



공개특허 10-2022-0029763



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0029763
(43) 공개일자 2022년03월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/00 (2006.01) *C07K 16/24* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/00 (2013.01)
C07K 16/241 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7006072(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2014년06월26일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2021-7024096
원출원일자(국제) 2014년06월26일
심사청구일자 2021년07월28일
- (85) 번역문제출일자 2022년02월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2014/001730
- (87) 국제공개번호 WO 2014/206561
국제공개일자 2014년12월31일
- (30) 우선권주장
13003264.2 2013년06월26일
유럽특허청(EPO)(EP)
- (71) 출원인
누맙 세러퓨틱스 아게
스위스 8820 베덴스빌 아인저들러스트라쎄 34
- (72) 발명자
페이어 세바스티안
스위스 에겐빌 5445 키르히라인스트라쎄 6
우레흐 테이비드
스위스 요나 8645 존넨브릭스트라쎄 8
- (74) 대리인
특허법인아이엠

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 신규한 항체 기본구조

(57) 요 약

본 발명은 유리한 특성을 가진 신규한 항체 기본구조에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2317/94 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

(i) 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III; (ii) CDR 도메인 CDR1, CDR2 및 CDR3; 및 (iii) 기본구조 부위 IV로서

a. 기본구조 부위 IV에 대한 인간 V_L 생식 계열 서열, 특히 서열번호 16 내지 22의 목록으로부터 선택된 V_L 생식 계열 서열;

b. (bi) 기본구조 부위 IV에 대한 인간 V_L 생식 계열 서열들로부터 나온 콘센서스 V_L 서열, 특히 서열번호 17; 또는 (bii) 기본구조 부위 IV에 대한 재정렬된 인간 V_L 서열들로부터 나온 콘센서스 V_L 서열, 특히 서열 번호 16 및 17의 목록으로부터 선택된 V_L 콘센서스 서열인 V_L -기반 서열;

c. 기본구조 부위 IV에 대한 가장 근접한 인간 V_L 생식 계열 서열에 비하여, 하나 또는 두 개 변이, 특히 하나의 변이를 가지는, V_L -기반 서열로부터 선택된 기본구조 부위 IV을 포함하는

항체 VL 도메인으로서;

b 또는 c의 경우, 기본구조 부위 IV가 서열 FGQGTKLTVLG (서열번호 15)을 가진다면,

(w) 상기 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III은 하기 클론 목록에서 나타난 바와 같이 상기 기본구조 부위들과는 상이하고: FW1.4gen (서열번호 4), 375-FW1.4opt, 435-FW1.4opt, 509-FW1.4opt, 511-FW1.4opt, 534-FW1.4opt, 567-FW1.4opt, 578-FW1.4opt, 1-FW1.4opt, 8-FW1.4opt, 15-FW1.4opt, 19-FW1.4opt, 34-FW1.4opt, 35-FW1.4opt, 42-FW1.4opt, 및 43-FW1.4opt;

(x) 상기 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III은 하기 클론 목록에서 나타난 바와 같이 상기 기본구조 부위들의 서열로부터의 순열에 의해 얻을 수 있는 서열과는 상이하고: FW1.4gen (서열번호 4), 375-FW1.4opt, 435-FW1.4opt, 509-FW1.4opt, 511-FW1.4opt, 534-FW1.4opt, 567-FW1.4opt, 578-FW1.4opt, 1-FW1.4opt, 8-FW1.4opt, 15-FW1.4opt, 19-FW1.4opt, 34-FW1.4opt, 35-FW1.4opt, 42-FW1.4opt, 및 43-FW1.4opt;

(y) 상기 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III은 서열 FW1.4gen (서열번호 4)의 변이로 얻을 수 있는 서열과 하나 이상의 위치 15, 22, 48, 57, 74, 87, 88, 90, 92, 95, 97 및 99에서 상이하고; 또는

(z) 상기 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III은 서열번호 8을 가진 인간 V_K 서열에서의 각 부위에 비하여 5 개 이하의 변이, 특히 다섯 미만, 넷 미만, 셋 미만, 특히 서열번호 8을 가진 인간 V_K 서열에 비해 하나 이하의 변이를 포함하는 것을 조건으로 하는 항체 VL 도메인.

청구항 2

제1항에 있어서, 기본구조 부위 III 내의 위치 AH0101에서의 아미노산 잔기는 인간 V_L 콘센서스 서열의 그 위치에 있는 아미노산 잔기이고, 구체적으로 상기 아미노산 잔기는 페닐알라닌과 상이하고, 더욱 구체적으로 상기 아미노산 잔기는 글루탐산인, 항체 VL 도메인.

청구항 3

제1항 또는 2항에 있어서, 상기 V_K 기본구조 부위 I 내지 III은 V_K 1 족에 속하는, 항체 VL 도메인.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 V_K 기본구조 부위 I 내지 III은 서열번호 2 및 서열번호 8로부터 선택된 서열, 특히 서열번호 8에 존재하는 기본구조 부위인, 항체 VL 도메인.

청구항 5

제1항 내지 4항 중 임의의 한 항에 있어서, 상기 CDR 도메인들 CDR1, CDR2 및 CDR3은 (i) 관심의 항원에 대한

특이성을 가지는 부모 비-인간 항체로부터, 특히 부모 토끼 항체 또는 부모 설치류 항체, 특히 부모 마우스 또는 래트 항체로부터 출처된 CDR 도메인들 CDR1, CDR2 및 CDR3; (ii) V_K 도메인을 포함하는 부모 인간 또는 인간화된 항체, 특히 치료 승인을 받았거나 상업화된 항체로부터 출처된 CDR 도메인들 CDR1, CDR2 및 CDR3; (iii) (i) 또는 (ii)에 따른 CDR 도메인들, 특히 (i) 또는 (ii)에 따른 CDR 도메인들의 하나 이상을 최적화하여 얻은 CDR 도메인들로부터 유도된 CDR 도메인들 CDR1, CDR2 및 CDR3; 및 (iv) (i), (ii) 및/또는 (iii)에 따른 CDR 도메인들의 하나 이상에 의해 치환될 CDR 도메인으로부터 독립적으로 선택되는, 항체 VL 도메인.

청구항 6

제1항 내지 5항 중 임의의 한 항에 있어서, 상기 기본구조 부위 I 내지 IV들은 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 11, 서열번호 12, 및 서열번호 13로부터 선택되는 서열에서 나타난 바와 같이 기본 구조 부위들의 조합인, 항체 VL 도메인. .

청구항 7

제1항 내지 6항 중 임의의 한 항에 따른 항체 VL 도메인을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 기능적 단편물.

청구항 8

제7항에 있어서, VH1A, VH1B, VH2, VH3, VH4, VH5, 및 VH6으로부터 선택된 VH 도메인 아족, 특히 VH 도메인 아족 VH3 또는 VH4, 특히 VH 도메인 아족 VH3에 속한 VH 도메인을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 기능적 단편물.

청구항 9

제7항 또는 8항에 있어서, IgG 항체, Fab 단편물, scFv 단편물, 단쇄 다이아바디 (scDb), 텐덤 scDb (Tandab), 선형 이량성 scDb (LD-scDb), 원형 이량성 scDb (CD-scDb), 이중특이성 T-세포 인게이저(engager) (BiTE; 텐덤 디(di)-scFv), 텐덤 트리-scFv, 트리(아)바디, 이중특이성 Fab2, 디-미니항체, 테트라바디, scFv-Fc-scFv 융합체, 디-다이아바디, DVD-Ig, IgG-scFab, scFab-dsscFv, Fv2-Fc, bsAb (경쇄의 C-말단에 연결된 scFv), Bs1Ab (경쇄의 N-말단에 연결된 scFv), Bs2Ab (중쇄의 N-말단에 연결된 scFv), Bs3Ab (중쇄의 C-말단에 연결된 scFv), Ts1Ab (중쇄 및 경쇄 둘 다의 N-말단에 연결된 scFv), Ts2Ab (중쇄의 C-말단에 연결된 dsscFv), 및 노브인투홀(Knob-into-Holes) (KiHs) (KiH 기술에 의해 제조된 이중특이성 IgG)와 같은 IgG-scFv 융합체, 및 듀오바디 (Duobody 기술로 제조된 이중특이성 IgG)로 구성되는 군으로부터 선택된, 단리된 항체 또는 이의 기능적 단편물.

청구항 10

제7항 내지 9항 중 임의의 한 항의 단리된 항체 또는 이의 기능적 단편물 및 조건적으로 약학적 허용 담체 및/ 또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 11

(i) 제1항 내지 6 항 중 어느 한 항의 항체 VL 도메인, 또는 제7항 내지 9항 중 어느 한 항의 단리된 항체 또는 이의 기능적 단편물을 암호화하는; 또는 (ii) 제17항의 방법으로 얻을 수 있는 핵산 서열 또는 핵산 서열들의 일 군.

청구항 12

제11항의 핵산 서열 또는 핵산 서열들의 일 군을 포함하는 벡터 또는 벡터들의 일 군.

청구항 13

제11항의 핵산 서열 또는 핵산 서열들의 일 군 또는 제12항의 벡터 또는 벡터들의 일 군을 포함하는 숙주 세포, 특히 밸현 숙주 세포.

청구항 14

제11항의 핵산 서열 또는 핵산 서열들의 일 군, 또는 제12항의 벡터 또는 벡터들의 일 군, 또는 제13항의 숙주 세포, 특히 발현 숙주 세포를 발현하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 6 항 중 어느 한 항의 항체 VL 도메인, 또는 제7항 내지 9 항 중 어느 한 항의 단리된 항체 또는 이의 기능적 단편물을 제조하는 방법.

청구항 15

- a) 토끼를 관심의 항원으로 면역화시키는 단계;
- b) 관심의 적어도 하나의 항체를 분리하는 단계; 및
- c) 상기 관심의 적어도 하나의 항체의 VL CDR 부위들을 제1항 내지 6 항 중 어느 한 항의 항체 VL 도메인을 암호화하는 핵산 서열내로 클로닝하는 단계를 포함하는 면역화된 토끼 또는 설치류 항체를 생성하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

- aa. 형광 활성화 세포 분류 (fluorescence activated cell-sorting)를 사용하여 관심의 항원과 반응하는 친화도 성숙된 메모리 B-세포들을 클론성 분리하는 단계;
- ab. 단일 B 세포들을 단일 B 세포 클론들의 불멸화를 요구하지 않는 공-배양 시스템에서 배양하는 단계;
- ac. B 세포 배양 상등액을 세포-기반 ELISA로 스크리닝하여 상기 관심의 항원에 결합하는 적어도 하나의 항체를 동정하는 단계; 및/또는
- ad. 상기 적어도 하나의 항체의 VH CDR 부위들을 인간 항체 VH 도메인을 암호화하는 핵산 서열로 클로닝 하는 단계 중 하나 이상의 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 17

제1항 내지 6항 중 어느 한 항의 항체 VL 도메인을 암호화하는 핵산 서열, 또는 제7 항 내지 9항 중 어느 한 항의 단리된 항체 또는 이의 기능적 단편물을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열들을 생성하는 방법으로서, (i) 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III; (ii) CDR 도메인들 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 (iii) 기본구조 부위 IV로서,

- a. 기본구조 부위 IV에 대한 인간 V_λ 생식 계열 서열, 특히 서열번호 16 내지 22의 목록으로부터 선택된 V_λ 생식 계열 서열;
- b. (bi) 기본구조 부위 IV에 대한 인간 V_λ 생식 계열 서열들로부터 나온 콘센서스 V_λ 서열, 특히 서열번호 17; 또는 (bii) 기본구조 부위 IV에 대한 재배열된 인간 V_λ 서열들로부터 나온 콘센서스 V_λ 서열, 특히 서열 번호 16 및 17의 목록으로부터 선택된 V_λ 콘센서스 서열인 V_λ-기반 서열; 및
- c. 기본구조 부위 IV에 대한 가장 근접한 인간 V_λ 생식 계열 서열에 비해, 하나 또는 두 개 변이, 특히 하나의 변이를 가지는 V_λ-기반 서열로부터 선택되는 기본구조 부위 IV를 암호화하는 핵산 서열들을 특히 하기 방법 중 하나를 사용하여 하나 이상의 단계로 조합하는 것을 포함하는 방법:
 - i. 핵산 작제물에서, 특히 인간 또는 인간화된 V_K 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터에서, 상기 V_K 기본구조 부위 IV를
 - a. 기본구조 부위 IV에 대한 인간 V_λ 생식 계열 서열, 특히 서열번호 16 내지 22의 목록으로부터 선택된 V_λ 생식 계열 서열;
 - b. (bi) 기본구조 부위 IV에 대한 인간 V_λ 생식 계열 서열들로부터 나온 콘센서스 V_λ 서열, 특히 서열번호 17; 또는 (bii) 기본구조 부위 IV에 대한 재배열된 인간 V_λ 서열들로부터 나온 콘센서스 V_λ 서열, 특히 서열 번호 16 및 17의 목록으로부터 선택된 V_λ 콘센서스 서열인 V_λ-기반 서열; 및
 - c. 기본구조 부위 IV에 대한 가장 근접한 인간 V_λ 생식 계열 서열에 비해, 하나 또는 두 개 변이, 특히 하나의 변이를 가지는 V_λ-기반 서열로부터 선택되는 기본구조 부위 IV로 치환하는 방법;
 - ii. 기본구조 부위 IV를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물, 특히 재조합 벡터 내로, (i) 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III; 및 (ii) CDR 도메인들 CDR1, CDR2 및 CDR3들을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열들

을 삽입하는 방법으로서, 상기 기본구조 부위 IV는

- a. 기본구조 부위 IV에 대한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열, 특히 서열번호 16 내지 22의 목록으로부터 선택된 $V\lambda$ 생식 계열 서열;
- b. (bi) 기본구조 부위 IV에 대한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열들로부터 나온 콘센서스 $V\lambda$ 서열, 특히 서열번호 17; 또는 (bii) 기본구조 부위 IV에 대한 재배열된 인간 $V\lambda$ 서열들로부터 나온 콘센서스 $V\lambda$ 서열, 특히 서열 번호 16 및 17의 목록으로부터 선택된 $V\lambda$ 콘센서스 서열인 $V\lambda$ -기반 서열; 및
- c. 기본구조 부위 IV에 대한 가장 근접한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열에 비해, 하나 또는 두 개 변이, 특히 하나의 변이를 가지는 $V\lambda$ -기반 서열로부터 선택되는 방법;
- iii. 인간 또는 인간화된 V_K 도메인을 암호화하는 핵산 서열 내에서 기본구조 부위 IV를 암호화하는 상기 핵산 서열을 변이시켜
 - a. 기본구조 부위 IV에 대한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열, 특히 서열번호 16 내지 22의 목록으로부터 선택된 $V\lambda$ 생식 계열 서열;
 - b. (bi) 기본구조 부위 IV에 대한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열들로부터 나온 콘센서스 $V\lambda$ 서열, 특히 서열번호 17; 또는 (bii) 기본구조 부위 IV에 대한 재배열된 인간 $V\lambda$ 서열들로부터 나온 콘센서스 $V\lambda$ 서열, 특히 서열 번호 16 및 17의 목록으로부터 선택된 $V\lambda$ 콘센서스 서열인 $V\lambda$ -기반 서열; 및
 - c. 기본구조 부위 IV에 대한 가장 근접한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열에 비해, 하나 또는 두 개 변이, 특히 하나의 변이를 가지는 $V\lambda$ -기반 서열로부터 선택된 기본구조 부위 IV를 생성하는 방법; 또는
- iv. 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III, CDR 도메인 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 기본구조 부위 IV를 포함하는 경쇄 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물, 특히 재조합 벡터에서, 상기 CDR 도메인들을 암호화하는 상기 핵산 서열들 중 하나 이상을 관심의 항체로부터 나온 상응하는 CDR 도메인(들)을 암호화하는 핵산 서열(들)로 하나 이상의 단계로 치환하는 방법으로서, 상기 기본구조 부위 IV는
 - a. 기본구조 부위 IV에 대한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열, 특히 서열번호 16 내지 22의 목록으로부터 선택된 $V\lambda$ 생식 계열 서열;
 - b. (bi) 기본구조 부위 IV에 대한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열들로부터 나온 콘센서스 $V\lambda$ 서열, 특히 서열번호 17; 또는 (bii) 기본구조 부위 IV에 대한 재배열된 인간 $V\lambda$ 서열들로부터 나온 콘센서스 $V\lambda$ 서열, 특히 서열 번호 16 및 17의 목록으로부터 선택된 $V\lambda$ 콘센서스 서열인 $V\lambda$ -기반 서열; 및
 - c. 기본구조 부위 IV에 대한 가장 근접한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열에 비해, 하나 또는 두 개 변이, 특히 하나의 변이를 가지는 $V\lambda$ -기반 서열로부터 선택되는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 유리한 특성을 가진 신규한 항체 기본구조들 (frameworks)에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

본 발명은 V_K 로부터의 기본구조 부위 I 내지 III 및 $V\lambda$ 로부터의 기본구조 부위 IV를 포함하는, 고안정성과 감소된 응집 특성과 같은 유리한 특성을 가진 신규한 키메릭 인간 항체 경쇄 기본구조에 관한 것이다.

[0003]

처음 단일클론성 항체의 개발("mAbs"; Kohler & Milstein, Nature. 256 (1975) 495-7) 이후 40년간, 항체들은 연구, 진단 및 치료 목적에 사용되는 점차 중요하게 된 일군의 생체분자들이 되었다. 처음, 항체들은 전적으로 동물들을 상응하는 목적 항원으로 면역화시킴으로써 얻었다. 비인간 출처의 항체들을 연구 및 진단에 사용할 수 있는 반면, 치료적 접근에는 인간 신체는 비-인간 항체들을 외부인자로 인식할 수 있고 그 비-인간 항체 약물 물체에 대하여 면역반응을 일으켜, 이를 덜 효과적이거나 전혀 효과적이지 않게 할 수 있다. 따라서, 재조합 방법들이 비-인간 항체들을 덜 면역원성적이 되도록 하기 위해 제안되었다.

[0005]

비-인간 mAb들을 덜 면역원성적 치료제로 전환하기 위한 초기 노력은 동물 (예를 들어 설치류) 가변 도메인들

및 인간 불변 부위들로 구성되는 키메릭 항체들을 조작하는 것을 수반하였다 (Boulianne 등, *Nature* 312, (1984) 643 – 646). 다른 접근 방식은 실치류 mAb들의 인간화 목적으로 인가변 도메인 골격들 (scaffolds)에 CDR들을 도입하고 (Jones 등 *Nature* 321 (1986) 522 – 525; Riechmann 등, *Nature* 332 (1988) 323-7) 또는 상기 가변 도메인들을 재표면화하였다 (Roguska 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 969-973).

[0006] CDR 루프 결합에 의해 인간화하기 위해, 인간 수용체 기본구조는 공여체 기본구조와의 유사성에 기반하거나 (예, Roguska 등, *Protein Engineering* 9 (1996) 895-904; WO/2008/144757 (for rabbits)) 또는 선호되는 안정성 특성에 기반하여 (Ewert 등, *Methods* 34 (2004) 184-199) 선택된다. 후자의 개념은 토끼 항체들을 보편적인 가변 도메인 기본구조 상에 인간화하는 데 사용되었다 (US 8,193,235).

[0007] 임의의 선택된 방식을 사용하여, 결과된 mAb 또는 기능적 단편들은 이상적으로는 공여체 mAb의 바람직한 약역학적 특성을 유지하면서, 약물-유사 생물리학적 특성과 최소 면역원성을 나타낸다. mAb들 또는 이의 기능적 단편들의 생물리적 특성에 관하여, 응집 경향은 치료적 분자의 개발성에 대한, 주로 하기 세 가지에 대한 주요 관심사항이 되었다:

[0008] 첫째, 단백질 응집체들은 일반적으로 숙주에서 면역 반응을 이끌어낼 더 높은 잠재성을 나타내고, 항-약물 항체들을 형성하고 및 결과적으로 약물 중립화 항체들을 형성하게 된다 (Joubert 등, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 25266-25279).

[0009] 둘째, 응집체들은 이들을 제거하는 노력이 크기 때문에 제조 수율에 영향을 미친다 (Cromwell 등, *AAPS Journal* 8 (2006), Article 66).

[0010] 셋째, 과녁에 벗어난 효과가 관측될 수 있다. 올리고머 형성에 대한 염려는 타겟 및 작제물당 오직 하나의 결합 가능을 가지는 이중 특이성 (또는 다중 특이성) 항체 형식을 위시한 일가 반응이 선호되는 적용에 더욱더 심화되는데, 이는 이러한 경우의 올리고머 형성이 다가 결합 특성을 가지는 단백질 집성체를 결과하여, 잠재적으로 탈-과녁 효과로 인도하기 때문이다. 그러한 비특이적 활성에 대한 예는 이중특이성 항체 형식으로 있는 단일 CD3 ε -결합 도메인을 가진 작제물의 사용이다. 그러한 형식은 예를 들어 두 개의 결합 도메인 중 하나를 사용하여 암 항원에 결합하고 및 두 번째를 사용하여 CD3 ε -결합 도메인 사용 세포독성 T 세포에 결합한다. 일가 CD3 ε -결합 분체의 가교는 CD3 ε 을 통한 신호전달을 유도하는데 요구되기 때문에, T 세포들은 상기 타겟 세포의 표면에 결합된 다중 이중 특이성 작제물에 의해 결합될 때 자극될 것이고 – 및 따라서, 가교된 분자의 특성을 채용하는 것 – 암세포로만 전적으로 지향된 특이적 T 세포 반응을 낳게 된다. 반면, 그러한 작제물의 올리고머들은 가교된 이중특이성 항체의 특성을 나타낼 것이고 및 암세포에 결합되지 않을 때에도 세포독성 T 세포들을 활성화 시키며, 따라서 T 세포들의 전신적 활성화로 이끈다. T 세포들의 그러한 비특이적 및 전신적 활성화는 사이토카인 수준을 결과하게 되고 이는 역효과로 이어진다.

[0011] 또한, 클로닝, 발현 및 정제 방법들이 표준화될 수 있기 때문에, 신뢰성 있는 및 보편적으로 적용 가능한 수용체 기본구조는 비-인간 항체들을 인간화하는 강고한 방법을 가능하기에 유익하다.

[0012] 비-인간 mAb들의 인간화에 대한 전술한 기준을 충족하기 위해, 공개된 방법론은 인간 콘센서스 가변 도메인 기본구조 서열들을 비-인간 상보성 결정 부위들의 접목하기 위한 수용체 골격으로서 사용하는 것을 제시하고 있다. 단백질 내에서의 각 아미노산 위치에 대하여, 단백질 안정성에 기여하는 잔기들은 진화 중에 생식계열 서열이 풍부해졌다는 가정에 근거하여, 결과된 인간화된 가변 도메인들이 각각의 가변 도메인 족의 인간 생식 계열 콘센서스 서열에 더 근접할 수록, 더 높은 안정성이 기대된다. 이러한 개념은 Steipe (Steipe 등, *J. Mol. Biol.* 1994 240 (1994) 188-92) 및 Worn의 의해 개괄됨 (Worn 등, *J. Mol. Biol.* 305 (2001) 989-1010)에 의해 설명된 바와 같이, 폭넓게 받아들여지고, 넓은 범위로 적용된다. 비제한적 예는 (a) 콘센서스 서열 가변 도메인들을 비-인간 항체들의 인간화에 사용하는 것 (Carter 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289); (b) CDR 라이브러리를 제조하는 콘센서스 서열 가변 도메인을 안정한 타겟-결합 항체들을 시험관내 스크리닝하는 데 사용하는 것 (Knappik 등, *J. Mol. Biol.* 296 (2000) 57--86); 및 (c) 비-콘센서스 잔기들을 콘센서스 잔기들로 교환함으로써 항체 가변 도메인들의 안정성을 향상시키는 지식-기반 방식 (Steipe, 상기 인용).

[0013] 또한, 상이한 가변 도메인 족들의 안정성이 설명되고 있고 VH3는 가장 안정한 가변 중쇄 도메인이다. 중요하게도, 가변 경쇄 도메인들의 경우, V_L 족이라기 보다는 V_K 족이 선호된다 (Ewert, 상기 인용). 특히, VH3 및 V_K 1의 인간 콘센서스 서열들이 유리한 생물리적 특성을 가지는 것(Ewert, 상기 인용) 및 비-인간 출처의 항체들을 인간화하는 데 특히 적합한 것 (use in Carter, 상기 인용)으로서 설명되었다.

[0014] 이와 부합하게, 인간 V_K 1-VH3 콘센서스 기본구조인 hu-4D5가 설치류 및 토끼 항체들의 인간화에 사용된 몇 가

지 공개물이 있다 (Rader, J. Biol. Chem. 275 (2000) 13668–13676; WO/2005/016950; WO 2008/004834). 또한, hu-4D5와 동일한 족에 속하는 자연발생적 서열을 사용하여 토끼 유래의 안정한 인간화된 단체 단편물(scFv)을 형성하였다 (US 8,293,235; Borras 등, J. Biol. Chem. 285 (2010) 9054–9066).

[0015] 중요한 것은, 자연도태로 인하여 전장 항체들의 맥락에서 언제나 안정한 가변 도메인들이 진화되었고, 여기서 상기 가변 도메인은 불변 도메인 1 옆에서 접촉되어 있다는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 아마도 일정 비-콘센서스 잔기들은 분리된 가변 도메인들에, 예를 들어 단체 Fv (scFv) 단편물의 맥락에서 더 좋은 안정성을 제공할 것이다. 이러한 가정을 지지하여, 안정성에 기여하는 비-콘센서스 변이들이 미국 특허 출원번호 US 2009/0074780에 설명되어 있다.

[0017] 또한, 항체 안정성은 제조, 정제, 수명, 및 결론적으로 항체 치료제에 대한 상품 가격에 매우 중요하다. 이러한 변수들 중 하나 이상에서 조금이라도 개선된다면 항체 약물의 연구개발이 상업적으로 성공할 것인지에 대한 의문에 매우 적절한 답이 될 수 있다.

[0018] 따라서, 인간화된 항체 약물 물체를 비-인간 항체들로부터 생산하는 데 이미 많은 시도를 한 사실에도 불구하고, 높은 안정성 및 감소된 응집 경향과 같은 유리한 특성을 지닌 신규한 인간 항체 기본 구조로서, 천연 서열과 비교할 때 가능한 한 적은 변이를 포함하는, 이상적으로는 전혀 변이되지 않아 면역원성적 서열을 창출 할 위험을 가능한 한 감소시킨 인간 항체 기본구조를 개발할 충족되지 않은 필요가 여전히 남아 있다. 그러한 안정한 인간 기본구조는 루프 접목하거나 단순히 부모 항체와 안정한 기본구조 사이의 안정성-기여 성분을 교환함으로써 온전한 인간항체들 또는 이의 단편들을 안정화시키는 데 또한 사용될 수 있다.

[0019] 이러한 문제에 대한, 본 발명, 즉 V_K 로부터의 기본구조 부위 I 내지 III 및 V_{λ} 로부터의 기본구조 부위 IV를 포함하는, 높은 안정성 및 감소된 응집 경향과 같은 유리한 특성을 지닌 신규한 키메릭 인간 항체 경쇄 기본구조에 의해 제공되는 해결책은 선행기술에 의해서는 성취되거나 제시되지 않았던 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0020] 본 발명은 V_K 로부터의 기본구조 부위 I 내지 III 및 V_{λ} 로부터의 기본구조 부위 IV를 포함하는, 높은 안정성, 감소된 응집 경향 및 최소 면역원성능과 같은 유리한 특성을 지닌, 신규한 키메릭 인간 항체 경쇄 기본구조에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0021] 따라서, 제1 관점에서, 본 발명은 (i) 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III; (ii) CDR 도메인 CDR1, CDR2 및 CDR3; 및 (iii) 기본구조 부위 IV로서

[0022] a. 기본구조 부위 IV에 대한 인간 V_{λ} 생식 계열 서열, 특히 서열번호 16 내지 22의 목록으로부터 선택된 V_{λ} 생식 계열 서열;

[0023] b. (bi) 기본구조 부위 IV에 대한 인간 V_{λ} 생식 계열 서열들로부터 나온 콘센서스 V_{λ} 서열, 특히 서열번호 17; 또는 (bii) 기본구조 부위 IV에 대한 재정렬된 인간 V_{λ} 서열들로부터 나온 콘센서스 V_{λ} 서열, 특히 서열번호 16 및 17의 목록으로부터 선택된 V_{λ} 콘센서스 서열인 V_{λ} -기반 서열;

[0024] c. 기본구조 부위 IV에 대한 가장 근접한 인간 V_{λ} 생식 계열 서열에 비하여, 하나 또는 두 개 변이, 특히 하나의 변이를 가지는, V_{λ} -기반 서열로부터 선택된 기본구조 부위 IV를 포함하는 항체 VL 도메인에 관한 것으로서;

[0025] b 또는 c의 경우, 기본구조 부위 IV가 서열 FGQGTKLTVLG (서열번호 15)을 가진다면,

[0026] (w) 상기 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III은 클론 목록에서 나타난 바와 같이 상기 기본구조 부위들과는 상이하고: FW1.4gen (서열번호 4), 375-FW1.4opt, 435-FW1.4opt, 509-FW1.4opt, 511-FW1.4opt, 534-FW1.4opt, 567-FW1.4opt, 578-FW1.4opt, 1-FW1.4opt, 8-FW1.4opt, 15-FW1.4opt, 19-FW1.4opt, 34-FW1.4opt, 35-FW1.4opt, 42-FW1.4opt, 및 43-FW1.4opt;

[0027] (x) 상기 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III은 클론 목록에서 나타난 바와 같이 상기 기본구조 부위들의 서열

로부터의 순열에 의해 얻을 수 있는 서열과는 상이하고: FW1.4gen (서열번호 4), 375-FW1.4opt, 435-FW1.4opt, 509-FW1.4opt, 511-FW1.4opt, 534-FW1.4opt, 567-FW1.4opt, 578-FW1.4opt, 1-FW1.4opt, 8-FW1.4opt, 15-FW1.4opt, 19-FW1.4opt, 34-FW1.4opt, 35-FW1.4opt, 42-FW1.4opt, 및 43-FW1.4opt;

- [0028] (y) 상기 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III은 서열 FW1.4gen (서열번호 4)의 변이로 얻을 수 있는 서열과 하나 이상의 위치 15, 22, 48, 57, 74, 87, 88, 90, 92, 95, 97 및 99 (AHo 번호매김)에서 상이하고; 또는
- [0029] (z) 상기 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III은 서열번호 8을 가진 인간 V_K 서열에서의 각 부위에 비하여 5 개 이하의 변이, 특히 다섯 미만, 넷 미만, 셋 미만, 특히 서열번호 8을 가진 인간 V_K 서열에 비해 하나 이하의 변이를 포함하는 것을 조건으로 하는 항체 VL 도메인에 관한 것이다.
- [0030] 제2 관점에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체 VL 도메인을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 기능적 단편물에 관한 것이다.
- [0031] 제3 관점에서, 본 발명은 본 발명의 단리된 항체 또는 이의 기능적 단편물, 및 조건적으로 약학적 허용 담체 및 /또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0032] 제4 관점에서, 본 발명은 본 발명의 임의의 하나의 항체 VL 도메인, 또는 본 발명의 단리된 항체 또는 이의 기능적 단편물을 암호화하는 핵산 서열 또는 핵산서열들의 일 군, 및/또는 본 발명의 제9관점에 따른 방법에 의해 얻을 수 있는 핵산 서열 또는 핵산 서열들에 관한 것이다.
- [0033] 제5 관점에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 서열 또는 핵산 서열들의 일 군을 포함하는 벡터 또는 벡터들의 일 군에 관한 것이다.
- [0034] 제6 관점에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 서열 또는 핵산 서열들의 일 군, 또는 본 발명의 벡터 또는 벡터들의 일 군을 포함하는 숙주 세포, 특히 발현 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0035] 제7 관점에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 서열 또는 핵산 서열들의 일 군, 또는 본 발명의 벡터 또는 벡터들의 일 군, 또는 본 발명의 숙주 세포, 특히 발현 숙주 세포를 발현하는 단계를 포함하는, 본 발명의 임의의 하나의 항체 VL 도메인, 또는 본 발명의 단리된 항체 또는 이의 기능적 단편물을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0036] 제8 관점에서, 본 발명은:
- [0037] a) 토키를 관심의 항원으로 면역화시키는 단계;
- [0038] b) 관심의 적어도 하나의 항체를 분리하는 단계; 및
- [0039] c) 상기 관심의 적어도 하나의 항체의 VL CDR 부위들을 본 발명에 따른 항체 VL 도메인을 암호화하는 핵산 서열 내로 클로닝하는 단계를 포함하는 면역화된 토키 항체를 생성하는 방법에 관한 것이다.
- [0040] 제9 관점에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체 VL 도메인을 암호화하는 핵산서열, 또는 본 발명에 따른 단리된 항체 또는 이의 기능적 단편물을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열들을 생성하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은, (i) 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III; (ii) CDR 도메인들 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 (iii) 기본구조 부위 IV로서,
- [0041] a. 기본구조 부위 IV에 대한 인간 V_L 생식 계열 서열, 특히 서열번호 16 내지 22의 목록으로부터 선택된 V_L 생식 계열 서열;
- [0042] b. (bi) 기본구조 부위 IV에 대한 인간 V_L 생식 계열 서열들로부터 나온 콘센서스 V_L 서열, 특히 서열번호 17; 또는 (bii) 기본구조 부위 IV에 대한 재배열된 인간 V_L 서열들로부터 나온 콘센서스 V_L 서열, 특히 서열번호 16 및 17의 목록으로부터 선택된 V_L 콘센서스 서열인 V_L -기반 서열; 및
- [0043] c. 기본구조 부위 IV에 대한 가장 근접한 인간 V_L 생식 계열 서열에 비해, 하나 또는 두 개 변이, 특히 하나의 변이를 가지는 V_L -기반 서열로부터 선택되는 기본구조 부위 IV를 암호화하는 핵산 서열들을 특히 하기 방법 중 하나를 사용하여 하나 이상의 단계로 조합하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다:
- [0044] i. 핵산 자체물에서, 특히 인간 또는 인간화된 V_K 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터에서, 상기 V_K 기본구조 부위 IV를
- [0045] a. 기본구조 부위 IV에 대한 인간 V_L 생식 계열 서열, 특히 서열번호 16 내지 22의 목록으로부터 선택된 V_L 생식 계열 서열;

- [0046] b. (bi) 기본구조 부위 IV에 대한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열들로부터 나온 콘센서스 $V\lambda$ 서열, 특히 서열번호 17; 또는 (bii) 기본구조 부위 IV에 대한 재배열된 인간 $V\lambda$ 서열들로부터 나온 콘센서스 $V\lambda$ 서열, 특히 서열 번호 16 및 17의 목록으로부터 선택된 $V\lambda$ 콘센서스 서열인 $V\lambda$ -기반 서열; 및
- [0047] c. 기본구조 부위 IV에 대한 가장 근접한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열에 비해, 하나 또는 두 개 변이, 특히 하나의 변이를 가지는 $V\lambda$ -기반 서열로부터 선택되는 기본구조 부위 IV로 치환하는 방법;
- [0048] ii. 기본구조 부위 IV를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물, 특히 재조합 벡터 내로, (i) 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III; 및 (ii) CDR 도메인들 CDR1, CDR2 및 CDR3들을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열들을 삽입하는 방법으로서, 상기 기본구조 부위 IV는
- [0049] a. 기본구조 부위 IV에 대한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열, 특히 서열번호 16 내지 22의 목록으로부터 선택된 $V\lambda$ 생식 계열 서열;
- [0050] b. (bi) 기본구조 부위 IV에 대한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열들로부터 나온 콘센서스 $V\lambda$ 서열, 특히 서열번호 17; 또는 (bii) 기본구조 부위 IV에 대한 재배열된 인간 $V\lambda$ 서열들로부터 나온 콘센서스 $V\lambda$ 서열, 특히 서열 번호 16 및 17의 목록으로부터 선택된 $V\lambda$ 콘센서스 서열인 $V\lambda$ -기반 서열; 및
- [0051] c. 기본구조 부위 IV에 대한 가장 근접한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열에 비해, 하나 또는 두 개 변이, 특히 하나의 변이를 가지는 $V\lambda$ -기반 서열로부터 선택되는 방법;
- [0052] iii. 인간 또는 인간화된 V_K 도메인을 암호화하는 핵산 서열 내에서 기본구조 부위 IV를 암호화하는 상기 핵산 서열을 변이시켜
- [0053] a. 기본구조 부위 IV에 대한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열, 특히 서열번호 16 내지 22의 목록으로부터 선택된 $V\lambda$ 생식 계열 서열;
- [0054] b. (bi) 기본구조 부위 IV에 대한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열들로부터 나온 콘센서스 $V\lambda$ 서열, 특히 서열번호 17; 또는 (bii) 기본구조 부위 IV에 대한 재배열된 인간 $V\lambda$ 서열들로부터 나온 콘센서스 $V\lambda$ 서열, 특히 서열 번호 16 및 17의 목록으로부터 선택된 $V\lambda$ 콘센서스 서열인 $V\lambda$ -기반 서열; 및
- [0055] c. 기본구조 부위 IV에 대한 가장 근접한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열에 비해, 하나 또는 두 개 변이, 특히 하나의 변이를 가지는 $V\lambda$ -기반 서열로부터 선택된 기본구조 부위 IV를 생성하는 방법; 또는
- [0056] iv. 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III, CDR 도메인 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 기본구조 부위 IV를 포함하는 경쇄 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물, 특히 재조합 벡터에서, 상기 CDR 도메인들을 암호화하는 상기 핵산 서열들 중 하나 이상을 관심의 항체로부터 나온 상응하는 CDR 도메인(들)을 암호화하는 핵산 서열(들)로 하나 이상의 단계로 치환하는 방법으로서, 상기 기본구조 부위 IV는
- [0057] a. 기본구조 부위 IV에 대한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열, 특히 서열번호 16 내지 22의 목록으로부터 선택된 $V\lambda$ 생식 계열 서열;
- [0058] b. (bi) 기본구조 부위 IV에 대한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열들로부터 나온 콘센서스 $V\lambda$ 서열, 특히 서열번호 17; 또는 (bii) 기본구조 부위 IV에 대한 재배열된 인간 $V\lambda$ 서열들로부터 나온 콘센서스 $V\lambda$ 서열, 특히 서열 번호 16 및 17의 목록으로부터 선택된 $V\lambda$ 콘센서스 서열인 $V\lambda$ -기반 서열; 및
- [0059] c. 기본구조 부위 IV에 대한 가장 근접한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열에 비해, 하나 또는 두 개 변이, 특히 하나의 변이를 가지는 $V\lambda$ -기반 서열로부터 선택되는 방법.

발명의 효과

- [0060] 본 발명은 V_K 로부터의 기본구조 부위 I 내지 III 및 $V\lambda$ 로부터의 기본구조 부위 IV를 포함하는, 높은 안정성, 감소된 응집 경향 및 최소 면역원성능과 같은 유리한 특성을 지닌, 신규한 키메릭 인간 항체 경쇄 기본구조에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0061] 도 1은 상기 기본구조 및 CDR 부위들의 개요를 설명하는 가변 도메인 위상을 나타낸다.
도 2는 hu-4D5 (Carter, 1992) 및 시험된 대안적인 기본구조들의 가변 도메인 서열들의 서열 배열을 나타낸다.

hu-4D5에 대한 차이는 검은 색으로 나타낸다. hu-4D5의 경우, 기본구조 부위 V_K , 기본구조 I 내지 IV (서열 번호 34 내지 37) 및 VH 기본구조 I 내지 IV (서열 번호 38 내지 41) 만이 나타나 있다.

도 3은 scFv1 내지 scFv10에 대한 단량체 내용물의 규범화된 (normalized) 시간 분해된 손실의 비교를 나타낸다.

도 4는 기본구조 III 잔기 AHo101과 람다 연결 부위 (기본구조 IV) 사이의 상호작용의 모델을 나타낸다; VL 카파 (상부; PDB ID: 1FVC) 및 VL 람다 (하부; PDB ID 2A9M).

도 5는 천연/원래 가변 도메인들 (회색)을 가진 및 람다 기본구조 IV을 포함하는 VL 도메인 (흑색)을 가진 인간화된 마우스 단일클론 항체의 두 개 scFv 작제물의 규범화된 겹쳐진 SE-HPLC 크로마토그래프 도면을 나타낸다. 상기 규범화된 scFv 단량체 피크는 별표(*)가 표시되어 있고, 올리고머 및 응집체 피크들은 팔호로 강조되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062]

비-인간 항체들의 인간화/안정화 또는 인간 항체들의 안정화에 대한 인간 기본구조를 창출하는 이전 접근 방식에 비하여 본 발명의 특이성은 본 발명은 κ 가변 경쇄 도메인내의 κ 연결 세그먼트를 λ 연결 세그먼트 (기본구조 부위 IV)로 대체하여, 향상된 단백질 안정성 및 감소된 응집 경향을 가지는 $\kappa-\lambda$ 키메릭 가변 경쇄 도메인을 결과하는 것에 관한 것이라는 것이다. 이는 또한 위치 AHo101 (기본구조 부위 III)에서의 κ 콘센서스를 변이시킴으로써 그리고 λ 콘센서스 잔기에 의한 치환으로써 $\kappa-\lambda$ 키메릭 가변 경쇄 도메인에서의 λ 연결 세그먼트의 패킹을 지지하여 단백질 안정성을 더 향상시키고 및 응집 경향을 더 감소시키는 것에 관한 것이다.

[0063]

따라서, 일 관점에 있어서, 본 발명은 (i) 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III; (ii) CDR 도메인 CDR1, CDR2 및 CDR3; 및 (iii) 기본구조 부위 IV로서

[0064]

a. 기본구조 부위 IV에 대한 인간 V_λ 생식 계열 서열, 특히 서열번호 16 내지 22의 목록으로부터 선택된 V_λ 생식 계열 서열;

[0065]

b. (bi) 기본구조 부위 IV에 대한 인간 V_λ 생식 계열 서열들로부터 나온 콘센서스 V_λ 서열, 특히 서열번호 17; 또는 (bii) 기본구조 부위 IV에 대한 재정렬된 인간 V_λ 서열들로부터 나온 콘센서스 V_λ 서열, 특히 서열번호 16 및 17의 목록으로부터 선택된 V_λ 콘센서스 서열인 V_λ -기반 서열;

[0066]

c. 기본구조 부위 IV에 대한 가장 근접한 인간 V_λ 생식 계열 서열에 비하여, 하나 또는 두 개 변이, 특히 하나의 변이를 가지는, V_λ -기반 서열로부터 선택된 기본구조 부위 IV를 포함하는 항체 VL 도메인에 관한 것으로서;

[0067]

b 또는 c의 경우, 기본구조 부위 IV가 서열 FGQGTTKLTVLG (서열번호 15)을 가진다면,

[0068]

(w) 상기 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III은 하기 클론 목록에서 나타난 바와 같이 상기 기본구조 부위들과는 상이하고: FW1.4gen (서열번호 4), 375-FW1.4opt, 435-FW1.4opt, 509-FW1.4opt, 511-FW1.4opt, 534-FW1.4opt, 567-FW1.4opt, 578-FW1.4opt, 1-FW1.4opt, 8-FW1.4opt, 15-FW1.4opt, 19-FW1.4opt, 34-FW1.4opt, 35-FW1.4opt, 42-FW1.4opt, 및 43-FW1.4opt;

[0069]

(x) 상기 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III은 하기 클론 목록에서 나타난 바와 같이 상기 기본구조 부위들의 서열로부터의 순열에 의해 얻을 수 있는 서열과는 상이하고: FW1.4gen (서열번호 4), 375-FW1.4opt, 435-FW1.4opt, 509-FW1.4opt, 511-FW1.4opt, 534-FW1.4opt, 567-FW1.4opt, 578-FW1.4opt, 1-FW1.4opt, 8-FW1.4opt, 15-FW1.4opt, 19-FW1.4opt, 34-FW1.4opt, 35-FW1.4opt, 42-FW1.4opt, 및 43-FW1.4opt;

[0070]

(y) 상기 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III은 서열 FW1.4gen (서열번호 4)의 변이로 얻을 수 있는 서열과 하나 이상의 위치 15, 22, 48, 57, 74, 87, 88, 90, 92, 95, 97 및 99 (AHo 번호매김)에서 상이하고; 또는

[0071]

(z) 상기 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III은 서열번호 8을 가진 인간 V_K 서열에서의 각 부위에 비하여 5 개 이하의 변이, 특히 다섯 미만, 넷 미만, 셋 미만, 특히 서열번호 8을 가진 인간 V_K 서열에 비해 하나 이하의 변이를 포함하는 것을 조건으로 하는 항체 VL 도메인에 관한 것이다.

[0072]

본 발명의 맥락에서, 클론 375-FW1.4opt, 435-FW1.4opt, 509-FW1.4opt, 511-FW1.4opt, 534-FW1.4opt, 567-FW1.4opt, 578-FW1.4opt, 1-FW1.4opt, 8-FW1.4opt, 15-FW1.4opt, 19-FW1.4opt, 34-FW1.4opt, 35-FW1.4opt, 42-FW1.4opt, 및 43-FW1.4opt은 Borras 등 (상기 인용)에 기재된 목록을 참조한다. 이러한 클론들은 VL 도메인

FW1.4gen (서열번호 4)의 변이체들로서, 표 5에서 나타난 바와 같이, 상기 VL 기본구조 부위들의 특정 위치에서 FW1.4gen (서열번호 4)의 것과 상이하다.

[0073] 특정 구체예에서, 상기 기본구조 부위 IV는 FGQGTLTQLG (서열번호 15)이 아니다.

[0074] 본 발명의 맥락에서, 용어 "항체"는 "면역글로불린" (Ig)과 동의어로서 사용되며, 이는 IgG, IgM, IgB, IgA, 또는 IgD 류 (또는 이의 아류)에 속하는 단백질로서 정의되고 통상적으로 공지된 모든 항체들 및 이의 기능적 단편들을 포함한다. 항체/면역글로불린의 "기능적 단편물"은 항원-결합 부위를 가지는 항체/면역글로불린의 단편들 (예, IgG의 가변부위)로서 정의된다. 항체의 "항원 결합 부위"는 일반적으로 항체의 하나 이상의 초가변부위(들), 예, CDR-1, -2, 및/또는 -3 부위에서 발견되며; 그러나, 상기 가변 "기본구조" 부위는 또한 CDR들에 대한 골격을 제공함으로써와 같이, 항원 결합에 중요한 역할을 할 수 있다.

[0075] 본 발명의 맥락에서, 별달리 언급되지 않는 한 Honegger & Pluckthun에 의해 제시된 번호매김 체계를 사용한다 (Honegger & Pluckthun, J. Mol. Biol. 309 (2001) 657-670). 또한, 하기 잔기들은 CDR 부위들로 정의된다: CDR-L1: L24-L42; CDR-L2: L58-L72; CDR-L3: L107-L138; CDR-H1: H27-H42; CDR-H2: H57-H76; CDR-H3: H109-H138. 바람직하게, 상기 "항원-결합 부위"는 적어도 가변 경쇄 (VL)의 아미노산 잔기 4 내지 149 및 가변 중쇄 (VH)의 아미노산 잔기 5 내지 144, 더욱 바람직하게는 VL의 아미노산 잔기 3 내지 149 및 VH의 아미노산 잔기 4 내지 146, 및 특히 바람직한 것은 온전한 VL 및 VH 사슬들이다 (VL의 아미노산 위치 1 내지 149 및 VH의 아미노산 위치 1 내지 149; 도 2에 따른 번호매김). 상기 기본구조 및 CDR 부위들은 도 2에 표시되어 있다. 본 발명에 사용되는 면역글로불린들의 바람직한 류는 IgG이다. 본 발명의 "기능적 단편물들"은 F(ab')₂ 단편물, Fab 단편물 및 scFv의 도메인을 포함한다. F(ab')₂ 또는 Fab는 CH1과 CL 도메인들 사이에 발생하는 분자간 디설파이드 상호작용을 최소화하거나 완전히 제거하도록 조작될 수 있다. 본 발명의 항체들 또는 이의 기능적 단편물들은 아래에서 더 설명되는 바와 같이 이중 또는 다중 기능성 작제물의 부분일 수 있다.

[0076] 본 발명의 맥락에서, 용어 "V_κ" 및 "V_λ"는 서열 일치성 및 유사성에 따라 분류되는 항체 경쇄 서열들의 군들을 지칭한다. 예를 들어 BLOSUM (Henikoff, S. & Henikoff, J. G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 10915-10919)와 같은 유사성 검색 매트릭스를 사용하여 서열 유사성을 결정하는 방법, 및 유사성에 따라 서열들을 분류하는 방법은 당해 분야의 통상적인 기술자에게 공지되어 있다. V_κ 및 V_λ 둘 다의 경우, 상이한 아족들이 동정될 수 있다 (참조, 예를 들어, Knappik, 상기 인용, V_κ를 V_κ1 내지 V_κ4로 및 V_λ를 V_λ1 내지 V_λ3으로 분류).

[0077] 본 발명의 맥락에서, 용어 "하기 클론 목록에서 나타난 바와 같이 상기 기본구조 부위들의 서열로부터의 순열에 의해 얻을 수 있는 서열..."는 (i) 상기 목록 (참조, Borras, 상기 인용)에 포함된 모든 서열에서의 주어진 위치에 존재하는 아미노산 잔기 또는 (ii) Borras (Borras, 상기 인용)에서 최적화된 위치의 경우, 상기 서열들에서 다양화된 위치의 적어도 하나 (Borras (Borras, 상기 인용)에서 위치 15, 22, 40, 49, 58, 69, 70, 72, 74, 77, 79, 및 81; AHo 위치 15, 22, 48, 57, 74, 87, 88, 90, 92, 95, 97 및 99에 상응)에서 존재하는 아미노산 잔기 중 임의의 하나를 사용함으로써 창출될 수 있는 서열들을 지칭한다.

[0078] 본 발명의 일 구체예에서, 기본구조 부위 III 내의 위치 AHo101 (Honegger and Pluckthun 의 번호매김 체계에 따른 위치 101)에서의 아미노산 잔기는 인간 V_λ 콘센서스 서열의 그 위치에 있는 아미노산 잔기이고, 구체적으로 상기 아미노산 잔기는 페닐알라닌과 상이하고, 더욱 구체적으로 상기 아미노산 잔기는 글루탐산이다.

[0079] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 V_κ 기본구조 부위 I 내지 III은 V_κ1, V_κ2, V_κ3, 및 V_κ4으로부터 선택된 V_κ 도메인 아족, 특히 V_κ1 족에 속한다.

[0080] 본 발명의 맥락에서, 상기 V_κ 도메인 아족들은 서열 번호 23 내지 26에 나타난 콘센서스 서열들에 의해 표시된다. 주어진 항체 가변 경쇄 도메인이 V_κ 도메인 아족에 속하는 것으로 간주되는 것은, 위에서 기재된 방법들을 사용할 때, 상기 V_κ 도메인 아족과 서열 유사성을 최고로 나타내는 경우이다.

[0081] 특정 구체예에서, 상기 V_κ 기본구조 부위 I 내지 III은 (a) 가장 근접한 인간 생식 계열 서열, 또는 (b) 서열 번호 23 내지 26, 특히 서열번호 23을 가진 상기 콘센서스 서열들 중 하나에 비하여 5개 이하의 변이, 특히 다섯 미만, 넷 미만, 셋 미만의 변이; 특히 (a) 가장 근접한 인간 생식 계열 서열, 또는 (b) 서열 번호 23 내지 26, 특히 서열번호 23을 가지는 상기 콘센서스 서열들 중 하나에 비해 오직 하나 이하의 변이를 포함한다.

[0082] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 V_κ 기본구조 부위 I 내지 III은 서열번호 2 및 서열번호 8로부터 선택된 서열, 특히 서열번호 8에 존재하는 기본구조 부위들이다.

- [0083] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 CDR 도메인들 CDR1, CDR2 및 CDR3은 (i) 관심의 항원에 대한 특이성을 가지는 부모 비-인간 항체로부터, 특히 부모 토끼 항체 또는 부모 설치류 항체, 특히 부모 마우스 또는 래트 항체로부터 출처된 CDR 도메인들 CDR1, CDR2 및 CDR3; (ii) V_K 도메인을 포함하는 부모 인간 또는 인간화된 항체, 특히 치료 승인을 받았거나 상업화된 항체로부터 출처된 CDR 도메인들 CDR1, CDR2 및 CDR3; (iii) (i) 또는 (ii)에 따른 CDR 도메인들, 특히 (i) 또는 (ii)에 따른 CDR 도메인들의 하나 이상을 최적화하여 얻은 CDR 도메인들로부터 유도된 CDR 도메인들 CDR1, CDR2 및 CDR3; 및 (iv) (i), (ii) 및/또는 (iii)에 따른 CDR 도메인들의 하나 이상에 의해 치환될 CDR 도메인으로부터 독립적으로 선택된다.
- [0084] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 기본구조 부위 I 내지 IV들은 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 11, 서열번호 12, 및 서열번호 13로부터 선택되는 서열에서 나타난 바와 같이 기본 구조 부위들의 조합이다.
- [0085] 제2관점에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체 VL 도메인을 포함하는 단리된 항체 또는 이의 기능적 단편물에 관한 것이다.
- [0086] 특정 구체예에서, 상기 항체 VL 도메인은 관심의 타겟에 결합 특이성을 가진다.
- [0087] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 결합분자가 예를 들어 인간 CD3와 같은 타겟 "에/에 대해 특이적", "을 특이적으로 인식한다", 또는 "과 특이적으로 결합한다"는 것은, 그러한 결합 분자가 그러한 타겟 생체분자 및 하나 이상의 참조 분자(들) 사이에 구별할 수 있을 때에 그러한 것이고, 이는 결합 특이성이 절대적인 것이 아니고 상대적 특성이기 때문이다. 이의 가장 일반적인 형태에서 (및 어떠한 정의된 참조물이 언급되지 않았을 때), "특이적 결합"은, 예를 들어, 당해 분야에 공지된 특이성 분석 방법에 따라 결정될 때, 관심의 타겟 생체분자와 무관한 생체분자 사이를 구별하는 결합분자의 능력을 지칭한다. 그러한 방법은 웨스턴 블랏, ELISA, RIA, ECL, IRMA 시험 및 웹타이드 스캔을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 표준 ELISA 분석법이 수행될 수 있다. 점수화는 표준 색깔 전개 (예, 호스라디쉬 페록사이드를 가진 이차 항체 및 과산화수소와 테트라메틸 벤자린 반응)에 의해 수행될 수 있다. 특정 웰에서의 반응은, 예를 들어, 450 nm에서의 광학 밀도에 의해 점수화된다. 전형적 배경 (= 음성 반응)은 약 0.1 OD일 수 있고; 전형적 양성 반응은 약 1 OD일 수 있다. 이것은 양성 및 음성 점수 간의 비율이 10-배 이상 일 수 있다는 것을 의미한다. 전형적으로, 결합 특이성의 결정은 단일 참조 생체 분자가 아니라, 우유 분말, BSA, 트랜스페린 등과 같은 3 내지 5 가지 무관한 생체분자의 일군들을 사용하여 수행된다.
- [0088] 본 발명의 맥락에서, 용어 "약" 또는 "대략"은 주어진 값 또는 범위의 90% 내지 110%를 의미한다.
- [0089] 그러나, "특이적 결합"은 또한 타겟 생체 분자 및 참조 점으로서 사용되는 하나 이상의 밀접하게 관련된 생체 분자(들) 사이를 구별할 수 있는 결합 분자의 능력을 지칭할 수 있다. 추가적으로, "특이적 결합"은 타겟 항원의 상이한 부분, 예, 타겟 생체 분자의 상이한 도메인들, 부위들 또는 에피토프들 사이 또는 타겟 생체 분자의 하나 이상의 주요 아미노산 잔기들 또는 아미노산 잔기들의 일정 범위를 사이를 구별할 수 있는 결합 분자의 능력에 관한 것일 수 있다.
- [0090] 본 발명의 맥락에서, 용어 "에피토프"는 상기 타겟 생체 분자 및 결합 분자 간에 특이적 결합에 요구되는 주어진 타겟 생체 분자의 부분을 지칭한다. 에피토프는 연속적, 예를 들어, 상기 타겟 생체 분자 내에 존재하는 인접 구조적 요소에 의해 형성될 수 있거나, 또는 불연속적, 예를 들어, 체액에서와 같이 상기 타겟 생체 분자가 채용하고 있는 삼차원적 구조에서 근접된 것 내에서가 아닌, 타겟으로서의 단백질의 아미노산 서열 내와 같이, 타겟 생체 분자의 일차 서열에서 상이한 위치에 있는 구조적 요소들에 의해 형성될 수 있다.
- [0091] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 단리된 항체 또는 이의 기능적 단편물은: IgG 항체, Fab 및 scFv 단편물로부터 선택된다.
- [0092] 본 발명의 다른 특정 구체예에서, 상기 단리된 항체 또는 이의 기능적 단편물은 단체 다이아바디 (scDb), 텐덤 scDb (Tandab), 선형 이량성 scDb (LD-scDb), 원형 이량성 scDb (CD-scDb), 이중특이성 T-세포 인게이저 (engager) (BiTE; 텐덤 디(di)-scFv), 텐덤 트리-scFv, 트리(아)바디, 이중특이성 Fab2, 디-미니항체, 테트라바디, scFv-Fc-scFv 융합체, 디-다이아바디, DVD-Ig, IgG-scFab, scFab-dsscFv, Fv2-Fc, bsAb (경쇄의 C-말단에 연결된 scFv), Bs1Ab (경쇄의 N-말단에 연결된 scFv), Bs2Ab (중쇄의 N-말단에 연결된 scFv), Bs3Ab (중쇄의 C-말단에 연결된 scFv), Ts1Ab (중쇄 및 경쇄 둘 다의 N-말단에 연결된 scFv), Ts2Ab (중쇄의 C-말단에 연결된 dsscFv), 및 노브인투홀(Knob-into-Holes) (KiHs) (KiH 기술에 의해 제조된 이중특이성 IgG)와 같은 IgG-scFv 융합체, 및 듀오바디 (Duobody 기술로 제조된 이중특이성 IgG들)로 구성되는 군으로부터 선택된 항체 형식의 이중 특이성 작제물이다. 특히 본 발명에 적절한 것은 단체 다이아바디 (scDb)이고, 특히, 이중특이성 단량

체성 scDb이다.

[0093] 상기 이중특이성 scDb, 특히, 이중특이성 단량체성 scDb는, 특히 링커 L1, L2 및 L3에 의해 VHA-L1-VLB-L2-VHB-L3-VLA, VHA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VLA, VLA-L1-VLB-L2-VHB-L3-VHA, VLA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VHA, VHB-L1-VLA-L2-VHA-L3-VLB, VHB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VLB, VLB-L1-VLA-L2-VHA-L3-VHB 또는 VLB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VHB의 순서로 연결된 두 개의 가변 중쇄 도메인 (VH) 또는 이의 단편물 및 두 개의 가변 경쇄 도메인 (VL) 또는 이의 단편물을 포함하며, 여기서 상기 VLA 및 VHA 도메인들은 제1항원에 대한 항원 경합 부위를 같이 형성하고 및 VLB 및 VHB는 제2 항원에 대한 항원 결합 부위를 같이 형성한다.

[0094] 상기 링커 L1은 구체적으로 2-10개 아미노산들, 더 구체적으로 3-7개 아미노산, 및 가장 구체적으로 5개 아미노산들의 웨타이드이고, 및 링커 L3는 구체적으로 1-10개 아미노산들, 더 구체적으로 2-7 개 아미노산들, 및 가장 구체적으로 5개 아미노산들의 웨타이드이다. 상기 중간 링커 L2는 구체적으로 10-40 개 아미노산들, 더 구체적으로 15-30 아미노산들, 및 가장 구체적으로 20-25 아미노산들의 웨타이드이다.

[0095] 본 발명의 이중특이성 작제물들은 당해 분야에 공지된 임의의 편리한 항체 제조 방법을 사용하여 제조될 수 있다 (참조, 예, 이중 특이성 작제물의 제조에 대하여 Fischer, N. & Leger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14; 이중특이성 다이아바디들 및 탠덤 scFv들에 대하여 Hornig, N. & Farber-Schwarz, A., Methods Mol. Biol. 907 (2012) 713-727, 및 WO 99/57150). 본 발명의 이중특이성 작제물의 제조하기 위한 적절한 방법들의 특정 예는, 특히, Genmab (참조 Labrijn 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110 (2013) 5145-5150) 및 Merus (참조 de Kruif 등, Biotechnol. Bioeng. 106 (2010) 741-750) 기술을 포함한다. 기능성 항체 Fc 부분을 포함하는 이중 특이성 항체들의 제조 방법은 또한 당해 분야에 공지되어 있다 (참조, 예, Zhu 등, Cancer Lett. 86 (1994) 127-134); 및 Suresh 등, Methods Enzymol. 121 (1986) 210-228).

[0096] 이러한 방법들은 전형적으로 하이브리도마 기술을 이용하여 골수종 세포를, 원하는 항원으로 면역화시킨 마우스 마우스의 비장세포와 융합함으로써 (참조, 예, Yokoyama 등, Curr. Protoc. Immunol. Chapter 2, Unit 2.5, 2006) 또는 재조합 항체 조작 (레퍼토리 클로닝 또는 파지 디스플레이 /이스트 디스플레이) (참조, 예, Chames & Baty, FEMS Microbiol. Letters 189 (2000) 1-8), 및 두 개 단일클론 항체들의 항원-결합 도메인들 또는 이의 단편물이나 부분체들의 조합하여 공지된 문자 클로닝 기술을 사용하여 이중특이성 작제물을 생성하는 단일 클론 항체들을 생성하는 것을 포함한다.

[0097] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 단리된 항체 또는 이의 기능적 단편물은 VH1A, VH1B, VH2, VH3, VH4, VH5, 및 VH6으로부터 선택된 VH 도메인 아족, 특히 VH 도메인 아족 VH3 또는 VH4, 특히 VH 도메인 아족 VH3에 속한 VH 도메인을 포함한다.

[0098] 본 발명의 맥락에서, 상기 VH 도메인 아족들은 서열 번호 27 내지 33에서 나타난 콘센서스 서열들에 의해 표시된다. 주어진 항체 가변 중쇄 도메인이 VH 도메인 아족에 속하는 것으로 간주되는 것은, 위에서 기재된 방법을 사용할 때 상기 VH 도메인과 서열 유사성이 최고로 보이는 경우이다.

[0099] 특정 구체예에서, 상기 VH 도메인은 (a) 가장 근접한 인간 생식 계열 서열, 또는 (b) 서열 번호 28 내지 34, 특히 서열 번호 30을 가진 콘센서스 서열들 중 하나에 비해 5 개 이하; 특히 5 미만, 4 미만, 3 미만의 변이, 특히 (a) 가장 근접한 인간 생식 계열 서열, 또는 (b) 서열 번호 27 내지 33, 특히 서열 번호 30을 가진 콘센서스 서열들 중 하나와 비교하여 오직 하나 이하의 변이를 포함한다.

[0100] 제3의 관점에서, 본 발명은 본 발명의 단리된 항체 또는 이의 기능적 단편물, 및 조건적으로 약학적 허용 담체 및/또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0101] 제4의 관점에서, 본 발명은 본 발명의 임의의 하나의 항체 VL 도메인, 또는 본 발명의 단리된 항체 또는 이의 기능적 단편물을 암호화하는 핵산 서열 또는 핵산 서열들의 일 군, 및/또는 본 발명의 제9관점에 따른 방법에 의해 얻을 수 있는 핵산 서열 또는 핵산 서열들에 관한 것이다.

[0102] 제5의 관점에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 서열 또는 핵산 서열들의 일 군을 포함하는 벡터 또는 벡터들의 일 군에 관한 것이다.

[0103] 제6의 관점에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 서열 또는 핵산 서열들의 일 군, 또는 본 발명의 벡터 또는 벡터들의 일 군을 포함하는 숙주 세포, 특히 발현 숙주 세포에 관한 것이다.

[0104] 제7의 관점에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 서열 또는 핵산 서열들의 일 군, 또는 본 발명의 벡터 또는 벡터들의 일 군, 또는 본 발명의 숙주 세포, 특히 발현 숙주 세포를 발현시키는 단계를 포함하는, 본 발명의 임의의

하나의 항체 VL 도메인, 또는 본 발명의 단리된 항체 또는 이의 기능적 단편물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0105] 제8의 관점에서, 본 발명은

a) 토끼 또는 설치류, 특히 마우스나 래트를 관심의 항원으로 면역화시키는 단계;

b) 적어도 하나의 관심의 항체를 분리하는 단계; 및

c) 상기 적어도 하나의 관심의 항체의 VL CDR 부위를 본 발명에 따른 항체 VL 도메인을 암호화하는 핵산 서열 내로 클로닝하는 단계를 포함하는, 인간화된 토끼 항체 또는 설치류 항체, 특히 마우스 또는 래트 항체를 생성하는 방법에 관한 것이다.

[0109] 특정 구체예에서, 인간화된 토끼 항체를 생성할 때 상기 항체 VL 도메인내의 상기 기본구조 부위 IV는 FGQGTLTVLG (서열번호 15)이 아니다.

[0110] 특정 구체예에서, 본 발명의 방법은:

aa. 형광 활성화 세포 분류 (fluorescence activated cell-sorting)를 사용하여 관심의 항원과 반응하는 친화도 성숙된 메모리 B-세포들을 클론성 분리하는 단계;

ab. 단일 B 세포들을 단일 B 세포 클론들의 불멸화를 요구하지 않는 공-배양 시스템에서 배양하는 단계;

ac. B 세포 배양 상등액을 세포-기반 ELISA로 스크리닝하여 상기 관심의 항원에 결합하는 적어도 하나의 항체를 동정하는 단계; 및/또는

ad. 상기 적어도 하나의 항체의 VH CDR 부위들을 인간 항체 VH 도메인을 암호화하는 핵산 서열로 클로닝 하는 단계 중 하나 이상의 단계를 더 포함한다.

[0115] 토끼 항체들 또는 설치류 항체들의 인간화 방법은 당해 분야의 통상적 기술자에게 공지되어 있다 (참조, 예를 들어, Borras, 상기 인용; Rader 등, The FASEB Journal, express article 10.1096/fj.02-0281fje, 온라인 공개 2002년 10월 18일; Yu 등 (2010) A Humanized Anti-VEGF Rabbit Monoclonal Antibody Inhibits Angiogenesis and Blocks Tumor Growth in Xenograft Models. PLoS ONE 5(2): e9072. doi:10.1371/journal.pone.0009072). 토끼 또는 설치류의 면역화는 단백질과 같은 관심의 항원을 사용하여, 또는 웨타이드 또는 단백질 항원의 경우, 핵산, 예 관심의 웨타이드 또는 단백질을 암호화하는 플라즈미드로 토끼를 DNA 면역화함으로써 수행될 수 있다.

[0116] 제9의 관점에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체 VL 도메인을 암호화하는 핵산 서열, 또는 본 발명에 따른 단리된 항체 또는 이의 기능적 단편물을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열들을 생성하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은, (i) 인간 V κ 기본구조 부위 I 내지 III; (ii) CDR 도메인들 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 (iii) 기본구조 부위 IV로서,

[0117] a. 기본구조 부위 IV에 대한 인간 V λ 생식 계열 서열, 특히 서열번호 16 내지 22의 목록으로부터 선택된 V λ 생식 계열 서열;

[0118] b. (bi) 기본구조 부위 IV에 대한 인간 V λ 생식 계열 서열들로부터 나온 콘센서스 V λ 서열, 특히 서열번호 17; 또는 (bii) 기본구조 부위 IV에 대한 재배열된 인간 V λ 서열들로부터 나온 콘센서스 V λ 서열, 특히 서열 번호 16 및 17의 목록으로부터 선택된 V λ 콘센서스 서열인 V λ -기반 서열; 및

[0119] c. 기본구조 부위 IV에 대한 가장 근접한 인간 V λ 생식 계열 서열에 비해, 하나 또는 두 개 변이, 특히 하나의 변이를 가지는 V λ -기반 서열로부터 선택되는 기본구조 부위 IV를 암호화하는 핵산 서열들을 특히 하기 방법 중 하나를 사용하여 하나 이상의 단계로 조합하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다:

[0120] i. 핵산 작제물에서, 특히 인간 또는 인간화된 V κ 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터에서, 상기 V κ 기본구조 부위 IV를

[0121] a. 기본구조 부위 IV에 대한 인간 V λ 생식 계열 서열, 특히 서열번호 16 내지 22의 목록으로부터 선택된 V λ 생식 계열 서열;

[0122] b. (bi) 기본구조 부위 IV에 대한 인간 V λ 생식 계열 서열들로부터 나온 콘센서스 V λ 서열, 특히 서열번호 17; 또는 (bii) 기본구조 부위 IV에 대한 재배열된 인간 V λ 서열들로부터 나온 콘센서스 V λ 서열, 특히 서열 번호 16 및 17의 목록으로부터 선택된 V λ 콘센서스 서열인 V λ -기반 서열; 및

- [0123] c. 기본구조 부위 IV에 대한 가장 근접한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열에 비해, 하나 또는 두 개 변이, 특히 하나의 변이를 가지는 $V\lambda$ -기반 서열로부터 선택되는 기본구조 부위 IV로 치환하는 방법;
- [0124] ii. 기본구조 부위 IV를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물, 특히 재조합 벡터 내로, (i) 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III; 및 (ii) CDR 도메인들 CDR1, CDR2 및 CDR3들을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열들을 삽입하는 방법으로서, 상기 기본구조 부위 IV는
- [0125] a. 기본구조 부위 IV에 대한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열, 특히 서열번호 16 내지 22의 목록으로부터 선택된 $V\lambda$ 생식 계열 서열;
- [0126] b. (bi) 기본구조 부위 IV에 대한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열들로부터 나온 콘센서스 $V\lambda$ 서열, 특히 서열번호 17; 또는 (bii) 기본구조 부위 IV에 대한 재배열된 인간 $V\lambda$ 서열들로부터 나온 콘센서스 $V\lambda$ 서열, 특히 서열 번호 16 및 17의 목록으로부터 선택된 $V\lambda$ 콘센서스 서열인 $V\lambda$ -기반 서열; 및
- [0127] c. 기본구조 부위 IV에 대한 가장 근접한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열에 비해, 하나 또는 두 개 변이, 특히 하나의 변이를 가지는 $V\lambda$ -기반 서열로부터 선택되는 방법;
- [0128] iii. 인간 또는 인간화된 V_K 도메인을 암호화하는 핵산 서열 내에서 기본구조 부위 IV를 암호화하는 상기 핵산 서열을 변이시켜
- [0129] a. 기본구조 부위 IV에 대한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열, 특히 서열번호 16 내지 22의 목록으로부터 선택된 $V\lambda$ 생식 계열 서열;
- [0130] b. (bi) 기본구조 부위 IV에 대한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열들로부터 나온 콘센서스 $V\lambda$ 서열, 특히 서열번호 17; 또는 (bii) 기본구조 부위 IV에 대한 재배열된 인간 $V\lambda$ 서열들로부터 나온 콘센서스 $V\lambda$ 서열, 특히 서열 번호 16 및 17의 목록으로부터 선택된 $V\lambda$ 콘센서스 서열인 $V\lambda$ -기반 서열; 및
- [0131] c. 기본구조 부위 IV에 대한 가장 근접한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열에 비해, 하나 또는 두 개 변이, 특히 하나의 변이를 가지는 $V\lambda$ -기반 서열로부터 선택된 기본구조 부위 IV를 생성하는 방법; 또는
- [0132] iv. 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III, CDR 도메인 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 기본구조 부위 IV를 포함하는 경쇄 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물, 특히 재조합 벡터에서, 상기 CDR 도메인들을 암호화하는 상기 핵산 서열들 중 하나 이상을 관심의 항체로부터 나온 상응하는 CDR 도메인(들)을 암호화하는 핵산 서열(들)로 하나 이상의 단계로 치환하는 방법으로서, 상기 기본구조 부위 IV는
- [0133] a. 기본구조 부위 IV에 대한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열, 특히 서열번호 16 내지 22의 목록으로부터 선택된 $V\lambda$ 생식 계열 서열;
- [0134] b. (bi) 기본구조 부위 IV에 대한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열들로부터 나온 콘센서스 $V\lambda$ 서열, 특히 서열번호 17; 또는 (bii) 기본구조 부위 IV에 대한 재배열된 인간 $V\lambda$ 서열들로부터 나온 콘센서스 $V\lambda$ 서열, 특히 서열 번호 16 및 17의 목록으로부터 선택된 $V\lambda$ 콘센서스 서열인 $V\lambda$ -기반 서열; 및
- [0135] c. 기본구조 부위 IV에 대한 가장 근접한 인간 $V\lambda$ 생식 계열 서열에 비해, 하나 또는 두 개 변이, 특히 하나의 변이를 가지는 $V\lambda$ -기반 서열로부터 선택되는 방법.
- [0136] 본 발명의 방법들의 특정 구체예에서, (b) 또는 (c)의 기본구조 부위 IV는 서열 FGQGTTKLTVLG (서열번호 15)을 가지는 경우
- [0137] (w) 상기 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III은 하기 클론 목록에서 나타난 바와 같이 상기 기본구조 부위들과는 상이하고: FW1.4gen (서열번호 4), 375-FW1.4opt, 435-FW1.4opt, 509-FW1.4opt, 511-FW1.4opt, 534-FW1.4opt, 567-FW1.4opt, 578-FW1.4opt, 1-FW1.4opt, 8-FW1.4opt, 15-FW1.4opt, 19-FW1.4opt, 34-FW1.4opt, 35-FW1.4opt, 42-FW1.4opt, 및 43-FW1.4opt;
- [0138] (x) 상기 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III은 하기 클론 목록에서 나타난 바와 같이 상기 기본구조 부위들의 서열로부터의 순열에 의해 얻을 수 있는 서열과는 상이하고: FW1.4gen (서열번호 4), 375-FW1.4opt, 435-FW1.4opt, 509-FW1.4opt, 511-FW1.4opt, 534-FW1.4opt, 567-FW1.4opt, 578-FW1.4opt, 1-FW1.4opt, 8-FW1.4opt, 15-FW1.4opt, 19-FW1.4opt, 34-FW1.4opt, 35-FW1.4opt, 42-FW1.4opt, 및 43-FW1.4opt;
- [0139] (y) 상기 인간 V_K 기본구조 부위 I 내지 III은 서열 FW1.4gen (서열번호 4)의 변이로 얻을 수 있는 서열과 하나 이상의 위치 15, 22, 48, 57, 74, 87, 88, 90, 92, 95, 97 및 99 (AHo 번호매김)에서 상이하고; 또는

[0140] (z) 상기 인간 V_{κ} 기본구조 부위 I 내지 III은 서열번호 8을 가진 인간 V_{κ} 서열에서의 각 부위에 비하여 5 개 이하의 변이, 특히 다섯 미만, 넷 미만, 셋 미만, 특히 서열번호 8을 가진 인간 V_{κ} 서열에 비해 하나 이하의 변이를 포함한다.

[0141] 특정 구체예에서, 상기 CDR 도메인(들) 중 하나 이상이 토끼 유래인 경우, 상기 기본구조 부위 IV는 FGQGKLTQLG (서열번호 15)이 아니다.

[0143] 실시예

[0144] 하기 실시예들은 범위의 제한 없이 본 발명을 설명한다.

[0146] 실시예 1: 예증적 토끼 CDR들을 가진 scFv 작제물들의 제작

[0147] 언폴딩 및 응집 경향에 대하여 향상된 안정을 나타내는 가변 도메인을 동정하는 것이 우리의 목적이었다. 또한, 이러한 도메인들은 인간 생식 계열 래퍼토리에 가능한 한 가까워서 인간에서의 면역 반응을 이끌어내는 위험을 최소화하여야 한다. 놀랍게도, 본 발명자들은 VH3 콘센서스 기본구조를 콘센서스 $V_{\kappa}1$ 에서 출처된 기본구조 부위 I 내지 III 및 상이한 V_{λ} 도메인들로부터 나온 기본구조 부위 IV (참조 도 1)로 구성된 키메릭 VL 도메인과 조합하면 우수한 생물리적 특성의 scFv 작제물을 결과하게 되었다는 것을 발견하였다.

[0148] 본 발명에 대한 출발점은 인간 VH3 및 $V_{\kappa}1$ 콘센서스 기본구조 Hu-4D5이고 이는 1992년에 이미 공개되었다 (Carter, 상기 인용). 본 발명자들은 예증적 토끼 항-TNF α 항체의 CDR들 (WO/2009/155723)을 설명된 바와 같이, (Rader 2000, 상기 인용; WO 2005/016950; WO 2008/004834) hu-4D5 가변 도메인에 접합하였다. 상기 인간화된 가변 도메인들을 상기 인용된 Borras에 의해 설명된 바와 같이, 유연한 웹타이드 링커에 의해 연결시켜 단쇄 Fv (scFv) 단편물 (scFv1)을 얻었다.

[0149] hu-4D5에 더하여, 다른 공개된 기본구조물, 즉 기본구조 FW1.4gen (scFv2)을 시험하였고, 이의 많은 생물리적 데이터는 공개되어 있다 (Borras, 상기 인용). 기본구조 FW1.4gen은 hu-4D5와 비교할 때, 수 개의 아미노산 치환이 있고 따라서, 인간 콘센서스에 이탈되어 있다. VH에서, 그러한 차이들은 아마도 친화성 성숙으로부터 결과된 것으로, 이는 한편으로 생식계열 서열들이라기보다는 체세포 과변이를 겪은 성숙한 항체들의 서열을 포함하는, 인간 cDNA 라이브러리로부터 유래되기 때문이고 및 다른 한편으로는 수개의 변이들이 토끼 CDR들을 수용할 목적으로 저자들에 의해 유도되었기 때문이다. VL에서, 어떠한 또는 오직 수 개 변이만이 일부러 도입되었고, 이는 대부분의 차이가 생식 계열 서열이 사용된 체세포 과변이로부터 결과하거나 또는 아마도 라이브러리 클로닝 과정에서 초래한 인공물이라는 것을 제시하고 있다.

[0150] hu-4D5 또는 FW1.4gen이 기반한 두 개의 작제물 (scFv1 및 scFv2, 각각)의 열적 언폴딩의 실험적으로 결정한 결과 scFv1의 우수한 능력이 나타났고, 그 기본구조는 인간 콘센서스 서열과 더 높은 유사성을 가져서, 문헌과 일치하였다. 놀랍게도, 이러한 우수한 안정성은 스트레스 조건하에서 저장하는 동안 단분산에 대하여는 더 높은 안정성으로 나타나지 못하였다 (참조 표 4). 반대로, 여기서 scFv2는 더 높은 안정성을 보였다.

[0151] 안정성에서 관측된 차이들을 합리화하기 위한 노력의 일환으로, 상기 기본구조들에서의 서열 변동을 더 면밀히 조사하였다. FW1.4gen (scFv3)에서 $V_{\kappa}1$ 의 콘센서스 서열로 전환될 때, 스트레스 안정성 연구에 의하면, 단량체 성 상태에서 안정성을 손상하게 하는, 기본구조 IV 부위에서의 연속된 다섯개 아미노산들을 동정하였다 (참조 도 3).

[0152] $V_{\kappa}1$ 의 경우에서 상기 콘센서스 서열은, 상기 각각의 가변 도메인의 안정성에 대하여 가장 선호하는 해결책을 제시할 것이라는 통상의 이해와는 반대되기 때문에 이러한 발견은 매우 이례적인 것이었다. 이러한 발견에 기반하여, 본 발명자들은 상기 모델 시스템에서 도메인 안정성의 결정자들을 더 연구하였다. FW1.4의 기본구조 부위 내의 상기 5 개 아미노산들이 κ -타입이라기 보다는 λ -타입 기본구조 부위 IV 서열을 닮은 연결 세그먼트 (기본구조 부위 IV)를 만들기 때문에, 본 발명자들은 λ -타입 연결 세그먼트들이 $V_{\kappa}1$ -VH3 가변 도메인들의 안정성에 대하여 κ -타입 연결 세그먼트보다 더 선호될 수 있다는 것으로 가설을 세웠다.

[0153] 실제, 본 발명자들은 $V_{\kappa}1$ 기본구조 부위 IV를 상응하는 V_{λ} 기본구조 부위 (scFv5, scFv9)로 전체 치환하게 되면 scFv1 또는 scFv2에 비하여 열적 언폴딩의 중간점 (표 3) 및 스트레스 안정성 연구 중의 단량체 상태의 안정성 (표 4) 두 가지 면에서 유리한 안정성 특성이 나타난다는 것을 발견하였다. 더욱이, 상이한 잘려진

(truncated) VL 기본구조 부위 IV 생식계열 모티프들을 VK1 콘센서스 기본구조 (scFv7, scFv10)의 배경으로 도입하게 되면 어떤 안정화 효과를 나타냈다. 중요하게는, VK1 기본구조 부위 IV를 VL 부위 IV로 전체 치환하는 것은, 모든 개별적 기본구조 부위들이 이러한 방식으로 생식계열과 또는 생식계열 콘센서스와 동일하게 남아 있기 때문에, 면역원성적이 될 더 낮은 잠재성을 가진다는 것이다.

[0154] 또한, 기본구조 부위 IV를 감싸는 것에 기여하게 되는 VK 및 VL 가변 도메인들의 구조적 모델들을 비교함으로써 기본구조 III 내의 위치 AHo101를 동정하였다 (도 4). 이러한 위치에서 VL 콘센서스 잔기를 도입하면 (scFv4, scFv6, scFv8) 열적 언폴딩 (표 3) 및 스트레스 안정성 (표 4)에서 도메인 안정성을 더 증가시켰다.

[0155] 요약하면, scFv 가변 도메인 작제물들의 맥락에서, 상이한 VL 생식계열 유전자들로부터 출처된 콘센서스 기본구조 부위들을 VK 서열의 기본구조 부위 I 내지 III과 조합함으로써 우수한 안정성 특성이 얻어진다는 것이 발견되었다. 이러한 인공적 및 키메릭 가변 도메인들의 안정성은 가변 경쇄 도메인의 기본구조 부위 III 내의 F101E (AHo 번호매김 체계), 즉 기본구조 부위 IV에 공간적으로 가까운 위치에 있는 아미노산을 개질함으로써 더 향상되었다.

[0156] 중요한 것은, 공개된 경우에 기반하여 (Schafer, Protein Engineering, Design & Selection 25 (2012) 485-505) 상기 가변 도메인들의 바람직한 특성들이 다른 항체 형태에도 또한 적용이 된다고 예상되는 것이다.

[0157] 예증적 토끼 결합체가 문헌 (WO 2009/155723)에서 동정되었고 및 이의 CDR들이 Borras 등 (Borras, 상기 인용)에 공개된 바와 같이 CDR 정의에 입각하여, 인간 콘센서스 VH3/VK1 기본구조의 각각의 가변 도메인들에 접합되었다 (Rader 2000, 상기 인용; WO/2005/016950; WO 2008/004834; US 8,293,235). 토끼 CDR들의 루프 접합을 위해, Honegger의 번호매김에 따른 (Honegger & Pluckthun, 상기 인용; 참조 도 2) 연속 서열체 CDR-L1 (L24-L42), CDR-L2 (L58-L72), CDR-L3 (L107-L138), CDR-H1 (H27-H42), CDR-H2 (H57-H76), CDR-H3 (H109-H138)을 인간 기본구조들로 옮겼다. 이러한 인간화된 가변 도메인들에 기반하여, VL 및 VH을 유연한 Gly4-Ser 링커로 결합하여 상기 scFv 작제물들을 생성하였고, 따라서 결과적으로 NH₂-VL-링커-VH-COOH의 형태를 만들었다.

[0158] 방법

[0159] 작제물 설계 및 제조

[0160] 상기 결과된 아미노산 서열을 처음부터 (de novo) 합성하였고 및 pET26b(+) 백본 (Novagen)에 기반한 *E. coli* 발현용에 적용된 발현 벡터 상에 클론하였다. 상기 발현 작제물을 *E. coli* 균주 BL12 (DE3) (Novagen)로 형질전환시키고 및 상기 세포들을 출발 배양물로서 2YT 배지 (Sambrook, J., 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual)에서 배양하였다. 발현 배양물을 접종하여 배플 플라스크내에서 37°C 및 200 rpm에서 배양하였다. 일단 OD600 nm가 1에 도달하면, IPTG를 0.5 mM의 최종 농도로 첨가하여 단백질 발현을 유도하였다. 밤새 발현시킨 후, 세포들을 4000 g에서 원심분리하여 수거하였다. 봉입체를 제조하기 위해, 세포 펠렛을 IB 재현탁 완충액 (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100)에 재현탁하였다. 세포 슬러리에 1 mM DTT, 0.1 mg/mL 리소자임, 10 mM 루펩틴, 100 μM PMSF 및 1 μM 웨스타틴을 보충하였다. 세포들을 냉동하면서 3 번 초음파 균질화시켜 분쇄하였다. 후속적으로, 0.01 mg/mL DNase를 첨가하고 균질물을 실온에서 20분간 항온 처리하였다. 봉입체들을 10,000 g 및 4°C에서 원심분리하여 침전시켰다. IB들을 IB 재현탁 완충액에 재현탁시키고 및 초음파처리하여 균질화 시킨 후 다시 원심분리하였다. IB 재현탁 완충액을 사용하여 총 최소 3번 세척한 후 IB 세척 완충액으로 2번 세척하여 최종 IB들을 얻었다.

[0161] 단백질 재풀딩의 경우, 상기 단리된 IB들을 습윤 IB들의 g 당 5 mL의 비율로 가용화 완충액 (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 6 M Gdn-HCl, 2 mM EDTA)에 재현탁하였다. 가용화물은 DTT를 최종 20 mM의 농도로 첨가할 때까지 실온에서 30분간 배양되었고 및 배양을 30 분간 더 수행하였다. 가용화가 완료된 후, 8500 g 및 4°C에서 10분간 원심분리하여 용액을 맑게 하였다. 상기 가용화된 단백질을 재풀딩 완충액 (일반적으로: 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 4.0 M 우레아, 5 mM 시스테인, 1 mM 시스틴)에 0.5 g/L의 최종 단백질 농도로 빠르게 희석시킴으로써 재풀딩하였다. 상기 재풀딩 반응물을 최소 14 시간 배양하였다. 결과된 단백질 용액을 농축하고 및 원래 완충액 (native buffer) (50 mM 구연산염-인산염 pH 6.4, 200 mM NaCl)로 디아플레이션 시킴으로써 완충액을 교환하였다. 재풀딩된 단백질을 적절한 레진 물질 (예, Superdex 75, GE Healthcare) 상에서 크기-배제 크로마토그래피하여 정제하였다. 분리된 단량체 분획물을 크기-배제 HPLC로 분석하고, 순도에 대하여는 SDS-PAGE로 및 단백질 함량에 대하여는 UV/Vis 분광분석으로 조사하였다. 단백질 농도를 요구되는 수준으로 조절하고 및 안정성 분석을 실시하였다.

[0162] 구조적 모델들의 비교

[0163] 가변 도메인 VL 카파 및 VL 람다의 삼차원 구조물을 PDB (PDB ID 1FVC 및 PDB ID 2A9M, 각각)에서 이용가능한 구조적 모델의 보기를 사용하여 비교하였다. VL 기본구조 부위 IV의 패킹을 분석한 결과 위치 147로부터 전방으로 난 측쇄 방향이 상이하다는 것이 밝혀졌다. 또한, 위치 101에서의 아미노산 측쇄 방향이 $V\kappa$ 및 $V\lambda$ 구조에서 다르다는 것을 밝혔다. 도 4에 나타난 바와 같이, 중앙 아미노산 (위치 101)의 상이한 패킹은 명백하다. $V\kappa$ 의 경우, 페닐알라닌 101은 상기 도메인으로 중앙으로 지향하나, 람다 가변 도메인에서, 위치 101에서의 글루타메이트는 용매에 노출되어 있고 및 V147 (화살표)는 소수성 중앙으로 위치하고 있다. 이러한 관측에 근거하여, 아미노산 교환체 F101E를 함유하는 가변도메인들을 생성하여 (서열번호 8, 11 및 13) 상기 $V\lambda$ 기본구조 IV의 $V\lambda$ 특이적 패킹을 수용하였다.

실시예 2: scFv 작제물들에 대한 생물리적 데이터의 결정

[0167] 열적 언풀딩

[0168] 시험된 작제물들의 열적 언풀딩에 대한 전이의 중간점을 기본적으로 Niesen (Niesen 등, Nat Protoc. 2 (2007) 2212-21)에 의해 설명된 바와 같이 시차 주사 형광측정법 (Differential Scanning Fluorimetry (DSF))을 사용하여 결정하였다. DSF 분석은 qPCR 기기 (예. MX3005p, Agilent Technologies)에서 수행되었다. 샘플들을 최종 농도 5x SYPRO 오렌지를 함유하는 총부피 25 μ L의 완충액 (구연산염-인산염 pH 6.4, 0.25 M NaCl)에 희석시켰다. 완충액 정찰 시험에서, 언풀딩 온도의 pH 의존성을 결정하였고, 비견할 만한 pH 특성들을 모든 작제물들에 대하여 관측하였다. 샘플들은 세 겹으로 측정하였고 25-96°C의 온도 상승을 만들었다. 형광 신호를 얻었고, 원 데이터는 GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.)을 사용하여 분석되었다.

[0170] 스트레스 안정성 연구

[0171] 단백질을 2 주간에 걸쳐 37°C에서 보관하면서 올리고머화에 대하여 크기 배제 고성능 액체 크로마토그래피 (SE-HPLC)로 및 분해에 대하여 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 젤 전기영동법 (SDS-PAGE)으로 분석하였다. 연구 전에, 샘플들을 1, 10 및 40 g/L으로 농축하였고 및 t0 시점을 결정하였다. 단량체 함량은 Shodex KW-402.5-4F (Showa Denko) 상에서 샘플들을 분리하고 결과 크로마토그래프 파일을 평가하여 정량하였다. 단백질 단량체의 상대적 비율을 계산하기 위해, 단량체 피크의 면적을 샘플 매트릭스에 기여되지 못한 피크들의 총면적으로 나눴다. 단백질 분해는 Any kD Mini-Protean TGX 젤 (Bio-Rad Laboratories)을 사용하는 SDS-PAGE 분석으로 평가하고 쿠마시 브릴란트 블루로 염색하였다. 단백질 농도는 플레이트가 장착된 인피니티 판독기 M200 Pro (Tecan Group Ltd.)을 사용하여 UV-Vis 분광분석으로 상이한 시점에서 모니터하였다.

실시예 3: 시판 인간화된 마우스 단일클론성 항체로부터 scFv 작제물들의 제작

[0174] 항체 가변 도메인들의 안정화에 대한 제안된 개념을 광범위한 적용가능성을 확인하기 위해, 두 개 단쇄 Fv 작제물을 VL 카파 경쇄를 포함하는 시판, 인간화된 마우스 단일클론 항체에 기반하여 생성하였다. 제1 작제물에 대하여는, 원래의 가변 도메인 서열들을 IgG의 아미노산 서열에 대하여 공개된 대로 사용하였고 반면 제2 작제물에 대하여는, 람다 생식계열 유전자로부터 나온 각각의 서열에 의해 가변 경쇄 도메인의 기본구조 부위 IV가 치환된 개질된 서열을 사용하였다. 상기 scFv 작제물에 있어서, 상기 가변 도메인들은 20 아미노산 잔기의 유연한 (Gly_4Ser_4) 링커 (서열번호 1)에 의해 연결되어, 결과적으로 $NH_2-VL-\text{링커}-VH-COOH$ 의 형태가 모델 작제물 scFv1 내지 scFv10에서 사용되었다 (참조 표 2). scFv 분자들의 발현과 재풀딩은 전술한 바와 같이 수행되었고, 재풀딩된 단백질들은 단백질 L 레진 상에서 친화성 크로마토그래피로 정제되었다. 정제된 단백질을 SE-HPLC로 분석한 결과, VL에서의 람다 기본구조 IV를 함유하는 작제물의 유의하게 향상된 단량체 함량이 나타난 작제물의 생산성이 분명하게 차이가 나는 것이 밝혀졌다 (참조 도 5). 또한, 상기 원래 서열 및 VL 내의 람다 기본구조 IV를 함유하는 분자를 가진 작제물을 열적 언풀딩 분석한 결과 각각 69.9 및 71.2°C의 언풀딩 중간점을 나타냈다. 이러한 관측은 위에서 설명된 결과와 일치한다.

실시예 4: 더 짧은 링커 서열을 가진 scFv 작제물들의 제작

상기 링커 서열의 효과를 분석하기 위해, 더 짧은 15개 아미노산 (Gly_4Ser_3) 잔기 링커 (서열번호 34)를 사용하여 실시예 1에서 설명한 방법대로 작제물들을 만들었다. 상기 링커를 제외하고는, 두 개 작제물 scFv11 및 scFv12은 작제물 scFv1 및 scFv5에 각각 상응한다 (참조 표 2). 스트레스-안정성 연구를 실시예 2에서 설명된 바와 같이 수행하였다. 표 4에 나타난 바와 같이, VL 내의 람다 기본구조 IV를 포함하는 더 짧은 링커를 가진 작제물 scFv12는 콘센서스 카파 경쇄 scFv11를 가진 작제물에 비하여 증가된 안정성을 나타냈다. 상기 분자들의 전체적인 안정성은 더 긴 링커를 가진 상응하는 작제물에 비하여 더 낮았다. scFv 안정성은 15mer 링커들 대신 20mer 또는 25mer 링커들을 사용함으로써 증가된다는 것이 공지되어 있다 (참조 Worn and Pluckthun, J. Mol. Biol. 305 (2001) 989-1010). 따라서 이러한 발견은 20mer 링커들을 사용한 결과와 일치하며 및 가변 도메인의 안정성은 VL 내의 람다 기본구조 IV를 도입함으로써 향상된다는 것을 확인한다.

五 1

단백질 서열들의 목록

서열번호	종류	서열
1	링커	GGGGSGGGGSGGGGGGGGS
2	VL	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCQASQSI SDWLAWYQQKPGKAPKLL IYGASRLASGVPSRFSRGSRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQQWSDSYVDNLFGQGTKEIKR
3	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVGFSLSGGAMSWSVRQAPGKGLEWGVIISSGATYYASWAKGRFT ISKDNTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPDDNSNSMGTDPWGQGTLTVSS
4	VL	EIVMTQSPSTLASVGDRVI ITcqasqsi SDWLAWYQQKPGKAPKLL IYGASRLASGVPSRFSGSGSG AEFTLTISSLQPDDFATYYCQQQWSDSYVDNLFGQGTKLTVLG
5	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVGFSLSGGAMSWSVRQAPGKGLEWGVIISSGATYYASWAKGRFT ISKDNTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPDDNSNSMGTDPWGQGTLTVSS
6	VL	EIVMTQSPSTLASVGDRVI ITcqasqsi SDWLAWYQQKPGKAPKLL IYGASRLASGVPSRFSGSGSG AEFTLTISSLQPDDFATYYCQQQWSDSYVDNLFGQGTKLTVLG
7	VL	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCQASQSI SDWLAWYQQKPGKAPKLL IYGASRLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQQWSDSYVDNLFGQGTKLTVLG
8	VL	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCQASQSI SDWLAWYQQKPGKAPKLL IYGASRLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQQWSDSYVDNLFGQGTKLTVLG
9	VL	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCQASQSI SDWLAWYQQKPGKAPKLL IYGASRLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQQWSDSYVDNLFGGGTKLTVLG
10	VL	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCQASQSI SDWLAWYQQKPGKAPKLL IYGASRLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQQWSDSYVDNLFGQGTKLTVLG
11	VL	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCQASQSI SDWLAWYQQKPGKAPKLL IYGASRLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQQWSDSYVDNLFGGGTKLTVLG
12	VL	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCQASQSI SDWLAWYQQKPGKAPKLL IYGASRLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQQWSDSYVDNLFGTGTKLTVLG
13	VL	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCQASQSI SDWLAWYQQKPGKAPKLL IYGASRLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQQWSDSYVDNLFGTGTKLTVLG
14	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSGGAMSWSVRQAPGKGLEWGVIISSGATYYASWAKGRFT ISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPDDNSNSMGTDPWGQGTLTVSS
15	1.4gen	기본구조 부위 IV FGQGTKLTVLG
16	FR_IV	V _A 생식 계열 FGTGTVTVLG
17	FR_IV	V _A 생식 계열 FGGGTKLTVLG
18	FR_IV	V _A 생식 계열 FGGGTQLIILG
19	FR_IV	V _A 생식 계열 FGEGETELTVLG
20	FR_IV	V _A 생식 계열 FGS GTKTVTVLG
21	FR_IV	V _A 생식 계열 FGGGTQLTVLG
22	FR_IV	V _A 생식 계열 FGGGTQLTALG
23	Vk1 콘센서스 (재배열)	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRASQSI SNYLWYQQKPGKAPKLL IYASSLQS GVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTPLFFGQGTKEIKR
24	Vk2 콘센서스 (재배열)	DIVMTQSPSLPVTPGEPASI C RASSQSLLHSNGYNLDWY LQKPGQSPQLL IY LGSNRAS GPDRFS GSGSGTDFTLK1S RVEADVGVYYC M QALQTPTY F GQGTKEIKR
25	Vk3 콘센서스 (재배열)	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSC RASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRL I Y GASSRAT GIPDRFS GSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGNSPY F GQGTKEIKR
26	Vk4 콘센서스 (재배열)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLL IY WASTRES GPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEVDVAVYYC QQYVYSTPPT FEGOGTKEIKR

27	VH1A 콘센서스 (재배열)	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASG GTFSSYAI ^{SVVRQAPGQGLEWMG} GIIPIFGTANYAQKFQGRV TITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR APGYC ^S GF DY ^W QGTLTVSS
28	VH1B 콘센서스 (재배열)	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASG YTFTSY ^{MHVRQAPGQGLEWMG} WINPNSGNTNYAQKFQGRV TMTRDTSI STAYMELSSLRSDDTAVYYCAR DGDGGF DY ^W QGTLTVSS
29	VH2 콘센서스 (재배열)	QVTLKESGPALVKPTQTLTLCFTSGFSLSTSGMG Y ^{SV} IRQPPGKALELWA HIDWDDDKEYSTSLKSRLT ISKDTSKNQVLTMTNMDPVDTATYYCAR IHNIGEAFD W ^W QGTLTVSS
30	VH3 콘센서스 (재배열)	EVQLVESGGGLVQPGSRLSCAASG GTFSSYAMH ^{WV} RQAPGKGLEWVS VISYDGGNYYADSVKGRFT TSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DRGGSGD F ^W QGTLTVSS
31	VH4 콘센서스 (재배열)	QVQLQESGPLVKPSETLSLCTVSG GS ^{SISSYYWS} IRQPPGKGLEW IEIYHSGSTNPNPLKSRT ISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR GRGGGYF D ^W QGTLTVSS
32	VH5 콘센서스 (재배열)	EVQLVQSGAEVKPGESLKISCKGSG YSFTSYWIG ^{WV} RQMPGKGLEWMG IIYPGDSSTRYSPSFQGV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCAR LGGGGYF D ^W QGTLTVSS
33	VH6 콘센서스 (재배열)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCIASGDSVSSNSAA W ^W IRQSPSRGLEWLGR TYYRSKWNDYAVSVK SRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR DPGGF D ^W QGTLTVSS
42	링커	GGGGSGGGGGGGGS

[0179] (서열 번호 23 내지 33에서, CDR 부위들은 볼드체와 이태릭체로 표시됨)

표 2

상이한 scFv 작제물을 위한 가변 도메인들의 조합

scFv 작제물	가변 도메인 1	링커	가변 도메인 2
scFv1	서열번호 2	서열번호 1	서열번호 3
scFv2	서열번호 4	서열번호 1	서열번호 5
scFv3	서열번호 6	서열번호 1	서열번호 3
scFv4	서열번호 11	서열번호 1	서열번호 14
scFv5	서열번호 9	서열번호 1	서열번호 14
scFv6	서열번호 8	서열번호 1	서열번호 14
scFv7	서열번호 7	서열번호 1	서열번호 14
scFv8	서열번호 13	서열번호 1	서열번호 14
scFv9	서열번호 12	서열번호 1	서열번호 14
scFv10	서열번호 10	서열번호 1	서열번호 14
scFv11	서열번호 2	서열번호 42	서열번호 3
scFv12	서열번호 9	서열번호 42	서열번호 14

[0181]

표 3

모든 작제물에 대하여 열적 언폴딩용 전이 중간점을 시차주사 형광법으로 결정하였다

작제물 ID	Tm
scFv 1	70.19 ± 0.22
scFv 2	66.82 ± 0.37
scFv 3	65.44 ± 0.15
scFv 4	74.31 ± 0.04
scFv 5	70.86 ± 0.16
scFv 6	75.19 ± 0.13
scFv 7	68.42 ± 0.05
scFv 8	75.45 ± 0.36
scFv 9	71.15 ± 0.27
scFv 10	71.25 ± 0.29
scFv 11	70.34 ± 0.20
scFv 12	70.18 ± 0.03

표 4

저장시 단량체 손실

서열번호	1 g/L, 37°C	10 g/L, 37°C	40 g/L, 37°C
scFv 1	-16.8%	-44.3%	-34.7%
scFv 2		-1.9%	-20.1%
scFv 3	-23.0%	-64.7%	-81.0%
scFv 4		-0.9%	-9.2%
scFv 5		-1.6%	-11.4%
scFv 6		-0.8%	-4.0%
scFv 7		-0.6%	-13.1%
scFv 8		0.1%	-0.2%
scFv 9		-1.3%	-10.1%
scFv 10		-0.5%	-14.4%
scFv 11	-56.3%	-77.7%	-80.2%
scFv 12		-5.7%	-41.3%
			-65.9%

[0184] 참고: 이태릭체로 표시된 것들은 V_{kappa} -타입 기본구조 IV 부위들을 가진 scFv 작제물로부터 유래된다

표 5

[0185]

VL 위치	15	22	40	49	58	69	70	72	74	77	79	81
FW1.4gen (서열번호 4)	V	T	P	Y	V	A	E	T	T	S	Q	D
375-FW1.4opt	V	T	P	Y	V	T	Q	T	T	S	Q	D
435-FW1.4opt	V	K	P	Y	V	A	E	T	T	S	Q	D
509-FW1.4opt	V	T	P	Y	V	T	E	T	T	S	Q	D
511-FW1.4opt	V	T	P	Y	V	T	E	T	T	S	Q	D
534-FW1.4opt	V	T	P	Y	V	T	E	T	T	S	Q	D
567-FW1.4opt	V	T	P	Y	V	T	Q	T	T	S	Q	D
578-FW1.4opt	V	T	P	Y	V	T	Q	T	T	S	Q	D
1-FW1.4opt	V	T	P	Y	V	T	E	T	T	S	Q	D
8-FW1.4opt	V	T	P	Y	V	T	D	T	A	S	Q	D
15-FW1.4opt	V	T	P	Y	V	T	E	T	T	S	Q	D
19-FW1.4opt	V	T	P	Y	V	T	Q	T	T	S	Q	D
34-FW1.4opt	L	T	S	Y	V	A	E	S	T	S	Q	D
35-FW1.4opt	V	T	P	Y	V	T	E	T	T	S	Q	D
42-FW1.4opt	V	T	P	Y	V	T	E	T	T	S	Q	D
43-FW1.4opt	V	K	P	Y	F	A	E	T	T	G	E	A

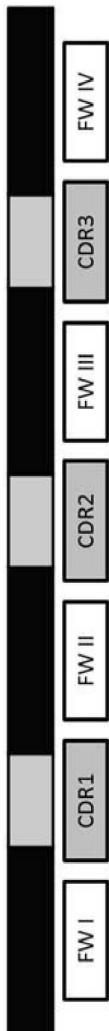
[0186] * * * * *

[0187] 본 발명은 본 명세서에서 설명된 특정된 구체예에 의한 범위로 제한되지 않는다. 실제, 본 명세서에서 설명된 것에 더하여 본 발명의 다양한 변경이 전술한 설명으로부터 당해분야의 숙련자에게 명백하게 될 것이다. 그러한 변경은 첨부된 청구범위의 범위 내로 속하는 것으로 의도된다.

[0188] 각각의 특허법하에 가능한 정도로, 모든 특허, 출원서, 공개물, 시험 방법, 문헌, 및 본 명세서에서 인용된 다른 물질들은 참조함으로써 병합된 것으로 간주한다.

도면

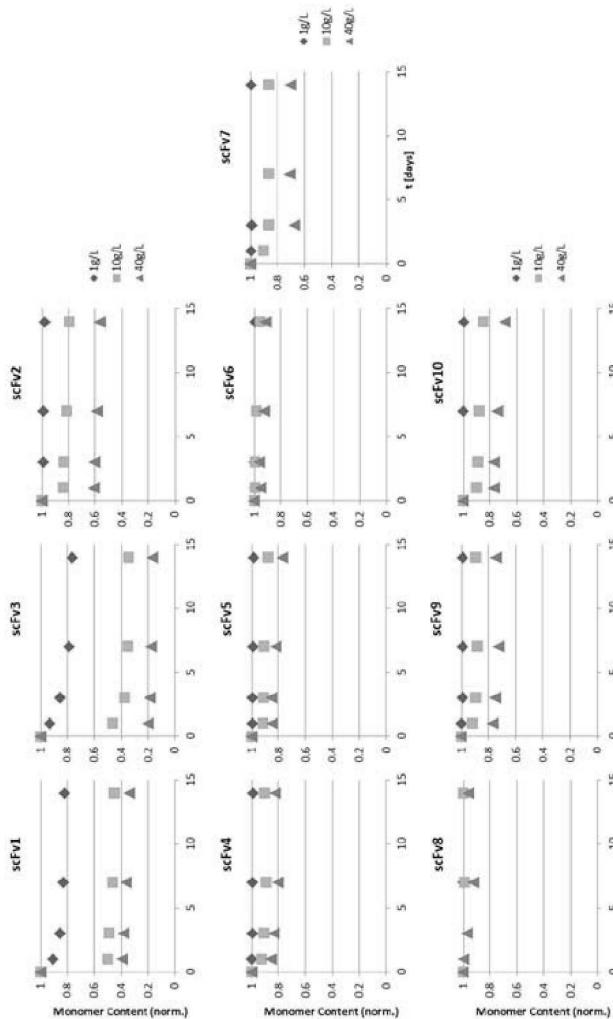
도면1



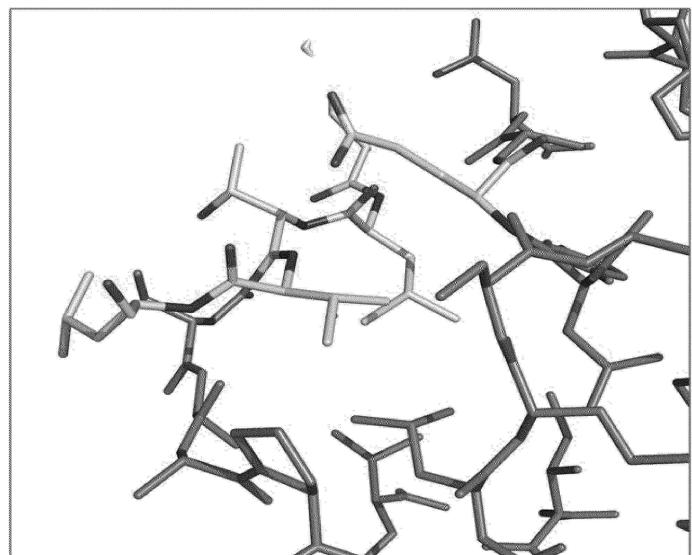
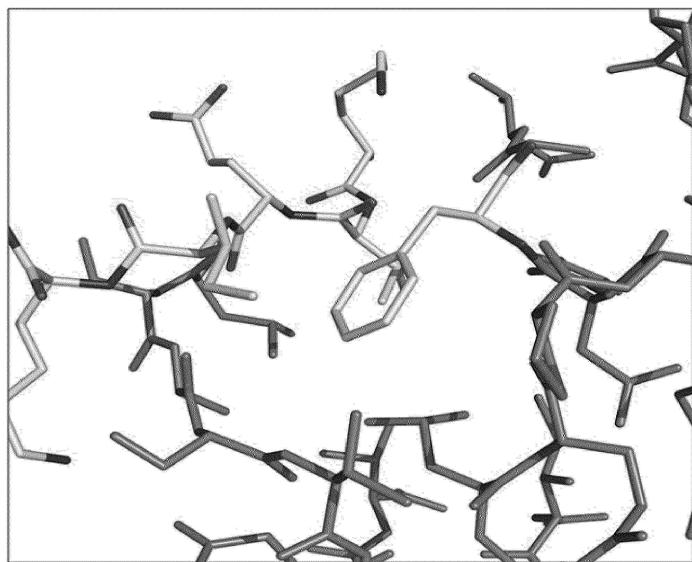
도면2

AHo	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49	CDR L1	
Hum cons VL-Id	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C	W Y Q Q K P G	
SEQ ID No 2	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C Q A S Q S	I S D W L A W Y Q Q K P G	
SEQ ID No 4	E I V M T Q S P S T L S A S V G D R V T I T C Q A S Q S	I S D W L A W Y Q Q K P G	
SEQ ID No 6	E I V M T Q S P S T L S A S V G D R V T I T C Q A S Q S	I S D W L A W Y Q Q K P G	
CDR L2			
AHo	50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100	CDR L2	
Hum cons VL-Id	K A P K L L I Y G V P S R F S G S G S G . . . T D F T L T I S S L Q P E		
SEQ ID No 2	K A P K L L I Y G A S R L A S G V P S R F S G S G R S G . . . T D F T L T I S S L Q P E		
SEQ ID No 4	K A P K L L I Y G A S R L A S G V P S R F S G S G S G . . . A E F T L T I S S L Q P D		
SEQ ID No 6	K A P K L L I Y G A S R L A S G V P S R F S G S G S G . . . A E F T L T I S S L Q P D		
CDR L3			
AHo	100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149	CDR L3	
Hum cons VL-Id	D F A T Y Y C C Q Q G W S D	F Q Q G T K V E I K R	
SEQ ID No 2	D F A T Y Y C C Q Q G W S D	S Y V D N L F Q Q G T K L T V L G	
SEQ ID No 4	D F A T Y Y C C Q Q G W S D	S Y V D N L F Q Q G T K V E I K R	
SEQ ID No 6	D F A T Y Y C C Q Q G W S D	S Y V D N L F Q Q G T K V E I K R	
CDR H1			
AHo	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49	CDR H1	
Hum cons VH3	E V Q L V E S . G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	W V R Q A P G	
SEQ ID No 3	E V Q L V E S . G G G L V Q P G G S L R L S C A V S G F S L S	S G A M S W V R Q A P G	
SEQ ID No 5	E V Q L V E S . G G G L V Q P G G S L R L S C T V S G F S L S	S G A M S W V R Q A P G	
CDR H2			
AHo	50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100	CDR H2	
Hum cons VH3	K G L E W V S		
SEQ ID No 3	K G L E W I G V I I S S C A T Y Y A S W A K G R F T I S K D N S K N T Y L Q O M N S L R A E		
SEQ ID No 5	K G L E W V C V I I S S C A T Y Y A S W A K G R F T I S K D T S K N T Y L Q O M N S L R A E		
CDR H3			
AHo	100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149	CDR H3	
Hum cons VH3	D T A V Y Y C A	W G Q G T L V T V S S	
SEQ ID No 3	D T A V Y Y C A R G G P D D S H	S M G T F D P W Q Q G T L V T V S S	
SEQ ID No 5	D T A V Y Y C A R G G P D D S H	S M G T F D P W Q Q G T L V T V S S	

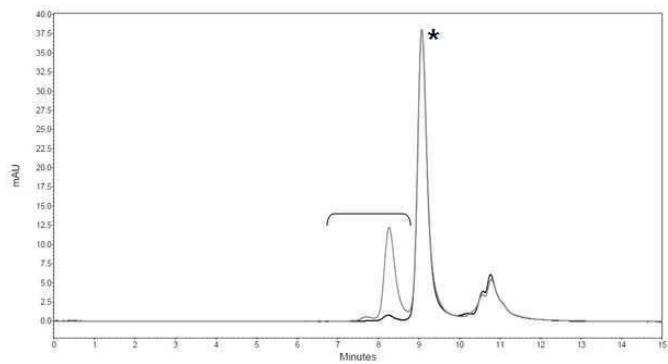
도면3



도면4



도면5



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Numab AG

<120> NOVEL ANTIBODY FRAMEWORKS

<130> 109894P877PC

<150> EP13003264.2

<151> 2013-06-26

<160> 42

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial linker

<400> 1

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

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

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 2

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VL sequence

<400> 2

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

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

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

20 25 30

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

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

Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Ala 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 Gly Trp Ser Asp Ser Tyr

85 90 95

Val Asp Asn Leu Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105 110

<210> 3

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VH sequence

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Gly Gly Pro Asp Asp Ser Asn Ser Met Gly Thr Phe Asp Pro Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 4

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VL sequence

<400> 4

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

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

<210> 5

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VH sequence

<400> 5

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

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

Arg Gly Gly Pro Asp Asp Ser Asn Ser Met Gly Thr Phe Asp Pro Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 6

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VL sequence

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Asp Asn Leu Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105 110

<210> 7

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VL sequence

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 8

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VL sequence

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 9

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VL sequence

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Asp Asn Leu Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

100 105 110

<210> 10

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VL sequence

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

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

<210> 11

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VL sequence

<400> 11

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

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

<210> 12

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VL sequence

<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 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Trp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Asp Asn Leu Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

100 105 110

<210> 13

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VL sequence

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

<210> 14

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VH sequence

<400> 14

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

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

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

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VL framework sequence

<400> 15

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

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

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

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

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

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

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Ile Ile Leu Gly

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

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Phe Gly Glu Gly Thr Glu Leu Thr Val Leu Gly

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

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

1 5 10

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly

1 5 10

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Ala Leu Gly

1 5 10

<210> 23

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VL sequence

<400> 23

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 Ser Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105

<210> 24

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VL sequence

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Met Gln Ala

85 90 95

Leu Gln Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg

<210> 25

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VL sequence

<400> 25

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 Asn Ser Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 26

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VL sequence

<400> 26

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

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

100 105 110

Lys Arg

<210> 27

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VH sequence

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ala Pro Gly Tyr Cys Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 28

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VH sequence

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 29

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VH sequence

<400> 29

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

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Asp Trp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95
 Cys Ala Arg Ile His Asn Ile Gly Glu Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120
 <210> 30
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> artificial VH sequence
 <400> 30

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 31
 <211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VH sequence

<400> 31

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly 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 Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

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 Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Gly Arg Gly Gly Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 32

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VH sequence

<400> 32

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

Gln Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 33

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VH sequence

<400> 33

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

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

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
 50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 34

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VL sequence

<400> 34

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

20

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VL sequence

<400> 35

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

1 5 10 15

<210> 36

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VL sequence

<400> 36

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VL sequence

<400> 37

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 38

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VH sequence

<400> 38

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 39

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VH sequence

<400> 39

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

1 5 10

<210> 40

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VH sequence

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial VH sequence

<400> 41

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial linker

<400> 42

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15