(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0015704
(43) 공개일자 2019년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A61P 3/08 (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/28 (2013.01)
A61P 13/12 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2018-7034004
(22) 출원일자(국제) 2017년04월25일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2018년11월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/029375
(87) 국제공개번호 WO 2017/189556
국제공개일자 2017년11월02일
(30) 우선권주장
62/326,907 2016년04월25일 미국(US)

(71) 출원인
신티뮨, 인크.
미국 02116 매사추세츠주 보스턴 헌팅턴 애비뉴 116 스위트 301
(72) 발명자
블럼버그 로렌스 제이
미국 10024 뉴욕주 뉴욕 웨스트 86번가 27 아파트먼트 14에이
블럼버그 리차드 에스
미국 02493 매사추세츠주 웨스트 에이콘 레인 1
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

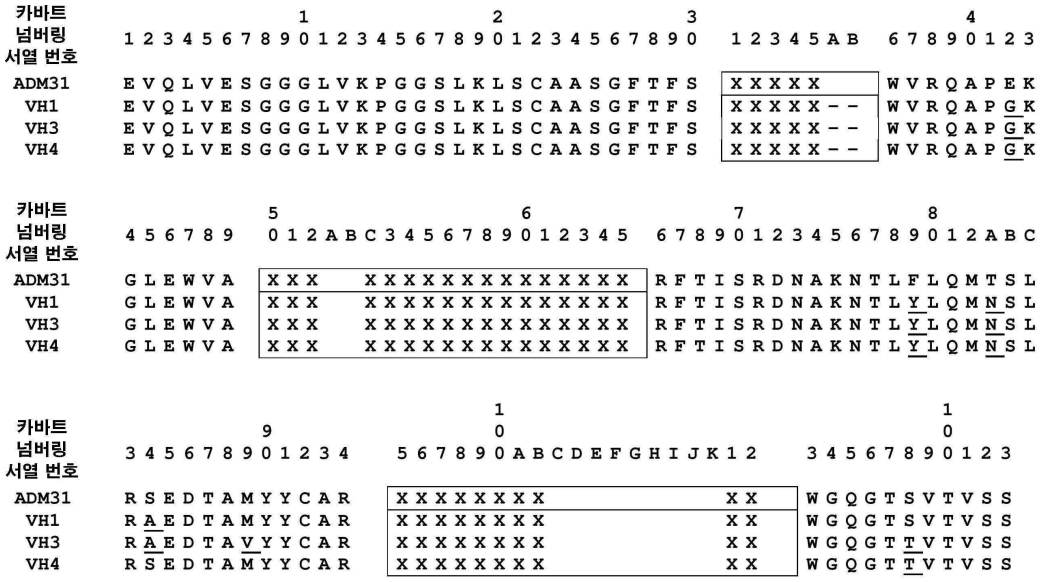
전체 청구항 수 : 총 66 항

(54) 발명의 명칭 **인간화된 친화성 성숙 항-FCRN 항체**

(57) 요 약

본 명세서는 FcRn에 결합 및 알부민에 대한 FcRn의 결합 차단에 유용한 재조합 항체 및 이의 항원-결합부를 제공한다. FcRn-결합 단백질은 급성 및 만성 독성 노출을 포함하는 다양한 질환의 치료에 사용될 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 25/28 (2018.01)
A61P 3/08 (2018.01)
A61P 9/00 (2018.01)
G01N 33/6872 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2317/94 (2013.01)

(72) 발명자
존스 수잔 다나
미국 02110 매사추세츠주 보스턴 프랭클린 스트리트 1 유닛 3604
루페니언 데리
미국 04672 메인주 솔즈베리 코브 로커스트 레인 15
홀게이트 로버트 조지 에드워드
영국 에스쥐8 7디디 하트퍼드셔주 로이스턴 스탬퍼드 애비뉴 22
존스 티모시 데이비드
영국 씨비22 3에이제이 케임브리지셔주 케임브리지 바브라함 브릭 로우 27
헌 애런 로버트
영국 씨비6 3더블유티 케임브리지셔주 일리 브룩 그로브 49

명 세 서

청구범위

청구항 1

중쇄 가변 영역을 포함하며, 중쇄 가변 영역은 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는, FcRn에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 이러한:

CDR1의 서열은 서열 번호:2이고;

CDR2의 서열은 서열 번호:4이고;

CDR3의 서열은 서열 번호:48인 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 2

청구항 1에 있어서, CDR3의 서열은 서열 번호:46인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 3

청구항 1에 있어서, CDR3의 서열은 서열 번호:44인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 4

청구항 1에 있어서, CDR3의 서열은 서열 번호:25, 서열 번호:27, 서열 번호:29, 서열 번호:31, 서열 번호:33, 서열 번호:35, 서열 번호:37, 및 서열 번호:39으로 구성된 군으로부터 선택되는 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 5

청구항 1에 있어서, CDR3의 서열은 서열 번호:27 또는 서열 번호:31인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 6

중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 각각은 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는, FcRn에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 이러한:

중쇄의 CDR1 서열은 서열 번호:2이고;

중쇄의 CDR2 서열은 서열 번호:4이고;

중쇄의 CDR3의 서열은 서열 번호:25, 서열 번호:27, 서열 번호:29, 서열 번호:31, 서열 번호:33, 서열 번호:35, 서열 번호:37, 서열 번호:39으로 구성된 군으로부터 선택되며;

경쇄의 CDR1 서열은 서열 번호:6이고;

경쇄의 CDR2 서열은 서열 번호:8이고;

경쇄의 CDR3의 서열은 서열 번호:10인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 중쇄의 CDR3의 서열은 서열 번호:27 또는 서열 번호:31인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 중쇄의 CDR3의 서열은 서열 번호:27인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 중쇄의 CDR3의 서열은 서열 번호:31인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 항원-결합 단편은 키메라 항체 또는 항원-결합 단편 또는 인간화된 항체 또는 항원-결합 단편인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 11

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 항원-결합 단편은 인간화된 항체 또는 항원-결합 단편인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 12

중쇄 가변 영역을 포함하는 FcRn에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 중쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:26, 서열 번호:28, 서열 번호:30, 서열 번호:32, 서열 번호:34, 서열 번호:36, 서열 번호:38, 또는 서열 번호:40이거나, 또는 중쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:26, 서열 번호:28, 서열 번호:30, 서열 번호:32, 서열 번호:34, 서열 번호:36, 서열 번호:38, 또는 서열 번호:40의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열에 적어도 95% 동일한 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 13

청구항 13에 있어서, 경쇄 가변 영역을 추가로 포함하며, 이러한 경쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:22인 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 14

청구항 12에 있어서, 중쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:28 또는 서열 번호:32인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 중쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:28이, 경쇄 가변 영역을 추가로 포함하며, 이러한 경쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:22인 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 16

청구항 14에 있어서, 중쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:32이고 경쇄 가변 영역을 추가로 포함하며, 이러한 경쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:22인 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 17

청구항 12에 있어서, 경쇄 가변 영역을 포함하며, 이러한 경쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:18, 서열 번호:20, 서열 번호:22, 또는 서열 번호:24이거나, 또는 경쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:18, 서열 번호:20, 서열 번호:22, 또는 서열 번호:24의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열에 적어도 95% 동일한 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 18

경쇄 가변 영역을 포함하는 FcRn에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 이러한 경쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:18, 서열 번호:20, 서열 번호:22, 또는 서열 번호:24이거나, 또는 경쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:18, 서열 번호:20, 서열 번호:22, 또는 서열 번호:24의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열에 적어도 95% 동일한 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 경쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:22인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 중쇄 가변 영역을 추가로 포함하며, 이러한 중쇄 가변 영역은 서열 번호:12의 프레임워크 영역을 포함하는 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 중쇄 가변 영역을 추가로 포함하며, 이러한 중쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:28인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 22

청구항 20에 있어서, 중쇄 가변 영역을 추가로 포함하며, 이러한 중쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:32인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 23

중쇄 가변 영역을 포함하는 FcRn에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 이러한 중쇄 가변 영역은 서열 번호:12, 서열 번호:14, 또는 서열 번호:16의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열의 프레임워크 영역, 또는 서열 번호:12, 서열 번호:14, 또는 서열 번호:16의 프레임워크 영역과 적어도 95% 동일한 프레임워크 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 24

청구항 23에 있어서, 중쇄 가변 영역은 서열 번호:12의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열의 프레임워크 영역, 또는 서열 번호:12의 프레임워크 영역에 최소한 95% 동일한 프레임워크 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 25

경쇄 가변 영역을 포함하고 FcRn에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 이러한 경쇄 가변 영역은 서열 번호:18, 서열 번호:20, 서열 번호:22, 또는 서열 번호:24의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열의 프레임워크 영역, 또는 서열 번호:18, 서열 번호:20, 서열 번호:22, 또는 서열 번호:24의 프레임워크 영역에 최소한 95% 동일한 프레임워크 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 26

청구항 25에 있어서, 경쇄 가변 영역은 서열 번호:22의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열의 프레임워크 영역, 또는 서열 번호:22의 프레임워크 영역에 최소한 95% 동일한 프레임워크 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 27

청구항23에 있어서, 경쇄 가변 영역을 추가로 포함하며, 이러한 경쇄 가변 영역은 서열 번호:18, 서열 번호:20, 서열 번호:22, 또는 서열 번호:24의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열의 프레임워크 영역, 또는 서열 번호:18, 서열 번호:20, 서열 번호:22, 또는 서열 번호:24의 프레임워크 영역에 최소한 95% 동일한 프레임워크 영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 28

청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 아이소형 IgG4을 가지는 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 29

청구항 28에 있어서, 중쇄에 S241P 변형을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 30

청구항 28에 있어서, 중쇄에 C-말단 리신을 가지지 않는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 31

청구항 28에 있어서, 중쇄에 S241P 변형을 포함하며 중쇄에 C-말단 리신을 가지지 않는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 32

청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, scFv, Fv, Fab', Fab, $F(ab')_2$, 또는 다이아바디인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 33

청구항 1 내지 32 중 어느 한 항의 항체 또는 항원-결합 단편과 경쟁하거나 이를 교차-차단하는 항체.

청구항 34

청구항 1 내지 33 중 어느 한 항의 FcRn 항체 또는 항원-결합 단편을 인코딩하는 단리된 핵산.

청구항 35

청구항 34에 따른 단리된 핵산을 포함하는 핵산 벡터.

청구항 36

청구항 34에 따른 단리된 핵산을 포함하는 원핵 또는 진핵 숙주 세포.

청구항 37

청구항 1 내지 33중 어느 한 항의 FcRn 항체 또는 항원-결합 단편, 및 제약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 38

FcRn과 알부민 사이의 상호 작용을 조절하는 방법으로서, 상기 방법은 FcRn와 청구항 1 내지 33 중 어느 한 항의 항체 또는 항원-결합 단편을 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 39

대상체에서 알부민의 수준을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 알부민의 수준을 감소시키기에 유효한 양의 청구항 1 내지 33 중 어느 한 항의 항체 또는 항원-결합 단편을 피험체에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 40

청구항 39에 있어서, 피험체는 포유동물인 방법.

청구항 41

청구항 40에 있어서, 포유 동물은 인간인 방법.

청구항 42

대상체에서 알부민-결합 독소의 수준을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 알부민-결합 독소의 수준을 감소시키기에 유효한 양의, 청구항 1 내지 33 중 어느 한 항의 항체 또는 항원-결합 단편-결합을 피험체에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 43

청구항 42에 있어서, 알부민-결합 독소는 구리, 헤마틴, 장쇄 지방산, 아연, 빌리루빈, 티록신, 에이코사노이드, 트립토판, 비타민 D3, 담즙산, 칼슘, 마그네슘, 클로라이드, 인도메타신, 브로모페놀 블루, 살리실레이트, 와파린, 페닐뷰타존, 다이곡신, 퓨로세마이드, 페니토인, 클로르프로파마이드, 벤질페니실린, 에반스 블루, 다이아제팜, 이부프로펜, 나프록센, 클로피브레이트, 클로르프로마진, 이미프라민, 퀴니딘, 리신, 아미오다론, 또는 아세트아미노펜인 방법.

청구항 44

청구항 43에 있어서, 알부민-결합 독소는 아세트아미노펜인 방법.

청구항 45

청구항 44에 있어서, 상기 방법은 치료학적 유효량의 N-아세틸렌 시스테인을 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 46

대상체에서 독소에 대한 노출을 예방, 치료, 억제 또는 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 유효량의 청구항 1 내지 33 중 어느 한 항의 항체 또는 항원-결합 단편을 피험체에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 47

청구항 46에 있어서, 알부민-결합 독소는 구리, 헤마틴, 장쇄 지방산, 아연, 빌리루빈, 티록신, 에이코사노이드, 트립토판, 비타민 D3, 담즙산, 칼슘, 마그네슘, 클로라이드, 인도메타신, 브로모페놀 블루, 살리실레이트, 와파린, 페닐뷰타존, 다이곡신, 퓨로세마이드, 페니토인, 클로르프로파마이드, 벤질페니실린, 에반스 블루, 다이아제팜, 이부프로펜, 나프록센, 클로피브레이트, 클로르프로마진, 이미프라민, 퀴니딘, 리신, 아미오다론, 또는 아세트아미노펜인 방법.

청구항 48

청구항 47에 있어서, 알부민-결합 독소는 아세트아미노펜인 방법.

청구항 49

청구항 48에 있어서, 상기 방법은 치료학적 유효량의 N-아세틸렌 시스테인을 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 50

알부민 독성과 관련된 의학적 상태를 예방 또는 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 유효량의 청구항 1 내지 33 중 어느 한 항의 항체 또는 항원-결합 단편을 피험체에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 51

청구항 50에 있어서, 의학적 상태는 죽상경화성 관상 및 말초 혈관 질병인 방법.

청구항 52

청구항 50에 있어서, 의학적 상태는 당뇨병성 혈관병 합병증인 방법.

청구항 53

청구항 50에 있어서, 의학적 상태는 알츠하이머병인 방법.

청구항 54

청구항 50에 있어서, 의학적 상태는 외상성 뇌손상인 방법.

청구항 55

청구항 50에 있어서, 의학적 상태는 당뇨병인 방법.

청구항 56

청구항 50에 있어서, 의학적 상태는 말기 신부전인 방법.

청구항 57

다음의 단계를 포함하는, 산성 pH 및 생리학적 pH 둘 모두에서 FcRn에 결합하며 FcRn에 대한 결합을 차단하는 항체를 식별하는 방법:

(a) 후보 항체 집합을 FcRn 또는 이의 일부와 pH 5.8-6.4에서 접촉시켜 FcRn 또는 이의 일부에 결합하는 항체를

단리시키는 단계;

(b) 단계 (a)의 단리된 항체를 FcRn 또는 이의 일부와 pH 6.8-7.6에서 접촉시켜 FcRn 또는 이의 일부에 결합하는 항체를 단리시키는 단계;

(c) 단계 (b)의 단리된 항체를 FcRn 또는 이의 일부와 pH 5.8-6.4에서 접촉시켜 FcRn 또는 이의 일부에 결합하는 항체를 단리시키는 단계.

(d) FcRn에 대한 알부민 결합을 차단하는 능력에 대해 단계 (c)의 단리된 항체를 분석하는 단계.

청구항 58

다음의 단계를 포함하는, 산성 pH 및 생리학적 pH 둘 모두에서 FcRn에 결합하며 FcRn에 대한 결합을 차단하는 항체를 식별하는 방법:

(a) 후보 FcRn-결합 항체의 집합을 제공하는 단계:

(b) pH 6.0에서 FcRn 또는 이의 일부와 후보 FcRn-결합 항체의 최소한 일부 간에 복합체가 형성되도록 하는 조건하에서 후보 FcRn-결합 항체의 집합을 FcRn 또는 이의 일부와 접촉시키는 단계;

(c) 복합체를 단리시키는 단계;

(d) 단리된 복합체로부터 후보 FcRn-결합 항체를 분리하는 단계;

(e) pH 7.4에서 FcRn 또는 이의 일부와 단계 (d)로부터 분리된 후보 FcRn-결합 항체의 최소한 일부 간에 복합체가 형성되도록 하는 조건하에서 상기 분리된 후보 FcRn-결합 항체를 FcRn 또는 이의 일부와 접촉시키는 단계;

(f) 단계 (e)에서 형성된 복합체를 단리시키는 단계;

(g) 단계 (f)의 단리된 복합체로부터 후보 FcRn-결합 항체를 분리하는 단계;

(h) pH 6.0에서 FcRn 또는 이의 일부와 단계 (g)로부터 분리된 후보 FcRn-결합 항체의 최소한 일부 간에 복합체가 형성되도록 하는 조건하에서 상기 분리된 후보 FcRn-결합 항체를 FcRn 또는 이의 일부와 접촉시키는 단계;

(i) 단계 (h)에서 형성된 복합체를 단리시키는 단계;

(j) 단계 (i)의 단리된 복합체로부터 후보 FcRn-결합 항체를 분리하여, 산성 pH 및 생리학적 pH 모두에서 FcRn에 결합하는 항체를 얻는 단계.

(k) FcRn에 대한 알부민 결합을 차단하는 능력에 대해 후보 FcRn-결합 항체를 분석하는 단계.

청구항 59

알부민계 치료제의 투여 이전에 내인성 알부민 분해를 촉진시키는 방법으로서, 상기 방법은 알부민계 치료제를 투여하기 전, 알부민계 치료제를 사용하여, FcRn의 알부민 결합 부위에 특이적인 항-FcRn 항체 또는 이의 단편을 치료를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 60

청구항 59에 있어서, 알부민계 치료제를 피험체에 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 61

청구항 60에 있어서, 알부민계 치료제의 약물동역학 또는 약물역학이 향상되는 방법.

청구항 62

청구항 59에 있어서, 항-FcRn 항체 또는 이의 단편은 서열 번호:28의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 및 서열 번호:22의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 방법.

청구항 63

청구항 59에 있어서, 항-FcRn 항체 또는 이의 단편은 서열 번호:32의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 및 서열 번호:22의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 방법.

청구항 64

대상체에 투여되었던 외인성 알부민계 치료제의 분해를 촉진시키는 방법으로서, 상기 방법은 유효량의, FcRn의 알부민 결합 부위에 특이적인 항-FcRn 항체 또는 이의 단편을 피험체에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 65

청구항 64에 있어서, 항-FcRn 항체 또는 이의 단편은 서열 번호:28의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 및 서열 번호:22의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 방법.

청구항 66

청구항 64에 있어서, 항-FcRn 항체 또는 이의 단편은 서열 번호:32의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 및 서열 번호:22의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 2016년 4월 25일자, 미국 특허 출원 제62/326,907호의 우선권을 주장하며, 상기 문헌은 본 명세서에 그 전체가 참조 문헌으로 포함된다.

[0002] 발명의 분야

[0003] 본 발명은 FcRn에 결합하는 항체 및 이의 항원-결합부 및 FcRn과 알부민의 상호 작용을 조절 또는 억제하기 위한 이의 용도에 관한 것이다. 이러한 항체는 알부민에 결합하는 특정 화합물 또는 분자의 독성 효과를 최소화하는 치료제로서 유용하다.

[0004] 서열 목록

[0005] 본 출원은 ASCII 형식으로 EFS-웹을 통해 제출된 서열 목록을 포함하며, 본 출원에 그 전체가 참고로 포함된다. 2017년 4월 25일 작성된 서열 목록은 명칭이 162255.46276_Sequence-Listing.txt이며 58,787 바이트 크기이다.

배 경 기 술

[0006] 신생아 Fc 수용체 (FcRn)는 IgG에 대한 세포내 수송 내재성 막 Fc 수용체이다. FcRn은 본래 신생아기에 기능하는 수용체로서 확인되었다. 이는 설치류의 장으로부터 12 kDa 내지 40-50 kDa의 이종이량체 단백질로서 최초로 분리되었으며 (Rodewald & Kraehenbuhl 1984, J. Cell. Biol. 99(1 Pt2): 159s-154s; Simister & Rees, 1985, Eur. J. Immunol. 15:733-738) 1989년에 복제되었다 (Simister & Mostov, 1989, Nature 337:184-187). FcRn의 복제 및 후속 결정화는 FcRn이 12 kDa β2-마이크로글로불린 경쇄와 비-공유 결합된, 대략 50 kDa의 주조직 적합 복합체 (MHC) 클래스 I- 유사 중쇄를 가짐을 밝혀냈다 (Raghavan 외, 1993, Biochemistry 32:8654-8660; Huber 외, 1993, J. Mol. Biol. 230:1077-1083). 태아기 및 신생아기와 관련하여 최초로 알려졌으나, 오늘날 FcRn은 지속하여 성인기 전체에 걸쳐 기능하는 것으로 알려져 있다. FcRn은 초기 산성 엔도솜에 존재하는데, 여기서 FcRn은 IgG의 Fc 영역에 pH-의존 방식으로, pH 6.5에서 마이크로몰 내지 나노몰의 친화도로 결합하며, 생리학적 pH에서 Fc에 대한 FcRn의 결합은 무시할 수 있다. 벌크 FcRn은 대부분의 세포에서 엔도솜에 존재하며, FcRn과 이의 IgG Fc 리간드 사이의 상호작용은 이러한 산성 환경에서 발생한다. 일부 세포, 가령, 조혈 세포에서, 상당 수준의 FcRn이 세포내 발현 이외에도 세포 표면에서 검출될 수 있다 (Zhu 외, 2001, J. Immunol. 166:3266-3276). 이러한 경우, 신생물 또는 감염 상태의 경우에서와 같이 세포외 환경이 산성일 때, FcRn은 이러한 세포 유형의 세포 표면에서 IgG에 결합할 수 있음이 가능하다. FcRn은 세포내 이입된 단량체 IgG에 결합하여 리소좀 구획 내에서의 분해로부터 이를 보호하고, 중성의 세포외 pH에서 방출시키기 위해 세포 표면으로 IgG를 운반함으로써 혈청 IgG 농도를 조절한다. 이러한 기전에도 불구하고, FcRn로 인해 IgG 혈청 반감기는 길어지는데, FcRn에 의해 결합되지 않은 IgG가 리소좀 경로로 유입하여 분해되기 때문이다.

[0007] FcRn은, FcRn과 FcRn 중쇄의 반대쪽 면에 있는 IgG 또는 알부민 간의 이온성 상호작용으로 인해, IgG의 Fc 도메인에 대한 결합 부위와 구별되는, 알부민에 대한 결합 부위를 내포한다 (Chaudhury 외, 2006, Biochemistry 45:4983-4990). IgG에 대한 결합과 유사하게, FcRn의 알부민에 대한 결합은 강하게 pH-의존적이며, 산성 pH (전형적으로 pH 6 미만, 그리고 최적으로 pH 5)에서 일어나지만 중성 pH에서는 일어나지 않는다. 알부민의 FcRn 결

합은 알부민을 분해로부터 보호하여 알부민에 대한 혈청 반감기를 연장시킨다. 마우스에서 FcRn 발현이 부재인 경우, 알부민은 순환에서 담즙으로 손실된다. (Kim 외, 2006, Am J Gastrointest Liver Phsiol 290(2):G352-60). 또한, 여러 질병 상황, 예를 들어 급성 및 만성 독성 노출 (Taguchi, J Pharm Sci 2012), 죽상경화성 관상 및 말초 혈관 질병 (Song, Atherosclerosis 2012), 당뇨병성 혈관병 합병증 (Kim, Diab Metab J 2012; Murea, Am J Nephrol 2012), 및 알츠하이머병 (Byun, PLoS One 2012)에서, 알부민이 발병의 원인이라는 증거가 증가하고 있다.

발명의 내용

[0008] 본 발명은 FcRn에 결합하는 항체 및 이의 항원-결합부를 제공한다. 항체는 알부민의 Fc 도메인에 대한 결합 부위와 중복(overlap)되는 FcRn의 에피토프에 결합하여 알부민에 대한 FcRn의 결합을 감소 또는 억제한다.

[0009] 본 출원은, 중쇄 가변 영역을 포함하고, 이러한 중쇄 가변 영역은 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는, FcRn에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하며, 이러한:

[0010] CDR1의 서열은 서열 번호:2이고;

[0011] CDR2의 서열은 서열 번호:4이고;

[0012] CDR3의 서열은 서열 번호:48이다.

[0013] 하나의 구체예에서, CDR3의 서열은 서열 번호:46이다. 또 다른 구체예에서, CDR3의 서열은 서열 번호:44이다.

[0014] 다른 구체예에서, CDR3의 서열은 서열 번호:25, 서열 번호:27, 서열 번호:29, 서열 번호:31, 서열 번호:33, 서열 번호:35, 서열 번호:37, 서열 번호:39, 서열 번호:44, 서열 번호:46, 및 서열 번호:48으로 구성된 군으로부터 선택된다. 하나의 구체예에서, CDR3의 서열은 서열 번호:27 또는 서열 번호:31이다.

[0015] 본 출원은, 또한 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 이러한 중쇄 및 경쇄 가변 영역 각각은 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는, FcRn에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하며, 이러한:

[0016] 중쇄의 CDR1 서열은 서열 번호:2이고;

[0017] 중쇄의 CDR2 서열은 서열 번호:4이고;

[0018] 중쇄의 CDR3의 서열은 서열 번호:25, 서열 번호:27, 서열 번호:29, 서열 번호:31, 서열 번호:33, 서열 번호:35, 서열 번호:37, 서열 번호:39으로 구성된 군으로부터 선택되고;

[0019] 경쇄의 CDR1 서열은 서열 번호:6이고;

[0020] 경쇄의 CDR2 서열은 서열 번호:8이고;

[0021] 경쇄의 CDR3의 서열은 서열 번호:10이다.

[0022] 일부 구체예에서, 중쇄의 CDR3의 서열은 서열 번호:27 또는 서열 번호:31이다.

[0023] 일부 구체예에서, 본 출원의 항체 또는 항원-결합 단편은 키메라 또는 인간화된 항체 또는 항원-결합 단편이다.

[0024] 또한, 본 출원은, 중쇄 가변 영역을 포함하는 FcRn에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하며, 이러한 중쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:26, 서열 번호:28, 서열 번호:30, 서열 번호:32, 서열 번호:34, 서열 번호:36, 서열 번호:38, 또는 서열 번호:40이거나, 또는 항원-결합 단편이 서열 번호:26, 서열 번호:28, 서열 번호:30, 서열 번호:32, 서열 번호:34, 서열 번호:36, 서열 번호:38, 또는 서열 번호:40의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열에 적어도 95% 동일하다.

[0025] 일부 구체예에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 경쇄 가변 영역을 추가로 포함하며, 이러한 경쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:22이다. 일부 구체예에서, 중쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:28 또는 서열 번호:32이다. 일부 구체예에서, 중쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:28이다. 다른 구체예에서, 중쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:32이다.

[0026] 또한, 경쇄 가변 영역을 포함하는 FcRn에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 제공되며, 이러한 경쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:18, 서열 번호:20, 서열 번호:22, 또는 서열 번호:24이거나, 또는 경쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:18, 서열 번호:20, 서열 번호:22, 또는 서열 번호:24의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열에 적어도 95% 동일하다. 일부 구체예에서, 경쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:22이다. 일부 구체예에서, 경쇄 가

변 영역의 서열은 서열 번호:22이고 항체 또는 항원-결합 단편은 중쇄 가변 영역을 추가로 포함하며, 이러한 중쇄 가변 영역은 서열 번호:12의 프레임워크 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 경쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:22이고 항체 또는 항원-결합 단편은 중쇄 가변 영역을 추가로 포함하며, 이러한 중쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:28이다. 다른 구체예에서, 경쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:22이고 항체 또는 항원-결합 단편은 중쇄 가변 영역을 추가로 포함하며, 이러한 중쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호:32이다.

[0027] 또한, 중쇄 가변 영역을 포함하는 FcRn에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 제공되며, 이러한 중쇄 가변 영역은 서열 번호:12, 서열 번호:14, 또는 서열 번호:16의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열의 프레임워크 영역, 또는 서열 번호:12, 서열 번호:14, 또는 서열 번호:16의 프레임워크 영역과 적어도 95% 동일한 프레임워크 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 중쇄 가변 영역은 서열 번호:12의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열의 프레임워크 영역, 또는 서열 번호:12의 프레임워크 영역에 최소한 95% 동일한 프레임워크 영역을 포함한다.

[0028] 또한, 경쇄 가변 영역을 포함하고 FcRn에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공하며, 이러한 경쇄 가변 영역은 서열 번호:18, 서열 번호:20, 서열 번호:22, 또는 서열 번호:24의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열의 프레임워크 영역, 또는 서열 번호:18, 서열 번호:20, 서열 번호:22, 또는 서열 번호:24의 프레임워크 영역에 최소한 95% 동일한 프레임워크 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 경쇄 가변 영역은 서열 번호:22의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열의 프레임워크 영역, 또는 서열 번호:22의 프레임워크 영역에 최소한 95% 동일한 프레임워크 영역을 포함한다.

[0029] 본 명세서에 기재된 항체의 일부 구체예에서, 항체는 아이소형 (isotype) IgG4를 가진다. 일부 구체예에서, 항체는 중쇄에 S241P 변형을 내포한다. 일부 구체예에서, 항체는 중쇄에 C-말단 리신이 없다. 일부 구체예에서, 항체는 중쇄에 S241P 변형을 내포하고 중쇄에 C-말단 리신이 없다.

[0030] 일부 구체예에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편은 scFv, Fv, Fab', Fab, $F(ab')_2$, 또는 다이아바디(diabody)이다.

[0031] 또한, 본 출원은, 본 명세서에 기재된 FcRn에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 경쟁하거나 이를 교차-차단하는 항체를 제공한다.

[0032] 또한, 본 출원은, 본 명세서에 기재된 FcRn 항체 또는 항원-결합 단편을 인코딩하는 단리된 핵산을 제공한다. 또한, 본 출원은, 본 명세서에 기재된 FcRn 항체 또는 항원-결합 단편을 인코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 핵산 벡터를 제공한다. 또한, 본 출원은, 본 명세서에 기재된 FcRn 항체 또는 항원-결합 단편을 인코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 핵산 벡터를 제공한다. 또한, 본 출원은, 본 명세서에 기재된 FcRn 항체 또는 항원-결합 단편 및 제약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0033] 또한, 본 출원은, FcRn과 알부민 사이의 상호 작용을 조절하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 FcRn와 본 명세서에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편을 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0034] 또한, 본 출원은, 대상체에서 알부민의 수준을 감소시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 알부민의 수준을 감소시키기에 유효한 양의, 본 명세서에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편을 피험체에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 대상체는 포유동물이다. 일부 구체예에서, 포유동물은 인간이다.

[0035] 또한, 본 출원은, 대상체에서 알부민-결합 독소의 수준을 감소시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 알부민-결합 독소의 수준을 감소시키기에 유효한 양의, 본 명세서에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편-결합을 피험체에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 알부민-결합 독소는 외인성 또는 내인성일 수 있다. 일부 구체예에서, 알부민-결합 독소는 구리, 헤마틴, 장쇄 지방산, 아연, 빌리루빈, 티록신, 에이코사노이드, 트립토판, 비타민 D3, 담즙산, 칼슘, 마그네슘, 클로라이드, 인도메타신, 브로모페놀 블루, 살리실레이트, 와파린, 페닐뷰타존, 다이곡신, 퓨로세마이드, 페니토인, 클로르프로파마이드, 벤질페니실린, 에반스 블루, 다이아제팜, 이부프로펜, 나프록센, 클로피브레이트, 클로르프로마진, 이미프라민, 퀴니딘, 리신, 아미오다론, 또는 아세트아미노펜이다. 일부 구체예에서, 알부민-결합 독소는 아세트아미노펜일 수 있다. 일부 구체예에서, 본 명세서에 제시된 치료적 유효량의 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 다른 제제, 약물 또는 호르몬과 (예컨대, 동시에, 순차적으로, 또는 별도로) 조합하여 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 공지된 치료법은 치료 기준일 수 있다. 예를 들어, 알부민-결합 독소가 아세트아미노펜일 수 있는 구체예에서, 이러한 방법은 N-아세틸렌 시스테인의 동시, 별도, 또는 순차적 투여를 추가로 포함할 수 있다.

[0036] 또한, 본 출원은, 대상체에서 독소에 대한 노출을 예방, 치료, 억제 또는 감소시키는 방법을 제공하며, 상기

방법은 유효량의 본 명세서에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편을 피험체에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 알부민-결합 독소는 외인성 또는 내인성일 수 있다. 일부 구체예에서, 독소는 구리, 헤마틴, 장쇄 지방산, 아연, 빌리루빈, 티록신, 에이코사노이드, 트립토판, 비타민 D3, 담즙산, 칼슘, 마그네슘, 클로라이드, 인도메타신, 브로모페놀 블루, 살리실레이트, 와파린, 페닐뷰타존, 다이곡신, 퓨로세마이드, 페니토인, 클로르프로파마이드, 벤질페니실린, 에반스 블루, 다이아제팜, 이부프로펜, 나프록센, 클로피브레이트, 클로르프로마진, 이미프라민, 퀴니딘, 리신, 아미오다론, 또는 아세트아미노펜이다. 일부 구체예에서, 알부민-결합 독소는 아세트아미노펜일 수 있다. 일부 구체예에서, 본 명세서에 제시된 치료적 유효량의 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 다른 제제, 약물 또는 호르몬과 (예컨대, 동시에, 순차적으로, 또는 별도로) 조합하여 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 공지된 치료법은 치료 기준일 수 있다. 예를 들어, 알부민-결합 독소가 아세트아미노펜일 수 있는 구체예에서, 이러한 방법은 N-아세틸렌 시스테인의 동시, 별도, 또는 순차적 투여를 추가로 포함할 수 있다.

[0037] 또한, 본 출원은, 알부민 독성과 관련된 의학적 상태를 예방 또는 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 유효량의 본 명세서에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편을 피험체에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 의학적 상태는 죽상경화성 관상 및 말초 혈관 질병이다. 일부 구체예에서, 의학적 상태는 당뇨병성 혈관병 합병증이다. 일부 구체예에서, 의학적 상태는 알츠하이머병이다. 일부 구체예에서, 의학적 상태는 외상성 뇌손상이다. 일부 구체예에서, 의학적 상태는 당뇨병이다. 일부 구체예에서, 의학적 상태는 말기 신부전이다. 일부 구체예에서, 본 명세서에 제시된 치료적 유효량의 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 다른 제제, 약물 또는 호르몬과 (예컨대, 동시에, 순차적으로, 또는 별도로) 조합하여 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 다른 제제, 약물, 또는 호르몬이 각각의 의학적 상태에 대해 공지된 치료법일 수 있다. 일부 구체예에서, 공지된 치료법은 치료 기준일 수 있다.

[0038] 또한, 본 출원은, 알부민계 치료제의 투여 이전에 내인성 알부민 분해를 촉진시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 알부민계 치료제를 투여하기 전, 알부민계 치료제를 사용하여, FcRn의 알부민 결합 부위에 특이적인 항-FcRn 항체 또는 이의 단편을 치료를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0039] 또한, 본 출원은, 대상체에 투여되었던 외인성 알부민계 치료제의 분해를 촉진시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 유효량의, FcRn의 알부민 결합 부위에 특이적인 항-FcRn 항체 또는 이의 단편을 피험체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0040] 일부 구체예에서, 상기 방법은 알부민계 치료제를 피험체에게 투여하는 단계를 추가적으로 포함한다. 일부 구체예에서, 알부민계 치료제의 약물동역학 또는 약물역학은 향상된다.

도면의 간단한 설명

[0041] 특허 또는 출원 파일은 컬러로 작성한 최소한 하나의 도면을 포함한다. 컬러 도면(들)과 함께 공개된 본 특허 또는 특허 출원의 사본은 특허청에 요청 및 필요한 요금 지불시 제공될 것이다.

도 1은 인간화된 중쇄 변이체 (V_H1, V_H1, 및 V_H4)의 아미노산 서열을 나타낸다. 이러한 변이체는 인간 중쇄 가변 도메인 서열에 기초하며 잠재적인 면역원성을 최소화시키기 위해 특정 위치에 혼입된 아미노산의 변화를 보여주도록 정렬된다. 인간화된 프레임워크 중에서 달라지는 아미노산 잔기에 밑줄되어 있다. 카바트 CDR가 박스표시되어 있다.

도 2는 인간화된 경쇄 변이체 ($V\kappa1$-$V\kappa4$)의 아미노산 서열을 보여준다. 이러한 변이체는 인간 경쇄 가변 도메인 서열에 기초하며 잠재적인 면역원성을 최소화시키기 위해 특정 위치에 혼입된 아미노산의 변화를 보여주도록 정렬된다. 인간화된 틀 중에서 달라지는 아미노산 잔기에 밑줄되어 있다. 카바트 CDR이 박스표시되어 있다.

도 3은 pH 6.0 및 pH 7.4에서의 경쟁 ELISA의 비교를 나타낸다. 모체 scFv가 중앙에 나타난다. 추가의 분석에 해당하는 scFv가 박스로 강조된다.

도 4는 (a) pH 7.4 또는 (b) pH 6.0에서 인간화된 친화성 성숙된 항-FcRn 항체의 항-FcRn 경쟁 ELISA 테스트를 나타낸다. IgG는 HEK 세포에서 일시적으로 발현되었다. 희석된 일련의 항-FcRn 인간화된 친화성 성숙된 변이체를 pH 7.4 또는 pH 6.0에서 재조합 인간 FcRn에 결합하기 위해 고정된 농도의 비오틴화된 쥐과 모체에 대하여 테스트하였다. 스트렙타비딘-HRP 및 TMB 기질을 사용하여 결합된 비오틴화된 쥐과 모체를 검출하였다.

도 5는 pH 6.0에서 인간화된 친화성 성숙된 항-FcRn 항체의 항-FcRn 경쟁 ELISA 테스트를 나타낸다. IgG는 NS0 세포에서 안정하게 발현되었다. 희석된 일련의 항-FcRn 인간화된 친화성 성숙된 변이체를 pH 6.0에서 재조합 인

간 FcRn에 결합하기 위해 고정된 농도의 비오틴화된 쥐과 모체에 대하여 테스트하였다. 스트렙타비딘-HRP 및 TMB 기질을 사용하여 결합된 비오틴화된 쥐과 모체를 검출하였다.

도 6는 pH 7.4에서 인간화된 친화성 성숙된 항-FcRn 항체의 항-FcRn 경쟁 ELISA 테스트를 나타낸다. IgG는 NS0 세포에서 안정하게 발현되었다. 희석된 일련의 항-FcRn 인간화된 친화성 성숙된 변이체를 pH 7.4에서 재조합 인간 FcRn에 결합하기 위해 고정된 농도의 비오틴화된 쥐과 모체에 대하여 테스트하였다. 스트렙타비딘-HRP 및 TMB 기질을 사용하여 결합된 비오틴화된 쥐과 모체를 검출하였다.

도 7은 pH 7.4 및 pH 6.0에서 인간 FcRn에 대한 mAbs의 결합을 보여준다. 고정된 mAbs (A) SYNT002h (인간화된 모체 $V_H1/V_κ1$), (B) SYNT002-3 (G15_C3/ $V_κ3$), (C) SYNT002-8 (G47_B10/ $V_κ3$), (D) SYNT002-16 (G50_C10/ $V_κ3$), (E) SYNT002-17 (G54_D11/ $V_κ3$), 및 (F) SYNT002-21 (G49_H9.3/ $V_κ3$)에 대해 주입된 적정량의 hFcRn의 결합을 나타내는 대표적인 센서그램을 나타낸다.

도 8A는 명시된 시점에서 24시간 기준선에 기초하여 평균 잔여 알부민 % (± 표준 오차)로서 플롯되는 SYNT002-8 (G47_B10/ $V_κ3$) 및 SYNT002-16 (G50_C10/ $V_κ3$)의 연구 결과를 나타낸다.

도 8B는 SYNT002-8 (G47_B10/ $V_κ3$)이 용량-의존적 방식으로 알부민 이화작용을 효과적으로 증가시킨 것을 나타낸다. 결과는 24 시간 기준선과 비교하여 명시된 시점에 잔여의 인간 알부민의 평균 백분율 (± SEM)의 $\log_{10}$로서 나타낸다.

도 9는 APAP 투여 2시간 후 PCS, NAC (140 mg/kg), SYNT002-8 (G47_B10/ $V_κ3$) (10 mg/kg), 또는 IgG4 아이소형 대조군 (10 mg/kg)이 투여된 *Fcgrt*^{TG} 마우스에 준치사량의 APAP 투여 후 6시간 및 8시간의 혈청 ALT 수준을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 하나의 양태에서, 본 출원은 FcRn에 결합하는 항체 및 결합 단백질을 제공한다. 더욱 구체적으로, 이러한 항체는 알부민에 대한 결합 부위와 중복되는 FcRn의 에피토프에 결합한다. 결과적으로, 이러한 항체는 FcRn-매개 기능, 예컨대 알부민에 대한 FcRn의 결합, 분해로부터 알부민 보호, 및 알부민-결합 화합물의 반감기 연장을 조절한다. 또 다른 양태에서, FcRn 항체 또는 이의 항원-결합 부위를 인코딩하는 서열을 포함하는 단리된 핵산을 제공한다. 또 다른 양태에서, FcRn 항체 또는 이의 항원-결합 부위 및 제약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 피험체에 투여하기에 적합한 조성물을 제공한다.

[0043] 일부 구체예에서, 본 명세서에 개시된 항체는 인간 FcRn에 대한 알부민의 결합을 억제하지만, 인간 FcRn에 대한 인간 IgG의 결합은 억제하지 않는다. 일부 구체예에서, 본 명세서에 개시된 항체는 알부민의 혈청 반감기를 감소시키지만, 인간 IgG의 혈청 반감기는 감소시키지 않는다.

[0044] 또 다른 양태에서, FcRn과 알부민 사이의 상호 작용을 조절하는 방법을 제공한다. 예를 들어, FcRn에 대한 알부민의 결합을 감소시킴으로써, 본 명세서에 제시된 항체 또는 이의 항원-결합부는 순환 알부민의 반감기를 감소시키고 급성 및 만성 독성 노출을 치료 또는 예방하도록 사용될 수 있다. 알부민은, 예를 들어, 다음의 광범위한 범위의 화합물 및 분자에 결합하는 것으로 알려져 있다: 구리, 헤마틴, 장쇄 지방산, 아연, 빌리루빈, 티록신, 에이코사노이드, 트립토판, 비타민 D3, 담즙산, 칼슘, 마그네슘, 클로라이드, 인도메타신, 브로모페놀 블루, 살리실레이트, 와파린, 페닐뷰타존, 다이곡신, 퓨로세마이드, 페니토인, 클로르프로파마이드, 벤질페니실린, 에반스 블루, 다이아제팜, 이부프로펜, 나프록센, 클로피브레이트, 클로르프로마진, 이미프라민, 및 퀴니딘 (예컨대, Varshney 외, Ligand binding strategies of human serum albumin: How can the cargo be optimized. Chirality. 2010(22):77-87을 참고한다). 리신은 또한 알부민에 결합하는 것으로 알려져 있다 (Blome and Schengrund., Toxicon. 2008 51(7):1214-24). 또한, 아세트아미노펜이 인간 혈청 알부민에 결합하는 것이 밝혀졌다 (Damsten 외, Drug Metab Dispos. 2007 35(8):1408-17). 이러한 화합물 및 분자의 배출은 다양한 약물 (예컨대, 알부민 접합 약물 및 융합 단백질)의 독성 과다 중독, 중금속 독성, 박테리아 과부하, 세균성 패혈증, 및 다양한 다른 병태를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 다양한 병태의 치료에 유리할 것이다.

[0045] 이와 유사하게, 본 명세서에 제시된 항체 또는 이의 항원-결합부는 알부민 독성과 관련된 의학적 상태를 치료하기 위해 순환 알부민의 반감기를 감소시키기 위해, 또는 낮은 수준이 유익한 것으로 나타난 경우에 사용될 수 있다. 예를 들어, 알부민은 죽상경화성 관상 및 말초 혈관 질병 (Song, Atherosclerosis 2012), 당뇨병성 혈관

병 합병증 (Kim, Diab Metab J 2012; Murea, Am J Nephrol 2012), 알츠하이머병 (Byun, PLoS One 2012), 및 외상성 뇌손상 (The SAFE Study Investigators, N Engl J Med 2007)에 영향을 준다. 순환 알부민을 감소시키면 또한 당뇨병, 말기 신부전, 및 다른 질환, 질병, 또는 장애의 치료에 유용할 수 있다.

[0046] 신생아 Fc 수용체로도 공지되어 있는 FcRn은 알부민에 대한 내재성 막 Fc 수용체이다. FcRn은 막 결합된 알파-사슬 (GenBank 등록 번호 NM004107)과 가용성 β2-마이크로글로불린 (β2m) (GenBank 등록 번호 NM004048)의 이종이량체이며 MHC 클래스 I 분자와 구조적으로 관련되어 있다. FcRn은 세포내 이입된 알부민에 결합하여 리소좀 구획 내에서의 분해로부터 이를 보호하고, 중성의 세포외 pH에서 방출시키기 위해 세포 표면으로 알부민을 운반함으로써 알부민 농도를 조절한다. 이러한 기전에도 불구하고, FcRn로 인해 알부민 혈청 반감기는 길어진다. 따라서, FcRn-알부민 상호 작용의 특이적 차단은 병원성 알부민 -결합 독소의 분해를 촉진시키기 위해 사용될 수 있다.

[0047] FcRn에 특이적으로 결합하여 알부민에 대한 FcRn의 결합을 차단하지만, FcRn의 IgG-Fc 결합 부위에 대하여는 실질적으로 결합하지 않는, 쥐과 항체로부터 유도된 항체를 제공한다. 이러한 항체는 pH 7.4 및 pH 6.0에서 FcRn에 대해 실질적으로 개선된 결합 친화성을 가지므로, 생리학적 및 산성 조건하에서 FcRn에 대한 알부민의 결합을 차단한다. 이러한 항체는 자가면역성 및 염증성 질병 치료에 유용하다. 이러한 항체는 하나 또는 그 이상의 친화성 성숙된 CDR을 포함한다. 친화성 성숙 과정은 6.0 내지 7.4의 임계적 pH 범위에 걸쳐 FcRn에 높은 친화성으로 결합하는 항체를 제공한다. 그러므로 이러한 항체는 엔도솜의 산성 환경으로 내재화되면 알부민의 결합을 효과적으로 차단한다.

[0048] 특정 구체예에 따르면, 개선된 항체는 또한 감소된 면역원성을 위해 인간화된 프레임워크를 특징으로 한다. 특정 구체예에서, FcRn-특이적 항체의 CDR은 인간 항체로부터 얻은 프레임워크 내부에 위치되어 있다. 다른 구체예에서, FcRn-특이적 항체의 CDR은 둘 이상의 인간 항체의 복합체(composite)인 프레임워크 내부에 위치되어 있다. 다른 구체예에서, FcRn-특이적 항체의 표면-노출되는 프레임워크 잔기는 인간 항체의 프레임워크 잔기로 치환된다. 바람직한 구체예에서, 이러한 프레임워크는 광범위한 모집단 범위에 걸쳐 T 세포 에피토프일 것으로 예측되는 아미노산 서열의 존재를 최소화하기 위해 선택된다. CDR은 또한 인간 불변 영역 (즉, 키메라 항체)에 연결된 쥐과 프레임워크 내부에 위치될 수 있다.

[0049] 본 명세서에 자세히 기재된 바와 같이, 친화성 성숙을 위해 중쇄 가변 도메인 CDR3 영역을 변이시켰으며 pH 6.0 및 pH 7.4에서 scFv 형태인 것을 선별하였다. 서열 ARGBNSVVSBNCVNCNVCRSC (서열 번호:41)을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 사용하여 아미노산 위치 94-100 (CDR3H의 a.a. 95-100 및 FW3의 a.a. 94)의 중쇄 CDR3H 영역에 아미노산 서열 변이를 도입시켰으며, 각 위치에서 다음과 같이 선택된 아미노산을 제공하였다: a.a. 94: K, R; a.a. 95: A, C, D, E, F, G, H, I, L, P, Q, R, S, V, W, Y; a.a. 96: A, D, E, G,H, K, N, P, Q, R, S, T; a.a. 97: A, C, D, F, G, H, L, P, R, S, T, V, Y; a.a. 98: A, D, G, H, I, L, N, P, R, S, T, V; a.a. 99: A, C, D, G, H, N, P, R, S, T, Y; a.a. 100: A, G, S, T. 서열 AGGNNSNNSNNSNNSRSC (서열 번호:42)을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 사용하여 아미노산 위치 94-99 (CDR3H의 a.a. 95-99 및 FW3의 a.a. 94)의 중쇄 CDR3H 영역에 아미노산 서열 변이를 도입시켰으며, 각 위치에서 다음과 같이 선택된 아미노산을 제공하였다: a.a. 94: R; a.a. 95: A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y; a.a. 96: A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y; a.a. 97: A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y; a.a. 98: A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y; a.a. 99: A, G, S, T.

[0050] 하기 실시예에 나타나는 바와 같이, 이는 FcRn 결합 친화성에 실질적 개선을 부여하였던 몇 가지 CDR3H 변이체를 생성하였다. CDR3H 라이브러리로 도입된 변이성과 비교하여 얻은 상기 변이체를 조사한 결과, 아미노산이 비교적 변화되지 않고 남아있는 특정 위치 및 변이가 도입되어 결합을 개선시킬 수 있는 다른 위치를 나타낸다. 따라서 변이될 수 있는 특정 아미노산을 포함하는 CDR3H를 중쇄가 포함하는, FcRn에 결합하는 항체 또는 이의 결합 부위가 제공된다. 이러한 하나의 구체예에서, CDR3H는 X_1ESTTX_2를 포함하고, 여기서 X_1 는 A, 또는 L이고; X_2는 T, 또는 R이다 (서열 번호:43). 이러한 또 다른 구체예에서, 중쇄 CDR3H는 X_1ESTTX_2VGDY이고, 여기서 X_1는 A, 또는 L이고; X_2는 T, 또는 R이다 (서열 번호:44). 이러한 또 다른 구체예에서, 중쇄 CDR3H는 X_1ESTTX_2를 포함하고, 여기서 X_1는 G, A, 또는 L이고; X_2는 T, 또는 R이다 (서열 번호:45). 이러한 또 다른 구체예에서, 중쇄 CDR3H는 X_1ESTTX_2VGDY이고, 여기서 X_1는 G, A, 또는 L이고; X_2는 T, 또는 R이다 (서열 번호:46). 이러한 또 다른 구체예에서, 중쇄 CDR3H는 $X_1X_2X_3X_4X_5$ X_6를 포함하며, 여기서 X_1은 G, A, F, 또는 L이고; X_2는 E, A, 또는 D이고; X_3는 S, T, 또는 A이고; X_4는 T, L, P, 또는 V이고; X_5는 T, S, 또는 A이고; X_6는 T 또는 A이다 (서열 번호:47).

이러한 또 다른 구체예에서, 중쇄 CDR3H는 $X_1X_2X_3X_4X_5$ X_6VGDY이고, 여기서 X_1는 G, A, F, 또는 L이고; X_2는 E, A, 또는 D이고; X_3는 S, T, 또는 A이고; X_4는 T, L, P, 또는 V이고; X_5는 T, S, 또는 A이고; X_6는 T 또는 A이다 (서열 번호:48).

[0051] 특정 구체예에서, CDR3H는 GESTTTVGDY (서열 번호:25), AESTTTVGDY (서열 번호:27), FSSLSTVGDY (서열 번호:29), 또는 LESTTAVGDY (서열 번호:31)이다. 특정 구체예에서, CDR3H는 FDTPATVGDY (서열 번호:33), FDTPSTVGDY (서열 번호:35), FDSLSTVGDY (서열 번호:37), 또는 LEAVSAVGDY (서열 번호:39)이다. 이러한 특정 구체예에서, 중쇄 가변 도메인의 위치 103의 아미노산은 트립토판이다. 이러한 특정 구체예에서, 중쇄 가변 도메인의 위치 103의 아미노산은 아르기닌이다.

[0052] CDR3H가 상기 제시된 바와 같은 특정 구체예에서, CDR1H는 서열 번호:2로 제시되고, CDR2H는 서열 번호:4로 제시된다.

[0053] 몇 가지 중쇄 및 경쇄 프레임워크가 개발되었다. 면역원성 T 세포 에피토프를 최소화하기 위해 눈에 관한 인간 가변 도메인 서열로부터 인간화된 프레임워크를 조립하였다. 이러한 세 가지 인간화된 중쇄 프레임워크 및 이러한 네 개의 경쇄 인간화된 프레임워크의 예시는 다음과 같다: V_H1 (서열 번호:12); V_H3 (서열 번호:14); V_H4 (서열 번호:16); Vκ1 (서열 번호:18); Vκ2 (서열 번호:20); Vκ3 (서열 번호:22); 및 Vκ4 (서열 번호:24). 이러한 인간화된 프레임워크의 예시에 상응하는 올리고뉴클레오티드 서열은 다음과 같이 제시된다: 서열 번호:11 (V_H1);서열 번호:13 (V_H3); 서열 번호:15 (V_H4); 서열 번호:17 (Vκ1); 서열 번호:19 (Vκ2); 서열 번호:21 (Vκ3); 및 서열 번호:23 (Vκ4). 서열 번호:12, 서열 번호:14, 서열 번호:16, 및 서열 번호:18로 제공되는 중쇄 가변 도메인 서열에서, CDR1H, CDR2H, 및 CDR3H 아미노산은 "Xaa"로 나타낸다. CDR1H 및 CDR2H의 아미노산 서열은 각각 서열 번호:2 및 서열 번호: 4로 제시된다. CDR1H에 상응하는 올리고뉴클레오티드 서열은 서열 번호:1로 제시되며 CDR2H에 상응하는 올리고뉴클레오티드 서열은 서열 번호:3으로 제시된다. 서열 번호:18, 서열 번호:20, 서열 번호:22, 및 서열 번호:24로 제공되는 경쇄 가변 도메인 서열에서, 모든 위치에서 특정 아미노산이 명시된다. CDR1L의 아미노산 서열은 서열 번호:6에 제시된 바와 같고, CDR2L은 서열 번호:8에 제시된 바와 같고, CDR3L은 서열 번호:10에 제시된 바와 같다. 상응하는 올리고뉴클레오티드 서열은 다음에 제시된 바와 같다: 서열 번호:5 (CDR1L); 서열 번호:7 (CDR2L); 및 서열 번호:9 (CDR3L). 중쇄 및 경쇄에서 FW 및 CDR의 위치는 또한 각각 도 1 및 도 2로부터 명확해질 것이다.

[0054] 표 1은 친화성 성숙된, 인간화된 FcRn-결합 항체 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 및 CDR의 비-제한적인 예를 제공한다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 가변 도메인은 pH 6.0 및 pH 7.4에서의 결합을 개선시키기 위해 선택되었으며, 모체 쥐과 항체에 비해 실질적으로 개선된 결합을 입증한다.

[0055]

표 1 - 서열 번호로 나타낸 항체 아미노산 서열

	CDR1H	CDR2H	CDR3H	V_H
G15_C3 V_H1	2	4	25	26
G47_B10 V_H1	2	4	27	28
G47_H6 V_H1	2	4	29	30
G50_C10 V_H1	2	4	31	32
G54_D11 V_H1	2	4	33	34
G52_G9 V_H1	2	4	35	36
G49_H9.3 V_H1	2	4	37	38
G49_H9.5 V_H1	2	4	39	40

[0056] 친화성 성숙된 중쇄 CDR3은 중쇄 CDR1 (예컨대, 서열 번호:2를 가지는 CDR1) 및/또는 중쇄 CDR2 (예컨대, 서열 번호:4를 가지는 CDR2)와 조합될 수 있다.

[0057] 하기 실시예에 개시된 바와 같이, 본 명세서에 예시된 다양한 항체 가변 도메인은 쥐과 항체에 기초한 것이며 친화성 성숙된 CDR을 내포하고, 그리고 특정 구체예는 또한 인간화된 FW를 특징으로 한다. 표 1에 개시된 임의

의 중쇄 가변 도메인은 임의의 개시된 경쇄와 공동 발현되어 기능적 항-FcRn 항체를 생성할 수 있다. 더욱이, 친화성 성숙된 중쇄 가변 도메인은 본 명세서에 개시된 인간화된 비-친화성 성숙된 경쇄 가변 도메인과 짝을 이룰 수 있으며, 친화성 성숙된 경쇄 가변 도메인은 인간화된 비-친화성 성숙된 중쇄 가변 도메인과 짝을 이룰 수 있다. 한 바람직한 구체예에서, 친화성 성숙된 중쇄 가변 도메인은 인간화된 경쇄 가변 도메인과 짝을 이룰 수 있다. 또한, 표 1은 V_H1의 중쇄 CDR를 제시한다. 중쇄 CDR은 또한 예컨대, 본 명세서에 개시된 프레임워크 V_H3, 및 V_H4에 적합하다 (도 1 참고). 본 명세서에서 사용 시, 명칭 V_H1, V_H3, V_H4, $V\kappa1$, $V\kappa2$, $V\kappa3$, 및 $V\kappa4$는 본 명세서에 개시된 예시적인 인간화된 프레임워크를 지칭하며, 인간 생식세포계열 유전자 패밀리를 지칭하지 않는다. 개선된 또는 변화된 결합 특성을 가지는 새로운 항체를 식별하기 위해 본 명세서에 개시된 임의의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인은 상보적 가변 도메인의 라이브러리와 조합되어 선별될 수 있음이 자명할 것이다.

[0058] 본 출원은 표 1에 개시된 것과 유사하지만 동일하지 않은 항체 및 항원 결합 부위을 제공한다. 이러한 항체는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환, 결실, 삽입, 및/또는 부가를 가질 수 있다. 특정 구체예에서, FcRn 항체는 표 1에 제시된 중쇄 가변 도메인에 최소한 85%, 최소한 90%, 또는 최소한 95% 동일한 중쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0059] 하나의 구체예에서, FcRn 항체는 표 1에 제시된 CDR 서열, 즉, CDR1H, CDR2H, 및 CDR3H, 및 V_H1, V_H3, 또는 V_H4의 프레임워크 (즉, FW1, FW3, 및 FW4) 또는 V_H1, V_H3, 또는 V_H4의 프레임워크에 최소한 85%, 90%, 또는 95% 동일한 프레임워크를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 내포한다. 하나의 구체예에서, FcRn 항체는 표 1에 제시된 CDR 서열 및 중쇄 가변 도메인 서열이 표 1에 제시된 가변 도메인에 최소한 85%, 또는 최소한 90%, 또는 최소한 95% 동일하도록 하는 프레임워크를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 내포한다.

[0060] 하나의 구체예에서, FcRn 항체는 표 1에 제시된 CDR 서열, 즉, CDR1H, CDR2H, 및 CDR3H, 및 V_H1, V_H3, 또는 V_H4의 프레임워크 (즉, FW1, FW3, 및 FW4) 또는 V_H1, V_H3, 또는 V_H4의 프레임워크에 최소한 85%, 90%, 또는 95% 동일한 프레임워크를 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 $V\kappa1$, $V\kappa2$, $V\kappa3$, 또는 $V\kappa4$, 또는 $V\kappa1$, $V\kappa2$, $V\kappa3$, 또는 $V\kappa4$에 최소한 85%, 90%, 또는 95% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 내포한다.

[0061] "동일성"은 두 개의 아미노산 또는 핵산 서열이 공유하는 동일한 위치의 수 또는 백분율을 지칭하며, 2개 서열의 최적의 정렬을 위해 도입시켜야 할 필요가 있는 갭의 수, 및 각 갭의 길이를 고려한다.

[0062] 하나의 아미노산 서열이 또 다른 아미노산 서열에 최소한 85%, 또는 최소한 90%, 또는 최소한 95% 동일한 것으로 기재되어 있는 경우, 이러한 아미노산 서열은 보존적 치환에 의해 달라질 수 있다 (모든 치환이 보존적 치환인 경우 포함).

[0063] 아미노산 치환은, 일부 경우에서, (a) 치환 구역에서의 펩타이드 골격 구조, (b) 표적 부위의 분자의 전하 또는 소수성; 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지시키는 것에 대해 이러한 효과를 현저히 달라지게 하지 않는 치환을 선택함으로써 이루어질 수 있다. 예를 들면, 자연 발생 잔기는 측쇄 성질에 기초하여 다음과 같은 그룹으로 나눌 수 있다; (1) 소수성 아미노산 (메티오닌, 알라닌, 발린, 류신, 및 아이소류신); (2) 중성 친수성 아미노산 (시스테인, 세린, 및 트레오닌); (3) 산성 아미노산 (아스파르트산 및 글루탐산); (4) 염기성 아미노산 (아스파라긴, 글루타민, 히스티딘, 리신, 및 아르기닌); (5) 사슬 배향에 영향을 주는 아미노산 (글리신 및 프롤린); 및 (6) 방향족 아미노산 (트립토판, 티로신, 및 페닐알라닌). 이러한 그룹 안에서 이루어지는 치환은 보존적 치환으로 고려될 수 있다. 치환의 예로는, 알라닌에 대한 발린, 아르기닌에 대한 리신, 아스파라긴에 대한 글루타민, 아스파르트산에 대한 글루탐산, 시스테인에 대한 세린, 글루타민에 대한 아스파라긴, 글루탐산에 대한 아스파르트산, 글리신에 대한 프롤린, 히스티딘에 대한 아르기닌, 아이소류신에 대한 류신, 류신에 대한 아이소류신, 리신에 대한 아르기닌, 메티오닌에 대한 류신, 페닐알라닌에 대한 류신, 프롤린에 대한 글리신, 세린에 대한 트레오닌, 트레오닌에 대한 세린, 트립토판에 대한 티로신, 티로신에 대한 페닐알라닌, 및/또는 발린에 대한 류신의 치환을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0064] 서열 유사성을 결정하기 위한 방법 및 컴퓨터 프로그램이 공개적으로 이용가능하며, GCG 프로그램 패키지 (Devereux 외, Nucleic Acids Research 12: 387, 1984), BLASTP, BLASTN, FASTA (Altschul 외, J. Mol. Biol. 215:403 (1990), 및 ALIGN 프로그램 (버전 2.0)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 널리 공지된 스미스 워터맨 알고리즘 (Smith Waterman algorithm) 또한 유사성을 결정하기 위해 사용될 수 있다. BLAST 프로그램은 NCBI 및 다른 출처로부터 공개적으로 이용가능하다 (BLAST Manual, Altschul, 외, NCBI NLM NIH, Bethesda, Md. 20894; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/에서 BLAST 2.0). 서열을 비교함에 있어서, 이러한 방법이 다

양한 치환, 결실, 및 다른 변형에 고려된다.

[0065] 본 명세서에서 사용 시, 용어 “상보성 결정 영역” (CDR, 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3)은 항원 결합에 필요한 존재인 항체 가변 도메인의 아미노산 잔기를 지칭한다. 각각의 가변 도메인은 전형적으로 CDR1, CDR2 및 CDR3로서 식별된 세 개의 CDR 영역을 가진다. 각각의 상보성 결정 영역은 카바트에 의해 정의된 “상보성 결정 영역”으로부터의 아미노산 잔기 (즉, 경쇄 가변 도메인에서 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3) 및 중쇄 가변 도메인에서 1-35 (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3))을 포함할 수 있다. 유사하게, “프레임워크” (FW)는 카바트 넘버링 시스템 (Kabat 외, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987, 1991))을 고려하여 경쇄 가변 도메인의 아미노산 31-23 (FW1), 35-49 (FW2), 57-88 (FW3), 및 98-107 (FW4) 및 중쇄 가변 도메인의 1-30 (FW1), 36-49 (FW2), 66-94 (FW3), 및 103-113 (FW4)을 포함한다.

[0066] 카바트 잔기 정의가 아미노산 잔기의 선형 넘버링에 항상 곧바로 상응하는 것은 아니다. 실제 선형 아미노산 서열은 기본 가변 도메인 구조의 프레임워크 또는 상보성 결정 영역 (CDR)에 관계없이, 구조 성분의 단축 또는 구조 성분으로의 삽입에 상응하는 엄격한 카바트 넘버링에서 보다 더 적은 또는 추가 아미노산을 내포할 수 있다. 잔기의 올바른 카바트 넘버링은 주어진 항체에 대하여 이러한 항체의 서열에서 상동성인 잔기를 “표준” 카바트 넘버링된 서열에 정렬시킴에 의해 결정될 수 있다.

[0067] 본 명세서에서 사용 시, “항체 가변 도메인”은 상보성 결정 영역 (CDR; 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3), 및 프레임워크 영역 (FR)의 아미노산 서열을 포함하는 ,항체 분자의 경쇄 및 중쇄 부분을 지칭한다. V_H는 중쇄의 가변 도메인을 지칭한다. V_L은 경쇄의 가변 도메인을 지칭한다.

[0068] 항체는 특정 항원 또는 물질을 인식하여 결합하는 단백질이다. 바람직한 구체예에서, 본 명세서에 제시된 항체 또는 항원-결합부는 최소한 천연 리간드 (즉, 알부민)만큼 강하게 FcRn에 결합한다. 항체를 이용한 항원의 해리에 대한 평형 상수 (Kd)로 나타내어지는 친화성은, 항원 결정인자와 항체 결합 부위 사이의 결합 강도를 측정한다. 항원에 대한 항체의 친화성은 적합한 표면 플라스몬 에너지 공명 측정을 사용하여 결정될 수 있다. 이러한 측정은 국제 공개 특허 출원 WO 2005/012359 및 본 출원의 다른 부분에 기재되어 있는 BIACORE® 분석일 수 있다. 친화성을 결정하는 다른 방법으로는 효소-결합 면역흡착 분석 또는 경쟁 분석, 가령, 방사면역분석을 포함한다.

[0069] 결합력(Avidity)은 항체와 그 항원과의 결합 강도의 측정치이다. 결합력은 항원 결정인자와 항체 상의 항원 결합 부위 간의 친화성, 및 각 항체 당 결합 부위의 수 (결합가) 모두에 관계된다. 예를 들면, 일가 항체 (예컨대, Fab 또는 scFv)는 특정 에피토프에 있어 하나의 결합 부위를 가진다. IgG 항체는 두 개의 항원 결합 부위을 가진다. 전형적인 K 값 (해리 상수 K_d의 역)은 10^5 내지 10^{11} 리터/몰이다. 10^4 리터/몰 보다 약한 임의의 K는 비특이적인 결합을 나타내는 것으로 고려된다.

[0070] 특정 구체예에서, 본 출원에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합부는 10^5 내지 10^{12} 리터/몰, 10^6 내지 10^{12} 리터/몰, 10^7 내지 10^{12} 리터/몰, 10^8 내지 10^{12} 리터/몰, 10^9 내지 10^{12} 리터/몰, 10^{10} 내지 10^{12} 리터/몰, 또는 10^{11} 내지 10^{12} 리터/몰의 K_d로 인간 FcRn의 알부민-결합 부분에 결합한다. 다른 구체예에서, 본 출원에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합부는 10^5 내지 10^{11} 리터/몰, 10^6 내지 10^{11} 리터/몰, 10^7 내지 10^{11} 리터/몰, 10^8 내지 10^{11} 리터/몰, 10^9 내지 10^{11} 리터/몰, 또는 10^{10} 내지 10^{11} 리터/몰의 K_d로 인간 FcRn의 알부민-결합 부분에 결합한다. 다른 구체예에서, 본 출원에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합부는 10^5 내지 10^{10} 리터/몰, 10^6 내지 10^{10} 리터/몰, 10^7 내지 10^{10} 리터/몰, 10^8 내지 10^{10} 리터/몰, 또는 10^9 내지 10^{10} 리터/몰의 K_d로 인간 FcRn의 알부민-결합 부분에 결합한다. 다른 구체예에서, 본 출원에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합부는 10^5 내지 10^8 리터/몰, 10^6 내지 10^8 리터/몰, 또는 10^7 내지 10^8 리터/몰의 K_d로 인간 FcRn의 알부민-결합 부분에 결합한다.

[0071] 인간에게 투여될 때 면역원성을 최소화하기 위하여, 본 명세서에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합부는 바람직하게는 인간 불변 도메인을 포함한다. 그러므로 항체는 임의의 아이소형 또는 하위유형일 수 있으며, IgG_1, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_3, IgG_4, IgM, IgA, IgD, 또는 IgE를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 항체 클래스는 효과기

기능을 최적화시키기 위하여 (*예컨대*, 보체 의존성 세포독성 (CDC) 또는 항체 의존성 세포매개 세포독성 (ADCC)을 증가 또는 감소시키기 위하여) 선택될 수 있다. 특정 구체예에서, 불변 영역 (즉, C_H1, C_H2, C_H3, 및/또는 경첩부 영역)은 예를 들면, Fc 수용체에 대한 결합을 증가 또는 감소시키기 위해 변형된다. 특정 구체예에서, 불변 도메인은 중쇄-중쇄 결합을 촉진 또는 안정화시키기 위하여 변형된다. 특정 구체예에서, 항체는 IgG_4 항체이고 중쇄의 경첩부 영역은 위치 241의 세린을 프롤린으로 교체함으로써 변형되어, 혈청 반감기를 연장시킨다 (Angal 외, 1993, Mol. Immunol. 30:105-108). 특정 구체예에서, 항체는 IgG_4 항체이고 중쇄의 위치 478의 C-말단 리신은 결실된다. 일부 구체예에서, IgG_4 항체는 양쪽에 S241P 변형을 가지며 C-말단 리신이 없다.

[0072] 특정 구체예에서, FcRn-결합 항체 단편이 제공된다. Fv는 모든 여섯 개의 초가변 루프 (CDR)를 포함하는 완전한 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 내포하는 최소 단편이다. 불변 도메인의 부재로 인해, 가변 도메인은 비공유적으로 결합된다. V_H 및 V_L 도메인을 결합시켜 항원 결합 부위를 형성할 수 있게 하는 링커를 사용하여 중쇄 및 경쇄는 단일 폴리펩타이드 사슬 (“단쇄 Fv” 또는 “scFv”)로 연결될 수 있다. 예컨대, Bird 외, 1988, Science 242:423 및 Huston 외, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879를 참고한다. 하나의 구체예에서, 링커는 $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_3$이다. scFv 단편은 전체 항체(whole antibody)의 불변 도메인이 없기 때문에, 전체 항체보다 상당히 작다. scFv 단편은 또한 특정 구체예에서 필요할 수 있는 다른 생물학적 분자와의 정상적인 중쇄 불변 도메인 상호작용이 없다.

[0073] 본 명세서에서 사용 시, “항체”는 단량체, 뿐만 아니라 다량체 및 결합 단편을 지칭한다. 다량체를 포함한 무손상 항체, 또는 항체의 항원-결합 영역을 보유하는 항체 단편이 사용될 수 있다. 항원-결합 영역은, 제한없이, Fv, scFv, Fab, Fab' 및 $F(ab')_2$ 단편을 포함한다. 항체 단편의 제조 방법은 해당 분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들면, 중쇄 경첩부 영역이 없는 일가 Fab 단편은 전체 면역글로불린으로부터 파파인을 이용한 단백분해성 소화에 의해 준비될 수 있다. 중쇄 경첩부 영역을 보유하는 이가 $F(ab')_2$ 단편은 펩신을 이용한 단백분해성 소화에 의해 준비될 수 있다.

[0074] V_H, V_L, 및 선택적으로 C_L, C_H1, 또는 다른 불변 도메인을 내포하는 항체의 단편 또한 사용될 수 있다. 이러한 단편은 또한 재조합적으로 제조될 수도 있다. 다수의 기타 유용한 항원-결합 항체 단편은 해당 분야에 공지이며, 제한없이, 다이아바디, 트라이아바디, 단일 도메인 항체, 및 다른 일가 및 다가 형태을 포함한다.

[0075] 다가 항원-결합 단백질이 또한 제공되는데, 이는 제한 없이, 항체, 이의 항원-결합 단편, 및 항체의 항원-결합 부 모두 또는 일부를 포함하는 단백질의 형태일 수 있다. 다가 항원-결합 단백질은 단일특이적, 이중특이적, 또는 다중특이적일 수 있다. 용어 특이성은 특정 분자가 결합할 수 있는 상이한 항원 결정인자 유형의 수를 지칭한다. 면역글로불린 분자가 오직 하나의 유형의 항원 결정인자에 결합하는 경우, 면역글로불린 분자는 단일특이적이다. 면역글로불린 분자가 상이한 유형의 항원 결정인자에 결합하는 경우, 이 때 면역글로불린 분자는 다중특이적이다.

[0076] 한 구체예에서, 다가 단쇄 항체는 가변 중쇄 단편에 연결된 가변 경쇄 단편을 포함하며 (scFv와 유사), 이는 또 다른 펩타이드 링커에 의해 최소한 하나의 다른 항원 결합 도메인에 추가로 연결된다. 전형적으로, 펩타이드 링커는 약 열 다섯개의 아미노산 잔기로 구성된다. 하나의 바람직한 구체예에서, V_L 및 V_H 도메인의 수는 동일하다. 예를 들면, 이가 단쇄 항체는 다음과 같이 나타내어질 수 있다: $V_L\text{-}L_1\text{-}V_H\text{-}L_2\text{-}V_L\text{-}L_3\text{-}V_H$ 또는 $V_L\text{-}L_1\text{-}V_H\text{-}L_2\text{-}V_H\text{-}L_3\text{-}V_L$ 또는 $V_H\text{-}L_1\text{-}V_L\text{-}L_2\text{-}V_H\text{-}L_3\text{-}V_L$ 또는 $V_H\text{-}L_1\text{-}V_L\text{-}L_2\text{-}VL\text{-}L_3\text{-}V_H$. 삼가 이상의 다가 단쇄 항체은 추가 펩타이드 링커에 의해 이가 단쇄 항체에 결합된 하나 이상의 항체 단편을 가진다. 삼가 단쇄 항체 중 하나의 예로는 다음과 같다: $V_L\text{-}L_1\text{-}V_H\text{-}L_2\text{-}V_L\text{-}L_I\text{-}V_H\text{-}L_2\text{-}V_L\text{-}L_I\text{-}V_H$.

[0077] 두 개의 단쇄 항체가 조합되어, 다이아바디를 형성할 수 있으며 이는 이가 이량체로도 또한 공지되어 있다. 예컨대, 유럽 특허 출원 제 0 404 097호 또는 Hollinger 외, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444를 참고한다. 다이아바디는 두 개의 사슬을 가진다. 다이아바디의 각 사슬은 약 5-10개 아미노산 잔기의 짧은 링커, 예컨대, (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser), $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_2$에 의해 V_L 도메인에 연결된 V_H 도메인을 포함한다. 이러한 링커는 동일한 사슬상의 도메인 간에 사슬간 짝형성을 방지하기에 충분히 짧으므로, 상이한 사슬 상의 상보적 도메인 간 사슬내 짝형성을 추진시켜 두 개의 항원-결합 부위를 재생성한다. 이러한 다이아바디 구조는 치밀하며, 분자의 반대쪽 단부에 항원-결합 부위를 가진다.

[0078] V_H 및 V_L 프레임워크 서열 변이체과 친화성 성숙된 항체는 잠재적인 면역원성을 평가하기 위하여 임상전 생체 외 분석될 수 있다. 이러한 하나의 분석은 EPISCREEN™이며, 이는 단백질 치료제에 대한 T 세포 반응을 정량함으로써 T 세포 면역원성을 예측하는 효과적인 기술을 제공한다. 이 분석은 세계 모집단에서 발현되는 HLA-DR 알로타입의 수 및 빈도를 가장 잘 나타내는 MHC 클래스 II 하플로타입에 기초하여 신중하게 선택된 혈액 공여자의 코호트를 사용한다. 이러한 분석은 전체 단백질의 면역원성을 T 세포 반응의 크기 및 빈도 두 가지에 관해 평가할 수 있는 방법을 제공한다 (Jones 외, J Interferon Cytokine Res. 2004 24(9):560-72; Jones 외, J Thromb Haemost. 2005 3(5):991-1000).

[0079] 본 명세서에 개시된 항체의 FcRn에 대한 결합과 경쟁하는 또는 결합을 교차-차단하는 항체, 또는 그 자체가 본 명세서에 개시된 항체에 의한 FcRn 결합으로부터 교차-차단되는 항체이 본 명세서에 개시된 FcRn 활성 차단 방법에서 사용될 수 있다. 일부 경우에서, 이러한 경쟁적, 교차-차단적, 또는 교차-차단되는 항체는 본 명세서에 기재된 항체에 의해 결합되는 에피토프와 경계를 이루는 및/또는 중복되는 FcRn의 에피토프에 결합한다. 일부 경우에서, 이러한 경쟁적, 교차-차단적, 또는 교차-차단되는 항체는 본 명세서에 기재된 항체에 의해 결합된 에피토프와 동일한 FcRn의 에피토프에 결합하는, 키메라의, 완전히 인간, 또는 인간화된 항체이다.

[0080] 경쟁적, 교차-차단적 및 교차-차단되는 항체는, 경쟁 ELISA 또는 BIACORE® 분석을 포함한 해당 분야에 공지된 임의의 적합한 방법을 사용하여 식별될 수 있으며, 이러한 방법에서 인간 FcRn에 대한 경쟁적 또는 교차 차단적 항체의 결합은 본 명세서에 개시된 항체의 결합을 저해하거나, 또는 그 반대이다.

[0081] 특정 구체예에서, 경쟁적 또는 교차-차단적 항체는, 인간 FcRn에 대한 알부민의 결합을 차단하며, 서열 번호:26, 서열 번호:28, 서열 번호:30, 서열 번호:32, 서열 번호:34, 서열 번호:36, 서열 번호:38, 및 서열 번호:40으로 구성된 군으로부터 선택되는 중쇄 서열, 및 서열 번호:18, 서열 번호:20, 서열 번호:22, 및 서열 번호:24으로 구성된 군으로부터 선택되는 경쇄 서열을 가지는 항체의 결합과 경쟁하거나 이러한 항체의 결합을 교차-차단하는 항체이다. 일부 구체예에서, 경쟁 또는 교차-차단은 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 또는 95% 초과이다.

[0082] 특정 구체예에서, 경쟁적 또는 교차-차단적 항체는 인간 FcRn에 대한 알부민의 결합을 차단하며, 서열 번호:28의 중쇄 서열, 및 서열 번호:22의 경쇄 서열을 가지는 항체의 결합과 경쟁 또는 이러한 항체의 결합을 교차-차단하는 항체이다. 일부 구체예에서, 경쟁 또는 교차-차단은 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 또는 95% 초과이다.

[0083] 특정 구체예에서, 경쟁적 또는 교차-차단적 항체는 인간 FcRn에 대한 알부민의 결합을 차단하며, 서열 번호:32의 중쇄 서열, 및 서열 번호:22의 경쇄 서열을 가지는 항체의 결합과 경쟁 또는 이러한 항체의 결합을 교차-차단하는 항체이다. 일부 구체예에서, 경쟁 또는 교차-차단은 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 또는 95% 초과이다.

[0084] 특정 구체예에서, 경쟁적 또는 교차-차단되는 항체는 인간 FcRn에 대한 알부민의 결합을 차단하며, FcRn에 대한 그 결합이 서열 번호:26, 서열 번호:28, 서열 번호:30, 서열 번호:32, 서열 번호:34, 서열 번호:36, 서열 번호:38, 및 서열 번호:40으로 구성된 군으로부터 선택되는 중쇄 서열, 및 서열 번호:18, 서열 번호:20, 서열 번호:22, 및 서열 번호:24으로 구성된 군으로부터 선택되는 경쇄 서열을 가지는 항체와 경쟁되는 또는 이러한 항체에 의해 교차-차단되는 항체이다.일부 구체예에서, 경쟁적 또는 교차-차단되는 항체는 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 또는 95% 초과까지 경쟁되거나 또는 교차-차단된다.

[0085] 특정 구체예에서, 경쟁적 또는 교차-차단되는 항체는 인간 FcRn에 대한 알부민의 결합을 차단하며 FcRn에 대한 그 결합이 서열 번호:28의 중쇄 서열, 및 서열 번호:22의 경쇄 서열을 가지는 항체와 경쟁되거나 또는 이러한 항체에 의해 교차-차단되는 항체이다.일부 구체예에서, 경쟁적 또는 교차-차단되는 항체는 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 또는 95% 초과까지 경쟁되거나 또는 교차-차단된다.

[0086] 특정 구체예에서, 경쟁적 또는 교차-차단되는 항체는 인간 FcRn에 대한 알부민의 결합을 차단하며 FcRn에 대한 그 결합이 서열 번호:32의 중쇄 서열, 및 서열 번호:22의 경쇄 서열을 가지는 항체와 경쟁되거나 또는 이러한 항체에 의해 교차-차단되는 항체이다.일부 구체예에서, 경쟁적 또는 교차-차단되는 항체는 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 또는 95% 초과까지 경쟁되거나 또는 교차-차단된다.

[0087] 일부 구체예에서, 경쟁적, 교차-차단적, 또는 교차-차단되는 항체는 키메라의, 완전한 인간이거나, 또는 인간화된다. 일부 구체예에서, 경쟁적, 교차-차단적, 또는 교차-차단되는 항체는 10^5 내지 10^{11} 리터/몰., 10^6 내지 10^{11} 리터/몰., 10^7 내지 10^{11} 리터/몰., 10^8 내지 10^{11} 리터/몰., 10^9 내지 10^{11} 리터/몰., 또는 10^{10} 내지 10^{11} 리터/몰.의 친화성으로 인간 FcRn의 알부민-결합 부위에 결합한다.

[0088] 또한, 본 출원은, 항-FcRn 항체 및 이의 기능적 단편을 인코딩하는 핵산, 벡터, 숙주 세포 및 발현 시스템을 제공한다. 항-FcRn 항체 및 이의 기능적 단편을 인코딩하는 핵산은, 예컨대, DNA, cDNA, RNA, 합성적으로 제조된 DNA 또는 RNA, 또는 임의의 이러한 폴리뉴클레오티드을 단독으로 또는 조합하여 포함하는 재조합적으로 제조된 키메라 핵산 분자일 수 있다. 예를 들면, 진핵 및/또는 원핵 숙주 세포에서의 발현에 적합한 발현 제어 서열(expression control sequence)에 작동적으로 연결된 본 명세서에 기재된 항-FcRn 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 내포하는 발현 벡터가 제공된다. 원핵 세포, 예컨대, 세균, 그리고 효모 및 포유동물 세포 배양 시스템을 포함하지만, 이에 제한되는 않는 진핵 시스템에서 항체 및 단편의 효과적인 합성을 위해 다양한 발현 벡터가 개발되어 왔다. 이러한 벡터는 염색체, 비-염색체 및 합성 DNA 서열의 분절을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 이러한 핵산은 서열 번호:1, 서열 번호:3, 서열 번호:5, 서열 번호:6, 서열 번호:9, 서열 번호:11, 서열 번호:13, 서열 번호:15, 서열 번호:17, 서열 번호:19, 서열 번호:21, 서열 번호:23, 서열 번호:41, 또는 서열 번호:42를 포함할 수 있다.

[0089] 임의의 적합한 발현 벡터가 사용될 수 있다. 예를 들면, 원핵 복제 벡터에는 *대장균*으로부터 얻은 플라스미드, 예컨대, *colE1*, *pCR1*, *pBR322*, *pMB9*, *pUC*, *pKSM*, 및 *RP4*를 포함한다. 원핵 벡터는 또한 파지 DNA, 가령, *M13* 및 다른 섬유상 단일-가닥 DNA 파지의 유도체를 포함한다. 효모에서 유용한 벡터의 한 예는 2μ 플라스미드이다. 포유동물 세포에서의 발현에 적합한 벡터는 SV40, 아데노바이러스, 레트로바이러스-유도된 DNA 서열의 널리-공지된 유도체 및 기능적 포유동물 벡터, 예컨대, 상기 기재된 것의 조합으로부터 유도된 셔틀 벡터, 및 기능적 플라스미드, 예컨대, pLenti6.3/V5-DEST®, pT-Rex™-DEST31®, pGene/V5-HispGene/V5-His®(Life Technologies, Norwalk, CT)를 포함한다.

[0090] 추가적인 진핵 발현 벡터는 해당 분야에 공지되어 있다 (예컨대, P.J. Southern 및 P. Berg, J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341 (1982); Subramani 외, Mol. Cell. Biol., 1: 854-864 (1981); Kaufmann 및 Sharp, "Amplification And Expression of Sequences Cotransfected with a Modular Dihydrofolate Reductase Complementary DNA Gene," J. Mol. Biol. 159, 601-621 (1982); Kaufmann 및 Sharp, Mol. Cell. Biol. 159, 601-664 (1982); Scahill 외, "Expression And Characterization Of The Product Of A Human Immune Interferon DNA Gene In Chinese Hamster Ovary Cells," Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 80, 4654-4659 (1983); Urlaub 및 Chasin, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77, 4216-4220, (1980).

[0091] 발현 벡터는 발현될 DNA 서열 또는 단편에 작동적으로 연결된 최소한 하나의 발현 제어 서열을 내포할 수 있다. 제어 서열은 복제된 DNA 서열의 발현을 제어하고 조절하기 위하여 벡터 내부에 삽입된다. 유용한 발현 제어 서열의 예로는 *lac* 시스템, *trp* 시스템, *tac* 시스템, *trc* 시스템, 파지 람다의 주요 작동유전자 및 프로모터 영역, fd 외피 단백질의 제어 영역, 효모의 당분해 프로모터, 예컨대, 3-포스포글리세레이트 키나아제에 대한 프로모터, 효모 산 포스파타제의 프로모터, 예컨대, Pho5, 효모 알파-접합 인자의 프로모터, 및 거대세포바이러스, 폴리오마, 아데노바이러스, 레트로바이러스, 및 원숭이 바이러스로부터 유도된 프로모터, 예컨대, 초기 및 후기 프로모터 또는 SV40, 및 원핵 또는 진핵 세포 및 이의 바이러스의 유전자의 발현을 제어하는 것으로 공지된 다른 서열 또는 이의 조합이다. 사용될 수 있는 다른 발현 제어 서열은 중국 햄스터 연장 인자-1α (CHEF1) 유전자로부터의 DNA 조절 서열을 포함한다 (Running Deer & Allison, 2004, Biotechnol. Prog. 20:880-889; 미국 특허 제 5,888,809).

[0092] 또한 전술한 발현 벡터를 내포하는 재조합 숙주 세포가 제공된다. 본 명세서에 제시된 항체 또는 이의 항원-결합부는 하이브리도마 이외의 다른 세포주에서 발현될 수 있다. 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드를 인코딩하는 서열을 포함하는 핵산은 적합한 포유동물 숙주 세포의 형질전환을 위해 사용될 수 있다.

[0093] 특히 바람직한 세포주는 높은 발현 수준, 관심 단백질의 항시적 발현(constitutive expression) 및 숙주 단백질로부터의 최소 오염에 기초하여 선택된다. 발현을 위한 숙주로서 이용가능한 포유동물 세포주은 해당 분야에 널리 공지되어 있으며, 많은 불멸화 세포주, 예컨대, NSO 세포, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, 새끼 햄스터 신장 (BHK) 세포 및 많은 다른 세포를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구체예에서, 세포는 골수종 세포, 예컨대, SP2/0이며, 이는 높은 IgG 농도가 복수 유액으로부터 회복될 수 있는 마우스의 복막강에서의 배지에서 형질주입되어 성장될 수 있다. 적합한 추가 진핵 세포로는 효모 및 다른 진균을 포함한다. 유용한 원핵 숙주는, 예를 들면, *대장균*, 예컨대, *대장균* SG-936, *대장균* HB 101, *대장균* W3110, *대장균* X1776, *대장균* X2282, *대장균* DHI, 및 *대장균* MRC1, *슈도모나스(Pseudomonas)*, *바실러스(Bacillus)*, 예컨대, *바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis)*, 및 *스트렙토마이세스(Streptomyces)*를 포함한다.

[0094] 이러한 존재하는 재조합 숙주 세포는 항체 또는 이의 단편의 발현을 허용하고 숙주 세포 또는 숙주 세포를 둘러

싼 배지로부터 항체 또는 이의 단편을 정제하는 조건하에서 세포를 배양함으로써, 항체 또는 이의 항원-결합 부위를 제조하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 하나의 구체예에서, FcRn의 알부민-결합 영역에 결합할 수 있는 항체의 제조 방법이 제공되며, 상기 방법은 다음 단계를 포함한다: (a) 상기 기재된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 숙주 세포 또는 숙주 세포의 배양 배지로부터 상기 항체를 단리하는 단계.

[0095] 형질전환된 숙주는 발효조에서 성장되고 해당 분야에 공지된 기술에 따라 배양될 수 있다. 원하는 항체 발현 수준이 도달되면, 항체는 황산 암모늄 침전법, 친화성 컬럼 상에서의 정제, 컬럼 크로마토그래피, 겔 전기영동법을 포함한 해당 분야의 표준 과정에 따라 정제될 수 있다. 본 명세서에 기재된 치료 방법에서 사용하기 위하여, 항체가 최소한 90%, 95%, 98%, 또는 99% 순도로 정제되는 것이 바람직하다.

[0096] 재조합 숙주 세포에서의 분비를 위한 상기 발현된 항체 또는 단편의 표적화는 관심 항체-인코딩 유전자의 5'-단부에 신호 또는 분비 리더(leader) 펩타이드-인코딩 서열을 삽입함으로써 용이해질 수 있다 (Shokri 외, Appl Microbiol Biotechnol. 60(6):654-64 (2003), Nielsen 외, Prot. Eng. 10:1-6 (1997) 및 von Heinje 외, Nucl. Acids Res. 14:4683-4690 (1986) 참고). 이러한 분비 리더 펩타이드 성분은 원핵 또는 진핵 서열로부터 유도될 수 있다. 따라서 적합하게는, 폴리펩타이드의 N-말단 단부에 결합된 아미노산인 분비 리더 펩타이드가 사용되어, 폴리펩타이드를 숙주 세포 세포액 밖으로 이동 및 매질 내부로 분비하도록 지시한다.

[0097] 항체 또는 이의 항원-결합부는 추가 아미노산 잔기에 융합될 수 있다. 이러한 아미노산 잔기는, 아마도 단리를 용이하게 하는, 펩타이드 태그일 수 있다. 특정 장기 또는 조직에 항체를 귀소시키기 위한 다른 아미노산 잔기 또한 고려된다.

[0098] 일부 구체예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 몇 가지 원하는 성질 (예컨대, 증가된 혈청 반감기)을 항체 또는 이의 항원-결합 부위에 제공하는 하나 이상의 효과기 분자에 접합될 수 있다. 특정 구체예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 폴리에틸렌글리콜 (PEG)에 접합된다. PEG는 임의의 아미노산 측쇄 또는 말단 아미노산 작용기, 예컨대, 유리 아미노, 이미노, 티올, 하이드록실, 또는 카복실 그룹에 부착될 수 있다. 항체에 대한 PEG 부착 방법은 해당 분야에 공지되어 있으며 사용될 수 있다. 예컨대, 유럽 특허 출원 EP 0948544; 유럽 특허 출원 EP1090037; “Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications,” 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York; “Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications,” 1997, J. Milton Harris & S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC; “Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences,” 1998, M. Aslam & A. Dent, Grove Publishers, New York; 또는 Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545를 참고한다.

[0099] 또 다른 구체예에서, 본 명세서에 제시된 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 형질전환 동물에서 상기 항체를 인코딩하는 핵산을 발현시킴으로써 제조되어, 이러한 항체가 발현되어 회수될 수 있다. 예를 들면, 항체는 회수 및 정제를 용이하게 하는 조직 특이적 방식으로 발현될 수 있다. 이러한 한 구체예에서, 항체는 수유 중 분비시키기 위해 유선에서 발현된다. 형질전환 동물로는 마우스, 염소 및 토끼를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0100] 본 출원은, 산성 pH 및 생리학적 pH 모두에서 FcRn에 결합하며, FcRn에 대한 알부민 결합과 경쟁하는 에피토프에 결합하는 항체 식별 방법을 제공한다. 이러한 방법은 산성 pH (예컨대, pH 5.0-6.6, pH 5.8-6.4, pH 6.0-6.2, 또는 pH 6.0)에서 수행되는 둘 이상의 선별 단계를 포함한다. 이러한 둘 이상의 산성 선별 단계은 생리학적 pH (예컨대, pH 6.8-8.2, pH 6.8-7.6, pH 7,2-7.4, 또는 pH 7.4)에서 수행되는 선별 단계과 교번된다.

[0101] 예를 들면, 이러한 방법의 한 구체예는 다음 단계를 포함한다:

[0102] (a) 후보 항체 집합을 FcRn 또는 이의 일부와 pH 5.8-6.4에서 접촉시켜 FcRn 또는 이의 일부에 결합하는 항체를 단리시키는 단계;

[0103] (b) 단계 (a)의 단리된 항체를 FcRn 또는 이의 일부와 pH 6.8-7.6에서 접촉시켜 FcRn 또는 이의 일부에 결합하는 항체를 단리시키는 단계;

[0104] (c) 단계 (b)의 단리된 항체를 FcRn 또는 이의 일부와 pH 5.8-6.4에서 접촉시켜 FcRn 또는 이의 일부에 결합하는 항체를 단리시키는 단계.

[0105] (d) FcRn에 대한 알부민 결합을 차단하는 능력에 대해 단계 (c)의 단리된 항체를 분석하는 단계.

[0106] 또 다른 구체예는 다음 단계를 포함한다:

[0107] (a) 후보 FcRn-결합 항체의 집합을 제공하는 단계:

[0108] (b) pH 6.0에서 FcRn 또는 이의 일부와 후보 FcRn-결합 항체의 최소한 일부 간에 복합체가 형성되도록 하는 조건하에서 후보 FcRn-결합 항체의 집합을 FcRn 또는 이의 일부와 접촉시키는 단계;

[0109] (c) 복합체를 단리시키는 단계;

[0110] (d) 단리된 복합체로부터 후보 FcRn-결합 항체를 분리하는 단계;

[0111] (e) pH 7.4에서 FcRn 또는 이의 일부와 단계 (d)로부터 분리된 후보 FcRn-결합 항체의 최소한 일부 간에 복합체가 형성되도록 하는 조건하에서 상기 분리된 후보 FcRn-결합 항체를 FcRn 또는 이의 일부와 접촉시키는 단계;

[0112] (f) 단계 (e)에서 형성된 복합체를 단리시키는 단계;

[0113] (g) 단계 (f)의 단리된 복합체로부터 후보 FcRn-결합 항체를 분리하는 단계;

[0114] (h) pH 6.0에서 FcRn 또는 이의 일부와 단계 (g)로부터 분리된 후보 FcRn-결합 항체의 최소한 일부 간에 복합체가 형성되도록 하는 조건하에서 상기 분리된 후보 FcRn-결합 항체를 FcRn 또는 이의 일부와 접촉시키는 단계;

[0115] (i) 단계 (h)에서 형성된 복합체를 단리시키는 단계;

[0116] (j) 단계 (i)의 단리된 복합체로부터 후보 FcRn-결합 항체를 분리하여, 산성 pH 및 생리학적 pH 모두에서 FcRn에 결합하는 항체를 얻는 단계.

[0117] (k) FcRn에 대한 알부민 결합을 차단하는 능력에 대해 후보 FcRn-결합 항체를 분석하는 단계.

[0118] 일부 구체예에서, 후보 FcRn-결합 항체의 집합은 항체 또는 이의 일부의 라이브러리 (예컨대, 파지 상에 나타나는 scFv의 라이브러리)일 수 있다.

[0119] 일부 구체예에서, FcRn 또는 이의 일부의 농도는 각 접촉 단계에서 감소된다. 예를 들면, 단계 (b)는 25 nM의 농도에서 수행될 수 있고, 단계 (e)는 2.5 nM의 농도에서 수행될 수 있으며, 단계 (h)는 0.25 nM의 농도에서 수행될 수 있다.

[0120] 일부 구체예에서, FcRn 또는 이의 일부는 고체 지지물, 예컨대, 자기 비드(magnetic bead)에 부착될 수 있다. 이러한 구체예에서, 단리 단계는, 예컨대, 고체 지지물이 크로마토그래피 컬럼인 경우 고체 지지물에 부착된 FcRn 또는 이의 일부에 대한 항체의 결합을 단순화시킬 수 있다. 일부 구체예에서, FcRn 또는 이의 일부는 FcRn 또는 이의 일부와 항체 간의 복합체 단리를 용이하게 하는 모이어티에 부착될 수 있다. 예를 들면, FcRn 또는 이의 일부는 비오틴에 부착될 수 있다.

[0121] 본 명세서에 제시된 항체 또는 이의 항원-결합부의 물리적 및 기능적 성질은 관례적 과정에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, FcRn-알부민 상호 작용을 차단하는 항체의 능력은 여러 방법에 의해 평가될 수 있다. 이러한 방법으로는 항체에 의해 FcRn에 대한 결합으로부터 차단된 알부민의 양을 검사하는 시험관 내 분석법, 알부민과 결합함에 있어 경쟁하는 공지된 FcRn 항체에 대한 경쟁적 분석법, 또는 항체의 투여로 인한 알부민 분비량을 검사하는 생체 내 분석법을 포함할 수 있다.

[0122] FcRn과 알부민 사이 결합의 파괴를 검출하는 임의의 다양한 방법, 예컨대 미국 특허 제8,232,067호에 기재된 방법이 사용될 수 있으며, 그 전체가 본 명세서에 참조 문헌으로 포함된다. 예를 들어, 형광 공명 에너지 전달 (“FRET”) 또는 크로마토그래피 방법이 사용될 수 있다. 일부 경우에, 단백질-단백질 상호 작용은 베타-갈락토시데이스(beta-galactosidase)와 같은 효소 도메인을 재구성함으로써 검출될 수 있다 (Rossi 외, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:8405-8410 (1997)를 참고한다). 일부 구체예에서, FcRn과 알부민 사이의 상호 작용을 파괴하는 항체 또는 항원-결합 단편의 시험 또는 FcRn 결합이 부족한 변이체 알부민 폴리펩타이드에 대한 시험이 동물 모델에서 일어날 수 있다. 예를 들어, FcRn 폴리펩타이드와 알부민 폴리펩타이드 사이의 파괴하는 항체 또는 항원-결합 단편에 의해 측정하는 방법은 항체 또는 항원-결합 단편을 대상체, 예컨대, 실험용 동물 (예컨대, 포유 동물)에 투여하는 단계, 항체 또는 항원-결합 단편을 사용하여 FcRn 폴리펩타이드 및 알부민 폴리펩타이드를 발현시키는 단계 및 피험체의 체액에서 알부민 폴리펩타이드의 수준을 측정하는 단계를 포함하며, 이러한 항체 또는 항원-결합 단편의 존재하에 피험체의 체액 내 알부민 폴리펩타이드의 농도 차이는, 항체 또는 항원-결합 단편의 부재하에 동물의 체액 내 존재하는 알부민 폴리펩타이드 농도와 비교하여, 시험 화합물이 FcRn 폴리펩타이드과 알부민 폴리펩타이드 사이의 상호 작용을 파괴시키는 것을 나타낸다. 일부 구체예에서, 본 명세서에 개시된 하나 이상의 방법에 따라 사용되는 동물은 형질전환 동물일 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 하나

이상의 방법에 따라 사용되는 동물은 FcRn, 알부민, 또는 둘 모두를 발현시키도록 형질전환될 수 있다. 일부 구체예에서, 동물은 인간 FcRn, 알부민, 또는 둘 모두를 발현시키도록 형질전환될 수 있다.

[0123] 본 명세서에 개시된 항체가 결합하는, 인간 FcRn의 특이적 영역 또는 에피토프는 해당 분야에 공지된 임의의 적합한 에피토프 맵핑법(mapping method)에 의해 식별될 수 있다. 이러한 방법은 FcRn 중 어느 아미노산에 항체가 결합하는지 결정하기 위해 FcRn과 상이한 길이의 펩타이드를 항체의 결합에 관해 선별하는 단계를 포함한다. 펩타이드는 널리-공지된 방법, 가령, FcRn의 단백분해성 소화 또는 화학적 합성법에 의해 제조될 수 있다. 항체에 결합하는 펩타이드를 식별하기 위한 기법, 예컨대, 질량 분광분석법이 사용될 수 있다. 택일적으로, NMR 분광법 또는 X-선 결정분석법이 사용될 수 있다. 결합 펩타이드가 식별되면, 이는 FcRn의 동일한 에피토프에 결합하는 추가 항체를 얻기 위한 면역원으로서 사용될 수 있다.

[0124] 예방 또는 치료의 목적으로 포유동물에서 사용되는 경우, 본 명세서에 제시된 항-FcRn 항체 또는 이의 항원-결합부는 제약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 조성물의 형태로 투여될 것으로 이해된다. 적합한 제약학적으로 허용가능한 담체는, 예를 들면, 물, 식염수, 인산염 완충 식염수, 덱스트로스, 히스티딘, 글루타메이트, 시트레이트, 만니톨, 트레할로스, 수크로스, 아르기닌, 아세테이트, 폴리소르베이트 80, 폴록사머 188, 등, 뿐만 아니라 이의 조합 중 하나 이상을 포함한다. 제약학적으로 허용가능한 담체는 항체의 보관 기간 또는 유효도를 향상시키는, 미량의 보조 물질, 예컨대, 습윤제 또는 유화제, 보존제 또는 완충제를 추가로 포함할 수 있다.

[0125] 일부 구체예에서, 항체 및 제약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물은 동결건조된다.

[0126] 항체 및 제약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물은 다양한 농도의 본 명세서에 제시된 항-FcRn 항체 또는 이의 항원-결합부를 포함할 수 있다. 예를 들면, 이러한 조성물은 10 mg/ml 내지 200 mg/ml, 25 mg/ml 내지 130 mg/ml, 50 mg/ml 내지 125 mg/ml, 75 mg/ml 내지 110 mg/ml, 또는 80 mg/ml 내지 100 mg/ml의 항체를 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 또한 약 10 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 110 mg/ml, 120 mg/ml, 130 mg/ml, 140 mg/ml, 또는 150 mg/ml의 항체를 포함할 수 있다.

[0127] “알부민-결합 독소”는 알부민에 결합하는 화합물, 약물, 또는 분자를 지칭한다. 일부 상황에서는 대상체 내에서 알부민-결합 독소의 농도를 감소시키는 것이 바람직할 수 있지만, 이러한 용어는 “독소”로서 표지되거나 또는 일반적으로 이해되는 화합물, 약물, 또는 분자에 제한되지 않는다. 이러한 용어는 또한 외인성 또는 내인성 독소 둘 모두를 포함할 수 있다. 알부민-결합 독소로는, 예를 들어, 구리, 헤마틴, 장쇄 지방산, 아연, 빌리루빈, 티록신, 에이코사노이드, 트립토판, 비타민 D3, 담즙산, 칼슘, 마그네슘, 클로라이드, 인도메타신, 브로모페놀 블루, 살리실레이트, 와파린, 페닐뷰타존, 다이곡신, 퓨로세마이드, 페니토인, 클로르프로파마이드, 벤질페니실린, 에반스 블루, 다이아제팜, 이부프로펜, 나프록센, 클로피브레이트, 클로르프로마진, 이미프라민, 퀴니딘, 리신, 아미오다론, 및 아세트아미노펜을 포함할 수 있다.

[0128] 하나의 구체예에서, 대상체에서 알부민-결합 독소의 수준을 감소시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 알부민-결합 독소의 수준을 감소시키기에 유효한 양의, 본 명세서에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편-결합을 피험체에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 알부민-결합 독소는 외인성 또는 내인성일 수 있다. 하나의 구체예에서, 알부민-결합 독소는 구리, 헤마틴, 장쇄 지방산, 아연, 빌리루빈, 티록신, 에이코사노이드, 트립토판, 비타민 D3, 담즙산, 칼슘, 마그네슘, 클로라이드, 인도메타신, 브로모페놀 블루, 살리실레이트, 와파린, 페닐뷰타존, 다이곡신, 퓨로세마이드, 페니토인, 클로르프로파마이드, 벤질페니실린, 에반스 블루, 다이아제팜, 이부프로펜, 나프록센, 클로피브레이트, 클로르프로마진, 이미프라민, 퀴니딘, 리신, 아미오다론, 또는 아세트아미노펜이다. 일부 구체예에서, 알부민-결합 독소는 아세트아미노펜일 수 있다. 알부민-결합 독소가 아세트아미노펜일 수 있는 다른 구체예에서, 이러한 방법은 N-아세틸렌 시스테인의 동시, 별도, 또는 순차적 투여를 추가로 포함할 수 있다.

[0129] 또 다른 구체예에서, 대상체에서 독소에 대한 노출의 심각성을 예방, 치료, 억제 또는 감소시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 유효량의 본 명세서에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편을 피험체에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 알부민-결합 독소는 외인성 또는 내인성일 수 있다. 하나의 구체예에서, 이러한 독소는 구리, 헤마틴, 장쇄 지방산, 아연, 빌리루빈, 티록신, 에이코사노이드, 트립토판, 비타민 D3, 담즙산, 칼슘, 마그네슘, 클로라이드, 인도메타신, 브로모페놀 블루, 살리실레이트, 와파린, 페닐뷰타존, 다이곡신, 퓨로세마이드, 페니토인, 클로르프로파마이드, 벤질페니실린, 에반스 블루, 다이아제팜, 이부프로펜, 나프록센, 클로피브레이트, 클로르프로마진, 이미프라민, 퀴니딘, 리신, 아미오다론, 또는 아세트아미노펜이다. 일부 구체예에서,

알부민-결합 독소는 아세트아미노펜일 수 있다. 알부민-결합 독소가 아세트아미노펜일 수 있는 다른 구체예에서, 이러한 방법은 N-아세틸렌 시스테인의 동시, 별도, 또는 순차적 투여를 추가로 포함할 수 있다.

[0130] 본 명세서에 기재된 방법은 대상체에서 알부민-결합 독소 (예컨대, 이러한 독소의 독성 수준)과 관련된 장애의 치료를 위한 방법을 포함하며, 예컨대, 과다 중독으로부터 (예컨대, 인간 또는 동물에게 안전한 것으로 고려되는 수준 이상의 독소의 양에 우발적 또는 의도적 노출 또는 섭취로부터), 또는 내인적으로 높은 수준의 알부민-결합 독소로부터 (예컨대, 인간 또는 동물 건강에 일반적이며 안전한 것으로 고려되는 수준보다 높은 독소의 수준을 생성하는 피험체로부터) 치료하는 방법을 포함한다.

[0131] 본 출원은, 알부민 독성과 관련된 의학적 상태를 예방 또는 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 유효량의 본 명세서에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편을 피험체에 투여하는 단계를 포함한다. 본 명세서에서 사용 시, "알부민 독성"은 알부민이 유해하거나 또는 해로운 것으로 고려되고, 예컨대, 사망, 장기 손상, 또는 신경학적 손상을 유발할 수 있는 상태를 지칭한다. 일부 구체예에서, 의학적 상태는 죽상경화성 관상 및 말초 혈관 질병이다. 일부 구체예에서, 의학적 상태는 당뇨병성 혈관병 합병증이다. 일부 구체예에서, 의학적 상태는 알츠하이머병이다. 일부 구체예에서, 의학적 상태는 외상성 뇌손상이다. 일부 구체예에서, 의학적 상태는 당뇨병이다. 일부 구체예에서, 의학적 상태는 말기 신부전이다.

[0132] 본 명세서에 기재된 방법에서, 본 명세서에 제시된 치료적 유효량의 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 다른 제제, 약물 또는 호르몬과 조합하여 (예컨대, 동시에, 순차적으로, 또는 별도로) 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 다른 제제, 약물, 또는 호르몬이 각각의 의학적 상태에 대해 공지된 치료법일 수 있다. 일부 구체예에서, 공지된 치료법은 치료 기준일 수 있다. 예를 들어, 대상체에서 알부민-결합 독소의 수준을 감소시키는 방법, 또는 대상체에서 독소에 대한 노출의 심각성을 예방, 치료, 억제, 또는 감소시키는 방법 중 일부 구체예에서, 알부민-결합 독소가 아세트아미노펜인 경우, 이러한 방법은 N-아세틸렌 시스테인의 동시, 별도, 또는 순차적 투여를 추가로 포함할 수 있다.

[0133] 일부 구체예에서, 알부민 저하제(albumin-lowering agent)를 이용한 FcRn의 차단은 내인성 알부민 수준을 감소시켜 알부민계 치료제의 약물동역학 및 약물역학을 향상시킬 수 있을 것이다. 상기 경우에서, 이러한 치료제의 투여 전 알부민 결합 부위에 특이적인 항-FcRn 항체를 이용한 사전-치료는 내인성 알부민으로부터 유래하는 경쟁을 저하시켜, 투여되는 알부민계 치료제 보호를 증가시킬 수 있을 것이다. 다른 구체예에서, 알부민 결합 부위에 특이적인 항-FcRn 항체를 사용하는 치료는 투여 이후 혈청으로부터 알부민계 치료제를 제거하도록 사용될 수 있다. 이것은 알부민계 치료제 치료가 더 이상 바람직하지 않거나, 또는 치료적 과용의 부작용을 감소시키기는데 유용할 수 있다.

[0134] 알부민은 반감기 연장을 위한 후보로서 연구되었으며 FcRn과 이의 상호 작용으로 인한 약물의 세포 내 전달을 목표로 하였다. 본 명세서에서 사용 시, 용어 "알부민계 치료제"는 알부민과 결합된 치료제를 지칭한다. 알부민계 치료제는, 예컨대, 공유 접합, 유전 융합, 또는 비공유 결합을 통해 알부민과 결합될 수 있다 (Larsen *외*, Molecular and Cellular Therapies (2016) 4:3를 참고하며, 상기 문헌은 그 전체가 본 명세서에 참고 문헌으로 포함된다). 알부민과의 결합은 투여 이전에 일어날 수 있으며, 즉, 알부민계 치료제는 외인성 알부민 분자 또는 분자와 결합된다. 예를 들어, II형 당뇨병의 치료를 위해 GlaxoSmithKline에 의해 제조되어 Eperzan/Tanzeum로서 시판되는 알비글루타이드(albiglutide)는 두 개의 인간 GLP-1 반복이 재조합 인간 알부민에 융합하여 개발된 GLP-1 수용체 작용제이다. 알부민과의 결합은 치료제의 투여 이후에 일어날 수 있으며, 즉, 알부민계 치료제는 내인성 알부민 분자 또는 분자와 결합된다. 예를 들어, I형 당뇨병의 치료를 위해 Novo Nordisk에 의해 제조되어 Levemir로서 시판되는 인슐린 디터머(insulin detemir)는, 미리스트산 개질 인슐린 유사체이다. 주사 시, 지방산 모이어티는 알부민에 결합하고 시간에 걸쳐 해리되어, 생체이용률 및 분포를 향상시킨다. 알부민계 치료제의 다른 예로는 리라글루타이드(liraglutide), 오조랄리주맙(ozoralizumab), MTX-HSA, 알독소루비신(aldoxorubicin), CJC-1134, 알부페론(Albuferon), 아브락산(Abraxane), ABI-008, ABI-009, ABI-010, ^{99m}Tc-Albures, ^{99m}Tc-Nanocoll, 및 Larsen 외에 기재된 치료제를 포함한다.

[0135] 본 명세서에 기재된 방법에서, 본 명세서에 제시된 치료적 유효량의 항체 또는 이의 항원-결합부가 이를 필요로 하는 포유동물에 투여된다. 본 명세서에서 사용 시, 용어 "투여"는 본 명세서에 제시된 항체 또는 이의 항원-결합부을 구하고자 하는 결과를 구현할 수 있는 임의의 방법에 의해 포유동물에 전달하는 것을 의미한다. 예를 들면, 피하로, 정맥내로 또는 근육내로 투여될 수 있다. 본 명세서에 제시된 항체 또는 이의 항원-결합부는 인간에 대한 투여에 특히 유용하지만, 이는 다른 포유동물에도 투여될 수 있다. 본 명세서에서 사용 시, 용어 "포유동물"은 인간, 실험 동물, 애완 동물 및 가축을 포함하고자 하지만, 이에 제한되지 않는다. "치료적 유효

량"은 포유동물에 투여시, 원하는 치료 효과를 생성함에 효과적인, 본 명세서에 제시된 항체 또는 이의 항원-결합부의 양을 의미한다. 예를 들면, 질병에 따라, 항체에 관해, 이러한 양은 0.1, 1.0, 3.0, 6.0, 또는 10.0 mg/Kg을 필요로 할 수 있다. 150,000 g/몰의 분자 질량을 가지는 IgG에 대하여 (두 개 결합 부위), 이 용량은 5 L 혈액 부피에 대해 대략 18 nM, 180 nM, 540 nM, 1.08 μM, 및 1.8 μM의 결합 부위에 상응한다.

[0136] 특정 구체예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 특정 시기에 걸쳐 포유동물의 정맥 내로 정맥내 주입, 즉, 항체 또는 이의 항원-결합 부위를 도입함에 의해 포유동물에 투여된다. 특정 구체예에서, 상기 시기는 약 5 분, 약 10 분, 약 30 분, 약 1 시간, 약 2 시간, 약 4 시간, 또는 약 8 시간이다.

[0137] 특정 구체예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 피하 전달, 즉, 일반적으로 피부를 집어서 기저 조직으로부터 피부를 들어올리고 이렇게 형성된 피부 아래 공간 내부로 항체 또는 이의 항원-결합 부위를 주사함으로써 포유동물의 피부 아래에 전달함에 의해 포유동물에 투여된다.

[0138] 특정 구체예에서, 화합물 또는 조성물의 용량은 매일, 격일로, 이틀에 한 번, 3일에 한 번, 주 1회, 주 2회, 주 3회, 또는 2주마다 1회 피험체에 투여된다. 다른 구체예에서, 2, 3 또는 4회 용량의 화합물 또는 조성물이 매일, 이틀에 한 번, 3일에 한 번, 주 1회 또는 2주마다 1회 피험체에 투여된다. 일부 구체예에서, 화합물 또는 조성물의 용량(들)은 2일, 3일, 5일, 7일, 14일, 또는 21일 동안 투여된다. 특정 구체예에서, 화합물 또는 조성물의 용량은 1 개월, 1.5 개월, 2 개월, 2.5 개월, 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월 또는 그 이상 동안 투여된다. 일부 구체예에서, 화합물 또는 조성물은 독소에 노출되기 전, 노출과 동시에, 또는 노출된 후에 투여될 수 있다.

[0139] 투여 방법은 비경구, 진피내, 유리체강내, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 비강내, 경막외, 경구, 설하, 비강내, 뇌내, 질내, 경피, 경점막, 직장으로, 흡입에 의한, 또는 특히 귀, 코, 눈 또는 피부로의 국소 투여를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 투여 방식은 의사 재량에 맡긴다. 대부분의 경우에서, 투여는 혈류로 화합물을 방출시키게 될 것이다.

[0140] 특정 구체예에서, 화합물을 국부적으로 투여하는 것이 필요할 수 있다. 이것은, 예를 들면, 국부 주입에 의해, 국소 적용으로, 주사에 의해, 카테터를 이용하여, 또는 이식물을 이용하여 이루어질 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 상기 이식물은 막, 예컨대, 실라스틱 막, 또는 섬유를 포함하는, 다공성, 비-다공성 또는 젤라틴형 재료이다. 이러한 예에서, 투여는 혈류로 화합물을 실질적으로 방출하지 않고 국부 조직을 선택적으로 표적할 수 있다.

[0141] 허파 투여 또한 사용될 수 있는데, 예컨대, 흡입기 또는 네뷸라이저, 및 에어로졸화제를 보유한 제형을 사용함에 의하거나 플루오로카본 또는 합성 허파 표면활성제에서의 관류를 통해 이루어진다. 특정 구체예에서, 화합물은 전형적인 결합제 및 운반체, 가령, 트라이글리세라이드와 함께 좌제로서 제형화된다.

[0142] 또 다른 구체예에서, 화합물은 소포, 특히, 리포솜에서 전달된다 (Langer, 1990, Science 249:1527 - 1533; Treat 외, in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Bacterial infection, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353 - 365 (1989); Lopez Berestein, ibid., pp. 317 - 327를 참고하며; 일반적으로 같은 내용을 참고한다).

[0143] 또 다른 구체예에서, 화합물은 제어된 방출 시스템에서 전달된다 (예컨대, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115 - 138 (1984) 참고). 제어된-방출 시스템의 예시가 Langer, 1990, Science 249:1527-1533에 의한 검토에서 논의되어 있으며, 사용될 수 있다. 하나의 구체예에서, 펌프가 사용될 수 있다 (Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald 외, 1980, Surgery 88:507; Saudek 외, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574 참고). 또 다른 구체예에서, 중합체 재료가 사용될 수 있다 (Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 참고; 또한 Levy 외, 1985, Science 228:190; During 외, 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard 외, 1989, J. Neurosurg. 71:105 참고).

[0144] 독성 및 치료 효능은, 예를 들어, LD50 (모집단의 50%에 대한 치사 용량) 및 ED50 (모집단의 50%에서 치료적으로 유효한 용량)을 결정하기 위해, 세포 배양 또는 실험 동물에서 표준 제약학적 절차에 의해 측정될 수 있다. 투여 비율은, LD50/ED50 사이의 비율로서 표현되며, 치료 지수로서 공지되어 있다. 높은 치료 지수를 나타내는 항체 또는 항원-결합 단편이 바람직하다.

[0145] 인간에게 사용하기 위한 투여 범위의 제형은 세포 배양 분석 및/또는 동물 연구로부터의 데이터로부터 획득될 수 있으며, 바람직하게 독성이 거의 없거나, 독성이 없는 ED50를 포함하는 순환 농도의 범위 내에 있다. 투여량은 사용된 투약 형태 및 투여 경로에 따라 이러한 범위 내에서 달라질 수 있다. 당업자는 특정 인자에 의해 환자를 효과적으로 치료하는데 필요한 투여 분량 및 시기에 영향을 미칠 수 있음을 인식 할 것이며, 이러한 인자로는 치료되는 환자의 유형, 질환 또는 질병의 심각성, 기존 치료, 환자의 전반적 건강 및/또는 연령, 및 기타 질병의 존재를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 게다가, 치료적 유효량의 항체 또는 항원-결합 단편을 이용한 피험체의 치료는, 단일 치료 또는 일련의 치료를 포함할 수 있다.

[0146] 상기 투여 일정은 단지 설명을 위해 제공된 것이며 제한으로 고려되어서는 안된다. 해당 분야의 숙련된 기술자는 모든 용량이 본 발명의 범위에 속함을 용이하게 이해할 것이다.

[0147] 본 명세서에 개시된 본 발명의 원리는 해당 분야의 숙련된 기술자에 의해 변형될 수 있으며 이러한 변형은 본 발명의 범위내에 포함시키고자 함을 이해 및 예상하여야 한다.

[0148] 본 출원 전반에 걸쳐, 다양한 문헌을 참고한다. 이러한 문헌은 본 발명이 속하는 해당 기술 분야의 상태를 보다 완전하게 설명하기 위해 그 내용 모두가 본 출원에 참고로 포함된다. 다음의 실시예는 본 발명을 추가로 설명하지만, 어떤 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0149] 실시예

[0150] **실시예 1**

[0151] **가변 도메인의 인간화**

[0152] FcRn에 결합하여 FcRn과 알부민의 결합을 차단하는 능력에 관해 선택된 마우스 단클론 항체에 기초하여, 인간 투여에 적합한 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 설계하였다. 상기 마우스 항체는 FcRn 및 IgG Fc의 결합을 실질적으로 차단하지 않는다. 현존하는 항체 구조에 기초한 단클론 항체 모델을 사용하여, 인간 항체를 위한 가변 영역 프레임워크를 인간 V 영역의 분절으로부터 설계하였다. 잠재적인 면역원성을 최소화하기 위하여, 몇 가지 변이체를, 인간 T 세포 에피토프를 제거하기 위해 설계된 특정 프레임워크 위치에서 선택된 아미노산을 이용하여 설계하였다.

[0153] 중쇄 및 경쇄 V 영역 유전자는, 연결효소 연쇄 반응 (LCR)을 사용하여 전장 유전자로 조립된 중복 올리고뉴클레오티드로부터, 후속하여 복제에 적합한 제한 부위를 증폭 및 추가하여 작제되었다.

[0154] S241P 돌연변이를 포함하는 인간 IgG4 불변 영역을 보유한 세 개의 중쇄 변이체가 작제되었다. 이러한 변이체를 V_H1, V_H3, 및 V_H4로 지정한다. 이러한 중쇄 변이체의 가변 도메인의 아미노산 서열을 각각 서열 번호:12, 14, 및 16로 나타낸다. 이러한 중쇄 변이체의 가변 도메인의 올리고뉴클레오티드 서열을 각각 서열 번호:11, 13, 및 15로 나타낸다. 도 1은 세 개 변이체의 정렬을 보여준다. 네 개 경쇄 변이체를 작제하여 인간 카파 사슬로서 발현시켰다. 이러한 변이체를 Vκ1, Vκ2, Vκ3, 및 Vκ4로 지정한다. 이러한 경쇄 변이체의 아미노산 서열을 각각 서열 번호:18, 20, 22, 및 24로 나타낸다. 이러한 경쇄 변이체의 가변 도메인의 올리고뉴클레오티드 서열을 각각 서열 번호:17, 19, 21, 및 23로 나타낸다. 도 2는 네 개 변이체의 정렬을 보여준다.

[0155] 항체는, 상류 거대세포바이러스 즉시/초기 프로모터/인핸서, 면역글로불린 신호 서열, 및 면역글로불린 불변 영역을 보유하는 포유동물 발현 벡터로 V 영역 유전자을 복제함으로써 전체 IgG로 발현되었다. 이러한 벡터를 HEK EBNA 세포에 형질주입하고, 발현을 정량화하고, 항체를 단백질 A 컬럼 상에서 정제하였다.

[0156] 상기 세 개의 중쇄 및 네 개의 경쇄 변이체의 12개 중쇄-경쇄 조합 모두는 HEK EBNA 세포로 일시적 형질주입시켜 발현되었다. 항체를 단백질 A 세파로스 컬럼에서 정제하고 정량하였다. 상기 설명한 바와 같이, FcRn은 주로 초기 산성 엔도솜에 상주하며 여기서 FcRn은 낮은 pH에서 세포 내 이입된 알부민을 포획한다. 알부민에 대한 FcRn의 결합을 차단하기 위해, FcRn 항체가 생리학적 pH (예컨대, pH 7.4)의 세포간 환경에 노출된 FcRn에 결합하게 되는 것이 또한 바람직하다. 그러므로, FcRn에 대한 정제된 항체의 결합을 pH 6.0 및 pH 7.4에서의 경쟁 ELISA 분석에서 평가하였다.

[0157] ELISA를 위해, Nunc Immuno MaxiSorp 96 웰의 평평한 바닥의 마이크로타이터 플레이트를 pH 7.4에서 하룻밤동안 알부민-결합 영역과 구별되는 IgG-결합 에피토프에 특이적인 FcRn 항체로 사전-코팅하였다. 다음 날 pH 7.4의 PBS에 희석시킨 1 μg/ml 재조합 인간 FcRn (Sino Biological Inc. 카탈로그 번호 CT009-H08H)을 웰에 추가하고 37 ° C에서 1시간 동안 배양시켰다. 30 μg/ml 내지 0.0018 μg/ml의 연속 4배 희석의 테스트 또는 대조군

IgG4 항체를 일정 농도의 비오틴화된 모체 쥐과 항체와 사전 혼합하고, 플레이트에 추가하고 37° C에서 1시간 동안 배양시켰다. 비오틴화된 mAb의 결합을 스트렙타비딘-HRP 및 TMB 기질을 이용하여 검출하였다. 450 nm에서 흡광도를 판독하고 결합 곡선을 플롯하였다. 12개 조합물의 결합을 pH 7.4 및 pH 6.0 모두에서 테스트하고 표 2에 나타낸 바와 같이 모체 항체와 비교하여 정량하였다.

표 2 - 상대 친화성

변이체	평균 적정량 (μg/ml)	평균 상대 IC_{50} (키메라 모체 IgG_4와 비교)	
		pH 7.4	pH 6
키메라 모체	10.30	1	1
$V_H1/V\kappa1$	27.92	0.51	0.64
$V_H1/V\kappa2$	25.61	0.29	0.45
$V_H1/V\kappa3$	27.93	0.37	0.56
$V_H1/V\kappa4$	28.00	0.45	0.75
$V_H3/V\kappa1$	33.05	1.39	1.09
$V_H3/V\kappa2$	24.27	1.24	0.90
$V_H3/V\kappa3$	24.76	0.50	0.52
$V_H3/V\kappa4$	21.56	0.58	0.61
$V_H4/V\kappa1$	37.18	1.06	1.06
$V_H4/V\kappa2$	38.71	1.06	1.06
$V_H4/V\kappa3$	33.95	1.24	0.86
$V_H4/V\kappa4$	34.95	1.37	0.99

[0158]

[0159] **실시예 2**

[0160] **친화성 성숙**

[0161] 산성 및 생리학적 pH에서 결합 친화성을 향상시키기 위해, 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 CDR3 영역을 변이시켰으며 pH 6.0 및 pH 7.4에서 scFv 형태인 것을 선별하였다. scFv을 준비하기 위하여, V_H 및 $V\kappa$를 인코딩하는 유전자를 15 아미노산 $(G_4S)_3$ 링커와 함께 중복 PCR을 사용하여 조립하였다. scFv 서열을 유전자 3 융합 단백질로서 파지미드 벡터로 복제하였으며, 벡터를 대장균 (TG1)으로 형질전환시켰다. V_H1 및 $V\kappa1$ 변이체를 사용하여 친화성 성숙 과정을 수행하였다. 선별을 위해, V_H1의 중쇄 CDR3의 라이브러리를 인간화된 모체 $V\kappa1$ 경쇄와 조합하고 $V\kappa1$의 경쇄 CDR3의 라이브러리를 인간화된 모체 V_H1 중쇄와 조합하였다.

[0162] 서열 ARGBNSVVSBNCVNCNVCRSC (서열 번호:41)을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 사용하여 아미노산 위치 94-100 (CDR3H의 a.a. 95-100 및 FW3의 a.a. 94)의 중쇄 CDR3H 영역에 아미노산 서열 변이를 도입시켰으며, 각 위치에서 다음과 같이 선택된 아미노산을 제공하였다: a.a. 94: K, R; a.a. 95: A, C, D, E, F, G, H, I, L, P, Q, R, S, V, W, Y; a.a. 96: A, D, E, G,H, K, N, P, Q, R, S, T; a.a. 97: A, C, D, F, G, H, L, P, R, S, T, V, Y; a.a. 98: A, D, G, H, I, L, N, P, R, S, T, V; a.a. 99: A, C, D, G, H, N, P, R, S, T, Y; a.a. 100: A, G, S, T. 서열 AGGNNSNNSNNSNNSRSC (서열 번호:42)을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 사용하여 아미노산 위치 94-99 (CDR3H의 a.a. 95-99 및 FW3의 a.a. 94)의 중쇄 CDR3H 영역에 아미노산 서열 변이를 도입시켰으며, 각 위치에서 다음과 같이 선택된 아미노산을 제공하였다: a.a. 94: R; a.a. 95: A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y; a.a. 96: A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y; a.a. 97: A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y; a.a. 98: A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y; a.a. 99: A, G, S, T.

[0163] 각 CDR에 대해, 대략 3-6x10^6 DNA 서열을 내포하는 약 5-10x10^7 파지의 라이브러리 (즉, 각 DNA 서열에 관해 약 10-20개 복제본이 제공되었다)를 선별하였다. 구체적으로, 파지 라이브러리를 가용성의 비오틴화된 FcRn과 혼합한 후, 스트렙타비딘-코팅된 비드 상에서 FcRn-항체 파지 복합체를 포획하였다. 산성 엔도솜에서 뿐만 아니라 생리학적 pH에서 FcRn에 결합하는 항체를 얻기 위하여, 교번하는 pH에서 라이브러리 선별을 연속하여 수행하였다. 또한, 각 연속적 선별 수행의 엄격성(stringency)을 높이기 위하여, FcRn 항원 농도를 감소시켰다. 최초 선택 라운드는 25 nM FcRn 농도로 pH 6.0에서 수행되었다. 두 번째 라운드는 2.5 nM으로 pH 7.4에서 수행되었다. 세 번째 라운드는 0.25 nM으로 pH 6.0에서 수행되었다. 세 번째 라운드 동안, "해리(Off-Rate)" 선택은 0.25 nM으로 pH 6.0에서 수행되었다. 네 번째 라운드는 0.1 nM으로 pH 7.4에서 수행되었다.

[0164] 이러한 scFv 항체를 세균 주변세포질 추출물로부터 준비하였으며, pH 6.0 및 pH 7.4에서 경쟁 ELISA로 테스트하였다. pH6.0에서 분석된 4100회 이상의 회귀선 중 99개가 pH 7.4에서 추가 분석을 위해 선택되었다. 경쟁 ELISA에서, 고정화된 FcRn에 대한 결합에 관해, FcRn-알부민 상호 작용을 차단하는 것으로 앞서 나타난, scFv 항체 단편을 비오틴화된 모체 쥐과 항체에 대하여 경쟁시켰다. 인간화된 변이체를 테스트하기 위하여 사용된 ELISA에서와 같이, 96 웰의 평평한 바닥의 마이크로타이터 플레이트를 알부민-결합 영역과 구별되는 IgG-결합 에피토프에 특이적인 FcRn 항체 1 μg/ml으로 사전-코팅하였다. 결합을 pH 7.4 및 pH 6.0에서 결정하였다. 도 3은 모체 scFv에 관하여 pH 6.0 및 pH 7.4에서의 경쟁 ELISA의 비교를 나타낸다 (즉, $V_H1/V_κ1$으로 이루어짐).

[0165] V_H1 프레임워크에 친화성 성숙된 중쇄 CDR3을 내포하는 scFv에 대해 결합에 있어서의 실질적 향상이 측정되었다. 그리하여 이러한 중쇄를 향상된 경쇄와 조합하여 테스트하기 위해 보냈다. 개선된 변이체는 Vκ3 프레임 워크에서 친화성 성숙된 경쇄 CDR3을 함유하는 scFv에 대해서는 확인되지 않았다.

[0166] **실시예 3**

[0167] **IgG 항체의 개발**

[0168] 21개의 친화성 성숙된 중쇄 (G03_B2, G15_C10, G15_C3, G15_B7, G02_F4, G24_C11, G19_F8, G47_B10, G47_H11, G47_H6, G48_G10, G48_E3, G49_F11, G50_B10, G50_G5, G50_C10, G54_D11, G52_G9, G51_H6, G49_H9.3, 또는 G49_H9.5)가 선택되었으며, 인간화된 경쇄 (Vκ3)로 발현되었다. 21개의 조합은 HEK 세포의 일시적 형질주입에 의해 S241P 돌연변이를 포함하는 이가 IgG4 항체로 발현되었으며, 그 후 이러한 IgG4 항체를 정제하였다.

[0169] **실시예 4**

[0170] **ELISA로 결정된 IgG4 항체의 항원 결합 특성**

[0171] IgG4 항체를 pH 6.0 및 pH 7.4의 경쟁 ELISA에서 항원 결합에 관해 테스트하였다. Nunc Immuno MaxiSorp 96 웰의 평평한 바닥의 마이크로타이터 플레이트 (Fisher, 카탈로그 번호 DIS-971-030J)를 pH 7.4에서 하룻밤 동안 알부민-결합 영역과 구별되는 IgG-결합 에피토프에 특이적인 FcRn 항체 1 μg/ml로 사전-코팅하였다. 다음 날 pH 7.4의 PBS에 희석시킨 1 μg/ml 재조합 인간 FcRn (Sino Biological Inc. 카탈로그 번호 CT009-H08H)을 웰에 추가하고 37° C에서 1시간 동안 배양시켰다. 플레이트를 3x PBST pH 7.4로 헹군 후, 플레이트를 PBSM pH 7.4로 1 시간동안 37° C에서 차단시켰다. 이 시점부터 계속, 모든 헹굼 및 배양 단계를 선택된 분석 pH (pH 6.0 또는 7.4)에서 수행하였다. 3x PBST로 헹군 후, 25 μg/ml로부터 0.006 μg/ml 최종 농도까지의 연속 4-배수 희석 테스트 항체를 일정 농도의 비오틴화된 모체 쥐과 항체 (0.4 μg/ml, 최종 농도)와 사전 혼합하고, FcRn 코팅된 플레이트에 추가하고 1 시간 동안 37° C에서 배양시켰다. 3x PBST 헹굼 후, 비오틴화된 mAb의 결합을 스트렙타비딘-HRP (Sigma, 카탈로그 번호 S5512) 및 TMB 기질 (Invitrogen, 카탈로그 번호 00-2023)을 이용하여 검출하였다. 반응을 3 M HCl로 중단시키고, Dynex Technologies MRX TC II 플레이트 판독기에서 450 nm에서의 흡광도를 판독하고 결합 곡선을 플롯하였다. 네 개의 항체에 대한 pH 7.4에서의 데이터의 예 (G02_F4V_H1_ Vκ3, G24_C11V_H1_ Vκ3, G19_F8V_H1_ Vκ3, G47_B10V_H1_ Vκ3)가 도 4(a)에 나타나며 pH 6.0에서의 데이터의 예가 도 4(b)에 나타난다. 전체 얻어진 결과가 표 3에 요약되어 있으며, 이러한 결과는 pH 7.4 및 pH 6.0에서 실시된 실험에 대한 평균 상대 IC_{50} 값 및 실험의 수(n)를 보여준다. 상기 조합의 IC_{50} 값을 동일한 플레이트에서 테스트하였던 인간화된 모체 항체에 대해 정규화하였다.

표 3 - 상대 친화성

변이체	평균 상대 IC_{50} (인간화된 모체와 비교)	
	pH 7.4	pH 6
$V_H1/V\kappa1$	1	1
G03_B2/Vκ3	4.3	9.1
G15_C10/Vκ3	0.6	0.7
G15_C3/Vκ3	0.8	0.9
G15_B7/Vκ3	2.0	8.2
G02_F4/Vκ3	0.8	0.6
G24_C11/Vκ3	2.6	1.5
G19_F8/Vκ3	0.9	0.7
G47_B10/Vκ3	0.6	0.6
G47_H11/Vκ3	1.5	1.0
G47_H6/Vκ3	0.7	0.8
G48_G10/Vκ3	2.4	1.0
G48_E3/Vκ3	3.6	2.3
G49_F11/Vκ3	1.5	1.0
G50_B10/Vκ3	1.1	1.0
G50_G5/Vκ3	1.2	0.9
G50_C10/Vκ3	0.7	0.9
G54_D11/Vκ3	0.8	0.6
G52_G9/Vκ3	0.8	0.8
G51_H6/Vκ3	2.9	2.3
G49_H9.3/Vκ3	0.7	0.8
G49_H9.5/Vκ3	1.0	0.8

[0172]

[0173] pH 6.0 또는 pH 7.4에서 인간화된 모체와 동등하거나 이보다 우수한 활성을 가지는 14개의 조합물을 확인하여 NS0 마우스 골수종 세포로의 안정적인 형질 감염을 위해 사용하였다.

[0174] **실시예 5**

[0175] **항체의 안정한 발현 및 정제**

[0176] 인간화된 모체와 동등하거나 이보다 우수한 활성을 가지며 (즉, $V_H1/V_\kappa1$로 이루어짐) 14개의 IgG 조합물 (G15_C10/ $V_\kappa3$, G15_C3/ $V_\kappa3$, G02_F4/ $V_\kappa3$, G19_F8/ $V_\kappa3$, G47_B10/ $V_\kappa3$, G47_H6/ $V_\kappa3$, G49_F11/ $V_\kappa3$, G50_B10/ $V_\kappa3$, G50_G5/ $V_\kappa3$, G50_C10/ $V_\kappa3$, G54_D11/ $V_\kappa3$, G52_G9/ $V_\kappa3$, G49_H9.3/ $V_\kappa3$, 또는 G49_H9.5/ $V_\kappa3$)을 DNA 암호화하는 pAnt 벡터를 전기천공법(electroporation)을 통해 NS0 마우스 골수종 세포로의 안정적으로 형질 감염시켰다. 또한, 바람직한 인간화된 항체, $V_H1/V_\kappa3$를 포함하였다. 안정적인 형질감염은 초기에 200nM 메토트렉세이트를 사용하여 선택하였으며, 확장 시 이를 500nM로 증가시켰다. 각각의 작제물에 대한 메토트렉세이트-내성의 콜로니를 IgG 발현 수준에 대하여 IgG4 ELISA를 사용하여 테스트하였고, 최대 발현 라인을 선택하고 증폭시켜 액체 질소하에 동결시켰다. 모든 14개의 인간화된 변이체, 뿐만 아니라 $V_H1/V_\kappa3$에 대한 성공적인 형질

감염 및 안정한 콜론 선별을 달성하였다.

[0177] 항체를 단백질 A 세파로즈 컬럼 상의 세포 배양 상청액으로부터 정제하고, 완충액을 pH 7.2로 교환하고, 예측된 아미노산 서열에 기초한 흡광 계수를 사용하여 OD_{280nm}으로 정량화하였다.

[0178] FcRn에 대한 인간화된 친화성 성숙된 항체의 결합은 상기 기재된 바와 같이 pH 7.4 및 pH 6.0 모두에서 경쟁 ELISA에 의해 테스트하고, 키메라 모체와 비교하였다. NS0 생성된 인간화된 친화성 성숙된 IgG는 G50_C10/ $V_{\kappa}3$ 이외의 모든 분석에서 사용하였으며, 이는 일시적으로 발현하는 HEK 세포로부터 정제되었다. pH 6.0에서의 실시예 데이터가 도 5에 나타나며, pH 7.4에서의 실시예 데이터가 도 6에 나타난다. 데이터는 하기 표 4에 요약되어 있다.

표 4 - 상대 친화성

변이체	평균 상대 IC_{50} (인간화된 모체와 비교)	
	pH 7.4	pH 6
$V_H1/V\kappa3$	1	1
G15_C10/Vκ3	0.98	0.78
G15_C3/Vκ3	0.80	0.68
G02_F4/Vκ3	1.10	0.95
G19_F8/Vκ3	1.19	0.76
G47_B10/Vκ3	0.74	0.58
G47_H6/Vκ3	0.89	0.84
G49_F11/Vκ3	1.35	0.98
G50_B10/Vκ3	1.29	1.23
G50_G5/Vκ3	1.63	0.84
G50_C10/Vκ3	0.54	0.89
G54_D11/Vκ3	1.93	0.62
G52_G9/Vκ3	0.92	0.56
G49_H9.3/Vκ3	0.73	0.58
G49_H9.5/Vκ3	0.87	0.80

[0179]

[0180] 바람직한 인간화된 변이체와 비교하여, 변이체 중 8개 (G15_C3/ $V_{\kappa}3$, G47_B10/ $V_{\kappa}3$, G47_H6/ $V_{\kappa}3$, G50_C10/ $V_{\kappa}3$, G54_D11/ $V_{\kappa}3$, G52_G9/ $V_{\kappa}3$, G49_H9.3/ $V_{\kappa}3$, 및 G49_H9.5/ $V_{\kappa}3$)가 pH 6.0 및 pH 7.4 둘 모두에서 개선되었다. 하나의 항체는 pH 6.0에서는 개선되었지만 pH 7.4에서는 개선되지 않았다. 이러한 8개의 항체를 Biacore 분석에 사용하였다.

[0181] **실시예 6**

[0182] **표면 플라스몬 공명을 이용한 mAb 결합 반응속도론의 결정**

[0183] 선택된 변이체의 결합 반응속도론은 T200 기구를 사용하여 BIACORE®에 의해 쥐과 모체 및 인간화된 모체 ($V_H1/V\kappa1$)와 비교하였다. Series S CM5 센서 칩 표면상에서 표준 아민 커플링 케미스트리 및 표면 상에 유동하는 분석물(FcRn)을 사용하여 항체를 고정시켰다. 50-0.01 nM FcRn로부터 2-배수 희석 범위가 선택되었다. FcRn 분석물의 결합 상(phase)을 40 μl/분으로 450 초간 모니터하고, 250 초 또는 2500 초간 해리를 측정하였다. F_c1이 기준 채널이었으며 그밖의 다른 유동 세포로부터 이것을 감하여, 비-특이적 결합에 대해 보정하였다. K_D의 배수 차이는 인간화된 모체의 K_D를 동일한 칩의 테스트 항체의 K_D로 나누어 계산하였다. 반응속도 값은 1:1 결합

모델에 기초한다 (표 5).

[0184] 친화성 성숙된 인간화된 항체 G15_C3/ $V_{\kappa}3$, G47_B10/ $V_{\kappa}3$, 및 G50_C10/ $V_{\kappa}3$는 인간화된 모체와 비교하여 친화성에 현저한 개선을 나타냈다 (평균 ~7.1 내지 ~50 배의 범위). G50_C10/ $V_{\kappa}3$에 대해 관찰된 느린 해리 속도는 Biacore 기기의 검출 한계에 도달하였다. G50_C10/ $V_{\kappa}3$에 대한 해리 상수를 보다 정확하게 결정하기 위해, 3 가지 최상의 변이체를 다시 분석하여 4500 초로 증가시킨 해리 시간으로 직접 순위 비교를 제공하였다.

표 5 - 항-인간 FcRn mAbs 의 결합 반응속도론

mAbs	F_c	K_a (1/*Ms*)	K_d (1/초)	K_D (n*M*)	χ^2	K_D 의 배수 차이
쥐과 모체	2	4.75E+05	1.29E-03	2.7	0.02	0.9
$V_H1/V\kappa1$	3	4.77E+05	1.16E-03	2.43	0.08	1.0
G47_B10/ $V_{\kappa}3$	4	4.15E+05	1.34E-04	0.33	0.07	7.4
$V_H1/V\kappa1$	2	5.37E+05	1.10E-03	2.05	0.02	1.0
G15_C3/ $V_{\kappa}3$	3	6.68E+05	1.96E-04	0.29	0.06	7.1
G50_C10/ $V_{\kappa}3$ (HEK)	4	3.99E+05	1.00E-05	0.025	0.07	82
$V_H1/V\kappa1$	2	5.17E+05	1.02E-03	1.97	0.08	1.0
G52_G9/ $V_{\kappa}3$	3	4.55E+05	9.04E-04	1.99	0.06	1.0
G49_H9.3/ $V_{\kappa}3$	4	5.47E+05	6.08E-04	1.11	0.09	1.8
$V_H1/V\kappa1$	2	4.47E+05	1.17E-03	2.61	0.08	1.0
G47_H6/ $V_{\kappa}3$	3	3.89E+05	8.14E-04	2.09	0.05	1.2
G49_H9.5/ $V_{\kappa}3$	4	1.5E+05	1.81E-04	1.21	0.07	2.2
$V_H1/V\kappa1$	2	4.72E+05	1.10E-03	2.34	0.04	1.0
G54_D11/ $V_{\kappa}3$	3	5.67E+05	2.10E-03	3.71	0.03	0.6
G50_C10/ $V_{\kappa}3$	4	2.98E+05	2.34E-05	0.078	0.09	30
G15_C3/ $V_{\kappa}3$	2	3.20E+05	1.25E-04	0.39	0.06	-
G47_B10/ $V_{\kappa}3$	3	3.74E+05	9.12E-04	0.24	0.1	-
G50_C10/ $V_{\kappa}3$	4	2.83E+05	1.54E-05	0.054	0.12	-

[0185]

[0186] 또 다른 연구에서, 제조업체가 설명한 바와 같이 아민-커플링 화학을 사용하여 mAbs (~500-700 공명 단위)와 커플링된 CM5 센서 칩을 구비한 Biacore 3000 기기 (GE Healthcare)를 사용하여 표면 플라스몬 공명 (SPR)을 수행하였다. 커플링은 아민 커플링 키트 (GE Healthcare)를 사용하여 각 단백질 2 μg/ml를 pH 4.5, 10 mM의 소듐 아세테이트 (GE Healthcare)에 주사함으로써 실시되었다. pH 7.4의 HBS-P 완충액 (0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 0.005% 표면활성제 P20) 또는 pH 6.0의 인산염 완충액 (67 mM 인산염 완충액, 0.15 M NaCl, 0.005% Tween 20)을 러닝 완충액 및 희석 완충액으로 사용하였다. 결합 반응속도론은 적정된 양의 단량체 His-태그된 hFcRn (400.0-12.5 nM)을 pH 7.4 또는 pH 6.0에서 고정화된 Abs에 주사함으로써 결정되었다. 모든 SPR 실험은

40 μl/분의 유속으로 25° C에서 수행되었다. 결합 데이터을 제로-조정하고 기준 세포값을 감하였다. BIAevaluation 소프트웨어 (버전 4.1)에 의해 제공된 랭뮤어 1:1 리간드 결합 모델을 사용하여 결합 반응속도론을 결정하였다. 적합도 근접성 (closeness of the fit)은 통계값 χ^2로 기재된다.

[0187] 도 7은 표면 플라스몬 공명으로 결정된 (A) SYNT002h (인간화된 모체 $V_H1/V\kappa1$), (B) SYNT002-3 (G15_C3/ $V_\kappa3$), (C) SYNT002-8 (G47_B10/ $V_\kappa3$), (D) SYNT002-16 (G50_C10/ $V_\kappa3$), (E) SYNT002-17 (G54_D11/ $V_\kappa3$), 및 (F) SYNT002-21 (G49_H9.3/ $V_\kappa3$)에 대한 결합 형성 및 해리에 대한 플롯을 나타낸다. 반응속도론 속도 상수는 아래 표 6에 제공된다. 반응속도 속도 상수는 단순 1차 (1:1) 랭뮤어 이분자 상호작용 모델을 사용하여 얻었다. 반응속도 값은 두 번의 평균을 나타낸다. χ^2 (카이-제곱) 값은 사용된 결합 모델에 대한 적합도를 나타낸다.

표 6 - 항-인간 FcRn mAbs 의 결합 반응속도론

mAbs	K_a (1/*Ms*)	K_d (1/초)	K_D (n*M*)	χ^2
pH 7.4				
$V_H1/V\kappa1$	1.7±0.1E+05	5.1±0.1E -03	30.0	5.0
G15_C3/ $V_\kappa3$	0.9±0.2E+05	0.7±0.0E -03	7.8	4.0
G47_B10/ $V_\kappa3$	1.5±0.1E+05	0.6±0.0E -03	4.0	0.9
G50_C10/ $V_\kappa3$	1.2±0.1E+05	0.00008±0.0E -03	0.00066	0.6
G54_D11/ $V_\kappa3$	2.2±0.1E+05	7.5±0.0E -03	34.0	5.0
G49_H9.3/ $V_\kappa3$	1.8±0.1E+05	1.8±0.1E -03	10.0	3.9
pH 6.0				
$V_H1/V\kappa1$	4.5 ±0.5E+05	1.3±0.1E -03	2.8	11.7
G15_C3/ $V_\kappa3$	2.7±0.1E+05	0.2±0.0E -03	0.7	27.0
G47_B10/ $V_\kappa3$	3.5±0.2E+05	0.2±0.1E -03	0.6	5.5
G50_C10/ $V_\kappa3$	1.1±1.0E+05	0.047±0.2E -03	0.4	2.1
G54_D11/ $V_\kappa3$	5.9±0.3E+05	0.8±0.1E -03	1.6	36.0
G49_H9.3/ $V_\kappa3$	5.3±0.3E+05	0.9±0.0E -03	1.7	20.0

[0188]

[0189] 결과는 모든 항체가 두 pH 조건에서 별개의 반응속도론으로 인간 FcRn에 결합한다는 것을 보여준다. pH 6.0에서만 개선된 G54_D11/ $V_\kappa3$를 제외하고, 인간화된 모체와 비교결합하였다.

[0190] **실시예 7**

[0191] **알부민 제거 연구**

[0192] 알부민 제거에 대한 항-FcRn 항체의 효과를 조사하기 위해 형질전환 마우스를 이용한 *생체내* 연구를 수행하였다. 제0일에, 모든 마우스는 500 mg/kg 인간 알부민을 IV 주사로 미리 부하되었다. 제1일에 각 그룹의 마우스 (n=6)는 PBS 또는 G47_B10/ $V_\kappa3$ (SYNT002-8) 또는 G50_C10/ $V_\kappa3$ (SYNT002-16)를 20 mg/kg으로 투여되었다. IV 주사 후 24, 32, 48, 56, 72, 96, 120, 및 144 시간에, 각 마우스로부터 혈액 샘플을 수집하고 플라즈마 처리하였다. 알부민의 플라즈마 농도는 ELISA으로 정량화하였다.

[0193] 도 8A는 명시된 시점에서 24시간 기준선에 기초하여 평균 잔여 알부민 % (± 표준 오차)로서 플롯되는 SYNT002-8 (G47_B10/ $V_\kappa3$) 및 SYNT002-16 (G50_C10/ $V_\kappa3$)의 연구 결과를 나타낸다.

[0194] 도 8B는 SYNT002-8 (G47_B10/ $V_{\kappa}3$)이 용량-의존적 방식으로 알부민 이화작용을 효과적으로 증가시킨 것을 입증하는 제2 실험의 결과를 나타낸다. PBS, IgG4 아이소형 대조군 (20 mg/kg), 및 3가지 상이한 농도의 SYNT002-8 (G47_B10/ $V_{\kappa}3$) (5 mg/kg, 10 mg/kg, 및 20 mg/kg)를 투여하였고, 결과는 24 시간 기준선과 비교하여 명시된 시점에 잔여의 인간 알부민의 평균 백분율 (± SEM)의 $\log_{10}$로서 나타낸다. 곡선은 90 % 신뢰 구간을 가지는 비선형 회귀 분석을 나타낸다. 이러한 곡선의 기울기 ± SD는 일원 분산 분석(oneway ANOVA)에 의해 분석되었다 (n = 5-11; *P = 0.031; **P = 0.0069; ***P = 0.0003; ****P < 0.0001).

[0195] **실시예 8**

[0196] **아세트아미노펜 (APAP) 보호 연구**

[0197] 아세트아미노펜 (APAP) 간독성에 대한 항-FcRn 항체의 보호 효과를 조사하기 위해 형질전환 마우스를 이용한 *생체내* 연구를 수행하였다. 이를 위해, 준치사량의 APAP (400 mg/kg)를 *Fcgrt*^{TG} 마우스에게 투여하였다. APAP 투여 2시간 후, PBS, 표준 임상 해독제인 *N*-아세틸시스테인(NAC) (140 mg/kg), SYNT002-8 (G47_B10/ $V_{\kappa}3$) (10 mg/kg), 또는 IgG4 아이소형 대조군 (10 mg/kg)을 투여하였다. 혈청 알라닌 아미노전이효소 (ALT) 수치는 APAP 투여 후 6 시간과 8 시간 후에 측정하였다.

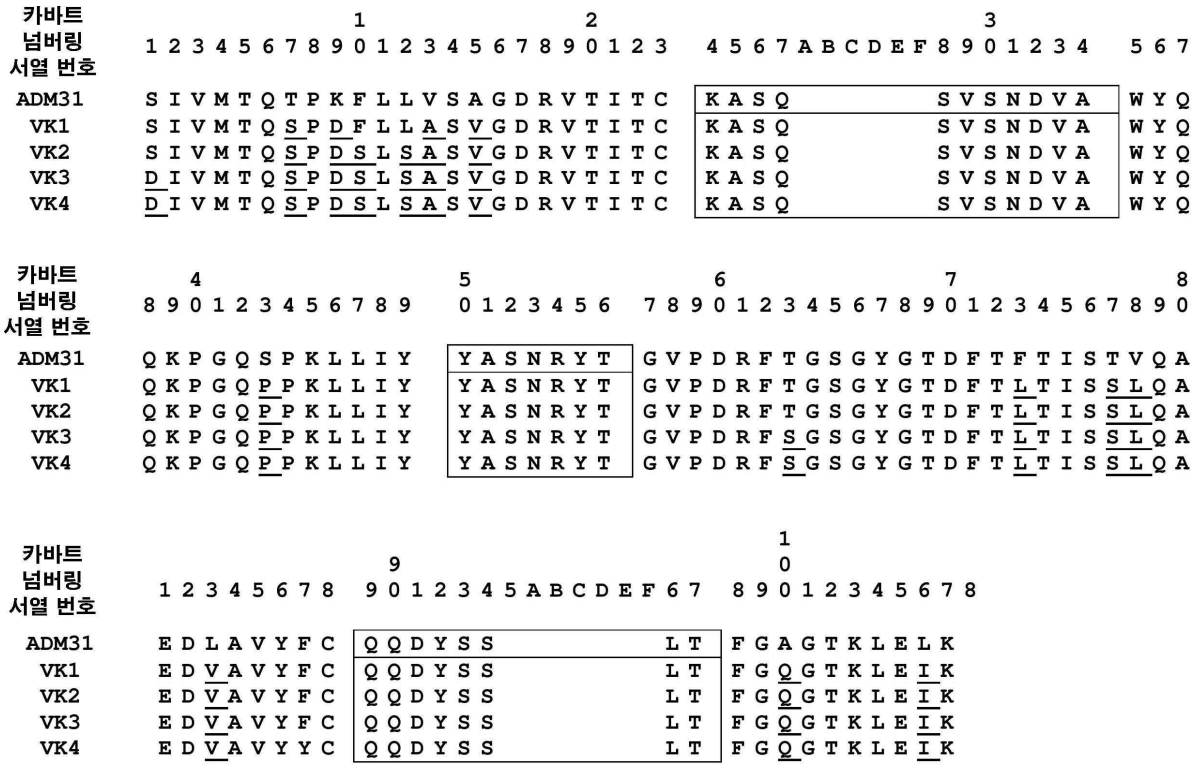
[0198] 도 9는 대조군 치료와 비교하여 SYNT002-8 (G47_B10/ $V_{\kappa}3$)가 10 mg/kg의 용량에서, 준치사 APAP 챌린지 2시간 후 투여된 NAC에 의해 제공된 것과 동일한 보호를 *Fcgrt*^{TG} 마우스에 제공하는 것을 나타낸다 (n = 3-5; *P < 0.05; **P < 0.0038; ***P < 0.001). 따라서, 치료 환경에서, SYNT002-8은 독성 APAP 노출로부터 현재 표준 해독제 NAC와 동일한 수준으로 보호한다.

도면

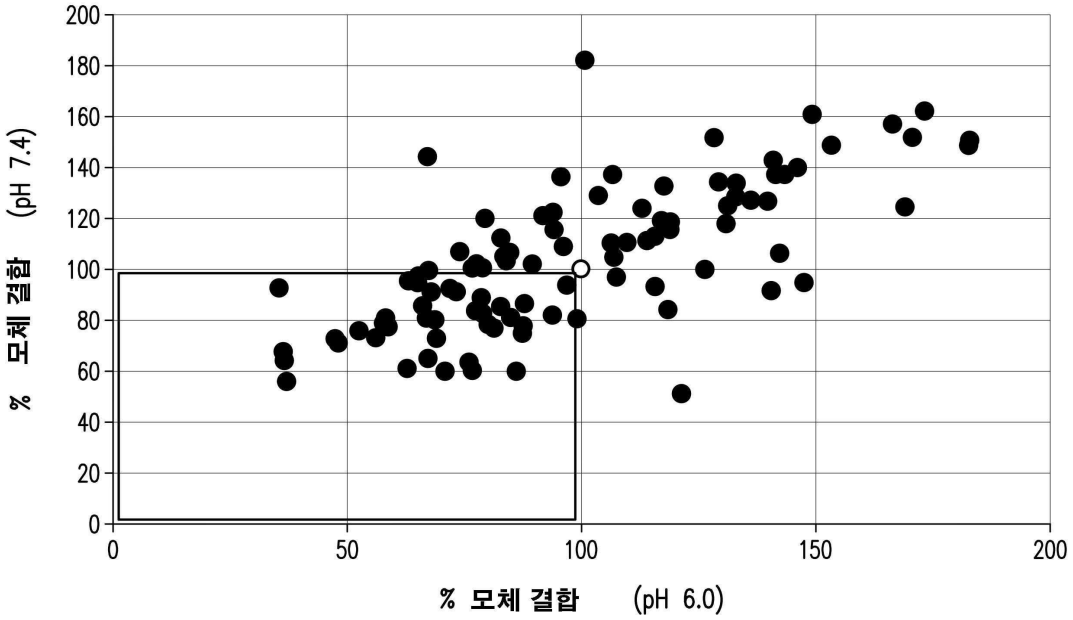
도면1

카바트 넘버링
서열 번호
ADM31
VH1
VH3
VH4
E V Q L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F S X X X X X
E V Q L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F S X X X X X - -
E V Q L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F S X X X X X - -
E V Q L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F S X X X X X - -
W V R Q A P E K
W V R Q A P G K
W V R Q A P G K
W V R Q A P G K
R F T I S R D N A K N T L F L Q M T S L
R F T I S R D N A K N T L Y L Q M N S L
R F T I S R D N A K N T L Y L Q M N S L
R F T I S R D N A K N T L Y L Q M N S L
G L E W V A X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X
G L E W V A X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X
G L E W V A X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X
G L E W V A X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X
R S E D T A M Y Y C A R X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X
R A E D T A M Y Y C A R X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X
R A E D T A V Y Y C A R X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X
R S E D T A M Y Y C A R X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X
W G Q G T S V T V S S
W G Q G T S V T V S S
W G Q G T T V T V S S
W G Q G T T V T V S S

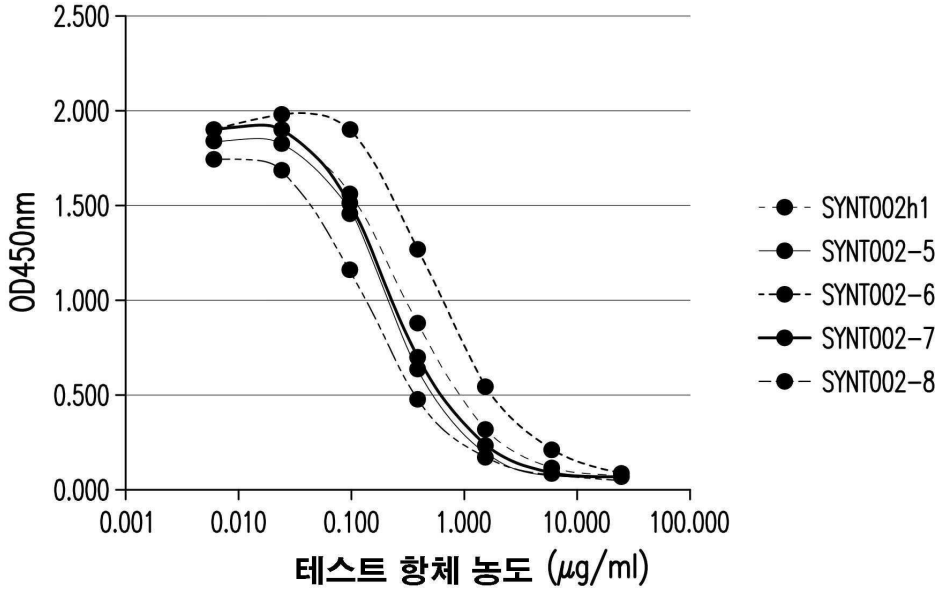
도면2


카바트 넘버링 서열 번호
ADM31 S I V M T Q T P K F L L V S A G D R V T I T C K A S Q S V S N D V A W Y Q
VK1 S I V M T Q S P D F L L A S V G D R V T I T C K A S Q S V S N D V A W Y Q
VK2 S I V M T Q S P D S L S A S V G D R V T I T C K A S Q S V S N D V A W Y Q
VK3 D I V M T Q S P D S L S A S V G D R V T I T C K A S Q S V S N D V A W Y Q
VK4 D I V M T Q S P D S L S A S V G D R V T I T C K A S Q S V S N D V A W Y Q
카바트 넘버링 서열 번호
ADM31 Q K P G Q S P K L L I Y Y A S N R Y T G V P D R F T G S G Y G T D F T F T I S T V Q A
VK1 Q K P G Q P P K L L I Y Y A S N R Y T G V P D R F T G S G Y G T D F T L T I S S L Q A
VK2 Q K P G Q P P K L L I Y Y A S N R Y T G V P D R F T G S G Y G T D F T L T I S S L Q A
VK3 Q K P G Q P P K L L I Y Y A S N R Y T G V P D R F S G S G Y G T D F T L T I S S L Q A
VK4 Q K P G Q P P K L L I Y Y A S N R Y T G V P D R F S G S G Y G T D F T L T I S S L Q A
카바트 넘버링 서열 번호
ADM31 E D L A V Y F C Q Q D Y S S L T F G A G T K L E L K
VK1 E D V A V Y F C Q Q D Y S S L T F G Q G T K L E I K
VK2 E D V A V Y F C Q Q D Y S S L T F G Q G T K L E I K
VK3 E D V A V Y F C Q Q D Y S S L T F G Q G T K L E I K
VK4 E D V A V Y Y C Q Q D Y S S L T F G Q G T K L E I K

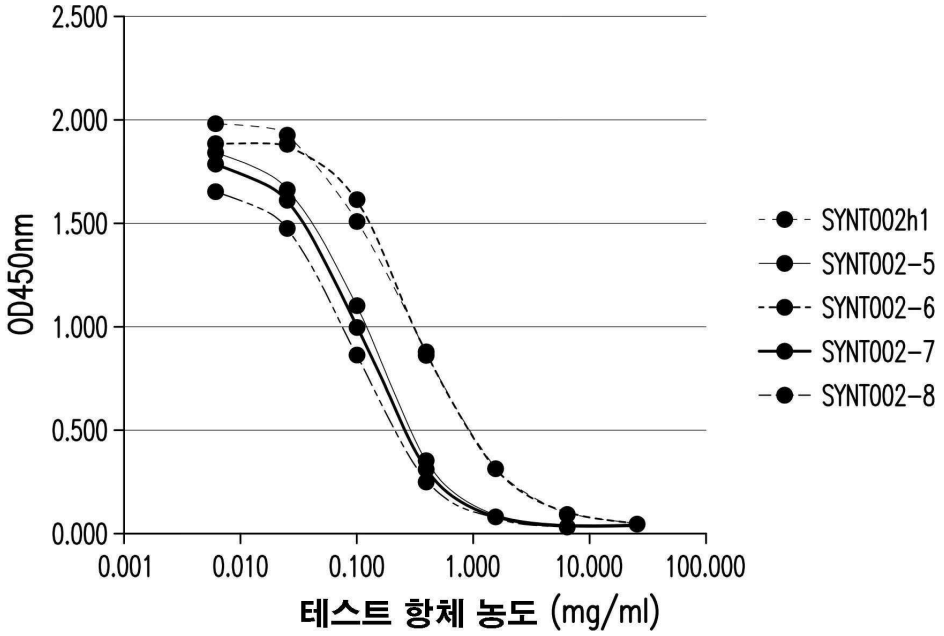
도면3


200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200
% 모체 결합 (pH 7.4)
% 모체 결합 (pH 6.0)

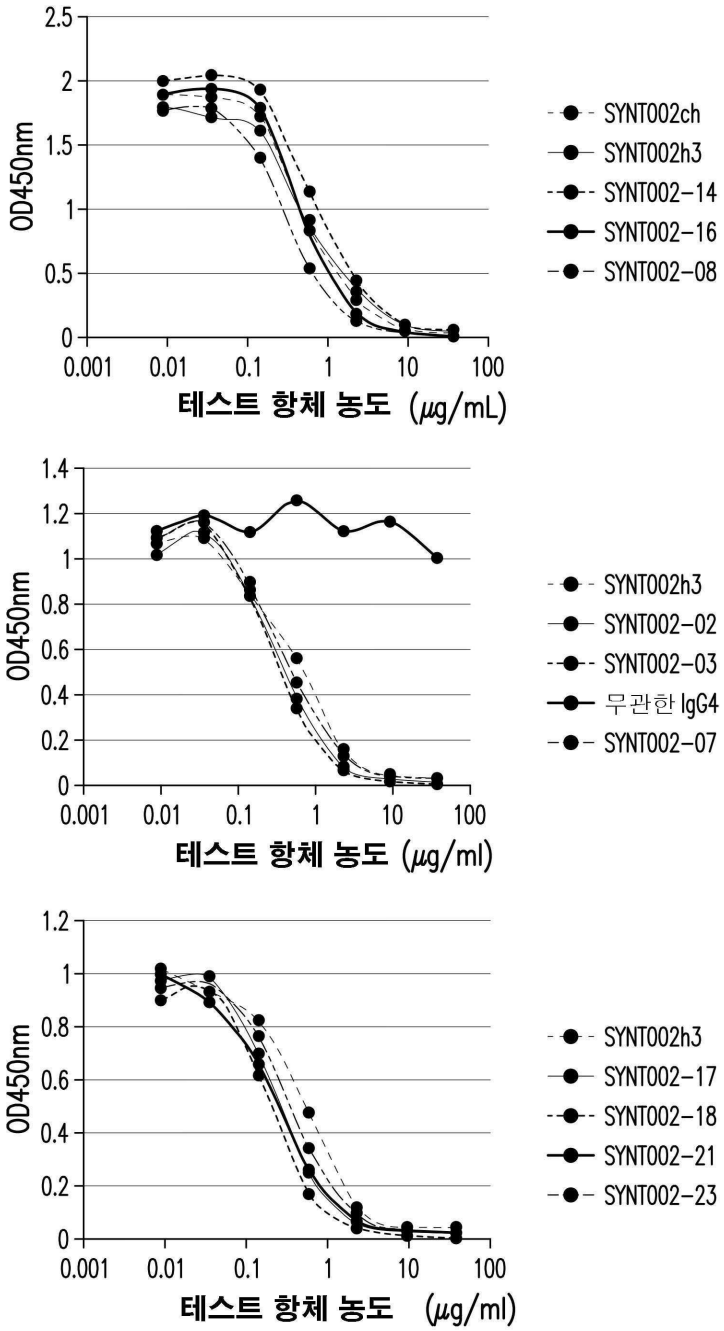
도면4a


2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0.000
0.001
0.010
0.100
1.000
10.000
100.000
OD450nm
테스트 항체 농도 (μg/ml)
SYNT002h1
SYNT002-5
SYNT002-6
SYNT002-7
SYNT002-8

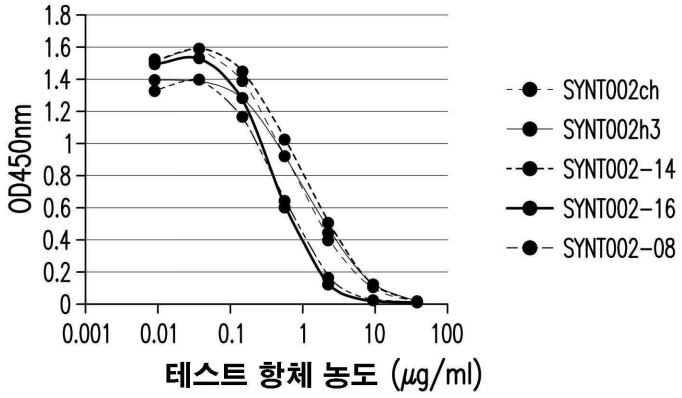
도면4b

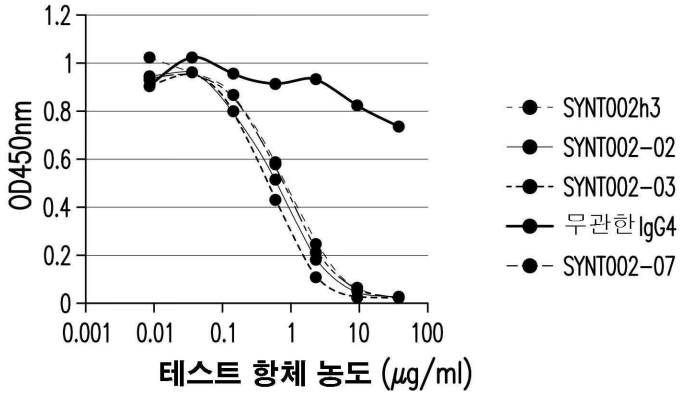

2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0.000
OD450nm
0.001
0.010
0.100
1.000
10.000
100.000
테스트 항체 농도 (mg/ml)
SYNT002h1
SYNT002-5
SYNT002-6
SYNT002-7
SYNT002-8

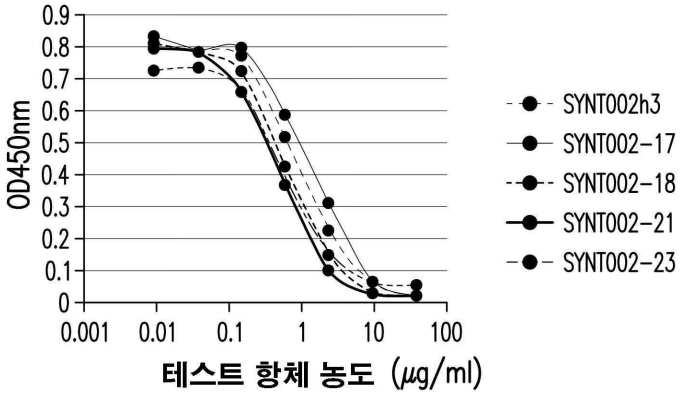
도면5


2.5
2
1.5
1
0.5
0
OD450nm
0.001
0.01
0.1
1
10
100
테스트 항체 농도 (μg/mL)
SYNT002ch
SYNT002h3
SYNT002-14
SYNT002-16
SYNT002-08
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
OD450nm
0.001
0.01
0.1
1
10
100
테스트 항체 농도 (μg/ml)
SYNT002h3
SYNT002-02
SYNT002-03
무관한 IgG4
SYNT002-07
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
OD450nm
0.001
0.01
0.1
1
10
100
테스트 항체 농도 (μg/ml)
SYNT002h3
SYNT002-17
SYNT002-18
SYNT002-21
SYNT002-23

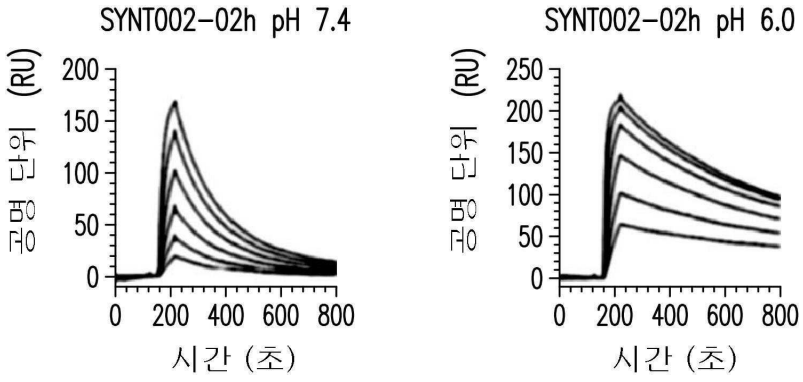
도면6


OD450nm
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
테스트 항체 농도 (μg/ml)
SYNT002ch
SYNT002h3
SYNT002-14
SYNT002-16
SYNT002-08

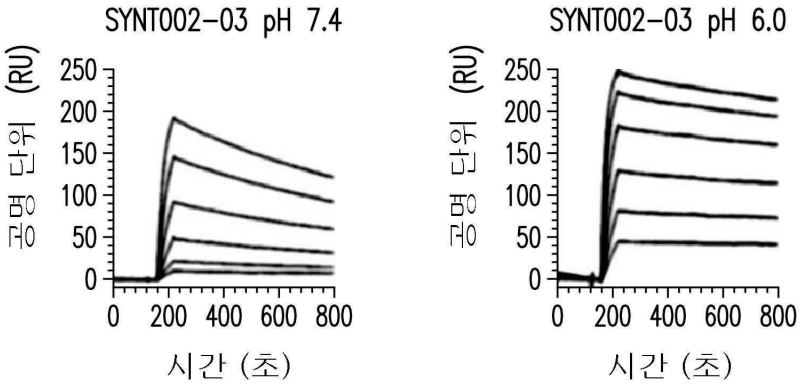

OD450nm
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
테스트 항체 농도 (μg/ml)
SYNT002h3
SYNT002-02
SYNT002-03
무관한 IgG4
SYNT002-07


OD450nm
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
테스트 항체 농도 (μg/ml)
SYNT002h3
SYNT002-17
SYNT002-18
SYNT002-21
SYNT002-23

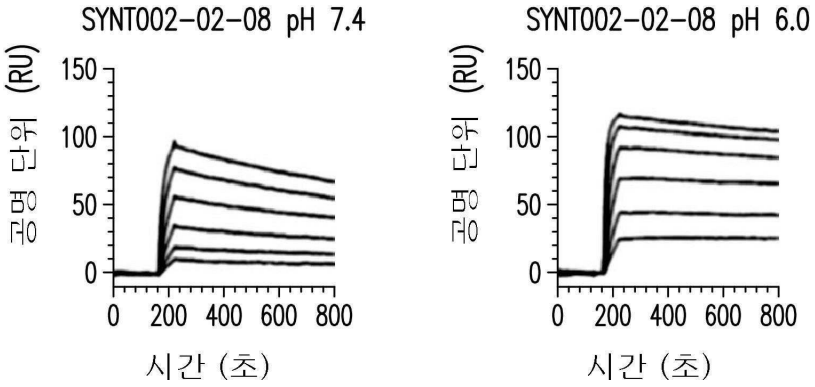
도면7a


SYNT002-02h pH 7.4
공명 단위 (RU)
200
150
100
50
0
0
200
400
600
800
시간 (초)
SYNT002-02h pH 6.0
공명 단위 (RU)
250
200
150
100
50
0
0
200
400
600
800
시간 (초)

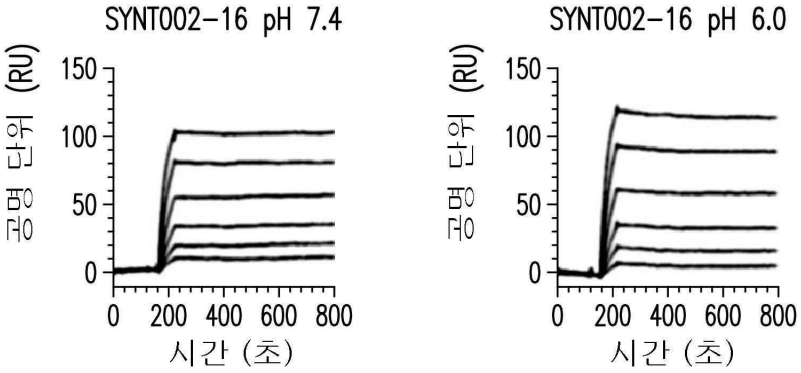
도면7b



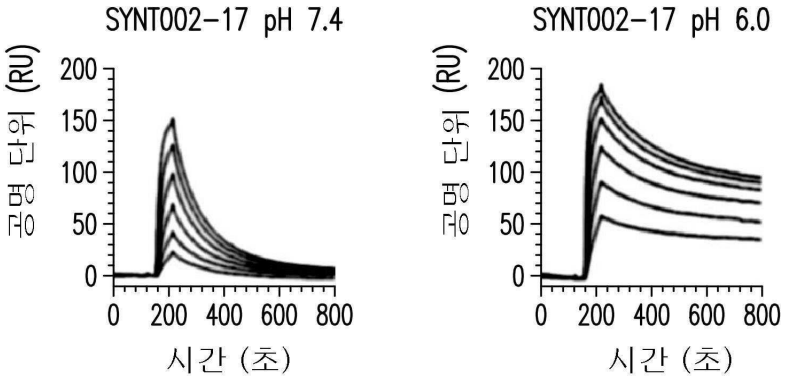
도면7c



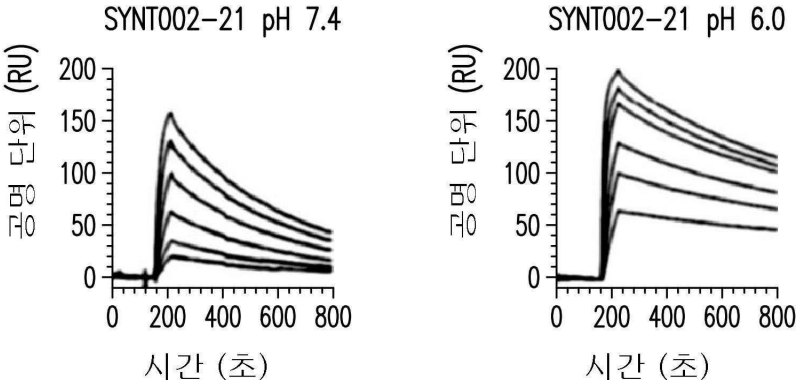
도면7d



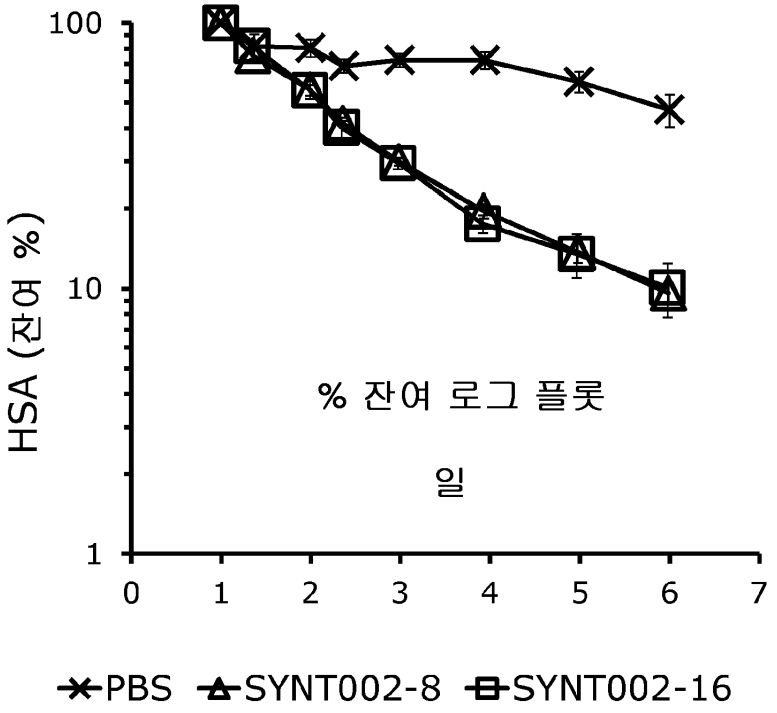
도면7e



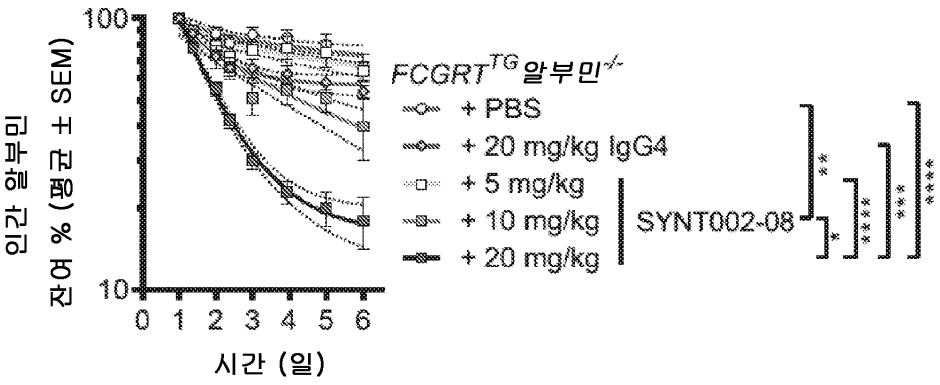
도면7f



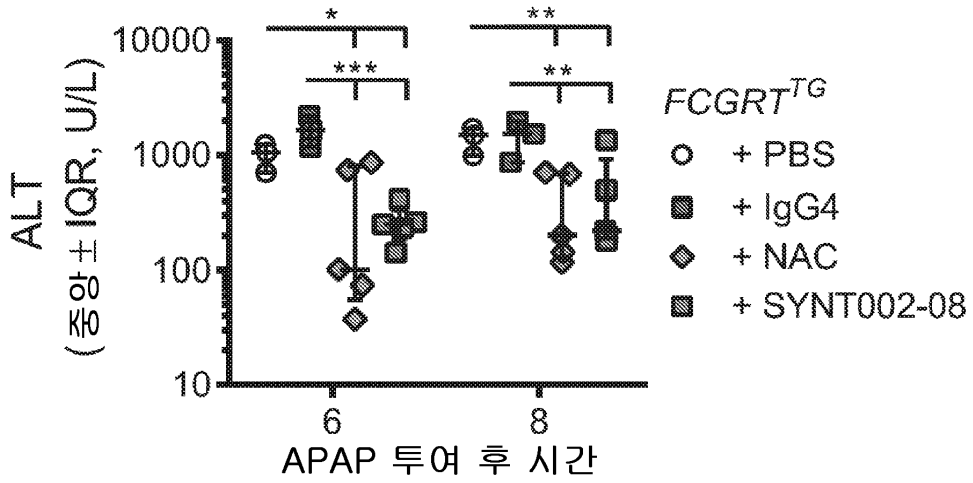
도면8a



도면8b



도면9



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Syntimmune, Inc.

Blumberg, Laurence J.

Blumberg, Richard S.

Jones, Susan Dana

Roopenian, Derry

Holgate, Robert

Jones, Timoth

Hearn, Arron

<120> Humanized Affinity-Matured Anti-FcRn Antibodies

<130> 162255.46276

<150> U.S. 60/326,907

<151> 2016-04-25

<160> 48

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> CDS

<222> (1)..(15)

<400> 1

gac tat gga atg cac 15

Asp Tyr Gly Met His

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Asp Tyr Gly Met His

1 5

<210> 3

<211> 51

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> CDS

<222> (1)..(51)

<400> 3

tac att agt agt ggc agt agt acc atc tac tat gca gac aca gtg aag 48

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

1 5 10 15

ggc 51

Gly

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

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

1 5 10 15

Gly

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> CDS

<222> (1)..(33)

<400> 5

aag gcc agt cag agt gtg agt aat gat gta gct 33

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala

1 5 10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala

1 5 10

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 7

tat gca tcc aat cgc tac act 21

Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> CDS

<222> (1)..(24)

<400> 9

cag cag gat tat agc tct ctc acg 24

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr

1 5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr

1 5

<210> 11

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized

<220><221> CDS

<222> (1)..(357)

<220><221> misc_feature

<222> (91)..(105)

<223> CDR; the 'n' at locations 91 to 105 stands for a, g, c, or t

<220><221> misc_feature

<222> (148)..(198)

<223> CDR; the 'n' at locations 148 to 198 stands for a, g, c, or t

<220><221> misc_feature

<222> (295)..(324)

<223> CDR; the 'n' at locations 295 to 324 stands for a, g, c, or t

<400> 11

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg 48

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

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt nnn nnn 96

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Xaa
20 25 30

nnn nnn nnn tgg gtt cgt cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt 144

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

gca nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn 192

Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

nnn nnn cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctg tat 240

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

ctg caa atg aac agt ctg agg gcc gag gac acg gcc atg tat tac tgt 288

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

gca agg nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn tgg ggt caa gga 336

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly
100 105 110

acc tca gtc acc gtc tcc tca 357

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> The 'Xaa' at location 31 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (32)..(32)

<223> The 'Xaa' at location 32 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (33)..(33)

<223> The 'Xaa' at location 33 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> The 'Xaa' at location 34 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> The 'Xaa' at location 35 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (50)..(50)

<223> The 'Xaa' at location 50 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (51)..(51)

<223> The 'Xaa' at location 51 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,

Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (52)..(52)

<223> The 'Xaa' at location 52 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (53)..(53)

<223> The 'Xaa' at location 53 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (54)..(54)

<223> The 'Xaa' at location 54 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (55)..(55)

<223> The 'Xaa' at location 55 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (56)..(56)

<223> The 'Xaa' at location 56 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,

Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (57)..(57)

<223> The 'Xaa' at location 57 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (58)..(58)

<223> The 'Xaa' at location 58 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (59)..(59)

<223> The 'Xaa' at location 59 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (60)..(60)

<223> The 'Xaa' at location 60 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (61)..(61)

<223> The 'Xaa' at location 61 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,

Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (62)..(62)

<223> The 'Xaa' at location 62 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (63)..(63)

<223> The 'Xaa' at location 63 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (64)..(64)

<223> The 'Xaa' at location 64 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,

Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (65)..(65)

<223> The 'Xaa' at location 65 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (66)..(66)

<223> The 'Xaa' at location 66 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,

Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(99)

<223> The 'Xaa' at location 99 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (100)..(100)

<223> The 'Xaa' at location 100 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr,
Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp,
Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (101)..(101)

<223> The 'Xaa' at location 101 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr,
Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp,
Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (102)..(102)

<223> The 'Xaa' at location 102 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr,
Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp,
Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (103)..(103)

<223> The 'Xaa' at location 103 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr,

Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp,

Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (104)..(104)

<223> The 'Xaa' at location 104 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr,

Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp,

Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (105)..(105)

<223> The 'Xaa' at location 105 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr,

Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp,

Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (106)..(106)

<223> The 'Xaa' at location 106 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr,

Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp,

Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (107)..(107)

<223> The 'Xaa' at location 107 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr,

Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp,

Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (108)..(108)

<223> The 'Xaa' at location 108 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr,

Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp,

Cys, or Phe.

<220><223> Synthetic Construct

<400> 12

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Xaa

20 25 30

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

35 40 45

Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

50 55 60

Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 13

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized

<220><221> CDS

<222> (1)..(357)

<220><221> misc_feature

<222> (91)..(105)

<223> CDR; the 'n' at locations 91 to 105 stands for a, g, c, or t

<220><221> misc_feature

<222> (148)..(198)

<223> CDR; the 'n' at locations 148 to 198 stands for a, g, c, or t

<220><221> misc_feature

<222> (295)..(324)

<223> CDR; the 'n' at locations 295 to 324 stands for a, g, c, or t

<400> 13

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg 48

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

1 5 10 15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt nnn nnn 96

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Xaa

20 25 30

nnn nnn nnn tgg gtt cgt cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt 144

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

35 40 45

gca nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn 192

Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

50 55 60

nnn nnn cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctg tat 240

Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

ctg caa atg aac agt ctg agg gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288

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

85 90 95

gca agg nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn tgg ggt caa gga 336

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly

100 105 110

acc acg gtc acc gtc tcc tca 357

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 14

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> The 'Xaa' at location 31 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,

or Phe.

<220

><221> misc_feature

<222> (32)..(32)

<223> The 'Xaa' at location 32 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (33)..(33)

<223> The 'Xaa' at location 33 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> The 'Xaa' at location 34 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,

Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> The 'Xaa' at location 35 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (50)..(50)

<223> The 'Xaa' at location 50 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (51)..(51)

<223> The 'Xaa' at location 51 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (52)..(52)

<223> The 'Xaa' at location 52 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (53)..(53)

<223> The 'Xaa' at location 53 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,

Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (54)..(54)

<223> The 'Xaa' at location 54 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (55)..(55)

<223> The 'Xaa' at location 55 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (56)..(56)

<223> The 'Xaa' at location 56 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (57)..(57)

<223> The 'Xaa' at location 57 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (58)..(58)

<223> The 'Xaa' at location 58 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,

Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (59)..(59)

<223> The 'Xaa' at location 59 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (60)..(60)

<223> The 'Xaa' at location 60 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (61)..(61)

<223> The 'Xaa' at location 61 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (62)..(62)

<223> The 'Xaa' at location 62 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (63)..(63)

<223> The 'Xaa' at location 63 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,

Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (64)..(64)

<223> The 'Xaa' at location 64 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (65)..(65)

<223> The 'Xaa' at location 65 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (66)..(66)

<223> The 'Xaa' at location 66 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(99)

<223> The 'Xaa' at location 99 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (100)..(100)

<223> The 'Xaa' at location 100 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (101)..(101)

<223> The 'Xaa' at location 101 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (102)..(102)

<223> The 'Xaa' at location 102 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (103)..(103)

<223> The 'Xaa' at location 103 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr,

Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp,
Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (104)..(104)

<223> The 'Xaa' at location 104 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr,
Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp,
Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (105)..(105)

<223> The 'Xaa' at location 105 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr,

Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp,
Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (106)..(106)

<223> The 'Xaa' at location 106 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr,
Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp,
Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (107)..(107)

<223> The 'Xaa' at location 107 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr,
Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp,
Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (108)..(108)

<223> The 'Xaa' at location 108 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr,
Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp,
Cys, or Phe.

<220><223> Synthetic Construct

<400> 14

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Xaa

20 25 30

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

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Humanized
<220><221> CDS
<222> (1)..(357)
<220><221> misc_feature
<222> (91)..(105)
<223> CDR; the 'n' at locations 91 to 105 stands for a, g, c, or t
<220><221> misc_feature
<222> (148)..(198)
<223> CDR; the 'n' at locations 148 to 198 stands for a, g, c, or t

<220><221> misc_feature
<222> (295)..(324)
<223> CDR; the 'n' at locations 295 to 324 stands for a, g, c, or t
<400> 15
gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt nnn nnn 96

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Xaa

20 25 30

nnn nnn nnn tgg gtt cgt cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt 144

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

35 40 45

gca nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn 192

Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

50 55 60

nnn nnn cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctg tat 240

Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

ctg caa atg aac agt ctg agg tct gag gac acg gcc atg tat tac tgt 288

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

85 90 95

gca agg nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn nnn tgg ggt caa gga 336

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly

100 105 110

acc acg gtc acc gtc tcc tca 357

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 16

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> The 'Xaa' at location 31 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,

Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,

or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (32)..(32)

<223> The 'Xaa' at location 32 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (33)..(33)

<223> The 'Xaa' at location 33 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> The 'Xaa' at location 34 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> The 'Xaa' at location 35 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (50)..(50)

<223> The 'Xaa' at location 50 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,

Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (51)..(51)

<223> The 'Xaa' at location 51 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (52)..(52)

<223> The 'Xaa' at location 52 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,

Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature
<222> (53)..(53)
<223> The 'Xaa' at location 53 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.
<220><221> misc_feature
<222> (54)..(54)
<223> The 'Xaa' at location 54 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.
<220><221> misc_feature
<222> (55)..(55)
<223> The 'Xaa' at location 55 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,

Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.
<220><221> misc_feature
<222> (56)..(56)
<223> The 'Xaa' at location 56 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.
<220><221> misc_feature
<222> (57)..(57)
<223> The 'Xaa' at location 57 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature
<222> (58)..(58)
<223> The 'Xaa' at location 58 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (59)..(59)

<223> The 'Xaa' at location 59 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (60)..(60)

<223> The 'Xaa' at location 60 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (61)..(61)

<223> The 'Xaa' at location 61 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (62)..(62)

<223> The 'Xaa' at location 62 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (63)..(63)

<223> The 'Xaa' at location 63 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (64)..(64)

<223> The 'Xaa' at location 64 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (65)..(65)

<223> The 'Xaa' at location 65 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,

Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (66)..(66)

<223> The 'Xaa' at location 66 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(99)

<223> The 'Xaa' at location 99 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile,
Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys,
or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (100)..(100)

<223> The 'Xaa' at location 100 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr,
Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp,
Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (101)..(101)

<223> The 'Xaa' at location 101 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr,
Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp,
Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (102)..(102)

<223> The 'Xaa' at location 102 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr,

Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp,
Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (103)..(103)

<223> The 'Xaa' at location 103 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr,
Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp,

Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (104)..(104)

<223> The 'Xaa' at location 104 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (105)..(105)

<223> The 'Xaa' at location 105 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (106)..(106)

<223> The 'Xaa' at location 106 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (107)..(107)

<223> The 'Xaa' at location 107 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (108)..(108)

<223> The 'Xaa' at location 108 stands for Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Ile, Met, Glu, Asp, Gly, Ala, Val, Gln, His, Pro, Leu, Tyr, Trp, Cys, or Phe.

<220><223> Synthetic Construct

<400> 16

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Xaa
20 25 30

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

35 40 45

Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

50 55 60

Xaa Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 17

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized

<220><221> CDS

<222> (1)..(318)

<400> 17

agt att gtg atg acc cag tct ccc gac ttc ctg ctt gca tca gtg gga 48

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

1 5 10 15

gac agg gtt acc ata acc tgc aag gcc agt cag agt gtg agt aat gat 96

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp

20 25 30

gta gct tgg tac caa cag aag cca ggg cag cct cct aaa ctg ctg ata 144

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

35 40 45

tac tat gca tcc aat cgc tac act gga gtc cct gat cgc ttc act ggc 192

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

50 55 60

agt gga tat ggg acg gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag gct 240

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala

65 70 75 80

gaa gac gtg gca gtt tat ttc tgt cag cag gat tat agc tct ctc acg 288

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

85 90 95

ttc ggt cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 318

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 18

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 18

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 19

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized

<220><221> CDS

<222> (1)..(318)

<400> 19

agt att gtg atg acc cag tct ccc gac tcc ctg tct gca tca gtg gga 48
Ser Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

gac agg gtt acc ata acc tgc aag gcc agt cag agt gtg agt aat gat 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp

20 25 30

gta gct tgg tac caa cag aag cca ggg cag cct cct aaa ctg ctg ata 144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

tac tat gca tcc aat cgc tac act gga gtc cct gat cgc ttc act ggc 192
Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

agt gga tat ggg acg gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag gct 240
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala

65 70 75 80

gaa gac gtg gca gtt tat ttc tgt cag cag gat tat agc tct ctc acg 288
Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr

85 90 95

ttc ggt cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 318
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 20

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 20

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 21

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized

<220><221> CDS

<222> (1)..(318)

<400> 21

gac att gtg atg acc cag tct ccc gac tcc ctg tct gca tca gtg gga 48

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

1 5 10 15

gac agg gtt acc ata acc tgc aag gcc agt cag agt gtg agt aat gat 96

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp

20 25 30

gta gct tgg tac caa cag aag cca ggg cag cct cct aaa ctg ctg ata 144

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

35 40 45

tac tat gca tcc aat cgc tac act gga gtc cct gat cgc ttc agt ggc 192

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

50 55 60

agt gga tat ggg acg gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag gct 240

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala

65 70 75 80

gaa gac gtg gca gtt tat ttc tgt cag cag gat tat agc tct ctc acg 288

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

85 90 95

ttc ggt cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 318

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 22

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 22

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 23

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanized

<220><221> CDS

<222> (1)..(318)

<400> 23

gac att gtg atg acc cag tct ccc gac tcc ctg tct gca tca gtg gga 48

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

1 5 10 15

gac agg gtt acc ata acc tgc aag gcc agt cag agt gtg agt aat gat 96

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp

20 25 30

gta gct tgg tac caa cag aag cca ggg cag cct cct aaa ctg ctg ata 144

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

35 40 45

tac tat gca tcc aat cgc tac act gga gtc cct gat cgc ttc agt ggc 192

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

50 55 60

agt gga tat ggg acg gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag gct 240

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala

65 70 75 80

gaa gac gtg gca gtt tat tac tgt cag cag gat tat agc tct ctc acg 288

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

85 90 95

ttc ggt cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 318

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 24

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 24

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Affinity Matured

<400> 25

Gly Glu Ser Thr Thr Thr Val Gly Asp Tyr

1 5 10

<210> 26

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Affinity Matured

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Affinity Matured

<400> 27

Ala Glu Ser Thr Thr Thr Val Gly Asp Tyr

1 5 10

<210> 28

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Affinity Matured

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

Ala Arg Ala Glu Ser Thr Thr Thr Val Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Affinity Matured
<400> 29
Phe Ser Ser Leu Ser Thr Val Gly Asp Tyr
1 5 10
<210> 30
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Affinity Matured
<400> 30
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Affinity Matured

<400> 31

Leu Glu Ser Thr Thr Ala Val Gly Asp Tyr

1 5 10

<210> 32

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Affinity Matured

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

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

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

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Affinity Matured

<400> 33

Phe Asp Thr Pro Ala Thr Val Gly Asp Tyr
1 5 10

<210> 34

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Affinity Matured

<400> 34

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

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

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

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

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

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Affinity Matured

<400> 35

Phe Asp Thr Pro Ser Thr Val Gly Asp Tyr

1 5 10

<210> 36

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Affinity Matured

<400> 36

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Affinity Matured

<400> 37

Phe Asp Ser Leu Ser Thr Val Gly Asp Tyr

1 5 10

<210> 38

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Affinity Matured

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Affinity Matured

<400> 39

Leu Glu Ala Val Ser Ala Val Gly Asp Tyr

1 5 10

<210> 40

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Affinity Matured

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Leu Glu Ala Val Ser Ala Val Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 41

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 41

argbnsvvsb ncvncnvcrs c 21

<210> 42

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 42

aggnnsnnsn nsnnsrsc 18

<210> 43

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Consensus

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> Residue is A or L

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> Residue is T or R

<400> 43

Xaa Glu Ser Thr Thr Xaa

1 5

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Consensus

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> Residue is A or L

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> Residue is T or R

<400> 44

Xaa Glu Ser Thr Thr Xaa Val Gly Asp Tyr

1 5 10

<210> 45

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Consensus

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> Residue is G, A, or L

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> Residue is T or R

<400> 45

Xaa Glu Ser Thr Thr Xaa

1 5

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Consensus

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> Residue is G, A, or L

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> Residue is T or R

<400> 46

Xaa Glu Ser Thr Thr Xaa Val Gly Asp Tyr

1 5 10

<210> 47

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Consensus

<220><221

> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> Residue is G, A, F, or L

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> Residue is E, A, or D

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> Residue is S, T, or A

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> Residue is T, L, P, or V

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> Residue is T, S, or A

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> Residue is T or A

<400> 47

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 48

<211> 10

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Consensus

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> Residue is G, A, F, or L

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> Residue is E, A, or D

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> Residue is S, T, or A

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> Residue is T, L, P, or V

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> Residue is T, S, or A

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> Residue is T or A

<400> 48

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Gly Asp Tyr

1 5 10