



등록특허 10-2381257



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년04월04일

(11) 등록번호 10-2381257

(24) 등록일자 2022년03월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/2866 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2018-7034930

(22) 출원일자(국제) 2017년05월08일

심사청구일자 2020년03월04일

(85) 번역문제출일자 2018년11월30일

(65) 공개번호 10-2019-0004762

(43) 공개일자 2019년01월14일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2017/060925

(87) 국제공개번호 WO 2017/191325

국제공개일자 2017년11월09일

(30) 우선권주장

16168617.5 2016년05월06일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

WO2015132602 A1*

WO2016020502 A1*

KR1020140003550 A

WO2016207304 A2

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

엠에이비 디스커버리 게임베하

독일, 82061 노이리트, 포스탈리더 스트라쎄 8-14

(72) 발명자

피셔 슈테판

독일, 82362 바일하임, 알프피츠스트라쎄 1

브란트 미카엘

독일, 81476 뮌헨, 스피겔베그스트라쎄 7

카잔지안 린다 베로니크

독일, 80802 뮌헨, 레오폴드스트라쎄 52

(74) 대리인

특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 17 항

심사관 : 허명숙

(54) 발명의 명칭 인간화 항-IL-1R3 항체

(57) 요 약

본 발명은 IL-1R3에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 단편 또는 유도체 또는 IL-1R3 결합 특이성을 부여하기에 충분한 상기 항체의 적어도 일부를 함유하는 폴리펩티드에 관한 것이다. 상기 항체는 IL-1R3 유도된 NFkB 활성을 억제한다. 이들은 또한 IL-1알파, IL-1베타, IL-33, 및/또는 IL-36 자극된 NFkB 활성을 억제한다. 본 발명은 추가로, 암과 같은 IL-1R3 매개된 질환의 치료에 있어서의 상기 인간화 항체의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 마지막으로 약제학적으로 허용되는 담체 및 치료학적 유효량의 본 발명에 따르는 항체를 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다. 약제학적 조성물은 암과 같은 IL-1R3 매개된 질환을 치료하는데 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

IL-1R3에 특이적으로 결합하는 인간화 항체(humanized antibody) 또는 이의 IL-1R3 결합 단편으로서, 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR) 및 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 단편:

- (1) 서열번호 77에 따른 CDR1H, 서열번호 94에 따른 CDR2H, 서열번호 111에 따른 CDR3H, 서열번호 128에 따른 CDR1L, 서열번호 145에 따른 CDR2L, 및 서열번호 162에 따른 CDR3L,
- (2) 서열번호 79에 따른 CDR1H, 서열번호 96에 따른 CDR2H, 서열번호 113에 따른 CDR3H, 서열번호 130에 따른 CDR1L, 서열번호 147에 따른 CDR2L, 및 서열번호 175에 따른 CDR3L, 및
- (3) 서열번호 81에 따른 CDR1H, 서열번호 98에 따른 CDR2H, 서열번호 115에 따른 CDR3H, 서열번호 132에 따른 CDR1L, 서열번호 149에 따른 CDR2L, 및 서열번호 166에 따른 CDR3L.

청구항 2

제1항에 있어서, 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 중쇄 가변(VH) 영역과 적어도 90% 동일한 VH 영역을 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 단편:

- (1) 서열번호 26에 따른 VH 영역,
- (2) 서열번호 28에 따른 VH 영역, 및
- (3) 서열번호 30에 따른 VH 영역.

청구항 3

제1항에 있어서, 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 경쇄 가변(VL) 영역과 적어도 90% 동일한 VL 영역을 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 단편:

- (1) 서열번호 60에 따른 VL 영역,
- (2) 서열번호 174에 따른 VL 영역, 및
- (3) 서열번호 64에 따른 VL 영역.

청구항 4

제2항에 있어서, 다음으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한 중쇄 가변(VH) 영역을 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 단편:

- (1) 서열번호 26에 따른 VH 영역,
- (2) 서열번호 28에 따른 VH 영역, 및
- (3) 서열번호 30에 따른 VH 영역.

청구항 5

제3항에 있어서, 다음으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한 경쇄 가변(VL) 영역을 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 단편:

- (1) 서열번호 60에 따른 VL 영역,
- (2) 서열번호 174에 따른 VL 영역, 및
- (3) 서열번호 64에 따른 VL 영역.

청구항 6

제1항에 있어서, 인간화 항체 또는 이의 단편이 IL-1R3 유도된 NFkB 활성을 억제하는, 인간화 항체 또는 이의 단편.

청구항 7

제1항에 있어서, 인간화 항체 또는 이의 단편이 IL-1알파, IL-1베타, IL-33, 및 IL-36 자극된 NFkB 활성을 억제하는, 인간화 항체 또는 이의 단편.

청구항 8

제1항에 있어서, 인간화 항체 또는 이의 단편이 IL-1 β /IL-1R1/IL-1RAcP, IL-1 α /IL-1R1/IL-1RAcP, IL-33/ST2/IL-1RAcP, 및/또는 IL-36/I1-36R/IL-1RAcP로 이루어진 그룹으로부터 선택된 복합체에 의해 자극된 NFkB 활성을 억제하는, 인간화 항체 또는 이의 단편.

청구항 9

제1항에 있어서, 인간화 항체 또는 이의 단편이 0.1 ng/ml 인간 IL-1알파, 인간 IL-1베타, IL-33 및/또는 IL-36로 자극된 A549-NFkB-RE-Luc 세포 용해물에서 10 μ g/ml의 농도로 NFkB 발현을, 상기 항체가 없는 동일한 검정에 비해, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 95% 이상 억제하는, 인간화 항체 또는 이의 단편.

청구항 10

제1항에 있어서, 인간화 항체 또는 이의 단편이 NF-kB 리포터 유전자의 조절하에 루시퍼라제로 형질감염된 HEK293T/17 세포에서 IL-1알파, IL-1베타, IL-33, 및 IL-36 각각에 자극된 루시퍼라제 활성을 억제하는, 인간화 항체 또는 이의 단편.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 항체가 적어도 인간 IgG1 Fc 영역에 L234A 및 L235A 또는 인간 IgG4 Fc 영역에 S228P 및 L235E의 아미노산 치환을 포함하는, 인간화 항체 또는 이의 단편.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 암을 치료하는데 사용하기 위한 인간화 항체 또는 이의 단편.

청구항 13

제12항에 있어서, 암이 폐암, 비-소세포 폐(NSCL)암, 기관폐포 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안내 흑색종, 난소암, 직장암, 항문부의 암, 위암, 결장암, 유방암, 및 자궁암으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 인간화 항체 또는 이의 단편.

청구항 14

약제학적으로 허용되는 담체 및 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따르는 치료학적 유효량의 인간화 항체 또는 이의 단편을 포함하는, 암을 치료하는데 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 암이 폐암, 비-소세포 폐(NSCL)암, 기관폐포 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안내 흑색종, 난소암, 직장암, 항문부의 암, 위암, 결장암, 유방암, 및 자궁암으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 16

제12항에 있어서, 하나 이상의 세포독성제, 세포정지제 또는 표적화 항암 화합물과 조합하여 암의 치료에서 사용하기 위한, 인간화 항체 또는 이의 단편.

청구항 17

제14항에 있어서, 하나 이상의 세포독성제, 세포정지제 또는 표적화 항암 화합물과 조합하여 암의 치료에서 사용하기 위한, 약제학적 조성물.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간화(humanized) 항-IL-1R3 항체 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] IL1R3으로도 불리는 인터류킨 1 수용체 보조 단백질(IL1RAP)은 타입 1 인터류킨 1 수용체 (IL1R1)의 공수용체이며 IL-1 신호전달의 전송을 위해 필수적이다. IL-1에 결합시, IL-1R1은 IL-1RAcP와 결합하여 기능적 신호전달 수용체 복합체를 형성하며, 이것이 NFkB 활성을 자극한다.

[0003] IL-33, 이의 수용체 ST2, 및 IL-1RAcP가 또한 IL-1 β /IL-1R1/IL-1RAcP 복합체와 NFkB 활성화에 관해 유사한 활성을 갖는 복합체(IL-33/ST2/IL-1RAcP)를 형성한다. IL-36(IL-36 α (IL-1F6), IL-36 β (IL-1F8), 및 IL-36 γ (IL-1F9)), 이들의 수용체 IL-36R, 및 IL-1RAcP가 또한 IL-1 β /IL-1R1/IL-1RAcP 복합체와 NFkB 활성화에 관해 유사한 활성을 갖는 복합체(IL-36/IL-36R/IL-1RAcP)를 형성한다.

[0004] 인간 NF-kB는 염증, 면역 반응 및 아폽토시스에 관련된 몇 가지 유전자의 발현의 중요한 조절인자이다. 따라서, NFkB의 기능부전은 자가면역 질환, 신경퇴행성 질환, 염증, 및 암을 포함한 각종 질환의 병리학에 관련된다. 예를 들면, 골관절염(OA)의 치료에서, NF-kB 경로가 중요한 표적이다. 따라서, 인간 IL-1R1/IL-1RAcP 복합체의 신호전달 활성을 억제를 통해 인간 NFkB 경로를 조절하는 제제가 다양한 인간 질환에 대해 가능한 치료를 나타낸다. 특히, 고 친화성 중화 항체가 탁월한 치료제를 만들어낼 것이다.

[0005] 15년 이상에 걸쳐, 인간 IL1RAP에 대한 기능적 단클론 항체를 생성하기 위한 시도들이 이루어져 왔다. 그러나, 여러 시도들은 실패하였으며 현존하는 항체들은 여전히 다양한 단점을 나타낸다. 제WO199623067호는 뮤린 IL-1 수용체 보조 단백질에 특이적으로 결합하는 IL-1RAcP 항체에 관한 것이다. 실시예 15 및 16은 IL-1 생물학적 활성을 중화시키는 항-인간 IL-1RAcP 항체를 생성하기 위한 시도들을 기술한다. 그러나, 이러한 어떠한 항체도 제WO199623067호 및 실시예 16에 제공되어 있지 않으며, IL-1 유도된 IL-6 검정은 단지 가설이라고 기술하고 있다. 윤 도영(Do-Young Yoon D-Y) 및 찰스 에이. 디나렐로(Charles A. Dinarello CA)는 문헌(J. Immunol. 1998; 160:3170-3179)에서 IL-1베타 활성을 억제하지만 결합하지는 않는 뮤린 IL-1RAcP의 도메인 II 및 III에 대한 다클론 항체를 기술한다. 그러나, 보다 높은 농도의 IL-1베타(1000 pg/ml)에서, 이러한 다클론 항혈청은 D10S 세포의 증식을 차단하지 않았다. (D10S는 미토겐의 부재하에서 서브펨토몰라(subfemtomolar)(아토몰라(attomolar)) 농도의 IL-1 베타 또는 알파로 증식하는 뮤린 D10.G4.1 헬퍼 T-세포의 아클론이다, cf. Orencole SF and Dinarello CA; Cytokine 1 (1989) 14-22). 자라스 앤. 등[문헌 참조; Jaras M. et al., PNAS 107 (2010) 16280-16285]은 CML 줄기 세포를 사멸시키기 위한 토끼 다클론 항-IL1RAcP 항체 KMT-1의 용도를 기술한다. 이 항체는 이의 토끼 Fc 부분에 의해 야기되는 IL1RAP-비의존적 방식으로 ADCC를 유도한다. 자라스 등(Jaras et al.)은 "잠재적 장래 치료학적 IL1RAP-표적화 항체가 정상 조혈 세포에 대해 낮은 독성을 보일 것으로 예상된다"고 기대한다. 뮤린 IL-1RAcP에 대한 다클론 토끼 항체는 또한 문헌[Do-Young Yoon and Charles A. Dinarello, Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 40, No. 4, July 2007, pp. 562-570]에도 언급되었다.

[0006] 제WO2002064630호도 IL-1RAcP 및 이의 용도에 관한 것이지만, IL-1RAcP에 대한 어떠한 항체도 기술되어 있지 않다. 제WO2004022718호 및 제WO2009120903호는 CSF1R, IL13RA1, IL1RAP, IFNAR1, IL5R, INSR, IL1RL1, LTK, 및 TACSTD1에 대한 항체가 최첨단 기술에 따라 생성될 수 있음을 이론적으로 언급하고 있다. 그러나, 여기에도 IL-1RAcP에 대한 항체는 기술되어 있지 않다. 제WO2011021014호 및 제WO 2012098407호(US20140017167)는 다클론 토끼 항-인간 IL-1RAcP 항혈청 KMT-1(참조; Jaras et al. 2010) 및 이의 용도에 관한 것이다. 제

WO2014100772호는 IL-1RAcP에 결합하는 항-IL-1RAcP 항체에 관한 것이다. 그러나, NFkB 활성을 자극하는 (IL-1 β /IL-1R1/IL-1RAcP와 같은) 임의의 기능적 신호전달 수용체 복합체의 억제와 관련한 활성을 기술되어 있지 않다. 제US6280955호는 IL-1RAcP 및 이의 용도에 관한 것이지만, 다시 IL-1RAcP에 대한 어떠한 항체도 기술하고 있지 않다. 제US7390880호는 IL1RAcP의 N-말단 단편을 언급하지만, IL-1RAcP에 대한 항체는 기술하고 있지 않다.

[0007] 제WO2004100987호는 신생 내막 증식의 치료용 약제의 제조에 있어서의 인터류킨-1(IL-1) 길항제의 용도 및 신생 내막 증식의 치료를 위한 IL-1 길항제의 용도에 관한 것이다. 이러한 길항제로서 항-IL-1RAcP 항체가 시사되어 있지만 추가로 기술되어 있지는 않다. 제US2003026806호는 IL-1에 결합하는 항체에 관한 것이다. 제WO2002064630호는 또한 IL-1 길항제 및 IL-1RAcP 단백질에 관한 것이다. IL-1RAcP 길항제를 스크리닝하기 위한 IL-1RAcP의 용도가 언급되어 있지만, 그러한 방법 또는 길항제는 개시되어 있지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이것은 IL-1R3에 대해 높은 친화성, 높은 특이성, 및 강력한 중화 활성을 갖는 단클론 항체를 동정하기가 대단히 어렵다는 것을 보여준다. 본 발명은 IL-1R 3에 대해 높은 친화성 및 특이성을 갖고, 강력한 IL-1R3 중화 활성 3, 및 개선된 안정성을 갖는 인간화 IL-1R3 항체를 포함한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 IL-1R3에 특이적으로 결합하는 인간화 IgG1_{LALA} 항체 또는 이의 단편 또는 유도체 또는 IL-1R3 결합 특이성을 부여하기에 충분한 상기 항체의 적어도 일부를 함유하는 폴리펩티드에 관한 것이다. 상기 항체는 IL-1R3 유도된 NFkB 활성을 억제한다. 이것은 또한 IL-1알파, IL-1베타, IL-33, 및/또는 IL-36 자극된 NFkB 활성을 억제한다.

[0010] 본 발명은 추가로 IL-1R3 매개된 질환을 치료하는데 사용하기 위한 본 발명에 따르는 항체에 관한 것이다.

[0011] 본 발명은 추가로 환자에게 약제학적 유효량의 상기 항체를 투여함을 포함하여, 환자에서 IL-1R3 매개된 질환을 치료하는 방법을 포함한다.

[0012] 본 발명은 또한 약제학적으로 허용되는 담체 및 치료학적 유효량의 상기 항체를 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다.

정의

[0014] 본 발명에 따르는 용어 "토끼(rabbit)"는, 바람직하게는 집토끼 속(genus Oryctolagus)의 가계(산토끼 및 토끼) 및 우는토끼과(Ochotonidae)(pikas)를 포함하는 분류 순서 토끼목(Lagomorpha)의 구성원의 동물을 의미한다.

[0015] 용어 "항체"는 본 발명에 따르는 특성을 보이는 한 전 항체 및 항체 단편을 포함하지만 이에 제한되지 않는 항체 구조의 다양한 형태를 포함한다.

[0016] 본 발명에 따르는 용어 "토끼 단클론 항체"는 토끼를 면역화함으로써 생산되고 상기 토끼의 항원 생성 세포로부터 단리되는 단클론 항체 뿐만 아니라 본 발명에 따르는 특징적인 특성들이 유지되는 한 추가로 변형된 이러한 항체, 바람직하게는 인간화 항체, 키메라 항체, 이의 단편, 또는 추가로 유전자 조작된 및 재조합에 의해 생산된 항체를 의미한다. 바람직하게는 항체는 상기 토끼의 B 세포 또는 토끼 하이브리도마 세포로부터의 항체이다.

[0017] 본 발명에 따르는 용어 "항체 생성 세포"는 항체를 생산하는 토끼 B 세포, 바람직하게는 B 세포 또는 토끼 하이브리도마 세포를 의미한다.

[0018] "천연 항체(Native antibody)"는 통상적으로 두 개의 동일한 경쇄(L) 및 두 개의 동일한 중쇄(H)로 이루어진 이형사량체성 당단백질이다. 각 경쇄는 하나의 공유 디설파이드 결합에 의해 중쇄에 연결되는 반면, 디설파이드 결합의 수는 상이한 면역글로불린 이소형의 중쇄마다 다르다. 각 중쇄 및 경쇄는 또한 일정한 간격의 쇄내 디설파이드 브릿지를 갖는다. 각 중쇄는 하나의 말단에 가변 도메인(VH)에 이어 다수의 불변 도메인을 갖는다. 각 경쇄는 하나의 말단(VL)에 가변 도메인을 갖고 다른 말단에 불변 도메인을 갖는다. 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인을 따라 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인을 따라 정렬된다. 특정 아

미노산 잔기가 경쇄와 중쇄 가변 도메인 사이에 계면을 형성하는 것으로 믿어진다.

[0019] 펩티드 또는 폴리펩티드 서열과 관련하여 "아미노산 서열 동일성 퍼센트(%)"는, 서열을 정렬하고 최대 서열 동일성 퍼센트를 달성하기 위해 필요에 따라 캡을 도입한 후, 및 보존적 치환을 서열 동일성의 일부로 간주하지 않고서, 특정 펩티드 또는 폴리펩티드 서열에서의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열에서의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 아미노산 서열 동일성 퍼센트를 결정할 목적을 위한 정렬은 당업계의 기술 내에 있는 다양한 방식으로, 예를 들어, BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 달성될 수 있다.

[0020] 용어 "VL (또는 VH) 영역"은 VL (또는 VH) 도메인과 동일한 의미를 갖는다.

[0021] 본 발명에 따르는 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 인간 수용체를 가리킨다. FcR은 IgG 항체와 결합하고 하기 수용체의 대립형질 변이체 및 대안적으로 스플라이싱된 형태를 포함한 Fc γ RI, Fc γ RII, 및 Fc γ RIII 서브클래스의 수용체를 포함한다. Fc γ RII 수용체는 Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB ("억제 수용체")를 포함하며, 이것은 주로 이의 세포질 도메인에 있어 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 이의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 이의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기반 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다 (참조; review M. in Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). FcRIIIA (CD16a)는 ADCC를 매개한다. FcR은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991); Capel et al, Immunomethods 4:25-34 (1994); and de Haas et al, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)]에 검토되어 있다. 이들 및 모든 다른 FcR이 본원에서 용어 "FcR"에 의해 포함된다. 상기 용어는 또한 태아로의 모(maternal) IgG의 전달을 책임지는 신생아 수용체, FcRn을 포함하고 (Guyer et al, J. Immunol. 117:587 (1976) and Kim et al, J. Immunol. 147:249 (1994)) 더 느린 이화작용, 이에 따른 더 긴 반감기를 매개한다.

[0022] 용어 "항체 효과기 기능(들)" 또는 "효과기 기능"은 본원에서 사용되는 바와 같이 IgG의 Fc 효과기 도메인(들)(e.g., 면역글로불린의 Fc 영역)에 의해 제공되는 기능을 가리킨다. 이러한 기능은, 예를 들면, 식균 또는 용해 활성을 갖는 면역 세포 상에서 Fc 수용체에 Fc 효과기 도메인(들)을 결합시킴으로써 또는 보체 시스템의 성분에 Fc 효과기 도메인(들)을 결합시킴으로써 수행될 수 있다. 전형적인 효과기 기능은 ADCC, ADCP 및 CDC이다.

[0023] "항체 단편"은 온전한(intact) 항체가 결합하는 항원에 결합하는 온전한 항체의 일부를 포함하는 온전한 항체 이외의 분자를 가리킨다. 항체 단편의 예는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2; 디아바디; 선형 항체; 단일-쇄 항체 분자(e.g. scFv); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이성 항체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 기준 항체(reference antibody)로서의 "동일한 에피토프에 결합하는 항체"는 경쟁 검정에서 이의 항원에의 기준 항체의 결합을 50% 이상까지 차단하는 항체를 가리키며, 반대로, 기준 항체는 경쟁 검정에서 이의 항원에의 항체의 결합을 50% 이상까지 차단한다. 예시적인 경쟁 검정은 본원에 제공되어 있다.

[0025] "항체-의존적 세포-매개된 세포독성" 및 "ADCC"는 FcR을 발현하는 비특이 세포독성 세포(e.g. 자연 살해(NK) 세포, 호중구, 및 대식세포)가 표적 세포 상의 결합된 항체를 인식하고 후속적으로 표적 세포의 용해를 야기하는 세포-매개 반응을 가리킨다. ADCC를 매개하기 위한 일차 세포, NK 세포는 Fc γ RIII 만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 FCYRIII을 발현한다.

[0026] 용어 "항체-의존적 세포 식균작용" 및 "ADCP"는 항체-피복된 세포가 면역글로불린 Fc 영역에 결합하는 식균성 면역 세포(e.g., 대식세포, 호중구 및 수지상 세포)에 의해 전부 또는 일부 내재화되는 과정을 가리킨다.

[0027] "C1q"는 면역글로불린의 Fc 영역에 대한 결합 부위를 포함하는 폴리펩티드이다. C1q는, 두 개의 세린 프로테아제, C1r 및 C1s와 함께, 보체 의존적 세포독성(CDC) 경로의 첫번째 성분인 복합체 C1을 형성한다. 인간 C1q는, 예를 들어, 캘리포니아주 샌 디에고에 소재하는 Quidel로부터 상업적으로 구입할 수 있다.

[0028] 항체의 "클래스"는 이의 중쇄에 의해 프로세싱된 불변 도메인 또는 불변 영역의 타입을 가리킨다. 항체의 주요 클래스에는 다섯 가지: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이 있고, 이를 중의 몇몇은 서브클래스(이소형), 예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgAi, 및 IgA₂로 더욱 세분될 수 있다. 면역글로불린의 상이한 클래스에 상응하는 중쇄 불변 도메인을 각각 α , δ , ϵ , γ , 및 μ 라고 부른다.

[0029] 제제, 예를 들어, 약제학적 제형의 "유효량"은, 필요한 투여량 및 시간 동안, 목적하는 치료적 또는 예방적 결과를 달성하는데 효과적인 양을 가리킨다.

- [0030] 본원에서 용어 "Fc 영역"은 불변 영역의 적어도 일부를 함유하는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는데 사용된다. 상기 용어는 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. 본원에 달리 명시되지 않는 한, Fc 영역 또는 불변 영역에서 아미노산 잔기의 넘버링은, 문헌[Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에 기술된 바와 같이, EU 인덱스라고도 불리는 EU 넘버링 시스템에 따른다.
- [0031] "변이체 Fc 영역"은 본원에 정의된 바와 같은 적어도 하나의 "아미노산 변형" 덕분에 "천연" 또는 "야생형" 서열 Fc 영역과는 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "Fc-변이체"는 Fc 도메인에 변형을 포함하는 폴리펩티드를 가리킨다. 본 발명의 Fc 변이체는 이들을 구성하는 아미노산 변형에 따라 정의된다. 따라서, 예를 들면, P329G는 부모 Fc 폴리펩티드에 비해 329 위치에서 프롤린이 글리신으로 치환된 Fc 변이체이며, 여기서 넘버링은 EU 인덱스에 따른다. 야생형 아미노산의 동일성은 명시할 수 없는데, 이 경우 상기한 변이체를 P329G라고 한다. 본 발명에서 논의된 모든 위치에 대해, 넘버링은 EU 인덱스에 따른다. EU 인덱스 또는 Kabat 또는 EU 넘버링 방식에서와 같은 EU 인덱스는 EU 항체의 넘버링을 가리킨다(Edelman, et al., Proc Natl Acad Sci USA 63 (1969) 78-85, 본원에 전문이 참고로 포함됨.) 변형은 부가, 결실, 또는 치환일 수 있다. 치환은 자연 발생적 아미노산 및 비-자연 발생적 아미노산을 포함할 수 있다. 변이체는 비-천연 아미노산을 포함할 수 있다. 예는 U.S. 특허 제6,586,207호; 제WO 98/48032호; 제WO 03/073238호; 제US 2004/0214988 A1호; 제WO 05/35727 A2호; 제WO 05/74524 A2호; 문헌[Chin, J.W., et al., Journal of the American Chemical Society 124 (2002) 9026-9027; Chin, J.W., and Schultz, P.G., ChemBioChem 11 (2002) 1135-1137; Chin, J.W., et al., PICAS United States of America 99 (2002) 11020-11024; and, Wang, L., and Schultz, P.G., Chem. (2002) 1-10, 모두는 전문이 참고로 포함됨]을 포함한다.
- [0032] 용어 "Fc 영역-함유 폴리펩티드"는 Fc 영역을 포함하는, 항체 또는 면역부착소(정의는 아래 참고)와 같은 폴리펩티드를 가리킨다.
- [0033] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기술하는데 사용된다. IgG 항체(감마 수용체)와 결합하는 FcR은 하기 수용체의 대립형질 변이체 및 대안적으로 스플라이싱된 형태를 포함한 FcyRI, FcyRII, 및 FcyRIII 서브클래스의 수용체를 포함한다. FcyRII 수용체는 FcyRIIA ("활성화 수용체") 및 FcyRIIB ("억제 수용체")를 포함하며, 이것은 주로 이의 세포질 도메인에서 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 FcyRIIA는 이의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 FcyRIIB는 이의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기반 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다(문헌[Daeron, M., Annu. Rev. Immunol. 15 (1997) 203-234]의 검토를 참고함). FcR은 문헌[Ravetch, and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492; Capel, et al., Immunomethods 4 (1994) 25-34; and de Haas, et al., J. Lab. Clin. Med. 126 (1995) 330-41]에 검토되어 있다. 장차 확인될 것을 포함한 기타의 FcR이 본원에서 용어 "FcR"에 의해 포함된다. 상기 용어는 또한 태아로의 모 IgG의 전달을 책임지는 신생아 수용체, FcRn을 포함한다(Guyer, et al., J. Immunol. 117 (1976) 587 and Kim, et al., J. Immunol. 24 (1994) 249).
- [0034] 본원에서 사용되는 바와 같이 "IgG Fc 리간드"란 IgG 항체의 Fc 영역에 결합하여 Fc/Fc 리간드 복합체를 형성하는 임의의 유기체로부터의 분자, 바람직하게는 폴리펩티드를 의미한다. Fc 리간드는 FcyRs, FcyRs, FcyRs, FcRn, Clq, C3, 만난 결합 렉틴, 만노스 수용체, 스타필로코커스 단백질(staphylococcal protein) A, 스트렙토코커스 단백질(streptococcal protein) G, 및 바이러스성 FcyR을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. Fc 리간드는 또한 FcyRs에 상동성인 Fc 수용체의 계열인 Fc 수용체 동족체(FcRH)를 포함한다(Davis, et al., Immunological Reviews 190 (2002) 123-136, 전문이 참고로 포함됨). Fc 리간드는 Fc에 결합하는 발견되지 않은 분자를 포함할 수 있다. 특정 IgG Fc 리간드는 FcRn 및 Fc 감마 수용체이다. 본원에서 사용되는 바와 같이 "Fc 리간드"란 항체의 Fc 영역에 결합하여 Fc/Fc 리간드 복합체를 형성하는 임의의 유기체로부터의 분자, 바람직하게는 폴리펩티드를 의미한다.
- [0035] 본원에서 사용되는 바와 같이 "Fc 감마 수용체", "FcyR" 또는 "Fc감마R"이란 IgG 항체 Fc 영역에 결합하고 FcyR 유전자에 의해 암호화되는 단백질의 계열의 임의의 구성원을 의미한다. 인간에서 이러한 계열은 이소형 FcyRIA, FcyRIB, 및 FcyRIC를 포함한 FcyRI (CD64); 이소형 FcyRIIA (알로타입 H131 및 R131 포함), FcyRIIB (FcyRIIB-1 및 FcyRIIB-2 포함), 및 FcyRIIC를 포함한 FcyRII (CD32); 및 이소형 FcyRIIIA (알로타입 VI 58 및 F158 포함) 및 FcyRIIIB (알로타입 FcyRIIB-NA1 및 FcyRIIB-NA2 포함)을 포함한 FcyRIII (CD 16) (Jefferis, et al., Immunol Lett 82 (2002) 57-65, 전문이 참고로 포함됨), 뿐만 아니라 임의의 발견되지 않은 인간 FcyRs 또는 FcyR 이소형 또는 알로타입을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. FcyR은 인간, 마우스, 래트, 토끼, 및 원숭이를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 유기체로부터의 것일 수 있다. 마우스 FcyR은 FcyRI

(CD64), FcyRII (CD32), FcyRIII (CD 16), 및 FCYRIII-2 (CD 16-2), 뿐만 아니라 임의의 발견되지 않은 마우스 FcyRs 또는 FcyR 이소형 또는 알로타입을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0036] 본원에서 사용되는 바와 같이 "FcRn" 또는 "신생아 Fc 수용체"란 IgG 항체 Fc 영역에 결합하고 FcRn 유전자에 의해 적어도 부분적으로 암호화되는 단백질을 의미한다. FcRn은 인간, 마우스, 래트, 토끼, 및 원숭이를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 유기체로부터의 것일 수 있다. 당업계에 알려져 있는 바와 같이, 기능적 FcRn 단백질은 종종 중쇄 및 경쇄라고 하는 두 개의 폴리펩티드를 포함한다. 경쇄는 베타-2-마이크로글로불린이고 중쇄는 FcRn 유전자에 의해 암호화된다. 본원에서 달리 주지되지 않는 한, FcRn 또는 FcRn 단백질은 FcRn 중쇄와 베타-2-마이크로글로불린의 복합체를 가리킨다.

[0037] "면역접합체"는 화학요법제, 약물, 성장 억제제, 독소, 다른 항체, 또는 방사성 동위원소와 같은 하나 이상의 세포독성제에 접합된 항체를 의미한다.

[0038] "항체 단편"은 전장 항체의 일부, 바람직하게는 이의 가변 영역, 또는 적어도 이의 항원 결합부를 포함한다. 항체 단편의 예는 디아바디, Fab 단편, 및 단일-쇄 항체 분자를 포함한다. scFv 항체는, 예를 들어, 문헌 [Huston, J.S., Methods in Enzymol. 203 (1991) 46-88]에 기술되어 있다.

[0039] 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "단클론 항체" 또는 "단클론 항체 조성물"은 단일 아미노산 조성물의 항체 분자의 제제를 가리킨다.

[0040] 용어 "인간화 항체" 또는 "항체의 인간화 버전"은 인간 가변 영역이 본 발명에 따르는 항체의 CDR을 포함하도록 변형된 항체를 가리킨다. 바람직한 실시형태에서, VH 및 VL의 CDR을 인간 항체의 골격 영역에 이식하여 "인간화 항체"를 제조한다. 예를 들어, 문헌[Riechmann, L., et al, Nature 332 (1988) 323-327; and Neuberger, M.S., et al, Nature 314 (1985) 268-270]을 참고한다. 중쇄 및 경쇄 가변 골격 영역은 동일하거나 상이한 인간 항체 서열로부터 유도될 수 있다. 인간 항체 서열은 자연 발생적 인간 항체의 서열일 수 있다. 인간 중쇄 및 경쇄 가변 골격 영역은, 예를 들어, 문헌[Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology (2000) - Appendix IP A.1P.1-A.1P.37]에 열거되어 있으며 IMGT, 국제 ImMunoGeneTics 정보 시스템® (<http://imgt.cines.fr>)을 통해 또는 <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk>를 통해 이용 가능하다.

[0041] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "표적, 또는 항-표적 항체에 대해 특이적으로 결합한다"는 ELISA에 의해 측정되는 각각의 항원(표적)에 대한 항체의 결합을 가리키며, 여기서, 상기 ELISA는 바람직하게는 각각의 항원을 고체 지지체에 코팅시키고, 각각의 항원 또는 단백질과의 면역 복합체의 형성을 가능하게 하는 조건하에서 상기 항체를 가하고, 본 발명에 따르는 항체에 대한 이차 항체 결합을 사용하여 광학 밀도 값(Optical Density value; OD)을 측정하고 퍼옥시다제-매개된 발색을 사용함으로써 상기 면역 복합체를 검출함을 포함한다.

[0042] 본 발명에 따르는 용어 "항원"은 면역화를 위해 사용되는 항원 또는 이의 단백질 서열의 부분으로서 상기 항원을 포함하는 단백질을 가리킨다. 예를 들면, 면역화를 위해서는 단백질의 세포외 도메인의 단편(e.g. 처음 20 개 아미노산)이 사용될 수 있고 검출/검정 등을 위해서는 단백질의 세포외 도메인 또는 전장 단백질이 사용될 수 있다.

[0043] 본원에서 용어 "특이적으로 결합하는" 또는 "특이적으로 인식되는"은 항체가 항원에 대해 주목할 만한 친화도를 나타내며, 바람직하게는, 유의적인 교차-반응성을 나타내지 않음을 의미한다.

[0044] "주목할 만한(appreciable)" 결합 친화도는 적어도 $10\exp{7}M^{-1}$, 구체적으로 적어도 $10\exp{8}M^{-1}$, 보다 구체적으로 적어도 $10\exp{9}M^{-1}$, 또는 더욱 더 구체적으로 적어도 $10\exp{10}M^{-1}$ 의 친화도를 갖는 결합을 포함한다.

[0045] "유의적인 교차-반응성을 나타내지 않는" 항체는 바람직하지 않은 다른 단백질에 주목할 만하게 결합하지 않는 항체이다. 본 발명에 따르는 에피토프에 특이적인 항체는, 예를 들면, IL-1R3 상의 다른 에피토프와 유의적으로 교차-반응하지 않을 것이다. 특이 결합은 이러한 결합을 결정하기 위해 당업계에서 인지되는 수단에 따라, 예를 들어, 경쟁적 결합 검정(e.g. ELISA)에 의해 결정될 수 있다.

[0046] 본원에서 사용되는 바와 같은 모든 단백질 용어는 인간 단백질을 가리킨다. 다른 종으로부터의 단백질을 의미한다면, 이것은 분명하게 언급된다.

[0047] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "IL-1알파"는 인간 IL-1 (UniProtKB P01583)을 가리킨다. 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "IL-1베타"는 인간 IL-1베타 (UniProtKB P01584)를 가리킨다. IL-1은 IL-2 방출, B-세포 성숙 및 증식, 및 섬유아세포 성장 인자 활성을 유도함으로써 흥선세포 증식을 자극한다. IL-1 단백질은 염증

반응에 관련되며, 내인성 발열원으로 확인된다(UniProtKB).

[0048] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "IL-33"은 IL1RL1/ST2 수용체에 결합하고 이를 통해 신호를 보내어 표적 세포(UniProtKB)에서 NF-카파-B 및 MAPK 신호전달 경로를 활성화시키는 사이토ки인 인간 IL-33 (UniProtKB Q95760)을 가리킨다.

[0049] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "IL-36"은 인간 IL-36알파 (UniProtKB Q9UHA7), IL-36베타 (UniProtKB Q9NZH7) 및 또는 IL-36감마 (UniProtKB Q9NZH8)를 가리킨다. IL-36은 IL1RL2/IL-36R 수용체에 결합하여 이를 통해 신호를 보내어 전염증성 반응에 관련된 표적 세포에서 NF-카파-B 및 MAPK 신호전달 경로를 활성화시키는 사이토킨이다. IL-36은 각질형성 세포, 수지상 세포 상에서 및 간접적으로 T 세포 상에서 조작 침윤, 세포 성숙 및 세포 증식을 주도하도록 작용함으로써 피부 염증 반응에 관여하는 것으로 보인다(UniProtKB).

[0050] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "NFkB"는 p105 서브유닛 (P19838) 및 p100 서브유닛 (Q00653)으로 이루어진 인간 핵 인자 NF-카파-B를 가리킨다.

[0051] "NFkB의 억제"는 인간 세포에서 NFkB 의존적 루시퍼라제 유전자 발현의 억제로서 본 발명에 따라 측정된다. 이러한 방법은, 예를 들어, 문헌 [Windheim M. et al., Mol. Cell. Biol. 28 (2008) 1783-1791; Huang J. et al. PNAS USA 94 (1997) 12829-12832; Xiaoxia L. et al., Mol. Cell. Biol. 19 (1999) 4643-4652]에 기술되어 있다. 뮤린 NFkB를 본원에서 의미한다면, 이것은 분명하게 언급된다.

[0052] 본원에서 사용되는 바와 같은 "본 발명에 따르는 항체의 가변 영역 (또는 도메인)" (경쇄 (VL)의 가변 영역, 중쇄 (VH)의 가변 영역)은 항원에 항체를 결합시키는데 직접적으로 관여하는 경쇄 및 중쇄 영역의 각각의 쌍을 나타낸다. 가변 경쇄 및 중쇄 영역은 동일한 일반 구조를 가지며 각 영역은 이의 서열이 광범위하게 보존되고 세 개의 상보성 결정 영역, CDR에 의해 연결된 네 개의 골격 (FR) 영역을 포함한다. 본 발명에 따르는 항체는 VH 영역 및 VL 영역 또는 이의 일부를 포함하며, 이것은 둘 다 함께 각각의 항원에의 특이 결합을 위해 충분하다.

[0053] 용어 "항체의 항원-결합부"는 본원에서 사용되는 경우 항원-결합을 책임지는 항체의 아미노산 잔기를 가리킨다. 항체의 항원-결합부는 바람직하게는 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기를 포함한다. CDR 서열은 카밧 등의 문헌 [참조; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]에 따라 정의된다. 이러한 넘버링 시스템을 사용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 영역의 FR 또는 CDR의 단축 또는 삽입에 상응하는 더 적은 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다.

[0054] 본원에서 사용되는 바와 같은 어구 "비경구 투여" 및 "비경구적으로 투여된다"는 통상적으로 주사에 의한, 장관 및 국소 투여 이외의 투여 모드를 의미하며, 정맥내, 근육내, 동맥내, 경막내, 낭내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 기관경유, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막의 및 흉골내 주사 및 주입을 제한 없이 포함한다.

[0055] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "암"은, 예를 들면, 하기 암들 중의 어느 것의 무반응성 버전(refractory version)을 포함한, 폐암, 비-소세포 폐(NSCL)암, 기관폐포(bronchioloalviolar) 세포 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문부의 암, 위장암(stomach cancer), 위암(gastric cancer), 결장암, 유방암, 자궁암, 나팔관의 암종, 자궁내막의 암종, 자궁경부의 암종, 질의 암종, 외음부의 암종, 호지킨병, 식도암, 소장암, 내분비계 암, 갑상선 암, 부갑상선 암, 부신 암, 연조직의 육종, 요도암, 음경 암, 전립선 암, 방광 암, 신장 또는 요관의 암, 신세포 암종, 신우의 암종, 중피종, 간세포 암, 담관암, 중추 신경계(CNS)의 신생물, 척추 종양, 뇌간 교종, 다형성 교아종, 성상세포종, 신경초종, 뇌질피복 세포종, 수아세포종, 수막종, 편평 세포 암종, 뇌하수체 선종, 림프종, 림프성 백혈병, 또는 상기 암들 중의 하나 이상의 조합일 수 있다.

발명의 상세한 설명

[0057] 면역화된 포유동물로부터 기원하는 항체의 인간화는, 상기 항체가 인간 치료제로서의 사용을 위한 것인 경우, 개발시 품질 특성으로서 요구된다. 인간화의 목표는 다른 유기체로부터 유도된 비-인간화 항체를 인간에게 도입할 때에 발생할 수 있는 면역학적 부작용을 감소시키면서 항체의 원래 특성들(결합 특이성, 활성)을 가능한 한 유지시키는 것이다. 본 발명은 CDR 이식의 알려진 인간화 전략에 기초한다. 여기서, 다양한 활성 인간화 항체가 동시에 생산되었으며 상위 후보물이 추가의 평가를 위해 선택되었다.

[0058] 본 출원의 도입부에 요약된 바와 같이, IL-1R3에 대해 높은 친화성, 높은 특이성, 및 강력한 중화 활성을 갖는

단클론 항체를 동정하는 것은 대단히 어렵다. 본 발명은 IL-1R 3에 대해 높은 친화성 및 특이성을 갖고, 강력한 IL-1R3 중화 활성 3, 및 개선된 안정성을 갖는 인간화 IL-1R3 항체를 포함한다.

[0059] 특히, 본 발명은 다음을 포함하는, IL-1R3에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 IL-1R3 결합 특이성을 부여하기에 충분한 상기 항체의 적어도 일부를 함유하는 이의 단편 또는 유도체에 관한 것이다:

[0060] a) CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3을 포함한 상보성 결정 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) (여기서,

CDR-H1 영역은 서열 번호 69 - 85의 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고,

CDR-H2 영역은 서열 번호 86 - 102의 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고,

CDR-H3 영역은 서열 번호 103 - 119의 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다); 및

[0064] b) CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3을 포함한 상보성 결정 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL) (여기서,

CDR-L1 영역은 서열 번호 120-136의 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고,

CDR-L2 영역은 서열 번호 137-153의 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고,

CDR-L3 영역은 서열 번호 154-170 및 175의 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다).

[0068] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 항체는 CDR-L3의 2 위치에 치환을 포함한다. 상기 치환은 시스테인에서 세린으로의 치환일 수 있다.

[0069] 더욱이, 본 발명은 IL-1R3에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 IL-1R3 결합 특이성을 부여하기에 충분한 상기 항체의 적어도 일부를 함유하는 이의 단편 또는 유도체를 포함하며, 여기서 항체는 서열 번호 1 내지 34 및 서열 번호 173의 VH 영역으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 VH 영역과 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90% 동일한 중쇄 가변 (VH) 영역을 포함한다.

[0070] 하나의 실시형태에서, IL-1R3에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 IL-1R3 결합 특이성을 부여하기에 충분한 상기 항체의 적어도 일부를 함유하는 이의 단편 또는 유도체는 본 발명에 따르는 VH 서열의 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역 (VH) 서열을 포함한다.

[0071] 특정 실시형태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열이 기준 서열에 비해 치환 (e.g., 보존적 치환), 삽입, 또는 결실을 함유함으로써 항체가 각각의 항원에 본 발명에 따라 특이적으로 결합하는 능력을 보유한다.

[0072] 본 발명은 또한 IL-1R3에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 IL-1R3 결합 특이성을 부여하기에 충분한 상기 항체의 적어도 일부를 함유하는 이의 단편 또는 유도체에 관한 것이며, 여기서 항체는 서열 번호 35 내지 68 및 174의 VL 영역으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 VL 영역과 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90% 동일한 경쇄 가변 (VL) 영역을 포함한다.

[0073] 또 다른 실시형태에서 IL-1R3에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 IL-1R3 결합 특이성을 부여하기에 충분한 상기 항체의 적어도 일부를 함유하는 이의 단편 또는 유도체는 본 발명에 따르는 VL 서열의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0074] 특정 실시형태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열은 기준 서열에 비해 치환 (e.g., 보존적 치환), 삽입, 또는 결실을 함유함으로써 항체가 각각의 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유한다.

[0075] 특정 실시형태에서, 총 1 내지 10개 아미노산이 상기 VL 서열에서 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시형태에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 CDR 외부의 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 본 발명은 또한 당업계에 공지된 방법에 따라 생산될 수 있는 친화도 성숙 항체를 포함한다. 문헌[Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992)]은 VH 및 VL 도메인 셀룰링에 의한 친화도 성숙을 기술하고 있다. CDR 및/또는 골격 잔기의 임의 돌연변이 유발은 문헌[Barbas et al., Proc Nat. Acad. Sci., USA 91 : 3809-3813 (1994); Schier et al., Gene 169: 147-155 (1995); Yelton et al., J. Immunol. 155 : 1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); and Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)] 및 제W02010108127호에 기술

되어 있다.

[0076] 특정 실시형태에서, 총 1 내지 10개 아미노산이 각각의 상기 VH 또는 VL 서열에서 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 하나의 실시형태에서, 본 발명의 항체는 VH 또는 VL 서열의 90 위치에 치환을 포함한다. 90 위치의 아미노산이 세린으로 치환되는 것이 바람직하다. 이러한 치환은 바람직하게는 경쇄 가변 영역 (VL)의 90 위치에서 이루어진다. 바람직한 실시형태에서, 서열 번호 62의 90 위치의 시스테인은 세린으로 치환된다. 그러나, 본 발명의 항체는 90 위치에서의 아미노산 치환에 제한되지 않으며, 본 발명의 항체의 특성을 갖는 기능적 항체를 야기하는 임의의 치환, 결실 또는 삽입을 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체의 VL 및 VH 서열은 또한 상이한 위치에 추가의 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0077] 특정 실시형태에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 CDR 외부의 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다.

[0078] 또 다른 실시형태에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 CDR 내부의 영역에서 일어난다. 하나의 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 항체는 CDR-L3의 2 위치에 치환을 포함한다. 이러한 치환은 시스테인에서 세린으로의 치환인 것이 바람직하다. 하나의 실시형태에서, 상기 치환은 서열 번호 164에서 이루어진다.

[0079] 본 발명은 또한 IL-1R3에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 IL-1R3 결합 특이성을 부여하기에 충분한 상기 항체의 적어도 일부를 함유하는 이의 단편 또는 유도체를 포함하며, 여기서 항체는 서열 번호 1 내지 34 및 173의 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다.

[0080] 바람직하게는, 중쇄 가변 영역 (VH) 서열은 서열 번호 1, 대안적으로 서열 번호 2, 또는 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8, 서열 번호 9, 서열 번호 10, 서열 번호 11, 서열 번호 12, 서열 번호 13, 서열 번호 14, 서열 번호 15, 서열 번호 16, 서열 번호 17, 서열 번호 18, 서열 번호 19, 서열 번호 20, 서열 번호 21, 서열 번호 22, 서열 번호 23, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 26, 서열 번호 27, 서열 번호 28, 또는 서열 번호 29, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 32, 서열 번호 33, 또는 대안적으로 서열 번호 34 또는 173이다.

[0081] 게다가, 본 발명은 IL-1R3에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 IL-1R3 결합 특이성을 부여하기에 충분한 상기 항체의 적어도 일부를 함유하는 이의 단편 또는 유도체에 관한 것이며, 여기서 항체는 서열 번호 35 내지 68 및 174의 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.

[0082] 보다 더 바람직하게는, 경쇄 가변 영역 (VL) 서열은 서열 번호 35, 또는 서열 번호 36, 서열 번호 37, 서열 번호 38, 서열 번호 39, 서열 번호 40, 서열 번호 41, 서열 번호 42, 서열 번호 43, 서열 번호 44, 서열 번호 45, 서열 번호 46, 서열 번호 47, 서열 번호 48, 서열 번호 49, 서열 번호 50, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 53, 서열 번호 54, 서열 번호 55, 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 서열 번호 61, 서열 번호 62, 서열 번호 63, 서열 번호 64, 서열 번호 65, 서열 번호 66, 서열 번호 67, 또는 대안적으로 서열 번호 68 또는 174이다.

[0083] IL-1R3에 특이적으로 결합하는 본 발명에 따르는 인간화 항체 또는 IL-1R3 결합 특이성을 부여하기에 충분한 상기 항체의 적어도 일부를 함유하는 이의 단편 또는 유도체는 또한 MAB-15-0139, MAB-15-0106MAB-15-0108, MAB-15-0110, MAB-15-0117, MAB-15-0121, MAB-15-0140, MAB-15-0115, MAB-15-0125, MAB-15-0119, MAB-15-0109, MAB-15-0097, MAB-15-0135, MAB-15-0133, MAB-15-0107, MAB-15-0128, MAB-15-0116, MAB-16-0004, MAB-16-0009, MAB-16-0028, MAB-16-0031, MAB-16-0043, MAB-16-0049, MAB-16-0045, MAB-16-0040, MAB-16-0036, MAB-16-0046, MAB-16-0030, MAB-16-0021, MAB-16-0019, MAB-16-0015, MAB-16-0027, MAB-16-0048, MAB-16-0041, MAB-16-0149, MAB-16-0150로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체의 각각의 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함하는 VH 영역 및 VL 영역을 포함한다.

[0084] 하나의 실시형태에서, IL-1R3에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 IL-1R3 결합 특이성을 부여하기에 충분한 상기 항체의 적어도 일부를 함유하는 이의 단편 또는 유도체는 서열 번호 1 및 35, 또는 서열 번호 2 및 36을 포함한다. 본 발명에 따르는 항체는 또한 서열 번호 3 및 37, 또는 서열 번호 4 및 38, 또는 서열 번호 5 및 39, 또는 서열 번호 6 및 40, 또는 서열 번호 7 및 41, 또는 서열 번호 8 및 42, 또는 서열 번호 9 및 43, 또는 서열 번호 10 및 44, 또는 서열 번호 11 및 45, 또는 서열 번호 12 및 46을 포함할 수 있다. 대안적으로, 본 발명에 따르는 항체는 서열 번호 13 및 47, 또는 서열 번호 14 및 48, 또는 서열 번호 15 및 49, 또는 서열 번호 16 및 50, 또는 서열 번호 17 및 51, 또는 서열 번호 18 및 52, 또는 서열 번호 19 및 53, 또는 서열 번호 20 및 54, 또는 서열 번호 21 및 55, 또는 서열 번호 22 및 56, 또는 서열 번호 23 및 57, 또는 서열 번호 24 및 58, 또는 서열 번호 25 및 59, 또는 서열 번호 26 및 60, 또는 서열 번호 27 및 61을 포함한다.

- [0085] 대안적으로, 본 발명에 따르는 항체는 서열 번호 28 및 62, 또는 서열 번호 29 및 63, 또는 서열 번호 30 및 64, 또는 서열 번호 31 및 65, 또는 서열 번호 32 및 66, 또는 서열 번호 33 및 67, 또는 서열 번호 34 및 68을 포함한다.
- [0086] 가장 바람직하게는, IL-1R3에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 IL-1R3 결합 특이성을 부여하기에 충분한 상기 항체의 적어도 일부를 함유하는 이의 단편 또는 유도체는 불변 영역 서열 CR-H (서열 번호 172) 및 CR-L (서열 번호 171) 및 서열 번호 1 내지 34 및 173의 그룹으로부터 선택된 VH 영역 및 서열 번호 35 내지 68 및 174의 그룹으로부터 선택된 VL 영역을 포함한다.
- [0087] IL-1R3에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 IL-1R3 결합 특이성을 부여하기에 충분한 상기 항체의 적어도 일부를 함유하는 이의 단편 또는 유도체는 또한 불변 영역 서열 CR-H (서열 번호 172) 및 CR-L (서열 번호 171) 및 MAB-15-0139, MAB-15-0106, MAB-15-0108, MAB-15-0110, MAB-15-0117, MAB-15-0121, MAB-15-0140, MAB-15-0115, MAB-15-0125, MAB-15-0119, MAB-15-0109, MAB-15-0097, MAB-15-0135, MAB-15-0133, MAB-15-0107, MAB-15-0128, MAB-15-0116, MAB-16-0004, MAB-16-0009, MAB-16-0028, MAB-16-0031, MAB-16-0043, MAB-16-0049, MAB-16-0045, MAB-16-0040, MAB-16-0036, MAB-16-0046, MAB-16-0030, MAB-16-0021, MAB-16-0019, MAB-16-0015, MAB-16-0027, MAB-16-0048, MAB-16-0041, MAB-16-0149 및 MAB-16-150으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체의 각각의 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함하는 VH 영역 및 VL 영역을 포함한다.
- [0088] 본 발명에 따르는 항체의 바람직한 치료학적 적용에 따르면, 본 발명의 항체의 효과기 기능 (예를 들어 ADCC)이 감소되거나 결핍된다. CAN04 (e.g. 제WO 2015/132602 A1호)와 같은 선행 기술의 다른 항체와 대조적으로, 본 발명의 항체는 증가된 효과기 기능을 나타내지 않으며 ADCC를 포함하지 않는다.
- [0089] 바람직하게는, 본 발명에 따르는 인간화 항체는 감소된 Fc γ-수용체 신호전달을 보이거나 Fc γ-수용체 신호전달을 전혀 보이지 않는다.
- [0090] 따라서, 본 발명은 또한 인간화 항체에 관한 것이며, 여기서 상기 항체는 적어도 인간 IgG1 Fc 영역의 L234A 및 L235A 또는 인간 IgG4 Fc 영역의 S228P 및 L235E에 아미노산 치환을 포함한다.
- [0091] 본 발명에 따르는 하나의 실시형태에서, 항체는 인간화 IgG1_{LALA} 항체이다.
- [0092] 본 발명에 따르는 하나의 실시형태에서, IL-1R3에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 IL-1R3 결합 특이성을 부여하기에 충분한 상기 항체의 적어도 일부를 함유하는 이의 단편 또는 유도체는 IL-1R3 유도된 NFkB 활성을 억제한다.
- [0093] 또 다른 실시형태에서, IL-1R3에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 IL-1R3 결합 특이성을 부여하기에 충분한 상기 항체의 적어도 일부를 함유하는 이의 단편 또는 유도체는 항체 MAB-15-0139, MAB-15-0106, MAB-15-0108, MAB-15-0110, MAB-15-0117, MAB-15-0121, MAB-15-0140, MAB-15-0115, MAB-15-0125, MAB-15-0119, MAB-15-0109, MAB-15-0097, MAB-15-0135, MAB-15-0133, MAB-15-0107, MAB-15-0128, MAB-15-0116, MAB-16-0004, MAB-16-0009, MAB-16-0028, MAB-16-0031, MAB-16-0043, MAB-16-0049, MAB-16-0045, MAB-16-0040, MAB-16-0036, MAB-16-0046, MAB-16-0030, MAB-16-0021, MAB-16-0019, MAB-16-0015, MAB-16-0027, MAB-16-0048, MAB-16-0041, MAB-16-0149 및 MAB-16-150의 그룹으로부터 선택된 항체와 동일한 에피토프에 결합한다.
- [0094] 본 발명에 따르는 항체는 이들의 표적에 결합하게 되는 경우 매우 강력하다는 이점을 갖는다. 이들은 이들의 항원, IL1R3에 대해 강한 결합 능력을 나타내지만, 다른 수용체에 대해서는 그러하지 않다. 항체의 결합 특성은 생화학적 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA) 및 세포 결합 분석 (유세포 분석법)으로 연구되었으며 도 2, 6 및 7에 예시되어 있다.
- [0095] 본 발명에 따르는 바람직한 항체는 30ng/ml 미만, 바람직하게는 20ng/ml 미만의 절반 최대 유효 농도(EC50)를 나타낸다. 또 다른 실시형태에서, 이들은 15ng/ml 미만, 10ng/ml 또는 5ng/ml 미만의 EC50을 나타낸다. 본 발명에 따르는 바람직한 항체는 생화학적 ELISA 실험에서 16.3ng/ml의 EC50을 나타낸다 (cf. 도 7).
- [0096] 본 발명에 따르는 항체는 또한 실험에서 이들의 항원에 매우 강한 결합을 보이는데, 여기서 인간 IL1R3은 상이한 세포주에서 발현되는 반면 항체는 인간 IL1R3을 발현하지 않는 세포주에 결합하지 않는다 (e.g. NIH-3T3, cf. 도 5).
- [0097] IL1R3 고-발현 세포주 SK-MEL-30 (cf. 도 6, 실시예 8)에서 항체는 바람직하게는 400ng/ml 미만, 보다 바람직하게는 350ng/ml 미만, 또는 310ng/ml 미만의 EC50을 나타낸다.

- [0098] 본 발명에 의해 포함되는 하나의 바람직한 실시형태에서, 본 발명에 따르는 항체는 IL-1알파 및/또는 IL-1베타 자극된 NFkB 활성을 억제한다. 도 3, 4 및 8은 본 발명에 따르는 항체의 강한 억제 활성을 예시한다.
- [0099] 하나의 실시형태에서, IL-1R3에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 IL-1R3 결합 특이성을 부여하기에 충분한 상기 항체의 적어도 일부를 함유하는 이의 단편 또는 유도체는 IL-1알파 자극된 NFkB 활성을 억제한다.
- [0100] 또 다른 실시형태에서, IL-1R3에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 IL-1R3 결합 특이성을 부여하기에 충분한 상기 항체의 적어도 일부를 함유하는 이의 단편 또는 유도체는 IL-1베타 자극된 NFkB 활성을 억제한다.
- [0101] 본 발명에 따르는 항체가 100ng/ml 미만, 바람직하게는 95ng/ml, 85ng/ml, 75ng/ml, 65ng/ml, 55ng/ml, 45ng/ml, 35ng/ml, 25ng/ml, 20ng/ml 미만 및 가장 바람직하게는 15ng/ml 미만의 EC50으로 HEK293T/17-FR 세포에서 IL-1베타 자극된 NFkB 활성을 억제하는 것이 바람직하다 (e.g. cf. 도 3).
- [0102] 본 발명에 따르는 항체가 A549-NFkB-RE-Luc 세포에서 1000ng/ml 미만, 바람직하게는 500ng/ml, 300ng/ml, 200ng/ml 미만, 가장 바람직하게는 100ng/ml 미만(e.g. cf. 도 8)의 EC50으로 IL-1알파 자극된 NFkB 활성을 억제하는 것이 추가로 바람직하다.
- [0103] 본 발명에 따르는 항체가 A549-NFkB-RE-Luc 세포에서 700ng/ml 미만, 바람직하게는 600ng/ml, 300ng/ml, 200ng/ml, 100ng/ml 미만, 가장 바람직하게는 50ng/ml 미만의 EC50으로 IL-1베타 자극된 NFkB 활성을 억제하는 것이 추가로 바람직하다 (e.g. cf. 도 8).
- [0104] 본 발명은 또한 인간화 항체를 포함하며, 여기서 상기 항체는 IL-1 β /IL-1R1/IL-1RAcP, IL-1 α /IL-1R1/IL-1RAcP IL-33/ST2/IL-1RAcP, 및/또는 IL-36/IL-36R/IL-1RAcP로 이루어진 그룹으로부터 선택된 복합체에 의해 자극된 NFkB 활성을 억제한다.
- [0105] 게다가, 본 발명에 따르는 인간화 항체는 0.1ng/ml 인간 IL-1알파, 인간 IL-1베타, IL-33 및/또는 IL-36 (분자량은 UniProtKB/Swiss-Prot 참조)으로 자극된 A549-NFkB-RE-Luc 세포 용해물 (Steady-Glo™ 루시퍼라제 검정 시스템; Promega; Cat. No. E2510)에서 10 μ g/ml (토끼 IgG 이소형은 150 KD의 분자량을 갖는다)의 농도로 NFkB 발현을, 본 발명에 따르는 항체가 없는 동일한 검정에 비해, 50% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상 억제한다.
- [0106] 하나의 실시형태에서, 본 발명에 따르는 인간화 항체는 HEK 293T/17 세포 (NF-kB 리포터 유전자의 조절하에 루시퍼라제로 형질감염된 HEK 293T/17-FR 세포), HEK-Blue-IL33™ 세포 (Invivogen) 또는 HEK-293/17-IF 세포에서 각각 IL-1알파, IL-1베타, IL-33, 및/또는 IL-36 자극된 루시퍼라제 활성을 억제한다.
- [0107] 바람직하게는, 상기 IL-1알파, 자극된 루시퍼라제 활성은 50% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상까지 억제된다. 바람직하게는, 상기 IL-1알파, 자극된 루시퍼라제 활성은 95%까지 억제된다.
- [0108] 바람직하게는, 상기 IL-1베타, 자극된 루시퍼라제 활성은 50% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상까지 억제된다. 바람직하게는, 상기 IL-1베타, 자극된 루시퍼라제 활성은 95%까지 억제된다.
- [0109] 바람직하게는, 상기 IL-33, 자극된 루시퍼라제 활성은 50% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상까지 억제된다. 바람직하게는, 상기 IL-33, 자극된 루시퍼라제 활성은 95%까지 억제된다.
- [0110] 바람직하게는, 상기 IL-36, 자극된 루시퍼라제 활성은 50% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상까지 억제된다. 바람직하게는, 상기 IL-36, 자극된 루시퍼라제 활성은 95%까지 억제된다.
- [0111] 게다가, 본 발명에 따르는 항체는 인간 IL-1a 및 IL-1b 매개된 IL-6 방출을 억제하며 다클론 항체보다 우수하다. 이러한 강력한 억제 활성은 도 9에 도시되고 예시되어 있다. 이러한 실험에서, EC50 값은 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체가 염소-항-인간-IL1-R3 다클론 항체 AF676 (R&D Systems)보다 우수함을 입증한다. 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 항체는 2500ng/ml 미만, 바람직하게는 1500ng/ml 미만, 1000ng/ml 미만, 600ng/ml 미만, 400ng/ml 미만, 또는 300ng/ml 미만의 EC50으로 인간 IL-a 매개된 IL-6 방출을 억제한다. 본 발명의 항체가 500ng/ml 미만, 바람직하게는 400ng/ml 미만, 300ng/ml 미만, 200ng/ml 미만, 또는 150ng/ml 미만의 EC50으로 인간 IL-1b 매개된 IL-6 방출을 억제하는 것이 또한 바람직하다.

- [0112] 본 발명에 따르는 또 다른 실시형태에서, 항체는 인간 IL-33 매개된 NfkB-신호전달을 억제한다. 도 10은 HEK-Blue-IL33™ 세포에서의 본 발명에 따르는 선택된 항체의 억제 활성을 예시하며 다클론 항체를 능가하는 우수성을 입증한다. 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 항체는 20000ng/ml 미만, 바람직하게는 18000ng/ml 미만, 3000ng/ml 미만, 1000ng/ml 미만, 500ng/ml 미만, 또는 400ng/ml 미만의 EC50으로 인간 IL-33 매개된 NfkB-신호전달을 억제한다.
- [0113] 본 발명의 항체는 또한 인간 IL-36 매개된 NfkB-신호전달을 억제할 수 있다(도 11). 바람직하게는, 이들은 100ng/ml 미만, 바람직하게는 50ng/ml 미만, 40ng/ml 미만, 30ng/ml 미만, 20ng/ml 미만, 또는 15ng/ml 미만의 EC50에서 인간 IL-36 매개된 NfkB-신호전달을 억제한다.
- [0114] 두드러지게도, 본 발명자들은 본 발명에 따르는 항체가 각종 상이한 자극들에 의해 매개된 사이토킨 방출을 억제한다는 것을 밝혀내었다. 예를 들면, 항체는 IL-1a, IL-33 및 IL-36a에 의해 매개된 사이토킨 방출을 억제한다. 선택된 항체의 결과가 도 12에 나타내어져 있다. 예를 들면, 항체 MAB-16-0030은 세 가지 모든 자극에 의해 매개된 사이토킨 방출을 억제하는 반면, IL-1Ra는 단지 IL-1a 매개된 사이토킨 방출에만 영향을 미친다.
- [0115] 급성 또는 만성 염증과 관련된 질환은 동시에 또는 연속해서 다중 사이토킨의 작용에 의해 유지되거나 확립된다. IL-1a 및 IL-33과 같은 초기 "알라민(alarmins)"이 IL-1b 및 IL-36을 포함하는 다른 사이토킨을 촉발시켜 강한 염증 환경을 확립할 수 있다. 따라서, 다중 사이토킨에 의해 매개된 신호전달의 동반 억제는 염증 과정의 효과적인 조절을 발휘한다. 본 발명의 항체의 주요 측면은 이들이 IL1R3 수용체의 차단을 통해 다중-사이토킨 신호전달을 억제한다는 것이다.
- [0116] 면역 세포에의 항체의 결합은, 예를 들어, 세포사멸적 신호전달 경로의 직접적인 유도, 과도한 사이토킨 방출의 자극 또는 항체 효과기 기능 매개된 항체 의존적 세포성 세포독성 항체(ADCC)에 의해 세포 고갈 및 유해 효과를 초래할 수 있다.
- [0117] 따라서, 본 발명의 항체의 추가의 한 측면은 이들이 세포사멸적 신호전달 경로의 직접적인 유도, 과도한 사이토킨 방출의 자극 또는 항체 효과기 기능 매개된 항체 의존적 세포성 세포독성에 의해 매개된 면역 세포 고갈을 유도하지 않는다는 것이다.
- [0118] 중요하게도, 본 발명에 따르는 항체는 면역 세포의 생존력에 영향을 미치지 않는다. 예를 들면, 이들은 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)의 생존력에 영향을 미치지 않으며 이들은 PBMC에서 IL-6 방출을 유도하지 않는다(cf. 도 13).
- [0119] 본 발명에 따르는 항체는 상기한 바와 같이 상이한 세포주에서 뿐만 아니라 기증자로부터의 PMBC 또는 전혈 세포에서 사이토킨 방출의 기능적 활성화를 억제한다. 이들은 상이한 특정 또는 복합 자극에 의해 매개된 사이토킨 방출을 억제한다. 예를 들면, 이들은 LPS, 열-불활성화된 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), IL-12/IL-33 또는 항-CD3/CD28 항체로 자극된 PBMC의 활성화를 억제한다 (cf. 도 14 및 15).
- [0120] 또한, 하나의 실시형태에서, 본 발명에 따르는 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체는 혼합 림프구 반응에서 IFNg, IL-6, TNF-a, IL-13, IL-17 및 IL-10의 방출을 억제할 수 있다 (cf. 도 16).
- [0121] 게다가, 본 발명에 따르는 항체는 표적, IL1R3의 조절장애가 근본적인 원인인 질환의 치료에 특별히 유용하다.
- [0122] 따라서, 본 발명은 또한 IL-1R3 매개된 질환을 치료하는데 사용하기 위한, IL-1R3에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 IL-1R3 결합 특이성을 부여하기에 충분한 상기 항체의 적어도 일부를 함유하는 이의 단편 또는 유도체에 관한 것이다.
- [0123] 본 발명은 또한 환자에게 약제학적 유효량의 본 발명에 따르는 항체, 또는 이의 유도체 또는 단편을 투여함을 포함하여, 환자에서 IL-1R3 매개된 질환을 치료하는 방법을 포함한다.
- [0124] 본 발명은 또한 약제학적으로 허용되는 담체 및 본 발명에 따르는 치료학적 유효량의, IL-1R3에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 IL-1R3 결합 특이성을 부여하기에 충분한 상기 항체의 적어도 일부를 함유하는 이의 단편 또는 유도체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0125] 본원에서 사용되는 바와 같이, "약제학적 담체"는 생리학적으로 상용성인 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 피막, 항균 및 항진균 제제, 등장성 및 흡수 지연 제제 등을 포함한다. 바람직하게는, 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척추 또는 표피 투여(e.g. 주사 또는 주입에 의한)에 적합하다.
- [0126] 본 발명의 조성물은 당업계에 공지된 다양한 방법들로 투여될 수 있다. 숙련가에 의해 인지되는 바와 같이, 투

여 경로 및/또는 모드는 목적하는 결과에 따라 달라질 것이다. 특정 투여 경로로 본 발명의 화합물을 투여하기 위해, 화합물을 이의 불활성화를 방지하는 물질로 코팅하거나 화합물을 상기 물질과 공동-투여하는 것이 필요할 수 있다. 예를 들면, 화합물은 적합한 담체, 예를 들면, 리포솜, 또는 희석제 중에서 대상체에 투여될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 희석제는 염수 및 수성 완충액을 포함한다. 약제학적 담체는 멸균 수용액 또는 분산액, 및 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 약제학적 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 제제의 사용은 당업계에 공지되어 있다.

[0127] 본원에서 사용되는 바와 같은 어구 "비경구 투여" 및 "비경구적으로 투여된다"는 통상적으로 주사에 의한, 장관 및 국소 투여 이외의 투여 모드를 의미하며, 정맥내, 근육내, 동맥내, 경막내, 낭내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 기관경유, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 제한 없이 포함한다.

[0128] 이들 조성물은 또한 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 함유할 수 있다. 미생물의 존재의 방지에는 상기 멸균 과정에 의해 및 다양한 항균 및 항진균 제제, 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등의 봉입 둘 다에 의해 보장될 수 있다. 당, 염화나트륨 등과 같은 등장화제를 조성물에 포함시키는 것이 또한 바람직할 수 있다. 또한, 주사 가능한 약제학적 형태의 연장된 흡수는 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같이 흡수를 자연시키는 제제의 봉입에 의해 야기될 수 있다. 선택된 투여 경로에 상관없이, 적합한 수화 형태로 사용될 수 있는 본 발명의 화합물, 및/또는 본 발명의 약제학적 조성물은 당업계의 숙련가들에게 공지된 통상의 방법들에 의해 약제학적으로 허용되는 투여형으로 제형화된다. 본 발명의 약제학적 조성물 중의 활성 성분의 실제 투여량 수준은 환자에게 독성이 아니면서 특정 환자, 조성물, 및 투여 모드에 대해 바람직한 치료학적 반응을 달성하는데 효과적인 활성 성분의 양을 수득하도록 달라질 수 있다. 선택된 투여량 수준은 사용되는 본 발명의 특정 조성물의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배설 속도, 치료 지속시간, 사용되는 특정 조성물과 조합하여 사용되는 다른 약제, 화합물 및/또는 물질, 치료되는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강 및 이전의 병력 등의 의학 분야에 널리 알려진 인자들을 포함한 다양한 약동학적 인자에 따라 좌우될 것이다.

[0129] 본 발명의 한 측면은 본 출원에서 정의된 바와 같은 암의 치료에 사용하기 위한 본 발명에 따르는 약제학적 조성물이다.

[0130] 본 발명의 또 다른 측면은 환자에게 본 발명에 따르는 약제학적 조성물을 투여함을 포함하여, 환자에서 IL-1R3 매개된 질환을 치료하는 방법이다.

[0131] 이러한 IL-1R3 매개된 질환은 암을 포함할 수 있다. 암의 부정적인 예후 및 진행은 IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-36의 증가된 수준 및/또는 IL-1R3의 증가된 발현과 연관된다고 문헌에 기술되어 있다.

[0132] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "암"은, 예를 들면, 하기 암들 중의 어느 것의 무반응성 버전을 포함한, 폐암, 비-소세포 폐(NSCL)암, 기관폐포 세포 폐암, 골암, 퀘장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문부의 암, 위장암, 위암, 결장암, 유방암, 자궁암, 나팔관의 암종, 자궁내막의 암종, 자궁경부의 암종, 질의 암종, 외음부의 암종, 호지킨병, 식도암, 소장암, 내분비계 암, 갑상선 암, 부갑상선 암, 부신 암, 연조직의 육종, 요도 암, 음경 암, 전립선 암, 방광 암, 신장 또는 요관의 암, 신세포 암종, 신우의 암종, 중피종, 간세포 암, 담관암, 중추 신경계(CNS)의 신생물, 척추 종양, 뇌간 교종, 다형성 교아종, 성상세포종, 신경초종, 뇌질피복 세포종, 수아세포종, 수막종, 편평 세포 암종, 뇌하수체 선종, 림프종, 림프성 백혈병, 또는 상기 암들 중의 하나 이상의 조합일 수 있다. 바람직하게는 이러한 암은 백혈병, 유방암, 결장암, 폐암, 또는 퀘장암이다. 가장 바람직하게는 암은 백혈병이다.

[0133] 하나의 실시형태에서, IL-1R3 매개된 질환은 백혈병, 유방암, 결장암, 폐암, 퀘장암, 간암, 비-소세포-폐암, 결장직장암, 위장암, 위암, 에스트로겐-수용체-양성 유방암, 두경부 편평 세포 암종, 중피종, 담낭암, 난소암, 방광암, 전립선암, 갑상선암, 호지킨병, MALT 림프종, 침샘암, 또는 흑색종으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0134] 일부 종양은 IL-1 α , IL-1 β , IL-33, IL-36과 같은 염증성 사이토kin을 분비하는 종양 미세-환경 세포에 의해 유발되거나 촉진된다. 몇몇 예에서, 이러한 사이토kin의 발현은 종양 내성의 형성을 초래한다. 사이토kin 억제제 및 항암 화합물의 동반 사용은 이러한 치료의 반응 속도를 상당히 개선시키거나 종양 내성을 파괴할 수 있다. 이것이 본 발명에 의해 제공되는데, 그 이유는 사이토kin 유도된 신호전달의 광범위한 억제가 달성되기 때문이다. 암 증상에 있어서의 이러한 활성은 암 세포의 직접적인 고갈 활성을 통해 달성되는 것이 아니라 IL1R3 신호전달 경로를 조절함으로써 암 관련 염증의 억제를 통해 달성된다. 본 발명의 항체는, 이들이 암 관

련 만성 염증의 효과적인 억제를 가능하게 하는 동시에 바람직하지 않은 부작용을 피하기 때문에, 이들이 항체 효과기 기능을 나타내지 않고 따라서 IL-1R3을 발현하는 표적화된 세포의 생존력에 영향을 미치지 않기 때문에 훨씬 더 바람직한 활성 프로파일을 제공한다.

[0135] 따라서, 본 발명의 하나의 실시형태에서, 항체 또는 약제학적 조성물은 환자의 치료를 위해 사용되며, 여기서 환자는 고형 종양과 같은 종양을 포함하고, 세포독성, 세포정지 또는 표적화된/면역요법에 대한 불충분한 반응 또는 종양 내성을 나타낸다.

[0136] 본 발명의 한 측면에서, 본 발명에 따르는 인간화 항체 및/또는 약제학적 조성물은, 하나 이상의 세포독성, 세포정지 또는 표적화된 항암 화합물과 조합하여 암의 치료에 사용하기 위해 의도된다. 사이토킨 억제제와 세포 독성, 세포정지 또는 표적화된 항암 화합물의 사용은 이러한 치료의 반응 속도를 상당히 개선시키거나 종양 내성을 파괴할 수 있다.

[0137] 본 발명의 이러한 측면에서, 암은 바람직하게는 체장암, 간암, 폐암(석면, 감염, 흡연, 실리카에 의해 유발되는 염증과 관련됨), 비-소세포-폐암, 결장직장암/결장염-관련 암(염증성 장 질환과 관련됨), 위장암, 위암, 만성 위염 관련 위암, 에스트로겐-수용체-양성 유방암, 두경부 편평 세포 암종, 중피종, 담낭암(담석-관련 만성 담낭 염 관련), 난소암, 방광암, 전립선암, 이.콜라이(E.coli)-감염 관련 전립선암, 갑상선암, 호지킨병, MALT 림프 종, 침샘암, 흑색종, 자궁내막증 관련 자궁내막 암종, 바렛 식도염 관련 식도암으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0138] 본 발명의 방법의 한 측면에서, 본 발명에 따르는 IL1R3 항체 또는 약제학적 조성물은 하나 이상의 세포독성제, 세포정지제 또는 표적화된 항암제와 동시에 투여된다. 또 다른 측면에서, 항체 또는 약제학적 조성물은 하나 이상의 세포독성제, 세포정지제 또는 표적화된 항암제와 연속하여 투여된다.

[0139] 후자의 경우에, 항체가 하나 이상의 세포독성제, 세포정지제 또는 표적화된 항암제로의 치료 후 투여되는 것이 바람직하다.

[0140] 본 발명에 따르는 세포독성제 또는 세포정지제는 탁산, 안트라사이클린, 알킬화제, 히스톤 데아세틸라제 억제제, 토포이소마라제 억제제, 키나제 억제제, 뉴클레오티드 유사체, 펩티드 항생제, 백금계 제제 및 체크포인트 억제제일 수 있다.

[0141] 바람직하게는 표적화된 항암제는 다음 중의 하나, 또는 이들의 조합으로부터 선택된다: 항-EGFR 화합물, 예를 들어 세툭시맙, 제피티닙, 에를로티닙, 라파티닙, 파니투무맙, 및 항-HER2 화합물, 예를 들어 트라스투주맙, 아도-트라스투주맙 엠탄신, 페르투주맙.

[0142] 표적화된 항암제가 체크포인트 억제제인 것이 추가로 바람직하다. 이들은 다음과 같을 수 있지만 이에 제한되지 않는다: 항-PD1 화합물, 예를 들어 펠브롤리주맙, 및 니볼루맙, 및 항-PDL1 화합물, 예를 들어 아테졸리주맙, 아벨루맙, 및 두르발루맙, 및 항-CTLA-4 화합물, 예를 들어 이필리무맙 및 트레멜리무맙.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0143] 실시예

[0144] 하기 실시예는 도면 및 표와 함께 본 발명을 예시하기 위해 사용된다.

[0145] 실시예 1: B-세포 상청액에서 P013_03 (인간 IL-1R3) 특이 항체의 측정

[0146] 검정 원리:

[0147] NUNC Maxisorp 384웰 미세역가 플레이트를 P013_03으로 코팅한다. 차단 과정 후, B-세포 상청액으로부터의 특이 항체를 항원에 결합시킨 다음 POD-표지된 항체에 의해 검출한다. 샘플은 1:2로 희석하여 시험한다.

[0148] 재료:

[0149] 플레이트: 384웰 NUNC Maxisorp 플레이트; Cat. No. 464718

[0150] 단백질: P013-03 (Conc. 1,5mg/ml; 검정 Conc. 0,5 µg/ml)

[0151] 표준 Ab: P013-02 (Conc. 1mg/ml; 출발 검정 Conc. 2 µg/ml)

[0152] 검출 Ab: 항-토끼 IgG, 퍼옥시다제-결합된 종-특이 전 항체(당나귀로부터) (ECL); GE; Cat. No.

NA9340; 검정 희석: 1:5000

[0153] PBS: 박스 중의 완충액, 예비혼합된 PBS 완충액, 10x; Roche Applied Sciences; Cat. No. 11666789001

[0154] BSA: 소 혈청으로부터의 소 혈청 일부민 분획 V; Roche Applied Sciences; Cat. No. 10735086001

[0155] Tween 20: Tween 20; Carl Roth; Cat. No. 9127.2

[0156] TMB: TMB 용액; Life Technologies; Cat. No. SB02

[0157] HCl: 1M Titripur 염산; Merck; Cat. No. 1090571000

[0158] ELISA 완충액: PBS, 0.5% BSA, 0.05% Tween

[0159] 세척 완충액: PBS, 0.1% Tween

[0160] 차단 완충액: PBS, 2% BSA, 0.05% Tween

[0161] 샘플: Elisa 완충액 중에서 1:2 희석

[0162] 과정:

[0163] 1. PBS 중의 $12.5 \mu\text{L}$ P013-03 ($0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$)을 384웰 NUNC Maxisorp 플레이트에 첨가하고 RT에서 1h 동안 항온처리한다.

[0164] 2. $90 \mu\text{l}$ 세척 완충액으로 3x 세척한다.

[0165] 3. $90 \mu\text{l}$ 차단 완충액을 각 웰에 첨가하고 RT에서 1h 동안 항온처리한다.

[0166] 4. 세척 완충액으로 3x 세척한다.

[0167] 5. 1:2 희석의 $12.5 \mu\text{L}$ 표준 항체 또는 Elisa 완충액에서 1:2 희석된 샘플을 첨가하고 RT에서 1h 동안 항온처리한다.

[0168] 6. 세척 완충액으로 3x 세척한다.

[0169] 7. Elisa 완충액 중의 $12.5 \mu\text{L}$ 1:5000 POD-항체를 첨가하고 RT에서 1h 동안 항온처리한다.

[0170] 8. 세척 완충액으로 6x 세척한다.

[0171] 9. $15 \mu\text{L}$ TMB를 첨가한다.

[0172] 10. 충분한 전개 후 $15 \mu\text{L}$ HCl을 첨가한다.

[0173] 11. 450nm/620nm에서 흡광도를 판독한다.

[0174] 실시예 2: 루시퍼라제 리포터 실험에 의한 P013-수용체를 억제하는 P013-특이 항체의 동정

[0175] 검정 원리:

[0176] NF-kB-RE 반딧불이 루시퍼라제 리포터를 발현하는 293T/17-FR 세포를 폴리-D-리신-세포 배양 플레이트에 접종한다. P013의 자극 후 293T/17-FR 용해물을 Steady-Glo 루시퍼라제 검정 키트를 사용하여 활성화된 NF-kB에 대해 시험한다. 기능적 항체를 갖는 상청액은 P013에 결합하고 NF-kB 활성화를 억제하며, 이것은 낮은 신호로 나타내어진다. 샘플을 P013 용액에서 1:2 희석하여 시험한다.

[0177] 재료:

[0178] 플레이트: 세포 플레이트: 384웰 PDL Costar 세포 배양 플레이트; Cat. No. 3844

[0179] 검정 플레이트: 384웰 lumitrac 화이트-플레이트; Corning; Cat. No. 3572

[0180] 세포: 293T/17-FR; 검정 conc. 250.000개 세포/mL

[0181] 세포-계대배양이 높을수록 신호는 낮다!

[0182] 단백질: P013_05 (Conc. 0,03mg/mL; 검정 Conc. 115pg/mL; 작동 Conc. 230pg/mL)

[0183] 표준 Ab: P013_06 (Conc. 0,2mg/mL; 출발 작동 Conc. 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

- [0184] 키트: Steady-Glo 루시퍼라제 검정 시스템; Promega; Cat. No. E2510
- [0185] 세포-배지: DMEM 배지; PAN Biotech; Cat. No. P04-04510
- [0186] FCS: 태아 소 혈청, HyClone; Thermo; Cat. No. St30070.03
- [0187] 293T/17-FR 배지: DMEM 배지, 10% FCS, (+ 20 µg/ml 히그로마이신-B, 단자 배양을 위해) 컨디셔닝된 B-세포 배지 (MAB Discovery)
- [0188] 샘플: DMEM-배지 + 10% FCS 중에서 P013_05로 1:2 희석
- [0189] 과정:
- [0190] 1. 세포 배양 과정:

[0191] 트립신/EDTA (RT에서 30sec 동안만 항온처리함)를 사용하여 월요일(접종: 5x106개 세포/T175 플라스크) 및 금요일(접종: 3x106개 세포/T175 플라스크)마다 융합성 293T/17-FR 세포를 분열시킨다.

[0192] 2. 25 µl DMEM + 10% FCS 중의 세포 (0,25x106개 세포/ml)를 384-웰 PDL-플레이트 (Corning cat # 3844)에 접종하고 37°C 및 5% CO2에서 밤새 항온처리한다.

[0193] 3. 배지를 흡인시키고 컨디셔닝된 배지 또는 막 컨디셔닝된 배지 중의 1:3 희석으로 12,5 µl 샘플 또는 P013_06을 첨가하고 37°C 및 5% CO2에서 30min 동안 항온처리한다 (프로그램: 3 Aspiration and Sample transfer).

[0194] 4. DMEM + 10%FCS 중의 12.5 µl P013_05를 첨가하고 37°C 및 5% CO2에서 5시간 동안 항온처리한다 (프로그램: 4_Add P013_05).

[0195] 5. 배양된 세포를 RT로 되도록 10 min 동안 평형화시킨다.

[0196] 6. 25 µl Steady-Glo 시약을 첨가하고 피펫으로 수회 혼합한다 (프로그램: 6_Steady Glo)

[0197] 7. 45 µl 상청액을 384-웰 lumitrac 화이트 플레이트 (Corning Cat# 3572)로 이동시키기 전에 5분간 기다린다 (프로그램: 7_Transfer 45u1)

[0198] 8. Tecan 판독기에서 발광을 측정한다: 적분 시간: 0,5sec
- [0199] 실시예 3: B-세포 상청액에서 huIL1RaP, msIL1RaP, CD134 및 CD137 특이 항체의 측정
- [0200] 검정 원리:
- [0201] NUNC Maxisorp 384웰 미세역가 플레이트를 표적 단백질로 코팅한다. 차단 과정 후, B-세포 상청액으로부터의 특이 항체를 표적에 결합시킨 다음 POD-표지된 항체에 의해 검출된다.
- [0202] 재료:
- [0203] 플레이트: 384웰 NUNC Maxisorp 플레이트; Cat. No. 464718
- [0204] 단백질: 절단된 huIL1RaP (P026_12; conc. 0.96 mg/mL; 검정 conc. 0.25 µg/mL)
- [0205] 절단된 muIL1RaP (P026_13; conc. 0.93 mg/mL; 검정 conc. 0.25 µg/mL)
- [0206] 절단된 CD134 (P026_14; conc. 0.51 mg/mL; 검정 conc. 0.25 µg/mL)
- [0207] 절단된 CD137 (P026_15; Batch2; conc. 1.1 mg/mL; 검정 conc. 1 µg/mL)
- [0208] 표준 Abs: 인간 IL-1 RAcP/IL-1 R3 항체 (P013_6/P026_08; conc. 0.2mg/mL 또는 0.399mg/mL; 출발 검정 conc. 2 µg/mL; huIL1RaP 및 msIL1RaP에 사용됨)
- [0209] MAB-14-0283 (conc. 0.6mg/mL; 출발 검정 conc. 2 µg/mL; CD134에 사용됨)
- [0210] MAB-14-0285 (conc. 1mg/mL; 출발 검정 conc. 2 µg/mL; CD137에 사용됨)
- [0211] 검출 Ab: 샘플: 항-토끼 IgG, 퍼옥시다제-결합된 종-특이 Fab₂ 단편 (당나귀로부터) (ECL); GE; Cat. No. NA9340; 검정 희석: Elisa 완충액에서 1:5000
- [0212] MAB-14-0283 및 MAB-0285의 경우: 항-인간 IgG 퍼옥시다제-결합된 종-특이 Fab₂ 단편 (염소로

부터) (HRP); AbD Serotec; Cat. No. STAR126P; 검정 희석: Elisa 완충액에서 1:5000

[0213] huIL1RaP 및 msIL1RaP의 경우: 폐우시다제-접합된 AffiniPure 당나귀 항-염소 IgG (H+L); Jackson Immuno Research; Cat. No. 705-035-003; 검정 희석: Elisa 완충액에서 1:5000

[0214] PBS: 박스 중의 완충액, 예비혼합된 PBS 완충액, 10x; Roche Applied Sciences; Cat. No. 11666789001

[0215] BSA: 소 혈청으로부터의 소 혈청 일부민 분획 V; Roche Applied Sciences; Cat. No. 10735086001

[0216] Tween 20: Tween 20; Carl Roth; Cat. No. 9127.2

[0217] TMB: TMB 용액; Invitrogen; Cat. No. SB02

[0218] HCl: 1M Titripur 염산; Merck; Cat. No. 1090571000

[0219] Elisa 완충액: PBS, 0.5% BSA, 0.05% Tween

[0220] 세척 완충액: PBS, 0.1% Tween

[0221] 차단 완충액: PBS, 2% BSA, 0.05% Tween

[0222] 샘플: Elisa 완충액 중에서 1:4 희석

과정:

[0224] 1. PBS 중에서 희석된 $0.25 \mu\text{g/mL}$ 또는 $1 \mu\text{g/mL}$ 단백질 $12.5 \mu\text{L}$ 를 384 웰 NUNC Maxisorp 플레이트에 첨가하고 RT에서 1h 동안 항온처리한다.

[0225] 2. $90 \mu\text{L}$ 세척 완충액으로 3x 세척한다.

[0226] 3. $90 \mu\text{L}$ 차단 완충액을 각 웰에 첨가하고 RT에서 1h 동안 항온처리한다.

[0227] 4. $90 \mu\text{L}$ 세척 완충액으로 3x 세척한다. 플레이트는 알루미늄 호일로 밀봉하여 -20°C 에서 6주 이하 동안 건조 상태로 저장할 수 있다.

[0228] 5. 1:2 희석 단계의 $12.5 \mu\text{L}$ 표준 항체 또는 샘플(Elisa 완충액 중에서 희석됨)을 가하고 RT에서 1h 동안 항온 처리한다.

[0229] 6. $90 \mu\text{L}$ 세척 완충액으로 3x 세척한다.

[0230] 7. Elisa 완충액 중의 $12.5 \mu\text{L}$ 1:5000 POD-항체를 첨가하고 RT에서 1h 동안 항온처리한다.

[0231] 8. $90 \mu\text{L}$ 세척 완충액으로 6x 세척한다.

[0232] 9. $15 \mu\text{L}$ TMB를 첨가한다.

[0233] 10. 15 min 전개 후 $15 \mu\text{L}$ HCl을 첨가한다.

[0234] 11. 450nm/620nm에서 흡광도를 판독한다.

실시예 4: IL-1 (α / β)로의 자극 후 A549-NFkB-RE-Luc 안정한 형질감염 세포의 NFkB-발현의 억제

검정 원리:

[0237] A549-NFkB-RE-Luc 안정한 형질감염 세포 (Signosis)를 384-웰 플레이트에 피랫팅하고 밤새 항온처리한다. 2일 째에 항-IL1R3 항체를 A549-NFkB-RE-Luc 안정한 형질감염 세포에 결합되도록 한 다음 IL-1 (α 또는 β)의 첨가에 의해 자극한다. 이것은 NFkB 신호전달 경로 활성화로 인해 루시페라제 유전자의 전사를 초래하며 세포 용해 및 루시페린의 첨가에 의해 측정될 수 있다.

[0238] 항체가 NFkB 경로의 활성화를 억제하고 따라서 발광 신호를 낮출 수 있는지를 시험한다.

재료:

[0240] 플레이트: 384-웰 저 플랜지 백색 평저 폴리스티렌 TC-처리된 멸균 마이크로플레이트; Corning; Cat. No. 3570

- [0241] 단백질: IL-1 α (P026_09); 재조합 인간 IL-1알파/IL-1F1; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; R&D Systems; Cat. No. 200-LA-002
- [0242] IL-1 β (P026_10); 재조합 인간 IL-1베타/IL-1F2; 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; R&D Systems; Cat. No. 200-LB-005
- [0243] 표준 Ab: MAB-15-0115; MAB Discovery GmbH; 2,51mg/ml; 작동 conc. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- [0244] 세포: A549-NFkB-RE-Luc 안정한 형질감염 세포; Signosis; Cat. No. SL-0014
- [0245] 배지: DMEM; PAN; Cat. No. P04-04510
- [0246] FCS: 태아 소 혈청 남아프리카 저 IgG; PAN; Cat. No. 1552-P120909
- [0247] Pen/Strep: 10,000 U 페니실린/ml; 10mg 스트렙토마이신/ml; PAN Biotech; Cat. No. P06-07100
- [0248] 박리제: 트립신-EDTA 1x; PAN; Cat. No. P10-023100 (T175의 경우 4mL/T75의 경우 2mL; ~8 min 37°C)
- [0249] 세포-배지: DMEM, 10% FCS, 1% Pen/Strep
- [0250] 검출 키트: Steady-Glo™ 루시퍼라제 검정 시스템; Promega; Cat. No. E2510
- [0251] 과정:
- [0252] 1. 세포-배지에서 A549-NFkB-RE-Luc 안정한 형질감염 세포 (3일간 1,7E+04 세포/cm²; 2일간 2,28E+04 세포/cm²)를 배양한다. 10회 계대배양을 넘지 않는다!
- [0253] 2. 웰당 25 μL 배지에서 40,000개 A549-NFkB-RE-Luc 안정한 형질감염 세포 (conc. = 1.6×10^6 개 세포/mL)를 평편 바닥을 갖는 백색 세포-배양물 처리된 384 웰 플레이트에 플레이팅한다.
- [0254] 37°C/5% CO₂에서 밤새 항온처리한다.
- [0255] 3. 플레이트로부터 배지를 흡인시키고 CyBio 피펫팅 로보터를 사용하여 배지 중의 10 μL 샘플 또는 표준물을 플레이트에 첨가한다 (프로그램: "Medium removal and sample transfer" in folder P026/NFkB). 37°C/5% CO₂에서 1 h 동안 항온처리한다.
- [0256] 4. CyBio 피펫팅 로보터를 사용하여 배지 중의 10 μL IL-1 (α 또는 β)을 플레이트에 첨가하고 (프로그램: "Transfer from reservoir" in folder P026/NFkB) (작동 conc.: 0.2ng/ml; 검정 conc.: 0.1ng/ml) 37°C/5% CO₂에서 5 h 항온처리한다.
- [0257] 단계 4를 수행하기 전에, Steady-Glo 프로토콜에 따라 Steady-Glo 기질을 Steady-Glo 완충액에 용해시키고 이 용액 및 검정 플레이트를 RT으로 평형화시킨다.
- [0258] 5. 20 μL Steady-Glo 혼합물을 첨가하고, 적절한 세포 용해를 보장하도록 완전히 혼합한다. RT에서, 10 min 항온처리한다.
- [0259] 6. 500ms 적분 시간으로 설정된 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 각 웰의 상대적 발광 단위를 결정한다 (프로그램: Lumineszenz-384).
- [0260] 실시예 5: IL-1 (α / β)로의 자극 후 A549 세포의 IL-6 분비
- [0261] 검정 원리:
- [0262] A549 세포를 384-웰 플레이트에 피펫팅하고 항-IL1R3 항체와 함께 항온처리한다. 그후, 세포를 IL-1 (α 또는 β)로 자극하고 IL-6을 검정 배지로 분비시킨다. IL-6의 양을 IL-6 ELISA로 측정한다.
- [0263] 재료:
- [0264] 검정 키트: DuoSet ELISA 인간 IL-6; Cat. No. DY206-05 (R&D Systems); DuoSet는 인간 IL-6 포획 항체 (part 840113), 인간 IL-6 검출 항체 (part 840114), 인간 IL-6 (part 840115) 및 스트렙타비딘-HRP (part 8939755)로 이루어진다.
- [0265] 플레이트: 384-웰 투명 세포 배양물 처리된 플레이트; Corning; Cat. No. 3701 384-웰 Maxisorp 플레이

트; NUNC; Cat. No. 464718

[0266] PP-플레이트: 120 μ L 384 딥 웰 "다이아몬드" 플레이트, 투명; Axygen (Corning); Cat. No.P-384-120SQ-C

[0267] 단백질: IL-1 α ; 재조합 인간 IL-1알파/IL-1F1; R&D Systems; Cat. No. 200-LA-002

[0268] IL-1 β ; 재조합 인간 IL-1베타/IL-1F2; R&D Systems; Cat. No. 200-LB-005

[0269] rhIL1-ra / IL-1F3; R&D Systems; Cat. No. 280-RA-010

[0270] 표준 Abs: 인간 IL-1RAcP/IL-1R3 항체; R&D Systems; Cat. No. AF676 또는 AF676-SP

[0271] 배지: DMEM; PAN; Cat. No. P04-04510

[0272] FCS: 태아 소 혈청 남아프리카 저 IgG; PAN; Cat. no. 1552-P120909

[0273] Pen/Strep: 10,000 U 페니실린/ml; 10mg 스트렙토마이신/ml; PAN Biotech; Cat. no. P06-07100

[0274] PBS: 박스 중의 완충액, 예비혼합된 PBS 완충액, 10x; Roche Applied Sciences; Cat. No. 11666789001

[0275] BSA: 소 혈청으로부터의 소 혈청 알부민 분획 V; Roche Applied Sciences; Cat. No. 10735086001

[0276] Tween 20: Tween 20; Carl Roth; Cat. No. 9127.2

[0277] TMB: TMB 용액; Invitrogen; Cat. No. SB02

[0278] HCl: 1M Titripur 염산; Merck; Cat. No. 1090571000

[0279] Elisa 완충액: PBS, 0.5% BSA, 0.05% Tween

[0280] 세척 완충액: PBS, 0.1% Tween

[0281] 차단 완충액: PBS, 2% BSA, 0.05% Tween

[0282] 세포-배지: DMEM, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep

[0283] 과정:

세포 자극

[0285] 1. 웰 당 25 μ L 배지 중의 6,000개 A549 세포 (conc. = 2.4×10^5 개 세포/mL)를 세포 배양 플레이트에 플레이팅한다. 37°C/5% CO₂에서 밤새 항온처리한다.

[0286] 2. 플레이트로부터 배지를 흡인시키고 배지 중의 12.5 μ L 샘플 또는 표준물을 플레이트에 첨가한다. 37°C/5% CO₂에서 3 h 동안 항온처리한다.

[0287] 3. 12.5 μ L IL-1 (α 또는 β)를 플레이트에 첨가하고 (작동 conc.: 0.2ng/mL; 검정 conc.: 0.1ng/ml) 37°C/5% CO₂에서 48 h 동안 항온처리한다.

[0288] 4. 배지를 흡인시키고 코팅되고 차단된 Elisa 플레이트로 이동시킨다 (단계 9.). 대안적으로, 상청액은 1주일 이하 동안은 PP-플레이트에서 -80°C에서 저장할 수 있다.

Elisa 플레이트 제조

[0290] 5. 포획 항체를 PBS 중에 2 μ g/mL의 농도로 희석시킨다. 384-웰 Maxisorp 플레이트를 웰당 12.5 μ L의 희석된 포획 항체로 즉시 코팅한다. 플레이트를 밀봉하고 실온에서 1 h 항온처리한다.

[0291] 6. 각 웰을 흡인시키고 세척 완충액으로 세척하며, 총 3회 세척을 위해 이 공정을 2회 반복한다. 각 웰을 자동 세척기를 사용하여 세척 완충액 (90 μ L)으로 충전함으로써 세척한다. 우수한 성능을 위해서는 각 단계에서 액체를 완전 제거하는 것이 필수적이다. 마지막 세척 후, 흡인시킴으로써 또는 플레이트를 뒤집어 깨끗한 종이 타월에 이를 블롯팅시킴으로써 임의의 남아있는 세척 완충액을 제거한다.

[0292] 7. 90 μ L 차단 완충액을 각 웰에 첨가함으로써 플레이트를 차단한다. 실온에서 최소 1 h 동안 항온처리한다.

[0293] 8. 단계 6에서와 같이 흡인/세척을 반복한다. 플레이트는 이제 샘플 첨가를 위한 준비가 되어 있다. 코팅되고

차단된 플레이트는 1개월 이하 동안 건조 상태로 -20°C에서 저장할 수 있다.

[0294] 검정 과정

[0295] 9. 웰당 Elisa 완충액 (EB)으로 희석된 12.5 μL의 순수한 샘플 또는 IL-6 표준물을 첨가한다. 덮어서 실온에서 1 h 동안 항온처리한다.

[0296] 10. Elisa 플레이트 제조의 단계 6에서와 같이 흡인/세척을 반복한다.

[0297] 11. EB에서 희석시킨 12.5 μL의 검출 항체를 각 웰에 첨가한다. 덮어서 실온에서 1 h 동안 항온처리한다.

[0298] 12. Elisa 플레이트 제조의 단계 6에서와 같이 흡인/세척을 반복한다.

[0299] 13. Elisa 완충액 중의 12.5 μL의 1:40 희석된 스트렙타비딘-HRP를 각 웰에 첨가한다. 플레이트를 덮고 실온에서 20분 동안 항온처리한다. 플레이트를 직사 광선에 두는 것은 피한다.

[0300] 14. Elisa 플레이트 제조의 단계 6에서와 같이 흡인/세척을 반복한다.

[0301] 15. 15 μL의 기질 용액 (TMB)을 각 웰에 첨가한다. 실온에서 20분 동안 항온처리한다.

[0302] 16. 15 μL의 정지 용액 (HCl, 1 M)을 각 웰에 첨가한다. 완전한 혼합을 보장하기 위해 플레이트를 가볍게 두드린다.

[0303] 17. 450nm로 설정된 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 즉시 각 웰의 광학 밀도를 결정한다. 과장 보정이 가능하다면, 540nm 또는 570nm로 설정한다 (프로그램: TMB stop 384 Cytokine). 보정 없이 450nm에서 직접 이루어진 판독은 다소 덜 정확할 수 있다.

[0304] 실시예 6: 경쟁 검정에 의한 huIL1RaP 특이 항체의 결합 특징의 측정

[0305] 검정 원리:

[0306] NUNC Maxisorp 384웰 미세역가 플레이트를 기준 항체 Can04로 코팅한다. 이 시간 동안 His-태그된 표적 단백질을 이차 항체와 함께 사전-항온처리하여 항-HIS-POD 항체를 시험한다. 그후 이러한 사전항온처리-혼합물을 검정 플레이트에 첨가하고 충분한 전개 시간 후 450nm/620nm에서의 흡광도를 측정한다.

[0307] 재료:

[0308] 플레이트: 384웰 NUNC Maxisorp 플레이트; Cat. No. 464718

[0309] 코팅 Ab: Can04 (MAB Discovery GmbH; CEP Ab no. 184; conc. 1mg/ml; 검정 conc. 100ng/ml)

[0310] 단백질: huIL1RaP-His 단백질 (P026_01; Fusion_1_Chain_A 동종이량체 huIL1RaP-His 태그됨; GeneArt; conc. 3mg/ml; 검정 conc. 62.5ng/ml)

[0311] 표준 Abs: Can04 (참조: "Coating Ab"; 출발 작동 conc. 3 μg/ml)

[0312] 음성 대조군: Her2 항체 (Lifespan; Cat. no. LS-C95808/26358; conc. 225 μg/mL; 출발 작동 conc. 3 μg/ml)

[0313] 검출 Ab: 항-HIS POD 항체 (단클론 항-폴리히스티딘 페옥시다제 접합체; Sigma; Cat. No. A7058; conc. 7.5mg/ml; 검정 conc.: 3.33 μg/ml)

[0314] PBS: 박스 중의 완충액, 사전혼합된 PBS 완충액, 10x; Roche Applied Sciences; Cat. No. 11666789001

[0315] BSA: 소 혈청으로부터의 소 혈청 알부민 분획 V; Roche Applied Sciences; Cat. No. 10735086001

[0316] Tween 20: Tween 20; Sigma-Aldrich; Cat. No. P1379

[0317] TMB: TMB 용액; Merck; Cat. No. CL07

[0318] HCl: 1M Titripur 염산; Merck; Cat. No. 1090571000

[0319] Elisa 완충액: PBS, 0.5% BSA, 0.05% Tween

[0320] 세척 완충액: PBS, 0.05% Tween

[0321] 차단 완충액: PBS, 2% BSA, 0.05% Tween

[0322] 과정:

[0323] 12. 예비-항온처리-혼합물을 제조하고 RT에서 2h 동안 항온처리한다.

[0324] a. (384웰 플레이트에서) 사전-항온처리.

[0325] i. Elisa 완충액 또는 BLANK 중의 $10\text{ }\mu\text{l}$ 이차 항체 희석 시리즈 (희석 1:2; 출발 작동 conc.: $3\text{ }\mu\text{g/ml}$)를

[0326] ii. $10\text{ }\mu\text{l}$ His-태그된 단백질 (검정 conc. 62.5ng/ml) 및

[0327] iii. $10\text{ }\mu\text{l}$ 항-HIS POD 항체 (검정 conc.: $3.33\text{ }\mu\text{g/ml}$)와 혼합하고 RT에서 1h 동안 항온처리 한다.

[0328] 13. 그 동안에, NUNC Maxisorp 플레이트를 PBS 중의 $20\text{ }\mu\text{l}$ 코팅 항체 (Can04; 검정 conc. 100ng/ml)로 코팅하고 RT에서 1h 동안 항온처리한다.

[0329] 14. $90\text{ }\mu\text{l}$ 세척 완충액으로 3x 세척한다.

[0330] 15. $90\text{ }\mu\text{l}$ 차단 완충액으로 RT에서 1h 동안 차단한다.

[0331] 16. 세척 완충액으로 3x 세척한다.

[0332] 17. ELISA-완충액 중의 $20\text{ }\mu\text{l}$ 사전-항온처리-혼합물을 RT에서 1h 동안 첨가한다.

[0333] 18. 세척 완충액으로 6x 세척한다.

[0334] 19. $25\text{ }\mu\text{L}$ TMB를 첨가한다.

[0335] 20. 충분한 전개 후 $25\text{ }\mu\text{L}$ HCl을 첨가한다.

[0336] 21. $450\text{nm}/620\text{nm}$ 에서 흡광도를 판독한다.

[0337] 실시예 7: IL12 카운터 스크린**[0338] 검정 원리:**

[0339] IL12 결합이 카운터스크린으로서 사용된다. HER 단백질을 IL12 단백질 같이 링커, huFc 및 His로 태그한다 (HER1은 His-Tag를 갖지 않는다). tag에 결합된 항체는 두 가지 검정 모두에서 양성인 반면, 항원 특이 항체는 단지 HER 단백질에만 결합하며 IL12에는 결합하지 않는다.

[0340] 재료:

[0341] 플레이트: 384웰 NUNC Maxisorp 플레이트; Cat. No. 464718

[0342] 단백질: 재조합 인간 IL-12 R β 1 Fc 키메라; R&D Systems; Cat. No. 839-B1; 검정 conc. $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$

[0343] 표준 Abs: IL-12R베타1 항체; GeneTex; Cat. No. GTX103917; 1mg/mL ; 출발 검정 conc. 500ng/mL (그후 1:2 희석)

[0344] 검출 Ab: 항-토끼 IgG, 페옥시다제-결합된 종-특이 Fab₂ 단편 (당나귀로부터) (ECL); GE; Cat. No. NA9340; 검정 희석: 1:5000

[0345] 샘플: Elisa 완충액에서의 희석은 프로젝트 의존적이다 (고 농도의 IgG에 대해서는 1:2 희석이 권장 된다)

[0346] 과정:

[0347] 1. PBS 중의 $12.5\text{ }\mu\text{L}$ $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ HER 단백질을 384웰 NUNC Maxisorp 플레이트에 첨가하고 RT에서 1h 동안 항온 처리한다.

[0348] 2. 세척 완충액으로 3x 세척한다.

[0349] 3. $90\text{ }\mu\text{L}$ 차단 완충액을 각 웰에 첨가하고 RT에서 1h 동안 항온처리한다.

[0350] 4. 세척 완충액으로 3x 세척한다. 플레이트는 알루미늄 호일로 밀봉하여 -20°C 에서 수 주 동안 동결시킬 수 있

다.

[0351] 5. 12.5 μL의 1:2 희석의 표준 항체 또는 Elisa 완충액에서 희석시킨 샘플을 첨가하고 RT에서 1h 동안 항온처리 한다 (동결된 플레이트는 샘플 적용 직전에 해동시켜야 한다).

[0352] 6. 세척 완충액으로 3x 세척한다.

[0353] 7. Elisa 완충액 중의 12.5 μL 1:5000 POD-항체를 첨가하고 RT에서 1h 동안 항온처리한다.

[0354] 8. 세척 완충액으로 6x 세척한다.

[0355] 9. 15 μL TMB를 첨가한다.

[0356] 10. 충분한 전개 후 15 μL HCl을 첨가한다 (프로젝트 의존적; IL12 검정은 다른 검정보다 더 짧지 않음).

[0357] 11. 450nm/620nm에서 흡광도를 판독한다.

실시예 8: 세포 결합 분석

[0359] A549 및 NIH-3T3 세포를 DMEM + 10% FCS 중에서 배양하였다. HEK-293 세포를 DMEM + 15% FCS 중에서 그리고 SK-MEL-30을 RPMI + 10% FBS 중에서 배양하였다. 세포를 Accumax (Sigma)를 사용하여 수화하고, PBS로 세척하여 염색 완충액 (BD Pharmingen)에 재현탁시켰다. 항-IL-1R3 항체를 10 μg/ml의 농도로 4°C에서 30분 동안 염색 완충액 중에서 세포와 함께 항온처리하였다. EC50 SK-MEL-30 세포 결합 분석을 위해, 세포를 20 μg/ml로 시작하여 1:2 희석 시리즈에서 항온처리하였다. 세포를 염색 완충액으로 세척하고 Alexa-488 표지된 염소-항-인간 이차 항체 (Dianova)와 4°C에서 30분 동안 항온처리하였다. 세포를 염색 완충액으로 세척하고 1:100 희석된 DRAQ7 (Abcam) 사멸 세포 염색을 함유하는 완충액에 재현탁시켰다. 세포를 BD Accuri C6 Sampler 유세포 분석기를 사용하여 분석하였다. 맞춤 곡선 및 EC50 계산은 Excel (Microsoft) 및 XLfit (IDBS)를 사용하여 수행하였다.

실시예 9: 생화학적 인간-IL-1R3 ELISA

[0361] Nunc 384-웰 Maxisorp 플레이트를 실온에서 60분 동안 PBS 중의 0,25 μg/ml의 농도로 재조합 Fc-태그된 hIL-1R3 (Ser21-Glu359)으로 피복시켰다. 플레이트를 세척 완충액 (PBS 0,1% Tween)으로 3회 세척하고 실온에서 60분 동안 PBS, 0,2% BSA, 0,05% Tween으로 차단하였다. 세척 완충액으로 3회 세척한 후, 항체를 6 내지 0,03 μg/ml (1:3 희석 시리즈) 범위의 농도로 Elisa 완충액 (PBS, 0,5% BSA, 0,05% Tween)에 첨가하고 실온에서 60분 동안 항온처리하였다. 플레이트를 세척 완충액으로 3회 세척한 다음 Elisa 완충액 중에 1:5000 희석으로 항-인간-IgG 페옥시다제-결합된, 종 특이 F(ab)2 단편 (goat, AbD Serotec)과 함께 실온에서 60분 동안 항온처리하였다. TMB 기질 용액 (Invitrogen, 15 μl/we11)을 첨가하기 전에 플레이트를 세척 완충액으로 6회 세척하였다. 5분간의 항온처리 후, 정지 용액 (1M HCl, 15 μl/웰)을 첨가하고 흡광도 (450nm/620nm)를 Tecan M1000 플레이트 판독기를 사용하여 측정하였다. 맞춤 곡선 및 EC50 계산은 Excel (Microsoft) 및 XLfit (IDBS)를 사용하여 수행하였다.

실시예 10: IL-1α 및 IL-1β 기능적 중화 검정

[0363] A-549-NFkB-RE-Luc (Signosis)를 384-웰 백색 평저 폴리스티렌 조직-배양물-처리된 마이크로플레이트 (Corning)에 25 μl 배지 중에 40,000개 세포/웰의 세포 밀도로 접종하기 전에 DMEM, 10% FCS, 1% Pen/Strep 중에서 5일간 배양하였다. 세포를 37°C/5% CO₂에서 밤새 항온처리하였다. 배지를 흡인에 의해 제거하고 단클론 또는 다클론 (염소-항-인간-IL-1R3, AF676, R&D Systems) 항체를 10 μl 배지의 용적 중에 다양한 농도로 첨가하고 37°C/5% CO₂에서 60분 동안 항온처리하였다. 재조합 인간 IL-1α 또는 IL-1β (R&D Systems) 단백질을 10 μl 배지에서 0,1ng/ml의 최종 농도로 되도록 첨가하고 플레이트를 37°C/5% CO₂에서 5시간 동안 항온처리하였다. 20 μl Steady-Glo™ (Promega) 용액을 각 웰에 첨가하고, 완전히 혼합하고, Tecan M1000 플레이트 판독기를 사용하여 발광을 측정하기 전에 플레이트를 실온에서 10분간 항온처리하였다. 맞춤 곡선 및 EC50 계산은 Excel (Microsoft) 및 XLfit (IDBS)를 사용하여 수행하였다.

실시예 11: IL-1α 및 IL-1β 기능적 중화 검정 - A-549 IL6-방출 검정

[0365] A549 세포를 DMEM, 10% FCS, 1% Pen/Strep 중에서 384-웰 투명 세포 배양물 처리된 플레이트 (Corning)에 25 μl 배지 중에 6,000개 세포/웰의 밀도로 접종하였다. 세포를 37°C/5% CO₂에서 밤새 항온처리하였다. 배지를 흡

인에 의해 제거하고 단클론 또는 다클론 (염소-항-인간-IL-1R3, AF676, R&D Systems) 항체를 $12.5\text{ }\mu\text{l}$ 배지의 용적 중에 다양한 농도로 첨가하고 $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ 에서 3시간 동안 항온처리하였다. 재조합 인간 IL-1 α 또는 IL-1 β (R&D Systems) 단백질을 $12.5\text{ }\mu\text{l}$ 배지에서 $0, 1\text{ng}/\text{mL}$ 의 최종 농도로 되도록 첨가하고 플레이트를 $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ 에서 48시간 동안 항온처리하였다. 세포 상청액 중의 분비된 인간-IL-6 수준을 DuoSet 인간 IL-6 ELISA 키트 (R&D Systems, Cat.No. DY206-05)를 사용하여 제조자의 지침에 따라 측정하였다. 맞춤 곡선 및 EC50 계산은 Excel (Microsoft) 및 XLfit (IDBS)를 사용하여 수행하였다.

[0366] 실시예 12: IL-33 기능적 중화 검정

HEK-Blue™ IL-33 세포 (InvivoGen)를 384-웰 투명 평저 세포 배양물 처리된 마이크로플레이트 (Corning)에 $15\text{ }\mu\text{l}$ 배지 중에 25,000개 세포/웰의 세포 밀도로 접종하기 전에 DMEM, 10% FCS 중에서 5일간 배양하였다. 다양한 농도의 단클론 또는 다클론 (염소-항-인간-IL-1R3, AF676, R&D Systems) 항체를 $5\text{ }\mu\text{l}$ 배지의 용적에 첨가하고 플레이트를 $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ 에서 60분 동안 항온처리하였다. 재조합 인간 IL-33 (R&D Systems) 단백질을 $5\text{ }\mu\text{l}$ 배지에서 $5\text{ng}/\text{mL}$ 의 최종 농도로 되도록 첨가하고 플레이트를 $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ 에서 밤새 항온처리하였다. $5\text{ }\mu\text{l}$ 세포 상청액을 $20\text{ }\mu\text{l}$ 2xQU항-Blue 시약 (InvivoGen)을 함유하는 투명한 평저 폴리스티렌 NBS™ 마이크로플레이트 (Corning)로 옮겼다. 플레이트를 37°C 에서 45분 동안 항온처리하고 광학 밀도를 Tecan M1000 플레이트 판독기를 사용하여 655nm에서 측정하였다. 맞춤 곡선 및 EC50 계산은 Excel (Microsoft) 및 XLfit (IDBS)를 사용하여 수행하였다.

[0368] 실시예 13: IL-36 기능적 중화 검정

HEK293/17-IF 세포 (MAB Discovery GmbH)를 384-웰 백색 평저 세포 배양물 처리된 플레이트 (Corning)에 $20\text{ }\mu\text{l}$ 배지 중에 30,000개 세포/웰의 세포 밀도로 접종하기 전에 DMEM, 10% FCS, $20\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 히그로마이신 중에서 5일간 배양하였다. 세포를 $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ 에서 밤새 항온처리하였다. 배지를 흡입에 의해 제거하고 다양한 농도의 단클론 또는 다클론 (염소-항-인간-IL-1R3, AF676, R&D Systems) 항체를 $10\text{ }\mu\text{l}$ 배지의 용적에 첨가하였다. 플레이트를 $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ 에서 60분 동안 항온처리하였다. 재조합 인간 IL-36g (R&D Systems) 단백질을 $10\text{ }\mu\text{l}$ 배지에서 $15\text{ng}/\text{mL}$ 의 최종 농도로 되도록 첨가하고 플레이트를 $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ 에서 5시간 동안 항온처리하였다. $20\text{ }\mu\text{l}$ Steady-Glo™ (Promega) 용액을 각 웰에 첨가하고, 완전히 혼합하고, Tecan M1000 플레이트 판독기를 사용하여 발광을 판독하기 전에 플레이트를 실온에서 10분 동안 항온처리하였다. 맞춤 곡선 및 EC50 계산은 Excel (Microsoft) 및 XLfit (IDBS)를 사용하여 수행하였다.

[0370] 실시예 14: IL-1 α , IL-33 및 IL-36 α 의 중화

신호전달을 위해 IL-1R3에 의존적인 세 개의 IL-1 수용체 (IL-1R1, -R4 또는 -R6)를 포함하는 신호전달 경로에 미치는 영향을 알아보기 위해 항-IL-1R3 항체의 기능을 IL-1 α , IL-33 또는 IL-36 α 를 갖는 상이한 세포주에서 시험하였다.

인간 상피 폐 세포주 A549를 자가-염증 질환과 같은 IL-1 의존적 질환의 모델로서 IL-1 α 로 자극하였다. 세포주를 T75 플라스크 (37°C , $5\% \text{CO}_2$) 중에서 완전 F-12K 배지 (10%FCS, 1% Pen/Strep)에서 배양하고 검정 전에 15회 계대배양을 초과하지 않으면서 평균 2회/주로 분열시켰다. A549 세포를 96개 평저 플레이트에 접종(50,000 개/웰)하고, MAB-16-0030 ($20\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ - $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) 또는 IL-1Ra ($10\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$)와 1hr 사전-항온처리 전에 3hr 동안 휴지시켰다. 그후, 상청액을 수확하여 IL-6 생산에 대해 검정(DuoSet ELISA, RnD Systems)하기 전에 세포를 재조합 인간 IL-1 α ($50\text{pg}/\text{mL}$, Peprotech)로 24hr 동안 자극하였다.

인간 비만 세포주 (HMC-1)를 IL-8 생산의 IL-33-의존적 유도에 대해 조사하였다. 세포주를 T75 플라스크 (37°C , $5\% \text{CO}_2$) 중에 완전 이스코브 개질된 둘베코 배지(IMDM, 10%FCS, 1% Pen/Strep)에서 배양하고, 검정 전에 $2*10^6/\text{mL}$ 초과의 세포 밀도를 갖지도 15회 계대배양을 초과하지도 않으면서 평균 3회/주로 분열시켰다. HMC-1 세포를 96개 평저 플레이트에 접종(30,000개/웰)하고, MAB-16-0030 ($20\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ - $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) 또는 IL-1Ra ($10\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$)와 1hr 사전-항온처리 전에 3hr 동안 휴지시켰다. 그후, 상청액을 수확하여 IL-8 생산에 대해 검정 (DuoSet ELISA, RnD Systems)하기 전에 세포를 재조합 인간 IL-33 ($20\text{ng}/\text{mL}$, RnD systems)로 24hr 동안 자극하였다.

IL-36 신호전달에 대한 영향을 인간 각질 세포주 (HaCaT)를 사용하여 조사하였다. 세포주를 T75 플라스크 (37

℃, 5% CO₂) 중에 완전 DMEM (10%FCS, 1% Pen/Strep)에서 배양하고, 검정 전에 15회 계대배양을 초과하지 않으면서 평균 3회/주로 분열시켰다. HaCaT 세포를 96개 평저 플레이트에 접종(50.000개/웰)하고, MAB-16-0030 (20 µg/mL - 1 µg/mL) 또는 IL-1Ra (10 µg/mL)와 1hr 사전-항온처리 전에 3hr 동안 휴지시켰다. 그후, 상청액을 수화하여 IL-8 생산에 대해 검정(DuoSet ELISA, RnD Systems)하기 전에 세포를 재조합 인간 IL-36α (50ng/mL, RnD systems)로 24hr 동안 자극하였다.

[0375] 실시예 15: PBMC의 생존력 및 IL-6 방출

세 명의 건강한 기증자로부터의 비자극된 PBMC (500.000개/웰)의 생존력에 대한 항-hIL-1R3 항체 MAB-16-0030의 영향을 종래의 MTT 환산(MTT reduction) 검정을 사용하여 시험하였다. 간략하게, PBMC (200 µL)를 배지 단독 또는 MAB-16-0030 (20 µg/mL)과 함께 항온처리하였다. 24hr, 3일 및 5일 후, ELISA 판독기 상에서 570nM에서 흡광도를 측정하기 전에 PBMC를 MTT (20 µL)와 2hr 동안 항온처리하였다. 흡광도와 생존 세포 변환 MTT 간의 알려진 선형성을 사용하여, 생존 세포의 수를 배지 단독을 100%로 설정된 대조군으로서 사용하여 계산하였다. MTT 분석 당일에, 동일한 기증자로부터 동일한 조건하에 항온처리된 PBMC로부터의 상청액을 수화한 다음 IL-6 생산 (DuoSet ELISA, RnD systems)에 대해 검정하여 MAB-16-0030 단독의 임의의 가능한 자극 효과를 평가하였다.

[0377] 실시예 16: PBMC의 기능적 차단

건강한 기증자로부터의 새로 단리된 PBMC를 사용하여, 다양한 항원으로 자극된 인간 세포에 대한 MAB-16-0030의 영향을 평가하였다. 모든 자극에 대해, 실험은 500.000개 PBMC/웰을 사용하여 수행하였으며, 200 µL의 총 용적에서 자극하였다. 세포를 접종하고 자극 전 1hr 동안 배지 단독, MAB-16-0030 (20 - 0.1 µg/mL) 또는 IL-1Ra (10 µg/mL)와 항온처리하였다. 다음의 자극들이 사용되었다; LPS (10ng/mL, 24hrs, RPMI no FCS), 항-인간 CD3/CD28 (1.25 µg/mL; 0.5 µg/mL (eBioscience) 3일, RPMI 10%FCS), IL-12 /-33 (2ng/mL; 20ng/mL (Peprotech;RnD Systems)), 3일, RPMI 10%FCS) 또는 열-불활성화된 칸디다 알비칸스 (0.5*10⁶/mL, 5일, RPMI 10%FCS). 자극 후, 상청액을 수화하고 DuoSet ELISA (RnD Systems)를 사용하여 제조자의 프로토콜에 따라 사이토kin 생산에 대해 검정하였다.

[0379] 실시예 17: 전혈에서 면역 세포의 기능적 차단

열-불활성화된 칸디다 알비칸스를 사용하여 전혈을 자극하였다. 건강한 기증자로부터 새로 수화한 혈액 (EDTA 관)을 미세-원심분리관 (250 µL/관)에 분배하고, 칸디다 알비칸스 (0.5*10⁶/mL)로 1mL의 최종 용적으로 되도록 자극하기 전에 1hr 동안 배지 단독 (RPMI, no FCS), MAB-16-0030 (20 - 0.1 µg/mL) 또는 IL-1Ra (10 µg/mL)와 사전-항온처리하였다. 24hr 항온처리 (37°C, 5% CO₂) 후, 상청액을 수화하고 ELISA (DuoSet, RnD Systems)에 의해 사이토kin 생산에 대해 검정하였다.

[0381] 실시예 18: 혼합 럼프구 반응 (MLR)

건강한, 비-매칭 기증자로부터의 PBMC를 1:1 비 (250.000개/기증자)로 혼합하고 5일간 (RPMI, 10%FCS) 배지 단독, MAB-16-0030 (20 - 1 µg/mL) 또는 IL-1Ra (10 µg/mL)와 항온처리하였다. 사이토kin 생산은 Quansys 멀티플렉스 플랫폼을 사용하여 제조자의 프로토콜에 따라 검정하였다.

[0383] 도면의 간단한 설명

[0384] 도면 범례

[0385] 도 1: 서열 (한 글자 코드의 아미노산)

[0386] 가변 영역 (VR)의 완전 서열:

[0387] 중쇄: VH 완전: 서열 번호 1-34 및 서열 번호 173

[0388] 경쇄: VL 완전: 서열 번호 35-68 및 서열 번호 174

[0389] 상보성 결정 영역 (CDR):

[0390] 중쇄: CDRH1: 서열 번호 69-85

[0391] CDRH2: 서열 번호 86-102

- [0392] CDRH3: 서열 번호 103-119
- [0393] 경쇄: CDRL1: 서열 번호 120-136
- [0394] CDRL2: 서열 번호 137-153
- [0395] CDRL3: 서열 번호 154-170 및 175
- [0396] 불변 영역 (CR):
- [0397] 경쇄: CR-L: 서열 번호 171
- [0398] 중쇄: CR-H: 서열 번호 172
- [0399] 하기 도면에서, AF676은 다음 링크로부터 구입한 시판 다클론 항체 제제이다:
<https://www.rndsystems.com/products/human-il-1-racp-il-1-r3-antibody-Baf676>
- [0400] **도2: 인간 IL-1R3 ELISA**
- [0401] 384개 미세역가 플레이트를 IL-1R3의 인간 세포와 도메인을 나타내는 인간 IL-1R3 단백질로 코팅하였다 ($0.5\text{mg}/\text{ml}$, 적어도 1h). 집중적인 세척 단계에 이은 차단 단계 후, 항체를 첨가하고 (웰당 $12.5\mu\text{l}$) RT에서 1h 동안 항온처리하였다. 비결합 항체를 집중적으로 세척제거하였다. 결합된 항체의 양은 미세역가 플레이트를 펴옥시다제 표지된 항-인간 검출 항체와 (RT에서 1h 동안) 항온처리함으로써 확인하였다. 펴옥시다제 반응은 TMB를 첨가하여 450nm/620nm에서 흡광도를 측정함으로써 개시하였다.
- [0402] 인간 IL-1R3에 특이적으로 결합하도록 보장하기 위해, 동일한 특징을 갖는 IL12 단백질을 사용하여 카운터 스크린을 동시에 수행하였다. 검정의 설정은 상기한 바와 동일하였다. B-세포 상청액이 인간 IL-1R3에는 결합하지만, IL12에는 결합하지 않는 것을 활성으로 간주하였다.
- [0403] **도 3: HEK293 리포터 검정**
- [0404] HEK293T/17-FR 세포를 pGL4.32[*Iuc2P/NF-βB-RE/Hygro*] 벡터 (Promega)로 안정하게 형질감염시키고 384웰 PDL Costar 세포 배양 플레이트에 집중한 다음 항체와 30 min 동안 항온처리하였다. 그후, Steady-Glo 루시퍼라제 검정 키트(Promega)를 사용하여 제조자의 프로토콜에 따라 NF-kB 활성을 측정하기 전에 5시간 동안 세포를 IL-1 β 로 자극하였다.
- [0405] **도 4: A549 안정한 세포주를 사용한 NFkB 루시퍼라제 리포터 검정**
- [0406] A549-NFkB-RE-Luc 안정한 형질감염 세포 (Signosis로부터 구입)를 3일간 배양하였다 ($1.7\text{E}+04$ 세포/ cm^3). 384-웰 저 플랜지 백색 평저 폴리스티렌 TC-처리된 미세역가 플레이트 (Corning)를 웰당 4×10^4 개 세포로 충전하였다. 10h의 배양 기간 후, 세포를 또 다른 5 h 동안 $10\mu\text{l}$ IL-1 β 로 자극하기 전 세포를 항체와 1 h 동안 항온처리하였다. NFkB 조절은 비-자극된 세포에 비해 각 웰의 상대적 발광 단위를 결정하는 Steady-GloTM 루시퍼라제 검정 시스템 (Promega)에 의해 측정하였다.
- [0407] **도 5: 세포 결합 분석: IL-1R3 발현 세포에의 결합**
- [0408] 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체를 유세포 분석법을 사용하여 상이한 IL-1R3 수용체 밀도를 갖는 세포주에의 결합에 대해 시험하였다. 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체는 저- 및 고-IL-1R3-발현 세포주에 결합한다. 항체는 마우스 NIH-3T3 세포에는 결합하지 않는다. 실험은 실시예 8에 기술된 방법에 따라 실시하였다.
- [0409] **도 6: 세포 결합 분석: 인간-IL-1R3 고 발현 세포주 SK-MEL-30에서의 세포 결합**
- [0410] 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체의 EC50 세포 결합 값을 유세포 분석법을 사용하여 고-IL-1R3-발현 세포주 SK-MEL-30에 결합시킴으로써 구하였다. 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체 MAB-16-0030 및 MAB-16-0149는 각각 307 및 306ng/ml의 세포 결합을 보인다. 실험은 실시예 8에 기술된 방법에 따라 실시하였다.
- [0411] **도 7: 인간-IL-1R3 생화학적 ELISA**
- [0412] 재조합 인간 IL-1R3 단백질에의 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체의 결합을 생화학적 ELISA로 시험하였다. 예시된 항체는 각각 16,3ng/ml 및 29,1ng/ml의 EC50 결합 값을 보인다. 실험은 실시예 9에 기술된 방법에 따라 실시하였다.

- [0413] 도 8: A549-NFkB-RE-Luc 세포에서 인간 IL-1a 및 IL-1b 매개된 NFkB 신호전달의 억제
- [0414] IL-1a 및 IL-1b의 기능적 중화는 각각 0, 1ng/ml IL-1a 및 IL-1b로 자극된 A549-NFkB-RE-Luc 세포를 사용하여 세포 기반 유전자 리포터 검정으로 시험하였다. 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체는 염소-항-인간-IL1-R3 다클론 항체 AF676 (R&D Systems)보다 우수한 EC50 값을 보인다. 실험은 실시예 10에 기술된 방법에 따라 실시하였다.
- [0415] 도 9: IL-1 α 및 IL-1 β 기능적 중화 검정 - A-549 세포에 의한 인간 IL-1a 및 IL-1b 매개된 IL-6 방출의 억제
- [0416] 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체에 의한 IL-6의 IL-1a 및 IL-1b 매개된 세포성 방출의 중화는 A-549 세포를 사용하여 시험하였다. EC50 값은 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체가 염소-항-인간-IL1-R3 다클론 항체 AF676 (R&D Systems)보다 우수함을 입증한다. 실험은 실시예 11에 기술된 방법에 따라 실시하였다.
- [0417] 도 10: IL-33 기능적 중화 검정 - HEK-Blue-IL33TM 세포에서 인간 IL-33 매개된 NFkB-신호전달의 억제
- [0418] 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체에 의한 IL-33 매개된 세포 신호전달의 중화는 IL-33 자극된 유전자 리포터 HEK-Blue-IL33TM 세포 (InvivoGen)를 사용하여 시험하였다. EC50 값은 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체가 염소-항-인간-IL1-R3 다클론 항체 AF676 (R&D Systems)보다 우수함을 입증한다. 실험은 실시예 12에 기술된 방법에 따라 실시하였다.
- [0419] 도 11: IL-36 기능적 중화 검정 - HEK-293/17-IF 세포에서 인간 IL-36 매개된 NFkB-신호전달의 억제
- [0420] 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체에 의한 IL-36 매개된 세포 신호전달의 중화는 IL-36g 자극된 유전자 리포터 HEK-293/17-IF 세포를 사용하여 시험하였다. 전형적인 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체는 염소-항-인간-IL1-R3 다클론 항체 AF676 (R&D Systems)보다 우수한 EC50 값을 보인다. 실험은 실시예 13에 기술된 방법에 따라 실시하였다.
- [0421] 도 12: IL-1a, IL-33 및 IL-36a 매개된 세포성 사이토킨 방출의 중화
- [0422] IL-1a, IL-33 및 IL-36a 매개된 세포성 사이토킨 방출의 중화는 특이 IL-1a, IL-33 및 IL-36a 의존적 세포 시스템을 사용하여 시험하였다. 본 발명에 따르는 대표적인 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체 (MAB-16-0030)에 의한 사이토킨 방출의 억제를 시험하고 IL-1Ra와 비교하였다. 본 발명에 따르는 항체는 모든 세 가지 자극에 의해 매개된 사이토킨 방출을 억제시킬 수 있었지만, IL-1Ra는 단지 IL-1a 매개된 사이토킨 방출에만 영향을 미쳤다. 실험은 실시예 14에 기술된 방법에 따라 실시하였다.
- [0423] 도 13: 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체로 처리된 비자극된 PBMC의 생존력 및 IL-6 방출
- [0424] 면역 세포에의 항체의 결합은, 예를 들어 세포사멸적 신호전달 경로의 직접적인 유도, 과도한 사이토킨 방출의 자극 또는 항체-의존적 세포성 세포독성(ADCC)에 의해 세포 고갈 및 유해 효과를 초래할 수 있다. 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체가 PBMC의 생존력에 직접적으로 영향을 미칠 수 있음을 배제하기 위해, 세 명의 기증자의 PBMC의 생존력 및 IL-6 방출을 상이한 농도의 본 발명에 따르는 대표적인 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체 (MAB-16-0030)와 1,3일 및 5일 동안 항온처리 후 조사하였다. 생존력 및 IL-6 방출 어느 것도 MAB-16-0030에 의해 영향을 받지 않았다. 이러한 결과는 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체가 정황적인 세포-고갈 및 세포-유해 효과의 유도 없이 면역 세포에 대한 IL-1R3 기능을 차단한다는 것을 뒷받침한다. 실험은 실시예 15에 기술된 방법에 따라 실시하였다.
- [0425] 도 14: 상이한 자극들로 활성화된 PBMC의 기능적 차단
- [0426] 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체가 특정 또는 복합 자극으로 자극된 PBMC의 활성화를 억제하는지를 시험하기 위해, 10명의 기능자의 PBMC를 LPS, 열-불활성화된 칸디다 알비칸스, IL-12/IL-33 또는 항-CD3/CD28 항체로 자극하였다. 본 발명에 따르는 대표적인 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체는 모든 시험된 자극들에 의해 매개된 사이토kin 방출을 억제시킬 수 있었다. 실험은 실시예 16에 기술된 방법에 따라 실시하였다.
- [0427] 도 15: 칸디다 알비칸스로 활성화된 전혈에서의 면역 세포의 기능적 차단
- [0428] 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체가 전혈에서 면역 세포의 활성화를 억제하는지를 시험하기 위해, 8명의 기증자의 전혈을 열-불활성화된 칸디다 알비칸스로 자극하였다. 도면에 나타낸 본 발명에 따르는 대표적인 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체는 칸디다 유도된 IL-6 사이토킨 방출을 억제시킬 수 있었다. 실험은 실시예 17에 기술

된 방법에 따라 실시하였다.

도 16: 혼합 림프구 반응 (MLR)에서의 사이토kin 방출의 차단

다양한 사이토kin의 방출을 차단하는 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체의 능력을 건강한 비매칭된 기증자의 PBMC를 사용하여 혼합 림프구 반응 (MLR)으로 시험하였다. 도면에 나타낸 본 발명에 따르는 대표적인 인간화 항-IL-1R3 IgG1-LALA 항체는 IFNg, IL-6, TNF-a, IL-13, IL-17 및 IL-10의 방출을 억제시킬 수 있었다. 실험은 실시예 18에 기술된 방법에 따라 실시하였다.

도면

도면 1a

도 1: 서열(한 글자 코드의 아미노산)

VH 완전: 서열 번호 1-34 및 서열 번호 173.

VL 완전: 서열 번호 35-68 및 서열 번호 174

CDR-H1: 서열 번호 69-85

CDR-H2: 서열 번호 86-102

CDR-H3: 서열 번호 103-119

CDR-L1: 서열 번호 120-136

CDR-L2: 서열 번호 137-153

CDR-L3: 서열 번호 154-170 및 175

CR-L: 서열 번호 171

CR-H: 서열 번호 172

mAB 명칭	서열 번호	완전 중쇄 VR 서열
MAB-15-0139	1	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSSYWICWVRQAPGKGLEWVSCIYTGSGGTYASWEKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDPGYSSWLWGQGTLTVSS
MAB-15-0106	2	EVQLEESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSSHYMCWVRQAPGKGLEWVSCIYAGSSGNTYYANWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARVDASSSGSWDLW/GQGTLTVSS
MAB-15-0108	3	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSSYAMGWVRQAPGKGLEYVSITSSATTYYASWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARGGPGYSTNTHYAFDPWGQGTLTVSS
MAB-15-0110	4	EVQLEESGGRVVQPGRSRLSCAVSGIDLDNYAMGWVRQAPGKGLEYVAVISSDGFFYDASWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDRGTTGSDLW/GQGTLTVSS
MAB-15-0117	5	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSIISGSASTYYATWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARTHYYAAVAGYGYASRLDLWGQGTLTVSS
MAB-15-0121	6	EVQLEESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSNYWICWVRQAPGKGLELVSICIYTSTGNTWYASWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDLLVVTSFNLWGQGTLTVSS
MAB-15-0140	7	EVQLEESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYYMCWVRQAPGKGLEWVSCIYAGSSVTYYASWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCASETDGNYFNLWGQGTLTVSS
MAB-15-0115	8	EVQLEQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSTSWSRCWVRQAPGKGLEWVSCIYAGSGDVYYANWVNNGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCASGVGFYFNWLWGQGTLTVSS
MAB-15-0125	9	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYYMCWVRQAPGKGLEWVSCIFIGYGDVTWYASWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARALGSSGYRVNLWGQGTLTVSS
MAB-15-0119	10	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSMIYGSGYTYASWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDPQYFILWGQGTLTVSS

도면 1b

MAB-15-0109	11	EVQLEESGGRLVQPGGSLRLSCAVGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSTIYIGGTTAYA SWPKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLQGANYYNSLALWGQGTLTVVS S
MAB-15-0097	12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSSNYYMCWVRQAPGKGLELSCIYTNGNT WSASWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDLNYPDTSNLWGQGTLVT VSS
MAB-15-0135	13	EVQLEESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFSFSFGYYMCWVRQAPGKGLEWVSCIYGDSSDT YYANWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARYPGGSYYNLWGQGTLTV S
MAB-15-0133	14	EVQLEESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSTYYMCWVRQAPGKGLEWVSCIYAGSSG YYASWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARVDGSSGSWDLWGQGTLV TVSS
MAB-15-0107	15	EVQLEESGGDLVQPGGSLRLSCAASGISFSSDFMCWVRQAPGKGLEWVSCIYAGSSVSI YYATWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARSTGSVGRGFNLWGQGTLV VSS
MAB-15-0128	16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSIYMCWVRQAPGKGLEWVSCIYTGNSDFT YYANWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARFRDDYASLKLWGQGTLV SS
MAB-15-0116	17	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSGYDMCWVRQAPGKGLEWVSCIYTGS YYANWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARNSNDWMYFNLWGQGTLV TVSS
MAB-16-0004	18	EVQLQESEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSSYWICWVRQAPGKGLEWVACIYTGG YYASWEKGRFTISKTSTTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDPGYSSWLWGQGTLV TVSS
MAB-16-0009	19	EVQLEESGGDLVQPGASLRLSCAASGFSFSSSHYMCWVRQAPGKGLEWVACIYAGSSGN YYANWAKGRFTISKTNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARVDASSGSWDLWGQGTL VTVSS
MAB-16-0028	20	EVQLLESGGRLVQPGTSLRLSCAVSGIDLSSYAMGWWVRQAPGKGLEYVGVITSSATT WAKGRFTISKTSTTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARGGPGSTNTHYAFDPWGQGTLV SS
MAB-16-0031	21	EVQLEESGGRRVQPGTSLRLSCAVSGIDLSDNYAMGWWVRQAPGKGLEYVAVISSD ASWAKGRFTISKANSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDRGTSTGSDLWGQGTLV S
MAB-16-0043	22	QVQLEESGGRLVQPGTSLRLSCAASGFSLSSYMSWVRQAPGKGLEWVAII TWAKGRFTISKTSTTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARTHYA AAVAGYGYASRDLWGQGTLV TVSS
MAB-16-0049	23	QVQLQESEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSNYWICWVRQAPGKGLEVACIYT YYASWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDLLV TVSS
MAB-16-0045	24	EVQLVESGGDLVQPGASLRLSCAASGFSFSSSYMCWVRQAPGKGLEWVACIYAGSSGV YYASWAKGRFTISDTSSTTLYLQMNSLRAEDTAVYFCASETD GNYFNLWGQGTLV TVSS
MAB-16-0040	25	EVQLEQSGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSTS YRCWVRQAPGKGLEWVACIYAGSSGD V TYYANWVNNGRTISRDNSKSTLYLQMNSLRAEDTAVY Y CASGVFGYFN LGQGTLV VSS
MAB-16-0036	26	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSSYYMCWVRQAPGKGLEWVACIFIGYGD V WYASWAKGRFTISKANSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARAL GSSGYRVNLWGQGTLV TVSS
MAB-16-0046	27	QVQLEESGGRLVQPGASLRLSCAASGFSLSSY WMSWVRQAPGKGLEWVAMI YASWAKGRFTISTTSTTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDP QYFILWGQGTLV TVSS

도면 1c

MAB-16-0030	28	EVQLEESGGRLVQPGTSRLSCAVSGFSLSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSTIYIGGTTAYA SWPKGRFTISKNTLYQMNSLRAEDTAVYFCARLQGANYYNSLALWGQGTLTVVS
MAB-16-0021	29	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSGYMCWVRQAPGKGLEWVACIYNGSSDT WSASWAKGRFTISKNTLYQMNSLRAEDTAVYFCARDLNYPDTSNLWQGQGTLTVVS
MAB-16-0019	30	EVQLEESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSTYYMCWVRQAPGKGLEWVACIYAGSSDT LYANWAKGRFTISKNTLYQMNSLRAEDTAVYFCARYPGSYYNLWGQGTLTVVS
MAB-16-0015	31	QVQLQESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSTYYMCWVRQAPGKGLEWVACIYAGSSGS TYYASWAKGRFTISKNSSTLYQMNSLRAEDTAVYFCARVDGSSGSDLWQGQGTLTV SS
MAB-16-0027	32	EVQLEESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSIYMCWVRQAPGKGLEWVACIYAGSSVI YYATWAKGRFTISKASSTTLQYMNSLRAEDTAVYFCARSTGSVGRGFNLWGQGTLTV SS
MAB-16-0048	33	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSIYMCWVRQAPGKGLEWVGCIYTGSDF TYYANWAKGRFTISRDNSKSTLYQMNSLRAEDTAVYFCARFRDDYASLKLWGQGTLTV VSS
MAB-16-0041	34	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTAGFSFSSGYDMCWVRQAPGKGLEWVGCIYTGS TYYANWAKGRFTISKDNSKTLYQMNSLRAEDTAVYFCARNSNDWMYFNLWGQGTLV TVSS

mAb 명칭	서열 번호	완전 k-경쇄VR 서열
MAB-15-0139	35	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESISNYLSWYQQKPGQAPKLLIYLASTLASGVPSRF SGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQNWWVIEHNGAAFGGGTKVVIK
MAB-15-0106	36	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESIYSNLAWSYQQKPGQAPKLLIYAASLLASGVPSRF SGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQSASYSTGPDWTFGQGTTKVVIK
MAB-15-0108	37	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSIYIYLWYQQKPGQAPKLLIYDASKLASGVPSRF SGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQCGATTYNVDNVFGQGTTKVVIK
MAB-15-0110	38	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASENIGNGLAWYQQKPGQAPKLLIYGASTLASGVPS RFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQCTYWPNDYIGGAFFGGGTKVVIK
MAB-15-0117	39	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCLASEDIYSGISWYQQKPGKAPKLLIYASNLASGVPSRF SGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCLGGYSYSNTGPTFGQGTTKVVIK
MAB-15-0121	40	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDIYSNLAWFQQKPGQAPKLLIYGASTLASGVPSRF FSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLGVCTDISTDDLYNAFGQGTTKVVIK
MAB-15-0140	41	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDIYSNLAWFQQKPGQAPKLLIYRASLASGVPSRF FSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLGVVTYSTDIDHAFGGGTKVVIK
MAB-15-0115	42	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDIYSNLAWFQQKPGQAPKLLIYDASTLASGVPSRF FSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLGVYTHISADNAFGGGGTKVVIK
MAB-15-0125	43	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASENIYSSLAWYQQKPGQAPKLLIYDASDLASGVPSRF FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQCGYSSWYQQKPGQAPKLLIYDASNLASGV
MAB-15-0119	44	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVDGNLLSWYQQKPGQAPKLLIYDASNLASGV PSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQGSYYSSWYVFGQGTTKVVIK
MAB-15-0109	45	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSIYFLSWYQQKPGQAPKLLIYAASDLESGVPSRF SGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQCNYIIDYGAFFGGGTKVVIK

도면 1d

MAB-15-0097	46	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQSIGYYLAWYQQKPGQAPKLLIYRASTLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSYNSDRAFTGQGTKVVIK
MAB-15-0135	47	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQTISINLAWYQQKPGQAPKLLIYASTLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQCGYTEDNIDNTFGQGTKVVIK
MAB-15-0133	48	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQNIYSNLAWYQQKPGQAPKLLIYAASLLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGAVSGNTWEAFGQGTKVVIK
MAB-15-0107	49	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQSIVNSNHLWSWYQQKPGQAPKLLIYASSTLASGVPSR SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGEFSCVSADCIAGGGTCKVVIK
MAB-15-0128	50	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQSISSYLSWYQQKPGQAPKLLIYGASNLLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQCTYDNNYGGAFGGGTKVVIK
MAB-15-0116	51	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASESISANYWSWYQQKPGQAPKLLIYGASTLASGVPSR RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYFCQSIVNSNHLWSWYQQKPGQAPKLLIYLASTLASGVPSR
MAB-16-0004	52	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASESISNYLSWYQQKPGQAPKLLIYLASTLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQCNWWVIEHNGAAFFGGTKVVIK
MAB-16-0009	53	AIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASESIYSNLAWYQQKPGQAPKLLIYAASLLASGVPSRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQASYSTGPDWTFGQGTKVVIK
MAB-16-0028	54	AIRMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQSIYIYLAWYQQKPGQAPKLLIYDASKLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQCGATTYNVDNVFGQGTKVVIK
MAB-16-0031	55	ELVMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASEENIGNGLAWYQQKPGQAPKLLIYGASTLASGVPSR RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQCTYWNPDYIGGAFGGGTKVVIK
MAB-16-0043	56	AIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCASEDIYSGISWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLGGYSNTGPTFGQGTKEIK
MAB-16-0049	57	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASEEDIYSNLAWFQQKPGQAPKLLIYGASTLASGVPSR FSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLGVCTDISTDDLYNAFGQGTKVVIK
MAB-16-0045	58	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASEEDIYSNLAWFQQKPGQAPKLLIYRASTLASGVPSR FSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLGVYTSTDIAFGGGTKVVIK
MAB-16-0040	59	ELVMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASEDIYSNLAWFQQKPGQAPKLLIYDASTLASGVPSR FSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLGVYTHISADNAFFGGTKVEIK
MAB-16-0036	60	ALQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASENIYSSLAWYQQKPGQAPKLLIYDASDLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYSSWYVNFQGTKVVIK
MAB-16-0046	61	NIVMTQSPSSLSASVGDRVITTCQSSQSVGNLLSWYQQKPGQAPKLLIYDASNLLASGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGSYSSWYVNFQGTKVVIK
MAB-16-0030	62	DVQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQSIYSFLSWYQQKPGQAPKLLIYAASDLESGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQCNYIIDYGAFFQGTKVVIK
MAB-16-0021	63	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQSIGYYLAWYQQKPGQAPKLLIYRASTLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQCGYTEDNIDNTFGQGTKVVIK
MAB-16-0019	64	AIVMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQTISINLAWYQQKPGQAPKLLIYASTLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQCGYTEDNIDNTFGQGTKVVIK
MAB-16-0015	65	AIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQNIYSNLAWYQQKPGQAPKLLIYAASLLASGVPSR FSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQGAVSGNTWEAFGQGTKVVIK
MAB-16-0027	66	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQSIVNSNHLWSWYQQKPGQAPKLLIYASSTLASGVPSR SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGEFSCVSADCIAGGGTCKVVIK
MAB-16-0048	67	DVVMQTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQSISSYLSWYQQKPGQAPKLLIYGASNLLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQCTYDNNYGGAFGGGTKEIK
MAB-16-0041	68	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASESISANYWSWYQQKPGQAPKLLIYGASTLASGVPSR RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYFCQSIVNSNHLWSWYQQKPGQAPKLLIYASSTLASGVPSR

도면 1e

mAb 명칭		서열 번호	CDR-H1	서열 번호	CDR-H2	서열 번호	CDR-H3
MAB-15-0139	MAB-16-0004	69	SSYWIC	86	CIYTGSGGTYYASWEKG	103	DPGYSSWL
MAB-15-0106	MAB-16-0009	70	SSHYIMC	87	CIYAGSSGNTYYANWAKG	104	VDASSGSWDL
MAB-15-0108	MAB-16-0028	71	SYAMG	88	VITSSATTYYASWAKG	105	GGPGYSTNTHYAFDP
MAB-15-0110	MAB-16-0031	72	NYAMG	89	VISSDGFFYDASWAKG	106	DRGTSTGSDL
MAB-15-0117	MAB-16-0043	73	SYYMS	90	IISGSASTYYATWAKG	107	THYAAVAGYGYASRLDL
MAB-15-0121	MAB-16-0049	74	SNYWIC	91	CIYTSTGNTWYASWAKG	108	DLLVVTSFNL
MAB-15-0140	MAB-16-0045	75	SSYYMC	92	CIYAGSSGVTTYASWAKG	109	ETDGNYFNL
MAB-15-0115	MAB-16-0040	76	TSYWRC	93	CIYAGSGDVTTYANWVNG	110	GVGFGYFNL
MAB-15-0125	MAB-16-0036	77	SYYYMC	94	CIFIGYGDVTWYASWAKG	111	ALGSSGYRVNL
MAB-15-0119	MAB-16-0046	78	SYWMS	95	MIYGSGYTTYASWAKG	112	DPQYFIL
MAB-15-0109	MAB-16-0030	79	SYDMS	96	TIYIGGTTAYASWPKG	113	LQGANYYNSLAL
MAB-15-0097	MAB-16-0021	80	SNYYMC	97	CIYTNSGNTWSASWAKG	114	DLNYPDTSNL
MAB-15-0135	MAB-16-0019	81	FGYYMC	98	CIYGDSSDTLYANWAKG	115	YPGGSYYNL
MAB-15-0133	MAB-16-0015	82	STYYMC	99	CIYAGSSGSTYYASWAKG	116	VDGSSGSWDL
MAB-15-0107	MAB-16-0027	83	SSDFMC	100	CIYAGSSVSIYYATWAKG	117	STGSVGRGFNL

도면1f

MAB-15-0128	MAB-16-0048	84	SIYYMC	101	CIYTGNSDFTYYANWAKG	118	FRDDYASLKL
MAB-15-0116	MAB-16-0041	85	SGYDMC	102	CIYTGSGSTYYANWAKG	119	NSNDWMYFNL

mAb 명칭	서열 번호	CDR-L1	서열 번호	CDR-L2	서열 번호	CDR-L3	
MAB-15-0139	MAB-16-0004	120	QASESISNYLS	137	LASTLAS	154	QNWWWVIEHNGAA
MAB-15-0106	MAB-16-0009	121	QASESIYSNLA	138	AASLLAS	155	QSASYSTGPDWT
MAB-15-0108	MAB-16-0028	122	QASQSIYIYLS	139	DASKLAS	156	QQGATTYNVDNV
MAB-15-0110	MAB-16-0031	123	QASENINGNLA	140	GASTLAS	157	QCTYWNPDYIGGA
MAB-15-0117	MAB-16-0043	124	LASEDIYSGIS	141	AASNLES	158	LGGYSYSNTGPT
MAB-15-0121	MAB-16-0049	125	QASEDIYSNLA	142	GASTLAS	159	LGVCTDISTDDLYNA
MAB-15-0140	MAB-16-0045	126	QASEDIYSNLA	143	RASTLAS	160	LGVYTYSTDIHA
MAB-15-0115	MAB-16-0040	127	QASEDIYSNLA	144	DASTLAS	161	LGVYTHISADNA
MAB-15-0125	MAB-16-0036	128	QASENIYSSLA	145	DASDLAS	162	QQGYYSGGTNDV
MAB-15-0119	MAB-16-0046	129	QSSQSVDGNNLLS	146	DASNLAS	163	QGSYYSSSWYNV
MAB-15-0109	MAB-16-0030	130	QASQSIYSFLS	147	AASDLES	164	QCNYIIDYGA
MAB-15-0097	MAB-16-0021	131	QASQSIGYYLA	148	RASTLAS	165	QSYYNSDSDA

도면 1g

MAB-15-0135	MAB-16-0019	132	QASQTISINLA	149	YASTLAS	166	QQGYTEDNIDNT
MAB-15-0133	MAB-16-0015	133	QASQNIYSNLA	150	AASLLAS	167	QGAVYSGNTEWA
MAB-15-0107	MAB-16-0027	134	QASQS VYNSN HLS	151	SASTLAS	168	QGEFSCVSADCIA
MAB-15-0128	MAB-16-0048	135	QASQSISSYLS	152	GASNLAS	169	QCTYYDNNYGGAA
MAB-15-0116	MAB-16-0041	136	QASESISANYWS	153	GASTLAS	170	QSWYYSGSGSYHSWA

서열 번호	불변 영역 서열 (CR)
171	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
172	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPNAVQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPKPDKTLMSRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

mAb 명칭	서열 번호	완전 중쇄 VR seq
MAB-16-0150	173	EVQLLESGGRLVQPGTSLRLSCAVSGIDLSSYAMGWVRQAPKGLEYVGVITSSATTYYAS WAKGRFTISKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARGGPGSTNTHYAFDPWGQGTLVT VSS

mAb 명칭	서열 번호	완전 경쇄 VR seq
MAB-16-0149	174	DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSIYSFLSWYQQKPGQAPKLLIYAASDLESGVPSR FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQSNYIIDYGAFGQQGTKVVIK CDR-L3
MAB-16-0149	175	QSNYIIDYGA

도면 1h

mAb 명칭	CDR-H1 서열 번호	CDR-H2 서열 번호	CDR-H3 서열 번호	CDR-L1 서열 번호	CDR-L2 서열 번호	CDR-L3 서열 번호	VH 서열 번호	VL 서열 번호
MAB-16-0150	71	88	105	122	139	156	173	54
MAB-16-0149	79	96	113	130	147	175	28	174

도면2

도 2: 인간 IL-1R3 ELISA

항체 ID	hIL1RaP ELISA EC50 [ng/ml]
MAB-16-0015	1,6
MAB-16-0019	28,1
MAB-16-0021	20,8
MAB-16-0004	8,0
MAB-16-0009	4,9
MAB-16-0027	5,3
MAB-16-0030	4,5
MAB-16-0040	6,6
MAB-16-0043	13,2
MAB-16-0046	7,4
MAB-16-0049	20,6
MAB-16-0028	6,0
MAB-16-0031	8,2
MAB-16-0041	15,2
MAB-16-0036	5,9
MAB-16-0045	28,4
MAB-16-0048	7,4
기준 AF676	79,6

도면3

도 3: HEK293 리포터 검정

항체 ID	HEK 리포터 검정 (IL1b) EC50 [ng/ml]
MAB-16-0015	27,3
MAB-16-0019	2,5
MAB-16-0021	33,0
MAB-16-0004	67,1
MAB-16-0009	18,2
MAB-16-0027	37,3
MAB-16-0030	8,7
MAB-16-0040	9,4
MAB-16-0043	27,0
MAB-16-0046	6,1
MAB-16-0049	42,6
MAB-16-0028	5,1
MAB-16-0031	23,3
MAB-16-0041	0,1
MAB-16-0036	9,5
MAB-16-0045	90,2
MAB-16-0048	16,3
기준 AF676	234

도면4

도 4: A549 안정한 세포주를 사용한 NFkB 루시퍼라제 리포터 검정

항체 ID	Signosis NFkB A549 (IL-1b) EC50 [ng/ml]
MAB-16-0015	+
MAB-16-0019	++
MAB-16-0021	+
MAB-16-0004	++
MAB-16-0009	+++
MAB-16-0027	++
MAB-16-0030	+++
MAB-16-0040	+
MAB-16-0043	+
MAB-16-0046	+++
MAB-16-0049	+
MAB-16-0028	+++
MAB-16-0031	+
MAB-16-0041	+
MAB-16-0036	+++
MAB-16-0045	+
MAB-16-0048	+
Reference AF676	+

도면5

도 5: 세포 결합 분석: IL-1R3 발현 세포에의 결합

	NIH-3T3	A549	HEK-293	SK-MEL-30
항체	MFI – 이소형 대조군을 능가하는 배수			
MAB-16-0019	1,2	2,7	3,6	79,0
MAB-16-0030	0,9	2,4	2,8	69,7
MAB-16-0040	1,0	2,6	3,0	73,7
MAB-16-0036	1,1	2,0	3,0	70,6
MAB-16-0149	1,1	2,4	3,4	77,7
MAB-16-0150	1,1	3,2	4,8	87,1

도면6

도 6: 세포 결합 분석: 인간-IL-1R3 고 발현 세포주 SK-MEL-30에 대한 세포 결합

항체	EC50 (ng/mL)
MAB-16-0030	307
MAB-16-0149	306

도면7

도 7: 인간-IL-1R3 생화학적 ELISA

항체	EC50 (ng/mL)
MAB-16-0149	16,3
MAB-16-0150	29,1

도면8

도 8: A549-NFkB-RE-Luc 세포에서 인간 IL-1a 및 IL-1b 매개된 NFkB 신호전달의 억제

	hIL-1a로의 자극	hIL-1b로의 자극
항체	EC50 (ng/mL)	EC50 (ng/mL)
MAB-16-0019	56	140
MAB-16-0030	156	149
MAB-16-0040	969	636
MAB-16-0036	199	25
MAB-16-0149	167	109
MAB-16-0150	211	11
AF676	3134	919

도면9

도 9: IL-1α 및 IL-1β 기능적 중화 검정 - A-549 세포에 의한 인간 IL-1a 및 IL-1b 매개된 IL-6 방출의 억제

	hIL-1a로의 자극	hIL-1b로의 자극
항체	EC50 (ng/mL)	EC50 (ng/mL)
MAB-16-0019	546	180
MAB-16-0030	361	346
MAB-16-0040	2246	234
MAB-16-0036	378	253
MAB-16-0149	266	108
MAB-16-0150	1464	313
AF676	>10000	>10000

도면10

도 10: IL-33 기능적 중화 검정 - HEK-Blue-IL33™ 세포에서 인간 IL-33 매개된 NfкB-신호전달의 억제

hIL33으로 자극	
항체	EC50 (ng/mL)
MAB-16-0019	376
MAB-16-0030	909
MAB-16-0040	17195
MAB-16-0036	426
MAB-16-0149	432
MAB-16-0150	2115
AF676	26114

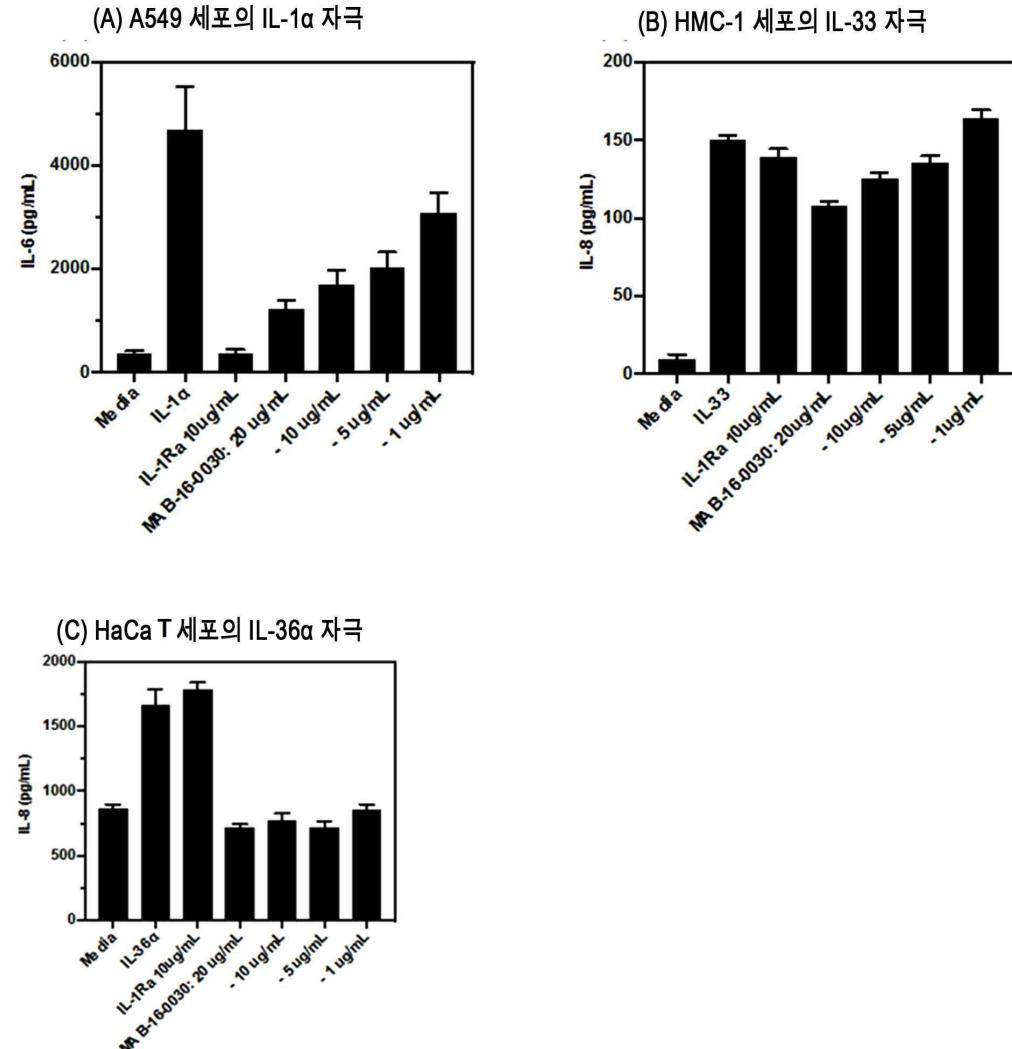
도면11

도 11: IL-36 기능적 중화 검정 - HEK-293/17-IF 세포에서 인간 IL-36 매개된 NfкB-신호전달의 억제

hIL36으로 자극	
항체	EC50 (ng/mL)
MAB-16-0019	11
MAB-16-0030	13
MAB-16-0040	42
MAB-16-0036	14
MAB-16-0149	18
MAB-16-0150	13
AF676	502

도면12

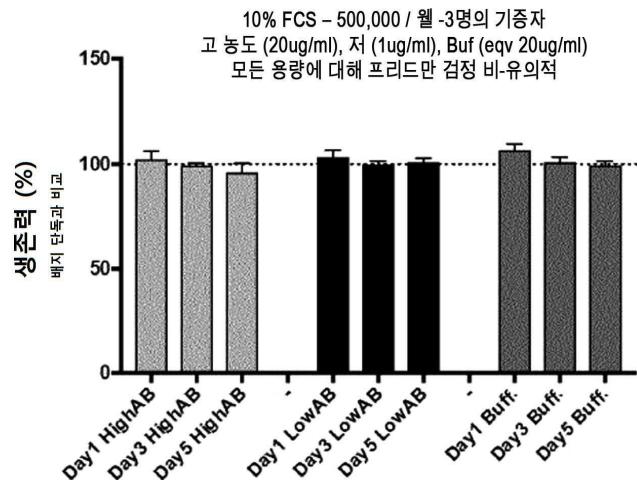
도 12: IL-1 α , IL-33 및 IL-36 α 의 중화 - IL-1Ra 및 MAB-16-0030에 의한 IL-1 α , IL-33 및 IL-36 α 매개된 세포성 세포독성 방출의 중화



도면 13a

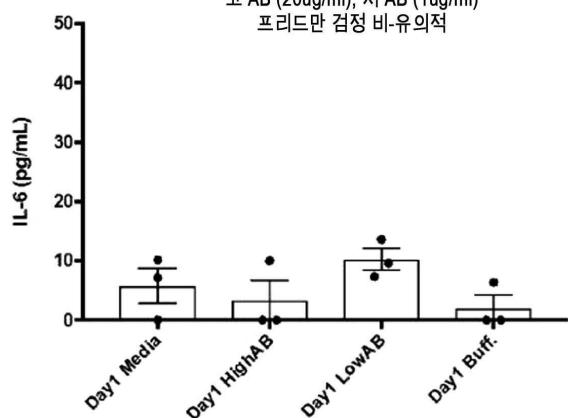
도 13: 인간화 항 -IL-1R3 IgG1-LALA 항체 MAB-16-0030로 처리한 비자극된 PBMC의 생존력 및 IL-6 방출

PBMC 의 생존력 w.o. MA B-16-0030을 사용한 자극

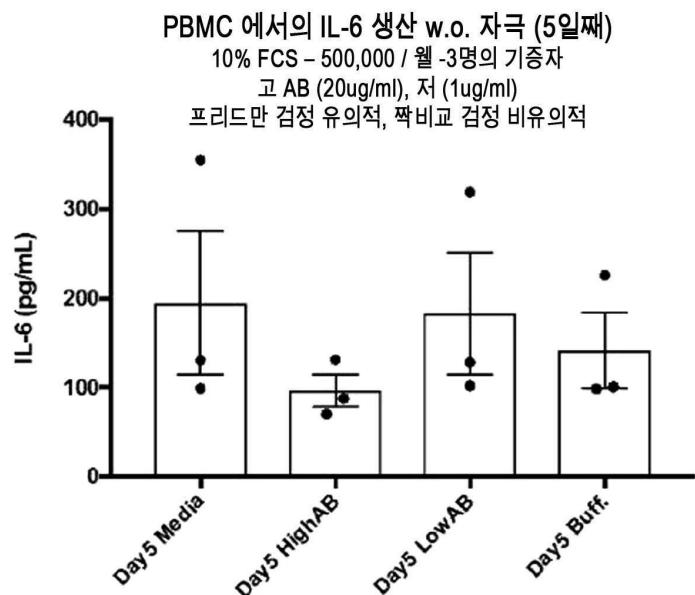
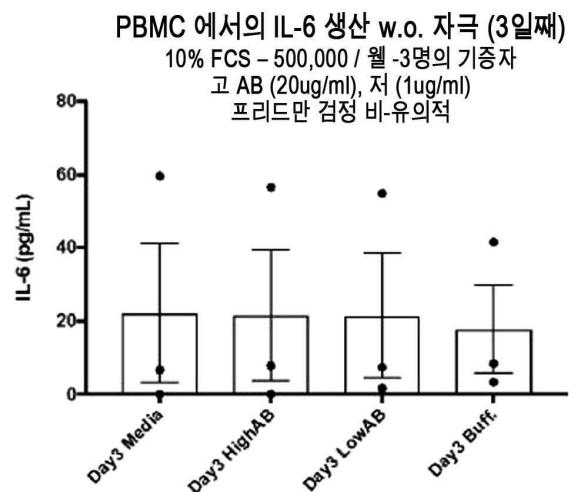


PBMC 에서의 IL-6 생산 w.o. 자극 (1일째)

10% FCS – 500,000 / 월 -3명의 기증자
고 AB (20ug/ml), 저 AB (1ug/ml)
프리드만 검정 비-유의적

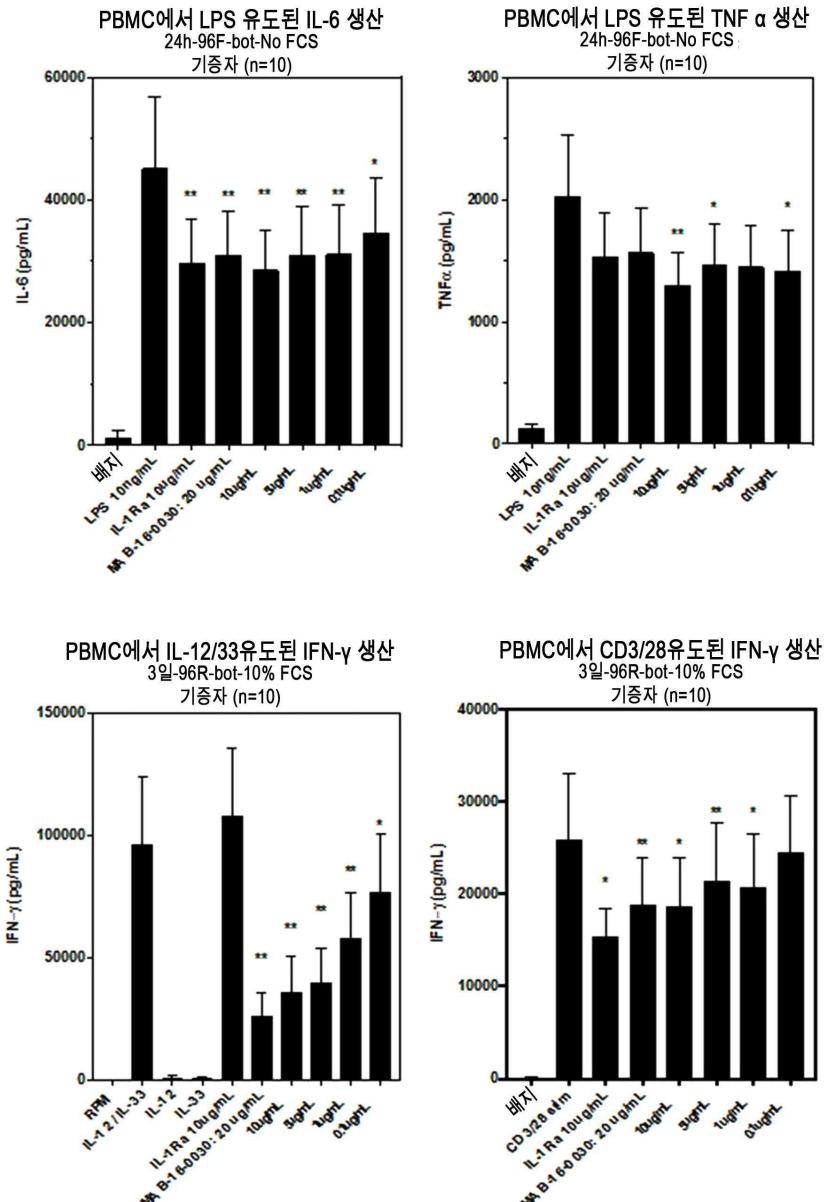


도면 13b

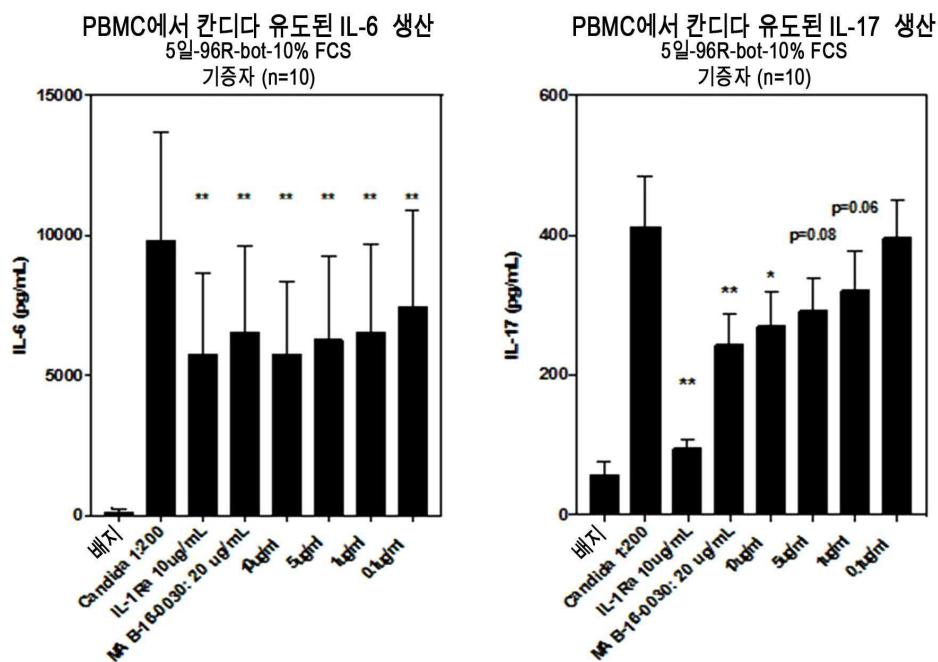


도면14a

도 14: 상이한 자극으로 활성화된 PBMC의 기능적 차단

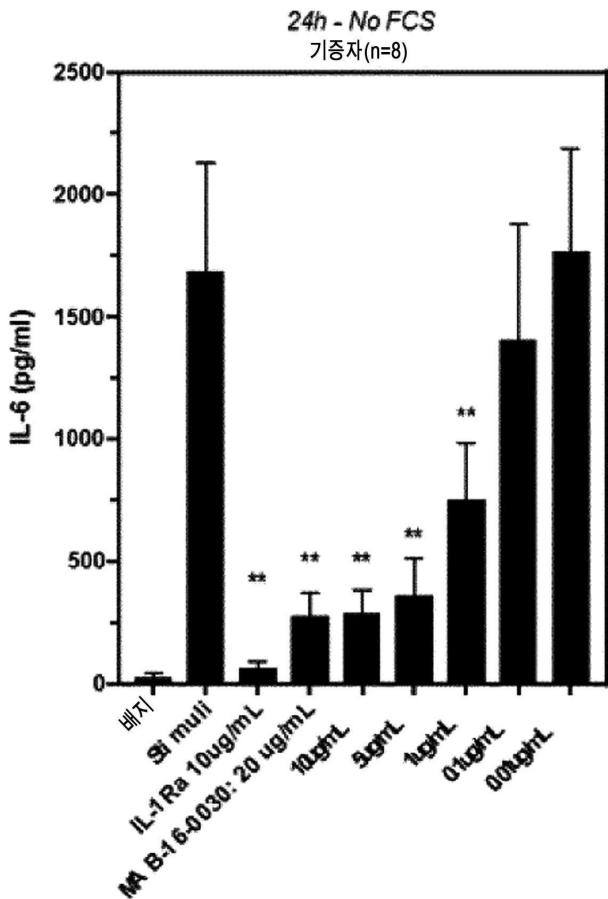


도면14b



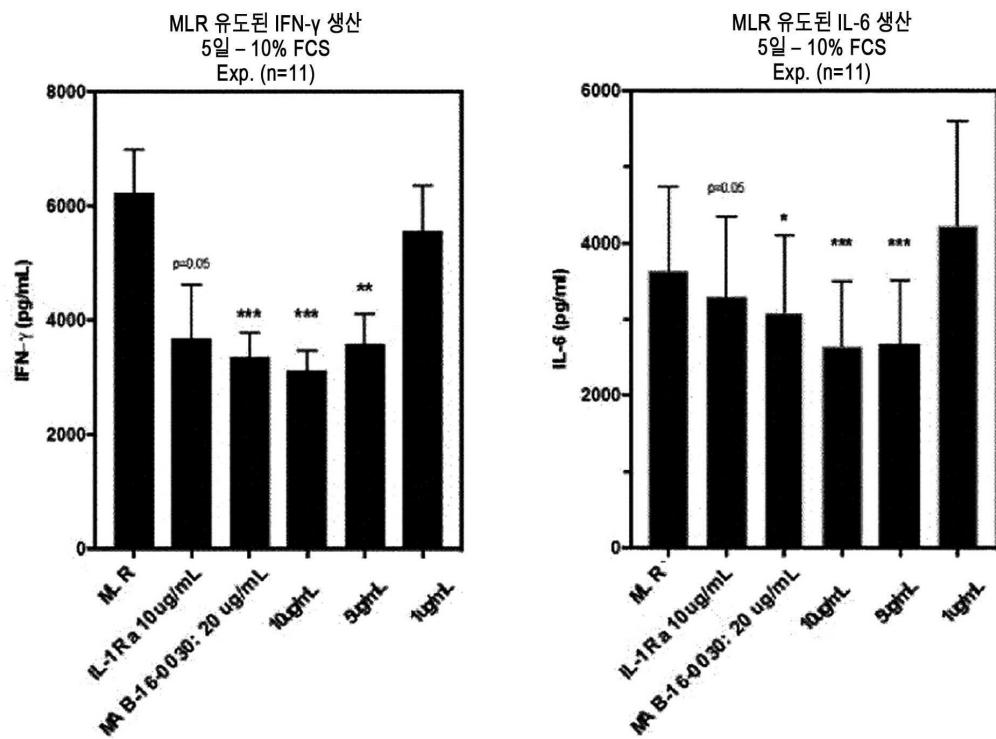
도면15

도 15: 칸디다 알비칸스로 활성화된 전혈에서 면역 세포의 기능적 차단

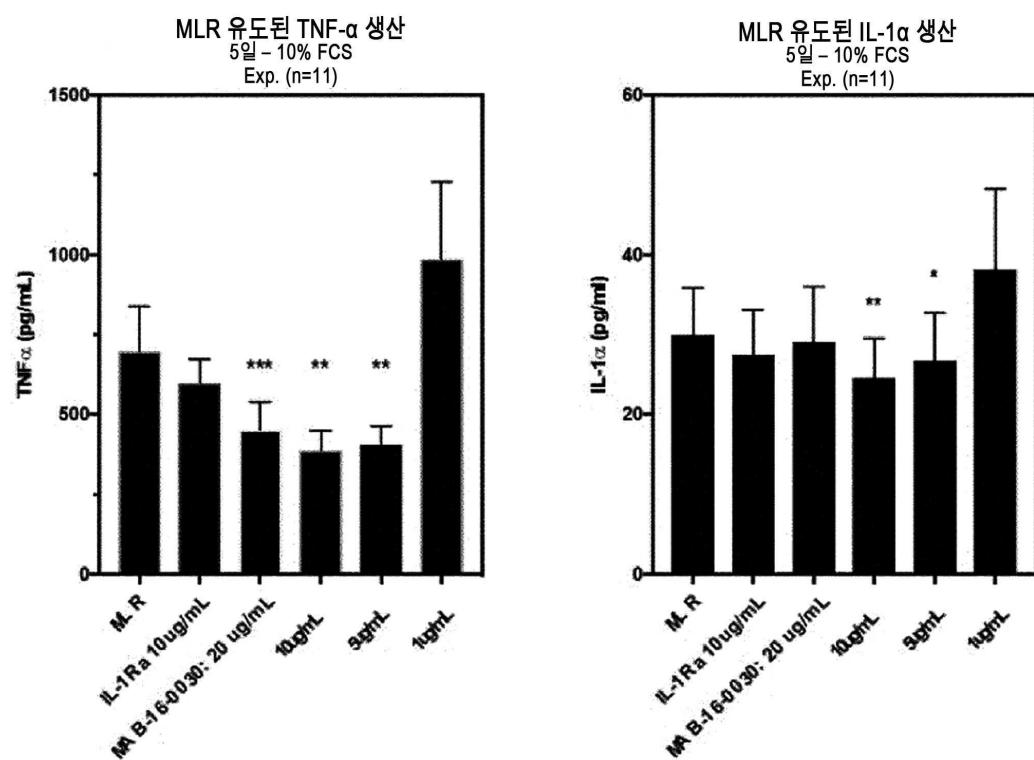


도면16a

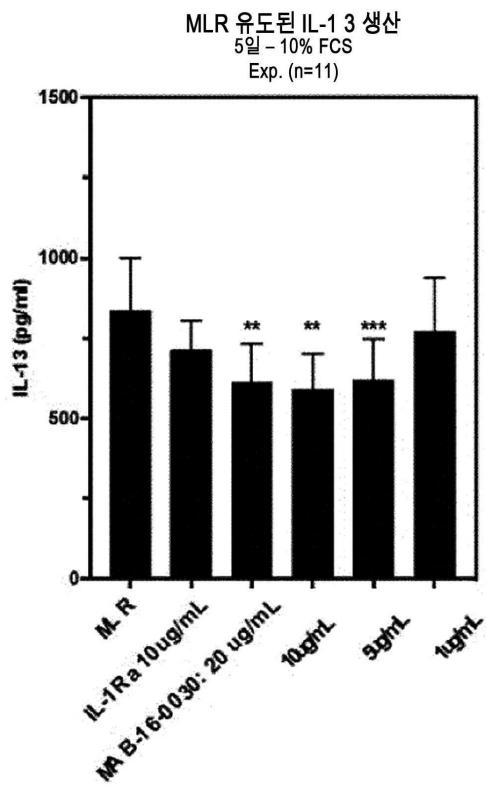
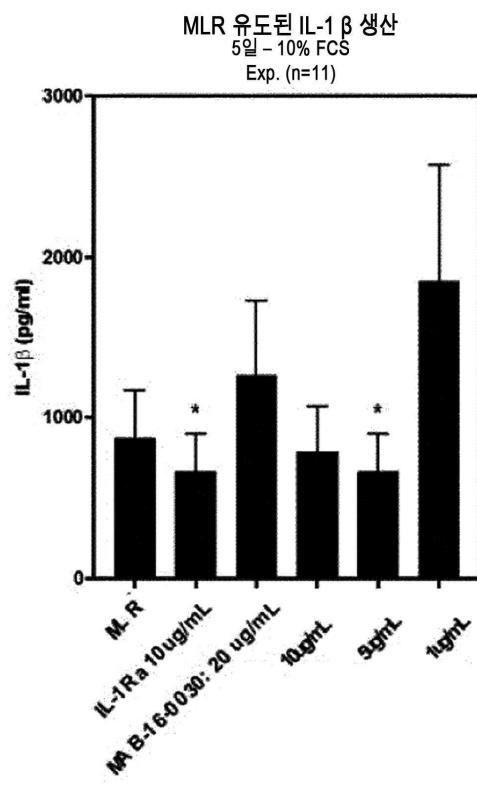
도 16: 혼합 림프구 반응 (MLR)에서의 사이토kin 방출의 차단



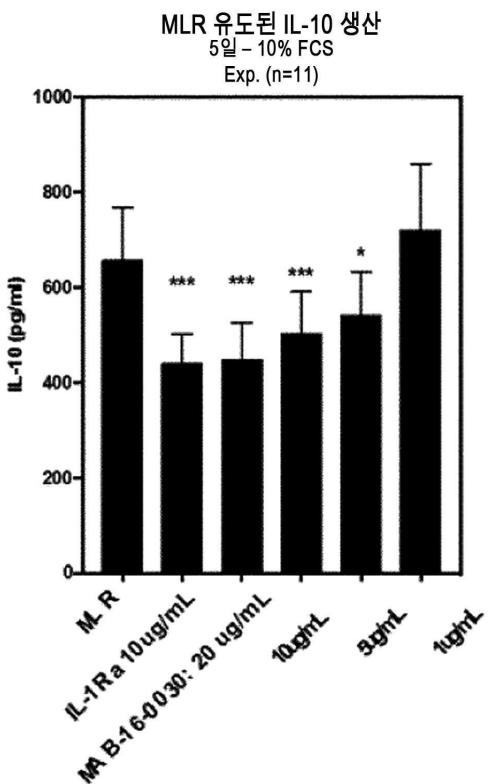
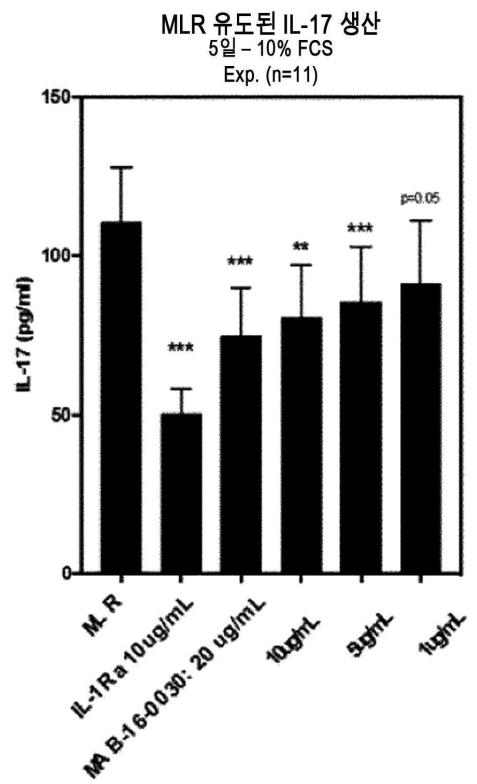
도면16b



도면 16c



도면 16d



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MAB DISCOVERY GMBH

<120> HUMANIZED ANTI-IL-1R3 ANTIBODIES

<130> IPA181329-DE

<150> EP16168617.5

<151> 2016-05-06

<160> 175

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 1

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Val Ser Cys Ile Tyr Thr Gly Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg Asp Pro Gly Tyr Ser Ser Trp Leu Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 2

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Cys Ala Arg Val Asp Ala Ser Ser Ser Gly Ser Trp Asp Leu Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 3

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

85 90 95
 Arg Gly Gly Pro Gly Tyr Ser Thr Asn Thr His Tyr Ala Phe Asp Pro
 100 105 110

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

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 4

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

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

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

Ala Val Ile Ser Ser Asp Gly Phe Phe Tyr Asp Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

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

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

Arg Asp Arg Gly Thr Ser Thr Gly Ser Leu Asp Leu Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ile Ile Ser Gly Ser Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 6

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu

35 40 45

Val Ser Cys Ile Tyr Thr Ser Thr Gly Asn Thr Trp Tyr Ala Ser Trp

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 7

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Val Ser Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Val Thr Tyr Tyr Ala Ser

50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Cys Ala Ser Glu Thr Asp Gly Asn Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 8

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 8

Glu Val Gln Leu Glu Gln 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 Ser Leu Ser Thr Ser

20 25 30

Tyr Trp Arg Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

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

50 55 60

Trp Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 9

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 9

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Asp Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Val Ser Cys Ile Phe Ile Gly Tyr Gly Asp Val Thr Trp Tyr Ala Ser
 50 55 60
 Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Phe Cys Ala Arg Ala Leu Gly Ser Ser Gly Tyr Arg Val Asn Leu Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 10
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> humanized antibody

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95

Arg Asp Pro Gln Tyr Phe Ile Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 11

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Thr Ile Tyr Ile Gly Gly Thr Thr Ala Tyr Ala Ser Trp Pro Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Leu Gln Gly Ala Asn Tyr Tyr Asn Ser Leu Ala Leu Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 12

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 12

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

 Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asp Leu Asn Tyr Pro Asp Thr Ser Asn Leu Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
<210> 13
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody
<400> 13
 Glu Val Gln Leu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Phe Gly
 20 25 30
 Tyr Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Val Ser Cys Ile Tyr Gly Asp Ser Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asn Trp
 50 55 60

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

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

85 90 95

Cys Ala Arg Tyr Pro Gly Gly Ser Tyr Tyr Asn Leu Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 14

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Val Ser Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser

50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Cys Ala Arg Val Asp Gly Ser Ser Gly Ser Trp Asp Leu Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 15

<211> 122

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 15

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Ser Phe Ser Ser Ser

20 25 30

Asp Phe Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Val Ser Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Val Ser Ile Tyr Tyr Ala Thr

50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 16

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 16

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Ile

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

<210> 17
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody
<400> 17

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

50 55 60
 Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asn Ser Asn Asp Trp Met Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 18
<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 18

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser

20 25 30

Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Val Ala Cys Ile Tyr Thr Gly Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp

50 55 60

Glu Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210

> 19

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 19

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50	55	60
Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Asn Ser Lys Asn Thr		
65	70	75
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
85	90	95
Phe Cys Ala Arg Val Asp Ala Ser Ser Ser Gly Ser Trp Asp Leu Trp		
100	105	110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115	120	

<210> 20

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 20

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

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

115 120

<210> 21

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Asp Arg Gly Thr Ser Thr Gly Ser Leu Asp Leu Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 22

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Ile Ile Ser Gly Ser Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

His Tyr Ala Ala Val Ala Gly Tyr Gly Tyr Ala Ser Arg Leu Asp Leu

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 23

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu

35 40 45

Val Ala Cys Ile Tyr Thr Ser Thr Gly Asn Thr Trp Tyr Ala Ser Trp

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115	120	
<210> 24		
<211> 119		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> humanized antibody		
<400> 24		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Ser		
20	25	30
Tyr Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
35	40	45
Val Ala Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Val Thr Tyr Tyr Ala Ser		
50	55	60
Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Asp Thr Ser Ser Thr Thr Leu		
65	70	75
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe		
85	90	95
Cys Ala Ser Glu Thr Asp Gly Asn Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 25		
<211> 120		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> humanized antibody		
<400> 25		
Glu Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		

1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu
Ser	Cys	Ala	Ala
Gly	Phe	Ser	Leu
Thr	Ser		
20	25	30	
Tyr	Trp	Arg	Cys
Trp	Val	Arg	Gln
Ala	Pro	Gly	Lys
Gly	Leu	Glu	Trp
35	40	45	
Val	Ala	Cys	Ile
Tyr	Ala	Gly	Ser
Gly	Asp	Val	Thr
Thr	Tyr	Tyr	Ala
			Asn
50	55	60	
Trp	Val	Asn	Gly
Arg	Phe	Thr	Ile
Ser	Asp	Asn	Ser
Lys	Ser	Thr	
65	70	75	80
Leu	Tyr	Leu	Gln
Met	Asn	Ser	Leu
Arg	Ala	Glu	Asp
Thr	Ala	Val	Tyr
85	90	95	
Tyr	Cys	Ala	Ser
Gly	Val	Gly	Phe
Gly	Tyr	Phe	Asn
Leu	Trp	Gly	Gln
Gly	Thr	Leu	Val
Thr	Val	Thr	Val
Ser	Ser		
100	105	110	
115	120		

<210> 26

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Asn Ser Lys Asn Thr

65 70 75 80

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

85	90	95
Phe Cys Ala Arg Ala Leu Gly Ser Ser Gly Tyr Arg Val Asn Leu Trp		
100	105	110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115	120	

<210> 27

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 27

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

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

<210> 28

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 28

Glu Val Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Gln Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Tyr Ile Gly Gly Thr Thr Ala Tyr Ala Ser Trp Pro Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95
 Arg Leu Gln Gly Ala Asn Tyr Tyr Asn Ser Leu Ala Leu Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 29

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 29

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

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

<210> 30

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 30

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Phe Gly

20 25 30

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

35 40 45

Val Ala Cys Ile Tyr Gly Asp Ser Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asn Trp

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg Tyr Pro Gly Gly Ser Tyr Tyr Asn Leu Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 31

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 31

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Val Ala Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Val Asp Gly Ser Ser Gly Ser Trp Asp Leu Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 32

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 32

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Ser Phe Ser Ser Ser

20 25 30

Asp Phe Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Val Ala Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Val Ser Ile Tyr Tyr Ala Thr

50	55	60
Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Ser Thr Thr Leu		
65	70	75
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe		80
	85	90
Cys Ala Arg Ser Thr Gly Ser Val Gly Arg Gly Phe Asn Leu Trp Gly		95
	100	105
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		110
	115	120

<210> 33
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 33

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

50	55	60
Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Thr		
65	70	75
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr		80
	85	90
Phe Cys Ala Arg Phe Arg Asp Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu Trp Gly		95
	100	105
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		110
	115	120

<210> 34

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Val Gly Cys Ile Tyr Thr Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg Asn Ser Asn Asp Trp Met Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 35

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 35

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Trp Trp Val Ile Glu His		
85	90	95
Asn Gly Ala Ala Phe Gly Gly Thr Lys Val Val Ile Lys		
100	105	110
<210> 36		
<211> 110		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		

<220><223> humanized antibody

<400> 36		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Asn		
20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Ala Ala Ser Leu Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Ser Tyr Ser Thr Gly		
85	90	95
Pro Asp Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Val Ile Lys		
100	105	110
<210> 37		
<211> 110		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		

<220><223> humanized antibody

<400> 37

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Thr Thr Tyr Asn

85 90 95

Val Asp Asn Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Val Ile Lys

100 105 110

<210> 38

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Ile Gly Gly Ala Phe Gly Gly Thr Lys Val Val Ile Lys

100 105 110

<210> 39

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 39

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Ser Tyr Ser Asn

85 90 95

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

100 105 110

<210> 40

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 40

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

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asn			
20	25	30	

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

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

<210> 41
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> humanized antibody
<400> 41

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

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

85	90	95
----	----	----

Asp Ile His Ala Phe Gly Gly Thr Lys Val Val Ile Lys

100	105	110
-----	-----	-----

<210> 42

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 42

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Val Tyr Thr His Ile Ser

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

<210> 43

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 43

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

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

<210> 44

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 44

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

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

<210> 45

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 45

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Val Ile Lys

100 105

<210> 46

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Asn Ser Asp Ser

85 90 95

Asp Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Val Ile Lys

100 105

<210> 47

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 47

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Glu Asp Asn

85 90 95

Ile Asp Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Val Ile Lys

100 105 110

<210> 48

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 48

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Leu Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Ala Val Tyr Ser Gly Asn

85 90 95

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

100 105 110

<210> 49

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 49

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn His Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Glu Phe Ser Cys

85	90	95
----	----	----

Val Ser Ala Asp Cys Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Val Ile
 100 105 110
 Lys

<210> 50

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 50

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

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

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

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Thr Tyr Tyr Asp Asn Asn

85	90	95
----	----	----

Tyr Gly Gly Ala Phe Gly Gly Thr Lys Val Val Ile Lys

100	105	110
-----	-----	-----

<210> 51

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 51

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

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

<210> 52
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> humanized antibody
<400> 52
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile

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

85 90 95

Asn Gly Ala Ala Phe Gly Gly Thr Lys Val Val Ile Lys

100 105 110

<210> 53

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 53

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Leu Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Ser Tyr Ser Thr Gly

85 90 95

Pro Asp Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Val Ile Lys

100 105 110

<210> 54

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 54

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Thr Thr Tyr Asn

85 90 95

Val Asp Asn Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Val Ile Lys

100 105 110

<210> 55

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 55

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Ile Gly Gly Ala Phe Gly Gly Thr Lys Val Val Ile Lys

100 105 110

<210> 56

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 56

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Ser Tyr Ser Asn

85 90 95

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

100 105 110

<210> 57

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 57

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
		80

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

<210> 58
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> humanized antibody
<400> 58

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

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

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

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

<210> 59
<211> 110
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 59

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Val Tyr Thr His Ile Ser

85 90 95

Ala Asp Asn Ala Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 60

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 60

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Tyr Ser Gly Gly			
85	90	95	

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

<210> 61

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 61

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Asp Gly Asn

20 25 30

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

35 40 45

Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Ser Tyr Tyr Ser

85 90 95

Ser Ser Trp Tyr Asn Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Val Ile Lys

100 105 110

<210> 62

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 62

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

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

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

<210> 63

<

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 63

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

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

100 105

<210> 64

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 64

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Thr Glu Asp Asn

85 90 95

Ile Asp Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Val Ile Lys

100 105 110

<210> 65

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 65

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Leu Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Ala Val Tyr Ser Gly Asn

85 90 95

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

100 105 110

<210> 66

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 66

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn His Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Glu Phe Ser Cys

85 90 95

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

100 105 110

Lys

<210> 67

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 67

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Thr Tyr Tyr Asp Asn Asn

85 90 95

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

100 105 110

<210> 68

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 68

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50	55	60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln		
65	70	75
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Ser Trp Tyr Tyr Ser Gly		

85	90	95
Ser Gly Ser Tyr His Ser Trp Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Val		
100	105	110
Ile Lys		

<210> 69
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> humanized antibody

<400> 69
Ser Ser Tyr Trp Ile Cys

1	5	5
<210> 70		
<211> 6		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> humanized antibody		
<400> 70		
Ser Ser His Tyr Met Cys		

1	5	5
<210> 71		
<211> 5		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> humanized antibody		
<400> 71		
Ser Tyr Ala Met Gly		

1	5	5
---	---	---

<210> 72

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 72

Asn Tyr Ala Met Gly

1 5

<210> 73

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 73

Ser Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 74

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 74

Ser Asn Tyr Trp Ile Cys

1 5

<210> 75

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 75

Ser Ser Tyr Tyr Met Cys

1 5

<210> 76

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 76

Thr Ser Tyr Trp Arg Cys

1 5

<210> 77

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 77

Ser Tyr Tyr Tyr Met Cys

1 5

<210> 78

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 78

Ser Tyr Trp Met Ser

1 5

<210> 79

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 79

Ser Tyr Asp Met Ser

1 5

<210> 80

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 80

Ser Asn Tyr Tyr Met Cys

1 5

<210> 81

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 81

Phe Gly Tyr Tyr Met Cys

1 5

<210> 82

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 82

Ser Thr Tyr Tyr Met Cys

1 5

<210> 83

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 83

Ser Ser Asp Phe Met Cys

1 5

<210> 84

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 84

Ser Ile Tyr Tyr Met Cys

1 5

<210> 85

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 85

Ser Gly Tyr Asp Met Cys

1 5

<210> 86

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 86

Cys Ile Tyr Thr Gly Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Glu Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 87

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 87

Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 88

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 88

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

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 89

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 89

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

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 90

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 90

Ile Ile Ser Gly Ser Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 91

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 91

Cys Ile Tyr Thr Ser Thr Gly Asn Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly

<210> 92

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 92

Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Val Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 93

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 93

Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Gly Asp Val Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Val

1 5 10 15

Asn Gly

<210> 94

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 94

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 95

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 95

Met Ile Tyr Gly Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 96

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 96

Thr Ile Tyr Ile Gly Gly Thr Thr Ala Tyr Ala Ser Trp Pro Lys Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 97

<211

> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 97

Cys Ile Tyr Thr Asn Ser Gly Asn Thr Trp Ser Ala Ser Trp Ala Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly

<210> 98

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 98

Cys Ile Tyr Gly Asp Ser Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asn Trp Ala Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly

<210> 99

<211

> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 99

Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 100

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 100

Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Val Ser Ile Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 101

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 101

Cys Ile Tyr Thr Gly Asn Ser Asp Phe Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 102

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 102

Cys Ile Tyr Thr Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly

<210> 103

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 103

Asp Pro Gly Tyr Ser Ser Trp Leu

1	5		
---	---	--	--

<210> 104

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 104

Val Asp Ala Ser Ser Ser Gly Ser Trp Asp Leu

1	5	10	
---	---	----	--

<210> 105

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 105

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

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 106

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 106

Asp Arg Gly Thr Ser Thr Gly Ser Leu Asp Leu

1 5 10

<210> 107

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 107

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

1 5 10 15

Leu

<210> 108

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 108

Asp Leu Leu Val Val Thr Ser Phe Asn Leu

1 5 10

<210> 109

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 109

Glu Thr Asp Gly Asn Tyr Phe Asn Leu

1 5

<210> 110

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 110

Gly Val Gly Phe Gly Tyr Phe Asn Leu

1 5

<210> 111

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 111

Ala Leu Gly Ser Ser Gly Tyr Arg Val Asn Leu

1 5 10

<210> 112

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 112

Asp Pro Gln Tyr Phe Ile Leu

1 5

<210> 113

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 113

Leu Gln Gly Ala Asn Tyr Tyr Asn Ser Leu Ala Leu

1 5 10

<210> 114

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 114

Asp Leu Asn Tyr Pro Asp Thr Ser Asn Leu

1 5 10

<210> 115

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 115

Tyr Pro Gly Gly Ser Tyr Tyr Asn Leu

1 5

<210> 116

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 116

Val Asp Gly Ser Ser Ser Gly Ser Trp Asp Leu

1 5 10

<210> 117

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 117

Ser Thr Gly Ser Val Gly Arg Gly Phe Asn Leu

1 5 10

<210> 118

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 118

Phe Arg Asp Asp Tyr Ala Ser Leu Lys Leu

1 5 10

<210> 119

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 119

Asn Ser Asn Asp Trp Met Tyr Phe Asn Leu

1 5 10

<210> 120

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 120

Gln Ala Ser Glu Ser Ile Ser Asn Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 121

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 121

Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 122

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 122

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Ile Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 123

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 123

Gln Ala Ser Glu Asn Ile Gly Asn Gly Leu Ala

1	5	10
---	---	----

<210> 124

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 124

Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Gly Ile Ser

1	5	10
---	---	----

<210> 125

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 125

Gln Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asn Leu Ala

1	5	10
---	---	----

<210> 126

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<

400> 126

Gln Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asn Leu Ala

1	5	10
---	---	----

<210> 127

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 127

Gln Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 128

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 128

Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 129

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 129

Gln Ser Ser Gln Ser Val Asp Gly Asn Asn Leu Leu Ser

1 5 10

<210> 130

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 130

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Ser Phe Leu Ser

1 5 10

<210> 131

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 131

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Tyr Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 132

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 132

Gln Ala Ser Gln Thr Ile Ser Ile Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 133

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 133

Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 134

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 134

Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Asn Ser Asn His Leu Ser

1 5 10

<210> 135

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 135

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 136

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 136

Gln Ala Ser Glu Ser Ile Ser Ala Asn Tyr Trp Ser

1 5 10

<210> 137

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 137

Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 138

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 138

Ala Ala Ser Leu Leu Ala Ser

1 5

<210> 139

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 139

Asp Ala Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 140

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 140

Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 141

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 141

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 142

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 142

Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 143

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 143

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 144

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 144

Asp Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 145

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 145

Asp Ala Ser Asp Leu Ala Ser

1 5

<210> 146

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 146

Asp Ala Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 147

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 147

Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser

1 5

<210> 148

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 148

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 149

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 149

Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 150

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 150

Ala Ala Ser Leu Leu Ala Ser

1 5

<210> 151

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 151

Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 152

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 152

Gly Ala Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 153

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 153

Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 154

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 154

Gln Asn Trp Trp Val Ile Glu His Asn Gly Ala Ala

1 5 10

<210> 155

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 155

Gln Ser Ala Ser Tyr Ser Thr Gly Pro Asp Trp Thr

1 5 10

<210> 156

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 156

Gln Gln Gly Ala Thr Thr Tyr Asn Val Asp Asn Val

1 5 10

<210> 157

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 157

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

1 5 10

<210> 158

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 158

Leu Gly Gly Tyr Ser Tyr Ser Asn Thr Gly Pro Thr

1 5 10

<210> 159

<211> 15

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 159

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

1 5 10 15

<210> 160

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 160

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

1 5 10

<210> 161

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 161

Leu Gly Val Tyr Thr His Ile Ser Ala Asp Asn Ala

1 5 10

<210> 162

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 162

Gln Gln Gly Tyr Tyr Ser Gly Gly Thr Asp Asn Asp Val

1 5 10

<210> 163

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 163

Gln Gly Ser Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Tyr Asn Val

1 5 10

<210> 164

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 164

Gln Cys Asn Tyr Ile Ile Asp Tyr Gly Ala

1 5 10

<210> 165

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 165

Gln Ser Tyr Tyr Asn Ser Asp Ser Asp Ala

1 5 10

<210> 166

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 166

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

1 5 10

<210> 167

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 167

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

1 5 10

<210> 168

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 168

Gln Gly Glu Phe Ser Cys Val Ser Ala Asp Cys Ile Ala

1 5 10

<210> 169

<211> 12

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 169

Gln Cys Thr Tyr Tyr Asp Asn Asn Tyr Gly Gly Ala

1 5 10

<210> 170

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400> 170

Gln Ser Trp Tyr Tyr Ser Gly Ser Gly Ser Tyr His Ser Trp Ala

1 5 10 15

<210> 171

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 171

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 172

<211> 329

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 172

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

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

195

200

205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210

215

220

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

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245

250

255

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

260

265

270

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

275

280

285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290

295

300

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

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

325

<210> 173

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized antibody

<400>

> 173

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

1 5 10 15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Gly Pro Gly Tyr Ser Thr Asn Thr His Tyr Ala Phe Asp Pro
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
<210> 174
<211> 108

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Humanized antibody
<400> 174
Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Ser Phe
20 25 30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Asn Tyr Ile Ile Asp Tyr
85 90 95
Gly Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Val Ile Lys
100 105
<210> 175
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized antibody

<400> 175

Gln Ser Asn Tyr Ile Ile Asp Tyr Gly Ala

1

5

10