



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년01월21일

(11) 등록번호 10-2755090

(24) 등록일자 2025년01월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)(52) CPC특허분류
C07K 16/28 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-7023776(분할)

(22) 출원일자(국제) 2014년03월10일

심사청구일자 2022년08월10일

(85) 번역문제출일자 2022년07월11일

(65) 공개번호 10-2022-0103204

(43) 공개일자 2022년07월21일

(62) 원출원 특허 10-2015-7027621
원출원일자(국제) 2014년03월10일

심사청구일자 2019년03월06일

(86) 국제출원번호 PCT/US2014/022623

(87) 국제공개번호 WO 2014/164503

국제공개일자 2014년10월09일

(30) 우선권주장
61/776,710 2013년03월11일 미국(US)
(뒷면에 계속)(56) 선행기술조사문헌
J.R. Junutula 등, Nature Biotechnology,
Vol.26, No.8, p.925-932 (2008.08.)
Z. Qu 등, Journal of Immunological Methods,
Vol.213, p.131-144 (1998)

(73) 특허권자

젠자임 코퍼레이션

미국 매사추세츠주 02141 캠브리지 워터 스트리트
450

(72) 발명자

팬, 클라크

미국 매사추세츠주 서튼

퀴우, 후아웨이

미국 매사추세츠주 웨스트보로

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 19 항

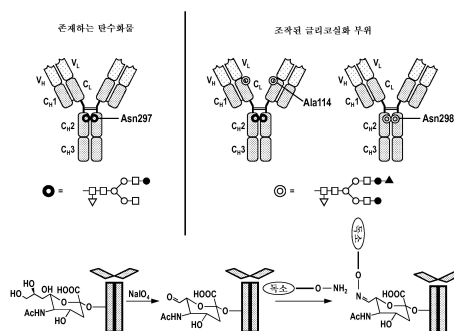
심사관 : 문명순

(54) 발명의 명칭 과글리코실화된 결합 폴리펩티드

(57) 요약

카바트 넘버링에 따른 아미노산 위치 (114)에 조작된 N-연결 글리코실화 부위를 갖는 CH1 도메인 (예를 들어, 인간 IgG1 CH1 도메인)을 포함하는 결합 폴리펩티드 (예를 들어, 항체) 및 그의 이펙터 모이어티 접합체를 제공한다. 또한, 항원-결합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산, 상기 항원-결합 폴리펩티드를 제조하기 위한 재조합 발현 벡 (뒷면에 계속)

대표도



터 및 숙주 세포를 제공한다. 질환을 치료하기 위해 본원에 개시된 항원-결합 폴리펩티드를 사용하는 방법을 또한 제공한다.

(52) CPC특허분류

C07K 2317/41 (2013.01)

C07K 2317/522 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(30) 우선권주장

61/776,715 2013년03월11일 미국(US)

61/776,724 2013년03월11일 미국(US)

(72) 발명자

달, 프라딕

미국 매사추세츠주 웨스트포드

첸, 보

미국 매사추세츠주 보스턴

지아놀리오, 디에고

미국 매사추세츠주 서머빌

명세서

청구범위

청구항 1

CH1 도메인을 포함하는, 종양 세포에서 발현되는 항원에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는

암의 치료를 필요로 하는 환자에서 암을 치료하기 위한 제약 조성물이며,

상기 CH1 도메인은 인간 IgG CH1 도메인이고,

여기서 CH1 도메인이 카바트 넘버링에 따른 아미노산 위치 114에 아스파라긴 잔기; 카바트 넘버링에 따른 위치 115에 프롤린을 제외한 임의의 아미노산 잔기; 및 카바트 넘버링에 따른 위치 116에 세린 또는 트레오닌 잔기를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, IgG CH1 도메인이 IgG1 CH1 도메인 또는 IgG4 CH1 도메인인 제약 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 아스파라긴 잔기의 측쇄가 글리칸에 연결되는 것인 제약 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

(a) 글리칸이 이중안테나(biantennary) 글리칸이거나; 또는

(b) 글리칸이 자연 발생 포유동물 당형태이거나; 또는

(c) 글리칸이 반응성 알데히드 기를 포함하는 것인,

제약 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

글리칸이 반응성 알데히드 기를 포함하는 산화된 사카라이드 잔기를 포함하고, 여기서 산화된 사카라이드 잔기가 말단 시알산 또는 갈락토스이거나; 또는

아스파라긴 잔기의 측쇄가 β -글리코실아미드 연결을 통해 글리칸에 연결되는 것인,

제약 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서, 글리칸이 이펙터 모이어티에 연결되는 것인 제약 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 이펙터 모이어티가 아스파라긴 잔기의 측쇄를 통해 글리칸의 사카라이드 잔기에 연결되는 것인 제약 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 사카라이드가 글리칸의 말단 시알산 또는 갈락토스 잔기인 제약 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 이펙터 모이어티가 옥심 또는 히드라존 연결을 통해 글리칸의 사카라이드 잔기에 연결되는 것인 제약 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 약물 이펙터 모이어티에 연결되어 항체 약물 접합체(ADC)를 형성하는 것인 제약 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 이펙터 모이어티가 모노메틸 오리스타틴 E(MMAE)를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서, 이펙터 모이어티가 돌로스타틴 10을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 HER2에 특이적인 제약 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 HER2에 특이적인 제약 조성물.

청구항 15

CH1 도메인을 포함하는, 종양 세포에서 발현되는 항원에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 및

제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는

종양의 치료를 필요로 하는 환자에서 종양을 치료하기 위한 제약 조성물이며,

상기 CH1 도메인은 인간 IgG CH1 도메인이고,

여기서 CH1 도메인이 카바트 넘버링에 따른 아미노산 위치 114에 아스파라긴 잔기; 카바트 넘버링에 따른 위치 115에 프롤린을 제외한 임의의 아미노산 잔기; 및 카바트 넘버링에 따른 위치 116에 세린 또는 트레오닌 잔기를 포함하며,

상기 아스파라긴 잔기의 측쇄가 글리칸에 연결되고, 상기 글리칸이 약물 이펙터 모이어티에 연결되어 항체 약물 접합체(ADC)를 형성하는 것인 제약 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, IgG CH1 도메인이 IgG1 CH1 도메인 또는 IgG4 CH1 도메인인 제약 조성물.

청구항 17

제15항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 HER2에 특이적이고, 환자가 Her2+ 종양을 갖는 것인 제약 조성물.

청구항 18

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 이펙터 모이어티가 모노메틸 오리스타틴 E(MMAE)를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 19

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 이펙터 모이어티가 돌로스타틴 10을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본원은 그 전문이 본원에 참조로 포함된, 2013년 3월 11일 출원된 미국 가출원 61/776,724 (발명의 명칭: "Site-Specific Antibody Drug Conjugation Through Glycoengineering"), 2013년 3월 11일 출원된 미국 가출원 61/776,710 (발명의 명칭: "Hyperglycosylated Binding Polypeptides"), 2013년 3월 11일 출원된 미국 가출원 61/776,715 (발명의 명칭: "Fc Containing Polypeptides with Altered Glycosylation and Reduced Effector Function"), 및 2013년 9월 12일 출원된 국제 출원 PCT/US13/59481을 우선권 주장한다. 상기 언급한 출원의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0003] 약물의 모노클로날 항체 또는 다른 폴리펩티드에 대한 접합은 종종 폴리펩티드 당 다양한 수의 분자를 보유하는 항체 약물 접합체 (ADC)의 불균일한 혼합물의 형성을 유발한다. 분자를 항체의 하나 이상의 규정된 부위(들)에 신뢰가능하고 효율적으로 부착하는 능력은 화학적으로 균일한 화합물을 제조하기 위해 매우 바람직하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 따라서, 모이어티의 화학양론적으로 일정한 접합을 허용하는 조작된 결합 폴리펩티드에 대한 필요성이 관련 기술분야에 존재한다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 개시내용은 카바트 넘버링에 따른 아미노산 위치 114에 조작된 N-연결 글리코실화 부위를 갖는 CH1 도메인 (예를 들어, 인간 IgG1 CH1 도메인)을 포함하는 결합 폴리펩티드 (예를 들어, 항체) 및 그의 이펙터 모이어티 접합체를 제공한다. 본 개시내용은 또한 항원-결합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산, 상기 항원-결합 폴리펩티드를 제조하기 위한 재조합 발현 벡터 및 숙주 세포를 제공한다. 질환을 치료하기 위해 본원에 개시된 항원-결합 폴리펩티드를 사용하는 방법을 또한 제공한다.

[0006] 본 개시내용의 결합 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)는 카바트 위치 114의 조작된 N-연결 글리코실화 부위가 또한 결합 폴리펩티드의 항원 결합 특성을 저해하지 않으면서 이펙터 모이어티 (예를 들어, 약물 모이어티 및 표적화 모이어티)의 접합 부위로서 기능할 수 있기 때문에 유리하다.

[0007] 따라서, 한 측면에서 본 개시내용은 CH1 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 CH1 도메인은 카바트 넘버링에 따른 아미노산 위치 114에 아스파라긴 잔기를 포함한다. 한 실시양태에서, CH1 도메인은 카바트 넘버링에 따른 위치 115에 프롤린을 제외한 임의의 아미노산 잔기; 및 카바트 넘버링에 따른 위치 116에 세린 또는 트레오닌 잔기를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, CH1 도메인은 IgG1 CH1 도메인 또는 그의 변이체이다. 또 다른 실시양태에서, CH1 도메인은 인간 IgG1 CH1 도메인 또는 그의 변이체이다.

[0008] 또 다른 실시양태에서, 아스파라긴 잔기의 측쇄는 β -글리코실아미드 연결을 통해 글리칸에 연결된다. 또 다른 실시양태에서, 글리칸은 이중안테나 (biantennary) 글리칸이다. 또 다른 실시양태에서, 글리칸은 자연 발생 포유동물 당형태이다. 또 다른 실시양태에서, 글리칸은 반응성 알데히드 기를 포함한다. 또 다른 실시양태에서,

글리칸은 반응성 알데히드 기를 포함하는 산화된 사카라이드 잔기를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 산화된 사카라이드 잔기는 말단 시알산 또는 갈락토스이다.

[0009] 또 다른 실시양태에서, 글리칸은 이펙터 모이어티에 연결된다. 또 다른 실시양태에서, 이펙터 모이어티는 세포 독소이다. 또 다른 실시양태에서, 세포독소는 표 1에 열거된 세포독소로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 이펙터 모이어티는 검출제이다. 특정 실시양태에서, 이펙터 모이어티는 표적화 모이어티이다. 한 실시양태에서, 표적화 모이어티는 탄수화물 또는 당펩티드이다. 또 다른 실시양태에서, 표적화 모이어티는 글리칸이다.

[0010] 또 다른 실시양태에서, 이펙터 모이어티는 옥심 또는 히드라존 연결을 통해 글리칸의 사카라이드 잔기에 연결된다. 또 다른 실시양태에서, 사카라이드는 글리칸의 말단 시알산 또는 갈락토스 잔기이다. 또 다른 실시양태에서, 이펙터 모이어티는 pH-감수성 링커, 디설피드 링커, 효소-감수성 링커 또는 다른 절단가능한 링커 모이어티를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 이펙터 모이어티는 표 2 또는 14에 제시된 링커 모이어티의 군으로부터 선택되는 링커 모이어티를 포함한다.

[0011] 또 다른 측면에서, 본 발명은 CH1 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 CH1 도메인은 카바트 넘버링에 따른 아미노산 위치 114에 유리 아스파라긴 잔기를 포함한다.

[0012] 또 다른 측면에서, 본 발명은 CH1 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 CH1 도메인은 카바트 넘버링에 따른 아미노산 위치 114에 변형된 아스파라긴 잔기를 포함하고, 상기 아스파라긴 잔기는 이펙터 모이어티에 연결된다. 한 실시양태에서, 이펙터 모이어티는 변형된 아스파라긴 잔기의 측쇄를 통해 글리칸의 사카라이드 잔기에 연결된다. 또 다른 실시양태에서, 사카라이드는 글리칸의 말단 시알산 또는 갈락토스 잔기이다. 또 다른 실시양태에서, 이펙터 모이어티는 옥심 또는 히드라존 연결을 통해 글리칸의 사카라이드 잔기에 연결된다. 또 다른 실시양태에서, 사카라이드는 글리칸의 말단 시알산 또는 갈락토스 잔기이다.

[0013] 특정 실시양태에서, 결합 폴리펩티드는 항체 또는 그의 단편 또는 유도체가다. 또 다른 실시양태에서, 항체, 항체 단편 또는 유도체는 약물 이펙터 모이어티에 연결되어 항체 약물 접합체 (ADC)를 형성한다.

[0014] 특정 측면에서, 본 발명은 본 발명의 결합 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0015] 다른 측면에서, 본 발명은 유효량의 본 발명의 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 환자의 치료 방법을 제공한다.

[0016] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 결합 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0017] 또 다른 측면에서, 본 발명은 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 세포에서 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 발현시키는 것을 포함하는, 결합 폴리펩티드의 제조 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 독소 모이어티가 옥심 연결을 사용하여 항체 글리칸의 산화된 시알산 잔기에 연결된 항체 약물 접합체의 합성을 보여주는 모식도이다.

도 2는 글리코실화 돌연변이체의 발현 및 정제를 보여주는 쿠마시-블루 염색된 겔이다.

도 3은 $\alpha\beta$ TCR HEBE1 IgG 항체 돌연변이체의 재조합 인간 Fc γ RIIIa (V158 & F158)에 대한 결합을 평가하기 위해 사용된 표면 플라즈몬 공명 실험의 결과를 보여준다.

도 4는 $\alpha\beta$ TCR HEBE1 IgG 항체 돌연변이체의 재조합 인간 Fc γ RI에 대한 결합을 평가하기 위해 사용된 표면 플라즈몬 공명 실험의 결과를 보여준다.

도 5는 돌연변이체 항- $\alpha\beta$ TCR 항체의 존재 하에 TNFa, GM-CSF, IFN γ 및 IL10에 대한 PBMC로부터의 시토카인 방출 프로파일을 보여준다 (제2일).

도 6은 돌연변이체 항- $\alpha\beta$ TCR 항체의 존재 하에 IL6, IL4 및 IL2에 대한 PBMC로부터의 시토카인 방출 프로파일을 보여준다 (제2일).

도 7은 돌연변이체 항- $\alpha\beta$ TCR 항체의 존재 하에 TNFa, GM-CSF, IFN γ 및 IL10에 대한 PBMC로부터의 시토카인 방

출 프로파일을 보여준다 (제4일).

도 8은 돌연변이체 항- $\alpha\beta$ TCR 항체의 존재 하에 IL6, IL4 및 IL2에 대한 PBMC로부터의 시토카인 방출 프로파일을 보여준다 (제4일).

도 9는 웨스턴 블롯팅 및 표면 플라스몬 공명에 의해 2C3 돌연변이체의 발현 수준을 조사하는 실험의 결과를 보여준다.

도 10은 PNGase F 처리 전 및 후에 2C3 돌연변이체의 글리코실화를 조사하는 실험의 결과를 보여준다.

도 11은 세포 배양물로부터 단리된 2C3 돌연변이체에 대한 글리코실화 부위를 조사하는 SDS-PAGE 실험의 결과를 보여준다.

도 12는 변형된 항-CD52의 재조합 인간 Fc γ RIIIa (V158)에 대한 결합을 평가하기 위해 사용되는 표면 플라스몬 공명 실험의 결과를 보여준다. CD52 펩티드 (a)에 결합하는, Fc γ RIIIa (V158, b)에 결합하는 변형된 분자, 및 마우스 FcRn에 결합하는 대조군 (c)의 이펙터 기능을 평가하기 위해 Fc 도메인에 S298N/Y300S 돌연변이를 포함하는 항-CD52를 사용하였다.

도 13은 2C3 돌연변이체의 Fc 결합 특성을 조사하는 표면 플라스몬 공명 실험의 결과를 보여준다.

도 14는 변형된 항-CD52의 Fc γ RIIIa (Val158) (상기한 바와 같은) 및 Fc γ RIIIa (Phe158) 둘 다에 대한 결합을 조사하는 표면 플라스몬 공명 실험의 결과를 보여준다. Fc γ RIIIa (Val158, 도 14a) 및 Fc γ RIIIa (Phe158, 도 14b)에 결합하는 변형된 분자의 이펙터 기능을 평가하기 위해 Fc 도메인에 S298N/Y300S 돌연변이를 포함하는 항-CD52 항체를 사용하였다.

도 15는 S298N/Y300S 돌연변이체 및 WT 2C3 대조군 (a)에서 C1q 결합의 분석 및 웰의 동등한 코팅을 확인하는 엘리자 (Eliza) 분석의 결과를 보여준다.

도 16은 2C3 돌연변이체의 CD-52 펩티드 741에 대한 결합 동역학을 측정하는 플라스몬 공명 실험의 결과를 보여준다.

도 17은 WT 항-CD-52 2C3 및 A114N 과글리코실화 돌연변이체의 항원 결합 친화도를 비교하는 플라스몬 공명 실험의 결과를 보여준다.

도 18은 2C3 돌연변이체의 글리칸 함량을 결정하기 위한 등전 포커싱 및 질량 분광 분석 전하 특성화 실험의 결과를 보여준다.

도 19는 WT 항-CD52 2C3 및 돌연변이체의 항원 결합 친화도를 비교하는 농도 (옥텟) 및 플라스몬 공명 실험의 결과를 보여준다.

도 20은 항-TEM1 A114N 돌연변이체의 추가의 글리코실화를 입증하기 위한 SDS-PAGE 실험의 결과를 보여준다.

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

도 22는 PEG의 아미노옥시 연결을 통한 2C3 A114N 돌연변이체에 대한 접합을 입증하기 위한 SDS-PAGE 실험의 결과를 보여준다.

도 23은 항-TEM1 A114N 과글리코실화 돌연변이체의 글리칸 함량을 결정하기 위한 LC-MS 실험의 결과를 보여준다.

도 24는 야생형 HER2 항체 및 A114N 항-Her2 과글리코실화 돌연변이체의 글리칸 함량을 결정하기 위한 LC-MS 실험의 결과를 보여준다.

도 25는 본 발명의 방법에 따라 항체의 부위-특이적 접합을 수행하기 위한 예시적인 방법을 보여준다.

도 26은 다음과 같은 본 발명의 예시적인 이펙터 모이어티의 합성을 보여준다: 아미노옥시-Cys-MC-VC-PABC-MMAE 및 아미노옥시-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Do110.

도 27은 시알릴화된 HER2 항체에 대한 특성화 정보를 보여준다.

도 28은 산화된 시알릴화된 항-HER2 항체에 대한 특성화 정보를 보여준다.

도 29는 2개의 상이한 아미노옥시기를 갖는 3개의 상이한 시알릴화된 항체를 사용하여 제조된 당접합체의 소수

성 상호작용 크로마토그래프를 보여준다.

도 30은 조작된 글리코실화 부위 A114N에 존재하는 조작된 글리칸을 통해 아미노옥시-유도체화된 MMAE 독소 (AO-MMAE)에 성공적으로 접합된 시알릴화된 항체의 HIC 크로마토그래프를 보여준다.

도 31은 항-HER2 당접합체 및 티올 접합체의 시험관내 효능의 비교를 보여준다.

도 32는 항 FAP B11 당접합체 및 티올 접합체의 시험관내 효능의 비교를 보여준다.

도 33은 Her2+ 종양 세포 이중이식편 모델에서 항-HER2 당접합체 및 티올 접합체의 생체내 효능의 비교를 보여준다.

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

도 35는 야생형 항- $\alpha\beta$ TCR 항체 및 S298N/Y300S 돌연변이를 함유하는 돌연변이체 항- $\alpha\beta$ TCR 항체의 상대적인 열 안정성을 결정하기 위한 원편광 이색성 실험의 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 개시내용은 카바트 넘버링에 따른 아미노산 위치 114에 조작된 N-연결 글리코실화 부위를 갖는 CH1 도메인 (예를 들어, 인간 IgG1 CH1 도메인)을 포함하는 결합 폴리펩티드 (예를 들어, 항체) 및 그의 이펙터 모이어티 접합체를 제공한다. 본 개시내용은 또한 항원-결합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산, 상기 항원-결합 폴리펩티드를 제조하기 위한 재조합 발현 벡터 및 숙주 세포를 제공한다. 질환을 치료하기 위해 본원에 개시된 항원-결합 폴리펩티드를 사용하는 방법을 또한 제공한다.

[0020] I. 정의

[0021] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "결합 단백질" 또는 "결합 폴리펩티드"는 관심 있는 표적 항원 (예를 들어 인간 항원)에 선택적으로 결합하는 것을 책임지는 적어도 하나의 결합 부위를 함유하는 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)를 의미한다. 예시적인 결합 부위는 항체 가변 도메인, 수용체의 리간드 결합 부위, 또는 리간드의 수용체 결합 부위를 포함한다. 특정 측면에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 다중 (예를 들어, 2, 3, 4개, 또는 그 초과)의 결합 부위를 포함한다.

[0022] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "천연 잔기"는 결합 폴리펩티드 (예를 들어, 항체 또는 그의 단편)의 특정 아미노산 위치에서 천연적으로 발생하고 인위적으로 변형되거나, 도입되거나, 변경되지 않은 아미노산 잔기를 의미한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "변경된 결합 단백질" 또는 "변경된 결합 폴리펩티드"는 적어도 하나의 비-천연 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함하는 결합 폴리펩티드 (예를 들어, 항체 또는 그의 단편)를 포함한다.

[0023] 용어 "특이적으로 결합하다"는 본원에서 사용되는 바와 같이, 최대 약 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M, 또는 그 미만의 해리 상수 (Kd)로 항원에 결합하고/하거나 그의 비특이적 항원에 대한 친화도보다 적어도 2배 더 큰 친화도로 항원에 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편의 능력을 의미한다.

[0024] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항체"는 관심 있는 항원 (예를 들어 종양 연관 항원)에 대해 유의한 알려진 특이적 면역반응 활성을 갖는 상기 조립체 (예를 들어, 무손상 항체 분자, 그의 항체 단편, 또는 변이체)를 의미한다. 항체 및 이뮤노글로불린은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 이들 사이에 사슬간 공유 연결이 존재하거나 또는 존재하지 않는다. 척추동물 시스템에서 기본 이뮤노글로불린 구조는 비교적 잘 이해되고 있다.

[0025] 아래에서 보다 상세히 논의되는 바와 같이, 포괄적인 용어 "항체"는 생화학적으로 구별될 수 있는 5개의 구별되는 클래스의 항체를 포함한다. 5개의 모든 클래스의 항체는 본 개시내용의 범위에 분명하게 포함되고, 다음 논의는 일반적으로 이뮤노글로불린 분자의 IgG 클래스에 대한 것일 것이다. IgG에서, 이뮤노글로불린은 분자량이 약 23,000 달톤인 2개의 동일한 경쇄, 및 분자량이 53,000-70,000인 2개의 동일한 중쇄를 포함한다. 4개의 사슬은 디설피드 결합에 의해 "Y" 입체형태로 연결되고, 여기서 경쇄는 "Y"의 입에서 출발하여 가변 영역을 통해 이어지는 중쇄에 함께 묶여진다.

[0026] 이뮤노글로불린의 경쇄는 카파 또는 람다 (κ , λ)로 분류된다. 각각의 중쇄 클래스는 카파 또는 람다 경쇄와

결합될 수 있다. 일반적으로 경쇄 및 중쇄는 서로 공유 결합되고, 2개의 중쇄의 "테일" 부분은 이뮤노글로불린이 하이브리도마, B 세포, 또는 유전자 조작된 숙주 세포에서 생성될 때 서로 공유 디설피드 연결 또는 비-공유 연결에 의해 결합된다. 중쇄에서, 아미노산 서열은 Y 입체형태의 포크형 말단부의 N-말단로부터 각각의 사슬의 기저부의 C-말단으로 이어진다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 중쇄가 감마, 뮤, 알파, 델타, 또는 엡실론(γ , μ , α , δ , ϵ)으로 분류되고, 그 중에 몇몇의 하위클래스(예를 들어, $\gamma 1$ - $\gamma 4$)가 존재함을 이해할 것이다. 항체의 "클래스"를 각각 IgG, IgM, IgA IgG, 또는 IgE로 결정하는 것은 바로 상기 사슬의 특성이다. 이뮤노글로불린 이소형 하위클래스(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 등)는 그 특성이 잘 규명되었고, 기능적 특수화를 부여하는 것으로 알려져 있다. 각각의 상기 클래스 및 이소형의 변형된 버전은 본 개시내용에 비추어 통상의 기술자가 쉽게 식별할 수 있고, 본 개시내용의 범위에 포함된다.

[0027] 경쇄 및 중쇄 둘 다는 구조적 및 기능적 상동성의 영역으로 분할된다. 용어 "영역"은 이뮤노글로불린 또는 항체 사슬의 일부 또는 부분을 의미하고, 불변 영역 또는 가변 영역, 및 상기 영역의 보다 분리된 일부 또는 부분을 포함한다. 예를 들어, 경쇄 가변 영역은 본원에서 규정되는 바와 같이 "프레임워크 영역" 또는 "FR" 중에 산재된 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"을 포함한다.

[0028] 이뮤노글로불린 중쇄 또는 경쇄의 영역은 "불변 영역"의 경우에 다양한 클래스 구성원의 영역 내의 서열 변이, 또는 "가변 영역"의 경우에 다양한 클래스 구성원의 영역 내의 유의한 변이의 상대적인 결여를 기초로 하여 "불변" (C) 영역 또는 "가변" (V) 영역으로 규정될 수 있다. 용어 "불변 영역" 및 "가변 영역"은 또한 기능적으로 사용될 수 있다. 이와 관련하여, 이뮤노글로불린 또는 항체의 가변 영역이 항원 인식 및 특이성을 결정함을 이해될 것이다. 반대로, 이뮤노글로불린 또는 항체의 불변 영역은 중요한 이펙터 기능, 예컨대 분비, 대반 경유 이동, Fc 수용체 결합, 보체 결합 등을 부여한다. 다양한 이뮤노글로불린 클래스의 불변 영역의 서브유닛 구조 및 3차원 입체형태는 잘 알려져 있다.

[0029] 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄의 불변 및 가변 영역은 도메인으로 폴딩된다. 용어 "도메인"은 예를 들어 β -주름 시트 및/또는 사슬내 디설피드 결합에 의해 안정화된 펩티드 루프(예를 들어, 3 내지 4개의 펩티드 루프)를 포함하는 중쇄 또는 경쇄의 구형 영역을 포함한다. 이뮤노글로불린의 경쇄 상의 불변 영역은 "경쇄 불변 영역 도메인", "CL 영역" 또는 "CL 도메인"으로서 교환가능하게 언급된다. 중쇄 상의 불변 도메인(예를 들어 힌지, CH1, CH2 또는 CH3 도메인)은 "중쇄 불변 영역 도메인", "CH" 영역 도메인 또는 "CH 도메인"으로서 교환가능하게 언급된다. 경쇄 상의 가변 도메인은 "경쇄 가변 영역 도메인", "VL 영역 도메인 또는 "VL 도메인"으로서 교환가능하게 언급된다. 중쇄 상의 가변 도메인은 "중쇄 가변 영역 도메인", "VH 영역 도메인" 또는 "VH 도메인"으로서 교환가능하게 언급된다.

[0030] 관례상, 가변 불변 영역 도메인의 넘버링은 이뮤노글로불린 또는 항체의 항원 결합 부위 또는 아미노-말단으로부터 더 멀어질수록 증가한다. 각각의 중쇄 및 경쇄 이뮤노글로불린 사슬의 N-말단은 가변 영역이고, C-말단은 불변 영역이고; CH3 및 CL 도메인은 실제로 각각 중쇄 및 경쇄의 카르복시-말단을 포함한다. 따라서, 경쇄 이뮤노글로불린의 도메인은 VL-CL 배향으로 배열되고, 중쇄의 도메인은 VH-CH1-힌지-CH2-CH3 배향으로 배열된다.

[0031] CH1, 힌지, CH2, CH3, 및 CL 도메인 내의 아미노산 위치를 포함하는, 중쇄 불변 영역 내의 아미노산 위치는 카바트 인덱스 넘버링 시스템에 따라 넘버링될 수 있다 ([Kabat et al., in "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Dept. Health and Human Services, 5th edition, 1991] 참조). 별법으로, 항체 아미노산 위치는 EU 인덱스 넘버링 시스템에 따라 넘버링될 수 있다 ([Kabat et al., 상기 문헌] 참조).

[0032] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "VH 도메인"은 이뮤노글로불린 중쇄의 아미노 말단 가변 도메인을 포함하고, 용어 "VL 도메인"은 이뮤노글로불린 경쇄의 아미노 말단 가변 도메인을 포함한다.

[0033] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "CH1 도메인"은 카바트 넘버링 시스템의 대략 위치 114-223 (EU 위치 118-215)으로부터 연장되는 이뮤노글로불린 중쇄의 처음 (대부분의 아미노 말단) 불변 영역 도메인을 포함한다. CH1 도메인은 VH 도메인에 인접하고, 이뮤노글로불린 중쇄 분자의 힌지 영역에 대해 아미노 말단이고, 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 영역의 일부를 형성하지 않는다.

[0034] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "힌지 영역"은 CH1 도메인을 CH2 도메인에 연결하는 중쇄 분자의 부분을 포함한다. 상기 힌지 영역은 약 25개 잔기를 포함하고, 유연하고, 따라서 2개의 N-말단 항원 결합 영역이 독립적으로 이동할 수 있다. 힌지 영역은 다음과 같은 3개의 구별되는 도메인으로 다시 분할될 수 있다: 상부, 중앙, 및 하부 힌지 도메인 (Roux et al. J. Immunol. 1998, 161:4083).

[0035] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "CH2 도메인"은 예를 들어 카바트 넘버링 시스템에서 대략 위치 244-360

(EU 위치 231-340)으로부터 연장되는 중쇄 이뮤노글로불린 분자의 부분을 포함한다. CH2 도메인은 또 다른 도메인과 밀접하게 쌍을 이루지 않는다는 점에서 특유하다. 오히려, 2개의 N-연결된 분지형 탄수화물 사슬이 무손상 천연 IgG 분자의 2개의 CH2 도메인 사이에 개재한다. 한 실시양태에서, 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 IgG1 분자 (예를 들어 인간 IgG1 분자)로부터 유래된 CH2 도메인을 포함한다.

[0036] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "CH3 도메인"은 CH2 도메인의 N-말단으로부터, 예를 들어 카바트 넘버링 시스템의 대략 위치 361-476 (EU 위치 341-445)으로부터 약 110개 잔기를 연장하는 중쇄 이뮤노글로불린 분자의 부분을 포함한다. CH3 도메인은 일반적으로 항체의 C-말단 부분을 형성한다. 그러나, 몇몇 이뮤노글로불린에서, 추가의 도메인은 CH3 도메인으로부터 연장되어 분자의 C-말단 부분을 형성할 수 있다 (예를 들어 IgM의 μ 사슬 및 IgE의 e 사슬 내의 CH4 도메인). 한 실시양태에서, 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 IgG1 분자 (예를 들어 인간 IgG1 분자)로부터 유래된 CH3 도메인을 포함한다.

[0037] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "CL 도메인"은 예를 들어 대략 카바트 위치 107A-216으로부터 연장되는 이뮤노글로불린 경쇄의 불변 영역 도메인을 포함한다. CL 도메인은 VL 도메인에 인접한다. 한 실시양태에서, 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 카파 경쇄 (예를 들어, 인간 카파 경쇄)로부터 유래된 CL 도메인을 포함한다.

[0038] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "Fc 영역"은 파파인 절단 부위 (즉, IgG의 잔기 216 (중쇄 불변 영역의 제1 잔기는 114로 간주함))의 바로 상류의 힌지 영역에서 시작하고 항체의 C-말단에서 끝나는 중쇄 불변 영역의 부분으로 규정된다. 따라서, 완전한 Fc 영역은 적어도 힌지 도메인, CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 포함한다.

[0039] 본원에서 사용되는 용어 "천연 Fc"는 단량체 또는 다량체 형태이고 항체의 소화 또는 다른 수단에 의해 생성되고 힌지 영역을 함유할 수 있는 비-항원-결합 단편의 서열을 포함하는 분자를 의미한다. 천연 Fc의 본래의 이뮤노글로불린 공급원은 바람직하게는 인간 기원이고, 임의의 이뮤노글로불린일 수 있지만, IgG1 및 IgG2가 바람직하다. 천연 Fc 분자는 공유 (즉, 디설피드 결합) 및 비-공유 회합에 의해 이량체 또는 다량체 형태로 연결될 수 있는 단량체 폴리펩티드로 이루어진다. 천연 Fc 분자의 단량체 서브유닛 사이의 분자간 디설피드 결합의 수는 클래스 (예를 들어, IgG, IgA, 및 IgE) 또는 하위클래스 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, 및 IgA2)에 따라 1 내지 4이다. 천연 Fc의 한 예는 IgG의 파파인 소화에 의해 생성되는 디설피드-결합 이량체이다. 본원에서 사용되는 용어 "천연 Fc"는 단량체, 이량체, 및 다량체 형태의 총칭이다.

[0040] 본원에서 사용되는 용어 "Fc 변이체"는 천연 Fc로부터 변형되지만 셀비지 수용체, FcRn (신생아 Fc 수용체)에 대한 결합 부위를 계속 포함하는 분자 또는 서열을 의미한다. 예시적인 Fc 변이체, 및 셀비지 수용체와 그의 상호작용은 관련 기술분야에 알려져 있다. 따라서, 용어 "Fc 변이체"는 비-인간 천연 Fc로부터 인간화된 분자 또는 서열을 포함할 수 있다. 또한, 천연 Fc는 본 발명의 항체-유사 결합 폴리펩티드에 필요하지 않은 구조적 특징 또는 생물학적 활성을 제공하기 때문에 제거될 수 있는 영역을 포함한다. 따라서, 용어 "Fc 변이체"는 다음에 영향을 주거나 다음에 관여하는 하나 이상의 천연 Fc 부위 또는 잔기가 결여되거나, 또는 하나 이상의 Fc 부위 또는 잔기가 변형된 분자 또는 서열을 포함한다: (1) 디설피드 결합 형성, (2) 선택된 숙주 세포와의 비특이적 결합, (3) 선택된 숙주 세포에서 발현시에 N-말단 불균일성, (4) 글리코실화, (5) 보체와의 상호작용, (6) 셀비지 수용체 이외의 다른 Fc 수용체에 대한 결합, 또는 (7) 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC).

[0041] 본원에서 사용되는 용어 "Fc 도메인"은 상기 규정된 바와 같은 천연 Fc 및 Fc 변이체 및 서열을 포함한다. Fc 변이체 및 천연 Fc 분자처럼, 용어 "Fc 도메인"은 전체 항체로부터 소화되거나 다른 수단에 의해 생산된 단량체 또는 다량체 형태의 분자를 포함한다.

[0042] 상기 나타난 바와 같이, 항체의 가변 영역은 항체가 항원 상의 에피토프를 선택적으로 인식하고 특이적으로 결합하도록 한다. 즉, 항체의 VL 도메인 및 VH 도메인은 조합되어 3차원 항원 결합 부위를 규정하는 가변 영역 (Fv)을 형성한다. 상기 4원 항체 구조는 Y의 각각의 아암에 존재하는 항원 결합 부위를 형성한다. 보다 구체적으로, 항원 결합 부위는 각각의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 상의 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)에 의해 규정된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항원 결합 부위"는 항원 (예를 들어, 세포 표면 또는 가용성 항원)에 특이적으로 결합하는 (면역반응하는) 부위를 포함한다. 항원 결합 부위는 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 이들 가변 영역에 의해 형성되는 결합 부위는 항체의 특이성을 결정한다. 항원 결합 부위는 항체마다 상이한 가변 영역에 의해 형성된다. 본 개시내용의 변형된 항체는 적어도 하나의 항원 결합 부위를 포함한다.

[0043] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 선택된 항원과 결합 폴리펩티드의 회합을 제공하는 적어도 2개의 항원 결합 도메인을 포함한다. 항원 결합 도메인은 동일한 이뮤노글로불린 분자로부터 유래될 필요는

없다. 이와 관련하여, 가변 영역은 체액 반응을 개시하고 요구되는 항원에 대한 이뮤노글로불린을 생성하기 위해 유도될 수 있는 임의의 종류의 동물로부터 유래될 수 있다. 따라서, 결합 폴리펩티드의 가변 영역은 예를 들어 포유동물 기원일 수 있고, 예를 들어 인간, 무린, 래트, 염소, 양, 비-인간 영장류 (예컨대 시노몰거스 원숭이, 마카크 등), 이리, 또는 낙타류 (예를 들어, 낙타, 라마 및 관련 종) 기원일 수 있다.

[0044] 자연 발생 항체에서, 각각의 단량체 항체에 존재하는 6개의 CDR은 항체가 수성 환경에서 그의 3차원 입체형태를 취하면서 항원 결합 부위를 형성하기 위해 특이적으로 위치하는 아미노산의 짧은 비-인접 서열이다. 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 나머지는 아미노산 서열 내의 보다 작은 분자간 변이를 보이고, 프레임워크 영역으로 불린다. 프레임워크 영역은 주로 β -시트 입체형태를 취하고, CDR은 β -시트 구조를 연결하고 몇몇 경우에 그 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 따라서, 이들 프레임워크 영역은 사슬간 비-공유 상호작용에 의해 6개의 CDR을 정확한 배향으로 위치시키는 스캐폴드를 형성하는 작용을 한다. 위치하는 CDR에 의해 형성된 항원 결합 도메인은 면역반응성 항원 상의 에피토프에 대한 표면 상보성을 규정한다. 상기 상보성 표면은 면역반응성 항원 에피토프에 대한 항체의 비-공유 결합을 촉진한다.

[0045] 본 발명의 예시적인 결합 폴리펩티드는 항체 변이체를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항체 변이체"는 자연 발생이 아니도록 변경된 합성 및 조작된 형태의 항체, 예를 들어, 적어도 2개의 중쇄 부분을 포함하지만 2개의 완전한 중쇄는 포함하지는 않는 항체 (예컨대, 도메인 결실 항체 또는 미니바디); 2개 이상의 상이한 항원에 또는 단일 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하도록 변경된 다중특이적 형태의 항체 (예를 들어, 이중특이적, 삼중특이적 등); scFv 분자에 연결된 중쇄 분자 등을 포함한다. 또한, 용어 "항체 변이체"는 다가 형태의 항체 (예를 들어, 3, 4 또는 그 초과 카피의 동일한 항원에 결합하는 3가, 4가 등의 항체)를 포함한다.

[0046] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "결합가"는 폴리펩티드 내의 잠재적인 표적 결합 부위의 수를 의미한다. 각각의 표적 결합 부위는 하나의 표적 분자 또는 표적 분자 상의 특이적 부위에 특이적으로 결합한다. 폴리펩티드가 하나 초과 표적 결합 부위를 포함할 때, 각각의 표적 결합 부위는 동일하거나 상이한 분자에 특이적으로 결합할 수 있다 (예를 들어, 상이한 리간드 또는 상이한 항원, 또는 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다). 본 발명의 결합 폴리펩티드는 바람직하게는 인간 항원 분자에 특이적인 적어도 하나의 결합 부위를 갖는다.

[0047] 용어 "특이성"은 제시된 표적 항원 (예를 들어, 인간 표적 항원)에 특이적으로 결합하는 (예를 들어, 면역반응하는) 능력을 의미한다. 결합 폴리펩티드는 단일특이적이고, 표적에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 결합 부위를 함유할 수 있거나 또는 폴리펩티드는 다중특이적이고 동일하거나 상이한 표적에 특이적으로 결합하는 2 이상의 결합 부위를 함유할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 동일한 표적의 2개의 상이한 (예를 들어, 비-중첩) 부분에 특이적이다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 하나 초과 표적에 특이적이다. 종양 세포에서 발현되는 항원에 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 예시적인 결합 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)는 관련 기술분야에 알려져 있고, 상기 항체로부터의 하나 이상의 CDR이 본 발명의 항체에 포함될 수 있다.

[0048] 용어 "연결 모이어티"는 이펙터 모이어티를 본원에 개시된 결합 폴리펩티드에 연결할 수 있는 모이어티를 포함한다. 연결 모이어티는 절단가능 (예를 들어, 효소에 의해 절단가능한 또는 pH-감수성) 또는 비-절단가능하도록 선택될 수 있다. 예시적인 연결 모이어티를 본원의 표 2에 기재한다.

[0049] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "이펙터 모이어티"는 생물학적 또는 다른 기능적 활성을 갖는 물질 (예를 들어 단백질, 핵산, 지질, 탄수화물, 당펩티드, 약물 모이어티, 및 그의 단편)을 포함한다. 예를 들어, 결합 폴리펩티드에 접합된 이펙터 모이어티를 포함하는 변형된 결합 폴리펩티드는 비접합된 항체에 비해 적어도 하나의 추가의 기능 또는 특성을 갖는다. 예를 들어, 세포독성 약물 (예를 들어, 이펙터 모이어티)의 결합 폴리펩티드에 대한 접합은 제2 기능으로서 (즉, 항원 결합에 추가로) 약물 세포독성을 갖는 결합 폴리펩티드의 형성을 유발한다. 또 다른 예에서, 제2 결합 폴리펩티드의 결합 폴리펩티드에 대한 접합은 추가의 결합 특성을 부여할 수 있다. 이펙터 모이어티가 유전자에 의해 코딩되는 치료 또는 진단 단백질 또는 핵산인 특정 실시양태에서, 이펙터 모이어티는 관련 기술분야에 잘 알려진 펩티드 합성 또는 재조합 DNA 방법에 의해 합성되거나 발현될 수 있다. 이펙터 모이어티는 유전자에 의해 코딩되지 않는 펩티드, 또는 약물 모이어티인 또 다른 측면에서, 이펙터 모이어티는 인위적으로 합성되거나 또는 천연 공급원으로부터 정제될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "약물 모이어티"는 소염, 항암, 항-염증 (예를 들어, 항-진균, 항박테리아, 항-기생충, 항-바이러스 등), 및 마취 치료제를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 약물 모이어티는 항암 또는 세포독성제이다. 상용성

약물 모이어티는 또한 전구약물을 포함할 수 있다. 예시적인 이펙터 모이어티를 본원의 표 1에 기재한다.

- [0050] 특정 실시양태에서, "이펙터 모이어티"는 "표적화 모이어티"를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "표적화 모이어티"는 표적 분자에 결합하는 이펙터 모이어티를 의미한다. 표적화 모이어티는 비제한적으로, 단백질, 핵산, 지질, 탄수화물 (예를 들어, 글리칸), 및 이들의 조합물 (예를 들어, 당단백질, 당펩티드, 및 당지질)을 포함할 수 있다.
- [0051] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "전구약물"은 모 약물에 비해 더 작은 활성, 반응성 또는 부작용 경향을 갖고 생체내에서 효소에 의해 활성화되거나 다른 방식으로 보다 활성이 큰 형태로 전환될 수 있는 제약 활성제의 전구체 또는 유도체 형태를 의미한다. 본 개시내용의 조성물 상용성인 전구약물은 보다 활성이 크고 세포독성이 없는 약물로 전환될 수 있는 다음을 포함하고, 이로 제한되지 않는다: 포스페이트-함유 전구약물, 아미노산-함유 전구약물, 티오포스페이트-함유 전구약물, 술페이트-함유 전구약물, 펩티드-함유 전구약물, β -락탐-함유 전구약물, 임의로 치환된 페녹시아세트아미드-함유 전구약물 또는 임의로 치환된 페닐아세트아미드-함유 전구약물, 5-플루오로시토신 및 다른 5-플루오로우리딘 전구약물. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 변형된 본 개시내용의 결합 폴리펩티드를 제조하기 위해 화합물이 반응을 보다 편리하게 만들기 위해 요구되는 약물 모이어티 또는 그의 전구약물에 대해 화학적 변형을 도입할 수 있다. 약물 모이어티는 또한 본원에서 설명되는 약물 모이어티의 유도체, 제약상 허용되는 염, 에스테르, 아마이드, 및 에테르를 포함한다. 유도체는 특정 약물의 요구되는 치료 활성을 개선하거나 또는 유의하게 감소시키지 않을 수 있는 본원에서 확인된 약물에 대한 변형을 포함한다.
- [0052] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항암제"는 신생물 또는 종양 세포의 성장 및/또는 증식에 유해하고 악성 종양을 감소시키거나 억제하거나 파괴하는 작용을 할 수 있는 작용제를 포함한다. 상기 항암제의 예는 세포증식억제제, 알킬화제, 항생제, 세포독성 뉴클레오사이드, 튜불린 결합제, 호르몬, 호르몬 길항제, 세포독성제 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 세포독성제는 토메이마이신 유도체, 메이탄신 유도체, 크립토피신 유도체, 안트라사이클린 유도체, 비스포스포네이트 유도체, 랩토마이신 유도체, 스트렙토니그린 유도체, 오리스타틴 유도체, 및 듀오카르마이신 유도체를 포함한다. 면역반응성 세포 또는 악성 세포의 성장을 지연하거나 느리게 하는 임의의 작용제가 본 개시내용의 범위에 포함된다.
- [0053] 본원에서 사용되는 용어 "항원" 또는 "표적 항원"은 결합 폴리펩티드의 결합 부위에 의해 결합될 수 있는 분자 또는 분자의 부분을 의미한다. 표적 항원은 하나 이상의 에피토프를 가질 수 있다.
- [0054] **II. 결합 폴리펩티드**
- [0055] 한 측면에서, 본 개시내용은 카바트 넘버링에 따른 위치 114에 N-연결 글리코실화 부위를 갖는 적어도 하나의 CH1 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드 (예를 들어, 항체, 항체 단편, 항체 변이체, 및 융합 단백질)를 제공한다.
- [0056] 임의의 이뮤노글로불린 클래스 (예를 들어, IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE) 및 종으로부터의 CH1 도메인은 본원에 개시된 결합 폴리펩티드에 사용될 수 있다. 상이한 종 또는 Ig 클래스로부터의 CH1 도메인의 부분을 포함하는 키메라 CH1 도메인도 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, CH1 도메인은 인간 IgG1 CH1 도메인이다. 인간 IgG1 도메인의 경우에, 위치 114의 야생형 아미노산의 아스파라긴으로의 돌연변이는 N-연결 글리코실화 컨센서스 부위 (즉, N-X-T/S 서열 (sequon), 여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)를 형성시킨다. 그러나, 다른 종 및/또는 Ig 클래스 또는 이소형의 다른 CH1 도메인의 경우에, 통상의 기술자는 N-X-T/S 서열을 생성하기 위해 CH1 도메인의 위치 115 및/또는 116을 돌연변이시키는 것이 필요할 수 있음을 이해할 것이다.
- [0057] 본원에 개시된 결합 폴리펩티드는 카바트 넘버링에 따른 위치 114에 N-연결 글리코실화 부위를 갖는 CH1 도메인을 포함하는 임의의 결합 폴리펩티드를 포함한다.
- [0058] 특정 실시양태에서, 결합 폴리펩티드는 항체 또는 그의 단편 또는 유도체이다. 임의의 공급원 또는 종으로부터의 임의의 항체가 본원에 개시된 결합 폴리펩티드에 사용될 수 있다. 적합한 항체는 비제한적으로, 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체를 포함한다.
- [0059] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 항체의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다. 용어 "항원-결합 단편"은 항원에 결합하거나 또는 항원 결합 (즉, 특이적 결합)을 위해 무손상 항체와 (즉, 이들이 유래된 무손상 항체와) 경쟁하는 이뮤노글로불린 또는 항체의 폴리펩티드 단편을 의미한다. 항원 결합 단편은 관련 기술분야에 잘 알려진 재조합 또는 생화학적 방법에 의해 생산될 수 있다. 예시적인 항원-결합 단편은 Fv, Fab, Fab', 및 (Fab')₂를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 본 개시내용의 항원-결합 단편은 적어도 하나의 조작된

글리코실화 부위를 포함하는 변경된 항원-결합 단편이다. 한 예시적인 실시양태에서, 본 개시내용의 변경된 항원 결합 단편은 상기 설명한 변경된 VH 도메인을 포함한다. 또 다른 예시적인 실시양태에서, 본 개시내용의 변경된 항원 결합 단편은 상기 설명한 변경된 CH1 도메인을 포함한다.

[0060] 예시적인 실시양태에서, 결합 폴리펩티드는 단일 사슬 가변 영역 서열 (ScFv)을 포함한다. 단일 사슬 가변 영역 서열은 하나 이상의 항원 결합 부위, 예를 들어, 유연한 링커에 의해 VH 도메인에 연결된 VL 도메인을 갖는 단일 폴리펩티드를 포함한다. ScFv 분자는 VH-링커-VL 배향 또는 VL-링커-VH 배향으로 구축될 수 있다. 항원 결합 부위를 이루는 VL 및 VH 도메인을 연결하는 유연한 힌지는 바람직하게는 약 10 내지 약 50개의 아미노산 잔기를 포함한다. 연결 펩티드는 관련 기술분야에 알려져 있다. 본 발명의 결합 폴리펩티드는 적어도 하나의 scFv 및/또는 적어도 하나의 불변 영역을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 CH1 도메인 (예를 들어 카바트 위치 114에 아스파라긴 잔기를 포함하는 CH1 도메인) 및/또는 CH2 도메인 (예를 들어 EU 위치 298에 아스파라긴 잔기, 및 EU 위치 300에 세린 또는 트레오닌 잔기를 포함하는 CH2 도메인)을 포함하는 항체 또는 단편에 연결 또는 융합된 적어도 하나의 scFv를 포함할 수 있다.

[0061] 특정 예시적인 실시양태에서, 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 항체를 코딩하는 DNA 서열을 ScFv 분자 (예를 들어, 변경된 ScFv 분자)와 융합함으로써 생산되는 다가 (예를 들어, 4가) 항체이다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 상기 서열은 scFv 분자 (예를 들어, 변경된 ScFv 분자)가 그의 N-말단 또는 C-말단에서 유연한 링커 (예를 들어, gly/ser 링커)를 통해 항체의 Fc 단편에 연결되도록 조합된다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 4가 항체는 ScFv-Fab 4가 분자를 구축하기 위해 ScFv 분자를 CH1 도메인 (예를 들어 카바트 위치 114에 아스파라긴 잔기를 포함하는 CH1 도메인)에 융합된 연결 펩티드에 융합함으로써 제조될 수 있다.

[0062] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 변경된 미니바디이다. 본 개시내용의 변경된 미니바디는 각각 연결 펩티드를 통해 CH3 도메인 또는 그의 일부에 융합된 ScFv 분자 (예를 들어, 상기 설명된 변경된 VH 도메인을 포함하는 변경된 ScFv 분자)를 포함하는 2개의 폴리펩티드 사슬로 이루어진 이량체 분자이다. 미니바디는 관련 기술분야에 설명된 방법 (예를 들어, US 특허 5,837,821 또는 WO 94/09817A1 참조)을 사용하여 ScFv 성분 및 연결 펩티드-CH3 성분을 구축함으로써 제조될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 4가 미니바디가 구축될 수 있다. 4가 미니바디는 2개의 ScFv 분자가 유연한 링커를 사용하여 연결되는 것을 제외하고 미니바디와 동일한 방식으로 구축될 수 있다. 연결된 scFv-scFv 구축물은 이어서 CH3 도메인에 결합된다.

[0063] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 디아바디를 포함한다. 디아바디는, 각각 scFv 분자에 유사한 폴리펩티드를 갖지만, 대체로 동일한 폴리펩티드 사슬 상의 VL 및 VH 도메인이 상호작용할 수 없도록 두 가변 도메인을 연결하는 짧은 (10개 미만 및 바람직하게는 1-5개의) 아미노산 잔기 링커를 갖는 이량체성 4가 분자이다. 그 대신, 하나의 폴리펩티드 사슬의 VL 및 VH 도메인은 제2 폴리펩티드 사슬 상의 VH 및 VL 도메인과 (각각) 상호작용한다 (예를 들어, WO 02/02781 참조). 본 개시내용의 디아바디는 CH3 도메인에 융합된 scFv 분자를 포함한다.

[0064] 다른 실시양태에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 동일한 폴리펩티드 사슬 상에 하나 이상의 가변 도메인을 연속적으로 포함하는 다중특이적 또는 다가 항체, 예를 들어, 직렬 가변 도메인 (TVD) 폴리펩티드를 포함한다. 예시적인 TVD 폴리펩티드는 미국 특허 5,989,830에 기재된 "이중 헤드" 또는 "이중-Fv" 입체형태를 포함한다. 이중-Fv 입체형태에서, 2개의 상이한 항체의 가변 도메인은 2개의 별개의 사슬 (하나의 중쇄 및 하나의 경쇄) 상에 직렬 배향으로 발현되고, 여기서 하나의 폴리펩티드 사슬은 펩티드 링커에 의해 분리된 2개의 VH 도메인 (VH1-링커-VH2)을 연속적으로 갖고, 다른 폴리펩티드 사슬은 펩티드 링커에 의해 연속적으로 연결된 상보성 VL 도메인 (VL1-링커-VL2)으로 이루어진다. 교차 이중 헤드 입체형태에서, 2개의 상이한 항체의 가변 도메인은 2개의 별개의 폴리펩티드 사슬 (하나의 중쇄 및 하나의 경쇄) 상에 직렬 배향으로 발현되고, 여기서 하나의 폴리펩티드 사슬은 펩티드 링커에 의해 분리된 2개의 VH 도메인 (VH1-링커-VH2)을 연속적으로 갖고, 다른 폴리펩티드 사슬은 반대 배향의 펩티드 링커에 의해 연속적으로 연결된 상보성 VL 도메인 (VL2-링커-VL1)으로 이루어진다.

[0065] "이중-Fv" 형식을 기초로 한 추가의 항체 변이체는 이중-가변-도메인 IgG (DVD-IgG) 이중특이적 항체를 포함한다 (미국 특허 7,612,181 참조 및 TBTI 형식 (US 2010/0226923 A1 참조). 이중-Fv의 각각의 사슬에 불변 도메인 (중쇄에 CH1-Fc 및 경쇄에 카파 또는 람다 불변 도메인)의 첨가는 임의의 추가의 변형 (즉, 안정성을 향상시키기 위한 불변 도메인의 명백한 첨가)의 필요 없이 기능성 이중특이적 항체를 생성한다.

[0066] 또 다른 예시적인 실시양태에서, 결합 폴리펩티드는 "이중 헤드" 입체형태를 기초로 한 교차 이중 가변 도메인 IgG (CODV-IgG) 이중특이적 항체를 포함한다 (그 전문이 본원에 참조로 포함된 US 20120251541 A1 참조).

CODV-IgG 항체 변이체는 CL 도메인에 연속적으로 연결된 VL 도메인을 갖는 하나의 폴리펩티드 사슬 (VL1-L1-VL2-L2-CL) 및 CH1 도메인에 반대 방향으로 연속적으로 연결된 상보성 VH 도메인을 갖는 제2 폴리펩티드 사슬 (VH2-L3-VH1-L4-CH1)을 갖고, 여기서 폴리펩티드 사슬은 교차 경쇄-중쇄쌍을 형성한다. 특정 실시양태에서, 제 2 폴리펩티드는 Fc 도메인에 추가로 연결될 수 있다 (VH2-L3-VH1-L4-CH1-Fc). 특정 실시양태에서, 링커 L3은 링커 L1의 길이의 적어도 2배이고/이거나 링커 L4는 링커 L2의 길이의 적어도 2배이다. 예를 들어, L1 및 L2는 1-3개 아미노산 잔기 길이일 수 있고, L3은 2 내지 6개 아미노산 잔기 길이일 수 있고, L4는 4 내지 7개의 아미노산 잔기 길이일 수 있다. 적합한 링커의 예는 단일 글리신 (Gly) 잔기; 디글리신 펩티드 (Gly-Gly); 트리펩티드 (Gly-Gly-Gly); 4개의 글리신 잔기를 갖는 펩티드 (Gly-Gly-Gly-Gly); 5개의 글리신 잔기를 갖는 펩티드 (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly); 6개의 글리신 잔기를 갖는 펩티드 (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly); 7개의 글리신 잔기를 갖는 펩티드 (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly); 8개의 글리신 잔기를 갖는 펩티드 (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly)를 포함한다. 아미노산 잔기의 다른 조합, 예컨대 펩티드 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser 및 펩티드 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser이 사용될 수 있다.

[0067] 특정 실시양태에서, 결합 폴리펩티드는 항체 불변 영역에 융합된 비-항체 결합 영역 (예를 들어, 수용체, 리간드, 또는 세포-부착 분자)을 포함하는 이뮤노어드레스인 분자를 포함한다 (예를 들어, 그 전문이 본원에 참조로 포함된 문헌 [Ashkenazi et al., Methods, 1995 8(2), 104-115] 참조).

[0068] 특정 실시양태에서, 결합 폴리펩티드는 이뮤노글로불린-유사 도메인을 포함한다. 적합한 이뮤노글로불린-유사 도메인은 비제한적으로, 피브로넥틴 도메인 (예를 들어, 그 전문이 본원에 참조로 포함된 문헌 [Koide et al. (2007), Methods Mol. Biol. 352: 95-109] 참조), DARPin (예를 들어, 그 전문이 본원에 참조로 포함된 문헌 [Stumpp et al. (2008) Drug Discov. Today (15-16): 695-701] 참조), 단백질 A의 Z 도메인 (그 전문이 본원에 참조로 포함된 문헌 [Nygren et al. (2008) FEBS J. 275 (11): 2668-76] 참조), 리포칼린 (예를 들어, 그 전문이 본원에 참조로 포함된 문헌 [Skerra et al. (2008) FEBS J. 275 (11): 2677-83] 참조), 아펠린 (예를 들어, 그 전문이 본원에 참조로 포함된 문헌 [Ebersbach et al. (2007) J. Mol. Biol. 372 (1): 172-85] 참조), 아피틴 (예를 들어, 그 전문이 본원에 참조로 포함된 문헌 [Krehenbrink et al. (2008). J. Mol. Biol. 383 (5): 1058-68] 참조), 아비머 (예를 들어, 그 전문이 본원에 참조로 포함된 문헌 [Silverman et al. (2005) Nat. Biotechnol. 23 (12): 1556-61] 참조), 피노머 (예를 들어, 그 전문이 본원에 참조로 포함된 문헌 [Grabulovski et al. (2007) J Biol Chem 282 (5): 3196-3204] 참조), 및 쿠니츠 도메인 펩티드 (예를 들어, 그 전문이 본원에 참조로 포함된 문헌 [Nixon et al. (2006) Curr Opin Drug Discov Devel 9 (2): 261-8] 참조)를 포함한다.

[0069] III. N-연결된 글리칸

[0070] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 결합 폴리펩티드의 CH1 도메인은 카바트 넘버링에 따른 위치 114에 조작되는 아르기닌 (N114)에서 글리코실화된다. N-연결된 글리칸은 일반적으로 N114 측쇄의 질소기에 β -글리코실아미드 연결을 통해 연결된다. 그러나, 다른 적합한 관련 기술분야에서 인정된 연결도 사용될 수 있다.

[0071] 임의의 종류의 자연 발생 또는 합성 (즉, 비-천연) N-연결된 글리칸은 N114에 연결될 수 있다. 예를 들어, 글리칸은 천연 글리칸 또는 비-천연 연결을 함유하는 조작된 글리칸일 수 있다. 특정 실시양태에서, 글리칸은 이펙터 모이머에 대한 접합을 위해 적합한 기 (예를 들어, 반응성 알데히드 기)를 생산하기 위해 산화 (예를 들어, 퍼아यो테이트 처리)될 수 있는 사카라이드를 포함한다. 적합한 산화가능 사카라이드는 비제한적으로, 갈락토스 및 시알산 (예를 들어, N-아세틸뉴라민산)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 글리칸은 이중안테나 글리칸이다. 특정 실시양태에서, 글리칸은 자연 발생 포유동물 당형태이다.

[0072] 글리코실화는 관련 기술분야에 알려진 임의의 수단을 통해 달성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 글리코실화는 N-연결 글리코실화가 가능한 세포에서 결합 폴리펩티드의 발현에 의해 달성된다. 임의의 천연 또는 조작된 세포 (예를 들어, 원핵 또는 진핵)가 사용될 수 있다. 일반적으로, 포유동물 세포가 글리코실화를 실시하기 위해 사용된다. 포유동물 세포에서 생산되는 N-글리칸은 통상 복합 N-글리칸으로 언급된다 (예를 들어, 그 전문이 본원에 참조로 포함된 문헌 [Drickamer K, Taylor ME (2006). Introduction to Glycobiology, 2nd ed.] 참조). 상기 복합 N-글리칸은 일반적으로 내부 코어 구조 Man₃GlcNAc₂에 연결된 시알릴락토사민 서열을 갖는 2 내지 6개의 외부 가지를 갖는 구조를 갖는다. 복합 N-글리칸은 예를 들어 NeuNAc-; NeuAc α 2,6 GalNAc α 1-; NeuAc α 2,3 Gal. 베타.1 3GalNAc α 1-; 및 NeuAc α 2,3/6 Gal β 1,4 GlcNAc β 1과 같은 올리고사카라이드로 끝나는 교대하는 GlcNAc 및 갈락토스 (Gal) 잔기의 적어도 하나, 및 바람직하게는 적어도 2개의 가지를 갖는다. 또한, 술페이트 에스테르는 갈락토스, GalNAc, 및 GlcNAc 잔기에서 발생할 수 있고, 포스페이트 에스테르는 만노스 잔기에

서 발생할 수 있다. NeuAc는 O-아세틸화되거나 또는 NeuG1 (N-글리콜릴뉴라민산)으로 교체될 수 있다. 복합 N-글리칸은 또한 양분하는 GlcNAc 및 코어 푸코스 (Fuc)의 사슬내 치환을 보일 수 있다.

[0073] 추가로 또는 별법으로, 글리코실화는 시험관내에서 효소 수단을 통해 달성되거나 변형될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 글리코실트랜스퍼라제는 특정 사카라이드 잔기를 N114에 부가하기 위해 사용될 수 있고, 하나 이상의 글리코시다제는 N-연결된 글리칸으로부터 원치않는 사카라이드를 제거하기 위해 사용될 수 있다. 그러한 효소 수단은 관련 기술분야에 잘 알려져 있다 (예를 들어, 그 전문이 본원에 참조로 포함된 WO/2007/005786 참조).

[0074] IV. 면역학적 이펙터 기능 및 Fc 변형

[0075] 특정 실시양태에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 하나 이상의 이펙터 기능을 매개하는 항체 불변 영역 (예를 들어, IgG 불변 영역, 예를 들어, 인간 IgG 불변 영역, 예를 들어, 인간 IgG1 또는 IgG4 불변 영역)을 포함할 수 있다. 예를 들어, C1-복합체의 항체 불변 영역에 대한 결합은 보체 시스템을 활성화할 수 있다. 보체 시스템의 활성화는 세포 병원체의 옵소닌화 및 용해에 중요하다. 보체 시스템의 활성화는 또한 염증 반응을 자극하고, 자가면역 과민성에 관여할 수 있다. 또한, 항체는 Fc 영역을 통해 다양한 세포 상의 수용체에 결합한다 (항체 Fc 영역 상의 Fc 수용체 결합 부위는 세포 상의 Fc 수용체 (FcR)에 결합한다). IgG (감마 수용체), IgE (에psilon 수용체), IgA (알파 수용체) 및 IgM (뮤 수용체)를 비롯하여 항체의 상이한 클래스에 특이적인 많은 Fc 수용체가 존재한다. 항체의 세포 표면 상의 Fc 수용체에 대한 결합은 항체-코팅된 입자의 흡입 및 파괴, 면역 복합체의 청소, 킬러 세포에 의한 항체-코팅된 표적 세포의 용해 (항체-의존성 세포-매개 세포독성, 또는 ADCC로 불림), 염증 매개체의 방출, 태반 이동 및 이뮤노글로불린 생산의 제어를 비롯한 많은 중요한 및 다양한 생물학적 반응을 촉발한다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드 (예를 들어, 항체 또는 그의 항원 결합 단편)는 Fc-감마 수용체에 결합한다. 별도의 실시양태에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 하나 이상의 이펙터 기능 (예를 들어, ADCC 활성화)이 결여되고/되거나 Fcγ 수용체에 결합할 수 없는 불변 영역을 포함할 수 있다.

[0076] 본 발명의 특정 실시양태는 하나 이상의 불변 영역 도메인 내의 적어도 하나의 아미노산이 요구되는 생화학적 특징, 예컨대 감소 또는 향상된 이펙터 기능, 비-공유 이량체화하는 능력, 중량 부위에 국제화하는 능력 증가, 대략 동일한 면역원성의 비변경된 전체 항체에 비해 감소된 혈청 반감기, 또는 증가된 혈청 반감기를 제공하기 위해 결실되거나 달리 변경된 항체를 포함한다. 예를 들어, 본원에서 설명되는 진단 및 치료 방법에 사용하기 위한 특정 항체는 이뮤노글로불린 중쇄에 유사한 폴리펩티드 사슬을 포함하지만 하나 이상의 중쇄 도메인의 적어도 부분이 결여된 도메인 결실 항체이다. 예를 들어, 특정 항체에서, 변형된 항체의 불변 영역의 하나의 전체 도메인이 결실될 것이고, 예를 들어, CH2 도메인의 전부 또는 일부가 결실될 것이다.

[0077] 다른 특정 실시양태에서, 결합 폴리펩티드는 상이한 항체 이소형으로부터의 불변 영역 (예를 들어, 2개 이상의 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4로부터의 불변 영역)을 포함한다. 다른 실시양태에서, 결합 폴리펩티드는 키메라 힌지 (즉, 상이한 항체 이소형의 힌지 도메인으로부터 유래된 힌지 부분, 예를 들어, IgG4 분자로부터의 상부 힌지 도메인 및 IgG1 중량 힌지 도메인을 포함하는 힌지)를 포함한다. 한 실시양태에서, 결합 폴리펩티드는 인간 IgG4 분자로부터의 Fc 영역 또는 그의 일부 및 분자의 코어 힌지 영역 내의 Ser228Pro 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함한다.

[0078] 특정 실시양태에서, Fc 부분은 관련 기술분야에 알려진 기술을 사용하여 이펙터 기능을 증가 또는 감소시키기 위해 돌연변이될 수 있다. 예를 들어, 불변 영역 도메인의 결실 또는 불활성화 (점 돌연변이 또는 다른 수단을 통한)는 순환하는 변형된 항체의 Fc 수용체 결합을 감소시켜 중량 국제화를 증가시킬 수 있다. 다른 경우에, 본 발명과 일치하는 불변 영역 변형은 보체 결합을 감소시키고, 따라서 접합된 세포독소의 혈청 반감기 및 비특이적 회합을 감소시킬 수 있다. 불변 영역의 또 다른 변형은 항원 특이성 또는 유연성의 증가에 의해 국제화를 향상시키는 디설피드 연결 또는 올리고사카라이드 모이어티의 변형을 위해 사용될 수 있다. 생성되는 생리학적 프로파일, 생체이용성 및 변형의 다른 생화학적 효과, 예컨대 중량 국제화, 생체내 분포 및 혈청 반감기는 과도한 실험을 수행하지 않으면서 공지된 면역학적 기술을 사용하여 쉽게 측정되고 정량될 수 있다.

[0079] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체에서 사용되는 Fc 도메인은 Fc 변이체이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "Fc 변이체"는 상기 Fc 도메인이 유래되는 야생형 Fc 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 갖는 Fc 도메인을 의미한다. 예를 들어, Fc 도메인이 인간 IgG1 항체로부터 유래되는 경우, 상기 인간 IgG1 Fc 도메인의 Fc 변이체는 상기 Fc 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.

- [0080] Fc 변이체의 아미노산 치환(들)은 Fc 도메인 내의 임의의 위치 (즉, 임의의 EU 협약 아미노산 위치)에 존재할 수 있다. 한 실시양태에서, Fc 변이체는 힌지 도메인 또는 그의 일부에 존재하는 아미노산 위치에 치환을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, Fc 변이체는 CH2 도메인 또는 그의 일부에 존재하는 아미노산 위치에 치환을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, Fc 변이체는 CH3 도메인 또는 그의 일부에 존재하는 아미노산 위치에 치환을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, Fc 변이체는 CH4 도메인 또는 그의 일부에 존재하는 아미노산 위치에 치환을 포함한다.
- [0081] 본 발명의 결합 폴리펩티드는 이펙터 기능 및/또는 FcR 결합의 개선 (예를 들어, 감소 또는 향상)을 부여하는 것으로 알려진 관련 기술분야에서 인정된 임의의 Fc 변이체를 사용할 수 있다. 상기 Fc 변이체는 예를 들어 각각 그 전문이 본원에 참조로 포함된 PCT 출원 공개 W088/07089A1, W096/14339A1, W098/05787A1, W098/23289A1, W099/51642A1, W099/58572A1, W000/09560A2, W000/32767A1, W000/42072A2, W002/44215A2, W002/060919A2, W003/074569A2, W004/016750A2, W004/029207A2, W004/035752A2, W004/063351A2, W004/074455A2, W004/099249A2, W005/040217A2, W005/070963A1, W005/077981A2, W005/092925A2, W005/123780A2, W006/019447A1, W006/047350A2, 및 W006/085967A2 또는 미국 특허 5,648,260; 5,739,277; 5,834,250; 5,869,046; 6,096,871; 6,121,022; 6,194,551; 6,242,195; 6,277,375; 6,528,624; 6,538,124; 6,737,056; 6,821,505; 6,998,253; 및 7,083,784에 개시된 임의의 하나의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 하나의 예시적인 실시양태에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 EU 위치 268에 아미노산 치환 (예를 들어, H268D 또는 H268E)을 포함하는 Fc 변이체를 포함할 수 있다. 또 다른 예시적인 실시양태에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 EU 위치 239 (예를 들어, S239D 또는 S239E) 및/또는 EU 위치 332에 아미노산 치환 (예를 들어, I332D 또는 I332Q)을 포함할 수 있다.
- [0082] 특정 실시양태에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 항체의 항원-독립적 이펙터 기능, 특히 결합 폴리펩티드의 순환 반감기를 변경하는 아미노산 치환을 포함하는 Fc 변이체를 포함할 수 있다. 상기 결합 폴리펩티드는 상기 치환이 결여된 결합 폴리펩티드에 비해 FcRn에 대한 증가된 또는 감소된 결합을 보이고, 따라서, 각각 증가된 또는 감소된 혈청내 반감기를 보인다. FcRn에 대한 개선된 친화도를 갖는 Fc 변이체는 보다 긴 혈청 반감기를 가질 것으로 예상되고, 상기 분자는 예를 들어 만성 질환 또는 장애의 치료를 위해 투여되는 항체의 긴 반감기가 요구되는 포유동물의 치료 방법에서 유용할 수 있다. 이와 대조적으로, 감소된 FcRn 결합 친화도를 갖는 Fc 변이체는 더 짧은 반감기를 가질 것으로 예상되고, 상기 분자는 또한 예를 들어 단축된 순환 시간이 유리할 수 있는 포유동물에게 투여하기 위해, 예를 들어 생체내 진단 영상화를 위해 또는 출발 항체가 연장된 기간 동안 순환계에 존재할 때 독성 부작용을 갖는 상황에 유용하다. 또한, 감소된 FcRn 결합 친화도를 갖는 Fc 변이체는 태반을 가로지르는 가능성이 작고, 따라서 임신한 여성의 질환 또는 장애의 치료에도 유용하다. 또한, 감소된 FcRn 결합 친화도가 요구될 수 있는 다른 용도는 뇌, 신장, 및/또는 간으로 국재화된 용도를 포함한다. 한 예시적인 실시양태에서, 본 발명의 변경된 결합 폴리펩티드 (예를 들어, 항체 또는 그의 항원 결합 단편)는 혈관계로부터 신장 사구체의 상피를 가로지르는 수송의 감소를 보인다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 변경된 결합 폴리펩티드 (예를 들어, 항체 또는 그의 항원 결합 단편)는 뇌로부터 혈액 뇌 장벽 (BBB)을 가로질러 혈관 공간 내로의 수송 감소를 보인다. 한 실시양태에서, 변경된 FcRn 결합을 갖는 항체는 Fc 도메인의 "FcRn 결합 루프" 내에 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 Fc 도메인을 포함한다. FcRn 결합 루프는 아미노산 잔기 280-299 (EU 넘버링에 따른)로 이루어진다. FcRn 결합 활성을 변경하는 예시적인 아미노산 치환은 그 전문이 본원에 참조로 포함된 PCT 출원 공개 W005/047327에 개시되어 있다. 특정 예시적인 실시양태에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드 (예를 들어, 항체 또는 그의 항원 결합 단편)는 하나 이상의 다음 치환을 갖는 Fc 도메인을 포함한다: V284E, H285E, N286D, K290E 및 S304D (EU 넘버링). 또 다른 예시적인 실시양태에서, 본 발명의 결합 분자는 이중 돌연변이 H433K/N434F를 갖는 인간 Fc 도메인을 포함한다 (예를 들어, US 특허 8,163,881 참조).
- [0083] 다른 실시양태에서, 본원에서 설명되는 진단 및 치료 방법에 사용하기 위한 결합 폴리펩티드는 글리코실화를 감소시키거나 제거하도록 변경된 불변 영역, 예를 들어, IgG1 또는 IgG4 중쇄 불변 영역을 갖는다. 예를 들어, 본 발명의 결합 폴리펩티드 (예를 들어, 항체 또는 그의 항원 결합 단편)는 또한 항체 Fc의 글리코실화를 변경하는 아미노산 치환을 포함하는 Fc 변이체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 Fc 변이체는 감소된 글리코실화 (예를 들어, N- 또는 O-연결된 글리코실화)를 가질 수 있다. 예시적인 실시양태에서, Fc 변이체는 아미노산 위치 297 (EU 넘버링)에서 정상적으로 발견되는 N-연결된 글리칸의 감소된 글리코실화를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 글리코실화 모티프, 예를 들어 아미노산 서열 NXT 또는 NXS를 함유하는 N-연결 글리코실화 모티프 근처에 또는 그 내에 아미노산 치환을 갖는다. 특정 실시양태에서, 항체는 아미노산 위치 228 또는 299 (EU 넘버링)에 아미노산 치환을 갖는 Fc 변이체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 결합 폴리펩티드는 S228P 및

T299A 돌연변이 (EU 넘버링)를 포함하는 IgG1 또는 IgG4 불변 영역을 포함한다.

[0084] 특정 실시양태에서, 결합 폴리펩티드의 Fc 도메인은 EU 넘버링에 따른 위치 298에 조작된 아르기닌, 및 아미노산 위치 300 (EU 넘버링)에 조작된 아르기닌, 세린 또는 트레오닌 잔기를 갖는 Fc 변이체를 포함한다. 상기 Fc 변이체는 위치 298에서 글리코실화되고, Fc γ 수용체에 대한 결합을 억제한다.

[0085] 감소된 또는 변경된 글리코실화를 부여하는 예시적인 아미노산 치환은 그 전문이 본원에 참조로 포함된 PCT 출원 공개 W005/018572에 개시되어 있다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 글리코실화를 제거하기 위해 변형된다. 상기 결합 폴리펩티드는 "agly" 결합 폴리펩티드 (예를 들어 "agly" 항체)로 언급될 수 있다. 이론에 매이지 않지만, "agly" 결합 폴리펩티드는 생체내에서 개선된 안전성 및 안정성 프로파일을 가질 수 있는 것으로 생각된다. agly 결합 폴리펩티드는 임의의 이소형 또는 그의 하위클래스, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4일 수 있다. 특정 실시양태에서, agly 결합 폴리펩티드는 Fc-이펙터 기능이 없는 IgG4 항체의 비글리코실화된 Fc 영역을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 변경된 글리칸을 포함한다. 예를 들어, 항체는 Fc 영역의 Asn297의 N-글리칸 상에 감소된 수의 푸코스 잔기를 가질 수 있고, 즉, 비푸코실화된다. 비푸코실화는 NK 세포에 대한 FcRgII 결합을 증가시키고, ADCC를 효과적으로 증가시킨다. 또 다른 실시양태에서, 결합 폴리펩티드는 Fc 영역의 Asn297의 N-글리칸 상에 변경된 수의 시알산 잔기를 가질 수 있다. 많은 관련 기술분야에서 인정된 방법이 "agly" 항체 또는 변경된 글리칸을 갖는 항체의 제조를 위해 이용가능하다. 예를 들어, 변형된 글리코실화 경로 (예를 들어, 글리코실-트랜스퍼라제 결실)를 갖는 유전자 조작된 숙주 세포 (예를 들어, 변형된 효모, 예를 들어, 피키아(*Picchia*), 또는 CHO 세포)가 상기 항체의 생산을 위해 사용될 수 있다.

[0086] V. 이펙터 모이어티

[0087] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 이펙터 모이어티를 포함한다. 일반적으로, 상기 이펙터 모이어티는 결합 폴리펩티드 상의 N-연결된 글리칸 (예를 들어, CH1 도메인의 N114에 연결된 N-연결된 글리칸)에 접합된다 (직접 또는 링커 모이어티를 통해). 특정 실시양태에서, 결합 폴리펩티드는 카바트 위치 114에 글리칸을 갖는 2개의 CH1 도메인을 포함하는 전장 항체이고, 여기서 두 글리칸은 하나 이상의 이펙터 모이어티에 접합된다.

[0088] 임의의 이펙터 모이어티가 본원에 개시된 결합 폴리펩티드에 첨가될 수 있다. 이펙터 모이어티는 바람직하게는 결합 폴리펩티드의 고유한 활성을 유의하게 변경하지 않으면서 비-천연 기능을 변경된 항체 또는 그의 단편에 부가한다. 이펙터 모이어티는 예를 들어 치료제 또는 진단제일 수 있고, 이로 제한되지 않는다. 본 개시내용의 변형된 결합 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)는 동일하거나 상이할 수 있는 하나 이상의 이펙터 모이어티를 포함할 수 있다.

[0089] 한 실시양태에서, 이펙터 모이어티는 하기 화학식 I일 수 있다:

[0090] <화학식 I>

[0091] $H_2N-Q-CON-X$

[0092] 상기 식에서,

[0093] A) Q는 NH 또는 O이고;

[0094] B) CON은 연결기 모이어티이고;

[0095] C) X는 이펙터 모이어티 (예를 들어, 본원에 정의된 치료제 또는 진단제)이다.

[0096] 연결기 모이어티는 치료제를 H_2N-Q -에 연결한다. 연결기 모이어티는 예를 들어, 알킬레닐 성분, 폴리에틸렌 글리콜 성분, 폴리(글리신) 성분, 폴리(옥사졸린) 성분, 카르보닐 성분, 시스테인아미드로부터 유래된 성분, 시트룰린과 결합된 발린으로부터 유래된 성분, 및 4-아미노벤질 카르바메이트로부터 유래된 성분, 또는 이들의 임의의 조합을 비롯하여 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 적어도 하나의 임의의 적합한 성분을 포함할 수 있다.

[0097] 또 다른 실시양태에서, 화학식 I의 이펙터 모이어티는 하기 화학식 Ia일 수 있다.

[0098] <화학식 Ia>

[0099] $H_2N-Q-CH_2-C(O)-Z-X$

[0100] 상기 식에서,

[0101] A) Q는 NH 또는 O이고;

[0102] B) Z는 $-Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C_{16}H_{32}O_8C_2H_4)_f$ 이고,

[0103] 여기서,

[0104] i. Cys는 시스테인아미드로부터 유래된 성분이고;

[0105] ii. MC는 말레이미드로부터 유래된 성분이고;

[0106] iii. VC는 시트룰린과 결합된 발린으로부터 유래된 성분이고;

[0107] iv. PABC는 4-아미노벤질 카르바메이트로부터 유래된 성분이고;

[0108] v. X는 이펙터 모이어티 (예를 들어, 본원에 정의된 치료제 또는 진단제)이고;

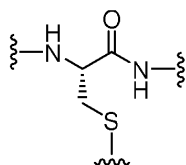
[0109] vi. a는 0 또는 1이고;

[0110] vii. b는 0 또는 1이고;

[0111] viii. c는 0 또는 1이고;

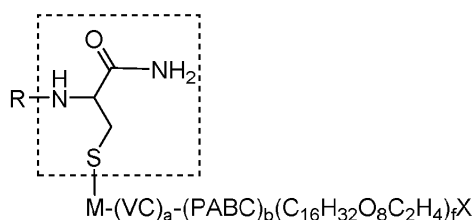
[0112] ix. f는 0 또는 1이다.

[0113] "시스테인아미드로부터 유래된 성분"은 $H_2N-Q-CH_2-C(O)-$ 에 대한 부착점이다. 한 실시양태에서, "시스테인아미드로부터 유래된 성분"은 다음 구조를 갖는 이펙터 모이어티의 하나 이상의 부분을 의미할 수 있다:



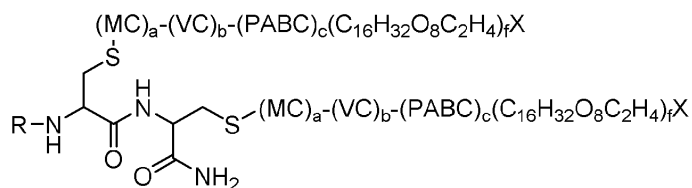
[0114]

[0115] 한 실시양태에서, 이펙터 모이어티의 "Cys" 성분은 하나의 상기 부분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 다음 구조는 하나의 상기 부분을 갖는 이펙터 모이어티를 보여준다 (여기서, "Cys" 성분은 점선 상자로 표시된다):



[0116]

[0117] 또 다른 실시양태에서, 이펙터 모이어티의 "Cys" 성분은 2개 이상의 상기 부분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 다음 모이어티는 2개의 상기 부분을 함유한다:

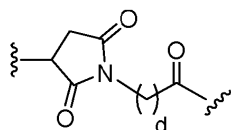


[0118]

[0119] 이 구조로부터 알 수 있는 바와 같이, 각각의 "Cys" 성분은 $-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C_{16}H_{32}O_8C_2H_4)_f-X$ 기를

보유한다.

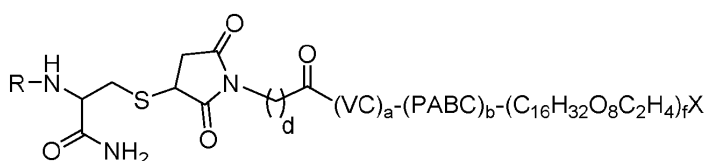
[0120] 한 실시양태에서, 문구 "말레이미드로부터 유래된 성분"은 다음 구조를 갖는 이펙터 모이어티의 임의의 부분을 의미할 수 있다:



[0121]

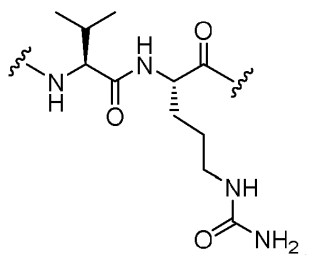
[0122] 여기서, d는 2 내지 5의 정수이다. 이펙터 모이어티 내의 임의의 Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C₁₆H₃₂O₈C₂H₄)_f-X 기에 포함되는 MC 성분의 수는 아래첨자 "a"로 표시되고, 0 또는 1일 수 있다. 한 실시양태에서, a는 1이다. 또 다른 실시양태에서, b는 0이다.

[0123] 한 실시양태에서, "Cys" 성분은 다음 구조에서 점선 상자로 표시되는 "Cys" 성분 내의 황 원자를 통해 "MC" 성분에 연결될 수 있다:



[0124]

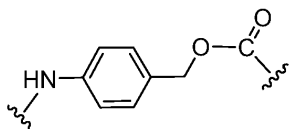
[0125] 한 실시양태에서, 문구 "시트룰린과 결합된 발린으로부터 유래된 성분"은 다음 구조를 갖는 이펙터 모이어티의 임의의 부분을 의미할 수 있다:



[0126]

[0127] 이펙터 모이어티 내의 임의의 Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C₁₆H₃₂O₈C₂H₄)_f-X 기에 포함되는 VC 성분의 수는 아래첨자 "b"로 표시되고, 0 또는 1일 수 있다. 한 실시양태에서, b는 1이다. 또 다른 실시양태에서, b는 0이다.

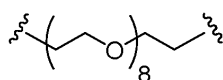
[0128] 한 실시양태에서, 문구 "4-아미노벤질 카르바메이트로부터 유래된 성분"은 다음 구조를 갖는 이펙터 모이어티의 임의의 부분을 의미할 수 있다:



[0129]

[0130] 이펙터 모이어티 내의 임의의 Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C₁₆H₃₂O₈C₂H₄)_f-X 기에 포함되는 PABC 성분의 수는 아래첨자 "c"로 표시되고, 0 또는 1일 수 있다. 한 실시양태에서, c는 1이다. 또 다른 실시양태에서, c는 0이다.

[0131] 한 실시양태에서, "C₁₆H₃₂O₈C₂H₄"는 다음 구조를 의미한다:



[0132]

[0133] 이펙터 모이어티 내의 임의의 Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C₁₆H₃₂O₈C₂H₄)_f-X 기에 포함되는 C₁₆H₃₂O₈ 단위의 수는 아래

첨자 "f"로 표시된다. 한 실시양태에서, f는 1이다. 또 다른 실시양태에서, f는 0이다.

한 실시양태에서, a는 1이고, b는 1이고, c는 1이고, f는 0이다.

a) 치료 이펙터 모이어티

특정 실시양태에서, 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 치료제, 예를 들어 약물 모이어티 (또는 그의 전구약물) 또는 방사성 표지된 화합물을 포함하는 이펙터 모이어티에 접합된다. 한 실시양태에서 치료제는 세포독소이다. 예시적인 세포독성 치료제를 본원의 표 1에 기재한다.

<표 1>

예시적인 세포독성 치료제

아미노프테린, 시토신 β -D-아라비노푸라노시드, 5-플루오로-5'-데옥시우리딘, 5-플루오로우라실, 간시클로버, 히드록시우레아, 악티노마이신-D 및 미토마이신 C), DNA-삽입제 또는 가교결합제 (예를 들어 블레오마이신, 카르보플라틴, 카르무스틴, 클로람부실, 시클로포스파미드, 시스-디아민염화백금(II) (시스플라틴), 멜팔란, 미톡산트론, 및 옥살리플라틴), 및 DNA-RNA 전사 조절물질 (예를 들어 악티노마이신 D, 다우노루비신, 독소루비신, 호모해당토닌 및 이다루비신)을 포함한다. 본 개시내용에 적합한 다른 예시적인 세포증식억제제는 안사마이신 벤조퀴논, 퀴노노이드 유도체 (예를 들어 퀴놀론, 게니스테인, 박타사이클린), 부술판, 이포스파미드, 메클로레타민, 트리아지쿠온, 디아지쿠온, 카르바질퀴논, 인돌로퀴논 E09, 디아지리디닐-벤조퀴논 메틸 DZQ, 트리에틸렌 포스포아미드, 및 니트로소우레아 화합물 (예를 들어 카르무스틴, 로무스틴, 세무스틴)을 포함한다.

[0141] 예시적인 세포독성 뉴클레오시드 항암제는 아데노신 아라비노시드, 시타라빈, 시토신 아라비노시드, 5-플루오로우라실, 플루다라빈, 플록스우리딘, 프토라푸르, 및 6-머캅토피린을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 예시적인 항암 튜블린 결합제는 탁소이드 (예를 들어 파클리탁셀, 도세탁셀, 탁산), 노코다졸, 리족신, 돌로스타틴 (예를 들어 돌로스타틴-10, -11, 또는 -15), 콜키신 및 콜키시노이드 (예를 들어 ZD6126), 콤브레타스타틴 (예를 들어 콤브레타스타틴 A-4, AVE-6032), 및 빙카 알칼로이드 (예를 들어 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신 및 비노렐빈 (나벨빈)을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 예시적인 항암 호르몬 및 호르몬 길항제는 코르티코스테로이드 (예를 들어 프레드니손), 프로게스틴 (예를 들어 히드록시프로게스테론 또는 메드로프로게스테론), 에스트로겐 (예를 들어 디에틸stil베스트롤), 항에스트로겐 (예를 들어 타목시펜), 안드로겐 (예를 들어 테스토스테론), 아로마타제 억제제 (예를 들어 아미노글루테치미드), 17-(알릴아미노)-17-데메톡시겔다나마이신, 4-아미노-1,8-나프탈리미드, 아피게닌, 브레펠딘 A, 시메티딘, 디클로로메틸렌-디포스포산, 류프로라이드 (류프로렌), 황체형성 호르몬-방출 호르몬, 피피트린-a, 라파마이신, 성 호르몬-결합 글로불린, 및 타프시가르긴을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 예시적인 항암, 항혈관신생물질은 안지오스타틴 K1-3, DL-a-디플루오로메틸-오르니틴, 엔도스타틴, 푸마길린, 게니스테인, 미노사이클린, 스타우로스포린, 및 (+/-)-탈리도마이드를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0142] 예시적인 항암 효소 억제제는 S(+)-캄토테신, 쿠르쿠민, (-)-테구엘린, 5,6-디클로로벤즈-이미다졸 1- β -D-리보푸라노시드, 에토포시드, 포르메스탄, 포스트리에신, 히스피딘, 2-이미노-1-이미다졸리딘아세트산 (시클로크레아틴), 메비놀린, 트리코스타틴 A, 티르포스틴 AG 34, 및 티르포스틴 AG 879를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0143] 예시적인 항암 유전자 조절물질은 5-아자-2'-데옥시시티딘, 5-아자시티딘, 콜레칼시페롤 (비타민 D3), 4-히드록시타목시펜, 멜라토닌, 미페프리스톤, 랄록시펜, 트랜스-레티날 (비타민 A 알데히드), 레티노산, 비타민 A산, 9-시스-레티노산, 13-시스-레티노산, 레티놀 (비타민 A), 타목시펜, 및 트로글리타존을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0144] 다른 바람직한 클래스의 항암제는 프테리딘 패밀리의 약물, 디이덴, 및 포도필로톡신을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 이들 클래스의 특히 유용한 구성원은 예를 들어, 메토프테린, 포도필로톡신, 또는 포도필로톡신 유도체, 예컨대 에토포시드 또는 에토포시드 포스페이트, 류로시딘, 빈데신, 류로신 등을 포함한다.

[0145] 본원의 개시내용에 적합한 또 다른 항암제는 오리스타틴 (예를 들어 오리스타틴 E 및 모노메틸오리스타틴 E), 겔다나마이신, 칼리케아미신, 그라미시딘 D, 메이탄사노이드 (예를 들어 메이탄신), 네오키르지노스타틴, 토포테칸, 탁산, 사이토칼라신 B, 에티뎀 브로마이드, 에메틴, 테노포시드, 콜키신, 디히드록시 안트라신디온, 미톡산트론, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 퓨로마이신, 및 그의 유사체 또는 상동체를 포함한다.

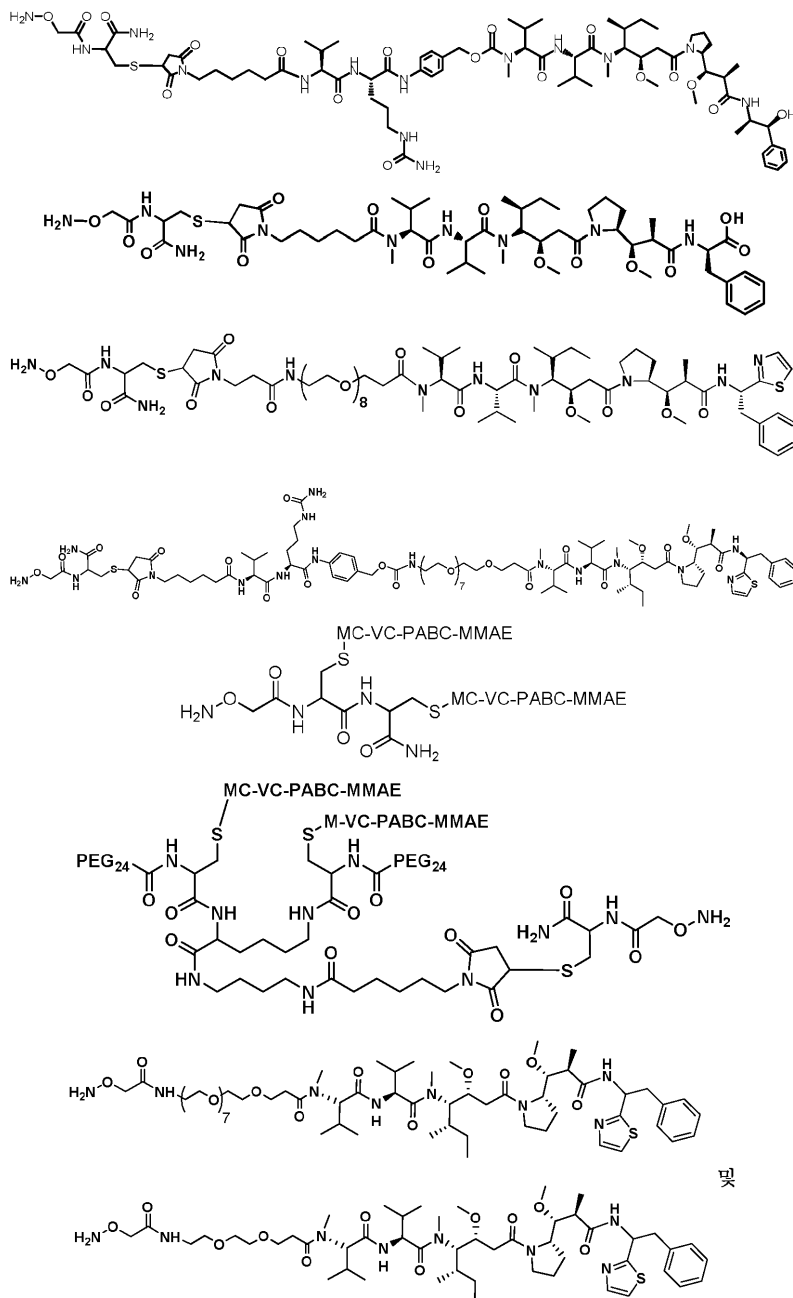
[0146] 본원의 내용에 적합한 또 다른 항암제는 토메이마이신 유도체, 메이탄신 유도체, 크립토피신 유도체, 안트라사이클린 유도체, 비스포스포네이트 유도체, 랩토마이신 유도체, 스트렙토니그린 유도체, 오리스타틴 유도체, 및 듀오카르마이신 유도체를 포함한다.

[0147] 약물 모이어티로서 사용할 수 있는 또 다른 클래스의 상용성 항암제는 종양 또는 면역반응성 세포에 효과적으로 유도될 수 있는 방사성 민감화 약물이다. 그러한 약물 모이어티는 이온화 방사선에 대한 감수성을 향상시켜, 방사선 요법의 효능을 증가시킨다. 이론에 제한되지 않지만, 방사성 민감화 약물 모이어티로 변형시키고 종양 세포에 의해 내재화된 항체는 방사성 민감제를 방사성 민감화가 최대가 되는 핵에 더 가까이 전달할 것이다. 방사성 민감제 모이어티를 잃은 항체는 혈액으로부터 빠르게 청소되고, 남아있는 방사성 민감제를 표적 종양에 국재화하고, 정상 조직 내의 최소 흡수를 제공할 것이다. 혈액으로부터 청소 후에, 보조 방사선 요법이 종양에 특이적으로 지정된 외부 빔 방사선, 종양 내에 직접 이식된 방사성, 또는 동일한 변형된 항체를 사용하는 전신 방사성 면역요법에 의해 투여될 수 있다.

[0148] 한 실시양태에서, 치료제는 핵 DNA에서 다중 가닥 파괴를 유발하여 세포 사멸을 일으킬 수 있는 고에너지 이온화 방사선을 갖는 방사성 핵종 또는 방사성 표지를 포함한다. 예시적인 고에너지 방사성 핵종은 ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{111}In , ^{105}Rh , ^{153}Sm , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re 및 ^{188}Re 를 포함한다. 이들 동위원소는 대개 짧은 경로 길이를 갖는 고에너지 α - 또는 β -입자를 생성한다. 그러한 방사성 핵종은 근접하여 존재하는 세포, 예를 들어 접합체가 부착되거나 도입된 신생물 세포를 사멸시킨다. 이들은 비-국재화된 세포에 대해 효과가 거의 또는 전혀 없고, 본질적으로 비-면역원성이다. 별법으로, 고에너지 동위원소는 예를 들어 붕소 중성자-포획 요법에서와 같이 달리 안정한 동위원소의 열 방사선조사에 의해 생성될 수 있다 (Guan et al., PNAS, 95: 13206-10, 1998).

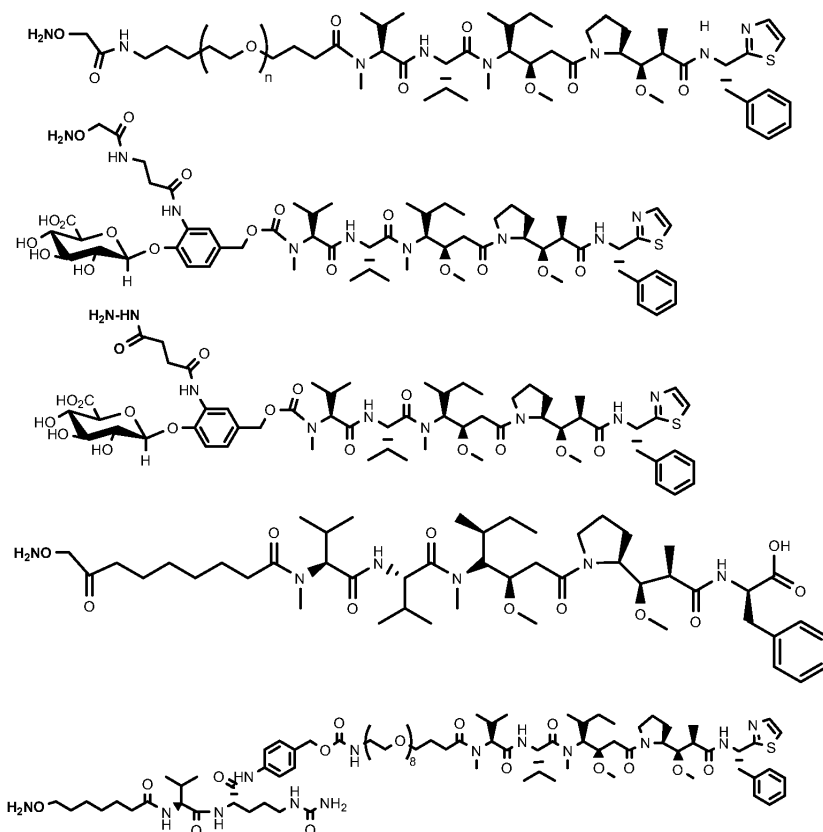
[0149] 한 실시양태에서, 치료제는 MMAE, MMAF, 및 PEG8-Do110으로부터 선택된다.

[0150] 예시적인 치료 이펙터 모이어티는 다음 구조를 포함한다:



[0151]

[0152] 한 실시양태에서, 이펙터 모이어티는 다음으로부터 선택된다:



[0153]

[0154] 특정 실시양태에서, 이펙터 모이어티는 하나 초과 치료제를 함유한다. 이들 다수의 치료제는 동일하거나 상이할 수 있다.

[0155] **b) 진단적 이펙터 모이어티**

[0156] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 진단제를 포함하는 이펙터 모이어티에 접합된다. 한 실시양태에서, 진단제는 검출가능한 소분자 표지, 예를 들어 비오틴, 형광단, 발색단, 스핀 공명 프로브, 또는 방사성 표지이다. 예시적인 형광단은 형광 염료 (예를 들어 플루오레세인, 로다민 등) 및 다른 발광 분자 (예를 들어 루미날)를 포함한다. 형광단은 기질 (예를 들어 단일 프로브)에 결합할 때 구조적 변화를 겪는 변형된 결합 폴리펩티드 내의 하나 이상의 잔기에 근접하게 위치하면 그의 형광이 변화하도록 환경-감수성일 수 있다. 예시적인 방사성 표지는 하나 이상의 저 감수성 핵을 갖는 원자 (^{13}C , ^{15}N , ^2H , ^{125}I , ^{124}I , ^{123}I , ^{99}Tc , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{111}In 등)를 함유하는 소분자를 포함한다. 바람직하게는, 방사성 핵종은 투여와 영상화 부위로의 국재화 사이에 경과한 시간 후에 활성화 또는 검출을 허용하기에 적합한 반감기를 갖는 감마, 광자, 또는 포지트론-방출 방사성 핵종이다.

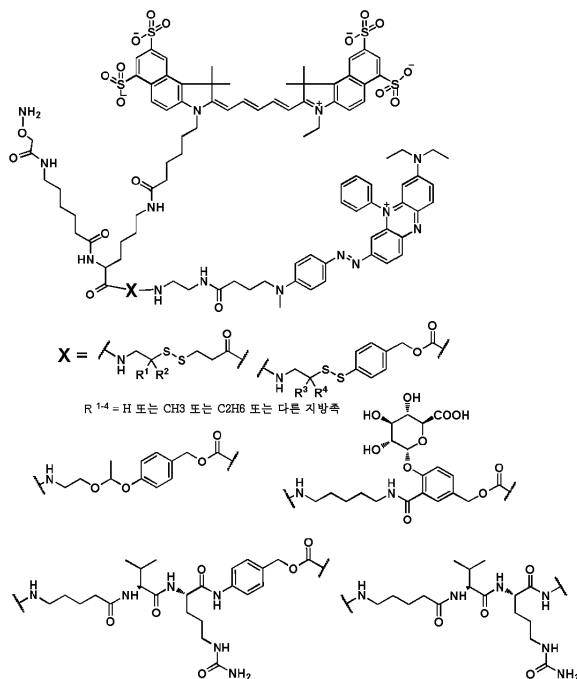
[0157] 한 실시양태에서, 진단제는 폴리펩티드이다. 예시적인 진단 폴리펩티드는 형광원성 또는 발색 활성화, 예를 들어 형광단 또는 발색단을 생성물로서 형성하는 기질을 절단하는 능력을 갖는 효소 (즉 리포터 단백질, 예컨대 루시퍼라제)를 포함한다. 다른 진단 단백질은 고유한 형광원성 또는 발색 활성을 가질 수 있거나 (예를 들어, 생체 발광 해양 유기체로부터의 초록색, 적색 및 황색 형광 생체발광 에쿼린 단백질) 또는 이들은 하나 이상의 저-에너지 방사성 핵 (^{13}C , ^{15}N , ^2H , ^{125}I , ^{124}I , ^{123}I , ^{99}Tc , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{111}In 등)을 함유하는 단백질 포함할 수 있다.

[0158] 본 개시내용과 관련하여 방사성 표지된 접합체의 사용에 있어서, 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 직접 표지될 수 있거나 (예컨대 아이오딘화를 통한) 또는 킬레이트화제의 사용을 통해 간접적으로 표지될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 문구 "간접 표지화" 및 "간접 표지화 방법" 둘 다는 킬레이트화제가 결합 폴리펩티드에 공유 부착되고 적어도 하나의 방사성 핵종이 킬레이트화제와 회합됨을 의미한다. 상기 킬레이트화제는 일반적으로 이들이 폴리펩티드 및 방사성 동위원소 둘 다에 결합하므로 이기능성 킬레이트화제로 언급된다. 예시적

인 킬레이트화제는 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디오텔렌 트리아민펜타아세트산 ("MX-DTPA") 및 시클로헥실 디에틸렌트리아민 펜타아세트산 ("CHX-DTPA") 유도체를 포함한다. 다른 킬레이트화제는 P-DOTA 및 EDTA 유도체를 포함한다. 간접적인 표지화를 위해 특히 바람직한 방사성 핵종은 ^{111}In 및 ^{90}Y 를 포함한다. 대부분의 영상화 연구는 5 mCi ^{111}In -표지된 항체를 이용하고, 그 이유는 상기 용량이 안전하고 보다 낮은 용량에 비해 증가된 영상화 효능을 갖기 때문이고, 최적 영상화는 항체 투여 3 내지 6일 후에 발생한다. 예를 들어, 문헌 [Murray, (1985), J. Nuc. Med. 26: 3328] 및 [Carraguiillo et al., (1985), J. Nuc. Med. 26: 67]를 참조한다. 직접 표지화에 특히 바람직한 방사성 핵종은 ^{131}I 이다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 비-방사성 접합체가 또한 접합되는 선택된 작용체에 따라 회합될 수 있음을 이해할 것이다.

[0159] 특정 실시양태에서, 진단 이펙터 모이어티는 FRET (형광 공명 에너지 전달) 프로브이다. FRET는 암 진단을 비롯한 다양한 진단 용도로 사용되고 있다. FRET 프로브는 FRET 프로브의 공여자 및 수용자 모이어티를 연결하는 절단가능한 링커 (효소 감수성 또는 pH 링커)를 포함할 수 있고, 여기서 절단은 향상된 형광 (근적외선 포함)을 생성한다 (예를 들어, 문헌 [A. Cobos-Correa et. al. Membrane-bound FRET probe visualizes MMP12 activity in pulmonary inflammation, Nature Chemical Biology (2009), 5(9), 628-63]; [S. Gehrig et.al. Spatially Resolved Monitoring of Neutrophil Elastase Activity with Ratiometric Fluorescent Reporters (2012) Angew. Chem. Int. Ed., 51, 6258-6261] 참조).

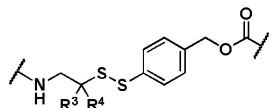
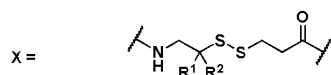
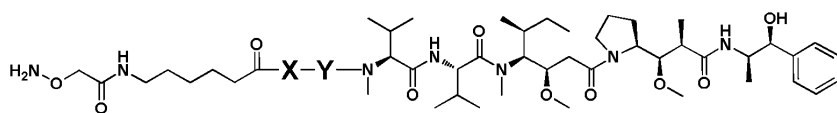
[0160] 한 실시양태에서, 이펙터 모이어티는 다음으로부터 선택된다:



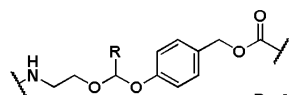
[0161]

[0162] **c) 관능화된 이펙터 모이어티**

[0163] 특정 실시양태에서, 본 발명의 이펙터 모이어티는 이펙터 모이어티 자체 이외에 추가의 기를 함유하도록 관능화될 수 있다. 예를 들어, 이펙터 모이어티는 특정 조건 하에 결합 폴리펩티드로부터 이펙터 모이어티를 방출하는 절단가능한 링커를 함유할 수 있다. 예시적인 실시양태에서, 이펙터 모이어티는 세포 효소에 의해 절단가능하고/하거나 pH 감수성인 링커를 포함할 수 있다. 추가로 또는 별법으로, 이펙터 모이어티는 세포 내로 흡수될 때 세포내 글루타티온에 의해 절단되는 디설피드 결합을 함유할 수 있다. 예시적인 디설피드 및 pH 감수성 링커를 아래에 제공한다:



R¹⁻⁴ = H 또는 CH₃ 또는 C₂H₅ 또는 다른 지방족

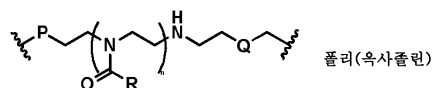
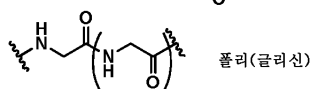
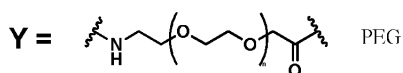
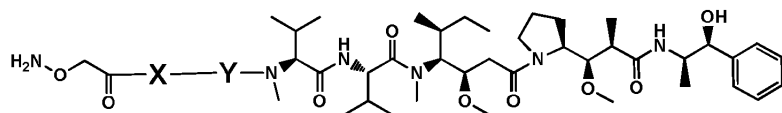


R = H 또는 치환 또는 비치환된 알킬, 알킬아릴기

[0164]

[0165]

또 다른 실시양태에서, 이펙터 모이어티는 친수성 및 생체적합성 모이어티, 예컨대 폴리(글리신), 폴리(옥사졸린), 또는 PEG 모이어티를 포함할 수 있다. 예시적인 구조 ("Y")를 아래에 제시한다:



R = H, 비치환된 또는 관능기 함유 알킬기

P 및 Q = 약물, 리포터 분자 및 단백질을 연결하기 위한 동일하거나 상이한 관능기

[0166]

[0167]

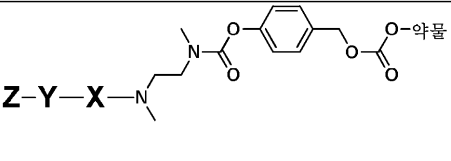
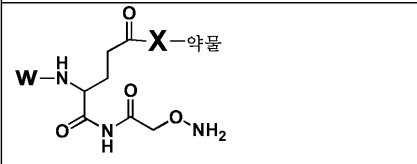
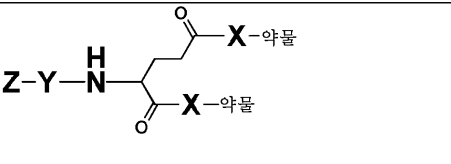
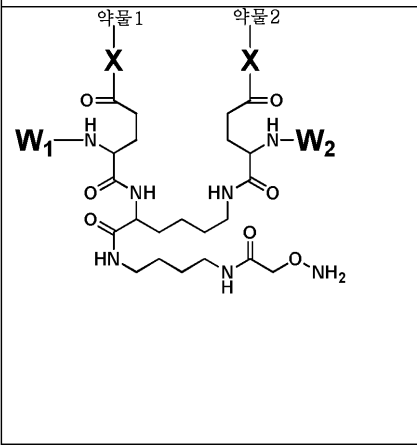
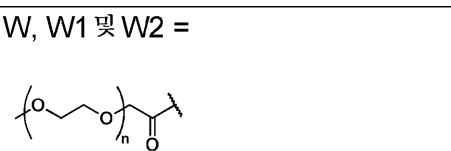
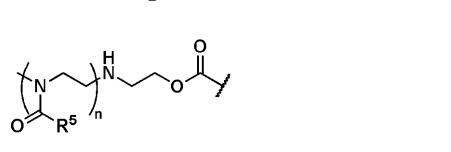
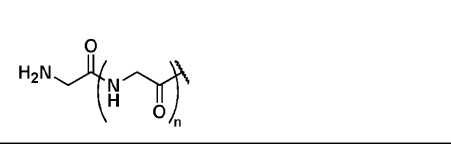
특정 실시양태에서, 이펙터 모이어티는 안정한 옥심 연결을 통해 결합 폴리펩티드에 대한 접합을 용이하게 하는 아미노옥시기를 함유한다. 아미노옥시기를 함유하는 예시적인 이펙터 모이어티를 본원의 표 2에 제시한다.

[0168]

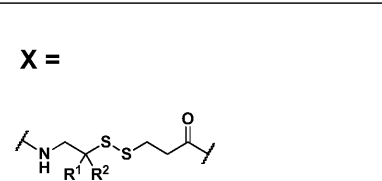
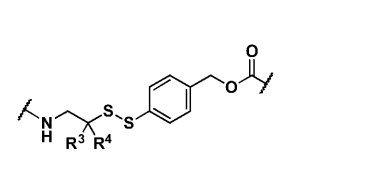
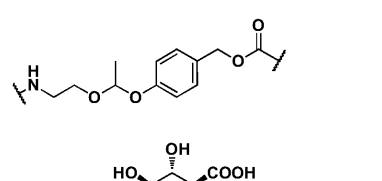
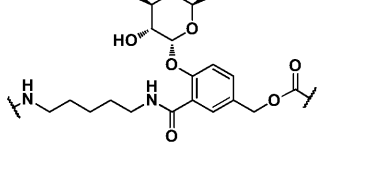
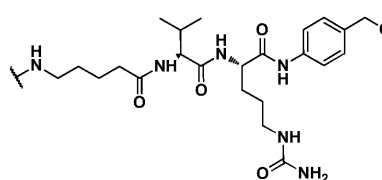

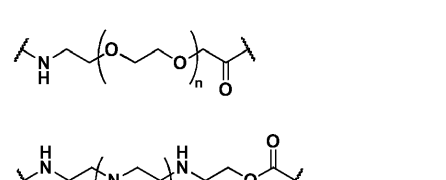
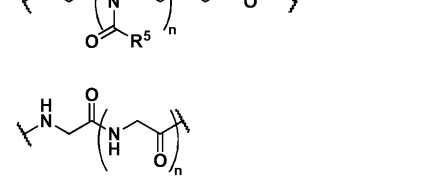
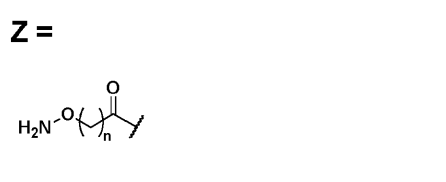

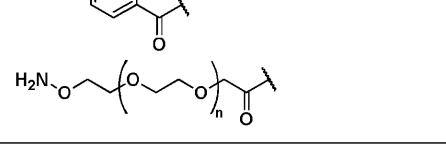
<표 2>

[0169]

예시적인 아미노옥시 이펙터 모이어티 (여기서, X는 임의의 링커일 수 있고, Y는 임의의 스페이서이고, X 및/또는 Y는 선택적임)

Z-Y-X-약물	
	
	W, W1 및 W2 =   

[0170]

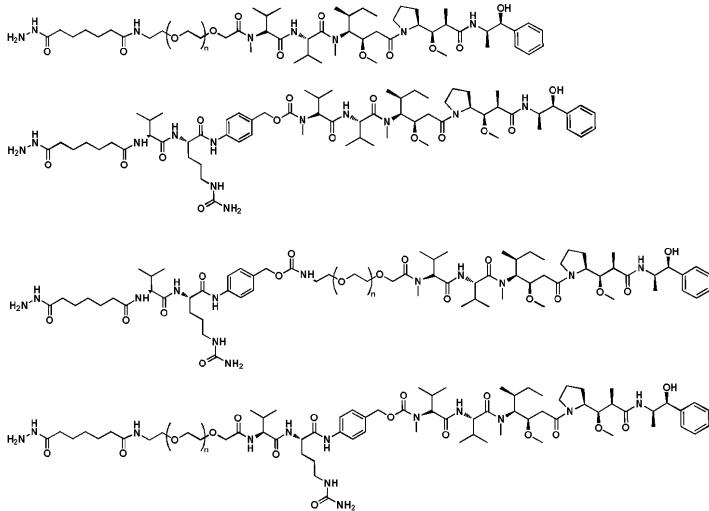
X =      <p>R¹⁻⁵ = H, 알킬 또는 아릴</p>	Y =     Z =  
---	--

[0171]

[0172] 다른 실시양태에서, 이펙터 모이어티는 안정한 히드라존 연결을 통해 결합 폴리펩티드에 대한 접합을 용이하게 하는 히드라지드 및/또는 N-알킬화된 히드라진을 함유한다. 아미노옥시기를 함유하는 예시적인 이펙터 모이어티를 본원의 표 14에 제시한다.

[0173] <표 14>

[0174] 예시적인 히드라진 및/또는 히드라지드 이펙터 모이어티



[0175]

[0176] **d) 표적화 모이어티**

[0177] 특정 실시양태에서, 이펙터 모이어티는 하나 이상의 표적 분자에 특이적으로 결합하는 표적화 모이어티를 포함한다. 비제한적으로, 단백질, 핵산, 지질, 탄수화물 (예를 들어, 글리칸), 및 이들의 조합물 (예를 들어, 당단백질, 당펩티드, 및 당지질)을 비롯한 임의의 종류의 표적화 모이어티가 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 표적화 모이어티는 탄수화물 또는 당펩티드이다. 특정 실시양태에서, 표적화 모이어티는 글리칸이다. 표적화 모이어티는 천연 또는 비-자연 발생 분자일 수 있다.

[0178] **VI. 이펙터 모이어티의 결합 폴리펩티드에 대한 접합**

[0179] 특정 실시양태에서, 이펙터 모이어티는 변경된 결합 폴리펩티드의 산화된 글리칸 (예를 들어, 산화된 N-연결된 글리칸) (예를 들어, 항체 CH1 도메인의 N114에서 조작된 글리칸)에 접합된다 (직접 또는 링커 모이어티를 통해). 용어 "산화된 글리칸"은 글리칸 상의 알콜 치환체가 산화되어 카르보닐 치환체를 제공함을 의미한다. 카르보닐 치환체는 적합한 질소 친핵체와 반응하여 탄소-질소 이중 결합을 형성할 수 있다. 예를 들어, 카르보닐기와 아미노옥시기 또는 히드라진기의 반응은 각각 옥심 또는 히드라진을 형성할 것이다. 한 실시양태에서, 카르보닐 치환체는 알데히드이다. 적합한 산화된 글리칸은 산화된 갈락토스 및 산화된 시알산을 포함한다.

[0180] 한 실시양태에서, 변형된 폴리펩티드는 하기 화학식 II일 수 있다:

[0181] <화학식 II>

[0182]
$$\text{Ab}(\text{Gal-C(O)H})_x(\text{Gal-Sia-C(O)H})_y$$

[0183] 상기 식에서,

[0184] A) Ab는 본원에서 규정되는 항체 또는 다른 결합 폴리펩티드이고;

[0185] B) Gal은 갈락토스로부터 유래된 성분이고;

[0186] C) Sia는 시알산으로부터 유래된 성분이고;

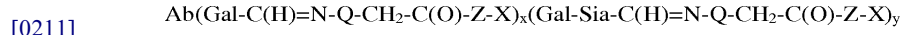
[0187] D) x는 0 내지 5이고;

[0188] E) y는 0 내지 5이고,

[0189] x 및 y 중 적어도 하나는 0이 아니다.

- [0190] 임의의 관련 기술분야에서 인정된 화학을 사용하여 이펙터 모이어티 (예를 들어, 링커 모이어티를 포함하는 이펙터 모이어티)를 글리칸에 접합할 수 있다 (예를 들어, 그 전문이 본원에 참조로 포함된 문헌 [Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques. Academic Press (1996)] 참조). 특정 실시양태에서, 글리칸의 사카라이드 잔기 (예를 들어, 시알산 또는 갈락토스 잔기)는 먼저 (예를 들어 과아이오딘산나트륨 처리를 사용하여) 산화되어 반응성 알데히드 기를 생성한다. 상기 알데히드 기는 이펙터 모이어티의 아미노옥시기 또는 히드라진기와 반응하여 각각 옥심 또는 히드라존 링커를 형성한다. 상기 일반적인 반응식을 이용하는 예시적인 방법을 실시예 10 내지 15에 제시한다.
- [0191] 특정 실시양태에서, 결합 폴리펩티드의 천연 또는 조작된 글리칸은 먼저 적합하게는 반응성인 말단 사카라이드 잔기를 제공하기 위해 시험관내에서 글리코실트랜스퍼라제 효소로 미리 처리된다. 예를 들어, 시알릴화는 먼저 갈락토실트랜스퍼라제 (Gal T) 및 시알릴트랜스퍼라제 (Sial T)의 조합물을 사용하여 달성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 갈락토스가 결여되거나 (GOF 또는 GO) 또는 단지 하나의 갈락토스만을 함유하는 (G1F 또는 G1) 이중안테나 글리칸은 접합에 적합한 보다 고차의 갈락토실화된 또는 시알릴화된 구조 (G1F, G1, G2F, G2, G1S1F, G1S1, G2S1F, G2S1, G2S2F, 또는 G2S2)로 전환될 수 있다.
- [0192] 시알릴화된 당접합체를 생산하기 위한 예시적인 접합 반응식이 도 25c에 제시된다. 시알산 잔기는 갈락토실트랜스퍼라제 (Gal T) 및 시알릴트랜스퍼라제 (Sial T)의 조합물을 사용하여 항체의 글리칸 (예를 들어, CH1 도메인의 N114에서 조작된 글리칸) 내로 효소에 의해 부위 특이적으로 도입된다. 도입된 시알산 잔기는 후속적으로 저농도의 과아이오딘산나트륨으로 산화되어, 항체 약물 접합체 (ADC) (예를 들어, 옥심-연결된 ADC)를 생성하기 위해 적합하게는 약물-링커 (예를 들어, 아미노옥시 약물 링커)와 반응성인 반응성 시알산 알데히드를 형성한다. 시험관내 재형성을 사용하여 글리칸의 수 및 시알산 잔기의 수를 제어함으로써, 통상의 기술자는 ADC의 약물-항체비 (DAR)를 정밀하게 제어할 수 있다. 예를 들어, ~1 시알산이 각각의 중쇄 내의 단일 이중안테나 글리칸 (A1F) 상에 첨가되면, 2의 DAR을 갖는 항체 또는 결합 폴리펩티드를 균일하게 얻을 수 있다.
- [0193] **VII. 변형된 결합 폴리펩티드**
- [0194] 특정 실시양태에서, 본 발명은 이펙터 모이어티가 변경된 결합 폴리펩티드의 산화된 글리칸 (예를 들어, 산화된 N-연결된 글리칸) (예를 들어, 항체 CH1 도메인의 N114에서 조작된 글리칸)에 접합된 (직접 또는 링커 모이어티를 통해) 변형된 폴리펩티드를 제공한다.
- [0195] 특정 실시양태에서,
- [0196] 한 실시양태에서, 결합 폴리펩티드는 하기 화학식 III일 수 있다:
- [0197] <화학식 III>
- [0198]
$$Ab--(Gal-C(H)=N-Q-CON-X)_x(Gal-Sia-C(H)=N-Q-CON-X)_y$$
- [0199] 상기 식에서,
- [0200] A) Ab는 본원에 정의된 항체이고;
- [0201] B) Q는 NH 또는 O이고;
- [0202] C) CON은 본원에 정의된 연결기 모이어티이고;
- [0203] D) X는 본원에 정의된 치료제 또는 진단제이고;
- [0204] E) Gal은 갈락토스로부터 유래된 성분이고;
- [0205] F) Sia는 시알산으로부터 유래된 성분이고;
- [0206] G) x는 0 내지 5이고;
- [0207] H) y는 0 내지 5이고,
- [0208] x 및 y 중 적어도 하나는 0이 아니다.
- [0209] 한 실시양태에서, 결합 폴리펩티드는 하기 화학식 IIIa일 수 있다:

[0210] <화학식 IIIa>



[0212] 상기 식에서,

[0213] A) Ab는 항체이고;

[0214] B) Q는 NH 또는 O이고;

[0215] C) Z는 $\text{Cys}-(\text{MC})_a-(\text{VC})_b-(\text{PABC})_c-(\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{C}_2\text{H}_4)_f$, 여기서

[0216] i. Cys는 시스테인아미드로부터 유래된 성분이고;

[0217] ii. MC는 말레이미드로부터 유래된 성분이고;

[0218] iii. VC는 시트룰린과 결합된 발린으로부터 유래된 성분이고;

[0219] iv. PABC는 4-아미노벤질 카르바메이트로부터 유래된 성분이고;

[0220] v. X는 이펙터 모이어티 (예를 들어, 본원에 정의된 치료제 또는 진단제)이고;

[0221] vi. a 는 0 또는 1이고;

[0222] vii. b 는 0 또는 1이고;

[0223] viii. c 는 0 또는 1이고;

[0224] ix. f 는 0 또는 1이고;

[0225] D) X는 본원에 정의된 치료제이고;

[0226] E) Gal은 갈락토스로부터 유래된 성분이고;

[0227] F) Sia는 시알산으로부터 유래된 성분이고;

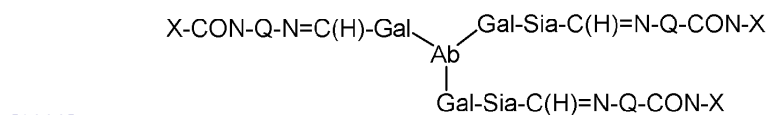
[0228] G) x는 0 내지 5이고;

[0229] H) y 는 0 내지 5이고,

[0230] x 및 y 중 적어도 하나는 0이 아니다.

[0231] 화학식 III은 항체, Gal 치환체, 및 Gal-Sia 치환체가 사슬-유사 방식으로 연결됨을 의미하도록 의도되지 않음을 이해하여야 한다. 오히려, 상기 치환체가 존재할 때, 항체는 직접 각각의 치환체에 연결된다. 예를 들어, x가 1이고 y가 2인 화학식 III의 결합 폴리펩티드는 아래에 제시된 배열을 가질 수 있다:

[0232] <화학식 III>



[0234] 화학식 III에서 CON 치환체 및 그 내의 성분은 이펙터 모이어티에 대한 화학식 I에서 설명된 바와 같다.

[0235] 한 실시양태에서, Q는 NH이다. 또 다른 실시양태에서, Q는 O이다.

[0236] 한 실시양태에서, x 는 0이다.

[0237] 화학식 III의 항체 Ab는 본원에서 설명되는 임의의 적합한 항체일 수 있다.

[0238] 한 실시양태에서, 화학식 III의 결합 폴리펩티드를 제조하는 방법이 제공되고, 이 방법은 하기 화학식 I의 이펙터 모이어티를 하기 화학식 II의 변형된 항체와 반응시키는 것을 포함한다.

[0239] <화학식 I>



- [0241] 상기 식에서,
- [0242] A) Q는 NH 또는 O이고;
- [0243] B) CON은 연결기 모이어티이고;
- [0244] C) X는 이펙터 모이어티 (예를 들어, 본원에 정의된 치료제 또는 진단제)이다.
- [0245] <화학식 II>
- [0246] $Ab(OXG)_r$
- [0247] 상기 식에서,
- [0248] A) OXG는 산화된 글리칸이고;
- [0249] B) r은 0 내지 4로부터 선택된다.
- [0250] 한 실시양태에서, 화학식 III의 결합 폴리펩티드를 제조하는 방법이 제공되고, 이 방법은 하기 화학식 I의 이펙터 모이어티를 하기 화학식 IIa의 변형된 항체와 반응시키는 것을 포함한다.
- [0251] <화학식 I>
- [0252] $NH_2-Q-CON-X$
- [0253] 상기 식에서,
- [0254] A) Q는 NH 또는 O이고;
- [0255] B) CON은 연결기 모이어티이고;
- [0256] C) X는 이펙터 모이어티 (예를 들어, 본원에 정의된 치료제 또는 진단제)이다.
- [0257] <화학식 IIa>
- [0258] $Ab(Gal-C(O)H)_x(Gal-Sia-C(O)H)_y$
- [0259] 상기 식에서,
- [0260] A) Ab는 본원에서 설명되는 항체이고;
- [0261] B) Gal은 갈락토스로부터 유래된 성분이고;
- [0262] C) Sia는 시알산으로부터 유래된 성분이고;
- [0263] D) x는 0 내지 5이고;
- [0264] E) y는 0 내지 5이고,
- [0265] x 및 y 중 적어도 하나는 0이 아니다.
- [0266] 특정 실시양태에서, 이펙터 모이어티는 변경된 결합 폴리펩티드의 산화된 글리칸 (예를 들어, 산화된 N-연결된 글리칸) (예를 들어, 항체 CH1 도메인의 N114에서 조작된 글리칸)에 접합된다 (직접 또는 링커 모이어티를 통해). 용어 "산화된 글리칸"은 글리칸 상의 알콜 치환체가 산화되어 카르보닐 치환체를 제공함을 의미한다. 카르보닐 치환체는 적합한 질소 친핵체와 반응하여 탄소-질소 이중 결합을 형성할 수 있다. 예를 들어, 카르보닐기와 아미노옥시기 또는 히드라진기의 반응은 각각 옥심 또는 히드라진을 형성할 것이다. 한 실시양태에서, 카르보닐 치환체는 알데히드이다. 적합한 산화된 글리칸은 산화된 갈락토스 및 산화된 시알산을 포함한다.
- [0267] 한 실시양태에서, 변형된 폴리펩티드는 하기 화학식 II일 수 있다:
- [0268] <화학식 II>
- [0269] $Ab(Gal-C(O)H)_x(Gal-Sia-C(O)H)_y$
- [0270] 상기 식에서,

- [0271] A) Ab는 본원에서 규정되는 항체 또는 다른 결합 폴리펩티드이고;
- [0272] B) Gal은 갈락토스로부터 유래된 성분이고;
- [0273] C) Sia는 시알산으로부터 유래된 성분이고;
- [0274] D) x는 0 내지 5이고;
- [0275] E) y는 0 내지 5이고,
- [0276] x 및 y 중 적어도 하나는 0이 아니다.
- [0277] 임의의 관련 기술분야에서 인정된 화학을 사용하여 이펙터 모이어티 (예를 들어, 링커 모이어티를 포함하는 이펙터 모이어티)를 글리칸에 접합할 수 있다 (예를 들어, 그 전문이 본원에 참조로 포함된 문헌 [Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques. Academic Press (1996)] 참조). 특정 실시양태에서, 글리칸의 사카라이드 잔기 (예를 들어, 시알산 또는 갈락토스 잔기)는 먼저 (예를 들어 과아이오딘산나트륨 처리를 사용하여) 산화되어 반응성 알데히드 기를 생성한다. 상기 알데히드 기는 이펙터 모이어티의 아미노옥시기 또는 히드라진기와 반응하여 각각 옥심 또는 히드라존 링커를 형성한다. 상기 일반적인 반응식을 이용하는 예시적인 방법을 실시예 10 내지 15에 제시한다.
- [0278] 특정 실시양태에서, 결합 폴리펩티드의 천연 또는 조작된 글리칸은 먼저 적합하게는 반응성인 말단 사카라이드 잔기를 제공하기 위해 시험관내에서 글리코실트랜스퍼라제 효소로 미리 처리된다. 예를 들어, 시알릴화는 먼저 갈락토실트랜스퍼라제 (Gal T) 및 시알릴트랜스퍼라제 (Sial T)의 조합물을 사용하여 달성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 갈락토스가 결합되거나 (GOF 또는 GO) 또는 단지 하나의 갈락토스만을 함유하는 (G1F 또는 G1) 이중안테나 글리칸은 접합에 적합한 보다 고차의 갈락토실화된 또는 시알릴화된 구조 (G1F, G1, G2F, G2, G1S1F, G1S1, G2S1F, G2S1, G2S2F, 또는 G2S2)로 전환될 수 있다.
- [0279] 시알릴화된 당접합체를 생산하기 위한 예시적인 접합 반응식이 도 25c에 제시된다. 시알산 잔기는 갈락토실트랜스퍼라제 (Gal T) 및 시알릴트랜스퍼라제 (Sial T)의 조합물을 사용하여 항체의 글리칸 (예를 들어, CH1 도메인의 N114에서 조작된 글리칸) 내로 효소에 의해 부위 특이적으로 도입된다. 도입된 시알산 잔기는 후속적으로 저농도의 과아이오딘산나트륨으로 산화되어, 항체 약물 접합체 (ADC) (예를 들어, 옥심-연결된 ADC)를 생성하기 위해 적합하게는 약물-링커 (예를 들어, 아미노옥시 약물 링커)와 반응성인 반응성 시알산 알데히드를 형성한다. 시험관내 재형성을 사용하여 글리칸의 수 및 시알산 잔기의 수를 제어함으로써, 통상의 기술자는 ADC의 약물-항체비 (DAR)를 정밀하게 제어할 수 있다. 예를 들어, ~1 시알산이 각각의 중쇄 내의 단일 이중안테나 글리칸 (A1F) 상에 첨가되면, 2의 DAR을 갖는 항체 또는 결합 폴리펩티드를 균일하게 얻을 수 있다.
- [0280] **VII. 변형된 결합 폴리펩티드**
- [0281] 특정 실시양태에서, 본 발명은 이펙터 모이어티가 변경된 결합 폴리펩티드의 산화된 글리칸 (예를 들어, 산화된 N-연결된 글리칸) (예를 들어, 항체 CH1 도메인의 N114에서 조작된 글리칸)에 접합된 (직접 또는 링커 모이어티를 통해) 변형된 폴리펩티드를 제공한다.
- [0282] 특정 실시양태에서,
- [0283] 한 실시양태에서, 결합 폴리펩티드는 하기 화학식 III일 수 있다:
- [0284] <화학식 III>
- $$\text{Ab}--(\text{Gal}-\text{C}(\text{H})=\text{N}-\text{Q}-\text{CON}-\text{X})_x(\text{Gal}-\text{Sia}-\text{C}(\text{H})=\text{N}-\text{Q}-\text{CON}-\text{X})_y$$
- [0285]
- [0286] 상기 식에서,
- [0287] A) Ab는 본원에 정의된 항체이고;
- [0288] B) Q는 NH 또는 O이고;
- [0289] C) CON은 본원에 정의된 연결기 모이어티이고;
- [0290] D) X는 이펙터 모이어티 (예를 들어, 본원에 정의된 치료제 또는 진단제)이고;
- [0291] E) Gal은 갈락토스로부터 유래된 성분이고;

[0292] F) Sia는 시알산으로부터 유래된 성분이고;

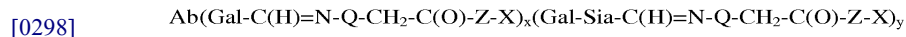
[0293] G) x 는 0 내지 5이고;

[0294] H) y 는 0 내지 5이고,

[0295] x 및 y 중 적어도 하나는 0이 아니다.

[0296] 한 실시양태에서, 결합 폴리펩티드는 하기 화학식 IIIa일 수 있다:

[0297] <화학식 IIIa>



[0299] 상기 식에서,

[0300] A) Ab는 항체이고;

[0301] B) Q는 NH 또는 O이고;

[0302] C) Z는 $\text{Cys}-(\text{MC})_a-(\text{VC})_b-(\text{PABC})_c-(\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{C}_2\text{H}_4)_f$ -, 여기서

[0303] i. Cys는 시스테인아미드로부터 유래된 성분이고;

[0304] ii. MC는 말레이미드로부터 유래된 성분이고;

[0305] iii. VC는 시트룰린과 결합된 발린으로부터 유래된 성분이고;

[0306] iv. PABC는 4-아미노벤질 카르바메이트로부터 유래된 성분이고;

[0307] v. X는 본원에 정의된 치료제 또는 진단제이고;

[0308] vi. a 는 0 또는 1이고;

[0309] vii. b 는 0 또는 1이고;

[0310] viii. c 는 0 또는 1이고;

[0311] ix. f 는 0 또는 1이고;

[0312] D) X는 본원에 정의된 치료제이고;

[0313] E) Gal은 갈락토스로부터 유래된 성분이고;

[0314] F) Sia는 시알산으로부터 유래된 성분이고;

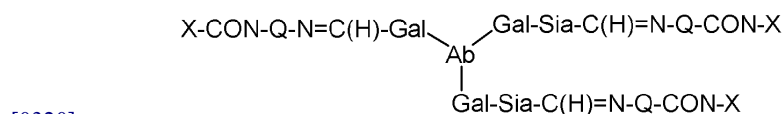
[0315] G) x 는 0 내지 5이고;

[0316] H) y 는 0 내지 5이고,

[0317] x 및 y 중 적어도 하나는 0이 아니다.

[0318] 화학식 III은 항체, Gal 치환체, 및 Gal-Sia 치환체가 사슬-유사 방식으로 연결됨을 의미하도록 의도되지 않음을 이해하여야 한다. 오히려, 상기 치환체가 존재할 때, 항체는 직접 각각의 치환체에 연결된다. 예를 들어, x가 1이고 y가 2인 화학식 III의 결합 폴리펩티드는 아래에 제시된 배열을 가질 수 있다:

[0319] <화학식 III>



[0321] 화학식 III에서 CON 치환체 및 그 내의 성분은 이펙터 모이어티에 대한 화학식 I에서 설명된 바와 같다.

[0322] 한 실시양태에서, Q는 NH이다. 또 다른 실시양태에서, Q는 O이다.

[0323] 한 실시양태에서, x 는 0이다.

- [0324] 화학식 III의 항체 Ab는 본원에서 설명되는 임의의 적합한 항체일 수 있다.
- [0325] 한 실시양태에서, 화학식 III의 결합 폴리펩티드를 제조하는 방법이 제공되고, 이 방법은 하기 화학식 I의 이펙터 모이어티를 하기 화학식 II의 변형된 항체와 반응시키는 것을 포함한다.
- [0326] <화학식 I>
- [0327] $\text{NH}_2\text{-Q-CON-X}$
- [0328] 상기 식에서,
- [0329] A) Q는 NH 또는 O이고;
- [0330] B) CON은 연결기 모이어티이고;
- [0331] C) X는 본원에 정의된 치료제 또는 진단제이다.
- [0332] <화학식 II>
- [0333] Ab(OXG)_r
- [0334] 상기 식에서,
- [0335] A) OXG는 산화된 글리칸이고;
- [0336] B) r은 0 내지 4로부터 선택된다.
- [0337] 한 실시양태에서, 화학식 III의 결합 폴리펩티드를 제조하는 방법이 제공되고, 이 방법은 하기 화학식 I의 이펙터 모이어티를 하기 화학식 IIa의 변형된 항체와 반응시키는 것을 포함한다.
- [0338] <화학식 I>
- [0339] $\text{NH}_2\text{-Q-CON-X}$
- [0340] 상기 식에서,
- [0341] A) Q는 NH 또는 O이고;
- [0342] B) CON은 연결기 모이어티이고;
- [0343] C) X는 이펙터 모이어티 (예를 들어, 본원에 정의된 치료제 또는 진단제)이다.
- [0344] <화학식 IIa>
- [0345] $\text{Ab(Gal-C(O)H)}_x(\text{Gal-Sia-C(O)H})_y$
- [0346] 상기 식에서,
- [0347] A) Ab는 본원에서 설명되는 항체이고;
- [0348] B) Gal은 갈락토스로부터 유래된 성분이고;
- [0349] C) Sia는 시알산으로부터 유래된 성분이고;
- [0350] D) x는 0 내지 5이고;
- [0351] E) y는 0 내지 5이고,
- [0352] x 및 y 중 적어도 하나는 0이 아니다.
- [0353] **VIII. 변형된 항체를 사용한 치료 방법**
- [0354] 한 측면에서, 본 발명은 유효량의 본원에 개시된 결합 폴리펩티드를 투여하는 것을 포함하는, 환자의 치료 또는 진단 방법을 제공한다. 본 개시내용의 바람직한 실시양태는 치료를 필요로 하는 포유동물 대상체에서 장애, 예를 들어, 신생물 장애의 진단 및/또는 치료를 위한 키트 및 방법을 제공한다. 바람직하게는, 대상체는 인간이다.

[0355] 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 많은 상이한 용도에서 유용하다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 결합 폴리펩티드의 결합 도메인에 의해 인식되는 에피토프를 보유하는 세포를 감소시키거나 제거하기 위해 유용하다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 순환계 내의 가용성 항원의 농도를 감소시키거나 제거할 때 효과적이다. 한 실시양태에서, 결합 폴리펩티드는 종양 크기를 감소시키고, 종양 성장을 억제하고/하거나, 종양 보유 동물의 생존 기간을 연장할 수 있다. 따라서, 본 개시내용은 또한 상기 인간 또는 동물에게 비-독성 유효량의 변형된 항체를 투여함으로써 인간 또는 다른 동물에서 종양을 치료하는 방법에 관한 것이다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 통상적인 실험을 통해 악성 종양의 치료를 위한 변형된 결합 폴리펩티드의 비-독성 유효량을 결정할 수 있을 것이다. 예를 들어, 변형된 항체 또는 그의 단편의 치료 활성량은 예컨대 질환 시기 (예를 들어, I기 대 IV기), 대상체의 연령, 성별, 의학적 합병증 (예를 들어, 면역 억제 상태 또는 질환) 및 체중, 및 대상체에서 목적되는 반응을 유도하는 변형된 항체의 능력과 같은 인자에 따라 상이할 수 있다. 투여 요법은 최적 치료 반응을 제공하도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 수개의 분할 용량이 매일 투여될 수 있거나, 또는 용량은 치료 상황의 긴급성에 의해 표시되는 바에 비례하여 감소될 수 있다.

[0356] 일반적으로, 본 개시내용에서 제공되는 조성물은 변형된 항체에 의한 암성 세포의 표적화를 허용하는 항원 마커를 포함하는 임의의 신생물을 예방 또는 치료 목적으로 처리하기 위해 사용될 수 있다.

[0357] IX. 변형된 항체 또는 그의 단편의 투여 방법

[0358] 본 개시내용의 결합 폴리펩티드를 제조하고 대상체에게 투여하는 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있거나 통상의 기술자에 의해 쉽게 결정된다. 본 개시내용의 결합 폴리펩티드의 투여 경로는 경구, 비경구, 흡입 또는 국소일 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 비경구는 정맥내, 동맥내, 복강내, 근내, 피하, 직장 또는 질내 투여를 포함한다. 비경구 투여의 정맥내, 동맥내, 피하 및 근내 형태가 일반적으로 바람직하다. 모든 상기 투여 형태가 본 개시내용의 범위에 명백하게 포함되는 것으로 고려되지만, 투여 형태는 주사, 특히 정맥내 또는 동맥내 주사 또는 점적을 위한 용액일 것이다. 대체로, 주사에 적합한 제약 조성물은 완충제 (예를 들어 아세트이트, 포스페이트 또는 시트레이트 완충제), 계면활성제 (예를 들어 폴리소르베이트), 임의로 안정화제 (예를 들어 인간 알부민) 등을 포함할 수 있다. 그러나, 본원의 교시내용에 적합한 다른 방법에서, 변형된 항체는 유해한 세포 집단의 부위에 직접 전달되어, 이화된 조직의 치료제에 대한 노출을 증가시킬 수 있다.

[0359] 한 실시양태에서, 투여되는 결합 폴리펩티드는 하기 화학식 III의 결합 폴리펩티드이다:

[0360] <화학식 III>

[0361]
$$Ab(Gal-C(H)=N-Q-CON-X)_x(Gal-Sia-C(H)=N-Q-CON-X)_y$$

[0362] 상기 식에서,

[0363] A) Ab는 본원에 정의된 항체이고;

[0364] B) Q는 NH 또는 O이고;

[0365] C) CON은 본원에 정의된 연결기 모이어티이고;

[0366] D) X는 이펙터 모이어티 (예를 들어, 본원에 정의된 치료제 또는 진단제)이고;

[0367] E) Gal은 갈락토스로부터 유래된 성분이고;

[0368] F) Sia는 시알산으로부터 유래된 성분이고;

[0369] G) x는 0 내지 5이고;

[0370] H) y는 0 내지 5이고,

[0371] x 및 y 중 적어도 하나는 0이 아니다.

[0372] 비경구 투여를 위한 제제는 멸균 수성 또는 비-수용액, 현탁액, 및 에멀전을 포함한다. 비-수성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일, 예컨대 올리브 오일, 및 주사용 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트이다. 수성 담체는 염수 및 완충된 매질을 비롯한 물, 알콜/수성 용액, 에멀전 또는 현탁액을 포함한다. 본 개시내용의 조성물 및 방법에서, 제약상 허용되는 담체는 0.01-0.1 M, 바람직하게는 0.05 M 포스페이트 완충제 또는 0.8% 염수를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 다른 통상적인 비경구 비히클은 인산나트륨

용액, 링거의 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화나트륨, 젖산화 링거액, 또는 고정유를 포함한다. 정맥내 비히클은 유체 및 영양소 보충물, 전해질 보충물, 예컨대 링거의 텍스트로스를 기재로 한 것 등을 포함한다. 또한, 대표적인 다른 첨가제, 예를 들어, 항미생물제, 항산화제, 킬레이트화제, 및 불활성 기체 등이 존재할 수 있다. 보다 특히, 주사 용도에 적합한 제약 조성물은 멸균 수용액 (수용성인 경우) 또는 멸균 주사용 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 이 경우에, 조성물은 멸균되어야 하고, 주사가 용이하도록 하는 정도로 유동성이어야 한다. 조성물은 제조 및 보관 조건 하에 안정하여야 하고, 바람직하게는 미생물, 예컨대 박테리아 및 진균의 오염 작용에 대하여 보존될 것이다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리에올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산액 배지일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어 코팅, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기의 유지에 의해 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.

[0373] 미생물 작용의 억제제는 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어, 페라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에, 조성물에 등장제, 예를 들어, 당, 다가알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사용 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연하는 작용제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 유도될 수 있다.

[0374] 임의의 경우에, 멸균 주사용 용액은 필요한 양의 활성 화합물 (예를 들어, 변형된 결합 폴리펩티드 단독 또는 다른 활성제와 조합한 결합 폴리펩티드)을 적절한 용매 내에 본원에서 제시되는 필요한 하나의 성분 또는 성분들의 조합물과 함께 도입한 후, 멸균 여과함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 기본적인 분산매 및 본원에서 제시되는 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내에 도입함으로써 제조된다. 멸균 주사용 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결-건조이고, 이것은 그의 앞서 멸균-여과된 용액으로부터 활성 성분 + 임의의 추가의 요구되는 성분의 분말을 생성한다. 주사용 제제는 처리되고, 용기, 예컨대 앰플, 백, 병, 주사기 또는 바이알 내에 충전되고, 관련 기술분야에 알려진 방법에 따라 무균 조건 하에 밀봉된다. 또한, 제제는 키트, 예컨대 각각 본원에 참조로 포함되는 동시 계류 중인 U.S.S.N. 09/259,337 및 U.S.S.N. 09/259,338에 기재된 것의 형태로 포장되고 판매될 수 있다. 상기 제조품은 바람직하게는 관련 조성물이 자가면역 또는 신생물 장애를 앓고 있거나 이에 취약한 대상체의 치료에 유용함을 나타내는 라벨 또는 포장 삽입물을 보유할 것이다.

[0375] 상기 설명된 병태의 치료를 위한, 본 개시내용의 조성물의 효과적인 용량은 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리학 상태, 환자가 인간인지, 동물인지의 여부, 투여되는 다른 약물, 및 처리가 예방 목적인지, 치료 목적인지의 여부를 포함하는 많은 상이한 인자에 따라 상이하다. 대체로, 환자는 인간이지만, 트랜스제닉 포유동물을 포함하는 비-인간 포유동물도 치료될 수 있다. 치료 투여량은 안전성 및 효능을 최적화하기 위해 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 통상적인 방법을 사용하여 적정될 수 있다.

[0376] 결합 폴리펩티드를 사용한 수동 면역을 위해, 투여량은 예를 들어 약 0.0001 내지 100 mg/kg (숙주 체중), 보다 대체로 0.01 내지 5 mg/kg (예를 들어, 0.02 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg 등)일 수 있다. 예를 들어, 투여량은 1 mg/kg (체중) 또는 10 mg/kg (체중), 또는 1-10 mg/kg, 바람직하게는 적어도 1 mg/kg일 수 있다. 상기 범위 내에 존재하는 용량도 본 개시내용의 범위에 포함되는 것으로 의도된다. 대상체에게 상기 용량은 매일, 격일, 매주 또는 실험에 의한 분석에 의해 결정된 임의의 다른 일정에 의해 투여될 수 있다. 예시적인 치료는 예를 들어 적어도 6개월의 연장된 기간에 걸쳐 다중 투여량으로 투여하는 것을 수반한다. 추가의 예시적인 치료 요법은 2주 1회, 1개월마다 1회 또는 3 내지 6개월마다 1회 투여를 수반한다. 예시적인 투여 일정은 매일 1-10 mg/kg 또는 15 mg/kg, 격일 30 mg/kg 또는 매주 60 mg/kg을 포함한다. 몇몇 방법에서, 상이한 결합 특이성을 갖는 2개 이상의 모노클로날 항체가 동시에 투여되고, 이 경우에 투여되는 각각의 항체의 투여량은 나타난 범위에 해당한다.

[0377] 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 다수 회 투여될 수 있다. 단일 투여 사이의 간격은 1주, 1개월 또는 1년일 수 있다. 간격은 또한 환자에서 변형된 결합 폴리펩티드 또는 항원의 혈액 수준을 측정함으로써 나타난 바와 같이 불규칙적일 수 있다. 몇몇 방법에서, 투여량은 1-1000 $\mu\text{g/ml}$ 및 몇몇 방법에서 25-300 $\mu\text{g/ml}$ 의 변형된 결합 폴리펩티드 혈장 농도를 달성하기 위해 조정된다. 별법으로, 결합 폴리펩티드 지속 방출 제제로 투여될 수 있고, 이 경우에 보다 덜 빈번한 투여가 요구된다. 항체에 대해, 투여량 및 빈도는 환자에서 항체의 반감기에 따라 상이하다. 일반적으로, 인간화 항체가 가장 긴 반감기를 보이고, 이어서 키메라 항체 및 비인간 항체 순으로 반감기가 길다.

- [0378] 투여량 및 투여 빈도는 치료가 예방 목적인지, 치료 목적인지의 여부에 따라 상이할 수 있다. 예방 용도에서, 본 항체 또는 그의 카테일을 함유하는 조성물은 환자의 저항성을 향상시키기 위해 아직 질환 상태에 빠지지 않은 환자에게 투여된다. 상기 양은 "예방 유효량"으로 규정된다. 이 용도에서, 정확한 양은 다시 환자의 건강 상태 및 일반적인 면역성에 따라 결정되지만, 일반적으로 용량당 0.1 내지 25 mg, 특히 용량당 0.5 내지 2.5 mg 이다. 비교적 적은 투여량은 긴 기간에 걸쳐 비교적 빈번하지 않은 간격으로 투여된다. 일부 환자는 그 생애의 나머지 동안 계속 치료를 받는다. 치료 용도에서, 때때로 비교적 짧은 간격으로 비교적 많은 투여량 (예를 들어, 용량당 약 1 내지 400 mg/kg의 항체 - 5 내지 25 mg의 투여량이 방사성 면역접합체에 대해 사용되고, 보다 고용량은 세포독소-약물 변형된 항체에 대해 사용됨)이 질환의 진행이 감소되거나 종료될 때까지, 바람직하게는 환자가 질환 증상의 부분적인 또는 완전한 개선을 보일 때까지 필요하다. 그 후, 환자에게 예방 요법이 투여될 수 있다.
- [0379] 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 임의로 치료 (예를 들어, 예방 또는 치료)를 필요로 하는 장애 또는 병태의 치료에 효과적인 다른 작용제와 조합하여 투여될 수 있다. 본 개시내용의 90Y-표지된 변형된 항체의 효과적인 단일 치료 투여량 (즉, 치료 유효량)은 약 5 내지 약 75 mCi, 보다 바람직하게는 약 10 내지 약 40 mCi이다. 131I-변형된 항체의 효과적인 단일 치료 비-골수 제거 투여량은 약 5 내지 약 70 mCi, 보다 바람직하게는 약 5 내지 약 40 mCi이다. 131I-표지된 항체의 효과적인 단일 치료 제거 투여량 (즉, 자가 골수 이식을 필요로 할 수 있음)은 약 30 내지 약 600 mCi, 보다 바람직하게는 약 50 내지 약 500 mCi 미만 범위이다. 키메라 항체와 관련하여, 무린 항체에 비해 보다 긴 순환 반감기 때문에, 아이오드-131 표지된 키메라 항체의 효과적인 단일 치료 비-골수 제거 투여량은 약 5 내지 약 40 mCi, 보다 바람직하게는 약 30 mCi 미만이다. 예를 들어, 111In 표지에 대한 영상화 기준은 일반적으로 약 5 mCi 미만이다.
- [0380] 결합 폴리펩티드는 바로 위에서 설명한 바와 같이 투여될 수 있지만, 다른 실시양태에서 결합 폴리펩티드는 그 외에는 건강한 환자에게 제1선 요법으로서 투여될 수 있음이 강조되어야 한다. 그러한 실시양태에서, 결합 폴리펩티드는 정상 또는 평균 적색 골수 저장치를 보이는 환자에게 및/또는 겪지 않았고 겪지 않고 있는 환자에게 투여될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 보조 요법과 함께 또는 조합하여 변형된 항체 또는 그의 단편의 투여는 요법 및 개시된 항체의 순차적인, 동시의, 동시간에 걸치는, 병용, 공존 또는 동시발생의 투여 또는 적용을 의미한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 조합 치료 요법의 다양한 성분의 투여 또는 적용이 치료의 전체적인 효과를 향상시키도록 시기를 조절될 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 화학치료제는 잘 알려진 표준 투여 과정으로 투여된 후, 본 개시내용의 방사성 면역접합체가 수주 내에 투여될 수 있다. 이와 반대로, 세포독소 결합 결합 폴리펩티드가 정맥 내로 투여된 후, 중앙 국제화 외부 빔 방사선이 조사될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 결합 폴리펩티드는 1회 내원시에 하나 이상의 선택된 화학치료제와 병용 투여될 수 있다. 통상의 기술자 (예를 들어 경험이 풍부한 종양학자)는 선택된 보조 요법 및 본 명세서의 교시내용을 기초로 하여 과도한 실험을 수행하지 않으면서 효과적인 조합 치료 요법을 쉽게 알 수 있을 것이다.
- [0381] 이와 관련하여, 결합 폴리펩티드 및 화학치료제의 조합물은 임의의 순서로, 환자에게 치료상 이점을 제공하는 임의의 기간 내에서 투여될 수 있음이 이해될 것이다. 즉, 화학치료제 및 결합 폴리펩티드는 임의의 순서로 또는 병용 투여될 수 있다. 선택된 실시양태에서, 본 개시내용의 결합 폴리펩티드는 이전에 화학요법을 받은 환자에게 투여될 것이다. 또 다른 실시양태에서, 결합 폴리펩티드 및 화학치료제는 실질적으로 동시에 또는 병용 투여될 것이다. 예를 들어, 환자에게 화학요법 과정을 적용하면서 결합 폴리펩티드가 제공될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 변형된 항체는 임의의 화학치료제 또는 치료 시행 후 1년 내에 투여될 것이다. 다른 바람직한 실시양태에서, 결합 폴리펩티드는 임의의 화학치료제 또는 치료 시행 후 10, 8, 6, 4, 또는 2개월 내에 투여될 것이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 결합 폴리펩티드는 임의의 화학치료제 또는 치료 시행 후 4, 3, 2, 또는 1주 내에 투여될 것이다. 또 다른 실시양태에서, 결합 폴리펩티드는 선택된 화학치료제 또는 치료 시행 후 5, 4, 3, 2, 또는 1일 내에 투여될 것이다. 2개의 작용제 또는 치료는 환자에게 수 시간 또는 수 분 이내에 (즉, 실질적으로 동시에) 투여될 수 있음이 추가로 이해될 것이다.
- [0382] 본원의 결합 폴리펩티드는 (예를 들어, 조합 치료 요법을 제공하기 위해) 생체내에서 신생물성 세포의 성장을 제거하거나 감소시키거나 억제하거나 제어하는 임의의 화학치료제(들)과 함께 또는 조합으로 사용될 수 있음이 추가로 이해될 것이다. 본 개시내용에 적합한 예시적인 화학치료제는 알킬화제, 빙카 알칼로이드 (예를 들어, 빈크리스틴 및 빈블라스틴), 프로카르바진, 메토트렉세이트 및 프레드니손을 포함한다. 4-약물 조합 MOPP (메클레타민 (질소 머스타드), 빈크리스틴 (온코빈 (Oncovin)), 프로카르바진 및 프레드니손)은 다양한 유형의 림프종을 치료하는데 매우 효과적이고, 본원의 바람직한 실시양태를 구성한다. MOPP-내성 환자에서, ABVD (예를 들어, 아드리아마이신, 블레오마이신, 빈블라스틴 및 다카르바진), ChIVPP (클로람부실, 빈블라스틴, 프로카르

바진 및 프레드니존), CABS (로무스틴, 독소루비신, 블레오마이신 및 스트렙토조토신), MOPP + ABVD, MOPP + ABV (독소루비신, 블레오마이신 및 빈블라스틴) 또는 BCVP (카르무스틴, 시클로포스파미드, 빈블라스틴, 프로카르바진 및 프레드니존) 조합을 사용할 수 있다. 표준 투여 및 일정에 대해 문헌 [Arnold S. Freedman and Lee M. Nadler, Malignant Lymphomas, in HARRISON'S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE 1774-1788 (Kurt J. Isselbacher et al., eds., 13th ed. 1994)] 및 [V. T. DeVita et al., (1997)] 및 여기에 인용된 참조문을 참조한다. 이들 요법은 본원에 설명한 본 개시내용의 하나 이상의 결합 폴리펩티드와 조합하여, 변화시키지 않거나 특정 환자에 필요한 대로 변경시켜 사용할 수 있다.

[0383] 본 개시내용의 문맥에서 유용한 추가의 요법은 단일 알킬화제, 예컨대 시클로포스파미드 또는 클로람부실, 또는 조합물, 예컨대 CVP (시클로포스파미드, 빈크리스틴 및 프레드니존), CHOP (CVP 및 독소루비신), C-MOPP (시클로포스파미드, 빈크리스틴, 프레드니존 및 프로카르바진), CAP-BOP (CHOP + 프로카르바진 및 블레오마이신), m-BACOD (CHOP + 메토티렉세이트, 블레오마이신 및 류코보린), ProMACE-MOPP (프레드니존, 메토티렉세이트, 독소루비신, 시클로포스파미드, 에토포시드 및 류코보린 + 표준 MOPP), ProMACE-CytaBOM (프레드니존, 독소루비신, 시클로포스파미드, 에토포시드, 시타라빈, 블레오마이신, 빈크리스틴, 메토티렉세이트 및 류코보린) 및 MACOP-B (메토티렉세이트, 독소루비신, 시클로포스파미드, 빈크리스틴, 고정 용량 프레드니존, 블레오마이신 및 류코보린)의 사용을 포함한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 각각 이들 요법에 대한 표준 투여량 및 일정을 쉽게 결정할 수 있을 것이다. CHOP은 또한 블레오마이신, 메토티렉세이트, 프로카르바진, 질소 머스타드, 시토신 아라비노시드 및 에토포시드와 조합되었다. 다른 상용성 화학치료제는 2-클로로데옥시아데노신 (2-CDA), 2'-데옥시코프르마이신 및 플루다라빈을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0384] 회복을 달성하지 못하거나 재발한 중간-등급 및 고-등급 NHL의 환자에 대해, 구체 요법이 사용된다. 구체 요법에서는 제시된 시토신 아라비노시드, 카르보플라틴, 시스플라틴, 에토포시드 및 이포스파미드와 같은 약물을 단독으로 또는 조합으로 사용한다. 재발 또는 침습성 형태의 특정 신생물 장애에서, 다음 프로토콜이 종종 사용된다: IMVP-16 (이포스파미드, 메토티렉세이트 및 에토포시드), MIME (메틸-gag, 이포스파미드, 메토티렉세이트 및 에토포시드), DHAP (텍사메타손, 고용량 시타라빈 및 시스플라틴), ESHAP (에토포시드, 메틸프레드니솔론, HD 시타라빈, 시스플라틴), CEPP(B) (시클로포스파미드, 에토포시드, 프로카르바진, 프레드니존 및 블레오마이신) 및 CAMP (로무스틴, 미톡산트론, 시타라빈 및 프레드니존), 이들은 각각 잘 알려진 투여 비율 및 일정을 갖는다.

[0385] 본 개시내용의 변형된 항체와 조합으로 사용될 화학치료제의 양은 대상체에 따라 변할 수 있거나, 관련 기술분야에 알려진 바와 따라 투여될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Bruce A Chabner et al., Antineoplastic Agents, in GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS 1233-1287 (Joel G. Hardman et al., eds., 9th ed. 1996)]을 참조한다.

[0386] 앞서 논의된 바와 같이, 본 개시내용의 결합 폴리펩티드, 그의 면역반응성 단편 또는 재조합체는 포유동물 장애의 생체내 치료를 위해 제약 유효량으로 투여될 수 있다. 이와 관련하여, 개시된 결합 폴리펩티드는 투여를 용이하게 하고 활성제의 안정성을 촉진도록 제제화될 것임이 이해될 것이다.

[0387] 바람직하게는, 본 개시내용에 따른 제약 조성물은 제약상 허용되는 비-독성 멸균 담체, 예컨대 생리학적 염수, 비독성 완충제, 보존제 등을 포함한다. 본원의 목적에서, 치료제에 접합되거나 비접합된 변형된 결합 폴리펩티드, 그의 면역반응성 단편 또는 재조합체의 제약 유효량은 항원에 대한 효과적인 결합을 달성하고 편익을 달성하기 위해, 예를 들어 질환 또는 장애의 증상을 개선하거나 또는 물질 또는 세포를 검출하기에 충분한 양을 의미하도록 유지될 것이다. 종양 세포의 경우에, 변형된 결합 폴리펩티드는 바람직하게는 신생물 또는 면역반응성 세포 상의 선택된 면역반응성 항원과 상호작용하고 이들 세포의 사멸의 증가를 제공할 수 있을 것이다. 물론, 본 개시내용의 제약 조성물은 제약 유효량의 변형된 결합 폴리펩티드를 제공하기 위해 단일 또는 다중 용량으로 투여될 수 있다.

[0388] 본 개시내용의 범위와 일치하게, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 치료 또는 예방 효과를 생성하기 위해 충분한 양으로 상기 언급한 치료 방법에 따라 인간 또는 다른 동물에게 투여될 수 있다. 개시내용의 결합 폴리펩티드는 개시내용의 항체를 알려진 기술에 따라 통상적인 제약상 허용되는 담체 또는 희석제와 조합함으로써 제조되는 통상적인 투여 형태로 상기 인간 또는 다른 동물에게 투여될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 제약상 허용되는 담체 또는 희석제의 형태 및 특징은 조합되는 활성 성분의 양, 투여 경로 및 다른 잘 알려진 변수에 의해 좌우됨을 알 것이다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 개시내용에 기재된 결합 폴리펩티드의 하나 이상의 종을 포함하는 콕테일이 특히 효과적인 것으로 입증될 수 있음을 추가로 이해할 것이다.

[0389] **X. 결합 폴리펩티드의 발현**

[0390] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 결합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 이들 폴리뉴클레오티드를 발현하는 것을 포함하는 결합 폴리펩티드의 제조 방법을 또한 제공한다.

[0391] 본원에 개시된 결합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 일반적으로 목적하는 양의 특허 청구된 항체, 또는 그의 단편을 생산하기 위해 사용될 수 있는 숙주 세포 내로의 도입을 위해 발현 벡터 내에 삽입된다. 따라서, 특정 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 이들 벡터 및 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0392] 용어 "벡터" 또는 "발현 벡터"는 세포 내에 목적하는 유전자를 도입하고 발현시키기 위한 비히클로서 본 발명에 따라 사용되는 벡터를 의미하기 위해 본원에서 명세서 및 청구범위의 목적을 위해 사용된다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 바와 같이, 상기 벡터는 플라스미드, 파지, 바이러스 및 레트로바이러스로 이루어지는 군으로부터 쉽게 선택될 수 있다. 일반적으로, 본 발명에 적합한 벡터는 선택 마커, 목적하는 유전자의 클로닝을 용이하게 하기 위한 적절한 제한 부위 및 진행 또는 원핵 세포에 들어가고/가거나 복제하는 능력을 포함할 것이다.

[0393] 많은 발현 벡터 시스템이 본 발명의 목적을 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 한 벡터 클래스는 동물 바이러스, 예컨대 소 유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, 우두 바이러스, 바콜로바이러스, 레트로바이러스 (RSV, MMTV 또는 MOMLV), 또는 SV40 바이러스로부터 유래된 DNA 요소를 이용한다. 다른 클래스는 내부 리보솜 결합 부위를 갖는 다시스트론 시스템의 사용을 수반한다. 추가로, DNA를 그 염색체 내로 통합한 세포는 형질감염된 숙주 세포의 선택을 허용하는 하나 이상의 마커를 도입함으로써 선택될 수 있다. 마커는 영양요구성 숙주에 자가영양성, 살생물제 내성 (예를 들어, 항생제) 또는 중금속, 예컨대 구리 내성을 제공할 수 있다. 선택가능 마커 유전자는 발현시킬 DNA 서열에 직접 연결되거나, 또는 동시 형질전환에 의해 동일한 세포 내로 도입될 수 있다. 추가의 요소가 또한 mRNA의 최적 합성을 위해 필요할 수 있다. 상기 요소는 신호 서열, 스플라이스 신호, 및 전사 프로모터, 인핸서, 및 종결 신호를 포함할 수 있다. 특히 바람직한 실시양태에서, 클로닝된 가변 영역 유전자는 상기 논의한 바와 같이 합성된 중쇄 및 경쇄 불변 영역 유전자 (바람직하게는 인간)와 함께 발현 벡터 내로 삽입된다.

[0394] 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 다시스트론 구축물을 사용하여 발현될 수 있다. 상기 발현 시스템에서, 관심 있는 다중 유전자 산물, 예컨대 항체의 중쇄 및 경쇄는 단일 다시스트론 구축물로부터 생산될 수 있다. 이들 시스템은 진행 숙주 세포에서 비교적 높은 수준의 본 발명의 폴리펩티드를 생산하기 위해 내부 리보솜 도입 부위 (IRES)를 유리하게 이용한다. 적합한 IRES 서열은 본원에 참조로 포함된 미국 특허 6,193,980에 개시되어 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 상기 발현 시스템이 본원에 개시된 전체 범위의 폴리펩티드를 효과적으로 생산하기 위해 사용될 수 있음을 이해할 것이다.

[0395] 보다 일반적으로, 항체, 또는 그의 단편을 코딩하는 벡터 또는 DNA 서열이 제조된 후, 발현 벡터는 적절한 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 즉, 숙주 세포는 형질전환될 수 있다. 숙주 세포 내로 플라스미드의 도입은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다양한 기술에 의해 달성될 수 있다. 이들은 형질감염 (전기영동 및 전기천공 포함), 원형질체 융합, 인산칼슘 침전, 외피형 DNA와의 세포 융합, 미세주입, 및 무손상 바이러스 감염을 포함하고 이로 제한되지 않는다 (문헌 [Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Chapter 24.2, pp. 470-472 Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988] 참조). 가장 바람직하게는, 숙주 내로 플라스미드의 도입은 전기천공을 통해 수행된다. 형질전환된 세포는 경쇄 및 중쇄의 생산을 위해 적절한 조건 하에 성장하고, 중쇄 및/또는 경쇄 단백질 합성에 대해 검정된다. 예시적인 검정 기술은 효소-연결 면역흡착 검정 (ELISA), 방사성 면역검정 (RIA), 또는 형광-활성화 세포 분류기 분석 (FACS), 면역조직화학 등을 포함한다.

[0396] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "형질전환"은 유전자형을 변화시키고 그 결과로서 수여자 세포의 변화를 유도하는 DNA의 수여자 숙주 세포 내로의 도입을 나타내기 위해 넓은 의미로 사용될 것이다.

[0397] 같은 맥락으로, "숙주 세포"는 재조합 DNA 기술을 사용하여 구축되고 적어도 하나의 이종성 유전자를 코딩하는 벡터로 형질전환된 세포를 의미한다. 재조합 숙주로부터 폴리펩티드의 단리를 위한 과정의 설명에서, 용어 "세포" 및 "세포 배양물"은 달리 명시적으로 특정되지 않으면 항체의 공급원을 나타내기 위해 교환가능하게 사용된다. 다시 말해서, "세포"로부터 폴리펩티드의 회수는 원심분리된 전체 세포로부터의, 또는 배지 및 현탁된 세포 둘 다를 함유하는 세포 배양물로부터의 회수를 의미할 수 있다.

- [0398] 한 실시양태에서, 항체 발현을 위해 사용된 숙주 세포주는 포유동물 기원이고; 관련 기술분야의 통상의 기술자는 그 내에서 발현되는 목적하는 유전자 산물에 가장 적합한 특정 숙주 세포주를 결정할 수 있다. 예시적인 숙주 세포주는 DG44 및 DUXB11 (차이니스 햄스터 난소 세포주, DHFR 마이너스), HELA (인간 자궁경부 암종), CVI (원숭이 신장 세포주), COS (SV40 T 항원을 갖는 CVI의 유도체), R1610 (차이니스 햄스터 섬유모세포) BALBC/3T3 (마우스 섬유모세포), HAK (햄스터 신장 세포주), SP2/O (마우스 골수종), BFA-1c1BPT (소 내피 세포), RAJI (인간 림프구), 293 (인간 신장)을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 한 실시양태에서, 세포주는 그로부터 발현된 항체의 변경된 글리코실화, 예를 들어, 비푸코실화를 제공한다 (예를 들어, PER.C6[®] (크루셀 (Cruce11)) 또는 FUT8-낙-아웃 CHO 세포주 (포텔리젠트[®] 셀즈 (Potelligent[®] Cells) (바이오와 (Biowa), 미국 뉴저지주 프린스턴)). 한 실시양태에서, NS0 세포가 사용될 수 있다. CHO 세포가 특히 바람직하다. 숙주 세포주는 일반적으로 상업적인 공급원, 아메리칸 티슈 컬처 컬렉션 (American Tissue Culture Collection) 또는 공개된 문헌으로부터 이용가능하다.
- [0399] 시험관내 생산은 다량의 목적하는 폴리펩티드를 제공하도록 규모 확대를 허용한다. 조직 배양 조건 하에 포유동물 세포 배양을 위한 기술은 관련 기술분야에 알려져 있고, 예를 들어 공기부양식 반응기 또는 연속 교반기 반응기에서의 균일한 현탁 배양, 또는 예를 들어 중공사, 미세캡슐, 아가로스 미세비드 또는 세라믹 카트리지에 서의 고정된 또는 포획된 세포 배양을 포함한다. 필요한 경우 및/또는 요구되는 경우, 폴리펩티드의 용액은 통상적인 크로마토그래피 방법, 예를 들어 겔 여과, 이온-교환 크로마토그래피, DEAE-셀룰로스에 대한 크로마토그래피 및/또는 (면역-) 친화도 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다.
- [0400] 본 발명의 결합 폴리펩티드를 코딩하는 유전자는 또한 비-포유동물 세포, 예컨대 박테리아 또는 효모 또는 식물 세포에서 발현될 수 있다. 이와 관련하여, 다양한 단세포 비-포유동물 미생물, 예컨대 박테리아가 또한 형질전환될 수 있고; 즉, 이들은 배양물 또는 발효액에서 성장할 수 있음이 이해될 것이다. 형질전환에 민감한 박테리아는 장내세균과의 구성원, 예컨대 균주 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 또는 살모넬라(*Salmonella*); 바실라세아에(*Bacillaceae*), 예컨대 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*); 뉴모코쿠스(*Pneumococcus*); 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*), 및 해모필루스 인플루엔자에(*Haemophilus influenzae*)를 포함한다. 박테리아에서 발현될 때, 폴리펩티드는 봉입체의 일부가 될 수 있음이 추가로 이해될 것이다. 폴리펩티드는 단리되고, 정제된 후, 기능성 분자로 조립되어야 한다.
- [0401] 원핵세포에 추가로, 진핵 미생물을 또한 사용할 수 있다. 사카로미세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 또는 통상적인 빵 효모가 진핵 미생물 중에서 가장 통상적으로 사용되지만, 많은 다른 균주가 통상적으로 이용가능하다. 사카로미세스에서의 발현을 위해, 예를 들어 플라스미드 YRp7 ([Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979)]; [Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979)]; [Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980)])가 통상적으로 사용된다. 이 플라스미드는 트립토판에서 성장하는 능력이 결여된 효모의 돌연변이체 균주, 예를 들어 ATCC No. 44076 또는 PEP4-1 (Jones, Genetics, 85:12 (1977))에 대한 선택 마커를 제공하는 TRP1 유전자를 이미 함유한다. 효모 숙주 세포 계통의 특징으로서 trp1 병소의 존재는 트립토판의 부재 하에서의 성장에 의해 형질전환을 검출하기 위한 효과적인 환경을 제공한다.
- [0402] **실시예**
- [0403] 본 발명을 추가로 제한하는 것으로 해석되어서는 안 되는 다음 실시예에 의해 더욱 설명한다. 서열 목록, 도면 및 본원 전체에 인용된 모든 참조문, 특허 및 공개 특허 출원의 내용은 본원에 명백하게 참고로 포함된다.
- [0404] **실시예 1. 2C3 항-CD-52 과글리코실화 항체 돌연변이체의 설계, 제조 및 특성화**
- [0405] 상호작용 계면에 부피가 큰 기를 (예를 들어 항체 약동학을 조정하기 위해 FcRn 결합 부위를) 첨가하는 목적으로, 또는 FcγR과 그의 상호작용을 변화시킴으로써 항체 이펙터 기능을 조정하기 위해, 또는 약물, 독소, 세포 독성제 및 방사성뉴클레오티드를 포함하고 이로 제한되지 않는, 이펙터 모이어티 접합을 위한 신규한 가교결합 부위 하위서열 화학적 변형을 도입하기 위해, 항-CD-52 항체 2C3의 중쇄 내에 다수의 과글리코실화 돌연변이를 설계하였다. 과글리코실화된 2C3 돌연변이체를 표 3에 기재한다.
- [0406] <표 3>

[0407] 과글리코실화된 2C3 항-CD-52 돌연변이체

돌연변이	목적하는 이익	용도
A114N	Asn-Ser-Thr 에서 글리코실화	1) 대조군 2) 이펙터 모이어티 접합
Y436T	Asn434 에서 글리코실화 FcRn 결합의 억제	1) 이식편 및 짧은 반감기를 필요로 하는 다른 지표
Y436S	Asn434 에서 글리코실화 FcRn 결합의 억제	1) 이식편 및 짧은 반감기를 필요로 하는 다른 지표
S440N	Asn-Leu-Ser 에서 글리코실화	1) 대조군 2) 이펙터 모이어티 접합
S442N	Asn-Leu-Ser 에서 글리코실화	1) 대조군 2) 이펙터 모이어티 접합
NGT 를 C- 말단에 부가함	글리코실화	1) 대조군 2) 이펙터 모이어티 접합
S298N/Y300S	Asn298 에서 글리코실화 감소된 이펙터 기능	1) 이펙터 기능을 감소시킴 2) 이펙터 모이어티 접합

[0408]

[0409] 1A. 2C3 항-CD-52 항체 과글리코실화 돌연변이체의 생성

[0410]

카바트 넘버링 시스템을 기반으로 지정된 A114N 돌연변이를 돌연변이유발 PCR에 의해 2C3의 CH1 도메인 내로 도입하였다. 전장 항체를 생성하기 위해, VH 도메인 + 돌연변이된 A114N 잔기를 라이게이션 비의존 클로닝 (LIC)에 의해 항체 CH 도메인 1-3을 코딩하는 pENTR-LIC-IgG1 벡터 내로 삽입하였다. 모든 다른 돌연변이를 퀵체인지 (QuikChange) 부위-지정 돌연변이유발 키트 (애질런트 테크놀로지스, 인크. (Agilent Technologies, Inc., 미국 캘리포니아주 산타클라라))를 사용하는 부위-지정 돌연변이유발에 의해 pENTR-LIC-IgG1 상으로 도입하였다. WT 2C3 VH를 돌연변이된 벡터 내로 LIC에 의해 클로닝하였다. 전장 돌연변이체를 게이트웨이 (Gateway) 클로닝에 의해 pCEP4(-E+I)Dest 발현 벡터 내로 클로닝하였다. Fc 돌연변이는 EU 넘버링 시스템에 기반하여 지정되었다. 돌연변이는 DNA 서열결정에 의해 확인하였다. WT 2C3 중쇄 및 경쇄와 돌연변이된 2C3 중쇄의 아미노산 서열을 표 4에 기재한다. 돌연변이된 아미노산을 회색으로 강조하고, 돌연변이에 의해 생성된 컨센서스 글리코실화 표적 부위를 밑줄친다.

[0411]

<표 4>

[0412] 2C3 항-CD-52 항체의 아미노산 서열

서열 번호	평칭	아미노산 서열
1	항-CD-52 WT 경쇄	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNG KTYLNLWLLQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHL HTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
2	항-CD-52 WT 중쇄	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYW MNWVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYA ESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAV YYCTPVDFWQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
3	항-CD-52 A114N 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTY WMNWVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHY AESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTA VYYCTPVDFWQGTTVTVSSNSTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
4	항-CD-52 Y436S 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTY WMNWVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHY AESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTA VYYCTPVDFWQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE

[0413]

서열 번호	명칭	아미노산 서열
		LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHSTQKSLSLSPGK
5	항-CD-52 S440N 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNY WMNWVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNYYATHY AESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTA VYYCTPVDFWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
6	항-CD-52 S442N 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNY WMNWVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNYYATHY AESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTA VYYCTPVDFWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
7	항-CD-52 NGT 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNY WMNWVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNYYATHY AESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTA VYYCTPVDFWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKNGT
8	항-CD-52 S298N / Y300S	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNY WMNWVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNYYATHY AESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTA

[0414]

서열 번호	명칭	아미노산 서열
	중쇄	VYYCTPVDFWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNNTSRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0415]

[0416] 돌연변이체 및 WT 대조군을 6-웰 플레이트 형식에서 HEK293-EBNA 세포 내로 형질감염시켰다. 도 9에 제시된 바

와 같이, 발현 수준은 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯에 의해 분석된 바와 같이 $\sim 0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 인 것으로 밝혀졌다. 조건화 배지 내에서 돌연변이체의 발현을 또한 비아코어 (Biacore) 상에서 단백질 A 포획에 의해 측정하였다. 농도는 고정시킨 단백질 A 내로 주입 6분 후에 해리 반응을 이용하여 결정하였다. $90 \mu\text{g}/\text{mL}$ 내지 $1.5 \text{ ng}/\text{mL}$ 로 배지 내에 연속 희석한 CHO-생산된 WT 2C3을 표준 곡선으로서 사용하였다. 농도는 4-파라미터 피트 (4-parameter fit)를 사용하여 고정 곡선에 의해 $\sim 0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 계산되었다. 도 9에 제시된 바와 같이, 상대적인 발현 수준은 낮고, 일반적으로 웨스턴 블롯 결과와 일치한다.

[0417] 1B. 과글리코실화의 입증

[0418] 추가의 글리코실화 부위가 돌연변이에 의해 도입되었는지 결정하기 위해, 2C3 돌연변이체 및 야생형 단백질을 보편적 탈글리코실화 효소 PNGase F로 처리하고, 단백질 샘플을 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. 도 10에 제시된 바와 같이, 단지 A114N 돌연변이체만이 증가된 겔보기 분자량을 가졌고, 이것은 추가의 N-연결된 탄수화물의 존재를 나타낸다.

[0419] 글리코실화 부위 도입의 추가의 입증을 위해 2C3 돌연변이체를 정제하기 위해 소규모 항체 제제를 생산하였다. 도 11에 제시된 바와 같이, 단지 A114N 돌연변이체만이 도입된 추가의 글리코실화 부위를 가졌음이 SDS-PAGE에 의해 확인되었다.

[0420] 1C. 2C3 항-CD-52 돌연변이체의 결합 특성

[0421] 정제된 단백질의 결합 특성을 비교하기 위해 비아코어를 사용하였다. 마우스 및 SEC-정제된 인간 FcRn-HPC4를 아민 커플링을 통해 CM5 칩 상에 고정시켰다. 각각의 항체를 200, 50, 및 10 nM로 희석하고, 고정된 Fc 수용체 위로 주입하였다. 캄파트 (Campath), CHO-생산된 WT 2C3, 및 DEPC-처리된 캄파트를 양성 및 음성 대조군으로서 포함시켰다. 도 13에 제시된 바와 같이, Y436S 돌연변이체는 인간 FcRn에 대한 결합의 약 2배 감소를 보여주었다. 흥미롭게도, 마우스 FcRn에 대한 상기 돌연변이체의 결합은 영향을 받지 않았다. 다른 2C3 돌연변이는 어느 것도 인간 또는 마우스 FcRn 결합에 대한 임의의 상당한 효과를 갖지 않았다.

[0422] CD-52 펩티드 741 비아코어 결합 검정을 사용하여 정제된 단백질의 항원 결합 특성을 비교하기 위해 비아코어를 사용하였다. CD-52 펩티드 741 및 대조군 펩티드 777을 CM5 칩에 고정시켰다. 항체를 HBS-EP 내에 60부터 0.2 nM까지 2배 연속 희석하고, 3 min 동안 이중으로 주입한 후, $50 \mu\text{L}/\text{min}$ 유속으로 완충제 내에서 5 min 해리시켰다. GLD52 로트 17200-084를 대조군으로 포함시켰다. 표면을 1 펄스의 40 mM HCl로 재생하였다. 1:1 결합 모델을 사용하여 7.5 내지 0.2 nM 곡선에 피팅하였다. 도 16에 제시된 바와 같이, A114N 돌연변이체는 상기 검정의 나머지 돌연변이체보다 근소하게 보다 낮은 CD-52 결합 친화도를 갖는 한편, NGT 돌연변이체는 근소하게 보다 큰 친화도를 가졌다. 보다 대규모 제조로부터 정제된 단백질을 사용하여 CD-52 펩티드 741 비아코어 결합 검정을 반복하였다. 도 17에 제시된 바와 같이, A114N 돌연변이체는 WT 2C3과 대등한 CD-52 펩티드 결합을 보여주었다.

[0423] 1D. A114N 돌연변이체의 전하 특성화

[0424] 2C3 돌연변이체의 전하를 특성화하기 위해 등전 포커싱 (IEF)을 수행하였다. 정제된 단백질을 고정된 pH 구배 (pH 3-10) 아크릴아미드 (IPG) 겔 상에서 실행하였다. 도 18a에 제시된 바와 같이, A114N은 아마도 시알산 잔기 때문에 보다 많은 음전하를 갖는 것으로 밝혀졌다. 무손상 MS 데이터는 A114N 돌연변이체 상에 시알산을 갖는 복합체 구조를 확인하였다. 이와 대조적으로, WT 2C3은 우세한 글리코실화 종으로서 G0F 및 G1F를 갖는 것으로 나타났다 (각각 도 18c 및 18d).

[0425] 실시예 2. 몇몇 항체 백본에서 과글리코실화 돌연변이체의 제조

[0426] 특유한 과글리코실화 부위가 비관련 중쇄 가변 도메인 서열 내로 도입될 수 있음을 확인하기 위해 2C3 항-CD-52 항체에 추가로, 몇몇 다른 항체 백본 내에 A114N 돌연변이를 조작하였다. 과글리코실화된 항-TEM1, 항-FAP, 및 항-Her2 돌연변이체를 표 5에 기재한다.

[0427] <표 5>

[0428] 몇몇 비관련 항체 백본 내에 설계된 A114N 및/또는 S298N 돌연변이체

돌연변이	항체	목적하는 이익	용도
A114N	항-TEM1 항-FAP 항-Her2	부위-특이적 탄수화물-매개 접합을 위한 중쇄의 엘보 힌지에서 추가의 글리코실화 부위	1) 대조군 2) 노출된 시알산 또는 갈락토스 기 (SAM 또는 GAM)를 통한 아미노옥시 독소 접합
S298N / T299A / Y300S (NNAS)	항-Her2	글리코실화를 Asn297로부터 조작된 Asn298로 전환시킨. S298N에서 복합 탄수화물 및 노출된 용매를 예상함, 이펙터 기능을 제거하기 위해 접합 부위 및 수단을 제공함	1) 노출된 시알산 또는 갈락토스 기 (SAM 또는 GAM)를 통한 아미노옥시 독소 접합 2) 감소된 이펙터 기능
A114N / NNAS	항-Her2	2 개의 접합 부위를 사용하여 증가된 접합 수용에 대한 가능성	1) 대조군 2) 노출된 시알산 또는 갈락토스 기 (SAM 또는 GAM)를 통한 아미노옥시 독소 접합

[0429]

[0430] 2A. 항-TEM1 및 항-FAP 항체 과글리코실화 돌연변이체의 생성

[0431] 카바트 넘버링 시스템을 기반으로 지정된 A114N 돌연변이를 돌연변이유발 PCR에 의해 항-TEM1 및 항-FAP의 CH1 도메인 내로 도입하였다. 전장 항체를 생성하기 위해, 돌연변이된 VH + 잔기 114를 라이게이션 비의존 클로닝 (LIC)에 의해 항체 CH 도메인 1-3을 코딩하는 pENTR-LIC-IgG1 벡터 내로 삽입하였다. 이어서, 전장 돌연변이체를 게이트웨이 클로닝에 의해 pCEP4(-E+I)Dest 발현 벡터 내로 클로닝하였다. 돌연변이는 DNA 서열결정에 의해 확인하였다. 항-TEM1 야생형과 돌연변이된 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열을 표 6에 기재한다. 돌연변이된 아미노산을 회색으로 강조하고, 돌연변이에 의해 생성된 컨센서스 글리코실화 표적 부위를 밑줄친다.

[0432] <표 6>

[0433] 항-TEM1 및 항-FAP 항체의 아미노산 서열

서열 번호	명칭	아미노산 서열
9	항-TEM1 WT 경쇄 (클론 #187)	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSSYL AWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFG QGTVKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
10	항-TEM1 WT 중쇄 (클론 #187)	QVQLQESAPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSY WSWIRQPPGKGLYIGYIYYTGSAIYNPSLQSR VTISVDTSKNQFSLKLNSTVAADTAVYYCARE GVRGASGYYYGMDVWGQGTITVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
11	항-TEM1 A114N	QVQLQESAPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSY WSWIRQPPGKGLYIGYIYYTGSAIYNPSLQSR VTISVDTSKNQFSLKLNSTVAADTAVYYCARE GVRGASGYYYGMDVWGQGTITVSSN STK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K*

[0434]

[0435] 돌연변이체 및 야생형 대조군을 삼중 플라스크 형식에서 HEK293-EBNA 세포 내로 형질감염시키고, HiTrap 단백질 A 칼럼 (지이 헬스케어 바이오사이언시즈 (GE Healthcare Biosciences, 미국 펜실베이니아주 피츠버그)) 상에서 정제하였다. 나노드롭 (NanoDrop) 분광광도계 상에서 A280에 의해 분석할 때, 항-FAP A114N 및 항-FAP A114C의 발현은 각각 약 3 $\mu\text{g/ml}$ 및 약 1 $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 항-TEM1 A114N의 발현은 약 0.04 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

[0436] 2B. 과글리코실화의 입증

[0437] 추가의 글리코실화 부위가 A114N 돌연변이체 내로 도입되었음을 확인하기 위해, A114N 돌연변이체로부터 정제된 단백질을 야생형 대조군 단백질과 함께 환원 SDS-PAGE 상에서 분석하였다. 하나의 추가의 글리코실화 부위는 중쇄의 분자량에 2000-3000 달톤을 추가할 것이다. 도 20에 제시된 바와 같이, SDS-PAGE는 항-FAP 및 항-TEM1 A114N 돌연변이체 중쇄 밴드가 증가된 겔보기 분자량을 가졌음을 나타내고, 이것은 두 항체 모두에 추가의 글리코실화 부위의 성공적인 도입과 일치한다.

[0438] 2C. 항-Her2 항체 과글리코실화 돌연변이체의 생성

[0439] Her-2 A114N, Her-2 A114N/NNAS 및 WT Her-2 항체를 라이게이션 비의존 클로닝에 의해 생성하였다. 헤르셉틴 (Herceptin)의 VH 도메인을 합성하고, WT 또는 A114N 돌연변이를 보유하는, 2개의 LIC-상용성 프라이머 세트를 사용하여 PCR-증폭시켰다. 전장 항체를 얻기 위해, 증폭된 VH 삽입물 (WT 또는 A114N)을 CH1-3 도메인을 코딩하는 2개의 pENTR 벡터 (pENTR-LIC-IgG1 WT 및 pENTR-LIC-IgG1 NNAS) 내로 클로닝하여, pENTR 상에 도입 클론으로서 3개의 전장 돌연변이체 (A114N, NNAS, A114N/NNAS) 및 WT 대조군을 얻었다. 이들 돌연변이체를 게이트웨이 클로닝에 의해 pCEP4(-E+I)Dest 발현 벡터 내로 클로닝하였다. 돌연변이는 DNA 서열결정에 의해 확인하였다. 항-Her-2 야생형과 돌연변이된 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열을 표 7에 기재한다. 돌연변이된 아미노산을

회색으로 강조하고, 돌연변이에 의해 생성된 컨센서스 글리코실화 표적 부위를 밑줄친다.

<표 7>

항-Her-2 항체의 아미노산 서열

서열 번호	명칭	아미노산 서열
12	항-Her-2 WT 경쇄	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDVNTAV AWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFGSR SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
13	항-Her-2 WT 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTY IHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	항-Her-2 A114N 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTY IHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSNSTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	항-Her2 NNAS 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTY IHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNASRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN

서열 번호	명칭	아미노산 서열
		GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
16	항-Her2 A114N/ NNAS 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFRNIKDTY IHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSNSTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYN NAS RVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0443]

[0444]

2D. A114N 항-Her2 항체 과글리코실화 돌연변이체의 발현

[0445]

A114N 항-Her2 및 야생형 구축물을 12개의 삼중 플라스크 내에서 HEK293-EBNA 세포 내로 리포펙타민 (Lipofectamine)-2000 (2.5:1 비의 시약:DNA) 및 엑스트림진 (XtremeGene) HP (3:1 비의 시약:DNA)을 사용하여 형질감염시켰다. 제3일 조건화 배지 (CM)로부터 분취액의 옥텟 측정은 단백질 발현이 리포펙타민-2000 및 엑스트림진 HP 모두에 대해 6개의 플라스크를 가로질러 일관되었음을 보여주었다. 표 8에 제시된 바와 같이, 전체 형질감염 효능은 엑스트림진 HP에서 약 30% 더 높았다. 두 형질감염 조건 모두에 대해 제3일에 수집한 조건화 배지를 함께 모으고, 단백질 A 칼럼에 의해 정제하였다. 옥텟 측정은 혈청-함유 모의 배지에서 1.8 $\mu\text{g/ml}$ 항체 대 혈청 비함유 모의 배지에서 0 $\mu\text{g/ml}$ 을 보여주었다.

[0446]

<표 8>

[0447]

A114N 항-Her2 과글리코실화 돌연변이체 발현

		리포펙타민-2000	엑스트림진 HP
단백질 A 칼럼으로부터 정제된 단백질	농도 (mg/ml)	1.72	3.18
	부피 (ml)	3.5	3.5
	총 단백질 (mg)	6.02	11.13
완충제-교환된 단백질	농도 (mg/ml)	15.59	16.86
	부피 (ml)	0.2	0.36
	총 단백질 (mg)	3.1	6.07
	%회수율	51.8	54.5

[0448]

[0449]

각각의 형질감염 조건에 대해 제6일로부터 조건화 배지를 모으고 따로 정제하였다. 두 용리액을 PBS (pH 7.2) 내로 따로 완충제-교환하고, 아미콘 (Amicon)-4 (50 kD 컷오프) 칼럼을 사용하여 ~15배 농축시켰다. 제6일 CM은 제3일 CM에 비해 더 높은 발현 수준을 보여주었다. 표 8에 제시된 바와 같이, 추가의 하류 용도, 예컨대 항체-약물 접합을 위해 제6일 조건화 배지로부터 총 3 mg의 헤르셉틴 A114N 15.59 mg/ml (리포펙타민 형질감염으

로부터) 및 6 mg의 헤르셉틴 A114N 16.86 mg/ml (엑스트림진 HP 형질감염으로부터)이 생산되었다.

[0450] 2E. A114N 항-Her2 돌연변이체의 SDS-PAGE 및 HIC 분석

[0451] 접합에 앞서, 정제된 A114N 헤르셉틴을 SDS-PAGE 및 HIC (소수성 상호작용 크로마토그래피)에 의해 특성화하였다. 도 21에 제시된 바와 같이, 정제된 A114N 헤르셉틴의 품질은 추가의 하류 용도를 위해 적합한 것으로 결정되었다.

[0452] 2F. 조작된 글리코실화에 접합

[0453] a) 글리코실화 부위가 항-TEM1 상의 카바트 위치 114 부위에 도입되고; b) A114N 돌연변이체가 환원 SDS-PAGE에 의해 중쇄 상에서 과글리코실화되고; c) 무손상 LC/MS에 의해 A114N 과글리코실화된 돌연변이체가 SAM 및 GAM 접합을 위해 이상적인 말단 시알산 및 갈락토스를 비롯한 복합 탄수화물 구조를 가졌음이 입증되었다. 조작된 글리코실화 부위가 접합을 위해 적합한지 확인하기 위해, 항-TEM1 A114N을 아미노옥시 화학을 통해 5 kDa PEG와 접합시켰다. 도 22에 제시된 바와 같이, PEG는 아미노옥시 연결을 통해 항-TEM1 A114N에 성공적으로 접합되었다. 상기 돌연변이체는 또한 항-FAP 및 항-CD-52 2C3 백본 상에서 성공적으로 제조되었다 (제시되지 않음). 이들 데이터는 N114에서 글리코실화 부위가 이펙터 모이어티의 접합을 위해 유용함을 입증한다.

[0454] 실시예 3: S298N/Y300S Fc 돌연변이체의 생성

[0455] 새로운 글리코실화 부위가 천연 발생 Asn297 부위 다음의 EU 위치 Ser 298에 도입된 조작된 Fc 변이체를 설계하고 생성하였다. Asn297에서 글리코실화는 유지되거나 돌연변이에 의해 결실되었다. 돌연변이 및 목적하는 글리코실화 결과를 표 9에 기재한다.

[0456] <표 9>

[0457] 다양한 항체 변이체의 글리코실화 상태

#	돌연변이	목적하는 글리코실화 상태	용도
17	N297Q	글리코실화 없음 (agly)	Agly 대조군
18	T299A	글리코실화 없음 (agly)	Agly 대조군, 알려지지 않은 이펙터 기능
19	N297Q/S298N/Y300S (NSY)	297에서 글리코실화가 없지만 298에서 조작된 글리코실화	감소된 이펙터 기능: 노출된 시알산 또는 갈락토스 기를 통한 접합
20	S298N/T299A/Y300S (STY)	297에서 글리코실화가 없지만 298에서 조작된 글리코실화	감소된 이펙터 기능: 노출된 시알산 또는 갈락토스 기를 통한 접합
21	S298N/Y300S (SY)	297 & 298에서 2개의 잠재적인 글리코실화 부위; 글리코실화 패턴에서 변경	감소된 이펙터 기능: 노출된 시알산 또는 갈락토스 기를 통한 접합
22	야생형	297	대조군

[0458]

[0459] 3A. H66 $\alpha\beta$ -TCR 항체 변경된 글리코실화 변이체의 생성

[0460] pENTR_LIC_IgG1 주형을 사용하는 킷체인지에 의해 $\alpha\beta$ T-세포 수용체 항체 클론 #66의 중쇄 상에 돌연변이를 제조하였다. HEBE1 Δ ab IgG1 #66의 VH 도메인을 LIC 프라이머를 사용하여 증폭시킨 후, LIC에 의해 돌연변이된 또는 야생형 pENTR_LIC_IgG1 내로 클로닝하여 전장 돌연변이체 또는 야생형 항체를 생성하였다. 서브클로닝은 DraIII/XhoI 이중 소화를 사용하여, 성공적인 클론 내에 약 1250 bp-크기의 삽입물을 생산함으로써 입증하였다. 이어서, 이들 전장 돌연변이체를 게이트웨이 클로닝을 통해 발현 벡터, pCEP4(-E+I)Dest 내로 클로닝하였

다. 돌연변이는 DNA 서열결정에 의해 확인하였다. WT H66 항- α β TCR 중쇄 및 경쇄와 돌연변이된 H66 중쇄의 아미노산 서열을 표 10에 기재한다. 돌연변이된 아미노산을 회색으로 강조하고, 돌연변이에 의해 생성된 컨센서스 글리코실화 표적 부위를 밑줄친다.

[0461] <표 10>

[0462] H66 항- α β TCR 항체의 아미노산 서열

서열 번호	명칭	아미노산 서열
23	항- α TCR 클론 H66 경쇄	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHW YQQKPGQAPRRLIYDTSKLASGVPARFSGSGSGT SYTLTISSLEPEDFAVYYCQWSSNPLTFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC*
24	항- α TCR 클론 H66 중쇄	EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYV MHWVRQAPGKGLEWVGYINPYNDVTKYNEKFK GRFTLSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR GSYYDYDGFVYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK*
25	항- α TCR 클론 H66 S298N/Y300S 중쇄	EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYV MHWVRQAPGKGLEWVGYINPYNDVTKYNEKFK GRFTLSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR GSYYDYDGFVYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN <u>NTSR</u> VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK*
26	항- α TCR 클론 H66 S298N/ T299A/ Y300S 중쇄	EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYV MHWVRQAPGKGLEWVGYINPYNDVTKYNEKFK GRFTLSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR GSYYDYDGFVYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN

[0463]

서열 번호	명칭	아미노산 서열
		<u>NASRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP</u> APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK*
27	항- $\alpha\beta$ TCR 클론 H66 N297Q/ S298N/ Y300S 중쇄	EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYV MHWVRQAPGKGLEWVGYINPYNDVTKYNEKFK GRFTLSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR GSYYDYDGFVYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQ <u>NTSRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP</u> APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK*

[0464]

[0465]

돌연변이체, 야생형, 및 2개의 비글리코실화된 대조군 (pCEP4 내에 HEBE1 Agly IgG4 및 HEBE1 Δ ab IgG1) 구축 물을 발현을 위해 삼중-플라스크 내에서 HEK293-EBNA 세포 내로 형질감염시켰다. 단백질을 다중-채널 연동 펌프를 사용하여 1 ml HiTrap 단백질 A 칼럼 (GE)으로 160 ml의 조건화 배지 (CM)로부터 정제하였다. 5 마이크로 그램의 각각의 생성되는 상청액을 4-20% Tris-글리신 환원 및 비-환원 SDS-PAGE 겔 상에서 분석하였다 (도 2 참조). 비글리코실화된 돌연변이체 (N297Q, T299A, 및 Agly 대조군)의 중쇄는 더욱 이동하였고 (화살촉), 이것은 이들 항체에서 글리칸의 손실과 일치한다. 그러나, 조작된 글리코실화된 항체 (NSY, STY, SY, Δ ab, 및 wt 대조군, 화살표)의 중쇄를 야생형 대조군에 유사하게 이동시켰다. 상기 결과는 EU 위치 298에서 조작된 글리코실화 부위의 존재와 일치한다. SEC-HPLC 분석은 모든 돌연변이체가 단량체로서 발현되었음을 나타낸다.

[0466]

3B. LC-MS에 의한 글리코실화 분석

[0467]

조작된 H66 IgG1 Fc 변이체를 37°C에서 30 min 동안 20 mM DTT로 부분적으로 환원시켰다. 이어서, 샘플을 QSTAR qq TOF 하이브리드 시스템 (어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems))과 결합된 애질런트 1100 모세관 HPLC 시스템 상에서 모세관 LC/MS에 의해 분석하였다. 데이터 분석을 위해 애널리스트 (Analyst) QS 1.1 (어플라이드 바이오시스템즈)에서 기준선 교정 및 컴퓨터 모델링을 이용한 베이지안 (Bayesian) 단백질 재구성을 사용하였다. S298N/T299A/Y300S H66 항체 돌연변이체에서, G0F, G1F 및 G2F와 나란히 주요 종으로서 이중안테나 및 삼중안테나 복합체-형 글리칸을 갖는 1개의 글리코실화 부위가 아미노산 298에서 관찰되었다 (도 34 참조). N297에서 야생형 글리코실화 부위 대신에 N298에서 글리코실화를 이동시킨 상기 변경된 글리코실화 프로파일이 일치한다.

[0468]

3C. 비아코어를 사용하는 인간 Fc γ RIIIa 및 Fc γ RI에 대한 $\alpha\beta$ TCR 항체 돌연변이체의 결합 특성.

[0469]

제조합 인간 Fc γ RIIIa (V158 & F158) 및 Fc γ RI에 대한 결합을 평가하기 위해 비아코어를 사용하였다. CM5 칩의 4개의 모든 유동셀에 비아코어에 의해 제공된 표준 아민 커플링 절차를 통해 항-HPC4 항체를 고정시켰다. 항-HPC4 항체를 커플링 반응을 위해 10 mM 아세트산나트륨 (pH 5.0) 내에 50 μ g/mL로 희석하고, 5 μ l/min으로 25 min 동안 주입하였다. 약 12,000 RU의 항체를 칩 표면에 고정시켰다. 제조합 인간 Fc γ RIIIa-V158 및 Fc γ RIIIa-F158을 결합 완충제 (1 mM CaCl₂를 함유한 HBS-P) 내에 0.6 μ g/mL로 희석하고, 5 μ l/min으로 3 min 동안 유동셀 2 및 4에 각각 주입하여 항-HPC4 칩 상에 300 - 400 RU 수용체를 포획하였다. 저결합체를 구별하기 위해, 본 검정에 대체로 사용된 것보다 3배 더 많은 rhFc γ RIIIa를 항-HPC4 표면 상에 포획시켰다. 유동셀 1 및 3은 참조 대조군으로서 사용하였다. 각각의 항체를 결합 완충제 내에 200 nM로 희석하고, 4 min 동안 4개의 모든 유동셀 위로 주입한 후, 완충제 내에서 5 min 해리시켰다. 표면은 20 μ l/min으로 3 min 동안 HBS-EP 완충제 내의 10 mM EDTA로 재생하였다. 이들 실험의 결과를 도 3에 제시한다.

[0470]

Fc γ RI 결합을 비교하기 위해 비아코어를 또한 사용하였다. 항-테트라 His 항체를 제바(Zeba) 탈염 칼럼을 사용하여 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.0) 내로 완충제 교환하고, 아민 커플링을 위해 아세테이트 완충제 내에 25

$\mu\text{g/mL}$ 로 희석하였다. CM5 칩의 2개의 유동셀에 $5 \mu\text{L/min}$ 으로 주사 20분 후에 ~ 9000 RU의 항-테트라-His 항체를 고정시켰다. 선행 실험에서와 같이, 약한 결합을 갖는 샘플을 비교하기 위해 10배 더 많은 Fc γ RI을 항-테트라-His 표면에 포획시켰다. 제조한 인간 Fc γ RI을 HBS-EP 결합 완충제 내에 $10 \mu\text{g/mL}$ 로 희석시키고, 유동셀 2에 1 min 동안 $5 \mu\text{L/min}$ 으로 주입하여 항-테트라-His 칩에 ~ 1000 RU 수용체를 포획하였다. 단일 농도의 항체, 100 nM을 3 min 동안 포획된 수용체 및 대조군 표면 위로 $30 \mu\text{L/min}$ 으로 주입하였다. 후속적으로, 해리를 3분 동안 모니터링하였다. 이어서, $20 \mu\text{L/min}$ 으로 10 mM 글리신 (pH 2.5)의 2회의 30초 주입으로 표면을 재생하였다. 이들 실험의 결과를 도 4에 제시한다.

[0471] 이들 결과는 Fc γ RIIIa 또는 Fc γ RI에 대한 당조작된 돌연변이체의 결합의 현저한 감소를 입증한다. H66 S298N/T299A/Y300S는 특히 두 수용체 모두에 대한 결합이 거의 완전히 폐지되었다. 보다 상세한 분석을 위해 상기 돌연변이체를 선택하였다.

[0472] 3D. 원편광 이색성 (CD)을 이용하는 안정성 특성화

[0473] S298N/T299A/Y300S 항체 돌연변이체의 안정성을 Far-UV CD 열 용융 실험에 의해 모니터링하였고, 여기서 증가하는 온도는 항체의 언폴딩 (변성)을 일으키므로 216 nm 및 222 nm에서 CD 신호를 모니터링하였다.

[0474] 온도는 열전기 펠티에 (peltier) (자스코 (Jasco) 모델 AWC100)에 의해 제어하고, $25-89^{\circ}\text{C}$ 까지 1°C/min 의 속도로 증가시켰다. CD 스펙트럼은 경로 길이가 10 mm인 수정 큐벳 (헬마, 인크 (Hellma, Inc)) 내에서 PBS 완충제 내에 약 0.5 mg/mL 의 단백질 농도에서 자스코 815 분광광도계 상에서 수집하였다. 스캐닝 속도는 50 nm/min 이고, 데이터 피치는 0.5 nm 이었다. 배지의 민감도 세팅에서 2.5 nm 의 대역폭을 사용하였다. CD 신호 및 HT 전압은 0.5 nm 의 데이터 간격 및 1°C 의 온도 간격에서 $210-260 \text{ nm}$ 로부터 수집하였고, 4개의 복제물 스캔을 각각의 샘플에 대해 수행하였다. 결과는 델타 AB H66 및 S298N/T299A/Y300S H66 돌연변이체는 둘 다 유사한 열 거동을 보이고, 분해를 위한 대략 동일한 개시(onset) 온도 (약 63°C)를 가졌음을 입증하고 (도 35), 이것은 이들이 대등한 안정성을 가짐을 추가로 제안한다.

[0475] 실시예 4: Fc-조작된 돌연변이체의 기능적 분석

[0476] Fc-조작된 돌연변이체를 PBMC 증식 검정 및 시토카인 방출 검정을 통해 평가하였다. PBMC 증식 검정에서, 인간 PBMC를 증가하는 농도의 치료 항체와 함께 72시간 동안 배양하고, ^3H -티미딘을 첨가하고, 세포를 18시간 후에 수거하였다. T 세포 고갈/시토카인 방출 검정을 위해, 인간 PBMC를 증가하는 농도의 치료 항체와 함께 배양하고, 제7일까지 매일 세포 계수 및 생존성 (비-셀 (Vi-Cell), 벡만 콜터 (Beckman Coulter))에 대해 분석하였다. 세포 상청액을 또한 수거하고, -20°C 에서 저장하고, 8-플렉스 시토카인 패널 (바이오-라드 (Bio-Rad)) 상에서 분석하였다.

[0477] 정상 공여자 PBMC를 해동하고, 다음 조건 하에 처리하였다 (모두 보체를 함유하는 배지 내에서): 비처리; BMA031, moIgG2b $10 \mu\text{g/mL}$; OKT3, moIgG2a $10 \mu\text{g/mL}$; H66, huIgG1 델타AB $10 \mu\text{g/mL}$, $1 \mu\text{g/mL}$ 및 $0.1 \mu\text{g/mL}$; H66, huIgG1 S298N/T299A/Y300S $10 \mu\text{g/mL}$, $1 \mu\text{g/mL}$ 및 $0.1 \mu\text{g/mL}$.

[0478] 바이오플렉스 (Bioplex) 분석을 위해 제2일 (D2) 및 제4일 (D4)에 시토카인을 수거하였다 (IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, GM-CSF, IFN γ , TNF α). CD4, CD8, CD25 및 abTCR 발현에 대해 세포를 D4에서 염색하였다.

[0479] 도 5-8에 제시된 결과는 H66 S298N/T299A/Y300S가 CD25 발현에 의한 최소의 T-세포 활성화, abTCR에 대한 결합 (델타AB에 대해 근소하게 상이한 동역학을 가짐), 및 D2 및 D4 시점 모두에서 최소의 시토카인 방출을 보여주어, 수행된 모든 세포 기반 검정에서 H66 델타AB와 유사하게 거동하였음을 입증한다. 따라서, S298N/T299A/Y300S 돌연변이체는 이펙터 기능을 델타AB 돌연변이만큼 효과적으로 제거하였다.

[0480] 실시예 5: 항-CD52 항체 백본 내에서 조작된 Fc 변이체의 제조 및 특성화.

[0481] H66 항- $\alpha\beta$ TCR 항체에 추가로, S298N/Y300S 돌연변이를 또한 항-CD52 항체 백본 내에 조작하였다 (클론 2C3). 이어서, S298N/Y300S H66 항- α TCR 항체에서 보인 관찰된 이펙터 기능 조정이 또다른 항체 백본에서 일치하는지 여부를 결정하기 위해 상기 돌연변이체를 검사하였다.

[0482] 5A. 2C3 항-CD52 항체 변경된 글리코실화 변이체의 생성

[0483] 먼저, S298N/Y300S 2C3 변이체 DNA를 pENTR_LIC_IgG1을 사용하는 쿼체인지 돌연변이유발에 의해 제조하고, WT 2C3 VH를 LIC에 의해 돌연변이된 벡터 내로 클로닝하였다. 전장 돌연변이체를 게이트웨이 기술을 이용하여 pCEP4 (-E+I)Dest 발현 벡터 내로 클로닝하였다. 돌연변이는 후속적으로 DNA 서열결정에 의해 확인하고, 서열

을 표 11에 기재한다. 이어서, 돌연변이체를 6-웰 플레이트 형식에서 HEK293-EBNA 세포 내로 형질감염시키고, 조건화 배지로부터 단백질을 정제하였다. 대조군으로서 항-CD52 2C3 야생형 항체를 평행으로 생산하였다. 발현 수준은 SD-PAGE 및 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 인 것으로 밝혀졌다 (도 9a). 순 조건화 배지 내에서 돌연변이체의 발현을 비아코어 상에서 단백질 A 포획에 의해 또한 측정하였다.

[0484] 농도는 고정된 단백질 A에 주입 6분 후 해리 반응을 이용하여 결정하였다. 90 $\mu\text{g/mL}$ 에서 1.5 ng/mL로 배지 내에 연속 희석시킨 CHO-생산된 WT 2C3을 표준 곡선으로서 사용하였다. 농도는 4-파라미터 핏을 사용하여 교정 곡선에 의해 약 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 내에서 계산되었다. 상대적인 발현 수준은 낮았고, 일반적으로 웨스턴 블롯 데이터와 일치한다 (도 9b).

[0485] <표 11>

[0486] 항-CD52 클론 2C3 항체 서열

서열 번호	명칭	아미노산 서열
28	항-CD-52 2C3 WT 경쇄	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYL NWLLQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHLHTFGQGTREIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT SKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC*
29	항-CD-52 2C3 WT 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRF TISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*
30	항-CD-52 2C3 S298N/Y300S 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYWMN WVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRF TISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNTSRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*

[0487]

[0488] 5B. PNGaseF를 사용하는 글리코실화 분석

[0489] 돌연변이에 의해 도입된 추가의 글리코실화 부위를 평가하기 위해, 농축된 S298N/Y300S 돌연변이체를 PNGase F로 탈-글리코실화시켰다. 이는 분자량의 임의의 결보기 변화를 나타내지 않았고, 이것은 추가의 탄수화물이 존재하지 않음을 나타낸다 (도 10). 추가의 특성화를 위해 이들 돌연변이체를 정제하기 위해 소규모 제조를 수행하였고, 결과는 추가의 탄수화물이 S298N/Y300S 돌연변이체 상에 존재하지 않음을 재확인하였다 (도 11).

[0490] 5C. 비아코어를 사용하는 인간 Fc γ RIIIa에 대한 2C3 항-CD52 항체 돌연변이체의 결합 특성.

[0491] 정제된 항체의 항원-결합, Fc γ RIII, 및 결합 특성을 특성화하기 위해 비아코어를 또한 사용하였다 (도 12, 13 및 14 참조). S298N/Y300S 2C3 변이체는 CD52 펩티드에 단단히 결합하였고, 결합 센소그램은 야생형 대조군으로부터 구분가능하지 않았고, 이것은 상기 돌연변이가 그의 항원 결합에 영향을 미치지 않음을 입증한다 (도 12a).

- [0492] Fc 이펙터 기능에 대해 검증하기 위해, Fc γ RIII 수용체 (Val158)를 결합 연구에서 사용하였다. 돌연변이체 및 야생형 대조군 항체를 200 nM로 희석하고, HPC4-태그 포획된 Fc γ RIIIa에 주입하였다. Fc γ RIII 결합은 S298N/Y300S 돌연변이체에 대해 거의 검출불가능하였고, 이것은 상기 변이체에 의한 이펙터 기능의 손실을 나타냈다 (도 12b 및 도 14a). Fc 이펙터 기능에 대해 추가로 검증하기 위해, Fc γ RIII 수용체 (Phe158)을 또한 결합 연구에서 사용하였다. 돌연변이체 및 야생형 대조군 항체를 200 nM로 희석하고, HPC4-태그 포획된 Fc γ RIIIa에 주입하였다. Fc γ RIII 결합은 S298N/Y300S 돌연변이체에 대해 거의 검출불가능하였고, 이것은 Phe158 변이체에서 이펙터 기능의 손실을 나타낸다 (도 14b). 마지막으로, 정제된 단백질의 FcRn 결합 특성을 비교하기 위해 비아코어를 사용하였다. 마우스 및 SEC-정제된 인간 FcRn-HPC4를 아민 커플링을 통해 CM5 칩에 고정시켰다. 각각의 항체를 200, 50, 및 10 nM로 희석하고, 수용체 위로 주입하였다. 캄파트, CHO-생산된 WT 2C3, 및 DEPC-처리된 캄파트를 양성 및 음성 대조군으로서 포함시켰다. 이들 데이터는 돌연변이체가 야생형 항체 대조군과 동일한 친화도로 인간 및 뮤린 FcRn 수용체 모두에 결합하고, 아마도 그의 순환 반감기 또는 다른 약동학적 특성에서 차이가 없음을 보여준다 (도 12c, 도 13a 및 b 참조). 따라서, S298N/Y300S 돌연변이는 예를 들어 인간 Fc γ 수용체의 참여를 통해, 바람직하지 않은 Fc 이펙터 기능을 감소 또는 제거하기 위해 항체에 전반적으로 적용가능하다.
- [0493] **실시예 6: S298N/Y300S 돌연변이체에서 순환 면역 복합체 검출.**
- [0494] S298N/Y300S 돌연변이체 및 WT 대조군에 대해 C1q 결합 검정을 이용하여 순환 면역 복합체 검출을 또한 조사하였다. 고결합 코스타 (Costar) 96-웰 플레이트를 코팅 완충제 (0.1 M NaCHO₃ pH 9.2) 내에서 10 - 0.001 μ g/ml 범위의 농도로 100 μ l의 2배 연속 희석된 2C3 Ab로 4°C에서 철야 코팅하였다. ELISA 분석은 WT에 비해 S298N/Y300S 돌연변이체에 대해 C1q 결합이 감소되었음을 보여주었다 (도 15a). 코팅된 2C3 Ab에 대한 항-Fab Ab의 결합은 웰의 균등한 코팅을 확인하였다 (도 15b).
- [0495] **실시예 7: 등전 포커싱을 이용하는 S298N/Y300S 돌연변이체의 분리 및 분석.**
- [0496] S298N/Y300S 돌연변이체를 특성화하기 위해 pH 3-10 등전 포커싱 (IEF) 겔을 실행하였다. S298/Y300S는 보다 많은 음전하, 및 따라서 아마도 보다 많은 시알산 분자를 갖는 것으로 밝혀졌다 (도 18a). S298N/Y300S 돌연변이체 및 WT 2C3은 둘 다 무손상 MS에 의해, 우세한 글리코실화 종으로서 G0F 및 G1F를 갖는 것으로 나타났다 (각각 도 18b 및 d).
- [0497] **실시예 8: S298N/Y300S의 항원 결합 친화도.**
- [0498] 비아코어를 이용하여, 보다 소규모 (도 16) 및 보다 대규모 (도 17) 발현으로부터 제조되고 정제된 WT 항-CD52 2C3 Ab 및 S298N/Y300S 돌연변이체의 항원 결합 친화도를 비교하였다. CD52 펩티드 741 및 대조군 펩티드 777을 고정시킨 CM5 칩을 얻었다. 항체를 HBS-EP 내에 60 내지 0.2 nM로 2배 연속 희석한 후, 3 min 동안 칩 표면 위로 주입한 다음 50 μ l/min의 유속으로 완충제 내에서 5 min 해리시켰다. 이어서, 표면을 40 mM HCl의 펄스로 재생하였다. 이들 분석은 이중으로 수행하였고, S298N/Y300S 돌연변이체 및 WT 2C3 항체가 대등한 CD52 펩티드 결합을 보여줌을 입증한다.
- [0499] 소규모 형질감염 동안 생성된 항체를 스크리닝하기 위해, 정제에 앞서 기능성 결합 특성을 시험하기 위해 배지 스크리닝 플랫폼을 설계하였다. 이들 시험은 농도를 결정하기 위해 옥텟 (도 19a)을 이용하여 수행하였고, 단백질 A 바이오센서 및 GLD52 표준 곡선을 사용하였다. 비아코어를 사용하는 CD52 결합 비교를 위해 샘플을 HBS-Ep 내에 7.5 및 2 nM로 희석하였다 (도 19b). 펩티드 결합 검정의 결과는 S298N/Y300S 돌연변이체 및 WT 2C3 항체가 모두 대등한 CD52 펩티드 결합을 가짐을 보여주었다. 또한, 이들 분석은 옥텟 및 비아코어가 소규모 형질감염으로부터 항체에 의한 항원 결합을 예측하기 위해 잘 작동함을 입증한다.
- [0500] **실시예 9: 추가의 항체 백본 내에 S298N/Y300S, S298N/T299A/Y300S, 및 N297Q/S298N/Y300S 변경된 글리코실화 돌연변이체의 제조.**
- [0501] 추가의 직렬 글리코실화 부위가 비관련 중쇄 가변 도메인 서열 내로 도입될 수 있는지 확인하기 위해 항- $\alpha\beta$ -TCR 항체 및 2C3 항-CD-52 항체에 추가로, S298/Y300S, S298N/T299A/Y300S, 및 N297Q/S298N/Y300S 돌연변이를 다른 항체 백본 내에 조작하였다. 별법으로 글리코실화된 항-CD-52 12G6 및 항-Her2 돌연변이체를 표 12 및 13에 기재한다.
- [0502] <표 12>

[0503] 항-CD52 클론 12G6 항체 서열

서열	명칭	아미노산 서열
31	항-CD-52 12G6 WT 경쇄	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYL NWVLQKPGQSPQRLLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCVQGSHFHTFGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
32	항-CD-52 12G6 WT 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNW VRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTIS RDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK *
33	항-CD-52 12G6 S298N/Y300S 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNW VRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTIS RDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNN TSRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K*
34	항-CD-52 12G6 S298N/ T299A/ Y300S 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNW VRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTIS RDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNN ASRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K*

[0504]

서열	명칭	아미노산 서열
35	항-CD-52 12G6 N297Q/ S298N/ Y300S 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNW VRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTIS RDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQN TSRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K*

[0505]

[0506] <표 13>

[0507] 항-Her2 항체 서열

서열 번호	명칭	아미노산 서열
36	항-Her2 WT 경쇄	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFLTIS SLQPEDFATYYCQGHYTPPTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
37	항-Her2 WT 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWV RQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EPTCQVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK*
38	항-Her2 S298N/T299A/ Y300S 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWV RQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EPTCQVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYN N ASRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK*

[0508]

[0509] 실시예 10. 반응성 글리칸 모이어터를 함유하는 변경된 항체의 생성

[0510] 유도체화된 이펙터 모이어터와 반응할 수 있는 글리칸 모이어터를 함유하는 항체를 생성하기 위해, 항-HER 항체를 먼저 글리코실트랜스퍼라제 및 관련 UDP 당 공여자를 사용하여 시험관내에서 글리코실화시켰다. 예를 들어, 시알산 잔기를 도입하기 위해, 문헌 [Kaneko et al. (Kaneko, Y., Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2006) Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. Science 313, 670-3)의 방법에 따라 공여자 항체를 먼저 β -갈락토실트랜스퍼라제를 사용하여 갈락토실화한 후, α 2,6-시알릴트랜스퍼라제를 사용하여 시알릴화하였다. 반응은 5 mM $MnCl_2$ 를 함유하는 50 mM MES 완충제 (pH 6.5) 내에서 공여자 당 뉴클레오타이드 기질, 즉, UDP-갈락토스 (10 mM) 및 CMP-시알산 (10 mM)과 함께 β -갈락토실트랜스퍼라제 (50 mU/mg, 시그마 (Sigma)) 및 α 2,6-시알릴트랜스퍼라제 (5 μ g/mg, 알앤디 시스템 (R&D system))을 사용하여 1-반응기 합성 단계로 수행하였다. 5 mg/ml 항-HER2 항체를 함유하는 반응 혼합물을 37°C에서 48시간 동안 인큐베이션하였다. 시알릴화는 PNGase F를 사용하여 항체로부터 방출된 과메틸화된 글리칸의 MALDI-TOF MS 분석, 디오넥스 (Dionex) HPLC를 사용하는 시알산 함량 분석, 및 SNA (α 2,6-시알산에 특이적인 렉틴)를 사용하는 렉틴 블롯팅을 이용하여 입증하였다.

[0511] 시알릴화된 항-HER2 항체의 PNGase F 처리에 의해 방출된 글리칸의 MALDI-TOF 분석에서는 천연 글리칸이 소량의 디시알릴화된 종과 함께 주로 모노시알릴화된 이중안테나 구조, A1F (도 27a)를 가지면서 완전히 재형성되었음을 나타냈다. 항체를 보다 다량의 α 2,6-시알릴트랜스퍼라제로 처리하면 A1F 당형태의 보다 균질한 집단을 생산하였고, 이것은 효소 활성 또는 글리칸 국제화가 완전 시알릴화를 방지할 수 있음을 제안한다. 시알산 함량은 ~ 2 mol/mol 항체인 것으로 결정되었고, 이것은 주요 당형태 중으로서 A1F 글리칸과 일치한다 (도 27b). α 2,6-연결된 시알산에 특이적인 삼부쿠스 니그라 (*Sambucus nigra*) 응집소인 SAN 렉틴을 사용한 렉틴 블롯팅으로

시알산이 α2,6-연결기 입체형태 내에 존재하였음을 확인하였다 (도 27c).

[0512] 결론적으로, 천연 단백질 글리칸은 다소 불균일하지만, 갈락토실 및 시알릴트랜스퍼라제를 통한 재형성은 단일 시알릴화되거나 완전 갈락토실화되는 이중안테나 글리칸 (A1F)을 갖는, 거의 균질한 항체를 생성한다. 각각의 분지형 글리칸 상에서 2개의 갈락토스 수용자 상에 단지 ~1개의 시알산의 도입은 종종 항체 내에 묻히는 글리칸으로부터 1개의 갈락토스의 제한된 접근성 또는 글리칸과 단백질 표면 사이의 비-공유 상호작용때문일 수 있다.

[0513] **실시예 11. 반응성 글리칸 모이어티를 함유하는 변경된 항체의 산화**

[0514] 일단 시알릴화가 입증되면, 다양한 농도의 피아이오데이트 (0.25 내지 2 mM)를 사용한 시알릴화된 항-HER2 항체의 공정내 산화를 조사하였다. 시알릴화된 항체를 먼저 5 mM EDTA를 함유하는 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) 내로 완충제-교환한 후, PBS 완충제로 완충제 교환하였다. 이어서, 완충시킨 항체 혼합물을 PBS 완충제로 예비-평형화시킨 단백질 A 세파로스 칼럼에 적용하였다. 칼럼을 15 칼럼 부피의 PBS, 5 mM EDTA를 함유하는 15 칼럼 부피의 PBS, 및 30 칼럼 부피의 PBS로 세척한 후에, 25 mM 시트레이트 포스페이트 완충제 (pH 2.9)로 용리하였다. 용리액을 이염기성 포스페이트 완충제로 즉시 중화시키고, 아미콘 울트라 (밀리포어 (Millipore))를 사용하여 항체를 농축시켰다. 정제 이후, 시알릴화된 항-HER2 항체를 30분 동안 암소에서 얼음 상에서 100 mM 아세트산 나트륨 완충제 (pH 5.6) 내에서 과아이오딘산나트륨 (시그마)으로 산화시키고, 15분 동안 얼음 상에서 3% 글리세롤을 사용하여 반응을 켜치시켰다. 생성물을 탈염시키고, 50 kDa 아미콘 상에서 5회의 초여과에 의해 100 mM 아세트산나트륨 (pH 5.6) 내로 교환하였다. 도 28a는 다양한 양의 피아이오데이트로 적정한 시알릴화된 항체의 시알산 함량 분석을 보여준다. 시알산 잔기의 완전 산화는 0.5 mM 초과 피아이오데이트 농도에서 달성되었다. 실제로, 0.5 mM 정도로 낮은 피아이오데이트 농도는 도입된 시알산을 완전히 산화시키기 위해 충분하였다. 따라서, 약물 접합을 위한 시알릴화된 항체의 산화를 위해 1 mM 농도의 피아이오데이트를 선택하였다.

[0515] 산화는 항체의 온전성에 유해한 효과를 미칠 수 있다. FcRn 결합 부위에 가까운 Fc CH3 영역 내에 위치하는, Met-252 및 Met-428을 비롯한 메티오닌 잔기의 산화는 항체 혈청 반감기를 연장시키기 위해 중요한 FcRn 결합에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Wang, W., et al. (2011) Impact of methionine oxidation in human IgG1 Fc on serum half-life of monoclonal antibodies. Mol Immunol 48, 860-6). 따라서, FcRn 상호작용을 위해 중요한 메티오닌 잔기 (예를 들어, Met-252)에 대한 피아이오데이트 산화의 잠재적인 부작용을 검사하기 위해, 시알릴화된 항체의 산화 상태를 트립신 펩티드 소화물의 LC/MS 분석에 의해 결정하였다. 상기 분석은 시알릴화된 트라스트주맙을 1 mM 피아이오데이트로 처리한 후 Met-252의 ~30% 산화 및 Met-428의 <10% 산화를 밝혔다. FcRn 결합에 대한 상기 메티오닌 산화 정도의 영향을 결정하기 위해, 각각의 항체에 대한 FcRn 결합 동역학을 표면 플라즈몬 공명 (비아코어)을 이용하여 평가하였다. 상기 분석으로 산화 상태가 FcRn 결합의 근소한 손실과 상호관련됨이 밝혀졌다 (마우스 및 인간 FcRn에 대한 Ka의 12% 및 26% 감소, 각각 도 28b 및 28c 참조). 특히, 인간 FcRn에 대한 Ka의 ~25% 감소는 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스에서 혈청 반감기에 대한 영향이 없는 것으로 보고되었고, 이것은 각각의 항체 상의 단일 무손상 FcRn 부위가 기능성 및 PK 잇점을 제공하기에 충분하기 때문이다 (Wang et al., 상기 문헌).

[0516] 요약하면, 이들 데이터는 시알릴트랜스퍼라제 처리에 의한 피아이오데이트-감수성 시알산 잔기의 도입이 훨씬 더 낮은 농도의 피아이오데이트의 사용을 허용하여, 응집 (≤1%)에 의해 평가할 때 항체-FcRn 상호작용 및 항체 온전성에 대해 최소의 부작용을 미치는 것을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 방법에 따른 시알릴화된 항체의 사용은 사용할 산화 조건의 보다 넓은 창을 제공하여, 혈청 반감기에 대한 영향없이 활성 당접합체의 재현가능한 생성을 허용한다.

[0517] **실시예 12. 반응성 이펙터 모이어티의 합성**

[0518] 본 발명의 알데히드-유도체화된 항체 당형태와의 접합을 촉진하기 위해, 후보 약물 이펙터 모이어티 (예를 들어, 모노메틸 오리스타틴 E (MMAE) 및 돌로스타틴 10 (Do110))을, 알데히드와 특이적으로 반응성인 관능기 (예를 들어, 아미노옥시-cys)를 함유하는 아미노옥시-시스타미드로 유도체화하였다.

[0519] 간단히 설명하면, 출발 물질로서 아미노옥시-시스타미드를 생성하기 위해, S-트리틸-L-시스테인아미드 (362 mg, 1 mmol)을 t-BOC-아미노옥시아세트산 N-히드록시숙신이미드 에스테르 (289 mg, 1 mmol)의 DMF 용액 3 mL에 첨가하였다. 반응은 HPLC 분석으로부터 입증될 때 3 h 후에 완료되었다. 반응 혼합물을 후속적으로 30 mL의 디클로로메탄으로 희석하고, 0.1 M 중탄산나트륨 용액 (2 X 20 mL), 물 (2 X 20 mL), 및 함수 (2 X 20 mL)로 세척하였다. 용액을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축 건조시켰다. 상기 건조시킨 잔류물에

3 mL의 TFA에 이어 150 μ L의 트리에틸실란을 첨가하였다. 생성되는 용액을 t-부틸 메틸 에테르로부터 침전시키고, 공정을 3회 반복하였다. 여과 후에, 잔류물을 감압 하에 건조시켜 205 mg의 회백색 고체를 수득하였다 (67% 수율). 화합물을 추가로 정제하지 않고 다음 단계에 사용하였다.

[0520] 아미노옥시-유도체화된 MMAE (아미노옥시-Cys-MC-VC-PABC-MMAE)를 생성하기 위해, 30.1 mg의 아미노옥시-시스타미드 (0.098 mmol, 2 eq.)을 3 mL의 DMF 내에서 64.6 mg의 MC-VC-PABC-MMAE (0.049 mmol), 및 100 μ L의 트리에틸아민과 합하였다. 생성되는 반응 혼합물을 실온에서 15분 동안 교반하였고, 이 때 HPLC 분석에 따라 반응이 완료되었다. 화합물을 조제용 HPLC에 의해 정제하여 45 mg (62%)의 목적하는 생성물을 회백색 고체로서 수득하였다. 역상 HPLC 분석은 화합물의 순도가 >96%임을 제안하였다. C73H116N14O18S에 대한 계산된 ESI (MH)⁺ 1509.8501; 실측치, m/z 1509.8469.

[0521] 아미노옥시-유도체화된 Do110 (아미노옥시-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Do110)를 생성하기 위해, 7.4 mg (0.024 mmol, 3 eq.)의 아미노옥시-시스타미드, 12 mg (0.008 mmol)의 MC-VC-PABC-PEG8-Do110 및 30 μ L 트리에틸아민을 3 mL의 DMF 내에서 합하였다. HPLC 분석에 따라 반응은 15분 이내에 완료되었다. 조제용 HPLC 정제로 6.2 mg (46%)의 목적하는 생성물을 회백색 고체로서 수득하였다. 역상 HPLC 분석은 화합물의 순도가 >96%인 것을 제안하였다. C80H124N16O19S2에 대한 계산된 ESI (MH)⁺ 1678.0664; 실측치, m/z 1678.0613.

[0522] **실시예 13. 반응성 이펙터 모이어티의 시알산-매개 (SAM) 접합**

[0523] 탈염 이후, 실시예 11의 약물-링커를 75% DMSO 내에서 25 mM의 농도로 실시예 10의 산화된 시알릴화된 항체와 합하여 약물-링커 대 항체의 24:1 몰비 및 5 mg/ml의 최종 항체 농도를 달성하였다. 혼합물을 실온에서 철야 인큐베이션하였다. 비포함된 약물-링커 및 임의의 유리 약물을 바이오비드 (BioBead)를 사용하여 제거하였다. 생성물을 PD-10 칼럼을 사용하여 히스티딘-트윈 (Tween) 완충제 내로 완충제-교환하고 멸균 여과하였다. 내독소 수준을 결정하였고, 생체내 연구를 위해 0.1 EU/mg ADC를 달성하였다.

[0524] 도 29A-C는 AO-MMAE에 당접합된 상이한 시알릴화된 항체 (항 FAP B11 및 G11, 및 실시예 11의 항-HER2 항체)의 소수성 상호작용 크로마토그래프 (HIC)를 보여준다. 시알릴화된 HER2 항체를 또한 약물-링커 AO-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Do110과 접합시켰다 (도 29D). 상기 분석은 1.3-1.9 범위의 약물-대-항체비 (DAR)를 갖는, 항체당 주로 1 또는 2개의 약물 접합체가 존재함을 밝혀주었다. MMAE 당접합체 (도 29C)에 비해 Do110 당접합체 (도 29D)의 증가한 체류 시간은 아마도 Do110의 보다 큰 소수성 때문일 것이다.

[0525] 30 mg 규모에서 2개의 상이한 약물-링커 (AO-MMAE 또는 AO-PEG8-Do110)와 접합된 항-HER 항체를 사용하여 LC-MS 분석을 또한 수행하였다. 상기 분석은 접합 이후 1.7 및 1.5의 유사한 DAR 값을 보여주고, 이것은 HIC 분석과 대등하였다. 크기-배제 크로마토그래피 (SEC)는 이들 접합체 내에 매우 낮은 수준 (1%)의 응집체를 보여주었다.

[0526] 천연 (야생형) 시알릴화된 항체에 추가로, 조작된 글리코실화 부위에 N-연결된 비-천연 (조작된) 글리칸을 함유하는 시알릴화된 항체에 대한 이펙터 모이어티의 당접합을 또한 조사하였다. 도 30b는 조작된 글리코실화 부위 A114N에 존재하는 조작된 글리칸을 통해 아미노옥시-유도체화된 MMAE 독소 (AO-MMAE; 도 30a)에 성공적으로 접합된 시알릴화된 항체의 HIC 크로마토그래프를 보여준다. 약 60%의 시알릴화된 항체가 MMAE 세포독소에 성공적으로 당접합되었다. 따라서, 상기 분석은 본 발명의 당접합 방법이 결합 폴리펩티드의 야생형 및 조작된 글리칸에 모두 적용될 수 있음을 확인한다.

[0527] **실시예 14. 시험관내 ADC 세포 증식 검증**

[0528] 본 발명의 항-HER 및 항-FAP 당접합체 분자의 시험관내 활성을 또한 티올 연결을 통해 동일한 공여자 항체의 힌지 영역 시스테인에 연결된 동일한 약물 모이어티를 함유하는 상응하는 티올 접합체와 비교하였다. 티올 접합체는 당접합체보다 항체당 약물 (DAR)의 수가 약 2배였다. 티올-기반 접합은 문헌 [Stefano et al. (Methods in Molecular Biology 2013, in press)]에 기재된 바와 같이 수행하였다. 이어서, Her2+ SK-BR-3 및 Her2-MDA-MB-231 세포주를 사용하여 각각의 ADC의 상대적인 효능을 평가하였다. 상기 분석의 결과를 아래 표 15에 제시한다.

[0529] <표 15>

[0530] 당접합체 및 티올 접합체의 EC₅₀ 비교

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

[0531]

[0532] 주의: LC-MS에 의해 결정된 *DAR; HIC에 의해 결정된 **DAR.

[0533] 도 31은 항-HER 당접합체 및 그의 상대물 티올 접합체의 시험관내 효능의 비교를 보여준다. 세포 생존성을 Her2 항원 발현 (SK-BR-3) 세포 (도 31a 및 31c) 또는 비-발현 (MDA-MB-231) 세포 (도 31b 및 31d)에 대한 접합체의 72 hr 노출 이후 결정하였다. ADC는 글리칸 ("glyco")에 또는 통상의 화학에 의해 힌지 영역 시스템인 ("thiol")에 연결된 MMAE 또는 PEG8-Dol10을 함유하였다. 도 30a 및 30c에 제시된 바와 같이, 당접합체에 비해 티올 접합체에 대해 ~2배 더 낮은 EC₅₀이 관찰되었고, 이것은 당접합체보다 티올 접합체의 2배 더 높은 DAR과 일치한다. 100 µg/ml까지 임의의 항체를 사용하여 Her2-세포주에서 독성은 관찰되지 않았다.

[0534] 결장암, 췌장암 및 유방암을 비롯한 상피암에서 반응성 기질 섬유모세포에 의해 고도로 발현되는 종양 항원 (FAP)에 대한 항체를 사용하여 제조된 ADC에 대해 세포 증식에서 유사한 경향이 또한 관찰되었다 (Teicher, B.A. (2009) Antibody-drug conjugate targets. Curr Cancer Drug Targets 9, 982-1004). 이들 접합체는 다시 아미노옥시 MMAE 약물-링커 또는 말레이미도 MMAE 약물-링커를 글리칸 또는 티올기에 접합시킴으로써 제조되었다. 이들 접합체의 세포 증식 검정은 티올 접합체의 EC₅₀이 도 32에 도시된 바와 같이 FAP 발현이 결여된 동일한 세포보다 인간 FAP로 형질감염된 CHO 세포에 대해 ~100배 더 큰 효능을 가졌음을 보여주었고, 여기서 도 32는 항 FAP B11 당접합체 및 티올 접합체의 시험관내 효능의 비교를 보여준다. 세포 생존성은 FAP 항원을 사용하여 또는 사용하지 않고 형질감염시킨 CHO 세포에 대한 접합체의 노출 이후 결정하였다. ADC는 글리칸 ("glyco")에 또는 통상의 화학에 의해 힌지 영역 시스템인 ("thiol")에 연결된 MMAE를 함유하였다. 당접합체에 비해 티올에 대한 ~2배 더 낮은 EC₅₀은 표적 결합 및 항원 발현 CHO 세포에서 내재화에 대해 유사한 효능을 가정하여 항체당 전달된 약물의 상대적인 양과 일치함에 주목한다. 이와 함께, 이전에 설명된 바와 같이 1.5의 DAR을 갖는 항 FAP (B11) ADC의 당접합체를 검정하였고, 비교물질 티올 접합체 (DAR 3.3)보다 ~2배 더 높은 EC₅₀을 보여주었다.

[0535] 요약하면, 절단가능한 링커를 사용하는 글리칸을 통한 약물의 부위-특이적 접합은 상이한 항체 및 상이한 약물-링커를 사용하여 입증된 바와 같이 통상적인 티올-기반 접합체와 동등한 독성 및 시험관내 효능을 갖는 ADC를 생산한다. 더욱이, 2 mM 피라이오데이트 미만에서, 약물 접합의 수준은 시알산의 환원과 상호관련된다. 피라이오데이트 농도를 2 mM을 초과하여 증가시키면 시알산의 산화 형태로 완전한 전환으로부터 예상되는 바와 같이 이익이 적다. 그러나, 모든 조건 하에, 항체당 약물의 수는 시알산 함량보다 다소 더 낮고, 이것은 산화된 시알산의 일부가 유사하게 묻히거나 달리 약물-링커의 부피에서 기인한 입체 장애 때문에 커플링을 위해 이용가능하지 않을 수 있음을 나타낸다.

[0536] **실시예 15. 항체 약물 접합체의 생체내 특성화**

[0537] 항-HER 당접합체의 효능을 또한 Her2+ 종양 세포 이종이식편 방식으로 평가하고, ~2배 더 높은 DAR을 갖는 티올 접합체 비교물질과 비교하였다. 누드 마우스에게 SK-OV-3 Her2+ 종양 세포를 이식하였고, 이를 치료 개시에 앞서 ~150 mm³의 종양을 확립하도록 허용하였다. 3 또는 10 mg/kg 용량의 ADC를 제38, 45, 52 및 59일에 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 군당 ~10마리 마우스가 존재하였다. 상이한 군 내의 마우스의 종양 부피를 측정하고,

그들의 생존을 기록하였다. 생존 곡선을 카플란-마이어 (Kaplan-Meier) 방법에 기반하여 그렸다.

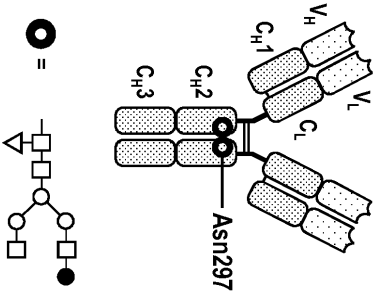
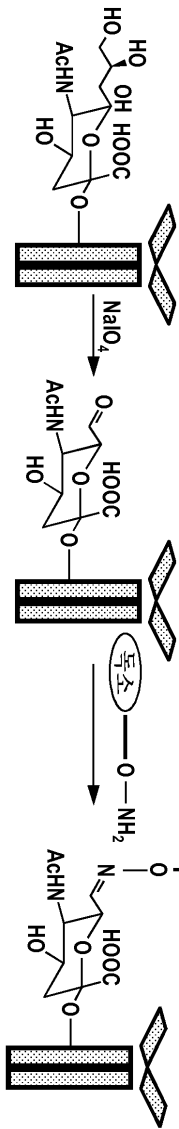
[0538] 도 33은 Her2+ 종양 세포 이중이식편 모델에서 항-HER 당접합체 및 티올 접합체의 생체내 효능의 비교를 보여준다. SK-OV-3 Her2+ 종양 세포를 이식한 누드 마우스에게 당접합체 또는 ~2배 더 높은 DAR을 갖는 티올 접합체 비교물질을 함유하는 MMAE (도 33a 및 33b) 및 PEG8-Dol10 (도 33c 및 33d)를 투여하였다. MMAE 접합체의 종양 성장 동역학을 도 33a에 제시한다. 본 경우에, 당접합체는 네이키드 항체 단독 (흑색)보다 유의하게 더 높지만 ~2배 더 높은 DAR을 갖는 티올 접합체 비교물질 (초록색)보다 적은 효능을 보여주었다. MMAE 당접합체는 유의한 종양 관해 및 종양 성장의 ~20일 지연 (도 33a)과 제1 용량으로부터 생존 시간의 ~2배 증가 (도 33b)를 보여주었다. 티올 MMAE 접합체는 동일한 용량의 ADC (10 mg/kg)에서 거의-완전한 종양 억제를 보여주었다.

[0539] PEG8-Dol10 당접합체 ("Glyco Dol10") 및 ~2배 더 높은 DAR을 갖는 티올 접합체 비교물질 ("Thiol Dol10")의 생체내 효능을 또한 동일한 Her2+ 종양 세포 이중이식편 모델에서 결정하였다. 두 접합체는 모두 이전에 설명된 바와 같이 MMAE 접합체보다 더 낮은 효능을 보여주었다. 그러나, 아미노옥시-PEG8-Dol10 당접합체 ("Glyco Dol10")는 10 mg/kg에서 종양 성장의 15-일 지연 (도 33c) 및 제1 투여 이후 생존 시간의 ~20일 (1.7배) 증가 (도 33d)를 보여주었다. 티올 접합체는 생존의 2배 증가를 보여주어, 동일한 용량에서 더 효과적이었다. 보다 저용량 (3 mg/kg)에서, 티올 접합체는 10 mg/kg에서의 당접합체보다 더 낮은 효능을 보여주었다. 상기 용량은 당접합체에 대해 110 μ mol PEG8-Dol10 약물/kg 용량에 비해 80 μ mol PEG8-Dol10 약물/kg 용량에 상응한다.

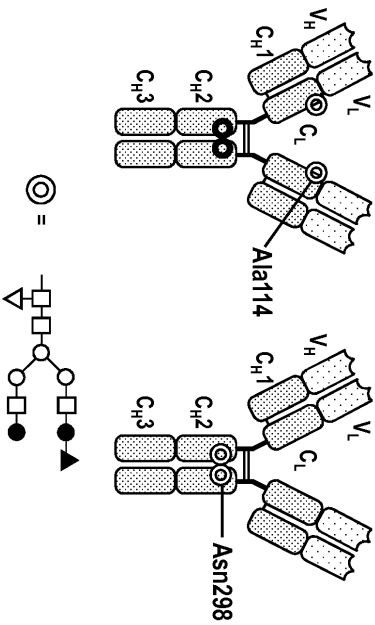
[0540] 이들 데이터는 항체 글리칸의 시알산 상에 약물의 부위-특이적 접합이 티올-기반 화학을 통해 생성된 ADC와 대등한 효능을 갖는 분자를 제공함을 입증한다. 다소 더 낮은 생체내 효능은 아마도 각각의 항체-결합된 항원의 내재화에 의해 종양 세포 내로 각각의 항체에 의해 보다 적은 수의 약물이 운반되는 것으로부터 기인할 것이다. 본 발명자들은 이들 당접합체를 동일한 DAR의 티올 접합체와 비교하지 않았지만, 대등한 수준의 투여된 약물을 나타내는 2가지 ADC의 상이한 용량에서 관찰된 효능이 당접합체가 그들의 티올 상대물과 대등한 고유한 효능을 가짐을 보여주고, 이것은 상기 부위에서 접합의 유해한 효과가 없음을 나타낸다. 더욱이, 단지 28% 더 많은 약물을 도입한 10 mg/kg 용량의 Dol10 당접합체는 티올 접합체 (3 mg/kg에서)에 비해 생존의 2배 증가를 제공하였고, 이것은 이들 접합체가 심지어 동일한 DAR에서 뛰어난 효능을 제공할 수 있음을 제안한다. 천연 글리칸에서 시알산 함량의 겉보기 제한을 고려하면, 분지형 약물 링커의 사용 또는 추가의 글리코실화 부위의 도입 및 동일한 방법을 사용하는 것을 비롯한 많은 상이한 전략에 의해 보다 많은 약물 로딩이 달성될 수 있다.

도면

도면1

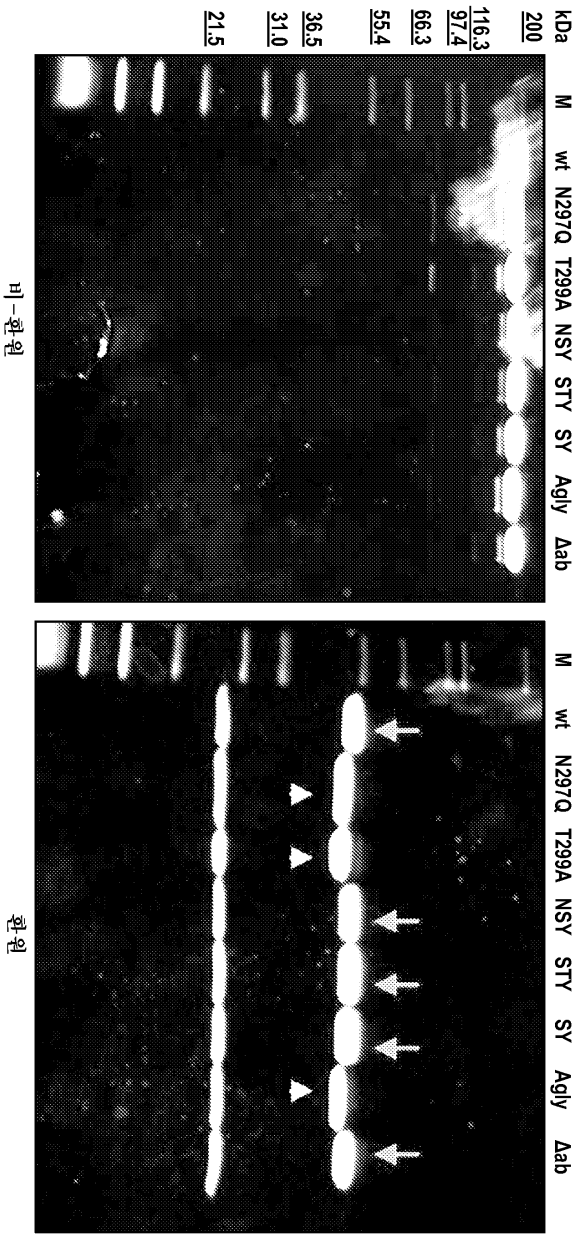


존재하는 탄수화물

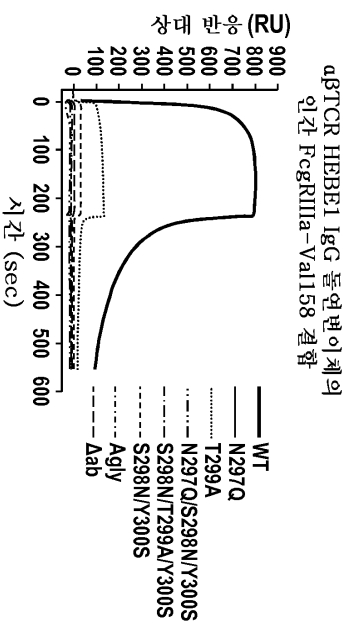


조작된 글리코실화 부위

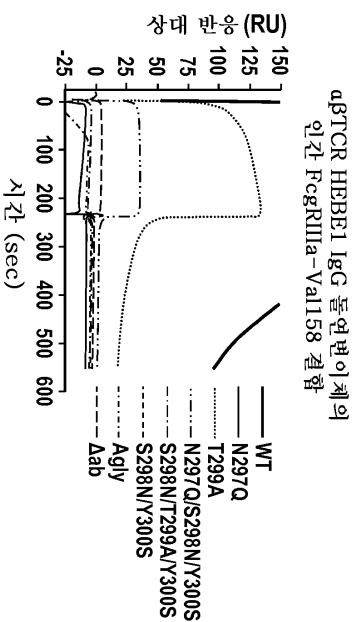
도면2



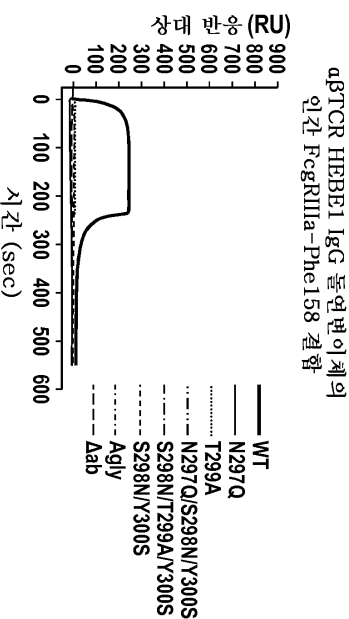
실물규모 : CD16a-Va1158



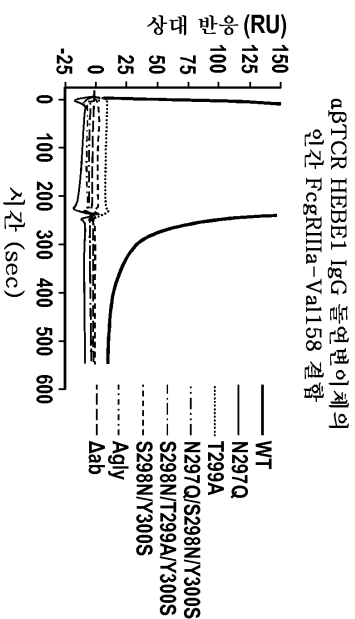
중규모 :



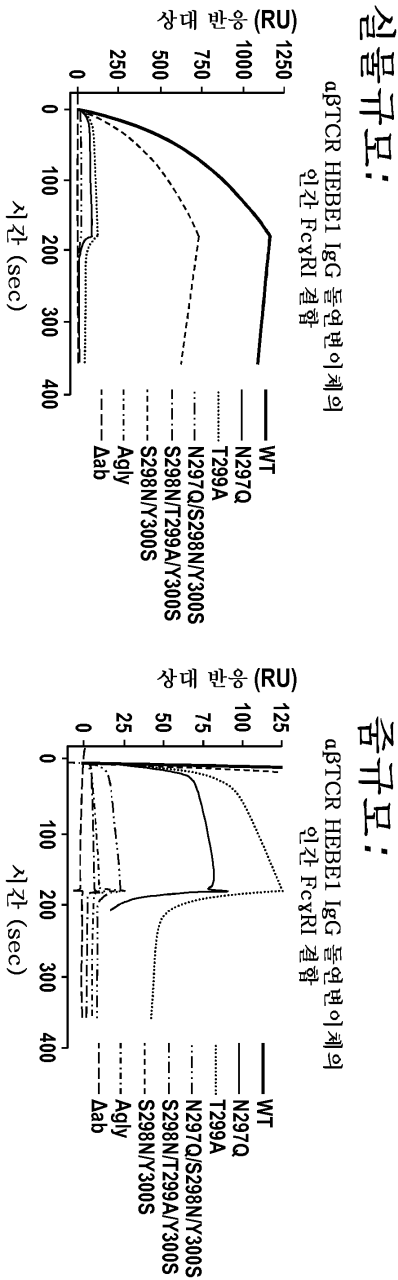
실물규모 : CD16a-Phe158



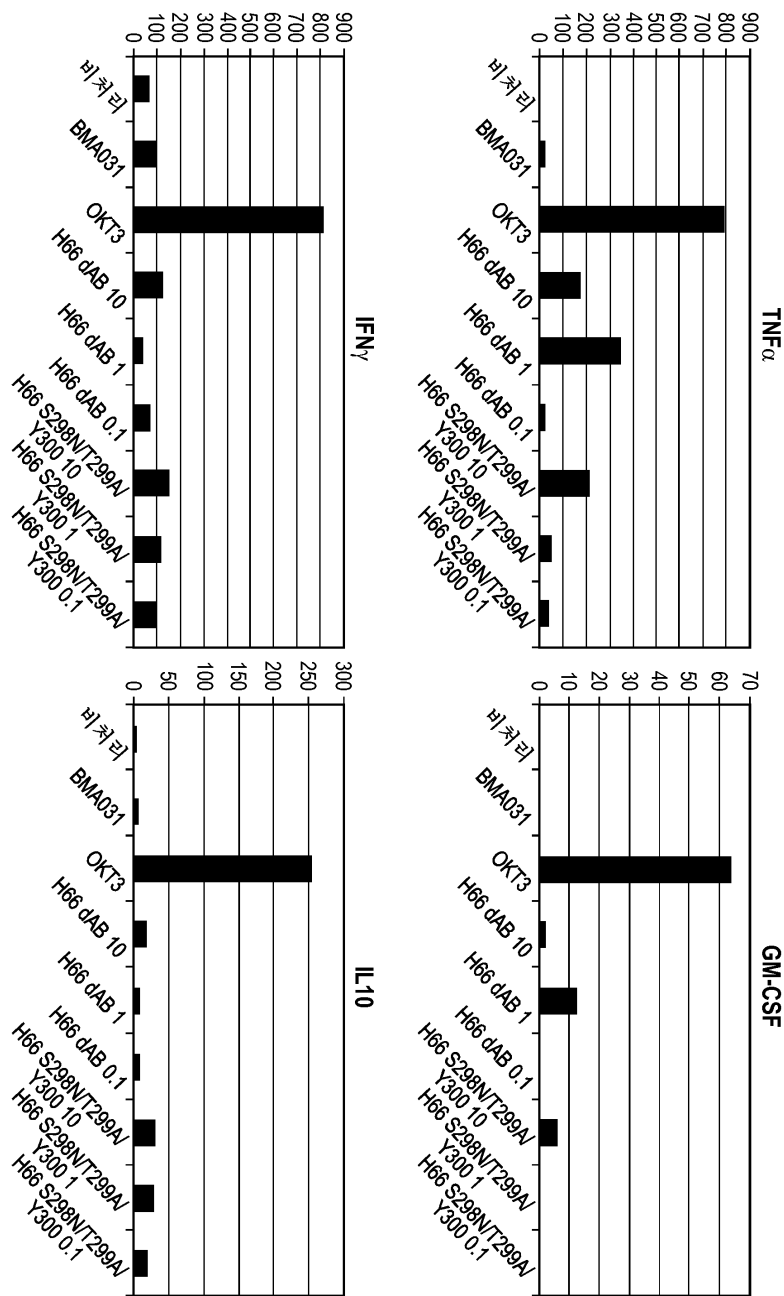
중규모 :



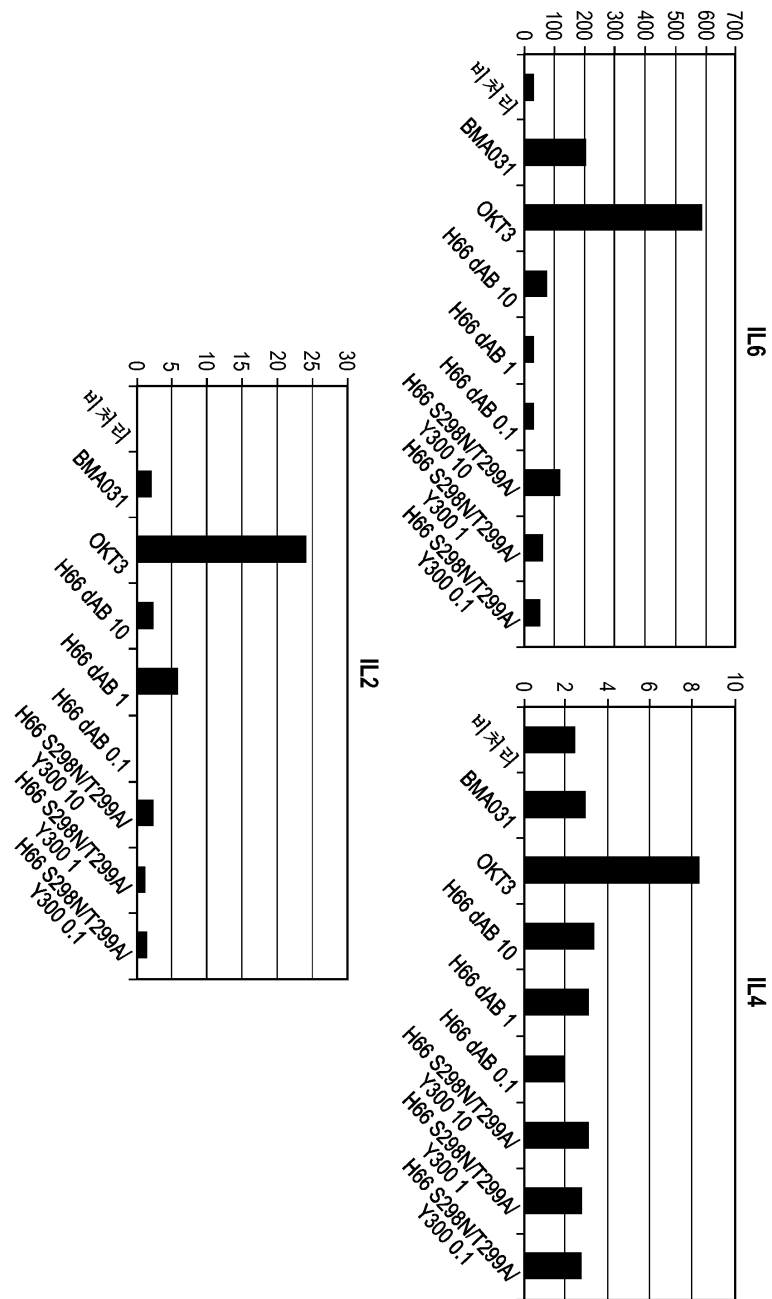
도면4



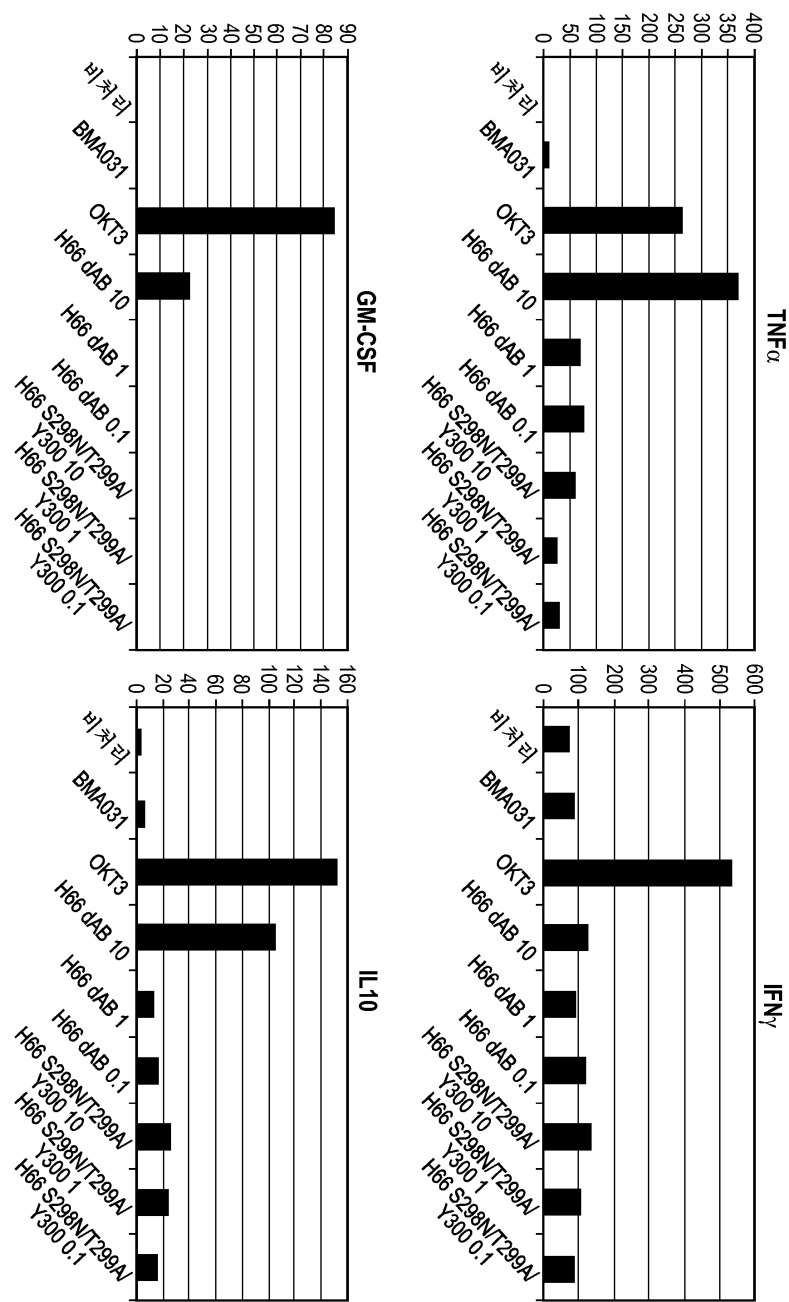
도면5



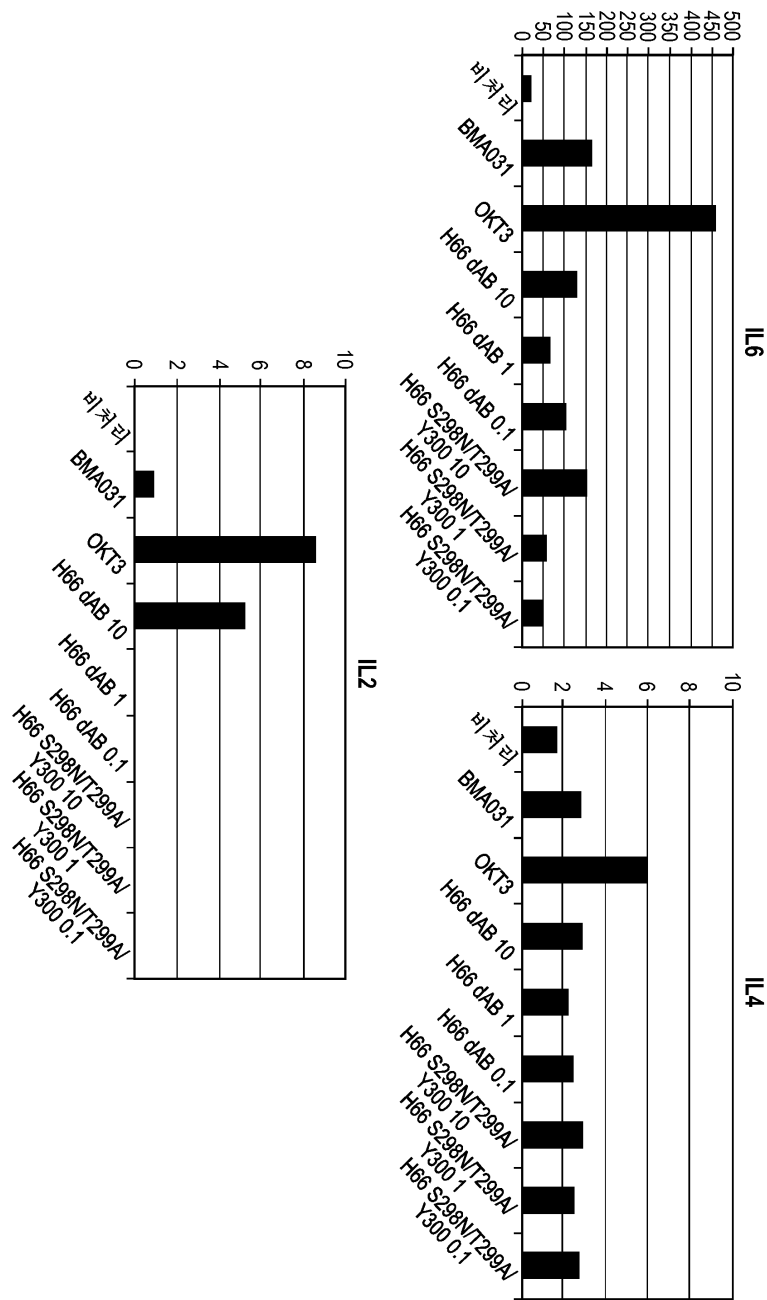
도면6



도면7



도면8



도면9a

웨스턴 블롯

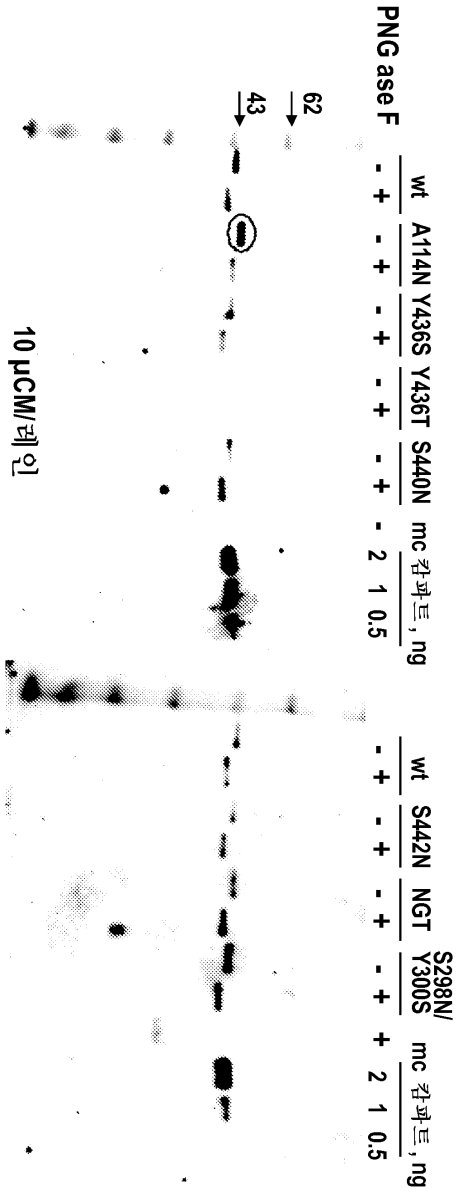


도면9b

비아코어

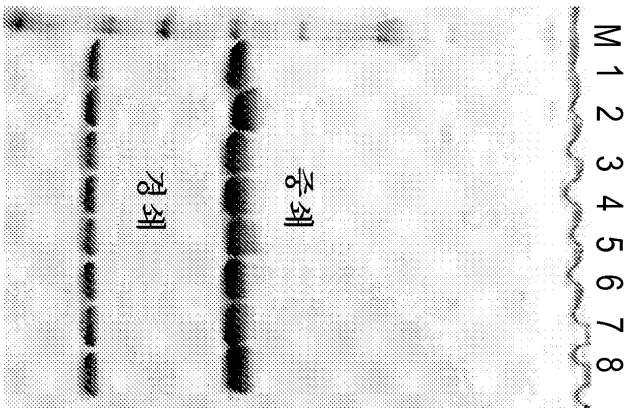
미지	농도 (μ g/mL)	상대 반응 (RU)	계산된 농도 (M)	계산된 농도 (μ g/mL)
배지 내의 2C3	3.00	855.75	2.45E-08	3.669
배지 내의 2C3	3.00	860.96	2.47E-08	3.710
배지 내의 2C3	3.00	866.89	2.51E-08	3.758
A114N		146.5	1.60E-09	0.240
모의		87.84	8.62E-10	0.129
NGT		124.52	1.30E-09	0.196
S298N/Y300S		112.14	1.15E-09	0.172
S440N		146.36	1.60E-09	0.240
S442N		121.21	1.26E-09	0.189
WT (Katya)		148.41	1.63E-09	0.244
WT (Tim)		148.08	1.62E-09	0.244
Y436S		158.72	1.78E-09	0.267
Y436T		84.27	8.23E-10	0.123
인큐베이션된 배지		87.38	8.57E-10	0.129

도면10

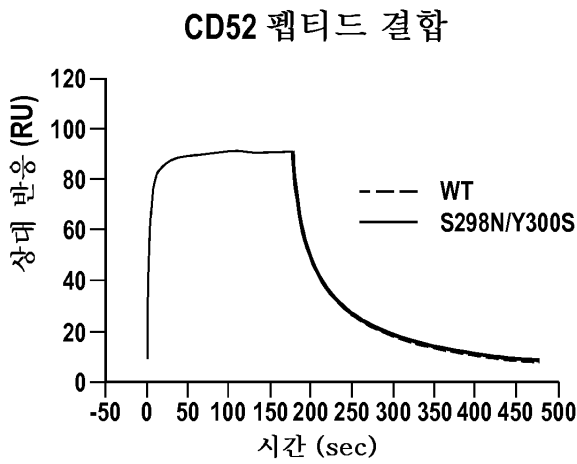


도면11

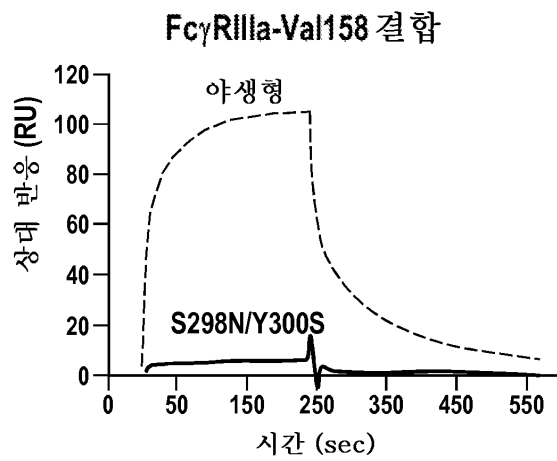
레인	돌연변이체	mg/ml
1	wt	2.66
2	A114N	2.99
3	Y436S	1.61
4	S298N/Y300S	0.99
5	Y436T	0.41
6	S440N	1.21
7	S442N	1.62
8	NGT	2.21



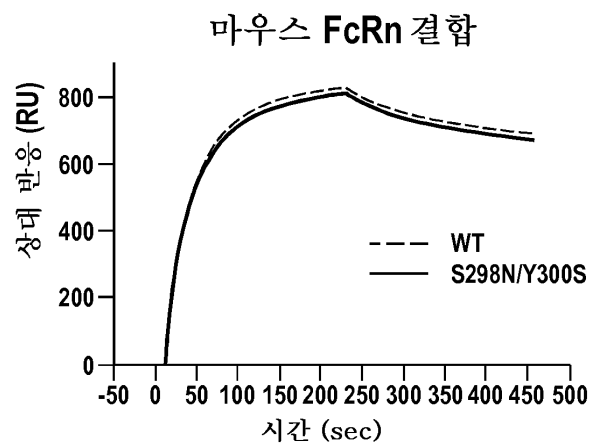
도면12a



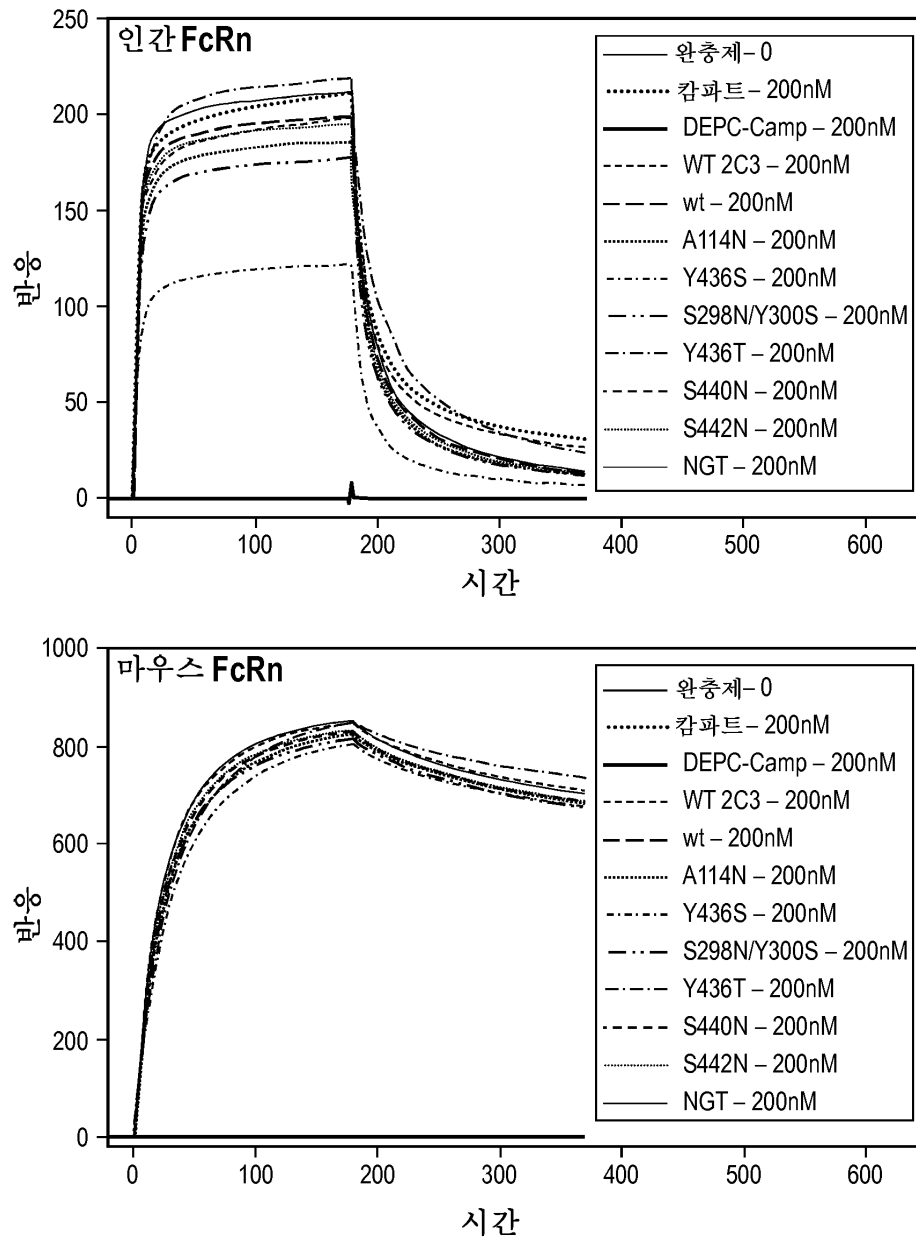
도면12b



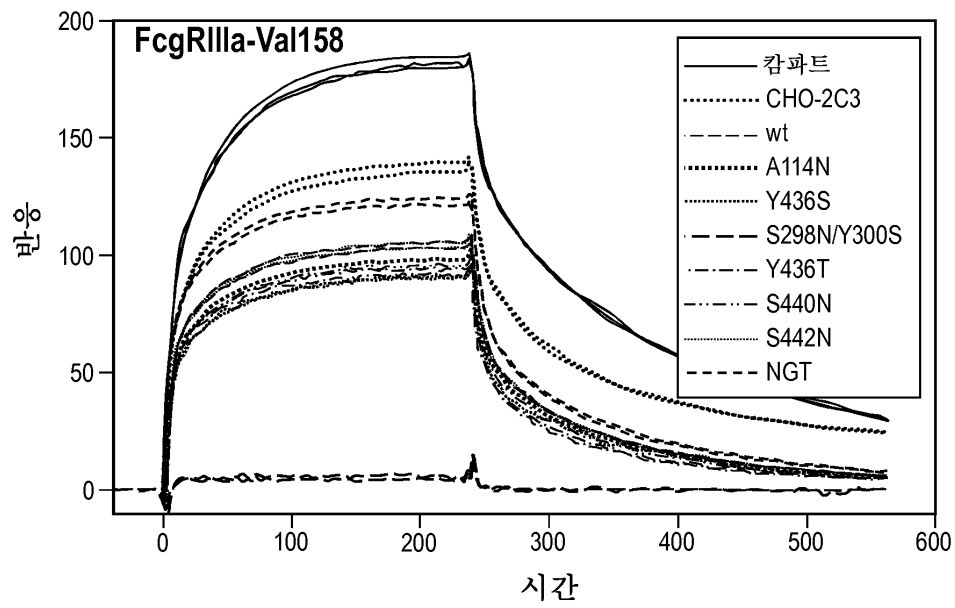
도면12c



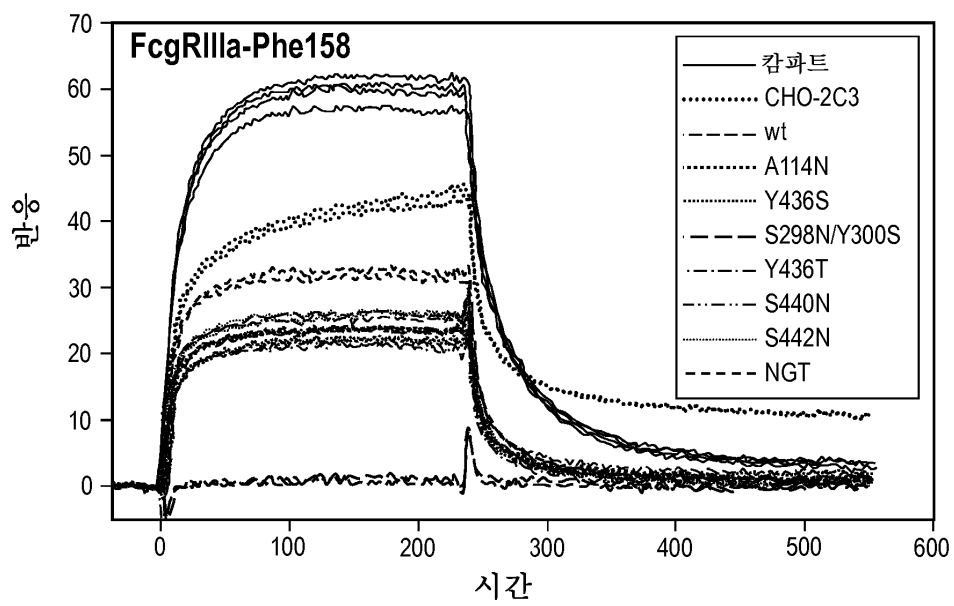
도면13



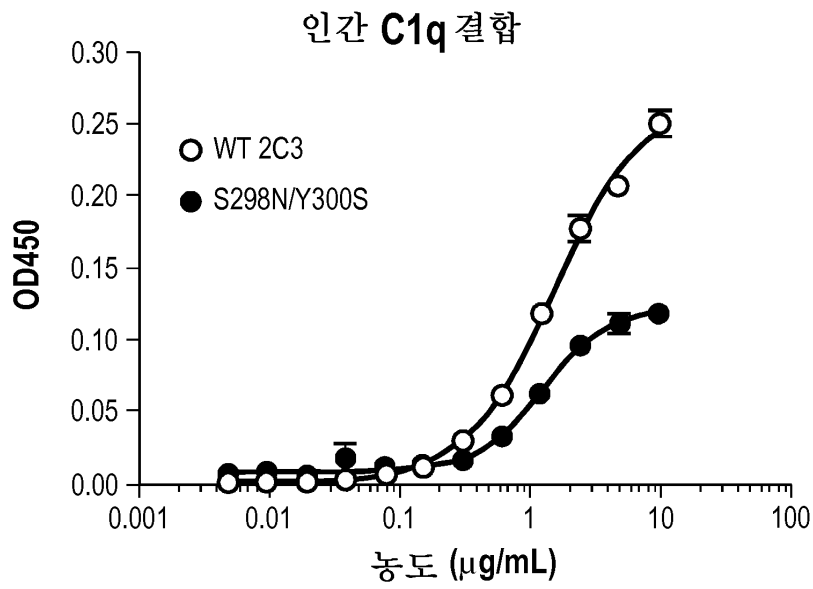
도면14a



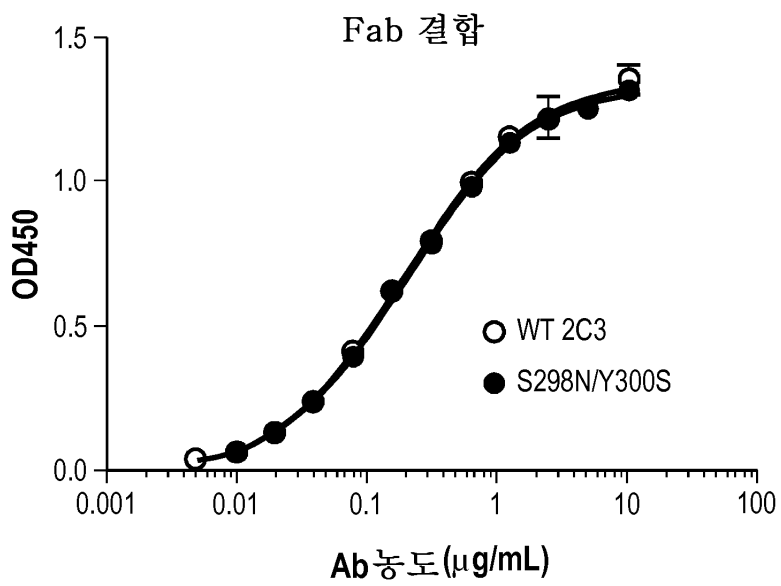
도면14b



도면15a



도면15b



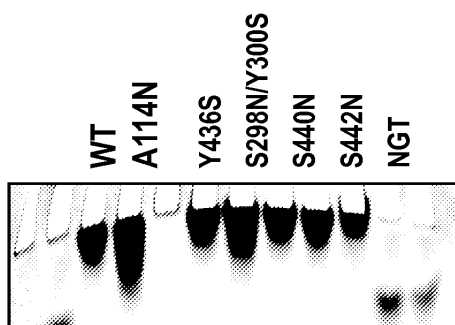
도면16

샘플	k_a ($\times 10^6/\text{Ms}$)	k_d ($\times 10^{-2}/\text{s}$)	R_{max} (RU)	K_D (nM)
GLDS2	7.0	1.7	67.0	2.44
WT 2C3	6.0	1.1	64.2	1.75
A114N	4.7	1.1	59.5	2.45
Y436S	5.9	1.0	66.9	1.73
S298N/Y300S	5.7	1.0	63.3	1.80
Y436T	4.8	0.9	65.7	1.95
S440N	5.8	1.1	66.8	1.84
S442N	5.7	1.1	66.2	1.85
NGT	7.9	1.1	70.2	1.35

도면17

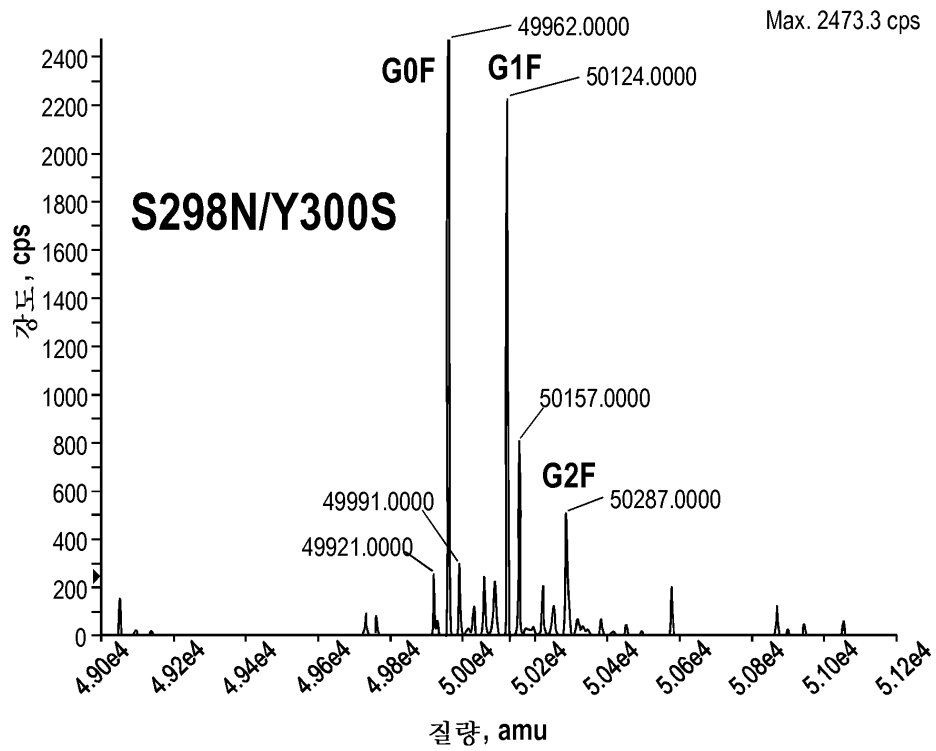
샘플	K_{on} ($\times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	K_{off} ($\times 10^{-2} \text{s}^{-1}$)	K_D (nM)
WT 2C3	5.2	1.1	2.1
A114N	5.3	1.3	2.4

도면18a

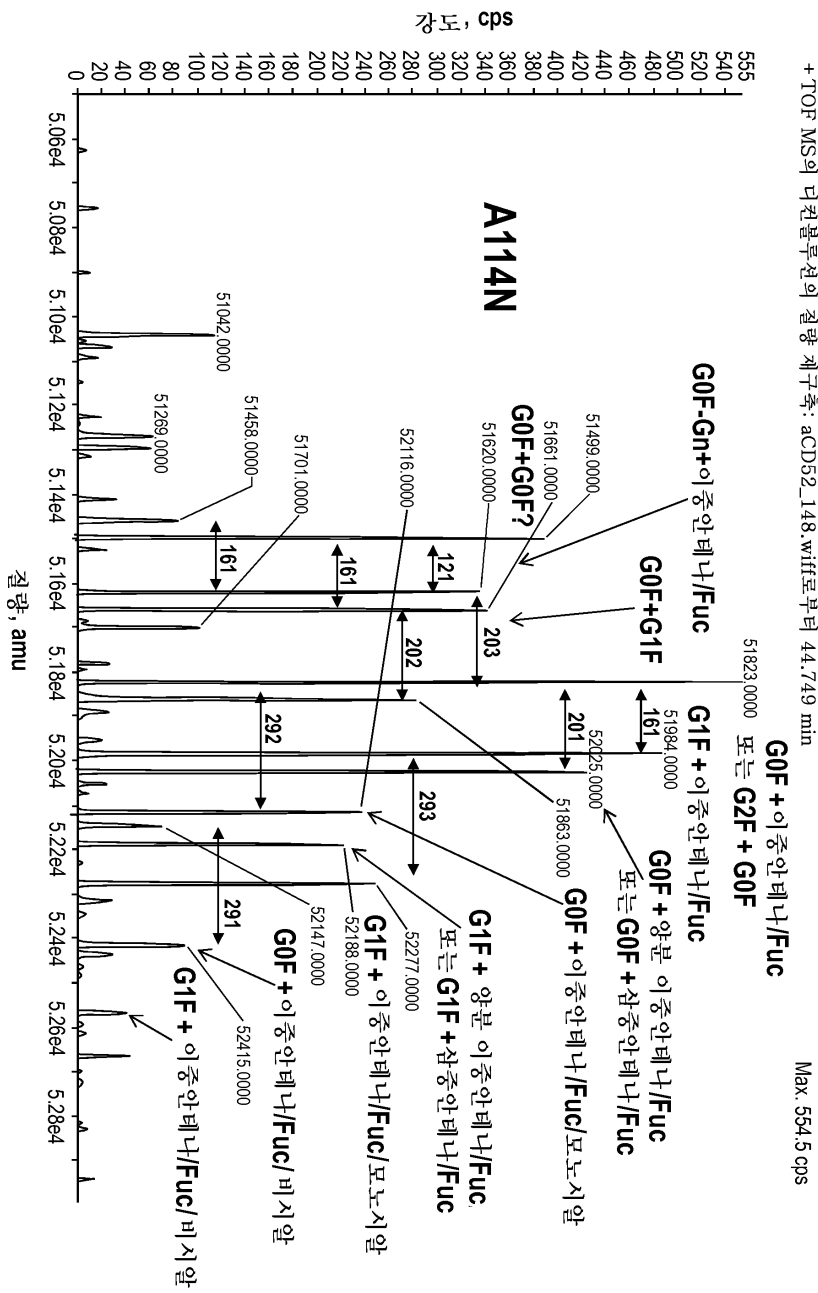


도면18b

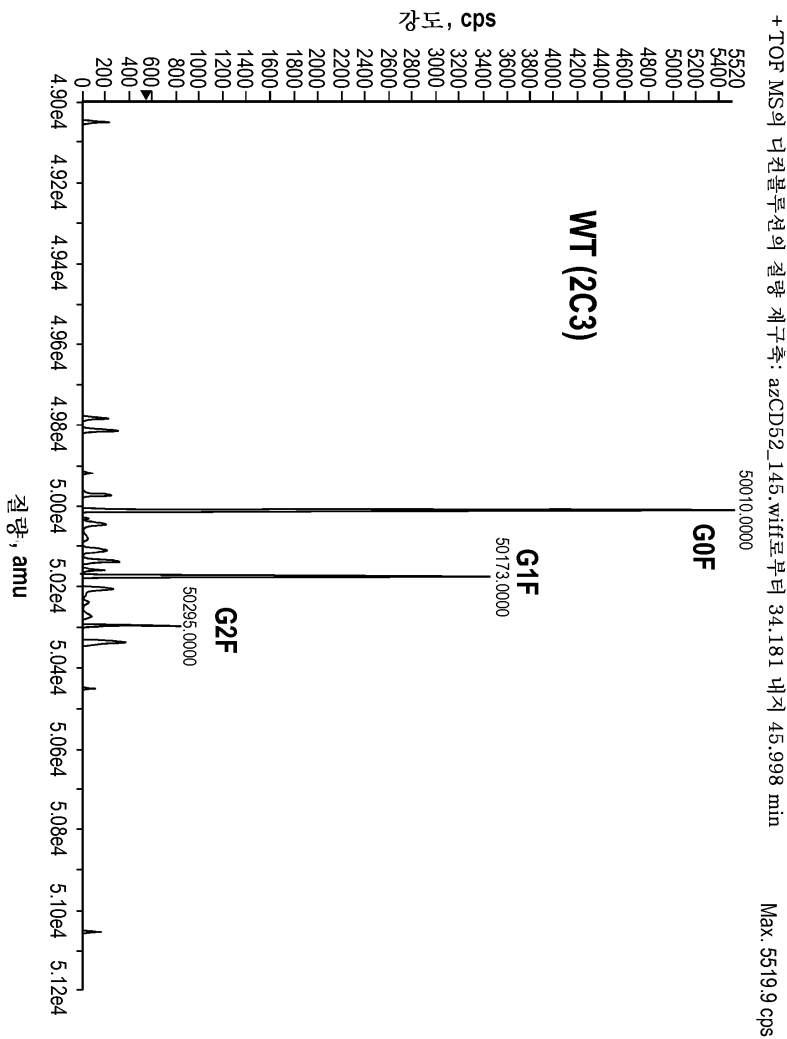
+ TOF MS의 디컨볼루션의 질량 재구축: aCD52_147.wiff로부터 34.114 내지 45.998 min



도면18c



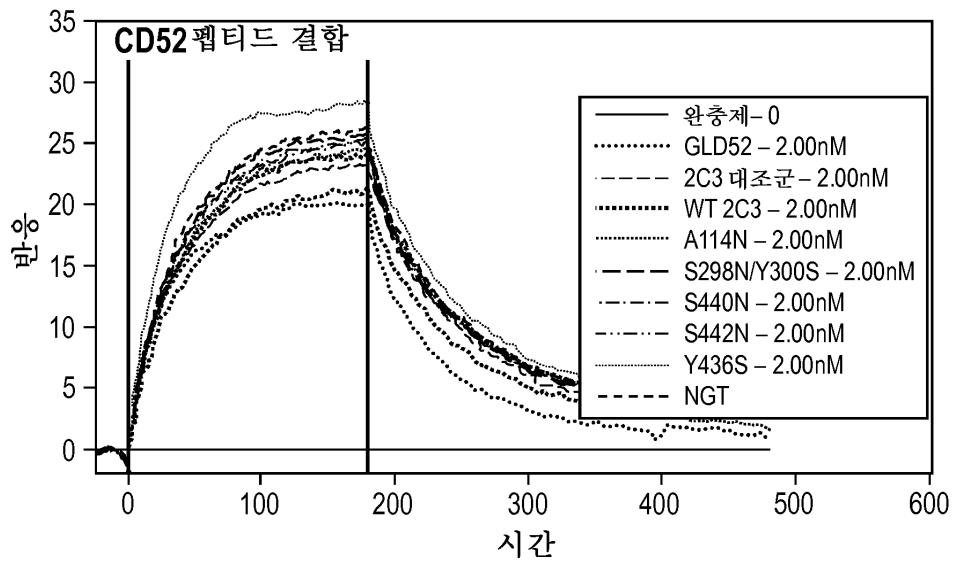
도면18d



도면19a

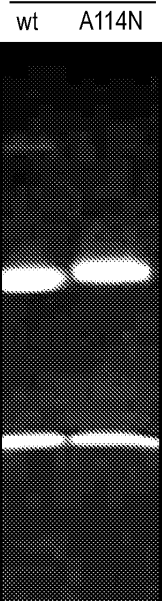
샘플	로트#	옥텟 농도 (μg/mL)
모의 배지	11/23/2009	너무 낮음
wt 2C3	11/23/2009	2.54
A114N	11/23/2009	2.83
S298N/Y300S	11/23/2009	1.36
S440N	11/23/2009	1.32
S442N	11/23/2009	1.21
Y436S	11/23/2009	1.92
Y436T	11/23/2009	0.34
NGT	11/23/2009	1.90

도면19b



도면20

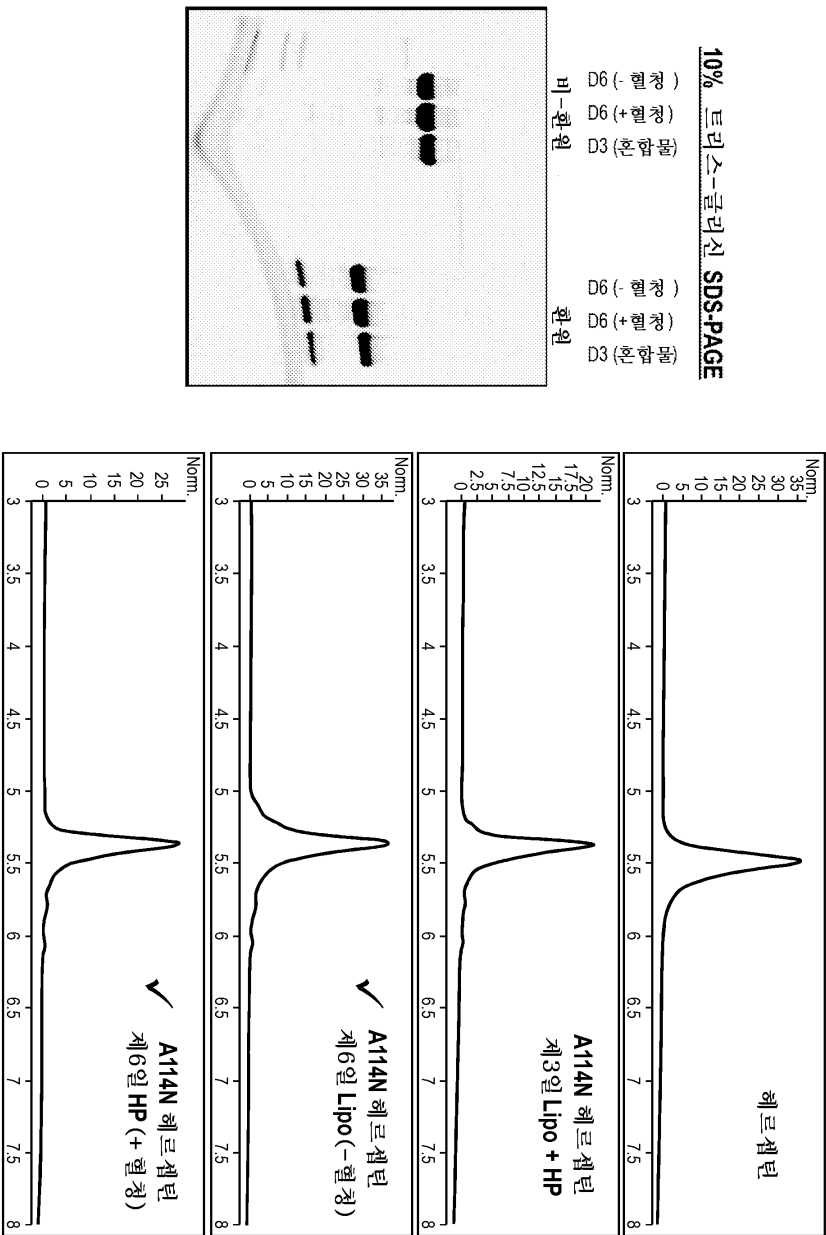
항-TEM1



⇒ 과글리코실화된 중쇄
중쇄

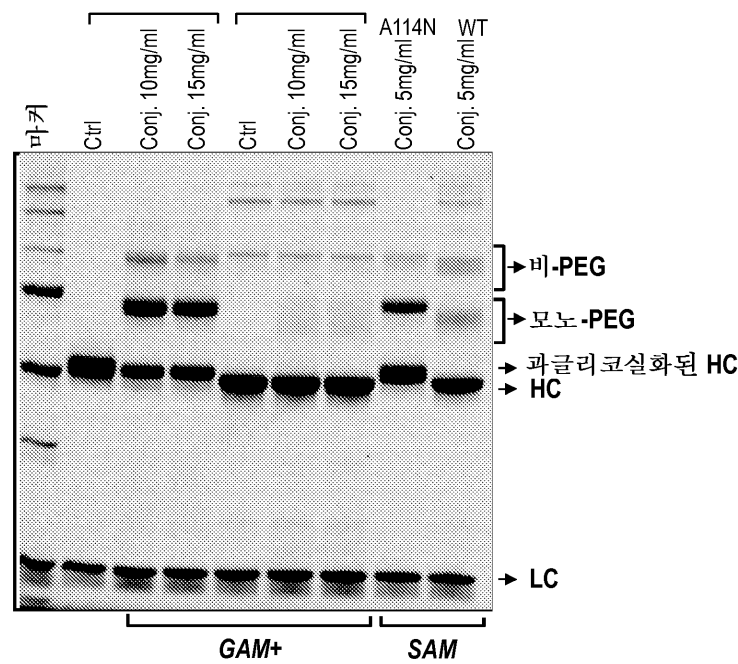
→ 경쇄

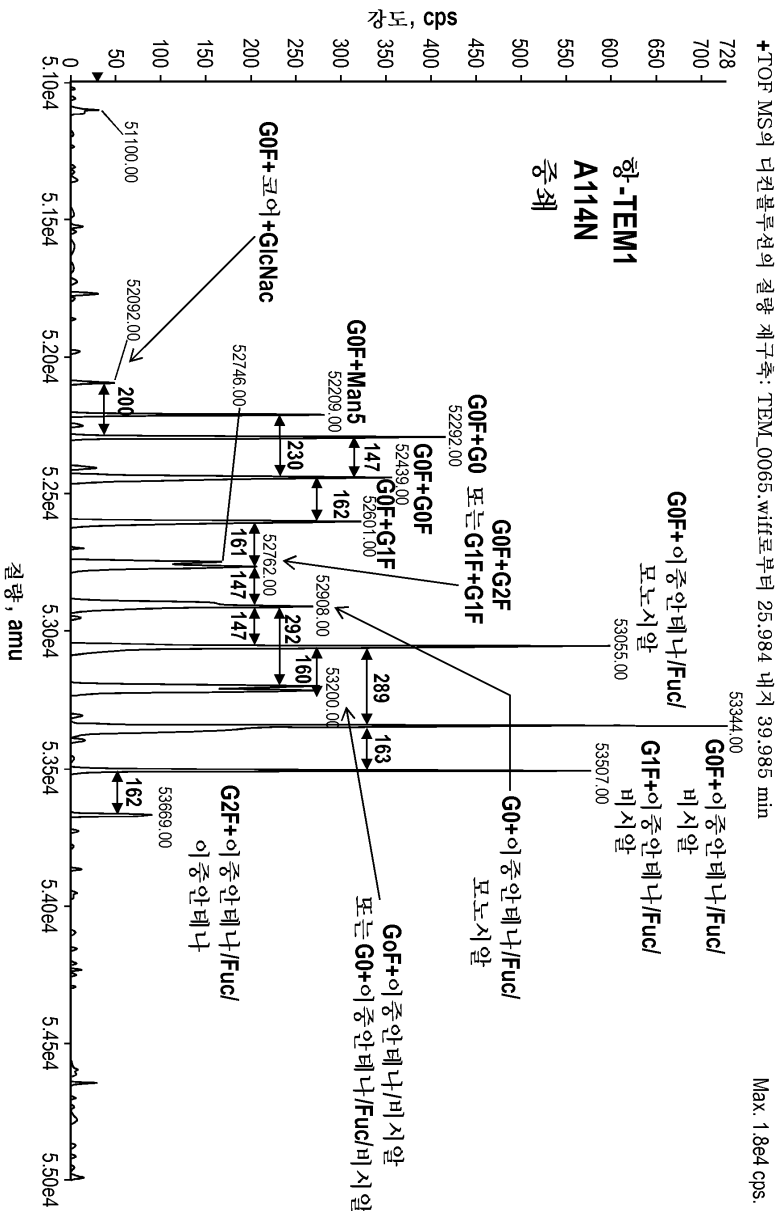
정제된 A114N 헤르셉틴의 HIC 분석



도면21

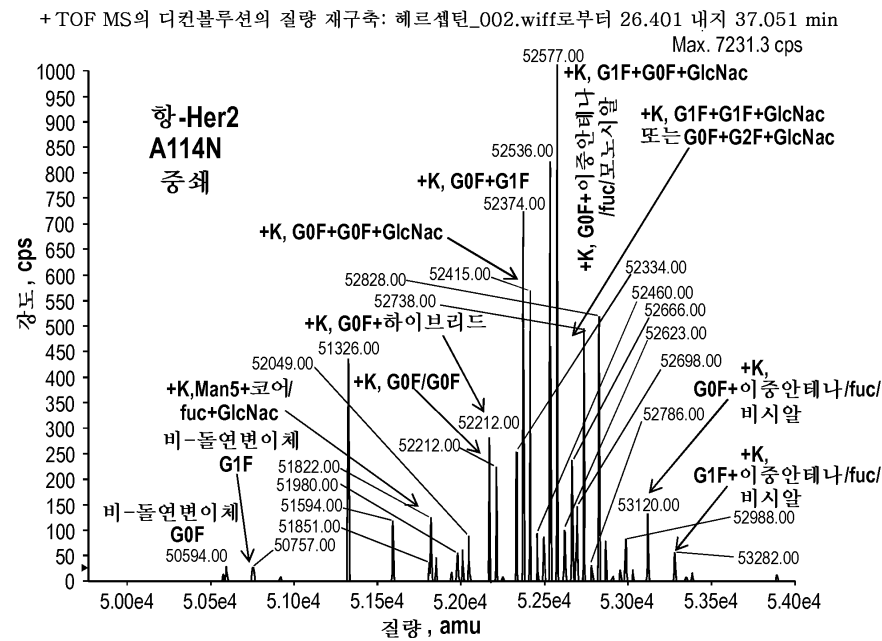
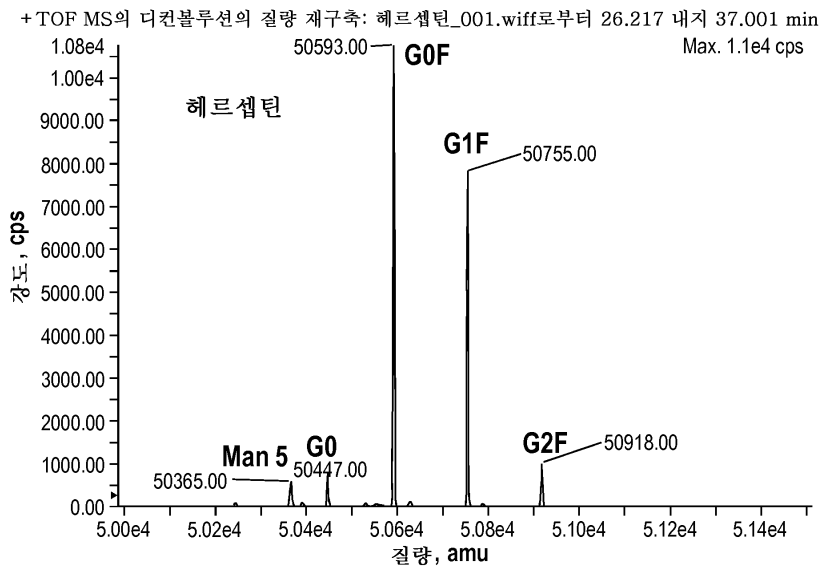
도면22



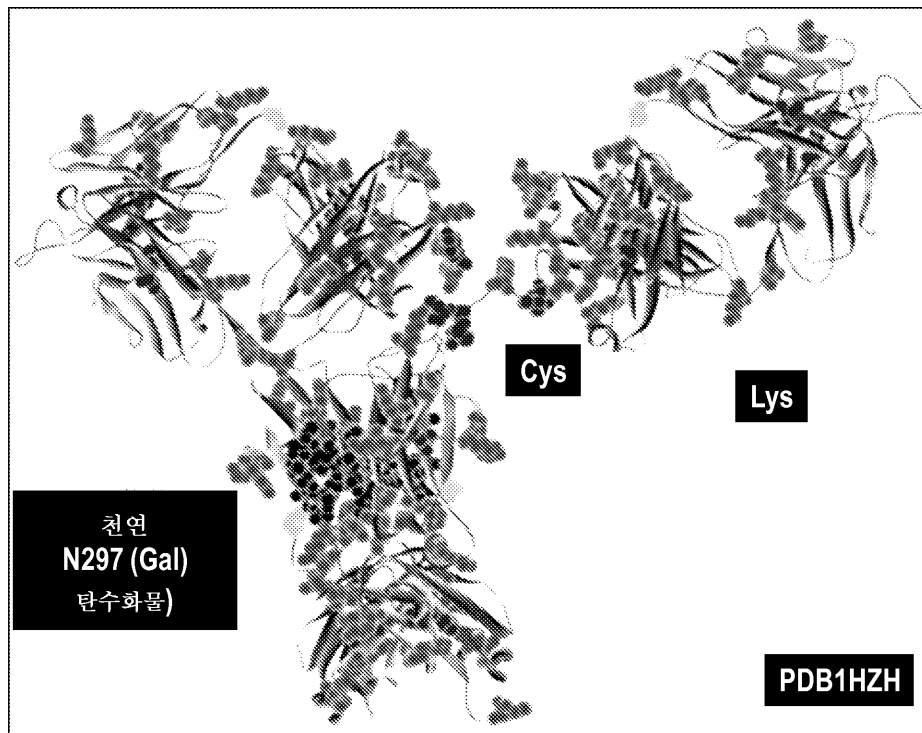


도면23

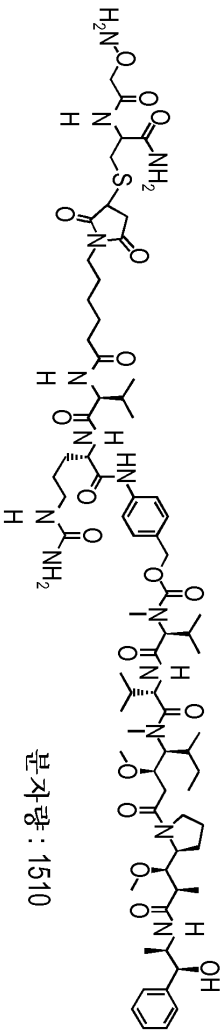
도면24



도면25a

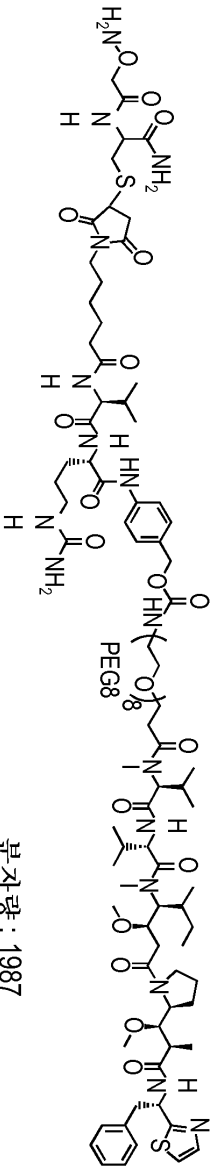


아미노옥시-Cys-MC-VC-PABC-MMAE



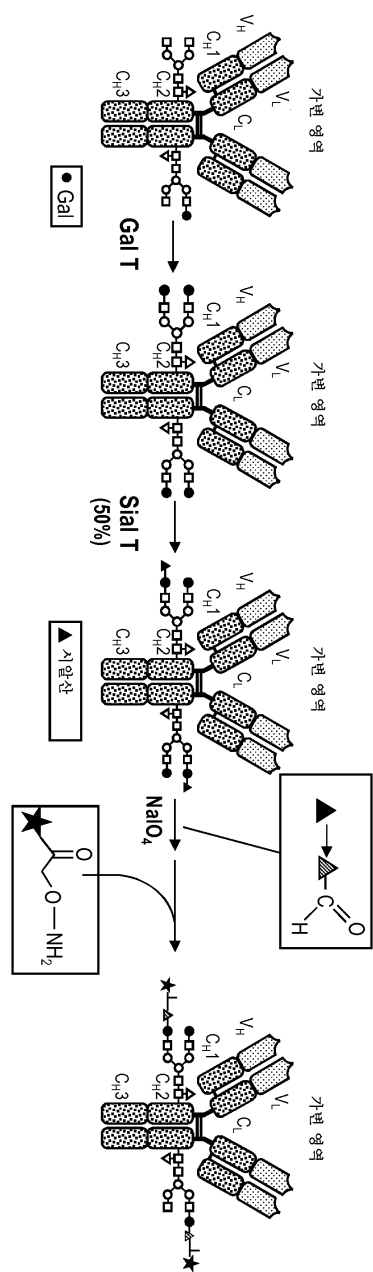
분자량 : 1510

아미노옥시-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-DO10

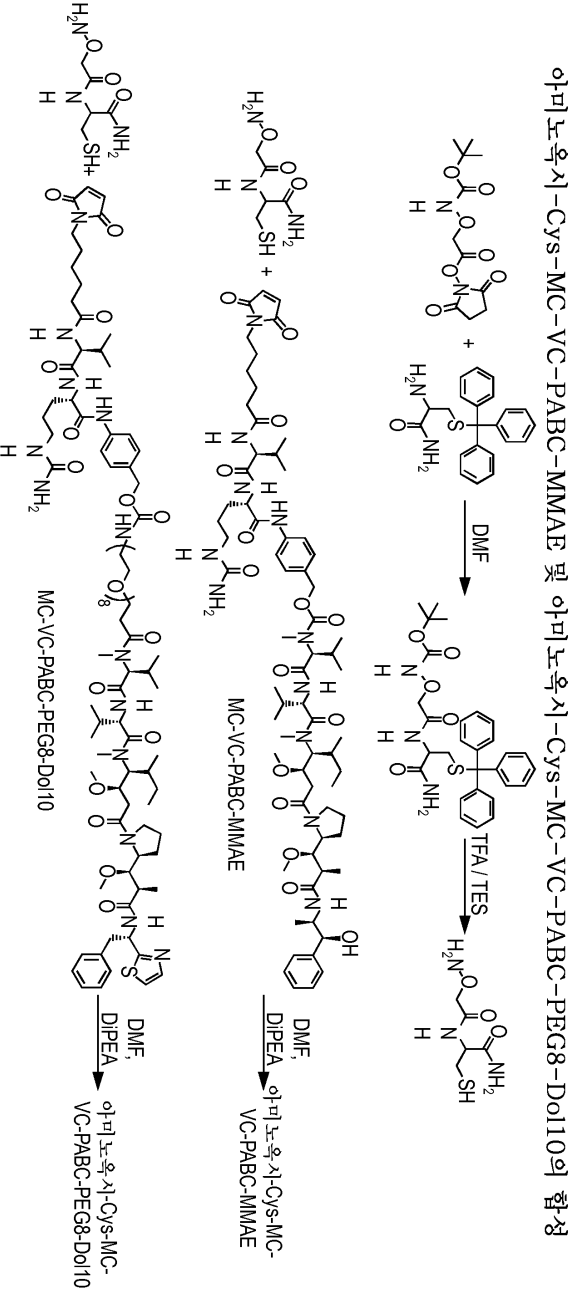


분자량 : 1987

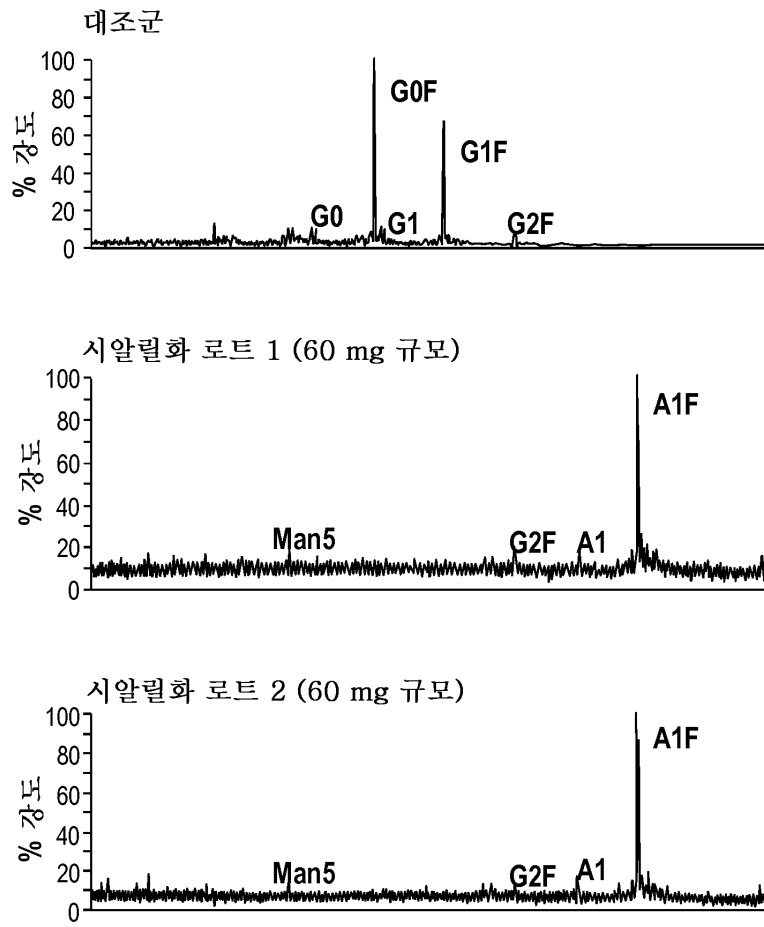
도면25c



도면26



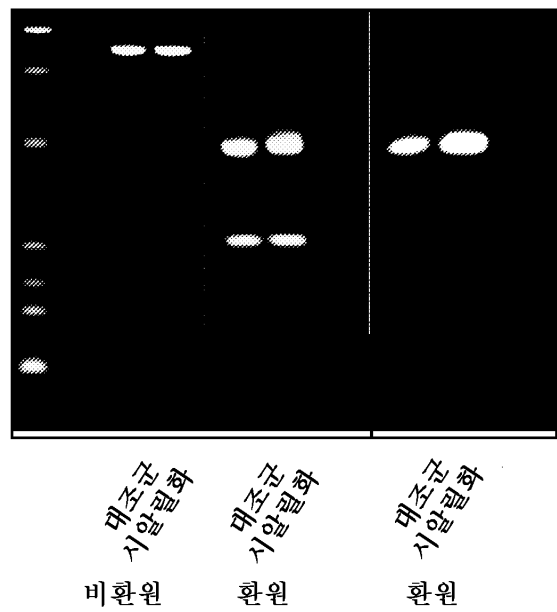
도면27a



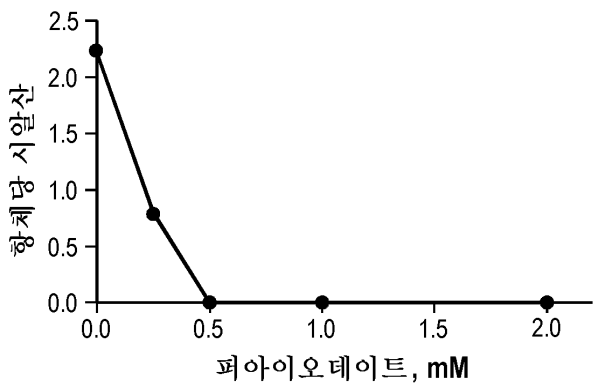
도면27b

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

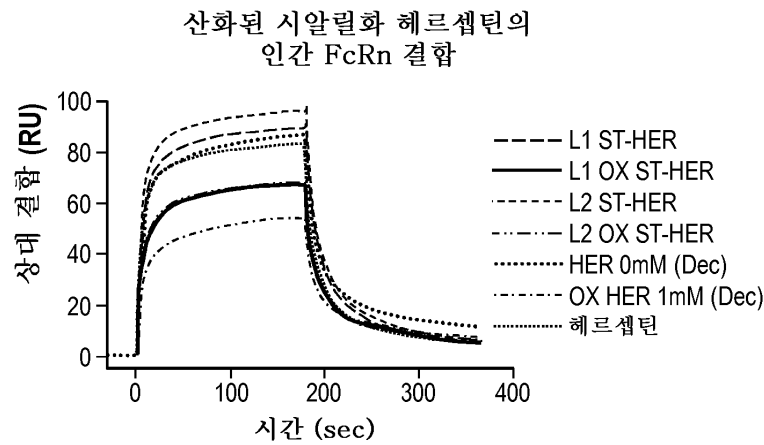
도면27c



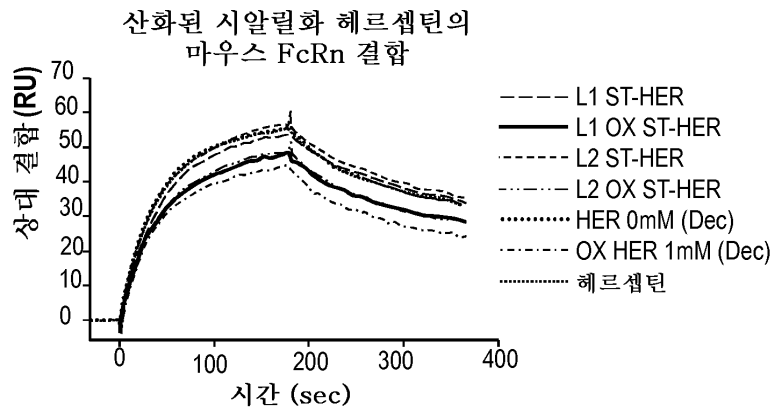
도면28a



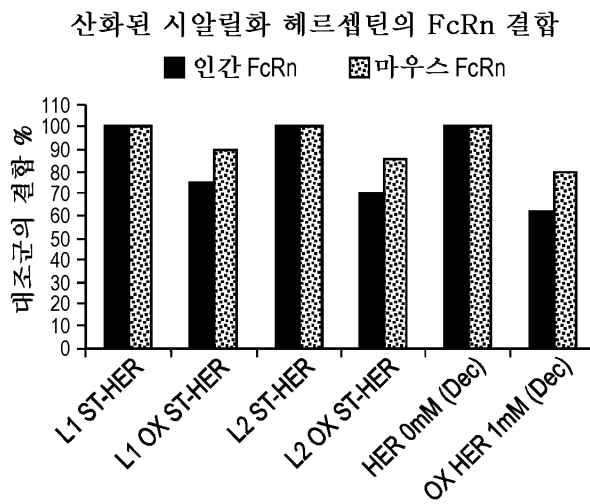
도면28b



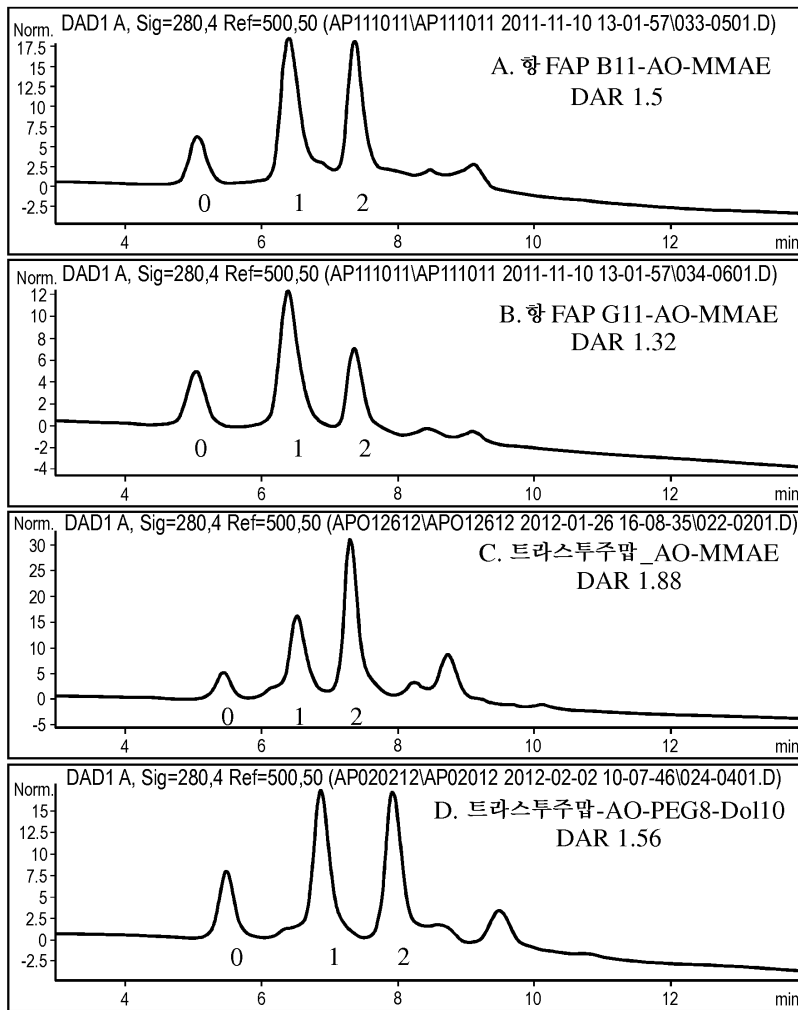
도면28c

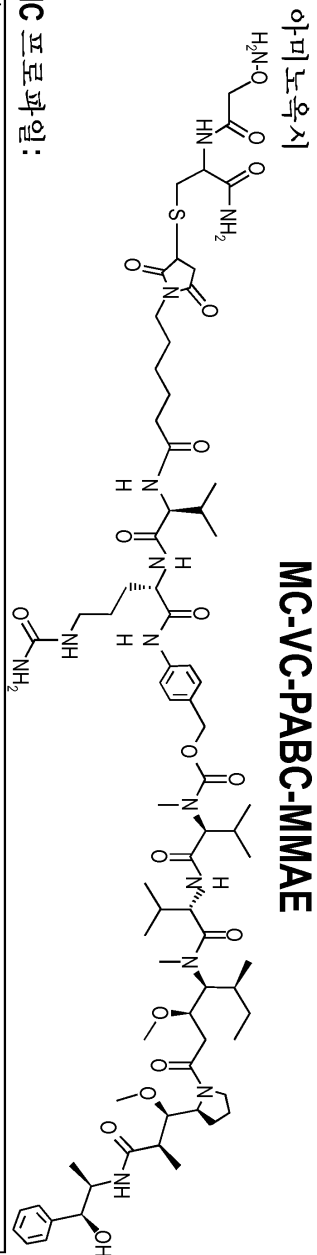


도면28d

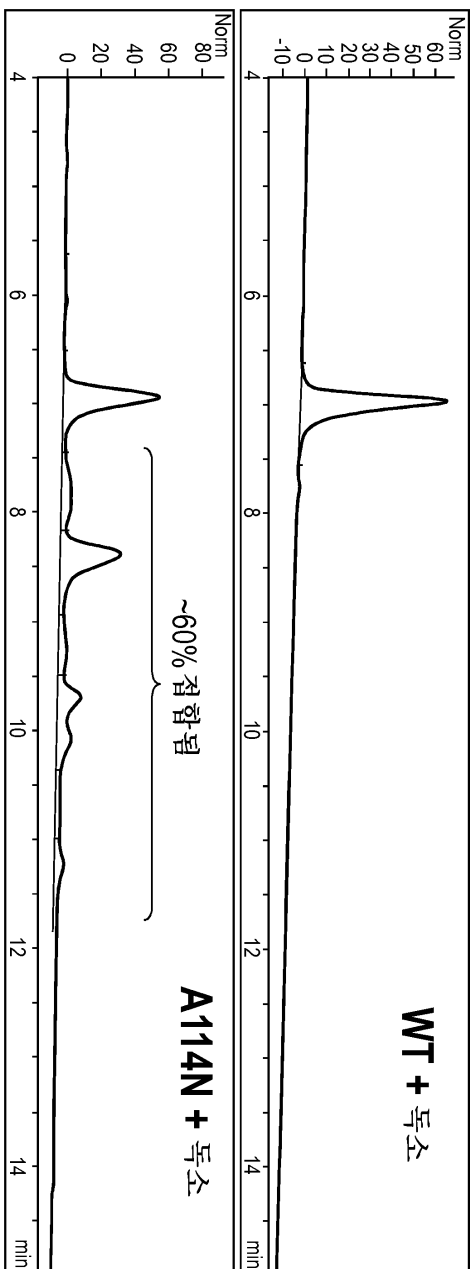


도면29

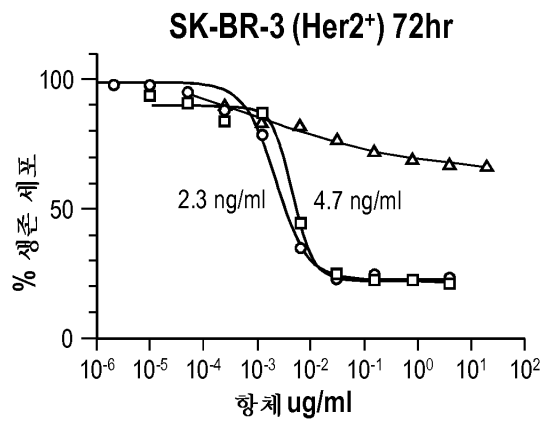




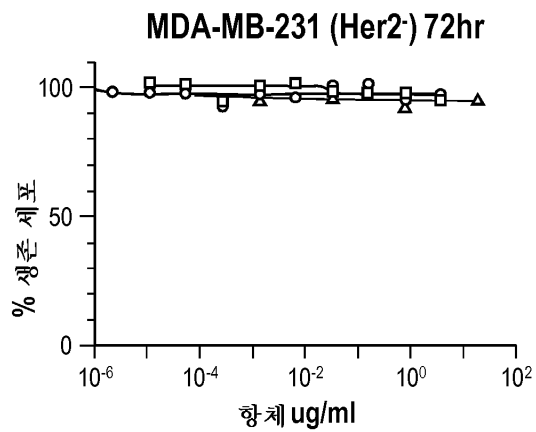
HIC 프로파일:



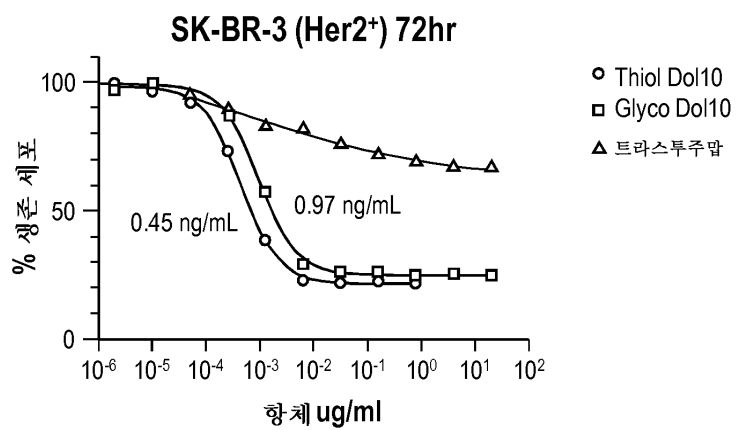
도면31a



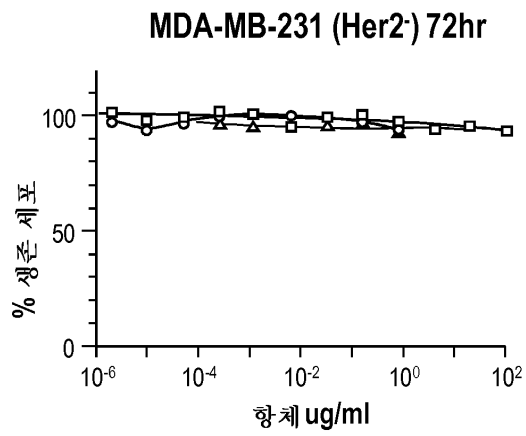
도면31b



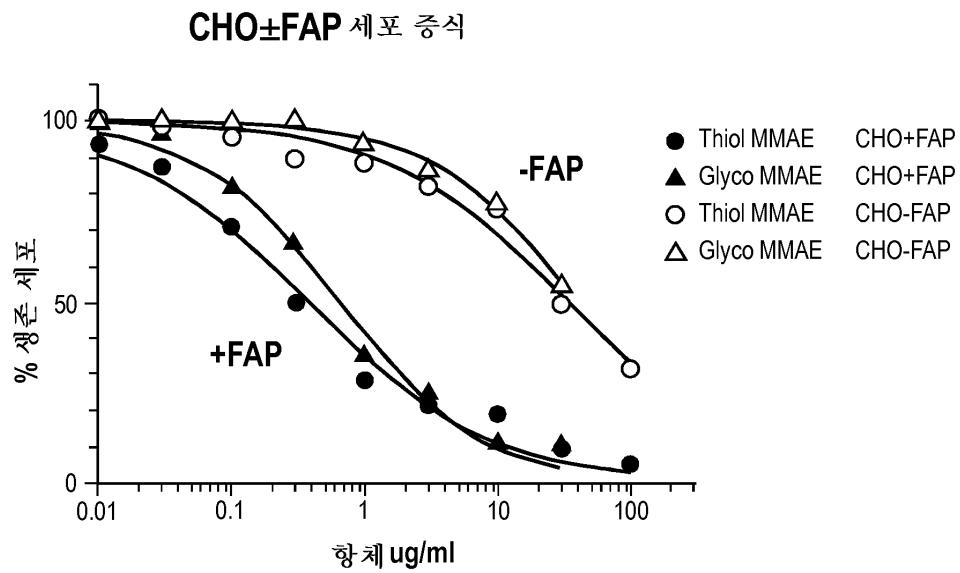
도면31c



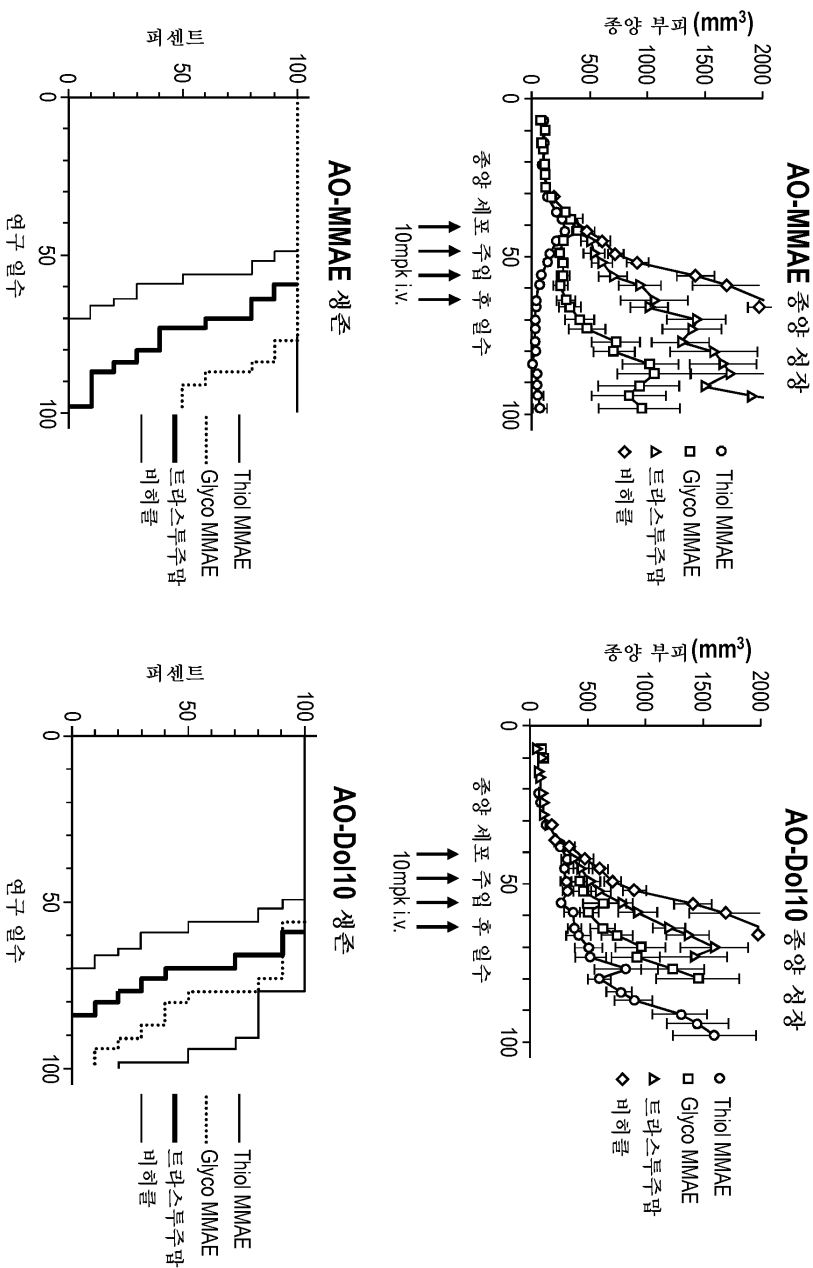
도면31d



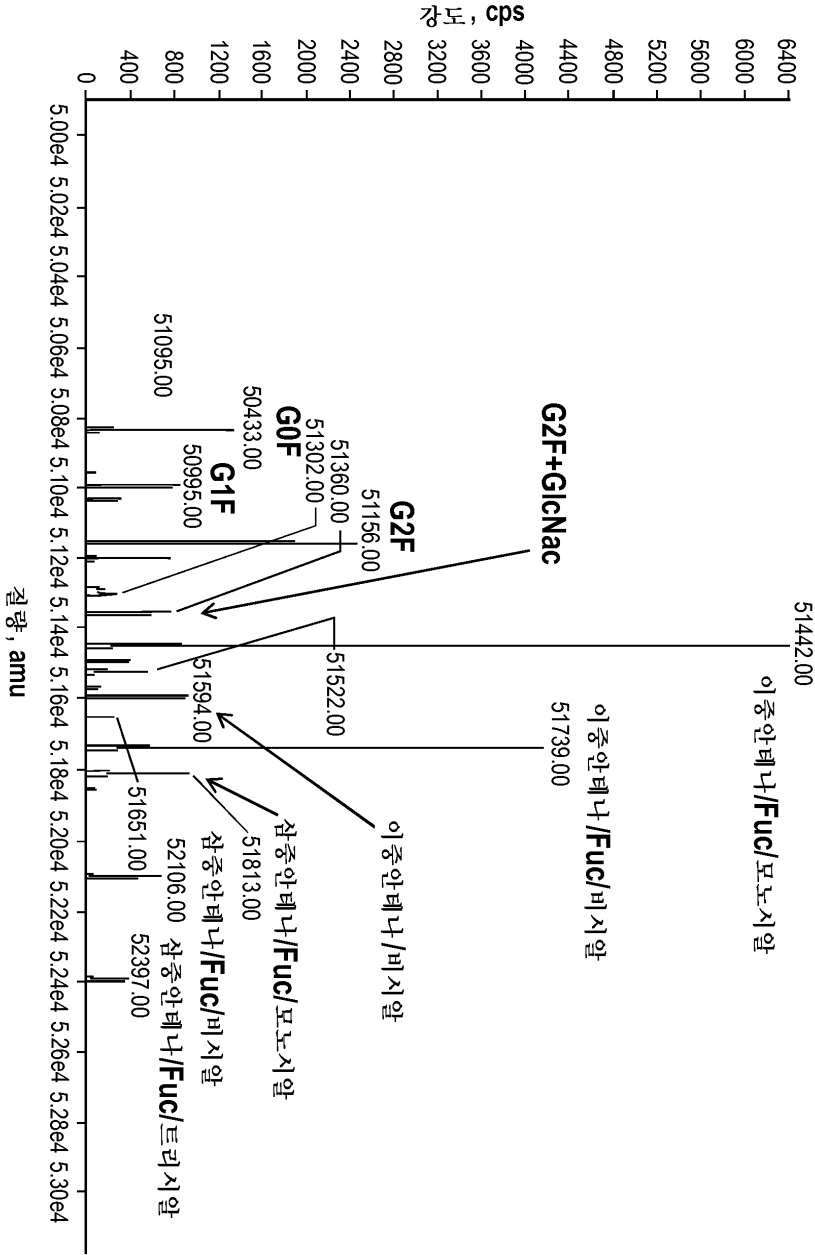
도면32



도면33

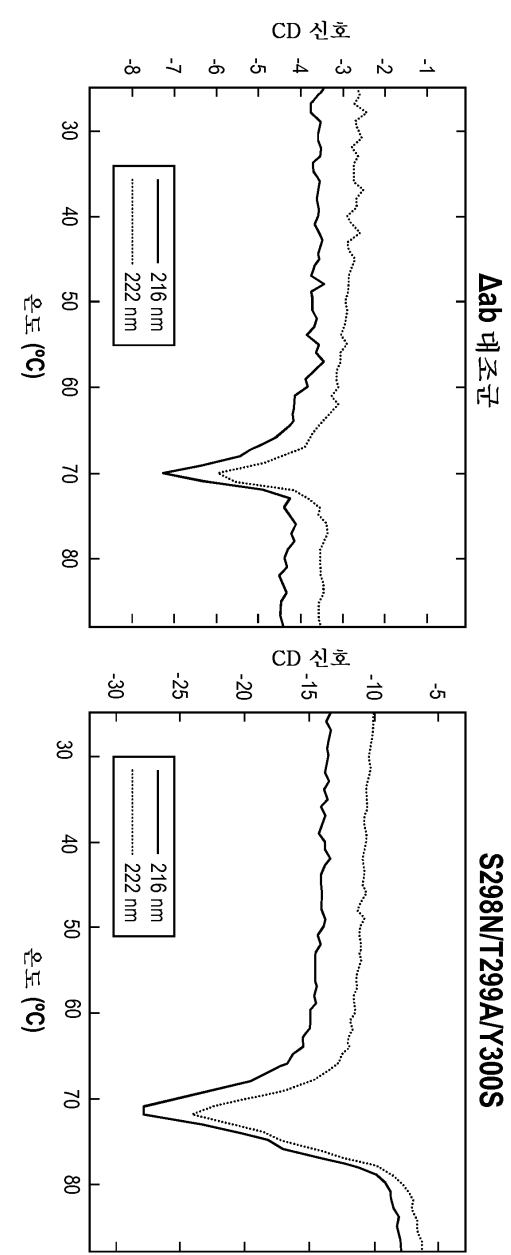


S298N/T299A/Y300S (NNAS) 중쇄의 LC/MS



도면34

도면35



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> GENZYME CORPORATION
- <120> HYPERGLYCOSYLATED BINDING POLYPEPTIDES
- <130> 554314 SA9-079PC
- <140> PCT/US2014/022623
- <141> 2014-03-10
- <150> 61/776,724
- <151> 2013-03-11

<150> 61/776,715

<151> 2013-03-11

<150> 61/776,710

<151> 2013-03-11

<160> 41

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 1

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

1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45
Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly

85 90 95
Thr His Leu His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

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

130 135 140

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

 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

 210 215

<210> 2

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 2

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

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

 35 40 45

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

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

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

 85 90 95
 Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

 100 105 110

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

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

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

<210> 3

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

385 390 395 400

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

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

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

<210> 4

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 4

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

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

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

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

50 55 60

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

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

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

340 345 350
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

370 375 380
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Ser Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440
 <210> 5
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 5
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

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

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

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430
Tyr Thr Gln Lys Asn Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440
<210> 6
<211> 444
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 6
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

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

340 345 350
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

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

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

385 390 395 400
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

405 410 415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

420 425 430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Asn Leu Ser Pro Gly Lys

435 440
<210> 7

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 7

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

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

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

35 40 45
Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

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

 340 345 350
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

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

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

385 390 395 400
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

 405 410 415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

 420 425 430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Thr

 435 440 445

<210> 8

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

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

225

230

235

240

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

245

250

255

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

260

265

270

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

275

280

285

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

290 295 300
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

305 310 315 320
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

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

340 345 350
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

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

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

385 390 395 400
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

405 410 415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

420 425 430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440

<210> 9

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 10

<211> 454

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 10

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

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

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

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

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

Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Glu Gly Val Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205

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

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 11

<211> 454

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450

<210> 12

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 12

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 13

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

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

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

435 440 445
Gly Lys

450

<210> 14

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 15

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 15

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

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

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

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

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

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

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

355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

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

Gly Lys

450

<210> 16

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly Lys

450

<210> 17

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 17

Gly Gly Gly Gly

1

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223>

/note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

```

        peptide"
<400> 18
Gly Gly Gly Gly Gly
1           5
<210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 19
Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1           5
<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400>
> 20
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1           5
<210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 21
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1           5

```

<210> 22
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 22
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 23
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 23
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
 35 40 45

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

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205
Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 24

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 24

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

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

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

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

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

Gly Lys

450

<210> 25

<211> 450

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 25

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr	Leu Ser Arg Asp Asn Ser	Lys Asn Thr Leu Tyr	
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser	Leu Arg Ala Glu Asp Thr	Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85	90	95
Ala Arg Gly Ser Tyr	Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe	Val Tyr Trp Gly Gln	
	100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr	Val Ser Ser Ala Ser Thr	Lys Gly Pro Ser Val	
	115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro	Ser Ser Lys Ser Thr Ser	Gly Gly Thr Ala Ala	
	130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val	Lys Asp Tyr Phe Pro	Glu Pro Val Thr Val Ser	
145	150	155	160
Trp Asn Ser Gly Ala	Leu Thr Ser Gly Val	His Thr Phe Pro Ala Val	
	165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly	Leu Tyr Ser Leu Ser Ser	Val Val Thr Val Pro	
	180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly	Thr Gln Thr Tyr Ile Cys	Asn Val Asn His Lys	
	195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys	Val Asp Lys Lys Val Glu	Pro Lys Ser Cys Asp	
	210	215	220
Lys Thr His Thr Cys	Pro Pro Cys Pro Ala Pro	Glu Leu Leu Gly Gly	
225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu	Phe Pro Pro Lys Pro Lys	Asp Thr Leu Met Ile	
	245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu	Val Thr Cys Val Val Val	Asp Val Ser His Glu	
	260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys	Phe Asn Trp Tyr Val Asp	Gly Val Glu Val His	
	275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr	Asn Asn Thr Ser Arg	
	290	295	300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

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

Gly Lys

450

<210> 26

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 26

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

20

25

30

Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

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

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

Gly Lys

450

<210> 27

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 27

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

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr			
	20	25	30
Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe			
	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln			
	100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val			
	115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala			
	130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser			
145	150	155	160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val			
	165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro			
	180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys			
	195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
	210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
	245	250	255

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 28

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 29

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195	200	205	
Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro			
210	215	220	
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe			
225	230	235	240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val			
245	250	255	
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe			
260	265	270	
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro			
275	280	285	
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr			
290	295	300	
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val			
305	310	315	320
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala			
325	330	335	
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg			
340	345	350	
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly			
355	360	365	
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro			
370	375	380	
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser			
385	390	395	400
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln			
405	410	415	
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His			
420	425	430	
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
435	440		

<210> 30

<211

> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 30

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

435 440

<210> 31

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 31

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

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

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 32

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 165 170 175

 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 180 185 190
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 195 200 205
 Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240

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

 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 340 345 350
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365

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

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

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

<210> 33

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 33

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

385 390 395 400
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 34

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 34

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 35

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 35

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 36

<211

> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 36

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 37

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 37

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

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

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

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

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

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

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

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

 435 440 445
Gly Lys

450

<210> 38

<211> 450

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 39

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 40
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 40
 Asn Asn Ala Ser
 1
 <210> 41
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 41
 His His His His
 1