(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0130562
(43) 공개일자 2019년11월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 35/17* (2014.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 47/68* (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7024625
(22) 출원일자(국제) 2018년01월23일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2019년08월22일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2018/073863
(87) 국제공개번호 WO 2018/133877
국제공개일자 2018년07월26일
(30) 우선권주장
201710058581.8 2017년01월23일 중국(CN)
201710920346.7 2017년09월30일 중국(CN)

(71) 출원인
카르스젠 테라퓨틱스 컴퍼니, 리미티드
중국, 상하이 200231, 쉬후이 디스트릭트, 인두 로드 388번, 빌딩 비
(72) 발명자
왕 평
중국 상하이 200231 쉬후이 디스트릭트 인두 로드 388번 빌딩 비
왕 후아마오
중국 상하이 200231 쉬후이 디스트릭트 인두 로드 388번 빌딩 비
지앙 후아
중국 상하이 200231 쉬후이 디스트릭트 인두 로드 388번 빌딩 비
(74) 대리인
제일특허법인(유)

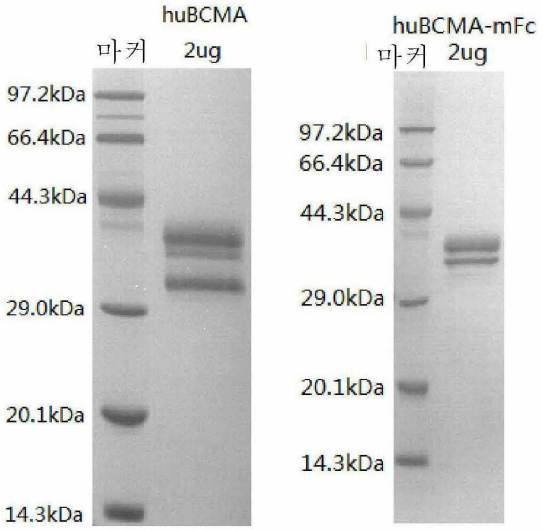
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 **BCMA 표적 항체 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 BCMA의 특이 항체 및 BCMA를 표적으로 하는 면역 효과기 세포에 관한 것으로서, 본 발명은 또한 상기 항체를 이용하여 제조된 키메라 항원 수용체 변형된 T 세포 및 이의 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 47/68 (2017.08)
A61K 47/6803 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C12N 15/63 (2013.01)
G01N 33/574 (2013.01)
G01N 33/57492 (2013.01)
G01N 33/68 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
G01N 2333/70578 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

(1) 서열번호 1, 60 또는 62에 의해 표시되는 HCDR1, 및/또는 서열번호 2, 61 또는 63에 의해 표시되는 HCDR2, 및/또는 서열번호 3, 4 또는 5에 의해 표시되는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체;

(2) 서열번호 6에 의해 표시되는 LCDR1, 및/또는 서열번호 7에 의해 표시되는 LCDR2, 및/또는 서열번호 8, 9 또는 10에 의해 표시되는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체;

(3) (1)에 따른 항체의 중쇄 가변 영역 및 (2)에 따른 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체; 및

(4) (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 따른 항체의 변이체이고 (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 따른 항체와 동일하거나 유사한 활성을 갖는 항체

로 이루어진 군으로부터 선택되는 B 세포 성숙 항원(BCMA) 표적 항체.

청구항 2

제1항에 있어서,

(1) 서열번호 1에 의해 표시되는 HCDR1, 서열번호 2에 의해 표시되는 HCDR2, 서열번호 3에 의해 표시되는 HCDR3, 서열번호 6에 의해 표시되는 LCDR1, 서열번호 7에 의해 표시되는 LCDR2 및 서열번호 8에 의해 표시되는 LCDR3을 포함하는 항체;

(2) 서열번호 1에 의해 표시되는 HCDR1, 서열번호 2에 의해 표시되는 HCDR2, 서열번호 4에 의해 표시되는 HCDR3, 서열번호 6에 의해 표시되는 LCDR1, 서열번호 7에 의해 표시되는 LCDR2 및 서열번호 9에 의해 표시되는 LCDR3을 포함하는 항체;

(3) 서열번호 1에 의해 표시되는 HCDR1, 서열번호 2에 의해 표시되는 HCDR2, 서열번호 5에 의해 표시되는 HCDR3, 서열번호 6에 의해 표시되는 LCDR1, 서열번호 7에 의해 표시되는 LCDR2 및 서열번호 10에 의해 표시되는 LCDR3을 포함하는 항체;

(4) 서열번호 60에 의해 표시되는 HCDR1, 서열번호 61에 의해 표시되는 HCDR2, 서열번호 5에 의해 표시되는 HCDR3, 서열번호 6에 의해 표시되는 LCDR1, 서열번호 7에 의해 표시되는 LCDR2 및 서열번호 10에 의해 표시되는 LCDR3을 포함하는 항체;

(5) 서열번호 62에 의해 표시되는 HCDR1, 서열번호 63에 의해 표시되는 HCDR2, 서열번호 5에 의해 표시되는 HCDR3, 서열번호 6에 의해 표시되는 LCDR1, 서열번호 7에 의해 표시되는 LCDR2 및 서열번호 10에 의해 표시되는 LCDR3을 포함하는 항체; 및

(6) (1) 내지 (5) 중 어느 하나에 따른 항체의 변이체이고 (1) 내지 (5) 중 어느 하나에 따른 항체와 동일하거나 유사한 활성을 갖는 항체

로 이루어진 군으로부터 선택되는 BCMA 표적 항체.

청구항 3

제1항에 있어서,

(1) 중쇄 가변 영역이 서열번호 13에 의해 표시되는 아미노산 서열, 서열번호 17에 의해 표시되는 아미노산 서열, 서열번호 21에 의해 표시되는 아미노산 서열, 서열번호 56에 의해 표시되는 아미노산 서열, 또는 서열번호 58에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖는 항체;

(2) 경쇄 가변 영역이 서열번호 11에 의해 표시되는 아미노산 서열, 서열번호 15에 의해 표시되는 아미노산 서열, 또는 서열번호 19에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖는 항체;

(3) (1)에 따른 항체의 중쇄 가변 영역 및 (2)에 따른 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체; 및

(4) (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 따른 항체의 변이체이고 (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 따른 항체와 동일하거나 유사한 활성을 갖는 항체

로 이루어진 군으로부터 선택되는 BCMA 표적 항체.

청구항 4

제3항에 있어서,

(1) 중쇄 가변 영역이 서열번호 13에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖고 경쇄 가변 영역이 서열번호 11에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖는 항체;

(2) 중쇄 가변 영역이 서열번호 17에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖고 경쇄 가변 영역이 서열번호 15에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖는 항체;

(3) 중쇄 가변 영역이 서열번호 21에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖고 경쇄 가변 영역이 서열번호 19에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖는 항체;

(4) 중쇄 가변 영역이 서열번호 56에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖고 경쇄 가변 영역이 서열번호 19에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖는 항체;

(5) 중쇄 가변 영역이 서열번호 58에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖고 경쇄 가변 영역이 서열번호 19에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖는 항체; 및

(6) (1) 내지 (5) 중 어느 하나에 따른 항체의 변이체이고 (1) 내지 (5) 중 어느 하나에 따른 항체와 동일하거나 유사한 활성을 갖는 항체

로 이루어진 군으로부터 선택되는 BCMA 표적 항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 항체와 동일한 항원결정부위를 식별하는 항체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체를 코딩하는 핵산.

청구항 7

제6항에 따른 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 8

제7항에 따른 발현 벡터를 포함하거나 게놈 중에 제6항에 따른 핵산이 통합되는 숙주 세포.

청구항 9

BCMA를 발현하는 종양 세포를 특이적 표적으로 하는 표적 약물, 항체 약물 접합체 또는 다기능 항체를 제조하거나;

BCMA를 발현하는 종양을 진단하는 시약을 제조하거나;

바람직하게는, T 림프구, NK 세포 또는 NKT 림프구를 포함하는, 키메라 항원 수용체 변형된 면역 세포를 제조하기 위한,

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체의 용도.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체; 및

상기 항체와 연결되는 기능성 분자로서, 종양 표면 마커 표적 분자, 종양 억제 분자, 면역 세포의 표면 마커 표적 분자 및 검출가능 표지로부터 선택되는 기능성 분자

를 포함하는 다기능 면역접합체.

청구항 11

제10항에 있어서,

종양 억제 분자가 항종양 사이토카인 또는 항종양 독소이고, 바람직하게는, 상기 사이토카인이 IL-12, IL-15, I형 인터페론, TNF-α를 포함하는, 다기능 면역접합체.

청구항 12

제10항에 있어서,

면역 세포의 표면 마커 표적 분자가 면역 세포 표면 마커에 결합하는 항체 또는 리간드이고, 바람직하게는, 상기 면역 세포 표면 마커가 CD3, CD16, CD28을 포함하고, 보다 바람직하게는, 상기 면역 세포 표면 마커에 결합하는 항체가 항-CD3 항체인, 다기능 면역접합체.

청구항 13

제12항에 있어서,

면역 세포의 표면 마커 표적 분자가 T 세포 표면 마커에 결합하는 항체인, 다기능 면역접합체.

청구항 14

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 다기능 면역접합체를 코딩하는 핵산.

청구항 15

항종양 약물을 제조하거나;

BCMA를 발현하는 종양을 진단하는 시약을 제조하거나;

바람직하게는, T 림프구, NK 세포 또는 NKT 림프구를 포함하는, 키메라 항원 수용체 변형된 면역 세포를 제조하기 위한,

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 다기능 면역접합체의 용도.

청구항 16

세포외 도메인, 막관통 도메인 및 세포내 신호 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체로서,

상기 세포외 도메인이 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체를 포함하고, 바람직하게는, 상기 항체가 단일 쇄 항체 또는 도메인 항체인, 키메라 항원 수용체.

청구항 17

제16항에 있어서,

세포내 신호 도메인이 하나 이상의 공자극 신호 도메인 및/또는 1차 신호 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

청구항 18

제16항에 있어서,

힌지 도메인을 추가로 포함하는 키메라 항원 수용체.

청구항 19

제17항에 있어서,

막관통 도메인이 TCR의 α 쇄, β 쇄 및 ζ 쇄, 및 CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5,CD8α, CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, CD154 및 PD1의 막관통 영역으로 이루어진

군으로부터 선택되고/거나;

공자극 신호 도메인이 CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54, CD83, OX40, CD137, CD134, CD150, CD152, CD223, CD270, PD-L2, PD-L1, CD278, DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM, FcεRIγ, MyD88 및 41BBL의 세포내 신호 영역으로 이루어진 군으로부터 선택되고/거나;

1차 신호 도메인이 TCRζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278("ICOS"로도 지칭됨), CD66d 및 CD3ζ로 이루어진 군으로부터 선택되고,

바람직하게는, 상기 막관통 도메인이 CD8α, CD4, CD45, PD1, CD154 및 CD28의 막관통 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택되고/거나;

상기 공자극 신호 도메인이 CD137, CD134, CD28 및 OX40으로 이루어진 군으로부터 선택되고/거나;

상기 1차 신호 도메인이 CD3ζ로부터 선택되고,

가장 바람직하게는, 상기 막관통 도메인이 CD8α 및 CD28로부터 선택되고, 상기 공자극 신호 도메인이 CD137 또는 CD28의 세포내 신호 도메인으로부터 선택되고, 상기 1차 신호 도메인이 CD3ζ로부터 선택되는,

키메라 항원 수용체.

청구항 20

제16항에 있어서,

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체, CD8의 막관통 영역 및 CD3ζ;

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체, CD8의 막관통 영역, CD137의 세포내 신호 영역 및 CD3ζ;

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체, CD28의 막관통 영역, CD28의 세포내 신호 영역 및 CD3ζ; 또는

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체, CD28의 막관통 영역, CD28의 세포내 신호 영역, CD137 및 CD3ζ의 순서로 연결되는 항체, 막관통 영역 및 세포내 신호 영역을 포함하는 키메라 항원 수용체.

청구항 21

제16항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산.

청구항 22

제21항에 따른 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 23

제22항에 따른 발현 벡터를 포함하는 바이러스.

청구항 24

BCMA를 발현하는 종양 세포 표적 유전자 변형된 면역 세포를 제조하기 위한, 제16항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 키메라 항원 수용체, 제21항에 따른 핵산, 제22항에 따른 발현 벡터 또는 제23항에 따른 바이러스의 용도.

청구항 25

제21항에 따른 핵산, 제22항에 따른 발현 벡터 또는 제23항에 따른 바이러스가 형질도입되거나; 제16항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 키메라 항원 수용체가 발현되는, 유전자 변형된 면역 세포로서,

바람직하게는, T 림프구, NK 세포 및 NKT 세포로부터 선택되는 유전자 변형된 면역 세포.

청구항 26

제25항에 있어서,

제16항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 키메라 항원 수용체 이외의 다른 서열을 추가로 발현하되, 상기 다른

서열이 사이토카인, 다른 키메라 항원 수용체, 케모카인 수용체, PD-1 발현을 감소시키는 siRNA, PD-L1을 차단하는 단백질, TCR 또는 안전 스위치를 포함하는, 유전자 변형된 면역 세포로서,

바람직하게는, 상기 사이토카인이 IL-12, IL-15, IL-21 또는 I형 인터페론을 포함하고;

바람직하게는, 상기 케모카인 수용체가 CCR2, CCR5, CXCR2 또는 CXCR4를 포함하고;

바람직하게는, 상기 안전 스위치가 iCaspase-9, 절두된 EGFR 또는 RQR8을 포함하는,

유전자 변형된 면역 세포.

청구항 27

BCMA를 발현하는 종양을 억제하는 약물을 제조하기 위한, 제25항 또는 제26항에 따른 유전자 변형된 면역 세포의 용도.

청구항 28

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 상기 항체를 코딩하는 핵산;

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 면역접합체 또는 상기 면역접합체를 코딩하는 핵산;

제16항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 키메라 항원 수용체 또는 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산; 또는

제25항 또는 제26항에 따른 유전자 변형된 면역 세포

를 포함하는 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 종양 면역 치료 또는 진단 분야에 속한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명은 B 세포 성숙 항원(BCMA) 표적 항체 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 다발성 골수종(Multiple myeloma, MM)은 모든 암증 사망 예의 2 %를 차지하는 흔한 악성 혈액병이다. MM은 이종 질병이고 대부분이 t(11; 14), t(4; 14), t(8; 14), del(13), del(17)(다른를 제외한 이외)의 염색체 전위에 의한 것이다(Drach 등, (1998)Blood 92(3): 802-809; Gertz 등, (2005)Blood 106(8): 2837-2840; Facon 등., (2001)Blood 97(6): 1566-1571). 다발성 골수종의 주요 병세는 골수에서 형질세포가 무한적으로 증폭되고 농축되어 골괴사를 초래하는 것이다. MM에 걸린 환자는 골수 침윤, 골질 파괴, 신부전, 면역 결핍 및 암증 진단의 심리적 부담으로 인해 다양한 질병 관련 증상을 경험할 수 있다. 현재, 주요한 치료 방안은 화학 요법과 줄기 세포 이식이고, 화학 요법 약물은 주로 스테로이드(steroid), 탈리도마이드(Thalidomide), 레날리도마이드(lenalidomide), 레나도마이드(Lenadomide), 보르테조밉(bortezomib) 또는 다양한 세포 독소 시약의 조합이고, 젊은 환자의 경우 고용량 화학 요법을 자가 줄기 세포 이식과 함께 사용할 수 있습니다. 젊은 환자에 대해서는 의 조합으로, 고용량 화학 요법을받는 젊은 환자에게 사용할 수 있다.

[0003] BCMA(B-cell maturation antigen)는 B 세포 성숙 항원이고, 185개 아미노산 잔기로 구성된 III형 막관통 단백질이고, TNF 수용체 슈퍼패밀리에 속하고, 그 리간드는 아프릴(APRIL, proliferation inducing ligand), B 림프구 자극인자(BAFF)와 같은 TNF 슈퍼패밀리에 속하며, BCMA는 그 리간드와 결합한 후, B 세포의 증식 및 생존을 활성화시킬 수 있다. BCMA는 형질세포와 다발성 골수종 세포의 표면에 특이적으로 고발현되며, 조혈모세포와 다른 정상 조직 세포에서 발현되지 않음으로써 BCMA는 MM의 표적 치료의 이상적인 표적으로 사용될 수 있다.

[0004] 이를 감안하여, 본 분야는 BCMA에 대한 특이 항체 및 BCMA를 표적으로 하는 면역 효과기 세포가 시급히 필요하다.

발명의 내용

[0005] 본 발명의 목적은 BCMA에 대한 특이 항체 및 BCMA를 표적으로 하는 면역 효과기 세포를 제공하는 것이다.

[0006] 제1 양태에 있어서, 본 발명은 BCMA 표적 항체를 제공하며, 상기 항체는, (1) 중쇄 가변 영역을 포함하되, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 1, 60 또는 62에 의해 표시되는 HCDR1, 및/또는 서열번호 2, 61 또는 63에 의해 표시되는 HCDR2, 및/또는 서열번호 3, 서열번호 4 또는 서열번호 5 중 어느 하나에 의해 표시되는 HCDR3을 포함하는 항체;

[0007] (2) 경쇄 가변 영역을 포함하되, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 6에 의해 표시되는 LCDR1, 및/또는 서열번호 7에 의해 표시되는 LCDR2, 및/또는 서열번호 8, 서열번호 9 또는 서열번호 10 중 어느 하나에 의해 표시되는 LCDR3을 포함하는 항체;

[0008] (3) (1)에 따른 항체의 중쇄 가변 영역 및 (2)에 따른 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체;

[0009] (4) (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 따른 항체의 변이체이고 (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 따른 항체와 동일하거나 유사한 활성을 갖는 항체로부터 선택된다.

[0010] 구체적인 실시형태에 있어서, 상기 항체는, (1) 서열번호 1에 의해 표시되는 HCDR1, 서열번호 2에 의해 표시되는 HCDR2, 서열번호 3에 의해 표시되는 HCDR3 및 서열번호 6에 의해 표시되는 LCDR1, 서열번호 7에 의해 표시되는 LCDR2, 서열번호 8에 의해 표시되는 LCDR3을 포함하는 항체;

[0011] (2) 서열번호 1에 의해 표시되는 HCDR1, 서열번호 2에 의해 표시되는 HCDR2, 서열번호 4에 의해 표시되는 HCDR3 및 서열번호 6에 의해 표시되는 LCDR1, 서열번호 7에 의해 표시되는 LCDR2, 서열번호 9에 의해 표시되는 LCDR3을 포함하는 항체;

[0012] (3) 서열번호 1에 의해 표시되는 HCDR1, 서열번호 2에 의해 표시되는 HCDR2, 서열번호 5에 의해 표시되는 HCDR3 및 서열번호 6에 의해 표시되는 LCDR1, 서열번호 7에 의해 표시되는 LCDR2, 서열번호 10에 의해 표시되는 LCDR3을 포함하는 항체;

[0013] (4) 서열번호 60에 의해 표시되는 HCDR1, 서열번호 61에 의해 표시되는 HCDR2, 서열번호 5에 의해 표시되는 HCDR3 및 서열번호 6에 의해 표시되는 LCDR1, 서열번호 7에 의해 표시되는 LCDR2, 서열번호 10에 의해 표시되는 LCDR3을 포함하는 항체;

[0014] (5) 서열번호 62에 의해 표시되는 HCDR1, 서열번호 63에 의해 표시되는 HCDR2, 서열번호 5에 의해 표시되는 HCDR3 및 서열번호 6에 의해 표시되는 LCDR1, 서열번호 7에 의해 표시되는 LCDR2, 서열번호 10에 의해 표시되는 LCDR3을 포함하는 항체;

[0015] (6) (1) 내지 (5) 중 어느 하나에 따른 항체의 변이체이고 (1) 내지 (5) 중 어느 하나에 따른 항체와 동일하거나 유사한 활성을 갖는 항체로부터 선택된다.

[0016] 구체적인 실시형태에 있어서, 상기 항체는, (1) 중쇄 가변 영역이 서열번호 13에 의해 표시되는 아미노산 서열, 서열번호 17에 의해 표시되는 아미노산 서열, 서열번호 21에 의해 표시되는 아미노산 서열, 서열번호 56에 의해 표시되는 아미노산 서열, 또는 서열번호 58에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖는 항체;

[0017] (2) 경쇄 가변 영역이 서열번호 11에 의해 표시되는 아미노산 서열, 서열번호 15에 의해 표시되는 아미노산 서열, 또는 서열번호 19에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖는 항체;

[0018] (3) (1)에 따른 항체의 중쇄 가변 영역 및 (2)에 따른 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체;

[0019] (4) (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 따른 항체의 변이체이고 (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 따른 항체와 동일하거나 유사한 활성을 갖는 항체로부터 선택된다.

[0020] 구체적인 실시형태에 있어서, 상기 항체는, (1) 중쇄 가변 영역이 서열번호 13에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖고 경쇄 가변 영역이 서열번호 11에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖는 항체;

[0021] (2) 중쇄 가변 영역이 서열번호 17에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖고 경쇄 가변 영역이 서열번호 15에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖는 항체;

[0022] (3) 중쇄 가변 영역이 서열번호 21에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖고 경쇄 가변 영역이 서열번호 19에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖는 항체;

[0023] (4) 중쇄 가변 영역이 서열번호 56에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖고 경쇄 가변 영역이 서열번호 19에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖는 항체;

[0024] (5) 중쇄 가변 영역이 서열번호 58에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖고 경쇄 가변 영역이 서열번호 19에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖는 항체;

[0025] (6) (1) 내지 (5) 중 어느 하나에 따른 항체의 변이체이고 (1) 내지 (5) 중 어느 하나에 따른 항체와 동일하거나 유사한 활성을 갖는 항체로부터 선택된다.

[0026] 제2 양태에 있어서, 본 발명은 본 발명의 제1 양태에 따른 항체와 동일한 항원결정부위를 식별하는 항체는 제공한다.

[0027] 제3 양태에 있어서, 본 발명은 본 발명의 제1 양태 또는 제2 양태에 따른 항체를 코딩하는 핵산을 제공한다.

[0028] 제4 양태에 있어서, 본 발명은 본 발명의 제3 양태에 따른 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

[0029] 제5 양태에 있어서, 본 발명은 본 발명의 제4 양태에 따른 발현 벡터를 포함하거나 게놈 중에 본 발명의 제3 양태에 따른 핵산이 통합되는 숙주 세포를 제공한다.

[0030] 제6 양태에 있어서, 본 발명은 BCMA를 발현하는 종양 세포를 특이적 표적으로 하는 표적 약물, 항체 약물 접합체 또는 다기능 항체를 제조하거나;

[0031] BCMA를 발현하는 종양을 진단하는 시약을 제조하거나;

[0032] 바람직하게는, T 림프구, NK 세포 또는 NKT 림프구를 포함하는, 키메라 항원 수용체 변형된 면역 세포를 제조하기 위한,

[0033] 본 발명의 제1 양태 또는 제2 양태에 따른 항체의 용도를 제공한다.

[0034] 제7 양태에 있어서, 본 발명은 본 발명의 제1 양태 또는 제2 양태에 따른 항체; 및 상기 항체와 연결되는 기능성 분자로서, 종양 표면 마커 표적 분자, 종양 억제 분자, 면역 세포의 표면 마커 표적 분자 및 검출가능 표지로부터 선택되는 기능성 분자를 포함하는 다기능 면역접합체를 제공한다.

[0035] 구체적인 실시형태에 있어서, 상기 종양 억제 분자는 항종양 사이토카인 또는 항종양 독소이고, 바람직하게는, 상기 사이토카인은 IL-12, IL-15, I형 인터페론, TNF-α를 포함한다.

[0036] 구체적인 실시형태에 있어서, 상기 면역 세포의 표면 마커 표적 분자는 면역 세포 표면 마커에 결합하는 항체 또는 리간드이고, 바람직하게는, 상기 면역 세포 표면 마커는 CD3, CD16, CD28을 포함하고, 보다 바람직하게는, 상기 면역 세포 표면 마커에 결합하는 항체는 항-CD3 항체이다.

[0037] 구체적인 실시형태에 있어서, 상기 면역 세포의 표면 마커 표적 분자는 T 세포 표면 마커에 결합하는 항체이다.

[0038] 제8 양태에 있어서, 본 발명은 본 발명의 제7 양태에 따른 다기능 면역접합체를 코딩하는 핵산을 제공한다.

[0039] 제9 양태에 있어서, 본 발명은 항종양 약물을 제조하거나;

[0040] BCMA를 발현하는 종양을 진단하는 시약을 제조하거나;

[0041] 바람직하게는, T 림프구, NK 세포 또는 NKT 림프구를 포함하는, 키메라 항원 수용체 변형된 면역 세포를 제조하기 위한,

[0042] 본 발명의 제7 양태에 따른 다기능 면역접합체의 용도를 제공한다.

[0043] 제10 양태에 있어서, 본 발명은 세포외 도메인, 막관통 도메인 및 세포내 신호 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 제공하며, 상기 세포외 도메인은 제1 양태 또는 제2 양태에 따른 항체를 포함하되, 바람직하게는, 상기 항체는 단일 쇄 항체 또는 도메인 항체이다.

[0044] 구체적인 실시형태에 있어서, 상기 세포내 신호 도메인은 하나 이상의 공자극 신호 도메인 및/또는 1차 신호 도메인을 포함한다.

[0045] 구체적인 실시형태에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체는 힌지 도메인을 추가로 포함한다.

[0046] 구체적인 실시형태에 있어서, 상기 막관통 도메인은 TCR의 α 쇄, β 쇄, ζ 쇄, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, CD154, 및 PD1의 막관통 영역으로부터 선택되고/거나;

[0047] 상기 공자극 신호 도메인은 CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54, CD83, OX40, CD137, CD134,

CD150, CD152, CD223, CD270, PD-L2, PD-L1, CD278, DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM, FcεRIγ, MyD88, 및 41BBL의 세포내 신호 영역으로부터 선택되고/거나;

[0048] 상기 1차 신호 도메인은 TCRζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278("ICOS"로도 지칭됨) 및 CD66d, 및 CD3ζ로부터 선택되고,

[0049] 바람직하게는, 상기 막관통 도메인은 CD8α, CD4, CD45, PD1, CD154 및 CD28의 막관통 도메인으로부터 선택되고/거나;

[0050] 상기 공자극 신호 도메인은 CD137, CD134, CD28 및 OX40으로부터 선택되고/거나;

[0051] 상기 1차 신호 도메인은 CD3ζ로부터 선택되고,

[0052] 가장 바람직하게는, 상기 막관통 도메인은 CD8α 및 CD28로부터 선택되고, 상기 공자극 신호 도메인은 CD137 또는 CD28의 세포내 신호 도메인으로부터 선택되고, 상기 1차 신호 도메인은 CD3ζ로부터 선택된다.

[0053] 구체적인 실시형태에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체는 본 발명의 제1 양태 또는 제2 양태에 따른 항체, CD8의 막관통 영역 및 CD3ζ;

[0054] 본 발명의 제1 양태 또는 제2 양태에 따른 항체, CD8의 막관통 영역, CD137의 세포내 신호 영역 및 CD3ζ;

[0055] 본 발명의 제1 양태 또는 제2 양태에 따른 항체, CD28의 막관통 영역, CD28의 세포내 신호 영역 및 CD3ζ; 또는

[0056] 본 발명의 제1 양태 또는 제2 양태에 따른 항체, CD28의 막관통 영역, CD28의 세포내 신호 영역, CD137 및 CD3ζ의 순서로 연결되는 항체, 막관통 영역 및 세포내 신호 영역을 포함한다.

[0057] 제11 양태에 있어서, 본 발명은 본 발명의 제10 양태에 따른 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산을 제공한다.

[0058] 제12 양태에 있어서, 본 발명은 본 발명의 제11 양태에 따른 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

[0059] 제13 양태에 있어서, 본 발명은 본 발명의 제12 양태에 따른 벡터를 포함하는 바이러스를 제공한다.

[0060] 바람직한 실시형태에 있어서, 상기 바이러스는 렌티바이러스(Lentivirus)이다.

[0061] 제14 양태에 있어서, 본 발명은 BCMA를 발현하는 종양 세포 표적 유전자 변형된 면역 세포를 제조하기 위한 것인 본 발명의 제10 양태에 따른 키메라 항원 수용체, 또는 본 발명의 제11양태에 따른 핵산, 또는 본 발명의 제12 양태에 따른 발현 벡터, 또는 본 발명의 제13 양태에 따른 바이러스의 용도를 제공하며,

[0062] 바람직한 실시형태에 있어서, 상기 BCMA를 발현하는 종양은 다발성 골수종이다.

[0063] 제15 양태에 있어서, 본 발명은 본 발명의 제11 양태에 따른 핵산, 또는 본 발명의 제12 양태에 따른 발현 벡터 또는 본 발명의 제13 양태에 따른 바이러스가 형질도입되거나; 본 발명의 제10 양태에 따른 키메라 항원 수용체가 발현되는 유전자 변형된 면역 세포를 제공하되, 바람직하게는, 상기 면역 세포는 T 림프구, NK 세포 및 NKT 세포로부터 선택된다.

[0064] 구체적인 실시형태에 있어서, 상기 유전자 변형된 면역 세포에는 본 발명의 제10 양태에 따른 키메라 항원 수용체 이외의 다른 서열을 추가로 발현하되, 상기 다른 서열은 사이토카인, 또는 다른 키메라 항원 수용체, 또는 케모카인 수용체, 또는 PD-1 발현을 감소시키는 siRNA, 또는 PD-L1을 차단하는 단백질, 또는 TCR, 또는 안전 스위치를 포함하고;

[0065] 바람직하게는, 상기 사이토카인은 IL-12, IL-15, IL-21, 또는 I형 인터페론을 포함하고;

[0066] 바람직하게는, 상기 케모카인 수용체는 CCR2, CCR5, CXCR2, 또는 CXCR4를 포함하고;

[0067] 바람직하게는, 상기 안전 스위치는 iCaspase-9, 절두된 EGFR 또는 RQR8을 포함한다.

[0068] 제16 양태에 있어서, 본 발명은 BCMA를 발현하는 종양을 억제하는 약물을 제조하기 위한 것인 본 발명의 제15 양태에 따른 유전자 변형된 면역 세포의 용도를 제공하며, 바람직한 실시형태에 있어서, 상기 BCMA를 발현하는 종양은 다발성 골수종이다.

[0069] 제17 양태에 있어서, 본 발명은 본 발명의 제1 양태 또는 제2 양태에 따른 항체 또는 상기 항체를 코딩하는 핵산; 또는

[0070] 본 발명의 제7 양태에 따른 면역접합체 또는 상기 면역접합체를 코딩하는 핵산; 또는

[0071] 본 발명의 제10 양태에 따른 키메라 항원 수용체 또는 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산; 또는

[0072] 본 발명의 제15 양태에 따른 유전자 변형된 면역 세포를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0073] 본 발명의 범위내에서, 본 발명의 상기 각 기술 특징과 아래(예를 들어, 실시예)에서 구체적으로 설명될 각 기술 특징 사이는 모두 상호 조합될 수 있으며, 이로써 새로운 또는 바람직한 기술적 해결수단을 구성함을 이해해야 한다. 편폭의 제한으로 인하여 여기서 더이상 일일이 설명하지 않기로 한다.

도면의 간단한 설명

[0074] 도 1은 BCMA_huFc, BCMA_muFc의 SDS 전기영동도(환원 조건)를 나타낸다.

도 2는 FACs에 의해 검출된 안정적 형질전환 세포주 K562-BCMA 중 BCMA의 발현 정황을 나타낸다.

도 3은 항체 7A12, 7G2, 23F10의 ELISA 측정 결과를 나타낸다.

도 4는 FACs에 의해 검출된 항체 7A12, 7G2, 23F10과 K562-BCMA 및 K562의 결합 정황을 나타낸다.

도 5는 SDS-PAGE 분석에 의해 정제된 항-BCMA scFv_Fc 항체(환원조건)를 나타낸다.

도 6은 FACs에 의해 단계희석된 정제 scFv_Fc와 K562-BCMA의 결합을 측정하는 정황을 나타낸다.

도 7은 Biacore에 의해 측정된 항체 7A12, 7G2, 23F10과 BCMA의 친화력을 나타낸다.

도 8은 FACs에 의해 측정된 항체 7A12, 7G2, 23F10과 RPMI8226 세포주의 결합 정황을 나타낸다.

도 9는 ELISA에 의해 검출된 항체 및 APRIL에 대한 BCMA의 경쟁적 결합 정황을 나타낸다.

도 10은 FACS에 의해 검출된 BCMA-CAR T바이러스에 의해 감염된 T 림프구의 양성률을 나타낸다.

도 11a는 BCMA에 대해 양성 및 음성 세포를 발현시키는 BCMA-CAR T의 체외 독성 실험 결과를 나타내며, 도 11b는 BCMA-CAR T의 쥐 체내 실험 결과를 나타낸다.

도 12는 25C2, 25D2 및 23F10 클론의 중쇄 아미노산 서열을 비교한다.

도 13a는 항체 25C2의 집합 정황을 나타내고, 도 13b는 항체 25D2의 집합 정황을 나타내며, 도 13c는 항체 23F10 및 7A12의 집합 정황을 나타낸다.

도 14a는 25C2, 25D2와 K562-BCMA 및 K562 세포의 결합 정황을 나타내고, 도 14b는 ELISA에 의해 측정된 항체 23F10, 25C2, 25D2의 특이성을 나타낸다.

도 15는 25C2-BBZ, 25D2-BBZ, 7A12-BBZ, C11D5.3-BBZ 및 sPD-1-7A12-BBZ의 세포 살상의 실험 결과를 나타낸다.

도 16은 25C2-BBZ, 25D2-BBZ, C11D5.3-BBZ, 7A12-BBZ의 피하 이식 종양 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0075] 발명자는 광범위하고 심층적 연구를 거쳐 예상 밖으로 BCMA에 특이적으로 결합되는 항체를 발견하였으며, 이러한 항체는 다양한 항종양 표적 약물 및 종양 진단 약물을 제조하는데 응용될 수 있었다. 이에 기반하여 본 발명을 완성하였다.

[0076] 본문에서 사용된 과학기술 용어는 본 분야의 기술자가 통상적으로 이해하는 용어와 동일하거나 유사한 의미를 갖고 있다. 본 발명을 쉽게 이해하기 위해 일부 용어는 하기와 같이 정의된다.

[0077] 본문에서의 용어 "BCMA"는 B 세포 성숙화 항원(anti-B-cell maturation antigen)을 가리키며, 184개 아미노산 잔기로 구성된 III형 막관통 단백질(NCBI Reference Sequence: NP_001183.2)이고, 아미노산 서열은 서열번호 37에 표시된 바와 같다. 일 구체적인 실시예에서, BCMA는 인간 BCMA를 가리킨다.

[0078] 본문에서의 용어 "APRIL"은 A proliferation-inducing ligand를 가리키며, 이것은 증식 유도 리간드이고, 184개 아미노산 잔기로 구성(NCBI Reference Sequence: NP_003799.1)되며 TNF 슈퍼패밀리에 속한다.

[0079] 본문에서의 용어 "항체"는 면역시스템의 항원결합단백질을 가리킨다. 본문에서 언급된 용어 "항체"는 항원결합영역을 갖는 완전한 전장 항체 및 그 중 "항원결합부분" 또는 "항원결합영역"에 보류된 임의의 단편, 또는 단일쇄 가변 단편(scFv)과 같은 단일 쇄를 포함한다. 천연 항체는 이황화 결합에 의해 상호 연결되는 적어도 두개의

중(H)쇄와 두개의 경(L)쇄 또는 그 항원결합단편을 포함하는 당단백질을 가리킨다. 용어 "항체"는 항체(특히 본문에서 서술된 항체)의 모든 재조합 형태, 예를 들어, 원핵세포 중 발현되는 항체, 비글리코실화의 항체 및 항원과 결합되는 항체 단편 및 아래에서 서술되는 유도체를 추가로 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본문에서 VH로 약칭함)과 중쇄 일정부위로 조성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본문에서 VL로 약칭함)과 경쇄 일정부위로 조성된다. VH와 VL은 상보결정부위(complementaritydetermining region, CDR)로 불리우는 초가변영역(hypervariable region)으로 더 세분화할 수 있으며, 이것들은 프레임워크 영역(FR)으로 불리우는 보다 보수적인 영역 중에 분산된다. 각각의 VH와 VL은 3개의 CDR 및 4개의 FR로 조성되며, 아미노말단으로부터 카르복실말단까지 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열된다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 포함한다. 항체의 일정부위는 상기 면역글로불린과 숙주 조직 또는 인자와의 결합을 매개할 수 있으며, 상기 숙주 조직 또는 인자는 면역시스템의 다양한 세포(예를 들어, 효과기 세포)와 고전보체시스템의 제1 성분(C1q)을 포함한다.

[0080] 항체 단편은 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 조성되고, Fab' 및 Fab'-SH를 포함하는 Fab 단편, (ii) VH 및 CH1 도메인으로 조성된 Fd 단편, (iii) 단일 항체의 VL 및 VH 도메인으로 조성된 Fv 단편; (iv) 단일 가변 영역으로 조성된 dAb 단편(Ward 등, 1989, Nature341: 544-546); (v) 2개의 연결된 Fab 단편을 포함한 2가 단편인 $F(ab')_2$ 단편; (vi) 단일 쇄 Fv 분자 항원결합사이트(Bird 등, 1988, Science 242: 423-426; Huston 등, 1988, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 85: 5879-5883); (vii) 이중 특이적 단일 쇄 Fv 이합체(PCT/US92/09965); (viii) 유전자 융합에 의해 구축된 다가 또는 다중 특이성 단편(Tomlinson 등, 2000, Methods Enzymol.326: 461-479; WO94/13804; Holliger 등, 1993, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 90: 6444-6448)의 "2체" 또는 "3체"; 및 (ix) 동일하거나 상이한 항체와 유전적으로 융합되는 scFv(Coloma & Morrison, 1997, Nature Biotechnology 15, 159-163)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0081] 본문에서의 용어 "Fc" 또는 "Fc 영역"은 제1 일정부위 면역글로불린 도메인 이외의 항체 일정부위를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 따라서, Fc는 IgA, IgD 및 IgG의 마지막 2개의 일정부위 면역글로불린 도메인, 및 IgE 및 IgM의 마지막 3개의 일정부위 면역글로불린 도메인, 및 이러한 도메인 N단의 플랙셔 힌지(Flexure Hinge)를 가리킨다. IgA 및 IgM에 대해 Fc는 J 쇄를 포함할 수 있다. IgG에 대해 Fc는 면역글로불린 도메인 Cɣ2와 Cɣ3 및 Cɣ1과 Cɣ2 사이에 있는 힌지를 포함한다. Fc 영역의 경계는 변화될 수 있지만 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 통상적으로 그 카르복실말단에 잔기 C226 또는 P230을 포함하는 것으로 정의되며, 그중 번호는 Kabat의 EU 색인에 의한 것이다. 인간 IgG1에 대해 Fc는 본문에서 잔기 P232로부터 그 카르복실말단까지 포함하는 것으로 정의되며, 그중 번호는 Kabat의 EU 색인에 의한 것이다. Fc는 분리된 상기 영역을 가리킬 수 있거나 예를 들어, 항체, 환경 중의 상기 영역과 같은 Fc 폴리펩타이드에 위치할 수 있다. 상기 "힌지"는 항체의 제1 일정 도메인과 제2 일정 도메인 사이에 포함된 아미노산의 플렉셔블 폴리펩타이드를 포함한다. 구조적으로, IgG CH1 도메인은 EU220 부위에서 중단되며, IgG CH2 도메인은 잔기 EU237 부위로부터 시작한다. 따라서, IgG에 대해 본문에서의 항체 힌지는 221(IgG1의 D221)로부터 231(IgG1의 A231) 부위까지 포함하는 것으로 정의되며, 그중 번호는 Kabat의 EU 색인에 의한 것이다.

[0082] 본문에서 사용된 용어 "친본 항체" 또는 "친본 면역글로불린"은 변형되지 않은 항체를 포함하고, 상기 항체 이후 변형되어 변이체를 생성한다. 상기 친본 항체는 천연적으로 존재하는 항체이거나 천연적으로 존재하는 항체의 변이체 또는 개선된 버전일 수 있다. 친본 항체는 항체 자체를 가리킬 수 있으며, 상기 친본 항체의 조성물을 포함하거나 그 아미노산 서열을 코딩한다. 본문에서 사용된 용어 "친본 항체" 또는 "친본 면역글로불린"은 그후 변형을 거쳐 인간화 항체를 생성하는 쥐 항체 또는 키메라 항체를 포함한다.

[0083] 본문에서 사용된 용어 "변이체 항체" 또는 "항체 변이체"는 친본의 적어도 하나의 변형으로 인하여 친본 항체 서열과 상이한 항체 서열을 포함한다. 본문에서의 변이체 항체 서열은 바람직하게는, 친본 항체 서열과 적어도 약 80 %, 가장 바람직하게는, 적어도 약 90 %, 보다 바람직하게는, 적어도 약 95 %의 아미노산 서열 동일성을 갖는다. 항체 변이체는 항체 자체를 가리킬 수 있으며, 상기 친본 항체의 조성물을 포함하거나 그 아미노산 서열을 코딩한다.

[0084] 본문에서 사용된 용어 "변이체"는 친본의 적어도 하나의 아미노산 변형으로 인하여 친본 항체 서열과 상이한 항체 서열을 포함한다. 구체적인 실시형태에 있어서, 본문에서의 변이체 항체 서열은 친본 항체 서열과 적어도 약 80 %, 바람직하게는, 적어도 약 90 %, 보다 바람직하게는, 적어도 약 95 %, 보다 바람직하게는, 적어도 약 97 %, 보다 바람직하게는, 적어도 약 98 %, 가장 바람직하게는, 적어도 약 99 %의 아미노산 서열 동일성을 갖는다. 항체 변이체는 항체 자체를 가리킬 수 있으며, 상기 친본 항체의 조성물을 포함하거나 그 아미노산 서열을 코딩

한다. 용어 "아미노산 변형"은 아미노산 치환, 첨가 및/또는 결실을 포함하고, "아미노산 치환"은 다른 한가지 아미노산으로 친본 폴리펩타이드 서열 중 특정 위치에서의 아미노산을 대체하는 것을 의미한다. 예를 들어, R94K 치환은 94 부위의 아르기닌이 리신으로 대체되는 것을 기리키며, 본문에서 사용된 "아미노산 삽입"은 친본 폴리펩타이드 서열 중의 특정 위치에 아미노산을 첨가하는 것을 의미한다. 본문에서 사용된 "아미노산 결실" 또는 "결실"은 친본 폴리펩타이드 서열 중 특정 위치에 있는 아미노산을 제거하는 것을 의미한다.

[0085] 본문에서 사용된 용어 "보수적 변형" 또는 "보수적 서열 변형"은 상기 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합 특징에 큰 영향을 미치지 않거나 변화시키지 않는 아미노산 변형을 의미한다. 해당 유형의 보수적 변형은 아미노산 치환, 삽입 및 결실을 포함하낟. 본 분야에서 공지된 표준 기술에 의해 변형을 본 발명의 항체에 도입시킬 수 있으며, 예를 들어, 부위 특이적 돌연변이 유도 및 PCR 매개에 의한 돌연변이 유도이다. 보수적인 아미노산 치환은 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 아미노산 잔기를 대체하는 치환이다. 본 분야에서는 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 패밀리를 정의하였다. 이러한 패밀리는 알칼리 측쇄를 포함하는 아미노산(예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 전하를 띠지 않는 급성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), β분지 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 포함한다. 따라서, 다른 동일한 측쇄 패밀리의 아미노산 잔기로 본 발명의 항체의 CDR 영역 또는 프레임워크 영역 중의 하나 이상의 아미노산 잔기로 대체할 수 있으며, 또한 변화된 항체(변이체 항체)가 보류한 기능을 테스트할 수 있다.

[0086] 본 발명에서 토론하는 모든 면역글로불린 중쇄 일정부위 위치는 모두 Kabat의 EU 색인에 의한 번호이다(Kabat 등, 1991, sequences of proteins of immunological interest, 제5판, United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, 전체 문장이 참조로서 통합됨). "Kabat의 EU 색인"은 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 번호이고, 예를 들어, Edelman 등 사람, 1969, Biochemistry 63: 78-85에 서술된 바와 같다.

[0087] 본문에서 사용된 용어 "항원결정부위"는 또 항원결정기로 불리우며, BCMA 단백질 서열의 연속적 서열에 의해 조성될 수 있고 BCMA 단백질 서열의 불연속적인 3차원 구조에 의해 조성될 수도 있다.

[0088] 본문에서 사용된 용어 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"은 항원을 결합할 수 있는 세포외 도메인, 막관통 도메인 및 세포질 신호를 도메인에 전달시키는 폴리펩타이드(즉 세포내 신호 도메인)를 포함하고, 세포내 신호 도메인은 결정된 신호 전달 경로를 경유하여 제2 메신저를 생성하여 정보를 세포내에 전달시킴으로써 세포 활성을 조절하는 단백질, 또는 상기 유형의 메신저에 해당되는 효과기로써 작용하는 단백질을 가리키고, 1차 신호 도메인을 포함하고, 아래에서 정의된 자극 분자의 기능 신호 전달 도메인(즉 공자극 신호 도메인)을 추가로 포함할 수 있다. 세포내 신호 도메인은 CAR의 세포(예를 들어, CAR T 세포)를 촉진시킬 수 있는 면역 효과기 기능의 신호, 면역 효과기 기능의 예를 산생할 수 있으며, 예를 들어, CAR T 세포에서 세포 열분해 활성과 보조 활성, 사이토카인 분비를 포함한다.

[0089] 용어 "1차 신호 도메인"은 자극적인 방식으로 TCR 복합체의 초기 활성화를 조절한다. 한편, 1차 신호 도메인은 예를 들어 TCR/CD3 복합체와 펩타이가 로딩된 MHC 분자의 결합에 의해 야기되고, 이로부터 T 세포 반응(증식, 활성화, 분화 등을 포함하지한 이에 한정되지 않음)을 매개한다. 자극적인 방식으로 작용하는 1차 신호 도메인은 면역 수용체 티로신 활성화 모티브 또는 ITAM의 신호 전달 모티브를 포함할 수 있다. 본 발명에서, 특히 유용적인 ITAM을 포함하는 1차 신호 도메인의 예는 TCRζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278("ICOS"로도 불리움) 및 CD66d로부터 선택된 서열을 포함하지만 이에 한정되지 았고, 본 발명의 CAR의 특정 예에서, 세포내 신호 전달 도메인은 어느 하나 이상의 본 발명의 CAR에서 CD3ζ의 1 차 신호 도메인과 같은 세포내 신호 전달 서열을 포함한다.

[0090] 용어 "공자극 신호 도메인"은 "공자극 분자"를 가리키며, 공자극 리간드에 특이 적으로 결합하는 T 세포의 관련 결합성 배우체이고, 이에 의해 T 세포의 공자극 반응(예를 들어, 증식을 포함하지만 이에 한정되지 않음)을 매개한다. 공자극 분자는 유효 면역 반응에 필요되는, 비항원 수용체의 세포 표면 분자 또는 그 리간드이다. 공자극 분자는 MHC I류 분자, BTLA 및 Toll 리간드 수용체, 및 OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1(CD11a/CD18) 및 4-1BB(CD137)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0091] 본 발명에서, 한편, CAR은 세포외 항원 식별 도메인, 막관통 도메인, 및 세포내 신호 전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함하고, 상기 세포내 신호 전달 도메인은 자극 분자로부터 유래된 기능 신호 전달 도메인을 포함한다. 다른 한편, CAR은 세포외 항원 식별 도메인, 막관통 도메인, 및 세포내 신호 전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함하고, 상기 세포내 신호 전달 도메인은 공자극 분자로부터 유래된 기능 신호

전달 도메인 및 자극 분자로부터 유래된 기능성 신호 전달 도메인을 포함한다. 또 다른 한편, CAR은 세포외 항원 식별 도메인, 막관통 도메인, 및 세포내 신호 전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함하고, 상기 세포내 신호 전달 도메인은 하나 이상의 공자극 분자로부터 유래된 적어도 2개의 기능성 신호 전달 도메인 및 자극 분자로부터 유래된 기능성 신호 전달 도메인을 포함한다. 한편, CAR은 CAR 융합 단백질의 아미노산(ND단)에서 선택 가능한 선도 서열을 포함한다. 다른 한편, CAR은 세포외 항원 식별 도메인의 N단에서 선도 서열을 추가로 포함하고, 그중 선도 서열은 CAR의 세포 가공 및 위치결정으로부터 세포막까지 과정에서 항원 식별 도메인(예를 들어, scFv)으로부터 임의적으로 절단된다.

[0092] 본문에서 용어 "CD3ζ"는 GenBank 등록번호 BAG36664.1에 의해 제공된 단백질, 또는 쥐, 설치류 동물, 원숭이, 유인원 등과 같은 비인간 종으로부터 유래된 등가 잔기로 정의된다. "CD3ζ 도메인"은 ζ 쇄로부터 생성된 세포질 도메인의 아미노산 잔기로 정의되며, 이는 T 세포 활성화에 필요한 초기 신호를 기능적으로 전달하기에 충분한다. 한편, ζ의 세포질 도메인은 GenBank 등록번호 BAG36664.1의 잔기 52부터 164, 그 기능성 이종상동체-쥐, 설치류 동물, 원숭이, 유인원 등과 같은 비인간 종으로부터 유래된 등가 잔기를 포함한다.

[0093] 본문에서 용어 "4-1BB"는 TNFR 슈퍼패밀리의 성원을 가리키며, GenBank Acc.No.AAA62478.2의 아미노산 서열, 또는 쥐, 설치류 동물, 원숭이, 유인원 등과 같은 비인간 종으로부터 유래된 등가 잔기를 갖고 있다. "4-1BB 공자극 도메인"은 GenBank ACC.No.AAA62478.2의 아미노산 서열 214-255, 또는 쥐, 설치류 동물, 원숭이, 유인원 등과 같은 비분류 종으로부터 유래된 등가 잔기로 정의된다. 한편, "4-1BB 공자극 도메인"은 서열번호 35에서 제공된 서열, 또는 쥐, 설치류 동물, 원숭이, 유인원 등과 같은 비인간 종으로부터 유래된 등가 잔기이다.

[0094] 본문에서 사용된 용어 "인터페론"은 전장 인터페론, 또는 기본적으로 전장 야생형 인터페론을 유지하는 생물활성(예를 들어, 적어도 80 %, 바람직하게는, 적어도 90 %, 보다 바람직하게는, 적어도 95 %, 98 % 또는 99 %의 전장을 유지함)의 인터페론 단편(절단된 인터페론) 또는 인터페론 돌연변이체를 가리킨다. 인터페론은 I형 인터페론(예를 들어, 인터페론α 및 인터페론β) 및 II형 인터페론(예를 들어, 인터페론γ)을 포함한다.

[0095] 본 발명의 항체 또는 그 변이체는 다양한 항종양 표적 약물 및 종양을 진단하는 약물의 제조에 응용될 수 있으며, 특히, BCMA를 표적으로 하는 면역 효과기 세포의 제조에 응용된다.

[0096] **항-BCMA의 항체**

[0097] 본 공개에 있어서, 항체를 포함한 scFv에 기반한 항원 결합 영역을 갖는 항원 결합 단백질이 기재되어있다. 여기서, 재조합 BCMA를 사용하여 인간 scFv 박테리오파지 전시 라이브러리로부터 scFv를 선택한다. 이러한 분자는 정밀한 특이성을 전시한다. 예를 들어, 상기 항체는 단지 BCMA를 안정적으로 발현하는 K562 세포를 식별하고 K562 세포를 식별하지 않는다.

[0098] 일부 실시방안에 있어서, 본 발명은 scFv 서열을 갖는 항체를 포함하고, 상기 scFv 서열은 하나 이상의 중쇄 일정부위와 융합되어 인간 면역글로불린 Fc 영역을 갖는 항체를 형성하여 이가 단백질을 생성함으로써 항체의 전반 친화력 및 안정성을 증가시킨다. 이밖에, Fc 부분은 다른 분자(형광 염료, 세포 독소, 방사성 동위원소 등을 포함하지만 이에 한정되지 않음)를 예를 들어 항원 정량 연구에 사용되는 항체와 직접 접합하여 친화력 측정을 위한 항체, 치료제의 정향적 배달을 위한 항체, 면역 효과기 세포를 이용한 Fc 매개의 세포 독성 및 많은 다른 응용을 테스트하기 위한 항체를 고정하기 위해서이다.

[0099] 본문에서 제공한 결과는 BCMA를 표적으로 할 때 본 발명의 항체의 특이성, 민감성 및 유용성을 강조한다.

[0100] 본 발명의 분자는 박테리오파지를 사용한 전시에 기반하여 단일 쇄 가변 단편(scFv)을 감정하고 선택하며, 상기 단일 쇄 가변 단편의 아미노산 서열은 분자에 BCMA에 대한 특이성을 부여하고 본원에서 공개된 전체 항원 결합 단백질의 기초를 형성한다. 따라서, 상기 scFv로 일련의 상이한 "항체" 분자를 설계할 수 있으며, 예를 들어 전장 항체, Fab 및 $F(ab')_2$와 같은 그 단편, 융합 단백질(scFv_Fc 포함), 다가 항체를 포함하고, 여기서 다가 항체는 동일한 항원 또는 상이한 항원에 대해 한 가지 특이성이 더 많은 항체, 예를 들어, 이중 특이성 T 세포 결합 항체(BiTE), 3항체(Cuesta 등, Multivalent antibodies: when design surpasses evolution, Trends in Biotechnology 28: 355-362, 2010) 등이다.

[0101] 항원 결합 단백질이 전장 항체인 하나의 실시방안에 있어서, 본 발명의 항체의 중쇄 및 경쇄는 전장(예를 들어, 항체는 적어도 하나와 바람직한 2개의 완전한 중쇄 및 적어도 하나와 바람직한 2개의 완전한 경쇄를 포함할 수 있음)일 수 있거나 항원 결합 부분(Fab, $F(ab')_2$, Fv 또는 scFv)을 포함할 수 있다. 다른 실시방안에 있어서, 항체 중쇄 일정부위는 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD 및 IgE로부터 선택된다. 항체

유형의 선택은 설계된 항체가 유도하려는 면역 효과기 기능에 의해 결정된다. 재조합 면역글로불린을 구축할 경우, 다양한 면역글로불린의 동종형의 일정부위의 적절한 아미노산 서열 및 광범위한 종류의 항체를 생성하는 방법은 본 분야의 기술자에게 있어서 공지된 바이다.

[0102] 한편, 본 발명은 서열번호 1, 60, 62 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 및/또는 서열번호 2, 61, 63 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및/또는 서열번호 3, 4, 5 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함하는 BCMA 결합 항체 또는 그 단편을 제공한다. 다른 한편, 본 발명은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 및/또는 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및/또는 서열번호 8, 9, 10 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 BCMA 결합 항체 또는 그 단편을 제공한다. 다른 한편, 본 발명은 서열번호 1, 60, 62 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 및/또는 서열번호 2, 61, 63 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및/또는 서열번호 3, 4, 5 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, 및/또는 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 및/또는 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및/또는 서열번호 8, 9, 10 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 BCMA 결합 항체 또는 그 단편을 제공한다. 바람직하게는, 상기 BCMA 결합 항체 또는 그 단편은 서열번호 1, 60, 62 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 및 서열번호 2, 61, 63 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열번호 3, 4, 5 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, 및/또는 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및 서열번호 8, 9, 10 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함한다. 보다 바람직하게는, 상기 BCMA 결합 항체 또는 그 단편은 서열번호 1, 60, 62의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 및 서열번호 2, 61, 63의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열번호 3, 4, 5 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및 서열번호 8, 9, 10 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함한다.

[0103] 다른 한편, 본 발명은 서열번호 13, 17, 21, 56, 58로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는 BCMA 결합 항체 또는 그 단편을 제공한다.

[0104] 다른 한편, 본 발명은 서열번호 11, 15, 19로부터 선택되는 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 BCMA 결합 항체 또는 그 단편을 제공한다.

[0105] 이러한 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열이 각각 BCMA를 결합할 수 있는 점을 고려하여, 중쇄 및 가변 영역 서열을 "혼합 및 통합"하여 본 발명의 항-BCMA의 결합 분자를 생성할 수 있다.

[0106] 다른 한편, 본 발명은 BCMA 결합 항체 또는 그 단편의 변이체를 제공한다. 따라서 본 발명은 중쇄 또는 경쇄의 가변 영역 서열과 적어도 80 % 동일한 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체 또는 그 단편을 제공한다. 바람직하게는, 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 동일성은 적어도 85 %, 보다 바람직하게는, 적어도 90 %, 가장 바람직하게는, 적어도 95 %, 특히 96 %, 보다 특별하게 97 %, 심지어 보다 특별하게 98 %, 가장 특별하게 99 %이고, 예를 들어 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % 및 100 %를 포함한다. 변이체는 본원 발명에서 서술한 항체를 모본 항체로 하고, 효모 라이브러리 선별, 박테리오파지 라이브러리 선별, 돌연변이 등 방법에 의해 얻을 수 있다. 본원 발명의 실시예 10에서 사용된 방법과 같이, 항체 23F10을 모본 항체로 하고, 박테리오파지 라이브러리 선별 방법으로 이용하여 돌연변이 개조를 진행한다.

[0107] 다른 한편, 본 발명은 상술한 항-BCMA의 항체와 동일한 항원결정부위를 식별하는 항체를 제공한다.

[0108] **항-BCMA의 항체 특성**

[0109] 항-BCMA의 항체와 같은 항체의 결합능력을 평가하기 위한 표준 측정은 본 분야에서 이미 공지된 바이고, 예를 들어, ELISA, biacore, 웨스턴 블롯(Western blot) 및 유세포분석기에 의한 분석을 포함한다. 적합한 측정은 실시예에 상세하게 기재되어있다.

[0110] **핵산, 벡터 및 숙주 세포**

[0111] 본 발명은 BCMA 결합 항체 및 그 단편을 코딩하여 분리된 핵산, 벡터 및 상기 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 핵산은 완전한 세포 중, 세포 열분해액 중 또는 부분적으로 정제되거나 기본적으로 정제된 형태로 위치할 수 있다.

[0112] 표준적인 분자생물학 기술을 이용하여 본 발명의 핵산을 얻을 수 있으며, 예를 들어 표준적인 PCR 증폭 또는 cDNA 클론 기술에 의해 항체를 코딩하는 경쇄 및 중쇄 또는 VH 및 VL 구간을 코딩하는 cDNA를 얻을 수 있다. 면역글로불린 유전자 라이브러리로부터 얻은 항체(예를 들어, 박테리오파지 전시 기술을 이용함)에 대해, 라이브러리로부터 항체를 코딩하는 한 가지 또는 다수의 핵산을 회수할 수 있다. 숙주 세포 중에 외래 핵산을 도입시키는 방법은 본 분야에서 통상적으로 공지된 바이고 사용되는 숙주 세포에 따라 변화될 수 있다.

[0113] 바람직하게는, 본 발명의 핵산 분자는 경쇄 가변 영역을 코딩하는 서열번호 12, 16, 20으로부터 선택되는 것이고, 및/또는 중쇄 가변 영역을 코딩하는 서열번호 14, 18, 22, 57, 59로부터 선택되는 것이다. 보다 바람직하게는, 중쇄를 코딩하는 서열번호 14 서열을 포함하고, 및 경쇄를 코딩하는 서열번호 12 서열을 포함하거나, 중쇄를 코딩하는 서열번호 18 서열을 포함하고, 및 경쇄를 코딩하는 서열번호 16 서열을 포함하거나, 중쇄를 코딩하는 서열번호 22 서열을 포함하고, 및 경쇄를 코딩하는 서열번호 20 서열을 포함하거나, 중쇄를 코딩하는 서열번호 57 서열을 포함하고, 및 경쇄를 코딩하는 서열번호 20 서열을 포함하거나, 중쇄를 코딩하는 서열번호 59 서열을 포함하고, 및 경쇄를 코딩하는 서열번호 20 서열을 포함하는 핵산 분자이다.

[0114] 단백질을 발현시키기 위하여, 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산을 발현 벡터 중에 통합시킬 수 있다. 다양한 발현 벡터는 단백질 발현에 사용될 수 있다. 발현 벡터는 자아 복제의 염색체 외 벡터 또는 숙주 게놈에 통합되는 벡터를 포함할 수 있다. 본 발명에 사용되는 발현 벡터는 포유 동물 세포, 세균, 곤충 세포, 효모 및 체외 시스템에서 단백질을 발현시킬 수 있는 발현 벡터를 포함 하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 분야에 공지된 바와 같이, 다양한 발현 벡터는 상업적 또는 다른 방식에 의해 얻을 수 있다. 본 발명에 사용되어 항체를 발현시킬 수 있다.

[0115] **면역접합체**

[0116] 본 발명은 본문에서 서술된 항체를 포함하고 적어도 한가지 다른 유형의 기능성 분자를 추가로 포함하는 다기능 면역접합체를 제공한다. 상기 기능성 분자는 종양 표면 마커 표적 분자, 종양 억제 분자, 면역 세포의 표면 마커 표적 분자 및 검출가능 표지로부터 선택되지만 이에 한정되지 않는다. 상기 항체와 상기 기능성 분자는 공유 결합 연결, 결합, 부착, 가교 등 방식에 의해 화합물을 구성할 수 있다.

[0117] 하나의 바람직한 방식으로서, 상기 면역접합체는 본 발명의 항체 및 적어도 하나의 종양 표면 마커 표적 분자 또는 종양 억제 분자를 포함할 수 있다. 상기 종양 억제 분자는 항종양 사이토카인이거나 항종양 독소일 수 있다. 바람직하게는, 상기 사이토카인은 IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, I형 IFN, TNF-α를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 구체적인 실시형태에 있어서, 상기 종양 표면 마커 표적 분자는 본 발명의 항체가 표적으로 하는 동일한 종양의 표면 마커를 표적으로 하는 분자이다. 예를 들어, 상기 종양 표면 마커 표적 분자는 종양 표면 마커를 결합한 항체 또는 리간드일 수 있으며, 예를 들어, 본 발명의 항체와 협동 작용하여 보다 정밀하게 종양 세포를 표적화할 수 있다.

[0118] 하나의 바람직한 방식으로서, 상기 면역접합체는 본 발명의 항체 및 검출가능 표지를 포함할 수 있다. 상기 검출가능 표지는 효소, 보조기, 형광 재료, 발광 재료, 생물발광 재료, 방사성 재료, 양전자 방출 금속 및 비방사성 상자성 금속 이온과 같은 형광 마커, 발색 마커를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 또한 하나 이상의 마커를 포함할 수도 있다. 검출 및/또는 분석 및/또는 진단 목적으로 항체를 표지하기 위해 사용되는 표지는 면역조직화학염색(조직) 샘플, 유동 세포 계측법 등과 같은 특정 검출/분석/진단 기술 및/또는 방법에 의존한다. 본 분야의 공지된 검출/분석/진단 기술 및/또는 방법에 적합한 표지는 본 분야의 기술자에게 있어서 숙지된 것이다.

[0119] 하나의 바람직한 방식으로서, 상기 면역접합체는 본 발명의 항체 및 면역 세포의 표면 마커 표적 분자를 포함할 수 있다. 상기 면역 세포의 표면 마커 표적 분자는 면역 세포 표면 마커를 결합한 항체 또는 리간드일 수 있으며, 면역 세포에 본 발명의 항체를 보유하는 면역 세포를 식별할 수 있고, 동시에 본 발명의 항체는 면역 세포를 종양 세포에 표적화하여 면역 세포가 종양을 특이적으로 살상하도록 유도할 수 있다. 상기 면역 세포 표면 마커는 CD3, CD16, CD28로부터 선택될 수 있으며, 보다 바람직하게는, 면역 세포 표면 마커를 결합한 항체는 항-CD3 항체이다. 면역 세포는 T 세포, NK 세포, NKT 세포로부터 선택될 수 있다.

[0120] 직접적 또는 간접적(예를 들어, 어댑터에 의함) 접합에 의해 면역접합체를 화학적으로 생산하는 수단으로서, 상기 면역접합체는 본 발명의 항체 및 적합한 다른 단백질을 포함하는 융합 단백질로서 생성될 수 있다. 융합 단백질은 본 분야의 공지된 방법에 의해 생성될 수 있으며, 예를 들어 핵산 분자를 구축하고 잇따라 상기 핵산 분자를 발현시켜 재조합적으로 생성되며, 상기 핵산 분자는 해독틀에 부합되는 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서

열 및 적절한 표지를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0121] 본 발명의 다른 한편에서는 본 발명의 적어도 한가지 항체, 그 기능 변이체 도는 면역접합체를 코딩하는 핵산 분자를 제공한다. 일단 관련 서열을 얻으면 재조합법으로 관련 서열을 대량적으로 얻을 수 있다. 이는 통상적으로 벡터에 클로닝하고, 다시 세포로 옮긴 다음, 통상적인 방법에 의해 증식된 후의 숙주 세포로부터 관련 서열을 분리하여 얻는 것으로써 수행된다.

[0122] 본 발명은 또한 상기 적당한 DNA 서열 및 적당한 프로모터를 포함하거나 서열을 제어하는 벡터에 관한 것이다. 이러한 벡터는 적당한 숙주 세포를 형질전환하여 이것이 단백질을 발현시키는데 사용될 수 있다. 숙주 세포는 세균 세포와 같은 원핵세포일 수 있다. 또는 효모 세포와 같은 저등 진핵세포일 수 있다. 또는 포유동물 세포와 같은 고등 진핵세포일 수 있다.

[0123] **항-BCMA 항체를 포함한 키메라 항원 수용체**

[0124] 본 발명은 본 발명의 항체 또는 항체 단편을 포함하는 다양한 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공하며, 상기 CAR-T 세포는 항종양 성질을 나타낸다. 일부 실시사례에서, CAR을 코딩하는 바이러스 벡터 형질도입 세포(예를 들어, T 세포)를 사용한다. 일부 실시사례에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다. 일부 실시방안에서 세포는 CAR을 안정적으로 발현시킬 수 있다.

[0125] 일 바람직한 예에서, CAR의 BCMA 결합 부분은 IgG 항체에 비해 등가의 결합친화력을 유지하는 scFv 항체 단편이고, 예를 들어 동등한 효능으로 동일한 항원을 결합한다. 상기 항체 단편은 기능적이므로 면역 반응의 활성화, 표적 항원으로부터의 신호 전달 개시의 억제, 키나아제 활성의 억제 등의 생물화학적 반응을 제공한다. 따라서 본 발명은 공정화에 의해 T 세포에 도입된, WT1 결합 도메인을 포함하는 BCMA-CAR을 제공하며, 이를 입양면역요법(Adoptive immunotherapy)에 사용한다.

[0126] 한편, CAR의 항-BCMA 항원 결합 도메인은 그로부터 유래된 쥐 서열 scFv가 인간화된 scFv 항체 단편이다.

[0127] 한편, 본 발명의 CAR은 특정 항체의 항원 결합 도메인과 세포내 신호 전달 분자를 조합시킨다. 예를 들어, 일부 양태에 있어서, 세포내 신호 전달 분자는 CD3ξ쇄, 4-1BB 및CD28 신호 전달 모듈 및 그 조합을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0128] 한편, BCMA-CAR은 CD137(4-1BB) 신호 전달 도메인, CD28 신호 전달 도메인, CD3ξ 신호 도메인 및 이들의 임의의 조합을 선택하는 적어도 하나의 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 한편, BCMA-CAR은 하나 이상의 비 CD137(4-1BB) 또는 CD28의 공자극 분자로부터 유래된 적어도 하나의 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다.

[0129] 예시적으로서, BCMA-CAR의 서열은 7A12-BBZ(서열번호 75), 25C2-BBZ(서열번호 76), 25D2-BBZ(서열번호 77), 7G2-BBZ(서열번호 78), 7A12-28Z(서열번호 79), 7A12-28BBZ(서열번호 80), 7G2-28Z(서열번호 81), 7G2-28BBZ(서열번호 82), 25C2-28Z(서열번호 83), 25C2-28BBZ(서열번호 84), 25D2-28Z(서열번호 85), 25D2-28BBZ(서열번호 86)일 수 있으며, 상기 서열번호 75-86의 막관통 도메인과 세포내 도메인은 본 분야의 기술자가 통상적인 막관통 도메인과 세포내 도메인을 선택하여 대체할 수 있고, 본원 발명의 보호 범위에 속한다.

[0130] **키메라 항원 수용체 변형된 T 세포**

[0131] 본 발명은 본 발명에 서술된 키메라 항원 수용체를 포함하는 면역 세포를 더 제공한다.

[0132] 다른 한편, 본 발명에 의해 제공된 키메라 항원 수용체 변형된 T 세포는 외인성 사이토카인의 코딩 서열을 더 보유한다. 바람직하게는, 상기 사이토카인은 IL-12, IL-15 또는 IL-21을 포함한다. 상기 면역 세포는 바람직하게는, T 림프구, NK 세포 및 NKT 세포로부터 선택된다.

[0133] 다른 한편, 본 발명에 의해 제공된 키메라 항원 수용체 변형된 T 세포는 천연 PD-1, 또는 PD-L1에 결합할 수 있는 돌연변이 PD-1, 또는 PD-L1에 결합할 수 있는 천연 또는 돌연변이 PD-1의 단편, 또는 항-PD-L1의 항체와 같은 PD-L1 차단제 또는 PD-L1을 차단하는 단백질을 더 보유한다. 예시적으로서, PD-L1 차단제는 서열번호 70이 코딩하는 아미노산 서열을 포함할 수 있다

[0134] **약학 조성물**

[0135] 본 발명의 항체, 상기 항체를 포함하는 면역접합체 및 유전자 변형된 면역 세포는 약학 조성물 또는 진단 시약을 제조하는데 응용될 수 있다. 상기 조성물은 유효량의 상기 항체, 면역접합체 또는 면역 세포를 포함한 이외, 약학적으로 허용 가능한 벡터를 추가로 포함할 수 있다. 용어 "약학적으로 허용 가능한"은 분자 본체 및 조성물

을 동물 또는 인간에 적절하게 투여할 경우, 이들에 불리하고 민감하거나 다른 불량 반응이 일어나지 않는 것을 가리킨다.

[0136] 약학적으로 허용 가능한 벡터 또는 그 성분으로서의 일부 물질의 구체적인 예로, 유당, 포도당 및 자당과 같은 당류; 옥수수 전분 및 감자 전분과 같은 전분; 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 에틸셀룰로오스 및 메틸셀룰로오스와 같은 셀룰로오스 및 그 유도체; Gummi Tragacanthae 분말; 맥아; 젤라틴(gelatin); 활석; 스테아린산 및 스테아린산마그네슘(Magnesium Stearate)과 같은 고체 윤활제; 황산칼슘; 땅콩 기름, 면실유, 참기름, 올리브유, 옥수수 기름, 코코아 기름과 같은 식물유; 프로필렌글리콜, 글리세린, 솔비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌글리콜과 같은 다가 알코올; 알긴산; Tween과 같은 유화제; 소듐라우릴황산염(Sodium Lauryl Sulfate) 과 같은 습윤제; 착색제; 조미료; 압편제, 안정제; 항산화제; 방부제; 무열원수; 등삼투염 용액; 인산염 완충액 등이 있을 수 있다.

[0137] 본 발명의 조성물은 수요에 따라 다양한 제형으로 형성될 수 있으며, 환자의 종류, 나이, 체중 및 대체적인 질병 상황, 약 투여 방식 등 요소에 따라 환자에게 유익한 투여량은 의사에 의해 결정될 수 있다. 약 투여 방식은 예를 들어 주사 또는 다른 치료 방식을 사용할 수 있다.

[0138] **본 발명의 이점:**

[0139] 1. 본 발명은 BCMA에 대한 특이 항체를 제공한다;

[0140] 2. 본 발명은 BCMA을 표적으로 하는 면역 효과기 세포를 제공한다; 및

[0141] 3. 본 발명의 항체는 BCMA를 발현하는 종양 세포에 효과적으로 결합할 수 있으며, 본 발명의 면역 효과기 세포는 BCMA를 발현하는 종양 세포에 대하여 현저한 살상 능력을 나타내므로, 본 발명의 항체 및 면역 효과기 세포는 다발성 골수종의 치료에 유효적 및 안전적으로 응용될 수 있음으로써 다발성 골수종의 치료에 물질적 기초를 마련한다.

[0142] 아래에서 구체적인 실시예를 결부하여 본 발명을 더 상세하게 설명한다. 이러한 실시예는 단지 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 한정하려는 것이 아님을 이해해야 한다. 아래 실시예에서 비고하지 않은 조건의 실험 방법은 일반적으로 J. Sambrook 등이 편집한 분자 클론 실험 지침, 제3버전, 과학출판사, 2002에서 서술된 조건 또는 제조업체에서 권장하는 조건을 따른다

[0143] **실시예 1. BCMA 재조합 단백질의 제조**

[0144] a. BCMA_huFc, BCMA_muFc 발현 플라스미드의 구축

[0145] 인간 BCMA의 세포외 부분 Met1-Ala54(서열번호 38) 유전자(서열번호 39)를 체외 합성하고, 상기 유전자를 인간 IgG1 중쇄 일정부위를 포함한 Fc 부분 Asp104-Lys330의 진핵 발현 플라스미드 중에 삽입하며 중간은 "GS"로 연결시켜, 융합 발현 단백질 BCMA_huFc(서열번호 40)를 형성하며, 대응되는 유전자 서열은 서열번호 41에 표시된 바와 같다.

[0146] BCMA 세포외 부분 유전자(서열번호 39)를 쥐 IgG1 중쇄 일정부위를 포함한 Fc 부분 Arg100-Lys324의 진핵 발현 플라스미드 중에 삽입하고 중간은 "GS"로 연결시켜, 융합 발현 단백질 BCMA_muFc(서열번호 42)를 형성하며, 대응되는 유전자 서열은 서열번호 43에 표시된 바와 같다.

[0147] b. BCMA_huFc, BCMA_muFc의 순시적 형질전환 발현

[0148] 1) 형질전환 하루 전에 125 ml 배양 플라스크에서 6 내지 7 x 10^5/ml 293F 세포를 접종시킨다.

[0149] 2) 형질전환 당일에 28 ml FreeStyle™ 293 expression medium에서 3 x 10^7 세포를 조정한다.

[0150] 3) 하기와 같은 조작 단계에 따라 lipid-DNA 복합체를 제조한다.

[0151] Opti-MEM I로 30 ug DNA를 희석하고 최종 부피 1 ml로 충분히 섞는다.

[0152] Opti-MEM I로 60 ul 293fectinTM을 희석하고 최종 부피 1 ml로 충분히 섞는다.

[0153] 실온에서 5분 동안 부화시킨다.

[0154] 4) 희석한 DNA와 293fectinTM을 혼합하고 실온에서 20분 동안 부화시킨다.

[0155] 5) 2 ml DNA-293fectin 복합체를 28 ml 세포 중에 넣고, 37도, 8 % CO_2, 125 rpm 조건에서 3 내지 4일 배양하여 상청액을 수집한다.

[0156] c. BCMA_huFc, BCMA_muFc의 정제

[0157] 1) 13000 rpm 조건에서 상청액을 15분 동안 원심분리한다.

[0158] 2) 단백질 A 필러를 사용하여 친화 정제를 진행하며 구체적인 조작 단계는 하기와 같다.

[0159] 균형: 10개 컬럼 부피의 균형 완충액으로 단백질 A 필러를 균형시킨다.

[0160] 샘플 로딩: 0.45 μm 필터로 처리된 모든 샘플을 로딩한다.

[0161] 세척: 물질 유출없이 통과할 때까지 20개 컬럼 부피 균형 완충액으로 세척한다.

[0162] 용리: 10개 컬럼 부피의 용리 완충액을 첨가하여 표적 단백질을 용리시킨다(6 % 중화 완충액을 수집 튜브에 사전에 첨가함).

[0163] 용액 배합

[0164] 균형 완충액: PBS pH 7.4

[0165] 용리 완충액: 0.1M 글리신 pH 2.6

[0166] 중화 완충액: 1M Tris

[0167] 3) 용리는 0.22 um의 막으로 여과하고, 10 KD의 단면 유동을 갖는 밀리 포어 한외 여과 튜브를 사용하여 1 ml 이내의 부피로 농축시키고, PD-Midi 탈염 칼럼을 사용하여 탈염시키고, 1.5 ml의 샘플을 수집한다. OD280/1.47에 의해 단백질 농도를 측정한다.

[0168] SDS-PAGE에 의해 2 ug 수집하였으며, 결과는 도 1에 도시된 바와 같다.

[0169] **실시예 2. K562-BCMA 안정적 형질전환 세포주의 구축**

[0170] 1. pWPT-BCMA 패키징 플라스미드의 구축

[0171] 인간 BCMA의 전장(서열번호 37) 유전자를 체외 합성하고 효소제한부위 MluI, SalI(서열번호 44)에 도입한다. 이중 제한효소에 의해 렌티바이러스 패키징 플라스미드 pWPT 중에 삽입한다.

[0172] 2. 렌티바이러스의 패키징

[0173] a) Lenti-x 293T 소화 후 8 × 10^6 세포로 10 cm 접시에 늘여놓고 37 ℃에서 배양한다.

[0174] b) 이튿날 오전: 플라스미드/PEI 혼합액을 배합하여 만든다.

[0175] pWPT-BCMA 5ug

[0176] psPAX.2 7.5ug

[0177] pMD2.G 2.5ug

[0178] 800 uL DMEM 중에 첨가하여 부화시킨다. PEI에 대응되는 양은 45 uL이고 800 uL OMEM 중에 첨가하여 5분 동안 부화시킨다.

[0179] c) 플라스미드 혼합액을 PEI 부화액 중에 적하하고 가볍게 혼합하여 실온에서 20분 동안 부화시킨다.

[0180] d) 배합하여 만든 플라스미드/PEI 혼합액을 세포 중에 적하하고 혼합시킨다. 5시간 후 액체를 교환한다.

[0181] e) 72시간 후 바이러스 상청액을 수집하여 0.45 um 필터로 여과한 후 4 ℃에서 잠시 보존한다.

[0182] 3. BCMA 바이러스에 의한 K562 세포 감염

[0183] a) 제1일 오후: 양호하게 성장한 K562 세포를 1 x 10^5 세포로 6 cm 접시에 늘여놓는다.

[0184] b) 제2일 오후: K562 세포 상청액을 제거하고, 3 mL의 신선한 완전 배지를 첨가하며, 또 1 mL의 바이러스 원액을 첨가하고, 최종 농도가 6 ug/mL인 폴리브렌을 첨가한다.

[0185] c) 제3일 오전: 상청액을 제거하고 5 mL의 신선한 완전 배지를 첨가한다.

[0186] d) 제6일 오전: 부분적 세포를 취한 후 유동식 검출을 진행한다.

[0187] 4. K562-BCMA 혼합 클론 감정

[0188] a) K562-BCMA 혼합 클론 및 K562 음성 세포를 1 % NCS(1 % 송아지 혈청을 함유하는 PBS)로 2 회 세척한 후 1차 항체로 부화한다. huBCMA 항체(abcam, #17323)를 1 % NCS 1:1000으로 희석하고, 각각 50 uL 첨가하며 4 ℃에서 45분 동안 부화시킨다.

[0189] b) 세포를 1 % NCS로 2회 세척한 후 2 차 항체로 부화한다. DyLight488로 표기된 염소 저항 쥐 IgG(abcam, #ab98420)를 1 % NCS 1:200으로 희석하고, 각각 50 uL 첨가하며 4 ℃에서 45분 동안 부화시킨다.

[0190] c) 세포를 1 % NCS로 3 회 세척한 후 1 % NCS 중에 재현탁하고 Guava easyCyte™ HT System 기기를 사용하여 검출하며, 결과는 도 2a에 도시된 바와 같다.

[0191] 5. K562-BCMA 단일 클론 플레이팅

[0192] a) K562-BCMA 혼합 클론 세포를 통계하여 유한희석법으로 단일 클론 플레이팅을 진행한다.

[0193] b) 한주일 후 클론 성장 정황을 관찰하고 배지를 보충 첨가한다.

[0194] c) 2주 후 단일 클론 성장한 셀 중 세포를 선택하여 확대배양을 진행한다.

[0195] 6. K562-BCMA 단일 클론 감정

[0196] 검출 방법은 혼합 클론 감정과 동일하며, 실험 결과는 도 2B에 도시된 바와 같다. 여기서 4개의 단일 클론은 BCMA 양성 클론이다.

[0197] **실시예 3. 전인 박테리오파지 디스플레이 라이브러리를 이용한 BCMA에 대해 특이적인 scFv 선별**

[0198] 본 발명에서 사용된 박테리오파지 디스플레이 라이브러리는 본 회사에서 구축한 전인의 천연 scFv 박테리오파지 라이브러리이고, 용량은 1E+11이다. 본 분야의 기술자에게 공지된 선별 방법을 이용하여 BCMA에 대해 고도로 특이적인 scFv 단편을 얻었다. 간단히 말해서, 10 ug/ml 항원 BCMA_huFc 및 인간 Fc 단편을 각각 면역 튜브에 코팅한다. Fc 단편의 영향을 감소시키기 위하여 박테리오파지 라이브러리를 인간 Fc 단편이 코팅된 면역 튜브 중에 넣고 1시간 결합시킨다. 상청액을 취하여 BCMA_huFc가 코팅된 면역 튜브 중에 넣고 1.5시간 결합시키며 잇따라 비특이적인 박테리오파지를 세척하고 결합된 박테리오파지를 용리시킨 후 로그성장기의 대장균 TG1에 대해 감염시킨다. 용리된 박테리오파지를 확대 배양하고 다음 라운드의 선별을 위해 PEG/NaCl 침전으로 확대된 박테리오파지 라이브러리를 정제하였다. 패닝에 의해 3 내지 4회 순환을 진행하여 BCMA와 특이적으로 결합되는 scFv 박테리오파지 단일 클론을 축적한다. BCMA_huFc에 대한 표준 ELISA 방법에 의해 양성 클론을 결정한다. ELISA는 인간 Fc 단편을 무관 항원으로 사용하여 항체의 특이성을 검증하는 것이다. 총 2470개의 클론을 선별하였고, 그 중 160개 클론된 ELISA 실험은 BCMA_huFc를 특이적으로 결합하고 인간의 Fc 단편을 결합하지 않는다. 여기서 76개 신호값이 높은 클론을 선택하여 시퀀스를 진행하여 23개 단일 서열을 얻었다. 이 23개 클론을 발현 정제하여 3개 특이적으로 결합된 K562-BCMA 세포(도 4)를 얻었으며 클론 명칭은 7G2, 7A12, 23F10이다. 시퀀스 분석 결과, 7A12의 중쇄 가변 영역은 서열번호 13에 의해 표시되는 아미노산 서열이고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 11에 의해 표시되는 아미노산 서열이다. 7G2의 중쇄 가변 영역은 서열번호 17에 의해 표시되는 아미노산 서열이고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 15에 의해 표시되는 아미노산 서열이다. 23F10의 중쇄 가변 영역은 서열번호 21에 의해 표시되는 아미노산 서열이고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 19에 의해 표시되는 아미노산 서열이다.

[0199] 7A12의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 13):

[0200] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYAMS**WVRQAPGKGLEWVS**AISGSGGSTYYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**YPYL AFDY**WGQGTLVTVSS(고딕활자체에 밑줄을 그은 부분은 CDR 서열을 나타냄)

[0201] 7A12의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 14):

[0202] GAGGTGCAATTGCTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATG AGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGCGTTACCCATACCTG GCATTCGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT

[0203] 7A12의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 11)

[0204] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**RASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAPRLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QQYGYPPSY**TFGQGTKVEIK(고딕활자체에 밑줄을 그은 부분은 CDR 서열을 나타냄)

[0205] 7A12의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 12):

[0206] GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTACGGTTACCCACCATCTTACACGTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAA

[0207] 7G2의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 17):

[0208] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYAMS**WVRQAPGKGLEWVS**AISGSGGSTYYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**LSGDAAMDY**WGQGTLVTVSS(고딕활자체에 밑줄을 그은 부분은 CDR 서열을 나타냄)

[0209] 7G2의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 17):

[0210] GAGGTGCAATTGCTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAACTGTCTGGTGATGCAGCAATGGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT

[0211] 7G2의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 15):

[0212] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**RASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAPRLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QQYGYPPRY**TFGQGTKVEIK(고딕활자체에 밑줄을 그은 부분은 CDR 서열을 나타냄)

[0213] 7G2의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서(서열번호 16):

[0214] GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTACGGTTACCCACCAAGATACACGTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAA

[0215] 23F10의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 21):

[0216] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS**AISGSGGSTYYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**VRPFWGTFDY**WGQGTLVTVSS(고딕활자체에 밑줄을 그은 부분은 CDR 서열을 나타냄)

[0217] 23F10의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 22):

[0218] GAGGTGCAATTGCTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGTTCGTCCATTCTGGGGTACTTTCGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT

[0219] 23F10의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 19):

[0220] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**RASQSVSSSYLA**WYQQKPGQAPRLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**QQYFNPPEY**TFGQGTKVEIK(고딕활자체에 밑줄을 그은 부분은 CDR 서열을 나타냄)

[0221] 23F10의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 20):

[0222] GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTACTTCAACCCACCAGAATACACGTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAA

[0223] **실시예 4. 항-BCMA scFv_Fc 융합 항체의 구축 및 그 진핵세포에서의 순시적 형질전환 발현 정제, 활성 감정**

[0224] 7G2, 7A12, 23F10의 VH 및 VL 단편에 대해 각각 프라이머를 설계하고, 15개 플렉셔블 아미노산

(GGGGSGGGGSGGGGS)으로 조성된 linker 연결을 도입하여 scFv를 조성한다. VH 상류에 NheI의 효소제한부위와 보호 염기를 도입하고, VL 하류에 BamHI의 효소제한부위와 보호 염기를 도입한다. 1 % 아가로오스 겔 전기영동에 의해 PCR 산물을 분석하고 정제 및 회수한다. 효소 절단 후 V152(상하이 루이진생물기술유한회사) 진핵 발현 벡터를 연결시킨다. 293fectin™ Transfection reagent(Invitrogen, 12347-019) 또는 폴리에틸렌이민(PEI)(Sigma-Aldrich, 408727)을 이용하여 로그 성장기의 293F 세포를 순시적 형질전환시킨다. 형질전환 5-7일 후, 배양 상청액을 수집하여 단백질 A에 의해 친화 정제를 진행한다. SDS PAGE를 통하여 얻은 항체에 대해 정량 및 정성 분석(도 5)을 진행한다.

[0225] 유세포분석법에 의해 항체와 BCMA를 안정적으로 발현하는 K562의 결합을 테스트한다. FACs 검출의 구체적인 방법은 다음과 같다. 세포를 수확하고, 성장 배지로 세포를 1회 세척하며, PBS 중에 재현탁시키고, 세포 농도를 4E+5 세포/ml로 조정한다. 얼음에서 구배 희석된 scFv_Fc 융합 항체를 세포와 30분 동안 부화시키고, 항체의 시작 농도는 500 nM이고, 5배 희석하여 총 7개 기울기가 있다. 그후 FITC 표지의 항-쥐 IgG 제2항체와 부화시킨다. 두번의 세척 단계 이후, Guava easyCyte™ HT System 기기로 검출한다. 도 6은 항체7A12, 7G2, 23F10 scFv_Fc 융합 형태와 K562-BCMA 결합 정황을 나타낸다. 이 3개 항체는 모두 농도에 의존하며 결합하고, EC50은 각각 3.13 nM, 3.42 nM, 5.61 nM이다.

[0226] **실시예 5. 표면 플라즈몬 공명 기술(SPR)을 이용한 항체의 친화력 측정**

[0227] biacoreT200을 사용하여 BCMA에 대한 상이한 항체의 친화력을 측정한다. 구체적으로 하기와 같이 수행한다.

[0228] BCMA_huFc를 아미노기와 결합된 방식으로 CM5 칩에 약 500 RU까지 코팅시키고, 구배 희석된 항체를 30 ul/min의 유속으로 유동상으로서 항원 코팅 채널을 통과시켰다. 작동 완충액은 HBS-N, 온도는 25도이다. 실험 데이터는 BIAevaluation3.2에 의해 분석하고, 역학 곡선은 1:1의 langmuir 모델로 피팅한다. 여기서 7A12(scFv_Fc)의 KD는 663 pM이고, 7G2(scFv_Fc)의 KD는 499 pM이고, 23F10(scFv_Fc)의 KD는 667 pM(도 7 참조)이다. 구체적인 파라미터는 하기 표에 표시된 바와 같다.

[0229]

클론	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
7G2	7.52E+04	3.75E-05	4.99E-10
7A12	9.84E+04	6.53E-05	6.63E-10
23F10	6.64E+04	4.43E-05	6.67E-10

[0230] **실시예 6. FACs를 이용한 항체와 종양 세포주의 결합 측정**

[0231] RPMI8226은 인간 다발성 골수종 말초혈액 B 림프구이다. FACs 검출의 구체적인 방법은 다음과 같다. 세포를 수확하고, 성장 배지로 세포를 1회 세척하며, PBS 중에 재현탁시키고, 세포 농도를 4E+5 세포/ml로 조정한다. 얼음에서 구배 희석된 scFv_Fc 융합 항체를 세포와 30분 동안 부화시키고, 항체의 시작 농도는 500 nM이고, 5배 희석하여 총 7개 기울기가 있다. 그후 FITC 표지의 항-쥐 IgG 제2항체와 부화시킨다. 두번의 세척 단계 이후, Guava easyCyte™ HT System 기기로 검출한다. 도 8에 도시된 바와 같이, 항체 7A12, 7G2, 23F10 scFv_Fc 융합 형태는 세포주 RPMI8226에서 농도 기울기에 의존하며 결합한다.

[0232] **실시예 7. 항-BCMA 항체와 BCMA 리간드 APRIL의 경쟁성 결합 실험**

[0233] 1. APRIL 융합 단백질의 발현 정제 재조합

[0234] 인간 APRIL His115-Leu250 및 인간의 IgG1 중쇄 일정부위를 발현하는 Fc 단편 Asp104-Lys330의 융합 단백질을 재조합시고, 중간은 "GS"로 연결시키며, 융합 단백질 APRIL_huFc(서열번호 45)에 대응되는 유전자 서열은 서열번호 46에 표시된 바와 같다. 실시예 1에 서술된 방법으로 순시적 형질전환 발현 정제를 진행한다.

[0235] 2. 경쟁성 ELISA

[0236] 50 ng/ml 100 ul/빈 BCMA_muFc와 ELISA 플레이트에서 코팅되고, 하룻밤 동안 4도의 온도에서 코팅하였다. 다음날, 코팅된 플레이트를 PBS로 3회 세척하고, 2 % 탈지 분유를 함유하는 PBS를 첨가하고, 실온에서 1 시간 동안 밀봉시킨다. 동시에 40 ng/ml APRIL_huFc 및 구배 희석된 항체 7A12, 7G2 또는 23F10(시작 농도 200 nM이고, 3배 희석하며, 7개 기울기가 있음)을 첨가한다. 실온에서 1시간 부화하고 PBST로 세번 세척하고, PBS로 세번 세척하며 1:1000으로 희석된 HRP 표지의 쥐 저항 인간 Fc 항체를 넣고 실온에서 1시간 동안 부화시키고, PBST로

세번 세척하며, PBS로 세번 세척한다. TMB 발색을 넣고 효소라벨기기로 숫자를 판독한다.

[0237] 실험 결과는 도 9에 도시된 바와 같으며, 7A12, 7G2, 23F10은 모두 APRIL과 BCMA의 결합을 현저하게 억제할 수 있다. 이는 본 발명의 항체가 BCMA와 그 천연 리간드의 결합을 억제할 수 있다는 것을 설명한다.

[0238] **실시예 8. 항-BCMA 키메라 항원 수용체 플라스미드(CAR)의 구축**

[0239] a. 항-BCMA 항체 7A12 키메라 항원 수용체 플라스미드의 구축

[0240] PRRLSIN-cPPT.EF-1α를 벡터로 하여, 항체 7A12를 발현하는, PRRLSIN-cPPT.EF-1α-7A12-28Z, PRRLSIN-cPPT.EF-1α-7A12-BBZ 및 PRRLSIN-cPPT.EF-1α-7A12-28BBZ를 포함하는 2대, 3대 키메라 항원 수용체의 렌티바이러스 플라스미드를 구축한다. 7A12-28Z 서열은 CD8α 신호 펩타이드(서열번호 23), 7A12scFv(서열번호 47), CD8 힌지(서열번호 25), CD28 막관통 영역(서열번호 27) 및 세포내 신호 전달 도메인(서열번호 29) 및 CD3의 세포내 단편 CD3ξ(서열번호 31)로 조성된다. 7A12-BBZ 서열은 CD8α 신호 펩타이드(서열번호 23), 7A12scFv(서열번호 47), CD8 힌지(서열번호 25) 및 막관통 영역(서열번호 33), CD137 세포내 신호 전달 도메인(서열번호 35) 및 CD3ξ(서열번호 31)로 조성된다. 7A12-28BBZ서열은 CD8α 신호 펩타이드(서열번호 23), 7A12-scFv(서열번호 47), CD8 힌지(서열번호 25), CD28 막관통 영역(서열번호 27) 및 세포내 단편(서열번호 29), CD137 세포내 신호 전달 도메인(서열번호 35) 및 CD3ξ(서열번호 31)로 조성된다.

[0241] b. 항-BCMA 항체 7G2 키메라 항원 수용체 플라스미드의 구축

[0242] PRRLSIN-cPPT.EF-1α를 벡터로 하여, 항체 7G2를 발현하는, PRRLSIN-cPPT.EF-1α-7G2-28Z, PRRLSIN-cPPT.EF-1α-7G2-BBZ 및 PRRLSIN-cPPT.EF-1α-7G2-28BBZ를 포함하는 2대, 3대 키메라 항원 수용체의 렌티바이러스 플라스미드를 구축한다. 7G2-28Z 서열은 CD8α 신호 펩타이드(서열번호 23), 7G2scFv(서열번호 48), CD8 힌지(서열번호 25), CD28 막관통 영역(서열번호 27) 및 세포내 신호 전달 도메인(서열번호 29) 및 CD3의 세포내 단편CD3ξ(서열번호 31)로 조성된다. 7G2-BBZ 서열은 CD8α 신호 펩타이드(서열번호 23), 7G2scFV(서열번호 48), CD8 힌지(서열번호 25) 및 막관통 영역(서열번호 33), CD137 세포내 신호 전달 도메인(서열번호 35) 및 CD3ξ(서열번호 31)로 조성된다. 7G2-28BBZ 서열은 CD8α 신호 펩타이드(서열번호 23), 7G2-scFv(서열번호 48), CD8 힌지(서열번호 25), CD28 막관통 영역(서열번호 27) 및 세포내 단편(서열번호 29), CD137 세포내 신호 전달 도메인(서열번호 35) 및 CD3ξ(서열번호 31)로 조성된다.

[0243] **실시예 9. CAR-T 세포의 제조**

[0244] 1. BCMA CAR 렌티바이러스 벡터를 표적으로 하는 렌티바이러스 패키징, 바이러스 농축 및 적도 측정

[0245] a. 렌티바이러스 패키징

[0246] 1) 293T 세포를 10 cm 세포 배양접시에 접종시키고, 형질전환하기 위해 37 ℃, 5 % CO_2 조건에서 하룻밤 동안 배양하며, 배양기는 10 % 소태아혈청(Gibico)을 함유한 DMEM이다.

[0247] 2) 표적 유전자 플라스미드 PRRLSIN-cPPT.EF-1α-EGFP(Mock) 또는 관련 CAR 플라스미드 5.4 μg을 각각 패키징 플라스미드 pRsv-REV 6.2 μg, RRE-PMDLg 6.2 μg, Vsvg 2.4 μg과 800 μL 대조군 DMEM 배양액에 용해시키고 균일하게 혼합시킨다.

[0248] 3) 60 μg PEI를 800 μl의 무혈청 DMEM 배양액 중에 용해시키고, 가볍게 균일하게 혼합시키며(또는 1000 rpm에서 5초 동안 소용돌이시킴), 실온에서 5분 동안 부화시킨다.

[0249] 4) 형질전환 복합체의 형성: 플라스미드 혼합액을 PEI 혼합액에 넣고 첨가 후, 즉시 소용돌이 혼합 또는 가볍게 균일하게 혼합하며, 실온에서 20분 동안 부화시킨다.

[0250] 5) 형질전환 복합체 1.6 ml를 11 ml DMEM 배지를 함유한 10 cm 배양접시(액체를 교환 할 필요가 없음)에 적가한다. 4-5시간 후, 10 % FBS의 DMEM 배지로 형질전환된 293T 세포에게 액체를 바꾸어준다. 37 ℃에서 72시간 동안 부화시키고, 바이러스 상청액을 수집한다.

[0251] b. 렌티바이러스 농축

[0252] 1) 5X PEG8000NaCl 배합: NaCl 8.766 g, PEG8000 50 g을 200 ml Milli-Q 순수물에 용해시킨다. 121 ℃에서 30분 동안 습열멸종시킨다. 4 ℃에 저장한다.

[0253] 2) 0.45 μm 필터를 사용하여 렌티바이러스 상청액을 여과한다. 각각 30 ml 여과한 후의 바이러스 초기액을 7.5

ml의 5X PEG-8000 NaCl 모액에 넣는다. 20 내지 30분에 한번씩 혼합시키고, 총 3 내지 5회 진행한다. 4 ℃에서 하룻밤 동안 놓아둔다. 4 ℃, 4000 g 조건에서 20분 동안 원심분리한다.

[0254] 3) 상층액을 흡인하고 1 내지 2 분 동안 튜브를 정치한 후 잔여 액체를 흡수한다. 적당한 양의 렌티바이러스 용해액을 넣고 렌티바이러스 침전을 용해시킨다. 분류한 후 -80 ℃에 저장한다.

[0255] c. 렌티바이러스 적도 측정

[0256] 1) 293T 세포를 2×0^{5}의 세포개수로 1 ml/well의 부피로 6well 배양판에 접종시킨다. 0.6 μl/ml에 따라 초기 농도 10 ug/μl의 폴리브렌 용액을 최종 농도 6 ug/ml가 되도록 첨가한다. 37 ℃, 5 % CO_2 조건에서 1시간 동안 배양하고 배양액은 10 % 소태아혈청을 함유한 DMEM이다.

[0257] 2) 10 μL/well의 바이러스 농축액을 3개 기울기에서 5배 희석하고, 37 ℃, 5 % CO_2 조건에서 배양한다.

[0258] 3) 감염 72시간 후, 췌장 효소로 293T 세포를 소화시키고, 1 ml DMEM(10 % FBS)을 넣어 소화를 종료시키며, 세포 현탁액을 2 ml 원심분리 튜브 중(2등분)에 전이시켜 5000 rpm에서 5분 동안 원심분리하고 상청액을 제거한다. PBS(2 % NBS)로 두번 세척한다.

[0259] 4) 대조군의 세포에 50μl PE-SA(1:200으로 희석) 항체를 넣어 얼음에서 45분 동안 부화시키고 PBS(2 % NBS)로 두번 세척하며 재현탁한 후 대조군으로 사용한다.

[0260] 5) 검출군의 세포 +50μl 1: 50에 의해 희석된 biotin-Goat anti 인간 IgG, $F(ab')_2$ 항체를 얼음에서 45분 동안 부화시킨다. PBS(2 % NBS)로 두번 세척한다. 50μl PE-SA(1:200으로 희석) 항체를 넣어 얼음에서 45분 동안 부화시킨다.

[0261] 6) 2 ml PBS(2 % NBS) 재현탁 세포를 넣고, 4 ℃, 5000 rpm/min 조건에서 5분 동안 원심분리하여 상청액을 제거한다. 두번 반복한다.

[0262] 7) 500 μl PBS(2 % NBS)를 넣고, 유동식 튜브 중에 전이시킨다. 유세포분석기로 PE 경로를 검출하며 양성률이 5 내지 20 %인 세포수가 적합하고, 적도(PFUs/mL)=세포개수×성률/바이러스 부피를 계산한다.

[0263] 2. 렌티바이러스에 의한 T 림프구의 형질도입------CAR 양성의 T 림프구의 제조

[0264] 1) T 림프구 활성화: 약 1×0^{6} /mL 밀도로 림프구를 넣고 배지에서 배양하며, 세포 비율이 2:1인 자성구슬에 따라 동시에 항-CD3 및 CD28 항체로 코팅된 자성구슬(Invitrogen)과 최종 농도 500 U/mL의 재조합 인간 IL-2(상하이 화신바이오테크유한회사)를 넣어 48시간 동안 자극하여 배양한다.

[0265] 2) 감염 하루 전에 Retronectin은 24-웰 플레이트에 코팅되고, retronectin의 최종 농도는 5 μg/ml이고, 4도에서 하룻밤 동안 배양되었다.

[0266] 3) 24-웰 플레이트 중의 retronectin 용액(PBS)을 제거하고, 1 ml PBS로 두번 세척한다.

[0267] 4) MOI = 10에 따라 PBMCs 세포에 농축후의 렌티바이러스를 넣고, 1000 g 조건에서 40분 동안 원심 분리한 후 세포 배양박스에 전이시킨다.

[0268] 5) 증폭 배양: 감염 후의 세포를 5×0^{5}/mL의 밀도로 격일로 계대배양하고, 동시에 림프구 배양액에서 최종 농도 500 U/mL의 재조합 인간 IL-2를 보충 첨가한다.

[0269] 3. T 림프구 키메라 항원 수용체의 발현

[0270] 1) 렌티바이러스에 의해 감염된 T 림프구의 배양 7일 째에 원심분리 튜브내에서 1×06의 T 세포를 취한다.

[0271] 2) 4 ℃, 5000 rpm 조건에서 5분 동안 원심분리하여 상청액을 제거하며, PBS로 두번 세척한다.

[0272] 3) 피검출 세포를 50 μl의 biotin-Goat anti 인간 IgG, F(ab')2항체(1: 50으로 희석)에 넣고 얼음에서 45분 동안 부화시킨다. PBS(2 % NBS)로 두번 세척한다. 50 μl PE-SA(1: 200으로 희석)항체를 넣고 얼음에서 45분 동안 부화시킨다.

[0273] 4) 2 ml PBS(2 % NBS) 재현탁 세포를 넣고, 4 ℃, 5000 rpm/min에서 5분 동안 원심분리하여 상청액을 제거한다. 두번 반복한다.

[0274] 5) 500 μl PBS(2 % NBS)를 넣고 유동 튜브에 전이시킨다. 유세포분석기로 PE 채널을 검출하여 CAR 양성의 T 세포 비율을 결정한다.

[0275] 체외 독성 살상 실험을 진행할 경우, 도 10에 도시된 바와 같이, Mock, 7A12-28Z, 7A12-BBZ, 7A12-28BBZ, 7G2-28Z, 7G2-BBZ 및 7G2-28BBZ T 세포의 감염 양성률은 각각 72.8 %, 60.8 %, 48.7 %, 57.4 %, 67.5 %, 68.8 %, 63.6 %이다.

[0276] 4. BCMA CAR T 세포를 표적으로 하는 세포 독성 측정

[0277] CytoTox 96 비방사성 세포 독성 검출 시약 키트(Promega 회사)를 사용하며 구체적으로 CytoTox 96 비방사성 세포 독성 검출 시약 키트 설명서를 참조한다.

[0278] 표적 세포: 각각 75μl 2×0^{5}/mL의 K562, K562-BCMA 및 RPMI-8226 세포를 96웰 플레이트에 접종시킨다. 효과기 세포: 효과기 표적 비 3:1, 1:1 또는 1:3에 따라 T-Mock 및 상이한 키메라 항원 수용체를 발현하는 CAR T 세포를 첨가한다. 각 군에 4개의 이중구멍을 설치하고 4개의 이중구멍의 평균값을 구한다. 검출 시간은 세포 부화 18시간이다. 여기서 각 실험군과 각 대조군은 하기와 같다.

[0279] 각 실험군: 각 표적 세포 + 상이한 키메라 항원 수용체를 발현하는 CAR T;

[0280] 대조군 1: 표적 세포는 LDH를 최대로 방출한다.

[0281] 대조군 2: 표적 세포는 자발적으로 LDH를 방출한다.

[0282] 대조군 3: 효과기 세포는 자발적으로 LDH를 방출한다.

[0283] 세포 독성 계산 공식은, 세포 독성 % = [(실험군 - 효과기 세포 대조 - 표적 세포 대조)/(표적 세포 최대 열분해량 - 표적 세포 대조)]×00 %이다.

[0284] 실험 결과, 상이한 키메라 항원 수용체를 각각 발현하는 CAR T 세포는 BCMA 양성의 K562-BCMA 및 RPMI-8226 세포에 대해 현저한 체외 살상 활성을 나타내며, 특히 BCMA를 내인성 발현하는 RPMI-8226 세포에 대한 그 살상 독성은 보다 강하고, BCMA 양성의 K562 세포에 대해 거의 살상 작용이 없다(도 11a).

[0285] 5. 다발성 골수종 말초혈액 B 림프구 RPMI-8226의 NOD/SCID 쥐 피하이식종양 모델에 대한 치료

[0286] RPMI-8226 세포를 각각 40마리 NOD/SCID 쥐에 접종하며, 접종한 세포수는 8×0^{6}/마리 쥐이다. 종양 세포를 피하 접종한 12일 째, 종양 부피는 평균 75 mm^{3}이고, 임의로 4개 군으로 나뉘어 각각 꼬리에 1×0^{7}CAR T를 정맥주사하고 주사하기 전에 100 mg/kg 용량의 시클로포스파미드(cyclophosphamide)를 복강주사하여 쥐 체내 잔류한 T 세포를 사전에 제거하고, CAR T를 주사한 17일 째에 쥐의 목을 길게 빼어 죽였다.

[0287] 쥐의 종양 크기에 대한 분석 결과는 도 11b에 도시된 바와 같으며, UTD 군에 비해, 7A12-28Z, 7A12-BBZ 및 7A12-28BBZ 치료군의 종양 억제 효과는 매우 현저하게 나타났으며, CAR T를 주사한 17일 째에 7A12-28Z 치료군의 7마리 쥐 중 1마리의 종양이 사라졌고, 7A12-BBZ 치료군의 7마리 쥐 중 2마리의 종양이 사라졌으며, 7A12-28BBZ 치료군의 7마리 쥐의 종양은 모두 사라졌고 종양 억제율은 각각 7A12-28Z(84.6 %), 7A12-BBZ(65.4 %) 및 7A12-28BBZ(100 %)이었다.

[0288] **실시예 10. 항체 23F10의 개조**

[0289] 본 실시예는 상술한 23F10을 모본 항체로 하고, 박테리오파지 디스플레이 방법을 이용하여 23F10에 대해 개조하였다. 23F10에 기반한 박테리오파지 라이브러리의 구축에 있어서 경쇄 및 중쇄의 CDR3 영역을 보류하였으며, 프라이머 변성에 의해, 경쇄의 CDR1 및 CDR2 또는 중쇄의 CDR1 및 CDR2를 각각 랜덤화하여 2개의 박테리오파지 라이브러리를 구축하였다. 프라이머 정보는 하기와 같다.

서열번호	명칭	서열
49	프라이머 LMF	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC
50	프라이머 BH1R	TGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTGGCGGAC CCAMNNMNNMNNMNNMNNMNNAAAGGTGAATCCGGAGGC TG
51	프라이머 BH2F	GGCTGGAGTGGGTCTCANNKATTNNKNNKNNKNNKGGTN NKACANNKTACGCAGACTCCGTGAAGGG
52	프라이머 FdR	GACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGG
53	프라이머 BL1R	GATGAGGAGCCTGGGAGCCTGGCCAGGTTTCTGCTGGTA CCAMNNTAAMNNMNNMNNMNNMNNMNNCTGACTGGCCCT GCAAGAG
54	프라이머 BL2F	CCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCNNKNNKNNKNNKNNKAG GGCCACTGGCATCCCAGAC

[0290]

[0291] **2.1 23F10 돌연변이체의 구축**

[0292] 우선 항체23F10(scFv)(서열번호 55)에 기반하여 템플릿 플라스미드를 구축한다. 경쇄 CDR1 및 CDR2를 랜덤화한 박테리오파지 라이브러리에 대해, 프라이머 LMF 및 BL1R을 사용하여 PCR에 의해 단편1을 증폭한다. 프라이머 BL2F 및 FdR을 사용하여 PCR에 의해 단편2를 증폭한다. 다음 단편1과 단편2를 바이패스 PCR에 의해 연결시켜 더 랜덤화된 서열의 scFv 전장을 얻은 다음, 전장 단편을 NcoI 및 NotI 효소로 절단하고 T4 연결효소에 의해 동일한 제한효소의 템플릿 플라스미드에 연결시킨다. 또한 TG1 수용성 세포에 전기전환하며 저장량은 1.50E+9이다. 중쇄 CDR1 및 CDR2를 랜덤화한 박테리오파지 라이브러리에 대해, LMF 및 BH1R을 사용하여 PCR에 의해 단편3을 증폭한다. BH2F 및 FdR을 사용하여 PCR에 의해 단편4를 증폭한다. 다음 단편3과 단편4를 바이패스 PCR에 의해 연결시켜 더 랜덤화된 서열의 scFv 전장을 얻은 다음, 전장 단편을 NcoI 및 NotI 효소로 절단하고 T4 연결효소에 의해 동일한 제한효소의 템플릿 플라스미드에 연결시킨다. 또한 TG1 수용성 세포에 전기전환하며 저장량은 2.2E+9이다.

[0293] 박테리오파지 라이브러리의 선별은 본 특허의 실시예 3의 방법을 참조한다. 항원 BCMA_huFc의 시작 농도는 20 nM이고, 5배 구배 희석하여 다음 라운드 선별을 진행한다. 패닝에 의해 2 내지 3회 순환을 진행하여 BCMA_huFc와 특이적으로 결합되는 scFv 박테리오파지 클론을 축적한다. BCMA_huFc에 대한 표준 ELISA 방법에 의해 양성 클론을 결정한다. ELISA는 인간 Fc 단편을 무관 항원으로 사용하여 항체의 특이성을 검증하는 것이다. 총 80개의 ELISA 양성의 클론을 선별하였고, 다시 유도한 이후 biacore에 의해 상청액을 유도한 해리 상수 K_d를 측정한다. 그중 두개의 클론 25C2, 25D2는 모본 클론 23F10에 비해 10배 낮으며, 하기 표에 표시된 바와 같다.

클론	해리 상수(K_d,S^{-1})
23F10	3.43E-03
25C2	3.64E-04
25D2	3.74E-04

[0294]

[0295] 시퀀싱 결과, 클론 25C2 및 25D2의 경쇄는 23F10과 같다. 도 12는 클론 25C2, 25D2 및 23F10의 중쇄 아미노산 서열을 비교하였으며, 여기서 클론 25C2는 모본 항체 23F10에 비해 중쇄에 5개 점이 돌연변이되고(서열번호 56, 57은 각각 25C2의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열 및 뉴클레오티드 서열임), 여기서 CDR1에는 2개, 즉 제31 부위 세린은 글리신으로 변하고, 제32 부위 티로신은 아스파라긴으로 변한다. CDR2에는 2개, 즉 제54 부위 세린은 아스파라긴으로 변하고, 제59 부위 티로신은 페닐알라닌으로 변하며, 프레임워크 영역에 1개, 즉 제30 부위 세린은 글리신으로 변한다. 클론 25D2는 모본 항체 23F10에 비해 중쇄에 4개 점이 돌연변이되며(서열번호 58, 59는 각각 25D2의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열 및 뉴클레오티드 서열임), 여기서 3개는 CDR2 영역에

위치하고, 즉 제54 부위 세린은 글리신으로 변하며, 제57 부위 세린은 아스파라긴으로 변하고, 제59 부위 티로신은 페닐알라닌으로 변하며, 프레임워크 영역에 1개, 즉 제30 부위 세린은 글리신으로 변한다.

[0296] 25C2의 HCDR1의 서열은 서열번호 60에 표시된 바와 같고, 25C2의 HCDR2의 서열은 서열번호 61에 표시된 바와 같다. 25D2의 HCDR1의 서열은 서열번호 62에 표시된 바와 같고, 25D2의 HCDR2의 서열은 서열번호 63에 표시된 바와 같다. 25C2scFv의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 64, 65에 표시된 바와 같고, 25D2scFv의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 66, 67에 표시된 바와 같다.

[0297] **2.2 클론25C2, 25D2(scFv_Fc)의 발현 정제**

[0298] 실시예 4를 참조하면, VH 상류에 적합한 효소제한부위와 보호 염기를 도입하고, VL의 하류에 적합한 효소제한부위와 보호 염기를 도입한다. 1 % 아가로오스 겔 전기영동에 의해 PCR 산물을 분석하고 정제 및 회수한다. 효소 절단 후 인간 Fc 단편을 함유한 진핵 발현 벡터 V152(상하이 루이진생물기술유한회사에서 구매됨)에 연결시킨다. 293Fectin에 의해 293F 세포에 형질주입시키고 발현시킨다.

[0299] SEC에 의해 25C2, 25D2의 축적 정황을 분석한 결과 도 13a 및 도 13b에 도시된 바와 같으며, 단량체 형식의 항체는 각각 91 %, 97 % 차지한다. 모본 항체 23F10(30 % 단량체율)에 비해 각각 61 % 및 67 % 향상되었으며, 축적도는 현저하게 감소하였다. 한외여과 농축을 거친 후, SDS PAGE에 의해 얻은 항체에 대해 정량 및 정성 분석을 진행한다. 수율은 각각 80 ug/ml 및 60 ug/ml(수율 = 최종산물 질량/형질주입 부피)이다.

[0300] **2.3 클론25C2, 25D2의 결합 특성**

[0301] 인간 BCMA를 안정적으로 발현하는 K562 세포(K562-BCMA) 및 K562를 사용하여 세포를 수집하고, 완전한 성장 배지로 세포를 세척하며 또 약 1 내지 5×0^{5}개 세포/well로 세포를 U형 저부 미량정량판에 펼쳐놓는다. 얼음에서 구배 희석된 scFv_Fc 융합 항체를 K562-BCMA/K562와 30분 동안 부화시키고, 그후 FITC 표지의 항-인간 Fc를 제2 항체로 하여 부화시킨다. 두번의 세척 단계 이후, Guava easyCyte™ HT System 기기로 분석하고, GraphPad Prism으로 실험 데이터를 처리하여 EC50을 얻었다. 도 14는 25C2, 25D2와 K562-BCMA 및 K562 세포의 결합 정황을 나타낸다. 결과, 안정성이 향상되고 축적 정도가 감소한 2개의 클론 25C2, 25D2와 K562-BCMA의 결합 능력 EC50은 각각 2.594 nM 및 1.891 nM이다. 23F10에 비해 3 내지 4배 향상되었다.

[0302] **2.4 클론 25C2, 25D2의 특이성 측정**

[0303] ELISA에 의해 항체23F10, 25C2, 25D2의 특이성을 측정한다.

[0304] 전날에 2 ug/ml 재조합 인간 BCMA_Fc, 마우스 BCMA_Fc, TACI_huFc(R&D, #174TC), BAFF R(R&D, #1162-BR)을 면역판에 코팅하고 4도에서 하룻밤 지낸다. 두 번째 날에 300 ul/well 2 % MPBS를 넣고 2시간 밀봉시킨 다음 200 nM 정제된 항체(scFv 형태)를 넣고 37도에서 1시간 동안 부화시키고, PBST(0.05 % Tween-20을 함유한 PBS)로 세번 세척하며 PBS로 세번 세척한 다음, 1: 4000으로 희석한 HRP 표지의 항-Flag 태그의 항체(sigma, #A8592-1MG)를 넣고 37도에서 1시간 동안 부화시키고, PBST(0.05 % Tween-20을 함유한 PBS)로 세번 세척하며 PBS로 세번 세척한다. 100 ul/well TMBS 기저물을 넣고 10분 내지 15분 발색시키며 50 ul 2M 황산을 넣어 반응을 정지한다.

[0305] 결과는 도 14b에 도시된 바와 같으며, 항체7A12, 23F10, 25C2, 25D2는 인간 BCMA와 특이적으로 결합하고 인간 TACI 및 인간 BAFF R과 결합하지 않는다. 여기서 항체 25C2, 25D2와 마우스 BCMA는 비교적 약하게 결합된다.

[0306] **실시예 11. 25C2, 25D2의 CAR-T 세포의 제조**

[0307] 실시예 8의 동작을 참조하면 각각 구축하여 25C2, 25D2의 키메라 항원 수용체 플라스미드를 얻었다.

[0308] a. 25C2의 키메라 항원 수용체 플라스미드의 구축

[0309] PRRLSIN-cPPT.EF-1α를 벡터로 하여 항체 25C2를 발현하는 2대 키메라 항원 수용체의 렌티바이러스 플라스미드 PRRLSIN-cPPT.EF-1α-25C2-BBZ를 구축하였다. PRRLSIN-cPPT.EF-1α를 벡터로 하여 항체 25D2를 발현하는 2대 키메라 항원 수용체의 렌티바이러스 플라스미드 PRRLSIN-cPPT.EF-1α-25D2-BBZ를 구축하였다.

[0310] 25C2-BBZ 서열은 CD8α 신호 펩타이드(서열번호 23), 25C2scFv(서열번호 64), CD8 힌지(서열번호 25) 및 막관통 영역(서열번호 33), CD137 세포내 신호 전달 도메인(서열번호 35) 및 CD3ζ(서열번호 31)로 조성된다.

[0311] 25D2-BBZ 서열은 CD8α 신호 펩타이드(서열번호 23), 25D2scFV(서열번호 66), CD8 힌지(서열번호 25) 및 막관

통 영역(서열번호 33), CD137 세포내 신호 전달 도메인(서열번호 35) 및 CD3ξ(서열번호 31)로 조성된다.

[0312] 실시예 9를 참조하면, 플라스미드 PRRLSIN-cPPT.EF-1α-25C2-BBZ, PRRLSIN-cPPT.EF-1α-25D2-BBZ를 각각 렌티바이러스 패키징, T 세포 감염, 증폭을 진행하여 키메라 항원 수용체 수식의 T 세포 25C2-BBZ 및 25D2-BBZ를 얻는다.

[0313] **실시예 12. 가용성 PD1 발현의 CAR-T 세포의 제조**

[0314] 본 실시예는 항체 7A12의 scFv를 이용하여 가용성 PD1 발현의 CAR-T 세포를 제조한다. 제조방법은 하기와 같다.

[0315] 1. PD-1의 신호 펩타이드 서열(서열번호 68), PD-1 세포외 단편 서열(서열번호 69), CH3의 서열(서열번호 70)을 모두 합성하고 T벡터를 클론하여 플라스미드 T-sPD1-Fc를 얻는다.

[0316] T-sPD1-Fc 플라스미드를 템플릿으로 하여, 상류 프라이머 5'-acgcgtcctagcgctaccggtcgccaccatgcagatcccacaggcgccc-3'(서열번호 71), 하류 프라이머 5'-ctctcggggctgcccaccatacaccagggtttggaactggc-3'(서열번호 72)의 PCR 증폭에 의해 Spd1 서열을 얻는다. 상류 프라이머 5'-tatggtgggcagccccgagagccacag-3'(서열번호 73), 하류 프라이머 5'-aaaattcaaagtctgtttcactttacccggagacagggag-3'(서열번호 74) 증폭에 의해 sPD1-CH3 단편을 얻는다.

[0317] sPD1-CH3 단편 및 7A12-BBZ(서열번호 75)의 단편을 PCR 결합 및 증폭하여 sPD1-CH3-7A12-BBZ를 얻으며, 7A12-BBZ의 서열은 CD8α 신호 펩타이드(서열번호 23), 7A12scFv(서열번호 47), CD8 힌지(서열번호 25) 및 막관통 영역(서열번호 33), CD137 세포내 신호 전달 도메인(서열번호 35) 및 CD3ξ(서열번호 31)로 조성된다.

[0318] 상기 단편 sPD1-CH3-7A12-BBZ를 구축하는 5'단은 MluI 효소제한부위를 보유하고, 3'단은 SalI 효소제한부위를 보유한다. MluI 및 SalI 이중효소제한에 의해 마찬가지로 이중효소제한된 PRRLSIN-cPPT.EF-1α벡터에 연결시켜 sPD-1-CH3 단백질을 발현하는 BCMA 표적 키메라 항원 수용체의 플라스미드를 얻는다.

[0319] 실시예 9를 참조하면, sPD1 및 7A12-BBZ를 발현하는 T 세포 sPD-1-7A12-BBZ를 얻는다.

[0320] **실시예 13. 체외세포 살상 실험**

[0321] 25C2-BBZ T 세포, 25D2-BBZ T 세포, 7A12-BBZ T 세포, C11D5.3-BBZ T 세포 및 sPD-1-7A12-BBZ T 세포를 효과기 세포로 하여, 체외 살상 실험을 진행하며, 여기서 C11D5.3-BBZ(서열번호 87)은 항-BCMA의 쥐 항-C11D5.3(CN201580073309.6을 참조바람)으로 제조된 2대 CAR이다. 표적 세포는 인간 골수종 세포 NCI-H929 및 다발성 골수종 말초혈액 B림프구 RPMI-8226이다.

[0322] CytoTox 96 비방사성 세포 독성 검출 시약 키드(Promega 회사)를 사용하여 진행한다. 구체적인 방법은 CytoTox 96 비방사성 세포 독성 검출 시약 키드 설명서를 참조한다.

[0323] 효과기 표적 비 3:1, 1:1 또는 1:3에 따라 각각 효과기 세포를 96웰 플레이트에 접종시키고, 50μL 2×0^{5}/mL의 NCI-H929 및 RPMI-8226 세포를 각각 대응되는 96웰 플레이트에 접종시킨다.

[0324] 각 군에 5개 이중 구멍을 설치하고 배지를 세포 배양 탱크에 놓고 18시간 동안 부화시킨다.

[0325] 여기서 각 실험군 및 각 대조군을 하기와 같이 설정한다. 실험군: 각 표적 세포 + 상이한 키메라 항원 수용체를 발현하는 T림프구; 대조군1: 표적 세포는 LDH를 최대로 방출한다. 대조군 2: 표적 세포는 자발적으로 LDH를 방출한다. 대조군 3: 효과기 세포는 자발적으로 LDH를 방출한다. 계산 공식은 세포 독성 % = [(실험군 - 효과기 세포 자발 군 - 표적 세포 자발 군)/(표적 세포 최대 - 표적 세포 자발)]×00 %이다.

[0326] 세포 살상의 실험 결과는 도 15에 도시된 바와 같다.

[0327] **실시예 14. 쥐 체내 세포 살상 실험**

[0328] 8×0^{6}의 RPMI-8226 세포를 각각 B-NDG 쥐 오른쪽 겨드랑이 부분의 피하에 접종시키고, 종양 세포를 피하에 접종시킨 18일 후, 종양 평균 부피는 약 243 mm^{3}이고, 다발성 골수종 말초혈액 B림프구 RPMI-8226의 B-NDG 쥐 피하이식 종양 모델을 얻는다.

[0329] 쥐 피하이식 종양 모델을 한 군에 4마리씩 각각 3개 군으로 나누고, 각각 5×0^{6}의 주사제 량의 25C2-BBZ, 25D2-BBZ, 및 형질주입되지 않은 T 세포(UTD)를 주사하였으며, 결과는 하기표에 표시된 바와 같고, 종양 세포를 각각

접종시킨 32일 및 36일 후, 25C2-BBZ 및 25D2-BBZ 치료군의 4마리 쥐의 종양은 모두 사라졌다.

CAR T 용량: 5×10^6	암 없음 종양 세포 접종 후 일수					
	25 일	29 일	32 일	36 일	39 일	42 일
UTD	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
25C2-BBZ	1/4	2/4	4/4	4/4	4/4	4/4
25D2-BBZ	0/4	1/4	3/4	4/4	4/4	4/4

[0330]

[0331] 쥐 피하 이식 종양 모델을 한 군에 4마리씩 각각 3개 군으로 나누고, 각각 1×0^6의 CAR T 주사제 량의25C2-BBZ, 25D2-BBZ, C11D5.3-BBZ, 7A12-BBZ 및 형질주입되지 않은 T 세포(UTD)를 주사하며, 종양이 사라진 결과는 하기 표와 도 16에 도시된 바와 같다.

CAR T 용량: 1×10^6	암 없음 종양 세포 접종 후 일수						
	29 일	32 일	36 일	39 일	42 일	45 일	49 일
UTD	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
25C2-BBZ	1/4	2/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4
25D2-BBZ	0/4	0/4	1/4	1/4	1/4	1/4	2/4
C11D5.3-BBZ	0/4	1/4	1/4	2/4	3/4	3/4	3/4
7A12-BBZ	0/4	0/4	0/4	1/4	2/4	2/4	2/4

[0332]

[0333] 본 발명에서 언급된 모든 문헌은 각각의 문헌이 단독으로 인용되는 것과 마찬가지로 모두 본원 발명에서 참조로서 인용된다. 이밖에, 본 발명의 상기 설명된 내용을 열독한 후 본 기술분야의 기술자들은 본 발명에 대해 여러 가지 변경 또는 수정을 진행할수 있으며 이러한 등가형식은 본원 발명의 청구범위에 의해 제한된 범위에 속함을 이해해야 한다.

서열번호	명칭	서열
1	7A12, 7G2, 23F10 HCDR1	SYAMS
2	7A12, 7G2, 23F10 HCDR2	AISGSGGSTYYADSVKG
3	7A12 HCDR3	YPYLAFDY
4	7G2 HCDR3	LSGDAAMDY
5	23F10 HCDR3	VRPFWGTFDY
6	7A12, 7G2, 23F10 LCDR1	RASQSVSSSYLA
7	7A12, 7G2, 23F10 LCDR2	GASSRAT
8	7A12 LCDR3	QQYGYPPSY
9	7G2 LCDR3	QQYGYPPRY
10	23F10 LCDR3	QQYFNPPEY
11	7A12 경쇄 가변 영역 아미노산 서열	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPPSYTFGQGTKVEIK
12	7A12 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC CTCTCTTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA GACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGA GCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTACGGTTACCCACCATCTTACACGTTC GGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAA
13	7A12 중쇄 가변 영역 아미노산 서열	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYPYLAFDYWGQGTLVTVSS
14	7A12중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열	GAGGTGCAATTGCTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT CTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG TATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGCGTTA CCCATACCTGGCATTCGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT
15	7G2경쇄 가변 영역 아미노산 서열	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPPRYTFGQGTKVEIK
16	7G2경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC CTCTCTTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA GACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGA GCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTACGGTTACCCACCAAGATACACGTT CGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAA
17	7G2중쇄 가변 영역 아미노산 서열	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLSGDAAMDYWGQGTLVTVSS
18	7G2중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열	GAGGTGCAATTGCTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT CTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG TATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAACT GTCTGGTGATGCAGCAATGGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT
19	23F10경쇄 가변 영역 아미노산 서열	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYFNPPEYTFGQGTKVEIK

[0334]

20	23F10경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC CTCTCTTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA GACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGA GCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTACTTCAACCCACCAGAATACACGTT CGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAA
21	23F10중쇄 가변 영역 아미노산 서열	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVRPFWGTFDYWGQGTLVTVSS
22	23F10중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열	GAGGTGCAATTGCTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT CTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG TATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGT TCGTCCATTCTGGGGTACTTTCGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG T
23	CD8α 신호 펩타이드 아미노산 서열	Malpvtalllplalllhaarp
24	CD8α 신호 펩타이드 뉴클레오티드 서열	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggccg
25	CD8힌지 아미노산 서열	Tttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacd
26	CD8힌지 뉴클레오티드 서열	Accacgacgccagcgccgcgaccaccaacacccggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcgg cgggggggcgcagtgcacacgaggggggctggacttcgcctgtgat
27	CD28막관통 영역 아미노산 서열	Fwvlvvvggvlacysllvtvafiifwv
28	CD28막관통 영역 뉴클레오티드 서열	ttttgggtgctggtggtggttggtggagtcctggcttgctatagcttgctagtaacagtggcctttattattttctgggtg
29	CD28세포내 영역 아미노산 서열	Rskrsrllhsdymnmtprrpgptrkhyqpyapprdfaayrs
30	CD28세포내 영역 뉴클레오티드 서열	Aggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggccaaccgcaagcattaccagccctatgccc caccacgcgacttcgcagcctatcgctcc
31	CD3Z도메인 아미노산 서열	Rvkfsrsadapayqqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkpqrrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdgl yqglstatkdtydalhmqalppr
32	CD3Z도메인 뉴클레오티드 서열	Agagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagagga gtacgatgttttGgacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggaaagccgcagagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatga actgcagaaagataagatggcGgaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggccttaccagg gtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgc
33	CD8막관통 영역 아미노산 서열	Iyiwaplagtcgvlllslvit
34	CD8막관통 영역 뉴클레오티드 서열	Atctacatctgggcgccctggccgggacttgtggggtccttctcctgtcactggttatcacc

[0335]

35	CD137세포 내 영역 아미노산 서열	Krgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcel
36	CD137세포 내 영역 뉴클레오티드 서열	Aaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttcc agaagaagaagaaggaggatgtgaactg
37	BCMA 아미노산 서열	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNAILWTCLGL SLIISLAVFVLMFLLRKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILPRGLEYTVEECT CEDCIKSKPKVDSDHCFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSATEIEKSISAR
38	인간 BCMA의 세포외 세그먼트Met1-Ala54	Mlqmagqcsqneyfdsllhacipcqlrcssntppltcqrycnasvtnsvkgtna
39	인간 BCMA의 세포외 세그먼트Met1-Ala54 뉴클레오티드 서열	Atgctgcagatggccggccagtgcagccagaacgagtacttcgacagcctgctgcacgcctgcatcccctgccagctgcggtgcagcagcaaca cccccccctgacctgccagcggtactgcaacgccagcgtgaccaacagcgtgaagggcaccaacgcc
40	BCMA_huFc	Mlqmagqcsqneyfdsllhacipcqlrcssntppltcqrycnasvtnsvkgtnagsdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpev tcvvvdvshEdpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvyt lppsrdeltknqvslwclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsls pgk
41	BCMA_huFc 뉴클레오티드 서열	Atgctgcagatggccggccagtgcagccagaacgagtacttcgacagcctgctgcacgcctgcatcccctgccagctgcggtgcagcagcaaca cccccccctGacctgccagcggtactgcaacgccagcgtgaccaacagcgtgaagggcaccaacgccggatccgacaaaactcacacatgcc caccgtgcccagcacctgaaCtcctggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgagg tcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaAgaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaag ccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagCgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgca aggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaAagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccc atcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgtggtgcctggtcaaaggcttctatcccagCgacatcgccgtggagtgggagagcaatg ggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaagctcaCcgtggacaagagcagg tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa
42	BCMA_muFc	Mlqmagqcsqneyfdsllhacipcqlrcssntppltcqrycnasvtnsvkgtnagsrdcgckpcictvpevssvfifppkpkdvltitltpkvtcv vvdiskddpevQfswfvddvevhtaqtqpreeqfnstfrsvselpimhqdwlngkefkcrvnsaafpapiektisktkgrpkapqvytipppk eqmakdkvsltcmitdffpeditvewqwngqpaenykntqpimdtdgsyfvysklnvqksnweagntftcsvlheglhnhhtekslshspg k
43	BCMA_muFc 뉴클레오티드 서열	Atgctgcagatggccggccagtgcagccagaacgagtacttcgacagcctgctgcacgcctgcatcccctgccagctgcggtgcagcagcaaca cccccCccctgacctgccagcggtactgcaacgccagcgtgaccaacagcgtgaagggcaccaacgccggatccagggattgtggttgtaagcc ttgcatatgtacAgtcccagaagtatcatctgtcttcatcttccccccaaagcccaaggatgtgctcaccattactctgactcctaaggtcacgtgtgttgt ggtagacatcagcaagGatgatcccgaggtccagttcagctggtttgtagatgatgtggaggtgcacacagctcagacgcaaccccgggaggagc agttcaacagcactttccgctcagTcagtgaacttcccatcatgcaccaggactggctcaatggcaaggagttcaaatgcagggtcaacagtgcagc tttccctgcccccatcgagaaaaccatctccAaaaccaaaggcagaccgaaggctccacaggtgtacaccattccacctcccaaggagcagatgg ccaaggataaagtcagtctgacctgcatgataacagacTtcttccctgaagacattactgtggagtggcagtggaatgggcagccagcggagaact acaagaacactcagcccatcatggacacagatggctcttacttcgtctAcagcaagctcaatgtgcagaagagcaactgggaggcaggaaatacttt cacctgctctgtgttacatgagggcctgcacaaccaccatactgagaagagcctctcccactctcctggtaaa
44	제한효소 사이트 MluI, SalI을 도입한 인간 BCMA의 뉴클레오티드 서열	Acgcgtcctagcgctaccggtcgccaccatgttgcagatggctgggcagtgctcccaaaatgaatattttgacagtttgttgcatgcttgcataccttgt caacttcgAtgttcttctaatactcctcctctaacatgtcagcgttattgtaatgcaagtgtgaccaattcagtgaaaggaacgaatgcgattctctggacc tgtttgggactgagcttAataatttctttggcagttttcgtgctaatgtttttgctaaggaagataaactctgaaccattaaaggacgagtttaaaaacacag gatcaggtctcctgggcatggctaaCattgacctggaaaagagcaggactggtgatgaaattattcttccgagaggcctcgagtacacggtggaaga atgcacctgtgaagactgcatcaagagcaaaccgAaggtcgactctgaccattgctttccactcccagctatggaggaaggcgcaaccattcttgtca ccacgaaaacgaatgactattgcaagagcctgccagctgctttgagtgctacggagatagagaaatcaatttctgctaggtaagtcgac
45	APRIL_huFc	Hsvlhlvpinatskddsdvtevmwqpalrrgrglqaqgygvriqdagvyllysqvlfqdvtftmgqvvsregqgrqetlfrcirsmpshpdray nscysagVfhlhqgdilsviipraraklnlsphgtflgfvklgsdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpe vkfnwyvdgvevhnAktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsrdeltknqvs lwclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

[0336]

46	APRIL_huFc 뉴클레오티드 서열	Cacagcgtgctgcacctggtgcccatcaacgccaccagcaaggacgacagcgacgtgaccgaggtgatgtggcagcccgccctgcggcggggg ccgggggcctgcaggcccagggctacggcgtgccggatccaggacgccggcgtgtacctgctgtacagccaggtgctgttccaggacgtgacgttca ccatgggccaggtggtgagccgggagggccagggccggcaggagaccctgttccggtgcatccggagcatgcccagccacccccgaccgggcc tacaacagctgctacagcgccggcgtgttccacctgcaccagggcgacatcctgagcgtgatcatccccgggcccgggccaagctgaacctgag ccccacggcaccttcctgggcttcgtgaagctgggatccgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggacgtc agtcttcctcttcccccaaaacccaaggacacccttcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccct gaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtgg tcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaa accatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgt ggtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgt gctggactccgacggctccttcttcctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatg aggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa
47	7A12 scFv	Evqllesgglvqpggslrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisgsggstyyadsvkgrftisrdnskntlylqmnslraedtavyy carypylafDywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivltqspgtlslspgeratlscrasqsvsssylawyqqkpgqaprlliygassratgi pdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyycqqygyppsytfgqgtkveikr
48	7G2 scFv	Evqllesgglvqpggslrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisgsggstyyadsvkgrftisrdnskntlylqmnslraedtavyy caklsgdaAmdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivltqspgtlslspgeratlscrasqsvsssylawyqqkpgqaprlliygassrat gipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyycqqygyppsytfgqgtkveikr
49	프라이머 LMF	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC
50	프라이머 BH1R	TGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTGGCGGACCCAMNNMNNMNNMNNMNN MNNAAAGGTGAATCCGGAGGCTG
51	프라이머 BH2F	GGCTGGAGTGGGTCTCANNKATTNNKNNKNNKNNKGGTNNKACANNKTACGCAGACTC CGTGAAGGG
52	프라이머 FdR	GACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGG
53	프라이머 BL1R	GATGAGGAGCCTGGGAGCCTGGCCAGGTTTCTGCTGGTACCAMNNTAAMNNMNNMNN MNNMNNMNNCTGACTGGCCCTGCAAGAG
54	프라이머 BL2F	CCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCNNKNNKNNKNNKNNKAGGGCCACTGGCATCCCAGAC
55	23F10 scFv	Evqllesggglvqpggslrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisgsggstyyadsvkgrftisrdnskntlylqmnslraedtavyy cakvrpfwgtfdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivltqspgtlslspgeratlscrasqsvsssylawyqqkpgqaprlliygassrat gipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyycqqyfnppeytfgqgtkveikr
56	25C2 VH(AA)	evqllesgglvqpggslrlscaasgftfggnamswvrqapgkglewvsaisgnggstfyadsvkgrftisrdnskntlylqmnslraedtavyy cakvrpfwgtfdywgqgtlvtvss
57	25C2 VH	gaggtgcaattgctggagtctgggggaggcttggtacagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctccggattcacctttggcggtaatg ccatgtcctgggtccgccaggctccagggaagggctggagtgggtctcagcaattagtggtaatggtggtagtacattctacgcagactccgtgaa gggccggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcagatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgc gaaagttcgtccattctggggtactttcgactactgggggccaaggaaccctggtcaccgtctcgagt
58	25D2 VH(AA)	evqllesggglvqpggslrlscaasgftfrsyamswvrqapgkglewvsaisggggntfyadsvkgrftisrdnskntlylqmnslraedtavyy cakvrpfwgtfdywgqgtlvtvss
59	25D2 VH	gaggtgcaattgctggagtctgggggaggcttggtacagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctccggattcacctttaggagctatgc catgagctgggtccgccaggctccagggaagggctggagtgggtctcagctattagtggcggtggtggtaacacattctacgcagactccgtgaa gggccggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcagatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgc gaaagttcgtccattctgggtactttcgactactgggggccaaggaaccctggtcaccgtctcgagt
60	25C2 HCDR1	gnams
61	25C2 HCDR2	aisgnggstfyadsvkg
62	25D2 HCDR1	syams
63	25D2 HCDR2	aisggggntfyadsvkg
64	25C2 scFv	gaggtgcaattgctggagtctgggggaggcttggtacagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctccggattcacctttggcggtaatg ccatgtcctgggtccgccaggctccagggaagggctggagtgggtctcagcaattagtggtaatggtggtagtacattctacgcagactccgtgaa gggccggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcagatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgc gaaagttcgtccattctgggtactttcgactactgggggccaaggaaccctggtcaccgtctcgagtggtggaggcggttcaggcggaggtggttct ggcggtggcggatcggaaatcgtgttaacgcagtctccaggcaccctgtctttgtctccaggggaaagagccacctctcttgcagggccagtcaga gtgttagcagcagctacttagcctggtaccagcagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatggagcatccagcagggccactggcatccc agacaggttcagtggcagtggatccgggacagacttcactctcaccatcagcagactggagcctgaagattttgcagtgtattactgtcagcagtactt caacccaccagaatacacgttcggccaggggaccaaagtggaaatcaaacgt
65	25C2 scFv(AA)	evqllesggglvqpggslrlscaasgftfggnamswvrqapgkglewvsaisgnggstfyadsvkgrftisrdnskntlylqmnslraedtavyy cakvrpfwgtfdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivltqspgtlslspgeratlscrasqsvsssylawyqqkpgqaprlliygassrat gipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyycqqyfnppeytfgqgtkveikr
66	25D2 scFv	gaggtgcaattgctggagtctgggggaggcttggtacagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctccggattcacctttaggagctatgc catgagctgggtccgccaggctccagggaagggctggagtgggtctcagctattagtggcggtggtggtaacacattctacgcagactccgtgaa gggccggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcagatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgc gaaagttcgtccattctgggtactttcgactactgggggccaaggaaccctggtcaccgtctcgagtggtggaggcggttcaggcggaggtggttct ggcggtggcggatcggaaatcgtgttaacgcagtctccaggcaccctgtctttgtctccaggggaaagagccacctctcttgcagggccagtcaga gtgttagcagcagctacttagcctggtaccagcagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatggagcatccagcagggccactggcatccc agacaggttcagtggcagtggatccgggacagacttcactctcaccatcagcagactggagcctgaagattttgcagtgtattactgtcagcagtactt caacccaccagaatacacgttcggccaggggaccaaagtggaaatcaaacgt

[0337]

67	25D2 scFv(AA)	evqllesggglvqpggslrlscaasgftfrsyamswvrqapgkglewvsaisggggntfyadsvkgrftisrdnskntlylqmnslraedtavyy cakvrpfwgtfdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivltqspgtlslspgeratlscrasqsvsssylawyqqkpgqaprlliygassrat gipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyycqqyfnppeytfgqgtkveikr
68	PD-1 신호 펩타이드 서열	ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACTGGGCTGGCG G
69	PD-1 세포외 세그먼트 서열	CCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCCCACCTTCTCCCCAGCC CTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCG GAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGC CGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACT GCCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCA CCTACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGG GCAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCCACAGCCCACCCCAGCCCCTC ACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTG
70	CH3 도메인의 DNA 서열	CCCCCATGCCCACCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTC CCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGA GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCC
71	프라이머	acgcgtcctagcgctacggtcgccaccatgcagatcccacaggcgccc
72	프라이머	ctctcggggctgcccaccatacaccagggtttggaactggc
73	프라이머	tatggtgggcagccccgagagccacag
74	프라이머	aaaattcaaagtctgtttcactttacccggagacagggag
75	7A12-BBZ	Evqllesggglvqpggslrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisggstyyadsvkgrftisrdnskntlylqmnslraedtavyy carypylafDywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivltqspgtlslspgeratlscrasqsvsssylawyqqkpgqaprlliygassratgi pdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyycqqygyppsytfgqgtkveikrTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR
76	25C2-BBZ	evqllesggglvqpggslrlscaasgftfggnamswvrqapgkglewvsaisgnggstfyadsvkgrftisrdnskntlylqmnslraedtavyy cakvrpfwgtfdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivltqspgtlslspgeratlscrasqsvsssylawyqqkpgqaprlliygassrat gipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyycqqyfnppeytfgqgtkveikrTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA GGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQALPPR
77	25D2-BBZ	evqllesggglvqpggslrlscaasgftfrsyamswvrqapgkglewvsaisggggntfyadsvkgrftisrdnskntlylqmnslraedtavyy cakvrpfwgtfdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivltqspgtlslspgeratlscrasqsvsssylawyqqkpgqaprlliygassrat gipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyycqqyfnppeytfgqgtkveikrTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA GGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQALPPR
78	7G2-BBZ	Evqllesggglvqpggslrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisgsggstyyadsvkgrftisrdnskntlylqmnslraedtavyy caklsgdaAmdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivltqspgtlslspgeratlscrasqsvsssylawyqqkpgqaprlliygassrat gipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyycqqygyppsytfgqgtkveikrTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA GGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQALPPR
79	7A12-28Z	Evqllesggglvqpggslrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisgsggstyyadsvkgrftisrdnskntlylqmnslraedtavyy carypylafDywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivltqspgtlslspgeratlscrasqsvsssylawyqqkpgqaprlliygassratgi pdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyycqqygyppsytfgqgtkveikrTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPG PTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR
80	7A12-28BBZ	Evqllesggglvqpggslrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisgsggstyyadsvkgrftisrdnskntlylqmnslraedtavyy carypylafDywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivltqspgtlslspgeratlscrasqsvsssylawyqqkpgqaprlliygassratgi pdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyycqqygyppsytfgqgtkveikrTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPG PTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELR VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

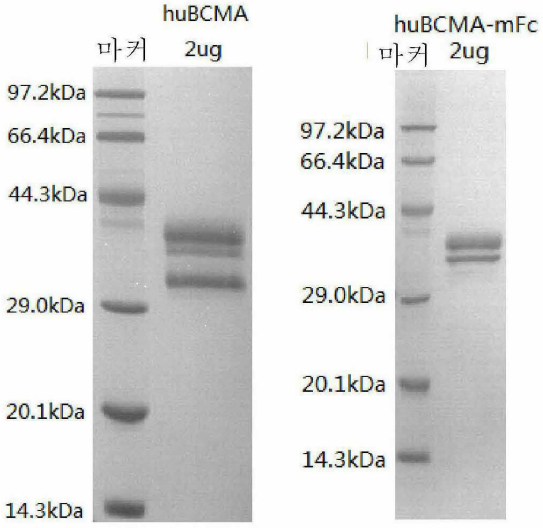
[0338]

81	7G2-28Z	Evqllesggglvqpggslrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisgsggstyyadsvkgrftisrdnskntlylqmnslraedtavyy caklsgdaAmdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivltqspgtlslspgeratlscrasqsvsssylawyqqkpgqaprlliygassrat gipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyycqqygyppprytfgqgtkveikrTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA GGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRP GPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR
82	7G2-28BBZ	Evqllesggglvqpggslrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisgsggstyyadsvkgrftisrdnskntlylqmnslraedtavyy caklsgdaamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivltqspgtlslspgeratlscrasqsvsssylawyqqkpgqaprlliygassrat gipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyycqqygyppprytfgqgtkveikrTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA GGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRP GPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGL YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
83	25C2-28Z	Evqllesggglvqpggslrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisgsggstyyadsvkgrftisrdnskntlylqmnslraedtavyy cakvrpfwgtfdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivltqspgtlslspgeratlscrasqsvsssylawyqqkpgqaprlliygassrat gipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyycqqyfnppeytfgqgtkveikrTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA GGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRP GPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGL YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
84	25C2-28BBZ	Evqllesggglvqpggslrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisgsggstyyadsvkgrftisrdnskntlylqmnslraedtavyy cakvrpfwgtfdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivltqspgtlslspgeratlscrasqsvsssylawyqqkpgqaprlliygassrat gipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyycqqyfnppeytfgqgtkveikrTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA GGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRP GPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGL YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
85	25D2-28Z	evqllesggglvqpggslrlscaasgftfrsyamswvrqapgkglewvsaisggggntfyadsvkgrftisrdnskntlylqmnslraedtavyy cakvrpfwgtfdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivltqspgtlslspgeratlscrasqsvsssylawyqqkpgqaprlliygassrat gipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyycqqyfnppeytfgqgtkveikrTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA GGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRP GPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR
86	25D2-28BBZ	evqllesggglvqpggslrlscaasgftfrsyamswvrqapgkglewvsaisggggntfyadsvkgrftisrdnskntlylqmnslraedtavyy cakvrpfwgtfdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivltqspgtlslspgeratlscrasqsvsssylawyqqkpgqaprlliygassrat gipdrfsgsgsgtdftltisrlepedfavyycqqyfnppeytfgqgtkveikrTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA GGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRP GPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGL YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
87	C11D5.3-BBZ	Qiqlvqsgpelkkpgetvkiscskasgytftdysinwvkrapgkglkwmgwintetrepayayadfrgrfafsletsastaylqinnlkyedtatyf caldysyamdywgqgtsvtvssggggsggggsggggsdivltqsppslamslgkratiscrasesvtilgshlihwyqqkpgqpptlliqlasn TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV ITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQG QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

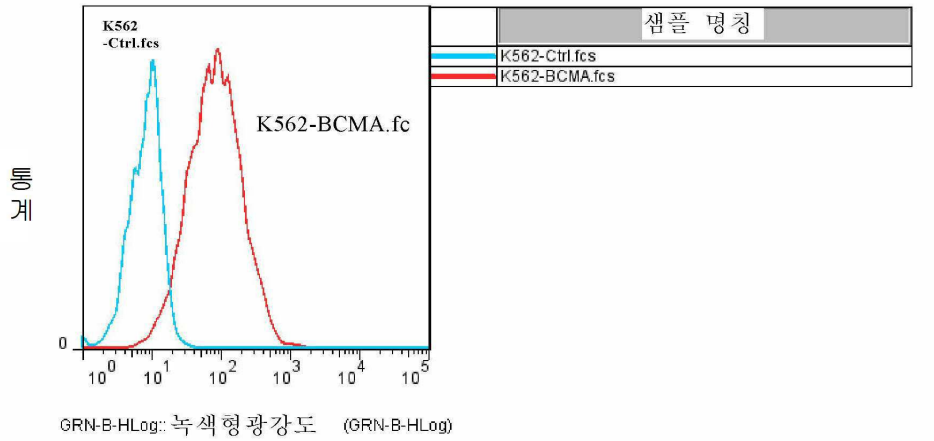
[0339]

도면

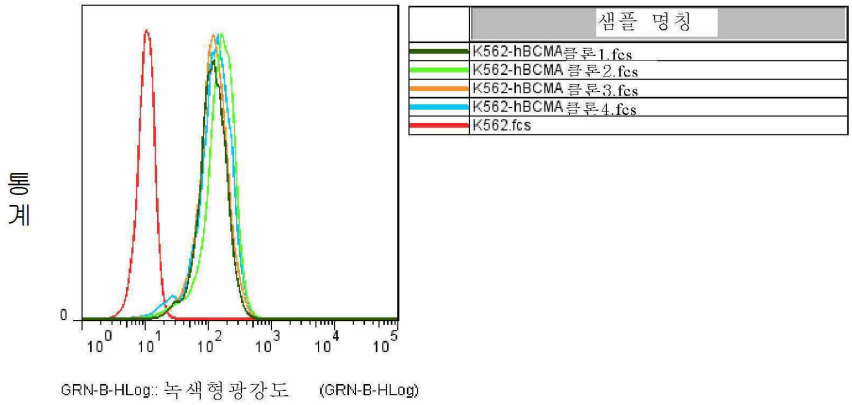
도면1



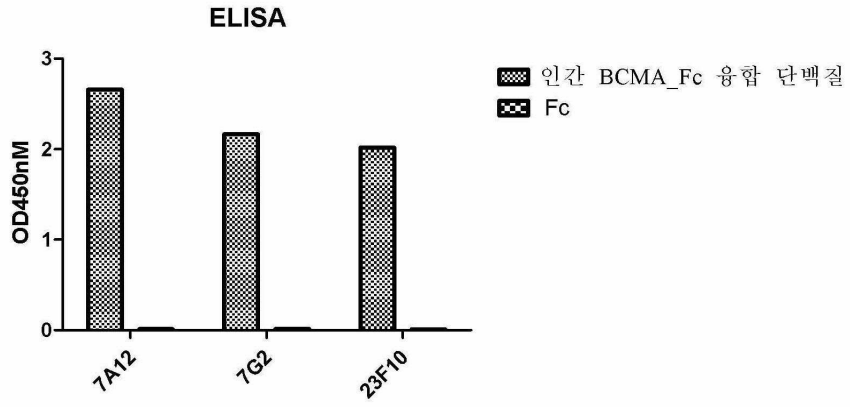
도면2a



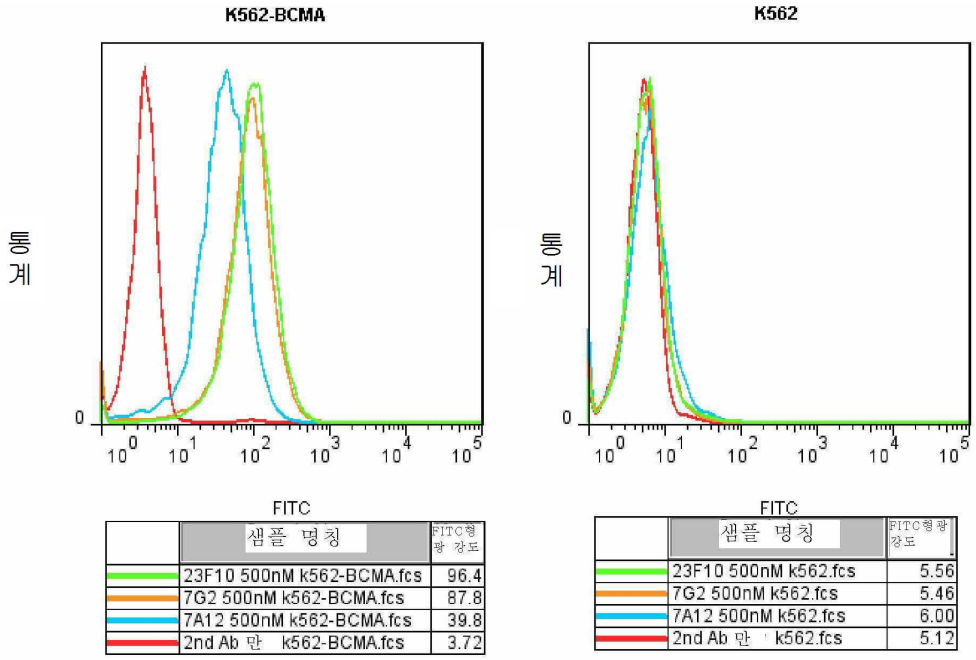
도면2b



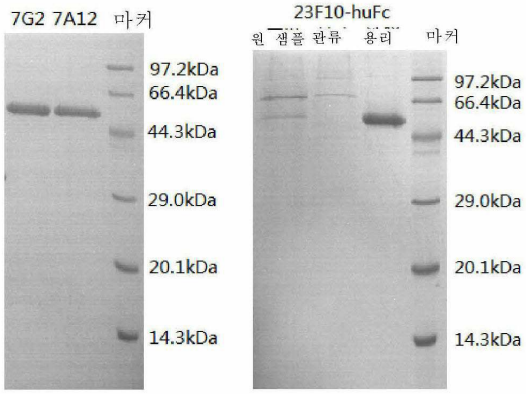
도면3



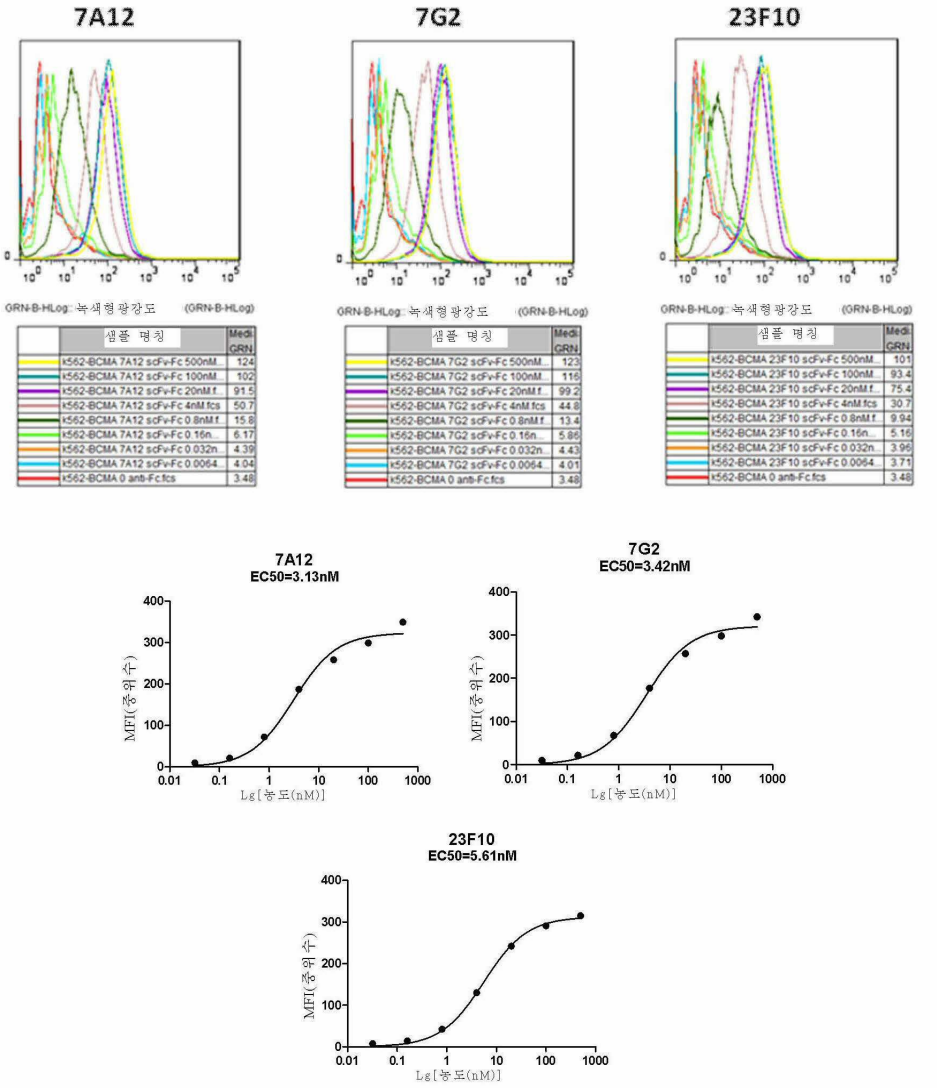
도면4


K562-BCMA
K562
통계
통계
0
0
FITC
FITC
샘플 명칭
FITC형광강도
23F10 500nM k562-BCMA.fcs 96.4
7G2 500nM k562-BCMA.fcs 87.8
7A12 500nM k562-BCMA.fcs 39.8
2nd Ab 만 k562-BCMA.fcs 3.72
23F10 500nM k562.fcs 5.56
7G2 500nM k562.fcs 5.46
7A12 500nM k562.fcs 6.00
2nd Ab 만 k562.fcs 5.12

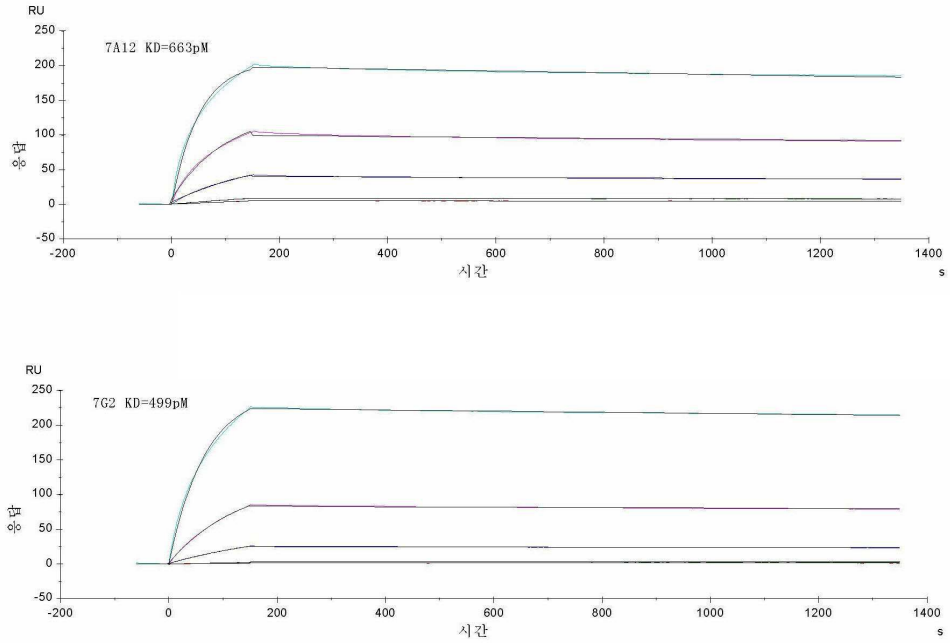
도면5


7G2 7A12 마커
23F10-huFc
원 샘플 관류 용리 마커
97.2kDa
66.4kDa
44.3kDa
29.0kDa
20.1kDa
14.3kDa

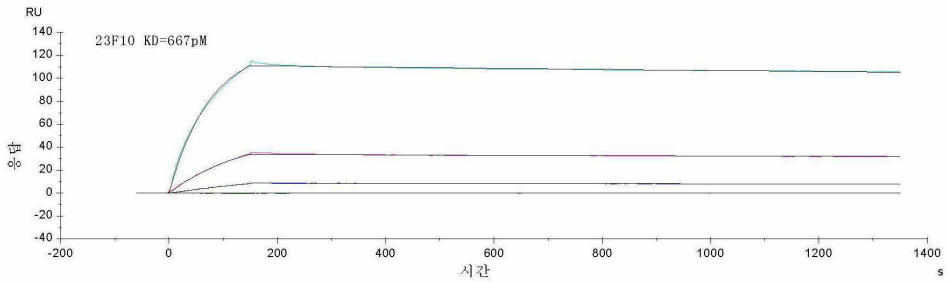
도면6


7A12
7G2
23F10
GRN-B-HLog: 녹색형광강도 (GRN-B-HLog)
샘플 명칭
Medi. GRN
k562-BCMA 7A12 scFv-Fc 500nM 124
k562-BCMA 7A12 scFv-Fc 100nM 102
k562-BCMA 7A12 scFv-Fc 20nM f 91.5
k562-BCMA 7A12 scFv-Fc 4nM fcs 50.7
k562-BCMA 7A12 scFv-Fc 0.8nM f 15.8
k562-BCMA 7A12 scFv-Fc 0.16n 6.17
k562-BCMA 7A12 scFv-Fc 0.032n 4.39
k562-BCMA 7A12 scFv-Fc 0.0064 4.04
k562-BCMA 0 anti-Fc fcs 3.48
k562-BCMA 7G2 scFv-Fc 500nM 123
k562-BCMA 7G2 scFv-Fc 100nM 116
k562-BCMA 7G2 scFv-Fc 20nM f 99.2
k562-BCMA 7G2 scFv-Fc 4nM fcs 44.8
k562-BCMA 7G2 scFv-Fc 0.8nM f 13.4
k562-BCMA 7G2 scFv-Fc 0.16n 5.86
k562-BCMA 7G2 scFv-Fc 0.032n 4.43
k562-BCMA 7G2 scFv-Fc 0.0064 4.01
k562-BCMA 0 anti-Fc fcs 3.48
k562-BCMA 23F10 scFv-Fc 500nM 101
k562-BCMA 23F10 scFv-Fc 100nM 93.4
k562-BCMA 23F10 scFv-Fc 20nM f 75.4
k562-BCMA 23F10 scFv-Fc 4nM fcs 30.7
k562-BCMA 23F10 scFv-Fc 0.8nM f 9.94
k562-BCMA 23F10 scFv-Fc 0.16n 5.16
k562-BCMA 23F10 scFv-Fc 0.032n 3.96
k562-BCMA 23F10 scFv-Fc 0.0064 3.71
k562-BCMA 0 anti-Fc fcs 3.48
7A12
EC50=3.13nM
7G2
EC50=3.42nM
23F10
EC50=5.61nM
MFI(중위수)
Lg[농도(nM)]

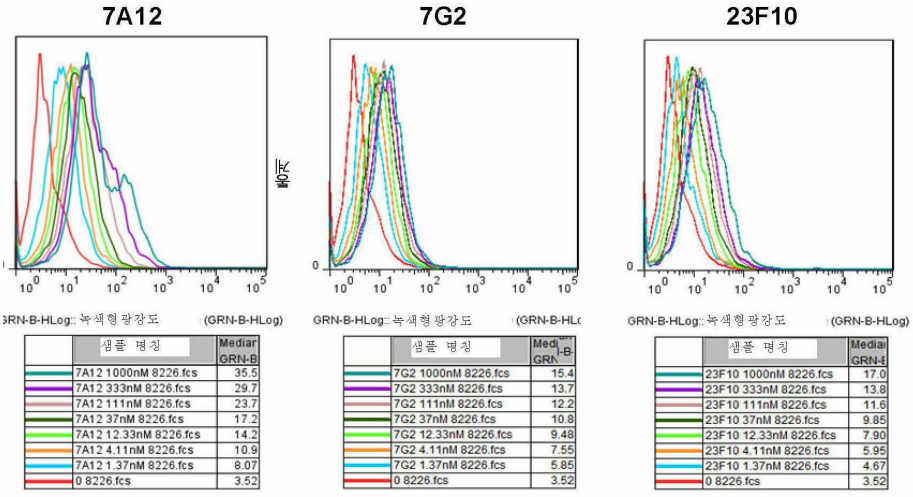
도면7a



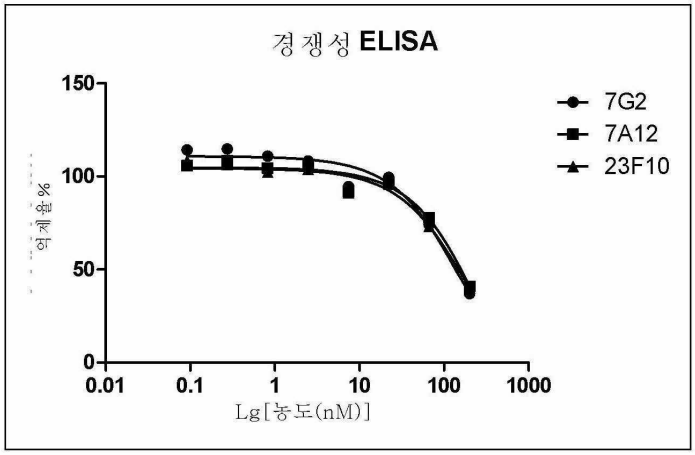
도면7b



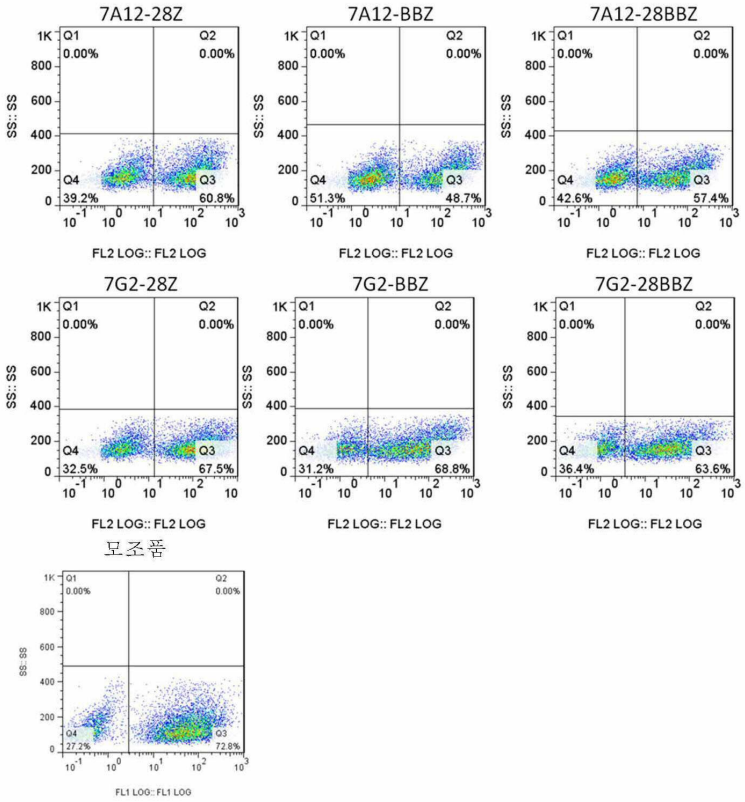
도면8



도면9


경쟁성 ELISA
150
100
50
0
억제율%
0.01
0.1
1
10
100
1000
Lg[농도(nM)]
7G2
7A12
23F10

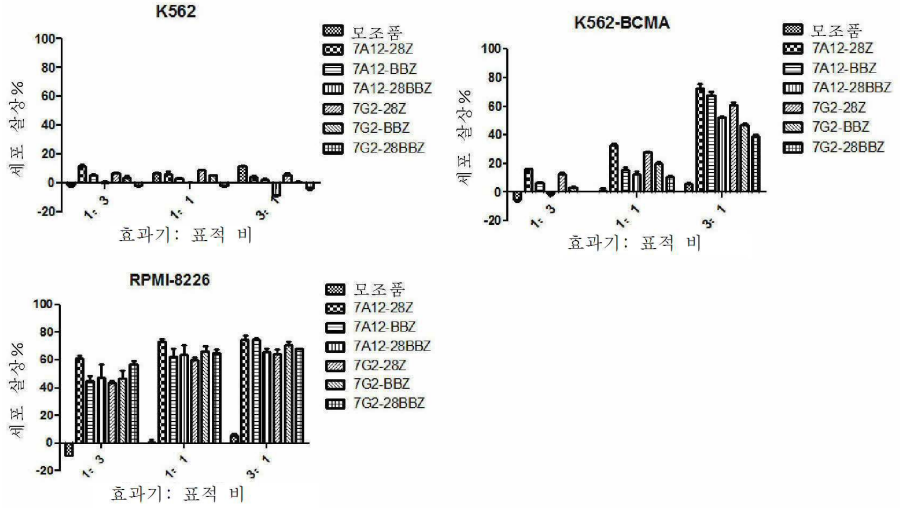
도면10


7A12-28Z
7A12-BBZ
7A12-28BBZ
7G2-28Z
7G2-BBZ
7G2-28BBZ
SS:: SS
FL2 LOG:: FL2 LOG
Q1 0.00%
Q2 0.00%
Q4 39.2%
Q3 60.8%
Q4 51.3%
Q3 48.7%
Q4 42.6%
Q3 57.4%
Q4 32.5%
Q3 67.5%
Q4 31.2%
Q3 68.8%
Q4 36.4%
Q3 63.6%

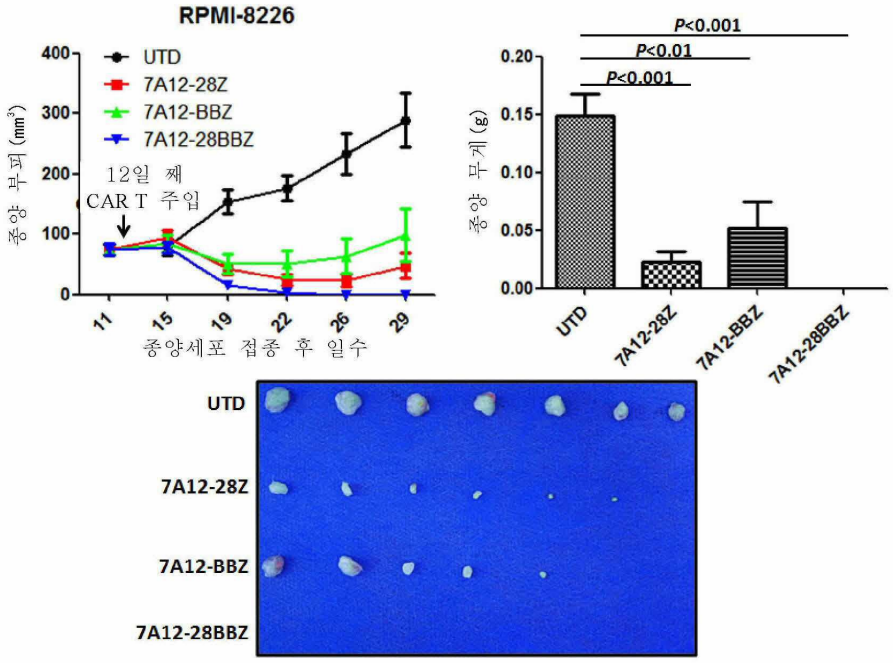
모조품

Q1 0.00%
Q2 0.00%
Q4 27.2%
Q3 72.8%
SS:: SS
FL1 LOG:: FL1 LOG

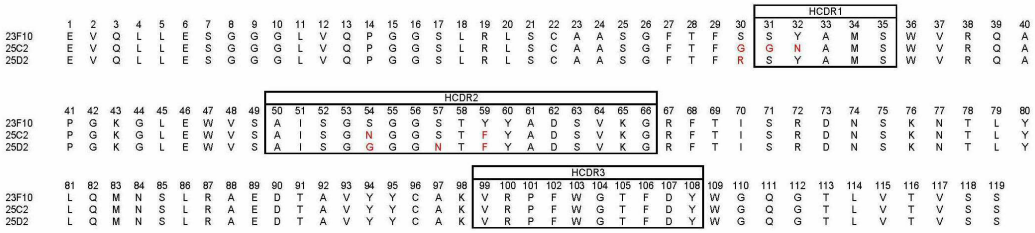
도면11a



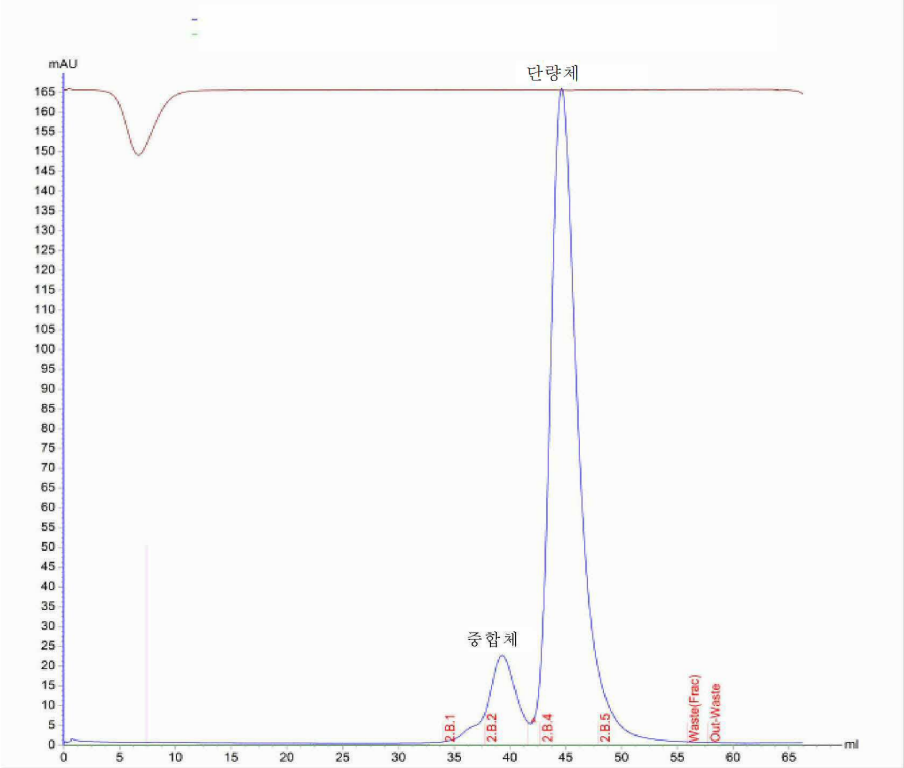
도면11b



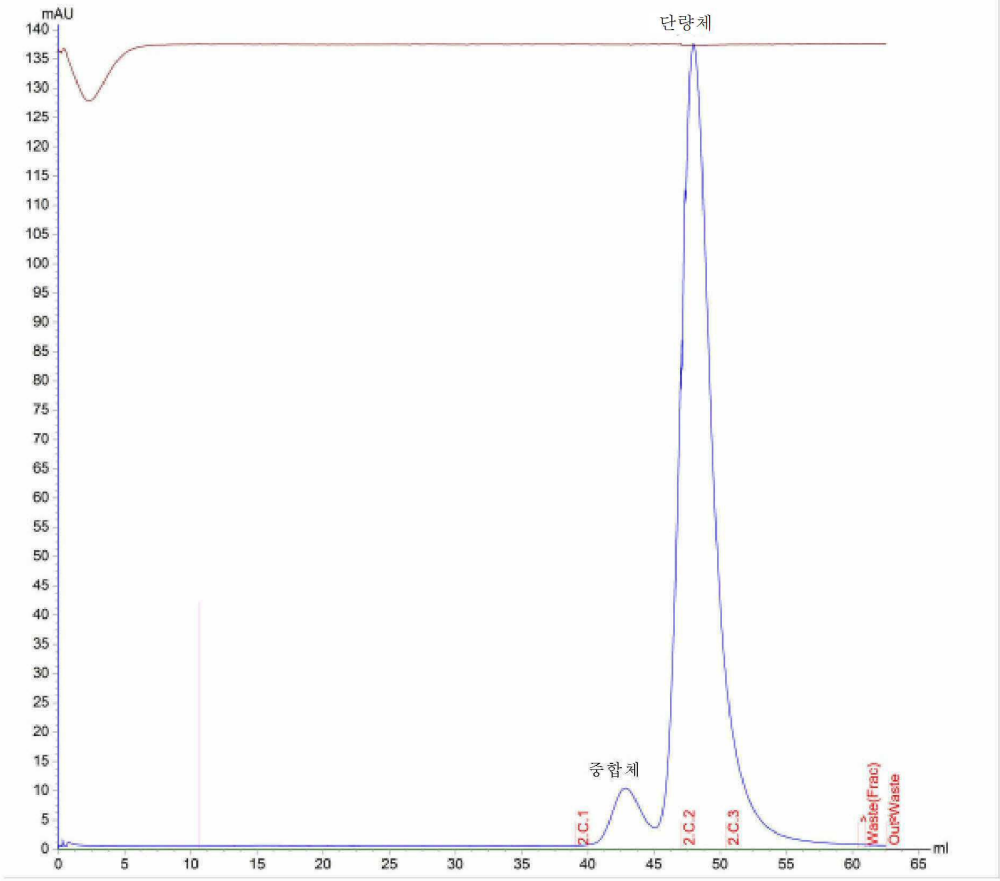
도면12



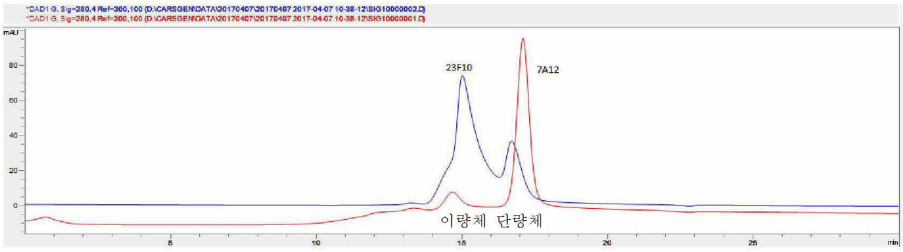
도면13a


mAU
단량체
중합체
2.B.1
2.B.2
2.B.4
2.B.5
Waste(Frac)
Out-Waste
ml

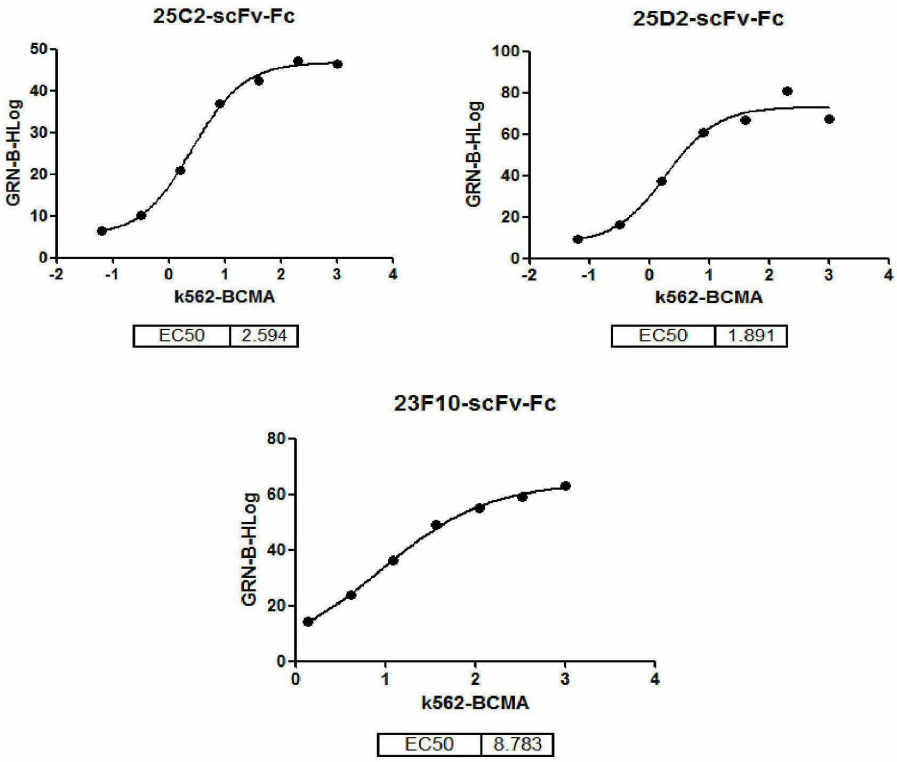
도면13b


mAU
단량체
중합체
2.C.1
2.C.2
2.C.3
Waste(Frac)
Out-Waste
ml

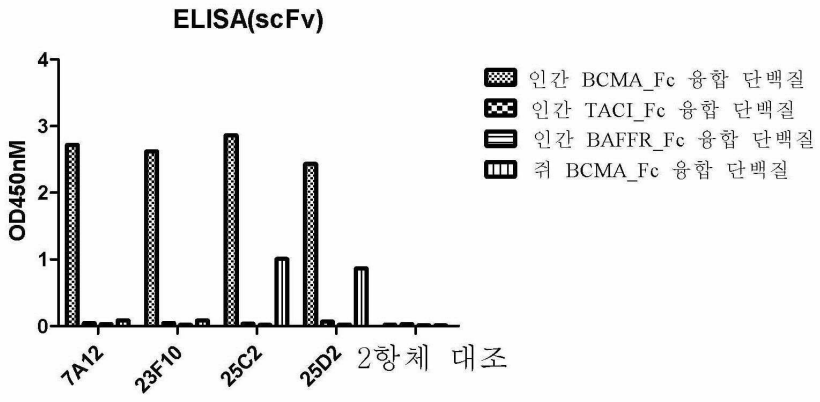
도면13c



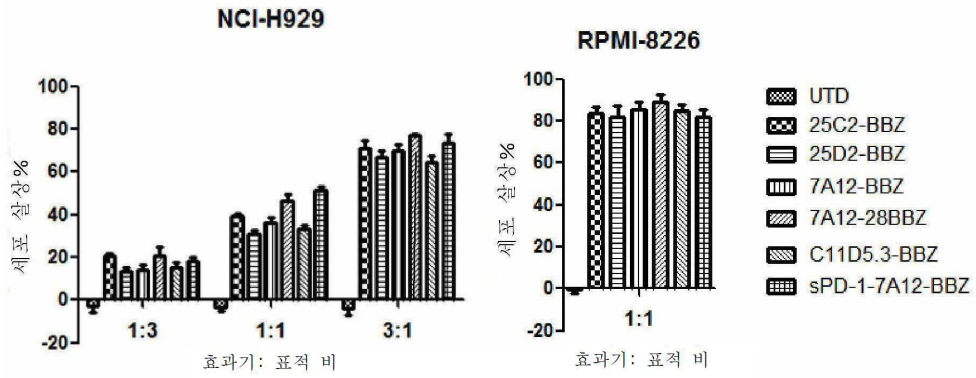
도면14a



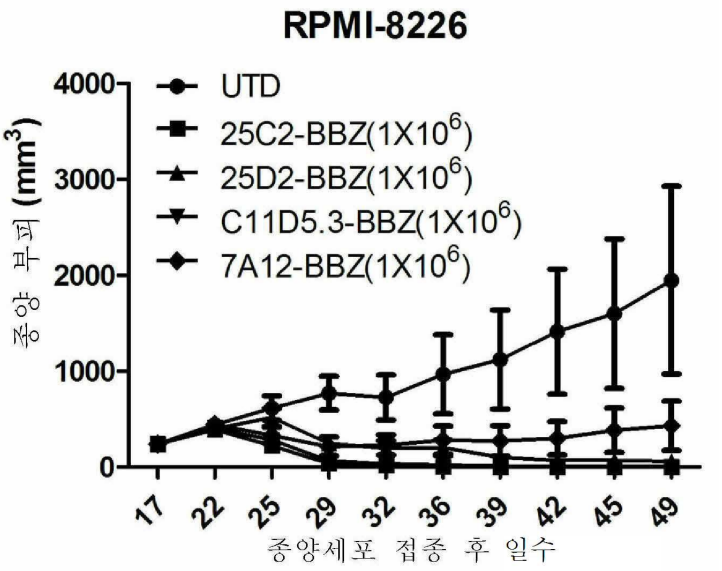
도면14b



도면15



도면16



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> CARSGEN THERAPEUTICS CO., LTD.

<120> BCMA-TARGETING ANTIBODY AND USE THEREOF

<130> P2018-0137

<140> PCT/CN2018/073863

<141> 2018-01-23

<150> CN 201710058581.8

<151> 2017-01-23

<150> CN 201710920346.7

<151> 2017-09-30

<160> 87

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 7A12, 7G2, 23F10 HCDR1

<400> 1

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 7A12, 7G2, 23F10 HCDR1

<400> 2

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

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 7A12 HCDR3

<400> 3

Tyr Pro Tyr Leu Ala Phe Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 7G2 HCDR3

<400> 4

Leu Ser Gly Asp Ala Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 23F10 HCDR3

<400> 5

Val Arg Pro Phe Trp Gly Thr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 7A12, 7G2, 23F10 LCDR1

<400> 6

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212

> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 7A12, 7G2, 23F10 LCDR2

<400> 7

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 7A12 LCDR3

<400> 8

Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Ser Tyr

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 7G2 LCDR3

<400> 9

Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Arg Tyr

1 5

<210> 10

<

211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 23F10 LCDR3

<400> 10

Gln Gln Tyr Phe Asn Pro Pro Glu Tyr

1 5

<210> 11

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of 7A12 light chain variable regoin

<400> 11

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 Gly 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 Tyr Pro Pro

85 90 95

Ser Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 12

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Nucleotide sequence of 7A12 light chain variable region

<400> 12

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtacggtt acccaccatc ttacacgttc 300

ggccagggga ccaaagtgga aatcaaa 327

<210> 13

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of 7A12 heavy chain variable region

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Pro Tyr Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14
<211> 351
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> Nucleotide sequence of 7A12 heavy chain variable region
<400> 14
gaggtgcaat tgctggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcgttaccca 300
tacctggcat tcgactactg gggccaagga accctggtca ccgtctcgag t 351
<210> 15
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Amino acid sequence of 7G2 light chain variable region

<400> 15
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 Gly 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 Tyr Pro Pro
85 90 95
Arg Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 16
<211> 327
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> Nucleotide sequence of 7G2 light variable region
<400> 16

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtacggtt acccaccaag atacacgttc 300
ggccagggga ccaaagtgga aatcaaa 327

<210> 17
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of 7G2 heavy chain variable region
<400> 17
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

50 55 60

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

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

Ala Lys Leu Ser Gly Asp Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 354
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> Nucleotide sequence of 7G2 heavy chain variable region
<400> 18
gaggtgcaat tgctggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaactgtct 300

ggtgatgcag caatggacta ctggggccaa ggaaccctgg tcaccgtctc gagt 354
<210> 19
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Amino acid sequence of 23F10 light chain variable region
<400> 19
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 Gly 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 Phe Asn Pro Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 20

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Nucleotide sequence of 23F10 light chain variable region

<400> 20

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtacttca acccaccaga atacacgttc 300

ggccagggga ccaaagtgga aatcaaa 327

<210> 21

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of 23F10 heavy chain variable region

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

Ala Lys Val Arg Pro Phe Trp Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> Nucleotide sequence of 23F10 heavy chain variable region
<400> 22
gaggtgcaat tgctggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagttcgt 300
ccattctggg gtactttcga ctactggggc caaggaaccc tggtcaccgt ctcgagt 357
<210> 23
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Amino acid sequence of CD8alpha signal peptide
<400> 23
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 24

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Nucleotide sequence of CD8alpha signal peptide

<400> 24

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

ccg 63

<210> 25

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of CD8 hinge

<400> 25

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp

35 40 45

<210> 26

<211> 135

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Nucleotide sequence of CD8 hinge

<400> 26

accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgcgtc gcagcccctg 60

tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcgggggcgc agtgcacac gagggggctg 120

gacttcgcct gtgat 135

<210> 27

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of CD28 transmembrane region

<400> 27

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

20 25

<210> 28

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220

><223> Nucleotide sequence of CD28 transmembrane region

<400> 28

ttttgggtgc tggtggtggt tggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg 60

gcctttatta ttttctgggt g 81

<210> 29

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of CD28 intracellular region

<400> 29

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 30

<211> 123

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Nucleotide sequence of CD28 intracellular region

<400> 30

aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc 60

gggccaaccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120

tcc 123

<210> 31

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of CD3Z domain

<400> 31

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45

Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
50 55 60

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
65 70 75 80

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
85 90 95

Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
100 105 110

Arg

<210> 32

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Nucleotide sequence of CD3Z domain

<400> 32

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60

tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120

cgggaccctg agatgggggg aaagccgcag agaaggaaga accctcagga aggcctgtac 180

aatgaactgc agaaagataa gatggcggag gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag 240

cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt taccagggtc tcagtacagc caccaaggac 300

acctacgacg cccttcacat gcaggccctg ccccctcgc 339

<210> 33

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of CD8 transmembrane region

<400> 33

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu

1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr

20

<210> 34

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Nucleotide sequence of CD8 transmembrane region

<400> 34

atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtggggtcc ttctcctgtc actggttatc 60

acc 63

<210> 35

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Amino acid sequence of CD137 intracellular region

<400> 35

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 36

<211> 126

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Nucleotide sequence of CD137 intracellular region

<400> 36

aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60

actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120

gaactg 126

<210> 37

<211> 184

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> BCMA amino acid sequence

<400> 37

Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser

1 5 10 15

Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr

20 25 30

Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser

35 40 45

Val Lys Gly Thr Asn Ala Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu

50 55 60

Ile Ile Ser Leu Ala Val Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile

65 70 75 80

Asn Ser Glu Pro Leu Lys Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu

85 90 95

Leu Gly Met Ala Asn Ile Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu
100 105 110
Ile Ile Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys

115 120 125
Glu Asp Cys Ile Lys Ser Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe
130 135 140
Pro Leu Pro Ala Met Glu Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys
145 150 155 160
Thr Asn Asp Tyr Cys Lys Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu
165 170 175
Ile Glu Lys Ser Ile Ser Ala Arg
180

<210> 38
<211> 54
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Human BCMA extracellular segment Met1-Ala54
<400> 38
Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
1 5 10 15
Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr
20 25 30
Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser
35 40 45

Val Lys Gly Thr Asn Ala
50
<210> 39
<211> 162
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> Nucleotide sequence of human BCMA extracellular segment Met1-Ala54
<400> 39

atgctgcaga tggccggcca gtgcagccag aacgagtact tcgacagcct gctgcacgcc 60

tgcatcccct gccagctgcg gtgcagcagc aacacccccc ccctgacctg ccagcggtac 120

tgcaacgcca gcgtgaccaa cagcgtgaag ggcaccaacg cc 162

<210> 40

<211> 283

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220

><223> BCMA_huFc

<400> 40

Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
1 5 10 15

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

Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser
35 40 45

Val Lys Gly Thr Asn Ala Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
50 55 60

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
65 70 75 80

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
85 90 95

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
100 105 110

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
115 120 125

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
130 135 140

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
145 150 155 160

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
165 170 175

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

180 185 190

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
195 200 205

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
210 215 220

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
225 230 235 240

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
245 250 255

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
260 265 270

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
275 280

<210> 41

<211> 849

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Nucleotide sequence of BCMA_huFc

<400> 41

atgctgcaga tggccggcca gtgcagccag aacgagtact tcgacagcct gctgcacgcc 60

tgcatcccct gccagctgcg gtgcagcagc aacacccccc ccctgacctg ccagcggtac 120

tgcaacgcca gcgtgaccaa cagcgtgaag ggcaccaacg ccggatccga caaaactcac 180

acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 240

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 300

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 360

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 420

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 480

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 540

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 600

ctgtggtgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 660

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 720

ttcctctata gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 780

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 840

ccgggtaaa 849

<210> 42

<211> 281

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> BCMA_muFc

<400> 42

Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser

1 5 10 15

Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr

20 25 30

Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser

35 40 45

Val Lys Gly Thr Asn Ala Gly Ser Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys

50 55 60

Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys

65 70 75 80

Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val

85 90 95

Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe

100 105 110

Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu

115 120 125

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His

130 135 140

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr

245 250 255

Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu

260 265 270

Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys

275 280

<210> 43

<211> 843

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Nucleotide sequence of BCMA_muFc

<400> 43

atgctgcaga tggccggcca gtgcagccag aacgagtact tcgacagcct gctgcacgcc 60

tgcatcccct gccagctgcg gtgcagcagc aacacccccc ccctgacctg ccagcggtac 120

tgcaacgcca gcgtgaccaa cagcgtgaag ggcaccaacg ccggatccag ggattgtggt 180

tgtaagcctt gcatatgtac agtcccagaa gtatcatctg tcttcatctt cccccaaag 240

cccaaggatg tgctcaccat tactctgact cctaaggtca cgtgtgttgt ggtagacatc 300

agcaaggatg atcccgaggt ccagttcagc tggtttgtag atgatgtgga ggtgcacaca 360

gctcagacgc aaccccggga ggagcagttc aacagcactt tccgctcagt cagtgaactt 420

cccatcatgc accaggactg gctcaatggc aaggagttca aatgcagggt caacagtgca 480

gctttccctg cccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aaggcagacc gaaggctcca 540

caggtgtaca ccattccacc tcccaaggag cagatggcca aggataaagt cagtctgacc 600

tgcatgataa cagacttctt ccctgaagac attactgtgg agtggcagtg gaatgggcag 660

ccagcggaga actacaagaa cactcagccc atcatggaca cagatggctc ttacttcgtc 720

tacagcaagc tcaatgtgca gaagagcaac tgggaggcag gaaatacttt cacctgctct 780

gtgttacatg agggcctgca caaccaccat actgagaaga gcctctccca ctctcctggt 840

aaa 843

<210> 44

<211> 589

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Nucleotide sequence of human BCMA with introduced restriction sites MluI, SalI

<400> 44

acgcgtccta gcgctaccgg tcgccaccat gttgcagatg gctgggcagt gctcccaaaa 60

tgaatatttt gacagtttgt tgcatgcttg cataccttgt caacttcgat gttcttctaa 120

tactcctcct ctaacatgtc agcgttattg taatgcaagt gtgaccaatt cagtgaaagg 180

aacgaatgcg attctctgga cctgtttggg actgagctta ataatttctt tggcagtttt 240

cgtgctaatg tttttgctaa ggaagataaa ctctgaacca ttaaaggacg agtttaaaaa 300

cacaggatca ggtctcctgg gcatggctaa cattgacctg gaaaagagca ggactggtga 360

tgaaattatt cttccgagag gcctcgagta cacggtggaa gaatgcacct gtgaagactg 420

catcaagagc aaaccgaagg tcgactctga ccattgcttt ccactcccag ctatggagga 480

aggcgcaacc attcttgtca ccacgaaaac gaatgactat tgcaagagcc tgccagctgc 540

tttgagtgct acggagatag agaaatcaat ttctgctagg taagtcgac 589

<210> 45

<211> 365

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> APRIL_huFc

<400> 45

His Ser Val Leu His Leu Val Pro Ile Asn Ala Thr Ser Lys Asp Asp

1 5 10 15

Ser Asp Val Thr Glu Val Met Trp Gln Pro Ala Leu Arg Arg Gly Arg

20 25 30

Gly Leu Gln Ala Gln Gly Tyr Gly Val Arg Ile Gln Asp Ala Gly Val

35 40 45

Tyr Leu Leu Tyr Ser Gln Val Leu Phe Gln Asp Val Thr Phe Thr Met
50 55 60

Gly Gln Val Val Ser Arg Glu Gly Gln Gly Arg Gln Glu Thr Leu Phe
65 70 75 80

Arg Cys Ile Arg Ser Met Pro Ser His Pro Asp Arg Ala Tyr Asn Ser
85 90 95

Cys Tyr Ser Ala Gly Val Phe His Leu His Gln Gly Asp Ile Leu Ser
100 105 110

Val Ile Ile Pro Arg Ala Arg Ala Lys Leu Asn Leu Ser Pro His Gly
115 120 125

Thr Phe Leu Gly Phe Val Lys Leu Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
130 135 140

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
145 150 155 160

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
165 170 175

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
180 185 190

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
195 200 205

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
210 215 220

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
225 230 235 240

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
245 250 255

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
260 265 270

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys
275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

<210> 46

<211> 1095

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Nucleotide sequence of APRIL_huFc

<400> 46

cacagcgtgc tgcacctggt gcccatcaac gccaccagca aggacgacag cgacgtgacc 60

gaggtgatgt ggcagcccgc cctgcggcgg ggccggggcc tgcaggccca gggctacggc 120

gtgcggatcc aggacgccgg cgtgtacctg ctgtacagcc aggtgctgtt ccaggacgtg 180

accttcacca tgggccaggt ggtgagccgg gagggccagg gccggcagga gaccctgttc 240

cggtgcatcc ggagcatgcc cagccacccc gaccgggcct acaacagctg ctacagcgcc 300

ggcgtgttcc acctgcacca gggcgacatc ctgagcgtga tcatcccccg ggcccgggcc 360

aagctgaacc tgagccccca cggcaccttc ctgggcttcg tgaagctggg atccgacaaa 420

actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc 480

ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 540

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 600

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 660

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 720

gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 780

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 840

gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 900

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 960

tccttcttcc tctatagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1020

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1080

ctgtctccgg gtaaa 1095

<210> 47

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 47 7A12 scFv

<400> 47

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Pro Tyr Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
130 135 140

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

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro

180 185 190

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

195 200 205

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr

210 215 220

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

225 230 235 240

Lys Arg

<210> 48

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 7G2 scFv

<400> 48

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Leu Ser Gly Asp Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile

180 185 190

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

195 200 205

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

210 215 220

Tyr Gly Tyr Pro Pro Arg Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

225 230 235 240

Ile Lys Arg

<210> 49

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer LMF

<400> 49

caggaaacag ctatgaccat gattac 26

<210> 50

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer BH1R

<220><221> misc_feature

<222> (44)..(45)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (47)..(48)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature
<222> (50)..(51)
<223> n is a, c, g, or t
<220><221> misc_feature
<222> (53)..(54)
<223> n is a, c, g, or t
<220><221> misc_feature
<222> (56)..(57)
<223> n is a, c, g, or t
<220><221> misc_feature
<222> (59)..(60)
<223> n is a, c, g, or t
<400> 50
tgagacccac tccagcccct tccctggagc ctggcggacc camnnmnnmn nmnnmnnmnn 60
aaaggtgaat ccggaggctg 80
<210> 51
<211> 67
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220><223> Primer BH2F
<220><221> misc_feature
<222> (18)..(19)
<223> n is a, c, g, or t
<220><221> misc_feature
<222> (24)..(25)
<223> n is a, c, g, or t
<220><221> misc_feature
<222> (27)..(28)
<223> n is a, c, g, or t
<220><221> misc_feature
<222> (30)..(31)
<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (33)..(34)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (39)..(40)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (45)..(46)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 51

ggctggagtg ggtctcannk attnnknnkn nknnkggtnn kacannktac gcagactccg 60

tgaaggg 67

<210> 52

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer FdR

<400> 52

gacgttagta aatgaatttt ctgtatgagg 30

<210> 53

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer BL1R

<220><221> misc_feature

<222> (44)..(45)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (50)..(51)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (53)..(54)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (56)..(57)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (59)..(60)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (62)..(63)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (65)..(66)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 53

gatgaggagc ctgggagcct ggccaggttt ctgctggtac camnntaamn nmnnmnnmnn 60

mnnmnnctga ctggccctgc aagag 85

<210> 54

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer BL2F

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(24)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(27)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (29)..(30)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (32)..(33)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (35)..(36)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 54

ccaggctccc aggctcctca tcnnknnknn knnknnkagg gccactggca tcccagac 58

<210> 55

<211> 244

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 23F10 scFv

<400> 55

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Val Arg Pro Phe Trp Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr
130 135 140

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

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln

210 215 220

Gln Tyr Phe Asn Pro Pro Glu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val

225 230 235 240

Glu Ile Lys Arg

<210> 56

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 25C2 VH(AA)

<400> 56

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Val Arg Pro Phe Trp Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 57

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> 25C2 VH

<400> 57

gaggtgcaat tgctggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttggc ggtaatgcca tgtcctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagca attagtggta atggtggtag tacattctac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagttcgt 300

ccattctggg gtactttcga ctactggggc caaggaaccc tggtcaccgt ctcgagt 357

<210> 58

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 25D2 VH(AA)

<400> 58

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Val Arg Pro Phe Trp Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 59

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> 25D2 VH

<400> 59

gaggtgcaat tgctggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagg agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggcg gtggtggtaa cacattctac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagttcgt 300

ccattctggg gtactttcga ctactggggc caaggaaccc tggtcaccgt ctcgagt 357

<210> 60

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 25C2 HCDR1

<400> 60

Gly Asn Ala Met Ser

1 5

<210> 61

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 25C2 HCDR2

<400> 61

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

1 5 10 15

Gly

<210> 62

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 25D2 HCDR1

<400> 62

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 63

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 25D2 HCDR2

<400> 63

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

1 5 10 15

Gly

<210> 64

<211> 732

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> 25C2 scFv

<400> 64

gaggtgcaat tgctggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttggc ggtaatgcca tgtcctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagca attagtggta atggtggtag tacattctac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagttcgt 300

ccattctggg gtactttcga ctactggggc caaggaaccc tggtcaccgt ctcgagtggt 360

ggaggcggtt caggcggagg tggttctggc ggtggcggat cggaaatcgt gttaacgcag 420

tctccaggca ccctgtcttt gtctccaggg gaaagagcca ccctctcttg cagggccagt 480

cagagtgtta gcagcagcta cttagcctgg taccagcaga aacctggcca ggctcccagg 540

ctcctcatct atggagcatc cagcagggcc actggcatcc cagacaggtt cagtggcagt 600

ggatccggga cagacttcac tctcaccatc agcagactgg agcctgaaga ttttgcagtg 660

tattactgtc agcagtactt caacccacca gaatacacgt tcggccaggg gaccaaagtg 720

gaaatcaaac gt 732

<210> 65

<211> 244

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 25C2 scFv(AA)

<400> 65

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Val Arg Pro Phe Trp Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln

210 215 220

Gln Tyr Phe Asn Pro Pro Glu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val

225 230 235 240

Glu Ile Lys Arg

<210> 66

<211> 732

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> 25D2 scFv

<400> 66

gaggtgcaat tgctggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagg agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggcg gtggtggtaa cacattctac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagttcgt 300

ccattctggg gtactttcga ctactggggc caaggaaccc tggtcaccgt ctcgagtggt 360

ggaggcggtt caggcggagg tggttctggc ggtggcggat cggaaatcgt gttaacgcag 420

tctccaggca ccctgtcttt gtctccaggg gaaagagcca ccctctcttg cagggccagt 480

cagagtgtta gcagcagcta cttagcctgg taccagcaga aacctggcca ggctcccagg 540

ctcctcatct atggagcatc cagcagggcc actggcatcc cagacaggtt cagtggcagt 600

ggatccggga cagacttcac tctcaccatc agcagactgg agcctgaaga ttttgcagtg 660

tattactgtc agcagtactt caacccacca gaatacacgt tcggccaggg gaccaaagtg 720

gaaatcaaac gt 732

<210> 67

<211> 244

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 25D2 scFv(AA)

<400> 67

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

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

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

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

50 55 60

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

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

Ala Lys Val Arg Pro Phe Trp Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr
130 135 140

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

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
165 170 175

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

180 185 190

Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
195 200 205

Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
210 215 220

Gln Tyr Phe Asn Pro Pro Glu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val

225 230 235 240

Glu Ile Lys Arg

<210> 68

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 signal peptide sequence

<400> 68

atgcagatcc cacaggcgcc ctggccagtc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg 60

<210> 69

<211> 450

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 extracellular segment sequence

<400> 69

ccaggatggt tcttagactc ccagacagg ccctggaacc cccccacctt ctccccagcc 60

ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg 120

gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 180

gccttccccg aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg 240

cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc 300

tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca 360

gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgcccacag cccaccccag cccctcaccc 420

aggccagccg gccagttcca aaccctggtg 450

<210> 70

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> DNA sequence of CH3 domain

<400> 70

cccccatgcc caccatgccc agcacctgag ttcctggggg gaccatcagt cttcctgttc 60

ccccccaaaac ccaaggacac tctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg 120

gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag 180

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc 240

agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 300

tccaacaaag gcctcccgtc c 321

<210> 71

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer

<400> 71

acgcgtccta gcgctaccgg tcgccaccat gcagatccca caggcgccc 49

<210> 72

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer

<400> 72

ctctcggggc tgcccaccat acaccagggt ttggaactgg c 41

<210> 73

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer

<400> 73

tatggtgggc agccccgaga gccacag 27

<210> 74

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Primer

<400> 74

aaaattcaaa gtctgtttca ctttacccgg agacagggag 40

<210> 75

<211> 465

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 7A12-BBZ

<400> 75

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

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

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

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

50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Pro Tyr Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
130 135 140

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

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro

180 185 190

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
195 200 205

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
210 215 220
Gly Tyr Pro Pro Ser Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
225 230 235 240
Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr

245 250 255
Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala
260 265 270
Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile
275 280 285
Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser
290 295 300
Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr

305 310 315 320
Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu
325 330 335
Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu
340 345 350
Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln
355 360 365
Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu

370 375 380
Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
385 390 395 400
Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
405 410 415
Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
420 425 430
Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr

435 440 445
Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro

450 455 460

Arg

465

<210> 76

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 25C2-BBZ

<400> 76

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Val Arg Pro Phe Trp Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln

210 215 220

Gln Tyr Phe Asn Pro Pro Glu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val

225 230 235 240

Glu Ile Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala

245 250 255

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg

260 265 270

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys

275 280 285

Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu

290 295 300

Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu

305 310 315 320

Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln

325 330 335

Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly

340 345 350

Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr

355 360 365

Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg

370 375 380

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met

385 390 395 400

Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu

405 410 415

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys

420 425 430

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
435 440 445

Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
450 455 460

Pro Pro Arg
465

<210> 77

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 25D2-BBZ

<400> 77

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Val Arg Pro Phe Trp Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr
130 135 140

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

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
165 170 175
Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly

180 185 190
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
195 200 205
Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
210 215 220
Gln Tyr Phe Asn Pro Pro Glu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
225 230 235 240
Glu Ile Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala

245 250 255
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
260 265 270
Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
275 280 285
Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
290 295 300
Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu

305 310 315 320
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
325 330 335
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
340 345 350
Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
355 360 365
Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg

370 375 380
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
385 390 395 400
Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu

405 410 415

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys

420 425 430

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu

435 440 445

Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu

450 455 460

Pro Pro Arg

465

<210> 78

<211> 466

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 7G2-BBZ

<400> 78

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Leu Ser Gly Asp Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile

180 185 190

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

195 200 205

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

210 215 220

Tyr Gly Tyr Pro Pro Arg Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

225 230 235 240

Ile Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro

245 250 255

Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro

260 265 270

Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp

275 280 285

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu

290 295 300

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu

305 310 315 320

Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu

325 330 335

Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys

340 345 350

Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys

355 360 365

Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu

370 375 380

Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
385 390 395 400
Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu

405 410 415
Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
420 425 430
Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
435 440 445
Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
450 455 460
Pro Arg
465
<210> 79
<211> 468
<
212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> 7A12-28Z
<400> 79
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

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

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro

180 185 190

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

195 200 205

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr

210 215 220

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

225 230 235 240

Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr

245 250 255

Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala

260 265 270

Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe

275 280 285

Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu

290 295 300

Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg

305 310 315 320

Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro

325 330 335

Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala

340 345 350

Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr

355 360 365

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg

370 375 380

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met

385 390 395 400

Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn

405 410 415

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met

420 425 430

Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly

435 440 445

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala

450 455 460

Leu Pro Pro Arg

465

<210> 80

<211> 510

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 7A12-28BBZ

<400> 80

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Tyr Pro Tyr Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro

180 185 190

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

195 200 205

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr

210 215 220

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

225 230 235 240

Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr

245 250 255

Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala

260 265 270

Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe

275 280 285

Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu

290 295 300

Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg

305 310 315 320

Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro

325 330 335

Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala

340 345 350

Tyr Arg Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

355 360 365

Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser

370 375 380

Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys

385 390 395 400

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln

405 410 415

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu

420 425 430

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg

435 440 445

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys

450 455 460

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg

465 470 475 480

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys

485 490 495

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

500 505 510

<210> 81

<211> 469

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 7G2-28Z

<400> 81

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

1 5 10 15

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

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

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

Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
210 215 220
Tyr Gly Tyr Pro Pro Arg Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
225 230 235 240
Ile Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro
245 250 255
Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro

260 265 270

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

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

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

Ala Leu Pro Pro Arg
465

<210> 82
<211> 511
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220><223> 7G2-28BBZ

<400> 82

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Leu Ser Gly Asp Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
130 135 140

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

Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
165 170 175

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile
180 185 190

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
195 200 205

Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
210 215 220

Tyr Gly Tyr Pro Pro Arg Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

225 230 235 240

Ile Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro
245 250 255
Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro
260 265 270
Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
275 280 285
Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
290 295 300

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
305 310 315 320
Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
325 330 335
Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
340 345 350
Ala Tyr Arg Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys
355 360 365

Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
370 375 380
Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val
385 390 395 400
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
405 410 415
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
420 425 430

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln
435 440 445
Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
450 455 460
Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
465 470 475 480

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
485 490 495

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
500 505 510

<210> 83

<211> 470

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 25C2-28Z

<400> 83

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Val Arg Pro Phe Trp Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr
130 135 140

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

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln

210 215 220

Gln Tyr Phe Asn Pro Pro Glu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val

225 230 235 240

Glu Ile Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala

245 250 255

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg

260 265 270

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys

275 280 285

Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser

290 295 300

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg

305 310 315 320

Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro

325 330 335

Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe

340 345 350

Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro

355 360 365

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly

370 375 380

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro

385 390 395 400

Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu

405 410 415

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile

420 425 430

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr

435 440 445

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met

450 455 460

Gln Ala Leu Pro Pro Arg

465 470

<210> 84

<211> 512

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 25C2-28BBZ

<400> 84

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Val Arg Pro Phe Trp Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln

210 215 220

Gln Tyr Phe Asn Pro Pro Glu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val

225 230 235 240

Glu Ile Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala

245 250 255

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg

260 265 270

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys

275 280 285

Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser

290 295 300

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg

305 310 315 320

Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro

325 330 335

Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe

340 345 350

Ala Ala Tyr Arg Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe

355 360 365

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly

370 375 380

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg

385 390 395 400

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln

405 410 415

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp

420 425 430

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro

435 440 445

Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys

450 455 460

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

465 470 475 480

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala

485 490 495

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

500 505 510

<210> 85

<211> 470

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 25D2-28Z

<400> 85

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

Ala Lys Val Arg Pro Phe Trp Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr
130 135 140

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

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
165 170 175

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly
180 185 190

Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
195 200 205

Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
210 215 220

Gln Tyr Phe Asn Pro Pro Glu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
225 230 235 240

Glu Ile Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
245 250 255

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
260 265 270

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
275 280 285

Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
290 295 300

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
305 310 315 320

Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
325 330 335
Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
340 345 350
Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
355 360 365
Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
370 375 380

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
385 390 395 400
Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
405 410 415
Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
420 425 430
Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
435 440 445

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
450 455 460
Gln Ala Leu Pro Pro Arg
465 470
<210> 86
<211> 512
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> 25D2-28BBZ
<400> 86
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ala Lys Val Arg Pro Phe Trp Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr
130 135 140
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
145 150 155 160

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
165 170 175
Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly
180 185 190
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
195 200 205
Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
210 215 220

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

Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser

290 295 300

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

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

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
420 425 430
Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
435 440 445
Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
450 455 460
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
465 470 475 480

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
485 490 495
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
500 505 510

<210> 87

<211> 412

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> C11D5.3-BBZ

<400> 87

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

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

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

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

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

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ala
130 135 140

Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
145 150 155 160

Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
165 170 175

Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Thr Thr Thr
180 185 190

Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro
195 200 205

Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val
210 215 220

His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro
225 230 235 240

Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu
245 250 255
Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro
260 265 270
Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys

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

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

405 410