



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2009-0013763  
 (43) 공개일자 2009년02월05일

- (51) Int. Cl.<sup>9</sup>  
 C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01)  
 C12N 15/09 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2008-7025863  
 (22) 출원일자 2008년10월22일  
 심사청구일자 없음  
 번역문제출일자 2008년10월22일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2007/056536  
 국제출원일자 2007년03월20일  
 (87) 국제공개번호 WO 2007/108559  
 국제공개일자 2007년09월27일
- (30) 우선권주장  
 JP-P-2006-081322 2006년03월23일 일본(JP)  
 JP-P-2006-299554 2006년11월02일 일본(JP)

- (71) 출원인  
 기린 파마 가부시끼가이샤  
 일본 150-8011 도쿄도 시부야구 진구마에 6-26-1
- (72) 발명자  
 가이, 마사유키  
 일본 3701295 군마켄 다카사끼시 미야하라쵸 3번  
 지 기린 파마 가부시끼가이샤 탄사쿠 켄큐쵸 내  
 모또끼, 가즈히로  
 일본 3701295 군마켄 다카사끼시 미야하라쵸 3번  
 지 기린 파마 가부시끼가이샤 탄사쿠 켄큐쵸 내  
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
 이석재, 장수길, 김성완

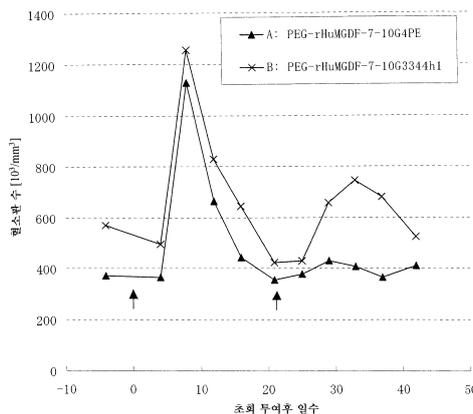
전체 청구항 수 : 총 20 항

**(54) 인간 트롬보포이에틴 수용체에 대한 아고니스트 항체**

**(57) 요약**

본 발명은, 인간 트롬보포이에틴 수용체(별명:인간 c-Mpl)에 대한 아고니스트 항체를 제공한다. 구체적으로는, 항체의 정상 영역이, (1) 인간 항체의 중쇄 정상 영역 및 경쇄 정상 영역의 아미노산 서열, (2) 인간 항체의 서브클래스 사이에서 중쇄 정상 영역의 도메인을 교체한 중쇄 정상 영역의 아미노산 서열, 및 인간 항체 경쇄 정상 영역의 아미노산 서열, 또는 (3) 상기 (1) 또는 (2)의 아미노산 서열에서 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열, 중 어느 하나의 아미노산 서열을 가지고, 또한 항체의 가변 영역이 인간 트롬보포이에틴 수용체에 결합하여 그 수용체를 활성화하는 능력을 가지고, (a) 인간 체대혈 CD34+세포를 이용한 CFU-MK 콜로니 형성 측정법에서, 10,000ng/mL 이하의 농도로 콜로니 형성을 유도하는 것, 및 (b) UT7/TPO 세포를 이용한 증식능 측정법에서, 최대 활성이 PEG-rHuMGDF의 50% 이상이고, 또한 50% 유효 농도(EC50)가 100nM 이하인 것의 성질을 가지는, 인간 트롬보포이에틴 수용체에 대한 아고니스트 항체, 및 상기 항체를 포함하는 혈소판 감소증 치료용 의약 조성물을 제공한다.

**대표도 - 도8**



(72) 발명자

**가따오카, 시로**

일본 1508011 도쿄도 시부야구 진구마에 6쵸메 26  
반 1고 기린 파마 가부시끼가이샤 내

**요시다, 히데아끼**

일본 3701295 군마켄 다카사끼시 미야하라쵸 3번지  
기린 파마 가부시끼가이샤 탄사쿠 켄큐쵸 내

**하기와라, 데쯔야**

일본 3701295 군마켄 다카사끼시 미야하라쵸 3번지  
기린 파마 가부시끼가이샤 탄사쿠 켄큐쵸 내

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

항체의 정상 영역이, 이하의 (1)~(3):

- (1) 인간 항체의 중쇄 정상 영역 및 경쇄 정상 영역의 아미노산 서열,
- (2) 인간 항체의 서브클래스 사이에서 중쇄 정상 영역의 도메인을 교체한 중쇄 정상 영역의 아미노산 서열, 및 인간 항체 경쇄 정상 영역의 아미노산 서열, 또는
- (3) 상기 (1) 또는 (2)의 아미노산 서열에서 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열

중 어느 하나의 아미노산 서열을 가지고, 또한 항체의 가변 영역이 인간 트롬보포이에틴(thrombopoietin) 수용체에 결합하여 그 수용체를 활성화하는 능력을 가지고, 이하의 (a) 및 (b):

- (a) 인간 제대혈 CD34+세포를 이용한 CFU-MK 콜로니 형성 측정법에서, 10,000ng/mL 이하의 농도로 콜로니 형성을 유도하는 것, 및
- (b) UT7/TPO 세포를 이용한 증식능 측정법에서, 최대 활성이, 그의 N 말단이 페길레이트(pegylated, PEG)화된 서열 번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 하기의 구조:

PEG-NH-SPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSRLSQCPVHPLPTPVLLPAVDFSLGEWKTQMEETKAQDILG  
 AVTLLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRLLLGALQSLLGTQLPPQGRRTAHKDPNAIFLSFQHLLRG  
 KVRFLMLVGGSTLCVRRAPPTTAVPS-COOH

를 가지는 PEG-rHuMGDF의 50% 이상이고, 또한 50% 유효 농도(EC50)가 100nM 이하인 것의 성질을 가지는, 인간 트롬보포이에틴 수용체(c-Mpl)에 대한 아고니스트 항체.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 이하의 (a) 및 (b):

- (a) 인간 제대혈 CD34+세포를 이용한 CFU-MK 콜로니 형성 측정법에서, 1,000ng/mL 이하의 농도로 콜로니 형성을 유도하는 것, 및
- (b) UT7/TPO 세포를 이용한 증식능 측정법에서, 최대 활성이 PEG-rHuMGDF의 70% 이상이고, 또한 EC50이 10nM 이하인 것

의 성질을 가지는 항체.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 이하의 (a) 및 (b):

- (a) 인간 제대혈 CD34+세포를 이용한 CFU-MK 콜로니 형성 측정법에서, 100ng/mL 이하의 농도로 콜로니 형성을 유도하는 것, 및
- (b) UT7/TPO 세포를 이용한 증식능 측정법에서, 최대 활성이 PEG-rHuMGDF의 90% 이상이고, 또한 EC50이 1nM 이하인 것

의 성질을 가지는 항체.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 이하의 (1)~(8):

- (1) 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역,

- (2) 서열 번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역,
  - (3) 서열 번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역,
  - (4) 서열 번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역,
  - (5) 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역,
  - (6) 서열 번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 5로 표시되는 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역,
  - (7) 서열 번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 7로 표시되는 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및
  - (8) 서열 번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 9로 표시되는 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역
- 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 가지는 항체.

**청구항 5**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 c-Mpl에 대한 아고니스트 항체가 인간 항체인 항체.

**청구항 6**

제4항에 있어서, 중쇄 정상 영역의 상부 힌지부가, 이하의 (1) 및 (2):

- (1) 서열 번호 10으로 표시되는 아미노산 서열, 및
- (2) 서열 번호 11로 표시되는 아미노산 서열

의 아미노산 서열로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 가지고, 상기 중쇄 정상 영역의 중간 힌지부 이후의 C 말단측이, 인간 면역글로불린 G4의 아미노산 서열 또는 상기 G4의 아미노산 서열에서 카바트(Kabat) EU 번호 부여에 의한 228위치 세린이 프롤린으로, 또한 235위치 류신이 글루탐산으로 치환된 아미노산 서열을 가지는 항체.

**청구항 7**

제6항에 있어서,

이하의 (1)~(8):

- (1) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 가지는 항체,
- (2) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 가지는 항체,
- (3) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 가지는 항체,
- (4) 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 가지는 항체,
- (5) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열 번호 3의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1

또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 가지는 항체,

(6) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열 번호 5의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 가지는 항체,

(7) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열 번호 7의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 가지는 항체, 및

(8) 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열 번호 9의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 가지는 항체

로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항체를 유효 성분으로서 포함하는 의약 조성물.

#### 청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항체를 유효 성분으로서 포함하는 혈소판 증가제.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 골수 이식 또는 제대혈 이식시의 혈소판 회복 촉진용인 혈소판 증가제.

#### 청구항 11

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항체를 유효 성분으로서 포함하는 혈소판 감소증 치료제.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 혈소판 감소증이 이하의 (1)~(6):

- (1) 특발성 혈소판 감소성 자반병(ITP),
- (2) 암 화학 요법 후의 혈소판 감소증,
- (3) 재생 불량성 빈혈,
- (4) 골수 이형성 증후군(MDS),
- (5) 간 질환에 수반되는 혈소판 감소증, 및
- (6) 골수 이식 또는 제대혈 이식 후의 혈소판 감소증

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환 중 어느 하나인 혈소판 감소증 치료제.

#### 청구항 13

이하의 (1)~(8):

- (1) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 코드하는 염기 서열,
- (2) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 코드하는 염기 서열,
- (3) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 코드하는 염기 서열, 및
- (4) 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 코드하는 염기 서열,
- (5) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열 번호 3의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 코드하는 염기

서열,

(6) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열 번호 5의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 코드하는 염기 서열,

(7) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열 번호 7의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 코드하는 염기 서열, 및

(8) 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열 번호 9의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 코드하는 염기 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되는, 중쇄를 코드하는 염기 서열을 포함하는 DNA 및 경쇄를 코드하는 염기 서열을 포함하는 DNA, 및 그들의 DNA의 발현을 제어하는 염기 서열을 포함하는 1 또는 복수의 DNA를 유지하는 포유 동물 세포를 제작하고, 상기 포유 동물 세포를 배양한 배양액으로부터 상기 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체를 코드하는 DNA의 발현 산물을 단리 정제하는 것을 포함하는, 인간 c-Mpl에 대한 아고니스트 항체의 제조 방법.

#### 청구항 14

이하의 (1)~(4):

- (1) 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열,
- (2) 서열 번호 4로 표시되는 아미노산 서열,
- (3) 서열 번호 6으로 표시되는 아미노산 서열, 및
- (4) 서열 번호 8로 표시되는 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 코드하는 염기 서열을 포함하는 DNA.

#### 청구항 15

이하의 (1)~(4):

- (1) 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열,
- (2) 서열 번호 4로 표시되는 아미노산 서열,
- (3) 서열 번호 6으로 표시되는 아미노산 서열, 및
- (4) 서열 번호 8로 표시되는 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 중쇄를 코드하는 DNA.

#### 청구항 16

제15항에 있어서,

항체 중쇄의 상부 힌지부가, 이하의 (1) 및 (2):

- (1) 서열 번호 10으로 표시되는 아미노산 서열, 및
- (2) 서열 번호 11로 표시되는 아미노산 서열

의 아미노산 서열로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열이고, 상기 항체 중쇄의 중간 힌지부 이후의 C 말 단측이 인간 면역글로불린 G4의 아미노산 서열 또는 상기 G4의 아미노산 서열에서 카바트 EU 번호 부여에 의한 228위치 세린이 프롤린으로, 또한 235위치 류신이 글루탐산으로 치환된 아미노산 서열을 가지는 DNA.

#### 청구항 17

이하의 (1)~(8):

- (1) 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열,
- (2) 서열 번호 5로 표시되는 아미노산 서열,
- (3) 서열 번호 7로 표시되는 아미노산 서열,
- (4) 서열 번호 9로 표시되는 아미노산 서열,
- (5) 서열 번호 3의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열,
- (6) 서열 번호 5의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열,
- (7) 서열 번호 7의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열, 및
- (8) 서열 번호 9의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 코드하는 염기 서열을 포함하는 DNA.

**청구항 18**

이하의 (1)~(8):

- (1) 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열,
- (2) 서열 번호 5로 표시되는 아미노산 서열,
- (3) 서열 번호 7로 표시되는 아미노산 서열,
- (4) 서열 번호 9로 표시되는 아미노산 서열,
- (5) 서열 번호 3의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열,
- (6) 서열 번호 5의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열,
- (7) 서열 번호 7의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열, 및
- (8) 서열 번호 9의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 경쇄를 코드하는 DNA.

**청구항 19**

조혈 간세포 이식 후의 혈구 회복 촉진용인 인간 c-Mpl 아고니스트 항체를 유효 성분으로서 포함하는 혈구 증가제.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 항체를 유효 성분으로서 포함하는 혈구 증가제.

**명세서**

**기술분야**

- <1> 본 발명은, 인간 트롬보포이에틴 수용체(별명:인간 c-Mpl)에 대한 아고니스트 항체에 관한 것이다.
- <2> 또한 본 발명은, 항 인간 c-Mpl 아고니스트 항체를 유효 성분으로 하는, 임상상 혈소판을 증가시킬 필요가 있는

환자/질환에 대한 치료제, 특히 혈소판 감소증 치료제에 관한 것이다.

**배경 기술**

<3> <TPO 및 TPO 수용체에 대하여>

<4> 트롬보포이에틴(Thrombopoietin:TPO)은 생체 내에서 거핵구 및 혈소판의 증식을 촉진하는 조혈 인자이다. 인간 TPO는 전장 332 아미노산 잔기를 포함하는 당 단백질이고, 그 활성에는 N 말단측의 서열이 중요한 것으로 알려져 있다. 세포막 상의 TPO 수용체와 결합함으로써 기능을 발휘한다.

<5> c-Mpl은, 현재 알려져 있는 유일한 TPO 수용체이다. 인간 c-Mpl은, 시그널 펩티드를 포함하면 635 아미노산, 성숙형은 610 아미노산을 포함하는 막 일회 관통형 당 단백질이고, I형의 사이토카인 수용체 패밀리에 속해 있다. 인간 c-Mpl의 메신저 RNA 및 단백질의 서열은 이미 보고되어 있다(Genbank:NM\_005373, NP\_005364 참조). 동일한 패밀리의 분자로서 에리트로포이에틴 수용체(EpoR) 또는 G-CSF 수용체(G-CSFR), 인터루킨 3 수용체(IL-3R) 등을 들 수 있다. 인간 c-Mpl은 세포 외에 2개의 CRH(Cytokine Receptor Homologue) 도메인(N 말단측으로부터 CRH1, CRH2라고 불림)을 가지고, 그 중에 사이토카인 수용체 패밀리에 특징적인 WSXWS 모티프를 포함하고 있다. 세포 내 도메인에는 Box1, Box2라고 불리는 2개의 서열이 있고, 이들은 시그널 전달에 필수이다. TPO는 CRH1에 결합하고, c-Mpl을 이량체화함으로써 시그널을 도입한다고 생각되고 있는데, 상세한 결합 및 활성화의 양식은 해명되어 있지 않다. c-Mpl이 이량체화되면, 세포 내 도메인에 결합한 시그널 전달 키나아제가 활성화 되고, 인산화 시그널이 세포 내에 전달된다. TPO-Mpl 시그널에 의해 Jak-STAT, PI3K-Akt, Ras-MAPK의 각 경로가 움직이는 것이 알려져 있다. TPO 또는 c-Mpl이 결손된 마우스는 혈소판 수가 야생형 마우스의 10-20% 정도 까지 감소하는 것이 보고되어 있고, TPO-Mpl 시스템이 혈소판 수를 조절하는 주요한 시스템을 나타내고 있다. c-Mpl의 발현은 거핵구뿐만 아니라, 또한 미분화된 조혈 전구 세포 또는 조혈 간세포에서도 확인된다. 골수 중의 c-Mpl 양성 세포 분획은 c-Mpl 음성 분획에 비하여, 높은 골수 재구축능을 가지고 있는 것이 나타나 있고, 또한, c-Mpl 결손 마우스에서는 거핵구·혈소판뿐만 아니라 조혈 간세포도 감소되고 있음을 알 수 있다(비특허 문헌 1, 2 참조). 이들 지견으로부터, TPO-Mpl 시스템이 조혈계에 간세포 레벨로부터 관여하고 있음이 시사되어 있다.

<6> TPO가 클로닝된 이래, 혈소판 감소증의 치료약으로서의 이용이 기대되고, 지금까지 2종류의 재조합형 TPO의 임상 시험이 행해지고 있다(비특허 문헌 3 참조). 전체 길이의 인간 TPO(rhTPO) 및 인간 TPO의 활성 부위인 N 말단측 163 아미노산의 펩티드 서열을 폴리에틸렌글리콜(PEG)화한 PEG-rHuMGDF(Pegylated Recombinant Human Megakaryocyte Growth and Development Factor)이다. 임상 시험에서, 이들 재조합형 TPO는 건강한 사람 및 특발성 혈소판 감소성 자반병(Idiopathic Thrombocytopenic Purpura:ITP) 환자의 혈소판을 증가시키는 것에 성공하였다. 또한, 골수 비파괴적인 화학 요법에 수반되는 혈소판 감소증을 경감시키는 효과가 나타나 있다. 또한, 예의 수는 적지만, 재생 불량성 빈혈(Aplastic Anemia:AA), 골수 이형성 증후군(Myelodysplastic Syndrome:MDS)의 환자에 대해서도 재조합형 TPO의 유효성이 보고되어 있다(비특허 문헌 4, 5).

<7> <c-Mpl 아고니스트 항체에 대하여>

<8> TPO와 마찬가지로 c-Mpl을 통하여 시그널을 도입하는 성질을 가지면서, 분자로서는 전혀 상이한 여러 가지 TPO 모방체(mimetics)가 연구되어 있다(비특허 문헌 6, 7 참조). 모방체에는 크게 나누어, 펩티드성 저분자, 비펩티드성 저분자, 항체 유래 분자, 아고니스트 항체 등이 알려져 있다.

<9> 공지의 항 c-Mpl 아고니스트 인간 항체로서, 12B5, 12E10, 12D5(특허 문헌 1 참조)를 들 수 있다. 이들은 전장 항체(Whole antibody, 예를 들면 전장 IgG)의 형태로 프라이머리 인간 세포(primary human cell)에 대한 활성을 가지지 않는다. 또한, 본 명세서에서 사용하는 "프라이머리 인간 세포"란, TPO에 대하여 고 감수성을 가지는 수립된 특수한 주화 세포 또는 TPO 수용체 유전자를 유전자 재조합 기술에 의해 도입하여 그 수용체를 고발현시킨 세포가 아니라, 인간 체대혈 또는 인간 골수 유래의 CD34+세포 등의 본래 생체 내에서 TPO의 작용 대상으로 되어 있는 세포를 의미한다.

<10> 또한, 공지의 아고니스트 마우스 항체로서, BAH-1(특허 문헌 2, 비특허 문헌 8 참조), VB22B(특허 문헌 3 참조)를 들 수 있는데, 마우스 항체는 인간 혈중에서 항원성을 나타내는 것으로 알려져 있고, 의약품으로서의 작용에는 적합하지 않다. 또한, 일반적으로, 아고니스트 항체를 전장 항체로, 예를 들면 CDR 그래프팅 등의 방법을 이용하여, 그 활성을 유지한 채로 인간화하는 것은 어렵다(특허 문헌 3, 비특허 문헌 9 참조). 따라서, 상기한 바와 같은 공지의 아고니스트 항체가 존재한다고 하더라도, 프라이머리 세포에 작용하는 아고니스트 인간

항체의 창출은 쉽지는 않다.

- <11> 또한 전술한 TPO 모방체에서 기술한 항체 유래의 저분자도 임의의 종의 아고니스트 항체이고, 항체의 일부를 이용 개변한 디아바디(Diabody), 단일쇄(Fv)<sub>2</sub>(Sc(Fv)<sub>2</sub>)가 보고되어 있다(특허 문헌 1, 3 참조). 그러나, 이 방법에 의해 작출된 개변 항체는 분자의 대폭적인 개변에 의한 항원성이 염려되고, 또한 전장 항체에 비하여 혈중 반감기가 단축되는 등, 의약품으로서 이용하기 위해서는 문제가 많다.
- <12> 이상, 전장 항체는 저 항원성 또는 혈중 반감기의 길이 등, 의약품으로서 유용한 성질을 구비하고 있는 한편, 전술한 바와 같이, 전장 항체로 충분한 활성을 가지는 아고니스트 인간 항체를 제작하는 것은 쉽지는 않다.
- <13> 그래서, 이하에 기술하는 바와 같이, 본 발명자들은 항체의 구조에 대폭적인 개변을 가하지 않고, 충분한 활성을 가진 아고니스트 인간 항체의 수득을 시도하고, 그 수득에 이르렀다. 또한 항체의 힌지(hinge) 영역에 개변을 가하고, 아고니스트 활성을 증폭시키는 데 성공하였다. 본 발명에 의해 제조된 항체는 혈소판 감소증 치료약으로서의 이용에 적합하다고 생각된다.
- <14> 비특허 문헌 1: [미야자키 히로시, 「트롬보포이에틴의 장래 전망」, Japanese Journal of Transfusion Medicine, 46(3), 311-316, 2000]
- <15> 비특허 문헌 2: [Murone M 등, Stem Cell 16:1-6, 1998]
- <16> 비특허 문헌 3: [Kuter DJ 등, Blood 100(10):3457-69, 2002]
- <17> 비특허 문헌 4: [Yonemura Y 등, Int J Hemat (82) 307-309, 2005]
- <18> 비특허 문헌 5: [Komatsu N 등, Blood 96 296a, 2000]
- <19> 비특허 문헌 6: [Broudy VC 등, Cytokine. 25(2):52-60, 2004]
- <20> 비특허 문헌 7: [Wang B 등, Clin Pharmacol Ther. 76(6):628-38, 2004]
- <21> 비특허 문헌 8: [Deng B 등, Blood 92(6):1981-1988, 1998]
- <22> 비특허 문헌 9: [Ji Hee Son 등, Journal of Immunological Methods 286:187-201, 2004]
- <23> 특허 문헌 1: 국제 공개 제W099/10494호 팸플릿
- <24> 특허 문헌 2: 국제 공개 제W099/03495호 팸플릿
- <25> 특허 문헌 3: 국제 공개 제W02005/056604호 팸플릿

**발명의 상세한 설명**

- <26> <발명의 개시>
- <27> 본 발명의 목적은 신규한 항 인간 c-Mpl 아고니스트 항체를 제공하는 것이다.
- <28> 본 발명에서, "항체"란 지금까지 전장 항체에서는 어려웠던, 인간 c-Mpl에 대하여 천연의 리간드인 TPO와 거의 동등한 시그널을 도입할 수 있고, 프라이머리 인간 세포에 대한 증식 자극 활성을 가지는 항체이다.
- <29> 본 발명의 제2 목적은, 항체의 단편화를 행하지 않고 아고니스트 항체의 활성을 높이는 기술을 제공함으로써, 항체 분자가 본래 가지는 긴 반감기, 저 항원성이라는 의약품으로서 바람직한 성질을 가지는 신규한 항 인간 c-Mpl 아고니스트 항체를 제공하는 것이다.
- <30> 상기 과제를 해결하기 위해서, 본 발명자들은, 항 인간 c-Mpl 아고니스트 항체의 연구에 열심히 임하였다. 그 결과, 전장 항체로, 천연 리간드와 거의 동등한 시그널을 발생시키고, 인간 프라이머리 세포에 대한 활성을 가지는 인간 항체를 수득하였다. 또한, 수득한 아고니스트 항체에 대하여 더욱 열심히 검토를 행하여, 항체의 단편화를 행하지 않고 그 아고니스트 활성을 높이는 개변 방법을 발견하고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- <31> 즉, 본 발명은 이하의 특징을 포함한다.
- <32> 1. 인간 트롬보포이에틴 수용체에 대한 아고니스트 항체
- <33> 본 발명에 관한 인간 트롬보포이에틴 수용체에 대한 아고니스트 항체는 이하의 (1)~(6)에 나타난 항체를 포함한다.

- <34> (1) 항체의 정상 영역이 이하의 (i)~(iii):
- <35> (i) 인간 항체의 중쇄 정상 영역 및 경쇄 정상 영역의 아미노산 서열,
- <36> (ii) 인간 항체의 서브클래스 사이에서 중쇄 정상 영역의 도메인을 교체한 중쇄 정상 영역의 아미노산 서열, 및 인간 항체 경쇄 정상 영역의 아미노산 서열, 또는
- <37> (iii) 상기 (i) 또는 (ii)의 아미노산 서열에서 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열,
- <38> 중 어느 하나의 아미노산 서열을 가지고, 또한 항체의 가변 영역이 인간 트롬보포이에틴 수용체에 결합하여 그 수용체를 활성화하는 능력을 가지고, 이하의 (a) 및/또는 (b):
- <39> (a) 인간 제대혈 CD34+세포를 이용한 CFU-MK 콜로니 형성 측정법에서, 10,000ng/mL 이하의 농도로 콜로니 형성을 유도하는 것,
- <40> (b) UT7/TPO 세포를 이용한 증식능 측정법에서, 활성이 하기의 구조를 가지는 PEG-rHuMGDF의 50% 이상이고, 또한 50% 유효 농도(EC50)가 100nM 이하인 것
- <41> 의 성질을 가지는, 인간 트롬보포이에틴 수용체에 대한 아고니스트 항체.
- <42> 본 명세서 중, 인간 항체 서브클래스는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다. 인간 면역글로불린의 정상 영역 등의 서열은, 예를 들면 NCBI 홈페이지(GenBank, UniGene 등)로부터 입수 가능하고, 예를 들면 인간 IgG1 중쇄 정상 영역에 대해서는 등록 번호 J00228, 인간 IgG2 중쇄 정상 영역에 대해서는 등록 번호 J00230, 인간 IgG3 중쇄 정상 영역에 대해서는 등록 번호 X03604, 인간 IgG4 중쇄 정상 영역에 대해서는 등록 번호 K01316, 인간 경쇄 κ 정상 영역에 대해서는 등록 번호 V00557, X64135, X64133 등, 인간 경쇄 λ 정상 영역에 대해서는 등록 번호 X64132, X64134 등을 포함할 수 있다.
- <43> 본 명세서 중, "인간 제대혈 CD34+세포를 이용한 CFU-MK 콜로니 형성 측정법"이란, 후술하는 실시예 6에 기재한 측정법을 의미하고, 콜로니 형성에 필요한 항체의 농도는 이 측정법에 기초하여 구할 수 있다.
- <44> 본 명세서 중, "UT7/TPO 세포를 이용한 증식능 측정법"이란, 후술하는 실시예 5에 기재한 측정법을 의미하고, 증식 활성 및 EC50은 이 측정법에 기초하여 구할 수 있다.
- <45> 본 명세서 중, "PEG-rHuMGDF"란, 인간 TPO의 아미노 말단 수용체 결합 도메인을 포함하는 말단 절단형(truncated) 단백질을 코드하는 cDNA를 함유하는 플라스미드로 형질 전환된 대장균(E. coli)을 사용하여 생산되는[문헌: Ulich 등, Blood 86:971-976(1995)] 폴리펩티드를 추출하고, 리폴딩(refolding)하고, 정제하고, 그 아미노 말단에 폴리에틸렌글리콜(PEG) 부분을 공유 결합시킨 서열 번호 1의 아미노산 서열을 가지는 분자이고, 이하의 구조:  

```

PEG-NH-SPAPPACDLRVLKLLRDSHVLHSRLSQCEVHPLPPTVLLPAVDFSLGEWKTQMEETKAQDILG
AVTLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSGQVRLLLGALQSLGTLQPPQGRRTAHKDPNAIFLSFQHLLRG
KVRFLMLVGGSTLCVRRAPPTTAVPS-COOH

```
- <46> 를 가지는 것이다.
- <47> 를 가지는 것이다.
- <48> 본 명세서 중, "인간 c-Mpl을 활성화한다"란, 인간 c-Mpl을 발현하고 있는 세포에서 인간 c-Mpl에 관한 세포 내 시그널 전달을 일으키는 것을 말한다.
- <49> 본 명세서 중, "수개"라는 용어는, 2 내지 약 10개, 예를 들면 2~9개, 2~8개, 2~7개, 2~6개, 2~5개, 2~4개, 또는 2~3개의 정수를 의미한다.
- <50> (2) 상기 콜로니 형성 측정법에 의해 콜로니 형성을 유도하는 활성을 가지고/가지거나 상기 UT7/TPO 세포를 이용한 증식능 측정법에 의해 세포 증식 활성을 가지는 항체 중, 콜로니 형성 활성에 대해서는 10,000ng/mL 이하의 농도로 콜로니 형성을 유도하는 활성을 가지는, 바람직하게는 1,000ng/mL 이하의 농도로 그 활성을 가지는, 더 바람직하게는 100ng/mL 이하의 농도로 그 활성을 가지는 상기 (1)의 항체.
- <51> (3) 상기 세포 증식 활성이 PEG-rHuMGDF의 50% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 더 바람직하게는 90% 이상의 활성을 나타내고, 50% 유효 농도(EC50)가 100nM 이하, 바람직하게는 10nM 이하, 더 바람직하게는 1nM 이하의 것인

상기 (1)의 항체.

- <52> (4) 상기 콜로니 형성 측정법 및 상기 증식능 측정법의 양자의 측정 방법에 의해 각각 이하의 활성을 나타내는 상기 (1)의 항체.
- <53> (i) 이하의 (a) 및 (b)의 성질을 가지는, 인간 트롬보포이에틴 수용체에 대한 아고니스트 항체.
- <54> (a) 인간 제대혈 CD34+세포를 이용한 CFU-MK 콜로니 형성 측정법에서, 10,000ng/mL 이하의 농도로 콜로니 형성을 유도한다.
- <55> (b) UT7/TPO 세포를 이용한 증식능 측정법에서, 최대 활성이 하기의 구조를 가지는 PEG-rHuMGDF의 50% 이상이고, 또한 50% 유효 농도(EC50)가 100nM 이하이다.
- <56> (ii) 이하의 (a) 및 (b)의 성질을 가지는, 인간 c-Mpl에 대한 아고니스트 항체.
- <57> (a) 인간 제대혈 CD34+세포를 이용한 CFU-MK 콜로니 형성 측정법에서, 1,000ng/mL 이하의 농도로 콜로니 형성을 유도한다.
- <58> (b) UT7/TPO 세포를 이용한 증식능 측정법에서, 최대 활성이 PEG-rHuMGDF의 70% 이상이고, 또한 EC50이 10nM 이하이다.
- <59> (iii) 이하의 (a) 및 (b)의 성질을 가지는, 인간 c-Mpl에 대한 아고니스트 항체.
- <60> (a) 인간 제대혈 CD34+세포를 이용한 CFU-MK 콜로니 형성 측정법에서, 100ng/mL 이하의 농도로 콜로니 형성을 유도한다.
- <61> (b) UT7/TPO 세포를 이용한 증식능 측정법에서, 최대 활성이 PEG-rHuMGDF의 90% 이상이고, 또한 EC50이 1nM 이하이다.
- <62> (5) 이하의 (a)~(h)로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 아미노산 서열 가변 영역 및 경쇄 아미노산 서열 가변 영역을 가지는 상기 (1)의 항체. (괄호 안에, 각 가변 영역 서열이 유래하는 후술 실시예의 항체의 명칭을 나타낸다.)
- <63> (a) 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역. (항체의 명칭:7-10)
- <64> (b) 서열 번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역. (항체의 명칭:4-49)
- <65> (c) 서열 번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역. (항체의 명칭:6-4-50)
- <66> (d) 서열 번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역. (항체의 명칭:6-5-2)
- <67> (e) 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역.
- <68> (f) 서열 번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 5로 표시되는 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역.
- <69> (g) 서열 번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 7로 표시되는 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역.
- <70> (h) 서열 번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 9로 표시되는 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역.
- <71> (6) 인간 c-Mpl에 대한 아고니스트 항체가 인간 항체인, 상기 (1)~(5)에 기재된 항체.

<72> 2. 중쇄 개변 아고니스트 항체

- <73> 본 발명에 관한 중쇄 개변 아고니스트 항체란, 이하의 것을 포함한다.
- <74> (1) 중쇄 정상 영역의 상부(upper) 힌지부가, 이하의 (a)~(b)의 아미노산 서열로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 가지고, 및, 그 중쇄 정상 영역의 중간(middle) 힌지부 이후의 C 말단측이 인간 면역글로불린 G4의 아미노산 서열 또는 상기 G4의 아미노산 서열에서 ADCC(항체 의존성 세포 장애) 활성 등에 관한 아고니스트 항체로서 바람직하지 못한 성질에 관한 부위를 변이시킨 아미노산 서열을 가지는 아고니스트 항체.
- <75> (a) 서열 번호 10으로 표시되는 아미노산 서열.
- <76> (b) 서열 번호 11로 표시되는 아미노산 서열.
- <77> 본 명세서 중에서 이용하는 상부 힌지란, 카바트(Kabat) EU 번호 부여(카바트 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, Md.(1991))에 의한 표기로 216위치 이후, 226위치보다 N 말단측의 서열을 가르킨다. 중간 힌지란, 동 표기로 226위치 이후, 231위치보다 N 말단측의 서열을 가르킨다. 인간 면역글로불린 G4를 포함하는 각 서브 타입에 대하여, 상부 힌지, 중간 힌지 및 그 전후의 아미노산 서열을 도 4B에 나타내었다. 도면 중, CH1은 상부 힌지에 인접하는 CH1 영역의 일부, CH2는 CH2 영역 중의 하부(lower) 힌지라고 일컬어지는 부분이다.
- <78> (2) 상기 중쇄 정상 영역의 중간 힌지부 이후의 C 말단측이 인간 면역글로불린 G4의 아미노산 서열에서, 카바트 EU 번호 부여에 의한 228위치 세린이 프롤린으로, 또한 235위치 류신이 글루탐산으로 치환된 아미노산 서열을 가지는 중쇄를 포함하는 항체.
- <79> (3) 이하의 (i) 또는 (ii)에 나타난, 인간 c-Mp1에 대한 아고니스트 항체인 상기 (2)의 중쇄 개변 항체.
- <80> (i) 중쇄 정상 영역의 상부 힌지부가 이하의 (a)~(b)의 아미노산 서열로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 가지고, 및, 그 중쇄 정상 영역의 중간 힌지부 이후의 C 말단측이 인간 면역글로불린 G4의 아미노산 서열 또는 그 G4의 아미노산 서열에서 카바트 EU 번호 부여에 의한 228위치 세린이 프롤린으로, 또한 235위치 류신이 글루탐산으로 치환된 아미노산 서열을 가지는 중쇄를 포함하는 인간 c-Mp1에 대한 아고니스트 항체.
- <81> (a) 서열 번호 10으로 표시되는 아미노산 서열.
- <82> (b) 서열 번호 11로 표시되는 아미노산 서열.
- <83> (ii) 더 바람직한 실시 형태로서는, 이하 (a)~(h)로 이루어진 군으로부터 선택되는, 상기 (i)에 기재된 인간 c-Mp1에 대한 아고니스트 항체를 들 수 있다.
- <84> (a) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 가지는 항체.
- <85> (b) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 가지는 항체.
- <86> (c) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 가지는 항체.
- <87> (d) 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 가지는 항체.
- <88> (e) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열 번호 3의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 가지는 항체.
- <89> (f) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열 번호 5의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 가지는 항체.
- <90> (g) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열 번호 7의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 가지는 항체.
- <91> (h) 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열 번호 9의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 가지는 항체.

3. 인간 c-MPL에 대한 아고니스트 항체의 의약 용도 및 의약 조성물

<93> 본 발명에 관한 인간 c-MPL에 대한 아고니스트 항체는, c-Mpl 수용체에 결합하여 그것을 활성화하는 능력, 및/또는 (생체내 및 시험관 내의 양쪽에서) 혈소판의 생산을 자극하는 능력(「혈소판 생성 활성화」) 및 혈소판 전구체의 생산을 자극하는 능력(「거핵구 생성 활성화」)을 가진다.

<94> 본 발명에 관한 인간 c-Mpl에 대한 아고니스트 항체를 유효 성분으로 하는 의약 조성물/의약 용도로는, 구체적으로는 다음의 것을 들 수 있다.

<95> (1) 상기 1. (1)~(6) 및 상기 2. (3) 중 어느 하나의 항체를 유효 성분으로 하는 의약 조성물.

<96> (2) 상기 1. (1)~(6) 및 상기 2. (3) 중 어느 하나에 기재된 항체를 유효 성분으로 하는 혈소판 증가제.

<97> (3) 골수 이식, 제대혈 이식시의 혈소판 회복 촉진용인 것을 특징으로 하는 상기 (2)에 기재된 혈소판 증가제.

<98> (4) 상기 1. (1)~(6) 및 상기 2. (3) 중 어느 하나의 항체를 유효 성분으로 하는 혈소판 감소증 치료제.

<99> (5) 혈소판 감소증이 이하의 (a)~(f) 중 어느 하나인, 상기 (4)에 기재된 혈소판 감소증 치료제.

<100> (a) 특발성 혈소판 감소성 자반병(ITP),

<101> (b) 암 화학 요법 후의 혈소판 감소증,

<102> (c) 재생 불량성 빈혈,

<103> (d) 골수 이형성 증후군(MDS),

<104> (e) 간 질환에 수반되는 혈소판 감소증, 또는

<105> (f) 골수 이식 또는 제대혈 이식 후의 혈소판 감소증.

<106> (6) 조혈 간세포 이식 후의 혈구 회복 촉진용인 인간 c-Mpl 아고니스트 항체를 유효 성분으로서 포함하는 혈구 증가제.

<107> (7) 상기 1. (1)~(6) 및 상기 2. (3) 중 어느 하나에 기재된 항체를 유효 성분으로서 포함하는 상기 (6)에 기재된 혈구 증가제.

4. 본 발명에 관한 항체의 제조 방법

<109> 본 발명의 항체는, 본 발명에 관한 항체를 생산하는 하이브리도마를 이용하여 항체를 제조할 수도 있고, 또는, 하이브리도마 등의 항체 생산 세포로부터 모노클로날 항체를 코딩하는 유전자를 클로닝하고, 적당한 벡터에 삽입하여, 유전자 재조합 기술을 이용하여 생산한 재조합형 항체를 제조할 수도 있다. 본 발명의 항체의 제조 방법으로서, 바람직하게는, 이하의 방법을 들 수 있다.

<110> 하기의 (a)~(h):

<111> (a) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 코딩하는 염기 서열,

<112> (b) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 코딩하는 염기 서열,

<113> (c) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 코딩하는 염기 서열,

<114> (d) 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 코딩하는 염기 서열,

<115> (e) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열 번호 3의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 코딩하는 염기 서열,

<116> (f) 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열 번호 5의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 코딩하는 염기

서열,

- <117> (g) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열 번호 7의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 코드하는 염기 서열, 및
- <118> (h) 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열 번호 9의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 코드하는 염기 서열
- <119> 로 이루어진 균으로부터 선택되는, 중쇄를 코드하는 염기 서열을 포함하는 DNA 및 경쇄를 코드하는 염기 서열을 포함하는 DNA, 및 그들의 DNA의 발현을 제어하는 염기 서열을 포함하는 1 또는 복수의 DNA를 유지하는 포유 동물 세포를 제작하고, 상기 포유 동물 세포를 배양한 배양액으로부터 상기 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체를 코드하는 DNA의 발현 산물을 단리 정제하는 것을 포함하는, 인간 c-Mp1에 대한 아고니스트 항체의 제조 방법.
- <120> 5. 본 발명에 관한 DNA
- <121> 본 발명에 관한 DNA로서, 이하의 것을 들 수 있다.
- <122> (1) 인간 Mp1에 대한 아고니스트 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 코드하는 염기 서열을 포함하는 신규한 DNA이며, 이하의 (a)~(d)로 이루어진 균으로부터 선택되는 아미노산 서열을 코드하는 염기 서열을 포함하는 DNA:
  - <123> (a) 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열;
  - <124> (b) 서열 번호 4로 표시되는 아미노산 서열;
  - <125> (c) 서열 번호 6으로 표시되는 아미노산 서열;
  - <126> (d) 서열 번호 8로 표시되는 아미노산 서열;
- <127> (2) 인간 Mp1에 대한 아고니스트 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 코드하는 염기 서열을 포함하는 신규한 DNA이며, 이하의 (a)~(h)로 이루어진 균으로부터 선택되는 아미노산 서열을 코드하는 염기 서열을 포함하는 DNA:
  - <128> (a) 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열;
  - <129> (b) 서열 번호 5로 표시되는 아미노산 서열;
  - <130> (c) 서열 번호 7로 표시되는 아미노산 서열;
  - <131> (d) 서열 번호 9로 표시되는 아미노산 서열;
  - <132> (e) 서열 번호 3의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열;
  - <133> (f) 서열 번호 5의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열;
  - <134> (g) 서열 번호 7의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열;
  - <135> (h) 서열 번호 9의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열.
- <136> (3) 상기 (1) 또는 (2)의 DNA가 각각 가변 영역 및 정상 영역을 포함하는 항체 중쇄 또는 경쇄를 코드하는 DNA.
- <137> (4) 항체의 중쇄 정상 영역의 상부 힌지부가 이하의 (a) 및 (b)의 아미노산 서열로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 가지고, 및, 그 중쇄 정상 영역의 중간 힌지부 이후의 C 말단측이 인간 면역글로불린 G4의 아미노산 서열 또는 상기 G4의 아미노산 서열에서 카바트 EU 번호 부여에 의한 228위치 세린이 프롤린으로, 또한 235위치 류신이 글루탐산으로 치환된 아미노산 서열을 가지는, 상기 (3)에 기재된 항체 중쇄를 코드하는 DNA.
- <138> (a) 서열 번호 10으로 표시되는 아미노산 서열.

<139> (b) 서열 번호 11로 표시되는 아미노산 서열.

<140> 본 명세서는 본원의 우선권의 기초인 일본 특허 출원 2006-81322호, 2006-299554호의 명세서 및/또는 도면에 기재된 내용을 포함한다.

**실시예**

<260> [실시예 1] 항원의 조제

<261> 1-1 인간 c-Mpl 발현 세포의 제작

<262> 항원 단백질을 발현하는 세포주를 면역에 이용하는 경우, 일반적으로 발현량이 높을수록 항체 제작에는 유리하다. 인간 c-Mpl 발현 세포주로는, 각종 인간 거핵구계 세포주 또는 강제 발현주가 알려져 있는데, 이들 세포주의 c-Mpl 발현량은 세포당 수천 분자로 낮고, 항원에는 부적합하다. 실제, 마우스 조혈계 세포주인 FDCP2에 인간 c-Mpl을 도입한 발현주 FDCP-hMpl(FEBS Lett. 1996 Oct 21;395(2-3):228-34. 참조)을 인간 항체 생산 마우스(KM 마우스<sup>TM</sup>)에 면역시킨 경우, 항체가 상승이 불충분하고, hMpl 특이적인 인간 항체를 얻을 수 없었다. 또한, 인간 거핵구계 세포주를 항원으로서 이용하는 경우, 다른 막 분자에 대한 항체도 유도되기 때문에, c-Mpl 특이적인 항체를 효율적으로 유도하기 위해서는, 마우스 세포주, 또한 가능한 한 MHC 적합한 세포주를 숙주에, 인간 c-Mpl을 도입한 고발현주를 이용하는 것이 바람직하다. 그래서, 인간 c-Mpl(hMpl) 고발현주를 제작하기 위해서, hMpl 발현 벡터를 이하와 같이 제작하고, 또한 2종류의 마우스 세포주(L929 및 FM3A)로 도입을 행하였다.

<263> 또한, hMpl에는 리간드 비의존성으로 항상적으로 아고니스트 시그널을 전달하는 변이형 수용체가 보고되어 있는데(508번째 Trp가 Ser로 변환되어 있는 변이체, Abe M 등, Leukemia. 2002 Aug;16(8):1500-1506), 이와 같은 변이체는 야생형과는 입체 구조가 상이한 것으로 예상된다. 이와 같은 항상 활성화형 변이체에 친화성이 높은 항체는 강력한 아고니스트 활성을 나타낼 가능성이 있다. 그래서, 항상 활성화형 변이체(이하 hMpl-Ser)의 발현 벡터도 제작하고, 발현 세포를 제작하여 면역에 이용하였다.

<264> 1) 항 인간 c-Mpl(hMpl) 발현 벡터의 조제

<265> hMpl의 전장 cDNA를 유지하는 플라스미드 DNA인 hump1-Pas12(Bartley TD 등, Cell 1994 Jul 1;77(7):1117-1124. 또는 Morita H 등, FEBS Lett. 1996 Oct 21;395(2-3):228-234.)의 DNA를 주형으로 하여 hMpl의 코딩 영역 전역을 증폭하는 PCR 반응을 실시하였다. 프라이머로서, 말단에 연결을 위한 제한 효소 부위(5' 말측 EcoRI, 3' 말측 XbaI)를 부가하도록 디자인한, Mpl\_F1 및 Mpl\_R2를 이용하여, KOD-Plus-DNA 폴리머라아제(토요보세키(Toyobo)(주)제, 일본)에 의한 PCR로 증폭하였다. 이하, 실시예 중의 PCR의 반응 온도 조절은, 진암프(GeneAmp) PCR 시스템 9700((주)퍼킨엘머·재팬(Perkin Elmer Japan)사제)을 사용하였다. 반응 온도 조건으로서, 94℃의 초기 온도에서 5분간의 가열 후, 98℃/10초간과 68℃/3분간의 사이클을 30회 반복하고, 마지막으로 72℃/7분간 가열하였다. 증폭한 PCR 단편은, 에탄올 침전으로 회수한 후, 아가로스 겔 전기 영동으로 분리하고, 멤브레인을 이용하는 DNA 정제 키트인 키아퀵 겔 추출 키트(QIAquick Gel Extraction Kit)(키아젠(Qiagen)사제)로 정제하였다. 정제한 DNA 단편을 pCR4Blunt-TOPO 벡터(토요보세키(주)제)에 서브클로닝을 행하고, 얻어진 클론의 플라스미드 DNA에 대하여 인서트 DNA의 염기 서열을 해석하였다. DNA 염기 서열 결정을 위한 프라이머로서, M13-20FW 및 M13RV를 이용하였다. 삽입 부분의 DNA 염기 서열 해석을 행하고, hMpl의 서열(GenBank ACCESSION:M90102)과 차이가 없고, 또한, 프라이머 부분도 디자인대로의 서열을 가지는 플라스미드 DNA를 선택하였다. 다음에, hMpl의 서열을 포함하는 플라스미드 DNA를 정제한 후, 제한 효소 EcoRI 및 XbaI로 소화시켜, 아가로스 겔 전기 영동으로 약 2kb 미만의 DNA를 회수하여 정제하였다. 한편, 인간 EF 프로모터와 블라스티시딘(Bsd) 선택 마커를 가지는 발현 벡터인 pEF6/Myc-His(인비트로젠(Invitrogen)(주)사제), 및 CMV 프로모터와 네오마이신(Neo) 선택 마커를 가지는 pEGEP-N1 벡터(벡톤·딕킨슨·바이오사이언스·클론테크(BD Biosciences Clontech)사제)에 대해서도, 마찬가지로 제한 효소 EcoRI와 XbaI로의 소화 처리를 행한 후, 탈인산화를 위해서 알칼리성 포스타제(Alkaline Phosphatase)(E. coli C75)(다카라바이오(TaKaRa Bio)(주), 일본)로 처리한 후에, 아가로스 겔 전기 영동과 DNA 정제 키트로 DNA를 회수하였다. 정제한 hMpl의 전체 영역 DNA 단편을, 각각의 발현 벡터 DNA에 T4 DNA 리가아제(ligase)를 이용하여 라이게이션하여, 대장균 DH10B로 도입하고, 각각 형질 전환체를 얻었다. 인서트 DNA를 포함하는 형질 전환체의 플라스미드 DNA에 대하여 DNA 염기 서열을 해석하여, hMpl의 전장 cDNA가 삽입된 pEF-MPL635 및 pCMV-MPL635를 수득하였다.

<266> Mpl\_F1 : 5' -AGAGAGAGAG GAATTCGCCA CCATGCCCTC CTGGGCCCTC TT-3' (서열번호 12)

Mp1\_R2 : 5' - AGAGAGAGAG CGGCCGCTCA AGGCTGCTGC CAATAGCTTA GTG -3' (서열번호 13)

M13-20FW: 5' -GTAACACGACGGCCAGTG-3' (서열번호 14)

M13RV : 5' -CAGGAAACAGCTATGAC-3' (서열번호 15)

<267>

2) 항상 활성화형 인간 c-Mpl(hMpl-Ser) 발현 벡터의 조제

<268>

<269>

TPO 비의존성으로 세포 내의 시그널 활성화가 보고되어 있는 hMpl 변이체(508번째 Trp가 Ser로 변환되어 있는 변이체, Abe M 등, Leukemia. 2002 Aug;16(8):1500-1506)의 발현 벡터를 제작하였다. 508번째의 아미노산 잔기를 코드하는 코돈을 변경(TGG→TCG)하기 위해서, pEF-MPL635의 DNA를 주형으로 하여, 진에디터™ 시험관 내 부위 지정 돌연변이 시스템(GeneEditor™ in vitro Site-Directed Mutagenesis System)(프로메가(Promega)사)을 이용한 부위 특이적 변이 도입법을 실시하였다. 변이 도입용 올리고뉴클레오티드(5' 말단 인산화 완료)로서는, Mut\_MplSer508을 이용하였다. 목적의 변이 도입용 올리고뉴클레오티드와 상기 키트 부속의 셀렉션 올리고뉴클레오티드(Selection Oligonucleotide)를 주형 DNA와 어닐링시켜 변이 도입체를 합성한 후, 진에디터™ 안티바이오틱 셀렉션 믹스(GeneEditor™ Antibiotic Selection Mix) 존재 하에서는 변이체만이 증식하는 것을 이용하여 변이체를 선택하였다. 더 구체적으로는, dsDNA 템플릿을 알칼리 조건 하(0.2M NaOH, 0.2 mM EDTA(최종 농도)) 실온에서 5분간 인큐베이트한 후, 2M 아세트산암모늄(pH 4.6)을 10분의 1용량 첨가하여 중화시키고 나서 에탄올 침전에 의해 회수하였다. 알칼리 변성 처리한 주형 DNA에, 변이 도입용 올리고뉴클레오티드와 새로운 항생 물질 내성 획득용 셀렉션 올리고뉴클레오티드(5' 말단 인산화), 및, 키트 첨부의 어닐링 버퍼를 첨가한 후, 75℃에서 5분간 보온하고, 37℃로 천천히 내림으로써 어닐링을 행하였다. 다음에, 변이체의 합성과의 연결을 위해서, 키트 부속의 신테시스(Synthesis) 10×buffer, T4 DNA 폴리머라아제, 및 T4 DNA 리가아제를 첨가하여, 37℃에서 90분 반응을 행하였다. 진에디터™ 안티바이오틱 셀렉션 믹스 존재 하에서 적격 세포(competent cell) BMH 71-18mutS에 형질 전환하여 배양한 형질 전환체 대장균으로부터 플라스미드 DNA를 조제하고, 또한 그 DNA에 의해 적격 세포 JM109를 형질 전환한 후, 진에디터™ 안티바이오틱 셀렉션 믹스를 포함하는 LB 플레이트에 파종하였다. 플레이트에 생긴 형질 전환체를 배양하여, 플라스미드 DNA의 DNA 염기 서열을 해석하여, 508번째의 아미노산이 변환(Trp로부터 Ser)한 hMpl을 발현하는 pEF-MPL635-Ser 벡터를 수득하였다.

<270>

Mut\_MplSer508 : 5' -CTGCTGCTGC TGAGGTCGCA GTTCCTGCA CACTAC-3' (서열번호 16)

<271>

3) 전장 인간 c-Mpl 발현 L929 세포의 제작

<272>

제작한 pEF-MPL635 벡터(1μg)를, 리포펙타민(Lipofectamine) 시약(인비트로젠으로부터 구입) 및 리포펙타민 PLUS(인비트로젠으로부터 구입) 시약과 혼합하고, 다시 무혈청 둘베코 개질 이글 배지(DMEM)와 혼합하였다. 혼합액을 1.5×10<sup>5</sup>셀/웰로 6-웰 플레이트에 배양한 L929 세포에 첨가하고, 3시간 배양함으로써 세포에 DNA를 도입하였다. 10% 소 태아 혈청(FBS) 첨가 DMEM 배지에서 하룻밤 배양하고, 다음 날부터, 배지에 10μg/mL 블라스티시딘(인비트로젠으로부터 구입)을 첨가하여 약제 내성 세포를 선발하였다. 그 후, 항 c-Mpl 항체를 이용한 형광 활성화 세포 분류(Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)법으로 c-Mpl 발현 세포를 단리하고, 전장 인간 c-Mpl 발현 L929 세포주(이하, L929-hMpl)를 수립하였다. FACS는 FACS-벤티지(FACS-Vantage)(백톤 덕킨손(Becton Dickinson)사제)에 의해 행하였다. 선발 후에는 5μg/mL 블라스티시딘, 10% FBS 첨가 DMEM 배지에서 배양, 유지하였다.

<273>

4) 전장 인간 c-Mpl 발현 FM3A 세포의 제작

<274>

상기 3)과 마찬가지로 방법으로 pEF-MPL635 벡터를 FM3A 세포에 도입하고, 전장 인간 c-Mpl 발현 FM3A 세포주(이하, FM3A-hMpl)를 수립하였다. 5μg/mL 블라스티시딘, 10% FBS 첨가 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트(Roswell Park Memorial Institute, RPMI) 배지에서 배양, 유지하였다.

<275>

5) 항상 활성화형 인간 Mpl 발현 FM3A 세포 제작

<276>

상기, pEF-MPL635-Ser 벡터를, 3)과 마찬가지로 방법으로, FM3A 세포에 도입하고, hMpl-Ser 발현 FM3A 세포주(이하, FM3A-hMpl-Ser)를 수립하였다. 5μg/mL 블라스티시딘, 10% FBS 첨가 RPMI 배지에서 배양, 유지하였다.

<277>

1-2 가용화 인간 c-Mpl 재조합 단백질의 제작

<278> 인간 c-Mpl의 세포막 관통 영역 및 세포 내 영역을 결실시키고, 하기 서열의 가용화형 인간 c-Mpl을 코딩하는 DNA를 발현 벡터 pEAK8(에지바이오시스템스(EdgeBioSystems)사제)에 결합시키고, 트랜스펙탐(Transfectam) 시약(프로메가사로부터 입수 가능)으로 Hek293 세포에 도입시켰다. 안정 발현주를 선택한 후, 그 배양 상청을 항 Mpl 항체 칼럼으로 정제하고, 가용화형 인간 c-Mpl 재조합 단백질(이하 가용성 Mpl-x, sMpl-x라고 약기)을 조제하였다.

NH<sub>2</sub>-MPSWALFMVTSCLLLPQNLAQVSSQDVSLASDSEPLKCFSTRFEDLTCFWDEEEAAPSGTYQLLYA  
 YPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLHLVWKNVFLNQTRTRQVLFVDSVGLPAPPSIIK  
 AMGGSQPGELQISWEEPAPPEISDFLRYELRYGPRDPKNSTGPTVIQLIATETCCPALQRPHSASALDQSPCA  
 QPTMPWQDGPQKQTSRREASALTAEGGSCLISGLQPGNSYWLQLRSEPDGSLGGSWGSWSLPVTVDLPGDA  
 VALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQDHASSQGGFFYHSRARCPRDRYPIWENCEEEKTNPGLQTPQFSRCHFKS  
 RNSIIHILVEVTTAPGTVHSYLGSPFWIHQAVRLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSSWAAQETCYQLRYT  
 GEGHQDWKLEPPLGARGGTLELRPRSRYLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAW-COOH

(서열번호 17)

<279>

<280> [실시예 2] 모노클로날 항체의 제작

<281> 본 발명의 항체는, 유전자 개변에 의해 인간 항체를 생산하는 능력을 가지는 인간 항체 생산 마우스(KM 마우스<sup>TM</sup>)를 면역시키고, 모노클로날 항체를 제작함으로써 얻어졌다. KM 마우스는 내재성 마우스면역글로불린(Ig) 중쇄 및 마우스 κ 경쇄를 결손하고 있고, 또한, 인간 Ig 중쇄 유전자를 포함하는 14번 염색체 단편(SC20) 및 인간 Igκ쇄 트랜스진(KC05)을 동시에 유지한다. 즉, KM 마우스는 인간 항체를 생산하는 능력을 가지고, 마우스 Ig 중쇄 및 κ쇄를 결손한 마우스이다. 이 마우스는 인간 Ig 중쇄 유전자좌를 가지는 계통 A의 마우스와, 인간 Igκ쇄 트랜스진을 가지는 계통 B의 마우스의 교배에 의해 제작된다. 계통 A는, 내인성 Ig 중쇄 및 κ 경쇄 파괴의 양자에 대하여 호모 접합체이고, 자손 전달 가능한 14번 염색체 단편(SC20)을 유지하는 마우스 계통(Tomizuka. et al., Proc Natl Acad Sci USA., 2000 Vol197:722 참조)이다. 또한, 계통 B는 내재성 마우스 Ig 중쇄 및 κ 경쇄 결손의 양자에 대하여 호모 접합체이고, 인간 Igκ쇄 트랜스진(KC05)을 유지하는 마우스 계통(Nat Biotechnol., 1996 Vol14:845 참조)이다.

<282> 본 실시예에서의 모노클로날 항체의 제작은, 공지 방법에 의해 행하였다(단클론 항체 실험 조작 입문 안도 타미에 등 저작, 고단샤(도쿄, 일본) 발행 1991 참조).

<283> 1) 면역

<284> 면역원으로서의 인간 c-Mpl은, 실시예 1에서 제작한 L929-hMpl 세포, FM3A-hMpl 세포, 항상 활성형 c-Mpl 발현 FM3A-hMpl-Ser 세포, sMpl-x 재조합 단백질을 이용하였다. 피면역 동물은, 실시예 2에서 제작한 인간 면역글로불린을 생산하는 인간 항체 생산 마우스를 사용하고, 하기의 면역 방법으로 행하였다.

<285> 면역 방법 1: 9주령의 인간 항체 생산 마우스에, 실시예 1에서 제작한 L929-hMpl 세포( $5 \times 10^6$  세포)를 리비(Ribi) 아췌반트와 혼합하고, 복강 내에 초회 면역시켰다. 초회 면역 이후, 1주일마다, 동 세포( $2 \times 10^6$  세포)를, 인터루킨 6(IL-6)(5μg)과 동시에, 미정맥 경유로 7회 면역시켰다. 또한, 비장 및 림프절의 수득 3일 전에 동 세포를 미정맥 경유로 최종 면역시켰다.

<286> 면역 방법 2: 9주령의 인간 항체 생산 마우스에, 실시예 1에서 제작한 FM3A-hMpl-Ser 세포( $5 \times 10^6$  세포)에 자외선 조사하고, 리비 아췌반트를 첨가하여 복강 내에 초회 면역시켰다. 초회 면역 이후, 동 세포( $5 \times 10^6$  세포)를 복강 내 투여로, 1주일마다 7회 면역시켰다. 또한, 비장 및 림프절의 수득 3일 전에, 실시예 1에서 제작한 FM3A-hMpl 세포( $2 \times 10^6$  세포)를 IL-6(5μg)을 첨가하여, 미정맥 경유로 최종 면역시켰다.

<287> 면역 방법 3: 9주령의 인간 항체 생산 마우스에, 실시예 1에서 제작한 sMpl-x 재조합 단백질(10μg)을, 완전 프로인트 아췌반트(CFA)와 혼합하여 피하 투여로 초회 면역시켰다. 2회째부터 5회째의 면역은, 1주일에 1번, sMpl-x 재조합 단백질(5μg)을 불완전 프로인트 아췌반트(IFA)와 혼합하여 피하 투여로 면역시켰다. 6회째부터 8회째의 면역에서는, L929-hMpl 세포( $5 \times 10^6$  세포)를 복강 내에 면역시켰다. 또한, 비장 및 림프절의 수득 3일

전에, sMp1-x 재조합 단백질(5 $\mu$ g) 및 IL-6(5 $\mu$ g)을, 미정맥 경유로 최종 면역시켰다.

<288> 2) 하이브리도마 제작

<289> 최종 면역의 3일 후에 마우스로부터 비장 및/또는 림프절을 외과적으로 수득하고, 350mg/ml 탄산수소나트륨, 50 단위/ml 페니실린, 50 $\mu$ g/ml 스트렙토마이신을 포함하는 무혈청 DMEM 배지 10ml 중에 넣고, 메시(셀 스트레이너 (cell strainer): 팔콘(Falcon)사제) 상에서 스페큘러를 이용하여 눌러 부셨다. 메시지를 통과한 세포 현탁액을 원심분리하여 세포를 침전시킨 후, 이 세포를 무혈청 DMEM 배지에서 2회 세정하고 나서, 무혈청 DMEM 배지에 현탁하여 세포 수를 측정하였다. 한편, 10% FCS를 포함하는 DMEM 배지에서, 37 $^{\circ}$ C, 5% 탄산가스 존재 하에서 세포 농도가  $1 \times 10^8$  세포/ml를 넘지 않도록 배양한 마이엘로마 세포 SP2/0(ATCC No. CRL-1581)을 마찬가지로 무혈청 DMEM 배지에서 세정하고, 무혈청 DMEM 배지에 현탁하여 세포 수를 측정하였다. 희수한 세포의 현탁액과 마우스 마이엘로마 현탁액을 세포 수 5:1로 혼합하고, 원심분리 후, 상청을 완전히 제거하였다. 이 펠릿에, 용합제로서 50%(w/v) 폴리에틸렌글리콜 1500(베링거만하임(Boehringer Mannheim)사제) 1ml를, 피펫 끝으로 교반하면서 천천히 첨가한 후, 미리 37 $^{\circ}$ C로 가온해 둔 무혈청 DMEM 배지 1ml를 2회로 나누어 천천히 첨가하고, 다시 7ml의 무혈청 DMEM 배지를 첨가하였다. 원심분리 후, 상청을 제거하여 얻어진 용합 세포를 이하에 기재하는 한계 회석법에 의한 스크리닝에 제공하였다. 하이브리도마의 선택은, 10%의 소 태아 혈청(Fetal Calf Serum, FCS)과 히포크산틴(H), 아미노프테린(A), 티미딘(T)(이하, 「HAT」라고 함.; 시그마(Sigma)사제)을 함유하는 DMEM 배지에서 배양함으로써 행하였다. 또한, 10% FCS 및 HT(시그마사제)를 함유하는 DMEM 배지를 이용하여 한계 회석법에 의해 싱글 클론으로 하였다. 배양은 96 웰 마이크로타이터 플레이트(백톤 디킨슨사제) 중에서 행하였다. 항 인간 c-Mp1 인간 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마 클론의 선택(스크리닝) 및 각각의 하이브리도마가 생산하는 인간 모노클로날 항체의 특징화는, 실시예 4에 기재된 유식 세포측정법, 또는 실시예 5에 기재된 UT7/TPO 세포를 이용한 세포 증식 분석에 의해 행하였다. 아고니스트 항체의 활성 평가계로서, BaF3 등의 마우스 세포주에 인간 Mp1을 발현시키고, 세포 증식 분석을 행할 수 있는데(Orita et al. Blood. 2005 Jan 15;105(2):562-6), 그와 같은 세포의 반응이 반드시 인간 세포의 반응을 반영하고 있다고는 할 수 없다. UT7/TPO는 인간 유래 세포주이기 때문에, 이것을 스크리닝에 이용함으로써, 인간 세포에 더 강한 활성을 가지는 항체를 선별하기 쉽다고 생각된다.

<290> 스크리닝의 결과, 항 인간 Mp1 아고니스트 항체 생산 하이브리도마로서, 면역 방법 1에 의한 하이브리도마 7-10, 면역 방법 2에 의한 하이브리도마 4-49, 면역 방법 3에 의한 하이브리도마 6-4-50, 6-5-2의 4 클론이 선택되었다. 또한, 비 아고니스트 항체 생산 하이브리도마로서 2-35(면역 방법 1에 의해 얻은 것)를 컨트롤로서 선별하였다.

<291> [실시예 3] 하이브리도마 배양 상청으로부터의 정제 항체 조제

<292> 하이브리도마의 배양 상청으로부터의 항 인간 c-Mp1 모노클로날 항체의 정제는 이하의 방법으로 행하였다. 항체를 포함하는 배양 상청을 rmp 프로테인 A(rmp Protein A)(아머샴파마시아사제) 및 0.8 $\times$ 40cm 칼럼(바이오래드(Bio-Rad)사제)을 이용하고, 흡착 완충액으로서 PBS, 용출 완충액으로서 0.02M 글리신 완충액(pH 3)을 이용하여 친화성(affinity) 정제하였다. 용출 분획은 1M 트리스(pH 9.0)를 첨가하여 pH 7.2 부근으로 조정하였다. 조제된 항체 용액은 투석막(10000 컷오프(cutoff), 스펙트럼 레버러토리스(Spectrum Laboratories)사제)을 이용하여 PBS로 치환하고, 공극 직경 0.22 $\mu$ m의 멤브레인 필터 밀렉스-GV(MILLEX-GV)(밀리포어(Millipore)사제)로 여과 멸균하고, 정제 항 인간 c-Mp1 모노클로날 항체를 얻었다. 정제 항체의 농도는 280nm의 흡광도를 측정하고, 1 mg/ml를 1.4 OD로서 산출하였다.

<293> 항 인간 c-Mp1 모노클로날 항체를 포함하는 배양 상청의 조제는 이하의 방법으로 행하였다.

<294> 우선, 항체 생산 하이브리도마를 10ng/ml 재조합 인간 IL-6(Recombinant Human IL-6)(R&D 시스템스(R&D Systems)사제), 10% 저(Low) IgG 소태아 혈청(하이클론(HyClone)사제) 함유 eRDF 배지(교쿠토제약(Kyokuto Pharmaceutical Industrial)사제)에 순화하였다. 이 순화한 하이브리도마를 동결 보존하였다. 다음에, 그 일부를, 소 인슐린(5 $\mu$ g/ml, 기브코 BRL(Gibco-BRL)사제), 인간 트랜스페린(5 $\mu$ g/ml, 기브코 BRL사제), 에탄올아민(0.01mM, 시그마사제), 아셀렌산나트륨(sodium selenite)( $2.5 \times 10^{-5}$  mM, 시그마사제), 10ng/ml 재조합 인간 IL-6(R&D 시스템스사제), 1% 저 IgG 소태아 혈청(하이클론사제) 함유 eRDF 배지(교쿠토제약사제)로 순화하였다. 플라스크에서 배양하고, 하이브리도마의 생존 세포율이 90%로 된 시점에서 배양 상청을 회수하였다. 회수한 상청은, 10 $\mu$ m 및 0.2 $\mu$ m의 필터(겔만 사이언스(Gelman Science)사제)에 제공하여, 오염물을 제거하였다.

- <295> [실시예 4] 유식 세포측정법에 의한 항 인간 c-Mpl 항체의 결합 활성 평가
- <296> 하이브리도마 배양 상청 또는 정제 항체를 이용한 유식 세포측정법에 의해, 항 인간 c-Mpl 항체의 결합 활성을 측정하였다. 수순은 이하와 같다. 세포는 FM3A-hMpl 세포 또는 인간 Mpl 발현 FDCP2 세포(FDCP-hMpl)(FEBS Lett. 1996 Oct 21;395(2-3):228-34. 참조)를 이용하였다.
- <297> 반응당  $4 \times 10^5$  개의 세포를 50  $\mu$ L의 FACS 염색 배지(2% FBS, 0.1% NaN<sub>3</sub>, 1mM EDTA in PBS)에 현탁시키고, 50  $\mu$ L의 하이브리도마의 배양 상청 또는 정제 인간 항체(최종 농도 0.1-1 $\mu$ g/mL)를 첨가하고, 얼음 상에서 30분간 반응시켰다. FACS 염색 배지에 의한 세정 후, 이차 항체인 R-피코에리트린(R-phycoerythrin, RPE) 표지 염소 항 인간 IgY F(ab') 항체(서던 바이오테크놀로지(Southern Biotechnology)사제 Cat#2043-09)를 첨가하고, 다시 얼음 상에서 30분 차광 반응시킨 후, 다시 세정하였다. 세포를 요오드화 프로피듐(PI)을 첨가한 FACS 염색 배지에 현탁하고, 해석을 행하였다. 해석은 FACS 칼리버(FACS Calibur)(벡톤 디킨슨사제)로 행하였다.
- <298> 도 1에 각 항체의 정제 항체를 이용한 유식 세포측정법의 결과를 나타내었다. 각 항체는 FDCP-hMpl 세포에 결합하였으나, 그 친세포인 FDCP2 세포(FDCP 모세포)에는 결합하지 않았다. 따라서, 이들 항체는 인간 Mpl 특이적으로 결합하고 있음이 나타났다.
- <299> [실시예 5] UT7/TPO 세포를 이용한 항 인간 c-Mpl 항체의 아고니스트 활성 평가
- <300> 하이브리도마 상청 또는 정제 항체를 이용하여, UT7/TPO 세포 증식 분석을 행하고, 아고니스트 활성을 평가하였다. UT7/TPO 세포는 TPO 의존성의 인간 거핵구계 세포주이다(Ozaki K et al. Blood. 1998 Dec 15;92(12):4652-62. 참조). 통상은 10% FBS, 5ng/mL PEG-rHuMGDF 첨가 이스코브 개질 돌베코 배지(IMDM)로 배양, 유지하였다. 세포 증식 분석의 수순은 이하와 같다.
- <301> (1) UT7/TPO 세포 배양액을 50mL 튜브에 옮기고, 원심 분리(1,500rpm, 5분, 4 $^{\circ}$ C)에 의해 세포를 펠릿으로 하였다. 배지를 제거하고, 사이토카인 비첨가, 10% FBS 첨가 IMDM 배지(이하, 증식 분석용 배지)에서 펠릿을 현탁시켰다. 다시 원심분리하고, 새로운 증식 분석용 배지에서 현탁시켰다. 원심분리 및 현탁을 한번 더 반복하였다.
- <302> (2) 상기 1.에서 증식 분석용 배지에 현탁한 세포를 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 6시간 배양하였다.
- <303> (3) 배양 후, 세포를 원심분리하여 펠릿화 하고, 증식 분석용 배지에서 현탁시켰다. 이 때, 세포 농도를  $6 \times 10^5$  세포/mL로 맞추고, 세포 현탁액을 각 웰 50  $\mu$ L로 96-웰 플레이트에 플레이팅하였다.
- <304> (4) 다음에, 하이브리도마 배양 상청 10  $\mu$ L에, 증식 분석용 배지 40  $\mu$ L를 첨가하고, 각 웰에 첨가하였다. 정제 항체의 경우는, 증식 분석용 배지 50  $\mu$ L에 검체를 최종 농도의 2배의 농도로 첨가하고, 각 웰에 첨가하였다.
- <305> (5) 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>에서, 48시간 배양한다.
- <306> (6) WST-8 시약(동인화학연구소(Dojindo Laboratories)사제)을 10  $\mu$ L/웰로 첨가하고, 2시간 배양한다.
- <307> (7) 흡광 마이크로플레이트 리더(테칸(TECAN)사제 선라이즈 레이보우(SUNRISE RAINBOW))로 각 웰의 흡광도를 측정한다.(측정 파장 450nm, 참조 파장 600nm 이상)
- <308> 도 2에 7-10(도 2A), 4-49(도 2B), 6-4-50(도 2C), 6-5-2(도 2D) 각 정제 항체를 이용한 UT7/TPO 세포 증식 분석에서의 증식 곡선을 나타내었다. 또한, 스크리닝의 결과 얻어진 항 인간 c-Mpl 항체의 서브클래스, 활성의 세기(UT7/TPO 세포 증식 분석에서의 50% 유효 농도(EC50), 최대 활성(Max)), 각 항체가 얻어진 실시예 2에 기재된 면역 방법을 표 2에 나타내었다.

표 2

하이브리도마	서브클래스	UT7/TPO (EC50)	UT7/TPO(Max)	면역방법
2-35 비-아고니스트	IgG1	-	-	1
7-10	IgG1	++	>90%	1
4-49	IgG1	++	>80%	2
6-4-50	IgG1	+	>80%	3
6-5-2	IgG1	+	>50%	3
PEG-rHuMGDF	-	0.001-0.01nM	100%	-

+: EC<sub>50</sub> 1-10nM  
 ++: EC<sub>50</sub> 0.1-1nM

<309>

<310>

[실시예 6] 콜로니 분석

<311>

인간 제대혈 유래 CD34+ 세포를 이용한 CFU-Mk 콜로니 형성 분석을 행하고, 정제 항체의 인간 프라이머리 세포에 대한 작용을 검토하였다. 분석에는 메가컬트™-C(MegaCult™-C)(스템 셀 테크놀로지스(Stem Cell Technologies)사제 Cat#04972)를 사용하였다. 수순은 이하와 같다.

<312>

(1) 검체를 포함한 0.15mL의 IMDM에 0.85mL의 메가컬트™-C 배지를 첨가하여 1mL로 하였다.

<313>

(2) 인간 제대혈로부터 조제한 CD34+ 세포를 1.1×10<sup>5</sup> 세포/mL의 농도로 IMDM에 현탁시키고, 상기 1.의 배지가 들어간 튜브에 0.05mL씩 첨가하였다.

<314>

(3) 세포를 첨가한 각 튜브를 보텍스로 교반하고, 0.6mL의 빙랭한 콜라겐액을 첨가하고, 다시 보텍스로 교반하였다.

<315>

(4) 상기 3.까지의 세포, 검체 혼합액을 챔버 슬라이드의 각 웰에 0.75mL씩 첨가하였다.

<316>

(5) 챔버 슬라이드를 100mm 페트리 접시 중에 넣었다. 건조를 방지하기 위해서, 3mL의 정제수를 넣은 35mm 페트리 접시를 동일한 100mm 페트리 접시 중에 넣었다.

<317>

(6) 챔버 슬라이드가 들어간 페트리 접시를 인큐베이터 중에 정치시키고, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 10~12일간 배양하였다.

<318>

(7) 배양 후, 고정액(메탄올:아세톤=1:3)으로 고정하였다.

<319>

(8) 항 인간 CD41 항체에 의한 면역 염색을 행하고, CFU-Mk 콜로니를 검출하였다. 현미경 하에서 콜로니 수를 카운팅하고, 각 검체의 CFU-Mk 콜로니 형성능을 비교하였다.

<320>

도 3에 콜로니 분석의 결과를 나타냈다. 7-10\_IgG1, 4-49\_IgG1에 의해 콜로니 형성이 유도되었다.

<321>

[실시예 7] 항체 유전자 클로닝과 서열 결정

<322>

제조항체를 제작하기 위해서, 선발된 항 인간 c-Mpl 아고니스트 항체 생산 하이브리도마로부터 항체 유전자, 구체적으로는 중쇄(H쇄)를 코딩하는 인간 Igγ cDNA 및 경쇄(L쇄)를 코딩하는 인간 Igκ cDNA를 단리하고, 서열을 결정하였다.

<323>

1) 각 모노클로날 항체의 cDNA 합성

<324>

각 하이브리도마에서 발현하는 인간 항체 중쇄, 및 경쇄의 항체의 가변 영역을 포함하는 DNA 단편을 수득하기 위해서, 인간 Igγ, 및 인간 Igκ의 각각의 정상 영역에 특이적인 프라이머를 이용한 5' RACE(5' rapid amplification of cDNA ends)법에 의한 클로닝을 행하였다. 구체적으로는, BD SMART RACE cDNA 증폭 키트(백틴·딕킨슨·바이오사이언스·클론테크사제)를 이용하고, 첨부 설명서에 따라 실시하였다.

<325>

cDNA 합성의 재료로는, 하이브리도마 7-10, 4-49, 6-4-50, 6-5-2 세포에 RNA 추출용 시약인 이소겐(ISOGEN)(닛폰진(Nippon Gene)사제, 일본)을 첨가하고, 취급 설명서에 따라서 전체(total) RNA를 정제하였다. 정제한 전체 RNA로부터 각 약 1μg을 주형으로서 이용하여, 제1 가닥(1st strand) cDNA를 제작하였다.

- <326> 제1 가닥 cDNA의 합성은,
- <327> 전체 RNA 1 $\mu$ g/3 $\mu$ l
- <328> 5' CDS 1 $\mu$ l
- <329> SMART 올리고 1 $\mu$ l
- <330> 상기 조성의 반응액을 70 $^{\circ}$ C에서 2분간 인큐베이트한 후,
- <331> 5 $\times$ 완충액(5 $\times$ Buffer) 2 $\mu$ l
- <332> DTT 1 $\mu$ l
- <333> DNTP mix 1 $\mu$ l
- <334> 파워스크립트 역전사 효소(PowerScript Reverse Transcriptase) 1 $\mu$ l
- <335> 를 첨가하고, 42 $^{\circ}$ C에서 1.5시간 인큐베이트하였다.
- <336> 또한, 50 $\mu$ l의 트리신-EDTA 완충액을 첨가한 후, 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 인큐베이트하고, 제1 가닥 cDNA를 수득하였다.
- <337> 2) PCR에 의한 중쇄 유전자, 경쇄 유전자의 증폭과 염기 서열의 확인
- <338> 2-1) PCR에 의한 중쇄 유전자, 경쇄 유전자의 증폭
- <339> 인간 항체 유전자의 cDNA를 증폭하기 위해서, 인간 항체 특이적 서열을 가지는 3' 프라이머(구체적인 서열은 후 기) 및 BD SMART RACE cDNA 증폭 키트로 합성된 cDNA의 5' 말단에 부가된 서열에 특이적으로 하이브리다이즈(hybridizing)하는 5' 프라이머(Universal primer A mix)를 PCR용 프라이머 세트로 하여, 또한 PCR용 효소로서 KOD-Plus- DNA 폴리머라아제(토요보세키(주)제)를 이용하여, 하기의 반응액을 조제하여 PCR에 제공하였다.
- <340> 멸균 H<sub>2</sub>O 28 $\mu$ l
- <341> cDNA 2.5 $\mu$ l
- <342> KOD-Plus-buffer(10X) 5 $\mu$ l
- <343> dNTP Mix(2mM) 5 $\mu$ l
- <344> MgSO<sub>4</sub>(25mM) 2 $\mu$ l
- <345> KOD-Plus-(1 단위/ $\mu$ l) 1 $\mu$ l
- <346> 유니버설 프라이머 A 믹스(Universal primer A mix, UPM)(10X) 5 $\mu$ l
- <347> 유전자 특이적 프라이머(Gene specific primers, GSP)(10 $\mu$ M) 1.5 $\mu$ l
- <348> 총 부피 50 $\mu$ l
- <349> 중쇄 유전자의 증폭 반응에는, SMART RACE cDNA 증폭 키트 부속의 UPM 프라이머 및 IgG1p 프라이머를 이용하고, 한편, 경쇄 유전자의 증폭에는 UPM 프라이머 및 hk-2 프라이머의 각 세트를 사용하였다.
- IgG1p 프라이머 : 5' -TCTTGTCACCTTGGTGTGCTGGGCTTGTG-3' (서열번호 18)**
- <350> **hk-2 : 5' -GTT GAA GCT CTT TGT GAC GGG CGA GC -3' (서열번호 19)**
- <351> 또한, 반응 온도 조건은 다음과 같다.
- <352> 94 $^{\circ}$ C/30초간, 72 $^{\circ}$ C/3분간의 사이클을 5회 반복,
- <353> 94 $^{\circ}$ C/30초간, 70 $^{\circ}$ C/30초간, 72 $^{\circ}$ C/3분간의 사이클을 5회 반복,
- <354> 94 $^{\circ}$ C/30초간, 68 $^{\circ}$ C/30초간, 72 $^{\circ}$ C/3분간의 사이클을 25회 반복하였다.
- <355> 또한, 이 반응액 2 $\mu$ l에 트리신-EDTA 완충액 98 $\mu$ l를 첨가하여 희석한 것의 5 $\mu$ l를 주형으로 하고, 제1 PCR보다 내측에 프라이머를 설정한 제2 PCR(Nested PCR)을 실시하였다. PCR 반응 용액의 조성을 다음에 나타낸다.

- <356>      멸균 H<sub>2</sub>O    30 μ l
- <357>      제1 PCR 반응액(50배 희석)  5 μ l
- <358>      KOD-Plus-buffer(10X)  5 μ l
- <359>      dNTP Mix(2mM)   5 μ l
- <360>      MgSO<sub>4</sub>(25mM)   2 μ l
- <361>      KOD-Plus-(1 단위/μ l)  1 μ l
- <362>      네스티드 유니버설 프라이머 A(Nested Universal primer A,NUP;10 μM)  1 μ l
- <363>      유전자 특이적 프라이머(GSP)(10 μM)  1 μ l
- <364>      총 부피   50 μ l
- <365>      상기 반응의 프라이머 세트로서, 중쇄 유전자 증폭용의 경우는, NUPM 프라이머(SMART RACE cDNA 증폭 키트 부속;백턴·딕킨슨·바이오사이언스·클론테크사제) 및 hh2 프라이머(4-49, 6-4-50, 6-5-2의 경우), 또는 IgG2p\_134(7-10의 경우)를 사용하였고, 또한, 경쇄 유전자의 증폭의 경우는, UPM 프라이머 및 hk-5 프라이머를 이용하였다. 반응 온도 조건으로서는, 94℃의 초기 온도에서 1분간 후, 94℃/5초간, 68℃/10초 및 72℃/3분간의 사이클을 20회 반복, 마지막으로 72℃/7분간 가열하였다.
- <366>      2-2) 항체 유전자의 염기 서열 결정
- <367>      상기한 방법으로 증폭한 중쇄 PCR 단편(이하 HV[C]라고 기재)은, 중쇄의 5' 비번역 영역, 리더 서열(분비 시그널 서열), 가변 영역(HV) 및 정상 영역의 일부([C])로 구성된다. 마찬가지로, 경쇄의 PCR 증폭 단편(이하 LV[C]라고 기재)은, 경쇄의 5' 비번역 영역, 리더 서열(분비 시그널 서열), 가변 영역(LV) 및 정상 영역의 일부([C])로 구성된다. 여기서 리더 서열(분비 시그널)이란 항체의 분비에 필요하고, 성숙 항체 단백질로부터 분리되는 아미노산 서열이다. HV[C] 단편 및 LV[C] 단편은, PCR 반응액으로부터 에탄올 침전으로 회수한 후, 아가로스 겔 전기 영동으로 분리하고, 멤브레인을 이용하는 DNA 정제 키트인 키아퀵 겔 추출 키트(키아젠사제)로 정제하였다. 정제한 HV[C] 증폭 단편 또는 LV[C] 증폭 단편은, 각각 제로 블런트 TOPO PCR 클로닝 키트(Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit)(인비트로젠사제)의 pCR4 Blunt-TOPO 벡터(토요보세키(주)제)에 서브클로닝을 행하고, 얻어진 클론의 플라스미드 DNA에 대하여 인서트 DNA의 염기 서열을 해석하였다. DNA 염기 서열 결정을 위해서 프라이머로서, M13-20FW 및 M13RV를 이용하였다.
- hk-5 : 5' - AGG CAC ACA ACA GAG GCA GTT CCA GAT TTC-3' (서열번호 20)
- hh2 프라이머 : 5' - GCT GGA GGG CAC GG TCA CCA CGC TG -3' (서열번호 21)
- <368>      IgG2p\_134 : 5' - TGCACGCCGC TGGTCAGGGC GCCTGAGTTC C -3' (서열번호 22)
- <369>      아고니스트 항체 7-10의 중쇄 가변 영역, 및 경쇄 가변 영역을 코딩하는 DNA 염기 서열, 및 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 각각 이하에 나타낸다.
- <370>      <7-10 중쇄 핵산 서열> (ATG 개시 코돈으로부터 가변 영역 C 말단 아미노산 잔기를 코딩하는 DNA 서열까지)
- ATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTTTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTG
- GAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTT
- GATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGTCTCAGGTATTAGTTGG
- AATAGTGGTAGCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC
- TCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAAAATCTATGG
- TTCGGGGAGTTCCGTTACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA
- (서열번호 23)
- <371>
- <372>      <7-10 중쇄 아미노산 서열> (리더 서열 및 가변 영역까지)

<373> (밑줄로 나타낸 아미노산 잔기는 분비 시그널로 되는 리더 서열을 나타낸다)

MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKLEWVSGISW  
NSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKNLWFGEFRYWYFD LWGRGTLTV SS

(서열번호 24)

<374>

<375> <7-10 경쇄 핵산 서열> (ATG 개시 코돈으로부터 가변 영역 C 말단 아미노산 잔기를 코드하는 DNA 서열까지)

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCATC  
CAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGT  
CAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGAT  
GCCTCCAGTTTGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC  
ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGCTCACTTTC  
GGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (서열번호 25)

<376>

<377> <7-10 경쇄 아미노산 서열> (리더 서열 및 가변 영역까지)

<378> (밑줄로 나타낸 아미노산 잔기는 분비 시그널로 되는 리더 서열을 나타낸다)

MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKLEWVSGISW  
NSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKNLWFGEFRYWYFDLWGRGTLTVSS

(서열번호 26)

<379>

<380> 아코니스트 항체 4-49의 중쇄 가변 영역, 및 경쇄 가변 영역을 코드하는 DNA 염기 서열, 및 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 각각 이하에 나타낸다.

<381> <4-49 중쇄 핵산 서열> (ATG 개시 코돈으로부터 가변 영역 C 말단 아미노산 잔기를 코드하는 DNA 서열까지)

ATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTGTTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGAGCAGCTGGTG  
GAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCCTCTGGATTACCTTT  
GATGATTATGCCATGTACTGGGTCCGGCAAGTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGTCTCAGGTATTAGTTGG  
AACAGTGGTAGCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCGTTTCCAGAGACAACGCCAAGAAC  
TCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTATATTACTGTGCAAAAGCCCTATGG  
TTCGGGGAGTTCCTCCACTACTACGGTATGGACGCTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

(서열번호 27)

<382>

<383> <4-49 중쇄 아미노산 서열> (리더 서열 및 가변 영역까지)

<384> (밑줄로 나타낸 아미노산 잔기는 분비 시그널로 되는 리더 서열을 나타낸다)

MELGLSWIFLVAILKGVQCEQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFDDYAMYWVRQVPKLEWVSGISW  
NSGSIGYADSVKGRFTVSRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKALWFGEFPHYGMVWVGQTTTVTVSS

(서열번호 28)

<385>

<386> <4-49 경쇄 핵산 서열> (ATG 개시 코돈으로부터 가변 영역 C 말단 아미노산 잔기를 코드하는 DNA 서열까지)

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCATC  
CAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGT  
CAGGGCATTAGCAGTACTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGAT  
GCCTCCAGTTTGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC  
ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGAACCTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGTACACTTTT  
GGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGT (서열번호 29)

<387>

<388> <4-49 경쇄 아미노산 서열> (리더 서열 및 가변 영역까지)

<389> (밑줄로 나타낸 아미노산 잔기는 분비 시그널로 되는 리더 서열을 나타낸다)

MDMRVPAQLLGLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQGISSTLAWYQQKPGKAPKLLIYD  
ASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNFSYPYTFGQGTKLEIKR (서열번호 30)

<390>

<391> 아고니스트 항체 6-4-50의 중쇄 가변 영역, 및 경쇄 가변 영역을 코드하는 DNA 염기 서열, 및 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 각각 이하에 나타낸다.

<392> <6-4-50 중쇄 핵산 서열> (ATG 개시 코돈으로부터 가변 영역 C 말단 아미노산 잔기를 코드하는 DNA 서열까지)

ATGGAATTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTTTGGCTATTTTAAAAGGTGCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTG  
GAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAACCTCTGGATTCACTTTT  
GATAATTATGCCATGTACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGG  
AATAGTGGTGACATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC  
TCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAGGGATCGGGG  
TTCGGGGAGTTCCACTACGGTCTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (서열번호 31)

<393>

<394> <6-4-50 중쇄 아미노산 서열> (리더 서열 및 가변 영역까지)

<395> (밑줄로 나타낸 아미노산 잔기는 분비 시그널로 되는 리더 서열을 나타낸다)

MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCATSGFTFDNYAMYWVRQAP  
GKGLEWVSGISWNSGDIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDAG  
FGEFHYGLDVWGQGTITVTVSS (서열번호 32)

<396>

<397> <6-4-50 경쇄 핵산 서열> (ATG 개시 코돈으로부터 가변 영역 C 말단 아미노산 잔기를 코드하는 DNA 서열까지)

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCATC  
CAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGT  
CAGGGCATTAGCAGTGTCTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCTCCTGATCTATGAT  
GCCTCCAGTTTGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC  
ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGAACCTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGTGGACGTTT  
GGCCAAGGGACCAAGGTGAAAATCAAACGT (서열번호 33)

<398>

<399> <6-4-50 경쇄 아미노산 서열> (리더 서열 및 가변 영역까지)

- <400> (밀줄로 나타낸 아미노산 잔기는 분비 시그널로 되는 리더 서열을 나타낸다)  
MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQGISSALAWYQQKPGKVPKLLIYD
- <401> ASSLESGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQFNPSYPWTFGQGTKVEIKR (서열번호 34)
- <402> 아고니스트 항체 6-4-2의 중쇄 가변 영역, 및 경쇄 가변 영역을 코드하는 DNA 염기 서열, 및 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 각각 이하에 나타낸다.
- <403> <6-5-2 중쇄 핵산 서열> (ATG 개시 코돈으로부터 가변 영역 C 말단 아미노산 잔기를 코드하는 DNA 서열까지)  
 ATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTTTGGCTATTTTAAAAGGTGCCAGTGTGAAGTGCAACTGGTG  
 GAGTGTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTT  
 GATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGG  
 AATAGTGGTAGTATAGGTTATGCGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC  
 TCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAAACCTATATGG  
 TTCGGGGAGTGGGGAACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA  
 (서열번호 35)
- <404>
- <405> <6-5-2 중쇄 아미노산 서열> (리더 서열 및 가변 영역까지)
- <406> (밀줄로 나타낸 아미노산 잔기는 분비 시그널로 되는 리더 서열을 나타낸다)  
MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVECGGLVQGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISW  
 NSGSIQYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKPIWFGWGNYYGMDVWVGQTTVTVSS  
 (서열번호 36)
- <407>
- <408> <6-5-2 경쇄 핵산 서열> (ATG 개시 코돈으로부터 가변 영역 C 말단 아미노산 잔기를 코드하는 DNA 서열까지)  
 ATGGAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTG  
 ACGCAGTCTCCAGGCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGT  
 GTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCA  
 TCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATC  
 AGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTACCGATCACCTTCGGC  
 CAAGGGACACGACTGGAGATTAACCGT (서열번호 37)
- <409>
- <410> <6-5-2 경쇄 아미노산 서열> (리더 서열 및 가변 영역까지)
- <411> (밀줄로 나타낸 아미노산 잔기는 분비 시그널로 되는 리더 서열을 나타낸다)  
METPAQLLFLLLLWLPLDITGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDA  
 SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIISRLPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGRLEIKR (서열번호 38)
- <412>
- <413> [실시예 8] 재조합 항체 발현 벡터의 구축
- <414> 상기한 방법으로 하이브리도마로부터 클로닝한 항체의 가변 영역을 인간 항체 발현용 벡터에 삽입하고, 여러 가  
 지 정상 영역을 가진 재조합 항체 발현 벡터를 제작하였다.
- <415> 인간 항체 발현용 벡터, N5KG1-VaL Lark(이하 N5KG1이라고 약기)(IDEC 파마슈티컬스사제, 미국 특허 제6001358  
 호 참조)는, 재조합 항체를 동물 세포에 발현시키는 목적으로 사용되는 플라스미드 벡터이다. N5KG1의 구조를  
 도 4A에 나타냈다. N5KG1은, 2개의 CMV 프로모터/인핸서를 가지고, 각각의 하류에 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유  
 전자의 클로닝 사이트를 가진다. 또한 그 하류에는, 인간 중쇄 정상 영역( $\gamma$ 1) 및 인간 경쇄 정상 영역( $\kappa$ )을

코드하는 유전자 서열을 미리 가지고 있다. 본 벡터의 가변 영역 클로닝 사이트에 임의의 중쇄 및 경쇄 가변 영역(리더 서열=분비 시그널 서열을 포함함)을, 리딩 프레임을 모두 삽입함으로써, 경쇄 가변 영역이 인간  $\kappa$ 쇄 정상 영역과, 중쇄 가변 영역이 인간  $\gamma$ 1쇄 정상 영역과 연결된 항체를 발현시킬 수 있다. 따라서, 본 벡터가 도입된 동물 세포는 배양액 중에 IgG1항체를 생산한다.

- <416> 마찬가지로, 발현 벡터 N5KG4PE(IDEK 파마슈티컬스사제)는, IgG4PE의 중쇄 정상 영역을 가지고 있다. IgG4PE란 IgG4에 2개의 변이(Ser228Pro, Leu235Glu)가 들어간 서열이다. Ser228Pro는 IgG4의 분자 내 가교(S-S 결합)에 의한 단량체 형성을 억제하는 변이이다. 또한, Leu235Glu는 항체 의존성 세포 상해(Antibody-dependent cellular cytotoxicity:ADCC) 활성을 저감시키는 변이이다.
- <417> 또한, N5KG1의 IgG1 정상 영역을 IgG3로 변환하고, N5KG3을 제작하였다.
- <418> 또한 본 실시예에서는, N5KG1, N5KG3, N5KG4PE를 기초로, 중쇄 정상 영역(특히 힌지 영역)에 여러 가지 개변을 가한 발현 벡터를 제작하였다.
- <419> 본 실시예에서 정상 영역에 가한 개변은, 첫째, 항체 도메인 간의 서브클래스의 교체에 의한 것이다. 항체 중쇄 정상 영역은, N 말단측으로부터 CH1-힌지-CH2-CH3이라는 도메인 구조를 가지고 있다. 본 실시예에서는, 이 도메인 단위로 각 서브클래스의 서열을 조합한 중쇄 정상 영역을 제작하였다. 예를 들면, CH1 및 힌지 영역은 인간 IgG3의 서열이고, CH2 및 CH3은 인간 IgG1인 중쇄 정상 영역을 제작하였다. 그리고, 이와 같은 중쇄 정상 영역을 가지는 항체를, CH1/힌지/CH2/CH3의 순으로 서브클래스를 표기하고, IgG3/3/1/1이라고 명명하였다(이하 는 IgG3311처럼 "/"를 생략하여 표기한다). 또한, 예를 들면, 힌지 영역은 인간 IgG3의 서열이고, CH1, CH2 및 CH3은 인간 IgG4PE인 중쇄 정상 영역을 제작하였다. 이와 같은 중쇄 정상 영역을 가지는 항체를 IgG4344라고 명명하였다.
- <420> 둘째, 인간 IgG3 힌지 영역의 개변체를 제작하였다. 항체의 힌지 영역은 상부 힌지와 중간 힌지로 나눌 수 있다. 상부 힌지란 카바트 EU 넘버링(카바트 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup>Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991))에 의한 표기로 216 이후, 226 보다 N 말단측의 서열을 가르킨다. 중간 힌지란, 동 표기로 226 이후, 231보다 N 말단측의 서열을 가르킨다. 인간 IgG3의 힌지 영역은, 상부 힌지가 12개의 아미노산, 중간 힌지가 50개의 아미노산으로 이루어진다. 또한 중간 힌지는, 5개의 아미노산과 15개의 아미노산×3회의 반복 서열로 나누어진다(5+15×3=50). 본 실시예에서는, IgG3 중간 힌지의 반복 서열을 1회로 단축한 변이체를 제작하였다. 이와 같은 힌지를 G3h1이라고 명명하고, 이 타입의 힌지를 가지는 항체를 전술한 도메인 단위의 변이와 합하여, IgGx3xxh1(x는 임의)처럼 표기하였다.
- <421> 또한, IgG3의 중간 힌지 후반의 반복 서열을 없앤 중쇄 정상 영역도 제작하였다. 이와 같은 힌지를 G3uh("upper hinge"의 줄임)라고 명명하고, IgGx3xxuh처럼 표기하였다.
- <422> 또한 G3uh 힌지에 L217S와 R228P의 변이를 첨가한 중쇄 정상 영역을 제작하였다. 이 변이에는 G3uh 힌지를 IgG4PE의 서열에 더 가깝게 하는 의도가 있다. 이것을 G3uhm("upper hinge mutation"의 줄임)이라고 명명하고, 이것을 가지는 항체를 IgGx3xxuhm이라고 표기하였다.
- <423> 도 4B에 천연형의 인간 면역글로불린, 및 IgG4PE, IgG4344, IgG4344h1, IgG4344uh, IgG4344uhm의 힌지 영역의 아미노산 서열을 나타낸다.
- <424> 본 실시예에서는 항 Mp1 아고니스트 항체의 가변 영역을 이용하여, 이하의 정상 영역을 가지는 항체의 발현 벡터를 제작하였다.
- <425> IgG1, IgG4PE, IgG3311, IgG3331, IgG3344, IgG3344h1, IgG4344, IgG4344h1, IgG4344uh, IgG4344uhm
- <426> 이하에 각 발현 벡터의 제작법을 기재한다.
- <427> 1) IgG1 서브클래스의 항 c-Mp1 항체 발현 벡터의 제작
- <428> 1-1) 항 인간 c-Mp1 항체 4-49\_IgG1 및 7-10\_IgG1 발현 벡터의 제작
- <429> 7-10 및 4-49에 대해서는, N5KG1 벡터에 최초로 중쇄 가변 영역, 다음에, 경쇄 가변 영역의 순으로 삽입하여 발현 벡터를 제작하였다.
- <430> 발현 벡터 제작의 공정을 도 4C에 나타낸다. 7-10 및 4-49 각각의 HV[C] 및 LV[C] 단편(실시예 7에 기재)을 포

합하는 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 말단에 연결을 위한 제한 효소 부위(5' 말측 SalI, 3' 말측 NheI)를 부가하도록 디자인한 프라이머 세트를 이용하여, 중쇄 및 경쇄의 리더 서열과 가변 영역의 DNA를 KOD-Plus-DNA 폴리머라아제에 의한 PCR로 증폭하였다. 이 PCR에 의해 증폭된, 중쇄 및 경쇄의 리더 서열+가변 영역을 각각 HV 단편, LV 단편으로 나타낸다.

<431> 우선, N5KG1에 7-10HV, 4-49HV 단편의 삽입을 행하였다. HV 단편 증폭용 프라이머는, 이하와 같다.

7-10 ;

HV 단편 5'용 프라이머 : 40-3H5Sal

5' - AGAGAGAGAG GTCGACCACC ATGGAGTTGGGACTGAGCTG GATTT -3' (서열번호 39)

HV 단편 3'용 프라이머 : 40-3H3Nhe

5' - AGAGAGAGAG GCTAGCTGAG GAGACAGTGACCAGGGTGCC A -3' (서열번호 40)

4-49 ;

HV 단편 5'용 프라이머 : F24HSal

5' -AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTT -3' (서열번호 41)

HV 단편 3'용 프라이머 : C15H3Nhe

5' - AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCGTGGT-3' (서열번호 42)

<432>

<433> 반응 온도 조건으로는, 94℃의 초기 온도에서 1분간의 가열 후, 94℃/5초간 및 68℃/45초간의 사이클을 35회 반복하고, 마지막으로 72℃/7분간 가열하였다. 증폭된 DNA 단편을 제한 효소 SalI와 NheI로 소화시켜, 아가로스 겔 전기 영동으로 약 430bp의 DNA를 회수하여 정제하였다. 한편, N5KG1 박테리에 대해서는 제한 효소 SalI, NheI 처리를 순차로 행한 후, 탈인산화를 위해서 알칼리성 포스타제(E. coli C75)(다카라슈조사제, 일본)로 처리한 후에, 아가로스 겔 전기 영동과 DNA 정제 키트로 약 8.9kb의 DNA를 회수하였다. 이들 2개의 단편을 T4 DNA 리가아제를 이용하여 라이게이션하여, 대장균 DH10B로 도입하여 형질 전환체를 얻었다. 얻어진 형질 전환체의 플라스미드 DNA에 대하여 DNA 염기 서열을 해석하여, 중쇄 정상 영역의 5' 상류에, HV 단편이 프레임이 모두 삽입된 플라스미드 DNA, N5KG1\_7-10\_Hv, 및 N5KG1\_4-49\_Hv를 획득하였다.

<434>

계속해서, 이들 HV 단편이 삽입된 플라스미드 박테리에 LV 단편(경쇄 리더 서열+가변 영역)의 삽입을 행하였다. LV[C] 단편을 포함하는 플라스미드 DNA를 주형으로 하여, 말단에 연결을 위한 제한 효소 부위(5' 말측 BglII, 3' 말측 BsiWI)를 부가하도록 디자인한 프라이머를 이용하여, LV 단편을 PCR로 증폭하였다. LV 증폭용 프라이머는 이하와 같다.

7-10 ;

LV 단편 5'용 프라이머 : 165-1B\_L18Bgl

5' - AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTC-3' (서열번호 43)

LV 단편 3'용 프라이머 : 165\_1B\_L18\_Bsi

5' - AGAGAGAGAG CGTACGTTG ATCTCCACCT TGGTCCCTCC -3' (서열번호 44)

4-49 ;

LV 단편 5'용 프라이머: DNP\_L1Bglp

5' - AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGAGGGTCCCCGCTCAGCTC -3' (서열번호 45)

LV 단편 3'용 프라이머 : A27\_R\_N202

5' - AGAGAGAGAGCGTACGTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTGGC-3' (서열번호 46)

<435>

<436> 반응은 94℃의 초기 온도에서 1분간의 가열 후, 94℃/5초간 및 68℃/45초간의 사이클을 35회 반복하고, 마지막

으로 72°C/7분간의 보온이라고 하는 조건으로 실시하였다. 정제한 LV의 증폭 DNA 단편은, pCR4Blunt-TOPO 벡터 (토요보세키(주)제)에 서브클로닝을 행하고, 얻어진 클론의 플라스미드 DNA에 대하여 인서트 DNA의 염기 서열을 해석하였다. DNA 염기 서열 결정을 위해서 프라이머로서, M13-20FW 및 M13RV를 이용하였다. 삽입 부분의 DNA 염기 서열 해석을 행하고, 주형으로 한 LV와 차이가 없고, 또한, 프라이머 부분도 디자인대로의 서열을 가지는 플라스미드 DNA(TOPO\_7-10\_Lv, 및 TOPO\_4-49\_Lv)를 선택하였다. 다음에, 각각의 DNA를 제한 효소 BglIII 및 BsiWI로 소화시켜, 아가로스 겔 전기 영동으로 약 400bp의 DNA를 회수하여 정제하였다. 그 정제 DNA 단편과, 제한 효소 처리(BglIII, BsiWI) 및, 탈 인산화 처리를 실시한 7-10 또는 4-49의 HV가 삽입된 벡터(약 9.3kb)를 T4 DNA 리가아제에 의해 라이게이션한 후, 대장균 DH10B로 도입하여 형질 전환체를 얻었다. 형질 전환체에 대하여, DNA 서열 해석이나 제한 효소 절단 패턴을 해석하고, 목적의 플라스미드 DNA를 포함하는 클론을 선택하였다. 또한, 얻어진 항체 발현 플라스미드 DNA의 대량 정제를 행하고, 중쇄 전체 영역과 경쇄 전체 영역, 및, 그 삽입 부위 주변의 DNA 염기 서열에 클로닝 공정에서의 변이가 없음을 확인하였다. 7-10\_IgG1 및 4-49\_IgG1 발현 벡터는 각각 N5KG1\_7-10 및 N5KG1\_4-49라고 명명하였다.

<437> 도 4C에 N5KG1\_7-10 및 N5KG1\_4-49의 제작 공정을 도시하였다.

<438> 1-2) 항 인간 c-Mpl 항체 6-4-50\_IgG1 및 6-5-2\_IgG1 항체 발현 벡터의 제작

<439> 6-4-50 및 6-5-2에 대해서는, 인간 항체 발현용 벡터에 최초로 경쇄 가변 영역, 다음에, 중쇄 가변 영역의 순으로 삽입하여 발현 벡터를 제작하였다.

<440> 6-4-50 및 6-5-2 항체 각각의 LV[C] 단편을 포함하는 플라스미드 DNA(실시에 7)를 주형으로 하여, 말단에 연결을 위한 제한 효소 부위(5' 말측 BglIII, 3' 말측 BsiWI)를 부가하도록 디자인한 프라이머 세트를 이용하여, LV 단편(경쇄의 리더 서열+가변 영역)의 DNA를 KOD-Plus-DNA 폴리머라아제에 의한 PCR로 증폭하였다. 프라이머는 이하와 같다.

6-4-50 ;

LV 단편 5'용 프라이머 : 208LF

5' -AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCGCTCAGC -3' (서열번호 47)

LV 단편 3'용 프라이머 : 62LP3Bsi

5' - AGAGAGAGAGCGTACGTTTATTCCACCTTGGTCCCTTG -3' (서열번호 48)

6-5-2 ;

LV 단편 5'용 프라이머 : A27\_F

5' -AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTC -3' (서열번호 49)

LV 단편 3'용 프라이머 : 202LR

5' - AGAGAGAGAGCGTACGTTTAAATCTCCAGTCGTGTCCCTTGGC -3' (서열번호 50)

<441>  
<442> 반응 온도 조건으로는, 94°C의 초기 온도에서 1분간의 가열 후, 94°C/5초간 및 68°C/45초간의 사이클을 35회 반복하고, 마지막으로 72°C/7분간 가열하였다. 증폭된 DNA 단편을 제한 효소 BglIII 및 BsiWI로 소화시켜, 아가로스 겔 전기 영동으로 약 400bp의 DNA를 회수하여 정제하였다. 한편, N5KG1 벡터에 대해서는 제한 효소 BglIII와 BsiWI 처리를 순차로 행한 후, 탈인산화 처리로서 알칼리성 포스타제(E. coli C75)(다카라슈조사제)로 처리한 후에, 아가로스 겔 전기 영동과 DNA 정제 키트로 약 8.9kb의 DNA를 회수하였다. 이들 2개의 단편을 T4 DNA 리가아제를 이용하여 라이게이션하여, 대장균 DH10B로 도입하여 형질 전환체를 얻었다. 인서트 DNA를 포함하는 형질 전환체의 플라스미드 DNA에 대하여 DNA 염기 서열을 해석하여, LV 단편이 N5KG1의 인간 항체 경쇄 정상 영역을 코드하는 5' 상류에 프레임이 모두 삽입된 플라스미드 DNA, N5KG1\_6-4-50\_Lv, 및 N5KG1\_6-5-2\_Lv를 수득하였다. 계속해서, 상기 LV 단편이 삽입된 플라스미드 벡터에 HV 단편(중쇄 리더 서열+가변 영역)의 삽입을 행하였다. HV[C]를 포함하는 플라스미드 DNA(실시에 7)를 주형으로 하여, 말단에 연결을 위한 제한 효소 부위(5' 말측 SalI, 3' 말측 NheI)를 부가하도록 디자인한 프라이머를 이용하여, HV 단편을 PCR로 증폭하였다. 사용한 프라이머는 이하와 같다.

6-4-50 ;

HV 단편 5' 용 프라이머 : 50-5-7Hsa1

5' - AGAGAGAGAG GTCGACCACC ATGGAATTGG GACTGAGCTG GATTTT -3' (서열번호 51)

HV 단편 3' 용 프라이머 : C15H3Nhe

5' -AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCGTGGT-3' (서열번호 52)

6-5-2 ;

HV 단편 5' 용 프라이머 : F24HSa1

5' - AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATT-3' (서열번호 53)

HV 단편 3' 용 프라이머 : L66H3Nhe

5' - AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTC-3' (서열번호 54)

<443>

<444>

반응은 94℃의 초기 온도에서 1분간의 가열 후, 94℃/5초간 및 68℃/45초간의 사이클을 35회 반복하고, 마지막으로 72℃/7분간의 보온이라고 하는 조건으로 실시하였다. 정제한 HV 단편의 증폭 DNA 단편은, 한번 pCR4Blunt-TOPO 벡터(토요보세키(주)제)에 서브클로닝을 행하고, 얻어진 클론의 플라스미드 DNA에 대하여 인서트 DNA의 염기 서열을 해석하였다. DNA 염기 서열 결정을 위해서 프라이머로서, M13-20FW 및 M13RV를 이용하였다. 삽입 부분의 DNA 염기 서열 해석을 행하고, 주형으로 한 HV와 차이가 없고, 또한, 프라이머 부분도 디자인 대로의 서열을 가지는 플라스미드 DNA(TOPO\_6-4-50\_Hv, 및 TOPO\_6-5-2\_Hv)를 선택하였다. 다음에, 각각의 DNA를 제한 효소 SalI와 NheI로 소화시켜, 아가로스 겔 전기 영동으로 약 430bp의 DNA를 회수하여 정제하였다. 병행하여 제한 효소 처리(SalI와 NheI), 및, 탈인산화 처리한 6-4-50 또는 6-5-2의 LV 단편이 삽입된 벡터(약 9.3kb)에, 인서트하고자 하는 DNA 단편을 라이게이션한 후, 대장균 DH10B로 도입하여, 얻어진 형질 전환체로부터 목적의 플라스미드 DNA를 가지는 클론을 선택하였다. 이렇게 해서 얻어진 항체 발현 플라스미드 DNA의 대량 정제를 행하고, 중쇄 전체 영역과 경쇄 전체 영역, 및, 그 삽입 부위 주변의 DNA 염기 서열에 클로닝 공정의 변이가 없음을 확인하였다. 6-4-50\_IgG1 및 6-5-2\_IgG1 항체 발현 벡터를 각각 N5KG1\_6-4-50 및 N5KG1\_6-5-2라고 명명하였다.

<445>

도 4D에 N5KG1\_6-4-50 및 N5KG1\_6-5-2의 제작 공정을 도시하였다.

<446>

2) IgG4PE 서브클래스의 항 인간 c-Mpl 항체의 제작

<447>

IgG4PE 서브클래스 항체의 발현 벡터 제작에는 전술한 N5KG4PE 벡터를 이용하였다. N5KG4PE의 플라스미드 DNA를 제한 효소 NheI와 BamHI로 절단하여, 중쇄 정상 영역을 포함하는 단편을 정제하여, 항 c-Mpl 항체인 N5KG1\_7-10, 및 N5KG1\_4-49의 동일한 제한 효소 부위 내에 다시 연결함으로써, N5KG4PE\_7-10, 및 N5KG4PE\_4-49를 제작하였다.

<448>

3) N5KG3의 제작

<449>

인간 IgG3용 발현 벡터 N5KG3은 N5KG1의 IgG1 중쇄 정상 영역을 하기 서열의 IgG3 정상 영역으로 치환함으로써 제작하였다.

<450>

IgG3 정상 영역 아미노산 서열

STKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS  
 SSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPGLDTHHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP  
 EPKSCDTPPPCPRCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNA  
 KTKLREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT  
 KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMH  
 LHNRYTQKSLSLSPGK\* (서열번호 55)

<451>

<452> IgG3 정상 영역 염기 서열

CTAGACCAAGGGCCCATCGGTCTCCCCCTGGCGCCTGCTCCAGGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC  
 TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCG  
 GCGTGCACACCTTCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT  
 CCAGCAGTTTGGGCACCCAGACTACACCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA  
 GAGTTGAGCTCAAAACCCCACTTGGTGACACAACCTCACACATGCCACGGTGCCAGAGCCCAAATCTTGTG  
 ACACACCTCCCCGTGCCACGGTGCCAGAGCCCAAATCTTGTGACACACCTCCCCATGCCACGGTGCC  
 CAGAGCCCAAATCTTGTGACACACCTCCCCGTGCCAAGGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGAGGACCGT  
 CAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGATACCCTTATGATTTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCGTGG  
 TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAAGTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATG  
 CCAAGACAAAGTGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTCCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACC  
 AGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAA  
 CCATCTCCAAAACCAAAGGACAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGA  
 CCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA  
 GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAACACCACGCCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCT  
 ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACATCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG  
 CTCTGCACAACCGTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA (서열번호 56)

<453>

<454> 4) IgG3311 발현 벡터의 제작

<455> IgG3311 발현 벡터는, N5KG3을 주형으로 하여, 프라이머 linkH, 13ch1-R로 98℃ 1초, 60℃ 30초, 72℃ 30초의 반응을 15회 행하였다. 동시에, N5KG1을 주형으로 하여, 프라이머 13ch1, linkH2를 이용하여, 98℃ 1초, 60℃ 30초, 72℃ 30초의 반응을 15회 행하였다. 증폭한 DNA 단편을 PCR 정제 키트로 정제하고, 2개의 정제 DNA 단편을 등량 혼합한 후, 98℃ 1초, 60℃ 30초, 72℃ 30초의 반응을 5회 행하고, 프라이머 linkH, linkH2를 첨가하여, 15회 반응시켰다. 증폭한 DNA 단편을 NheI, BamHI로 절단하고, N5KG1 벡터의 IgG1 정상 영역과 치환하였다. 이 발현 벡터를 N5KG3311이라고 명명하였다.

linkH: GGG TAC GTC CTC ACA TTC AGT GAT CAG (서열번호 57)

13ch1-R: GTC TTC GTG GCT CAC GTC CAC CAC CAC GCA (서열번호 58)

13ch1: TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC (서열번호 59)

linkH2: TGA TCA TAC GTA GAT ATC ACG GC (서열번호 60)

<456>

<457> 5) IgG3331 발현 벡터의 제작

<458> IgG3331 발현 벡터는, N5KG3을 주형으로 하여, 프라이머 linkH, CH3consR로 98℃ 1초, 60℃ 30초, 72℃ 30초의 반응을 15회 행하였다. 동시에, N5KG1을 주형으로 하여, 프라이머 CH3cons, linkH2를 이용하여, 98℃ 1초, 60℃ 30초, 72℃ 30초의 반응을 15회 행하였다. 증폭한 DNA 단편을 PCR 정제 키트로 정제하고, 2개의 정제 DNA 단편을 등량 혼합한 후, 98℃ 1초, 60℃ 30초, 72℃ 30초의 반응을 5회 행하고, 프라이머 linkH, linkH2를 첨가하여, 15회 반응하였다. 증폭한 DNA 단편을 NheI, BamHI로 절단하고, N5KG1 벡터의 IgG1 정상 영역과 치환하였다. 이 발현 벡터를 N5KG3331이라고 명명하였다.

CH3consR: GGTGTACACCTGTGGCTCTCGGGGCTGCCC (서열번호 61)

<459>

CH3cons: GGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACC (서열번호 62)

<460>

이하에, IgG3344, IgG3344h1, IgG4344, IgG4344h1, IgG4344uh, IgG4344uhm의 제작법을 기재한다. 이들에 대해

서는, 각 정상 영역을 PCR법에 의해 증폭하고, 그것을 클로닝한 플라스미드를 제작하였다. 이어서, 그들 개변 정상 영역을 N5KG1\_7-10 등의 IgG1 정상 영역과 치환하였다.

<461> 6) IgG3344, IgG3344h1 정상 영역의 제작

<462> IgG3344 발현 벡터는, N5KG3331 및 N5KG4PE를 주형으로 하여, PCR을 이용한 변이 도입(오버랩 신장 (Overlap Extention)법)에 의한 부위 특이적 변이 도입법에 의해 이하의 수순으로 행하였다.

<463> N5KG3331을 주형으로 하여, 프라이머로서 G3G4\_P1\_F 및 G3G4\_P2\_R을 이용하여 94℃의 초기 온도에서 1분간의 가열 후, 94℃/15초간, 55℃/10초간, 그리고 68℃/1분간의 사이클을 35회 반복하고, 마지막으로 72℃/7분간 가열하였다. 동시에, 전술한 발현 벡터 N5KG4PE를 주형으로 하여, 프라이머로서 G3G4\_P3\_F 및 G3G4\_P4\_R을 이용하여 동 조건으로 PCR을 실시하였다. 증폭한 DNA 단편을 아가로스 겔 전기 영동으로 회수하고, 키아퀵 겔 추출 키트(키아퀵사제)로 정제하였다. 이들 정제 DNA 단편을 등량 혼합한 후, 최초의 5사이클에 대해서는, 2DNA 단편의 오버랩 부분을 어닐링시켜 94℃의 초기 온도에서 1분간의 가열 후, 94℃/10초간, 55℃/10초간, 그리고 68℃/1.5분간이라고 하는 5 사이클의 신장 반응을 행한 후, 전장을 증폭시키기 위해서 반응액에 프라이머로서 G3G4\_P1\_F 및 G3G4\_P4\_R을 첨가하여, 다시 94℃/5초간 및 68℃/2분간의 사이클을 20회 반복하고, 마지막으로 72℃/7분간의 가열을 행하였다. G3G4\_P1\_F 및 G3G4\_P4\_R의 프라이머는, 인간 항체 정상 영역의 코드 부분을 잘라내서, 항체의 발현 벡터의 해당하는 부분에 변경 가능하게 하기 위해서 제한 효소 부위(G3G4\_P1\_F에 *Nhe*I, G3G4\_P4\_R에 *Bam*HI 부위)가 존재한다. 증폭한 PCR 단편은, 아가로스 겔 전기 영동으로 회수하고, 키아퀵 겔 추출 키트로 정제하였다. 정제한 증폭 단편은, 제로 블런트 TOPO PCR 클로닝 키트(인비트로젠사제)의 pCR 4 Blunt-TOPO 벡터에 서브 클로닝을 행하고, 얻어진 클론의 플라스미드 DNA에 대하여 인서트 DNA의 염기 서열을 해석하였다. 염기 서열의 해석으로부터 IgG3344 및 IgG3344h1 정상 영역을 가지는 클론을 선택하였다.

G3G4\_P1\_F : 5' -AGAGAGGCTA GCACCAAGGG CCCATCG-3' (서열번호 63)

G3G4\_P2\_R : 5' -GAACTCAGGT GCTGGGCACC TTGGGCACG-3' (서열번호 64)

G3G4\_P3\_F : 5' - CCAAGGTGCC CAGCACCTGA GTTCGAGGGG GGA -3' (서열번호 65)

G3G4\_P4\_R : 5' - AGAGAGGGAT CCTCATTTAC CCAGAGACAG GGA -3' (서열번호 66)

<464> <465> 7) IgG4344 정상 영역의 제작

<466> IgG4344 발현 벡터의 제작에서는, N5KG3331을 주형으로 하여, 프라이머로서 G434\_P5\_F 및 G434\_P6\_R을 이용하여 94℃의 초기 온도에서 1분 간의 가열 후, 94℃/15초간, 55℃/10초간, 그리고 68℃/1분간의 사이클을 35회 반복하고, 마지막으로 72℃/7분간 가열하였다. 동시에, N5KG4PE를 주형으로 하여, 프라이머로서 G3G4\_P7\_F 및 G3G4\_P2\_R을 이용하여 동 조건으로 PCR을 실시하였다. 증폭한 DNA 단편을 아가로스 겔 전기 영동으로 회수하고, 키아퀵 겔 추출 키트(키아퀵사제)로 정제하였다. 이들 정제된 2개의 DNA 단편, 및 전술한 N5KG4PE를 주형으로 하고, G3G4\_P3\_F 및 G3G4\_P4\_R을 프라이머로 하여 증폭·정제해 둔 DNA 단편의 3종류의 오버랩 신장 반응을 실시하였다. 즉, 3종류의 DNA 단편의 오버랩 부분을 어닐링시켜 94℃의 초기 온도에서 1분간의 가열 후, 94℃/10초간, 55℃/10초간, 68℃/1.5분간의 사이클을 5회 반복하여 신장시킨 후, 전장을 증폭시키기 위해서 반응액에 프라이머로서 G434\_P5\_F 및 G3G4\_P4\_R을 첨가하여, 94℃/5초간 및 68℃/2분간의 사이클을 20회 반복하고, 마지막으로 72℃/7분간의 가열을 행하였다. 증폭한 PCR 단편은 키아퀵 겔 추출 키트로 정제한 후, pCR 4 Blunt-TOPO 벡터에 서브클로닝을 행하고, 얻어진 클론의 플라스미드 DNA에 대하여 인서트 DNA의 염기 서열을 해석하였다. 염기 서열의 해석으로부터 IgG4344 정상 영역을 가지는 클론을 선택하였다.

G434\_P5\_F : 5' - AGAGAGGCTA GCACCAAGGG GCCATCC -3' (서열번호 67)

G434\_P6\_R : 5' - GGTTTTGAGC TCAACTCTCT TGTCCACCTT GGTGTTGC -3' (서열번호 68)

G434\_P7\_F : 5' - GTGGACAAGA GAGTTGAGCT CAAAACCCCA CTTGGTGACA C -3' (서열번호 69)

<467> <468> 8) IgG4344h1 정상 영역의 제작

<469> IgG4344h1 발현 벡터의 제작은, N5KG4344를 주형으로 하여, 프라이머로서 G434\_P5\_F, G434\_P6\_R을 이용하여 98℃의 초기 온도에서 10초 간의 가열 후, 98℃/10초간, 55℃/30초간, 그리고 72℃/1분간의 사이클을 7회 반복하고, 이어서 98℃/10초간, 68℃/1분간의 사이클을 30회 반복하여, 마지막으로 72℃/1분간 가열하였다. PCR용 효소로서는, 피로베스트 DNA 폴리머라아제(Pyrobest DNA Polymerase) (다카라바이오주식회사)를 사용하였다. 동

시에, N5KG3344h1을 주형으로 하여, 프라이머로서 G434\_P7\_F 및 G3G4\_P4\_R을 이용하여 동 조건으로 PCR을 실시하였다. 증폭한 DNA 단편을 아가로스 겔 전기 영동으로 회수하고, 키아퀵 겔 추출 키트(키아젠사제)로 정제하였다. 이들 정제된 DNA 단편을 등량 혼합한 후, 2개의 DNA 단편의 오버랩 부분을 어닐링시켜, 98°C의 초기 온도에서 10초간의 가열 후, 98°C/10초간, 55°C/30초간, 그리고 72°C/1분간의 사이클을 7회 반복하여 신장시킨 후, 전장을 증폭시키기 위해서 반응액에 프라이머로서 G434\_P5\_F 및 G3G4\_P4\_R을 첨가하여, 다시 98°C/10초간 및 68°C/1분간의 사이클을 30회 반복하고, 마지막으로 72°C/7분간의 가열을 행하였다. 증폭한 PCR 단편은, 아가로스 겔 전기 영동으로 회수하고, 키아퀵 겔 추출 키트로 정제하였다. 정제한 증폭 단편은, pCR 4 Blunt-TOPO 벡터에 서브클로닝을 행하고, 얻어진 클론의 플라스미드 DNA에 대하여 인서트 DNA의 염기 서열을 해석하였다. 염기 서열의 해석으로부터 G4344h1 정상 영역을 가지는 클론을 선택하였다.

<470> 9) IgG4344uh 정상 영역의 제작

<471> G4344uh의 제작은, N5KG4344를 주형으로 하여, 프라이머로서 G434\_P5\_F 및 17-1R을 이용하여 98°C의 초기 온도에서 10초 간의 가열 후, 98°C/10초간, 50°C/30초간, 그리고 72°C/1분간의 사이클을 5회 반복하고, 이어서 98°C/10초간, 55°C/30초간, 그리고 72°C/1분간의 사이클을 5회 반복하고, 98°C/10초간, 68°C/1분간의 사이클을 25회 반복하여, 마지막으로 72°C/7분간 가열하였다. PCR용 효소로는 피로베스트 DNA 폴리머라아제(다카라바이오주식회사)를 사용하였다. 병행하여, N5KG3344h1을 주형으로 하여, 프라이머로서 17-2F 및 G3G4\_P4\_R을 이용하여 동 조건으로 PCR을 실시하였다. 증폭한 DNA 단편을 아가로스 겔 전기 영동으로 회수하고, 키아퀵 겔 추출 키트로 정제하였다. 이들 정제 DNA 단편을 등량 혼합한 후, 2개의 DNA 단편의 오버랩 부분을 어닐링시켜, 98°C의 초기 온도에서 10초간의 가열 후, 98°C/10초간, 68°C/1분간의 사이클을 5회, 다시 98°C/10초간, 50°C/30초간, 그리고 72°C/1분간의 사이클을 5회 반복하여 신장시킨 후, 전장을 증폭시키기 위해서 반응액에 프라이머로서 G434\_P5\_F 및 G3G4\_P4\_R을 첨가하여, 다시 94°C/30초간과 68°C/1분간의 사이클을 30회 반복하고, 마지막으로 72°C/7분간의 가열을 행하였다. 증폭한 PCR 단편은, 아가로스 겔 전기 영동으로 회수하고, 키아퀵 겔 추출 키트로 정제하였다. 정제한 증폭 단편은, pCR 4 Blunt-TOPO 벡터에 서브클로닝을 행하고, 얻어진 클론의 플라스미드 DNA에 대하여 인서트 DNA의 염기 서열을 해석하였다. 염기 서열의 해석으로부터 IgG4344uh 정상 영역을 가지는 클론을 선택하였다.

17-1R : 5' - AGGTGCTGGG CACCGTGGGC ATGTGTGAGT TGT -3' (서열번호 70)

17-2F : 5' - CACACATGCC CACGGTGCCC AGCACCTGAG TTC -3' (서열번호 71)

<472>  
<473> 10) IgG4344uhm 정상 영역의 제작

<474> IgG4344uhm 발현 벡터의 제작은, N5KG4PE를 주형으로 하여, 프라이머로서 G434\_P5\_F 및 17m-1R을 이용하여 98°C의 초기 온도에서 10초 간의 가열 후, 98°C/10초간, 50°C/30초간, 그리고 72°C/1분간의 사이클을 5회 반복하고, 이어서 98°C/10초간, 55°C/30초간, 그리고 72°C/1분간의 사이클을 5회 반복하고, 98°C/10초간, 68°C/1분간의 사이클을 25회 반복하고, 마지막으로 72°C/7분간 가열하였다. PCR용 효소로서는, 피로베스트 DNA 폴리머라아제를 사용하였다. 병행하여, N5KG4PE를 주형으로 하여, 프라이머로서 17m-2F 및 G3G4\_P4\_R을 이용하여 동 조건으로 PCR을 실시하였다. 증폭한 DNA 단편을 아가로스 겔 전기 영동으로 회수하고, 키아퀵 겔 추출 키트로 정제하였다. 이들 정제 DNA 단편을 등량 혼합한 후, 2개의 DNA 단편의 오버랩 부분을 어닐링시켜, 94°C/30초간, 55°C/30초간, 그리고 72°C/1분간의 사이클을 7회 반복하여 신장시킨 후, 전장을 증폭시키기 위해서 반응액에 프라이머로서 G434\_P5\_F 및 G3G4\_P4\_R을 첨가하여, 다시 94°C/30초간 및 68°C/1분간의 사이클을 30회 반복하고, 마지막으로 72°C/7분간의 가열을 행하였다. 증폭한 PCR 단편은, 아가로스 겔 전기 영동으로 회수하고, 키아퀵 겔 추출 키트로 정제하였다. 정제한 증폭 단편은, pCR 4 Blunt-TOPO 벡터에 서브클로닝을 행하고, 얻어진 클론의 플라스미드 DNA에 대하여 인서트 DNA의 염기 서열을 해석하였다. 염기 서열의 해석으로부터 IgG4344uhm 정상 영역을 가지는 클론을 선택하였다.

17m-1R : 5' - TGTGTGAGTT GTGTCACCAA GTGGGTTTT GGA CTCAACT CTCTTGCCA CCTTGGT  
-3' (서열번호 72)

17m-2F : 5' - ACCCCACTTG GTGACACAAC TCACACATGC CCACCATGCC CAGCACCTGA GTTCGAG  
-3' (서열번호 73)

<475>  
<476> 도 4E에 각종 개변 중쇄의 아미노산 서열을 나타냈다.

- <477> 11) 각종 개변 중쇄 정상 영역을 가진 항체 발현 벡터의 제작
- <478> 제작한 각종 개변 중쇄 정상 영역을 가지는 플라스미드 DNA를 제한 효소 NheI, BamHI로 절단한 후, 정상 영역 서열을 정제 분리하였다. 계속해서, 항 인간 c-Mpl 항체 발현 벡터 N5KG1\_7-10, N5KG1\_4-49, N5KG1\_6-4-50, N5KG1\_6-5-2를 동 효소로 처리하고, 정상 영역을 치환하였다.
- <479> 도 4F에 7-10\_IgG4344uhm의 중쇄 서열을 나타냈다.
- <480> 도 4G에 7-10\_IgG4344uhm의 경쇄 서열을 나타냈다.
- <481> [실시에 9] 항 인간 c-Mpl 항체의 293F 세포에서의 일과성 발현, 및 정제
- <482> 실시예 8에서 제작한 발현 벡터 DNA를 엔도프리 플라스미드 키트(EndoFree Plasmid Kit)(키아젠사)로 조제하고, 프리스타일™ 293 표현 시스템(FreeStyle™ 293 Expression System)(인비트로젠라이프테크놀로지(Invitrogen Life Technologies)사)을 이용하여 부유성 293 세포(인비트로젠라이프테크놀로지사)에 도입하여, 일과성 발현에 의해 각 항체를 포함하는 배양 상청을 얻었다. 공극 직경 0.22 $\mu$ m의 멤브레인 필터(밀리포어사제)로 여과한 배양 상청(IgG로서 약 500 $\mu$ g)을 항체 정제용 친화성 칼럼인 하이트랩 아르프로테인 A FF(HiTrap rProtein A FF)(칼럼 체적 1ml)(아머삼바이오사이언스사)에 충전시키고, PBS(-)로 세정한 후 20mM 시트르산 완충액(pH 3.4)에 의해 용출하고, 200mM 인산 완충액(pH 7.0)를 포함하는 튜브에 회수하였다.
- <483> [실시에 10] 재조합형 항체의 제작
- <484> 구축한 항체 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하여, 항체 발현 세포를 제작하였다. 발현을 위한 숙주 세포에는, dhfr 결손의 CHO DG44 세포(IDEC 파마슈티컬스 코포레이션)를 무혈청 배지인 EX-CELL325PF(JRH)에 순화한 세포주를 이용하였다. 숙주 세포로의 벡터의 도입은 일렉트로포레이션에 의해 실시하였다. 일렉트로포레이션은 항체 발현 벡터 약 2 $\mu$ g를 제한 효소 AscI로 선상화하고, 바이오-레드 일렉트로포레터(Bio-Rad electrophoreter)를 이용하여 350V, 500 $\mu$ F의 조건으로, 4 $\times$ 10<sup>6</sup>개의 CHO 세포에 유전자를 도입하고, 96 웰 배양 플레이트에 파종하였다. 벡터의 도입 처리 후, G418을 첨가하여 배양을 계속하였다. 콜로니를 확인한 후, 항체 발현주를 선별하였다. 선별한 CHO 세포주를 EX-CELL325-PF 배지(JRH)(2mM 글루타민, 100 단위/ml 페니실린, 100 $\mu$ g/ml 스트렙토마이신, 히포크산틴 및 티미딘(HT) 보충제(1:100)(인비트로젠)를 포함함)로 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다. 배지 상청을 맵셀렉트 프로테인 A(Mabselect Protein A) 칼럼(아머삼파마시아바이오테크사제)에 흡착시킨 후, PBS로 세정하여, 20mM 시트르산-Na, 50mM NaCl(pH 3.4) 완충액으로 용출하였다. 용출액은 50mM 포스페이트-Na, pH 7.0으로 중화하였다. 밀리-Q(Milli-Q) 수로, 약 1.5배로 희석하여 전도도를 4.0ms/cm 이하로 조정하였다. 다음에, Q-세파로스(Q-Sepharose)(하이트랩 Q HP)(아머삼파마시아바이오테크사제)와 SP-세파로스(하이트랩 SP FF)(아머삼파마시아바이오테크사제)를 연결한 칼럼에, 샘플을 차지하여 흡착 후, 20mM 인산나트륨 완충액(pH 5.0)으로 세정한 후, 1 $\times$ PBS 완충액으로 용출하였다. 조제된 항체 용액은, 공극 직경 0.22 $\mu$ m의 멤브레인 필터 MILLEX-GV(밀리포어사제)로 여과 멸균하였다. 정제한 항체의 농도는 280nm의 흡광도를 측정하고, 1mg/mL를 1.4 OD로서 산출하였다.
- <485> 재조합형의 개변 항체를 이용하여, UT7/TPO 분석(실시에 5)에서의 활성을 측정하였다. 4-49\_IgG1에 비하여, IgG3311과 IgG3331은 활성의 증강이 보였다(도 5A). 7-10\_IgG4344uhm 및 4-49\_IgG4344uhm은 PEG-rHuMGDF와 동등한 활성을 나타냈다.
- <486> 표 3에 각종 개변 항체의 활성을 정리하였다. 모든 아고니스트 항체에 관하여, 정상 영역 개변에 의한 활성의 증강이 보였다. 7-10, 4-49에 관해서는, IgG1과 IgG4PE는 동등한 활성이었으나, IgG4344uhm은 IgG4PE에 비하여 고효성이었다. IgG4344uhm은, IgG4PE의 상부 힌지부 7 아미노산 서열 중의 C 말측 4-7위치가 IgG3의 상부 힌지 12 아미노산 서열 중의 4-12위치의 서열로 치환되어 있다(도 4B 참조). 따라서, 이 부분이 활성의 증강에 중요하다고 생각된다.

표 3

	2-35	7-10	4-49	6-4-50	6-5-2
IgG1	-	++	++	+	+
IgG4PE	NT	++	++	NT	NT
IgG3311	NT	+++	+++	++	++
IgG3331	NT	+++	+++	NT	NT
IgG3344	NT	+++	NT	NT	++
IgG3344h1	NT	+++	NT	NT	NT
IgG4344	NT	+++	NT	NT	NT
IgG4344h1	NT	+++	NT	NT	NT
IgG4344uh	NT	+++	NT	NT	NT
IgG4344uhm	NT	+++	+++	NT	NT

+: EC<sub>50</sub> 1-10nM  
 ++: EC<sub>50</sub> 0.1-1nM  
 +++: EC<sub>50</sub> 0.01-0.1nM  
 NT: 시험하지 않음

<487>

<488>

[실시예 11] 아고니스트 항체에 의한 시그널 전달

<489>

TPO가 수용체인 c-Mpl에 결합하면, 세포 내 단백질의 인산화가 일어난다. TPO에 의해 활성화되는 주요한 경로로는, Jak-STAT, Ras-MAPK, PI3K-Akt의 3개가 알려져 있다. 아고니스트 항체에 의한 c-Mpl 하류의 인산화 시그널 전달의 해석을 행하였다. 해석은, 인산화 단백질 특이적인 항체를 이용한 웨스턴 블롯법으로 행하였다. 이하에 사용한 항체를 열거한다. 항 STAT5(셀 시그널링(Cell Signaling)사제, Cat#9352), 항 포스포(phospho)-STAT5(셀 시그널링사제, Cat#9351L), 항 JAK2(업스테이트(Upstate)사제, Cat#06-255), 항 포스포-JAK2(Upstate사제, Cat#07-606), 항 Erk1/2(셀 시그널링사제, Cat#9272), 항 포스포-Erk1/2(셀 시그널링사제, Cat#9271L), 항 Akt(셀 시그널링사제, Cat#9102), 항 포스포-Akt(셀 시그널링사제, Cat#9101S).

<490>

이들 항체를 사용하고, 이하의 수순으로 분석을 행하였다.

<491>

1) UT7/TPO 세포를 사이토카인 비첨가 IMDM 배지에서 세정하고, 6시간 배양하였다.

<492>

2) 배양 후, 세포를 1×10<sup>6</sup> 세포/mL로 조제하고, 6-웰 플레이트에 2mL/웰로 플레이팅하였다.

<493>

3) 웰에, 아고니스트 항체 또는 양성 컨트롤로서 PEG-rHuMGDF를 첨가하고, 세포를 자극하였다.

<494>

4) 최단 5분~최장 2시간의 자극 시간 후에 세포를 회수하고, 빙랭 PBS로 세포를 세정하였다.

<495>

5) 원심 분리로 세포를 펠릿화 하고, 상청을 제거한 후, 포스포세이프(PhosphoSafe)<sup>TM</sup> 추출 시약(노바젠(Novagen)사제, Cat#71296)로 펠릿을 용해시킨 후, 다시 원심분리하여, 상청(세포 용출액)을 회수하였다.

<496>

6) 상기 5.의 세포 추출액을 이용하여, 웨스턴 블롯법으로 인산화 단백질을 검출하였다.

<497>

결과를 도 6에 나타내었다. 아고니스트 항체 7-10G4344uhm 및 4-49G4344uhm에 의해, TPO 시그널과 마찬가지로의 경로의 인산화가 보였다(도 6A). 항체 6-5-2에 대해서는, IgG1은 Jak2, STAT5의 인산화가 관찰되지 않았으나, IgG3344는 Jak2, STAT5의 인산화가 보였다(도 6B).

<498>

[실시예 12] 인간 혈소판에 대한 프라이밍 작용 검토

<499>

TPO는 그 자체로는 혈소판 응집을 일으키지 않지만, ADP 등의 응집 야기 물질에 의한 혈소판 응집을 촉진하는 작용(프라이밍 작용)이 있다. 아고니스트 항체에 의한 인간 혈소판 프라이밍 작용을 이하의 수순으로 조사하였다.

<500>

1) 항응고제로서, 3.1%(w/v) 시트르산삼나트륨을 10분의 1 용량 첨가한, 건강한 사람의 말초혈을 원심 분리(140g, 15분)하고, 다혈소판 혈장(Platelet Rich Plasma, 이하 PRP)을 조제하였다.

<501>

2) 또한 원심 분리(2500g, 15분)하여 혈구 성분을 침전시키고, 혈장을 채취하였다.

- <502> 3) PRP에 포함되는 혈소판 수를 측정하고, 혈장을 이용하여 혈소판 수를  $3 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 로 맞추었다.
- <503> 4) 상기 3.에서 조제한 혈소판 부유액 100  $\mu\text{L}$ 에 검체를 첨가하고, 교반하면서 3분간 인큐베이션하였다.
- <504> 5) 30  $\mu\text{M}$  ADP(시그마사제)를 5  $\mu\text{L}$  첨가하고, 혈소판 응집에 의한 현탁의 저하를 측정하였다. 측정에는 MC 메디컬사제, 헤마트레이서801(Hematracer801)을 이용하였다.
- <505> 결과를 도 7에 나타내었다. ADP 첨가 조건 하에서, 아고니스트 항체에 의한 프라이밍 작용이 관찰되었다. 항체 단독(ADP 없음)으로는, 혈소판 응집은 일어나지 않았다.
- <506> [실시예 13] 게잡이원숭이에의 투여
- <507> 아고니스트 항체를 게잡이원숭이에게 투여하고, 혈소판 수의 변동을 해석하였다. 사용 개체의 TPO에 대한 반응성을 확인하기 위해서, 첫날(Day0)에 PEG-rHuMGDF(10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )를 정맥 내 투여하고 3주간 경과를 관찰한 후, 첫회 투여 후 21일째에 정제된 아고니스트 항체 7-10G4PE(개체 A) 7-10G3344h1(개체 B)을 용량 1mg/kg으로 정맥 내 투여하였다.
- <508> 결과를 도 8에 나타내었다. A, B 양쪽의 개체에서 PEG-rHuMGDF에 의한 일과성의 혈소판 상승이 보였다. 개체 B에서는 아고니스트 항체 7-10G3344h1 투여 후에, 혈소판 수의 상승이 보였다. 또한, 항체 투여에 의한 중독의 독성은 보이지 않았다.
- <509> [실시예 14] 인간 제대혈 이식 모델에서의 작용 검토
- <510> 실시예 10에서 제작한 아고니스트 항체가 인간 제대혈 이식 모델에서의 인간 조혈계의 구축을 촉진하는 것을 확인하기 위해서, 이하의 수순으로 실험을 행하였다.
- <511> · NOG(NOD/SCID/IL2- $\gamma$ R KO) 마우스(실험 동물 중앙 연구소(일본 가나가와켄 가와사키시)로부터 구입)에 이식 전 처치로서 방사선 조사(2그레이)를 행하고, 인간 제대혈 유래 CD34+세포를 1,000 내지 10,000개를 꼬리 정맥을 통해 주입 이식하였다.
- <512> · 이식 후 1일째에 최초의 피험 물질 투여를 행하고, 그 후, 주 1회 투여를 실시하였다. 군 구성과 각각의 피험 물질 및 투여량은 하기와 같다. 마리 수는 각군 6마리, 투여는 복강 내 투여로 행하였다. 또한, 매주의 투여시에 체중 측정을 행하였다.
- <513> <군 구성, 피험 물질, 투여량>
- <514> I : 이식 수 10,000, PBS(컨트롤) 투여
- <515> II : 이식 수 1,000, PBS 투여
- <516> III : 이식 수 10,000, 항체 7-10G4344uhm 투여, 100 $\mu\text{g}/\text{head}/\text{week}$
- <517> IV : 이식 수 1,000, 항체 7-10G4344uhm 투여, 100 $\mu\text{g}/\text{head}/\text{week}$
- <518> V : 이식 수 10,000, TPO(PEG-rHuMGDF) 투여, 5 $\mu\text{g}/\text{head}/\text{week}$
- <519> VI : 이식 수 1,000, TPO(PEG-rHuMGDF) 투여, 5 $\mu\text{g}/\text{head}/\text{week}$
- <520> · 이식 전 1일과 이식 후 2, 4, 6주에 말초혈의 해석을 행하였다. 말초혈 해석의 수순은 하기와 같다.
- <521> <말초혈 해석 수순>
- <522> · 캐필러리(capillary)를 이용하여, 마우스 안와 정맥으로부터 말초혈(약 70  $\mu\text{L}$ )을 채취하였다.
- <523> · KX-21 자동 혈구 해석 시스템(시스맥스(Sysmex)사제)을 이용하여 혈구 수를 측정하였다.
- <524> · 인간 혈소판 및 백혈구의 키메라율을 조사하기 위해서, 이하의 A 및 B에 든 각 항체의 조합으로 염색하고, FACS 칼리버로 해석하였다. A(혈소판 해석용): PE 표지-항 인간 CD41 항체(다코(Dako)사제 R7058)+FITC 표지-항 마우스 CD41 항체(BD 파르민겐(BD Pharmingen)사제 #553848), B(백혈구 해석용): APC 표지-항 인간 CD45 항체(베크만·쿨터(Beckman Coulter, Inc.)사제 IM2473)+FITC 표지-항 마우스 CD45 항체(BD 파르민겐사제 #553080). 또한, 해석시에 정량용 형광 비즈(Flow-Count beads)를 첨가하고, 일정량의 혈액을 해석할 수 있도록 하였다.
- <525> · 혈소판·백혈구 모두, 인간 세포수/(인간 세포수+마우스 세포수) $\times 100(\%)$ 라는 식으로 키메라율을 산출하였다.

말초혈 중의 전체 혈소판 수와 키메라율을 곱함으로써, 인간 혈소판 수를 산출하였다.

- <526> · 6주째에 마우스를 도살하고, 대퇴골로부터 골수 세포를 채취하였다. 그것을 이용하여 콜로니 분석을 행하고, 인간의 거핵구계(MK) 및 적혈구계(E), 과립구·매크로파지계(GM)의 전구 세포의 수를 측정하였다. 거핵구계 전구 세포(CFU-Mk)를 검출하는 콜로니 분석은, 배양 중에 TPO(50ng/mL) 및 SCF(100ng/mL)를 첨가하여 행하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 12일간의 배양을 행하였다. 콜로니의 검출은 실시예 6과 마찬가지로 항 인간 CD41 항체를 이용하여 행하였다. 적혈구계, 과립구·매크로파지계의 전구 세포를 검출하는 콜로니 분석은, 메토컬트 시스템(Methocult system)(스텝 셀 테크놀로지스사제)을 이용하여, 배양 중에 EPO(4IU/mL), SCF(100ng/mL), IL-3(20ng/mL), GM-CSF(10ng/mL)를 첨가하여 행하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> 조건 하에서 14일간의 배양을 행하였다. 배양 후, 현미경 하에서 콜로니의 카운트를 행하였다.
- <527> 도 9A, 9B 및 9C에 본 실험의 결과를 도시하였다.
- <528> 이식 후 6주의 시점에서, 항체 투여군에서는, 타군에 비하여, 말초혈 인간 혈소판 수가 유의하게 높았다(도 9A). 이에 의해, 아고니스트 항체 7-10G4344uhm은 제대혈 이식시의 혈소판 회복을 촉진하는 것이 시사되었다. 또한 항체 투여군에서는, 골수 중의 인간 적혈구 및 과립구·매크로파지계 전구 세포의 수가 유의하게 높았다(도 9B). 또한 마우스 백혈구에 대한 인간 백혈구의 비율을 나타내는 CD45 키메라율에서도 유의하게 높았던 점으로부터, 항체 투여군에서 인간 백혈구가 증가하고 있음을 알 수 있다(도 9C). 이 점은 7-10G4344uhm이 거핵구계뿐만 아니라, 타계열의 세포의 생착도 촉진할 수 있는 가능성을 시사하고 있다.
- <529> 이들 지견으로부터, 아고니스트 항체는 혈구가 거핵구계·적혈구계·과립구·매크로파지계로 나누어지는 보다 상류의 세포에 작용하고 있음이 시사되었다. Mpl이 조혈 간세포에 발현하고 있다고 하는 지견과 함께 생각하면, 아고니스트 항체는 조혈 간세포의 증식을 촉진하고 있을 가능성이 높다.
- <530> 덧붙여 말하면 본 실험에서는 TPO 투여군에서는 마찬가지로의 효과가 보이지 않았다. 이에 대해서는, TPO가 마우스 조혈 세포에도 작용하기 때문에, TPO 투여군에서는 골수 중에서 인간 세포와 마우스 세포의 경합이 일어나고, 순수하게 인간 세포에 대한 작용을 관찰할 수 없을 가능성을 고려해야만 한다. 본 아고니스트 항체는 인간 Mpl에만 작용하는 것을 특징으로 하는 점으로부터, Mpl을 통한 시그널이 인간 제대혈 조혈 간세포의 증폭에 효과가 있음을 생체내에서 처음으로 밝힐 수 있었다.
- <531> [실시예 15] 힌지 개변 항체의 항원성 해석
- <532> 본 발명의 아고니스트 항체는 힌지 분포의 개변에 의해 활성이 증강되고 있는 것을 특징으로 하고 있는데, 개변에 의한 항원성의 상승이 우려되었다. 그래서, 힌지 개변체인 7-10G4344uhm의 아미노산 서열을 기초로, 컴퓨터 상에서의 항원성 예측을 실시하였다.
- <533> 체내에 투여된 외래 단백질은 수상 세포, 매크로파지 등의 항원 제시 세포(APC)에 받아들여지고, 분해된 후, 펩티드가 주요 조직 적합 항원 복합체(MHC) 클래스 II 분자(인간의 경우 HLA 클래스 II, HLA-DR, DQ, DP)에 의해 항원 제시된다. APC에 의해 제시된 펩티드는 T세포 수용체(TCR)에 의해 인식되고, T세포를 활성화시킨다. 활성화된 T세포(헬퍼 T세포)는 동 항원을 인식하는 항체를 발현하는 B세포를 활성화하고, 외래 단백질에 대한 항체가 생산된다. 이 기구 중에서, 펩티드와 MHC 클래스 II 분자의 친화성이 항원성을 규정하는 큰 요인으로 되어 있다. 인간의 MHC 클래스 II 분자에는 많은 형(다형)이 있고, 동일한 펩티드이라도 클래스 II 분자의 형에 따라 친화성은 크게 달라지는 것으로 알려져 있다.
- <534> 그래서, 7-10G4344uhm과 IgG4PE의 정상 영역을 가지는 별도의 인간 항체의 아미노산 서열의, 여러 가지 형의 인간 HLA-DR, DQ, DP 분자와의 친화성을 해석하였다(HLA 분자의 데이터 베이스 및 해석의 알고리즘은 알고노믹스(AlgoNomics)사로부터 제공되었음).
- <535> 그 결과, 힌지 개변에 의한 새로운 에피토프 출현은 없었다. 본 개변 항체를 의약품으로서 이용할 때에 항원성의 문제는 없는 것이 시사되었다.
- <536> [실시예 16] 인간 Mpl 트랜스제닉 마우스에의 항체 투여
- <537> 본 발명의 항체는 마우스 Mpl과는 교차하지 않기 때문에, 약효를 측정하기 위해서, 외래 유전자로서 인간 Mpl을 도입한 트랜스제닉(Tg) 마우스를 제작하고, 항체를 투여하는 실험을 행하였다. 우선, 마우스 Mpl의 프로모터 영역 5.5kb를 PCR로 증폭하고, 피블루스크립트(pBluescript) 플라스미드 벡터에 클로닝하였다. 다음에, 인간 Mpl의 번역 영역 및 3'측 비번역 영역을 PCR로 증폭하고, 마우스 Mpl 프로모터 하류에 연결하였다. 이 구조체

(construct)를 C57BL/6 마우스 수정란에 주입하고, 수정란을 양부모에게 되돌려서 출산시켰다. 생후 3주 경과 한 시점에서 꼬리로부터 게놈 DNA를 추출하고, PCR로 Tg 마우스를 선별하였다. 얻어진 Tg 마우스 개체를 C57BL/6과 교배하고, 계통화하였다. 골수에서의 인간 Mp1의 발현 해석을 행하였다.

- <538> 그 결과, 복수의 인간 Mp1을 가지는 Tg 마우스 계통이 얻어졌다. 그 중, 39L 계통의 골수에서는 인간 Mp1이 발현하고 있는 것이 RT-PCR로 확인되었다. 39L 계통의 마우스를 이용하여 항체의 약효를 확인하였다.
- <539> 아고니스트 항체 7-10G4344uhm을 단회 투여(3 또는 10 $\mu$ g/mL)하고, 말초혈 중의 혈소판 수의 추이를, KX-21 자동혈구 해석 장치를 이용하여 조사하였다. 말초혈의 채취는 안와 정맥으로부터 행하고, 매주 측정을 행하였다. 양성 컨트롤로서 TPO(PEG-rHuMGDF)를 이용하였다. 군 구성은 이하와 같다(각 군 6마리).
- <540> I :7-10G4344uhm 10 $\mu$ g 투여군
- <541> II :7-10G4344uhm 3 $\mu$ g 투여군
- <542> III:TPO 3 $\mu$ g 투여군
- <543> IV:PBS 투여군
- <544> VI:야생형 마우스 7-10G4344uhm 10 $\mu$ g 투여군
- <545> 결과를 도 10에 나타내었다. 항체 투여군, TPO 투여군에서 혈소판이 증가하였다. TOP 투여군은 투여 후 2주간에서 거의 베이스 라인으로 되돌아갔다. 이에 대하여 항체 투여군은 투여 후 1개월을 경과하여도 혈소판 수는 상승한 채로였다. 이 결과로부터, 아고니스트 항체는 혈중에서 매우 안정되고, 단회 투여로 장기에 걸쳐 혈소판 조절을 촉진할 수 있는 것이 시사되었다. 이 점으로부터, 특히 아고니스트 항체는 만성 혈소판 감소증의 치료에 적합함이 시사되었다.
- <546> [실시에 17] 7-10G4344uhm 경쇄 변이체의 활성 평가
- <547> 아고니스트 항체 7-10의 경쇄 가변 영역(7-10VL)의 프레임워크 영역에 변이를 도입하고, 결합 활성 및 아고니스트 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 경쇄의 변이체는 아고니스트 항체 4-49의 경쇄(V104L), 아고니스트 6-4-50의 경쇄의 아미노산을 1개 치환한 것(A43V, G100Q)의 3종이다. 이들 변이 경쇄와 7-10G4344uhm 중쇄를 조합한 항체를 제작한 결과, 모두, 결합 활성, 아고니스트 활성 모두 올리지널의 7-10G4344uhm과 동등했다. 한편, 아고니스트 항체 7-10의 경쇄 가변 영역의 상보성 결정 영역(CDR 영역)에 변이(Y94F)를 도입한 경우, 결합 활성, 아고니스트 활성 모두 10분의 1 정도로 저하하였다. 이 결과로부터 경쇄 아미노산 서열에는, 어느 정도의 자유도가 있음이 나타났다.
- <548> 각 변이체의 경쇄 아미노산 서열 및 7-10VL의 아미노산 서열은 이하와 같다. 또한, 변이부는 굵은 글씨와 밑줄로 나타냈다.

7-10VL (서열번호 3) :

AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFRSGSGSGTDF  
LTISSLQPEDFATYYCQQFN~~S~~YPLTFGGGTKVEIK

7-10VL\_V104L (4-49VL; 서열번호 85) :

AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFRSGSGSGTDF  
LTISSLQPEDFATYYCQQFN~~S~~YPLTFGGGTKLEIK

7-10VL\_G100Q (6-4-50VL 치환체 1; 서열번호 86) :

AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFRSGSGSGTDF  
LTISSLQPEDFATYYCQQFN~~S~~YPLTFGGGQTKVEIK

7-10VL\_A43V (6-4-50VL 치환체 2; 서열번호 87) :

AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPGKVPKLLIYDASSLESGVPSRFRSGSGSGTDF  
TLTISSLQPEDFATYYCQQFN~~S~~YPLTFGGGTKVEIK

7-10VL\_Y94F (CDR 치환체; 서열번호 88) :

AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFRSGSGSGTDF  
LTISSLQPEDFATYYCQQFNSFPLTFGGGTKVEIK

<549>

<550>

결합 활성 해석: 각 항체의 농도를 1, 0.1, 0.01 $\mu$ g/mL로 조제하고, FM3A-hMpl 세포를 이용한 유식 세포측정법을 행하였다. 실험 방법은 실시예 4에 기재된 방법으로 행하였다. 컨트롤에 항 DNP(디니트로페놀) 항체(서브클래스 IgG4; 인간 항체)를 이용하였다. 경쇄 변이 항체는 7-10G4344uhm과 동등한 결합 활성을 나타냈다(도 11).

<551>

아고니스트 활성 해석: 실시예 5에 기재된 방법으로, UT-7/TPO 세포를 이용한 세포 증식 분석을 행하였다. 경쇄 변이 항체는 7-10G4344uhm과 동등한 아고니스트 활성을 나타냈다(도 12).

### 산업상 이용 가능성

<552>

본 발명에 의해, 여러 가지 혈소판 감소증에 대한 치료약으로서 이용할 수 있는, 항 인간 cMpl 아고니스트 인간 항체가 제공되었다. 또한 다른 아고니스트 항체에도 응용할 수 있는, 높은 안전성과 약효를 기대할 수 있는 항체의 정상 영역이 제공되었다.

<553>

본 발명에 의해, 전장 항체로 인간 트롬보포이에틴 수용체(c-Mpl)를 활성화할 수 있는 인간 c-Mpl에 대한 아고니스트 항체가 제공된다. 이 아고니스트 항체는 여러 가지 혈소판 감소증에 대한 치료약으로서 사용 가능하고, 의료 산업상 다대한 기여가 기대된다.

<554>

본 명세서에서 인용한 모든 간행물, 특허 및 특허 출원을 그대로 참고로서 본 명세서에 포함시키는 것으로 한다.

<555>

서열표 프리 텍스트

<556>

서열 번호 11: 변이 힌지 도메인 UH2G3uhm

<557>

서열 번호 12~16: 프라이머

<558>

서열 번호 18~22: 프라이머

<559>

서열 번호 39~54: 프라이머

<560>

서열 번호 57~73: 프라이머

<561>

서열 번호 74: G3344h1

<562>

서열 번호 75: G3344

- <563> 서열 번호 76:G4344
- <564> 서열 번호 77:G4344h1
- <565> 서열 번호 78:G4344uh
- <566> 서열 번호 79:G4344uhm
- <567> 서열 번호 80:G4PE
- <568> 서열 번호 81:7-10G4344uhm H쇄
- <569> 서열 번호 82:7-10G4344uhm H쇄
- <570> 서열 번호 83:7-10G4344uhm L쇄
- <571> 서열 번호 84:7-10G4344uhm L쇄
- <572> 서열 번호 85:7-10VL\_V104L(변이체)
- <573> 서열 번호 86:7-10VL\_G100Q(변이체)
- <574> 서열 번호 87:7-10VL\_A43V(변이체)

**도면의 간단한 설명**

- <141> 도 1은 아고니스트 항체 결합 활성을 나타낸다. FDCC-hMp1 세포 및 FDCC2 세포(PDCC 모세포(parent))를 이용한 유식 세포측정법(flow cytometry) (실시에 2)으로, 도시한 각 항체의 결합 활성을 조사하였다. 각 항체는 인간 c-Mp1에 특이적으로 결합하는 것으로 나타났다.
- <142> 도 2는 UT7/TPO 분석 결과를 나타낸다. 도 A~D에 나타낸 각 정제 항체(IgG)의 UT7/TPO 세포 증식 분석(실시에 5)에서의 각 항체의 증식 곡선을 나타냈다.
- <143> 도 3은 CFU-Mk 분석 결과를 나타낸다. 이는 인간 체대혈 CD34+세포를 이용한 콜로니 형성 분석(실시에 6)의 결과이다.
- <144> 도 4A는 재조합 항체 제작에 관한 N5KG1 벡터의 구조를 나타낸다. 도면 중, (C)는 사이토메갈로 바이러스의 프로모터/인핸서, (B)는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역, (N1)은 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제의 엑손 1, (K)는 인간 면역글로불린  $\kappa$  정상 영역, (G1)은 인간 면역글로불린  $\gamma$ 1 정상 영역, (BT)는 마우스  $\beta$  글로불린 주요 프로모터, (N2)는 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제의 엑손 2, (D)는 디히드로 엽산 리덕타제, (VH)는 중쇄 가변 영역, (VL)은 경쇄 가변 영역을 각각 나타낸다.
- <145> 도 4B는 재조합 항체 제작에 관한 천연형의 인간 면역글로불린, 및 IgG4PE, IgG4344, IgG4344h1, IgG4344uh, IgG4344uhm의 CH1 영역 및 힌지 영역(상부 힌지 및 중간 힌지)의 아미노산 서열을 나타낸다.
- <146> 도 4C(즉, 도 4C1~도 4C3)는 재조합 항체 제작에 관한 N5KG1\_7-10, N5KG1\_4-49 발현 벡터 제작 공정도를 나타낸다.
- <147> 도 4D(즉, 도 4D1~도 4D3)는 재조합 항체 제작에 관한 N5KG1\_6-4-50, N5KG1\_6-5-2 발현 벡터 제작 공정도를 나타낸다.
- <148> 도 4E는 재조합 항체 제작에 관한, 도시한 각종 개변 중쇄의 정상 영역의 서열을 나타낸다.
- <149> 도 4F(즉, 도 4F1~도 4F2)는 재조합 항체 제작에 관한 7-10G4344uhm 중쇄의 핵산 및 아미노산 서열을 나타낸다.
- <150> 도 4G는 재조합 항체 제작에 관한, 7-10G4344uhm 경쇄의 핵산 및 아미노산 서열을 나타낸다.
- <151> 도 5는 힌지 개변 항체의 활성을 나타낸다. A:UT7/TPO 세포 증식 분석에서의 4-49G1, 4-49G3311, 4-49G3331의 활성. B:UT7/TPO 세포 증식 분석에서의 7-10G4344uhm, 4-49G4344uhm의 활성.
- <152> 도 6A는 시그널 전달 해석(실시에 11)에서의 아고니스트 항체 7-10G4344uhm, 4-49G4344uhm의 시그널 전달 해석 결과를 나타낸다.
- <153> 도 6B는 시그널 전달 해석(실시에 11)에서의 아고니스트 항체 6-5-2G1, 6-5-2G3344의 시그널 전달 해석 결과를 나타낸다.

나타낸다.

- <154> 도 7은 인간 혈소판 프라이밍 작용을 나타낸다. 이는, 실시예 12에 기재된 시험의 결과를 나타낸다. 아고니스트 항체 7-10G3311, 4-49G3311에 의한 혈소판 프라이밍 작용이 나타났다. 또한, 아고니스트 항체만(DAP 비첨가)에서는 혈소판의 응집은 일어나지 않는 것으로 나타났다.
- <155> 도 8은 계잡이원숭이(cynomolgus monkey)의 아고니스트 항체 투여에 의한 혈소판 수의 변화를 나타낸 그래프이다. 실시예 13에 기재된 바와 같이, 계잡이원숭이에게 아고니스트 항체를 투여하고, 혈소판 수를 모니터링하였다. 화살표는 1회째(PEG-rHuMGDF) 및 2회째(아고니스트 항체)의 투여일을 나타낸다.
- <156> 도 9A는 NOG 제대혈 이식 모델 마우스에서 CD34+세포를 1,000개(우측 도면) 또는 10,000개(좌측 도면)를 이식한 후에 피험 물질을 투여하였을 때의 말초혈 인간 혈소판 수의 경시적 추이를 나타낸다. 도면 중, "Pre"는 투여 전의 혈소판 수를 나타낸다.
- <157> 도 9B는 NOG 제대혈 이식 모델 마우스에서 CD34+세포를 1,000개(우측 도면) 또는 10,000개(좌측 도면)를 이식한 후에 피험 물질을 투여하였을 때의, 이식 후 6주에서의 골수 인간 전구 세포 수(colony count;GM+E+GEM)를 나타낸다. 전구 세포 수는, 거핵구계 이외의 합계 세포 수이고, GM은 과립구·매크로파지계, E는 적혈구계, GEM은 콜로니-형성-단위-과립구-매크로파지-적혈구(Colony-forming-unit-granulocyte-macrophage-erythroid)를 나타낸다. 결과는, 평균±표준 편차(mean±SD)로 나타내고 있다. 또한, 비히클(Vehicle)은 컨트롤로서의 PBS(인산 완충 염수)를 나타내고, 또한, NT는 비처리(Non-treated)를 나타낸다.
- <158> 도 9C는 NOG 제대혈 이식 모델 마우스에서 CD34+세포를 1,000개(우측 도면) 또는 10,000개(좌측 도면)를 이식한 후에 피험물질을 투여하였을 때의, 이식 후 6주에서의 말초혈 인간 세포 키메라율(chimeric rate)을 나타낸다. 비히클은 대조군으로서의 PBS(인산 완충 염수)를 나타내고, 또한, NT는 비처리를 나타낸다.
- <159> 도 10은 인간 Mpl Tg 마우스에의 아고니스트 항체 투여 후의 혈소판 수의 경일 추이를 나타낸다. 대조군으로서, 상기 Tg 마우스에의 TPO 또는 비히클(PBS)의 투여, 및, 비 Tg(야생형;Non-Tg) 마우스에의 7-10G4344uhm(10 $\mu$ g)의 투여 실험을 행하고, 그 결과도 나타났다. 결과는, 평균±SEM으로 나타났다.
- <160> 도 11은 아고니스트 항체 7-10G4344uhm의 경쇄 변이 항체의 FM3A-hMpl 세포에의 결합성을 나타낸다.
- <161> 도 12는 아고니스트 항체 7-10G4344uhm의 경쇄 변이 항체에 관한 UT-7/TPO 세포를 이용한 세포 증식 분석의 결과를 나타낸다.
- <162> <발명을 실시하기 위한 최선의 형태>
- <163> 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- <164> 본 발명은, 프라이머리 인간 세포에 작용하는 항 인간 c-Mpl 아고니스트 인간 항체를 제공한다.
- <165> 본 발명에서의 항체는, 인간 항체 생산 마우스(예를 들면, KM 마우스<sup>TM</sup>(Kirin Brewery Co., Ltd.))를 인간 Mpl 재조합 단백질 또는 인간 Mpl 발현 세포로 면역시키고, 통상의 모노클로날 항체 제작법으로 단리할 수 있다. 또한, 하이브리도마로부터 항체 유전자를 단리하고, 발현 벡터를 구축하고, 발현 세포를 제작하고, 그 과정에서, 여러 가지 정상 영역을 가지는 재조합 항체를 제작할 수 있다.
- <166> 1. 본 발명에 관한 항체에 대하여
- <167> 본 명세서에서 항체란, Fab 영역, 힌지 영역, Fc 영역을 가지는 항체를 의미하고, 천연에 존재하는 항체, 및 마찬가지로의 구성을 가지는 범위에서, 그 자체 공지의 방법으로 얻어진 모노클로날 항체 생산 하이브리도마에 의해 생산되는, 또는, 일단 항체 유전자를 획득하여 그것을 이용하여 유전자 공학적으로 생산되는 항체, 또한 부위 특이적 돌연 변이 유발법에 의해 일부 개변되어 유전자 공학적으로 생산되는 항체를 포함한다. 그리고 본 발명에 관한 인간 cMpl에 대한 아고니스트 항체 및 중쇄 개변 아고니스트 항체는 전술한 바와 같은 것이다.
- <168> 일반적으로, 아고니스트 항체는 세포막 상의 표준 분자에 결합하고, 복합체를 형성시킴으로써 시그널을 전달한다. 호모 이량체를 형성하는 사이토카인 수용체 패밀리를, 예를 들면 에리트로포이에틴 수용체(EpoR), G-CSF 수용체(G-CSFR), 트롬보포이에틴 수용체(c-Mpl) 등에 대한 아고니스트 항체는, 이가의 항체가 2개의 분자와 결합함으로써 이량체를 형성시킨다고 생각된다. 많은 아고니스트 항체가 Fab 단편만으로는 활성을 나타내지 않는 것도 그것을 시사하고 있다.
- <169> 복합체 형성에는, 2개의 항원 결합 부위가 접근하기 쉬운 것이 중요하다고 생각된다. 전장 항체에서는 충분한

활성을 갖지 않는 항체라도,  $sc(Fv)_2$  등의 형태로 저 분자화됨으로써 아고니스트 활성이 상승하는 것은 이 점을 시사하고 있다. 한편, 저 분자화 항체는 분자의 대폭적인 개변에 의한 항원성이 우려되고, 또한 혈중 반감기가 단축되는 등, 의약품으로서 이용하기 위해서는 과제가 많다. 전장 항체가 가지는, 저 항원성 또는 혈중 반감기의 길이 등, 의약품으로서 유용한 성질을 살리기 위해서는, 항체의 구조에 대폭적인 개변을 가하지 않고, 높은 활성을 갖는 아고니스트 항체가 요망된다.

<170> 후술하는 실시예 2에 나타낸 바와 같이, 본 발명자들은 면역의 방법을 연구하여, 전장 항체에서 높은 활성을 가진 항 인간 c-Mpl 아고니스트 항체를 수득하였다. 연구란, 예를 들면 고 발현 세포주에 의한 면역 또는 항상 활성형의 변이 수용체 발현 세포를 이용한 면역이다. 상기 아고니스트 항체는 후술하는 실시예 6에 기재된 인간 체대혈 CD34+세포를 이용한 콜로니 분석으로 콜로니 형성을 유도하는 것이 나타나 있고, 의약품으로서 유용한 것으로 기대된다.

<171> 또한, 본 발명자들은 힌지 부분의 유연성을 높임으로써, 복합체 형성의 효율을 높이고, 아고니스트 활성을 증가시키는 것을 고안하였다. 유연성이 높은 서열은, 예를 들면 글리신 링커와 같은 서열을 생각할 수 있다. 또는, 인간 IgG 중에서도, 가장 유연성이 높은 IgG3의 힌지 영역을 이용할 수 있다. 항체의 저 항원성을 해치지 않기 위해서는, 가능한 한 천연에 존재하는 서열을 이용하는 것이 바람직하다. 그래서, IgG3의 힌지 서열이 더 바람직하다.

<172> 또한, 유전자 공학적 개변에 의해, 세포 상해 활성이 낮고, 또한, 높은 힌지의 유연성을 가진, 아고니스트 항체에 최적인 정상 영역으로서, 인간 IgG3의 상부 힌지 영역을 가지고, 중간 힌지 이후 C 말단측의 영역은 인간 IgG4의 서열로 하도록 하는 항체의 제작도 가능하다.

<173> 더 구체적으로는, 당업자에게 주지인 유전자 공학적 개변(예를 들면, 유럽 특허 EP314161 공보를 참조할 것)에 의해 상이한 서브클래스의 것으로 변환하고, 즉, 본 발명의 항체의 가변 영역을 코드하는 DNA를 이용하여 유전자 공학적 수법을 이용하여 원래의 서브클래스와는 상이한 서브클래스의 항체로 변경할 수 있다. 또한 인간 IgG4 중쇄 정상 부분의 EU 번호 부여(Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242를 참조)에서의 228번째의 세린을 프롤린으로 변이시킴으로써, IgG4의 분자 내 가교(S-S 결합)에 의한 단량체 형성을 억제하는 것이 가능하고, 또한, 마찬가지로 235번째 류신을 글루탐산으로 변이시킴으로써, 항체 의존성 세포 상해(Antibody-dependent cellular cytotoxicity:ADCC) 활성을 저감시킬 수 있다. 상기 2개의 변이를 가진 IgG4를 IgG4PE라고 부른다.

<174> 상기한 사항을 고려하여, 본 발명자들은 세포 상해 활성이 낮고, 또한, 높은 힌지의 유연성을 가진, 아고니스트 항체에 최적인 정상 영역을 제작하였다. 본 정상 영역은, 인간 IgG3의 상부 힌지 영역을 갖고, 중간 힌지 이후 C 말단측의 영역은 인간 IgG4의 서열로 되어 있다. 이 정상 영역과 항 c-Mpl 아고니스트 항체의 가변 영역을 조합함으로써, 안전성과 고효성을 겸비한 아고니스트 항체를 제작할 수 있다.

<175> 2. 본 발명에 관한 항체의 제조 방법

<176> 본 발명의 항체는 여러 방법에 의해 생산할 수 있는데, 우선은 본 발명의 항체 생산 하이브리도마를 얻을 필요가 있다. 후술하는 실시예 1에 기재한 바와 같은 본 발명의 항원을 이용하여, 마우스 등을 면역시키고, 특히 인간 항체를 얻는 경우에는 인간 항체 생산 트랜스제닉 마우스 등의 비 인간 포유 동물에 면역시킨다. 모노클로날 항체는, 정법에 따라, 면역 감작 동물로부터 얻은 항체 생산 세포와, 자기 항체 생산능이 없는 골수종계 세포(마이엘로마(myeloma) 세포)를 융합함으로써 얻어지는 하이브리도마를 배양하고, 면역에 이용한 항원에 대하여 특이적 친화성을 나타내는 모노클로날 항체를 생산하는 클론을 선택함으로써 수득할 수 있다. 수득한 항체군으로부터 아고니스트 항체를 더 선택할 필요가 있는데, 아고니스트 항체의 작용 대상 수용체에 대한 리간드의 활성 측정 방법으로서 확립된 방법을 이용하면 되고, 인간 c-Mpl에 대한 아고니스트 항체를 선택하는 경우에는, 후술하는 실시예 5에 나타낸 UT7/TPO 세포 증식 분석 등의 TPO 활성 측정 방법으로서 이미 확립된 방법을 이용하여 적절히 행할 수 있다.

<177> 본 발명에 관한 인간 c-Mpl에 대한 아고니스트 항체, 특히 모노클로날 항체의 제조에서는, 하기의 공정을 포함한다. 즉, (1) 면역원으로서 사용하는 생체 고분자의 정제 및/또는 항원 단백질을 세포 표면에 파인으로 발현하고 있는 세포의 제작, (2) 항원을 동물에 주사함으로써 면역시킨 후, 혈액을 채취하여 그 항체를 검정하여 비장 등의 적출의 시기를 결정하고 나서, 항체 생산 세포를 조제하는 공정, (3) 골수종 세포(마이엘로마)의 조제, (4) 항체 생산 세포와 마이엘로마의 세포 융합, (5) 목적하는 항체를 생산하는 하이브리도마군의 선별, (6) 단일 세포 클론으로의 분할(클로닝), (7) 경우에 따라서는, 모노클로날 항체를 대량으로 제조하기 위한 하이브

리도마의 배양, 또는 하이브리도마를 이식한 동물의 사육, (8) 이와 같이 하여 제조된 모노클로날 항체의 생리 활성 및 그 인식 특이성의 검토, 또는 표지 시약으로서의 특성의 검토, (9) 모노클로날 항체 유전자의 클로닝 및 재조합 항체 제작 등이다.

<178> 이하, 인간 c-Mpl에 대한 아고니스트 모노클로날 항체의 제작법을 상기 공정에 따라 상세하게 기술하는데, 상기 항체의 제작법은 이것에 제한되지 않고, 예를 들면 비세포 이외의 항체 생산 세포 및 마이엘로마를 사용할 수도 있다.

<179> (1) 항원

<180> 일반적으로 인간 c-mpl 항체를 얻는 경우에는, 인간 c-Mpl 단백질의 일차 구조가 공지(Genbank:NP\_005364 참조)이기 때문에, 당업자에게 주지의 방법에 의해, c-Mpl의 아미노산 서열로부터 펩티드를 화학 합성하고, 이것을 항원으로 사용하여 사용할 수 있고, 또한 c-Mpl의 세포막 관통 영역 및 세포 내 영역을 결손한 가용화 c-Mpl 재조합 단백질을 항원으로 사용하여 이용할 수도 있다.

<181> 또는, 각종 인간 거핵구계 세포주 또는 강제 발현주 등의 인간 c-Mpl 발현 세포주의 항원으로서의 이용을 들 수 있다. 단, 인간 c-Mpl 발현 세포주로서는, 각종 인간 거핵구계 세포주 또는 강제 발현주가 알려져 있는데, 이들 세포주의 c-Mpl 발현량은 세포당 수천 분자로 낮고, 항원에는 부적합하다. 실제로, 마우스 조혈계 세포주인 FDCP2에 인간 c-Mpl을 도입한 발현주 FDCP-hMpl(FEBS Lett. 1996 Oct 21;395(2-3):228-34 참조)을 인간 항체 생산 마우스(KM 마우스<sup>TM</sup>)에 면역시킨 경우, 항체가 상층이 불충분하고, hMpl 특이적인 인간 항체를 얻을 수 없었다. 또한, 인간 거핵구계 세포주를 항원으로서 이용하는 경우, 다른 막 분자에 대한 항체도 유도되기 때문에, c-Mpl 특이적인 항체를 효율적으로 유도하기에 반드시 적절하지는 않다. 따라서, 목적으로 하는 것이 단지 인간 c-mpl 항체가 아니라 아고니스트 활성을 가지는 항체의 수득시에 항원 단백질을 발현하는 세포주를 면역에 이용하는 경우에는, 발현량이 높은 세포를 선택하는 것이 바람직하다. 특히, 마우스 세포주, 또한 가능한 한 MHC 적합한 세포주를 숙주에, 인간 c-Mpl을 도입한 고발현주를 이용하는 것이 바람직하다. 예로서, 후술하는 실시예 1에 기재된 세포(발현 벡터로서 인간 c-mpl 전장 유전자가 담지된 pEF-MPL635 또는 pCMV-MPL635를, 숙주로서 마우스 세포주 L929 및 FM3A를 이용한 것)를 들 수 있다.

<182> 또한, 야생형의 인간 c-mpl 대신에, 인간 c-mpl의 항상 활성형 변이체(예를 들면, 508번째 Trp가 Ser로 변이하여 리간드 비의존성으로 항상적으로 아고니스트 시그널을 전달하는 변이체; Abe M 등, Leukemia. 2002 Aug;16(8):1500-1506)를 마찬가지로의 방법으로 강제 발현시킨 세포주를 이용하여도 된다. 이와 같은 변이체는 야생형과는 입체 구조가 상이한 것으로 예상되고, 그와 같은 항상 활성형 변이체에 친화성이 높은 항체는 강력한 아고니스트 활성을 나타낼 가능성이 있다.

<183> 또한, 이들 강제 발현 세포주는 인간 c Mpl 또는 그 세포 외 가용성 영역 등과 적절히 조합하여 항원으로서 이용할 수도 있다.

<184> (2) 항체 생산 세포의 조제 공정

<185> 상기 (1)에서 얻어진 항원, 및 프로인트(Freund)의 완전 또는 불완전 아췌반트, 또는 칼륨명반(potash alum)과 같은 보조제를 혼합하고, 면역원으로서 실험 동물에 면역시킨다. 실험 동물로는, 유전자 개변에 의해 인간 항체를 생산하는 능력을 가지는 마우스(인간 항체 생산 마우스)가 최적이다.

<186> 본 발명에서 이용된 인간 항체 생산 마우스(예를 들면 (KM 마우스<sup>TM</sup>)는, 내재성 마우스 면역글로불린(Ig) 중쇄 및 마우스  $\kappa$  경쇄를 결손하고 있고, 또한, 인간 Ig 중쇄 유전자를 포함하는 14번 염색체 단편(SC20) 및 인간 Ig  $\kappa$ 쇄 트랜스진(transgene)(KCo5)을 동시에 유지한다. 이 마우스는 인간 Ig 중쇄 유전자좌를 가지는 계통 A의 마우스, 및 인간 Ig  $\kappa$ 쇄 트랜스진을 가지는 계통 B의 마우스의 교배에 의해 제작된다. 계통 A는, 내인성 Ig 중쇄 및  $\kappa$  경쇄 파괴의 양자에 대하여 호모 접합체이고, 자손 전달 가능한 14번 염색체 단편(SC20)을 유지하는 마우스 계통(Tomizuka. et al., Proc Natl Acad Sci USA., 2000 Vol197:722)이다. 또한, 계통 B는 내재성 마우스 Ig 중쇄 및  $\kappa$  경쇄 결손의 양자에 대하여 호모 접합체이고, 인간 Ig  $\kappa$ 쇄 트랜스진(KCo5)을 유지하는 마우스 계통(Nat Biotechnol., 1996 Vol14:845)이다. 따라서, KM 마우스는 인간 항체를 생산하는 능력을 가지고, 마우스 Ig 중쇄 및  $\kappa$ 쇄를 결손한 마우스이다.

<187> 마우스 면역시의 면역원 투여법은, 피하 주사, 복강 내 주사, 정맥 내 주사, 피내 주사, 근육 내 주사, 발바닥 주사 등 중 어느 것이어도 되고, 복강 내 주사, 발바닥 주사 또는 정맥 내 주사가 바람직하다.

- <188> 면역은, 1회, 또는, 적당한 간격으로(바람직하게는 2주일 내지 4주일 간격으로) 복수 회 반복해서 행할 수 있다. 그 후, 면역시킨 동물의 혈청 중의 항원에 대한 항체를 측정하고, 항체가 충분히 높아진 동물을 항체 생산 세포의 공급원으로서 이용하면, 이후의 조작의 효과를 높일 수 있다. 일반적으로는, 최종 면역 후 3~5일 후의 동물 유래의 항체 생산 세포를 나중의 세포 융합에 이용하는 것이 바람직하다.
- <189> 여기서 이용되는 항체의 측정법으로는, 유식 세포측정법, 방사성 동위 원소 면역 정량법(이하, 「RIA법」이라고 함), 고상 효소 면역 정량법(이하, 「ELISA법」이라고 함), 형광 항체법, 수신 혈구 응집 반응법 등 여러 가지의 공지 기술을 들 수 있는데, 검출 감도, 신속성, 정확성, 및 조작의 자동화의 가능성 등의 관점에서, 유식 세포측정법 또는 ELISA법이 더 바람직하다.
- <190> 본 발명에서의 항체의 측정은, 예를 들면 유식 세포측정법에 의하면, 이하에 기재하는 바와 같은 수순에 의해 행할 수 있다. 우선, 항원을 발현한 세포 및 인간 항체를 포함하는 검체(예를 들면, 마우스 혈청, 하이브리도마의 배양 상청, 정제 항체 등)와 반응시킨다. 또한 이차 항체로서 형광 표지된 인간 항체에 대한 항체를 더하여 인간 항체에 결합시키고, 세정 후, 세포에 결합한 이차 항체의 양을 형광에 의해 측정함으로써, 항체를 산출한다.
- <191> (3) 마이엘로마의 조제 공정
- <192> 마이엘로마로서는, 마우스, 래트, 기니피그, 햄스터, 토끼 또는 인간 등의 포유 동물에서 유래하는 자기 항체 생산능이 없는 세포를 이용할 수 있는데, 일반적으로는 마우스로부터 얻어진 주화 세포, 예를 들면 8-아자구아닌 내성 마우스(BALB/c 유래) 마이엘로마주 P3X63Ag8U.1(P3-U1)[Yelton, D.E. et al. Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7(1978)], P3/NSI/1-Ag4-1(NS-1)[Kohler, G. et al, European J. Immunology, 6, 511-519(1976)], Sp2/0-Ag14(SP-2)[Shulman, M. et al. Nature, 276, 269-270(1978)], P3X63Ag8.653(653)[Kearney, J.F. et al. J. Immunology, 123, 1548-1550(1979)], P3X63Ag8(X63)[Horibata, K. and Harris, A.W. Nature, 256, 495-497(1975)] 등을 이용하는 것이 바람직하다. 이들 세포주는 적당한 배지, 예를 들면 8-아자구아닌 배지[글루타민, 2-메르캅토에탄올, 겐타마이신 및 소 태아 혈청(이하, 「FCS」라고 함)]을 첨가한 RPMT-1640 배지에 8-아자구아닌을 첨가한 배지, 이스코브 개질 돌베코 배지(Iscove's Modified Dulbecco's Medium;이하, 「IMDM」이라고 함), 또는 돌베코 개질 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium;이하, 「DMEM」이라고 함)로 계대 배양하는데, 세포 융합의 3~4일 전에 정상 배지(예를 들면, 10% FCS를 포함하는 DMEM 배지)로 계대 배양하고, 융합 당일에  $2 \times 10^7$  이상의 세포 수를 확보해 둔다.
- <193> (4) 세포 융합
- <194> 항체 생산 세포는, 형질 세포, 및 그의 전구 세포인 림프구이고, 이는 개체의 어느 부위로부터 얻어도 되고, 일반적으로는 비장, 림프절, 골수, 편도, 말초혈, 또는 이들을 적절히 조합한 것 등으로부터 얻을 수 있는데, 비세포(spleen cell)가 가장 일반적으로 이용된다.
- <195> 최종 면역 후, 소정의 항체가 얻어진 마우스로부터 항체 생산 세포가 존재하는 부위, 예를 들면 비장을 적출하고, 항체 생산 세포인 비세포를 조제한다. 이어서, 비세포와 마이엘로마를 융합시키면 된다. 이 비세포와 공정 (3)에서 얻어진 마이엘로마를 융합시키는 수단으로서 현재 가장 일반적으로 행해지고 있는 것은, 세포 독성이 비교적 적고 융합 조작도 간단한, 폴리에틸렌글리콜을 이용하는 방법이다. 이 방법은, 예를 들면 이하의 수순으로 이루어진다.
- <196> 비세포와 마이엘로마를 무혈청 배지(예를 들면, DMEM), 또는 인산 완충 생리 식염액(이하, 「PBS」라고 함)으로 잘 세정하고, 비세포와 마이엘로마의 세포 수의 비가 5:1~10:1 정도로 되도록 혼합하고, 원심 분리한다. 상청을 제거하고, 침전된 세포군을 잘 푼 후, 교반하면서 1mL의 50%(w/v) 폴리에틸렌글리콜(분자량 1000~4000)을 포함하는 무혈청 배지를 적하한다. 그 후, 10mL의 무혈청 배지를 천천히 첨가한 후 원심 분리한다. 다시 상청을 버리고, 침전된 세포를 적량의 히포크산틴·아미노프테린·티미딘(이하, 「HAT」라고 함)액 및 인간 인터루킨-6(이하, 「IL-6」이라고 함)을 포함하는 정상 배지(이하, 「HAT 배지」라고 함) 중에 현탁하여 배양용 플레이트(이하, 「플레이트」라고 함)의 각 웰에 나누어 주입하고, 5% 탄산 가스 존재 하, 37℃에서 2주일 정도 배양한다. 도중에 적절히 HAT 배지를 보충한다.
- <197> (5) 하이브리도마군의 선택
- <198> 상기 마이엘로마 세포가 8-아자구아닌 내성주인 경우, 즉, 히포크산틴·구아닌·포스포리보실트랜스퍼라아제(HGPRT) 결손주인 경우, 융합하지 않은 상기 마이엘로마 세포, 및 마이엘로마 세포끼리의 융합 세포는 HAT 함유

배지 중에서는 생존할 수 없다. 한편, 항체 생산 세포끼리의 융합 세포, 또는 항체 생산 세포와 마이엘로마 세포의 하이브리도마는 생존할 수 있는데, 항체 생산 세포끼리의 융합 세포에는 수명이 있다. 따라서, HAT 함유 배지 중에서의 배양을 계속함으로써, 항체 생산 세포와 마이엘로마 세포의 융합 세포인 하이브리도마만이 살아 남고, 결과적으로 하이브리도마를 선택할 수 있다. 콜로니상으로 생육해 온 하이브리도마에 대하여, HAT 배지로부터 아미노프테린을 제거한 배지(이하, 「HT 배지」라고 함)에의 배지 교환을 행한다. 이후, 배양 상층의 일부를 채취하고, 예를 들면 유식 세포측정법에 의해 항 인간 c-Mpl 항체가를 측정한다. 이상, 8-아자구아닌 내성의 세포주를 이용하는 방법을 예시하였으나, 그 외의 세포주도 하이브리도마의 선택 방법에 따라 사용할 수 있고, 그 경우 사용하는 배지 조성도 변화한다.

<199> (6) 클로닝 공정

<200> 진술한 (2)의 기재와 마찬가지로의 방법으로 항체가를 측정함으로써, 특이적 항체를 생산하는 것이 판명된 하이브리도마를 별도의 플레이트에 옮겨 클로닝을 행한다. 이 클로닝법으로는, 플레이트의 1웰에 1개의 하이브리도마가 포함되도록 희석하여 배양하는 한계 희석법, 연한천 배지 중에서 배양하여 콜로니를 회수하는 연한천법, 마이크로 매니퓰레이터(micromanipulator)에 의해 1개씩의 세포를 취출하여 배양하는 방법, 세포 분류기에 의해 1개의 세포를 분리하는 「소터 클론(sorter clone)」 등을 들 수 있는데, 한계 희석법이 간편하여 자주 이용된다.

<201> 항체가가 인정한 웰에 대하여, 예를 들면 한계 희석법에 의한 클로닝을 2~4회 반복하고, 안정되게 항체가가 인정한 것을 항 인간 c-Mpl 모노클로날 항체 생산 하이브리도마주로서 선택한다.

<202> (7) 아고니스트 항체의 선택

<203> 얻어진 항 인간 c-Mpl 모노클로날 항체 생산 하이브리도마주의 배양 상층 또는 후술하는 (8)에 따라서 상기 상층으로부터 정제한 항체를 여러 가지 TPO 활성 측정계로 측정함으로써, 아고니스트 항체를 선택할 수 있다. 스크리닝으로서 바람직한 방법으로서, 포유 동물 세포에 인간 Mpl을 발현시키고, 세포 증식 분석을 행하는 방법을 들 수 있다. 예를 들면 마우스 세포주 BaF3에 인간 Mpl을 발현시킨 세포에 의한 증식 분석(Orita et al. Blood, 2005 Jan 15;105(2):562-6.) 등도 사용할 수 있는데, 마우스 세포를 이용한 경우에, 반드시 인간 세포의 반응을 반영하고 있다고는 할 수 없는 것을 고려하면, 인간 세포에 더 강한 활성을 가지는 항체를 선별하기 위해서는 인간 Mpl이 발현되고 있는 인간 세포를 이용하는 증식 분석 방법이 더 바람직하다. 인간 세포에 의한 계로서 구체적으로는, 후술하는 실시예 5에 기재된 UT7/TPO 세포를 이용한 세포 증식 분석을 들 수 있다.

<204> (8) 하이브리도마 배양에 의한 모노클로날 항체의 조제

<205> 클로닝을 완료한 하이브리도마는 배지를 HT 배지로부터 정상 배지로 바꾸어 배양된다. 대량 배양은 대형 배양 병을 이용한 회전 배양, 스피너(spinner) 배양, 또는 중공 섬유(hollow fiber) 시스템 등을 이용한 배지에서 행해진다. 이러한 대량 배양에서의 상층을 겔 여과 등, 당업자에게 주지의 방법을 이용하여 정제함으로써, 항 인간 c-Mpl 모노클로날 항체를 얻을 수 있다. 또한, 동일 계통의 마우스(예를 들면 BALB/c) 또는 nu/nu 마우스, 래트, 기니피그, 햄스터 또는 토끼 등의 복강 내에서 상기 하이브리도마를 증식시킴으로써, 항 인간 c-Mpl 모노클로날 항체를 대량으로 포함하는 복수를 얻을 수 있다. 정제의 간편한 방법으로는, 시판되는 모노클로날 항체 정제 키트(예를 들면, MAbTrap GII 키트;아머삼과마시아바이오테크(Amersham Pharmacia Biotech)사제) 등을 이용할 수도 있다. 이렇게 해서 얻어진 모노클로날 항체는 인간 c-Mpl에 대하여 높은 항원 특이성을 가진다.

<206> (9) 모노클로날 항체의 검정

<207> 이렇게 해서 얻어진 모노클로날 항체의 아이소 타입(isotype) 및 서브클래스의 결정은 이하와 같이 행할 수 있다. 우선, 동정법으로는 오크테르로니(Ouchterlony)법, ELISA법, 또는 RIA법을 들 수 있다. 오크테르로니법은 간편하기는 하지만, 모노클로날 항체의 농도가 낮은 경우에는 농축 조작이 필요하다. 한편, ELISA법 또는 RIA법을 이용한 경우에는, 배양 상층을 그대로 항원 흡착 고체상과 반응시키고, 다시 이차 항체로서 각종 면역글로불린 아이소 타입, 서브클래스에 대응하는 항체를 이용함으로써, 모노클로날 항체의 아이소 타입, 서브클래스를 동정하는 것이 가능하다. 또한, 단백질의 정량은, 폴린-로우리(Follin-Lowry)법, 및 280nm에서의 흡광도 [1.4(OD280)=면역글로불린 1mg/mL]로부터 산출하는 방법 등에 의해 행할 수 있다. 또한, 하이브리도마로부터 모노클로날 항체를 코드하는 유전자를 클로닝하고, 서열을 결정함으로써 서브클래스를 특정할 수도 있다.

<208> (10) 모노클로날 항체를 코드하는 유전자의 클로닝과 재조합형 항체 제작

<209> 또한, 하이브리도마 등의 항체 생산 세포로부터 모노클로날 항체를 코드하는 유전자를 클로닝하고, 적당한 벡터

에 삽입하여, 이것을 숙주(예를 들면 포유류 세포주, 효모 세포, 곤충 세포 등)에 도입하고, 유전자 재조합 기술을 이용하여 생산시킨 재조합형 항체를 조제할 수도 있다(P.J.Delves., ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997 WILEY, P. Shepherd and C. Dean., Monoclonal Antibodies., 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS, J.W. Goding., Monoclonal Antibodies:principles and practice., 1993 ACADEMIC PRESS).

- <210> 본 발명은, 본 발명의 항체를 생산하는 하이브리도마를 보유하는 항체의 유전자 서열을 포함하는 핵산, 특히 후술하는 본 발명의 하이브리도마가 생산하는 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 핵산도 포함한다. 여기서, 핵산에는 DNA 및 RAN가 포함된다.
- <211> 하이브리도마로부터 모노클로날 항체를 코드하는 유전자를 조제하기 위해서는, 모노클로날 항체의 L쇄 V 영역, L쇄 C영역, H쇄 V영역 및 H쇄 C영역을 각각 코드하는 DAN를 PCR법 등에 의해 조제하는 방법이 채택된다. 프라이머는 항체 유전자 또는 아미노산 서열로부터 설계한 올리고 DNA를, 주형으로서는 하이브리도마로부터 조제한 DNA를 사용할 수 있다. 이들 DNA를 1개의 적당한 벡터에 삽입하고, 이것을 숙주에 도입하여 발현시키거나, 또는 이들 DNA를 각각 적당한 벡터에 삽입하고 공발현시킨다.
- <212> 벡터로는 숙주 미생물로 자율적으로 증식할 수 있는 파지 또는 플라스미드가 사용된다. 플라스미드 DNA로는 대장균, 길초균 또는 효모 유래의 플라스미드 등을 들 수 있고, 파지 DNA로서는  $\lambda$  파지를 들 수 있다.
- <213> 형질 전환에 사용하는 숙주로는 항체의 입체 구조를 정확하게 구성할 수 있는 점으로부터, 진핵 세포를 들 수 있고, 예를 들면, 효모, 동물 세포(COS 세포, CHO 세포 등), 곤충 세포를 들 수 있다. 특히 동물 세포 숙주를 이용하는 경우, 벡터로는, 예를 들면 N5KG1-VaL Lark 벡터(IDEC 파마슈티컬스(IDEC pharmaceuticals):미국 특허 제6001358호)를 이용할 수 있다. 본 벡터는 재조합 항체를 동물 세포에 발현시키는 목적으로 사용되는 발현 벡터로, 2개의 CMV 프로모터/인헨서를 가지고, 각각의 하류에 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 클로닝 사이트를 가진다. 또한 상기 하류에는, 인간  $\gamma$ 1쇄 정상 영역 및 인간  $\kappa$ 쇄 정상 영역을 코드하는 유전자 서열을 미리 가지고 있다. 본 벡터의 가변 영역 클로닝 사이트에 임의의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을, 리딩 프레임을 모두 삽입함으로써, 경쇄 가변 영역이 인간  $\kappa$ 쇄 정상 영역과, 중쇄 가변 영역이 인간  $\gamma$ 1 정상 영역과 연결된 항체를 발현시킬 수 있다. 본 벡터가 도입된 동물 세포는 배양액 중에 항체(인간 IgG1)를 생산한다. 또한, 상이한 중쇄 정상 영역 유전자를 포함하는 벡터도 사용할 수 있다. 예를 들면 N5KG4PE 벡터(IDEC 파마슈티컬스사제)는 정상 영역 유전자로서, 인간  $\gamma$ 4에, 전술한 2개의 변이(Ser228Pro, Leu235Glu)가 들어간 서열을 가지고 있다. N5KG4PE 벡터에 임의의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자 서열을 삽입함으로써, 임의의 가변 영역을 가지는 IgG4PE를 발현시킬 수 있다. 또한, 중쇄 또는 경쇄 유전자에 개변을 가함으로써, 여러 가지 정상 영역을 가진 항체를 제작하는 것이 가능하다.
- <214> 물론, 본 발명에 이용하는 포유 동물 세포용 발현 벡터는 상기한 것에 한정되는 것은 아니다. 예를 들면 발현을 제어하는 염기 서열로서 전술한 CMV 프로모터/인헨서를 이용한 다른 발현 벡터를 이용하여도 되고, 이것과는 상이한 공지의 프로모터/인헨서(1 또는 복수)를 발현 제어 서열로서 사용하여도 된다. 프로모터로는, 예를 들면, 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스(1989년 7월 5일 공개의 UK2211504), 아데노바이러스(예를 들면 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 새의 육종 바이러스, 사이토메갈로 바이러스, 레트로 바이러스, B형 간염 바이러스 및 가장 바람직하게는 시미안 바이러스 40(SV40)과 같은 바이러스의 계놈으로부터 얻어지는 프로모터, 이종 유래(heterologous) 포유 동물 프로모터(예를 들면 액틴 프로모터, 면역글로불린 프로모터, 열충격 프로모터)를 들 수 있다. 프로모터에 작용하여 전사를 증대시키는 인헨서로는, 공지의 포유 동물 유전자 유래의 인헨서(글로빈, 엘라스타제, 알부민,  $\alpha$ -페토프로테인, 및 인슐린), 및, 진핵 세포 바이러스 유래의 인헨서(복제 기점의 후기측의 SV40 인헨서(bp100-270), 복제 기점의 후기측의 폴리오마 인헨서, 및 아데노 바이러스 인헨서)를 이용할 수 있다.
- <215> 또한, 발현 벡터에는 전사의 중지 및 mRNA의 안정화에 필요한 서열을 포함할 수 있다. 이와 같은 서열은 보통, 진핵 생물의 또는 바이러스의 DNA 또는 cDNA의 5' 및 때로는 3' 비번역 영역으로부터 수득할 수 있다.
- <216> 숙주로의 유전자의 도입 방법은 공지이고, 임의의 방법(예를 들면 칼슘 이온을 이용하는 방법, 일렉트로포레이션(electroporation)법, 스페로플라스트(spheroplast)법, 아세트산리튬법, 인산칼슘법, 리포펙션(lipofection)법 등)을 들 수 있다. 또한, 후술하는 동물에 유전자를 도입하는 방법으로는, 마이크로인젝션(microinjection)법, ES 세포에 일렉트로포레이션이나 리포펙션법을 사용하여 유전자를 도입하는 방법, 핵 이식법 등을 들 수 있다.
- <217> 본 발명에서, 목적으로 하는 항체는 형질 전환체를 배양하고, 그 배양 상청으로부터 채취함으로써 얻을 수

있다. 형질 전환체를 배양하기 위해서는, 사용하는 숙주에 적합한 배지를 이용하고, 정치 배양법, 롤러 병에 의한 배양법 등이 채택된다.

<218> 배양 후, 세포 외에 생산된 항체의 정제는 배양액을 그대로 사용하거나, 원심 분리 등에 의해 세포를 제거하여 행한다. 그 후, 단백질의 단리 정제에 이용되는 각종 크로마토그래피를 이용한 일반적인 생화학적 방법을 단독으로 또는 적절히 조합하여 이용함으로써, 상기 배양물 중으로부터 목적의 항체를 단리 정제할 수 있다.

<219> 또한, 트랜스제닉 동물 제작 기술을 이용하여, 목적 항체의 유전자가 내재성 유전자에 삽입된 동물 숙주, 예를 들면 트랜스제닉 소, 트랜스제닉 염소, 트랜스제닉 양 또는 트랜스제닉 돼지를 제작하고, 그 트랜스제닉 동물로부터 분비되는 밀크 중으로부터 그 항체 유전자에 유래하는 모노클로날 항체를 대량으로 수득하는 것도 가능하다(Wright, G., et al.(1991) Bio/Technology 9, 830-834).

<220> 본 발명에 관한 인간 Mp1에 대한 아고니스트 항체의 제법으로서 바람직한 방법은, 전술한 [과제를 해결하기 위한 수단]의 4.에서 예시한 유전자 재조합 기술에 의한 방법인데, 이것에 한정되는 것은 아니다.

<221> 3. 본 발명에 관한 DNA

<222> 본 발명은, 위에서 기술한 바와 같이,

<223> (1) 인간 Mp1에 대한 아고니스트 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 코드하는 염기 서열로서 이하의 (a)~(d)로부터 선택되는 아미노산 서열을 코드하는 염기 서열을 포함하는 DNA:

<224> (a) 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열;

<225> (b) 서열 번호 4로 표시되는 아미노산 서열;

<226> (c) 서열 번호 6으로 표시되는 아미노산 서열;

<227> (d) 서열 번호 8로 표시되는 아미노산 서열;

<228> 및,

<229> (2) 인간 Mp1에 대한 아고니스트 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 코드하는 염기 서열로서, 이하의 (a)~(h)로부터 선택되는 아미노산 서열을 코드하는 염기 서열을 포함하는 DNA:

<230> (a) 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열;

<231> (b) 서열 번호 5로 표시되는 아미노산 서열;

<232> (c) 서열 번호 7로 표시되는 아미노산 서열;

<233> (d) 서열 번호 9로 표시되는 아미노산 서열;

<234> (e) 서열 번호 3의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열;

<235> (f) 서열 번호 5의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열;

<236> (g) 서열 번호 7의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열;

<237> (h) 서열 번호 9의 아미노산 서열에서 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기가 결실, 치환, 부가 또는 삽입된 아미노산 서열;

<238> 를 제공하는 것이고, 상기 2.의 본 발명에 관한 인간 Mp1에 대한 아고니스트 항체의 제법, 더 구체적으로는, 유전자 재조합 기술을 이용한 항체의 제조에서 이용할 수 있다.

<239> 이들 가변 영역의 아미노산 서열 (a)~(d)를 코드하는 DNA는, 전술한 인간 Mp1에 대한 아고니스트 항체 생산 하이브리도마 수득 방법에 의해 얻어진 하이브리도마주로부터, 후술하는 실시예 7과 같이, 정법에 의해 mRNA를 추출하여 이미 공지된 항체 정상 영역의 아미노산 서열에 기초한 프라이머를 이용하여 5'RACE법에 의해 수득한 것이고, 그 가변 영역을 코드하는 각 DNA를 포함하는 플라스미드는, 독립 행정 법인 산업 기술 종합 연구소 특허 생물 기탁 센터(일본 이바라끼켄 쓰꾸바시 히가시 1-1-1 쓰꾸바 센터 중앙 제6)에 2006년 3월 14일자로 부다페

스트 조약에 기초한 국제 기탁이 되어 있다.

표 1

서열번호 (플라스미드 명칭)	수탁번호	수탁일
2 (Anti-hMpl 7-10_HV/pCR4)	FERM BP-10559	2006년 3월 14일
4 (Anti-hMpl 4-49_HV/pCR4)	FERM BP-10553	2006년 3월 14일
6 (Anti-hMpl 6-4-50_HV/pCR4)	FERM BP-10555	2006년 3월 14일
8 (Anti-hMpl 6-5-2_HV/pCR4)	FERM BP-10557	2006년 3월 14일
3 (Anti-hMpl 7-10_LV/pCR4)	FERM BP-10560	2006년 3월 14일
5 (Anti-hMpl 4-49_LV/pCR4)	FERM BP-10554	2006년 3월 14일
7 (Anti-hMpl 6-4-50_LV/pCR4)	FERM BP-10556	2006년 3월 14일
9 (Anti-hMpl 6-5-2_LV/pCR4)	FERM BP-10558	2006년 3월 14일

<240>

<241>

본 발명의 아고니스트 항체를 구성하는 경쇄의 가변 영역은, 그 특징으로서, 서열 번호 3, 5, 7 또는 9에 나타나는 아미노산 서열을 포함하는데, 이들 아미노산 서열의 프레임워크 영역에 1 또는 수개의 아미노산 잔기의 결실, 치환, 부가 또는 삽입을 포함하여도 되고, 또는 이들 아미노산 서열의 프레임워크 영역의 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88% 또는 89%, 바람직하게는 적어도 90%, 92%, 93% 또는 94%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함하고 있어도 된다. 프레임워크 영역은, 가변 영역에서 3개의 CDR(상보성 결정 부위; complementarity-determining region), 즉 서열 번호 3, 5 또는 7에 나타나는 아미노산 서열에서는, RASQGISS(A 또는 T)LA(아미노산 위치 24-34), DASSLES(아미노산 위치 50-56), 및 QQFNSSYP(L 또는 Y 또는 W)T(아미노산 위치 89-97)를 제외한 영역을 가르키고, 서열 번호 9에 나타나는 아미노산 영역에서는, RASQSVSSSYLA(아미노산 위치 24-35), DASSRAT(아미노산 서열 51-57), 및 QQYGSSPIT(아미노산 위치 90-98)를 제외한 영역을 가르킨다. 후술하는 실시예 17에서 실증하는 바와 같이, 프레임워크 영역 내에 아미노산 변이가 존재하여도, 본 발명의 변이형 항체는 모두, 비변이형 항체의 경우와 거의 동등한 아고니스트 활성, 즉, FM3A-hMpl 세포 등의 FM3A-hMpl 세포의 인간 트롬보포이에틴 수용체에 결합하여 그 수용체를 활성화하는 능력 및/또는 UT-7/TPO 세포의 증식능을 가질 수 있다.

<242>

그와 같은 변이의 예는, 보존적 아미노산 사이에서의 치환이다. 보존적 아미노산은, 전하, 구조, 극성 등의 성질이 유사한 아미노산군이고, 예를 들면 염기성 아미노산(Arg, His, Lys), 산성 아미노산(Glu, Asp), 비극성 아미노산(Ala, Leu, Ile, Val, Gly, Pro), 극성 아미노산(Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp)으로 분류할 수 있다.

<243>

또한, 서열 동일성은 2개 또는 그 이상의 서열을, 갭(gap)을 도입하여 또는 갭을 도입하지 않고 정렬 비교하였을 때의 아미노산(또는 뉴클레오티드) 서열 간의 일치율을 나타내고, 일반적으로 전체 아미노산(또는 뉴클레오티드) 수에 대한 동일 아미노산(또는 뉴클레오티드) 수의 백분율이다. 서열 동일성은, 필요에 따라 NCBI(미국) 등의 데이터뱅크에 액세스하여, 서열 검정용의 BLAST, FASTA 등의 공지의 알고리즘을 이용하여 결정할 수 있다.

<244>

변이의 도입은, 변이를 포함하지 않는 아미노산 서열을 코드하는 DNA에 대하여, 예를 들면 부위 특이적 돌연 변이 유발법, PCR법(변이를 포함하는 프라이머를 사용함) 등을 적용함으로써 실시할 수 있다. 변이 도입법은, 예를 들면, 문헌[ Sambrook 등, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)] 등에 기재되어 있다.

<245>

본 발명의 상기 DNA는 또한, 가변 영역에 더하여, 각각 중쇄 또는 경쇄의 정상 영역을 코드하는 염기 서열을 포

함하는 것이어도 된다.

<246> 또한, 본 발명에 관한 항체의 제조 방법의 항에서 기술한 증쇄 정상 영역의 개변은, 기탁한 DNA 및 공지의 인간 항체 정상 영역의 서열에 기초하여, 주지의 유전자 공학적 개변 수법에 의해 얻을 수 있다.

<247> 4. 인간 c-Mpl에 대한 아고니스트 항체의 의약 용도 및 의약 조성물

<248> 본 발명에 관한 인간 c-Mpl에 대한 아고니스트 항체는, c-MPL 수용체에 결합하여 그것을 활성화하는 능력, 및/또는 (생체내 및 시험관 내의 양쪽에서) 혈소판의 생산을 자극하는 능력(「혈소판 생성 활성화」) 및 혈소판 전구체의 생산을 자극하는 능력(「거핵구 생성 활성화」)을 가진다.

<249> 또한, 인간 c-Mpl 수용체는 거핵구뿐만 아니라 조혈 간세포에서도 발현하고 있다고 알려져 있다. 정상 동물에서, PEG-rHuMGDF 투여에 의해 골수 중의 적아구계 또는 과립구/매크로파지계의 전구 세포가 증가하였다는 보고도 있다(Stem Cell, 14:651-660, 1996). 그러나, 인간 제대혈 이식 마우스에서는, PEG-rHuMGDF의 투여에 의해 마우스의 거핵구계 이외의 전구 세포의 증식은 보였지만, 인간의 전구 세포의 증식은 인정되지 않았다. 한편, 인간 c-Mpl에 대한 아고니스트 항체에서는 골수 중의 인간 적혈구 및 과립구/매크로파지계의 전구 세포의 수가 유의하게 높았다(실시예 14). 이는, 인간 c-Mpl에 대한 아고니스트 항체가 인간 세포에 선택적으로 시그널을 도입하고, 거핵구계뿐만 아니라, 타 계열의 세포의 생착도 촉진할 수 있는 가능성을 시사하고 있다.

<250> 본 발명에 관한 인간 c-Mpl에 대한 아고니스트 항체를 유효 성분으로 하는 의약 조성물에 의해 치료되는 상태는, 일반적으로는, 존재하는 거핵구/혈소판의 결핍 또는 장애에 예기 또는 예상되는 거핵구/혈소판의 결핍(예를 들면, 계획되어 있는 수술 또는 혈소판 공여에 의한 것)을 수반하는 상태이다. 그와 같은 상태는, 생체내에서의 활성 Mpl 리간드의 (일시적 또는 영구적인) 결핍에 의해 생길 수 있다. 따라서 본 발명의 조성물은, 혈소판 결핍 상태 즉 혈소판 감소증의 치료를 필요로 하는 환자에서 혈소판 감소증을 예방적 또는 치료적으로 치료하기 위해서 이용 가능하다. 또한, 범혈구 감소를 장기간에 걸쳐 수반하는 조혈 간세포 이식(골수 이식, 제대혈 이식, 말초혈 간세포 이식) 후의 혈구 회복을 위한 치료를 필요로 하는 환자에서, 범혈구 감소증을 예방적 또는 치료적으로 치료하기 위해서도 이용 가능하다.

<251> 혈소판 감소증(혈소판 결핍증)은, 화학 요법 및 여러 가지 약물에서의 다른 요법, 방사선 요법, 수술, 뜻하지 않은 출혈, 및 다른 구체적인 병태를 포함하는 여러 가지 이유에 의해 생길 수 있다. 혈소판 감소증을 수반하여 본 발명에 따라 치료될 수 있는 전형적인 구체적인 병태로는 이하의 것을 들 수 있다:무형성 빈혈; 특발성 또는 면역 혈소판 감소증(ITP), 예를 들면 유방암에 수반되는 특발성 혈소판 감소성 자반병; HIV에 수반하는 ITP 및 HIV에 관련된 혈전성 혈소판 감소성 자반병;혈소판 감소증을 일으키는 전이성 종양; 전신성 에리테마토데스, 예를 들면 신생아 루푸스 증후군 비중; 판코니 증후군; 비타민 B12 결핍증; 엽산 결핍증; 메이-헤글린 이상(May-Hegglin anomaly); 비스코트-올드리지 증후군(Wiskott-Aldridge Syndrome); 만성 간질환; 혈소판 감소증에 관련된 골수 형성 이상 증후군; 발작성 야간 헤모글로빈뇨증; C7E3 Fab(Abciximab) 요법 후의 급성 심부혈소판 감소증; 동종 면역 혈소판 감소증, 예를 들면 모성 동종 면역 혈소판 감소증; 항인지질 항체 및 혈전증에 관련된 혈소판 감소증; 자기 면역 혈소판 감소증; 약물에 의해 유발된 면역 혈소판 감소증, 예를 들면 카르보플라틴에 의해 유발된 혈소판 감소증, 헤파린에 의해 유발된 혈소판 감소증; 태아 혈소판 감소증; 임신 혈소판 감소증; 휴즈 증후군(Hughes' syndrome); 루포이드 혈소판 감소증; 뜻하지 않은/얇거나 대량의 실혈; 골수 증식성 이상증; 악성 질환을 가지는 환자에서의 혈소판 감소증; 혈전성 혈소판 감소 자반병, 예를 들면 암 환자에서 혈전성 혈소판 감소성 자반병/용혈성 뇨독증성 증후군으로서 나타나는 혈전성 세소혈관증; 자기 면역성 용혈성 빈혈; 잠재성 공장 계실 천공; 진정 적혈구계 무형성증; 자기 면역 혈소판 감소증; 유행성(epidemic) 신장해; 리팜피신에 관련된 급성 신부전; 파리스-트트루소(Paris-Trousseau) 혈소판 감소증; 신생아 동종 면역 혈소판 감소증; 발작성 야간 헤모글로빈뇨증; 위암에서의 혈액학적 변화; 소아에서의 용혈성 뇨독증성 증후군; A형 관련 바이러스를 포함하는 바이러스 감염에 관련된 혈액학적 징후 및 CMV에 관련된 혈소판 감소증. 또한, 어느 종류의 에이즈 치료는 혈소판 감소증을 일으킨다(예를 들면, AZT). 또한, 어느 종류의 창상 치유 장애는, 혈소판 수의 증가가 유익할 것이다. 또한 상기 환자에서는, 혈소판 감소뿐만 아니라, 그 외의 혈구 감소를 수반하는 질환도 존재한다.

<252> 예상되는 혈소판의 결핍(예를 들면, 장애의 수술에 의한 것)에 대하여, 혈소판이 필요로 되기 전에 수일로부터 수시간에 걸쳐 유효 성분으로서의 본 발명의 아고니스트 항체를 투여하는 것이 가능할 것이다. 긴급 상황(예를 들면, 뜻하지 않은 대량의 실혈)에서는, 혈액 또는 정제 혈소판과 함께 본 발명의 아고니스트 항체를 투여하는 것이 가능할 것이다. 또는, 범혈구의 결핍(예를 들면, 제대혈 이식에 의한 것)에 대해서도, 유효 성분으로서의 본 발명의 아고니스트 항체를 투여하는 것이 가능할 것이다.

- <253> 특히 바람직한 치료 대상으로서는, (1) 특발성 혈소판 감소성 자반병 또는 간질환에 수반하여 일어나는 혈소판 감소증, (2) 암 화학 요법, 재생 불량성 빈혈, 골수 이형성 증후군(MDS), 골수 이식 또는 제대혈 이식에 수반하여 일어나는 혈소판 감소증 및/또는 범혈구 감소증을 들 수 있다.
- <254> 본 발명의 인간 c-MPL에 대한 아고니스트 항체는 또한, 혈소판 및/또는 거핵구 및 관련 세포의 생존능 또는 보존 수명을 유지하는 데 유용할 수 있다. 따라서, 그와 같은 세포를 함유하는 조성물 중에 유효량을 함유시키는 것이 유용할 것이다.
- <255> 본 발명에 관한 인간 c-MPL에 대한 아고니스트 항체를 유효 성분으로 하는 의약 조성물은, 주사용 또는 경구, 코, 경피 또는 다른 투여 형태를 위한 것이어도 된다. 그들에는, 예를 들면, 정맥내, 피내, 근육내, 유방내, 복강내, 경막내, 안내, 연수 후방, 폐내(예를 들면 에어로솔화 약) 또는 피하 주사(장기에 걸친 방출을 위한 데포 투여를 포함함), 설하, 향문, 질 또는 외과적 이식, 예를 들면 비장막하, 뇌 또는 각막 내의 매립에 의한 투여가 포함된다. 그 치료는, 단회 투여 또는 일정 기간에 걸친 복수 회의 투여로 이루어지는 것이어도 된다. 일반적으로는, 본 발명에 관한 인간 c-MPL에 대한 아고니스트 항체의 유효량 및 의약상 허용되는 희석제, 보존제, 가용화제, 유화제, 보조제 및/또는 담체를 포함하는 의약 조성물이 본 발명에 포함된다. 그와 같은 조성물은, 여러 가지 완충제 함유물(예를 들면, 트리스(Tris)-HCl, 아세트산염, 인산염), pH 및 이온 강도의 희석제; 첨가물, 예를 들면 계면 활성제 및 가용화제(예를 들면, 트윈(Tween) 80, 폴리소르베이트(Polysorbate) 80), 항산화제(예를 들면, 아스코르브산, 메타중아황산나트륨), 보존제(예를 들면, 티메르솔(Thimersol), 벤질알코올) 및 증량 물질(예를 들면, 락토오스, 만니톨); 폴리유산, 폴리글리콜산 등의 중합체 화합물의 입자상 제제 내 또는 리포솜 내에 그 물질이 봉입된 것을 포함한다. 희망에 따라, 의약 비히클, 부형제 또는 매체로서 작용하는 또 다른 의약상 허용되는 액체, 반고체 또는 고체 희석제를 포함하고 있어도 된다. 그들에는, 폴리옥시에틸렌 소르비탄모노라우레이트, 스테아르산마그네슘, 메틸- 및 프로필히드록시벤조에이트, 전분, 수크로오스, 텍스트로오스, 아라비아 검, 인산칼슘, 팜유, 카카오지 및 테오브로마유가 포함되는데, 이들에 한정되는 것은 아니다. 그 조성물은, 액체 형태 또는 건조 분말(예를 들면, 동결 건조 형태)로서 제조할 수 있다. 이식 가능한 서방 제제, 및 경피 제제도 의도된다.
- <256> 상기한 상태의 치료 방법에 관한 투여 계획은, 약물의 작용을 개변시키는 여러 가지 요인(예를 들면, 환자의 연령, 상태, 체중, 성별 및 식사, 어느 하나의 감염의 중증도, 투여 시간 및 다른 임상적 용인)을 고려하여 담당 의사에 의해 결정될 것이다. 일반적으로는, 그 용량은, 1일당 본 발명 항체 100 $\mu$ g~1mg/kg 체중, 바람직하게는 10~100 $\mu$ g/kg, 더 바람직하게는 1~10 $\mu$ g/kg이고, 이들을 1일량으로, 또는 더 긴 또는 더 짧은 간격으로(예를 들면, 하루 걸러, 1주일에 2회, 매주, 또는 매일 2회 또는 3회) 동등량으로 투여한다.
- <257> 또한, 본 발명에 관한 인간 c-MPL에 대한 아고니스트 항체를 유효 성분으로 하는 의약 조성물은, 단독으로 또는 다른 사이토카인, 가용성 Mpl 수용체, 조혈 인자, 인터루킨, 증식 인자와 조합하여, 혈소판의 결핍 및 다른 증상에 의해 특징지어지는 병태의 치료에서 사용할 수 있다. 조혈의 일반적인 자극 인자(예를 들면, IL-3 또는 GM-CSF)와 조합하여, 몇 가지 형태의 혈소판 감소증을 치료하는 데 유용하다고 예상된다. 또한, 다른 거핵구 자극 인자, 즉 meg-CSF, 간세포 인자(SCF), 백혈병 저해 인자(LIF), 온코스타틴 M(oncostatin M, OSM) 또는 거핵구 자극 활성을 가지는 다른 분자를, Mpl 리간드와 함께 사용할 수 있다. 그와 같은 공투여를 위한 추가적인 대표적인 사이토카인 또는 조혈 인자에는, IL-1 알파, IL-1 베타, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, 콜로니 자극 인자-1(CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF), EPO, 인터페론-알파(IFN-알파), 컨센서스 인터페론, IFN-베타, IFN-감마, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, 토포보포이에틴(TPO), 안지오포이에틴, 예를 들면 Ang-1, Ang-2, Ang-3, Ang-4, Ang-Y, 인간 안지오포이에틴양 폴리펩티드, 혈관 내피 증식 인자(VEGF), 안지오키닌, 골 형성 인자(bone morphogenic protein)-1, 골 형성 인자-2, 골 형성 인자-3, 골 형성 인자-4, 골 형성 인자-5, 골 형성 인자-6, 골 형성 인자-7, 골 형성 인자-8, 골 형성 인자-9, 골 형성 인자-10, 골 형성 인자-11, 골 형성 인자-12, 골 형성 인자-13, 골 형성 인자-14, 골 형성 인자-15, 골 형성 인자 수용체 IA, 골 형성 인자 수용체 IB, 뇌 유래 신경 영양 인자, 모양체 신경 영양 인자, 모양체 신경 영양 인자  $\alpha$ , 사이토카인 유도성 호중구 주화 인자 1, 사이토카인 유도성 호중구 주화 인자 2 $\alpha$ , 사이토카인 유도성 호중구 주화 인자 2 $\beta$ ,  $\beta$  내피 세포 증식 인자, 엔도텔린 1, 상피 증식 인자, 상피 유래 호중구 유인 물질, 섬유 아세포 증식 인자 4, 섬유 아세포 증식 인자 5, 섬유 아세포 증식 인자 6, 섬유 아세포 증식 인자 7, 섬유 아세포 증식 인자 8, 섬유 아세포 증식 인자 8b, 섬유 아세포 증식 인자 8c, 섬유 아세포 증식 인자 9, 섬유 아세포 증식 인자 10, 산성 섬유 아세포 증식 인자, 염기성 섬유 아세포 증식 인자, 글리아 세포주 유래 신경 영양 인자 수용체  $\alpha$ 1, 글리아 세포주 유래 신경 영양 인자 수용체  $\alpha$ 2, 성장 관련 단백질(growth related protein), 성장 관련 단백질  $\alpha$ , 성장 관련 단백질  $\beta$ , 성장 관련 단백질

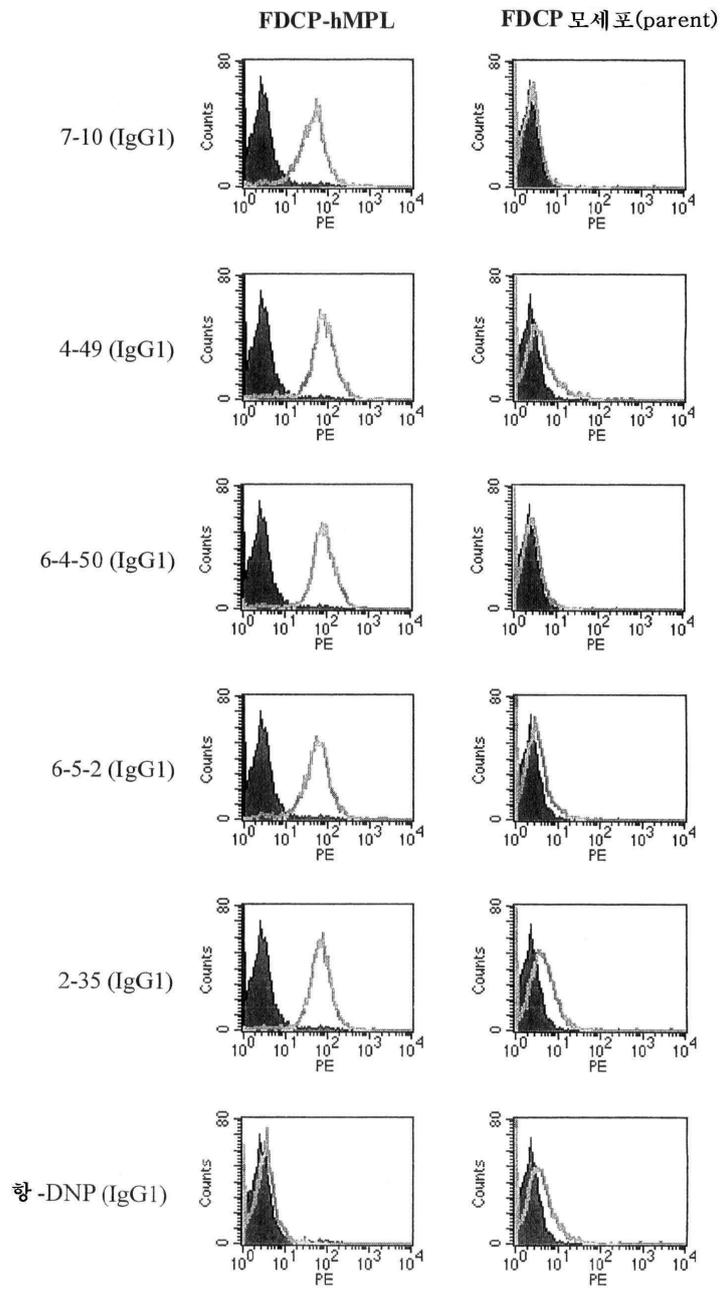
질  $\gamma$ , 헤파린 결합성 상피 증식 인자, 간세포 증식 인자, 간세포 증식 인자 수용체, 인슐린양 증식 인자 I, 인슐린양 증식 인자 수용체, 인슐린양 증식 인자 II, 인슐린양 증식 인자 결합 단백질, 각질 세포 증식 인자, 백혈병 저해 인자, 백혈병 저해 인자 수용체  $\alpha$ , 신경 성장 인자, 신경 성장 인자 수용체, 뉴로트로핀-3, 뉴로트로핀-4, 태반 증식 인자, 태반 증식 인자 2, 혈소판 유래 내피 세포 증식 인자, 혈소판 유래 증식 인자, 혈소판 유래 증식 인자 A쇄, 혈소판 유래 증식 인자 AA, 혈소판 유래 증식 인자 AB, 혈소판 유래 증식 인자 B쇄, 혈소판 유래 증식 인자 BB, 혈소판 유래 증식 인자 수용체  $\alpha$ , 혈소판 유래 증식 인자 수용체  $\beta$ , 프리 B세포 증식 자극 인자, 간세포 인자 수용체, TNF(TFNO, TNF1, TNF2를 포함함), 트랜스포밍 증식 인자  $\alpha$ , 트랜스포밍 증식 인자  $\beta$ , 트랜스포밍 증식 인자  $\beta$ 1, 트랜스포밍 증식 인자  $\beta$ 1.2, 트랜스포밍 증식 인자  $\beta$ 2, 트랜스포밍 증식 인자  $\beta$ 3, 트랜스포밍 증식 인자  $\beta$ 5, 잠재(latent) 트랜스포밍 증식 인자  $\beta$  결합 단백질 I, 트랜스포밍 증식 인자  $\beta$  결합 단백질 II, 트랜스포밍 증식 인자  $\beta$  결합 단백질 III, 종양 괴사 인자 수용체 I형, 종양 괴사 인자 수용체 II형, 우로키나아제형 플라스미노겐 활성화자 수용체, 혈관 내피 증식 인자, 및 그들의 키메라 단백질이 포함된다.

<258> 따라서, 본 발명에 관한 인간 c-Mp1에 대한 아고니스트 항체를 유효 성분으로 하는 의약 조성물의 투여(성숙 거핵구의 수를 증가시키기 위한 것)는, 혈소판의 생산을 자극하는 특히 유효한 수단이라고 예상된다. 또한 조혈 간세포의 생산을 자극함에 있어서도 유용한 수단이라고 예상된다. 상기에서 열거한 용량은, 그 치료용 조성물 중의 그와 같은 추가적인 성분을 보상하도록 조절될 것이다. 치료된 환자의 경과를, 통상의 방법에 의해 모니터링할 수 있다.

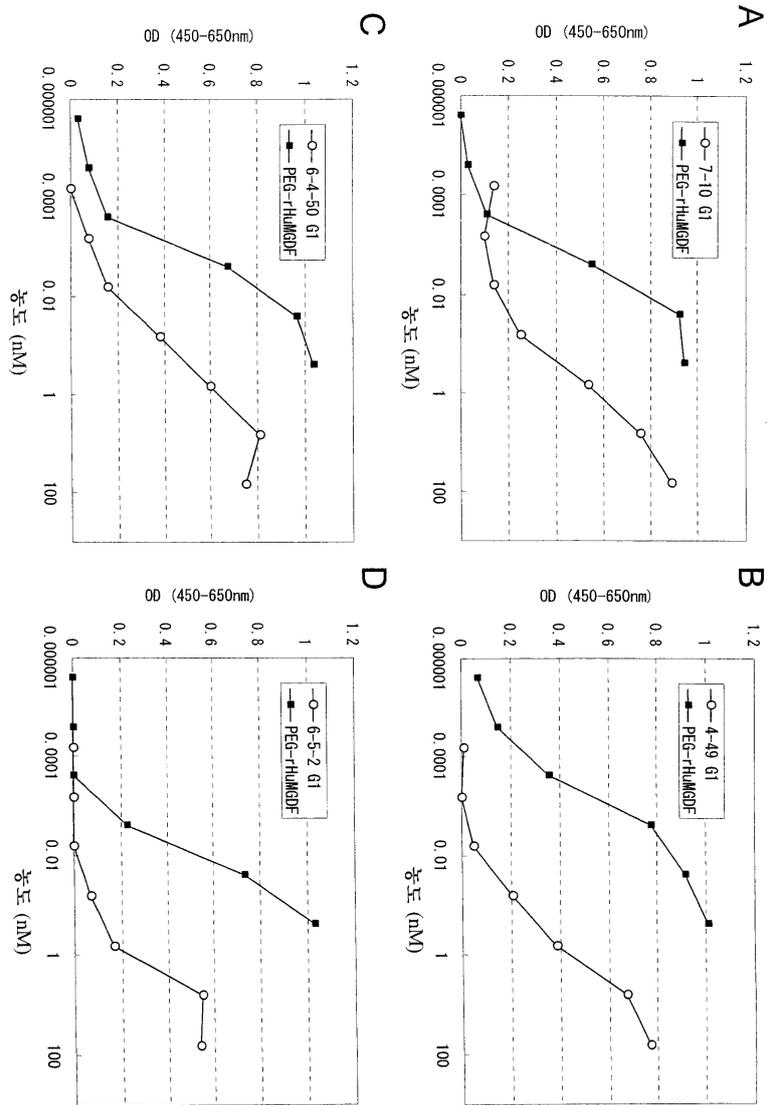
<259> 이하, 실시예에 의해 본 발명을 더욱 상세하게 설명하지만, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

도면

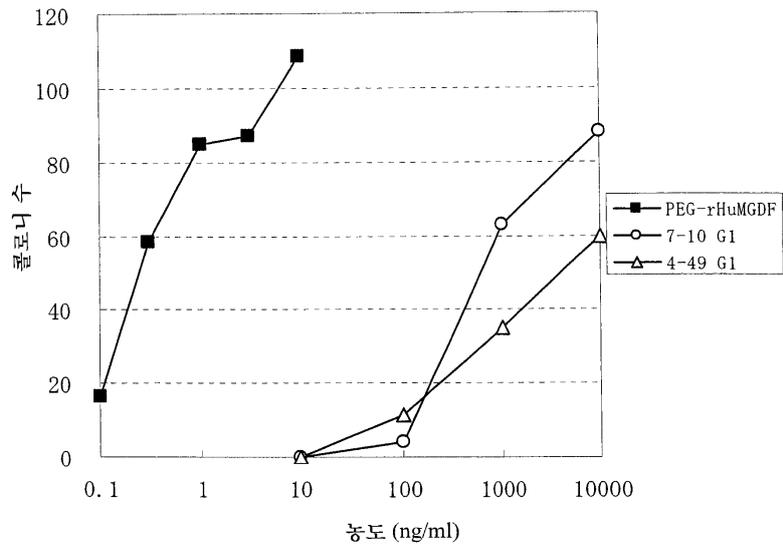
도면1



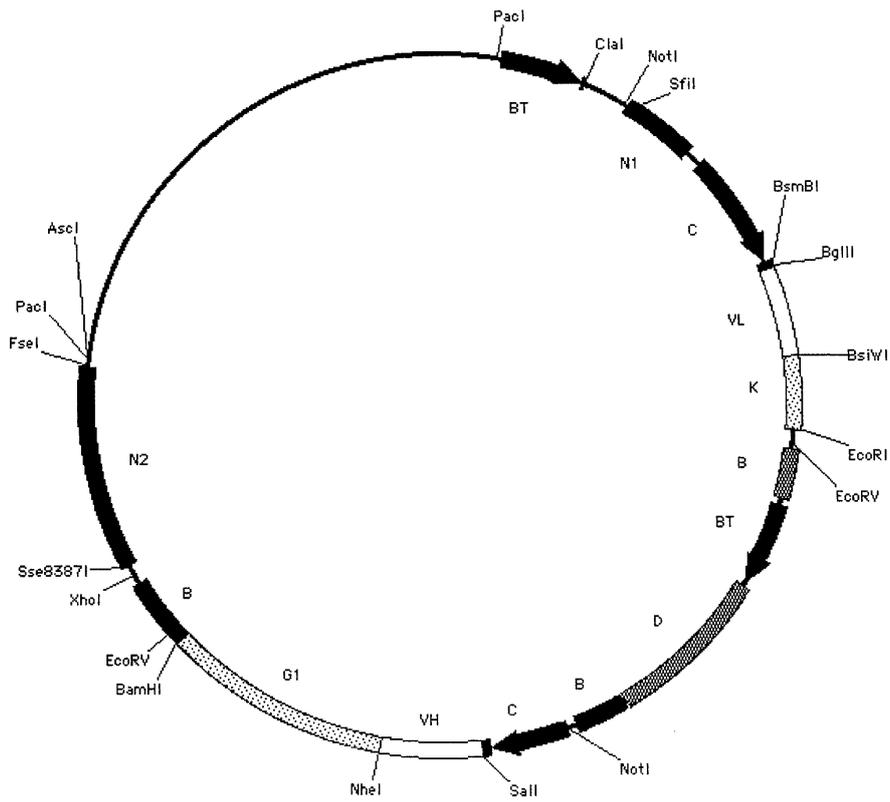
도면2



도면3



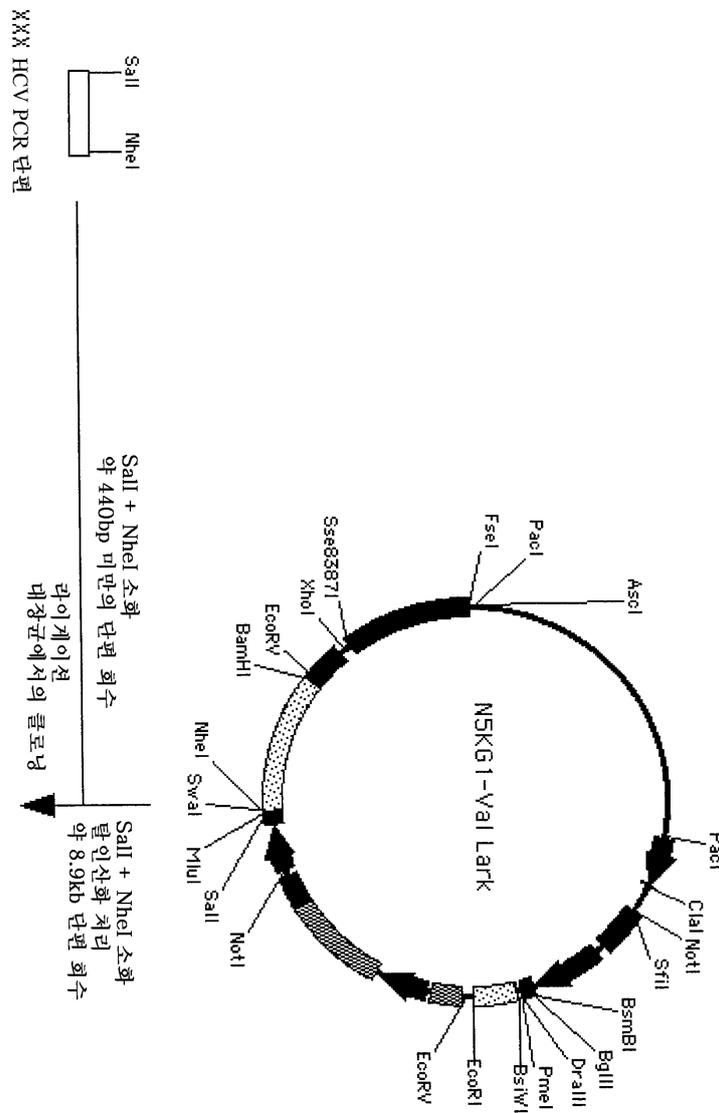
도면4A



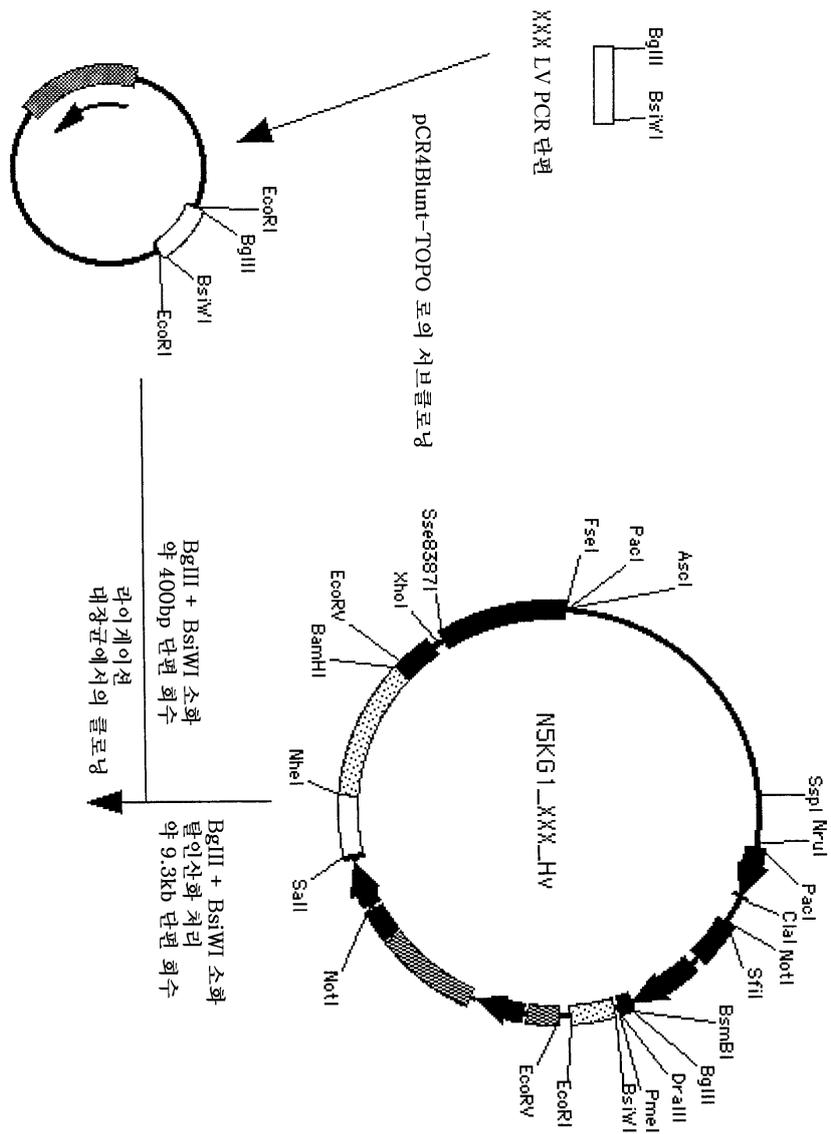
도면4B

	CH1	상부 힌지	중간 힌지	CH2
IgG1	VDKRV	EPKSCDKTHT	CPPCP	APELLGGP
IgG2	VDKTV	ERK	CCVECP	APPVAGP
IgG3	VDKRV	ELKTPLGDTTHT	CPRCP(EPKSCDTTPPCPRCP)x3	APELLGGP
IgG4	VDKRV	ESKYGPP	CPSCP	APEFLGGP
G4PE	VDKRV	ESKYGPP	CPPCP	APEFEGGP
G4344	VDKRV	ELKTPLGDTTHT	CPRCP(EPKSCDTTPPCPRCP)x3	APEFEGGP
G4344h1	VDKRV	ELKTPLGDTTHT	CPRCPEPKSCDTTPPCPRCP	APEFEGGP
G4344uh	VDKRV	ELKTPLGDTTHT	CPRCP	APEFEGGP
G4344uhm	VDKRV	ESKTPGDTTHT	CPPCP	APEFEGGP

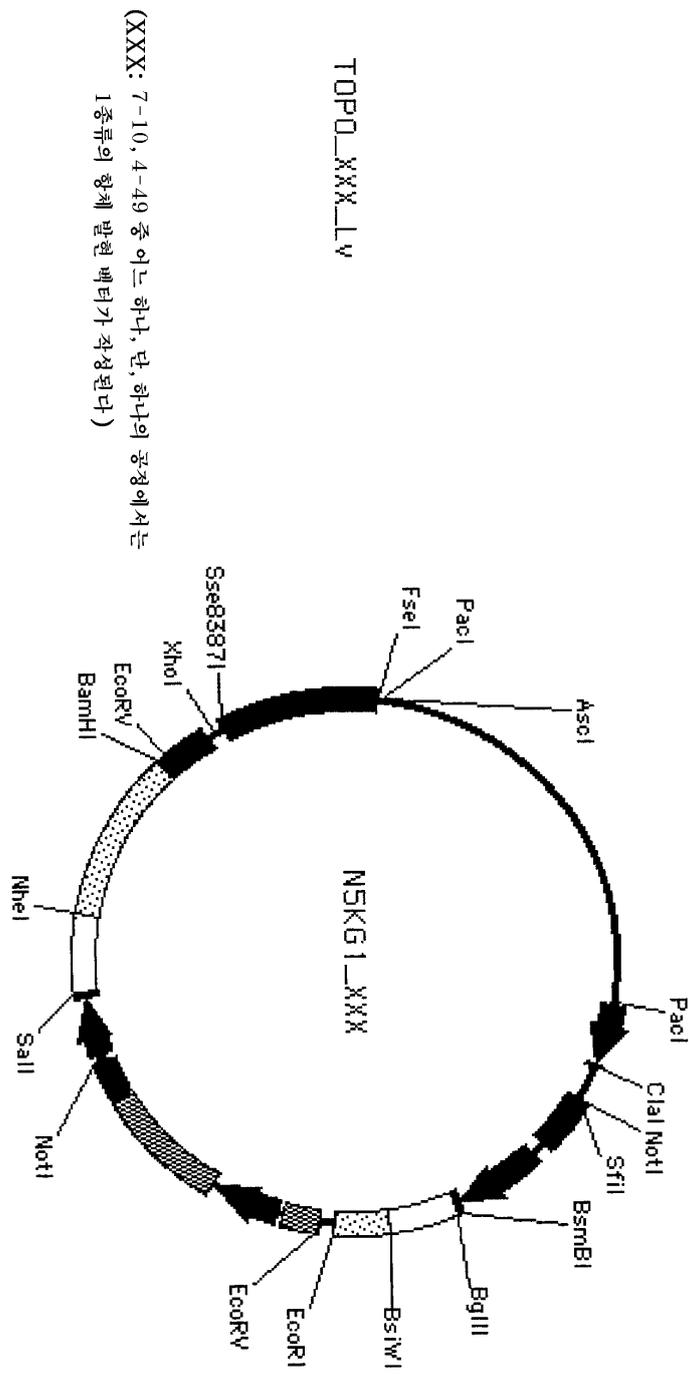
도면4C1



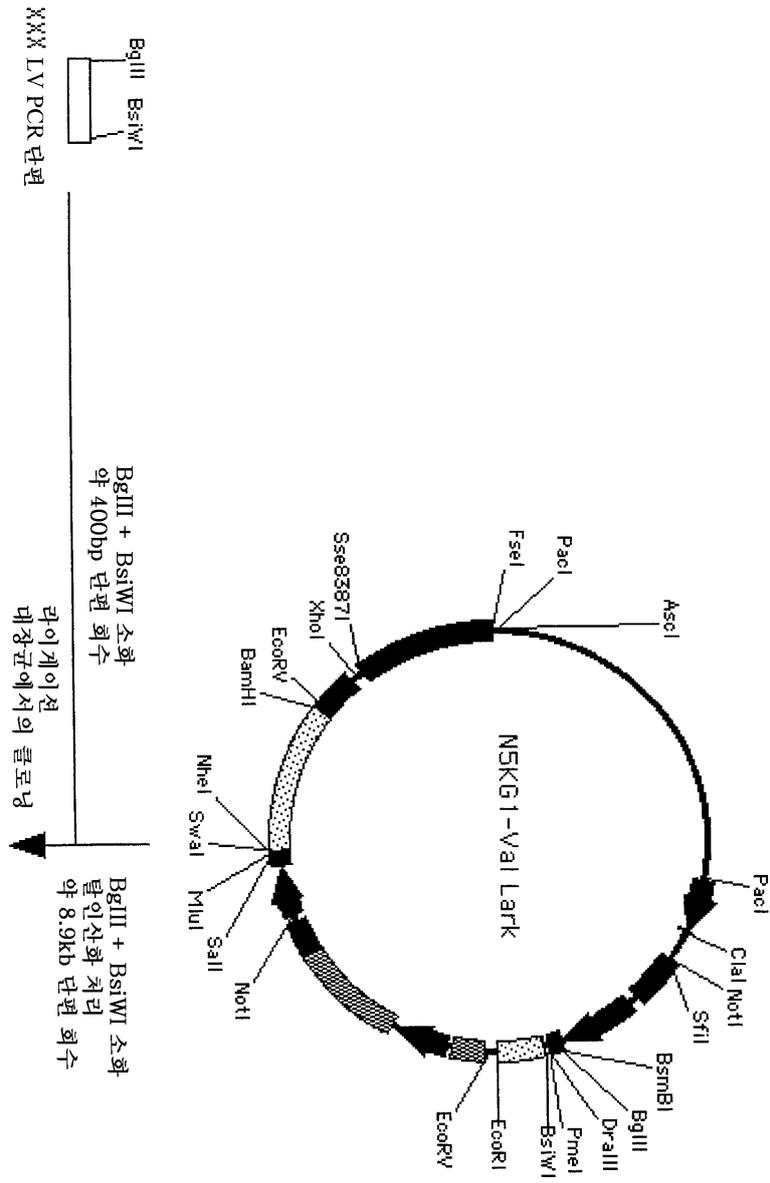
도면4C2



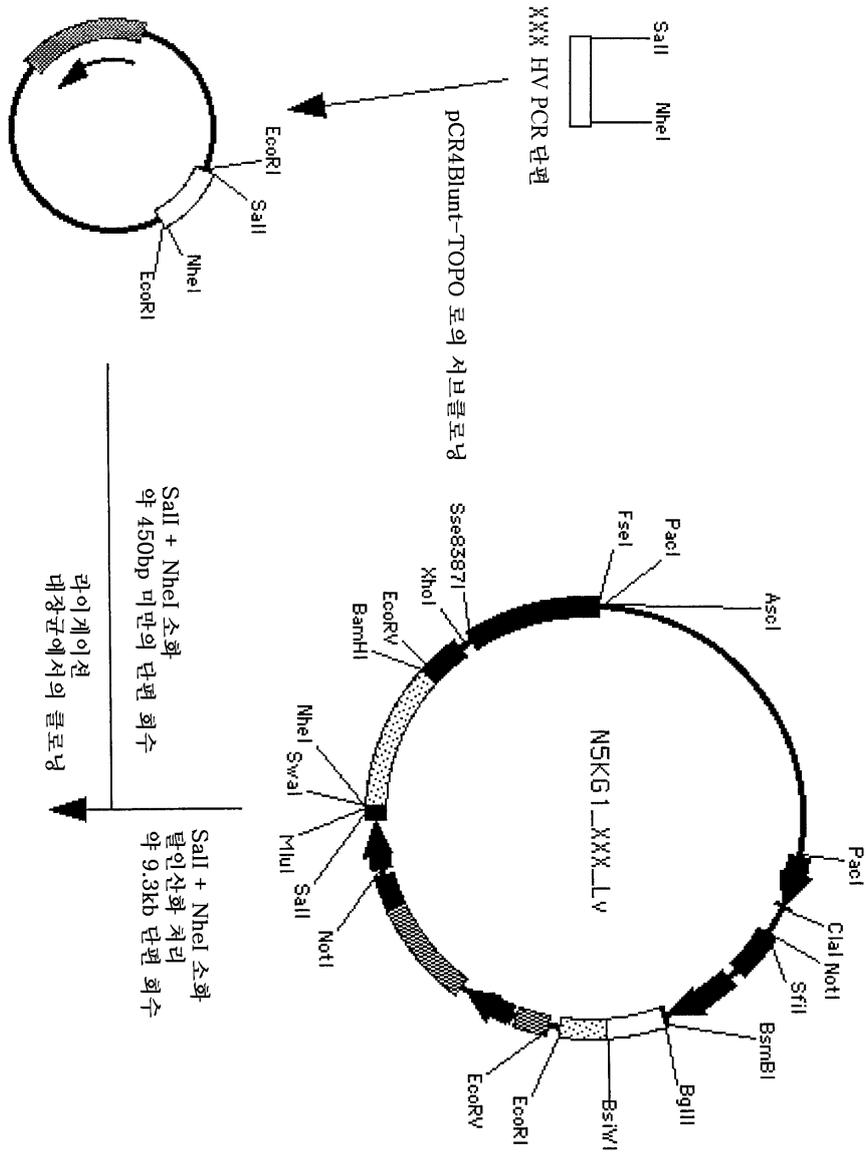
도면4C3



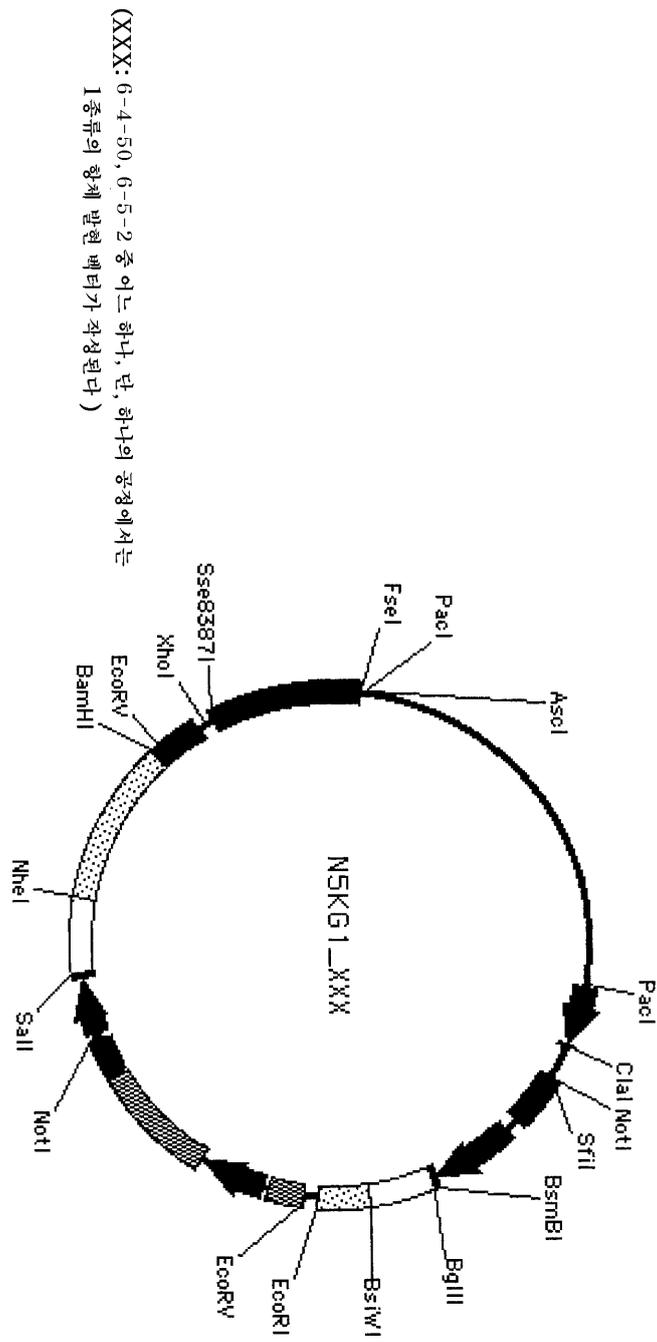
도면4D1



도면4D2



도면4D3



(XXX: 6-4-50, 6-5-2 중 어느 하나, 단, 하나의 공경에서는  
1 종류의 항체 발현 벡터가 작성된다)

도면4E

G3344h1 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
G3344 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
G4344 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
G4344h1 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
G4344uh ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
G4344uhm ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
G4PE ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

G3344h1 GLYLSVVVTPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTRKDKRVELKTPLDGDTHTCPRCPEPKSC  
G3344 GLYLSVVVTPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTRKDKRVELKTPLDGDTHTCPRCPEPKSC  
G4344 GLYLSVVVTPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTRKDKRVELKTPLDGDTHTCPRCPEPKSC  
G4344h1 GLYLSVVVTPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTRKDKRVELKTPLDGDTHTCPRCPEPKSC  
G4344uh GLYLSVVVTPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTRKDKRVELKTPLDGDTHTCPRCPEPKSC  
G4344uhm GLYLSVVVTPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTRKDKRVELKTPLDGDTHTCPRCPEPKSC  
G4PE GLYLSVVVTPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTRKDKRVELKTPLDGDTHTCPRCPEPKSC

G3344h1 DTPPPCPRCP-----APEFEGGPSVFLFPPKPKDT  
G3344 DTPPPCPRCP-----APEFEGGPSVFLFPPKPKDT  
G4344 DTPPPCPRCP-----APEFEGGPSVFLFPPKPKDT  
G4344h1 DTPPPCPRCP-----APEFEGGPSVFLFPPKPKDT  
G4344uh -----APEFEGGPSVFLFPPKPKDT  
G4344uhm -----APEFEGGPSVFLFPPKPKDT  
G4PE -----APEFEGGPSVFLFPPKPKDT

G3344h1 LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH  
G3344 LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH  
G4344 LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH  
G4344h1 LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH  
G4344uh LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH  
G4344uhm LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH  
G4PE LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH

G3344h1 QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK  
G3344 QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK  
G4344 QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK  
G4344h1 QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK  
G4344uh QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK  
G4344uhm QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK  
G4PE QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK

G3344h1 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE  
G3344 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE  
G4344 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE  
G4344h1 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE  
G4344uh GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE  
G4344uhm GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE  
G4PE GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE

G3344h1 ALHNHYTQKSLSLGLK  
G3344 ALHNHYTQKSLSLGLK  
G4344 ALHNHYTQKSLSLGLK  
G4344h1 ALHNHYTQKSLSLGLK  
G4344uh ALHNHYTQKSLSLGLK  
G4344uhm ALHNHYTQKSLSLGLK  
G4PE ALHNHYTQKSLSLGLK

도면4F1

SaII  
 1 OTGCGACCACC ATG GAG TTG GGA CTG AGC TGG ATT TTC CTT TTG GCT ATT TTA AAA GGT GTC CAG TGT GAA GTG CAG  
 CAGCTGGTGG TAC CTC AAC CCT GAC TCG ACC TTA HAA GAA AAC CAA TAA HAT TTT CCA CAG GTC ACCA CTT CAC GTC  
 11 M E L G L S W L L A L L K G V Q C E V Q  
 77 CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGC AAG TCC CTC GTA AAG CTC TCC TGT GCA GGC TCT GAA TTC ACC  
 GAC CAC CTC AAG CCC CCT CGA CCG TCC GAG CCA GTC GTC AAG TCT GAG AAG ACA CTA CCA GGT CAG AAG CCT AAG TGG  
 231 L V E S G G L V Q P G R S L R L S C A A S G F T  
 152 TTT GAT GAT TAT GCC ATG CAC TGG GTC CAG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATT AGT TGG  
 HAA CTA CTA ATA CAG TAC ATG ACC CAG GTT CAA GGT CCC TTC CCG GAC GTT ACC CAG AGT CCA TAA TCA ACC  
 481 F D D Y A M H W V R Q A P G K G L E W V S G I S W  
 227 HAT AGT GGT AGC ATA GGC TAT GCG GAC TCT GTA HAA GGC CAA TTC ACC ATC TCC AHA GAC AAC GCC AAG AAC TCC  
 TTA TCA CCA TCG TAT CCG ATA CAG CTC AHA CAC TTC CCG GCT AAG TGG TAG AAG TCT CTG TTG CAG TTC TTG AAG  
 731 N S G S I G Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S  
 382 CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT CTG AAG GCT GAG GAC ACG GGC TTC TAT TAC TGT GCA HAA HAT CTA TGG TTC GGG  
 GAC ATA GAC GTT TAC TTG TCA GAC TCT CAA CTC CTG TGC CAG AAC ATA ATG ACA CGT TTT TTA GAT ACC AAG CCC  
 981 L Y L Q M N S L R A E D T A L L Y Y C A A K N L L W F G  
 377 GAG TTC CGT TAC TGG TAC TTC GAT CTC TGG GGC CGT GGC ACC CTG GTC ACT GTC TCC TCA GCT AAG ACC AAG GGG  
 CTC HAA GCA ATG ACC ATG HAA CTA HAA GAG ACC CCG GCA CCG TGG GAC CAG TGA CAG AAG AGT CAA TCG TGG TTC CCC  
 1231 E F R Y W Y F D L W G R G T L L V T V S A S T K G  
 452 CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCG CCC TGC ACC AAG ACC ACC TCC GAG ACC ACA GCC GGC CTG GGC TGC CTG GTC HAA  
 GGT AGC CAG AAG GGG GAC CCG GAG ACC TCC TCG TGG AAG CTC TCG TGT CAG CAG GAC CCG AAC CCG GAC CAG TTC  
 1481 P S V F P L A P C S R S T S E S T A L G C L V K  
 527 GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GGC CTG ACC AAG GGC GTG CAG ACC TTC CCG GCT  
 CTG ATG AAG GGG CTT GGC CAC TGC CAC ACC TTG AGT CCG GAC TGG TCG CAG CTC GCG GAC GTG TGG AAG GGC CAA  
 1731 D Y F P E P V T V S W N S G A L L T S G V H T F P A  
 602 GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AAC AAC GTG GTC ACC GTC GTC CCC TCC AAG ACC TTG GGC ACG AAG ACC  
 CAG GAT GTC AAG AGT CCT GAG ATG AAG AAG TCG CAC TGG CAC TGG CAG GGG AAG TCG TCC AAC CCG TGC TTC TGG  
 1981 V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S L L G T K T  
 677 TAC ACC TGC AAC GTA GAT CAG AAC CCC AAC AAC ACC GTC  
 ATG TGG ACG TTG CAT CTA GTG TTC GGG TCG TGG TTC CAC CTG TGT CCA CTA AAG TTT TGG GGT GAA CCA  
 2231 Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K K T P L G  
 752 GAC ACA ACT CAC ACA TGC CCA CCA TGC CCA GCA CCT GAG TTC GAG GGG GAA CCA TCA GTC TTC CTG CCC CCA  
 CTG TGT TGA GTG ACG GGT GGT ACG GGT GGT GAA CTG CCC CCT GGT AGT CAG AAG AAC GAG GGG GGT  
 2481 D T T H T C P A P E F E G G P S V F L L F P P  
 827 HAA CCC AAG GAC ACT CTC ATG ATC TCC CAG ACC CCT GAG GTC ACC TGC GTG GTG GTC GTC GTC GTC GTC GTC GTC  
 TTT GGG TTC CTG TGA GAG TAC TAG AAG GGC TGG GAA CTC CAG TGC AAG CAC CAC CTG GTC GTC GTC GTC GTC GTC  
 2731 K P K D T L L M I S R T P E V V T C V V D V S Q E E D

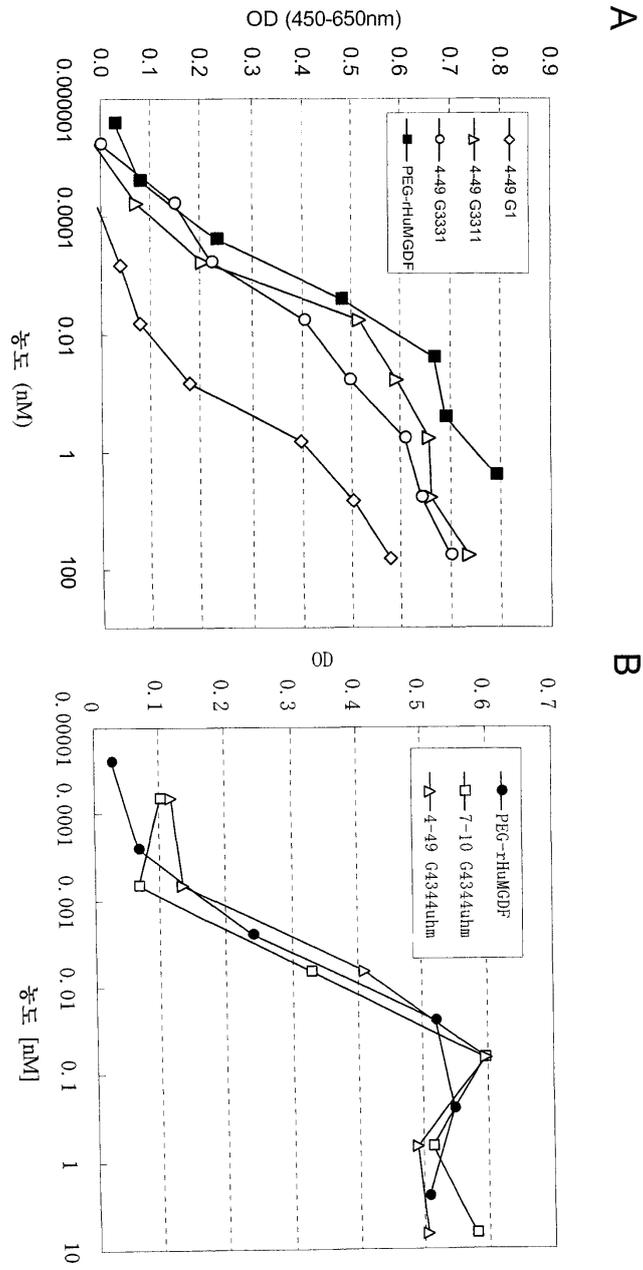
도면4F2

902 CCC GAG GTC CAG TTC AAC TGG TAC GTG GAT GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CAG GAG GAG CAG  
 GGG CTC CAG GTC AAG TTG ACC ATG ACC CTA CCG CAC CTC CTA TTA CAG TTC TGT TGC GCC CTC CTC GTC  
 298▶ P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q  
 977 TTC AAC AGC ACG TAC CGT GTG AAC GTC CTC AAC GTC CAG CAC CAG GAG TGG CAG GAG GTC GTC ACC TTC ATG TTC  
 AAG TTG TCG TGC ATG GCA CAG CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAG GTC GTC ACC AAC TTC CCG TTC CTC ATG TTC  
 323▶ F N S T Y R V V S V L L T V L H Q D W L N G K E Y K  
 1052 TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG TCC TTC ATC AAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CAA GAG  
 ACG TTC CAG AAG TTG TTT CCG AAG GGC AAC AAG TGG CTC TTT TGG TGG AAG TTT CCG TTT CCC GTC GAG GCT CTC  
 348▶ C K V S N K G L P S S I E E M T K T I S K A K G Q P R E  
 1127 CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG AAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AAC CTG AAC TGC CTG GTC AHA  
 GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AAG GTC CTC CTC TAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG AAC TGG ACG GAG CAG TTT  
 373▶ P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K  
 1202 GGC TTC TAC CCC ACC GAG ATC GCC GTG GAG TGG AAG AAC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT  
 CCG AAG ATG GGG TCG CTG TGG CAG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TTG TGG TGC GGA  
 398▶ G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N N Y K T T P  
 1277 CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC TAC AAC AAG CTA ACC GTG GAC AAG AAC AAC AAG TGG CAG GAG GGG  
 GGG CAC GAC CTG AAG CTG CCG AAG AAG AAG GAG ATG TCG TCC GAT TGG CAG CTC TTC TCG AAC AAC AAC AAC AAC  
 423▶ P V L D S D G S F F L L Y S R L L T V D K S R W Q E G  
 1352 AAT GTC TTC TCA TGC TCC CTC GTG ATG CAT AAG GCT CTG CAC AAC AAC CAC TAC ACA CAG AAG AAC CTC TTC CTG  
 TTA CAG AAG AAT ACG AAG GAG CAC TAC GTA CTC CAA GAC GTG TTG GTG ATG TGT GTC TTC TCG GAG AAG GAG AAC  
 448▶ N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L L S L L S L  
 BamHI  
 1427 GGT AAA TGAAGATCC  
 CCA TTT ACTCCTAGG  
 473▶ G K

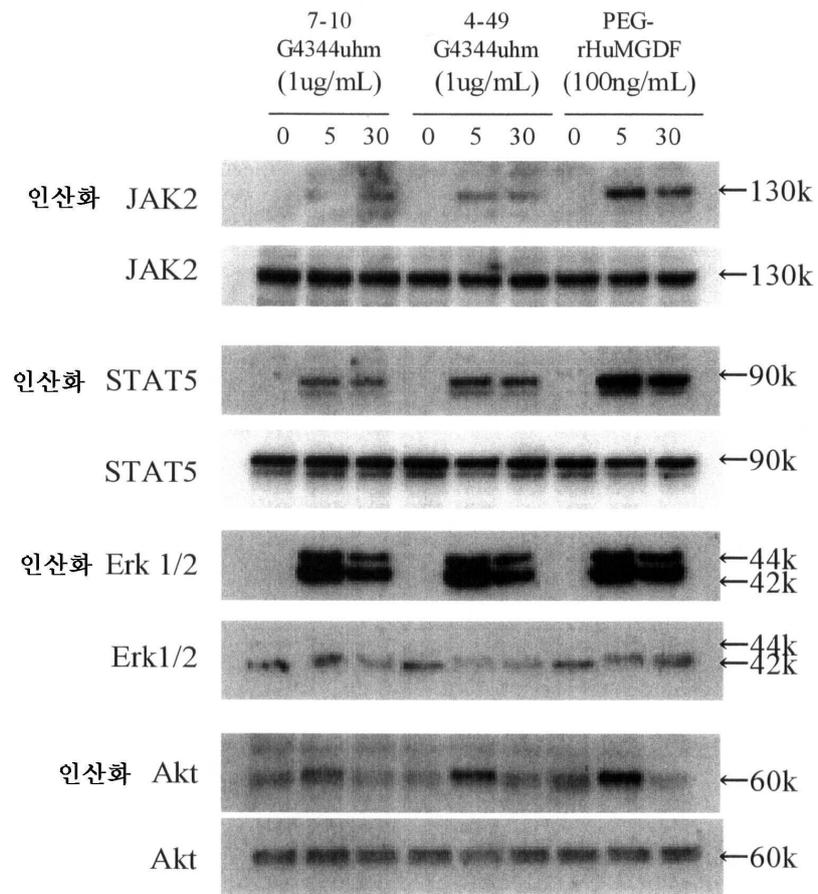
도면46

1 AGARTCTCTGACC ATG GAC ATG AAG GTC CCC GCT CAG CTC CTG GGG CTT CTG CTG CTC CTG TGG CTC  
 TCTTGGAGGATGAG TAC CTG TAC TCC CAG GGG CAA GTC GAG GAC CCC GAA GAC GAC GAG ACC GAG  
 64 CCA GGT GGC AGR TGT GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GAA  
 GGT CCA CCG TCT ACA CCG TAG GTC AAC GGT TAG GGT AAG GGC GAC AGR CGT AGR CAT CCT  
 189 P G A R C A I Q L T Q S P S S L S A S V G  
 127 GAC AGR GTC ACC ATC ACT TGC CCG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT CAG  
 CTG TCT CAG TGG TAG TGA ACG GCC TTT CAA GAA TTC GAG GAC TAG CCG TAA TCG TCA CAA AAT CCG ACC ATTA GTC  
 399 D R V T T I T C R A S Q G I S S A L A W Y Q  
 190 CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG GAA AGT GGG GTC  
 GTC TTT GGT CCC TTT CAA GAA TTC GAG GAC TAG ATR CTA CCG AAG TCA AHC CTT TCA CCC CAG  
 609 Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V  
 253 CCA TCA AAG TTC AGC GGC AGT GAA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC ACC ACC CTC CAG  
 GGT AGT TCC AAG TCG CCG TCA CCT AAG CCC TGT CTA AAG TGA GAG TGG TAG TCG TCG GAC GTC  
 819 P S R F S G S G T D F T L T I S S L Q  
 316 CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG TTT AAT AGT TAC CCG CTC ACT TTC GGC GAA  
 GAA CTT CTA AAA CGT TGA ATR ATG AGR GTT GTC AAA TTA TCA ATG GGC AAG TGA AAG CCG CCT  
 1029 P E D F A T Y Y C Q Q Q F N S Y P L L T F G G  
 379 GAG ACC AAG GTG GAG ATC AAA GAT ACG GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT  
 CCC TGG TTC CAC CTC TAG TTT GCA TGC CAC CAA CGT GGT AGR CAG AAG TAG AAG GGC GGT AGR  
 1239 G T K V E I K R T V A A P S V I F P P S  
 442 GAT GAG CAG TTG AAA TCT GAA ACT GCC TCT GTT GTC TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGR  
 CTA CTC GTC AHC TTT AGR CCT TGA CCG AGR CAA CAC ACG TTA TTG AAG ATR GGG TCT  
 1449 D E Q L K S G T A S V C L L N F Y P R  
 505 GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AHC GCC CTC CAA TCG GGT AHC TCC CAG GAG AGT GTC  
 CTC CCG TTT CAT GTC ACC TTC CAC CTA TTG CCG GAG GTT AHC CCA TTG AAG GTC CTC TCA CAG  
 1659 E A K V Q W K Y D N A L Q S G N S Q E S V  
 568 ACA GAG CAG GAC AAG ACC AAG GAC ACC TAC AAG CTC ACC CTC ACG CTG AAG CTA GGC AAA GCA  
 TGT CTC GTC CTG TCG TTC CTG TCG TCG AAG TCG  
 1869 T E Q D S K D S T Y S L S S T L L T L S K A  
 631 GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AAG TCG CCC GTC  
 CTG ATG CTC TTT GAG TTT CAG ATG CCG ACG CTT CAG TGG GTA GTC CTC CCG GAC TCG AAG GGG CAG  
 2079 D Y E K H K K Y Y A C E Y T H Q G L S S P Y  
 694 ACA AAG ACC TTC AHC AAG GGA GAG TGT TGAATTC  
 TGT TTC TCG AAG TTG TCC CCT ACA ACTTAAAG  
 2289 T K S F N R G E E C  
 Esaki  
 Esaki

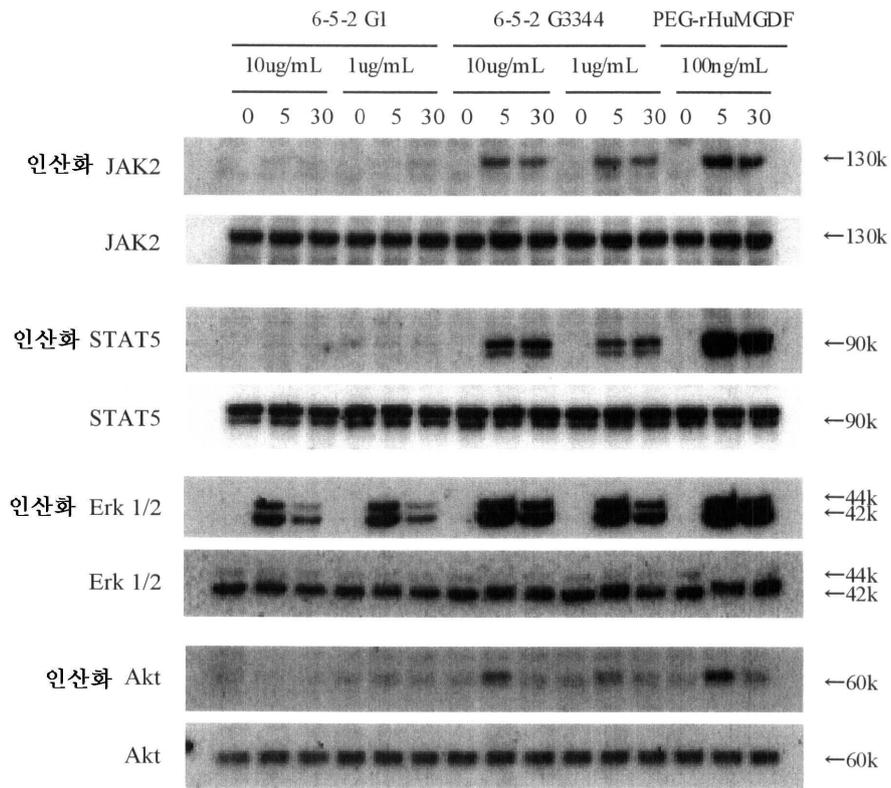
도면5



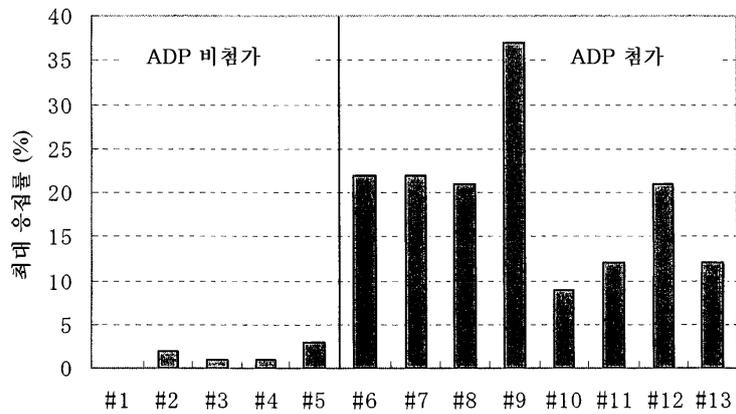
도면6A



도면6B

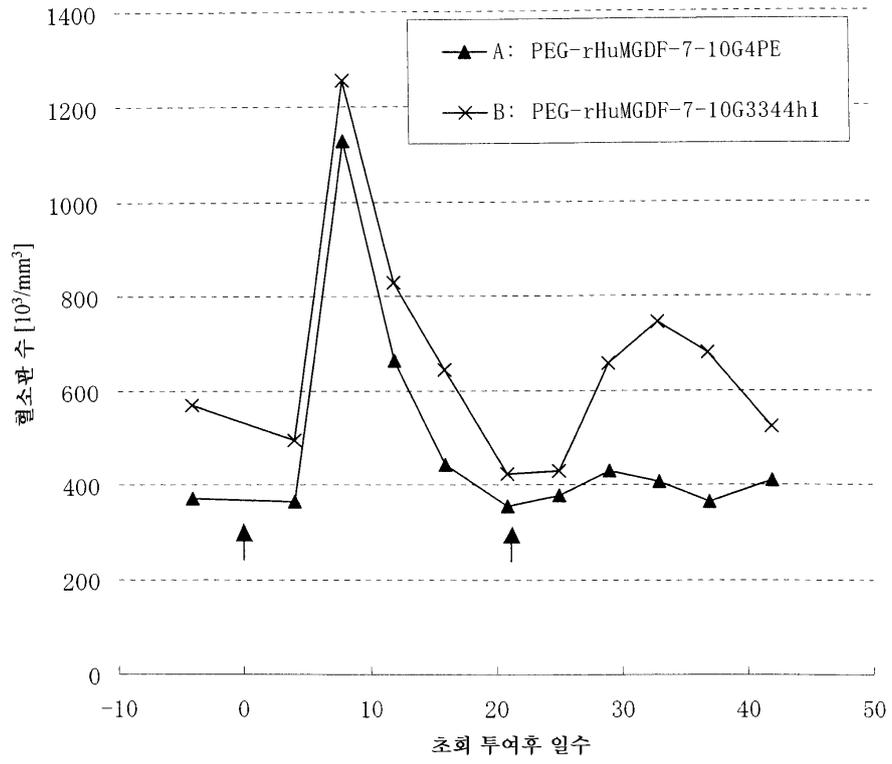


도면7

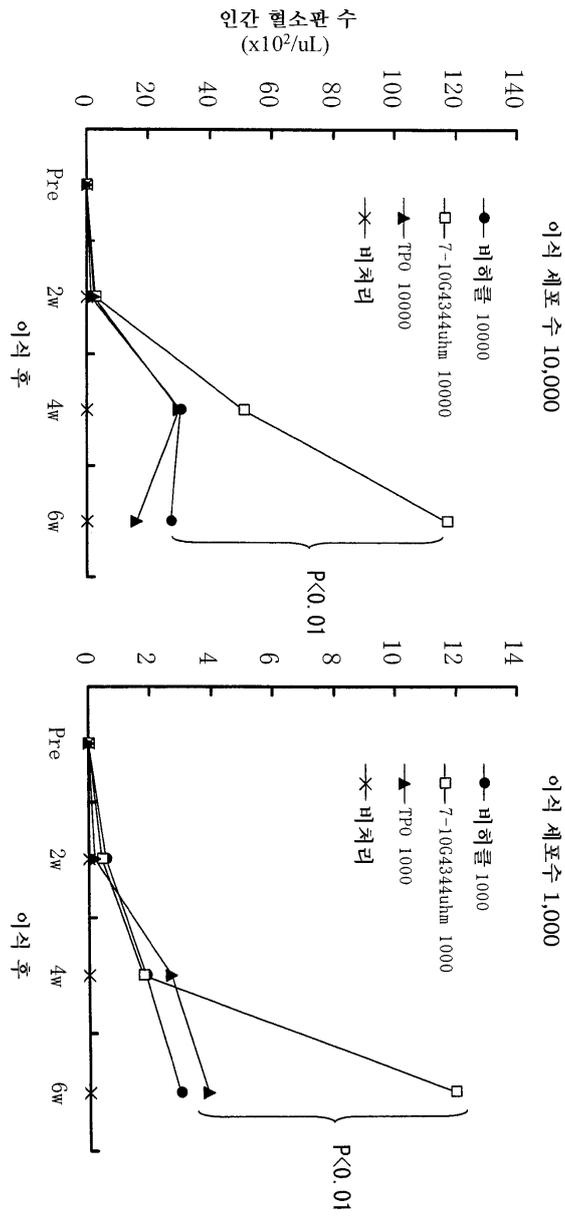


- #1 7-10 G1 (10ug/ml)
- #2 7-10 G3311 (10ug/ml)
- #3 4-49 G1 (10ug/ml)
- #4 4-49 G3311 (10ug/ml)
- #5 2-35 G1 (10ug/ml)
- #6 ADP + 7-10 G1 (10ug/ml)
- #7 ADP + 7-10 G3311 (10ug/ml)
- #8 ADP + 4-49 G1 (10ug/ml)
- #9 ADP + 4-49 G3311 (10ug/ml)
- #10 ADP + 2-35 G1 (10ug/ml)
- #11 ADP + PEG-rHuMGDF (0.01ug/ml)
- #12 ADP + PEG-rHuMGDF (0.1ug/ml)
- #13 ADP + PBS

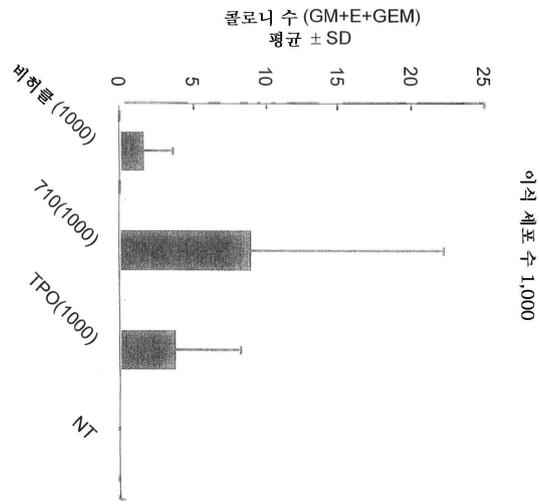
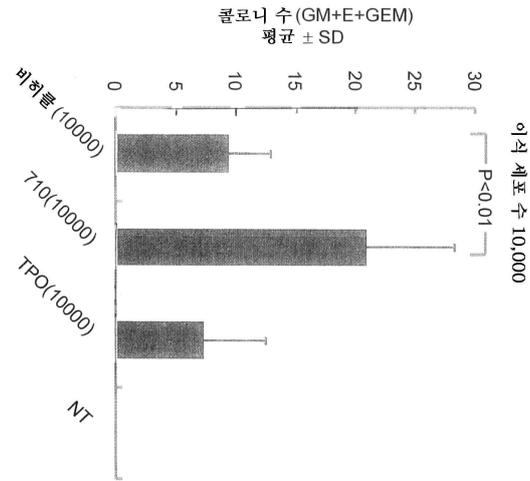
도면8



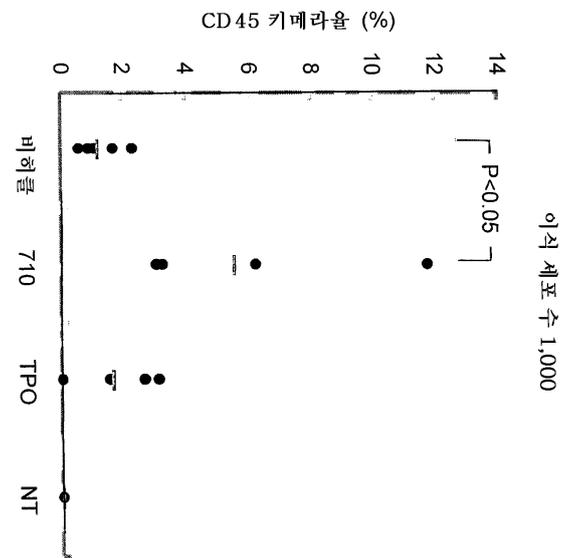
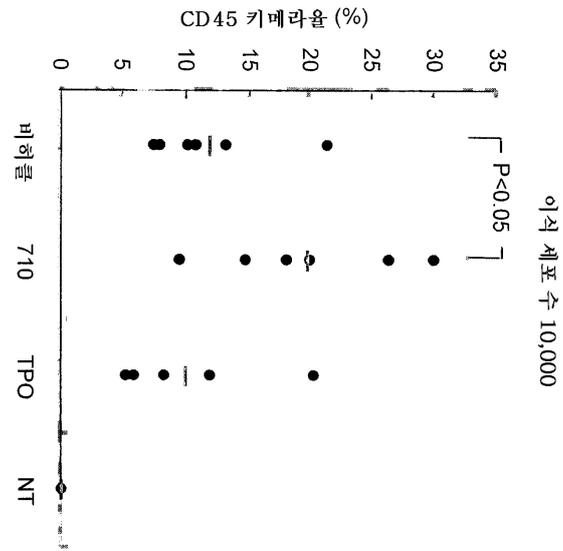
도면9A



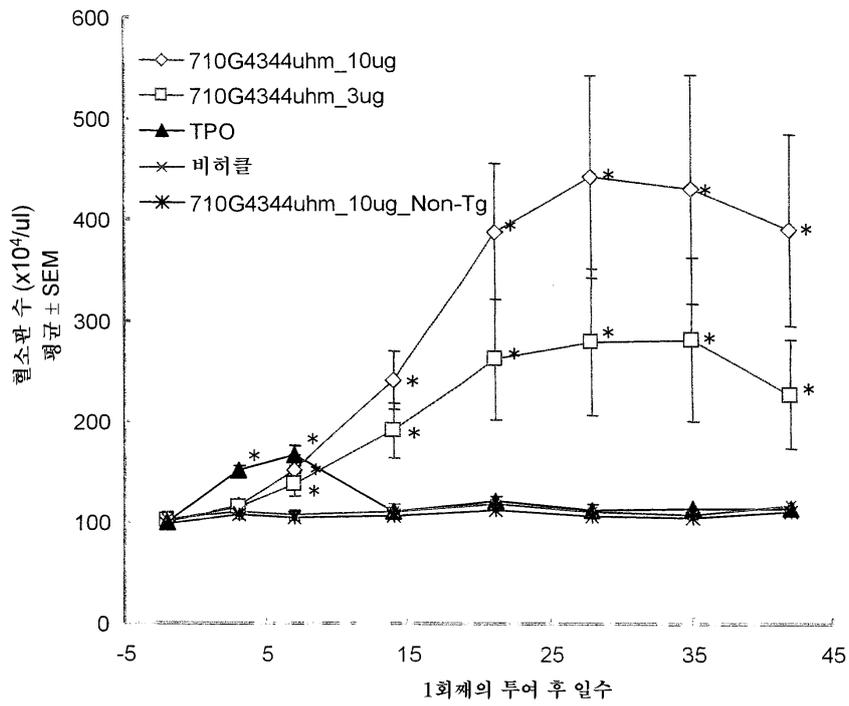
도면9B



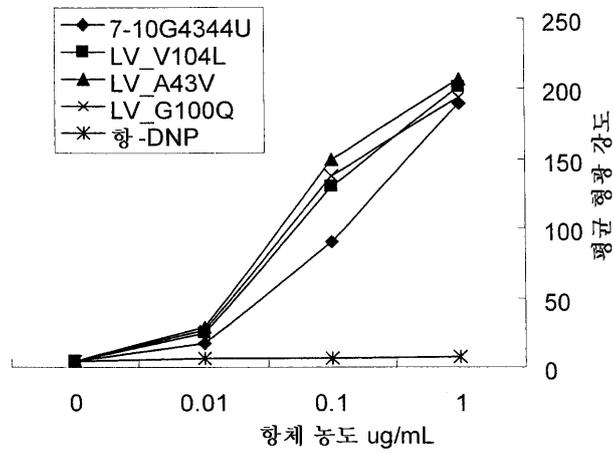
도면9C



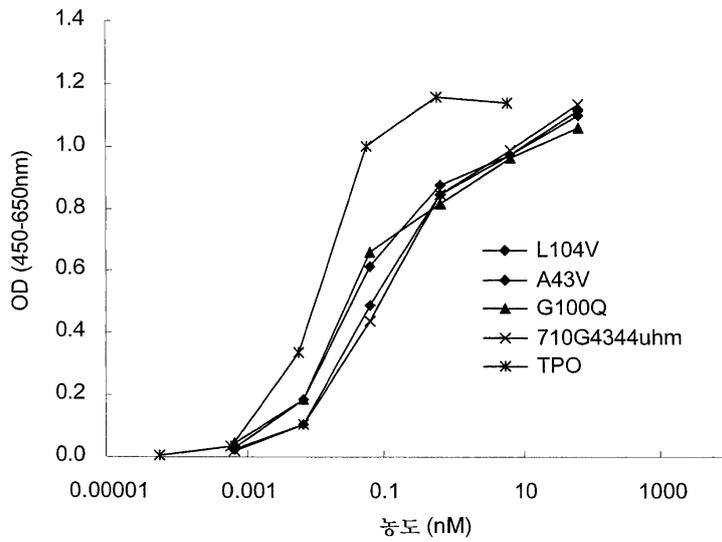
도면10



도면11



도면12



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Kirin Beer Kabushiki Kaisha

<120> Agonist antibodies to human thrombopoietin receptor

<130> PH-3098-PCT

<150> JP 2006-81322

<151> 2006-03-23

<150> JP 2006-299554

<151> 2006-11-02

<160> 94

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 163

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu

1

5

10

15

Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val  
 20 25 30

His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu  
 35 40 45

Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu  
 50 55 60

Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln  
 65 70 75 80

Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln  
 85 90 95

Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu  
 100 105 110

Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe  
 115 120 125

Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu  
 130 135 140

Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala  
 145 150 155 160

Val Pro Ser

<210> 2  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

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

20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Lys Asn Leu Trp Phe Gly Glu Phe Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu  
 100 105 110

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

<210> 3  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 3  
 Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala  
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 4  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4  
 Glu Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Lys Ala Leu Trp Phe Gly Glu Phe Pro His Tyr Tyr Gly Met Asp  
 100 105 110

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

<210> 5  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 5

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Thr  
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 6

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asn Tyr  
 20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Asp Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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



<213> Homo sapiens

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Cys Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1                   5                   10                   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
           20                   25                   30

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

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
           50                   55                   60

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

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

Ala Lys Pro Ile Trp Phe Gly Glu Trp Gly Asn Tyr Tyr Gly Met Asp  
                   100                   105                   110

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

<210> 9

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1                   5                   10                   15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
           20                   25                   30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
           35                   40                   45

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60

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

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

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 10  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: mutated hinge

Domain UH1G3uh

<400> 10  
 Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr  
 1 5 10

<210> 11  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: mutated hinge  
 Domain UH2G3uhm

<400> 11  
 Glu Ser Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr  
 1 5 10

<210> 12  
 <211> 42

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 12  
 agagagagag gaattcgcca ccatgccctc ctgggcctc tt 42

<210> 13  
 <211> 43  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 13  
 agagagagag cggccgctca aggctgctgc caatagctta gtg 43

<210> 14  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 14  
 gtaaaacgac ggccagtg 18

<210> 15  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 15  
 caggaacag ctatgac 17

<210> 16  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 16  
 ctgctgctgc ttaggtcgca gtttctgca cactac 36

<210> 17  
 <211> 491  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 17  
 Met Pro Ser Trp Ala Leu Phe Met Val Thr Ser Cys Leu Leu Leu Ala  
 1 5 10 15

Pro Gln Asn Leu Ala Gln Val Ser Ser Gln Asp Val Ser Leu Leu Ala  
 20 25 30

Ser Asp Ser Glu Pro Leu Lys Cys Phe Ser Arg Thr Phe Glu Asp Leu  
 35 40 45

Thr Cys Phe Trp Asp Glu Glu Glu Ala Ala Pro Ser Gly Thr Tyr Gln  
 50 55 60

Leu Leu Tyr Ala Tyr Pro Arg Glu Lys Pro Arg Ala Cys Pro Leu Ser  
 65 70 75 80

Ser Gln Ser Met Pro His Phe Gly Thr Arg Tyr Val Cys Gln Phe Pro  
 85 90 95

Asp Gln Glu Glu Val Arg Leu Phe Phe Pro Leu His Leu Trp Val Lys  
 100 105 110

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



Glu Glu Lys Thr Asn Pro Gly Leu Gln Thr Pro Gln Phe Ser Arg Cys  
 340 345 350

His Phe Lys Ser Arg Asn Asp Ser Ile Ile His Ile Leu Val Glu Val  
 355 360 365

Thr Thr Ala Pro Gly Thr Val His Ser Tyr Leu Gly Ser Pro Phe Trp  
 370 375 380

Ile His Gln Ala Val Arg Leu Pro Thr Pro Asn Leu His Trp Arg Glu  
 385 390 395 400

Ile Ser Ser Gly His Leu Glu Leu Glu Trp Gln His Pro Ser Ser Trp  
 405 410 415

Ala Ala Gln Glu Thr Cys Tyr Gln Leu Arg Tyr Thr Gly Glu Gly His  
 420 425 430

Gln Asp Trp Lys Val Leu Glu Pro Pro Leu Gly Ala Arg Gly Gly Thr  
 435 440 445

Leu Glu Leu Arg Pro Arg Ser Arg Tyr Arg Leu Gln Leu Arg Ala Arg  
 450 455 460

Leu Asn Gly Pro Thr Tyr Gln Gly Pro Trp Ser Ser Trp Ser Asp Pro  
 465 470 475 480

Thr Arg Val Glu Thr Ala Thr Glu Thr Ala Trp  
 485 490

- <210> 18
- <211> 31
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 18  
 tcttgccac cttggtgttg ctgggcttgt g

<210> 19  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 19  
gttgaagctc tttgtgacgg gcgagc 26

<210> 20  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 20  
aggcacacaa cagaggcagt tccagatttc 30

<210> 21  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 21  
gctggagggc acggtcacca cgctg 25

<210> 22  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 22  
 tgcacgccgc tggtcagggc gcctgagttc c 31

<210> 23  
 <211> 426  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 23  
 atggagtgg gactgagctg gattttcctt ttggctatth taaaaggtgt ccagtgtgaa 60  
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gcaggtccct gagactctcc 120  
 tgtgcagcct ctggattcac ctttgatgat tatgccatgc actgggtccg gcaagctcca 180  
 gggaagggcc tggagtgggt ctcaggtatt agttggaata gtgtagcat aggctatgcg 240  
 gactctgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc cctgtatctg 300  
 caaatgaaca gtctgagagc tgaggacacg gccttgtatt actgtgcaaa aaatctatgg 360  
 ttcggggagt tccgttactg gtacttcgat ctctggggcc gtggcacct  
 ggtcactgtc 420  
 tcctca 426

<210> 24  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 24  
 Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly  
 1 5 10 15  
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 20 25 30  
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45  
 Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60  
 Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala  
 65 70 75 80  
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
 85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asn Leu Trp Phe Gly Glu Phe Arg Tyr Trp Tyr  
 115 120 125

Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 130 135 140

<210> 25  
 <211> 387  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 25  
 atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggtttctgc tgctctggct cccaggtgcc 60  
 agatgtgcca tccagttgac ccagctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120  
 gtccaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagcagtg ctttagcctg gtatcagcag 180  
 aaaccagga aagctcctaa gctcctgac tatgatgct ccagtttga aagtggggtc 240  
 ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctaccat cagcagcctg 300  
 cagcctgaag attttgaac ttattactgt caacagtta atagttacc gctcactttc 360  
 ggccggaggga ccaaggtgga gatcaaa 387

<210> 26  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 26  
 Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly  
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45

Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala  
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
 85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asn Leu Trp Phe Gly Glu Phe Arg Tyr Trp Tyr  
 115 120 125

Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 130 135 140

<210> 27  
 <211> 429  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 27  
 atggagttgg gactgagctg gattttcctt gtggctatTT taaaaggtgt ccagtgtgaa 60  
 gagcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gcaggtccct gagactctcc 120  
 tgtacagcct ctggattcac ctttgatgat tatgccatgt actgggtccg gcaagtcca 180  
 gggaagggcc tggagtgggt ctcaggtatt agttggaaca gtggtagcat aggctatgcg 240  
 gactctgtga agggccgatt caccgtttcc agagacaacg ccaagaactc cctgtatctg 300  
 caaatgaaca gtctgagagc tgaggacacg gccttatatt actgtgcaaa agccctatgg 360  
 ttcggggagt tccccacta ctacggtatg gacgtctggg gccaaggac  
 cacggtcacc 420  
 gtctcctca 429

<210> 28  
 <211> 143  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 28  
 Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly  
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 20 25 30

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



Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser  
 35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Thr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys  
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val  
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 100 105 110

Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 115 120 125

Lys Arg  
 130

<210> 31

<211> 423

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

atggaattgg gactgagctg gattttcctt ttggctatth taaaaggtgt ccagtgtgaa 60  
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gcaggtccct gagactctcc 120  
 tgtgcaacct ctggattcac ctttgataat tatgccatgt actgggtccg gcaagctcca 180  
 gggaagggcc tggagtgggt ctcaggtatt agttggaata gtggtgacat aggctatgcg 240  
 gactctgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc cctgtatctg 300  
 caaatgaaca gtctgagagc tgaggacacg gccttgtatt actgtgcaag ggatgcgggg 360  
 ttcggggagt tccactacgg tctggacgtc tggggccaag ggaccacggt  
 caccgtctcc 420  
 tca 423

<210> 32

<211> 141  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 32  
 Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly  
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45

Asp Asn Tyr Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Asp Ile Gly Tyr Ala  
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
 85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Gly Phe Gly Glu Phe His Tyr Gly Leu  
 115 120 125

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 130 135 140

<210> 33  
 <211> 390  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 33  
 atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggcttctgc tgctctggct cccaggtgcc 60  
 agatgtgccca tccagttgac ccagctcctca tctcctctgt ctgcatctgt aggagacaga 120  
 gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagcagtg ctttagcctg gtatcagcag 180  
 aaaccagggga aagttcctaa gctcctgac tatgatgcct ccagtttggga aagtggggtc 240  
 ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagattca ctctcacat cagcagcctg 300  
 cagcctgaag attttgcac ttattactgt caacagtta atagttacc gtggacgttc 360

ggccaagga ccaaggtgga aatcaaact

390

<210> 34  
 <211> 130  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 34  
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp  
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser  
 35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys  
 50 55 60

Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val  
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 100 105 110

Phe Asn Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 115 120 125

Lys Arg  
 130

<210> 35  
 <211> 429  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 35  
atggagtgg gactgagctg gattttcctt ttggctatatt taaaagggtg ccagtgtgaa 60  
gtgcaactgg tggagtgtgg gggaggcttg gtacagcctg gcaggtccct gagactctec 120  
tgtgcagcct ctggattcac ctttgatgat tatgccatgc actgggtccg gcaagctcca 180  
gggaagggcc tggagtgggt ctccaggtatt agttggaata gtggtagtat aggttatgcg 240  
gactctgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc cctgtatctg 300  
caaatgaaca gtctgagagc tgaggacacg gccttgtatt actgtgcaaa acctatatgg 360  
ttcggggagt ggggaaacta ctacggtatg gacgtctggg gccaagggac  
cacggtcacc 420  
gtctcctca 429

<210> 36  
<211> 143  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 36  
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly  
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Cys Gly Gly Gly Leu Val Gln  
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
35 40 45

Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala  
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Ile Trp Phe Gly Glu Trp Gly Asn Tyr Tyr  
115 120 125

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
130 135 140

<210> 37  
 <211> 387  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 37  
 atggaaaccc cagcgcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60  
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120  
 ctctctctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180  
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat gatgcatcca gcagggccac tggcatcca 240  
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300  
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgat caccttcggc 360  
 caagggacac gactggagat taaacgt 387

<210> 38  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 38  
 Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
 1 5 10 15  
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser  
 20 25 30  
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
 35 40 45  
 Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
 50 55 60  
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro  
 65 70 75 80  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 85 90 95  
 Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr  
 100 105 110

Gly Ser Ser Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
115 120 125

Arg

<210> 39  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 39  
agagagagag gtcgaccacc atggagttgg gactgagctg gattt 45

<210> 40  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 40  
agagagagag gctagctgag gagacagtga ccagggtgcc 40

<210> 41  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 41  
agagagagag gtcgaccacc atggagttgg gactgagctg gattt 45

<210> 42  
<211> 37

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 42  
 agagagagag gctagctgag gagacggtga ccgtggt 37

<210> 43  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 43  
 agagagagag atctctcacc atggacatga ggtccccgc tc 42

<210> 44  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 44  
 agagagagag cgtacgtttg atctccacct tggtcctcc 40

<210> 45  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 45  
 agagagagag atctctcacc atgagggtcc ccgctcagct c 41

<210> 46  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 46  
agagagagag cgtacgtttg atttcacct tggtccttg gc 42

<210> 47  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 47  
agagagagag atctctcacc atggacatga ggtcccccgc tcagc 45

<210> 48  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 48  
agagagagag cgtacgtttg atttcacct tggtccttg 40

<210> 49  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 49

agagagagag atctctcacc atggaaaccc cagcgcagct tctcttc

47

<210> 50

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 50

agagagagag cgtacgttta atctccagtc ggtcccttg gc

42

<210> 51

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 51

agagagagag gtcgaccacc atggaattgg gactgagctg gatttt

46

<210> 52

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 52

agagagagag gctagctgag gagacggtga ccgtggt

37

<210> 53

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 53

agagagagag gtcgaccacc atggagttgg gactgagctg gattt 45

<210> 54

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 54

agagagagag gctagctgag gagacggtga cctggtc 38

<210> 55

<211> 376

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

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

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

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly  
35 40 45

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

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr  
65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg

85

90

95

Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg  
100 105 110

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys  
115 120 125

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro  
130 135 140

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala  
145 150 155 160

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
165 170 175

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
180 185 190

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val  
195 200 205

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Leu Arg Glu Glu Gln  
210 215 220

Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
225 230 235 240

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
245 250 255

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro  
260 265 270

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr  
275 280 285

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
290 295 300

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 305 310 315 320

Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 325 330 335

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe  
 340 345 350

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys  
 355 360 365

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 370 375

<210> 56  
 <211> 1133  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 56  
 ctagacacaa gggcccatcg gtcttcccc tggcgccctg ctccaggagc acctctgggg 60  
 gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg acggtgtcgt 120  
 ggaactcagg cgcctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtctcag 180  
 gacttactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagtttgggc acccagacct 240  
 acactgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttagactca 300  
 aaacccact tggtagacaca actcacacat gccacgggtg cccagagccc aaatcttgtg 360  
 acacacctcc cccgtgccca cgggtgccag agcccaaatac ttgtgacaca  
 cctccccat 420  
 gcccacgggtg cccagagccc aaatcttgtg acacacctcc cccgtgccca aggtgcccag 480  
 cacctgaact cctgggagga cgcgtcagtct tctcttccc cccaaaacc aaggataccc 540  
 ttatgatttc cggaccct gaggtcacgt gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc 600  
 ccgaggtcca gttcaagtgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc 660  
 tgcgggagga gcagtacaac agcacgttcc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctctgacc 720  
 aggactggct gaacggcaag gactacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagccc 780  
 ccatcgagaa aaccatctcc aaaaccaaag gacagccccg  
 agaaccacag gtgtacacc 840  
 tgccccate ccgggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag 900  
 gcttctacce cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact 960  
 acaacaccac gcttccatg ctgactccg acggctcctt cttctctac agcaagctca 1020  
 ccgtggacaa gacaggtgg cagcagggga acatcttctc atgctcctg atgcatgagg 1080  
 ctctgcacaa ccgctacag cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 1133

<210> 57  
 <211> 27  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 57

gggtacgtcc tcacattcag tgatcag

27

<210> 58

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 58

gtcttcgtgg ctcacgtcca ccaccagca

30

<210> 59

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 59

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac

30

<210> 60

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 60

tgatcatacg tagatatcac ggc

23

<210> 61  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 61  
ggtgtacacc tgggctctc ggggctgcc 30

<210> 62  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 62  
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc 30

<210> 63  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 63  
agagaggcta gcaccaaggg cccatcg 27

<210> 64  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 64

gaactcaggt gctgggcacc ttgggcacg

29

<210> 65

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 65

ccaagtgcc cagcacctga gttcgagggg gga

33

<210> 66

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 66

agagagggat ctcatttac ccagagacag gga

33

<210> 67

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 67

agagaggcta gcaccaaggg gccatcc

27

<210> 68

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 68

ggttttgagc tcaactctct tgtccacctt ggtgttgc 38

<210> 69

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 69

gtggacaaga gagttgagct caaaaccca cttggtgaca 40

<210> 70

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 70

aggtgctggg caccgtgggc atgtgtgagt tgt 33

<210> 71

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 71

cacacatgcc cacggtgcc agcactgag ttc 33

<210> 72  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 72  
 tgtgtgagtt gtgtcaccaa gtggggtttt ggactcaact ctcttgcctca ccttgggt 57

<210> 73  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 73  
 accccacttg gtgacacaac tcacacatgc ccaccatgcc cagcacctga gttcgag 57

<210> 74  
 <211> 347  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: G3344h1

<400> 74  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro  
 100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg  
 115 120 125

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
 130 135 140

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
 145 150 155 160

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn  
 165 170 175

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
 180 185 190

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 195 200 205

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
 210 215 220

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
 225 230 235 240

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu  
 245 250 255

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 260 265 270

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 275 280 285

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 290 295 300

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly  
 305 310 315 320

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
 325 330 335

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 340 345

<210> 75

<211> 377

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: G3344

<400> 75

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85

90

95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro  
 100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg  
 115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys  
 130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro  
 145 150 155 160

Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 180 185 190

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
 195 200 205

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

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 245 250 255

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met  
 275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 305 310 315 320

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val  
 340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 370 375

<210> 76

<211> 377

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: G4344

<400> 76

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 Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro  
 100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg  
 115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys  
 130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro  
 145 150 155 160

Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 180 185 190

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
 195 200 205

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

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 245 250 255

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met  
 275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn



Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro  
 100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg  
 115 120 125

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
 130 135 140

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
 145 150 155 160

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn  
 165 170 175

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
 180 185 190

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 195 200 205

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
 210 215 220

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
 225 230 235 240

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu  
 245 250 255

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 260 265 270

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 275 280 285

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 290 295 300

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly  
 305 310 315 320

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
 325 330 335

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 340 345

<210> 78  
 <211> 257  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: G4344uh

<400> 78  
 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 Leu Met Ile Ser  
 50 55 60

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp  
 65 70 75 80

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 85 90 95

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
 100 105 110

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 115 120 125

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



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 Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro  
 100 105 110

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
 115 120 125

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
 130 135 140

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
 145 150 155 160

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 165 170 175

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
 180 185 190

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
 195 200 205

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
 210 215 220

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln  
 225 230 235 240

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 245 250 255

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
 260 265 270

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
 275 280 285

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu  
 290 295 300

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 305 310 315 320

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 325 330

<210> 80

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: G4PE

<400> 80

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

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85

90

95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

Glu 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> 81  
 <211> 1425  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: 7-10G4344uhm H chain

<400> 81  
 atggagtgg gactgagctg gattttcctt ttggctatth taaaagggtg ccagtgtgaa 60  
 gtgcagctgg tggagctctg gggaggcttg gtacagcctg gcaggtccct gagactctcc 120  
 tgtgcagcct ctggattcac ctttgatgat tatgccatgc actgggtccg gcaagctcca 180  
 gggaagggcc tggagtgggt ctgaggtatt agttggaata gtggtagcat aggctatgcg 240  
 gactctgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc cctgtatctg 300  
 caaatgaaca gtctgagagc tgaggacacg gccttgtatt actgtgcaaa aaatctatgg 360  
 ttcggggagt tccgttactg gtacttcgat ctctggggcc gtggcacct  
 ggtcactgtc 420  
 tcctcagcta gcaccaaggg gccatcggtc ttccccctgg cgcctgctc caggagcacc 480  
 tccgagagca cagccgcctt gggtgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540  
 gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggctgtcaca ccttcccggc tctcctacag 600  
 tcctcaggac tctactcctt cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag ctggggcacg 660  
 aagacctaca cctgcaactg agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt 720  
 gagtcaaaaa ccccacttgg tgacacaact cacacatgcc caccatgccc agcacctgag 780  
 ttcgaggggg gaccatcagt ctctctgttc cccccaaac  
 ccaaggacac tctcatgatc 840  
 tcccggacce ctgaggtcac gtgctgtgtg gtggacgtga gccaggaaga ccccagggtc 900  
 cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 960  
 gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 1020  
 ctgaacggca aggagtaca gtgcaaggtc tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag 1080  
 aaaaccatct ccaagccaa agggcagccc cgagagccac aggtgtacac cctgccccca 1140  
 tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggttctac 1200  
 cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc  
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1260  
 acgctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctct acagcaggct aaccgtggac 1320  
 aagagcaggt ggcaggaggg gaatgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1380  
 aaccactaca cacagaagag cctctccctg tctctgggta aatga 1425

<210> 82  
 <211> 474  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 7-10G4344uhm H chain

<400> 82

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly  
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45

Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala  
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
 85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asn Leu Trp Phe Gly Glu Phe Arg Tyr Trp Tyr  
 115 120 125

Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
 130 135 140

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr  
 145 150 155 160

Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro  
 165 170 175

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val  
 180 185 190

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser  
 195 200 205

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr  
 210 215 220

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val  
 225 230 235 240

Glu Ser Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 245 250 255

Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp  
 290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 305 310 315 320

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 340 345 350

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu  
 370 375 380

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 405 410 415

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

420

425

430

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

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 465 470

<210> 83

<211> 711

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 7-10G4344uhm L chain

<400> 83

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggcttctgc tgctctggct cccaggtgcc 60  
 agatgtgcc tccagttgac ccagctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120  
 gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagcagtg ctttagcctg gtatcagcag 180  
 aaaccagga aagctcctaa gctcctgac tatgatgcct ccagtttga aagtggggtc 240  
 ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctacccat cagcagcctg 300  
 cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagtta atagttacc getcactttc 360  
 ggccggagga ccaaggtgga gatcaaact acggtggctg caccatctgt  
 cttcatcttc 420  
 ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 480  
 ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 540  
 tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600  
 ctgacgctga gcaaagcaga ctacagaaa cacaaagtct acgctgcga agtcacccat 660  
 cagggcctga gctcgccctg cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgttg a 711

<210> 84

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 7-10G4344uhm L chain

<400> 84

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp  
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser  
 35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys  
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val  
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 100 105 110

Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
 130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
 145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
 165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
 180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
 195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
 210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys



<220>

<223> Description of Artificial Sequence:7-10VL\_G100Q (mutant)

<400> 86

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala  
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 87

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:7-10VL\_A43V (mutant)

<400> 87

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala  
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 88  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:7-10VL\_Y94F (mutant)

<400> 88

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala  
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Phe Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 89  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<222> 9..9  
<223> Xaa is Ala or Thr

<400> 89

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Xaa Leu Ala  
1 5 10

<210> 90  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 90

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser  
1 5

<210> 91  
<211> 9

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<222> 8..8  
<223> Xaa is Leu, Tyr or Trp

<400> 91

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Xaa Thr  
1 5

<210> 92  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 92

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 93  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 93

Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

<210> 94  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 94

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Ile Thr  
1 5

58/58