



등록특허 10-2647825



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년03월14일
(11) 등록번호 10-2647825
(24) 등록일자 2024년03월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2833 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-0110296
- (22) 출원일자 2021년08월20일
심사청구일자 2021년08월20일
- (65) 공개번호 10-2023-0015245
- (43) 공개일자 2023년01월31일
- (30) 우선권주장
1020210096685 2021년07월22일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌
JP2001506122 A
KR1020090125067 A
JP2008531032 A
- (73) 특허권자
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
- (72) 발명자
이은봉
서울특별시 강남구 압구정로 401, 55동 208호(압구정동, 한양아파트)
김미리암
서울특별시 서대문구 통일로 319, 106동 207호(홍제동, 홍제삼성래미안아파트)
- (74) 대리인
특허법인이름리온

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 최홍석

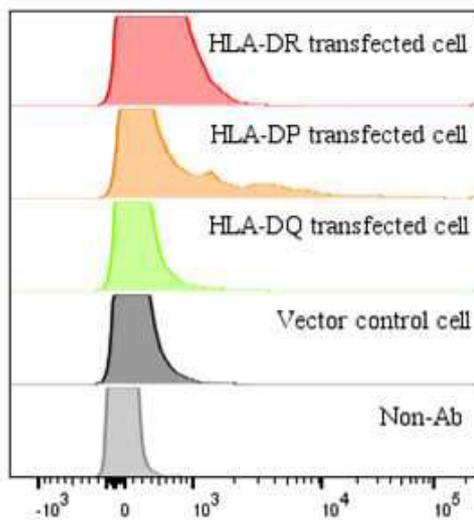
(54) 발명의 명칭 항-HLA-DP 단클론 항체 및 이의 용도

(57) 요약

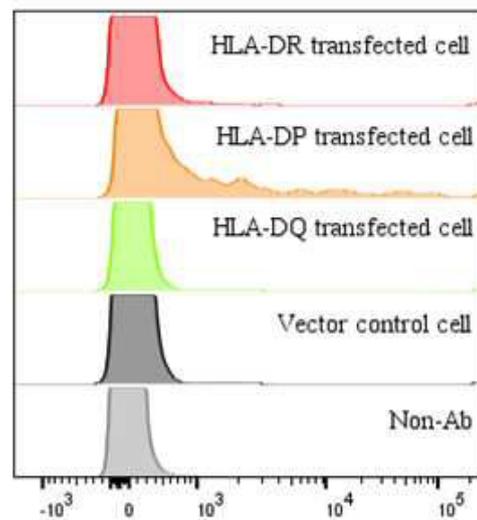
본 발명은 HLA-DP에 높은 친화력과 특이도로 결합하는 항-HLA-DP 단클론 항체 및 이의 용도에 관한 것으로, 상기 항체는 HLA-DQ나 HLA-DR과 교차 반응없이 높은 친화력으로 HLA-DP에 결합하는바, 면역 블롯팅 및 유세포 분석을 포함하는 *in vitro* 세포 기반 실험, *in vivo* 효능 실험에 다양한 용도로 활용이 가능하다.

대표도 - 도11

Commercial Antibody HLA-DPA1 (NB-A3)



HLA-DPA1 (13-4-1-26-14)



명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 CDR1, 서열번호 2의 CDR 2 및 서열번호 3의 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및
 서열번호 4의 CDR1, 서열번호 5의 CDR 2 및 서열번호 6의 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역;을 포함하는, HLA-DP
 에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 7의 중쇄 가변영역을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 서열번호 8의 경쇄 가변영역을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산.

청구항 5

제4항의 핵산 또는 이를 포함하는 발현 벡터로 형질전환된 세포.

청구항 6

다음 단계를 포함하는 HLA-DP에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조방법:

- (a) 제5항의 세포를 배양하는 단계; 및
- (b) 상기 배양된 세포에서 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 회수하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항-HLA-DP 단클론 항체 및 이의 용도에 관한 것으로, 더 상세하게는 HLA-DP에 높은 친화력과 특이도
 로 결합하는 항-HLA-DP 단클론 항체 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 주조직 적합성 복합체(MHC)는 유핵 세포의 표면에 발현되는 표면 단백질로, MHC는 다유전자 및 다형성을 특징으
 로 한다. 인간 백혈구 항원(HLA) 유전자는 인간의 MHC를 암호화하는 유전자로, 6번 염색체 상에 위치하며, HLA
 복합체는 멘델 유전 및 세포 표면의 공동 우성 발현에 따라 각 부모로부터 유전된다. HLA 복합체는 Class I과
 Class II로 분류되는데, Class I 및 Class II 분자는 구조적으로 상이하다. HLA Class I 분자는 β -미크로
 글로불린 쇠에 결합된 형태로 존재하며, HLA-A, -B, -C가 포함된다. HLA class II는 α 와 β 사슬 결합 형태로
 구성되며, HLA-DR, -DP, -DQ가 포함된다. 이렇게 구성된 HLA 유전자는 인간의 유전자 중 가장 다양한 다양성을
 지녀서 HLA 유전자의 조합으로 구성되는 HLA 일배체형(haplotype)은 면역 반응에서 자기(self)와 비자기(non-

self)를 구별하는 역할을 한다. 면역반응에서 HLA 복합체는 면역반응의 핵심 세포인 T 림프구에 항원을 제시하여 면역 반응을 유발하는 역할을 한다. 따라서 면역 반응에 관한 연구에서 HLA 복합체에 관한 연구는 핵심 연구 분야로 다양한 연구가 이루어져 왔다. 하지만 HLA Class II의 연구는 그동안 HLA-DR에 집중되어 왔으며, HLA-DP에 대한 연구는 최근 들어서 급격히 늘어나고 있다.

[0004] 한편, HLA-DP 유전자는 HLA-DPA1, -DPB1, -DPA2, -DPA3 및 DPB2를 포함한다. HLA-DP 유전자는 HLA-DPA1과 HLA-DPB1에 의해서 발현되고, HLA-DPA2, -DPA3, -DPB2는 실제로는 발현되지 않는 슈도유전자(HLA-DP related pseudogenes)이다. HLA-DP는 DPA1(알파쇄)과 DPB1(베타쇄)이 결합된 형태로 세포 표면에 발현된다. 약 9개 아미노산의 펩타이드가 HLA-DP 결합 부위에 로딩되어 항원 제시 세포(APC)에 제시된다. 일반적으로 HLA 클래스 II에서 HLA-DP에 의해 제시되는 펩타이드는 외인성 항원이며 CD4+ T 세포가 펩타이드-HLA 복합체를 인식하고 자극된다. IMGT/HLA 데이터베이스에 따르면 2021년 6월 현재 DRA, DRB1, DPA1, DPB1, DQA1 및 DQB1에는 각각 2, 2015, 107, 1106, 143 및 1303개의 단백질이 알려져 있다. 따라서 HLA-DP는 3개의 HLA 클래스 II 분자 중 가장 적은 다형성을 갖는다. HLA-DP는 다양한 질병과 유전적으로 연관되어 있는데, 자가면역 질환, 간염, 골수성 질환, 장기 이식 등이 포함된다. 자가면역질환으로는 류마티스 관절염, 진신흡반루푸스, 당뇨병, 그레이브스병(Graves' disease), 만성 베릴륨병(berylliosis), 소아 만성 관절염(Juvenile chronic arthritis), 사르코이드증(sarcoidosis), 아토피성 척수염(atopic myelitis), 다발혈관염(polyangiitis), 육아종증(granulomatosis) 등의 관련성이 보고되었다 (Diabetes 2010 Aug; 59(8): 2055-2062, Clin Rheumatol 2018 Jul;37(7):1799-1805. Scientific Reports 2017; 7: 39757).

[0005] HLA-DP 단백질의 결정 구조는 2010년에 확인되었고, 최근에는 HLA-DP에 대한 펩타이드와 질병 부하(disease loading) 간의 연관성에 대한 연구가 진행되고 있으나, HLA-DP는 다른 HLA 클래스 II 분자만큼 광범위하게 연구되지는 않은 실정이다. HLA 및 질병 메커니즘에 대한 연구를 위해서는 HLA-DP 분자의 특이적 분리, 검출 및 정제가 필요한데, 많은 양의 HLA-DP 분자를 정제하려면 특히 많은 양의 항체가 필요하다. 따라서, 본 발명자들은 HLA-DP를 특이적으로 검출할 수 있는 효과 좋은 항체를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 본 발명에 따른 HLA-DPA1에 특이적인 항체를 생산하는 단클론 하이브리도마 세포주를 제작하였고, 상기 세포주가 종래 HLA-DPA1에 비해 특이도가 향상된 항체를 생산할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) Diabetes 2010 Aug; 59(8): 2055-2062,
- (비특허문헌 0002) Clin Rheumatol 2018 Jul;37(7):1799-1805
- (비특허문헌 0003) Scientific Reports 2017; 7: 39757

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 HLA-DP에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 및 이의 용도를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 CDR1, 서열번호 2의 CDR 2 및 서열번호 3의 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및/또는 서열번호 4의 CDR1, 서열번호 5의 CDR 2 및 서열번호 6의 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역;을 포함하는, HLA-DP에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0010] 본 발명에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 7의 중쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0011] 본 발명에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 8의 경쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0012] 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산을 제공한다.

- [0013] 본 발명은 또한, 상기 핵산 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터로 형질 전환된 세포를 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는 HLA-DP에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조방법을 제공한다:
- [0015] (a) 상기 세포를 배양하는 단계; 및
- [0016] (b) 상기 배양된 세포에서 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 회수하는 단계.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 HLA-DP에 결합하는 항체는 HLA-DQ나 HLA-DR과 교차 반응없이 높은 친화력으로 HLA-DP에 결합하는 바, 면역 블롯팅 및 유세포 분석을 포함하는 *in vitro* 세포 기반 실험, *in vivo* 효능 실험에 다양한 용도로 활용이 가능할 뿐만 아니라, HLA-DP에 의해서 매개되는 다양한 면역 질환의 발병 기전 등을 연구하는데 다각적으로 활용이 가능할 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 한계희석법을 보여주는 모식도이다.
- 도 2는 단클론 항체 생산을 위한 하이브리도마 세포 생산의 모식도이다.
- 도 3은 HLA-DPA1의 뉴클레오티드 서열, 클로닝을 위해 코돈 최적화된 서열 및 이에 따른 아미노산 서열이다.
- 도 4는 480개의 하이브리도마 클론 중 가장 높은 역가를 보여주는 24개 하이브리도마 클론의 ELISA 결과를 나타낸다. #7을 제외하고 HLA-DPA1 항원에 양성이었다. P는 양성 대조군으로 상업적 HLA-DPA1 항체(NB-A3), N은 음성 대조군으로 PBS를 나타낸다.
- 도 5는 HLA α쇄 항원에 대한 ELISA 결과이다. P는 양성 대조군으로 상업적 HLA-DPA1 항체(NB-A3), N은 음성 대조군으로 PBS를 나타낸다. (A) DRA1 항원에 대해서는 모든 클론에서 blank과 유사한 정도의 결합력을 나타내었다. (B) DPA1 항원에 대해서는 모든 클론이 양성으로 확인되었고, 그 중 가장 효과 좋은 5개 클론을 노란색으로 표시하였다. (C) DQA1 항원에 대해서는 모든 클론이 음성으로 확인되었다.
- 도 6은 ELISA에서 양성으로 확인된 23개 하이브리도마 클론의 유세포 분석 결과이다. 항체를 첨가하지 않은 미염색 대조군은 회색으로 표시하고, 2차 항체만 첨가한 음성 대조군은 검은색으로 표시하였으며, 상업적 HLA-DPA1 항체(NB-A3)를 첨가한 양성 대조군은 하늘색으로 표시하였다. 17개 클론이 음성으로 확인되어 파란색으로, 6개의 클론이 양성으로 확인되어 빨간색으로 표시하였다.
- 도 7은 단클론 항체를 스크리닝하는 모식도이다.
- 도 8은 HLA-DP에 대한 하이브리도마의 한계희석법을 나타낸 것으로, 한계희석 과정은 유세포 분석의 의해 수행되었다. (a)는 #13 클론의 한계희석 결과로, 13-4-1-26-4 및 13-4-1-26-14가 최종 클론으로 선별되었다. (b)는 #23 클론의 한계희석 결과로, 23-6-46-26가 최종 클론으로 선별되었다.
- 도 9는 최종 클론의 결합 친화력을 보여주는 유세포 분석 결과이다. 항체를 첨가하지 않은 미염색 대조군은 회색으로 표시하고, 2차 항체만 첨가한 음성 대조군은 검은색으로 표시하였으며, 상업적 HLA-DPA1 항체(NB-A3)를 첨가한 양성 대조군은 하늘색으로 표시하였다. 최종 클론으로 선택된 상위 3개의 클론을 빨간색으로 표시하고, 선택되지 않은 클론을 파란색으로 표시하였다.
- 도 10은 임상적으로 적용 가능성을 확인하기 위하여, 정제된 항체의 인간 PBMC에 대한 결합 친화력을 확인한 결과이다. 항체를 첨가하지 않은 미염색 대조군은 회색으로 표시하고, 2차 항체만 첨가한 음성 대조군은 검은색으로 표시하였으며, 상업적 HLA-DPA1 항체(NB-A3)를 첨가한 양성 대조군은 주황색으로 표시하였다. 13-4-1-26-4는 빨간색 선, 13-4-1-26-14는 녹색 선, 23-6-46-26은 파란색 선으로 나타내었다.
- 도 11은 13-4-1-26-14 클론의 결합 친화력 시험 결과로, 항-HLA-DPA1 항체의 결합 친화도를 제조된 HLA 형질감염 세포를 이용하여 상용화된 항체의 결합 친화도와 정량적으로 비교하였다. 항체가 없는 대조군은 회색, 빈 벡터로 형질주입된 대조군은 검은색, HLA-형질주입된 세포는 HLA DR, HLA-DP 및 HLA-DQ에 대해 각각 빨간색, 주황색 및 녹색으로 표시하였다.
- 도 12는 최종 하이브리도마 클론에서 생성된 항체의 중쇄 및 경쇄의 이소타이핑 테스트 결과를 나타낸 것으로,

단클론 항체의 이소타이핑 ELISA 검사 결과, 3개의 단클론 항체는 모두 IgG2a 중쇄에 대해 양성(상단 회색)이었고, 모든 경쇄는 카파 쇠로 확인되었다(하단 회색).

도 13는 항-HLA-DP 단클론 항체의 중쇄 (상단) 및 경쇄 (하단) 가변 영역의 상동성 서열 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0022] 본 발명에서 HLA-DPA1의 유전자를 합성하고 면역원으로 사용하여 HLA-DP에 대한 항체를 생산할 수 있는 하이브리도마 세포를 제작하고, 상기 하이브리도마 세포에서 효과 좋은 단클론 항체를 생산할 수 있는 하이브리도마 세포를 선별하였다. 최종적으로 선별된 하이브리도마 세포에서 생산된 단클론 항체는 시판되고 있는 항체보다 더 높은 결합력으로 HLA-DP에 결합하였고, HLA-DR, DP, DQ를 발현하는 인간 세포주를 이용하여 확인해 본 결과, HLA-DR, HLA-DQ에는 결합하지 않았으나, HLA-DP에는 매우 높은 특이도(specificity)로 결합하는 것이 확인되었다. 이에, 상기 단클론 항체의 가변 도메인 서열을 분석해 본 결과, 상기 서열은 종래 보고된 바 없는 신규한 서열로 나타났다.
- [0024] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 1의 CDR1, 서열번호 2의 CDR 2 및 서열번호 3의 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및/또는 서열번호 4의 CDR1, 서열번호 5의 CDR 2 및 서열번호 6의 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역;을 포함하는, HLA-DP에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다.
- [0025] 서열번호 1: 중쇄 CDR1
- [0026] GFTFSSYG
- [0027] 서열번호 2: 중쇄 CDR2
- [0028] ISRGDSYT
- [0029] 서열번호 3: 중쇄 CDR3
- [0030] ARTFAY
- [0031] 서열번호 4: 경쇄 CDR1
- [0032] KSVSTSGYSY
- [0033] 서열번호 5: 경쇄 CDR2
- [0034] LVS
- [0035] 서열번호 6: 경쇄 CDR3
- [0036] QHIRELTR
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 7의 중쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0039] 서열번호 7: 중쇄 가변영역
- [0040] VQLQESGGDLVKGPGSLKLSAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVATISRGDSYTYYPDSVKGRFAISRDNKNTLYLQMSLKSSEDATYYCARTFAYWGQGTILVTVSA
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 8의 경쇄 가변영역을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0043] 서열번호 8: 경쇄 가변영역
- [0044] QSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQKPGQPRLLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGGPSWK-NGLMLHQLYPSH

- [0046] 본 명세서에서 사용된 용어, "항체(antibody)"는 HLA-DP에 특이적으로 결합하는 항-HLA-DP 항체를 의미한다. 본 발명의 범위에는 HLA-DP에 특이적으로 결합하는 완전한 항체 형태 뿐 아니라, 상기 항체 분자의 항원 결합 단편도 포함된다.
- [0047] 완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고 서브클래스로 감마1(γ 1), 감마2(γ 2), 감마3(γ 3), 감마4(γ 4), 알파1(α 1) 및 알파2(α 2)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.
- [0048] 항체의 항원 결합 단편 또는 항체 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변영역 및 중쇄의 첫 번째 불변영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 다이설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역만을 가지고 있는 최소의 항체 조각이다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv, scFv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변영역과 경쇄의 가변영역이 공유결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수도 있다.
- [0049] 일 양태에서, 본 발명에 따른 항체는 Fv 형태(예컨대, scFv)이거나, 완전한 항체 형태이다. 또한, 중쇄 불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 또는 엡실론(ϵ) 중의 어느 한 이소타입으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 불변영역은 감마1(IgG1), 감마 3(IgG3) 또는 감마 4(IgG4)이다. 경쇄 불변영역은 카파 또는 람다형일 수 있다.
- [0050] 본 명세서에서 사용되는 용어, "중쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VH 및 3 개의 불변영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 전체길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어, "경쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VL 및 불변영역 도메인 CL을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.
- [0051] 본 발명의 항체는 단클론 항체, 다특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단쇄 Fvs(scFV), 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 다이설파이드-결합 Fvs(sdFV) 및 항-이디오타입(항-Id) 항체, 또는 상기 항체들의 에피토프-결합 단편 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 상기 단클론 항체는 실질적으로 동질적 항체 집단으로부터 수득한 항체, 즉 집단을 차지하고 있는 개개의 항체가 미량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 발생적 돌연변이를 제외하고는 동일한 것을 지칭한다. 단클론 항체는 고도로 특이적이어서, 단일 항원 부위에 대항하여 유도된다. 전형적으로 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 통상의 (폴리클로날) 항체 제제와는 대조적으로, 각각의 단클론 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 지시된다.
- [0053] "에피토프"은 항체가 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정부위 (determinant)를 의미한다. 에피토프는 통상 화학적으로 활성인 표면 분자군, 예를 들어 아미노산 또는 당 측쇄로 구성되며, 일반적으로 특정한 3차원의 구조적 특징뿐만 아니라 특정한 전하 특성을 갖는다. 입체적 에피토프 및 비입체적 에피토프는 변성 용매의 존재 하에서 전자에 대한 결합은 소실되지만 후자에 대해서는 소실되지 않는다는 점에서 구별된다.
- [0054] "인간화" 형태의 비-인간 항체는 비-인간 (예: 뮤린) 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는, 수용자의 초가변 영역으로부터의 잔기를 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 보유하고 있는 비-인간 중 (공여자 항체), 예를 들어 마우스, 랫트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 초가변 영역으로부터의 잔기로 대체시킨 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이다.
- [0055] "인간 항체"는 인간 면역글로불린으로부터 유래하는 분자로서 상보성 결정영역, 구조 영역을 포함한 항체를 구성하는 모든 아미노산 서열 전체가 인간의 면역글로불린으로 구성되어 있는 것을 의미한다.
- [0056] 중쇄 및/또는 경쇄 일부가 특별한 중으로부터 유래되거나 특별한 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상

응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 반면, 나머지 쇠(들)는 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 "키메라" 항체 (면역글로불린) 뿐 아니라 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 상기 항체의 단편이 포함된다.

- [0057] 사용된 바와 같은 "항체 가변 도메인"은 상보성 결정 영역 (CDR; 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3), 및 골격 영역 (FR)의 아미노산 서열을 포함하는 항체 분자의 경쇄 및 중쇄 부분을 지칭한다. VH는 중쇄의 가변 도메인을 지칭한다. VL은 경쇄의 가변 도메인을 지칭한다.
- [0058] "상보성 결정 영역" (CDR; 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3)은 항원 결합을 위해 필요한 존재인, 항체 가변 도메인의 아미노산 잔기를 지칭한다. 각 가변 도메인은 전형적으로, CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 확인된 3개의 CDR 영역을 갖는다.
- [0059] "골격 영역" (FR)은 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다. 각 가변 도메인은 전형적으로, FR1, FR2, FR3 및 FR4로서 확인된 4개의 FR을 가진다.
- [0060] HLA-DP 항체는 1가 또는 2가이고, 단쇄 또는 이중 쇠를 포함한다. 기능적으로, HLA-DP 항체의 결합 친화성은 10^{-5} M 내지 10^{-12} M 범위 내에 있다. 예를 들어, HLA-DP 항체의 결합 친화성은 10^{-6} M 내지 10^{-12} M, 10^{-7} M 내지 10^{-12} M, 10^{-8} M 내지 10^{-12} M, 10^{-9} M 내지 10^{-12} M, 10^{-10} M 내지 10^{-12} M, 10^{-11} M 내지 10^{-12} M, 10^{-5} M 내지 10^{-11} M, 10^{-6} M 내지 10^{-11} M, 10^{-7} M 내지 10^{-11} M, 10^{-8} M 내지 10^{-11} M, 10^{-9} M 내지 10^{-11} M, 10^{-10} M 내지 10^{-11} M, 10^{-5} M 내지 10^{-10} M, 10^{-6} M 내지 10^{-10} M, 10^{-7} M 내지 10^{-10} M, 10^{-8} M 내지 10^{-10} M, 10^{-9} M 내지 10^{-10} M, 10^{-5} M 내지 10^{-9} M, 10^{-6} M 내지 10^{-9} M, 10^{-7} M 내지 10^{-9} M, 10^{-8} M 내지 10^{-9} M, 10^{-5} M 내지 10^{-8} M, 10^{-6} M 내지 10^{-8} M, 10^{-7} M 내지 10^{-8} M, 10^{-5} M 내지 10^{-7} M, 10^{-6} M 내지 10^{-7} M 또는 10^{-5} M 내지 10^{-6} M이다.
- [0061] 한편, CDR 서열(영역)에 대한 정의는 그 넘버링 방식에 따라 동일한 가변영역을 가지는 항체에 대해서도 다소 달라질 수 있으며, 이는 본 기술분야의 통상의 기술을 가진 자에 의해 용이하게 파악될 수 있을 것이다.
- [0062] 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 HLA-DP을 특이적으로 인식할 수 있는 범위 내에서, 본 명세서에 기재된 본 발명의 항-HLA-DP 항체의 서열뿐만 아니라, 이의 생물학적 균등물도 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 보다 더 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에 추가적인 변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어, 항체의 아미노산 서열 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 가지며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.
- [0063] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 항체 또는 이를 코딩하는 핵산 분자는 서열번호에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.
- [0064] 예컨대, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다른 양태로서 서열번호 1의 서열과 90% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 2의 서열과 90% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 CDR2 및 서열번호 3의 서열과 90% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 CDR 3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및/또는 서열번호 4의 서열과 90% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 5의 서열과 90% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및 서열번호 6의 서열과 90% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 CDR 3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는, HLA-DP에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다.
- [0065] 본 발명에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 일부 양태로서 서열번호 7의 중쇄 가변영역과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다.

- [0066] 본 발명에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 일부 양태로 서열번호 8의 경쇄 가변영역과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다.
- [0067] 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)은 NCBI 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn 및 tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.
- [0068] 이에 기초하여, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 명세서에 기재된 명시된 서열 또는 전체와 비교하여 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 이상의 상동성을 가질 수 있다. 이러한 상동성은 당업계에 공지된 방법에 의한 서열 비교 및/또는 정렬에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 서열 비교 알고리즘(즉, BLAST 또는 BLAST 2.0), 수동 정렬, 육안 검사를 이용하여 본 발명의 핵산 또는 단백질의 퍼센트 서열 상동성을 결정할 수 있다.
- [0069] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산에 관한 것이다.
- [0070] 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산을 분리하여 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 재조합적으로 생산할 수 있다. 핵산을 분리하고, 이를 복제 가능한 벡터 내로 삽입하여 추가로 클로닝하거나 (DNA의 증폭) 또는 추가로 발현시킨다. 이를 바탕으로, 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다.
- [0071] "핵산"은 DNA(gDNA 및 cDNA) 및 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산에서 기본 구성단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다. 본 발명의 중쇄 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산의 서열은 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오타이드의 추가, 결실, 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.
- [0072] 상기 항체를 암호화하는 DNA는 통상적인 과정을 사용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄와 경쇄를 암호화하는 DNA와 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 분리 또는 합성한다. 많은 벡터가 입수 가능하다. 벡터 성분에는 일반적으로, 다음 중의 하나 이상이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 증강인자 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열.
- [0073] 본 명세서에서 사용되는 용어, "벡터"는 숙주세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단으로 플라스미드 벡터; 코즈미드 벡터; 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터 같은 바이러스 벡터 등을 포함한다. 상기 벡터에서 항체를 코딩하는 핵산은 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있다.
- [0074] "작동가능하게 연결"은 핵산 발현조절서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [0075] 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pLλ 프로모터, pRλ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 또한, 예를 들어, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터, β 액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈 프로모터 및 사람 근육 크레아틴 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터엡스타인 바 바이러스(EBV)의 프로모터 및 로우스 사코마 바이러스(RSV)의 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [0076] 경우에 따라서, 벡터는 그로부터 발현되는 항체의 정제를 용이하게 하기 위하여 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은, 예컨대 글루타티온 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질(NEB, USA), FLAG(IBM, USA) 및 6x His(hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있다.
- [0077] 상기 벡터는 선택표지로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이

클린에 대한 내성 유전자가 있다.

- [0078] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 핵산 또는 상기 언급된 벡터로 형질전환된 세포에 관한 것이다. 본 발명의 항체를 생성시키기 위해 사용된 세포는 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵생물 세포일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0079] 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 슈린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*)(예를 들면, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)), 프로테우스미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 및 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)(예를 들면, 스태필로코쿠스 카르노수스(*Staphylococcus carnosus*))와 같은 원핵 숙주세포를 이용할 수 있다.
- [0080] 다만, 동물 세포에 대한 관심이 가장 크며, 유용한 숙주 세포주의 예는 COS-7, BHK, CHO, CHO-S, CHOK1, GS-CHO, DXB-11, DG-44, CHO/-DHFR, CV1, COS-7, HEK293, BHK, TM4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PER.C6, SP2/0, NS-0, U2OS, 또는 HT1080일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0081] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 상기 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양된 세포에서 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 회수하는 단계를 포함하는 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조방법에 관한 것이다.
- [0082] 상기 세포는 각종 배지에서 배양할 수 있다. 시판용 배지 중 제한없이 배양 배지로서 사용할 수 있다. 당업자에게 공지되어 있는 기타 모든 필수 보충물이 적당한 농도로 포함될 수도 있다. 배양 조건, 예를 들어 온도, pH 등이 발현을 위해 선별된 숙주 세포와 함께 이미 사용되고 있고, 이는 당업자에게 명백할 것이다.
- [0083] 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 회수는 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 불순물을 제거하고, 그 결과물을 예를 들어 친화 크로마토그래피 등을 이용하여 정제할 수 있다. 추가의 기타 정제 기술 예를 들어 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피, 히드록실아파타이트 크로마토그래피 등이 사용될 수 있다.
- [0084] 본 발명에서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 면역질환의 발병기전을 연구하는데 사용될 수 있다.
- [0085] 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 일부 실시 양태로서 면역질환의 발병기전을 연구하기 위하여 항체를 이용하는 다양한 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에 활용할 수 있다. 예컨대, 상기 항체는 면역침강법 (Immunoprecipitation, IP), 웨스턴 블롯팅 (Western Blotting, WB), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), 유세포분석 (Fluorescence-activated cell sorting, FACS) 등의 실험에 활용할 수 있으며, 특히 본 발명은 상업적으로 입수가능한 HLA-DPA1 항체(NB-A3)와 달리 유세포 분석에서도 사용이 가능하다는 장점이 있으며, 또한 대용량 생산이 가능하고 형광을 추가로 접합시켜 사용이 가능하다.
- [0086] 본 발명에 있어서, 상기 면역질환은 자가면역 질환 및 이식관련 질환으로 예컨대 당뇨병, 류마티스 관절염, 전신홍반 루프스, 유육종증, 간이식 등을 연구하는데 활용할 수 있고, 바이러스 감염으로 만성 B형 감염 또는 만성 C형 감염을 연구하는데 활용할 수 있으며, 종양성 질환으로 백혈병, 자궁경부암 등을 연구하는데 활용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0087] 일부 양태로서, 상기 면역질환은 그레이브스병(Basedow's disease), 만성 베릴륨병(berylliosis), 소아 만성 관절염(Juvenile chronic arthritis), 사르코이드증(sarcoidosis), 아토피성 척수염(atopic myelitis), 다발혈관염(polyangiitis) 및 육아종증(granulomatosis)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0089] 본 발명은 상기 항-HLA-DP 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 약물이 접합된 항체-약물 접합체 형태로 제공될 수 있다.
- [0090] 상기 항-HLA-DP 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 링커를 통하여 약물에 결합될 수 있다. 상기 링커는 항-HLA-DP 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 약물 사이를 연결하는 부위로, 예를 들어 상기 링커는 세포내 조건에서 절단 가능한 형태 즉, 세포 내 환경에서 항체에서 약물이 링커의 절단을 통해 방출될 수 있도록 한다.
- [0091] 상기 링커는 세포 내 환경 예를 들어 리소좀 또는 엔도솜에 존재하는 절단제에 의해 절단될 수 있으며, 예를 들어 세포 내 펩티다아제 또는 프로테아제 효소 예를 들어 리소좀 또는 엔도솜 프로테아제에 의해 절단될 수 있는 펩타이드 링커일 수 있다. 일반적으로 펩타이드 링커는 적어도 2개 이상의 아미노산 길이를 가진다. 상기 절단제는 카텝신 B 및 카텝신 D, 플라스민을 포함할 수 있으며, 펩타이드를 가수분해하여 약물을 표적 세포 내로 방

출할 수 있도록 한다.

- [0092] 상기 펩타이드 링커는 티올 의존성 프로테아제 카텝신-B에 의해 절단될 수 있고, 이는 암 조직에서 과발현되며, 예를 들어 Phe-Leu 또는 Gly-Phe-Leu-Gly 링커가 사용될 수 있다. 또한, 상기 펩타이드 링커는 예를 들어 세포 내 프로테아제에 의해 절단될 수 있는 것으로, Val-Cit 링커이거나 Phe-Lys 링커일 수 있다.
- [0093] 하나의 양태에서, 상기 절단성 링커는 pH 민감성으로, 특정 pH 값에서 가수분해에 민감할 수 있다. 일반적으로, pH 민감성 링커는 산성 조건에서 가수분해될 수 있음을 나타낸다. 예를 들어, 리소좀에서 가수분해될 수 있는 산성 불안정 링커 예를 들어, 하이드라존, 세미카바존, 티오세미카바존, 시스-아코니틱 아마이드 (cis_aconitic amide), 오르쏘에스테르, 아세탈, 케탈 등일 수 있다.
- [0094] 다른 양태에서, 상기 링커는 환원 조건에서 절단될 수도 있으며, 예를 들어 이황화 링커가 이에 해당할 수 있다. SATA (N-succinimidyl-S-acetylthioacetate), SPDP (N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate), SPDB (N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)butyrate) 및 SMPT (N-succinimidyl-oxycarbonyl-alpha-methyl_alpha-(2-pyridyl-dithio)toluene)를 사용하여 다양한 이황화 결합이 형성될 수 있다.
- [0095] 또한, 상기 링커는 예를 들어 비절단성 링커일 수 있으며, 항체 가수분해 한 단계만을 통해 약물이 방출되어, 예를 들어 아미노산-링커-약물 복합체를 생산한다. 이러한 유형의 링커는 티오에테르기 또는 말레이미도카프로일기 (maleimidocaproyl)일 수 있고, 혈액 내 안정성을 유지할 수 있다.
- [0096] 상기 항체-약물 접합체에서의 약물은 약리학적 효과를 나타내는 제제로 항체에 결합될 수 있으며, 구체적으로 화학요법제, 독소, 마이크로 RNA (miRNA), siRNA, shRNA 또는 방사성 동위원소일 수 있다. 상기 화학요법제는 예를 들어, 세포독성 제제 또는 면역억제제일 수 있다. 구체적으로 마이크로투블린 억제제, 유사분열 억제제, 토포이소머라아제 억제제, 또는 DNA 인터칼레이터로서 기능할 수 있는 화학요법제를 포함할 수 있다. 또한, 면역조절 화합물, 항암제 및 항바이러스제, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0098] 본 발명은 또한 상기 항-HLA-DP 항체 또는 이의 항원 결합 단편과, 다른 항원에 결합하는 항체가 결합된 이중항체(bispecific antibody) 형태로 제공될 수 있다.
- [0099] 본 발명에 따른 항-HLA-DP 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 이중항체를 형성하는 항체는 제한없이 사용 가능하나, 면역 질환 관련 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체가 바람직하다.
- [0101] 한편, 본 발명에서는 상기 단클론 항체 생산을 위한 하이브리도마를 선별하는 과정에서 상기 항체와 유사한 수준의 특이도와 민감도를 가지는 추가의 항체를 생산할 수 있는 또 다른 단클론 항체 생산을 위한 하이브리도마를 확인하였다.
- [0103] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 서열번호 1의 CDR1, 서열번호 2의 CDR2 및 서열번호 3의 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및/또는 서열번호 9의 CDR1, 서열번호 5의 CDR2 및 서열번호 10의 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역;을 포함하는, HLA-DP에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다.
- [0104] 서열번호 1: 중쇄 CDR1
- [0105] GFTFSSYG
- [0106] 서열번호 2: 중쇄 CDR2
- [0107] ISRGDSYT
- [0108] 서열번호 3: 중쇄 CDR3
- [0109] ARTFAY
- [0110] 서열번호 9: 경쇄 CDR1
- [0111] QSLDSDGKTY
- [0112] 서열번호 5: 경쇄 CDR2
- [0113] LVS
- [0114] 서열번호 10: 경쇄 CDR3
- [0115] WQGFHPQT

- [0117] 본 발명에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 7의 중쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0118] 서열번호 7: 중쇄 가변영역
- [0119] VQLQESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVATISRGDSYTYYPDSVKGRFAISRDNANTLYLQMSLKSSEDATYYCARTFAYW
GQGTLLVTSA
- [0121] 본 발명에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 11의 경쇄 가변영역을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0122] 서열번호 11: 경쇄 가변영역
- [0123] VMTQTPLTSLVITIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYCWQGTHTFPQTFG
GGT
- [0125] 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다른 양태로서 서열번호 1의 서열과 90% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 2의 서열과 90% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 CDR2 및 서열번호 3의 서열과 90% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 CDR 3을 포함하는 중쇄 가변영역; 및/또는 서열번호 9의 서열과 90% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 5의 서열과 90% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및 서열번호 10의 서열과 90% 이상의 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 CDR 3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는, HLA-DP에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다.
- [0126] 본 발명에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 일부 양태로서 서열번호 7의 중쇄 가변영역과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다.
- [0127] 본 발명에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 일부 양태로 서열번호 11의 경쇄 가변영역과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다.
- [0129] **실시예**
- [0131] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0133] **실시예 1. 실험방법**
- [0134] 1-1. 세포 및 시약
- [0135] 293T 세포 (CRL-3216) 및 THP-1 세포 (TIB-202)는 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)에서 입수하였다. 폴리에틸렌이민 (Polyethylenimine, PEI)은 Polyscience Inc. (Niles, IL, USA)에서 구입하였다. PE-CyTM7 마우스 항-인간 HLA-DR 항체 (cat.no.560651), PE 마우스 항-인간 HLA-DP 항체 (cat.no.566825), FITC 염소 항-마우스 Ig 항체 (cat.no.554001) 및 PE 염소 항-마우스 Ig (cat.no.550589)는 BD Biosciences (San Jose, CA, USA)에서 구입하였다. PE/Cyanine7 항-인간 HLA-DR, DP, DQ (cat.no.361708) 및 PE 항-인간 HLA-DQ (cat.no.318105)는 Biolegend (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. 정제된 HLA-DPA1 항체 (NB-A3)는 Santa Cruz Biotech. Inc (CA, USA)에서 구입하였다.
- [0137] 1-2. 면역화 및 하이브리도마 세포 생산
- [0138] HLA-DPA1을 면역원으로 사용하기 위해 인간 HLA-DPA1 염기 서열 정보는 NCBI 유전자 데이터베이스 (NM_001242524.1)에서 얻었다. 인간 HLA-DPA1 염기 서열의 길이는 777bp이고, 코돈 최적화를 통해 789bp 염기 서열을 합성하였다. 합성된 염기 서열은 263개 아미노산의 서열을 나타낸다(도 3). 합성된 HLA-DPA1 염기 서열을 클로닝하여 pET23b 벡터에 삽입하였다. 정제 편의를 위해 c-말단에 6-His 태그가 있는 벡터를 사용하였다. 클로닝된 벡터를 4종의 대장균 균주로 형질전환시켰다. HLA-DPA1이 형질전환된 세포에서 발현되는지 확인하기 위하여 웨스턴 블롯 및 친화성 결합 테스트를 수행하고, HLA-DPA1이 약 34kDa에서 발현됨을 확인하였다. His-태그된 HLA-DPA1 단백질을 Ni-NTA 친화성 결합 테스트를 사용하여 얻었다.
- [0139] 합성된 HLA-DPA1을 완전한 freund's adjuvant와 혼합한 후 암컷 BALB/c 마우스에 주입하였다. 2주 후 마우스 꼬리에서 혈청을 채취하고 ELISA를 이용하여 항체 역가를 측정하였다. 면역원 HLA-DPA1을 PBS와 혼합하고 마우스

스에 다시 주입하였다. 3일 후, 마우스로부터 비장을 분리하여 배양 배지로 세척한 후 비장 세포를 분리하였다. 분리된 비장 세포는 PEG를 사용하여 골수종 세포 (Sp2/0-Ag14)와 융합하였다. 융합된 세포는 1 x HAT 배양 배지에서 배양하였다. HLA DPA1 유전자 구축물 생산 및 HLA-DPA1 하이브리도마 클론 생산은 Youngin Frontier Inc. (대한민국 서울)에서 수행하였다.

[0141] 1-3. 효소 결합 면역 흡착 분석 (ELISA)

[0142] HLA-DRA1 (Cloud-Clone Corp., Wuhan, China), HLA-DPA1 (Youngin Frontier Inc. Seoul, 대한민국) 및 HLA-DQA1 (Novus Biologicals, USA) 단백질을 PBS (100 ng/well)로 희석하고 96-웰 플레이트에 넣고 4 °C에서 밤새 배양하였다. 플레이트를 PBS로 1회 세척한 후 100ul의 블로킹 버퍼를 첨가하고 37 °C에서 1 시간 동안 배양하였다. PBS로 3회 세척한 후 100ul의 하이브리도마 세포 상청액을 첨가하여 37 °C에서 1 시간 동안 인큐베이션 하였다. 다시 PBS로 3회 세척한 후 HRP가 결합된 염소 항-마우스 IgG를 첨가하고 37 °C에서 1 시간 동안 인큐베이션 하였다. PBS로 3회 세척한 후 HRP에 반응하는 TMB를 50ul/웰로 첨가하고 상온에서 반응시켜 충분히 발색시키고 1N H₂SO₄로 반응을 중지시킨 후, 450nm 파장에서 흡광도를 체크하여 결합 친화도를 확인하였다.

[0144] 1-4. 유세포 분석

[0145] ELISA 스크리닝에서 선별된 하이브리도마 세포 중에서 HLA-DP의 3 차 구조에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 생산하는 하이브리도마 클론만을 선별하기 위해 유세포 분석을 수행하였다. 먼저 THP-1 세포를 수확하고 튜브당 1 x 10⁵ 세포가 있는 FACS 튜브에 추가하였다. 그 다음, 각 하이브리도마 세포 상청액 100ul를 첨가하고 4 °C에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 그 후 1ml의 FACS 완충액을 첨가하고 13000rpm에서 5 분간 원심분리하였다. 침전된 세포 펠렛을 FITC 염소 항-마우스 Ig 항체가 포함된 FACS 완충액으로 재현탁하고 4 °C에서 30 분 동안 인큐베이션 하였다. 동일한 조건에서 세척한 후 펠렛을 200ul의 FACS 완충액에 재현탁한 후 FACScalibur (Becton Dickinson, USA)를 사용하여 분석하였다. HLA-DP MAb에 대해 HLA-DR, HLA-DP 및 HLA-DQ 형질 감염된 세포를 스크리닝하기 위하여 유세포 분석을 수행하였다. 세포를 수확하고 5 분 동안 13000 rpm에서 원심분리 하였다. HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ 및 HLA 클래스 II 항체를 포함하는 항체 혼합물을 첨가하고 4 °C에서 30 분 동안 인큐베이션 하였다. 같은 방법으로 FACS 버퍼로 세척하고, 형광 표지된 세포는 LSR II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로 분석하였다.

[0147] 1-5. 한계희석 분석 (Limiting dilution assay, LD)

[0148] 한계희석 분석을 수행하여 다클론을 단클론으로 선별하고자 하였다. 간단히 서술하면, HLA-DP에 결합하는 다클론을 100mm 배양 접시에서 배양하고 혈청학적 피펫을 사용하여 수확하였다. 1300rpm에서 5 분 동안 원심분리하고 혈구계(hematocytometer)를 사용하여 계산하였다. 96-웰 배양 플레이트에 웰당 하나의 세포를 에 1 x Hybridoma Fusion and Cloning Supplement (HFCS; Roche, Basel, Switzerland), 1% 페니실린-스트렙토마이신 (P/S; Gibco, USA) 및 20% 열 불활성화된 소태아 혈청 (FBS; Biowest, Nuaille, France)를 함유하는 Dulbecco의 Modified Eagle's Medium (DMEM; Biowest, Nuaille, France)에 씨딩하였다. 높은 친화성을 가진 클론을 선택한 다음 24 웰 배양 플레이트에 씨딩하였다. 2일 후 동일한 방법으로 유세포 분석을 수행하였다. 선택된 클론을 6 웰 배양 플레이트로 옮겨 씨딩하였다. 마지막으로, 2일 후 유세포 분석을 수행하고 두 개의 클론을 선택하였다. 선택된 클론을 100mm 배양 접시에 씨딩하였다. 완전한 단일 클론 항체를 생산하는 하이브리도마 클론을 얻기 위하여 전체 과정을 3-4 회 반복하였다.

[0150] 1-6. 단클론 항체 정제

[0151] 최종적으로 선택된 클론에서 단일 클론 항체를 얻기 위하여 100mm 배양 접시에서 배양하였다. 동일한 양의 상청액에서 가능한 한 많은 항체를 얻기 위하여 2 ~ 3 일마다 Hybridoma SFM (Gibco, Waltham, MA, USA)을 추가하였다. 총 부피가 50ml에 도달하면 13000rpm에서 5 분간 수확 및 원심 분리하여, 상등액을 수집하고 Pierce™ Protein A IgG Purification Kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)를 사용하여 정제하였다.

[0153] 1-7. HLA-DR, HLA-DP 및 HLA-DQ의 클로닝

[0154] 1-7-1. RNA 추출 및 cDNA 합성

[0155] 모든 샘플은 무작위로 수집되었으며, 건강한 기증자의 인간 혈액을 사용하였다. mRNA는 RNeasy®Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 분리하고 cDNA는 AccuPower®CycleScript™ RT PreMix (Bioneer, Korea) 및 T100 Thermal Cycler (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 합성하였다.

[0157] 1-7-2. HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ 벡터의 구축

[0158] 먼저 HLA-DRA1, HLA-DRB1, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1 및 HLA-DQB1의 전체 오픈 리딩 프레임을 포함하는 NheI 및 EcoRI를 포함한 한 쌍의 프라이머를 설계했고, 해당 프라이머를 이용하여 인간 cDNA에서 각 유전자를 PCR 증폭하였다. 프라이머의 서열은 표 1에 나타난 바와 같다. PCR 산물의 크기를 1% agarose gel에 전기영동하여 확인하고 PCR 정제 키트 (Lobopass, Korea)를 이용하여 정제하였다. 이후 cDNA 단편을 pGEM®-T easy vector (promega, USA)에 삽입하고 DH5α 컴피턴트 세포 (RBC, Taiwan)로 형질전환한 다음 50ug/mL ampicillin, 40ug/mL X-gal 및 0.5mM IPTG가 포함된 LB plate에 플레이팅하였다. LB 플레이트의 흰색 콜로니를 5mL LB 앰피실린 (50ug/mL) 액체 배지에서 밤새 배양한 후, 플라스미드 DNA 추출 미니 키트(Favorgen, Ping-Tung, Taiwan)를 사용하여 플라스미드 DNA를 분리하였다. 추출된 플라스미드 DNA를 시퀀싱 서비스(cosmo-genetech, Korea)를 통해 시퀀싱하고, 벡터에 표적 유전자가 삽입되었는지 여부는 전기영동을 통해 확인하고 NheI(NEB)과 EcoRI(NEB)을 이용한 제한효소 처리 후 겔 추출 키트(Lobopass, Korea)로 겔 추출하였으며, 그 산물을 pCDH-EF1-MCS-IRES-copGFP 벡터 및 pcDNA3.1 발현 벡터(Addgene, Cambridge, MA, USA)에 삽입하였다. 형질전환, 플라스미드 추출, 제한효소 처리, 전기영동, 염기서열분석은 앞의 과정과 동일한 방법으로 진행하였다.

표 1

[0160]

5' to 3'	Forward	Reverse
HLA-DRA	ACGGCTAGCGCCACCATGGCCATAAGTGGAGTCCC	CGTGAATTCTTACAGAGGCCCCCTGCGTT
HLA-DRB1	ACGGCTAGCGCCACCATGGTGTGTCTGAGGCTCCC	CGTGAATTCTCAGCTCAGGAATCCTGTTG
HLA-DPA1	ACGGCTAGCGCCACCATGCGCCCTGAAGACAGAAT	CGTGAATTCTCACAGGTGCCCTGGGCC
HLA-DPB1	ACGGCTAGCGCCACCATGATGGTTCTGCAGGTTTC	ACGCTCGAGATGATGGTTCTGCAGGTTTC
HLA-DQA1	ACGGCTAGCGCCACCATGATCCTAAACAAGCTCT	CGTGAATTCTCACAAATGGCCCTTGGTGTC
HLA-DQB1	ACGGCTAGCGCCACCATGTCTTGAAGAAGGCTTT	CGTGAATTCTCAGTGCAGAAGCCCTGCTG

[0162] 1-7-3. 일시적 형질주입(transfection)

[0163] 형질주입 전날, HEK293T 세포를 웰당 5×10^5 로 6-웰에 접종하였다. 형질주입 직전에 항생제가 없는 10% DMEM으로 배지를 교체하였다. 세포를 폴리에틸렌이민(PEI) 형질주입 시약을 사용하여 pCDH-DRA 플라스미드 및 pCDH-DRB1로 형질주입시켰다 (DP와 DQ에 대해서도 동일하게 진행함). PEI와 플라스미드의 농도비는 5:1이 되도록 처리하였다. 6시간 후, 항생제가 없는 10% DMEM으로 배지를 변경하고, 형질감염 48시간 후, GFP 발현을 확인한 후 FACS 분석을 수행하였다.

[0165] 1-8. 항-HLA-DPA1 단일 클론 항체의 이소타이핑

[0166] 생성된 항-HLA-DPA1 단클론 항체의 중쇄 및 경쇄 유형을 확인하기 위해 이소타이핑을 수행하였다. 하이브리도마를 배양하여 얻은 배양 배지를 Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping Kit(Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)를 사용하여 제조자의 지침에 따라 이소타이핑하였다.

[0168] 1-9. 항-HLA DPA1 단클론 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 시퀀싱

[0169] 단클론 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 시퀀싱을 수행하여 생산된 하이브리도마 세포주의 염기서열(또는 아미노산 서열)을 확인하였다. 사용된 프라이머는 표 2 및 표 3에 나열되어 있다. 하이브리도마 세포주를 배양한 후 RNeasy mini kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 제조자의 지침에 따라 총 RNA를 추출하였다. AccuPower cyclescript RT premix (Bioneer, Korea)를 사용하여 제조자의 지침에 따라 DNA를 합성하였다. HLA DPA1 특이적 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 서열을 확인하기 위해 표 2 및 표 3의 프라이머를 이용하여 1차 PCR을 수행하였다. 1차 PCR 결과는 DW로 희석하여 2차 PCR을 수행하였다. 2차 PCR 결과는 PCR 정제 키트 (Lobopass, Korea)를 이용하여 제조자의 지침에 따라 정제하고, 시퀀싱 서비스는 코스모진텍에서 진행하였다.

표 2

[0171] 하이브리도마 중쇄 시퀀싱을 위한 PCR 프라이머 서열

5' to 3'	Forward	Reverse	
5' MsVHE	GGG AAT TCG AGG TGC AGC TGC AGG AGT CTG G	3' C γ 1 outer	GGA AGG TGT GCA CAC CGC TGG AC
		3' C γ 2b outer	GGA AGG TGT GCA CAC TGC TGG AC
		3' C γ 2a outer	GGA AGG TGT GCA CAC CAC TGG AC
		3' C γ 1 inner	GCT CAG GGA AAT AGC CCT TGA C
		3' C γ 2a inner	GCT CAG GGA AAT AAC CCT TGA C
		3' C γ 2b inner	ACT CAG GGA AGT AGC CCT TGA C

표 3

[0173] 하이브리도마 경쇄 시퀀싱을 위한 PCR 프라이머 서열

5' to 3'	Forward	Reverse	
5' L-V κ _3	TGC TGC TGC TCT GGG TTC CAG	3' mC κ	GAT GGT GGG AAG ATG GAT ACA GTT
5' L-V κ _4	ATT WTC AGC TTC CTG CTA ATC		
5' L-V κ _5	TTT TGC TTT TCT GGA TTY CAG		
5' L-V κ _6	TCG TGT TKC TST GGT TGT CTG		
5' L-V κ _6,8,9	ATG GAA TCA CAG RCY CWG GT		
5' L-V κ _14	TCT TGT TGC TCT GGT TYC CAG		
5' L-V κ _19	CAG TTC CTG GGG CTC TTG TTG TTC		
5' L-V κ _20	CTC ACT AGC TCT TCT CCT C		
5' mV κ	GAY ATT GTG MTS ACM CAR WCT MCA		

[0175] 실시예 2. HLA-DPA1에 대한 다클론 하이브리도마의 개발

[0176] HLA-DPA1 단백질이 HLA-DP에 특이적으로 반응하는 항체를 생산하는 면역원으로 사용되었다. 먼저, HLA-DPA1 유전자를 도 3과 같이 합성하여 HLA DP 특이적 항체를 생산하는 하이브리도마를 생산하였다. HLA-DPA1 단백질의 번역, 면역화 및 하이브리도마 세포의 생산은 (주)영인프론티어에 의해 도 2의 과정으로 진행되었다. 480개의 하이브리도마 세포 클론의 상청액을 수집하고 HLA-DPA1 단백질을 항원으로 사용하여 ELISA를 수행하였다. 양성 클론 중에서 상위 23개 클론을 선별하였다(도 4).

[0178] 실시예 3. 하이브리도마 세포의 HLA-DPA1에 대한 특이성(specificity) 확인

[0180] 3-1. ELISA에 의한 하이브리도마 스크리닝

[0181] 생산된 하이브리도마의 특이성을 알아보기 위하여 HLA class II α 사슬 항원(HLA-DRA1, HLA-DPA1, HLA-DQA1)을 이용하여 ELISA를 수행하였다(도 5). 23개 클론 모두 HLA-DPA1(OD, 0.38-1.79)에 강력하게 반응하였으나(도 5B), HLA-DRA1 및 HLA-DQA1(OD: 0.50 미만)에는 반응하지 않았다(도 5A, 5C). 이로써, 23개의 클론이 HLA-DPA1에 특이적으로 반응함을 확인하였다.

[0183] 3-2. 유세포 분석에 의한 하이브리도마 스크리닝

[0184] ELISA 방법은 선형 형태의 단백질을 인식하는 항체를 선별하기 때문에, *in vivo* 환경에서도 항원을 효과적으로 인식할 수 있도록 3차원 단백질 구조를 인식하는 항체를 선별하기 위하여 유세포 분석을 수행하였다. 세포 표면

(클래스 I 및 클래스 II 모두 포함)에서 모든 인간 HLA를 발현하는 세포주인 THP-1을 항원으로 사용하였다. 이전에 선택된 23개 클론 중 #10, #13, #15, #18, #22, #23의 6개 클론만이 유세포 분석에 의해 양성으로 확인되었다 (도 6).

[0186] 3-3. 한계희석법을 이용한 특정 단클론 하이브리도마 세포의 선별

[0187] 다클론 하이브리도마 세포는 높은 친화력을 가진 항체를 생산하기 위한 지속적 유지가 어려운바, HLA-DPA1에 특이적으로 반응하는 단클론 항체를 생산하는 단클론 하이브리도마 세포를 얻기 위하여 한계희석(Limiting dilution, LD)을 수행하였다. 이미 확인된 바와 같이 ELISA를 통해 23개의 클론을 선별하였고, 6개의 클론만이 유세포분석에서 양성 결과를 보였다. 도 7은 선별 과정의 개략적으로 나타낸 것이다. 한계희석은 상위 6 개의 클론에 대해 수행되었다. 이 중 4개 클론에서는 수 차례의 한계희석 과정에서 높은 역가를 유지하는 안정한 단클론 항체를 생산할 수 없어, 한계희석 과정에서 높은 역가가 유지되는 클론인 #13과 #23를 선별하였다.

[0188] #13 및 #23에 대한 한계희석법은 도 7에 나타낸 바와 같으며, #13 클론은 총 4회의 한계희석 프로세스를 거쳐 최종적으로 13-4-1-26-4 및 13-4-1-26-14의 하이브리도마 클론이 선별되었다(도 8a). #23 클론은 동일한 방법으로 23-6-46-26이 최종 클론으로 선별되었다(도 8b). 선별된 클론은 상용화된 항체(MFI, 25.0, positive control)와 비교하여 유사하거나 (MFI, 23.9) 더 높은 (MFI, 31.2) 친화도를 갖는 것으로 확인되었다(도 9).

[0189] 상용화된 항체와 정량적으로 비교하여도 그 결과가 유의한지 확인하기 위하여 각 하이브리도마의 상층액을 채취하고 IgG 정제 키트를 이용하여 정제하였다. 정제된 항체를 Human PBMC와 동일한 용량 (100ng)으로 조합하였을 때, 상용 항체(MFI, 523)와 가장 유사한 결합 친화도를 갖는 단클론 하이브리도마 클론 13-4-1-26-14(MFI, 537)이 최종 클론으로 선택되었다(도 10).

[0191] 형질주입된 세포(pCDH-DR, pCDH-DP 및 pCDH-DQ)를 사용하여 유세포 분석을 수행함으로써 생성된 모노클로날 항체가 실제로 HLA-DP 특이적인지 확인하였다. 그 결과, pCDH-DR(MFI, 131) 및 pCDH-DQ(MFI, 136)에 비해 pCDH-DP 세포(MFI, 352)에서 높은 결합 친화도를 나타내어, 최종 클론 13-4-1-26-14는 HLA-DR 및 HLA-DQ에 반응하지 않지만, HLA-DP에 특이적으로 반응하는 것을 확인할 수 있었다.

[0193] **실시예 4. 항-HLA-DPA1 단클론 항체의 특성 분석**

[0195] 4-1. ELISA에 의한 항-HLA-DPA1 단클론 항체의 이소타이핑 테스트

[0196] 항-HLA-DPA1 단클론 항체의 특성을 확인하기 위하여 이소타이핑 테스트를 진행하였다. 하이브리도마 상층액으로부터 항-DPA1 단클론항체를 정제한 후, 면역글로불린 클래스와 서브클래스 항체가 미리 포획되어 있는 키트를 이용하여 ELISA를 수행하였다. 3개의 모노클로날 항체는 모두 IgG2a 중쇄 및 카파 경쇄에 속하였다(도 12).

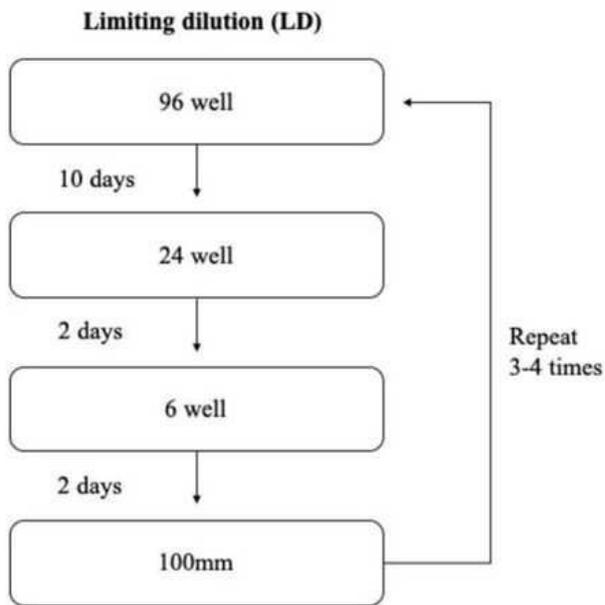
[0198] 4-2. 항-HLA-DP 단클론 항체 가변 도메인의 시퀀싱

[0199] 생성된 항-HLA-DP 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 서열을 확인하기 위해 하이브리도마의 cDNA를 추출하였다. 표 2 및 표 3의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 후, 시퀀싱 분석을 수행하였다. 확인된 서열은 NCBI IgBlast 프로그램을 사용하여 상동성 분석한 결과, mouse 생식선(germline) V, D 및 J 유전자에 대해 중쇄 97.3%, 경쇄 97.2% 상동성을 나타내어, 이들 항체가 mouse 생식선(germline)에서 재배열되어 생성된 면역 글로불린 가변 도메인임을 확인할 수 있었다.

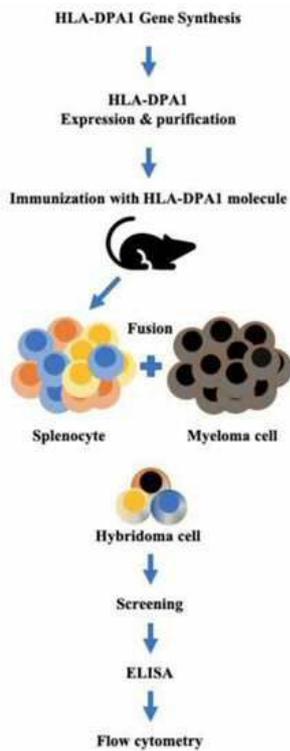
[0201] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다 고 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

Nucleotide sequence

HLA-DPA1 (777bp)

```
cgcctgaagacgaatgtccatcacagctgcatctgagagccctctctgttctctgaggtccc
gagagctgggcccacagggcggccatggtcaactafgcpcttggacagacgcatagaccaacag
gggagttatgtgaattgtgaatgagatgagatggtctgacagaaggagaccgtctggcactc
ggagggttggccaagccttctcttgggctcagggcggcctggctaacattgctafatgaacaacact
gaatacctgatccaggtcccaaccaactcaggcccaacggtcccctgagggaccgtgttccaag
gagcctgtgagctggcccaaccaacactcctgccacattgacaaattctcccaaggtgetcaag
tcactggctgtgcaagggagctggtcactgaggggtctgctgagagcctctccccaagcaatg
acagttccacaagttccactgacctgtgccctcagcagagactctgaatgacgggtgagac
tgggctggaccagccctcctcaagcctgggagcccaagcctccagatgctgagacaacgg
agactgtctctgtgcccggcctgtgtgctggcctagtcggcctctgtggaccgctctcataaa
gtctctgcttggccatgaccccgggccaggacccctg
```

Nucleotide sequence

HLA-DPA1 (789bp) Codon optimization

```
CATATGCGCCCTGAAGATAGGATGTTCCATATAAGAGCTGTTATCCTGAG
AGCACTCAGCCTTGCCCTTCTGCTGAGTTCACGAGGAGCTGGTGCCATAA
AAGCGGATCATGTATCAACTTATGCGCGCTTGTACAGACTACCCGCCG
ACAGGGAGTTCATGTTGAATTTGATGAAGATGAAATGTTCTATGTCGA
TTTAGATAAGAAAAGAGACAGTATGGCACTCGAAAGAAATTTGCCAGGCCT
TTTTCTTGAAGCTCAGGGCGGCTGGCTAACATTGCTATATTGAATAAC
AATTTGAATACCTTGATCCAACTGCAATCATAGCAAGCGACCAATGA
TCGCGCTGAGGTGACCGTTTTTCCAAGGAACCGTTGAGCTGGGTGAGC
CGAACACCTTAATTTGCCACATCGATAAAATTTTTCCACAGTGTGAACG
TCACGTGGCTGTGCAATGGTAACTTGTGACTGAAAGTGTGCGCAGAAAGT
TTATTCCTGCCCGTACAGATTACAGCTTTCACAAATTTCAATTACCTGACG
TTTGTCCCTCAGCAGAGGACTTCTATGACTGTCCGCTGAAACATTTGGGG
ATTGGACAGCGCTCTCAACACTGGGAGGCCAAGAGCCTATTGAGA
TGCTGAAACCAGGAAACTGTGCTTTGTGACTGGTCTGGTCTGGGC
CTAGTGGCATATTCGTCCGACAGTTTAAATTTAAATCTTACGTTCT
GGACATGACCCCGGCACAGGGACCTTCTCGAG
```

Amino acid sequence

HLA-DPA1 (263A.A)

```
HMRPEDRMFHIRAVILRALSLAFLLSLRGAGAIKADHVSTYA AFVQT
HRPTGEFMFFFEDEMFYVLDKKE TVWHLEFGQAFSFEAQGGLA
NAILNNLNTLQRNSHTQATNDPPEVTVFPKEPVELGQPNLICHID
KFFPPVLNVTWLCNGELVTEGV AESLFLPRDYSFHKFHYLTFVPSA
EDFYDCRVEHWGLDQPLLKHWAEQPIQMPETTETVLCALGLVLGL
VGHIV GTVLIKLSRSGHDPRAQGTLLE
```

도면4

24well test (protein)							
1	2.021	9	2.415	17	2.194	N	0.064
2	1.428	10	1.213	18	1.834	P	2.355
3	1.909	11	2.103	19	1.689		
4	2.102	12	1.815	20	1.844		
5	2.183	13	1.842	21	2.184		
6	2.013	14	1.998	22	1.666		
7	0.071	15	1.806	23	1.785		
8	1.637	16	2.414	24	2.157		

도면5

A

24 well test (DPA1 Antigen)							
1	0.045	9	0.051	17	0.047	N	0.044
2	0.043	10	0.046	18	0.046	P	0.077
3	0.048	11	0.045	19	0.047		
4	0.045	12	0.044	20	0.042		
5	0.044	13	0.044	21	0.045		
6	0.045	14	0.044	22	0.043		
blank	0.049	15	0.046	23	0.046		
8	0.05	16	0.048	24	0.047		

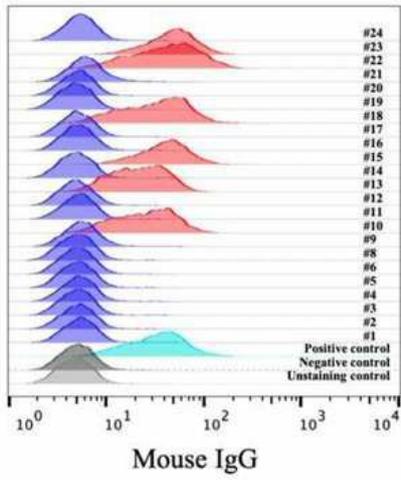
B

24 well test (DPA1 Antigen)							
1	0.878	9	1.643	17	0.769	N	0.048
2	0.866	10	0.718	18	0.376	P	1.75
3	0.618	11	1.095	19	0.593		
4	1.071	12	0.27	20	1.132		
5	1.251	13	1.037	21	1.786		
6	0.691	14	1.333	22	1.301		
blank	0.044	15	1.384	23	1.397		
8	0.702	16	0.742	24	0.895		

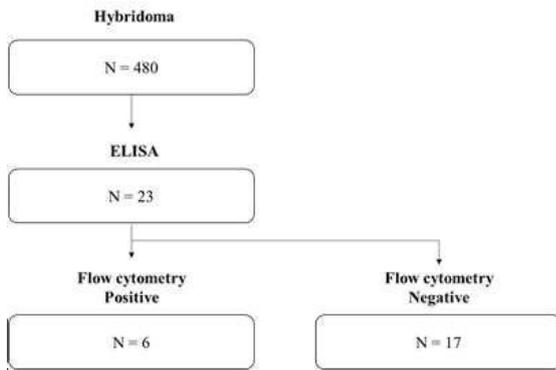
C

24 well test (DQA1 Antigen)							
1	0.049	9	0.049	17	0.047	N	0.045
2	0.044	10	0.048	18	0.045	P	0.052
3	0.046	11	0.045	19	0.044		
4	0.044	12	0.043	20	0.044		
5	0.052	13	0.044	21	0.05		
6	0.046	14	0.05	22	0.044		
blank	0.045	15	0.044	23	0.046		
8	0.045	16	0.05	24	0.047		

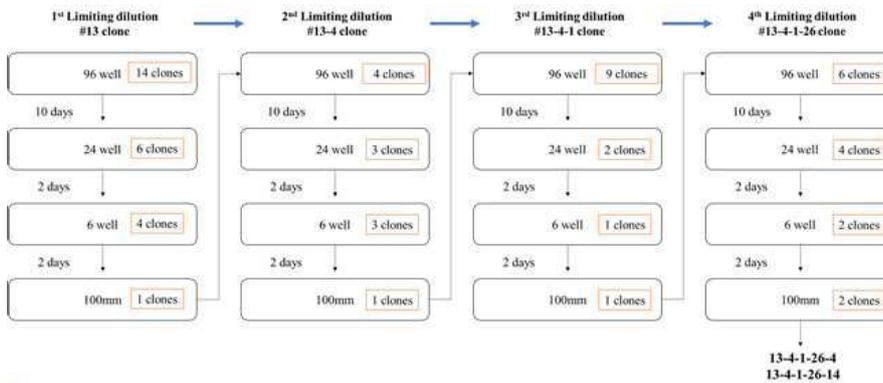
도면6



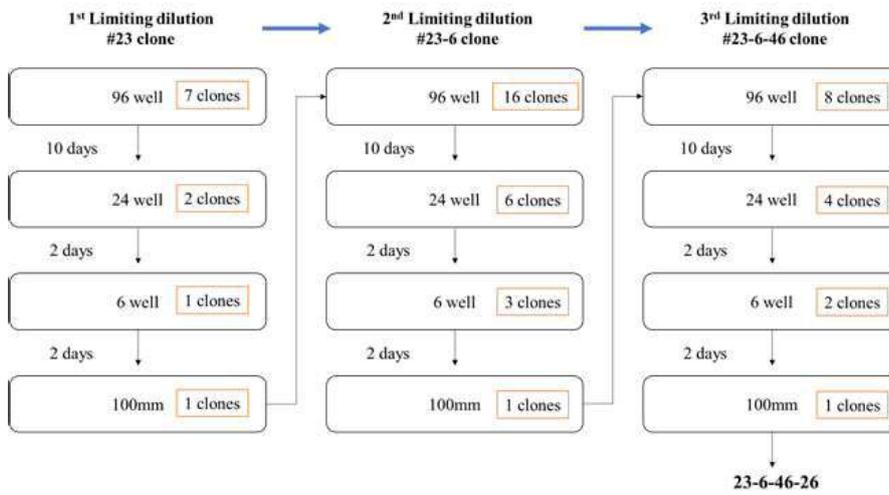
도면7



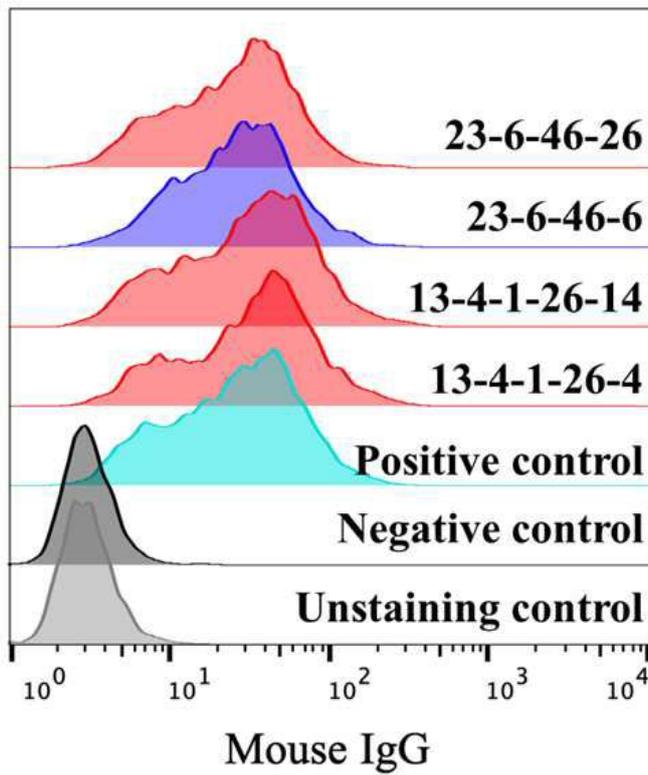
도면8a



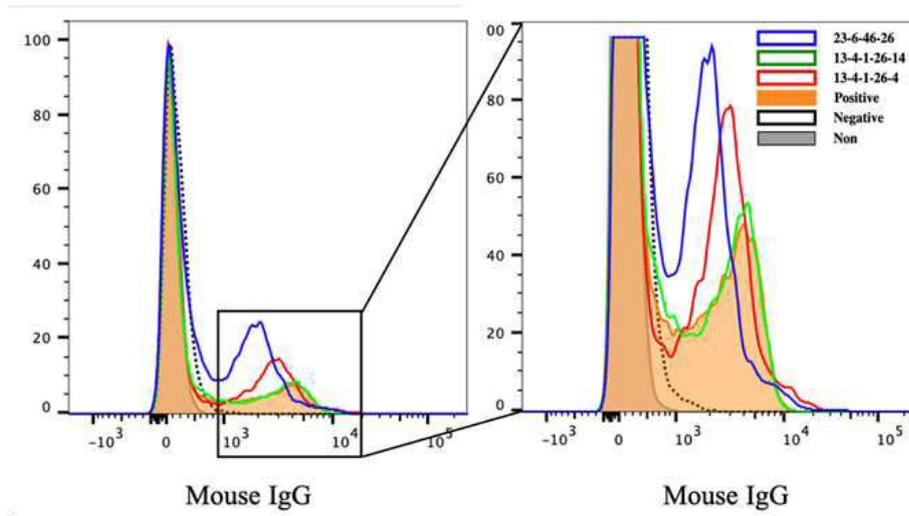
도면8b



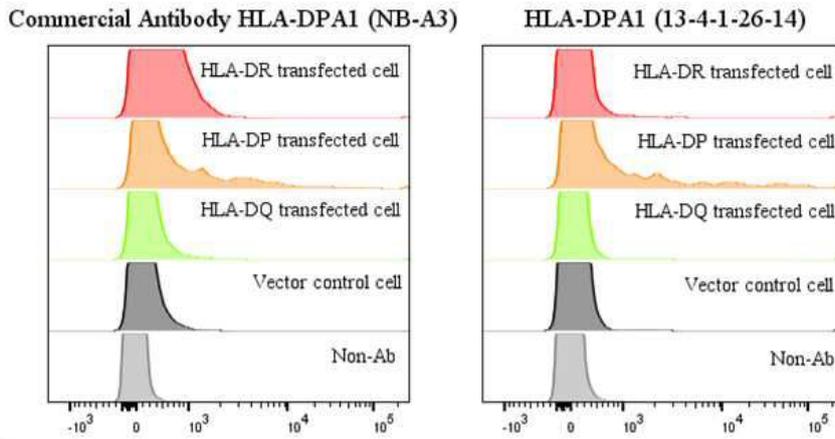
도면9



도면10



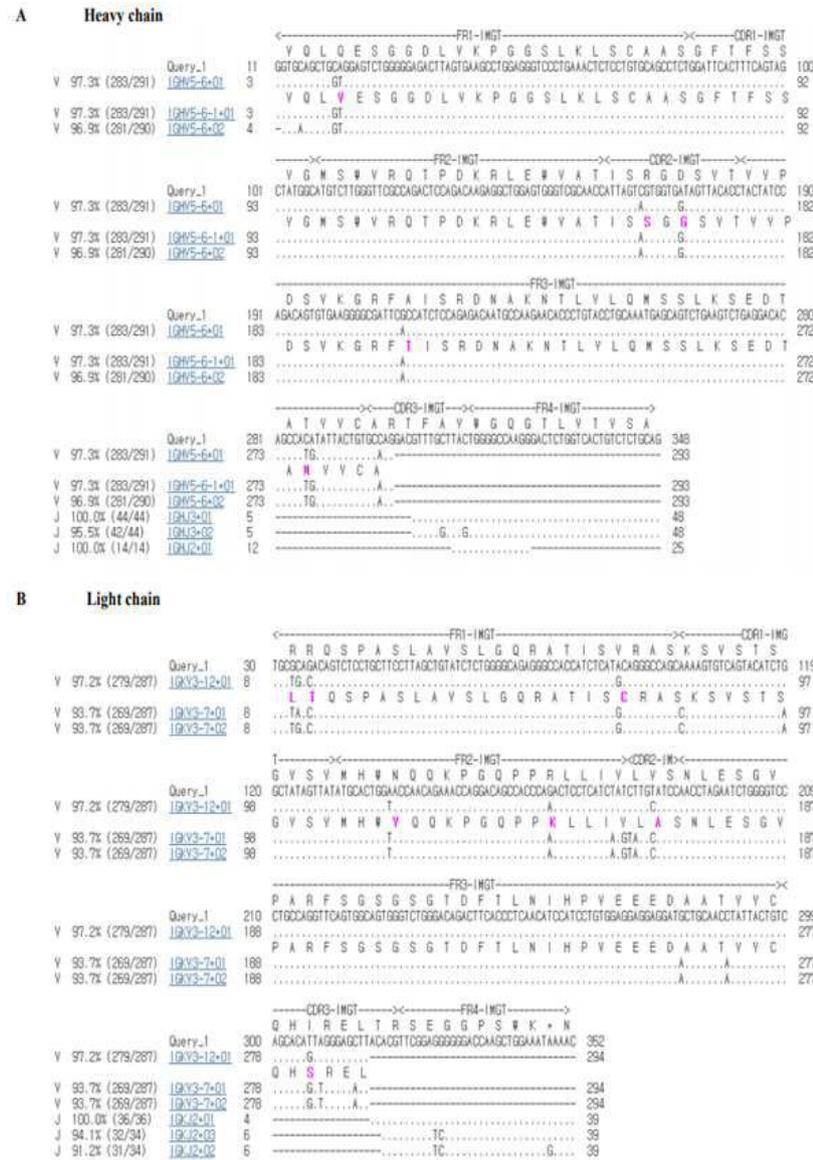
도면11



도면12

Isotype	13-4-1-26-4	13-4-1-26-14	23-6-46-26	commercial HLA-DPA1
IgG1	0.891	0.803	1.369	0.727
IgG2a	3.172	3.344	3.14	3.172
IgG2b	0.573	0.81	1.192	1.249
IgG3	0.09	0.092	0.087	0.095
IgA	0.065	0.072	0.071	0.067
IgM	0.069	0.068	0.066	0.07
Kappa	0.972	1.039	0.88	1.192
Lambda	0.085	0.074	0.068	0.085
H-chain	IgG2a	IgG2a	IgG2a	IgG2a
L-chain	k	k	k	k

도면13



서열목록

- <110> Seoul National University R&DB Foundation
- <120> Anti-HLA-DP monoclonal antibody and use thereof
- <130> 1069658
- <150> KR 1020210096685
- <151> 2021-07-22
- <160> 50
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR1

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR2

<

400> 2

Ile Ser Arg Gly Asp Ser Tyr Thr

1 5

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR3

<400> 3

Ala Arg Thr Phe Ala Tyr

1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain CDR1

<400> 4

Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr

1 5 10

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain CDR2

<400> 5
 Leu Val Ser
 1
 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Light Chain CDR3
 <400> 6
 Gln His Ile Arg Glu Leu Thr Arg
 1 5
 <210> 7
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH
 <400> 7
 Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 20 25 30
 Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala
 35 40 45
 Thr Ile Ser Arg Gly Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Thr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 100 105 110
 <210> 8
 <211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg Glu Leu Thr Arg Ser

85 90 95

Glu Gly Gly Pro Ser Trp Lys Asn Gly Leu Met Leu His Gln Leu Tyr

100 105 110

Pro Ser Ser His

115

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain 2_CDR1

<400> 9

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr

1 5 10

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain 2_CDR3

<400> 10
 Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gln Thr
 1 5

<210> 11
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> VL_2

<400> 11
 Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly Gln Pro
 1 5 10 15
 Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly
 20 25 30
 Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys
 35 40 45
 Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg
 50 55 60

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

<210> 12
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward Primer (HLA-DRA)

<400> 12
 acggctagcg ccaccatggc cataagtgga gtccc

35

<210> 13
 <211> 29

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse Primer (HLA-DRA)
 <400> 13
 cgtgaattct tacagaggcc ccctgcgtt 29
 <210> 14
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward Primer (HLA-DRB1)
 <400> 14
 acggctagcg ccaccatggt gtgtctgagg ctccc 35
 <210> 15
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse Primer (HLA-DRB1)
 <400> 15
 cgtgaattct cagctcagga atcctgttg 29
 <210> 16
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward Primer (HLA-DPA1)
 <400> 16
 acggctagcg ccaccatgcg ccctgaagac agaat 35
 <210> 17
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse Primer (HLA-DPA1)
 <400> 17
 cgtgaattct cacagggtcc cctgggccc 29
 <210>

> 18

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer (HLA-DPB1)

<400> 18

acggctagcg ccaccatgat ggttctgcag gtttc 35

<210> 19

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer (HLA-DPB1)

<400> 19

acgctcgaga tgatggttct gcaggtttc 29

<210> 20

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer (HLA-DQA1)

<400> 20

acggctagcg ccaccatgat cctaaca aaa gctct 35

<210> 21

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer (HLA-DQA1)

<400> 21

cgtgaattct cacaatggcc cttggtgtc 29

<210> 22

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer (HLA-DQB1)

<400> 22

acggctagcg ccaccatgtc ttggaagaag gcttt 35

<210>

> 23

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer (HLA-DQB1)

<400> 23

cgtgaattct cagtcagaa gccctgctg 29

<210> 24

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer (MsVHE)

<400> 24

gggaattcga ggtgcagctg caggagtctg g 31

<210> 25

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer (Cgamma1 outer)

<400> 25

ggaaggtgtg cacaccgctg gac 23

<210> 26

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer (Cgamma2b outer)

<400> 26

ggaaggtgtg cacactgctg gac 23

<210> 27

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer (Cgamma2a outer)
 <400> 27
 ggaaggtgtg cacaccactg gac 23

<210> 28
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer (Cgamma1 inner)
 <400> 28
 gctcaggaa atagcccttg ac 22
 <210> 29
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer (Cgamma2a inner)
 <400> 29
 gctcaggaa ataacccttg ac 22
 <210> 30
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223>
 Reverse Primer (Cgamma2b inner)
 <400> 30
 actcaggaa gtagcccttg ac 22
 <210> 31
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer (L-Vkappa_3)
 <400> 31
 tgctgetgct ctgggtcca g 21
 <210> 32
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward Primer (L-Vkappa_4)
 <400> 32
 attwtcagct tcctgctaata c 21

<210> 33
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward Primer (L-Vkappa_5)
 <400> 33
 ttttgctttt ctggattyca g 21

<210> 34
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward Primer (L-Vkappa_6)
 <400> 34
 tcgtgttkct stggttgct g 21

<210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward Primer (L-Vkappa_6,8,9)
 <400> 35
 atggaatcac agrcycwgg t 20

<210> 36
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward Primer (L-Vkappa_14)
 <400> 36
 tcttggtgct ctggttycca g 21

<210> 37
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward Primer (L-Vkappa_19)
 <400> 37
 cagttcctgg ggctcttggtt gttc 24

<210> 38
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward Primer (L-Vkappa_20)
 <400> 38
 ctcaactagct cttctcctc 19

<210> 39
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward Primer (mVkappa)
 <400> 39
 gayattgtgm tsacmcarwc tmca 24

<210> 40
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse Primer (mCkappa)
 <400> 40
 gatggtggga agatggatac agtt 24

<210> 41
 <211> 777
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 41

cgccctgaag acagaatgtt ccatatcaga gctgtgatct tgagagccct ctccttggct 60
 ttcttctga gtctccgagg agctggggcc atcaaggcgg accatgtgtc aacttatgcc 120
 gcgtttgtac agacgcatag accaacaggg gagtttatgt ttgaatttga tgaagatgag 180
 atgttctatg tggatctgga caagaaggag accgtctggc atctggagga gtttggccaa 240
 gccttttctt ttgaggctca gggcgggctg gctaacattg ctatattgaa caacaacttg 300

aataccttga tccagegttc caaccacact caggccacca acgatcccc tgaggtgacc 360
 gtgtttcca aggagcctgt ggagctgggc cagcccaaca ccctcatctg ccacattgac 420
 aagttcttcc caccagtgt caacgtcagc tggctgtgca acggggagct ggtcactgag 480
 ggtgtcgctg agagcctctt cctgccaga acagattaca gttccacaa gttccattac 540
 ctgacctttg tgcctcagc agaggacttc tatgactgca gggaggagca ctggggcttg 600
 gaccaccgc tctcaagca ctgggaggcc caagagccaa tccagatgcc tgagacaacg 660
 gagactgtgc tctgtgcct gggcctgggt ctggcctag tccgcatcat cgtgggcacc 720

gtcctcatca taaagtctct gcgttctggc catgaccccc gggcccaggg gaccctg 777

<210> 42
 <211> 789
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Codon optimized HLA-DPA1 nucleotide sequence
 <400> 42

catatcgccc ctgaagatag gatgttccat ataagagctg ttatcctgag agcactcagc 60
 cttgcgttcc tgctgagttt acgaggagct ggtgccataa aagcggatca tgtatcaact 120
 tatgccgcgt ttgtacagac tcaccgcccg acaggggagt tcatgtttga atttgatgaa 180
 gatgaaatgt tctatgtgga tttagataag aaagagacag tatggcatct ggaagaattt 240

ggccaggcct ttcctttga agctcaaggc ggcttgctta acattgctat attgaataac 300
 aatttgaata ccttgatcca acgttcgaat catacgcaag cgaccaatga tccgctgag 360
 gtgaccgttt ttccaaagga accggttgag ctgggtcagc cgaacacctt aatttgccac 420
 atcgataaat tttttccacc agtgtgtaac gtcacgtggc tgtgcaatgg tgaacttgtg 480
 actgaagggtg tcgcagaaag tttattcctg ccccgtagag attacagctt tcacaaattt 540
 cattacctga cgtttgttcc gtcagcagag gacttctatg actgtcgcgt agaacattgg 600
 ggattggacc agecgtctct caaacactgg gaggcccaag agcctattca gatgcctgaa 660

accacggaaa ctgtgctttg tgcactgggt ctggttctgg gcctagtgg cattatcgtc 720

```

ggcacagttt taattattaa atctttacgt tctggacatg acccccgggc acaggggacc      780
cttctcgag                                                                    789
<210>    43
<211>    263
<212>    PRT
<213>    Homo sapiens
<400>    43
His Met Arg Pro Glu Asp Arg Met Phe His Ile Arg Ala Val Ile Leu
  1             5             10             15
Arg Ala Leu Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ser Leu Arg Gly Ala Gly Ala
          20             25             30
Ile Lys Ala Asp His Val Ser Thr Tyr Ala Ala Phe Val Gln Thr His
          35             40             45
Arg Pro Thr Gly Glu Phe Met Phe Glu Phe Asp Glu Asp Glu Met Phe
          50             55             60
Tyr Val Asp Leu Asp Lys Lys Glu Thr Val Trp His Leu Glu Glu Phe
          65             70             75             80
Gly Gln Ala Phe Ser Phe Glu Ala Gln Gly Gly Leu Ala Asn Ile Ala
          85             90             95

Ile Leu Asn Asn Asn Leu Asn Thr Leu Ile Gln Arg Ser Asn His Thr
          100             105             110
Gln Ala Thr Asn Asp Pro Pro Glu Val Thr Val Phe Pro Lys Glu Pro
          115             120             125
Val Glu Leu Gly Gln Pro Asn Thr Leu Ile Cys His Ile Asp Lys Phe
          130             135             140
Phe Pro Pro Val Leu Asn Val Thr Trp Leu Cys Asn Gly Glu Leu Val
          145             150             155             160
Thr Glu Gly Val Ala Glu Ser Leu Phe Leu Pro Arg Thr Asp Tyr Ser
          165             170             175
Phe His Lys Phe His Tyr Leu Thr Phe Val Pro Ser Ala Glu Asp Phe
          180             185             190
Tyr Asp Cys Arg Val Glu His Trp Gly Leu Asp Gln Pro Leu Leu Lys

```


ctatagtat atgcactgga accaacagaa accaggacag ccaccagac tcctcatcta 180
 tcttgatcc aacctagaat ctgggtccc tgccaggttc agtggcagtg ggtctgggac 240
 agacttcacc ctcaacatcc atcctgtgga ggaggaggat gctgcaacct attactgtca 300
 gcacattagg gagcttacac gttcggaggg gggaccaagc tggaaataaa acgggctgat 360

gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca t 391

- <210> 46
- <211> 384
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> VL_1-2
- <400> 46

gcgttgggga ttigtgctga cagtctcctg cttccttagc tgtatctctg gggcagaggg 60
 ccaccatctc atacagggcc agcaaaagtg tcagtacatc tggctatagt tatatgcact 120
 ggaaccaaca gaaaccagga cageccacca gactcctcat ctatcttgta tccaacctag 180
 aatctggggt ccctgccagg ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc acctcaaca 240
 tccatcctgt ggaggaggag gatgctgcaa cctattactg tcagcacatt agggagctta 300

cacgttcgga ggggggacca agctggaaat aaaacgggct gatgctgcac caactgtatc 360
 catcttccca caatcggcgg aggg 384

- <210> 47
- <211> 379
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> VL_1-3
- <400> 47

gggggggatt gtgctgacca gtctcctgct tccttagctg tatctctggg gcagagggcc 60
 accatctcat acagggccag caaaagtgtc agtacatctg gctatagtta tatgactgg 120
 aaccaacaga aaccaggaca gccaccaga ctctcatct atcttgatc caacctagaa 180
 tctggggtcc ctgccaggtt cagtggcagt gggctctggga cagacttcac cctcaacatc 240

catcctgtgg aggaggagga tgctgcaacc tattactgtc agcacattag ggagcttaca 300
 cgttcggagg ggggaccaag ctggaataaa aacgggctga tgctgcacca actgtatcca 360
 tcatccccac catgaaaaa 379

- <210> 48

<211> 360
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL_2-1
 <400> 48
 ttgggaacaa cggaccatga tgtgatgacc cagactccac tcactttgtc ggttaccatt 60
 ggacaaccag cctccatctc ttgcaagtca agtcagagcc tcttagatag tgatggaaag 120
 acatatttga attggttggt acagaggcca ggccagtctc caaagcgctt aatctatctg 180

 gtgtctaaac tggactctgg agtccctgac aggttctactg gcagtggatc agggacagat 240
 ttcacactga aaatcagcag agtggaggct gaggatttgg gagtttatta ttgctggcaa 300
 ggtacacatt ttctcagac gttcgggtga ggcaccttgc tggggatcaa acgaggctgc 360

 <210> 49
 <211> 391
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL_2-2
 <400> 49
 gggtcacggt gagttgtaat gaccagact cactcactt tgtcggttac cattggacaa 60
 ccagcctcca tatcttgcaa gtcaagtcag agcctcttag atagtgatgg aaagacatat 120

 ttgaattggt tgttacagag gccaggccag tctcaaagc gcctaatcta tctggtgtct 180
 aaactggact ctggagtccc tgacaggttc actggcagtg gatcaggac agatttcaca 240
 ctgaaaaatca gcagagtgga ggctgaggat ttgggagttt attattgctg gcaaggtaca 300
 cattttcctc agacgttcgg tggaggcacc aagctggaaa tcaaacgggc tgatgctgca 360
 ccaactgtat ccatcttcac accataaaga g 391

 <210> 50
 <211> 408
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VL_2-3
 <400> 50
 ggggtgtggt caaaagaccg atcgccgtag ttgtgatgac cagactccac tcactttgtc 60

ggttaccatt ggacaaccag cctccatctc ttgcaagtca agtcagagcc tcttagatag	120
tgatggaaag acatatttga attggttgtt acagaggcca ggccagtctc caaagcct	180
aatctatctg gtgtctaac tggactctgg agtccctgac aggttcaactg gcagtggatc	240
agggacagat ttcacactga aaatcagcag agtggaggct gaggatttgg gagtttatta	300
ttgctggcaa ggtacacatt ttcctcagac gttcgggtga ggcaccaagc tggaaatcaa	360
acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcaaaacc atcaacaa	408