한 NK 세포 기반 세포독성을 향상시킨다

[0280] 원래의 마우스 mAb를 보면, 인간화 항-PD-1 mAb인 hu317-4B5, hu317-4B6, hu326-3B1 및 hu326-3G1는 표적 폐암 세포 SK-MES-1/PD-L1에 대한 NK92MI/PD-1 세포 매개 세포독성을 투여량 의존적 방식으로 향상시킨다 (도 10, 표 23). 이론적으로 인간화 항-PD-1 mAb는 PD-1 신호에 의해 매개되는 면역세포 내성을 파괴하여 면역세포 예를 들어 NK세포 및 세포독성 T-림프구에 의한 살해 활성을 향상시키는 기능을 할 수 있음이 명확한 것처럼 보인다.

[0281] 인간화 항-PD-1 mAb는 인간 PBMC를 활성화하고, 마우스 이종이식 종양 모델에서 *in vivo* 종양 성장을 억제한다

[0282] 위 모든 실험적 증거는 인간 암 세포로 이종이식하고, 이후 인간 PBMC 이식한 다음 암세포 성장을 *in vivo* 저해하기 위한 mAb 처리를 적용한 면역 부전 마우스를 사용하여 마우스 암 모델에서, 항-PD-1 mAb가 작용할 수 있음을 의미하였다. 다음과 같이 실험을 설계하였다. 8주령 SCID-수컷 마우스(Vital River Laboratories, China) 7마리의 우측 옆구리에 50% Matrigel (BD Biosciences, New Jersey, USA)의 Hep3B/OS8-PD-L1 세포 3x10⁶을 피하 접종하였다. 종양 접종 15일 후, 100-250 mm³ 사이의 종양 크기를 가지는 마우스를 임의 선택하고, 3개 처리군으로 분류하였다. 2명의 건강한 공여자로부터 100 마이크로리터의 모인 PBMC (5x10⁵)를 종양 내로 주사하였다. PBMC 이식 3일 후, 항-PD-1 항체 (Hu317-IgG4mt2) 및 인간 IgG를 10 mg/kg의 투여량으로 각각 s.c.를 통해 투여하였다. 항체 처리는 총 3회 매 10일마다 1회 반복하였다. 음성 대조군으로서 병렬군에 PBS를 주사하였다. 7일에 시작하여 측정 양각기를 사용하여 1주일에 2회 종양을 측정하였다. 종양 부피는 다음의 식을 사용하여 측

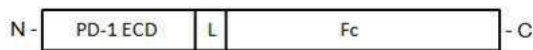
정하였다: $[D \times (d^2)]/2$, 여기서 D 는 종양의 장직경을 나타내고, d 는 단직경을 나타낸다. 모든 동물 연구는 Beigene Animal Care 및 사용 절차에 따라 수행하였다.

[0283]

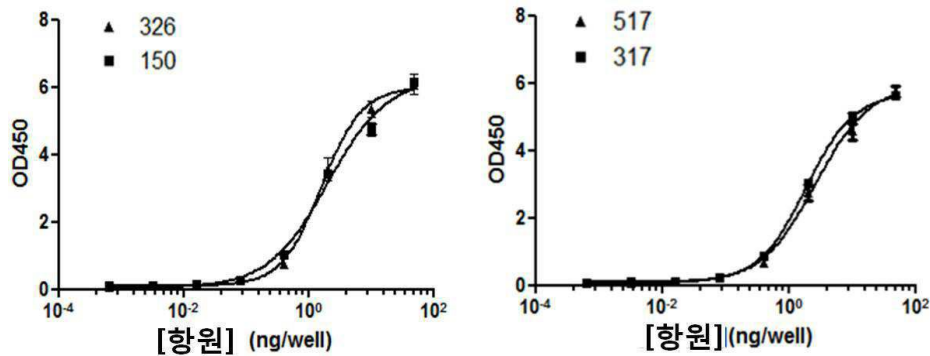
in vivo 연구에서, 대조군의 60% 종양이 자동 퇴행되었을지라도, 나머지 *in vivo* 실험에서는 여전히 상당한 정보를 제공하며, 도 11에 제시되었다. 대조군에서, 비히클 처리 또는 인간 IgG (huIgG)-처리군 중 어느 하나는 각각 시작점에서의 기준선보다 더 크게 자라는 40% 종양 (5 마우스 중 2)을 가진다. PBS-처리군에서 2개의 종양은 훨씬 더 크게 자랐다 (2,000 mm³ 초과, 종양 포함 마우스 한마리는 프로토콜에 의한 종양 사이즈 제한을 초과하여 조기 종결하였다). huIgG처리군에서 2개의 종양은 800 및 1,370 mm³의 크기로 자랐으며, PBS 처리 종양보다 더 작지만 평균 기준선인 164 mm³를 상당히 초과한다. 한편, 항- PD-1 mAb (hu317-1/IgG4mt2) 처리군에서, 종양은 완전히 퇴행하였거나, 기준선 크기로 근접하였다 (하나의 종양=200 mm³, PBMC 이식으로부터 2주에 기준선의 50%로 퇴화된 후 다시 천천히 자랐다). 결과는 앞서 언급한 항-PD-1 mAb가 마우스 *in vivo* 암 모델에서 종양세포 성장을 억제할 수 있는 인간 면역세포를 활성화할 수 있음을 의미하며, 이는 앞서 언급한 *in vitro* 실험 결과와 일치한다.

도면

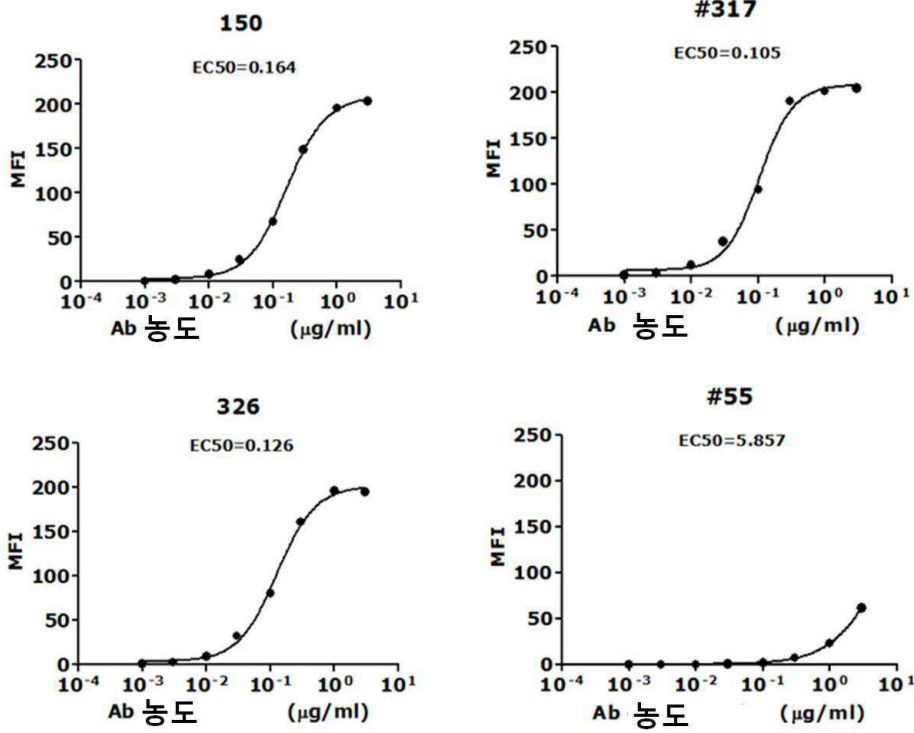
도면1



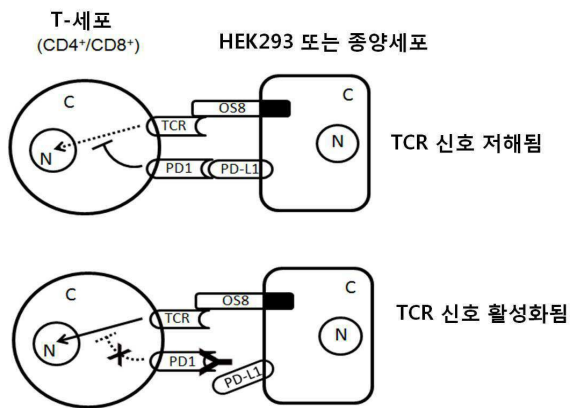
도면2



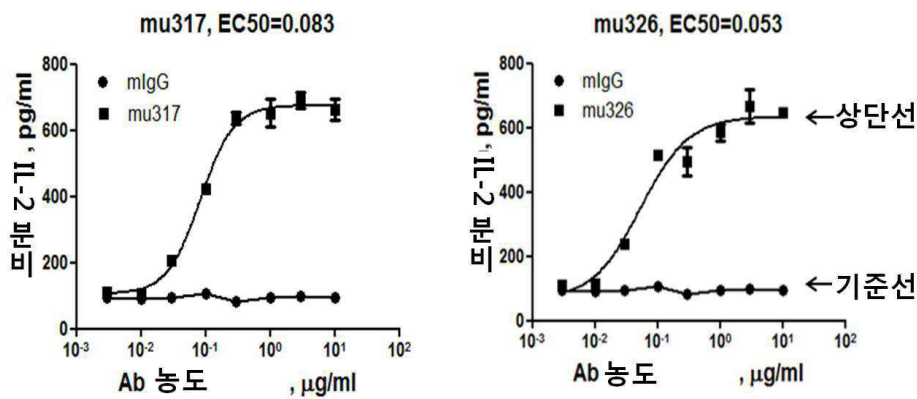
도면3



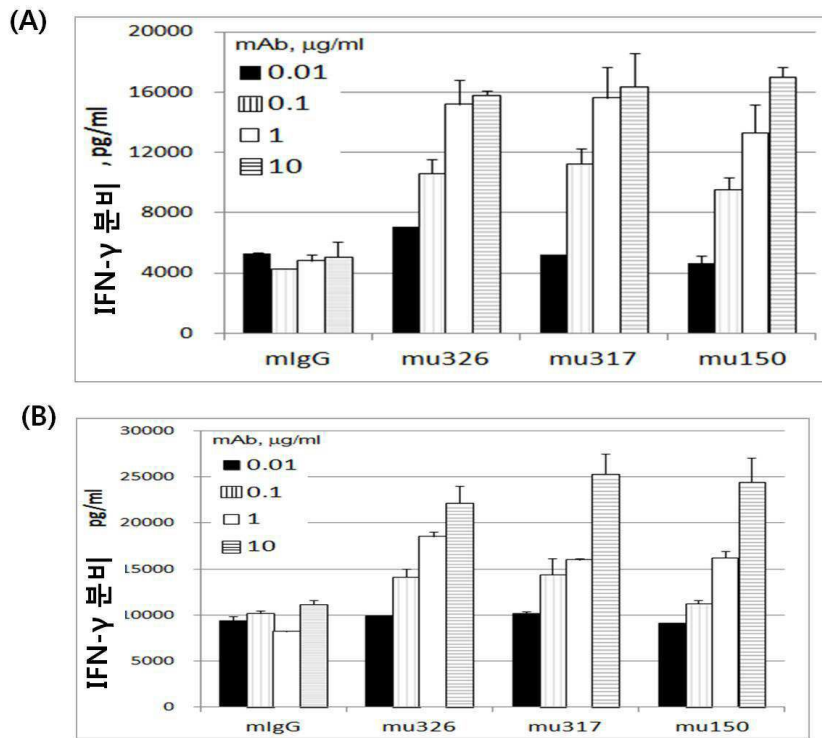
도면4



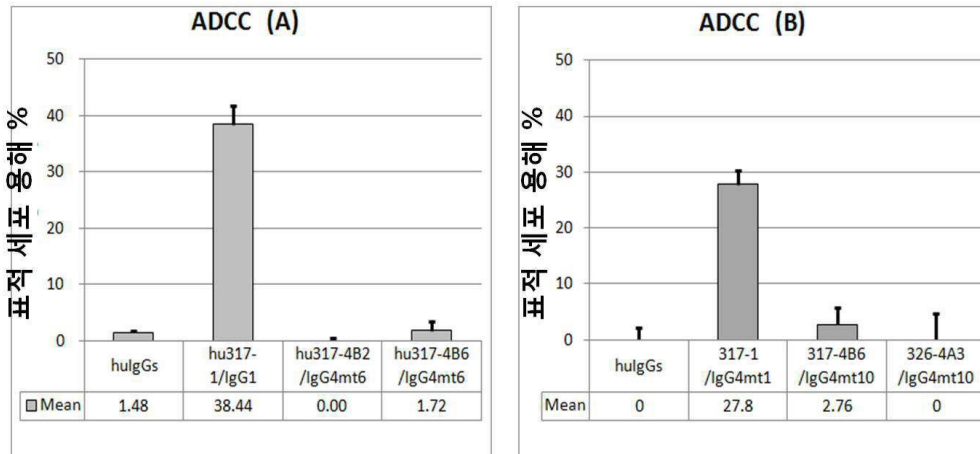
도면5



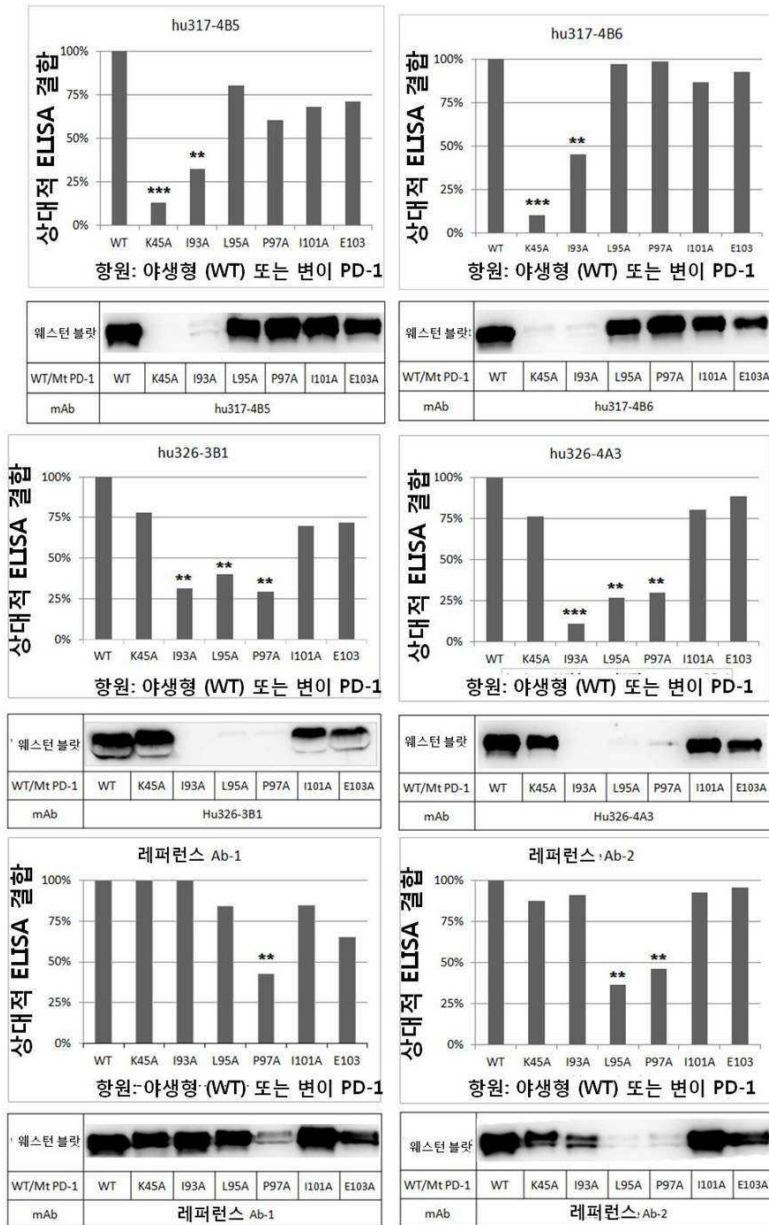
도면6



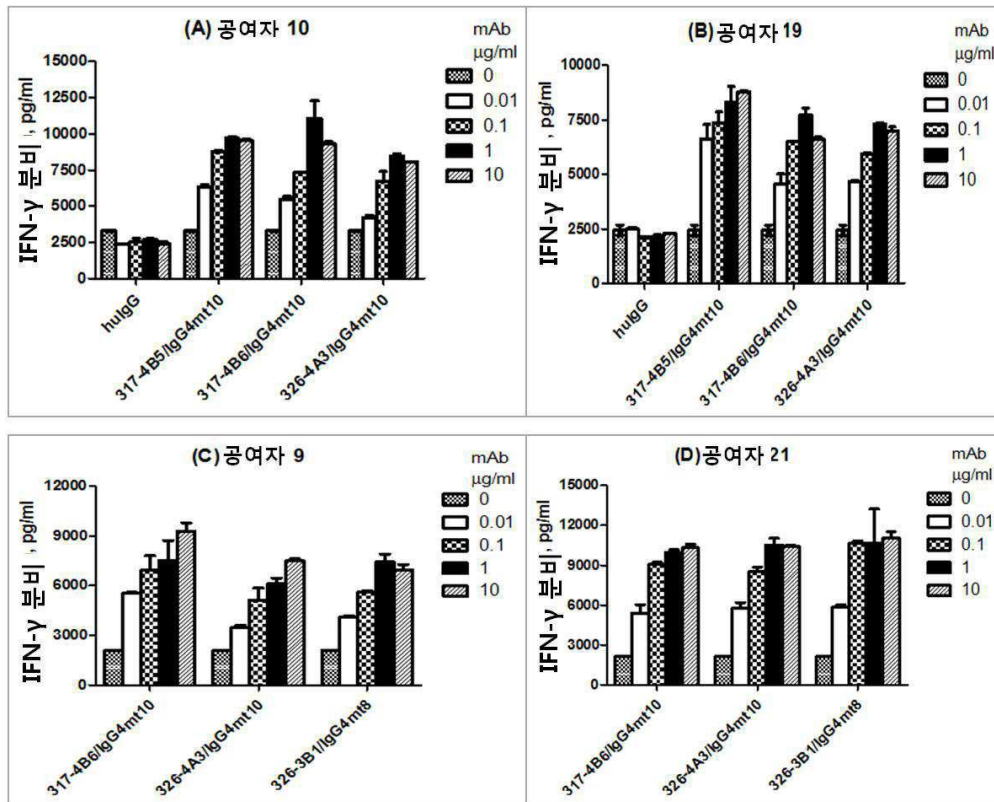
도면7



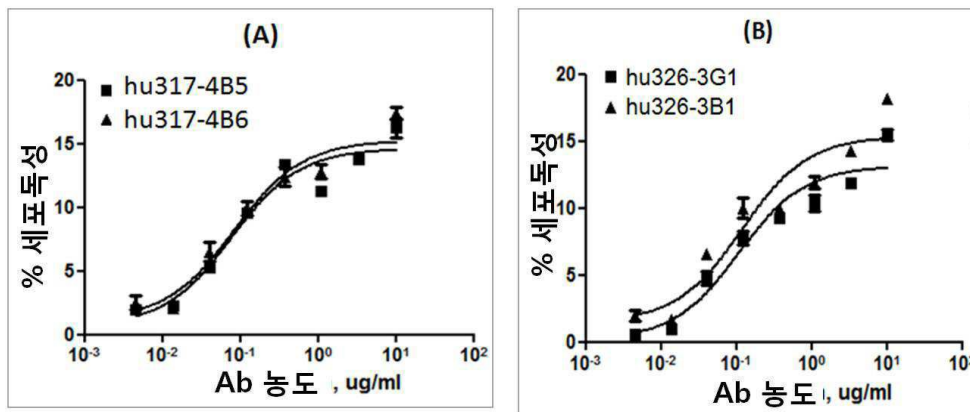
도면8



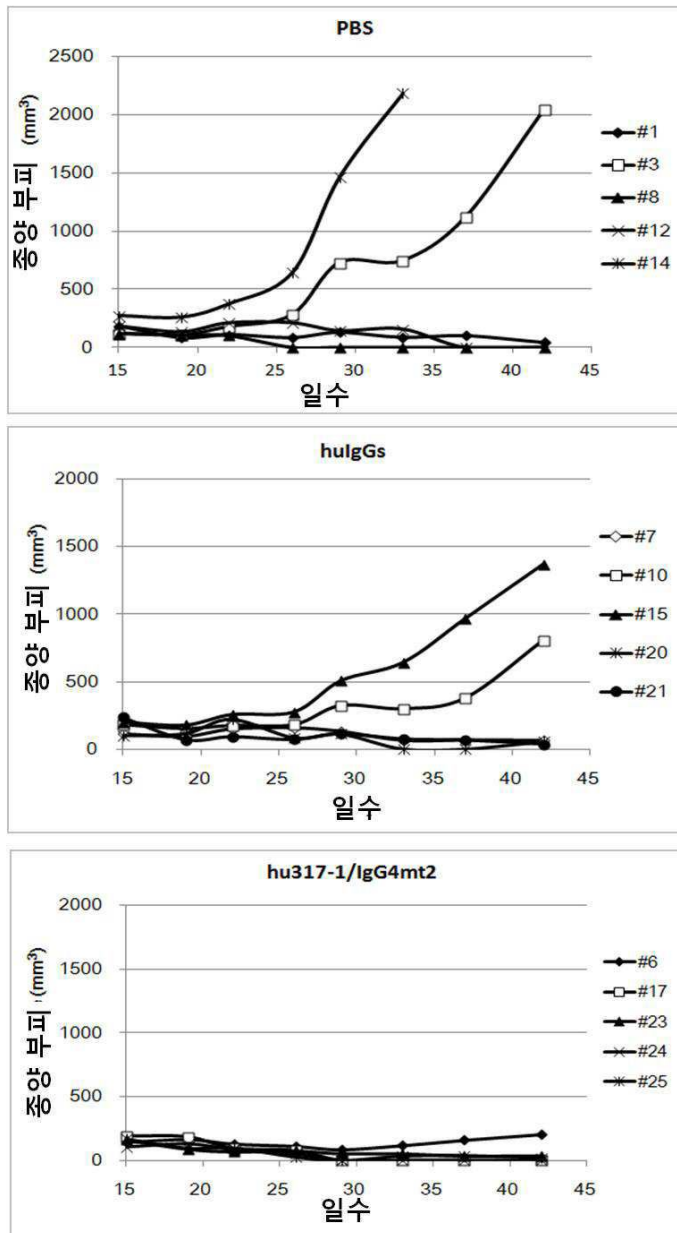
도면9



도면10



도면11



서열목록

- <110> BeiGene
- <120> ANTI-PD1 ANTIBODIES AND THEIR USE AS THERAPEUTICS AND DIAGNOSIS
- <130> 067
- <160> 90
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 444
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens

<400> 1
 ccaggatggt tcttagactc cccagacagg ccctggaacc cccccacatt ctccccagcc 60
 ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg 120
 gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 180
 gccttccccg aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg 240

 cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggcc ggcgcaatga cagcggcacc 300
 tacctctgtg gggccatctc cctggcccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca 360
 gagctcaggg tgacagagag aaggcagaa gtgcccacag cccaccccag cccctcacc 420
 aggccagccg gccagttcca aacc 444

<210> 2
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
 1 5 10 15

 Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
 20 25 30
 Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
 50 55 60
 Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
 65 70 75 80
 Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
 85 90 95
 Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
 100 105 110
 Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
 115 120 125
 Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
 130 135 140

Gln Phe Gln Thr

145

<210> 3

<211> 354

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

```

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcaaagaa cctgtccatc      60
acttgcactg tcctcgggtt ttcattaacc agctatgggtg tacactggat tcgccagcct      120
ccaggaaagg gactggaatg gctgggagta atatgggccg gtggaagcac aaattataat      180
tcggctctca tgtccagact gagcatcagc aaagacaact ccaggagcca agttttctta      240
agaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatgtact actgtgccag agcctatggt      300
aactactggt acatcgatgt ctggggcgca gggaccacgg tcaccgtctc ctca          354
    
```

<210> 4

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 5

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 5

gacattgtga tgaccagac tcccaaattc ctgcttgat cagcaggaga cagggttacc 60
 ataacctgca aggccagtc gagtgtgagt aatgatgtag cttggtacca acagaagcca 120
 gggcagtctc ctaaactgct gataaactat gcatttcac gttcactgg agtcctgat 180
 cgtttcactg gcagtggata tgggacggat ttcattttca ccatcagcac tgtgcaggct 240
 gaagacctgg cagtttattt ctgtcaccag gcttatagtt ctccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggaaatgaa a 321

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Asn Tyr Ala Phe His Arg Phe Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Ile Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys His Gln Ala Tyr Ser Ser Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
 100 105

<210> 7
 <211> 342
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 7
 cagatccagt tggatgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60
 tcctgcaagg ctctcgggta taccttcaca aactatggaa tgaactgggt gaagcaggct 120

 ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacaata ataatggaga gccaacatat 180
 gctgaagagt tcaagggacg gtttccttc tctttggaaa cctctgccag cactgcctat 240
 ttgcagatca acaacctcaa aatgaggac acggctacat atttctgtgc aagagatgtt 300
 atggactatt ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcct ca 342

<210> 8
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 8
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

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

 85 90 95
 Ala Arg Asp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser

<210> 9
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 9
 gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
 atatcctgca gagccagtga aagtgttgat aattatggct atagttttat gcactggtac 120
 cagcagaaac caggacagcc accccaactc ctcatctatc gtgcatcaa cctagaatct 180

gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag gcttcaccct caccattaat 240
 cctgtggagg ctgatgatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagtaaaga atatccgacg 300
 ttcggtggag gcaccaagct ggaagtcaaa 330

<210> 10
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 10
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr

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

Glu Tyr Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys
 100 105 110

<210> 11
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 11
 Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val His
 1 5 10

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser
 1 5 10 15

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Ala Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val
 1 5 10

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala
 1 5 10

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Tyr Ala Phe His Arg Phe Thr
 1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213>

Mus musculus

<400> 16

His Gln Ala Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn

1 5 10

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Trp Ile Asn Asn Asn Asn Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211

> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Ala Arg Asp Val Met Asp Tyr

1 5

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Tyr Ser Phe Met His

1 5 10 15

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213>

> Mus musculus

<400> 22

Gln Gln Ser Lys Glu Tyr Pro Thr

1 5

<210> 23

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 317-4B6 cDNA-Vh

<400> 23

caggtgcagc tgcaggagtc gggaccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgactg tctctgggtt ttcatataacc agctatggtg tacactggat ccggcagccc 120

ccaggaagg gactggagtg gatcggggtc atatacaccg atggaagcac aaattataat 180

ccctccctca agagtcgagt gaccatatca aaagacacct ccaagaacca ggtttccctg 240

aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agcctatggt 300

aactactggt acatcgatgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 24

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 317-4B6 pro-Vh

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Tyr Ala Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 25

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 317-4B6 cDNA-Vk

<400> 25

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcca gagggccacc 60

atcaactgca agtccagcga gagtgtgagt aatgatgtag cttggtacca gcagaaacca 120

ggacagcctc ctaagctgct cattaactat gcatttcac gttcactgg ggtccctgac 180

cgattcagtg gcagcgggta tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcaggct 240

gaagatgtgg cagtttatta ctgtcaccag gcttatagtt ctccgtacac gtttgccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 317-4B6 pro-Vk

<400> 26

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Glu Ser Val Ser Asn Asp

20 25 30

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

35 40 45

Asn Tyr Ala Phe His Arg Phe Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Ala Tyr Ser Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 27

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 326-4A3 cDNA-Vh

<400> 27

caggtgcagc tgggtgcagag cggcagcgag ctgaagaagc cgggcgccag cgtgaaggtg 60

agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc aactacggca tgaactgggt gagacaggcc 120

cccggccagg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacaaca acaacgccga gcccacctac 180

gcccaggact tcagaggcag attcgtgttc agcctggaca ccagcggcag caccgcctac 240

ctgcagatca gcagcctgaa gaccgaggac accgccgtgt actactgcmc cagagacgtg 300

atggactact ggggccaggg caccctggtg accgtgagca gc 342

<210> 28

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 326-4A3 pro-Vh

<400> 28

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Asn Asn Asn Ala Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Asp Phe
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

<210> 29

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 326-4A3 cDNA-Vk

<400> 29

gacattgtgc tgaccagtc tccagcctcc ttggccgtgt ctccaggaca gagggccacc 60
 atcacctgca gagccagtga aagtgtgat aattatggct atagttttat gcaactggtat 120
 cagcagaaac caggacaacc tctaaactc ctgatttacc gtgcatcaa cctagaatct 180
 ggggtcccag ccaggttcag cggcagtggg tctgggaccg attcacct cacaattaat 240
 cctgtggaag ctgaggatag tgcaaattat tactgtcagc aaagtaaga atatccgacg 300
 ttcggcggag ggaccaaggt ggagatcaaa 330

<210> 30
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 326-4A3 pro-Vk
 <400> 30
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ala Glu Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95
 Glu Tyr Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 31
 Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val His
 1 5 10

<210> 32
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 317-4B6 H-CDR2 or CDR-H2
 <400> 32

Val Ile Tyr Ala Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15
 <210> 33
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 33

Ala Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val

1 5 10
 <210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 317-4B6 L-CDR1 or CDR-L1
 <400> 34

Lys Ser Ser Glu Ser Val Ser Asn Asp Val Ala

1 5 10
 <210> 35
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 35

Tyr Ala Phe His Arg Phe Thr

1 5
 <210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 36

His Gln Ala Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr

1 5
 <210> 37
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 37
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
 1 5 10

<210> 38
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 326-4A3 H-CDR2 or CDR-H2
 <400> 38

Trp Ile Asn Asn Asn Asn Ala Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Asp Phe Arg
 1 5 10 15
 Gly

<210> 39
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Mus musculus
 <400> 39
 Ala Arg Asp Val Met Asp Tyr
 1 5

<210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 40

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Tyr Ser Phe Met His
 1 5 10 15
 <210> 41
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 41

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400

> 42

Gln Gln Ser Lys Glu Tyr Pro Thr

1 5

<210> 43

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 317-4B2 pro-Vh

<400> 43

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 44

<211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 317-4B2 pro-Vk
 <400> 44
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Glu Ser Val Ser Asn Asp
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

<210> 45
 <211> 118
 <212> PRT
 <
 213> Artificial Sequence
 <220><223> 317-4B5 pro-Vh
 <400> 45
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Val Ile Tyr Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

<220><223> 317-1 cDNA-Vh

<400> 47

```

caggtgcage tgcaggagtc gggaccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc      60
acctgcaactg tcctcgggtt ttcattaacc agctatggtg tacactggat cgggcagccc      120
ccaggaagg gactggagtg gctgggggtc atatgggccg gtggaagcac aaattataat      180
ccctccctca agagtcgact gaccatatca aaagacaact ccaagagcca ggtttccctg      240
aagatgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag agcctatggt      300
aactactggt acatcgatgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca          354
    
```

<210> 48

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 317-1 pro-Vh

<400> 48

```

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

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

<210> 49

<211> 321

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220
 ><223> 317-1 cDNA-Vk
 <400> 49
 gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgca aggccagcca gagtgtgagt aatgatgtag cttggtacca gcagaaacca 120
 ggacagcctc ctaagctgct cattaactat gcatttcatc gttcactgg ggtccctgac 180
 cgattcagtg gcagcgggta tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcaggct 240
 gaagatgtgg cagtttatta ctgtcaccag gcttatagtt ctccgtacac gtttggcggg 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 50
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 317-1 pro-Vk
 <400> 50
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Asn Tyr Ala Phe His Arg Phe Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Ala Tyr Ser Ser Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 51
 <211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 326-3B1 pro-Vh

<400>

51

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 52

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 326-3B1 pro-Vk

<400> 52

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

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

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

Pro Val Glu Ala Asn Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95

Glu Tyr Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 53

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 326-3G1 pro-Vh

<400> 53

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

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

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Asn Asn Asn Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Asp Phe
 50 55 60

Arg Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

<210> 54

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 326-3G1 pro-Vk

<400> 54

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asn Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys

85 90 95

Glu Tyr Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 55

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 326-1 cDNA-Vh

<400> 55

caggtgcagc tgggtgcagag cggcagcgag ctgaagaagc cgggcgccag cgtgaaggtg 60

agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc aactacggca tgaactgggt gagacaggcc 120

cccgccagg gcctggagtg gatgggctgg atcaacaaca acaacggcga gcccacctac 180

gcccagggtc tcagaggcag attcgtgttc agcctggaca ccagcggcag caccgcctac 240

ctgcagatca gcagcctgaa gaccgaggac accgccgtgt acttctgcgc cagagacgtg 300

atggactact ggggccaggg caccaccgtg accgtgagca gc 342

<210> 56

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 326-1 pro-Vh

<400> 56

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Asn Asn Asn Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

<210> 57

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 326-1 cDNA-Vk

<400> 57

gacattgtgc tgaccagtc tccagcctcc ttggccgtgt ctccaggaca gagggccacc 60
 atcacctgca gagccagtga aagtgtgat aattatggct atagttttat gcaactggtat 120
 cagcagaaac caggacaacc tctaaactc ctgatttacc gtgcatcaa ctagaatct 180
 ggggtcccag ccaggttcag cggcagtggg tctaggaccg attcacct cacaattaat 240
 cctgtggaag ctaatgatac tgcaaattat tactgtcagc aaagtaaga atatccgacg 300
 ttcggcggag ggaccaaggt ggagatcaaa 330

<210> 58
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> 326-1 pro-Vk

<400> 58

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asn Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys

85 90 95

Glu Tyr Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 59
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> 317-1 H-CDR2 or CDR-H2

<400> 59

Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 60

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 317-4B2 H-CDR2 or CDR-H2

<400> 60
 Val Ile Tyr Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<

<210> 61

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 317-4B2 L-CDR1 or CDR-L1

<400> 61

Lys Ser Ser Glu Ser Val Ser Asn Asp Val Ala
 1 5 10

<210> 62

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 326-1 H-CDR2 or CDR-H2

<400> 62

Trp Ile Asn Asn Asn Asn Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe Arg
 1 5 10 15

Gly

<210> 63

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 326-3G1 H-CDR2 or CDR-H2

<400> 63

Trp Ile Asn Asn Asn Asn Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Asp Phe Arg
 1 5 10 15

Gly

<210> 64

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 317-3A1 pro-Vh

<400> 64

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 65

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 317-3C1 pro-Vh

<400> 65

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 66
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 317-3E1 pro-Vh
 <400> 66

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

35 40 45
 Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 67
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 317-3F1 pro-Vh
 <400> 67

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

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

115

<210> 68
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 317-3G1 pro-Vh
 <400> 68

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 69

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 317-3H1 pro-Vh

<400> 69

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 70

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 317-3I1 pro-Vh

<400> 70

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 71

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 317-4B1 pro-Vh

<400> 71

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser

115
 <210> 72
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 317-4B3 pro-Vh
 <400> 72

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Val Ile Asn Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 73

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 317-4B4 pro-Vh

<400> 73

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Pro Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 74

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 317-4A2 pro-Vk

<400> 74

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

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

<210> 75
 <211> 114
 <212> PRT

<

213> Artificial Sequence
 <220><223> 326-3A1 pro-Vh
 <400> 75

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Asn Asn Asn Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

<210> 76

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 326-3C1 pro-Vh

<400> 76

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 77

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 326-3D1 pro-Vh

<400>

> 77

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

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

<210> 78
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 326-3E1 pro-Vh
 <400> 78

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

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

<210> 79
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 326-3F1 pro-Vh
 <400> 79

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

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

 85 90 95
 Ala Arg Asp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser

<210> 80
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 326-3B N55D pro-Vh

<400> 80
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Asn Asn Asp Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Asp Phe
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser

<210> 81

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 326-4A1 pro-Vk

<400> 81

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

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 Phe Glu 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> 84

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

huIgG4mt2 pro

<400> 84

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

Pro Val 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> 85

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> huIgG4mt6 pro

<400> 85

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

Pro Val 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

Ala 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> 86
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> huIgG4mt8 pro
 <400> 86
 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
 Pro Val 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
 Thr 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> 87
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> huIgG4mt9 pro

<400> 87

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
 Pro Val 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
 Ala 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
 Lys 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> 88
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> huIgG4mt10 pro
 <400> 88

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

Pro Val 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

Ala 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 Val 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

Lys 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> 89

<211> 367

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> OS8 pro

<400> 89

Met Glu Arg His Trp Ile Phe Leu Leu Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp

115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser

145 150 155 160

Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys

165 170 175

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240
 Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
 245 250 255
 Glu Ile Asn Ser Ser Val Val Pro Val Leu Gln Lys Val Asn Ser Thr
 260 265 270

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

 340 345 350
 Leu Val Arg Gln Glu Gly Lys Pro Arg Pro Ser Glu Lys Ile Val
 355 360 365

 <210> 90
 <211> 304
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> P3Z pro
 <400> 90

 Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
 1 5 10 15
 Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
 20 25 30

 Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
 35 40 45
 Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
 50 55 60
 Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala

