(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0110295
(43) 공개일자 2009년10월21일

(51) Int. Cl.
C07K 14/78 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-7012553
(22) 출원일자 2007년11월21일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2009년06월17일
(86) 국제출원번호 PCT/US2007/024316
(87) 국제공개번호 WO 2008/066752
국제공개일자 2008년06월05일
(30) 우선권주장
60/860,605 2006년11월22일 미국(US)
60/879,666 2007년01월09일 미국(US)

(71) 출원인
에드넥서스, 어 브리스톨-마이어스 스퀴브 알&디 컴파니
미국 02453 매사추세츠주 왈탐 수트 300 비버 스트리트 100
(72) 발명자
캠프하우젠, 레이
미국 02452 매사추세츠주 왈탐 릿지 레인 #207 249
파브리지오, 데이빗
미국 01907 매사추세츠주 스왐프스콧 뱅크스 테라스 19
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영, 양영준

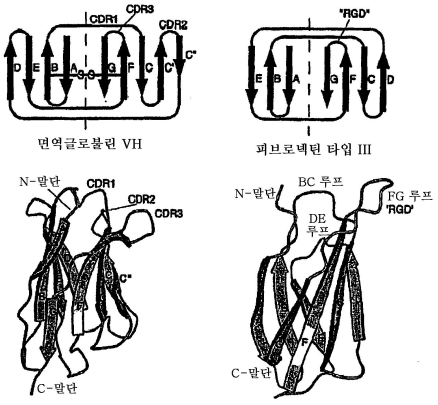
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) IGF-IR을 포함하는 티로신 키나제 수용체에 대한 공학처리된 단백질에 기반한 표적화 치료제

(57) 요 약

본 발명은 인슐린-유사 성장 인자-I 수용체 (IGF-IR)에 결합하는 혁신적인 단백질, 및 다른 중요한 단백질을 제공한다. 본 발명은 또한 제약 제제 중의 혁신적인 단백질 및 상기 단백질의 유도체 및 진단, 연구 및 치료 용도에 있어서 그의 용도를 제공한다. 본 발명은 상기 단백질을 포함하는 세포, 상기 단백질 또는 그의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 혁신적인 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 추가로 제공한다.

대 표 도 - 도24



(72) 발명자

라이트, 마틴, 씨.

미국 02115 매사추세츠주 보스턴 컴버랜드 스트리트 #4 12

게이지, 패트릭

미국 19004 펜실베니아주 발라 신위드 프레지덴셜 불러바드 유닛 607 19

멘들레인, 존

미국 02066 매사추세츠주 시추에이트 이집트 애비뉴 66

특허청구의 범위

청구항 1

10번째 피브로넥틴 타입 III (^{10}Fn3) 도메인을 포함하고, 상기 ^{10}Fn3 도메인이 (i) 루프 AB; 루프 BC; 루프 CD; 루프 DE; 루프 EF; 및 루프 FG를 포함하고; (ii) 인간 ^{10}Fn3 도메인의 상응하는 루프의 서열에 비해 변경된 아미노산 서열을 갖는 루프 BC, DE 및 FG 중에서 선택된 적어도 하나의 루프를 갖고, (iii) 인간 IGF-IR에 약 1 μM 이하의 해리 상수로 결합하는 것인 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, ^{10}Fn3 도메인이 인간 IGF-IR에 약 10 nM 이하의 해리 상수로 결합하는 것인 폴리펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서, 루프 BC 및 루프 FG가 인간 ^{10}Fn3 도메인의 상응하는 루프의 서열에 비해 변경된 아미노산 서열을 갖는 것인 폴리펩티드.

청구항 4

제1항에 있어서, ^{10}Fn3 도메인이 서열 2-125, 184-203, 또는 226 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 5

제1항에 있어서, 폴리옥시알킬렌 모이어티, 인간 혈청 알부민 결합 단백질, 시알산, 인간 혈청 알부민, 트랜스페린, 및 Fc 단편 중에서 선택되는 하나 이상의 약동학 (PK) 모이어티를 추가로 포함하는 폴리펩티드.

청구항 6

제5항에 있어서, PK 모이어티가 폴리옥시알킬렌 모이어티이고, 상기 폴리옥시알킬렌 모이어티가 폴리에틸렌 글리콜인 폴리펩티드.

청구항 7

제1항에 있어서, 약 50 kD 미만의 항체 모이어티; 리포칼린의 유도체; 테트라넥틴의 유도체; 아비머; 안키린의 유도체, 및 제2의 10번째 피브로넥틴 타입 III (^{10}Fn3) 도메인으로부터 선택된 제2 도메인을 추가로 포함하고, 여기서 제2 도메인은 인간 단백질에 결합하고, 제2의 ^{10}Fn3 도메인이 (i) 루프 AB; 루프 BC; 루프 CD; 루프 DE; 및 루프 FG를 포함하고; (ii) 인간 ^{10}Fn3 도메인의 상응하는 루프의 서열에 비해 랜덤화된 (randomized) 아미노산 서열을 갖는 루프 BC, DE 및 FG 중에서 선택되는 적어도 하나의 루프를 갖고, (iii) 인간 ^{10}Fn3 도메인에 의해 결합되지 않은 인간 단백질에 약 10 nM 이하의 해리 상수로 결합하는 것인 폴리펩티드.

청구항 8

제7항에 있어서, 제2 도메인이 제2의 ^{10}Fn3 도메인이고, 서열 2-125, 184-203, 또는 226 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 9

제7항에 있어서, 제2 도메인이 인간 IGF-IR에 결합하는 것인 폴리펩티드.

청구항 10

제7항에 있어서, 제2 도메인이 인간 VEGFR2에 결합하는 것인 폴리펩티드.

청구항 11

제7항에 있어서, 제2 도메인이 제2의 ^{10}Fn3 도메인이고, 서열 126-183 중의 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 12

제7항에 있어서, ^{10}Fn3 도메인 및 제2 도메인이 적어도 하나의 디술피드 결합, 펩티드 결합, 폴리펩티드, 중합체성 당류 (polymeric sugar), 또는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 통해 작동가능하게 연결되는 것인 폴리펩티드.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 IGF-IR에 대한 IGF-I 또는 IGF-II의 결합을 억제하고, 세포-기반 분석에서 IC50 미만의 농도에서 인간 IGF-IR을 활성화시키지 않는 것인 폴리펩티드.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 ^{10}Fn3 도메인이 a) 각각 인간 ^{10}Fn3 도메인 코딩 서열과 상이한 후보 10번째 피브로넥틴 타입 III (^{10}Fn3) 도메인 서열을 포함하는 후보 RNA 분자의 집단을 생산하고, 여기서 상기 RNA 분자는 각각 상기 후보 ^{10}Fn3 도메인 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 번역 개시 서열 및 출발 코돈을 포함하고, 각각 3' 단부에서 핵산-푸로마이신 링커에 작동가능하게 연결되고; b) 시험관 내에서 상기 후보 ^{10}Fn3 도메인 코딩 서열을 번역하여 후보 RNA-^{10}Fn3 융합체의 집단을 생산하고; c) 상기 후보 RNA-Fn3 융합체의 집단을 IGF-IR과 접촉시키고; d) 그의 단백질 부분이 IGF-IR에 대한 상기 인간 ^{10}Fn3의 결합 친화도 또는 특이성에 비해 변경된 IGF-IR에 대한 결합 친화도 또는 특이성을 갖는 RNA-^{10}Fn3 융합체를 선택하는 단계를 포함하는 방법에 의해 선택되는 것인 폴리펩티드.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드를 포함하고, 본질적으로 내독소가 존재하지 않는 제약상 허용되는 조성물.

명 세 서

<1> <관련 출원>

<2> 본원은 그 전문을 본원에 참조로 포함시킨 미국 특허 가출원 60/860,605 (2006년 11월 22일 출원) 및 60/879,666 (2007년 1월 9일 출원)을 기초로 한 이익을 청구한다.

기 술 분 야

<3> 본 발명은 인슐린-유사 성장 인자-I 수용체 (IGF-IR)에 결합하는 혁신적인 단백질, 및 다른 중요한 단백질을 제공한다. 본 발명은 제약 제제 중의 혁신적인 단백질 및 상기 단백질의 유도체 및 진단, 연구 및 치료 용도에 있어서 그의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 상기 단백질을 포함하는 세포, 상기 단백질 또는 그의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 혁신적인 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터에 관한 것이다.

배 경 기 술

<4> 인슐린-유사 성장 인자-I 수용체 (IGF-IR)은 막횡단 (transmembrane) 이종4량체 단백질이고, 이는 2개의 세포외 알파 사슬 및 2개의 막-관통 (membrane-spanning) 베타 사슬을 디술피드-연결된 베타-알파-알파-베타 형상으로 갖는다. IGF-IR 수용체의 세포외 도메인에 의한 인슐린-유사 성장 인자-I (IGF-I) 및 인슐린-유사 성장 인자-II (IGF-II)와 같은 리간드의 결합은 그를 활성화시키고, 많은 경우에 그의 세포내 티로신 키나제 도메인을 활성화시켜, 수용체의 자가인산화 및 기질 인산화를 일으킨다.

<5> IGF-IR은 인슐린 수용체에 상동성이고, 베타 사슬 티로신 키나제 도메인에서 84%의 높은 서열 유사성 및 알파

사슬 세포외 시스테인 풍부 도메인에서 48%의 낮은 서열 유사성을 갖는다 ([Ulrich, A. et al., 1986, EMBO, 5, 2503-2512]; [Fujita-Yamaguchi, Y. et al., 1986, J. Biol. Chem., 261, 16727-16731]; [LeRoith, D. et al., 1995, Endocrine Reviews, 16, 143-163]). IGF-IR 및 리간드 (IGF-I 및 IGF-II)는 배아발생 동안 성장 및 발달, 성인에서 대사, 세포 증식 및 세포 분화를 포함한 수많은 생리학적 과정에서 중요한 역할을 한다 ([LeRoith, D., 2000, Endocrinology, 141, 1287-1288]; [LeRoith, D., 1997, New England J. Med., 336, 633-640]).

<6> IGF-I 및 IGF-II 리간드는 혈액 (여기서 이들은 주로 IGF-결합 단백질과 복합체로서 존재한다) 내에서 내분비 호르몬으로서, 및 국소 생산되는 주위분비 (paracrine) 및 자가분비 성장 인자로서 기능한다 ([Humbel, R. E., 1990, Eur. J. Biochem., 190, 445-462]; [Cohick, W. S. and Clemmons, D. R., 1993, Anna Rev. Physiol. 55, 131-153]).

<7> 생체 내에서, IGF-I의 혈청 수준은 뇌하수체 성장 호르몬 (GH)의 존재에 의존적이다. 간이 GH 의존 IGF-I 합성의 주요 부위이지만, 매우 많은 간외 조직이 또한 IGF-I을 생산한다 (Daughaday and Rotwein, Endocrine Rev. 10:68-91 (1989). 다양한 신생물 조직이 또한 IGF-I을 생산할 수 있다 (Werner and LeRoith, Adv. Cancer Res. 68:183-223 (1996)). 따라서, IGF-I은 자가분비 또는 주위분비를 통해 및 내분비 메카니즘을 통해 정상 및 비정상 세포성 증식의 조절인자로서 작용할 수 있다. IGF-I 및 IGF-II는 생체 내에서 IGF 결합 단백질 (IGFBP)에 결합한다. IGF에 결합시에, IGFBP는 순환 혈을 통해 IGF를 수송하거나, 단백분해적 절단 및 불활성화로부터 IGF를 보호할 수 있다. IGF-IR과의 상호작용을 위한 유리 IGF의 이용성은 IGFBP에 의해 조정된다. IGFBP 및 IGF-I의 검토를 위해서는 문헌 [Grimberg et al., J. Cell. Physiol. 183: 1-9, 2000]을 참조한다.

<8> 분자 수준에서, IGF-IR은 종양 세포의 성장, 형질전환 및 생존을 촉진하는데 관여되었다 ([Baserga, R. et al., 1997, Biochem. Biophys. Acta, 1332, F105-F126]; [Blakesley, V. A. et al., 1997, Journal of Endocrinology, 152, 339-344]; [Kaleko, M., Rutter, W. J., and Miller, A. D. 1990, Mol. Cell. Biol., 10, 464-473]). 유방암, 대장암, 난소 암종, 윤활막 육종 및 췌장암을 비롯한 몇몇 종류의 종양은 정상 수준보다 더 높은 IGF-IR을 발현하는 것으로 알려져 있다 ([Khandwala, H. M. et al., 2000, Endocrine Reviews, 21, 215-244]; [Werner, H. and LeRoith, D., 1996, Adv. Cancer Res., 68, 183-223]; [Happerfield, L. C. et al., 1997, J. Pathol., 183, 412-417]; [Frier, S. et al., 1999, Gut, 44, 704-708]; [van Dam, P. A. et al., 1994, J. Clin. Pathol., 47, 914-919]; [Xie, Y. et al., 1999, Cancer Res., 59, 3588-3591]; [Bergmann, U. et al., 1995, Cancer Res., 55, 2007-2011] 참조).

<9> 시험관 내에서, IGF-I 및 IGF-II는 몇몇 인간 종양 세포주, 예를 들어 폐암, 유방암, 대장암, 뼈육종 및 자궁경부암에 대한 강력한 분열촉진물질 (mitogen)인 것으로 나타났다 ([Ankrapp, D. P. and Bevan, D. R., 1993, Cancer Res., 53, 3399-3404]; [Cullen, K. J., 1990, Cancer Res., 50, 48-53]; [Hermanto, U. et al., 2000, Cell Growth & Differentiation, 11, 655-664]; [Guo, Y. S. et al., 1995, J. Am. Coll. Surg., 181, 145-154]; [Kappel, C. C. et al., 1994, Cancer Res., 54, 2803-2807]; [Steller, M. A. et al., 1996, Cancer Res., 56, 1761-1765]). 이들 종양 및 종양 세포주 중 몇몇은 또한 높은 수준의 IGF-I 또는 IGF-II를 발현하고, 이들은 자가분비 또는 주위분비 방식으로 그들의 성장을 자극할 수 있다 (Quinn, K. A. et al., 1996, J. Biol. Chem., 271, 11477-11483).

<10> 역학 연구에서는 상승된 혈장 수준의 IGF-I (및 보다 낮은 수준의 IGF-결합 단백질-3)과 전립선암, 대장암, 폐암 및 유방암에 대한 증가된 위험과의 상관관계를 보여주었다 ([Chan, J. M. et al., 1998, Science, 279, 563-566]; [Wolk, A. et al., 1998, J. Natl. Cancer Inst, 90, 911-915]; [Ma, J. et al., 1999, J. Natl. Cancer Inst, 91, 620-625]; [Yu, H. et al., 1999, J. Natl. Cancer Inst., 91, 151-156]; [Hankinson, S. E. et al., 1998, Lancet, 351, 1393-1396]). 암 예방을 위해 혈장 내의 IGF-I 수준을 낮추거나 IGF-IR의 기능을 억제하기 위한 전략이 제안되었다 ([Wu, Y. et al., 2002, Cancer Res., 62, 1030-1035]; [Grimberg, A and Cohen P., 2000, J. Cell. Physiol., 183, 1-9]).

<11> IGF-IR은 성장 인자 상실, 부착기능 소실 (anchorage independence) 또는 세포독성 약물 치료에 의해 유발된 세포자멸로부터 종양 세포를 보호할 수 있다 ([Navarro, M. and Baserga, R., 2001, Endocrinology, 142, 1073-1081]; [Baserga, R. et al., 1997, Biochem. Biophys. Acta, 1332, F105-F126]). 그의 분열촉진, 형질전환 및 항-세포자멸 활성에 중요한 IGF-IR의 도메인은 돌연변이 분석에 의해 확인되었다. 예를 들어, IGF-IR의 티로신 1251 잔기는 항-세포자멸 및 형질전환 활성에는 중요하지만 그의 분열촉진 활성에는 중요하지 않은 것으로 확인되었다 ([O'Connor, R. et al., 1997, Mol. Cell. Biol., 17, 427-435]; [Miura, M. et al., 1995, J.

Biol. Chem., 270, 22639-22644]).

<12> **IGF-IR 길항작용 또는 억제에 기반한 치료제의 제조 어려움.**

<13> IGF-IR은 치료 표적으로서 매력적인 생물학적 특징을 갖지만, 길항제 또는 다른 종류의 억제제를 제조하기 위한 시도는 치료 패러다임에 따라 주로 하나 이상의 다음 요인으로 인해 실패하였다: 효능작용 (agonism) 없이 표적을 길항하는 것의 곤란 또는 불능; 다른 티로신 키나제 표적 또는 수용체, 예를 들어 인슐린 수용체와의 원치 않는 교차 반응성으로 인해 선택적 길항제 또는 억제제를 제조하는 것의 곤란 또는 불능; 잠재적인 치료제의 짧은 반감기로 인해 효과적인 투여의 곤란; 잠재적인 치료제의 낮은 용해도로 인해 효과적인 투여의 곤란; 및 잠재적인 치료제의 응집으로 인한 효과적인 투여의 곤란. 본 발명의 치료제는 하나 이상의 이들 어려움을 극복한 것이다.

<14> IGF-IR mRNA에 대한 안티센스 (antisense)를 발현하는 종양 세포는 생물확산실에서 동물에게 주사될 때 대량의 세포자멸을 겪는다. 이러한 관찰로, 종양 세포가 IGF-IR의 억제에 의한 세포자멸에 대해 정상 세포보다 더 감수성이라는 가설에 기초하여 IGF-IR은 매력적인 치료 표적이 된다 ([Resnicoff, M. et al., 1995, Cancer Res., 55, 2463-2469]; [Baserga, R., 1995, Cancer Res., 55, 249-252]). 그러나, 안티센스 및 siRNA 치료 전략은 모두 투여 문제 및 잠재적인 상품 비용의 문제가 존재한다.

<15> 종양 세포에서 IGF-IR의 기능을 억제하는 다른 전략은 IGF-IR의 세포외 도메인에 결합하고 활성화를 억제할 수 있는 항-IGF-IR 항체를 사용하는 것이다. IGF-IR에 대한 마우스 모노클로날 항체를 개발하기 위한 몇몇 시도가 보고되었고, 그 중 2가지 억제성 항체 (IR3 및 IH7)가 이용가능하고, 그들의 용도는 몇몇 IGF-IR 연구에서 보고되었다.

<16> IR3 항체는 마우스를 면역화시키기 위해 인슐린 수용체의 부분 정제된 태반 제제를 사용하여 개발되었고, 이는 인슐린 수용체에 대한 결합에 대해 선택적인 항체 IR1, 및 IGF-IR의 우선적인 면역침전 (소마토메딘-C 수용체), 그러나 인슐린 수용체의 약한 면역침전을 보인 2개의 항체 IR2 및 IR3을 생성하였다 (Kull, F. C. et al., 1983, J. Biol. Chem., 258, 6561-6566).

<17> *항체의 예시적인 결핍*

<18> 일부 경우에, 항체는 IGF-IR을 활성화시킨다. 이는 문헌에서 여러 번 보여졌다. 또한, "억제하는" 것으로 나타난 항체는 주의깊게 특성화되지 않았을 수 있고, 실제로는 보다 낮은 항체 농도와 같은 특정 조건 하에서 IGF-IR을 활성화시킬 수 있다. 아마도 항체의 확산 구배가 존재하는 종양에서, IGF-IR의 활성화는 종양에서 보다 낮은 항체 농도로 항체를 사용하여 일어날 수 있다.

<19> 1H7 항체는 마우스를 IGF-IR의 정제된 태반 제제로 면역화함으로써 개발되었고, 이는 *3개의 자극 항체*에 추가로 억제성 항체 1H7을 생산하였다 ([Li, S. L. et al., 1993, Biochem. Biophys. Res. Commun., 196, 92-98]; [Xiong, L. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 5356-5360]).

<20> 다른 보고에서, 높은 수준의 IGF-IR을 발현하는 형질감염된 3T3 세포로 마우스를 면역화시킴으로써 인간 IGF-IR에 대해 특이적인 마우스 모노클로날 항체의 패널이 얻어졌고, 이들은 결합 경쟁 연구에 의해 및 형질감염된 3T3 세포에 대한 IGF-I 결합의 억제 또는 자극에 의해 7개의 군으로 분류되었다 (Soos, M. A. et al., 1992, J. Biol. Chem., 267, 12955-12963).

<21> IR3 항체는 시험관내 IGF-IR 연구를 위해 가장 일반적으로 사용되는 억제성 항체이지만, 인간 IGF-IR을 발현하는 형질감염된 3T3 및 CHO 세포에서 *효능 활성을 나타내는* 단점이 있다 ([Kato, H. et al., 1993, J. Biol. Chem., 268, 2655-2661]; [Steele-Perkins, G. and Roth, R. A., 1990, Biochem. Biophys. Res. Commun., 171, 1244-1251]). 이와 유사하게, 수스 (Soos) 등에 의해 개발된 항체의 패널 중에서, 최대 억제성 항체 24-57 및 24-60은 또한 형질감염된 3T3 세포에서 *효능 활성*을 보였다 (Soos, M. A. et al., 1992, J. Biol. Chem., 267, 12955-12963). IR3 항체는 가용화 후에 무손상 세포에서 발현된 수용체에 대한 IGF-I의 결합을 억제하는 (IGF-II는 아님) 것으로 보고되었지만, 시험관 내에서 세포 내에서 DNA 합성을 자극하는 IGF-I 및 IGF-II의 능력을 모두 억제하는 것으로 나타났다 (Steele-Perkins, G. and Roth, R. A., 1990, Biochem. Biophys. Res. Commun., 171, 1244-1251). IR3 항체의 결합 에피토프는 키메라 (chimeric) 인슐린-IGF-IR 구성체로부터 IGF-IR의 223-274 구역인 것으로 추측되었다 ([Gustafson, T. A. and Rutter, W. J., 1990, J. Biol. Chem., 265, 18663-18667]; [Soos, M. A. et al., 1992, J. Biol. Chem., 267, 12955-12963]).

<22> MCF-7 인간 유방암 세포주는 시험관 내에서 IGF-I 및 IGF-II의 성장 반응을 입증하기 위한 모델 세포주로서 일

반적으로 사용된다 (Dufourny, B. et al., 1997, J. Biol. Chem., 272, 31163-31171). MCF-7 세포에서, IR3 항체는 무-혈청 조건에서 외인적으로 첨가된 IGF-I 및 IGF-II의 자극 효과를 약 80%로 불완전하게 차단한다. 또한, IR3 항체는 10% 혈청 내에서 MCF-7 세포의 성장을 유의하게 억제하지 않는다 (25% 미만) (Cullen, K. J. et al., 1990, Cancer Res., 50, 48-53). 시험관 내에서 IR3 항체에 의한 MCF-7 세포의 혈청-자극된 성장의 이러한 약한 억제는 IR3 항체 처리가 누드 마우스에서 MCF-7 이종이식편의 성장을 유의하게 억제하지 않았다는 생체내 연구의 결과에 관련될 수 있다 (Arteaga, C. L. et al., 1989, J. Clin. Invest, 84, 1418-1423).

<23> IR3 및 다른 보고된 항체의 약한 효능 활성과 이들이 혈청-자극의 보다 생리학적 조건에서 MCF-7 세포와 같은 종양 세포의 성장을 유의하게 억제하지 못하기 때문에 (무혈청 조건에서 외인성으로 첨가된 IGF-I 또는 IGF-II에 의한 자극 대신), 그들에 의한 유의한 효능 활성 없이 종양 세포의 혈청-자극된 성장을 억제할 수 있는 새로운 항-IGF-IR 조정물질이 필요하다. 그래도, 일부 경우에, 대체로 종양학 또는 잘못 제어되거나 원치 않는 조직 팽창, 증식 또는 성장 외의 용도에 대해서 효능 활성이 요구될 것이다.

<24> 항-IGF-IR 항체는 자가면역 질병의 특정 환자에 존재하는 것으로 보고되었지만, 이들 항체는 정제되지 않았고 진단 또는 임상 절차를 위해 IGF-I 활성을 억제하기에 적합한 것으로 나타나지 않았다 (예를 들어, [Thompson et al., Pediat. Res. 32: 455 459, 1988]; [Tappy et al., Diabetes 37: 1708-1714, 1988]; [Weightman et al., Autoimmunity 16:251-257, 1993]; [Drexhage et al., Nether. J. of Med. 45:285-293, 1994] 참조). 추가로, 세포 증식을 자극할 수 있는 IGF-IR에 대한 모노클로날 항체가 보고되었다 (Xiong et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5356-5360, 1992).

<25> 추가로, 특이성, 효능작용, 응집 및 용해도로 인해 항체 및 다른 치료제를 제조하는 것, 또한 특히 항체를 사용하여 표적으로서 IGF-IR을 포함하는 이중-특이적 치료제를 제조하는 것은 역사적으로 어려웠다.

<26> *소분자 억제제의 예시적인 결핍*

<27> 소분자 화학 프로그램은 IGF-IR에 대한 치료제를 형성하는데 대부분 성공적이지 않았다. 단백질 및 소분자에 의한 상기 표적의 약물성 (druggability)은 관련 티로신 키나제 또는 수용체, 예를 들어 인슐린 수용체를 억제하거나 그에 결합하지 않으면서 IGF-IR에 대한 선택적인 화학적 특성을 얻는 능력을 포함한 많은 이유로 인해 어려웠다. 또한, 소분자는 종종 용해도가 낮아서 생체이용률, 투여 또는 제형화에 문제를 제기한다.

<28> *세포자멸 및 IGF-IR*

<29> 본 발명의 많은 측면 중 하나는 종양과 같은 목적하는 조직의 세포에서 IGF-IR에 선택적으로 결합하여 세포자멸을 촉발시키는 본 발명의 폴리펩티드에 대한 것이다. 활성화를 비롯한 IGF-IR 생물학은 세포자멸의 조절에 기여한다. 이는 세포자멸을 느리게 하거나 방지할 수 있다. 다양한 유전자 병변에 의한 세포자멸 프로그램의 억제는 악성종양의 발달 및 진행에 기여할 수 있다.

<30> 현재의 가능한 치료 전략은 시험관 내에서 세포자멸을 유도하거나 시험관 내에서 증가된 IGF-I, 증가된 IGF-II 및/또는 증가된 IGF-IR 수용체 수준과 연관된 세포 증식을 억제할 수 있지만, IGF-I 수준 또는 IGF-II 수준을 억제하거나 IGF-IR에 대한 IGF-I의 결합을 방지하는 것을 포함하고, 이 때문에 보다 우수한 치료제 개발에는 부적합하다. 예를 들어, 지속성 소마토스타틴 유사체 옥트레오티드 (octreotide)가 IGF 합성 및/또는 분비를 감소시키기 위해 사용되었다. 가용형 IGF-IR은 생체 내에서 종양 세포의 세포자멸을 유도하고, 시험 동물 시스템에서 종양 발생을 억제하기 위해 사용되었다 (D'Ambrosio et al., Cancer Res. 56: 4013-20, 1996). 또한, IGF-IR 안티센스 올리고뉴클레오티드, IGF-I의 펩티드 유사체, 및 IGF-IR에 대한 항체는 IGF-I 또는 IGF-IR 발현을 감소시키기 위해 사용되었다 (상기 참조). 그러나, 이들 물질은 인간 환자에 대한 보다 장기 투여에 적합하지 않았다. 또한, IGF-I은 단신, 골다공증, 근육 질량 감소, 신경병증 또는 당뇨병의 치료를 위해 환자에게 투여되었지만, IGFBP에 대한 IGF-I의 결합으로 인해 종종 IGF-I을 사용한 치료가 어렵거나 무효하게 된다. IGF-I, IGF-II 및 IGF-IR이 암 및 증식성 질환을 비롯한 질환에서 갖는 역할, 예를 들어 IGF-I 또는 IGF-II 및/또는 IGF-IR이 과다-발현될 때 및 다른 치료 방법 (예를 들어, 소분자, siRNA, 안티센스 및 항체)의 결핍을 고려하여, IGF-IR을 선택적으로 조정하거나, 억제하거나, 차단할 수 있는 IGF-IR 경로 (또는 수용체 또는 그의 리간드의 다양한 이소형 또는 돌연변이체)에 대한 치료제, 예를 들어 본 발명의 폴리펩티드를 생성하는 것이 바람직할 것이다.

<31> 또한, 그러한 폴리펩티드가 비용 효과적인 방식으로 발현되고, 바람직한 생물물리학적 특성 (예를 들어, Tm, 실질적으로 단량체성, 또는 잘 접히는 특성), 조직을 관통하도록 작은 크기, 및 IGF-IR 또는 다른 표적에 대한 결합 친화도에 관하여 혈액 내에서 적절한 반감기 또는 생체내 노출 시간을 갖는 것이 바람직할 것이다.

<32> <발명의 개요>

<33> 본 발명의 하나의 측면은 IGF-IR에 높은 친화도로 결합하는 신규한 폴리펩티드에 관한 것이다. 일부 실시태양에서, 폴리펩티드는 IGF-IR에 약 1 μM 이하, 약 10 nM 이하, 또는 1 nM 이하의 해리 상수로 결합한다. 일부 실시태양에서, 폴리펩티드는 인슐린 수용체에 약 1 μM 이상의 해리 상수로 결합한다. 일부 실시태양에서, 본 발명의 폴리펩티드는 IGF-IR에 대한 IGF-I 또는 IGF-II의 결합을 억제하고, 세포-기반 분석에서 IC50 미만의 농도에서 인간 IGF-IR을 활성화시키지 않고, IC50은 약 1 nM 또는 약 100 pM 미만이다. 일부 실시태양에서, 본 발명의 폴리펩티드는 IGF-IR 활성화에 의존성인 세포주에서 세포 기반 분석에서 세포자멸을 유도한다. 일부 실시태양에서, IGF-IR 결합물질은 세포자멸, 인산화 또는 이량체화의 제어와 같은 IGF-IR 활성을 차단한다.

<34> 특히 생체내 용도에서, 단일-특이적 치료제 또는 다중-특이적 (이중-특이적 또는 삼중-특이적 포함) 치료제로서 IGF-IR을 표적으로 하는 본 발명의 단백질은 인슐린 수용체에 비해 IGF-IR에 대해 선택적인 것이 종종 바람직할 것이다. 그러한 선택성은 바람직하게는 적어도 약 100배, 적어도 약 1000배, 적어도 약 10,000배 및 적어도 약 100,000배이다. 또한, 특히 IGF-IR에 대해 높은 친화도를 갖는 단백질은 치료제 또는 단백질의 규정된 농도 이하에서 인슐린 수용체에 검출가능하게 결합하지 않는 것이 바람직할 수 있고, 상기 농도는 약 100 nM, 약 1 μM 또는 약 10 μM이다. 인슐린 수용체에 비해 IGF-IR에 결합하는 단백질의 선택도 관계는 또한 분석에 의존하여 측정되거나 계산된 것으로서; 또는 동일한 생화학적 또는 생물학적 파라미터 (예를 들어, Kd, IC50 및 Ki)의 비로서 Kd, IC50 및 Ki를 비교함으로써 표현될 수 있다. 그러한 비는 바람직하게는 약 100, 약 1,000, 약 10,000 또는 약 100,000인, IGF-IR 결합 또는 다른 측정치에 대한 인슐린 수용체 결합 또는 다른 측정치의 비를 포함한다. 다른 표적, 특히 티로신 키나제 수용체에 결합하는 본 발명의 다른 단백질은 바람직하게는 본원에 제공된 선택도 지침을 이용하여 인슐린 수용체에 비해 목적하는 표적 (예를 들어, EGFR 또는 Her2)에 대해 선택적이다.

<35> 일부 실시태양에서, 폴리펩티드는 피브로넥틴-기반 스캐폴드 (scaffold) 단백질을 포함한다. 일부 실시태양에서, 폴리펩티드는 10번째 피브로넥틴 타입 III (^{10}Fn3) 도메인을 포함하고, 여기서, ^{10}Fn3 도메인은 (i) 루프 AB; 루프 BC; 루프 CD; 루프 DE; 루프 EF; 및 루프 FG를 포함하고; (ii) 인간 ^{10}Fn3 도메인의 상응하는 루프의 서열에 비해 변경된 아미노산 서열을 갖는 루프 BC, DE 및 FG 중에서 선택된 적어도 하나의 루프를 갖고, (iii) 인간 IGF-IR에 약 1 μM 이하의 해리 상수로 결합한다. 일부 실시태양에서, 루프 BC, DE 및 FG 중에서 선택된 적어도 하나의 루프에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산은 야생형 서열과 상이한 아미노산으로 치환된다. 일부 실시태양에서, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산은 루프 BC, DE 및 FG 중에서 선택된 적어도 하나의 루프에서 결실되거나 부가된다. 일부 실시태양에서, 루프 BC 및 루프 FG는 인간 ^{10}Fn3 도메인의 상응하는 루프의 서열에 비해 변경된 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시태양에서, 폴리펩티드는 서열 2-125, 184-203, 또는 226 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함한다. 피브로넥틴 기반 스캐폴드를 통한 IGF-IR에 대한 실질적으로 2가의 결합은 본 발명의 상기 및 다른 실시태양에서 IGF-IR 활성화를 감소시키는 것에 도움이 된다.

<36> 일부 실시태양에서, 본 발명의 폴리펩티드는 하나 이상의 약동학 (PK) 모이어티 (moiety)를 추가로 포함한다. PK 모이어티는 폴리펩티드의 하나 이상의 약동학 특성, 예를 들어, 생체이용률, 혈청 반감기, 생체내 안정성, 및 약물 분포를 개선시킨다. 일부 실시태양에서, PK 모이어티는 폴리옥시알킬렌 모이어티, 인간 혈청 알부민 결합 단백질, 시알산, 인간 혈청 알부민, 트랜스페린, 및 Fc 또는 Fc 단편 중에서 선택된다. 일부 실시태양에서, PK 모이어티는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이다. 일부 실시태양에서, PEG 모이어티는 Cys 또는 Lys 아미노산을 통해 본 발명의 폴리펩티드에 공유 연결된다. 일부 실시태양에서, 본 발명의 폴리펩티드는 적어도 하나의 펩티드 결합에 의해 인간 혈청 알부민 (HSA)에 약 300 nM 이하의 결합 친화도로 결합하는 제2 단백질에 연결된다.

<37> 일부 실시태양에서, 본 발명의 폴리펩티드는 인간 단백질에 결합하는 제2 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시태양에서, 인간 단백질은 EGFR, 엽산 (folate) 수용체, Her2, Her3, c-kit, c-Met, FGFR1, FGFR2, PDGFR, VEGFR1, VEGFR2, VEGF3, Tie2, Ang1, Ang2, FGF (섬유모세포 성장 인자), EGF (표피 성장 인자), HGF (간세포 성장 인자), VEGF-A (혈관 내피 성장 인자-A), VEGF-C, 및 VEGF-D 중에서 선택된다. 일부 실시태양에서, 인간 단백질은 IGF-IR이다. 일부 실시태양에서, 인간 단백질은 티로신 수용체이다. 일부 실시태양에서, 제2 도메인은 인간 단백질에 약 1 μM 이하, 약 10 nM 이하, 또는 약 1 nM 이하의 해리 상수로 결합한다. 일부 실시태양에서, 제2 도메인은 VEGFR2에 약 1 μM 이하, 약 10 nM 이하, 또는 약 1 nM 이하의 해리 상수로 결합하고, VEGFR1에 약 1 μM, 10 μM, 또는 10 μM 이상의 해리 상수로 결합한다.

<38> 일부 실시태양에서, 폴리펩티드는 제1 및 제2 단백질을 포함하고, 여기서 단백질 중 하나 또는 둘 모두는 단일쇄 항체이고, 제1 및 제2 단백질은 PEG 모이어티를 통해 연결된다. 일부 실시태양에서, 제1 단백질은 IGF-IR에 결합한다.

<39> 일부 실시태양에서, 제2 도메인은 약 50 kDa 미만의 항체 모이어티; 리포칼린의 유도체; 테트라넥틴의 유도체; 아비머 (avimer); 안키린의 유도체, 및 제2의 10번째 피브로넥틴 타입 III (^{10}Fn3) 도메인 중에서 선택되고, 여기서 제2의 ^{10}Fn3 도메인은 루프 AB; 루프 BC; 루프 CD; 루프 DE; 및 루프 FG를 포함하고; 인간 ^{10}Fn3 도메인의 상응하는 루프의 서열에 비해 랜덤화된 (randomized) 아미노산 서열을 갖는 루프 BC, DE 및 FG 중에서 선택된 적어도 하나의 루프를 갖고, 인간 ^{10}Fn3 도메인에 의해 결합되지 않은 인간 단백질에 약 10 nM 이하의 해리 상수로 결합한다. 일부 실시태양에서, 제2 도메인은 ^{10}Fn3 도메인이고, 서열 2-203, 또는 226의 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, 본 발명의 폴리펩티드 및 제2 도메인은 적어도 하나의 디술피드 결합, 펩티드 결합, 폴리펩티드, 중합체성 당류 (polymeric sugar), 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 모이어티를 통해 작동가능하게 연결된다. 일부 실시태양에서, PEG는 약 0.5 kDa 내지 약 100 kDa이다.

<40> 본 발명의 일부 실시태양에서, 본 발명의 폴리펩티드는 폴리펩티드를 통해 연결되는 제1 및 제2 단백질을 포함하고, 여기서 제1 또는 제2 단백질 또는 폴리펩티드 링커 (linker)는 혈액 또는 표적 조직 내의 프로테아제에 의해 절단가능한 프로테아제 부위를 갖는다. 상기 실시태양은 보다 우수한 전달 또는 치료 특성을 위해 또는 그러한 단백질을 따로 생산하는 것에 비해 보다 효율적인 생산을 위해 2개 이상의 치료 단백질을 방출하도록 사용될 수 있다.

<41> 일부 실시태양에서, 제1 및 제2 단백질은 중합체성 당류와 같은 생체적합성 중합체를 사용하여 연결된다. 그러한 중합체성 당류는 혈액 또는 표적 조직 내의 효소에 의해 절단가능한 효소 절단 부위를 포함할 수 있다. 상기 실시태양은 보다 우수한 전달 또는 치료 특성을 위해 또는 그러한 단백질을 따로 생산하는 것에 비해 보다 효율적인 생산을 위해 2개 이상의 치료 단백질을 방출하도록 사용될 수 있다.

<42> 본 발명의 다른 측면은 다기능성 단백질을 생성하기 위해 중합체를 통한, 본 발명의 단백질 치료제를 제조하기 위한 본 발명의 하나 이상의 단백질, 또는 본원에 기재된 다른 단백질의 작동가능한 연결이다. 예를 들어, 중합체는 폴리펩티드, 중합체성 당류, 탄소 기반 중합체 (예를 들어, 지방족 사슬) 또는 PEG일 수 있다. 본 발명의 추가의 측면은 PEG를 사용하여 본원에 기재된 바와 같이 IGF-IR에 결합하는 본 발명의 단백질을 다른 단백질, 예를 들어 Fab, 단일쇄 Ab, 도메인 항체, 낙타 항체 및 그들의 유도체 (특히 약 50 kDa 미만의 엔티티 (entity)), 항체 모이어티 (예를 들어, 약 50 kDa 미만의), 애드테인 (Adtein) (예를 들어, 본원에 기재된 하나 이상의 제약학적 또는 생화학적 특성을 가지면서 목적하는 특이성으로 표적에 결합하는 5 내지 40 kDa의 단백질, 특히 티로신 키나제 수용체에 관련된 것), 피브로넥틴 기반 스캐폴드 단백질 (예를 들어, Adnectin™), 또는 항체 대용제, 예를 들어 아비머, 미소체 (microbody), Trans-bodies™, Affibodies™, Affilins™, 또는 트리넥틴 (예를 들어, 테트라넥틴) 및 리포칼린 또는 안키린 (DARPin)과 같은 단백질의 다른 유도체에 연결시키는 것을 포함한다. 일부 실시태양에서, 제1 및 제2 연결된 단백질은 종합적으로 1 또는 0개의 디술피드 결합을 갖는다. 이는 세포 기반 시스템에서 단백질 생산을 개선하기 위해 바람직할 수 있다. 바람직하게는, 상기 제1 단백질은 실질적으로 IGF-IR에 대해 실질적으로 1가 결합을 갖는 단일 도메인이다. 이는 세포 기반 시스템에서 단백질 생산을 개선하기 위해 바람직할 수 있다. 바람직하게는, 상기 제1 단백질은 인간 IGF-IR에 약 100 pM 이하의 결합 친화도로 결합하고, 인간 IGF-IR에 대한 상기 제1 단백질의 결합에 참여하는 적어도 2개의 구조적 루프를 갖는다. 바람직하게는, 상기 제2 단백질은 적어도 하나의 펩티드 결합에 의해 상기 제1 단백질에 연결된 피브로넥틴 기반 스캐폴드 단백질이다. 일부 실시태양에서, 상기 제1 단백질 및 제2 단백질은 적어도 하나의 디술피드 결합에 의해 연결된다. 이는 세포 내에서 달성될 수 있지만, 상기 연결을 세포 없이 시험관 내에서 수행하는 것이 바람직할 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드는 인간 IGF-IR에 약 300 pM 이하의 결합 친화도로 결합하고, 인간 IGF-IR에 대한 제1 단백질의 결합에 참여하는 적어도 2개의 구조적 루프를 갖는 제1 단백질을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 제1 단백질은 인간 IGF-IR에 약 1 nM 이하의 결합 친화도로 결합하고, 인간 인슐린 수용체에 약 1 μM 이상의 결합 친화도로 결합한다. 바람직하게는, 본 발명의 폴리펩티드는 상기 제1 단백질 또는 상기 제2 단백질 중 하나에 작동가능하게 연결된 PEG 모이어티를 추가로 포함한다. 바람직하게는, 상기 제2 단백질은 인간 암에서 상향-조절된 인간 티로신 키나제 수용체에 결합하고, 여기서 상기 제2 단백질은 인간 티로신 키나제 수용체에 약 10 nM 이하의 결합 친화도로 결합하고, 인간 인슐린 수용체에 약 1 μM 이상의 결합 친화도로 결합한다.

<43> 일부 실시태양에서, 본 발명의 폴리펩티드는 종합적으로 적어도 6개의 디술피드 결합을 갖거나, 다른 측면에서 종합적으로 적어도 8개의 디술피드 결합을 갖는 제1 단백질 및 제2 단백질을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 제1 단백질 및 상기 제2 단백질은 미생물로부터 발현된 단일 폴리펩티드이다. 바람직하게는, 상기 제1 단백질은 인간 IGF-IR에 약 100 pM 이하의 결합 친화도로 결합하고, 인간 IGF-IR에 대한 상기 제1 단백질의 결합에 참여하는 적어도 2개의 구조적 루프를 갖는다. 일부 실시태양에서, 상기 제1 단백질 및 상기 제2 단백질 중 적어도 하나는 항체 모이어티이다. 바람직하게는, 상기 항체 모이어티는 약 50 kDa 미만이거나, 다른 측면에서 약 40 kDa 미만이다. 일부 실시태양에서, 항체 모이어티는 단일쇄 항체 모이어티이다. 단백질 치료제는 상기 제2 단백질이 EGFR, 엽산 수용체, Her2, Her3, c-kit, c-Met, FGFR1, FGFR2, PDGFR, VEGFR1, VEGFR2, VEGF3 및 Tie2; 및 리간드: Ang1, Ang2, FGF, EGF, HGF, 줄기 세포 인자 (SCF), VEGF-A, VEGF-C 및 VEGF-D의 인간 단백질 중 하나에 결합하는 실시태양을 포함한다. 일부 실시태양에서, 제1 단백질 및/또는 제2 단백질은 리포칼린의 유도체이다. 일부 실시태양에서, 상기 제1 단백질 및 상기 제2 단백질 중 적어도 하나는 테트라넥틴의 유도체이다. 일부 실시태양에서, 상기 제1 단백질 모이어티 및 상기 제2 단백질 모이어티 중 적어도 하나는 아비머의 유도체이다.

<44> PEG는 본 발명의 많은 측면에서 사용될 수 있고, 상이한 크기가 목적하는 치료 또는 다른 생체내 효과, 예를 들어 영상화를 위해 본원에 기재된 바와 같이 사용될 수 있다. 신체, 혈액, 비-혈액 세포외 유체 또는 조직 내에서 반감기를 증가시키기 위해 보다 큰 PEG가 바람직하다. 생체내 세포성 활성을 위해, 약 10 내지 60 kDa 범위의 PEG가 바람직하고, 또한 약 100 kDa 미만 및 보다 바람직하게는 약 60 kDa 미만 내지 약 100 kDa보다 큰 크기의 PEG가 또한 사용될 수 있다. 생체내 영상화 용도를 위해, 보다 빠른 분포 및 짧은 반감기를 허용하도록 보다 큰 PEG만큼 반감기를 증가시키지 않는, 일반적으로 약 20 kDa 미만의 보다 작은 PEG가 사용될 수 있다.

<45> 일부 실시태양에서, 본 발명의 폴리펩티드는 단일 Cys 또는 Lys를 통해 PEG에 작동가능하게 연결된 제1 단백질 및 제2 단백질을 포함한다. 일부 실시태양에서, 적어도 제1 또는 제2 단백질은 단지 단일 Cys 또는 Lys만을 갖는다. 일부 실시태양에서, 단일 Cys 또는 Lys는 상기 제1 또는 제2 단백질 내에 아미노산 서열 내에서 비-야생형 위치에 위치한다.

<46> 일부 실시태양에서, 본 발명의 폴리펩티드는 제1 및 제2 단백질을 포함하고, 여기서 상기 제1 단백질은 세포 증식을 억제하고, Tm이 적어도 55℃이고, 인간 IGF-IR에 대한 결합을 실질적으로 저해하지 않는 그의 아미노산 서열의 구역에서 비-야생형 Cys 또는 Lys를 갖는다. 일부 실시태양에서, 제1 단백질 및 제2 단백질은 미생물로부터 발현된 단일 폴리펩티드이다. 일부 실시태양에서, 제1 단백질은 인간 IGF-IR에 약 50 pM 이하의 결합 친화도로 결합하고, 인간 IGF-IR에 대한 상기 제1 단백질의 결합에 참여하는 적어도 2개의 구조적 루프를 갖는다. 일부 실시태양에서, 본 발명의 폴리펩티드는 IV 투여에서 생체내 반감기가 적어도 1일이다. 일부 실시태양에서, 본 발명의 폴리펩티드는 투여 후 설치류에서 24시간 이상 동안 인간 IGF-IR에 대한 상기 제1 단백질의 결합 친화도의 적어도 약 10배의 농도에서 노출 수준을 갖는다. 일부 실시태양에서, 본 발명의 폴리펩티드는 피하 투여 후 설치류에서 24시간 이상 동안 인간 IGF-IR에 대한 상기 제1 단백질의 결합 친화도의 적어도 약 100배의 농도에서 노출 수준을 갖는다. 일부 실시태양에서, 제1 또는 제2 단백질은 피브로넥틴 기반 스캐폴드 단백질이다.

<47> IGF-IR, 다른 인간 단백질, 또는 PK 모이어티에 대한 본 발명의 폴리펩티드의 다양한 친화도는 진단, 치료, 시험관내 또는 생체내 용도에 따라 사용될 수 있다. 예를 들어, 해리 상수가 약 1 μM, 약 100 nM, 약 10 nM, 약 1 nM, 약 100 pM, 약 10 pM, 약 1 pM 또는 약 100 fM과 유사하거나 그 미만인 친화도는 특히 IGF-IR에 대해 바람직하다. 목적하는 표적에 대해 상이한 친화도를 갖는 본 발명의 단백질의 생체내 시험은 생체내 용도를 위해 목적하는 친화도를 선택하는 것에 도움이 된다. 다른 단백질 및 일정량의 IGF-IR의 존재에 의존적인 시험관내 시험에서는 일반적으로 생체내 용도에 비해 상이한 친화도의 본 발명의 단백질을 사용할 수 있다. 종종, 보다 적은 친화도 또는 보다 약한 결합이 시험관 내에서 사용될 수 있다.

<48> 일부 실시태양에서, 폴리펩티드는 a) 각각 인간 ^{10}Fn3 도메인 코딩 서열과 상이한 후보 10번째 피브로넥틴 타입 III (^{10}Fn3) 도메인 서열을 포함하는 후보 RNA 분자의 집단을 생산하고 (상기 RNA 분자는 각각 상기 후보 ^{10}Fn3 도메인 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 번역 개시 서열 및 출발 코돈을 포함하고, 각각 3' 단부에서 핵산-푸로마이신 링커에 작동가능하게 연결된다); b) 시험관 내에서 상기 후보 ^{10}Fn3 도메인 코딩 서열을 번역하여 후보 RNA-^{10}Fn3 융합체의 집단을 생산하고; c) 상기 후보 RNA-Fn3 융합체의 집단을 IGF-IR과 접촉시키고; d) 그의 단백질 부분이 IGF-IR에 대한 상기 인간 ^{10}Fn3의 결합 친화도 또는 특이성에 비해 변경된 IGF-IR에 대한 결합 친화

도 또는 특이성을 갖는 RNA-^{10}Fn3 융합체를 선택하는 단계를 포함하는 방법에 의해 선택된 ^{10}Fn3 도메인이다.

<49> 본 발명의 하나의 측면은 인간 표적에 결합하는 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질을 포함하는 폴리펩티드에 관한 것이다. 일부 실시태양에서, 폴리펩티드는 본원에 기재된 바와 같이 PK 모이어티를 추가로 포함한다. PK 모이어티는 본원에 기재된 것과 같은 임의의 적합한 링커에 의해 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질에 연결될 수 있다.

<50> 본 발명의 한 측면은 예를 들어, 혈청, 인슐린-유사 성장 인자-I 및 인슐린-유사 성장 인자-II와 같은 성장 자극제의 존재 하에 암 세포의 성장을 약 80% 초과로 억제할 수 있는 본 발명의 폴리펩티드를 제공한다.

<51> 본 발명의 추가의 측면은 본 발명의 폴리펩티드를 포함하는 제약상 허용되는 조성물을 제공하고, 여기서 조성물에는 본질적으로 내독소가 없다. 바람직하게는, 조성물에는 실질적으로 미생물 오염이 없어서 생체내 투여에 적합하다. 조성물은 예를 들어, IV, IP 또는 피하 투여를 위해 제형화될 수 있다.

<52> 본 발명의 추가의 측면은 하나 이상의 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포를 제공한다. 상기 단백질에 대한 폴리뉴클레오티드를 함유하는 벡터가 또한 포함된다. 서열은 바람직하게는 사용된 세포 종류에서 발현, 바람직하게는, 이. 콜라이 (*E. coli*)에서 발현을 최대화하도록 최적화된다. 본 발명의 단백질은 또한 예를 들어, 진핵 미생물, 예를 들어 효모 (예를 들어, 피치아 (*pichia*) 또는 세레비지아 (*cerevisea*)) 또는 남조류 (blue green algae)에서 발현될 수 있다. 효모 세포는 본원에 기재된 임의의 단백질 상에 목적하는 글리코실화를 생성하도록 공학처리될 수 있다. 본 발명의 세포는 포유동물 세포일 수 있다. 하나의 측면에서, 포유동물 세포는 본원에 기재된 임의의 단백질 상에 목적하는 글리코실화를 생성하도록 공학처리될 수 있다. 하나의 측면에서, 세포는 피브로넥틴 기반 스캐폴드 단백질을 발현한다. 하나의 측면에서, 피브로넥틴 기반 스캐폴드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 선택된 세포 종류에서 발현을 위해 최적화된 코돈이다.

<53> 본 발명의 한 측면은 본 발명의 신규한 폴리펩티드를 단독으로 또는 다른 세포독성제 또는 치료제와 조합으로 투여함으로써, 암에 걸린 대상의 치료를 위한 방법을 제공한다. 암은 예를 들어, 유방암, 대장암, 난소 암종, 뼈육종, 자궁경부암, 전립선암, 폐암, 윤활막 암종, 췌장암, 또는 비-종양발생 세포에 비해 생리학에서 IGF-IR 수준이 상승되거나, 상향-조절되거나, 변이되거나, 변경되는지 결정해야될 다른 암 중 하나 이상일 수 있다.

<54> 본 발명의 다른 측면은 본 발명의 폴리펩티드를 단독으로 또는 다른 세포독성제 또는 치료제와 조합으로 투여함으로써, 암에 걸린 대상의 치료를 위한 방법을 제공한다. 특히, 바람직한 세포독성제 및 치료제는 도세탁셀, 파클리탁셀, 독소루비신, 에피루비신, 시클로포스파미드, 트라스투주맙, 카페시타빈, 타목시펜, 토레미펜, 레트로졸, 아나스트로졸, 풀베스트란트, 엑세메스탄, 고세렐린, 옥살리플라틴, 카르보플라틴, 시스플라틴, 텍사메타손, 안타이드, 베바시주맙, 5-플루오로우라실, 류코보린, 레바미솔, 이리노테칸, 에토포시드, 토포테칸, 겜시타빈, 비노렐빈, 에스트라무스틴, 미톡산트론, 아바렐릭스, 졸레드로네이트, 스트렙토조신, 리툭시맙, 이다루비신, 부술판, 클로람부실, 플루다라빈, 이마티닙, 사이타라빈, 이브리투모맙, 토시투모맙, 인터페론 알파-2b, 멜팔람, 보르테조밉, 알트레타민, 아스파라기나제, 게피티닙, 에르롤니팁, 항-EGF 수용체 항체 (예를 들어, 세툭시맙 또는 판티투무맙), 익사베필론, 및 에포틸론 또는 그의 유도체를 포함한다. 보다 바람직하게는, 치료제는 백금제 (예를 들어 카르보플라틴, 옥살리플라틴, 시스플라틴), 탁산 (예를 들어 파클리탁셀, 도세탁셀), 겜시타빈, 또는 캄포테신이다.

<55> 또한, 본 발명의 폴리펩티드를 단일 분자로서 제2 치료 단백질과 또는 아마도 단일 분자로서 제3 치료 단백질과 조합하는 것이 바람직할 수 있다. 상기 치료 엔티티는 PEG 또는 다른 중합체 (예를 들어, Cys-Cys 디술피드 또는 폴리펩티드)에 의해 하나 이상의 치료 단백질에 연결된 본 발명의 단백질을 포함한다. 그러한 치료 단백질은 항체 유도체 (예를 들어, Fab, 낙타 항체 및 그들의 유도체, 도메인 항체 (예를 들어, 크기 약 50 kDa 미만의) 및 단일쇄 (바람직하게는 크기 약 50 kDa 미만의)), Adnectins™ 및 바람직하게는 ~5 내지 ~40 kDa의 단백질을 포함한다.

<56> 본 발명의 단백질의 표적은 특히 인간 버전 (하지만 일부 경우에 마우스, 래트, 원숭이 및 개와 같은 모델 종), 즉 IGF-IR, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, c-Kit, 인간 p185 수용체-유사 티로신 키나제 (HER2 또는 Her2), Her3, c-Met, 엽산 수용체, PDGFR, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, 인간 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) A, VEGF C, VEGF D, 인간 CD20, 인간 CD18, 인간 CD11a, 인간 세포자멸 수용체-2 (Apo-2), 인간 α4β7 인테그린, 인간 GPIIb-IIIa 인테그린, 줄기 세포 인자 (SCF), 인간 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 및 인간 CD3을 포함한다. 또한, 본 발명의 측면들은 제1 표적 및 적어도 하나의 다른 표적에 결합하는 다기능성 단백질을 포함한다. 바

람직하게는, 상기 단백질은 본원에 기재된 PEG에 의해 연결되지만, 많은 실시태양에서, 상기 단백질은 폴리펩티드 또는 다른 중합성 링커 또는 비-중합성 링커에 의해 연결될 수 있다.

<57> 본 발명의 안정하게 연결된 단백질은 암의 치료적 처치를 위해 유용할 수 있다. 본 발명의 다중특이적 단백질은 2, 3, 4 이상의 치료 표적 또는 에피토프에 대해 지정될 때 하나 초과의 치료 표적을 조정하거나, 차단하거나 억제하는 잇점을 갖는다.

<58> 임의의 종류의 종양 및 임의의 종류의 종양 항원이 치료제의 상응하는 생물학으로 표적화될 수 있는 것으로 예상된다. 암은 예를 들어, 유방암, 대장암, 난소 암종, 뼈육종, 자궁경부암, 전립선암, 폐암, 윤활막 암종, 췌장암, 흑색종, 다발 골수종, 신경모세포종, 및 횡문근육종, 또는 비-종양발생 세포에 비해 생리학에서 IGF-IR 수준이 상승되거나, 상향-조절되거나, 변이되거나, 변경되는지 결정해야될 다른 암 중 하나 이상일 수 있다.

<59> 표적화될 수 있는 다른 예시적인 종류의 종양은 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수 백혈병, 담낭암, 유방암, 자궁경부암, 만성 림프성 백혈병, 만성 골수 백혈병, 직결장암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 두경부암, 호지킨 (Hodgkin) 림프종, 폐암, 수질성 갑상선암, 비-호지킨 림프종, 다발 골수종, 신암, 난소암, 췌장암, 신경아교종, 흑색종, 간암, 전립선암, 및 방광암을 포함한다.

<60> 추가로, 본 발명의 폴리펩티드에 의해 종양-연관 표적이 표적화될 수 있다. 일부 실시태양에서, 항원 표적화는 조직 분포, 또는 조직 또는 목적하는 세포 종류에서 증가된 국소 농도의 영향이라는 측면에서 치료제를 국소화하는 것을 도울 것이다. 별법으로, 그에 대해 치료제가 제조되는 본원에 기재된 표적의 하나와 함께 암을 제거하는 추가의 작용 메카니즘을 제공할 수 있다. 상기 항원 또는 표적은 탄산 탈수효소 IX, A3, A33 항체에 대해 특이적인 항원, BrE3-항원, CD1, CD1a, CD3, CD5, CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD45, CD74, CD79a, CD80, HLA-DR, NCA 95, NCA90, HCG 및 그의 하위단위, CEA (CEACAM-5), CEACAM-6, CSAp, EGFR, EGP-1, EGP-2, Ep-CAM, Ba 733, HER2/neu, 저산소증 유도 인자 (HIF), KC4-항원, KS-1-항원, KS1-4, Le-Y, 대식세포 억제 인자 (MIF), MAGE, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, PAM-4-항원, PSA, PSMA, RS5, S100, TAG-72, p53, 테나신, IL-6, IL-8, 인슐린 성장 인자-I (IGF-I), 인슐린 성장 인자-II (IGF-II), Tn 항원, 톰슨-프리덴라이히 (Thomson-Friedenreich) 항원, 종양 괴사 항원, 태반 성장 인자 (PlGF), 17-1A-항원, 혈관신생 마커 (예를 들어, ED-B 피브로넥틴), 종양유전자 마커, 종양유전자 산물, 및 다른 종양-연관 항원을 포함하나 이로 제한되지 않는다. 종양 연관 항원에 대한 최근의 보고는 각각 본원에 참조로 포함시킨 문헌 ([Mizukami et al., 2005, Nature Med. 11:992-97]; [Hatfield et al., 2005, Curr. Cancer Drug Targets 5:229-48]; [Vallbohmer et al., 2005, J. Clin. Oncol. 23:3536-44]; 및 [Ren et al., 2005, Ann. Surg. 242:55-63])을 포함한다.

<61> 다른 실시태양에서, 항-혈관신생제가 치료제의 일부를 형성할 수 있고, 본 발명의 단백질에 작동가능하게 연결될 수 있다. 유용한 예시적인 항-혈관신생제는 안지오스타틴, 바큘로스타틴, 칸스타틴, 마스핀, 항-VEGF 항체 또는 펩티드, 항-태반 성장 인자 항체 또는 펩티드, 항-Flk-1 항체, 항-Fit-1 항체 또는 펩티드, 라미닌 펩티드, 피브로넥틴 펩티드, 플라스미노겐 활성인자 억제제, 조직 메탈로프로테이나제 억제제, 인터페론, 인터루킨 12, IP-10, Gro-β, 트롬보스폰딘, 2-메톡시에스트라디올, 프로리페린-관련 단백질, 카르복시아미도트리아졸, CM101, 마리마스타트, 펜토산 폴리술페이트, 안지오포이에틴 2, 인터페론-알파, 헤르비마이신 A, PNU145156E, 16K 프로락틴 단편, 리노마이드, 탈리도마이드, 펜톡시필린, 제니스테인, TNP-470, 엔도스타틴, 파클리탁셀, 아큐틴, 안지오스타틴, 시도포비르, 빈크리스틴, 블레오마이신, AGM-1470, 혈소판 인자 4 또는 미노사이클린을 포함한다.

<62> 본 발명의 다른 측면은 본원에 기재된 하나 이상의 요소, 및 상기 요소의 사용 지시서를 포함하는 키트 (kit)를 제공한다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 키트는 본 발명의 단백질을 단독으로 또는 제2 치료제와 함께 포함한다. 상기 바람직한 실시태양을 위한 지시서는 본 발명의 단백질을 단독으로 또는 제2 치료제와 함께 사용하여 암 세포의 성장을 억제하기 위한 지시서, 및/또는 그를 사용하여 암에 걸린 환자를 치료하는 방법에 대한 지시서를 포함한다.

<63> 본 발명의 다른 측면은 인간 IGF-IR에 특이적으로 결합하는 제1 단백질을 포함하는 단백질 기반 조성물을 제공하고; 여기서 상기 제1 단백질은 MW가 약 4 kDa 내지 약 40 kDa이고, 인간 IGFI 또는 IGF II에 약 30% 미만의 아미노산 동일성을 갖고, 실질적으로 미생물 오염이 없어서 생체내 투여에 적합하다. 일부 실시태양에서, 조성물은 PK 모이어티, 예를 들어 PEG 또는 인간 혈청 알부민에 결합하는 단백질을 추가로 포함한다. 일부 실시태양에서, 제1 단백질은 인간 IGF-IR에 대해 약 1 nM 이하의 해리 상수를 갖는다. 일부 실시태양에서, 조성물은 IGF-IR에 대한 IGF-I 또는 IGF-II의 결합을 차단한다.

<64> 본 발명의 다른 측면은 인간 IGF-IR에 약 10 nM 이하의 결합 친화도로 결합하고 인간 인슐린 수용체에 약 1 μM 이상의 결합 친화도로 결합하는 제1 단백질을 포함하는 단백질 기반 조성물을 제공하고; 여기서 상기 제1 단백질은 실질적으로 인간 IGF-IR에 관하여 실질적으로 1가 결합을 갖는 단일 도메인이고, 실질적으로 미생물 오염이 없어서 생체내 투여에 적합하다. 일부 실시태양에서, 조성물은 펩티드 결합에 의해 상기 제1 단백질에 연결된 제2 단백질을 추가로 포함하고, 여기서 상기 제2 단백질은 인간 IGF-IR에 약 10 nM 이하의 결합 친화도로 결합하고 인간 인슐린 수용체에 약 1 μM 이상의 결합 친화도로 결합한다. 일부 실시태양에서, 조성물은 적어도 하나의 펩티드 결합에 의해 상기 제1 단백질에 연결된 제2 단백질을 추가로 포함하고, 여기서 상기 제2 단백질은 인간 혈청 알부민에 약 300 nM 이하의 결합 친화도로 결합한다. 일부 실시태양에서, 조성물은 PEG에 의해 상기 제1 단백질에 연결된 제2 단백질을 추가로 포함하고, 여기서 상기 제2 단백질은 인간 IGF-IR에 약 10 nM 이하의 결합 친화도로 결합하고 인간 인슐린 수용체에 약 1 μM 이상의 결합 친화도로 결합한다. 일부 실시태양에서, 제1 또는 제2 단백질은 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질을 포함한다.

<65> 본 발명의 다른 측면은 인간 IGF-IR에 100 nM의 결합 친화도로 결합하는 제1 단백질 및 인간 단백질에 결합하는 제2 단백질에 연결된 제1 PEG를 포함하는 PEG 기반 조성물을 제공하고; 여기서 상기 PEG는 약 0.5 kDa 내지 약 100 kDa이고, 상기 조성물은 실질적으로 유리 PEG가 없고, 실질적으로 미생물 오염이 없어서 생체내 투여에 적합하다. 일부 실시태양에서, 제2 단백질은 적어도 하나의 인간 티로신 수용체 또는 적어도 하나의 인간 티로신 수용체 리간드에 약 1 nM 이하의 결합 친화도로 결합하고 인간 인슐린 수용체에 약 1 μM 이상의 결합 친화도로 결합한다. 일부 실시태양에서, 하나 또는 두 단백질은 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질이다.

<66> 본 발명의 다른 측면은 인간 단백질에 결합하는 제2 단백질에 작동가능하게 연결된 인간 IGF-IR에 결합하는 제1 단백질을 포함하는 단백질 기반 조성물을 제공하고; 여기서 상기 제1 단백질은 인간 IGF-IR에 약 10 nM 이하의 결합 친화도로 결합하고 인간 인슐린 수용체에 약 1 μM 이상의 결합 친화도로 결합하고, 실질적으로 미생물 오염이 없어서 생체내 투여에 적합하다. 일부 실시태양에서, 단백질 기반 조성물은 상기 제1 단백질 또는 상기 제2 단백질에 작동가능하게 연결된 PEG 모이어티를 추가로 포함한다. 일부 실시태양에서, 제2 단백질은 인간 암에서 상향-조절된 인간 티로신 키나제 수용체에 결합하고, 여기서 상기 제2 단백질은 인간 티로신 키나제 수용체에 약 10 nM 이하의 결합 친화도로 결합하고 인간 인슐린 수용체에 약 1 μM 이상의 결합 친화도로 결합한다.

<67> 본 발명의 다른 측면은 인간 치료 표적에 결합하는 제2 단백질 모이어티에 작동가능하게 연결된 인간 IGF-IR에 결합하는 제1 단백질 모이어티를 포함하는 단백질 치료제를 제공하고; 여기서 상기 제1 단백질은 인간 IGF-IR에 약 10 nM 이하의 결합 친화도로 결합하고 인간 인슐린 수용체에 약 1 μM 이상의 결합 친화도로 결합하고, 실질적으로 미생물 오염이 없어서 생체내 투여에 적합하고; 추가로 여기서 상기 제2 단백질은 인간 치료 표적에 약 10 nM 이하의 결합 친화도로 결합하고 인간 인슐린 수용체에 약 1 μM 이상의 결합 친화도로 결합하고, 실질적으로 미생물 오염이 없어서 생체내 투여에 적합하다. 일부 실시태양에서, 제1 단백질 및 제2 단백질은 미생물로부터 발현된 단일 폴리펩티드이다.

<68> 본 발명의 다른 측면은 인간 치료 표적에 결합하는 제2 단백질 모이어티에 작동가능하게 연결된 PEG에 작동가능하게 연결된 인간 IGF-IR에 결합하는 제1 단백질 모이어티를 포함하는 단백질 치료제를 제공하고; 여기서 상기 제1 단백질 모이어티는 인간 IGF-IR에 약 10 nM 이하의 결합 친화도로 결합하고 인간 인슐린 수용체에 약 1 μM 이상의 결합 친화도로 결합하고, 실질적으로 미생물 오염이 없어서 생체내 투여에 적합하고; 추가로 여기서 상기 제2 단백질 모이어티는 인간 치료 표적에 약 10 nM 이하의 결합 친화도로 결합하고 인간 인슐린 수용체에 약 1 μM 이상의 결합 친화도로 결합하고, 실질적으로 미생물 오염이 없어서 생체내 투여에 적합하다. 일부 실시태양에서, 제1 단백질 모이어티 및 제2 단백질 모이어티는 종합적으로 적어도 6개의 디술피드 결합을 갖는다.

<69> 본 발명의 다른 측면은 인간 치료 표적에 결합하는 제2 단백질 모이어티에 작동가능하게 연결된 PEG에 작동가능하게 연결된 인간 IGF-IR에 결합하는 제1 단백질 모이어티를 포함하는 단백질 치료제를 제공하고; 여기서 상기 제1 단백질 모이어티는 인간 IGF-IR에 약 10 nM 이하의 결합 친화도로 결합하고 인간 인슐린 수용체에 약 1 μM 이상의 결합 친화도로 결합하고 인간 IGF-IR에 관한 결합은 실질적으로 1가이고, 실질적으로 미생물 오염이 없어서 생체내 투여에 적합하고; 추가로 여기서 상기 제2 단백질 모이어티는 인간 치료 표적에 약 10 nM 이하의 결합 친화도로 결합하고 인간 인슐린 수용체에 약 1 μM 이상의 결합 친화도로 결합하고, 인간 IGF-IR에 관한 결합은 실질적으로 1가이고, 실질적으로 미생물 오염이 없어서 생체내 투여에 적합하다.

<70> 본 발명의 다른 측면은 인간 치료 표적에 결합하는 제2 단백질 모이어티에 작동가능하게 연결된 생체적합성 중합체에 작동가능하게 연결된 인간 IGF-IR에 결합하는 제1 단백질 모이어티를 포함하는 단백질 치료제를 제공하

고; 여기서 상기 제1 단백질 모이어티는 인간 IGF-IR에 약 10 nM 이하의 결합 친화도로 결합하고 인간 인슐린 수용체에 약 1 μM 이상의 결합 친화도로 결합하고, 실질적으로 미생물 오염이 없어서 생체내 투여에 적합하고; 추가로 여기서 상기 제2 단백질 모이어티는 인간 치료 표적에 약 10 nM 이하의 결합 친화도로 결합하고 인간 인슐린 수용체에 약 1 μM 이상의 결합 친화도로 결합하고, 실질적으로 미생물 오염이 없어서 생체내 투여에 적합하고; 추가로 여기서 상기 제1 단백질 모이어티 및 제2 단백질 모이어티는 비-치료 효과를 최소화하고 하나 초과의 치료 표적에 결합하는 치료 이익을 최대화하도록 최적화된 그들의 각각의 표적에 대한 친화도를 갖는다. 일부 실시태양에서, 폴리펩티드는 혈액 또는 표적 조직 내의 프로테아제에 의해 절단가능한 프로테아제 부위를 갖는다.

<71> 본 발명의 다른 측면은 인간 단백질에 결합하는 제2 단백질에 작동가능하게 연결된 PEG에 작동가능하게 연결된 인간 IGF-IR에 결합하는 제1 단백질을 포함하는 단백질 치료제를 제공하고; 여기서 상기 제1 단백질은 인간 IGF-IR에 약 10 nM 이하의 결합 친화도로 결합하고 인간 인슐린 수용체에 약 1 μM 이상의 결합 친화도로 결합하고, 인간 IGF-IR의 길항제이고, 실질적으로 미생물 오염이 없어서 생체내 투여에 적합하고; 추가로 여기서 상기 제2 단백질은 인간 치료 표적에 약 10 nM 이하의 결합 친화도로 결합하고 인간 인슐린 수용체에 약 1 μM 이상의 결합 친화도로 결합하고, 실질적으로 미생물 오염이 없어서 생체내 투여에 적합하다. 일부 실시태양에서, 제1 단백질은 세포 증식을 억제하고, Tm이 적어도 55℃이고, 인간 IGF-IR에 대한 결합을 실질적으로 저해하지 않는 그의 아미노산 서열의 구역 내에 비-야생형 cys 또는 lys를 갖는다. 일부 실시태양에서, 단백질 치료제는 IV 투여에서 생체내 반감기가 적어도 1일이다. 일부 실시태양에서, 단백질 치료제는 투여 후 설치류에서 24시간 이상 동안 인간 IGF-IR에 대한 상기 제1 단백질의 결합 친화도의 적어도 약 10배의 농도에서 노출 수준을 갖는다. 일부 실시태양에서, 제1 및/또는 제2 단백질은 피브로넥틴 기반 스캐폴드이다.

<72> 본 발명의 다른 측면은 본원에 기재된 하나 이상의 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포를 제공한다. 일부 실시태양에서, 세포는 본원에 기재된 임의의 단백질 상에 목적하는 글리코실화를 생성하도록 공학처리된 효모이다. 일부 실시태양에서, 세포는 남조류이다. 일부 실시태양에서, 세포는 본원에 기재된 임의의 단백질 상에 목적하는 글리코실화를 생성하도록 공학처리된 포유동물 세포이다. 일부 실시태양에서, 단백질은 피브로넥틴 기반 스캐폴드이고, 임의로 세포 내에서 발현을 위해 최적화된 폴리뉴클레오티드 코돈을 갖는다.

발명의 상세한 설명

<103> **정의**

<104> 본원에 기재된 방법은 적어도 2개의 관련 군의 단백질 구조, 즉 면역글로불린 폴드를 갖는 단백질 및 면역글로불린-유사 폴드를 갖는 단백질로부터 유래된 단일 도메인 IGF-IR 결합 폴리펩티드를 포함하나 이로 제한되지 않는 본 발명의 단백질을 개발하기 위해 성공적으로 사용되었다.

<105> "폴리펩티드"는 길이, 번역후 변형, 또는 기능에 무관하게 2개 이상의 아미노산의 임의의 서열을 의미한다. "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 폴리펩티드는 본원에 참조로 포함된 미국 특허 6,559,126에 기재된 것과 같은 천연 아미노산 및 비-천연 아미노산을 포함할 수 있다. 폴리펩티드는 또한 임의의 다양한 표준 화학 방식으로 변형될 수 있다 (예를 들어, 아미노산은 보호기로 변형될 수 있거나; 카르복시-말단 아미노산은 말단 아미드기로 만들어질 수 있거나; 아미노-말단 잔기는 예를 들어, 친지성을 향상시키기 위한 기로 변형될 수 있거나; 폴리펩티드는 안정성 또는 생체내 반감기를 증가시키기 위해 화학적으로 글리코실화되거나 달리 변형될 수 있다). 폴리펩티드 변형은 폴리펩티드에 대한 다른 구조, 예를 들어 환식 화합물 또는 다른 분자의 부착을 포함할 수 있고, 또한 변경된 형상 (즉, R 또는 S; 또는 L 또는 D)의 하나 이상의 아미노산을 함유하는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 용어 "단일 도메인 폴리펩티드"는 예를 들어, 항체 및 단일쇄 항체로부터 분화될 때 폴리펩티드의 표적 결합 활성 (예를 들어, IGF-IR 결합 활성)이 단일 구조 도메인 내에 놓이는 것을 나타내도록 사용되고, 여기서 항원 결합 활성에는 일반적으로 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인 모두가 기여한다. 본원에 개시된 분류의 복수의 단일 도메인 폴리펩티드는 연결되어 증가된 결합력 (avidity)을 갖는 복합 분자를 생성할 수 있음이 고려된다. 마찬가지로, 단일 도메인 폴리펩티드는 임의의 많은 다른 폴리펩티드, 예를 들어 형광 폴리펩티드, 표적화 폴리펩티드 및 구분되는 치료 효과를 갖는 폴리펩티드에 부착될 수 있다 (예를 들어, 융합 단백질으로서).

<106> 용어 "PK"는 "약동학"에 대한 두문자약어 (acronym)이고, 예로서 대상에 의한 흡수, 분포, 대사 및 제거를 포함한 화합물의 특성을 포함한다. "PK 조정 단백질" 또는 "PK 모이어티"는 생물학적 활성 분자에 융합되거나 함께 투여될 때 생물학적 활성 분자의 약동학적 특성에 영향을 미치는 임의의 단백질, 펩티드 또는 모이어티를 나타낸다. PK 조정 단백질 또는 PK 모이어티의 예는 PEG, 인간 혈청 알부민 (HSA) 결합물질 (미국 특허 공개

20050287153 및 20070003549에 개시된 바와 같이), 인간 혈청 알부민, Fc 또는 Fc 단편, 및 당 (예를 들어, 시알산)을 포함한다.

<107> 면역글로불린 또는 면역글로불린-유사 스캐폴드의 단일 도메인 폴리펩티드는 특정 구조적 특징을 공유하는 경향이 있을 것이다. 예를 들어, 폴리펩티드는 약 80 내지 약 150개의 아미노산을 포함할 수 있고, 상기 아미노산은 베타 시트를 형성하는 베타 또는 베타-유사 스트랜드의 세트로 구조적으로 조직화되고, 여기서 베타 또는 베타-유사 스트랜드는 개재하는 루프 부분에 의해 연결된다. 중쇄 가변 도메인 및 ^{10}Fn3 도메인에 대한 구조 조직의 예를 도 24에 도시한다. 베타 시트는 베타 또는 베타-유사 스트랜드를 연결시키는 루프로 이루어진 2개의 "정면 (face)"을 생성하면서 단일 도메인 폴리펩티드의 안정한 코어 (core)를 형성한다. 본원에 설명 바와 같이, 이들 루프는 맞춤화된 (customized) 리간드 결합 부위를 생성하도록 변이될 수 있고, 적절한 제어 하에 상기 변이는 단백질의 전체 안정성을 파괴하지 않으면서 생성될 수 있다. 항체에서, 이들 루프 중 3개는 잘 공지된 상보성 결정 구역 (또는 "CDR")이다.

<108> 단일 도메인 폴리펩티드의 형성을 위한 스캐폴드는 생리학적 조건에서 고도로 가용성이고 안정할 것이다. 면역글로불린 스캐폴드의 예는 단일 도메인 V_H 또는 V_L 스캐폴드, 및 단일 도메인 카멜리드 (camelid) V_{HH} 도메인 (낙타에서 발견된 가변 중쇄 도메인의 형태) 또는 자연에서 발견되거나 실험실에서 공학처리된 다른 면역글로불린 가변 도메인이다. 본원에 개시된 단일 도메인 포맷에서, 면역글로불린 폴리펩티드는 결합 활성을 달성하기 위해 제2 폴리펩티드와 이량체를 형성할 필요가 없다. 따라서, 제2 단백질에 대한 디술피드 가교결합을 매개하는 시스테인을 자연적으로 함유하는 임의의 상기 폴리펩티드는 시스테인을 제거하도록 변경될 수 있다. 별법으로, 시스테인은 단일 도메인 폴리펩티드에 PEG와 같은 추가의 모이어티를 컨쥬게이팅하는데 사용하기 위해 보유될 수 있다.

<109> 다른 스캐폴드는 비-항체 스캐폴드 단백질일 수 있다. "비-항체 스캐폴드 단백질 또는 도메인"은 면역글로불린-유사 폴드를 갖는 비-항체 폴리펩티드를 의미한다. "면역글로불린-유사 폴드"는 역평행 베타-시트의 2개의 층을 포함하고 2개의 베타-시트의 평평한 소수성 정면이 서로에 대해 충전되는 약 80-150개 아미노산 잔기의 단백질 도메인을 의미한다. 상기 스캐폴드의 한 예는 "피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질"이고, 이는 피브로넥틴 타입 III 도메인 (Fn3)에 기반한 폴리펩티드를 의미한다. 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질의 예는 Adnectins™ (애드넥서스 테라퓨틱스, 인크. (Adnexus Therapeutics, Inc.))이다. 피브로넥틴은 세포외 매트릭스의 형성 및 세포-세포 상호작용에서 필수적인 역할을 하는 큰 단백질이고; 3가지 타입 (타입 I, II, 및 III)의 작은 도메인의 많은 반복체로 이루어진다 (Baron et al., 1991). Fn3 자체는 세포 부착 분자, 세포 표면 호르몬 및 사이토킨 수용체, 샤퍼로닝 (chaperoning), 및 탄수화물-결합 도메인의 일부를 포함하는 큰 하위패밀리의 패러다임이다. 검토를 위해서는 문헌 ([Bork & Doolittle, Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Oct 1;89(19):8990-4]; [Bork et al., J Mol Biol. 1994 Sep 30;242(4):309-20]; [Campbell & Spitzfaden, Structure. 1994 May 15;2(5):333-7]; [Harpez & Chothia, J Mol Biol. 1994 May 13;238(4):528-39])을 참조한다.

<110> 바람직하게는, 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질은 "10Fn3" 스캐폴드이고, 이는 인간 피브로넥틴 타입 III 단백질의 10번째 모듈에 기반한 폴리펩티드 변이체를 의미하고, 여기서 용매 접근가능 루프 중 하나 이상, 특히 BC 루프 (아미노산 23-30), DE 루프 (아미노산 52-56) 및 FG 루프 (아미노산 77-87)로서 확인된 3개의 루프 중 하나 이상은 랜덤화되거나 돌연변이된다 (넘버링 (numbering) 방식은 인간 피브로넥틴 타입 III 도메인의 야생형 10번째 모듈 상의 서열, 즉 VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITGYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (서열 1)에 기초한다. 바람직하게는, 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질은 서열 1에 기초한다.

<111> 다양한 돌연변이체 10Fn3 스캐폴드가 보고되었다. 하나의 측면에서, 하나 이상의 Asp 7, Glu 9, 및 Asp 23은 예를 들어, 음전하를 띄지 않은 아미노산 잔기 (예를 들어, Asn, Lys 등)와 같은 다른 아미노산에 의해 교체된다. 이들 돌연변이는 야생형 형태에 비해 중성 pH에서 돌연변이체 10Fn3의 보다 큰 안정성을 촉진하는 효과를 갖는 것으로 보고되었다 (PCT 공개 WO02/04523 참조). 유익하거나 특성이 없는 10Fn3 스캐폴드에서 다양한 추가의 변경이 개시되었다 (예를 들어, 문헌 [Batori et al., Protein Eng. 2002 Dec;15(12):1015-20]; [Koide et al., Biochemistry 2001 Aug 28;40(34):10326-33] 참조).

<112> 변이체 및 야생형 ^{10}Fn3 단백질은 모두 동일한 구조, 즉, A 내지 G로 지정된 7개의 베타-스트랜드 도메인 서열, 및 7개의 베타-스트랜드 도메인 서열을 연결하는 6개의 루프 구역 (AB 루프, BC 루프, CD 루프, DE 루프, EF 루프, 및 FG 루프)을 특징으로 한다. N- 및 C-말단에 가장 가까이 위치하는 베타 스트랜드는 용액 내에서 베타-

유사 입체형태를 취할 수 있다. 서열 1에서, AB 루프는 잔기 15-16에 대응하고, BC 루프는 잔기 22-30에 대응하고, CD 루프는 잔기 39-45에 대응하고, DE 루프는 잔기 51-55에 대응하고, EF 루프는 잔기 60-66에 대응하고, FG 루프는 잔기 76-87에 대응한다. 도 24에 나타낸 바와 같이, BC 루프, DE 루프, 및 FG 루프는 모두 폴리펩티드의 동일한 단부에 위치한다. 이와 유사하게, 면역글로불린 스캐폴드는 적어도 7개의 베타 또는 베타-유사 스트랜드, 및 종종 9개의 베타 또는 베타-유사 스트랜드를 갖는 경향이 있다. 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질은 ^{10}Fn3 타입 도메인에 유사한 유용할 활성 및 특성을 나타내는 한 다른 Fn3 타입 피브로넥틴 도메인을 포함할 수 있다.

<113> 본원에 개시된 단일 도메인 폴리펩티드는 적어도 2개의 베타 시트 사이에 분포된 적어도 5 내지 7개의 베타 또는 베타-유사 스트랜드, 및 2개의 베타 또는 베타-유사 스트랜드를 연결하는 적어도 하나의 루프 부분을 가질 수 있고, 상기 루프 부분은 IGF-IR에 대한 결합에 참여하고, 상기 결합은 $1x10^{-6}$M 미만, 바람직하게는 $1x10^{-8}$M 미만의 해리 상수를 특징으로 한다. 본원에 설명된 바와 같이, 해리 상수가 $5x10^{-9}$M 미만인 폴리펩티드가 리간드 신호전달을 억제하기 위해 생체내 치료 용도에 특히 바람직하다. 해리 상수가 $1x10^{-6}$M 내지 $5x10^{-9}$M인 폴리펩티드는 생체 외에서 또는 생체 내에서 IGF-IR 단백질을 검출 또는 표지하는데 사용하기 위해 바람직할 수 있다.

<114> 임의로, "IGF-IR 결합 단백질"은 동일한 종으로부터의 다른 관련 단백질에 비해 IGF-IR에 특이적으로 결합할 것이다. "특이적으로 결합하는"은 표적 단백질 (예를 들어, IGF-IR)을 인식하고 상호작용하지만, 샘플, 예를 들어, 생물학적 샘플 내의 다른 분자를 실질적으로 인식하고 상호작용하지 않는 폴리펩티드를 의미한다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 폴리펩티드는 IGF-IR에 적어도 500 nM의 K_D만큼 강하게 특이적으로 결합할 것이다. 바람직하게는, 폴리펩티드는 IGF-IR에 1 pM 내지 500 nM, 보다 바람직하게는 1 pM 내지 100 nM, 보다 바람직하게는 1 pM 내지 10 nM, 가장 바람직하게는 1 pM 내지 1 nM 이하의 K_D로 특이적으로 결합할 것이다.

<115> "기능적 Fc 구역"은 천연 서열 Fc 구역의 적어도 하나의 "효과기 기능"을 갖는다. 예시적인 "효과기 기능"은 C1q 결합; 보체 의존 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존 세포-매개 세포독성 (ADCC); 포식작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등을 포함한다. 그러한 효과기 기능은 일반적으로 Fc 구역이 결합 도메인 (예를 들어, 항체 가변 도메인)과 조합될 것을 요구하고, 그러한 항체 효과기 기능을 평가하기 위해 당업계에 공지된 다양한 분석을 이용하여 평가할 수 있다.

<116> "천연 서열 Fc 구역"은 자연에서 발견되는 Fc 구역의 아미노산 서열에 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 도 3은 천연 서열 인간 및 쥐 IgG Fc 구역의 아미노산 서열을 제공한다.

<117> "변이체 Fc 구역"은 적어도 하나의 아미노산 변형에 의해 천연 서열 Fc 구역과 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 변이체 Fc 구역은 천연 서열 Fc 구역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 구역에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환, 예를 들어, 천연 서열 Fc 구역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 구역에서 약 1 내지 약 10개의 아미노산 치환, 바람직하게는 약 1 내지 약 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 본원에서, 변이체 Fc 구역은 바람직하게는 천연 서열 Fc 구역 및/또는 모 폴리펩티드의 Fc 구역과 적어도 약 80% 서열 동일성, 가장 바람직하게는 적어도 약 90% 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 약 95% 서열 동일성을 가질 것이다.

<118> "항체-의존 세포-매개 세포독성" 및 "ADCC"는 Fc 수용체 (FcR)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포 (예를 들어, 천연 킬러 (NK) 세포, 중성구, 및 대식세포)가 표적 세포 상의 결합된 항체를 인식하고, 후속적으로 표적 세포를 용해시키는 세포-매개 반응을 나타낸다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 FcγRIII 만을 발현하는 반면, 단핵구는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII을 발현한다. 조혈 세포 상의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)]의 페이지 464의 표 3에 요약되어 있다. 관심있는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 미국 특허 5,500,362 또는 5,821,337에 설명된 것과 같은 시험관내 ADCC 분석을 수행할 수 있다. 상기 분석을 위한 유용한 효과기 세포는 말초 혈액 단핵구 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 별법으로 또는 추가로, 관심있는 분자의 ADCC 활성은 생체 내에서, 예를 들어, 문헌 [Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다.

<119> "퍼센트 (%) 아미노산 서열 동일성"은 본원에서 임의의 보존적 치환을 서열 동일성의 일부로서 고려하지 않고, 최대 % 서열 동일성을 달성하기 위해 필요한 경우에 서열을 정렬시키고 갭 (gap)을 도입한 후 선택된 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율으로서 정의된다. % 아미노산 서열 동일성을 결정하는 목적에서 정렬은 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어와

같은 공공으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 당업계의 기술 범위 내에 있는 다양한 방식으로 달성할 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하기 위해 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적에서, % 아미노산 서열 동일성 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 아래 설명된 바와 같이 얻는다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크, 인크.(Genentech, Inc., 미국 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코)에 의해 창안되었고, 미국 저작권청 (U.S. Copyright Office, 미국 20559 워싱턴 디.씨.)에 사용자 문서로 출원되었고, 여기서 미국 저작권 등록 번호 TXU510087 하에 등록되었고, 제넨테크, 인크로부터 공공으로 이용가능하다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 운영 시스템, 바람직하게는 디지탈 UNIX V4.0D 상에서 사용하기 위해 컴파일링(compiling)되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되고 변화되지 않는다.

<120> 본원의 목적에서, 주어진 아미노산 서열 B에 대한, 서열 B와의, 또는 서열 B에 대조한 주어진 아미노산 서열 A의 % 아미노산 서열 동일성 (이는 별법으로 주어진 아미노산 서열 B에 대한, 서열 B와의, 또는 서열 B에 대조한 특정 % 아미노산 서열 동일성을 갖거나 포함하는 주어진 아미노산 서열 A로서 표현될 수 있다)은 다음과 같이 계산된다: 100 × X/Y (여기서, X는 프로그램에서 A 및 B의 정렬에서 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의해 동일한 일치로서 스코어링된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B 내의 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우에는, B에 대한 A의 % 아미노산 서열 동일성은 A에 대한 B의 % 아미노산 서열 동일성과 동일하지 않을 것임이 이해될 것이다.

<121> "폴리펩티드 사슬"은 그의 각각의 도메인이 비-공유 상호작용 또는 디술피드 결합과는 반대로 펩티드 결합(들)에 의해 다른 도메인(들)에 연결되는 폴리펩티드이다.

<122> "단리된" 폴리펩티드는 그의 천연 환경의 성분으로부터 확인되고 분리되고/되거나 회수된 것이다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 폴리펩티드에 대한 진단 또는 치료 용도를 저해할 물질이고, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 폴리펩티드는 (1) 로리 (Lowry) 법에 의해 결정할 때 95 중량% 초과의 폴리펩티드, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과로, (2) 회전 컵 (spinning cup) 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개 잔기를 얻기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마지 블루 (Coomassie blue), 또는 바람직하게는 은 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의한 균질성 (homogeneity)으로 정제될 것이다. 단리된 폴리펩티드는 재조합 세포 내의 계내 폴리펩티드를 포함하고, 이는 폴리펩티드의 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로 단리된 폴리펩티드는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

<123> 표적은 또한 상기 표적의 단편일 수 있다. 따라서, 표적은 또한 면역 반응을 일으킬 수 있는 상기 표적의 단편이다. 표적은 또한 전장 표적에 대해 생성된 단일 도메인 항체에 결합할 수 있는 상기 표적의 단편이다.

<124> 단편은 본원에서 사용될 때 100% 미만의 서열 (예를 들어, 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 등)이지만, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25개 이상의 아미노산을 포함하는 서열을 나타낸다. 단편은 관심있는 상호작용이 $1x10^{-6}$M 이상의 친화도로 유지되도록 충분한 길이이다.

<125> 단편은 본원에서 사용될 때 또한 야생형 표적에 대해 생성된 단일 도메인 항체에 결합하는 표적의 능력을 실질적으로 변경시키지 않는 하나 이상의 아미노산의 선택적인 삽입, 결실 및 치환을 나타낸다. 아미노산 삽입, 결실 또는 치환의 수는 바람직하게는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 또는 70개 이하의 아미노산이다.

<126> "세포 사멸을 유도하는" 본 발명의 단백질은 생육가능한 세포를 생육불가능하게 하는 것이다. 세포는 일반적으로 단백질이 결합하는 항원을 발현하는 것이고, 특히 세포는 항원을 과다발현한다. 바람직하게는, 세포는 암세포, 예를 들어, 유방, 난소, 위, 자궁내막, 침샘, 폐, 신장, 대장, 갑상선, 췌장 또는 방광 세포이다. 시험관 내에서, 세포는 예를 들어, SKBR3, BT474, Calu 3, MDA-MB453, MDA-MB-361 또는 SKOV3 세포일 수 있다. 시험관내 세포 사멸은 항체 의존 세포-매개 세포독성 (ADCC) 또는 보체 의존 세포독성 (CDC)에 의해 유도된 세포 사멸을 구분하기 위해 보체 및 면역 효과기 세포의 부재 하에 결정할 수 있다. 따라서, 세포 사멸을 위한 분석은 열 불활성화된 혈청을 사용하여 (즉, 보체의 부재 하에) 및 면역 효과기 세포의 부재 하에 수행할 수 있다. 본 발명의 단백질이 세포 사멸을 유도할 수 있는지 결정하기 위해, 프로피듐 요오다이드 (PI), 트리판 블루 (Moore et al. Cytotechnology 17:1-11 (1995)) 또는 7AAD의 섭취에 의해 평가되는 막 완전성 (integrity)의

손실을 비처리된 세포에 비교하여 평가할 수 있다.

<127> "세포자멸을 유도하는" 본 발명의 단백질은 세포자멸 관련 분자 또는 사건, 예를 들어 아넥신 V의 결합, DNA의 단편, 세포 수축, 세포질 세망의 확장, 세포 단편화, 및/또는 막 소포 (세포자멸체로 불림)의 형성에 의해 결정할 때 프로그래밍된 (programmed) 세포 사멸을 유도하는 것이다. 세포는 단백질이 결합하는 항원을 발현하는 것이고, 항원을 과다발현하는 것일 수 있다. 세포는 종양 세포, 예를 들어 유방, 난소, 위, 자궁내막, 침샘, 폐, 신장, 대장, 갑상선, 췌장 또는 방광 세포일 수 있다. 시험관 내에서, 세포는 예를 들어, SKBR3, BT474, Calu 3 세포, MDA-MB453, MDA-MB-361 또는 SKOV3 세포일 수 있다. 세포자멸과 연관된 세포성 사건을 평가하기 위한 다양한 방법이 이용가능하다. 예를 들어, 포스파티딜 세린 (PS) 전위는 아넥신 결합에 의해 측정할 수 있고; DNA 단편화는 본원의 실시예에 개시된 바와 같이 DNA 래더링 (laddering)을 통해 평가할 수 있고; DNA 단편화에 따른 핵/염색질 응축을 저이배수체 (hypodiploid) 세포의 임의의 증가에 의해 평가할 수 있다. 바람직하게는, 세포자멸을 유도하는 단백질은 본 발명의 단백질이 결합하는 항원을 발현하는 세포를 사용한 아넥신 결합 분석에서 비처리된 세포에 비해 아넥신 결합을 약 2 내지 50배, 바람직하게는 약 5 내지 50배, 가장 바람직하게는 약 10 내지 50배 유도하는 것이다.

<128> 용어 "치료 유효량"은 포유동물에서 질병 또는 질환을 치료하기 위해 효과적인 약물의 양을 나타낸다. 암의 경우에, 치료 유효량의 약물은 암 세포의 수를 감소시키고/시키거나; 종양 크기를 감소시키고/시키거나; 말초 장기로의 암 세포 침윤을 억제하고/하거나 (즉, 어느 정도 느리게 하고 바람직하게는 중지시키고); 종양 전이를 억제하고/하거나 (즉, 어느 정도 느리게 하고 바람직하게는 중지시키고); 종양 성장을 어느 정도 억제하고/하거나; 질환과 연관된 하나 이상의 증상을 어느 정도 경감할 수 있다. 약물이 성장을 방지하고/하거나 기존의 암 세포를 죽일 수 있는 점에서, 세포증식억제 및/또는 세포독성일 수 있다. 암 요법을 위해, 생체내 효능을 예를 들어, 질병 진행까지의 시간 (TTP)를 평가하고/하거나 반응률 (RR)을 결정함으로써 측정할 수 있다.

<129> <개요>

<130> 본 발명자들은 1가 또는 다가 결합 방식 (예를 들어, 특정 표적 (IGF-IR 및 다른 티로신 키나제 수용체 포함)에 결합하는 하나 또는 하나 초과의 도메인); 특히 인슐린 수용체에 비해 IGF-IR에 선택적으로 결합하는 단백질에 관하여, 다른 수용체에 비해 목적하는 표적에 대한 높은 선택도; 약 100 nM 내지 약 10 pM 미만 (펨토몰 친화도 포함)의 범위를 포함한 조정가능한 친화도; 최소 또는 검출불가능한 효능제 활성을 가지면서 특이적인 길항제 활성; IGF-I 또는 IGF-II 결합 또는 활성화의 차단; 목적하는 표적에 대한 단일특이적 또는 다중-특이적 결합; 단일 또는 다수 에피토프 결합; 래트에서 연장된 혈청 반감기; 피하 (SC) 또는 정맥내 (IV) 투여; 작은 크기 (예를 들어 ~5 kDa 내지 ~40 kDa); 약 55℃ 초과 또는 약 60℃ 초과의 Tm; 및 실질적으로 단량체성 성질 (예를 들어 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)에서 단일 피크, 예를 들어 면적의 약 90%, 면적의 약 95% 또는 면적의 약 98%)을 포함하나 이로 제한되지 않는 유리한 특성을 갖는, IGF-IR에 결합하는 본 발명의 신규한 단백질을 발명하기에 이르렀다.

<131> **수조개의 단백질에 의한 신규한 단백질의 제조 및 표적화**

<132> 본 발명의 하나의 측면으로서, 추정 1-5조개의 상이한 단백질 변이체를, 상기 단백질에 상응하고 상기 단백질을 코딩하는 1-5조개의 RNA 및 DNA 변이체와 함께 제조하였다. 제조된 단백질을 인간 IGF-IR에 대한 결합에 대해 시험하고, 일부 경우에 추가로 발현하고 정제시키고 적합한 유용한 단백질, 특히 치료제를 확인하는 것을 돕도록 다양한 생물학적, 생화학적 및 생물물리학적 분석 및 측정을 수행하였다.

<133> 또한, 5000개 초과의 단백질 변이체를 본 발명의 벡터 및 폴리뉴클레오티드의 예를 사용하여 이. 콜라이 내에서 발현시키고, 발현 수준 및 다양한 생물학적, 생화학적 및 생물물리학적 분석에 대해 시험하였다. 상이한 이들 측정의 결과에 따라, 선택된 단백질을 본원에 기재된 특징을 갖는 추가로 최적화된 변이체를 제조하기 위해 진행시켰다. 많은 상기 단백질을 또한 각각의 인슐린 수용체와의 선택도에 대해 시험하였다.

<134> 본 발명자들은 처음으로 IGF-IR에 대한 단백질 및 도메인 결합의 상기한 종류의 광범한 평가를 적용하였다. 상기 종류의 평가를 위한 본 발명의 단백질을 신속하게 제조하고 시험하기 위한 하나의 방식은 애드넥서스 테라퓨틱스, 인크의 핵산-단백질 융합 기술이다. 본 명세서는 IGF-IR, 및 티로신 키나제 수용체를 포함한 다른 단백질에 대한 결합에 중요한 신규한 단일 및 다수 도메인 폴리펩티드 및 아미노산 모티프를 확인하기 위해 핵산-단백질 융합체 (RNA- 및 DNA-단백질 융합체)를 활용하는 PROfusion™으로 불리는 상기 시험관내 발현 및 태깅 (tagging) 기술의 사용을 설명한다. 핵산-단백질 융합 기술은 단백질을 그의 코딩 유전자 정보에 공유 방식으로 커플링시키는 기술이다. PROfusion™ 기술은 인간 피브로넥틴 타입 3 도메인 (^{10}Fn3)에 기반한 스캐폴드를

사용하여 구성된 또는 항체 경쇄의 가변 도메인으로부터 구성된 단일 도메인 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 컬렉션을 스크리닝하기 위해 사용되었다. 스캐폴드 단백질의 "라이브러리"로 불리는 발현된 폴리펩티드를 표적에 높은 친화도로 결합할 수 있는 폴리펩티드에 대해 스크리닝하였다. 본 발명자들은 스캐폴드 단백질의 상기 라이브러리로부터 IGF-IR에 결합하고 IGF-IR 생물학적 활성을 억제하는 신규한 단일 도메인 폴리펩티드를 단리하였다. 또한, 면역글로불린 또는 면역글로불린-유사 스캐폴드 내에 위치하는 많은 독립적으로 랜덤화된 루프가 IGF-IR 결합에 참여하는 컨센서스 서열의 관련 세트에 집중하는 경향이 있는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 이들 컨센서스 서열을 갖는 폴리펩티드는 이들이 확인된 단백질 맥락으로부터 분리된 때에도 IGF-IR 결합제로서 유용할 것으로 예상된다. 예를 들어, 본원의 실시예 및 표를 참조한다. 상기 폴리펩티드는 독립적인 작은 펩티드 IGF-IR 결합제로서 사용될 수 있거나, 다른 단백질, 특히 면역글로불린 또는 면역글로불린-유사 폴드를 공유하는 단백질 내에 위치할 수 있다 (RNA-단백질 융합 기술 및 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질 라이브러리 스크리닝 방법의 상세한 설명에 대해서는, 본원에 참조로 포함시킨 스조스탁 (Szostak) 등의 미국 특허 6,258,558; 6,261,804; 6,214,553; 6,281,344; 6,207,446; 6,518,018; PCT 공개 WO00/34784; WO01/64942; WO02/032925; 및 문헌 [Roberts and Szostak, Proc Natl. Acad. Sci. 94:12297-12302, 1997]을 참조한다).

<135> 상기 논의된 바와 같이, 본원에서는 특정 바람직한 특성, 예를 들어 IGF-IR에 대한 높은 친화도 결합, 상기 수용체의 하나 이상의 리간드에 대하여 길항제 효과 및 개선된 약동학을 갖는 단일 도메인 폴리펩티드가 효과적인 항암제로서 사용될 수 있음을 입증한다. 항암제로서 상기한 폴리펩티드의 유효성은 암에서 IGF 리간드 및 수용체의 역할에 관련되는 것으로 예상되지만, 임의의 특정 메카니즘에 매이기를 바라지 않는다.

<136> 본 발명자들이 알기로는, 본원은 IGF-IR에 대한 시험관 내에서 및 생체 내에서 치료 효과를 달성하도록 설계된 Fn3-기반 폴리펩티드를 사용하기 위한 최초의 성공적인 노력을 나타낸다. 생체내 유효성을 달성하는데 있어서 이루어진 많은 개선 및 발견은 상기 및 다른 표적에 대한 다른 Fn3-기반 폴리펩티드, 및 다른 단백질 모이어티 및 도메인, 일반적으로 약 50 kDa 또는 약 40 kDa 미만의 단백질에 널리 적용될 것이다. 즉, Fn3-기반 폴리펩티드의 리간드 결합 특성은 일반적으로 용매 접근가능 루프 구역 내에 놓인 비교적 적은 수의 아미노산에 의해 결정될 것이지만, Fn3-기반 폴리펩티드의 다른 특징, 예를 들어 약동학적 특징은 리간드 결합에 직접적으로 관여되지 않고 표적 단백질에 무관하게 단백질마다 보존되는 대다수의 단백질에 의해 결정되는 경향이 있을 것이다. 이는 CDR 구역으로 불리는 몇몇 루프가 항원 결합을 매개하는 한편, 생체내 항체 거동의 다른 특징은 보존된 프레임워크 구역 및 불변 도메인에 의해 크게 지정되는 항체의 경우와 같았다.

<137> **추가의 단백질 실시태양**

<138> 본 발명의 단백질은 일반적으로 표적, 예를 들어 IGF-IR에 결합하는 폴리펩티드인 본원에 기재된 단일 도메인 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 표적 결합 활성은 예를 들어, 항체 및 단일쇄 항체로부터 분화될 때 단일 구조 도메인 내에 놓이고, 항원 결합 활성은 일반적으로 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인 모두에 의해 기여된다. 본원은 또한 표적에 결합하는 단일 도메인 폴리펩티드를 포함할 수 있는 보다 큰 단백질을 제공한다. 예를 들어, 복수의 단일 도메인 폴리펩티드는 연결되어 증가된 결합력 또는 다가성 (multivalency)를 갖는 복합 분자를 생성할 수 있다. 마찬가지로, 단일 도메인 폴리펩티드는 임의의 많은 다른 폴리펩티드에 부착될 수 있다 (예를 들어, 융합 단백질로서). 특정 측면에서, 단일 도메인 폴리펩티드는 면역글로불린 및 면역글로불린-유사 도메인으로 예시되는 바와 같이 적어도 2개의 베타 시트 사이에 분포된 적어도 5 내지 7개의 베타 또는 베타-유사 스트랜드를 포함할 수 있다. 베타-유사 스트랜드는 단일 도메인 폴리펩티드의 안정화에 참여하지만 반드시 베타 스트랜드 입체형태를 취하지는 않는 아미노산의 스트링 (string)이다. 베타-유사 스트랜드가 단백질의 안정화에 참여하는지 여부는 스트링을 결실시키거나 스트링의 서열을 변경시키고 단백질 안정성이 감소되는지 분석함으로써 평가할 수 있다. 안정성은 예를 들어 열 변성 및 탈변성 (renaturation) 연구에 의해 평가할 수 있다. 바람직하게는, 단일 도메인 폴리펩티드는 2개 이하의 베타-유사 스트랜드를 포함할 것이다. 베타-유사 스트랜드는 보통 알파-나선 입체형태를 취하지 않을 것이지만, 랜덤 코일 구조를 취할 수 있다. 면역글로불린 도메인 또는 면역글로불린-유사 도메인의 문맥에서, 베타-유사 스트랜드는 가장 종종 그렇지 않으면 가장 N-말단 베타 스트랜드 또는 가장 C-말단 베타 스트랜드에 의해 점유될 구조 내의 위치에서 일어날 것이다. 단백질 서열의 내부에 놓이면 정상적으로 베타 스트랜드를 형성할 아미노산 스트링은 N- 또는 C-말단에 보다 가까운 위치에 놓일 때 명백히 베타 스트랜드는 아니고 본원에서 베타-유사 스트랜드로서 칭하는 입체형태를 취할 수 있다.

<139> 특정 실시태양에서, 본원은 IGF-IR에 결합하는 단일 도메인 폴리펩티드를 제공한다. 바람직하게는, 단일 도메인 폴리펩티드는 인간 IGF-IR 및 모델 종 IGF-IR에 결합한다. 단일 도메인 폴리펩티드는 적어도 2개의 베타 시트 사이에 분포된 적어도 7개의 베타 스트랜드 또는 베타-유사 스트랜드, 및 2개의 베타 스트랜드 또는 베타-유

사 스트랜드를 연결하는 적어도 하나의 루프 부분 (상기 루프 부분은 IGF-IR에 대한 결합에 참여한다)을 포함하는 구조 조직을 갖는 약 80 내지 약 150개의 아미노산을 포함할 수 있다. 즉, 루프 부분은 2개의 베타 스트랜드, 2개의 베타-유사 스트랜드 또는 하나의 베타 스트랜드와 하나의 베타-유사 스트랜드를 연결할 것이다. 일반적으로, 루프 부분의 하나 이상이 IGF-IR 결합에 참여할 것이지만, 하나 이상의 베타 또는 베타-유사 스트랜드 부분, 특히 루프 부분에 가장 가까이 위치하는 베타 또는 베타-유사 스트랜드 부분이 또한 IGF-IR 결합에 참여할 것도 가능하다. 단일 도메인 폴리펩티드는 면역글로불린 도메인 또는 면역글로불린-유사 도메인인 구조 단위를 포함할 수 있다. 단일 도메인 폴리펩티드는 IGF-IR의 임의의 부분에 결합할 수 있지만, IGF-IR의 세포외 도메인에 결합하는 폴리펩티드가 바람직하다. 결합은 평형 상수 (예를 들어, 해리, K_D)의 면에서 및 운동 상수 (예를 들어, 온률 (on rate) 상수, k_{on} 및 오프율 (off rate) 상수, k_{off})의 면에서 평가할 수 있다. 단일 도메인 폴리펩티드는 대개 IGF-IR에 약 10^{-6}M 미만, 또는 약 10^{-7}M 미만, 약 $5x10^{-8}$M, 약 10^{-8}M 또는 약 10^{-9}M 미만의 K_D로 결합하도록 선택될 것이다. IGF-IR 결합 폴리펩티드는 IGF 패밀리의 하나 또는 2개 이상의 멤버, 특히 IGF-I 및 IGF-II와 결합에 대해 경쟁할 수 있고, 하나 이상의 IGF-IR-매개된 생물학적 사건, 예를 들어 암 세포의 증식 및 암 전이를 억제할 수 있다. IGF-IR 결합 폴리펩티드는 치료 목적을 위해 및 IGF-IR의 검출 또는 결합을 포함한 임의의 목적을 위해 사용될 수 있다. 치료 용도를 위한 폴리펩티드는 일반적으로 $5x10^{-8}$M 미만, 10^{-8}M 미만 또는 10^{-9}M 미만의 K_D를 가질 것이지만, k_{off}가 충분히 낮거나 k_{on}이 충분히 높은 경우에 보다 높은 K_D 값이 허용될 수 있다. 특정 실시태양에서, IGF-IR에 결합하는 단일 도메인 폴리펩티드는 본원에 기재된 IGF-IR 결합 클론으로부터 선택된 IGF-IR 결합 서열의 컨센서스 또는 하나 이상의 서열을 포함할 것이다. 바람직하게는, 상기 서열은 PCT 공개 WO2005/056764A2 (Chen et al)에 설명된 바와 같이 루프, 특히 BC, DE, 및 FG 루프 내에 위치할 것이다.

<140> 특정 실시태양에서, 단일 도메인 폴리펩티드는 면역글로불린 (Ig) 가변 도메인을 포함한다. Ig 가변 도메인은 예를 들어, 인간 V_L 도메인, 인간 V_H 도메인 및 카멜리드 V_{HH} 도메인으로 이루어지는 군 중에서 선택될 수 있다. Ig 가변 도메인의 1, 2, 3개 이상의 루프가 IGF-IR에 대한 결합에 참여할 수 있고, 일반적으로 CDR1, CDR2 또는 CDR3으로 공지된 임의의 루프가 IGF-IR 결합에 참여할 것이다.

<141> 특정 실시태양에서, 단일 도메인 폴리펩티드는 면역글로불린-유사 도메인을 포함한다. 면역글로불린-유사 도메인의 1, 2, 3개 이상의 루프는 IGF-IR에 대한 결합에 참여할 수 있다. 바람직한 면역글로불린-유사 도메인은 피브로넥틴 타입 III (Fn3) 도메인이다. 상기 도메인은 N-말단으로부터 C-말단까지의 순서로 베타 또는 베타-유사 스트랜드 A; 루프 AB; 베타 또는 베타-유사 스트랜드 B; 루프 BC; 베타 또는 베타-유사 스트랜드 C; 루프 CD; 베타 또는 베타-유사 스트랜드 D; 루프 DE; 베타 또는 베타-유사 스트랜드 E; 루프 EF; 베타 또는 베타-유사 스트랜드 F; 루프 FG; 및 베타 또는 베타-유사 스트랜드 G를 포함할 수 있다 (구조 조직의 예에 대해 도 24 참조). 임의로, 임의의 또는 모든 루프 AB, BC, CD, DE, EF 및 FG는 IGF-IR 결합에 참여할 수 있지만, 바람직한 루프는 BC, DE 및 FG이고, 특히 루프 BC 및 FG이다. 바람직한 Fn3 도메인은 인간 피브로넥틴으로부터 유래된 Fn3 도메인, 특히 피브로넥틴의 10^{th} Fn3 도메인 (^{10}Fn3으로 칭함)이다. 본원에 개시된 IGF-IR 결합 폴리펩티드는 어느 것도 천연 ^{10}Fn3과 동일한 아미노산 서열을 갖지 않고; 서열은 IGF-IR 결합 단백질을 얻도록 변형되었지만, ^{10}Fn3의 기본 구조적 특징을 갖는 단백질, 및 특히 천연 ^{10}Fn3에 대한 인식가능한 서열 상동성을 보유하는 단백질은 그럼에도 불구하고 본원에서 "^{10}Fn3 폴리펩티드"로서 칭해짐을 알아야 한다. 상기 명명법은 항체 분야에서 발견되는 것과 유사하고, 여기서 예를 들어, 특정 표적 단백질에 대해 생성된 재조합 항체 V_L 도메인은 임의의 자연 발생 V_L 도메인과 동일하지 않을 수 있지만, 그럼에도 불구하고 단백질은 인식가능하게 V_L 단백질이다. ^{10}Fn3 폴리펩티드는 서열 1에 제시된 인간 ^{10}Fn3 도메인에 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 또는 90% 동일할 수 있다. 많은 가변성이 일반적으로 하나 이상의 루프에서 일어날 것이다. ^{10}Fn3 폴리펩티드의 각각의 베타 또는 베타-유사 스트랜드는 그러한 변이가 생리학적 조건에서 폴리펩티드의 안정성을 파괴하지 않는다면 본질적으로 서열 1의 상응하는 베타 또는 베타-유사 스트랜드의 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열로 이루어질 수 있다. ^{10}Fn3 폴리펩티드는 각각의 루프 AB, CD, 및 EF 내에 본질적으로 서열 1의 상응하는 루프의 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열로 이루어지는 서열을 가질 수 있다. 많은 경우에, 임의의 또는 모든 루프 BC, DE, 및 FG는 서열 1에 비해 불량하게 보존될 것이

다. 예를 들어, 모든 루프 BC, DE, 및 FG는 서열 1의 그의 상응하는 루프에 20% 미만, 10% 미만 또는 0% 동일할 수 있다. 일부 실시태양에서, BC 및 FG 루프만이 서열 1에 비해 불량하게 보존될 것이다.

<142> 특정 실시태양에서, 본원은 10번째 피브로넥틴 타입 III (^{10}Fn3) 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 ^{10}Fn3 도메인은 루프 AB; 루프 BC; 루프 CD; 루프 DE; 루프 EF; 및 루프 FG를 포함하고; 인간 ^{10}Fn3 도메인의 상응하는 루프의 서열에 비해 변경된 아미노산 서열을 갖는 루프 BC, DE 및 FG 중에서 선택된 적어도 하나의 루프를 갖는다. "I"는 템플레이트 서열 (상응하는 인간 피브로넥틴 도메인)에 비해 하나 이상의 아미노산 서열 변경을 의미하고, 아미노산 부가, 결실 및 치환을 포함한다. 아미노산 서열을 변경시키는 것은 일반적으로 핵산 코딩 서열의 의도적, 맹목적 (blind) 또는 자발적 서열 변이를 통해 달성할 수 있고, 임의의 기술, 예를 들어, PCR, 오류 빈발 (error-prone) PCR, 또는 화학적 DNA 합성에 의해 일어날 수 있다.

<143> 일부 실시태양에서, BC, DE 및 FG 중에서 선택된 하나 이상의 루프는 상응하는 인간 피브로넥틴 루프에 비해 길이가 연장되거나 짧아질 수 있다. 일부 실시태양에서, 루프의 길이는 2-25개 아미노산이 연장될 수 있다. 일부 실시태양에서, 루프의 길이는 1-11개 아미노산이 감소할 수 있다. 특히, ^{10}Fn3의 FG 루프는 12개 잔기 길이인 반면, 항체 중쇄 내의 상응하는 루프는 4-28개 잔기이다. 따라서, 항원 결합을 최적화하기 위해, ^{10}Fn3의 FG 루프의 길이는 항원 결합에서 최대의 가능한 가요성 및 친화도를 얻기 위해 4-28개 잔기의 CDR3 범위를 덮도록 바람직하게는 길이 및 서열에서 랜덤화된다. 일부 실시태양에서, 인테그린-결합 모티프는 극성 아미노산-중성 아미노산-산성 아미노산 서열 (N-말단으로부터 C-말단까지의 방향으로)인 아미노산 서열로 교체될 수 있다.

<144> 일부 실시태양에서, ^{10}Fn3 도메인을 포함하는 폴리펩티드는 서열 2-125 또는 184-202의 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함한다. 추가의 서열이 N- 또는 C-말단에 부가될 수 있다. 예를 들어, 추가의 MG 서열이 N-말단에 배치될 수 있다. M은 대체로 절단되어 N-말단에 GVS... 서열이 존재할 것이다. 일부 실시태양에서, 링커 서열이 ^{10}Fn3 도메인의 C-말단, 예를 들어, 서열 203 및 226에 배치될 수 있다.

<145> 특정 실시태양에서, 본원은 IGF-IR에 결합하는 면역글로불린-유사 폴드를 갖는 도메인을 포함하는 비-항체 폴리펩티드를 제공한다. 비-항체 폴리펩티드는 분자량이 20 kDa 미만 또는 15 kDa 미만일 수 있고, 일반적으로 참조 또는 "스캐폴드" 단백질, 예를 들어 Fn3 스캐폴드로부터 유래할 것이다 (예를 들어, 아미노산 서열의 변경에 의해). 비-항체 폴리펩티드는 IGF-IR에 10^{-6}M 미만, 또는 10^{-7}M 미만, $5x10^{-8}$M 미만, 10^{-8}M 미만 또는 10^{-9}M 미만의 K_D로 결합할 수 있다. 변경되지 않은 참조 단백질은 IGF-IR에 의미있게 결합하지 않거나, 10^{-6}M 초과의 K_D로 결합할 것이다. 비-항체 폴리펩티드는 특히 비-항체 폴리펩티드가 $5x10^{-8}$M 미만, 10^{-8}M 미만 또는 10^{-9}M 미만의 K_D를 갖는 경우에 IGF-IR 신호전달을 억제할 수 있지만, k_{off}가 충분히 낮은 경우에 (예를 들어, $5x10^{-4}$ s^{-1} 미만) 보다 높은 K_D 값이 허용될 수 있다. 면역글로불린-유사 폴드는 ^{10}Fn3 폴리펩티드일 수 있다.

<146> 특정 실시태양에서, 본원은 IGF-IR에 결합하는 면역글로불린 폴드를 갖는 단일 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다. 폴리펩티드는 분자량이 20 kDa 미만 또는 15 kDa 미만일 수 있고, 일반적으로 면역글로불린의 가변 도메인으로부터 유래할 것이다 (예를 들어, 아미노산 서열의 변경에 의해). 폴리펩티드는 IGF-IR에 10^{-6}M 미만, 또는 10^{-7}M 미만, $5x10^{-8}$M 미만, 10^{-8}M 미만 또는 10^{-9}M 미만의 K_D로 결합할 수 있다. 폴리펩티드는 특히 폴리펩티드가 $5x10^{-8}$M 미만, 10^{-8}M 미만 또는 10^{-9}M 미만의 K_D를 갖는 경우에 IGF-IR 신호전달을 억제할 수 있지만, k_{off}가 충분히 낮은 경우 또는 k_{on}이 충분히 높은 경우에 보다 높은 K_D 값이 허용될 수 있다. 특정 바람직한 실시태양에서, IGF-IR에 결합할 수 있고 면역글로불린 경쇄 가변 도메인으로부터 유래된 면역글로불린 폴드를 갖는 단일 도메인 폴리펩티드는 본원에 기재된 IGF-IR 결합 클론 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

<147> 특정 바람직한 실시태양에서, 본원은 가장 바람직한 생화학적 특징을 갖는 본원에 기재된 임의의 IGF-IR 결합 클론의 아미노산 서열을 포함하는 IGF-IR 결합 폴리펩티드를 제공한다. 상기 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드의 경우에, PEG 모이어티 또는 관심있는 다른 모이어티는 단백질에 따라 위치 약 85 내지 100에서 시스테인에 공유 결합될 수 있다. PEG 모이어티는 또한 폴리펩티드 내의 아민 모이어티에 공유 결합될 수 있다. 아민 모이어티는 예를 들어, 폴리펩티드의 N-말단에서 발견되는 1차 아민, 또는 라이신 또는 아르기닌과 같은 아미노산 내에 존재하는 아민기일 수 있다. 특정 실시태양에서, PEG 모이어티는 a) N-말단; b) N-말단과 가장 N-말단

베타 스트랜드 또는 베타-유사 스트랜드 사이; c) 표적-결합 부위 반대편의 폴리펩티드의 정면 상에 위치하는 루프; d) C-말단과 가장 C-말단 베타 스트랜드 또는 베타-유사 스트랜드 사이; 및 e) C-말단으로 이루어지는 군 중에서 선택되는 폴리펩티드 상의 위치에서 부착된다.

<148> 특정 측면에서, 본원은 IGF-IR 결합을 매개하는 짧은 펩티드 서열을 제공한다. 상기 서열은 단리된 형태로 또는 특정 단백질 구조, 예를 들어 면역글로불린 또는 면역글로불린-유사 도메인 내로 삽입될 때 IGF-IR 결합을 매개할 수 있다. 상기 서열의 예는 표에 개시된 것 및 서열 1 또는 본원에 나열된 임의의 다른 서열에 적어도 85%, 90% 또는 95% 동일한 다른 서열을 포함하고, IGF-IR 결합 활성을 보유한다. 따라서, 본원은 상기 서열의 임의의 서열에 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 실질적으로 순수한 또는 단리된 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 상기 폴리펩티드는 IGF-IR에 결합하고, IGF-IR에 대한 결합에 대해 IGF 종과 경쟁한다. 상기 폴리펩티드의 예는 표 내의 임의의 서열에 적어도 85% 동일한 아미노산 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 바람직하게는, 상기 폴리펩티드는 IGF의 생물학적 활성을 억제할 것이고, IGF-IR에 10^{-6}M 미만, 또는 10^{-7}M 미만, $5x10^{-8}$M 미만, 10^{-8}M 미만 또는 10^{-9}M 미만의 K_D로 결합할 수 있다.

<149> 특정 실시태양에서, 본원에 기재된 임의의 IGF-IR 결합 폴리펩티드는 예를 들어 IGF-IR에 또한 결합하는 모이어티 (예를 들어, 제2의 동일한 또는 상이한 IGF-IR 결합 폴리펩티드), 상이한 표적에 결합하는 모이어티 (예를 들어, 이중-특이성 결합제를 생성하도록), 표지 모이어티, 단백질 정제를 용이하게 하는 모이어티, 또는 개선된 약동학을 제공하는 모이어티를 비롯한 하나 이상의 추가의 모이어티에 결합될 수 있다. 개선된 약동학은 인지된 치료적 필요에 따라 평가할 수 있다. 종종, 생체이용률을 증가시키고/시키거나, 가능하게는 투약 후 혈청 내에 단백질이 이용가능하게 남아있는 시간을 증가시킴으로써 투약 사이의 시간을 증가시키는 것이 바람직하다. 일부 경우에, 시간에 따른 단백질의 혈청 농도의 연속성을 개선하는 (예를 들어, 투여 직후 및 다음 투여 직전의 단백질의 혈청 농도의 사이를 감소시키는) 것이 바람직하다. 혈액으로부터 단백질의 청소를 느리게 하는 경향이 있는 모이어티 (본원에서 "PK 모이어티"로서 칭함)는 폴리옥시알킬렌 모이어티, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜, 당 (예를 들어, 시알산), 및 잘 허용되는 단백질 모이어티 (예를 들어, Fc, Fc 단편 또는 혈청 알부민)를 포함한다. 본 발명의 폴리펩티드는 미국 특허 공개 20070048282에 설명된 바와 같이 알부민 또는 알부민의 단편 (일부) 또는 변이체에 융합될 수 있다. 단일 도메인 폴리펩티드는 포유동물 (예를 들어, 마우스, 래트, 또는 인간)에서 폴리펩티드의 청소율을 비변형 폴리펩티드에 비해 3배 초과로 감소시키는 모이어티에 부착될 수 있다. 개선된 약동학의 다른 측정치는 혈청 반감기를 포함할 수 있고, 이는 종종 알파상 및 베타상으로 나누어진다. 하나의 또는 두 상은 모두 적절한 모이어티의 첨가에 의해 유의하게 개선될 수 있다. 폴리에틸렌 글리콜이 사용되는 경우에, 하나 이상의 PEG 분자가 단백질 내의 상이한 위치에서 부착될 수 있고, 그러한 부착은 아민, 티올 또는 다른 적합한 반응기와의 반응에 의해 달성할 수 있다. Peg화는 부위-지정 peg화에 의해 달성할 수 있고, 여기서 적합한 반응기가 단백질 내로 도입되어 peg화가 우선적으로 일어나는 부위를 생성한다. 바람직한 실시태양에서, 단백질은 목적하는 위치에서 시스테인 잔기를 갖도록 변형되어, 시스테인 상의 부위 지정 peg화를 허용한다. PEG는 분자량이 매우 넓게 변할 수 있고, 분지형 또는 선형일 수 있다. 특히, 본원은 peg화가 ^{10}Fn3 폴리펩티드의 표적 결합 활성과 적합성이고, 추가로, peg화가 상기 폴리펩티드의 약동학을 개선함을 확립한다. 따라서, 하나의 실시태양에서, 본원은 폴리펩티드가 결합할 수 있는 표적에 무관하게 ^{10}Fn3 폴리펩티드의 peg화된 형태를 제공한다.

<150> 일부 실시태양에서, 본 발명의 폴리펩티드는 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질 및 PK 모이어티의 컨쥬게이트 (conjugate)를 포함한다. 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질은 임의의 인간 단백질에 결합할 수 있고, 바람직하게는 ^{10}Fn3 도메인으로부터 유래된다. PK 모이어티는 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질의 약동학을 개선하는 임의의 모이어티일 수 있다. 일부 실시태양에서, PK 모이어티는 스캐폴드 단백질의 혈청 반감기를 적어도 2배로 만든다. 일부 실시태양에서, PK 모이어티는 폴리펩티드 링커를 통해 스캐폴드 단백질에 연결된다. 예시적인 폴리펩티드 링커는 PSTSTST (서열 244), EIDKPSQ (서열 245), 및 GS 링커, 예를 들어 GSGSGSGSGS (서열 246) 및 그의 다량체를 포함한다. 일부 실시태양에서, PK 모이어티는 인간 혈청 알부민이다. 일부 실시태양에서, PK 모이어티는 트랜스페린이다.

<151> 특정 측면에서, 본원은 세포 내에서 IGF 생물학적 활성을 억제하기 위해 또는 IGF-IR에 의해 매개된 생물학적 활성을 억제하기 위해 IGF-IR 결합 단백질을 사용하는 방법을 제공한다. 세포는 생체 내에 또는 생체 외에 위치할 수 있고, 예를 들어, 살아있는 유기체의 세포, 배양된 세포 또는 조직 샘플 내의 세포일 수 있다. 방법은

상기 세포를 생물학적 활성을 억제하기 위한 양으로 충분한 시간 동안 본원에 개시된 임의의 IGF-IR-억제 폴리펩티드와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다.

<152> 특정 측면에서, 본원은 IGF 또는 IGF-IR의 억제에 반응하는 병태에 걸린 대상을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 대상에게 유효량의 본원에 기재된 임의의 IGF-IR 억제 폴리펩티드를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 병태는 부적절한 IGF-IR 생물학을 특징으로 하는 것일 수 있다. 본원에 기재된 임의의 IGF-IR 억제 폴리펩티드가 질환, 특히 자가면역 질환, 재협착 및 암으로 이루어지는 군 중에서 선택된 질환의 치료용 의약의 제조를 위해 사용될 수 있다.

<153> 특정 측면에서, 본원은 샘플 내에서 IGF-IR을 검출하기 위한 방법을 제공한다. 방법은 샘플을 본원에 기재된 IGF-IR 결합 폴리펩티드와 접촉시키고 (여기서 상기 접촉은 폴리펩티드-IGF-IR 복합체 형성을 허용하는 조건 하에 수행된다); 상기 복합체를 검출함으로써, 상기 샘플 내에서 상기 IGF-IR을 검출하는 것을 포함할 수 있다. 검출은 당업계에 공지된 임의의 기술, 예를 들어, 방사선촬영, 면역학적 분석, 형광 검출, 질량 분석법, 또는 표면 플라즈몬 공명을 이용하여 수행할 수 있다. 샘플은 종종 생물학적 샘플, 예를 들어 생검, 및 특히 종양, 의심되는 종양의 생검일 것이다. 샘플은 인간 또는 다른 포유동물의 것일 수 있다. IGF-IR 결합 폴리펩티드는 표지 모이어티, 예를 들어 방사성 모이어티, 형광 모이어티, 발색 모이어티, 화학발광 모이어티, 또는 합텐 모이어티로 표지될 수 있다. IGF-IR 결합 폴리펩티드는 고체 지지체 상에 고정될 수 있다.

<154> 본원의 다른 측면은 본원에 개시된 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산에 관한 것이다. 특정 실시태양에서, 핵산은 본원에 개시된 표의 임의의 단백질 서열로 이루어지는 군 중에서 선택된 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있다.

<155> 본원의 추가의 측면은 프로모터와 작동가능하게 연결된 핵산을 포함하는 발현 벡터에 관한 것이고, 여기서 핵산은 본원에 개시된 폴리펩티드를 코딩한다. 본원의 다른 측면은 본원에 개시된 핵산을 포함하는 세포에 관한 것이다. 본원의 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 발현하는 것을 포함하는, IGF-IR에 결합하는 폴리펩티드를 생산하는 방법을 또한 제공한다. 특정 실시태양에서, 핵산은 본원에 개시된 표의 임의의 서열 및 그들의 상응하는 단백질로 이루어지는 군 중에서 선택되는 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 핵산은 세포 내에서 발현된다. 별법으로, 핵산은 무-세포 시스템에서 발현된다.

<156> 특정 측면에서, 본원은 폴리펩티드가 어떤 표적에 결합하도록 공학처리되었는지와 무관하게, 임의의 ^{10}Fn3 폴리펩티드에 적용될 수 있는 발견을 제공한다. 상기한 바와 같이, 본원은 PEG가 표적 결합을 의미있게 저해하지 않으면서 ^{10}Fn3 폴리펩티드의 약동학을 개선하기 위해 성공적으로 사용될 수 있음을 입증한다. 따라서, 본원은 표적에 결합하고 비-peg화 폴리펩티드에 비해 개선된 약동학을 갖는 peg화된 ^{10}Fn3 폴리펩티드를 제공한다. 추가의 실시태양에서, 본원은 ^{10}Fn3 폴리펩티드의 처음 8개 아미노산의 결실이 표적 결합 친화도를 증가시킬 수 있음을 입증한다. 따라서, 본원은 처음 8개 아미노산 (서열 1의 서열에 관련하여 넘버링된 아미노산)이 결핍되는 ^{10}Fn3 폴리펩티드를 제공한다. 번역 및 적절한 처리를 용이하게 하도록 하나 또는 2개의 아미노산이 결실된 형태의 폴리펩티드에 다시 부가될 수 있음이 이해된다. 본원은 ^{10}Fn3 폴리펩티드의 피하 투여가 혈류 내로 폴리펩티드의 방출을 지연시키고, ^{10}Fn3 폴리펩티드의 최대 혈청 농도를 감소시킴을 입증한다. 따라서, 본원은 ^{10}Fn3 폴리펩티드를 환자에게 피하 투여에 의해 투여하는 방법을 제공한다. 상기 투여 경로는 정맥내 투여에 비해 지연된 방출을 달성하고/하거나 ^{10}Fn3 폴리펩티드의 최대 혈청 농도를 동일 투여량의 정맥내 투여에 의해 달성된 최대 혈청 농도에 비해 적어도 25% 또는 적어도 50% 감소시키기 위해 유용할 수 있다. 투여된 ^{10}Fn3 폴리펩티드는 ^{10}Fn3 폴리펩티드의 혈청 반감기를 증가시키는 (또는 청소율을 감소시키거나, 다른 약동학 파라미터에 유사하게 영향을 미치는) 모이어티, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 부착될 수 있다. 바람직하게는, 투여된 ^{10}Fn3 폴리펩티드는 서열 1에 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

<157> 특정 측면에서, 본원은 제1 포유동물로부터의 예비선택된 표적 단백질에 및 제2 포유동물로부터의 그의 상동체에 결합하는 단일 도메인 폴리펩티드를 제공한다. 그러한 단일 도메인 폴리펩티드는 제1 포유동물이 인간이고, 제2 포유동물이 전임상 시험을 수행하기에 바람직한 포유동물, 예를 들어 마우스, 래트, 기니 피그, 개 또는 비-인간 영장류인 경우에 특히 유용하다. 본원은 단일 도메인 폴리펩티드가 그러한 이중 특이성을 갖도록 공학처리될 수 있고, 상기 이중 특이성은 인간 세포, 인간 대상 및 동물 모델에서 동일한 폴리펩티드의 시험을 허용함

으로써 약물 개발을 단순화시킴을 입증한다. 바람직하게는, 제1 포유동물로부터의 예비선택된 표적 단백질 및 제2 포유동물로부터의 그의 상동체는 이중 특이성 폴리펩티드의 생성을 허용하도록 아미노산 서열이 충분히 유사하다. 예를 들어, 예비선택된 표적 단백질 및 제2 포유동물로부터의 상동체는 적어도 50개 아미노산의 구역에 걸쳐 적어도 80%, 90% 또는 95% 동일성을 공유할 수 있고, 임의로 막 단백질의 경우에 전체 단백질 서열에 걸쳐 또는 세포외 도메인의 서열에 걸쳐 적어도 80%, 90% 또는 95% 동일성을 공유할 수 있다. 상기 종류의 이중 특이성 결합 특징을 갖는 단일 도메인 폴리펩티드는 면역글로불린 또는 면역글로불린-유사 도메인을 포함할 수 있고, 바람직하게는 예비선택된 인간 표적 단백질 및 그의 상동체 모두에 $1x10^{-6}$M, $1x10^{-7}$M, $5x10^{-8}$M, $1x10^{-8}$M 또는 $1x10^{-9}$M 미만의 해리 상수로 결합할 것이다.

<158> **추가의 분석**

<159> *본 발명의 IGF-IR 결합 단백질에 의한 IGF-IR 티로신 인산화 또는 수용체 수준 또는 생체내 종양 세포 성장의 억제*

<160> 추가의 실시태양에서, 본 발명의 단백질은 생체 내에서 IGF-IR 티로신 인산화 또는 수용체 수준 또는 둘 모두를 억제하는 IGF-IR 결합물질을 제공한다. 하나의 실시태양에서, 동물에 IGF-IR 결합물질을 투여하면 IGF-IR-발현 종양에서 IGF-IR 포스포티로신 신호를 감소시킨다. 바람직한 실시태양에서, IGF-IR 결합물질은 포스포티로신 신호를 적어도 20% 감소시킨다. 보다 바람직한 실시태양에서, IGF-IR 결합물질은 포스포티로신 신호를 적어도 50%, 보다 바람직하게는 60% 감소시킨다. 훨씬 더 바람직한 실시태양에서, 결합물질은 포스포티로신 신호를 적어도 70%, 보다 바람직하게는 80%, 훨씬 더 바람직하게는 90% 감소시킨다.

<161> 다른 실시태양에서, 동물에 IGF-IR 결합물질을 투여하면 IGF-IR-발현 종양에서 IGF-IR 수준을 감소시킨다. 바람직한 실시태양에서, IGF-IR 결합물질은 수용체 수준을 비처리 동물에 비해 적어도 20% 감소시킨다. 보다 바람직한 실시태양에서, IGF-IR 결합물질은 수용체 수준을 비처리 동물에서의 수용체 수준의 적어도 50%, 보다 바람직하게는 60%로 감소시킨다. 훨씬 더 바람직한 실시태양에서, 결합물질은 수용체 수준을 적어도 70%, 보다 바람직하게는 80% 감소시킨다.

<162> *생체내 조정*

<163> 본 발명의 단백질의 다른 실시태양에서, IGF-IR 결합물질은 생체 내에서 종양 세포 성장을 억제한다. 종양 세포는 비제한적으로 표피, 상피, 내피, 백혈병, 육종, 다발 골수종 또는 중배엽 세포를 포함한 임의의 세포 종류로부터 유래할 수 있다. 이종이식편 종양 연구에 사용하기 위한 일반적인 종양 세포주의 예는 A549 (비-소세포 폐 암종) 세포, DU-145 (전립선) 세포, MCF-7 (유방) 세포, Colo 205 (대장) 세포, 3T3/TGF-IR (마우스 섬유모세포) 세포, NCI H441 세포, HEP G2 (간암) 세포, MDA MB 231 (유방) 세포, HT-29 (대장) 세포, MDA-MB-435s (유방) 세포, U266 세포, SH-SY5Y 세포, Sk-Mel-2 세포, NCI-H929, RPMI 8226 및 A431 세포를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 결합물질은 비처리 동물에서의 종양의 성장에 비해 종양 세포 성장을 억제한다. 보다 바람직한 실시태양에서, 결합물질은 종양 세포 성장을 50% 억제한다. 훨씬 더 바람직한 실시태양에서, 결합물질은 종양 세포 성장을 60%, 65%, 70% 또는 75% 억제한다. 하나의 실시태양에서, 종양 세포 성장의 억제는 동물에게 결합물질을 사용한 치료를 시작한 지 적어도 7일 후 측정한다. 보다 바람직한 실시태양에서, 종양 세포 성장의 억제는 동물에게 결합물질을 사용한 치료를 시작한 지 적어도 14일 후 측정한다. 다른 바람직한 실시태양에서, 다른 항신생물제를 IGF-IR 결합물질과 함께 동물에게 투여한다. 바람직한 실시태양에서, 항신생물제는 종양 세포 성장을 더욱 억제할 수 있다. 훨씬 더 바람직한 실시태양에서, 항신생물제는 아드리아마이신, 탁솔, 타목시펜, 5-플루오로데옥시유리딘 (5-FU) 또는 CP-358,774이다.

<164> **추가의 이중특이적 및 다중-특이적 실시태양**

<165> 많은 실시태양에서, 다중-특이적 조성물, 예를 들어 하나 초과의 표적 또는 관심있는 다른 단백질에 결합하는 조성물을 제조하는 것이 바람직할 것이다. 하나의 측면에서, 본 발명의 단백질은 제1 목적하는 표적 (예를 들어, IGF-IR)에 약 10 nM (본원에 기재된 다른 적절한 친화도) 이하의 결합 친화도를 갖고, 원치 않는 관련 표적 (예를 들어, 인간 인슐린 수용체)에 약 1 μM (본원에 기재된 다른 적절한 친화도) 이상의 결합 친화도로 결합하고, 바람직하게는 단일 도메인 또는 실질적으로 1가이고, 제2 단백질에 부착 연결되는 제1 단백질을 포함하고, 상기 제2 단백질은 제2 목적하는 표적 (예를 들어, EGFR, c-Met, c-kit, Her2, FGFR1, VEGFR2, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, 엽산 수용체)에 대해 약 10 nM (본원에 기재된 다른 적절한 친화도) 이하의 결합 친화도를 갖고, 원치 않는 관련 표적 (예를 들어, 인간 인슐린 수용체)에 약 1 μM (본원에 기재된 다른 적절한 친화도) 이상의 결합 친화도로 결합하고, 바람직하게는 단일 도메인 또는 실질적으로 1가이다. 이중특

이적 친화도를 갖는 그러한 분자는 본원에 기재된 다른 단백질을 포함한 다른 분자에 더욱 부착될 수 있다.

<166> 하나의 측면에서, 본 발명의 단백질은 IGF-IR에 결합하는 제1의 ^{10}Fn3 도메인 및 VEGFR2에 결합하는 제2의 ^{10}Fn3 도메인을 포함한다. VEGFR-2 결합 폴리펩티드는 본원에 참조로 포함시킨 PCT 공개 WO2005/056764에 설명된 바와 같이 생성되었다. 본 발명에 유용한 바람직한 VEGFR-2 결합 ^{10}Fn3 폴리펩티드의 서열을 도 30a-30i, 서열 126-183에 제시한다. 본 발명의 단백질은 처음 8개 아미노산이 결실된 개시된 아미노산 서열을 포함하고, N- 또는 C-말단에 추가의 아미노산을 포함할 수 있다. 예를 들어, 추가의 MG 서열이 N-말단에 위치할 수 있다. M은 대체로 절단되어 N-말단에 GEV... 서열이 존재할 것이다. N-말단에 8개의 정상 아미노산을 재-첨가하면 또한 바람직한 특성을 갖는 VEGFR2 결합 단백질을 생성한다. 일부 실시태양에서, N-말단 메티오닌이 절단 제거된다. 생체내 사용을 위해, peg화에 적합한 형태가 생성될 수 있다. 하나의 실시태양에서, 시스테인을 포함한 C-말단 테일 (tail)이 첨가될 수 있다 (예를 들어, EIDKPCQ (서열 225)가 C-말단에 첨가된다).

<167> 하나의 측면에서, 본 발명의 단백질은 제1 목적하는 표적 (예를 들어, EGFR)에 약 10 nM (본원에 기재된 다른 적절한 친화도) 이하의 결합 친화도를 갖고, 원치 않는 관련 표적 (예를 들어, 인간 인슐린 수용체)에 약 1 μM (본원에 기재된 다른 적절한 친화도) 이상의 결합 친화도로 결합하고, 바람직하게는 단일 도메인 또는 실질적으로 1가이고, 제2 단백질에 부착 연결되는 제1 단백질을 포함하고, 상기 제2 단백질은 제2 목적하는 표적 (예를 들어, Her2, 엽산 수용체)에 약 10 nM (본원에 기재된 다른 적절한 친화도) 이하의 결합 친화도를 갖고, 원치 않는 관련 표적 (예를 들어, 인간 인슐린 수용체)에 약 1 μM (본원에 기재된 다른 적절한 친화도) 이상의 결합 친화도로 결합하고, 바람직하게는 단일 도메인 또는 실질적으로 1가이다. 이중특이적 친화도를 갖는 그러한 분자는 본원에 기재된 다른 단백질을 포함하는 다른 분자에 추가로 부착될 수 있다.

<168> 하나의 측면에서, 본 발명의 단백질은 제1 목적하는 표적 (예를 들어, EGFR)에 또는 약 10 nM (본원에 기재된 다른 적절한 친화도) 이하의 결합 친화도를 갖고, 원치 않는 관련 표적 (예를 들어 인간 인슐린 수용체)에 약 1 μM (본원에 기재된 다른 적절한 친화도) 이상의 결합 친화도로 결합하고, 바람직하게는 단일 도메인 또는 실질적으로 1가이고, 제2 단백질에 부착 연결되는 제1 단백질을 포함하고, 상기 제2 단백질은 제2 목적하는 표적 (예를 들어, VEGFR2)에 약 10 nM (본원에 기재된 다른 적절한 친화도) 이하의 결합 친화도를 갖고, 원치 않는 관련 표적 (예를 들어, VEGFR1)에 약 1 μM (본원에 기재된 다른 적절한 친화도) 이상의 결합 친화도로 결합하고, 바람직하게는 단일 도메인 또는 실질적으로 1가이다. 이중특이적 친화도를 갖는 그러한 분자는 본원에 기재된 다른 단백질을 포함하는 다른 분자에 추가로 부착될 수 있다.

<169> 하나의 측면에서, 본 발명의 단백질은 제1 목적하는 표적 (예를 들어, Her2)에 약 10 nM (본원에 기재된 다른 적절한 친화도) 이하의 결합 친화도를 갖고, 원치 않는 관련 표적 (예를 들어, Her4)에 약 1 μM (본원에 기재된 다른 적절한 친화도) 이상의 결합 친화도로 결합하고, 바람직하게는 단일 도메인 또는 실질적으로 1가이고, 제2 단백질에 부착 연결되는 제1 단백질을 포함하고, 상기 제2 단백질은 제2 목적하는 표적 (예를 들어, VEGFR2)에 약 10 nM (본원에 기재된 다른 적절한 친화도) 이하의 결합 친화도를 갖고, 원치 않는 관련 표적 (예를 들어, VEGFR1)에 약 1 μM (본원에 기재된 다른 적절한 친화도) 이상의 결합 친화도로 결합하고, 바람직하게는 단일 도메인 또는 실질적으로 1가이다. 이중특이적 친화도를 갖는 그러한 분자는 본원에 기재된 다른 단백질을 포함하는 다른 분자에 추가로 부착될 수 있다.

<170> 하나의 측면에서, 본 발명의 단백질은 제1 목적하는 표적 (예를 들어, FGFR1, c-Met, c-kit)에 약 10 nM (본원에 기재된 다른 적절한 친화도) 이하의 결합 친화도를 갖고, 원치 않는 관련 표적 (예를 들어 인간 인슐린 수용체)에 약 1 μM (본원에 기재된 다른 적절한 친화도) 이상의 결합 친화도로 결합하고, 바람직하게는 단일 도메인 또는 실질적으로 1가이고, 제2 단백질에 부착 연결되는 제1 단백질을 포함하고, 상기 제2 단백질은 제2 목적하는 표적 (예를 들어, VEGFR2)에 약 10 nM (본원에 기재된 다른 적절한 친화도) 이하의 결합 친화도를 갖고, 원치 않는 관련 표적 (예를 들어, VEGFR1)에 약 1 μM (본원에 기재된 다른 적절한 친화도) 이상의 결합 친화도로 결합하고, 바람직하게는 단일 도메인 또는 실질적으로 1가이다. 이중특이적 친화도를 갖는 그러한 분자는 본원에 기재된 다른 단백질을 포함하는 다른 분자에 추가로 부착될 수 있다.

<171> 하나의 측면에서, 본 발명의 단백질은 제1 목적하는 표적 (예를 들어, Her2)에 약 10 nM (본원에 기재된 다른 적절한 친화도) 이하의 결합 친화도를 갖고, 원치 않는 관련 표적 (예를 들어 인간 인슐린 수용체)에 약 1 μM (본원에 기재된 다른 적절한 친화도) 이상의 결합 친화도로 결합하고, 바람직하게는 단일 도메인 또는 실질적으로 1가이고, 제2 단백질에 부착 연결되는 제1 단백질을 포함하고, 상기 제2 단백질은 제2 목적하는 표적 (예를 들어, Her3)에 약 10 nM (본원에 기재된 다른 적절한 친화도) 이하의 결합 친화도를 갖고, 원치 않는 관련 표적 (예를 들어, Her4)에 약 1 μM (본원에 기재된 다른 적절한 친화도) 이상의 결합 친화도로 결합하고, 바람직하

게는 단일 도메인 또는 실질적으로 1가이다. 이중특이적 친화도를 갖는 그러한 분자는 본원에 기재된 다른 단백질을 포함하는 다른 분자에 추가로 부착될 수 있다.

<172> **추가의 PEG 실시태양**

<173> 본 발명자들이 알기로는, PEG (또는 기능상 유사한 분자)가 단일 표적에 결합하는 비-항체 모이어티인 2개의 단백질, 특히 각각의 결합 단백질이 단일 도메인 또는 다수의 도메인으로 구성되고, 대체로 각각의 도메인이 약 50 또는 약 60 또는 약 75개 이상의 아미노산 (5 내지 20개 아미노산의 작은 펩티드와 달리)인 단백질을 연결하기 위해 사용될 수 있음이 처음 알려졌다. 바람직하게는, 피브로넥틴 스캐폴드 단백질은 상기 실시태양에서, 보다 바람직하게는 Cys 또는 Lys 아미노산의 적합한 공학처리와 함께 유리하게 사용될 수 있다.

<174> 본 발명자들이 알기로는, PEG (또는 기능상 유사한 분자)가 2개 이상의 상이한 표적 또는 관심있는 단백질 (예를 들어, PK 조정 단백질)에 결합하는 비-항체 모이어티인 2개의 단백질, 특히 각각의 결합 단백질이 단일 도메인 또는 다수의 도메인으로 구성되고, 대체로 각각의 도메인이 약 50 또는 약 60 또는 약 75개 이상의 아미노산 (5 내지 20개 아미노산의 작은 펩티드와 달리)인 단백질을 연결하기 위해 사용될 수 있음이 처음 알려졌다. 바람직하게는, 피브로넥틴 스캐폴드 단백질은 상기 실시태양에서, 보다 바람직하게는 Cys 또는 Lys 아미노산의 적합한 공학처리와 함께 유리하게 사용될 수 있다.

<175> 또한, 본 발명의 비PEG 및 PEG 측면은 항체 모이어티 (예를 들어, 낙타 항체 및 그들의 유도체, 및 단일쇄 및 도메인 항체; 특히 미생물로부터 발현된 것) 및 항체-유사 모이어티 (예를 들어, 리포칼린의 유도체, 안키린, 다수 Cys-Cys 도메인, 및 테트라넥틴; 특히 미생물로부터 발현된 것), 특히 PEG에 의해 연결되는 약 40 kDa 미만의 것, 보다 특히 제한된 수의 cys 아미노산을 갖는 것을 포함한다.

<176> 이전에 인식되거나 밝혀지지 않은 본 발명의 PEG 연결된 단백질의 많은 특징 및 잇점이 존재한다. 상기 단백질이 미생물 내에서 발현될 때, 도메인을 단리한 후, PEG 또는 다른 중합성 링커를 통해 이들을 연결하는 것이 바람직할 수 있다. PEG, 또는 다른 기능적으로 작동가능한 중합성 링커는 각각의 단백질 모이어티 사이의 거리를 최적으로 변화시켜 다음 특징 중 하나 이상을 갖는 단백질을 생성시키도록 사용될 수 있다: 1) 관심있는 단백질 (예를 들어, 표적)에 결합할 때 하나 이상의 단백질 도메인의 결합의 입체 장해를 감소시키거나 증가시키고, 2) 상이한 표적에 결합하는 2개 이상의 도메인을 연결하고, 3) 안정성 또는 용해도를 증가시키기 위해 추가의 아미노산 치환을 찾지 않으면서 단백질 안정성 또는 용해도를 증가시키고 (예를 들어, 적어도 약 20 mg/ml, 또는 적어도 약 50 mg/ml의 용해도), 4) 안정성을 감소시키기 위해 추가의 아미노산 치환을 찾지 않으면서 단백질 응집을 감소시키고 (예를 들어, SEC로 측정할 때), 5) 추가의 결합 도메인을 첨가함으로써 관심있는 단백질에 대한 단백질의 전체 결합력 또는 친화도를 증가시킨다. PEG 연결된 단백질의 추가의 잇점은 PEG 연결된 단백질 내에 포함되는 단백질 표적화 모이어티의 수에 따라 단일특이적, 다가 결합 방식, 및 다중-특이적, 1가 또는 다가 결합 방식을 빠르게 제조하는 것을 포함한다.

<177> 본 발명의 ^{10}Fn3 폴리펩티드는 peg화되고, 리간드 결합 활성을 보유할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, peg화된 ^{10}Fn3 폴리펩티드는 부위 지정 peg화에 의해, 특히 N- 또는 C-말단에서 시스테인 모이어티에 PEG의 컨쥬게이션에 의해 제조된다. 따라서, 본원은 개선된 약동학 특성을 갖는 표적-결합 ^{10}Fn3 폴리펩티드를 제공하고, 상기 폴리펩티드는 약 80 내지 약 150개의 아미노산을 갖는 ^{10}Fn3 도메인 (여기서, 상기 ^{10}Fn3 도메인의 루프 중 적어도 하나는 표적 결합에 참여한다); 및 공유 결합된 PEG 모이어티를 포함하고, 여기서 상기 ^{10}Fn3 폴리펩티드는 표적에 100 nM 미만의 K_D로 결합하고, 청소율은 포유동물에서 30 mL/hr/kg 미만이다. PEG 모이어티는 부위 지정 peg화에 의해, 예를 들어 Cys 잔기에 대한 부착에 의해 ^{10}Fn3 폴리펩티드에 부착될 수 있고, 여기서 Cys 잔기는 ^{10}Fn3 폴리펩티드의 N-말단에, 또는 N-말단과 가장 N-말단의 베타 또는 베타-유사 스트랜드 사이에, 또는 ^{10}Fn3 폴리펩티드의 C-말단에, 또는 C-말단과 가장 C-말단의 베타 또는 베타-유사 스트랜드 사이에 위치할 수 있다. Cys 잔기는 또한 다른 위치에, 특히 표적 결합에 참여하지 않는 임의의 루프에 위치할 수 있다. PEG 모이어티는 또한 아민에 대한 컨쥬게이션을 포함한 다른 화학 방법에 의해 부착될 수 있다. 또한, 본 발명은 항체 모이어티 (예를 들어, 낙타 항체 및 그들의 유도체, 및 단일쇄 및 도메인 항체; 특히 미생물로부터 발현된 것) 및 항체-유사 모이어티 (예를 들어, 리포칼린의 유도체, 안키린, 다수 Cys-Cys 도메인, 및 테트라넥틴; 특히 미생물로부터 발현된 것), 특히 PEG에 의해 연결되는 40 kDa 미만의 것, 보다 특히 제한된 수의 cys 아미노산을 갖는 것에 상기 종류의 N 또는 C 말단 PEG 컨쥬게이션을 포함한다.

<178> 본 발명의 하나의 특정 실시태양에서, 가용형 폴리펩티드의 변형된 형태는 가용형 폴리펩티드를 비-단백질성 중합체에 연결하는 것을 포함한다. 하나의 특정 실시태양에서, 중합체는 미국 특허 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 또는 4,179,337에 기재된 것과 같은 방식으로 폴리에틸렌 글리콜 ("PEG"), 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리옥시알킬렌이다. 본 발명의 변형된 폴리펩티드의 예는 본원에 추가로 설명된 PEG화 단백질을 포함한다.

<179> PEG는 시판되거나 당업계에 잘 공지된 방법에 따라 에틸렌 글리콜의 개환 중합반응에 의해 제조될 수 있는 잘 공지된 수용성 중합체이다 (Sandler and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161). 용어 "PEG"는 크기 또는 PEG의 단부에서의 변형과 무관하게 임의의 폴리에틸렌 글리콜 분자를 포함하도록 넓은 의미로 사용되고, 다음 일반식으로 나타낼 수 있다:

<180> $X\text{-}O(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2OH$ (1)

<181> 식에서, n은 20 내지 2300이고, X는 H 또는 말단 변형, 예를 들어, C_{1-4} 알킬이다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 PEG는 하나의 단부에서 히드록시 또는 메톡시로 끝나고, 즉, X는 H 또는 CH_3 ("메톡시 PEG")이다. PEG는 결합 반응에 필수적인 추가의 화학기를 함유할 수 있고; 이는 분자의 화학적 합성으로부터 생성되거나; 분자의 일부의 최적 거리를 위한 스페이서 (spacer)이다. 또한, 상기 PEG는 함께 연결되는 하나 이상의 PEG 측쇄로 이루어질 수 있다. 하나 초과의 PEG 사슬을 갖는 PEG는 다중가지형 (multiarmed) 또는 분지형 PEG로 불린다. 분지형 PEG는 예를 들어, 폴리에틸렌 옥시드를 다양한 폴리올, 예를 들어 글리세롤, 펜타에리쓰리톨 및 소르비톨에 첨가하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 4-가지형 분지형 PEG는 펜타에리쓰리톨 및 에틸렌 옥시드로부터 제조할 수 있다. 분지형 PEG는 예를 들어, 유럽 특허 출원 공개 473084A 및 미국 특허 5,932,462에 설명되어 있다. PEG의 하나의 형태는 라이신의 일차 아미노기를 통해 연결된 2개의 PEG 측쇄 (PEG2)를 포함한다 (Monfardini, C, et al., Bioconjugate Chem. 6 (1995) 62-69).

<182> PEG는 잘 공지되어 있지만, 본 발명자들이 알기로는, 2개의 별개의 ^{10}Fn3 폴리펩티드가 peg화되고 리간드 결합 활성을 보유할 수 있음이 처음 입증되었다. 바람직한 실시태양에서, peg화된 ^{10}Fn3 폴리펩티드는 부위-지정 peg화, 특히 N- 또는 C-말단에서 시스테인 모이어티에 대한 PEG의 컨쥬게이션에 의해 제조된다. 따라서, 본원은 개선된 약동학 특성을 갖는 표적-결합 ^{10}Fn3 폴리펩티드를 제공하고, 상기 폴리펩티드는 약 80 내지 약 150개의 아미노산을 갖는 ^{10}Fn3 도메인 (여기서 상기 ^{10}Fn3 도메인의 루프 중 적어도 하나는 표적 결합에 참여한다); 및 공유 결합된 PEG 모이어티를 갖고, 여기서 상기 ^{10}Fn3 폴리펩티드는 표적에 100 nM 미만의 K_D로 결합하고 포유동물에서 30 mL/hr/kg 미만의 청소율을 갖는다. PEG 모이어티는 부위 지정 peg화에 의해, 예를 들어 Cys 잔기에 대한 부착에 의해 ^{10}Fn3 폴리펩티드에 부착될 수 있고, 여기서 Cys 잔기는 ^{10}Fn3 폴리펩티드의 N-말단에, 또는 N-말단과 가장 N-말단의 베타 또는 베타-유사 스트랜드 사이에, 또는 ^{10}Fn3 폴리펩티드의 C-말단에, 또는 C-말단과 가장 C-말단의 베타 또는 베타-유사 스트랜드 사이에 위치할 수 있다. Cys 잔기는 또한 다른 위치에, 특히 표적 결합에 참여하지 않는 임의의 루프에 위치할 수 있다. PEG 모이어티는 또한 아민에 대한 컨쥬게이션을 포함한 다른 화학에 의해 부착될 수 있다.

<183> 펩티드 또는 단백질에 대한 PEG 컨쥬게이션에는 일반적으로 PEG의 활성화, 및 활성화된 PEG-중간체의 표적 단백질/펩티드에 대한 직접적인, 또는 후속적으로 활성화되어 표적 단백질/펩티드에 커플링되는 링커에 대한 커플링을 포함한다 ([Abuchowski, A. et al, J. Biol. Chem., 252, 3571 (1977)] 및 [J. Biol. Chem., 252, 3582 (1977)], [Zalipsky, et al., and Harris et. al., in: Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications; (J. M. Harris ed.) Plenum Press: New York, 1992; Chap.21 and 22] 참조). PEG 분자를 함유하는 결합 폴리펩티드는 컨쥬게이팅된 단백질로서 또한 알려져 있는 반면, 부착된 PEG 분자가 없는 단백질은 비컨쥬게이팅된 것으로 언급할 수 있음에 주목한다.

<184> 본 발명의 결합 폴리펩티드에 컨쥬게이팅하기 위해, 예를 들어 약 1,000 달톤 (Da) 내지 100,000 Da (n은 20 내지 2300임)의 다양한 분자 질량 형태의 PEG를 선택할 수 있다. PEG 내의 반복 단위 "n"의 수는 달톤으로 기재된 분자 질량에 대해 어림잡는다. 활성화된 링커 상의 PEG의 합한 분자 질량은 제약 용도에 적합한 것이 바람직하다. 따라서, 하나의 실시태양에서, PEG 분자의 분자 질량은 100,000 Da을 초과하지 않는다. 예를 들어, 3개의 PEG 분자가 링커에 부착되면, 각각의 PEG 분자가 12,000 Da의 동일한 분자 질량 (각각의 n은 약 270임)을 갖는 경우에, 링커 상의 PEG의 총 분자 질량은 약 36,000 Da (총 n은 약 820임)이다. 링커에 부착된 PEG의 분

자 질량은 또한 상이할 수 있고, 예를 들어, 링커 상의 3개의 분자 중에 2개의 PEG 분자는 각각 5,000 Da (각각의 n은 약 110임)일 수 있고, 하나의 PEG 분자는 12,000 Da (n은 약 270임)일 수 있다.

<185> 본 발명의 특정 실시태양에서, IGF-IR 또는 다른 수용체 결합 폴리펩티드는 화학식 $-CO-(CH_2)_x-(OCH_2CH_2)_m-OR$의 하나의 폴리(에틸렌 글리콜)기에 공유 결합되고, 폴리(에틸렌 글리콜)기의 -CO (즉, 카르보닐)은 결합 폴리펩티드의 아미노기 중 하나와 아미드 결합을 형성하고; 식에서, R은 저급 알킬이고; x는 2 또는 3이고; m은 약 450 내지 약 950이고; n 및 m은 컨쥬게이트 - 결합 폴리펩티드의 분자량이 약 10 내지 40 kDa이 되도록 선택된다. 하나의 실시태양에서, 라이신의 결합 폴리펩티드의 ε-아미노기가 이용가능한 (유리) 아미노기이다.

<186> 상기 컨쥬게이트는 보다 구체적으로 화학식 (II)로 표시될 수 있다:

<187> $P-NHCO-(CH_2)_X-(OCH_2CH_2)_m-OR$ (II),

<188> 식에서, P는 본원에 기재된 결합 폴리펩티드의 기이고 (즉, 화학식 (II)에 제시된 카르보닐과 아미드 연결을 형성하는 아미노기(들)을 갖지 않는); R은 저급 알킬이고; x는 2 또는 3이고; m은 약 450 내지 약 950이고, 컨쥬게이트 - 결합 폴리펩티드의 분자량이 약 10 내지 약 40 kDa이 되도록 선택된다. 본원에서 사용될 때, "m"의 주어진 범위는 배향적 의미를 갖는다. "m"의 범위는 어떠한 경우에도 PEG기의 분자량에 의해 정확하게 결정된다.

<189> 당업자는 예를 들어, peg화된 결합 폴리펩티드가 치료 목적으로 사용될 방식, 목적하는 투여량, 순환 시간, 단백분해에 대한 내성, 면역원성 및 다른 고려사항에 기초하여 PEG에 대한 적합한 분자 질량을 선택할 수 있다. PEG 및 단백질의 특성을 향상시키기 위한 그의 사용에 대한 논의는 문헌 [N.V. Katre, Advanced Drug Delivery Reviews 10: 91-114 (1993)]을 참조한다.

<190> 본 발명의 하나의 실시태양에서, PEG 분자는 결합 폴리펩티드 상의 아미노기, 예를 들어 라이신과 반응하도록 활성화될 수 있다 ([Bencham C.O. et al., Anal. Biochem., 131, 25 (1983)]; [Veronese, F.M. et al., Appl. Biochem., 11, 141 (1985)]; [Zalipsky, S. et al., Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems, adrs 9-110 ACS Symposium Series 469 (1999)]; [Zalipsky, S. et al., Europ. Polym. J., 19, 1177-1183 (1983)]; [Delgado, C. et al., Biotechnology and Applied Biochemistry, 12, 119-128 (1990)]).

<191> 하나의 특정 실시태양에서, PEG의 카르보네이트 에스테르가 PEG-결합 폴리펩티드 컨쥬게이트를 형성하기 위해 사용된다. N,N'-디숙신이미딜 카르보네이트 (DSC)는 PEG와의 반응에 사용되어 활성 혼합형 PEG-숙신이미딜 카르보네이트를 형성할 수 있고, 이는 후속적으로 링커의 친핵기 또는 결합 폴리펩티드의 아미노기와 반응할 수 있다 (미국 특허 5,281,698 및 미국 특허 5,932,462 참조). 유사한 종류의 반응에서, 1,1'-(디벤조트리아졸)카르보네이트 및 디-(2-피리딜)카르보네이트는 PEG와 반응하여 각각 PEG-벤조트리아졸 및 PEG-피리딜 혼합 카르보네이트를 형성할 수 있다 (미국 특허 5,382,657).

<192> ^{10}Fn3 폴리펩티드의 Peg화는 당업계의 기술 상태의 방법에 따라, 예를 들어 결합 폴리펩티드와 친전자 활성 PEG (공급처: 쉬어워터 코프. (Shearwater Corp., 미국), www.shearwatercorp.com)의 반응에 의해 수행할 수 있다. 본 발명의 바람직한 PEG 시약은 예를 들어 N-히드록시숙신이미딜 프로피오네이트 (PEG-SPA), 부타노에이트 (PEG-SBA), PEG-숙신이미딜 프로피오네이트 또는 분지형 N-히드록시숙신이미드, 예를 들어 mPEG2-NHS이다 (Monfardini, C, et al., Bioconjugate Chem. 6 (1995) 62-69). 상기 방법은 결합 폴리펩티드 라이신의 ε-아미노기 또는 결합 폴리펩티드의 N-말단 아미노기에서 peg화되도록 사용될 수 있다.

<193> 다른 실시태양에서, PEG 분자는 결합 폴리펩티드 상의 술프히드릴기에 커플링될 수 있다 ([Sartore, L., et al., Appl. Biochem. Biotechnol., 27, 45 (1991)]; [Morpurgo et al., Biocon. Chem., 7, 363-368 (1996)]; [Goodson et al., Bio/Technology (1990) 8, 343]; 미국 특허 5,766,897). 미국 특허 6,610,281 및 5,766,897에서는 술프히드릴기에 커플링될 수 있는 예시적인 반응성 PEG 종이 설명되어 있다.

<194> PEG 분자가 결합 폴리펩티드 상의 시스테인 잔기에 컨쥬게이팅되는 일부 실시태양에서, 시스테인 잔기는 결합 폴리펩티드에 고유한 것인 반면, 다른 실시태양에서, 하나 이상의 시스테인 잔기는 결합 폴리펩티드 내로 공학처리된다. 시스테인 잔기를 생성하도록 결합 폴리펩티드 코딩 서열 내로 돌연변이가 도입될 수 있다. 이는 예를 들어 하나 이상의 아미노산 잔기를 시스테인으로 돌연변이시킴으로써 달성할 수 있다. 시스테인 잔기로 돌연변이시키기 위해 바람직한 아미노산은 세린, 트레오닌, 알라닌 및 다른 친수성 잔기를 포함한다. 바람직하게는, 시스테인으로 돌연변이될 잔기는 표면-노출 잔기이다. 1차 서열 또는 단백질에 기초하여 잔기의 표면 접근 가능성을 예측하기 위한 알고리즘은 당업계에 잘 공지되어 있다. 별법으로, 결합 폴리펩티드가 그를 기초로 하

여 설계되고 전개되는 프레임워크의 결정 구조가 설명된다면 (Himanen et al., Nature. (2001) 20-27;414(6866):933-8 참조), 표면 잔기는 결합 폴리펩티드의 아미노산 서열을 비교함으로써 예측될 수 있고, 따라서 표면-노출된 잔기가 확인된다. 하나의 실시태양에서, 시스테인 잔기는 N- 및/또는 C-말단에서 또는 그 부근에서 또는 루프 구역 내에서 결합 폴리펩티드 내로 도입된다.

<195> 일부 실시태양에서, peg화된 결합 폴리펩티드는 N-말단 아미노산의 알파 아미노기에 공유 부착된 PEG 분자를 포함한다. 부위 특이적 N-말단 환원적 아민화는 문헌 [Pepinsky et al., (2001) JPET,297,1059] 및 미국 특허 5,824,784에 설명되어 있다. 다른 이용가능한 친핵 아미노기를 이용하는 단백질의 환원적 아민화를 위한 PEG-알데히드의 사용은 미국 특허 4,002,531, 문헌 ([Wieder et al., (1979) J. Biol. Chem. 254,12579] 및 [Chamow et al., (1994) Bioconjugate Chem. 5, 133])에 설명되어 있다.

<196> 다른 실시태양에서, peg화된 결합 폴리펩티드는 링커에 공유 부착된 하나 이상의 PEG 분자를 포함하고, 링커는 다시 결합 폴리펩티드의 N-말단에서 아미노산 잔기의 알파 아미노기에 부착된다. 상기 방안은 미국 특허 공개 2002/0044921 및 PCT 공개 WO94/01451에 개시되어 있다.

<197> 하나의 실시태양에서, 결합 폴리펩티드는 C-말단에서 peg화된다. 특정 실시태양에서, 단백질은 C-말단 아지도-메티오닌의 도입 및 스타우딩거 (Staudinger) 반응을 통한 메틸-PEG-트리아릴포스핀 화합물의 후속적인 컨쥬게이션에 의해 C-말단에서 peg화된다. 상기 C-말단 컨쥬게이션 방법은 문헌 [Cazalis et al., C-Terminal Site-Specific PEGylation of a Truncated Thrombomodulin Mutant with Retention of Full Bioactivity, Bioconjug Chem. 2004;15(5):1005-1009]에 기재되어 있다.

<198> 결합 폴리펩티드의 모노peg화는 또한 PCT 공개 WO94/01451에 기재된 일반적인 방법에 따라 이루어질 수 있다. WO94/01451에서는 변형된 말단 아미노산 알파-탄소 반응기를 갖는 재조합 폴리펩티드를 제조하기 위한 방법을 설명하고 있다. 방법의 단계는 재조합 폴리펩티드를 형성하고, 그를 N-말단 알파-아민 및 C-말단 알파-카르복실에서 하나 이상의 생물학적으로 첨가된 보호기로 보호하는 것을 포함한다. 이어서, 폴리펩티드는 반응성 측쇄기를 선택적으로 보호하여 측쇄기가 변형되는 것을 방지하도록 화학적 보호제와 반응될 수 있다. 이어서, 폴리펩티드 는 생물학적 보호기에 특이적인 절단 시약으로 절단되어 비보호된 말단 아미노산 알파-탄소 반응기를 형성한다. 비보호된 말단 아미노산 알파-탄소 반응기는 화학 변형제를 사용하여 변형시킨다. 이어서, 측쇄 보호된 말단 변형된 단일 카피 폴리펩티드는 측쇄기에서 탈보호되어 말단 변형된 재조합 단일 카피 폴리펩티드를 형성한다. 방법에서 단계의 수와 순서는 폴리펩티드의 N- 및/또는 C-말단 아미노산의 선택적 변형을 달성하도록 변할 수 있다.

<199> 컨쥬게이션 반응에서 결합 폴리펩티드 대 활성화된 PEG의 비는 약 1:0.5 내지 1:50, 약 1:1 내지 1:30, 또는 약 1:5 내지 1:15일 수 있다. 결합 폴리펩티드에 대한 PEG의 공유 첨가를 촉매하기 위해 다양한 수성 버퍼가 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 하나의 실시태양에서, 사용된 버퍼의 pH는 약 7.0 내지 9.0이다. 다른 실시태양에서, pH는 약염기성 범위, 예를 들어, 약 7.5 내지 8.5이다. 중성 pH 범위에 가까운 pKa를 갖는 버퍼, 예를 들어, 포스페이트 버퍼를 사용할 수 있다. 다중-특이적 PEG 연결된 단백질을 제조할 때, 약 1:4 내지 1:8, 또는 약 1:3 내지 1:5와 같은 다른 비가 사용될 것이다.

<200> PEG화된 결합 폴리펩티드를 정제하기 위해 당업계에 공지된 통상적인 분리 및 정제 기술, 예를 들어 크기-배제 (예를 들어, 겔 여과) 및 이온 교환 크로마토그래피를 사용할 수 있다. 생성물은 또한 SDS-PAGE를 사용하여 분리될 수 있다. 분리될 수 있는 생성물은 모노-, 디-, 트리- 폴리- 및 비-peg화된 결합 폴리펩티드, 및 유리 PEG를 포함한다. 모노-PEG 컨쥬게이트의 백분율은 조성물 내의 모노-PEG의 백분율을 증가시키기 위해 용출 피크 부근의 보다 넓은 분획을 모음으로써 제어될 수 있다. 약 90% 모노-PEG 컨쥬게이트는 수율 및 활성의 우수한 균형을 나타낸다. 예를 들어, 적어도 92% 또는 적어도 96%의 컨쥬게이트가 모노-PEG 종인 조성물이 바람직할 수 있다. 본 발명의 실시태양에서, 모노-PEG 컨쥬게이트의 백분율은 90% 내지 96%이다.

<201> 하나의 실시태양에서, 본 발명의 PEG화된 결합 폴리펩티드는 하나 또는 2개 이상의 PEG 모이어티를 함유한다. 하나의 실시태양에서, PEG 모이어티(들)은 단백질의 표면 상에 있는 및/또는 표적 리간드에 접촉하는 표면에서 먼 아미노산 잔기에 결합된다. 하나의 실시태양에서, PEG-결합 폴리펩티드 내의 PEG의 합한 또는 총 분자 질량은 약 3,000 Da 내지 60,000 Da, 임의로 약 10,000 Da 내지 36,000 Da이다. 하나의 실시태양에서, peg화된 결합 폴리펩티드 내의 PEG는 실질적으로 선형 직쇄형 PEG이다.

<202> 본 발명의 하나의 실시태양에서, peg화된 결합 폴리펩티드 내의 PEG는 peg화된 아미노산 잔기로부터 히드록실라민 분석, 예를 들어, 실온에서 8 내지 16시간에 걸쳐 450 mM 히드록실라민 (pH 6.5)을 사용하여 가수분해되지

않고, 따라서 안정하다. 하나의 실시태양에서, 조성물의 80% 초과, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 가장 바람직하게는 적어도 95%가 안정한 모노-PEG-결합 폴리펩티드이다.

<203> 다른 실시태양에서, 본 발명의 peg화된 결합 폴리펩티드는 바람직하게는 적어도 약 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 비변형된 단백질과 연관된 생물학적 활성을 보유할 것이다. 하나의 실시태양에서, 생물학적 활성은 K_D, k_{on} 또는 k_{off}에 의해 평가할 때 VEGFR-2 또는 IGF-IR에 결합하는 그의 능력을 나타낸다.

하나의 특정 실시태양에서, peg화된 결합 폴리펩티드 단백질은 peg화되지 않은 결합 폴리펩티드에 비해 VEGFR 또는 IGF-IR에 대한 결합이 증가한다.

<204> PEG-변형 폴리펩티드의 혈청 청소율은 비변형된 결합 폴리펩티드의 청소율에 비해 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 심지어 90% 감소할 수 있다. PEG-변형 폴리펩티드는 반감기 ($t_{1/2}$)가 비변형된 단백질의 반감기에 비해 향상될 수 있다. PEG-결합 폴리펩티드의 반감기는 비변형된 단백질의 반감기에 비해 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 400% 또는 500%, 또는 심지어 1000% 향상될 수 있다. 일부 실시태양에서, 단백질 반감기는 시험관 내에서, 예를 들어 완충 염수 용액 내에서 또는 혈청 내에서 결정된다. 다른 실시태양에서, 단백질 반감기는 생체내 반감기, 예를 들어 동물의 혈청 또는 다른 체액 내의 단백질의 반감기이다.

<205> **추가의 벡터 & 폴리뉴클레오티드 실시태양**

<206> 본원에 개시된 임의의 다양한 단백질 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 화학적으로 합성할 수 있다. 코돈 사용방식 (usage)은 세포 내에서 발현을 개선하도록 선택할 수 있다. 상기 코돈 사용방식은 선택된 세포 종류에 따를 것이다. 특수한 코돈 사용방식 패턴이 이. 콜라이 및 다른 세균, 및 포유동물 세포, 식물 세포, 효모 세포 및 곤충 세포에 대해 개발되었다 (예를 들어, 문헌 ([Mayfield et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jan 21;100(2):438-42]; [Sinclair et al. Protein Expr Purif. 2002 Oct;26(1):96-105]; [Connell ND. Curr Opin Biotechnol. 2001 Oct;12(5):446-9]; [Makrides et al. Microbiol Rev. 1996 Sep;60(3):512-38]; 및 [Sharp et al. Yeast. 1991 Oct;7(7):657-78]) 참조).

<207> 핵산 조작을 위한 일반적인 기술은 예를 들어 본원에 참조로 포함시킨 문헌 ([Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ed., 1989] 또는 [F. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing and Wiley-Interscience: New York, 1987]) 및 주기적 개정판에 설명되어 있다. 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포유동물, 바이러스, 또는 곤충 유전자로부터 유래된 적합한 전사 또는 번역 조절 요소에 작동가능하게 연결시킨다. 상기 조절 요소는 전사 프로모터, 전사를 제어하는 선택적인 작동유전자 (operator) 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 번역의 종료를 제어하는 서열을 포함한다. 대체로 복제 기점에 의해 부여되는 숙주 내에서 복제하는 능력, 및 형질전환체의 인식을 용이하게 하기 위한 선택 유전자가 추가로 포함된다.

<208> 본 발명의 단백질은 재조합 방식으로 직접적으로뿐만 아니라, 바람직하게는 신호 서열, 또는 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에서 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드인 이종성 폴리펩티드와의 융합 폴리펩티드로서 제조할 수 있다. 선택된 이종성 신호 서열은 바람직하게는 숙주 세포에 의해 인식되고 처리되는 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단되는) 것이다. 천연 신호 서열에 의해 인식되고 처리되지 않는 원핵생물 숙주 세포에 대해, 신호 서열은 예를 들어, 알칼린 포스파타제, 페니실리나제, lpp, 또는 열-안정성 장독소 II 리더 (leader)의 군 중에서 선택된 원핵생물 신호 서열에 의해 치환된다. 효모 분비를 위해, 천연 신호 서열은 예를 들어, 효모 인버타제 (invertase) 리더, 인자 리더 (사카로마이세스 (*Saccharomyces*) 및 클루이베로마이세스 (*Kluyveromyces*) α-인자 리더 포함), 또는 산 포스파타제 리더, 씨. 알비칸스 (*C. albicans*) 글루코아밀라제 리더, 또는 PCT 공개 WO90/13646에 설명된 신호에 의해 치환될 수 있다. 포유동물 세포 발현에서, 포유동물 신호 서열 및 바이러스 분비 리더, 예를 들어, 헤르페스 심플렉스 gD 신호가 이용가능하다. 상기 전구체 유전자에 대한 DNA는 판독 프레임 내에서 단백질을 코딩하는 DNA에 라이게이팅될 수 있다.

<209> 발현 및 클로닝 벡터는 모두 벡터가 하나 이상의 선택된 숙주 세포 내에서 복제하도록 하는 핵산 서열을 함유한다. 일반적으로, 클로닝 벡터에서, 상기 서열은 벡터가 숙주 염색체 DNA와 관계없이 복제할 수 있도록 하는 것이고, 복제 기점 또는 자동 복제하는 서열을 포함한다. 그러한 서열은 다양한 세균, 효모 및 바이러스에 대해 잘 알려져 있다. 플라스미드 pBR322로부터의 복제 기점이 대부분의 그람 음성 세균에 대해 적합하고, 2μ 플라스미드 기점이 효모에 대해 적합하고, 다양한 바이러스 기점 (SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, VSV 또는 BPV)이 포유동물 세포에서 클로닝 벡터를 위해 유용하다. 일반적으로, 복제 기점 성분은 포유동물 발현 벡터에 대

해 필요하지 않다 (SV40 기점은 대개 단지 조기 프로모터를 함유하기 때문에 사용될 수 있다).

<210> 발현 및 클로닝 벡터는 또한 선택가능 마커로도 칭하는 선택 유전자를 함유할 수 있다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어, 암피실린, 네오마이신, 메토트렉세이트, 또는 테트라사이클린에 대한 내성을 부여하거나, (b) 영양요구 결핍을 보완하거나, (c) 복합 배지로부터 이용가능하지 않은 중요한 영양분을 공급하는 단백질을 코딩하고, 예를 들어, 바실러스 (Bacilli)에 대한 D-알라닌 라세마제 (racemase)를 코딩하는 유전자가 있다.

<211> 선택 계획의 한 예는 숙주 세포의 성장을 중지시키는 약물을 이용하는 것이다. 이종성 유전자로 성공적으로 형질전환되는 세포는 약물 내성을 부여하는 단백질을 생산하고, 따라서 선택 계획에서 생존한다. 그러한 우성 선택의 예는 약물 네오마이신, 마이코페놀산 및 하이그로마이신을 사용한다.

<212> 포유동물 또는 진핵 세포에 대한 적합한 선택가능 마커의 다른 예는 다가 항체 핵산을 흡수하기 위해 유능한 세포의 확인을 가능하게 하는 것, 예를 들어 DHFR, 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영장류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 탈아미노효소, 오르니틴 탈카르복실효소 등이다.

<213> 예를 들어, DHFR 선택 유전자로 형질전환된 세포는 먼저 모든 형질전환체를 DHFR의 경쟁적 길항제인 메토트렉세이트 (Mtx)를 함유하는 배양 배지 내에서 배양함으로써 확인된다. 야생형 DHFR이 사용될 때 적절한 숙주 세포는 DHFR 활성이 결핍되는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포주이다.

<214> 별법으로, 다가 항체, 야생형 DHFR 단백질, 및 다른 선택가능 마커, 예를 들어 아미노글리코시드 3'-포스포트랜스퍼라제 (APH)를 코딩하는 DNA 서열로 형질전환되거나 동시-형질전환된 숙주 세포 (특히 내인성 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)는 선택가능 마커에 대한 선택제, 예를 들어 아미노글리코시드 항생제, 예를 들어, 카나마이신, 네오마이신 또는 G418을 함유하는 배지 내에서 세포 성장에 의해 선택할 수 있다 (미국 특허 4,965,199 참조).

<215> 효모에서 사용하기에 적합한 선택 유전자는 효모 플라스미드 YRp7에 존재하는 trp1 유전자이다 (Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979)). trp1 유전자는 트립토판 내에서 성장하는 능력이 결핍되는 효모의 돌연변이체 균주, 예를 들어, ATCC No. 44076 또는 PEP4-1에 대한 선택 마커를 제공한다 (Jones, Genetics, 85:12 (1977)). 이어서, 효모 숙주 세포 게놈 내의 trp1 병소의 존재는 트립토판의 부재 하의 성장에 의해 형질전환을 검출하기 위한 효과적인 환경을 제공한다. 이와 유사하게, Leu2-결핍 효모 균주 (ATCC 20,622 또는 38,626)는 Leu2 유전자를 보유하는 공지의 플라스미드에 의해 보완된다.

<216> 또한, 1.6 μm 원형 플라스미드 pKD1로부터 유래된 벡터는 클루이베로마이세스 효모의 형질전환을 위해 사용될 수 있다. 별법으로, 케이. 락티스 (*K. lactis*)에 대한 재조합 송아지 키모신의 대규모 생산을 위한 발현 시스템이 보고되었다 (Van den Berg, Bio/Technology, 8:135 (1990)). 클루이베로마이세스의 산업용 균주에 의한 성숙 재조합 인간 혈청 알부민의 분비를 위한 안정한 다수-카피 발현 벡터가 또한 개시되었다 (Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)).

<217> 발현 및 클로닝 벡터는 대체로 숙주 유기체에 의해 인식되고, 본 발명의 단백질, 예를 들어 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질을 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결되는 프로모터를 함유한다. 원핵생물 숙주에서 사용하기에 적합한 프로모터는 phoA 프로모터, 베타-락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 알칼린 포스파타제, 트립토판 (trp) 프로모터 시스템, 및 하이브리드 프로모터, 예를 들어 tac 프로모터를 포함한다. 그러나, 다른 공지의 세균 프로모터가 적합하다. 세균 시스템에서 사용하기 위한 프로모터는 또한 본 발명의 단백질을 코딩하는 DNA에 작동가능하게 연결된 샤인-달가노 (Shine-Dalgarno: S.D.) 서열을 함유할 것이다.

<218> 진핵생물에 대한 프로모터 서열이 공지되어 있다. 실질적으로 모든 진핵생물 유전자는 전사가 개시되는 부위로부터 약 25 내지 30개 염기 상류에 위치하는 AT-풍부 구역을 갖는다. 많은 유전자의 전사의 개시로부터 70 내지 80개 염기 상류에서 발견되는 다른 서열은 CNCAAT 구역이고, 여기서 N은 임의의 뉴클레오티드일 수 있다. 대부분의 진핵생물 유전자의 3' 단부에, 코딩 서열의 3' 단부에 폴리 A 테일의 첨가를 위한 신호일 수 있는 AATAAA 서열이 존재한다. 이들 서열은 모두 진핵생물 발현 벡터 내로 적합하게 삽입된다.

<219> 효모 숙주에서 사용하기 위한 적합한 촉진 서열의 예는 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 당분해 효소, 예를 들어 에놀라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소효소, 헥소키나제, 파이루베이트 탈카르복실효소, 포스포프룩토키나제, 글루코스-6-포스페이트 이소머라제, 3-포스포글리세레이트 뮤타제, 파이루베이트 키나제, 트리오스포스페이트 이소머라제, 포스포글루코스 이소머라제, 및 글루코키나제에 대한 프로모터를 포함한다.

<220> 성장 조건에 의해 제어되는 전사의 추가의 잇점을 갖는 유도가능 프로모터인 다른 효모 프로모터는 알콜 탈수소

효소 2, 이소사이토크롬 C, 산 포스파타제, 질소 대사와 연관된 분해 효소, 메탈로티오네인, 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소효소, 및 말토스 및 갈락토스 활용을 담당하는 효소에 대한 프로모터 구역이다. 효모 발현에 사용하기 위한 적합한 벡터 및 프로모터는 EP 특허 공개 73,657에 추가로 설명되어 있다. 효모 인핸서(enhancer)가 또한 효모 프로모터와 함께 유리하게 사용된다.

<221> 포유동물 숙주 세포 내에서 벡터로부터의 전사는 예를 들어, 프로모터가 숙주 세포 시스템에 적합하다면 폴리오마 바이러스, 조류폭스 바이러스, 아데노바이러스 (예를 들어 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이노메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 가장 바람직하게는 원숭이 바이러스 40 (SV40)와 같은 바이러스의 게놈으로부터, 이종성 포유동물 프로모터, 예를 들어, 액틴 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터로부터, 열-쇼크 프로모터로부터 얻은 프로모터에 의해 제어될 수 있다.

<222> SV40 바이러스의 조기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스 복제 기점을 또한 함유하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 얻어진다. 인간 사이노메갈로바이러스의 최조기 프로모터는 HindIII E 제한 단편으로서 편리하게 얻어진다. 벡터로서 소 유두종 바이러스를 사용하여 포유동물 숙주 내에서 DNA를 발현하기 위한 시스템은 미국 특허 4,419,446에 개시되어 있다. 상기 시스템의 변형은 미국 특허 4,601,978에 설명되어 있다. 헤르페스 심플렉스 바이러스로부터의 티미딘 키나제 프로모터의 제어 하에 마우스 세포 내에서 인간 β-인터페론 cDNA의 발현에 대해서는 또한 문헌 [Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982)]을 참조한다. 별법으로, 라우스 (rous) 육종 바이러스 긴 말단 반복부 (long terminal repeat)가 프로모터로서 사용될 수 있다.

<223> 보다 고등한 진핵생물에 의한 본 발명의 단백질을 코딩하는 DNA의 전사는 인핸서 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 종종 증가된다. 포유동물 유전자 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, α-페토단백질, 및 인슐린)로부터 많은 인핸서 서열이 현재 알려져 있다. 그러나, 일반적으로, 진핵 세포 바이러스로부터의 인핸서를 사용할 것이다. 그 예로는 복제 기점 (bp 100-270)의 후기 측면 상의 SV40 인핸서, 사이노메갈로바이러스 조기 프로모터 인핸서, 복제 기점의 후기 측면 상의 폴리오마 인핸서, 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다. 진핵생물 프로모터의 활성화를 위한 강화 요소에 대해서는 또한 문헌 [Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)]을 참조한다. 인핸서는 다가 항체-코딩 서열에 대해 위치 5' 또는 3'에서 벡터 내로 스플라이싱될 수 있지만, 바람직하게는 프로모터로부터 부위 5'에 위치한다.

<224> 진핵 숙주 세포 (예를 들어, 효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간, 또는 다른 다세포 유기체로부터의 유핵 세포)에서 사용되는 발현 벡터는 또한 전사의 종료 및 mRNA의 안정화를 위해 필요한 서열을 함유할 것이다. 그러한 서열은 진핵생물 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 때때로 3' 비번역 구역으로부터 일반적으로 이용가능하다. 이들 구역은 다가 항체를 코딩하는 mRNA의 비번역 부분에서 폴리아데닐화 단편으로서 전사된 뉴클레오티드 절편을 함유한다. 하나의 유용한 전사 종료 성분은 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 구역이다 (WO94/11026 및 여기에 개시된 발현 벡터 참조).

<225> 재조합 DNA는 단백질을 정제하기 위해 유용할 수 있는 임의의 종류의 단백질 태그 서열을 또한 포함할 수 있다. 단백질 태그의 예는 히스티딘 태그, FLAG 태그, myc 태그, HA 태그, 또는 GST 태그를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 세균, 진균, 효모 및 포유동물 세포 숙주에서 사용하기 위한 적절한 클로닝 및 발현 벡터는 그의 관련 내용을 본원에 참조로 포함시킨 문헌 [Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985]에서 찾을 수 있다.

<226> 발현 구성체는 당업자에게 명백할 바와 같이 숙주 세포에 적절한 방법을 이용하여 숙주 세포 내로 도입된다. 핵산을 숙주 세포 내로 도입하기 위한 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있고, 전기천공; 염화칼슘, 염화루비듐, 인산칼슘, DEAE-덱스트란 또는 다른 물질을 사용한 형질감염; 유전자총 충격 (microprojectile bombardment); 리포펙션 (lipofection); 및 감염 (벡터가 감염제인 경우)을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

<227> 적합한 숙주 세포는 원핵생물, 효모, 포유동물 세포, 또는 세균 세포를 포함한다. 적합한 세균은 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예를 들어, 이. 콜라이 또는 바실러스 종을 포함한다. 바람직하게는 사카로마이세스 종, 예를 들어 에스. 세레비지애 (*S. cerevisiae*)로부터의 효모가 또한 폴리펩티드의 생산을 위해 사용될 수 있다. 다양한 포유동물 또는 곤충 세포 배양 시스템이 또한 재조합 단백질을 발현하기 위해 사용될 수 있다. 곤충 세포에서 이종성 단백질의 생산을 위한 바큘로바이러스 (*Baculovirus*) 시스템은 문헌 [Luckow and Summers, Bio/Technology, 6:47, 1988]에서 검토되었다. 적합한 포유동물 숙주 세포주의 예는 내피 세포, COS-7 원숭이 신장 세포, CV-1, L 세포, C127, 3T3, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO), 인간 배아 신장 세포, HeLa, 293, 293T 및 BHK 세포주를 포함한다. 정제된 폴리펩티드는 재조합 단백질을 발현하도록 적합한 숙주/벡터 시스템을 배양함으로써 제조된다. 많은 용도에 대해, 본원에 개시된 많은 폴리펩티드의 작은 크기로 인해 이. 콜라이 내에서

발현이 바람직한 발현 방법이 된다. 이어서, 단백질은 배양 배지 또는 세포 추출물로부터 정제된다.

<228> **추가의 발현 & 세포 실시태양**

<229> 생산 및 세포 실시태양을 위해 바람직한 단백질은 피브로넥틴 기반 스캐폴드 및 관련 단백질이다. 본원의 벡터 내에서 DNA를 클로닝 또는 발현하기 위한 적합한 숙주 세포는 상기 설명된 원핵생물, 효모 또는 보다 고등한 진핵 세포이다. 상기 목적에 적합한 원핵생물은 진정세균 (eubacteria), 예를 들어 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예를 들어, 장내세균과 (*Enterobacteriaceae*), 예를 들어 에스케리치아 (*Escherichia*), 예를 들어, 이. 콜라이, 엔테로박터 (*Enterobacter*), 어위니아 (*Erwinia*), 클렙시엘라 (*Klebsiella*), 프로테우스 (*Proteus*), 살모넬라 (*Salmonella*), 예를 들어, 살모넬라 티피무륨 (*S. typhimurium*), 세라티아 (*Serratia*), 예를 들어, 세라티아 마르세스칸스 (*S. marcescans*) 및 쉬겔라 (*Shigella*), 및 바실러스, 예를 들어 비. 섭틸리스 (*B. subtilis*) 및 비. 리체니포르미스 (*B. licheniformis*) (예를 들어, 1989년 4월 12일 공개된 DD 266,710에 개시된 비. 리체니포르미스 41P), 슈도모나스 (*Pseudomonas*), 예를 들어 피. 애루기노사 (*P. aeruginosa*), 및 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*)를 포함한다. 하나의 바람직한 이. 콜라이 클로닝 숙주는 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446)이지만, 이. 콜라이 B, 이. 콜라이 X1776 (ATCC 31,537) 및 이. 콜라이 W3110 (ATCC 27,325)와 같은 다른 균주도 적합하다. 이들 예는 제한적이라기보다는 예시적이다.

<230> 원핵생물 외에, 진핵 미생물, 예를 들어 사상 (filamentous) 진균 또는 효모가 단백질-코딩 벡터에 대한 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로마이세스 세레비지애, 또는 일반적인 제빵용 효모가 저등 진핵 숙주 미생물 사이에서 가장 일반적으로 사용된다. 그러나, 많은 다른 속, 종 및 균주, 예를 들어 쉬조사카로마이세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*); 클루이베로마이세스 숙주, 예를 들어, 케이. 락티스 (*K. lactis*), 케이 프래질리스 (*K. fragilis*) (ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045), 케이. 위커라미이 (*K. wickeramii*) (ATCC 24,178), 케이. 왈티이 (*K. waltii*) (ATCC 56,500), 케이. 드로소필라룸 (*K. drosophilarum*) (ATCC 36,906), 케이. 터모톨레란스 (*K. thermotolerans*) 및 케이. 마륵시아누스 (*K. marxianus*); 야로위아 (*yarrowia*) (EP 특허 공개 402,226); 피치아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) (EP 특허 공개 183,070); 칸디다 (*Candida*); 트리코더마 레에시아 (*Trichoderma reesia*) (EP 특허 공개 244,234); 뉴로스포라 크라싸 (*Neurospora crassa*); 쉬와니오마이세스 (*Schwanniomyces*), 예를 들어 쉬와니오마이세스 옥시덴탈리스 (*S. occidentalis*); 및 사상 진균, 예를 들어, 뉴로스포라 (*Neurospora*), 페니실륨 (*Penicillium*), 톨리포클라듐 (*Tolypocladium*), 및 아스페르길루스 (*Aspergillus*) 숙주, 예를 들어 에이. 니둘란스 (*A. nidulans*) 및 에이. 니거 (*A. niger*)가 일반적으로 이용가능하고 본원에서 유용하다.

<231> 본 발명의 글리코실화된 단백질의 발현을 위한 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유도된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 수많은 바큘로바이러스 균주 및 변이체 및 상응하는 허용 곤충 숙주 세포, 예를 들어 스포돕테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*) (유충), 애데스 애집시 (*Aedes aegypti*) (모기), 애데스 알보픽투스 (*Aedes albopictus*) (모기), 드로소필라 멜라노가스테르 (*Drosophila melanogaster*) (과일파리), 및 봄빅스 모리 (*Bombyx mori*)가 확인되었다. 형질감염을 위한 다양한 바이러스 균주는 공공으로 이용가능하고, 예를 들어, 오토그라파 캘리포르니카 (*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이체 및 봄빅스 모리 NPV의 Bm-5 균주를 포함하고, 상기 바이러스는 특히 스포돕테라 프루기페르다 세포의 형질감염을 위해 본 발명에 따른 바이러스로서 사용될 수 있다.

<232> 일부 경우에, 척추동물 세포에서 단백질을 생산하는 것이 요구될 것이고, 예를 들어, 배양액 (조직 배양액) 내에서 척추동물 세포의 증식 및 글리코실화는 일상적인 방법이 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장주 (현탁 배양으로 성장을 위해 서브클로닝된 293 또는 293 세포들 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1997)]; 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 차이니즈 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980); 마우스 세르톨리 세포 (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75), 인간 간세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); MRC 5 세포; FS4 세포; 인간 간암 세포주 (Hep G2); 및 골수종 또는 림프종 세포 (예를 들어, Y0, J558L, P3 및 NS0 세포) (미국 특허 5,807,715 참조)이다. 면화, 옥수수, 감자, 대두, 페튜니아, 토마토 및 담배의 식물 세포 배양액도 숙주로서 이용할 수 있다.

<233> 숙주 세포는 단백질 생산을 위한 상기한 발현 또는 클로닝 벡터를 사용하여 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지 내에서 배양한다.

<234> *세포의 배양*

<235> 본 발명의 단백질을 생산하기 위해 사용된 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양할 수 있다. 시판 배지, 예를 들어 햄 (Ham) F10 (시그마 (Sigma)), 최소 필수 배지 (MEM, 시그마), RPMI-1640 (시그마) 및 둘베코 (Dulbecco) 개질 이글 (Eagle) 배지 (DMEM, 시그마)가 숙주 세포를 배양하기에 적합하다. 또한, 문헌 ([Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979)], [Barnes et al., Anal. Biochem. 102:225 (1980)]), 미국 특허 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WO90/03430; WO87/00195; 또는 미국 특허 Re. 30,985에 설명된 임의의 배지를 숙주 세포를 위한 배양 배지로서 사용할 수 있다. 임의의 이들 배지는 필요하다면 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예를 들어, 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염 (예를 들어, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 버퍼 (예를 들어 HEPES), 뉴클레오티드 (예를 들어, 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예를 들어, GENTAMYCIN™ 약물), 미량 원소 (보통 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨) 및 글루코스 또는 동등 에너지원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필수 보충물이 또한 당업계의 숙련인에게 잘 알려진 적절한 농도로 포함될 수 있다. 배양 조건, 예를 들어 온도, pH 등은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 사용된 것이며, 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

<236> 본원에 기재된 단백질은 또한 세포-번역 시스템을 사용하여 생산될 수 있다. 상기 목적을 위해, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 mRNA를 생산하도록 시험관내 전사를 허용하기 위해 및 사용되는 특정 무-세포 시스템 (진핵생물, 예를 들어 포유동물 또는 효모 무-세포 번역 시스템 또는 원핵생물, 예를 들어 세균 무-세포 번역 시스템)에서 mRNA의 무-세포 번역을 허용하도록 변형될 수 있다.

<237> 본 발명의 단백질은 또한 화학 합성에 의해 생산될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, IL]에 기재된 방법에 의해). 단백질에 대한 변형은 또한 화학 합성에 의해 제조될 수 있다.

<238> 본 발명의 단백질은 단백질 화학 분야에 일반적으로 공지된 단백질에 대한 단리/정제 방법에 의해 정제될 수 있다. 비-제한적인 예는 추출, 재결정화, 염석 (예를 들어, 황산암모늄 또는 황산나트륨을 사용하는), 원심분리, 투석, 한외여과, 흡착 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피, 정상 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 겔 여과, 겔 투과 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 전기영동, 역류 (countercurrent) 분배 또는 이들의 임의의 조합법을 포함한다. 정제 후, 폴리펩티드는 상이한 버퍼 내로 교환되고/되거나 여과 및 투석을 포함하고 이로 제한되지 않는 당업계에 공지된 임의의 다양한 방법에 의해 농축될 수 있다.

<239> 정제된 폴리펩티드는 바람직하게는 적어도 85% 순수하고, 보다 바람직하게는 적어도 95% 순수하고, 가장 바람직하게는 적어도 98% 순수하다. 순도의 정확한 수치 값에 무관하게, 폴리펩티드는 제약 제품으로 사용하기 위해 충분히 순수하다.

<240> **추가의 글리코실화 실시태양**

<241> 일부 실시태양에서, 본 발명의 단백질을 글리코실화하는 것이 바람직할 수 있다. 바람직하게는, 상기 단백질은 피브로넥틴 기반 스캐폴드이다. 피브로넥틴 기반 스캐폴드는 정상적으로 글리코실화 부위를 함유하지 않지만, 상기 글리코실화는 단백질 내로 공학처리될 수 있다.

<242> 단백질의 글리코실화는 대개 N-연결 또는 O-연결된다. N-연결은 아스파라긴 잔기의 측쇄에 대한 탄수화물 모이어티의 부착을 의미한다. 트리펩티드 서열, 즉 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 아스파라긴 측쇄에 대한 탄수화물 모이어티의 효소에 의한 부착을 위한 인식 서열이다. 이들은 본 발명의 단백질, 특히 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질 및 그들의 상응하는 폴리뉴클레오티드 내로 공학처리될 수 있다. 따라서, 폴리펩티드 내의 상기 트리펩티드 서열의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성시킨다. O-연결 글리코실화는 히드록시아미노산, 가장 일반적으로 세린 또는 트레오닌에 대한 당 N-아세일갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중의 하나의 부착을 나타내지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시라이신도 사용될 수 있다.

<243> 본 발명의 단백질에 대한 글리코실화 부위의 첨가는 하나 이상의 상기 설명된 트리펩티드 서열 (N-연결 글리코

실화 부위에 대해)을 포함하도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성된다. 또한, 변형은 본래 항체의 서열 (O-연결된 글리코실화 부위에 대해)에 대한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 부가 또는 치환에 의해 수행될 수 있다.

<244> 본 발명의 단백질의 상기 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조된다. 이들 방법은 천연 공급원으로부터의 단리 (자연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우에), 또는 단백질 (예를 들어, 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질)의 보다 일찍 제조된 변이체 또는 비-변이체 버전의 올리고뉴클레오티드-매개 (또는 부위-지정) 돌연변이 유발, PCR 돌연변이 유발 및 카세트 돌연변이 유발에 의한 제조를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

<245> 본 발명의 단백질을 효과기 기능에 관하여, 예를 들어, 항체의 항원-의존 세포-매개 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체 의존 세포독성 (CDC)을 향상시키도록 변형하는 것이 바람직할 수 있다. 이는 단백질 (예를 들어, 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질)의 Fc 구역의 활성 부분 및 Fc 구역에서 하나 이상의 아미노산 변형을 도입하여, 변이체 Fc 구역을 생성함으로써 달성할 수 있다. Fc 구역 변이체는 하나 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형 (예를 들어, 치환)을 포함하는 인간 Fc 구역 서열 (예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 구역)을 포함할 수 있다.

<246> 하나의 실시태양에서, 변이체 Fc 구역은 천연 서열 Fc 구역보다 인간 효과기 세포의 존재 하에 항체-의존 세포-매개 세포독성 (ADCC)을 보다 효과적으로 매개하거나, Fc 감마 수용체 (FcγR)에 보다 우수한 친화도로 결합할 수 있다. 그러한 Fc 구역 변이체는 Fc 구역의 임의의 하나 이상의 위치 256, 290, 298, 312, 326, 330, 333, 334, 360, 378 또는 430에서 아미노산 변형을 포함할 수 있고, 여기서 Fc 구역 내의 잔기의 넘버링은 카바트 (Kabat)에서와 같은 EU 인덱스의 넘버링이다.

<247> **추가의 항체 기반 단백질, 예를 들어 모이어티 및 유도체**

<248> 본 발명의 추가의 실시태양은 그의 상보성 결정 구역이 단일 도메인 폴리펩티드의 일부인 단일 도메인 항체를 포함한다. 바람직하게는, IGF-IR, 및 본 발명의 PEG 연결된 단백질이 포함된다. 그 예로는 중쇄 항체, 자연적으로 경쇄가 없는 항체, 통상적인 4-사슬 항체로부터 유도된 단일 도메인 항체, 공학처리된 항체, 및 항체로부터 유도된 것 이외의 단일 도메인 스캐폴드를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 단일 도메인 항체는 임의의 당업계의 또는 임의의 미래의 단일 도메인 항체일 수 있다. 단일 도메인 항체는 마우스, 인간, 낙타, 라마, 염소, 토끼, 소를 포함하고 이로 제한되지 않는 임의의 종으로부터 유래할 수 있다. 본 발명의 하나의 측면에 따라, 본원에서 사용될 때 단일 도메인 항체는 경쇄가 없는 중쇄 항체로서 알려진 자연 발생 단일 도메인 항체이다. 그러한 단일 도메인 항체는 예를 들어 WO94/04678에 개시되어 있다. 명료함을 위해, 자연적으로 경쇄가 없는 중쇄 항체로부터 유도된 상기 가변 도메인은 4 사슬 면역글로불린의 통상적인 VH와 구분하기 위해 본원에서 VHH 또는 나노바디 (nanobody)로서 알려져 있다. 상기 VHH 분자는 낙타과 (*Camelidae*) 종, 예를 들어 낙타, 단봉낙타, 라마, 비큐나 (vicuna), 알파카 (alpaca) 및 과나코 (guanaco)에서 생성된 항체로부터 유래할 수 있다. 낙타과를 제외한 다른 종이 자연적으로 경쇄가 없는 중쇄 항체를 생산할 수 있고; 그러한 VHH는 본 발명의 범위 내에 포함된다.

<249> 당업자에게 알려진 바와 같은 본 발명에 따른 VHH는 자연적으로 경쇄가 없는 면역글로불린으로부터 유도된 중쇄 가변 도메인, 예를 들어 WO94/04678에 설명된 바와 같이 낙타과로부터 유래된 (및 이하에서 VHH 도메인 또는 나노바디로서 언급되는) 것이다. VHH 분자는 IgG 분자보다 약 10x 더 작다. 이들은 단일 폴리펩티드이고, 매우 안정하여, 극한 pH 및 온도 조건에 저항한다. 또한, 이들은 프로테아제의 작용에 저항성이고, 이는 통상적인 항체의 경우에는 그렇지 않다. 더욱이, VHH의 시험관내 발현은 고수율의 적합하게 접힌 기능적 VHH를 생산한다. 또한, 카멜리드에서 생성된 항체는 항체 라이브러리를 사용하여 시험관 내에서 또는 카멜리드 이외의 포유동물의 면역화를 통해 생성된 항체에 의해 인식되는 것 이외의 에피토프를 인식할 것이다 (WO9749805). 따라서, 항-EGFR VHH는 EGFR과 통상적인 항체보다 더 효율적으로 상호작용할 수 있어서, 그의 EGFR 리간드(들)과의 상호작용을 더 효율적으로 차단한다. VHH는 공극 (cavity) 또는 그루브 (groove)와 같은 '비정상' 에피토프에 결합하는 것으로 알려져 있으므로 (WO97/49805), 상기 VHH의 친화도는 치료 처치에 보다 적합할 수 있다.

<250> 본 발명의 다른 실시태양은 EGFR 또는 밀접하게 관련된 패밀리 멤버에 대해 생성된 낙타과 VHH의 것에 상응하는 서열로 이루어지는 항-표피 성장 인자 수용체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 폴리펩티드의 상동성 서열, 상동성 서열의 기능 부분 또는 기능적 부분에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 폴리펩티드를 코딩할 수 있는 핵산에 관한 것이다. 본 발명의 단일 도메인 항체는 EGFR 또는 밀접하게 관련된 패밀리 멤버에 대해 생성될 수 있다.

<251> 본 발명에 따라, 본원에서 논의된 바와 같이, 폴리펩티드 구성체는 다른 표적, 예를 들어, 혈청 알부민에 대해 생성된 단일 도메인 항체를 추가로 포함할 수 있다. 표적에 대해 생성된 단일 도메인 항체는 상기 표적에 10^{-6}M 보다 우수한 친화도로 결합할 수 있는 단일 도메인 항체를 의미한다.

<252> 본 발명은 추가로 인간-유사 서열을 갖는 클래스에 속하는 VHH인 단일 도메인 항체에 관한 것이다. 하나의 그러한 클래스는 VHH가 카바트 넘버링에 따른 위치 45에서 글라이신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 메티오닌, 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 또는 글루타민으로 이루어지는 군 중의 하나의 아미노산, 예를 들어, L45 및 위치 103에서 트립토판을 보유하는 것을 특징으로 한다. 따라서, 상기 클래스에 속하는 폴리펩티드는 인간 VH 프레임워크 구역에 높은 아미노산 서열 상동성을 보이고, 상기 폴리펩티드는 그로부터 원치 않는 면역 반응이 예상되지 않으면서 추가의 인간화의 부담 없이 인간에 직접 투여될 수도 있다.

<253> 낙타과 단일 도메인 항체의 또다른 인간-유사 클래스가 PCT 공개 WO03/035694에서 설명되었고, 인간 기원 또는 다른 종으로부터의 통상적인 항체에서 대개 발견되는 소수성 FR2 잔기를 함유하지만, 친수도에서의 상기한 손실은 이중쇄 항체로부터의 VH 내에 존재하는 보존된 트립토판 잔기를 치환하는 위치 103의 전하를 띈 아르기닌 잔기에 의해 보충된다. 따라서, 상기 2개의 클래스에 속하는 펩티드는 인간 VH 프레임워크 구역에 높은 아미노산 서열 상동성을 보이고, 상기 펩티드는 그로부터 원치 않는 면역 반응이 예상되지 않으면서 추가의 인간화의 부담 없이 인간에 직접 투여될 수도 있다. 본 발명은 또한 상기 폴리펩티드를 코딩할 수 있는 핵산에 관한 것이다. 폴리펩티드는 전장 낙타과 항체, 즉 Fc 및 VHH 도메인을 포함할 수 있다.

<254> 항-알부민 VHH는 운반체 단백질로서 공지된 혈청 알부민과 보다 효율적인 방식으로 상호작용할 수 있다. 운반체 단백질로서, 혈청 알부민의 에피토프의 일부는 결합된 단백질, 펩티드 및 작은 화학 화합물에 의해 접근가능하지 않을 수 있다. VHH는 '비정상' 또는 비-통상적인 에피토프, 예를 들어 공극에 결합하는 것으로 알려져 있으므로 (WO97/49805), 순환 알부민에 대한 그러한 VHH의 친화도는 치료 처치에 보다 적합할 수 있다. 혈청 단백질은 대상의 혈청에서 발견되는 임의의 적합한 단백질 또는 그의 단편일 수 있다. 본 발명의 하나의 측면에서, 혈청 단백질은 혈청 알부민, 혈청 면역글로불린, 타이록신-결합 단백질, 트랜스페린, 또는 피브리노겐이다. 효과적인 치료를 위해 요구되는 반감기 및/또는 표적 항원의 구획화와 같은 의도된 용도에 따라, VHH-파트너는 상기 혈청 단백질 중 하나에 대해 생성될 수 있다.

<255> "항체 단편"은 일반적으로 무손상 항체의 항원 결합 부위를 포함하고, 따라서 항원에 결합하는 능력을 보유하는 무손상 항체의 부분만을 포함한다. 본 명세서의 정의에 포함되는 항체 단편의 예는 (i) VL, CL, VH 및 CH1 도메인을 갖는 Fab 단편; (ii) CH1 도메인의 C-말단에서 하나 이상의 시스테인 잔기를 갖는 Fab 단편인 Fab' 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인을 갖는 Fd 단편; (iv) VH 및 CH1 도메인을 갖고, CH1 도메인의 C-말단에서 하나 이상의 시스테인 잔기를 갖는 Fd' 단편; (v) 항체의 단일 아암 (arm)의 VL 및 VH 도메인을 갖는 Fv 단편; (vi) VH 도메인으로 이루어지는 dAb 단편 (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)); (vii) 단리된 CDR 구역; (viii) 힌지 구역에서 디술피드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab' 단편을 포함하는 2가 단편인 $F(ab')_2$ 단편; (ix) 단일쇄 항체 분자 (예를 들어, 단일쇄 Fv; scFv) ([Bird et al., Science 242:423-426 (1988)]; 및 [Huston et al., PNAS (USA) 85:5879-5883 (1988)]); (x) 동일한 폴리펩티드 사슬 내에 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)를 포함하는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 "디아바디 (diabody)" (예를 들어, EP 특허 공개 404,097; WO93/11161; 및 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]); (xi) 상보성 경쇄 폴리펩티드와 함께 한 쌍의 항원 결합 구역을 형성하는 한 쌍의 탠덤 (tandem) Fd 절편 (VH-CH1-VH-CH1)을 포함하는 "선형 항체" (Zapata et al. Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995); 및 미국 특허 5,641,870)를 포함한다.

<256> 본 발명에서 사용되는 항체 단편을 제조하기 위해 사용될 수 있는 항체 단편의 생산을 위한 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 무손상 항체의 단백분해적 소화에 의해 유도되었다 (예를 들어, [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)]; 및 [Brennan et al., Science, 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 이들 단편은 현재 재조합 숙주 세포에 의해 직접 생산될 수 있다. 예를 들어, 항체 단편은 상기 논의한 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 별법으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 $F(ab')_2$ 단편을 형성할 수 있다 (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). 다른 방안에 따르면, $F(ab')_2$ 단편은 재조합 숙주 세포 배양액으로부터 직접 단리될 수 있다. 항체 단편의 생산을 위한 다른 기술은 당업자에게 명백할 것이다. 다른 실시태양에서,

선택되는 항체는 단일쇄 Fv 단편 (scFv)이다 (WO 93/16185; 미국 특허 5,571,894; 및 미국 특허 5,587,458 참조). 항체 단편은 또한 예를 들어, 미국 특허 5,641,870에 설명된 바와 같이 "선형 항체"일 수 있다. 상기 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

<257> **다른 표적화 단백질 치료제**

<258> 특정 실시태양에서, 본원에 기재된 본 발명의 단백질은 하나 이상의 아비머 서열을 포함할 수 있다. 아비머는 본원에 기재된 것을 포함한 다양한 표적 분자에 대한 친화도 및 특이성을 갖는 결합 단백질의 종류이다. 이들 단백질은 본 발명의 PEG 연결된 실시태양에 포함될 수 있다. 이들은 인간 세포외 수용체 도메인으로부터 시험관내 엑손 셔플링 (shuffling) 및 파지 디스플레이에 의해 개발되었다 ([Silverman et al., 2005, Nat. Biotechnol. 23:1493-94]; [Silverman et al., 2006, Nat. Biotechnol. 24:220]). 생성되는 멀티도메인 단백질은 단일-에피토프 결합 단백질에 비해 개선된 친화도 (일부 경우에, 나노몰 미만) 및 특이성을 나타낼 수 있는 다수의 독립적인 결합 도메인을 포함할 수 있다. 다양한 실시태양에서, 아비머는 예를 들어 PEG 또는 폴리펩티드 링커를 사용하여 부착될 수 있다. 아비머의 제조 방법 및 용도에 관한 추가의 상세한 내용은 예를 들어, 각각의 실시예 부분과 전체 문헌을 본원에 참조로 포함시킨 미국 특허 공개 20040175756, 20050048512, 20050053973, 20050089932 및 20050221384에 개시되어 있다.

<259> 특정 실시태양에서, 본원에 기재된 본 발명의 단백질은 하나 이상의 리포칼린 관련 서열, 예를 들어, 안티칼린 또는 리포칼린 유도체를 포함할 수 있다. 안티칼린 또는 리포칼린 유도체는 본원에 기재된 것을 포함한 다양한 표적 분자에 친화도 및 특이성을 갖는 결합 단백질의 종류이다. 이들 단백질은 미국 특허 공개 20060058510 (Anticalins), 미국 특허 공개 20060088908 ("Muteins of human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and related proteins"), 미국 특허 공개 20050106660 ("Muteins of apolipoprotein d") 및 PCT 공개 WO2006/056464에 기재되어 있다. 이들 단백질은 본 발명의 PEG 연결된 실시태양에 포함될 수 있다.

<260> 특정 실시태양에서, 본원에 기재된 본 발명의 단백질은 하나 이상의 테트라넥틴 C-타입 렉틴 관련 서열 또는 트리넥틴, 예를 들어, 테트라넥틴 C-타입 렉틴 또는 테트라넥틴 C-타입 렉틴 유도체를 포함할 수 있다. 테트라넥틴 C-타입 렉틴 또는 테트라넥틴 C-타입 렉틴 유도체는 본원에 기재된 것을 포함한 다양한 표적 분자에 대한 친화도 및 특이성을 갖는 결합 단백질의 종류이다. 상이한 테트라넥틴 C-타입 렉틴 및 관련 단백질이 PCT 공개 WO2006/053568, WO2005/080418, WO2004/094478, WO2004/039841, WO2004/005335, WO2002/048189, WO98/056906 및 미국 특허 공개 20050202043에 기재되어 있다. 이들 단백질은 본 발명의 PEG 연결된 실시태양에 포함될 수 있다.

<261> 특정 실시태양에서, 본원에 기재된 본 발명의 단백질은 하나 이상의 천연 안키린 리피트 단백질, 예를 들어, DARPins (몰레큘라 파트너스 (Molecular Partners))를 포함할 수 있다.

<262> 특정 실시태양에서, 본원에 기재된 본 발명의 단백질은 하나 이상의 Affibodies™를 포함할 수 있다. Affibodies™는 포도구균 (Staphyloccal) 단백질 A의 IgG 결합 도메인으로부터 유도된다. 신규한 결합 특성은 단백질 A 도메인의 결합 표면 가까이에 위치하는 잔기를 변경함으로써 달성될 수 있다.

<263> 특정 실시태양에서, 본원에 기재된 본 발명의 단백질은 하나 이상의 시스테인 노트 (knot) 기반 단백질 스캐폴드, 즉, 미소체 (셀레코어 (Selecore)/나스카셀 (NascaCell))를 포함할 수 있다.

<264> 특정 실시태양에서, 본원에 기재된 본 발명의 단백질은 하나 이상의 Trans-bodies™를 포함할 수 있다. Trans-bodies™은 트랜스페린 스캐폴드에 기반한다 (바이오레시스 (BioResis)/화이자 (Pfizer)).

<265> 특정 실시태양에서, 본원에 기재된 본 발명의 단백질은 감마-크리스탈린 또는 유비퀴틴에 기반한 결합 단백질을 포함할 수 있다. 이들 소위 Affilin™ (실 프로테인스 (Scil Proteins)) 분자는 단백질의 베타 시트 구조 내의 결합 구역의 드 노보 (de novo) 디자인을 특징으로 한다. Affilin™ 분자는 미국 특허 공개 20070248536에 설명되어 있다.

<266> **본 발명의 단백질에 연결된 독소 및 다른 분자**

<267> 본원에 개시된 바와 같은 본 발명의 단백질은 세포독성제에 연결될 수 있다. 그러한 실시태양은 시험관내 또는 생체내 방법에 의해 적절하게 제조될 수 있다. 시험관내 방법은 단백질에 적합성인 화학, 예를 들어 특수한 아미노산, 예를 들어 Cys 및 Lys에 대한 화학을 포함한 당업계에 잘 공지된 컨쥬게이션 화학을 포함한다. 세포독성제를 본 발명의 단백질에 연결하기 위해, 연결기 또는 반응기가 사용된다. 적합한 연결기는 당업계에 잘 알려져 있고, 디술피드기, 티오에테르기, 산불안정기, 광불안정기, 펩티다제 불안정기 또는 에스테라제 불안정기

를 포함한다. 바람직한 연결기는 디술피드기 및 티오에테르기이다. 예를 들어, 컨쥬게이트는 디술피드 교환 반응을 이용하여 또는 항체와 세포독성제 사이에 티오에테르 결합을 형성함으로써 제조할 수 있다. 바람직한 세포독성제는 메이탄시노이드, 탁산 및 CC-1065의 유사체이다.

<268> 생체내 방법은 독성, 태깅 또는 표지 단백질을 본 발명의 단백질에 융합 단백질로서 연결시키는 것을 포함한다. 목적하는 폴리펩티드에 대한 코딩 폴리뉴클레오티드를 사용하여 단일 폴리펩티드가 생산된다. 독성 단백질은 독소 내성 또는 비감수성 세포 내에서 발현시킴으로써 또는 감수성인 세포 내에서 유도가능 프로모터를 사용하여 조절될 수 있다.

<269> 제한되지 않지만, 다양한 실시태양에서, 본 발명의 단백질은 단백질, 예를 들어 세균 독소, 식물 독소, 리신, 아브린, 리보뉴클레아제 (RNase), DNase I, 프로테아제, 포도구균 장독소-A, 미국자리공 (pokeweed) 항바이러스 단백질, 겔로닌, 디프테린 독소, 슈도모나스 외독소, 슈도모나스 내독소, 란피마제 (Rap), Rap (N69Q), 효소, 또는 형광 단백질에 연결된다.

<270> 바람직한 세포독성제 중에 메이탄시노이드 및 메이탄시노이드 유사체가 있다. 적합한 메이탄시노이드의 예는 메이탄시놀 및 메이탄시놀 유사체를 포함한다. 적합한 메이탄시노이드는 미국 특허 4,424,219; 4,256,746; 4,294,757; 4,307,016; 4,313,946; 4,315,929; 4,331,598; 4,361,650; 4,362,663; 4,364,866; 4,450,254; 4,322,348; 4,371,533; 6,333,410; 5,475,092; 5,585,499; 및 5,846,545에 개시되어 있다.

<271> 탁산도 바람직한 세포독성제이다. 본 발명에 사용하기에 적합한 탁산은 미국 특허 6,372,738 및 6,340,701에 개시되어 있다.

<272> 또한, CC-1065 및 그의 유사체도 본 발명에 사용하기 위해 바람직한 세포독성 약물이다. CC-1065 및 그의 유사체는 미국 특허 6,372,738; 6,340,701; 5,846,545 및 5,585,499에 개시되어 있다.

<273> 상기 세포독성 컨쥬게이트를 제조하기 위해 매력적인 후보는 CC-1065이고, 이는 스트렙토마이세스 젤렌시스 (*S. zelensis*)의 배양 브로쓰로부터 단리된 강력한 항-종양 항생제이다. CC-1065는 일반적으로 사용되는 항암 약물, 예를 들어 독소루비신, 메토트렉세이트 및 빈크리스틴보다 시험관 내에서 약 1000배 더 강력하다 (B. K. Bhuyan et al., Cancer Res., 42, 3532-3537 (1982)).

<274> 세포독성 약물, 예를 들어 메토트렉세이트, 다우노루비신, 독소루비신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실 및 칼리케아미신도 본 발명의 컨쥬게이트의 제조에 적합하고, 약물 분자도 또한 중계 담체 분자, 예를 들어 혈청 알부민을 통해 항체 분자에 연결될 수 있다.

<275> 진단 용도를 위해, 본 발명의 항체는 대개 검출가능한 모이어티로 표지될 것이다. 검출가능한 모이어티는 직접적으로 또는 간접적으로 검출가능한 신호를 생성할 수 있는 임의의 것일 수 있다. 예를 들어, 검출가능한 모이어티는 방사성 동위원소, 예를 들어 H3, C14 또는 13, P32, S35 또는 I131; 형광 또는 화학발광 화합물, 예를 들어 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민 또는 루시페린; 또는 효소, 예를 들어 알칼린 포스파타제, 베타-갈락토시다제 또는 양고추냉이 퍼옥시다제일 수 있다.

<276> **컨쥬게이션**

<277> 단백질을 검출가능한 모이어티에 컨쥬게이팅하기 위해 문헌 ([Hunter, et al., Nature 144:945 (1962)]; [David, et al., Biochemistry 13:1014 (1974)]; [Pain, et al., J. Immunol. Meth. 40:219 (1981)]; 및 [Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30:407 (1982)])에 설명된 방법을 포함한 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용할 수 있다. 시험관내 방법은 단백질에 적합성인 화학적 방법, 예를 들어 특수한 아미노산, 예를 들어 Cys 및 Lys에 대한 화학적 방법을 포함한 당업계에 잘 공지된 컨쥬게이션 화학적 방법을 포함한다. 모이어티 (예를 들어, PEG)를 본 발명의 단백질에 연결하기 위해, 연결기 또는 반응기가 사용된다. 적합한 연결기는 당업계에 잘 공지되어 있고, 디술피드기, 티오에테르기, 산불안정기, 광불안정기, 펩티다제 불안정기 또는 에스테라제 불안정기를 포함한다. 바람직한 연결기는 용도에 따라 디술피드기 및 티오에테르기이다. 피브로넥틴 기반 스캐폴드 또는 cys 아미노산이 없는 다른 단백질에 대해, cys가 컨쥬게이션을 위한 위치를 생성하면서 단백질의 활성이 존재하도록 하는 위치에서 공학처리될 수 있다.

<278> **영상화 및 다른 용도**

<279> 본 발명의 단백질은 또한 생체내 영상화에 유용하고, 여기서 검출가능한 모이어티, 예를 들어 방사성비투과제 (radio-opaque agent) 또는 방사성 동위원소로 표지된 단백질을 대상에게, 바람직하게는 혈류 내로 투여하고, 숙주 내에서 표지된 단백질의 존재 및 위치를 분석한다. 상기 영상화 기술은 악성종양의 단계결정 및 치료에

유용하다. 단백질은 핵자기 공명, 방사선과학, 또는 당업계에 공지된 다른 검출 수단에 의해 숙주 내에서 검출 가능한 임의의 모이어티로 표지될 수 있다.

<280> 또한, 본 발명의 단백질은 친화도 정제제로서 유용하다. 상기 과정에서, 항체는 당업계에 잘 공지된 방법을 이용하여 적합한 지지체, 예를 들어 Sephadex 수지 또는 여과지에 고정된다.

<281> 본 발명의 단백질은 또한 세포 내에서 그들의 IGF-IR 기능 억제에 기초하여 생물학 연구에서 시약으로서 유용하다.

<282> 본 발명의 단백질은 임의의 공지된 분석 방법, 예를 들어 경쟁적 결합 분석, 직접 및 간접 샌드위치 분석, 및 면역침전 분석에서 사용될 수 있다 (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)).

<283> **본 발명의 적절한 실시태양에 사용될 수 있는 추가의 물질**

<284> 다른 치료 처치 또는 조성물에서, 본 발명의 단백질은 하나 이상의 추가의 치료제와 동시투여되거나 순차적으로 투여된다. 적합한 치료제는 표적화 치료제, 다른 표적화 생물학적 물질, 및 세포독성제 또는 세포증식억제제를 포함하나 이로 제한되지 않는다. 일부 경우에, 동일한 또는 별개의 치료상 허용되는 바이알, 시린지 또는 액체 제형을 보유하는 다른 투여 장치로부터 약제를 투여하는 것이 바람직할 것이다.

<285> 암 치료제는 환자에 대해 최소의 효과를 가지면서 암 세포를 죽이거나 성장을 제한하고자 하는 물질이다. 따라서, 상기 물질은 건강한 숙주 세포와 암 세포 특성 (예를 들어, 대사, 혈관화 또는 세포-표면 항원 제시)의 임의의 차이를 활용할 수 있다. 종양 형태학의 차이는 개입을 위한 가능한 부위이고: 예를 들어, 제2 치료제는 항체, 예를 들어 고형 종양의 내부의 혈관화를 지연시켜, 그의 성장 속도를 느리게 하는데 유용한 항-VEGF 항체일 수 있다. 다른 치료제는 보조약 (adjunct), 예를 들어 그라니세트론 HCl, 안드로겐 억제제, 예를 들어 류프롤리드 아세테이트, 항생제, 예를 들어 독소루비신, 항에스트로겐, 예를 들어 타목시펜, 항대사물질, 예를 들어 인터페론 알파-2a, 세포독성제, 예를 들어 탁솔, 효소 억제제, 예를 들어 ras 파르네실-트랜스퍼라제 억제제, 면역조정물질, 예를 들어 알데스류킨, 및 질소 머스타드 유도체, 예를 들어 멜팔란 HCl 등을 포함하나 이로 제한되지 않는다.

<286> 개선된 항암 효능을 위해 본 발명의 단백질과 조합할 수 있는 치료제는 종양학 실무에 사용되는 다양한 물질 (참고문헌: Cancer, Principles & Practice of Oncology, DeVita, V. T., Hellman, S., Rosenberg, S. A., 6th edition, Lippincott-Raven, Philadelphia, 2001), 예를 들어 도세탁셀, 파클리탁셀, 독소루비신, 에피루비신, 시클로포스파미드, 트라스투주맙, 카페시타빈, 타목시펜, 토레미펜, 레트로졸, 아나스트로졸, 풀베스트란트, 엑세메스탄, 고세렐린, 옥살리플라틴, 카르보플라틴, 시스플라틴, 덱사메타손, 안타이드, 베바시주맙, 5-플루오로우라실, 류코보린, 레바미솔, 이리노테칸, 에토포시드, 토포테칸, 겜시타빈, 비노렐빈, 에스트라무스틴, 미톡산트론, 아바렐릭스, 졸레드로네이트, 스트렙토조신, 리툭시맙, 이다루비신, 부술판, 클로람부실, 플루다라빈, 이마티닙, 사이타라빈, 이브리투모맙, 토시투모맙, 인터페론 알파-2b, 멜팔람, 보르테조밉, 알트레타민, 아스파라기나제, 게피티닙, 에르롤니팁, 항-EGF 수용체 항체 (예를 들어, 세툭시맙 또는 파니투맙), 익사베필론, 에포틸론 또는 그의 유도체, 및 세포독성 약물과 세포-표면 수용체에 대한 항체의 컨쥬게이트를 포함한다. 바람직한 치료제는 백금제 (예를 들어 카르보플라틴, 옥살리플라틴, 시스플라틴), 탁산 (예를 들어 파클리탁셀, 도세탁셀), 겜시타빈 및 캄포테신이다.

<287> 하나 이상의 추가의 치료제가 본 발명의 항체, 항체 단편 또는 컨쥬게이트 전에, 동시에, 또는 후에 투여될 수 있다. 당업자는 각각의 치료제에 대해 특정 투여 순서에 유리할 수 있음을 이해할 것이다. 이와 유사하게, 당업자는 각각의 치료제에 대해, 치료제와 본 발명의 항체, 항체 단편 또는 컨쥬게이트 사이의 시간 길이가 변할 것임을 이해할 것이다.

<288> **제형화 및 투여**

<289> 본 발명의 치료 제제는 목적하는 정도의 순도를 갖는 설명된 단백질을 저장을 위해 선택적인 생리학상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))와 혼합함으로써 수용액, 동결건조 제형 또는 다른 건조 제형 형태로 제조된다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 용량 및 농도에서 수여체에 무독성이고, 버퍼, 예를 들어 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제 (예를 들어 옥타데실디메틸벤질 염화암모늄; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예를 들어 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레졸시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10

개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글라이신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 라이신; 단당류, 이당류 및 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 덱스트란; 킬레이팅제, 예를 들어 EDTA; 당, 예를 들어 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대 이온, 예를 들어 나트륨; 금속 복합체 (예를 들어, Zn-단백질 복합체); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예를 들어 TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다.

<290> 본원에서 제제는 또한 치료되는 특정 적응증에 필요한 하나 초과의 활성 화합물, 바람직하게는 서로 유해한 영향을 주지 않는 상보 활성을 갖는 것을 포함할 수 있다. 활성 화합물의 조합의 예가 본원에서 제공된다. 상기 분자는 적합하게는 의도된 목적에 효과적인 양으로 조합되어 존재한다.

<291> 활성 성분은 또한 예를 들어, 액적 형성 기술에 의해 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포좀, 알부민 미세구, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐) 내에 또는 마크로에멀젼 내에 봉입될 수 있다. 상기 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

<292> 생체내 투여를 위해 사용될 제제는 멸균되어야 한다. 이는 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성된다.

<293> 지연 방출 제제를 제조할 수 있다. 지연 방출 제제의 적합한 예는 본 발명의 단백질을 함유하는 소수성 고체 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 상기 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐 형태이다. 지연 방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 3,773,919), L-글루탐산과 γ 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예를 들어 LUPRON DEPOT™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사가능 미세구) 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체는 100일 넘게 분자의 방출을 가능하게 하는 한편, 특정 히드로겔은 단백질을 더 짧은 기간 동안 방출한다. 본 발명의 캡슐화된 단백질은 장기간 동안 신체에서 유지될 때, 37℃에서 습기에 노출됨으로써 변성 또는 응집되어, 생물학적 활성의 손실 및 가능하게는 면역원성의 변경이 일어날 수 있다. 관련된 메카니즘에 따라 안정화를 위한 합리적인 전략을 고안할 수 있다. 예를 들어, 응집 메카니즘은 티오-디술피드 교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 밝혀지면, 안정화는 술프히드릴 잔기의 변형, 산성 용액으로부터의 동결건조, 습기 함량의 조절, 적절한 첨가제의 사용 및 특이적 중합체 매트릭스 조성물의 개발에 의해 달성될 수 있다.

<294> 당업자는 각각의 치료제의 용량이 치료제에 따라 결정됨을 이해할 것이지만, 바람직한 용량은 약 10 mg/제곱미터 내지 약 2000 mg/제곱미터, 보다 바람직하게는 약 50 mg/제곱미터 내지 약 1000 mg/제곱미터일 수 있다. 바람직한 치료제, 예를 들어 백금제 (카르보플라틴, 옥사플라틴, 시스플라틴)의 경우에 바람직한 용량은 약 10 mg/제곱미터 내지 약 400 mg/제곱미터이고, 탁산 (파클리탁셀, 도세탁셀)의 경우에 바람직한 용량은 약 20 mg/제곱미터 내지 약 150 mg/제곱미터이고, 겜시타빈의 경우에 바람직한 용량은 약 100 mg/제곱미터 내지 약 2000 mg/제곱미터이고, 캄포테신의 경우에 바람직한 용량은 약 50 mg/제곱미터 내지 약 350 mg/제곱미터이다. 상기 및 다른 치료제의 용량은 본 발명의 항체, 항체 단편 또는 컨쥬게이트가 치료제와 동시에 또는 순차적으로 투여되는지에 따라 결정될 수 있다.

<295> 치료 용도를 위해, 본 발명의 단백질 또는 컨쥬게이트는 제약상 허용되는 투여 형태로 대상에게 투여된다. 이들은 정맥내로 볼러스 (bolus)로서 또는 연속적인 주입에 의해 일정 시간에 걸쳐, 또는 근내, 피하, 관절내, 윤활강내, 경막내, 경구, 국소 또는 흡입 경로에 의해 투여될 수 있다. 단백질은 또한 국소 및 전신 치료 효과를 나타내도록 종양내, 종양주위, 병변내 또는 병변주위 경로에 의해 투여될 수 있다. 적합한 제약상 허용되는 담체, 희석제 및 부형제는 잘 공지되어 있고, 임상 상황에 따라 당업자가 결정할 수 있다. 적합한 담체, 희석제 및/또는 부형제의 예는 (1) 약 1 mg/ml 내지 25 mg/ml 인간 혈청 알부민을 함유하는 둘베코 포스페이트 완충 염수 (pH 약 7.4), (2) 0.9% 염수 (0.9% w/v NaCl), 및 (3) 5% (w/v) 덱스트로스를 포함한다. 본 발명의 방법은 시험관 내에서, 생체 내에서, 또는 생체 외에서 실시할 수 있다.

<296> 본 발명의 단백질 및 하나 이상의 추가의 치료제의 투여 (동시 투여이든지 순차적인 투여이든지)는 치료 용도에 대해 상기 설명된 바와 같이 일어날 수 있다. 동시 투여에 적합한 제약상 허용되는 담체, 희석제 및 부형제는 동시 투여되는 특정 치료제의 종류에 따라 당업자가 이해할 것이다.

<297> 동결건조되는 것이 아니라 수성 투여형으로 존재할 때, 단백질은 대개 약 0.1 mg/ml 내지 100 mg/ml의 농도로 제형화될 것이지만, 상기 범위 밖의 넓은 변동이 허용된다. 질병의 치료를 위해, 항체 또는 컨쥬게이트의 적절한 용량은 상기 정의한 바와 같은 치료할 질병의 종류, 질병의 중증도 및 경과, 항체가 예방 또는 치료 목적을 위해 투여되는지 여부, 선행 요법의 경과, 환자의 임상력 및 항체에 대한 반응 및 담당의의 판단에 의해 결정될 것이다. 단백질은 적합하게는 환자에게 1회 또는 일련의 치료에 걸쳐 투여된다.

<298> 질병의 종류 및 중증도에 따라, 바람직하게는 약 1 mg/제곱미터 내지 약 2000 mg/제곱미터의 단백질이 환자에 투여하기 위한 개시 후보 용량이고, 보다 바람직하게는 예를 들어, 1회 이상의 별개의 투여에 의해서인지 연속 주입에 의해서인지에 따라 약 10 mg/제곱미터 내지 약 1000 mg/제곱미터의 항체이다. 수일 이상에 걸친 반복 투여를 위해, 병태에 따라 치료는 질병 증상의 목적하는 억제가 일어날 때까지 반복된다. 그러나, 다른 투약 계획이 유용할 수 있고 배제되지 않는다.

<299> 본 발명은 또한 본원에 기재된 하나 이상의 성분, 및 상기 성분의 사용을 위한 지시서를 포함하는 키트를 또한 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 키트는 본 발명의 항체, 항체 단편 또는 컨쥬게이트, 및 치료제를 포함한다. 상기 바람직한 실시태양에 대한 지시서는 본 발명의 단백질 및 치료제를 사용하여 암 세포의 성장을 억제하기 위한 지시서, 및/또는 본 발명의 항체, 항체 단편 또는 컨쥬게이트 및 치료제를 사용하여 암에 걸린 환자를 치료하는 방법을 위한 지시서를 포함한다.

<300> 바람직하게는, 키트에 사용되는 치료제는 도세탁셀, 파클리탁셀, 독소루비신, 에피루비신, 시클로포스파미드, 트라스투주맙, 카페시타빈, 타목시펜, 토레미펜, 레트로졸, 아나스트로졸, 풀베스트란트, 엑세메스탄, 고세렐린, 옥살리플라틴, 카르보플라틴, 시스플라틴, 덱사메타손, 안타이드, 베바시주맙, 5-플루오로우라실, 류코보린, 레바미솔, 이리노테칸, 에토포시드, 토포테칸, 겜시타빈, 비노렐빈, 에스트라무스틴, 미톡산트론, 아바렐릭스, 졸레드로네이트, 스트렙토조신, 리툭시맙, 이다루비신, 부술판, 클로람부실, 플루다라빈, 이마티닙, 사이타라빈, 이브리투모맙, 토시투모맙, 인터페론 알파-2b, 멜팔람, 보르테조밉, 알트레타민, 아스파라기나제, 게피티닙, 에르롤니팁, 항-EGF 수용체 항체 (예를 들어, 세툭시맙 또는 판티투무맙), 익사베필론 및 에포틸론 또는 그의 유도체로 이루어지는 군 중에서 선택된다. 보다 바람직하게는, 치료제는 백금제 (예를 들어 카르보플라틴, 옥살리플라틴, 시스플라틴), 탁산 (예를 들어 파클리탁셀, 도세탁셀), 겜시타빈 또는 캄포테신이다.

<301> 본 발명의 키트의 성분은 키트에 적합한 형태, 예를 들어 용액 또는 동결건조 분말로서 존재한다. 당업자는 키트의 성분의 농도 또는 양이 키트의 각각의 성분의 종류 및 의도된 용도에 따라 변할 것임을 이해할 것이다.

<302> 키트의 지시서에서 참조되는 암 및 세포는 유방암, 대장암, 난소 암종, 뼈육종, 자궁경부암, 전립선암, 폐암, 윤활막 암종, 췌장암, 흑색종, 다발 골수종, 신경모세포종 및 횡문근육종을 포함한다.

<303> *추가의 특허 참조*

<304> 다음 추가의 특허 출원 및 특허에 설명된 방법 및 조성물이 또한 본원에 포함된다:

<305> 미국 특허 공개 20050186203; 20050084906; 20050008642; 20040202655; 20040132028; 20030211078; 20060083683; 20060099205; 20060228355; 20040081648; 20040081647; 20050074865; 20040259155; 20050038229; 20050255548; 20060246059; 및 미국 특허 5,707,632; 6,818,418; 및 7,115,396; 및 PCT 공개 WO2005/085430; WO2004/019878; WO2004/029224; WO2005/056764; WO2001/064942; 및 WO2002/032925. 본원은 그 전문을 본원에 참조로 포함시킨 미국 특허 가출원 60/860,605 (2006년 11월 22일 출원) 및 60/879,666 (2007년 1월 9일 출원)을 기초로 한 우선권을 주장한다.

<306> *참조에 의한 포함*

<307> 특허 문헌 및 웹사이트를 비롯한 본원에 기재된 모든 문헌 및 참조문은 본 문헌에 전체를 또는 일부를 기재한 것과 같은 정도로 본 문헌에 개별적으로 참조로 포함된다.

실 시 예

<308> 이제 본 발명을 단지 예시적이고 본 발명을 제한하려고 의도되지 않는 다음 실시예를 참조하여 설명한다. 본 발명은 그의 구체적인 실시태양을 참조하여 상세히 설명되지만, 본 발명의 취지와 범위를 벗어나지 않으면서 다양한 변화 및 변형이 이루어질 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다.

<309> 실시예 1. IGF-IR 결합 분자의 초기 확인

<310> 위치 23-29, 52-55 및 77-86에서 3개의 랜덤화된 구역을 갖는 인간 피브로넥틴의 10번째 타입 3 도메인의 스캐폴드에 기반하여 약 10^{13}개의 RNA-단백질 융합체 변이체의 라이브러리를 제조하였다 (아미노산 번호는 서열 1을 참조한다) (3개의 루프 라이브러리; [Xu et al, Chemistry & Biology 9:933-942, 2002]). mRNA/cDNA 이종이중체로의 전환 후에, 1조개의 mRNA/cDNA-단백질 융합체의 라이브러리를 용액 내에서 100 nM 비오티닐화 IGF-IR에 결합시키고, 스트렙타비딘-코팅 자석 비드 상에 포획하였다. cDNA를 용출시키고, PCR에 의해 증폭시키고, mRNA/cDNA-단백질 융합체의 새로운 라이브러리를 생성하기 위해 사용하였다. 5 라운드의 선택을 상기 방식으로 수행하고, 표적 결합 농축 (enrichment)을 확인하기 위해 모든 라운드 후에 IGF-IR에 대한 라이브러리 결합의 백분율을 정량적 PCR에 의해 모니터링하였다 (도 1).

<311> 실시예 2: 경쟁적 IGF-IR 클론의 확인

<312> 독립 클론에 의해 코딩된 단백질을 경쟁적 결합 분석을 이용하여 IGF-IR의 존재 하에 표적 결합의 억제에 대해 분석하였다. IGF-IR에 대한 IGF-I의 결합을 억제한 100개 초과의 클론이 확인되었고, 이것은 상기 클론이 천연 리간드 (IGF-I) 결합 부위에서 또는 그 부위 부근에서 IGF-IR에 결합함을 시사하였다. 상기 100개의 클론의 서열 번호 (도 30a-30i) 및 경쟁적 결합 분석에서 %억제를 표 1에 제시한다.

표 1

IGF-IR 경쟁적 클론의 서열 번호 및 억제 %

클론	서열	억제 %	클론	서열	억제 %
223B02	2	89.1%	224D01	56	62.3%
223A04	3	87.0%	225D09	57	61.8%
223F03	4	86.8%	218H08	58	61.6%
214D04	5	86.5%	225C05	59	61.1%
225E09	6	84.6%	224B02	60	60.2%
224A02	7	84.6%	214F04	61	59.6%
223A07	8	83.8%	225H10	62	58.4%
223E11	9	82.2%	215G10	63	58.2%
223H04	10	82.2%	225G09	64	58.1%
215G06	11	80.5%	223A09	65	58.0%
219F08	12	80.0%	225A10	66	58.0%
223B01	13	79.7%	215G07	67	58.0%
225B01	14	79.4%	215H06	68	57.6%
214C11	15	78.9%	215G01	69	57.4%
219C07	16	78.8%	225D11	70	57.3%
218C04	17	77.0%	225H09	71	56.8%
215A07	18	76.1%	215H03	72	56.4%
223D01	19	76.0%	218F11	73	56.4%
225D03	20	74.8%	225G07	74	56.1%
225A02	21	74.6%	225E05	75	55.7%
223A10	22	73.7%	218G01	76	54.3%
225B03	23	73.7%	224F01	77	53.6%
218C05	24	73.6%	225F05	78	53.0%
225A05	25	72.1%	219C04	79	52.5%
224A01	26	72.0%	215F02	80	50.7%
214F03	27	72.0%	223B05	81	50.6%
214A08	28	70.6%	214G08	82	50.5%
223H11	29	70.5%	219F03	83	50.3%
218B03	30	70.4%	214H01	84	50.0%
215E09	31	70.3%	215A03	85	49.7%

<313>

223A11	32	70.2%	214C08	86	49.6%
215H07	33	70.0%	214E04	87	49.2%
219G02	34	69.8%	219F07	88	49.1%
224F02	35	69.6%	215A05	89	49.0%
225A07	36	68.9%	214B07	90	48.7%
225B08	37	68.9%	214B10	91	48.5%
215E10	38	68.8%	215F10	92	48.1%
225B11	39	68.6%	215D01	93	47.9%
214C04	40	68.5%	223C04	94	46.8%
218F01	41	68.3%	219A09	95	46.7%
225H01	42	67.1%	219C11	96	46.6%
215D11	43	67.1%	215C05	97	46.6%
219H07	44	66.3%	215E11	98	46.3%
225A06	45	65.9%	225C03	99	45.9%
218A10	46	65.7%	219A06	100	45.9%
225H08	47	65.7%	215B03	101	45.7%
214B04	48	65.6%	215H09	102	45.7%
218F04	49	65.2%	219G08	103	45.4%
225A09	50	65.0%	225C06	104	45.3%
223G04	51	64.2%	215E01	105	45.3%
224H03	52	63.7%	219G10	106	44.9%
215G08	53	63.6%	219A11	107	44.7%
218B06	54	62.7%	215F05	108	44.7%
224D05	55	62.5%	219F04	109	44.3%

<314>

<315> 실시예 3: IGF-IR 경쟁적 클론의 전기영동 특성의 검사

<316> 선택된 클론의 순도 및 전기영동 특성을 SDS-PAGE에 의해 조사하였다 (도 2). 이들은 그들의 단일-컬럼 정제를 고려하여 합당하게 순수한 것으로 밝혀졌고, 겉보기 분자량은 이론적 질량과 일치하였다 (C-말단 태그와 관련된 추가의 질량을 고려함).

<317> 실시예 4: IGF-IR에 결합하는 서열 패밀리의 확인

<318> IGF-I과 경쟁할 수 있는 클론을 서열결정하고, 벡터 NTI (인비트로겐)을 사용하여 정렬시켰다. 대부분의 클론은 3개의 구분되는 패밀리에 속하였다. 하나의 패밀리는 BC 루프의 위치 6에서 보존된 발린, 및 보존된 아르기닌 및 티로신을 함유하는 가변 길이 FG 루프에 의해 인식되었다 (클론 218C04, 215D09, 214C04, 214F03, 214C03, 214E01 및 218F09). 제2 패밀리는 DE 루프에서 보존된 티로신 및 프롤린에 의해 인식되고, 대체로 정확히 10개 아미노산의 FG 루프와 연관되었다 (클론 225D03, 215E09, 215B07, 215D11, 218E09, 309B01, 310A01 및 310A03). 세번째 패밀리의 클론은 보존된 소수성 아미노산을 갖는 14개 아미노산의 FG 루프를 가졌다 (클론 223B01, 223B02 및 218F08). 나머지 클론은 다른 패밀리에 유사성을 보이지 않았고, 구분되는 패밀리로 나눌 수 없고 제시하지 않는다.

<319> 실시예 5. 최적화에 적합한 후보 클론의 확인

<320> 상기 선택 과정으로부터 생성되는 클론은 생물치료제의 엄격한 친화도, 특이성 및 생물물리학적 요건을 만족하는 것 같지 않고, 따라서 결합 루프가 개량되거나 "최적화되는" 추가의 돌연변이 유발을 필요로 한다. 상기 궤도를 따라 가장 먼 클론을 확인하기 위해, 선택된 수의 후보를 심층적으로 특성화하였다. 본 실시예에서, 하나의 IGF-IR-경쟁적 클론인 218C04의 특성화를 설명한다.

<321> 1 리터의 이. 콜라이 성장액을 제조하고, SDS PAGE에 의해 제시되는 바와 같이 클론 218C04를 정제하였다 (도 3). 생물물리학적 특성의 검사에서, 218C04는 SEC에 의해 반영되는 바와 같이 실질적으로 모두 단량체성이었고 (도 4), 이는 상기 클론이 보다 높은 단백질 농도에서 안정한 응집체를 생산하는 경향이 없음을 시사한다. 정제된 생성물의 표면 플라즈몬 공명 (BIAcore) 분석을 통해 용액상 내에 주입된 클론이 고정된 IGF-IR에 1.8 nM의 KD로 결합하였음이 밝혀졌다. 종합적으로, 이들 특성은 상기 클론이 최적화에 적합하였음을 나타낸다.

<322> 실시예 6. IGF-IR-특이적 클론의 최적화

<323> 다음 실시예에서, 하나의 IGF-IR-특이적 클론 218C04의 최적화를 설명한다.

<324> 각각 밑줄친 BC, DE 및 FG 루프를 갖는 클론 218C04의 서열을 제시한다:

<325> VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSPYLRVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSSARTATISGLKPGVDYTITVYA VTPSNIIGRHYGPISINYRT (서열 17)

<326> 한번에 하나의 루프가 랜덤 서열로 교체되는 3개의 라이브러리를 제조하였다. 아래 설명된 DNA 수준에서 라이브러리를 제조하였고, 단, 3개의 루프 중 2개에서 랜덤 서열을 클론 218C04에 상응하는 고정된 서열로 교체하였다.

<327> 이들 3개의 라이브러리를 사용하여 증폭, mRNA-단백질 융합체의 합성, 및 친화도 선택을 수행하였다. 결합 백분율을 각각의 라운드에 모니터링하고 (도 5a), PROfusion을 각각의 라이브러리가 1% 초과의 결합을 보일 때까지 지속하였다. 이 시점에, 각각의 라이브러리로부터 랜덤 루프를 증폭시키고, 재조립하여 3개의 모든 루프가 최적화된 마스터 (master) 라이브러리를 제조하였다 (도 5b).

<328> 증폭, mRNA-단백질 융합체의 합성, 및 친화도 선택의 사이클을 통해 3개의 모든 최적화된 루프를 함유하는 마스터 라이브러리를 취하였다. 최고 친화도 결합물질을 선택하기 위해 IGF-IR을 감소하는 농도에서 사용하였다 (도 5c).

<329> 실시예 7. 최적화된 유도체 클론을 평가하기 위한 경쟁적 IGF-IR 분석

<330> 본 실시예에서, 선택된 최적화된 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질을 경쟁적 분석에서 IGF-I와 IGF-IR 사이의 상호작용을 억제하는 능력에 대해 예비-최적화된 클론인 클론 218C04와 비교하였다. HTPP 및 정량 후, 많은 클론이 낮은 nM 범위의 IC50으로 출발 클론보다 우수한 억제를 보인다 (도 6). 하나의 클론, 특히 338A06은 본 분석에서 1 nM 이하의 IC50을 갖는 것으로 나타났다 (도 6).

<331> 실시예 8. 최적화된 IGF-IR 경쟁적 클론의 서열

<332> 선택된 클론의 최적화 및 경쟁적 분석에서 IGF-IGF-IR 상호작용의 억제에 대한 유도체의 평가 후에, 클론의 서열을 결정하였다. 도 30a-30i 및 표 2의 서열 110-125를 참고한다. 본 실시예에서 모 클론 218C04와 유사하게, 모든 억제성 유도체 클론은 BC 루프에서 보존된 발린 잔기를 함유하였다. 또한, 보존된 소수성 잔기, 대개 류신이 BC 루프 내의 보존된 위치에서 또한 종종 관찰되었다.

<333> 또한, 루프 길이의 변동에도 불구하고, 최적화된 클론의 FG 루프는 특정 위치에서 모 클론 218C04와 보존된 잔기를 공유하였다. 상기 특정 패밀리의 클론에 대해, 아르기닌-X-티로신 모티프가 기능성을 위해 요구되는 중요한 모티프인 것으로 보인다. 이는 하나를 제외한 모든 유도체 클론에서 및 상기 클론 (354C10, 아르기닌-X-발린)에서 발견되고, 인용되는 보존적 치환인 것으로 보인다. 따라서, 218C04 패밀리의 클론에 대해, 4개의 우성 위치, 즉, BC 루프에서 2개 및 FG 루프에서 2개가 IGF-IR 결합 및 억제 활성을 규정하는데 가장 큰 역할을 하는 것으로 보인다.

표 2

<334>

클론	서열	클론	서열	클론	서열
338A05	110	354A09	115	354D10	120
338A06	111	354A10	116	354E02	121
339A01	112	354B10	117	354F11	122
353F10	113	354C05	118	354F06	123
353H09	114	354C10	119	354G02	124
				354G09	125

<335> 실시예 9. 최적화된 IGF-IR 경쟁적 클론의 전기영동 특성의 검사

<336> 선택된 최적화된 클론의 1 리터 이. 콜라이 성장액을 제조하고, 단백질을 정제하였다. SDS PAGE (도 7)에 의해, 단일 컬럼 정제에도 불구하고 우수한 순도, 및 이론적 분자량과 일치하는 클론에 대한 겉보기 분자량 (태그에 대해 허용하는)이 밝혀졌다.

<337> 실시예 10. 최적화된 IGF-IR 경쟁적 클론의 열 안정성 검사

<338> 선택된 IGF-IR 최적화된 클론의 1 리터 이. 콜라이 성장액을 제조하고, 단백질을 정제하였다. 개별 클론의 풀림 (unfolding), 또는 융점 (T_m)의 에너지학을 특성화하기 위해 시차 주사 열량계 (DSC) 분석을 수행하였다. 클론 338A06은 62℃의 풀림 온도 (도 8)를 보였고, 이는 고도로 안정한 구조를 나타낸다. 추가의 최적화된 클

론의 융점을 표 3에 나타낸다.

표 3

<339> 시차 주사 열량계에 의해 결정된 IGF-IR 클론의 융점

클론	(T_m, ℃)
338A05	68
353F10	59
353H09	55
354A10	46
368G05	56
375G10	59

<340> 실시예 11. 최적화된 IGF-IR 경쟁적 클론의 용액 특성의 검사

<341> 선택된 최적화된 클론의 1 리터 이. 콜라이 성장액을 제조하고, 단백질을 정제하였다. 크기-배제 크로마토그래피 (SEC)로 본 실시예에서 클론 338A06에 대한 (도 9) 단량체성 거동이 밝혀졌고, 이는 보다 높은 단백질 농도에서, 최적화된 클론이 응집하는 경향을 없음을 나타낸다. 단량체성은 다각 레이저 광 산란 (MALLS)과 조합한 SEC를 이용하여 확인하였다. "고전적인" 광 산란 ("정적" 또는 "레일리" 산란 또는 MALLS로도 알려짐)은 분자 질량의 직접적인 측정치를 제공한다. 따라서, 이는 천연 상태의 단백질이 단량체인지 보다 고차의 올리고머인지 결정하기 위해, 및 응집물 또는 다른 비-천연 종의 질량을 측정하기 위해 매우 유용하다. 본 실시예에서, 클론 338A06의 분석을 제시한다. 도 10에 나타낸 바와 같이, SEC MALLS는 클론 338A06에 대해 12,190 Da의 질량을 결정하였고, 이는 His-태깅된 단량체에 대해 11,740의 예측된 질량에 대한 실험 오차 내에 있다. 이는 클론이 용액 내에서 거동이 우수한 단량체라는 추가의 증거를 제공한다.

<342> 실시예 12. 최적화된 IGF-IR 경쟁적 클론의 결합 친화도 및 운동학의 결정

<343> 선택된 최적화된 클론의 1 리터 이. 콜라이 성장액을 제조하고, 단백질을 정제하였다. 결합 운동학 및 결합 친화도를 결정하기 위해, 고정된 재조합 IGF-IR 및 용액-상 클론을 사용하여 표면 플라즈몬 공명 (BIAcore) 분석을 수행하였다. 표 4에 제시된 바와 같이, 본 실시예에 제시된 클론에 대해 결합 친화도는 두자리수 pM 내지 한자리수 nM K_D 범위였다. 오프율은 10^{-4} (1/s) 범위 내에 있고, 온률은 매우 빨라서, 대개 ~10^6 (1/M·s)이었다.

표 4

BIAcore 에 의한 k_a, k_d 및 K_D의 결정

클론	k_a (1/M·s)x10^{+6}	k_d(1/s)x10^{-4}	K_D (nM)
353F10	3.7	2.1	0.056
353H09	3.8	2.2	0.057
338A06	2.2	4.3	0.069
354A10	1.1	1.8	0.158
338A05	1.3	3.3	0.261
375G10	1.3	7.0	0.538
339A01	1.2	6.7	0.565
368G05	0.0036	9.8	2.740

<344>

<345> 실시예 13. 인슐린 수용체에 대한 최적화된 IGF-IR 경쟁적 클론의 결합의 결정

<346> 선택된 최적화된 클론의 1 리터 이. 콜라이 성장액을 제조하고, 단백질을 정제하였다. 인간 인슐린 수용체에 대한 인간 IGF-IR의 상동성은 약 56%이다. IGF-IR 경쟁적 클론이 IGF-IR에 실제로 특이적인지 보장하기 위해, 이들을 BIAcore 방법을 이용하여 고농도에서 인간 인슐린 수용체에 대해 평가하였다. 인간 인슐린 수용체를 BIAcore 칩 상으로 고정하였고, 비-특이적 결합에 대해 제어하기 위해 비관련 단백질도 그렇게 하였다. 클론을 칩 상으로 10 μM에서 통과시켰고, 상기 농도는 대다수의 클론에 대한 IGF-IR의 K_D보다 10,000배 초과로 더 크

다. 유사한 농도에서 인슐린 결합에 대한 신호의 백분율을 기록하고, 표 5에 제시한다. 대다수의 클론은 상기 높은 농도에서 인슐린 수용체에 대한 검출가능한 결합을 거의 또는 전혀 나타내지 않았고, 이는 이들이 IGF-IR에 실제로 특이적임을 예시한다. 인슐린 수용체에 대해 일부 정도의 결합을 나타내는 클론은 선택적 결합물질인 것으로 보인다.

표 5

<347> IGF-IR 클론에 의한 인슐린 수용체 (IR) 결합

클론	10 μM에서 IR 결합%
338A06	2
354A10	1
353F10	1
353H09	0
375G10	0
368G05	21
338A05	45
339A01	>100
인슐린	100

<348> 실시예 14. IGF-IR 클론 338A06의 MALDI TOF 질량 분광법

<349> 종류를 확인하기 위해 정제된 최적화된 IGF-IR 클론의 질량 분광법을 수행하였다. 본 실시예에서, 클론 338A06을 검사하였다. 클론 338A06의 예측된 질량은 11741 원자 질량 단위 (amu)이다. 클론 338A06의 MALDI TOF 질량 분광법을 통해, 표준품을 사용한 검정 후에 11741 m/z의 질량이 밝혀졌다 (도 11). 추가의 소량의 종이 보다 높은 m/z에서 관찰되었지만, 이들은 매트릭스 부가물과 일치한다 (도 11). 따라서, 338A06 및 실제로 검사된 모든 IGF-IR 클론은 그들의 예측된 질량과 일치하는 질량을 보였다.

<350> 실시예 15. 세포-기반 분석에서 IGF-IR 경쟁적 클론 338A06의 활성

<351> 정제된 최적화된 IGF-IR 클론을 활성을 확인하기 위해 세포-기반 분석으로 평가하였다. 하나의 예에서, 선택된 클론 338A06에 의한 IGF-I-매개된 분열촉진의 억제가 도 12에 도시된 바와 같이 입증된다. IGF-I 없는 배지 내에서 인간 췌장 선암종 세포주 BxPC-3를 클론 338A06의 희석 시리즈 또는 일반적으로 사용되는 항-IGF-IR 모노클로날 항체 (MAB391)로 처리하였다. IGF-I에 대한 24시간 자극 노출 후, 세포 증식을 측정하기 위해 세포를 ^{3}H-티미딘으로 처리하였다. 도 12에 나타낸 바와 같이, 클론 338A06은 모노클로날 항체 대조군에 비해 IGF-I-의존 증식을 약 10-20 nM의 IC50으로 억제하였다.

<352> 제2 세포-기반 분석에서, 클론 338A06에 의한 IGF-IR-발현 암 세포주에 대한 방사성 표지된 IGF-I 결합의 억제를 입증한다. 인간 유방 선암종 MCF-7 세포를 30분 동안 클론 338A06, 모노클로날 항체 MAB391, 또는 비표지된 IGF-I와 함께 예비-인큐베이팅하였다. 인큐베이션 기간 후, 방사성 표지된 IGF-I을 첨가하였다. 후속적으로 세포를 용해시키고, 방사성을 정량하였다. 도 13에 나타낸 바와 같이, 클론 338A06 및 비방사성 (cold) IGF-I은 약 1-2 nM의 본질적으로 유사한 IC50을 갖는 반면, 모노클로날 항체는 약 5 nM의 IC50으로 효력이 더 적은 것으로 보였다.

<353> 실시예 16: 클론 338A06의 최적화

<354> 저장 동안 단백질에서 일반적으로 보이는 분해 과정 중 하나는 메티오닌 잔기의 산화이고, 이는 화학적 및 물리적 안정성 및 생물학적 활성의 잠재적인 손실을 일으킬 수 있다. 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질 클론은 그들의 백본 내에 메티오닌 잔기를 함유하지 않지만, 선택된 수의 IGF-IR 경쟁적 클론은 그들의 루프 내에 메티오닌을 함유한다. 출발 클론의 생물학적 활성 및 생물물리학적 특성의 바람직한 특성을 보유하지만, 루프 내의 바람직하지 않은 메티오닌 잔기(들)을 치환한 클론을 선택하기 위해 최적화를 수행하였다. 본 실시예에서, FG 루프 내에 메티오닌 잔기를 함유하는 클론 338A06의 최적화를 보여준다.

<355> 클론 338A06을 FG 루프 내에 6개의 랜덤 아미노산을 갖는 단일 라이브러리를 사용하여 최적화하였다. 338A06의 서열 (서열 111)을 적절한 올리고뉴클레오티드를 사용하여 새로운 라이브러리의 BC 및 DE 루프 내로

통합시켰다.

<356> 라이브러리를 아래에 설명된 바와 같이 제조하고, 이중 가닥 DNA를 mRNA-단백질 융합체로 전환시켜 약 1000 카피의 각각의 FG 루프 서열을 생성시켰다. 증폭, mRNA-단백질 융합체 형성 및 친화도 선택의 PROfusion 사이클을 수행하였다. 제1 라운드에서, 비오티닐화 IGF-IR 농도는 100 nM이지만, 이는 최고 친화도 결합물질에 대해 농축시키기 위해 후속 라운드에서 감소시켰다.

<357> 실시예 17. 338A06의 최적화된 유도체에 대한 직접 결합 분석

<358> IGF-IR에 대한 향상된 결합에 대해 클론 338A06의 최적화된 유도체를 스크리닝하기 위해 직접 결합 분석을 사용하였다. 단일-점 분석에서 결합을 보인 클론을 클론 농도의 구배를 사용하여 추가로 분석하였다. 도 14에 나타낸 바와 같이, 많은 유도체 클론은 모 클론 338A06에 상당하는 친화도로 IGF-IR에 결합하였다. 1/2 최대 결합은 약 1 nM의 농도에서 보였다 (도 14).

<359> 실시예 18. 최적화된 338A06 IGF-IR 경쟁적 클론의 서열

<360> 338A06 클론의 FG 루프 최적화 및 직접 결합 분석으로 IGF-IR에 대한 결합에 대한 유도체의 평가 후, 클론의 서열을 결정하였다. 도 30a-30i 및 표 6의 서열 184-202를 참조한다. 본 실시예에 제시된 클론 중에서, 단지 하나의 클론이 FG 루프 내에 메티오닌을 함유하고 (클론 387A09), 이는 모 338A06 클론과 구분되는 위치 내에 있다. 따라서, 338A06 클론의 FG 루프 내의 메티오닌은 기능성에 중요한 것으로 보이지 않는다. 본 발명은 상기 탈안정화 잔기를 공학처리로 제거하는 수단을 제공한다.

<361> 이들 클론의 218C04 유도화와 일치하게, 아르기닌-X-티로신 모티프는 338A06 FG 루프 최적화 시도의 생성물 모두에서 보유된다. 이는 상기 영역에서 이들 2개의 잔기가 상기 특정 패밀리에 대한 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질 폴드의 맥락에서 IGF-IR 결합 및 억제에서 우성 결정인자로 보인다는 추가의 증거를 제공한다.

표 6

<362>

클론	서열	클론	서열	클론	서열
385A08	184	385F08	190	386F10	196
385A09	185	385H06	191	386F11	197
385B04	186	386A03	192	386H05	198
385D05	187	386A05	193	387A03	199
385E01	188	386A07	194	387A09	200
385E04	189	386F01	195	387B01	201
				387C02	202

<363> 실시예 19. FG 루프 최적화된 338A06 IGF-IR 경쟁적 클론의 용액 특성의 검사

<364> FG 루프 최적화된 338 A06 IGF-IR 경쟁적 클론에 대한 HTPP 물질의 크기-배제 크로마토그래피 (SEC)를 통해 단량체성 거동이 밝혀졌고, 이는 보다 높은 단백질 농도에서, 최적화된 클론이 응집하는 경향이 없음을 나타낸다. 최적화 및 HTPP로부터 유래된 9개의 클론을 본 실시예에서 제시한다 (도 15a-15b).

<365> 실시예 20. FG 루프 최적화된 338A06 IGF-IR 경쟁적 클론의 결합 친화도 및 운동학의 결정

<366> 선택된 FG 루프 최적화된 338A06 IGF-IR 경쟁적 클론의 1 리터 이. 콜라이 성장액을 제조하고, 단백질을 정제하였다. 결합 운동학 및 결합 친화도를 결정하기 위해, 고정된 재조합 IGF-IR 및 용액-상 클론을 사용하여 BIAcore 분석을 수행하였다. 표 7에 제시된 바와 같이, 본 실시예에 제시된 클론에 대해 결합 친화도는 두자리수 내지 세자리수 pM 범위였다. 오프율은 10^{-4} (1/s) 범위 내에 있고, 온률은 매우 빨라서, 대개 ~10^{6} (1/M·s)이었다.

표 7

BIAcore 에 의한 k_a, k_d 및 K_D의 결정

클론	k_a (1/M·s)x10^{+6}	k_d(1/s)x10^{-4}	K_D (pM)
385A08	5.7	1.9	34
386A03	5.2	4.6	88
387B01	6.5	4.4	67
389A12	6.4	2.8	44
386F10	1.9	2.3	123

<367>

<368> 실시예 21. 인슐린 수용체에 대한 FG 루프 최적화된 338A06 IGF-IR 경쟁적 클론의 결합 결정

<369> 선택된 FG 루프 최적화된 338A06 IGF-IR 경쟁적 클론의 1 리터 이. 콜라이 성장액을 제조하고, 단백질을 정제하였다. 인간 인슐린 수용체에 대한 인간 IGF-IR의 상동성은 약 56%이다. IGF-IR 경쟁적 클론이 IGF-IR에 실제로 특이적인지 보장하기 위해, 이들을 BIAcore 방법을 이용하여 고농도에서 인간 인슐린 수용체에 대해 평가하였다. 인간 인슐린 수용체를 BIAcore 칩 상으로 고정하였고, 비-특이적 결합에 대해 제어하기 위해 비관련 단백질도 그렇게 하였다. 클론을 칩 상으로 10 μM에서 통과시켰고, 상기 농도는 대다수의 클론에 대한 IGF-IR의 K_D보다 10,000배 초과로 더 크다. 유사한 농도에서 인슐린 결합에 대한 신호의 백분율을 기록하고, 표 8에 제시한다. 대다수의 클론은 상기 높은 농도에서 인슐린 수용체에 대한 검출가능한 결합을 나타내지 않았고, 이는 이들 클론이 IGF-IR에 실제로 특이적임을 예시한다.

표 8

<370> 338A06 FG 루프 최적화된 IGF-IR 클론에 의한 인슐린 수용체 결합

클론	10 μM에서 IR 결합%
338A06	0
385A08	0
386A03	3
387B01	0
386F10	3
389A12	0
인슐린	100

<371> 실시예 22. IGF-IR에 대한 FG 루프 최적화된 338A06 클론의 열 안정성 검사

<372> 선택된 FG 루프 최적화된 338A06 IGF-IR 경쟁적 클론의 1 리터 이. 콜라이 성장액을 제조하고, 단백질을 정제하였다. 개별 클론의 폴림, 또는 융점 (T_m)의 에너지학을 특성화하기 위해 시차 주사 열량계 (DSC)를 수행하였다. 시험된 클론은 58-63℃의 풀림 온도를 보였고, 이는 고도로 안정한 구조를 나타낸다. 최적화된 클론의 융점을 표 9에 나타낸다.

표 9

<373> 시차 주사 열량계에 의해 결정된 IGF-IR 클론의 융점

클론	(T_m, ℃)
385A08	59
386A03	62
386F10	58
387B01	63
389A12	58

<374> 실시예 23. 정제 후 FG 루프 최적화된 338A06 IGF-IR 경쟁적 클론의 용액 특성의 검사

<375> 선택된 FG 루프 최적화된 338A06 IGF-IR 경쟁적 클론의 1 리터 이. 콜라이 성장액을 제조하고, 단백질을 정제하였다. FG 루프 최적화된 338A06 IGF-IR 경쟁적 클론에 대한 HTPP 물질의 크기-배제 크로마토그래피 (SEC)를 통해 단량체성 거동이 밝혀졌고, 이는 보다 높은 단백질 농도에서, 최적화된 클론이 응집하는 경향이 없음을 나타낸다. 본 실시예에서, 대표적인 클론 387B01의 SEC 프로필을 제시한다 (도 16).

<376> 실시예 24. 정제 후 RP-HPLC에 의한 IGF-IR에 대한 FG 루프 최적화된 338A06 클론의 순도 및 균질성의 검사

<377> 선택된 FG 루프 최적화된 338A06 IGF-IR 경쟁적 클론의 1 리터 이. 콜라이 성장액을 제조하고, 단백질을 정제하였다. 클론의 순도를 특성화하고 또한 클론 균질성을 확립하기 위해 역상 고성능 액체 크로마토그래피 (RP-HPLC)를 수행하였다. 모든 클론은 도 17에 도시된 대표적인 크로마토그램에 의해 예시되는 바와 같이 그들의 C-말단 내로 공학처리된 C-말단 태그를 활용하는 단일 컬럼 정제 후에 뛰어난 순도 및 균질성을 나타냈다.

<378> 실시예 25. 정제 후 FG 루프 최적화된 338A06 클론의 MALDI TOF 질량 분광법

<379> 선택된 FG 루프 최적화된 338A06 IGF-IR 경쟁적 클론의 1 리터 이. 콜라이 성장액을 제조하고, 단백질을 정제하였다. 종류를 확인하기 위해 정제된 최적화된 IGF-IR 클론의 질량 분광법을 수행하였다. 본 실시예에서, 클론 387B01을 검사하였다. 클론 387B01의 예측된 질량은 11554 원자 질량 단위 (amu)이다. 클론 387B01의 MALDI TOF 질량 분광법을 통해, 표준품을 사용한 검정 후 약 11553 m/z의 질량이 밝혀졌고, 이는 장비의 실험 오차 내에 있다 (도 18). 추가의 소량의 종이 보다 높은 m/z에서 관찰되었다 (도 18). 이것이 매트릭스 부가물인지 소량의 번역후 변형된 종인지는 불확실하다. 따라서, 387B01 및 검사된 실제로 모든 IGF-IR 클론은 예측된 질량과 일치하는 질량을 보였다.

<380> 실시예 26. 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질의 PEG화

<381> 생체내 연구를 수행하기 위해, 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질의 PEG화를 수행하였다. 본 실시예에서, 클론 385A08을 C-말단 연장과 함께 이. 콜라이 발현 시스템 내에서 생산하여 다음 단백질 서열을 얻었다 (C-말단 연장을 굵은 이탤릭체로 나타내고, Cys97을 밑줄친다):

<382> GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRT***EIDKPCO*** (서열 203)

<383> 위치 97에서 시스테인 잔기의 단일 술프히드릴은 표준 말레이미드 화학을 이용하여 PEG 변이체에 커플링하도록 사용되어, 385A08의 2개의 상이한 PEG화된 형태를 얻었다. 선형 20 kDa 이중기능적 PEG 및 단일-기능적 분지형 40 kDa PEG (엔오에프 코퍼레이션 (NOF Corporation)) 모두를 클론 385A08에 컨쥬게이팅하여 각각 385A08-PEG20-385A08 및 385A08-PEG40을 생산하였다. PEG화된 단백질 형태를 음이온 교환 및 크기-배제 크로마토그래피에 의해 비반응 단백질 및 PEG로부터 정제하였다. 385A08의 2개의 PEG 형태의 공유 연결은 SDS-PAGE (도 11) 및 질량 분석법에 의해 입증하였다.

<384> 실시예 27. PEG화된 피브로넥틴-기반 스캐폴드 클론 변이체의 결합 친화도 및 운동학의 결정

<385> 385A08-PEG20-385A08 및 385A08-PEG40 변이체의 결합 운동학 및 결합 친화도를 결정하기 위해, 고정된 재조합 IGF-IR 및 용액-상 분석물을 사용하여 표면 플라즈몬 공명 (BIAcore) 분석을 수행하였다. 385A08-PEG40 형태는 비변형 385A08에 비해 약 10배 더 느린 온률 (ka)을 갖는 것으로 밝혀진 반면, 385A08-PEG20-385A08 형태는 약 2배 더 빠른 온률을 가졌다 (표 10). 비변형 385A08에 비해 변이체의 오프율 (kd; 표 10)은 385A08-PEG40 형태에 대해 약간 증가하였고, 385A08-PEG20-385A08 변이체에 대해 약간 감소하였다.

표 10

<386>

BIAcore에 의한 k_a, k_d 및 K_D의 결정

클론	k_a (1/M•s)x10^{+6}	k_d(1/s)x10^{-4}	K_D (pM)
385A08	6.9	1.6	23
385A08-PEG20-385A08	15	0.9	6
385A08-PEG40	0.6	2.1	355

<387> 실시예 28. IGF-IR 증식 분석에서 PEG화된 피브로넥틴-기반 스캐폴드 클론 변이체의 평가

<388> PEG화된 피브로넥틴-기반 스캐폴드 변이체를 인간 형질세포종 세포주 NCI-H929를 사용하여 혈청 매개된 증식의

억제에 대해 평가하였다. 상기 세포주에서, 항-IGF-IR MAB391 및 비변형 385A08은 약 100 pM의 겉보기 IC50으로 세포 성장의 유사한 정도의 억제를 나타냈다. 385A08-PEG40 변이체는 IC50이 1 nM에 접근하는, 약간 덜 억제성이었다. 그 반면에, PEG20-385A08-PEG20 변이체는 매우 강력하고, 시험된 모든 농도에서 본질적으로 100% 억제성이었다. 따라서, IC50은 100 fM 미만이었다.

<389> 실시예 29. IGF-IR 증식 분석에서 피브로넥틴 스캐폴드 IGF-IR 결합물질의 다량체의 평가

<390> 인간 IGF-IR을 발현하는 쥐 림프구 세포주 32D를 사용하여 IGF-IR 길항제의 효과를 평가하였다. 2개의 피브로넥틴 스캐폴드 IGF-IR 결합 도메인을 포함하는 길항제는 단일 피브로넥틴 스캐폴드 도메인 또는 항-IGF-IR 항체에 비해 억제 효과에서 현저한 증가를 나타냈다.

<391> 실시예 30. IGF-IR 증식 분석에서 이중특이적 피브로넥틴 스캐폴드 다량체의 평가

<392> 피브로넥틴 스캐폴드 단백질을 인간 형질세포종 세포주 NCI-H929를 사용하여 혈청 매개된 증식의 억제에 대해 평가하였다. 상기 세포주에서, IGF-IR 피브로넥틴 스캐폴드 및 IGF-IR/VEGFR2 이중특이적 피브로넥틴 스캐폴드 다량체는 세포 성장의 유사한 정도의 억제를 나타냈다.

<393> 실시예 31. VEGFR2 증식 분석에서 이중특이적 피브로넥틴 스캐폴드 다량체의 평가

<394> 피브로넥틴 스캐폴드 단백질을 VEGF-의존 세포주의 억제에 대해 평가하였다. 상기 세포주에서, VEGFR2 피브로넥틴 스캐폴드 및 IGF-IR/VEGFR2 이중특이적 피브로넥틴 스캐폴드 다량체는 세포 성장의 유사한 정도의 억제를 나타냈다.

<395> 실시예 32. 피브로넥틴 스캐폴드 IGF-IR 결합물질 HSA 컨쥬게이트의 평가

<396> 피브로넥틴 스캐폴드 단백질을 인간 형질세포종 세포주 NCI-H929를 사용하여 혈청 매개된 증식의 억제에 대해 평가하였다. IGF-IR 및 IGF-IR/HSA 단백질은 세포 성장의 유사한 정도의 억제를 나타냈다 (도 25 참조).

<397> 다양한 IGF-IR 길항제를 RH41 육종 이종이식편에서 그들의 생체내 항종양 활성에 대해 시험하였다 (도 26 및 27 참조). 표 11에 연구 결과를 요약한다.

표 11

RH41 육종 연구에서 생체내 항종양 활성

화합물	스케쥴, 경로	용량 (mg/kg)	AVE 중량 변화(g)[c]	LCK	%TGI*	%TGI*에 대한 p값	LCK에 의한 결과 (%TGI)
IGF-IR 화합물	qdx21; 20 po[a]	50	-0.9	0.5	70	0.004	I(A)
385A08	2qdx20; 28 ip[b]	40	1.0	0.2	19	0.301	I(I)
385A08	2qdx20; 28 ip[b]	20	0.6	0.2	33	0.053	I(I)
385A08-PEG20-385A08	TIWx3; 20 ip[b]	40	0.1	0.6	66	0.001	I(A)
385A08-PEG40	TIWx3; 20 ip[b]	40	1.4	0.4	56	0.053	I(A)
385A08-HSA	TIWx3; 20 ip[b]	40	0.8	0.7	71	0.013	I(A)
대조군 (비처리)	---	---	1.4	---	---	1.0	---

<398>

<399> *제39일에 계산된 종양 성장 억제 및 확률값. [a]비히클은 80% PEG400, 20% dH_2O였다. [b]비히클은 PBS였다. [c]각각의 군에 대한 평균 중량 변화는 치료의 개시 (제20일)에서와 치료의 끝 (제42일) 후의 체중의 평균 변화이다. TVDT는 500 mg 크기에 대해 계산하였다. 사용된 약자는 다음과 같다: po, 경구 경로; ip, 복강내 경로; LCK, LCK=T-C/(3.32xTVDT)로서 계산된 총 로그 세포 치사 (gross log cell kill), 여기서, T-C는 비히클 대조군 (C)에 비해 처리된 종양 (T)이 소정의 크기 (종양 표적 크기)에 도달하기 위한 시간 차이 (일)÷종양 부피 배가 시간 (TVDT) x 3.32. TVDT는 대조 종양이 표적 크기에 도달하기 위한 중간 시간 (일) - 대조 종양이 표적 크기의 절반에 도달하기 위한 중간 시간 (일)이었다; 결과, 치료 계획은 ≥1.0의 통계학상 유의한 LCK를 생성하면 활성인 것으로 간주하였다; %TGI, $\%TGI=[(C_t-T_t)/(C_t-C_0)] \times 100$으로서 계산된 상대적인 % 종양 성장 억제, 여기

서, C_t= 종양 이식 후 시간 t (일)에서 대조 마우스의 중간 종양 중량, T_t= 시간 t에서 처리된 마우스의 중간 종양 중량, C_0= 시간 0에서 대조 마우스의 중간 종양 중량. %TGI 값은 1.5 종양 부피 배가 시간에 시작하여 가능하다면 3 종양 부피 배가 시간의 기간에 걸쳐 지속하는 다양한 시점에 계산하였다. >50%의 %TGI 값을 활성으로 간주하였다; q2dx5 (스케쥴의 예로서), 화합물을 2일 마다 5회 투여량에 대해 투여하였다.

<400> HSA-IGF-IR의 폴리펩티드 융합 단백질을 또한 생성할 수 있다. 다음은 IGF-IR 클론 385A08에 대한 다양한 N- 및 C-말단 HSA 융합체를 나열한다. HSA 리더 및 프로펩티드 서열은 C-말단 구성체에서 생략된다. Fn 링커1은 첫번째 및 2번째 피브로넥틴 타입 III 도메인을 연결하는 아미노산 서열로부터 유래한다. Fn 링커2는 10번째 및 11번째 피브로넥틴 타입 III 도메인을 연결하는 아미노산 서열로부터 유래한다 (도 30a-30i 참조).

<401> 인간 혈청 알부민 (비처리된 (unprocessed))-Fn 링커1-385A08; 서열 228

<402> 385A08-Fn 링커1-인간 혈청 알부민 (처리된); 서열 229

<403> 인간 혈청 알부민 (비처리된)-Fn 링커2-385A08; 서열 230

<404> 인간 혈청 알부민 (비처리된)-$(GS)_5$ 링커-385A08; 서열 231

<405> 인간 혈청 알부민 (비처리된)-$(GS)_{10}$ 링커-385A08; 서열 232

<406> 385A08-Fn 링커2-인간 혈청 알부민 (처리된); 서열 233

<407> 385A08-$(GS)_5$ 링커-인간 혈청 알부민 (처리된); 서열 234

<408> 385A08-$(GS)_{10}$ 링커-인간 혈청 알부민 (처리된); 서열 235

<409> 실시예 33. 트랜스페린에 연결된 피브로넥틴 스캐폴드 IGF-IR 결합물질의 평가

<410> 트랜스페린에 융합된 피브로넥틴 스캐폴드 단백질을 인간 형질세포종 세포주 NCI-H929를 사용하여 혈청 매개된 증식의 억제에 대해 평가하였다.

<411> 트랜스페린-IGF-IR의 폴리펩티드 융합 단백질을 생성할 수 있다. 다음은 IGF-IR 클론 385A08에 대한 다양한 N- 및 C-말단 트랜스페린 융합체를 나열한다. 트랜스페린 리더 서열은 C-말단 구성체에서 생략된다 (도 30a-30i 참조).

<412> 인간 트랜스페린 (비처리된)-Fn 링커1-385A08; 서열 236

<413> 385A08-Fn 링커1-인간 트랜스페린 (처리된); 서열 237

<414> 인간 트랜스페린 (비처리된)-Fn 링커2-385A08; 서열 238

<415> 인간 트랜스페린 (비처리된)-$(GS)_5$ 링커-385A08; 서열 239

<416> 인간 트랜스페린 (비처리된)-$(GS)_{10}$ 링커-385A08; 서열 240

<417> 385A08-Fn 링커2-인간 트랜스페린 (처리된); 서열 241

<418> 385A08-$(GS)_5$ 링커-인간 트랜스페린 (처리된); 서열 242

<419> 385A08-$(GS)_{10}$ 링커-인간 트랜스페린 (처리된); 서열 243

<420> 실시예 34. IGF-IR-Fc 융합 단백질

<421> Fc에 융합된 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질을 다양한 세포주를 억제하는 그들의 능력에 대해 평가하였다. Rh41 세포 (4.5 nM), DU4475 세포 (>50 nM), H929 세포 (0.15 nM), BXPC-3 (>500 nM) 및 HT-29 세포 (>1000 nM) 내에서 385A08-Fc (서열 247의 아미노산 90-423)에 대한 IC50 값을 결정하였다. IGF-IR-Fc 융합체는 Rh41 세포주에서 91% 최대 억제를 나타냈다.

<422> Fc에 융합된 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질을 Rh41 인간 횡문근육종 세포 내에서 IGF-IR, AKT 및 MAPK 인산화를 억제하는 그들의 능력에 대해 평가하였다 (도 29 참조).

<423> Fc에 융합된 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질을 Rh41 및 H929 세포주에서 증식을 억제하는 그들의 능력에 대해

평가하였다 (표 12). 세포를 표시된 바와 같이 nM 농도의 385A08-Fc로 처리하였다. IC50 값은 다음과 같다: Rh41 시험 1 (48.65 nM), Rh41 시험 2 (39.43 nM), Rh1 시험의 평균 (44 nM) 및 H929 시험 (0.15 nM).

표 12

Rh41 및 H929 세포주에서 세포 증식에 대한 385A08-Fc의 효과

	Rh41 시험 1		Rh41 시험 2		H929 분석	
nM	[^{3}H] 통합	표준 편차	[^{3}H] 통합	표준 편차	[^{3}H] 통합	표준 편차
50	54.9	2.67	52.1	3.27	20.2	1.52
10.0	61.9	1.56	59.3	1.14	18.4	0.89
2.0	77.9	2.86	78.6	1.9	20.6	0.62
0.4	97.1	2.26	94.6	1.08	32.0	1.97
0.08	102.9	1.14	98.4	0.52	57.1	3.87
0.016	101.2	1.26	102.5	0.95	80.1	3.09

<424>

<425> 실시예 35. 본원에서 사용된 방법의 예

<426> 다음 물질 및 방법을 선행 실시예에 설명된 실험에 사용하였다.

<427> 재조합 단백질:

<428> 재조합 인간, IGF-I, IGF-IR, 인슐린 수용체 (IR), 항-IGF-IR MAB391, 및 재조합 인간 VEGF-R2-Fc는 알앤디 시스템즈로부터 입수하였다. IGF-IR의 비오티닐화는 1xPBS 내에서 4℃에서 2시간 동안 EZ-Link™ 술포-NHS-LC-LC-비오틴 (피어스 (Pierce, 미국 일리노이주 록포드))의 존재 하에 수행하였다. 과잉의 EZ-Link™ 술포-NHS-LC-LC-비오틴은 1xPBS에 대한 투석에 의해 제거하였다. 비오티닐화의 수준은 질량 분석법에 의해 결정하였고, 단백질 농도는 쿠마지 단백질 플러스 분석 (피어스)를 사용하여 결정하였다.

<429> 프라이머:

<430> 선택된 클론의 라이브러리 제조 및 돌연변이 유발에서 궁극적으로 사용하기 위해 다음 올리고뉴클레오티드를 화학적 합성에 의해 제조하였다.

<431> T7TMV: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG-3' (서열 204)

<432> FnAB: 5'-GGG ACA ATT ACT ATT TAC AAT TAC AAT GGT TTC TGA TGT GCC GCG CGA CCT GGA AGT GGT TGC TGC CAC CCC CAC CAG CCT GCT GAT CAG CTG G-3' (서열 205)

<433> FnBC: 5'-AGC CTG CTG ATC AGC TGG NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS CGA TAT TAC CGC ATC ACT-3' (서열 206)

<434> FnCD: 5'-AGG CAC AGT GAA CTC CTG GAC AGG GCT ATT GCC TCC TGT TTC GCC GTA AGT GAT GCG GTA ATA TCG-3' (서열 207)

<435> FnDE: 5'-CAG GAG TTC ACT GTG CCT NNS NNS NNS NNS ACA GCT ACC ATC AGC GGC-3' (서열 208)

<436> FnEF: 5'-AGT GAC AGC ATA CAC AGT GAT GGT ATA ATC AAC GCC AGG TTT AAG GCC GCT GAT GGT AGC TGT-3' (서열 209)

<437> 6개의 랜덤 아미노산을 갖는 FG 루프를 제공하기 위한 FnFG6: 5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT NNS NNS NNS NNS NNS NNS CCA ATT TCC ATT AAT TAC-3' (서열 210).

<438> 8개의 랜덤 아미노산을 갖는 FG 루프를 제공하기 위한 FnFG8: 5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS CCA ATT TCC ATT AAT TAC-3' (서열 211).

<439> 10개의 랜덤 아미노산을 갖는 FG 루프를 제공하기 위한 FnFG10: 5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS CCA ATT TCC ATT AAT TAC-3' (서열 212).

<440> 12개의 랜덤 아미노산을 갖는 FG 루프를 제공하기 위한 FnFG12: 5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS CCA ATT TCC ATT AAT TAC-3' (서열 213).

<441> 14개의 랜덤 아미노산을 갖는 FG 루프를 제공하기 위한 FnFG14: 5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT NNS NNS NNS NNS

NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS CCA ATT TCC ATT AAT TAC-3' (서열 214).

<442> FnG: 5'-TTA AAT AGC GGA TGC CTT GTC GTC GTC GTC CTT GTA GTC TGT GCG GTA ATT AAT GGA AAT TGG-3' (서열 215)

<443> FLAG: 5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTA AAT AGC GGA TGC CTT GTC GTC GTC GTC CTT GTA-3' (서열 216)

<444> 218C04BC: 5'-AGC CTG CTG ATC AGC TGG TCC CCG TAC CTG CGC GTC GCC CGA TAT TAC CGC ATC ACT-3' (서열 217)

<445> 218C04DE: 5'-CAG GAG TTC ACT GTG CCT TCC TCC GCC CGC ACA GCT ACC ATC AGC GGC-3' (서열 218)

<446> 218C04FG: 5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT CCG TCC AAC ATC ATC GGC CGT CAC TAT GGC CCA ATT TCC ATT AAT TAC-3' (서열 219)

<447> FnB: 5'-AGC CTG CTG ATC AGC TGG-3' (서열 220)

<448> FnD: 5'-CAG GAG TTC ACT GTG CCT-3' (서열 221)

<449> FnF: 5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT-3' (서열 222)

<450> 338A06BC: AGC CTG CTG ATC AGC TGG TCT GCG CGT CTG AAA GTT GCG CGA TAT TAC CGC ATC ACT (서열 223)

<451> 338A06DE: CAG GAG TTC ACT GTG CCT AAA AAC GTT TAC ACA GCT ACC ATC AGC GGC (서열 224)

<452> 1차 라이브러리 제조:

<453> KOD 중합효소 (이엠디 바이오사이언시스 (EMD Biosciences, 미국 캘리포니아주 샌 디에고))를 사용하여 상기 설명된 중첩하는 (overlapping) 합성 올리고뉴클레오티드의 연장에 의해 다양한 라이브러리를 제조하였다. 이들 올리고뉴클레오티드 명칭에서, "N"은 A, C, G 및 T의 혼합물을 나타내고; "S"는 C 및 G의 혼합물을 나타낸다. 루프 정의는 예전에 설명된 것과 동일하다 (Xu et al, 2002). BC 루프는 1M 베타인 및 3% DMSO를 보충한 100 ㎕ KOD 반응액 내에서 100 pmol FnCD를 사용하는 50 pmol FnBC의 연장에 의해 제조하였다. 단편의 완전한 연장을 보장하기 위해 반응액을 94℃에서 30s, 52℃에서 30s 및 68℃에서 1 min의 10회의 온도 사이클을 통과시켰다. DE 및 FG 루프를 DE 루프에 대해 200 pmol FnDE를 100 pmol FnEF와 함께 및 FG 루프에 대해 100 pmol FnFG10을 200 pmol FnG와 함께 사용하여 유사한 방식으로 제조하였다. 3개의 개별 루프의 연장 후, DE 및 FG 루프를 조합하고, 94℃에서 30s, 52℃에서 30s 및 68℃에서 1 min의 추가의 10회의 온도 사이클 동안 함께 연장시켰다. BC 루프를 100 pmol FnAB를 사용하여 동일한 방식으로 연장시켰다. DE/FG 혼합물 및 BC 루프를 각각 신선한 KOD 시약으로 10배 희석하고, 각각 FLAG 및 T7TMV로 94℃에서 30s, 52℃에서 30s 및 68℃에서 1 min의 10회의 온도 사이클 동안 연장시켰다. 마지막으로, 단편을 조합하고, 94℃에서 30s, 52℃에서 30s 및 68℃에서 1 min의 10회의 온도 사이클 동안 함께 연장시켰다. 이는 BC 루프 내에 7개의 랜덤 아미노산, DE 루프 내에 4개의 랜덤 아미노산, 및 FG 루프 내에 10개의 랜덤 아미노산을 갖는 라이브러리를 생산하였다. FnFG10 대신에 올리고뉴클레오티드 FnFG6, FnFG8, FnFG12 또는 FnFG14를 사용함으로써 상이한 FG 루프 길이를 사용하여 추가의 라이브러리를 제조하였다. 6 내지 14개 아미노산의 FG 루프 길이를 갖는 라이브러리를 조합하여 가변-길이 FG 라이브러리를 제공하였다.

<454> 클론 218C04로부터 단일-루프 랜덤화된 라이브러리의 제조:

<455> 단일 루프가 랜덤 서열로 교체된 3개의 라이브러리를 제조하였다. 상기 설명된 바와 같은 KOD 중합효소를 사용한 오버랩 연장에 의한 DNA 수준에서 라이브러리를 제조하였고, 단, 3개의 루프 중 2개에서 랜덤 서열을 클론 218C04에 상응하는 고정된 서열로 교체하였다. 고정된 서열은 BC 루프 내에서 올리고뉴클레오티드 218C04BC에 의해, 및 DE 루프 내에서 올리고뉴클레오티드 218C04DE에 의해, 및 FG 루프 내에서 올리고뉴클레오티드 218C04FG에 의해 제공되었다. 이들은 라이브러리 제조 동안 상응하는 랜덤 올리고뉴클레오티드 FnBC, FnDE, 또는 FnFG10을 교체하였다.

<456> 클론 218C04로부터의 BC 루프가 랜덤 아미노산에 의해 교체되는 라이브러리는 상기 설명된 바와 같이 올리고뉴클레오티드 T7TMV + FnAB + FnBC + FnCD + 218C04DE + FnEF + 218C04FG + FnG + FLAG를 조립함으로써 제조하였다. 클론 218C04로부터의 DE 루프가 랜덤 아미노산에 의해 교체되는 라이브러리는 올리고뉴클레오티드 T7TMV + FnAB + 218C04BC + FnCD + FnDE + FnEF + 218C04FG + FnG + FLAG를 조립함으로써 제조하였다. 클론 218C04로부터의 FG 루프가 랜덤 아미노산에 의해 교체되는 라이브러리는 올리고뉴클레오티드 T7TMV + FnAB + 218C04BC + FnCD + 218C04DE + FnEF + FnFG10 + FnG + FLAG를 조립함으로써 제조하였다.

<457> 클론 218C04로부터 3-루프 랜덤화된 라이브러리의 제조:

<458> 클론 218C04로부터 유래된 3개의 단일-루프 라이브러리를 상기 설명된 바와 같이 PROfusion 선택으로 처리하였다. 각각의 라이브러리 내의 생존 클론은 각각의 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질의 결합과 일치한 모 클론으로부터 2개의 루프 및 랜덤 서열로부터 1개의 루프를 포함하였다. 각각의 라이브러리로부터의 하나씩 3개의 랜덤 루프를 둘러싸는 스캐폴드 구역에 결합된 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 증폭시켰다. BC 루프는 올리고뉴클레오티드 프라이머 FnB 및 FnCD를 사용하여 가변 BC 루프를 함유하는 라이브러리로부터 증폭시켰다. DE 루프는 올리고뉴클레오티드 프라이머 FnD 및 FnEF를 사용하여 가변 DE 루프를 함유하는 라이브러리로부터 증폭시켰다. FG 루프는 올리고뉴클레오티드 프라이머 FnF 및 FnG를 사용하여 가변 FG 루프를 함유하는 라이브러리로부터 증폭시켰다. 3개의 삭제된 루프를 아가로스 겔 전기영동에 의해 정제하고, 동일한 비율로 혼합하고, 프라이머 FnAB 및 FnG에 이어 T7TMV 및 FLAG를 사용하여 KOD 중합효소에 의해 증폭시켰다.

<459> 클론 338A06으로부터 단일-루프 랜덤 FG 라이브러리의 제조:

<460> 클론 338A06의 FG 루프가 6개의 랜덤 아미노산으로 교체된 라이브러리를 제조하였다. KOD 중합효소를 상기 설명된 바와 같이 올리고뉴클레오티드 T7TMV + FnAB + 338A06BC + FnCD + 338A06DE + FnEF + FnFG6 + FnG + FLAG의 중첩 연장을 위해 사용하였다. 클론 338A06에 상응하는 루프 서열은 올리고뉴클레오티드 338A06BC 및 338A06DE에 의해 도입되고, 랜덤 6-아미노산 FG 루프는 올리고뉴클레오티드 FnFG6에 의해 도입되었다.

<461> RNA-단백질 융합체 생산:

<462> 이중 가닥 DNA 라이브러리를 본질적으로 설명된 바와 같이 RNA-단백질 융합체 (PROfusion)로 전환시켰다 (Xu et al, 2002, Kurz et al, Nuc. Acid Res. 28:83, 2000). 간단히 설명하면, DNA 라이브러리를 시험관 내에서 전사 키트 (MEGAscript™, 앰비온 (Ambion, 미국 텍사스주 오스틴))를 사용하여 전사하고, 생성되는 RNA를 NAP-5 컬럼 (지이 헬쓰케어 (GE Healthcare)) 상에서 크기-배제 크로마토그래피에 의해 탈염시켰다. 2 nmol RNA를 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8) 및 1.5배 과량의 푸로마이신-함유 링커 (5'-Pso u agc gga ugc XXX XXX CC Pu-3' (Pu = 푸로마이신, Pso = C6-솔라렌, u, a, g, c = 2'-OMe-RNA, X=9-원자 PEG 스페이서))를 함유하는 200 $\mu\ell$의 용액 내에서 20 min 동안 314 nM에서 방사선 조사에 의해 가교결합시켰다.

<463> 이어서, mRNA-푸로마이신 분자를 3 ml 토끼 세망세포 용해물 (앰비온) 내에서 ^{35}S-표지된 메티오닌의 존재 하에 번역하였다. 생성되는 mRNA-단백질 융합체를 올리고 dT 셀룰로스 (지이 헬쓰케어)를 사용하여 정제하고, 제조자의 지시에 따라 superscript II 역전사효소 (인비트로겐) 및 2 nmol의 프라이머 FLAG를 사용하여 역전사하였다.

<464> cDNA/mRNA-단백질 융합체를 M2 Flag 아가로스 (시그마, 미국 미주리주 세이트 루이스)에 의해 정제하고, 통합된 ^{35}S 메티오닌을 측정함으로써 정량하였다. 이는 약 10^{12}의 전장 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질의 정제된 라이브러리를 제공하였고, 이를 후속적인 PROfusion 실험에 사용하기 위해 프라이머 T7TMV 및 FLAG를 사용하여 PCR에 의해 증폭시켰다.

<465> IGF-IR에 대한 결합에 대한 친화도 선택:

<466> 상기한 바와 같이 제조된 mRNA-단백질 융합체의 라이브러리를 스트렙타비딘-코팅 자석 비드 (M280 스트렙타비딘, 인비트로겐)와 함께 인큐베이팅하여, 스트렙타비딘에 결합하는 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질을 제거하였다. 비드를 자석 상에서 분리하고, 결합된 분획을 수집하고, 0.05% Tween 20 및 1 mg/ml BSA (앰비온)를 함유하는 PBS 내에서 100 nM 비오티닐화 IGF-IR에 첨가하였다. 30 min 후, 결합된 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질을 스트렙타비딘-코팅 자석 비드 상에 포획시키고, Kingfisher 자성 입자 프로세서 (processor) (써모 일렉트론 (Thermo Electron, 미국 매사추세츠주 월탐))를 사용하여 6회 세척하였다. cDNA을 100 mM KOH 내에서 용출하고, 100 mM Tris-HCl로 중화하고, PCR에 의해 증폭시켜 IGF-IR에 결합하는 분자가 농축된 제2 세대 라이브러리를 생성하였다. 증폭, mRNA-단백질 융합체의 합성 및 친화도 선택의 연속적인 과정을 총 5회 수행하고, 결합된 분자의 수를 정량적 PCR에 의해 모니터링하였다. 라운드 4 및 5 후에 얻은 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질 집단을 증폭시키고, T7 RNA 중합효소에 대한 프로모터 및 인-프레임 (in-frame) His_6 태그를 함유하는 이. 콜라이 발현 벡터 내로 재조합에 의해 라이게이팅하였다 (InFusion™, 클론테크 (Clontech, 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰)). 라이게이팅된 혼합물을 IPTG로 유도 시에 T7 RNA 중합효소를 발현하여,유도가능한 단백질 발현을 제공하는 이. 콜라이 균주 BL21 (DE3) pLysS (인비트로겐) 내로 형질전환시켰다.

<467> 3개의 랜덤 루프를 함유하는 클론 218C04의 최적화:

<468> 3-루프 랜덤화된 218C04 라이브러리를 상기 설명된 바와 같이 증폭, mRNA-단백질 융합체의 합성, 및 친화도 선택의 사이클로 통과시켰다. 제1 라운드를 위해, IGF-IR을 스트렙타비딘-결합 펩티드의 선택을 피하기 위해 에폭시-활성화된 비드 상에 고정하였다. 그 후, 최고 친화도 결합물질을 선택하기 위해 비오티닐화 IGF-IR을 감소하는 농도로 사용하였다. 라운드 2 후부터, 비-비오티닐화 인슐린 수용체 (IR)가 또한 IR 결합에 대한 음성 선택으로서 작용하도록 1 μM의 농도로 포함되었다. 4 라운드 후, 생성되는 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질 집단을 상기 설명된 분석을 위해 이. 콜라이 내로 클로닝하였다.

<469> 6개 아미노산의 랜덤 FG 루프를 함유하는 클론 338A06의 최적화:

<470> DNA 라이브러리를 상기한 바와 같이 mRNA-단백질 융합체로 전환시켜 약 1000 카피의 각각의 FG 루프 서열을 생성시켰다. 증폭, mRNA-단백질 융합체 형성 및 친화도 선택의 PROfusion 사이클을 상기한 바와 같이 수행하였다. 제1 라운드에서, 비오티닐화 IGF-IR 농도는 100 nM이지만, 이는 라운드 2에서 0.8 nM 및 라운드 3에서 0.4 nM로 감소시켰다. 표적 농도는 IGF-IR에 결합된 mRNA-단백질 융합체의 백분율이 정량적 PCR에 의해 측정할 때 각각의 경우에 0.1% 미만이 되도록 선택하였다. 상기 방법에 의해, 개선된 친화도를 갖는 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질은 전체로서 집단에 비해 유리할 것이다.

<471> IGF-IR에 대한 경쟁적 ELISA:

<472> MaxiSorp™ 플레이트 (넝크 인터내셔날 (Nunc International, 미국 뉴욕주 로체스터))를 PBS 내에서 30 nM IGF-IR로 4℃에서 밤새 코팅한 후, OptEIA 버퍼 (비디 바이오사이언시스 (BD biosciences, 미국 캘리포니아주 샌 디에고)) 내에서 3시간 동안 실온에서 차단하였다. OptEIA 버퍼 내의 정제된 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질을 각각의 웰에 1시간 동안 실온에서 50 pM 내지 1 μM 농도에서 결합시켰다. 비결합 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질을 제거하기 위해 PBST 내에서 세척한 후, 점거되지 않은 IGF-IR에 결합하도록 10 nM 비오티닐화 IGF-I (업스테이트 (Upstate, 미국 캘리포니아주 테메쿨라))을 1시간 동안 실온에서 첨가하였다. 과잉의 리간드는 PBST로 세척함으로써 제거하고, 결합된 리간드는 제조자의 지시에 따라 TMB 검출 시약 (비디 바이오사이언시스)을 사용하여 스트렙타비딘-HRP (피어스)로 검출하였다.

<473> IGF-IR에 대한 직접 결합 ELISA:

<474> MaxiSorp™ 플레이트 (넝크 인터내셔날)를 PBS 내에서 10 nM IGF-IR로 4℃에서 밤새 코팅한 후, PBS-카제인 버퍼 (피어스) 내에서 3시간 동안 실온에서 차단하였다. 카제인 버퍼 내의 정제된 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질을 각각의 웰에 1시간 동안 실온에서 5 nM 농도에서 결합시켰다. 플레이트를 PBST로 세척하고, His-HRP 프로브 (피어스)의 1:4000 희석액 100 ㎕을 15 min 동안 실온에서 인큐베이팅하면서 각각의 웰에 첨가하였다. 웰을 PBST로 5회 세척하고, 결합된 HRP는 제조자의 지시에 따라 TMB 검출 시약 (비디 바이오사이언시스)를 사용하여 검출하였다. 상기 단일-점 분석에서 결합은 보인 클론을 30 pmol에서 330 nM까지의 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질 농도 구배를 사용하여 추가로 분석하였다.

<475> 고속 (High Throughput) 단백질 생산 (HTPP):

<476> pDEST-14 벡터 내로 클로닝되고 이. 콜라이 BL21 (DE3) pLysS 세포 내로 형질전환된 선택된 결합물질을 24-웰 포맷에서 50 ㎍/mL 카르베니실린 및 34 ㎍/mL 클로롬페니콜을 함유하는 5 ml LB 배지 내에 접종하고, 37℃에서 밤새 성장시켰다. 신선한 5 ml LB 배지 (50 ㎍/mL 카르베니실린 및 34 ㎍/mL 클로롬페니콜) 배양액을 철야 배양액으로부터 200 ㎕을 흡인하고, 이를 적절한 웰 내로 분배함으로써 유도가능한 발현을 위해 제조하였다. 배양액을 A_{600} 0.6-1.0까지 37℃에서 성장시켰다. 1 mM 이소프로필-β-티오갈락토시드 (IPTG)로 유도한 후, 배양액을 추가의 4시간 동안 30℃에서 성장시키고, 30분 동안 3220 g에서 4℃에서 원심분리에 의해 회수하였다. 세포 펠렛을 -80℃에서 동결시켰다.

<477> 세포 펠렛 (24-웰 포맷)을 450 ㎕의 용해 버퍼 (50 mM NaH_2PO_4, 0.5 M NaCl, 1x Complete™ 프로테아제 억제제 칵테일-EDTA 프리 (free) (로슈 (Roche)), 1 mM PMSF, 10 mM CHAPS, 40 mM 이미다졸, 1 mg/ml 라이소자임, 30 ㎍/ml DNAse, 2 ㎍/ml 아프로토닌, pH 8.0) 내에 재현탁시키고 실온에서 1시간 동안 진탕함으로써 용해시켰다. 용해물을 96-웰, 650 ㎕ 캐치 (catch) 플레이트가 장치된 96-웰 Whatman GF/D Unifilter 내로 전달하고 5분 동안 200 g에서 원심분리함으로써 청정화하고 96-웰 포맷으로 재-설정하였다. 청정화한 용해물을 평형 버퍼 (50 mM NaH_2PO_4, 0.5 M NaCl, 10 mM CHAPS, 40 mM 이미다졸, pH 8.0)으로 평형화시킨 96-웰 Ni-킬레이팅 플레이트로 전달하고, 5 min 동안 인큐베이팅하였다. 비결합된 물질을 진공에 의해 제거하였다. 수지를 세척 버퍼 #1 (50

mM NaH_2PO_4, 0.5 M NaCl, 5mM CHAPS, 40 mM 이미다졸, pH 8.0)로 2 x 0.3 ml/웰로 세척하고, 각각의 세척액은 진공에 의해 제거하였다. 이어서, 수지를 PBS로 3 x 0.3 ml/웰로 세척하고, 각각의 세척 단계는 진공에 의해 제거하였다. 용출에 앞서, 각각의 웰을 50 ㎕ 용출 버퍼 (PBS + 20 mM EDTA)로 세척하고, 5 min 동안 인큐베이팅하고, 상기 세척액을 진공에 의해 제거하였다. 단백질을 추가의 100 ㎕의 용출 버퍼를 각각의 웰에 적용함으로써 용출시켰다. 실온에서 30분 인큐베이션 후, 플레이트(들)을 5분 동안 200 g에서 원심분리하고, 용출된 단백질을 Ni-플레이트의 저변에 고정된 5 ㎕의 0.5M $MgCl_2$를 함유하는 96-웰 캐치 플레이트 내에 모았다. 용출된 단백질을 단백질 표준품으로서 BSA를 사용하는 Bradford 분석을 이용하여 정량하였다.

<478> 가용형 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질 결합물질의 중간-규모 발현 및 정제:

<479> 발현을 위해, His_6 태그가 이어지는 선택된 클론(들)을 pDEST-14 벡터 내로 클로닝하고, 이. 콜라이 BL21 (DE3) pLysS 세포 내에서 발현시켰다. 20 ml의 접종 배양액 (단일 플레이팅된 콜로니로부터 생성된)을 사용하여 50 ㎍/mL 카르베니실린 및 34 ㎍/mL 클로롬페니콜을 함유하는 1 리터의 LB 배지에 접종하였다. 배양액을 A_{600} 0.6-1.0까지 37℃에서 성장시켰다. 1 mM 이소프로필-β-티오갈락토시드 (IPTG)로 유도한 후, 배양액을 추가의 4시간 동안 30℃에서 성장시키고, 30분 동안 ≥10,000 g에서 4℃에서 원심분리에 의해 회수하였다. 세포 펠렛을 -80℃에서 동결시켰다. 세포 펠렛을 얼음 상에서 Ultra-turrax 균질화기 (IKA works)를 사용하여 25 mL의 용해 버퍼 (20 mM NaH_2PO_4, 0.5 M NaCl, 1x Complete™ 프로테아제 억제제 칵테일-EDTA 프리 (로슈), 1 mM PMSF, pH 7.4) 내에 재현탁시켰다. 세포 용해는 Model M-110S 마이크로플루다이저 (Microfluidizer) (마이크로플루딕스 (Microfluidics))를 사용하여 고압 균질화 (≥18,000psi)에 의해 달성하였다. 가용성 분획을 30분 동안 23,300 g에서 4℃에서 원심분리에 의해 분리하였다. 상등액을 0.45㎛ 필터를 통해 청정화하였다. 청정화한 용해물을 20 mM NaH_2PO_4, 0.5 M NaCl (pH 7.4)로 예비-평형화시킨 HisTrap 컬럼 (GE) 상으로 로딩하였다. 이어서, 컬럼을 25 컬럼 부피의 20 mM NaH_2PO_4, 0.5 M NaCl (pH 7.4), 이어서 20 컬럼 부피의 20 mM NaH_2PO_4, 0.5 M NaCl, 25 mM 이미다졸 (pH 7.4), 이어서 35 컬럼 부피의 20 mM NaH_2PO_4, 0.5 M NaCl, 40 mM 이미다졸 (pH 7.4)로 세척하였다. 단백질을 15 컬럼 부피의 20 mM NaH_2PO_4, 0.5 M NaCl, 500 mM 이미다졸 (pH 7.4)로 용출하고, 분획을 A_{280}에서 흡광도에 기초하여 모으고, 1x PBS 또는 50 mM NaOAc; 150 mM NaCl; pH 4.5에 대하여 투석하였다. 임의의 침전물은 0.22 ㎛에서 여과하여 제거하였다.

<480> 항-IGF1R 피브로넥틴 스캐폴드의 PEG화

<481> 피브로넥틴 스캐폴드-PEG40 분자는 말레이미드 화학을 통해 피브로넥틴 스캐폴드의 C-버전에 대해 2배 과량의 PEG-40-kDa (엔오에프 코퍼레이션)를 사용하여 제조하였다. 반응을 실온에서 2.5시간 동안 진행시켰다. 유리 PEG-40은 양이온 교환 크로마토그래피 (SP-HiTrap; GE)에 의해 피브로넥틴 스캐폴드-PEG-40으로부터 분리하였다. 반응 혼합물을 20 mM NaH_2PO_4 (PH 6.7)로 1:10 희석하고, 평형 버퍼 (20 mM NaH_2PO_4, 10 mM NaCl, pH 6.7)로 예비-평형화시킨 SP-HiTrap 컬럼에 적용하고, 평형 버퍼로 세척하고, 20 mM NaH_2PO_4, 0.5M NaCl (pH 6.7)로 용출하였다. 용출된 분획을 SDS-PAGE 분석에 기초하여 모았다. SP-모은 용출물을 G25 크로마토그래피 (GE)를 통해 PBS 내로 버퍼 교환하였다.

<482> PEG20-피브로넥틴 스캐폴드-PEG20는 말레이미드 화학을 통해 PEG-20-kDa (엔오에프 코퍼레이션)에 대해 2배 과량의 정제된 피브로넥틴 스캐폴드-C를 사용하여 제조하였다. 반응은 실온에서 1시간 동안 수행하였다. peg화되지 않은 피브로넥틴 스캐폴드는 20 mM NaH_2PO_4, 10 mM NaCl (pH 6.7) 버퍼 내에서 SEC 크로마토그래피 (Superose 6; GE)에 의해 PEG20-피브로넥틴 스캐폴드-PEG20으로부터 분리하였다. PEG20-피브로넥틴 스캐폴드-PEG20을 함유하는 분획을 모으고, 더욱 정제하여 모노-peg화된 피브로넥틴 스캐폴드를 제거하였다. 이는 양이온 교환 크로마토그래피 (SP; GE)에 의해 달성하였다. SP-HiTrap 컬럼을 버퍼 A (20 mM NaH_2PO_4, 10 mM NaCl, pH 6.7)으로 예비-평형화시키고, SEC 용출물을 적용한 후, 컬럼을 버퍼 A로 세척한 후, 0-10% 구배의 버퍼 B (20 mM NaH_2PO_4, 1.0 M NaCl, pH 6.7)로 5 컬럼 부피 위로 세척하고, 추가의 5 컬럼 부피에 대해 유지하였다. PEG20-피브로넥틴 스캐폴드-PEG20는 50% 버퍼 B로 용출함으로써 SP-컬럼으로부터 용출시켰다. 분획을 A280에 의해 모으고, G25 크로마토그래피 (GE)에 의해 PBS 내로 버퍼 교환하였다.

<483> IGF-IR-PEG-VEGFR2 결합물질의 생산:

<484> PEG 20을 미량저울 상에서 칭량하고, 100 mg/ml (5 mM)로 20 mM 인산나트륨/10 mM NaCl (pH 6.7) 내에 용해시

켰다. PEG 용액을 클론 385A08 (서열 203) 용액에 5:1 (PEG:단백질)의 몰비로 첨가하였다. 반응액을 혼합하면서 실온에서 적어도 1시간 동안 인큐베이팅하였다.

<485> 385A08-PEG20을 커플링되지 않은 PEG, Bis-385A08, PEG화되지 않은 385A08 단량체 및 385A08 디술피드-연결된 이량체로부터 분리하기 위해, PEG-단백질 반응액을 20 mM 인산나트륨/10 mM NaCl (pH 6.7) (버퍼 A)로 평형화시킨 HiTrap SP 양이온 교환 컬럼 상으로 로딩하였다. 용출 버퍼 (버퍼 B)는 20 mM 인산나트륨/1.0M NaCl (pH 6.7)이다. 10% B (100 mM NaCl)을 사용하는 등용매 용출로 385A08-PEG20- 종을 단리하고, 이를 사용하여 VEGFR2 특이적 결합물질 (서열 128)과 반응시켰다. VEGFR2 특이적 결합물질을 385A08-PEG20-에 첨가하면 385A08-PEG20-VEGFR2 특이적 결합물질 이종2량체를 형성한다.

<486> 크기-배제 크로마토그래피를 수행하여 커플링되지 않은 단량체성 및 이량체성 VEGFR2 특이적 결합물질을 385A08-PEG20-VEGFR2 특이적 결합물질 이종2량체로부터 분리하였다. Superdex 200 컬럼을 20 mM 인산나트륨/10 mM NaCl (pH 6.7)로 평형화시켰다. 385A08-PEG20 + VEGFR2 특이적 결합물질 반응 혼합물을 1.0 ml/min의 유속으로 적용하였다. 385A08-PEG20-VEGFR2 특이적 결합물질에 상응하는 분획을 최종 생성물로서 모았다.

<487> 가용형 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질의 BIAcore 분석:

<488> 표적에 대한 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질 결합 단백질의 결합 운동학을 BIAcore 2000 또는 3000 바이오센서 (파마시아 바이오센서 (Pharmacia Biosensor))를 사용하여 측정하였다. 포획 분석은 IGF-IR-Fc 융합체를 사용하여 개발하였다. 유사한 시약은 문헌 [Forbes et al. 2002, European J. Biochemistry, 269, 961-968]에서 설명되었다. 인간 IGF-IR의 세포외 도메인 (aa 1-932)을 인간 IgG1의 힌지 및 불변 구역을 함유하는 포유동물 발현 벡터 내로 클로닝하였다. 플라스미드의 일시적인 형질감염으로 융합 단백질, IGF-IR-Fc를 생산하고, 이를 후속적으로 단백질 A 크로마토그래피에 의해 정제하고, 아민 커플링에 의해 Biasensor CM5 칩 상에 고정된 단백질 A 상에 포획하였다. 운동학 분석은 단백질 A 상의 IGF-IR-Fc에 이어서, 용액 내의 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질의 주입 및 글라이신 (pH 2.0)에 의한 단백질 A 표면의 재생을 포함하였다. 센소그램 (sensorgram)을 각각의 농도에서 얻고, 프로그램 Biaevaluation, BIA Evaluation 2.0 (BIAcore)을 사용하여 평가하여 속도 상수 k_a (k_{on}) 및 k_d (k_{off})를 얻었다. 해리 상수 K_D는 속도 상수의 비 k_{off}/k_{on}으로부터 계산하였다. 일반적으로, 농도 시리즈 (2 μM 내지 0 μM)의 정제된 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질을 단백질 A 포획된 인간 IGF-IR-Fc 융합 단백질에 대한 결합에 대해 평가하였다.

<489> 인간 인슐린 수용체에 대한 결합을 결정하는 실험을 위해, 재조합 인간 인슐린 수용체 (IR) 및 재조합 인간 VEGF-R2-Fc를 비아코어 (Biacore, 스웨덴 웁살라)에서 권장하는 표준 절차에 따라 아민기 연결에 의해 CM5 Biasensor 칩에 직접 커플링시켰다. 간단히 설명하면, 유동 세포 2 및 3 상에 아세테이트 4.5에 희석시킨 60 ㎍/mL의 IR을 8300 RU의 수준으로 커플링/고정하고, 아세테이트 5.0에 희석시킨 11.9 ㎍/mL의 VEGF-R2-Fc를 9700 RU의 수준으로 고정하였다. 블랭크 (blank) 참조 표면은 FC1 상에 제조하였다. IR 또는 VEGF-R2-Fc에 대한 특이적 결합은 블랭크 참조 유동 세포 1에 대해 관찰된 결합을 공제함으로써 계산하였다. 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질을 HBS-EP (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% 계면활성제 P20) 내에 10 μM로 희석하고, 25℃에서 20 ㎕/min으로 3분 동안 유동 세포 위로 주입하고, 해리를 10분에 걸쳐 관찰하였다.

<490> 시차 주사 열량계:

<491> 중간규모 클론의 시차 주사 열량계 (DSC) 분석을 수행하여 열 안정성을 결정하였다. 적절한 클론의 1 mg/ml 용액을 N-DSC II 열량계 (칼로리메트리 사이언시즈 코프 (Calorimetry Sciences Corp))에서 3 atm 압력 하에 온도를 5℃에서 95℃로 분당 1도의 속도로 상승시킴으로써 스캐닝하였다. 데이타를 Orgin Software (오리진랩 코프 (OrginLab Corp))을 사용하는 최적 적합 (best fit)을 사용하여 적절한 버퍼의 대조 실행에 대해 분석하였다.

<492> 크기-배제 크로마토그래피:

<493> 크기-배제 크로마토그래피 (SEC)는 TSKgel Super SW2000 컬럼 (토소 바이오사이언시즈, 엘엘씨 (TOSOH Biosciences, LLC), 4.6mm x 30cm)을 사용하여 Agilent 1100 HPLC 시스템 상에서 A214 nm 및 A280 nm에서 UV 검출 및 형광 검출 (여기= 280 nm, 방출= 350 nm)를 이용하여 수행하였다. 100 mM 황산나트륨, 100 mM 인산나트륨, 150 mM 염화나트륨 (pH 6.8)의 버퍼를 100 ㎕/min의 유속으로 사용하였다. 샘플 (각각 0.1 내지 1 ㎍)을 약 100 ㎍/mL의 농도로 따로 주입하였다. 겔 여과 표준품 (바이오-라드 래보래토리스 (Bio-Rad Laboratories, 미국 캘리포니아주 허큘레스))을 분자량 검정을 위해 사용하였다.

<494> IGF-IR 피브로넥틴 스캐폴드 클론의 SEC MALLS 분석:

<495> 크기-배제 크로마토그래피 (SEC)는 Waters 2487 UV 검출기가 장치된 Waters Breeze HPLC 시스템 상에서 Superdex 200 컬럼 (지이 헬쓰케어)을 사용하여, 100 mM 황산나트륨, 100 mM 인산나트륨, 150 mM 염화나트륨 (pH 6.8)의 이동상을 0.6 ml/min의 유속으로 적용하여 수행하였다. 샘플을 이동상으로 약 1.0 mg/ml로 희석하고, 50 ㎕을 주입하였다. 다각 레이저 광 산란 (MALLS) 분석은 UV 검출기 뒤에 수직으로 인-라인 (in-line)인 miniDAWN 광 산란 검출기 (와야트 테크놀로지 코퍼레이션 (Wyatt Technology Corporation)) 및 Optilab DSP 시차 굴절계 (와야트 테크놀로지 코퍼레이션)를 사용하여 수행하였다. 광 산란 데이타의 분석은 Astra V 버전 5.1.9.1 소프트웨어 (와야트 테크놀로지 코퍼레이션)를 사용하여 수행하였다. 280 nm에서 흡광도에 의해 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질의 농도를 계산하기 위해, 아미노산 서열에 기반한 이론적 몰 소광 계수를 사용하였다. 굴절률 (Refractive Index)에 의한 농도 결정을 위해, 0.185 mL/g의 추정 비굴절률 증분 (dn/dc)을 사용하였다.

<496> RP-HPLC 크로마토그래피:

<497> 역상 HPLC (RP-HPLC)는 60℃로 가열한 C4 중합체 컬럼 #259VHP5415 (바이닥 (Vydac), 4.6mm x 15cm)를 사용하여 Agilent 1100 HPLC 시스템 상에서 A214 nm 및 A280 nm에서 UV 검출 및 형광 검출 (여기= 280 nm, 방출= 350 nm)을 이용하여 수행하였다. 용매 A는 0.01% TFA를 함유하는 MilliQ 수로 이루어지고, 용매 B는 0.01% TFA를 함유하는 100% HPLC-등급 아세토니트릴이었다. 1 mL/min의 유속을 사용하였다. 용출 계획은 10% B로 10 min 동안 평형 조건에 이어서, 30 min에 걸쳐 50% B까지의 선 구배로 이루어졌다. 이들 조건 하에, 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질은 총 실행 시간의 약 25 내지 30분에서 용출되었다.

<498> MALDI TOF 질량 분광법:

<499> 피브로넥틴-기반 스캐폴드 단백질은 Voyager DE PRO 질량 분광기 (어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems))를 사용하여 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화법 (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight; MALDI-TOF) 질량 분광기 (도 14)에 의해 분석하였다. 샘플을 0.1% TFA로 약 1.0 mg/ml로 희석하였다. 약 12 ㎕의 샘플을 C4 ZipTip (밀리포어 코퍼레이션 (Millipore Corporation)) 상으로 로딩하고, 0.1% 트리플루오로아세트산 (TFA)으로 세척하여 염 및 오염물을 제거하였다. 샘플은 2 ㎕의 시나핀산 (Sinapinic Acid) 매트릭스 (70% 아세토니트릴, 0.1% TFA 중 10 mg/ml)를 사용하여 ZipTip으로부터 표적 플레이트 상으로 직접 용출시켰다. 기구의 표준화는 시나핀산 내에 5 μM의 최종 농도로 제조되고 플레이트 상으로 점적된 공지 질량의 2개의 단백질: 사이토크롬 C (12361.96 Da) 및 아포미오글로빈 (16952.27 Da)을 사용하여 수행하였다. 스펙트럼은 다음 기구 세팅에서 획득하였다: 가속 전압 25000V, 그리드 (Grid) 전압 91%, 가이드 와이어 (Guide Wire) 0.1%, 추출 지연 시간 400 nsec, 레이저 강도 3824. 비처리 스펙트럼은 기저선 교정, 및 9의 필터 폭 값을 갖는 가우스 (Gaussian) 평활 알고리즘을 적용함으로써 Data Explorer v. 4.5 (어플라이드 바이오시스템즈)에서 처리하였다.

<500> 세포 분열촉진 분석:

<501> 인간 췌장 선암종 세포주 BxPC-3 (ATCC)를 96 웰 플레이트 내에 2500 세포/웰의 농도로 10% 태소 혈청 (하이클론)을 함유하는 RPMI 1640 (인비트로겐) 내에 플레이팅하였다. 다음날, 세포를 0.1% BSA (시그마)를 함유하는 RPMI 1640으로 이루어지는 무영양 (starvation) 배지 내에 세척하였다. 세척한 세포를 4시간 동안 다양한 농도의 각각의 IGF-IR 길항제를 함유하는 무영양 배지 내에서 예비-인큐베이팅하였다. 4시간 예비-인큐베이션 후, 세포를 IGF-I에 25 ng/mL에서 노출시키고, 24시간 동안 37℃, 5% CO_2에서 인큐베이팅하였다. 인큐베이션의 처음 4시간 동안, 세포를 [^{3}H]-티미딘 (0.25 μCi/웰; 퍼킨 엘머 (Perkin Elmer, 미국 매사추세츠주 웰즐리))에 노출시켰다. 인큐베이션 기간 후, 세포를 PBS 내에서 세척하고, 0.1% SDS + 0.5 N NaOH로 이루어지는 100 ㎕ 버퍼 내에서 용해시키고, TopCount NXT 섬광 계수기 (퍼킨 엘머) 상에서 계수하였다. 데이타를 SigmaPlot (사이스타트 소프트웨어)를 사용하여 분석하였다.

<502> 세포-기반 수용체 차단 분석:

<503> 인간 유방 선암종 MCF-7 (ATCC)를 24 웰 플레이트 내에 50,000 세포/웰의 농도로 10% 태소 혈청 (하이클론)을 함유하는 RPMI 1640 (인비트로겐) 내에 플레이팅하였다. 다음날, 세포를 0.1% BSA (시그마)를 함유하는 RPMI 1640으로 이루어지는 결합 버퍼 내에서 세척한 후, 30분 동안 얼음 상에서 IGF-IR 경쟁물질을 함유하는 200 ㎕ 결합 버퍼 내에서 예비-인큐베이팅하였다. 예비-인큐베이션 기간 후, 40 pM [125I]-IGF-I (퍼킨 엘머) (약

60000 계수/분과 동등함)를 각각의 웰에 첨가하고, 부드럽게 교반하면서 추가의 3시간 동안 얼음 상에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 웰을 0.1% BSA를 함유하는 빙냉 PBS로 세척하였다. 세포를 0.1% SDS + 0.5 N NaOH로 이루어지는 500 ㎕ 버퍼로 용해시켰다. Wallac 1470 감마 계수기 (퍼킨 엘머)를 사용하여 용해물의 방사성을 측정하고, 데이타를 SigmaPlot (사이스타트 소프트웨어)를 사용하여 분석하였다.

<504> NCI-H929 세포 증식 분석:

<505> 인간 형질세포종 세포주 NCI-H929 (ATCC)를 96 웰 플레이트 내에 10000 또는 25000 세포/웰의 농도로 다양한 농도의 IGF-IR 길항제를 함유하는 10% 태소 혈청 (하이클론)을 함유하는 DMEM (인비트로겐) 내에서 플레이팅하였다. 세포를 72시간 동안 37℃, 5% CO_2에서 증식시켰다. 증식 기간 후, 세포를 20 ㎕의 Cell Titer 96 수성 증식 시약 (프로메가)에 노출시키고, 추가의 4시간 동안 인큐베이팅하였다. 490 nm에서 흡광도를 Spectramax Plus 384 (몰레큘라 디바이시즈) 상에서 측정하고, 생성되는 데이타를 SigmaPlot (사이스타트 소프트웨어)를 사용하여 분석하였다.

<506> 32D:IGF-IR 세포 증식 분석

<507> 세포 (10^4)를 96 웰 플레이트 내에 10% 태소 혈청 (하이클론)을 함유하는 RPMI (인비트로겐) 내에서 100 ng/mL 인간 IGF-I (알앤디 시스템즈) 및 IGF-IR 길항제의 존재 하에 접종하였다. 세포를 72시간 동안 37℃, 5% CO_2에서 증식시켰다. 증식 기간 후, 세포를 Cell Titer 96 수성 증식 시약 (프로메가)에 노출시키고, 추가의 4시간 동안 인큐베이팅하였다. 490 nm에서 흡광도를 Spectramax Plus 384 (몰레큘라 디바이시즈) 상에서 측정하고, 생성되는 데이타를 SigmaPlot (사이스타트 소프트웨어)를 사용하여 분석하였다.

<508> Ba/F3:VEGFR2 세포 증식 분석

<509> 쥐 IL-3-의존 프로-B 세포주 Ba/F3을 키메라 VEGR2 (세포외 도메인)/EpoR (세포내 도메인)을 과다발현하여 VEGF-의존 세포주가 되도록 공학처리하였다. BaF3:VEGFR2 세포 ($2.5x10^4$)를 96 웰 플레이트 내에 10% 태소 혈청 (하이클론)을 함유하는 RPMI (인비트로겐) 내에 VEGFR2 길항제의 존재 하에 접종하였다. 세포를 72시간 동안 37℃, 5% CO_2에서 증식시켰다. 증식 기간 후, 세포를 Cell Titer 96 수성 증식 시약 (프로메가)에 노출시키고, 추가로 4시간 동안 인큐베이팅하였다. 490 nm에서 흡광도를 Spectramax Plus 384 (몰레큘라 디바이시즈) 상에서 측정하고, 생성되는 데이타를 SigmaPlot (사이스타트 소프트웨어)를 사용하여 분석하였다.

<510> IGF-IR-HSA 컨쥬게이트 생산

<511> BM(PEO)2를 몰 과량으로 클론 385A08 (서열 203)에 첨가하였다. 385A08-BM(PEO)2를 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 단리하였다. 유리 술프히드릴기를 갖는 재조합 인간 혈청 알부민을 385A08-BM(PEO)2에 첨가하여 HSA-385A08을 형성하였다. 컨쥬게이트를 음이온 및 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 더욱 정제하였다.

<512> IGF-IR-Fc 융합체 생산

<513> 385A08 (서열 226)의 카르복실-말단 (밑줄친)을 Fc 단편 (Fc 힌지-CH2-CH3) (굵은 글씨)의 아미노-말단 구역에 연결하였다. 입체 장해의 위험을 최소화하기 위해 스페이서 (아래의 경우에)를 둘 사이에 배치하였다. 발현 벡터는 분자가 피치아 세포 내에서 발현되도록 설계하였고, 이는 전통적인 포유동물 세포 방안보다 더 빠르다. 발현 벡터는 또한 피치아 세포에서 발현 동안 분비를 가능하게 하는 알파 인자 신호 펩티드 (이탤릭체)를 포함한다. 상기 신호 서열은 분비 시에 제거되고, 최종 정제된 IGF-IR-Fc 분자의 일부가 아니다. 생성되는 발현 구성체의 서열을 아래에 제시한다.

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTNNG
*LLFINTTIASIAAKEEGVSLEKREAEA*GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYY
RITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTE
IDKPSQdpgs**EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV**
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 247)

<514>

<515> 발현 구성체를 선형화하고, 3개의 피치아 숙주 세포, 즉, X-33, GS115 및 KM17H 내로 형질전환하였다. 형질전환체를 제오신 플레이트 상에서 선택하고, 2 ml 배양액 중에서IGF-IR-Fc 발현에 대해 스크리닝하였다. 선택된

클론을 진탕 플라스크 내에서 다양한 pH에서 성장시키고, 단백질 A 수지에 의해 정제하였다. 발현을 pH 6.5 내지 7.0에서 관찰하였다. 클론 중 하나의 1 L 진탕 플라스크를 사용하여 IGF-IR-DPGG-Ig를 pH 6.7에서 발현시키고, 단백질 A 및 크기 배제를 통해 정제하였다.

<516> 도 28은 정제된 IGF-IR-Ig 융합 단백질의 SDS PAGE 분석을 도시한 것이다. 볼 수 있는 바와 같이, 관찰된 질량은 디술피드-연결된 무손상 IGF-IR-Ig에 대해 예상되는 바와 같이 비환원된 샘플 크기의 약 절반이다.

<517> IGF-IR-HSA 컨쥬게이트의 생체내 종양 연구

<518> 종양을 누드 마우스에서 증식시켰다. 종양 계대접종 (passage)은 인간 RH41 이종이식편에 대해 4주마다 일어났다. 효능 시험에 관하여, 인간 종양 이종이식편을 누드 마우스에 이식하였다. 모든 종양 계대접종은 피하(sc)로 이루어졌다.

<519> 항종양 활성은 a) 치유 (cure), 및 쥐 종양 모델에 대해, 처리군 (T) 대 대조군 (C)의 상대적인 중간 생존 시간 (MST) (즉, %T/C 값)에 의해 반영되는 수명 증가; 및 b) 소정의 "표적" 크기 (설명된 모든 sc 종양 모델에 대해 1 g)의 종양으로 성장하기 위한 T 및 C 마우스에 대한 상대적인 중간 시간을 계산함으로써 결정되고 T-C 값 (일)으로서 표현한 1차 종양 성장 억제의 면에서 평가하였다. 치유된 마우스의 정의는 처리 후 10 초과의 종양 부피 배가 시간 (TVDT)을 평가할 때 그의 종양이 검출불가능하거나 <35 mg인 마우스이다. 종양 억제/감소에 대한 활성 기준은 ≥ 1 총 로그 세포 치사 (LCK)에 일치하는 1차 종양 성장에서 통계학상 유의한 지연이었다. 다음 식을 사용하여 LCK를 계산하였다:

<520> LCK = T-C/(3.32 x TVDT)

<521> 식에서, TVDT = 표적 크기에 도달하기 위한 대조 종양에 대한 중간 시간 (일) - 표적 크기의 절반에 도달하기 위한 대조 종양에 대한 중간 시간 (일). 최대 치료 효과를 일으키는 화합물의 용량을 최적 용량 (OD)으로 칭한다. 약물 독성으로 인한 1 초과의 사망이 있는 처리군 (대개 8마리의 마우스)은 과도한 독성 처리를 받은 것으로 간주하였고, 이들의 데이타는 항종양 활성의 평가에 사용하지 않았다. 최대 허용 용량 (MTD)은 과도한 독성 (즉, 1 초과의 사망)이 일어난 바로 미만의 용량 수준으로서 정의한다. 종양이 표적 크기에 도달하기 전에 죽은 처리된 마우스는 약물 독성으로 인해 죽은 것으로 간주하였다. 데이타의 통계학적 평가는 게한 (Gehan)의 일반화된 윌콕슨 (Wilcoxon) 테스트 (Gehan, Biometrika 52:203-223, 1965)를 사용하여 수행하였다.

<522> 385A08-Fc의 웨스턴 블롯 분석

<523> Rh41 인간 횡문근육종 세포를 0.3% BSA의 존재 하에 밤새 혈청이 없도록 한 후, 이들을 용해 전에 IGF-I, IGF-II 또는 인슐린 리간드 (50 ng/ml)로 5분 동안 자극한 후 385A08-Fc에 1 hr 동안 37℃에서 노출시켰다. 세포를 TTG 버퍼 (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1% Triton X-100, 5% 글리세롤, 0.15M NaCl, 1 mM EDTA, Complete Tablets 및 포스파타제 억제제 칵테일) 내에서 용해시켰다. 총 세포 용해물의 단백질 농도를 표준품으로서 BSA를 사용하여 결정하였다. 각각의 용해물로부터 동일량의 단백질을 겔의 각각의 웰에 로딩하였다. 단백질을 SDS PAGE에 의해 분리하고, 니트로셀룰로스 막에 옮기고, Odyssey 차단 버퍼 (리-코르 바이오사이언시스 (Li-Cor Biosciences)) 내에서 밤새 4℃에서 차단하였다. 막을 IGF-IR, Akt 및 MAPK에 대한 포스포-특이적 항체로 2 hr 동안 실온에서 프로빙한 후, 0.1% Tween-20을 갖는 TBS 내에 3회 세척하였다. 세척 후에, 막을 형광-표지된 2차 항체와 함께 인큐베이팅하였다. 단백질 가시화는 형광 신호의 동시 및 독립적 검출을 가능하게 하는 Odyssey 적외선 영상 시스템 (리-코르 바이오사이언시스)를 이용하여 수행하였다. 리-코르 바이오사이언시스 영상 시스템을 사용하는 농도측정 스캐닝에 기초하여, 로딩 대조군으로 사용된 액틴 또는 GAPDH에 표준화한 후 비처리된 대 처리된 샘플 내의 포스포-신호의 비를 비교함으로써 억제를 계산하였다.

<524> Rh41 (인간 횡문근육종) 및 H929 (인간 다발 골수종) 내에서 세포 증식.

<525> 증식은 시약에 72시간 노출 후 DNA 내로 [3H]-티미딘의 통합에 의해 평가하였다. Rh41 세포를 3500 세포/웰 및 H929 세포를 8000 세포/웰의 밀도에서 96-웰 미세적정 플레이트 내에 플레이팅하고, 24시간 후 이들을 다양한 약물 농도에 노출시켰다. 37℃에서 72시간 인큐베이션 후, 세포를 4 μCi/ml [3H] 티미딘 (아머샴 파마시아 바이오테크 (Amersham Pharmacia Biotech, 영국))로 3시간 동안 펄싱하고, 트립신처리하고, UniFilter-96, GF/B 플레이트 (퍼킨엘머 (PerkinElmer, 미국 매사추세츠주 보스톤)) 상에 회수하고, 섬광을 TopCount.NXT (패커드 (Packard, 미국 코네티컷주)) 상에서 측정하였다. 결과를 IC50 (세포 증식을 비처리된 대조 세포에 비해 50% 억제하기 위해 요구되는 약물 농도)으로 표현한다. 데이타는 표준 편차를 보여주는 3중 웰의 평균을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

<73> 도 1. 인간 IGF-IR 결합 클론의 단리를 위한 선택 프로필. 랜덤 (random) 피브로넥틴 스캐폴드 도메인 단백질의 라이브러리 (library)를 사용한 PROfusion 실험 과정 동안 % IGF-IR 결합의 증가를 예시하는 그래프가 도시된다. 1조의 mRNA/cDNA-단백질 융합체의 라이브러리를 용액 내에서 100 nM 비오티닐화 IGF-IR에 결합시키고, 스트렙타비딘-코팅 자석 비드 상에 포획하였다. cDNA를 용출하고, PCR에 의해 증폭시키고, mRNA/cDNA-단백질 융합체의 새로운 라이브러리를 생성하기 위해 사용하였다. 5 라운드의 PROfusion을 상기 방식으로 수행하고, IGF-IR에 결합하는 라이브러리의 백분율을 정량적 PCR에 의해 모니터링하였다.

<74> 도 2. 인간 IGF-IR 경쟁적 클론의 SDS PAGE. 실시예 35에 설명된 바와 같이 HTPP에 의해 정제된 인간 IGF-IR 경쟁적 Adnectins을 보여주는 SDS PAGE 겔이 도시된다. 샘플을 10% NuPAGE 미니겔 상으로 로딩하고, 사이프로-오렌지 (Sypro-orange)를 사용하여 염색하였다.

<75> 도 3. 인간 IGF-IR 경쟁적 클론 218C04의 정제 단계의 SDS PAGE. SDS PAGE 겔은 실시예 35에 설명된 바와 같이 인간 IGF-IR 경쟁적 피브로넥틴 스캐폴드 도메인 단백질, 본 경우에는 선도 (lead) 클론 218C04의 전형적인 중간-규모 (mid-scale) 정제 및 최종 생성물의 품질을 예시한다. 샘플을 10% NuPAGE 미니겔 상으로 로딩하고, 사이프로-오렌지를 사용하여 염색하였다.

<76> 도 4. 인간 IGF-IR 경쟁적 클론 218C04의 크기-배제 크로마토그래피. 대표적인 인간 IGF-IR 경쟁적 피브로넥틴 스캐폴드 도메인 단백질 선도물, 구체적으로 클론 218C04의 크기-배제 크로마토그램. 크로마토그래피의 상세한 내용은 실시예 35에 설명된다. 형광 검출을 사용하였다.

<77> 도 5. 인간 IGF-IR 경쟁적 클론 218C04의 최적화. 개략도는 인간 IGF-IR 피브로넥틴 스캐폴드 도메인 단백질 선도물, 본 예에서 클론 218C04에 대한 전형적인 최적화 단계를 예시한다. 도 5a는 각각 클론 218C04로부터의 하나의 루프의 랜덤화에 의해 얻은 3개의 라이브러리로부터의 결과를 도시한 것이다. 1조의 mRNA/cDNA-단백질 융합체의 라이브러리를 용액 내에서 100 nM 비오티닐화 IGF-IR에 결합시키고, 스트렙타비딘-코팅 자석 비드 상에 포획하였다. cDNA를 용출시키고, PCR에 의해 증폭시키고, mRNA/cDNA-단백질 융합체의 새로운 라이브러리를 생성하기 위해 사용하였다. 정량적 PCR에 의해 측정할 때 IGF-IR에 결합된 비율이 1%를 초과할 때까지 라이브러리 제조 및 친화도 선택의 과정을 반복하였다. 이 시점에서, 최적화된 루프를 증폭시키고 재조합하여 3개의 모든 최적화된 루프를 함유하는 단일 라이브러리를 제조하였다 (도 5b). 상기 라이브러리로부터의 mRNA/cDNA-단백질 융합체를 IGF-IR-코팅 비드 상에 포획시킨 후, 1 nM 비오티닐화 IGF-IR을 사용하여 3 라운드의 PROfusion을 수행하였다. 각각의 경우에, 결합 백분율을 정량적 PCR에 의해 측정하였다 (도 5c).

<78> 도 6. 클론 218C04 최적화된 클론의 IGF-I/IGF-IR 경쟁 분석. 그래프는 실시예 35에 설명된 바와 같은 경쟁적 ELISA에서 IGF-I과 IGF-IR 사이의 상호작용을 억제하는 능력이 개선된 최적화된 피브로넥틴 스캐폴드 도메인 단백질의 예를 보여준다.

<79> 도 7. 선택된 클론 218C04 최적화되고 정제된 IGF-IR 클론의 SDS PAGE. 선도물의 최적화로부터 유래되고 실시예 35에 설명된 바와 같이 HTPP에 의해 정제된 개선된 인간 IGF-IR 경쟁적 Adnectins을 보여주는 SDS PAGE 겔이 도시된다. 샘플을 10% NuPAGE 미니겔 상으로 로딩하고, 사이프로-오렌지를 사용하여 염색하였다.

<80> 도 8. 최적화된 경쟁적 IGF-IR 클론 338A06의 시차 주사 열량계. 대표적인 IGF-IR 최적화된 클론, 본 경우에는 클론 338A06의 시차 주사 열량계 (DSC). 흑색 선은 원 데이타이고, 적색 선은 피트 (fit)이다. DSC는 실시예 35에 설명된 바와 같이 수행하였다.

<81> 도 9. 최적화된 IGF-IR 경쟁적 클론 338A06의 SEC. 최적화 과정으로부터 유래된 대표적인 인간 IGF-IR 경쟁적 피브로넥틴 스캐폴드 도메인 단백질, 구체적으로 클론 338A06의 크기-배제 크로마토그램. 크로마토그래피의 상세한 내용은 실시예 35에 설명된다. 형광 검출을 사용하였다.

<82> 도 10. 최적화된 IGF-IR 경쟁적 클론 338A06의 SEC MALLS. 피브로넥틴 스캐폴드 도메인 단백질 클론 338A06의 SEC MALLS. 용출 피크에 대한 용출 시간 대 몰 질량의 플롯. 레일리 (Rayleigh) 비는 용매 단독에 의해 산란되는 것에 비해 산란된 과도한 광 (90° 검출기만을 도시함)이다.

<83> 도 11. IGF-IR 경쟁적 클론 338A06의 질량 분광법. 인간 IGF-IR 경쟁적 클론 338A06의 MALDI MS. 샘플 제조 및 실험 조건은 실시예 35에 설명된 바와 같다.

<84> 도 12. 클론 338A06의 IGF-I 증식 분석. 그래프는 선택된 인간 경쟁적 IGF-IR 결합 클론, 본 경우에는 클론 338A06에 의한 IGF-I 매개 분열촉진의 억제를 보여준다. 시판 중화 항-IGF-IR Mab (MAB391)에 대한 비교를 포함하였다. 인간 췌장 선암종 세포주 BxPC-3을 실시예 35에 설명된 바와 같이 사용하였다.

<85> 도 13. IGF-IR 경쟁적 클론 338A06의 IGF-IR 억제 분석. 그래프는 선택된 인간 경쟁적 IGF-IR 결합 클론, 본 경우에는 클론 338A06에 의한 IGF-I과 IGF-IR 사이의 상호작용의 파괴를 보여준다. IGF-I 및 시판 중화 항-IGF-IR Mab (MAB391)에 대한 비교를 포함하였다. 인간 유방 선암종 MCF-7을 실시예 35에 설명된 바와 같이 사용하였다.

<86> 도 14. 클론 338A06 FG 루프 최적화된 클론의 IGF-IR 결합 분석. 그래프는 실시예 35에 설명된 바와 같이 직접 결합 ELISA에서 클론 338A06 FG 루프 최적화된 클론의 활성을 보여준다.

<87> 도 15a-15b. FG 루프 최적화된 338A06 IGF-IR 경쟁적 클론의 SEC. 18개의 선택된 FG 루프 최적화된 338A06 IGF-IR 경쟁적 클론의 크기-배제 크로마토그램. 크로마토그래피 조건은 실시예 29에 설명되어 있다. 형광 검출을 사용하였다.

<88> 도 16. IGF-IR FG 루프 최적화된 클론 387B01의 SEC. 중간규모 수준으로 정제된 대표적인 인간 FG 루프 최적화된 338A06 IGF-IR 경쟁적 클론, 구체적으로 클론 387B01의 크기-배제 크로마토그램. 크로마토그래피의 상세한 내용은 실시예 35에 설명된다. 형광 검출을 사용하였다.

<89> 도 17. IGF-IR FG 루프 최적화된 클론 387B01의 RP-HPLC. 중간규모 수준으로 정제된 대표적인 인간 FG 루프 최적화된 338A06 IGF-IR 경쟁적 클론, 구체적으로 클론 387B01의 RP-HPLC 크로마토그램. 크로마토그래피의 상세한 내용은 실시예 35에 설명된다. A280 nm에서 검출을 사용하였다.

<90> 도 18. IGF-IR FG 루프 최적화된 클론 387B01의 MALDI TOF 질량 분광법. 중간규모 수준으로 정제된 대표적인 인간 FG 루프 최적화된 338A06 IGF-IR 경쟁적 클론, 구체적으로 클론 387B01의 MALDI MS. 샘플 제조 및 실험 조건은 실시예 35에 설명된 바와 같다.

<91> 도 19. PEG화 단백질의 SDS PAGE. 385A08의 PEG화 변이체를 보여주는 SDS PAGE 겔이 도시된다. PEG화 조건은 실시예 35에 설명된 바와 같다. 샘플을 10% NuPAGE 미니겔 상으로 로딩하고, 사이프로-오렌지를 사용하여 염색하였다.

<92> 도 20. PEG화된 인간 IGF-IR 변이체의 세포-기반 분석. 그래프는 클론 385A08의 선택된 IGF-IR PEG화 변이체에 의한 혈청 매개된 증식의 억제를 보여준다. 인간 형질세포종 세포주 NCI-H929를 실시예 35에 설명된 바와 같이 사용하였다.

<93> 도 21. IGF-IR 다량체의 세포-기반 분석. 그래프는 선택된 IGF-IR 결합 피브로넥틴 스캐폴드 클론에 의한 IGF 매개된 증식의 억제를 보여준다. 공학처리된 림프구 세포주 32D:IGF-IR을 100 ng/mL IGF 및 다양한 농도의 각각의 IGF-IR 길항제 (● IGF-IR 모노클로날 항체 MAB391; ■ IGF-IR 결합 클론 385A08 (서열 226); ○ PEG에 의해 연결된 2개의 IGF-IR 결합 클론 (서열 203): 385A08-PEG20-385A08; ▲ 디술피드 결합에 의해 연결된 2개의 IGF-IR 결합 클론 (서열 203): 385A08-SS-385A08)의 존재 하에 10% 태소 혈청 (하이클론 (Hyclone, 미국 유타주 로간))을 함유하는 RPMI (인비트로겐 (Invitrogen, 미국 캘리포니아주 칼스바드)) 내에서 96 웰 플레이트에 10000 세포/웰의 농도로 플레이팅하였다.

<94> 도 22. IGF-IR/VEGFR2 다량체의 세포-기반 IGF-IR 분석. 그래프는 선택된 IGF-IR 결합 피브로넥틴 스캐폴드 클론에 의한 혈청 매개된 증식의 억제를 보여준다. 인간 형질세포종 세포주 NCI-H929 (ATCC (미국 버지니아주 매나사스))를 다양한 농도의 각각의 IGF-IR 길항제 (● 항-IGF-IR 모노클로날 항체 MAB391, 알앤디 시스템즈 (R&D Systems, 미국 미네소타주 미네아폴리스)); ○ IGF-IR 결합 클론 385A08 (서열 203); ▲ PEG에 의해 연결된 VEGFR2/IGF-IR 결합 클론 (서열 203): 385A08-PEG20-서열 128; ■ VEGFR2 결합 클론 (서열 128))의 존재 하에 10% 태소 혈청 (하이클론)을 함유하는 DMEM (인비트로겐) 내에서 96 웰 플레이트에 25000 세포/웰의 농도로 플레이팅하였다.

<95> 도 23. IGF-IR/VEGFR2 다량체의 세포-기반 VEGFR2 분석. 그래프는 선택된 IGF-IR 결합 피브로넥틴 스캐폴드 클론에 의한 VEGF 매개된 증식의 억제를 보여준다. 공학처리된 pro-B 세포주 hKE8-3 (Ba/F3:VEGFR2)을 5 ng/mL VEGF 및 다양한 농도의 각각의 VEGFR2 길항제 (● VEGFR2 결합 클론 서열 128; ○ 대조 서열 227; ▲ PEG에 의해 연결된 VEGFR2/IGF-IR 결합 클론 (서열 203): 385A08-PEG20-서열 128)의 존재 하에 10% 태소 혈청 (하이클론)을 함유하는 RPMI (인비트로겐) 내에서 96 웰 플레이트에 25000 세포/웰의 농도로 플레이팅하였다.

<96> 도 24. V_H 및 ^{10}Fn3 도메인 구조. 면역글로불린 폴드 (fold)를 갖는 단일 도메인 폴리펩티드 (면역글로불린의 V_H 도메인, 좌측) 및 면역글로불린-유사 폴드를 갖는 단일 도메인 폴리펩티드 (^{10}Fn3 도메인, 우측)에 대한 구조

조직 (organization)이 도시된다.

<97> 도 25. HSA에 연결된 피브로넥틴 스캐폴드 IGF-IR 결합물질의 평가. 그래프는 선택된 IGF-IR 결합 피브로넥틴 스캐폴드 클론에 의한 혈청 매개된 증식의 억제를 보여준다. 인간 형질세포종 세포주 NCI-H929 (ATCC)를 다양한 농도의 각각의 IGF-IR 길항제 (● 항-IGF-IR 모노클로날 항체 MAB391 (알앤디 시스템즈); ○ IGF-IR 결합 클론 385A08 (서열 203); ▲ HSA-385A08 (서열 203); ■ 인간 혈청 알부민 (HSA, 인비트로겐))의 존재 하에 10% 태소 혈청 (하이클론)을 함유하는 DMEM (인비트로겐) 내에서 96 웰 플레이트에 25000 세포/웰의 농도로 플레이팅하였다. 세포를 72시간 동안 37℃, 5% CO_2에서 증식시켰다. 증식 기간 후, 세포를 Cell Titer 96 수성 증식 시약 (프로메가 (Promega, 미국 위스콘신주 매디슨))에 노출시키고, 추가의 4시간 동안 인큐베이팅하였다. 490 nm에서 흡광도를 Spectramax Plus 384 (몰레큘라 디바이시즈 (Molecular Devices, 미국 캘리포니아주 서니베일)) 상에서 측정하고, 생성되는 데이타를 SigmaPlot (사이스타트 소프트웨어 (Systat Software, 미국 캘리포니아주 포인트 리치몬드))를 사용하여 분석하였다.

<98> 도 26. IGF-IR 구성체에 의한 생체내 종양 성장 억제. 중간 종양 부피 (mg) (y-축)를 종양 이식 후 일수 (x-축)에 대해 플로팅한다. X-축의 저변의 삼각형은 투여된 용량을 나타낸다. IGFIR 화합물 (IGF-IR 길항제); 385A08 (서열 226); 385A08-PEG20-385A08 (서열 203-PEG20-서열 203); 385A08-PEG40 (서열 203); 및 385A08-HSA (서열 203)은 Rh41 이종이식편 모델에서 다양한 정도의 종양 억제를 나타낸다.

<99> 도 27. IGF-IR 구성체에 의한 생체내 종양 성장 억제. 500 mg의 중간 군 종양 크기에 도달하기까지의 일수 (y-축)를 도 26에 설명된 바와 같이 상이한 처리군에 대해 플로팅한다 (x-축). 표적 크기에 도달하기까지의 군에 대한 중간 시간을 수평선으로 나타낸다. 대조군에 비해 500 mg에 도달하기까지의 시간에 대해 $^{*}p \leq 0.05$ 또는 $^{***}p \leq 0.0005$.

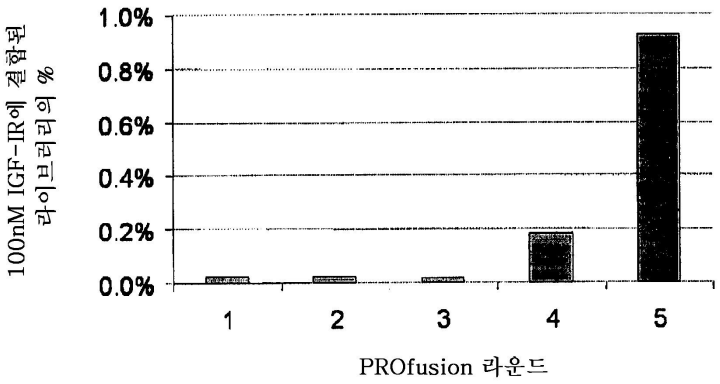
<100> 도 28. IGF-IR-Fc 융합체 구성체의 특성화. 상부 패널은 최좌측 칼럼에 분자량 마커에 이어, 비환원된 IGF-IR-Ig (레인 1), endo-H 처리된 IGF-IR-Ig (레인 2), 및 Endo H (레인 3)를 갖는 SDS PAGE 겔을 보여준다. endo H 처리 시에 보다 낮은 질량으로의 작은 이동은 IGF-IR-Ig 단백질이 소량의 글리코실화를 갖는다는 것을 나타낸다. 하부 패널은 최좌측 칼럼에서 분자량 마커에 이어, 비처리된 IGF-IR-Ig (레인 1), endo-H 처리된 IGF-IR-Ig (레인 2), endo-H 및 SDS 처리된 IGF-IR-Ig (레인 3) 및 Endo H (레인 4)를 갖는, 환원제의 존재 하의 SDS PAGE 겔을 보여준다. 볼 수 있는 바와 같이, 관찰된 질량은 디술피드-연결된 무손상 IGF-IR-Ig에 대해 예상되는 바와 같이 비환원된 샘플의 크기의 약 절반이다.

<101> 도 29는 Rh41 인간 횡문근육종 세포에서 IGF-IR AKT 및 MAPK 인산화를 억제하는 385A08-Fc의 능력을 평가하기 위해 사용된 웨스턴 블롯 (Western Blot)을 도시한 것이다. 세포를 IGF-I, IGF-II, 인슐린 리간드 (50 ng/ml)으로 자극하거나, 자극하지 않고 (NS), 이어서 다양한 농도의 385A08-Fc (서열 226)로 처리하였다. 막을 지시된 바와 같은 항체, 및 포스포-특이적 항체로 프로빙하였다.

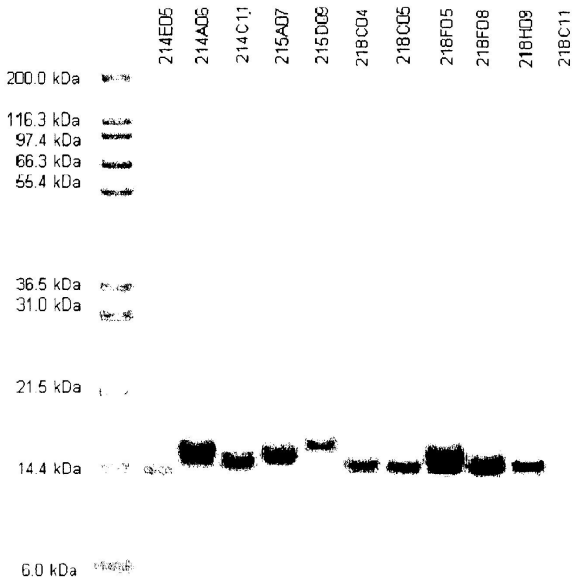
<102> 도 30a-30i는 인간 피브로넥틴 타입 III 도메인의 야생형 10번째 모듈 (서열 1), 실시예 2에서 확인된 IGF-IR 경쟁적 클론 (서열 2-109), 실시예 8의 최적화된 218C04 클론 (서열 110-125), 예시적인 VEGFR-2 결합 ^{10}Fn3 폴리펩티드 (서열 126-183), 실시예 18의 최적화된 338A06 클론 (서열 184-202), 도 21의 IGF-IR 결합 클론 385A08 대조군 (서열 226), 도 23의 피브로넥틴 스캐폴드 단백질 대조군 (서열 227), 예시적인 HSA-IGF-IR 융합 단백질 (서열 228-235), 및 예시적인 트랜스페린-IGF-IR 융합 단백질 (서열 236-243)의 아미노산 서열을 도시한 것이다. BC, DE, 및 FG 루프를 서열 1-125에서 어둡게 표시한다.

도면

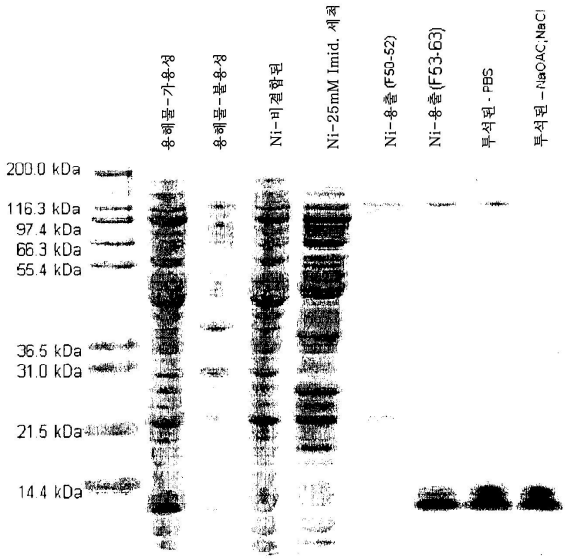
도면1


100nM IGF-IR에 결합된
라이브러리의 %
1.0%
0.8%
0.6%
0.4%
0.2%
0.0%
1
2
3
4
5
PROfusion 라운드

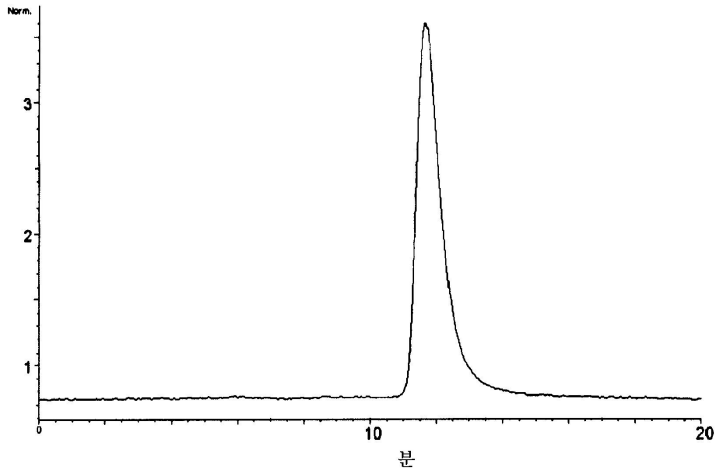
도면2


214E05
214A06
214C11
215A07
215D08
218C04
218C05
218F05
218F08
218H09
218C11
200.0 kDa
116.3 kDa
97.4 kDa
66.3 kDa
55.4 kDa
36.5 kDa
31.0 kDa
21.5 kDa
14.4 kDa
6.0 kDa

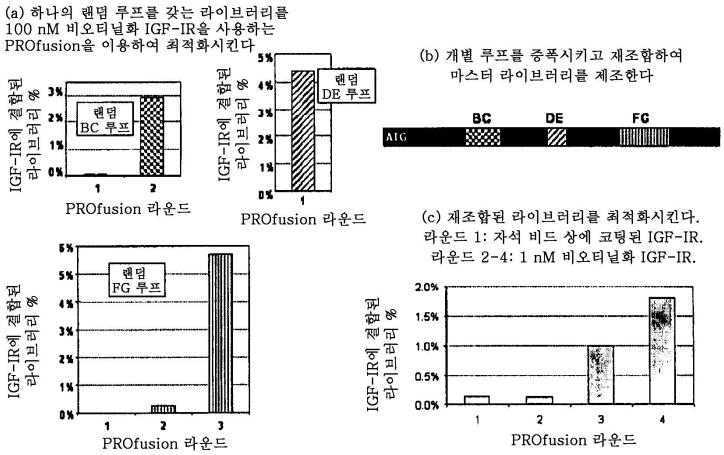
도면3


용해물-가용성
용해물-불용성
Ni-비결합분
Ni-25mM Imid. 세척
Ni-용출(F50-52)
Ni-용출(F53-63)
투석분 - PBS
투석분 - NaOAC,NaCl
200.0 kDa
116.3 kDa
97.4 kDa
66.3 kDa
55.4 kDa
36.5 kDa
31.0 kDa
21.5 kDa
14.4 kDa

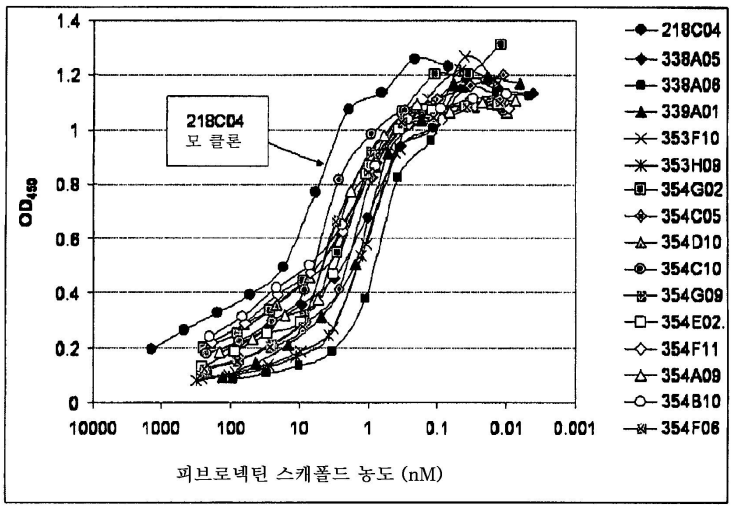
도면4


Norm.
3
2
1
0
10
20
분

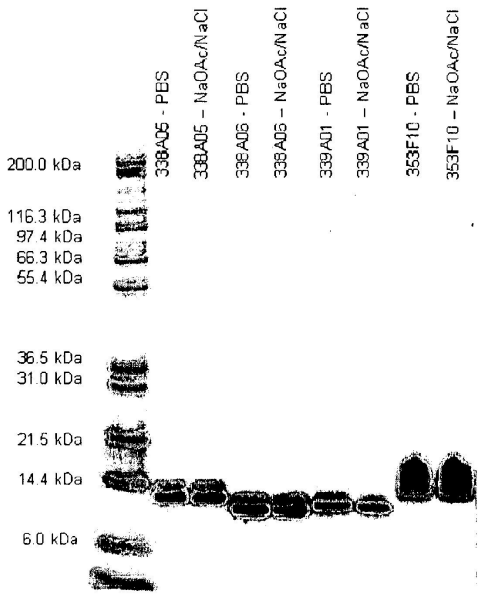
도면5


(a) 하나의 랜덤 루프를 갖는 라이브러리를
100 nM 비오티닐화 IGF-IR을 사용하는
PROfusion을 이용하여 최적화시킨다
IGF-IR에 결합된 라이브러리 %
랜덤
BC 루프
PROfusion 라운드
랜덤
DE 루프
PROfusion 라운드
(b) 개별 루프를 증폭시키고 재조합하여
마스터 라이브러리를 제조한다
ATG
BC
DE
FG
랜덤
FG 루프
PROfusion 라운드
(c) 재조합된 라이브러리를 최적화시킨다.
라운드 1: 자석 비드 상에 코팅된 IGF-IR.
라운드 2-4: 1 nM 비오티닐화 IGF-IR.
PROfusion 라운드

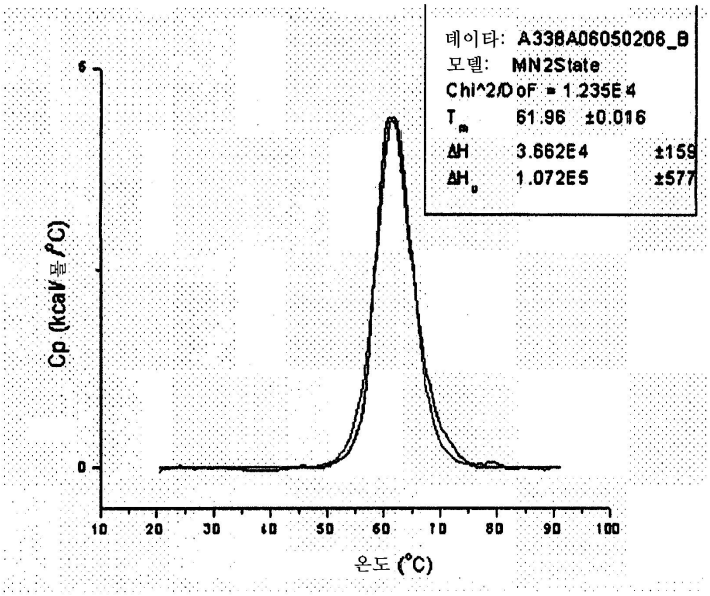
도면6


218C04
모 클론
OD450
피브로넥틴 스캐폴드 농도 (nM)
218C04
338A05
338A08
339A01
353F10
353H08
354G02
354C05
354D10
354C10
354G09
354E02
354F11
354A09
354B10
354F06

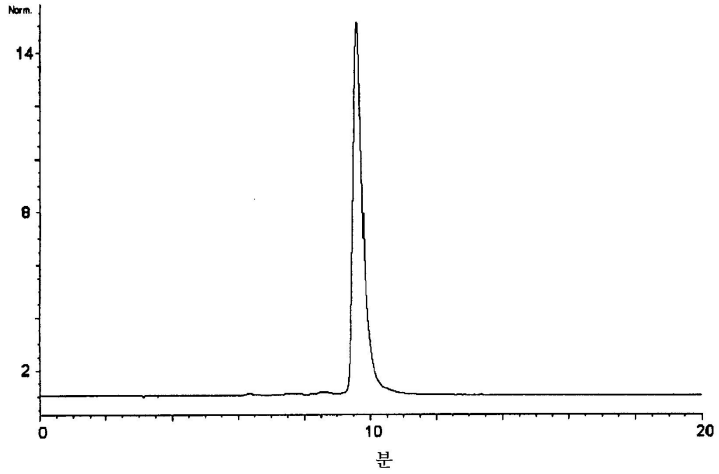
도면7


338A05 - PBS
338A05 – NaOAc/NaCl
338A06 - PBS
338A05 – NaOAc/NaCl
339A01 - PBS
339A01 – NaOAc/NaCl
353F10 - PBS
353F10 – NaOAc/NaCl
200.0 kDa
116.3 kDa
97.4 kDa
66.3 kDa
55.4 kDa
36.5 kDa
31.0 kDa
21.5 kDa
14.4 kDa
6.0 kDa

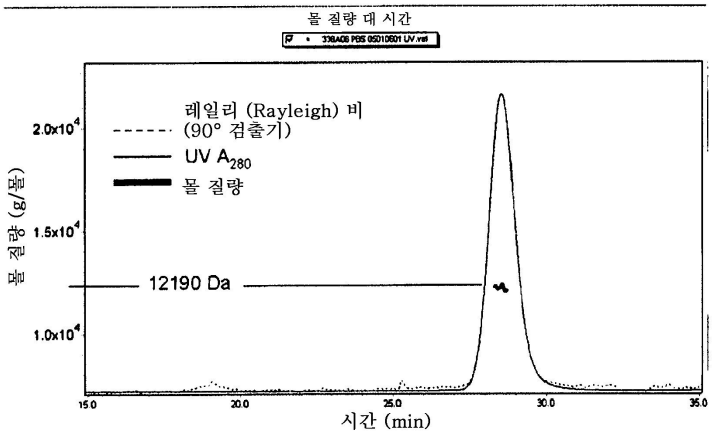
도면8


데이타: A336A06050206_B
모델: MN2State
Chi^2/DoF = 1.235E4
T_m 61.96 ±0.016
ΔH 3.662E4 ±159
$ΔH_v$ 1.072E5 ±577
Cp (kcal/몰/°C)
6
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
온도 (°C)

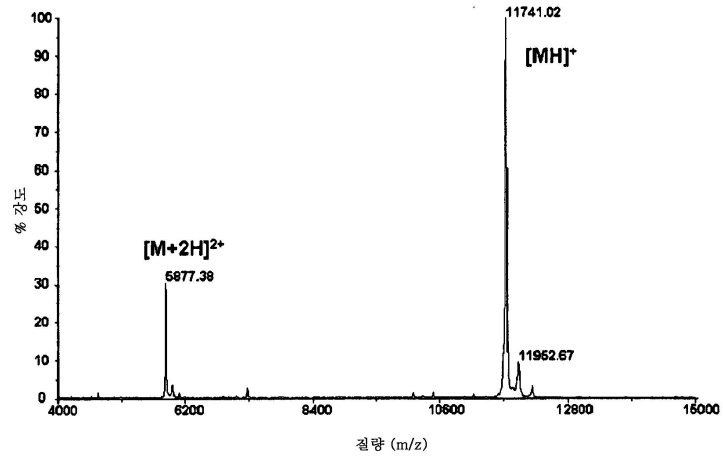
도면9



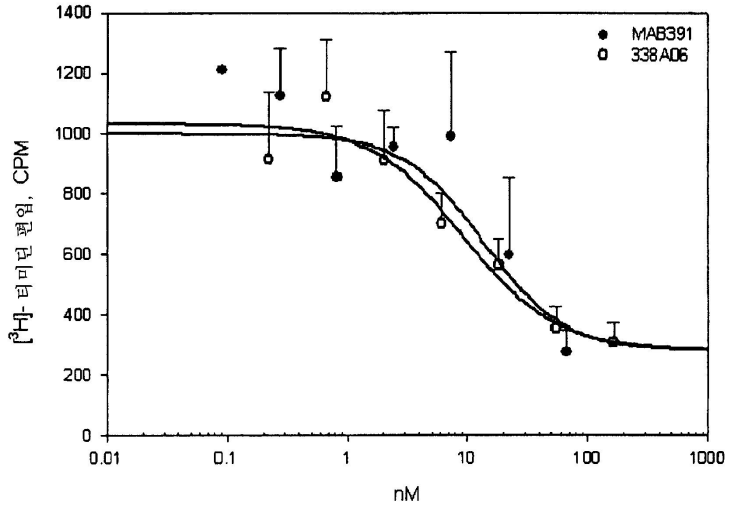
도면10



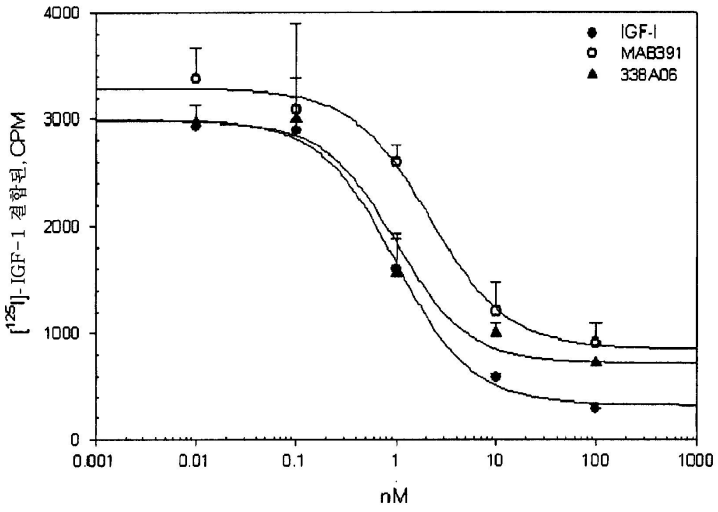
도면11



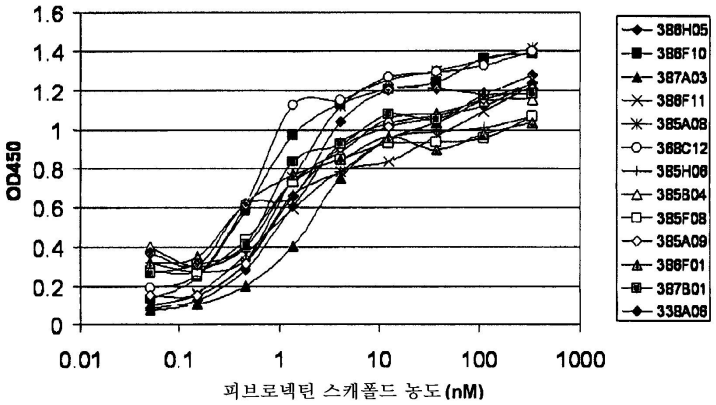
도면12


MAB391
338A06
[3H]-티미딘 편입, CPM
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
nM

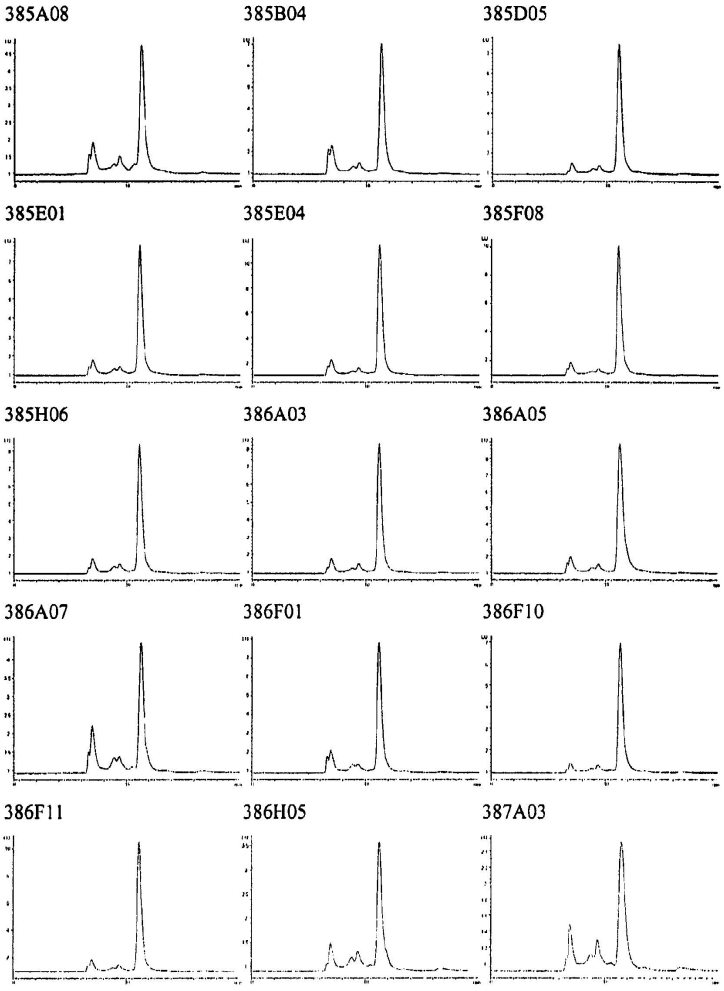
도면13


IGF-I
MAB391
338A06
[125I]-IGF-1 결합된, CPM
4000
3000
2000
1000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
nM

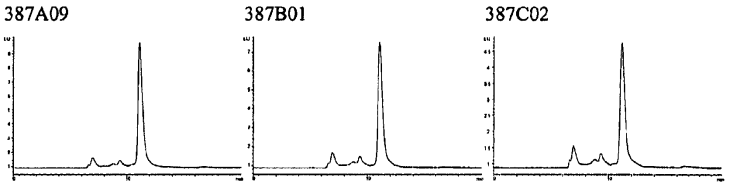
도면14


1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
OD450
0.01
0.1
1
10
100
1000
피브로넥틴 스캐폴드 농도 (nM)
386H05
386F10
387A03
386F11
385A08
386C12
385H06
385B04
385F08
385A09
386F01
387B01
338A08

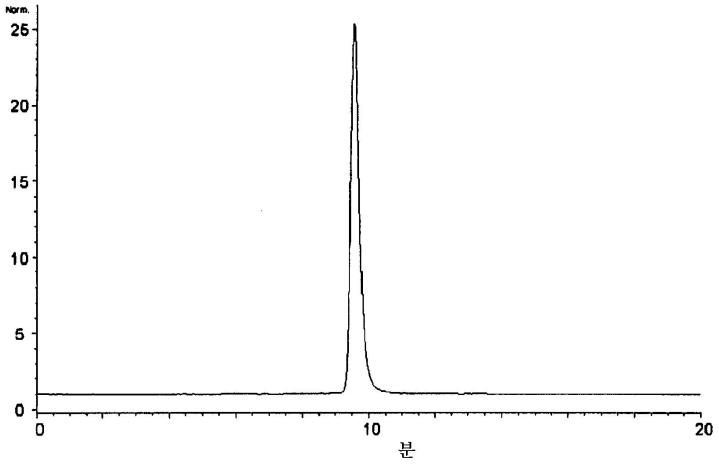
도면15a


385A08
385B04
385D05
385E01
385E04
385F08
385H06
386A03
386A05
386A07
386F01
386F10
386F11
386H05
387A03

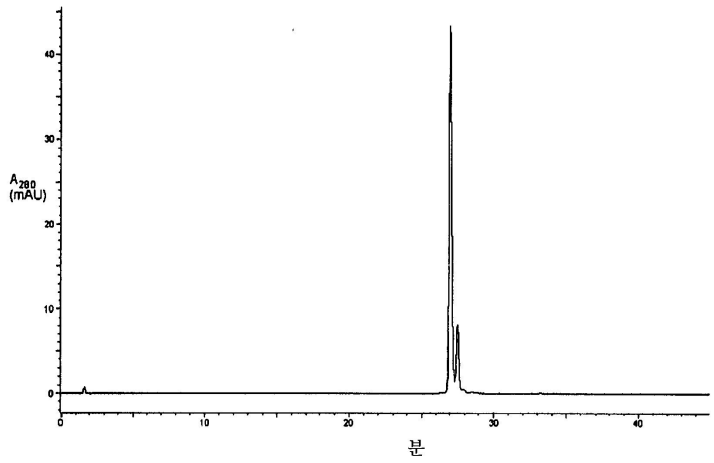
도면15b



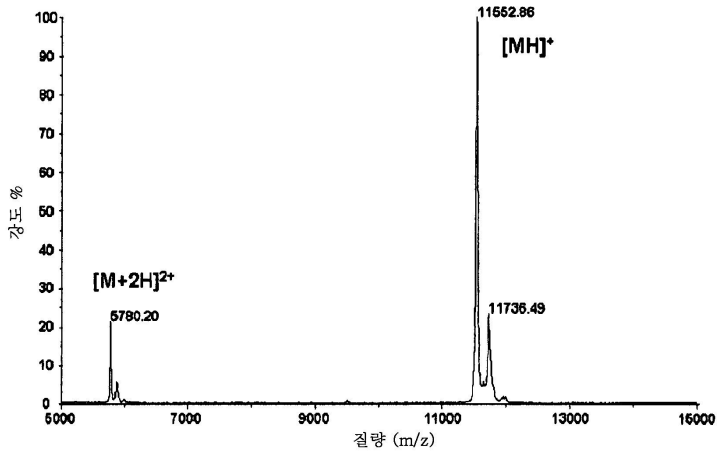
도면16



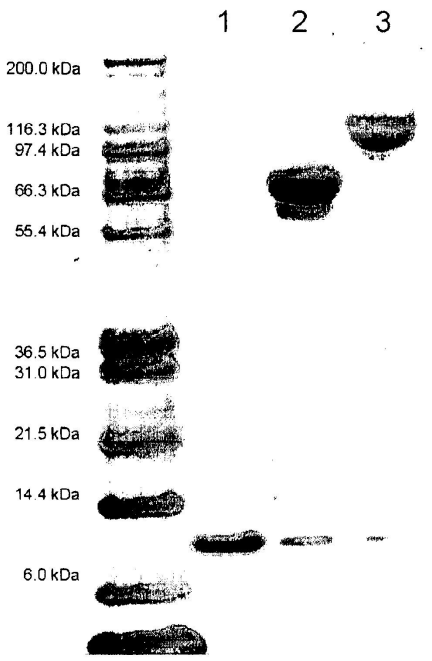
도면17



도면18

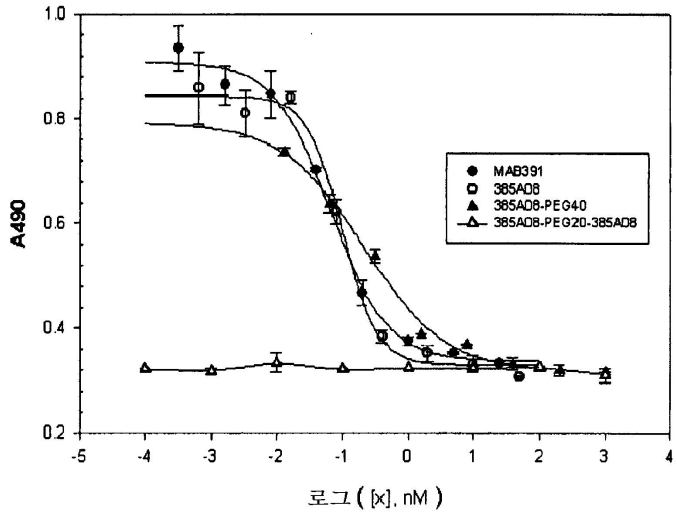


도면19

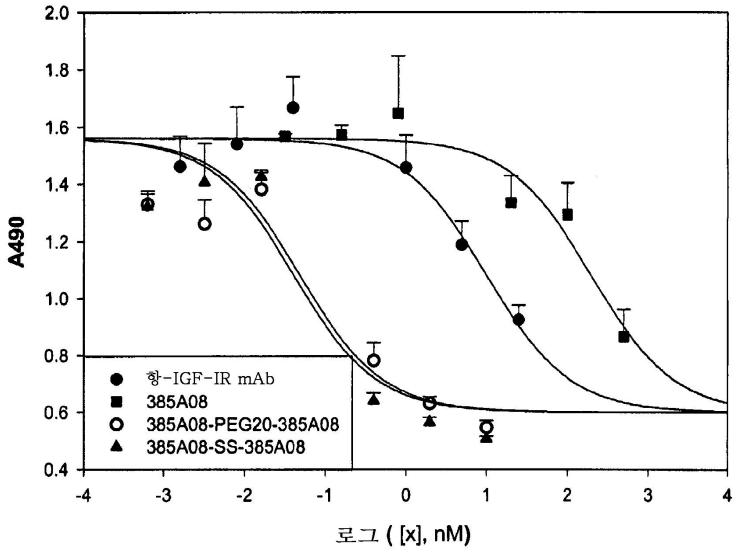


1: 385A08
2: 385A08-PEG20-385A08
3: 385A08-PEG40

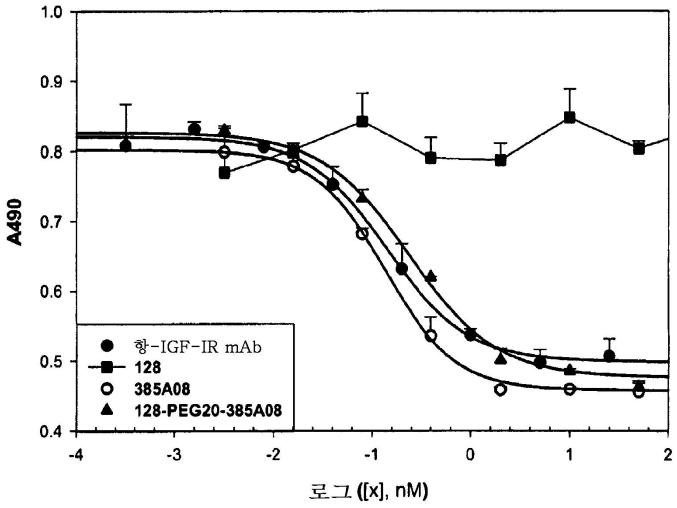
도면20


A490
로그 ([x], nM)
MAB391
385A08
385A08-PEG40
385A08-PEG20-385A08

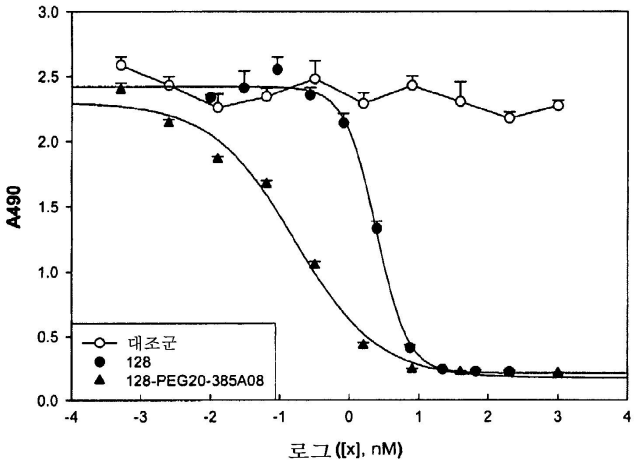
도면21


A490
로그 ([x], nM)
항-IGF-IR mAb
385A08
385A08-PEG20-385A08
385A08-SS-385A08

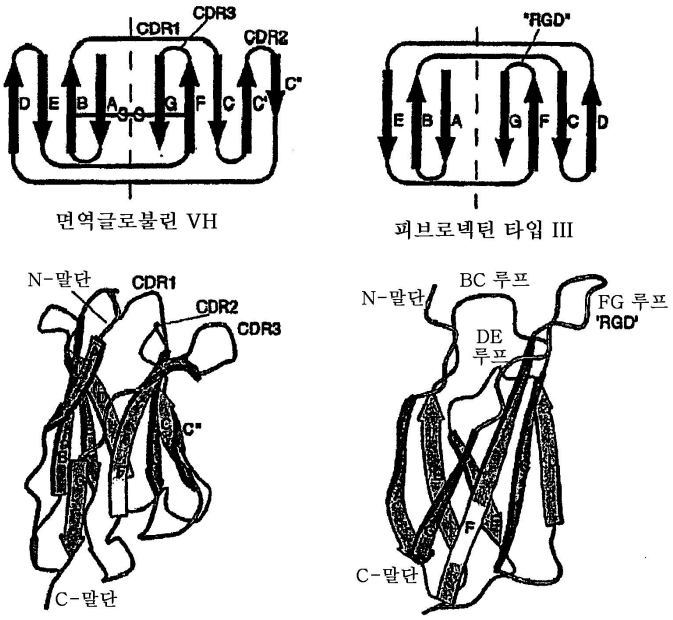
도면22


1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
A490
-4
-3
-2
-1
0
1
2
로그 ([x], nM)
항-IGF-IR mAb
128
385A08
128-PEG20-385A08

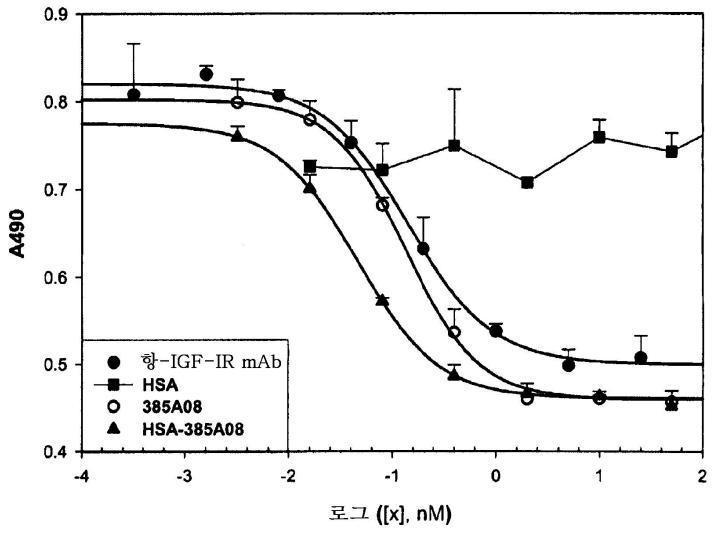
도면23


3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
A490
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
로그 ([x], nM)
대조군
128
128-PEG20-385A08

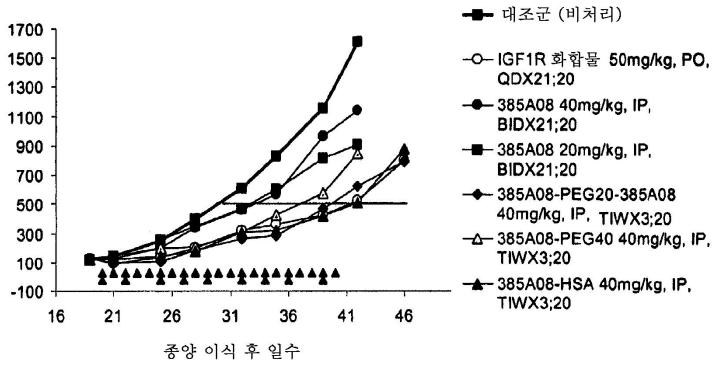
도면24


CDR3
CDR1
CDR2
D E B A G F C C' C"
면역글로불린 VH
"RGD"
E B A G F C D
피브로넥틴 타입 III
N-말단
CDR1
CDR2
CDR3
C"
C-말단
N-말단
BC 루프
FG 루프
'RGD'
DE
루프
C-말단

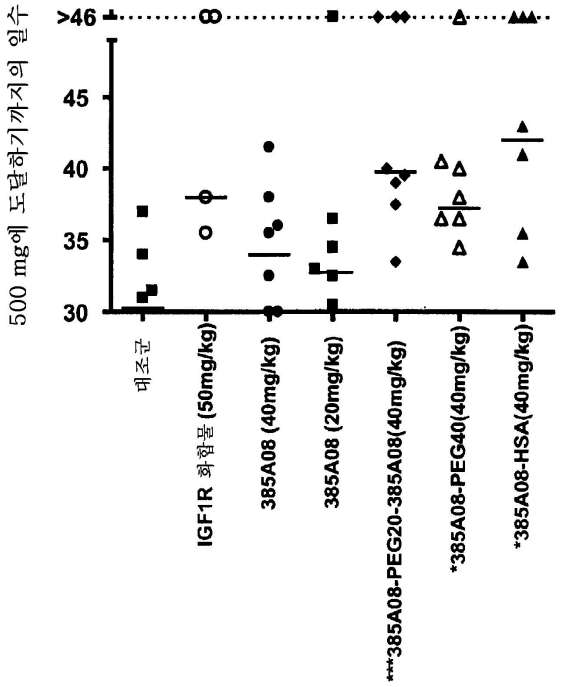
도면25


A490
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
-4
-3
-2
-1
0
1
2
로그 ([x], nM)
항-IGF-IR mAb
HSA
385A08
HSA-385A08

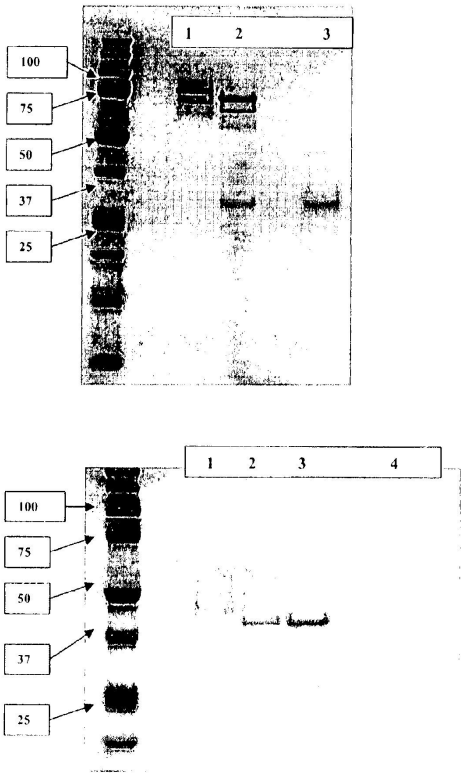
도면26


1700
1500
1300
1100
900
700
500
300
100
-100
16
21
26
31
36
41
46
종양 이식 후 일수
대조군 (비처리)
IGF1R 화합물 50mg/kg, PO, QDX21;20
385A08 40mg/kg, IP, BIDX21;20
385A08 20mg/kg, IP, BIDX21;20
385A08-PEG20-385A08 40mg/kg, IP, TIWX3;20
385A08-PEG40 40mg/kg, IP, TIWX3;20
385A08-HSA 40mg/kg, IP, TIWX3;20

도면27

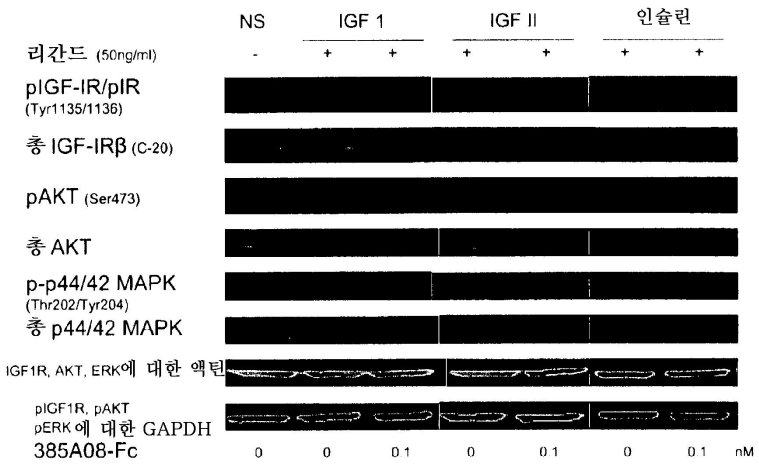

500 mg에 도달하기까지의 일수
>46
45
40
35
30
대조군
IGF1R 화합물 (50mg/kg)
385A08 (40mg/kg)
385A08 (20mg/kg)
***385A08-PEG20-385A08(40mg/kg)
*385A08-PEG40(40mg/kg)
*385A08-HSA(40mg/kg)

도면28



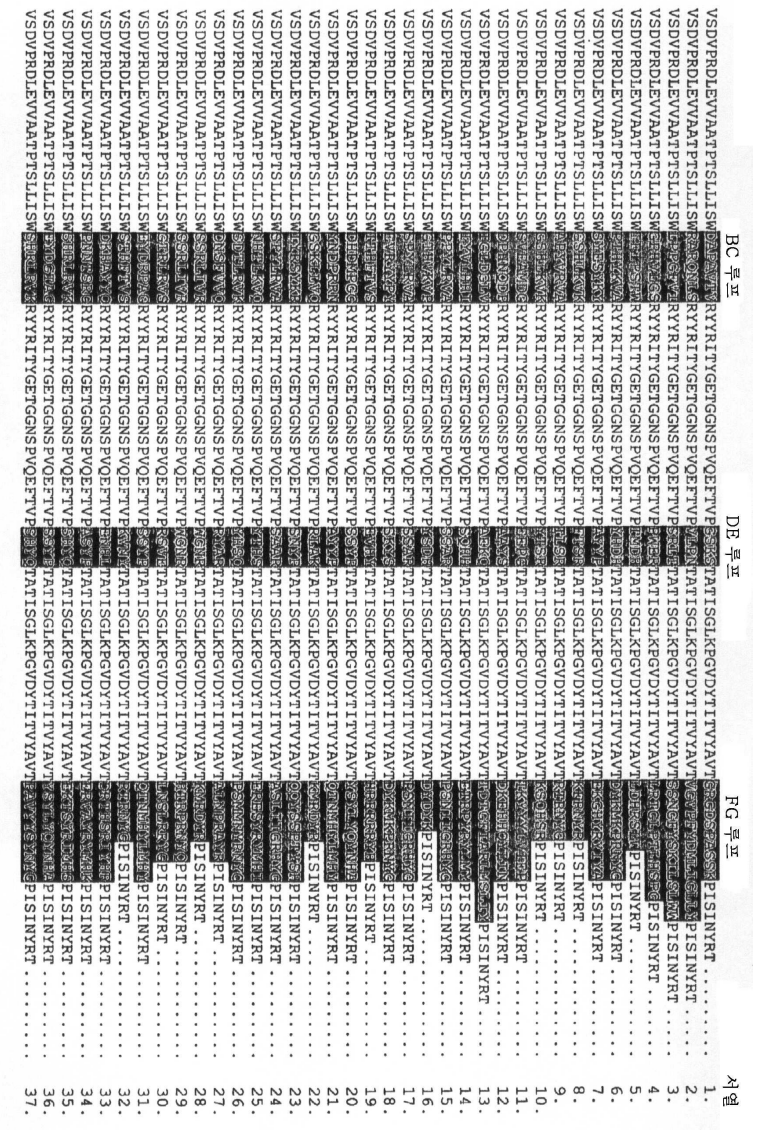
도면29

Rh41 세포에서 385A08-Fc ± IGF-I/IGF-II/인슐린의 생화학

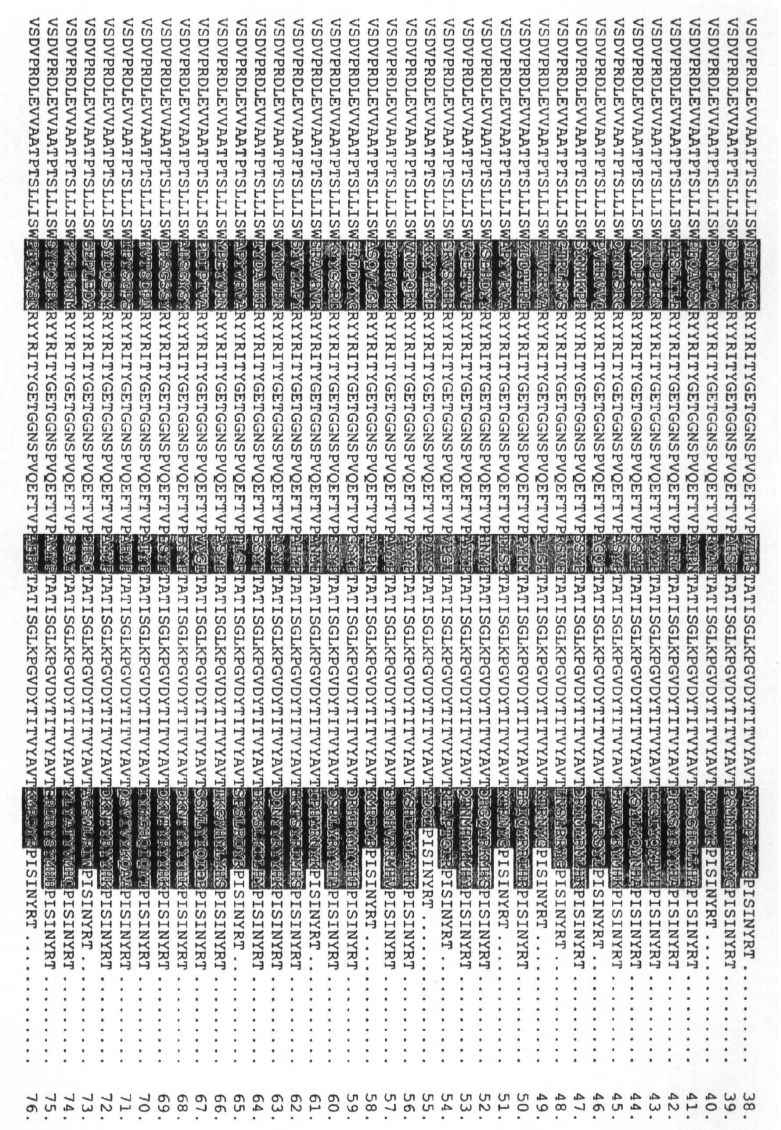


Rh41 세포를 0.3% BAS 배지로 밤새 혈청-처리한 후, 385A08-Fc로 1hr 처리하였다. IGF-I/IGF-II/인슐린 (50 ng/ml)로 5분 동안 자극함.

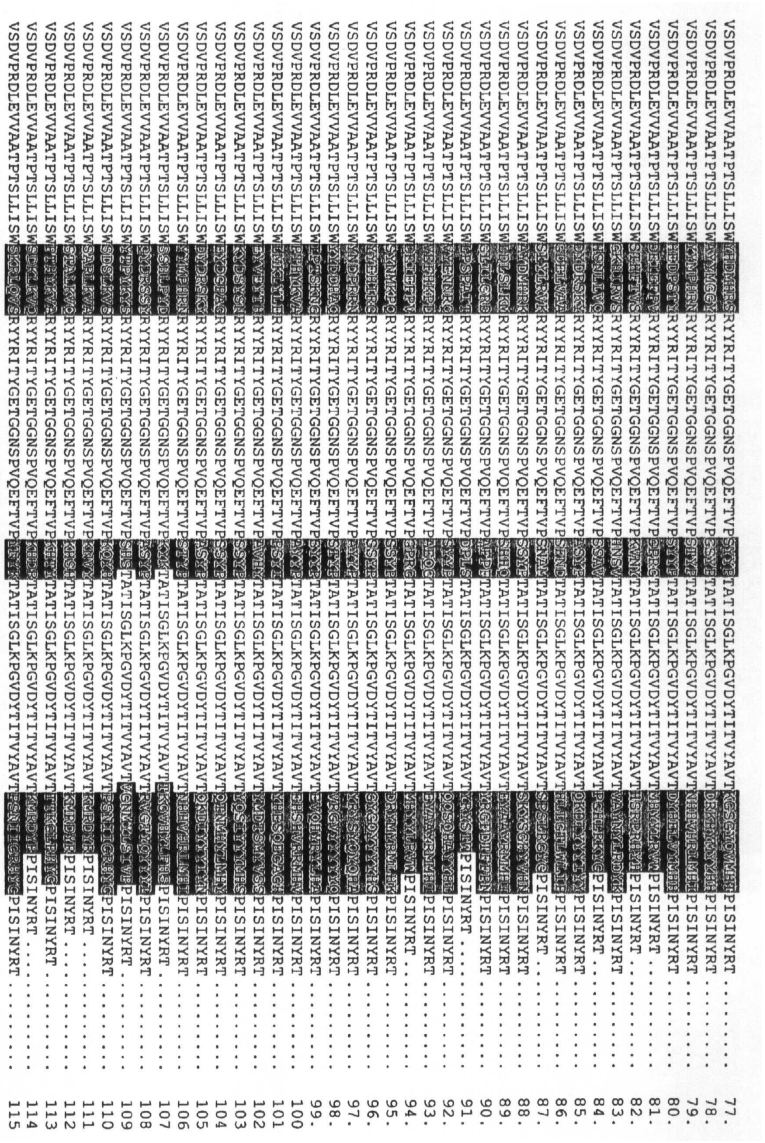
도면30a



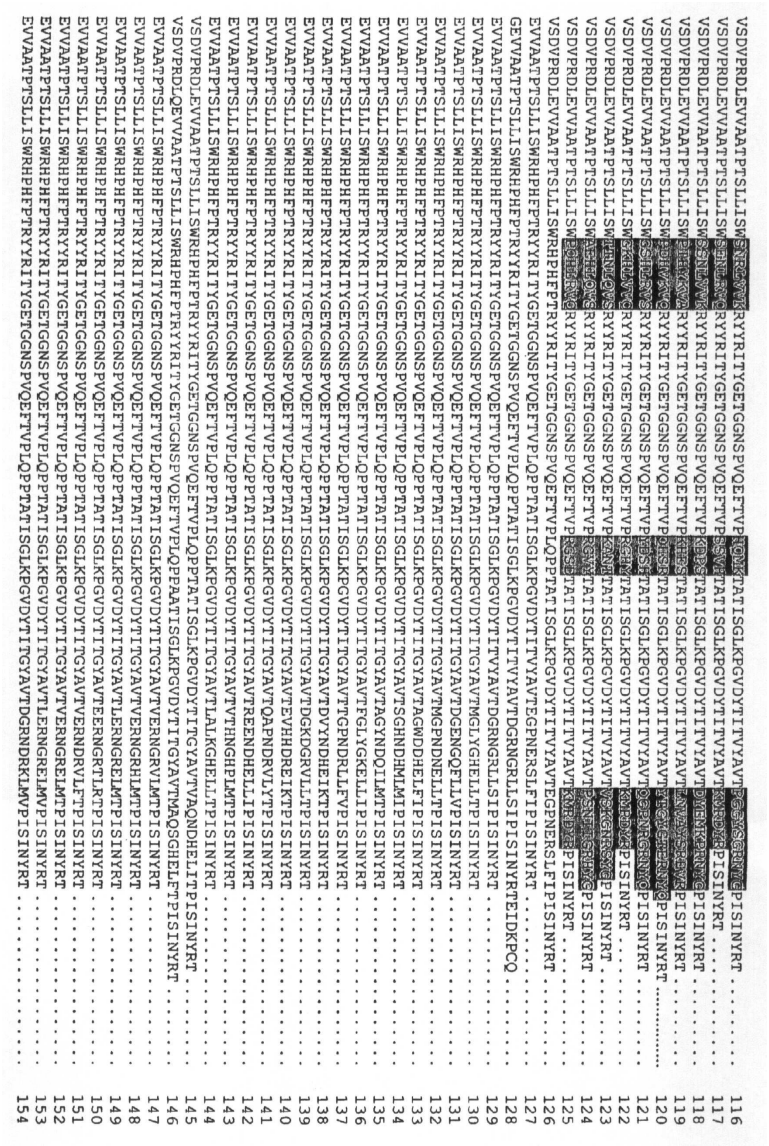
도면30b



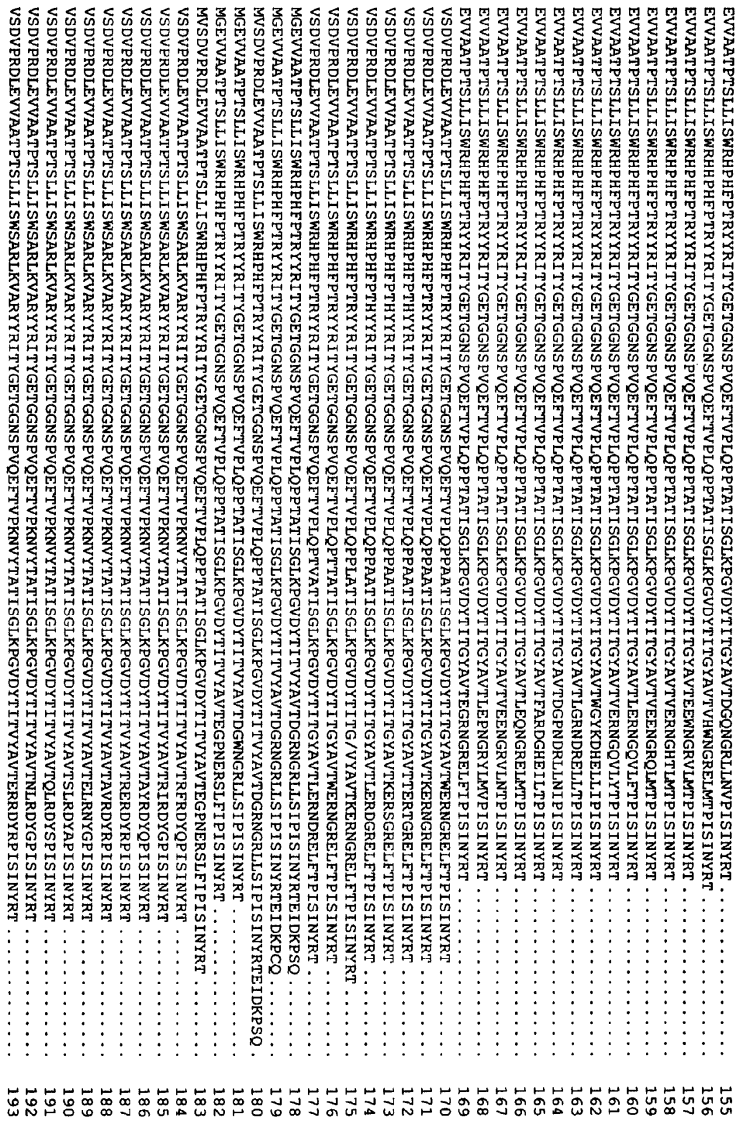
도면30c



도면30d



도면30e



도면30f

```
VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTLVRNYGPISINYRT ..............  194
VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTIRDYRPISINYRT ..............  195
VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTLLRDYGPISINYRT ..............  196
VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTLTRDYKPISINYRT ..............  197
VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTVVRDYRPISINYRT ..............  198
VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTMSRDYGPISINYRT ..............  199
VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTMSRDYGPISINYRT ..............  200
VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTSLRDYGPISINYRT ..............  201
VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTGVRNYGPISINYRT ..............  202
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIDKPSQ ....  226
GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITGYAVTGSGESPASSKPISINYRT ....  227
MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA
KQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGE
LKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLEIDKPSQGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFR
KCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLEIDKPSQGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFR
DYQPISINYRT ..............  230
MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA
KQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGE
RAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKD
VFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKH
PEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE
KCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSGSGSGSGSGSGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVT
RFRDYQPISINYRT ..............  231
```

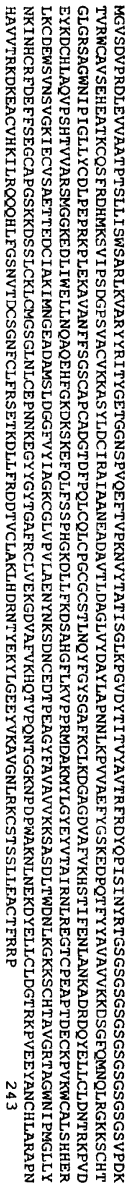
도면30g

```
MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA
KQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGE
RAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKD
VFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKH
PEARKMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVE
KCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL
DYTITVYAVTRFRDYQPISINYRT
MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYVRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIDKPSQAHKSEVAHRFKDLGEEN
FKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETF
LKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDL
LECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADP
HECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEARKMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLV
NRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALG 233
MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYVRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTGSGSGSGSGSGSAHKSEVAHRFKDLG
EENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVAILRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNE
ETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCH
GDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAA
ADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEARKMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLV
SLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALG 234
MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYVRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTGSGSGSGSGSGSAHKSEVAHRFKDLG
EVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVD
VMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTD
LTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTY
ETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEARKMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPV
SDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALG
235
MRLAVGALLVCAVLGLCLAVPDKTVRWCAVSEHEATKCQSEFRDHMKSVIPSDGPSVACVKKASYLDCIRAIAANEADAVTLDAGLVYDAYLAPNNLKPVVAEFYGSKEDPQTFYYA
VAVVKKDSGFQMNQLRGKKSCHTGLGRSAGWNIPIGLLYCDLPEPRKPLEKAVANFFSGSCAPCADGTDFPQLCQLCPGCGCSTLNQYFGYSGAFKCLKDGAGDVAFVKHSTIFEN
LANKADRDQYELLCLDNTRKPVDEYKDCHLAQVPSHTVVARSMGGKEDLIWELLNQAQEHFGKDKSKEFQLFSSPHGKDLLFKDSAHGFLKVPPRMDAKMYLGYEYVTAIRNLREG
TCPEAPTDECKPVKWCALSHHERLKCDEWSVNSVGKIECVSAETTEDCIAKIMNGEADAMSLDGGFVYIAGKCGLVPVLAENYNKSDNCEDTPEAGYFAVAVVKKSASDLTWDNLK
GKKSCHTAVGRTAGWNIPMGLLYNKINHCRFDEFFSEGCAPGSKKDSSLCKLCMGSGLNLCEPNNKEGYYGYTGAFRCLVEKGDVAFVKHQTVPQNTGGKNPDPWAKNLNEKDYEL
LCLDGTRKPVEEYANCHLARAPNHAVVTRKDKEACVHKILRQQQHLFGSNVTDCSGNFCLFRSETKDLLFRDDTVCLAKLHDRNTYEKYLGEEYVKAVGNLRKCSTSSLLEACTFR
RPSTSTSTGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYVRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRT 236
MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYVRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTPSTSTSTVPDKTVRWCAVSEHEAT
KCQSFRDHMKSVIPSDGPSVACVKKASYLDCIRAIAANEADAVTLDAGLVYDAYLAPNNLKPVVAEFYGSKEDPQTFYYAVAVVKKDSGFQMNQLRGKKSCHTGLGRSAGWNIPIG
LLYCDLPEPRKPLEKAVANFFSGSCAPCADGTDFPQLCQLCPGCGCSTLNQYFGYSGAFKCLKDGAGDVAFVKHSTIFENLANKADRDQYELLCLDNTRKPVDEYKDCHLAQVPSH
TVVARSMGGKEDLIWELLNQAQEHFGKDKSKEFQLFSSPHGKDLLFKDSAHGFLKVPPRMDAKMYLGYEYVTAIRNLREGTCPEAPTDECKPVKWCALSHHERLKCDEWSVNSVGK
IECVSAETTEDCIAKIMNGEADAMSLDGGFVYIAGKCGLVPVLAENYNKSDNCEDTPEAGYFAVAVVKKSASDLTWDNLKGKKSCHTAVGRTAGWNIPMGLLYNKINHCRFDEFFS
```

도면30h

```
EGCAPGSKKDSSLCKLCMGSGLNLCEPNNKEGYYGYTGAFRCLVEKGDVAFVKHQTVPQNTGGKNPDPWAKNLNEKDYELLCLDGTRKPVEEYANCHLARAPNHAVVTRKDKEACV
HKILRQQQHLFGSNVTDCSGNFCLFRSETKDLLFRDDTVCLAKLHDRNTYEKYLGEEYVKAVGNLRKCSTSSLLEACTFRRP                                237
MRLAVGALLVCAVLGLCLAVPDKTVRWCAVSEHEATKCQSFRDHMKSVIPSDGPSVACVKKASYLDCIRAIAANEADAVTLDAGLVYDAYLAPNNLKPVVAEFYGSKEDPQTFYYA
VAVVKKDSGFQMNQLRGKKSCHTGLGRSAGWNIPIGLLYCDLPEPRKPLEKAVANFTSGSCAPCADGTDFPQLCQLCPGGGCSTLNQYFGYSGAFKCLKDGAGDVAFVKHSTIFEN
LANKADRDQYELLCLDNTRKPVDEYKDCHLAQVPSHTVVARSMGGKEDLIWELLNQAQEHFGKDKSKEFQLFSSPHGKDLLFKDSAHGFLKVPPRMDAKMYLGYEYVTAIRNLREG
TCPEAPTDECKPVKWCALSHHERLKCDEWSVNSVGKIECVSAETTEDCIAKIMNGEADAMSLDGGFVYIAGKCGLVPVLAENVNKSDNCEDTPEAGYFAVAVVKKSASDLTWDNLK
GKKSCHTAVGRTAGWNIPMGLLYNKINHCRFDEFFSEGCAPGSKKDSSLCKLCMGSGLNLCEPNNKEGYYGYTGAFRCLVEKGDVAFVKHQTVPQNTGGKNPDPWAKNLNEKDYEL
LCLDGTRKPVEEYANCHLARAPNHAVVTRKDKEACVHKILRQQQHLFGSNVTDCSGNFCLFRSETKDLLFRDDTVCLAKLHDRNTYEKYLGEEYVKAVGNLRKCSTSSLLEACTFR
RPEIDKPSQCVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRT      238
MRLAVGALLVCAVLGLCLAVPDKTVRWCAVSEHEATKCQSFRDHMKSVIPSDGPSVACVKKASYLDCIRAIAANEADAVTLDAGLVYDAYLAPNNLKPVVAEFYGSKEDPQTFYYA
VAVVKKDSGFQMNQLRGKKSCHTGLGRSAGWNIPIGLLYCDLPEPRKPLEKAVANFTSGSCAPCADGTDFPQLCQLCPGGGCSTLNQYFGYSGAFKCLKDGAGDVAFVKHSTIFEN
LANKADRDQYELLCLDNTRKPVDEYKDCHLAQVPSHTVVARSMGGKEDLIWELLNQAQEHFGKDKSKEFQLFSSPHGKDLLFKDSAHGFLKVPPRMDAKMYLGYEYVTAIRNLREG
TCPEAPTDECKPVKWCALSHHERLKCDEWSVNSVGKIECVSAETTEDCIAKIMNGEADAMSLDGGFVYIAGKCGLVPVLAENVNKSDNCEDTPEAGYFAVAVVKKSASDLTWDNLK
GKKSCHTAVGRTAGWNIPMGLLYNKINHCRFDEFFSEGCAPGSKKDSSLCKLCMGSGLNLCEPNNKEGYYGYTGAFRCLVEKGDVAFVKHQTVPQNTGGKNPDPWAKNLNEKDYEL
LCLDGTRKPVEEYANCHLARAPNHAVVTRKDKEACVHKILRQQQHLFGSNVTDCSGNFCLFRSETKDLLFRDDTVCLAKLHDRNTYEKYLGEEYVKAVGNLRKCSTSSLLEACTFR
RPGSGSGSGSGSGSGSGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRT      240
MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIDKPSQVPDKTVRWCAVSEHEAT
KCQSFRDHMKSVIPSDGPSVACVKKASYLDCIRAIAANEADAVTLDAGLVYDAYLAPNNLKPVVAEFYGSKEDPQTFYYAVAVVKKDSGFQMNQLRGKKSCHTGLGRSAGWNIPIG
LLYCDLPEPRKPLEKAVANFTSGSCAPCADGTDFPQLCQLCPGGGCSTLNQYFGYSGAFKCLKDGAGDVAFVKHSTIFENLANKADRDQYELLCLDNTRKPVDEYKDCHLAQVPSH
TVVARSMGGKEDLIWELLNQAQEHFGKDKSKEFQLFSSPHGKDLLFKDSAHGFLKVPPRMDAKMYLGYEYVTAIRNLREGTCPEAPTDECKPVKWCALSHHERLKCDEWSVNSVGK
IECVSAETTEDCIAKIMNGEADAMSLDGGFVYIAGKCGLVPVLAENVNKSDNCEDTPEAGYFAVAVVKKSASDLTWDNLKGKKSCHTAVGRTAGWNIPMGLLYNKINHCRFDEFFS
EGCAPGSKKDSSLCKLCMGSGLNLCEPNNKEGYYGYTGAFRCLVEKGDVAFVKHQTVPQNTGGKNPDPWAKNLNEKDYELLCLDGTRKPVEEYANCHLARAPNHAVVTRKDKEACV
HKILRQQQHLFGSNVTDCSGNFCLFRSETKDLLFRDDTVCLAKLHDRNTYEKYLGEEYVKAVGNLRKCSTSSLLEACTFRRP                                241
MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTGSGSGSGSGSVPDKTVRWCAVSEH
EAIKCQSFRDHMKSVIPSDGPSVACVKKASYLDCIRAIAANEADAVTLDAGLVYDAYLAPNNLKPVVAEFYGSKEDPQTFYYAVAVVKKDSGFQMNQLRGKKSCHTGLGRSAGWNI
PIGLLYCDLPEPRKPLEKAVANFTSGSCAPCADGTDFPQLCQLCPGGGCSTLNQYFGYSGAFKCLKDGAGDVAFVKHSTIFENLANKADRDQYELLCLDNTRKPVDEYKDCHLAQV
PSHTVVARSMGGKEDLIWELLNQAQEHFGKDKSKEFQLFSSPHGKDLLFKDSAHGFLKVPPRMDAKMYLGYEYVTAIRNLREGTCPEAPTDECKPVKWCALSHHERLKCDEWSVNS
VGKIECVSAETTEDCIAKIMNGEADAMSLDGGFVYIAGKCGLVPVLAENVNKSDNCEDTPEAGYFAVAVVKKSASDLTWDNLKGKKSCHTAVGRTAGWNIPMGLLYNKINHCRFDE
FFSEGCAPGSKKDSSLCKLCMGSGLNLCEPNNKEGYYGYTGAFRCLVEKGDVAFVKHQTVPQNTGGKNPDPWAKNLNEKDYELLCLDGTRKPVEEYANCHLARAPNHAVVTRKDKE
ACVHKILRQQQHLFGSNVTDCSGNFCLFRSETKDLLFRDDTVCLAKLHDRNTYEKYLGEEYVKAVGNLRKCSTSSLLEACTFRRP                                242
```

도면30i



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> ADNEXUS, A BRISTOL-MYERS SQUIBB R&D COMPANY

<120> TARGETED THERAPEUTICS BASED ON ENGINEERED PROTEINS FOR TYROSINE

KINASES RECEPTORS, INCLUDING IGF-IR

<130> COTH-013-WO1

<140> PCT/US07/024316
<141> 2007-11-21

<150> 60/879,666
<151> 2007-01-09

<150> 60/860,605
<151> 2006-11-22

<160> 248

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 94
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
65 70 75 80

Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 2
<211> 98
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 2
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg Ala Arg Gln Asn Leu Ser Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Val Leu Pro Asn Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val Gly Val Pro
65 70 75 80

Phe Tyr Asp Met Leu Ile Gly Leu Leu Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr
85 90 95

Arg Thr

<210> 3
<211> 98
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 3
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Leu Pro Pro Gly Phe Val Ile Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Arg Leu Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ser Ser Asn Gly
65 70 75 80

Phe Tyr Ser Lys Ile Leu Ser Leu Trp Trp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr
85 90 95

Arg Thr

<210> 4
<211> 96
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 4
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Pro His Val Leu Gly Ser Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Pro Trp Glu Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu Arg Thr Gly
65 70 75 80

Leu Pro Thr Leu His Ser Pro Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90 95

<210> 5
<211> 91
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 5
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ile Phe Ile Pro Ser Thr Trp Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Thr Met Asp His Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu Asp His Arg
65 70 75 80

Ser Leu Trp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 6
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 6
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Thr His Tyr Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Tyr His Asp His Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Tyr Lys Met
65 70 75 80

Lys Pro Arg Asn Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 7
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 7

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Tyr Glu Ser Tyr Lys Tyr Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Tyr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Lys Gly His
65 70 75 80

Tyr Arg Tyr Ile Tyr Ala Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 8
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 8
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Ser His Leu Lys Val Lys Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Phe Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

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

Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 9
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 9
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ala Pro Tyr Val Arg Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Thr Leu Ser Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Thr Arg Asn
65 70 75 80

Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 10

<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 10
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Ser His Leu Lys Val Lys Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Tyr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

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

Ser Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 11
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 11
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Val Glu Ala Met Asp Gly Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Glu Glu Pro Gly Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Thr Lys Tyr Tyr
65 70 75 80

Tyr Leu Val Ile Glu Pro Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 12
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 12
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Pro His Asn Gln Asp Pro Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Ala Tyr Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Lys Glu His
65 70 75 80

His Gln Tyr Leu Ile Asn Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 13
<211> 98
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 13
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ile Gly Leu Asp Gly Leu Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Glu Lys Gln Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Thr Asp Thr Gly
65 70 75 80

Phe Ile Ala Arg Leu Met Ser Leu Ile Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr
85 90 95

Arg Thr

<210> 14
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 14
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ile Tyr Val Leu His His Ile Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Gln His His Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Thr Arg Pro
65 70 75 80

Tyr Arg Tyr Leu Met Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 15
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 15

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Pro Tyr Leu Arg Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Ser Ala Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Pro Ser Asn Ile
65 70 75 80

Ile Gly Arg His Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 16
<211> 89
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 16
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Thr His Val Lys Val Pro Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Tyr Ser Asp His Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Tyr Asp Tyr
65 70 75 80

Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 17
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 17
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Pro Tyr Leu Arg Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Ser Ala Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Pro Ser Asn Ile
65 70 75 80

Ile Gly Arg His Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 18

<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 18
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Glu Val Arg Tyr Tyr Pro Tyr Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Lys Tyr Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Tyr Lys Met
65 70 75 80

Lys Pro Arg Asn Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 19
<211> 92
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 19
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Thr Thr His Phe Thr Val Ser Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Glu Val His Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr His Arg Arg Arg
65 70 75 80

Arg Arg Tyr His Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 20
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 20
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp His Asp Met Pro Gly Gly Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Ser Tyr Leu
65 70 75 80

Tyr Gln Tyr Asn His Ala Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 21
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 21
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Asn Asp Pro Arg Arg Asn Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Tyr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gln Thr Asn Met
65 70 75 80

His Tyr Leu Met His Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 22
<211> 90
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 22
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Ser Lys Leu Leu Val Gln Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Arg Leu Ala Lys Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Met Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 23
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 23
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ile Tyr Arg Ser Tyr Lys Arg Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Asn Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

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

Ser Pro Thr Tyr Ser His Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 24
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 24
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Pro Tyr Leu Arg Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Ala Ala Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Gly Arg His Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 25
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 25
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asn His Thr Leu Lys Val Gln Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Tyr Thr His Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Arg Glu Ser
65 70 75 80

Tyr Arg Tyr Met His Ile Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 26
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 26
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Asp Thr Leu Arg Val Lys Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Tyr His Ser Gln Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Pro Ser Met Met
65 70 75 80

Asn Tyr Arg Asn Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 27
<211> 92
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 27
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Asn Ser Phe Val Val Gln Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Arg Tyr Ala Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ala Leu Asn Pro
65 70 75 80

Arg Ala Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 28
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 28
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ser Arg Leu Ile Val Arg Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Trp Gly Asn Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Met Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 29
<211> 92
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 29
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ser Arg Leu Ile Val Arg Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Trp Gly Asn Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr His Thr Arg Pro
65 70 75 80

Arg Asn Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 30
<211> 92
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 30
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Thr Arg Leu Arg Val Ser Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Arg Ser Val Glu Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu Asn Ser Leu
65 70 75 80

Arg Arg Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 31
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 31
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Glu Tyr Asp Arg Pro Ala Gly Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

Thr Val Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gln Thr Asn Met
65 70 75 80

His Tyr Leu Met His Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 32
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 32
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Thr His Phe Thr Val Ser Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Val Asn Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Thr Arg Asn
65 70 75 80

Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 33
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 33
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Lys His Ala Tyr Tyr Gln Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Glu Asn His Leu Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Arg Thr His
65 70 75 80

Ser Arg Ile Tyr His Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 34
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 34
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Asn Asn Thr Ser Arg Gly Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Arg Val Ala
65 70 75 80

Tyr Arg Tyr Met His Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 35
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 35
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser His Arg Leu Arg Val Lys Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser His Tyr Gln Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

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

Tyr Arg Ile Met His Ser Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 36
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 36
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Glu Tyr Asp Gly Thr Ala Gly Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Ser Tyr Leu
65 70 75 80

Tyr Gln Tyr Asn His Ala Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 37
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 37
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser His Arg Leu Arg Val Lys Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser His Tyr Gln Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Pro Ala Val Tyr
65 70 75 80

Tyr Ser Tyr Asn Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 38
<211> 93
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 38

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asn His Thr Leu Lys Val Gln Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Tyr Thr His Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asn Tyr Lys Gly
65 70 75 80

Pro Arg Gly Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 39
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 39
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Asp Val Phe Pro Ala Tyr Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala His Ser Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Pro Ser Met Met
65 70 75 80

Asn Tyr Arg Asn Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 40
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 40
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Asn Asn Phe Leu Val Gln Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Arg Tyr Ala His Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Met Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 41

<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 41
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Phe Gln Ala Val Ser Asn Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Tyr Pro Asn Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Met Ser Gly
65 70 75 80

His Arg Leu Leu His Ala Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 42
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 42
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Pro Ser Leu Ile Leu Glu Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Asp Leu Arg Leu Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

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

Tyr Arg Tyr Tyr His Ala Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 43
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 43
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Asn Asp Pro Arg Arg Asn Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Tyr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile Lys Gly Ile
65 70 75 80

Tyr Gln Tyr Thr Tyr His Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 44
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 44
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Asn Asp Pro Arg Arg Asn Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Ser Tyr Leu
65 70 75 80

Tyr Gln Tyr Asn His Ala Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 45
<211> 94
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 45
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gln Tyr Asn Thr Ser Arg Gly Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Arg Val Ala
65 70 75 80

Tyr Arg Tyr Met His Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 46
<211> 92
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 46
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Val His Arg Val Val Gln Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Gly Gln Phe Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu Gly Lys Phe
65 70 75 80

Arg Ser Tyr Leu Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 47
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 47
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Tyr Asn Met Lys Pro His Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Arg Met Leu His Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 48
<211> 92
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 48
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Thr Arg Leu Arg Val Ser Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Arg Ser Val Glu Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu Asn Ser Leu
65 70 75 80

Arg Arg Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 49
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 49
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Thr Val Arg Arg Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Leu Gly Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Thr Arg Asn
65 70 75 80

Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 50
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 50
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Leu Asp Thr Thr Arg Asp Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Pro Tyr Pro Met Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

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

Tyr Arg Arg Ile His Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 51
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 51
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ala Pro Tyr Val Arg Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Thr Leu Ser Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Thr Arg Asn
65 70 75 80

Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 52
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 52
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Ser Glu His Asp Tyr Tyr Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro His Asn Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp His Gly Gln
65 70 75 80

Tyr Arg Lys Met His Ser Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 53
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 53
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Tyr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gln Thr Asn Met
65 70 75 80

His Tyr Leu Met His Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 54
<211> 92
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 54
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Arg Val Ser Lys His Arg Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

Thr Val Pro Val Pro Gly Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Glu Ala Pro
65 70 75 80

Thr Gly Ile Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 55
<211> 88
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 55
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Lys Lys Tyr Tyr His Met Asp Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Asp Ala Tyr Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Asp Gly Ile
65 70 75 80

Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

<210> 56
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 56
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Val Asn Asp Pro Gln Arg Asn Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Tyr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Ser His Ile
65 70 75 80

Lys Tyr Leu Tyr His Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 57
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 57
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Glu Tyr Asp Arg Val Lys Lys Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Tyr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu His Ser His
65 70 75 80

Val Arg Arg Met His Val Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 58
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 58
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ala Ser Gln Val Leu Gly His Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Leu Pro Asn Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Met Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 59
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 59
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Leu Asp Asp Tyr Tyr Gly Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Arg Lys His
65 70 75 80

Tyr Met Tyr Tyr His His Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 60
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 60
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Lys Tyr Tyr Gly Ser Arg Asp Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Glu Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Ser Arg Leu
65 70 75 80

Tyr Arg Tyr Tyr His Ala Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 61
<211> 92
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 61

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Arg Ala Val Arg Val Arg Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Asn Met Phe Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ile Pro His Tyr
65 70 75 80

Arg Asn Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 62
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 62
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Tyr Val Tyr Ala Pro Tyr Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala His Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

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

Tyr Arg Ile Met His Ser Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 63
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 63
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Tyr Met Pro His Arg Asn Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Gln Asn Tyr
65 70 75 80

Tyr Arg Tyr Tyr His Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 64

<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 64
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Thr Tyr Asp Ala His Lys Arg Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

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

Leu Lys Ile Leu His Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 65
<211> 92
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 65
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ala Pro Tyr Val Arg Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Thr Leu Ser Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ser Pro Ser Leu
65 70 75 80

Arg Asp Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 66
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 66
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Pro Glu Tyr Val Arg Asn Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Thr Lys Gly Val
65 70 75 80

His Tyr Leu Tyr His Ser Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 67
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 67
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Asp Ile Pro Ile Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Val Val Gly Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ser Ser Met Leu
65 70 75 80

Tyr Ile Gln Ile Glu Pro Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 68
<211> 94
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 68
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ala His Ser Gly Tyr Ser Tyr Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Glu Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Lys Asn Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Tyr Tyr His Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 69
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 69
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp His Ser Gly Ser Ser Tyr Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Glu Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Lys Asn Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Tyr Tyr His Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 70
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 70
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Val Thr Ser Asp Arg Asn Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Thr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

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

65 70 75 80

His Gln Ile Gln Tyr Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 71
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 71
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ile Pro Tyr Ser Gly Pro Ser Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala His Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

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

Val Tyr Lys Gln Ala Ala Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 72
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 72
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Tyr Asp Gln Ser Arg Tyr Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Met Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Lys Asn Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Tyr Tyr His Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 73
<211> 92
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 73
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Glu Pro Leu Glu Asp Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Asp His Ser Gln Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ala Gly Ser Trp
65 70 75 80

Leu Arg Ile Trp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 74
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 74
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Lys Arg Pro Met Asn Met Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Ser Ala Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Leu Tyr Ala
65 70 75 80

Thr Tyr Val Met His Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 75
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 75
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Tyr Asp Gln Ser Arg Tyr Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Met Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Arg Asp Arg
65 70 75 80

Tyr Ser Tyr Met His His Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 76
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 76
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Phe Gln Ala Val Ser Asn Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Phe Pro Asn Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Met Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 77
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 77
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr His Asp Met His Arg Ser Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

Thr Val Pro Ser Tyr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

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

Tyr Gln Val Met His Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 78
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 78
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ala Tyr Tyr Met Gly Gly Tyr Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Arg Lys His
65 70 75 80

Tyr Met Tyr Tyr His His Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 79
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 79
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Tyr Met Pro His Arg Asn Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Thr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asn His His Val
65 70 75 80

His Arg Leu Met His Ile Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 80
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 80
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Glu Asp Pro Ser Thr Tyr Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Tyr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Tyr His Glu
65 70 75 80

Leu Val Tyr Met His His Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 81
<211> 92
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 81
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Glu Ile Glu Phe Pro Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Pro Arg Gly Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Met His Tyr Tyr
65 70 75 80

Leu Arg Val Trp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 82
<211> 92
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 82
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Thr His Phe Thr Val Ser Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Val Asn Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr His Ser Arg Pro
65 70 75 80

Arg His Tyr His Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 83
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 83
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Lys His Ile Arg Val Ser Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro His Asn Ser Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val Ala Tyr Asn
65 70 75 80

Tyr Leu Arg Asp Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 84
<211> 92
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 84

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp His Ser Asn Leu Leu Val Gln Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Ser Ala Val Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Pro Gly His Leu
65 70 75 80

Arg Lys Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 85
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 85
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Tyr Asp Arg Ser Lys Tyr Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

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

Tyr Tyr Tyr Ile Tyr Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 86
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 86
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Asp Glu Leu Val Ala Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Phe Asn Asp Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr His Leu Leu Gly
65 70 75 80

Thr Leu Trp Leu Ile Pro Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 87

<211> 92
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 87
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Leu Tyr Leu Arg Val Lys Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Asn Ala Met Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ser Pro Ser Leu
65 70 75 80

Arg Gly Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 88
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 88
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ala Tyr Asp Met His Arg Lys Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

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

Gly His Tyr Val His Asn Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 89
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 89
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Leu Asp Leu Ser Leu Lys Met Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser His His Gln Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Tyr Ala Ala
65 70 75 80

Tyr Arg Met Met His Ile Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 90
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 90
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Leu Ile Leu Gly Arg Asp Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Phe Pro Phe Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Arg Gly Phe
65 70 75 80

Asp Thr Phe Phe Pro Asn Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 91
<211> 90
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 91
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Leu Pro Ser Pro Ala Ile Thr Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Asp Pro Leu Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Arg Tyr Ser
65 70 75 80

Thr Trp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 92
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 92
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Val Tyr Glu Asn Asn Arg Gln Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Tyr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

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

His Ala Tyr Tyr His Leu Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 93
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 93
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Val Glu Phe His Lys Pro Asp Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Glu Gln Gly Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Tyr Ala Ala

65 70 75 80

Tyr Arg Met Met His Ile Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 94
<211> 92
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 94
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Glu Ile Glu Phe Pro Val Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gly Pro Arg Gly Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Met His Tyr Tyr
65 70 75 80

Leu Arg Val Trp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 95
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 95
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Tyr Asn Met Lys Pro Gln Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Arg Tyr Met
65 70 75 80

Tyr Arg Met Leu His Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 96
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 96
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Tyr Glu His Ile Arg Gly Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Tyr Gly Gln
65 70 75 80

Tyr Tyr Tyr Tyr His Ser Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 97
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 97
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Asn Asp Pro Arg Arg Asn Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Tyr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Arg Tyr Ser
65 70 75 80

Tyr Gln Tyr Gln His Ala Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 98
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 98
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Tyr Asp Asp His Ala Gln Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Thr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val Arg Gly Val
65 70 75 80

Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 99
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 99
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ile Pro Thr Ser Lys Asn Gly Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Tyr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Val Gln His
65 70 75 80

Tyr Arg Tyr Leu His Ala Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 100
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 100
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Thr His Tyr Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

Thr Val Pro Ala Tyr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu His Ser His
65 70 75 80

Val Arg Arg Met His Val Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 101
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 101
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Leu Met Lys Leu Tyr Leu Glu Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Pro Ser Tyr Ile Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr His Glu Ser
65 70 75 80

Gln Glu Gly Ala Gly His Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 102
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 102
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Glu Tyr Val Glu Tyr Thr His Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Val His Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Met Asp Thr
65 70 75 80

Ser Met Tyr Val Ser Ser Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 103
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 103
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Lys Tyr Asp Ser Tyr Ser Asn Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

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

Tyr Tyr Tyr Met His Ser Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 104
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 104
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Glu Tyr Asp Gly Pro Ala Gly Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gln Thr Asn Met
65 70 75 80

His Tyr Leu Met His Tyr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 105
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 105
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Tyr Asp Arg Ser Lys Tyr Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

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

Tyr Tyr Tyr Ile Tyr Asn Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 106
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 106
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Tyr Met Pro His Arg Asn Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Thr Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asn His His Val
65 70 75 80

His Arg Leu Met His Ile Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 107
<211> 93
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 107

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ser His Leu Pro Tyr Asp Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Tyr Lys Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Thr Lys Gly Val His
65 70 75 80

Tyr Leu Phe His Ser Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 108
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 108
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gln Tyr Asp Arg Ser Ser Tyr Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ala Ser Tyr Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Val Gly Thr
65 70 75 80

Tyr Gln Tyr Tyr Tyr Leu Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 109
<211> 93
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 109
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Tyr Thr Pro Tyr Lys Tyr Ser Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser His Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val Gly Asn Met Tyr
65 70 75 80

Leu Ser Ile Val Pro Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 110

<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 110
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Asp Ser Leu Lys Val Ser Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Gln Tyr His Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Pro Ser Asn Ile
65 70 75 80

Ile Gly Arg His Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 111
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 111
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Met Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 112
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 112
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Thr Ala Leu Lys Val Gln Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys His Ser His Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Met Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 113
<211> 93
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 113
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Thr His Tyr Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys His Thr Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Thr Thr Lys Gly
65 70 75 80

Leu Arg His Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 114
<211> 90
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 114
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Asp Lys Leu Lys Val Gln Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys His Asp Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Met Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 115
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 115
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Lys Arg Leu Gln Val Ser Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Tyr Asn Tyr Lys Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Pro Ser Asn Ile
65 70 75 80

Ile Gly Arg His Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 116
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 116
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Asn Arg Leu Val Val Lys Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro His Gln Met Lys Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Pro Gly Gly Tyr

65 70 75 80

Ser Gly Arg Asn Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 117
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 117
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Glu Asn Leu Arg Val Gln Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Ser Ser Val His Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Met Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 118
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 118
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ser Asn Leu Val Val Lys Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Asp Pro Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Tyr Glu Met
65 70 75 80

Lys Pro Arg Asn Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 119
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 119
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Thr His Tyr Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys His Glu Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu Asn Val Ala
65 70 75 80

Tyr Ser Arg Glu Val Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 120
<211> 95
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 120
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Asp His Val Lys Val Gln Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Gln His Ser Arg Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Tyr Thr Gly Tyr
65 70 75 80

Gly Thr Glu Arg Asn Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90 95

<210> 121
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 121
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Ser His Leu Arg Val Ser Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Tyr Asp Ser His Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gln Gly Pro Asn
65 70 75 80

Arg Gly Arg Asn Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 122
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 122
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Gly Lys His Leu Val Val Gln Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Arg Gly His Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Met Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 123
<211> 93
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 123
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Thr Thr Asn Leu Gln Val Ser Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

Thr Val Pro Lys Ala Asn Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

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

Asn Arg Ser Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 124
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 124
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ala Glu His Leu Gln Val Ser Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Arg Gly Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Pro Ser Asn Ile
65 70 75 80

Ile Gly Arg His Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 125
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 125
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Pro Gln His Leu Arg Val Gln Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Arg Gly Ser Asp Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Lys Met Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 126
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 126
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Gly Pro Asn
65 70 75 80

Glu Arg Ser Leu Phe Ile Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 127
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 127
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Glu Gly Pro Asn Glu Arg Ser Leu Phe Ile Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 128
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 128
Gly Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg
1 5 10 15

His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr
20 25 30

Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro
35 40 45

Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr
50 55 60

Val Tyr Ala Val Thr Asp Gly Arg Asn Gly Arg Leu Leu Ser Ile Pro
65 70 75 80

Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro Cys Gln
85 90

<210> 129
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 129
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His

1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Asp Gly Arg Asn Gly Arg Leu Leu Ser Ile Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 130
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 130

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Met Gly Leu Tyr Gly His Glu Leu Leu Thr Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 131
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 131
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Asp Gly Glu Asn Gly Gln Phe Leu Leu Val Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 132
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 132
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Met Gly Pro Asn Asp Asn Glu Leu Leu Thr Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 133

<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 133
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Ala Gly Trp Asp Asp His Glu Leu Phe Ile Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 134
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 134
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Ser Gly His Asn Asp His Met Leu Met Ile Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 135
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 135
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Ala Gly Tyr Asn Asp Gln Ile Leu Met Thr Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 136
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 136
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Phe Gly Leu Tyr Gly Lys Glu Leu Leu Ile Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 137
<211> 86
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 137
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Thr Gly Pro Asn Asp Arg Leu Leu Phe Val Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 138
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 138
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Asp Val Tyr Asn Asp His Glu Ile Lys Thr Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 139
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 139
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Asp Gly Lys Asp Gly Arg Val Leu Leu Thr Pro Ile

65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 140
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 140
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Glu Val His His Asp Arg Glu Ile Lys Thr Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 141
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 141
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

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

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 142
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 142
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Arg Glu Glu Asn Asp His Glu Leu Leu Ile Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 143
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 143
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Val Thr His Asn Gly His Pro Leu Met Thr Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 144
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 144
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Leu Ala Leu Lys Gly His Glu Leu Leu Thr Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 145
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 145
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly Tyr Ala Val Thr Val Ala Gln Asn
65 70 75 80

Asp His Glu Leu Ile Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 146
<211> 95
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 146
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Gln Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr
20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu

35 40 45

Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Ala Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
50 55 60

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly Tyr Ala Val Thr Met Ala Gln
65 70 75 80

Ser Gly His Glu Leu Phe Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90 95

<210> 147
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 147
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His

1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Val Glu Arg Asn Gly Arg Val Leu Met Thr Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85

<210> 148
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 148
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Val Glu Arg Asn Gly Arg His Leu Met Thr Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 149
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 149
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Leu Glu Arg Asn Gly Arg Glu Leu Met Thr Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 150
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 150
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Glu Glu Arg Asn Gly Arg Thr Leu Arg Thr Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 151
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 151
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Val Glu Arg Asn Asp Arg Val Leu Phe Thr Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 152
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 152
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Val Glu Arg Asn Gly Arg Glu Leu Met Thr Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 153
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 153

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Leu Glu Arg Asn Gly Arg Glu Leu Met Val Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 154
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 154
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

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

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 155
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 155
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Asp Gly Gln Asn Gly Arg Leu Leu Asn Val Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 156

<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 156
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr
20 25 30

Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro
35 40 45

Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr
50 55 60

Gly Tyr Ala Val Thr Val His Trp Asn Gly Arg Glu Leu Met Thr Pro
65 70 75 80

Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 157
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 157
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Glu Glu Trp Asn Gly Arg Val Leu Met Thr Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 158
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 158
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His

1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Val Glu Arg Asn Gly His Thr Leu Met Thr Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 159
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 159
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Val Glu Glu Asn Gly Arg Gln Leu Met Thr Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 160
<211> 86
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 160
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Leu Glu Arg Asn Gly Gln Val Leu Phe Thr Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 161
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 161
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
            20   25   30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
        35   40   45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
    50   55   60

Tyr Ala Val Thr Val Glu Arg Asn Gly Gln Val Leu Tyr Thr Pro Ile
65   70   75   80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
                85

<210> 162
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polypeptide

<400> 162
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His

1   5   10   15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
            20   25   30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
        35   40   45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
    50   55   60

Tyr Ala Val Thr Trp Gly Tyr Lys Asp His Glu Leu Leu Ile Pro Ile

65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 163
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 163
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Leu Gly Arg Asn Asp Arg Glu Leu Leu Thr Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 164
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 164
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Asp Gly Pro Asn Asp Arg Leu Leu Asn Ile Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 165
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 165
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Phe Ala Arg Asp Gly His Glu Ile Leu Thr Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 166
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 166
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Leu Glu Gln Asn Gly Arg Glu Leu Met Thr Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 167
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 167
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Val Glu Glu Asn Gly Arg Val Leu Asn Thr Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 168
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 168
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Leu Glu Pro Asn Gly Arg Tyr Leu Met Val Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 169
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 169
Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His
1 5 10 15

Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly
20 25 30

Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly
50 55 60

Tyr Ala Val Thr Glu Gly Arg Asn Gly Arg Glu Leu Phe Ile Pro Ile
65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 170
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 170
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Ala Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly Tyr Ala Val Thr Trp Glu Arg Asn
65 70 75 80

Gly Arg Glu Leu Phe Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 171
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 171
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Ala Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly Tyr Ala Val Thr Lys Glu Arg Asn
65 70 75 80

Gly Arg Glu Leu Phe Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 172
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 172
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr His Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Ala Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly Tyr Ala Val Thr Thr Glu Arg Thr
65 70 75 80

Gly Arg Glu Leu Phe Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 173
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 173
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr His Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Ala Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly Tyr Ala Val Thr Lys Glu Arg Ser
65 70 75 80

Gly Arg Glu Leu Phe Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 174
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 174
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr His Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Ala Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly Tyr Ala Val Thr Leu Glu Arg Asp
65 70 75 80

Gly Arg Glu Leu Phe Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 175
<211> 95
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 175
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Leu Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly Val Tyr Ala Val Thr Lys Glu Arg
65 70 75 80

Asn Gly Arg Glu Leu Phe Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90 95

<210> 176
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 176

```
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1               5                   10                  15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr
            20                  25                  30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
        35                  40                  45

Thr Val Pro Leu Gln Pro Thr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
    50                  55                  60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly Tyr Ala Val Thr Trp Glu Arg Asn
65                  70                  75                  80

Gly Arg Glu Leu Phe Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
                85                  90

<210> 177
<211> 94
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polypeptide

<400> 177
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1               5                   10                  15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr
            20                  25                  30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
        35                  40                  45
```

Thr Val Pro Leu Gln Pro Thr Val Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly Tyr Ala Val Thr Leu Glu Arg Asn
65 70 75 80

Asp Arg Glu Leu Phe Thr Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 178
<211> 95
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 178
Met Gly Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp
1 5 10 15

Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu
20 25 30

Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro
35 40 45

Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile
50 55 60

Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Gly Arg Asn Gly Arg Leu Leu Ser Ile
65 70 75 80

Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln
85 90 95

<210> 179

<211> 95
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 179
Met Gly Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp
1 5 10 15

Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu
20 25 30

Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro
35 40 45

Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile
50 55 60

Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Gly Arg Asn Gly Arg Leu Leu Ser Ile
65 70 75 80

Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro Cys Gln
85 90 95

<210> 180
<211> 102
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 180
Met Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr
20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
35 40 45

Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
50 55 60

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Gly Arg
65 70 75 80

Asn Gly Arg Leu Leu Ser Ile Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
85 90 95

Ile Asp Lys Pro Ser Gln
100

<210> 181
<211> 88
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 181
Met Gly Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp

1 5 10 15

Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu
20 25 30

Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro
35 40 45

Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile
50 55 60

Thr Val Tyr Ala Val Thr Asp Gly Trp Asn Gly Arg Leu Leu Ser Ile
65 70 75 80

Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 182
<211> 88
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 182
Met Gly Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp

1 5 10 15

Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu
20 25 30

Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro
35 40 45

Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile
50 55 60

Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Gly Pro Asn Glu Arg Ser Leu Phe Ile
65 70 75 80

Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85

<210> 183
<211> 95
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 183
Met Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg His Pro His Phe Pro Thr Arg Tyr
20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
35 40 45

Phe Thr Val Pro Leu Gln Pro Pro Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
50 55 60

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Gly Pro
65 70 75 80

Asn Glu Arg Ser Leu Phe Ile Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90 95

<210> 184
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 184

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 185
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 185
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Ile Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 186
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 186
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ala Tyr Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 187

<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 187
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Glu Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 188
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 188
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ala Val Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 189
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 189
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Glu Leu Arg Asn
65 70 75 80

Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 190
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 190
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ser Leu Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Ala Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 191
<211> 90
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 191
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gln Leu Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Ser Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 192
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 192
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Asn Leu Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 193
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 193
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 194
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 194
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu Val Arg Asn
65 70 75 80

Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 195
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 195
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Thr Ile Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 196
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 196
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu Leu Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 197
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 197
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Leu Thr Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 198
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 198
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Val Val Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Arg Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 199
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 199
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ser Tyr Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Trp Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 200
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 200
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe

35 40 45

Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Met Ser Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 201
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 201
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Ser Leu Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

85 90

<210> 202
<211> 90
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 202
Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr
20 25 30

Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe
35 40 45

Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro
50 55 60

Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Val Arg Asn
65 70 75 80

Tyr Gly Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90

<210> 203
<211> 98
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 203
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr
20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
35 40 45

Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
50 55 60

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe Arg
65 70 75 80

Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro
85 90 95

Cys Gln

<210> 204
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 204
taatacgact cactataggg acaattacta tttacaatta caatg 45

<210> 205
<211> 94
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 205
gggacaatta ctatttacaa ttacaatggt ttctgatgtg ccgcgcgacc tggaagtggt 60

tgctgccacc cccaccagcc tgctgatcag ctgg 94

<210> 206
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220>
<221> modified_base
<222> (19)..(20)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (22)..(23)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (25)..(26)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (28)..(29)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (31)..(32)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (34)..(35)

<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (37)..(38)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<400> 206
agcctgctga tcagctggnn snnsnnsnns nnsnnsnnsc gatattaccg catcact 57

<210> 207
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 207
aggcacagtg aactcctgga cagggctatt gcctcctgtt tcgccgtaag tgatgcggta 60

atatcg 66

<210> 208
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220>
<221> modified_base
<222> (19)..(20)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (22)..(23)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (25)..(26)

<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (28)..(29)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<400> 208
caggagttca ctgtgcctnn snnsnnsnns acagctacca tcagcggc 48

<210> 209
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 209
agtgacagca tacacagtga tggtataatc aacgccaggt ttaaggccgc tgatggtagc 60

tgt 63

<210> 210
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220>
<221> modified_base
<222> (19)..(20)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (22)..(23)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (25)..(26)

<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (28)..(29)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (31)..(32)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (34)..(35)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<400> 210
actgtgtatg ctgtcactnn snnsnnsnns nnsnnsccaa tttccattaa ttac 54

<210> 211
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220>
<221> modified_base
<222> (19)..(20)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (22)..(23)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (25)..(26)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base

<222> (28)..(29)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (31)..(32)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (34)..(35)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (37)..(38)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (40)..(41)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<400> 211
actgtgtatg ctgtcactnn snnsnnsnns nnsnnsnnsn nsccaatttc cattaattac 60

<210> 212
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220>
<221> modified_base
<222> (19)..(20)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (22)..(23)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>

<221> modified_base
<222> (25)..(26)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (28)..(29)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (31)..(32)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (34)..(35)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (37)..(38)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (40)..(41)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (43)..(44)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (46)..(47)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<400> 212
actgtgtatg ctgtcactnn snnsnnsnns nnsnnsnnsn nsnnsnnscc aatttccatt 60

aattac 66

<210> 213

<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220>
<221> modified_base
<222> (19)..(20)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (22)..(23)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (25)..(26)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (28)..(29)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (31)..(32)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (34)..(35)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (37)..(38)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (40)..(41)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (43)..(44)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (46)..(47)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (49)..(50)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (52)..(53)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<400> 213
actgtgtatg ctgtcactnn snnsnnsnns nnsnnsnnsn nsnnsnnsnn snnsccaatt 60

tccattaatt ac 72

<210> 214
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220>
<221> modified_base
<222> (19)..(20)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (22)..(23)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (25)..(26)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (28)..(29)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (31)..(32)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (34)..(35)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (37)..(38)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (40)..(41)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (43)..(44)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (46)..(47)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (49)..(50)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base

<222> (52)..(53)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (55)..(56)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<220>
<221> modified_base
<222> (58)..(59)
<223> a, c, g, t, unknown, or other

<400> 214
actgtgtatg ctgtcactnn snnsnnsnns nnsnnsnnsn nsnnsnnsnn snnsnnsnns 60

ccaatttcca ttaattac 78

<210> 215
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 215
ttaaatagcg gatgccttgt cgtcgtcgtc cttgtagtct gtgcggtaat taatggaaat 60

tgg 63

<210> 216
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 216
ttttttttt ttttttttt aaatagcgga tgccttgtcg tcgtcgtcct tgta 54

<210> 217
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 217
agcctgctga tcagctggtc cccgtacctg cgcgtcgccc gatattaccg catcact 57

<210> 218
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 218
caggagttca ctgtgccttc ctccgcccgc acagctacca tcagcggc 48

<210> 219
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 219
actgtgtatg ctgtcactcc gtccaacatc atcggccgtc actatggccc aatttccatt 60

aattac 66

<210> 220
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 220
agcctgctga tcagctgg 18

<210> 221
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 221
caggagttca ctgtgcct 18

<210> 222
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 222
actgtgtatg ctgtcact 18

<210> 223
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 223
agcctgctga tcagctggtc tgcgcgtctg aaagttgcgc gatattaccg catcact 57

<210> 224
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 224
caggagttca ctgtgcctaa aaacgtttac acagctacca tcagcggc 48

<210> 225
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 225
Glu Ile Asp Lys Pro Cys Gln

1 5

<210> 226
<211> 98
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
construct

<400> 226
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro

1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr
20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
35 40 45

Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys

50 55 60

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe Arg
65 70 75 80

Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro
85 90 95

Ser Gln

<210> 227
<211> 95
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic construct

<400> 227
Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
35 40 45

Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
50 55 60

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Gly Tyr Ala Val Thr Gly Ser Gly
65 70 75 80

Glu Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
85 90 95

<210> 228
<211> 707
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic construct

<400> 228
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
35 40 45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
85 90 95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
130 135 140

```
Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
145                 150                 155                 160

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
                165                 170                 175

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
            180                 185                 190

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
        195                 200                 205

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
    210                 215                 220

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
225                 230                 235                 240

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
                245                 250                 255

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
            260                 265                 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
        275                 280                 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
    290                 295                 300

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
305                 310                 315                 320

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
                325                 330                 335
```

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
340 345 350

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
370 375 380

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
385 390 395 400

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
405 410 415

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
435 440 445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu

530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
595 600 605

Leu Pro Ser Thr Ser Thr Ser Thr Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp
610 615 620

Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser
625 630 635 640

Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr
645 650 655

Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr
660 665 670

Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr
675 680 685

Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn
690 695 700

Tyr Arg Thr
705

<210> 229
<211> 682

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic construct

<400> 229
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15

Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg
20 25 30

Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
35 40 45

Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
50 55 60

Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe
65 70 75 80

Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ser Thr Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu
100 105 110

Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr
115 120 125

Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val
130 135 140

Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys
145 150 155 160

Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala
165 170 175

Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln
180 185 190

Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro
195 200 205

Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala
210 215 220

Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile
225 230 235 240

Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala
245 250 255

Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys
260 265 270

Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys
275 280 285

Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe
290 295 300

Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg
305 310 315 320

Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu
325 330 335

Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala
340 345 350

Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser

355 360 365

Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys
370 375 380

Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu
385 390 395 400

Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn
405 410 415

Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr
420 425 430

Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala
435 440 445

Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro
450 455 460

His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu
465 470 475 480

Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu
485 490 495

Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys
500 505 510

Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu
515 520 525

Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met
530 535 540

Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val

545 550 555 560

Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr
565 570 575

Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp
580 585 590

Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His
595 600 605

Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln
610 615 620

Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu
625 630 635 640

Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys
645 650 655

Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys
660 665 670

Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
675 680

<210> 230
<211> 707
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic construct

<400> 230
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
35 40 45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
85 90 95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
130 135 140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
145 150 155 160

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
165 170 175

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
180 185 190

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
195 200 205

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
210 215 220

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
225 230 235 240

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
245 250 255

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
260 265 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
275 280 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
290 295 300

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
305 310 315 320

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
325 330 335

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
340 345 350

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
370 375 380

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
385 390 395 400

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys

405 410 415

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
435 440 445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
580 585 590

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

595 600 605

Leu Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp
610 615 620

Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser
625 630 635 640

Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr
645 650 655

Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr
660 665 670

Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr
675 680 685

Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn
690 695 700

Tyr Arg Thr
705

<210> 231
<211> 710
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic construct

<400> 231
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
20 25 30

```
His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
        35                  40                  45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
    50                  55                  60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
65                  70                  75                  80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
                85                  90                  95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
            100                 105                 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
        115                 120                 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
    130                 135                 140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
145                 150                 155                 160

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
                165                 170                 175

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
            180                 185                 190

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
        195                 200                 205

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
    210                 215                 220
```

```
Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
225                 230                 235                 240

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
                245                 250                 255

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
            260                 265                 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
        275                 280                 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
    290                 295                 300

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
305                 310                 315                 320

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
                325                 330                 335

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
            340                 345                 350

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
        355                 360                 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
    370                 375                 380

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
385                 390                 395                 400

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
                405                 410                 415
```

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
435 440 445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
595 600 605

Leu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Val Ser Asp Val
610 615 620

Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile
625 630 635 640

Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr
645 650 655

Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Lys
660 665 670

Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr
675 680 685

Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe Arg Asp Tyr Gln Pro Ile
690 695 700

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
705 710

<210> 232
<211> 720
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic construct

<400> 232
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu

```
        35                  40                  45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
    50                  55                  60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
65                  70                  75                  80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
                85                  90                  95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
            100                 105                 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
        115                 120                 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
    130                 135                 140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
145                 150                 155                 160

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
                165                 170                 175

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
            180                 185                 190

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
        195                 200                 205

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
    210                 215                 220

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
```

225 230 235 240

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
245 250 255

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
260 265 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
275 280 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
290 295 300

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
305 310 315 320

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
325 330 335

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
340 345 350

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
370 375 380

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
385 390 395 400

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
405 410 415

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
435 440 445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
465 470 475 480

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
595 600 605

Leu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
610 615 620

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val
625 630 635 640

Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu
645 650 655

Lys Val Ala Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn
660 665 670

Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr
675 680 685

Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala
690 695 700

Val Thr Arg Phe Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
705 710 715 720

<210> 233
<211> 682
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic construct

<400> 233
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr

1 5 10 15

Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg
20 25 30

Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
35 40 45

Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu

```
    50                  55                  60

Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe
65                  70                  75                  80

Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys
                85                  90                  95

Pro Ser Gln Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu
            100                 105                 110

Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr
        115                 120                 125

Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val
    130                 135                 140

Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys
145                 150                 155                 160

Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala
                165                 170                 175

Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln
            180                 185                 190

Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro
        195                 200                 205

Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala
    210                 215                 220

Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile
225                 230                 235                 240

Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala
```

245 250 255

Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys
260 265 270

Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys
275 280 285

Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe
290 295 300

Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg
305 310 315 320

Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu
325 330 335

Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala
340 345 350

Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser
355 360 365

Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys
370 375 380

Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu
385 390 395 400

Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn
405 410 415

Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr
420 425 430

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

435 440 445

Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro
450 455 460

His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu
465 470 475 480

Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu
485 490 495

Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys
500 505 510

Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu
515 520 525

Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met
530 535 540

Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val
545 550 555 560

Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr
565 570 575

Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp
580 585 590

Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His
595 600 605

Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln
610 615 620

Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu

625 630 635 640

Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys
645 650 655

Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys
660 665 670

Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
675 680

<210> 234
<211> 685
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic construct

<400> 234
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr

1 5 10 15

Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg
20 25 30

Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
35 40 45

Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
50 55 60

Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe
65 70 75 80

Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Gly Ser Gly Ser
85 90 95

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe
100 105 110

Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe
115 120 125

Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val
130 135 140

Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala
145 150 155 160

Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys
165 170 175

Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys
180 185 190

Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp
195 200 205

Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met
210 215 220

Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu
225 230 235 240

Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu
245 250 255

Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala
260 265 270

Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp
275 280 285

```
Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu
    290                 295                 300

Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu
305                 310                 315                 320

Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val
                325                 330                 335

Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu
            340                 345                 350

Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn
        355                 360                 365

Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu
    370                 375                 380

Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro
385                 390                 395                 400

Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val
                405                 410                 415

Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu
            420                 425                 430

Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu
        435                 440                 445

Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala
    450                 455                 460

Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro
465                 470                 475                 480
```

Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe
485 490 495

Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr
500 505 510

Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser
515 520 525

Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala
530 535 540

Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln
545 550 555 560

Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys
565 570 575

Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu
580 585 590

Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe
595 600 605

Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile
610 615 620

Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
625 630 635 640

Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val
645 650 655

Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu
660 665 670

Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly

675 680 685

<210> 235
<211> 695
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic construct

<400> 235
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15

Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg
20 25 30

Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
35 40 45

Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
50 55 60

Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe
65 70 75 80

Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Gly Ser Gly Ser
85 90 95

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
100 105 110

Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu
115 120 125

Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln
130 135 140

```
Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe
145                 150                 155                 160

Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser
                165                 170                 175

Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg
            180                 185                 190

Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu
        195                 200                 205

Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro
    210                 215                 220

Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp
225                 230                 235                 240

Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg
                245                 250                 255

His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr
            260                 265                 270

Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys
        275                 280                 285

Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser
    290                 295                 300

Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg
305                 310                 315                 320

Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys
                325                 330                 335
```

Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val
340 345 350

His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg
355 360 365

Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser
370 375 380

Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys
385 390 395 400

Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu
405 410 415

Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu
420 425 430

Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg
435 440 445

His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr
450 455 460

Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys
465 470 475 480

Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln
485 490 495

Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr
500 505 510

Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln
515 520 525

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

530 535 540

Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala
545 550 555 560

Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu
565 570 575

Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu
580 585 590

Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr
595 600 605

Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile
610 615 620

Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu
625 630 635 640

Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys
645 650 655

Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala
660 665 670

Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala
675 680 685

Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
690 695

<210> 236
<211> 796
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

construct

<400> 236

```
Met Arg Leu Ala Val Gly Ala Leu Leu Val Cys Ala Val Leu Gly Leu

1               5                  10                  15

Cys Leu Ala Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu
            20                  25                  30

His Glu Ala Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val
        35                  40                  45

Ile Pro Ser Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr
    50                  55                  60

Leu Asp Cys Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr
65                  70                  75                  80

Leu Asp Ala Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Asn Asn Leu
                85                  90                  95

Lys Pro Val Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp Pro Gln Thr
            100                 105                 110

Phe Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly Phe Gln Met
        115                 120                 125

Asn Gln Leu Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser
    130                 135                 140

Ala Gly Trp Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Glu
145                 150                 155                 160

Pro Arg Lys Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser Gly Ser
                165                 170                 175

Cys Ala Pro Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu
```

180 185 190

Cys Pro Gly Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe Gly Tyr Ser
195 200 205

Gly Ala Phe Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val
210 215 220

Lys His Ser Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala Asp Arg Asp
225 230 235 240

Gln Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Glu
245 250 255

Tyr Lys Asp Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr Val Val Ala
260 265 270

Arg Ser Met Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln
275 280 285

Ala Gln Glu His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe
290 295 300

Ser Ser Pro His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly
305 310 315 320

Phe Leu Lys Val Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu Gly Tyr
325 330 335

Glu Tyr Val Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr Cys Pro Glu
340 345 350

Ala Pro Thr Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His
355 360 365

His Glu Arg Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys

370 375 380

Ile Glu Cys Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile
385 390 395 400

Met Asn Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr
405 410 415

Ile Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Asn
420 425 430

Lys Ser Asp Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val
435 440 445

Ala Val Val Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys
450 455 460

Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp Asn
465 470 475 480

Ile Pro Met Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys Arg Phe Asp
485 490 495

Glu Phe Phe Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser
500 505 510

Leu Cys Lys Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn
515 520 525

Asn Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val
530 535 540

Glu Lys Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln Asn
545 550 555 560

Thr Gly Gly Lys Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Lys
565 570 575

Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Glu Glu
580 585 590

Tyr Ala Asn Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Thr
595 600 605

Arg Lys Asp Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln
610 615 620

His Leu Phe Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu
625 630 635 640

Phe Arg Ser Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys
645 650 655

Leu Ala Lys Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu
660 665 670

Glu Tyr Val Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser
675 680 685

Leu Leu Glu Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro Pro Ser Thr Ser Thr Ser
690 695 700

Thr Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
705 710 715 720

Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg
725 730 735

Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
740 745 750

Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
755 760 765

Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe
770 775 780

Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
785 790 795

<210> 237
<211> 778
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic construct

<400> 237
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15

Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg
20 25 30

Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
35 40 45

Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
50 55 60

Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe
65 70 75 80

Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ser Thr Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu
100 105 110

```
His Glu Ala Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val
        115                 120                 125

Ile Pro Ser Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr
    130                 135                 140

Leu Asp Cys Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr
145                 150                 155                 160

Leu Asp Ala Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Asn Asn Leu
                165                 170                 175

Lys Pro Val Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp Pro Gln Thr
            180                 185                 190

Phe Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly Phe Gln Met
        195                 200                 205

Asn Gln Leu Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser
    210                 215                 220

Ala Gly Trp Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Glu
225                 230                 235                 240

Pro Arg Lys Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser Gly Ser
                245                 250                 255

Cys Ala Pro Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu
            260                 265                 270

Cys Pro Gly Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe Gly Tyr Ser
        275                 280                 285

Gly Ala Phe Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val
    290                 295                 300
```

```
Lys His Ser Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala Asp Arg Asp
305                 310                 315                 320

Gln Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Glu
                325                 330                 335

Tyr Lys Asp Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr Val Val Ala
            340                 345                 350

Arg Ser Met Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln
        355                 360                 365

Ala Gln Glu His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe
    370                 375                 380

Ser Ser Pro His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly
385                 390                 395                 400

Phe Leu Lys Val Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu Gly Tyr
                405                 410                 415

Glu Tyr Val Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr Cys Pro Glu
            420                 425                 430

Ala Pro Thr Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His
        435                 440                 445

His Glu Arg Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys
    450                 455                 460

Ile Glu Cys Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile
465                 470                 475                 480

Met Asn Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr
                485                 490                 495
```

Ile Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Asn
500 505 510

Lys Ser Asp Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val
515 520 525

Ala Val Val Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys
530 535 540

Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp Asn
545 550 555 560

Ile Pro Met Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys Arg Phe Asp
565 570 575

Glu Phe Phe Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser
580 585 590

Leu Cys Lys Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn
595 600 605

Asn Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val
610 615 620

Glu Lys Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln Asn
625 630 635 640

Thr Gly Gly Lys Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Lys
645 650 655

Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Glu Glu
660 665 670

Tyr Ala Asn Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Thr
675 680 685

Arg Lys Asp Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln

690 695 700

His Leu Phe Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu
705 710 715 720

Phe Arg Ser Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys
725 730 735

Leu Ala Lys Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu
740 745 750

Glu Tyr Val Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser
755 760 765

Leu Leu Glu Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro
770 775

<210> 238
<211> 796
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic construct

<400> 238
Met Arg Leu Ala Val Gly Ala Leu Leu Val Cys Ala Val Leu Gly Leu

1 5 10 15

Cys Leu Ala Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu
20 25 30

His Glu Ala Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val
35 40 45

Ile Pro Ser Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr
50 55 60

Leu Asp Cys Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr
65 70 75 80

Leu Asp Ala Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Asn Asn Leu
85 90 95

Lys Pro Val Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp Pro Gln Thr
100 105 110

Phe Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly Phe Gln Met
115 120 125

Asn Gln Leu Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser
130 135 140

Ala Gly Trp Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Glu
145 150 155 160

Pro Arg Lys Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser Gly Ser
165 170 175

Cys Ala Pro Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu
180 185 190

Cys Pro Gly Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe Gly Tyr Ser
195 200 205

Gly Ala Phe Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val
210 215 220

Lys His Ser Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala Asp Arg Asp
225 230 235 240

Gln Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Glu
245 250 255

Tyr Lys Asp Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr Val Val Ala
260 265 270

Arg Ser Met Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln
275 280 285

Ala Gln Glu His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe
290 295 300

Ser Ser Pro His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly
305 310 315 320

Phe Leu Lys Val Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu Gly Tyr
325 330 335

Glu Tyr Val Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr Cys Pro Glu
340 345 350

Ala Pro Thr Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His
355 360 365

His Glu Arg Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys
370 375 380

Ile Glu Cys Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile
385 390 395 400

Met Asn Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr
405 410 415

Ile Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Asn
420 425 430

Lys Ser Asp Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val
435 440 445

Ala Val Val Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys
450 455 460

Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp Asn
465 470 475 480

Ile Pro Met Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys Arg Phe Asp
485 490 495

Glu Phe Phe Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser
500 505 510

Leu Cys Lys Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn
515 520 525

Asn Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val
530 535 540

Glu Lys Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln Asn
545 550 555 560

Thr Gly Gly Lys Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Lys
565 570 575

Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Glu Glu
580 585 590

Tyr Ala Asn Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Thr
595 600 605

Arg Lys Asp Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln
610 615 620

His Leu Phe Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu
625 630 635 640

Phe Arg Ser Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys
645 650 655

Leu Ala Lys Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu
660 665 670

Glu Tyr Val Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser
675 680 685

Leu Leu Glu Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro Glu Ile Asp Lys Pro Ser
690 695 700

Gln Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
705 710 715 720

Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg
725 730 735

Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
740 745 750

Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
755 760 765

Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe
770 775 780

Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
785 790 795

<210> 239
<211> 799
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic construct

<400> 239

```
Met Arg Leu Ala Val Gly Ala Leu Leu Val Cys Ala Val Leu Gly Leu
1               5                  10                  15

Cys Leu Ala Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu
            20                  25                  30

His Glu Ala Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val
        35                  40                  45

Ile Pro Ser Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr
    50                  55                  60

Leu Asp Cys Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr
65                  70                  75                  80

Leu Asp Ala Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Asn Asn Leu
                85                  90                  95

Lys Pro Val Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp Pro Gln Thr
            100                 105                 110

Phe Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly Phe Gln Met
        115                 120                 125

Asn Gln Leu Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser
    130                 135                 140

Ala Gly Trp Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Glu
145                 150                 155                 160

Pro Arg Lys Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser Gly Ser
                165                 170                 175

Cys Ala Pro Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu
            180                 185                 190
```

Cys Pro Gly Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe Gly Tyr Ser
195 200 205

Gly Ala Phe Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val
210 215 220

Lys His Ser Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala Asp Arg Asp
225 230 235 240

Gln Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Glu
245 250 255

Tyr Lys Asp Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr Val Val Ala
260 265 270

Arg Ser Met Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln
275 280 285

Ala Gln Glu His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe
290 295 300

Ser Ser Pro His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly
305 310 315 320

Phe Leu Lys Val Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu Gly Tyr
325 330 335

Glu Tyr Val Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr Cys Pro Glu
340 345 350

Ala Pro Thr Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His
355 360 365

His Glu Arg Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys
370 375 380

```
Ile Glu Cys Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile
385                 390                 395                 400

Met Asn Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr
                405                 410                 415

Ile Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Asn
            420                 425                 430

Lys Ser Asp Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val
        435                 440                 445

Ala Val Val Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys
    450                 455                 460

Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp Asn
465                 470                 475                 480

Ile Pro Met Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys Arg Phe Asp
                485                 490                 495

Glu Phe Phe Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser
            500                 505                 510

Leu Cys Lys Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn
        515                 520                 525

Asn Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val
    530                 535                 540

Glu Lys Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln Asn
545                 550                 555                 560

Thr Gly Gly Lys Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Lys
                565                 570                 575
```

```
Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Glu Glu
            580                 585                 590

Tyr Ala Asn Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Thr
        595                 600                 605

Arg Lys Asp Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln
    610                 615                 620

His Leu Phe Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu
625                 630                 635                 640

Phe Arg Ser Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys
                645                 650                 655

Leu Ala Lys Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu
            660                 665                 670

Glu Tyr Val Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser
        675                 680                 685

Leu Leu Glu Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro Gly Ser Gly Ser Gly Ser
    690                 695                 700

Gly Ser Gly Ser Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val
705                 710                 715                 720

Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys
                725                 730                 735

Val Ala Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser
            740                 745                 750

Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile
        755                 760                 765
```

Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val
770 775 780

Thr Arg Phe Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
785 790 795

<210> 240
<211> 809
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic construct

<400> 240
Met Arg Leu Ala Val Gly Ala Leu Leu Val Cys Ala Val Leu Gly Leu

1 5 10 15

Cys Leu Ala Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu
20 25 30

His Glu Ala Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val
35 40 45

Ile Pro Ser Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr
50 55 60

Leu Asp Cys Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr
65 70 75 80

Leu Asp Ala Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Asn Asn Leu
85 90 95

Lys Pro Val Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp Pro Gln Thr
100 105 110

```
Phe Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly Phe Gln Met
        115                 120                 125

Asn Gln Leu Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser
    130                 135                 140

Ala Gly Trp Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Glu
145                 150                 155                 160

Pro Arg Lys Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser Gly Ser
                165                 170                 175

Cys Ala Pro Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu
            180                 185                 190

Cys Pro Gly Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe Gly Tyr Ser
        195                 200                 205

Gly Ala Phe Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val
    210                 215                 220

Lys His Ser Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala Asp Arg Asp
225                 230                 235                 240

Gln Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Glu
                245                 250                 255

Tyr Lys Asp Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr Val Val Ala
            260                 265                 270

Arg Ser Met Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln
        275                 280                 285

Ala Gln Glu His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe
    290                 295                 300

Ser Ser Pro His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly
```

305 310 315 320

Phe Leu Lys Val Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu Gly Tyr
325 330 335

Glu Tyr Val Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr Cys Pro Glu
340 345 350

Ala Pro Thr Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His
355 360 365

His Glu Arg Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys
370 375 380

Ile Glu Cys Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile
385 390 395 400

Met Asn Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr
405 410 415

Ile Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Asn
420 425 430

Lys Ser Asp Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val
435 440 445

Ala Val Val Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys
450 455 460

Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp Asn
465 470 475 480

Ile Pro Met Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys Arg Phe Asp
485 490 495

Glu Phe Phe Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser
500 505 510

Leu Cys Lys Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn
515 520 525

Asn Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val
530 535 540

Glu Lys Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln Asn
545 550 555 560

Thr Gly Gly Lys Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Lys
565 570 575

Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Glu Glu
580 585 590

Tyr Ala Asn Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Thr
595 600 605

Arg Lys Asp Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln
610 615 620

His Leu Phe Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu
625 630 635 640

Phe Arg Ser Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys
645 650 655

Leu Ala Lys Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu
660 665 670

Glu Tyr Val Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser
675 680 685

Leu Leu Glu Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro Gly Ser Gly Ser Gly Ser
690 695 700

```
Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Val
705                 710                 715                 720

Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser
                725                 730                 735

Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr Arg
            740                 745                 750

Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr
        755                 760                 765

Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly
    770                 775                 780

Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe Arg Asp Tyr
785                 790                 795                 800

Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
                805
```

<210> 241
<211> 778
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic construct

<400> 241

```
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr

1               5                   10                  15

Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg
            20                  25                  30

Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
```

```
        35                  40                  45

Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
    50                  55                  60

Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe
65                  70                  75                  80

Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys
                85                  90                  95

Pro Ser Gln Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu
            100                 105                 110

His Glu Ala Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val
        115                 120                 125

Ile Pro Ser Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr
    130                 135                 140

Leu Asp Cys Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr
145                 150                 155                 160

Leu Asp Ala Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Asn Asn Leu
                165                 170                 175

Lys Pro Val Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp Pro Gln Thr
            180                 185                 190

Phe Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly Phe Gln Met
        195                 200                 205

Asn Gln Leu Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser
    210                 215                 220

Ala Gly Trp Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Glu
```

225 230 235 240

Pro Arg Lys Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser Gly Ser
245 250 255

Cys Ala Pro Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu
260 265 270

Cys Pro Gly Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe Gly Tyr Ser
275 280 285

Gly Ala Phe Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val
290 295 300

Lys His Ser Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala Asp Arg Asp
305 310 315 320

Gln Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Glu
325 330 335

Tyr Lys Asp Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr Val Val Ala
340 345 350

Arg Ser Met Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln
355 360 365

Ala Gln Glu His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe
370 375 380

Ser Ser Pro His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly
385 390 395 400

Phe Leu Lys Val Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu Gly Tyr
405 410 415

Glu Tyr Val Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr Cys Pro Glu
420 425 430

Ala Pro Thr Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His
435 440 445

His Glu Arg Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys
450 455 460

Ile Glu Cys Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile
465 470 475 480

Met Asn Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr
485 490 495

Ile Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Asn
500 505 510

Lys Ser Asp Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val
515 520 525

Ala Val Val Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys
530 535 540

Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp Asn
545 550 555 560

Ile Pro Met Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys Arg Phe Asp
565 570 575

Glu Phe Phe Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser
580 585 590

Leu Cys Lys Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn
595 600 605

Asn Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val
610 615 620

```
Glu Lys Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln Asn
625                 630                 635                 640

Thr Gly Gly Lys Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Lys
                645                 650                 655

Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Glu Glu
            660                 665                 670

Tyr Ala Asn Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Thr
        675                 680                 685

Arg Lys Asp Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln
    690                 695                 700

His Leu Phe Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu
705                 710                 715                 720

Phe Arg Ser Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys
                725                 730                 735

Leu Ala Lys Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu
            740                 745                 750

Glu Tyr Val Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser
        755                 760                 765

Leu Leu Glu Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro
    770                 775
```

<210> 242
<211> 781
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

construct

<400> 242

```
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr

1               5                  10                  15

Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg
            20                  25                  30

Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
        35                  40                  45

Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
    50                  55                  60

Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe
65                  70                  75                  80

Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Gly Ser Gly Ser
                85                  90                  95

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala
            100                 105                 110

Val Ser Glu His Glu Ala Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met
        115                 120                 125

Lys Ser Val Ile Pro Ser Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys
    130                 135                 140

Ala Ser Tyr Leu Asp Cys Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp
145                 150                 155                 160

Ala Val Thr Leu Asp Ala Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro
                165                 170                 175

Asn Asn Leu Lys Pro Val Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp
```

180 185 190

Pro Gln Thr Phe Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly
195 200 205

Phe Gln Met Asn Gln Leu Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu
210 215 220

Gly Arg Ser Ala Gly Trp Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp
225 230 235 240

Leu Pro Glu Pro Arg Lys Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe
245 250 255

Ser Gly Ser Cys Ala Pro Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu
260 265 270

Cys Gln Leu Cys Pro Gly Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe
275 280 285

Gly Tyr Ser Gly Ala Phe Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val
290 295 300

Ala Phe Val Lys His Ser Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala
305 310 315 320

Asp Arg Asp Gln Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro
325 330 335

Val Asp Glu Tyr Lys Asp Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr
340 345 350

Val Val Ala Arg Ser Met Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu
355 360 365

Leu Asn Gln Ala Gln Glu His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe

370 375 380

Gln Leu Phe Ser Ser Pro His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser
385 390 395 400

Ala His Gly Phe Leu Lys Val Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr
405 410 415

Leu Gly Tyr Glu Tyr Val Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr
420 425 430

Cys Pro Glu Ala Pro Thr Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala
435 440 445

Leu Ser His His Glu Arg Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser
450 455 460

Val Gly Lys Ile Glu Cys Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile
465 470 475 480

Ala Lys Ile Met Asn Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly
485 490 495

Phe Val Tyr Ile Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu
500 505 510

Asn Tyr Asn Lys Ser Asp Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr
515 520 525

Phe Ala Val Ala Val Val Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp
530 535 540

Asn Leu Lys Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala
545 550 555 560

Gly Trp Asn Ile Pro Met Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys
565 570 575

Arg Phe Asp Glu Phe Phe Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys
580 585 590

Asp Ser Ser Leu Cys Lys Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys
595 600 605

Glu Pro Asn Asn Lys Glu Gly Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg
610 615 620

Cys Leu Val Glu Lys Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val
625 630 635 640

Pro Gln Asn Thr Gly Gly Lys Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu
645 650 655

Asn Glu Lys Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro
660 665 670

Val Glu Glu Tyr Ala Asn Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala
675 680 685

Val Val Thr Arg Lys Asp Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg
690 695 700

Gln Gln Gln His Leu Phe Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn
705 710 715 720

Phe Cys Leu Phe Arg Ser Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp
725 730 735

Thr Val Cys Leu Ala Lys Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr
740 745 750

Leu Gly Glu Glu Tyr Val Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser
755 760 765

Thr Ser Ser Leu Leu Glu Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro
770 775 780

<210> 243
<211> 791
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic construct

<400> 243
Met Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr
1 5 10 15

Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg
20 25 30

Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
35 40 45

Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
50 55 60

Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe
65 70 75 80

Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Gly Ser Gly Ser
85 90 95

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
100 105 110

Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu His Glu Ala
115 120 125

Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val Ile Pro Ser
130 135 140

Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr Leu Asp Cys
145 150 155 160

Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp Ala
165 170 175

Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Asn Asn Leu Lys Pro Val
180 185 190

Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp Pro Gln Thr Phe Tyr Tyr
195 200 205

Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly Phe Gln Met Asn Gln Leu
210 215 220

Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser Ala Gly Trp
225 230 235 240

Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Glu Pro Arg Lys
245 250 255

Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser Gly Ser Cys Ala Pro
260 265 270

Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu Cys Pro Gly
275 280 285

Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe Gly Tyr Ser Gly Ala Phe
290 295 300

Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Ser
305 310 315 320

Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala Asp Arg Asp Gln Tyr Glu
325 330 335

Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Glu Tyr Lys Asp
340 345 350

Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr Val Val Ala Arg Ser Met
355 360 365

Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln Ala Gln Glu
370 375 380

His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe Ser Ser Pro
385 390 395 400

His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly Phe Leu Lys
405 410 415

Val Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu Gly Tyr Glu Tyr Val
420 425 430

Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr Cys Pro Glu Ala Pro Thr
435 440 445

Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His His Glu Arg
450 455 460

Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys Ile Glu Cys
465 470 475 480

Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile Met Asn Gly
485 490 495

Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr Ile Ala Gly
500 505 510

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

515 520 525

Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val Ala Val Val
530 535 540

Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys Gly Lys Lys
545 550 555 560

Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met
565 570 575

Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys Arg Phe Asp Glu Phe Phe
580 585 590

Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser Leu Cys Lys
595 600 605

Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn Asn Lys Glu
610 615 620

Gly Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val Glu Lys Gly
625 630 635 640

Asp Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln Asn Thr Gly Gly
645 650 655

Lys Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Lys Asp Tyr Glu
660 665 670

Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Glu Glu Tyr Ala Asn
675 680 685

Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Thr Arg Lys Asp
690 695 700

Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln His Leu Phe

705 710 715 720

Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu Phe Arg Ser
725 730 735

Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys Leu Ala Lys
740 745 750

Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr Val
755 760 765

Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser Leu Leu Glu
770 775 780

Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro
785 790

<210> 244
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 244
Pro Ser Thr Ser Thr Ser Thr

1 5

<210> 245
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 245

Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln

1 5

<210> 246
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 246
Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 247
<211> 423
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic construct

<400> 247
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser

1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Gly Val Ser Asp Val Pro Arg
85 90 95

Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp
100 105 110

Ser Ala Arg Leu Lys Val Ala Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu
115 120 125

Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Lys Asn Val
130 135 140

Tyr Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile
145 150 155 160

Thr Val Tyr Ala Val Thr Arg Phe Arg Asp Tyr Gln Pro Ile Ser Ile
165 170 175

Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln Asp Pro Gly Ser Glu
180 185 190

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
195 200 205

Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
210 215 220

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
225 230 235 240

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
245 250 255

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

260 265 270

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
275 280 285

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
290 295 300

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
305 310 315 320

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
325 330 335

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
340 345 350

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
355 360 365

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
370 375 380

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
385 390 395 400

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
405 410 415

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
420

<210> 248
<211> 10
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 248
uagcggaugc 10