



등록특허 10-2306492



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년09월29일
(11) 등록번호 10-2306492
(24) 등록일자 2021년09월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/46 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/468 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7007082
- (22) 출원일자(국제) 2014년09월04일
심사청구일자 2019년09월04일
- (85) 번역문제출일자 2016년03월17일
- (65) 공개번호 10-2016-0077036
- (43) 공개일자 2016년07월01일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/054079
- (87) 국제공개번호 WO 2015/053887
국제공개일자 2015년04월16일
- (30) 우선권주장
61/874,277 2013년09월05일 미국(US)
61/874,284 2013년09월05일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문현
US20020062010 A1
(뒷면에 계속)

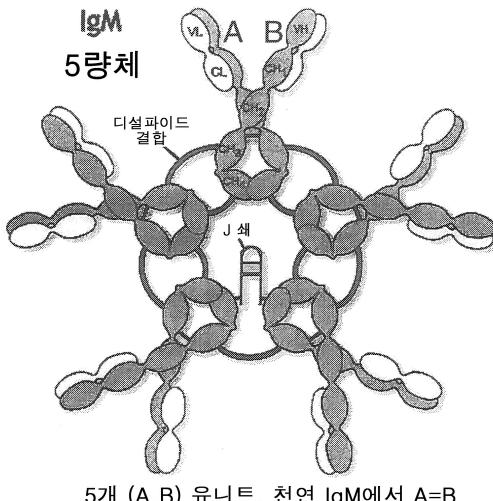
전체 청구항 수 : 총 20 항

심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 불변 쇄 변형된 이특이적, 5가 및 6가 Ig-M 항체

(57) 요 약

본 발명은 예를 들어, 5개 또는 6개의 이특이적 결합 유니트를 갖는 분리된 IgM 항체와 같은 5량체 또는 6량체 환 구조를 갖는 결합 분자, 및 이들 제조하고 사용하기 위한 방법 및 수단에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 예를 들어, 5개 또는 6개의 이특이적 결합 유니트를 갖는 분리된 IgM 항체와 같은 5량체 또는 6량체 환 구조를 갖는 다중 특이적 결합 분자, 및 이를 제조하고 사용하기 위한 방법 및 수단에 관한 것이다.

대 표 도

(52) CPC특허분류

C07K 16/2809 (2013.01)

C07K 16/2887 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/52 (2013.01)

C07K 2317/522 (2013.01)

C07K 2317/524 (2013.01)

C07K 2317/526 (2013.01)

C07K 2317/528 (2013.01)

C07K 2317/64 (2013.01)

(72) 발명자

프레스타, 레너드, 조지

미국 94109 캘리포니아주 샌 프란시스코 아파트먼트 206 고프 스트리트 1900

요시무라, 렌시

미국 95054 캘리포니아주 산타 클라라 빌링즈 서클 4462

(56) 선행기술조사문헌

US20130129723 A1

WO1996027011 A1

WO2006008548 A2

WO2009089004 A1

명세서

청구범위

청구항 1

5개 또는 6개의 이특이적 결합 유니트를 포함하는 5량체 또는 6량체 환 구조를 갖는 결합 분자로서, 상기 이특이적 결합 유니트 각각은, 동일한 2개의 결합 특이성을 갖고 제1 결합 표적에 대한 제1 결합 영역에 접합된 인간 IgM 중쇄 불변 영역의 적어도 C μ 4 도메인, C μ 3 도메인, 및 C μ 2 도메인을 포함하는 제1 쇄, 및 인간 IgM 중쇄 불변 영역의 적어도 C μ 4 도메인, C μ 3 도메인, 및 C μ 2 도메인 및 제2 결합 표적에 대한 제2 결합 영역을 포함하는 제2 쇄를 포함하고, 상기 제1 및 제2 결합 표적은 상이하고, 상기 제1 및 제2 쇄는 어셈블링되어 이들의 각각의 IgM 중쇄 불변 영역 사이에 생성된 비대칭 계면의 결과로서 이특이적 결합 유니트를 생성하고, 비대칭 계면은

(i) 상기 결합 유니트의 2개의 쇄의 C μ 2, C μ 3 및/또는 C μ 4 도메인 중 적어도 하나에서 반대로 하전된 아미노산 잔기 간의 하나 이상의 쌍별 스위치(pair-wise switch)에 의해 형성된 염 브릿지(salt bridge)에 의해 생성되고, 반대로 하전된 아미노산 잔기 간의 하나 이상의 쌍별 스위치가

C μ 4 R328E, D \leftrightarrow C μ 4 E339R, K;

C μ 4 R344E, D \leftrightarrow C μ 4 D330R, K;

C μ 4 K376E, D \leftrightarrow C μ 4 E385R, K;

C μ 4 R427E, D \leftrightarrow C μ 4 E339R, K;

C μ 4 T354E, D \leftrightarrow C μ 4 I397R, K;

C μ 2 E167R, K \leftrightarrow C μ 2 K177E, D;

C μ 2 K169E, D \leftrightarrow C μ 2 E170R, K;

C μ 2 D121K, R \leftrightarrow C μ 4 K315D, E;

또는

C μ 2 K185D, E \leftrightarrow C μ 4 D360K, R

을 포함하거나; 또는

(ii) 크롭 T350Y 및 홀 L352S 및 H395V; 또는 크롭 T350Y, T354E, 및 I397E 및 홀 L352S, T354K, H395V, 및 I397K를 포함하는 크롭-인투-홀 연결(knobs-into-holes connection)을 통해 생성되고,

여기서, 아미노산 넘버링은 서열번호 31의 야생형 인간 IgM 중쇄 불변 영역의 서열을 기준으로 하는 것인 결합분자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 이특이적 결합 유니트가 동일한 것인 결합 분자.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 및 제2 결합 영역이 각각 상기 제1 및 제2 결합 표적에 결합하는 2개의 상이한 항체 중쇄 가변 영역인 결합 분자.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 2개의 상이한 IgM 중쇄 가변 영역 중 적어도 하나와 연합된 적어도 하나의 IgM 경쇄 가변 영역 서열을 추가로 포함하는 결합 분자.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역 서열이 경쇄와 중쇄 사이에 비대칭 계면을 생성시킴에 의해 이의 매칭 중쇄 가변 영역에 커플링되는 것인 결합 분자.

청구항 6

제5항에 있어서, 비대칭 계면이 크로스맵(CrossMab) 기술, 크냅-인투-홀 커플링 및/또는 염 브릿지 커플링에 의해 생성되는 것인 결합 분자.

청구항 7

5개 또는 6개의 단일특이적 결합 유니트를 포함하는 5량체 또는 6량체 환 구조를 갖는 결합 분자로서, (i) 상기 단일특이적 결합 유니트 각각은 결합 표적에 대한 결합 영역에 접합된 적어도 $C\mu 2$, $C\mu 3$ 및 $C\mu 4$ 도메인을 각각 포함하는 2개의 IgM 중쇄 불변 영역을 포함하고, (ii) 상기 단일특이적 결합 유니트의 적어도 2개는 상이한 결합 표적에 결합하고, 그리고 (iii) 외부 비대칭 계면이 상이한 결합 표적에 결합하는 이웃하는 단일특이적 결합 유니트의 중쇄 불변 영역 사이에 생성되고, 외부 비대칭 계면은 $C\mu 3-C\mu 3$ 도메인에서 적어도 하나의 쌍별 하전된 아미노산 잔기 스위치에 의해 생성되고, 쌍별 하전된 아미노산 스위치는 $K238 \leftrightarrow D293$ 또는 $K268 \leftrightarrow D294$ 이고, 여기서, 아미노산 넘버링은 서열번호 31의 야생형 인간 IgM 중쇄 불변 영역의 서열을 기준으로 하는 것인 결합 분자.

청구항 8

5개 또는 6개의 이특이적 결합 유니트를 포함하는 5량체 또는 6량체 환 구조를 갖는 결합 분자로서, (i) 상기 이특이적 결합 유니트 각각은 결합 표적에 대한 결합 영역에 접합된 적어도 $C\mu 2$, $C\mu 3$ 및 $C\mu 4$ 도메인을 각각 포함하는 2개의 IgM 중쇄 불변 영역을 포함하고, (ii) 상기 이특이적 결합 유니트의 적어도 2개는 상이한 결합 표적에 결합하고, (iii) 내부 비대칭 계면이 각각의 이특이적 결합 유니트의 2개의 IgM 중쇄 불변 영역 사이에 생성되고, 그리고 (iv) 외부 비대칭 계면이 상이한 표적에 결합하는 이웃하는 이특이적 결합 유니트의 중쇄 불변 영역 사이에서 생성되고, 내부 비대칭 계면은

(a) 상기 결합 유니트의 2개의 쇄의 $C\mu 2$, $C\mu 3$ 및/또는 $C\mu 4$ 도메인 중 적어도 하나에서 반대로 하전된 아미노산 잔기 간의 하나 이상의 쌍별 스위치에 의해 형성된 염 브릿지에 의해 생성되고, 반대로 하전된 아미노산 잔기 간의 하나 이상의 쌍별 스위치가

$C\mu 4$ R328E, D \leftrightarrow $C\mu 4$ E339R, K;

$C\mu 4$ R344E, D \leftrightarrow $C\mu 4$ D330R, K;

$C\mu 4$ K376E, D \leftrightarrow $C\mu 4$ E385R, K;

$C\mu 4$ R427E, D \leftrightarrow $C\mu 4$ E339R, K;

$C\mu 4$ T354E, D \leftrightarrow $C\mu 4$ I397R, K;

$C\mu 2$ E167R, K \leftrightarrow $C\mu 2$ K177E, D;

$C\mu 2$ K169E, D \leftrightarrow $C\mu 2$ E170R, K;

$C\mu 2$ D121K, R \leftrightarrow $C\mu 4$ K315D, E;

또는

$C\mu 2$ K185D, E \leftrightarrow $C\mu 4$ D360K, R

을 포함하거나; 또는

(b) 크냅 T350Y 및 홀 L352S 및 H395V; 또는 크냅 T350Y, T354E, 및 I397E 및 홀 L352S, T354K, H395V, 및 I397K를 포함하는 크냅-인투-홀 연결을 통해 생성되고,

외부 비대칭 계면은 $C\mu 3-C\mu 3$ 도메인에서 적어도 하나의 쌍별 하전된 아미노산 잔기 스위치에 의해 생성되고, 쌍별 하전된 아미노산 스위치는 $K238 \leftrightarrow D293$ 또는 $K268 \leftrightarrow D294$ 이고,

여기서, 아미노산 넘버링은 서열번호 31의 야생형 인간 IgM 중쇄 불변 영역의 서열을 기준으로 하는 것인 결합 분자.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 결합 영역이 항체 중쇄 가변 영역인 결합 분자.

청구항 10

제9항에 있어서, 결합 유니트의 적어도 하나에서 IgM 중쇄 가변 영역과 연합된 적어도 하나의 IgM 경쇄 가변 영역 서열을 추가로 포함하는 결합 분자.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역 서열이 경쇄와 중쇄 사이에 비대칭 계면을 생성시킴에 의해 이의 매칭 중쇄 가변 영역에 커플링되는 것인 결합 분자.

청구항 12

제11항에 있어서, 비대칭 계면이 크로스맵 기술, 크롭-인투-홀 커플링 및/또는 염 브릿지 커플링에 의해 생성되는 것인 결합 분자.

청구항 13

제1항, 제2항, 제7항 및 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 결합 표적이 펩타이드, 폴리펩타이드, 당단백질, 핵산 분자, 및 유기 및 무기 소형 문자로부터 선택되는 것인 결합 분자.

청구항 14

제13항에 있어서, 결합 표적이 가용성 폴리펩타이드, 세포 표면 수용체, 리간드, 문자 수송체, 효소 및 효소의 기질로부터 선택되는 것인 결합 분자.

청구항 15

제7항 또는 제8항에 있어서, 상이한 표적에 결합하는 결합 유니트가 동일한 가용성 표적 상의 부위; 동일한 세포 표면 수용체 표적 상의 부위; 상이한 가용성 표적; 상이한 세포 표면 수용체 표적; 가용성 및 세포 표면 수용체 표적; 가용성 또는 세포 표면 수용체 및 긴 체류 시간 표적; 가용성 및 매트릭스 단백질 또는 기질 표적; 가용성 또는 수용체 및 문자 수송체 표적; 및 상이한 세포 유형에 결합하는 결합 유니트로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 결합 분자.

청구항 16

제1항, 제2항, 제7항 및 제8항 중 어느 한 항에 있어서, IgM J 쇄를 추가로 포함하는 결합 분자.

청구항 17

제1항, 제2항, 제7항 및 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 독소 또는 화학치료학적 제제에 접합되는 결합 분자.

청구항 18

제17항에 있어서, 접합이 융합 또는 화학적 링커에 의한 것인 결합 분자.

청구항 19

제1항, 제2항, 제7항 및 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 또는 인간화된 결합 분자.

청구항 20

제1항, 제2항, 제7항 및 제8항 중 어느 한 항의 결합 분자 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 치료용 약제학적 조성물.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 5량체 또는 6량체 구조를 갖는 결합 분자에 관한 것이다.

[0002] 특히, 본 발명은 5개 또는 6개의 이특이적 결합 유니트를 포함하는 5량체 또는 6량체 환 구조를 갖는 결합 분자에 관한 것이다. 본 발명의 결합 분자에서, 이특이적 결합 유니트 각각은 동일한 결합 표적에 대해 2개의 상이한 결합 표적 또는 상이한 결합 영역(예를 들어, 애피토프)에 결합하고 5개 또는 6개 이특이적 결합 유니트 각각은 동일한 결합 특이성(동일한 2개의 결합 표적에 결합한다)을 갖는다. 특정 양태에서, 본 발명은 5개 또는 6개의 이특이적 결합 유니트를 포함하는 5량체 또는 6량체 구조를 갖는 이특이적 항체에 관한 것이다.

[0003] 상이한 측면에서, 본 발명은 5개 또는 6개의 단일특이적 결합 유니트를 포함하는 결합 분자를 포함하고, 여기서, (i) 단일특이적 결합 유니트 각각은 결합 표적에 대한 결합 영역에 접합된 적어도 C_μ3 및 C_μ4 도메인을 각각 포함하는 2개의 IgM 중쇄 불변 영역을 포함하고, (ii) 단일특이적 결합 유니트의 적어도 2개는 상이한 결합 표적에 결합한다. 본 발명은 5개 또는 6개 이특이적 유니트를 포함하는 결합 분자를 추가로 포함하고, 여기서, (i) 상기 이특이적 결합 유니트 각각은 결합 표적에 대한 결합 영역에 접합된 적어도 C_μ3 및 C_μ4 도메인을 각각 포함하는 2개의 IgM 중쇄 불변 영역을 포함하고, (ii) 상기 이특이적 결합 유니트의 적어도 2개는 상이한 결합 표적에 결합한다. 특정 양태에서, 결합 분자는 다중-특이적 IgM 항체이다.

배경 기술

[0004] 인간화된 항체의 도래 이후, Rituxan®(리툭시맙), Herceptin®(트라스투주맙) 및 Avastin®(베바시주맙)과 같은 항체의 치료학적 용도는 종양학, 류마티스 관절염과 같은 염증 장애 및 많은 다른 질환의 치료를 포함하는 의학 분야를 혁신시켰다. 미국에서, 30개 이상의 인간 또는 인간화된 항체들이 임상 용도로 승인되었고, 600개 이상의 새로운 항체 또는 항체 유사 분자가 다양한 개발 단계에 있다. 일부 항체는 이의 작용이 질환의 병리학적 과정의 일부인 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 또는 종양 괴사 인자(TNF)와 같은 가용성 표적 분자에 대해 길항 기능을 갖는다. 대안적으로, 항체는 암과 같은 특정 질환에서 병리학적 세포에 결합하고, 차단하고/하거나 파괴를 유도할 수 있다. 이들 치료학적 항체의 주요 기능은 Fab 영역을 통해 결합하고 Fc 도메인(이는 또한 항체의 긴 순환 반감기를 매개한다)을 통해 이펙터 기능을 집결시킨다. 소분자 약물과 비교하여 항체의 주요 잇점들 중 하나는 이들의 정교한 특이성을 수 있다. 항체는 발암유전자와 같은 선택된 단백질 항원을 정확하게 표적화하여 매우 유사한 동족체를 배제하면서 양성의 안전성 프로필을 가능하게 한다. 따라서, 항체는 특이적 단일 표적화 기능에 대해 잘 특징화되어 있다.

[0005] 기술분야가 진보됨에 따라, 항체 기능은 독성의 페이로드 전달(예를 들어, 항체-약물 접합체)을 통한 세포 파괴에 큰 중점을 둔 소형 및 대형 분자 기술의 조합 뿐만 아니라 보다 큰 친화성, 보다 긴 반감기 및/또는 보다 우수한 조직 분포와 같은 단백질 가공의 창조적 수단을 통해 증진되었다. 항체 기능을 개선시키는 또 다른 방법은 하나의 IgG 분자가 2개의 항원에 결합하도록 하는 면역글로불린 G(IgG) 구조의 2가 결합을 이용하는 것이다. 실제로, 특정 응용에서, 2개의 상이한 표적 항원에 동시에 결합함에 의해 유용한 기능을 발휘하는 비대칭 항체에 대한 양호한 잠재력이 존재한다. 이러한 필요성을 해결하기 위해, 천연적으로는 이전에 결코 나타나지 않았던 기능들을 가능하게 하는, 2개의 상이한 항원에 결합할 수 있는 단일 분자를 수득하기 위한 다양한 작제물을 제조되어 왔다. 상기 이특이적 방법의 예는 각각 T- 및 B-세포 상에서 CD3 및 CD19 수용체에 결합하는 "블리나투무맙"(MT103)이다. 암성 B-세포로의 세포독성 T 세포의 상기 테더링은 B 세포 백혈병의 효과적인 치료를 가능하게 한다.

[0006] 그러나, 이특이적 항체의 작제, 발현 및 제조에는 상당한 기술적 어려움이 남아 있다. 이특이적 항체가 동시에 2개의 상이한 항원에 결합하는 이들의 능력으로 인해 전망있는 치료학적 제제로서 간주되지만, 이들의 활용성은 안정성 및 제조의 복잡함으로 인해 제한된다.

[0007] 다양한 형태의 단백질 가공은 이특이적 IgG를 효율적으로 수득하기 위한 중쇄 및 경쇄의 적당한 쌍별(pair-wise) 매칭과 더불어 이종성 중쇄와 매칭하기 위해 사용되어 왔다. 추가로, 사원항체(quadroma), 화학적 이종접합체, 선택된 이종이량체화 도메인을 사용하는 재조합 작제물 및 2개의 최소 항원 결합 부위로 이루어진 최소

크기의 재조합 작제물을 포함하는 다양한 이특이적 항체 포맷이 사용되어 왔다.

[0008] 그러나, 이들 모든 노력은 어려움으로 인해 근심거리이다.

[0009] 따라서, 이특이적 치료학적 항체를 개발하고자 하는 노력에도 불구하고 이특이적 및 다중 특이적 항체의 보다 효율적이고 융통성 있는 생성을 유도하여 상기 치료제의 발견과 임상적 도입 간의 타임라인(timeline)을 단축시키고 다중 특이성 및/또는 결합가를 갖는 새로운 유형의 항체 포맷의 디자인 및 생성을 가능하게 할 수 있는 보다 효율적인 플랫폼을 개발할 필요성이 크다.

발명의 내용

발명의 요약

[0011] 본 발명은 예를 들어, 5개 또는 6개의 이특이적 결합 유니트를 갖는 분리된 IgM 항체와 같은 5량체 또는 6량체 환 구조를 갖는 결합 분자 및 이를 제조하고 사용하는 방법 및 수단에 관한 것이다.

[0012] 하나의 측면에서, 본 발명은 5개 또는 6개의 이특이적 결합 유니트를 포함하는 5량체 또는 6량체 환 구조를 갖는 결합 분자에 관한 것이고, 여기서, 상기 이특이적 결합 유니트 각각은 동일한 2개의 결합 특이성을 갖고 제1 결합 표적에 대해 제1 결합 영역에 접합된 IgM 중쇄 불변 영역의 적어도 C μ 4 도메인을 포함하는 제1 쇄 및 제2 결합 표적에 대한 IgM 중쇄 불변 영역 및 제2 결합 영역의 적어도 C μ 4 도메인을 포함하는 제2 쇄를 포함하고, 여기서, 상기 제1 및 제2 결합 표적은 상이하고 상기 제1 및 제2 쇄는 어셈블리되어 이들의 각각의 IgM 중쇄 불변 영역 사이에 생성된 비대칭 계면의 결과로서 이특이적 결합 유니트를 생성한다.

[0013] 하나의 양태에서, 이특이적 결합 유니트는 동일하다.

[0014] 또 다른 양태에서, 결합 분자는 IgM J 쇄를 추가로 포함한다.

[0015] 또 다른 양태에서, 결합 분자는 5량체 환 구조를 갖는다.

[0016] 추가의 양태에서, 결합 분자는 6량체 환 구조를 갖는다.

[0017] 여전히 추가의 양태에서, 결합 분자에서, 제1 및 제2 쇄는 IgM 중쇄 불변 영역의 C μ 3 도메인을 추가로 포함한다.

[0018] 또 다른 양태에서, 제1 및 제2 쇄는 IgM 중쇄 불변 영역의 C μ 2 도메인을 추가로 포함한다.

[0019] 또 다른 양태에서, 제1 및 제2 결합 표적은 웨타이드, 폴리웨타이드, 당단백질, 핵산 분자, 및 유기 및 무기 소형 분자로부터 선택되고, 제한없이 가용성 폴리웨타이드, 세포 표면 수용체, 리간드, 분자 수송체, 효소 및 효소의 기질을 포함한다.

[0020] 여전히 추가의 양태에서, 제1 및 제2 결합 표적은 동일한 가용성 표적상에 2개 부위, 동일한 세포 표면 수용체 표적상에 2개의 부위, 2개의 상이한 가용성 표적, 2개의 세포 표면 수용체 표적, 1개의 가용성 표적 및 1개의 세포 표면 수용체 표적, 1개의 가용성 또는 세포 표면 수용체 표적 및 1개의 긴 체류 시간 표적, 1개의 가용성 표적 및 1개의 매트릭스 단백질 또는 기질 표적, 1개의 가용성 또는 수용체 표적 및 1개의 분자 수송체 표적 또는 2개의 상이한 세포 유형이다.

[0021] 분자의 나머지에 대한 결합 영역의 접합은 융합에 의해 발생할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 제1 및 제2 결합 영역은 각각 제1 및 제2 IgM 중쇄 불변 영역의 N 말단에 융합될 수 있다.

[0022] 특정 양태에서, 제1 및 제2 결합 영역은 항체의 가변 영역이다.

[0023] 또 다른 양태에서, 제1 및 제2 결합 표적은 2개의 상이한 항원이다.

[0024] 또 다른 양태에서, 제1 및 제2 결합 표적은 동일한 항원상에 상이한 애피토프이다.

[0025] 추가의 양태에서, 제1 및 제2 결합 영역은 2개의 결합 표적 또는 동일한 결합 표적상의 상이한 애피토프에 결합하는 2개의 상이한 항체 중쇄 가변 영역일 수 있다.

[0026] 본 발명의 결합 분자에서, 항체 중쇄 가변 영역은 IgG, IgA, IgE, 및/또는 IgM 항체로부터 유래하거나, 바람직하게 IgM 항체로부터 유래할 수 있다. 바람직하게, 본원에서 결합 분자는 이특이적 IgM 분자이고 이는 2개의 상이한 IgM 중쇄 가변 영역 중 하나와 연합된 적어도 하나의 IgM 경쇄 가변 영역 서열을 추가로 포함할 수 있지만 요구되지 않는다.

- [0027] 특정 양태에서, 본 발명의 결합 분자에서 결합 유니트의 2개의 쇄의 IgM 중쇄 불변 영역간의 비대칭 계면의 적어도 일부는 상기 결합 유니트의 2개의 쇄의 $C\mu 2$, $C\mu 3$ 및/또는 $C\mu 4$ 도메인 중 적어도 하나에서 반대로 하전된 아미노산 잔기 간의 쌍별 스위치에 의해 형성된 염 브릿지에 의해 생성된다.
- [0028] 따라서, 염 브릿지는 결합 유니트의 2개의 쇄의 $C\mu 2-C\mu 2$, $C\mu 4-C\mu 4$, 및 $C\mu 2-C\mu 3-C\mu 4$ 도메인 중 적어도 하나 사이에 형성될 수 있다.
- [0029] 하나의 양태에서, 쌍별 스위치는 $E \rightarrow K$, $K \rightarrow E$; $R \rightarrow E$, $E \rightarrow R$; $D \rightarrow K$, $K \rightarrow D$; 및 $R \rightarrow D$, $D \rightarrow R$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0030] 또 다른 양태에서, 결합 분자는 $C\mu 4-C\mu 4$ 도메인에서 적어도 하나의 쌍별 하전된 아미노산 잔기 스위치를 포함할 수 있고, 여기서, 상기 스위치는 예를 들어, $R328E, D \leftrightarrow E339R, K$; $R344E, D \leftrightarrow S330R, K$; $K376E, D \leftrightarrow E385R, K$; $R427E, D \leftrightarrow E339R, K$; 및 $T354E, D \leftrightarrow I397R, K$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.
- [0031] 추가의 양태에서, $C\mu 2-C\mu 2$ 도메인 간의 적어도 하나의 쌍별 하전된 아미노산은 스위치하고 예를 들어, $E167R, K \leftrightarrow K177E, D$ 및 $K169E, D \leftrightarrow E170R, K$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.
- [0032] 여전히 추가의 양태에서, 적어도 하나의 쌍별 하전된 아미노산 잔기 스위치는 $C\mu 2-C\mu 3-C\mu 4$ 도메인에 있고, 예를 들어, $D121K, R \leftrightarrow K315D, E$; $K150E, D \leftrightarrow E385K, R$; 및 $K185D, E \leftrightarrow D360K, R$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.
- [0033] 추가의 양태에서, 본 발명의 결합 분자에서, 결합 유니트의 2개의 쇄의 IgM 중쇄 불변 영역 간의 비대칭 계면의 적어도 일부는 크냅-인투-홀 연결을 통해 생성되고, 상기 연결은 예를 들어, 크냅: $T350 \rightarrow Y, F, W$; 및 $H395 \rightarrow Y, F$; 및 홀: $L352 \rightarrow G, A, V, I, M, S, T$; $H395 \rightarrow A, V, I, L, M, F, Y$; $F393 \rightarrow W, Y$; $I397 \rightarrow A, V, S, T$; $T350 \rightarrow S, A, V$; 및 $T348 \rightarrow S$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 돌연변이에 의해 생성될 수 있다.
- [0034] 특정 양태에서, 본 발명의 결합 분자에서 존재하는 경우, 경쇄 가변 영역 서열은 경쇄와 중쇄 사이에 비대칭 계면을 생성시킴에 의해 이들의 매칭 중쇄 가변 영역에 커플링된다.
- [0035] 다른 양태에서, 상기 비대칭 계면은 크로스맵 기술, 크냅-인투-홀 커플링 및/또는 염 브릿지 커플링에 의해 생성된다.
- [0036] 본 발명의 결합 분자는 공통된 경쇄를 포함할 수 있고/있거나 독소 또는 화학치료학적 제제에 접합될 수 있다. 바람직하게, 접합은 융합에 의한 것이지만 화학적 링커에 의한 접합이 또한 발명의 범위에 포함된다.
- [0037] 본원에서 결합 분자는 키메라 또는 인간화될 수 있는 5량체 또는 6량체 구조를 갖는 이특이적 항체일 수 있다.
- [0038] 상이한 측면에서, 본 발명은 본원에서 상기 정의된 바와 같은 결합 분자의 적어도 약 70%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 90% 또는 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%를 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0039] 특정 양태에서, 상기 조성물은 약제학적 조성물이다.
- [0040] 본 발명은 추가로 5개 또는 6개의 단일 특이적 결합 유니트를 포함하는 5량체 또는 6량체 환 구조를 갖는 다중 특이적 결합 분자에 관한 것이고, 여기서, (i) 상기 단일특이적 결합 유니트 각각은 결합 표적에 대해 결합 영역에 접합된 적어도 $C\mu 3$ 및 $C\mu 4$ 도메인을 각각 포함하는 2개의 IgM 중쇄 불변 영역을 포함하고, (ii) 상기 단일특이적 결합 유니트의 적어도 2개는 상이한 결합 표적에 결합하고, (iii) 외부 비대칭 계면은 상이한 결합 표적에 결합하는 이웃하는 단일특이적 결합 유니트의 중쇄 불변 영역들 사이에 생성된다.
- [0041] 하나의 양태에서, 단일특이적 결합 유니트의 적어도 3개는 상이한 결합 표적에 결합한다.
- [0042] 또 다른 양태에서, 상기 단일특이적 결합 유니트의 적어도 4개는 상이한 결합 표적에 결합한다.
- [0043] 또 다른 양태에서, 결합 분자는 5량체 환 구조를 갖고 모든 5개의 단일특이적 결합 유니트는 상이한 표적에 결합한다.
- [0044] 추가의 양태에서, 결합 분자는 6량체 환 구조를 갖고 상기 단일특이적 결합 유니트의 적어도 5개는 상이한 표적에 결합한다.
- [0045] 여전히 추가의 양태에서, 단일특이적 결합 유니트의 모든 6개는 상이한 표적에 결합한다.
- [0046] 또 다른 측면에서, 본 발명은 5개 또는 6개의 비특이적 결합 유니트를 포함하는 5량체 또는 6량체 환 구조를 갖는 다중 특이적 결합 분자에 관한 것이고, 여기서, (i) 상기 이특이적 결합 유니트 각각은 결합 표적에 대해 결

합 영역에 접합된 적어도 C μ 3 및 C μ 4 도메인을 각각 포함하는 2개의 IgM 중쇄 불변 영역을 포함하고, (ii) 상기 이특이적 결합 유니트의 적어도 2개는 상이한 결합 표적에 결합하고, (iii) 내부 비대칭 계면은 각각의 이특이적 결합 유니트의 2개의 IgM 중쇄 불변 영역 사이에 생성되고, (iv) 외부 비대칭 계면은 상이한 표적에 결합하는 이웃하는 이특이적 결합 유니트의 중쇄 불변 영역 사이에서 생성된다.

- [0047] 하나의 양태에서, 이특이적 결합 유니트의 적어도 3개는 상이한 결합 표적에 결합한다.
- [0048] 또 다른 양태에서, 이특이적 결합 유니트의 적어도 4개는 상이한 결합 표적에 결합한다.
- [0049] 또 다른 양태에서, 결합 분자는 5량체 환 구조를 갖고 모든 5개의 이특이적 결합 유니트는 상이한 표적에 결합한다.
- [0050] 추가의 양태에서, 결합 분자는 6량체 환 구조를 갖고 이특이적 결합 유니트의 적어도 5개는 상이한 표적에 결합한다.
- [0051] 여전히 추가의 양태에서, 모든 6개의 이특이적 결합 유니트는 상이한 표적에 결합한다.
- [0052] 상이한 양태에서, 다중 특이적 결합 분자는 IgM J 쇄를 추가로 포함한다.
- [0053] 다양한 양태에서, 다중 특이적 결합 분자는 5량체 또는 6량체 환 구조를 가질 수 있다.
- [0054] 본 발명의 다중 특이적 결합 분자의 결합 특이성의 수 및 성질에 상관없이, 하기의 특이적 양태를 적용한다:
- [0055] 하나의 양태에서, 결합 유니트의 적어도 하나에서 IgM 중쇄 불변 영역은 C μ 2 도메인을 추가로 포함한다. 여전히 또 다른 양태에서, 모든 결합 유니트에서, IgM 중쇄 불변 영역은 C μ 2 도메인을 추가로 포함한다. 다양한 양태에서, 본 발명의 다중 특이적 결합 분자는 펩타이드, 폴리펩타이드, 당단백질, 핵산 분자 및 유기 및 비유기 소형 분자로부터 선택되는 결합 표적에 결합할 수 있다.
- [0056] 다른 양태에서, 본 발명의 다중 특이적 결합 분자는 가용성 폴리펩타이드, 세포 표면 수용체, 리간드, 분자 수송체, 효소 및 효소의 기질로부터 선택되는 결합 표적에 결합한다.
- [0057] 추가의 양태에서, 상이한 표적에 결합하는 본 발명의 다중 특이적 결합 분자는 동일한 가용성 표적 상의 부위; 동일한 세포 표면 수용체 표적 상의 부위; 상이한 가용성 표적; 상이한 세포 표면 수용체 표적; 가용성 및 세포 표면 수용체 표적; 가용성 또는 세포 표면 수용체 및 긴 체류 시간 표적; 가용성 및 매트릭스 단백질 또는 기질 표적; 가용성 또는 수용체 및 분자 수송체 표적 및 상이한 세포 유형에 결합하는 결합 유니트로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0058] 특정 양태에서, 본 발명의 결합 분자내 결합 유니트에서, IgM 중쇄 불변 영역과 결합 표적에 대한 결합 영역 간의 접합은 융합에 의한 것이다. 따라서, 예를 들어, 결합 영역은 IgM 중쇄 불변 영역의 N 말단에 융합될 수 있다.
- [0059] 하나의 양태에서, 결합 영역의 적어도 하나는 항체의 가변 영역이다.
- [0060] 또 다른 양태에서, 모든 결합 영역은 항체 중쇄 가변 영역이다.
- [0061] 또 다른 양태에서, 적어도 2개의 결합 표적은 상이한 항원이다.
- [0062] 추가의 양태에서, 적어도 2개의 결합 표적은 동일한 항원 상에 상이한 에피토프이다.
- [0063] 모든 측면 및 양태에서, 항체 중쇄 가변 영역은 IgG, IgA, IgE, 또는 IgM 항체로부터 유래하거나, 바람직하게는 IgM 항체로부터 유래할 수 있다.
- [0064] 바람직한 양태에서, 본 발명의 다중 특이적 결합 분자는 다중 특이적 IgM 항체이다.
- [0065] 하나의 양태에서, 본 발명의 다중 특이적 IgM 항체는 결합 유니트의 적어도 하나에서 IgM 중쇄 가변 영역과 연합된 적어도 하나의 IgM 경쇄 가변 영역을 추가로 포함한다.
- [0066] 또 다른 양태에서, 다중 특이적 IgM 항체는 IgM 중쇄 가변 영역 각각과 연합된 IgM 경쇄 가변 영역 서열을 추가로 포함한다.
- [0067] 모든 측면 및 양태에서, 외부 비대칭 계면은 C μ 3 도메인 내에서 변형 (들)에 의해 생성된다. 하나의 양태에서, 상기 변형은 C μ 3 도메인에서 반대로 하전된 아미노산 잔기들 사이의 쌍별 스위치에 의해 형성되는 염 브릿지에 의해 생성된다.

- [0068] 다양한 양태에서, 외부 비대칭 계면을 제공하는 염 브릿지는 $C\mu 3-C\mu 3$ 도메인에서 적어도 하나의 쌍별 하전된 아미노산 잔기에 의해 형성되고 이는 예를 들어, 이웃하는 μ 쇄 내 $K238 \leftrightarrow D293$ 또는 $K268 \leftrightarrow D294$ 일 수 있다.
- [0069] 모든 측면 및 양태에서, 다중 특이적 결합 분자, 예를 들어, 본 발명의 다중 특이적 IgM 항체에서 내부 비대칭 계면은 $C\mu 2$, $C\mu 3$ 및/또는 $C\mu 4$ 도메인 중 하나에서 반대로 하전된 아미노산 잔기간의 쌍별 스위치에 의해 형성되는 염 브릿지에 의해 생성된다.
- [0070] 하나의 양태에서, 염 브릿지는 상기 결합 유니트의 2개의 쇄의 $C\mu 2-C\mu 2$, $C\mu 4-C\mu 4$ 와 $C\mu 2-C\mu 3-C\mu 4$ 도메인 중 적어도 하나 사이에 형성된다.
- [0071] 또 다른 양태에서, 쌍별 스위치는 $E \rightarrow K$, $K \rightarrow E$; $R \rightarrow E$, $E \rightarrow R$; $D \rightarrow K$, $K \rightarrow D$; 및 $R \rightarrow D$, $D \rightarrow R$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0072] 추가의 양태에서, 다중 특이적 결합 분자, 예를 들어, 다중 특이적 IgM 항체는 $C\mu 4-C\mu 4$ 도메인에서 적어도 하나의 쌍별 하전된 아미노산 잔기 스위치를 포함하고, 이는 예를 들어, $R328E, D \leftrightarrow E339R, K$; $R344E, D \leftrightarrow S330R, K$; $K376E, D \leftrightarrow E385R, K$; $R427E, D \leftrightarrow E339R, K$; 및 $T354E, D \leftrightarrow I397R, K$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.
- [0073] 여전히 추가의 양태에서, 다중 특이적 결합 분자, 예를 들어, 다중 특이적 IgM 항체는 $C\mu 2-C\mu 2$ 도메인 사이의 적어도 하나의 쌍별 하전된 아미노산 스위치를 포함하고, 이는 예를 들어, $E167R, K \leftrightarrow K177E, D$ 및 $K169E, D \leftrightarrow E170R, K$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.
- [0074] 또 다른 양태에서, 다중 특이적 결합 분자, 예를 들어, 다중 특이적 IgM 항체는 $C\mu 2-C\mu 3-C\mu 4$ 도메인에서 적어도 하나의 쌍별 하전된 아미노산 잔기 스위치를 포함하고, 이는 예를 들어, $D121K, R \leftrightarrow K315D, E$; $K150E, D \leftrightarrow E385K, R$; 및 $K185D, E \leftrightarrow D360K, R$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.
- [0075] 모든 측면 및 양태에서, IgM 중쇄 불변 영역 사이의 외부 및/또는 내부 비대칭 계면 중 적어도 일부는 크냅-인투-홀 연결을 통해 생성될 수 있다. 예를 들어, 적어도 하나의 크냅-인투-홀 연결은 크냅: $T350 \rightarrow Y, F, W$; 및 $H395 \rightarrow Y, F$; 및 홀: $L352 \rightarrow G, A, V, I, M, S, T$; $H395 \rightarrow A, V, I, L, M, F, Y$; $F393 \rightarrow W, Y$; $I397 \rightarrow A, V, S, T$; $T350 \rightarrow S, A, V$; 및 $T348 \rightarrow S$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 돌연변이에 의해 생성될 수 있다.
- [0076] 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 다중 특이적 IgM 항체에서, 상기 경쇄 가변 영역 서열은 경쇄와 중쇄 사이에 비대칭 계면을 생성시킴에 의해 이들의 매칭 중쇄 가변 영역에 커플링될 수 있다. 다양한 양태에서, 비대칭 계면은 크로스맵 기술, 크냅-인투-홀 커플링 및/또는 염 브릿지 커플링에 의해 생성될 수 있다. 추가의 양태에서, 다중 특이적 결합 분자의 결합 유니트는 공통된 경쇄를 포함한다.
- [0077] 모든 측면 및 양태에서, 다중 특이적 결합 분자는 독소 또는 화학치료학적 제제에 접합될 수 있고, 여기서, 상기 접합은 예를 들어, 융합에 의해 및/또는 화학적 링커를 통한 것일 수 있다.
- [0078] 본 발명의 다중 특이적 IgM 항체는 키메라되거나 인간화될 수 있다.
- [0079] 추가의 측면에서, 본 발명은 본원에서의 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 80% 또는 적어도 약 90% 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%의 다중 특이적 결합 분자를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 조성물을 예를 들어, 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 성분을 포함하는 약제학적 조성물일 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0080] 도 1은 J 쇄를 포함하는 IgM 5량체의 구조를 도시하고, 여기서, A쇄 및 B쇄는 천연 IgM에서와 동일하다.
- 도 2a는 2개의 결합 특이성을 갖는 5개-구성원 IgM 분자를 도시하고, 여기서, A 및 B로서 지정된 중(μ)쇄는 상이하다.
- 도 2b는 5개 또는 6개의 단일특이적 결합 유니트를 포함하는 다중 특이적 IgM 항체를 도시하고, 여기서, (i) 상기 단일특이적 결합 유니트 각각은 결합 표적에 대한 결합 영역에 접합된 적어도 $C\mu 4$ 도메인을 각각 포함하는 2개의 IgM 중쇄 불변 영역을 포함하고, (ii) 상기 단일특이적 결합 유니트의 적어도 2개는 상이한 결합 표적에 결합한다.
- 도 2c는 5개 또는 6개의 이특이적 결합 유니트를 포함하는 다중 특이적 IgM 항체를 도시하고, 여기서, (i) 상기 이특이적 결합 유니트 각각은 결합 표적에 대한 결합 영역에 접합된 적어도 $C\mu 4$ 도메인을 각각 포함하는 2개의 IgM 중쇄 불변 영역을 포함하고, (ii) 상기 이특이적 결합 유니트의 적어도 2개는 상이한 결합 표적에

결합한다.

도 3은 문헌[참조: Czajkowsky D.M, Shao Z, PNAS 2009; 106:14960-14965]에 공개된 바와 같은 IgM 분자의 A 및 B 중쇄의 구조적 모델이다.

도 4a는 인간 IgG1, IgE 및 IgM 각각의 CG1, CE1 및 CM1 불변 영역의 배열을 보여준다.

도 4b는 인간 IgE 및 IgM 각각의 CE2 및 CM2 불변 영역의 배열을 보여준다.

도 4c는 인간 IgG1, IgE 및 IgM 각각의 CG2, CE3 및 CM3 불변 영역의 배열을 보여준다.

도 4d는 인간 IgG, IgE 및 IgM 각각의 CG3, CE4 및 CM4 불변 도메인의 배열을 보여준다.

도 4a-4d에서:

인간 IgE 서열은 GenBank J00222.1로부터 유래하고; 잔기 넘버링은 PDB 2WQR로부터 유래하고; 헬릭스 (h) 및 쉬트 (s) 배열은 PDB 2WQR로부터 유래하고;

인간 IgG1 서열은 GenBank J00228.1로부터 유래하고; 잔기 넘버링은 PDB 10Q0로부터 유래하고; 헬릭스 (h) 및 쉬트 (s) 배열은 PDB 10Q0로부터 유래하고;

인간 IgM 서열은 GenBank X14940.1로부터 유래하고; 잔기 넘버링은 CM1 도메인의 개시로부터 후속적이고; 인간 IgM 서열에서 보고된 결합가는 GenBank CAB37838.1, CAC20458.1, AFM37312.1, X57331.1 및 J00260.1에 대한 IgM 서열 아래에 나타낸다.

도 5는 실시예 1에서 제조된 헤테로-단량체의 구조를 보여준다.

도 6은 야생형 및 가공된 IgM Fc 쌍 2a 및 2b의 비-환원된 SDS-PAGE 겔을 보여준다.

례인 1: 야생형 Rtx:Fc.

례인 2: Rtx2a:Fc2b의 혼합물, 여기서, Rtx2a는 C291S, T350Y, T354E, 및 I397E 돌연변이 및 꼬리 일부 결실을 갖는 인간 μ 쇄의 CM1 내지 CM4와 융합된 키메라 리툭산(항-CD20) Vh 영역에 대한 μ 쇄로 구성되고; Fc2b는 인간 μ 쇄 CH2 내지 CH4이고 C291S, L352S, T354K, H395V, 및 I397K 돌연변이 및 꼬리 일부 결실을 갖는다.

례인 3: Rtx2b:Fc2a의 혼합물, 여기서, Rtx2b는 C291S, L352S, T354K, H395V, 및 I397K 돌연변이 및 꼬리 일부 결실을 갖는 인간 μ 쇄의 CM1 내지 CM4와 융합된 키메라 리툭산(항-CD20) Vh 영역에 대한 μ 쇄로 구성되고; Fc2a는 C291S, T350Y, T354E, 및 I397E 돌연변이 및 꼬리 일부 결실을 갖는 인간 μ 쇄 CH2 내지 CH4 영역으로 이루어진다. 화살표는 이종이량체를 지적한다.

도 7은 야생형 및 가공된 IgM Fc 쌍 1a 및 2b의 환원된 SDS-PAGE 겔을 보여주고, 여기서, 표시는 도 6에서와 같다.

도 8은 야생형 및 가공된 IgM Fc 쌍의 비-환원된 SDS-PAGE 겔을 보여준다:

례인 1: 야생형 Okt:Fc. 인간 μ 쇄의 CM2 내지 CM4와 융합된 OKT3(항-CD3 항체) scFv로 구성된 Okt.

례인 2: Okt2a:Fc2b의 혼합물, 여기서, Okt2a는 C291S, T350Y, T354E, 및 I397E 돌연변이 및 꼬리 일부 결실을 갖는 인간 μ 쇄의 CM2 내지 CM4와 융합된 OKT3(항-CD3 항체) scFv로 구성된다;

례인 3: Okt2b:Fc2a의 혼합물, 여기서, Okt2b는 C291S, L352S, T354K, H395V, 및 I397K 돌연변이 및 꼬리 일부 결실을 갖는 인간 μ 쇄의 CM2 내지 CM4와 융합된 OKT3(항-CD3 항체) scFv로 구성된다. 화살표는 이종이량체를 지적한다.

례인 4-6: 야생형 Okt:Rtx 조합; 가공된 Okt2a:Rtx2b 조합 및 Okt2b:Rtx2a 조합, 여기서, Rtx2a는 C291S, T350Y, T354E, 및 I397E 돌연변이 및 꼬리 일부 결실을 갖는 인간 μ 쇄의 CM1 내지 CM4와 융합된 키메라 리툭산(항-CD20) Vh 영역에 대한 μ 쇄로 구성되고, Rtx2b는 C291S, L352S, T354K, H395V, 및 I397K 돌연변이 및 꼬리 일부 결실을 갖는 인간 μ 쇄의 CM1 내지 CM4와 융합된 키메라 리툭산(항-CD20) Vh 영역에 대한 μ 쇄로 구성된다. 화살표는 이종이량체를 지적한다.

도 9는 도 8에 나타낸 바와 동일한 작제물의 293F 세포 형질감염체의 SDS-PAGE 겔 상의 환원된 샘플을 보여준다.

도 10a은 C μ 3 영역에서 4개의 염 브릿지가 본 발명의 다중 특이적 결합 분자에서 디설파이드 브릿지 주변의 2

개의 이웃하는 (AB) μ 쇄를 어떻게 안정화시키는지를 도시한다.

도 10b 내지 10i (표 A-1 내지 표 A-8)는 크롭-홀 위치에서 및 잠재적 전하 도입에 대한 인간 IgM CM4 도메인 계면 잔기들을 열거한다.

도 10j (표 B)는 잠재적 전하 스와프에 대한 인간 IgM CM4 도메인 계면 잔기들을 열거한다.

도 10k (표 C)는 잠재적 전하 도입에 대한 인간 IgM CM2 도메인 계면 잔기들을 열거한다.

도 10l(표 D-1) 및 10m(표 D-2)은 크롭-홀 위치에서 인간 IgM CM2 도메인 계면 잔기들을 열거한다.

도 10n (표 E)는 잠재적 전하 스와프에 대한 인간 IgM CM2 도메인 계면 잔기들을 열거한다.

도 10o(표 F-1) 및 도 10p(표 F-2)는 전하 교환에 대한 인간 IgM CM2, CM3 및 CM4 도메인 계면 잔기들을 열거한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0081]

I. 정의

[0082]

용어 "항체"는 모노클로날 항체(면역글로불린 Fc 영역을 갖는 전장 항체를 포함하는), 단일쇄 분자, 및 항체 단편(예를 들어, Fab, $F(ab')_2$, 및 Fv)을 포함한다. 용어 "면역글로불린" (Ig)는 본원에서 "항체"와 상호교환적으로 사용된다. 염기성 4-쇄 항체 유니트는 2개의 동일한 경(L)쇄 및 2개의 동일한 중(H)쇄로 구성된 이종사량체 당단백질이다.

[0083]

IgG의 경우에, 4-쇄 유니트는 일반적으로 약 150,000 달톤이다. 각각의 L쇄는 하나의 공유 디설파이드 결합에 의해 H 쇄에 연결되어 있고, 2개의 H 쇄는 H 쇄 이소타입에 따라 하나 이상의 디설파이드 결합에 의해 서로 연결되어 있다. 각각의 H 및 L 쇄는 또한 일정하게 공간 배치된 내부쇄 디설파이드 브릿지를 갖는다. 각각의 H 쇄는 N 말단에서 가변 도메인(V_H)에 이어서 α 및 γ 쇄의 각각에 대한 3개의 불변 도메인(C_H) 및 μ 및 ϵ 이소타입에 대한 4개의 C_H 도메인을 갖는다. 각각의 L 쇄는 N 말단에서, 가변 도메인(V_L)에 이어서 이의 다른 말단에 불변 도메인을 갖는다. V_L 은 V_H 와 함께 정렬되고 C_L 은 중쇄의 제1 불변 도메인(C_{H1})과 함께 정렬된다. 특정 아미노산 잔기들은 경쇄와 중쇄 가변 도메인 사이에 계면을 형성하는 것으로 사료된다. V_H 와 V_L 함께 쌍별은 단일 항원 결합 부위를 형성한다.

[0084]

IgM은 중합체를 형성하고, 여기서, 다중 면역글로불린은 디설파이드 결합으로 함께 공유적으로 연결되어 있다. IgM은 대부분 5량체로서 및 6량체로서 존재하고 따라서 10개 또는 12개 항원 결합 부위를 함유한다. 5량체 형태는 임의로 J 쇄로 불리우는 추가의 폴리펩타이드를 함유하지만 또한 J 쇄의 부재하에 만들어질 수 있다. 5량체 IgM 분자는 대략 970kDa의 분자량을 갖는다. 이의 중합체 성질로 인해, IgM은 높은 결합활성을 소유하고 특히 보체 활성화에 효과적이다. IgG에서와 같지 않게, IgM 단량체에서 중쇄는 1개의 가변 및 4개의 불변 도메인으로 구성된다. IgM 불변 도메인은 본원에서 CM1 또는 $C\mu 1$, CM2 또는 $C\mu 2$, CM3 또는 $C\mu 3$, 및 CM4 또는 $C\mu 4$ 로서 지정되고, 여기서, "CM" 및 " $C\mu$ " 지정은 상호교환적으로 사용된다.

[0085]

IgA 항체는 단량체 형태로 존재하지만 또한 중합할 수 있다. 이들의 분비형에서 IgA는 J 쇄 및 분비 성분에 의해 연결된 2 내지 5개의 염기성 4쇄 유니트를 포함한다.

[0086]

IgE는 단량체 형태로 존재하고 본원에서 CE1, CE2, CE3 및 CE4로서 언급되는 4개의 불변 도메인을 갖는다.

[0087]

임의의 척추동물 종 유래의 L 쇄는 이들의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기준으로 카파(κ) 및 람다(λ)로 불리우는 2개의 명백히 구분되는 유형 중 하나로 할당될 수 있다.

[0088]

항체의 일부 유형은 추가로 다양한 아부류 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 나누어질 수 있다.

[0089]

상이한 부류의 항체의 구조 및 성질에 대한 추가의 세부 사항에 대해서는 예를 들어, 문헌[Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, page 71 and Chapter 6]을 참조한다.

[0090]

달리 진술되지 않는 경우, 용어 "항체"는 구체적으로, 천연적으로 발생하는 변이체를 포함하는 천연 인간 및 비-인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD 및 IgM 항체를 포함한다. 따라서, 예를 들어, 인간 IgM 서열은 GenBank 승인 번호 X14940.1하에 가용하고, 변이체는 GenBank CAB37838.1, CAC20458.1, AFM37312.1, X57331.1,

및 J00260.1로서 보고되었다.

[0091] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균일한 항체 집단으로부터 수득된 항체를 언급하고, 즉, 개별 항체 포함 집단은 소량으로 존재할 수 있는 가능한 천연적으로 발생하는 변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 고도로 특이적이고 단일 항원 부위에 대해 지시된다. 추가로, 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 통상의 (풀리클로날) 항체 제제와는 대조적으로, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 지시된다. 변형어구 "모노클로날"은 실질적으로 균일한 항체 집단으로부터 수득된 것으로서의 항체 특성을 지적하고 임의의 특정 방법에 의해 항체의 생성을 요구하는 것으로서 해석되지 말아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용될 모노클로날 항체는 문헌[참조: Kohler et al. (1975) *Nature* 256:495]에 최초로 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다(문헌참조: 예를 들어, 미국 특허 번호 제4,816,567호). 상기 "모노클로날 항체"는 또한 예를 들어, 문헌[참조: Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628 and Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597]에 기재된 기술을 사용한 파아지 항체 라이브러리로부터 분리될 수 있다.

[0092] 본원의 모노클로날 항체는 구체적으로 "키메라" 항체(면역글로불린)을 포함하고, 여기서, 중쇄 및/또는 경쇄 부분은 특정 종으로부터 유래된 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 이에 상동성이거나 특정 항체 부류 또는 아부류에 속하고, 쇄(들)의 나머지는 또 다른 종으로부터 유래된 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이거나 이들이 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 상기 항체의 단편 뿐만 아니라 또 다른 항체 부류 또는 아부류에 속한다(미국 특허 제 4,816,567호; 및 Morrison et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855).

[0093] "인간화된" 형태의 비-인간(예를 들어, 쥐) 항체는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 항체이다. 대부분에 대해, 인간화된 항체는 인간 면역글로불린(수용자 항체)이고, 여기서, 수용자의 초가변 영역 유래의 잔기들은 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 갖는 마우스, 랫트, 래빗 또는 비인간 영장류와 같은 비-인간 종(공여자 항체)의 초가변 영역 유래의 잔기들에 의해 대체된다. 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 Fv 골격 영역(FR) 잔기들은 또한 상응하는 비-인간 잔기들에 의해 대체된다. 추가로, 인간화된 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기들을 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 수능행을 추가로 개선하기 위해 수행된다. 일반적으로, 인간화된 항체는 실질적으로 모든 적어도 1개, 및 전형적으로 2개의 가변 도메인을 포함하고, 여기서, 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 면역글로불린의 루프에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 면역글로불린 서열의 영역들이다. 인간화된 항체는 임의로 또한 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로불린의 일부를 포함한다. 추가의 세부 사항에 대해, 문헌[Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-329; and Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596]을 참조한다.

[0094] "종-의존성 항체"는 이것이 제2 포유동물 종 유래의 상기 항원의 상동체에 대해 갖는 것보다 제1 포유동물 종 유래의 항원에 대해 보다 강한 결합 친화성을 갖는 항체이다. 정상적으로, 종-의존성 항체는 인간 항원(즉, 약 1×10^{-7} M 이하, 바람직하게는, 약 1×10^{-8} M 이하 및 가장 바람직하게는 약 1×10^{-9} M 이하의 결합 친화성 (K_d) 값을 갖는다)에 "특이적으로 결합"하지만 인간 항원에 대한 이의 결합 친화성 보다 적어도 약 50배, 또는 적어도 약 500배, 또는 적어도 약 1000배 약한 제2 비인간 포유동물 종 유래의 항원의 상동체에 대해 결합 친화성을 갖는다. 종 의존성 항체는 상기 정의된 임의의 다양한 유형의 항체일 수 있지만 바람직하게 인간화된 또는 인간 항체이다.

[0095] 본원에 사용된 바와 같은, "항체 돌연변이" 또는 "항체 변이체"는 표준 항체의 아미노산 서열 변이체를 언급하고, 여기서, 표준 항체의 아미노산 잔기들 중 하나 이상은 변형되었다. 표준 항체는 예를 들어, 천연 항체 및 천연 항체의 공지된 변이체일 수 있다. 상기 돌연변이는 필연적으로 표준 항체와 100% 미만의 서열 동일성 또는 유사성을 갖는다. 바람직한 양태에서, 항체 돌연변이는 표준 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열과 적어도 75% 아미노산 서열 동일성 또는 유사성, 보다 바람직하게는, 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90% 및 가장 바람직하게는 적어도 95%의 동일성 또는 유사성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다. 상기 서열과 관련된 동일성 또는 유사성은 본원에서 필요하다면 최대 퍼센트 서열 동일성을 성취하기 위해 서열을 정렬하고 캡을 도입한 후 표준 항체 잔기와 동일(즉, 동일 잔기) 또는 유사(즉, 통상의 측쇄 성질을 기초로 하는 동일한 그룹 유래의 아미노산 잔기)한 후보 서열에서 아미노산 잔기들의 %로서 본원에 정의된다. N 말단, C 말단, 또는 내부 연장, 결실 또는 가변 도메인의 항체 서열 외부로의 삽입의 어느 것도 서열 동일성 또는 유사성에 영향을 미치는 것으로 해석되지 않는다.

[0096]

"분리된" 이특이적 또는 다중 특이적 결합 분자, 예를 들어, 본원의 이특이적 또는 다중 특이적 항체는 재조합 숙주 세포에서 천연 환경의 성분으로부터 동정되고/되거나 회수되는 항체이다. 이의 천연 환경의 오염 성분들은 상기 분자, 예를 들어, 항체에 대한 진단학적 또는 치료학적 용도를 방해하고 예를 들어, 단일특이적 결합 유니트(AB 결합 유니트를 포함하는 이특이적 분자의 경우에 AA 및/또는 BB) 또는 5개 미만의 이특이적 결합 유니트를 갖는 분자와 같은 생성의 목적하지 않은 부산물 뿐만 아니라 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 양태에서, 항체와 같은 이특이적 결합 분자는 SDS-PAGE 또는 SEC-HPLC 방법에 의한 측정시 (1) 95중량% 초과 또는 98중량% 초과, 또는 99중량% 초과로, (2) 아미노산 서열분석기를 사용하여 N 말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개 잔기들을 수득하기에 충분한 정도 또는 (3) 코마시 블루 또는 바람직하게 은 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건하에서 SDS-PAGE에 의한 균일성으로 정제한다. 통상적으로, 분리된 다중 특이적, 예를 들어, 이특이적 결합 분자, 예를 들어, 항체는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조된다.

[0097]

용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하는" 또는 "에 대해 특이적"은 항체와 같은 결합 분자의 표적 분자, 예를 들어, 특정 폴리펩타이드 또는 특정 폴리펩타이드 상의 에피토프 또는 다른 표적(예를 들어, 당단백질 표적)으로의 결합을 언급하고, 비특이적 상호작용(예를 들어, 비특이적 상호작용은 소 혈청 알부민 또는 카세인에 결합할 수 있다)과는 측정가능하게 상이한 결합을 의미한다. 특이적 결합은 예를 들어, 항체의 대조군 분자로의 결합과 비교하여 표적 분자로의 항체의 결합을 결정함에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 특이적 결합은 표적, 예를 들어, 과량의 비-표지된 표적과 유사한 대조군 분자와의 경쟁에 의해 결정될 수 있다. 이 경우에, 특이적 결합은 표지된 표적의 프로브로의 결합이 과량의 비표지된 표적에 의해 경쟁적으로 억제되는 경우 지적된다. 본원에 사용된 바와 같은 특정 폴리펩타이드 표적상의 특정 폴리펩타이드 또는 에피토프에 대한 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하는" 또는 "에 대해 특이적"은 예를 들어, 표적에 대해 적어도 약 200nM, 대안적으로 적어도 약 150nM, 대안적으로 적어도 약 100nM, 대안적으로 적어도 약 60nM, 대안적으로 적어도 약 50nM, 대안적으로 적어도 약 40nM, 대안적으로 적어도 약 30nM, 대안적으로 적어도 약 20nM, 대안적으로 적어도 약 10nM, 대안적으로 적어도 약 8nM, 대안적으로 적어도 약 6nM, 대안적으로 적어도 약 4nM, 대안적으로 적어도 약 2nM, 대안적으로 적어도 약 1nM 또는 이를 초과하는 K_d 를 갖는 분자에 의해 나타낼 수 있다. 특정 경우에, 용어 "특이적 결합"은 분자가 임의의 다른 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 에피토프에 실질적으로 결합하는 것 없이 특정 폴리펩타이드 상의 특정 폴리펩타이드 또는 에피토프에 결합하는 경우의 결합을 언급한다.

[0098]

"결합 친화성"은 분자(예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위 및 이의 결합 파트너(예를 들어, 항원) 간의 비공유 상호작용의 총합 강도를 언급한다. 달리 지적되지 않는 경우, 본원에 사용된 바와 같은 "결합 친화성"은 결합 쌍(예를 들어, 항체와 항원)의 구성원 간의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화성을 언급한다. 이의 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화성은 일반적으로 해리 상수(K_d)로 나타내 수 있다. 예를 들어, K_d 는 약 200nM, 150nM, 100nM, 60nM, 50nM, 40nM, 30nM, 20nM, 10nM, 8nM, 6nM, 4nM, 2nM, 1nM, 또는 보다 강할수 있다. 친화성은 본원에 기재된 것들을 포함하는 당업계에 공지된 통상의 방법에 의해 측정될 수 있다. 저-친화성 항체는 일반적으로 항원에 느리게 결합하고 쉽게 해리하는 경향이 있는 반면 고친화성 항체는 일반적으로 항원에 신속하게 결합하고 보다 길에 결합된채로 남아있는 경향이 있다. 결합 친화성을 측정하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다.

[0099]

본원에 사용된 바와 같은, " K_d " 또는 " K_d 값"은 25°C에서 약 10개 반응 유니트(RU)로 고정화된 항원 CM5와 함께 예를 들어 BIAcoreTM-2000 또는 BIAcoreTM-3000 (제조원: BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.)을 사용하는, 예를 들어 표면 플라스몬 공명 분석을 사용하여 항체 및 표적 쌍에 적당한 기술에 의해 측정되는 해리 상수를 언급한다.

[0100]

용어 "이특이적 결합 유니트"는 각각 적어도 CM4 도메인을 포함하고 각각 상이한 결합 표적에 대한 결합 영역에 접합된 1쌍의 IgM 중쇄 불변 영역 폴리펩타이드를 포함하는 분자를 언급하기 위해 사용된다. 바람직하게, 접합은 바람직하게 IgM 중쇄 불변 영역 폴리펩타이드 서열의 N 말단으로 융합에 의한 것이다. 용어 "이특이적 결합 유니트"는 구체적으로 이후 본원에 정의된 바와 같은 "이특이적 IgM 항체 결합 유니트"를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 결합 분자는 5량체 또는 6량체 환 구조를 갖고 5개 또는 6개 이특이적 결합 유니트를 포함한다.

[0101]

용어 "접합체", "접합된", 및 "접합"은 임의의 모든 형태의 공유 또는 비-공유 결합을 언급하고, 제한없이 링커 또는 가교-결합체 및 비공유 연합을 통해 커플링하는 직접 유전학적 또는 화학적 융합을 포함한다.

[0102]

용어 "이특이적 IgM 항체 결합 유니트"는 가장 광범위한 의미로 사용되고 구체적으로 가변 도메인 서열(V_H)에

융합된 적어도 CM4 불변 도메인을 포함하는 한쌍의 IgM 항체 중쇄 불변 영역 폴리펩타이드를 포함하고, 각각의 가변 도메인 서열은 연합된 항체 경쇄 가변 도메인(V_L) 서열의 존재 또는 부재하에 상이한 표적에 결합한다. 하나의 양태에서, 이특이적 IgM 항체는 2개의 V_HV_L 항원 결합 영역을 포함하고, 각각은 하나의 항원 상에 상이한 에피토프 또는 2개의 상이한 항원 상의 에피토프에 결합할 수 있다. 이특이적 IgM 항체 결합 유니트는 단일 종 유래의 전장일 수 있거나 키메라일 수 있거나 인간화될 수 있다. 본 발명의 이특이적 IgM 항체는 5개 또는 6개의 이특이적 IgM 결합 유니트를 포함하는 5량체 또는 6량체 환 구조를 갖는다.

[0103] "전장 IgM 항체 중쇄"는 N 말단에서 C 말단 방향으로 항체 중쇄 가변 도메인(VH), 항체 불변 중쇄 불변 도메인 1(CM1 또는 C_μ1), 항체 중쇄 불변 도메인 2(CM2 또는 C_μ2), 항체 중쇄 불변 도메인 3(CM3 또는 C_μ3) 및 항체 중쇄 불변 도메인 4(CM4 또는 C_μ4)로 이루어진 폴리펩타이드이다. 본 발명에 따른 이특이적 전장 IgM 항체는 5개 또는 6개 단량체(결합 유니트)를 포함하고 각각은 2개의 상이한 결합 표적(에피토프)에 특이적으로 결합하는 2개의 항원 결합 부위를 갖는다. 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C 말단은 중쇄 또는 경쇄의 C 말단에서 마지막 아미노산을 나타낸다. 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N 말단은 중쇄 또는 경쇄의 N 말단에서 제1 아미노산을 나타낸다.

[0104] 본원에 사용된 용어 "결합가(valent)"는 항체내 특정 수의 결합 부위의 존재를 나타낸다. 이와 같이, 용어 "2가", "4가", 및 "6가"는 각각 2개 결합 부위, 4개의 결합 부위 및 6개의 결합 부위의 존재를 나타낸다. 본 발명에 따른 이특이적 IgM 항체에서, 각각의 결합 유니트는 2가이다. 따라서, 본원에서 이특이적 IgM 항체는 10 또는 12가를 갖는다. 상기 정의는 유사하게는 비-항체인 결합 분자에 적용된다.

[0105] 용어 "에피토프"는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 분자 결정인자를 포함한다. 특정 양태에서, 에피토프 결정인자는 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴 또는 설플로닐과 같은 분자의 화학적 활성 표면 그룹핑을 포함하고, 특정 양태에서, 특이적 3차원 구조 특성 및 특이적 하전 특성을 가질 수 있다. 에피토프는 항체에 의해 결합되는 항원 영역이다. "결합 영역"은 결합 분자에 의해 결합된 표적 상의 영역이다.

[0106] "다중에피토프 특이성"은 동일하거나 상이한 표적(들)상에 2개 이상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합하는 능력을 언급한다. "단일 특이적"은 단지의 하나의 에피토프에 결합하는 능력을 언급한다. 하나의 양태에 따라, 이특이적 IgM 항체는 적어도 10^{-7} M, 또는 10^{-8} M 또는 이 보다 양호한 친화성으로 각각의 에피토프에 결합한다.

[0107] 용어 "표적"은 광범위한 의미로 사용되고 구체적으로 폴리펩타이드, 핵산, 탄수화물, 지질, 및 이들이 천연 형태로 존재하는 바와 같은 생물학적 기능을 갖는 다른 분자들을 포함한다. "표적"은 예를 들어, 이특이적 결합 유니트가 2개의 상이한 세포 유형, 동일한 세포 유형의 상이한 아집단(예를 들어, 상이한 B-세포 집단) 또는 단일 세포 상의 2개의 상이한 실체를 표적화하는 세포일 수 있다.

[0108] 본 발명의 항체의 "항원-결합 부위" 또는 "항원-결합 영역"은 다양한 정도로 항원에 대한 결합 부위의 친화성에 기여하는 6개의 상보성 결정 영역(CDR)을 함유한다. 3개의 중쇄 가변 도메인 CDR(CDRH1, CDRH2 및 CDRH3) 및 3개의 경쇄 가변 도메인 CDRL(CDRL1, CDRL2 및 CDRL3)이 있다. CDR 및 골격 영역(FR)의 정도는 아미노산 서열의 컴파일링된 데이터베이스와 비교하여 결정하고, 여기서, 상기 영역들은 항체/항원 복합체로부터 서열 및/또는 구조적 정보 중에 가변성에 따라 정의되었다. 본 발명의 범위에는 보다 적은 CDR(즉, 결합 특이성이 3개, 4개 또는 5개의 CDR에 의해 결정되는)로 구성된 기능성 항원 결합 부위가 포함된다. 6개 미만의 완전한 세트의 CDR은 일부 결합 표적에 결합하기 위해 충분할 수 있다. 따라서, 일부 경우에, VH 또는 VL 도메인 단독의 CDR은 충분하다. 추가로, 특정 항체는 항원에 대해 비-CDR 연합 결합 부위를 가질 수 있다. 상기 결합 부위는 구체적으로 본 발명의 정의에 포함된다.

[0109] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "계면"은 제2 IgM 중쇄 불변 영역에서 하나 이상의 "접촉" 아미노산 잔기(또는 다른 비-아미노산 그룹)와 상호작용하는 제1 IgM 중쇄 불변 영역에서 이들 "접촉" 아미노산 잔기(또는 다른 비-아미노산 그룹, 예를 들어, 탄수화물 그룹)를 포함하는 영역을 언급하기 위해 사용된다.

[0110] 상기 용어 "비대칭 계면"은 제1 및 제2 IgM 중쇄 불변 영역과 같은 2개의 항체 쇄 사이에 및/또는 IgM 중쇄 불변 영역과 이의 매칭 경쇄 사이에 형성되는 계면(상기 본원에 정의된 바와 같이)을 언급하기 위해 사용되고, 여기서, 상기 제1 및 제2 쇄에서 접촉 잔기는 상보성 접촉 잔기를 포함하는 디자인에 의해 상이하다. 비대칭 계면은 크냅/홀 상호작용 및/또는 염 브릿지 커플링(전하 스와프) 및/또는 예를 들어, μ 중쇄를 이의 매칭 경쇄에 커플링하기 위한 크로스맵 방법에 의해서와 같은 당업계에 공지된 다른 기술에 의해 생성될 수 있다.

[0111] "강(cavity)" 또는 "홀"은 제2 폴리펩타이드의 계면으로부터 오목하게 되고 따라서 제1 폴리펩타이드의 인접한

계면 상에 상응하는 볼록해진 것("크늄")을 수용하는 적어도 하나의 아미노산 측쇄를 언급한다. 강(홀)은 본래의 계면에 존재할 수 있거나 합성적으로(예를 들어, 계면을 암호화하는 핵산을 변화시킴에 의해) 도입될 수 있다. 정상적으로, 제2 폴리펩타이드의 계면을 암호화하는 핵산은 강(cavity)을 암호화하도록 변형된다. 이를 성취하기 위해, 제2 폴리펩타이드의 계면에서 적어도 하나의 "본래의" 아미노산 잔기를 암호화하는 핵산은 본래의 아미노산 잔기보다 작은 측쇄 용적을 갖는 적어도 하나의 "임포트(import) 아미노산 잔기"를 암호화하는 DNA로 대체된다. 하나 이상의 본래 및 상응하는 임포트 잔기일 수 있음을 인지할 것이다. 대체되는 본래의 잔기들의 수에 대한 상한치는 제2 폴리펩타이드의 계면에서 잔기들의 총수이다. 강을 형성하기 위한 바람직한 임포트 잔기는 일반적으로 천연 아미노산 잔기이고 바람직하게 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T), 발린(V) 및 글라이신(G)으로부터 선택된다. 대부분의 바람직한 아미노산 잔기는 세린, 알라닌 또는 트레오닌이고, 가장 바람직하게는 알라닌이다. 바람직한 양태에서, 티로신(Y), 아르기닌(R), 페닐알라닌(F) 또는 트립토판(W)과 같은 볼록한 부분의 형성을 위한 본래의 잔기는 대형의 측쇄 용적을 갖는다.

[0112] "본래의" 아미노산 잔기는 본래의 잔기보다 작거나 큰 측쇄 용적을 가질 수 있는 "임포트" 잔기에 의해 대체되는 잔기이다. 임포트 아미노산 잔기는 천연적으로 존재하거나 비천연적으로 존재하는 아미노산 잔기일 수 있고 바람직하게는 전자이다.

[0113] "비천연적으로 존재하는" 아미노산 잔기란 유전자 코드에 의해 암호화되지 않지만 폴리펩타이드 쇄에서 인접한 아미노산 잔기(들)을 공유적으로 결합할 수 있는 잔기를 의미한다. 비천연적으로 존재하는 아미노산 잔기의 예는 노르류신, 오르니틴, 노르발린, 호모세린, 및 예를 들어, 문헌[참조: Ellman et al., Meth. Enzym. 202:301-336 (1991)]에 기재된 것들과 같은 다른 아미노산 잔기 유사체이다. 상기 비천연적으로 존재하는 아미노산 잔기를 생성하기 위해, 문헌[참조: Noren et al. Science 244: 182 (1989) and Ellman et al., supra]의 과정을 사용할 수 있다. 간략하게, 이것은 비천연적으로 존재하는 아미노산 잔기로 서프레서 tRNA를 화학적으로 활성화시키고 이어서 RNA의 시험관내 전사 및 해독을 포함한다. 특정 양태에서 본 발명의 방법은 IgM 중쇄에서 적어도 하나의 본래의 아미노산 잔기를 대체함을 포함하지만 하나 이상의 본래의 잔기는 대체될 수 있다. 정상적으로, 제1 또는 제2 폴리펩타이드의 계면에서 총수 이하의 잔기는 대체된 본래의 아미노산 잔기를 포함한다. 대체를 위해 바람직한 본래의 잔기는 "묻혀(buried)" 있다. "묻혀" 있는 이란 잔기가 근본적으로 용매에 접근불가능한 것임을 의미한다. 바람직한 임포트 잔기는 디설파이드 결합의 가능한 산화 또는 잘못된 쌍형성을 막기 위해 시스테인이 아니다.

[0114] 상기 볼록한 부분은 강에 "위치할 수 있고" 이것은 각각 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드의 계면 상에 볼록한 부분 및 강의 공간적 위치가 상기 볼록한 부분이 계면에서 제1 및 제2 폴리펩타이드의 정상적 연합을 상당히 교란시키는 것 없이 강에 위치할 수 있도록 함을 의미한다. Tyr, Phe 및 Trp와 같은 볼록한 부분은 전형적으로 계면의 축으로부터 직각으로 연장하지 않고 바람직한 형태를 갖기 때문에, 상응하는 강과 볼록한 부분의 배열은 X선 결정학 또는 핵 자기 공명(NMR)에 의해 수득된 것과 같은 3차원 구조를 기준으로 볼록한부분/강 쌍을 모델링하는 것에 의존한다. 이것은 분자 모델링의 기술을 포함하는, 당업계에서 광범위하게 수용된 기술을 사용하여 성취될 수 있다.

[0115] "본래의 핵산"이란 볼록한 부분 또는 강을 암호화하도록 "변형된"(즉, 유전학적으로 가공되거나 돌연변이된) 것일 수 있는 목적하는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 의미한다. 본래의 또는 개시 핵산은 천연적으로 존재하는 핵산일 수 있거나 사전 변형된 핵산(예를 들어, 인간화된 항체 단편)을 포함할 수 있다. 핵산을 "변형"시키는 것이란 본래의 핵산이 목적하는 아미노산 잔기를 암호화하는 적어도 하나의 코돈을 삽입하거나, 결실시키거나 대체함에 의해 돌연변이됨을 의미한다. 정상적으로, 본래의 잔기를 암호화하는 코돈은 임포트 잔기를 암호화하는 코돈에 의해 대체된다. DNA를 상기 방식으로 유전학적으로 변형시키기 위한 기술은 문헌[참조: Mutagenesis: a Practical Approach, M. J. McPherson, Ed., (IRL Press, Oxford, UK. (1991))에서 검토되었고, 예를 들어, 부위-지시된 돌연변이유발, 카세트 돌연변이유발 및 폴리머라제 쇄 반응(PCR) 돌연변이유발을 포함한다.

[0116] 볼록한 부분 또는 강은 합성 수단에 의해, 예를 들어, 재조합 기술, 시험관내 웨타이드 합성, 이전에 기재된 비천연적으로 존재하는 아미노산 잔기들을 도입하기 위한 기술, 웨타이드 또는 이를 기술의 일부 조합에 의해 제1 및 제2 폴리펩타이드의 계면으로 "도입"될 수 있다. 따라서, "도입된" 볼록한 부분 또는 강은 "비천연적으로 존재하거나", "비천연"이고, 이는 이것이 천연적으로 또는 본래의 폴리펩타이드(예를 들어, 인간화된 모노클로날 항체)에 존재하지 않음을 의미한다.

[0117] 바람직하게, 볼록한 부분을 형성하기 위한 임포트 아미노산 잔기들은 비교적 소수의 "로타며"(예를 들어, 약 3-

6)를 갖는다. "로타머"는 아미노산 측쇄의 에너지학적으로 우호적인 형태이다. 다양한 아미노산 잔기에 대한 로타머의 수는 문헌[참조: Ponders and Richards, J. Mol. Biol. 193: 775-791 (1987)]에서 검토된다.

[0118] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "숙주 세포"는 본 발명에 따른 항체를 생성하도록 가공될 수 있는 임의의 종류의 세포 시스템을 나타낸다. 하나의 양태에서, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포는 숙주 세포로서 사용된다.

[0119] 본원에 사용된 바와 같은, 표현 "세포", "세포주", 및 "세포 배양물"은 상호교환적으로 사용되고 모든 상기 지정은 후손을 포함한다. 따라서, 용어 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"는 1차 대상 세포 및 전달 횟수와 관련되는 것 없이 이로부터 유래되는 배양물을 포함한다. 또한, 모든 후손이 의도하거나 의도하지 않은 돌연변이로 인해 DNA 함량에서 정확하게 동일하지 않을 수 있는 것으로 이해된다. 본래에 형질전환된 세포에서 이에 의해 스크리닝된 바와 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 변이체 후손이 포함된다.

[0120] 핵산은 이것이 또 다른 핵산 서열과의 기능적 관계에 위치하는 경우 "작동적으로 연결된"이다. 예를 들어, 예비 서열 또는 분비 리더에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 관여하는 예비 단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동적으로 연결되거나; 프로모터 또는 인핸서는 이것이 서열의 전사에 영향을 미치는 경우 암호화 서열에 작동적으로 연결되거나; 리보솜 결합 부위는 이것이 해독을 촉진시키도록 위치되는 경우 암호화 서열에 작동적으로 연결된다. 일반적으로, "작동적으로 연결된"은 연결된 DNA 서열이 연속적이고 분비 리더의 경우에 연속적이고 판독 프레임에 있음을 의미한다. 그러나, 인핸서는 연속적일 필요는 없다. 연결은 통상의 제한 부위에서 결합시킴에 의해 성취된다. 상기 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어탭터 또는 링커는 통상적인 관행에 따라 사용된다.

상세한 기술

[0122] IgM은 항원에 의한 자극에 응답하는 B 세포에 의해 제조되는 제1 면역글로불린이고 혈청에 약 1.5mg/ml로 존재하고 반감기는 5일이다. IgM은 5량체 또는 6량체 분자이다. IgG와 같이 IgM 단량체는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄로 이루어진다. 그러나, IgG는 3개의 중쇄 불변 도메인(CH1, CH2 및 CH3)을 함유하지만, IgM의 중(μ)쇄는 IgE에서 ϵ 중쇄와 유사하게 제4 불변 도메인(CH4)을 함유한다. 상기 여분의 불변 도메인은 IgG 및 IgA 항체의 Fc 도메인에 비해 항원 결합 Fab 도메인의 회전 유연성에 관여하는 IgG 및 IgA 프롤린 풍부 힌지 영역 대신에 위치한다.

[0123] 5개의 IgM 단량체는 천연 IgM 분자를 형성하기 위해 추가의 소형 폴리펩타이드 쇄(J 쇄)와 복합체를 형성한다. J 쇄는 IgM이 항체 생성 세포로부터 분비되기 전에 μ 쇄의 중합화를 촉진시키는 것으로 고려된다. IgM의 결정화는 실제로 도전 과제인 것으로 입증되었지만, 문헌[참조: Czajkowsky and Shao (PNAS 106(35):14960-14965, 2009)]에서는 최근에 IgE Fc 도메인과 공지된 디설파이드 쌍별의 구조를 기반으로 IgM의 상동성 기반 구조적 모델을 공개했다. 상기 저자는 인간 IgM 5량체가 굴곡 편향을 갖는 벼섯 모양의 분자임을 보고한다.

[0124] 천연 5량체 또는 6량체 IgM 항체 분자에서 모든 중(μ)쇄는 동일하고 경쇄도 동일하다. 본 발명은 2개의 μ 쇄가 서로 상이한 IgM 분자의 생성을 가능하게 한다.

[0125] 하나의 측면에서, 본 발명은 5개 또는 6개의 이특이적 결합 유니트에 의해 형성된 5량체 또는 6량체 구조를 갖는, 2개의 상이한 결합 영역에 대해 결합 특이성을 갖는 이특이적 결합 분자에 관한 것이고, 여기서, 상기 이특이적 결합 유니트 각각은 동일한 2개의 결합 특이성을 갖고 제1 결합 표적에 대한 제1 결합 영역에 접합된 IgM 중쇄 불변 영역의 적어도 CM4 도메인을 포함하는 제1 쇄, 및 IgM 중쇄 불변 영역 및 제2 결합 표적에 대한 제2 결합 영역의 적어도 CM4 도메인을 포함하는 제2 쇄를 포함하고, 여기서, 상기 제1 및 제2 결합 표적은 상이하고 제1 및 제2 쇄는 어셈블리하여 이들의 각각의 IgM 중쇄 불변 영역 사이에 생성된 비대칭 계면의 결과로서 이특이적 결합 유니트를 생성한다.

[0126] 다양한 양태에서, IgM 중쇄 불변 영역은 CM2 및 CM3 도메인 중 하나 또는 둘다 또는 이의 단편 및 잠재적으로 다른 IgM 중쇄 불변 도메인 서열을 추가로 포함한다. 하나의 양태에서, 본 발명의 결합 분자는 완전한 IgM 중(μ)쇄 불변 도메인을 함유하고, 2개의 중쇄 사이에 비대칭 계면을 생성하기 위한 하나 이상의 변형을 갖는다.

[0127] 2개의 상이한 μ 중쇄(쇄 A 및 B)를 갖는 IgM 분자를 생성하기 위해서는 서로에 대해 2개의 상이한 결합 특이성과 함께 2개의 매칭 μ 중쇄(A 및 B)를 커플링시키는 해결책이 모색되어야 한다. 추가로, 경쇄가 결합 영역을 형성하기 위해 요구되는 경우, 목적하는 결합 특이성을 제공하기 위해 이의 매칭 경쇄와 각각의 중쇄를 커플링시키는 해결책이 모색되어야 한다.

[0128] 상기 커플링은 특정 잔기들 사이의 염 브릿지 쌍 전하 스위칭(또한 전하 스왑 또는 전하 역전으로서 언급됨) 및

/또는 2개의 쇄 사이의 크놉-홀 상호작용을 생성시킴에 의해 성취될 수 있다. 중쇄는 또한 크로스맵 기술을 사용함에 의해 이들의 매칭 경쇄와 쌍을 형성할 수 있다. 최적의 결과를 성취하기 위해 상이한 방법들이 또한 조합될 수 있다.

[0129] 또 다른 측면에서, 본 발명은 5량체 또는 6량체 구조를 갖는, 2개 이상의 상이한 결합 표적에 결합 특이성을 갖는 다중 특이적 결합 분자에 관한 것이다. 본 발명은 5개 또는 6개의 단일특이적 결합 유니트를 포함하는 결합 분자를 포함하고, 여기서, (i) 상기 단일특이적 결합 유니트 각각은 결합 표적에 대한 결합 영역으로 접합된 적어도 C μ 3 및 C μ 4 도메인을 각각 포함하는 2개의 IgM 중쇄 불변 영역을 포함하고, (ii) 상기 단일특이적 결합 유니트의 적어도 2개는 상이한 결합 표적에 결합한다. 본 발명은 5개 또는 6개의 이특이적 결합 유니트를 포함하는 결합 분자를 추가로 포함하고, 여기서, (i) 상기 이특이적 결합 유니트 각각은 결합 표적에 대한 결합 영역에 접합된 적어도 C μ 3 및 C μ 4 도메인을 각각 포함하는 2개의 IgM 중쇄 불변 영역을 포함하고, (ii) 상기 이특이적 결합 유니트의 적어도 2개는 상이한 결합 표적에 결합한다. 특정 양태에서, 결합 분자는 다중 특이적 IgM 항체이다.

[0130] 다양한 양태에서, IgM 중쇄 불변 영역은 C μ 2 도메인 또는 이의 단편 및 잠재적으로 다른 IgM 중쇄 불변 도메인 서열을 추가로 포함한다. 하나의 양태에서, 본 발명의 결합 분자는 완전한 IgM 중(μ)쇄 불변 도메인을 함유하고 2개의 중쇄 사이에 비대칭 계면을 생성하기 위해 하나 이상의 변형을 갖는다.

[0131] 적어도 하나의 이특이적 결합 유니트를 함유하는 본 발명의 다중 특이적 결합 분자에서, 2개의 상이한 μ 중쇄(쇄 A 및 B)를 갖는 IgM 분자를 생성하기 위해서는 내부 비대칭 계면을 통해 서로에 대해 2개의 상이한 결합 특이성을 갖는 2개의 매칭 μ 중쇄(A 및 B)를 커플링시키는 해결책이 모색되어야 한다. 추가로, 경쇄가 결합 영역을 형성하기 위해 요구되는 경우, 목적하는 결합 특이성을 제공하도록 이의 매칭 경쇄와 각각의 중쇄를 커플링시키는 해결책이 모색되어야 한다.

[0132] 추가로, 상이한 결합 표적에 결합하는 이웃하는 단일특이적 결합 유니트의 중쇄 불변 영역 사이에 외부 비대칭 계면을 생성하는 해결책이 모색되어야 한다.

[0133] 내부 및 외부 비대칭 계면을 생성하기 위한 기술은 제한 없이 특정 잔기들 사이의 염 브릿지 쌍 전하 스위칭(또한 전하 스왑 또는 전하 역전으로 언급됨) 및 2개의 쇄 사이의 크놉-홀 상호작용의 생성을 포함한다. 중쇄는 또한 크로스맵 기술을 사용함에 의해 이들의 매칭 경쇄와 쌍을 형성할 수 있다. 최적의 결과를 성취하기 위해 상이한 방법이 또한 조합될 수 있다.

1. 크놉-인투-홀 기술(Knobs-into-Holes Technique)

[0134] 본 발명의 5량체 또는 6량체 이특이적 또는 다중 특이적 결합 분자의 수율을 개선시키기 위해, IgM 중쇄 불변 영역, 예를 들어, CM4, CM2 및/또는 CM3 도메인은 몇몇 예시와 함께 상세히 문현[참조: WO 96/027011, Ridgway, J., B., et al., Protein Eng 9 (1996) 617-621; and Merchant, A. M., et al., Nat Biotechnol 16 (1998) 677-681]에 기재된 "크놉-인투-홀"에 의해 변형될 수 있다. 상기 방법에서, 2개의 IgM 중쇄 불변 도메인의 상호작용 표면은 상이한 결합 특이성을 갖고/갖거나 중쇄와 이의 매칭 경쇄 사이에 2개의 중쇄의 이종이량체화를 증가시키기 위해 변형된다. 2개의 중쇄 도메인, 예를 들어, CM4-CM4, CM2-CM2 및/또는 CM2-CM3-CM4/CM2-CM3-CM4 각각은 "크놉"일 수 있고, 다른 하나는 "홀"이다. 디설파이드 브릿지의 도입은 이종이량체를 안정화시키고(문현참조: Merchant, A. M., et al., Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35) 수율을 증가시킨다. 유사하게, 매칭 중쇄 및 경쇄는 상기 기술에 의해 서로 커플링될 수 있다[문현참조: Zhu, Z.; Presta, L.G.; Zapata, G.; Carter, P. Remodeling domain interfaces to enhance heterodimer formation. Prot. Sci. 6:781-788 (1997)].

[0135] 상기 방법 후, 이특이적 IgM 결합 분자(예를 들어, 항체) 내 다른 중쇄의 상응하는 도메인의 본래의 계면을 충족하는 하나의 중쇄의 CH4, CH2 및/또는 CH3 도메인의 본래의 계면 내 이특이적 IgM 결합 분자의 경우에, 아미노산 잔기는 보다 큰 측쇄 용적을 갖는 아미노산 잔기로 대체함에 의해 다른 IgM 중쇄 불변 영역에서 상응하는 도메인의 계면내 강에서 위치가능하는 계면내 볼록한 부분을 생성시킨다. 유사하게, 제2 IgM 중쇄는 제1 IgM 중쇄의 불변 영역에서 상응하는 도메인과의 계면 내에서 아미노산 잔기를 보다 작은 측쇄 용적을 갖는 아미노산 잔기로 대체함에 의해 변형되어 2개의 중쇄 영역 사이의 계면 내 홀(강)을 생성시킬 수 있다.

[0136] 크놉-홀 위치에서 인간 IgM CM4 및 CM2 도메인 계면 잔기들은 표 A 및 D에 나타낸다. 상기 표는 크놉-홀 쌍을 생성시키기 위해 사용될 수 있는 잠재적 돌연변이 뿐만 아니라, 도면에 보여지는 넘버링에 따라 도 4d에 보여지는 CM4 서열과 도 4b에서 보여지는 CM2 서열의 지적된 위치에서 천연 잔기를 확인한다. 따라서, 예를 들어, CM4

도메인에서, 350번 위치에서 천연 트레오닌(T) 잔기는 티로신(Y)로 돌연변이되어 크냅을 생성시킬 수 있고, 이는 천연 CM4 서열(세트 #1)의 잔기 352, 393 및 395에 대해 열거된 잠재적 돌연변이의 임의의 조합과 조합될 수 있다. 254번 및 397번 위치에서 추가의 돌연변이는 임의로 세트 #1과 조합될 수 있고 세트 #2 및 세트 #3에 나타낸다. 유사하게, 세트 #4는 352, 393, 395 및 397번 위치중 하나 이상에서 홀 돌연변이와 조합된 350번 및 395번 위치에서의 크냅 돌연변이를 예시한다. 세트 #4와의 조합을 위한 추가의 돌연변이는 세트 #5 및 세트 #6에 열거한다. 표 A의 나머지는 유사한 방식으로 판독될 수 있다. 세트의 일부는 또한 전하 도입, 즉 비-하전된 잔기로부터 하전된 잔기로의 변화(하기 논의된 표 C와 유사하게)를 포함한다.

[0138] 세트 #1-30에서 열거된 크냅-홀 돌연변이는 표 A에 제시된 바와 다양한 조합으로 사용될 수 있는 것으로 강조된다. 추가로, 상기 열거된 돌연변이는 표의 나머지에 열거된 다른 크냅 홀 및/또는 전하 스왑 및/또는 전하 도입 돌연변이와 조합될 수 있다. 따라서, 표 A에 제시된 크냅-홀 돌연변이 중 하나 이상은 본원에서 하기에 논의된 바와 같이 임의의 조합으로 표 D에 나타낸 크냅-홀 돌연변이 중 하나 이상 및/또는 표 B, C, E 및 F에 열거된 전하 스왑/전하 도입 돌연변이 중 하나 이상과 조합될 수 있다. 따라서, 당업자는 임의의 순서 또는 조합으로 표 A로부터의 임의의 세트를 선택하고 이를 표 C 등 유래의 임의의 세트와 혼합된, 표 B 유래의 임의의 세트와 혼합할 수 있다.

2. 염 브릿지 쌍 전하 스위칭(전하 스와핑)

[0140] 반대 전하는 서로 끌어당기고 유사 전하는 서로 반발한다. 아미노산 분자의 전하는 pH 의존성이고 유리된 아미노산의 α 아미노 그룹(N), α 카복시 그룹(C) 및 측쇄에 대해 결정되는 pK 값에 의해 특징화될 수 있다. 국소 환경은 아미노산이 단백질 또는 펩타이드의 일부인 경우 측쇄의 pK_a 를 변화시킬 수 있다.

[0141] 아미노산 분자의 전하 성질은 또한 분자의 전체 전하가 중성인 pH인 등전점 (pI)에 의해 특징분석될 수 있다. 아미노산은 그들의 측쇄에서 서로 상이하기 때문에, pI는 측쇄의 pK 의 차이를 반영한다.

[0142] 대부분의 아미노산(15/20)은 6에 가까운 pI를 갖고 따라서 이들은 중성의 총 전하를 갖는 것으로서 간주된다. Asp 및 Glu는 음으로 하전되어 있고 His, Lys, Arg는 양성으로 하전되어 있다.

[0143] 베섯 형태의 IgM 복합체에서 2개의 결합 유니트 간의 계면에는 상기 및 하기에서 상기 4개의 염 브릿지 및 단량체를 연결하는 디설파이드 브릿지가 있다. 이들 상호작용(Lys-238, Lys-268, Asp-293 및 Asp294)에 관여하는 잔기들은 2개의 단량체에서 동일하지만 상기 계면에서 이들의 상대적 배치는 IgM Fc 구조에서 CM3 도메인의 비대칭으로 인해 상이하다.

[0144] 전하 스와핑 또는 전하 도입 돌연변이를 위한 위치 및 아미노산 잔기들은 표 A, B, D, E, 및 F에 열거한다. 상기 논의된 바와 같이, 이들 돌연변이의 하나 이상 또는 돌연변이 세트는 하나 이상의 세트의 크냅-홀 돌연변이와 조합하여 2개의 상이한 IgM 중쇄 사이 및/또는 IgM 중쇄와 이의 매칭 경쇄 사이의 목적하는 비대칭 계면을 제공할 수 있다.

[0145] 바람직하게, 2개의 상이한 IgM 중쇄 불변 영역 간의 비대칭 계면은 예를 들어, 하나의 IgM 중쇄에서 1-8, 또는 1-7, 또는 1-6, 또는 1-5, 또는 1-4, 또는 1-3, 또는 1-2 돌연변이, 또는 2개의 IgM 중쇄에서 2-10, 또는 2-9, 또는 2-8, 또는 2-7, 또는 2-6, 또는 2-5, 또는 2-4, 또는 2-3의 조합된 돌연변이와 같이 8개 이하에 의해 생성된다.

[0146] 본원의 다중 특이적 결합 분자에 대해, 외부 비대칭 계면은 C μ 3 도메인에서의 변화에 의해 생성된다. 특히, 외부 비대칭 계면을 생성하기 위해, 염 브릿지는 C μ 3 도메인에서 반대로 하전된 아미노산 잔기들 사이에 쌍별 스 위치에 의해 형성된다. 다양한 양태에서, 외부 비대칭 계면을 제공하는 염 브릿지는 이웃하는 μ 쇄에서 예를 들어, K238 \leftrightarrow D293 또는 K268 \leftrightarrow D294일 수 있는 C μ 3-C μ 3 도메인내 적어도 하나의 쌍별 하전된 아미노산 잔기 스위치에 의해 형성된다.

3. 크로스맵 기술(CrossMap technique)

[0148] 상기 논의된 바와 같이, 크냅-인투-홀 기술 또는 전하 스와핑은 항체 중쇄의 이종이량체화를 가능하게 한다. 경쇄와 이들의 동족 중쇄의 올바른 연합은 이특이적 항체 결합 유니트의 하나의 절반의 항원 결합 단편(Fab) 내 중쇄 및 경쇄 도메인의 교환에 의해 성취될 수 있다. 크로스오버는 완전한 VH-CM 및 VL-CL도메인의 크로스오버로서, IgM 항체의 이특이적 결합 유니트의 하나의 절반내 VH 및 VL 도메인 또는 CM 및 CL 도메인의 크로스오버로서 일어날 수 있다. 상기 "크로스오버"는 항원 결합 친화성을 보유하지만 경쇄 잘못된 쌍별이 더 이상 일어날 수 없도록 2개의 아암을 상이하게 한다. 추가의 세부사항에 대해서는 IgG 항체와 관련하여 예를 들어, 문헌

[Schaeffer et al., (2011) *Proc Natl Acad Sci USA* 108(27): 11187-11192]을 참조한다.

[0149] 4. 이특이적 및 다중 특이적 IgM 결합 분자의 생성

[0150] 목적하는 돌연변이 (크롭-인투-홀, 전하 스왑 및/또는 크로스맵 기술 후)을 갖는 이특이적 IgM 항체 결합 유니트의 중쇄의 암호화 서열은 항체 DNA에 적당한 뉴클레오타이드 변화를 도입함에 의해 또는 뉴클레오타이드 합성에 의해 생성될 수 있다. 이어서 항체는 재조합 수단에 의해 생성될 수 있다.

[0151] 재조합 생성을 위한 방법은 당업계에 광범위하게 공지되어 있고 항체의 후속적 분리 및 일반적으로 약제학적으로 허용되는 순도로의 정제와 함께 원핵 및 진핵 세포에서 단백질 발현을 포함한다. 숙주 세포에서 항체의 발현을 위해, 각각의 변형된 중쇄 및 임의로 경쇄를 암호화하는 핵산은 표준 방법에 의해 발현 벡터로 삽입된다. 발현은 CHO 세포, NS0 세포, SP2/0 세포, HEK293 세포, COS 세포, PER.C6 세포, 효모, 또는 *S. cerevisiae* 세포와 같은 적당한 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 수행되고, 항체는 세포(상동액 또는 용해 후 세포)로부터 회수된다. 항체의 재조합 생성을 위한 일반적 방법은 예를 들어, 문헌[참조: Makrides, S. C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R. J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161; Werner, R. G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880]의 검토 부분에 기재되어 있다.

[0152] 이특이적 및 다중 특이적 항체는 예를 들어, 단백질 A-SEPHAROSE®, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 젤 전기영동, 투석, 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 통상의 면역글로불린 정제 과정에 의해 배양 배지로부터 적합하게 분리된다.

[0153] 이의 복합한 구조로 인해, 재조합 IgM의 대규모 생성은 어려웠지만, 비-립프성 세포를 사용한 IgM에 대한 여러 재조합 생성은 보고되었고, C6 신경교종 세포, CHO 세포, 및 HeLa 세포에서 IgM 중쇄(H) 및 경쇄(L)의 동시 발현을 포함한다. 상기 동시 발현은 성공적으로 중합체의 형성을 유도하지만 상기 수율은 전형적으로 낮고(문헌참조: 예를 들어, WO89/01975 and Wood et al., *J. Immunol.* 145, 3011-3016 (1990), CHO 세포에서의 발현을 위해), 5량체 또는 6량체 분자의 정확한 중합체 구조는 용이하게 결정될 수 없다. 아데노바이러스의 E1A 및 E1B 단백질을 발현하는 불멸화된 인간 망막 세포주에서 IgM의 생성은 미국 출원 공개 번호 제20060063234호에 기재되어 있다. 본 발명의 이특이적 IgM 항체를 생성하는 추가의 세부 사항은 하기 실시예에 제공된다.

[0154] 본 발명의 방법은 목적하는 5량체 또는 6량체 구조 대신, 단일특이적 항체, 항체 단편, 이특이적 결합 유니트의 단량체, 이량체, 삼량체 및/또는 사량체와 같은, 제조 공정의 다양한 부산물과 조합된 주요 성분으로서의 이특이적 또는 다중 특이적 IgM 항체와 같이 이특이적 또는 다중 특이적 IgM 결합 분자를 포함하는 조성물을 유도한다. 생성된 조성물은 일반적으로 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 75%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 92%, 또는 적어도 약 95%의 목적하는 5량체 또는 6량체 이특이적 결합 분자, 예를 들어, 항체를 함유하고, 이는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 99.5%, 또는 적어도 약 99.9%의 순도로 생성물을 수득하기 위해 당업계에 공지된 방법에 의해 추가로 정제된다.

[0155] 5. 이특이적 및 다중 특이적 IgM 결합 분자의 적용

[0156] 본 발명의 이특이적 및 다중 특이적 IgM 결합 분자, 예를 들어, 항체는 광범위한 치료학적 및 진단학적 용도를 갖는다.

[0157] 하나의 양태에서, 본원에서의 이특이적 결합 분자는 예를 들어, VEGF, TNF α 또는 IL6과 같은 동일한 가용한 표적 상에 2개의 부위에 결합한다. 상기 목적은 예를 들어, 단백질 상의 다중 부위를 길항시키고/시키거나 소정의 표적에 대한 결합가를 증가시킬 수 있다.

[0158] 또 다른 양태에서, 본원에서 이특이적 또는 다중 특이적 결합 분자는 EGFR 또는 HER2 (ErbB2)와 같은 동일한 세포 표면(수용체) 표적 상에 2개 이상의 부위를 결합한다. 따라서, 예를 들어, 이특이적 또는 다중 특이적 결합 분자는 HER2 분자 상의 4D5 및 2C4 에피토프 둘 다를 표적화할 수 있다. 이러한 방법은 생물 효능 및/또는 소정의 표적에 대한 결합가를 증가시킬 수 있다.

[0159] 또 다른 양태에서, 본 발명의 이특이적 또는 다중 특이적 결합 분자는 2개 이상의 상이한 가용성 표적(구형 단백질 또는 웨타이드), 예를 들어, TNF α 및 IL6, VEGF α 및 Ang2, 또는 2개의 사이토킨에 결합한다. 상기 방법은 특정 경로의 보다 완전한 차단; 소위 "사이토킨 스톰"으로 불리우는 차단, 또는 배위 효소 및 이의 기질, 예를 들어, 인자 IXa 및 인자 X의 인자의 차단을 유도할 수 있다.

[0160] 추가의 양태에서, 본원에서 이특이적 또는 다중 특이적 결합 분자는 가용성 표적 및 세포 표면 수용체 표적, 예

를 들어, 혈관형성 인자 및 신생 혈관 특이적 수용체에 결합할 수 있다. 상기 방법의 목적은 또한 특정 부위 또는 조직에서 증가된 전달 및 차단일 수 있다.

[0161] 여전히 추가의 양태에서, 본원에서 이특이적 결합 분자는 예를 들어, HER2 (ErbB2) 및 HER3 (ErbB3)와 같은 2개의 상이한 세포 표면 수용체 표적에 결합하도록 디자인한다. 유사하게, 본원에서 다중 특이적 결합 분자는 예를 들어, HER1, HER2 (ErbB2) 및 HER3 (ErbB3)와 같은 2개 이상의 상이한 세포 표면 수용체 표적에 결합하도록 디자인할 수 있다. 이것은 특이성 및 선택성을 증진시키고/시키거나 소정의 경로의 완전한 차단을 유도할 수 있다.

[0162] 본 발명의 이특이적 및 다중 특이적 결합 분자, 예를 들어, 항체는 또한 하나의 가용성 표적 또는 세포 표면 수용체 표적 및 긴 체류 시간 표적, 예를 들어, TNF α 및 혈청 알부민 또는 VEGF 및 혈청 알부민에 결합하도록 디자인할 수 있다. 이들 분자들은 알부민 특이성 없이 결합 분자보다 더 오래 순환하는 반감기를 가질 것으로 예상된다.

[0163] 추가의 양태에서, 본원에서 이특이적 결합 분자는 예를 들어, VEGF α 및 하이알루론산과 같은 하나의 가용성 표적 및 매트릭스 단백질 또는 기질에 결합할 수 있다. 유사하게, 본원에서 다중 특이적 결합 분자는 예를 들어, VEGF α 및 하이알루론산과 같은 하나 이상의 가용성 표적 및 하나 이상의 매트릭스 단백질 및/또는 기질에 결합할 수 있다. 수득한 이특이적 및 다중 특이적 결합 분자는 예를 들어, 안내 공간에서 이들의 증가된 체류 시간으로 인해, 나이 관련 황반 퇴화(AMD)와 같은 눈 병태의 항-혈관형성 치료에서의 유용성을 찾을 수 있다.

[0164] 이특이적 분자, 예를 들어, 하나의 가용성 또는 수용체 표적 및 수송체 수용체(즉, 트랜스페린 수용체)에 결합하는 항체, 예를 들어, 항-트랜스페린 특이성과 조합된 교모세포종에 발견된 항-EGFRvIII (액손 III가 결실된 돌연변이 형태)는 혈뇌 장벽을 통과하는 항체 전달에서의 용도를 찾을 수 있다.

[0165] 유사하게, 다중 특이적 분자, 예를 들어, 하나 이상의 가용성 또는 수용체 표적, 및 하나 이상의 수송체 수용체(즉, 트랜스페린 수용체)에 결합하는 항체, 예를 들어, 항-트랜스페린 특이성과 조합된 교모세포종에서 발견되는 항-EGFRvIII (액손 III가 결실된 돌연변이체)는 혈뇌 장벽을 통과하는 항체 전달에서의 용도를 찾을 수 있다.

6. 조성물, 약제학적 조성물 및 치료 방법

[0167] 하나의 측면에서, 본 발명은 정제된 이특이적 또는 다중 특이적 IgM 결합 분자, 예를 들어, 본원에서 이특이적 또는 다중 특이적 IgM 항체를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 조성물은 일반적으로 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 92%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%의 목적하는 이특이적 또는 다중 특이적 IgM 결합 분자, 예를 들어, 항체를 함유한다. 상기 조성물은 이특이적 또는 다중 특이적 결합 분자, 예를 들어, 항체가 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합된 약제학적 조성물일 수 있다.

[0168] 본 발명의 약제학적 조성물은 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 투여될수 있다. 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 표적 질환 또는 병태 및 목적하는 결과에 따라 다양할 것이다. 특정 경로의 투여에 의한 본 발명의 화합물을 투여하기 위해, 상기 화합물을 이의 불활성화를 막기 위한 물질로 피복시키거나 함께 동시 투여할 필요가 있을 수 있다. 예를 들어, 상기 화합물은 적당한 담체, 예를 들어, 리포좀 또는 희석제 중에 대상체에 투여될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 희석제는 식염수 및 수성 완충 용액을 포함한다. 약제학적 담체는 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉각적 제조를 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 약제학적 활성 물질에 대한 상기 매질 및 제제의 사용은 당업계에 공지되어 있다.

[0169] 조성물은 또한 보존제, 습윤화제, 유화제 및/또는 분산제와 같은 보조제를 함유할 수 있다. 미생물 존재의 예방은 멸균 과정에 의해 및 다양한 항세균 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등을 포함시킴에 의해 확신될 수 있다. 또한, 조성물에 당, 염화나트륨 등과 같은 등장성 제제를 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 추가로, 주사가능한 약제학적 형태의 지속적인 흡수는 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수를 지연하는 제제에 의해 일어날 수 있다.

[0170] 본 발명의 약제학적 조성물 중에 실제 용량 수준의 활성 성분은 환자에 대한 독성없이 특정 환자, 조성물 및 투여 방식에 대한 목적하는 치료학적 반응을 달성하기 위해 효과적인 활성 성분의 양을 수득하기 위해 다양할 수 있다. 상기 선택된 용량 수준은 사용되는 본 발명의 특정 조성물의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배설율, 치료 지속기간, 다른 약물, 사용되는 특정 조성물과 조합하여 사용되는 화합물 및/또는 물질, 치료받는 환자의 나이, 성별, 체중, 병태, 일반 건강 및 의학적 병력 및 의학적 분야에 널리 공지된 인자들을

포함하는 다양한 약리역학적 인자에 의존한다.

[0171] 조성물은 멀균성이어야만 하고 조성물이 시린지에 의해 전달가능한 정도로 유동성이어야 한다. 물에 추가로, 담체는 바람직하게 등장성 완충 식염 용액이다.

[0172] 하기의 실시예, 서열 목록 및 도면은 본 발명의 이해를 돋기 위해 제공되고, 이의 실제 범위는 첨부된 청구항에 제시된다. 본 발명의 취지로부터 벗어나는 것 없이 제시된 과정에서 변형될 수 있는 것으로 이해된다.

[0173] 본원 전반에 걸쳐 인용된 모든 특허 및 과학적 참조자료는 본원에 참조로서 명확히 인용된다.

실시예 1

1. 디자인된 돌연변이를 갖는 DNA 작제물의 생성

[0176] 재료 및 방법

[0177] a. DNA 작제물 합성

[0178] 디자인된 돌연변이를 갖는 모든 DNA 작제물은 당업계에 널리 공지된 방법을 사용하여, 각각의 발현 벡터로 서브 클로닝하기 위해 양 말단에 적격의 제한 부위를 갖는 시판 회사(Genewiz, Inc)에 의해 합성하였다.

[0179] b. 발현 벡터의 작제

[0180] 합성된 DNA 작제물은 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 트리스-EDTA 완충액 중에 재현탁시켰다. DNA ($1\mu\text{g}$)를 효소 분해시키고 합성된 유전자는 전기영동에 의해 캐리어 플라스미드 DNA로부터 분리하였다. 분해된 DNA는 표준 분자 생물학 기술에 의해 미리 분해된 플라스미드 DNA(μ 쇄에 대해 pFUSEss-CHIg-hM*03; κ 쇄에 대해 pFUSE2ss-CLig-hk, InvivoGen)에 연결하였다. 연결된 DNA는 컴피턴트 세균으로 형질전환시키고 다중 선택적 항생제를 갖는 LB 플레이트에 도말하였다. 여러 세균 콜로니를 집어내고 표준 분자 생물학 기술에 의해 DNA 제제를 제조하였다. 상기 제조된 DNA는 서열분석에 의해 확인하였다. 디자인된 DNA 서열과 100% 매칭되는 DNA 서열을 갖는 세균 클론만을 플라스미드 DNA 제조 및 후속적으로 세포 형질감염을 위해 사용하였다.

[0181] c. 상이한 크기의 μ 쇄

[0182] CM4 상호작용 계면 돌연변이(A 및 B)의 존재 또는 부재하에 2개의 상이한 μ 쇄가 함께 커플링할 수 있는지를 입증하기 위해, 독특한 분자량 및 리간드 특이성을 갖는 상이한 크기의 μ 쇄의 2개의 세트를 작제하였다.

[0183] i. Rtx 쇄는 C291S 돌연변이를 갖고 꼬리 일부 결실을 갖는 인간 IgM 항체 μ 쇄의 CM1 영역과 융합된 키메라 항-CD20 항체 리툭산(리툭시맙) Vh 영역에 대한 μ 쇄로 구성된다:

QVQLQQPGAEVLKPGASVMSCKASGYIFTSYNMHWVKQTPGRGLE
WIGAIYPGNQGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY
YCARSTYYGGDWYFNWVGAGTTVTVSSGSASAPTLFPLVSCENSPSDT
SSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKNNSDISSSTRGFPSSLRGKTYAATSQ
VLLPSKDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSVFVP
PRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSGVTTDQVQA
EAKESGPTTYKVISTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMC
VPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNG
EAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASISEDWNNSGERFTCTVHTDLPSP
KQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADV
QWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETY
TCVVAHEALPNRVTERTV

(서열 번호: 1)

[0184] [0185] 상기 Rtx 쇄는 약 60kD(당화가 없는) 및 66kD(4개의 N-당화 부위를 갖는)의 계산된 분자량을 갖고 Raji 세포와 같은 CD20 양성 B 세포에 결합할 수 있다.

[0186] ii. Fc 쇄는 인간 IgM μ 쇄 CM2 대지 CM4 영역을 포함하고 cMyc 태그를 함유하고 이의 꼬리 일부가 6His 태그로 대체되고 C291S 돌연변이를 갖는다:

GSGSKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSRQIQVSWLREGKQVG
 SGVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGL
 TFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDS
 VTISWTRQNGEAVKTHNISESHPNATFSAVGEASISEDDWNSGERFTC
 TVTHTDLPSPLKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLV
 TGFS PADV FVQWMQRGQPLSPEK YVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILIVS
 EEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKGGGSEQKLISEEDL
 NSAVDHHHHHH

(서열 번호: 2)

[0187]

[0188] **Fc** 쇄는 약 39kD(당화가 없는) 및 43kD(3개의 N-당화 부위가 있는)의 분자량을 갖고 항-myel 모노클로날 항체 9E4 또는 다른 항-myel 항체에 결합할 수 있다.

[0189]

iii. **0kt** 쇄는 C291S를 갖고 꼬리 일부 결실된 인간 μ 쇄의 CM2와 융합된 단일쇄 Fv 버전의 OKT3 (항-CD3)로 구성된다:

QVQLQQSGAELARP GASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLE
 WIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTA YMQLSSLTSEDSA VY
 YCARYYDDHYSLDYWGQGTTLT VSSGGGGSGGGGSGGGSQIVLTQS
 PAIMSASPGEKVTMTC SASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAS
 GVP AFRGSGSGT SYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKL
 EIKGSGSKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSRQIQVSWLREGK
 QVGSGVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDH
 RGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTT
 YDSVTISWTRQNGEAVKTHNISESHPNATFSAVGEASISEDDWNSGER
 FTCTVTHTDLPSPLKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATIT
 CLVTGFSPADVFVQWMQRGQPLSPEK YVTSAPMPEPQAPGRYFAHSIL
 TVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVD

(서열 번호: 3)

[0191]

0kt 쇄는 당화가 없는 약 61kD의 계산된 분자량 및 4개의 N-당화 부위를 포함하는 67kD의 계산된 분자량을 갖고 CD3 양성 T 세포에 결합할 수 있다.

[0192]

d. 경쇄 커플링

[0193]

i. 천연 키메라 리툭산 카파(κ) 쇄

QIVLSQSPA ILSASPGEKVTMTCRASSSVYIHWFQQKPGSSPKPWYAT
 SNLASGV PVRFSGSGSGT SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGG
 GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTL SKADYEKHKVYACEVT
 HQGLSSPVTKSFNRGEC

(서열 번호: 4)

[0195]

상기 κ 쇄는 약 23kD의 계산된 분자량을 갖고 리툭산 IgM 중쇄에 연결할 수 있다.

[0196]

e. 계면 돌연변이

[0197]

크롭 및 홀, 정전기 전하 커플링은 비대칭적으로 CM3 상호작용 계면에 도입하여 2개의 μ 쇄의 이종이량체화를 최대화하였다. CM3 상호작용 계면 돌연변이의 2개의 쌍을 합성하였다.

[0198] i. **Fc1a**는 C291S 및 T350Y 돌연변이를 갖고 꼬리 일부가 결실된 인간 μ 쇄 CH2 내지 CH4 영역이다:

GSGSKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSRQIQVSWLREGKQVG
 SGVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGL
 TFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDS
 VTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASISEDDWNSGERFTC
 TVTHTDLPSPPLKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATI~~Y~~CLV
 TGFSPADVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVS
 EEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGK

(서열 번호: 5)

[0200] **Fc1a** 쇄는 당화 없이 약 36kD의 계산된 분자량을 갖고 3개의 N-당화 부위가 포함되는 경우 41kD의 계산된 분자량을 갖는다.

[0201] ii. **Fc1b**는 인간 μ 쇄 CH2 내지 CH4이고 C291S, L352S 및 H395V 돌연변이를 갖고 꼬리 일부는 결실되어 있다.

GSGSKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSRQIQVSWLREGKQVG
 SGVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGL
 TFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDS
 VTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASISEDDWNSGERFTC

TVTHTDLPSPPLKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATI~~TC~~S
 TGFSPADVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFA~~V~~SILTVS
 EEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGK

(서열 번호: 6)

[0204] **Fc1b** 쇄는 당화 없이 약 36kD의 계산된 분자량을 갖고 3개의 N-당화 부위를 포함하는 41kD의 계산된 분자량을 갖는다.

[0205] iii. **Fc2a**는 인간 μ 쇄 CH2 내지 CH4 영역으로 이루어지고 C291S, T350Y, T354E, 및 I397E 돌연변이를 갖고 꼬리 일부 결실을 갖는다.

GSGSKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSRQIQVSWLREGKQVG
 SGVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGL
 TFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDS
 VTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASISEDDWNSGERFTC
 TVTHTDLPSPPLKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATI~~Y~~CLV
 EGFSPADVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSELTVS
 EEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGK

(서열 번호: 7)

[0207] **Fc2a** 쇄는 당화 없이 약 36kD의 계산된 분자량을 갖고 3개의 N-당화 부위를 포함하는 41kD의 계산된 분자량을 갖는다.

[0208] iv. **Fc2b**는 인간 μ 쇄 CH2 내지 CH4이고 C291S, L352S, T354K, H395V, 및 I397K 돌연변이를 갖고 꼬리 일부가 결실되어 있다.

GSGSKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSRQIQVSWLREGKQVG
 SGVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGL
 TFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDS
 VTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASISEDDWNSGERFTC
 TVTHTDLPSPPLKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATI~~TC~~S
 KGFSPADVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFA~~V~~SILTVS
 EEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGK

(서열 번호: 8)

[0210] **Fc2b** 쇄는 당화 없이 약 36kD의 계산된 분자량을 갖고 3개의 N-당화 부위를 포함하는 41kD의 계산된 분자량을

갖는다.

[0211] f. 계면 돌연변이

[0212] 크냅, 훌 및 정전기 전하 커플링을 갖는 **Fc2a** 쇄 및 **Fc2b** 쇄는 2개의 μ 쇄의 비대칭적으로 이종 이량체화를 위한 분자 클로닝에 의해 리툭산 및 OKT3(항-CD3 항체) scFv 둘 다에 추가로 연결되어 있다.

[0213] i. **Rtx2a**는 C291S, T350Y, T354E, 및 I397E 돌연변이를 갖고 꼬리 일부가 결실되어 있는 인간 μ 쇄의 CM1 내지 CM4가 융합된 키메라 리툭산(항-CD20) Vh 영역에 대한 μ 쇄로 구성된다.

QVQLQQPGAEVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE
WIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY
YCARSTYYGGDWYFNWVGAGTTVTVSSGSASAPTLFPLVSCENSPSDT
SSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKNNSDISSTRGFPVSLRGKGKYAATSQ
VLLPSKDVMQGTDEHVVKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSVFVP
PRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQLVSLREGKQVGSVTTDQVQA
EAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMC
VPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNG
EAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASISEDWNSGERFTCTVHTDLPSP
KQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATIYCLVEGFSPADVFV
QWMQRGQPLSPEKVVTSAPMPEPQAPGRYFAHS~~EL~~TVSEEEWNTGET
YTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGK

[0214] (서열 번호: 9)

[0215] **Rtx2a** 쇄는 당화 없이 약 61kD의 계산된 분자량을 갖고 4개의 N-당화 부위를 갖는 67kD의 계산된 분자량을 갖는다.

[0216] ii. **Rtx2b**는 C291S, L352S, T354K, H395V, 및 I397K 돌연변이를 갖고 꼬리 일부가 결실되어 있는 인간 μ 쇄의 CM1 내지 CM4와 융합된 키메라 리툭산(항-CD20) Vh 영역에 대한 μ 쇄로 구성된다.

QVQLQQPGAEVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLE
WIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY
YCARSTYYGGDWYFNWVGAGTTVTVSSGSASAPTLFPLVSCENSPSDT
SSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKNNSDISSTRGFPVSLRGKGKYAATSQ
VLLPSKDVMQGTDEHVVKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSVFVP
PRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQLVSLREGKQVGSVTTDQVQA
EAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMC
VPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNG
EAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASISEDWNSGERFTCTVHTDLPSP
KQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCSV~~Y~~GFSPADVFV
QWMQRGQPLSPEKVVTSAPMPEPQAPGRYFA~~V~~SKLT~~V~~SEEEWNTGET
YTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGK

[0217] (서열 번호: 10)

[0218] **Rtx2b** 쇄는 당화 없이 약 61kD의 계산된 분자량을 갖고 4개의 N-당화 부위를 포함하는 67kD의 계산된 분자량을 갖는다.

[0219] iii. **0kt2a**는 C291S, T350Y, T354E, 및 I397E 돌연변이를 갖고 꼬리 일부가 결실되어 있는 인간 μ 쇄의 CM2 내지 CM4와 융합된 OKT3(항-CD3 항체) scFv로 구성된다.

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLE
 WIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSA
 YCARYYDDHYSLDYWGGTTTVSSGGGGSGGGGSQIVLTQS
 PAIMSASPGEKVTMTCASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKL
 GVAHFRGSGSGTYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTK
 EIKGSGSKVSVFVPPRDGFPGNPRKSKLICQATGFSRQIQVSWLREGK
 QVGSGVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDH
 RGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCVTDLTT
 YDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASISEDDWNSGER
 FTCTVTHTDLPPLKQTISRPKGVALHRPDVYLLPAREQLNLRESATIY
 CLVEGFSPADVFVQWMQRGQPLSPEK YVTSAPEPQAPGRYFAHSE
 LTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGK

(서열 번호: 11)

[0220]

0kt2a 쇄는 당화 없이 약 62kD의 계산된 분자량을 갖고 4개의 N-당화 부위를 포함하는 68kD의 계산된 분자량을 갖는다.

[0222]

iv. 0kt2b는 C291S, L352S, T354K, H395V, 및 I397K 돌연변이를 갖고 꼬리 일부가 결실되어 있는 인간 μ 쇄의 CM2 내지 CM4와 융합된 OKT3(항-CD3 항체) scFv로 구성된다.

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLE
 WIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSA
 YCARYYDDHYSLDYWGGTTTVSSGGGGSGGGGSQIVLTQS
 PAIMSASPGEKVTMTCASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKL
 GVAHFRGSGSGTYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTK
 EIKGSGSKVSVFVPPRDGFPGNPRKSKLICQATGFSRQIQVSWLREGK
 QVGSGVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDH
 RGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCVTDLTT
 YDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASISEDDWNSGER
 FTCTVTHTDLPPLKQTISRPKGVALHRPDVYLLPAREQLNLRESATIY
 CSVKGFSPADVFVQWMQRGQPLSPEK YVTSAPEPQAPGRYFAVSKL
 TVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGK

(서열 번호: 12)

[0223]

0kt2b 쇄는 당화 없이 약 62kD의 계산된 분자량을 갖고 4개의 N-당화 부위를 포함하는 약 68kD의 계산된 분자량을 갖는다.

[0225]

2. 단백질 발현, 정제 및 특징 분석

[0226]

a. 형질감염

[0227]

IgM은 293F 세포(Invitrogen)와 같은 포유동물 세포에 동물 비율로 여러 상이한 발현 벡터를 동시-형질감염시켜 제조하였다. 발현 벡터를 위한 $10\mu\text{g}$ 의 혼합 DNA는 2ml의 Opti-MEM(Invitrogen) 중에서 실온에서 30분동안 $20\mu\text{l}$ 의 293펙틴(Invitrogen)과 혼합하였고 이어서 10^7 293F 세포에 첨가하였다. 293F 세포와의 형질감염은 보충물을 수거하기 전에 형질감염 후 72시간 동안 항온처리하였다.

[0228]

b. 면역침전에 의한 단백질 정제

[0229]

i. 포획 선택 IgM (Catalog 2890.05, BAC, Thermo Fisher)

[0230]

형질감염된 상등액을 10분 동안 2,000G에서 원심분리하여 수거하였다. IgM 단백질은 친화성 포획 선택 IgM 친화성 매트릭스를 사용한 면역침전에 의해 정제하였다. $100\mu\text{l}$ 의 포획 선택 IgM 슬러리는 15ml의 수거된 상등액에 첨가하였다. 상등액 및 친화성 매트릭스 혼합물은 진탕기에서 2시간 동안 실온에서 항온처리하였다. 이어서 친화성 매트릭스를 2분 동안 300g에서 원심분리하였고 용액을 따라 버린다. 친화성 매트릭스는 3회 동안 PBS + 0.05% Tween으로 추가로 세척하였다. 최종적으로, 상기 정제된 IgM 단백질은 5분 동안 실온에서 $20\mu\text{l}$ 의 4x LSD 샘플 로딩 완충액을 항온처리하고 이어서 10,000g에서 원심분리하여 친화성 매트릭스로부터 세척하였다. 친화성 매트릭스는 추가로 $60\mu\text{l}$ 의 PBS로 세척하였고 상등액은 겔 전기영동에 의한 분석을 위해 풀링하였다.

- [0231] c. 겔 전기영동
- [0232] i. 비-환원 SDS PAGE
- [0233] 비-환원 SDS PAGE는 상이한 분자량의 다양한 돌연변이 IgM 단백질을 분리하기 위해 사용하였다. Novex 4-12% Bis-Tris Gel (Life Technologies)는 Novex MES SDS 전개 완충액 (Life Technologies)과 함께 사용하였다.
- [0234] ii. 환원 SDS-PAGE
- [0235] NuPage LDS 샘플 완충액 (Life Technologies) 및 NuPage 환원제 디티오프레이톨 (Life Technologies)을 IgM 단백질 샘플에 첨가하고 NuPage Novex 4-12% Bis-Tris 겔 (Life Technologies, cat# NP0322) 상에 로딩하기 전에 10분 동안 80°C로 가열하였다. NuPage MES SDS 전개 완충액 (Life Technologies, cat# NP0002)은 겔 전기영동을 위해 사용하였다. 전기영동이 완료된 후, 겔은 장치로부터 제거하고 콜로이드 블루 염색 (Life Technologies, manual #LC6025)을 사용하여 염색시켰다.
- [0236] iii. 겔 랜드 정량
- [0237] 단백질 겔을 건조시키고 이어서 이미지 스캐너를 사용하여 디지털화한다. 겔 이미지는 이미지 J 프로그램으로 프로세싱하고 특정 랜드에 단백질의 양은 겔 정량 기능을 사용하여 결정한다.
- [0238] iv. SDS-PAGE 겔의 분석
- [0239] 야생형 및 가공된 IgM Fc 쌍 2a 및 2b SDS-PAGE 겔을 포함하는 Rtx:Fc. 비환원 SDS-PAGE 겔상의 레인 1, 2, 및 3(도 6)은 동종이량체 Rtx (H2L2, MW 168-180 kDa로 예상됨)에 대한 상부 랜드 및 단독의 Rtx2a, 단독의 Rtx2b 및 야생형 Rtx에 대한 절반-항체(HL, 예상된 MW 84-90 kDa)에 대한 하부 랜드를 보여준다. 비연합된 Fc(예상된 MW 36-41 kDa)에 대한 랜드는 모든 3개의 레인에 존재하고; 연합된 Fc (예상된 MW 72-82 kDa)는 또한 80-90 kDa 랜드의 성분일 수 있다. 레인 2는 Rtx2a:Fc2b의 혼합물을 보여주고 레인 3은 Rtx2b:Fc2a의 혼합물을 보여준다. 둘다의 레인에서, 이종이량체(예상된 MW 120-131 kDa)는 화살표로 지적한다. 가공된 Rtx2a:Fc2b 및 Rtx2b:Fc2a 조합 둘다는 상당한 이종이량체의 존재를 보여주는 반면, 야생형 Rtx-Fc 조합은 단지 소량의 이종이량체를 보여준다.
- [0240] Fc는 실제로 도 7에서 보여지는 환원된 SDS-PAGE의 레인 1-3에 나타낸 바와 같이 존재한다: 상부 랜드는 Rtx 중쇄(예상된 MW 61-67 kDa)이고, 중앙 랜드는 Fc (예상된 MW 36-41 kDa)이고, 바닥 랜드는 Rtx 경쇄(예상된 MW 23 kDa)이다.
- [0241] 야생형 및 가공된 IgM Fc 쌍 2a 및 2b를 포함하는 Okt-Fc, SDS-PAGE, 도 8, 레인 1-3
- [0242] 야생형 Okt:Fc 조합 (SDS-PAGE, FIG. 8, 레인 1)은 Okt:Fc 이종이량체 (예상된 MW 98-107 kDa)의 상부 랜드, 비연합된 Fc(예상된 MW 36-41)에 대한 바닥 랜드 및 연합된 Fc를 나타내는 큰 중앙 랜드(예상된 MW 72-82)를 보여준다. 대조적으로, Okt2a:Fc2b 및 Okt2b:Fc2a 조합에 대해, 도 8, 레인 2에 나타낸 SDS-PAGE 겔은 상기 연합된 Fc2b 및 Okt2a 동종이량체에 대해 현저한 랜드 및 상기 연합된 Fc2b 및 Okt2a 동종이량체에 대해 연한 랜드를 보여주고 Okt2a:Fc2b 이종이량체와 동일하다. 상기 화살표는 이종이량체를 지적한다.
- [0243] Okt2a 및 Fc2b 둘다는 환원된 겔(도 9에 나타낸 SDS-PAGE 겔, 레인 2)에 존재한다. 유사한 결과는 도 8 및 9에 나타낸 겔 상의 Okt2b:Fc2a 쌍에 대해 나타낸다.
- [0244] 도 8 및 9, 레인 4-6에 보여지는 야생형 및 가공된 IgM Fc 쌍 2a 및 2b SDS-PAGE 겔을 포함하는 Okt:Rtx
- [0245] 야생형 Okt:Rtx 조합 (도 8에 보여지는 SDS-PAGE 겔, 레인 4)은 wt Rtx 동종이량체(H2L2, 예상된 MW 168-180 kDa)의 랜드, wt Rtx 절반-항체(HL, 예상된 MW 84-90 kDa)의 랜드 및 Okt 동종이량체(예상된 MW 124-133 kDa) 일 수 있는 연한 랜드를 보여준다. 대조적으로, 가공된 Okt2a:Rtx2b 조합 (도 8에 보여지는 SDS-PAGE 겔, 레인 5)은 Rtx2b 동종이량체 (예상된 MW 168-180 kDa) 및 절반 항체 (예상된 MW 84-90 kDa) 뿐만 아니라 상당한 이종이량체(예상된 MW 146-157)의 존재를 보여준다. 환원된 경우(도 9에 보여지는 SDS-PAGE, 레인 5), Rtx2b 경쇄는 MW 23 kDa에서 랜드를 보여주고; 60-80 kDa 사이의 진한 랜드는 Rtx2b 중쇄 (예상된 MW 61-67 kDa) 및 Okt2a 중쇄 (예상된 MW 62-67 kDa)로 구성될 가능성이 있다. 유사한 결과는 Okt2b:Rtx2a 쌍에 대해 나타낸다.
- [0246] 결론:
- [0247] 모든 시험된 3개의 시스템에 대해 -- Okt:Rtx, Okt:Fc, Rtx:Fc -- 가공된 IgM Fc 변이체는 천연 (비-가공된) IgM Fc와 비교하여 실질적으로 증가된 이종이량체 형성을 보여주었다. 단일 쌍의 서열(즉, 도 2a 및 2b)을 시험

하고 가공된 Fc 계면의 추가의 변이체는 동종이량체 형성을 추가로 감소시키고 이종이량체 형성을 최적화하기 위해 평가될 수 있다.

[0248] 3. 이특이적 기능성 분석

[0249] a. 2개의 리간드에 대한 ELISA 분석

OKT3 (A체) 및 cMyc 웨타이드 (B체)를 갖는 IgM은 가용성 CD3 ϵ 단백질 포획 및 항-cMyc(9E10) 검출을 사용한 ELISA 분석에 의해 평가한다. 가용성 CD3e 단백질은 150 mM의 NaHCO₃ 중에서 2mg/ml로 ELISA 플레이트상에 코팅 시킴에 이어서 PBS 중에서 3% BSA로 차단시킨다. 형질감염된 IgM-OKT3-cMyc를 함유하는 상등액 (100 μ l)는 25°C에서 4시간 동안 차단된 ELISA에 첨가한다. PBS로 세척한 후, 9E10 항체는 실온에서 2시간동안 ELISA 플레이트로 첨가한다. 항-마우스 IgG-HRP는 PBS로 세척한 후 첨가한다. 이특이적 IgM의 존재는 HRP 기질을 첨가한 후 OD 450으로 판독함에 의해 검출한다.

Okt3 (A체) 및 리툭산 (B체)을 갖는 IgM은 가용성 CD3 ϵ 단백질 포획 및 단백질-L-HRP 검출을 사용한 ELISA 분석에 의해 분석한다. 가용성 CD3e 단백질은 150mM의 NaHCO₃ 중 2mg/ml로 ELISA 플레이트에 코팅시키고 이어서 PBS 중에서 3% BSA로 차단시킨다. 형질감염된 IgM-Okt3:Rtxa를 함유하는 상등액 (100 μ l)을 25°C에서 4시간 동안 차단된 ELISA 플레이트에 첨가한다. PBS로 세척한 후, 단백질-L-HRP는 실온에서 2시간동안 ELISA 플레이트에 첨가한다. 이특이적 IgM의 존재는 HRP 기질을 첨가한 후 OD 450으로 판독함에 의해 검출한다.

[0252] b. 표적 결합의 FACS 분석

T 세포로의 IgM-OKT3-cMyc 결합은 T 세포주 (Peer, 양성 세포주) 및 B 세포주 (Daudi, 음성 대조군 세포주)로의 항체의 결합에 의해 확인한다. 세척 후, 로다민 표지된 9E10은 세포 혼탁액에 첨가한다. 세포 표적 결합은 CD20 항원의 존재 또는 부재하에 양성 및 음성 둘다의 조절된 세포의 MFI에 의해 검출한다.

[0254] c. 이특이적 결합에 대한 형광 현미경 분석

각각의 세포 유형에 대해 2개의 상이한 바이탈 염료에 의해 표지된 CD3 양성 세포 및 CD20 양성 세포의 2개 집단을 함께 규합하는 능력에 의해 디자인된 IgM의 이특이적 결합을 입증한다. 예를 들어:

i. CD3 양성 세포주(Peer)에 대한 녹색 형광 사이토졸 바이탈 염료 (CellTraceTM 칼세인 녹색 AM) 표지화

ii. 적색 형광 사이토졸 바이탈 염료 (CellTraceTM 칼세인 적색-오렌지, AM) 표지된 CD20 양성 B-세포 세포주 (Daudi)

[0258] 실시예 2

[0259] 1. 디자인된 돌연변이를 갖는 DNA 작제물의 생성

[0260] DNA 작제물 합성 및 발현 벡터의 작제는 실시예 1에서와 같이 수행한다.

[0261] a. 상이한 크기의 μ 체

[0262] A체는 인간 μ 체의 CM1과 융합된 키메라 OKT3(항-CD3) Vh 영역에 대한 전장 μ 체로 구성된다:

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIG
YINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR
YYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGC
LAQDFLPDSITFSWKYKNNSDIISSTRGFPVSLRGKGKYAATSQVLLPSKD
VMQGTDEHVVKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVPPRDGFFGN
PRKSKLICQATGFSRQIQVSWLREGKQVGSGVTTDQVQAEAKESGPTT
YKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRV
FAIIPPSFASIFLTKSTKLTCVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHNI
SESHPNATFSAVGEASICEEDWNSGERFTCTVTHTDLPSPLKQTISRPK
GVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADVFVQWMQRGQP
LSPEKYVTSAPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEAL
PNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

[0263] (서열 번호: 13)

[0264] A쇄는 약 63kD의 분자량을 갖고 CD3 (10977-H08H, Sino Biological), 또는 T 세포의 가용성 ε 쇄에 결합할 수 있다.

[0265] B쇄는 인간 μ 쇄의 CH2와 융합된 cMyc 태그를 갖는다:

QVQLGGPEQQLTSEEIDLNSAVLPVIAELPPKVSVFVPPRDGFFGNPRKS
KLIQCATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKESGPTTYKVT
STLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIP
PSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESH
PNATFSAVGEASICEDDWNSGERFTCTVHTDLPSPLKQTISRPKGVAL
HRPDVYLLPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADVFVQWMQRGQPLSPE
KYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVVVAHEALPNRV
TERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

(서열 번호: 14)

[0266]

B쇄는 약 41kD의 분자량을 갖고 항-myc 모노클로날 항체 9E4 또는 다른 항-myc 항체에 결합할 수 있다.

[0268]

또 다른 B쇄는 인간 μ 쇄의 CH2와 융합된 CrossMab^{M-CL} ($V_H + C_L$) 리툭시맙(항-CD20)에 대한 전장 μ 쇄를 갖는다:

QVQLQQPGAEVLVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQT PGRGLEWIG
AIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR
STYYGGDWYFNVWAGTTVTVSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHLPVIAELPPKVSF
VPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSVTTDQVQ
AEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMC
VPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQN
GEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNSGERFTCTVHTDLPS
PLKQTISRPKGVALHRPDVYLLPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADV
FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGET
YTCVVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

(서열 번호: 15)

[0269]

B쇄는 약 64kD의 분자량을 갖고 CD20 양성 B 세포에 결합할 수 있다.

b. 상이한 경쇄 커플링

[0272]

본래 키메라 OKT3 κ 쇄

QIVLTQSPAAMSASPGEKVTMTCASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYD
TSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFG
SGTKLEINRAVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQW
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACEVT
HQGLSSPVTKSFNRGEC

(서열 번호: 16)

[0273]

리툭시맙에 대한 CrossMab^{CM1-CL}

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYA
TSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFG
GGTKLEIKSSASTKGPSVPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTW
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNWK
PSNTKVDKRVEPKSC

(서열 번호: 17)

[0276] c. 상이한 발현 벡터에 대한 상이한 선택 마커

[0277] 상이한 선택 마커는 동시 형질감염을 위해 사용되는 상이한 발현 벡터 상에서 사용한다. 다중 약물은 IgM 생성과 관련된 모든 필요한 발현 벡터를 수용하기 위해 세포의 선택을 위해 사용한다. 표준 분자 생물학 기술은 이들 벡터에 특정 DNA를 클로닝하기 위해 사용한다.

[0278] i. Mu 쇄는 제오신 선택(항-zn-1, Invivogen)을 사용한다. 제오신은 100 μ g/ml의 농도로 사용한다. Sh ble 유전자를 함유하는 플라스미드를 사용한 형질감염 후, 이어서, 상기 세포는 안정한 형질감염체를 선별하기 위해 100 μ g/ml에서 제오신을 함유하는 Opti-CHO 배지에서 항온처리한다.

[0279] ii. κ 쇄는 블라스티시딘 S 선별(항-bl-1, Invivogen)을 사용한다. 블라스티시딘 S는 10 μ g/ml의 농도로 사용한다. bsr 유전자를 함유하는 플라스미드로 형질감염시킨 후, 이어서 세포는 안정한 형질감염체를 선별하기 위해 10 μ g/ml로 블라스티시딘 S를 함유하는 Opti-CHO 배지에서 항온처리한다.

[0280] d. 단백질 발현, 정제 및 특징분석

[0281] i. 형질감염

[0282] IgM은 동일 몰비 또는 가변 몰비(5 내지 10배 차이)에서 여러 상이한 발현 벡터를 293 세포 또는 CHO 세포와 같은 포유동물 세포에 동시 형질감염시킴에 의해 제조한다. 발현 벡터를 위한 DNA는 PEI와 혼합하고 이어서 CHO-S 세포에 첨가한다. CHO-S 세포를 사용한 PEI 형질감염은 확립된 기술에 따라 수행한다(문헌참조: "Biotechnology and Bioengineering, Vol 87, 553-545").

[0283] ii. 단백질 정제

[0284] · 포획 선택 IgM (Catalog 2890.05, BAC, Thermo Fisher)

[0285] 형질감염된 CHO-S 세포 상등액 유래의 IgM 단백질은 제조업자의 프로토콜에 따라 친화성 포획 선택 IgM 친화성 매트릭스에 의해 정제한다.

[0286] · Capto-L (Catalog 17-5478-01, GE Healthcare)

[0287] CHO-S 세포 상등액에서 κ 쇄를 함유하는 형질감염된 IgM 단백질은 제조업자의 프로토콜에 따라 Capto-L 친화성 매트릭스에 의해 정제한다.

[0288] iii. 겔 전기영동

[0289] · 비활원 SDS PAGE

[0290] 비활원 SDS PAGE는 크기에 따라 본래의 IgM 및 이의 돌연변이 형태를 분리한다. 동종이량체 중쇄(AA)로 구성된 5량체 IgM은 대략 1,000,000 분자량의 단백질 밴드를 생성한다. 보다 짧은 버전의 동종이량체 중쇄(BB)로 구성된 5량체 IgM은 상당히 낮은 분자량의 단백질 밴드를 생성한다. 이종이량체 중쇄(키메라 AB)로 구성된 5량체 IgM은 BB보다 크고 AA보다 작은 분자량을 갖는 다중 단백질을 생성한다.

[0291] NuPage LDS 샘플 완충액 (Life Technologies)은 겔로 로딩하기 전에 30분안 25°C에서 IgM 단백질 샘플에 첨가한다. NativePage Novex 3-12% Bis-Tris 겔 (Life Technologies)은 Novex Tris-아세테이트 SDS 전개 완충액 (Life Technologies)과 함께 사용한다. 염료 전면이 겔의 바닥에 도달할때까지 겔을 전개한다.

[0292] · 활원 SDS-PAGE

[0293] NuPage LDS 샘플 완충액 (Life Technologies) 및 NuPage 활원제 디티오프레이탈 (Life Technologies)은 IgM 단백질 샘플에 첨가하고 NuPage Novex 4-12% Bis-Tris 겔 (Life Technologies, cat# NP0322)에 로딩하기 전에 10분 동안 80°C로 가열한다. NuPage MES SDS 전개 완충액 (Life Technologies, cat# NP0002)은 겔 전기영동을 위해 사용한다. 겔은 염료 전면이 겔의 바닥에 도달할 때까지 전개한다.

[0294] 전기영동을 완료한 후, 장치로부터 겔을 제거하고 콜로이드 블루 염색(Life Technologies, manual #LC6025)을 사용하여 겔을 염색한다.

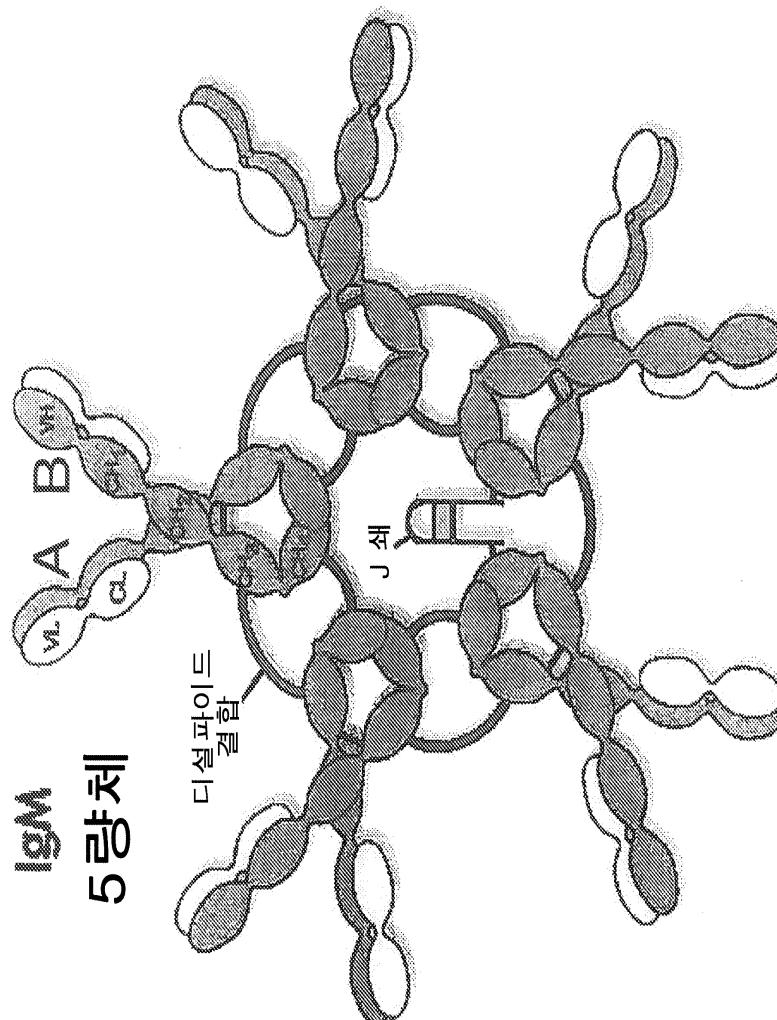
[0295] · 겔 밴드 정량

[0296] 단백질 겔은 진조시키고 이어서 이미지 스캐너를 사용하여 디지털화한다. 상기 겔 이미지는 이미지 J 프로그램으로 프로세싱하고 특정 밴드에서 단백질의 양은 겔 정량 기능을 사용하여 결정할 수 있다

- [0297] iv. 이특이적 제제 중에서 다양한 mAb를 동정하고/정량하기 위한 질량 분광측정 분석.
- [0298] v. 차등 스캐닝 칼로리측정 (DSC)를 사용한 안정성 분석
- [0299] e. 이특이적 기능성 분석
- [0300] i. 2개의 리간드에 대한 ELISA 분석
- [0301] OKT3 (쇄 A) 및 cMyc 웨بت아이드 (쇄 B)를 갖는 IgM은 가용성 CD3 ε 단백질 포획 및 항-cMyc (9E10) 검출을 사용한 ELISA 분석에 의해 분석한다. 가용성 CD3e 단백질은 150 mM의 NaHCO₃ 중에서 2mg/ml로 ELISA 플레이트상에 코팅시키고 이어서 PBS 중에서 3% BSA로 차단한다. 형질감염된 IgM-OKT3-cMyc를 함유하는 상등액 (100μl)을 25 °C에서 4시간 동안 차단된 ELISA 플레이트에 첨가한다. PBS로 세척한 후, 9E10 항체는 실온에서 2시간동안 ELISA 플레이트에 첨가한다. 항-마우스 IgG-HRP는 PBS로 세척한 후 첨가한다. 이특이적 IgM의 존재는 HRP 기질을 첨가한 후 OD450으로 판독함에 의해 검출한다.
- [0302] ii. 표적 결합의 FACS 분석
- [0303] T 세포에 결합하는 IgM-OKT3-cMyc는 T 세포주 (Peer, 양성 세포주) 및 B 세포주 (Daudi, 음성 대조군 세포주)로의 항체 결합에 의해 확인한다. 세척 후, 로다민 표지된 9E10은 세포 혼탁액에 첨가한다. 세포 표적 결합은 CD20 항원의 존재 또는 부재하에 양성 및 음성 제어된 세포 둘다의 MFI에 의해 검출한다.
- [0304] iii. 이특이적 결합을 위한 형광 현미경 분석
- [0305] 각각의 세포 유형에 대해 2개의 상이한 바이탈 염료에 의해 예비 표지된 CD3 양성 세포 및 CD20 양성 세포의 2개 집단을 함께 규합하는 능력에 의해 디자인된 IgM의 이특이적 결합을 입증한다. 예를 들어:
- [0306] · CD3 양성 세포주(Peer)에 대한 녹색 형광 사이토졸 바이탈 염료(CellTrace™ 칼세인 녹색 AM) 표지화
- [0307] · 적색 형광 사이토졸 바이탈 염료 (CellTrace™ 칼세인 적색-오렌지, AM) 표지된 CD20 양성 B-세포 세포주 (Daudi)
- [0308] 다중 특이적 결합 및 다중 특이적 기능성 분석은 상기된 것들과 같이 당업계에 공지된 기술을 사용하여 유사한 방식으로 수행할 수 있다.

도면

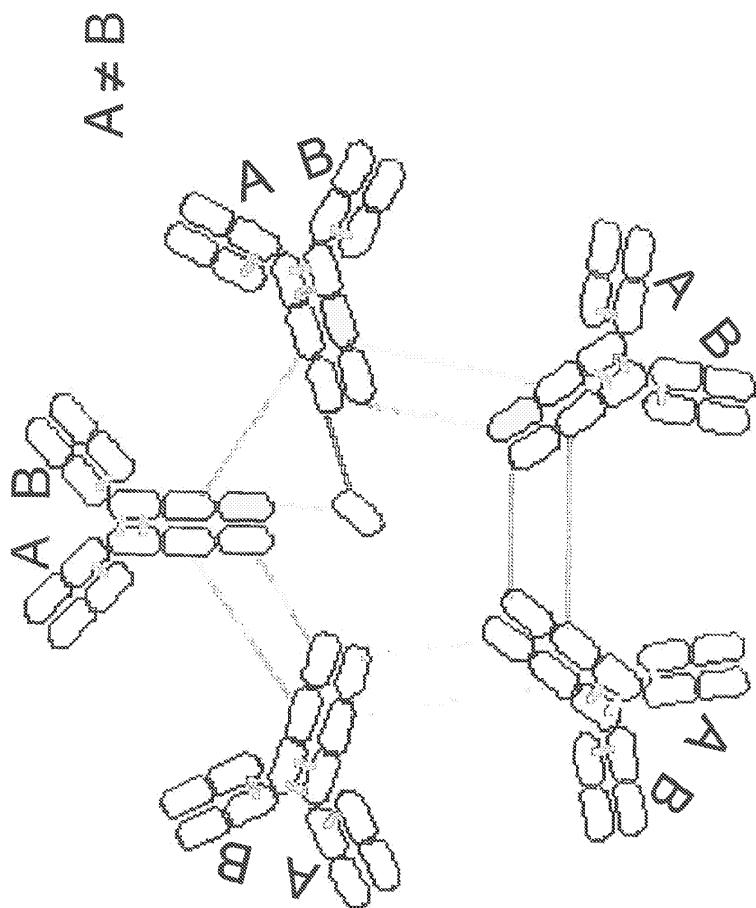
도면1



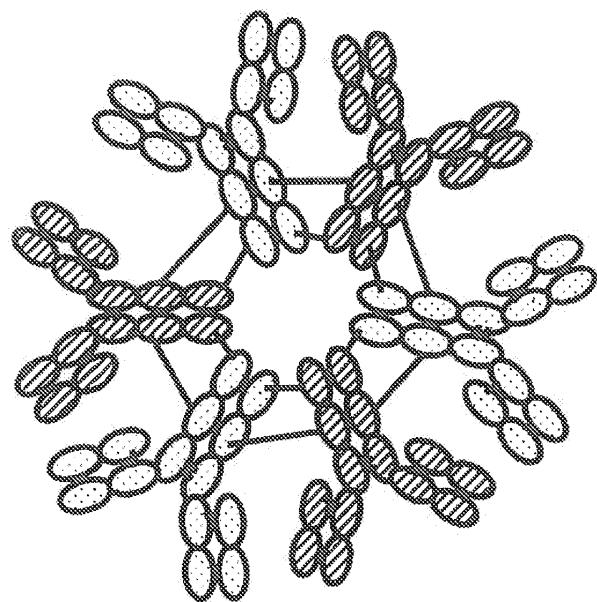
5가형 (A,B) 유니트, 천연 IgM에서 A=B

도면2a

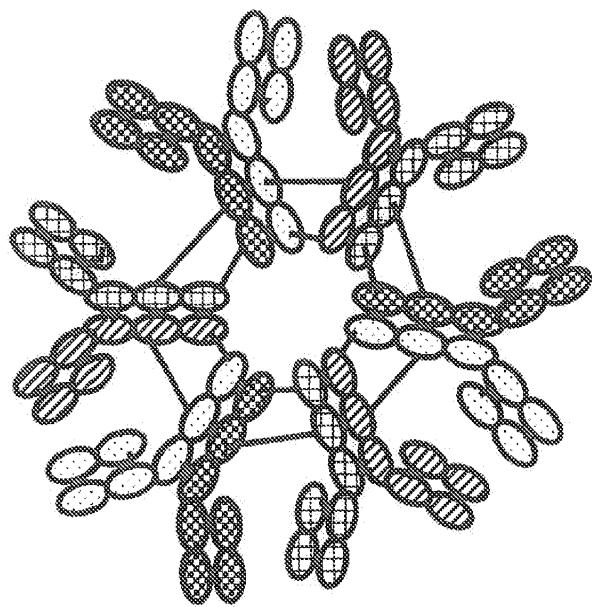
$(A, B)_5$ 또는 $(A, B)_6$ 을 갖는 이특이적 IgM



도면2b

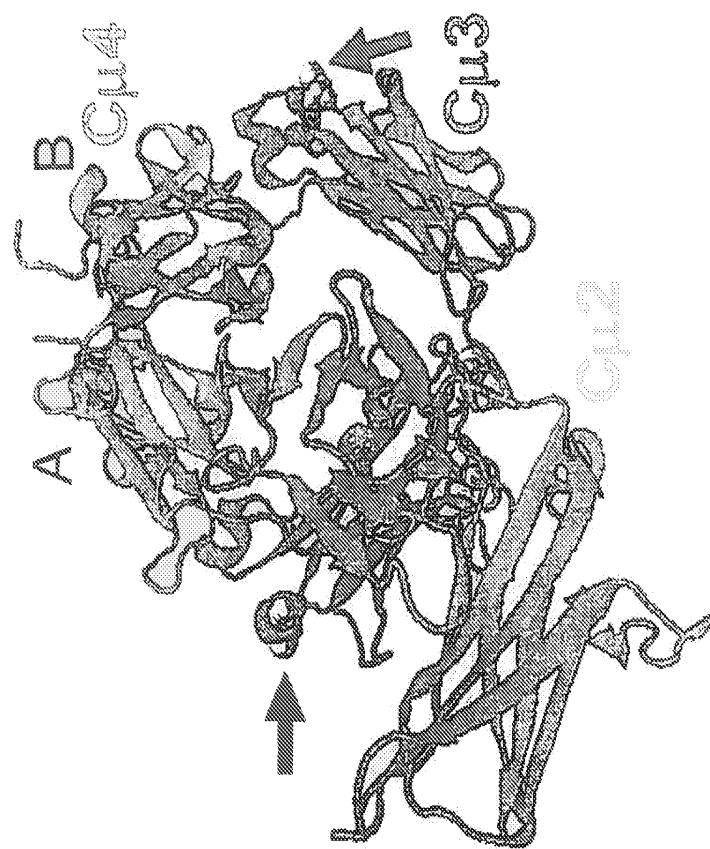


도면2c



도면3

(A,B) 유니트 구조적 모델



Czajkowsky D M , Shao Z PNAS 2009;106:14960-14965

도면4a

불변 도메인	CG1 / CE1 / CM1					
CE1	ASTOSPSVFPPLTRCKNNIPSNATSVTILGCLATGYFPEPVMVTCDTGSLNGLTT	--MILPATTLTI				
CG1	ASTKGPSVFPPLAPSSKSTS --CGTAALGCLVKDVFPEPVIVSNISGALTSGV	--HIFPAVLQSS				
	1 10 20 30 40 50 60					
	*	*	*	*	*	*
CM1	GSASAPTLFPLVSCENSPSD -TSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKKYKANSDISSTRGFPESVLAAGGCKY	H				
	L					
CE1	SGHYATISLILTVSGAWAKQMFRCRVAAITPSSTDWVDNKTFS					
CG1	GLYSLSVVTVPSLGLGTYIICNVNMHKPSNTIKVDKKV					
	70 80 90 100					
	*	*	*	*		
CM1	AAATSQVLLPSKDVMOGTRDEAVVCKVQHPPGNKEKVNPLP					

도면4b

한국 도메인 CM2 / CM2

CE2	VCSRDFTPTVKKLQQSSCDGCHFPPPTIQLICIVSGXYPTMINITWLEDQVMD	230	240	250	b	260	270
	*	*	*	*	*	*	*
	ssssss	ssssss	ssssss	ssssss	ssssss	ssssss	hhhh
CM2	- - VIAELPPKVSVPVPPRDGFTCGNPRKSULICQATGFSPROIQVSWLRECGKQNGSGVTLIDQV	110	120	130	140	150	160
	*	*	*	*	*	*	*
CE2	STASPTQEGELASTQSRLTLSQKHWLSDRIFTYCQVTRQGHTPELSTKKC	280	290	300	310	320	330
	*	*	*	*	*	*	*
	ssssss	sssssssssshhhh	ssssss	ssssss	ssssss	ssssss	ssssss
CM2	QAEAKESGSPPTVKKVSTLTKEKSDWLGQSMFTCRVDRGLTFOQNA	170	180	190	200	210	220
	*	*	*	*	*	*	*
	SSMC	S	T				

한지 Tag 1

CG-H EPISCDTHCPCP

도면4c

불변 도메인 CG2/CE3/CM3

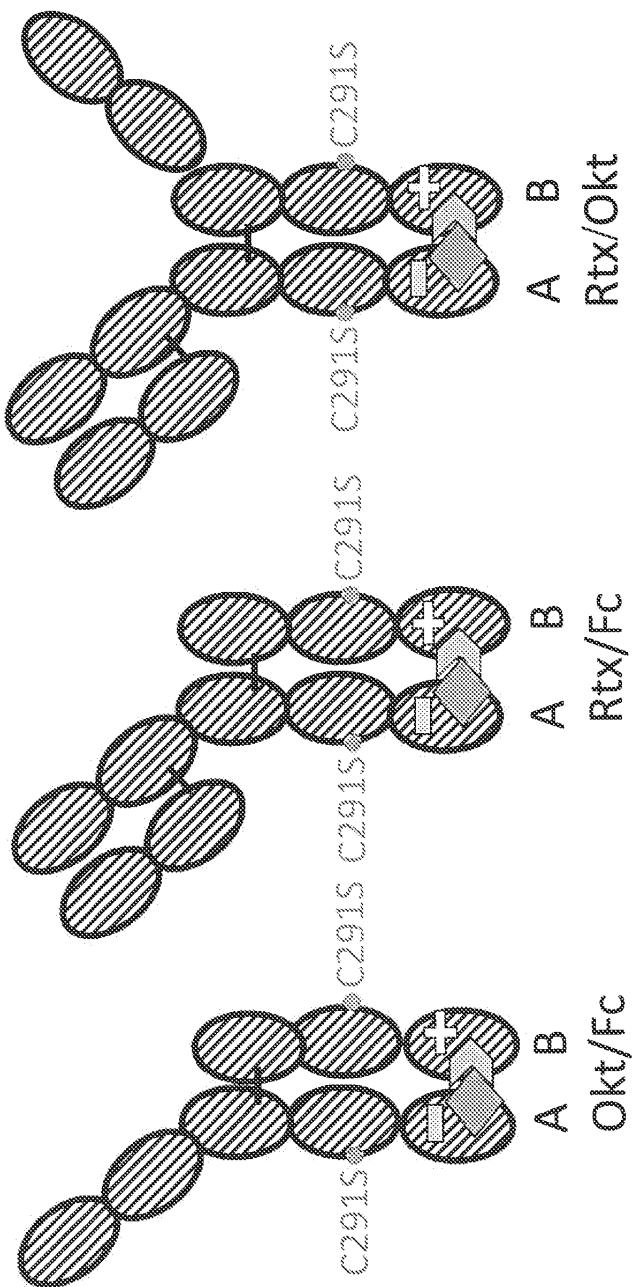
CE3	-ADSNPRGVSAVLSRPSPEDLEIRSKSPTICLVDLAPSKGTVNLTMWSRASGKPVNHSIR	330	340	350	360	370	380
	ssss	hmmmm	ssssssss	ssssss	*	*	*
	240	250	260	270	280	290	*
	*	*	*	*	*	*	*
CG2	APELLGGESEVLEPPKPKDTLMISRTKEVYTCVVNDVSHEDPEVKFNWYVVDVEVHNNAKTK	220	230	240	250	260	270
	*	*	*	*	*	*	*
CM3	-VPDQIUTAIRVENAIZPSEASILITKSTKLTCLVMDLITYD - SVTISWTRONGEAVKTHTN	G	I	S			
	390	400	410	420	430		
	*	*	*	*	*		
CE3	KEEKQORMGILTVSTILPVGTRDMEGETYQCRVTHPHILPALARSTIKTS	ssss	ssss	ssss	ssss	ssss	ssss
	300	310	320	330	340		
	*	*	*	*	*		
CG2	PRREQNISTYRUVSUTVILQDMLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISSAK	ssssss	ssssss	ssssss	ssss	ssss	ssss
	280	290	300	310	320		
	*	*	*	*	*		
CM3	ISESHPNATESAVGEASICEDDNNSGERETCTVTHLPSPLKQTISRPK						

도면4d

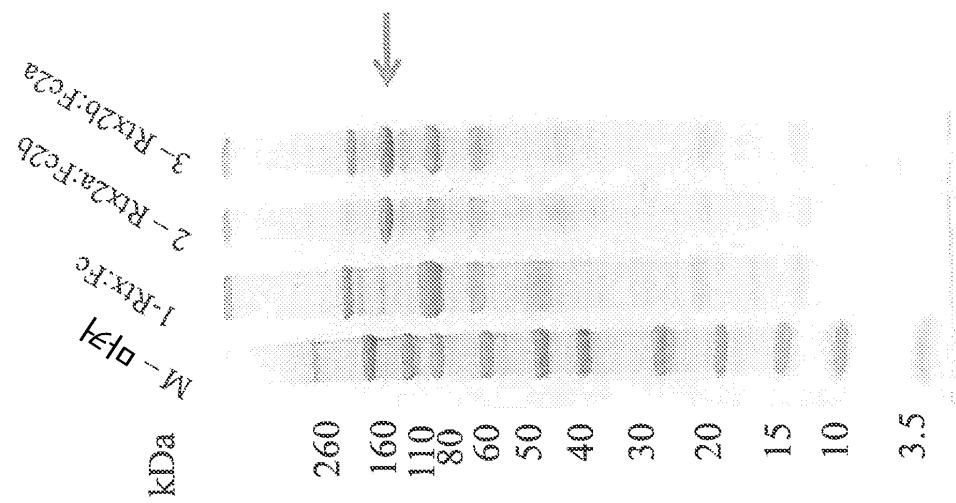
불변 도메인	CG3 / CE4 / CM4	440	450	460	470	480	490
CE4	-GPRAAPEVYAFATPENPGSR	*	*	*	*	*	*
CG3	-GQPREPQVYTLPPSKRDLTK	350	360	370	380	390	400
CM4	GVALEREDVYLLPPAREQNLRESATITCLVTFGEFSPADVFVQMNQGQLSPEK						
CE4	-GSGFPVSKRLEVTRAWEQDREFICRAVEHAASPSQTVQRAVSVNPGK	500	510	520	530	540	
CG3	-DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGENTVSCSVMHEALHNHYTQKSLISLSPGK	390	400	410	420	430	440
CM4	QAPGRYFAHSILTVSEBBNTGETTYTCVVAHEDALPNRVERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDPTAGTCY						

이중단량체

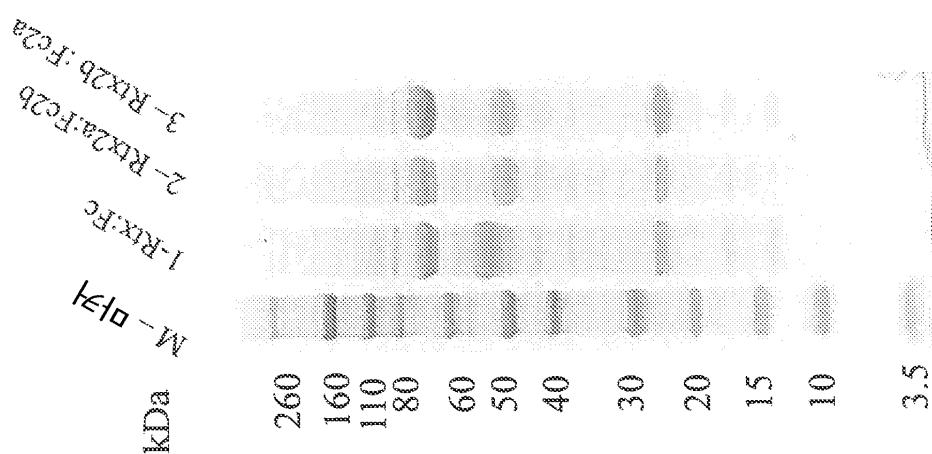
도면5



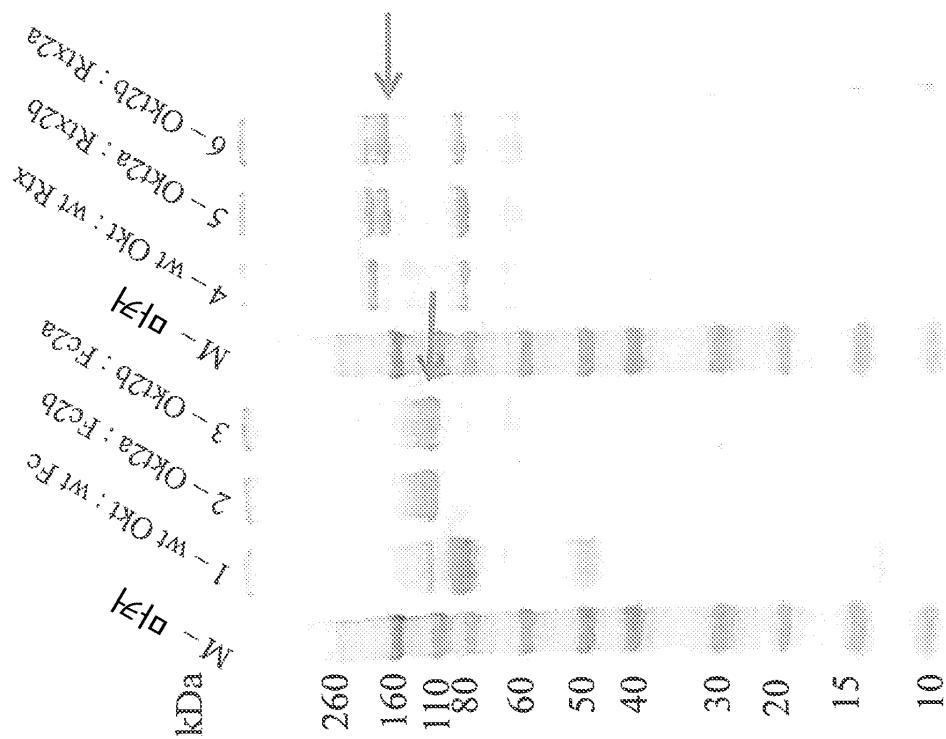
도면 9



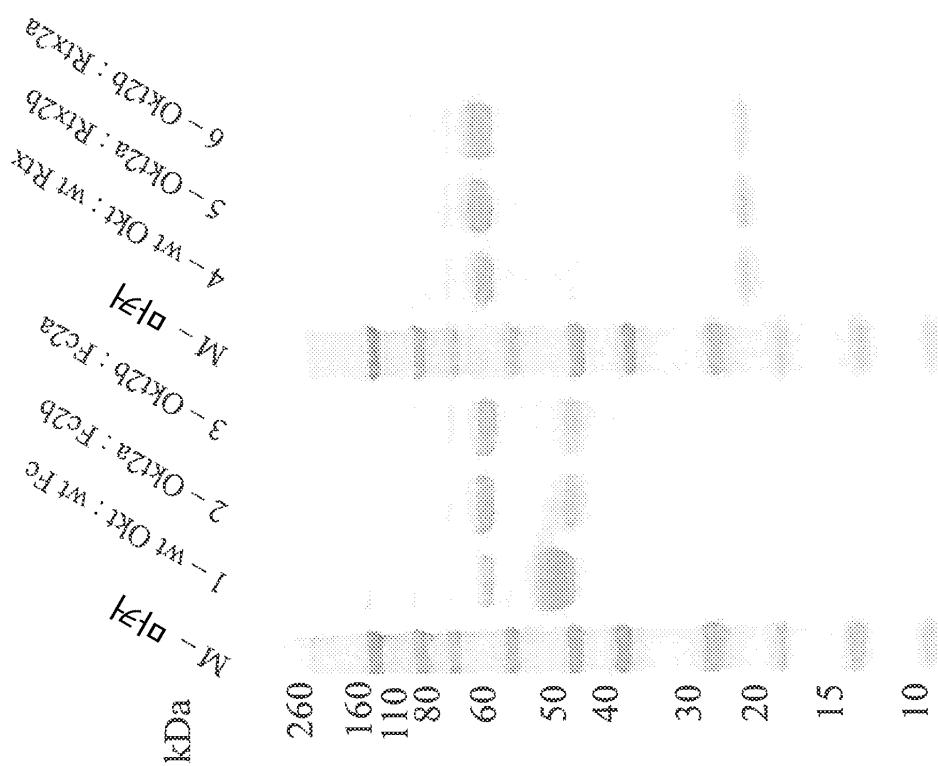
도면 7



8면



6면



도면 10a

4개의 CH_3 염 브릿지는 디설파이트
브릿지 주변의 2개의 이웃하는 (A, B) 를
안정화시킨다

(A, B) 쇄 B 쇄 C (C, D)

K238	↔	D293
D293	↔	K238
K268	↔	D294
D294	↔	K268

(C, D) 쇄 D 쇄 E (E, F)

K238	↔	D293
D293	↔	K238
K268	↔	D294
D294	↔	K268



도면10b

인간 IgM CM4 도메인 계면 잔기
크눌-홀 및 전하 변화 위치

[표 A-1]

세트 #1

크눌 (CM4 #1)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
350	Y	Y

홀 (CM4 #2) : 임의의 조합

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
352	L	S
393	F	F (W)
395	H	A (V, I, L, S, T)

세트 #2 (세트 #1으로 부가)

크눌 (CM4 #1)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
354	T	D, E
397	I	D, E

홀 (CM4 #2)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
354	T	K, R
397	I	K, R

세트 #3 (세트 #1으로 부가)

크눌 (CM4 #1)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
354	T	K, R
397	I	K, R

홀 (CM4 #2)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
354	T	D, E
397	I	D, E

세트 #4

크눌 (CM4 #1)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
350	Y	Y
395	H	Y

홀 (CM4 #2) : 임의의 조합

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
352	L	S

도면10c

393	g	F (W)	[표 A-2]
395	h	A (V, I, L)	
397	i	T (S)	
=====			
세트 #5 (세트 #4으로 부가)			
크눌 (CM4 #1)			
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이	
354	T	D, E	
397	I	D, E	
=====			
홀 (CM4 #2)			
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이	
354	T	K, R	
397	I	K, R	
=====			
세트 #6 (세트 #4으로 부가)			
크눌 (CM4 #1)			
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이	
354	T	K, R	
397	I	K, R	
=====			
홀 (CM4 #2)			
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이	
354	T	D, E	
397	I	D, E	
=====			
세트 #7			
크눌 (CM4 #1)			
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이	
350	T	Y	
395	H	Y	
=====			
홀 (CM4 #2) : 임의의 조합			
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이	
350	T	V (A, I, L)	
352	L	S	
393	g	F (W)	
395	H	A (V, I, L)	
=====			
세트 #8 (세트 #7으로 부가)			
크눌 (CM4 #1)			
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이	
354	T	D, E	
397	I	D, E	
=====			
홀 (CM4 #2)			
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이	

도면10d

354	T	K, R
397	I	K, R

[표 A-3]

세트 #9 (세트 #7으로 부가)

크늘 (CM4 #1)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
354	T	K, R
397	I	K, R

홀 (CM4 #2)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
354	T	D, E
397	I	D, E

세트 #10

크늘 (CM4 #1)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
350	T	E

홀 (CM4 #2) : 임의의 조합

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
352	L	A
393	F	F (W)
395	H	A (V, I, L, S, T)

세트 #11 (세트 #10으로 부가)

크늘 (CM4 #1)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
354	T	D, E
397	I	D, E

홀 (CM4 #2)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
354	T	K, R
397	I	K, R

세트 #12 (세트 #10으로 부가)

크늘 (CM4 #1)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
354	T	K, R
397	I	K, R

홀 (CM4 #2)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
354	T	D, E
397	I	D, E

도면10e

세트 #13

크눌 (CM4 #1)

잔기 #	본래의 서열
350	7
393	33

잠재적 돌연변이
7
33

[표 A-4]

홀 (CM4 #2) : 임의의 조합

잔기 # 본래의 서열

352	5
393	8
395	9
397	1

잠재적 돌연변이
5
8 (W)
9 (V, I, L)
1 (S)

세트 #14 (세트 #13으로 부가)

크눌 (CM4 #1)

잔기 #	본래의 서열
354	7
397	1

잠재적 돌연변이
7
D, S

홀 (CM4 #2)

잔기 # 본래의 서열

354	7
397	1

잠재적 돌연변이
K, R

세트 #15 (세트 #13으로 부가)

크눌 (CM4 #1)

잔기 #	본래의 서열
354	7
397	1

잠재적 돌연변이
K, R

홀 (CM4 #2)

잔기 # 본래의 서열

354	7
397	1

잠재적 돌연변이
D, S

세트 #16

크눌 (CM4 #1)

잔기 #	본래의 서열
350	7
396	23

잠재적 돌연변이
7

홀 (CM4 #2) : 임의의 조합

잔기 # 본래의 서열

350	7
352	12
393	8
395	9

잠재적 돌연변이
V (A, I, L)
A
F (W)
A (V, I, L)

도면10f

세트 #17 (세트 #16으로 부가)		
크눌 (CM4 #1)		
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
354	T	D, S
397	I	D, S
홀 (CM4 #2)		
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
354	T	K, R
397	I	K, R
세트 #18 (세트 #16으로 부가)		
크눌 (CM4 #1)		
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
354	T	K, R
397	I	K, R
홀 (CM4 #2)		
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
354	T	D, S
397	I	D, S
세트 #19		
크눌 (CM4 #1)		
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
350	T	W
홀 (CM4 #2) : 일의의 조합		
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
352	L	G (A)
393	E	F (W)
395	H	A (V, S, T)
세트 #20 (세트 #19으로 부가)		
크눌 (CM4 #1)		
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
354	T	D, S
397	I	D, S
홀 (CM4 #2)		
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
354	T	K, R
397	I	K, R
세트 #21 (세트 #19으로 부가)		
크눌 (CM4 #1)		

[표 A-5]

도면10g

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이	[표 A-6]
354	3	K, R	
397	1	K, R	
홀 (CM4 #2)			
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이	
354	3	D, S	
397	1	D, S	
세트 #22			
크눌 (CM4 #1)			
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이	
350	3	W	
395	1	W	
홀 (CM4 #2) : 임의의 조합			
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이	
352	2	G (A)	
393	3	F (W)	
395	1	A (V, I, L)	
397	1	T (S)	
세트 #23 (세트 #22으로 부가)			
크눌 (CM4 #1)			
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이	
354	3	D, S	
397	1	D, S	
홀 (CM4 #2)			
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이	
354	3	K, R	
397	1	K, R	
세트 #24 (세트 #22으로 부가)			
크눌 (CM4 #1)			
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이	
354	2	K, R	
397	1	K, R	
홀 (CM4 #2)			
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이	
354	3	D, S	
397	1	D, S	
세트 #25			
크눌 (CM4 #1)			
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이	

도면 10h

350	T	W
395	H	E

[표 A-7]

홀 (CM4 #2) : 임의의 조합

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
350	T	V (A, I, L)
352	I	G (A)
393	H	E (W)
395	H	A (V, I, L)

세트 #26 (세트 #25으로 부가)

크늘 (CM4 #1)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
354	T	D, E
397	I	D, E

홀 (CM4 #2)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
354	T	K, R
397	I	K, R

세트 #27 (세트 #25으로 부가)

크늘 (CM4 #1)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
354	T	K, R
397	I	K, R

홀 (CM4 #2)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
354	T	D, E
397	I	D, E

세트 #28

크늘 (CM4 #1)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
334	I	C
350	T	W (F)
395	H	E

홀 (CM4 #2) : 임의의 조합

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
334	I	C
350	T	W
352	I	A (V)
393	H	E (W)
395	H	M (I)

도면10i

세트 #29 (세트 #28으로 부가)

크톱 (CM4 #1)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
354	3	D, E
337	1	D, E

[표 A-8]

홀 (CM4 #2)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
354	3	K, R
337	1	K, R

세트 #30 (세트 #28으로 부가)

크톱 (CM4 #1)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
354	3	K, R
337	1	K, R

홀 (CM4 #2)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
354	3	D, E
337	1	D, E

도면10j

인간 IgM CM4 도메인 계면 잔기

Cm4 도메인내 잠재적 전하 스와프

[표 B]

세트 #1

CM4 쇄 #1

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
328	K	E (G)

CM4 쇄 #2

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
339	S	R (K)

세트 #2

CM4 쇄 #1

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
344	K	E (D)

CM4 쇄 #2

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
330	D	R (K)

세트 #3

CM4 쇄 #1

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
376	K	E (D)

CM4 쇄 #2

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
385	S	R (K)

세트 #4

CM4 쇄 #1

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
427	K	E (D)

CM4 쇄 #2

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
339	S	R (K)

도면10k

인간 IgM CM2 도메인 계면 잔기
전하 도입

[표 C]

세트 #1

CM2 쇄 #1

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
116	V	S (D)
133	I	S (D)

CM2 쇄 #2

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
116	F	R (K)
133	I	R (K)

도면10l

인간 IgM CM2 도메인 계면 잔기
크놈-홀

[표 D-1]

세트 #1

크놈 (CM2 #1)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
119	S	W

홀 (CM2 #2) : 임의의 조합

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
115	V	V (I)
117	V	G (A, S)
132	L	M (A)
189	W	V (I, L, M, F)
210	A	G

세트 #2

크놈 (CM2 #1)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
116	S	S (D)
119	S	W
133	I	S (D)

홀 (CM2 #2) : 임의의 조합

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
115	V	V (I)
116	S	R (K)
117	V	G (A, S)
132	L	M (A)
133	I	R (K)
189	W	V (I, L, M, F)
210	A	G

세트 #3

크놈 (CM2 #1)

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
116	S	R (K)
119	S	W
133	I	R (K)

홀 (CM2 #2) : 임의의 조합

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
115	V	V (I)
116	S	S (D)
117	V	G (A, S)

도면 10m

132	L	M (A)	[표 D-2]
133	L	E (D)	
139	M	V (I, L, M, P)	
210	A	G	

도면 10n

인간 IgM CM2 도메인 계면 잔기 전하 교환		

세트 #1		
CM2 쇄 #1		
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
167	E	K (R)
CM2 쇄 #2		
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
177	K	E (D)
세트 #2		
CM2 쇄 #1		
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
169	K	E (D)
CM2 쇄 #2		
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
170	E	K (R)
세트 #3		
CM2 쇄 #1		
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
170	E	K (R)
CM2 쇄 #2		
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
177	K	E (D)
세트 #4		
CM2 쇄 #1		
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
167	E	K (R)
169	K	E (D)
CM2 쇄 #2		
잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
170	E	K (R)
177	K	E (D)

도면10o

인간 IgM CM2, CM3 및 CM4 도메인 계면 잔기
전하 교환

[표 F-1]

세트 #1

CM2 쇄 #1

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
121	D	K (R)

CM3 쇄 #2

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
315	K	D (E)

세트 #2

CM2 쇄 #1

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
150	K	E (D)

CM4 쇄 #2

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
386	E	K (R)

세트 #3

CM2 쇄 #1

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
185	K	E (D)

CM4 쇄 #2

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
360	D	K (R)

세트 #4

CM2 쇄 #1

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
121	D	K (R)
150	K	E (D)

CM3 / CM4 쇄 #2

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
315	K	D (E)
386	E	K (R)

세트 #5

CM2 쇄 #1

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
121	D	K (R)

도면 10p

185	K	E (O)	[표 F-2]
-----	---	-------	---------

CM3 / CM4 쇄 #2

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
315	K	O (E)
360	D	K (R)

세트 #6

CM2 쇄 #1

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
180	K	E (O)
185	K	E (O)

CM4 쇄 #2

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
360	D	K (R)
385	E	K (R)

세트 #7

CM2 쇄 #1

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
121	D	K (R)
180	K	E (D)
185	K	E (D)

CM3 / CM4 쇄 #2

잔기 #	본래의 서열	잠재적 돌연변이
315	K	D (E)
360	D	K (R)
385	E	K (R)

서열 목록

SEQUENCE LISTING

SEQUENCE LISTING

<110> IGM BIOSCIENCES, INC.

<120> BINDING MOLECULES

<130> IGM-0001-2-US

<140> US 14/916,166

<141> 2016-03-02

<150> PCT/US2014/054079

<151> 2014-09-04

<150> 61/874,277

<151> 2013-09-05

<150> 61/874,284

<151> 2013-09-05

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 551

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly

100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr

115 120 125

Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser

130 135 140

Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val

195 200 205

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

450	455	460	
Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala			
465	470	475	480
Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu			
485	490	495	
Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg			
500	505	510	
Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr			
515	520	525	
Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg			
530	535	540	
Val Thr Glu Arg Thr Val Asp			
545	550		
210> 2			
<211> 353			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide			
<400> 2			
Gly Ser Gly Ser Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe			
1	5	10	15
Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe			
20	25	30	
Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Gln Val			
35	40	45	
Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser			
50	55	60	
Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser			
65	70	75	80
Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly			
85	90	95	

Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp

100 105 110

Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe

115 120 125

Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser

165 170 175

Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Ser Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu

180 185 190

Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys

195 200 205

Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val

210 215 220

Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala

225 230 235 240

Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val

245 250 255

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

260 265 270

Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His

275 280 285

Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr

290 295 300

Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg

305 310 315 320

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

325 330 335

Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His

340 345 350

His

<210> 3

<211> 563

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 3

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

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

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

Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser
	165		170		175										

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

180 185 190

Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

195 200 205

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

210 215 220

Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

225 230 235 240

Gly Ser Gly Ser Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe

245 250 255

Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly

325 330 335

Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp

340 345 350

Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe

355 360 365

Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr

370 375 380

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

385 390 395 400

Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser

405 410 415

Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Ser Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu

420	425	430
Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys		
435	440	445
Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val		
450	455	460
Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala		
465	470	475
480		
Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val		
485	490	495
Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr		
500	505	510
Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His		
515	520	525
Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr		
530	535	540
Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg		
545	550	555
560		
Thr Val Asp		
<210> 4		
<211> 213		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide		
<400> 4		
Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly		
1	5	10
15		
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile		
20	25	30
His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr		
35	40	45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Thr Lys Leu 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> 5

<211> 328

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 5

Gly Ser Gly Ser Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe

1 5 10 15

Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe

20	25	30
Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val		
35	40	45
Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser		
50	55	60
Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser		
65	70	75
Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly		
85	90	95
Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp		
100	105	110
Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe		
115	120	125
Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr		
130	135	140
Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val		
145	150	155
Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser		
165	170	175
Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Ser Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu		
180	185	190
Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys		
195	200	205
Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val		
210	215	220
Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala		
225	230	235
Thr Ile Tyr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val		
245	250	255
Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr		
260	265	270

Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His
 275 280 285
 Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr
 290 295 300
 Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg

305 310 315 320

Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys

325

<210> 6

<211> 328

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 6

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

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

Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser
 50 55 60

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

Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp
 100 105 110

Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe
 115 120 125

Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr

130	135	140	
Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val			
145	150	155	160
Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser			
165	170	175	
Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Ser Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu			
180	185	190	
Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys			
195	200	205	
Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val			
210	215	220	
Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala			
225	230	235	240
Thr Ile Thr Cys Ser Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val			
245	250	255	
Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr			
260	265	270	
Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala Val			
275	280	285	
Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr			
290	295	300	
Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg			
305	310	315	320
Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys			
325			
<210> 7			
<211> 328			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic			
polypeptide			
<400> 7			

Gly Ser Gly Ser Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe

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

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

35 40 45
Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser

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

65 70 75 80
Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly

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

100 105 110
Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe

115 120 125
Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr

130 135 140
Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val

145 150 155 160
Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser

165 170 175
Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Ser Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu

180 185 190
Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys

195 200 205
Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val

210 215 220
Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala

225 230 235 240
Thr Ile Tyr Cys Leu Val Glu Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val

245	250	255
Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr		
260	265	270
Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His		
275	280	285
Ser Glu Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr		
290	295	300
Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg		
305	310	315
Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys		
325		

<210> 8

<211> 328

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 8

Gly Ser Gly Ser Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe

1 5 10 15

Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly

85 90 95

Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp

100	105	110
Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe		
115	120	125
Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr		
130	135	140
Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val		
145	150	155
Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser		
165	170	175
Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Ser Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu		
180	185	190
Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys		
195	200	205
Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val		
210	215	220
Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala		
225	230	235
Thr Ile Thr Cys Ser Val Lys Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val		
245	250	255
Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr		
260	265	270
Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala Val		
275	280	285
Ser Lys Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr		
290	295	300
Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg		
305	310	315
Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys		
325		
<210> 9		
<211> 556		

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly

100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr

115 120 125

Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser

130 135 140

Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val

195 200 205

Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu

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

450	455	460	
Arg Glu Ser Ala Thr Ile Tyr Cys Leu Val Glu Gly Phe Ser Pro Ala			
465	470	475	480
Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu			
485	490	495	
Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg			
500	505	510	
Tyr Phe Ala His Ser Glu Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr			
515	520	525	
Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg			
530	535	540	
Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys			
545	550	555	
<210> 10			
<211> 556			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide			
<400> 10			
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr			
20	25	30	
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe			
50	55	60	
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			

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

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

340 345 350

Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr

355 360 365

Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn

370 375 380

Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn

385 390 395 400

Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Ser Glu Asp Asp Trp

405 410 415

Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro

420 425 430

Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His

435 440 445

Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu

450 455 460

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

465 470 475 480

Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu

485 490 495

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

500 505 510

Tyr Phe Ala Val Ser Lys Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr

515 520 525

Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg

530 535 540

Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys

545 550 555

<210> 11

<211> 568

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

195 200 205

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

210	215	220
Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
225	230	235
Gly Ser Gly Ser Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe		
245	250	255
Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe		
260	265	270
Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val		
275	280	285
Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser		
290	295	300
Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser		
305	310	315
Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly		
325	330	335
Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp		
340	345	350
Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe		
355	360	365
Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr		
370	375	380
Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val		
385	390	395
Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser		
405	410	415
Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Ser Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu		
420	425	430
Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys		
435	440	445
Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val		
450	455	460

Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His

515 520 525

Ser Glu Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr

530 535 540

Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg

545 550 555 560

Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys

565

<210> 12

<211> 568

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

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

Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 210 215 220
 Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 225 230 235 240
 Gly Ser Gly Ser Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe
 245 250 255
 Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe
 260 265 270

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

325 330 335

Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp

340 345 350

Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe

355 360 365

Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr

370 375 380

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

385 390 395 400

Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser

405 410 415

Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Ser Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu

420 425 430

Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys

435 440 445

Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val

450 455 460

Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala

465 470 475 480

Thr Ile Thr Cys Ser Val Lys Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val

485 490 495

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

500 505 510

Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala Val

515 520 525

Ser Lys Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr

530 535 540

Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg

545 550 555 560

Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys

565

<210> 13

<211> 572

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 13

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

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

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

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

65	70	75	80												
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
	85		90			95									

Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Cys	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
	100		105			110									

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

Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala

130	135	140													
Val	Gly	Cys	Leu	Ala	Gln	Asp	Phe	Leu	Pro	Asp	Ser	Ile	Thr	Phe	Ser
145		150		155		160									
Trp	Lys	Tyr	Lys	Asn	Asn	Ser	Asp	Ile	Ser	Ser	Thr	Arg	Gly	Pro	
	165		170		175										
Ser	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Lys	Tyr	Ala	Ala	Thr	Ser	Gln	Val	Leu	Leu
	180		185		190										

Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys

195 200 205

Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val

210 215 220

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

225 230 235 240

Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr

245 250 255

Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His

305 310 315 320

Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp

325 330 335

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

340 345 350

Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu

355 360 365

Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu

370 375 380

Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr

385 390 395 400

Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser

405 410 415

Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro

420 425 430

Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro

435

440

445

Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu

450

455

460

Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val

465 470 475 480

Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr

485

490

495

Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe

500

505

510

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

515

520

525

Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr

530

535

540

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

545 550 555 560

Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr

565

570

<210> 14

<211> 372

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20

25

30

Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys

35

40

45

Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln

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

Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser
 305 310 315 320

Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His
 325 330 335

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

Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala
 355 360 365

Gly Thr Cys Tyr
 370

<210> 15

<211> 582

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 15

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
 100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg

210 215 220

Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro

225 230 235 240

Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro

245 250 255

Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln

260 265 270

Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val

275 280 285

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

290 295 300

Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser

305 310 315 320

Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln

325 330 335

Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg

340 345 350

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

355 360 365

Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val
 370 375 380

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

Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro
 450 455 460
 Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys
 465 470 475 480
 Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln
 485 490 495
 Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met
 500 505 510

Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr
 515 520 525
 Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val
 530 535 540
 Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys
 545 550 555 560
 Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp
 565 570 575

Thr Ala Gly Thr Cys Tyr

580

<210> 16

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 16

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

35 40 45

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

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Ala 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 125Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140Val 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 190Cys 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> 17

<211> 211

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 17

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
85 90 95Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys
100 105 110Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
115 120 125Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
130 135 140Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
145 150 155 160Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
165 170 175Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
180 185 190

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
 195 200 205

Lys Ser Cys

210

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

6xHis tag

<400> 18

His His His His His His

1 5

<210> 19

<211> 103

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Ala Ser Thr Gln Ser Pro Ser Val Phe Pro Leu Thr Arg Cys Cys Lys

1 5 10 15

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

Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Met Val Thr Cys Asp Thr Gly Ser Leu
 35 40 45

Asn Gly Thr Thr Met Thr Leu Pro Ala Thr Thr Leu Thr Leu Ser Gly
 50 55 60

His Tyr Ala Thr Ile Ser Leu Leu Thr Val Ser Gly Ala Trp Ala Lys
 65 70 75 80

Gln Met Phe Thr Cys Arg Val Ala His Thr Pro Ser Ser Thr Asp Trp
 85 90 95

Val Asp Asn Lys Thr Phe Ser

100

<210> 20

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Val

<210> 21

<211> 104

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Ala or Leu

<220><221> MOD_RES

<222> (65)..(65)

<223> Tyr or His

<400> 21

Gly Ser Xaa Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn

1 5 10 15

Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp

20 25 30

Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Leu Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser

35 40 45

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

50 55 60

Xaa Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln

65 70 75 80

Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn

85 90 95

Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro

100

<210> 22

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Val Cys Ser Arg Asp Phe Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Cys

100 105

<210> 23

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (69)..(69)

<223> Pro or Thr

<220><221> MOD_RES

<222> (87)..(87)

<223> Gly or Ser

<400> 23

Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg

1 5 10 15

Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala

20 25 30

Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly

35 40 45

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

50 55 60

Lys Glu Ser Gly Xaa Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile

65 70 75 80

Lys Glu Ser Asp Trp Leu Xaa Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp

85 90 95

His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys

100 105 110

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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

1 5 10 15

<210> 25

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Ala Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Pro Ser

1 5 10 15

Pro Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile Thr Cys Leu Val

20 25 30

Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val Asn Leu Thr Trp Ser Arg

35 40 45

Ala Ser Gly Lys Pro Val Asn His Ser Thr Arg Lys Glu Glu Lys Gln

50 55 60

Arg Asn Gly Thr Leu Thr Val Thr Ser Thr Leu Pro Val Gly Thr Arg

65 70 75 80

Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val Thr His Pro His

85 90 95

Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr Ser

100 105

<210> 26

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85	90	95
----	----	----

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 100 105 110

<210> 27

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Val or Gly

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Thr or Ile

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> Ala or Ser

<400> 27

Xaa Pro Asp Gln Asp Xaa Ala Ile Arg Val Phe Xaa Ile Pro Pro Ser

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

Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val

20	25	30
----	----	----

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

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

Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro

50	55	60
----	----	----

Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp

65	70	75	80
----	----	----	----

Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu

85	90	95
----	----	----

Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys

100	105
-----	-----

<210> 28

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln Leu

35 40 45

Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser

50 55 60

Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp Glu

65 70 75 80

Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro

85 90 95

Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys

100 105 110

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 30

<211> 131

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln

35 40 45

Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu

85 90 95

Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly

100 105 110

Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly

115 120 125

Thr Cys Tyr

130

<210> 31

<211> 453

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

1 5 10 15

Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp

20 25 30

Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Leu Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser

35 40 45

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

50 55 60

Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln

65 70 75 80

Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn

85 90 95

Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys

100 105 110

Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg

115 120 125

Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile

130 135 140

Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr

145 150 155 160

Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr

165 170 175

Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Gly Gln

180 185 190

Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln

195 200 205

Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val

210 215 220

Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr

225 230 235 240

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

245 250 255

Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn

260 265 270

Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala

275 280 285

Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr

290 295 300

Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg

305 310 315 320

Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro

325 330 335

Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu

340 345 350

Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala

405 410 415

His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser

420 425 430

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

435 440 445

Ala Gly Thr Cys Tyr

450