



- (73) 특허권자
젠자임 코포레이션
 미국 메사추세츠주 02142 캠프리지 50 비니 스트리트
- (72) 발명자
팬, 클라크
 미국 01776 메사추세츠주 서드버리 더튼 로드 353
추, 화웨이
 미국 01581 메사추세츠주 웨스트보로 프라임로드
 레인 5
- (74) 대리인
양영준, 김영

심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭: 변경된 당화 및 감소된 효과기 기능을 갖는 FC 함유 폴리펩티드

변형된 당화 프로파일 및 감소된 효과기 기능을 갖는 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항체) 및 의 약물 컨쥬게이트가 본 발명에서 제공된다. 특정 구현예에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 298에서 아스파라긴 잔기, 및 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 300에서 세린 또는 트레오닌 잔기를 포함한다. 또한, 항원-결합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산, 상기 항원-결합 폴리펩티드를 제조하기 위한 재조합 발현 벡터 및 숙주 세포가 제공된다. 질병을 치료하기 위해 본원에 개시된 항원-결합 폴리펩티드를 이용하는 방법이 또한 제공된다.

- 1 -

(52) CPC특허분류

A61K 49/0004 (2013.01)
C07K 16/2809 (2013.01)
C07K 16/2893 (2013.01)
C07K 16/32 (2013.01)
C07K 2317/41 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/71 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

Fc 도메인을 포함하는 분리된 결합 폴리펩티드로서, Fc 도메인은

EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 298에서 아스파라긴 잔기; 및

EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 300에서 세린 또는 트레오닌 잔기

를 포함하는 것이며, 상기 결합 폴리펩티드는 자연 Fc 도메인을 갖는 결합 폴리펩티드보다 Fc γ 수용체에 대해 낮은 친화성을 갖고, FcRn 수용체에 대해 자연 Fc 도메인을 갖는 결합 폴리펩티드와 유사한 친화성을 갖는 것인, 분리된 결합 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 299에서 알라닌 잔기 또는 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 297에서 글루타민 잔기를 추가로 포함하며,

여기서 Fc 도메인이 IgG1 Fc 도메인이거나;

여기서 Fc 도메인이 인간 Fc 도메인인 결합 폴리펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서, 아스파라긴 잔기의 측쇄가 β -글리코실아미드 결합을 통해 글리칸에 연결된 것이거나; 또는 상기 Fc γ 수용체가 Fc γ RI 및/또는 Fc γ RIIIa인 결합 폴리펩티드.

청구항 4

제3항에 있어서, 글리칸이 바이안테나리(biantennary) 글리칸 또는 자연 발생 포유동물 당형(glycoform)이거나;

글리칸이 반응성 알데하이드기, 또는 반응성 알데하이드기를 포함하는 산화된 당류 잔기를 포함하거나; 또는

글리칸이, 임의로 세포독소 또는 검출 작용제이거나 임의로 pH-민감성 링커, 디설파이드 링커, 효소-민감성 링커 또는 다른 분해성 링커 모이어티를 포함하는 효과기 모이어티에 연결된 것인 결합 폴리펩티드.

청구항 5

제4항에 있어서, 산화된 당류 잔기가 말단 시알산 또는 갈락토스인 결합 폴리펩티드.

청구항 6

제1항에 있어서, 항체인 결합 폴리펩티드.

청구항 7

Fc 도메인을 포함하는 분리된 결합 폴리펩티드로서, Fc 도메인은

EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 298에서 자유 아스파라긴 잔기; 및

EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 300에서 자유 세린 또는 트레오닌 잔기

를 포함하는 것이며,

상기 결합 폴리펩티드는 자연 Fc 도메인을 갖는 결합 폴리펩티드보다 Fc γ 수용체에 대해 낮은 친화성을 갖고, FcRn 수용체에 대해 자연 Fc 도메인을 갖는 결합 폴리펩티드와 유사한 친화성을 갖는 것인,

분리된 결합 폴리펩티드.

청구항 8

Fc 도메인을 포함하는 분리된 결합 폴리펩티드로서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 298에서 아스파라긴 잔기에 연결된 N-글리칸; 및 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 300에서 자유 세린 또는 트레오닌 잔기를 포함하는 것이며, 상기 결합 폴리펩티드는 자연 Fc 도메인을 갖는 결합 폴리펩티드보다 Fc γ 수용체에 대해 낮은 친화성을 갖고, FcRn 수용체에 대해 자연 Fc 도메인을 갖는 결합 폴리펩티드와 유사한 친화성을 갖는 것인, 분리된 결합 폴리펩티드.

청구항 9

제8항에 있어서, 효과기 모이어티가 아스파라긴 잔기의 측쇄를 통해 N-글리칸의 당류 잔기에 연결되며, 여기서 임의로 당류 잔기는 말단 시알산 또는 갈락토스 잔기인 결합 폴리펩티드.

청구항 10

제9항에 있어서, 항체이며, 여기서 N-글리칸은 약물 효과기 모이어티에 연결되어 항체 약물 컨쥬게이트(ADC)를 형성하는 것인 결합 폴리펩티드.

청구항 11

제1항의 결합 폴리펩티드 및 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는, 암의 치료에서 사용하기 위한 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 임의로 수용체 또는 수용체의 리간드인 비-항체 결합 영역을 포함하는 면역부착소(immunoadhesin)이거나, 또는 수용체의 리간드 결합 부위인 적어도 하나의 결합 부위 또는 리간드의 수용체 결합 부위인 적어도 하나의 결합 부위를 포함하는 결합 폴리펩티드.

청구항 13

제1항에 있어서, 수용체의 리간드 결합 부위인 적어도 하나의 결합 부위 또는 리간드의 수용체 결합 부위인 적어도 하나의 결합 부위를 포함하는 결합 폴리펩티드.

청구항 14

제8항에 있어서, 항체이거나, 또는 임의로 수용체 또는 수용체의 리간드인 비-항체 결합 영역을 포함하는 면역부착소이거나, 또는 수용체의 리간드 결합 부위인 적어도 하나의 결합 부위 또는 리간드의 수용체 결합 부위인 적어도 하나의 결합 부위를 포함하는 결합 폴리펩티드.

청구항 15

인간 IgG1 Fc 도메인을 포함하는 분리된 결합 폴리펩티드로서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 297에서 아스파라긴 잔기; EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 298에서 당화된 아스파라긴 잔기; EU 넘버링에 따른 위치 299에서 프롤린이 아닌 아미노산; 및 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 300에서 세린 또는 트레오닌 잔기를 포함하는 것이며,

상기 결합 폴리펩티드는 자연 Fc 도메인을 갖는 결합 폴리펩티드보다 Fc γ 수용체에 대해 낮은 친화성을 갖고, FcRn 수용체에 대해 자연 Fc 도메인을 갖는 결합 폴리펩티드와 유사한 친화성을 갖는 것인, 분리된 결합 폴리펩티드.

청구항 16

인간 IgG1 Fc 도메인을 포함하는 분리된 결합 폴리펩티드로서, Fc 도메인은

EU numbering에 따른 아미노산 위치 297에서 글루타민 잔기;

EU numbering에 따른 아미노산 위치 298에서 당화된 아스파라긴 잔기;

EU numbering에 따른 위치 299에서 프롤린이 아닌 아미노산; 및

EU numbering에 따른 아미노산 위치 300에서 세린 또는 트레오닌 잔기

를 포함하는 것이며,

상기 결합 폴리펩티드는 자연 Fc 도메인을 갖는 결합 폴리펩티드보다 Fc γ 수용체에 대해 낮은 친화성을 갖고, FcRn 수용체에 대해 자연 Fc 도메인을 갖는 결합 폴리펩티드와 유사한 친화성을 갖는 것인,

분리된 결합 폴리펩티드.

청구항 17

인간 IgG1 Fc 도메인을 포함하는 분리된 결합 폴리펩티드로서, Fc 도메인은

EU numbering에 따른 아미노산 위치 297에서 아스파라긴 잔기;

EU numbering에 따른 아미노산 위치 298에서 당화된 아스파라긴 잔기;

EU numbering에 따른 아미노산 위치 299에서 알라닌 잔기; 및

EU numbering에 따른 아미노산 위치 300에서 세린 또는 트레오닌 잔기

를 포함하는 것이며,

상기 결합 폴리펩티드는 자연 Fc 도메인을 갖는 결합 폴리펩티드보다 Fc γ 수용체에 대해 낮은 친화성을 갖고, FcRn 수용체에 대해 자연 Fc 도메인을 갖는 결합 폴리펩티드와 유사한 친화성을 갖는 것인,

분리된 결합 폴리펩티드.

청구항 18

인간 IgG4 Fc 도메인을 포함하는 분리된 결합 폴리펩티드로서, Fc 도메인은

EU numbering에 따른 아미노산 위치 298에서 당화된 아스파라긴 잔기;

EU numbering에 따른 아미노산 위치 299에서 알라닌 잔기; 및

EU numbering에 따른 아미노산 위치 300에서 세린 또는 트레오닌 잔기

를 포함하는 것이며,

상기 결합 폴리펩티드는 자연 Fc 도메인을 갖는 결합 폴리펩티드보다 Fc γ 수용체에 대해 낮은 친화성을 갖고, FcRn 수용체에 대해 자연 Fc 도메인을 갖는 결합 폴리펩티드와 유사한 친화성을 갖는 것인,

분리된 결합 폴리펩티드.

청구항 19

제18항에 있어서, Fc 도메인이 Ser228Pro 돌연변이(EU numbering)를 갖는 힌지 영역을 포함하는 것인 분리된 결합 폴리펩티드.

청구항 20

제11항에 있어서, 치료를 필요로 하는 암 환자를 치료하기 위해 사용되는 조성물.

청구항 21

제1항의 결합 폴리펩티드를 인코딩하는 분리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 22

제21항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 23

제21항의 폴리뉴클레오티드 또는 제22항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 24

제21항의 폴리뉴클레오티드 또는 제22항의 벡터를 세포에서 발현시키는 것을 포함하는, 결합 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2012년 9월 12일에 출원된 "Anti-Alpha Beta TCR Antibodies"을 제목으로 하는 국제 출원 번호 PCT/EP2012/003819호, 및 2013년 3월 11일에 출원된 "Fc Containing Polypeptides With Altered Glycosylation and Reduced Effector Function"을 제목으로 하는 미국 가출원 61/776,715호에 대한 우선권을 주장한다.

[0002] 본 출원은 또한 2013년 3월 11일에 출원된 "Site-Specific Antibody Drug Conjugation Through Glycoengineering"을 제목으로 하는 미국 가출원 61/776,724호, 및 2013년 3월 11일에 출원된 "Hyperglycosylated Binding Polypeptides"를 제목으로 하는 미국 가출원 61/776,710호에 관한 것이다. 상기 언급된 출원의 내용은 그 전체내용이 참조로서 본원에 포함된다.

배경 기술

[0003] 감소되거나 파기된 Fc 당화를 갖는 항체는 원치않는 효과기 기능과 관련된 부작용 또는 독성을 감소시키기 위해 염증성 및 자가면역 질병 또는 장애의 치료에서 사용되어 왔다(예를 들어, 문헌[Chan and Carter, Nat. Reviews Immunology, 2010] 참조). 그러나, 항체 Fc 도메인 당화는 항체 구조, 안정성 및 기능에 중요하며, 비당화(aglycosylation)는 불량한 생물리학적 특성을 갖는 항체를 발생시킬 수 있다. 따라서, 감소된 효과기 기능을 갖지만, 당화된 Fc 도메인의 요망되는 특성을 또한 보유하는 조작된 결합 단백질이 당 분야에 필요하다.

발명의 내용

[0004] 개요

[0005] 본 발명의 개시는 변경된 당화 및 감소된 효과기 기능을 갖는 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항체 또는 융합체), 및 임의로 이의 약물 컨쥬게이트를 제공함으로써 종래 기술을 개선시킨다. 예시적 구현예에서, Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 298에서 아스파라긴 잔기, 및 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 300에서 세린 또는 트레오닌 잔기를 포함한다. 본 발명의 개시는 또한 항원-결합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산, 상기 항원-결합 폴리펩티드를 제조하기 위한 제조용 발현 벡터 및 숙주 세포를 제공한다. 질병을 치료하기 위해 본원에 개시된 항원-결합 폴리펩티드를 이용하는 방법이 또한 제공된다.

[0006] 본 발명자는 놀랍게도 본 발명의 개시의 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항체)가 변경된 당화 프로파일을 나타내며, 이러한 변경된 당화 프로파일은 이들이 Fc γ 수용체로의 결합 폴리펩티드의 결합을 파기시킴으로써, 당화에 의해 제공되는 요망되는 생물리적 특성을 보유하면서 결합 폴리펩티드의 효과기 기능을 변경시키는데 있어서 유리한 것을 발견하였다. 더욱이, 아미노산 위치 298에서의 조작된 N-결합된 당화 부위는 또한 효과기 모이어티, 예를 들어, 세포독성 약물의 컨쥬게이션을 위한 부위로 사용될 수 있다.

[0007] 따라서, 한 양태에서, 본 발명은 변경된 당화를 갖는 Fc 도메인을 포함하는 분리된 결합 폴리펩티드를 제공하고, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 298에서 아스파라긴 잔기, 및 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 300에서 세린 또는 트레오닌 잔기를 포함하며, 상기 결합 폴리펩티드는 상기 변경된 당화로 인해 감소된 효과기 기능을 나타낸다. 한 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 299에서 알라닌 잔기를 추가로 포함한다. 또 다른 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 297에서 글루타민 잔기를 추가로 포함한다. 한 구현예에서, Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인이다. 또 다른 구현예에서, Fc 도메인은 인간 Fc 도메인이다.

[0008] 한 구현예에서, 아스파라긴 잔기의 측쇄는 β -글리코실아미드 결합을 통해 글리칸에 연결된다. 또 다른 구현예에서, 글리칸은 바이안테나리(biantennary) 글리칸이다. 또 다른 구현예에서, 글리칸은 자연 발생 포유동물 당형(glycoform)이다.

[0009] 또 다른 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 자연 Fc 도메인을 갖는 결합 폴리펩티드보다 Fc γ 수용체에 대해 더 낮은 친화성을 갖는다. 한 구현예에서, Fc γ 수용체는 Fc γ RI 및/또는 Fc γ RIIIa이다. 또 다른 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 자연 Fc 도메인을 갖는 결합 폴리펩티드와 유사한 FcRn 수용체에 대한 친화성을 갖는다.

- [0010] 또 다른 구현예에서, 글리칸은 반응성 알데하이드기를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 글리칸은 반응성 알데하이드기를 포함하는 산화된 당류 잔기를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 산화된 당류 잔기는 말단 시알산 또는 갈락토스이다.
- [0011] 또 다른 구현예에서, 글리칸은 효과기 모이어티에 연결된다. 또 다른 구현예에서, 효과기 모이어티는 세포독소이다. 또 다른 구현예에서, 세포독소는 표 1에 나열된 세포독소의 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 구현예에서, 효과기 모이어티는 검출 작용제이다. 또 다른 구현예에서, 효과기 모이어티는 옥심 또는 하이드라존 결합을 통해 글리칸의 당류 잔기에 연결된다. 또 다른 구현예에서, 당류 잔기는 글리칸의 말단 시알산 또는 갈락토스 잔기이다. 또 다른 구현예에서, 효과기 모이어티는 pH-민감성 링커, 디설파이드 링커, 효소-민감성 링커 또는 다른 분해성 링커 모이어티를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 효과기 모이어티는 표 2 또는 14에 기재된 링커 모이어티의 그룹으로부터 선택된 링커 모이어티를 포함한다.
- [0012] 특정 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 항체 또는 면역부착소이다.
- [0013] 또 다른 양태에서, 본 발명은 Fc 도메인을 포함하는 분리된 결합 폴리펩티드를 제공하며, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 298에서 자유 아스파라긴 잔기, 및 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 300에서 자유 세린 또는 트레오닌 잔기를 포함한다.
- [0014] 또 다른 양태에서, 본 발명은 Fc 도메인을 포함하는 분리된 결합 폴리펩티드를 제공하며, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 298에서 변형된 아스파라긴 잔기, 및 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 300에서 자유 세린 또는 트레오닌 잔기를 포함한다.
- [0015] 또 다른 구현예에서, 효과기 모이어티는 변형된 아스파라긴 잔기의 측쇄를 통해 글리칸의 당류 잔기에 연결된다. 한 구현예에서, 당류는 글리칸의 말단 시알산 또는 갈락토스 잔기이다. 한 구현예에서, 효과기 모이어티는 옥심 또는 하이드라존 결합을 통해 글리칸의 당류 잔기에 연결된다. 한 구현예에서, 당류는 글리칸의 말단 시알산 또는 갈락토스 잔기이다. 또 다른 구현예에서, 변형된 아스파라긴 잔기는 약물 효과기 모이어티에 연결되어 항체 약물 컨쥬게이트(ADC)를 형성한다.
- [0016] 또 다른 양태에서, 조성물은 본 발명의 결합 폴리펩티드 및 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함한다.
- [0017] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유효량의 본 발명의 조성물을 투여하는 것을 포함하여 치료를 필요로 하는 환자를 치료하는 것을 제공한다.
- [0018] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 결합 폴리펩티드를 인코딩하는 분리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 또는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0019] 또 다른 양태에서, 본 발명은 세포에서 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 발현시키는 것을 포함하는 결합 폴리펩티드를 제조하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0020] **도 1**은 독소 모이어티가 옥심 결합을 이용하여 항체 글리칸의 산화된 시알산 잔기에 연결된 항체 약물 컨쥬게이트의 합성의 개략적 예시이다.
- 도 2**는 당화 돌연변이의 발현 및 정제를 나타내는 쿠마시-블루 염색된 젤이다.
- 도 3**은 재조합 인간 Fc γ RIIIa(V158 & F158)로의 $\alpha\beta$ TCR HEBE1 IgG 항체 돌연변이의 결합을 평가하기 위해 이용된 표면 플라즈몬 공명 실험의 결과를 도시한다.
- 도 4**는 재조합 인간 Fc γ RI으로의 $\alpha\beta$ TCR HEBE1 IgG 항체 돌연변이의 결합을 평가하기 위해 이용된 표면 플라즈몬 공명 실험의 결과를 도시한다.
- 도 5**는 돌연변이 항- $\alpha\beta$ TCR 항체의 존재하에서의 TNFa, GM-CSF, IFN γ 및 IL10에 대한 PBMC로부터의 사이토카인 방출 프로파일(2일)을 도시한다.
- 도 6**는 돌연변이 항- $\alpha\beta$ TCR 항체의 존재하에서의 IL6, IL4 및 IL2에 대한 PBMC로부터의 사이토카인 방출 프로파일(2일)을 도시한다.
- 도 7**는 돌연변이 항- $\alpha\beta$ TCR 항체의 존재하에서의 TNFa, GM-CSF, IFN γ 및 IL10에 대한 PBMC로부터의 사이토카인

방출 프로파일(4일)을 도시한다.

도 8은 돌연변이 항- $\alpha\beta$ TCR 항체의 존재하에서의 IL6, IL4 및 IL2에 대한 PBMC로부터의 사이토카인 방출 프로파일(4일)을 도시한다.

도 9는 웨스턴 블로팅 및 표면 플라즈몬 공명에 의한 2C3 돌연변이의 발현 수준을 연구하는 실험의 결과를 도시한다.

도 10은 PNGase F 처리 전 및 처리 후의 2C3 돌연변이의 당화를 연구하는 실험의 결과를 도시한다.

도 11은 세포 배양으로부터 분리된 2C3 돌연변이에 대한 당화 부위를 연구하는 SDS-PAGE 실험의 결과를 도시한다.

도 12는 제조합 인간 Fc γ RIIIa(V158)로의 변형된 항-CD52의 결합을 평가하기 위해 이용된 표면 플라즈몬 공명 실험의 결과를 도시한다. Fc 도메인 내에 S298N/Y300S 돌연변이를 포함하는 항-CD52가 변형된 분자의 효과기 기능, CD52 펩티드(A)에 대한 결합, Fc γ RIIIa(V158, B)에 대한 결합, 마우스 FcRn(C)에 대한 대조군 결합을 평가하기 위해 사용되었다.

도 13은 2C3 돌연변이의 Fc 결합 특성을 연구하는 표면 플라즈몬 공명 실험의 결과를 도시한다.

도 14는 Fc γ RIIIa(Val158)(상기와 같음) 및 Fc γ RIIIa(Phe158) 둘 모두로의 변형된 항-CD52의 결합을 연구하는 표면 플라즈몬 공명 실험의 결과를 도시한다. Fc 도메인 내에 S298N/Y300S 돌연변이를 포함하는 항-CD52 항체가 Fc γ RIIIa(Val158, 도 14A) 및 Fc γ RIIIa(Phe58, 도 14B)에 결합하는 변형된 분자의 효과기 기능을 평가하기 위해 사용되었다.

도 15는 S298N/Y300S 돌연변이 및 WT 2C3 대조군에서의 C1q 결합의 분석(A) 및 웰의 동등한 코팅을 입증하는 Eliza 분석의 결과를 도시한다.

도 16은 CD-52 펩티드 741로의 2C3 돌연변이의 결합 동역학을 측정하는 플라즈몬 공명 실험 실험의 결과를 도시한다.

도 17은 WT 항-CD-52 2C3 및 A114N 과당화 돌연변이의 항원 결합 친화성을 비교하는 플라즈몬 공명 실험 실험의 결과를 도시한다.

도 18은 2C3 돌연변이의 글리칸 함량을 결정하기 위한 등전 초점조절(isoelectric focusing) 및 질량분광법 전하 특성규명 실험의 결과를 도시한다.

도 19는 WT 항-CD-52 2C3 및 돌연변이의 항원 결합 친화성을 비교하는 농도(옥텟(Octet)) 및 플라즈몬 공명 실험의 결과를 도시한다.

도 20은 항-TME1 A114N 돌연변이의 글리칸 함량을 결정하기 위한 SDS-PAGE 실험의 결과를 도시한다.

도 21은 A114N 항-Her2 돌연변이의 SDS-PAGE 및 소수성 상호작용 크로마토그래피 분석의 결과를 도시한다.

도 22는 아미노옥시 결합을 통한 2C3 A114N 돌연변이로의 PEG의 컨쥬게이션을 입증하기 위한 SDS-PAGE 실험의 결과를 도시한다.

도 23은 항-TEM1 A114N 과당화 돌연변이의 글리칸 함량을 결정하기 위한 LC-MS 실험의 결과를 도시한다.

도 24는 야생형 HER2 항체 및 A114N 항-Her2 과당화 돌연변이의 글리칸 함량을 결정하기 위한 LC-MS 실험의 결과를 도시한다.

도 25는 본 발명의 방법에 따른 항체의 부위-특이적 컨쥬게이션을 수행하기 위한 예시적 방법을 도시한다.

도 26은 본 발명의 예시적 효과기 모이어티인 아미노옥시-Cys-MC-VC-PABC-MMAE 및 아미노옥시-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Do110의 합성을 도시한다.

도 27은 시알릴화된 HER2 항체에 대한 특성규명 정보를 도시한다.

도 28은 산화된 시알릴화 항-HER2 항체에 대한 특성규명 정보를 도시한다.

도 29는 2개의 상이한 아미노옥시기를 갖는 3개의 상이한 시알릴화된 항체를 이용하여 제조된 글리코컨쥬게이트(glycoconjugate)의 소수성 상호작용 크로마토그래피를 도시한다.

도 30은 GAM(+) 화학을 이용하여 제조된 AO-MMAE를 갖는 항Her2 A114 당화 돌연변이 컨주게이트의 HIC 크로마토 그래피를 도시한다.

도 31은 항-HER2 글리코컨주게이트 및 티올 컨주게이트의 시험관내 효능의 비교를 도시한다.

도 32는 항 FAP B11 글리코컨주게이트 및 티올 컨주게이트의 시험관내 효능의 비교를 도시한다.

도 33은 Her2+ 종양 세포 이중이식 모델에서의 항-HER2 글리코컨주게이트 및 티올 컨주게이트의 생체내 효능의 비교를 도시한다.

도 34는 S298N/Y300S 돌연변이를 함유하는 돌연변이 항- $\alpha\beta$ TCR 항체의 글리칸 함량을 결정하기 위한 LC-MS 실험의 결과를 도시한다.

도 35는 야생형 항- $\alpha\beta$ TCR 항체 및 S298N/Y300S 돌연변이를 함유하는 돌연변이 항- $\alpha\beta$ TCR 항체의 상대적 열 안정성을 결정하기 위한 원편광 이색성(circular dichroism) 실험의 결과를 도시한다.

도 36은 A114N 과당화 돌연변이를 갖는 항-HER 항체 및 AO-MMAE를 이용하여 제조된 ADC에 대한 세포 증식 검정의 결과를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명의 개시는 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항체), 및 이의 약물 컨주게이트를 제공하며, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 298에서 아스파라긴 잔기, 및 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 300에서 세린 및 트레오닌 잔기를 포함한다. 본 발명의 개시는 또한 항원-결합 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산, 상기 항원-결합 폴리펩티드를 제조하기 위한 재조합 발현 벡터 및 숙주 세포를 제공한다. 질병을 치료하기 위해 본원에 개시된 항원-결합 폴리펩티드를 이용하는 방법이 또한 제공된다.

[0022] I. 정의

[0023] 본원에서 사용되는 용어 "결합 폴리펩티드"는 관심 표적 항원(예를 들어, 인간 항원)에 선택적으로 결합하는 것을 담당하는 적어도 하나의 결합 부위를 함유하는 폴리펩티드(예를 들어, 항체)를 나타낸다. 예시적 결합 부위는 항체 가변 도메인, 수용체의 리간드 결합 부위, 또는 리간드의 수용체 결합 부위를 포함한다. 특정 양태에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 다수(예를 들어, 2개, 3개, 4개, 또는 그 초과)의 결합 부위를 포함한다.

[0024] 본원에서 사용되는 용어 "자연 잔기"는 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항체 또는 이의 단편)의 특정 아미노산 위치에서 자연적으로 발생하고, 인간의 손에 의해 변형되거나, 도입되거나, 변경되지 않은 아미노산 잔기를 나타낸다. 본원에서 사용되는 용어 "변경된 결합 폴리펩티드"는 적어도 하나의 비-자연 돌연변이 아미노산 잔기를 포함하는 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항체 또는 이의 단편)를 포함한다.

[0025] 본원에서 사용되는 용어 "특이적으로 결합하다"는 최대 약 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M, 또는 그 미만의 해리 상수(Kd)로 항원에 결합하고/하거나, 비특이적 항원에 대한 친화성보다 적어도 2배 더 큰 친화성으로 항원에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 능력을 나타낸다.

[0026] 본원에서 사용되는 용어 "항체"는 관심 항원(예를 들어, 종양 관련 항원)에 대한 유의한 공지된 특이적 면역반응 활성을 갖는 상기 어셈블리(예를 들어, 완전한 항체 분자, 항체 단편, 또는 이들의 변이체)를 나타낸다. 항체 및 면역글로불린은 경쇄와 중쇄 사이에 사슬간 공유 결합을 갖거나 갖지 않는 경쇄 및 중쇄를 포함한다. 척추동물계에서의 기본 면역글로불린 구조는 비교적 잘 이해되어 있다.

[0027] 하기에 보다 상세히 논의될 바와 같이, 일반 용어 "항체"는 생화학적으로 구별될 수 있는 항체의 5개의 별개의 부류를 포함한다. 항체의 모든 5개의 부류는 본 발명의 개시의 범위 내에 명백히 속하며, 하기 논의는 일반적으로 면역글로불린 분자의 IgG 부류에 관한 것일 것이다. IgG에 관해서, 면역글로불린은 약 23,000 달톤의 분자량의 2개의 동일한 경쇄, 및 53,000 내지 70,000의 분자량의 2개의 동일한 중쇄를 포함한다. 4개의 사슬은 "Y" 형태로 이황화 결합에 의해 연결되며, 여기서 경쇄는 "Y"의 마우스(mouth)에서 시작하고 가변 영역을 통해 지속되는 중쇄와 하나로 묶여진다.

[0028] 면역글로불린의 경쇄는 카파 또는 람다(κ , λ)로 분류된다. 각각의 중쇄 부류는 카파 또는 람다 경쇄와 함께 결

합될 수 있다. 일반적으로, 경쇄 및 중쇄는 서로 공유 결합되고, 2개의 중쇄의 "꼬리" 부분은 면역글로불린이 하이브리도마, B 세포, 또는 유전학적으로 조작된 숙주 세포에 의해 생성되는 경우에 공유 이황화 결합 또는 비-공유 결합에 의해 서로 결합된다. 중쇄에서, 아미노산 서열은 Y 형태의 갈래진 말단의 N-말단으로부터 각각의 사슬의 하부의 C-말단으로 이어진다. 당업자는 중쇄가 감마, 뮤, 알파, 델타, 또는 엡실론(γ , μ , α , δ , ϵ)과 이들 중 일부 하위부류(예를 들어, $\gamma 1$ 내지 $\gamma 4$)로 분류되는 것을 인지할 것이다. IgG, IgM, IgA, IgG, 또는 IgE로 각각 항체의 "부류"를 결정하는 것이 상기 사슬의 특성이다. 면역글로불린 아이소형(isotype) 하위 부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 등)는 잘 특성규명되어 있으며, 기능적 전문화를 제공하는 것으로 공지되어 있다. 상기 부류 및 아이소형 각각의 변형된 형태는 본 발명의 개시에 비추어 당업자가 용이하게 식별할 수 있으며, 따라서, 본 발명의 개시의 범위에 속한다.

[0029] 경쇄 및 중쇄 둘 모두는 구조적 및 기능적 상동성의 영역으로 나누어진다. 용어 "영역"은 면역글로불린 또는 항체 사슬의 부분 또는 일부를 나타내며, 불변 영역 또는 가변 영역뿐만 아니라 상기 영역의 더욱 별개의 부분 또는 일부를 포함한다. 예를 들어, 경쇄 가변 영역은 본원에서 정의되는 바와 같은 "프레임워크 영역" 또는 "FR" 사이에 산재된 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"을 포함한다.

[0030] 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄의 영역은 "불변 영역"의 경우에서 다양한 부류의 일원의 영역 내의 서열 변화의 상대적 결핍, 또는 "가변 영역"의 경우에서 다양한 부류의 일원의 영역 내의 유의한 변화를 기초로 하여 "불변"(C) 영역 또는 "가변"(V) 영역으로 정의될 수 있다. 용어 "불변 영역" 및 "가변 영역"은 또한 기능적으로 사용될 수 있다. 이와 관련하여, 면역글로불린 또는 항체의 가변 영역이 항원 인지 및 특이성을 결정하는 것이 인지될 것이다. 역으로, 면역글로불린 또는 항체의 불변 영역은 중요한 효과기 기능, 예를 들어, 분비, 태반경유 이동, Fc 수용체 결합, 보체 결합 등을 제공한다. 다양한 면역글로불린 부류의 불변 영역의 서브유닛 구조 및 3차원 형태가 널리 공지되어 있다.

[0031] 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 불변 및 가변 영역은 도메인으로 폴딩된다. 용어 "도메인"은, 예를 들어, β -병풍 구조(β -pleated sheet) 및/또는 사슬내 이황화 결합에 의해 안정화된 펩티드 루프(예를 들어, 3 내지 4개의 펩티드 루프를 포함함)를 포함하는 중쇄 또는 경쇄의 구상 영역을 나타낸다. 면역글로불린의 경쇄 상의 불변 영역 도메인은 "경쇄 불변 영역 도메인", "CL 영역" 또는 "CL 도메인"으로 상호교환적으로 언급된다. 중쇄 상의 불변 도메인(예를 들어, 힌지, CH1, CH2 또는 CH3 도메인)은 "중쇄 불변 영역 도메인", "CH" 영역 도메인 또는 "CH 도메인"으로 상호교환적으로 언급된다. 경쇄 상의 가변 도메인은 "경쇄 가변 영역 도메인", "VL 영역 도메인" 또는 "VL 도메인"으로 상호교환적으로 언급된다. 중쇄 상의 가변 도메인은 "중쇄 가변 영역 도메인", "VH 영역 도메인" 또는 "VH 도메인"으로 상호교환적으로 언급된다.

[0032] 관례적으로, 가변 불변 영역 도메인의 넘버링은 이들이 항원 결합 부위 또는 면역글로불린 또는 항체의 아미노-말단으로부터 더 멀어질수록 증가한다. 각각의 중쇄 및 경쇄 면역글로불린의 N-말단은 가변 영역이고, C-말단은 불변 영역이며, CH3 및 CL 도메인은 실제로 중쇄 및 경쇄의 카르복시-말단을 각각 포함한다. 따라서, 경쇄 면역글로불린의 도메인은 VL-CL 배향으로 정렬되는 반면, 중쇄의 도메인은 VH-CH1-힌지-CH2-CH3 배향으로 정렬된다.

[0033] CH1, 힌지, CH2, CH3, 및 CL 도메인 내의 아미노산 위치를 포함하는 중쇄 불변 영역 내의 아미노산 위치는 케이벳(Kabat) 지표 넘버링 시스템(문헌[Kabat et al, in "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Dept. Health and Human Services, 5th edition, 1991] 참조)에 따라 넘버링될 수 있다. 대안적으로, 항체 아미노산 위치는 EU 지표 넘버링 시스템(같은 문헌[Kabat et al] 참조)에 따라 넘버링될 수 있다.

[0034] 본원에서 사용되는 용어 "VH 도메인"은 면역글로불린 중쇄의 아미노 말단 가변 도메인을 포함하고, 용어 "VL 도메인"은 면역글로불린 경쇄의 아미노 말단 가변 도메인을 포함한다.

[0035] 본원에서 사용되는 용어 "CH1 도메인"은, 예를 들어, 케이벳 넘버링 시스템에서 약 위치 114 내지 223(EU 위치 118 내지 215)에 걸쳐있는 면역글로불린 중쇄의 첫번째(가장 아미노 말단)의 불변 영역 도메인을 포함한다. CH1 도메인은 VH 도메인에 인접하여 있고, 면역글로불린 중쇄 분자의 힌지 영역에 대해 아미노 말단에 있으며, 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 부분을 형성하지 않는다.

[0036] 본원에서 사용되는 용어 "힌지 영역"은 CH1 도메인을 CH2 도메인에 연결시키는 중쇄 분자의 일부를 포함한다. 이러한 힌지 영역은 약 25개의 잔기를 포함하고, 가요성이어서, 2개의 N-말단 항원 결합 영역이 독립적으로 움직이는 것을 가능케 한다. 힌지 영역은 3개의 별개의 도메인인 상부, 중간, 및 하부 힌지 도메인으로 다시 나누어질 수 있다(Roux et al. J. Immunol. 1998, 161: 4083).

[0037] 본원에서 사용되는 용어 "CH2 도메인"은, 예를 들어, 케이벳 넘버링 시스템에서 약 위치 244 내지 360(EU 위치

231 내지 340)에 걸쳐 있는 중쇄 면역글로불린 분자의 일부를 포함한다. CH2 도메인은 또 다른 도메인과 밀접하게 쌍을 이루지 않는다는 점에서 독특하다. 오히려, 2개의 N-결합된 분지형 탄수화물 사슬은 완전한 자연 IgG 분자의 2개의 CH2 도메인 사이에 삽입되어 있다. 한 구현예에서, 본 발명의 개시의 결합 폴리펩티드는 IgG1 분자(예를 들어, 인간 IgG1 분자)로부터 유래된 CH2 도메인을 포함한다.

[0038] 본원에서 사용되는 용어 "CH3 도메인"은, 예를 들어, 케이벳 넘버링 시스템의 약 위치 361 내지 476(EU 위치 341 내지 445)과 같이 CH2 도메인의 N-말단으로부터의 약 110개의 잔기에 걸쳐있는 중쇄 면역글로불린 분자의 일부를 포함한다. CH3 도메인은 통상적으로 항체의 C-말단 일부를 형성한다. 그러나, 일부 면역글로불린에서, 추가 도메인이 CH3 도메인으로부터 연장되어 분자의 C-말단 일부(예를 들어, IgM의 μ 사슬 및 IgE의 e 사슬 내 CH4 도메인)를 형성할 수 있다. 한 구현예에서, 본 발명의 개시의 결합 폴리펩티드는 IgG1 분자(예를 들어, 인간 IgG1 분자)로부터 유래된 CH3 도메인을 포함한다.

[0039] 본원에서 사용되는 용어 "CL 도메인"은, 예를 들어, 케이벳 위치 약 107A 내지 216에 걸쳐있는 면역글로불린 경쇄의 불변 영역 도메인을 포함한다. CL 도메인은 VL 도메인에 인접하여 있다. 한 구현예에서, 본 발명의 개시의 결합 폴리펩티드는 카파 경쇄(예를 들어, 인간 카파 경쇄)로부터 유래된 CL 도메인을 포함한다.

[0040] 본원에서 사용되는 용어 "Fc 영역"은 파파인 분해 부위(즉, IgG 내의 잔기 216, 중쇄 불변 영역의 첫번째 잔기는 114로 간주함)의 바로 업스트림의 힌지 영역에서 시작하여 항체의 C-말단에서 종료되는 중쇄 불변 영역의 일부로 정의된다. 따라서, 완전한 Fc 영역은 적어도 힌지 도메인, CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 포함한다.

[0041] 본원에서 사용되는 용어 "자연 Fc"는 단량체 형태이거나 다합체 형태이건 간에 항체의 분해로부터 발생하거나 다른 수단에 의해 생성된 비-항원-결합 단편의 서열을 포함하는 분자를 나타내며, 이는 힌지 영역을 함유할 수 있다. 자연 Fc의 본래의 면역글로불린 공급원은 바람직하게는 인간 기원이며, IgG1 및 IgG2가 바람직하나 임의의 면역글로불린일 수 있다. 자연 Fc 분자는 공유(즉, 이황화 결합) 및 비-공유 회합에 의해 이합체 또는 다합체 형태로 연결될 수 있는 단량체 폴리펩티드로 구성된다. 자연 Fc 분자의 단량체 서브유닛 사이의 분자간 이황화 결합의 수는 부류(예를 들어, IgG, IgA, 및 IgE) 또는 하위부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, 및 IgGA2)에 따라 1 내지 4의 범위이다. 자연 Fc의 한 예는 IgG의 파파인 분해로부터 발생하는 이황화 결합된 이합체이다. 본원에서 사용되는 용어 "자연 Fc"는 단량체, 이합체, 및 다합체 형태가 일반적이다.

[0042] 본원에서 사용되는 용어 "Fc 변이체"는 자연 Fc로부터 변형되거나, 회수 수용체(salvage receptor)인 FcRn(신생아 Fc 수용체)에 대한 결합 부위를 여전히 포함하는 분자 또는 서열을 나타낸다. 예시적 Fc 변이체, 및 이의 회수 수용체와의 상호작용은 당 분야에 공지되어 있다. 따라서, 용어 "Fc 변이체"는 비-인간 자연 Fc로부터 인간화된 분자 또는 서열을 포함할 수 있다. 또한, 자연 Fc는 제거될 수 있는 영역을 포함하는데, 이는 상기 영역이 본 발명의 항체-유사 결합 폴리펩티드에 필요하지 않은 구조적 특징 또는 생물학적 활성을 제공하기 때문이다. 따라서, 용어 "Fc 변이체"는 하나 이상의 자연 Fc 부위 또는 잔기가 결핍되거나, 하나 이상의 Fc 부위 또는 잔기가 변형되었거나, (1) 이황화 결합 형성, (2) 선택된 숙주 세포와의 부적합성, (3) 선택된 숙주 세포에서의 발현시 N-말단 이질성, (4) 당화, (5) 보체와의 상호작용, (6) 회수 수용체가 아닌 Fc 수용체로의 결합, 또는 (7) 항체-의존성 세포 세포독성(ADCC)에 영향을 미치거나 이들과 관련된, 분자 또는 서열을 포함한다.

[0043] 본원에서 사용되는 용어 "Fc 도메인"은 상기 정의된 바와 같은 자연 Fc 및 Fc 변이체 및 서열을 포함한다. Fc 변이체 및 자연 Fc 분자와 같이, 용어 "Fc 도메인"은 전체 항체로부터 분해되거나 다른 수단에 의해 생성되건 간에 단량체 또는 다합체 형태의 분자를 포함한다.

[0044] 상기 기재된 바와 같이, 항체의 가변 영역은 항체가 항원 상의 에피토프를 선택적으로 인지하고 특이적으로 결합하는 것을 가능케 한다. 즉, 항체의 VL 도메인 및 VH 도메인은 조합되어 3차원 항원 결합 부위를 규정하는 가변 영역(Fv)을 형성한다. 이러한 4차 항체 구조는 Y의 각각의 아암(arm) 말단에 제공되는 항원 결합 부위를 형성한다. 더욱 특히, 항원 결합 부위는 중쇄 및 경쇄 가변 영역 각각 상의 3개의 상보성 결정 영역(CDR)에 의해 규정된다. 본원에서 사용되는 용어 "항원 결합 부위"는 항원(예를 들어, 세포 표면 또는 가용성 항원)에 특이적으로 결합(상기 항원과 면역반응)하는 부위를 포함한다. 항원 결합 부위는 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 가변 영역에 의해 형성된 결합 부위는 항체의 특이성을 결정한다. 항원 결합 부위는 항체마다 다양한 가변 영역에 의해 형성된다. 본 발명의 개시의 변형된 항체는 적어도 하나의 항원 결합 부위를 포함한다.

[0045] 특정 구현예에서, 본 발명의 개시의 결합 폴리펩티드는 결합 폴리펩티드와 선택된 항원의 회합을 제공하는 적어도 2개의 항원 결합 도메인을 포함한다. 항원 결합 도메인은 동일한 면역글로불린 분자로부터 유래될 필요는 없

다. 이와 관련하여, 가변 영역은 체액성 반응을 개시시키고, 요망되는 항원에 대한 면역글로불린을 발생시키기 위해 유도될 수 있는 임의의 유형의 동물의 가변 영역일 수 있거나 이로부터 유래될 수 있다. 이와 같이, 결합 폴리펩티드의 가변 영역은, 예를 들어, 포유동물 기원일 수 있고, 예를 들어, 인간, 무린, 래트, 염소, 양, 비-인간 영장류(예를 들어, 시노몰구스 원숭이(cynomolgus monkey), 짧은꼬리 원숭이(macaques) 등), 이리, 또는 낙타과(예를 들어, 낙타, 라마 및 관련 종) 기원일 수 있다.

[0046] 자연 발생 항체에서, 각각의 단량체 항체 상에 존재하는 6개의 CDR은 특이적으로 위치되어 항체가 수성 환경에서 이의 3차원 형태를 취함에 따라 항원 결합 부위를 형성하는 짧은 비연속적인 아미노산 서열이다. 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 나머지는 아미노산 서열에 있어서 덜한 분자간 변동성을 나타내며, 프레임워크 영역으로 언급된다. 프레임워크 영역은 주로 β -시트 형태를 채택하며, CDR은 β -시트 구조를 연결하고, 일부 경우에는 β -시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 따라서, 이들 프레임워크 영역은 사슬간 비공유 상호작용에 의해 정확한 배향으로 6개의 CDR의 위치결정을 제공하는 스캐폴드를 형성시키는 작용을 한다. 위치결정된 CDR에 의해 형성된 항원 결합 도메인은 면역반응성 항원 상의 에피토프에 상보적인 표면을 규정한다. 이러한 상보적 표면은 면역반응성 항원 에피토프의 항체의 비-공유 결합을 촉진한다.

[0047] 본 발명의 예시적 결합 폴리펩티드는 항체 변이체를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "항체 변이체"는 항체가 자연 발생이 아니도록 변경된 항체의 합성 및 조작된 형태, 예를 들어, 적어도 2개의 중쇄 부분을 포함하나, 2개의 완전한 중쇄가 아닌 항체(예를 들어, 도메인 결실된 항체 또는 미니바디(minibody)); 2개 이상의 상이한 항원 또는 단일 항원 상의 다양한 에피토프에 결합하도록 변경된 항체의 다중특이적(예를 들어, 이중특이적, 삼중특이적 등) 형태; scFv 분자에 연결된 중쇄 분자 등을 포함한다. 또한, 용어 "항체 변이체"는 동일 항원의 3개, 4개 또는 그 초과 카피에 결합하는 항체인 항체의 다합체(예를 들어, 삼합체, 사합체 등) 형태를 포함한다.

[0048] 본원에서 사용되는 용어 "결합가"는 폴리펩티드 내의 잠재적 표적 결합 부위의 수를 나타낸다. 각각의 표적 결합 부위는 하나의 표적 분자 또는 표적 분자 상의 특정 부위에 특이적으로 결합한다. 폴리펩티드가 1개 초과 표적 결합 부위를 포함하는 경우, 각각의 표적 결합 부위는 동일하거나 상이한 분자에 특이적으로 결합할 수 있다(예를 들어, 상이한 리간드 또는 상이한 항원, 또는 동일 항원 상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다). 본 발명의 결합 폴리펩티드는 바람직하게는 인간 항원 분자에 특이적인 적어도 하나의 결합 부위를 갖는다.

[0049] 용어 "특이성"은 제공된 표적 항원(예를 들어, 인간 표적 항원)에 특이적으로 결합(예를 들어, 면역반응)하는 능력을 나타낸다. 결합 폴리펩티드는 일특이적일 수 있고, 표적에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 결합 부위를 함유할 수 있거나, 폴리펩티드는 다중특이적일 수 있고, 동일하거나 상이한 표적에 특이적으로 결합하는 2개 이상의 결합 부위를 함유할 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 동일 표적의 2개의 상이한(즉, 중첩되지 않는) 부분에 특이적이다. 특정 구현예에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 1개 초과 표적에 특이적이다. 종양 세포 상에서 발현되는 항원에 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 예시적 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항체)는 당 분야에 공지되어 있으며, 상기 항체로부터의 하나 이상의 CDR이 본 발명의 항체에 포함될 수 있다.

[0050] 용어 "연결 모이어티"는 본원에 개시된 결합 폴리펩티드에 효과기 모이어티를 연결시킬 수 있는 모이어티를 포함한다. 연결 모이어티는 분해가능하거나(예를 들어, 효소적으로 분해가능하거나 pH-민감성) 분해가능하지 않도록 선택될 수 있다. 예시적 연결 모이어티는 본원의 표 2에 기재되어 있다.

[0051] 본원에서 사용되는 용어 "효과기 모이어티"는 생물학적 또는 다른 기능적 활성을 갖는 진단제 및 치료제(예를 들어, 단백질, 핵산, 지질, 약물 모이어티, 및 이들의 단편)를 포함한다. 예를 들어, 결합 폴리펩티드에 컨쥬게이션된 효과기 모이어티를 포함하는 변형된 결합 폴리펩티드는 컨쥬게이션되지 않은 항체와 비교하여 적어도 하나의 추가 기능 또는 특성을 갖는다. 예를 들어, 결합 폴리펩티드로의 세포독성 약물(예를 들어, 효과기 모이어티)의 컨쥬게이션은 이차 기능으로서(즉, 항원 결합에 더하여) 약물 세포독성을 갖는 결합 폴리펩티드를 형성시킨다. 또 다른 예에서, 결합 폴리펩티드로의 이차 결합 폴리펩티드의 컨쥬게이션은 추가 결합 특성을 제공할 수 있다. 특정 구현예에서, 효과기 모이어티가 유전학적으로 인코딩된 치료 또는 진단 단백질 또는 핵산인 경우, 효과기 모이어티는 당 분야에 널리 공지된 펩티드 합성 또는 재조합 DNA 방법에 의해 합성되거나 발현될 수 있다. 또 다른 양태에서, 효과기가 비-유전학적으로 인코딩된 펩티드, 또는 약물 모이어티인 경우, 효과기 모이어티는 인공적으로 합성되거나, 자연 공급원으로부터 정제될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "약물 모이어티"는 항염증제, 항암제, 항감염제(예를 들어, 항진균제, 항균제, 항기생충제, 항바이러스제 등), 및 마취 치료제를 포함한다. 추가 구현예에서, 약물 모이어티는 항암제 또는 세포독성제이다. 상용성 약물 모이어티는 또한 프로

드러그를 포함할 수 있다. 예시적 효과기 모이어티는 본원의 표 1에 기재되어 있다.

[0052] 본원에서 사용되는 용어 "프로드러그"는 모 약물(parent drug)과 비교하여 덜 활성이거나, 덜 반응성이거나, 부 작용이 덜하고, 생체내에서 효소적으로 활성화되거나 더욱 활성인 형태로 달리 전환될 수 있는 약학적 활성제의 전구체 또는 유도체 형태를 나타낸다. 본 발명의 개시의 조성물과 상용성인 프로드러그는 더욱 활성의 세포독성 비함유 약물로 전환될 수 있는 포스페이트-함유 프로드러그, 아미노산-함유 프로드러그, 티오포스페이트-함유 프로드러그, 셀레이트-함유 프로드러그, 펩티드-함유 프로드러그, β -락탐-함유 프로드러그, 임의로 치환된 페녹시아세트아미드-함유 프로드러그 또는 임의로 치환된 페닐아세트아미드-함유 프로드러그, 5-플루오로사이토신 및 다른 5-플루오로우리딘 프로드러그를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 당업자는 본 발명의 개시의 변형된 결합 폴리펩티드를 제조하기 위한 목적으로 상기 화합물의 반응을 더욱 편리하게 만들기 위해 요망되는 약물 모이어티 또는 이의 프로드러그에 대한 화학적 변형을 실시할 수 있다. 약물 모이어티는 또한 본원에 기재된 약물 모이어티의 유도체, 약학적으로 허용되는 염, 에스테르, 아미드, 및 에테르를 포함한다. 유도체는 특정 약물의 요망되는 치료 활성을 개선시키거나 유의하게 감소시키지 않을 수 있는 본원에서 확인된 약물에 대한 변형을 포함한다.

[0053] 본원에서 사용되는 용어 "항암제"는 신생물 또는 종양 세포의 성장 및/또는 증식에 유해하고, 악성종양을 감소시키거나, 억제하거나, 파괴하는 작용을 할 수 있는 작용제를 포함한다. 상기 작용제의 예는 세포증식 억제제, 알킬화제, 항생제, 세포독성 뉴클레오시드, 튜블린 결합제, 호르몬, 호르몬 길항제, 세포독성제 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 세포독성제는 토마이마이신(tomaymycin) 유도체, 마이탄신(maytansine) 유도체, 크립토파이신(cryptophycin) 유도체, 안트라사이클린(anthracycline) 유도체, 비스포스포네이트(bisphosphonate) 유도체, 렙토마이신(leptomycin) 유도체, 스트렙토니그린(streptonigrin) 유도체, 아우리스타틴(auristatine) 유도체, 및 듀오카르마이신(duocarmycin) 유도체를 포함한다. 면역반응성 세포 또는 악성종양 세포의 성장을 지연시키거나 늦추는 작용을 하는 임의의 작용제가 본 발명의 개시의 범위 내에 속한다.

[0054] 본원에서 사용되는 용어 "항원" 또는 "표적 항원"은 결합 폴리펩티드의 결합 부위에 의해 결합될 수 있는 분자 또는 분자의 일부를 나타낸다. 표적 항원은 하나 이상의 에피토프를 가질 수 있다.

[0055] II. 결합 폴리펩티드

[0056] 한 양태에서, 본 발명의 개시는 Fc 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항체, 항체 단편, 항체 변이체, 및 융합 단백질)를 제공하며, 상기 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 298에서 아스파라긴 잔기, 및 EU 넘버링에 따른 아미노산 위치 300에서 세린 또는 트레오닌 잔기를 포함한다.

[0057] 임의의 면역글로불린 부류(예를 들어, IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE) 및 종으로부터의 Fc 도메인이 본원에 개시된 결합 폴리펩티드에서 사용될 수 있다. 상이한 종 또는 Ig 부류로부터의 Fc 도메인의 일부를 포함하는 키메라 Fc 도메인이 또한 이용될 수 있다. 특정 구현예에서, Fc 도메인은 인간 IgG1 Fc 도메인이다. 인간 IgG1 Fc 도메인의 경우에서, 케이벳 위치 298에서 아스파라긴으로 및 케이벳 위치 300에서 세린 또는 트레오닌으로의 야생형 아미노산의 돌연변이는 N-결합된 당화 컨센서스(consensus) 부위(즉, N-X-T/S 세쿠온(sequon), 여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)를 형성시킨다. 그러나, 다른 종 및/또는 Ig 부류 또는 아이소형의 Fc 도메인의 경우에서, 당업자는 N-X-T/S 세쿠온을 재생시키기 위해 프롤린 잔기가 제공되는 경우 Fc 도메인의 케이벳 위치 299를 돌연변이화시키는 것이 필요할 수 있음을 인지할 것이다.

[0058] 본원에 개시된 결합 폴리펩티드는 케이벳 넘버링에 따른 위치 298에서 N-결합된 당화 부위를 갖는 Fc 도메인을 포함하는 임의의 결합 폴리펩티드를 포함한다. 특정 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 항체, 또는 이의 단편 또는 유도체이다. 임의의 공급원 또는 종으로부터의 임의의 항체가 본원에 개시된 결합 폴리펩티드에서 이용될 수 있다. 적합한 항체는 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0059] 특정 구현예에서, 본 발명의 개시의 결합 폴리펩티드는 항체의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다. 용어 "항원-결합 단편"은 항원에 결합하거나, 항원 결합(즉, 특이적 결합)에 대해 완전한 항체(즉, 항원-결합 단편이 유래되는 완전한 항체)와 경쟁하는 면역글로불린 또는 항체의 폴리펩티드 단편을 나타낸다. 항원 결합 단편은 당 분야에 널리 공지된 재조합 또는 생화학적 방법에 의해 생성될 수 있다. 예시적 항원-결합 단편은 Fv, Fab, Fab', 및 (Fab')₂를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 개시의 항원-결합 단편은 적어도 하나의 조작된 당화 부위를 포함하는 변형된 항원-결합 단편이다. 한 예시적 구현예에서, 본 발명의 개시의 변형된 항원 결합 단편은 상기 기재된 변형된 VH 도메인을 포함한다. 또 다른 예시적 구현예에서, 본 발명의 개시의 변형된 항원 결합 단편은 상기 기재된 변형된 CH1 도메인을 포함한다.

- [0060] 예시적 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 단쇄 가변 영역 서열(ScFv)을 포함한다. 단쇄 가변 영역 서열은 하나 이상의 항원 결합 부위, 예를 들어, 가요성 링커에 의해 VH 도메인에 연결된 VL 도메인을 갖는 단일 폴리펩티드를 포함한다. ScFv 분자는 VH-링커-VL 배향 또는 VL-링커-VH 배향으로 작제될 수 있다. 항원 결합 부위를 구성하는 VL 및 VH 도메인을 연결시키는 가요성 힌지는 바람직하게는 약 10 내지 약 50개의 아미노산 잔기를 포함한다. 펩티드를 연결시키는 것은 당 분야에 공지되어 있다. 본 발명의 결합 폴리펩티드는 적어도 하나의 scFv 및/또는 적어도 하나의 불변 영역을 포함할 수 있다. 한 구현예에서, 본 발명의 개시의 결합 폴리펩티드는 CH1 도메인(예를 들어, 케이벳 위치 114에서 아스파라긴 잔기를 포함하는 CH1 도메인) 및/또는 CH2 도메인(예를 들어, EU 위치 298에서 아스파라긴 잔기, 및 EU 위치 300에서 세린 또는 트레오닌 잔기를 포함하는 CH2 도메인)을 포함하는 항체 또는 단편에 연결되거나 융합된 적어도 하나의 scFv를 포함할 수 있다.
- [0061] 특정한 예시적 구현예에서, 본 발명의 개시의 결합 폴리펩티드는 항체를 인코딩하는 DNA 서열과 ScFv 분자(예를 들어, 변경된 ScFv 분자)를 융합시킴으로써 생성되는 다가(예를 들어, 4가) 항체이다. 예를 들어, 한 구현예에서, 상기 서열은 ScFv 분자(예를 들어, 변경된 ScFv 분자)가 이의 N-말단 또는 C-말단에서 가요성 링커(예를 들어, gly/ser 링커)를 통해 항체의 Fc 단편에 연결되도록 조합된다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 개시의 4가 항체는 CH1 도메인(예를 들어, 케이벳 위치 114에서 아스파라긴 잔기를 포함하는 CH1 도메인)에 융합된 연결 펩티드에 ScFv 분자를 융합시켜 ScFv-Fab 4가 분자를 작제함으로써 제조될 수 있다.
- [0062] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 개시의 결합 폴리펩티드는 변경된 미니바디이다. 본 발명의 개시의 변경된 미니바디는 연결 펩티드를 통해 CH3 도메인 또는 이의 일부에 융합된 ScFv 분자(예를 들어, 상기 기재된 변경된 VH 도메인을 포함하는 변경된 ScFv 분자)를 각각 포함하는 2개의 폴리펩티드 사슬로 구성된 이합체 분자이다. 미니바디는 당 분야에 기재된 방법(예를 들어, 미국 특허 5,837,821호 또는 WO 94/09817A1호 참조)을 이용하여 ScFv 구성요소를 작제하고, 펩티드-CH3 구성요소를 연결시킴으로써 제조될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 4가 미니바디가 작제될 수 있다. 4가 미니바디는 2개의 ScFv 분자가 가요성 링커를 이용하여 연결되는 것을 제외하고는 미니바디와 동일한 방식으로 작제될 수 있다. 연결된 scFv-scFv 작제물은 이후 CH3 도메인에 연결된다.
- [0063] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 개시의 결합 폴리펩티드는 디아바디(diabody)를 포함한다. 디아바디는 scFv 분자와 유사한 폴리펩티드를 각각 갖지만, 보통 둘 모두의 가변 도메인을 연결시키는 짧은(10개 미만, 바람직하게는 1 내지 5개) 아미노산 잔기의 링커를 가져, 동일 폴리펩티드 사슬 상의 VL 및 VH 도메인이 상호작용할 수 없는 4가의 이합체 분자이다. 대신, 하나의 폴리펩티드 사슬의 VL 및 VH 도메인은 두번째 폴리펩티드 사슬 상의 VH 및 VL 도메인과 (각각)상호작용한다(예를 들어, WO 02/02781호 참조). 본 발명의 개시의 디아바디는 CH3 도메인에 융합된 scFv 분자를 포함한다.
- [0064] 다른 구현예에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 동일 폴리펩티드 사슬 상에 하나 이상의 가변 도메인을 연속하여 포함하는 다중특이적 또는 다가 항체, 예를 들어, 직렬 가변 도메인(tandem variable domain)(TVD) 폴리펩티드를 포함한다. 예시적인 TVD 폴리펩티드는 미국 특허 번호 5,989,830호에 기재된 "더블 헤드(double head)" 또는 "이중-Fv" 형태를 포함한다. 이중-Fv 형태에서, 2개의 상이한 항체의 가변 도메인은 2개의 별개의 사슬(하나의 중쇄 및 하나의 경쇄) 상에서 직렬 배향으로 발현되고, 여기서 하나의 폴리펩티드 사슬은 펩티드 링커에 의해 분리된 2회의 VH를 연속하여 가지며(VH1-링커-VH2), 나머지 폴리펩티드 사슬은 펩티드 링커에 의해 연속하여 연결된 상보적 VL 도메인으로 구성된다(VL1-링커-VL2). 교차하는 더블 헤드 형태에서, 2개의 상이한 항체의 가변 도메인은 2개의 별개의 폴리펩티드 사슬(하나의 중쇄 및 하나의 경쇄) 상에서 직렬 배향으로 발현되고, 여기서 하나의 폴리펩티드 사슬은 펩티드 링커에 의해 분리된 2개의 VH를 연속하여 가지며(VH1-링커-VH2), 나머지 폴리펩티드 사슬은 반대 배향으로 펩티드 링커에 의해 연속하여 연결된 상보적 VL 도메인으로 구성된다(VL2-링커-VL1). "이중-Fv" 포맷을 기초로 한 추가의 항체 변이체는 이중-가변-도메인 IgG (DVD-IgG) 이특이적 항체(미국 특허 번호 7,612,181호 참조) 및 TBTI 포맷(US 2010/0226923 A1호 참조)을 포함한다. 이중-Fv의 각각의 사슬로의 불변 도메인의 첨가(중쇄로 CH1-Fc 및 경쇄로 카파 또는 람다 불변 도메인의 첨가)는 어떠한 추가 변형(즉, 안정성을 향상시키기 위한 불변 도메인으로의 명백한 첨가)의 필요 없이 기능적 이특이적 항체를 발생시킨다.
- [0065] 또 다른 예시적 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 "더블 헤드" 형태를 기초로 한 교차 이중 가변 도메인 IgG(CODV-IgG) 이특이적 항체를 포함한다(전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 US20120251541 A1호 참조). CODV-IgG 항체 변이체는 CL 도메인에 연속하여 연결된 VL 도메인을 갖는 하나의 폴리펩티드 사슬(VL1-L1-VL2-L2-CL), 및 CH1 도메인에 반대 배향으로 연속하여 연결된 상보적 VH 도메인을 갖는 두번째 폴리펩티드 사슬(VH2-L3-VH1-L4-CH1)을 가지며, 상기 폴리펩티드 사슬은 교차 경쇄-중쇄쌍을 형성한다. 특정 구현예에서, 두번째 폴리펩티드는 Fc 도메인에 추가로 연결될 수 있다(VH2-L3-VH1-L4-CH1-Fc). 특정 구현예에서, 링커 L3은 링커

L1의 길이의 적어도 2배이고/이거나, 링커 L4는 링커 L2의 길이의 적어도 두배이다. 예를 들어, L1 및 L2는 1 내지 3개의 아미노산 잔기 길이일 수 있고, L3은 2 내지 6개의 아미노산 잔기 길이일 수 있고, L4는 4 내지 7개의 아미노산 잔기 길이일 수 있다. 적합한 링커의 예는 단일 글리신(Gly) 잔기; 디글리신 펩티드(Gly-Gly); 트리펩티드(Gly-Gly-Gly); 4개의 글리신 잔기를 갖는 펩티드(Gly-Gly-Gly-Gly); 5개의 글리신 잔기를 갖는 펩티드(Gly-Gly-Gly-Gly-Gly); 6개의 글리신 잔기를 갖는 펩티드(Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly); 7개의 글리신 잔기를 갖는 펩티드(Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly); 8개의 글리신 잔기를 갖는 펩티드(Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly)를 포함한다. 펩티드 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser 및 펩티드 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser과 같이 다른 조합의 아미노산 잔기가 이용될 수 있다.

[0066] 특정 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 항원 불변 영역에 융합된 비-항체 결합 영역(예를 들어, 수용체, 리간드, 또는 세포-부착 분자)을 포함하는 면역부착소 분자를 포함한다(예를 들어, 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Ashkenazi et al., *Methods*, 1995 8(2), 104-115] 참조).

[0067] 특정 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 면역글로불린-유사 도메인을 포함한다. 적합한 면역글로불린-유사 도메인은 섬유결합소 도메인(예를 들어, 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Koide et al. (2007), *Methods Mol. Biol.* 352: 95-109] 참조), DARPin(예를 들어, 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Stumpp et al. (2008) *Drug Discov. Today* 13 (15-16): 695-701] 참조), 단백질 A의 Z 도메인(예를 들어, 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Nygren et al. (2008) *FEBS J.* 275 (11): 2668-76] 참조), 리포칼린(Lipocalin)(예를 들어, 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Skerra et al. (2008) *FEBS J.* 275 (11): 2677-83] 참조), 어필린(Affilin)(예를 들어, 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Ebersbach et al. (2007) *J. Mol. Biol.* 372 (1): 172-85] 참조), 어피틴(Affitin)(예를 들어, 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Krehenbrink et al. (2008). *J. Mol. Biol.* 383 (5): 1058-68] 참조), 아비머(Avimer)(예를 들어, 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Silverman et al. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23 (12): 1556-61] 참조), 피노머(Fynomer)(예를 들어, 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Grabulovski et al. (2007) *J Biol Chem* 282 (5): 3196-3204] 참조), 및 쿤니츠(Kunitz) 도메인 펩티드(예를 들어, 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Nixon et al. (2006) *Curr Opin Drug Discov Devel* 9 (2): 261-8] 참조)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0068] III. N-결합된 글리칸

[0069] 특정 구현예에서, 본원에 개시된 결합 폴리펩티드의 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 위치 298(N298)의 조작된 아르기닌에서 당화된다. N-결합된 글리칸은 일반적으로 N298 측쇄의 질소기에 대한 β -글리코실아미드 결합을 통해 연결된다. 그러나, 다른 적합한 당 분야에 인지된 결합이 또한 이용될 수 있다.

[0070] 임의의 유형의 자연 발생 또는 합성(즉, 비-자연) N-결합된 글리칸이 N114에 연결될 수 있다. 예를 들어, 글리칸은 자연 글리칸 또는 비-자연 결합을 함유하는 조작된 글리칸일 수 있다. 특정 구현예에서, 글리칸은 효과기 모이어티(예를 들어, 반응성 알데하이드기)로의 컨주게이션에 적합한 기를 생성시키기 위해 산화(예를 들어, 페리오데이트 처리에 의함)될 수 있는 당류를 포함한다. 적합한 산화가능한 당류는 갈락토스 및 시알산(예를 들어, N-아세틸뉴라민산)을 포함하였으나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 구현예에서, 글리칸은 바이안테나리 글리칸이다. 특정 구현예에서, 글리칸은 자연 발생 포유동물 당형이다.

[0071] 당화는 당 분야에 공지된 임의의 수단을 통해 달성될 수 있다. 특정 구현예에서, 당화는 N-결합된 당화가 가능한 세포에서의 결합 폴리펩티드의 발현에 의해 달성된다. 임의의 자연 또는 조작된 세포(예를 들어, 원핵생물 또는 진핵생물)가 이용될 수 있다. 일반적으로, 포유동물 세포가 당화를 달성하기 위해 이용된다. 포유동물 세포에서 생성되는 N-글리칸은 통상적으로 복합체 N-글리칸으로 언급된다(예를 들어, 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Drickamer K, Taylor ME (2006). *Introduction to Glycobiology*, 2nd ed.] 참조). 이들 복합체 N-글리칸은 내부 코어 구조 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 에 연결된 시알릴락토사민 서열을 갖는 통상적으로 2 내지 6개의 외부 분지를 갖는 구조를 갖는다. 복합체 N-글리칸은 적어도 하나의 분지, 및 바람직하게는, 예를 들어, NeuNAc-; NeuAc α 2,6 GalNAc α 1-; NeuAc α 2,3 Gal β 1,3 GalNAc α 1-; 및 NeuAc α 2,3/6 Gal β 1,4 GlcNAc β 1.과 같이 올리고당류로 끝나는 적어도 2개의 교대로 존재하는 GlcNAc 및 갈락토스(Gal) 잔기를 갖는다. 또한, 설페이트 에스테르는 갈락토스, GalNAc, 및 GlcNAc 잔기에서 발생할 수 있고, 포스페이트 에스테르는 만노스 잔기에서 발생할 수 있다. NeuAc는 O-아세틸화될 수 있거나, NeuG1에 의해 대체(N-글리코릴뉴라민산)될 수 있다. 복합체 N-글리칸은 또한 양분성 GlcNAc 및 코어 푸코스(Fuc)의 사슬내 치환을 가질 수 있다.

[0072] 추가로 또는 임의로, 당화는 시험관내에서 효소적 수단을 통해 달성되거나 변형될 수 있다. 예를 들어, N298에

특정한 당류 잔기를 첨가하기 위해 하나 이상의 글리코실트랜스페라제가 이용될 수 있고, N-결합된 글리칸으로부터 원치않는 당류를 제거하기 위해 하나 이상의 글리코시다제가 이용될 수 있다. 상기 효소적 수단은 당 분야에 널리 공지되어 있다(예를 들어, 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 WO/2007/005786호 참조).

[0073] IV. 면역학적 효과기 기능 및 Fc 변형

[0074] 특정 구현예에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 하나 이상의 효과기 기능을 매개하는 항체 불변 영역(예를 들어, IgG 불변 영역, 예를 들어, 인간 IgG 불변 영역, 예를 들어, 인간 IgG1 또는 IgG4 불변 영역)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체 불변 영역으로의 보체의 C1 구성요소의 결합은 보체 시스템을 활성화시킬 수 있다. 보체의 활성화는 세포 병원체의 흡수인화 및 용해에서 중요하다. 보체의 활성화는 또한 염증 반응을 자극하며, 이는 또한 자가면역 과민성과 관련될 수 있다. 추가로, 항체는 Fc 영역을 통해 다양한 세포 상의 수용체에 결합하며, 항체 Fc 영역 상의 Fc 수용체 결합 부위는 세포 상의 Fc 수용체(FcR)에 결합한다. IgG(감마 수용체), IgE(엡실론 수용체), IgA(알파 수용체) 및 IgM(뮤 수용체)를 포함하는 다양한 부류의 항체에 특이적인 다수의 Fc 수용체가 존재한다. 세포 표면 상의 Fc 수용체로의 항체의 결합은 항체-코팅된 입자의 포식 및 파괴, 면역 복합체의 청소, 살세포에 의한 항체-코팅된 표적 세포의 용해(항원-의존성 세포-매개 세포독성, 또는 ADCC로 언급됨), 염증성 매개체의 방출, 태반 이동 및 면역글로불린 생성의 조절을 포함하는 다수의 중요하고 다양한 생물학적 반응을 촉발시킨다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편)는 Fc-감마 수용체에 결합한다. 대안적 구현예에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 하나 이상의 효과기 기능(예를 들어, ADCC 활성화)이 결여되고/되거나 Fc γ 수용체에 결합할 수 없는 불변 영역을 포함할 수 있다.

[0075] 본 발명의 특정 구현예는 대략 동일한 면역원성의 완전한 변경되지 않은 항체와 비교하는 경우 요망되는 생화학적 특징, 예를 들어, 감소되거나 향상된 효과기 기능, 비-공유적으로 이합체화하는 능력, 종양의 부위에서 국소화시키는 증가된 능력, 감소된 혈청 반감기, 또는 증가된 혈청 반감기를 제공하기 위해 하나 이상의 불변 영역 도메인 중 적어도 하나의 아미노산이 결실되거나 달리 변경된 항체를 포함한다. 예를 들어, 본원에 기재된 진단 및 치료 방법에서 사용하기 위한 특정 항체는 면역글로불린 중쇄와 유사한 폴리펩티드 사슬을 포함하나, 하나 이상의 중쇄 도메인의 적어도 일부가 결핍된 도메인 결실된 항체이다. 예를 들어, 특정 항체에서, 변형된 항체의 불변 영역의 하나의 전체 도메인이 결실될 것이며, 예를 들어, CH2 도메인의 전부 또는 일부가 결실될 것이다.

[0076] 특정한 다른 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 다양한 항체 아이소형으로부터 유래된 불변 영역(예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 중 2개 이상으로부터의 불변 영역)을 포함한다. 다른 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 키메라 힌지(즉, 다양한 항체 아이소형의 힌지 도메인, 예를 들어, IgG4 분자로부터의 상부 힌지 도메인 및 IgG1 중간 힌지 도메인으로부터 유래된 힌지 부분을 포함하는 힌지)를 포함한다. 한 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 분자의 코어 힌지 영역 내에 인간 IgG4 분자로부터의 Fc 영역 또는 이의 일부 및 Ser228Pro 돌연변이(EU 넘버링)를 포함한다.

[0077] 특정 구현예에서, Fc 부분은 당 분야에 공지된 기술을 이용하여 효과기 기능을 증가시키거나 감소시키기 위해 돌연변이화될 수 있다. 예를 들어, 불변 영역 도메인의 결실 또는 비활성화(점돌연변이 또는 다른 수단을 통한)는 순환하는 변형된 항체의 Fc 수용체 결합을 감소시킴으로써 종양 국소화를 증가시킬 수 있다. 다른 경우에서, 본 발명과 일치하는 불변 영역 변형이 보체 결합을 완화시킴으로써 권주게이션된 세포독소의 혈청 반감기 및 비특이적 회합을 감소시킬 수 있다. 증가된 항원 특이성 또는 유연성으로 인해 향상된 국소화를 가능케 하는 불변 영역의 또 다른 변형이 디설파이드 결합 또는 올리고당류 모이어티를 변형시키기 위해 이용될 수 있다. 발생된 변형의 생리학적 프로파일, 생체이용률 및 다른 생화학적 효과, 예를 들어, 종양 국소화, 생체분포 및 혈청 반감기는 과도한 실험 없이 널리 공지된 면역학적 기술을 이용하여 용이하게 측정되고 정량될 수 있다.

[0078] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체에서 이용되는 Fc 도메인은 Fc 변이체이다. 본원에서 사용되는 용어 "Fc 변이체"는 Fc 도메인이 유래되는 야생형 Fc 도메인과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 치환을 갖는 Fc 도메인을 나타낸다. 예를 들어, Fc 도메인이 인간 IgG1 항체로부터 유래되는 경우, 상기 인간 IgG1 Fc 도메인의 Fc 변이체는 상기 Fc 도메인과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.

[0079] Fc 변이체의 아미노산 치환(들)은 Fc 도메인 내의 임의의 위치(즉, 임의의 EU 규약 아미노산 위치)에 위치될 수 있다. 한 구현예에서, Fc 변이체는 힌지 도메인 또는 이의 일부에 위치한 아미노산 위치에서 치환을 포함한다. 또 다른 구현예에서, Fc 변이체는 CH2 도메인 또는 이의 일부에 위치한 아미노산 위치에서 치환을 포함한다. 또 다른 구현예에서, Fc 변이체는 CH3 도메인 또는 이의 일부에 위치한 아미노산 위치에서 치환을 포함한다. 또 다른 구현예에서, Fc 변이체는 CH4 도메인 또는 이의 일부에 위치한 아미노산 위치에서 치환을 포함한다.

[0080] 본 발명의 결합 폴리펩티드는 효과기 기능 및/또는 FcR 결합에 있어서 개선(예를 들어, 감소 또는 향상)을 제공하는 것으로 공지된 임의의 당 분야에서 인정된 Fc 변이체를 이용할 수 있다. 상기 Fc 변이체는, 예를 들어, 각각이 참조로서 본원에 포함되는 국제 PCT 공보 W088/07089A1호, W096/14339A1호, W098/05787A1호, W098/23289A1호, W099/51642A1호, W099/58572A1호, W000/09560A2호, W000/32767A1호, W000/42072A2호, W002/44215A2호, W002/060919A2호, W003/074569A2호, W004/016750A2호, W004/029207A2호, W004/035752A2호, W004/063351A2호, W004/074455A2호, W004/099249A2호, W005/040217A2호, W005/070963A1호, W005/077981A2호, W005/092925A2호, W005/123780A2호, W006/019447A1호, W006/047350A2호, 및 W006/085967A2호 또는 미국 특허 번호 5,648,260호; 5,739,277호; 5,834,250호; 5,869,046호; 6,096,871호; 6,121,022호; 6,194,551호; 6,242,195호; 6,277,375호; 6,528,624호; 6,538,124호; 6,737,056호; 6,821,505호; 6,998,253호; 및 7,083,784호에 개시된 아미노산 치환 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 한 예시적 구현예에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 EU 위치 268에서 아미노산 치환(예를 들어, H268D 또는 H268E)을 포함하는 Fc 변이체를 포함할 수 있다. 또 다른 예시적 구현예에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 EU 위치 239(예를 들어, S239D 또는 S239E) 및/또는 EU 위치 332(예를 들어, I332D 또는 I332Q)에서 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[0081] 특정 구현예에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 항체의 항원-독립적 효과기 기능, 특히 결합 폴리펩티드의 순환 반감기를 변경시키는 아미노산 치환을 포함하는 Fc 변이체를 포함할 수 있다. 상기 결합 폴리펩티드는 상기 치환이 결핍된 결합 폴리펩티드와 비교하는 경우 FcRn에 대한 증가되거나 감소된 결합을 나타내며, 따라서 혈청에서 각각 증가되거나 감소된 반감기를 갖는다. FcRn에 대한 개선된 친화성을 갖는 Fc 변이체는 더 긴 혈청 반감기를 갖는 것으로 예상되고, 상기 분자는, 예를 들어, 만성 질병 또는 장애를 치료하기 위해 투여되는 항체의 긴 반감기가 요망되는 경우 포유동물을 치료하는 방법에서 유용한 적용성을 갖는다. 대조적으로, 감소된 FcRn 결합 친화성을 갖는 Fc 변이체는 더 짧은 반감기를 갖는 것으로 예상되고, 예를 들어, 상기 분자는 또한, 예를 들어, 생체내 진단 영상화를 위해 또는 시작 항체가 연장된 기간 동안 순환에 존재하는 경우에 독성 부작용을 갖는 상황에서 감소된 순환 시간이 유리할 수 있는 경우 포유동물로의 투여에 유용할 수 있다. 감소된 FcRn 결합 친화성을 갖는 Fc 변이체는 또한 태반을 가로지르는 가능성이 덜하고, 따라서 임신한 여성에서 질병 또는 장애의 치료에서 또한 유용하다. 또한, 감소된 FcRn 결합 친화성이 요망될 수 있는 다른 적용은 뇌, 신장, 및/또는 간에서의 국소화가 요망되는 적용을 포함한다. 한 예시적 구현예에서, 본 발명의 변경된 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편)은 혈관구조로부터 신장 사구체염의 상피를 가로지르는 감소된 운반을 나타낸다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 변경된 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편)은 뇌로부터 혈관 공간으로 혈액뇌장벽(BBB)을 가로지르는 감소된 운반을 나타낸다. 한 구현예에서, 변경된 FcRn 결합을 갖는 항체는 Fc 도메인의 "FcRn 결합 루프" 내에 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 Fc 도메인을 포함한다. FcRn 결합 루프는 아미노산 잔기 280 내지 299(EU 넘버링에 따름)로 구성된다. FcRn 결합 활성을 변경시키는 예시적 아미노산 치환은 본원에 참조로서 포함되는 국제 PCT 공개 번호 W005/047327호에 개시되어 있다. 특정한 예시적 구현예에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편)는 V284E, H285E, N286D, K290E 및 S304D(EU 넘버링)의 치환 중 하나 이상을 갖는 Fc 도메인을 포함한다. 또 다른 예시적 구현예에서, 본 발명의 결합 분자는 이중 돌연변이 H433K/N434F를 갖는 인간 Fc 도메인을 포함한다(예를 들어, 미국 특허 번호 8,163,881호 참조).

[0082] 다른 구현예에서, 본원에 기재된 진단 및 치료 방법에서 사용하기 위한 결합 폴리펩티드는 당화를 감소시키거나 제거하기 위해 변경되는 불변 영역, 예를 들어, IgG1 또는 IgG4 중쇄 불변 영역을 갖는다. 예를 들어, 본 발명의 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편)는 또한 항체 Fc의 당화를 변경시키는 아미노산 치환을 포함하는 Fc 변이체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 Fc 변이체는 감소된 당화(예를 들어, N- 또는 O-결합된 당화)를 가질 수 있다. 예시적 구현예에서, Fc 변이체는 아미노산 위치 297(EU 넘버링)에서 일반적으로 발견되는 N-결합된 글리칸의 감소된 당화를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 항체는 아미노산 서열 NXT 또는 NXS를 함유하는 당화 모티프, 예를 들어, N-결합된 당화 모티프 근처 또는 당화 모티프, 예를 들어, N-결합된 당화 모티프 내에 아미노산 치환을 갖는다. 특정 구현예에서, 항체는 아미노산 위치 228 또는 299(EU 넘버링)에서 아미노산 치환을 갖는 Fc 변이체를 포함한다. 더욱 특정한 구현예에서, 항체는 S228P 및 T299A 돌연변이(EU 넘버링)를 포함하는 IgG1 또는 IgG4 불변 영역을 포함한다.

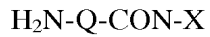
[0083] VIII. 효과기 모이어티

[0084] 특정 구현예에서, 본 발명의 개시의 결합 폴리펩티드는 효과기 모이어티를 포함한다. 일반적으로, 이들 효과기 모이어티는 결합 폴리펩티드 상의 N-결합된 글리칸에 컨쥬게이션(직접 또는 링커 모이어티를 통한)(예를 들어, CH2 도메인의 N298(EU 넘버링) 및/또는 CH1 도메인의 N114(케이벳 넘버링)에 연결된 N-결합된 글리칸)된다. 특

정 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 케이벳 위치 114에서 글리칸을 갖는 2개의 CH1 도메인을 포함하는 전장 항체이며, 여기서 둘 모두의 글리칸은 하나 이상의 효과기 모이어티에 컨쥬게이션된다.

[0085] 임의의 효과기 모이어티가 본원에 개시된 결합 폴리펩티드에 첨가될 수 있다. 효과기 모이어티는 바람직하게는 결합 폴리펩티드의 내인성 활성을 유의하게 변경시킴이 없이 변경된 항체 또는 이의 단편에 비-자연 기능을 부가한다. 효과기 모이어티는, 예를 들어, 치료제 또는 진단제일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 개시의 변형된 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항체)는 동일하거나 상이할 수 있는 하나 이상의 효과기 모이어티를 포함할 수 있다.

[0086] 한 구현예에서, 효과기 모이어티는 하기 화학식 (I)의 효과기 모이어티일 수 있다:



[0087] 화학식 (I),

[0088] 상기 식에서,

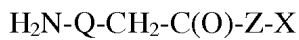
[0089] A) Q는 NH 또는 O이고;

[0090] B) CON은 연결기 모이어티이고;

[0091] C) X는 본원에 정의된 바와 같은 치료제이다.

[0092] 연결기 모이어티는 치료제를 H₂N-Q-에 연결시킨다. 연결기 모이어티는, 예를 들어, 알킬레닐 구성요소, 폴리에틸렌 글리콜 구성요소, 폴리(글리신) 구성요소, 폴리(옥사졸린) 구성요소, 카르보닐 구성요소, 시스테인아미드로부터 유래된 구성요소, 시트룰린과 커플링된 발린으로부터 유래된 구성요소, 및 4-아미노벤질 카르바메이트로부터 유래된 구성요소, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 당업자에게 공지된 임의의 적합한 구성요소 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[0093] 또 다른 구현예에서, 화학식 (I)의 효과기 모이어티는 하기 화학식 (Ia)의 효과기 모이어티일 수 있다:



[0094] 화학식 (Ia),

[0095] 상기 식에서,

[0096] A) Q는 NH 또는 O이고;

[0097] B) Z는 -Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C₁₆H₃₂O₈C₂H₄)_f이고,

[0098] 상기 식에서,

[0099] i. Cys는 시스테인아미드로부터 유래된 구성요소이고;

[0100] ii. MC는 말레이미드로부터 유래된 구성요소이고;

[0101] iii. VC는 시트룰린과 커플링된 발린으로부터 유래된 구성요소이고;

[0102] iv. PABC는 4-아미노벤질 카르바메이트로부터 유래된 구성요소이고;

[0103] v. X는 본원에 정의된 바와 같은 치료제이고;

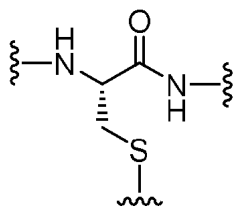
[0104] vi. a는 0 또는 1이고;

[0105] vii. b는 0 또는 1이고;

[0106] viii. c는 0 또는 1이고;

[0107] ix. f는 0 또는 1이다.

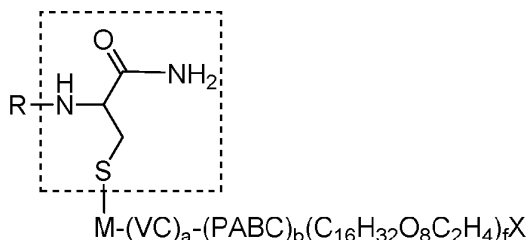
[0108] "시스테인아미드로부터 유래된 구성요소"는 H₂N-Q-CH₂-C(O)-에 대한 부착 지점이다. 한 구현예에서, "시스테인아미드로부터 유래된 구성요소"는 하기 구조를 갖는 효과기 모이어티의 하나 이상의 부분을 나타낼 수 있다:



[0109]

[0110]

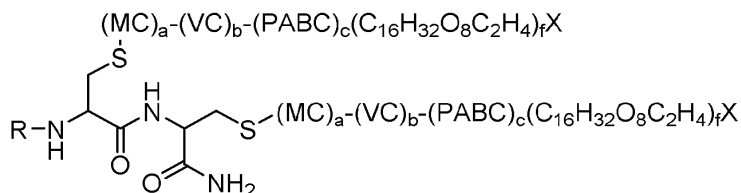
한 구현예에서, 효과기 모이어티의 "Cys" 구성요소는 하나의 상기 부분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 하기 구조는 하나의 상기 부분을 갖는 효과기 모이어티를 나타낸다(여기서, "Cys" 구성요소는 점선 박스로 표시된다):



[0111]

[0112]

또 다른 구현예에서, 효과기 모이어티의 "Cys" 구성요소는 2개 이상의 상기 부분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 하기 모이어티는 2개의 상기 부분을 함유한다:



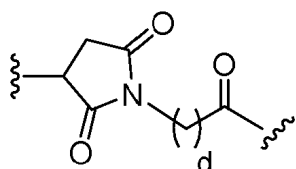
[0113]

[0114]

상기 구조로부터 관찰될 수 있는 바와 같이, 각각의 "Cys" 구성요소는 $-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C_{16}H_{32}O_8C_2H_4)_f-X$ 기를 갖는다.

[0115]

한 구현예에서, 구 "말레이미드로부터 유래된 구성요소"는 하기 구조를 갖는 효과기 모이어티의 임의의 부분을 나타낼 수 있다:



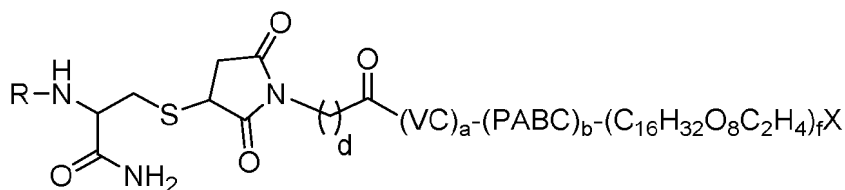
[0116]

[0117]

상기 식에서, d는 2 내지 5의 정수이다. 효과기 모이어티 내의 임의의 Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C₁₆H₃₂O₈C₂H₄)_f-X 기에 포함된 MC 구성요소의 수는 첨자 "a"로 표시되고, 0 또는 1일 수 있다. 한 구현예에서, a는 1이다. 또 다른 구현예에서, a는 0이다.

[0118]

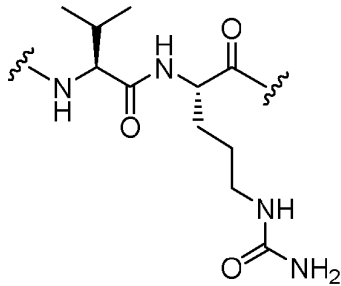
한 구현예에서, "Cys" 구성요소는 하기 구조에서 점선 박스로 표시되는 바와 같이 "Cys" 구성요소 내의 황 원자를 통해 "MC" 구성요소에 연결될 수 있다:



[0119]

[0120]

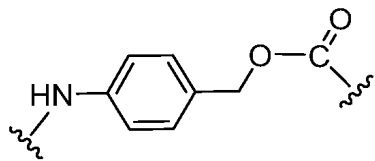
한 구현예에서, 구 "시트룰린과 커플링된 발린으로부터 유래된 구성요소"는 하기 구조를 갖는 효과기 모이어티의 임의의 부분을 나타낼 수 있다:



[0121]

[0122] 효과기 모이어티 내의 임의의 $\text{Cys}-(\text{MC})_a-(\text{VC})_b-(\text{PABC})_c-(\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{C}_2\text{H}_4)_f-\text{X}$ 기에 포함된 VC 구성요소의 수는 첨자 "b"로 표시되고, 0 또는 1일 수 있다. 한 구현예에서, b는 1이다. 또 다른 구현예에서, b는 0이다.

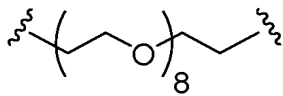
[0123] 한 구현예에서, 구 "4-아미노벤질 카르바메이트로부터 유래된 구성요소"는 하기 구조를 갖는 효과기 모이어티 중 임의의 부분을 나타낼 수 있다:



[0124]

[0125] 효과기 모이어티 내의 임의의 $\text{Cys}-(\text{MC})_a-(\text{VC})_b-(\text{PABC})_c-(\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{C}_2\text{H}_4)_f-\text{X}$ 기에 포함된 PABC 구성요소의 수는 첨자 "c"로 표시되고, 0 또는 1일 수 있다. 한 구현예에서, c는 1이다. 또 다른 구현예에서, c는 0이다.

[0126] 한 구현예에서, " $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{C}_2\text{H}_4$ "는 하기 구조를 나타낼 수 있다:



[0127]

[0128] 효과기 모이어티 내의 임의의 $\text{Cys}-(\text{MC})_a-(\text{VC})_b-(\text{PABC})_c-(\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{C}_2\text{H}_4)_f-\text{X}$ 기에 포함된 $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_8$ 단위의 수는 첨자 "f"로 표시된다. 한 구현예에서, f는 1이다. 또 다른 구현예에서, f는 0이다.

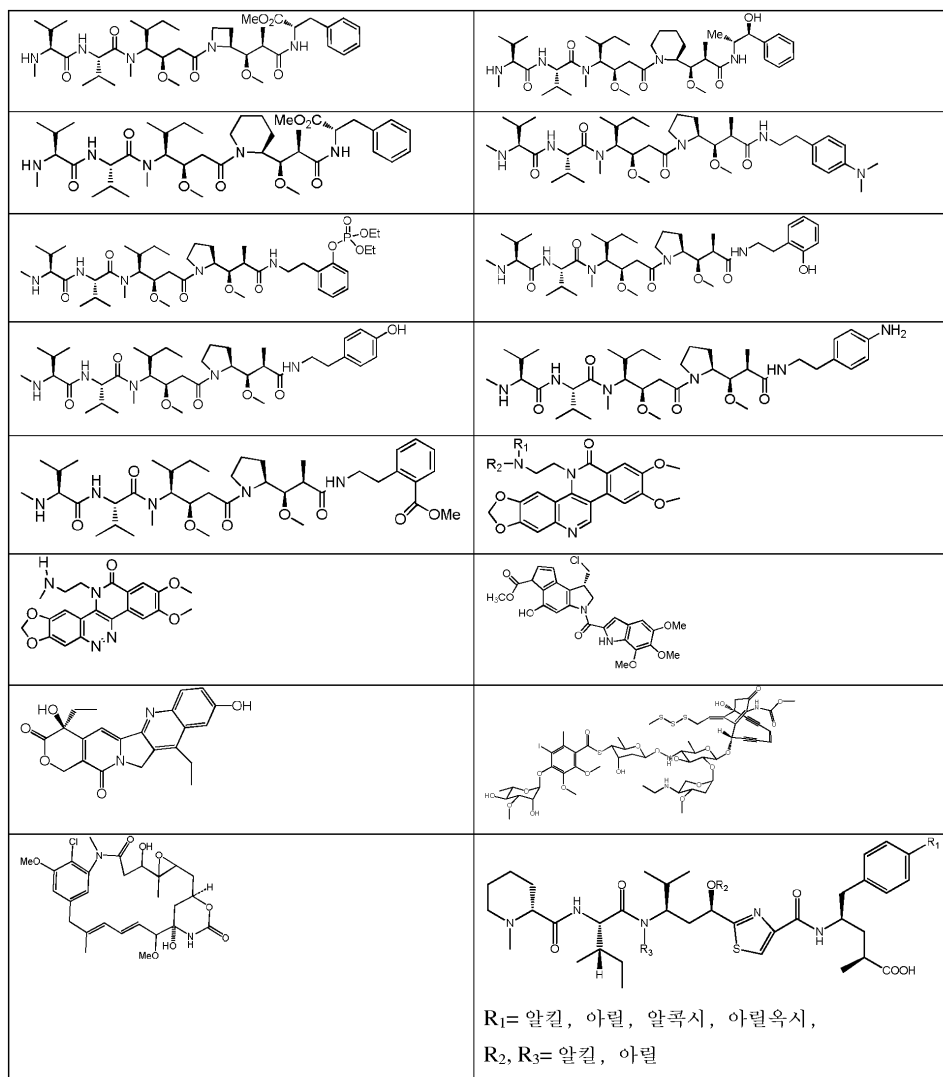
[0129] 한 구현예에서, a는 1이고, b는 1이고, c는 1이고, f는 0이다.

[0130] a) 치료 효과기 모이어티

[0131] 특정 구현예에서, 본 발명의 개시의 결합 폴리펩티드는 치료제, 예를 들어, 약물 모이어티(또는 이의 프로드러그) 또는 방사성표지된 화합물을 포함하는 효과기 모이어티에 컨주게이션된다. 한 구현예에서, 치료제는 세포독소이다. 예시적 세포독성 효과기 모이어티는 본원의 표 1에 기재되어 있다.

[0132] 표 1. 예시적 세포독성 효과기 모이어티

[0133]



조퀴논(diaziridiny-benzoquinone) 메틸 DZQ, 트리에틸렌포스포라미드, 및 니트로소우레아 화합물(예를 들어, 카르무스틴(carmustine), 로무스틴(lomustine), 세무스틴(semustine))을 포함한다.

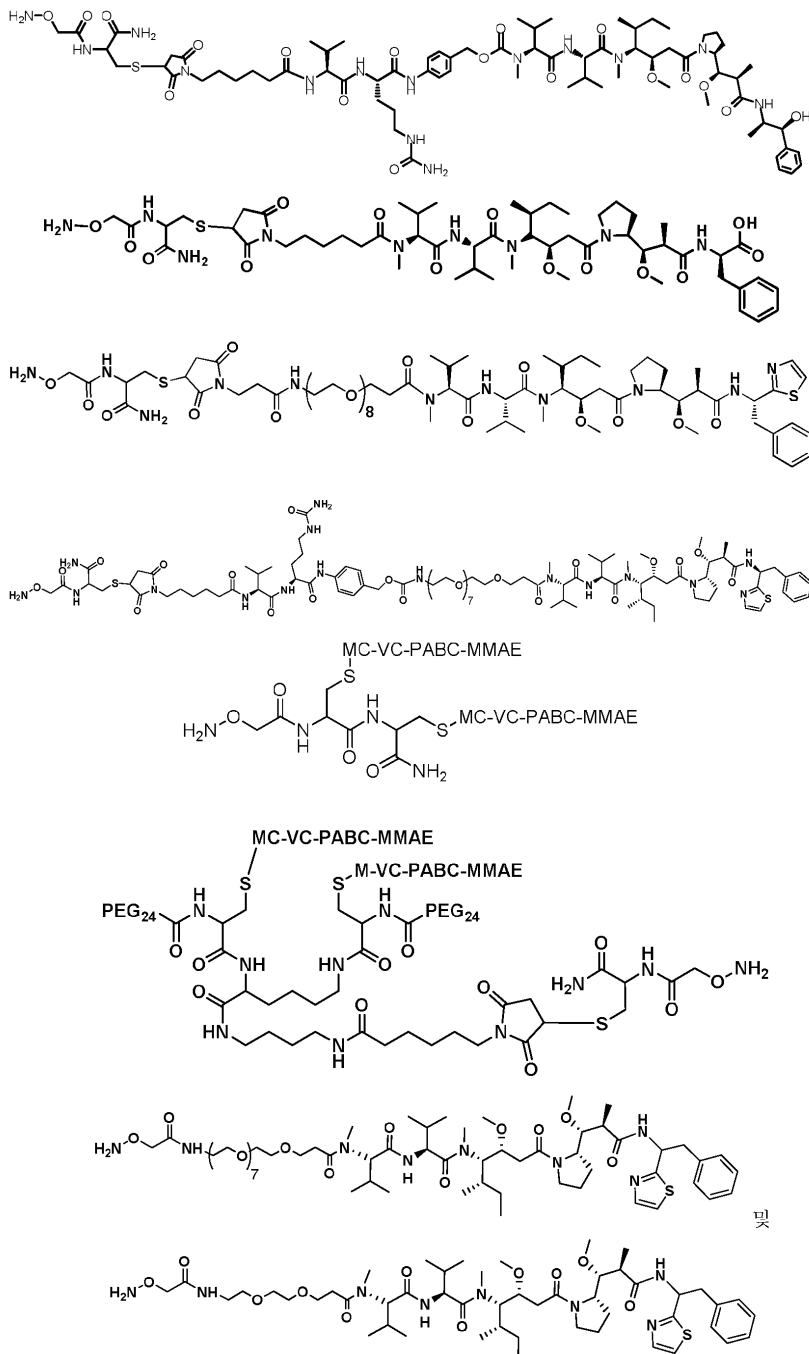
- [0136] 예시적인 세포독성 뉴클레오시드 항암제는, 예를 들어, 아데노신 아라비노시드, 시타라빈(cytarabine), 사이토신 아라비노시드, 5-플루오로우라실, 플루다라빈(fludarabine), 플록스우리딘(floxuridine), 프토라푸르(ftorafur), 및 6-머캅토피린을 포함한다. 예시적 항암 튜블린 결합제는 탁소이드(taxoid)(예를 들어, 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 탁산(taxane)), 노코다졸(nocodazole), 리족신(rhizoxin), 돌라스타틴(dolastatin)(예를 들어, 돌라스타틴-10, -11, 또는 -15), 콜히친 및 콜히치노이드(colchicinoid)(예를 들어, ZD6126), 콤브레타스타틴(combretastatin)(예를 들어, 콤브레타스타틴 A-4, AVE-6032), 및 빈카 알칼로이드(예를 들어, 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 빈데신(vindesine), 및 비노렐빈(vinorelbine)(나벨빈(navelbine)))을 포함한다. 예시적 항암 호르몬 및 호르몬 길항제는 코르티코스테로이드(예를 들어, 프레드니손(prednisone)), 프로게스틴(progestin)(예를 들어, 하이드록시프로게스테론 또는 메드로프로게스테론), 에스트로겐(예를 들어, 디에틸stil베스트롤(diethylstilbestrol)), 항에스트로겐(예를 들어, 타목시펜(tamoxifen)), 안드로겐(예를 들어, 테스토스테론), 아로마타제 억제제(예를 들어, 아미노글루테티미드), 17-(알릴아미노)-17-데메톡시겔다나마이신, 4-아미노-1,8-나프탈리미드, 아피게닌(apigenin), 브레펠딘 A(brefeldin A), 시메티딘(cimetidine), 디클로로메틸렌-디포스포산, 류프롤라이드(leuprolide)(류프로렐린(leuporelin)), 황체형성 호르몬-방출 호르몬, 피피트린-a(pifithrin-a), 라파마이신, 성 호르몬-결합 글로불린, 및 탐시가르긴(thapsigargin)을 포함한다. 예시적 항암, 항-혈관신생 화합물은 안지오스타틴 K1-3, DL-a-디플루오로메틸-오르니틴, 엔도스타틴, 퓨마길린(fumagillin), 제니스테인(genistein), 미노사이클린(minocycline), 스타우로스포르린(staurosporine), 및 (±)-탈리도마이드((±)-thalidomide)를 포함하였다.
- [0137] 예시적 항암 효소 억제제는 S(+)-캄프토테신(S(+)-camptothecin), 커큐민(curcumin), (-)-데구엘린((-)-deguelin), 5,6-디클로로벤즈-이미다졸 1-β-D-리보푸라노시드, 에토포시드(etoposide), 포르메스탄(formestane), 포스트리에신(fostriecin), 히스피딘(hispidin), 2-이미노-1-이미다졸리딘아세트산(사이클로크레아틴(cyclocreatine)), 메비놀린(mevinolin), 트리코스타틴 A(trichostatin A), 트리포스틴 AG 34(tyrphostin AG 34), 및 티르포스틴 AG 879(tyrphostin AG 879)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0138] 예시적 항암 유전자 조절제는 5-아자-2'-데옥시시티딘, 5-아자시티딘, 콜레칼시페롤(cholecalciferol)(비타민 D3), 4-하이드록시타목시펜(4-hydroxytamoxifen), 멜라토닌, 미페프리스톤(mifepristone), 랄록시펜(raloxifene), 트랜스-레티날(비타민 A 알데하이드), 레티노산, 비타민 A 산, 9-시스-레티노산, 13-시스-레티노산, 레티놀(비타민 A), 타목시펜, 및 트로글리타존(troglitazone)을 포함한다.
- [0139] 다른 바람직한 부류의 항암제는, 예를 들어, 프테리딘 패밀리 의 약물, 다이넨(diynene), 및 포도필로톡신을 포함한다. 상기 부류의 특히 유용한 일원은, 예를 들어, 메토프테린(methopterin), 포도필로톡신, 또는 포도필로톡신 유도체, 예를 들어, 에토포시드(etoposide) 또는 에토포시드 포스페이트, 류로시딘(leurosidine), 빈데신(vindesine), 류로신(leurosine) 등을 포함한다.
- [0140] 본원의 교시내용과 상용되는 또 다른 항암제는 아우리스타틴(예를 들어, 아우리스타틴 E 및 모노메틸아우리스타틴 E), 겔다나마이신(geldanamycin), 칼리케아마이신(calicheamicin), 그라미시딘 D(gramicidin D), 마이탄사노이드(maytansanoid)(예를 들어, 마이탄신), 네오카르지노스타틴(neocarzinostatin), 토포테칸(topotecan), 탁산(taxane), 시토칼라신 B(cytochalasin B), 에티뒸 브로마이드(ethidium bromide), 에메틴(emetine), 테노포시드(tenoposide), 콜히친, 디하이드록시 안트라신디온, 미톡산트론, 프로카인(procaine), 테트라카인(tetracaine), 리도카인(lidocaine), 프로프라놀롤(propranolol), 퓨로마이신(puromycin), 및 이의 유사체 또는 동족체를 포함한다.
- [0141] 본원의 교시내용과 상용되는 또 다른 항암제는 토마이마이신 유도체, 마이탄신 유도체, 크립토파이신(cryptophycine) 유도체, 안트라사이클린 유도체, 비스포스포네이트 유도체, 랩토마이신 유도체, 스트랩토니그린 유도체, 아우리스타틴 유도체, 및 듀오카르마이신 유도체를 포함한다.
- [0142] 약물 모이어티로서 사용될 수 있는 상용성 항암제의 또 다른 부류는 종양 또는 면역반응성 세포로 효과적으로 유도될 수 있는 방사선민감성 약물이다. 상기 약물 모이어티는 이온화 방사선에 대한 민감성을 향상시킴으로써 방사선요법의 효능을 증가시킨다. 이론으로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 방사선민감성 약물 모이어티로 변형되고 종양 세포에 의해 내재화되는 항체는 핵에 더 가까이 방사선민감제를 전달하며, 여기서 방사선민감화가 최대가 될 것이다. 방사선민감제 모이어티를 상실한 항체는 혈액으로부터 신속히 청소되고, 남아있는 방사선민감화 작용제를 표적 종양에 국소화시키고, 정상 조직에서 최소 흡수를 제공할 것이다. 혈액으로부터의 청소 후,

부수적인 방사선요법은 종양으로 특별히 유도된 외부 빔 방사선, 종양 내에 직접 이식된 방사능, 또는 동일한 변형된 항체를 이용한 전신 방사선면역치료법에 의해 제공될 수 있다.

[0143] 한 구현예에서, 치료제는 핵 DNA 내에서 다수의 가닥 파괴를 야기시켜 세포 사멸을 발생시킬 수 있는 고-에너지 이온화 방사선을 갖는 방사성핵종 또는 방사성표지를 포함한다. 예시적 고-에너지 방사성핵종은 ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{111}In , ^{105}Rh , ^{153}Sm , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re 및 ^{188}Re 를 포함한다. 이들 동위원소는 통상적으로 짧은 경로 길이를 갖는 고 에너지 α - 또는 β -입자를 생성시킨다. 상기 방사성핵종은 이들이 근접한 세포, 예를 들어, 컨주게이트가 부착되거나 진입한 신생물 세포를 사멸시킨다. 이들은 국소화되지 않은 세포에 대해 거의 효과가 없거나 효과가 없고, 본질적으로 비-면역원성이다. 대안적으로, 고-에너지 동위원소는, 예를 들어, 보론 중성자-포획 요법에서와 같이 다른 안정적인 동위원소의 열 방사선조사에 의해 발생할 수 있다 (Guan et al., PNAS, 95: 13206-10, 1998).

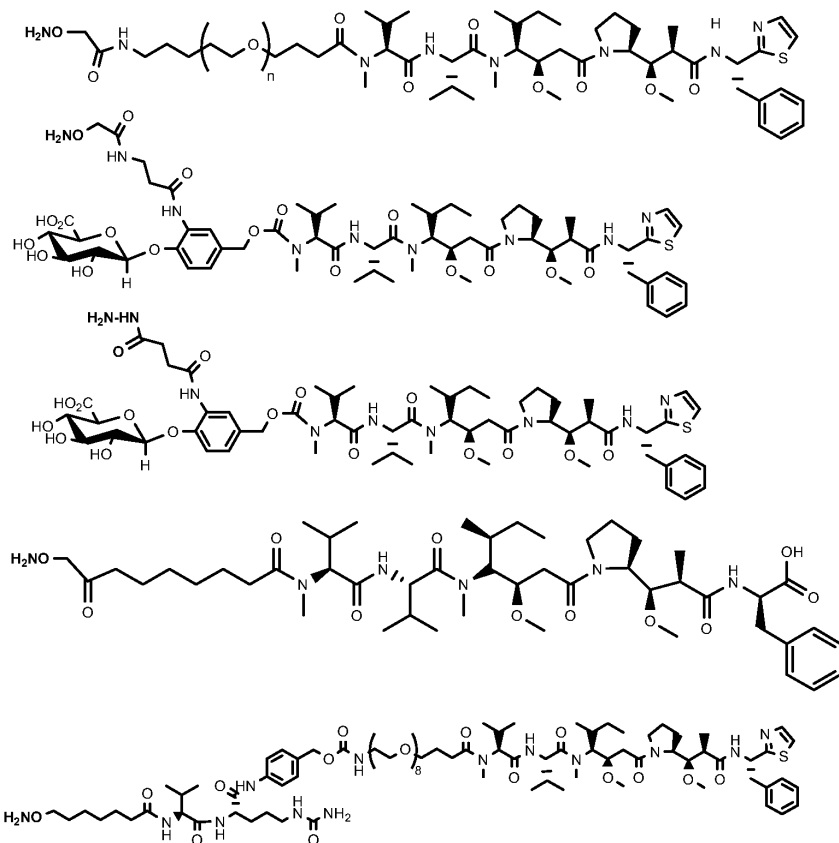
[0144] 한 구현예에서, 치료제는 MMAE, MMAF, 및 PEG8-Do110으로부터 선택된다.

[0145] 예시적 치료 효과기 모이어티는 하기 구조를 포함한다:



[0146]

[0147] 한 구현예에서, 효과기 모이어티는 하기로부터 선택된다:



[0148]

[0149] 특정 구현예에서, 효과기 모이어티는 1개 초과 치료제를 함유한다. 이들 다수의 치료제는 동일하거나 상이할 수 있다.

[0150] i. 진단 효과기 모이어티

[0151] 특정 구현예에서, 본 발명의 개시의 결합 폴리펩티드는 진단 작용제를 포함하는 효과기 모이어티에 컨주게이션된다. 한 구현예에서, 진단 작용제는 검출가능한 소분자 표지, 예를 들어, 비오틴, 형광단, 발색단, 스핀 공명 프로브, 또는 방사성표지이다. 예시적 형광단은 형광 염료(예를 들어, 플루오레세인, 로다민 등) 및 다른 발광 분자(예를 들어, 루미날)를 포함한다. 형광단은 기질(예를 들어, 단일 프로브)로의 결합시 구조적 변화를 겪는 변형된 결합 폴리펩티드 내의 하나 이상의 잔기에 가깝게 위치되는 경우 형광이 변화되도록 환경적으로 민감할 수 있다. 예시적 방사성표지는 하나 이상의 저 민감성 핵을 갖는 원자를 함유하는 소분자(¹³C, ¹⁵N, ²H, ¹²⁵I, ¹²⁴I, ¹²³I, ⁹⁹Tc, ⁴³K, ⁵²Fe, ⁶⁴Cu, ⁶⁸Ga, ¹¹¹In 등)를 포함한다. 바람직하게는, 방사성핵종은 투여와 영상화 부위로의 국소화 사이에서 시간 경과 후에 활성 또는 검출을 가능케 하기에 적합한 반감기를 갖는 감마, 알파, 또는 양전자-방출 방사성핵종이다.

[0152] 한 구현예에서, 진단제는 폴리펩티드이다. 예시적 진단 폴리펩티드는 플루오로게닉(fluorogenic) 또는 크로모게닉(chromogenic) 활성, 예를 들어, 기질을 분해하여 생성물로서 형광단 또는 발색단을 형성시키는 능력을 갖는 효소(즉, 리포터 단백질, 예를 들어, 루시페라제)를 포함한다. 다른 진단 단백질은 내인성 플루오로게닉 또는 크로모게닉 활성(예를 들어, 생물발광 해양 유기체로부터의 녹색, 적색, 및 황색 형광 생물발광 애쿠오린 단백질)을 가질 수 있거나, 이들은 하나 이상의 저-에너지 방사성 핵(¹³C, ¹⁵N, ²H, ¹²⁵I, ¹²⁴I, ¹²³I, ⁹⁹Tc, ⁴³K, ⁵²Fe, ⁶⁴Cu, ⁶⁸Ga, ¹¹¹In 등)을 함유하는 단백질을 포함할 수 있다.

[0153] 본 발명의 개시와 관련된 방사성표지된 컨주게이트의 사용과 관련하여, 본 발명의 개시의 결합 폴리펩티드는 직접 표지(예를 들어, 요오드화를 통한)될 수 있거나, 킬레이트제의 사용을 통해 간접적으로 표지될 수 있다. 본원에서 사용되는 구 "간접적으로 표지된" 및 "간접적으로 표지되는 접근법" 둘 모두는 킬레이트제가 결합 폴리펩티드에 공유적으로 부착되고, 적어도 하나의 방사성핵종이 킬레이트제와 회합되는 것을 의미한다. 이러한 킬레이트제는 통상적으로 이들이 폴리펩티드 및 방사성동위원소 둘 모두에 결합하는 이기능성 킬레이트제로 언급된다. 예시적 킬레이트제는 1-이소티오시마토벤질(isothiocyanatobenzyl)-3-메틸디옥틸렌 트리아민펜타아세트

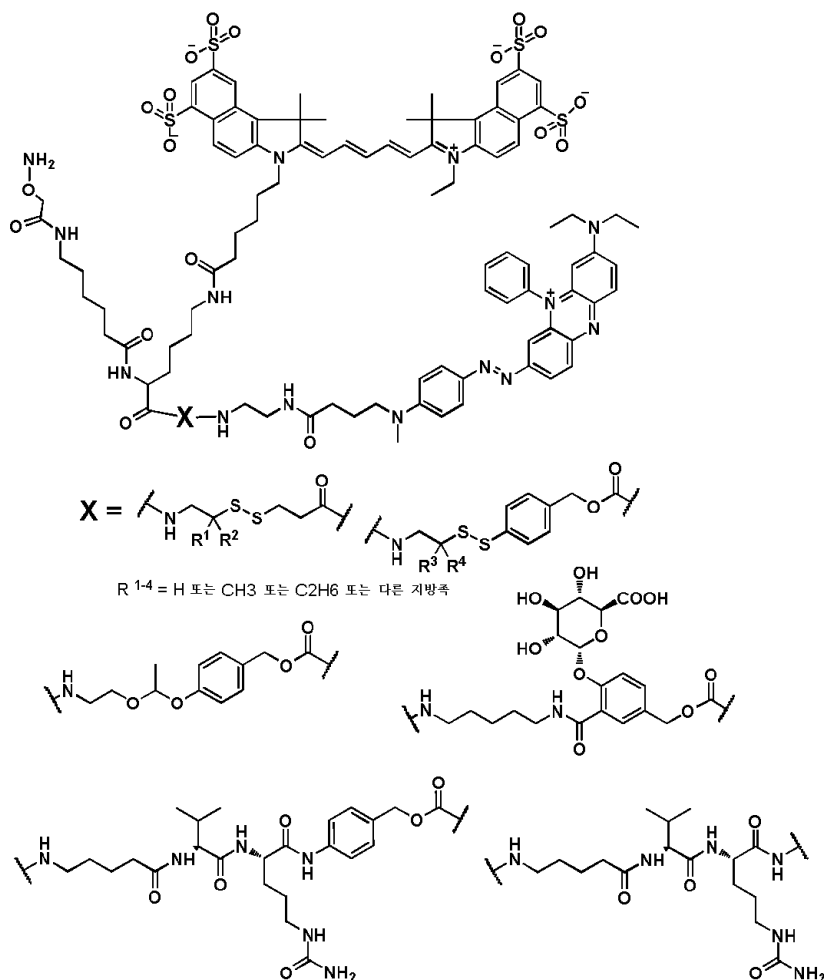
산("MX-DTPA") 및 사이클로헥실 디에틸렌트리아민 펜타아세트산("CHX-DTPA") 유도체를 포함한다. 다른 킬레이트제는 P-DOTA 및 EDTA 유도체를 포함한다. 간접적 표지화를 위해 특히 바람직한 방사성핵종은 ^{111}In 및 ^{90}Y 를 포함한다. 대부분의 영상화 연구는 5 mCi ^{111}In -표지된 항체를 이용하는데, 이는 이러한 선량이 안전하고, 더 낮은 선량과 비교하여 증가된 영상화 효율을 갖기 때문이며, 최적의 영상화는 항체 투여 3 내지 6일 후에 발생한다. 예를 들어, 문헌[Murray, (1985), J. Nuc. Med. 26: 3328 and Carraguillo et al, (1985), J. Nuc. Med. 26: 67]을 참조하라. 직접 표지화를 위해 특히 바람직한 방사성핵종은 ^{131}I 이다. 당업자는 비-방사성 컨쥬게이트가 또한 컨쥬게이션되는 선택된 작용제에 따라 어셈블리될 수 있음을 인지할 것이다.

[0154]

특정 구현예에서, 진단 효과기 모이어티는 FRET(형광 공명 에너지 전이) 프로브이다. FRET는 암 진단을 포함하는 다양한 진단 적용분야에 사용되어 왔다. FRET 프로브는 FRET 프로브의 공여체 및 수용체 모이어티를 연결하는 분해성 링커(효소 민감성 또는 pH 링커)를 포함할 수 있으며, 여기서 분해는 향상된 형광(근적외선을 포함함)을 발생시킨다(예를 들어, 문헌[A. Cobos-Correa et. al. *Membrane-bound FRET probe visualizes MMP12 activity in pulmonary inflammation*, Nature Chemical Biology (2009), 5(9), 628-63; S. Gehrig et.al. *Spatially Resolved Monitoring of Neutrophil Elastase Activity with Ratiometric Fluorescent Reporters* (2012) Angew. Chem. Int. Ed., 51, 6258-6261] 참조).

[0155]

한 구현예에서, 효과기 모이어티는 하기로부터 선택된다:



[0156]

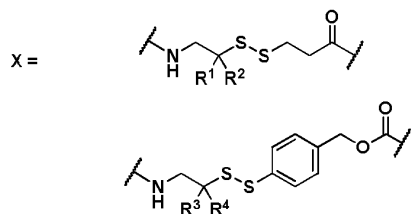
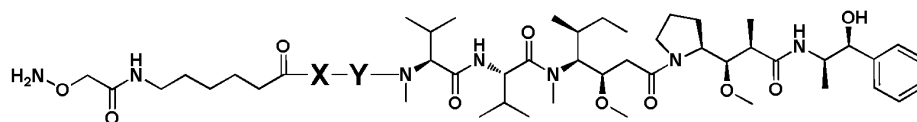
[0157]

c. 기능화된 효과기 모이어티

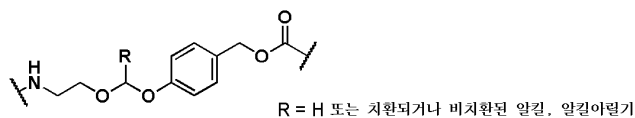
[0158]

특정 구현예에서, 본 발명의 효과기 모이어티는 효과기 모이어티 자체에 더하여 추가의 기를 함유하도록 기능화될 수 있다. 예를 들어, 효과기 모이어티는 특정 조건하에서 결합 폴리펩티드로부터 효과기 모이어티를 방출시키는 분해성 링커를 함유할 수 있다. 예시적 구현예에서, 효과기 모이어티는 세포 효소에 의해 분해가능하고/하거나 pH 민감성인 링커를 포함할 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 효과기 모이어티는 세포로의 흡수시 세포내 글루타티온에 의해 분해되는 디설파이드 결합을 함유할 수 있다. 예시적 디설파이드 및 pH 민감성 링커가 하기

에 제공된다:



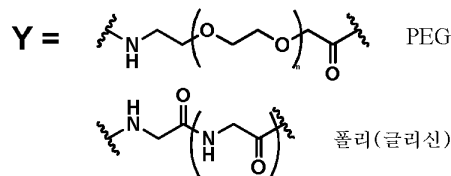
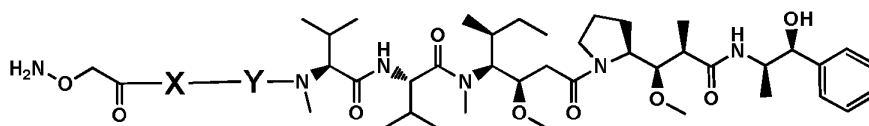
R¹⁻⁴ = H 또는 CH₃ 또는 C₂H₅ 또는 다른 지방족



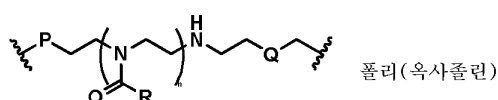
[0159]

[0160]

또 다른 구현예에서, 효과기 모이어티는 친수성 및 생체적합성 모이어티, 예를 들어, 폴리(글리신), 폴리(옥사졸린), 또는 PEG 모이어티를 포함할 수 있다. 예시적 구조("Y")가 하기에 제공된다:



폴리(글리신)



폴리(옥사졸린)

[0161]

[0162]

특정 구현예에서, 효과기 모이어티는 안정적인 옥심 결합을 통해 결합 폴리펩티드로의 컨쥬게이션을 촉진하는 아미노옥시기를 함유한다. 아미노옥시기를 함유하는 예시적 효과기 모이어티는 본원의 표 2에 기재되어 있다.

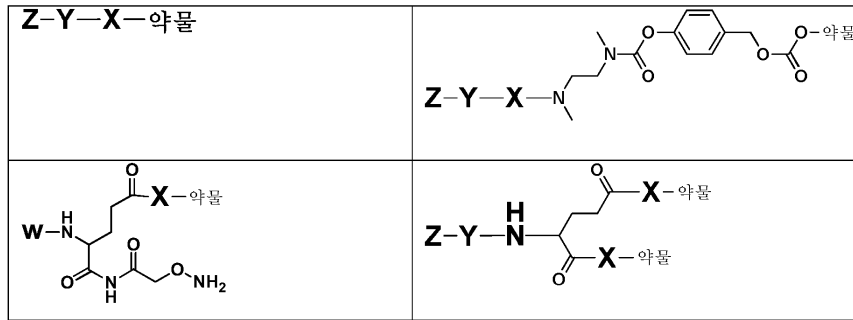
[0163]

표 2. 예시적인 아미노옥시 기능화 링커 모이어티

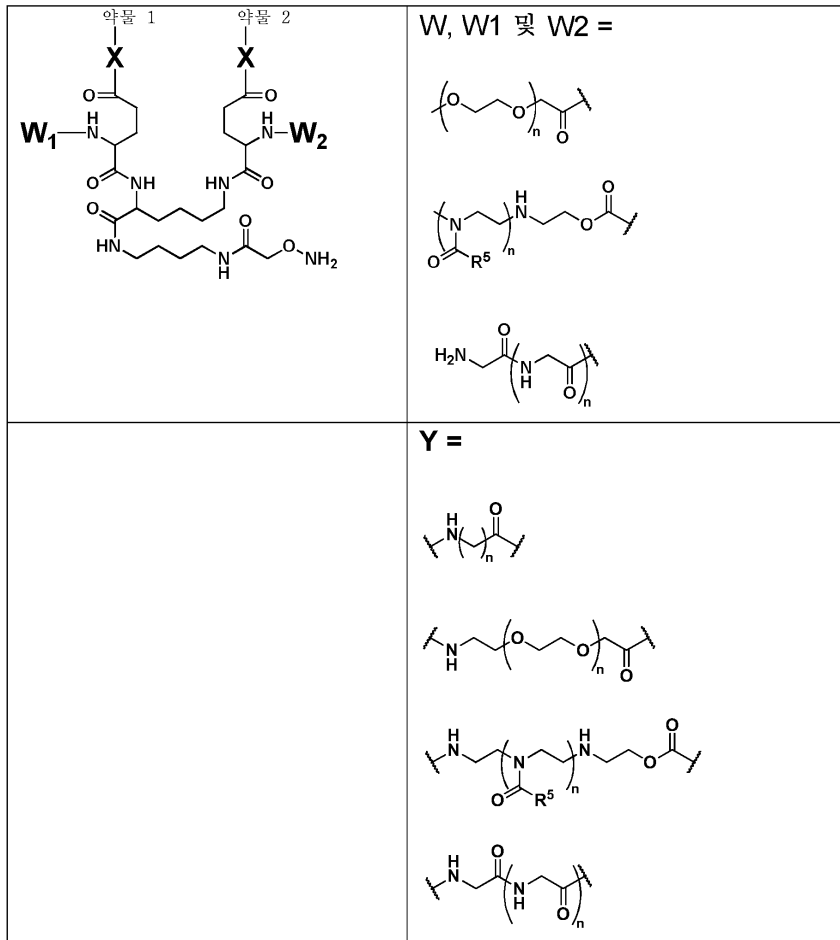
[0164]

표 2. 예시적인 아미노옥시 효과기 모이어티 (여기서, X는 임의의 링커일 수 있고, Y는 임의의 스페이서이고, 여기서 X 및/또는 Y는 임의적이다)

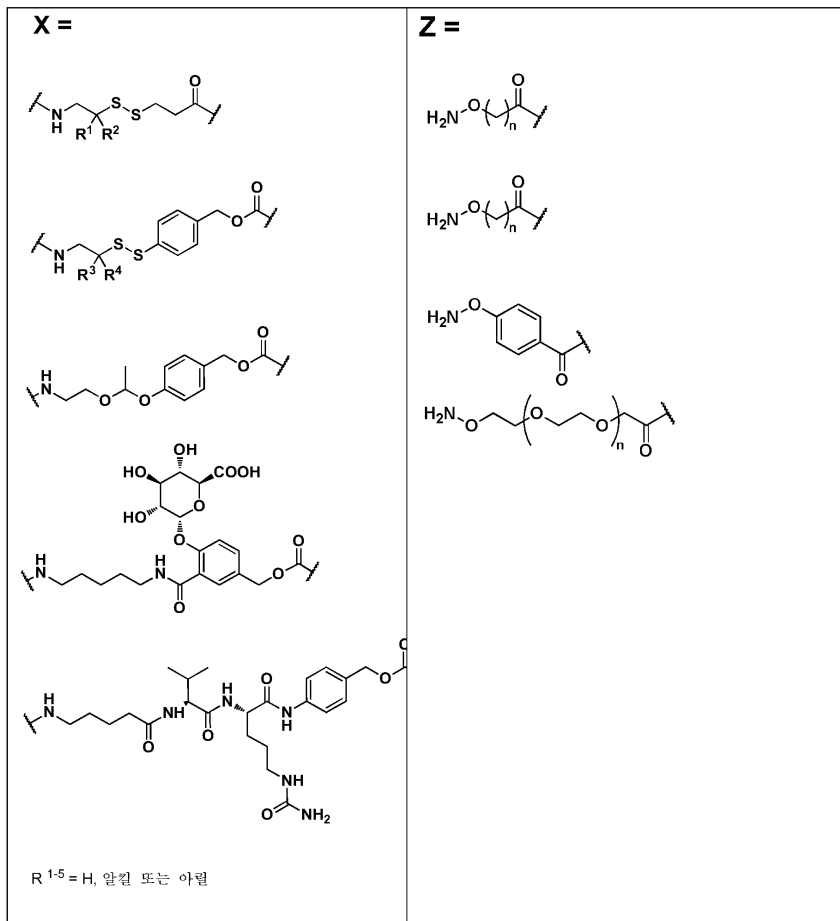
[0165] 본원의 약물은 본문의 표 1의 임의의 약물일 수 있다. 약물 1 및 약물 2는 동일하거나 상이한 약물일 수 있다.



[0166]



[0167]



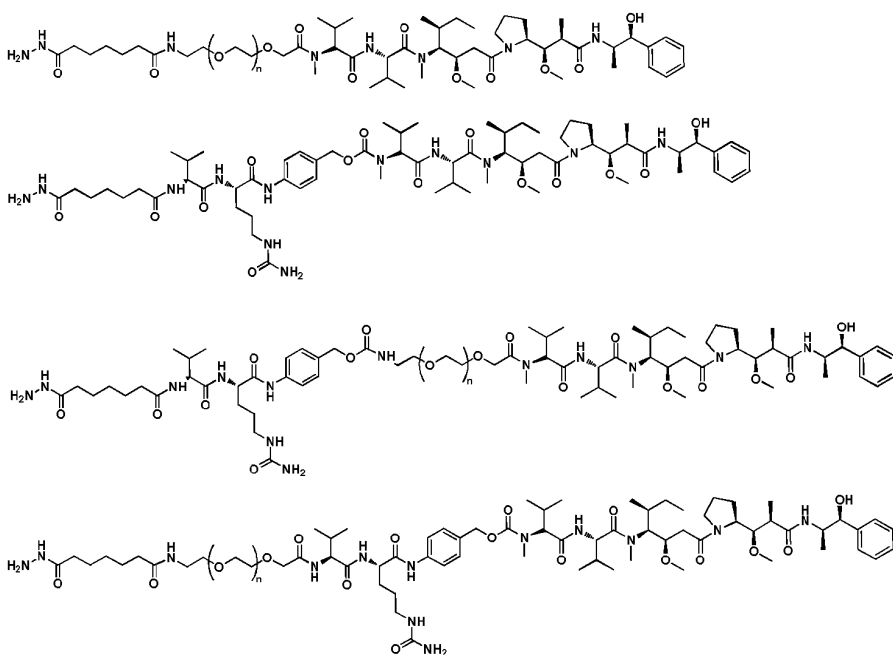
[0168]

[0169]

다른 구현예에서, 효과기 모이어티는 안정적인 하이드라존 결합을 통한 결합 폴리펩티드로의 컨쥬게이션을 촉진하는 하이드라지드 및/또는 N-알킬화된 하이드라진기를 함유한다. 아미노옥시기를 함유하는 예시적 효과기 모이어티는 본원의 표 14에 기재되어 있다.

[0170]

표 14. 예시적 하이드라진 및/또는 하이드라지드 효과기 모이어티



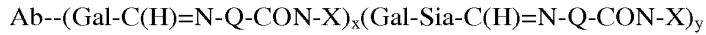
[0171]

[0172]

V. 결합 폴리펩티드로의 효과기 모이어티의 컨쥬게이션

- [0173] 특정 구현예에서, 효과기 모이어티는 변경된 결합 폴리펩티드의 산화된 글리칸(예를 들어, 산화된 N-결합된 글리칸)(예를 들어, 항체 Fc 도메인의 N298에서의 조작된 글리칸)으로 컨쥬게이션(직접적 또는 링커 모이어티를 통한)된다. 용어 "산화된 글리칸"은 글리칸 상의 알콜 치환기가 산화되어 카르보닐 치환기를 제공하는 것을 의미한다. 카르보닐 치환기는 적합한 질소 친핵체와 반응하여 탄소-질소 이중결합을 형성할 수 있다. 예를 들어, 카르보닐기와 아미노옥시기 또는 하이드라진기의 반응은 각각 옥심 또는 하이드라진을 형성한다. 한 구현예에서, 카르보닐 치환기는 알데하이드이다. 적합한 산화된 글리칸은 산화된 갈락토스 및 산화된 시알산을 포함한다.
- [0174] 한 구현예에서, 화학식 (II)의 변형된 폴리펩티드는 하기 화학식 (II)의 변형된 폴리펩티드일 수 있다:
- $$\text{Ab}(\text{Gal-C(O)H})_x(\text{Gal-Sia-C(O)H})_y$$
- [0175] 화학식 (II),
- [0176] 상기 식에서,
- [0177] A) Ab는 본원에 정의된 바와 같은 항체 또는 다른 결합 폴리펩티드이고;
- [0178] B) Gal은 갈락토스로부터 유래된 구성요소이고;
- [0179] C) Sia는 시알산으로부터 유래된 구성요소이고;
- [0180] D) x는 0 내지 5이고;
- [0181] E) y는 0 내지 5이고,
- [0182] 여기서, x 및 y 중 적어도 하나는 0이 아니다.
- [0183] 글리칸에 효과기 모이어티(예를 들어, 링커 모이어티를 포함하는 효과기 모이어티)를 컨쥬게이션시키기 위해 임의의 당 분야에 인정된 화학이 이용될 수 있다(예를 들어, 전체내용이 참조로서 본원에 포함되는 문헌 [Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques. Academic Press (1996)] 참조). 특정 구현예에서, 글리칸의 당류 잔기(예를 들어, 시알산 또는 갈락토스 잔기)는 먼저 산화(예를 들어, 소듐 페리오데이트 또는 갈락토스 산화효소 처리를 이용함)되어 반응성 알데하이드기를 생성시킨다. 이러한 알데하이드기는 효과기 모이어티인 아미노옥시기 또는 하이드라진기와 반응되어 옥심 또는 하이드라존 링커를 각각 형성시킨다. 이러한 일반적 반응식을 이용하는 예시적 방법은 실시예 10 내지 15에 기재되어 있다.
- [0184] 특정 구현예에서, 결합 폴리펩티드의 자연 글리칸 또는 조작된 글리칸은 먼저 시험관내에서 글리코실트랜스페라제 효소로 전처리되어 적합하게 반응성인 말단 당류 잔기를 제공한다. 예를 들어, 시알릴화는 먼저 갈락토실트랜스페라제(Gal T) 및 시알릴트랜스페라제(Sial T)의 조합을 이용하여 달성될 수 있다. 특정 구현예에서, 갈락토스가 결핍되거나(G0F 또는 G0), 단지 하나의 갈락토스를 함유하는(G1F 또는 G1) 바이안테나리 글리칸은 컨쥬게이션에 적합한 더-고등한 갈락토실화되거나 시알릴화된 구조로 전환될 수 있다(G1F, G1, G2F, G2, G1S1F, G1S1, G2S1F, G2S1, G2S2F, 또는 G2S2).
- [0185] 시알릴화된 글리코컨쥬게이트를 생성시키기 위한 예시적 컨쥬게이션 반응식은 도 25C에 제시되어 있다. 시알산 잔기는 갈락토실트랜스페라제(Gal T) 및 시알릴트랜스페라제(Sial T)의 조합을 이용하여 항체의 글리칸(예를 들어, Fc 도메인의 N298에서 조작된 글리칸)으로 효소적 및 부위 특이적으로 도입된다. 도입된 시알산 잔기는 이후에 저농도의 소듐 페리오데이트로 산화되어, 반응성 시알산 알데하이드를 생성시키고, 이는 약물-링커(예를 들어, 아미노옥시 약물 링커)와 적합하게 반응되어, 항체 약물 컨쥬게이트(ADC)(예를 들어, 옥심-결합된 ADC)를 생성시킨다. 시험관내 재형성을 이용하여 글리칸의 수 및 시알릭 잔기의 수를 조절함으로써, 당업자는 ADC의 약물-항체 비(DAR)를 정확하게 조절할 수 있다. 예를 들어, 약 1개의 시알산이 각각의 중쇄 내에 하나의 바이안테나리 글리칸(A1F)으로 첨가되는 경우, 2의 DAR을 갖는 항체 또는 결합 폴리펩티드가 균일하게 수득될 수 있다.
- [0186] VI. 변형된 결합 폴리펩티드
- [0187] 특정 구현예에서, 본 발명은 효과기 모이어티가 변경된 결합 폴리펩티드의 산화된 글리칸(예를 들어, 산화된 N-결합된 글리칸)(예를 들어, 항체 Fc 도메인의 N298에서 조작된 글리칸)에 컨쥬게이션(직접 또는 링커 모이어티를 통한)된 컨쥬게이션의 생성물인 변형된 폴리펩티드를 제공한다.
- [0188] 한 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 하기 화학식 (III)의 결합 폴리펩티드일 수 있다:

[0189] 삭제



[0190] 화학식 (III),

[0191] 상기 식에서,

[0192] A) Ab는 본원에 정의된 바와 같은 항체이고;

[0193] B) Q는 NH 또는 O이고;

[0194] C) CON은 본원에 정의된 바와 같은 연결기 모이어티이고;

[0195] D) X는 본원에 정의된 바와 같은 치료제 또는 진단제이고;

[0196] E) Gal은 갈락토스로부터 유래된 구성요소이고;

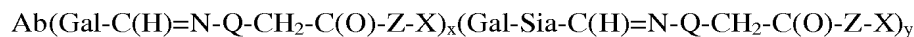
[0197] F) Sia는 시알산으로부터 유래된 구성요소이고;

[0198] G) x는 0 내지 5이고;

[0199] H) y는 0 내지 5이고,

[0200] 여기서, x 및 y 중 적어도 하나는 0이 아니다.

[0201] 한 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 하기 화학식 (IIIa)의 결합 폴리펩티드일 수 있다:



[0202] 화학식 (IIIa),

[0203] 상기 식에서,

[0204] A) Ab는 항체이고;

[0205] B) Q는 NH 또는 O이고;

[0206] C) Z는 $\text{Cys}-(\text{MC})_a-(\text{VC})_b-(\text{PABC})_c-(\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_8 \text{ C}_2\text{H}_4)_f$ -이고,

[0207] i. Cys는 시스테인아미드로부터 유래된 구성요소이고;

[0208] ii. MC는 말레이미드로부터 유래된 구성요소이고;

[0209] iii. VC는 시트룰린과 커플링된 발린으로부터 유래된 구성요소이고;

[0210] iv. PABC는 4-아미노벤질 카르바메이트로부터 유래된 구성요소이고;

[0211] v. X는 본원에 정의된 바와 같은 치료제 또는 진단제이고;

[0212] vi. a는 0 또는 1이고;

[0213] vii. b는 0 또는 1이고;

[0214] viii. c는 0 또는 1이고;

[0215] ix. f는 0 또는 1이고;

[0216] D) X는 본원에 정의된 바와 같은 치료제이고;

[0217] E) Gal은 갈락토스로부터 유래된 구성요소이고;

[0218] F) Sia는 시알산으로부터 유래된 구성요소이고;

[0219] G) x는 0 내지 5이고;

[0220] H) y는 0 내지 5이고,

- [0245] 상기 화학식 (IIa)에서,
- [0246] A) Ab는 본원에 기재된 바와 같은 항체이고;
- [0247] B) Gal은 갈락토스로부터 유래된 구성요소이고;
- [0248] C) Sia는 시알산으로부터 유래된 구성요소이고;
- [0249] D) x는 0 내지 5이고;
- [0250] E) y는 0 내지 5이고,
- [0251] 여기서, x 및 y 중 적어도 하나는 0이 아니다.

[0252] **IX. 변형된 항체를 이용한 치료 방법**

[0253] 한 양태에서, 본 발명은 유효량의 본원에 개시된 결합 폴리펩티드를 투여하는 것을 포함하는, 환자를 치료하거나 진단하는 방법을 제공한다. 본 발명의 개시의 바람직한 구현에는 치료를 필요로 하는 포유동물 대상체에서 장애, 예를 들어, 신생물 장애의 진단 및/또는 치료를 위한 키트 및 방법을 제공한다. 바람직하게는, 대상체는 인간이다.

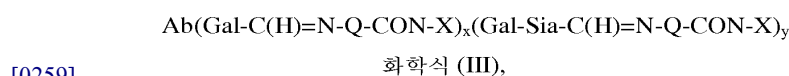
[0254] 본 발명의 개시의 결합 폴리펩티드는 다수의 다양한 적용에서 유용하다. 예를 들어, 한 구현예에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 결합 폴리펩티드의 결합 도메인에 의해 인지되는 에피토프를 갖는 세포를 감소시키거나 제거하는데 유용하다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 순환 중의 가용성 항원의 농도를 감소시키거나 가용성 항원을 제거하는데 효과적이다. 한 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 종양 크기를 감소시키고/시키거나, 종양 성장을 억제하고/하거나, 종양을 갖는 동물의 생존 기간을 연장시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 개시는 또한 효과적인 비독성 양의 변형된 항체를 인간 또는 다른 동물에 투여함으로써 인간 또는 다른 동물에서 종양을 치료하는 방법에 관한 것이다. 당업자는 효과적인 비독성 양의 변형된 결합 폴리펩티드가 악성종양을 치료하기 위한 목적에 부합하는지 일상적인 실험에 의해 결정할 수 있을 것이다. 예를 들어, 변형된 항체 또는 이의 단편의 치료적 유효량은 질병 단계(예를 들어, 단계 I 대 단계 IV), 대상체의 연령, 성별, 의학적 합병증(예를 들어, 면역억제 질환 또는 질병) 및 체중, 및 대상체에서 요망되는 반응을 유도하는 변형된 항체의 능력과 같은 요인에 따라 다양할 수 있다. 투여 요법은 최적의 치료 반응을 제공하기 위해 조정될 수 있다. 예를 들어, 몇몇으로 나누어진 용량이 매일 투여될 수 있거나, 용량은 치료 상황의 긴급성에 의해 지정되는 바에 따라 비례적으로 감소될 수 있다.

[0255] 일반적으로, 본 발명의 개시에 제공된 조성물은 변형된 항체에 의한 암성 세포의 표적화를 가능케 하는 항원성 마커를 포함하는 임의의 신생물을 예방적 또는 치료적으로 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0256] **X. 변형된 항체 또는 이의 단편을 투여하는 방법**

[0257] 본 발명의 개시의 결합 폴리펩티드를 제조하고 피검체에 투여하는 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있거나, 당업자에 의해 용이하게 결정된다. 본 발명의 개시의 결합 폴리펩티드의 투여 경로는 경구, 비경구, 흡입 또는 국소 투여 경로일 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 비경구는 정맥내, 동맥내, 복막내, 근내, 피하, 직장 또는 질내 투여를 포함한다. 비경구 투여의 정맥내, 동맥내, 피하 및 근내 형태가 일반적으로 바람직하다. 상기 모든 형태의 투여가 본 발명의 개시의 범위 내인 것으로 명백히 고려되나, 투여를 위한 형태는, 특히 정맥내 또는 동맥내 주사 또는 점적주입을 위한 주사용수일 것이다. 보통, 주사를 위한 적합한 약학적 조성물은 완충제(예를 들어, 아세트이트, 포스페이트 또는 시트레이트 완충제), 계면활성제(예를 들어, 폴리소르베이트), 임의로 안정화제(예를 들어, 인간 알부민) 등을 포함할 수 있다. 그러나, 본원의 교시내용과 상용되는 다른 방법에서, 변형된 항체는 유해한 세포 집단 부위에 직접 전달됨으로써 치료제에 대한 병든 조직의 노출을 증가시킬 수 있다.

[0258] 한 구현예에서, 투여되는 결합 폴리펩티드는 하기 화학식 (III)의 결합 폴리펩티드이다:



- [0260] 상기 식에서,
- [0261] A) Ab는 본원에 정의된 바와 같은 항체이고;
- [0262] B) Q는 NH 또는 O이고;

- [0263] C) CON은 본원에 정의된 바와 같은 연결기 모이어티이고;
- [0264] D) X는 본원에 정의된 바와 같은 치료제 또는 진단제이고;
- [0265] E) Gal은 갈락토스로부터 유래된 구성요소이고;
- [0266] F) Sia는 시알산으로부터 유래된 구성요소이고;
- [0267] G) x는 0 내지 5이고;
- [0268] H) y는 0 내지 5이고,
- [0269] 여기서, x 및 y 중 적어도 하나는 0이 아니다.
- [0270] 비경구 투여를 위한 제조물은 멸균 수성 또는 비수성 용액, 현탁액, 및 에멀전을 포함한다. 비수성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일, 예를 들어, 올리브유, 및 주사가능한 유기 에스테르, 예를 들어, 에틸 올레에이트이다. 수성 담체는 물, 알콜 용액/수용액, 에멀전 또는 현탁액, 예를 들어, 염수 및 완충 매질을 포함한다. 본 발명의 개시의 조성물 및 방법에서, 약학적으로 허용되는 담체는 0.01 내지 0.1M 및 바람직하게는 0.05M 포스페이트 완충액 또는 0.8% 염수를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 다른 일반적인 비경구 비히클은 소듐 포스페이트 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스 및 소듐 클로라이드, 락테이트와 링거, 또는 고정유를 포함한다. 정맥내 비히클은 유체 및 영양소 보충물, 전해질 보충물, 예를 들어, 링거 텍스트로스를 기반으로 한 전해질 보충물 등을 포함한다. 보존제 및 다른 첨가물, 예를 들어, 항미생물제, 항산화제, 킬레이트제, 및 비활성 가스 등이 또한 제공될 수 있다. 더욱 특히, 주사용 용도에 적합한 약학적 조성물은 멸균 수용액(수용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균 주사용 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 상기 경우에서, 조성물은 멸균되어야 하고, 용이한 주사가가능성이 존재하는 정도로 유동성이 있어야 한다. 이는 제조 및 저장 조건하에서 안정적이어야 하고, 바람직하게는 미생물, 예를 들어, 박테리아 및 진균의 오염 작용에 대해 보존될 것이다. 담체는, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 코팅, 예를 들어, 레시틴의 사용, 분산액의 경우에서 필요한 입자 크기의 유지 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.
- [0271] 미생물의 작용의 예방은 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어, 과라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에서, 조성물 내에 등장성 작용제, 예를 들어, 당, 폴리알콜, 예를 들어, 만니톨, 소르비톨, 또는 소듐 클로라이드를 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 주사용 조성물의 지속 흡수는 조성물 내에 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함시킴으로써 발생될 수 있다.
- [0272] 임의의 경우, 멸균 주사용 용액은 본원에 열거된 성분 중 하나 또는 본원에 열거된 성분의 조합물을 갖는 적절한 용매에 필요량의 활성 화합물(예를 들어, 변형된 결합 폴리펩티드 단독 또는 다른 활성제와의 조합물)을 혼합시킨 후, 필요시 여과 멸균에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산 매질 및 상기 열거된 성분으로부터의 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클에 활성 화합물을 혼합시킴으로써 제조된다. 멸균 주사용 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 활성 성분에 더하여 이전에 멸균 여과된 용액으로부터의 임의의 추가의 요망되는 성분의 분말을 발생시키는 진공 건조 및 동결-건조이다. 주사용 제조물은 가공되고, 용기, 예를 들어, 앰플, 병, 병, 주사기 또는 바이알로 충전되고, 당 분야에 공지된 방법에 따라 무균 조건하에서 밀봉된다. 추가로, 제조물은 각각이 본원에 참조로서 포함되는 공동-계류 U.S.S.N. 09/259,337호 및 U.S.S.N. 09/259,338호에 기재된 것과 같은 키트의 형태로 패키징되고 판매될 수 있다. 상기 제조 물품은 바람직하게는 관련 조성물이 자가면역 또는 신생물 장애로부터 고통받거나 상기 자가면역 또는 신생물 장애에 걸리기 쉬운 대상체를 치료하는데 유용한 것을 나타내는 라벨 또는 패키지 삽입물을 가질 것이다.
- [0273] 상기 기재된 질환의 치료를 위한 본 발명의 개시의 조성물의 유효량은 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리학적 상태, 환자가 인간이거나 동물인지의 여부, 투여되는 다른 의약, 및 치료가 예방적 치료이거나 치료적 치료인지의 여부를 포함하는 많은 다양한 요인에 따라 다양하다. 보통, 환자는 인간이나, 트랜스제닉 포유동물을 포함하는 비-인간 포유동물이 또한 치료될 수 있다. 치료 투여량은 안전성 및 효능을 최적화시키기 위해 당업자에게 공지된 일상적인 방법을 이용하여 결정될 수 있다.
- [0274] 결합 폴리펩티드를 이용한 수동 면역화를 위해, 투여량은, 예를 들어, 숙주 체중의 약 0.0001 내지 100 mg/kg, 및 더욱 일반적으로 0.01 내지 5 mg/kg(예를 들어, 0.02 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 1 mg/kg,

2 mg/kg 등)의 범위일 수 있다. 예를 들어, 투여량은 1 mg/kg 체중 또는 10 mg/kg 체중, 또는 1 내지 10 mg/kg, 바람직하게는 적어도 1 mg/kg의 범위 내일 수 있다. 상기 범위 내의 용량 중간값이 또한 본 발명의 개시의 범위 내인 것으로 의도된다. 대상체는 매일, 격일, 매주 또는 경험 분석에 의해 결정된 임의의 다른 스케줄에 따라 상기 용량이 투여될 수 있다. 예시적 치료는, 예를 들어, 적어도 6개월의 지속 기간에 걸쳐 다수의 투여량의 투여를 수반한다. 추가의 예시적 치료 요법은 2주에 1회 또는 1개월에 1회 또는 3 내지 6개월에 1회의 투여를 수반한다. 예시적 투여 스케줄은 매일 1 내지 10 mg/kg 또는 15 mg/kg, 격일에 30 mg/kg 또는 매주 60 mg/kg을 포함한다. 일부 방법에서, 다양한 결합 특이성을 갖는 2개 이상의 모노클로날 항체가 동시에 투여되며, 이러한 경우 투여되는 각각의 항체의 투여량은 기재된 범위 내에 해당한다.

[0275] 본 발명의 개시의 결합 폴리펩티드는 다수의 기간으로 투여될 수 있다. 단일 투여 사이의 간격은 매주, 매월 또는 매년일 수 있다. 상기 간격은 또한 환자에서의 변형된 결합 폴리펩티드 또는 항원의 혈중 수준을 측정하여 나타나는 바에 따라 불규칙할 수 있다. 일부 방법에서, 투여량은 1 내지 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 일부 방법에서 25 내지 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 혈장 변형된 결합 폴리펩티드 농도를 달성하도록 조정된다. 대안적으로, 결합 폴리펩티드는 지속 방출 제형으로 투여될 수 있으며, 이러한 경우 빈도가 덜한 투여가 필요하다. 항체에 대해, 투여량 및 빈도는 환자에서의 항체의 반감기에 따라 다양하다. 일반적으로, 인간화 항체는 가장 긴 반감기를 나타내며, 키메라 항체 및 비인간 항체가 후속된다.

[0276] 투여량 및 투여 빈도는 치료가 예방적 치료이거나 치료적 치료인지의 여부에 따라 다양할 수 있다. 예방적 적용에서, 본 발명의 항체 또는 이의 각테일을 함유하는 조성물은 환자의 내성을 향상시키기 위해 이미 질병 상태의 환자에게 투여되지는 않는다. 상기 양은 "예방적 유효량"으로 정의된다. 이러한 용도에서, 정확한 양은 다시 환자의 건강 상태 및 일반 면역성에 좌우되나, 일반적으로 용량 당 0.1 내지 25 mg, 특히 용량 당 0.5 내지 2.5 mg의 범위이다. 비교적 적은 투여량이 장기간에 걸쳐 비교적 드문 간격으로 투여된다. 일부 환자는 그들의 남은 생애 동안 치료를 지속적으로 받는다. 치료 적용에서, 질병의 진행이 감소되거나 종결될 때까지, 바람직하게는 환자가 질병의 증상의 부분적 또는 완전한 개선을 나타낼 때까지, 비교적 짧은 간격으로 비교적 많은 투여량(예를 들어, 용량 당 약 1 내지 400 mg/kg의 항체, 방사면역컨쥬게이트에 대해 더욱 일반적으로 사용되는 5 내지 25 mg의 투여량, 및 세포독소-약물 변형 항체에 대해 더 많은 용량)이 때때로 필요하다. 이후, 환자는 예방적 요법이 제공될 수 있다.

[0277] 본 발명의 개시의 결합 폴리펩티드는 임의로 치료(예를 들어, 예방적 또는 치료적 치료)를 필요로 하는 장애 또는 질환을 치료하는데 효과적인 다른 작용제와 조합하여 투여될 수 있다. 본 발명의 개시의 90Y-표지된 변형 항체의 효과적인 단일 치료 조사량(즉, 치료적 유효량)은 약 5 내지 약 75 mCi, 더욱 바람직하게는 약 10 내지 약 40 mCi의 범위이다. 131I-변형된 항체의 효과적인 단일 치료 비-골수 절제 조사량은 약 5 내지 약 70 mCi, 더욱 바람직하게는 약 5 내지 약 40 mCi의 범위이다. 131I-표지된 항체의 효과적인 단일 치료 절제 조사량(즉, 자가 골수 이식을 필요로 할 수 있음)은 약 30 내지 약 600 mCi, 더욱 바람직하게는 약 50 내지 약 500 mCi 미만의 범위이다. 키메라 항체와 관련하여, 무린 항체와 비교하여 더 긴 순환 반감기로 인해, 요오드-131 표지된 키메라 항체의 효과적인 단일 치료 비-골수 절제 조사량은 약 5 내지 약 40 mCi, 더욱 바람직하게는 약 30 mCi 미만의 범위이다. 예를 들어, 111In 표지에 대한 영상화 기준은 통상적으로 약 5 mCi 미만이다.

[0278] 결합 폴리펩티드는 바로 위에 기재된 바와 같이 투여될 수 있으나, 다른 구현예에서 결합 폴리펩티드는 일차 치료로서 달리 건강한 환자에게 제공될 수 있음이 강조되어야 한다. 상기 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 정상 또는 평균 적색골수 예비력을 갖는 환자 및/또는 다른 요법을 받은 적이 없고 다른 요법을 받지 않는 환자에 투여될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같은, 보조 요법과 함께 또는 보조 요법과 조합된 변형된 항체 또는 이의 단편의 투여는 요법 및 개시된 항체의 연속, 동시, 동일 시간간, 동반, 공존 또는 동시발생 투여 또는 적용을 의미한다. 당업자는 조합된 치료 요법의 다양한 구성요소의 투여 또는 적용이 치료의 전체 효과를 향상시키기 위해 시간 지정될 수 있음을 인지할 것이다. 예를 들어, 화학요법제가 표준의 널리 공지된 치료 과정으로 투여된 후 수주 이내에 본 발명의 개시의 방사면역컨쥬게이트가 투여될 수 있다. 역으로, 세포독소 회합된 결합 폴리펩티드가 정맥내 투여된 후, 종양 국소화 외부 빔 방사선이 제공될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 변형된 결합 폴리펩티드는 단일 진료실 방문시 하나 이상의 선택된 화학요법제와 동반 투여될 수 있다. 당업자(예를 들어, 경험이 많은 종양전문의)는 선택된 보조 요법 및 본 발명의 명세서의 교시내용을 기초로 하여 과도한 실험 없이 효과적인 조합 치료 요법을 용이하게 인식할 수 있을 것이다.

[0279] 이와 관련하여, 결합 폴리펩티드 및 화학요법제의 조합이 환자에게 치료 이점을 제공하는 임의의 기간 내에 임의의 순서로 투여될 수 있음이 인지될 것이다. 즉, 화학요법제 및 결합 폴리펩티드는 임의의 순서로 또는 동반 투여될 수 있다. 선택된 구현예에서, 본 발명의 개시의 결합 폴리펩티드는 이전에 화학요법을 받은 적이 있는

환자에 투여될 것이다. 또 다른 구현예에서, 결합 폴리펩티드 및 화학요법 치료는 실질적으로 동시 또는 동반 투여될 것이다. 예를 들어, 환자는 화학요법의 과정을 겪으면서 결합 폴리펩티드가 제공될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 변형된 항체는 임의의 화학요법제 또는 치료의 1년 이내에 투여될 것이다. 다른 바람직한 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 임의의 화학요법제 또는 치료의 10, 8, 6, 4, 또는 2개월 이내에 투여될 것이다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 임의의 화학요법제 또는 치료의 4, 3, 2 또는 1주 이내에 투여될 것이다. 또 다른 구현예에서, 결합 폴리펩티드는 선택된 화학요법제 또는 치료의 5, 4, 3, 2 또는 1일 이내에 투여될 것이다. 2개의 작용제 또는 치료가 약 수시간 또는 수분 이내(즉, 실질적으로 동시)에 환자에게 투여될 수 있음이 추가로 인지될 것이다.

[0280] 본 발명의 개시의 결합 폴리펩티드가 생체내에서 신생물 세포의 성장을 제거하거나, 감소시키거나, 억제하거나, 조절하는 임의의 화학요법제 또는 작용제와 함께 또는 상기 임의의 화학요법제 또는 작용제와 조합하여 사용(예를 들어, 조합된 치료 요법을 제공하기 위함)될 수 있음이 추가로 인지될 것이다. 본 발명의 개시와 상용되는 예시적 화학요법제는 알킬화제, 빈카 알칼로이드(예를 들어, 빈크리스틴 및 빈블라스틴), 프로카르바진, 메토트렉세이트 및 프레드니손을 포함한다. 4-약물 조합 MOPP(메클레타민(질소 머스타드), 빈크리스틴(온코빈(Oncovin)), 프로카르바진 및 프레드니손)가 다양한 유형의 림프종을 치료하는데 매우 효과적이며, 이는 본 발명의 개시의 바람직한 구현예를 포함한다. MOPP-내성 환자에서, ABVD(예를 들어, 아드리아마이신, 블레오마이신, 빈블라스틴 및 다카르바진), ChIVPP(클로람부실, 빈블라스틴, 프로카르바진 및 프레드니손), CABS(로무스틴, 독소루비신, 블레오마이신 및 스트렙토조토신), MOPP + ABVD, MOPP + ABV(독소루비신, 블레오마이신 및 빈블라스틴) 또는 BCVPP(카르무스틴, 사이클로포스파미드, 빈블라스틴, 프로카르바진 및 프레드니손) 조합이 이용될 수 있다. 표준 투여 및 스케줄링에 대해 문헌[Arnold S. Freedman and Lee M. Nadler, Malignant Lymphomas, in HARRISON'S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE 1774-1788 (Kurt J. Isselbacher et al, eds., 13th ed. 1994) and V. T. DeVita et al, (1997)] 및 이에 인용된 참고문헌을 참조하라. 이들 요법은 변경되지 않고 사용될 수 있거나, 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 개시의 하나 이상의 결합 폴리펩티드와 조합하여 특정 환자에 대해 필요에 따라 변경되어 사용될 수 있다.

[0281] 본 발명의 개시의 상황에서 유용한 추가 요법은 단일 알킬화제, 예를 들어, 사이클로포스파미드 또는 클로람부실, 또는 조합물, 예를 들어, CVP(사이클로포스파미드, 빈크리스틴 및 프레드니손), CHOP(CVP 및 독소루비신), C-MOPP(사이클로포스파미드, 빈크리스틴, 프레드니손 및 프로카르바진), CAP-BOP(CHOP + 프로카르바진 및 블레오마이신), m-BACOD(CHOP + 메토트렉세이트, 블레오마이신 및 류코보린), ProMACE-MOPP(프레드니손, 메토트렉세이트, 독소루비신, 사이클로포스파미드, 에토포시드 및 류코보린 + 표준 MOPP), ProMACE-CytaBOM(프레드니손, 독소루비신, 사이클로포스파미드, 에토포시드, 시타라빈, 블레오마이신, 빈크리스틴, 메토트렉세이트 및 류코보린) 및 MACOP-B(메토트렉세이트, 독소루비신, 사이클로포스파미드, 빈크리스틴, 고정 용량 프레드니손, 블레오마이신 및 류코보린)의 사용을 포함한다. 당업자는 상기 요법 각각의 표준 투여량 및 스케줄링을 용이하게 결정할 수 있을 것이다. CHOP가 또한 블레오마이신, 메토트렉세이트, 프로카르바진, 질소 머스타드, 사이토신 아라비노시드 및 에토포시드와 조합되어졌다. 다른 상용성 화학요법제는 2-클로로데옥시아데노신(2-CDA), 2'-데옥시코포르마이신 및 플루다라빈을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0282] 완화를 달성하는데 실패하거나 재발된 중간-등급 및 고-등급 NHL을 갖는 환자에 대해, 구체 요법이 이용된다. 구체 요법은 단독으로 제공되거나 조합하여 제공되는 약물, 예를 들어, 사이토신 아라비노시드, 카르보플라틴, 시스플라틴, 에토포시드 및 이포스파미드를 이용한다. 특정 신생물 장애의 재발 또는 공격적 형태에서, 다음과 같은 프로토콜이 종종 이용된다: 각각이 공지된 투여 속도 및 스케줄을 갖는 IMVP-16(이포스파미드, 메토트렉세이트 및 에토포시드), MIME(메틸-gag, 이포스파미드, 메토트렉세이트 및 에토포시드), DHAP(덱사메타손, 고 용량 시타라빈 및 시스플라틴), ESHAP(에토포시드, 메틸프레디솔론, HD 시타라빈, 시스플라틴), CEPP(B)(사이클로포스파미드, 에토포시드, 프로카르바진, 프레드니손 및 블레오마이신) 및 CAMP(로무스틴, 미톡산트론, 시타라빈 및 프레드니손).

[0283] 본 발명의 개시의 변형된 항체와 조합하여 사용되는 화학요법제의 양은 대상체마다 다양할 수 있거나, 당 분야에 공지된 바에 따라 투여될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Bruce A. Chabner et al, Antineoplastic Agents, in GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS 1233-1287 (Joel G. Hardman et al., eds., 9th ed. 1996)]을 참조하라.

[0284] 이전에 논의된 바와 같이, 본 발명의 개시의 결합 폴리펩티드, 이의 면역반응성 단편 또는 재조합물은 포유동물 장애의 생체내 치료를 위해 약학적 유효량으로 투여될 수 있다. 이와 관련하여, 개시된 결합 폴리펩티드가 투여

를 돕고 활성제의 안정성을 촉진하도록 포물레이션될 것이 인지될 것이다.

[0285] 바람직하게는, 본 발명의 개시에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 비독성의 멸균 담체, 예를 들어, 생리학적 염수, 비독성 완충제, 보존제 등을 포함한다. 본 발명의 적용의 목적을 위해, 치료제에 컨주게이션되거나 컨주게이션되지 않은 변형된 결합 폴리펩티드, 이의 면역반응성 단편 또는 재조합물의 약학적 유효량은 항원으로서의 효과적인 결합을 달성하고, 이점을 달성하고, 예를 들어, 질병 또는 장애의 증상을 개선시키거나 물질 또는 세포를 검출하기에 충분한 양을 의미하도록 유지될 것이다. 종양 세포의 경우, 변형된 결합 폴리펩티드는 바람직하게는 신생물 또는 면역반응성 세포 상의 선택된 면역반응성 항원과 상호작용할 수 있을 것이며, 상기 세포의 사멸의 증가를 제공할 것이다. 물론, 본 발명의 개시의 약학적 조성물은 약학적 유효량의 변형된 결합 폴리펩티드를 제공하기 위해 단일 용량 또는 다용량으로 투여될 수 있다.

[0286] 본 발명의 개시의 범위와 일치하게, 본 발명의 개시의 결합 폴리펩티드는 치료 또는 예방 효과를 생성시키기에 충분한 양으로 상기 언급된 치료 방법에 따라 인간 또는 다른 동물에 투여될 수 있다. 본 발명의 개시의 결합 폴리펩티드는 공지된 기술에 따라 본 발명의 개시의 항체와 통상적인 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 조합시킴으로써 제조된 통상적인 투여 형태로 인간 또는 다른 동물에 투여될 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제의 형태 및 특성은 조합되는 활성 성분의 양, 투여 경로 및 다른 널리 공지된 변수에 의해 지정되는 것이 당업자에 의해 인지될 것이다. 당업자는 본 발명의 개시에 기재된 결합 폴리펩티드의 하나 이상의 종을 포함하는 각태일이 특히 효과적인 것을 입증할 수 있음을 추가로 인지할 것이다.

[0287] V. 결합 폴리펩티드의 발현

[0288] 한 양태에서, 본 발명은 본원에 개시된 결합 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 상기 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 것을 포함하는 결합 폴리펩티드를 제조하는 방법이 또한 제공된다.

[0289] 본원에 개시된 결합 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 통상적으로 청구된 항체 또는 이의 단편의 요망되는 양을 생성시키기 위해 사용될 수 있는 숙주 세포로의 도입을 위한 발현 벡터로 삽입된다. 따라서, 특정 양태에서, 본 발명은 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 벡터 및 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0290] 용어 "벡터" 또는 "발현 벡터"는 명세서 및 청구항의 목적상 세포로 도입시키고, 세포에서 요망되는 유전자를 발현시키기 위한 비히클로서 본 발명에 따라 사용되는 벡터를 의미하는 것으로 본원에서 사용된다. 당업자에게 공지된 바와 같이, 상기 벡터는 플라스미드, 파지, 바이러스 및 레트로바이러스로 구성된 그룹으로부터 용이하게 선택될 수 있다. 일반적으로, 본 발명과 상용성인 벡터는 선별 마커, 요망되는 유전자의 클로닝을 돕기에 적절한 제한 부위 및 진핵생물 또는 원핵생물 세포로 진입하고/하거나 상기 세포에서 복제하는 능력을 포함할 것이다.

[0291] 본 발명의 목적을 위해 다수의 발현 벡터 시스템이 이용될 수 있다. 예를 들어, 한 부류의 벡터는 동물 바이러스, 예를 들어, 소 유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 배콜로바이러스, 레트로바이러스(RSV, MMTV 또는 MOMLV) 또는 SV40 바이러스로부터 유래되는 DNA 요소를 이용한다. 다른 벡터는 내부 리보솜 결합 부위를 갖는 다시스טר론 시스템의 사용을 수반한다. 추가로, 세포의 염색체로 DNA가 통합된 세포는 트랜스펙션된 숙주 세포의 선별을 가능케 하는 하나 이상의 마커를 도입시킴으로써 선택될 수 있다. 마커는 영양요구 숙주에 대한 프로토포피(prototrophy), 살생제 내성(예를 들어, 항생제) 또는 중금속, 예를 들어, 구리에 대한 내성을 제공할 수 있다. 선별가능한 마커 유전자는 발현되는 DNA 서열에 직접 연결될 수 있거나, 공동형질전환(cotransformation)에 의해 동일 세포로 도입될 수 있다. mRNA의 최적 합성을 위해 추가 요소가 또한 필요할 수 있다. 이들 요소는 신호 서열, 스플라이스 신호뿐만 아니라 전사 프로모터, 인핸서, 및 종료 신호를 포함할 수 있다. 특히 바람직한 구현예에서, 클로닝된 가변 영역 유전자는 상기 논의된 바와 같은 합성 중쇄 및 경쇄 불변 영역 유전자(바람직하게는, 인간)와 함께 발현 벡터로 삽입된다.

[0292] 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 다시스טר론 작제물을 이용하여 발현될 수 있다. 이러한 발현 시스템에서, 다수의 관심 유전자 생성물, 예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄가 단일 다시스טר론 작제물로부터 생성될 수 있다. 이들 시스템은 유리하게는 진핵생물 숙주 세포에서 비교적 높은 수준의 본 발명의 폴리펩티드를 제공하기 위해 내부 리보솜 결합 부위(IRES)를 이용한다. 상용성 IRES 서열은 본원에 참조로서 포함되는 미국 특허 번호 6,193,980호에 개시되어 있다. 당업자는 상기 발현 시스템이 본 출원에 개시된 전체 범위의 폴리펩티드를 효과적으로 생성시키기 위해 이용될 수 있음을 인지할 것이다.

[0293] 더욱 일반적으로, 항체 또는 이의 단편을 인코딩하는 벡터 또는 DNA 서열이 제조된 후, 발현 벡터는 적절한 숙

주 세포로 도입될 수 있다. 즉, 숙주 세포는 형질전환될 수 있다. 숙주 세포로의 플라스미드의 도입은 당업자에게 널리 공지된 다양한 기술에 의해 달성될 수 있다. 이들은 트랜스펙션(전기영동 및 전기천공을 포함함), 원형질체 융합, 칼슘 포스페이트 침전, 겹질보유 DNA와의 세포 융합, 미세주입, 및 완전한 바이러스를 이용한 감염을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 문헌[Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Chapter 24.2, pp. 470-472 Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988)]을 참조하라. 가장 바람직하게는, 숙주로의 플라스미드 도입은 전기천공을 통한다. 형질전환된 세포는 경쇄 및 중쇄의 생성에 적합한 조건하에서 성장되고, 중쇄 및/또는 경쇄 단백질 합성에 대해 검정된다. 예시적 검정 기술은 효소-결합 면역흡착 측정법(ELISA), 방사면역측정법(RIA), 또는 형광-활성화 세포 분류기 분석(FACS), 면역조직화학 등을 포함한다.

[0294] 본원에서 사용되는 용어 "형질전환"은 유전자형을 변경시키고, 이후에 수용자 세포가 변화하는 수용자 숙주 세포로의 DNA의 도입을 나타내기 위해 광범위한 의미로 사용될 것이다.

[0295] 동일 방침에 따라, "숙주 세포"는 재조합 DNA 기술을 이용하여 작제되고, 적어도 하나의 이중성 유전자를 인코딩하는 벡터로 형질전환된 세포를 나타낸다. 재조합 숙주로부터의 폴리펩티드의 분리를 위한 방법의 설명에서, 용어 "세포" 및 "세포 배양"은 명백히 달리 특정되지 않는 한 항체의 공급원을 나타내기 위해 상호교환적으로 사용된다. 즉, "세포"로부터의 폴리펩티드의 회수는 전체 세포 스피인 다운, 또는 배지 및 현탁된 세포 둘 모두를 함유하는 세포 배양물로부터의 회수를 의미할 수 있다.

[0296] 한 구현예에서, 항체 발현에 사용되는 숙주 세포주는 포유동물 기원이며, 당업자는 숙주 세포에서 발현되는 요망되는 유전자 생성물에 최고로 적합한 특정 숙주 세포주를 결정할 수 있다. 예시적 숙주 세포주는 DG44 및 DUXB11(차이니스 햄스터 난소 세포주, DHFR minus), HELA(인간 자궁경부 암종), CVI(원숭이 신장 세포주), COS(SV40 T 항원을 갖는 CVI의 유도체), R1610(차이니스 햄스터 섬유모세포), BALBC/3T3(마우스 섬유모세포), HAK(햄스터 신장 세포주), SP2/O(마우스 골수종), BFA-1c1BPT(소 내피세포), RAJI(인간 림프구), 293(인간 신장)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 한 구현예에서, 세포주는 세포주에서 발현된 항체의 변경된 당화, 예를 들어, 비푸코실화(afucosylation)를 제공한다(예를 들어, PER.C6.RTM.(CruCell) 또는 FUT8-넉-아웃 CHO 세포주(Potelligent.RTM. Cells)(Biowa, Princeton, N.J.)). 한 구현예에서, NSO 세포가 사용될 수 있다. CHO 세포가 특히 바람직하다. 숙주 세포주는 통상적으로 상업적 기관인 미국 조직 배양 컬렉션(American Tissue Culture Collection) 또는 공개된 문헌으로부터 이용가능하다.

[0297] 시험관내 생성은 많은 양의 요망되는 폴리펩티드를 생성시키기 위해 규모 확장이 가능하다. 조직 배양 조건하에서의 포유동물 세포 배양을 위한 기술은 당 분야에 공지되어 있으며, 이는, 예를 들어, 공기부양 반응기 또는 연속 교반기 반응기 중에서의 균일 현탁 배양, 또는, 예를 들어, 중공 섬유, 마이크로캡슐 내, 아가로스 마이크로비드 또는 세라믹 카트리지 상에서의 고정되거나 엔트랩핑(entrapment)된 세포 배양을 포함한다. 필요하고/하거나 요망시, 폴리펩티드의 용액은 통상적인 크로마토그래피 방법, 예를 들어, 젤 여과, 이온-교환 크로마토그래피, DEAE-셀룰로스 상에서의 크로마토그래피 및/또는 (면역-) 친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다.

[0298] 본 발명의 결합 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자는 또한 비-포유동물 세포, 예를 들어, 박테리아 또는 효모 또는 식물 세포에서 발현될 수 있다. 이와 관련하여, 다양한 단세포 비-포유동물 미생물, 예를 들어, 박테리아, 즉, 배양 또는 발효에서 성장될 수 있는 것들이 또한 형질전환될 수 있음이 인지될 것이다. 형질전환에 민감한 박테리아는 장내세균과의 일원, 예를 들어, 에스케리키아 콜리(*Escherichia coli*) 또는 살모넬라(*Salmonella*); 바실루스과, 예를 들어, 바실루스 서틸리스(*Bacillus subtilis*); 폐렴구균; 연쇄구균, 및 헤모필루스 인플루엔자의 균주를 포함한다. 박테리아에서 발현되는 경우, 폴리펩티드가 봉입체의 일부가 될 수 있음이 추가로 인지될 것이다. 폴리펩티드는 분리되어야 하고, 정제되어야 하고, 이후 기능성 분자로 어셈블리되어야 한다.

[0299] 원핵생물에 더하여, 진핵생물 미생물이 또한 사용될 수 있다. 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 또는 일반적인 제빵 효모가 진핵생물 미생물 중에서 가장 일반적으로 사용되나, 다수의 다른 균주가 일반적으로 이용가능하다. 효모균에서의 발현을 위해, 플라스미드 YRp7, 예를 들어, 문헌[(Stinchcomb *et al.*, Nature, 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene, 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, Gene, 10:157 (1980))]에서의 플라스미드 YRp7이 일반적으로 사용된다. 이러한 플라스미드는 이미 트립토판에서 성장하는 능력이 결핍된 효모의 돌연변이 균주, 예를 들어, ATCC No. 44076 또는 PEP4-1에 대한 선별 마커를 제공하는 TRP1 유전자를 함유한다(Jones, Genetics, 85:12 (1977)). 효모 숙주 세포 유전체의 특징으로서의 *trp1* 병소의 존재는 이후에 트립토판의 부재하에서의 성장에 의해 형질전환을 검출하기 위한 효과적인 환경을 제공한다.

[0300] 실시예

[0301] 본 발명은 추가로 제한되는 것으로 간주되어선 안되는 하기 실시예에 의해 추가로 예시된다. 본 출원 전체에 걸쳐 인용된 서열 목록, 도면 및 모든 참고문헌, 특허, 및 공개된 특허 공개의 내용은 명백히 참조로서 본원에 포함된다.

[0302] 실시예 1. 2C3 항-CD-52 과당화 항체 돌연변이의 설계, 제조, 및 특성규명

[0303] Fc γRs와의 상호작용을 변경시킴에 의해 항체 효과기 기능을 조정하거나, 약물, 독소, 세포독성제, 및 방사뉴클레오티드를 포함하나, 이에 제한되지는 않는 효과기 모이어티 컨쥬게이션에 대한 이후의 화학적 변형을 신규한 가교 부위에 도입시키기 위해 상호작용 경계면(예를 들어, 항체 약동학을 조정하기 위한 FcRn 결합 부위)으로 부피가 큰 기를 첨가하기 위한 목적으로 항-CD-52 항체, 2C3의 중쇄 내에서 다수의 과당화 돌연변이를 설계하였다. 과당화된 2C3 돌연변이가 표 3에 기재되어 있다.

[0304] 표 3. 과당화된 2C3 항-CD-52 돌연변이

돌연변이	요망되는 이점	적용
A114N	Asn-Ser-Thr에서의 당화	1) 대조군 2) 효과기 모이어티 컨쥬게이션
Y436T	Asn434에서의 당화 FcRn 결합의 억제	1) 이식 및 짧은 반감기를 필요로 하는 다른 적응증
Y436S	Asn434에서의 당화 FcRn 결합의 억제	1) 이식 및 짧은 반감기를 필요로 하는 다른 적응증
S440N	Asn-Leu-Ser에서의 당화	1) 대조군 2) 효과기 모이어티 컨쥬게이션
S442N	Asn-Leu-Ser에서의 당화	1) 대조군 2) 효과기 모이어티 컨쥬게이션
C-말단으로의 NGT 첨가	당화	1) 대조군 2) 효과기 모이어티 컨쥬게이션
S298N/Y300S	Asn298에서의 당화 감소된 효과기 기능	1) 감소된 효과기 기능 2) 효과기 모이어티 컨쥬게이션

[0305]

[0306] 1A. 2C3 항-CD-52 항체 과당화 돌연변이의 생성

[0307] 케이벳 넘버링 시스템을 기초로 하여 지정된 A114N 돌연변이를 돌연변이유발 PCR에 의해 2C3의 CH1 도메인으로 도입시켰다. 전장 항체를 생성시키기 위해, VH 도메인 + 돌연변이된 A114N 잔기를 항체 CH 도메인 1 내지 3을 인코딩하는 pENTR-LIC-IgG1 벡터로 라이게이션 비의존성 클로닝(LIC)에 의해 삽입하였다. 모든 다른 돌연변이를 퀵체인지(QuikChange) 부위-특이적 돌연변이유발 키트(Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)를 이용한 부위-특이적 돌연변이유발에 의해 pENTR-LIC-IgG1에 도입시켰다. WT 2C3 VH를 LIC에 의해 돌연변이된 벡터로 클로닝하였다. 전장 돌연변이를 게이트웨이(Gateway) 클로닝에 의해 pCEP4(-E+I)Dest 발현 벡터로 클로닝하였다. Fc 돌연변이를 EU 넘버링 시스템을 기초로 하여 지정하였다. 돌연변이를 DNA 서열분석에 의해 확인하였다. WT 2C3 중쇄 및 경쇄 및 돌연변이된 2C3 중쇄의 아미노산 서열이 표 4에 기재되어 있다. 돌연변이된 아미노산은 회색으로 강조되어 있으며, 돌연변이화에 의해 생성된 컨센서스 당화 표적 부위는 밑줄로 표시되어 있다.

[0308]

표 4. 2C3 항-CD-52 항체의 아미노산 서열

SEQ ID NO	명칭	아미노산 서열
1	항-CD-52 WT 경쇄	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTY LNWLLQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHLHTFGQGTRL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
2	항-CD-52 WT 중쇄	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
3	항-CD-52 A114N 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
4	항-CD-52 Y436S 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHSTQKSLSLSPGK
5	항-CD-52 S440N 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW

[0309]

SEQ ID NO	명칭	아미노산 서열
		GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
6	항-CD-52 S442N 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
7	항-CD-52 NGT 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
8	항-CD-52 S298N / Y300S 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0310]

[0311]

돌연변이 및 WT 대조군을 6-웰 플레이트 포맷으로 HEK293-EBNA 세포로 트랜스펙션시켰다. 도 9에 제시된 바와 같이, 발현 수준은 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯에 의해 분석시 약 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 것으로 밝혀졌다. 적응용 배지에서 돌연변이의 발현을 또한 비아코어(Biacore) 상에서의 단백질 A 포획에 의해 측정하였다. 고정된 단백질 A로의 주입 6분 후에 해리 반응을 이용하여 농도를 결정하였다. 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로부터 1.5ng/ml로 배지에서 연속 희석된 CHO-생성 WT 2C3을 표준 곡선으로 사용하였다. 4-파라미터 적합화를 이용한 교정 곡선에 의해 농도를 약 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 아래로 계산하였다. 도 9에 제시된 바와 같이, 상대 발현 수준은 낮았고, 일반적으로 웨스턴 블롯 결과와 상응하였다.

[0312]

1B. 과당화의 확인

[0313]

추가 당화 부위가 돌연변이에 의해 도입되었는지의 여부를 결정하기 위해, 2C3 돌연변이 및 야생형 단백질을 보편(universal) 탈당화 효소 PNGase F로 처리하고, 단백질 샘플을 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. 도 10에 제시된 바와 같이, A114N 돌연변이만이 증가된 겔보기 분자량을 가지며, 이는 추가 N-결합된 탄수화물의 존재를 나타낸다.

[0314]

당화 부위 도입의 추가 확인을 위해 2C3 돌연변이를 정제하기 위해 소규모 항체 제조물을 생성시켰다. 도 11에

제시된 바와 같이, A114N 돌연변이만이 도입된 추가 당화 부위를 가진 것이 SDS-PAGE에 의해 확인되었다.

1C. 2C3 항-CD-52 돌연변이의 결합 특성

정제된 단백질의 결합 특성을 비교하기 위해 비아코어를 이용하였다. 마우스 및 SEC-정제된 인간 FcRn-HPC4를 아민 커플링을 통해 CM5 칩 상에 고정시켰다. 각각의 항체를 200, 50, 및 10nM로 희석시키고, 고정된 Fc 수용체 상에 주입하였다. 캄파스(Campath), CHO-생성 WT 2C3, 및 DEPC-처리 캄파스를 양성 및 음성 대조군으로 포함시켰다. 도 13에 제시된 바와 같이, Y436S 돌연변이는 인간 FcRn으로의 결합에서 약 2배의 감소를 나타내었다. 흥미롭게도, 마우스 FcRn으로의 상기 돌연변이의 결합은 영향을 받지 않았다. 다른 2C3 돌연변이 중 어느 것도 인간 또는 마우스 FcRn 결합에 대해 임의의 고려할 만한 효과가 없었다.

정제된 단백질의 항원 결합 특성을 비교하기 위해 CD-52 펩티드 741 비아코어 결합 검정을 이용한 비아코어를 이용하였다. CD-52 펩티드 741 및 대조군 펩티드 777을 CM5 칩 상에 고정시켰다. 항체를 HBS-EP 중에서 60으로부터 0.2nM로 연속적으로 2배 희석시키고, 3분 동안 2회 주입한 후, 50 μ l/분 유량으로 완충액 중에서 5분 동안 해리시켰다. GLD52 lot 17200-084를 대조군으로 포함시켰다. 표면을 1 펄스의 40mM HCl로 재생시켰다. 7.5 내지 0.2nM 곡선을 적합화시키기 위해 1:1 결합 모델을 이용하였다. 도 16에 제시된 바와 같이, A114N 돌연변이는 상기 검정에서 나머지 돌연변이보다 약간 더 낮은 CD-52 결합 친화성을 갖는 반면, NGT 돌연변이는 상기 검정에서 나머지 돌연변이보다 약간 더 높은 친화성을 가졌다. CD-52 펩티드 741 비아코어 결합 검정을 대규모 프랩 (prep)으로부터 정제된 단백질로 반복하였다. 도 17에 제시된 바와 같이, A114N 돌연변이는 WT 2C3과 동등한 CD-52 펩티드 결합을 나타내었다.

1D. A114N 돌연변이의 전하 특성규명

2C3 돌연변이의 전하를 특성규명하기 위해 등전 초점조절(IEF)을 수행하였다. 정제된 단백질을 고정된 pH 구배 (pH3 내지 10) 아크릴아미드(IPG) 젤 상에서 영동시켰다. 도 18A에 제시된 바와 같이, A114N은 시알산 잔기로 인한 것일 수 있는 더욱 음성의 전하를 갖는 것으로 밝혀졌다. 완전한 MS 데이터에서 A114N 돌연변이에 대해 시알산을 갖는 복합체 구조를 확인하였다. 대조적으로, WT 2C3은 우세한 당화 종으로서 G0F 및 G1F를 갖는 것으로 밝혀졌다(각각 도 18C 및 18D).

실시예 2. 여러 항체 백본에서의 과당화 돌연변이의 제조

2C3 항-CD-52 항체에 더하여, 독특한 과당화 부위가, 관련되지 않은 중쇄 가변 도메인 서열에 도입될 수 있는지 확인하기 위해 A114N 돌연변이를 여러 다른 항체 백본에서 조작하였다. 과당화된 항-TEM1, 항-FAP, 및 항-Her2 돌연변이는 표 5에 기재되어 있다.

표 5. 여러 관련되지 않은 항체 백본에서 설계된 A114N 및/또는 S298N 돌연변이

돌연변이	항체	요망되는 이점	적용
A114N	항-TEM1 항-FAP 항-Her2	부위-특이적 탄수화물-매개 컨쥬게이션을 위한 중쇄의 엘보우 힌지에서의 추가 당화 부위	1) 대조군 2) 노출된 시알산 또는 갈락토스 기(SAM 또는 GAM)를 통한 아미노옥시 독소 컨쥬게이션
S298N / T299A / Y300S (NNAS)	항-Her2	Asn297로부터 조작된 Asn298로 당화 교환. 용매 노출 및 컨쥬게이션 부위 및 효과기 기능을 제거하는 수단을 제공하는 S298N에서의 복합체 탄수화물 예상	1) 노출된 시알산 또는 갈락토스 기(SAM 또는 GAM)를 통한 아미노옥시 독소 컨쥬게이션 2) 감소된 효과기 기능
A114N / NNAS	항-Her2	2 개의 컨쥬게이션 부위를 이용한 증가된 컨쥬게이션 수율에 대한 잠재성	1) 대조군 2) 노출된 시알산 또는 갈락토스 기(SAM 또는 GAM)를 통한 아미노옥시 독소 컨쥬게이션

2A. 항-TEM1 및 항-FAP 항체 과당화 돌연변이의 생성

[0325] 케이벳 넘버링 시스템을 기초로 하여 지정된 A114N 돌연변이를 돌연변이유발 PCR에 의해 항-TEM1 및 항-FAP의 CH1 도메인으로 도입시켰다. 전장 항체를 생성시키기 위해, 돌연변이된 VH + 잔기 114를 라이게이션 비의존성 클로닝(LIC)에 의해 항체 CH 도메인 1 내지 3을 인코딩하는 pENTR-LIC-IgG1 벡터로 삽입하였다. 이후, 전장 돌연변이를 게이트웨이 클로닝에 의해 pCEP4(-E+I)Dest 발현 벡터로 클로닝하였다. 돌연변이를 DNA 서열분석에 의해 확인하였다. 항-TEM1 야생형 및 돌연변이된 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열이 표 6에 기재되어 있다. 돌연변이된 아미노산은 회색으로 강조되어 있고, 돌연변이에 의해 생성된 컨센서스 당화 표적 부위는 밑줄로 표시되어 있다.

[0326] 표 6. 항-TEM1 및 항-FAP 항체의 아미노산 서열

SEQ ID NO	명칭	아미노산 서열
9	항-TEM1 WT 경쇄 (클론 #187)	EIVLTQSPGTL SL SPGERATL SC RASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
10	항-TEM1 WT 중쇄 (클론 #187)	QVQLQESAPGLV KP SETLSLTCTVSGGSIRSY Y WSW IRQPPGKGLEYIGYIYYTGS AI YNPSLQSRVTISVDTS KNQFSLK LN SVTAADTAVYYCAREGVRGASGY Y YGM D VWGQGT TV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVT SV WNSGALTSGVHTF P AVLQSSGLYSLSSV TV VPSSSLGTQTYICNVN HK PS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PC PAPELLG GP SVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCV VD VSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VL HQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISK AKGQPREPQ VY TL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYK TP PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSV M HEALHNHYTQKSLSLSPGK
11	항-TEM1 A114N	QVQLQESAPGLV KP SETLSLTCTVSGGSIRSY Y WSW IRQPPGKGLEYIGYIYYTGS AI YNPSLQSRVTISVDTS KNQFSLK LN SVTAADTAVYYCAREGVRGASGY Y YGM D VWGQGT TV TVSS NT STKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVT SV WNSGALTSGVHTF P AVLQSSGLYSLSSV TV VPSSSLGTQTYICNVN HK PS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PC PAPELLG GP SVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCV VD VSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VL HQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISK AKGQPREPQ VY TL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYK TP PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSV M HEALHNHYTQKSLSLSPGK*

[0327]

[0328] 돌연변이 및 야생형 대조군을 삼중 플라스크 포맷으로 HEK293-EBNA 세포로 트랜스펙션시키고, HiTrap 단백질 A 컬럼(GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, USA) 상에서 정제하였다. NanoDrop 분광광도계 상에서의 A280에 의해 분석됨에 따라, 항-FAP A114N 및 항-FAP A114C의 발현은 각각 약 3 μ g/ml 및 약 1 μ g/ml였다. 항-TEM1 A114N의 발현은 약 0.04 μ g/ml였다.

[0329] 2B. 과당화의 확인

[0330] 추가 당화 부위가 A114N 돌연변이에 도입된 것을 확인하기 위해, A114N 돌연변이로부터 정제된 단백질을 야생형 대조군 단백질과 함께 환원 SDS-PAGE에서 분석하였다. 하나의 추가 당화 부위는 중쇄의 분자량에 2000 내지 3000 달톤을 부가할 것이다. 도 20에 제시된 바와 같이, SDS-PAGE는 항-FAP 및 항-TEM1 A114N 돌연변이의 중쇄 밴드가 둘 모두의 항체로의 추가 당화 부위의 성공적인 도입과 일치하는 증가된 겔보기 분자량을 갖는 것을 나타내었다.

[0331] 2C. 항-Her2 항체 과당화 돌연변이의 생성

[0332] Her-2 A114N, Her-2 A114N/NNAS, 및 WT Her-2 항체를 라이게이션 비의존성 클로닝에 의해 생성시켰다. 허셉틴(Herceptin)의 VH 도메인을 합성하고, WT 또는 A114N 돌연변이를 갖는 2개의 LIC-상용성 프라이머 세트와 PCR-증폭시켰다. 전장 항체를 수득하기 위해, 증폭된 VH 삽입물(WT 또는 A114N)을 CH 1 내지 3 도메인, pENTR-LIC-IgG1 WT 및 pENTR-LIC-IgG1 NNAS를 인코딩하는 2개의 pENTR 벡터로 클로닝하여, pENTR에 대한 진입 클론으로서

3개의 전장 돌연변이(A114N, NNAS, A114N/NNAS) 및 WT 대조군을 생성시켰다. 이들 돌연변이를 게이트웨이 클로닝에 의해 pCEP4(-E+I)Dest 발현 벡터로 클로닝하였다. 돌연변이를 DNA 서열분석에 의해 확인하였다. 항-Her-2 야생형 및 돌연변이된 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열이 표 7에 기재되어 있다. 돌연변이된 아미노산은 회색으로 강조되어 있고, 돌연변이에 의해 생성된 컨센서스 당화 표적 부위는 밑줄로 표시되어 있다.

표 7. 항-Her-2 항체의 아미노산 서열

SEQ ID NO	명칭	아미노산 서열
12	항-Her-2 WT 경쇄	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVNTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSGRSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLT LSKADYEHKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
13	항-Her-2 WT 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	항-Her-2 A114N 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	항-Her2 NNAS 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
16	항-Her2 A114N / NNAS 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWSGALTSGVHTFPA

SEQ ID NO	명칭	아미노산 서열
		VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0336] 2D. A114N 항-Her2 항체 과당화 돌연변이의 발현

[0337] A114N 항-Her2 및 야생형 작제물을 리포펙타민-2000(Lipofectamine-2000)(2.5:1 비의 시약 대 DNA) 및 XtremeGene HP(3:1 비의 시약 대 DNA)를 이용하여 12개의 삼중 플라스크 중 HEK293-EBNA 세포로 트랜스펙션시켰다. 3일의 적응용 배지(CM)으로부터의 분취액의 옥텟(Octet) 측정은 단백질 발현이 리포펙타민-2000 및 XtremeGene HP 둘 모두에 대해 6개의 플라스크 전체에 걸쳐 일치한 것을 나타내었다. 표 8에 제시된 바와 같이, 전체 트랜스펙션 효율은 XtremeGene HP를 이용하여 약 30% 더 높았다. 3일에 수거된 적응용 배지를 둘 모두의 트랜스펙션 조건에 대해 함께 풀링(pooling)시키고, 단백질 A 컬럼에 의해 정제하였다. 옥텟 측정은 혈청이 없는 모의 배지에서의 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에 비해 혈청-함유 모의 배지에서 1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 항체를 나타내었다.

[0338] 표 8. A114N 항-Her2 과당화 돌연변이 발현

		리포펙타민-2000	XtremeGene HP
단백질 A 컬럼으로부터의 정제된 단백질	농도 (mg/ml)	1.72	3.18
	부피 (ml)	3.5	3.5
	전체 단백질 (mg)	6.02	11.13
완충액-교환된 단백질	농도 (mg/ml)	15.59	16.86
	부피 (ml)	0.2	0.36
	전체 단백질 (mg)	3.1	6.07
	회수 %	51.8	54.5

[0339]

[0340] 6일로부터의 적응용 배지를 수거하고, 각각의 트랜스펙션 조건에 대해 별개로 정제하였다. 둘 모두의 용리액을 PBS, pH 7.2로 별개로 완충액 교환하고, 아미콘-4(Amicon-4)(50 kD 컷-오프) 컬럼을 이용하여 약 15배 농축시켰다. 6일 CM은 3일 CM에 비해 더 높은 발현 수준을 나타내었다. 표 8에 제시된 바와 같이, 전체 3 mg의 허셉틴 A114N 15.59 mg/mL(리포펙타민 트랜스펙션으로부터) 및 6 mg의 허셉틴 A114N 16.86 mg/mL(XtremeGene HP 트랜스펙션으로부터)을 추가의 다운스트림 적용, 예를 들어, 항체-약물 컨쥬게이션을 위해 6일의 적응용 배지로부터 생성시켰다.

[0341] 2E. A114N 항-Her2 돌연변이의 SDS-PAGE 및 HIC 분석

[0342] 컨쥬게이션 전, 정제된 A114N 허셉틴을 SDS-PAGE 및 HIC(소수성 상호작용 크로마토그래피)에 의해 특성규명하였다. 도 21에 제시된 바와 같이, 정제된 A114N 허셉틴의 양은 추가 다운스트림 적용에 적합한 것으로 결정되었다.

[0343] 2F. 조작된 당화로의 컨쥬게이션

[0344] a) 당화 부위가 항-TEM1 상의 케이벳 위치 114 부위에 도입되었고; b) A114N 돌연변이가 환원 SDS-PAGE에 의해 중쇄 상에 과당화되고; c) A114N 과당화된 돌연변이가 완전한 LC/MS에 의해 SAM 및 GAM 컨쥬게이션에 이상적인 말단 시알산 및 갈락토스를 포함하는 복합체 탄수화물 구조를 갖는 것으로 입증되었다. 조작된 당화 부위가 컨쥬게이션에 적합한지 확인하기 위해, 항-TEM1 A114N을 아미노옥시 화학을 통해 5kDa PEG와 컨쥬게이션시켰다. 도 22에 제시된 바와 같이, PEG는 아미노옥시 결합을 통해 항-TEM1 A114N에 성공적으로 컨쥬게이션되었다. 이러한 돌연변이는 또한 항-FAP 및 항-CD-52 2C3 백본 상에서 성공적으로 제조되었다(제시되지 않음). 이들 데이터는 N114의 당화 부위가 효과기 모이어티의 컨쥬게이션에 대해 유용한 것을 입증한다.

[0345] 실시예 3: S298N/Y300S Fc 돌연변이의 생성

[0346] 새로운 당화 부위가 자연 발생 Asn297 부위 다음의 EU 위치 Ser 298에 도입된 조작된 Fc 변이체를 설계하고 생성시켰다. Asn297에서의 당화를 유지시키거나, 돌연변이에 의해 제거하였다. 돌연변이 및 요망되는 당화 결과가 표 9에 기재되어 있다.

[0347] 표 9: 다양한 항체 변이체의 당화 상태

#	돌연변이	요망되는 당화 상태	적용
17	N297Q	당화 없음 (agly)	Agly 대조군
18	T299A	당화 없음 (agly)	Agly 대조군, 공지되지 않은 효과기 기능
19	N297Q/S298N/Y300S (NSY)	297 에서 당화가 없으나, 298 에서 조작된 당화 부위 존재	감소된 효과기 기능; 노출된 시알산 또는 갈락토스기를 통한 컨쥬게이션
20	S298N/T299A/Y300S (STY)	297 에서 당화가 없으나, 298 에서 조작된 당화 부위 존재	감소된 효과기 기능; 노출된 시알산 또는 갈락토스기를 통한 컨쥬게이션
21	S298N/Y300S (SY)	297 & 298 에서 2 개의 잠재적 당화 부위 존재; 당화 패턴에서의 변경.	감소된 효과기 기능; 노출된 시알산 또는 갈락토스기를 통한 컨쥬게이션
22	야생형	297	대조군

[0348]

[0349] 3A. H66 α β -TCR 항체 변경된 당화 변이체의 생성

[0350] pENTR_LIC_IgG1 주형을 이용하여 퀵체인지에 의해 α β T-세포 수용체 항체 클론 #66의 중쇄 상에 돌연변이를 제조하였다. HEBE1 Δ ab IgG1 #66의 VH 도메인을 LIC 프라이머를 이용하여 증폭시킨 후, LIC에 의해 돌연변이 또는 야생형 pENTR_LIC_IgG1으로 클로닝하여, 전장 돌연변이 또는 야생형 항체를 생성시켰다. 서브클로닝을 성공적인 클론에서 약 1250 bp-크기의 삽입물을 생성시키는 DraIII/XhoI 이중 분해로 확인하였다. 상기 전장 돌연변이를 이후 게이트웨이 클로닝을 통해 발현 벡터 pCEP4(-E+I)Dest로 클로닝하였다. 돌연변이를 DNA 서열분석에 의해 확인하였다. WT H66 항- α β TCR 중쇄 및 경쇄 및 돌연변이된 H66 중쇄의 아미노산 서열이 표 10에 기재되어 있다. 돌연변이된 아미노산은 회색으로 강조되어 있고, 돌연변이에 의해 생성된 컨센서스 당화 표적 부위는 밑줄로 표시되어 있다.

[0351] 표 10: H66 항- α TCR 항체의 아미노산 서열.

SEQ ID NO	명칭	아미노산 서열
23	항- α TCR 클론 H66 경쇄	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSVMHWYQQ KPGQAPRRLIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYTLTIS SLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGGGTKEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
24	항- α TCR 클론 H66 중쇄	EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHW VRQAPGKGLEWVGYNPYNDVTKYNEKFGRFTLSR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDYDGF VYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK*
25	항- α TCR 클론 H66 S298N/Y300S 중쇄	EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHW VRQAPGKGLEWVGYNPYNDVTKYNEKFGRFTLSR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDYDGF VYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK*
26	항- α TCR 클론 H66 S298N/ T299A/ Y300S 중쇄	EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHW VRQAPGKGLEWVGYNPYNDVTKYNEKFGRFTLSR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDYDGF VYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK*
27	항- α TCR 클론	EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHW

[0352]

SEQ ID NO	명칭	아미노산 서열
	H66 N297Q/ S298N/ Y300S 중쇄	VRQAPGKGLEWVGYNPYNDVTKYNEKFGRFTLSR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDYDGF VYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK*

[0353]

[0354] 돌연변이, 야생형, 및 2개의 비당화 대조군(pCEP4 중 HEBE1 Agly IgG4 및 HEBE1 Δ ab IgG1) 작제물을 발현을 위해 삼중-플라스미드 내의 HEK293-EBNA 세포로 트랜스펙션시켰다. 단백질을 다-채널 연동 펌프를 이용한 1 ml

HiTrap 단백질 A 컬럼(GE)으로 160 ml의 적응용 배지(CM)으로부터 정제하였다. 5 마이크로그램의 각각의 발생된 상층액을 4 내지 20% 트리스-글리신 환원 및 비-환원 SDS-PAGE 젤에서 분석하였다(도 2 참조). 비당화 돌연변이(N297Q, T299A, 및 Agly 대조군)의 중쇄는 상기 항체에서의 글리칸의 손실과 일치하게 추가로 이동(화살촉 모양)하였다. 그러나, 조작된 당화 항체(NSY, STY, SY, Δab, 및 wt 대조군, 화살표)의 중쇄는 야생형 대조군과 유사하게 이동한다. 이러한 결과는 EU 위치 298에서의 조작된 당화 부위의 존재와 일치한다. SEC-HPLC 분석은 모든 돌연변이가 단량체로 발견되는 것을 나타내었다.

[0355] 3B. LC-MS에 의한 당화 분석

[0356] 조작된 H66 IgG1 Fc 변이체를 30분 동안 37°C에서 20mM DTT로 부분적으로 환원시켰다. 이후, 샘플을 QSTAR qq TOF 하이브리드 시스템과 커플링된 Agilent 1100 모세관 HPLC 시스템(Applied Biosystems) 상에서의 모세관 LC/MS에 의해 분석하였다. 기준선 보정 및 Analyst QS 1.1(Applied Biosystem)에서의 컴퓨터 모델링을 이용한 베이지언(Bayesian) 단백질 재구성을 데이터 분석에 이용하였다. S298N/T299A/Y300S H66 항체 돌연변이에서, GOF, G1F 및 G2F와 함께 주요 종으로서 검출된 바이안테나리 및 트라이안테나리 복합체-유형 글리칸을 갖는 한 당화 부위가 아미노산 298에서 관찰되었다(도 34 참조). 이러한 변경된 당화 프로파일은 N297에서의 야생형 당화 부위 대신 N298에서의 전환된 당화와 일치한다.

[0357] 3C. 비아코어를 이용한 인간 FcγRIIIa 및 FcγRI에 대한 αβTCR 항체 돌연변이의 결합 특성

[0358] 재조합 인간 FcγRIIIa(V158 & F158) 및 FcγRI으로의 결합을 평가하기 위해 비아코어를 이용하였다. CM5 칩의 4개 모두의 플로우셀(flowcell)을 비아코어에 의해 제공되는 표준 아민 커플링 절차를 통해 항-HPC4 항체와 함께 고정시켰다. 항-HPC4 항체를 커플링 반응을 위해 10mM 소듐 아세테이트 pH 5.0 중 50μg/ml로 희석시키고, 5 μl/분으로 25분 동안 주입하였다. 약 12,000 RU의 항체를 칩 표면 상에 고정시켰다. 재조합 인간 FcγRIIIa-V158 및 FcγRIIIa-F158을 결합 완충액(1mM CaCl₂를 갖는 HBS-P)에 0.6μg/ml로 희석시키고, 5μl/분으로 3분 동안 플로우셀 2 및 4에 각각 주입하여, 항-HPC4 칩 상에 300 내지 400 RU 수용체를 포획하였다. 낮은 결합체 사이를 구별하기 위해, 본 검정에서 일반적으로 사용되는 것보다 3배 더 많은 rhFcγRIIIa를 항-HPC4 표면 상에 포획시켰다. 플로우셀 1 및 3을 참조 대조군으로 사용하였다. 각각의 항체를 결합 완충액 중에서 200nM로 희석시키고, 4분 동안 4개 모두의 플로우셀 상에 주입한 후, 완충액 중에서 5분 해리시켰다. 표면을 20μl/분에서 3분 동안 HBS-EP 완충액 중 10mM EDTA로 재생시켰다. 상기 실험의 결과는 도 3에 제시되어 있다.

[0359] 비아코어를 또한 FcγRI 결합을 비교하기 위해 이용하였다. 항-테트라 His 항체를 Zeba 탈염 컬럼을 이용하여 10mM 소듐 아세테이트 pH 4.0으로 완충액 교환하고, 아민 커플링을 위해 아세테이트 완충액 중 25μg/ml로 희석시켰다. CM5 칩의 2개의 플로우셀을 5μl/분으로 20분 주입 후 약 9000 RU의 항-테트라-His 항체와 함께 고정시켰다. 이전 실험에서와 같이, 약한 결합을 갖는 샘플을 비교하기 위해 항-테트라-His 표면에 10배 더 많은 FcγRI를 포획시켰다. 재조합 인간 FcγRI을 HBS-EP 결합 완충액 중에 10μg/ml로 희석시키고, 5μl/분에서 1분 동안 플로우셀 2로 주입하여, 항-테트라-His 칩에 약 1000 RU의 수용체를 포획시켰다. 단일 농도의 항체 100nM을 포획된 수용체 및 대조군 표면 상에 30μl/분으로 3분 동안 주입하였다. 이후, 3분 동안 해리를 모니터하였다. 이후, 표면을 20μl/분으로 10mM 글리신 pH 2.5의 2회의 30초 주입으로 재생시켰다. 상기 실험의 결과는 도 4에 제시되어 있다.

[0360] 이들 결과는 FcγRIIIa 또는 FcγRI으로의 당조작된 돌연변이의 결합에서의 현저한 감소를 입증한다. 특히, H66 S298N/T299A/Y300S는 둘 모두의 수용체로의 결합을 거의 완전히 파기시켰다. 이러한 돌연변이를 더욱 상세한 분석을 위해 선택하였다.

[0361] 3D. 원형 광이색성(CD)을 이용한 안정성 특성규명

[0362] S298N/T299A/Y300S 항체 돌연변이의 안정성을 항체의 언폴딩(변성)을 발생시키는 온도 증가에 따라 216nm 및 222nm에서의 CD 신호를 모니터링하는 원적외선 CD 열 용해 실험에 의해 모니터하였다.

[0363] 온도를 열전기 펠티어(thermoelectric peltier)(Jasco model AWC100)에 의해 조절하고, 25 내지 89°C로부터 1°C/분의 속도로 증가시켰다. CD 스펙트럼을 10 mm의 경로 길이를 갖는 석영 큐벳(Hellma, Inc) 내의 PBS 완충액 중 약 0.5 mg/ml의 단백질 농도로 Jasco 815 분광광도계 상에서 수집하였다. 스캐닝 속도는 50 nm/분이었고, 데이터 피치(data pitch)는 0.5 nm였다. 중간 감도 설정과 함께 2.5 nm의 대역폭을 이용하였다. CD 신호 및 HT 전압을 1°C의 온도 간격에서 0.5 nm의 데이터 간격을 이용하여 210 내지 260 nm로부터 수집하고, 4개의 반복 스캔을 각각의 샘플에 대해 수행하였다. 결과는 델타 AB H66 및 S298N/T299A/Y300S H66 돌연변이 둘 모두가 유사한 열 거동을 나타내고, 분해에 대해 대략 동일한 개시 온도(약 63°C)를 갖는 것을 입증하며(도 35), 이는 상기

텔타 AB H66 및 S298N/T299A/Y300S H66 돌연변이 둘 모두가 동등한 안정성을 갖는 것을 추가로 암시한다.

[0364] **실시예 4: Fc-조작된 돌연변이의 기능적 분석**

[0365] Fc-조작된 돌연변이를 PBMC 증식 검정 및 사이토카인 방출 검정을 통해 평가하였다. PBMC 증식 검정에서, 인간 PBMC를 72시간 동안 증가하는 농도의 치료 항체와 함께 배양하고, ³H-티미딘을 첨가하고, 세포를 18시간 후에 수거하였다. T 세포 고갈/사이토카인 방출 검정을 위해, 인간 PBMC를 증가하는 농도의 치료 항체와 함께 배양하고, 7일까지 세포 수 및 생활력에 대해 매일 분석하였다(Vi-Cell, Beckman Coulter). 세포 상층액을 또한 수거하고, -20℃에서 저장하고, 8-플렉스(8-plex) 사이토카인 패널(Bio-Rad) 상에서 분석하였다.

[0366] 정상 공여체 PBMC를 해동시키고, 다음과 같은 조건하에서 처리하였다(모두 보체 함유 배지 중): 미처리; BMA031, moIgG2b 10μg/ml; OKT3, moIgG2a 10μg/ml; H66, huIgG1 deltaAB 10μg/ml, 1μg/ml 및 0.1μg/ml; H66, huIgG1 S298N/T299A/Y300S 10μg/ml, 1μg/ml 및 0.1μg/ml.

[0367] 바이오플렉스(Bioplex) 분석을 위해 2일(D2) 및 4일(D4)에 사이토카인을 수거하였다(IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, GM-CSF, IFNγ, TNFα). 세포를 CD4, CD8, CD25 및 abTCR 발현에 대해 D4에서 염색시켰다.

[0368] 도 5 내지 8에 제시된 결과는 H66 S298N/T299A/Y300S가 수행된 모든 세포 기반 검정에서 H66 deltaAB와 유사하게 거동하였고, CD25 발현에 의한 최소의 T-세포 활성화, abTCR로의 결합(deltaAB에 대해 약간 상이한 동역학을 가짐), 및 D2 및 D4 둘 모두의 시점에서의 최소의 사이토카인 방출을 나타낸 것을 입증한다. 따라서, S298N/T299A/Y300S 돌연변이는 deltaAB 돌연변이만큼 효과적으로 효과기 기능을 제거하였다.

[0369] **실시예 5: 항-CD52 항체 백본에서의 조작된 Fc 변이체의 제조 및 특성규명.**

[0370] H66 항-αβ TCR 항체에 더하여, S298N/Y300S 돌연변이를 또한 항-CD52 항체 백본에서 조작하였다(클론 2C3). 이러한 돌연변이를 이후 S298N/Y300S H66 항-α TCR 항체에서 관찰된 바와 같은 관찰된 효과기 기능 조절이 또 다른 항체 백본과 일치하는지의 여부를 결정하기 위해 시험하였다.

[0371] 5A. 2C3 항-CD52 항체 변경된 당화 변이체의 생성

[0372] 먼저, pENTR_LIC_IgG1을 이용한 신속 변경 돌연변이유발(quick change mutagenesis)에 의해 S298N/Y300S 2C3 변이체 DNA를 제조하고, WT 2C3 VH를 LIC에 의해 돌연변이된 벡터로 클로닝하였다. 전장 돌연변이를 게이트웨이 기술을 이용하여 pCEP4 (-E+I)Dest 발현 벡터로 클로닝하였다. 이후, DNA 서열분석에 의해 돌연변이를 확인하였고, 서열은 표 11에 기재되어 있다. 이후, 돌연변이를 6-웰 플레이트 포맷으로 HEK293-EBNA 세포로 트랜스펙션 시키고, 단백질을 적응용 배지로부터 정제하였다. 항-CD52 2C3 야생형 항체를 대조군과 동시에 생성시켰다. 발현 수준은 SD-PAGE 및 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 0.1μg/ml인 것으로 밝혀졌다(도 9A). 순수한 적응용 배지에서의 돌연변이의 발현을 또한 비아코어 상에서의 단백질 A 포획에 의해 측정하였다. 고정된 단백질 A로의 6분 주입 후의 해리 반응을 이용하여 농도를 결정하였다. 90 μg/ml로부터 1.5ng/ml로 배지 중에 연속 희석된 CHO-생성된 WT 2C3을 표준 곡선으로 사용하였다. 농도는 4-파라미터 적합화를 이용한 교정 곡선에 의해 약 0.2 μg/ml 내로 계산되었다. 상대 발현 수준은 낮았고, 일반적으로 웨스턴 블롯 데이터와 일치했다(도 9B).

[0373] 표 11: 항-CD52 클론 2C3 항체 서열

SEQ ID NO	명칭	아미노산 서열
28	항-CD-52 2C3 WT 경쇄	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWL LQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVVYCVQGTHTLHTFGQGTREIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC*
29	항-CD-52 2C3 WT 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYWMNWVR QAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFWGQGTITVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYIC NVNHPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*
30	항-CD-52 2C3 S298N/Y300S 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYWMNWVR QAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFWGQGTITVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYIC NVNHPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*

[0374]

[0375] 5B. PNGaseF를 이용한 당화 분석

[0376] 돌연변이에 의해 도입된 추가 당화 부위를 평가하기 위해, 강화된 S298N/Y300S 돌연변이를 PNGase F로 탈당화시켰다. 이는 분자량에서 어떠한 명백한 변화를 나타내지 않았는데, 이는 추가 탄수화물이 존재하지 않는 것을 나타낸다(도 10). 추가 특성구명을 위해 상기 돌연변이를 정제하기 위해 소규모 제조를 수행하였고, 결과는 S298N/Y300S 돌연변이에 추가 탄수화물이 존재하지 않는 것을 재확인하였다(도 11).

[0377] 5C. 비아코어를 이용한 인간 Fc γ RIIIa에 대한 2C3 항-CD52 항체 돌연변이의 결합 특성

[0378] 항원-결합, Fc γ RIII, 및 정제된 항체의 결합 특성을 특성구명하기 위해 비아코어를 또한 이용하였다(도 12, 13, 및 14 참조). S298N/Y300S 2C3 변이체는 CD52 펩티드에 단단히 결합하였고, 결합 센소그램은 야생형 대조군과 구별할 수 없었는데, 이는 상기 돌연변이가 상기 항원 결합에 영향을 미치지 않은 것을 입증한다(도 12A).

[0379] Fc 효과기 기능에 대해 검정하기 위해, Fc γ RIII 수용체(Val158)를 결합 연구에서 사용하였다. 돌연변이 및 야생형 대조군 항체를 200nM로 희석시키고, HPC4-태그 포획된 Fc γ RIIIa에 주입하였다. S298N/Y300S 돌연변이에 대해 Fc γ RIII 결합은 거의 검출할 수 없었고, 이는 상기 변이체에 의한 효과기 기능의 상실을 나타낸다(도 12B 및 도 14A). Fc 효과기 기능에 대한 추가 검정을 위해, Fc γ RIII 수용체(Phe158)를 또한 결합 연구에서 사용하였다. 돌연변이 및 야생형 대조군 항체를 200nM로 희석시키고, HPC4-태그 포획된 Fc γ RIIIa에 주입하였다. Fc γ RIII 결합은 S298N/Y300S 돌연변이에 대해 거의 검출할 수 없었고, 이는 Phe158 변이체를 이용한 효과기 기능의 상실을 나타낸다(도 14B). 최종적으로, 정제된 단백질의 FcRn 결합 특성을 비교하기 위해 비아코어를 이용하였다. 마우스 및 SEC-정제된 인간 FcRn-HPC4를 아민 커플링을 통해 CM5 칩 상에 고정시켰다. 각각의 항체를 200, 50, 및 10 nM로 희석시키고, 수용체 상에 주입하였다. 캄파스, CHO-생성 WT 2C3, 및 DEPC-처리 캄파스를 양성 및 음성 대조군으로 포함시켰다. 이들 데이터는 돌연변이가 야생형 항체 대조군과 동일한 친화성으로 인간 및 뮤린 FcRn 수용체 둘 모두에 결합하고, 이의 순환 반감기 또는 다른 약동학 특성에서 변경이 없을 수 있음을 나타낸다(도 12C, 도 13A 및 B 참조). 따라서, S298N/Y300S 돌연변이는, 예를 들어, 인간 Fc γ 수용체의 진입기전을 통해 일반적으로 요망되지 않는 Fc 효과기 기능을 감소시키거나 제거하기 위해 항체에 적용가능하다.

[0380] 실시예 6: S298N/Y300S 돌연변이에서의 순환 면역 복합체 검출.

[0381] 순환 면역 복합체 검출을 또한 S298N/Y300S 돌연변이 및 WT 대조군에 대한 C1q 결합 검정을 이용하여 연구하였

다. 고 결합 Costar 96-웰 플레이트를 4℃에서 밤새 코팅 완충액(0.1M NaCHO₃ pH 9.2) 중 10 내지 0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 범위의 농도의 연속적으로 2배 희석된 2C3 Abs 100 μl 를 이용하여 코팅하였다. ELISA 분석은 C1q 결합이 WT에 비해 S298N/Y300S 돌연변이에 대해 감소된 것을 나타내었다(도 15A). 코팅된 2C3 Abs로의 항-Fab Ab의 결합은 웰의 동등한 코팅을 입증하였다(도 15B).

[0382] 실시예 7: 등전 초점조절을 이용한 S298N/Y300S 돌연변이의 분리 및 분석.

[0383] S298N/Y300S 돌연변이를 특성규명하기 위해 pH 3 내지 10 등전 초점조절(IEF) 젤을 영동시켰다. S298/Y300S는 더 음성의 전하를 갖는 것으로 밝혀졌고, 이에 따라, 시알산 분자가 더 많을 수 있다(도 18A). S298N/Y300S 돌연변이 및 WT 2C3 둘 모두는 완전한 MS에 의해 우세한 당화 종으로서 G0F 및 G1F를 갖는 것으로 밝혀졌다(각각, 도 18 B 및 D).

[0384] 실시예 8: S298N/Y300S의 항원 결합 친화성.

[0385] 더 작은 규모(도 16) 및 더 큰 규모(도 17)의 발현 둘 모두로부터 제조되고 정제된 WT 항-CD52 2C3 Ab 및 S298N/Y300S 돌연변이의 항원 결합 친화성을 비교하기 위해 비아코어를 이용하였다. CD52 펩티드 741 및 대조군 펩티드 777로 고정된 CM5 칩을 수득하였다. 항체를 HBS-EP 중에서 60으로부터 0.2nM로 연속적으로 2배 희석시킨 후, 3분 동안 칩 표면 상에 주입한 후, 50 μl /분의 유량으로 완충액 중에서 5분 해리시켰다. 이후, 표면을 40mM HCl의 펄스로 재생시켰다. 상기 분석을 2회 수행하였고, 이는 S298N/Y300S 돌연변이 및 WT 2C3 항체가 동등한 CD52 펩티드 결합을 나타내는 것을 입증한다.

[0386] 소규모 트랜스펙션 동안 생성된 항체를 스크리닝하기 위해 정제 전에 기능적 결합 특성을 시험하기 위해 배지 스크리닝 플랫폼을 설계하였다. 이들 시험을 농도를 결정하기 위해 옥텟(도 19A)을 이용하여 수행하였고, 단백질 A 바이오센서 및 GLD52 표준 곡선을 이용하였다. 샘플을 비아코어를 이용한 CD52 결합 비교를 위해 HBS-Ep 중에 7.5 및 2nM로 희석시켰다(도 19B). 펩티드 결합 검정의 결과는 S298N/Y300S 돌연변이 및 WT 2C3 항체 둘 모두가 동등한 CD52 펩티드 결합을 갖는 것을 나타내었다. 또한, 이들 분석은 옥텟 및 비아코어 작업이 소규모 트랜스펙션으로부터 항체에 의한 항원 결합을 잘 예측한 것을 입증한다.

[0387] 실시예 9: 추가 항체 백본에서의 S298N/Y300S, S298N/T299A/Y300S, 및 N297Q/S298N/Y300S 변경 당화 돌연변이의 제조.

[0388] 항- $\alpha\beta$ -TCR 항체 및 2C3 항-CD-52 항체에 더하여, 추가 직렬 당화 부위가, 관련되지 않은 중쇄 가변 도메인 서열로 도입될 수 있는지 확인하기 위해 다른 항체 백본에서 S298/Y300S, S298N/T299A/Y300S, 및 N297Q/S298N/Y300S 돌연변이를 조작하였다. 대안적으로 당화된 항-CD-52 12G6 및 항-Her2 돌연변이는 표 12 및 13에 기재되어 있다.

[0389]

표 12: 항-CD52 클론 12G6 항체 서열

SEQ ID NO	명칭	아미노산 서열
31	항-CD-52 12G6 WT 중쇄	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWV LQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGIDFTLKISR EAEDVGYYCVQGSFHTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTSLTLTKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
32	항-CD-52 12G6 WT 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPPFSNYWMNWVRQ APGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKN SLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGTITVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK*
33	항-CD-52 12G6 S298N/Y300S 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPPFSNYWMNWVRQ APGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKN SLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGTITVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK*
34	항-CD-52 12G6 S298N/ T299A/ Y300S 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPPFSNYWMNWVRQ APGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKN SLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGTITVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK*
35	항-CD-52 12G6 N297Q/ S298N/ Y300S 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPPFSNYWMNWVRQ APGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKN SLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGTITVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP

[0390]

SEQ ID NO	명칭	아미노산 서열
		KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK*

[0391]

[0392] 표 13: 항-Her2 항체 서열

SEQ ID NO	명칭	아미노산 서열
36	항-Her2 WT 경쇄	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKP GKAPKLLIYASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC*
37	항-Her2 WT 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS WNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*
38	항-Her2 S298N/T299A/ Y300S 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS WNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*

[0393] 실시예 10. 반응성 글리칸 모이어티를 함유하는 변경된 항체의 생성

[0395] 유도체화된 효과기 모이어티와 반응할 수 있는 글리칸 모이어티를 함유하는 항체를 생성시키기 위해, 항-HER 항체를 글리코실트랜스페라제 및 관련된 UDP 당 공여체를 이용하여 시험관내에서 먼저 당화시켰다. 예를 들어, 시알산 잔기를 도입시키기 위해, 문헌[Kaneko et al. (Kaneko, Y., Nimmerjahn, F., and Ravetch, J. V. (2006) Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* 313, 670-3)]의 방법에 따라 공여자 항체를 β-갈락토실트랜스페라제로 먼저 갈락토실화시킨 후, α2,6-시알릴트랜스페라제로 시알릴화시켰다. 5mM MnCl₂를 함유하는 50mM MES 완충액(pH 6.5) 중 공여자 당 뉴클레오타이드 기질을 갖는 β-갈락토실트랜스페라제(50U/mg, Sigma) 및 α2,6-시알릴트랜스페라제(5μg/mg, R&D system), UDP-갈락토스(10mM) 및 CMP-시알산(10mM)을 이용하여 단일-단계 합성 단계로 반응을 수행하였다. 5mg/ml 항-HER2 항체를 함유하는 반응 혼합물을 37℃에서 48시간 동안 인큐베이션하였다. PNGase F를 이용하여 항체로부터 방출된 파메틸화된 글리칸의 MALDI-TOF MS 분석, Dionex HPLC를 이용한 시알산 함량 분석 및 α2,6-시알산에 대해 특이적인 렉틴인 SNA를 이용한 렉틴 블로팅을 이용하여 시알릴화를 확인하였다.

[0396] 시알릴화 항-HER2 항체의 PNGase F 처리에 의해 방출된 글리칸의 MALDI-TOF 분석은 자연 글리칸이 소량의 디시알릴화 종과 함께 주로 일시알릴화 바이안테나리 구조, A1F(도 27A)로 완전히 재형성된 것을 나타내었다. 더 많은 양의 α2,6-시알릴트랜스페라제를 이용한 항체의 처리는 A1F 당형의 더욱 균일한 집단을 발생시켰으며, 이는 효소 활성 또는 글리칸 국소화가 완전한 시알릴화를 방해할 수 있음을 암시한다. 시알산 함량은 항체의 mol 당 약 2 mol인 것으로 결정되었고, 이는 주요 당형 종으로서 A1F 글리칸과 일치한다(도 27B). α2,6-결합된 시알산에 대해 특이적인 삼부쿠스 니그라(*Sambucus nigra*) 응집소인 SAN 렉틴을 이용한 렉틴 블로팅은 시알산이 α2,6-결합 형태로 존재하는 것을 입증하였다(도 27C).

[0397] 결론으로서, 자연 단백질 글리칸은 다소 이종성이나, 갈락토실 및 시알릴트랜스페라제를 통한 재형성은 일시알릴화되었으나 충분히 갈락토실화된 바이안테나리 글리칸을 갖는 거의 동종성 항체(A1F)를 생성시킨다. 각각의 분지된 글리칸 상의 2개의 갈락토스 수용체 상의 단지 약 1개의 시알산의 도입은 항체 내에 종종 묻혀지는 글리칸으로부터 갈락토스 중 하나의 제한된 접근성 또는 글리칸과 단백질 표면의 비-공유 상호작용으로 인한 것일 수 있다.

[0398] **실시예 11. 반응성 글리칸 모이어터를 함유하는 변경된 항체의 산화**

[0399] 시알릴화가 확인된 후, 시알릴화된 항-HER2 항체와 다양한 농도의 페리오데이트(0.25 내지 2mM)의 공정중(in-process) 산화를 연구하였다. 시알릴화된 항체를 먼저 5mM EDTA를 함유하는 25mM 트리스-HCl(pH 7.5)로 완충제 교환한 후, PBS 완충액으로 완충액 교환하였다. 이후, 완충된 항체 혼합물을 PBS 완충액으로 사전-평형화된 단백질 A 세파로스 컬럼으로 적용시켰다. 컬럼을 15 컬럼 부피의 PBS, 15 컬럼 부피의 5mM EDTA를 함유하는 PBS, 및 30 컬럼 부피의 PBS로 세척한 후, 이를 25mM 시트레이트 포스페이트 완충액(pH 2.9)으로 용리시켰다. 용리액을 이염기 인산염 완충액으로 즉시 중화시키고, 항체를 Millipore로부터의 아미콘 울트라(Amicon ultra)를 이용하여 농축시켰다. 정제 후, 시알릴화된 항-HER2 항체를 이후 30분 동안 어두운 곳에서 얼음 상 100mM 소듐 아세테이트 완충액(pH 5.6) 중 소듐 페리오데이트(Sigma)로 산화시키고, 반응을 15분 동안 얼음 상에서 3% 글리세롤로 켄칭시켰다. 생성물을 탈염시키고, 50kDa 아미콘(Amicons) 상에서의 5라운드의 초여과에 의해 100mM 소듐 아세테이트(pH 5.6)로 교환하였다. 도 28A는 다양한 양의 페리오데이트로 적정된 시알릴화된 항체의 시알산 함량 분석을 제시한다. 시알산 잔기의 완전한 산화를 0.5mM 초과와 페리오데이트 농도에서 달성하였다. 확실히, 0.5mM만큼 낮은 페리오데이트 농도는 도입된 시알산을 완전히 산화시키기에 충분하였다. 따라서, 약물 컨쥬게이션을 위한 시알릴화된 항체의 산화를 위해 1mM 농도의 페리오데이트를 선택하였다.

[0400] 산화는 항체의 완전함에 대해 유해한 효과를 가질 수 있다. FcRn 결합 부위에 가까운 Fc CH3 영역에 위치한 Met-252 및 Met-428을 포함하는 메티오닌 잔기의 산화는 항체 혈청 반감기를 연장시키는데 중요한 FcRn 결합에 영향을 미치는 것으로 공지되어 있다(Wang, W., et al. (2011) Impact of methionine oxidation in human IgG1 Fc on serum half-life of monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 48, 860-6). 따라서, FcRn 상호작용에 중요한 메티오닌 잔기(예를 들어, Met-252) 상에서의 페리오데이트 산화의 잠재적인 부작용을 시험하기 위해, 시알릴화된 항체의 산화 상태를 트립신 펩티드 분해의 LC/MS 분석에 의해 결정하였다. 이러한 분석은 1mM 페리오데이트를 이용한 시알릴화된 트라스투주맙의 처리 후 Met-252의 약 30% 산화 및 Met-428의 <10% 산화를 나타내었다. FcRn 결합에 대한 상기 정도의 메티오닌 산화의 영향을 결정하기 위해, 각각의 항체에 대한 FcRn 결합 동역학을 표면 플라즈몬 공명(BIACORE)을 이용하여 평가하였다. 이러한 분석은 산화 상태가 FcRn 결합에서의 약간의 손실과 서로 관련된다는 것을 나타내었다(마우스 및 인간 FcRn에 대한 Ka에서의 12% 및 26% 감소, 각각 도 28B and 28C 참조). 특히, 인간 FcRn에 대한 Ka에서의 약 25% 감소는 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스에서 혈청 반감기에 대해 영향을 미치지 않은 것으로 보고되었는데, 이는 각각의 항체 상의 하나의 완전한 FcRn 부위가 기능성 및 PK 장점을 제공하기에 충분하기 때문이다(Wang et al., *Id*).

[0401] 요컨대, 이들 데이터는 시알릴트랜스페라제 처리에 의한 페리오데이트-민감성 시알산 잔기의 도입은 훨씬 낮은 농도의 페리오데이트의 사용을 가능케 하여, 항체-FcRn 상호작용에 대한 최소의 부작용 및 응집(<1%)에 의해 평가시 항체 완전성을 발생시키는 것을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 방법에 따른 시알릴화 항체의 사용은 사용되는 더 광범위한 범위의 산화 조건을 제공하여, 혈청 반감기에 대한 영향 없이 활성 글리코컨쥬게이트의 재현가능한 생성을 가능케 한다.

[0402] 과당화된 항체 돌연변이 내의 갈락토스는 특히 컨쥬게이션을 위한 알데하이드기를 생성시키기 위해 갈락토스 산화효소를 이용하여 산화될 수 있다. 상기 접근법을 확인하기 위해, A114N 항-TEM1 항체를 13 내지 20 mg/ml로 농축시킨 후, 37°C에서 6시간 동안 PBS 중 20mU/mg 시알리다제로 처리하였다. 이후, 탈시알릴화 생성물을 먼저 37°C에서 밤새 단백질 mg 당 5 µg GAO와 함께 갈락토스 산화효소("GAO")로 산화시킨 후, 단백질 mg 당 2 µg GAO를 첨가하고, 추가 5시간 동안 인큐베이션하였다. 소듐 아세테이트를 첨가하여 pH를 5.6(0.1 v/v, pH5.6)으로 조정하고, DMSO를 첨가하여 16%의 최종 반응 농도를 달성하고, 컨쥬게이션 전에 첨가하였다. 과당화 돌연변이 A114N 항-HER 항체(15mg/ml)를 유사하게 시알리다제(20mU/mg)로 탈시알릴화시키고, 37°C에서 밤새 단일 반응으로 단백질 mg 당 5µg GAO로 산화시켰다.

[0403] **실시예 12. 반응성 효과기 모이어터의 합성**

[0404] 본 발명의 알데하이드-유도체화 항체 당형과의 컨쥬게이션을 촉진시키기 위해, 후보 약물 효과기 모이어터(예를 들어, 모모메틸 아우리스타틴 E(MMAE) 및 돌라스타틴 10(Do110))를 아미노옥시-시스타미드로 유도체화시켜, 알데하이드와 특이적으로 반응성인 작용기(예를 들어, 아미노옥시-cyc)를 함유시켰다.

[0405] 간단히, 시작 물질로서 아미노옥시-시스타미드를 생성시키기 위해, S-트리틸-L-시스테인아미드(362 mg, 1 mmol)를 3 ml의 t-BOC-아미노옥시아세트산 N-하이드록시숙신아미드 에스테르(289 mg, 1 mmol)의 DMF 용액에 첨가하였다. HPLC 분석으로부터 명백한 바와 같이 반응은 3시간 후에 완료되었다. 반응 혼합물을 이후 30 ml의 디클로로메탄으로 희석시키고, 0.1 M 소듐 바이카르보네이트 용액(2 x 20 ml), 물(2 x 20 ml), 및 염수(2 x 20 ml)로

세척하였다. 용액을 무수 소듐 설페이트 상에서 건조시키고, 여과시키고, 건조 농축시켰다. 이러한 건조된 잔여물에 3 ml의 TFA, 및 이후 150 μ l의 트리에틸실란을 첨가하였다. 생성된 용액을 t-부틸 메틸 에테르로부터 침전시키고, 상기 과정을 3회 반복하였다. 여과 후, 잔여물을 감압하에서 건조시켜, 205 mg의 회백색 고체(67% 수율)를 생성시켰다. 화합물을 추가 정제 없이 다음 단계에 사용하였다.

[0406] 아미노옥시-유도체화된 MMAE(아미노옥시-Cys-MC-VC-PABC-MMAE)를 생성시키기 위해, 30.1 mg의 아미노옥시-시스타미드(0.098 mmol, 2 당량)를 3 ml의 DMF 중 64.6 mg의 MC-VC-PABC-MMAE(0.049 mmol), 및 100 μ l의 트리에틸아민과 조합시켰다. 생성된 반응 혼합물을 15분 동안 실온에서 교반하였고, 이 시간에 의해 HPLC 분석에 따라 반응이 완료되었다. 화합물을 분취용 HPLC로 정제하여, 회백색 고체로서 45 mg(62%)의 요망되는 생성물을 생성시켰다. 역상 HPLC 분석은 화합물의 순도가 >96%인 것을 암시하였다. C73H116N14O18S (MH)⁺에 대해 계산된 ESI, 1509.8501; 실측치, m/z 1509.8469.

[0407] 아미노옥시-유도체화 Do110(아미노옥시-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Do110)을 생성시키기 위해, 7.4 mg(0.024 mmol, 3 당량)의 아미노옥시-시스타미드, 12 mg(0.008 mmol)의 MC-VC-PABC-PEG8-Do110 및 30 μ l의 트리에틸아민을 3 ml의 DMF 중에서 조합시켰다. HPLC 분석에 따라 반응은 15분 이내에 완료되었다. 분취용 HPLC 정제로 회백색 고체로서 6.2 mg(46%)의 요망되는 생성물을 생성시켰다. 역상 HPLC 분석은 화합물의 순도가 >96%인 것을 암시한다. C80H124N16O19S2 (MH)⁺에 대해 계산된 ESI, 1678.0664; 실측치, m/z 1678.0613.

[0408] 실시예 13. 반응성 효과기 모이어티의 시알산-매개(SAM) 컨쥬게이션

[0409] 탈염 후, 실시예 11의 약물-링커를 25mM의 농도의 75% DMSO 중 실시예 10의 산화된 시알릴화 항체와 조합시켜, 24:1 몰 비의 약물-링커 대 항체 및 5 mg/ml의 최종 항체 농도를 달성하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 인큐베이션하였다. 혼합되지 않은 약물-링커 및 임의의 자유 약물을 바이오비즈(BioBeads)를 이용하여 제거하였다. 생성물을 PD-10 컬럼을 이용하여 히스티딘-트윈 완충액으로 완충액 교환하고, 멸균 여과시켰다. 내독소 수준을 결정하였고, ADC mg 당 0.1EU 미만이 생체내 연구에 대해 달성되었다.

[0410] **도 29A 내지 C**는 AO-MMAE에 글리코컨쥬게이션된 다양한 시알릴화 항체(항 FAP B11 및 G11 및 실시예 11의 항-HER2 항체)의 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)를 제시한다. 시알릴화된 HER2 항체를 또한 약물-링커, AO-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Do110과 컨쥬게이션시켰다(**도 29D**). 이러한 분석은 1.3 내지 1.9 범위의 약물-대-항체 비(DAR)를 갖는 항체 당 1개 또는 2개의 약물 컨쥬게이트가 주로 존재하는 것을 나타낸다. MMAE 글리코컨쥬게이트(**도 29C**)에 비한 Do110 글리코컨쥬게이트(**도 29D**)의 증가된 체류 시간은 Do110의 더 큰 소수성으로 인한 것일 수 있다.

[0411] LC-MS 분석을 또한 30mg 규모로 2개의 상이한 약물-링커(AO-MMAE 또는 AO-PEG8-Do110)와 컨쥬게이션된 항-HER 항체로 수행하였다. 이러한 분석은 컨쥬게이션 후 1.7 및 1.5의 유사한 DAR 값을 나타내었고, 이는 HIC 분석과 동등하다. 크기-배제 크로마토그래피(SEC)는 상기 컨쥬게이트에서 매우 낮은 수준(1%)의 응집물을 나타내었다.

[0412] 실시예 14. 반응성 효과기 모이어티의 갈락토스-매개(GAM) 컨쥬게이션

[0413] 실시예 11에 기재된 바와 같은 A114N 항TEM1 과당화 돌연변이 항체 상에서 갈락토스 산화효소로 생성된 갈락토스 알데하이드를 25°C에서의 밤새의 인큐베이션에 의해 항체 상의 24 몰 과당의 아미노옥시-MC-VC-PABC-MMAE 약물-링커와 컨쥬게이션시켜, 1.72의 DAR을 갖는 ADC 컨쥬게이트를 생성시켰다.

[0414] 실시예 11에 기재된 바와 같이 제조된 갈락토스 산화효소-처리된 항HER 항체에 1/10 반응 부피의 1M 소듐 아세테이트(pH5.6)를 첨가하여, pH를 5.6으로 조정하고, DMSO를 첨가하여 14%의 최종 농도를 만든 후, 24 당량의 아미노옥시 MC-VC-PABC-MMAE 약물 링커를 첨가하였다. 반응물을 실온에서 밤새 인큐베이션하였다. 자유 약물 및 약물-링커를 바이오비즈(Biobeads)로 제거하고, 생성물을 SEC에 의해 완충액 교환하였다(65% 수율). 생성물 컨쥬게이트를 HIC에 의해 분석하였다. **도 30**에 제시된 바와 같이, AO-MMAE는 분자의 약 60%에 컨쥬게이션되었다.

[0415] 실시예 15. 시험관내 ADC 세포 증식 검정

[0416] 본 발명의 항-HER 및 항-FAP 글리코컨쥬게이트 분자의 시험관내 활성을 또한 티올 결합을 통해 동일 공여체 항체의 힌지 영역 시스템에 연결된 동일 약물 모이어티를 함유하는 상응하는 티올 컨쥬게이트와 비교하였다. 티올 컨쥬게이트는 글리코컨쥬게이트보다 약 2배의 수의 항체 당 약물(DAR)을 함유하였다. 티올-기반 컨쥬게이션을 문헌[Stefano et al (Methods in Molecular Biology 2013, in press)]에 기재된 바와 같이 수행하였다. Her2+ SK-BR-3 및 Her2- MDA-MB-231 세포주를 이후 각각의 ADC의 상대 효능을 평가하기 위해 이용하였다. 상기

분석의 결과는 하기 표 15에 제공된다.

표 15. 글리코컨쥬게이트 및 티올 컨쥬게이트의 EC₅₀ 비교

	DAR	EC ₅₀ (ng/ml)
항-HER-MC-VC-PABC-MMAE (티올 MMAE)	3.8*	2.3
항 HER-AO-Cys-MC-VC-PABC-MMAE (글리코 MMAE)	1.7*	4.7
항 -HER-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10 (티올 Dol10)	3.9*	0.45
항 -HER-AO-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10 (글리코 Dol10)	1.5*	0.97
항 FAP B11-MC-VC-PABC-MMAE (티올 MMAE), CHO+FAP	3.3**	382.4
항 FAP B11-AO-Cys-MC-VC-PABC-MMAE (글리코 MMAE), CHO+FAP	1.5**	682.4

주: * LC-MS 에 의해 결정된 DAR; ** HIC 에 의해 결정된 DAR

도 31은 항-HER 글리코컨쥬게이트 및 이의 대응물 티올 컨쥬게이트의 시험관내 효능의 비교를 도시한다. 세포 생활력을 Her2 항원 발현(SK-BR-3) 세포(**도 31A 및 C**) 또는 무발현(MDA-MB-231) 세포(**도 31B 및 D**)에 대한 컨쥬게이트의 72시간의 노출 후에 결정하였다. ADC는 글리칸에 연결("글리코")되거나 통상적인 화학작용에 의해 힌지 영역 시스테인에 연결("티올")된 MMAE 또는 PEG8-Dol10을 함유하였다. 도 30A 및 C에 제시된 바와 같이, 글리코컨쥬게이트에 비해 티올 컨쥬게이트에 대해 약 2배 더 낮은 EC₅₀이 관찰되었고, 이는 글리코컨쥬게이트보다 티올 컨쥬게이트에서 2배 더 높은 DAR과 일치한다. 100µg/ml까지 어떠한 항체와 함께 Her2- 세포주를 이용해서도 독성이 관찰되지 않았다.

결장암, 췌장암 및 유방암을 포함하는 상피암에서 반응성 기질 섬유모세포에 의해 고도로 발현되는 종양 항원(FAP)에 대한 항체와 함께 제조된 ADC에 대한 세포 증식에서 유사한 경향이 또한 관찰되었다(Teicher, B. A. (2009) Antibody-drug conjugate targets. *Curr Cancer Drug Targets* 9, 982-1004). 이들 컨쥬게이트를 아미노옥시 MMAE 약물-링커 또는 말레이미도 MMAE 약물-링커를 글리칸 또는 티올기에 컨쥬게이션시킴으로써 다시 제조하였다. 상기 컨쥬게이트의 세포 증식 검정은 항 FAP B11 글리코컨쥬게이트 및 티올 컨쥬게이트의 시험관내 효능의 비교를 도시하는 **도 32**에 도시된 바와 같이, FAP 발현이 결핍된 동일 세포보다 인간 FAP로 트랜스펙션된 CHO 세포에 대해 티올 컨쥬게이트의 EC₅₀이 약 100배 더 높은 효능을 갖는 것을 나타내었다. FAP 항원으로 트랜스펙션되거나 FAP 항원 없이 트랜스펙션된 CHO 세포로의 컨쥬게이트의 노출 후에 세포 생활력을 결정하였다. ADC는 글리칸("글리코") 또는 통상적인 화학작용에 의해 힌지 영역 시스테인("티올")에 연결된 MMAE를 함유하였다. 글리코컨쥬게이트에 비해 티올에 대한 약 2배 더 낮은 EC₅₀은 항체 당 전달된 약물의 상대량과 일치하며, 이는 항원 발현 CHO 세포에서의 표적 결합 및 내재화에 대한 유사한 효율로 추정됨을 주목하라. 동시에, 상기 기재된 바와 같이 1.5의 DAR을 갖는 항 FAP (B11) ADC의 글리코컨쥬게이트를 검정하였고, 이는 비교측정기 티올 컨쥬게이트(DAR 3.3)보다 약 2배 더 높은 EC₅₀을 나타내었다.

도 36에 제시된 바와 같이, SK-BR-3 발현 세포 또는 MDA-MB-231 세포에 대해 검정시 실시예 14에 기재된 바와 같이 A114N 과당화 돌연변이 및 AO-MMAE를 갖는 항-HER 항체로 제조된 ADC에 대한 세포 증식 검정에서 유사한 경향이 관찰되었다. A114N 글리코컨쥬게이트는 무-발현 세포주에 비해 Her2 발현 세포주에 대해 향상된 세포 독성을 명백히 나타낸다. 동일 항체로 제조된 Sia1T 글리코컨쥬게이트에 비한 상대 독성은 상기 제조물의 더 적은 약물 부하량(loading)과 일치한다.

세포 증식 검정을 또한 실시예 14에 기재된 바와 같이 제조된 A114N 과당화 돌연변이 및 AO-MMAE를 갖는 항-TEM1 항체로 제조된 ADC에 대해 수행하였다. 무-발현 MDA-MB-231 세포주에 비해 TEM1-발현 세포주 SJSA-1 및 A673으로 더 높은 독성이 관찰되었다. 동일 항체를 갖는 통상적인 티올 컨쥬게이트와 비교한 독성 수준은 상기 제조물의 약물 부하량(DAR)과 일치하였다.

	SJSA-1	A673-RPMI	A673-DMEM-RPMI	MDA-MB-231
	IC50	IC50	IC50	IC50
항TEM1 A114N-AO-MC-VC-PABC-MMAE	3 µg/ml	3.2 µg/ml	2.2 µg/ml	40 µg/ml
항TEM1-MC-VC-PABC-MMAE	4 µg/ml	1 µg/ml	0.9 µg/ml	20 µg/ml

[0423]

[0424]

요컨대, 분해성 링커를 갖는 글리칸을 통한 약물의 부위-특이적 컨쥬게이션은 다양한 항체 및 다양한 약물-링커를 이용하여 입증되는 바와 같이 통상적인 티올-기반 컨쥬게이트와 동등한 독성 및 시험관내 효능을 갖는 ADC를 생성시킨다. 또한, 2mM 미만의 페리오데이트의 약물 컨쥬게이션의 수준은 시알산의 환원과 서로 관련이 있다. 2mM 초과로 페리오데이트 농도를 증가시키는 것은 시알산의 산화된 형태로의 완전한 전환으로부터 예상되는 바와 같이 거의 이점을 갖지 않는다. 그러나, 모든 조건하에서, 항체 당 약물의 수는 시알산 함량보다 약간 더 적었으며, 이는 산화된 시알산 중 일부가 마찬가지로 묻히거나 그렇지 않으면 약물-링커의 크기로부터 발생하는 입체 장애로 인해 커플링에 이용될 수 없음을 나타낸다.

[0425]

실시예 16. 항체 약물 컨쥬게이트의 생체내 특성규명

[0426]

항-HER 글리코컨쥬게이트의 효능을 또한 Her2+ 종양 세포 이종이식 방식으로 평가하였고, 약 2배 더 높은 DAR을 갖는 티올 컨쥬게이트 비교측정기와 비교하였다. Beige/SCID 마우스에 SK-OV-3 Her2+ 종양 세포를 이식하여 치료 개시 전 약 150 mm³의 종양을 확립시켰다. 3 또는 10mg/kg 용량의 ADC를 38일, 45일, 52일 및 59일에 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 그룹 당 약 10마리의 마우스가 있었다. 다양한 그룹의 마우스의 종양 부피를 측정하고, 마우스의 생존을 기록하였다. 생존 곡선을 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 방법을 기초로 하여 플로팅하였다.

[0427]

도 33은 Her2+ 종양 세포 이종이식 모델에서의 항-HER 글리코컨쥬게이트 및 티올 컨쥬게이트의 생체내 효능의 비교를 도시한다. SK-OV-3 Her2+ 종양 세포가 이식된 Beige/SCID 마우스에 글리코컨쥬게이트 및 약 2배 더 높은 DAR을 갖는 티올 컨쥬게이트 비교측정기를 함유하는 MMAE(도 33 A 및 B) 및 PEG8-Dol10(도 33 C 및 D)을 투여하였다. MMAE 컨쥬게이트의 종양 성장 동역학은 도 33A에 제시되어 있다. 이러한 경우, 글리코컨쥬게이트는 네 이키드 항체 단독(흑색)보다 유의하게 더 높은 효능을 나타내었으나, 약 2배 더 높은 DAR을 갖는 티올 컨쥬게이트 비교측정기(녹색) 미만을 나타내었다. MMAE 글리코컨쥬게이트는 유의한 종양 회귀 및 종양 성장에서의 약 20일의 지연(도 33A), 및 첫번째 투여로부터 생존 시간의 약 2배의 증가(도 33B)를 나타내었다. 티올 MMAE 컨쥬게이트는 ADC의 동일 용량(10 mg/kg)에서 거의 완전한 종양 억제력을 나타내었다.

[0428]

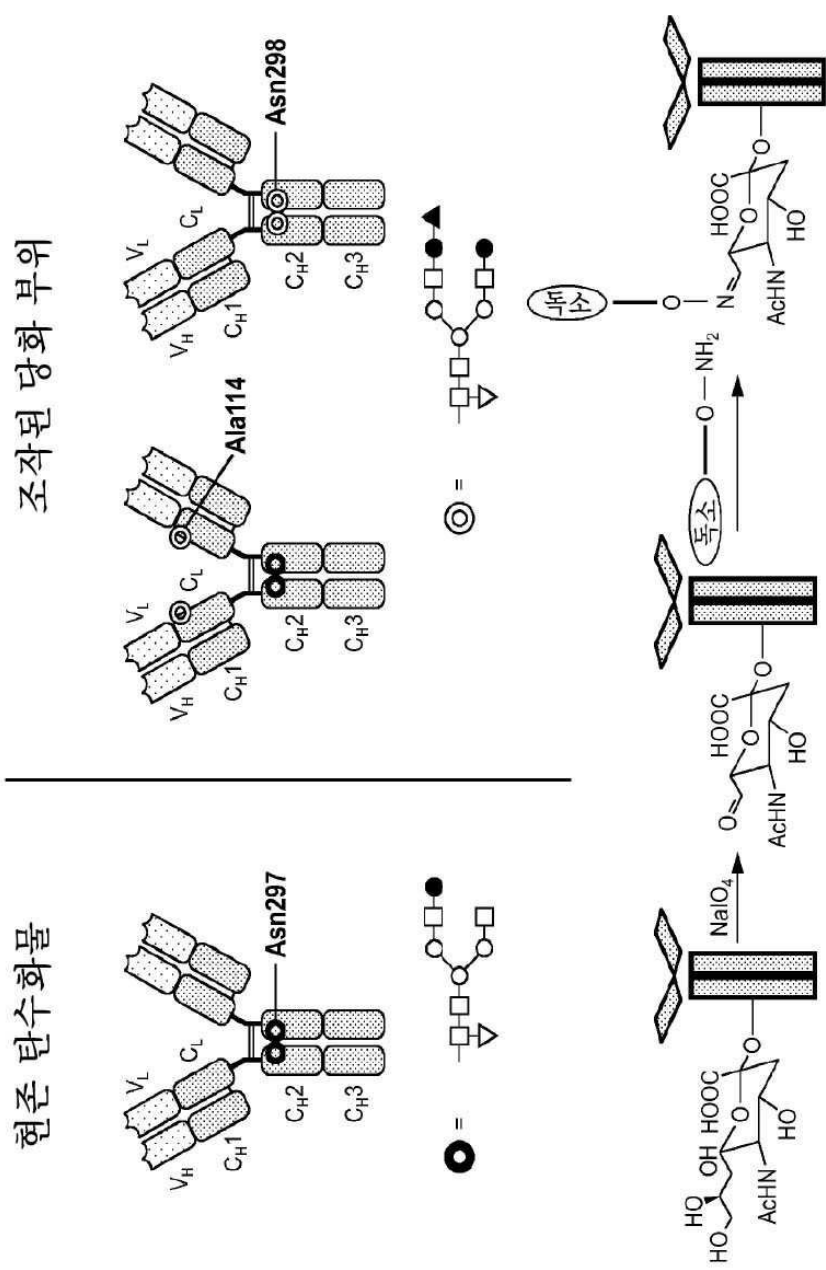
PEG8-Dol10 글리코컨쥬게이트("글리코 Dol10") 및 약 2배 더 높은 DAR을 갖는 티올 컨쥬게이트 비교측정기("티올 Dol10")의 생체내 효능을 또한 동일한 Her2+ 종양 세포 이종이식 모델에서 결정하였다. 둘 모두의 컨쥬게이트는 이전에 기재된 바와 같이 MMAE보다 낮은 효능을 나타내었다. 그러나, 10 mg/kg의 아미노옥시-PEG8-Dol10 글리코컨쥬게이트("글리코 Dol10")는 첫번째 투여 후 종양 성장에 있어서 15일의 지연(도 33C) 및 생존 시간에 있어서 약 20일(1.7배)의 증가(도 33D)를 나타내었다. 티올 컨쥬게이트는 동일 용량에서 더욱 효과적이었고, 생존에 있어서 2배의 증가를 나타내었다. 더 적은 용량(3 mg/kg)에서, 티올 컨쥬게이트는 10 mg/kg의 글리코컨쥬게이트보다 적은 효능을 나타내었다. 이러한 용량은 글리코컨쥬게이트에 대한 용량 kg 당 110 µmol의 PEG8-Dol10 약물에 비해 kg 용량 당 80 µmol의 PEG8-Dol10 약물에 해당한다.

[0429]

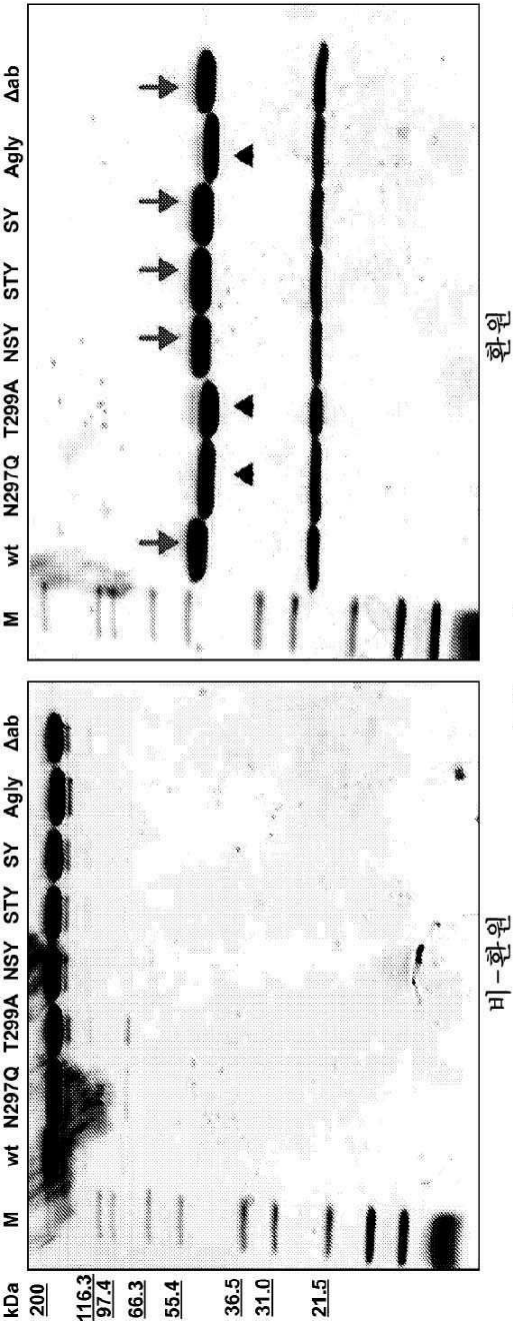
이들 데이터는 항체 글리칸의 시알산으로의 약물의 부위-특이적 컨쥬게이션이 티올-기반 화학작용을 통해 생성된 ADC와 동등한 효능을 갖는 분자를 생성시키는 것을 입증한다. 다소 더 낮은 생체내 효능은 각각의 항체-결합된 항원의 내재화에 의해 종양 세포로 각각의 항체에 의해 운반되는 약물의 더 적은 수로부터 발생할 수 있다. 본 발명자는 상기 글리코컨쥬게이트와 동일 DAR의 티올 컨쥬게이트를 비교하지 않았으나, 투여된 약물의 동등한 수준을 나타내는 2개의 ADC의 상이한 용량에서 관찰된 효능은, 글리코컨쥬게이트가 이의 티올 대응물과 동등한 내인성 효능을 갖고, 상기 부위에서 컨쥬게이션의 유해한 효과를 나타내지 않는 것을 제시한다. 또한, 단지 28% 더 많은 약물이 도입된 10mg/kg 용량의 Dol10 글리코컨쥬게이트가 티올 컨쥬게이트(3mg/kg)에 비해 생존에 있어서 2배의 증가를 제공하였으며, 이는 상기 컨쥬게이트가 동일한 DAR에서 우수한 효능을 제공할 수 있음을 암시한다. 자연 글리칸에서의 시알산 혼입에 명백한 제한이 있었으나, 분지된 약물 링커의 사용 또는 추가 당화 부위의 도입을 포함하는 다수의 다양한 전략에 의해 동일한 방법을 이용하여 더 높은 약물 부하량이 달성될 수 있다.

도면

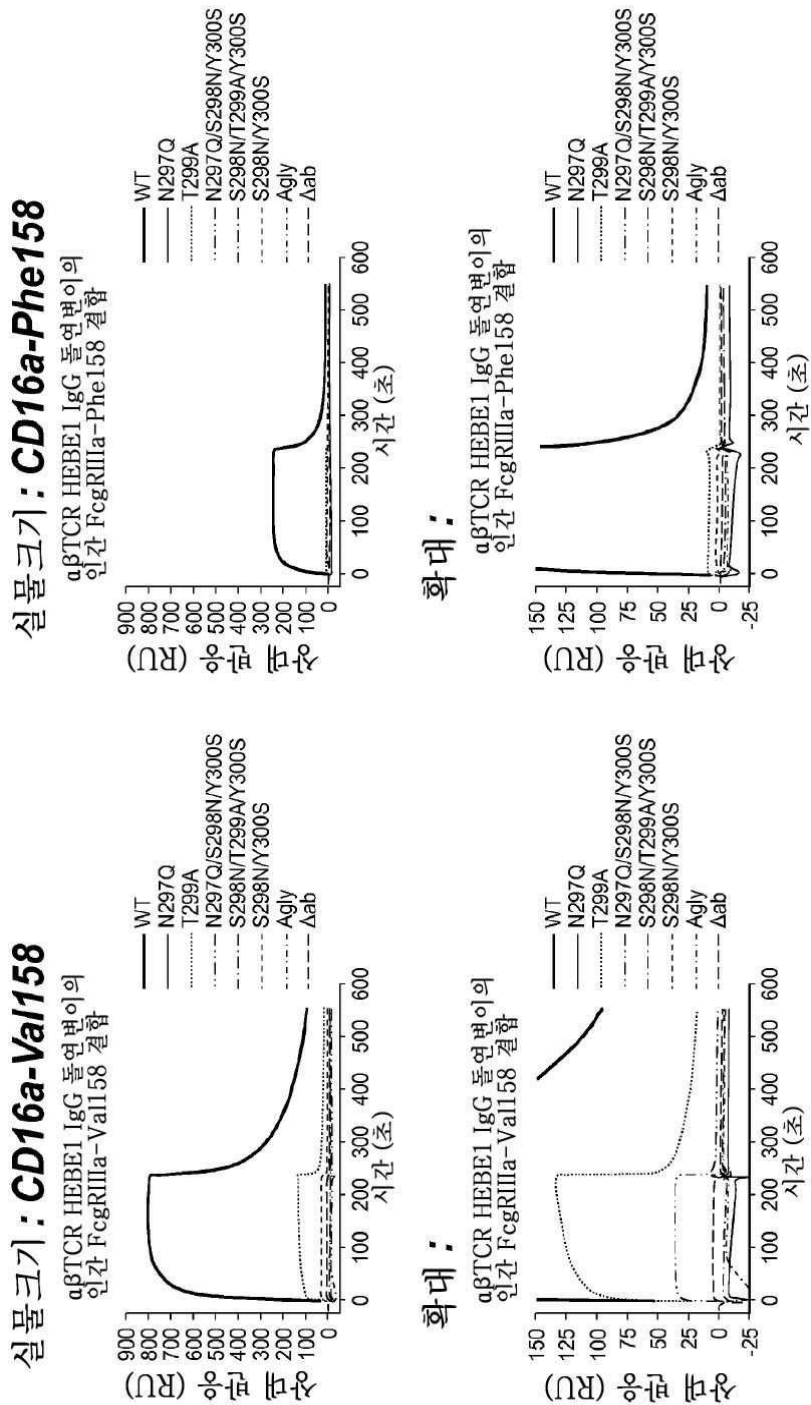
도면1



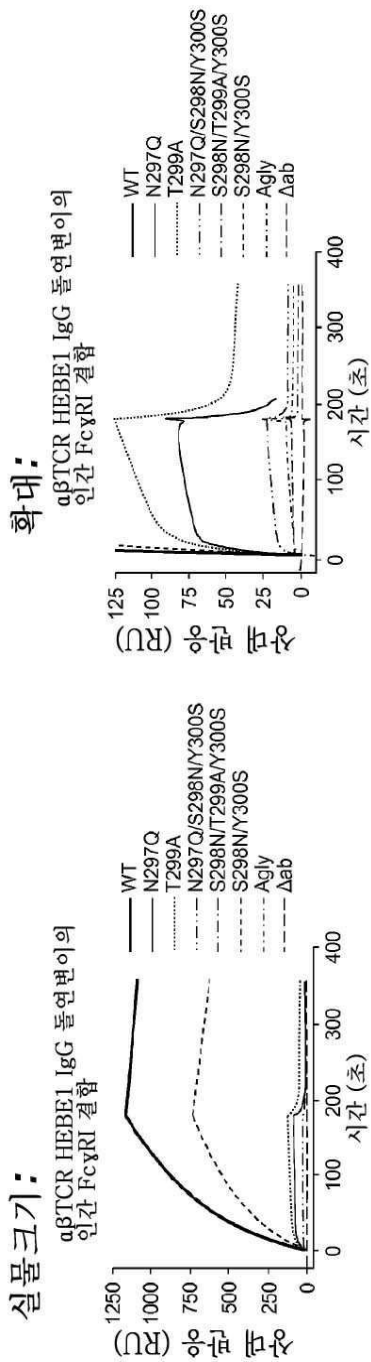
도면2



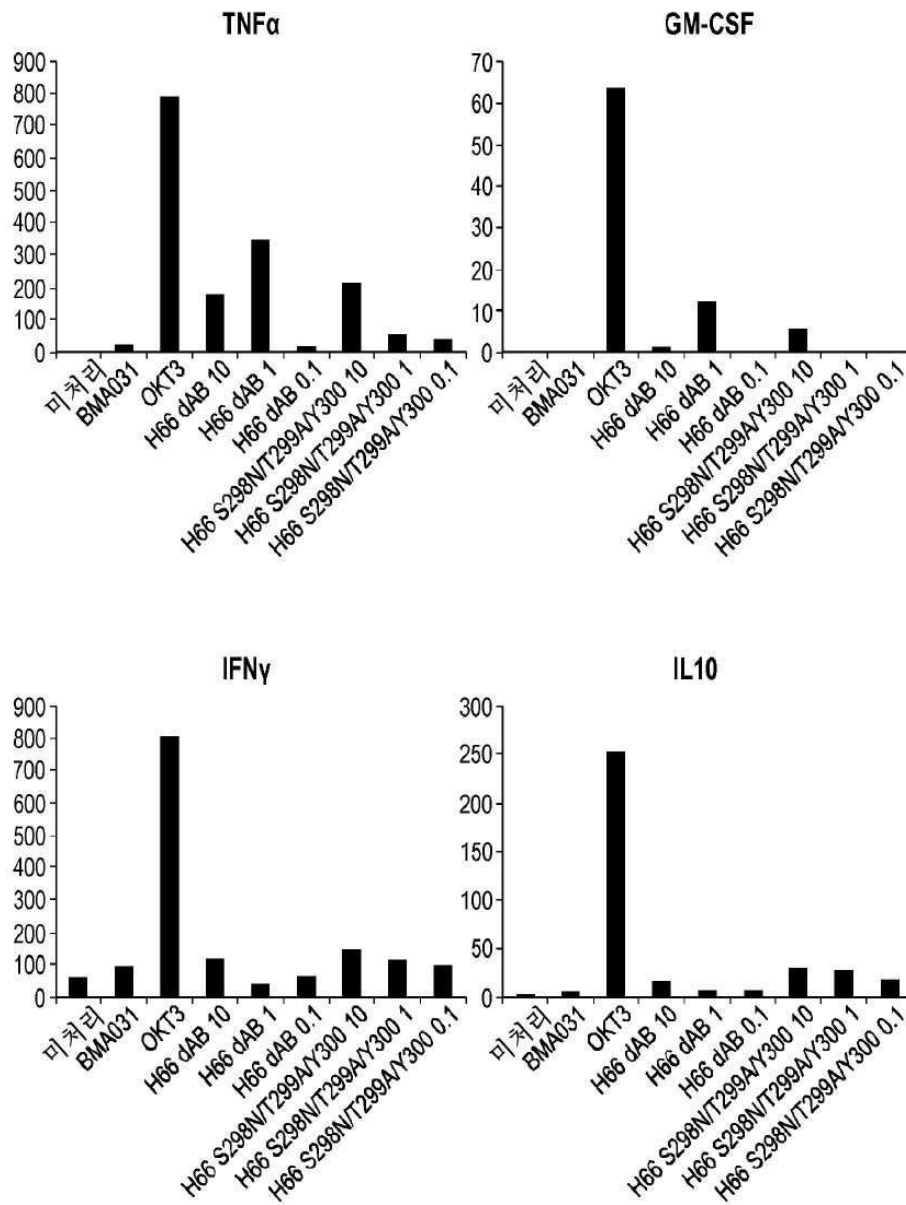
도면3



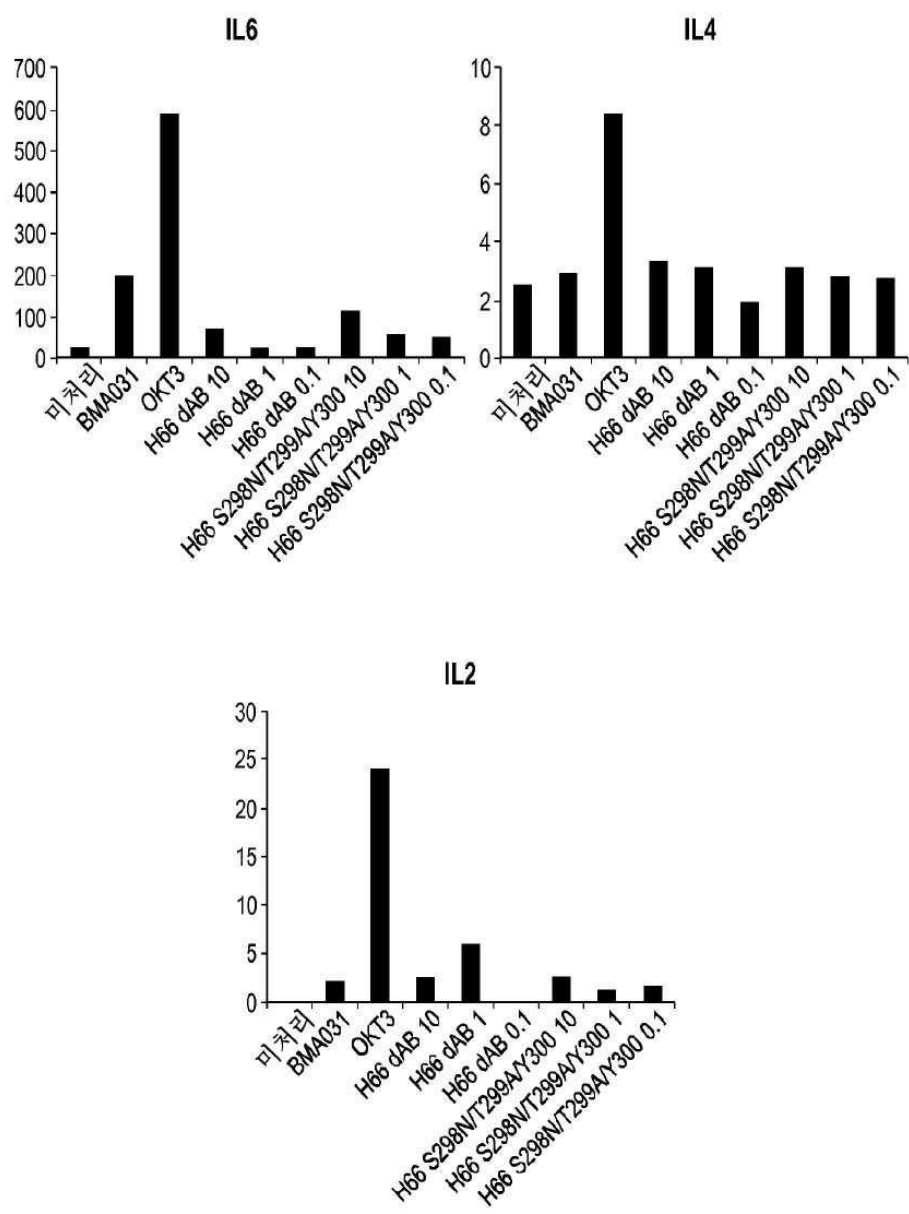
도면4



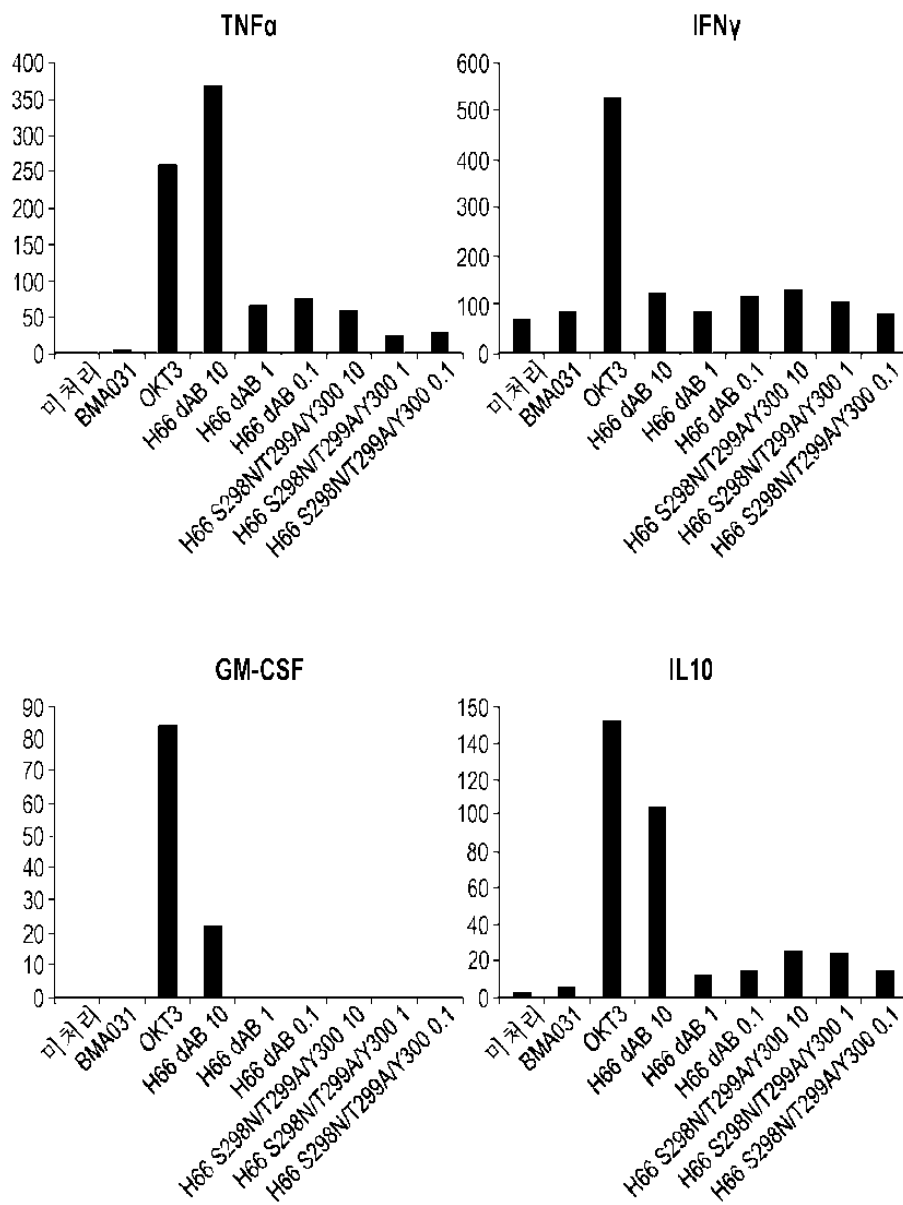
도면5



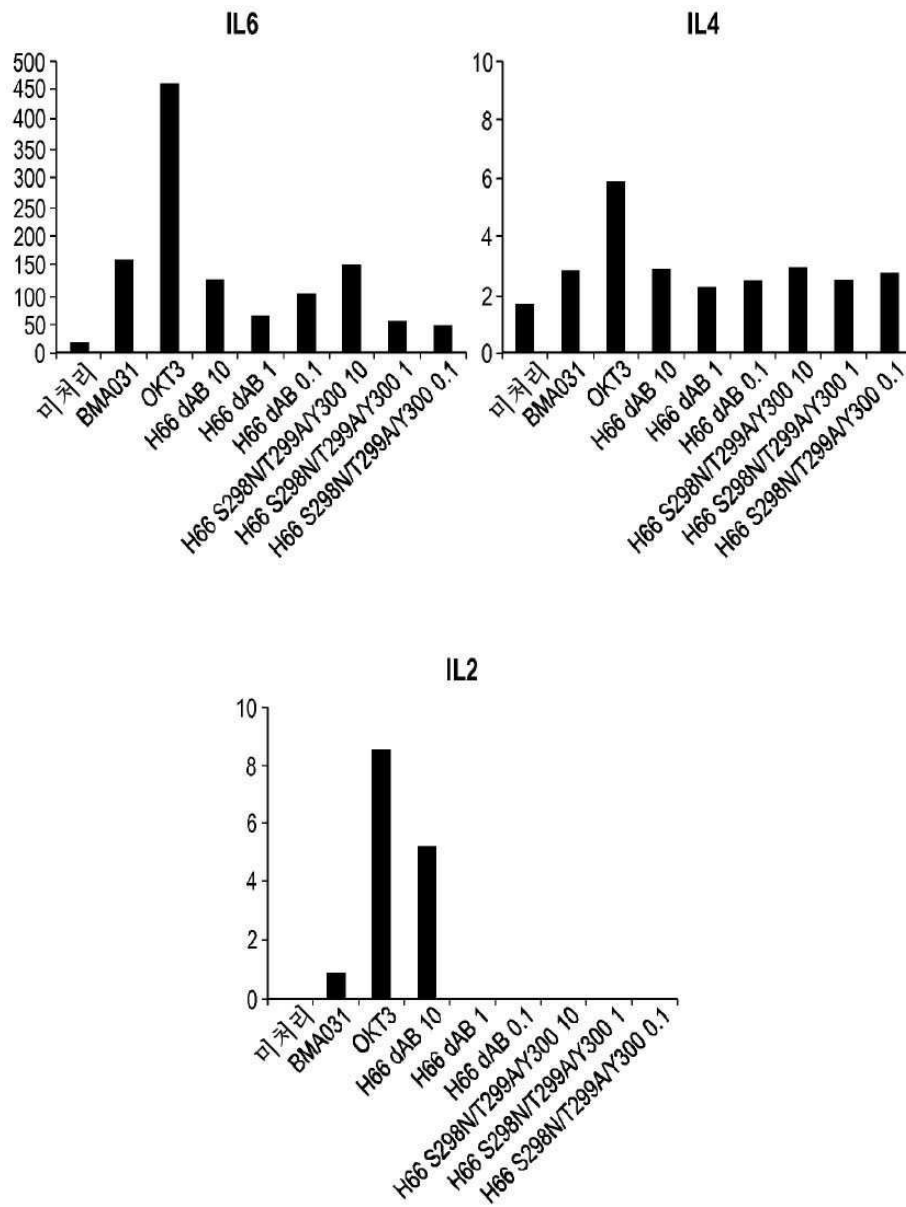
도면6



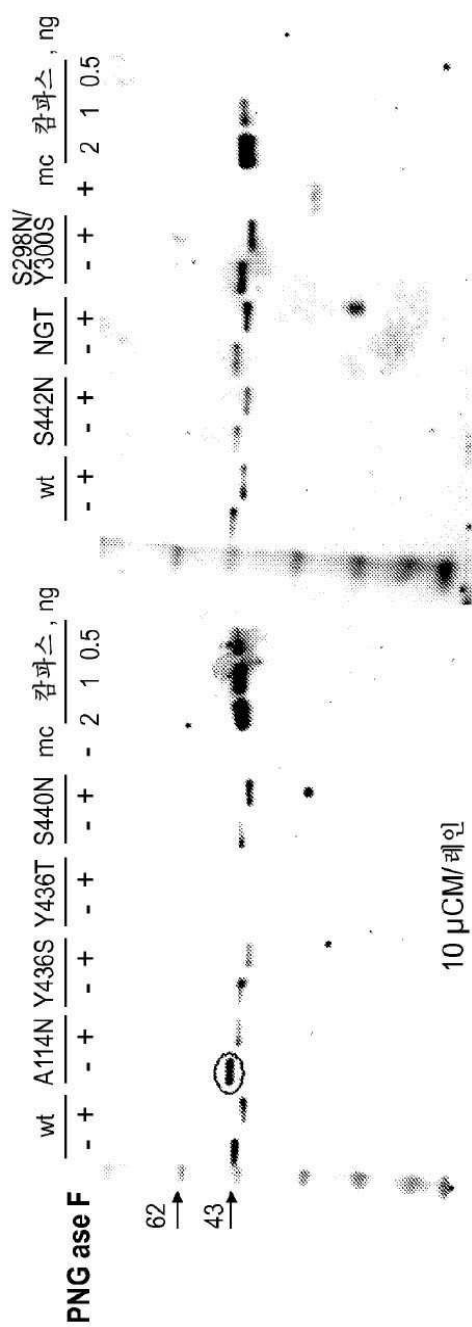
도면7



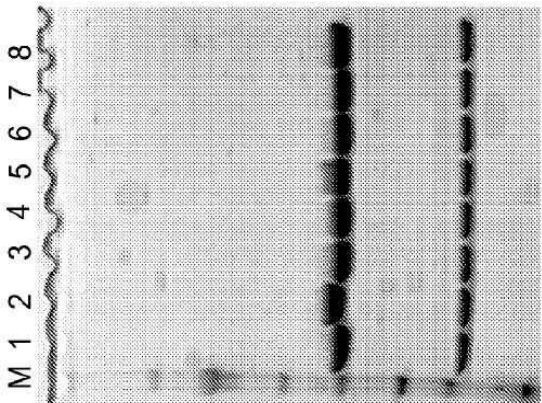
도면8



도면10

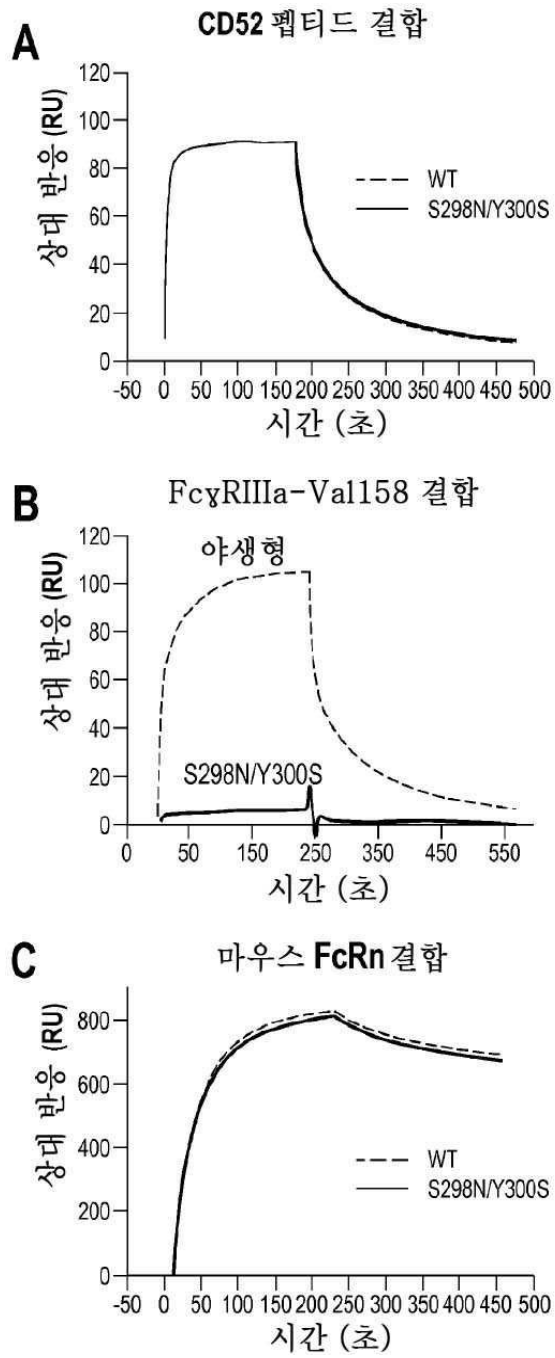


도면11

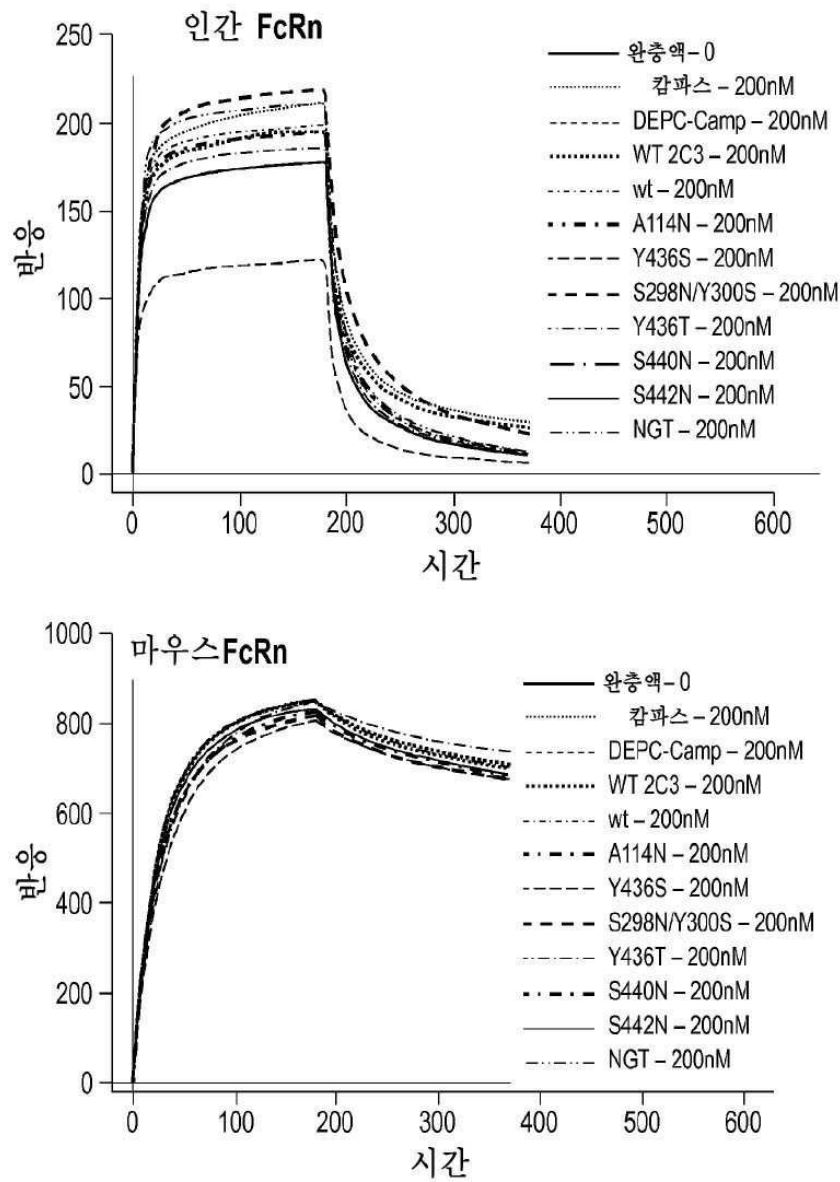


레인	돌연변이	mg/ml
1	wt	2.66
2	A114N	2.99
3	Y436S	1.61
4	S298N/Y300S	0.99
5	Y436T	0.41
6	S440N	1.21
7	S442N	1.62
8	NGT	2.21

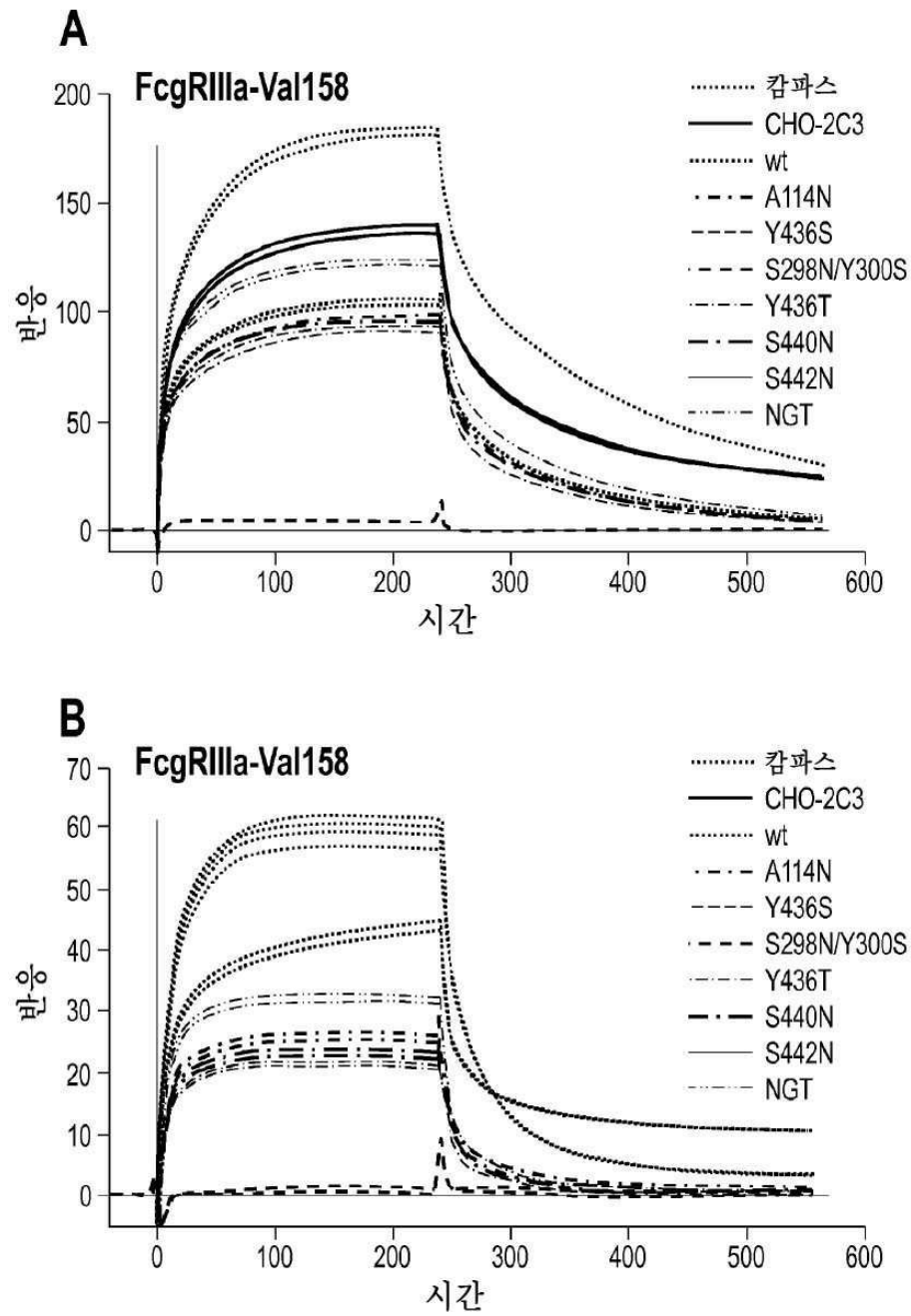
도면12



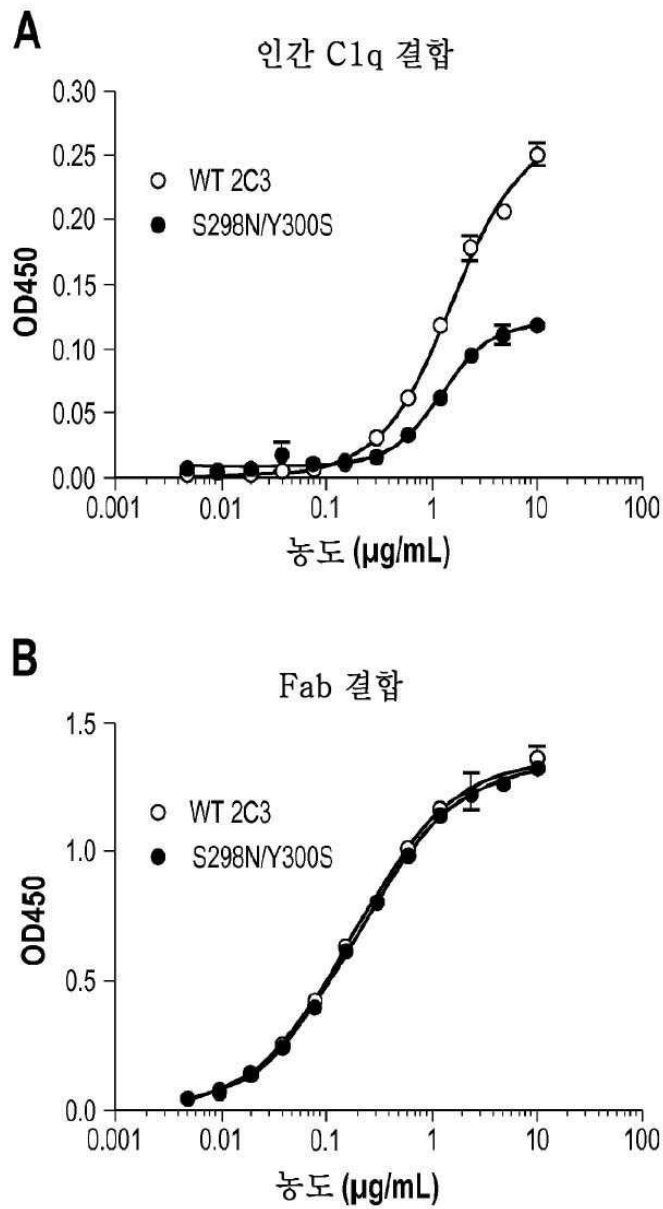
도면13



도면14



도면15



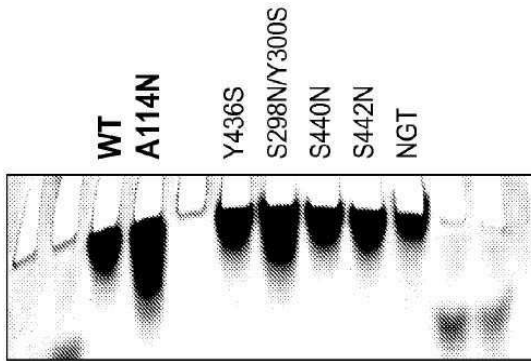
도면16

샘플	$k_a(\times 10^6/\text{Ms})$	$k_d(\times 10^{-2}/\text{s})$	$R_{\text{max}}(\text{RU})$	$K_D(\text{nM})$
GLD52	7.0	1.7	67.0	2.44
WT2C3	6.0	1.1	64.2	1.75
A114N	4.7	1.1	59.5	2.45
Y436S	5.9	1.0	66.9	1.73
S298N?Y300S	5.7	1.0	63.3	1.80
Y436T	4.8	0.9	65.7	1.95
S440N	5.8	1.1	66.8	1.84
S442N	5.7	1.1	66.2	1.85
NGT	7.9	1.1	70.2	1.35

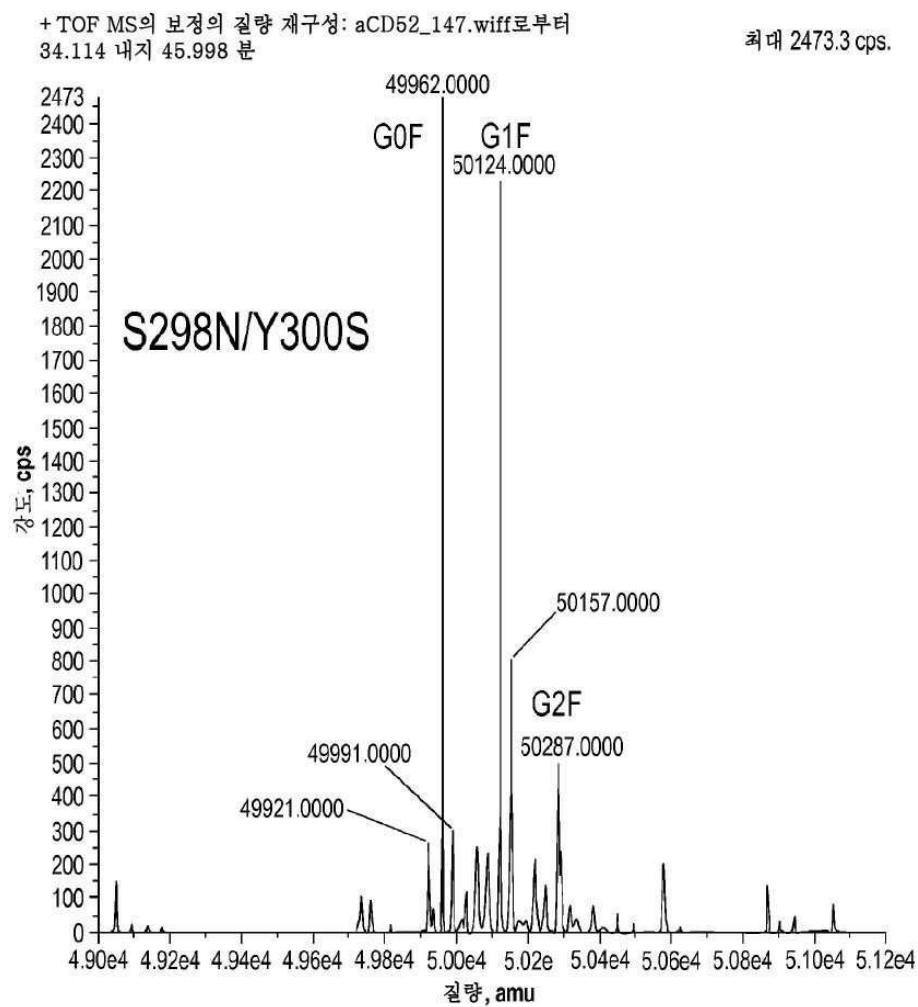
도면17

샘플	K on ($\times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	K off ($\times 10^{-2} \text{s}^{-1}$)	KD (nM)
WT 2C3	5.2	1.1	2.1
A114N	5.3	1.3	2.4

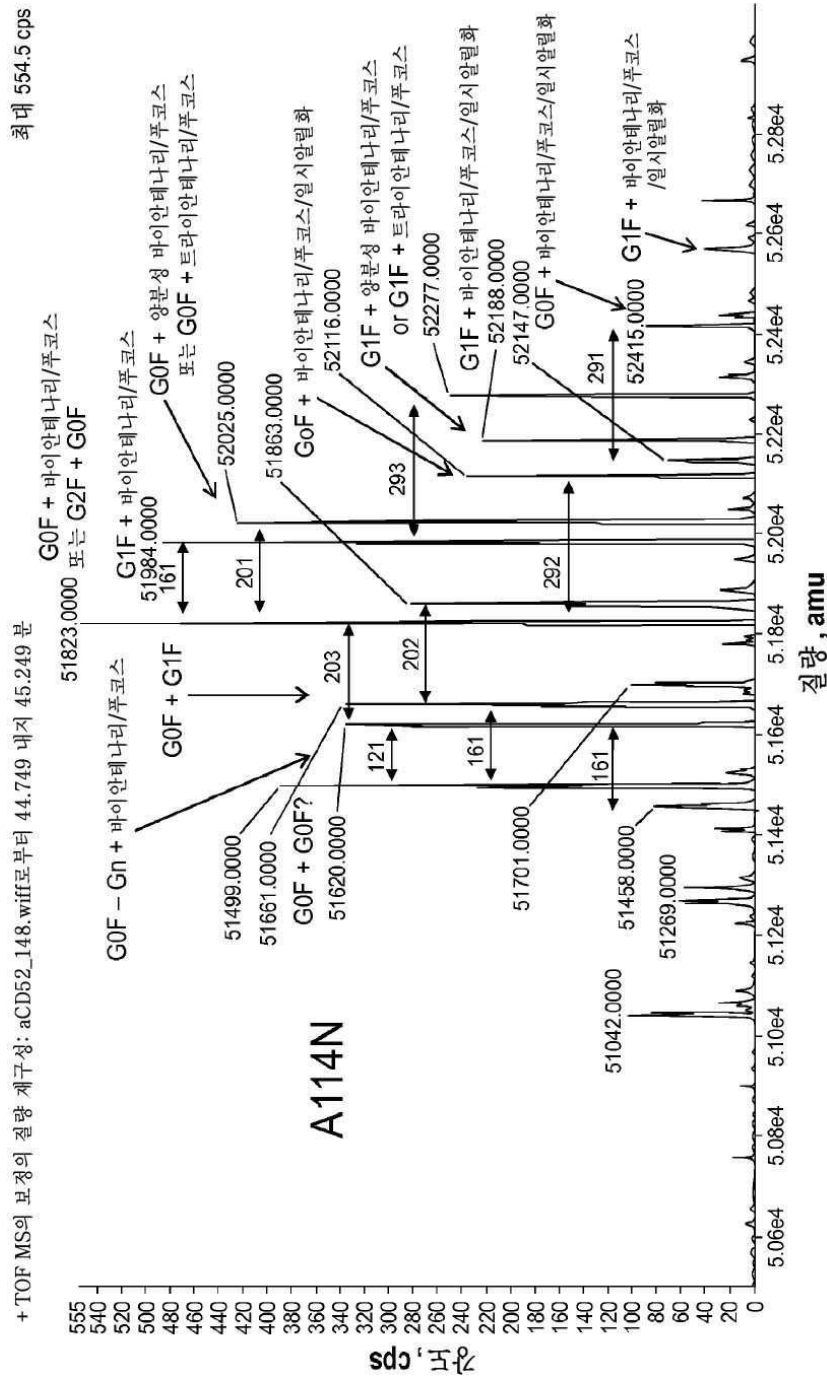
도면18a



도면18b



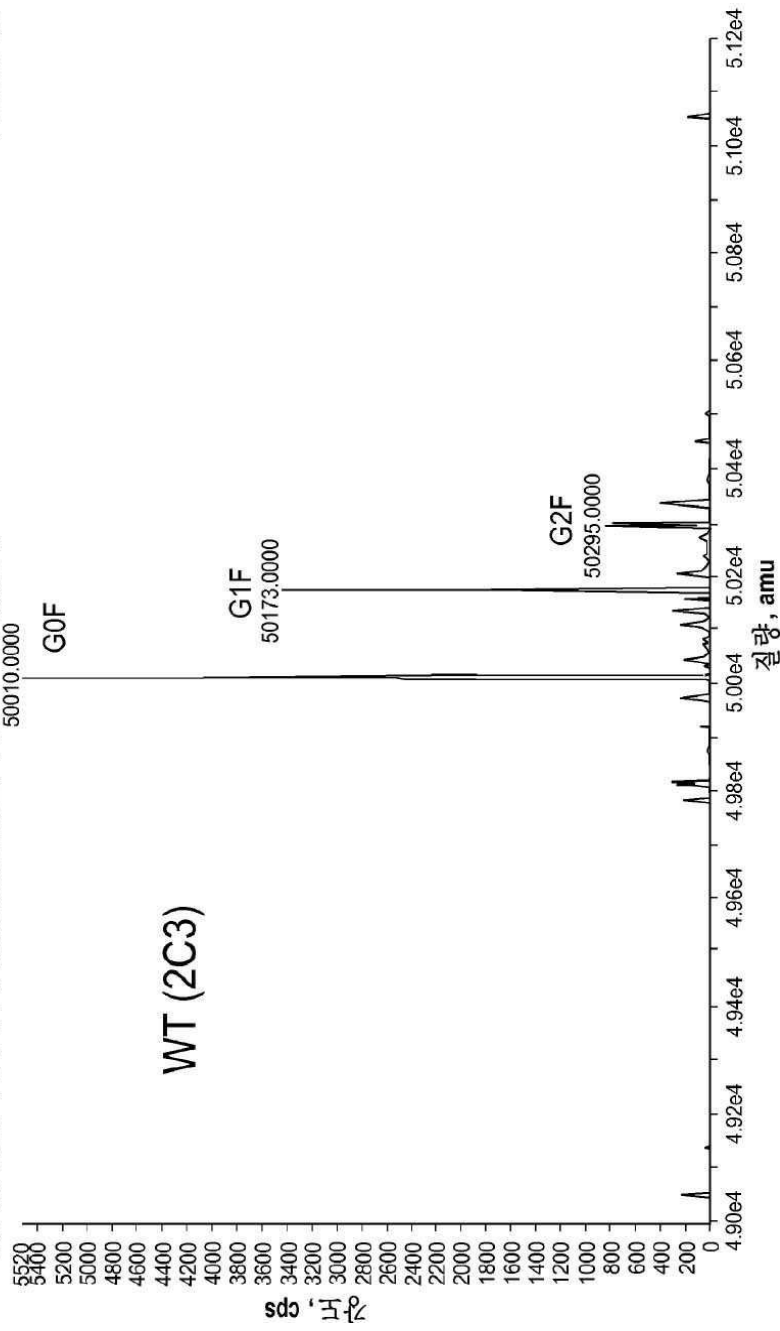
도면18c



도면 18d

최대 55199 cps

+ TOF MS의 보정의 질량 재구성: aCD52_145.wiff로부터 34.181 내지 45.998 분

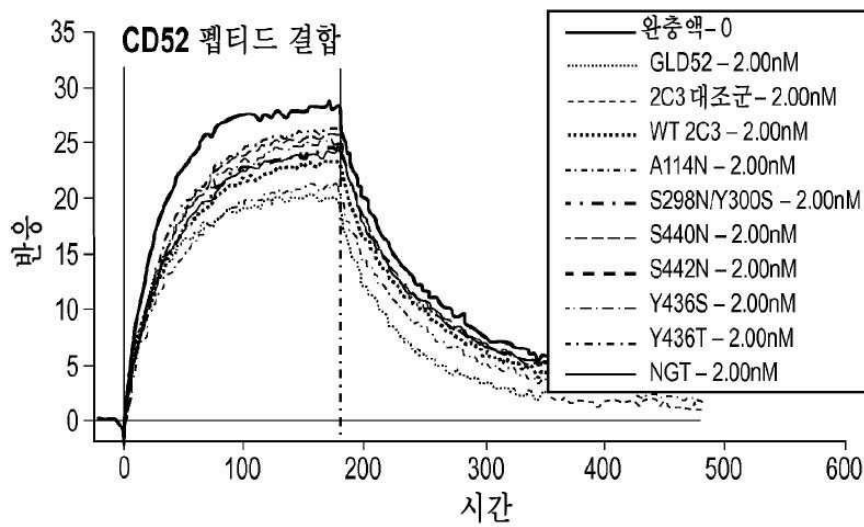


도면19

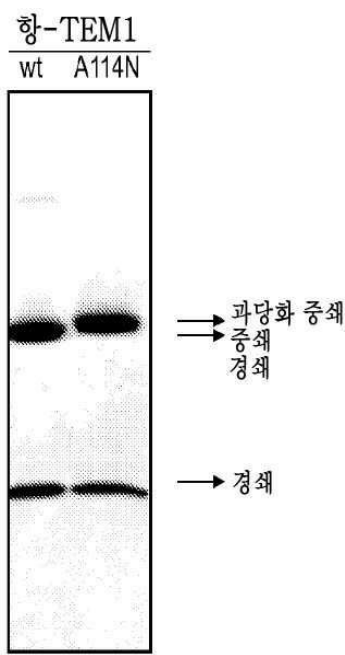
A

샘플	lot #	옥텟 농도 (μg/mL)
모의 배지	11/23/2009	너무 낮음
wt 2C3	11/23/2009	2.54
A114N	11/23/2009	2.83
S298N/Y300S	11/23/2009	1.36
S440N	11/23/2009	1.32
S442N	11/23/2009	1.21
Y436S	11/23/2009	1.92
Y436T	11/23/2009	0.34
NGT	11/23/2009	1.90

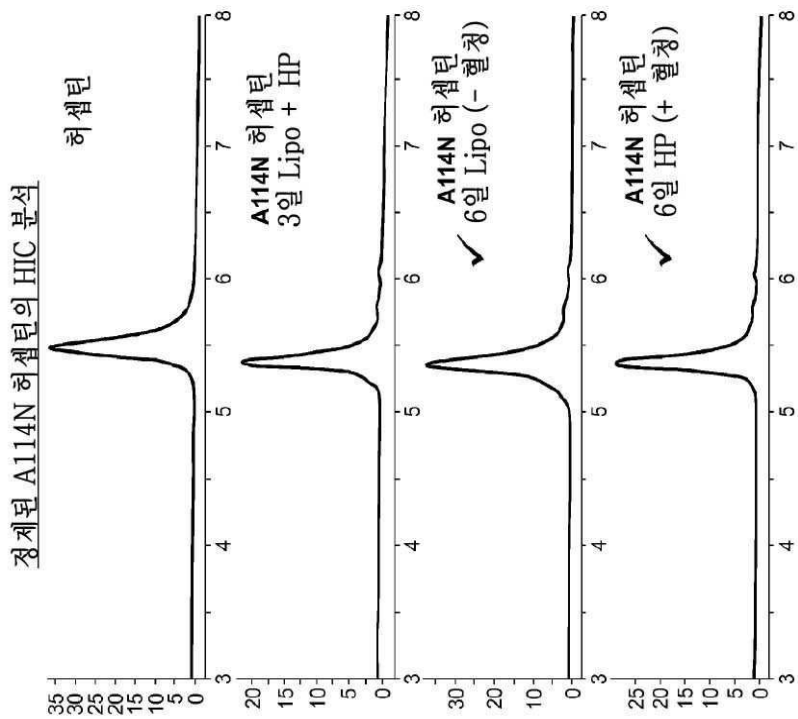
B



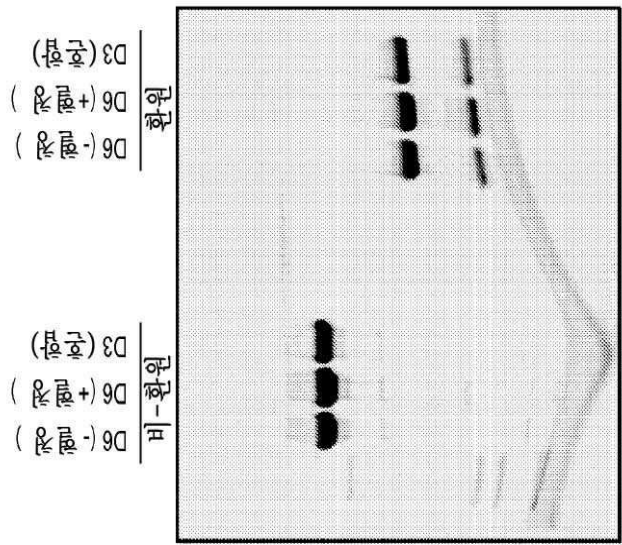
도면20



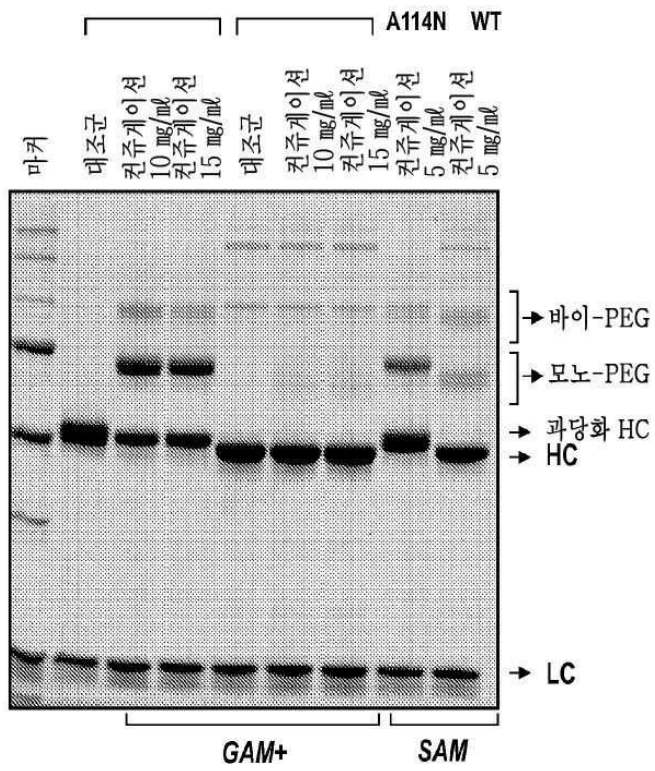
도면21



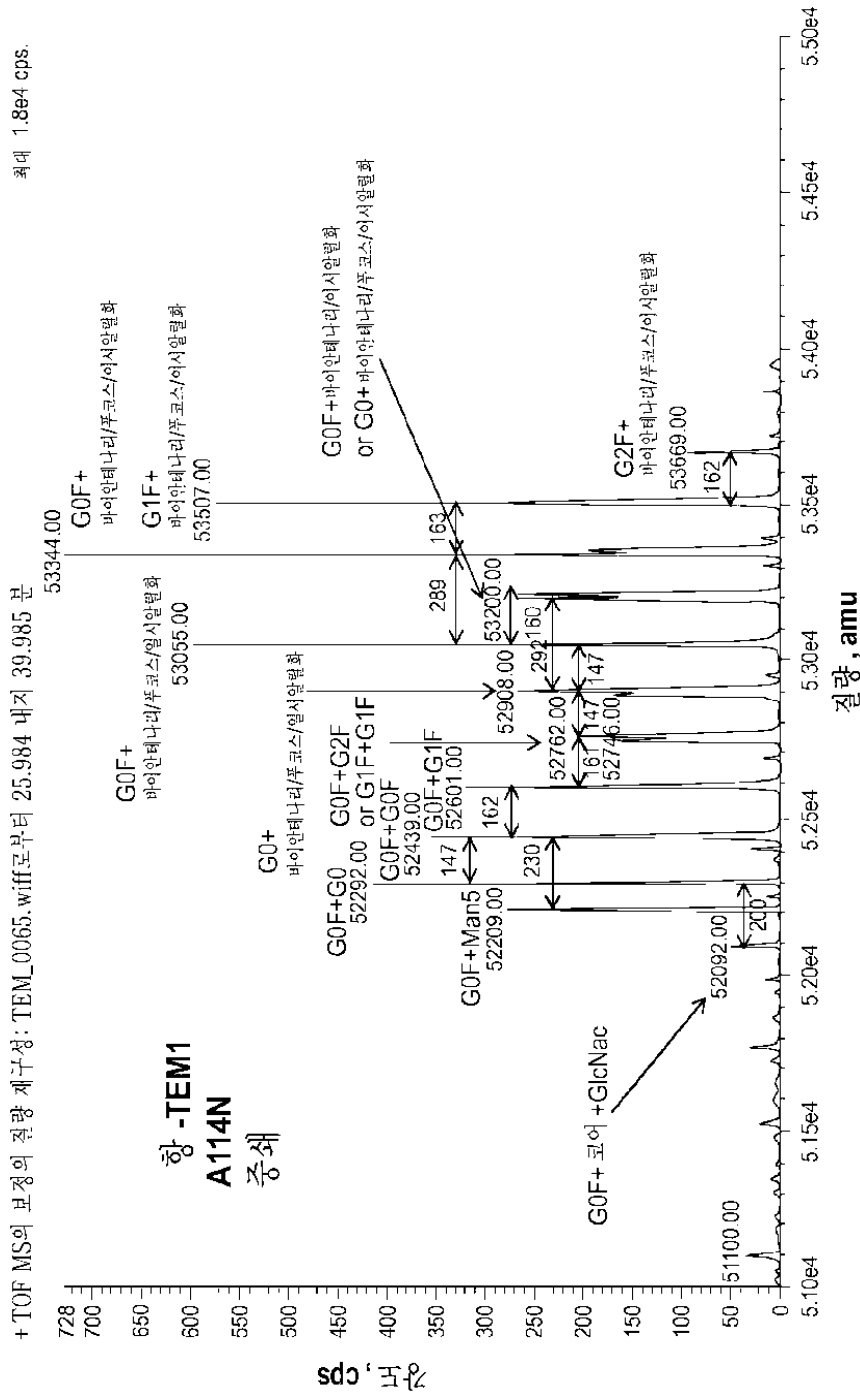
10% 트리스-글리신 SDS-PAGE



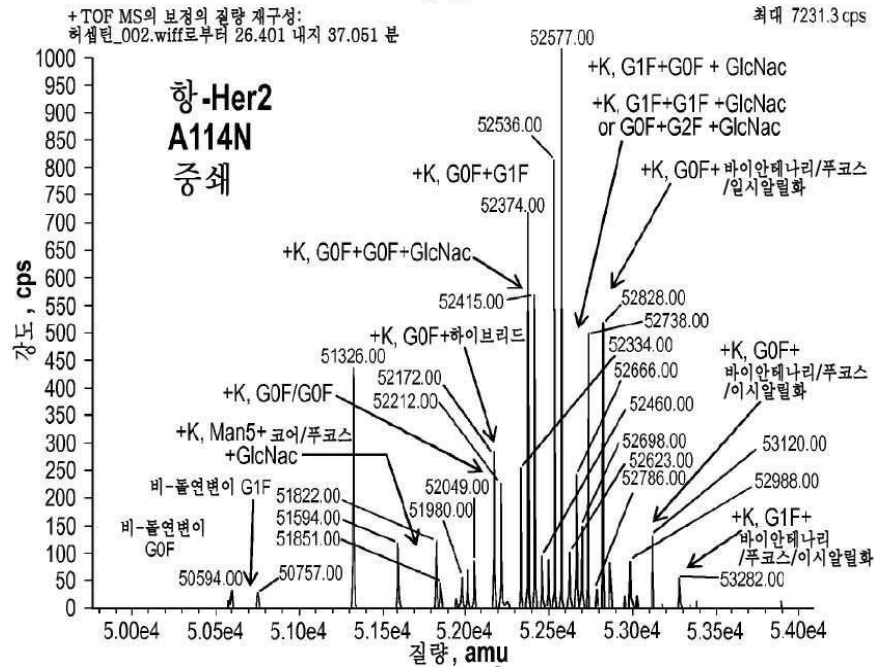
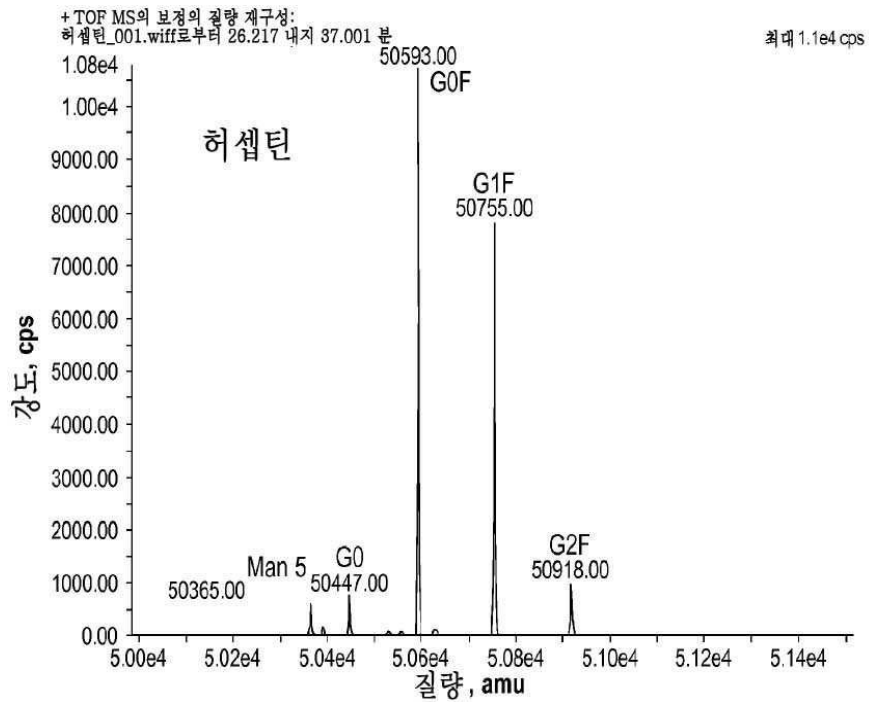
도면22



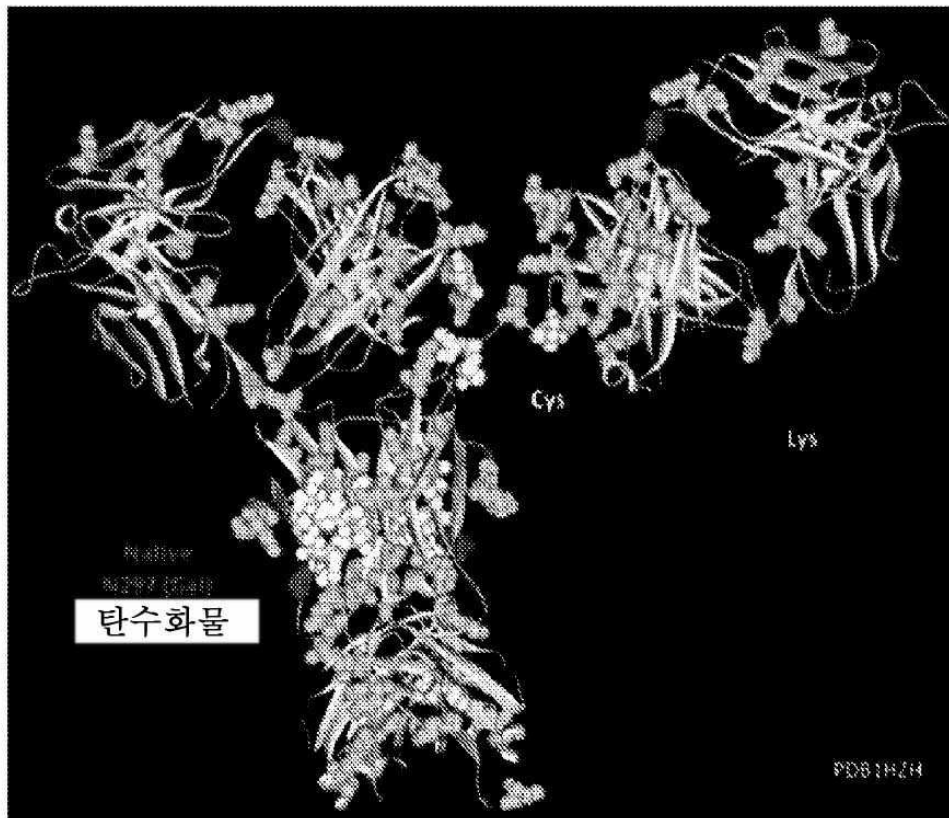
도면23



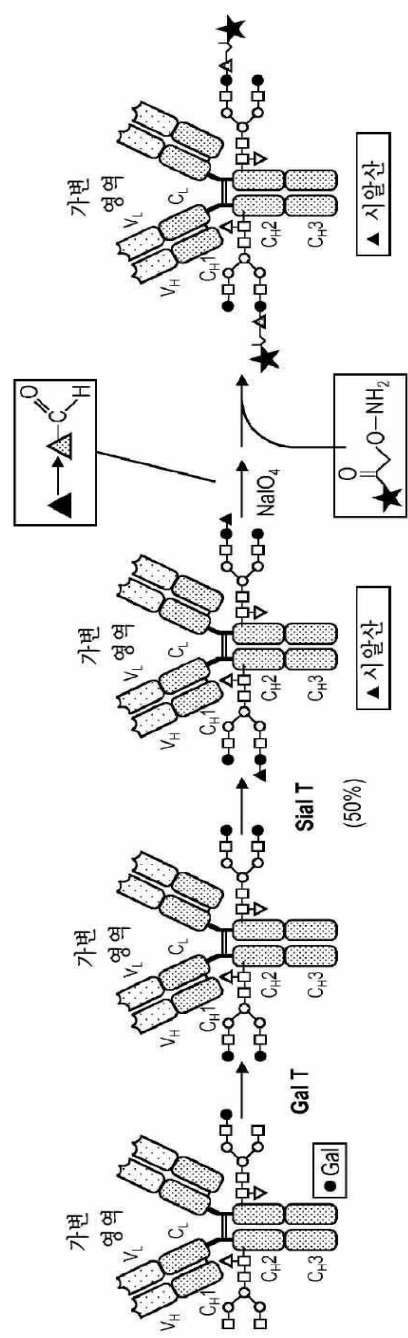
도면24



도면25a

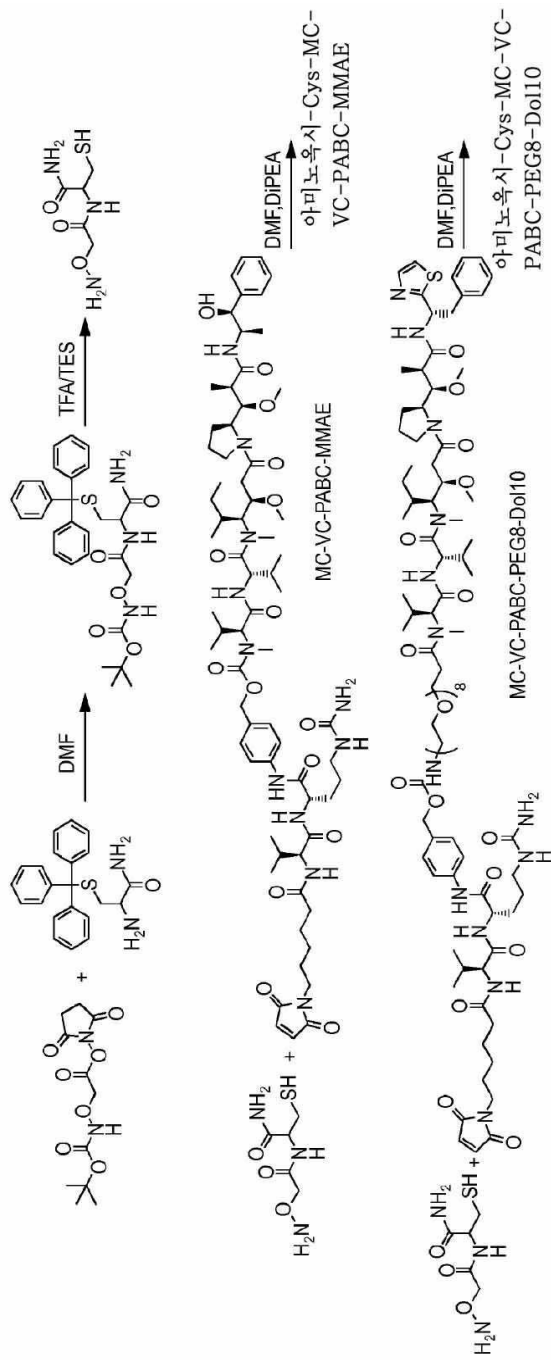


도면25c

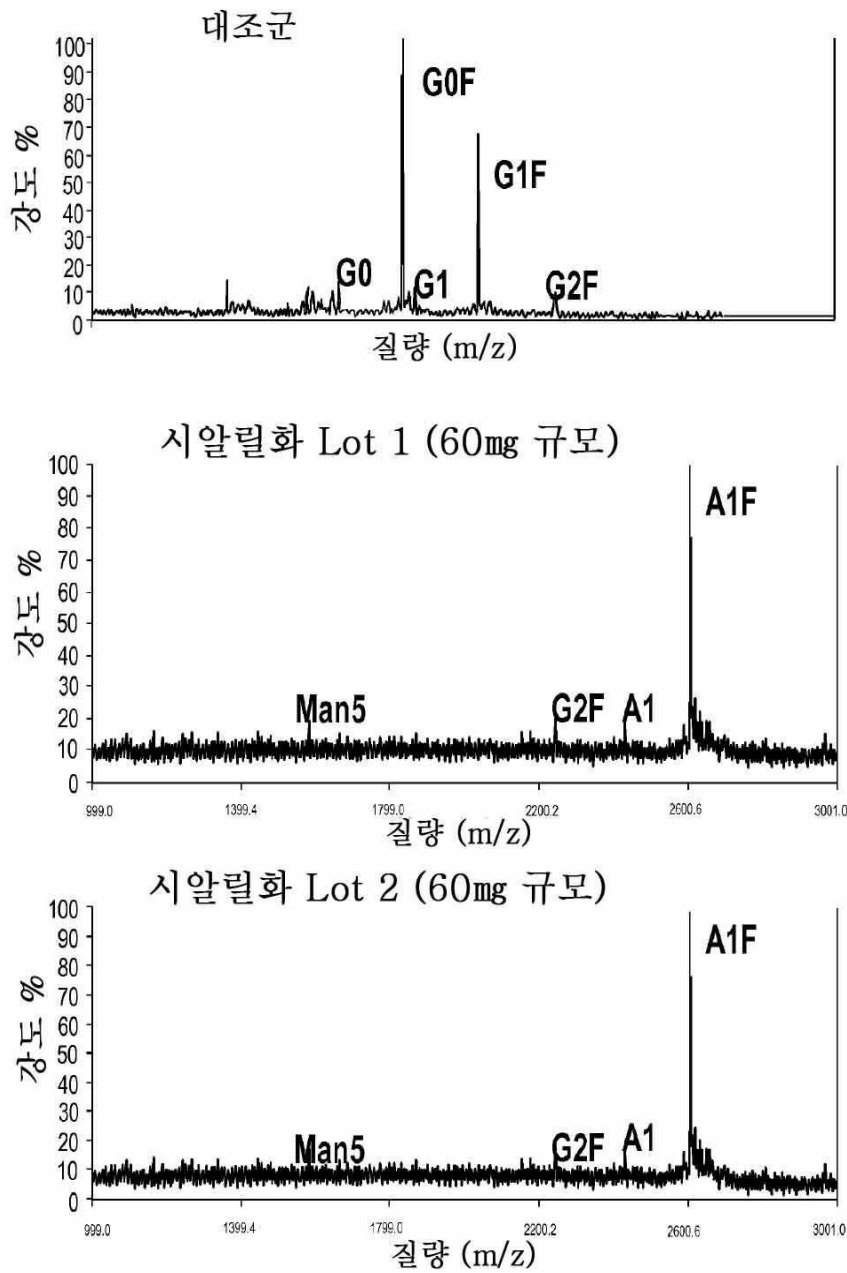


도면26

아미노옥사리-Cys-MC-VC-PABC-MMAE 및 아미노옥사리-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10의 합성



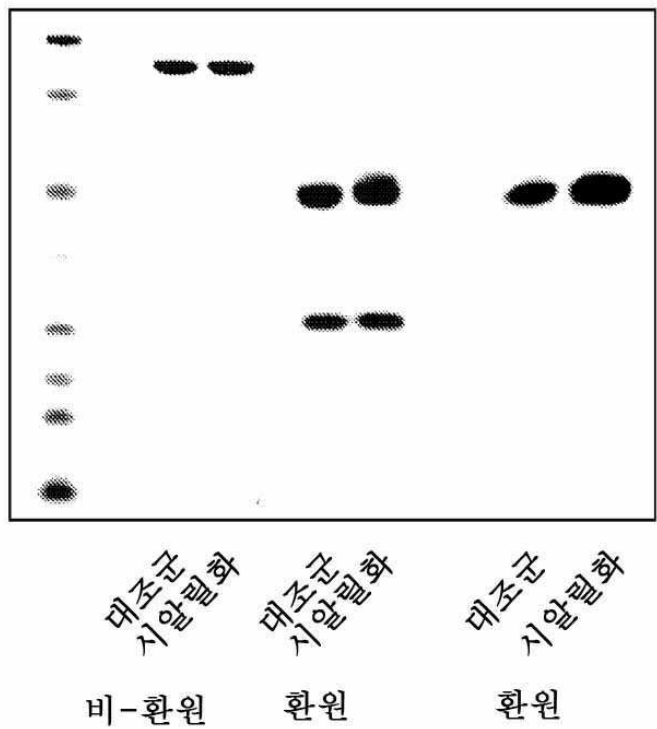
도면27a



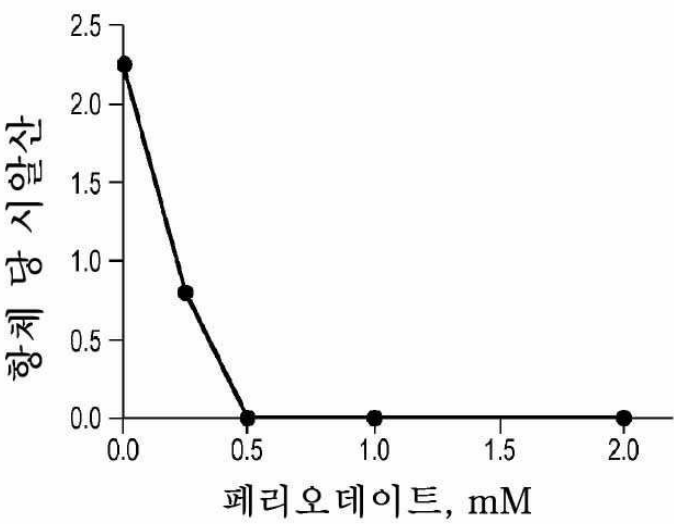
도면27b

	시알산, mol/mol
대조군	0
시알릴화 Lot 1	2.2 ± 0
시알릴화 Lot 2	2.3 ± 0.1

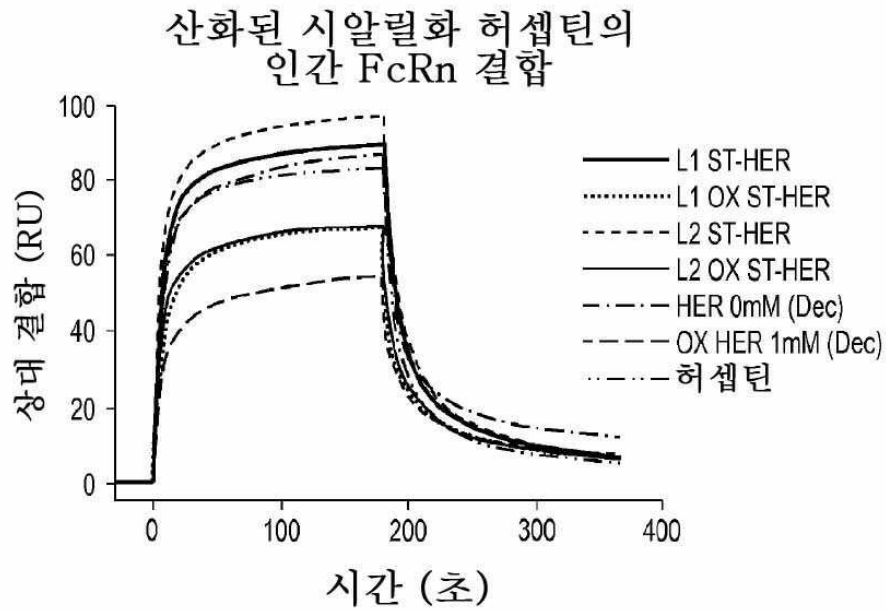
도면27c



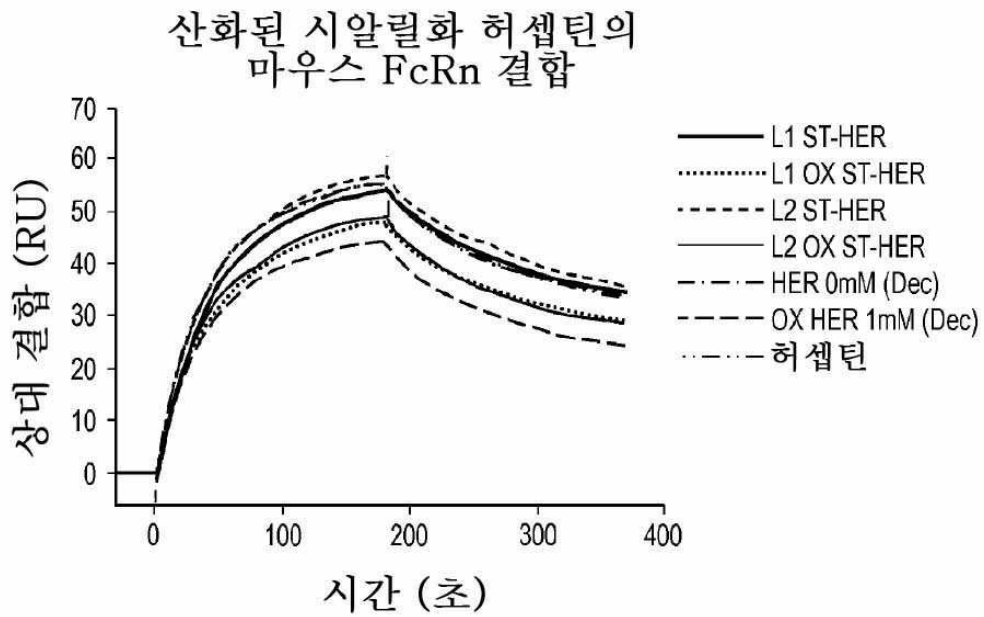
도면28a



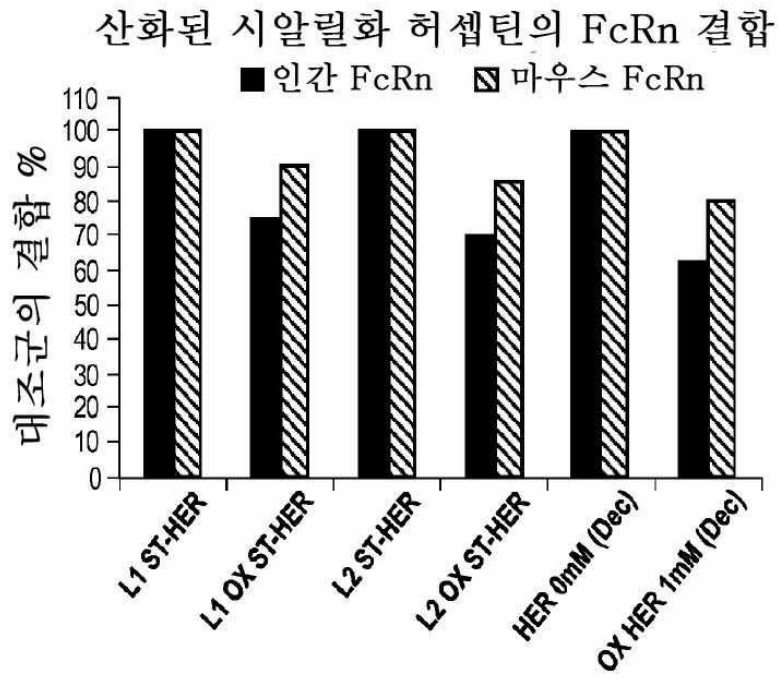
도면28b



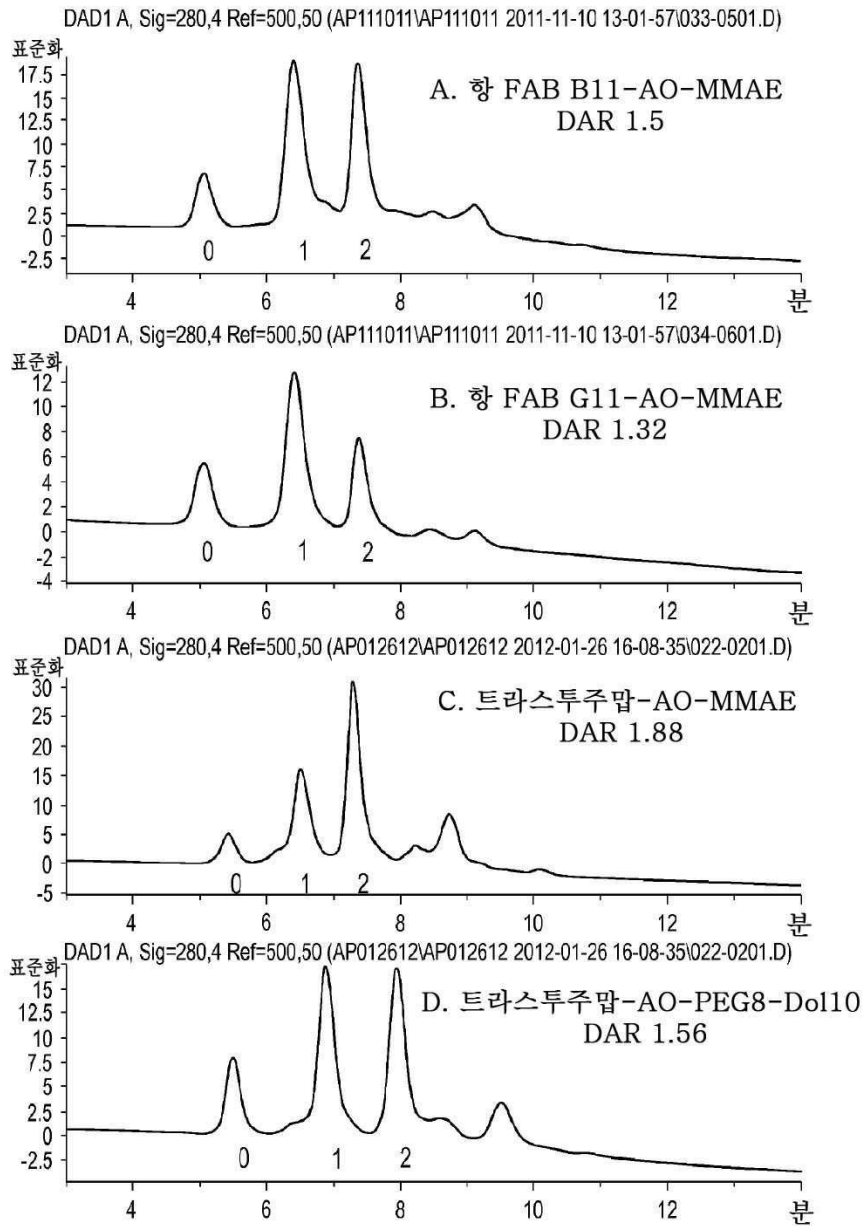
도면28c



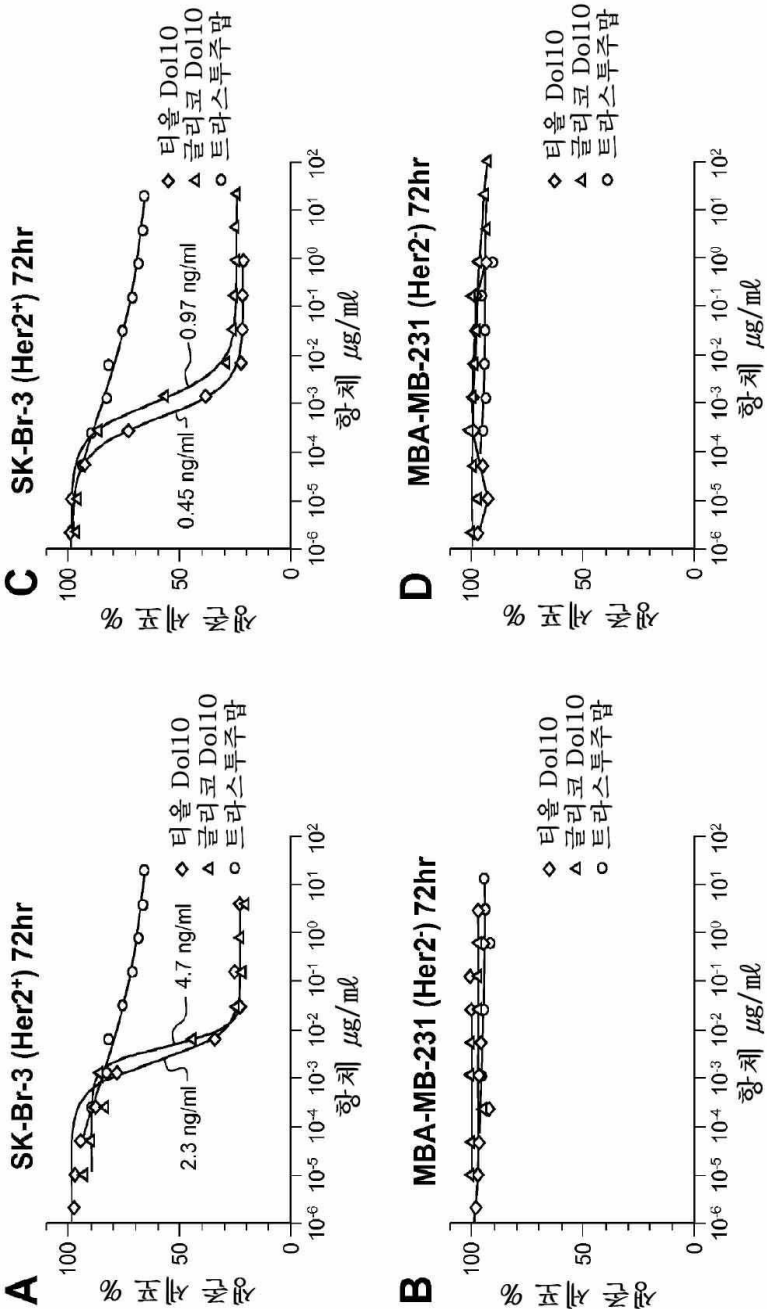
도면28d



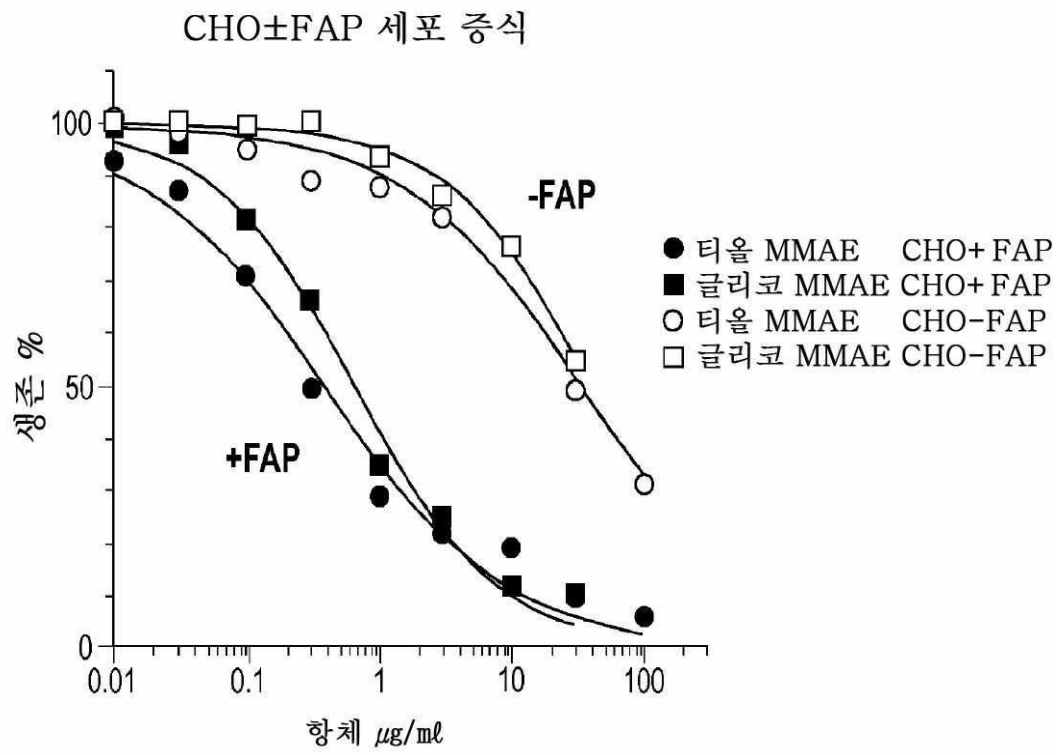
도면29



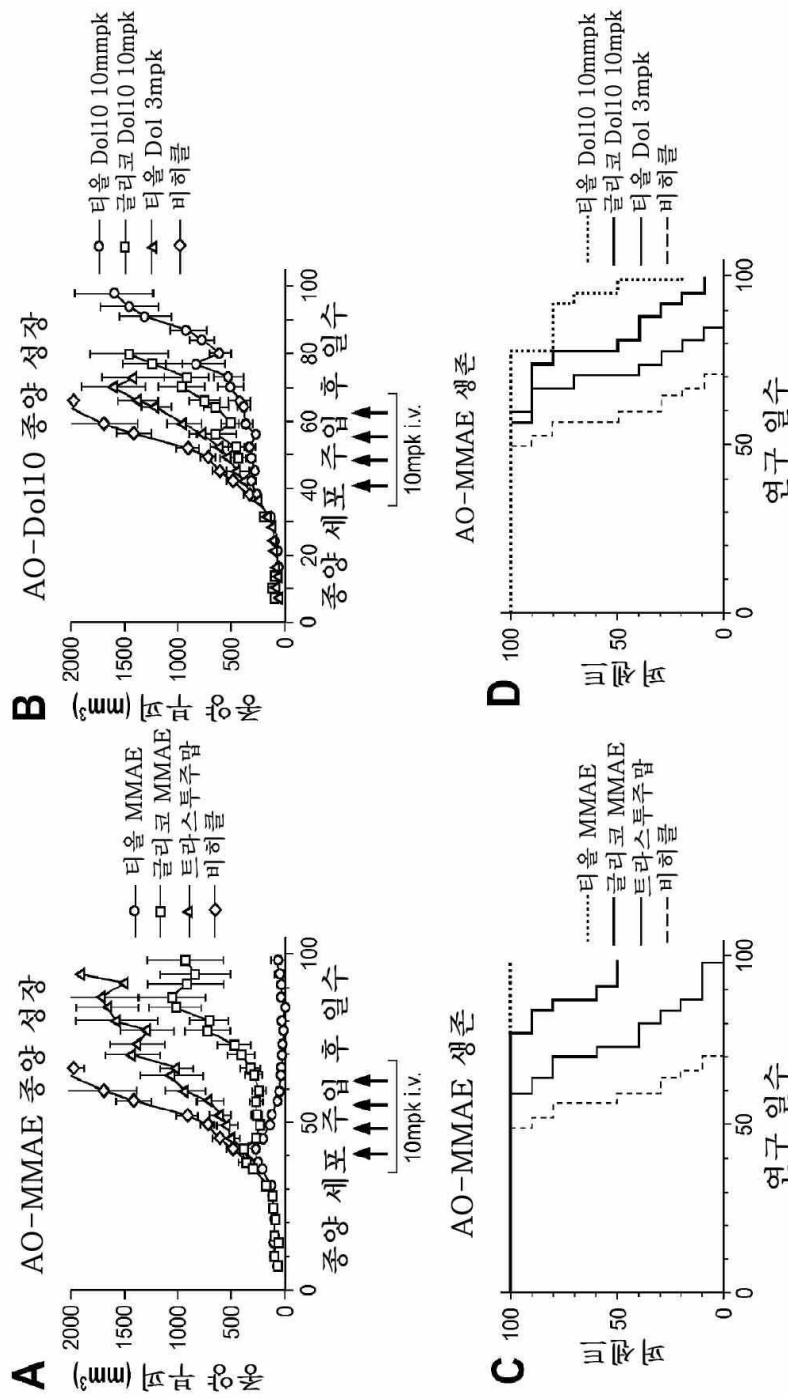
도면31



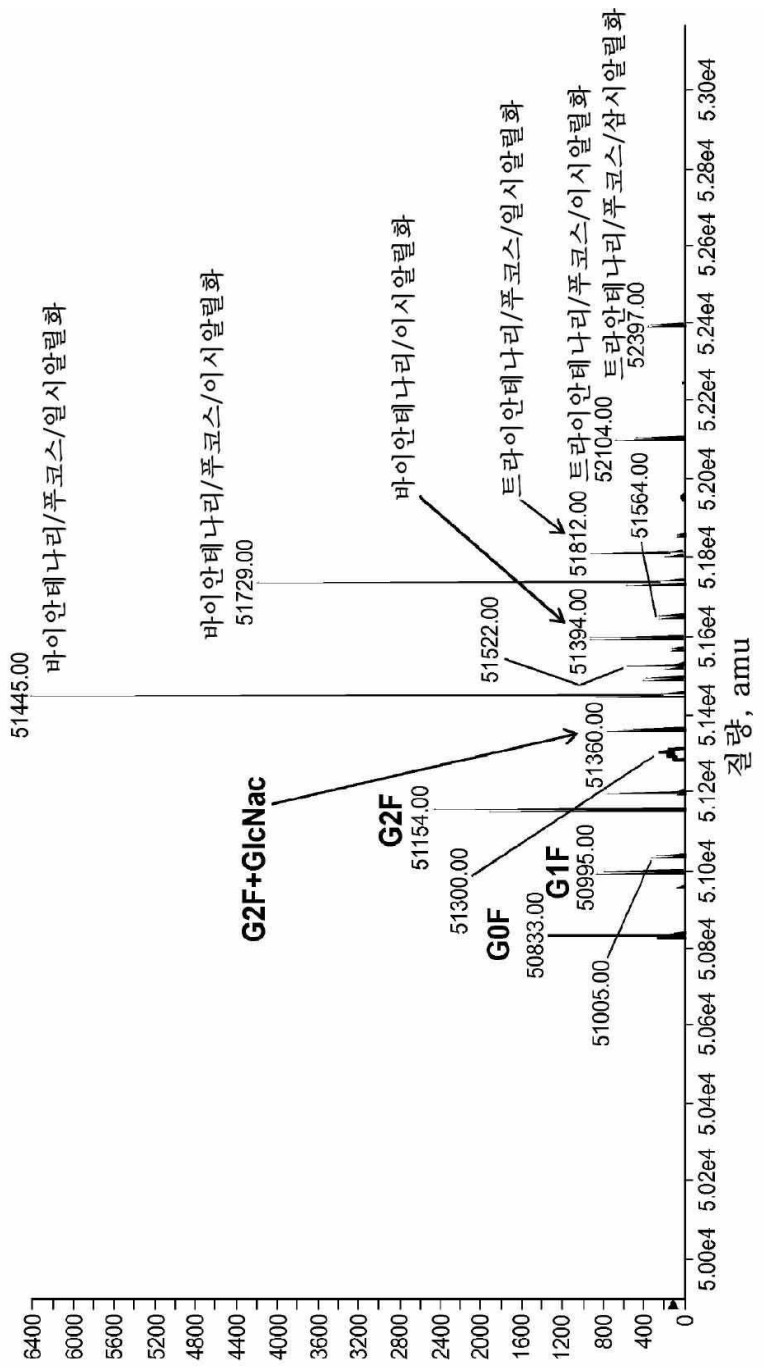
도면32



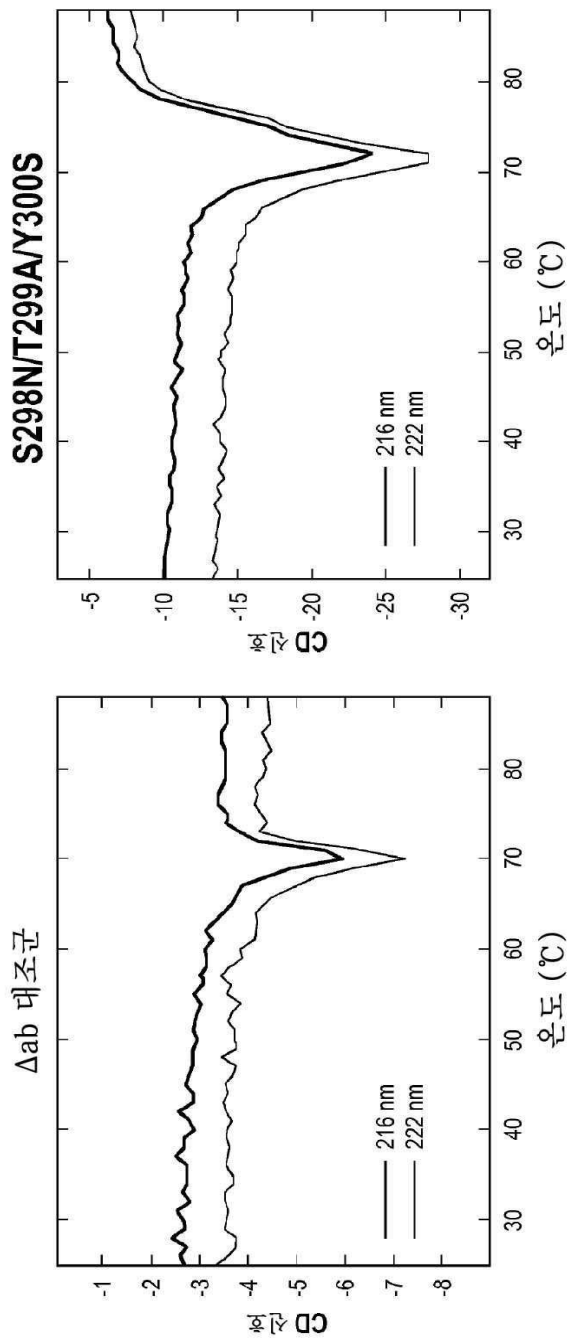
도면33



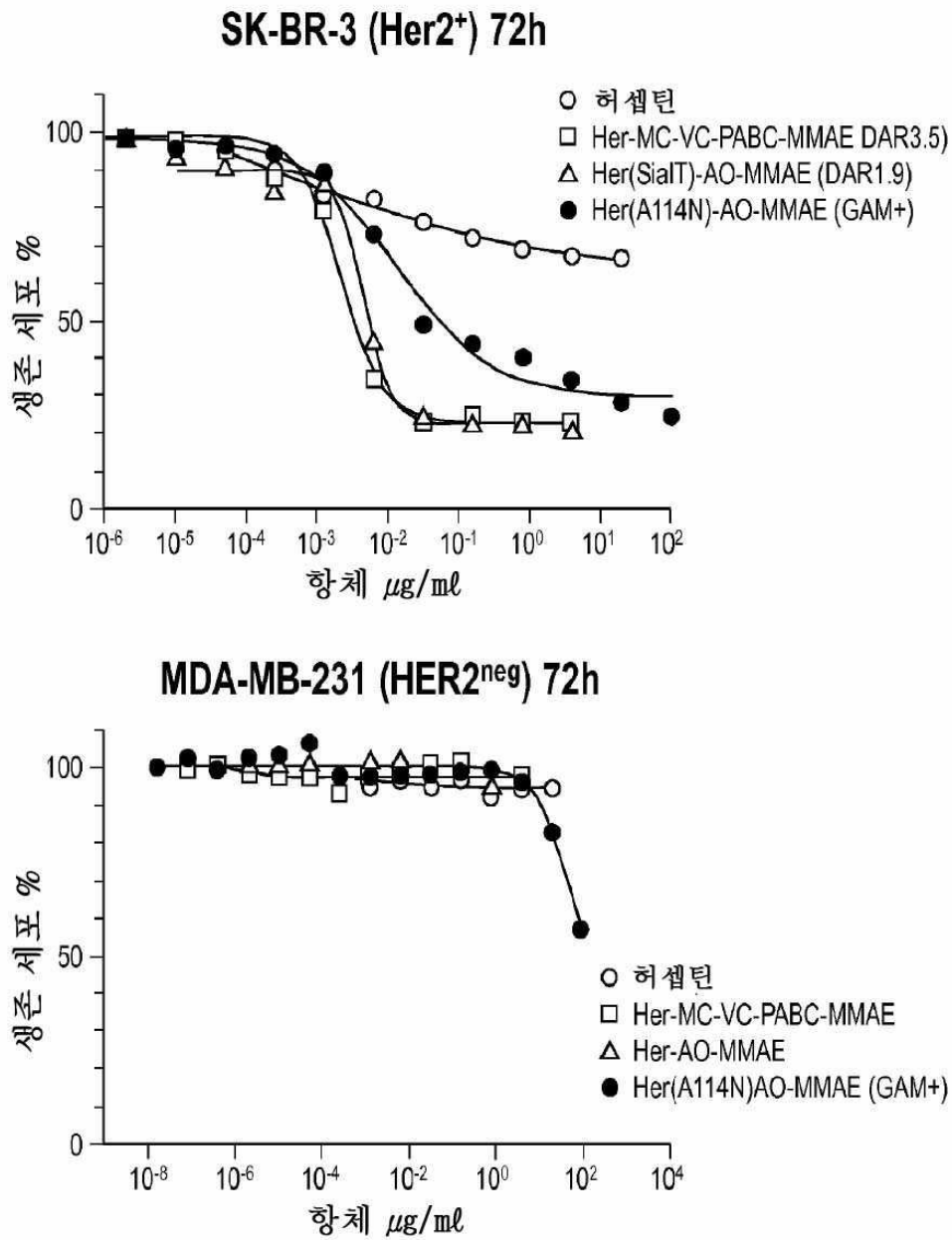
S298N/T299A/Y300S (NNAS) 중체의 LC/MS



도면35



도면36



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENZYME CORPORATION

<120> FC CONTAINING POLYPEPTIDES WITH ALTERED GLYCOSYLATION AND REDUCED

EFFECTOR FUNCTION

<130> 550502 SA9-109PC

<140> PCT/US2013/059481

<141> 2013-09-12

<150> 61/776,715

<151> 2013-03-11

<150> PCT/EP2012/003819

<151> 2012-09-12

<160> 45

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<

400> 1

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly

85 90 95

Thr His Leu His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 2

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 2

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

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

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

Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser
 50 55 60

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

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

Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 100 105 110

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

115	120	125	
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp			
130	135	140	
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr			
145	150	155	160
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr			
165	170	175	
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln			
180	185	190	
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp			
195	200	205	
Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro			
210	215	220	
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro			
225	230	235	240
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr			
245	250	255	
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn			
260	265	270	
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg			
275	280	285	
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val			
290	295	300	
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser			
305	310	315	320
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys			
325	330	335	
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp			
340	345	350	
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe			
355	360	365	

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 405 410 415
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 3

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 3

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

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

Ser Ser Asn Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
115 120 125

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
180 185 190

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

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

355 360 365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 4

<211

> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 4

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

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

100	105	110
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser		
115	120	125
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys		
130	135	140
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu		
145	150	155
160		
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu		
165	170	175
Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr		
180	185	190
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val		
195	200	205
Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro		
210	215	220
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
225	230	235
240		
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
245	250	255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe		
260	265	270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
275	280	285
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
290	295	300
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
305	310	315
320		
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		
325	330	335
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg		
340	345	350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Ser Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 5
<211> 444
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 5

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

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

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

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

85

90

95

Tyr Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

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

225

230

235

240

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

245

250

255

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

260

265

270

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

275

280

285

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

290

295

300

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

305

310

315

320

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

325

330

335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Asn Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 6
<211> 444
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 6

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

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

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

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

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

65	70	75	80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr			
	85	90	95
Tyr Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val			
	100	105	110
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser			
	115	120	125
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys			
130	135	140	
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu			
145	150	155	160
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu			
	165	170	175
Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr			
	180	185	190
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val			
195	200	205	
Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro			
210	215	220	
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe			
225	230	235	240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val			
	245	250	255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe			
260	265	270	
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro			
275	280	285	
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr			
290	295	300	
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val			
305	310	315	320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Asn Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 7

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 7

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

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

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

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu

50	55	60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser		
65	70	75
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
	85	90
Tyr Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val		95
	100	105
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser		110
	115	120
		125
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys		
	130	135
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu		140
145	150	155
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu		160
	165	170
Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr		175
	180	185
		190
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val		
	195	200
Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro		205
	210	215
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		220
225	230	235
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		240
	245	250
		255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe		
	260	265
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		270
	275	280
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		285
	290	295
		300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Thr
435 440 445

<210> 8

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 8

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

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

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

35	40	45
Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu		
50	55	60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser		
65	70	75
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
85	90	95
Tyr Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val		
100	105	110
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser		
115	120	125
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys		
130	135	140
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu		
145	150	155
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu		
165	170	175
Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr		
180	185	190
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val		
195	200	205
Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro		
210	215	220
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
225	230	235
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
245	250	255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe		
260	265	270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
275	280	285

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Thr Ser Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 9

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 9

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20				25				30							
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
35				40				45							
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
50				55				60							
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65				70				75				80			
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro
85				90				95							
Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala
100				105				110							
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser
115				120				125							
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu
130				135				140							
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser
145				150				155				160			
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu
165				170				175							
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val
180				185				190							
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys
195				200				205							
Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys									
210				215											
<210> 10															
<211> 454															
<212> PRT															
<213> Artificial Sequence															

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Glu Gly Val Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp

100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro

145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr

165 170 175

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

180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn

290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn

355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450

<210> 11

<211> 454

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Glu Gly Val Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp

100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Asn Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro

145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr

165 170 175

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

180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn

195 200 205

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

210	215	220	
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu			
225	230	235	240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp			
	245	250	255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp			
	260	265	270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly			
	275	280	285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn			
	290	295	300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp			
305	310	315	320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro			
	325	330	335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu			
	340	345	350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn			
	355	360	365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile			
	370	375	380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr			
385	390	395	400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys			
	405	410	415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys			
	420	425	430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu			
	435	440	445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	450		

<210> 12

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 12

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 Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 13

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 14

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 14

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

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

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

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asn Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

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

130

135

140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195

200

205

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

210

215

220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

225

230

235

240

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

245

250

255

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

260

265

270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275

280

285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290

295

300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305

310

315

320

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

325

330

335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340

345

350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355

360

365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445
Gly Lys

450

<210> 15

<211> 450

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100	105	110	
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val			
115	120	125	
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala			
130	135	140	
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser			
145	150	155	160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val			
165	170	175	
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro			
180	185	190	
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys			
195	200	205	
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
210	215	220	
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
245	250	255	
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
260	265	270	
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
275	280	285	
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser Arg			
290	295	300	
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
305	310	315	320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
325	330	335	
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
340	345	350	

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 16

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 16

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

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

20 25 30

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

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

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

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

85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asn Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

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

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

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

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

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

325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445
Gly Lys

450

<210> 17

<400> 17

000

<210> 18

<400> 18

000

<210> 19

<400> 19

000

<210> 20

<400> 20

000

<210> 21

<400> 21

000

<210> 22

<400> 22

000

<210> 23

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 23

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

85 90 95

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

100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

115 120 125

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

130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 24
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

 polypeptide"
 <400> 24
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

 Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

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

130	135	140	
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser			
145	150	155	160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val			
	165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro			
	180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys			
	195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
	210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
	245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
	260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
	275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
	290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
305	310	315	320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
	325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
	340	345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
	355	360	365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
370	375	380	

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys

450

<210> 25

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 25

Glu Val Gln Leu Leu 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 Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Thr Ser Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys

450

<210> 26

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 26

Glu Val Gln Leu Leu 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 Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

85	90	95
Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln		
100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
145	150	155
160		
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
225	230	235
240		
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser Arg		
290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
305	310	315
320		
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
325	330	335

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

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 27

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 27

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

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Leu	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65				70				75				80			
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
85				90				95							
Ala	Arg	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Gly	Phe	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln
100				105				110							
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
115				120				125							
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
130				135				140							
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
145				150				155				160			
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
165				170				175							
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
180				185				190							
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
195				200				205							
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
210				215				220							
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
225				230				235				240			
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
245				250				255							
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
260				265				270							
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
275				280				285							
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Gln	Asn	Thr	Ser	Arg
290				295				300							
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys

305 310 315 320

 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

 Gly Lys
 450
 <210> 28
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 28
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

35 40 45

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly

85 90 95

Thr His Leu His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 29

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 29

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

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

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

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
115 120 125

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
180 185 190

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

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

245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 260 265 270
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 340 345 350
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 30

<211

> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 30

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440

<210> 31

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 31

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Val Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly

85 90 95

Ser His Phe His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 32

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Thr Pro Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr

180	185	190	
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val			
195	200	205	
Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro			
210	215	220	
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe			
225	230	235	240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val			
245	250	255	
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe			
260	265	270	
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro			
275	280	285	
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr			
290	295	300	
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val			
305	310	315	320
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala			
325	330	335	
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg			
340	345	350	
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly			
355	360	365	
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro			
370	375	380	
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser			
385	390	395	400
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln			
405	410	415	
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His			
420	425	430	

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

435

440

<210> 33

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 33

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Tyr Cys Thr Pro Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 180 185 190
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 195 200 205
 Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 210 215 220

 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 260 265 270
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285

 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Thr Ser Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 340 345 350

 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 405 410 415

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

420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440
 <210> 34
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 34
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 145 150 155 160
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu

	165		170		175										
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr
	180		185		190										
Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val
	195		200		205										
Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro
	210		215		220										
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe
225		230		235		240									
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val
	245		250		255										
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe
	260		265		270										
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro
	275		280		285										
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Asn	Ala	Ser	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr
	290		295		300										
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val
305		310		315		320									
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala
	325		330		335										
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg
	340		345		350										
Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly
	355		360		365										
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro
	370		375		380										
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser
385		390		395		400									
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln
	405		410		415										

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 35
<211> 444
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 35

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

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Thr Pro Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
115 120 125

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
180 185 190

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Asn Thr Ser Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

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

405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440
 <210> 36
 <211
 > 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 36
 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 Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 37

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 37

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

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

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

115	120	125	
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala			
130	135	140	
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser			
145	150	155	160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val			
165	170	175	
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro			
180	185	190	
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys			
195	200	205	
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
210	215	220	
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
245	250	255	
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
260	265	270	
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
275	280	285	
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
290	295	300	
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
305	310	315	320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
325	330	335	
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
340	345	350	
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
355	360	365	

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

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

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 38

<211> 450

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 38

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

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

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys

450

<210> 39

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 39

Gly Gly Gly Gly

1

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 40
 Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 41
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 41
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 42
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 42
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5
 <210>
 > 43
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 43
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 44

```

<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 44
Gly Gly Gly Gly Ser
1             5
<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<
220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 45
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1             5             10

```