

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0101417 (43) 공개일자 2012년09월13일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C07K 16/46</i> (2006.01) <i>C07K 16/28</i> (2006.01) <i>C07K 16/18</i> (2006.01) <i>A61K 39/395</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-7013723 (22) 출원일자(국제) 2010년10월25일 심사청구일자 없음 (85) 번역문제출일자 2012년05월25일 (86) 국제출원번호 PCT/EP2010/066046 (87) 국제공개번호 WO 2011/051217 국제공개일자 2011년05월05일 (30) 우선권주장 61/255,235 2009년10월27일 미국(US)	(71) 출원인 글락소 그룹 리미티드 영국 유비6 0엔엔 미들섹스 그린포드 버클리 애 비뉴 글락소 웰컴 하우스 (72) 발명자 드 실바, 이누사 영국 씨비4 0더블유지 캠브리지 캠브리지셔 캠브 리지 사이언스 파크 315 도만티스 리미티드 셉, 아르민 영국 씨비4 0더블유지 캠브리지 캠브리지셔 캠브 리지 사이언스 파크 315 도만티스 리미티드 스톱, 아드리안 올라트 영국 씨비4 0더블유지 캠브리지 캠브리지셔 캠브 리지 사이언스 파크 315 도만티스 리미티드 (74) 대리인 남상선

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **안정한 항-TNFR1 폴리펩티드, 항체 가변 도메인 및 길항제**

(57) 요약

본 발명은 저장-안정한 항-TNFR1 항체 단일 가변 도메인(dAb), 길항제 및 다중특이적 리간드 뿐만 아니라 이들의 방법 및 용도에 관한 것이다. 항-TNFR1 폴리펩티드, 항체 단일 가변 도메인(dAb), 길항제 및 다중특이적 리간드는 관절염 또는 COPD와 같은 염증성 질환의 치료 및/또는 예방뿐 아니라, 폐 투여, 경구 투여, 폐로의 전달 및 환자의 위장관으로의 전달에 유용하다.

특허청구의 범위

청구항 1

DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 또는 DOM1h-574-214의 아미노산 서열과 95, 96, 97, 98 또는 99% 이상 동일한 (또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하는, 항-TNF α 수용체 1형(TNFR1; p55) 면역글로불린 단일 가변 도메인으로서, 상기 단일 가변 도메인이 PBS에서 40℃로 40시간 동안 인큐베이션 후에 <1.0, <0.9, <0.8, <0.7, <0.6, <0.5, 또는 <0.4의 OD₃₂₀을 지니는, 항-TNF α 수용체 1형(TNFR1; p55) 면역글로불린 단일 가변 도메인.

청구항 2

제 1항의 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 임의로 혈청 알부민(SA)에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는, 다중특이적 리간드.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 리간드가 (i) 제 1항에 따른 항-TNF α 수용체 1형(TNFR1; p55) 면역글로불린 단일 가변 도메인, (ii) DOM7h-11-3의 서열과 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 또는 99% 이상 동일한 (또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하며 SA에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항-혈청 알부민(SA) 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하며, (iii) 임의로, 상기 항-TNFR1 단일 가변 도메인과 상기 항-SA 단일 가변 도메인 사이에 링커가 제공되는, 다중특이적 리간드.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 링커가 아미노산 서열 AST, 임의로 ASTSGPS를 포함하거나, 상기 링커가 AS(G₄S)_n(여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8임)이며, 예를 들어 AS(G₄S)₃인, 다중특이적 리간드.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항의 단일 가변 도메인 또는 다중특이적 리간드를 포함하는 TNFR1 길항제.

청구항 6

제 5항에 있어서, 경구 전달, 환자의 위장관으로의 전달, 폐 전달, 환자의 폐로의 전달 또는 전신 전달을 위한, TNF α 수용체 1형(TNFR1; p55) 길항제.

청구항 7

제 5항 또는 제 6항에 있어서, 염증 질환을 치료하고/하거나 예방하기 위한, TNF α 수용체 1형(TNFR1; p55) 길항제.

청구항 8

염증 질환을 치료하고/하거나 예방하기 위한 약제의 제조에서의 제 5항 또는 제 6항의 TNFR1 길항제의 용도.

청구항 9

제 5항 또는 제 6항의 길항제를 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 환자에서 염증 질환을 치료하고/하거나 예방하는 방법.

청구항 10

DMS5535, DMS5541, DMS5542 또는 DMS5544를 포함하거나, 이들로 이루어진, 다중특이적 리간드.

청구항 11

DMS5535, DMS5541, DMS5542 또는 DMS5544의 뉴클레오타이드 서열과 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 또는 99% 이상 동일한 (또는 100% 동일한) 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산.

청구항 12

제 1항의 항-TNF α 수용체 1형(TNFR1; p55) 면역글로불린 단일 가변 도메인을 엔코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산.

청구항 13

제 1항의 항-TNF α 수용체 1형(TNFR1; p55) 면역글로불린 단일 가변 도메인을 엔코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산으로서, 상기 뉴클레오타이드 서열이 DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 또는 DOM1h-574-214의 뉴클레오타이드 서열과 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 또는 99% 이상 동일한 (또는 100% 동일한), 핵산.

청구항 14

제 11항, 제 12항 또는 제 13항의 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 15

제 14항의 벡터를 포함하는 숙주 세포, 임의로 비-인간 배아 세포.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 항-종양 괴사 인자 1(TNFR1, p55, CD120a, P60, TNF 수용체 상과 구성원 1A, TNFRSF1A) 폴리펩티드, 면역글로불린(항체) 단일 가변 도메인 및 이들을 포함하는 길항제에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 이러한 항-TNFR1 리간드를 포함하거나 사용하는 방법, 용도, 제형, 조성물 및 장치에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] TNFR1

[0003] TNFR1은 리간드에 결합하는 세포의 영역, 및 내재적 신호 전달 활성이 없으나 신호 전달 분자와 회합할 수 있는 세포내 도메인을 함유하는 막횡단(transmembrane) 수용체이다. TNFR1과 결합 TNF와의 복합체는 3개의 TNFR1 사슬 및 3개의 TNF 사슬을 함유한다(문헌[Banner et al., Cell, 73(3) 431-445 (1993)]). TNF 리간드는 3량체로 존재하며, 이는 3개의 TNFR1 사슬에 의해 결합된다(상기 문헌과 동일한 문헌). 3개의 TNFR1 사슬은 수용체-리간드 복합체에서 함께 가까이 클러스터링되며, 이러한 클러스터링은 TNFR1-매개의 신호 전달의 요건이다. 사실상, TNFR1에 결합하는 다가 작용제, 이를테면 항-TNFR1 항체는 TNF의 부재 하에서 TNFR1 클러스터링 및 신호 전달을 유도할 수 있고, 통상적으로 TNFR1 효능제로 사용된다(참조예: 문헌[Belka et al., EMBO, 14(6): 1156-1165 (1995)]; 문헌[Mandik-Nayak et al., J. Immunol, 167: 1920-1928 (2001)]). 따라서, TNFR1에 결합하는 다가 작용제는 이것이 TNF α 의 TNFR1으로의 결합을 차단하더라도 일반적으로 효과적인 TNFR1의 길항제가 아니다.

[0004] 본 단락에서의 SEQ ID 번호는 W02006038027호에 사용된 넘버링(numbering)을 말한다. TNFR1의 세포의 영역은 13개 아미노산 아미노-말단 세그먼트(SEQ ID NO:603의 아미노산 1-13(인간); SEQ ID NO:604의 아미노산 1-13(마우스)), 도메인 1(SEQ ID NO:603의 아미노산 14-53(인간); SEQ ID NO:604의 아미노산 14-53(마우스)), 도메인 2(SEQ ID NO:603의 아미노산 54-97(인간); SEQ ID NO:604의 아미노산 54-97(마우스)), 도메인 3(SEQ ID NO:603의 아미노산 98-138(인간); SEQ ID NO:604의 아미노산 98-138(마우스)) 및 도메인 4(SEQ ID NO:603의 아미노산 139-167(인간); SEQ ID NO:604의 아미노산 139-167(마우스))에 이어서, 막-근위 영역(SEQ ID NO:603의 아미노산 168-182(인간); SEQ ID NO:604의 아미노산 168-183(마우스))을 포함한다(참조 문헌[Banner et al., Cell 73(3) 431-445 (1993)] 및 참조 문헌[Loetscher et al., Cell 61(2) 351-359 (1990)]). 도메인 2 및 3은 결합 리간드(TNF β , TNF α)와 접촉한다(문헌[Banner et al., Cell, 73(3) 431-445 (1993)]). 또한, TNFR1

의 세포의 영역은 프레-리간드(pre-ligand) 결합 어셈블리 도메인 또는 PLAD 도메인(SEQ ID NO:603의 아미노산 1-53(인간); SEQ ID NO:604의 아미노산 1-53(마우스))으로 지칭되는 영역을 함유한다(문헌[The Government of the USA, WO 01/58953; Deng et al., Nature Medicine, doi: 10.1038/nml304 (2005)]).

[0005] TNFR1은 도메인 4 또는 막-근위 영역(SEQ ID NO:603의 아미노산 168-182; SEQ ID NO:604의 아미노산 168-183)에서의 TNFR1의 단백질 가수분해를 포함하는 과정을 통하여 생체 내에서 세포의 표면으로부터 떨어져, TNFR1의 용해성 형태를 생성한다. 용해성 TNFR1은 TNF α에 결합하는 능력을 계속 유지하여, TNF α의 활성의 내인성 억제제로 작용한다.

[0006] WO2006038027호, WO2008149144호 및 WO2008149148호는 항-TNFR1 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 이들을 포함하는 길항제를 개시하고 있다. 또한, 이들 문헌은 TNF α에 의해 매개되는 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 이러한 도메인 및 길항제의 용도를 개시하고 있다. 개선된 저장 안정성을 지니는 항-인간 TNFR1 면역글로불린 단일 가변 도메인, 이들을 포함하는 길항제, 리간드 및 제품을 제공하는 것이 바람직할 것이다. 이들의 목표는 샘플 내의 인간 TNFR1을 검출하기 위한 개선된 진단 시약을 제공하는 것뿐만 아니라, 또는 다르게는 인간 또는 기타 포유동물에서 TNFR1-매개의 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 개선된 치료제를 제공하는 것일 것이다. TNFR1, 특히 인간 TNFR1의 강력한 중화제인 항-TNFR1 면역글로불린 단일 가변 도메인, 이들을 포함하는 길항제, 리간드 및 제품을 제공하는 것이 특히 바람직할 것이다.

[0007] 본 발명의 다양한 태양은 이들 바람직한 특징을 만족시킨다.

발명의 내용

[0008] 발명의 개요

[0009] 일 태양에서, 본 발명은 DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 또는 DOM1h-574-214의 아미노산 서열과 적어도 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일한 (또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하는 항-TNF α 수용체 1형(TNFR1; p55) 면역글로불린 단일 가변 도메인을 제공하고, 여기서 단일 가변 도메인은 PBS에서 40℃로 40시간 동안 인큐베이션 후에 <1.0, <0.9, <0.8, <0.7, <0.6, <0.5, 또는 <0.4의 OD₃₂₀을 지닌다. 일 구체예에서, 단일 가변 도메인은 하기 시험에 의해 측정된 <1.0, <0.9, <0.8, <0.7, <0.6, <0.5, 또는 <0.4의 OD₃₂₀을 지닌다:

[0010] a) PBS(포스페이트 완충된 염수) 중 100 μl의 1 mg/ml의 단일 가변 도메인을 PCR 플레이트 상에 분배시킨다;

[0011] b) 플레이트를 40시간 동안 40℃에서 인큐베이션한다: 및

[0012] c) 50 μl의 분취량을 제거하고, 예를 들어 마이크로플레이트 리더 (예컨대, Molecular Devices로부터의 것)에서 OD₃₂₀을 측정한다.

[0013] 일 태양에서, 본 발명은 DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 또는 DOM1h-574-214의 아미노산 서열과 적어도 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일한 (또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하는 항-TNF α 수용체 1형(TNFR1; p55) 면역글로불린 단일 가변 도메인을 제공한다.

[0014] 일 태양에서, 본 발명은 DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 및 DOM1h-574-214로부터 선택된 아미노산 서열과 동일하거나 상기 선택된 아미노산 서열에 비해 1 또는 2개의 아미노산 변화를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 항-TNF α 수용체 1형(TNFR1; p55) 면역글로불린 단일 가변 도메인을 제공한다.

[0015] 일 태양에서, 본 발명은 항-TNF α 수용체 1형(TNFR1; p55) 면역글로불린 단일 가변 도메인을 엔코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 제공하고, 상기 가변 도메인은 DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-

201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 또는 DOM1h-574-214의 아미노산 서열과 적어도 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일한 (또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함한다.

[0016] 일 태양에서, 본 발명은 항-TNF α 수용체 1형(TNFR1; p55) 면역글로불린 단일 가변 도메인을 엔코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 제공하고, 상기 뉴클레오타이드 서열은 DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 또는 DOM1h-574-214의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일하다 (또는 100% 동일하다).

[0017] 일 태양에서, 본 발명은 본 발명의 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 임의로 혈청 알부민(SA)에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 다중특이적 리간드에 관한 것이다. 일 구체예에서, 다중특이적 리간드는 본 명세서에 개시된 "DMS"로 표시된 임의의 작제물의 아미노산 서열, 예를 들어, DMS5535, 5541, 5542 및 5544 중 임의의 것으로부터 선택된 아미노산 서열이거나 이를 포함한다. 일 구체예에서, 다중특이적 리간드는 본 명세서에 개시된 임의의 DMS의 뉴클레오타이드 서열, 예를 들어, DMS5535, 5541, 5542 및 5544의 뉴클레오타이드 서열 중 임의의 것에 의해 엔코딩된 아미노산 서열이거나, 이를 포함한다. 일 구체예에서, 본 발명은 항-TNFR1 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 항-SA 단일 가변 도메인을 포함하는 다중특이적 리간드를 엔코딩하는 핵산을 제공하며, 여기서, 상기 핵산은 본 명세서에 개시된 임의의 DMS의 뉴클레오타이드 서열, 예를 들어, DMS5535, 5541, 5542 및 5544의 뉴클레오타이드 서열 중 임의의 것을 포함한다. 이러한 핵산을 포함하는 벡터뿐 아니라, 이러한 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.

[0018] 일 태양에서, 본 발명은 (i) DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 또는 DOM1h-574-214의 아미노산 서열과 적어도 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일한 (또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하는 항-TNF α 수용체 1형(TNFR1; p55) 면역글로불린 단일 가변 도메인, (ii) DOM7h-11-3의 서열과 80% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하며 SA에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항-혈청 알부민(SA) 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하며, (iii) 임의로, 여기서 항-TNFR1 단일 가변 도메인과 항-SA 단일 가변 도메인 사이에 링커가 제공되는, 다중특이적 리간드를 제공한다.

[0019] 일 구체예에서, 링커는 아미노산 서열 AST, 임의로 ASTSGPS를 포함한다. 대안적으로, 상기 링커는 $AS(G_4S)_n$ (여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8임)이며, 예를 들어, $AS(G_4S)_3$ 이다.

[0020] 일 태양에서, 본 발명은 본 발명의 임의의 선행 태양의 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다중특이적 리간드를 포함하는 TNFR1 길항제를 제공한다.

[0021] 일 태양에서, 본 발명은 경구 전달, 환자의 위장관으로의 전달, 폐 전달, 환자의 폐로의 전달 또는 전신 전달을 위한 본 발명의 TNF α 수용체 1형(TNFR1; p55) 길항제를 제공한다.

[0022] 일 태양에서, 본 발명은 염증 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 본 발명의 TNFR1 길항제를 제공한다.

[0023] 일 태양에서, 본 발명은 염증 질환의 치료 및/또는 예방용 약제의 제조에서의 본 발명의 TNFR1 길항제의 용도를 제공한다.

[0024] 본 발명의 다른 태양은 DMS5535, DMS5541, DMS5542 또는 DMS5544를 포함하거나, 이들로 이루어진 다중특이적 리간드를 제공한다. 본 발명의 일 태양은 어느 한쪽의 다중특이적 리간드를 엔코딩하는 핵산을 제공한다. 본 발명의 다른 태양은 DMS5535, DMS5541, DMS5542 또는 DMS5544의 뉴클레오타이드 서열과 80% 이상 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 제공한다. 본 발명은 상기 핵산을 포함하는 벡터뿐 아니라 벡터를 포함하는 숙주, 임의로 비-인간 배아 세포를 추가로 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1. 안정성 선택으로부터 dAb에 대한 아미노산 서열 정렬 및 특성화를 위해 정제. 서열은 안정성 선택을 위한 출발 dAb로서 이용되는 것들에 대해 대표적인 dAb인 DOM1h-574-156에 대해 정렬된다. 특정 위치에서의 "."은 DOM1h-574-156에서 그 위치에서 관찰되는 것과 동일한 아미노산을 표시한다. CDR을 밑줄 및 진한 문자로 표

시한다 (첫 번째 밀줄친 서열은 CDR1이고, 두 번째 밀줄친 서열은 CDR2이고, 세 번째 밀줄친 서열은 CDR3임).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 발명의 상세한 설명
- [0027] 본 명세서 내에서, 본 발명은 명확하고 정확한 명세서가 기재될 수 있도록 하는 방식으로, 구체예를 참조하여 기재되었다. 상기 구체예는 본 발명으로부터 벗어남이 없이 다양하게 조합되고 분리될 수 있도록 의도되며 그럴 수 있음이 이해되어야 한다.
- [0028] 달리 정의하지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 해당 분야(예를 들어, 세포 배양, 분자 유전학, 핵산 화학, 하이브리드화 기법 및 생화학 분야)의 통상의 기술자에 의해 공통적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 표준 기법은 분자적, 유전학적 및 생화학적 방법 (일반적으로, 참고문헌으로 본 명세서에 포함되는 문헌[Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.] 및 문헌[Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc.]을 참조)과 화학적 방법에 사용된다.
- [0029] 본 명세서에 기재된 면역글로불린 단일 가변 도메인(dAb)은 상보성 결정 영역 (CDR1, CDR2 및 CDR3)을 함유한다. CDR 및 프레임워크(FR) 영역의 위치 및 넘버링 시스템은 카바트 등에 의해 정의되었다 (문헌[Kabat, E.A. *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)]). 본 명세서에 기재된 V_H 및 V_L(V_K) dAb의 CDR(CDR1, CDR2, CDR3)의 아미노산 서열은 잘 알려져 있는 카바트 아미노산 넘버링 시스템 및 CDR의 정의에 기초하여, 해당 분야의 숙련자에게 명백할 것이다. 카바트 넘버링 시스템에 따라, 중쇄 CDR-H3은 다양한 길이를 가지며, 잔기 H100과 H101 사이의 삽입을 K까지의 문자로 넘버링한다 (즉, H100, H100A ... H100K, H101). 다르게는, CDR은 다음과 같은 AbM에 따라, 또는 접촉 방법에 따라, 초티아 시스템을 사용하여 결정될 수 있다 (문헌[Chothia *et al.*, (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions; *Nature* 342 (6252), p877-883]). CDR을 결정하는 적합한 방법에 대해서는 <http://www.bioinf.org.uk/abs/>를 참조하길 바란다.
- [0030] 일단 각각의 잔기가 넘버링되면, 하기의 CDR 정의를 적용할 수 있다 ("-"는 카바트 넘버링에 대해 나타낸 바와 동일한 잔기 번호를 의미한다):
- [0031] 카바트-서열 가변성에 기초하여 가장 통상적으로 사용되는 방법
- [0032] (카바트 넘버링 사용)
- [0033] CDR H1: 31-35/35A/35B
- [0034] CDR H2: 50-65
- [0035] CDR H3: 95-102
- [0036] CDR L1: 24-34
- [0037] CDR L2: 50-56
- [0038] CDR L3: 89-97
- [0039] 초티아: 구조적 루프 영역의 위치에 기초
- [0040] (초티아 넘버링 사용)
- [0041] CDR H1: 26-32
- [0042] CDR H2: 52-56
- [0043] CDR H3: 95-102
- [0044] CDR L1: 24-34
- [0045] CDR L2: 50-56
- [0046] CDR L3: 89-97

- [0047] AbM: 카바트와 초티아 간의 절충
- [0048] (카바트 넘버링 사용): (초티아 넘버링 사용):
- [0049] CDR H1: 26-35/35A/35B 26-35
- [0050] CDR H2: 50-58 -
- [0051] CDR H3: 95-102 -
- [0052] CDR L1: 24-34 -
- [0053] CDR L2: 50-56 -
- [0054] CDR L3: 89-97 -
- [0055] 접촉: 결정 구조 및 항원과의 접촉 잔기의 예측에 기초
- [0056] (카바트 넘버링 사용): (초티아 넘버링 사용):
- [0057] CDR H1: 30-35/35A/35B 30-35
- [0058] CDR H2: 47-58 -
- [0059] CDR H3: 93-101 -
- [0060] CDR L1: 30-36 -
- [0061] CDR L2: 46-55 -
- [0062] CDR L3: 89-96 -
- [0063] 본 명세서에서 사용되는 용어 "종양 괴사 인자 수용체 1(TNFR1)의 길항제" 또는 "항-TNFR1 길항제" 등은 TNFR1에 결합하고, TNFR1의 하나의(즉, 하나 이상의) 기능을 억제할 수 있는 작용제(예를 들어, 분자, 화합물)를 지칭한다. 예를 들어, TNFR1의 길항제는 TNF α 의 TNFR1으로의 결합을 억제하고/거나 TNFR1을 통해 매개되는 신호 전달을 억제할 수 있다. 따라서, TNFR1-매개의 과정 및 세포 반응 (예를 들어, 표준 L929 세포독성 검정에서의 TNF α -유도된 세포사)은 TNFR1의 길항제를 사용하여 억제될 수 있다.
- [0064] 본 명세서에서 사용되는 "펩티드"는 펩티드 결합을 통해 함께 연결된 약 2개 내지 약 50개의 아미노산을 지칭한다.
- [0065] 본 명세서에서 사용되는 "폴리펩티드"는 펩티드 결합에 의해 함께 연결된 약 50개 이상의 아미노산을 지칭한다. 폴리펩티드는 일반적으로 3차 구조를 포함하며 기능성 도메인으로 폴딩된다.
- [0066] 본 명세서에 사용되는 "프로테아제 분해에 대해 내성인" 펩티드 또는 폴리펩티드 (예를 들어, 도메인 항체(dAb))는 프로테아제 활성에 적합한 조건 하에서 프로테아제와 함께 인큐베이션되는 경우 프로테아제에 의해 실질적으로 분해되지 않는다. 프로테아제 활성에 적합한 온도, 예를 들어 37 °C 또는 50 °C에서 약 1시간 동안 프로테아제와 함께 인큐베이션된 후에, 단백질의 약 25% 이하, 약 20% 이하, 약 15% 이하, 약 14% 이하, 약 13% 이하, 약 12% 이하, 약 11% 이하, 약 10% 이하, 약 9% 이하, 약 8% 이하, 약 7% 이하, 약 6% 이하, 약 5% 이하, 약 4% 이하, 약 3% 이하, 약 2% 이하, 약 1% 이하가 프로테아제에 의해 분해되거나 단백질이 실질적으로 프로테아제에 의해 분해되지 않는 경우에, 폴리펩티드(예를 들어, dAb)는 실질적으로 분해되지 않는 것이다. 단백질 분해는 임의의 적합한 방법, 예를 들어, SDS-PAGE에 의해 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 기능 검정 (예를 들어, 리간드 결합)에 의해 평가할 수 있다.
- [0067] 본 명세서에 사용된 "디스플레이 시스템"은 폴리펩티드 또는 펩티드의 집합체(collection)가 원하는 특징, 예컨대, 물리적, 화학적 또는 기능적 특징에 기초한 선택을 위해 접근가능한 시스템을 의미한다. 디스플레이 시스템은 (예를 들어, 용액 중의, 적합한 지지체에 고정된) 폴리펩티드 또는 펩티드의 적합한 레퍼토리일 수 있다. 디스플레이 시스템은 또한 세포 발현 시스템(예를 들어, 형질변환되거나, 감염되거나, 트랜스펙션되거나 형질도입된 세포내에서 핵산 라이브러리의 발현 및 세포의 표면상에서 엔코딩된 폴리펩티드의 디스플레이) 또는 무세포 발현 시스템(예를 들어, 에멀전 구획화 및 디스플레이)을 이용하는 시스템일 수 있다. 예시적인 디스플레이 시스템은 핵산의 코딩 기능과 상기 핵산에 의해 엔코딩된 폴리펩티드 또는 펩티드의 물리적, 화학적 및/또는 기능적 특징을 연결시킨다. 이와 같은 디스플레이 시스템이 이용되는 경우, 원하는 물리적, 화학적 및/또는 기능

적 특징을 지니는 폴리펩티드 또는 펩티드가 선택될 수 있고, 선택된 폴리펩티드 또는 펩티드를 엔코딩하는 핵산은 용이하게 분리되거나 회수될 수 있다. 핵산의 코딩 기능과 폴리펩티드 또는 펩티드의 물리적, 화학적 및/또는 기능적 특징을 연결시키는 다수의 디스플레이 시스템이 해당 분야에 공지되어 있는데, 예를 들어, 박테리오파지 디스플레이(파지 디스플레이, 예를 들어, 파지미드 디스플레이), 리보솜 디스플레이, 에멀전 구획화 및 디스플레이, 효모 디스플레이, 퓨로마이신 디스플레이, 박테리아 디스플레이, 플라스미드상의 디스플레이, 공유 결합성 디스플레이 등이 있다 (예를 들어, 제EP 0436597호(Dyax), 미국 특허 제6,172,197호(McCafferty 등), 미국 특허 제6,489,103호(Griffiths 등)를 참조).

[0068] 본 명세서에서 사용되는 "레퍼토리"는 아미노산 서열 다양성을 특징으로 하는 폴리펩티드 또는 펩티드의 집합체를 지칭한다. 레퍼토리의 개별 구성원은 공통의 특징, 예를 들어, 공통의 구조적 특징 (예를 들어, 공통의 코어 구조) 및/또는 공통의 기능적 특징 (예를 들어, 공통의 리간드(예를 들어, 제네릭(generic) 리간드 또는 표적 리간드, TNFR1)에 결합하는 능력)을 가질 수 있다.

[0069] 본 명세서에서 사용되는 "기능적"은 생물학적 활성, 예컨대, 특정 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 또는 펩티드를 기술한다. 예를 들어, 용어 "기능적 폴리펩티드"는 항원 결합 부위를 통해 표적 항원에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0070] 본 명세서에서 사용되는 "제네릭 리간드"는 제공된 레퍼토리의 기능적 구성원의 상당한 부분 (예를 들어, 실질적으로 모든 부분)에 결합하는 리간드를 지칭한다. 제네릭 리간드 (예를 들어, 공통의 제네릭 리간드)는 제공된 레퍼토리의 많은 구성원에 결합할 수 있는데, 상기 구성원이 공통의 표적 리간드에 대해 결합 특이성을 갖지 않더라도 상기 구성원에 결합할 수 있다. 일반적으로, 폴리펩티드 상의 기능적 제네릭 리간드 결합 부위의 존재 (제네릭 리간드에 결합하는 능력에 의해 나타남)는 폴리펩티드가 정확하게 폴딩되었고 기능성을 나타낸다. 제네릭 리간드의 적합한 예는 초항원(superantigen), 레퍼토리의 기능적 구성원의 상당한 부분에서 발현되는 에피토프에 결합하는 항체 등을 포함한다.

[0071] "초항원"은 이들 단백질의 표적 리간드 결합 부위와 다른 부위에서 면역글로불린 상과의 구성원과 상호작용하는 제네릭 리간드를 지칭하는 해당 분야의 용어이다. 포도구균 장독소가 T 세포 수용체와 상호작용하는 초항원의 예이다. 항체에 결합하는 초항원은 IgG 불변 영역에 결합하는 단백질 G (문헌[Bjorck and Kronvall, J. Immunol., 133:969 (1984)]); IgG 불변 영역 및 V_H 도메인에 결합하는 단백질 A(문헌[Forsgren and Sjoquist, J. Immunol., 97:822 (1966)]); 및 V_L 도메인에 결합하는 단백질 L(문헌[Bjorck, J. Immunol., 140:1194 (1988)])을 포함한다.

[0072] 본 명세서에 사용되는 "표적 리간드"는 폴리펩티드 또는 펩티드가 특이적으로 또는 선택적으로 결합하는 리간드를 지칭한다. 예를 들어, 폴리펩티드가 항체 또는 이의 항원-결합 단편인 경우, 표적 리간드는 임의의 요망되는 항원 또는 에피토프일 수 있다. 표적 항원으로서의 결합은 기능적인 폴리펩티드 또는 펩티드에 좌우된다.

[0073] 본 명세서에서 사용되는 "항체"는 항체를 천연적으로 생성하는 임의의 종으로부터 유래되거나 재조합 DNA 기술에 의해 생성되었는지의 여부에 상관없이; 또한 혈청, B-세포, 하이브리도마, 이입세포(transfectoma), 효모 또는 박테리아로부터 분리되었는지의 여부에 상관없이, IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE 또는 단편(예를 들어, Fab, $F(ab')_2$, Fv, 이황화 결합된 Fv, scFv, 단원 형태의 다중특이적 항체, 이황화 결합된 scFv, 디아바디(diabody))를 지칭한다.

[0074] 본 명세서에서 사용되는 "항체 포맷", "포맷화된" 또는 유사한 표현은 하나 이상의 항체 가변 도메인이 항원에 대한 결합 특이성을 구조에 부여하도록 통합될 수 있는 임의의 적합한 폴리펩티드 구조를 의미한다. 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체, 단일 사슬 항체, 이중특이적 항체, 항체 중쇄, 항체 경쇄, 항체 중쇄 및/또는 경쇄의 동종이량체 및 이종이량체, 상기 중 임의의 것의 항원 결합 단편(예를 들어, Fv 단편(예를 들어, 단일 사슬 Fv(scFv), 이황화 결합된 Fv), Fab 단편, Fab' 단편, $F(ab')_2$ 단편), 단일 항체 가변 도메인(예를 들어, dAb, V_H , V_{HH} , V_L), 및 상기 중 임의의 것의 변형된 형태(예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 또는 다른 적합한 중합체 또는 인간화된 V_{HH} 의 공유 결합에 의해 변형됨)와 같은 다양한 적합한 항체 포맷이 해당 분야에 공지되어 있다.

[0075] 어구 "면역글로불린 단일 가변 도메인"은 다른 V 영역 또는 도메인과는 독립적으로 항원 또는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 가변 도메인(V_H , V_{HH} , V_L)을 지칭한다. 면역글로불린 단일 가변 도메인은 다른 가변 영역 또는 가변 도메인을 갖는 포맷(예를 들어, 동종다량체 또는 이종다량체)으로 존재할 수 있고, 여기서 다른 영역

또는 도메인은 단일 번역글로불린 가변 도메인에 의한 항원 결합에 필요하지 않다 (즉, 번역글로불린 단일 가변 도메인이 추가의 가변 도메인과는 독립적으로 항원에 결합하는 경우). "도메인 항체" 또는 "dAb"는 본 명세서에서 사용되는 용어 "번역글로불린 단일 가변 도메인"과 동일하다. "단일 번역글로불린 가변 도메인"은 본 명세서에서 사용되는 용어 "번역글로불린 단일 가변 도메인"과 동일하다. "단일 항체 가변 도메인" 또는 "항체 단일 가변 도메인"은 본 명세서에서 사용되는 용어 "번역글로불린 단일 가변 도메인"과 동일하다. 번역글로불린 단일 가변 도메인은 일 구체예에서 인간 항체 가변 도메인이나, 이는 또한 설치류(예를 들어, 전문이 참고문헌으로 본 명세서에 포함되는 WO 00/29004호에 기재된 것과 같은), 너스 샤크(nurse shark) 및 카멜리드(Camelid) V_H dAb와 같은 다른 종으로부터의 단일 항체 가변 도메인을 포함한다. 카멜리드 V_H는 천연적으로 경쇄가 결합된 중쇄 항체를 생성하는 낙타, 라마, 알파카, 단봉 낙타 및 과나코를 포함하는 종으로부터 유래된 번역글로불린 단일 가변 도메인 폴리펩티드이다. V_H는 인간화될 수 있다.

[0076] "도메인"은 단백질의 나머지와는 독립적인 3차 구조를 갖는 폴딩된 단백질 구조이다. 일반적으로, 도메인은 단백질의 별개의 기능적 특징을 책임지며, 많은 경우에 단백질 및/또는 도메인의 나머지의 기능 손실 없이 첨가되거나, 제거되거나, 다른 단백질로 전달될 수 있다. "단일 항체 가변 도메인"은 항체 가변 도메인의 특징적인 서열을 포함하는 폴딩된 폴리펩티드 도메인이다. 따라서, 이는 완전한 항체 가변 도메인 및, 예를 들어, 하나 이상의 루프가 항체 가변 도메인의 특징이 아닌 서열로 대체된 변형된 가변 도메인, 또는 절두형(truncated) 항체 가변 도메인, 또는 N-말단 신장 또는 C-말단 신장을 포함하는 항체 가변 도메인, 뿐만 아니라 적어도 전장 도메인의 결합 활성 및 특이성을 보유하는 가변 도메인의 폴딩된 단편을 포함한다.

[0077] 용어 "라이브러리"는 이종 폴리펩티드 또는 핵산의 혼합물을 지칭한다. 라이브러리는 구성원들로 구성되고, 이들 구성원 각각은 단일 폴리펩티드 또는 핵산 서열을 갖는다. 본 명세서에서, "라이브러리"는 "레퍼토리"와 동의어이다. 라이브러리 구성원 간의 서열 차이는 라이브러리에 존재하는 다양성의 원인이다. 라이브러리는 폴리펩티드 또는 핵산의 단순한 혼합물의 형태를 취할 수 있거나, 핵산의 라이브러리로 형질전환된 유기체 또는 세포, 예를 들어, 박테리아, 바이러스, 동물 또는 식물 세포 등의 형태일 수 있다. 일 구체예에서, 각각의 개별 유기체 또는 세포는 단지 하나 또는 한정된 수의 라이브러리 구성원을 함유한다. 일 구체예에서, 핵산에 의해 엔코딩되는 폴리펩티드의 발현을 가능케 하기 위해 핵산은 발현 벡터로 통합된다. 따라서, 일 태양에서, 라이브러리는 숙주 유기체의 집단의 형태를 취할 수 있고, 이러한 각각의 유기체는 핵산의 해당 폴리펩티드 구성원을 생성하도록 발현될 수 있는 핵산 형태의 라이브러리의 단일 구성원을 함유하는 하나 이상의 카피의 발현 벡터를 함유한다. 따라서, 숙주 유기체의 집단은 큰 레퍼토리의 다양한 폴리펩티드를 엔코딩하는 능력을 갖는다.

[0078] "유니버설 프레임워크(universal framework)"는 카바트 (문헌["Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Department of Health and Human Services])에 의해 정의된 서열에 보존된 항체의 영역에 상응하거나 또는 문헌[Chothia and Lesk, (1987) J. Mol. Biol. 196:910-917]에 정의된 인간 생식계 번역글로불린 레퍼토리 또는 구조에 상응하는 단일 항체 프레임워크 서열이다. 라이브러리 및 레퍼토리는 단독의 파변이 영역에서의 변이를 통하여 실질적으로 임의의 결합 특이성의 유도를 허용하는 것으로 밝혀진, 단일 프레임워크, 또는 이러한 프레임워크의 세트를 사용할 수 있다.

[0079] 본 명세서에 사용된 용어 "용량"은 한번에 모두(단위 용량), 또는 규정된 시간 간격에 걸쳐 2회 이상의 투여로 대상체에게 투여되는 리간드의 양을 지칭한다. 예를 들어, 용량은 1일(24시간)(매일 용량), 2일, 1주, 2주, 3주, 또는 1개월 이상의 기간에 걸쳐(예컨대, 단일 투여, 또는 2회 이상의 투여로) 대상체에게 투여되는 리간드(예컨대, 표적 항원에 결합하는 번역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 리간드)의 양을 지칭할 수 있다. 투여 간의 간격은 임의의 요망되는 기간일 수 있다.

[0080] 본 명세서에서 사용되는 "유체역학적 크기"는 수용액을 통한 분자의 확산에 기초한 분자(예를 들어, 단백질 분자, 리간드)의 명백한 크기를 지칭한다. 용액을 통한 단백질의 확산 또는 운동은 단백질의 명백한 크기를 유도하도록 처리될 수 있고, 여기서 상기 크기는 단백질 입자의 "스톡스 반경(Stokes radius)" 또는 "유체역학 반경"으로 제공된다. 단백질의 "유체역학적 크기"는 질량 및 형상(형태) 둘 모두에 좌우되어, 동일한 분자 질량을 갖는 2개의 단백질이 단백질의 종합적인 형태에 기초하여 상이한 유체역학적 크기를 가질 수 있다.

[0081] 본 명세서에서 언급되는 용어 "경쟁하다"는 동족체 표적 결합 도메인에 대한 제1 표적의 결합이 동족체 표적에 대해 특이적인 제2 결합 도메인의 존재하에서 억제되는 것을 의미한다. 예를 들어, 결합 도메인의 물리적 차단, 또는 결합 도메인의 구조 또는 환경의 변화에 의해 입체구조적으로 결합이 억제되어, 표적에 대한 친화성 또는 결합력이 감소될 수 있다. 제1 및 제2 결합 도메인 간의 경쟁을 결정하기 위한 경쟁 ELISA 및 경쟁

BiaCore 실험을 수행하기 위한 방법의 상세사항은 W02006038027호를 참조하길 바란다.

- [0082] 두 서열 간에 "상동성" 또는 "동일성" 또는 "유사성" (상기 용어는 본 명세서에서 상호 교환하여 사용된다)의 계산은 하기와 같이 실시된다. 서열을 최적의 비교 목적으로 정렬한다 (예컨대, 최적의 정렬을 위해 제1 아미노산 및 제2 아미노산 또는 핵산 서열의 하나 또는 둘 모두에 갭이 도입될 수 있고, 비-상동성 서열은 비교를 목적으로 무시할 수 있다). 일 구체예에서, 비교를 목적으로 정렬한 참조 서열의 길이는 참조 서열 길이의 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상 및 70%, 80%, 90% 이상, 또는 100%일 수 있다. 그 다음, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오티드 위치에서 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 비교한다. 제1 서열 내의 한 위치가 제2 서열 내의 상응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드로 채워져 있는 경우, 분자는 그 위치에서 동일하다 (본 명세서에서 사용되는 아미노산 또는 핵산 "상동성"은 아미노산 또는 핵산 "동일성"과 동등하다). 2개 서열 간에 동일성 퍼센트는 2개 서열의 최적의 정렬을 위해 도입되어질 필요가 있는 각 갭의 길이, 갭의 수를 고려하여, 서열이 공유하는 동일한 위치의 수의 함수이다. 본 명세서에서 정의된 아미노산 서열 및 뉴클레오티드 서열 정렬 및 상동성, 유사성 또는 동일성은 알고리즘 BLAST 2 서열을 이용하고 디폴트 파라미터를 이용하여 작성되고 결정될 수 있다 (문헌[Tatusova, T. A. *et al.*, FEMS Microbiol Lett, 174:187-188(1999)]).
- [0083] 본 발명의 임의의 태양의 일 구체예에서, 항-TNFR1 단일 가변 도메인, 길항제, 리간드 또는 폴리펩티드는 표준 MRC5 검정에서 TNF 알파-유도된 IL-8 분비의 억제제로 결정시, (약) 5, 4, 3, 2 또는 1 nM 이하의 ND50으로 TNFR1 (예를 들어, 인간 TNFR1)을 중화시킨다.
- [0084] 본 발명의 임의의 태양의 일 구체예에서, 항-TNFR1 단일 가변 도메인, 길항제, 리간드 또는 폴리펩티드는 표준 L929 검정에서 TNF 알파-유도된 세포독성의 억제제로 결정시, 150, 100, 50, 40, 30 또는 20 nM 이하; 또는 (약) 150 내지 10 nM; 또는 (약) 150 내지 20 nM; 또는 (약) 110 내지 10 nM; 또는 (약) 110 내지 20 nM의 ND50으로 TNFR1 (예를 들어, 무린 TNFR1)을 중화시킨다.
- [0085] 본 발명의 임의의 태양의 일 구체예에서, 항-TNFR1 단일 가변 도메인, 길항제, 리간드 또는 폴리펩티드는 표준 사이노몰구스 KI 검정에서 TNF 알파-유도된 IL-8 분비의 억제제로 결정시, 5, 4, 3, 2 또는 1 nM 이하; 또는 (약) 5 내지 (약) 1 nM의 ND50으로 TNFR1 (예를 들어, 사이노몰구스 원숭이 TNFR1)을 중화시킨다.
- [0086] 본 발명의 임의의 태양의 일 구체예에서, 단일 가변 도메인은 말단, 임의로 C-말단의 시스테인 잔기를 포함한다. 예를 들어, 시스테인 잔기는 예를 들어 말레이미드 결합을 사용하여 PEG를 가변 도메인에 부착하는데 사용될 수 있다 (참조예 W004081026호). 본 발명의 임의의 태양의 일 구체예에서, 단일 가변 도메인은 폴리알킬렌 글리콜 부분, 임의로 폴리에틸렌 글리콜 부분에 연결된다. 적합한 PEG 부분 및 컨쥬게이션 (conjugation) 방법 및 시험에 대해서는 W004081026호를 참조하길 바란다. 이들 개시물은 예를 들어 하기 청구범위에 포함될 특정 PEG의 개시물을 제공하기 위하여 본 명세서에 포함된다.
- [0087] 일 태양에서, 본 발명은 본 발명의 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 이펙터 그룹(effector group) 또는 항체 불변 도메인, 임의로 항체 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드에 관한 것이며, 임의로, 여기서 Fc의 N-말단은 가변 도메인의 C-말단에 연결(임의로 직접 연결)된다. W004058820호에 기재된 임의의 "이펙터 그룹"은 본 발명의 이러한 태양에 사용될 수 있으며, W004058820호에서의 이펙터 그룹의 설명 및 이 문헌에 기재된 이들을 가변 도메인으로 연결시키는 방법은 예를 들어, 본 명세서에서 청구범위에 사용될 수 있는 본 명세서의 설명을 제공하기 위하여 본 명세서에 명시적으로 참고로 포함된다.
- [0088] 일 태양에서, 본 발명은 본 발명의 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 임의로 혈청 알부민(SA)에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 다중특이적 리간드에 관한 것이다. 일 구체예에서, 다중특이적 리간드는 TNFR1 단량체의 KD보다 2배 이상 더 낮은 KD로 TNFR1 (예를 들어, 인간 TNFR1)에 결합한다. 부가적으로 또는 다르게는, 일 구체예에서, 다중특이적 리간드는 반감기가 단량체의 반감기의 5, 10, 20, 30, 40, 50 또는 100배 이상이다. 부가적으로 또는 다르게는, 일 구체예에서, 다중특이적 리간드는 인간에서의 최종 반감기가 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25일 이상이다 (예를 들어, 인간 자원자에서 실험적으로 결정되거나 또는 예를 들어, 항-SA 도메인이 인간 SA 및 동물로부터의 SA 간에 교차 반응성인 경우, 동물 시스템, 이를 테면 마우스, 개 및/또는 비-인간 영장류 (예를 들어, 사이노몰구스 원숭이, 비비, 레수스 원숭이)의 반감기로부터 추론함으로써 당업자에게 친숙한 통상의 기법을 사용하여 계산되는 경우).
- [0089] 본 발명의 다중특이적 리간드의 일 구체예에서, 리간드는 TNFR1(예를 들어, 인간 TNFR1)의, 임의로 TNFR1-매개의 신호전달의 길항제이다.

- [0090] 일 구체예에서, 본 발명은 $t\beta$ 반감기가 (약) 2.5시간 이상의 범위인 본 발명에 따른 가변 도메인, 다중특이적 리간드 또는 길항제를 제공한다. 일 구체예에서, 상기 범위의 하한은 (약) 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 10시간, 11시간, 또는 12시간이다. 부가적으로 또는 다르게는, $t\beta$ 반감기는 (약) 21일 또는 25일 이하이다. 일 구체예에서, 상기 범위의 상한은 (약) 12시간, 24시간, 2일, 3일, 5일, 10일, 15일, 19일, 20일, 21일 또는 22일이다. 예를 들어, 본 발명에 따른 가변 도메인 또는 길항제는 $t\beta$ 반감기가 12 내지 60시간 (또는 약 12 내지 60시간) 범위일 것이다. 추가의 구체예에서, 이는 12 내지 48시간 (또는 약 12 내지 48시간)의 범위일 것이다. 추가의 구체예에서, 이는 12 내지 26시간(또는 약 12 내지 26시간)의 범위일 것이다.
- [0091] 2-구획 모델링(two-compartment modeling)을 사용하는 것에 대한 대안으로서, 숙련자는 비-구획 모델링의 사용이 친숙할 것이며, 상기 비-구획 모델링은 최종 반감기를 결정하는데 사용될 수 있다 (이러한 면에서, 본 명세서에 사용되는 용어 "최종 반감기"는 비-구획 모델링을 사용하여 결정되는 최종 반감기를 의미한다). 예를 들어, 이러한 방법으로 곡선을 모델링하기 위하여 윈론린 분석 패키지, 예를 들어 버전 5.1(Pharsight Corp.(Mountain View, CA94040, USA)으로부터 입수가능)이 사용될 수 있다. 이러한 예에서, 일 구체예에서, 단일 가변 도메인, 다중특이적 리간드 또는 길항제는 최종 반감기가 (약) 8시간, 10시간, 12시간, 15시간, 28시간, 20시간, 1일, 2일, 3일, 7일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일 또는 25일 이상이다. 일 구체예에서, 상기 범위의 상한은 (약) 24시간, 48시간, 60시간 또는 72시간 또는 120시간이다. 예를 들어, 인간에서의 최종 반감기는 (약) 8시간 내지 60시간, 또는 8시간 내지 48시간, 또는 12 내지 120시간이다.
- [0092] 상기 기준에 부가적으로 또는 그와 다르게는, 본 발명에 따른 가변 도메인 또는 길항제는 AUC 값(곡선 아래 면적)이 (약) 1 mg.분/ml 이상의 범위이다. 일 구체예에서, 상기 범위의 하한은 (약) 5, 10, 15, 20, 30, 100, 200 또는 300 mg.분/ml이다. 부가적으로 또는 다르게는, 본 발명에 따른 가변 도메인, 다중특이적 리간드 또는 길항제는 AUC가 (약) 600 mg.분/ml 이하의 범위이다. 일 구체예에서, 상기 범위의 상한은 (약) 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75 또는 50 mg.분/ml이다. 유리하게는 가변 도메인 또는 길항제는 AUC가 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 (대략의) 범위일 것이다: 15 내지 150 mg.분/ml, 15 내지 100 mg.분/ml, 15 내지 75 mg.분/ml 및 15 내지 50 mg.분/ml.
- [0093] t 알파, t 베타 및 최종 반감기뿐 아니라 본 명세서에 인용된 AUC 중 하나 이상은 혈청 알부민, 예를 들어 마우스 및/또는 인간 혈청 알부민(SA)에 특이적으로 결합하는 PEG 또는 단일 가변 도메인(또는 결합 부분) 중 어느 하나에 연결된 하나 이상의 항-TNFR1 단일 가변 도메인(또는 본 명세서에서 정의된 다른 결합 부분)을 제공함으로써, 인간 및/또는 동물(예를 들어, 마우스 또는 비-인간 영장류, 예를 들어 비비, 레수스, 사이노몰구스 원숭이)에서 수득될 수 있다. PEG 크기는 (약) 20 kDa, 예를 들어 30, 40, 50, 60, 70 또는 80 kDa 이상일 수 있다. 일 구체예에서, PEG는 40 kDa, 예를 들어 2x20kDa PEG이다. 일 구체예에서, t 알파, t 베타 및 최종 반감기 또는 본 명세서에 인용된 AUC를 얻기 위하여, 항-SA 면역글로불린 단일 가변 도메인에 연결된 항-TNFR1 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 길항제를 제공한다. 일 구체예에서, PEG는 40 kDa, 예를 들어 2x20kDa PEG이다. 예를 들어, 길항제는 오직 하나의 이러한 항-TNFR1 가변 도메인, 예를 들어 오직 하나의 항-SA 가변 도메인에 연결된 하나의 이러한 항-TNFR1 가변 도메인을 포함한다. 일 구체예에서, t 알파, t 베타 및 최종 반감기 또는 본 명세서에 인용된 AUC를 얻기 위하여, PEG, 예를 들어 40-80 kDa PEG, 예를 들어 40 kDa PEG에 연결된 항-TNFR1 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 길항제를 제공한다. 예를 들어, 길항제는 오직 하나의 이러한 항-TNFR1 가변 도메인, 예를 들어 40 kDa PEG에 연결된 하나의 이러한 도메인을 포함한다.
- [0094] 본 발명의 다중특이적 리간드의 일 구체예에서, 리간드는 DOM7h-11, DOM7h-11-3, DOM7h-11-12, DOM7h-11-15, DOM7h-14, DOM7h-14-10, DOM7h-14-18 또는 DOM7m-16의 서열과 동일하거나 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 항-SA (예를 들어, HSA) 단일 가변 도메인을 포함한다 (구체적으로 항-혈청 알부민 dAb 서열을 포함하는, 2009년 3월 27일 출원된 WO04003019, WO2008096158 및 공동-계류중인 특허 출원 USSN 61/163,987 및 61/163,990 참조, 이들의 기재가 본원에 참조로서 포함된다). 다르게는 또는 부가적으로, 일 구체예에서, 다중특이적 리간드는 항-TNFR1 단일 가변 도메인과 항-SA 단일 가변 도메인 사이에 제공되는 링커를 포함하며, 상기 링커는 아미노산 서열 AST, 임의로 ASTSGPS를 포함한다. 다르게는, 상기 링커는 $AS(G_4S)_n$ (여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8임)이며, 예를 들어, $AS(G_4S)_3$ 이다. 예를 들어, 상기 리간드는 (N-에서 C-말단으로) DOM1h-574-16-AST-DOM7h-11; 또는 DOM1h-574-72-ASTSGPS-DOM7m-16; 또는 DOM1h-574-72-ASTSGPS-DOM7h-11-12를 포함한다.
- [0095] 일 태양에서, 본 발명은 (i) DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192,

DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 또는 DOM1h-574-214의 아미노산 서열과 동일하거나 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 항-TNF α 수용체 1형(TNFR1; p55) 면역글로불린 단일 가변 도메인, (ii) SA에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항-혈청 알부민(SA) 면역글로불린 단일 가변 도메인으로서, 상기 항-SA 단일 가변 도메인이 DOM7h-11-3의 서열과 동일하거나 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 하나 이상의 항-혈청 알부민(SA) 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하며, (iii) 임의로, 여기서 상기 항-TNFR1 단일 가변 도메인과 상기 항-SA 단일 가변 도메인 사이에 링커가 제공되며, 상기 링커가 아미노산 서열 AST, 임의로 ASTSGPS를 포함하는, 다중특이적 리간드를 제공한다. 다르게는, 상기 링커는 $AS(G_4S)_n$ (여기서 n 은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8임)이며, 예를 들어, $AS(G_4S)_3$ 이다. 예를 들어, 상기 리간드는 임의로 AST 또는 ASTSGPS에 의해 연결된 DOM1h-574-156 및 DOM7h-11-3을 포함한다. 다르게는, 상기 링커는 $AS(G_4S)_n$ (여기서 n 은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8임)이며, 예를 들어, $AS(G_4S)_3$ 이다. 이러한 예 또는 이러한 태양에서, 상기 리간드는 임의로 정맥내, 피하, 근육내, 복강내 또는 흡입에 의한 환자로의 투여에 적합하게 구성된다. 일 예에서, 상기 리간드는 건조-분말(dry-powder) 또는 동결건조된 조성물로 제공된다 (이는 임의로 투여 전에 희석제와 혼합된다).

[0096] 일 태양에서, 본 발명은 (i) DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 또는 DOM1h-574-214의 아미노산 서열과 동일하거나 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 항-TNF α 수용체 1형(TNFR1; p55) 면역글로불린 단일 가변 도메인, (ii) SA에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항-혈청 알부민(SA) 면역글로불린 단일 가변 도메인으로서, 상기 항-SA 단일 가변 도메인이 DOM7h-14-10의 서열과 동일하거나 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 하나 이상의 항-혈청 알부민(SA) 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하며, (iii) 임의로, 여기서 상기 항-TNFR1 단일 가변 도메인과 상기 항-SA 단일 가변 도메인 사이에 링커가 제공되며, 상기 링커가 아미노산 서열 AST, 임의로 ASTSGPS를 포함하는, 다중특이적 리간드를 제공한다. 다르게는, 상기 링커는 $AS(G_4S)_n$ (여기서 n 은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8임)이며, 예를 들어, $AS(G_4S)_3$ 이다. 이러한 예 또는 이러한 태양에서, 상기 리간드는 임의로 정맥내, 피하, 근육내, 복강내 또는 흡입에 의한 환자로의 투여에 적합하게 구성된다. 일 예에서, 상기 리간드는 건조-분말 또는 동결건조된 조성물로 제공된다 (이는 임의로 투여 전에 희석제와 혼합된다).

[0097] 본 발명은 본 발명의 임의의 태양 또는 구체예의 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다중특이적 리간드를 포함하는 TNFR1 길항제를 제공한다. 예를 들어, 본 발명의 길항제 또는 가변 도메인은 TNFR1 결합에 대하여 일가이다. 예를 들어, 본 발명의 길항제 또는 가변 도메인은 표준 SEC-MALLS로 결정시 일가 또는 실질적으로 일가이다. 실질적인 일가는 표준 SEC-MALLS로 결정시 5, 4, 3, 2 또는 1% 이하의 가변 도메인 또는 길항제가 비-일가 형태로 존재하는 것을 나타낸다.

[0098] 일 구체예에서, 본 발명의 길항제는 제1 및 제2 항-TNFR1 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하며, 여기서 각각의 가변 도메인은 본 발명의 임의의 태양 또는 구체예에 따른다. 상기 제1 및 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인은 일 예에서 동일하다. 다른 예에서 이들은 상이하다.

[0099] 길항제의 일 예에서, 본 발명의 길항제에서 상기 또는 각각의 항-TNFR1 단일 가변 도메인의 아미노산 서열은 DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 또는 DOM1h-574-214의 아미노산 서열과 동일하다.

[0100] 일 태양에서, 본 발명은 경구 전달, 환자의 위장관으로의 전달, 폐 전달, 환자의 폐로의 전달 또는 전신 전달을 위한 본 발명의 임의의 태양에 따른 항-TNFR1 가변 도메인을 포함하는 TNF α 수용체 1형(TNFR1; p55) 길항제를 제공한다. 다른 태양에서, 본 발명은 경구 전달을 위한 약제의 제조에서의 본 발명의 임의의 태양의 TNFR1 길항제의 용도를 제공한다. 또 다른 태양에서, 본 발명은 환자의 위장관으로의 전달을 위한 약제의 제조에서의 본 발명의 임의의 태양의 TNFR1 길항제의 용도를 제공한다. 일 예에서, 길항제 또는 가변 도메인은 트립신, 엘

라스타제 및/또는 판크레아틴에 대해 내성이다 (W02009149143 참조).

- [0101] 일 태양에서, 본 발명은 폐 전달을 위한 약제의 제조에서의 본 발명의 임의의 태양의 TNFR1 길항제의 용도를 제공한다.
- [0102] 다른 태양에서, 본 발명은 환자의 폐로의 전달을 위한 약제의 제조에서의 본 발명의 임의의 태양의 TNFR1 길항제의 용도를 제공한다. 일 예에서, 길항제 또는 가변 도메인은 류코자임에 대해 내성이다.
- [0103] 일 태양에서, 본 발명은 경구 전달, 또는 환자의 위장관 또는 환자의 폐 또는 폐 조직으로의 약제의 전달 방법을 제공하며, 여기서 상기 방법은 환자에게 약제학적 유효량의 본 발명의 TNFR1 길항제를 투여하는 것을 포함한다.
- [0104] 일 태양에서, 본 발명은 인간, 무린 또는 사이노몰구스 원숭이 TNFR1에 결합하는 TNF α 수용체 1형(TNFR1; p55) 길항제를 제공하며, 상기 길항제는 DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 또는 DOM1h-574-214 서열과 동일하거나 50, 60, 70, 80, 90, 95 또는 98% 이상 동일한 CDR1 서열을 갖는다. 임의로, 상기 길항제는 또한 선택된 서열의 CDR2 서열과 동일하거나 50, 60, 70, 80, 90, 95 또는 98% 이상 동일한 CDR2 서열을 갖는다. 임의로, 부가적으로 또는 다르게는, 상기 길항제는 또한 선택된 서열의 CDR3 서열과 동일하거나 50, 60, 70, 80, 90, 95 또는 98% 이상 동일한 CDR3 서열을 갖는다.
- [0105] 일 태양에서, 본 발명은 인간, 무린 또는 사이노몰구스 원숭이 TNFR1에 결합하는 TNF α 수용체 1형(TNFR1; p55) 길항제를 제공하며, 상기 길항제는 DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 또는 DOM1h-574-214의 CDR2 서열과 동일하거나 50, 60, 70, 80, 90, 95 또는 98% 이상 동일한 CDR2 서열을 갖는다. 임의로, 상기 길항제는 또한 선택된 서열의 CDR3 서열과 동일하거나 50, 60, 70, 80, 90, 95 또는 98% 이상 동일한 CDR3 서열을 갖는다.
- [0106] 일 태양에서, 본 발명은 인간, 무린 또는 사이노몰구스 원숭이 TNFR1에 결합하는 TNF α 수용체 1형(TNFR1; p55) 길항제를 제공하며, 상기 길항제는 DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 또는 DOM1h-574-214의 CDR3 서열과 동일하거나 50, 60, 70, 80, 90, 95 또는 98% 이상 동일한 CDR3 서열을 갖는다.
- [0107] 일 태양에서, 본 발명은 인간, 무린 또는 사이노몰구스 원숭이 TNFR1에 결합하는 TNF α 수용체 1형(TNFR1; p55) 길항제를 제공하며, 상기 길항제는 DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 또는 DOM1h-574-214로부터 선택된 단일 가변 도메인의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3의 서열을 포함하는 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함한다.
- [0108] 본 발명은 염증 질환을 치료 및/또는 예방하기 위한 임의의 태양의 TNFR1 길항제를 제공한다. 본 발명은 염증 질환의 치료 및/또는 예방용 약제의 제조에서의 임의의 태양의 TNFR1 길항제의 용도를 제공한다. 길항제 또는 용도의 일 구체예에서, 상기 질환은 관절염, 다발성 경화증, 염증성 장질환 및 만성폐쇄폐병으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 예에서, 상기 관절염은 류머티스 관절염 또는 연소성 류머티스 관절염이다. 일 예에서, 상기 염증성 장질환은 크론병 및 궤양성 대장염(ulcerative colitis)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 예에서, 상기 만성폐쇄폐병은 만성 기관지염, 만성 폐쇄성 기관지염 및 폐기종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 예에서, 상기 폐기종은 세균성 폐기종이다. 일 예에서, 상기 세균성 폐기종은 포도구균(Staphylococcal) 폐렴이다.
- [0109] 본 발명은 호흡기 질환을 치료 및/또는 예방하기 위한 임의의 태양의 TNFR1 길항제를 제공한다. 본 발명은 호흡기 질환의 치료 및/또는 예방용 약제의 제조에서의 임의의 태양의 TNFR1 길항제의 용도를 제공한다. 일 예에서, 호흡기 질환은 폐 염증, 만성폐쇄폐병, 천식, 폐렴, 과민성 폐간질염, 호산구증가증을 갖는 폐 침윤물, 환

경성 폐질환, 폐렴, 기관지확장증, 낭성 섬유증, 간질성 폐질환, 원발성 폐고혈압, 폐혈전색전증, 늑막 장애, 중격 장애, 횡경막 장애, 저환기, 과호흡, 수면중 무호흡, 급성 호흡 곤란 증후군, 중피종, 육종, 이식거부, 이식편대숙주병, 폐암, 알러지성 비염, 알러지, 석면증, 아스페르길루스증, 아스페르길루스증, 기관지확장증, 만성기관지염, 폐기종, 호산구성 폐렴, 특발성 폐섬유증, 침습성 폐렴구균 질환, 인플루엔자, 비결핵성 미코박테리아, 홍막삼출, 진폐증, 뉴모시스티스병, 폐렴, 폐방선균증, 폐포단백증, 폐탄저병, 폐부종, 폐색전, 폐염증, 폐 X 조직구증, 폐고혈압, 폐의 노카르디아증, 폐결핵, 폐정맥폐쇄병, 류머티스성 폐 질환, 사르코이드증 및 베게너 육아종증으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0110] 폴리펩티드, dAb 및 길항제
- [0111] 폴리펩티드, 리간드, dAb, 리간드 또는 길항제는 이. 콜라이(*E. coli*) 또는 피키아(*Pichia*) 종(예컨대, 피. 파스토리스(*P. pastoris*))에서 발현될 수 있다. 일 구체예에서, 리간드 또는 dAb 단량체는 이. 콜라이(*E. coli*) 또는 피키아 종(예컨대, 피. 파스토리스(*P. pastoris*))에서 발현되는 경우 약 0.5 mg/L 이상의 양으로 분비된다. 비록 본 명세서에 기재된 리간드 및 dAb 단량체가 이. 콜라이(*E. coli*) 또는 피키아 종(예컨대, 피. 파스토리스(*P. pastoris*))에서 발현될 때 분비될 수 있으나, 이들은 이. 콜라이(*E. coli*) 또는 피키아 종을 사용하지 않는 합성 화학적 방법이나 생물학적 생성 방법과 같은 임의의 적합한 방법을 이용하여 제조될 수 있다.
- [0112] 일부 구체예에서, 폴리펩티드, 리간드, dAb, 리간드 또는 길항제는 예컨대 위치 108, 37, 44, 45 및/또는 47에서 카멜리드 생식신 항체 유전자 세그먼트(segment)에 의해 엔코딩되는 면역글로불린 가변 도메인에 유일한 하나 이상의 프레임워크 아미노산 또는 카멜리드 면역글로불린 가변 도메인을 포함하지 않는다. 일 구체예에서, 본 발명의 항-TNFR1 가변 도메인은 카바트 넘버링에 따른 위치 44에 G 잔기를 포함하며, 임의로 다른 위치, 예를 들어 위치 37 또는 103에 하나 이상의 카멜리드-특이적 아미노산을 포함한다.
- [0113] 본 발명에 따른 TNFR1의 길항제는 일가 또는 다가일 수 있다. 일부 구체예에서, 길항제는 일가이고 TNFR1과 상호작용하는 하나의 결합 부위를 포함하는데, 이 결합 부위는 본 발명의 폴리펩티드 또는 dAb에 의해 제공된다. 일가 길항제는 하나의 TNFR1에 결합되며 수용체의 활성화 및 신호전달을 초래할 수 있는 세포의 표면 상의 TNFR1의 가교결합 또는 클러스터링(clustering)을 유도하지 않을 수 있다. 본 발명에 따른 일가 길항제는 TNFR1의 도메인 1, 도메인 2, 도메인 3 또는 도메인 4에 결합할 수 있다. 구체예에서, 일가 길항제는 TNFR1의 도메인 4에 결합한다. 다른 구체예에서, 일가 길항제는 TNFR1의 하나 초과 도메인에 걸쳐 있는 에피토프에 결합한다. 따라서, 일 구체예에서, 일가 길항제는 TNFR1의 도메인 1과 2, 도메인 1과 3, 도메인 1과 4, 도메인 2와 3, 도메인 2와 4, 도메인 3과 4, 도메인 1, 2 및 3, 도메인 1, 2 및 4, 또는 도메인 1, 3 및 4에 결합할 수 있다.
- [0114] 다른 구체예에서, TNFR1의 길항제는 다가이다. TNFR1의 다가 길항제는 TNFR1에 대한 특정 결합 부위의 둘 이상의 카피를 함유하거나 TNFR1에 결합되는 둘 이상의 상이한 결합 부위를 함유할 수 있는데, 이 결합 부위들 중 하나 이상은 본 발명의 폴리펩티드 또는 dAb에 의해 제공된다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 대로 TNFR1의 길항제는 TNFR1에 결합되는 본 발명의 특정 폴리펩티드 또는 dAb의 둘 이상의 카피, 또는 TNFR1에 결합되는 본 발명의 둘 이상의 상이한 폴리펩티드 또는 dAb를 포함하는 이량체, 삼량체 또는 다량체일 수 있다. 일 구체예에서, TNFR1의 다가 길항제는 표준 세포 검정에서 TNFR1을 실질적으로 효능화(TNFR1의 효능제로 작용)시키지 않는다 (즉, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM, 10 μM, 100 μM, 1000 μM 또는 5,000 μM의 농도로 존재하는 경우에 상기 검정에서 TNF α (100 pg/ml)에 의해 유도되는 TNFR1 매개 활성화의 약 5% 이하를 유발함).
- [0115] 특정 구체예에서, TNFR1의 다가 길항제는 TNFR1의 요망되는 에피토프 또는 도메인에 대한 2개 이상의 결합 부위를 함유한다. 예를 들어, TNFR1의 다가 길항제는 TNFR1의 도메인 1 내의 동일한 에피토프에 결합하거나 TNFR1의 도메인 4 내의 동일한 에피토프에 결합하는 2개 이상의 결합 부위를 포함할 수 있다.
- [0116] 다른 구체예에서, TNFR1의 다가 길항제는 TNFR1의 상이한 에피토프 또는 도메인에 결합하는 본 발명의 폴리펩티드 또는 dAb에 의해 제공되는 2개 이상의 결합 부위를 함유한다. 예를 들어, TNFR1의 다가 길항제는 TNFR1의 도메인 1과 2, 도메인 1과 3, 도메인 1과 4, 도메인 2와 3, 도메인 2와 4, 도메인 3과 4, 도메인 1, 2 및 3, 도메인 1, 2 및 4, 또는 도메인 1, 3 및 4에 대한 결합 부위를 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 상기 다가 길항제는 W02006038027호에 기재된 바와 같이 표준 L929 세포독성 검정 또는 표준 HeLa IL-8 검정에서 약 1 nM, 또는 약 10 nM, 또는 약 100 nM, 또는 약 1 μM, 또는 약 10 μM의 농도로 존재하는 경우 TNFR1을 효능화시키지 않는다.
- [0117] TNFR1의 다른 길항제는 TNFR1로의 TNF α의 결합을 억제하지 않는다. 이러한 리간드(및 길항제)는 진단제로 유

용할 수 있는데, 이는 이들이 샘플 내의 TNFR1에 결합하여 이를 검출하거나, 정량하거나, 측정하는데 사용될 수 있고, 이는 TNFR1으로의 결합에 대해 샘플 내의 TNF와 경쟁하지 않을 것이기 때문이다. 따라서, TNFR1이 샘플 내에 존재하는지의 여부 또는 얼마나 많이 존재하는지의 여부의 정확한 결정이 이루어질 수 있다.

- [0118] 다른 구체예에서, 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제는 TNFR1에 결합하여 표준 세포 검정에서 ≤ 100 nM의 ND_{50} 으로 TNFR1의 활성을 길항시키고, ≤ 10 μ M의 농도에서 dAb는 상기 검정에서 TNFR1의 활성을 $\leq 5\%$ 로 효능화시킨다.
- [0119] 특정 구체예에서, 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제는 표준 세포 검정에서 TNFR1을 실질적으로 효능화 (TNFR1의 효능제로 작용)시키지 않는다 (즉, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M 또는 5,000 μ M의 농도로 존재하는 경우에 상기 검정에서 TNF α (100 pg/ml)에 의해 유도된 TNFR1 매개 활성의 약 5% 이하를 유발함).
- [0120] 특정 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제는 유효량이 투여되는 경우에 만성 염증 질환의 모델에서 유효하다. 일반적으로 유효량은 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg이다 (예컨대 약 1 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 3 mg/kg, 약 4 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 6 mg/kg, 약 7 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 9 mg/kg, 또는 약 10 mg/kg). 만성 염증 질환의 모델(WO2006038027호에 기재된 것을 참조)은 인간에서의 치료적 효능을 예보하는 것으로 당업자에게 인식된다.
- [0121] 특정 구체예에서, 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제는 표준 마우스 콜라겐 유도 관절염 모델에서 유효하다 (상기 모델의 세부사항은 WO2006038027호 참조). 예를 들어, 유효량의 폴리펩티드, 리간드 dAb 또는 길항제를 투여하는 것은 표준 마우스 콜라겐 유도 관절염 모델에서 4개의 사지의 평균 관절염 스코어 합계를 적절한 대조군에 비해 약 1 내지 약 16, 약 3 내지 약 16, 약 6 내지 약 16, 약 9 내지 약 16, 또는 약 12 내지 약 16까지 감소시킬 수 있다. 또 다른 예에서, 유효량의 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제를 투여하는 것은 표준 마우스 콜라겐 유도 관절염 모델에서 관절염의 징후의 발생을 적절한 대조군에 비해, 예를 들어, 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 10일, 약 14일, 약 21일 또는 약 28일까지 지연시킬 수 있다. 또 다른 예에서, 유효량의 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제를 투여하는 것은 표준 마우스 콜라겐 유도 관절염 모델에서 0 내지 약 3, 약 3 내지 약 5, 약 5 내지 약 7, 약 7 내지 약 15, 약 9 내지 약 15, 약 10 내지 약 15, 약 12 내지 약 15, 또는 약 14 내지 약 15의 4개 사지의 평균 관절염 스코어 합계를 야기할 수 있다.
- [0122] 다른 구체예에서, 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제는 관절염의 마우스 Δ ARE 모델(이러한 모델의 세부사항은 WO2006038027호 참조)에서 유효하다. 예를 들어, 유효량의 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제를 투여하는 것은 관절염의 마우스 Δ ARE 모델에서 평균 관절염 스코어를 적절한 대조군에 비해 약 0.1 내지 약 2.5, 약 0.5 내지 약 2.5, 약 1 내지 약 2.5, 약 1.5 내지 약 2.5, 또는 약 2 내지 약 2.5까지 감소시킬 수 있다. 또 다른 예에서, 유효량의 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제를 투여하는 것은 관절염의 마우스 Δ ARE 모델에서 관절염의 징후의 발생을 적절한 대조군에 비해, 예를 들어, 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 10일, 약 14일, 약 21일 또는 약 28일까지 지연시킬 수 있다. 또 다른 예에서, 유효량의 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제를 투여하는 것은 관절염의 마우스 Δ ARE 모델에서 0 내지 약 0.5, 약 0.5 내지 약 1, 약 1 내지 약 1.5, 약 1.5 내지 약 2, 또는 약 2 내지 약 2.5의 평균 관절염 스코어를 야기할 수 있다.
- [0123] 다른 구체예에서, 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제는 염증성 장질환(IBD)의 마우스 Δ ARE 모델(이러한 모델의 세부사항은 WO2006038027호 참조)에서 유효하다. 예를 들어, 유효량의 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제를 투여하는 것은 IBD의 마우스 Δ ARE 모델에서 평균 급성 및/또는 만성 염증 스코어를 적절한 대조군에 비해 약 0.1 내지 약 2.5, 약 0.5 내지 약 2.5, 약 1 내지 약 2.5, 약 1.5 내지 약 2.5, 또는 약 2 내지 약 2.5까지 감소시킬 수 있다. 또 다른 예에서, 유효량의 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제를 투여하는 것은 IBD의 마우스 Δ ARE 모델에서 IBD의 징후의 발생을 적절한 대조군에 비해, 예를 들어, 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 10일, 약 14일, 약 21일 또는 약 28일까지 지연시킬 수 있다. 또 다른 예에서, 유효량의 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제를 투여하는 것은 IBD의 마우스 Δ ARE 모델에서 0 내지 약 0.5, 약 0.5 내지 약 1, 약 1 내지 약 1.5, 약 1.5 내지 약 2, 또는 약 2 내지 약 2.5의 평균 급성 및/또는 만성 염증 스코어를 야기할 수 있다.
- [0124] 다른 구체예에서, 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제는 IBD의 마우스 텍스트란 설페이트 나트륨(DSS) 유도 모델(이러한 모델의 세부사항은 WO2006038027호 참조)에서 유효하다. 예를 들어, 유효량의 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제를 투여하는 것은 IBD의 마우스 DSS 모델에서 평균 중증도 스코어를 적절한 대조군에 비해 약 0.1 내지 약 2.5, 약 0.5 내지 약 2.5, 약 1 내지 약 2.5, 약 1.5 내지 약 2.5, 또는 약 2 내지 약

2.5까지 감소시킬 수 있다. 또 다른 예에서, 유효량의 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제를 투여하는 것은 IBD의 마우스 DSS 모델에서 IBD의 징후의 발생을 적합한 대조군에 비해, 예를 들어, 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 10일, 약 14일, 약 21일 또는 약 28일까지 지연시킬 수 있다. 또 다른 예에서, 유효량의 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제를 투여하는 것은 IBD의 마우스 DSS 모델에서 0 내지 약 0.5, 약 0.5 내지 약 1, 약 1 내지 약 1.5, 약 1.5 내지 약 2, 또는 약 2 내지 약 2.5의 평균 중증도 스코어를 야기할 수 있다.

[0125] 특정 구체예에서, 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제는 만성폐쇄폐병(COPD)의 마우스 담배 연기 모델(이러한 모델의 세부사항은 W02006038027호 및 W02007049017호 참조)에서 유효하다. 예를 들어, 유효량의 리간드를 투여하는 것은 적합한 대조군에 비해 COPD의 징후의 발생을 감소시키거나 지연시킬 수 있다.

[0126] 질환에 대해 보호하거나 이를 치료하는데 있어서 TNFR1의 길항제(예를 들어, 리간드, 항체 또는 이의 결합 단백질)의 효과를 스크리닝하는데 사용될 수 있는 동물 모델 시스템이 이용가능하다. 감수성 마우스에서 전신홍반 루푸스(SLE)를 시험하는 방법은 당 분야에 공지되어 있다 (Knight et al. (1978) J. Exp. Med., 147: 1653; Reinersten et al. (1978) New Eng. J. Med., 299: 515). 중증근무력증(MG)은 또 다른 중으로부터의 가용성 AchR 단백질을 이용하여 이러한 질환을 유도함으로써 SJL/J 암컷 마우스에서 시험된다 (Lindstrom et al. (1988) Adv. Immunol., 42: 233). 관절염은 II형 콜라겐의 주입에 의해 마우스의 감수성 스트레인에서 유도된다 (Stuart et al. (1984) Ann. Rev. Immunol., 42: 233). 애췌번트 관절염이 미코박테리아 열 충격 단백질의 주입에 의해 감수성 랫트에서 유도되는 모델이 기재되어 있다 (Van Eden et al. (1988) Nature, 331:171). 갑상선염은 기재된 바와 같이 티로글로불린(thyroglobulin)의 투여에 의해 마우스에서 유도된다 (Maron et al. (1980) J. Exp. Med., 152: 1115). 인슐린 의존성 당뇨병(IDDM)은 자연 발생하거나, 문헌[Kanasawa et al. (1984) Diabetologia, 27:113]에 기재된 바와 같이 마우스의 특정 스트레인에서 유도될 수 있다. 마우스 및 랫트에서의 EAE는 인간에서의 MS에 대한 모델로 제공된다. 이러한 모델에서, 탈수초성 질병은 수초 염기성 단백질의 투여에 의해 유도된다 (Paterson (1986) Textbook of Immunopathology, Mischer et al., eds., Grune and Stratton, New York, pp. 179-213; McFarlin et al. (1973) Science, 179: 478; and Satoh et al. (1987) J. Immunol., 138: 179 참조).

[0127] 일반적으로, 본 리간드 (예컨대, 길항제)는 약리학적으로 적합한 담체와 함께 정제된 형태로 사용될 것이다. 전형적으로, 이러한 담체는 수성 또는 알코올/수용액, 에멀전 또는 현탁액, 염수 및/또는 완충된 매질을 포함하는 임의의 것을 포함한다. 비경구 비히클은 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로오스, 텍스트로오스와 염화나트륨 및 락테이트화 링거를 포함한다. 필요에 따라, 폴리펩티드 복합체를 현탁액에 유지하기 위하여, 적합한 약리학적으로 허용되는 애췌번트를 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 젤라틴 및 알기네이트와 같은 증점제로부터 선택할 수 있다.

[0128] 정맥내 비히클은 링거 텍스트로오스에 기초한 것들과 같은, 유체 및 영양소 보충물 및 전해질 보충물을 포함한다. 보존제 및 기타 첨가제, 예컨대 항균제, 항산화제, 킬레이팅제 및 불활성 가스도 존재할 수 있다 (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition). 연장된 방출 제형을 포함하는 다양한 적합한 제형이 이용될 수 있다.

[0129] 본 발명의 리간드(예컨대, 길항제)는 별도로 또는 다른 작용제와 함께 투여되는 조성물로서 이용될 수 있다. 이들은 다양한 면역치료적 약물, 예컨대 시클로스포린, 메토타렉세이트, 아드리아마이신 또는 시스플라틴, 및 면역독소를 포함할 수 있다. 약제학적 조성물은 본 발명의 리간드와 함께 다양한 세포독성제 또는 기타 작용제의 "칵테일", 또는 심지어 상이한 특이성을 지니는 본 발명에 따른 리간드의 조합물을 포함하는데, 예컨대 리간드는 이들이 투여 전에 풀링되는지와 무관하게, 상이한 표적 항원 또는 에피토프를 이용하여 선택된다.

[0130] 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 투여 경로는 당업자에게 일반적으로 공지된 임의의 경로일 수 있다. 제한 없이 면역치료법을 포함하는 치료법을 위해, 본 발명에서 선택된 이의 리간드를 표준 기술에 따라 임의의 환자에게 투여할 수 있다.

[0131] 투여는 비경구, 정맥내, 근육내, 복강내, 피하, 경피, 폐 경로를 거쳐, 또는 적합하게는 카테터를 이용한 직접 주입에 의한 것을 포함하는 임의의 적합한 방식으로 이루어질 수 있다. 투여 용량 및 빈도는 환자의 연령, 성별 및 상태, 다른 약물의 동시 투여, 맞조치(counterindication) 및 의사에 의해 고려되는 다른 파라미터에 의존적일 것이다. 투여는 지시된 대로 국소적 (예컨대, 폐 투여에 의해 폐로의 국소 전달, 예컨대 비내 투여) 또는 전신적일 수 있다.

- [0132] 본 발명의 리간드는 저장을 위해 동결건조되고 사용 전에 적합한 담체에서 재구성될 수 있다. 이 기술은 통상적인 면역글로불린에 효과적인 것으로 나타나 있으며 당업계에 공지된 동결건조 및 재구성 기술을 사용할 수 있다. 당업자는 동결건조 및 재구성이 다양한 정도의 항체 활성 손실을 초래할 수 있고 (예컨대, 통상적인 면역글로불린의 경우, IgM 항체는 IgG 항체보다 큰 활성 손실을 지니기 쉽다) 이용 수준은 보상을 위해 상향 조정되어야 할 수 있음을 이해할 것이다.
- [0133] 본 리간드(예컨대, 길항제) 또는 이의 각테일을 함유하는 조성물을 예방 및/또는 치료적 처치를 위해 투여할 수 있다. 특정 치료적 적용에서, 선택된 세포 집단의 적어도 부분적인 억제, 억압, 조절, 치사, 또는 몇몇 다른 측정가능한 파라미터를 달성하기에 충분한 양은 "치료적 유효량"으로서 정의된다. 이 용량을 달성하는데 요구되는 양은 질환의 중증도 및 환자 자신의 면역계의 일반적인 상태에 의해 좌우될 것이나 일반적으로 체중 킬로그램 당 0.005 내지 10.0 mg의 리간드, 예컨대 dAb 또는 길항제 범위일 것이며, 0.05 내지 2.0 mg/kg/용량이 더욱 일반적으로 사용된다. 예방적 적용을 위해, 본 리간드 또는 이의 각테일을 함유하는 조성물을 질환의 발병을 예방, 억제 또는 지연(예컨대, 관해 또는 정지의 유지, 또는 급성기 예방)하기 위해 유사하거나 다소 낮은 용량으로 투여할 수 있다. 숙련된 의사는 질환을 치료, 억제 또는 예방하기 위한 적절한 투여 간격을 결정할 수 있을 것이다. 만성 염증 질환을 치료, 억제 또는 예방하기 위해 TNFR1의 리간드(예컨대, 길항제)를 투여할 때, 이것은 예를 들어, 약 10 μ g/kg 내지 약 80 mg/kg, 약 100 μ g/kg 내지 약 80 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 80 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 70 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 60 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 40 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 10 μ g/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 10 μ g/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 10 μ g/kg 내지 약 2.5 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 3 mg/kg, 약 4 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 6 mg/kg, 약 7 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 9 mg/kg 또는 약 10 mg/kg의 용량으로 하루에 4회 이하, 1주에 2회, 1주에 1회, 2주에 1회, 매 1개월에 1회나 매 2개월에 1회 투여될 수 있다. 특정 구체예에서, TNFR1의 리간드(예컨대, 길항제)를 만성 염증 질환을 치료, 억제 또는 예방하기 위해 약 10 μ g/kg 내지 약 10 mg/kg(예컨대, 약 10 μ g/kg, 약 100 μ g/kg, 약 1 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 3 mg/kg, 약 4 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 6 mg/kg, 약 7 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 9 mg/kg 또는 약 10 mg/kg)의 용량으로 매 2주에 1회 또는 1개월에 1회 투여한다.
- [0134] 하나 이상의 징후가 치료 전에 존재하는 동일한 징후에 비해, 또는 상기 조성물이나 기타 적합한 대조군으로 치료되지 않은 개체(인간 또는 모델 동물)에서의 동일한 징후에 비해 감소된 경우(예컨대, 10% 이상 또는 임상적 평가 척도 상에서 1점 이상만큼) 본 명세서에 개시된 조성물을 이용하여 수행된 치료 또는 치료법은 "효과적"인 것으로 간주된다. 징후는 표적으로 하는 질환 또는 질병에 따라 명백히 다양할 것이나, 보통의 숙련된 의사 또는 전문가에 의해 측정될 수 있다. 이러한 징후는, 예를 들어 질환 또는 질병의 하나 이상의 생화학적 지표의 수준(예컨대, 질환과 관련된 효소 또는 대사산물, 영향받은 세포 수 등의 수준)을 모니터링하거나, 물리적 조짐(예컨대, 염증, 종양 크기 등)을 모니터링하거나, 인정된 임상적 평가 척도, 예를 들어, 확장장애상태척도(Expanded Disability Status Scale)(다발성 경화증에 대한 것임), 어빈 염증성 장질환 질문서(장 기능, 전신 징후, 사회적 기능 및 감정 상태와 관련된 삶의 질을 평가하는 32 포인트의 평가 - 32 내지 224 범위의 스코어, 보다 높은 스코어는 보다 나은 삶의 질을 나타냄), 류머티스 관절염 스케일의 삶의 질, 또는 당 분야에 공지된 다른 허용되는 임상 평가 스케일에 의해 판단될 수 있다. 제공된 임상 스케일에서 10% 이상 또는 1점 이상의 질환 또는 질병 징후의 지속된(예를 들어, 1일 이상, 또는 이 이상의 기간) 감소는 "효과적인" 치료를 나타낸다. 유사하게, 본 명세서에 기재된 조성물을 이용하여 수행된 예방은 조성물로 치료되지 않은 유사한 개체(인간 또는 동물 모델)에서의 징후에 비해 하나 이상의 징후의 발생 또는 중증도가 지연되거나, 감소되거나, 제거된 경우에 "효과적"이다.
- [0135] 포유동물에서 선택 표적 세포 집단을 변경, 비활성화, 사멸 또는 제거하는 것을 돕기 위해 본 발명에 따른 리간드(예컨대, 길항제) 또는 이의 각테일을 함유하는 조성물을 예방적 및 치료적 환경에서 이용할 수 있다. 또한, 본 명세서에 개시된 폴리펩티드의 선택된 레퍼토리는 체외순환에 의해서나 시험관 내에서 표적 세포 집단을 세포의 이중 집합물로부터 선택적으로 사멸, 고갈 또는 달리 효과적으로 제거하기 위해 이용될 수 있다. 포유동물로부터의 혈액을 체외순환에 의해 리간드와 조합시킴으로써 요망되지 않는 세포를 사멸시키거나 다르게는 표준 기술에 따라 포유동물로 돌려보내기 위해 혈액으로부터 제거할 수 있다.
- [0136] 포유동물에서 선택 표적 세포 집단을 변경, 비활성화, 사멸 또는 제거하는 것을 돕기 위해 본 발명에 따른 리간드(예컨대, 길항제)를 함유하는 조성물을 예방적 및 치료적 환경에서 이용할 수 있다.
- [0137] 리간드(예컨대, 항-TNFR1 길항제, dAb 단량체)를 하나 이상의 추가의 치료제 또는 활성제와 함께 투여하고/거나 제형화할 수 있다. 리간드(예컨대, dAb)를 추가의 치료제와 함께 투여할 때, 리간드는 추가 작용제의 투여 이

전에, 이와 동시에 또는 이에 후속하여 투여될 수 있다. 일반적으로, 리간드와 추가 작용제는 치료적 효과의 중복을 제공하는 방식으로 투여된다.

- [0138] 일 구체예에서, 본 발명은 치료적 유효 용량 또는 유효량의 본 발명에 따른 TNFR1의 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제를 만성 염증 질환의 치료, 억제, 또는 예방이 필요한 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 만성 염증 질환의 치료, 억제, 또는 예방 방법이다.
- [0139] 일 구체예에서, 본 발명은 치료적 유효 용량 또는 유효량의 본 발명에 따른 TNFR1의 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제를 관절염(예를 들어, 류머티스 관절염, 연소성 류머티스 관절염, 강직성 척추염, 건선성 관절염)의 치료, 억제, 또는 예방이 필요한 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 관절염의 치료, 억제, 또는 예방 방법이다.
- [0140] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 치료적 유효 용량 또는 유효량의 본 발명에 따른 TNFR1의 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제를 건선의 치료, 억제, 또는 예방이 필요한 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 건선의 치료, 억제, 또는 예방 방법이다.
- [0141] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 치료적 유효 용량 또는 유효량의 본 발명에 따른 TNFR1의 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제를 염증성 장질환(예를 들어, 크론병, 궤양성 대장염)의 치료, 억제, 또는 예방이 필요한 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 염증성 장질환의 치료, 억제, 또는 예방 방법이다.
- [0142] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 치료적 유효 용량 또는 유효량의 본 발명에 따른 TNFR1의 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제를 만성폐쇄폐병(예를 들어, 만성 기관지염, 만성 폐쇄성 기관지염, 폐기종)의 치료, 억제, 또는 예방이 필요한 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 만성폐쇄폐병의 치료, 억제, 또는 예방 방법이다.
- [0143] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 치료적 유효 용량 또는 유효량의 본 발명에 따른 TNFR1의 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제를 폐렴(예를 들어, 세균성 폐렴, 예를 들어, 포도구균 폐렴)의 치료, 억제, 또는 예방이 필요한 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 폐렴의 치료, 억제, 또는 예방 방법이다.
- [0144] 본 발명은 만성폐쇄폐병 및 폐렴 외의 다른 폐 질환의 치료, 억제, 또는 예방 방법을 제공한다. 본 발명에 따라 치료되거나, 억제되거나, 예방될 수 있는 다른 폐 질환은, 예를 들어, 낭성 섬유증 및 천식(예를 들어, 스테로이드 내성 천식)을 포함한다. 따라서, 또 다른 구체예에서, 본 발명은 치료적 유효 용량 또는 유효량의 본 발명에 따른 TNFR1의 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제를 폐 질환(예를 들어, 낭성 섬유증, 천식)의 치료, 억제, 또는 예방이 필요한 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 폐 질환의 치료, 억제, 또는 예방 방법이다.
- [0145] 특정 구체예에서, TNFR1의 길항제는 폐 전달, 예를 들어, 흡입(예를 들어, 기관지내, 비내 또는 경구 흡입, 비내 점적) 또는 전신 전달(예를 들어, 비경구, 정맥내, 근육내, 복강내, 피하)에 의해 투여된다.
- [0146] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 치료적 유효 용량 또는 유효량의 본 발명에 따른 TNFR1의 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제를 패혈성 쇼크의 치료, 억제, 또는 예방이 필요한 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 패혈성 쇼크의 치료, 억제, 또는 예방 방법이다.
- [0147] 본 발명의 추가의 태양에서, 본 발명에 따른 TNFR1의 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제, 및 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 조성물이 제공된다.
- [0148] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 TNFR1의 폴리펩티드, 리간드, dAb 또는 길항제, 또는 조성물을 이용하여 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 상기 질환은 암 또는 염증 질환, 예를 들어, 류머티스 관절염, 천식 또는 크론병이다.
- [0149] 본 발명의 추가의 태양에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드, 단일 가변 도메인, 리간드 또는 길항제 및 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 조성물이 제공된다.
- [0150] 특정 구체예에서, 폴리펩티드, 리간드, 단일 가변 도메인, 길항제 또는 조성물은 폐 전달, 예를 들어, 흡입(예를 들어, 기관지내, 비내 또는 경구 흡입, 비내 점적) 또는 전신 전달(예를 들어, 비경구, 정맥내, 근육내, 복강내, 피하)에 의해 투여된다.
- [0151] 본 발명의 일 태양은 본 발명에 따른 폴리펩티드, 단일 가변 도메인, 리간드, 조성물 또는 길항제를 함유하는 폐 전달 장치를 제공한다. 상기 장치는 흡입기 또는 비내 투여 장치일 수 있다.
- [0152] 다른 구체예에서, 본 명세서에 기재된 리간드 (예를 들어, 길항제 또는 단일 가변 도메인) 중 임의의 것은 반감

기 연장 부분, 예를 들어 폴리알킬렌 글리콜 부분, 혈청 알부민 또는 그의 단편, 트랜스페린 수용체 또는 그의 트랜스페린-결합 부분, 또는 생체 내 반감기를 증가시키는 폴리펩티드에 대한 결합 부위를 포함하는 부분을 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 반감기 연장 부분은 친화체(affibody), SpA 도메인, LDL 수용체 클래스 A 도메인, EGF 도메인 및 아비머(avimer)로 이루어진 군으로부터 선택되는, 생체 내 반감기를 증가시키는 폴리펩티드에 대한 결합 부위를 포함하는 부분이다.

[0153] 다른 구체예에서, 반감기 연장 부분은 폴리에틸렌 글리콜 부분이다. 일 구체예에서, 길항제는 폴리에틸렌 글리콜 부분 (임의로, 여기서 상기 부분은 크기가 약 20 내지 약 50 kDa, 임의로 약 40 kDa 선형 또는 분지형 PEG임)에 연결된 본 발명의 단일 가변 도메인을 포함한다 (임의로, 이로 이루어진다). dAb의 페길화(PEGylation) 및 결합 부분에 대한 더욱 상세사항에 대해서는 W004081026호를 참조하길 바란다. 일 구체예에서, 길항제는 PEG에 연결된 dAb 단량체로 이루어지며, 여기서, dAb 단량체는 본 발명에 따른 단일 가변 도메인이다. 이 길항제는 염증 질환, 폐 질환(예를 들어, 천식, 인플루엔자 또는 COPD) 또는 암의 치료를 위해 제공될 수 있으며, 임의로 이는 정맥내 투여용이다.

[0154] 다른 구체예에서, 반감기 연장 부분은 혈청 알부민 또는 신생아 Fc 수용체에 대한 결합 부위를 포함하는 항체 또는 항체 단편(예를 들어, 면역글로불린 단일 가변 도메인)이다.

[0155] 본 발명은 또한 본 발명의 리간드(예를 들어, 길항제 또는 단일 가변 도메인) 및 생리적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물)에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 조성물은 정맥내, 근육내, 복강내, 동맥내, 척추강내, 관절내, 피하 투여, 폐, 비내, 질내 또는 직장내 투여용 비히클을 포함한다.

[0156] 본 발명은 또한 본 발명의 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물)을 포함하는 약물 전달 장치에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 약물 전달 장치는 다수의 치료적 유효 용량의 리간드를 포함한다. 다른 구체예에서, 약물 전달 장치는 비경구 전달 장치, 정맥내 전달 장치, 근육내 전달 장치, 복강내 전달 장치, 경피 전달 장치, 폐 전달 장치, 동맥내 전달 장치, 척수강내 전달 장치, 관절내 전달 장치, 피하 전달 장치, 비내 전달 장치, 질내 전달 장치, 직장내 전달 장치, 주사기, 경피 전달 장치, 캡슐, 정제, 네블라이저, 흡입기, 아토마이저, 에어로졸분무기, 미스터(mister), 건조 분말 흡입기, 정량식 흡입기, 정량식 스프레이, 정량식 미스터, 정량식 아토마이저, 및 카테터로 이루어진 군에서 선택된다.

[0157] 본 발명의 리간드(예를 들어, 단일 가변 도메인, 길항제 또는 다중특이적 리간드)는 본 명세서에 기재된 바와 같이 포맷화될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 리간드는 생체내 혈청 반감기를 조정하기 위해 포맷화될 수 있다. 필요에 따라, 리간드는 본 명세서에 기재된 독소 또는 독소 부분을 추가로 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 리간드는 자유 라디칼 생성체(예를 들어, 셀레늄 함유 독소) 또는 방사성핵종(radionuclide)과 같은 표면 활성 독소를 포함한다. 다른 구체예에서, 독소 또는 독소 부분은 세포내 표적에 대한 결합 특이성이 있는 결합 부위를 갖는 폴리펩티드 도메인(예를 들어, dAb)이다. 특정 구체예에서, 리간드는 TNFR1(예를 들어, 인간 TNFR1)에 대한 결합 특이성을 갖는 IgG-형 포맷이다.

[0158] 일 태양에서, 본 발명은 본 발명의 단일 가변 도메인을 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 가변 도메인은 예를 들어, 펩티드 또는 폴리펩티드 또는 단백질에 융합될 수 있다. 일 구체예에서, 가변 도메인은 항체 또는 항체 단편, 예를 들어, 모노클로날 항체에 융합된다. 일반적으로, 융합은 단일 핵산 서열로부터 융합 생성물을 발현하거나, 단일 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 발현한 다음, 이 폴리펩티드를 통상적인 기법을 사용하여 더 큰 단백질 또는 항체 포맷으로 어셈블링(assembly)함으로써, 달성될 수 있다.

[0159] 일 구체예에서, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 길항제 또는 융합 단백질은 항체 불변 도메인을 포함한다. 일 구체예에서, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 길항제 또는 융합 단백질은 항체 Fc를 포함하며, 임의로, 여기서 Fc의 N-말단은 가변 도메인의 C-말단에 연결된다 (임의로 직접 연결된다). 일 구체예에서, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 길항제 또는 융합 단백질은 반감기 연장 부분을 포함한다. 반감기 연장 부분은 폴리에틸렌 글리콜 부분, 혈청 알부민 또는 그의 단편, 트랜스페린 수용체 또는 그의 트랜스페린-결합 부분, 또는 생체 내에서 반감기를 증가시키는 폴리펩티드에 대한 결합 부위를 포함하는 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 반감기 연장 부분은 혈청 알부민 또는 신생아 Fc 수용체에 대한 결합 부위를 포함하는 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 반감기 연장 부분은 dAb, 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 일 구체예에서, 가변 도메인(또는 길항제 또는 융합 단백질이 포함하는 가변 도메인)이 폴리알킬렌 글리콜 부분을 추가로 포함하도록 면역글로불린 단일 가변 도메인 또는 길항제 또는 융합 단백질이 제공된다. 폴리알킬렌 글리콜 부분은 폴리에틸렌 글리콜 부분일 수 있다. 추가의 검토가 하기에 제공된다.

- [0160] W02006038027호를 참조하길 바라며, 이는 항-TNFR1 면역글로불린 단일 가변 도메인을 개시한다. 이 참고문헌의 개시내용은 특히 본 명세서의 청구범위로의 도입을 위한 명시적인 설명을 제공하는 것을 비롯하여, 항-TNFR1 단일 가변 도메인, 리간드, 길항제 등에 대한 용도, 포맷, 선택 방법, 생성 방법, 제형화 방법 및 검정을 제공하기 위하여, 이들 개시물이 본 발명의 문맥에 특별히 그리고 명시적으로 적용될 수 있도록 본 명세서에 그 전문이 참고문헌으로 포함된다.
- [0161] 본 발명의 항-TNFR1은 면역글로불린 단일 가변 도메인이며, 임의로 인간 가변 도메인이거나 인간 프레임워크 영역 (예를 들어, DP47 또는 DPK9 프레임워크 영역)을 포함하거나 이로부터 유래되는 가변 도메인이다. 특정 구체예에서, 가변 도메인은 본 명세서에 기재된 유니버설 프레임워크를 기반으로 한다.
- [0162] 특정 구체예에서, TNFR1에 대한 결합 특이성이 있는 결합 부위를 갖는 폴리펩티드 도메인 (예를 들어, 면역글로불린 단일 가변 도메인)은 내용집성이며, 가역적으로 언폴드(unfold)된다 (그 교시가 본 명세서에 참고문헌으로 포함되는 W004101790호를 참조하길 바란다).
- [0163] 핵산 분자, 벡터 및 숙주 세포
- [0164] 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 바와 같은 리간드(단일 가변 도메인, 융합 단백질, 폴리펩티드, 이중특이적 리간드 및 다중특이적 리간드)를 엔코딩하는 분리된 핵산 분자 및/또는 재조합 핵산 분자를 제공한다.
- [0165] 일 태양에서, 본 발명은 본 발명에 따른 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 분리된 핵산 또는 재조합 핵산을 제공한다. 일 구체예에서, 핵산은 DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 또는 DOM1h-574-214의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 태양에서, 본 발명은 분리된 핵산 또는 재조합 핵산을 제공하며, 여기서, 상기 핵산은 DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 또는 DOM1h-574-214의 뉴클레오티드 서열과 80, 85, 90, 95, 98 또는 99% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 핵산은 TNFR1에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩한다. 일 태양에서, 본 발명은 분리된 핵산 또는 재조합 핵산을 제공하며, 여기서, 상기 핵산은 DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 또는 DOM1h-574-214의 뉴클레오티드 서열과 80, 85, 90, 95, 98 또는 99% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 핵산은 TNFR1에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩한다. 일 태양에서, 본 발명은 분리된 핵산 또는 재조합 핵산을 제공하며, 여기서, 상기 핵산은 DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 또는 DOM1h-574-214의 뉴클레오티드 서열과 80, 85, 90, 95, 98 또는 99% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 핵산은 TNFR1에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩한다.
- [0166] 일 태양에서, 본 발명은 본 발명의 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 일 태양에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 숙주 세포를 상기 핵산 또는 벡터의 발현에 적합한 조건 하에 유지시킴으로써, 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 생성하는 단계를 포함하여, 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 생성하는 방법이 제공된다. 임의로, 이 방법은 폴리펩티드를 분

리하고, 임의로 분리된 폴리펩티드보다 표준 MRC5, L929 또는 사이노몰구스 KI 검정에서 개선된 친화성(KD); TNFR1 중화에 대한 ND₅₀을 갖는 변이체, 예를 들어 돌연변이된 변이체를 생성하는 단계를 추가로 포함한다.

[0167] 본 발명에서 "분리된"으로 지칭되는 핵산은 그들의 기원 (예를 들어, 세포 내에 존재하거나 또는 라이브러리화 같은 핵산 혼합물의 존재)의 세포 RNA 또는 게놈(genomic) DNA의 핵산으로부터 분리된 핵산이며, 이는 본 발명에 기술된 방법 또는 다른 적합한 방법에 의해 수득된 핵산을 포함하며, 본질적으로 순수한 핵산, 화학적 합성, 생물학 및 화학적 방법의 조합에 의해 생성된 핵산, 및 분리된 재조합 핵산을 포함한다 (예를 들어, 문헌[Daugherty, B.L. et al., *Nucleic Acids Res.*, 19(9): 2471-2476 (1991)]; 문헌[Lewis, A.P. and J.S. Crowe, *Gene*, 101: 297-302 (1991)]을 참조하길 바란다).

[0168] 본 명세서에서 "재조합"으로 지칭되는 핵산은 재조합 DNA 방법에 의해 생성된 핵산이며, 중합효소 연쇄 반응(PCR) 및/또는 제한효소를 이용한 벡터로의 클로닝과 같은 인공 재조합 방법에 의존하는 절차에 의하여 생성되는 핵산을 포함한다.

[0169] 특정 구체예에서, 분리된 핵산 및/또는 재조합 핵산은 본 명세서에서 기재된 리간드를 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는데, 상기 리간드는 본 명세서에 개시된 TNFR1에 결합하는 dAb의 아미노산 서열, 예를 들어 DOM1h-574-188, DOM1h-574-189, DOM1h-574-190, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-193, DOM1h-574-194, DOM1h-574-195, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-202, DOM1h-574-203, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206, DOM1h-574-207, DOM1h-574-208, DOM1h-574-209, DOM1h-574-211, DOM1h-574-212, DOM1h-574-213 또는 DOM1h-574-214와 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 또는 약 99% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다. 뉴클레오티드 서열 동일성은 선택된 항-TNFR1 dAb를 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열의 전체 길이에 비해 결정될 수 있다.

[0170] 또한, 본 발명은 본 발명의 재조합 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다. 특정 구체예에서, 벡터는 본 발명의 재조합 핵산에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 발현 제어 엘리먼트(element) 또는 서열을 포함하는 발현 벡터이다. 또한, 본 발명은 본 발명의 재조합 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 재조합 숙주 세포를 제공한다. 적합한 벡터(예를 들어, 플라스미드, 파지미드), 발현 제어 엘리먼트, 숙주 세포 및 본 발명의 재조합 숙주 세포를 생성시키는 방법은 해당 분야에 널리 공지되어 있고, 예가 본 명세서에 추가로 설명되어 있다.

[0171] 적합한 발현 벡터는 다수의 성분, 예를 들어 복제 기점, 선택가능한 마커 유전자, 하나 이상의 발현 제어 엘리먼트, 예를 들어 전사 제어 엘리먼트 (예를 들어, 프로모터, 인핸서, 터미네이터) 및/또는 하나 이상의 번역 신호, 신호 서열 또는 리더(leader) 서열 등을 함유할 수 있다. 발현 제어 엘리먼트 및 신호 서열은 존재하는 경우 벡터 또는 다른 공급원에 의해 제공될 수 있다. 예를 들어, 항체 사슬을 엔코딩하는 클로닝된 핵산의 전사 및/또는 번역 제어 서열이 발현을 지시하는데 사용될 수 있다.

[0172] 프로모터는 요망되는 숙주 세포에서의 발현을 위해 제공될 수 있다. 프로모터는 항시성(constitutive) 또는 유도성일 수 있다. 예를 들어, 프로모터는 핵산의 전사를 지시하도록 항체, 항체 사슬 또는 이의 부분을 엔코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결될 수 있다. 원핵(예를 들어, 이. 콜라이(*E.coli*)의 경우 lac, tac, T3, T7 프로모터) 및 진핵(예를 들어, 시미안(simian) 바이러스 40 초기 또는 후기 프로모터, 라우스(Rous) 육종 바이러스 긴 말단 반복 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터) 숙주에 대한 다양한 적합한 프로모터가 이용가능하다.

[0173] 또한, 발현 벡터는 전형적으로 벡터를 수반하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택가능한 마커를 포함하며, 복제 가능한 발현 벡터의 경우, 복제 기점을 포함한다. 항생제 또는 약물 내성을 부여하는 생성물을 엔코딩하는 유전자는 공통의 선택가능한 마커이며, 원핵 세포(예를 들어, 락타마아제 유전자(암피실린 내성), 테트라사이클린 내성을 위한 Tet 유전자) 및 진핵 세포(예를 들어, 네오마이신(G418 또는 제네티신), gpt(마이코페놀산), 암피실린, 또는 하이그로마이신 내성 유전자)에 사용될 수 있다. 디하이드로폴레이트 환원효소 마커 유전자는 다양한 숙주에서 메토타렉세이트를 사용한 선택을 가능하게 한다. 숙주의 영양요구성 마커의 유전자 생성물을 엔코딩하는 유전자(예를 들어, *LEU2*, *URA3*, *HIS3*)는 종종 효모의 선택가능한 마커로서 사용된다. 바이러스(예를 들어, 배콜로바이러스) 또는 파지 벡터, 및 숙주 세포의 게놈으로 통합할 수 있는 벡터, 예컨대 레트로바이러스 벡터의 이용이 또한 고려된다. 포유동물 세포 및 원핵 세포(이. 콜라이(*E.coli*)), 곤충 세포(드로소필라 슈나이더(*Drosophila Schnieder*) S2 세포, Sf9) 및 효모(피. 메타놀리카(*P. methanolica*), 피. 파스토리스(*P. pastoris*), 에스. 세레비지애(*S. cerevisiae*))에서 발현하기에 적합한 발현 벡터는 해당 분야에 널리 공지되어

있다.

- [0174] 적합한 숙주 세포는 이. 콜라이(*E. coli*), 비. 서브틸리스(*B. subtilis*) 및/또는 다른 적합한 박테리아와 같은 박테리아 세포를 포함하는 원핵 세포; 진핵 세포, 이를 테면 진균 또는 효모 세포(예를 들어, 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 아스퍼길루스 종(*Aspergillus* sp.), 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 스킴조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)), 또는 다른 하등 진핵 세포, 및 고등 진핵생물의 세포, 예를 들어 곤충(예를 들어, 드로소필라 슈나이더 S2 세포, Sf9 곤충 세포(W094/26087호(O'Connor))), 포유동물(예를 들어, COS-1(ATCC 수탁 번호 CRL-1650) 및 COS-7(ATCC 수탁 번호 CRL-1651)와 같은 COS 세포, CHO(예를 들어, ATCC 수탁 번호 CRL-9096, CHO DG44(문헌[Urlaub, G. and Chasin, LA., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77(7):4216-4220 (1980)])), 293(ATCC 수탁 번호 CRL-1573), HeLa(ATCC 수탁 번호 CCL-2), CV1(ATCC 수탁 번호 CCL-70), WOP(문헌[Dailey, L., et al., J. Virol, 54:739-749 (1985)]), 3T3, 293T(문헌[Pear, W. S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90:8392-8396 (1993)]) NSO 세포, SP2/O, HuT 78 세포 등, 또는 식물(예를 들어 담배)로부터의 세포일 수 있다 (예를 들어, 문헌[Ausubel, F.M. et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc. (1993)] 참조). 일부 구체예에서, 숙주 세포는 분리된 숙주 세포이며, 다세포 생물(예를 들어, 식물 또는 동물)의 일부가 아니다. 특정 구체예에서, 숙주 세포는 비인간(non-human) 숙주 세포이다.
- [0175] 또한, 본 발명은 본 발명의 제조합 핵산을 포함하는 제조합 숙주 세포를 제조합 핵산의 발현에 적합한 조건 하에서 유지시킴으로써 제조합 핵산이 발현되어 리간드가 생성되는 단계를 포함하여 본 발명의 리간드(예를 들어, 이중-특이적 리간드, 다중특이적 리간드)를 생성시키는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 리간드를 분리하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0176] 본 발명의 구체예에 적용가능한 개시물의 상세사항을 위하여 W02006038027호를 참조하길 바란다. 예를 들어, 관련 개시물은 면역글로불린 단일 가변 도메인 기반의 리간드의 제조, 라이브러리 벡터 시스템, 라이브러리 작제, 단일 가변 도메인의 결합, 리간드의 특성화, 리간드의 구조, 골격, 단백질 스캐폴드, 정규 서열(Canonical sequence)의 다변화, 검정, 및 치료 및 진단 조성물 및 용도, 뿐만 아니라 "작동가능하게 연결된", "나이프", "예방", "억제", "치료", 및 "치료적 유효 용량"의 정의에 관한 것이다.
- [0177] 포맷
- [0178] 증가된 반감기는 면역글로불린, 특히 항체 및 가장 특히 작은 크기의 항체 단편의 생체 내 적용에 유용하다. 이러한 단편(Fv, 이항화 결합된 Fv, Fab, scFv, dAb)은 신체로부터의 신속한 제거를 경험하므로, 이들은 신체의 대부분에 신속하게 도달하고 생성이 빠르며 다루기가 용이한 한편, 이들의 생체내 적용은 생체내에서의 이들의 짧은 지속성에 의해 제한되어 왔다. 본 발명의 일 구체예는 생체 내에서 리간드의 반감기 증가 및 결과적으로 리간드 기능 활성의 신체에서의 보다 긴 지속 시간을 제공함으로써 이러한 문제를 해결한다. 리간드 반감기를 약물동력학적 분석 및 결정 방법은 당업자에게 익숙할 것이다. 상세사항은 문헌[Kenneth, A et al., Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists and in Peters et al., Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996)]에서 찾아볼 수 있다. $t_{1/2}$ 알파 및 $t_{1/2}$ 베타 반감기 및 곡선 아래 면적(AUC)과 같은 약물동력학적 파라미터를 기술하고 있는 문헌["Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, published by Marcel Dekker, 2nd Rev. ex edition (1982)]도 참조하길 바란다. 반감기와 AUC 정의는 상기에 제공된다.
- [0179] 일 구체예에서, 본 발명은 $t_{1/2}$ 반감기가 15분 이상의 범위인 본 발명에 따른 리간드를 포함하는 조성물 또는 리간드(예를 들어, 폴리펩티드, 가변 도메인, 길항제, 다중특이적 리간드)를 제공한다. 일 구체예에서, 상기 범위의 하한은 30분, 45분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 10시간, 11시간 또는 12시간이다. 추가로 또는 다르게는, 본 발명에 따른 리간드 또는 조성물은 $t_{1/2}$ 반감기가 12시간 이하의 범위일 것이다. 일 구체예에서, 상기 범위의 상한은 11, 10, 9, 8, 7, 6 또는 5시간이다. 적합한 범위의 예는 1 내지 6시간, 2 내지 5시간, 또는 3 내지 4시간이다.
- [0180] 일 구체예에서, 본 발명은 $t_{1/2}$ 반감기가 약 2.5시간 이상의 범위인 본 발명에 따른 리간드를 포함하는 조성물 또는 리간드(폴리펩티드, 가변 도메인, 길항제, 다중특이적 리간드)를 제공한다. 일 구체예에서, 상기 범위의 하한은 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간, 약 10시간, 약 11시간 또는 약 12시간이다. 추가로 또는 다르게는, 본 발명에 따른 리간드 또는 조성물은 $t_{1/2}$ 반감기가 21일 이하의 범위이다. 일 구체예에서, 상기 범위의 상한은 약 12시간, 약 24시간, 약 2일, 약 3일, 약 5일, 약 10일, 약 15일 또는 약 20일이다. 일

구체예에서, 본 발명에 따른 리간드 또는 조성물은 $t\beta$ 반감기가 약 12 내지 약 60시간 범위일 것이다. 추가의 구체예에서, 이것의 범위는 약 12 내지 약 48시간일 것이다. 여전히 추가의 구체예에서, 이것의 범위는 약 12 내지 약 26시간일 것이다.

[0181] 상기 기준에 추가하여 또는 다르게는, 본 발명은 AUC 값(곡선 아래 면적)이 약 1 mg/분/ml 이상의 범위인 본 발명에 따른 리간드를 포함하는 조성물 또는 리간드를 제공한다. 일 구체예에서, 상기 범위의 하한은 약 5, 약 10, 약 15, 약 20, 약 30, 약 100, 약 200 또는 약 300 mg/분/ml이다. 추가로 또는 다르게는, 본 발명에 따른 리간드 또는 조성물은 AUC가 약 600 mg/분/ml 이하이다. 일 구체예에서, 상기 범위의 상한은 약 500, 약 400, 약 300, 약 200, 약 150, 약 100, 약 75 또는 약 50 mg/분/ml이다. 일 구체예에서, 본 발명에 따른 리간드는 AUC가 약 15 내지 약 150 mg/분/ml, 약 15 내지 약 100 mg/분/ml, 약 15 내지 약 75 mg/분/ml, 및 약 15 내지 약 50 mg/분/ml로 이루어진 군으로부터 선택된 범위일 것이다.

[0182] 본 발명의 폴리펩티드 및 dAb, 및 이들을 포함하는 길항제는 예를 들어, PEG 기, 혈청 알부민, 트랜스페린, 트랜스페린 수용체 또는 적어도 이의 트랜스페린-결합 부분, 항체 Fc 영역의 부착에 의해, 또는 항체 도메인으로의 컨쥬게이션에 의해, 더 큰 유체역학적 크기를 갖도록 포맷화될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 dAb 및 길항제는 항체의 더 큰 항원-결합 단편으로 또는 항체로 포맷화된다(예컨대, Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, IgG, scFv로 포맷화됨).

[0183] 본 발명의 리간드(예를 들어, dAb 단량체 및 다량체)의 유체역학적 크기는 해당 분야에 잘 알려진 방법을 이용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 겔 여과 크로마토그래피는 리간드의 유체역학적 크기를 결정하기 위해 이용될 수 있다. 리간드의 유체역학적 크기를 결정하기 위한 적합한 겔 여과 매트릭스, 예를 들어, 가교 결합된 아가로오스 매트릭스는 잘 알려져 있고, 용이하게 이용가능하다.

[0184] 리간드 포맷의 크기(예를 들어, dAb 단량체에 부착된 PEG 부분의 크기)는 원하는 응용에 따라서 달라질 수 있다. 예를 들어, 리간드가 순환계를 벗어나 말초 조직에 들어가고자 하는 경우, 혈류로부터의 유출을 촉진하기 위해 리간드의 유체역학적 크기를 작게 유지하는 것이 바람직하다. 다르게는, 리간드가 전신 순환계에서 더 오랜 시간 동안 남아 있기를 원하는 경우, 예를 들어, Ig형 단백질로서 포맷화함으로써 리간드의 크기를 증가시킬 수 있다.

[0185] 생체 내에서 반감기를 증가시키는 항원 또는 에피토프의 표적화에 의한 반감기 연장

[0186] 또한, 리간드의 유체역학적 크기 및 이의 혈청 반감기는 본 발명의 TNFR1 결합 폴리펩티드, dAb 또는 길항제를 본 명세서에서 기재된 바와 같은 생체 내에서 반감기를 증가시키는 항원 또는 에피토프에 결합하는 결합 도메인(예를 들어, 항체 또는 항체 단편)으로 컨쥬게이션시키거나 또는 회합시킴으로써 증가시킬 수 있다. 예를 들어, TNFR1 결합제(예를 들어, 폴리펩티드)는 항혈청 알부민 또는 항-신생아 Fc 수용체 항체 또는 항체 단편, 예를 들어, 항-SA 또는 항-신생아 Fc 수용체 dAb, Fab, Fab' 또는 scFv, 또는 항-SA 친화체 또는 항-신생아 Fc 수용체 친화체 또는 항-SA 아비머, 또는 CTLA-4, 리포칼린, SpA, 친화체, 아비머, GroEl 및 피브로넥틴으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이에 한정되지 않는 스캐폴드를 포함하는 항-SA 결합 도메인에 컨쥬게이션되거나 연결될 수 있다(이들 결합 도메인의 개시내용에 대해서는 W02008096158호를 참조하길 바라며, 이 도메인 및 이들의 서열은 본 명세서에 참고로 포함되며, 본 명세서의 본문의 일부를 형성한다). 컨쥬게이션은 혈청 알부민에 결합하는 결합 도메인에 결합된(공유적으로 또는 비공유적으로) 본 발명의 폴리펩티드, dAb 또는 길항제를 포함하는 조성물을 지칭한다.

[0187] 생체 내에서 혈청 반감기를 증가시키는 적합한 폴리펩티드는 예를 들어, 트랜스페린 수용체 특이적 리간드-신경 약제 융합 단백질(미국 특허 제5977307호 참조, 상기 문헌의 개시물은 본 발명에 참고문헌으로 포함됨), 뇌 모세관 내피 세포 수용체, 트랜스페린, 트랜스페린 수용체(예를 들어, 용해성 트랜스페린 수용체), 인슐린, 인슐린-유사 성장인자 1(IGF1) 수용체, 인슐린-유사 성장인자 2(IGF2) 수용체, 인슐린 수용체, 혈액 응고 인자 X, $\alpha 1$ -안티트립신 및 HNF 1 α 를 포함한다. 또한, 혈청 반감기를 증가시키는 적합한 폴리펩티드는 알파-1 당단백질(오로소뮤코이드; AAG), 알파-1 안티키모트립신(ACT), 알파-1 마이크로글로불린(단백질 HC, AIM), 안티트롬빈 III(AT III), 아포리포프로테인 A-1(Apo A-1), 아포리포프로테인 B(Apo B), 세룰로플라스민(Cp), 보체 성분 C3(C3), 보체 성분 C4(C4), C1 에스테라제 억제제(C1 INH), C-반응성 단백질(CRP), 페리틴(FER), 헤모펙신(HPX), 리포프로테인(a)(Lp(a)), 만노스-결합 단백질(MBP), 미오글로빈(Myoglobin), 프레알부민(트랜스티레틴, PAL), 레티놀-결합 단백질(RBP) 및 류마티스 인자(RF)도 포함한다.

[0188] 세포외 매트릭스로부터의 적합한 단백질은 예를 들어, 콜라겐, 라미닌, 인테그린 및 피브로넥틴을 포함한다.

콜라겐은 세포외 매트릭스의 주된 단백질이다. 약 15종의 콜라겐 분자가 현재 알려져 있고, 신체의 다른 부분에서 발견되며, 예를 들어 뼈, 피부, 힘줄, 인대, 각막, 내부기관에서 1형 콜라겐(신체 콜라겐의 90%를 차지함)이 발견되거나 또는 연골, 척추 디스크, 척색 및 눈의 유리체 액에서 2형 콜라겐이 발견된다.

[0189] 혈액으로부터의 적합한 단백질은 예를 들어, 혈장 단백질(예를 들어, 피브리, α -2 마크로글로불린, 혈청 알부민, 피브리노겐(예를 들어, 피브리노겐 A, 피브리노겐 B), 혈청 아밀로이드 단백질 A, 헵토글로빈, 프로필린, 유비퀴틴, 우테로글로불린 및 β -2-마크로글로불린), 효소 및 효소 억제제(예를 들어, 플라스미노겐, 리소자임, 시스타틴 C, 알파-1-안티트립신 및 췌장 트립신 억제제), 면역글로불린 단백질(예를 들어, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, 면역글로불린 경쇄(카파/람다))와 같은 면역계의 단백질, 수송 단백질(예를 들어, 레티놀 결합 단백질, α -1 마이크로글로불린), 디펜신(예를 들어, 베타-디펜신 1, 뉴트로필 디펜신 1, 뉴트로필 디펜신 2 및 뉴트로필 디펜신 3) 등을 포함한다.

[0190] 혈관-뇌 장벽 또는 신경 조직에서 발견되는 적합한 단백질은 예를 들어, 멜라노코르틴 수용체, 미엘린, 아스코르베이트 수송체 등을 포함한다.

[0191] 생체 내에서 혈청 반감기를 증가시키는 적합한 폴리펩티드는 또한 신장에 국소화된 단백질(예를 들어, 폴리시스틴, IV형 콜라겐, 유기 음이온 수송체 K1, 헤이만스(Heymann's) 항원), 간에 국소화된 단백질(예를 들어, 알콜 탈수소효소, G250), 폐에 국소화된 단백질(예를 들어 IgA에 결합하는 분비 성분), 심장에 국소화된 단백질(예를 들어, 팽창성 심근증과 관련된 HSP27), 피부에 국소화된 단백질(예를 들어, 케라틴), 골포제닉 프로테인(BMP)과 같은 뼈 특이적 단백질(상기 BMP는 골형성 활성을 보이는 변형 성장 인자 β 상과 단백질의 서브셋(subset)이다(예를 들어, BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8)), 종양 특이적 단백질(예를 들어, 트로포블라스트 항원, 헤르셉틴 수용체, 오에스트로겐(oestrogen) 수용체, 카텝신(예를 들어, 간과 비장에서 발견할 수 있는 카텝신 B)을 포함한다.

[0192] 적합한 질병-특이적 단백질은 예를 들어, LAG-3(림프구 활성화 유전자), 오스테오프로테게린 리간드(OPGL; 문헌[Nature 402, 304-309 (1999)] 참조), OX40(TNF 수용체 패밀리의 구성원, 활성화된 T 세포에서 발현되고, 특이적으로 인간 T 세포 백혈병 바이러스 I형(HTLV-1)-생성 세포에서 상향 조절됨; 문헌[Immunol. 165(1): 263-70 (2000)] 참조)을 포함하는 활성화된 T 세포에서만 발현되는 항원을 포함한다. 적합한 질병-특이적 단백질은 또한, 예를 들어, CG6512 드로소필라, 인간 파라프레긴, 인간 FtsH, 인간 AFG3L2, 뮤린 ftsH를 포함하는 메탈로프로테아제(관절염/암과 연관); 및 산성 섬유모세포 성장 인자(FGF-1), 염기성 섬유모세포 성장 인자(FGF-2), 혈관 내피 성장 인자/혈관 투과성 인자(VEGF/VPF), 전환 성장 인자- α (TFG- α), 종양 괴사 인자-알파(TNF- α), 안지오텐신, 인터루킨-3(IL-3), 인터루킨-8(IL-8), 혈소판-유래 내피 성장 인자(PD-ECGF), 태반 성장 인자(PIGF), 미드킨 혈소판-유래 성장인자-BB(PDGF) 및 프랙탈킨을 포함하는 혈관신생 성장 인자를 포함한다.

[0193] 또한, 생체 내에서 혈청 반감기를 증가시키는 적합한 폴리펩티드는 열충격 단백질(HSP)과 같은 스트레스 단백질을 포함한다. HSP는 보통 세포 내에서 발견된다. 그들이 세포 외에서 발견되면, 세포가 죽어 그 내용물이 빠져나왔다는 것을 나타낸다. 이러한 프로그램화되지 않은 세포 죽음(괴사)은 외상, 질환 또는 손상의 결과로 세포의 HSP가 면역계로부터의 반응을 일으킬 때 발생한다. 세포의 HSP로의 결합은 본 발명의 조성물의 질환 부위로의 국소화를 야기할 수 있다.

[0194] Fc 수송에 수반되는 적합한 단백질은, 예를 들어 브람벨(Brambell) 수용체(FcRB라고도 알려짐)를 포함한다. 이러한 Fc 수용체는 2가지 기능이 있고, 이들 모두는 운반에 잠재적으로 유용하다. 이 기능은 (1) 태반을 통하여 임마로부터 아이에게 IgG를 수송하는 것 (2) 분해로부터 IgG를 보호하여 혈청 반감기를 연장하는 것이다. 상기 수용체는 엔도솜으로부터 IgG를 재활용하는 것으로 여겨진다 (문헌[Holliger et al., Nat Biotechnol 15(7):632-6 (1997)] 참조).

[0195] 혈청 알부민에 결합하는 dAb

[0196] 일 구체예에서, 본 발명은 리간드, 폴리펩티드 또는 길항제(예를 들어, TNFR1에 결합하는 항-TNFR1 dAb(제1 dAb) 및 혈청 알부민(SA)에 결합하는 제2 dAb를 포함하는 이중 특이적 리간드)를 제공하며, 상기 제2 dAb는 표면 플라즈몬 공명으로 결정시 약 1 nM 내지 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 10, 약 20, 약 30, 약 40, 약 50, 약 60, 약 70, 약 100, 약 200, 약 300, 약 400 또는 약 500 μ M(즉, $\times 10^{-9}$ 내지 5×10^{-4} M), 또는 약 100 nM 내지 약 10 μ M, 또는 약 1 내지 약 5 μ M 또는 약 3 내지 약 70 nM 또는 약 10 nM 내지 약 1, 약 2, 약 3, 약 4 또는 약 5 μ M, 예를 들어, 약 30 내지 약 70 nM의 KD로 SA에 결합한다. 일 구체예에서, 제1 dAb(또는 dAb 단량체)는 표면 플라즈몬 공명으로 결정시 대략 약 1, 약 50, 약 70, 약 100, 약 150, 약 200, 약 300 nM

또는 약 1, 약 2 또는 약 3 μM 의 KD로 SA(예를 들어, HSA)에 결합한다. 일 구체예에서, 제1 항-SA dAb 및 TNFR1에 대한 제2 dAb를 포함하는 이중 특이적 리간드에 대하여, 제2 dAb의 그의 표적에 대한 친화성(예컨대, 표면 플라즈몬 공명으로 측정시의 KD 및/또는 K_{off} , 예컨대 BiaCore 이용)은 제1 dAb의 SA에 대한 친화성의 약 1 내지 약 100000배(예를 들어, 약 100 내지 약 100000배, 또는 약 1000 내지 약 100000배, 또는 약 10000 내지 약 100000배)이다. 일 구체예에서, 혈청 알부민은 인간 혈청 알부민(HSA)이다. 예를 들어, 제1 dAb는 대략 10 μM 의 친화성으로 SA에 결합하나, 제2 dAb는 약 100 pM의 친화성으로 그 표적에 결합한다. 일 구체예에서, 혈청 알부민은 인간 혈청 알부민(HSA)이다. 일 구체예에서, 제1 dAb는 대략적으로 약 50, 예를 들어 약 70, 약 100, 약 150 또는 약 200 nM의 KD로 SA(예컨대, HSA)에 결합한다. 이중 특이적 리간드의 상세사항은 WO03002609호, WO04003019호, WO2008096158호 및 WO04058821호에서 관찰된다.

[0197] 일 구체예에서, 본 발명의 리간드는 표면 플라즈몬 공명으로 결정시 약 1 nM 내지 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 10, 약 20, 약 30, 약 40, 약 50, 약 60, 약 70, 약 100, 약 200, 약 300, 약 400 또는 약 500 μM (즉, $\times$ 약 10^{-9} 내지 약 5×10^{-4} M), 또는 약 100 nM 내지 약 10 μM , 또는 약 1 내지 약 5 μM 또는 약 3 내지 약 70 nM 또는 약 10 nM 내지 약 1, 약 2, 약 3, 약 4 또는 약 5 μM , 예를 들어, 약 30 내지 약 70 nM의 KD로 혈청 알부민(SA)에 결합하는 dAb를 포함한다. 일 구체예에서, 제1 dAb(또는 dAb 단량체)는 표면 플라즈몬 공명으로 결정시 대략적으로 약 1, 약 50, 약 70, 약 100, 약 150, 약 200, 약 300 nM 또는 약 1, 약 2 또는 약 3 μM 의 KD로, SA(예를 들어, HSA)에 결합한다. 일 구체예에서, 제1 및 제2 dAb는 링커, 예를 들어, 1 내지 4개 아미노산 또는 1 내지 3개 아미노산, 또는 3개 초과 아미노산, 또는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 또는 20개 초과 아미노산에 의해 연결된다. 일 구체예에서, 더 긴 링커(3개 초과 아미노산)가 역가(길항제에서 1개 또는 2개 모두의 dAb의 KD)를 증가시키기 위하여 사용된다.

[0198] 리간드 및 길항제의 특정 구체예에서, dAb는 인간 혈청 알부민에 결합하며, 알부민과의 결합에 대하여, DOM7h-11, DOM7h-11-3, DOM7h-11-12, DOM7h-11-15, DOM7h-14, DOM7h-14-10, DOM7h-14-18 및 DOM7m-16으로 이루어진 군으로부터 선택된 dAb와 경쟁한다.

[0199] 리간드 및 길항제의 특정 구체예에서, dAb는 인간 혈청 알부민에 결합하며, 알부민과의 결합에 대하여,

[0200] MSA-16, MSA-26 (이들 서열의 공개에 대해서는 WO04003019호를 참조하길 바라며, 이들 서열 및 이들의 핵산 대응물은 본 명세서에 참고문헌으로 포함되며, 본 명세서의 본문의 일부를 형성한다),

[0201] DOM7m-16 (SEQ ID NO: 473), DOM7m-12 (SEQ ID NO: 474), DOM7m-26 (SEQ ID NO: 475), DOM7r-1 (SEQ ID NO: 476), DOM7r-3 (SEQ ID NO: 477), DOM7r-4 (SEQ ID NO: 478), DOM7r-5 (SEQ ID NO: 479), DOM7r-7 (SEQ ID NO: 480), DOM7r-8 (SEQ ID NO: 481), DOM7h-2 (SEQ ID NO: 482), DOM7h-3 (SEQ ID NO: 483), DOM7h-4 (SEQ ID NO: 484), DOM7h-6 (SEQ ID NO: 485), DOM7h-1 (SEQ ID NO: 486), DOM7h-7 (SEQ ID NO: 487), DOM7h-22 (SEQ ID NO: 489), DOM7h-23 (SEQ ID NO: 490), DOM7h-24 (SEQ ID NO: 491), DOM7h-25 (SEQ ID NO: 492), DOM7h-26 (SEQ ID NO: 493), DOM7h-21 (SEQ ID NO: 494), DOM7h-27 (SEQ ID NO: 495), DOM7h-8 (SEQ ID NO: 496), DOM7r-13 (SEQ ID NO: 497), DOM7r-14 (SEQ ID NO: 498), DOM7r-15 (SEQ ID NO: 499), DOM7r-16 (SEQ ID NO: 500), DOM7r-17 (SEQ ID NO: 501), DOM7r-18 (SEQ ID NO: 502), DOM7r-19 (SEQ ID NO: 503), DOM7r-20 (SEQ ID NO: 504), DOM7r-21 (SEQ ID NO: 505), DOM7r-22 (SEQ ID NO: 506), DOM7r-23 (SEQ ID NO: 507), DOM7r-24 (SEQ ID NO: 508), DOM7r-25 (SEQ ID NO: 509), DOM7r-26 (SEQ ID NO: 510), DOM7r-27 (SEQ ID NO: 511), DOM7r-28 (SEQ ID NO: 512), DOM7r-29 (SEQ ID NO: 513), DOM7r-30 (SEQ ID NO: 514), DOM7r-31 (SEQ ID NO: 515), DOM7r-32 (SEQ ID NO: 516), DOM7r-33 (SEQ ID NO: 517) (이들 서열의 공개에 대해서는 WO2007080392호를 참조하길 바라며, 이들 서열 및 이들의 핵산 대응물은 본 명세서에 참고문헌으로 포함되며, 본 명세서의 본문의 일부를 형성한다; 본 단락의 SEQ ID No는 WO2007080392호에 나타난 것이다),

[0202] dAb8 (dAb10), dAb10, dAb36, dAb7r20 (DOM7r20), dAb7r21 (DOM7r21), dAb7r22 (DOM7r22), dAb7r23 (DOM7r23), dAb7r24 (DOM7r24), dAb7r25 (DOM7r25), dAb7r26 (DOM7r26), dAb7r27 (DOM7r27), dAb7r28 (DOM7r28), dAb7r29 (DOM7r29), dAb7r29 (DOM7r29), dAb7r31 (DOM7r31), dAb7r32 (DOM7r32), dAb7r33 (DOM7r33), dAb7r33 (DOM7r33), dAb7h22 (DOM7h22), dAb7h23 (DOM7h23), dAb7h24 (DOM7h24), dAb7h25 (DOM7h25), dAb7h26 (DOM7h26), dAb7h27 (DOM7h27), dAb7h30 (DOM7h30), dAb7h31 (DOM7h31), dAb2 (dAb 4,7,41), dAb4, dAb7, dAb11, dAb12 (dAb7m12), dAb13 (dAb 15), dAb15, dAb16 (dAb21, dAb7m16), dAb17, dAb18, dAb19, dAb21, dAb22, dAb23, dAb24, dAb25 (dAb26, dAb7m26), dAb27, dAb30 (dAb35), dAb31, dAb33, dAb34, dAb35, dAb38 (dAb54), dAb41, dAb46 (dAb 47, 52 및 56), dAb47, dAb52, dAb53, dAb54, dAb55, dAb56, dAb7m12, dAb7m16, dAb7m26, dAb7r1 (DOM 7r1), dAb7r3 (DOM7r3), dAb7r4 (DOM7r4), dAb7r5 (DOM7r5),

dAb7r7 (DOM7r7), dAb7r8 (DOM7r8), dAb7r13 (DOM7r13), dAb7r14 (DOM7r14), dAb7r15 (DOM7r15), dAb7r16 (DOM7r16), dAb7r17 (DOM7r17), dAb7r18 (DOM7r18), dAb7r19 (DOM7r19), dAb7h1 (DOM7h1), dAb7h2 (DOM7h2), dAb7h6 (DOM7h6), dAb7h7 (DOM7h7), dAb7h8 (DOM7h8), dAb7h9 (DOM7h9), dAb7h10 (DOM7h10), dAb7h11 (DOM7h11), dAb7h12 (DOM7h12), dAb7h13 (DOM7h13), dAb7h14 (DOM7h14), dAb7p1 (DOM7p1), 및 dAb7p2 (DOM7p2)(이들 서열의 공개에 대해서는 W02008096158호를 참조하길 바라며, 이들 서열 및 이들의 핵산 대응물은 본 명세서에 참고문헌으로 포함되며, 본 명세서의 본문의 일부를 형성한다)로 이루어진 군으로부터 선택되는 dAb와 경쟁한다. 대안적인 명칭을 dAb 뒤에 괄호 안에 나타내었으며, 예를 들어, dAb8은 dAb10의 대안적인 명칭을 가지며, 즉 dAb8(dAb10)이다.

[0203] 특정 구체예에서, dAb는 인간 혈청 알부민에 결합하고, DOM7h-11, DOM7h-11-3, DOM7h-11-12, DOM7h-11-15, DOM7h-14, DOM7h-14-10, DOM7h-14-18 및 DOM7m-16으로 이루어진 군으로부터 선택되는 dAb의 아미노산 서열과 약 80% 이상, 또는 약 85% 이상, 또는 약 90% 이상, 또는 약 95% 이상, 또는 약 96% 이상, 또는 약 97% 이상, 또는 약 98% 이상, 또는 약 99% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0204] 특정 구체예에서, dAb는 인간 혈청 알부민에 결합하고,

[0205] MSA-16, MSA-26,

[0206] DOM7m-16 (SEQ ID NO: 473), DOM7m-12 (SEQ ID NO: 474), DOM7m-26 (SEQ ID NO: 475), DOM7r-1 (SEQ ID NO: 476), DOM7r-3 (SEQ ID NO: 477), DOM7r-4 (SEQ ID NO: 478), DOM7r-5 (SEQ ID NO: 479), DOM7r-7 (SEQ ID NO: 480), DOM7r-8 (SEQ ID NO: 481), DOM7h-2 (SEQ ID NO: 482), DOM7h-3 (SEQ ID NO: 483), DOM7h-4 (SEQ ID NO: 484), DOM7h-6 (SEQ ID NO: 485), DOM7h-1 (SEQ ID NO: 486), DOM7h-7 (SEQ ID NO: 487), DOM7h-22 (SEQ ID NO: 489), DOM7h-23 (SEQ ID NO: 490), DOM7h-24 (SEQ ID NO: 491), DOM7h-25 (SEQ ID NO: 492), DOM7h-26 (SEQ ID NO: 493), DOM7h-21 (SEQ ID NO: 494), DOM7h-27 (SEQ ID NO: 495), DOM7h-8 (SEQ ID NO: 496), DOM7r-13 (SEQ ID NO: 497), DOM7r-14 (SEQ ID NO: 498), DOM7r-15 (SEQ ID NO: 499), DOM7r-16 (SEQ ID NO: 500), DOM7r-17 (SEQ ID NO: 501), DOM7r-18 (SEQ ID NO: 502), DOM7r-19 (SEQ ID NO: 503), DOM7r-20 (SEQ ID NO: 504), DOM7r-21 (SEQ ID NO: 505), DOM7r-22 (SEQ ID NO: 506), DOM7r-23 (SEQ ID NO: 507), DOM7r-24 (SEQ ID NO: 508), DOM7r-25 (SEQ ID NO: 509), DOM7r-26 (SEQ ID NO: 510), DOM7r-27 (SEQ ID NO: 511), DOM7r-28 (SEQ ID NO: 512), DOM7r-29 (SEQ ID NO: 513), DOM7r-30 (SEQ ID NO: 514), DOM7r-31 (SEQ ID NO: 515), DOM7r-32 (SEQ ID NO: 516), DOM7r-33 (SEQ ID NO: 517) (본 단락에서의 SEQ ID No는 W02007080392호에 나타나 있는 것이다),

[0207] dAb8, dAb10, dAb36, dAb7r20, dAb7r21, dAb7r22, dAb7r23, dAb7r24, dAb7r25, dAb7r26, dAb7r27, dAb7r28, dAb7r29, dAb7r30, dAb7r31, dAb7r32, dAb7r33, dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, dAb7h24, dAb7h25, dAb7h26, dAb7h27, dAb7h30, dAb7h31, dAb2, dAb4, dAb7, dAb11, dAb12, dAb13, dAb15, dAb16, dAb17, dAb18, dAb19, dAb21, dAb22, dAb23, dAb24, dAb25, dAb26, dAb27, dAb30, dAb31, dAb33, dAb34, dAb35, dAb38, dAb41, dAb46, dAb47, dAb52, dAb53, dAb54, dAb55, dAb56, dAb7m12, dAb7m16, dAb7m26, dAb7r1, dAb7r3, dAb7r4, dAb7r5, dAb7r7, dAb7r8, dAb7r13, dAb7r14, dAb7r15, dAb7r16, dAb7r17, dAb7r18, dAb7r19, dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10, dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13, dAb7h14, dAb7p1, 및 dAb7p2로 이루어진 군으로부터 선택되는 dAb의 아미노산 서열과 약 80% 이상, 또는 약 85% 이상, 또는 약 90% 이상, 또는 약 95% 이상, 또는 약 96% 이상, 또는 약 97% 이상, 또는 약 98% 이상, 또는 약 99% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0208] 예를 들어, 인간 혈청 알부민에 결합하는 dAb는 DOM7h-11-3 또는 DOM7h-14-10과 약 90% 이상, 또는 약 95% 이상, 또는 약 96% 이상, 또는 약 97% 이상, 또는 약 98% 이상, 또는 약 99% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0209] 예를 들어, 인간 혈청 알부민에 결합하는 dAb는

[0210] DOM7h-2 (SEQ ID NO:482), DOM7h-3 (SEQ ID NO:483), DOM7h-4 (SEQ ID NO:484), DOM7h-6 (SEQ ID NO:485), DOM7h-1 (SEQ ID NO:486), DOM7h-7 (SEQ ID NO:487), DOM7h-8 (SEQ ID NO:496), DOM7r-13 (SEQ ID NO:497), DOM7r-14 (SEQ ID NO:498), DOM7h-22 (SEQ ID NO:489), DOM7h-23 (SEQ ID NO:490), DOM7h-24 (SEQ ID NO:491), DOM7h-25 (SEQ ID NO:492), DOM7h-26 (SEQ ID NO:493), DOM7h-21 (SEQ ID NO:494) 또는 DOM7h-27 (SEQ ID NO:495) (이 단락의 SEQ ID No는 W02007080392호에 나타나 있는 것임), 또는

[0211] dAb8, dAb10, dAb36, dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, dAb7h24, dAb7h25, dAb7h26, dAb7h27, dAb7h30, dAb7h31,

dAb2, dAb4, dAb7, dAb11, dAb12, dAb13, dAb15, dAb16, dAb17, dAb18, dAb19, dAb21, dAb22, dAb23, dAb24, dAb25, dAb26, dAb27, dAb30, dAb31, dAb33, dAb34, dAb35, dAb38, dAb41, dAb46, dAb47, dAb52, dAb53, dAb54, dAb55, dAb56, dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10, dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13 또는 dAb7h14와 약 90% 이상, 또는 약 95% 이상, 또는 약 96% 이상, 또는 약 97% 이상, 또는 약 98% 이상, 또는 약 99% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0212]

특정 구체예에서, dAb는 인간 혈청 알부민에 결합하며,

[0213]

DOM7h-2 (SEQ ID NO:482), DOM7h-6 (SEQ ID NO:485), DOM7h-1 (SEQ ID NO:486), DOM7h-7 (SEQ ID NO:487), DOM7h-8 (SEQ ID NO:496), DOM7h-22 (SEQ ID NO:489), DOM7h-23 (SEQ ID NO:490), DOM7h-24 (SEQ ID NO:491), DOM7h-25 (SEQ ID NO:492), DOM7h-26 (SEQ ID NO:493), DOM7h-21 (SEQ ID NO:494), DOM7h-27 (SEQ ID NO:495) (이 단락의 SEQ ID No는 WO2007080392호에 나타나 있는 것임),

[0214]

dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, Ab7h24, Ab7h25, Ab7h26, dAb7h27, dAb7h30, dAb7h31, dAb2, dAb4, dAb7, dAb38, dAb41, dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10, dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13 및 dAb7h14로 이루어진 군으로부터 선택되는 dAb의 아미노산 서열과 약 80% 이상, 또는 약 85% 이상, 또는 약 90% 이상, 또는 약 95% 이상, 또는 약 96% 이상, 또는 약 97% 이상, 또는 약 98% 이상, 또는 약 99% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0215]

더욱 특정한 구체예에서, dAb는 인간 혈청 알부민에 결합하며,

[0216]

DOM7h-2 (SEQ ID NO:482), DOM7h-6 (SEQ ID NO:485), DOM7h-1 (SEQ ID NO:486), DOM7h-7 (SEQ ID NO:487), DOM7h-8 (SEQ ID NO:496) (이 단락의 SEQ ID No는 WO2007080392호에 나타나 있는 것임),

[0217]

dAb2, dAb4, dAb7, dAb38, dAb41, dAb54, dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10, dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13 및 dAb7h14로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 V_{κ} dAb이다.

[0218]

더욱 특정한 구체예에서, dAb는 인간 혈청 알부민에 결합하는 V_H dAb이며, dAb7h30 및 dAb7h31로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는다.

[0219]

더욱 특정한 구체예에서, dAb는 dAb7h11 또는 dAb7h14이다. 일 예에서, dAb는 DOM7h-11-3이다. 다른 예에서, dAb는 DOM7h-14-10이다.

[0220]

다른 구체예에서, dAb, 리간드 또는 길항제는 인간 혈청 알부민에 결합하며, 상기 아미노산 서열의 임의의 것의 CDR 중 1개, 2개 또는 3개, 예를 들어 DOM7h-11-3, DOM7h-14-10, dAb7h11 또는 dAb7h14의 CDR 중 1개, 2개 또는 3개를 포함한다.

[0221]

혈청 알부민에 결합하는 적합한 카멜리드 V_H 는 서열 A(SEQ ID NO:518), 서열 B(SEQ ID NO:519), 서열 C(SEQ ID NO:520), 서열 D(SEQ ID NO:521), 서열 E(SEQ ID NO:522), 서열 F(SEQ ID NO:523), 서열 G(SEQ ID NO:524), 서열 H(SEQ ID NO:525), 서열 I(SEQ ID NO:526), 서열 J(SEQ ID NO:527), 서열 K(SEQ ID NO:528), 서열 L(SEQ ID NO:529), 서열 M(SEQ ID NO:530), 서열 N(SEQ ID NO:531), 서열 O(SEQ ID NO:532), 서열 P(SEQ ID NO:533), 서열 Q(SEQ ID NO:534)와 같은 WO 2004/041862호(Ablynx N. V.) 및 WO2007080392호(V_H 서열 및 이들의 핵산 대응물이 본 명세서에 참고로 포함되며, 본 명세서의 본문의 일부를 형성한다)에 개시된 것을 포함하며, 이들 서열 번호는 WO2007080392호 또는 WO 2004/041862호(Ablynx N. V.)에 기재된 것에 상응한다. 특정 구체예에서, 카멜리드 V_H 는 인간 혈청 알부민에 결합하며, WO2007080392호에 개시된 ALB1 또는 SEQ ID NO:518-534 중 임의의 것과 약 80% 이상, 또는 약 85% 이상, 또는 약 90% 이상, 또는 약 95% 이상, 또는 약 96% 이상, 또는 약 97% 이상, 또는 약 98% 이상, 또는 약 99% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 서열 번호는 WO2007080392호 또는 WO2004/041862호에 기재된 것에 상응한다.

[0222]

일부 구체예에서, 리간드 또는 길항제는 혈청 알부민(예를 들어, 인간 혈청 알부민)에 결합하기 위하여 본 명세서에 개시된 임의의 항-혈청 알부민 dAb와 경쟁하는 항-혈청 알부민 dAb를 포함한다.

[0223]

대안적인 구체예에서, 길항제 또는 리간드는 SA(예를 들어, 인간 SA)에 특이적인 결합 부분을 포함하며, 여기서, 이 부분은 WO2008096158호에 기재된 비-면역글로불린 서열을 포함하며, 이들 결합 부분의 개시물, 이들의 생성 및 선택 방법(예를 들어, 다양한 라이브러리로부터의) 및 이들의 서열은 본 명세서에 본 명세서의 본문의 일부로서 참고로 포함된다.

- [0224] 반감기 연장 부분(예를 들어, 알부민)으로의 컨주게이션
- [0225] 일 구체예에서, (하나 이상의) 반감기 연장 부분(예를 들어, 알부민, 트랜스페린 및 이의 단편 및 유사체)은 본 발명의 TNFR1-결합 폴리펩티드, dAb 또는 길항제와 컨주게이션되거나 회합된다. TNFR1 결합 포맷으로 사용하기에 적합한 알부민, 알부민 단편 또는 알부민 변이체의 예는 WO 2005077042호에 기재되어 있으며, 이 개시물은 본 명세서에 참고로 포함되며, 본 명세서의 본문의 일부를 형성한다. 특히, 하기의 알부민, 알부민 단편 또는 알부민 변이체가 본 발명에 사용될 수 있다:
- [0226] ? SEQ ID NO: 1(WO 2005077042호에 기재, 이 서열은 본 명세서에 참고로 명백히 포함된다);
- [0227] ? WO 2005077042호에서 SEQ ID NO: 1의 아미노산 1-387을 포함하거나 이로 이루어지는 알부민 단편 또는 변이체;
- [0228] ? (a) WO 2005077042호에서 SEQ ID NO: 1의 아미노산 54 내지 61; (b) WO 2005077042호에서 SEQ ID NO: 1의 아미노산 76 내지 89; (c) WO 2005077042호에서 SEQ ID NO: 1의 아미노산 92 내지 100; (d) WO 2005077042호에서 SEQ ID NO: 1의 아미노산 170 내지 176; (e) WO 2005077042호에서 SEQ ID NO: 1의 아미노산 247 내지 252; (f) WO 2005077042호에서 SEQ ID NO: 1의 아미노산 266 내지 277; (g) WO 2005077042호에서 SEQ ID NO: 1의 아미노산 280 내지 288; (h) WO 2005077042호에서 SEQ ID NO: 1의 아미노산 362 내지 368; (i) WO 2005077042호에서 SEQ ID NO: 1의 아미노산 439 내지 447; (j) WO 2005077042호에서 SEQ ID NO: 1의 아미노산 462 내지 475; (k) WO 2005077042호에서 SEQ ID NO: 1의 아미노산 478 내지 486; 및 (l) WO 2005077042호에서 SEQ ID NO: 1의 아미노산 560 내지 566으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 알부민, 또는 이의 단편 또는 변이체.
- [0229] TNFR1-결합 포맷으로 사용하기 위한 적합한 알부민, 단편 및 유사체의 추가의 예는 W003076567호에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참고문헌으로 포함되며, 본 명세서의 개시내용의 일부를 형성한다. 특히 다음의 알부민, 단편 또는 변이체가 본 발명에서 이용될 수 있다:
- [0230] ? W003076567호, 예를 들어, 도 3에 기재된 인간 혈청 알부민(이 서열 정보는 참고로 본 명세서에 명백히 포함됨);
- [0231] ? 화학식 분자량이 66,500인 585개 아미노산의 단일 비-글리코실화 폴리펩티드 사슬로 이루어진 인간 혈청 알부민(HA)(문헌[Meloun, et al., FEBS Letters 58: 136 (1975)]; 문헌[Behrens, et al., Fed. Proc. 34:591 (1975)]; 문헌[Lawn, et al., Nucleic Acids Research 9:6102-6114(1981)]; 문헌[Minghetti, et al., J. Biol Chem. 267:6747 (1986)] 참조);
- [0232] ? 문헌[Weitkamp, et al., Ann. Hum. Genet. 57:219 (1973)]에 기재된 알부민의 다형성 변이체 또는 유사체 또는 단편;
- [0233] ? 제EP 322094호에 기재된 알부민 단편 또는 변이체, 예를 들어, HA(1-373), HA(1-388), HA(1-389), HA(1-369), 및 HA(1-419) 및 1-369와 1-419 사이의 단편;
- [0234] ? 제EP 399666호에 기재된 알부민 단편 또는 변이체, 예를 들어, HA(1-177) 및 HA(1-200), 및 HA(1-X)간의 단편(여기서 X는 178 내지 199의 임의의 수임).
- [0235] (하나 이상의) 반감기 연장 부분(예를 들어, 알부민, 트랜스페린 및 이들의 단편 및 유사체)이 본 발명의 TNFR1-결합 폴리펩티드, dAb 및 길항제를 포맷화하는 데 사용되는 경우, 이는 예를 들어, 융합 단백질을 엔코딩하는 단일 뉴클레오티드 작제물을 사용하여 TNFR1-결합 부분(예를 들어, 항-TNFR1 dAb)으로의 직접 융합과 같은 임의의 적절한 방법을 사용하여 컨주게이션될 수 있으며, 여기서, 융합 단백질은 TNFR1 결합 부분에 N- 또는 C-말단으로 위치한 반감기 연장 부분을 가지는 단일 폴리펩티드 사슬로 엔코딩된다. 대신에, 컨주게이션은 부분 사이에 펩티드 링커, 예를 들어, W003076567호 또는 W02004003019호(이들 링커에 대한 기재는 본 발명에서 사용하기 위한 실시예를 제공하기 위하여 본 발명의 명세서에 참고문헌으로 포함됨)에 기재된 펩티드 링커를 사용하여 달성할 수 있다. 전형적으로, 생체 내에서 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드는 생체 내에서 자연적으로 발생하고, 유기체(예를 들어, 인간)로부터 원하지 않는 물질을 제거하는 내인성 메커니즘에 의한 분해 또는 제거에 내성인 폴리펩티드이다. 예를 들어, 생체 내에서 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드는 세포외 매트릭스로부터의 단백질, 혈액 내에서 발견되는 단백질, 혈관-뇌 장벽 또는 신경 조직에서 발견되는 단백질, 신장, 간, 폐, 심장, 피부 또는 뼈에 국소화된 단백질, 스트레스 단백질, 질환-특이적 단백질, 또는 Fc 수용에 수반되는 단백질로부터 선택될 수 있다.

- [0236] 본 개시내용을 통해 기재된 본 발명의 구체예에서, 숙련자는 본 발명의 길항제 또는 리간드에서 항-TNFR1 단일 가변 도메인("dAb")을 사용하는 것 대신에, TNFR1에 결합하는 본 발명의 dAb의 CDR(예를 들어, 적합한 단백질 스캐폴드 또는 골격, 예를 들어 친화체, SpA 스캐폴드, LDL 수용체 클래스 A 도메인 또는 EGF 도메인 상으로 이식된 CDR)의 하나 이상 또는 3개 모두를 포함하는 폴리펩티드 또는 도메인을 사용할 수 있는 것이 고려된다. 따라서, 전체로서 상기 개시내용은 dAb 대신에 이들 도메인을 사용한 길항제의 개시를 제공하는 것으로 간주되어야 한다. 이러한 면에서, 단백질 스캐폴드에 기초하여 다양한 라이브러리를 생성하는 방법 및 이들 라이브러리로부터의 도메인의 선택 및 특성화에 관해서는 그 개시물이 참고문헌으로 포함되는 W02008096158호를 참조하길 바란다.
- [0237] 따라서, 일 구체예에서, 본 발명의 길항제는 TNFR1에 대한 결합 특이성을 갖는 면역글로불린 단일 가변 도메인 또는 도메인 항체(dAb) 또는 적합한 포맷의 이러한 dAb의 상보성 결정 영역을 포함한다. 길항제는 이러한 dAb로 이루어지거나 이러한 dAb로 본질적으로 이루어진 폴리펩티드일 수 있다. 길항제는 항체 포맷(예를 들어, IgG-형 포맷, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂)과 같은 적합한 포맷의 dAb(또는 dAb의 CDR)를 포함하는 폴리펩티드, 또는 TNFR1에 결합하는 dAb 및 다른 표적 단백질, 항원 또는 에피토프(예를 들어, 혈청 알부민)에 결합하는 제2 dAb를 포함하는 이중 특이적 리간드일 수 있다.
- [0238] 본 발명에 따른 폴리펩티드, dAb 및 길항제는 해당 분야에 공지된 다양한 적합한 항체 포맷, 예를 들어, IgG-형 포맷, 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체, 단일 사슬 항체, 이중특이적 항체, 항체 중쇄, 항체 경쇄, 항체 중쇄 및/또는 경쇄의 동종이량체 및 이종이량체, 상기의 것 중 임의의 것의 항원-결합 단편(예를 들어, Fv 단편(예를 들어, 단일 사슬 Fv(scFv), 이항화 결합된 Fv), Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편), 단일 가변 도메인(예를 들어, V_H, V_L), dAb 및 상기의 것 중 임의의 것의 변형된 버전(예를 들어, 폴리알킬렌 글리콜(예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리부틸렌 글리콜) 또는 다른 적합한 중합체의 공유적 부착에 의한 변형)으로 포맷화될 수 있다.
- [0239] 일부 구체예에서, 본 발명은 IgG-형 포맷인 리간드(예를 들어, 항-TNFR1 길항제)를 제공한다. 이러한 포맷은 IgG 분자의 통상적인 4개 사슬 구조(2개의 중쇄와 2개의 경쇄)를 가지며, 여기서, 가변 영역(V_H 및/또는 V_L)의 하나 이상이 본 발명의 dAb로 대체된다. 일 구체예에서, 각 가변 영역(2개 V_H 영역 및 2개 V_L 영역)은 dAb 혹은 단일 가변 도메인으로 대체되며, 이 중 적어도 하나는 본 발명에 따른 항-TNFR1 dAb이다. IgG-형 포맷으로 포함되는 dAb(들) 또는 단일 가변 도메인(들)은 동일하거나 상이한 특이성을 가질 수 있다. 일부 구체예에서, IgG-형 포맷은 4가지고, 1개(예를 들어, 오직 항-TNFR1 만), 2개(예를 들어, 항-TNFR1 및 항-SA), 3개, 혹은 4개의 특이성을 가질 수 있다. 예를 들어, IgG-형 포맷은 단일특이적일 수 있고, 동일한 특이성을 가지는 4개 dAb를 포함하거나; 이중특이적이며, 동일한 특이성을 가지는 3개 dAb 및 상이한 특이성을 가지는 다른 dAb를 포함하거나; 이중특이적이며, 동일한 특이성을 가지는 2개 dAb 및 이와는 상이한 공통의 특이성을 가지는 다른 2개 dAb를 포함하거나; 삼중특이적이며, 동일한 특이성을 가지는 제1 및 제2 dAb, 다른 특이성을 가지는 제3 dAb 및 제1, 제2 및 제3 dAb와 다른 특이성을 가지는 제4 dAb를 포함하거나; 또는 사중특이적이며, 각기 다른 특이성을 가지는 4개 dAb를 포함할 수 있다. IgG-형 포맷(예를 들어, Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, scFv)의 항원 결합 단편이 제조될 수 있다. 일 구체예에서, IgG-형 포맷 또는 항원-결합 단편은 TNFR1에 대하여 1가일 수 있다. 보체 활성화 및/또는 항체 의존적 세포독성(ADCC) 기능이 요구된다면, 그 리간드는 IgG1-형 포맷일 수 있다. 필요에 따라, IgG-형 포맷은 Fc 수용체로의 결합 및/또는 보체를 고정시키는 능력을 최소화하기 위하여, 돌연변이된 불변 영역(변이체 IgG 중쇄 불변 영역)을 포함할 수 있다 (예컨대, 문헌 [Winter et al., GB 2,209,757 B]; 문헌[Morrison et al., W089/07142]; 문헌[Morgan et al., WO 94/29351, December 22, 1994] 참조).
- [0240] 본 발명의 리간드(예를 들어, 폴리펩티드, dAb 및 길항제)는 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인에 직접적으로 융합되는 제1의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 함유하는 융합 단백질로서 포맷화될 수 있다. 필요에 따라, 이러한 포맷이 반감기를 연장하는 부분을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 리간드는 혈청 알부민에 결합하는 면역글로불린 단일 가변 도메인에 직접적으로 융합된 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인에 직접적으로 융합된 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함할 수 있다.
- [0241] 일반적으로 표적에 대한 결합 특이성이 있는 결합 부위를 갖는 폴리펩티드 도메인의 배향, 그리고 상기 리간드가 링커를 포함하는지의 여부는 설계상 선택의 문제이다. 그러나 링커가 있든 없든 일부 배향은 다른 배향보다 더 우수한 결합 특성을 제공할 수 있다. 본 발명에 포함되는 모든 배향(예컨대, dAb1-링커-dAb2; dAb2-링커-dAb1)은 스크리닝에 의해 용이하게 동정될 수 있는 바람직한 결합 특성을 제공하는 배향을 포함하는

리간드이다.

[0242] dAb 단량체, 이량체 및 삼량체를 비롯한 본 발명에 따른 dAb 및 폴리펩티드는 C_H2 및 C_H3 도메인 중 하나 또는 둘 모두를 포함하고, 힌지 영역을 임의로 포함하는 항체 Fc 영역에 연결될 수 있다. 예를 들어, 단일 누클레오타이드 서열로서 Fc 영역에 연결된 리간드를 엔코딩하는 벡터를 사용하여, 이러한 폴리펩티드를 제조할 수 있다.

[0243] 더욱이, 본 발명은 상술된 dAb 단량체의 이량체, 삼량체 및 다량체를 제공한다.

[0244] 실시예

[0245] 항체 단편의 생물물리학적 특성은 항체 단편이 치료제로서 개발될 수 있는지 없는지를 결정하는데 있어서 중요한 역할을 담당한다. 이러한 생물물리학적 특성들 중 하나는 저장시 침전에 대한 항체 단편의 안정성이다. 가속 안정성 시험은 단백질을 상술된 온도에서 연장된 기간 동안 인큐베이션한 다음 침전 수준을 측정함에 의해 안정성을 더욱 신속하게 평가하는데 이용되는 기법이다. 이에 따라, 본 발명자들은 7개의 항-TNFR1 dAb를 이들의 가속 안정성에 대해 특성화하였다. 연구되는 개별적인 dAb들의 매우 상이한 특성으로 인해 (특히 상이한 T_m), 이러한 dAb들의 가속 안정성 연구는 모두 40℃에서 수행되었다.

[0246] 가속 안정성 시험에 사용된 프로토콜은 다음과 같다: 모든 단백질을 PBS로 완충제 교환하고 1 mg/ml의 농도로 조정하였다. 250μl의 네 개의 분취량(4 시점에 상응; 0h, 2h, 23h 및 47h)을 0.5ml 에펜도르프에서 제조하였다. 제1 샘플 (47h 시점)을 40℃로 설정된 오븐에 넣었고; 24시간 후에 제2 250μl 분취량 (23h 시점)을 오븐에 넣었으며; 추가로 20시간 후에 제3 250μl 분취량 (2h 시점)을 오븐에 넣었고; 0h 분취량을 이러한 연구 동안 4℃에서 유지하였다. 모든 분취량은 이들이 40℃ 오븐에 넣어질 때까지 4℃에서 유지되었다. 총 47h 후에 모든 분취량을 오븐에서 제거하고 16,100xg에서 10분간 원심분리하였다. 각각의 샘플의 A280을 96웰 UV 플레이트 리더를 이용하여 측정함으로써 여전히 용해 상태인 단백질의 양을 모니터링하였다. 이러한 데이터를 이용하여 각 시점에 각각의 단백질에 대한 단백질 농도를 계산하였고, 이것을 다시 시간에 대해 플롯팅하여 시간에 따른 단백질의 손실을 모니터링하였다.

[0247] 실시예 1: 가속 안정성에 대한 항-TNFR1 dAb 시험

[0248] 항-TNFR1 dAb에 대해, 6개의 관련 항-TNFR1 dAb, 즉 DOM1h-574-72, DOM1h-574-109, DOM1h-574-133, DOM1h-574-138, DOM1h-574-156 및 DOM1h-574-180 뿐만 아니라 비관련 항-TNFR1 dAb DOM1h-131-206을 평가하였다. pDOM13의 이러한 모든 dAb 클로닝된 SalI/NotI의 유전적 작제물 (pBR322-유래 발현 벡터)을 이.콜라이(E.coli) HB2151로 형질전환시키고 상청액에서 단백질 발현시켰다. dAb를 단백질-A 스트림라인(Streamline) (GE Healthcare cat no. 17-1281-03) 상에서 단일-단계 정제로 상청액으로부터 정제시킨 다음, 100 mM 글리신 pH2.0으로 용리시키고 200 mM Tris pH8로 중화시켰다. 농축 후에, dAb를 투석에 의해 PBS로 완충제 교환하고 1 mg/ml에서 가속 안정성에 대해 시험하였다. 가속 안정성의 결과를 표 1에 제시하며, 표 1은 각 시점에 용해 상태인 dAb의 양을 t=0h에 존재하는 dAb 양의 백분율로서 예시한다.

클론	용해 상태의 %			
	0.0h	2.3h	23.0h	47.0h
DOM1h-574-72	100%	91%	18%	9%
DOM1h-574-109	100%	86%	18%	8%
DOM1h-574-133	100%	101%	91%	80%
DOM1h-574-138	100%	100%	39%	18%
DOM1h-574-156	100%	84%	17%	9%
DOM1h-574-180	100%	73%	12%	8%
DOM1h-131-206	100%	102%	101%	100%

[0249]

[0250] 표 1: 1 mg/ml로 PBS에서 40℃에서 인큐베이션시에 항-TNFR1 dAb의 가속 안정성. 수치들은 각 시점에 용해 상태인 dAb의 양을 t=0h에 존재하는 dAb 양의 백분율로서 나타낸다.

[0251] DOM1h-574-133을 제외한 DOM1h-574 계통의 항-TNFR1 dAb는 처음 47h 내에 침전되는 경향이 있고, 상기 시점에 용해 상태의 단백질의 양을 실질적으로 감소시켰다. 대조적으로, 항-TNFR1 dAb DOM1h-131-206은 상기 기간 동안 용해 상태인 채로 있었다. 따라서, 가속 안정성 연구에서 dAb를 침전에 더욱 견디게 하는 dAb의 안정성이

유리하다.

- [0252] 실시예 2: 개선된 생물물리학적 특성에 대해 항-TNFR1 dAb 계통 DOM1h-574의 선택 및 스크리닝
- [0253] 상승된 온도에서의 인큐베이션 후에 침전에 개선된 내성을 갖는 새로운 dAb를 확인하기 위해, 오류-빈발(error-prone) PCR 라이브러리를 5개의 항-TNFR1 dAb: DOM1h-574-156, DOM1h-574-109, DOM1h-574-138, DOM1h-574-162 및 DOM1h-574-180에 기반하여 작성하였다. pDOM13 벡터에서 주형으로서 이러한 클론을 이용하여 오류-빈발 라이브러리를 제조한 다음, GeneMorph II (Stratagene, cat no. 200550)를 이용하여 2라운드의 오류-빈발 PCR로 처리하였다. 제1 라운드에서, 50 ng의 벡터를 올리고뉴클레오티드 AS9 및 AS339와 하기 증폭 프로필을 이용하여 50 μ l의 부피로 30회 사이클 동안 증폭시켰다: 2분 95°C에 이어서 15초 95°C, 30초 50°C, 1분 72°C; 및 끝으로 10분 72°C의 30회 사이클.
- [0254] 제2 라운드에서, 0.4 μ l의 첫 번째 오류-빈발 PCR 반응 생성물을 GeneMorph II (Stratagene) 200 μ l 부피로 네스티드 프라이머 AS639 및 AS65와 하기 증폭 프로필을 이용한 제2라운드의 돌연변이유발에 주형으로서 이용하였다: 2분 95°C에 이어서 15초 95°C, 30초 50°C, 1분 72°C; 및 끝으로 10분 72°C의 35회 사이클.
- [0255] PCR 생성물을 Qiagen Gel Extraction 키트를 이용하여 2% E-Gel 상에서 정제하고 Sal I 및 Not I 제한 엔도뉴클레아제 (NEB)로 절단하였다. 분해 반응 생성물을 2% E-Gel 상에서 진행시키고 dAb-엔코딩 DNA 삽입물을 Qiagen Gel Extraction 키트를 이용하여 E-Gel로부터 정제하였다. 정제된 삽입물을 T4 DNA 리가아제 키트 (NEB)를 이용하여 pDOM33 파지 디스플레이 벡터로 라이게이션하였다:
- [0256] 40 μ l의 30 nM 0.7 μ g/ml Sal I/Not I-절단 pDOM33 벡터
- [0257] 30 μ l의 300 nM 삽입물
- [0258] 400 μ l의 H₂O
- [0259] 50 μ l 10x완충제
- [0260] 15 μ l의 400U/ μ l T4 DNA 리가아제
- [0261] 반응물을 16°C에서 18시간 동안 인큐베이션하였다. 반응 생성물을 페놀-클로로포름 추출하고, 에탄올 침전시키고, 50 μ l의 H₂O에 용해시키고, 400 μ l의 전기충격용(electrocompetent) TB1 이. 콜라이(*E. coli*) 세포에 첨가하고 100 μ l의 부피로 Bio-Rad Gene Pulser II를 이용하여 일렉트로포레이션시킨 다음, 테트라사이클린-2xTY 아가로오스 플레이트 상에 플레이트하였다. 평균, 약 2.4×10^8 개의 개별적인 형질전환체가 5개의 라이브러리 각각에 대해 수득되었다. 평균, 유전자 당 약 3개의 아미노산 돌연변이가 존재하였다.
- [0262] 개선된 생물물리학적 특성에 대한 선택을 시작하기 전에, 5개의 오류-빈발 파지 라이브러리를 EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce Protein Research Products, Rockford Illinois, cat no. 21327)을 이용하여 비오티닐화된 용해성 TNFR1 (R&D Systems)에 대해 사전-선택함으로써 TNFR1 결합 특성을 지니는 기능성 파지를 풍부하게 하였다. 사전-선택은 하기 프로토콜을 이용하여 수행되었다:
- [0263] 1. 1 ml의 M280 Streptavidin Dynabead (Invitrogen)를 2% Marvel로 PBS에서 1시간 동안 실온에서 차단
- [0264] 2. 각각의 라이브러리에 대해 약 10^{11} 개 형질전환 유닛 (Tu) 파지를 0.5 ml의 PBS에서 2% Marvel로 1시간 동안 실온에서 차단.
- [0265] 3. 0.53 μ l의 47 μ M 비오티닐화된 인간 용해성 TNFR1을 0.5 ml의 차단된 파지에 첨가. 1시간 동안 실온에서 인큐베이션.
- [0266] 4. 200 μ l의 차단된 Dynabead를 파지 용액에 첨가. 10분간 실온에서 인큐베이션.
- [0267] 5. PBST (0.1% Tween 20을 지니는 PBS)로 5회 세척
- [0268] 6. 결합된 파지를 500 μ l의 0.1M 글리신 pH=2로 용리.
- [0269] 7. 100 μ l의 1 M Tris pH8로 중화되고 용리된 파지.
- [0270] 약 2%의 투입 Tu 파지를 각각의 라이브러리에 대해 사전-선택 라운드의 끝에 회수하였다. 사전-선택 후에, DOM1h-574-109, DOM1h-574-138, DOM1h-574-162 및 DOM1h-574-180 리드(lead) 클론에 대한 라이브러리를 풀링시

켜, 라이브러리 A를 형성하였다. DOM1h-574-156에 대한 라이브러리 B를 별도로 유지시켰다.

이러한 단계에서 네 개의 파지-디스플레이 선택 방법을 채택하여 이러한 오류-유발 PCR 라이브러리로부터 개선된 생물물리학적 특성을 지니는 DOM1h-574 변이체를 풍부하게 하였다:

- 1) 상승된 온도에서 동역학적 안정성 (65°C)
- 2) 열적 변성의 가역성 (80°C)
- 3) 프로테아제 분해에 대한 내성
- 4) 낮은 pH-유도 변성의 가역성

파지 디스플레이 라이브러리 선택 1라운드

제1 라운드의 파지-디스플레이 선택에서, 라이브러리 A 및 B를 PBS에 5×10^{11} Tu/ml로 희석한 다음 100 μ l의 분취량을 열, 프로테아제 또는 낮은 pH 사전-처리에 의해 처리하였다. 열적 선택을 위해 (샘플 1 내지 4, 표 2), 50°C 내지 80°C의 온도를 이용하였고 하기 표 2에 지시된 대로 인큐베이션 기간은 2h 또는 10분이었다. 트립신 (Promega, V511) 선택 (샘플 5 내지 7)을 10 내지 100 μ g/ml의 트립신에서 2시간 동안 37°C로 PBS에서 수행하였고 대조 인큐베이션을 실온에서 2시간 동안 PBS에서 수행하였다 (샘플 8 및 9). 인큐베이션 후에, 50 μ l의 2x완전 프로테아제 억제제 (Roche 04 693 116 001)를 샘플 5-9의 각각에 첨가하였다. 산 선택을 위해, 샘플 10 내지 13, 파지를 파지 원액으로부터 420 μ l의 HNC 완충제 (5 mM HEPES, 5 mM NaCl, 100 mM 시트레이트, pH=3.2)내로 10배 희석시켰다. 인큐베이션의 끝에 (각각의 샘플에 대한 산 인큐베이션의 길이는 표 2에 표시된다), 샘플을 80 μ l의 Tris 완충제로 중화시켰다.

이러한 스트레스 조건에서의 인큐베이션 후에, 사전-선택 단계에서 상기 기재된 대로, 비오틴화된 인간 용해성 TNFR1과의 인큐베이션을 통해 기능적으로 활성인 dAb에 대해 파지 라이브러리를 선택하였다. 이용된 프로토콜에 대한 변화는 단지 Kingfisher를 이용한 10회 세척을 수행한 것이었다. 라이브러리 A 및 B를 이용한 모든 선택에 대하여, 회수된 파지의 수를 측정하였고 표 2에 제시한다. 이어서 다음 라운드의 선택을 위해 파지를 증폭시켰다.

표 2: 개선된 특성에 대한 1라운드 선택. 이용된 선택 조건이 표시되며 선택 후에 Tu 파지를 두 개의 라이브러리 각각으로부터 회수하였다. 모든 선택에 대해 5×10^{10} Tu 파지를 투입하였다.

	선택 조건	라이브러리 A	라이브러리 B
1	50°C 에서 2 시간 동안 인큐베이션	4×10^7	1×10^8
2	55°C 에서 2 시간 동안 인큐베이션	3×10^7	7×10^7
3	60°C 에서 2 시간 동안 인큐베이션	1×10^7	2×10^7
4	80°C 에서 10 분간 인큐베이션	5×10^6	1×10^7
5	PBS 에서 2 시간 동안 트립신 10 μ g/ml 37°C	1×10^5	1×10^6
6	PBS 에서 2 시간 동안 트립신 30 μ g/ml 37°C	3×10^5	3×10^8
7	PBS 에서 2 시간 동안 트립신 100 μ g/ml 37°C	1×10^6	1×10^8
8	PBS 에서 2 시간 동안 실온	1×10^8	1×10^8
9	PBS 에서 2 시간 동안 실온	1×10^8	1×10^8
10	37°C 에서 30 분간 pH3.2	4×10^7	1×10^7
11	37°C 에서 1 시간 동안 pH3.2	5×10^7	8×10^6
12	37°C 에서 2 시간 동안 pH3.2	5×10^6	1×10^6
13	얼음 상에서 1 분간 pH3.2	1×10^8	7×10^7

회수 수준에 기반하여, 둘 모두의 라이브러리에 대한 선택 3, 4, 5 및 12 (및 라이브러리 A로부터의 선택 6)로부터의 산출물을 2라운드의 선택으로 보냈다. 파지 산출물을 한 라운드의 이.콜라이(*E. coli*) 감염에 의해 증

폭시켰고, 이어서 정제하고, 2×10^{14} Tu/ml로 농축시켰다.

[0282] 파지 디스플레이 라이브러리 선택 2라운드

[0283] 라이브러리 A 및 B로부터 제1 라운드의 선택으로부터의 산출물을 PBS에서 5×10^{11} Tu/ml로 희석시키고, 각각의 100 μ l 분취량을 제2 라운드의 선택에 이용하였다. 동일한 프로토콜을 이용하였으나, 선택 조건은 표 3에 요약된 대로 변형되었다.

[0284] 표 3: 2라운드 선택 투입, 조건 및 회수. 투입은 1라운드에 사용된 선택 조건 언급을 참조한다. 라이브러리 A의 경우, 1라운드의 조건 5 및 6에 대한 선택 투입물을 풀링시켜 "*"로 표시된 곳에 풀을 사용하였다. 선택 조건은 리간드의 부재하에 백그라운드 결합에 대한 네거티브 대조군을 포함하였다. 모든 선택에 대해 5×10^{10} Tu 파지를 투입하였다.

	1라운드 선택으로부터 투입	선택 조건	라이브러리 A로부터 회수된 Tu	라이브러 리 B로부터 회수된 Tu
1	3	65°C에서 2시간 동안 인큐베이션	3×10^8	1×10^8
2	3	실온, 리간드로 회수	1.5×10^{10}	3.5×10^{10}
3	3	실온, 리간드 없이 회수	0	0
4	4	80°C에서 10분간 인큐베이션	1.5×10^{10}	3.5×10^9
5	4	실온, 리간드로 회수	1.5×10^{10}	2.5×10^{10}
6	4	실온, 리간드 없이 회수	0	0
7	5	PBS에서 2시간 동안 트립신 10 μ g/ml 37°C	* 3×10^9	3×10^9
8	5	PBS에서 2시간 동안 트립신 30 μ g/ml 37°C	* 1.5×10^9	2×10^9
9	5	트립신 100 μ g/ml 37°C, PBS에서 2시간	* 1.5×10^9	2×10^9
10	5	실온, 리간드로 회수	* 4×10^{10}	5×10^{10}
11	5	실온, 리간드 없이 회수	* 0	0
12	12	37°C에서 4시간 동안 pH3.2	1.5×10^9	1×10^9
13	12	37°C에서 밤새 동안 pH3.2	1×10^7	5×10^6
14	12	실온, 리간드로 회수	5×10^{10}	2.5×10^{10}
15	12	실온, 리간드 없이 회수	5×10^4	0

[0285]

[0286] 파지 산출물을 정제하고 1×10^{13} Tu/ml로 농축시켰다. 둘 모두의 라이브러리에 대해 선택 1, 4, 9 및 12로부터의 산출물을 다음 라운드의 선택으로 보냈다. 파지 산출물을 한 라운드의 이.콜라이(*E. coli*) 감염에 의해 증폭시켰고, 이어서 정제하고, 2×10^{14} Tu/ml로 농축시켰다.

[0287] 파지 디스플레이 라이브러리 선택 3라운드

[0288] 라이브러리 A 및 B로부터 제2 라운드의 선택으로부터의 산출물을 PBS에서 5×10^{11} Tu/ml로 희석시키고, 각각의 100 μ l 분취량을 제3 라운드의 선택에 이용하였다. 동일한 프로토콜을 이용하였으나, 선택 조건은 표 4에 요약된 대로 변형되었다.

[0289] 표 4: 3라운드 선택 투입, 조건 및 회수. 투입은 2라운드에 사용된 선택 조건 언급을 참조한다. 선택 조건은 리간드의 부재하에 백그라운드 결합에 대한 네거티브 대조군을 포함하였다. 모든 선택에 대해 5×10^{10} Tu 파지를 투입하였고 0.5 ml의 부피가 회수되었으며, 그 결과를 Tu/ml로 표시한다.

	2라운드 선택으로부터 투입	선택 조건	라이브러리 A 로부터 회수된 Tu	라이브러리 B 로부터 회수된 Tu
1	1	60°C 에서 6 시간 동안 인큐베이션	0	100
2	1	60°C 에서 18 시간 동안 인큐베이션	30	100
3	1	실온, 리간드로 회수	1×10^{11}	5×10^{10}
4	1	실온, 리간드 없이 회수	0	0
5	4	80°C 에서 20 분간 인큐베이션	8	20
6	4	실온, 리간드로 회수	1×10^{10}	3×10^{10}
7	4	실온, 리간드 없이 회수	0	4×10^3
8	9	PBS 에서 6 시간 동안 트립신 100 µg/ml 37°C	1×10^9	3×10^8
9	9	PBS 에서 18 시간 동안 트립신 100 µg/ml 37°C	2×10^7	3×10^3
10	9	실온, 리간드로 회수	5×10^{10}	3×10^{10}
11	9	실온, 리간드 없이 회수	0	1000
12	12	37°C 에서 6 시간 동안 pH3.2	3×10^9	3×10^9
13	12	37°C 에서 18 시간 동안 pH3.2	5000	3×10^3
14	12	실온, 리간드로 회수	1×10^{11}	5×10^{10}
15	12	실온, 리간드 없이 회수	2×10^3	1.0×10^3

[0290]

[0291] 2라운드 및 3라운드로부터의 파지 산출물을 증폭시키고, 이어서 정제하고 1×10^{13} Tu/ml로 농축시켰다. 선택 산출물로부터의 파지로 감염된 박테리아 배양액 (100 ml)을 성장시키고, Qiagen Midi DNA 정제 컬럼 (Qiagen)을 이용한 이중-가닥 파지 DNA의 회수에 이용하였다.

[0292] 2라운드 라이브러리 A 및 B의 선택 1 및 4 뿐만 아니라 3라운드 라이브러리 A 선택 2, 5, 9, 12, 13 및 라이브러리 B 선택 1, 2, 5, 8, 9, 12 및 13으로부터의 dAb 삽입물을 개개의 파지 제조 분취량으로부터 프라이머 CE2 및 CE3을 지나는 Taq 중합효소를 이용하여 PCR 증폭시켰다. 증폭 생성물을 겔 정제시키고 Sal I 및 Not I 제한 효소로 절단한 다음 서열화 및 발현을 위해 pDOM13 벡터로 클로닝하였다.

[0293] **선택 결과의 분석:**

[0294] 상기 언급된 파지 선택을 이용하여 라이브러리 B로부터 3라운드 후에 선택된 DOM1h-574 변이체의 DNA 서열의 풀의 분석으로부터, 상이한 선택 강제가 표 5에 요약된 대로 상이한 세트의 돌연변이를 우선적으로 풍부하게 하였음이 밝혀졌다. 관찰된 특정 돌연변이는 또한 선택을 위한 출발점으로서 사용된 dAb에 존재하고, 즉, 30V 및 62A는 DOM1h-574-180에 존재하고, 30V는 DOM1h-574-109에 존재하며, 100A는 DOM1h-574-138에 존재한다.

[0295] 표 5: 각각의 선택 조건에 대해 가장 빈번하게 발견된 변화 및 위치를 나타내는 개요. '+'의 수는 그러한 아미노산 잔기의 상대 빈도를 표시한다. 카바트에 따른 넘버링.

	30D	30S	30V	37I	62A	94V	100E	100A
65°C	++	++	++		+		++	++
80°C		++					++	
트립신				+++		+++		+++
pH		+++					++	+

[0296]

[0297] 실시예 3: 선택된 dAb의 특성화

- [0298] DNA 서열 분석으로부터의 정보를 이용하여, 표 6에 요약되어 있고, 도 1에 도시된 상이한 돌연변이들을 조합시킨 항-TNFR1 dAb의 서브셋을 선택하였다. 추가의 특성화를 위해, 이러한 dAb를 이.콜라이(*E.coli*)에서 발현시키고, 단백질-A 스트림라인에 대한 배치 결합을 이용하여 상청액으로부터 정제하고, PBS로 완충제 교환하였다. 스크리닝 공정을 촉진하기 위해, 가속 안정성 시험을 앞서 개시된 방법으로부터 다소 변형시켰다.
- [0299] 가속 안정성 시험을 위해, 반응을 요망된 기간 동안 열적 사이클러에서 인큐베이션된 PCR 플레이트에서 수행하였다:
- [0300] d) PBS 중 100 μ l의 1 mg/ml dAb를 PCR 플레이트의 웰내로 분배한다.
- [0301] e) 단백질을 40시간 동안 40°C 또는 50°C에서 인큐베이션한다.
- [0302] f) 50 μ l의 분취량을 제거하고, OD₃₂₀을 마이크로플레이트 리더 (Molecular Devices)에서 측정하고, 측정 후에 반응 용기로 돌려보낸다. 더 높은 판독치는 응집물 형성을 나타낸다. OD₃₂₀의 측정이 침전 및 응집의 측정에 가장 적합하기 때문에 이것을 이용하는 한편, OD₂₈₀은 용해 상태인 단백질 농도의 측정에 이용하기에 가장 좋다.
- [0303] 상기 스크린의 결과를 표 6에 요약한다. 이러한 분석은 40°C에서 측정될 때 DOM1h-574-156에 비해 가속 안정성에 있어서 현저한 증가를 지니는 다수의 dAb를 두드러지게 한다. 출발 클론인 DOM1h-574-156이 40°C에서 40h 후에 320 nm에서 1.08의 흡광도를 제공하여 현저한 양의 단백질이 침전되었음을 나타낸 반면, 신규한 dAb의 다수는 낮은 판독치를 지니는데 (<0.5), 이는 단백질의 대부분이 여전히 용해 상태임을 나타낸다. 40°C에서 40h 동안 가속 안정성에 있어서 가장 명백한 증가는 DOM1h-574-188, DOM1h-574-191, DOM1h-574-192, DOM1h-574-196, DOM1h-574-201, DOM1h-574-204, DOM1h-574-205, DOM1h-574-206 및 DOM1h-574-208에서 관찰되었다.
- [0304] 표 6: 가속 안정성에 대해 시험된 신규한 dAb. 각각의 dAb에 대해, 이것이 비롯된 라이브러리 뿐만 아니라 이러한 dAb를 확인하는데 사용된 선택 조건이 표시된다. 정제된 dAb (1 mg/ml)를 40°C 또는 50°C에서 40h 동안 PCR 플레이트에서 인큐베이션을 통해 가속 안정성에 대해 시험하였다. 인큐베이션 후에, 각각의 dAb에 대해 OD₃₂₀을 측정하며, 각각의 웰에서 침전의 수준을 확립하였다. 낮은 숫자일수록 더욱 안정한 dAb이다.

클론	라이브리리	선택 강제	OD ₃₂₀ , 40h 40°C	OD ₃₂₀ , 48h 50°C
PBS			0.15	0.15
DOM1h-574-156		모 클론	1.08	2
DOM1h-574-188	B	65°C	0.37	
DOM1h-574-189	B	80°C	0.7	
DOM1h-574-190	B	트립신	0.94	2
DOM1h-574-191	B	pH 3.2, 6h	0.37	1.6
DOM1h-574-192	B	pH 3.2, 18h	0.4	2
DOM1h-574-193	B	65°C, 18h	2.0	
DOM1h-574-194	B	65°C, 18h	1.3	
DOM1h-574-195	B	65°C	0.87	
DOM1h-574-196	B	pH 3.2	0.35	
DOM1h-574-201	A	80°C	0.31	1.9
DOM1h-574-202	A	80°C	0.57	
DOM1h-574-203	A	80°C	0.52	2.25
DOM1h-574-204	A	트립신	0.25	
DOM1h-574-205	A	pH 3.2, 6h	0.24	1.6
DOM1h-574-206	A	pH 3.2, 6h	0.28	2.1
DOM1h-574-208	A	80°C	0.38	1.65
DOM1h-574-209	A	트립신		1.98
DOM1h-574-211	A	pH 3.2, 18h		2
DOM1h-574-212	A	pH 3.2, 6h		2.1
DOM1h-574-213	A	pH 3.2, 18h		1.5
DOM1h-574-214	A	pH 3.2, 18h		0.4

[0305]

[0306]

DOM1h-574-207을 Tris-글리신 완충제에서 시험하였고, 이것은 DOM1h-574-156 보다 안정하였다.

[0307]

실시예 4: 안정한 항-TNFR1 dAb는 기능적으로 활성이다

[0308]

가속 안정성에서의 증가를 확인하기 위해, 네 개의 dAb를 또한 실시예 1에 기재된 더욱 광범한 프로토콜에 따라 특성화였다. 이러한 프로토콜에서, dAb를 48h 이내로 40°C에서 인큐베이션하고, 원심분리하고, 용해 상태의 남아 있는 dAb를 OD₂₈₀을 이용하여 정량하였다. 시험된 dAb는 DOM1h-574-188, DOM1h-574-196, DOM1h-574-208 및 DOM1h-574-214였고 결과를 표 7에 요약한다. 명백하게, 이러한 dAb는 출발 dAb DOM1h-574-156에 비해 현저하게 더욱 안정하였는데 (과거 데이터), 그 이유는 40°C에서 처음 48h 동안 단백질의 손실이 관찰되지 않기 때문이다. 안정성의 증가가 dAb의 기능적 항-TNFR1 활성을 희생하지 않음을 입증하기 위해, dAb의 TNFR1와의 결합 친화성을 BIAcore SA 칩 상에 포획된 비오틴화된 TNFR1을 이용하여 BIAcore에 의해 측정하였다. 이러한 신규한 dAb의 인간 TNFR1에 대한 친화성이 DOM1h-574-156 dAb (150 pM)에 대해 앞서 기재된 것보다 다소 낮지만, 이것은 여전히 모 dAb의 4배 이내이다. 따라서, 이러한 dAb는 TNFR1에 대한 dAb의 친화성을 많이 손상시키지 않으며 가속 안정성의 증가를 검비한다.

dAb	용해 상태의 %				BIAcore
	0.0 h	2h	24h	48h	Kd (nM)
DOM1h-574-188	100	98	102	101	0.35
DOM1h-574-196	100	102	98	100	0.47
DOM1h-574-208	100	98	103	100	0.27
DOM1h-574-214	100	99	100	99	0.58

[0309]

[0310]

표 7: 신규한 항-TNFR1 dAb의 인간 sTNFR1에 대한 친화성 및 가속 안정성. 정제된 dAb를 40°C에서 지시된 길이의 시간 동안 PBS에서 1 mg/ml으로 인큐베이션하였다. 그 시간 이후에, 용해 상태로 남아 있는 단백질의 백분율을 OD280 측정에 의해 결정하였다. sTNFR1에 대한 친화성을, 기재된 대로 코팅된 sTNFR1을 이용하고 dAb를

주입한 BIAcore에 의해 측정하였다.

[0311] 실시예 5: AlbuAb를 지니는 안정한 항-TNFR1 dAb의 유전자 융합체의 작제

[0312] 항-TNFR1 dAb의 혈청 반감기를 연장시키기 위해, 이들을 알부민-결합 dAb DOM7h-11-3과 융합시켰다. 선택된 네 개의 안정한 항-TNFR1 dAb는 DOM1h-574-188, DOM1h-574-196, DOM1h-574-208 및 DOM1h-574-214였고 DOM7h-11-3과의 융합에는 Ala-Ser-Thr 링커 서열을 이용하였다. 이러한 융합 분자의 작제를 두 단계로 수행하였다. 먼저, 항-TNFR1 dAb를 프라이머 AS9 및 OA154를 이용하여 PCR에 의해 증폭시키고, 그 후 정제된 반응 생성물을 SalI/NheI로 분해시키고, 겔 정제하고, 링커 및 DOM7h-11-3을 함유하는 SalI/NheI 분해된 pDOM13 벡터에 라이게이션하였다. 라이게이션 후에, DNA를 XL10-Gold (Stratagene) 세포로 형질전환하고 서열 분석을 위해 콜로니를 취하였다. 이러한 작제물의 서열 확인 후에, 항-TNFR1/항-알부민 카세트 올리고뉴클레오타이드 JAL102 및 AS65를 이용하여 증폭시킴에 의해 작제의 제2 단계를 수행하였다. 반응 생성물을 제한 효소 Nde I/Not I로 분해시키고 아가로오스 겔 상에서 진행시키고 겔 추출에 의해 정제하였다. 그 후, 융합 생성물을 함유하는 정제된 DNA 단편을 Nde I/Not I-절단 pET30a 벡터 (Merck)로 클로닝하였다. 이러한 벡터에서의 클로닝은, 발효기에서 IPTG 유도를 이용한 단백질 발현이 가능하도록 수행되었고 dAb가 임의의 선도 아미노산 잔기 없이 가공되게 할 것이다. 이것은 상기 벡터에서 발현된 모든 dAb의 N-말단에 Ser-Thr을 삽입할 pDOM13 벡터와 대조적이다. 하기 항-TNFR1 dAb/DOM7h-11-3 융합체가 pET30a에서 작제되었다:

클론 명칭	항-TNFR1 dAb	링커	항-알부민 dAb
DMS5535	DOM1h-574-196	Ala-Ser-Thr	DOM7h-11-3
DMS5541	DOM1h-574-208	Ala-Ser-Thr	DOM7h-11-3
DMS5542	DOM1h-574-214	Ala-Ser-Thr	DOM7h-11-3
DMS5544	DOM1h-574-188	Ala-Ser-Thr	DOM7h-11-3

[0313]

[0314] 발현을 위해, 작제물을 문헌[Aon et al. 2008]에 기재된 대로 pECO-1pgl을 지니는 이.콜라이(*E. coli*) 균주 BL21(DE3)로 형질전환시켰다. 그 후, 네 개의 모든 작제물을 유도 후 23℃에서의 성장을 이용하여 발효기에서 발현시켰고 0.01mM IPTG로 발현을 유도하였다. 모든 발효는 5L 규모의 최소 배지에서 높은 세포 밀도가 되었다.

[0315] 원형질막 추출물을 하기 방식으로 제조하였다. 동결된 세포 페이스트를 녹이고 0.5M GuHCl, 200mM Tris pH8, 10mM EDTA와 37℃에서 밤새 혼합시킨 다음 1시간 동안 4500g에서 원심분리하고 펠렛을 폐기하였다. 원형질막으로부터의 정제는 단백질-A로의 배치 결합에 의해 수행되었고, 그 후 100mM 글리신 pH2로 용리시키고 200 mM Tris pH8로 중화시켰다. 용리된 단백질을 PBS로 완충제-교환시키고 농축시킨 후에 기능적 특성화하였다.

[0316] 실시예 6: 항-TNFR1/항-알부민 융합체의 특성화

[0317] DMS5535, DMS5541, DMS5542 및 DMS5544에 대해 정제된 단백질을 일련의 시험으로 특성화하여 이러한 분자가 안정하며 양호한 항-TNFR1 활성을 지님을 입증하였다.

[0318] 가속 안정성 특성화

[0319] 분자의 생물물리학적 특성을 평가하기 위해, 융합 단백질을 가속 안정성에 대해 시험하였다. 분자가 현저하게 더욱 안정할 것으로 예상되므로, 가속 안정성에 대한 시험을 2일 대신, 40℃에서 28일 동안 PBS에서 1 mg/ml로 수행하였다. 결과를 표 8에 요약한다. 그 결과로부터, 모든 작제물이 28일 후에 OD280에 의해 측정된 바와 같이 단백질 손실 없이 매우 안정하였다고 결론 내릴 수 있다. 관찰된 단백질의 약간의 증가는 대개 이러한 검출 방법 내에서의 오류 때문일 것이고 유의하지 않다.

[0320] 표 8: 유전자 항-TNFR1/항-알부민 융합체의 가속 안정성 및 기능적 특성화의 요약. 가속 안정성을 OD280에 의해 측정된 바와 같이 40℃에서 28일 후에 용해 상태인 융합체-단백질의 백분율로서 정량하였다. 6개 이상의 상이한 농도의 항-TNFR1/AlbuAb™ (AlbuAb는 항-혈청 알부민 dAb이다)을 주입함에 의해 BIAcore™ 친화성 (KD)을 측정하였다. 이러한 절차를 두 번의 독립적인 실험으로 수행하였고 실험 값을 평균 내고 예시된 표준 편차(SD)를 생성하였다. 항-TNFR1/Albudab 융합체의 효능을 HUVEC 세포 검정으로 측정하였다. 평균 EC50 값을 항-TNFR1/Albudab 융합체에 대한 총 7번의 실험으로부터 계산하였다. S.E = 평균의 표준 오차.

클론 명칭	40°C에서 28 일 후 용해 상태의 %	KD (pM) ± SD	평균 EC50 (nM) ± SE
DMS5535	104	277 ± 62	5.79 ± 0.69
DMS5541	106	163 ± 74	3.58 ± 0.45
DMS5542	103	202 ± 30	6.23 ± 1.05
DMS5544	108	180 ± 24	4.83 ± 0.94

[0321]

[0322]

항-TNFR1/항-알부민 단백질의 기능적 특성화

[0323]

분자의 기능적 항-TNFR1 활성이 손상되지 않았음을 보장하기 위해, 항-TNFR1/항-알부민의 네 개의 유전자 융합체를 기능적 검정으로 시험함으로써 TNF α 유도 신호전달을 억제함에 있어서 이들의 효능 및 TNFR1에 대한 이들의 친화성 둘 모두를 측정하였다.

[0324]

TNFR1 친화성 - BIAcore

[0325]

인간 TNFR1에 대한 항-TNFR1/AlbudAb 융합체의 친화성을 BIAcore에 의해 측정하였다. 간단히 말해, 항-TNFR1 분자를 비오틴화된, 인간 TNFR1이 고정되어 있는 스트렙타비딘 BIAcore 칩 상에 주입시켰다. 회합 및 분리를 상이한 농도의 주입된 항-TNFR1에서 측정하였다. 이러한 특성화 결과를 표 8에 요약하며, 상기 표는 분자가 인간 TNFR1의 높은 친화성 결합제임을 나타낸다 (KD <280 pM). 항-TNFR1/AlbudAb 융합체의 BIAcore에 의해 측정된 인간 TNFR1에 대한 친화성은 각각의 조합 작제물에 사용된 단일 항-TNFR1 dAb에 대해 측정된 것보다 다소 높았다.

[0326]

HUVEC 세포 검정에서의 효능

[0327]

dAb의 항-TNFR1 활성을 측정하기 위한 두 번째 기능적 검정은 HUVEC 검정이다. 간단히 말해, 이러한 검정에서 HUVEC를 dAb와 1h 동안 미리-인큐베이션한 다음 1 ng/ml의 TNF α 로 자극한다. 이러한 자극은 세포 상에서 측정될 수 있는 VCAM 발현을 증가시킨다. dAb에 의해 제공된 TNF α -유도 VCAM 발현의 억제 수준은, dAb 농도를 VCAM 발현에 대해 플롯팅함에 의해 결정된다.

[0328]

그 결과를 표 8에 요약하며, 이러한 결과는 항-TNFR1/AlbudAb 융합체가 이러한 HUVEC 검정에서 단일-자릿수 nM 효능을 지님을 입증한다.

[0329]

결론적으로, 가혹한 선택 조건하에 돌연변이 라이브러리의 파지 디스플레이 선택을 수행함에 의해, 본 발명자들은 신규한 항-TNFR1 dAb를 확인할 수 있었다. 이러한 dAb들은 증가된 가속 안정성과 함께, BIAcore에 의해 측정된 바와 같이 TNFR1에 대한 높은 친화성을 겸비한다. 더욱이, DOM7h-11-3 AlbudAb에 의해 예시된 바와 같이, 이러한 dAb가 또 다른 단백질 또는 펩티드에 융합될 때, 결합 특성이 유지되며, 안정성은 더욱 증가된다. 이러한 dAb는 현저한 개선을 나타내고 dAb의 신규한 특성은 이러한 dAb의 치료제로서의 개발가능성을 개선시킴에 틀림없다.

[0330]

BIAcore 프로토콜

[0331]

제조한 인간 TNFR1과의 결합에 대한 결합 친화성은 BIAcore™ 분석에 의해 평가되었다. 분석은 스트렙타비딘 코팅된 (SA) 칩을 이용하여 수행되었다 (BIAcore, cat no. BR-1000-32). SA 칩을 비오틴화된 hTNFR1을 이용하여 낮은 밀도로 코팅하였다. 조사되는 분자는 이러한 표면 상에 7개의 농도, 즉 32, 16 (두 번), 8, 4, 2, 1 및 0.5 nM으로, 임의의 순서로 50 μ l/분의 유량을 이용하여, 주입되었다. 개별적인 주입들 사이에, 표면을 10mM 글리신 pH 2.0을 이용하여 기준선으로 다시 재생시켰다. 이중 레퍼런싱(referencing)을 이용하여 데이터를 기계 허상에 대해 교정하였다. 실험을 BIAcore™ 3000 기계 상에서 수행하였고 데이터를 BIAevaluation 소프트웨어 버전 4.1을 이용하여 분석하였으며, k_{on} 및 k_{off} 는 1:1 Langmuir 결합 모델을 이용하여 동시에 피팅되었다. 피팅 목적을 위해, 단량체에 대해 1-32 nM 농도 범위를 이용하였고, 그 동안 0.5-16 nM이 AlbudAb 융합 분자에 대해 이용되었다. 결합 데이터는 시험된 모든 분자에 대해 1:1 모델로 잘 피팅되었다. 모든 k_D 값을 k_{on} 및 k_{off} 비율로부터 계산하였다. BIAcore™ 진행은 25°C에서 수행되었다.

[0332]

HUVEC 세포 검정 프로토콜

[0333]

인간 배꼽 정맥 내피 세포 (HUVEC)는 VCAM-1의 발현을 상향조절함에 의해 TNF- α 처리에 반응한다. 항-TNFR1 dAb는 TNF- α 의 작용을 억제하므로, VCAM-1 발현의 감소는 항-TNFR1 dAb의 존재하에 HUVEC 세포에 의해 관찰될

수 있다. 이러한 억제제를 평가하기 위해, 간단히 말해, 정상 폴딩된 HUVEC 세포 (Promocell # C-12203)를 젤라틴 코팅된 96웰 미세역가 플레이트 (VWR # 734-0403) (4×10^4 세포/웰)에서 내피 세포 성장 배지에 (Promocell # C-22110) 플레이트하였다. 세포가 밤새 부착하도록 방치한 다음 ($37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$) 용량 범위의 dAb 또는 배지만을 세포에 첨가하고, 플레이트를 $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$ 에 1시간 동안 방치하였다. 그 후, 고정된 농도의 TNF- α (1ng/ml, Peprotech # 300-01A)를 세포에 첨가하고 추가로 23시간 동안 인큐베이션하였다 ($37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$). 네거티브 대조군으로서, 세포를 단지 배지와 인큐베이션하였고, 포지티브 대조군으로서, 세포를 단지 TNF- α 와 인큐베이션하였다.

[0334] 인큐베이션 후에, 세포 배양 상청액을 흡인시키고, 세포를 빙냉 PBS에서 3회 세척하였다. $75 \mu\text{l}$ /웰의 빙냉 Tris-글리세롤 용해 완충제 (40mM Tris, 274mM NaCl, 2% Triton-X-100, 20% 글리세롤, 50mM NaF, 1mM Na_3VO_4 , 1x 프로테아제 억제제 정제/10ml (Roche # 11-836-170-001))를 첨가함에 의해 세포를 용해시키고, 15분간 얼음 상에서 인큐베이션하였다. 그 후, 세포 용해물을 VCAM-1 샌드위치 ELISA로 옮겼다.

[0335] VCAM-1 샌드위치 ELISA를 위해, F96 Maxisorp 면역플레이트 (Nunc # 439454)를 밤새 4°C 에서 PBS 중 100 μl /well의 항-VCAM-1 mAb (R&D systems # MAB809, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 코팅하였다. 다음 날, 플레이트를 세척하고, 1% BSA/PBS (200 μl /웰)로 1시간 동안 차단한 후에 HUVE 세포 용해물 (50 μl /웰)을 첨가하였다. 플레이트를 2시간 동안 용해물과 인큐베이션하고, 다시 세척한 다음, 0.1% BSA/PBS 중 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 비오티닐화된 항-VCAM-1 폴리클로날 Ab (R&D systems # BAF809), 100 μl /웰의 0.05% Tween-20을 첨가하고, 추가로 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척한 다음 100 μl /웰의 스트렙타비딘-HRP (제조사에 지시에 따라 0.1% BSA/PBS, 0.05% Tween에서 희석됨)를 첨가하였다. 결합된 스트렙타비딘-HRP를 Sureblue TMB-1 퍼옥시다제 기질 (KPL-# 52-00-00)의 첨가에 의해 가시화하고 1M HCl을 첨가시켜 반응을 중지시켰다. 직후에 SpectraMax M5^e 플레이트 리더 (Molecular Devices) 상에서 450nm에서 흡광도를 판독하였다.

[0336] 원 OD 값을 마이크로소프트 엑셀로 내보내고 백그라운드 OD 값 (단지 배지와 인큐베이션된 세포)을 모든 데이터 포인트에서 감하였다. 세포에 의한 TNF- α 유도 VCAM-1 상향조절의 억제제를 계산하기 위해, 각각의 농도의 dAb에서 최대 VCAM-1 발현 (포지티브 대조군에 의해 제시됨)의 억제 %를 하기 식을 이용하여 계산하였다:

[0337] 최대 VCAM-1 상향조절의 억제 % = $100 - (\text{특정 dAb 희석액에서 OD 값}/\text{포지티브 대조군의 OD 값}) \times 100$.

[0338] 그 후 dAb 농도 값을 GraphPad Prism에서 억제 %에 대해 플롯팅하고 농도 효과 곡선 및 효능 (EC_{50}) 값을 가변 기울기를 갖는 S자상 용량 반응 곡선을 이용하여 결정하였다.

[0339] 세포를 자극하는데 사용된 TNF- α 의 농도는 세포에 의한 TNF- α 에 대한 최대 반응의 대략 70% (EC_{70})였다.

[0340] 참고문헌:

Aon JC, Caimi RJ, Taylor AH, Lu Q, Oluboyede F, Dally J, Kessler MD, Kerrigan JJ, Lewis TS, Wysocki LA, Patel PS. Suppressing posttranslational gluconoylation of heterologous proteins by metabolic engineering of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Feb;74(4):950-8. Epub 2007 Dec 14.

[0342] 서열 목록

[0343] 모든 뉴클레오티드 서열은 5'에서 3'으로 기록되고, 모든 아미노산 서열은 N-에서 C-말단으로 기록된다.

[0344] DOM1h-131-206은 WO2008149148호에 기재되어 있다 (이러한 PCT 출원에 기재된 아미노산 서열 및 뉴클레오티드 서열은 본원에 명백하게 기재된 대로 본 발명에 사용하기 위해 명백하게 참조로서 본원에 포함되고, 이러한 기재의 어떠한 부분은 본원의 하나 이상의 청구항내로 포함될 수 있는 것으로 고려된다).

[0345] 사용된 올리고뉴클레오타이드:

AS9: CAGGAAACAGCTATGACCATG
 AS339: TTCAGGCTGCGCAACTGTTG
 AS639: CGCCAAAGCTTGCATGCAAATTC
 AS65: TTGTAAAACGACGGCCAGTG
 CE2: CTTAAACAGCTTGATAACCG
 CE3: GACAGCCCTCATAGTTAG
 OA154: TTCTTTTGCTAGCGCTCGAGACGGTGACCAGGGTTC
 JAL102:
 GGAATTCCATATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTC
 CTCGCTGCCCAGCCGGCGATGGCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGG

[0346]

[0347] 뉴클레오타이드 서열:

>DOM1h-574-188
 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
 CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTGATAAGTATTCAATGG
 GGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTT
 CGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA
 CCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC
 TGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTG
 GGTGCCCTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

[0348]

>DOM1h-574-189

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
 CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTTCAAGTATTTCGATGGG
 GTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTT
 GGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA
 CATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCT
 GCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGGTATATACTGGGCGTTG
 GAGCCTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-190

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
 CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTTCAAGTATTTCGATGGG
 GTGGATCCGCCAGGCTCCAGGTAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTT
 GGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA
 CATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCT
 GCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGGTATATACGGGTGCGGTG
 GGCGCCTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-191

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
 CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACATTTTCCAAGTATTTCGATGG
 GGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTT
 CGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA
 CCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC
 TGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTG
 GGTGCCCTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-192

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
 CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCCAAGTATTTCGATGG
 GGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTT
 CGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA
 CCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC
 TGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTG
 GGTGCCCTTTGAGAACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-193

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
 CTCCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTGATAAGTATTTCGATGG
 GGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTT
 CGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA
 CCAACTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC
 TGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTG
 GGAGCCTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

[0349]

>DOM1h-574-194

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTGTAAAGTATTCGATGG
GGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATT
CGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACGCGGTGAAGGGCCGGTTCA
CCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC
TGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTG
GGTGCCATTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-195

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTTCAAGTATTCGATGGG
GTGGGTCCGCCAGGCTCCTGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTC
GGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTAC
CATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCT
GCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGCTG
GGAGCCTTTTGAAGTACTGGGGACAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-196

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTTCCAAGTATTCGATGG
GGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATT
CGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA
CCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC
TGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTG
GGAGCCTTTTGAAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-201

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTGATAAGAATTCGATGG
GGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATAT
CGGATACAGCTGATCGTACATACTACGCACACTCACTGAAGGGCCGGTTCA
CCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC
TGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTG
GGTGCCATTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-202

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTTCAAGTATTCGATGGG
GTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTATCACAGATATC
GGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA
CATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCT
GCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGGTATATACGGGTCCGGTG
GGCGCCTTTTGAAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

[0350]

>DOM1h-574-203

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTTCAAGTATTCGATGGG
GTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTC
GGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCAC
CATCTCCCGCGACGATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCT
GCGCGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGCGCGATATATACGGGTCGGTG
GGCGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-204

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTTCAAGTATTCGATGGG
GTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTC
GGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCAC
CATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCT
GCGTGTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCAGTG
GGCGCCTTATGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTTCGAGCG

>DOM1h-574-205

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTGATAAGTATTCGATGG
GGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGATCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTC
CGGATACTGCTGACCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCAC
CCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCT
GCGTGTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTG
GGTGCCTTTTGAGAACTGGGGTCACGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-206

GAGGTGCAGTTGTTGGATTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTTCAAGTATTCGATGGG
GTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTC
GGATACTGCTGATCGTACATACTACTACCCCTCCGTGAAGGGCCGGTTCACC
ATCTCCCGCGACAATCCGGGAACACGCTGAATCTGCAAATGACCCCCCTG
CGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGG
GAGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-207

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCATGGTACAGCCGGGGGGTCC
CTGCGTCTCTCCTGTGCATCCTCCGGATTACCTTTTCCAAGTATTCGATGGG
GTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTC
CGATACTGCTGATCTTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACC
ATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG

[0351]

CGTGCCGAGGACACCGCGGAATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGGTGG
GCGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCaCCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-208

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTGATAAGTATTTCGATGG
GGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTT
CGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACGCGGTGAAGGGCCGGTTCA
CCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC
TGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTG
GGTGCCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-209

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTTCAAGTATTTCGATGGG
GTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTT
GGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTTCA
CATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCT
GCGTGTCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCAGTG
GGCGCCTTATGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-211

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTGCTAAGTATTTCGATGG
GGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTT
CGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACGCGGTGAAGGGCCGGTTCA
CCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC
TGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTG
GGTGCCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-212

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCCAAGTATTTCGATGG
GGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTT
CGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA
CCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACACTGTACCTGCAAATGAACAGCC
TGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTG
GGTGCCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-213

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTCCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTGATAAGTATTTCGATGG
GGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTT
CGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTAAAGGGCCGGTTCA

[0352]

CCATCACCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC
TGCCTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTG
GGAGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-214

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCCGGGGGGTCC
CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCCAAGTATTCGATGG
GGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTT
CGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA
CCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC
TGCCTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATACACTGGGCGTT
GGGTGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DMS5535

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCCAAGTATTCGATGG
GGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTT
CGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA
CCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC
TGCCTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTG
GGAGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGC
TAGCACCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTA
GGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGACG
TTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCCTT
TGGAATTCCTGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGAT
CTGGGACAGATTTCACTCTACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGC
TACGTACTACTGTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTCCGGCCAAGG
GACCAAGGTGGAATCAAACGG

>DMS5541

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGATAAGTATTCGATGG
GGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTT
CGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACGCGGTGAAGGGCCGGTTCA
CCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC
TGCCTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTG
GGTGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCT
AGCACCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG
GAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGACGT
TAAGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCCTGT
GGAATTCCTGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATC
TGGGACAGATTTCACTCTACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCT
ACGTACTACTGTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTCCGGCCAAGG
ACCAAGGTGGAATCAAACGG

[0353]

>DMS5542

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCCGGGGGGTCC
CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCCAAGTATTGATGG
GGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTT
CGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA
CCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC
TGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATACACTGGGCGTT
GGGTGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCG
CTAGCACCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGT
AGGAGACCGTGTCAACCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGAC
GTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCCT
TTGGAATCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGA
TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTG
CTACGTACTACTGTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTTCGGCCAAG
GGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

>DMS5544

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGATAAGTATTCAATGG
GGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTT
CGGATACTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA
CCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC
TGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTG
GGTGCCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCT
AGCACCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG
GAGACCGTGTCAACCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGACGT
TAAGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCCTTT
GGAATCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATC
TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCT
ACGTACTACTGTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTTCGGCCAAGGG
ACCAAGGTGGAAATCAAACGG

>DOM1h-574-72

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTC
TCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCAATACTGCTGATCGTACA
TACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACA
CGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGC
GATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCGAGC

>DOM1h-574-109

[0354]

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTC
TCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTGTAAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATACTGCTGATCGTACA
TACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACA
CGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGC
GATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCGAGC

>DOM1h-574-133

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTC
TCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTGTAAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATACTGCTGATCGTACA
TACTACGATCACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACA
CGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGC
GATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGTCTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCGAGC

>DOM1h-574-138

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTC
TCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATACTGCTGATCGTACA
TACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACA
CGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGC
GATATATACGGGTCGTTGGGCGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCGAGC

>DOM1h-574-156

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTC
TCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATACTGCTGATCGTACA
TACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACA
CGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGC
GATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCGAGC

>DOM1h-574-180

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTC
TCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATACTGCTGATCGTACA
TACTACGCACACGCGGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACA
CGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGC

GATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCGAGC

>DOM1h-574-162

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTC
TCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATACTGCTGATCGTACA
TACTACTCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACA
CGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGC
GATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGAGTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCGAGC

DOM7h-11-3

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGT
CACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCG TCCGATTGGG ACGACGTTAA GTTGGTACCA GC
AGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCCTTTGG AATTCCCGTT TGCAAAGT
GG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCAT
CAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTGCGCAG GCTGGGACGC
ATCCTACGAC GTTCGGCCAA GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

[0355]

[0356]

[0357]

아미노산 서열:

>DOM1h-574-188
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISD
TADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPF
EYWGQGT LTVTVSS

>DOM1h-574-189
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISD
TADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVYTGRWEP
FEYWGQGT LTVTVSS

>DOM1h-574-190
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWIRQAPGKGLEWVSQISD
TADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVYTGRWAP
FEYWGQGT LTVTVSS

[0358]

>DOM1h-574-191

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISD
TADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPF
EYWGQGT LTVTVSS

>DOM1h-574-192
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISD
TADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPF
ENWGQGT LTVTVSS

>DOM1h-574-193
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGWVRQAPGKGPEWVSQISD
TADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEP
FEYWGQGT LTVTVSS

>DOM1h-574-194
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISD
TADRTYYAHAVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVP
FEYWGQGT LTVTVSS

>DOM1h-574-195
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISD
TADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPF
EYWGQGT LTVTVSS

>DOM1h-574-196
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISD
TADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPF
EYWGQGT LTVTVSS

>DOM1h-574-201
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKNSMGWVRQAPGKGLEWVSQISD
TADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPF
EYWGQGT LTVTVSS

>DOM1h-574-202
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISD
TADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVYTGRWAP
FEYWGQGT LTVTVSS

>DOM1h-574-203
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISD
TADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWAPF
EYWGQGT LTVTVSS

[0359]

>DOM1h-574-204
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISD
TADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCAIYTGQWAP
YEYWGQGT LTVRA

>DOM1h-574-205
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGWVRQAPGKDLEWVSQISD
TADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPF
ENWGHGTLTVSS

>DOM1h-574-206
EVQLLD SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISD
TADRTYYSPSVKGRFTISRDN SGNTLNLQMTPLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFE
YWGQGT LTVSS

>DOM1h-574-207
EVQLLESGGGMVQPGGSLRLSCASSGFTFSKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISD
TADLTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAEYYCAIYTGRWAPF
EYWGQGT LTVSS

>DOM1h-574-208
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISD
TADRTYYAHAVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVP
FEYWGQGT LTVSS

>DOM1h-574-209
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISD
TADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCAIYTGWAP
YEYWGQGT LTVSS

>DOM1h-574-211
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISD
TADRTYYAHAVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVP
FEYWGQGT LTVSS

>DOM1h-574-212
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISD
TADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPF
EYWGQGT LTVSS

>DOM1h-574-213
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISD
TADRTYYAHSVKGRFTITRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPF
EYWGQGT LTVSS

[0360]

>DOM1h-574-214
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISD
TADRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPF
EYWGQGT LTVSS

>DMS5535
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISD
TADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPF
EYWGQGT LTVSSASTDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASRPIGTTLSWYQQ
KPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAQAGT
HPTTFGQGTKVEIKR

>DMS5541
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISD
TADRTYYAHAVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVP
FEYWGQGT LTVSSASTDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASRPIGTTLSWYQ
QKPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAQAG
THPTTFGQGTKVEIKR

>DMS5542
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISD
TADRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPF
EYWGQGT LTVSSASTDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASRPIGTTLSWYQQ
KPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAQAGT
HPTTFGQGTKVEIKR

>DMS5544
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISD
TADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPF
EYWGQGT LTVSSASTDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASRPIGTTLSWYQQ
KPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAQAGT
HPTTFGQGTKVEIKR

>DOM1h-574-72
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRT
YYAHSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGT LTV
VSS

>DOM1h-574-109
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRT
YYAHSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGT LTV
VSS

[0361]

>DOM1h-574-133
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFT FVKYS MGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRT
YYDHSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFVYWGQGT LVT
VSS

>DOM1h-574-138
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFT FFKYS MGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRT
YYAHSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWAPFEYWGQGT LVT
VSS

>DOM1h-574-156
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFT FFKYS MGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRT
YYAHSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGT LVT
VSS

>DOM1h-574-180
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFT FVKYS MGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRT
YYAHAVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGT LVT
VSS

>DOM1h-574-162
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFT FFKYS MGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRT
YYSHSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGT LVT
VSS

DOM7h-11-3
DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASRP IGTTL SWYQQKPGKAPKLLILWNSRLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

[0362]

도면

도면 1a

[illegible]

도면 1b

[illegible]

도면1c

[illegible]

도면1d

[illegible]

도면1e

[illegible]

도면1f

카바트관기	100a'	104	109
DOM1h-574-156	G	R	W
DOM1h-574-188	Y	E	N
DOM1h-574-189	Y	E	N
DOM1h-574-190	Y	E	N
DOM1h-574-191	Y	E	N
DOM1h-574-192	Y	E	N
DOM1h-574-193	Y	E	N
DOM1h-574-194	Y	E	N
DOM1h-574-195	Y	E	N
DOM1h-574-196	Y	E	N
DOM1h-574-201	Y	E	N
DOM1h-574-202	Y	E	N
DOM1h-574-203	Y	E	N
DOM1h-574-204	Y	E	N
DOM1h-574-205	Y	E	N
DOM1h-574-206	Y	E	N
DOM1h-574-207	Y	E	N
DOM1h-574-208	Y	E	N
DOM1h-574-209	Y	E	N
DOM1h-574-211	Y	E	N
DOM1h-574-212	Y	E	N
DOM1h-574-213	Y	E	N
DOM1h-574-214	Y	E	N

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Glaxo Group Limited

Inusha DE SILVA

Armin SEPP

Adriaan Allart STOOP

<120> STABLE ANTI-TNFR1 ANTAGONISTS

<130> AGS/DB63980 WO

<150> 61/255235

<151> 2009-10-27

<160> 76

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer

<400> 1

caggaaacag ctatgaccat g 21

<210> 2

<211> 20

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer

<400> 2

ttcaggtgc gcaactgttg 20

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer

<400> 3

cgccaagctt gcatgcaaat tc 22

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer

<400> 4

ttgtaaaacg acggccagtg 20

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer

<400> 5

cttaaacagc ttgataccg 19

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer

<400> 6

gacagccctc atagttag 18

<210> 7

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer

<400> 7

ttcttttgct agcgctcgag acggtgacca gggttc 36

<210> 8

<211> 102

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer

<400> 8

ggaattccat atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc 60

ccagccggcg atggccgagg tgcagctgtt ggagtctggg gg 102

<210> 9

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 9

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgat aagtattcaa tggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180

gcacactccg tgaaggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300
gggcgttggg tgccttttga gtactggggt caggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 10

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 10

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttgc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180

gcacactccg tgaaggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggttt attactgtgc ggtataact 300
gggcgttggg agccttttga gtactggggt caggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 11

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 11

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttttc aagtattcga tggggtggat ccgccaggct 120
ccaggttaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180

gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc ggtatatacg 300
ggtcggtggg cgccttttga gtactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 12

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 12

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacattttcc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180

gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatatact 300
gggcgttggg tgccttttga gtactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 13

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 13

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacattttcc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180

gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatatact 300
gggcgttggg tgccttttga gaactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 14

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 14

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctccgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgat aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtccagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180

gcacactccg tgaaggccg gttcaccaac tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300
gggcgttggg agccttttga gtactggggt caggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 15

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 15

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgtt aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180

gcacacgcgg tgaaggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300
gggcgttggg tgccatttga gtactggggt caggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 16

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 16

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttttc aagtattcga tggggtgggt cgcgcaggct 120
 cctgggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180

gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatatact 300
 gggcgctggg agccttttga gtactgggga cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 17

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 17

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccttttcc aagtattcga tggggtgggt cgcgcaggct 120
 ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180

gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatatact 300
 gggcgctggg agccttttga gtactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 18

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 18

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttgat aagaattcga tggggtgggt cgcgcaggct 120
 ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacag atatcgata cagctgatcg tacatactac 180

gcacactcac tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatatact 300
 gggcgctggg tgccttttga gtactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 19

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 19

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttttc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtatcacag atatcggata ctgctgatcg tacatactac 180

gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc ggtatatacg 300
ggtcggtggg cgccttttga gtactggggt caggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 20

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 20

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttttc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180

gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgacg attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg cgccgaggac accgcggtat attactgcgc gatatactac 300
ggtcggtggg cgccttttga gtactggggt caggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 21

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 21

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttttc aagtattcga tggggtgggt cgcgcaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180

gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatatactac 300
ggtcagtggg cgccttatga gtactggggt cagggaaccc tggtcaccgt tcgagcg 357

<210> 22

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 22

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgat aagtattcga tggggtgggt cgcgcaggct 120
ccaggaagg atctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgaccg tacatactac 180

gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatatactac 300
gggcgttggg tgccttttga gaactggggt cacggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 23

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 23

gaggtgcagt tgttggattc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttttc aagtattcga tggggtgggt cgcgcaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180

tcacctccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccgggaa cacgctgaat 240
ctgcaaatga cccccctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatatactac 300
gggcgttggg agccttttga gtactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 24

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 24

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc atggtacagc cgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcat cctccggatt caccttttcc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaag gtctagagtg ggtctcacag atttccgata ctgctgatct tacatactac 180

gcacactccg tgaaggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggaat attactgtgc gatatactac 300
ggtcggtggg cgccttttga gtactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 25

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 25

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgat aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttccgata ctgctgatcg tacatactac 180

gcacacgcgg tgaaggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatatact 300
gggcgttggg tgccttttga gtactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 26

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 26

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttttc aagtattcga tggggtgggt cgcgcaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180

gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatatactac 300
ggtcagtggg cgccttatga gtactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 27

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 27

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgct aagtattcga tggggtgggt cgcgcaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180

gcacacggcg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatatactac 300
gggcgttggg tgccttttga gtactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 28

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 28

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttcc aagtattcga tggggtgggt cgcgcaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180

gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacactgtac 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatatactac 300
gggcgttggg tgccttttga gtactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 29

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 29

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctccgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgat aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180

gcacactccg taaaggccg gttcaccatc acccgcgaca attccaagaa cacgtgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac acccggtat attactgtgc gatatact 300
gggcgttggg agccttttga gtactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 30

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 30

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ccggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttcc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180

gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgtgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acccggtat attactgtgc gatatact 300
gggcgttggg tgccttttga gtactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 31

<211> 690

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 31

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cactttttcc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180

gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300
gggcgttggg agccttttga gtactggggt cagggaacce tggtcaccgt ctcgagcgt 360
agcaccgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagaccgt 420
gtcaccatca cttgccgggc aagtcgtccg attgggacga cgttaagttg gtaccagcag 480
aaaccaggga aagccccctaa gctcctgac ctttgggaatt cccgtttgca aagtggggtc 540
ccatcacgtt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagctctg 600
caacctgaag attttctac gtactactgt gcgcaggctg ggacgcatcc tacgacgttc 660

ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaacgg 690

<210> 32

<211> 690

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 32

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacttttgat aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacacgcgg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300

gggcgttggg tgccttttga gtactggggt cagggaacce tggtcaccgt ctcgagcgt 360
agcaccgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagaccgt 420
gtcaccatca cttgccgggc aagtcgtccg attgggacga cgttaagttg gtaccagcag 480
aaaccaggga aagccccctaa gctcctgac ctgtgggaatt cccgtttgca aagtggggtc 540
ccatcacgtt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagctctg 600
caacctgaag attttctac gtactactgt gcgcaggctg ggacgcatcc tacgacgttc 660
ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaacgg 690

<210> 33

<211> 690

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 33

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ccggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttcc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gatatact 300
gggcgttggg tgccttttga gtactggggt caggaaccc tggtcaccgt ctgcagcgt 360

agcaccgaca tccagatgac ccagctccca tctccctgt ctgcatctgt aggagaccgt 420
gtcaccatca ctgcccggc aagtcgtccg attgggacga cgtaagtgt gtaccagcag 480
aaaccaggga aagcccctaa gctcctgac ctttggaatt cccgtttgca aagtggggtc 540
ccatcacgtt tcaaggcag tggatctggg acagatttca ctctacat cagcagctgt 600
caactgaag attttgctac gtactactgt gcgcaggctg ggacgcatcc tacgacgttc 660
ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaacgg 690

<210> 34

<211> 690

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 34

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgat aagtattcaa tggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatatact 300
gggcgttggg tgccttttga gtactggggt caggaaccc tggtcaccgt ctgcagcgt 360

agcaccgaca tccagatgac ccagtcacca tcctccctgt ctgcatctgt aggagaccgt 420

gtcaccatca cttgccgggc aagtcgtccg attgggacga cgtaagtgtg gtaccagcag 480

aaaccaggga aagcccctaa gctcctgac ctttggatt cccgtttgca aagtggggtc 540

ccatcacgtt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcttg 600

caacctgaag attttctac gtactactgt gcgcaggctg ggacgcatcc tacgacgttc 660

ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaacgg 690

<210> 35

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 35

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60

tcctgtgcag cctccggatt caccittgtt aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120

ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcgaata ctgctgatcg tacatactac 180

gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300

gggcgttggg tgccttttga gtactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 36

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 36

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60

tcctgtgcag cctccggatt caccittgtt aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120

ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180

gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300

gggcgttggg tgccttttga gtactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 37

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 37

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttgtt aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120

ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180

gatcactccg tgaaggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gatataatcg 300

ggtcgttggg agccttttgt ctactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 38

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 38

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttttc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120

ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180

gcacactccg tgaaggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gatataatcg 300

ggtcggtggg cgctttttga gtactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 39

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 39

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttttc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300
gggcgttggg tgccttttga gtactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 40

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 40

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttgtt aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
gcacacggcg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300
gggcgttggg tgccttttga gtactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 41

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 41

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttttc aagtattcga tggggtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagtg ggtctcacag atttcggata ctgctgatcg tacatactac 180
tcacactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgctgaggac accgcggtat attactgtgc gatataact 300
gggcgttggg tgccttttga gtactggggt cagggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 42

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 42

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtcg tccgattggg acgacgttaa gttggtacca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gaccccttgg aattcccgtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg ctacgtacta ctgtgcgag gctgggacgc atcctacgac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 43

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 43

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

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

20 25 30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His 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 Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 44

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 44

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Phe Lys Tyr
20 25 30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His 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 Val Tyr Thr Gly Arg Trp Glu Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 45

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 45

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Phe Lys Tyr
 20 25 30
 Ser Met Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His 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 Val Tyr Thr Gly Arg Trp Ala Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 46

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 46

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

 Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His 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 Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 47

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 47

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

35 40 45
 Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His 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 Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Asn Trp Gly Gln Gly

100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 48

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 48

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Asn 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 Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Glu Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 49

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 49

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ala 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 Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 50

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 50

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His 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 Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Glu Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 51

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 51

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

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

20 25 30
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His 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 Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Glu Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 52

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 52

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Lys Asn
 20 25 30
 Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ser Leu
 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 Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 53

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 53

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

Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His 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 Val Tyr Thr Gly Arg Trp Ala Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 54

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 54

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp 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 Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Ala Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 55

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 55

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

85 90 95

Ala Ile Tyr Thr Gly Gln Trp Ala Pro Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Arg Ala

115

<210> 56

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 56

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

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Lys Tyr
 20 25 30

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

Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His 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 Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Asn Trp Gly His Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 57

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 57

Glu Val Gln Leu Leu Asp 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 Phe Lys Tyr

20 25 30

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

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

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

Leu Gln Met Thr Pro Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Glu Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly

100

105

110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 58

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 58

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Leu Thr Tyr Tyr Ala His 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 Glu Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Ala Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly

100

105

110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 59

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 59

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

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Lys Tyr			
20	25	30	
Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ala 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 Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly			
100	105	110	
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115			

<210> 60

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 60

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

35 40 45
 Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His 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 Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ile Tyr Thr Gly Gln Trp Ala Pro Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 61

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 61

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Lys Tyr
 20 25 30
 Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ala 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 Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 62

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 62

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His 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 Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 63

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 63

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

100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 64

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 64

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg 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 Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 65

<211> 230

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 65

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

20					25					30					
Ser	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
35					40					45					
Ser	Gln	Ile	Ser	Asp	Thr	Ala	Asp	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	His	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	Ile	Tyr	Thr	Gly	Arg	Trp	Glu	Pro	Phe	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly				
				100					105					110					
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln				
				115					120				125						
Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr				
	130							135					140						

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

145 150 155 160

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Leu Trp Asn Ser Arg Leu

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Tyr Cys Ala Gln Ala Gly Thr His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr

210 215 220

Lys Val Glu Ile Lys Arg

225 230

<210> 66

<211> 230

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 66

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ala 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 Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln
 115 120 125
 Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
 130 135 140
 Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Gly Thr Thr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln
 145 150 155 160

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

Lys Val Glu Ile Lys Arg
 225 230

<210> 67

<211> 230

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 67

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

 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln
 115 120 125
 Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
 130 135 140
 Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Gly Thr Thr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln
 145 150 155 160
 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Leu Trp Asn Ser Arg Leu

 165 170 175
 Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 180 185 190
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 195 200 205
 Tyr Cys Ala Gln Ala Gly Thr His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 210 215 220
 Lys Val Glu Ile Lys Arg
 225 230

<210> 68

<211> 230

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 68

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

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

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

Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His 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 Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln
115 120 125

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
130 135 140

Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Gly Thr Thr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln
145 150 155 160

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Leu Trp Asn Ser Arg Leu
165 170 175

Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
180 185 190

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
195 200 205

Tyr Cys Ala Gln Ala Gly Thr His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr
210 215 220

Lys Val Glu Ile Lys Arg
225 230

<210> 69

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 69

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 70

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 70

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45
 Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His 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 Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 71

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 71

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

35 40 45
 Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Asp His 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 Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Glu Pro Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 72
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Derived from a human germline sequence
 <400> 72
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Phe Lys Tyr
 20 25 30

 Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His 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 Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Ala Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 73
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Derived from a human germline sequence
 <400> 73

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Phe Lys Tyr
 20 25 30
 Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His 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 Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 74

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 74

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

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 75

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 75

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ser His 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 Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 76

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Derived from a human germline sequence

<400> 76

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 Arg Pro Ile Gly Thr Thr

20 25 30

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

35 40 45

Leu Trp Asn Ser Arg 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 Ala Gln Ala Gly Thr His Pro Thr

85 90 95

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

100 105