



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년08월18일

(11) 등록번호 10-2434073

(24) 등록일자 2022년08월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/78 (2006.01) A61K 38/39 (2019.01)
A61P 1/04 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01) A61P 17/14 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 14/78 (2013.01)
A61K 38/39 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7019515(분할)

(22) 출원일자(국제) 2012년10월10일

심사청구일자 2020년08월03일

(85) 번역문제출일자 2020년07월06일

(65) 공개번호 10-2020-0085376

(43) 공개일자 2020년07월14일

(62) 원출원 특허 10-2014-7012468

원출원일자(국제) 2012년10월10일

심사청구일자 2017년10월11일

(86) 국제출원번호 PCT/US2012/059477

(87) 국제공개번호 WO 2013/055745

국제공개일자 2013년04월18일

(30) 우선권주장

61/546,028 2011년10월11일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

JP2011501951 A

KR1020100113481 A

WO2009058379 A2*

Law C.L. et al, Landes Bioscience and
Springer Science Business Media 647:pp.8~36.
(2009)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

비엘라 바이오, 인크.

미국 메릴랜드 20878, 게이터스버그, 원 메디문
웨이

(72) 발명자

코일 앤서니

미국 02118 매사추세츠주 보스턴 유니온 파크 12

바카 마뉴엘

미국 20878 메릴랜드주 게이터스버그 원 메디
문 웨이 메디문 엘엘씨 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김태홍, 김진희

전체 청구항 수 : 총 30 항

심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 CD40L 특이적 TN3 유래 스카폴드 및 이의 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 CD40L에 특이적으로 결합하는 테나신 FnIII 도메인-기초 스카폴드(scaffold)를 제공한다. 본 발명은 표적에 대한 증가된 친화성을 갖는 조작된 변이체도 제공한다. 또한, 본 발명은 특히 SLE 및 다른 자가면역 질환 및 병태에 대한 치료적 사용을 위한 예방제, 진단제 또는 치료제로서의 조작된 스카폴드에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61P 1/04 (2018.01)
A61P 1/16 (2018.01)
A61P 17/06 (2018.01)
A61P 17/14 (2018.01)
C07K 16/2875 (2013.01)
C07K 2318/20 (2013.01)
C07K 2319/21 (2013.01)
C07K 2319/30 (2013.01)
C07K 2319/31 (2013.01)

(72) 발명자

디스테드 토마스

미국 20878 메릴랜드주 게이테르스부르크 원 메디
 문 웨이 메디문 엘엘씨 내

드라빅 스테이시

미국 20878 메릴랜드주 게이테르스부르크 원 메디
 문 웨이 메디문 엘엘씨 내

그린버그 루바

미국 20878 메릴랜드주 게이테르스부르크 원 메디
 문 웨이 메디문 엘엘씨 내

노바라 사바츠

미국 20878 메릴랜드주 게이테르스부르크 원 메디
 문 웨이 메디문 엘엘씨 내

오가네산 바헤

미국 20878 메릴랜드주 게이테르스부르크 원 메디
 문 웨이 메디문 엘엘씨 내

허브스트 로날드

미국 20878 메릴랜드주 게이테르스부르크 원 메디
 문 웨이 메디문 엘엘씨 내

스펜서 데이비드 케네스

미국 20878 메릴랜드주 게이테르스부르크 원 메디
 문 웨이 메디문 엘엘씨 내

명세서

청구범위

청구항 1

Tn3 스카폴드를 코딩하는 단리된 핵산 분자로서,

Tn3 스카폴드는 2개 이상의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하고,

2개 이상의 단량체 서브유닛 각각은 A, B, C, D, E, F 및 G로 표기된 7개의 베타 가닥(beta strand), 및 AB, BC, CD, DE, EF 및 FG로 표기된 6개의 루프 영역을 포함하며,

7개의 베타 가닥 및 6개의 루프 영역은 N 말단부터 C 말단까지, A 베타 가닥, AB 루프, B 베타 가닥, BC 루프, C 베타 가닥, CD 루프, D 베타 가닥, DE 루프, E 베타 가닥, EF 루프, F 베타 가닥, FG 루프, G 베타 가닥의 순서로 되어 있고, 또한

2개 이상의 단량체 서브유닛 각각에 대해: AB 루프가 서열번호 4의 서열을 포함하고; BC 루프가 서열번호 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 또는 93의 서열을 포함하고; CD 루프가 서열번호 6의 서열을 포함하고; DE 루프가 서열번호 94, 95, 96, 97, 또는 98의 서열을 포함하고; EF 루프가 서열번호 8의 서열을 포함하며; 또한 FG 루프가 서열번호 9, 99 또는 139의 서열을 포함하는 것인

단리된 핵산 분자.

청구항 2

제1항에 있어서,

(a) BC 루프가 서열번호 83의 서열을 포함하고, DE 루프가 서열번호 94의 서열을 포함하고, 또한 FG 루프가 서열번호 9 또는 139의 서열을 포함하거나;

(b) BC 루프가 서열번호 83의 서열을 포함하고, DE 루프가 서열번호 94의 서열을 포함하고, 또한 FG 루프가 서열번호 99의 서열을 포함하거나;

(c) BC 루프가 서열번호 84의 서열을 포함하고, DE 루프가 서열번호 95의 서열을 포함하고, 또한 FG 루프가 서열번호 9 또는 139의 서열을 포함하거나;

(d) BC 루프가 서열번호 85의 서열을 포함하고, DE 루프가 서열번호 94의 서열을 포함하고, 또한 FG 루프가 서열번호 9 또는 139의 서열을 포함하거나;

(e) BC 루프가 서열번호 86의 서열을 포함하고, DE 루프가 서열번호 96의 서열을 포함하고, 또한 FG 루프가 서열번호 9 또는 139의 서열을 포함하거나;

(f) BC 루프가 서열번호 87의 서열을 포함하고, DE 루프가 서열번호 97의 서열을 포함하고, 또한 FG 루프가 서열번호 9 또는 139의 서열을 포함하거나;

(g) BC 루프가 서열번호 88의 서열을 포함하고, DE 루프가 서열번호 95의 서열을 포함하고, 또한 FG 루프가 서열번호 9 또는 139의 서열을 포함하거나;

(h) BC 루프가 서열번호 89의 서열을 포함하고, DE 루프가 서열번호 94의 서열을 포함하고, 또한 FG 루프가 서열번호 9 또는 139의 서열을 포함하거나;

(i) BC 루프가 서열번호 90의 서열을 포함하고, DE 루프가 서열번호 94의 서열을 포함하고, 또한 FG 루프가 서열번호 9 또는 139의 서열을 포함하거나;

(j) BC 루프가 서열번호 91의 서열을 포함하고, DE 루프가 서열번호 95의 서열을 포함하고, 또한 FG 루프가 서열번호 9 또는 139의 서열을 포함하거나;

(k) BC 루프가 서열번호 92의 서열을 포함하고, DE 루프가 서열번호 98의 서열을 포함하고, 또한 FG 루프가 서열번호 9 또는 139의 서열을 포함하거나; 또는

(l) BC 루프가 서열번호 93의 서열을 포함하고, DE 루프가 서열번호 94의 서열을 포함하고, 또한 FG 루프가 서

열번호 9 또는 139의 서열을 포함하는 것인

단리된 핵산 분자.

청구항 3

제2항에 있어서, BC 루프가 서열번호 86의 서열을 포함하고, DE 루프가 서열번호 96의 서열을 포함하고, 또한 FG 루프가 서열번호 9 또는 139의 서열을 포함하는 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 4

제3항에 있어서, A 베타 가닥이 서열번호 11의 서열을 포함하고; B 베타 가닥이 서열번호 12의 서열을 포함하고; C 베타 가닥이 서열번호 13 또는 14의 서열을 포함하고; D 베타 가닥이 서열번호 15의 서열을 포함하고; E 베타 가닥이 서열번호 16의 서열을 포함하고; F 베타 가닥이 서열번호 17의 서열을 포함하고; 또한 G 베타 가닥이 서열번호 18의 서열을 포함하는 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 5

제3항에 있어서, 2개 이상의 단량체 서브유닛 각각은 서열번호 28 또는 146의 서열을 포함하는 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 6

제3항에 있어서, 2개 이상의 단량체 서브유닛은 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 142 또는 서열번호 143의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 링커를 통해 직렬로 연결된 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 7

제4항에 있어서, 2개 이상의 단량체 서브유닛은 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 142 또는 서열번호 143의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 링커를 통해 직렬로 연결된 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 8

제6항에 있어서, Tn3 스카폴드는 서열번호 208의 서열을 포함하는 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 9

제1항에 있어서, 코딩된 Tn3 스카폴드의 2개 이상의 단량체 서브유닛 중 하나 이상이 이중 모이어티에 결합되어 있고, 상기 이중 모이어티가 비오틴, 알부민, 인간 혈청 알부민(HSA), HSA FcRn 결합 부분, 항체, 항체의 도메인, 항체 단편, 단일 쇠 항체, 도메인 항체, 알부민 결합 도메인, 효소, 리간드, 수용체, 결합 펩티드, 비-FnIII 스카폴드, 에피토프 태그, 재조합 폴리펩티드 중합체, 사이토카인, 또는 상기 모이어티들 중 2개 이상의 모이어티들의 조합물인 단리된 핵산 분자.

청구항 10

제3항에 있어서, 코딩된 Tn3 스카폴드의 2개 이상의 단량체 서브유닛 중 하나 이상이 이중 모이어티에 결합되어 있고, 상기 이중 모이어티가 비오틴, 알부민, HSA FcRn 결합 부분, 항체, 항체의 도메인, 항체 단편, 단일 쇠 항체, 도메인 항체, 알부민 결합 도메인, 효소, 리간드, 수용체, 결합 펩티드, 비-FnIII 스카폴드, 에피토프 태그, 재조합 폴리펩티드 중합체, 사이토카인, 또는 상기 모이어티들 중 2개 이상의 모이어티들의 조합물인 단리된 핵산 분자.

청구항 11

제10항에 있어서, 이중 모이어티가 비오틴, 알부민, HSA FcRn 결합 부분, 항체, 항체의 도메인, 항체 단편, 단일 쇠 항체, 도메인 항체, 알부민 결합 도메인, 결합 펩티드, 에피토프 태그, 재조합 폴리펩티드 중합체, 및 상기 모이어티들 중 2개 이상의 모이어티들의 조합물로 이루어진 군에서 선택되는 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 12

제10항에 있어서, 이중 모이어티가 펩티드 링커에 의해 Tn3 스카폴드에 결합되어 있고, 상기 펩티드 링커가

(GmX)_n 서열을 포함하고, 여기서

(a) X가 세린(S), 알라닌(A), 글리신(G), 류신(L), 이소류신(I), 또는 발린(V)이고;

(b) m 및 n이 정수이고;

(c) m이 1, 2, 3 또는 4이고; 또한

(d) n이 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7인

단리된 핵산 분자.

청구항 13

제11항에 있어서, 이중 모이어티가 펩티드 링커에 의해 Tn3 스카폴드에 결합되어 있고, 상기 펩티드 링커가 (GmX)_n 서열을 포함하고, 여기서

(a) X가 세린(S), 알라닌(A), 글리신(G), 류신(L), 이소류신(I), 또는 발린(V)이고;

(b) m 및 n이 정수이고;

(c) m이 1, 2, 3 또는 4이고; 또한

(d) n이 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7인

단리된 핵산 분자.

청구항 14

제12항에 있어서, 펩티드 링커가 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 142 또는 서열번호 143의 서열을 포함하는 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 15

제13항에 있어서, 펩티드 링커가 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 142 또는 서열번호 143의 서열을 포함하는 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 16

제15항에 있어서, 이중 모이어티가 알부민인 단리된 핵산 분자.

청구항 17

제16항에 있어서, 알부민이 인간 혈청 알부민(HSA)인 단리된 핵산 분자.

청구항 18

제17항에 있어서, HSA가 변이체 HSA인 단리된 핵산 분자.

청구항 19

제18항에 있어서, 변이체 HSA는 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 서열번호 133 또는 138의 서열을 포함하고, 또한

하나 이상의 아미노산 치환은 하기로부터 선택된 위치에 존재하는 것인 단리된 핵산 분자:

(a) 위치 407에서 아스파라긴(N) 또는 티로신(Y)으로의 류신(L)의 치환;

(b) 위치 415에서 트레오닌(T)으로의 발린(V)의 치환;

(c) 위치 463에서 아스파라긴(N)으로의 류신(L)의 치환;

(d) 위치 500에서 아르기닌(R)으로의 라이신(K)의 치환;

(e) 위치 506에서 티로신(Y)으로의 트레오닌(T)의 치환;

- (f) 위치 508에서 아르기닌(R)으로의 트레오닌(T)의 치환;
- (g) 위치 509에서 메티오닌(M) 또는 트립토판(W)으로의 페닐알라닌(F)의 치환;
- (h) 위치 511에서 페닐알라닌(F)으로의 알라닌(A)의 치환;
- (i) 위치 512에서 티로신(Y)으로의 아스파르트산(D)의 치환;
- (j) 위치 515에서 글루타민(Q)으로의 트레오닌(T)의 치환;
- (k) 위치 516에서 트레오닌(T) 또는 트립토판(W)으로의 류신(L)의 치환;
- (l) 위치 521에서 트립토판(W)으로의 아르기닌(R)의 치환;
- (m) 위치 523에서 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 글리신(G), 라이신(K) 또는 아르기닌(R)으로의 이소류신(I)의 치환;
- (n) 위치 524에서 류신(L)으로의 라이신(K)의 치환;
- (o) 위치 526에서 메티오닌(M)으로의 글루타민(Q)의 치환;
- (p) 위치 535에서 프롤린(P)으로의 히스티딘(H)의 치환;
- (q) 위치 550에서 글루탐산(E)으로의 아스파르트산(D)의 치환;
- (r) 위치 557에서 글리신(G)으로의 라이신(K)의 치환;
- (s) 위치 573에서 페닐알라닌(F), 히스티딘(H), 프롤린(P), 트립토판(W) 또는 티로신(Y)으로의 라이신(K)의 치환;
- (t) 위치 574에서 아스파라긴(N)으로의 라이신(K)의 치환; 및
- (u) 위치 580에서 라이신(K)으로의 글루타민(Q)의 치환.

청구항 20

제19항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 치환이 하기로부터 선택된 위치에 존재하는 것인 단리된 핵산 분자:

- (a) 위치 463에서 아스파라긴(N)으로의 류신(L)의 치환;
- (b) 위치 508에서 아르기닌(R)으로의 트레오닌(T)의 치환;
- (c) 위치 523에서 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 글리신(G), 라이신(K) 또는 아르기닌(R)으로의 이소류신(I)의 치환; 및
- (d) 위치 524에서 류신(L)으로의 라이신(K)의 치환.

청구항 21

제18항에 있어서, 변이체 HSA가 서열번호 133의 서열을 포함하는 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 22

제17항에 있어서, 이중 모이어티에 결합된 Tn3 스카폴드가 서열번호 145의 서열을 포함하는 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 24

제23항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 25

핵산 분자에 의해 코딩된 Tn3 스카폴드가 발현되는 조건 하에서 제24항의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하

는, Tn3 스카폴드를 제조하는 방법.

청구항 26

제1항 내지 제5항, 제7항 및 제9항 내지 제22항 중 어느 한 항의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를, 상기 핵산 분자에 의해 코딩된 Tn3 스카폴드가 발현되는 조건 하에서 배양하는 단계를 포함하는 Tn3 스카폴드의 제조 방법에 의해 제조된 Tn3 스카폴드를 포함하는, 자가 면역 질환 치료용 약학 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, Tn3 스카폴드는 CD40L과 접촉할 때, CD40L 발현 세포에서 CD40L에 의해 매개되는 CD40 매개 신호전달을 방해할 수 있는 것인 약학 조성물.

청구항 28

Tn3 스카폴드 융합 단백질을 코딩하는 단리된 핵산 분자로서,

Tn3 스카폴드 융합 단백질은 Tn3 스카폴드 단백질 및 이중 모이어티를 포함하고,

Tn3 스카폴드 융합 단백질은 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하며,

상기 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 A, B, C, D, E, F 및 G로 표기된 7개의 베타 가닥, 및 AB, BC, CD, DE, EF 및 FG로 표기된 6개의 루프 영역을 포함하고,

AB 루프가 서열번호 4의 서열을 포함하고;

BC 루프가 서열번호 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93 또는 168 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고;

CD 루프가 서열번호 6의 서열을 포함하고;

DE 루프가 서열번호 94, 95, 96, 97, 98 또는 169 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고;

EF 루프가 서열번호 8의 서열을 포함하며; 또한

FG 루프가 서열번호 9, 99, 139 또는 170 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하며,

코딩된 Tn3 스카폴드 융합 단백질이 CD40L에 결합하는 것인

단리된 핵산 분자.

청구항 29

제28항에 있어서, BC 루프가 서열번호 86의 아미노산 서열을 포함하고, DE 루프가 서열번호 96의 아미노산 서열을 포함하고, 또한 FG 루프가 서열번호 139의 아미노산 서열을 포함하는 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 30

제28항에 있어서, 이중 모이어티가 비오틴, 알부민, HSA FcRn 결합 부분, 항체, 항체의 도메인, 항체 단편, 단일쇄 항체, 도메인 항체, 알부민 결합 도메인, 효소, 리간드, 수용체, 결합 펩티드, 비-FnIII 스카폴드, 에피토프 태그, 및 사이토카인으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 단리된 핵산 분자.

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 참조

[0002] 본원은 2011년 10월 11일자로 출원된 미국 가출원 제61/546,028호; 2010년 4월 13일자로 출원된 미국 가출원 제 61/323,708호; 2011년 4월 12일자로 출원된 국제 특허출원 제PCT/US2011/032184호; 2011년 4월 12일자로 출원된 국제 특허출원 제PCT/US2011/032188호; 및 2008년 10월 10일자로 출원되었고 국제 공개 제WO 2009/058379 A2호로 공개된 국제 특허출원 제PCT/US2008/012398호와 관련된 청구대상을 부분적으로 함유한다. 상기 언급된 출원들 각각은 전체적으로 본원에 참고로 인용된다.

[0003] 서열목록의 참조

[0004] 본원은 2012년 10월 3일자로 생성되었고 크기가 232 킬로바이트인 시험 파일 명칭 "CD40L-101W01_SL.txt"로서 EFS-웹을 통해 본원과 함께 제출된 서열목록을 참고로 도입한다.

[0005] 발명의 분야

[0006] 본 발명은 일반적으로 항체 모방(mimetic) 분야, 구체적으로 예를 들면, 신규 결합 특성을 갖는 생성물의 발생에 유용한 인간 테나신(Tenascin) C의 제3 피브로넥틴 III형 도메인으로부터 유도된 스카폴드(scaffold)에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드, 이러한 스카폴드의 제조 방법, 및 전신홍반루푸스 및 다른 자가면역 및/또는 염증성 장애의 진단 및 치료를 위한 사용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 본 발명은 예를 들면, 자가면역 및/또는 염증성 장애의 치료에 유용한, CD40L에 결합하는 CD40L 특이적 단백질 스카폴드에 관한 것이다.

- [0008] 원하는 표적 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 생체분자는 치료, 연구 및 의학 진단 수단으로서 매우 중요하다. 이 클래스의 분자들의 잘 공지된 예는 항체이다. 거의 임의의 구조적 에피토프에 특이적으로 결합하고 친화성을 갖는 항체가 선택될 수 있다. 그러나, 고전적인 항체는 단순한 진핵 시스템에서 발현되기에 어려운 구조적으로 복잡한 이중사량체 분자이다. 그 결과, 대다수의 항체들은 복잡하고 비싼 포유동물 세포 발현 시스템의 사용을 통해 생성된다.
- [0009] 통상적으로 단백질 스카폴드로서 지칭되는, 상대적으로 정의된 3차원 구조를 갖는 단백질은 조작된 생성물의 디자인을 위한 시약으로서 사용될 수 있다. 이러한 스카폴드가 유용한 한 특정 영역은 항체 미메틱 디자인의 분야이다. 항체 미메틱, 즉 작은 비-항체 단백질 치료제는 일부 단점들, 예컨대, 항체 단편이 응집하고 전장 IgG보다 덜 안정한 경향을 피하면서 항체 및 항체 단편의 장점, 예컨대, 표적의 높은 친화성 결합, 및 낮은 면역원성 및 독성을 활용한다.
- [0010] 이들 단점들은 항체 천연 폴드(fold)의 부분의 제거에 의해 생성된 항체 단편을 사용함으로써 극복될 수 있다. 그러나, 이것은 정상적으로 소수성 환경, 예컨대, 가변 도메인과 불변 도메인 사이의 계면에 묻혀있을 아미노산 잔기가 용매에 노출될 때 종종 응집을 야기한다. 스카폴드-기초 항체 미메틱의 일례는 문(phyla) 및 단백질 클래스에 걸쳐 넓게 발견되는, 예컨대, 포유동물 혈액 및 구조 단백질에서 발견되는 도메인인 피브로넥틴 III형 도메인(FnIII)의 구조에 기초한다. 인간 테나신 C의 제3 FnIII 도메인으로부터 유도된 FnIII 스카폴드의 디자인 및 사용은 PCT 출원 제PCT/US2011/032184호 및 제PCT/US2011/032188호(이들 둘다 전체적으로 본원에 참고로 도입됨)에 기재되어 있다.
- [0011] CD40L은 활성화된 T 세포(Th0, Th1 및 Th2 서브타입을 포함함) 상에서 주로 발현되는 TNF 패밀리를(family) 분자의 구성원이고, 이 패밀리의 다른 구성원과 유사한 동종삼량체를 형성한다. 또한, CD40L은 비만 세포, 및 활성화된 호염기구 및 호산구 상에서도 발현된다는 것이 발견되었다. CD40L은 항원 제시 세포(APC) 상의 CD40 수용체(CD40R)에 결합하여 표적 세포 종류에 따라 많은 효과를 유발한다. 일반적으로, CD40L은 보조자극 분자의 역할을 수행하고 APC 상의 MHC 분자에 의한 T 세포 수용체 자극과 함께 APC에서의 활성화를 유도한다.
- [0012] CD40L에 의한 CD40 수용체를 통한 신호전달은 CD40 수용체 보유 세포의 활성화 및 최적 CD4+ T 세포 프라이밍을 유발하는 일련의 사건들을 개시한다. 보다 구체적으로, CD40L과 CD40 수용체 사이의 동족 상호작용은 B 세포가 항체 분비 세포 및 기억 B 세포로 분화하는 것을 촉진한다(Burkly, In Adv. Exp. Med. Bio., Vol. 489., D. M. Monroe, U. Hedner, M. R. Hoffman, C. Negrier, G. F. Savidge, and G. C. I. White, eds. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001, p. 135). 추가로, CD40L과 CD40 수용체의 상호작용은 대식세포 및 수지상 세포의 활성화를 통한 세포 매개 면역, 및 천연 살해 세포 및 세포독성 T 림프구의 발생을 촉진한다(상기 문헌(Burkly) 참조).
- [0013] CD40L과 CD40 수용체의 상호작용은 여러 실험적으로 유도된 자가면역 질환, 예컨대, 콜라겐에 의해 유도된 관절염, 실험적 알레르기성 뇌척수염, 난소염, 결장염, 약물에 의해 유도된 루푸스 신염에서 중요하다는 것이 밝혀졌다. 구체적으로, 모든 이들 모델들에서 질환 유도는 항원 투여 시 CD40L 길항제에 의해 차단될 수 있다는 것이 밝혀졌다. 항-CD40L 길항제를 사용한 질환의 차단은 인슐린 의존적 당뇨병 및 루푸스 신염을 포함하는 자발성 자가면역 질환의 동물 모델뿐만 아니라 이식편-대-숙주 질환, 이식, 폐 섬유증 및 죽상동맥경화증 질환 모델에서도 관찰되었다.
- [0014] CD40L 차단을 통한 CD40L/CD40R 경로의 파괴는 많은 자가면역 매개 질환들(예를 들면, 전신홍반루푸스(SLE), 류마티스성 관절염(RA), 다발성 경화증(MS), 염증성 장 질환(IBD) 및 동종이식 거부(그러나, 이들로 한정되지 않음))에서 유리하다는 것이 밝혀졌다. 예를 들면, 항-CD40L 항체를 사용한 치료는 콜라겐에 의해 유도된 관절염 마우스 모델에서 신염을 예방하였거나 개선하였다(Mohan et al. J. Immuno. 154:1470). 추가로, 항-CD40L 항체는 확립된 신염을 갖는 SNF1 마우스에서 신장 기능을 보존하였다(Kalled et al. J. Immuno. 160:2158). CD40L 수준은 임상 질환 중증도(즉, 염증의 감소), 및 비-인간 및 인간 둘다에서의 표적 조직의 손상과 밀접한 상관관계를 갖는다.
- [0015] SLE는 진행성 및 종종 치명적인 자가면역 질환이다. 루푸스의 다양한 발현양상은 빈혈 및 혈소판감소를 통한 발진 및 관절염부터 심지어 정신병까지 이른다. 면역 시스템의 많은 아암(arm)들이 신장, 피부 및 뇌 질환 및 혈전증을 유발하는 염증 과정에 관여한다는 것을 보여주는 명확한 증거가 있다. SLE의 한 특징적인 특징은 B 세포 내성의 상실이고, 자가항체가 이 질환을 갖는 환자에서 현저하다. 루푸스 신장 질환에서, 항-이중 가닥 DNA 자가항체는 항체 뉴클레오폴 복합체를 형성할 수 있고 신장 사구체 기저막에서 침착될 수 있다. 그 다음, 이들 면역

역 복합체는 보체를 활성화시키고, 이것은 사구체신염을 유발할 수 있다.

[0016] CD40L의 발현뿐만 아니라 CD40R의 발현도 SLE를 갖는 환자에서 상승된다는 것이 발견되었다. 증가된 보조자극 신호는 SLE에서 발견되는 병리학적 염증 반응에 기여할 가능성이 있다. SLE T 세포는 자가 항원에 대한 활성화의 감소된 역치와 관련된 활성화를 자발적으로 증가시킨다. 또한, 이들 세포는 추가 항원성 자극에 대한 저반응성을 나타내고, 아토피시스에 대한 저항성을 나타내고 활성화 후 증가된 생존을 갖고 많은 변경된 세포내 신호 전달 경로들을 갖는다. T 세포 CD40L에 의한 APC 상에서의 CD40R 활성화 후, APC 및 T 세포 둘다가 활성화되게 되고, 사이토카인을 생성하고 SLE에서 병원성 자가항체의 생성 및 조직 손상(루푸스 신염)에 기여한다. CD40R/CD40L 경로의 차단은 루푸스에 취약한 마우스에서 질환을 차단하는 데에 있어서 단독으로 또는 조합으로 효과적이다. SLE를 갖는 환자에서, 인간화된 항-CD40L 항체는 항-dsDNA 및 B 세포, 및 단백뇨를 감소시켰고 SLE 질환 중증도를 개선하였다.

[0017] 그러나, 종래 항체를 사용한 CD40L의 표적화는 상당한 안전성 문제를 발생시켰다. 예를 들면, 만성 불응성 특발성 혈소판감소자색반병(ITP)을 앓고 있는 환자에서 항-CD40L 항체 5c8(바이오젠(BIOGEN®))을 사용한 연구는 보고된 혈전색전증성 합병증 때문에 보류되었다(Davidson et al. Arth Rheu, 43:S271). 또한, CD40L에 대해 유도된 대안적인 항체를 사용한 추가 시험은 다른 혈전증 관련 합병증을 발생시켰다(Davis et al. Arth Rheu, 43:S281; Schuler, Transplantation, 77:717). CD40L의 항체-유도된 길항작용에 의한 합병증을 고려할 때, 대안적인 비-항체로 CD40L을 표적화하고 길항할 충족되지 않은 필요성이 있다. 따라서, Tn3-기초 스카폴드를 사용한 CD40L의 표적화는 Fab2 및/또는 Fc 매개 혈소판 응집 및 다운스트림 부작용을 피하므로 흥미로운 대안이다.

[0018] 본원에서 참고문헌의 인용 또는 논의는 이러한 참고문헌이 본 발명의 종래기술이라는 것을 인정하는 취지로서 해석되어서는 안 된다.

발명의 내용

[0019] 발명의 요약

[0020] 본 발명은 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는 Tn3 스카폴드를 제공하는데, 이때 상기 단량체 서브유닛은 A, B, C, D, E, F 및 G로 표기된 7개의 베타 가닥(beta strand), 및 AB, BC, CD, DE, EF 및 FG로 표기된 6개의 루프 영역을 포함하고, 상기 Tn3 스카폴드는 CD40L에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 단일 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다. 다른 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 직렬로 연결된 2개의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다. 일부 특정 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 직접적으로 연결된 2개의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다.

[0021] 일부 실시양태에서, 2개의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛들은 링커에 의해 연결되어 있다. 다른 실시양태에서, 링커는 유연성 펩티드 링커일 수 있는 펩티드 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 $(G_mX)_n$ 서열 (이때, X는 세린(S), 알라닌(A), 글리신(G), 류신(L), 이소류신(I) 또는 발린(V)이고; m 및 n은 정수 값이고; m은 1, 2, 3 또는 4이고; n은 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7임)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 서열 번호 131, 서열번호 132, 서열번호 142 또는 서열번호 143을 포함한다.

[0022] 일부 실시양태에서, CD40L와의, 2개의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는 Tn3 스카폴드의 결합은 단일 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는 Tn3 스카폴드의 결합에 비해 개선된다. 다른 실시양태에서, CD40L와, 2개의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는 Tn3 스카폴드의 결합은 단일 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는 Tn3 스카폴드의 결합에 비해 표적에 대한 작용을 개선한다. 다른 실시양태에서, Tn3 스카폴드와 CD40L의 결합의 개선은 결합 친화성의 개선, 결합력의 개선, 또는 이들 둘다이다. 특정 실시양태에서, CD40L에 대한 2개의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는 Tn3 스카폴드의 결합 친화성 및 Tn3 스카폴드 단백질 안정성은 단일 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는 Tn3 스카폴드의 결합 친화성 및 단백질 안정성에 비해 개선된다. 일부 실시양태에서, CD40L에 대한 2개의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는 Tn3 스카폴드의 결합력 및 Tn3 스카폴드 단백질 안정성은 단일 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는 Tn3 스카폴드의 결합력 및 단백질 안정성에 비해 개선된다.

[0023] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드에서 하나 이상의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 링커 또는 이중 모이어티(moiety)에 결합되어 있다. 다른 실시양태에서, Tn3 스카폴드에서 링커 또는 이중 모이어티는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛의 N 말단 또는 C 말단에 접합되어 있다. 특정 실시양태에서, Tn3 스카폴드에서 CD40L 특이적 단량체 서브유닛에 결합된 링커는 일부 실시양태에서 유연성 펩티드 링커일 수 있는 펩티드 링커를 포함한다. 이

펩티드 링커는 특정 실시양태에서 $(G_mX)_n$ 서열(이때, X는 세린(S), 알라닌(A), 글리신(G), 류신(L), 이소류신(I) 또는 발린(V)이고; m 및 n은 정수 값이고; m은 1, 2, 3 또는 4이고; n은 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7임)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드에서 CD40L 특이적 단량체 서브유닛에 결합된 링커는 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 142 또는 서열번호 143을 포함한다.

[0024] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 기능성 모이어티를 포함하는 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이 기능성 모이어티는 면역글로불린 또는 이의 단편이다. 특정 실시양태에서, 이 면역글로불린 또는 이의 단편은 Fc 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이 Fc 도메인은 하나 이상의 Fc γ R 매개 이펙터 기능(effector function)을 유도하지 못한다. 일부 실시양태에서, 이 하나 이상의 Fc γ R 매개 이펙터 기능은 ADCC이다.

[0025] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 이중 모이어티에 결합된 하나 이상의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이 이중 모이어티는 단백질, 펩티드, 단백질 도메인, 링커, 약물, 독소, 세포독성제, 조영제, 방사성 핵종, 방사성 화합물, 유기 중합체, 무기 중합체, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 비오틴, 알부민, 인간 혈청 알부민(HSA), HSA FcRn 결합 부분, 항체, 항체의 도메인, 항체 단편, 단일쇄 항체, 도메인 항체, 알부민 결합 도메인, 효소, 리간드, 수용체, 결합 펩티드, 비-FnIII 스카폴드, 에피토프 태그, 재조합 폴리펩티드 중합체, 사이토카인, 및 상기 모이어티들 중 2개 이상의 모이어티들의 조합물로 구성된 군으로부터 선택된 조성물을 포함한다.

[0026] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 PEG에 접합된 하나 이상의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다. 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 알부민에 접합된 하나 이상의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다. 특정 실시양태에서, 이 알부민은 인간 혈청 알부민(HSA)이다. 다른 실시양태에서, 이 HSA는 변이체 HSA이다. 일부 특정 실시양태에서, 변이체 HSA의 아미노산 서열은 서열번호 133이다. 다른 실시양태에서, 변이체 HSA는 천연 HSA 또는 천연 HSA 단편에 비해 하나 이상의 개선된 성질을 갖는다. 특정 실시양태에서, 개선된 성질은 천연 HSA 또는 천연 HSA 단편의 혈장 반감기에 비해 변경된 혈장 반감기이다. 일부 실시양태에서, 변경된 혈장 반감기는 천연 HSA 또는 천연 HSA 단편의 혈장 반감기에 비해 더 긴 혈장 반감기이다. 다른 실시양태에서, 변경된 혈장 반감기는 천연 HSA 또는 천연 HSA 단편의 혈장 반감기에 비해 더 짧은 혈장 반감기이다.

[0027] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 HSA 도메인 III 내에 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 HSA 변이체에 융합된다. 다른 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 전장 성숙 HSA에서의 위치에 대하여 넘버링된 407, 415, 463, 500, 506, 508, 509, 511, 512, 515, 516, 521, 523, 524, 526, 535, 550, 557, 573, 574 및 580으로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서의 하나 이상의 아미노산 치환을 제외하고는 전장 성숙 HSA(서열번호 133 또는 138) 또는 이의 단편의 서열을 포함하는 HSA 변이체에 융합되는데, 여기서 상기 하나 이상의 아미노산 치환이 위치 573에서 글루탐산(E)으로의 라이신(K)의 치환을 포함하지 않고, Tn3 스카폴드가 이러한 HSA 변이체에 접합되지 않은 Tn3 스카폴드의 혈장 반감기보다 더 긴 혈장 반감기를 갖는다.

[0028] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 하나 이상의 아미노산 치환이 전장 성숙 HSA에서의 위치에 대하여 넘버링된 463, 508, 523 및 524로 구성된 군으로부터 선택된 위치에 존재하는 HSA 변이체에 융합되는데, 여기서 상기 Tn3 스카폴드는 상기 HSA 변이체에 접합되지 않은 Tn3 스카폴드의 혈장 반감기보다 더 긴 혈장 반감기를 갖는다. 일부 실시양태에서, HSA 변이체는 전장 성숙 HSA에서의 위치에 대하여 넘버링된 위치에서의, 하기 아미노산 치환들로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 제외하고는 전장 성숙 HSA(서열번호 133 또는 138) 또는 이의 단편의 서열을 포함하는데, 여기서 상기 Tn3 스카폴드가 상기 HSA 변이체에 접합되지 않은 Tn3 스카폴드의 혈장 반감기보다 더 긴 혈장 반감기를 갖는다: (a) 위치 407에서 아스파라긴(N) 또는 티로신(Y)으로의 류신(L)의 치환; (b) 위치 415에서 트레오닌(T)으로의 발린(V)의 치환; (c) 위치 463에서 아스파라긴(N)으로의 류신(L)의 치환; (d) 위치 500에서 아르기닌(R)으로의 라이신(K)의 치환; (e) 위치 506에서 티로신(Y)으로의 트레오닌(T)의 치환; (f) 위치 508에서 아르기닌(R)으로의 트레오닌(T)의 치환; (g) 위치 509에서 메티오닌(M) 또는 트립토판(W)으로의 페닐알라닌(F)의 치환; (h) 위치 511에서 페닐알라닌(F)으로의 알라닌(A)의 치환; (i) 위치 512에서 티로신(Y)으로의 아스파르트산(D)의 치환; (j) 위치 515에서 글루타민(Q)으로의 트레오닌(T)의 치환; (k) 위치 516에서 트레오닌(T) 또는 트립토판(W)으로의 류신(L)의 치환; (l) 위치 521에서 트립토판(W)으로의 아르기닌(R)의 치환; (m) 위치 523에서 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 글리신(G), 라이신(K) 또는 아르기닌(R)으로의 이소류신(I)의 치환; (n) 위치 524에서 류신(L)으로의 라이신(K)의 치환; (o) 위치 526에서 메티오닌(M)으로의 글루타민(Q)의 치환; (p) 위치 535에서 프롤린(P)으로의 히스티딘(H)의 치환; (q) 위치 550에서 글루탐산(E)으로의 아스파르트산(D)의 치환; (r) 위치 557에서 글리신(G)으로의 라이신(K)의 치환; (s) 위치 573에서 페닐알라닌(F), 히스티딘(H), 프롤린(P), 트립토판(W) 또는 티로신(Y)으로의 라이신(K)의 치환; (t) 위치

574에서 아스파라긴(N)으로의 라이신(K)의 치환; (u) 위치 580에서 라이신(K)으로의 글루타민(Q)의 치환; 및 (v) 상기 치환들 중 둘 이상의 치환들의 조합.

[0029] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 전장 성숙 HSA에서의 위치에 대하여 넘버링된 위치에서의 하기 아미노산 치환들로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 제외하고는 전장 성숙 HSA(서열번호 133 또는 138) 또는 이의 단편의 서열을 포함하는 HSA 변이체에 융합되는데, 여기서 상기 Tn3 스카폴드가 상기 HSA 변이체에 접합되지 않은 Tn3 스카폴드의 혈장 반감기보다 더 긴 혈장 반감기를 갖는다: (a) 위치 463에서 아스파라긴(N)으로의 류신(L)의 치환; (b) 위치 508에서 아르기닌(R)으로의 트레오닌(T)의 치환; (c) 위치 523에서 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 글리신(G), 라이신(K) 또는 아르기닌(R)으로의 이소류신(I)의 치환; (d) 위치 524에서 류신(L)으로의 라이신(K)의 치환; 및 (e) 상기 치환들 중 둘 이상의 치환들의 조합.

[0030] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 2개 이상의 동일한 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다. 다른 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 2개 이상의 상이한 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다. 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40 수용체 작용제(agonist)이다. 다른 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40 수용체 길항제이다.

[0031] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 동일한 CD40L 에피토프에 특이적으로 결합하는 2개 이상의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다. 다른 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 상이한 CD40L 에피토프에 특이적으로 결합하는 2개 이상의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이들 상이한 CD40L 에피토프들은 비중첩 에피토프이다. 다른 실시양태에서, 이들 상이한 CD40L 에피토프들은 중첩 에피토프이다.

[0032] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 2개 이상의 CD40L 분자에 결합한다. 다른 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 2개 이상의 CD40L 분자에 결합하는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다.

[0033] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드의 하나 이상의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛의 베타 가닥은 서열번호 3의 베타 가닥에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는다. 다른 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 서열번호 11을 포함하는 A 베타 가닥을 포함하거나 하나 이상의 돌연변이를 제외한 서열번호 11을 포함하는 A 베타 가닥을 포함하는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다. 다른 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 서열번호 12를 포함하는 B 베타 가닥을 포함하거나 하나 이상의 돌연변이를 제외한 서열번호 12를 포함하는 B 베타 가닥을 포함하는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다. 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 서열번호 13 또는 14를 포함하는 C 베타 가닥을 포함하거나 하나 이상의 돌연변이를 제외한 서열번호 13 또는 14를 포함하는 C 베타 가닥을 포함하는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 서열번호 13 또는 14에서 시스테인은 치환되지 않는다. 다른 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 서열번호 15를 포함하는 D 베타 가닥을 포함하거나 하나 이상의 돌연변이를 제외한 서열번호 15를 포함하는 D 베타 가닥을 포함하는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다.

[0034] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 서열번호 16을 포함하는 E 베타 가닥을 포함하거나 하나 이상의 돌연변이를 제외한 서열번호 16을 포함하는 E 베타 가닥을 포함하는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다. 다른 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 서열번호 17을 포함하는 F 베타 가닥을 포함하거나 하나 이상의 돌연변이를 제외한 서열번호 17을 포함하는 F 베타 가닥을 포함하는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 서열번호 17에서 시스테인은 치환되지 않는다. 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 서열번호 18을 포함하는 G 베타 가닥을 포함하거나 하나 이상의 돌연변이를 제외한 서열번호 18을 포함하는 G 베타 가닥을 포함하는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다.

[0035] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 아미노산 서열 $IEV(X_{AB})_nALITW(X_{BC})_nCELX_1YGI(X_{CD})_nTTIDL(X_{DE})_nYSI(X_{EF})_nYEVSLIC(X_{FG})_nKETFTT$ 를 포함하는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 X_{AB} , X_{BC} , X_{CD} , X_{DE} , X_{EF} 및 X_{FG} 는 각각 AB, BC, CD, DE, EF 및 FG 루프의 서열에 존재하는 아미노산 잔기를 나타내고; X_1 은 아미노산 잔기 A 또는 T를 나타내고; 루프의 길이 n은 2 내지 26의 정수이다.

[0036] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 AB 루프의 서열은 서열번호 4 또는 서열번호 136을 포함하고, CD 루프의 서열은 서열번호 6을 포함하고, EF 루프의 서열은 서열번호 8 또는 서열번호 137을 포함한다. 다른 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 BC 루프의 서열은 서열번호 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93 및 168로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 DE 루프의 서열은 서열번호 94, 95, 96, 97, 98 및 169로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 FG 루프의 서열은 서열번호

번호 104를 포함하고, DE 루프의 서열은 서열번호 122를 포함하고, FG 루프의 서열은 서열번호 129를 포함한다. 다른 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 BC 루프의 서열은 서열번호 105를 포함하고, DE 루프의 서열은 서열번호 121을 포함하고, FG 루프의 서열은 서열번호 129를 포함한다. 다른 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 BC 루프의 서열은 서열번호 106을 포함하고, DE 루프의 서열은 서열번호 123을 포함하고, FG 루프의 서열은 서열번호 129를 포함한다. 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 AB 루프의 서열은 서열번호 136을 포함한다.

[0044] 특정 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 BC 루프의 서열은 서열번호 107을 포함하고, DE 루프의 서열은 서열번호 123을 포함하고, FG 루프의 서열은 서열번호 129를 포함한다. 다른 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 BC 루프의 서열은 서열번호 108을 포함하고, DE 루프의 서열은 서열번호 118을 포함하고, FG 루프의 서열은 서열번호 129를 포함한다. 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 BC 루프의 서열은 서열번호 109를 포함하고, DE 루프의 서열은 서열번호 123을 포함하고, FG 루프의 서열은 서열번호 129를 포함한다. 일부 실시양태에서, BC 루프의 서열은 서열번호 110을 포함하고, DE 루프의 서열은 서열번호 121을 포함하고, FG 루프의 서열은 서열번호 129를 포함한다. 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 AB 루프의 서열은 서열번호 136을 포함한다.

[0045] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 BC 루프의 서열은 서열번호 111을 포함하고, DE 루프의 서열은 서열번호 123을 포함하고, FG 루프의 서열은 서열번호 130을 포함한다. 다른 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 BC 루프의 서열은 서열번호 108을 포함하고, DE 루프의 서열은 서열번호 121을 포함하고, FG 루프의 서열은 서열번호 129를 포함한다. 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 BC 루프의 서열은 서열번호 112를 포함하고, DE 루프의 서열은 서열번호 124를 포함하고, FG 루프의 서열은 서열번호 129를 포함한다. 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 BC 루프의 서열은 서열번호 113을 포함하고, DE 루프의 서열은 서열번호 125를 포함하고, FG 루프의 서열은 서열번호 129를 포함한다. 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 AB 루프의 서열은 서열번호 136을 포함한다.

[0046] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 BC 루프의 서열은 서열번호 114를 포함하고, DE 루프의 서열은 서열번호 118을 포함하고, FG 루프의 서열은 서열번호 129를 포함한다. 다른 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 BC 루프의 서열은 서열번호 115를 포함하고, DE 루프의 서열은 서열번호 126을 포함하고, FG 루프의 서열은 서열번호 129를 포함한다. 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 BC 루프의 서열은 서열번호 116을 포함하고, DE 루프의 서열은 서열번호 127을 포함하고, FG 루프의 서열은 서열번호 129를 포함한다. 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 BC 루프의 서열은 서열번호 117을 포함하고, DE 루프의 서열은 서열번호 128을 포함하고, FG 루프의 서열은 서열번호 129를 포함한다. 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 AB 루프의 서열은 서열번호 136을 포함한다.

[0047] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 서열번호 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 및 146으로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다. 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 하기 아미노산 서열을 포함하는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다:

[0048] IEVKDVTDTTALITWX₁DX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈CELTG₁KDVP₂GDRTTIDLWX₉HX₁₀AX₁₁YSIGNLKP₁₂DEYEVSLICRX₁₂GDMSSNPAKETFTT(서열번호 167)

[0049] 상기 서열에서,

[0050] (a) X₁은 아미노산 잔기 세린(S) 또는 류신(L)을 나타내고;

[0051] (b) X₂는 아미노산 잔기 아스파르트산(D) 또는 글루탐산(E)을 나타내고;

[0052] (c) X₃은 아미노산 잔기 히스티딘(H), 이소류신(I), 발린(V), 페닐알라닌(F) 또는 트립토판(W)을 나타내고;

- [0053] (d) X_4 는 아미노산 잔기 알라닌(A), 글리신(G), 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;
- [0054] (e) X_5 는 아미노산 잔기 글루탐산(E), 류신(L), 글루타민(Q), 세린(S), 아스파르트산(D) 또는 아스파라긴(N)을 나타내고;
- [0055] (f) X_6 은 아미노산 잔기 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0056] (g) X_7 은 아미노산 잔기 이소류신(I), 발린(V), 히스티딘(H), 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;
- [0057] (h) X_8 은 아미노산 잔기 글리신(G), 트립토판(W) 또는 발린(V)을 나타내고;
- [0058] (i) X_9 는 아미노산 잔기 트립토판(W), 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0059] (j) X_{10} 은 아미노산 잔기 세린(S), 글루타민(Q), 메티오닌(M) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;
- [0060] (k) X_{11} 은 아미노산 잔기 트립토판(W) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;
- [0061] (l) X_{12} 는 아미노산 잔기 아르기닌(R) 또는 세린(S)을 나타낸다.
- [0062] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 서열번호 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80 및 82로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다.
- [0063] 일부 실시양태에서, the Tn3 스카폴드는 하기 아미노산 서열을 포함하는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다:
- [0064] IEVX₁DVDTTALITWX₂X₃RSX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀CELEX₁₁YGIKDVPGRDTTIDLX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅YVHYSIGNLKPDTX₁₆YEVSLICLTTDGTYX₁₇NPAKETFTT(서열번호 171)
- [0065] 상기 서열에서,
- [0066] (a) X_1 은 아미노산 잔기 라이신(K) 또는 글루탐산(E)을 나타내고;
- [0067] (b) X_2 는 아미노산 잔기 트레오닌(T) 또는 이소류신(I)을 나타내고;
- [0068] (c) X_3 은 아미노산 잔기 아스파라긴(N) 또는 알라닌(A)을 나타내고;
- [0069] (d) X_4 는 아미노산 잔기 세린(S), 류신(L), 알라닌(A), 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0070] (e) X_5 는 아미노산 잔기 티로신(Y), 알라닌(A), 글리신(G), 발린(V), 이소류신(I) 또는 세린(S)을 나타내고;
- [0071] (f) X_6 은 아미노산 잔기 티로신(Y), 세린(S), 알라닌(A) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;
- [0072] (g) X_7 은 아미노산 잔기 아스파라긴(N), 아스파르트산(D), 히스티딘(H) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0073] (h) X_8 은 아미노산 잔기 류신(L), 페닐알라닌(F), 히스티딘(H) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0074] (i) X_9 는 아미노산 잔기 히스티딘(H), 프롤린(P), 세린(S), 류신(L) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;
- [0075] (j) X_{10} 은 아미노산 잔기 글리신(G), 페닐알라닌(F), 히스티딘(H) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0076] (k) X_{11} 은 아미노산 잔기 알라닌(A) 또는 트레오닌(T)을 나타내고;
- [0077] (l) X_{12} 는 아미노산 잔기 세린(S), 아스파라긴(N), 글루탐산(E), 아스파라긴(R) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;
- [0078] (m) X_{13} 은 아미노산 잔기 세린(S), 글루타민(Q), 트레오닌(T), 아스파라긴(N) 또는 알라닌(A)을 나타내고;
- [0079] (n) X_{14} 는 아미노산 잔기 프롤린(P), 발린(V), 이소류신(I) 또는 알라닌(A), 또는 아미노산의 부제를 나타내고;

- [0080] (o) X_{15} 는 아미노산 잔기 이소류신(I), 또는 아미노산의 부재를 나타내고;
- [0081] (p) X_{16} 은 아미노산 잔기 글루탐산(E) 또는 라이신(K)을 나타내고;
- [0082] (q) X_{17} 은 아미노산 잔기 세린(S) 또는 아스파라긴(N)을 나타낸다.
- [0083] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 서열번호 134, 135, 205, 206, 207 및 208로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 다른 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 서열번호 134, 135, 205, 206, 207 및 208로 구성된 군으로부터 선택된 서열로 구성된다.
- [0084] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 서열번호 201, 202, 203 및 204로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 서열번호 201, 202, 203 및 204로 구성된 군으로부터 선택된 서열로 구성된다. 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 상기 CD40L 특이성은 인간 CD40L에 대한 특이성이다. 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 상기 CD40L 특이성은 막 결합된 CD40L(서열번호 1), 가용성 CD40L(서열번호 2) 또는 이들의 단편에 대한 특이성이다. 일부 특정 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L에 결합하고 CD40L과 CD40의 결합을 방지한다.
- [0085] 본 발명은 CD40L 발현 세포를 Tn3 스카폴드와 접촉시키는 단계를 포함하는, 상기 CD40L 발현 세포에서 활성을 변경시키는 방법도 제공하는데, 이때 Tn3 스카폴드는 CD40L에 결합하고 CD40L과 CD40의 결합을 방지한다. 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 약 1 μ M 이하, 약 500 nM 이하, 약 100 nM 이하, 약 50 nM 이하, 약 25 nM 이하, 약 10 nM 이하, 약 5 nM 이하 또는 약 2 nM 이하의 친화성(K_d)으로 CD40L에 결합한다.
- [0086] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 서열번호 2의 위치 142 내지 155, 200 내지 230, 또는 247 내지 251에 위치하는 아미노산을 포함하는 CD40L 에피토프에 특이적으로 결합하는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다. 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 아미노산 E142, Y146, M148, N151, L155, R200, R203 및 E230과 상호작용하는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다. 다른 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 CD40L 아미노산 R203, I204, V247, H249 및 T251과 상호작용하는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다. 다른 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 제1 CD40L 분자에 위치하는 CD40L 아미노산 E142, Y146, M148, N151 및 L155, 및 제2 CD40L 분자에 위치하는 CD40L 아미노산 R200, R203 및 E230과 상호작용하는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다. 다른 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 제1 CD40L 분자에 위치하는 CD40L 아미노산 R203 및 I204, 및 제2 CD40L 분자에 위치하는 CD40L 아미노산 V247, H249 및 T251과 상호작용하는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다.
- [0087] 본 발명은 본원에 기재된 혈청 알부민 용합체를 포함하는 이들로 한정되지 않는, 하나 이상의 CD40L 특이적 Tn3 단량체를 포함하는 폴리펩티드도 제공한다.
- [0088] 본 발명은 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드를 코딩하는 단리된 핵산 분자, CD40L 특이적 Tn3 스카폴드를 코딩하는 상기 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터, 및 이러한 벡터를 포함하는 숙주 세포도 제공한다. 본 발명은 상기 핵산 분자에 의해 코딩된 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드가 발현되는 조건 하에서 상기 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, Tn3 스카폴드를 제조하는 방법도 제공한다.
- [0089] 또한, 본 발명은 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 본 발명은 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드를 포함하는 유효량의 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 자가면역 질환의 예방, 치료, 호전 또는 관리가 필요한 환자에서 자가면역 질환을 예방하거나, 치료하거나, 호전시키거나, 또는 관리하는 방법도 제공한다.
- [0090] 또한, 본 발명은 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드를 포함하는 치료 유효량의 약학 조성물을 자가면역 질환을 갖는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 환자에게 투여되는 코르티코스테로이드의 빈도 또는 양을 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0091] CD40L 특이적 Tn3 스카폴드의 투여에 의해 치료되는 자가면역 질환은 원형탈모증, 강직 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역 에디슨병, 부신의 자가면역 질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 난소염 및 고환염, 쇼그렌 증후군, 건선, 죽상동맥경화증, 당뇨병성 망막병증 및 기타 망막병증, 후수정체 섬유증, 연령 관련 황반 변성, 신생혈관 녹내장, 혈관종, 갑상선 과다형성(그레이브스병을 포함함), 각막 및 기타 조직 이식, 만성 염증, 부패증, 류마티스성 관절염, 복막염, 크론병, 재관류 손상, 폐혈증, 내독성 쇼크, 남성 섬유증, 심

내막염, 건선, 관절염(예를 들면, 건선 관절염), 아나필락시스 쇼크, 장기 허혈, 재관류 손상, 척수 손상, 동종 이식 거부, 자가면역 혈소판감소, 베체트병, 수포성 유천포창, 심근병증, 복강 스프루-피부염, 만성 피로 면역 기능장애 증후군(CFIDS), 만성 염증성 탈수초 다발신경병증, 처르그 스트라우스 증후군, 반흔성 유천포창, CREST 증후군, 한랭응집소병, 크론병, 원관상루푸스, 본태성 혼합 한랭글로불린혈증, 섬유근육통-섬유근육염, 사구체신염, 그레이브스병, 켈랭-바레, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐 섬유증, 특발성 혈소판감소자색반병(ITP), IgA 신경병증, 소아 관절염, 편평태선, 홍반루푸스, 메니에르병, 혼합결합조직 질환, 다발성 경화증, 1형 또는 면역 매개 진성당뇨병, 중증근육무력증, 심상성천포창, 악성 빈혈, 결절다발동맥염, 다발연골염, 다분비선증후군, 류마티스성 다발근육통, 다발근육염 및 피부근육염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담관간경화증, 건선, 건선 관절염, 레이놀드 현상, 레이터 증후군, 류마티스성 관절염, 사르코이드증, 피부경화증, 쇼그렌 증후군, 강직 증후군, 전신홍반루푸스, 홍반루푸스, 타카야수 동맥염, 측두 동맥염/거대세포 동맥염, 케양성 결장염, 포도막염, 혈관염, 예컨대 포진피부염 혈관염, 백반증, 및 베게너 육아종증일 수 있다.

[0092] 일부 특정 실시양태에서, CD40L 특이적 Tn3 스카폴드의 투여에 의해 치료되는 자가면역 질환은 전신홍반루푸스(SLE)이다.

[0093] CD40L 특이적 Tn3 스카폴드를 사용하여 치료하는 방법은 추가 치료, 예컨대, 면역치료, 생물학적 치료, 화학치료, 방사선치료 또는 소분자 약물치료를 추가로 포함할 수 있다.

[0094] 본 발명은 가용성 CD40L(서열번호 2)과 복합체를 형성한 서열번호 20으로 구성된 Tn3 스카폴드를 포함하는 단백질 결정도 제공하는데, 이때 상기 결정은 P2₁2₁2₁ 사방정계 공간군 내의 결정 격자, 및 a=85.69 Å, b=90.64 Å 및 c=95.56 Å의 단위 셀 치수(+/-0.1%)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 결정의 비대칭 단위는 CD40L의 삼량체 및 3개의 Tn3 스카폴드 분자를 포함한다. 다른 실시양태에서, 결정은 구조 좌표의 확인을 위한 X-선을 3.2 Å 이하의 레졸루션(resolution) 값까지 회절시킨다.

[0095] 본 발명은 가용성 CD40L(서열번호 2)과 복합체를 형성한 서열번호 68로 구성된 Tn3 스카폴드를 포함하는 단백질 결정도 제공하는데, 이때 상기 결정은 P2₁3 입방정계 공간군 내의 결정 격자, 및 a=b=c=97.62 Å의 단위 셀 치수(+/-0.1%)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 결정의 비대칭 단위는 1개의 CD40L 분자 및 1개의 Tn3 스카폴드 분자를 포함한다. 다른 실시양태에서, 결정은 구조 좌표의 확인을 위한 X-선을 2.7 Å 이하의 레졸루션 값까지 회절시킨다.

[0096] 본 발명은 가용성 CD40L(서열번호 2)과 복합체를 형성한 서열번호 28 또는 146으로 구성된 Tn3 스카폴드를 포함하는 단백질 결정도 제공하는데, 이때 상기 결정은 P321 공간군 내의 결정 격자, 및 a=95.53 Å, b=93.53 Å 및 c=66.69 Å의 단위 셀 치수(+/-0.1%)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 결정의 비대칭 단위는 1개의 CD40L 분자 및 1개의 Tn3 스카폴드 분자를 포함한다. 다른 실시양태에서, 결정은 구조 좌표의 확인을 위한 X-선을 2.8 Å 이하의 레졸루션 값까지 회절시킨다.

[0097] 본 발명은 가용성 CD40L(서열번호 2)과 복합체를 형성한 서열번호 68 및 서열번호 28 또는 146으로 구성된 2개의 상이한 Tn3 스카폴드를 포함하는 단백질 결정도 제공하는데, 이때 상기 결정은 P2₁ 입방정계 공간군 내의 결정 격자, 및 a=80.32 Å, b=143.48 Å, c=111.27 Å 및 β=98.22 Å의 단위 셀 치수(+/-0.1%)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 결정의 비대칭 단위는 2개의 CD40L 삼량체 및 6개의 각각의 Tn3 스카폴드 분자를 포함한다. 다른 실시양태에서, 결정은 구조 좌표의 확인을 위한 X-선을 1.9 Å 이하의 레졸루션 값까지 회절시킨다.

[0098] 일부 실시양태에서, 단백질 결정은 시팅 드롭(sitting-drop) 증기 확산의 이용에 의해 생성된다. 본 발명은 (a) CD40L과 복합체를 형성한 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는 Tn3 스카폴드를 포함하는 일정 부피의 용액을 침전제를 포함하는 일정 부피의 저장기 용액과 혼합하는 단계; 및 (b) 밀폐된 용기 내에서 단계 (a)에서 수득된 혼합물을 단백질 결정이 형성될 때까지 결정화에 적합한 조건 하에서 항온처리하는 단계를 포함하는, 단백질 결정을 제조하는 방법도 제공한다. 일부 실시양태에서, 단백질 결정을 제조하는 방법은 시팅 드롭 증기 확산의 이용을 포함한다.

[0099] 일부 실시양태에서, 단백질 결정을 제조하는 방법은 서열번호 20, 서열번호 28, 서열번호 68 또는 서열번호 146의 CD40L 특이적 Tn3 단량체 서브유닛을 포함하는 결정을 제조하는 데에 이용된다.

[0100] 또한, 본 발명은 하기 (a) 및 (b)에 대한 기계 판독가능한 명령어가 암호화되어 있는 데이터 저장 물질을 포함하는 기계 판독가능한 데이터 저장 매체를 제공한다: (a) 데이터를, CD40L과 복합체를 형성한 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는 Tn3 스카폴드의 단백질 결정의 부분의 구조에 대한 그래픽 3차원 표현으로 변환시키

는 것; 및 (b) 상기 그래픽 3차원 표현의 디스플레이를 야기하는 것. 일부 실시양태에서, 이러한 Tn3 스카폴드는 서열번호 20, 서열번호 28, 서열번호 68 또는 서열번호 146을 포함한다. 다른 실시양태에서, 이러한 단백질 결정은 하기 (a) 내지 (e) 중 어느 한 단백질 결정이다:

- [0101] (a) 가용성 CD40L(서열번호 2)과 복합체를 형성한 서열번호 20으로 구성된 Tn3 스카폴드를 포함하는 단백질 결정으로서, $P2_12_12_1$ 사방정계 공간군 내의 결정 격자, 및 $a=85.69 \text{ \AA}$, $b=90.64 \text{ \AA}$ 및 $c=95.56 \text{ \AA}$ 의 단위 셀 치수 ($\pm 0.1\%$)를 갖는 단백질 결정;
- [0102] (b) 가용성 CD40L(서열번호 2)과 복합체를 형성한 서열번호 68로 구성된 Tn3 스카폴드를 포함하는 단백질 결정으로서, $P2_13$ 입방정계 공간군 내의 결정 격자, 및 $a=b=c=97.62 \text{ \AA}$ 의 단위 셀 치수 ($\pm 0.1\%$)를 갖는 단백질 결정;
- [0103] (c) 서열번호 20으로 구성된 Tn3 스카폴드 및 서열번호 68로 구성된 Tn3 스카폴드를 포함하는 단백질 결정으로서, 이때 상기 두 Tn3 스카폴드들이 가용성 CD40L(서열번호 2)과 복합체를 형성하는 것인 단백질 결정;
- [0104] (d) 가용성 CD40L(서열번호 2)과 복합체를 형성한 서열번호 28 또는 146으로 구성된 Tn3 스카폴드를 포함하는 단백질 결정으로서, $P321$ 공간군 내의 결정 격자, 및 $a=95.53 \text{ \AA}$, $b=93.53 \text{ \AA}$ 및 $c=66.69 \text{ \AA}$ 의 단위 셀 치수 ($\pm 0.1\%$)를 갖는 단백질 결정; 또는
- [0105] (e) 가용성 CD40L(서열번호 2)과 복합체를 형성한 서열번호 68 및 서열번호 28 또는 146으로 구성된 2개의 상이한 Tn3 스카폴드를 포함하는 단백질 결정으로서, $P2_1$ 입방정계 공간군 내의 결정 격자, 및 $a=80.32 \text{ \AA}$, $b=143.48 \text{ \AA}$, $c=111.27 \text{ \AA}$ 및 $\beta=98.22 \text{ \AA}$ 의 단위 셀 치수 ($\pm 0.1\%$)를 갖는 단백질 결정.

도면의 간단한 설명

- [0106] 본 발명을 예증하기 위한 목적으로, 본 발명의 일부 실시양태들이 도면에 도식화되어 있다. 그러나, 본 발명은 도면에 도식화된 실시양태들의 정확한 정렬 및 수단으로 한정되지 않는다.

도 1a는 D10G4.1/PBMC(말초혈 단핵세포) 분석을 이용함으로써 측정된 뮤린 CD40L(MuCD40L)-유도된 CD86 발현의 억제력을 보여준다. M13 마우스 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드, 이의 M31 친화성 최적화된 변이체(대략 20배 친화성 개선), 항-CD40L MR1 단일클론 항체 및 음성 대조군을 분석하였다. IC_{50} 값도 표시되어 있다.

도 1b는 뮤린 NfκB 분석에서 CD40L 억제력을 보여준다. 상기 분석은 뮤린 CD40R을 발현하고 NfκB-루시퍼라제 레포터 구축물을 함유하는 NIHT3T 세포를 사용한다. CD40L의 첨가는 MR1 항-CD40L 항체 및 M31 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드 둘다에 의해 억제되는 신호전달(루시퍼라제 활성화에 의해 측정됨)을 유발한다.

도 2a는 CD40L 특이적 직렬 2가 Tn3 스카폴드 및 혈청 알부민(SA) 융합 구축물의 디자인을 보여준다.

도 2b는 정제된 1가 M13 구축물(CD40L 특이적 Tn3 구축물), 또는 2개의 M13 Tn3 단량체 서브유닛을 연결하는 1개, 3개, 5개 또는 7개의 Gly₄Ser 유닛(GS로 표기됨)을 함유하는 링커를 갖는 직렬 2가 스카폴드의 SDS-PAGE 분석을 보여준다. 1가 M13 구축물은 레인 2에서 런닝되었고, 1개의 GS 유닛을 갖는 이량체 구축물(C1)은 레인 3 및 7에서 런닝되었고, 3개의 GS 유닛을 갖는 이량체 구축물(C2)은 레인 4 및 8에서 런닝되었고, 5개의 GS 유닛을 갖는 이량체 구축물(C3)은 레인 5 및 9에서 런닝되었고, 7개의 GS 유닛을 갖는 이량체 구축물(C4)은 레인 6 및 10에서 런닝되었다. 샘플은 비-환원된 조건(레인 2 내지 6) 및 환원된 조건(레인 7 내지 10)에서 런닝되었다.

도 2c는 뮤린 CD40L 특이적 1가(M13) 또는 2가 직렬 스카폴드(M13-xGS-M13, 이때 x는 1개, 3개, 5개 또는 7개의 Gly₄Ser 유닛을 함유하는 링커를 갖는 2가 스카폴드에 상응하는 1, 3, 5 또는 7임)에 의한 바이오센서 칩 상에 고정된 뮤린 CD40 수용체에 결합하는 뮤린 CD40L의 경쟁 억제력을 보여준다. 다양한 구축물들에 대한 절반 최대 억제 농도(IC_{50})도 표시되어 있다.

도 2d는 B 세포 상에서의 뮤린 CD40L-유도된 CD86 발현에 대한 뮤린 CD40L 특이적 Tn3 1가(M13) 및 2가 직렬 스카폴드의 억제 효과를 보여준다. 모든 Tn3 구축물 및 MR1 항-뮤린 CD40L 항체에 대한 IC_{50} 값이 제공되어 있다.

도 3a는 HEK293 세포에서 마우스 혈청 알부민(MSA)에 융합된 뮤린 CD40L 특이적 직렬 2가 Tn3 스카폴드의 높은

발현 수준을 보여준다. 이들 구축물은 Tn3 스카폴드 유닛들 사이의 링커에서 1개의 (G₄S) 반복부를 갖고 Tn3 스카폴드와 MSA 사이의 링커에서 3개의 (G₄S) 반복부를 갖는다. 추가로, 상기 구축물은 잠재적인 N-연결된 글리코실화 부위를 제거하기 위해 각각의 M13 및 M31 스카폴드 내에 N49Q 돌연변이를 함유한다. 형질감염으로부터 3일 또는 6일 후 수득된 10 μ l 배양물 상청액이 공지된 양의 정제된 단백질과 함께 SDS-PAGE 겔 상에서 런닝되었다. 발현 수준은 형질감염으로부터 6일 후 200 mg/l 로 평가되었다. 정제는 C 말단 His-태그를 통해 IMAC에 의해 수행되었다.

도 3b는 D10G4.1/PBMC 세포 분석을 이용함으로써 측정된 뮤린 CD40L(MuCD40L)-유도된 CD86 발현의 억제를 보여준다. CD40L 특이적 직렬 2가 Tn3 스카폴드(M13-1GS-M13), 마우스 혈청 알부민(MSA)에 융합된 동일한 구축물(M13-1GS-M13-MSA) 및 MR1 항-뮤린 CD40L 단일클론 항체가 분석되었다. 모든 구축물들에 대한 IC₅₀ 값이 제공되어 있다.

도 3c는 D10G4.1/PBMC 세포 분석을 이용함으로써 측정된 뮤린 CD40L(MuCD40L)-유도된 CD86 발현의 억제를 보여준다. 마우스 혈청 알부민(MSA)에 융합된 CD40L 특이적 직렬 2가 Tn3 스카폴드(M13-1GS-M13)(M13-1GS-M13-MSA), MSA에 접합된 M13 스카폴드의 친화성 성숙된 변이체(M31Mono-MSA), MSA에 접합된 M31 친화성 최적화된 변이체를 포함하는 직렬 2가 스카폴드(M31-1GS-M31-MSA), 뮤린 CD40L에 결합하지 않는 음성 대조군 직렬 2가 스카폴드(D1-1GS-D1-MSA) 및 MR1 단일클론 항체가 분석되었다. IC₅₀ 값이 제공되어 있다.

도 4a는 ELISA에 의해 측정되었을 때 마우스에서 여러 뮤린 CD40L 특이적 구축물들의 약동학을 보여준다. 각각의 구축물에 대한 혈장 반감기(t_{1/2})가 표시되어 있다.

도 4b는 ELISA에 의해 측정되었을 때 사이노몰구스 원숭이에서 인간 CD40L 특이적 342-HSA, 및 위치 463에서 Asn에 의한 Leu의 치환(L463N) 및 위치 524에서 Leu에 의한 Lys의 치환(K524L)을 포함하는 342-HSA 변이체의 약동학을 보여준다.

도 5a는 양 적혈구 세포(SRBC) 면역화 분석으로부터 배중심(GC)에서의 B 세포 성숙을 보여준다. MR1 단일클론 항-뮤린 CD40L 항체가 분석되었다.

도 5b는 양 적혈구 세포(SRBC) 면역화 분석으로부터 배중심(GC)에서의 B 세포 성숙을 보여준다. MSA에 융합된 M31-유도된 1가 구축물 및 2가 구축물이 분석되었다. MSA에 접합된 D1-D1 2가 구축물이 음성 대조군으로서 사용되었다.

도 5c는 양 적혈구 세포(SRBC) 면역화 분석으로부터 말초(비-GC)에서의 B 세포 성숙을 보여준다. MSA에 융합된 M31-유도된 1가 구축물 및 2가 구축물이 분석되었다. MSA에 접합된 D1-D1 2가 구축물이 음성 대조군으로서 사용되었다.

도 5d는 양 적혈구 세포(SRBC) 면역화 분석으로부터 CD4 양성 세포의 백분율(% CD4) 및 수(# CD4)를 보여준다. MSA에 융합된 M31-유도된 1가 구축물 및 2가 구축물, 및 MR1 항-CD40L 단일클론 항체가 분석되었다. MSA에 접합된 D1-D1 2가 구축물이 음성 대조군으로서 사용되었다.

도 5e는 양 적혈구 세포(SRBC) 면역화 분석으로부터 CD44hi 양성 세포의 백분율(% CD44hi) 및 수(# CD44hi)를 보여준다. MSA에 융합된 M31-유도된 1가 구축물 및 2가 구축물, 및 MR1 항-CD40L 단일클론 항체가 분석되었다. MSA에 접합된 D1-D1 2가 구축물이 음성 대조군으로서 사용되었다.

도 5f는 양 적혈구 세포(SRBC) 면역화 분석으로부터 항-SRBC IgG의 양을 보여준다. MSA에 융합된 M31-유도된 1가 구축물 및 2가 구축물이 분석되었다. MSA에 접합된 D1-D1 2가 구축물이 음성 대조군으로서 사용되었다.

도 5g는 KLH 특이적 T 세포 의존적 항체 반응(TDAR) 모델로부터 항-KLH IgM 역가를 보여준다. HSA에 융합된 342-유도된 1가 구축물 및 2가 구축물이 분석되었다.

도 5h는 KLH 특이적 T 세포 의존적 항체 반응(TDAR) 모델로부터 항-KLH IgG 역가를 보여준다. HSA에 융합된 342-유도된 1가 구축물 및 2가 구축물이 분석되었다.

도 6a는 주르카트(Jurkat) D1.1 세포에 의해 자극된 CD19 양성 인간 PBMC 상에서의 인간 CD40L-유도된 CD86 발현에 대한 인간 CD40L 특이적 1가 Tn3 단량체 스카폴드 309 및 311의 억제 효과를 보여준다.

도 6b는 인간 CD40L에 의해 자극된 B 세포 증식에 대한 인간 CD40L 특이적 1가 Tn3 단량체 스카폴드 309 및 311

의 억제 효과를 보여준다.

도 6c는 T/B 세포 공-배양에서 혈장 세포 수에 대한 인간 CD40L 특이적 1가 Tn3 단량체 스카폴드 309 및 311의 억제 효과를 보여준다. Tn3 스카폴드 309는 활성화된 일차 T 세포에 결합한다는 것도 FACS에 의해 밝혀졌다(테이터는 나타내지 않음). D1 스카폴드("Neg Tn3")가 대조군으로서 사용되었다. aCD40L(RE) 및 aCD40L(Bio)(바이오젠의 5c8 항-인간 CD40L 단일클론 항체)로 표기된, CD40L에 대한 2개의 단일클론 항체들도 대조군으로서 사용되었다.

도 7a는 인간 CD40L 특이적 1가 Tn3 스카폴드 309 및 311이 유사한 생체물리학 특성을 갖는다는 것을 보여준다. 두 스카폴드들은 SEC에 의해 측정되었을 때 단일분산되어 있다.

도 7b는 인간 CD40L 특이적 1가 Tn3 스카폴드 309 및 311이 유사한 생체물리학 특성을 갖는다는 것을 보여준다. 두 스카폴드들은 시차주사열량측정(DSC)에 의해 측정되었을 때 모 Tn3 스카폴드(그래프에서 Tn3(야생형)으로 표기됨)와 유사한 열안정성을 갖는다.

도 8a는 주르카트 D1.1 세포에 의해 자극된 CD19 양성 인간 PBMC 상에서의 인간 CD40L-유도된 CD86 발현의 억제를 보여준다. 1가(311) 및 2가(311_3GS 및 311_7GS) 인간 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드가 분석되었다. 각각의 구축물에 대한 IC₅₀ 값이 표시되어 있다.

도 8b는 주르카트 D1.1 세포에 의해 자극된 CD19 양성 인간 PBMC 상에서의 인간 CD40L-유도된 CD86 발현의 억제를 보여준다. 1가(309) 및 2가(309_3GS 및 309_7GS) 인간 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드뿐만 아니라 바이오젠의 5c8 항-인간 CD40L 단일클론 항체도 분석되었다. 각각의 구축물 및 항체에 대한 IC₅₀ 값이 표시되어 있다.

도 9a는 인간 혈청 알부민(HSA)에 융합된 대표적인 인간 CD40L 특이적 직렬 2가 Tn3 스카폴드의 디자인을 보여준다. "GGGGG"(서열번호 148) 및 "GGGGA"(서열번호 149)는 "GGGGS" 링커(서열번호 147)에 대한 대안적인 링커가다.

도 9b는 IEX 컬럼 상에서의 293F 세포로부터의 시험 정제를 보여준다. 쇼울더 분획(주 피크의 10% 미만)은 링커에 존재하는 세린 잔기에 연결된 O-글리코실화된 단백질을 함유한다.

도 9c는 주르카트 D1.1 세포에 의해 자극된 CD19 양성 인간 PBMC 상에서의 인간 CD40L-유도된 CD86 발현의 억제를 보여준다. 2가 (309) 인간 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드, HSA에 융합된 동일한 스카폴드 및 바이오젠의 5c8 항-인간 CD40L 단일클론 항체가 분석되었다.

도 9d는 주르카트 D1.1 세포에 의해 자극된 CD19 양성 인간 PBMC 상에서의 인간 CD40L-유도된 CD86 발현의 억제를 보여준다. 3개의 2가 (309) 인간 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드가 시험되었다. 3개의 (G₄S) 반복부가 인간 CD40L 특이적 서브유닛들(본 실시예에서 309) 사이의 링커에 존재하였지만, 309 서브유닛과 HSA 사이의 링커는 1개 내지 3개의 (G₄S) 반복부이었다. 바이오젠의 5c8 항-인간 CD40L 단일클론 항체도 분석되었다.

도 10a는 CD40L 결합에 대한 309(좌측 패널) 및 311(우측 패널)의 루프 서열의 돌연변이의 효과를 보여준다. 결합은 결합 분석에서의 신호 강도를 표시한다. WT는 원래의 리드(lead) 서열(모 Tn3 서열)을 갖는 변이체인 반면, BC, DE 및 FG는 BC, DE 또는 FG 루프 서열이 인간 테나신 C에 존재하는 모 Tn3 서열로 교체되어 있는 변이체를 표시한다.

도 10b는 주르카트 D1.1 세포에 의해 자극된 CD19 양성 인간 PBMC 상에서의 인간 CD40L-유도된 CD86 발현에 의해 측정되었을 때 친화성 최적화된 스카폴드 패널의 억제 프로파일을 보여준다. 인간 CD40L 특이적 Tn3 클론 309 단량체가 친화성 최적화되었다. 친화성 최적화된 단량체는 클론 340 내지 클론 349로 표기되어 있다. 클론 309wtFG 구축물은 모 Tn3 스카폴드의 FG 루프로 교체된 전체 FG 루프를 가졌다. 5c8 항-CD40L 단일클론 항체도 분석되었다.

도 10c는 주르카트 D1.1 세포에 의해 자극된 CD19 양성 인간 PBMC 상에서의 인간 CD40L-유도된 CD86 발현에 의해 측정되었을 때 억제 프로파일을 보여준다. 인간 CD40L 특이적 Tn3 311 단량체, 이의 K4E 변이체 및 음성 대조군의 프로파일이 표시되어 있다.

도 10d는 주르카트 D1.1 세포에 의해 자극된 CD19 양성 인간 PBMC 상에서의 인간 CD40L-유도된 CD86 발현에 의해 측정되었을 때 억제 프로파일을 보여준다. 인간 CD40L 특이적 Tn3 311K4E 단량체, 친화성 최적화된 311K4E_12 단량체 및 5c8 항-CD40L 단일클론 항체의 프로파일이 표시되어 있다. 상기 2개의 구축물 및 항체에

대한 IC₅₀도 제시되어 있다.

도 11a 및 11b는 모 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드 309, 309FGwt 변이체 및 친화성 최적화된 변이체 340 내지 349의 다중 서열 정렬을 보여준다. 아미노산 잔기 1 내지 42는 도 11a에 표시되어 있고, 아미노산 잔기 43 내지 83은 도 11b에 표시되어 있다. 변이체 루프는 음영으로 표시되어 있다. 컨센서스 아미노산 서열은 다중 서열 정렬 아래에 제시되어 있다. 정렬된 서열은 Tn3 스카폴드 클론 309(서열번호 20), 309FGwt(서열번호 22), 340(서열번호 24), 341(서열번호 26), 342(서열번호 28), 343(서열번호 30), 344(서열번호 32), 345(서열번호 34), 346(서열번호 36), 347(서열번호 38), 348(서열번호 40) 및 349(서열번호 42)의 아미노산 서열에 상응한다.

도 12a 및 도 12b는 모 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드 311, 311K4E 변이체 및 친화성 최적화된 변이체 311K4E_1 내지 311K4E_21의 다중 서열 정렬을 보여준다. 아미노산 잔기 1 내지 44는 도 12a에 표시되어 있고, 아미노산 잔기 45 내지 87은 도 12b에 표시되어 있다. 변이체 루프는 음영으로 표시되어 있다. 음영으로 표시된 루프 외부의 아미노산 변이는 상자로 표시되어 있다. 컨센서스 아미노산 서열은 다중 서열 정렬 아래에 제시되어 있다. 정렬된 서열은 Tn3 스카폴드 클론 311(서열번호 44), 311K4E(서열번호 46), 311K4E_1(서열번호 48), 311K4E_2(서열번호 50), 311K4E_2(서열번호 52), 311K4E_3(서열번호 54), 311K4E_4(서열번호 56), 311K4E_5(서열번호 58), 311K4E_7(서열번호 60), 311K4E_8(서열번호 62), 311K4E_9(서열번호 64), 311K4E_10(서열번호 66), 311K4E_11(서열번호 68), 311K4E_12(서열번호 70), 311K4E_13(서열번호 72), 311K4E_14(서열번호 74), 311K4E_15(서열번호 76), 311K4E_16(서열번호 78), 311K4E_19(서열번호 80), 311K4E_20(서열번호 82) 및 311K4E_21(서열번호 84)의 아미노산 서열에 상응한다.

도 13은 인간 CD40 수용체를 발현하고 NfκB-루시페라제 레포터 구축물을 함유하는 HEK293 세포를 사용하는 인간 NfκB 억제 분석을 보여준다. 인간 CD40L의 첨가는 CD40L 결합 분자에 의해 억제될 수 있는 신호전달(루시페라제 활성화에 의해 측정됨)을 유발한다. CD40L 특이적 Tn3 스카폴드 340 및 342뿐만 아니라 5c8 항-CD40L 단일클론 항체도 분석되었다.

도 14는 인간 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드와 24h 항-CD3/28 활성화된 인간 CD4+ T 세포의 결합을 보여준다. HSA에 융합된 1가 342 스카폴드(342-HSA로 표기됨) 및 HSA에 융합된 2가 342 스카폴드(342-342-HSA로 표기됨)가 분석되었다.

도 15는 3일째 날 일차 인간 T/B 세포 증식의 억제를 보여준다. HSA에 융합된 1가 340 스카폴드(340-HSA), HSA에 융합된 1가 342 스카폴드(342-HSA) 및 HSA에 융합된 2가 342 스카폴드(342-342-HSA)가 분석되었다. 각각의 구축물에 대한 IC₅₀ 값이 표시되어 있다.

도 16a는 세척된 혈소판에 대한 응집 분석을 보여준다. 그래프는 5c8 단일클론 항체(600 nM)와 가용성 인간 CD40L(200 nM)의 면역 복합체(IC)와 함께 공여자(각각 상부 3개의 트레이스(trace)) ADP(0.5 μM, 1 μM 및 2 μM)에 대한 대표적인 ADP-유도된 응집 양성 대조군을 보여준다.

도 16b는 세척된 혈소판에 대한 응집 분석을 보여준다. 그래프는 (HSA에 융합되지 않은) 309-309 2가 스카폴드와 가용성 인간 CD40L의 미리 형성된 면역복합체가 사용되었을 때 응집의 결여를 보여준다. 인간 CD40L(가용성 형태)의 농도는 600 nM에서 일정하게 유지되었고, 스카폴드 구축물의 농도는 200 nM 내지 800 nM이었다.

도 16c는 세척된 혈소판에 대한 응집 분석을 보여준다. 그래프는 HSA에 융합된 342 1가 스카폴드와 가용성 인간 CD40L의 미리 형성된 면역복합체가 사용되었을 때 응집의 결여를 보여준다. 인간 CD40L(가용성 형태)의 농도는 600 nM에서 일정하게 유지되었고, 스카폴드 구축물의 농도는 100 nM 내지 400 nM이었다. 그래프는 바이오텐 5c8 단일클론 항체와 가용성 인간 CD40L의 면역복합체에 의해 유도된 신속한 응집도 보여준다.

도 17a는 CD40L 특이적 Tn3 309 단량체 스카폴드와 복합체를 형성한 가용성 CD40L의 결정 구조의 리본 표시를 보여준다. CD40L은 삼량체(폴리펩티드 A, B 및 C)를 형성한다. 각각의 309 스카폴드(폴리펩티드 D, E 및 F, 원으로 표시됨)는 2개의 CD40L 폴리펩티드와 접촉한다. 각각의 309 스카폴드와 제1 및 제2 CD40L 폴리펩티드 사이의 구체적인 접촉이 나열되어 있다. 이것은 구조의 "하향"도이다.

도 17b는 CD40L 특이적 Tn3 311K4E_12 단량체 스카폴드와 복합체를 형성한 가용성 CD40L의 결정 구조의 리본 표시를 보여준다. CD40L은 삼량체(폴리펩티드 A, B 및 C)를 형성한다. 각각의 311K4E_12 단량체 스카폴드(폴리펩티드 D, E 및 F, 원으로 표시됨)는 2개의 CD40L 폴리펩티드와 접촉한다. 각각의 311K4E_12 단량체 스카폴드와 제1 및 제2 CD40L 폴리펩티드 사이의 구체적인 접촉이 나열되어 있다. 이것은 구조의 "하향"도이다.

도 17c는 311K4E_12 및 309 스카폴드(원으로 표시됨)가 CD40L 삼량체 복합체의 상이한 부분에 위치하는 상이한

에피토프에 결합한다는 것을 나타내는 리본 표시를 보여준다. 두 스카폴드들이 CD40 수용체와 상호작용할 동일한 홈(groove)에서 결합한다. 이것은 구조의 "측면"도이다.

도 17d는 CD40L 특이적 Tn3 342 단량체 스카폴드와 복합체를 형성한 가용성 CD40L의 결정 구조의 리본 표시를 보여준다. 1개의 CD40L 및 1개의 342 단량체 스카폴드만이 표시되어 있다. 342 단량체 스카폴드와 제1 CD40L 폴리펩티드 사이의 구체적인 접촉이 나열되어 있다.

도 17e는 342 및 311K4E_12 스카폴드가 CD40L 삼량체 복합체의 상이한 부분에 위치하는 상이한 에피토프에 동시에 결합할 수 있다는 것을 나타내는 리본 표시를 보여준다. 두 스카폴드들이 CD40 수용체와 상호작용할 동일한 홈에서 결합한다. 이것은 구조의 "측면"도이다.

도 18a는 CD40L 특이적 Tn3 311K4E_12 단량체 스카폴드(서열번호 68)의 아미노산과 도 17a에 나타난 가용성 CD40L(서열번호 2) 분자에 의해 형성된 삼량체의 아미노산 사이의 접촉 위치를 보여준다. 각각의 스카폴드는 2개의 CD40L 분자와 접촉한다. CD40L 서열(서열번호 2)이 표시되어 있다. 점선 밑줄 = 세포질 도메인; 직선 밑줄 = 신호 고착제 II형 막 단백질; 이중 밑줄 = Tn3 스카폴드에 의해 공결정화된 부분; 어두운 음영 = Tn3과 접촉하는 제1 CD40L 상의 잔기; 밝은 음영 = Tn3과 접촉하는 제2 CD40L 상의 잔기.

도 18b는 CD40L 특이적 Tn3 309 단량체 스카폴드의 아미노산과 도 17b에 나타난 CD40L 삼량체의 아미노산 사이의 접촉 위치를 보여준다. 각각의 스카폴드는 2개의 CD40L 분자와 접촉한다. CD40L 서열(서열번호 2)이 표시되어 있다. 점선 밑줄 = 세포질 도메인; 직선 밑줄 = 신호 고착제 II형 막 단백질; 이중 밑줄 = Tn3 스카폴드에 의해 공결정화된 부분; 어두운 음영 = Tn3과 접촉하는 제1 CD40L 상의 잔기; 밝은 음영 = Tn3과 접촉하는 제2 CD40L 상의 잔기; 이중 상자로 표시된 잔기는 야생형 FG 루프를 갖는 클론에서 보존되어 있지 않을 가능성이 있는 309 스카폴드의 FG 루프와 접촉한다.

도 19의 패널 A는 크기 배제 수퍼텍스 200 10/300 GL 컬럼에 의한 Tn3 스카폴드(309 또는 311K4E_12), CD40L 및 이들 사이의 복합체의 용출의 예시적인 크로마토그램을 보여준다. 패널 B는 309-CD40L 복합체의 결정을 보여준다. 상기 결정은 최대 0.15 x 0.15 x 0.1 mm의 치수까지 성장된 결정이 표시되어 있다. 패널 C는 311K4E_12-CD40L 복합체의 결정을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0107] 정의

[0108] 본 발명을 더 상세히 기재하기 전에, 본 발명이 그 자체로 변경될 수 있는 특정 조성물 또는 방법 단계로 한정되지 않는다는 것을 이해해야 한다. 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서 사용된 바와 같이, 문맥이 달리 명시하지 않은 한, 단수형 "하나", "1개" 및 "상기"는 복수형 지시대상을 포함한다는 것을 인식해야 한다. 용어 "하나"(또는 1개)뿐만 아니라 "하나 이상" 및 "적어도 하나"도 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0109] 나아가, 본원에서 사용된 "및/또는"은 2개의 특정된 특징 또는 성분 각각이 나머지 하나와 함께 또는 나머지 하나 없이 구체적으로 개시된 것으로서 해석되어야 한다. 따라서, 본원에서 "A 및/또는 B"와 같은 어구에서 사용된 용어 "및/또는"은 "A 및 B", "A 또는 B", "A"(단독) 및 "B"(단독)을 포함하기 위한 것이다. 마찬가지로, "A, B 및/또는 C"와 같은 어구에서 사용된 용어 "및/또는"은 하기 실시양태들 각각을 포괄하기 위한 것이다: A, B 및 C; A, B 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A 및 B; B 및 C; A(단독); B(단독); 및 C(단독).

[0110] 달리 정의되어 있지 않은 한, 본원에서 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명과 관련된 분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 통상적으로 이해되는 의미와 동일한 의미를 갖는다. 예를 들면, 문헌(the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press); 문헌(The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press); 및 문헌(the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press)은 본 발명에서 사용된 많은 용어들의 일반적인 사전을 당업자에게 제공한다.

[0111] 단위, 접두사 및 부호는 국제단위계(SI)에 의해 허용된 형태로 표기된다. 수치 범위는 범위를 한정하는 숫자를 포함한다. 달리 표시되어 있지 않은 한, 아미노산 서열은 아미노에서 카복시 방향으로 좌측에서 우측으로 기재되어 있다. 본원에서 제공된 표제는 본 명세서를 전체적으로 참고함으로써 한정될 수 있는 본 발명의 다양한 양태 또는 실시양태의 한정이다. 따라서, 바로 아래에 정의된 용어들은 본 명세서를 전체적으로 참고함으로써 더 완전히 정의된다.

- [0112] 실시양태가 본원에서 용어 "포함하는"으로 기재되어 있는 경우에는 언제나 "로 구성된" 및/또는 "로 본질적으로 구성된"의 관점에서 기재된 다른 유사한 실시양태들도 제공된다는 것이 이해된다.
- [0113] 아미노산들은 본원에서 그들의 통상적으로 공지된 3-문자 부호, 또는 IUPAC-IUB 생화학 명명위원회에 의해 권장된 1-문자 부호에 의해 지칭된다. 마찬가지로, 뉴클레오타이드들은 그들의 통상적으로 허용된 1-문자 코드에 의해 지칭된다.
- [0114] 본원에서 사용된 용어 "에피토프"는 본 발명의 스카폴드에 결합할 수 있는 단백질 결정인자(determinant)를 지칭한다. 에피토프는 통상적으로 분자의 화학적 활성 표면 기, 예컨대, 아미노산 또는 당 측쇄로 구성되고, 통상적으로 특정 3차원 구조 특성뿐만 아니라 특정 전하 특성도 갖는다. 입체구조적 에피토프와 비-입체구조적 에피토프는 변성 용매의 존재 하에서 입체구조적 에피토프와의 결합이 상실되는 반면, 비-입체구조적 에피토프와의 결합은 상실되지 않는다는 점에서 구별된다.
- [0115] 용어 "피브로넥틴 유형 III(FnIII) 도메인", "FnIII 도메인" 및 "FnIII 스카폴드"는 서로에 대해 스스로 팩킹되어 단백질의 코어를 형성하는 2개의 베타 시트 사이에 분포되어 있는 7개 이상의 베타 가닥을 갖고 베타 가닥을 서로 연결하는 용매 노출된 루프를 추가로 함유하는 인간 피브로넥틴 III형 도메인에 대한 상동성을 나타내는 폴리펩티드를 지칭한다. 베타 가닥 샌드위치의 각각의 가장자리에 3개 이상의 이러한 루프가 존재하고, 이때 상기 가장자리는 베타 가닥의 방향에 수직인 단백질의 경계이다. 특정 실시양태에서, FnIII 도메인은 AB, BC, CD, DE, EF 및 FG로 표기된 6개의 루프 영역에 연결된 A, B, C, D, E, F 및 G로 표기된 7개의 베타 가닥을 포함하고, 이때 루프 영역은 각각의 베타 가닥을 연결한다.
- [0116] 본원에서 사용된 용어 "Tn3 스카폴드"는 하나 이상의 FnIII 스카폴드를 포함하는 분자를 지칭하고, 이때 A 베타 가닥은 서열번호 11을 포함하고, B 베타 가닥은 서열번호 12를 포함하고, C 베타 가닥은 서열번호 13 또는 14를 포함하고, D 베타 가닥은 서열번호 15를 포함하고, E 베타 가닥은 서열번호 16을 포함하고, F 베타 가닥은 서열번호 17을 포함하고, 베타 가닥 G는 서열번호 18을 포함하고, 이때 하나 이상의 루프는 "모 Tn3 스카폴드" 내의 루프의 비-천연 발생 변이체이다. 특정 실시양태에서, Tn3 모듈의 베타 가닥들 중 하나 이상의 베타 가닥은 C 베타 가닥 내의 시스테인 잔기(예를 들면, 서열번호 13 또는 14 내의 시스테인) 및 F 베타 가닥(서열번호 17) 내의 시스테인 잔기가 치환되지 않는다는 점을 제외하고 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0117] 본원에서 사용된 용어 "모 Tn3"은 서열번호 3을 포함하는 FnIII 스카폴드, 즉 인간 테나신 C의 제3 FnIII 도메인으로부터 유도된 열적으로 안정화된 시스테인-조작된 FnIII 스카폴드를 지칭한다.
- [0118] 용어 "다량체" 또는 "다량체 스카폴드"는 연결된 2개 이상의 FnIII 스카폴드를 포함하는 분자를 지칭한다. 다량체 스카폴드를 형성하는 스카폴드는 각각의 스카폴드가 독립적으로 작용하게 하는 링커를 통해 연결될 수 있다.
- [0119] 용어 "단량체", "단량체 서브유닛" 또는 "단량체 스카폴드"는 1개의 FnIII 스카폴드만을 포함하는 분자를 지칭한다.
- [0120] 본원에서 사용된 용어 "CD40L 특이적 단량체 서브유닛"은 "모 Tn3"으로부터 유도된 Tn3 단량체를 지칭하고, 이때 Tn3 단량체는 CD40L 또는 이의 단편, 예를 들면, CD40L의 가용성 형태에 특이적으로 결합한다.
- [0121] 용어 "DNA"는 2개 이상의 공유결합된 천연 발생 또는 변경된 데옥시리보뉴클레오타이드로 구성된 서열을 지칭한다.
- [0122] 용어 "융합 단백질"은 (ii) 제2 상이한 단백질(즉, "이종" 단백질)에 연결된 (i) 하나 이상의 본 발명의 스카폴드를 포함하는 단백질을 지칭한다.

표 1

“모 Tn3”의 성분의 서열 및 서열번호

명칭/간단한 설명	서열	서열번호
Tn3	IEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGCE LTYGKIDVPGDRTTIDLTEENQYSI GNLKPDTEYEVSLICRRGDMSSNPA KETFTT (이황화 결합의 cys 잔기는 밑줄로 표 시되어 있다)	3
테나신 C의 제3 FnIII, AB 루프(Tn3)	KDVTDDTT	4
테나신 C의 제3 FnIII, BC 루프(Tn3)	FKPLAEIDG	5
테나신 C의 제3 FnIII, CD 루프(Tn3)	KDVPGDR	6
테나신 C의 제3 FnIII, DE 루프(Tn3)	TEENQ	7
테나신 C의 제3 FnIII, EF 루프(Tn3)	GNLKPDTE	8
테나신 C의 제3 FnIII, FG 루프(Tn3)	RRGDMSSNPA	9
테나신 C의 제3 FnIII, 베타 가닥 A(Tn3)	RLDAPSQIEV	10
테나신 C의 제3 FnIII, 베타 가닥 A(Tn3) N-말단 절두	IEV	11
테나신 C의 제3 FnIII, 베타 가닥 B(Tn3)	ALITW	12
테나신 C의 제3 FnIII, 베타 가닥 C(Tn3 변이체)	CELAYGI	13
테나신 C의 제3 FnIII, 베타 가닥 C(Tn3)	CELTGYI	14
테나신 C의 제3 FnIII, 베타 가닥 D(Tn3)	TTIDL	15
테나신 C의 제3 FnIII, 베타 가닥 E(Tn3)	YSI	16
테나신 C의 제3 FnIII, 베타 가닥 F(Tn3)	YEVSLIC	17
테나신 C의 제3 FnIII, 베타 가닥 G(Tn3)	KETFTT	18

[0123]

[0124]

용어 "이중 모이어티"는 본 발명의 Tn3 스카폴드에서의 조성물의 첨가를 표시하기 위해 사용되고, 이때 상기 조성물은 통상적으로 FnIII 도메인의 부분이 아니다. 예시적인 이중 모이어티는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 세포독성제, 방사성 핵종, 조영제, 비오틴, 이량체화 도메인(예를 들면, 류신 지퍼 도메인), 인간 혈청 알부민(HSA) 또는 이의 FcRn 결합 부분, 항체의 도메인 또는 단편(예를 들면, 항체 가변 도메인, CH1 도메인, C_{카파} 도메인, C_{람다} 도메인, CH2, 또는 CH3 도메인), 단일쇄 항체, 도메인 항체, 알부민 결합 도메인, IgG 분자, 효소, 리간드, 수용체, 결합 펩티드, 비-FnIII 스카폴드, 에피토프 태그, 재조합 폴리펩티드 중합체, 사이토카인 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는 단백질, 펩티드, 단백질 도메인, 링커, 약물, 독소, 조영제, 방사성 화합물, 유기 중합체 및 무기 중합체, 및 FnIII 도메인 자체에 내재되지 않은 활성을 제공할 임의의 다른 조성물을 포함한다.

[0125]

본원에서 사용된 "링커"는 2개 이상의 스카폴드를 연결시키거나 연결시키는 임의의 분자 조립을 지칭한다. 링커는 스카폴드 내의 모듈들 사이의 "스페이서"로서 작용하는 기능을 갖는 분자일 수 있거나, 추가 기능을 갖는 분자(즉, "기능성 모이어티")일 수도 있다. "이중 모이어티"의 정의에 포함되는 분자는 링커로서도 작용할 수 있다.

[0126]

용어 "연결된" 및 "융합된"은 상호교환가능하게 사용된다. 이들 용어들은 화학적 접합 또는 재조합 수단을 포함하는 임의의 수단에 의한 2개 이상의 스카폴드, 이중 모이어티 또는 링커를 함께 연결하는 것을 지칭한다.

[0127]

용어 "도메인" 또는 "단백질 도메인"은 종종 단백질의 나머지와 독립적으로 안정한 3차원 구조로 폴딩될 수 있고 특정 기능을 부여받을 수 있는 단백질의 영역을 지칭한다. 이 구조는 원래의 단백질 내에서의 도메인의 기능과 관련된 특정 기능, 예를 들면, 효소 활성, 또 다른 분자에 대한 인식 모티프의 생성, 또는 단백질이 단백질의 특정 환경에 존재하는 데에 필요한 구조 성분들의 제공을 유지한다. 단백질 패밀리 내에서 및 관련된 단백질 수퍼패밀리 내에서, 단백질 도메인은 진화적으로 보존된 영역일 수 있다. 다량체 스카폴드의 성분을 기술할 때, 용어 "도메인", "단량체성 스카폴드", "단량체 서브유닛" 및 "모듈"은 상호교환적으로 사용될 수 있다. "천연 FnIII 도메인"은 살아있는 유기체에 의해 코딩된 임의의 비-재조합 FnIII 도메인을 의미한다.

[0128]

"단백질 서열" 또는 "아미노산 서열"은 폴리펩티드의 아미노산 구성요소가 아미노 말단에서 카복실 말단 방향으로 선형으로 표시되어 있는 것을 의미하고, 이때 상기 표시에서 서로 인접하는 잔기들은 폴리펩티드의 일차 구

조에서 인접한다.

- [0129] 용어 "핵산"은 임의의 2개 이상의 공유결합된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 지칭하다. 본원에서 사용된 바와 같이, 이 용어는 DNA, RNA 및 PNA를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 본원에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0130] 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 단일 핵산뿐만 아니라 다수의 핵산도 포괄하기 위한 것이고, 단리된 핵산 분자 또는 구축물, 예를 들면, 메신저 RNA(mRNA) 또는 플라스미드 DNA(pDNA)를 지칭한다. 용어 "단리된" 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드는 그의 천연 환경으로부터 제거된 핵산 분자, DNA 또는 RNA를 지칭한다. 예를 들면, 벡터 내에 함유된 본 발명의 스카폴드를 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드는 본 발명의 목적을 위해 단리된 것으로서 간주된다. 단리된 폴리뉴클레오타이드의 추가 예로는 이중 숙주 세포에서 유지된 재조합 폴리뉴클레오타이드, 또는 용액 중의 (부분적으로 또는 실질적으로) 정제된 폴리뉴클레오타이드가 있다. 단리된 RNA 분자는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 생체내 또는 시험관내 RNA 전사체를 포함한다. 본 발명에 따른 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산은 합성에 의해 제조된 이러한 분자를 추가로 포함한다. 또한, 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산은 조절 요소, 예컨대, 프로모터, 리보솜 결합 부위 또는 전사 종결요소일 수 있거나 이러한 요소를 포함할 수 있다.
- [0131] 용어 "약학적으로 허용가능한"은 유의한 불리한 의학적 결과 없이 동물(예를 들면, 포유동물)에게 투여될 수 있는 화합물 또는 단백질을 지칭한다.
- [0132] 용어 "생리학적으로 허용가능한 담체"는 치료된 숙주에 대한 유의한 유해한 영향을 미치지 않고 그와 함께 투여되는 화합물의 치료 성질을 유지하는 담체를 지칭한다. 한 예시적인 생리학적으로 허용가능한 담체는 생리식염수이다. 다른 생리학적으로 허용가능한 담체 및 이들의 제제는 당업자에게 공지되어 있고, 예를 들면, 본원에 참고로 도입되는 문헌(Remington's Pharmaceutical Sciences, (18th edition), ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, Pa.)에 기재되어 있다.
- [0133] "폴리펩티드"는 길이, 번역 후 변경 또는 기능과 관계없이 아미드 결합(펩티드 결합)에 의해 선형으로 연결된 2개 이상의 아미노산으로 구성된 임의의 서열을 의미한다. "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 따라서, 펩티드, 디펩티드, 트리펩티드 또는 올리고펩티드는 "폴리펩티드"의 정의 내에 포함되고, 용어 "폴리펩티드"는 이들 용어들 중 임의의 용어 대신에 또는 이러한 용어와 상호교환적으로 사용될 수 있다. 또한, 용어 "폴리펩티드"는 글리코실화, 아세틸화, 인산화, 아미드화, 공지된 보호/차단기에 의한 유도체화, 단백질용해성 절단, 또는 비-천연 발생 아미노산에 의한 변경을 포함하나 이들로 한정되지 않는 폴리펩티드의 발현 후 변경의 생성물을 지칭하기 위한 것이다. 폴리펩티드는 천연 생물학적 공급원으로부터 유래될 수 있거나 재조합 기술에 의해 제조될 수 있으나, 표시된 핵산 서열로부터 반드시 번역될 필요는 없다. 폴리펩티드는 화학적 합성을 포함하는 임의의 방식으로 발생될 수 있다.
- [0134] 본 발명의 폴리펩티드의 단편, 유도체, 유사체 또는 변이체, 및 이들의 임의의 조합물도 본 발명의 폴리펩티드로서 포함된다. 변이체는 천연적으로 발생할 수 있거나 비-천연적으로 발생할 수 있다. 비-천연 발생 변이체는 당분야에서 공지된 돌연변이유발 기법의 이용을 통해 제조될 수 있다. 변이체 폴리펩티드는 보존적 또는 비-보존적 아미노산 치환, 결실 또는 추가를 포함할 수 있다. 20개의 표준 아미노산의 하나 이상의 천연 발생 아미노산 유도체를 함유하는 펩티드도 "유도체"로서 포함된다.
- [0135] "무작위화된" 또는 "돌연변이된"은 주형 서열을 기준으로 하나 이상의 아미노산 변경(결실, 치환 또는 추가를 포함함)을 포함하는 것을 의미한다. "무작위화" 또는 "돌연변이유발"은 이러한 아미노산 변경을 서열 내로 도입하는 과정을 의미한다. 무작위화 또는 돌연변이는 일반적으로 핵산 코딩 서열의 의도적, 비의도적 또는 자발적 서열 변경을 통해 달성될 수 있고, 임의의 기법, 예를 들면, PCR, 오류-유발 PCR 또는 화학적 DNA 합성에 의해 발생될 수 있다. 용어 "무작위화", "무작위화된", "돌연변이유발", "돌연변이된" 등은 본원에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0136] "동족" 또는 "동족 비-돌연변이된 단백질"은 변이체 단백질 내로 도입된 아미노산 돌연변이를 제외하고 변이체 단백질과 서열 면에서 동일한 단백질을 의미하고, 이때 상기 변이체 단백질은 무작위화되거나 돌연변이된다.
- [0137] "RNA"는 2개 이상의 공유결합된 천연 발생 또는 변경된 리보뉴클레오타이드로 구성된 서열을 의미한다. 이 용어 내에 포함된 변경된 RNA의 일례는 포스포로티오에이트 RNA이다.
- [0138] 본원에서 사용된 용어 "본 발명의 스카폴드" 또는 "본 발명의 스카폴드"는 다량체 Tn3 스카폴드뿐만 아니라 다량체 Tn3 스카폴드도 지칭한다. 용어 "표적"은 본 발명의 특정 스카폴드에 의해 인식되는 화합물을 지칭한다. 용어 "표적" 및 "항원"은 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 본원에서, 예를 들면, 용어 "특이적으로

결합한다" 또는 "특이적 결합"에서 사용된 용어 "특이성"은 본 발명의 Tn3 스카폴드가 하나 이상의 항원 결합 도메인을 통해 하나 이상의 항원에 결합하는 상대적인 친화성을 지칭하고, 상기 결합은 하나 이상의 항원 결합 도메인과 하나 이상의 항원 사이의 어느 정도의 상보성을 필요로 한다. 이 정의에 따라, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 관련 없는 무작위 에피토프에 결합하는 것보다 더 용이하게 한 에피토프에 결합할 때 그 에피토프에 "특이적으로 결합한다"고 주장된다.

- [0139] "친화성 성숙된" 스카폴드는 변경(들)을 보유하지 않는 모 Tn3 스카폴드에 비해 에피토프에 대한 Tn3 스카폴드의 친화성을 개선하는 하나 이상의 변경을 일반적으로 루프 내에 갖는 스카폴드이다.
- [0140] 본원에서 사용된 용어 "친화성"은 본 발명의 특정 Tn3 스카폴드와 개별 에피토프의 결합 강도의 척도를 지칭한다.
- [0141] 본원에서 사용된 용어 "결합력"은 본 발명의 Tn3 스카폴드 집단과 특정 에피토프 사이의 복합체의 전체 안정성, 즉 다수의 Tn3 스카폴드와 항원의 결합의 기능적으로 조합된 강도를 지칭한다. 결합력은 특정 에피토프에 대한 개별 항원 결합 도메인의 친화성 및 본 발명의 스카폴드의 원자가 둘다와 관련되어 있다.
- [0142] 용어 "표적에 대한 작용"은 본 발명의 Tn3 스카폴드와 하나 이상의 표적의 결합, 이러한 결합으로부터 발생하는 생물학적 효과를 지칭한다. 이와 관련하여, Tn3 스카폴드 내의 다수의 항원 결합 유닛은 다양한 표적 및/또는 에피토프와 상호작용할 수 있고, 예를 들면, 2개의 표적들이 물리적으로 보다 가까이 있게 할 수 있고, 상이한 표적들과의 상호작용을 통해 대사 캐스케이드를 유발할 수 있다. CD40L과 관련하여, "표적에 대한 작용"은 예를 들면, CD40L의 하나 이상의 생물학적 활성의 향상, 자극 또는 활성화에 의해 달성된 효과를 지칭한다.
- [0143] 본원에서 사용된 용어 "원자가"는 본 발명의 스카폴드 내의 잠재적인 항원 결합 모듈의 수, 예를 들면, FnIII 모듈의 수를 지칭한다. 본 발명의 Tn3 스카폴드가 하나 초과와 항원 결합 모듈을 포함할 때, 각각의 결합 모듈은 동일한 표적 또는 상이한 표적에서 예를 들면, 동일한 에피토프 또는 상이한 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0144] 본원에서 사용된 용어 "이황화 결합"은 2개의 황 원자들 사이에 형성된 공유결합을 포함한다. 아미노산 시스템은 제2 티올기와 함께 이황화 결합 또는 가교를 형성할 수 있는 티올기를 포함한다.
- [0145] 용어 "면역글로불린" 및 "항체"는 생화학적으로 구별될 수 있는 폴리펩티드의 다양한 넓은 클래스를 포함한다. 당업자는 중쇄가 감마, 뮤, 알파, 델타 또는 엡실론으로서 분류된다는 것을 인식할 것이다. 항체의 "클래스"를 각각 IgG, IgM, IgA, IgE 또는 IgD로서 결정하는 것은 이 쇄의 성질이다. 이들 클래스 각각의 변경된 버전은 당업자에게 용이하게 식별될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 온전한 항체, 변경된 항체, 항체 VL 또는 VL 도메인, CH1 도메인, C_{카파} 도메인, C_{람다} 도메인, Fc 도메인(하기 참조), CH2 또는 CH3 도메인을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0146] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "Fc 도메인"은 항체 불변 영역의 부분을 지칭한다. 전통적으로, 용어 Fc 도메인은 항체의 CH2, CH3 및 힌지 영역 쌍을 포괄하는 프로테아제(예를 들면, 파파인) 절단 생성물을 지칭한다. 본개시와 관련하여, 용어 Fc 도메인 또는 Fc는 제조 수단과 관계없이 면역글로불린 폴리펩티드의 CH2, CH3 및 힌지 영역의 전부 또는 부분을 포함하는 임의의 폴리펩티드(또는 이러한 폴리펩티드를 코딩하는 핵산)를 지칭한다.
- [0147] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "변경된 항체"는 천연 발생 항체가 아니도록 변경된 합성 형태의 항체, 예를 들면, 2개 이상의 중쇄 부분을 포함하되 2개의 완전한 중쇄를 포함하지 않는 항체(예를 들면, 도메인 결실 항체 또는 미니바디); 및 2개 이상의 항원들 또는 단일 항원의 상이한 에피토프들에 결합하도록 변경된 다중특이적(예를 들면, 이중특이적, 삼중특이적 등) 형태의 항체를 포함한다. 추가로, 용어 "변경된 항체"는 다가 형태의 항체(예를 들면, 동일한 항원의 3개 이상의 카피에 대한 3가, 4가 등의 항체)를 포함한다(예를 들면, 문헌(Antibody Engineering, Kontermann & Dubel, eds., 2010, Springer Protocols, Springer) 참조).
- [0148] 용어 "생체내 반감기"는 그의 통상적인 의미, 즉 폴리펩티드의 생물학적 활성의 50%가 체내/표적 장기에 여전히 존재하는 시간, 또는 폴리펩티드의 활성이 그의 초기 값의 50%인 시간의 의미로 사용된다. 기능적 생체내 반감기의 측정의 대안으로서, "혈청 반감기", 즉 폴리펩티드 분자의 50%가 제거되기 전에 혈장 또는 혈류에서 순환하는 시간을 측정할 수 있다. 혈청 반감기의 측정은 기능적 생체내 반감기의 측정보다 종종 더 간단하고, 혈청 반감기의 크기는 통상적으로 기능적 생체내 반감기의 크기의 우수한 표시이다. 혈청 반감기에 대한 대안적 용어는 "혈장 반감기", 순환 반감기, 순환적 반감기, 혈청 제거, 혈장 제거 및 제거 반감기를 포함한다. 보유되는

기능성은 통상적으로 특정 단백질과 관련된 응고활성, 단백질용해, 보조인자 결합, 수용체 결합 활성 및 다른 종류의 생물학적 활성으로부터 선택된다.

- [0149] 기능적 생체내 반감기 또는 혈장 반감기와 관련하여 용어 "증가된"은 폴리펩티드의 관련 반감기가 필적할만한 조건 하에서 측정될 때 기준 물질(예를 들면, 비-변경된 폴리펩티드)의 반감기에 비해 통계적으로 유의하게 증가된다는 것을 표시하기 위해 사용된다.
- [0150] 기능적 생체내 반감기 또는 혈장 반감기와 관련하여 용어 "감소된"은 폴리펩티드의 관련 반감기가 필적할만한 조건 하에서 측정될 때 기준 물질(예를 들면, 비-변경된 폴리펩티드)의 반감기에 비해 통계적으로 유의하게 감소된다는 것을 표시하기 위해 사용된다.
- [0151] 본원에서 사용된 용어 "발현"은 유전자가 생화학적 물질, 예를 들면, 본 발명의 스카폴드 또는 이의 단편을 생성하는 과정을 지칭한다. 상기 과정은 일시적 발현 및 안정한 발현 둘다뿐만 아니라 유전자 녹다운도 포함하나 이들로 한정되지 않는, 세포 내에서의 유전자의 기능적 존재의 임의의 발현양상을 포함한다. 이것은 하나 이상의 mRNA로의 유전자의 전사, 및 하나 이상의 폴리펩티드로의 이러한 mRNA의 번역을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 최종 원하는 생성물이 생화학적 물질인 경우, 발현은 생화학적 물질 및 임의의 전구체의 생성을 포함한다.
- [0152] "발현 생성물"은 핵산, 예를 들면, 유전자의 전사에 의해 생성된 메신저 RNA, 또는 폴리펩티드일 수 있다. 본원에 기재된 발현 생성물은 전사 후 변경, 예를 들면, 폴리아데닐화를 갖는 핵산; 또는 번역 후 변경, 예를 들면, 메틸화, 글리코실화, 지질의 추가, 다른 단백질 서브유닛과의 연결, 단백질용해성 절단 등을 갖는 폴리펩티드를 추가로 포함한다.
- [0153] 용어 "벡터" 또는 "발현 벡터"는 숙주 세포 내로 도입하고 원하는 발현 생성물을 숙주 세포에서 발현하기 위한 비히클로서 본 발명에 따라 사용되는 벡터를 의미하기 위해 본원에서 사용된다. 당업자에게 공지된 바와 같이, 이러한 벡터는 플라스미드, 파지, 바이러스 및 레트로바이러스로 구성된 군으로부터 용이하게 선택될 수 있다. 일반적으로, 본 발명에 적합한 벡터는 선택 마커, 원하는 핵산의 클로닝을 용이하게 하기에 적합한 제한 부위, 및 진핵 또는 원핵 세포로 들어가고/가거나 진핵 또는 원핵 세포에서 복제하는 능력을 포함할 것이다.
- [0154] 용어 "숙주 세포"는 재조합 DNA 기법을 이용함으로써 구축되고 하나 이상의 발현 생성물을 코딩하는 벡터를 보유하는 세포를 지칭한다. 재조합 숙주로부터 발현 생성물을 분리하는 과정의 설명에서, 용어 "세포" 및 "세포 배양물"은, 명확히 달리 특정되어 있지 않은 한, 발현 생성물의 공급원을 표시하기 위해 상호교환적으로 사용된다(즉, "세포"로부터의 발현 생성물의 회수는 원심분리된 전체 세포로부터의 회수, 또는 배지 및 현탁된 세포 둘다를 함유하는 세포 배양물로부터의 회수를 의미한다).
- [0155] 본원에서 사용된 용어 "치료한다" 또는 "치료"는 치료적 처치 및 예방적 또는 방지적 조치 둘다를 지칭하고, 이때 목적은 대상체에서 원하지 않는 생리학적 변화 또는 장애, 예컨대, 염증성 질환 또는 병태의 진행을 예방하거나 늦추는(경감시키는) 것이다. 유리한 또는 원하는 임상 결과는 검출가능하든 아니면 검출불가능하든 관계없이 증상의 완화, 질환 정도의 감소, 질환의 안정화(즉, 악화되지 않는) 상태, 질환 진행의 지연 또는 늦춤, 질환 상태의 호전 또는 경감, 및 (부분적인 또는 전체적인) 관해를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0156] 또한, 용어 "치료"는 치료를 받지 않은 경우 예측된 생존에 비해 생존의 연장을 의미한다. 치료가 필요한 대상체는 병태 또는 장애를 이미 갖는 대상체뿐만 아니라 상기 병태 또는 장애를 갖기 쉬운 대상체, 또는 상기 병태 또는 장애가 예방되어야 할 대상체도 포함한다.
- [0157] 용어 "대상체", "개체", "동물", "환자" 또는 "포유동물"은 진단, 예후 또는 치료가 요구되는 임의의 개체, 환자 또는 동물, 특히 포유동물 대상체를 지칭한다. 포유동물 대상체는 인간, 가축, 농장 동물, 및 동물원, 스포츠 또는 애완 동물, 예컨대, 개, 고양이, 기니아 피그, 토끼, 래트, 말, 소, 젖소 등을 포함한다.
- [0158] 본원에서 사용된 용어 "CD40L"은 T 세포의 표면 상에서 발현된 CD40L, 재조합적으로 발현된 CD40L, 이. 콜라이 또는 다른 적합한 재조합 단백질 발현 시스템으로부터 발현되고 정제된 CD40L, 글리코실화 결여된 CD40L, 및 CD40L의 가용성 단편을 지칭하나 이들로 한정되지 않는다. 본원에서 사용된 바와 같이, "CD40L"은 메가(Mega)40L도 지칭한다. 메가CD40L™은 2개의 삼량체 CD40 리간드가 ACRP30/아디포넥틴의 콜라겐 도메인을 통해 인공적으로 연결되어 있는 고활성 구축물이다. 이 구축물은 생체내에서 CD40L의 천연 막-보조된 응집을 매우 효과적으로 시뮬레이션한다. 이것은 [CD40L+인헨서] 조합물(알렉시스 바이오케미칼스)에 대한 단순하고 동등하게 강력한 대체물을 제공한다. 용어 "CD40L"은 CD40L의 단량체 형태뿐만 아니라 올리고머 형태, 예를 들면, 삼량체

CD40L도 지칭한다.

- [0159] 용어 "CD40L"은 전장 CD40L, 및 단백질용해로부터 발생하는 CD40L의 가용성 단편, 예를 들면, 세포의 도메인 형태 둘다를 지칭한다. 인간 CD40L(Swissprot: P29965)의 막 결합된 형태 및 가용성 형태의 아미노산 서열은 각각 서열번호 1 및 서열번호 2에 제시되어 있다.
- [0160] 용어 "CD40L 길항제" 또는 "길항제"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 시험관내에서, 제자리에서 또는 생체내에서 CD40L 및 이의 생물학적 활성 변이체의 하나 이상의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 전체적으로 억제하거나, 감소시키거나 불활성화시키는 임의의 분자를 포함한다. 예를 들면, CD40L 길항제는 생체내에서, 시험관내에서 또는 제자리에서 CD40L과 그의 결합의 결과로서 하나 이상의 CD40L 분자, 또는 CD40 또는 다른 표적에 결합된 하나 이상의 CD40L 분자의 하나 이상의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 전체적으로 억제하거나, 감소시키거나 불활성화시키도록 작용할 수 있다.
- [0161] 용어 "CD40L 작용제" 또는 "작용제"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 시험관내에서, 제자리에서 또는 생체내에서 CD40L 및 이의 생물학적 활성 변이체의 하나 이상의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 전체적으로 향상시키거나, 자극하거나 활성화시키는 임의의 분자를 포함한다. 예를 들면, CD40L 작용제는 생체내에서, 시험관내에서 또는 제자리에서 CD40L과 그의 결합의 결과로서 하나 이상의 CD40L 분자, 또는 CD40R 또는 다른 표적에 결합된 하나 이상의 CD40L 분자의 하나 이상의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 전체적으로 향상시키거나, 자극하거나 활성화시키도록 작용할 수 있다.
- [0162] 본원에서 사용된 용어 "결정"은 원자들이 3차원에서 주기적으로 반복되는 패턴으로 정렬되어 전형적으로 격자를 형성하는 물질의 고체 상태의 한 형태를 지칭한다.
- [0163] 본원에서 사용된 용어 "공간군 대칭"은 결정성 격자의 병진 대칭과 점군 대칭을 조합하는 결정의 전체 대칭을 지칭한다. "공간군"은 격자 군을 확인시켜주는 대문자(P, A, F 등) 다음에 회전 및 반사 요소가 나사축 및 활주면을 포함하도록 확장되어 있는 점군 부호로 표기되어 있다. 주어진 공간군에 대한 점군 대칭이 공간군의 셀 중심 부호를 제거하고 모든 나사축을 유사한 회전축으로 교체하고 모든 활주면을 거울면으로 교체함으로써 확인될 수 있다는 것을 주목한다. 공간군에 대한 점군 대칭은 그의 역 격자의 진정한 대칭을 기술한다.
- [0164] 본원에서 사용된 용어 "단위 셀"은 규칙적으로 반복된 패턴으로 정렬된 결정 내의 원자를 의미하고, 이때 가장 작은 반복 단위가 단위 셀로서 지칭된다. 전체 구조는 3개의 길이(a, b 및 c) 및 3개의 각도(α , β 및 γ)를 특징으로 하는 단위 셀의 지식으로부터 재구성될 수 있다. 양 a 및 b는 셀의 기저 면의 길이이고, γ 는 이들 2개의 면들 사이의 각도이다. 양 c는 단위 셀의 높이이다. 각도 α 및 β 는 단위 셀의 기저 면과 수직 면 사이의 각도를 기술한다.
- [0165] 본원에서 사용된 용어 "기계 판독가능한 데이터 저장 매체"는 기계 판독가능한 데이터가 암호되어 있는 데이터 저장 물질을 의미하고, 이때 기계는 이러한 데이터의 사용에 대한 명령어로 프로그래밍되어 있고 데이터를 원하는 형식, 예를 들면, 분자 또는 분자 복합체의 그래픽 3차원 표현을 디스플레이할 수 있다.
- [0166] 용어 "X-선 회절 패턴"은 결정 내의 분자 또는 원자의 주기적인 조립의 X-선 산란으로부터 수득된 패턴을 의미한다. X-선 결정학은 X-선이 결정에 의해 회절된다는 사실을 활용하는 기법이다. X-선은 필적가능한 크기의 원자의 전자 구름에 의해 산란되기에 적당한 파장(옹스트롬 범위, 대략 10^{-8} cm)을 갖는다. 결정 내의 분자 또는 원자의 주기적인 조립의 X-선 산란으로부터 수득된 회절 패턴에 기초하여, 전자 밀도를 재구성할 수 있다. 회절 데이터 또는 보충 회절 실험으로부터 추가 위상 정보를 추출하여 재구성을 완결할 수 있다(결정학에서의 위상 문제). 모델을 데이터에 대해 정련된 실험 전자 밀도로 점진적으로 구축하여 정확한 분자 구조를 생성한다. X-선 구조 좌위는 공간에서 점의 유일한 배열을 한정한다. 당업자는 단백질 또는 단백질-리간드 복합체, 또는 이의 부분에 대한 구조 좌표 세트가 3차원에서의 배열을 한정하는 상대적인 점 세트를 한정한다는 것을 이해한다. 유사한 또는 동일한 배열은 전체적으로 상이한 좌표 세트에 의해 한정될 수 있되, 좌표들 사이의 거리 및 각도는 본질적으로 동일하게 남아있다. 추가로, 점의 배열은 각도를 본질적으로 동일하게 유지하면서 좌표들 사이의 거리를 스칼라 계수만큼 증가시키거나 감소시킴으로써 한정될 수 있다.
- [0167] 본원에서 사용된 용어 "결정 구조"는 결정성 물질에서 반복 원자 또는 분자 유닛의 3차원 또는 격자 공간 정렬을 지칭한다. 결정성 물질의 결정 구조는 X-선 결정학적 방법에 의해 확인될 수 있다(예를 들면, 문헌("Principles of Protein X-Ray Crystallography" by Jan Drenth, Springer Advanced Texts in Chemistry, Springer Verlag, 2nd ed., February 199, ISBN: 0387985875) 및 문헌("Introduction to Macromolecular

Crystallography" by Alexander McPherson, Wiley-Liss, Oct. 18, 2002, ISBN: 0471251224) 참조).

- [0168] 용어 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역(천연 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인할 수 있는 항체 또는 항체 단편의 생물학적 활성을 지칭하고 항체 동종형에 따라 달라진다. 항체 이펙터 기능의 예로는 C1q 결합 및 보체 의존적 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC); 식균작용; 세포 표면 수용체(예를 들면, B 세포 수용체)의 하향조절; 및 B 세포 활성화가 있다.
- [0169] 용어 "항체 의존적 세포 매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 특정 세포독성 세포(예를 들면, 천연 살해(NK) 세포, 호중구 및 대식세포) 상에 존재하는 Fc 수용체(FcR) 상에 결합된 분비된 Ig가 이들 세포독성 이펙터 세포로 하여금 항원 보유 표적 세포에 특이적으로 결합한 후 표적 세포를 세포독소로 살해할 수 있게 하는 형태의 세포독성을 지칭한다.
- [0170] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기술한다. FcR은 천연 서열 인간 FcR일 수 있다. FcR은 IgG 항체(감마 수용체)에 결합할 수 있고 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII 서브클래스의 수용체들(이들 수용체들의 대립형질 변이체 및 대안적으로 스플라이싱된 형태를 포함함)을 포함한다. 상기 용어는 신생아 수용체 FcRn도 포함한다.
- [0171] 용어 "컨센서스 서열"은 다수의 서열들이 정렬된 후 특정 위치에서 가장 공통된 아미노산을 보이는 단백질 서열을 지칭한다. 컨센서스 서열은 관련된 서열들이 서로 비교되는 다수의 서열 정렬의 결과를 표현하는 한 방식이다. 컨센서스 서열은 어떤 잔기가 각각의 위치에서 정렬에서 가장 풍부한 지, 및 각각의 위치에서의 가변성의 정도를 보여준다.
- [0172] 서론
- [0173] CD40L(CD154, CD40 리간드, gp39 또는 TBAM으로도 알려짐)은 33 kDa의 II형 막 당단백질(Swiss-ProtAcc-No P29965)이다. 추가로, (sCD40L 또는 가용성 CD40L로서도 공지된) 보다 짧은 18 kDa CD40L 가용성 형태가 존재한다. 이들 가용성 형태의 CD40L은 막 결합된 단백질의 단백질용해성 프로세싱에 의해 발생되지만, 가용성 종의 세포 활성화는 고차 올리고머화(예를 들면, 삼량체화)의 부재 하에서 약하다.
- [0174] 본 발명은 CD40L에 결합할 수 있는 재조합 비-천연 발생 단백질 스카폴드(Tn3 스카폴드)의 패밀리를 제공한다. 구체적으로, 본원에 기재된 단백질은 항체 가변 영역의 상보성 결정 영역("CDR")과 유사한 정의된 루프를 디스플레이하는 데에 사용될 수 있다. 이들 루프들을 무작위화하거나 제한적으로 진화시켜 다수의 표적 화합물들에 결합할 수 있는 다양성을 발생시킬 수 있다. Tn3 스카폴드는 단량체로서 사용될 수 있거나 CD40L에 결합할 수 있는 다량체 스카폴드로 조립될 수 있다.
- [0175] 특정 실시양태에서, 본 발명은 질환, 예컨대, 자가면역 질환(그러나, 이것으로 한정되지 않음)의 예방, 호전, 검출, 진단 또는 모니터링에 유용한 CD40L 특이적 결합체를 제공한다. 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드는 자가면역 질환 및 병태의 치료에 유용하다. 일부 실시양태에서, 자가면역 질환은 전신홍반루푸스(SLE), 류마티스성 관절염(RA), 다발성 경화증(MS), 염증성 장 질환(IBD) 및 동종이식 거부를 포함할 수 있으나, 이들로 한정되지 않는다.
- [0176] 본 발명의 Tn3 스카폴드는 인간 테나신 C의 제3 FnIII 도메인으로부터 유도된 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 하나 이상의 비-천연 발생 분자내 이황화 결합이 조작되어 있다. 본 발명의 Tn3 스카폴드를 구성하는 단량체 서브유닛들은 서로 독립적으로 정확히 폴딩되고, 그들의 결합 특이성 및 친화성을 보유하고, 단량체 스카폴드 각각은 그의 기능적 성질을 보유한다. 단량체 서브유닛이 고원자가 다량체 Tn3 스카폴드로 조립될 때, 단량체 서브유닛들은 서로 독립적으로 정확히 폴딩되고, 그들의 결합 특이성 및 친화성을 보유하고, 단량체들 각각은 그의 기능적 성질을 보유한다.
- [0177] 하나 초과인 단량체 서브유닛을 포함하는 본 발명의 Tn3 스카폴드는 다수의 에피토프들에 결합하여(예를 들면, (i) 단일 표적 내의 다수의 에피토프들에 결합하거나, (ii) 다수의 표적들 내의 단일 에피토프에 결합하거나, (iii) 한 표적의 상이한 서브유닛들 상에 위치하는 다수의 에피토프들에 결합하거나, (iv) 다수의 표적들 상의 다수의 에피토프들에 결합하여), 결합력을 증가시킬 수 있다.
- [0178] 추가로, 링커를 통해 다수의 단량체들 사이의 거리를 변경시킬 가능성으로 인해, 다량체 Tn3 스카폴드는 표면(동일한 세포/표면 또는 상이한 세포/표면) 상의 다수의 표적 분자들에 결합할 수 있다. 본 발명의 Tn3 다량체 스카폴드는 하나 초과인 표적에 동시적으로 결합하는 그들의 능력 때문에 다수의 경로들을 조절하고/하거나, 세포 표면 상의 수용체들을 가교연결하고/하거나, 별도의 세포 상의 세포 표면 수용체들에 결합하고/하거나, 표적

분자 또는 세포를 기질에 결합시키는 데에 사용될 수 있다.

- [0179] 추가로, 본 발명은 특정 표적에 대한 스카폴드의 친화성이 돌연변이를 통해 조절되어 있는 친화성 성숙된 스카폴드를 제공한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 스카폴드를 제조하는 방법뿐만 아니라 바람직한 물리화학적, 약학적 또는 면역학적 성질을 갖도록 스카폴드를 조작하는 방법도 제공한다. 나아가, 본 발명은 치료, 예방 및 진단 사용을 위한 이러한 스카폴드 및 방법의 용도를 제공한다.
- [0180] FnIII 구조 모티프
- [0181] 본 발명의 Tn3 스카폴드는 생명체 및 바이러스의 모든 3개 도메인들 및 다수의 단백질 클래스에 걸쳐 광범위하게 발견되는 도메인인 III형 피브로넥틴 모듈(FnIII)의 구조에 기초한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 스카폴드는 인간 테나신 C의 제3 FnIII 도메인으로부터 유도된다(국제 공보 제WO 2009/058379호로서 공개된 국제 특허출원 제PCT/US2008/012398호; 국제 공보 제WO 2011/130324호로서 공개된 국제 특허출원 제PCT/US2011/032184호; 및 국제 공보 제WO 2011/130328호로서 공개된 국제 특허출원 제PCT/US2011/032188호 참조).
- [0182] 한 특정 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 모 Tn3 스카폴드로부터 유도된 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다. 단량체의 전체 3차원 폴드는 낙타 및 낙타과(예를 들면, 라마)의 단일 도메인 항체에서 전체 항원 인식 유닛을 포함하는 가장 작은 기능성 항체 단편인 중쇄의 가변 영역(VH)의 전체 3차원 폴드와 밀접하게 관련되어 있다.
- [0183] 본 발명의 Tn3 단량체 서브유닛 및 테나신 C의 천연 FnIII 도메인은 동일한 3차원 구조, 즉 6개의 루프 영역들에 의해 연결된, 한 측면 상의 3개의 베타 가닥(A, B 및 E) 및 다른 측면 상의 4개의 베타 가닥(C, D, F 및 G)을 갖는 베타-샌드위치 구조를 특징으로 한다. 이들 루프 영역들은 각각의 루프의 N 말단 및 C 말단에 연결된 베타 가닥에 따라 표기된다. 따라서, AB 루프는 베타 가닥 A와 B 사이에 위치하고, BC 루프는 가닥 B와 C 사이에 위치하고, CD 루프는 베타 가닥 C와 D 사이에 위치하고, DE 루프는 베타 가닥 D와 E 사이에 위치하고, EF 루프는 베타 가닥 E와 F 사이에 위치하고, FG 루프는 베타 가닥 F와 G 사이에 위치한다. FnIII 도메인은 높은 친화성으로 특정 표적에 결합할 수 있는 단백질 스카폴드들의 다양한 풀(pool)의 발생을 용이하게 하는 무작위화를 견뎌내는 용매-노출된 루프를 보유한다.
- [0184] 본 발명의 한 양태에서, Tn3 단량체 서브유닛은 항체 가변 영역의 상보성 결정 영역(CDR)과 유사한 하나 이상의 루프를 무작위화하도록 디자인된 유도 진화를 받는다. 이러한 유도 진화 방법은 관심 있는 표적, 예를 들면, CD40L에 대한 높은 친화성을 갖는 항체 유사 분자를 생성한다.
- [0185] 추가로, 몇몇 실시양태에서, 본원에 기재된 Tn3 스카폴드는 이러한 도입된 루프에 결합하는 분자의 진화를 유도하기 위해 한정된 노출된 루프(예를 들면, 표적 결합에 기초하여 미리 무작위화되고 선택된 루프)를 디스플레이하는 데에 사용될 수 있다. 이러한 종류의 선택은 임의의 개별 CDR 유사 루프에 대한 인식 분자, 또는 대안적으로 비선형 에피토프 결합 모이어티로 조합된 2개 또는 모든 3개의 CDR 유사 루프들의 인식을 확인하기 위해 수행될 수 있다. 특정 표적 결합을 부여할 수 있는 3개 루프(BC, DE 및 FG로 표기됨)의 세트는 각각 B와 C 가닥 사이, D와 E 가닥 사이, 및 F와 G 베타 가닥 사이에 위치한다. 인간 테나신 C의 제3 FnIII 도메인의 BC, DE 및 FG 루프는 각각 9개, 6개 및 10개 아미노산 잔기의 길이를 갖는다. 이들 루프들의 길이는 각각 7개 내지 10개, 4개 내지 8개 및 4개 내지 28개 아미노산 길이인, 항체 중쇄에서 발견되는 동족 항원-인식 루프의 좁은 범위 내에 있다. 유사하게, 루프의 제2 세트인 AB, CD 및 EF 루프(각각 7개, 7개 및 8개 아미노산의 길이)는 각각 A와 B 베타 가닥 사이, C와 D 베타 가닥 사이 및 E와 F 베타 가닥 사이에 위치한다.
- [0186] 일단 무작위화되고 표적에 대한 높은 친화성 결합에 대해 선택되면, Tn3 단량체 스카폴드 내의 루프는 항체 내의 동족 CDR 루프의 접촉과 동등하게 표적과 접촉할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, AB, CD 및 EF 루프는 무작위화되고 하나 이상의 표적, 예를 들면, CD40L에 대한 높은 친화성 결합에 대해 선택된다. 일부 실시양태에서 이 무작위화 및 선택 과정은 BC, DE 및 FG 루프의 무작위화와 동시에 수행될 수 있는 반면, 다른 실시양태에서 이 무작위화 및 선택 과정은 연속적으로 수행된다.
- [0187] CD40L 특이적 단량체 서브유닛
- [0188] 본 발명은 다수의 루프 영역들에 연결된 다수의 베타 가닥 도메인을 포함하는 CD40L 특이적 재조합 비-천연 발생 Tn3 스카폴드를 제공하고, 이때 상기 루프 영역들 중 하나 이상의 루프 영역은 하나 이상의 아미노산의 결실, 치환 또는 부가에 의해 야생형 Tn3(서열번호 3) 내의 동족 루프와 상이하다(표 1 참조).

[0189] 신규 결합 특성을 갖는 개선된 CD40L 특이적 Tn3 단량체 서브유닛을 발생시키기 위해, 모 Tn3에 대한 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 수행한다. CD40L 특이적 Tn3 단량체 서브유닛의 서열을 모 Tn3의 서열과 비교할 때 베타 가닥 및 루프의 동일한 정의가 사용된다는 것이 이해될 것이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 CD40L 특이적 Tn3 단량체 서브유닛은 하기 아미노산 서열을 포함한다:

[0190] $IEV(X_{AB})_nALITW(X_{BC})_nCELYX_1YGI(X_{CD})_nTTIDL(X_{DE})_nYSI(X_{EF})_nYEVSLIC(X_{FG})_nKETFTT$

[0191] 상기 서열에서,

[0192] (a) X_{AB} , X_{BC} , X_{CD} , X_{DE} , X_{EF} 및 X_{FG} 는 각각 AB, BC, CD, DE, EF 및 FG 루프의 서열에 존재하는 아미노산 잔기를 나타내고;

[0193] (b) X_1 은 아미노산 잔기 알라닌(A) 또는 트레오닌(T)을 나타내고;

[0194] (c) 루프의 길이 n은 2 내지 26의 정수이다.

표 2

이들 연구에서 사용된 Tn3 클론들의 루프 서열

클론	AB 루프 서열번호	BC 루프 서열번호	CD 루프 서열번호	DE 루프 서열번호	EF 루프 서열번호	FG 루프 서열번호*
<i>PARENT Tn3</i>						
Tn3	4	5	6	7	8	9
<i>309 패밀리</i>						
309FGwt	4	83	6	94	8	9
309	4	83	6	94	8	99
340	4	84	6	95	8	9
341	4	85	6	94	8	9
342	4	86	6	96	8	9
343	4	87	6	97	8	9
344	4	88	6	95	8	9
345	4	89	6	94	8	9
346	4	90	6	94	8	9
347	4	91	6	95	8	9
348	4	92	6	98	8	9
349	4	93	6	94	8	9
309FGwt 컨센서스	4	168	6	169	8	170
<i>311 패밀리**</i>						
311	4	100	6	118	8	129
311K4E	136	100	6	118	137	129
311K4E_1	136	101	6	119	8	129
311K4E_2	136	102	6	120	8	129
311K4E_3†	136	103	6	121	8	129
311K4E_4†	136	104	6	122	8	129
311K4E_5†	136	105	6	121	8	129
311K4E_7	136	106	6	123	8	129

[0195]

클론	AB 루프 서열번호	BC 루프 서열번호	CD 루프 서열번호	DE 루프 서열번호	EF 루프 서열번호	FG 루프 서열번호*
311K4E_8†	136	107	6	123	8	129
311K4E_9	136	108	6	118	8	129
311K4E_10†	136	109	6	123	8	129
311K4E_11	136	110	6	121	8	129
311K4E_12†	136	111	6	123	8	130
311K4E_13	136	108	6	121	8	129
311K4E_14	136	112	6	124	8	129
311K4E_15	136	113	6	125	8	129
311K4E_16	136	114	6	118	8	129
311K4E_19	136	115	6	126	8	129
311K4E_20	136	116	6	127	8	129
311K4E_21	136	117	6	128	8	129
311 컨센서스	173	174	6	175	176	177

† 서열 CELAYGI(서열번호 14)를 갖는 C 베타 가닥을 포함하는 클론, 서열 CELTYGI(서열번호 13)를 갖는 C 베타 가닥을 포함하는 모든 다른 클론들.

* 309 패밀리의 몇몇 변이체, 예를 들면, 342에서, FG 루프는 서열번호 139로 교체될 수 있다.

** 311 패밀리의 몇몇 변이체에서, BC 루프는 위치 21에서 티로신을 교체하도록 조작될 수 있다. 교체 아미노산 잔기가 작은 측쇄를 가질 수 있다는 것이 구체적으로 고려된다.

[0196]

일부 실시양태에서, 본 발명의 CD40L 특이적 Tn3 단량체 서브유닛은 하기 아미노산 서열로 구성된다:

[0197]

IEV(X_{AB})_nALITW(X_{BC})_nCELX₁YGI(X_{CD})_nTTIDL(X_{DE})_nYSI(X_{EF})_nYEVSLIC(X_{FG})_nKETFTT

[0198]

상기 서열에서,

[0199]

(a) X_{AB}, X_{BC}, X_{CD}, X_{DE}, X_{EF} 및 X_{FG}는 각각 AB, BC, CD, DE, EF 및 FG 루프의 서열에 존재하는 아미노산 잔기를 나타내고;

[0200]

(b) X₁은 아미노산 잔기 알라닌(A) 또는 트레오닌(T)을 나타내고;

[0201]

(c) 루프의 길이 n은 2 내지 26의 정수이다.

[0202]

한 실시양태에서, CD40L 특이적 Tn3 단량체 스카폴드의 베타 가닥은 모 Tn3 스카폴드(서열번호 3)의 베타 가닥에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는다. 이러한 서열 동일성 백분율을 계산하기 위해, 당분야에서 공지된 방법을 적용하여 아미노산 서열들을 정렬한다. 서열 동일성의 백분율은 (a) 서열 정렬에서 동일한, 베타 가닥에 위치하는 아미노산의 수와 (b) 베타 가닥에 위치하는 아미노산의 총 수 사이의 비로서 정의된다.

[0203]

한 실시양태에서, AB 루프의 서열은 서열번호 4 또는 서열번호 136을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, CD 루프의 서열은 서열번호 6을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, EF 루프의 서열은 서열번호 8 또는 서열번호 137을 포함한다. 한 실시양태에서, AB 루프의 서열은 서열번호 4 또는 서열번호 136으로 구성된다. 또 다른 실시양태에서, CD 루프의 서열은 서열번호 6으로 구성된다. 또 다른 실시양태에서, EF 루프의 서열은 서열번호 8 또는 서열번호 137로 구성된다.

[0204]

한 실시양태에서, BC 루프의 서열은 서열번호 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 및 93으로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, BC 루프의 서열은 서열번호 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 및 93으로 구성된 군으로부터 선택된 서열로 구성된다.

[0205]

한 실시양태에서, DE 루프의 서열은 서열번호 94, 95, 96, 97 및 98로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, DE 루프의 서열은 서열번호 94, 95, 96, 97 및 98로 구성된 군으로부터 선택된 서열

[0206]

로 구성된다.

- [illegible]

구성되고, DE 루프의 서열은 서열번호 98로 구성되고, FG 루프의 서열은 서열번호 9 또는 139로 구성된다.

- [illegible]

CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 서열번호 28 또는 146으로 구성된다.

[0246] 일부 실시양태에서, 본 발명의 CD40L 특이적 Tn3 단량체 서브유닛은 하기 아미노산 서열을 포함한다:

[0247] IEVKDVTDTTALITWX₁DX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈CELTGIGKDVPGDRTTIDLWX₉HX₁₀AX₁₁YSIGNLKPDEYEVSLICRX₁₂GMSSNPAKETFTT(서열번호 167)

[0248] 상기 서열에서,

[0249] (a) X₁은 아미노산 잔기 세린(S) 또는 류신(L)을 나타내고;

[0250] (b) X₂는 아미노산 잔기 아스파르트산(D) 또는 글루탐산(E)을 나타내고;

[0251] (c) X₃은 아미노산 잔기 히스티딘(H), 이소류신(I), 발린(V), 페닐알라닌(F) 또는 트립토판(W)을 나타내고;

[0252] (d) X₄는 아미노산 잔기 알라닌(A), 글리신(G), 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;

[0253] (e) X₅는 아미노산 잔기 글루탐산(E), 류신(L), 글루타민(Q), 세린(S), 아스파르트산(D) 또는 아스파라긴(N)을 나타내고;

[0254] (f) X₆은 아미노산 잔기 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)을 나타내고;

[0255] (g) X₇은 아미노산 잔기 이소류신(I), 발린(V), 히스티딘(H), 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;

[0256] (h) X₈은 아미노산 잔기 글리신(G), 트립토판(W) 또는 발린(V)을 나타내고;

[0257] (i) X₉는 아미노산 잔기 트립토판(W), 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)을 나타내고;

[0258] (j) X₁₀은 아미노산 잔기 세린(S), 글루타민(Q), 메티오닌(M) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;

[0259] (k) X₁₁은 아미노산 잔기 트립토판(W) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;

[0260] (l) X₁₂는 아미노산 잔기 아르기닌(R) 또는 세린(S)을 나타낸다.

[0261] 일부 실시양태에서, 본 발명의 CD40L 특이적 Tn3 단량체 서브유닛은 하기 아미노산 서열로 구성된다:

[0262] IEVKDVTDTTALITWX₁DX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈CELTGIGKDVPGDRTTIDLWX₉HX₁₀AX₁₁YSIGNLKPDEYEVSLICRX₁₂GMSSNPAKETFTT(서열번호 167)

[0263] 상기 서열에서,

[0264] (a) X₁은 아미노산 잔기 세린(S) 또는 류신(L)을 나타내고;

[0265] (b) X₂는 아미노산 잔기 아스파르트산(D) 또는 글루탐산(E)을 나타내고;

[0266] (c) X₃은 아미노산 잔기 히스티딘(H), 이소류신(I), 발린(V), 페닐알라닌(F) 또는 트립토판(W)을 나타내고;

[0267] (d) X₄는 아미노산 잔기 알라닌(A), 글리신(G), 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;

[0268] (e) X₅는 아미노산 잔기 글루탐산(E), 류신(L), 글루타민(Q), 세린(S), 아스파르트산(D) 또는 아스파라긴(N)을 나타내고;

[0269] (f) X₆은 아미노산 잔기 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)을 나타내고;

[0270] (g) X₇은 아미노산 잔기 이소류신(I), 발린(V), 히스티딘(H), 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;

[0271] (h) X₈은 아미노산 잔기 글리신(G), 트립토판(W) 또는 발린(V)을 나타내고;

[0272] (i) X₉는 아미노산 잔기 트립토판(W), 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)을 나타내고;

- [0273] (j) X_{10} 은 아미노산 잔기 세린(S), 글루타민(Q), 메티오닌(M) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;
- [0274] (k) X_{11} 은 아미노산 잔기 트립토판(W) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;
- [0275] (l) X_{12} 는 아미노산 잔기 아르기닌(R) 또는 세린(S)을 나타낸다.
- [0276] 일부 실시양태에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 서열번호 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80 및 82로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 서열번호 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80 및 82로 구성된 군으로부터 선택된 서열로 구성된다.
- [0277] 일부 실시양태에서, 본 발명의 CD40L 특이적 Tn3 단량체 서브유닛은 하기 아미노산 서열을 포함한다:
- [0278] IEVX₁DVTDTTALITWX₂X₃RSX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀CELX₁₁YGIKDVPGDRTTIDLX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅YVHYSIGNLKPDXTX₁₆YEVSLICLTDTGTXX₁₇NPAKETFTT(서열번호 171)
- [0279] 상기 서열에서,
- [0280] (a) X_1 은 아미노산 잔기 라이신(K) 또는 글루탐산(E)을 나타내고;
- [0281] (b) X_2 는 아미노산 잔기 트레오닌(T) 또는 이소류신(I)을 나타내고;
- [0282] (c) X_3 은 아미노산 잔기 아스파라긴(N) 또는 알라닌(A)을 나타내고;
- [0283] (d) X_4 는 아미노산 잔기 세린(S), 류신(L), 알라닌(A), 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0284] (e) X_5 는 아미노산 잔기 티로신(Y), 알라닌(A), 글리신(G), 발린(V), 이소류신(I) 또는 세린(S)을 나타내고;
- [0285] (f) X_6 은 아미노산 잔기 티로신(Y), 세린(S), 알라닌(A) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;
- [0286] (g) X_7 은 아미노산 잔기 아스파라긴(N), 아스파르트산(D), 히스티딘(H) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0287] (h) X_8 은 아미노산 잔기 류신(L), 페닐알라닌(F), 히스티딘(H) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0288] (i) X_9 는 아미노산 잔기 히스티딘(H), 프롤린(P), 세린(S), 류신(L) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;
- [0289] (j) X_{10} 은 아미노산 잔기 글리신(G), 페닐알라닌(F), 히스티딘(H) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0290] (k) X_{11} 은 아미노산 잔기 알라닌(A) 또는 트레오닌(T)을 나타내고;
- [0291] (l) X_{12} 는 아미노산 잔기 세린(S), 아스파라긴(N), 글루탐산(E), 아스파라긴(R) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고,
- [0292] (m) X_{13} 은 아미노산 잔기 세린(S), 글루타민(Q), 트레오닌(T), 아스파라긴(N) 또는 알라닌(A)을 나타내고;
- [0293] (n) X_{14} 는 아미노산 잔기 프롤린(P), 발린(V), 이소류신(I) 또는 알라닌(A), 또는 아미노산의 부재를 나타내고;
- [0294] (o) X_{15} 는 아미노산 잔기 이소류신(I) 또는 아미노산의 부재를 나타내고;
- [0295] (p) X_{16} 은 아미노산 잔기 글루탐산(E) 또는 라이신(K)을 나타내고;
- [0296] (q) X_{17} 은 아미노산 잔기 세린(S) 또는 아스파라긴(N)을 나타낸다.
- [0297] 일부 실시양태에서, 본 발명의 CD40L 특이적 Tn3 단량체 서브유닛은 하기 아미노산 서열로 구성된다:
- [0298] IEVX₁DVTDTTALITWX₂X₃RSX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀CELX₁₁YGIKDVPGDRTTIDLX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅YVHYSIGNLKPDXTX₁₆YEVSLICLTDTGTXX₁₇NPAKETFTT(서열번호 171)
- [0299] 상기 서열에서,

- [0300] (a) X_1 은 아미노산 잔기 라이신(K) 또는 글루탐산(E)을 나타내고;
- [0301] (b) X_2 는 아미노산 잔기 트레오닌(T) 또는 이소류신(I)을 나타내고;
- [0302] (c) X_3 은 아미노산 잔기 아스파라긴(N) 또는 알라닌(A)을 나타내고;
- [0303] (d) X_4 는 아미노산 잔기 세린(S), 류신(L), 알라닌(A), 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0304] (e) X_5 는 아미노산 잔기 티로신(Y), 알라닌(A), 글리신(G), 발린(V), 이소류신(I) 또는 세린(S)을 나타내고;
- [0305] (f) X_6 은 아미노산 잔기 티로신(Y), 세린(S), 알라닌(A) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;
- [0306] (g) X_7 은 아미노산 잔기 아스파라긴(N), 아스파르트산(D), 히스티딘(H) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0307] (h) X_8 은 아미노산 잔기 류신(L), 페닐알라닌(F), 히스티딘(H) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0308] (i) X_9 는 아미노산 잔기 히스티딘(H), 프롤린(P), 세린(S), 류신(L) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;
- [0309] (j) X_{10} 은 아미노산 잔기 글리신(G), 페닐알라닌(F), 히스티딘(H) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0310] (k) X_{11} 은 아미노산 잔기 알라닌(A) 또는 트레오닌(T)을 나타내고;
- [0311] (l) X_{12} 는 아미노산 잔기 세린(S), 아스파라긴(N), 글루탐산(E), 아스파라긴(R) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고,
- [0312] (m) X_{13} 은 아미노산 잔기 세린(S), 글루타민(Q), 트레오닌(T), 아스파라긴(N) 또는 알라닌(A)을 나타내고;
- [0313] (n) X_{14} 는 아미노산 잔기 프롤린(P), 발린(V), 이소류신(I) 또는 알라닌(A), 또는 아미노산의 부재를 나타내고;
- [0314] (o) X_{15} 는 아미노산 잔기 이소류신(I) 또는 아미노산의 부재를 나타내고;
- [0315] (p) X_{16} 은 아미노산 잔기 글루탐산(E) 또는 라이신(K)을 나타내고;
- [0316] (q) X_{17} 은 아미노산 잔기 세린(S) 또는 아스파라긴(N)을 나타낸다.
- [0317] 일부 실시양태에서, CD40L 특이적 단량체 스카폴드는 Tn3 모듈을 포함하고, 이때 C 및 F 베타 가닥(각각 서열번호 13 또는 14, 및 서열번호 17)의 시스테인 잔기가 치환될 수 없다는 것을 제외하고 베타 가닥들 중 하나 이상의 베타 가닥은 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0318] CD40L 특이적 단량체 서브유닛의 다양한 베타 가닥들을 연결하는 루프들은 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화될 수 있다. 한 실시양태에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화되는 하나 이상의 루프를 갖는다. 한 실시양태에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛의 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상 또는 6개 이상의 루프는 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다. 한 실시양태에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛의 하나 이상의 루프는 불변 상태로 유지되지만, 하나 이상의 추가 루프는 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다. 또 다른 실시양태에서, 루프 AB, CD 및 EF 중 1개 이상, 2개 이상 또는 모든 3개의 루프는 불변 상태로 유지되지만, 루프 BC, DE 및 FG 중 1개 이상, 2개 이상 또는 모든 3개의 루프는 길이 또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다. 또 다른 실시양태에서, 루프 AB, CD 및 EF 중 1개 이상, 2개 이상 또는 모든 3개의 루프는 무작위화되지만, 루프 BC, DE 및 FG 중 1개 이상, 2개 이상 또는 모든 3개의 루프는 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다. 또 다른 실시양태에서, 루프 AB, CD, EF, BC, DE 및 FG 중 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상 또는 모든 6개의 루프는 길이 또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다.
- [0319] 일부 실시양태에서, 루프 내의 하나 이상의 잔기는 불변 상태로 유지되지만, 다른 잔기들은 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다. 일부 실시양태에서, 루프 내의 하나 이상의 잔기는 예정된 제한된 수의 상이한 아미노산으로 유지되지만, 다른 잔기는 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다. 따라서, 본 발명의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 축퇴 컨센서스 서열 및/또는 하나 이상의 불변 아미노산 잔기를 갖는 하나 이상의 루프를 포함할 수 있다.

- [0320] 한 실시양태에서, 본 발명의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 무작위화되는 AB 루프를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 무작위화되는 BC 루프를 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 무작위화되는 CD 루프를 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 무작위화되는 DE 루프를 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 무작위화되는 EF 루프를 포함한다.
- [0321] 특정 실시양태에서, 본 발명의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 인간 테나신 C의 제3 FnIII 도메인의 동족 FG 루프보다 하나 이상의 아미노산 잔기만큼 더 짧도록 유지되고 하나 이상의 위치에서 더 무작위화된 FG 루프를 포함한다.
- [0322] 특정 실시양태에서, 루프 BC, DE 및 FG 중 하나 이상의 루프가 무작위화되고, 이때 A 베타 가닥은 서열번호 10 또는 11을 포함하고, B 베타 가닥은 서열번호 12를 포함하고, C 베타 가닥은 서열번호 13 또는 14를 포함하고, D 베타 가닥은 서열번호 15를 포함하고, E 베타 가닥은 서열번호 16을 포함하고, F 베타 가닥은 서열번호 17을 포함하고, G 베타 가닥은 서열번호 18을 포함하고, AB 루프는 서열번호 4 또는 136을 포함하고, CD 루프는 서열번호 6을 포함하고, EF 루프는 서열번호 8 또는 137을 포함한다.
- [0323] 다른 특정 실시양태에서, 루프 AB, CD 및 EF 중 하나 이상의 루프가 무작위화되고, 이때 A 베타 가닥은 서열번호 10 또는 11을 포함하고, B 베타 가닥은 서열번호 12를 포함하고, C 베타 가닥은 서열번호 13 또는 14를 포함하고, D 베타 가닥은 서열번호 15를 포함하고, E 베타 가닥은 서열번호 16을 포함하고, F 베타 가닥은 서열번호 17을 포함하고, G 베타 가닥은 서열번호 18을 포함하고, BC 루프는 서열번호 5를 포함하고, DE 루프는 서열번호 7을 포함하고, FG 루프는 서열번호 9 또는 139를 포함한다.
- [0324] 향상된 스카폴드 안정성
- [0325] 본 발명의 Tn3 스카폴드의 안정성은 많은 상이한 방법들에 의해 증가될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 N 및/또는 C 말단 영역을 연장시킴으로써 안정화될 수 있다. N 및/또는 C 말단 영역은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 10개 초과 아미노산에 의해 연장될 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 본원에 기재된 바와 같이 혈청 반감기를 증가시키는 변형을 도입함으로써 안정화될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 이 스카폴드의 소수성 코어를 안정화시키기 위한 하나 이상의 아미노산 잔기의 추가, 결실 또는 치환을 포함한다.
- [0326] 본 발명의 Tn3 스카폴드는 국제 특허출원 제PCT/US2011/032184호에 개시된 바와 같이 비-천연 이황화 결합을 조작함으로써 효과적으로 안정화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 스카폴드는 PCT 공보 제WO 2009/058379호에 기재된 바와 같이 비-천연 발생 이황화 결합을 포함한다. 생물정보학 방법을 이용하여 이황화 결합의 조작에 적합한 후보 위치를 확인할 수 있다.
- [0327] 한 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 단량체 서브유닛은 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상 또는 5개 이상의 비-천연 발생 분자내 이황화 결합을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 단량체 서브유닛은 하나 이상의 비-천연 발생 분자내 이황화 결합을 포함하고, 이때 상기 하나 이상의 비-천연 발생 이황화 결합은 상기 단량체를 안정화시킨다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 하나 이상의 비-천연 발생 이황화 결합을 포함하는데, 이때 상기 결합은 2개의 상이한 단량체 또는 다량체 Tn3 스카폴드들 사이에 위치한다(즉, 상기 이황화 결합은 분자간 이황화 결합이다). 예를 들면, 이황화 결합은 상이한 스카폴드들(예를 들면, 2개의 CD40L 특이적 단량체 스카폴드들)을 연결할 수 있거나, Tn3 스카폴드와 링커를 연결할 수 있거나, Tn3 스카폴드와 Fc 도메인을 연결할 수 있거나, 또는 Tn3 스카폴드와 항체 또는 이의 단편을 연결할 수 있다.
- [0328] 일부 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 Tn3 단량체 서브유닛과 단리된 이중 모이어티를 연결하거나, Tn3 단량체 서브유닛과 동일한 Tn3 스카폴드에 융합되거나 접합된 이중 모이어티를 연결하거나, 또는 Tn3 단량체 서브유닛과 상이한 Tn3 스카폴드에 융합되거나 접합된 이중 모이어티를 연결하는 하나 이상의 비-천연 발생 분자간 이황화 결합을 포함한다.
- [0329] 일부 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 2개 이상, 3개 이상 또는 4개 이상의 단량체 서브유닛으로 구성된 Tn3 다량체 스카폴드를 형성하는 이황화 결합을 포함한다.
- [0330] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 N 및/또는 C 말단 영역의 연장을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 본원에 기재된 바와 같이 혈청 반감기를 증가시키기 위한 변형을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 스카폴드는 이 스카폴드의 소수성 코어를 안정화시키기 위한 하나 이상의 아

미노산 잔기의 추가, 결실 또는 치환을 포함한다.

[0331] 안정성 측정

[0332] 단리된 본 발명의 Tn3 단량체 서브유닛 또는 다량체 Tn3 스카폴드의 일부로서의 본 발명의 Tn3 단량체 서브유닛의 안정성은 당분야에서 잘 공지된 기법, 예컨대, 열(Tm) 및 카오트로픽 변성(예컨대, 우레아 또는 구아니딘 염을 사용한 처리), 프로테아제 처리(예컨대, 썬모라이신을 사용한 처리), 또는 단백질 안정성을 측정하는 당분야에서 인정된 또 다른 방법에 의해 용이하게 측정될 수 있다. 단백질 안정성을 측정하는 데에 이용된 기법의 포괄적인 검토는 예를 들면, 문헌("Current Protocols in Molecular Biology" and "Current Protocols in Protein Science" by John Wiley and Sons, 2007)에서 발견될 수 있다.

[0333] 다량체 Tn3 스카폴드

[0334] 본 발명의 한 양태는 직렬로 연결된 2개 이상의 본 발명의 Tn3 단량체 서브유닛을 포함하는 다량체 Tn3 스카폴드를 제공하는데, 이때 상기 단량체들 중 하나 이상의 단량체는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛이다. 이러한 다량체 Tn3 스카폴드는 다수의 형식으로 조립될 수 있다. 특정 양태에서, 본 발명은 다량체 Tn3 스카폴드를 제공하는데, 이때 2개 이상의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 펩티드 링커를 통해 직렬로 연결되어 있다. 일부 실시양태에서, 다량체 Tn3 스카폴드는 표적 결합의 원자가 및/또는 결합력, 또는 표적(들)의 다른 작용의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 다수의 단량체 서브유닛들이 동일한 표적에 결합할 때 표적 결합의 원자가 및/또는 결합력의 증가는 달성된다. 일부 실시양태에서, 원자가의 증가는 표적에 대한 특정 작용을 개선한다(예컨대, 표적 단백질의 이량체화를 증가시킨다).

[0335] 특정 실시양태에서, 본 발명의 다량체 Tn3 스카폴드는 직렬로 연결된 2개 이상의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 각각의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 하나 이상의 표적에 결합하고, 각각의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 복수의 루프 영역들에 연결된 복수의 베타 가닥들을 포함하고, 이때 하나 이상의 루프는 모 Tn3 스카폴드(서열번호 3)의 동족 루프의 비-천연 발생 변이체이다.

[0336] 한 실시양태에서, 다량체 Tn3 스카폴드는 예를 들면, CD40L 특이적 단량체 서브유닛들의 직접적인 연결에 의한, 또는 링커, 예를 들면, 펩티드 링커의 포함에 의한 CD40L 특이적 단량체 서브유닛들 사이의 공유결합을 통해 발생된다. 구체적인 예에서, 공유결합된 Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 코딩하는 융합 유전자를 구축함으로써, 또는 대안적으로 시스템 잔기에 대한 코돈을 CD40L 특이적 단량체 서브유닛 내로 조작하여 도입하고 발현 생성물들 사이에 이황화 결합 형성이 일어나게 함으로써 발생된다.

[0337] 한 실시양태에서, 본 발명의 다량체 Tn3 스카폴드는 임의의 추가 개재 아미노산 없이 서로 직접적으로 연결된 2개 이상의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛들을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 다량체 Tn3 스카폴드는 링커, 예를 들면, 펩티드 링커를 통해 직렬로 연결된 2개 이상의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛들을 포함한다.

[0338] 특정 실시양태에서, 본 발명의 다량체 Tn3 스카폴드는 펩티드 링커를 통해 직렬로 연결된 2개 이상의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛들을 포함하는데, 이때 펩티드 링커는 1개 내지 약 1000개, 1개 내지 약 500개, 1개 내지 약 250개, 1개 내지 약 100개, 1개 내지 약 50개, 또는 1개 내지 약 25개의 아미노산을 포함한다. 특정 실시양태에서, 다량체 Tn3 스카폴드는 펩티드 링커를 통해 직렬로 연결된 2개 이상의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛들을 포함하는데, 이때 펩티드 링커는 1개 내지 약 20개, 1개 내지 약 15개, 1개 내지 약 10개, 또는 1개 내지 약 5개의 아미노산을 포함한다.

[0339] 특정 실시양태에서, 다량체 Tn3 스카폴드는 링커, 예를 들면, 펩티드 링커를 통해 직렬로 연결된 2개 이상의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛들을 포함하는데, 이때 링커는 기능성 모이어티이다. 기능성 모이어티는 다량체 Tn3 스카폴드의 원하는 기능 및/또는 특성에 기초하여 선택될 것이다. 예를 들면, 정제에 유용한 기능성 모이어티(예를 들면, 히스티딘 태그)가 링커로서 사용될 수 있다. 링커로서 유용한 기능성 모이어티는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 세포독성제, 방사성 핵종, 조영제, 비오틴, 이량체화 도메인, 인간 혈청 알부민(HSA) 또는 이의 FcRn 결합 부분, 항체의 도메인 또는 단편, 단일쇄 항체, 도메인 항체, 알부민 결합 도메인, IgG 분자, 효소, 리간드, 수용체, 결합 펩티드, 비-Tn3 스카폴드, 에피토프 태그, 제조용 폴리펩티드 중합체, 사이토카인 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 링커로서 사용될 수 있는 구체적인 펩티드 링커 및 기능성 모이어티가 하기 개시되어 있다.

[0340] 특정 실시양태에서, 기능성 모이어티는 면역글로불린 또는 이의 단편이다. 일부 실시양태에서, 면역글로불린 또는 이의 단편은 Fc 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 도메인은 하나 이상의 Fc γ R 매개 이펙터 기능,

예컨대, ADCC(항체 의존적 세포 매개 세포독성)를 유도하지 못한다. Fc 도메인은 하나 이상의 Fc γ R 매개 이펙터 기능을 감소시키거나 제거하도록 변경될 수 있다는 것이 당분야에서 공지되어 있다(예를 들면, 미국 특허 제 5,624,821호 및 제6,737,056호 참조).

[0341] 일부 실시양태에서, 다량체 Tn3 스카폴드는 하나 이상의 링커를 통해 연결된 2개 이상의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 각각의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛 사이에 개재된 링커는 동일한 링커 또는 상이한 링커일 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 동일한 링커 또는 상이한 링커일 수 있는 다수의 링커를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 링커들이 연쇄적으로 연결되어 있을 때, 일부 또는 모든 링커들은 기능성 모이어티일 수 있다.

[0342] 스카폴드 결합 화학양론

[0343] 일부 실시양태에서, 단량체 또는 다량체 Tn3 스카폴드는 단일 CD40L 분자 또는 상이한 CD40L 표적 분자들 상의 상이한 에피토프들일 수 있는 상이한 에피토프들에 대해 특이적인 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 다량체 Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함할 수 있는데, 각각의 서브유닛은 하나 이상의 CD40L 분자 상의 하나 이상의 상이한 에피토프를 표적화한다.

[0344] 다른 실시양태에서, 단량체 또는 다량체 Tn3 스카폴드는 동일한 CD40L 분자 상의 2개 이상의 상이한 에피토프들에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상이한 에피토프들은 비중첩 에피토프들이다. 다른 실시양태에서, 상이한 에피토프들은 중첩 에피토프들이다.

[0345] 또 다른 특정 실시양태에서, 단량체 또는 다량체 Tn3 스카폴드는 CD40L 분자 상의 하나 이상의 에피토프에 결합할 수 있고 제2 CD40L 분자 상의 하나 이상의 에피토프에 추가로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상이한 표적 분자들은 올리고머 복합체, 예를 들면, 삼량체 CD40L 복합체의 일부이다.

[0346] 또 다른 특정 실시양태에서, 단량체 또는 다량체 Tn3 스카폴드는 CD40L 삼량체 상의 단일 에피토프에 결합할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 단량체 또는 다량체 Tn3 스카폴드는 2개 이상의 CD40L 삼량체 상의 동일한 에피토프에 결합할 수 있다.

[0347] 특정 실시양태에서, 단량체 또는 다량체 Tn3 스카폴드는 인접 세포 표면 상의 2개 이상의 카피의 CD40L 분자 상의 동일한 에피토프에 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 단량체 또는 다량체 Tn3 스카폴드는 용액 중의 2개 이상의 카피의 CD40L 분자 상의 동일한 에피토프에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단량체 또는 다량체 Tn3 스카폴드는 동일한 또는 상이한 결합 친화성 및/또는 결합력으로 CD40L 상의 동일한 에피토프 또는 상이한 에피토프에 결합할 수 있다.

[0348] 또 다른 실시양태에서, 단량체 또는 다량체 Tn3 스카폴드는 하나 이상의 카피의 CD40L 상의 에피토프에 결합할 수 있고, 표적에 대한 원하는 작용을 (예를 들면, 상승작용적으로) 달성할 수 있거나 향상시킬 수 있다(예를 들면, 수용체와의 결합을 방지할 수 있거나 올리고머화를 방해할 수 있다).

[0349] 추가로, 본 발명의 단량체 또는 다량체 Tn3 스카폴드가 복수의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛들, 예를 들면, 상이한 단량체들을 포함하고, 이때 각각의 단량체가 CD40L 상의 상이한 에피토프들을 표적화할 때, 이러한 단량체 서브유닛들은 특정 패턴 또는 특별한 배향에 따라 정렬되어 특정 생물학적 효과를 달성할 수 있거나 향상시킬 수 있다. 단량체 서브유닛들의 이러한 조합물은 조립된 후 당분야에서 공지된 방법의 이용을 통해 평가될 수 있다.

[0350] 융합체

[0351] 본 발명은 Tn3 스카폴드를 제공하는데, 이때 하나 이상의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 이중 모이어티에 융합될 수 있다. 이와 관련하여, 이중 모이어티는 스페이서로서 스카폴드들을 연결하는 데에 사용되지 않지만 Tn3 스카폴드에 추가 기능성을 제공할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이중 모이어티는 링커로서도 작용할 수 있다. 본 발명은 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 융합 단백질, 핵산 분자, 소분자, 미메틱 물질, 합성 약물, 무기 분자 및 유기 분자를 포함하나 이들로 한정되지 않는 하나 이상의 이중 모이어티에 접합되거나 융합된 Tn3 스카폴드의 용도를 포괄한다. 따라서, 본 발명은 본원에 기재된 융합 단백질을 포함하나 이것으로 한정되지 않는, 하나 이상의 CD40L 특이적 Tn3 단량체를 포함하는 폴리펩티드를 제공한다.

[0352] 본 발명은 이중 단백질 또는 폴리펩티드, 또는 이들의 단편에 재조합적으로 융합되거나 화학적으로 접합된 Tn3 스카폴드의 용도를 포괄한다. 접합은 공유접합 및 비-공유접합 둘다를 포함한다. 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 10개 이상, 20개 이상, 30개 이상, 40개 이상, 50개 이상, 60개 이상, 70개 이상, 80개 이상, 90개

이상, 100개 이상, 200개 이상, 300개 이상, 500개 이상 또는 1000개 이상의 아미노산으로 구성된 폴리펩티드에 융합되거나 화학적으로 접합되어 융합 단백질을 발생시킬 수 있다.

- [0353] Tn3 스카폴드와 하나 이상의 이중 모이어티의 융합 또는 접합은 직접적으로(즉, Tn3 스카폴드와 이중 모이어티 사이에 개재된 링커 없이) 일어날 수 있거나 본원에 기재된 하나 이상의 링커 서열을 통해 일어날 수 있다. 일부 실시양태에서, 스카폴드는 Tn3 스카폴드를 표적 세포의 특정 세포 표면 수용체에 대해 특이적인 항체에 융합시키거나 접합시킴으로써 시험관내에서 또는 생체내에서 이중 폴리펩티드를 특정 종류의 세포에 표적화시키는 데에 사용될 수 있다.
- [0354] 이중 폴리펩티드에 융합되거나 접합된 Tn3 스카폴드는 당분야에서 공지된 방법을 이용한 시험관내 면역분석 및 정제 방법에서도 사용될 수 있다. 예를 들면, 전체적으로 참고로 도입되는 국제 공보 제WO 93/21232호; 유럽 특허 제439,095호; 문헌(Naramura et al., Immunol. Lett. 39:91-99, 1994); 미국 특허 제5,474,981호; 문헌(Gillies et al., PNAS 89:1428-1432, 1992); 및 문헌(Fell et al., J. Immunol. 146:2446-2452, 1991)을 참조한다.
- [0355] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 예를 들면, N 또는 C 말단을 통해 스카폴드를 면역글로불린 또는 이의 도메인(IgG의 불변 영역(Fc)을 포함하나 이것으로 한정되지 않음)과 융합시키거나 접합시킴으로써 인간 면역 반응과 통합될 수 있다. 유사하게, Tn3 스카폴드와 보체 단백질, 예컨대, C1q 사이의 융합을 이용하여 세포를 표적화할 수 있다.
- [0356] 다양한 공개문헌들이 FcRn 결합 폴리펩티드를 분자 내로 도입함으로써(예를 들면, 국제 공보 제WO 97/43316호, 미국 특허 제5,869,046호, 미국 특허 제5,747,035호, 국제 공보 제WO 96/32478호 및 국제 공보 제WO 91/14438호 참조), FcRn 결합 친화성이 보존되어 있으나 다른 Fc 수용체에 대한 친화성이 크게 감소되어 있는 항체를 분자와 융합시킴으로써(예를 들면, 국제 공보 제WO 99/43713호 참조), 또는 분자를 항체의 FcRn 결합 도메인과 융합시킴으로써(예를 들면, 국제 공보 제WO 00/09560호 및 미국 특허 제4,703,039호 참조) 변경된 반감기를 갖는 생리학적 활성 분자를 수득하는 방법을 기술한다. 생리학적 활성 분자의 반감기를 증가시키는 구체적인 기법 및 방법도 미국 특허 제7,083,784호에서 발견될 수 있다. 구체적으로, Tn3 스카폴드가 IgG의 Fc 영역에 융합될 수 있다는 것이 고려되는데, 이때 상기 Fc 영역은 아미노산 잔기 돌연변이 M252Y/S254T/T256E 또는 H433K/N434F/Y436H를 포함하고, 이때 아미노산 위치는 카바트 넘버링 체계에 따라 표기되어 있다. Tn3 스카폴드와 Fc 도메인 변이체의 융합체는 ADCC를 유도할 수 없다는 것이 구체적으로 고려된다.
- [0357] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드의 반감기는 Tn3 스카폴드와 본질적으로 비구조화된 재조합 폴리펩티드(예를 들면, XTEN™ 폴리펩티드)의 유전적 융합 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과의 접합에 의해 증가될 수 있다.
- [0358] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 생체내 또는 혈청 반감기를 증가시키거나 연장시키는 분자와 융합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 스카폴드는 혈류에서의 그의 반감기 및/또는 그의 조직 침투를 증가시키기 위해 알부민, 예컨대, 인간 혈청 알부민(HSA), 이의 신생아 Fc 수용체(FcRn) 결합 단편, PEG, 다당류, 항체, 보체, 헤모글로빈, 결합 펩티드, 지단백질 및 다른 인자와 융합될 수 있거나 접합될 수 있다. 이들 융합체들 중 임의의 융합체가 표준 기법, 예를 들면, 공개적으로 입수가 가능한 유전자 서열을 사용하여 구축한 재조합 융합 유전자로부터의 융합 단백질의 발현에 의해 발생될 수 있다.
- [0359] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드의 성질은 HSA 변이체, 즉 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 서열 절두를 포함하는, 전장 HSA(서열번호 139)로부터 유도된 분자와의 접합 또는 융합에 의해 개선될 수 있다.
- [0360] 일부 실시양태에서, HSA 변이체와의 접합에 의해 개선된 성질은 혈장 반감기이다. Tn3 스카폴드의 혈장 반감기의 개선은 이러한 성질의 변경, 예컨대, 혈장 반감기의 증가 또는 감소, 또는 다른 약동학적 파라미터의 변화일 수 있다. 일부 실시양태에서, HSA 변이체는 전장 HSA(서열번호 138)로부터 유도된 돌연변이체이다. 특정 실시양태에서, HSA 변이체는 위치 34에서 세린으로의 시스테인의 치환을 포함한다(서열번호 133). Tn3 스카폴드의 혈장 반감기를 변경시키는 데에 사용될 수 있는 HSA 변이체는 예를 들면, 국제 공보 제WO 2011/103076호 및 제WO 2011/051489호(이들 둘다가 전체적으로 참고로 도입됨)에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드의 혈장 반감기는 상기 스카폴드를, HSA의 도메인 III 내에 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 HSA 변이체와 융합시킴으로써 증가된다.
- [0361] 일부 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 전장 성숙 HSA에서의 위치에 대하여 넘버링된 407, 415, 463, 500, 506, 508, 509, 511, 512, 515, 516, 521, 523, 524, 526, 535, 550, 557, 573, 574 및 580으로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서의 하나 이상의 아미노산 치환을 제외하고는 전장 성숙 HSA(서열번호 138) 또는 이

의 단편의 서열을 포함하는 HSA 변이체를 포함하는데, 여기서 상기 하나 이상의 아미노산 치환이 위치 573에서의 글루탐산(E)으로의 라이신(K)의 치환을 포함하지 않고, Tn3 스카폴드가 상기 HSA 변이체에 접합되지 않은 Tn3 스카폴드의 혈장 반감기보다 더 긴 혈장 반감기를 갖는다.

[0362] 몇몇 다른 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 전장 성숙 HSA에서의 위치에 대하여 넘버링된 463, 508, 523 및 524로 구성된 군으로부터 선택된 위치에 존재하는데, 이때 Tn3 스카폴드는 HSA 변이체에 접합되지 않은 Tn3 스카폴드의 혈장 반감기보다 더 긴 혈장 반감기를 갖는다.

[0363] 다른 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 전장 성숙 HSA에서의 위치에 대하여 넘버링된 위치에서의, 하기 아미노산 치환들로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 제외하고는 전장 성숙 HSA(서열번호 133 또는 138) 또는 이의 단편의 서열을 포함하는 HSA 변이체를 포함하는데, 여기서 상기 Tn3 스카폴드가 상기 HSA 변이체에 접합되지 않은 Tn3 스카폴드의 혈장 반감기보다 더 긴 혈장 반감기를 갖는다: (a) 위치 407에서 아스파라긴(N) 또는 티로신(Y)으로의 류신(L)의 치환; (b) 위치 415에서 트레오닌(T)으로의 발린(V)의 치환; (c) 위치 463에서 아스파라긴(N)으로의 류신(L)의 치환; (d) 위치 500에서의 아르기닌(R)으로의 라이신(K)의 치환; (e) 위치 506에서의 티로신(Y)으로의 트레오닌(T)의 치환; (f) 위치 508에서의 아르기닌(R)으로의 트레오닌(T)의 치환; (g) 위치 509에서의 메티오닌(M) 또는 트립토판(W)으로의 페닐알라닌(F)의 치환; (h) 위치 511에서의 페닐알라닌(F)으로의 알라닌(A)의 치환; (i) 위치 512에서의 티로신(Y)으로의 아스파르트산(D)의 치환; (j) 위치 515에서의 글루타민(Q)으로의 트레오닌(T)의 치환; (k) 위치 516에서의 트레오닌(T) 또는 트립토판(W)으로의 류신(L)의 치환; (l) 위치 521에서의 트립토판(W)으로의 아르기닌(R)의 치환; (m) 위치 523에서의 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 글리신(G), 라이신(K) 또는 아르기닌(R)으로의 이소류신(I)의 치환; (n) 위치 524에서의 류신(L)으로의 라이신(K)의 치환; (o) 위치 526에서의 메티오닌(M)으로의 글루타민(Q)의 치환; (p) 위치 535에서의 프롤린(P)으로의 히스티딘(H)의 치환; (q) 위치 550에서의 글루탐산(E)으로의 아스파르트산(D)의 치환; (r) 위치 557에서의 글리신(G)으로의 라이신(K)의 치환; (s) 위치 573에서의 페닐알라닌(F), 히스티딘(H), 프롤린(P), 트립토판(W) 또는 티로신(Y)으로의 라이신(K)의 치환; (t) 위치 574에서의 아스파라긴(N)으로의 라이신(K)의 치환; (u) 위치 580에서의 라이신(K)으로의 글루타민(Q)의 치환; 및 (v) 상기 치환들 중 둘 이상의 치환들의 조합.

[0364] 일부 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 전장 성숙 HSA에서의 위치에 대하여 넘버링된 위치에서의, 하기 아미노산 치환들로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 제외하고는 전장 성숙 HSA(서열번호 133 또는 138) 또는 이의 단편의 서열을 포함하는 HSA 변이체를 포함하는데, 여기서 상기 Tn3 스카폴드가 상기 HSA 변이체에 접합되지 않은 Tn3 스카폴드의 혈장 반감기보다 더 긴 혈장 반감기를 갖는다: (a) 위치 463에서 아스파라긴(N)으로의 류신(L)의 치환; (b) 위치 508에서 아르기닌(R)으로의 트레오닌(T)의 치환; (c) 위치 523에서 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 글리신(G), 라이신(K) 또는 아르기닌(R)으로의 이소류신(I)의 치환; (d) 위치 524에서 류신(L)으로의 라이신(K)의 치환; 및 (e) 상기 치환들 중 둘 이상의 치환들의 조합.

[0365] 나아가, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 마커 서열, 예컨대, 정제를 용이하게 하기 위한 펩티드에 융합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 마커 아미노산 서열은 폴리히스티딘 펩티드(His-태그), 예를 들면, 옥타-히스티딘-태그(His-8-태그) 또는 헥사-히스티딘-태그(His-6-태그), 예컨대, 다른 벡터들 중에서 pQE 발현 벡터(퀴아젠 인코포레이티드(QIAGEN, Inc.), 미국 캘리포니아주 91311 채스워쓰 에튼 예비뉴 9259 소재) 내에 제공된 태그(이들 중 대다수는 상업적으로 입수될 수 있음)이다. 예를 들면, 문헌(Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, 1989)에 기재된 바와 같이, 폴리히스티딘은 융합 단백질의 편리한 정제를 제공한다. 정제에 유용한 다른 펩티드 태그는 인플루엔자 혈구응집소 단백질로부터 유래된 에피토프에 상응하는 혈구응집소("HA") 태그, FLAG 태그, Strep-태그, myc-태그, V5 태그, GFP-태그, AU1-태그, AU5-태그, ECS-태그, GST-태그 또는 OLLAS 태그를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0366] 본 발명의 Tn3 스카폴드를 포함하는 추가 융합 단백질은 유전자 서플링, 모티프 서플링, 엑손 서플링 및/또는 코돈 서플링("DNA 서플링"으로서 총칭됨) 기법을 통해 발생될 수 있다.

[0367] DNA 서플링은 표적에 대한 Tn3 스카폴드의 작용을 변경시키는 데에(예를 들면, 보다 높은 친화성 및 보다 낮은 해리 속도를 갖는 스카폴드를 발생시키는 데에) 이용될 수 있다. Tn3 스카폴드는 오류 유발 PCR에 의한 무작위 돌연변이유발, 무작위 뉴클레오타이드 삽입, 또는 재조합 이전의 다른 방법에 의해 변경될 수 있다. 특정 표적에 결합하는 스카폴드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 하나 이상의 부분은 하나 이상의 이중 분자의 하나 이상의 성분, 모티프, 구획, 부분, 도메인, 단편 등과 재조합될 수 있다.

[0368] 항체 및 Fc 도메인의 융합체

- [0369] 일부 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 Fc 도메인을 포함하나 이것으로 한정되지 않는, 항체(예를 들면, IgG)의 도메인 또는 단편에 융합된 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다.
- [0370] 일부 실시양태에서, 단지 1개의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 항체의 도메인 또는 단편에 접합되거나 융합된다. 예를 들면, 단일 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 항체의 도메인 또는 단편(예를 들면, 항체의 중쇄 또는 경쇄)의 폴리펩티드의 N 말단에 융합될 수 있다. 다른 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 하나 이상의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 항체의 도메인 또는 단편(예를 들면, 항체의 중쇄 및/또는 경쇄, 또는 Fc 도메인)의 폴리펩티드의 N 말단 및/또는 C 말단에 융합시키거나 접합시킴으로써 생성된다.
- [0371] 일부 실시양태에서, 항체의 도메인 또는 단편에 융합된 일부 또는 모든 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 동일하다. 몇몇 다른 실시양태에서, 항체의 도메인 또는 단편에 융합된 일부 또는 모든 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 상이하다.
- [0372] 특정 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 Fc 도메인에 융합된 1개의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 Fc 도메인에 융합된 2개 이상의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다. 한 특정 실시양태에서, Fc 도메인에 융합된 CD40L 특이적 단량체 서브유닛들 중 2개 이상의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛들은 동일하다. 한 특정 실시양태에서, Fc 도메인에 융합된 CD40L 특이적 단량체 서브유닛들 중 2개 이상의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛들은 상이하다. 한 특정 실시양태에서, Fc 도메인에 융합된 2개의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛들은 직렬로 서로 연결되고, 상기 CD40L 특이적 단량체 서브유닛들 중 하나는 Fc 도메인에 융합된다.
- [0373] 일부 실시양태에서, 본 발명의 상이한 Tn3 스카폴드들은 이중이량체의 형성에 유리한 Fc 도메인 돌연변이의 사용에 의해 이량체화될 수 있다. Fc 영역의 변이체(예를 들면, 아미노산 치환 및/또는 추가 및/또는 결실)는 항체의 이펙터 기능을 향상시키거나 감소시키고 항체의 약동학적 성질(예를 들면, 반감기)을 변경시킬 수 있다는 것이 당분야에서 공지되어 있다. 따라서, 특정 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 Tn3 스카폴드의 기능적 및/또는 약동학적 성질을 변화시키기 위해 하나 이상의 변형이 Fc 영역 내에서 만들어져 있는 변경된 Fc 영역을 포함하는 Fc 도메인(들)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 하나 이상의 Fc γ R 매개 이펙터 기능을 감소시키거나 제거하기 위해 하나 이상의 변형이 Fc 영역 내에서 만들어져 있는 변경된 Fc 영역을 포함하는 Fc 도메인(들)을 포함한다.
- [0374] Fc 영역의 글리코실화는 이펙터 기능 및/또는 소염 활성을 증가시키거나 감소시키도록 변경될 수 있다는 것도 공지되어 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 Tn3 스카폴드의 세포독성 및/또는 소염 성질을 변화시키기 위해 아미노산 잔기의 변경된 글리코실화를 갖는 Fc 영역을 포함한다.
- [0375] Tn3 스카폴드 위상기하학
- [0376] 본 발명의 Tn3 스카폴드는 임의의 적합한 공간적 정렬로 Fc 도메인, 항체 경쇄 및 항체 중쇄의 C 말단에 융합될 수 있다. 예를 들면, 고려되는 스카폴드 위상기하학의 상세한 설명에 대해서는 국제 특허출원 제 PCT/US2011/032184호를 참조한다.
- [0377] 본 발명의 스카폴드의 발생
- [0378] 본원에 기재된 Tn3 스카폴드는 신규 또는 개선된 표적 결합 단백질을 개발하기 위한 임의의 기법에서 사용될 수 있다. 한 구체적인 예에서, 표적은 고체 지지체, 예컨대, 컬럼 수지 또는 마이크로타이터 플레이트 웰 상에 고정되고, 표적은 후보 스카폴드-기초 결합 단백질의 라이브러리와 접촉된다. 이러한 라이브러리는 CDR 유사 루프의 서열 및/또는 길이의 무작위화를 통해 Tn3 스카폴드로부터 구축된 클론들로 구성될 수 있다.
- [0379] 이와 관련하여, 박테리오파지(파지) 디스플레이는 큰 올리고펩티드 라이브러리를 스크리닝하여 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 상기 라이브러리의 구성원(들)을 찾을 수 있게 하는 잘 공지된 한 기법이다. 파지 디스플레이는 변이체 폴리펩티드가 박테리오파지 입자의 표면 상에서 코트 단백질과의 융합 단백질로서 디스플레이되는 기법이다(Scott, J. K. and Smith, G. P. (1990) Science 249: 386). 생물정보학 방법을 이용하여 천연 발생 FnIII 도메인의 루프 길이 및 다양성 선호도를 측정할 수 있다. 루프 길이 및 서열 다양성에 대한 선호도는 이 분석을 이용하여 "제한된 무작위화" 방법을 개발하는 데에 이용될 수 있다. 이 제한된 무작위화에서, 상대적인 루프 길이 및 서열 선호도가 라이브러리 전략의 개발 내로 도입된다. 루프 길이 및 서열 다양성 분석을 라이브러리 개발 내로 도입하여 제한된 무작위화를 일으킨다(즉, 무작위화된 루프 내의 일부 위치는 어떤 아미노산이 그 위치에 존재할 수 있는 지에 있어서 한정된다).

- [0380] 본 발명은 비-천연 발생 Tn3 스카폴드의 다양한 집단을 포함하는 제조합 라이브러리도 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 라이브러리는 복수의 루프 영역들에 연결된 복수의 베타 가닥 도메인들을 포함하는 비-천연 발생 Tn3 스카폴드를 포함하는데, 이때 상기 루프들 중 하나 이상의 루프는 하나 이상의 아미노산에 의한 결실, 치환 또는 추가에 의해 달라진다. 특정 실시양태에서, 상기 라이브러리는 야생형 Tn3 스카폴드로부터 유도된 Tn3 스카폴드를 포함한다.
- [0381] 상기 상세히 기재된 바와 같이, 스카폴드의 다양한 베타 가닥들을 연결하는 루프들은 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 라이브러리는 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화된 하나 이상의 루프를 갖는 Tn3 스카폴드를 포함한다. 한 실시양태에서, Tn3 스카폴드의 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상 또는 6개 이상의 루프는 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다. 한 실시양태에서, 하나 이상의 루프는 불변 상태로 유지되지만, 하나 이상의 추가 루프는 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다. 또 다른 실시양태에서, 루프 AB, CD 및 EF 중 1개 이상, 2개 이상 또는 모든 3개의 루프는 불변 상태로 유지되지만, 루프 BC, DE 및 FG 중 1개 이상, 2개 이상 또는 모든 3개의 루프는 길이 또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다. 또 다른 실시양태에서, 루프 AB, CD 및 EF 중 1개 이상, 2개 이상 또는 모든 3개의 루프는 무작위화되지만, 루프 BC, DE 및 FG 중 1개 이상, 2개 이상 또는 모든 3개의 루프는 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다.
- [0382] 특정 실시양태에서, 본 발명의 라이브러리는 FnIII 스카폴드를 포함하는데, 이때 A 베타 가닥은 서열번호 10 또는 11을 포함하고, B 베타 가닥은 서열번호 12를 포함하고, C 베타 가닥은 서열번호 13 또는 14를 포함하고, D 베타 가닥은 서열번호 15를 포함하고, E 베타 가닥은 서열번호 16을 포함하고, F 베타 가닥은 서열번호 17을 포함하고, G 베타 가닥은 서열번호 18을 포함한다.
- [0383] 특정 실시양태에서, 본 발명의 라이브러리는 FnIII 스카폴드를 포함하는데, 이때 A 베타 가닥은 서열번호 10 또는 11로 구성되고, B 베타 가닥은 서열번호 12로 구성되고, C 베타 가닥은 서열번호 13 또는 14로 구성되고, D 베타 가닥은 서열번호 15로 구성되고, E 베타 가닥은 서열번호 16으로 구성되고, F 베타 가닥은 서열번호 17로 구성되고, G 베타 가닥은 서열번호 18로 구성된다.
- [0384] 특정 실시양태에서, 본 발명의 라이브러리는 FnIII 스카폴드를 포함하는데, 이때 A 베타 가닥은 본질적으로 서열번호 10 또는 11로 구성되고, B 베타 가닥은 본질적으로 서열번호 12로 구성되고, C 베타 가닥은 본질적으로 서열번호 13 또는 14로 구성되고, D 베타 가닥은 본질적으로 서열번호 15로 구성되고, E 베타 가닥은 본질적으로 서열번호 16으로 구성되고, F 베타 가닥은 본질적으로 서열번호 17로 구성되고, G 베타 가닥은 본질적으로 서열번호 18로 구성된다.
- [0385] 상기 상세히 기재된 바와 같이, 루프 내의 하나 이상의 잔기는 불변 상태로 유지될 수 있지만, 다른 잔기는 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다. 임의적으로 또는 대안적으로, 루프 내의 하나 이상의 잔기는 예정된 한정된 수의 상이한 아미노산으로 유지될 수 있지만, 다른 잔기는 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다. 따라서, 본 발명의 라이브러리는 축퇴 컨센서스 서열 및/또는 하나 이상의 불변 아미노산 잔기를 갖는 하나 이상의 루프를 포함할 수 있는 Tn3 스카폴드를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 라이브러리는 무작위화된 BC 루프를 갖는 Tn3 스카폴드를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 라이브러리는 무작위화된 BC 루프를 갖는 Tn3 스카폴드를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 라이브러리는 무작위화된 BC 루프를 갖는 Tn3 스카폴드를 포함한다.
- [0386] 한 실시양태에서, 본 발명의 라이브러리는 무작위화된 DE 루프를 갖는 Tn3 스카폴드를 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 라이브러리는 무작위화된 FG 루프를 갖는 Tn3 스카폴드를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 라이브러리는 무작위화된 FG 루프를 갖는 FnIII 스카폴드를 포함한다.
- [0387] 특정 실시양태에서, 본 발명의 라이브러리는 스카폴드를 포함하는데, 이때 상기 스카폴드는 하기 아미노산 서열을 포함한다:
- [0388] $IEV(X_{AB})_nALITW(X_{BC})_nCELX_1YGI(X_{CD})_nTTIDL(X_{DE})_nYSI(X_{EF})_nYEVSLIC(X_{FG})_nKETFTT$
- [0389] 상기 서열에서,
- [0390] (a) X_{AB} , X_{BC} , X_{CD} , X_{DE} , X_{EF} 및 X_{FG} 는 각각 AB, BC, CD, DE, EF 및 FG 루프의 서열에 존재하는 아미노산 잔기를 나타내고;

- [0391] (b) X_1 은 아미노산 잔기 A 또는 T를 나타내고;
- [0392] (c) 루프의 길이 n은 2 내지 26의 정수이다.
- [0393] 일부 실시양태에서, 본 발명의 라이브러리는 하기 아미노산 서열을 포함하는 본 발명의 CD40L 특이적 Tn3 단량체 서브유닛을 포함한다:
- [0394] IEVKDVTDTTALITWX₁DX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈CELTGYIKDVPGRDRTTIDLWX₉HX₁₀AX₁₁YSIGNLKPDEYEVSLICRX₁₂GDMSSNPAKETFTT(서열번호 167)
- [0395] 상기 서열에서
- [0396] (a) X_1 은 아미노산 잔기 세린(S) 또는 류신(L)을 나타내고;
- [0397] (b) X_2 는 아미노산 잔기 아스파르트산(D) 또는 글루탐산(E)을 나타내고;
- [0398] (c) X_3 은 아미노산 잔기 히스티딘(H), 이소류신(I), 발린(V), 페닐알라닌(F) 또는 트립토판(W)을 나타내고;
- [0399] (d) X_4 는 아미노산 잔기 알라닌(A), 글리신(G), 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;
- [0400] (e) X_5 는 아미노산 잔기 글루탐산(E), 류신(L), 글루타민(Q), 세린(S), 아스파르트산(D) 또는 아스파라긴(N)을 나타내고;
- [0401] (f) X_6 은 아미노산 잔기 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0402] (g) X_7 은 아미노산 잔기 이소류신(I), 발린(V), 히스티딘(H), 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;
- [0403] (h) X_8 은 아미노산 잔기 글리신(G), 트립토판(W) 또는 발린(V)을 나타내고;
- [0404] (i) X_9 는 아미노산 잔기 트립토판(W), 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0405] (j) X_{10} 은 아미노산 잔기 세린(S), 글루타민(Q), 메티오닌(M) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;
- [0406] (k) X_{11} 은 아미노산 잔기 트립토판(W) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;
- [0407] (l) X_{12} 는 아미노산 잔기 아르기닌(R) 또는 세린(S)을 나타낸다.
- [0408] 일부 실시양태에서, 본 발명의 라이브러리는 하기 아미노산 서열을 포함하는 본 발명의 CD40L 특이적 Tn3 단량체 서브유닛을 포함한다:
- [0409] IEVX₁DVTDTTALITWX₂X₃RSX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀CELX₁₁YGIKDVPGDRTTIDLX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅YVHYSIGNLKPDTX₁₆YEVSLICLTDDGTXX₁₇NPAKETFTT(서열번호 171)
- [0410] 상기 서열에서,
- [0411] (a) X_1 은 아미노산 잔기 라이신(K) 또는 글루탐산(E)을 나타내고;
- [0412] (b) X_2 는 아미노산 잔기 트레오닌(T) 또는 이소류신(I)을 나타내고;
- [0413] (c) X_3 은 아미노산 잔기 아스파라긴(N) 또는 알라닌(A)을 나타내고;
- [0414] (d) X_4 는 아미노산 잔기 세린(S), 류신(L), 알라닌(A), 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0415] (e) X_5 는 아미노산 잔기 티로신(Y), 알라닌(A), 글리신(G), 발린(V), 이소류신(I) 또는 세린(S)을 나타내고;
- [0416] (f) X_6 은 아미노산 잔기 티로신(Y), 세린(S), 알라닌(A) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;
- [0417] (g) X_7 은 아미노산 잔기 아스파라긴(N), 아스파르트산(D), 히스티딘(H) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0418] (h) X_8 은 아미노산 잔기 류신(L), 페닐알라닌(F), 히스티딘(H) 또는 티로신(Y)을 나타내고;

- [0419] (i) X_9 는 아미노산 잔기 히스티딘(H), 프롤린(P), 세린(S), 류신(L) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;
- [0420] (j) X_{10} 은 아미노산 잔기 글리신(G), 페닐알라닌(F), 히스티딘(H) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0421] (k) X_{11} 은 아미노산 잔기 알라닌(A) 또는 트레오닌(T)을 나타내고;
- [0422] (l) X_{12} 는 아미노산 잔기 세린(S), 아스파라긴(N), 글루탐산(E), 아스파라긴(R) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고,
- [0423] (m) X_{13} 은 아미노산 잔기 세린(S), 글루타민(Q), 트레오닌(T), 아스파라긴(N) 또는 알라닌(A)을 나타내고;
- [0424] (n) X_{14} 는 아미노산 잔기 프롤린(P), 발린(V), 이소류신(I) 또는 알라닌(A), 또는 아미노산의 부재를 나타내고;
- [0425] (o) X_{15} 는 아미노산 잔기 이소류신(I) 또는 아미노산의 부재를 나타내고;
- [0426] (p) X_{16} 은 아미노산 잔기 글루탐산(E) 또는 라이신(K)을 나타내고;
- [0427] (q) X_{17} 은 아미노산 잔기 세린(S) 또는 아스파라긴(N)을 나타낸다.
- [0428] 본 발명은 본 발명의 라이브러리를 스크리닝함으로써 표적, 예를 들면, CD40L에 결합하고, 모 Tn3 스카폴드에 비해 표적, 예를 들면, CD40L에 대한 증가된 안정성 또는 개선된 작용을 갖는 재조합 Tn3 스카폴드를 확인하는 방법도 제공한다.
- [0429] 특정 실시양태에서, 모 Tn3 스카폴드에 비해 증가된 단백질 안정성을 갖고 표적에 특이적으로 결합하는 재조합 Tn3 스카폴드를 확인하는 방법은
- [0430] 스카폴드:표적 리간드 복합체를 형성하기에 적합한 조건 하에서 표적 리간드를 본 발명의 라이브러리와 접촉시키는 단계;
- [0431] 상기 복합체로부터 표적 리간드에 결합하는 스카폴드를 수득하는 단계; 및
- [0432] 단계 (b)에서 수득된 스카폴드의 안정성이 야생형 Tn3 스카폴드의 안정성보다 더 큰 지를 확인하는 단계
- [0433] 를 포함한다.
- [0434] 동일한 방법을 이용하여 표적에 대한 개선된 결합 친화성, 결합력 등을 갖는 재조합 Tn3 스카폴드를 확인할 수 있다. 한 실시양태에서, 단계 (a)에서 본 발명의 스카폴드 라이브러리는 고정된 표적과 함께 항온처리된다. 한 실시양태에서, 단계 (b)에서 스카폴드:표적 리간드 복합체를 세척하여 비-특이적 결합체를 제거하고, 가장 단단히 밀착된 결합체를 매우 엄격한 조건 하에서 용출하고 PCR로 분석하여 서열 정보를 회수한다. 단계 (b)에서 수득된 결합체 및/또는 서열 정보는 선택 과정을 반복하는 데에 이용될 수 있는, 본원에 개시된 또는 당업자에게 공지된 방법을 서열의 추가 돌연변이유발과 함께 또는 이러한 추가 돌연변이유발 없이 이용하여 신규 라이브러리를 생성하는 데에 사용될 수 있다는 것이 구체적으로 고려된다. 일부 실시양태에서, 항원에 대한 충분한 친화성을 갖는 결합체가 수득될 때까지 다회 라운드의 선별이 수행될 수 있다.
- [0435] 본 발명의 추가 실시양태는 전술된 바와 같이 본 발명의 스카폴드를 포함하는 라이브러리를 코딩하는 단리된 핵산 분자들의 집합물이다.
- [0436] 본 발명의 스카폴드에 대해 친화성 성숙을 수행할 수 있다. 당분야에서 인정된 이 방법에서, 특이적 결합 단백질은 특정 표적에 대한 증가된 친화성에 대해 선택하는 방식으로 분석된다(문헌(Wu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95(11):6037-42) 참조). 본 발명의 발생된 스카폴드는 친화성 성숙 전 상기 스카폴드와 비교될 때 적어도 이 스카폴드만큼 높은 결합 특성을 나타낼 수 있다.
- [0437] 본 발명은 스카폴드:표적 복합체를 형성하도록 표적에 결합할 수 있는 단백질 스카폴드의 아미노산 서열을 확인하는 방법도 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 (a) 본 발명의 라이브러리를 고정된 또는 분리가능한 표적과 접촉시키는 단계; (b) 스카폴드:표적 복합체를 자유 스카폴드로부터 분리시키는 단계; (c) 낮아진 다양성을 갖고 표적에 결합할 수 있는 디스플레이된 스카폴드가 풍부하다는 점에 의해 상기 (a)의 라이브러리와 구별되는 신규 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리를 발생시키도록 (b)의 분리된 스카폴드의 복제를 야기하는 단계; d) 임의적으로 (c)의 신규 라이브러리를 사용하여 단계 (a) 및 단계 (b)를 반복하는 단계; 및 e) 단계 (d)로부터 수득된 종의 디스플레이된 스카폴드를 코딩하는 영역의 핵산 서열을 결정하여 표적에 결합할 수 있는 펩티드

서열을 유추하는 단계를 포함한다.

- [0438] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 라이브러리 스크린으로부터의 확인 후 더 무작위화될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 방법은 본원에 기재된 방법을 이용하여 라이브러리로부터 확인된 스카폴드의 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상 또는 6개 이상의 루프를 더 무작위화하는 단계를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 더 무작위화된 스카폴드는 표적에 결합할 수 있는 스카폴드를 확인하는 후속 방법으로 분석된다. 이 방법은 (a) 상기 더 무작위화된 스카폴드를 고정된 또는 분리가능한 표적과 접촉시키는 단계, (b) 상기 더 무작위화된 스카폴드:표적 복합체를 자유 스카폴드로부터 분리하는 단계, (c) (b)의 분리된 스카폴드의 복제를 야기하고 임의적으로 단계 (a) 내지 (c)를 반복하는 단계, 및 (d) 상기 더 무작위화된 스카폴드를 코딩하는 영역의 핵산 서열을 결정하여 표적에 결합할 수 있는 펩티드 서열을 유추하는 단계를 포함한다.
- [0439] 추가 실시양태에서, 더 무작위화된 스카폴드는 제1 라이브러리에서 미리 무작위화된 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상 또는 6개 이상의 무작위화된 루프를 포함한다. 대안적인 추가 실시양태에서, 더 무작위화된 스카폴드는 제1 라이브러리에서 미리 무작위화되지 않은 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상 또는 6개 이상의 무작위화된 루프를 포함한다.
- [0440] 본 발명은 하나 이상의 표적에 결합하는 2개 이상의 Tn3 스카폴드를 수득하는 방법도 제공한다. 이것은 상호협력적으로 작용하여 특정 반응을 이끌어내는 물질들의 스크리닝을 가능하게 한다. 하나 초과 스카폴드의 상호협력력을 요구하는 작용제 활성이 요구될 때 이러한 스크린을 이용하는 것이 유리할 수 있다. 이 방법은 라이브러리의 재초기화 없이 다량체 복합체를 형성하는 상호협력적 물질들의 스크리닝을 가능하게 한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 방법은 스카폴드:표적 리간드 복합체가 형성될 수 있게 하는 조건 하에서 표적 리간드를 본 발명의 라이브러리와 접촉시키는 단계, 상기 스카폴드들을 가교링커(2개 이상의 동일한 또는 상이한 스카폴드들을 가까이 인접하여 함께 존재하게 하는 물질로서 정의됨)로 가교연결시키는 단계로서, 이때 상기 스카폴드들의 가교연결이 검출가능한 반응을 이끌어내는 것인 단계, 및 표적에 결합하는 상기 스카폴드들을 상기 복합체로부터 수득하는 단계를 포함한다. 추가 실시양태에서, 가교링커는 스카폴드 특이적 항체 또는 이의 단편, 에피토프 태그 특이적 항체 또는 이의 단편, 이량체화 도메인, 예컨대, Fc 영역, 감겨진 코일 모티프(예를 들면, 류신 지퍼(그러나, 이것으로 한정되지 않음)), 화학적 가교링커, 또는 당분야에서 공지된 또 다른 이량체화 도메인이다.
- [0441] 본 발명은 본 발명의 Tn3 스카폴드를 사용하여 화합물을 검출하는 방법도 제공한다. 라이브러리 스크리닝에 의해 수득된 Tn3 스카폴드의 결합 특이성에 기초하여, 샘플에서 특정 표적을 검출하는 분석, 예컨대, 진단 방법에서 이러한 Tn3 스카폴드를 사용할 수 있다. 한 실시양태에서, 화합물을 검출하는 방법은 화합물:스카폴드 복합체가 형성될 수 있게 하는 조건 하에서 샘플 중의 상기 화합물을 본 발명의 Tn3 스카폴드와 접촉시키는 단계, 및 상기 스카폴드를 검출하여 샘플 중의 상기 화합물을 검출하는 단계를 포함한다. 추가 실시양태에서, 스카폴드는 화합물의 검출을 용이하게 하기 위해 표지된다(즉, 방사성 표지, 형광 표지, 효소-연결된 표지 또는 비색 표지).
- [0442] 본 발명은 본 발명의 Tn3 스카폴드를 사용하여 화합물을 포획하는 방법도 제공한다. 라이브러리 스크리닝에 의해 수득된 Tn3 스카폴드의 결합 특이성에 기초하여, 샘플 중의 특정 표적을 포획하는 분석, 예컨대, 정제 방법에서 이러한 Tn3 스카폴드를 사용할 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플에서 화합물을 포획하는 방법은 화합물:스카폴드 복합체의 형성을 가능하게 하는 조건 하에서 샘플 중의 상기 화합물을 본 발명의 스카폴드와 접촉시키는 단계 및 상기 복합체를 상기 샘플로부터 제거하여 상기 샘플에서 상기 화합물을 포획하는 단계를 포함한다. 추가 실시양태에서, Tn3 스카폴드는 화합물:스카폴드 복합체의 제거를 용이하게 하기 위해 고정된다.
- [0443] 일부 실시양태에서, 본 발명의 라이브러리로부터 단리된 Tn3 스카폴드는 1개 이상, 2개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상 또는 이보다 많은 수의 무작위화된 루프를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 Tn3 스카폴드 루프 서열은 공여자 스카폴드로부터 FnIII 수용자 스카폴드(Tn3 수용자 스카폴드를 포함하나 이것으로 한정되지 않음) 내의 임의의 루프로 교체될 수 있다(예를 들면, 공여자 스카폴드의 FG 루프 서열은 수용자 FnIII 스카폴드 내의 임의의 루프로 옮겨질 수 있다). 특정 실시양태에서, 단리된 루프 서열은 수용자 스카폴드 내의 동족 루프로 옮겨질 수 있다(예를 들면, 공여자 스카폴드의 FG 루프 서열은 FG 루프 위치에서 FnIII 수용자 스카폴드로 옮겨질 수 있다). 일부 실시양태에서, 단리된 루프 서열은 다양한 수용자 스카폴드와 무작위로 "혼합되고 매칭될" 수 있다.
- [0444] 다른 실시양태에서, 단리된 Tn3 스카폴드 서열은 루프 서열에 의해 확인될 수 있다. 예를 들면, 라이브러리는 특정 표적을 가려내는 데에 사용되고, 특정 결합체들의 집합물이 단리된다. 무작위화된 루프 서열은 Tn3 스카폴드 배경과 무관하게 특정 서열로서 특징규명될 수 있다(즉, 표적 X에 결합하는 스카폴드로서, 서열번호 X의 FG

루프 서열을 포함하는 스카폴드). 스카폴드가 표적 X에 결합하는 2개의 루프 서열들을 나타내는 대안적인 실시양태에서, 상기 루프 서열들은 스카폴드 서열의 부재 하에서 표적 X에 결합하는 것으로서 특징규명될 수 있다. 즉, 특정 표적에 결합하는 라이브러리로부터 단리된 스카폴드가 스카폴드 골격과 무관하게 그 표적에 결합하는 가변 루프 서열로서 발현될 수 있다는 것이 고려된다. 이 과정은 항체의 가변 영역 내의 CDR들의 개념과 유사할 것이다.

[0445] 친화성 성숙

[0446] 본 발명의 Tn3 스카폴드의 개발은 하나 이상의 시험관내 또는 생체내 친화성 성숙 단계를 수반할 수 있다. 일부 실시양태에서, Tn3 단량체 서브유닛은 단일 친화성 성숙 단계를 거칠 수 있다. 다른 실시양태에서, Tn3 단량체 서브유닛은 2개 이상의 친화성 성숙 단계를 거칠 수 있다. 일반적으로 모 Tn3 스카폴드에서 아미노산 변화를 야기하거나, 또는 구체적으로 친화성 성숙된 Tn3 스카폴드와 원하는 항원의 결합을 개선하는 아미노산 변화를 모 Tn3 스카폴드의 루프에서 야기하는 임의의 친화성 성숙 방법이 이용될 수 있다.

[0447] 이들 아미노산 변화는 예를 들면, 무작위 돌연변이유발, "워크 쓰루(walk through)" 돌연변이유발 및 "룩 쓰루(look through)" 돌연변이유발을 통해 달성될 수 있다. 이러한 돌연변이유발은 예를 들면, 오류 유발 PCR, 효모 또는 세균의 "돌연변이유발자" 균주, 또는 FnIII-기초 결합 분자의 전부 또는 일부의 초기 합성 동안 무작위 또는 한정된 핵산 변화의 도입을 이용함으로써 달성될 수 있다. 친화성 성숙 및/또는 돌연변이유발을 수행하는 방법은 예를 들면, 미국 특허 제7,195,880호, 제6,951,725호, 제7,078,197호, 제7,022,479호, 제5,922,545호, 제5,830,721호, 제5,605,793호, 제5,830,650호, 제6,194,550호, 제6,699,658호, 제7,063,943호 및 제5,866,344호, 및 PCT 공보 제WO 06/023144호에 기재되어 있다.

[0448] 이러한 친화성 성숙 방법은 항원에 대한 개선된 친화성을 갖는 Tn3 스카폴드를 선택하기 위해 항원 결합 스크리닝 분석의 엄격성이 증가될 것을 더 요구할 수 있다. 단백질-단백질 상호작용 분석의 엄격성을 증가시키는, 당분야에서 인정된 방법이 여기에서 이용될 수 있다. 한 실시양태에서, 원하는 항원에 대한 Tn3 스카폴드의 친화성을 감소시키기 위해 하나 이상의 분석 조건(예를 들면, 분석 완충제의 염 농도)이 변경된다. 또 다른 실시양태에서, Tn3 스카폴드가 원하는 항원에 결합하도록 허용된 시간의 길이가 감소된다.

[0449] 또 다른 실시양태에서, 경쟁 결합 단계가 단백질-단백질 상호작용 분석에 추가될 수 있다. 예를 들면, 먼저 Tn3 스카폴드가 원하는 고정된 항원에 결합하도록 허용될 수 있다. 그 다음, 항원에 대한 가장 낮은 친화성을 갖는 Tn3 스카폴드가 고정된 항원으로부터 용출되어 개선된 항원 결합 친화성을 갖는 Tn3 스카폴드가 선택되도록 고정된 항원과의 결합에 대해 경쟁하는 데에 기여하는 특정 농도의 비-고정된 항원을 추가한다. 분석에 첨가되는 비-고정된 항원의 농도를 증가시킴으로써 분석 조건의 엄격성을 더 증가시킬 수 있다.

[0450] 스크리닝 방법은 개선된 항원 결합을 갖는 하나 이상의 Tn3 스카폴드가 풍부해지도록 다회 라운드의 선택을 요구할 수도 있다. 한 실시양태에서, 각각의 라운드의 선택에서 추가 아미노산 돌연변이가 Tn3 스카폴드 내로 도입된다. 또 다른 실시양태에서, 각각의 라운드의 선택에서 원하는 항원에 대한 결합의 엄격성을 증가시켜 항원에 대한 증가된 친화성을 갖는 Tn3 스카폴드를 선택한다.

[0451] 일부 실시양태에서, 친화성 성숙은 Tn3의 BC, DE 및 FG 루프의 부분의 포화 돌연변이유발에 의해 수행된다. 일부 실시양태에서, 포화 돌연변이유발은 쿤켈(Kunkel) 돌연변이유발을 이용함으로써 수행된다. 다른 실시양태에서, 포화 돌연변이유발은 PCR을 이용함으로써 수행된다.

[0452] 일부 실시양태에서, 1회 이상, 2회 이상, 3회 이상, 4회 이상, 5회 이상 또는 5회 초과 라운드의 친화성 성숙이 적용된다. 일부 실시양태에서, 포화 돌연변이유발은 1개의 루프에만 적용되는 반면, 일부 다른 실시양태에서 1개의 루프 또는 루프의 일부만이 1회 라운드의 친화성 성숙 동안 돌연변이된다. 일부 실시양태에서, 1개 초과 라운드의 루프 또는 1개 초과 라운드의 루프의 일부가 동일한 라운드의 친화성 성숙 동안 돌연변이된다.

[0453] 다른 실시양태에서, BC, DE 및 FG 루프는 동일한 라운드의 친화성 성숙 동안 동시에 돌연변이된다.

[0454] 단량체가 동일한 표적의 상이한 에피토프들에 결합하는 다량체 Tn3 스카폴드로 조립되는 경우, 각각의 결합 특이성은 독립적으로 스크리닝될 수 있다.

[0455] 일부 실시양태에서, 파지 디스플레이 라이브러리를 이용하여 루프를 무작위화한다. 일부 실시양태에서, 당분야에서 인정된 방법을 이용하여 Tn3 스카폴드와 원하는 표적의 결합을 측정할 수 있다. 또한, 당분야에서 인정된 방법을 이용하여 스크린에서 확인된 Tn3 스카폴드의 아미노산 서열을 결정할 수 있다.

[0456] 일부 실시양태에서, 본 발명의 단량체 친화성 성숙된 스카폴드는 표면 플라스몬 공명 또는 당분야에서 공지된

다른 분석에 의해 측정될 때 친화성 성숙 전의 동일한 Tn3 스카폴드에 비해 5배 이상, 10배 이상, 20배 이상, 40배 이상, 60배 이상, 80배 이상 또는 100배 이상 증가된 CD40L에 대한 친화성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 다량체 친화성 성숙된 스카폴드는 표면 플라스몬 공명 또는 당분야에서 공지된 다른 분석에 의해 측정될 때 5 μ M 미만, 1 μ M 미만, 500 μ M 미만, 250 μ M 미만, 100 μ M 미만 또는 50 μ M 미만의 해리 상수(K_d)를 갖는다.

- [0457] 이들 친화성 성숙 방법은 바람직한 개선된 결합 성질, 예컨대, 증가된 친화성 또는 다른 바람직한 특성, 예컨대, 유리한 약동학적 성질, 높은 효능, 낮은 면역원성, 증가된 또는 감소된 교차반응성 등을 갖는 Tn3 스카폴드를 개발하는 데에 적용될 수 있다.
- [0458] 직렬 반복부의 발생
- [0459] 2개의 CD40L 특이적 다량체 서브유닛들의 연결에 의해 형성된 이량체인 직렬 구축물의 연결은 II형 제한효소 및 IIS형 제한효소를 포함하나 이들로 한정되지 않는 당분야에서 공지된 제한효소를 사용하여 제한 부위에서 올리고뉴클레오타이드를 결합시킴으로써 발생될 수 있다.
- [0460] 본 발명의 다량체 Tn3 스카폴드는 본원에 기재된 바와 같이 C 말단 및/또는 N 말단에서, 및/또는 도메인들 사이에서 링커를 포함할 수 있다. 또한, 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상 또는 8개 이상의 폴리펩티드 스카폴드를 포함하는 본 발명의 스카폴드는 하기 항체 모이어티들로부터 선택된 항체 모이어티를 포함하나 이들로 한정되지 않는 이량체화 도메인에 융합될 수 있거나 접합될 수 있다:
- [0461] (i) VL, CL, VH 및 CH1 도메인을 갖는 Fab 단편;
- [0462] (ii) CH1 도메인의 C 말단에서 하나 이상의 시스테인 잔기를 갖는 Fab 단편인 Fab' 단편;
- [0463] (iii) VH 및 CH1 도메인을 갖는 Fd 단편;
- [0464] (iv) VH 및 CH1 도메인을 갖고 CH1 도메인의 C 말단에서 하나 이상의 시스테인 잔기를 갖는 Fd' 단편;
- [0465] (v) 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인을 갖는 Fv 단편;
- [0466] (vi) VH 도메인으로 구성된 dAb 단편;
- [0467] (vii) 단리된 CDR 영역;
- [0468] (viii) 힌지 영역에서 이황화 가교에 의해 연결된 2개의 Fab' 단편들을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편;
- [0469] (ix) 단일쇄 항체 분자(예를 들면, 단일쇄 Fv; scFv);
- [0470] (x) 동일한 폴리펩티드 쇄 내의 경쇄 가변 도메인(VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하는, 2개의 항원 결합 부위를 갖는 "디아바디";
- [0471] (xi) 상보적인 경쇄 폴리펩티드와 함께 한 쌍의 항원 결합 영역을 형성하는 한 쌍의 직렬 Fd 절편(VH-CH1-VH-CH1)을 포함하는 "선형 항체";
- [0472] (xii) 전장 항체; 및
- [0473] (xiii) 힌지 영역 및/또는 CH1 영역의 전부 또는 일부를 추가로 포함할 수 있는 CH2-CH3을 포함하는 Fc 영역.
- [0474] Tn3 스카폴드 제조
- [0475] 본 발명의 Tn3 스카폴드의 제조법 발현은 상기 Tn3 스카폴드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 발현 벡터의 구축을 요구한다. 일단 Tn3 스카폴드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 수득되면, 상기 Tn3 스카폴드를 제조하기 위한 벡터는 당분야에서 잘 공지된 기법을 이용한 제조법 DNA 기술에 의해 제조될 수 있다. 따라서, Tn3 스카폴드 코딩 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 폴리뉴클레오타이드를 발현함으로써 단백질을 제조하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 당업자에게 잘 공지된 방법을 이용하여, 스카폴드 폴리펩티드 코딩 서열 및 적절한 전사 및 번역 조절 신호를 함유하는 발현 벡터를 구축할 수 있다. 이들 방법들은 예를 들면, 시험관내 제조법 DNA 기법, 합성 기법 및 생체내 유전 제조법을 포함한다. 따라서, 본 발명은 프로모터에 작동가능하게 연결된, 본 발명의 Tn3 스카폴드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 복제가능한 벡터를 제공한다.
- [0476] 발현 벡터를 통상적인 기법으로 숙주 세포에게 전달한 후, 형질감염된 세포를 통상적인 기법으로 배양하여 본 발명의 Tn3 스카폴드를 제조한다. 따라서, 본 발명은 이중 프로모터에 작동가능하게 연결된, 본 발명의 스카폴

드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 숙주 세포를 포함한다. 적합한 숙주 세포는 미생물, 예컨대, 세균(예를 들면, 이. 콜라이(*E. coli*) 및 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*))을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0477] 다양한 숙주-발현 벡터 시스템을 이용하여 본 발명의 Tn3 스카폴드를 발현시킬 수 있다. 이러한 숙주-발현 시스템은 관심 있는 코딩 서열이 제조된 후 정제될 수 있는 비히클을 나타낼 뿐만 아니라, 적절한 뉴클레오티드 코딩 서열로 형질전환되거나 형질감염될 때 본 발명의 스카폴드를 제자리에서 발현할 수 있는 세포도 나타낸다. 이들은 스카폴드 코딩 서열을 함유하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 미생물, 예컨대, 세균(예를 들면, 이. 콜라이 및 바실러스 서브틸리스), 또는 포유동물 세포 시스템(예를 들면, COS, CHO, BHK, 293, NSO 및 3T3 세포)을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0478] 본 발명의 Tn3 스카폴드의 제조에 유용한 방법은 예를 들면, 국제 특허출원 공보 제WO 2009/058379호에 개시되어 있다. 본 발명의 스카폴드는 일단 재조합 발현에 의해 제조되면 당분야에서 공지된 임의의 단백질 정제 방법에 의해 정제될 수 있다.

[0479] 일부 실시양태에서, 재조합 발현 동안 글리코실화될 수 있는 아미노산 잔기를 치환시킴으로써 본 발명의 스카폴드를 글리코실화 결여 형태로 제조할 수 있다. 한 특정 실시양태에서, 재조합 발현 동안 글리코실화를 방지하기 위해 글리신-세린 링커(예를 들면, 서열번호 131 또는 서열번호 132)에서 세린 아미노산을 다른 아미노산 잔기, 예컨대, 알라닌, 글리신, 류신, 이소류신 또는 발린(예를 들면, 서열번호 140, 141, 142 및 143 참조)으로 치환시킬 수 있다. 일부 특정 실시양태에서, N-글리코실화 부위를 본 발명의 Tn3 스카폴드로부터 제거한다. 다른 실시양태에서, 재조합 발현 후 본 발명의 스카폴드를 탈글리코실화시킬 수 있다. 재조합 발현 후, 예를 들면, 효소 카테일을 사용하는 시험관내 탈글리코실화 방법이 당분야에서 공지되어 있다(예를 들면, 큐에이-바이오(QA-bio)(미국 캘리포니아주 팜 데저트 소재)에 의해 시판되는 PFGase F, 엔도(Enodo) F 멀티(Multi), 오렐라(Orela) O-연결된 글리칸 릴리즈(Glycan Release), 효소 카보릴리즈(CarboRelease) 및 효소 데글리코 Mx(DeGlycoMx) 탈글리코실화 키트).

[0480] 미국 특허 공보 제2010-0298541 A1호에 기재된 바와 같이 연구 실험실에서의 본 발명의 Tn3 스카폴드의 제조를 규모 확대하여 분석 규모 반응기 또는 생산 규모 반응기에서 스카폴드를 제조할 수 있다.

[0481] 분비된 Tn3 스카폴드의 규모 확대가능한 제조

[0482] 본 발명의 Tn3 스카폴드를 세포내에서 제조할 수 있거나 분비된 형태로서 제조할 수 있다. 일부 실시양태에서, 분비된 스카폴드는 적절하게 폴딩되고 전체적으로 기능성을 나타낸다. 본 발명의 Tn3 스카폴드를 규모 확대가능한 방법으로 제조할 수 있다. 일부 실시양태에서, 분석 규모 생물반응기(예를 들면, 5 ℓ, 10 ℓ, 15 ℓ, 30 ℓ 또는 50 ℓ 생물반응기(그러나, 이들로 한정되지 않음))에서 본 발명의 스카폴드를 제조하기 위해 규모 확대될 수 있는 본 발명의 규모 확대가능한 방법으로 연구 실험실에서 스카폴드를 제조할 수 있다. 다른 실시양태에서, 생산 규모 생물반응기(예를 들면, 75 ℓ, 100 ℓ, 150 ℓ, 300 ℓ 또는 500 ℓ(그러나, 이들로 한정되지 않음))에서 본 발명의 Tn3 스카폴드를 제조하기 위해 규모 확대될 수 있는 본 발명의 규모 확대가능한 방법으로 연구 실험실에서 Tn3 스카폴드를 제조할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 규모 확대가능한 방법은 연구 실험실에서 수행된 제조 방법에 비해 제조 효율의 감소를 거의 또는 전혀 초래하지 않는다.

[0483] 링커

[0484] 다량체 Tn3 스카폴드 내의 단량체 서브유닛은 단백질 및/또는 비-단백질 링커에 의해 연결될 수 있는데, 이때 각각의 링커는 2개 이상의 단량체 서브유닛에 융합된다. 적합한 링커는 단백질 링커, 비-단백질 링커 및 이들의 조합물로 구성될 수 있다. 링커들의 조합물은 동중체 또는 이종체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 다량체 Tn3 스카폴드는 복수의 단량체 서브유닛들을 포함하고, 이때 모든 링커들이 동일하다. 다른 실시양태에서, 다량체 Tn3 스카폴드는 복수의 단량체 서브유닛들을 포함하고, 이때 하나 이상의 링커가 나머지 링커와 기능적으로 또는 구조적으로 상이하다. 일부 실시양태에서, 링커 자체가 표적과의 결합에 직접적으로 또는 간접적으로 참여함으로써 다량체 Tn3 스카폴드의 활성화에 기여할 수 있다.

[0485] 일부 실시양태에서, 단백질 링커는 폴리펩티드이다. 링커 폴리펩티드는 2개 이상의 단량체 서브유닛들이 원하는 활성을 보유하도록 서로 상대적으로 정확한 입체구조를 취하는 방식으로 상기 2개 이상의 단량체 서브유닛들을 연결하는 데에 적당한 길이를 가져야 한다.

[0486] 한 실시양태에서, 폴리펩티드 링커는 1개 내지 약 1000개의 아미노산 잔기, 1개 내지 약 50개의 아미노산 잔기, 1개 내지 25개의 아미노산 잔기, 1개 내지 20개의 아미노산 잔기, 1개 내지 15개의 아미노산 잔기, 1개 내지 10

개의 아미노산 잔기, 1개 내지 5개의 아미노산 잔기, 또는 1개 내지 3개의 아미노산 잔기를 포함한다. 본 발명은 폴리펩티드 링커 서열을 코딩하는 핵산, 예컨대, DNA, RNA 또는 이들 둘다의 조합물도 제공한다. 폴리펩티드 링커에 포함되기 위해 선택된 아미노산 잔기는 본 발명의 다량체 Tn3 스카폴드의 활성 또는 기능을 유의하게 방해하지 않는 성질을 나타내어야 한다. 따라서, 폴리펩티드 링커는 본 발명의 Tn3 다량체 스카폴드의 활성 또는 기능과 일치하지 않거나, 내부 폴딩을 방해하거나, 또는 본 발명의 다량체 Tn3 스카폴드와 CD40L의 결합을 심각하게 방해할 하나 이상의 단량체 서브유닛 내의 아미노산 잔기와 결합 또는 다른 상호작용을 형성할 전하를 전체적으로 나타내지 않아야 한다.

[0487] 폴리펩티드들을 신규 연결된 융합 폴리펩티드로 연결하기 위한 천연 발생 펩티드 링커 및 인공 펩티드 링커의 사용은 문헌에서 잘 공지되어 있다. 따라서, 2개 이상의 단량체 서브유닛을 융합시키는 링커는 천연 링커, 인공 링커 또는 이들의 조합물이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 다량체 스카폴드에 존재하는 모든 펩티드 링커들의 아미노산 서열은 동일하다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 다량체 Tn3 스카폴드에 존재하는 펩티드 링커들 중 2개 이상의 펩티드 링커들의 아미노산 서열들은 상이하다.

[0488] 일부 실시양태에서, 폴리펩티드 링커는 입체구조적 유연성을 보유한다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드 링커 서열은 (G-G-G-X)_m 아미노산 서열을 포함하고, 이때 X는 알라닌(A), 세린(S), 글리신(G), 이소류신(I), 류신(L) 또는 발린(V)이고, m은 양의 정수이다(예를 들면, 서열번호 209 참조). 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 링커 서열은 (G-G-G-S)_m 아미노산 서열을 포함하고, 이때 m은 양의 정수이다(예를 들면, 서열번호 147 참조). 또 다른 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 링커 서열은 (G-G-G-G)_m 아미노산 서열을 포함하고, 이때 m은 양의 정수이다(예를 들면, 서열번호 148 참조). 또 다른 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 링커 서열은 (G-G-G-A)_m 아미노산 서열을 포함하고, 이때 m은 양의 정수이다(예를 들면, 서열번호 149 참조). 일부 실시양태에서, 폴리펩티드 링커는 본질적으로 비구조화된 천연 또는 인공 폴리펩티드이다(예를 들면, 문헌(Schellenberger et al., Nature Biotechnol. 27:1186-1190, 2009) 참조; 문헌(Sickmeier et al., Nucleic Acids Res. 35:D786-93, 2007) 또한 참조).

[0489] 펩티드 링커는 비-폴리펩티드 모이어티에 대한 부착 기를 포함하는 아미노산 잔기가 도입되는 방식으로 변경될 수 있다. 이러한 아미노산 잔기의 예는 (추후에 비-폴리펩티드 모이어티가 부착되는) 시스테인 잔기일 수 있거나, 아미노산 서열은 생체내 N-글리코실화 부위를 포함할 수 있다(이로써 (생체내에서) 당 모이어티를 펩티드 링커에 부착시킬 수 있다).

[0490] 일부 실시양태에서, 폴리펩티드 다량체에 존재하는 모든 펩티드 링커들의 아미노산 서열은 동일하다. 대안적으로, 폴리펩티드 다량체에 존재하는 모든 펩티드 링커들의 아미노산 서열은 상이할 수 있다.

[0491] Tn3 스카폴드의 표지 또는 접합

[0492] 본 발명의 Tn3 스카폴드는 비-접합된 형태로 사용될 수 있거나, 표적 검출을 용이하게 하거나 조영 또는 치료를 위해 다양한 이종 모이어티들 중 하나 이상의 이종 모이어티에 접합된 형태로 사용될 수 있다. 상기 Tn3 스카폴드는 정제가 수행될 때 정제 전 또는 후에 표지될 수 있거나 접합될 수 있다.

[0493] 많은 이종 모이어티들은 본 발명의 Tn3 스카폴드가 연결될 수 있는 적합한 작용기를 결여한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 이펙터 분자는 링커를 통해 스카폴드에 부착되고, 이때 링커는 접합을 위한 반응성 기를 함유한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드에 접합된 이종 모이어티는 링커로서 작용할 수 있다. 다른 실시양태에서, 상기 모이어티는 절단가능한 또는 절단불가능한 링커를 통해 Tn3 스카폴드에 접합된다. 한 실시양태에서, 절단가능한 연결 분자는 산화환원 절단가능한 연결 분자이므로, 이 연결 분자는 보다 낮은 산화환원 전위를 갖는 환경, 예컨대, 자유 설프하이드릴 기를 갖는 고농도의 분자를 갖는 세포질 및 다른 영역에서 절단될 수 있다. 산화환원 전위의 변화로 인해 절단될 수 있는 연결 분자의 예로는 이황화물을 함유하는 연결 분자가 있다.

[0494] 일부 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 접합을 위한 반응성 기를 제공하도록 조작된다. 이러한 스카폴드에서, N 말단 및/또는 C 말단도 접합을 위한 반응성 기를 제공하는 데에 기여할 수 있다. 다른 실시양태에서, N 말단은 한 모이어티(예컨대, PEG(그러나, 이것으로 한정되지 않음))에 접합될 수 있는 반면, C 말단은 또 다른 모이어티(예컨대, 비오틴(그러나, 이것으로 한정되지 않음))에 접합되거나, 이의 반대 경우도 가능하다.

[0495] 용어 "폴리에틸렌 글리콜" 또는 "PEG"는 커플링제, 커플링 또는 활성화 모이어티(예를 들면, 티올, 트라이플레이트, 트레실레이트, 아지리딘, 옥시란, N-하이드록시석신이미드 또는 말레이미드 모이어티)를 갖거나 갖지 않는 폴리에틸렌 글리콜 화합물 또는 이의 유도체를 의미한다. 용어 "PEG"는 500 내지 150,000 Da의 분자량을 갖

는 폴리에틸렌 글리콜(이의 유사체를 포함함)을 표시하기 위한 것인데, 이때, 예를 들면, 말단 OH 기는 메톡시 기로 치환되어 있다(mPEG로서 지칭됨).

[0496] 본 발명의 Tn3 스카폴드는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)로 유도체화될 수 있다. PEG는 2개의 말단 하이드록실 기를 갖는 에틸렌 옥사이드 반복 단위로 구성된 선형 수용성 중합체이다. PEG는 전형적으로 약 500 달톤 내지 약 40,000 달톤인 그들의 분자량에 의해 분류된다. 특정 실시양태에서, 사용된 PEG는 5,000 달톤 내지 약 20,000 달톤의 분자량을 갖는다. 본 발명의 스카폴드에 커플링된 PEG는 분지될 수 있거나 비분지될 수 있다. 예를 들면, 문헌(Monfardini, C. et al. 1995 Bioconjugate Chem 6:62-69)을 참조한다. PEG는 넥타르 인코포레이티드(Nektar Inc.), 시그마 케미칼 캄파니(Sigma Chemical Co.) 및 다른 회사로부터 상업적으로 입수될 수 있다. 이러한 PEG는 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜(MePEG-OH), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-석시네이트(MePEG-S), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-석시네이미드 석시네이트(MePEG-S-NHS), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-아민(MePEG-NH₂), 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-트레실레이트(MePEG-TRES), 및 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜-이미다졸릴-카보닐(MePEG-IM)을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0497] 요약하건대, 사용되는 친수성 중합체, 예를 들면, PEG는 비반응성 기, 예컨대, 메톡시 또는 에톡시 기에 의해 한 말단에서 캡핑된다. 그 후, 중합체는 적합한 활성화제, 예컨대, 시아누르산 할로겐화물(예를 들면, 시아누르산 염화물, 브롬화물 또는 불소화물), 카보닐디이미다졸, 무수물 시약(예를 들면, 디할로석신산 무수물, 예컨대, 디브로모석신산 무수물), 아실 아지드, p-디아조늄벤질 에테르, 3-(p-디아조늄페녹시)-2-하이드록시프로필에테르) 등과의 반응에 의해 다른 말단에서 활성화된다. 그 다음, 활성화된 중합체는 본원에 기재된 바와 같이 폴리펩티드와 반응하여 중합체로 유도체화된 폴리펩티드를 생성한다. 대안적으로, 본 발명의 Tn3 스카폴드의 작용기는 중합체와의 반응을 위해 활성화될 수 있거나, 2개의 기는 공지된 커플링 방법의 이용을 통해 협력된 커플링 반응으로 연결될 수 있다. 당업자에게 공지되어 있고 당업자에 의해 이용되는 다수의 다른 반응식을 이용하여 본 발명의 폴리펩티드를 PEG로 유도체화할 수 있다는 것이 용이하게 인식될 것이다. PEG는 Tn3 스카폴드의 어느 한 말단 또는 Tn3 스카폴드 내에 있는 하나 이상의 작용기에서 본 발명의 스카폴드에 커플링될 수 있다. 특정 실시양태에서, PEG는 N 말단 또는 C 말단에 커플링된다.

[0498] 다른 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드, 이의 유사체 또는 유도체는 진단 또는 검출가능한 시약에 접합될 수 있다. 이러한 Tn3 스카폴드는 임상 시험 절차의 일부로서 질환의 발생 또는 진행을 모니터링하거나 예후하는 데에, 예컨대, 특정 치료의 효능을 확인하는 데에 유용할 수 있다.

[0499] 본 발명은 치료 모이어티에 접합된 Tn3 스카폴드의 용도를 추가로 포괄한다. Tn3 스카폴드는 치료 모이어티, 예컨대, 세포독소, 예를 들면, 세포증식억제제, 세포파괴제, 치료제 또는 방사성 금속 이온, 예를 들면, 알파 방사체에 접합될 수 있다. 세포독소 또는 세포독성체는 세포에 유해한 임의의 물질을 포함한다.

[0500] Tn3 스카폴드의 분석

[0501] 항원에 대한 Tn3 스카폴드의 결합 친화성 및 다른 결합 성질은 예를 들면, 평형 방법(예를 들면, 효소-연결된 면역흡착 분석(ELISA)) 또는 반응속도(예를 들면, 비아코어(BIACORE)[®] 분석)), 및 다른 방법, 예컨대, 간접적인 결합 분석, 경쟁 결합 분석, 겔 전기영동 및 크로마토그래피(예를 들면, 겔 여과)를 포함하는, 당분야에서 공지된 다양한 시험관내 분석 방법들에 의해 측정될 수 있다. 이들 방법 및 다른 방법은 조사될 성분들 중 하나 이상의 성분 상의 표지를 사용할 수 있고/있거나, 발색, 형광, 발광 또는 동위원소 표지를 포함하나 이들로 한정되지 않는 다양한 검출 방법들을 이용할 수 있다. 결합 친화성 및 반응속도의 상세한 설명은 문헌(Paul, W.E., ed., Fundamental Immunology, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999))에서 발견될 수 있다.

[0502] 일부 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 특정 반응속도로 표적에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 1×10^{-2} M, 1×10^{-3} M, 1×10^{-4} M, 1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M, 1×10^{-13} M, 1×10^{-14} M 또는 1×10^{-15} M 미만의 해리 상수 또는 $K_d(k_{off}/k_{on})$ 를 가질 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 비아코어[®] 분석 또는 당분야에서 공지된 다른 분석에 의해 측정될 때 500 μ M, 100 μ M, 500 nM, 100 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM 미만의 K_d 를 갖는다.

[0503] 대안적인 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드의 친화성은 1×10^2 M⁻¹, 1×10^3 M⁻¹, 1×10^4 M⁻¹, 1×10^5 M⁻¹, 1×10^6 M⁻¹, 1×10^7 M⁻¹, 1×10^8 M⁻¹, 1×10^9 M⁻¹, 1×10^{10} M⁻¹, 1×10^{11} M⁻¹, 1×10^{12} M⁻¹, 1×10^{13} M⁻¹, $1 \times$

10^{14} M^{-1} , $1 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$ 또는 $5 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$ 이상의 결합 상수(K_a)(비 k_{on}/k_{off} 로서 계산됨)의 관점에서 기재된다.

[0504] 일부 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드가 표적 에피토프로부터 해리되는 속도는 K_d 또는 K_a 의 값보다 더 적절할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 10^{-3} s^{-1} 미만, $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 미만, 10^{-4} s^{-1} 미만, $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 미만, 10^{-5} s^{-1} 미만, $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 미만, 10^{-6} s^{-1} 미만, $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 미만, 10^{-7} s^{-1} 미만, $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 미만, 10^{-8} s^{-1} 미만, $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ 미만, 10^{-9} s^{-1} 미만, $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ 또는 10^{-10} s^{-1} 미만의 k_{off} 를 갖는다.

[0505] 일부 다른 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드가 표적 에피토프와 결합하는 속도는 K_d 또는 K_a 의 값보다 더 적절할 수 있다. 이 경우, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상, $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상, $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상, $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상, $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상 또는 $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상의 k_{on} 속도로 표적에 결합한다.

[0506] 본 발명의 Tn3 스카폴드는 표적 항원의 면역분석 또는 정제에 특히 유용한 고체 지지체에 부착될 수도 있다. 이러한 고체 지지체는 유리, 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 나일론, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드 또는 폴리프로필렌을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0507] CD40L 특이적 Tn3 스카폴드

[0508] 본 발명은 CD40L에 특이적으로 결합하는 Tn3 스카폴드를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 스카폴드는 인간 CD40L에 특이적으로 결합한다. 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 마우스, 닭, 붉은털 원숭이, 사이노몰구스, 래트 또는 토끼의 CD40L 상동체에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 CD40L의 노출된 에피토프에 결합한다. 이러한 실시양태는 세포 및/또는 수용체를 이소적으로 발현하도록 형질감염된 세포 상에서 내생적으로 발현된 CD40L을 포함한다.

[0509] 일부 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 단량체 CD40L 상에 디스플레이된 에피토프를 인식한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 삼량체 형태의 CD40L 상에 디스플레이된 에피토프를 인식한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 막 결합된 CD40L 상에 디스플레이된 에피토프를 인식한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 가용성 CD40L 상에 디스플레이된 에피토프를 인식한다.

[0510] 다른 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 단량체 CD40L에 결합하고 CD40L 분자의 올리고머화를 방해하거나 저해한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 스카폴드는 CD40L과 CD40의 상호작용을 감소시키거나 억제한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 CD40L에 의해 매개된 세포 신호전달을 작동시킨다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 CD40L에 의해 매개된 세포 신호전달을 길항한다.

[0511] 본 발명은 본원에 기재된 Tn3 스카폴드를 사용하여 CD40L 활성을 조절하는 방법도 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법은 CD40L을 CD40L 특이적 스카폴드와 접촉시키는 단계 및 CD40과 CD40L 사이의 상호작용을 차단하는 단계를 포함한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 방법은 CD40L을 발현하는 세포를 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드와 접촉시키는 단계 및 세포 표면으로부터의 CD40L의 단백질질해 절단을 방해하는 단계를 포함한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 방법은 CD40L 단량체를 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드와 접촉시키는 단계 및 CD40L 올리고머화를 방해하는 단계를 포함한다. 다른 실시양태에서, CD40L의 이량체화 또는 올리고머화는 다량체 Tn3 스카폴드의 사용을 통해 달성될 수 있다.

[0512] 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법은 당분야에서 공지된 관용적인 분석에 의해 측정될 때 CD40L에 결합하는 CD40에 의해 개시된 CD40 매개 면역 반응(예를 들면, 문헌(Elqueta et al. 229: 152-172, 2009) 참조) 또는 다운스트림 신호전달 경로를 감소시키는 CD40L 특이적 스카폴드의 투여를 포함한다.

[0513] 임의의 특정 이론에 의해 구속받고자 하지 않지만, 본 발명의 CD40L 스카폴드는 CD40L과 CD40의 결합을 방지함으로써, 가용성 CD40L에 결합하여 이를 격리시킴으로써, CD40L과 CD40의 상호작용을 변경시키되 결합을 방지하지 않음으로써, 세포 표면으로부터의 CD40L의 메탈로프로테아제 매개 효소적 절단을 방해하거나 향상시켜 가용성 CD40L을 생성함으로써, 세포 표면 CD40L 세포내이입을 방해하거나 향상시킴으로써, 또는 기타 기작에 의해 작용할 수 있다.

[0514] 특이적 CD40L 결합 서열

- [0515] 일부 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 CD40L에 결합하는 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상 또는 6개 이상의 루프 서열을 포함하는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다.
- [0516] 일부 실시양태에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 하기 CD40L 결합 단량체 클론들로부터 선택된 CD40L 결합 단량체 클론의 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상 또는 6개 이상의 루프 서열을 포함한다: 309(천연 Tn3 라이브러리로부터 단리된 모 309 패밀리 클론; 서열번호 20), 309FGwt(인간화된 FG 루프를 갖는 모 309 클론; 서열번호 22), 340(친화성 성숙된 309 클론; 서열번호 24), 341(친화성 성숙된 309 클론; 서열번호 26), 342(친화성 성숙된 309 클론; 서열번호 28 또는 서열번호 146), 343(친화성 성숙된 309 클론; 서열번호 30), 344(친화성 성숙된 309 클론; 서열번호 32), 345(친화성 성숙된 309 클론; 서열번호 34), 346(친화성 성숙된 309 클론; 서열번호 36), 347(친화성 성숙된 309 클론; 서열번호 38), 348(친화성 성숙된 309 클론; 서열번호 40), 349(친화성 성숙된 309 클론; 서열번호 42), 311(천연 Tn3 라이브러리로부터 단리된 모 311 패밀리 클론; 서열번호 44), 311K4E(제1 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열번호 46); 311K4E_1(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열번호 48), 311K4E_2(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열번호 50), 311K4E_3(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열번호 52), 311K4E_4(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열번호 54), 311K4E_5(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열번호 56), 311K4E_7(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열번호 58), 311K4E_8(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열번호 60), 311K4E_9(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열번호 62), 311K4E_10(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열번호 64), 311K4E_11(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열번호 66), 311K4E_12(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열번호 68), 311K4E_13(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열번호 70), 311K4E_14(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열번호 72), 311K4E_15(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열번호 74), 311K4E_16(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열번호 76), 311K4E_19(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열번호 78), 311K4E_20(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열번호 80) 및 311K4E_21(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열번호 82).
- [0517] 일부 실시양태에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 표 2에 나열된 루프 서열들로부터 선택된 하나 이상의 루프 서열을 포함한다. 다른 실시양태에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 표 2에 나열된 BC 루프 서열들로부터 선택된 하나 이상의 BC 루프 서열을 포함한다. 다른 실시양태에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 표 2에 나열된 DE 루프 서열들로부터 선택된 하나 이상의 DE 루프 서열을 포함한다. 다른 실시양태에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 표 2에 나열된 FG 루프 서열들로부터 선택된 하나 이상의 FG 루프 서열을 포함한다.
- [0518] 일부 실시양태에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 표 2에 나열된 BC 루프 서열들로부터 선택된 BC 루프 서열; 및 표 2에 나열된 DE 루프 서열들로부터 선택된 DE 루프 서열을 포함한다. 다른 실시양태에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 표 2에 나열된 BC 루프 서열들로부터 선택된 BC 루프 서열; 및 표 2에 나열된 FG 루프 서열들로부터 선택된 FG 루프 서열을 포함한다. 다른 실시양태에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 표 2에 나열된 DE 루프 서열들로부터 선택된 DE 루프 서열; 및 표 2에 나열된 FG 루프 서열들로부터 선택된 FG 루프 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 1개, 2개 또는 3개의 상이한 Tn3 클론의 루프 서열에 상응하는 루프 서열을 포함한다.
- [0519] 일부 실시양태에서, CD40L 특이적 단량체 스카폴드 서열이 서열의 C 말단에서 또는 추가 N 말단 아미노산에서 링커 및/또는 히스티딘 태그(예를 들면, His-8 태그)를 함유하는 경우, 이들 C 말단 링커 및/또는 히스티딘 태그 및 추가 N 말단 아미노산이 제거됨으로써, 상응하는 아미노산 서열이 C 말단 링커 및 His 태그 서열 및 N 말단 추가 아미노산 또는 아미노산들의 결실을 함유할 수 있다.
- [0520] 일부 실시양태에서, CD40L 특이적 Tn3 스카폴드는 단일 단량체 서브유닛, 예를 들면, 342 클론 서열(친화성 성숙된 309 클론; 서열번호 28 및/또는 서열번호 146)을 포함한다. 다른 실시양태에서, CD40L 특이적 스카폴드는 하나 초과 단량체 서브유닛, 예를 들면, 2개의 342 클론 단량체 서브유닛(서열번호 28 및/또는 서열번호 146)을 직렬로 포함한다(예를 들면, 서열번호 135 참조). 특정 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 변이체 HSA에 접합된다(예를 들면, 서열번호 134 및 서열번호 135 참조). 추가 실시양태에서, HSA는 다량체 Tn3 스카폴드의 N 말단 또는 C 말단에서 접합될 수 있다.

- [0521] 특정 실시양태에서, CD40L 특이적 Tn3 스카폴드는 단일 311K4E_12 단량체 서브유닛, GS 링커, 및 C34S HSA 변이체를 포함한다(예를 들면, 서열번호 201 참조). 다른 특정 실시양태에서, CD40L 특이적 Tn3 스카폴드는 베타 가닥 C CELTYG 변이체, 1개의 전부 글리신 링커 및 C34S HSA 변이체와 함께 단일 311K4E_12 단량체 서브유닛을 포함한다(예를 들면, 서열번호 202 참조). 또 다른 특정 실시양태에서, CD40L 특이적 Tn3 스카폴드는 직렬로 연결된 2개의 311K4E_12 서브유닛, 및 2개의 GS 링커를 포함하는데, 이때 1개의 GS 링커는 상기 서브유닛들을 서로 연결하고 제2 GS 링커는 1개의 서브유닛을 C34S HSA 변이체에 연결한다(예를 들면, 서열번호 203 참조). 또 다른 특정 실시양태에서, CD40L 특이적 Tn3 스카폴드는 직렬로 연결된 2개의 311K4E_12 서브유닛, 및 2개의 전부 글리신 링커를 포함하는데, 이때 1개의 전부 글리신 링커는 상기 서브유닛들을 서로 연결하고 제2 전부 글리신 링커는 1개의 서브유닛을 C34S HSA 변이체에 연결한다(예를 들면, 서열번호 204 참조).
- [0522] 한 특정 실시양태에서, CD40L 특이적 Tn3 스카폴드는 GS 링커를 통해 직렬로 연결된 2개의 309 서브유닛을 포함한다(예를 들면, 서열번호 205 참조). 또 다른 특정 실시양태에서, CD40L 특이적 Tn3 스카폴드는 C34S HSA 변이체에 연결된 단일 309 서브유닛을 포함한다(예를 들면, 서열번호 206 참조). 또 다른 특정 실시양태에서, CD40L 특이적 Tn3 스카폴드는 직렬로 연결된 2개의 309 서브유닛, 및 2개의 GS 링커를 포함하는데, 이때 1개의 GS 링커는 상기 서브유닛들을 서로 연결하고 제2 GS 링커는 1개의 서브유닛을 C34S HSA 변이체에 연결한다(예를 들면, 서열번호 207 참조).
- [0523] 특정 실시양태에서, CD40L 특이적 Tn3 스카폴드는 단일 342 단량체 서브유닛, GS 링커, 및 C34S HSA 변이체를 포함한다(예를 들면, 서열번호 134 참조). 또 다른 특정 실시양태에서, CD40L 특이적 Tn3 스카폴드는 단일 342 단량체 서브유닛, 1개의 전부 글리신 링커 및 C34S HSA 변이체를 포함한다(예를 들면, 서열번호 144 참조). 또 다른 특정 실시양태에서, CD40L 특이적 Tn3 스카폴드는 직렬로 연결된 2개의 342 서브유닛, 및 2개의 GS 링커를 포함하는데, 이때 1개의 GS 링커는 상기 서브유닛들을 서로 연결하고 제2 GS 링커는 1개의 서브유닛을 C34S HSA 변이체에 연결한다(예를 들면, 서열번호 135 참조). 또 다른 특정 실시양태에서, CD40L 특이적 Tn3 스카폴드는 직렬로 연결된 2개의 342 서브유닛, 및 2개의 전부 글리신 링커를 포함하는데, 이때 1개의 전부 글리신 링커는 상기 서브유닛들을 서로 연결하고 제2 전부 글리신 링커는 1개의 서브유닛을 C34S HSA 변이체에 연결한다(예를 들면, 서열번호 145 참조). 또 다른 특정 실시양태에서, CD40L 특이적 Tn3 스카폴드는 GS 링커에 의해 직렬로 연결된 2개의 342 서브유닛을 포함한다(예를 들면, 서열번호 208 참조).
- [0524] 특정 실시양태에서, CD40L 특이적 Tn3 스카폴드는 포함한다. 또 다른 특정 실시양태에서, CD40L 특이적 Tn3 스카폴드는 직렬로 연결된 311 서브유닛 또는 311로부터 유도된 서브유닛(예를 들면, 311K4E_12) 및 309 서브유닛 또는 309로부터 유도된 서브유닛(예를 들면, 342), 및 2개의 GS 링커를 포함하는데, 이때 1개의 GS 링커는 상기 서브유닛들을 서로 연결하고 제2 GS 링커는 1개의 서브유닛을 C34S HSA 변이체에 연결한다(예를 들면, 서열번호 135 참조). 또 다른 특정 실시양태에서, CD40L 특이적 Tn3 스카폴드는 직렬로 연결된 311 서브유닛 또는 311로부터 유도된 서브유닛(예를 들면, 311K4E_12) 및 309 서브유닛 또는 309로부터 유도된 서브유닛(예를 들면, 342), 및 2개의 전부 글리신 링커를 포함하는데, 이때 1개의 전부 글리신 링커는 상기 서브유닛들을 서로 연결하고 제2 전부 글리신 링커는 1개의 서브유닛을 C34S HSA 변이체에 연결한다(예를 들면, 서열번호 145 참조).
- [0525] CD40L 특이적 직렬 2가 Tn3 스카폴드 및 혈청 알부민(SA) 융합체의 예는 도 2a에 제시되어 있다(도 9a 또한 참조). 특정 링커가 도 2a에 제공되어 있지만, 다른 링커들도 본원에서 제공된 것으로서 고려된다. 야생형 성숙 SA, 예를 들면, 무린 혈청 알부민(MSA) 또는 인간 혈청 알부민(HSA)이 사용될 수 있지만, 성숙 SA 내의 하나 이상의 시스테인(C) 아미노산 잔기가 예를 들면, 세린(S), 알라닌(A), 글리신(G) 등으로 치환될 수 있다는 것이 고려된다.
- [0526] 대표적인 구조물들은 하기 제시되어 있다. SA의 서열은 밑줄로 표시되어 있다. 링커는 상자표시되어 있다. 다수의 변형이 본 발명의 범위 내에 있다는 것이 이해될 것이다. 예를 들면, 링커가 변경될 수 있고(여러 비-한정된 예가 본원에서 제공되어 있음), 1개 또는 2개의 제1 N 말단 아미노산 잔기(SQ)가 부재할 수 있고/있거나 대안적인 아미노산 잔기로 치환될 수 있고, 태그(예를 들면, 6xHis 태그)가 도입될 수 있고, 대안적인 CD40L 특이적 스카폴드(예를 들면, 피브로넥틴의 제10 Fn3 도메인에 기초한 스카폴드)가 유사한 구조물에서 사용될 수 있다.
- [0527] 342 1가 HSA 구조물 1(서열번호 134)

[0528] [342 단량체]-(G₄S)₂ 링커-HSA_{C34S}

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPD
TEYEVSLICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
AFAQYLQOSPFDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG
EMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPRLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARR
HPYFYAPELLFFAKRYKAAFECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQK
FGERAFKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC
ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDV
FLGMFLYEYARRHPDYSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAE
TFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKE
TCFAEEGKKLVAASQAALGL

[0529]

[0530] 342 1가 HSA 구축물 2(서열번호 144)

[0531] [342 단량체]-(G₁₀) 링커-HSA_{C34S}:

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPD
TEYEVSLICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGGGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
AFAQYLQOSPFDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG
EMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPRLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARR
HPYFYAPELLFFAKRYKAAFECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQK
FGERAFKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC
ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDV
FLGMFLYEYARRHPDYSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAE
TFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKE
TCFAEEGKKLVAASQAALGL

[0532]

[0533] 342 2가 HSA 구축물 1(서열번호 135)

[0534] [342 단량체]-(G₄S)₃ 링커-[342 단량체]-(G₄S)₂ 링커-HSA_{C34S}:

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPD
TEYEVSLICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGSGGGSGGGGSRDAPSQIEVKDVTDTTALI
TWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPDTEYEVSLICRSGDMS
SNPAKETFTTGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOSPFDHV
KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE
CFLOHKDDNPRLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKR
YKAAFECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCE
KPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPD
YSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE
RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQ
AALGL

[0535]

[0536] 342 2가 HSA 구축물 2(서열번호 145)

[0537] [342 단량체]-G₁₅ 링커-[342 단량체]-G₁₀ 링커-HSA_{C34S}:

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPD
TEYEVSLICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGGGGGGGGGGRLDAPSQIEVKDVTDTTALI
TWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPDTEYEVSLICRSGDMS
SNPAKETFTTGGGGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQOSPFDHV
KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE
CFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKR
YKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAKAWAVARLS
QRFPAEFAEVSKLVDTLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCE
KPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPD
YSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGE
YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL
CVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE
RQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQ
AALGL

[0538]

[0539] 311K4E₁₂ 1가 HSA 구축물 1(서열번호 201)

[0540] [311K4E₁₂ 단량체]-(G₄S)₂ 링커-HSA_{C34S}:

SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLK
PDTEYEVSLICLTDTGTYNNPAKETFTTGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKAL
VLIAFAQYLQOSPFDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRE
TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEI
ARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKAS
LQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVDTLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAK
YICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEA
KDVFLGMFLYEYARRHPDYYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVE
EPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPE
AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEF
NAETFTFHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKAD
DKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

[0541]

[0542] 311K4E₁₂ 1가 HSA 구축물 2(서열번호 202)

[0543] [311K4E₁₂ 단량체]-G₁₀ 링커-HSA_{C34S}:

SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELTYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLK
PDTEYEVSLICLTDTGTYNNPAKETFTTGGGGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKAL
VLIAFAQYLQOSPFDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRE
TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEI
ARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKAS
LQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVDTLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAK
YICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEA
KDVFLGMFLYEYARRHPDYYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVE
EPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPE
AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEF
NAETFTFHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKAD
DKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

[0544]

[0545] 311K4E₁₂ 2가 HSA 구축물 1(서열번호 203)

[0546] [311K4E_12 단량체]-G₄S₃ 링커-[311K4E_12 단량체]-(G₄S)₂ 링커-HSA_{C34S}:

SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLK
PDTEYEVSLICLTDTTGTNNPAKETFTTGGGGSGGGSGGGGSRDAPSQIEVEDVTDTT
ALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLKPDTEYEVSLICL
TTDGTNNPAKETFTTGGGGSGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQS
PFEDHVKLNVNEVEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQ
EPERNECFLQHKDDNPRLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPEL
LFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELREDEGKASSAKQRLKCSLQKFGERAFAKAW
AVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSK
LKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCNKYAEAKDVFLGMFLY EY
ARRHPDYSVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC E
FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLS
VVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADIC
TLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKK
LVAASQAALGL

[0547]

[0548] 311K4E_12 2가 HSA 구조물 2(서열번호 204)

[0549] [311K4E_12 단량체]-G₁₅ 링커-[311K4E_12 단량체]-G₁₀ 링커-HSA_{C34S}:

SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELTGKIDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLK
PDTEYEVSLICLTDTTGTNNPAKETFTTGGGGGGGGGGGGSRDAPSQIEVEDVTDTT
ALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLKPDTEYEVSLICL
TTDGTNNPAKETFTTGGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQS
PFEDHVKLNVNEVEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQ
EPERNECFLQHKDDNPRLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPEL
LFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELREDEGKASSAKQRLKCSLQKFGERAFAKAW
AVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSK
LKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCNKYAEAKDVFLGMFLY EY
ARRHPDYSVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC E
FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLS
VVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADIC
TLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKK
LVAASQAALGL

[0550]

[0551] 약학 조성물

[0552] 또 다른 양태에서, 본 발명은 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 제제화된, 본 발명의 Tn3 스카폴드들 중 하나 또는 이들의 조합물을 함유하는 조성물, 예를 들면, 약학 조성물(그러나, 이것으로 한정되지 않음)을 제공한다. 이러한 조성물은 본 발명의 Tn3 스카폴드들 중 하나 또는 이들의 조합물, 예를 들면, 2개 이상의 상이한 본 발명의 Tn3 스카폴드(그러나, 이것으로 한정되지 않음)를 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 약학 조성물은 표적 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하거나 상보적인 활성을 갖는 Tn3 스카폴드들의 조합물을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 본 발명의 단일 단량체 Tn3 스카폴드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 본 발명의 다량체 Tn3 스카폴드를 포함한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 본 발명의 이량체 Tn3 스카폴드를 포함한다.

[0553] 본 발명의 약학 조성물은 조합 치료에서, 예컨대, 다른 약제와 조합된 형태로 투여될 수도 있다. 예를 들면, 조합 치료는 하나 이상의 다른 치료와 조합된 본 발명의 Tn3 스카폴드를 포함할 수 있는데, 이때 상기 치료는 면역치료, 화학치료, 방사선치료 또는 약물치료일 수 있다. 본 발명의 약학 화합물은 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 염을 포함할 수 있다.

[0554] 스카폴드를 사용하는 방법

[0555] 본 발명의 Tn3 스카폴드는 시험관내 및 생체내 진단 및 치료 유용성을 갖는다. 예를 들면, 이들 분자는 다양한 장애를 치료하거나, 예방하거나 진단하기 위해 배양물 중의 세포, 예를 들면, 시험관내 또는 생체외, 또는 대상체, 예를 들면, 생체내에 투여될 수 있다.

[0556] 본 발명은 본 발명의 Tn3 스카폴드를 사용하는 방법도 제공한다. 본 발명은 단독으로 또는 다른 치료와 조합되어 사용되는, 암, 염증성 및 자가면역 질환, 및 감염성 질환을 포함하나 이들로 한정되지 않는 질환 또는 장애와 관련된 하나 이상의 증상의 예방, 진단, 관리, 치료 또는 호전을 위한 본 발명의 Tn3 스카폴드의 용도도 포

괄한다. 본 발명은 단독으로 또는 다른 치료와 조합되어 사용되는, 암, 염증성 및 자가면역 질환, 및 감염성 질환을 포함하나 이들로 한정되지 않는 질환, 장애 또는 감염과 관련된 하나 이상의 증상의 예방, 관리, 치료 또는 호전을 위한, 모이어티(예를 들면, 치료제 또는 약물)에 접합되거나 융합된 본 발명의 Tn3 스카폴드의 용도도 포괄한다.

- [0557] 본 발명은 전통적인 항체에 의해 용이하게 달성되지 않는 에피토프의 표적화 방법도 제공한다. 예를 들면, 한 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 먼저 인접한 항원을 표적화하는 데에 사용될 수 있고, 결합하는 동안 또 다른 결합 도메인은 숨은 항원에 결합할 수 있다.
- [0558] 본 발명은 상이한 종류의 세포들을 회합시키기 위해 Tn3 스카폴드를 사용하는 방법도 제공한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 단백질은 표적 세포를 1개의 결합 도메인과 결합시킬 수 있고 또 다른 세포를 또 다른 결합 도메인을 통해 동원할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 제1 세포는 암세포일 수 있고, 제2 세포는 면역 이펙터 세포, 예컨대, NK 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 2개의 상이한 세포들, 예컨대, 항원 제시 세포와 T 세포 사이의 상호작용을 강화시켜 가능하게는 면역 반응을 증강시키는 데에 사용될 수 있다.
- [0559] 본 발명은 세포 집단을 고갈시키기 위해 Tn3 스카폴드를 사용하는 방법도 제공한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 방법은 하기 종류의 세포의 고갈에 유용하다: 호산구, 호염기구, 호중구, T 세포, B 세포, 비만 세포, 단핵구 및 종양 세포.
- [0560] 본 발명은 진단 시약으로서 Tn3 스카폴드를 사용하는 방법도 제공한다. 이러한 진단 시약은 CD40L의 존재 또는 부재, CD40 수용체의 존재, CD40 수용체에 대한 CD40L의 결합 효율, 환자에서의 자유 CD40L, 샘플 중의 자유 CD40L, 또는 샘플 중의 CD40 수용체에 결합된 CD40L에 대해 시험하는 데에 사용될 수 있다.
- [0561] 본 발명의 Tn3 스카폴드 및 이를 포함하는 조성물은 많은 목적을 위해, 예를 들면, 자가면역 및/또는 염증성 질환을 포함하나 이들로 한정되지 않는 광범위한 만성 및 급성 질환 및 장애에 대한 치료제로서 유용하다. 본원에 기재된 본 발명의 조성물 및 방법은 자가면역 장애 및/또는 염증성 장애의 예방 또는 치료에 유용하다.
- [0562] 자가면역 및/또는 염증성 장애의 예로는 원형탈모증, 강직 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역 에디슨병, 부신의 자가면역 질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 난소염 및 고환염, 쇼그렌 증후군, 건선, 죽상동맥경화증, 당뇨병성 망막병증 및 기타 망막병증, 후수정체 섬유증, 연령 관련 황반 변성, 신생혈관 녹내장, 혈관종, 갑상선 과다형성(그레이브스병을 포함함), 각막 및 기타 조직 이식, 만성 염증, 부패증, 류마티스성 관절염, 복막염, 크론병, 재관류 손상, 폐혈증, 내독성 쇼크, 낭성 섬유증, 심내막염, 건선, 관절염(예를 들면, 건선 관절염), 아나필락시스 쇼크, 장기 허혈, 재관류 손상, 척수 손상 및 동종이식 거부, 자가면역 혈소판감소, 베체트병, 수포성 유천포창, 심근병증, 복강 스프루-피부염, 만성 피로 면역 기능장애 증후군(CFIDS), 만성 염증성 탈수초 다발신경병증, 처르그 스트라우스 증후군, 반흔성 유천포창, CREST 증후군, 한랭응집소병, 크론병, 원관상루푸스, 본태성 혼합 한랭글로불린혈증, 섬유근육통-섬유근육염, 사구체신염, 그레이브스병, 켈랭-바레, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐 섬유증, 특발성 혈소판감소자색반병(ITP), IgA 신경병증, 소아 관절염, 편평태선, 홍반루푸스, 메니에르병, 혼합결합조직 질환, 다발성 경화증, 1형 또는 면역 매개 진성당뇨병, 중증 근육무력증, 심상성천포창, 악성 빈혈, 결절다발동맥염, 다발연골염, 다분비선증후군, 류마티스성 다발근육통, 다발근육염 및 피부근육염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담관간경화증, 건선, 건선 관절염, 레이놀드 현상, 레이터 증후군, 류마티스성 관절염, 사르코이드증, 피부경화증, 쇼그렌 증후군, 강직 증후군, 전신홍반루푸스, 홍반루푸스, 타카야수 동맥염, 측두 동맥염/거대세포 동맥염, 폐양성 결장염, 포도막염, 혈관염, 예컨대 포진피부염 혈관염, 백반증, 및 베게너 육아종증이 있으나 이들로 한정되지 않는다.
- [0563] 염증성 장애의 예로는 만성 바이러스 또는 세균 감염으로부터 발생된 천식, 너염, 염증성 장 질환, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 알레르기 장애, 폐혈증 쇼크, 폐 섬유증, 미분화된 척추관절병증, 미분화된 관절병증, 관절염, 염증성 골용해 및 만성 염증을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 본 발명의 조성물 및 방법은 상기 질환들의 예방, 관리 또는 치료에 사용되는 하나 이상의 통상적인 치료와 함께 사용될 수 있다.
- [0564] 본 발명은 암, 자가면역, 염증성 또는 감염성 질환, 또는 이들의 하나 이상의 증상을 예방하거나, 관리하거나, 치료하거나 호전시키는 방법으로서, 암 치료제가 아닌 하나 이상의 치료제(비-암 치료로도 공지됨)와 조합된 하나 이상의 본 발명의 Tn3 스카폴드를 상기 예방, 관리, 치료 또는 호전이 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0565] 이러한 치료제의 예로는 진토제, 항진균제, 항균제, 예컨대, 항생제, 소염제 및 항바이러스제가 있으나 이들로

한정되지 않는다. 진토제의 비-한정적인 예로는 메토피마진 및 메토클로프라미드가 있다. 항진균제의 비-한정적인 예로는 아졸 약물, 이미다졸, 트라이아졸, 폴리엔, 암포테리신 및 라이리미딘이 있다. 항균제의 비-한정적인 예로는 닥티노마이신, 블레오마이신, 에리쓰로마이신, 페니실린, 미쓰라마이신, 세팔로스포린, 이미페넴, 악스트레오남, 반코마이신, 사이클로세린, 박시트라신, 클로람페니콜, 클린다마이신, 테트라사이클린, 스트렙토마이신, 토브라마이신, 젠타미신, 아미카신, 카나마이신, 네오마이신, 스펙티노마이신, 트리메토프림, 노르플록사신, 레팜핀, 폴리믹신, 암포테리신 B, 니스타틴, 케토카나졸, 이소니아지드, 메트로니다졸 및 펜타미딘이 있다. 항바이러스제의 비-한정적인 예로는 뉴클레오시드 유사체(예를 들면, 지도부딘, 아사이클리비르, 강사이클리비르, 비다르빈, 이독수리딘, 트리플루리딘 및 리바비린), 포스카렛, 아만타딘, 리만타딘, 사퀴나비르, 인디나비르, 리토나비르, 인터페론("IFN")- α , β 또는 γ , 및 AZT가 있다. 소염제의 비-한정적인 예로는 비-스테로이드성 소염 약물("NSAID"), 스테로이드성 소염 약물, 베타 작용제, 항콜린작용제 및 메틸잔틴이 있다.

[0566] 한 실시양태에서, 본 발명은 만성 염증을 치료할 수 있는 조성물을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 조성물은 파괴 또는 불활성화를 위한 면역 세포의 표적화에 유용하다. 한 실시양태에서, 상기 조성물은 활성화된 T 세포, 휴면 T 세포, B 세포, 호중구, 호산구, 호염기구, 비만 세포 또는 수지상 세포의 표적화에 유용하다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 면역 세포 기능을 감소시킬 수 있는 조성물을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 면역 세포 기능을 제거할 수 있다.

[0567] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 위장관 질환의 치료에 유용한 조성물을 포함한다. 본 발명의 스카폴드는 낮은 pH 조건 하에서 고도의 안정성을 나타낸다. 낮은 pH에서의 안정성은 상기 조성물이 다양한 위장 장애, 예컨대, 자극성 장 증후군, 위식도 역류, 장 가성폐쇄, 덤핑 증후군, 난치성 구역, 소화성 궤양, 충수염, 허혈성 결장염, 궤양성 결장염, 위염, 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 질환, 크론병, 위플병(Whipple's disease), 복강 스프루, 게실염, 게실증, 삼킴곤란, 열공 헤르니아, 감염 식도 장애, 딸꾹질, 되새김질 등에 대한 경구 투여용으로 적합할 것이다.

[0568] 본 발명은 질환 또는 이의 증상의 예방, 치료, 경감 또는 호전에 있어서 조합 조성물 및 이러한 조성물의 사용 방법을 추가로 제공한다. 본 발명의 Tn3 스카폴드는 질환 또는 이의 증상의 예방, 치료, 경감 또는 호전에 적합한 보편적인 치료와 조합될 수 있다. 예시적인 보편적인 치료는 문헌(Physician's Desk Reference (56th ed., 2002 and 57th ed., 2003))에서 발견될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 화학치료, 방사선치료, 수술, 생물학적 물질(항체 또는 펩티드)을 사용한 면역치료, 소분자, 또는 당분야에서 공지된 또 다른 치료와 조합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조합 치료가 함께 투여된다. 다른 실시양태에서, 조합 치료가 따로 투여된다.

[0569] 본 발명은 질환을 진단하는 방법도 제공한다. 질환과 관련된 특정 표적에 결합하는 본 발명의 Tn3 스카폴드는 상기 질환을 진단하는 데에 이용되는 방법에서 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계, 표적:스카폴드 상호작용이 형성될 수 있게 하는 조건 하에서 표적을 상기 샘플 중의 Tn3 스카폴드와 접촉시키는 단계, 및 표적:스카폴드 복합체를 확인하여 샘플 중의 표적을 검출하는 단계를 포함하는, 대상체에서 질환을 진단하는 방법에서 사용된다. 다른 실시양태에서, 진단되는 질환은 본원에 기재되어 있다.

[0570] 본 발명은 특정 표적을 조영하는 방법도 제공한다. 한 실시양태에서, 조영제, 예컨대, 녹색 형광 단백질, 다른 형광 태그(Cy3, Cy5, 로다민 등), 비오틴 또는 방사성 핵종에 접합된 본 발명의 Tn3 스카폴드는 특정 표적의 존재, 위치 또는 진행을 조영하는 방법에서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드를 포함하는 표적을 조영하는 방법은 시험관내에서 수행된다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드를 포함하는 표적을 조영하는 방법은 생체내에서 수행된다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드를 포함하는 표적을 조영하는 방법은 MRI, PET 스캐닝, X-선, 형광 검출 또는 당분야에서 공지된 다른 검출 방법에 의해 수행된다.

[0571] 본 발명은 본 발명의 스카폴드를 사용하여 질환 진행, 재발, 치료 또는 호전을 모니터링하는 방법도 제공한다. 한 실시양태에서, 질환 진행, 재발, 치료 또는 호전을 모니터링하는 방법은 화합물/표적을 본원에서 제시된 본 발명의 Tn3 스카폴드로 조영하거나, 진단하거나 접촉시키는 방법에 의해 달성된다.

[0572] 약학 투약 및 투여

[0573] 본 발명의 Tn3 스카폴드를 포함하는 약학 또는 멸균 조성물을 제조하기 위해, 스카폴드를 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제와 혼합한다. 투여를 위해, 조성물은 바람직하게는 내독소 및/또는 관련 발열원성 물질을 실질적으로 함유하지 않는 발열원 무함유 조성물이다. 치료를 위한 투여 요법의 선택은 물질의 혈청 또는 조직

전환 속도, 증상의 수준, 물질의 면역원성 및 생물학적 매트릭스 내의 표적 세포의 접근가능성을 비롯한 여러 인자들에 의해 좌우된다. 특정 실시양태에서, 투여 요법은 허용가능한 수준의 부작용과 일치하는, 환자에게 전달되는 치료제의 양을 최소화한다.

[0574] 환자에게 독성을 나타내지 않으면서 특정 환자, 조성물 및 투여 방식에 대한 원하는 치료 반응을 달성하기에 효과적인 활성 성분의 양을 수득하기 위해 본 발명의 약학 조성물 중의 활성 성분의 실제 용량 수준을 변경할 수 있다. 선택된 용량 수준은 사용된 본 발명의 특정 조성물, 또는 이의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배출 속도, 치료 지속기간, 사용된 특정 조성물과 조합되어 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료되는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강 및 과거 병력, 및 의학 분야에서 잘 공지된 유사 인자들을 비롯한 다양한 약동학적 인자들에 의해 좌우될 것이다.

[0575] 본 발명의 조성물은 당분야에서 공지된 다양한 방법들 중 하나 이상의 방법을 이용함으로써 하나 이상의 투여 경로를 통해 투여될 수도 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 Tn3 스카폴드는 적절한 생체내 분포를 보장하도록 제제화될 수 있다.

[0576] 등가물

[0577] 당업자는 단지 관용적인 실험을 이용하여 본원에 기재된 발명의 특정 실시양태들에 대한 많은 등가물들을 인식할 것이거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물들은 하기 특허청구범위에 의해 포괄되고자 한다.

[0578] 본 명세서에서 언급된 모든 공개문헌, 특허 및 특허출원은 각각의 개별 공개문헌, 특허 또는 특허출원이 본원에 참고로 도입되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 표시되어 있는 것처럼 동일한 정도로 본 명세서 내로 참고로 도입된다.

[0579] **실시예**

[0580] 이하 본 발명을 하기 실시예와 관련하여 기재한다. 이들 실시예는 단지 예시적이고 본 발명은 이들 실시예로 한정되는 것으로서 해석되어서는 결코 안 되며 오히려 본원에서 제공된 교시의 결과로서 자명해질 임의의 모든 변형들을 포괄하는 것으로서 해석되어야 한다.

[0581] 실시예 1

[0582] **모 Tn3 스카폴드에 대한 3 루프 라이브러리의 구축**

[0583] 국제 특허출원 공보 제W0 2009/058379호에 기재된 모 Tn3 스카폴드(여기서, "Tn3 SS4"로 표기됨)에 기초하여 라이브러리를 구축하였다. 상기 라이브러리는 BC, DE 및 FG 루프의 무작위화된 영역을 함유하였다. 이 디자인은 천연 FnIII 도메인에 대해 기재된 다양성의 패턴과 일치하는, 특징규명된 서열 및 루프 길이 다양성(BC 및 FG 루프에 대한 3개의 상이한 길이)을 Tn3 라이브러리 내로 도입하였고, 다양성을 상기 라이브러리 내로 도입하기 위해 "NHT" 혼합된 코돈 체계를 사용하였다(H = A, T, C). 이 체계는 20개의 아미노산 중 12개의 아미노산을 코딩하는 12개의 코돈(표 3 참조), 즉 유일한 아미노산을 코딩하는 각각의 코돈을 발생시켰다. 더욱이, 정지 또는 시스테인(Cys) 코돈은 없었다.

표 3

A	AAT = Asn	ATT = Ile	ACT = Thr
G	GAT = Asp	GTT = Val	GCT = Ala
C	CAT = His	CTT = Leu	CCT = Pro
T	TAT = Tyr	TTT = Phe	TCT = Ser
	A	T	C

[0584]

[0585] 표 4에 제시된 축퇴 올리고뉴클레오티드를 사용하여 라이브러리 다양성을 발생시켰다.

표 4

올리고 뉴클레오타이드	루프	서열	서열번호
BC9 NHT	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGNHTNHTSCGNHTGSTNHTNHTNHTGGCTGTGAAGTACCTATGGCATTAAA	178
BC11 NHT	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGNHTNHTBSTNHTNHTNHTNHTNHTNHTGGCTGTGAAGTACCTATGGCATTAAA	179
BC12 NHT	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGNHTVMACCGNHTNHTNHTRRRCRGCNHTVTTNHTGGCTGTGAAGTACCTATGGCATTAAA	180
DE NHT	DE	CGATCGCACCACCATAGATCTGNHTNHTNHTNHTNHTNHTTTATAGCATTGGTAACCTGAAACCG	181
FG9 NHT	FG	GAATATGAAGTGAGCCTGATTTGCNHTAMSNTNHTGGTNHTNHTNHTKCGAAAGAAACCTTTACCACCGGTG	182
FG10 NHT	FG	GAATATGAAGTGAGCCTGATTTGCNHTAMSNTNHTNHTNHTNHTRGCNHTCCGGCGAAAGAAACCTTTACCACCGGTG	183
FG11 NHT	FG	GAATATGAAGTGAGCCTGATTTGCNHTAMSNTNHTGGTNHTNHTAGCAACCCGGCGAAAGAAACCTTTACCACCGGTG	184

뉴클레오타이드 코드: N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G; M = A/C; K = G/T

[0586]

[0587]

표 5에 제시된 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 라이브러리를 조립하였다.

표 5

올리고뉴클레오타이드	서열	서열번호
BCX-DE 브리지 v2	CAGATCTATGGTGGTGCGATCGCCCGGCACATCTTTAATGCCATAGGTCAAGTTCACA	185
DE-FGX 브리지 v2	GCAAATCAGGCTCACTTCATATTCGGTATCCGGTTTCAGGTTACCAATGCTAT	186
KpnI amp rev v2	CGGGTCGGTTGGGGTACCGCCACCGGTGGTAAAGGTTTCTTT	187
KpnI 역방향 v2	CGGGTCGGTTGGGGTA	188
BC 라이브러리 amp v2	GGCCAGCCGGCCATGGCCGCCATTGAAGTGAAAGATGTGACCGATACCAACCGCGCTGATTACCTGG	189

[0588]

[0589]

축퇴 올리고뉴클레오타이드들(각각 BC 및 FG 루프에 상응하는 등물 비의 올리고뉴클레오타이드들), BCX-DE 브리지 (bridge) v2, DE-FGX 브리지 v2, 및 KpnI amp rev v2의 혼합물을, 과량의 외부 프라이머를 사용하지 않으면서 20 주기 PCR 반응에서 조립하였다. 이 생성물을 희석하고, 프라이머 BC 라이브러리 amp v2 및 KpnI 역방향 v2를 사용하여 정규 PCR 반응에서 증폭하였다. 발생된 PCR 생성물은 완전한 Tn3 유전자를 발생시켰고, 그 후 상기 완전한 Tn3 유전자를 NcoI 및 KpnI로 절단하고 파지 디스플레이 벡터(국제 특허출원 공보 제W0 2009/058379호에 기재됨) 내로 결합시켰다. DNA를 전기천공으로 이. 콜라이 내로 형질전환시켰다. 라이브러리의 최종 다양성은 약 7.9×10^{10} 개 구성원인 것으로 평가되었다.

[0590]

전기천공 후, 라이브러리를 진탕하면서 37℃에서 1시간 동안 항온처리하였다. M13K07 헬퍼 파지를 첨가하고, 1 시간 후 세포를 보다 큰 부피까지 희석하고 밤새 진탕하면서 37℃에서 생장시켰다. 다음날 PEG 8000을 사용한 침전으로 파지를 상청액으로부터 제거하고 농축하였다.

[0591]

실시예 2

- [0592] 인간 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드에 대한 패닝(panning) 라이브러리
- [0593] 10¹⁰ 개 초과와 유일한 서열들을 함유하는 파지 디스플레이된 Tn3 라이브러리들을 CD40L에 대해 패닝시켰다. 이들 라이브러리들에서의 다양성을 항체 가변 도메인 내의 3개 CDR 루프들과 유사한 BC, DE 및 FG 루프들의 서열 및 길이 다양성으로부터 유도하였다. 제조합 바이오티닐화된 인간 CD40L 및 CD40L 과다발현 CHO 세포주에 대한 라이브러리의 패닝으로 리드(lead) Tn3 단백질의 선택을 수행하였다. 이들 2개의 물질들에 대한 대안적인 라운드의 패닝을 이용하여 리드가 천연 막-고착된 CD40L뿐만 아니라 제조합 세포의 도메인도 인식하도록 보장하였다.
- [0594] 5배 물 과량의 바이오티닐화 시약을 사용하여 제조합 인간 CD40L(인간 메가CD40L; 악소라(Axxora))을 EZ-링크 설포-NHS-비오틴(피어스(Pierce), 미국 일리노이주 록포드 소재)으로 바이오티닐화시켰다. 실온에서 1시간 동안 항온처리한 후, 샘플을 PBS에서 밤새 투석하여 접합되지 않은 비오틴을 제거하였다. 10 μ g의 바이오티닐화된 CD40L을 M280 스트렙타비딘 비드(다이날(Dynal), 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재) 상에 고정시킨 후, 10 mg/ml의 BSA를 함유하는 PBS에서 2시간 동안 차단하였다. 투입물(input)은 실시예 1에 기재된 바와 같이 발생된 라이브러리 또는 추가로 표준 구축 기법, 예컨대, 국제 특허출원 공보 제WO 2009/058379호에 기재된 구축 기법의 이용을 통해 발생된 라이브러리로 구성되었다.
- [0595] 파지를, 10 mg/ml의 BSA를 함유하는 PBS에서 2시간 동안 차단하였다. 차단된 투입물을 차단된 M280 스트렙타비딘 대조군 비드(표적 없음)에 첨가하고 실온에서 진동기(rocker) 상에서 2시간 동안 항온처리하여 상기 비드에 대한 결합제의 라이브러리를 고갈시켰다. 그 후, 고갈된 라이브러리를 CD40L로 코팅된 비드에 첨가하고 진동 플랫폼 상에서 실온에서 2시간 동안 항온처리하였다. PBST(PBS + 0.1% 트윈(Tween))로 3회 세척하여 결합되지 않은 파지를 제거한 후, 비드를 기하급수적으로 성장하는 이. 콜라이 XL-1 블루 세포에 첨가한 후, 50 μ g/ml의 카베니실린을 함유하는 60 ml의 2xYT 배지에서 상기 세포를 M13K07 헬퍼 파지로 공-감염시켰다. 진탕하면서 37°C에서 밤새 생장시킨 후, PEG 침전을 이용하여 파지를 밤샘 배양 배지로부터 수거하였다.
- [0596] CD40L 과다발현 CHO 세포주에 대한 제2 라운드의 패닝(라운드 2)을 수행하였다. 파지 라이브러리를 실온에서 진동시키면서 3% BSA/PBS에서 1시간 동안 차단하였다. 세포를 아큐타제(인비트로젠(Invitrogen))로 탈착시키고 5 ml의 PBS로 2회 세척하였고, 10⁷개의 세포를 실온에서 진동시키면서 1 ml의 3% BSA/PBS에서 30분 동안 차단하였다. 차단된 세포를 500xg로 5분 동안 원심분리하고 차단된 파지 라이브러리 용액에 약하게 재현탁하고 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 세포를 1 ml의 3% BSA/PBS로 3회 약하게 세척하고 PBS로 1회 세척하고, 각각의 세척에 대하여 새로운 에펜도르프 튜브를 사용하여 마이크로원심분리기에서 500xg로 5분 동안 원심분리하여 세포를 펠렛화함으로써 결합되지 않은 파지를 제거하였다. 세포 펠렛을 기하급수적으로 성장하는 이. 콜라이 XL-1 블루에 직접적으로 첨가한 후, 라운드 1에 대해 기재된 바와 같이 처리하였다.
- [0597] 100 mM HCl을 첨가한 후 1 M 트리스-HCl(pH 8)로 중화시켜 결합된 파지를 용출하였다는 점을 제외하고 패닝 라운드 3을 라운드 1에 대해 기재된 바와 같이 수행하였다. 용출된 중화된 파지를 사용하여 라운드 1에 대해 기재된 바와 같이 이. 콜라이 XL1 블루 세포를 감염시켰다.
- [0598] 3% BSA/PBS를 사용한 5회 세척을 수행하였다는 점을 제외하고 라운드 2에 대해 기재된 바와 같이 세포에 대한 패닝 라운드 4를 다시 수행하였다. 5 μ g의 바이오티닐화된 메가CD40L을 사용하되 라운드 3에 대해 기재된 바와 같이 다른 방식으로 라운드 5를 수행하였다.
- [0599] 5 라운드의 패닝 후, 가용성 단백질로서 발생된 Tn3 변이체의 스크리닝을 수행하였다. 증폭되고 PEG에 의해 침전된 파지 스톡(stock)을 PCR에서 사용하여 코팅된 Tn3 서열을 포괄하는 단편의 풀을 증폭하였다. 이 단편 풀을 NcoI + KpnI로 절단하고 플라스미드 pSec-oppA(L25M)-Tn3의 상응하는 NcoI - KpnI 부위 내로 클로닝하였다(예를 들면, 국제 특허출원 공보 제WO 2009/058379호 참조). 96웰 딥웰 플레이트에서 카베니실린(100 μ g/ml)을 함유하는 자가 유도 매직메디아(MagicMedia)(인비트로젠)를, pSec-oppA(L25M)-Tn3으로부터 유도된 구축물로 형질 전환된 이. 콜라이 BL21 DE3 세포로 접종하였다. 배양물을 37°C에서 진탕하면서 18시간 동안 생장시켰고, 세포를 원심분리로 배지로부터 분리하였다. 분비된 가용성 Tn3 변이체를 함유하는 배지를 CD40L 결합에 대한 스크리닝 분석에서 직접적으로 사용하였다.
- [0600] 96개의 클론들로 구성된 10개의 세트를 스크리닝하여 제조합 CD40L에 특이적으로 결합된 Tn3 단백질을 확인하였다. 요약하건대, 상기 스크리닝 분석은 마이크로플레이트의 웰에 고정된 항-His 항체와의 결합을 통해 배지 내로 분비된 가용성 His-태그 부착된 Tn3 변이체의 포획을 이용하였다. 포획 후, 배지 및 과량의 단백질을 세척하여 제거하였고, 바이오티닐화된 인간 메가CD40L을 사용하고 (플레이트의 세척 후) 남은 표적을 SA-HRP 및 보편

적인 ELISA 시약으로 측정함으로써 포획된 Tn3 변이체와 CD40L 사이의 상호작용을 모니터링하였다.

- [0601] 포획 단계에서, 고정된 항-His 항체를 Tn3으로 포화시켰고, 각각의 웰에서 물량의 포획된 Tn3은 개별 클론들의 발현 수준과 관계없이 사실상 동일하게 되었다. Tn3 수준의 이 표준화는 표적 상호작용의 효율과 비례하고 단백질 발현 수준의 잠재적인 차이에 의해 영향을 받지 않는 분석 수준을 발생시켰다.
- [0602] 이 분석으로부터의 양성 클론을 서열결정하여 재조합 CD40L에 결합된 34개의 유일한 Tn3 서열들을 확인하였다. 유일한 CD40L 결합 Tn3 서열들의 패널로부터, 배양물 상청액의 SDS-PAGE에 의해 판단될 때 강력한 분석 신호 및 우수한 발현 수준을 갖는 24개의 클론들로 구성된 서브세트를 재발현 및 소규모 정제에 사용하였다.
- [0603] 요약하건대, 1% 글루코스와 함께 카베니실린($100 \mu\text{g/ml}$)을 함유하는 수퍼브로쓰 배지를, pSec-oppA(L25M)-Tn3으로부터 유도된 구축물로 형질전환된 이. 콜라이 BL21 DE3 세포로 접종하였다. 배양물을 37°C 에서 0.5 내지 0.8의 광학 밀도(O.D.)까지 생장시킨 후 0.2 mM IPTG로 유도하였다. 37°C 에서 5시간 동안 진탕시킨 후, 세포를 원심분리로 배지로부터 분리하였다. Ni-NTA 수퍼플로우(퀴아젠)를 사용한 회분 정제, 20 mM 이미다졸을 함유하는 2x PBS를 사용한 세척, 및 250 mM 이미다졸을 함유하는 2x PBS를 사용한 용출로 배지로부터의 Tn3 스카폴드의 정제를 수행하였다. 샘플을 PBS에서 투석하였고, 문헌(Gill and von Hippel, Anal. Biochem. 182: 319, 1989)에 따라 280 nm에서 UV 흡광도로 농도를 측정하였다.
- [0604] 분석 등급화 및 SEC 거동에 기초하여, 8개의 리드의 발현을 규모 확대하였고 기능성 세포 분석에서의 시험을 위해 낮은 내독소 수준($< 1 \text{ EU/mg}$)까지 정제하였다.
- [0605] 2개의 Tn3 클론(309 및 311로 표기됨)은 생화학적 분석 및 세포-기초 분석에서 유사한 활성을 보였고(도 6a, 6b 및 6c) 가장 가까운 경쟁 클론보다 3배 내지 5배 더 강력하였다.
- [0606] 인간 CD40L 특이적 1가 Tn3 스카폴드 309 및 311은 총 B 세포 수, 혈장 세포 수 및 Ig 클래스 전환을 억제하였다(도 6a, 6b 및 6c). 도 6a는 주르카트 D1.1 세포로 자극된 CD19 양성 인간 PBMC 상에서의 HuCD40L-유도된 CD86 발현에 대한 309 및 311의 억제 효과를 보여주며; 도 6b는 309 및 311에 의한 HuCD40L-자극된 B 세포 증식의 억제를 보여주며; 도 6c는 T/B 세포 공-배양물 중의 혈장 세포 수의 억제를 보여준다. 309는 활성화된 일차 T 세포에 결합한다는 것도 FACS에 의해 밝혀졌다(테이터는 나타내지 않음). PBMC를 재조합 인간 메가CD40L(약소라) 또는 인간 CD40L 발현 주르카트 세포(D1.1, ATCC)로 자극하였고, 24시간 후 CD19+/CD86+ 세포의 백분율을 FACS로 측정하였다.
- [0607] 309 및 311 리드 클론들은 단일분산되었고, 정제된 샘플의 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 분석에 의해 확인되었을 때 용액에서 응집하거나 고차 올리고머를 형성하는 경향을 전혀 나타내지 않았다(도 7a).
- [0608] PBS(pH 7.2) 중의 1 mg/ml 단백질 샘플을 사용하여 시차주사열량측정(DSC)으로 309 및 311 리드 클론의 열안정성을 측정하였고, 이 열안정성을 모 Tn3 단백질의 열안정성과 비교하였다(도 7b). 309 및 311 리드 클론은 모 Tn3의 $T_m(72^\circ\text{C})$ 보다 단지 약간 더 낮은 $70 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 T_m 을 가졌다.
- [0609] 뮤린 교차반응성 클론이 확인되지 않았기 때문에, 전술된 바와 유사한 패닝 과정을 수행하여 M13으로 표기된 뮤린 특이적 Tn3을 확인하였다. M13도 PBMC 세포-기초 분석에서 활성을 보였다(도 1a 참조).
- [0610] 실시예 3
- [0611] CD40L 특이적 Tn3 스카폴드 리드 최적화
- [0612] 친화성 최적화를 이용하여 선택된 Tn3 리드의 효능을 증가시켰다. 일반적으로, 조합 파지 디스플레이 라이브러리로부터 개선된 변이체를 선택하면서 표적과 접촉하는 Tn3 루프 내에서 1회 이상의 라운드의 돌연변이유발을 수행하였다.
- [0613] 3.1 루프 교체
- [0614] 상기 2개 리드들 내의 3개 루프들 중 어떤 루프가 CD40L과의 상호작용에 관여하는 지를 확인하기 위해, 각각의 단일 루프 서열이 인간 테나신 C에서 발견된 모 Tn3 루프 서열로 교체되어 있는 구축물을 발생시켰다. 돌연변이된 변이체의 활성을 전술된 스크리닝 분석에 대해 기재된 바와 같이 수행된 결합 분석에서 원래의 변이체와 비교하였다(도 10a). 상기 두 리드들의 경우, BC 및 DE 루프의 돌연변이유발은 CD40L과의 결합을 완전히 상실시킨 반면, FG 루프를 모 Tn3 서열로 교체시킨 것은 결합에 대한 효과를 나타내지 않았거나(309의 경우) 한정된 효과를 나타내었다(311의 경우). 따라서, BC 및 DE 루프는 CD40L과의 접촉을 주로 담당하는 서열을 함유하는 것으로

보였으므로 친화성 최적화를 위해 일차적으로 선택되었다.

[0615] 3.2 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드 309 리드 최적화

[0616] 루프 교체 실험은 결합 효능의 실질적인 상실 없이 309 FG 루프 서열이 모 Tn3 FG 루프 서열로 치환될 수 있다는 것을 표시하였기 때문에, 이 구축물(309FGwt로 명명됨)을 친화성 성숙을 위한 골격으로서 사용하기로 결심하였다. 이것은 가능한 번역원성 위험을 감소시키기 위해 모 테나신 C 서열로부터 벗어나는 비-필수 돌연변이를 제거할 것이다. 모 Tn3 FG 루프 서열이 최종 리드 분자에서의 돌연변이에 의해 추후 제거되는 RGD 모티프를 함유하였다는 것을 인식해야 한다. 3개의 BC 루프 라이브러리 및 1개의 DE 루프 라이브러리를 발생시켰다.

[0617] 3개의 BC 루프 라이브러리를 위해, BC 루프 코돈이 정지 코돈으로 교체되어 있는 309FGwt-유도된 주형을 사용하되 역방향 프라이머 KpnI amp rev v2(표 5)와 함께 축퇴된 올리고뉴클레오타이드 BC9 PCR, BC 9-루프 NNK 및 309 BC 루프 NNKdope(표 6)를 사용하여 3회 라운드의 PCR을 수행하였다. 그 후, 프라이머 BC 라이브러리 amp v2(표 5) 및 KpnI 역방향 v2를 사용한 단편의 PCR 증폭은 전장 Tn3 라이브러리 단편을 제공하였다.

[0618] DE 루프 라이브러리의 경우, (DE 루프 코돈이 정지 코돈으로 교체되어 있는) 309FGwt-유도된 주형에 대한 DE PCR 및 KpnI amp 역방향 v2를 사용한 PCR 증폭은, 309 주형에 대한 BC 라이브러리 amp v2 및 BCX-DE 브리지 v2를 사용한 PCR에 의해 발생된 DE 루프의 업스트림에 위치한 Tn3 영역을 코딩하는 단편과 조합된, 무작위화된 DE 루프 및 야생형 Tn3 FG 루프를 함유하는 단편을 제공하였다. 상기 2개의 단편들을 외부 프라이머 BC 라이브러리 amp v2 및 KpnI 역방향 v2를 사용한 중첩 PCR에서 연결하였다.

표 6

309FGwt LO 라이브러리 발생에 사용된 DNA 올리고뉴클레오타이드

올리고뉴클레오타이드	서열	서열번호
BC9 PCR	5'-ACCGCGCTGATTACCTGGTCT1213111GGCTGTGA ACTGACCTATGGCATTAAAGATG	190
BC 9-루프 NNK	5'-ACCGCGCTGATTACCTGGNNKNNKSMGNNKGSTN NNNNNNKGGCTGTGAACTGACCTATGGCATTAAA-3'	191
309 BC-루프 NNKdope	5'-ACCGCGCTGATTACCTGG76K45K77K44K65K78 T45K44KTGTGAACTGACCTATGGCATTAAA-3'	192
DE PCR	5'-GATGTGCCGGGCGATCGCACCACCATAGATCTG1 11111TATAGCATTGGTAACCTGAAACCGG-3'	193
업스트림 BC 루프 Rev	CCAGGTAATCAGCGCGGTGGTAT	194
BC 서플 rev	CAGATCTATGGTGGTGCATCGC	195
DE 서플 FWD	TGTGAACTGACCTATGGCATTAAAGATGT	196

- 1= 모든 19 개 아미노산(-cys)에 대한 코돈
 2= Ala/Pro 에 대한 코돈
 3= Ala/Gly 에 대한 코돈
 4= 70%G, 10%A, 10%C, 10%T
 5= 10%G, 70%A, 10%C, 10%T
 6= 10%G, 10%A, 70%C, 10%T
 7= 10%G, 10%A, 10%C, 70%T
 8= 70%A, 15%C, 15%T K = 50%G/50%T

[0619]

[0620] NcoI-KpnI 단편을 파지 디스플레이 벡터 내로 클로닝하였고, 파지 라이브러리를 실시예 1에 기재된 바와 같이 발생시켰다.

[0621] 라운드 1에서 4 µg의 CD40L을 사용하고 라운드 2에서 1 µg의 CD40L을 사용하여 실시예 2에서 제1 라운드에 대해 기재된 바와 같이 4개의 라이브러리를 바이오티닐화된 인간 메가CD40L에 대해 따로 패닝시켰다. 라운드 2 후 파지 결과물의 증폭 후, 쿼아젠 스핀 M13 키트(쿼아젠, 미국 캘리포니아주 발렌시아 소재)를 사용하여 단일 가닥 DNA를 단리하였고, BC 라이브러리 amp v2 및 BC 서플 rev를 사용하여 BC 루프 함유 단편들의 풀을 BC 루프 라이브러리로부터 증폭한 반면, 프라이머 DE 서플 FWD 및 KpnI 역방향 v2를 사용하여 DE 루프 함유 단편들의 풀을 DE 루프 라이브러리로부터 증폭하였다. PCR 단편을 겔 정제하고 외부 프라이머 BC 라이브러리 amp v2 및 KpnI

역방향 v2를 사용하여 그들의 중첩 서열을 통해 조립하였다. 발생된 PCR 단편을 사용하여 전술된 바와 같이 파지 벡터에서 라이브러리를 발생시켰다. 라운드 1 내지 4의 경우 먼저 라이브러리를 50 nM, 20 nM, 20 nM 및 10 nM(50 μ l의 총 부피)의 농도로 표적과 2시간 동안 접촉시킨 후 차단된 M280 스트렙타비딘 자기 비드와 함께 10 분 동안 항온처리한 다음 세척하였다는 점을 제외하고 이 라이브러리를 실시예 2에 기재된 바와 같이 바이오티닐화된 인간 메가CD40L에 대해 총 5회 라운드 동안 패닝시켰다.

[0622] 결과물을 플라스미드 pSec-oppA(L25M)-Tn3 pSec의 NcoI - KpnI 부위 내로 폴 클로닝하였고, 전술된 스크리닝 분석에서 가용성 단백질을 사용하여 16개의 96웰 플레이트를 CD40L 결합에 대해 스크리닝하였다. 최고 점수를 기록한 270개의 클론들을 선별하고 재분석하고 서열결정하였다. 결합 분석 및 서열 분석에 기초하여 10개의 클론들을 추가 특징구명을 위해 선택하였다. 이것은 PBMC 분석에서의 효능, 바이오센서 분석에서의 CD40L과의 결합에 대한 K_d 측정, 시차주사열량측정에 의해 측정된 열역학적 안정성, 및 크기 배제 크로마토그래피 분석에 의한 용액에서 응집하거나 고차 올리고머를 형성하는 경향의 평가를 포함하였다. 결과는 표 7에 요약되어 있다. 10개의 최적화된 클론들(340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348 및 349로 표기됨)과 정렬된 309 및 309FGwt 클론의 서열은 도 11a 및 11b에 제시되어 있다.

[0623] 친화성 성숙된 변이체는 309 클론보다 1 내지 3 로그 더 높은 효능을 보였고, DSC에 의해 측정되었을 때 높은 안정성을 보유하고, SEC에 의해 측정되었을 때 대부분 단일분산되어 있었다.

표 7

변이체	PBMC IC ₅₀ (nM)	K _d (nM)	SEC 프로파일	T _m , DSC(°C)
309	226	191	OK	72
309FGwt	760	nd	OK	71
340	0.7	2.2	OK	77
341	0.7	nd	OK(?)	71
342	0.7	1.4	OK	73
343	0.6	2.0	OK	69 (?)
344	1.3	nd	OK	(65+78.5)
345	37.3	39	OK	72
346	9.0	14.9	OK	71
347	11.0	10.7	OK	70
348	1.0	1.8	?	nd
349	38.2	21	OK(?)	nd

[0624]

[0625] PBMC를 인간 CD40L 발현 주르카트 세포(D1.1, ATCC)로 자극하여 PBMC 분석을 수행하였고, 24시간 후 CD19+/CD86+ 세포의 백분율을 FACS로 측정하였다. 이 분석을 이용하여 리딩 Tn3 스카폴드들의 패널을 시험하고 등급화함으로써 생화학적 기준에 기초한 우선순위매김으로부터 부각시켰다. PBMC 분석의 결과는 도 10b에 제시되어 있고 표 7에 요약되어 있다.

[0626] 25°C에서 GLC 센서 칩을 갖는 프로테온(ProteOn) XPR36 단백질 상호작용 어레이 시스템(바이오-라드(Bio-Rad), 미국 캘리포니아주 허큘레스 소재) 상에서 친화성 측정을 수행하였다. 0.005% 트윈 20을 함유하는 프로테온 인산염 완충 식염수(pH 7.4)(PBS/트윈)를 런닝 완충제로서 사용하였다. 인간 메가CD40L을 대략 2300 RU의 표면 밀도로 상기 칩 상에 고정시켰다. Tn3 변이체들(340, 342, 343, 345, 346, 347, 348 및 349)의 2배 희석물(150 nM부터 4.7 nM까지)을 PBS/트윈/0.5 mg/ml BSA(pH 7.4)에서 제조하였다. 각각의 농도의 샘플을 300초 동안 30 μ l/분의 유속으로 6개 분석물 채널 내로 주입하였다. 프로테온 소프트웨어 내의 평형 분석 설정을 이용하여 K_d 를 측정하였다. 결과는 표 7에 제시되어 있다.

[0627] 10개의 TCD40L 특이적 Tn3 변이체를 DSC로 안정성에 대해 분석하였다. 요약하건대, DSC 측정을 VP-모세관 DSC(마이크로칼(MicroCal)) 상에서 수행하였다. 광범위한 투석을 통해 단백질을 PBS(pH 7.2) 내로 교환하고 DSC 분석을 위해 0.25 내지 0.5 mg/ml의 농도로 조절하였다. 스캔을 반복하지 않으면서 샘플을 90°C/시간(h)의 스캔 속도로 20°C부터 95°C까지 스캐닝하였다. 결과는 표 7에 제시되어 있다.

[0628] 가장 우수한 클론의 경우 309에 비해 IC₅₀의 최대 300배 개선 및 리드 최적화 라이브러리 발생을 위해 사용된 309FGwt 골격에 비해 1000배 개선을 수득하였다. 7개의 클론들은 한 자릿수 nM 범위 내의 K_d 를 가졌다.

- [0629] 3.3 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드 311 리드 최적화
- [0630] 앞서 언급된 루프 사용 실험(도 10a 참조)을 수행하기 전, 리드 최적화 라이브러리에서의 초기 시도는 다양성을 311의 FG 루프 내에 도입하여 파지 디스플레이 라이브러리를 발생시키고 발생된 파지 디스플레이 라이브러리를 스크리닝하는 것에 초점을 맞추었다. 전술된 바와 같이, 바이오티닐화된 인간 메가CD40L에 대한 4회 라운드의 패닝 후 스크리닝을 수행하였고, 대부분의 양성 결과물이 BC 루프의 업스트림에 있는 Tn3의 N 말단 불변 영역에서 잔기 E로의 잔기 K4의 우연한 돌연변이를 함유하였다는 것을 발견하였다. 양성 결과물들의 FG 루프 서열들 사이에서 명확한 컨센서스는 검출되지 않았다. 311 내로의 단일 K4E 돌연변이의 도입은 PBMC 분석에서의 효능(대략 4 μ M 내지 36 nM)을 대략 100배 증가시켰다(도 10c 참조).
- [0631] 루프 교체 실험은 BC 및 DE 루프 서열이 CD40L과의 결합을 위해 요구된다는 것을 표시하였기 때문에, 이들 루프들을 추가 친화성 성숙을 위해 311K4E 골격에서 표적화하였다. 2개의 별도의 라이브러리를 발생시켰다. 1개의 라이브러리는 각각의 잔기가 야생형 311 서열의 잔기일 50% 가능성 및 다른 11개의 NHT 코딩된 잔기들 중 하나일 대략 50% 가능성을 갖는 방식으로 BC 루프를 표적화하였다. 다른 라이브러리는 6개 잔기 DE 루프를 완전히 무작위화하였다.
- [0632] BC 루프 라이브러리의 경우, 올리고뉴클레오타이드 BC11-311Gly 및 BC11-311NHT(표 8)를, BC 루프 코돈이 정지 코돈으로 교체되어 있는 311-유도된 주형에 대한 역방향 프라이머 KpnI amp rev v2(표 5)와 함께 PCR 반응에서 사용하여 BC, DE 및 FG 루프를 비롯한 단편을 발생시켰다. 최종적으로, 프라이머 BC 라이브러리 amp K4E 및 KpnI amp rev v2를 사용한 이들 단편들의 1:1 혼합물의 증폭은 전장 Tn3 라이브러리 단편을 제공하였다.
- [0633] 311-유도된 주형을 PCR 반응에서 사용하였고 BC 라이브러리 amp K4E 프라이머를 최종 PCR 증폭에서 사용하였다는 점을 제외하고 DE 루프 라이브러리를 전술된 309FGwt DE 루프 라이브러리로서 발생시켰다.

표 8

311K4E 리드 최적화 라이브러리 발생을 위해 사용된 올리고뉴클레오타이드

올리고뉴클레오타이드	서열	서열번호
BC11-311Gly	5'-ACCGCGCTGATTACCTGG26T25TV1T46T46T45T45T25 T37T35TGGCTGTGAACTGACCTATGGCATTAAA-3'	197
BC11-311NHT	5'-ACCGCGCTGATTACCTGG26T25TV1T46T46T45T45T25 T37T35TNHTTGTGAACTGACCTATGGCATTAAA-3'	198
BC 라이브러리 amp K4E	5'-GGCCCAGCCGCCCATGGCCGCCATTGAAGTGAAG ATGTGACCGATACCACCGCGCTGATTACCTGG-3'	199
BC11-311Gly	5'-ACCGCGCTGATTACCTGG26T25TV1T46T46T45T45T25 T37T35TGGCTGTGAACTGACCTATGGCATTAAA-3'	197
BC11-311NHT	5'-ACCGCGCTGATTACCTGG26T25TV1T46T46T45T45T25 T37T35TNHTTGTGAACTGACCTATGGCATTAAA-3'	198
BC 라이브러리 amp K4E	5'-GGCCCAGCCGCCCATGGCCGCCATTGAAGTGAAG ATGTGACCGATACCACCGCGCTGATTACCTGG-3'	199

1=70%G, 10%A, 10%C, 10%T 2=10%G, 70%A, 10%C, 10%T
 3=10%G, 10%A, 70%C, 10%T 4=10%G, 10%A, 10%C, 70%T
 5=70%A, 15%C, 15%T 6=15%A, 70%C, 15%T
 7=15%A, 15%C, 70%T V=33%A, 33%C, 33%G
 H=33%A, 33%C, 33%T

- [0634]
- [0635] 전장 라이브러리 단편을 NcoI 및 KpnI로 절단하고 파지 디스플레이 벡터 내로 클로닝하였고, 파지 라이브러리를 실시예 1에 기재된 바와 같이 발생시켰다.
- [0636] 라운드 1에서 10 μ g의 단백질을 사용하고 라운드 2에서 5 μ g의 단백질을 사용하고 라운드 3에서 5 μ g의 단백질을 사용하여 실시예 1에 기재된 바와 같이 2개의 라이브러리를 바이오티닐화된 인간 메가CD40L에 대해 따로 패닝시켰다. 라운드 3 후 파지 결과물의 증폭 후, 쿼젠헤 키트(쿼젠헤, 미국 캘리포니아주 발렌시아 소재)를 사용하여 단일 가닥 DNA를 단리하였고, 상기 2개의 라이브러리를 309FGwt 라이브러리에 대해 기재된 바와 같이 서플링하였다. 라운드 1 내지 5에 대해 100 nM, 20 nM, 4 nM, 1 nM 및 1 nM의 표적을 사용하여 서플링된 라이브러리

를 309FGwt 서플링된 라이브러리에 대해 전술된 바와 같이 총 5회 라운드 동안 바이오티닐화된 인간 메가CD40L에 대해 패닝시켰다.

[0637] 결과물을 전술된 바와 같이 가용성 분비 벡터 내로 풀 클로닝하였고, 전술된 가용성 단백질 스크리닝 분석을 이용하여 5개의 96웰 플레이트를 CD40L 결합에 대해 스크리닝하였다. 311K4E 골격 변이체를 사용하여 수득한 신호를 기준으로 양성 결과물을 확인하였다. 311K4E_1, 311K4E_2, 311K4E_3, 311K4E_4, 311K4E_5, 311K4E_7, 311K4E_8, 311K4E_9, 311K4E_10, 311K4E_11, 311K4E_12, 311K4E_13, 311K4E_14, 311K4E_15, 311K4E_16, 311K4E_19, 311K4E_20 및 311K4E_21(도 12a 및 12b에 제시된 서열들)로 표기된, 최고 점수를 기록하는 18개의 유일한 클론들을 해리속도 등급화를 위한 조절의 미정제된 단백질로서 분석하였다. 미정제된 Tn3 스카폴드의 해리속도 평가를 칩 상에 고정된 CD40L을 사용하여 바이오센서 분석에서 프로테온 XPR36 단백질 상호작용 어레이 시스템(바이오-라드, 미국 캘리포니아주 허큘레스 소재) 상에서 수행하였다. 메가 인간 CD40L을 GLC 칩(바이오라드) 상에 고정시켰고, 모든 변이체들을 80 nM의 추정된 농도까지 희석하였고 1200초까지 설정된 해리시간을 이용하여 300초 동안 30 μ l/분의 유속으로 주입하였다. PBS(0.005% 트윈 20 및 3 mM EDTA)(pH 7.4)를 런닝 완충제로서 사용하였다. 해리속도를 센서그램의 시각적 검사로 등급화하였다. 가장 느린 해리속도를 나타낸 4개의 변이체들, 즉 311K4E_3, 311K4E_11, 311K4E_12 및 311K4E_15로 구성된 서브세트를 정제하였고, K_d 값은 1.1 내지 6.4 nM인 것으로 측정되었다(표 9).

표 9

인간 CD40L에 결합하는 311K4E 및 4개 친화성 정제된 변이체들의 K_d

311 변이체	K_d (nM)
311K4E	18
311K4E_12	1.1
311K4E_11	6.3
311K4E_15	1.6
311K4E_3	6.4

[0638]

[0639] 도 10d에 표시된 바와 같이, 감소된 K_d (18 nM부터 1 nM까지)의 311K4E_12는 PBMC 분석에서 311K4E 골격에 비해 상대적으로 12배의 효능 증가에 상응하였다.

[0640] 결론적으로, 무경험(naive) 라이브러리로부터의 초기 결과물 309 및 311의 리드 최적화 캠페인은 한 자릿수 nM의 CD40L 결합제를 유발하였다.

[0641] 무린 특이적 M13 분자에 대해 유사한 최적화 캠페인을 수행하였다(데이터는 나타나지 않음). 발생된 최적화된 무린 CD40L 특이적 분자(M31로 표기됨)는 PBMC 분석에서 모 분자에 비해 대략 20배의 효능 증가를 보였다(도 1a).

[0642] 실시예 4

[0643] 태그가 부착되지 않은 CD40L 특이적 Tn3-HSA 융합체의 발현 및 정제

[0644] 도 2a 및 9a에 요약된 바와 같이 HSA에 융합된 Tn3 구축물을 일시적 형질감염으로 포유동물 293F 세포주에서 발현시켰다. 사내 발생된 포유동물 발현 벡터에 기초하여 Tn3-HSA 융합 발현 구축물을 발생시켰다. 생성물 균질성을 증가시키기 위해, 쌍을 형성하지 않은 부분적으로 노출된 시스테인 34가 세린으로 돌연변이되어 있는 돌연변이체 형태의 HSA(HSA C34S로 표기됨)를 사용하였다(Zhao et al., 2009, Eur. J. Pharm. Biopharm. 72: 405-11).

[0645] 융합 단백질을 이온 교환 크로마토그래피(IEX)로 1-단계 정제로 정제할 수 있었다. 염 구배를 이용하여 309-309-HSA를 Q-HP 컬럼(지이 헬스케어)으로부터 용출하는 것의 일례는 도 9b에 제시되어 있다. 주 피크 이외에, 나중에 용출되는 부 피크들이 관찰되었다(총 피크 면적의 10% 미만을 차지함). 질량 분광측정 분석은 이들 부수적인 부 피크들이 0-글리코실화된 309-309-HSA 중의 경우 풍부하다는 것을 표시하였다. 주 피크를 함유하는 분

획을 풀링하여 후속 활성 분석을 위해 사용하였다.

[0646] 보다 큰 규모의 정제를 위해, 상기 언급된 IEX 단계 전에 HSA 친화성 매트릭스, 예를 들면, 하이트랩 블루 (HiTrap Blue) HP(지이 헬쓰케어)를 사용한 친화성 크로마토그래피로 배양물 상청액으로부터 Tn3-HSA 융합체를 포획하였다. 세척 후, HSA 융합 단백질을 옥텐산 함유 완충제로 용출할 수 있었다. 용출물을 인산염 완충제로 3 배 희석한 후 Q-HP 컬럼 상에 적재하였다.

[0647] 부 피크(들)의 분석은 O-연결된 탄수화물 모이어티의 존재를 표시하였다. O-글리칸은 하기 표시된 바와 같은 종래 보고된 O-자일로실화된 코어 구조로부터 유도된 탄수화물의 이중 혼합물인 것으로 제안되었다(Wakabayashi et al., 1999, J. Biol. Chem. 274:5436-5442):



[0648]

[0649] 우선적인 부착 부위는 Tn3 도메인들 사이의 GGGGS 링커 내에 있다는 것을 확인하였다. 글리칸도 Tn3과 HSA 사이에서 발견된 GGGGS 링커 내에 보다 적은 정도로 존재한다는 것도 발견하였다. 따라서, O-글리칸의 수준은 1가 구축물에 비해 2가 구축물에서 더 높았고 CHO 세포에 비해 HEK 세포에서 생성된 물질에서 더 높았다. 상기 수준은 상이한 Tn3 구축물들 사이에도 상이하였다. 따라서, O-글리칸의 수준은 조심스러운 숙주 세포 선택, 예를 들면, 보다 낮은 수준의 O-글리칸을 갖는 물질을 생성하는 것으로 발견된 CHO 세포 또는 다른 세포의 사용을 통해 감소될 수 있다. 또한, O-글리칸을 함유하는 물질을 정제 방법을 통해 제거하여 O-글리칸을 결여하는 보다 균질한 생성물을 수득할 수 있다. 대안적으로, 예를 들면, Ser 잔기를 Gly으로 돌연변이시킴으로써 링커를 변경하여 O-글리칸 부착의 일차 부위(들)를 제거할 수 있다. 여러 구축물들에서 하나 이상의 GGGGG 링커를 갖도록 링커를 재조작하였다. GGGGG 링커(들)를 갖는 물질에서 어떠한 종류의 O-글리칸도 검출되지 않았고, 활성의 차이는 관찰되지 않았다(데이터는 나타내지 않음).

[0650] 실시예 5

[0651] CD40L 특이적 Tn3 스카폴드의 혈청 반감기의 연장

[0652] CD40L 특이적 Tn3 스카폴드의 혈청 반감기를 연장하기 위한 방법으로서 혈청 알부민과의 융합을 조사하였다. 뮤린 CD40L 특이적 Tn3-MSA 융합체의 약동학적(PK) 성질을 측정하기 위해, 마우스 PK 분석을 수행하였다. 마우스 FcRn이 MSA에 결합하는 것보다 상당히 더 약하게 HSA에 결합하여 엔도솜으로부터의 감소된 재순환 및 결과적으로 증가된 전환을 초래하기 때문에(Andersen et al. J. Biol. Chem. 285, 4826-4836, 2010), 상응하는 HSA 융합체에 비해 MSA 융합체를 대용 분자의 연구를 위해 선택하였다.

[0653] MSA에 융합된 마우스 CD40L 특이적 직렬 2가 Tn3 스카폴드의 발현을 위해 HEK 293 세포를 사용하였다. 고도의 발현이 관찰되었다(도 3a). 이들 구축물들은 Tn3 스카폴드 유닛들 사이에 1개의 (G₄S) 링커를 갖고 상기 스카폴드와 MSA 사이의 링커에서 3개의 (G₄S) 반복부를 가졌다. 추가로, N49Q 돌연변이를 각각의 M13 및 M31 스카폴드 내로 도입하여 잠재적인 N-연결된 글리코실화 부위를 제거하였다. 이 돌연변이는 이들 스카폴드들의 효능에 영향을 미치지 않았다(데이터는 나타내지 않음). 형질감염으로부터 6일 후 발현 수준은 200 mg/ℓ 인 것으로 평가되었다. C 말단 His-태그를 통해 IMAC로 정제를 수행하였다. 정제된 단백질의 수율은 125 mg/ℓ (배양물 상청액)인 것으로 평가되었다.

[0654] MSA가 2가 M13 스카폴드에 융합되었을 때, MSA를 갖지 않은 M13 이량체 스카폴드에 비해 8배의 효능 감소가 관찰되었다(도 3b). MSA에 융합된 친화성 성숙된 M31을 포함하는 2가 스카폴드는 MSA에 융합된 상응하는 2가 M13 스카폴드보다 140배 더 강력하였고, 1가 M31 MSA 융합체보다 대략 900배 더 강력하였고, MR1 항-뮤린 CD40L 단일클론 항체에 필적할만한 효능을 가졌다(도 3c).

[0655] CD40L 특이적 Tn3-MSA 융합체의 PK 성질을 측정하기 위해, 마우스 PK 분석을 수행하였다. 10 mg/kg의 단백질 구축물을 5주령 내지 7주령의 암컷 CD-1 마우스에게 정맥내로 투여하였다. 각각의 마우스를 다양한 시점에서 150

μ l 채혈하였고, Tn3-HSA 융합체의 혈청 농도를 ELISA 분석으로 측정하였다. 요약하건대, 닌크 맥시소르프(Nunc MaxiSorp) 플레이트를 항-FLAG M2 항체(아질런트)로 코팅하고 PBS+0.1% 트윈(PBST) 중의 4% 우유로 차단하고 뮤린 메가CD40L(악소라)과 함께 항온처리하였다. 메가CD40L을 그의 FLAG 태그를 통해 고정시켰다. 플레이트를 PBST로 세척한 후, 혈청 샘플 및 단백질 표준물을 4% 우유 PBST로 희석하고 첨가하였다. 항온처리 후, 플레이트를 PBST로 세척하였고, 표준 ELISA 프로토콜에서 토끼 항-TN3 다중클론 항체(코반스(Covance))를 염소 항-토끼 HRP-접합된 항체(잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch))와 함께 사용하여 Tn3-HSA 융합 구축물을 검출하였다. 혈청 샘플 중의 농도를 동일한 Tn3-MSA 융합 구축물의 희석물의 분석에 의해 발생된 표준 곡선의 선형 회귀에 기초하여 측정하였다. 농도를 3마리의 상이한 마우스들에 대한 평균으로서 측정하였다.

[0656] 도 4a에서 알 수 있는 바와 같이, M31-MSA 및 M13-M13-MSA는 각각 38시간 및 31시간의 반감기를 갖는 반면, M31-M31-HSA 구축물은 12시간의 반감기를 가졌다. 비교하건대, (MSA에 융합되지 않은) M13-M13 직렬 구축물 자체는 30분의 반감기를 나타내었다(데이터는 나타내지 않음).

[0657] 마우스 스카폴드에서의 관찰과 대조적으로, HSA가 인간 CD40L 특이적 스카폴드에 융합되었을 때, 효능의 유의한 감소는 없었다. 도 9c는 PMBC 분석에서 측정되었을 때 2개의 309 단량체를 포함하는 인간 CD40L 특이적 2가 Tn3 스카폴드를 HSA에 융합시킴에 의한 효능의 유의한 감소가 없었다는 것을 보여준다.

[0658] 단회 정맥내 주사 후 사이노몰구스 원숭이에서 인간 CD40L 특이적 342-HSA 단량체 구축물의 PK 성질을, 혈청 반감기를 향상시키기 위한 2개의 치환(L463N 및 K524L)을 포함하는 342-HSA 변이체의 PK 성질과 비교하였다. 느린 볼루스 주사를 통해 10 mg/kg의 단백질 구축물을 2 내지 5 kg의 체중을 갖는 수컷 사이노몰구스 원숭이에게 투여하였다. 1 ml의 혈액/동물/시점을 투약 전; 투약 후 5분 및 30분; 투약 후 2시간, 12시간, 24시간 및 48시간; 및 4일째 날, 8일째 날, 11일째 날, 15일째 날, 22일째 날, 29일째 날, 36일째 날, 43일째 날 및 57일째 날에 말초 혈관으로부터 채취하였다. Tn3-HSA 융합체의 혈청 농도를 ELISA 분석으로 측정하였다. 요약하건대, 닌크 맥시소르프 플레이트를 항-FLAG M2 항체(아질런트)로 코팅하고 PBS+0.1% 트윈(PBST) 중의 4% 우유로 차단하고 인간 메가CD40L(악소라)과 함께 항온처리하였다. 메가CD40L을 그의 FLAG 태그를 통해 고정시켰다. 플레이트를 PBST로 세척한 후, 혈청 샘플 및 단백질 표준물을 4% 우유 PBST로 희석하고 첨가하였다. 항온처리 후, 플레이트를 PBST로 세척하였고, 표준 ELISA 프로토콜에서 토끼 항-TN3 다중클론 항체(코반스)를 염소 항-토끼 HRP-접합된 항체(잭슨 이뮤노리서치)와 함께 사용하여 Tn3-HSA 융합 구축물을 검출하였다. 혈청 샘플 중의 농도를 동일한 Tn3-MSA 융합 구축물의 희석물의 분석에 의해 발생된 표준 곡선의 선형 회귀에 기초하여 측정하였다. 농도는 도 4b에 작도되어 있다. 342-HSA 구축물의 반감기는 약 7일인 반면, 342-HSA L463N/K524L 변이체 구축물은 초기 선형기 동안 13일 내지 17일의 증가된 반감기를 보였다(도 4b). 30일 후, 342-HSA L463N/K524L 변이체 구축물의 혈청 농도는 야생형 HSA 구축물에 비해 보다 신속히 떨어졌다. 이들 관찰은 원숭이에서 이 구축물의 약간의 면역원성을 표시할 수 있다.

[0659] 실시예 6

[0660] CD40L 특이적 Tn3 스카폴드의 특징규명

[0661] 6.1 실험 방법

[0662] 6.1.1 PBMC 자극 분석: 메디쿰(MedImmune) 안전성 지침에 따라 건강한 공여자로부터 혈액을 수득하였다. PBMC를 CPT 튜브를 통해 분리하였고(20분 동안 1500g로 회전), (조건 당) 1×10^6 개의 PBMC를 재조합 인간 메가CD40L(악소라) 또는 인간 CD40L 발현 주르카트 세포(D1.1, ATCC)로 자극하였다. 자극으로부터 24시간 후 CD19+/CD86+ 세포의 백분율을 FACS로 측정하였다. 이 분석을 이용하여 리딩(leading) Tn3 스카폴드의 패널을 시험하고 등급 화합으로써 생화학적 기준에 기초하여 우선순위매김으로부터 부각시켰다. 뮤린 리간드가 인간 수용체와 교차반응하기 때문에 인간 세포 또는 재조합 단백질 자극 대신에 뮤린 CD40L 발현 세포주(D10.G4) 또는 뮤린 메가CD40L(악소라 ALX522120)을 사용하여 상기 분석을 수행할 수도 있다.

[0663] 6.1.2 뮤린 CD40R/NF κ B 분석: NF κ B 레포터 NIH3T3 세포(파노믹스 NF κ B 레포터 시스템 및 사내 mCD40R 형질 감염)를, Tn3 스카폴드를 사용하거나 사용하지 않으면서 뮤린 메가CD40L(악소라, 카탈로그 ALX522120) 재조합 단백질 또는 CD40L 과다발현 D10.G4 세포(ATCC)로 24시간 동안 자극하였다. 브라이트-글로우(Bright-Glow)(프로메가(Promega) E2610)를 제조자의 설명서에 따라 첨가하였다. 판독치는 엔비전(EnVision) 시스템(퍼킨 엘머(Perkin Elmer)) 상에서 수행된 NF κ B 레포터 활성화를 통한 발광(700)이었다.

[0664] 6.1.3 인간 CD40R/NF κ B 분석: 레포터 HEK293 세포(파노믹스 및 사내 제작)를, Tn3 스카폴드를 사용하거나 사용하지 않으면서 메가CD40L(악소라 ALX522110) 재조합 단백질 또는 CD40L 과다발현 D1.1 주르카트 서브클론 세포

(ATCC)로 24시간 동안 자극하였다. 브라이트-글로우(프로메가 E2610)를 제조자의 설명서에 따라 첨가하였다. 판독치는 엔비전 시스템(퍼킨 엘머) 상에서 수행된 NF κ B 레포터 활성화를 통한 발광(700)이었다.

[0665] 6.1.4 이중 세포 분석: 일차 T/B 세포를 다양한 공여자들로부터 분리하였다. 항-CD3에 의해 자극되고 미토마이신 C로 처리된 인간 CD4⁺ T 세포(1×10^5)를 정제된 인간 B 세포(5×10^4)와 함께 배양하였다. 판독치는 다음과 같았다: 2일째 날: 활성화 마커(FACS), 5일째 날: B 세포 증식(ATV 대사물질, 셀-타이터 글로, 인비트로젠), 7일째 날: 혈장 세포 분화(FACS), 7일째 날: Ig 생성(ELISA, 알앤드디 시스템스(R&D Systems)).

[0666] 6.1.5 혈소판 응집 분석: 아데노신 디포스페이트(ADP)를 크로노-로그(Chrono-Log)(미국 펜실베이니아주 하버타운 소재)로부터 입수하였다. 모든 다른 제품들은 적어도 시약 등급이었다. 건강한 지원자로부터 혈액 샘플을 12.9 mM 시트르산나트륨 내로 채취하고 150xg에서 15분 동안 원심분리하여 PRP(혈소판 풍부 혈장)를 수득하였다. PRP의 분리 후, 튜브를 1,200xg에서 다시 15분 동안 원심분리하여 PPP(혈소판 부족 혈장)를 수득하였다. 문헌(Mustard et al., Br. J. Haematol. 22:193-204, 1972))에 기재된 방법을 이용하여 혈소판을 세척하고, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.1% 텍스트로스, 0.35% 소 혈청 알부민 및 0.05 U/ml 아피라제(aprase)를 함유하는 티로드(Tyrode) 용액(pH 7.35)에 재현탁하였다. 광 투과 응집측정기(aggregometer)(크로노-로그 700-4DR, 크로노-로그 코포레이션, 미국 펜실베이니아주 하버타운 소재)를 이용하여 혈소판 응집을 연구하고 전술된 바와 같이 표시된 혈소판 작용제로 혈소판을 자극한 후 10분 동안 기록하였다. 첨가 전, Tn3 스카폴드를 가용성 CD40L(sCD40L)과 함께 예비항온처리하여 면역복합체를 형성하였다.

[0667] 6.1.6 면역화 분석: 양 적혈구 세포(SRBC)를 콜로라도 세럼(Colorado Serum)(미국 콜로라도주 덴버 소재)으로부터 구입하여 사용 직전에 HBSS 배지로 10배 희석하였다. 0일째 날, 마우스를 0.2 ml의 희석된 SRBC로 면역화시켰다. 면역화로부터 14일 후, 켈리진된 마우스에서 일차 배중심(GC) 반응을 분석하였다(GC B 세포, 비-GC B 세포 및 모든 T 세포 서브세트). Tn3 스카폴드 및 대조군을 표시된 바와 같이 9일째 날부터 13일째 날까지 24시간 간격으로 투여하였다.

[0668] 6.1.7 KLH 특이적 T 세포 의존적 항체 반응(TDAR) 분석: 중국으로부터 유래되었고 3.1 내지 4.6 kg의 체중을 갖는 사이노물구스 원숭이(마카카 파시쿨라리스(Macaca fascicularis))(코반스 리서치 프로덕츠, 미국 텍사스주 엘리스 소재)에게 표시된 용량(0.5, 5 또는 40 mg/kg)의 억제제(342-단량체-Tn3-HSA 및 342-342 2가-Tn3-HSA) 또는 대조군/비히클을 주당 1회 정맥내(복재 정맥 또는 요측피 정맥)로 투약하였다. KLH(로트 번호 MD158678A, 공급자 피어스 바이오테크놀로지스(Pierce Biotechnologies), 미국 일리노이주 록포드 소재)를 멸균 조건 하에서 적절한 양의 주사용 멸균수(공급자 미드웨스트 바테리나리 서플라이(Midwest Veterinary Supply), 미국 펜실베이니아주 노리스타운 소재)로 재구성하였다. 바이알을 빙빙돌려 혼합한 후 멸균 바이알 내로 함께 풀링하였다. 시험 또는 대조군 제품 투여의 종결 1시간 이내에 1 ml의 KLH 용액(10 mg/ml)을 중앙선 좌측에서 각각의 동물의 등에 2회(1일째 날 및 29일째 날) 피하 투여하였다. 추가 분석용 혈액 샘플을 하기 시점에서 모든 동물들로부터 수득하였다: 시험 전, 4일째 날, 6일째 날, 8일째 날, 11일째 날, 15일째 날, 22일째 날, 25일째 날, 32일째 날, 34일째 날, 36일째 날, 39일째 날, 43일째 날, 46일째 날, 50일째 날 및 57일째 날. 8일째 날, 15일째 날 및 22일째 날에 채취된 샘플을 투약 전에 수득하였다. KLH 특이적 IgM 및 IgG 항체 역가의 평가를 8일째 날, 11일째 날 및 15일째 날에 수행하였다. 15일째 날 KLH 특이적 IgM 및 IgG 항체의 역가는 각각 5g 및 5h에 제시되어 있다. 컷점 적정 방법은 원숭이 혈청에서 항-KLH 항체를 검출하기 위해 ELISA 형식을 이용하였다. 샘플을 ELISA 플레이트 상에 고정된 KLH와 함께 항온처리하였다. 항온처리 후, 플레이트를 세척하였고, 결합된 항체를 염소 항-원숭이 IgG-HRP 또는 IgM-HRP로 검출한 후 테트라메틸벤지딘(TMB)으로 가시화하였다.

[0669] 동물을 사용하는 모든 실험들을 위해, 현재 허용가능한 우수한 축산업 관행, 예를 들면, 연구 동물의 보호 및 사용에 대한 지침(National Academy Press, 2011)을 따랐다. 헌팅돈 라이프 사이언시스(Huntingdon Life Sciences)(미국 뉴저지주 이스트 밀스톤 소재)는 실험 동물 보호의 평가 및 승인에 대한 국제 협회(AAALAC)에 의해 완전히 승인받았다. 기술 직원이 가능한 수의학적 보호를 필요로 하는 임의의 상태에 대해 동물을 모니터링하였고 필요에 따라 치료하였다.

[0670] 6.2 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드는 CD40L:CD40 상호작용을 기능적으로 중화시킨다.

[0671] CD40L 발현 T 세포는 NF κ B 신호전달 경로를 활성화시키는 CD40 발현 B 세포와 상호작용한다(Zangani, 2009). 따라서, NF κ B-루시퍼라제 레포터 세포주를 사용하여, 항-CD40L-Tn3 분자가 CD40 상호작용의 다운스트림에 있는 신호전달을 억제할 수 있는지를 확인하였다. 인간 CD40L 및 레포터를 발현하는 HEK293 세포를 EC₉₀(90% 억제를 발생시키는 효과적인 농도; 즉, 인간 메가CD40L의 경우 1.5 μ g/ml, 및 무린 메가CD40L의 경우 3 μ g/ml)에서 인

간 또는 뮤린 메가CD40L로 자극하였다.

- [0672] 인간 특이적 342 분자는 1.5 nM의 IC₅₀으로 인간 CD40L-유도된 NF κ B 활성을 억제하였다(도 13). 뮤린 특이적 M31 분자는 1.6 nM의 IC₅₀으로 뮤린 CD40L-유도된 NF κ B 활성을 중화시켰다(도 1b). 양성 대조군 항-CD40L 단일클론 항체 5c8(항-인간 CD40L) 및 MR1(항-뮤린 CD40L) 둘다가 0.200 nM +/- SD(분석의 최저 역치)의 IC₅₀을 갖는 단량체 Tn3 스카폴드보다 약 10배 더 우수하게 수행하였다. 이것은 그들 각각의 CD40L과의 상호작용의 결합력에 기여하는 상기 단일클론 항체의 2가 성질에 부분적으로 기인할 수 있었다.
- [0673] 6.3 이량체 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드는 개선된 결합을 나타낸다.
- [0674] 실험 데이터는 CD40L 특이적 Tn3 2가 스카폴드의 결합이 CD40L 특이적 Tn3 단량체 스카폴드의 결합에 비해 개선되었다는 것을 표시한다. 도 2c 및 2d(뮤린), 및 도 8a 및 8b(인간)에 나타난 바와 같이 시험관내에서 CD40L 특이적 Tn3 2가 스카폴드와 CD40L의 결합은 표적에 대한 작용을 몇몇 경우 CD40L 특이적 Tn3 단량체 스카폴드의 결합에 비해 대략 3 로그까지 개선하였다.
- [0675] 도 2c는 뮤린 CD40L 특이적 1가(M13) 또는 2가 직렬 스카폴드에 의한 바이오센서 칩 상에 고정된 뮤린 CD40 수용체에 결합하는 뮤린 CD40L의 경쟁 억제를 보여준다. M13 단량체를 1개(1GS), 3개(3GS), 5개(5GS) 또는 7개(7GS)의 "GGGGS" 반복부를 포함하는 다양한 길이의 펩티드 링커로 연결하였다. M13-1GS-M13 스카폴드의 IC₅₀은 29 nM인 반면, 단량체 M13 스카폴드의 IC₅₀은 71 nM이었다. 보다 긴 링커를 갖는 2가 M13 스카폴드의 IC₅₀은 급격히 더 낮았다(5 내지 6 nM).
- [0676] 도 2d는 B 세포 상에서의 뮤린 CD40L-유도된 CD86 발현에 대한 뮤린 CD40L 특이적 1가(M13) 또는 2가 직렬 스카폴드의 억제 효과를 보여준다. 상기 2가 스카폴드는 상기 1가 스카폴드보다 대략 3 로그 더 강력하였다.
- [0677] 도 8a 및 8b는 인간 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드 309 및 311이 2가 직렬 형식에서 향상된 효능을 나타내었다는 것을 보여준다. 2가 311 스카폴드(도 8a) 및 2가 309 스카폴드(도 8b)는 주르카트 D1.1 세포로 자극된 CD19 양성 인간 PBMC 상에서의 인간 CD40L-유도된 발현의 억제에 있어서 각각 대략 7배 및 500배 내지 1000배 개선을 보였다. 2가 309 스카폴드는 효능에 있어서 바이오젠의 5c8 항-인간 CD40L 단일클론 항체에 필적할만하였다.
- [0678] 가용성, 안정성 및 정제 용이성은 1개(1GS), 3개(3GS), 5개(5GS) 또는 7개(7GS)의 "GGGGS" 반복부를 포함하는 다양한 길이의 펩티드 링커의 첨가에 의해 파괴되지 않았다(도 2b 참조).
- [0679] 6.4 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드 결합 및 기능
- [0680] 전술된 생화학적 결합 이외에, 이들 신규 Tn3 스카폴드가 활성화 후 일차 T 세포 상에서 발현된 내생성 CD40L에 결합할 수 있다는 것을 입증하는 것이 중요하였다. T 세포를 전술된 바와 같이 다수의 공여자로부터 단리하고 활성화하였다. 24시간 후, 5c8(인간 특이적) 단일클론 항체 및 MR1(뮤린 특이적) 단일클론 항체를 사용한 염색에 의해 측정되었을 때 CD40L 발현은 상향조절되었다(데이터는 나타나지 않음). CD40L 특이적 Tn3 스카폴드 분자는 단일클론 항체에 필적할만한 수준의 CD40L 발현을 검출할 수 있었는데, 이것은 이들 분자들이 천연 단백질에 결합할 수 있다는 것을 확인시켜준다.
- [0681] CD40L:CD40 상호작용의 기능적 결과 중 하나는 B 세포 상의 보조자극 분자의 상향조절이다(Yellin et al., J. Exp. Med. 6:1857-1864, 1995). CD40L-유도된 Tn3 분자가 이를 방해하는 능력을 시험하였다. 인간 또는 뮤린 CD40L을 내생적으로 발현하는 세포주(각각 D1.1 주르카트 서브클론 또는 D10.G4)를 사용하여 말초혈 단핵세포(PBMC)를 자극하였다. 일단 자극되면, CD19+ B 세포에 의한 CD86 상향조절의 백분율을 유세포분석(flow cytometry)으로 측정함으로써 B 세포의 활성화를 평가하였다. 이 분석에서, 양성 대조군 단일클론 항체는 0.170 nM(5c8) 및 0.230 nM(MR1)의 IC₅₀으로 CD86 발현을 갖는 세포의 CD19+ 백분율을 억제할 수 있었다. 인간 특이적 최적화된 Tn3인 342는 0.700 nM의 IC₅₀ 값으로 CD86 상향조절을 길항할 수 있었다(n = 5명의 공여자)(도 10b 및 표 7 참조).
- [0682] 뮤린 특이적 최적화된 Tn3 M31은 1.5 nM의 IC₅₀을 가졌다. 이들 유사한 결과는 메가-CD40L 재조합 단백질을 사용하여 PBMC를 자극하였을 때 관찰되었다. 실험 데이터는 뮤린 특이적 분자이든 아니면 인간 특이적 분자이든 두 분자들이 세포 내에서 주요 신호전달 경로(NF κ B)를 억제할 수 있을 뿐만 아니라 그의 가장 중요한 기능적 역할들 중 하나인 T-B 세포 상호작용도 억제할 수 있다는 것을 입증하였다. 이 억제 작용은 많은 자가면역 질환 및 병태에서 CD40L의 기여를 방해할 수 있다.

- [0683] 6.5 항-CD40L Tn3은 T/B 공-배양 후 B 세포 증식 및 혈장 세포 분화를 억제한다.
- [0684] T 세포 상의 CD40L과 CD40 발현 B 세포의 상호작용은 후천성 면역 반응의 발생을 용이하게 하는 T 세포 보조의 기본적인 양태이다(Banchereau, 1994; Oxenius, 1996, van Kooten & Banchereau, 1997). 이것을 모델링하기 위해, 항-CD3에 의해 자극되고 미토마이신 C로 처리된 인간 CD4⁺ T 세포가 정제된 인간 B 세포와 함께 배양된, T 세포 및 B 세포의 일차 세포 공-배양에서 340, 342 및 342-342 이량체의 항-hCD40L Tn3-HSA 융합체를 평가하였다. 4일째 날에 증식하여 7일째 날까지 혈장 세포(PC)로 분화하고 그들의 생성 항체 클래스를 전환하는 B 세포의 능력을 측정하였다(PC 및 항체 데이터는 나타내지 않음)(도 15)(Ettinger, 2007). CD40L 특이적 Tn3 스카폴드 342-342-HSA는 스카폴드의 부재 하에서 또는 비-특이적 대조군 스카폴드의 존재 하에서 B 세포의 세포 증식에 비해 50% 이상까지 T 세포-유도된 증식을 감소시킬 수 있었다. 증식은 CD40L:CD40 결합 시 혈장 세포 분화에 대한 전조(한 신호)이다. 혈장 세포 분화 및 항체 클래스 전환의 억제(데이터는 나타내지 않음)도 관찰되었다.
- [0685] 6.6 CD40:CD40L 축의 생체내 파괴
- [0686] T 의존적 면역 반응에서 CD40L:CD40R 상호작용의 중추적인 역할은 잘 특징규명되어 있다(Noelle, 1992; Renshaw, 1994, Wykes, 2003). 무린 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드 M31(M31-MSA 및 M31-M31-MSA)을 사용하여 0일째 날 마우스를 양 적혈구 세포(SRBC)로 (정맥내로) 면역화시켜 T 의존적 면역화 모델에서 이들 신규 분자들의 효과를 평가하였다.
- [0687] 9일째 날 내지 13일째 날, 표시된 용량의 억제제를 마우스에게 매일 복강내로 주사하였고, 14일째 날 비장 및 림프절 GC B 세포를 정량하였다. 생체내에서 이 분자의 $T_{1/2}$ 가 짧았기(31시간) 때문에 매일 투약이 요구되었다(도 4). CD40L이 비장 및 림프절과 같은 해부학적 부위에서 체액성 반응, 예컨대, 배중심의 발생을 조절한다는 것은 종래 발견으로부터 잘 확립되어 있다(Jacob, 1991). 여기서, GC B 세포의 백분율에 의해 표시된 바와 같이, 그 형성에 대한 CD40L:CD40 축 기여의 파괴가 무경험 또는 본 발명자들의 비-특이적 대조군인 D1-MSA에 비해 M31-MSA를 사용할 때 용량 의존적 방식으로 관찰되었다.
- [0688] 10 mg/kg에서조차도 M31-MSA는 MR1 단일클론 항체(도 5a)뿐만 아니라 GC B 세포(도 5b)의 퍼센트도 없앨 수 있었다. 특정 T 세포 집단을 비롯한 세포의 다른 하위집단은 정상으로 보였는데, 이것은 관찰된 결과가 T 세포 고갈에 기인하지 않는다는 것을 확인시켜준다(도 5c, 5d 및 5e). 또한, 항-SRBC Ig ELISA 데이터의 결과는 배중심 B 세포 데이터의 결과를 반영하였다(도 5f). 더불어, 이들 데이터는 무린 특이적 Tn3 스카폴드 M31-MSA가 CD40 신호전달을 통해 유도된 반응을 없앨 수 있다는 것을 표시하였다.
- [0689] 유사하게, 인간 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드 342(342-HSA 및 342-342-HSA)를 사용하여 사이노몰구스 원숭이에서 KLH 특이적 T 세포 의존적 항체 반응(TDAR) 모델에서 이들 신규 분자들의 효과를 평가하였다. 여기서, CD40L:CD40 축의 파괴는 KLH 항원에 대한 항체 발생의 억제를 용량 의존적 방식으로 초래한다. 도 5g 및 5h에 나타낸 바와 같이, 342-2가 구축물은 0.5 mg/kg(mpk)에서 IgM 및 IgG 항체의 수준을 억제하였고, 거의 완전한 억제가 5 mg/kg에서 관찰되었다. 342-단량체 구축물도 IgM 및 IgG의 수준을 억제하였지만, 보다 높은 농도인 40 mg/kg에서 거의 완전한 억제가 관찰되었다. 이들 데이터는 인간 특이적 Tn3 스카폴드 구축물 342-HSA 및 342-342-HSA 둘다가 CD40 신호전달을 통해 유도된 반응을 없앨 수 있다는 것을 표시하였다.
- [0690] 6.7 인간 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드는 혈소판 응집을 유도하지 않는다.
- [0691] 여러 환자에서 혈전색전증이 발생하였을 때 항-CD40L 단일클론 항체를 사용한 인간 임상 시험이 중단되었다(Davidson et al. Arth Rheu, 43:S271). 후속 임상 전 분석은 이것이 항-CD40L 단일클론 항체의 정확한 클래스 효과라는 것을 암시하였다. 따라서, 혈소판 응집 분석에서 인간 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드를 시험하는 것이 중요하다.
- [0692] 3개의 생리학적 CD40L 분자 대 1개의 항-CD40L 단일클론 항체 분자의 비가 사용되었을 때, 시트레이트로 처리된 혈소판 풍부 혈장(PRP), 세척된 혈소판 및 전혈에서 전구응집제 효과가 관찰되었다(도 16a). 이들 효과는 CD40L 결합 후 단일클론 항체 Fc 도메인 의존적 상호작용에 의해 매개되었다(데이터는 나타내지 않음). Fc 도메인 융합체의 부재 하에서, 응집은 관찰되지 않았다. 임의의 인간 CD40L 특이적 Tn3 스카폴드를 이량체 또는 HSA 융합 단백질로서 사용하였을 때 다수의 공여자들에서 응집이 관찰되지 않았다(도 16b 및 16c).
- [0693] 혈소판의 존재 하에서 가용성 CD40L/항-CD40L 단일클론 항체 면역복합체를 생성함으로써 임상 시험에서 관찰된 유해한 부작용을 관찰하였다(도 16a, 및 도 16c 상의 5C8 트레이스). 이의 또 다른 예는 형질전환 인간 Fc γ RIIa 무린 연구의 역사에서 관찰될 수 있다(Francis et al., 2010). 가용성 CD40L/단일클론 항체 면역복합체의

투여 시, 투여 후 수분 이내에 폐 조직 내에서 풍부한 혈전이 관찰되었다. 그러나, 항-CD40L Tn3 스카폴드를 사용하여 재현하였을 때, 대조군 샘플과 부합되게 정상적인 조직학이 폐에 존재하였다(데이터는 나타내지 않음).

[0694] 실시예 7

[0695] CD40L에 결합하도록 조작된 피브로넥틴 III형 도메인: 2개의 복합체의 클로닝, 발현, 정제, 결정화 및 예비 X-선 회절 분석

[0696] 재조합 인간 가용성 CD40L을, 파지 디스플레이 라이브러리로부터 CD40L 결합제로서 단리된 2개의 CD40L 특이적 Tn3 단량체 스카폴드 309 및 311K4E-12로 공-결정화하였다. 결정들은 각각 3.1 Å 및 2.9 Å까지 회절되었다. 또한, 재조합 인간 가용성 CD40L을 최적화된 Tn3 단량체 342 단독과 함께 또는 342 단량체 및 311K4E-12 단량체 둘다와 함께 공-결정화시켰다. 이들 구조들에 대한 결정들은 각각 2.8 Å 및 1.9 Å까지 회절되었다. 상응하는 결정 구조는 Tn3 스카폴드와 CD40L 사이의 상호작용을 이해하는 데에 도움이 되고, 다수의 에피토프들에 결합하는 고친화성 CD40L 결합제 및 직렬 구축물을 디자인하는 데에 사용될 수 있다.

[0697] 7.1 Tn3 분자 및 인간 가용성 CD40L의 발현 및 정제

[0698] 결정화를 위한 태그 결여 Tn3 분자를 생성하기 위해, 재조합적으로 발현된 단백질을 주변세포질 공간 내로 분비하도록 디자인된 사내 IPTG 유도성 벡터를 사용하여 단백질을 이. 콜라이에서 발현시켰다. 이 벡터는 트롬빈 절단 부위 이외에 Ptac 프로모터, OppA 신호 펩티드 돌연변이체 L25/M(MTNITKRSLVAAGVLAALMAGNVAMA)(서열번호 210) 및 C 말단 8xHis-태그를 갖는다. Tn3 서열을 신호 펩티드와 트롬빈 절단 부위 사이에 서브클로닝하였다.

[0699] Ni-NTA 수지를 제조자의 설명서(퀴아젠, 미국 캘리포니아주 발렌시아 소재)에 따라 사용하여 발현되고 분비된 His-태그 부착된 단백질을 정제한 후, 트롬빈으로 절단한 다음, Ni-NTA 친화성 정제로 다시 정제하여 절단되지 않은 온전한 단백질 및 절단된 His-태그 부착된 단편을 제거하였다. 이 정제 단계 후, 악타(Acta) 정제기(지이 헬쓰케어, 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재) 상에서 하이트랩 Q 컬럼(지이 헬쓰케어, 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)을 사용한 이온 교환 단계를 수행하였다. 정제된 태그 결여 Tn3 단백질은 SDS-PAGE 및 SEC 결과에 기초할 때 95% 초과 순도 및 균질도를 보인다.

[0700] 진아트(GeneArt)가 N 말단 6xHis-태그를 갖는 인간 가용성 CD40L(113-261, UNIPROT: P29965) 유전자를 합성하였고, 이 유전자를 사이토메갈로바이러스 주요 즉시 초기(hCMVie) 프로모터의 조절 하에 있는 사내 포유동물 발현 벡터 내로 클로닝하였다(Boshart et al., Cell 41: 521-530, 1985). CD40L 유전자를 CD33 신호 펩티드와 인 프레임으로 클로닝하였다. 상기 벡터 내의 EBNA 및 Ori P 유전자를 사용하여 단백질 발현을 증가시켰다. CD40L 유전자는 그의 mRNA 3' 말단의 적절한 프로세싱을 가능하게 하기 위해 SV40 폴리-A 서열도 포함하였다. 상기 구축물을 293F 현탁 세포(293 프리스타일 배지에서 성장된 인간 배아 신장 세포[HEK] 및 293 팩틴을 사용함, 인비트로젠, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재) 내로 일시적으로 형질감염시켰다. 표준 프로토콜을 이용하여 세포를 성장시켰고, 배지를 4일 및 8일 후 수거하였다. 그 다음, Ni-NTA 수지를 이용한 후 하이-트랩 SP FF 컬럼(지이 헬쓰케어, 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)을 이용한 이온 교환 단계 및 50 mM 트리스(pH 7.5) 및 50 mM NaCl에 대한 투석을 이용하여 가용성 CD40L 단백질을 정제하였다.

[0701] Tn3 분자의 복합체를 제조하기 위해, 309, 311K4E-12 또는 342를 1.1:1 비로 CD40L과 혼합하였고, 비바스핀(Vivaspin) 농축기(30,000 Da 컷-오프; 지이 헬쓰케어, 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)를 이용하여 대략 10 mg/ml까지 농축하였고, 50 mM 트리스-HCl(pH 7.5), 100 mM NaCl 및 0.02% Na₃N로 예비평형화된 수퍼텍스 200 10/300 GL 컬럼(지이 헬쓰케어, 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)을 사용한 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로 분석하였다(도 19, 패널 A). 분리 단계 후, 복합체를 18 mg/ml까지 농축하고 결정화시켰다. 1.1:1.1:1 비의 상기 3개 성분들을 사용하여 본질적으로 상기 전술된 바와 같이 342-311K4E-12-CD40L 복합체를 제조하였다.

[0702] 7.2 결정화 스크리닝 및 최적화

[0703] 적하 구획에서 300 nL 부피의 웰 용액과 단백질 복합체 용액을 혼합하고 50 μL의 웰 용액에 대해 평형화시킴으로써 포에닉스(Phoenix) 결정화 로봇(아트 로빈스 인스트루먼트(Art Robbins Instruments), 미국 캘리포니아주 서니베일 소재)를 이용하여 96웰 인텔리-플레이트(아트 로빈스 인스트루먼트, 미국 캘리포니아주 서니베일 소재)에서 시팅 드롭 결정화 실험을 준비하였다. 햄튼 리서치(Hampton Research)(미국 캘리포니아주 알리소 비에조 소재), 에머랄드 바이오시스템스(Emerald BioSystems)(미국 워싱턴주 베인브리지 아일랜드 소재) 및 몰레큘라 디멘션스(Molecular Dimensions)(미국 플로리다주 아폴카 소재)로부터 입수된 상업적인 결정화 스크린을 사용하였다.

- [0704] 309-CD40L, 342-CD40L 및 342-311K4E_12-CD40L 복합체 각각의 결정화는 애디티브 스크린(Additive Screen) HT (햄톤 리서치, 미국 캘리포니아주 알리소 비에조 소재)를 사용하는 추가 스크리닝을 포함하는 최적화 단계를 필요로 하였다. 최적화 단계에서, 96웰 플레이트의 웰 용액을 초기 스크리닝으로부터 수득된 80%의 성공적인 용액 및 20%의 각각의 첨가제로 충전시켰다. 소적은 300 nL의 단백질 용액과 300 nL의 신규 웰 용액의 철저한 혼합 후 이들 용액들로 만들어졌다. 회절 품질의 결정을 96웰 플레이트로부터 직접적으로 수거하였다. 냉동보존을 위해, 증가하는 글리세롤 농도를 갖는 모액의 3개 연속 용액들 내로 결정을 옮겼다.
- [0705] 회절 품질의 311-CD40L 결정은 초기 스크린에서 냉동제의 첨가를 필요로 하지 않는 용액으로부터 성장하였다.
- [0706] 7.3 X-선 회절 및 데이터 수집
- [0707] ADSC Q315R CCD X-선 검출기(에어리어 디텍터 시스템스 코퍼레이션(Area Detector Systems Corporation), 미국 캘리포니아주 포웨이 소재)를 갖춘 로우렌스 버클리 국립 연구소(캘리포니아 버클리 대학)의 어드밴스드 라이트 소스(Advanced Light Source)의 빔라인(Beamline) 5.0.3에서 단일 결정으로부터 309-CD40L 복합체에 대한 X-선 회절 패턴을 수집하였다. 진동 범위가 0.5° 인 360개의 연속 영상을 300 mm의 결정-대-검출기 거리 및 0.8초의 노출 시간에서 수집하였다.
- [0708] 레이오닉스(Rayonix) 225 HE 검출기(레이오닉스 엘엘씨(Rayonix LLC), 미국 일리노이주 에반스톤 소재)를 갖춘 아르곤(Argonne) 국립 연구소의 어드밴스드 포톤 소스(Advanced Photon Source)(시카고 대학, 미국 일리노이주 시카고 소재)의 빔라인 31-ID-D에서 단일 결정으로부터 311K4E_12-CD40L, 342-CD40L 및 342-311K4E_12-CD40L 복합체에 대한 X-선 회절 패턴을 수집하였다. 진동 범위가 1° 인 180개의 연속 영상을 300 mm의 결정-대-검출기 거리 및 0.8초의 노출 시간에서 수집하였다.
- [0709] HKL2000 스위트(Otwinowski & Minor, Methods in Enzymology, 276:307-326, 1997)를 이용하여 모든 데이터 세트에 대한 축소 및 규모 확대를 수행하였다.
- [0710] 7.4 결과 및 논의
- [0711] 309-CD40L 복합체의 가장 재현가능한 결정화 조건은 Peg/Ion 스크린(햄톤 리서치)에서 B5(0.2 M NaNO_3 , 20% PEG3350)인 것으로 보였다. 애디티브 스크린을 사용한 추가 최적화는 A1 조건(0.1 M $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)으로부터 회절 품질의 결정을 제공하였다. 도 19의 패널 B에 나타난 결정을 96웰 플레이트로부터 수거하였고, 20% 글리세롤로 보충된 모액 용액으로 전달한 후 액체 질소에서 냉각시켰다.
- [0712] 공간군 대칭: 결정은 셀 파라미터 $a=85.69 \text{ \AA}$, $b=90.64 \text{ \AA}$ 및 $c=95.56 \text{ \AA}$ 를 갖는 사방정계 공간군 $P2_12_12_1$ 에 속하였고 3.1 \AA 까지 회절하였다. 비대칭 단위는 약 $2.3 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ 의 VM 값을 가지면서 CD40L의 삼량체 및 3개의 309 분자를 함유할 것으로 예측된다.
- [0713] 311K4E_12-CD40L 결정화의 경우, 크라이오(Cryo) I 및 II 스크린(에머랄드 바이오스트럭처스(Emerald BioStructures))은 최적화 및 냉동보존 둘다를 필요로 하지 않는 다수의 조건을 제공하였다. 조건 F7(40% PEG 600, 0.1 M CH_3COONa , 0.2 M MgCl_2)로부터의 단일 결정(도 19, 패널 C)을 데이터 수집을 위해 사용하였다.
- [0714] 공간군 대칭: 결정은 셀 파라미터 97.62 \AA 를 갖는 입방정계 공간군 $P2_13$ 에 속하였고 2.6 \AA 까지 회절하였다. 비대칭 단위는 약 $2.9 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ 의 VM 값을 가지면서 1개의 CD40L 및 1개의 311K4E_12 분자를 함유한다.
- [0715] 342-CD40L 공간군 대칭: 결정은 셀 파라미터 $a=93.53 \text{ \AA}$, $b=93.53 \text{ \AA}$, $c=66.69 \text{ \AA}$ 및 레졸루션 2.8 \AA 를 갖는 공간군 $P321$ 에 속하였다. 비대칭 단위는 1개의 CD40L 단량체 및 1개의 342 단량체를 함유한다.
- [0716] 342-311K4E_12-CD40L 공간군 대칭: 결정은 셀 파라미터 $a=80.32 \text{ \AA}$, $b=143.48 \text{ \AA}$, $c=111.27 \text{ \AA}$, $\beta=98.22^\circ$ 및 레졸루션 1.9 \AA 를 갖는 공간군 $P21$ 에 속하였다. 비대칭 단위는 2개의 CD40L 삼량체, 6개의 342 단량체 및 6개의 311K4E-12 단량체를 함유한다.
- [0717] 모든 구조들에 대한 데이터 통계는 하기 표 10에 제시되어 있다.

표 10

X-선 데이터 수집 통계학

	309-CD40L	311K4E-12
파장, Å	0.9793	0.9793
레졸루션, Å	50.0-3.05 (3.16-3.05) ^a	50.0-2.94
공간군	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 3
셀 파라미터, Å	a=85.69, b=90.64, c=95.56	a=97.62
총 반사	94,024	128,140
유일한 반사	14,555	6720
평균 중복	6.5 (6.4) ^a	19.2 (19.7)
완결도, %	100.0 (100.0) ^a	99.4 (100.0)
R _{sym}	0.097 (0.443) ^a	0.114 (0.785)
평균 I/σ (I)	17.2 (4.6) ^a	20.1 (2.4)

^a가로 내의 값은 최대 레졸루션 셀(shell)에 상응한다.

	342-CD40L	342-311K4E_12-CD40L
파장, Å	0.9793	0.9793
레졸루션, Å	50.0-2.8 (2.83-2.82) ^a	144.5-1.9 (1.96-1.95) ^a
공간군	P321	P2 ₁
셀 파라미터, Å	a=93.53, b=93.53, c=66.69	a=80.32, b=143.48, c=111.27, β=98.22°
총 반사	66,038 (549) ^a	733,814 (1806) ^a
유일한 반사	8,406 (88) ^a	179,232 (1806) ^a
평균 중복	7.9 (6.2) ^a	4.1 (4.2) ^a
완결도, %	99.9 (100.0) ^a	99.7 (99.6) ^a
R _{sym}	0.19 (0.79) ^a	0.06 (0.57) ^a
평균 I/σ (I)	8.1 (1.4) ^a	14.5 (3.0) ^a

^a 가로 내의 값은 최대 레졸루션 셀에 상응한다.

[0718]

[0719]

CD40L은 삼량체를 형성하였다(도 17a에서 폴리펩티드 A, B 및 C). 각각의 309 Tn3 스카폴드(도 17a에서 폴리펩티드 D, E 및 F)는 2개의 CD40L 폴리펩티드와 접촉한다. 결정 구조는 각각의 309 스카폴드와 제1 및 제2 CD40L 폴리펩티드 사이에 6개의 특정 접촉이 존재한다는 것을 보여주었다. BC의 아스파르트산 17은 제1 CD40L의 트레오닌 251과 접촉한다. BC 루프의 글루탐산 18은 제1 CD40L의 아르기닌 203 및 제2 CD40L의 이소류신 204와 접촉한다. DE 루프의 세린 47은 제1 CD40L의 히스티딘 249와 접촉한다. DE 루프의 트립토판 49는 제1 CD40L의 발린 247과 접촉한다. FG 루프의 아스파르트산 70은 제2 CD40L의 세린 185와 접촉한다(도 17a 참조). 311 스카폴드와 접촉하는 CD40L 아미노산 잔기도 도 18a에 나타나 있다.

[0720]

309의 경우, 각각의 311K4E_12 단량체 스카폴드(도 17b의 폴리펩티드 A, B 및 C)는 2개의 CD40L 폴리펩티드와 접촉한다. 결정 구조는 각각의 311K4E_12 스카폴드와 제1 및 제2 CD40L 폴리펩티드 사이에 19개의 특정 접촉이 존재한다는 것을 보여주었다. BC 루프의 아스파라긴 17은 제1 CD40L의 티로신 146 및 글루탐산 142와 접촉한다. BC 루프의 아르기닌 18은 제1 CD40L의 글루탐산 142, 티로신 146 및 메티오닌 148과 접촉한다. BC 루프의 세린 19는 제1 CD40L의 글루탐산 142 및 류신 155와 접촉한다. BC 루프의 세린 22는 제1 CD40L의 아스파라긴 151과 접촉한다. BC 루프의 히스티딘 15는 제1 CD40L의 티로신 146과 접촉한다. DE 루프의 히스티딘 51은 제1 CD40L의 티로신 146 및 제2 CD40L의 글루탐산 230과 접촉한다. DE 루프의 발린 50은 제2 CD40L의 글루탐산 230과 접촉한다. 311K4E_1 단량체 스카폴드의 N 말단 영역은 제2 CD40L과 연결된다. 제2 CD40L의 아르기닌 200은 311K4E_12의 N 말단 영역의 트레오닌 7, 아스파르트산 8 및 트레오닌 10과 접촉한다. 제2 CD40L의 아르기닌 203은 글루탐산 4 및 아스파르트산 5와 접촉한다. 309 스카폴드와 접촉하는 CD40L 아미노산 잔기는 도 18b에도 나타나 있다.

[0721]

309 및 311K4E_12와 복합체를 형성한 CD40L의 결정 구조는 311K4E_12 및 309 단량체 스카폴드들이 CD40L 삼량

체 복합체의 상이한 부분들에 위치한 상이한 에피토프들에 결합한다는 것을 보여주었다(도 17c). 상기 구조는 상기 두 스카폴드들이 CD40 수용체와 상호작용할 동일한 홈에 결합한다는 것을 보여주었다.

[0722] CD40L을 갖는 342의 결정 구조는 도 17d에 제공되어 있고, 342가 CD40L의 동일한 부분에 결합하지만 접촉 잔기의 특정 변화가 모 309 클론과 비교될 때 관찰된다는 것을 보여준다. 구체적으로, 342에서 BC 루프의 아스파르트레이트 18은 CD40L의 트레오닌 251과 접촉하고, DE 루프의 히스티딘 47은 CD40L의 히스티딘 249와 접촉하고, DE 루프의 히스티딘 48은 CD40L의 히스티딘 249, 세린 245 및 세린 248과 접촉하고, DE 루프의 히스티딘 50은 CD40L의 발린 247과 접촉한다.

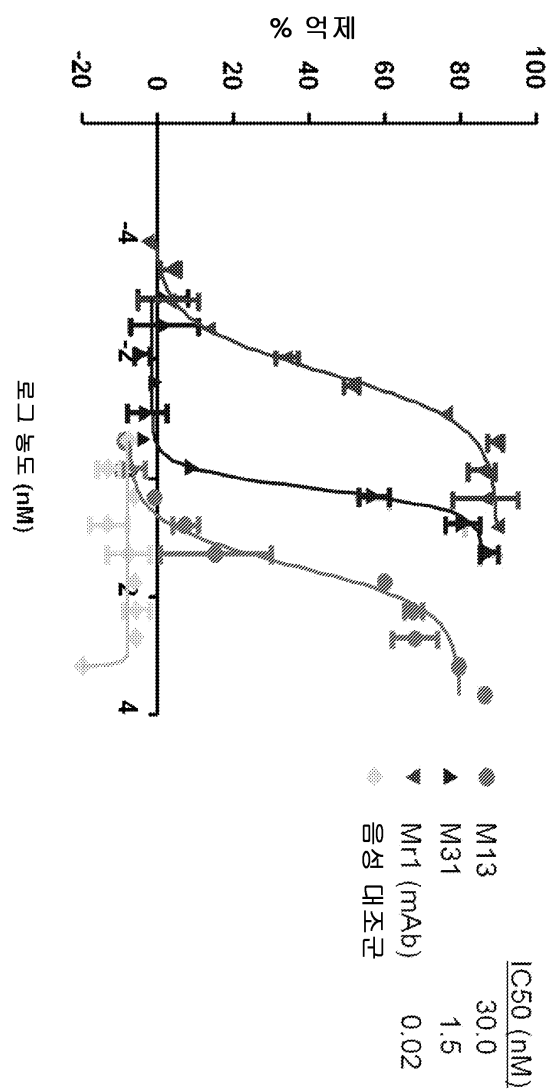
[0723] CD40L을 갖는 342 및 311K4E_12의 결정 구조는 상기 두 스카폴드들이 CD40L 삼량체 복합체의 상이한 부분들에 위치하는 그들 각각의 에피토프들에 동시에 결합할 수 있다는 것을 입증한다(도 17e). 별도의 스카폴드 각각에 대한 접촉이 (전술된 바와 같이) 유지된다.

[0724] 상기 제시된 실시예들은 본 발명의 다양한 양태 및 본 발명의 방법의 실시를 예시한다. 이들 실시예들은 본 발명의 많은 상이한 실시양태들의 배타적인 설명을 제공하기 위한 것이 아니다. 따라서, 본 발명이 명확한 이해를 목적으로 예증 및 예시에 의해 다소 상세히 기재되어 있다 하더라도, 당분야에서 통상의 기술을 가진 자는 첨부된 특허청구범위의 사상 또는 범주를 벗어나지 않으면서 많은 변화 및 변경을 만들 수 있다는 것을 용이하게 인식할 것이다.

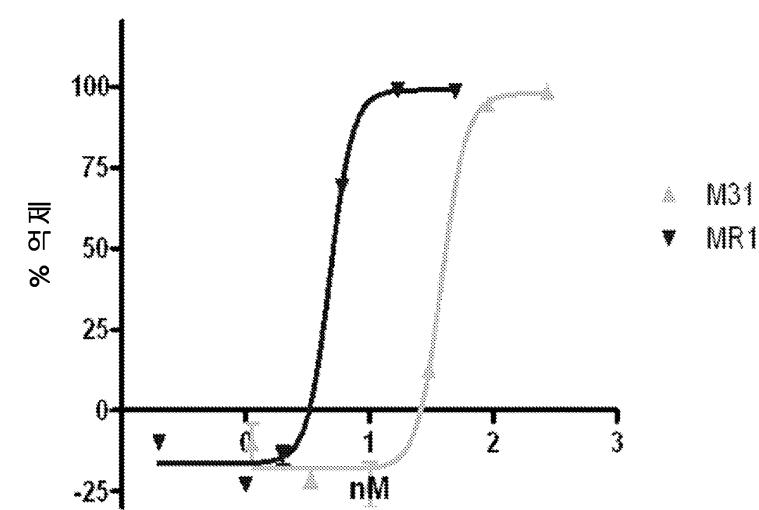
[0725] 본 명세서에서 언급된 모든 공개문헌, 특허 및 특허출원은 각각의 개별 공개문헌, 특허 또는 특허출원이 본원에 참고로 도입되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 표시되어 있는 것처럼 동일한 정도로 본 명세서 내로 참고로 도입된다.

도면

도면1a

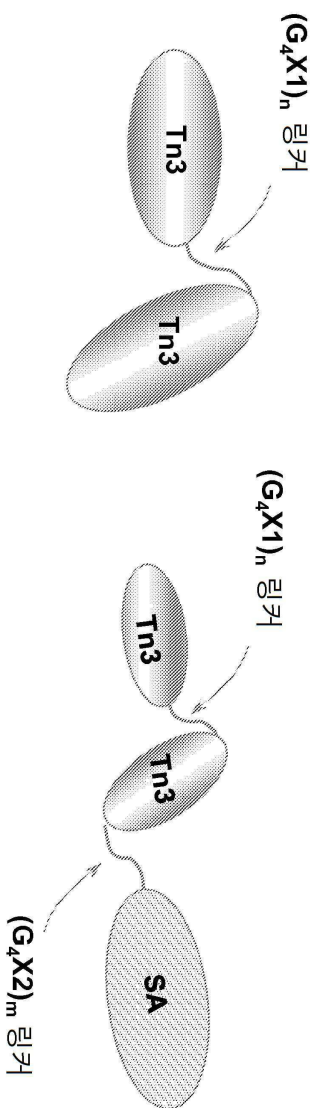


도면1b



2가 CD40L 스캐폴드

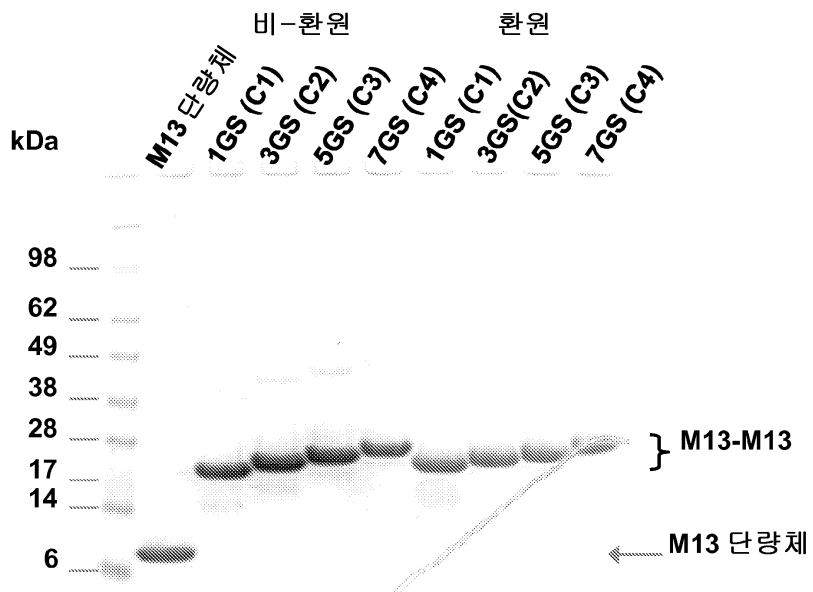
2가 CD40L-형질 알부민 (SA)
융합 구축물



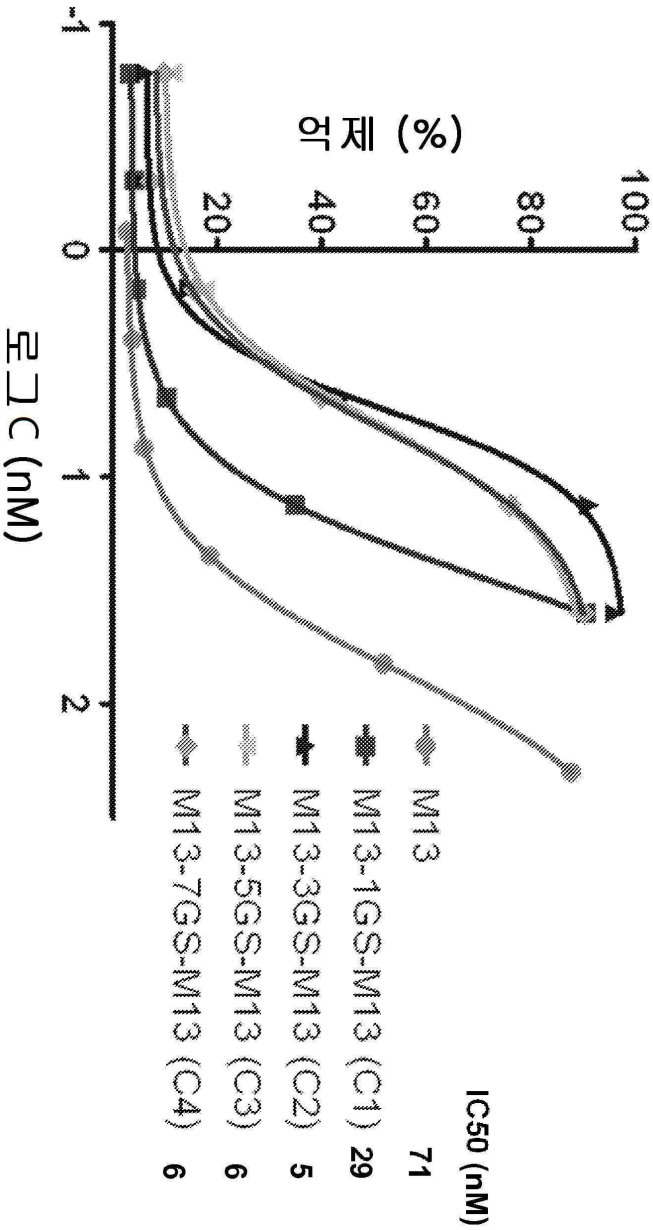
도면2a

X1=S 또는 G 또는 A
X2=S 또는 G 또는 A
n=1-7 (링커는 추가 잔기를 포함할 수 있다)
m=1-7 (링커는 추가 잔기를 포함할 수 있다)

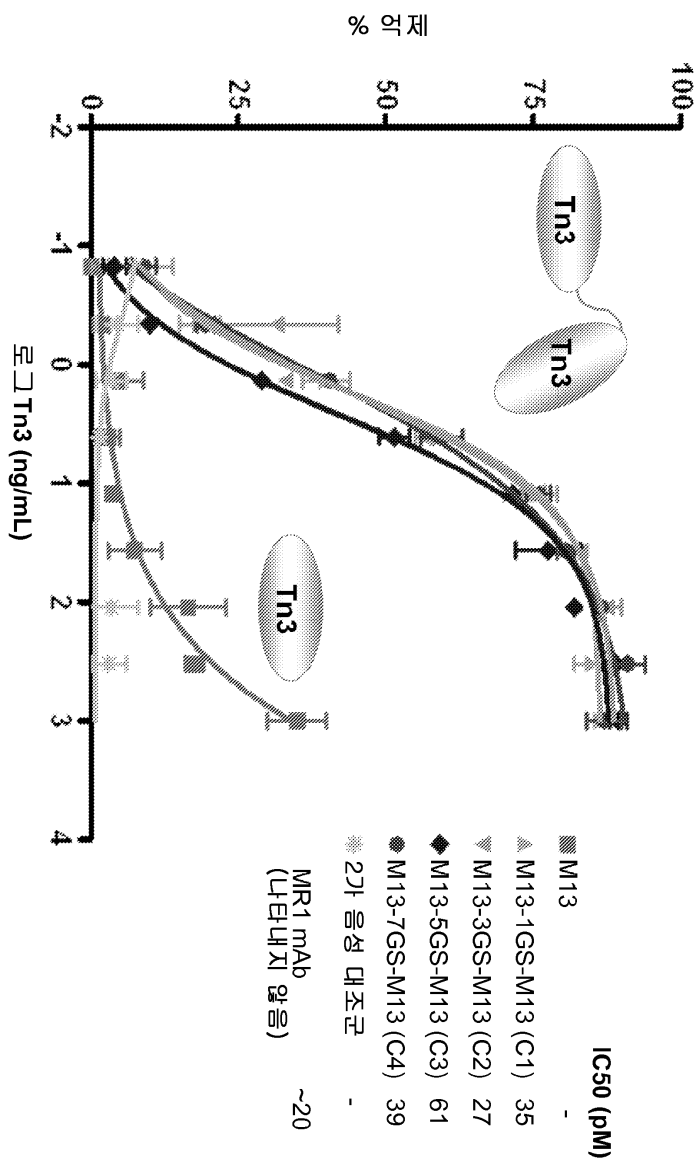
도면2b



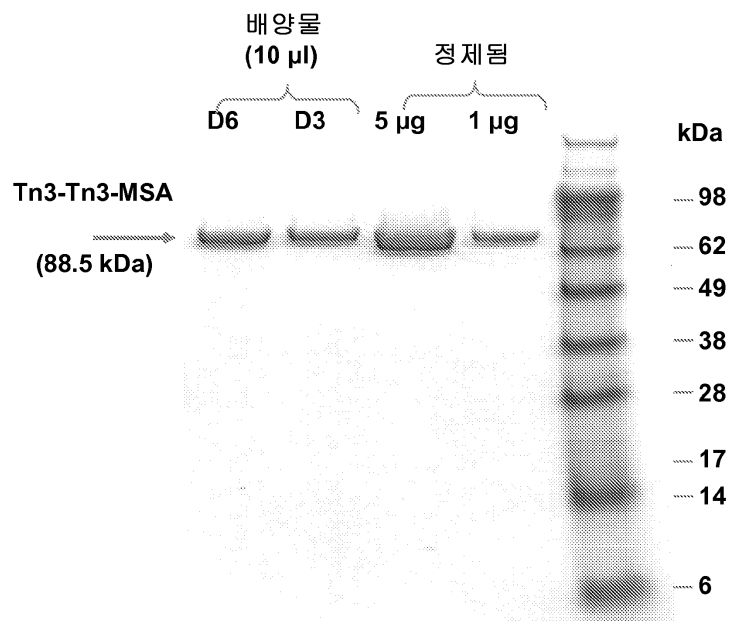
도면2c



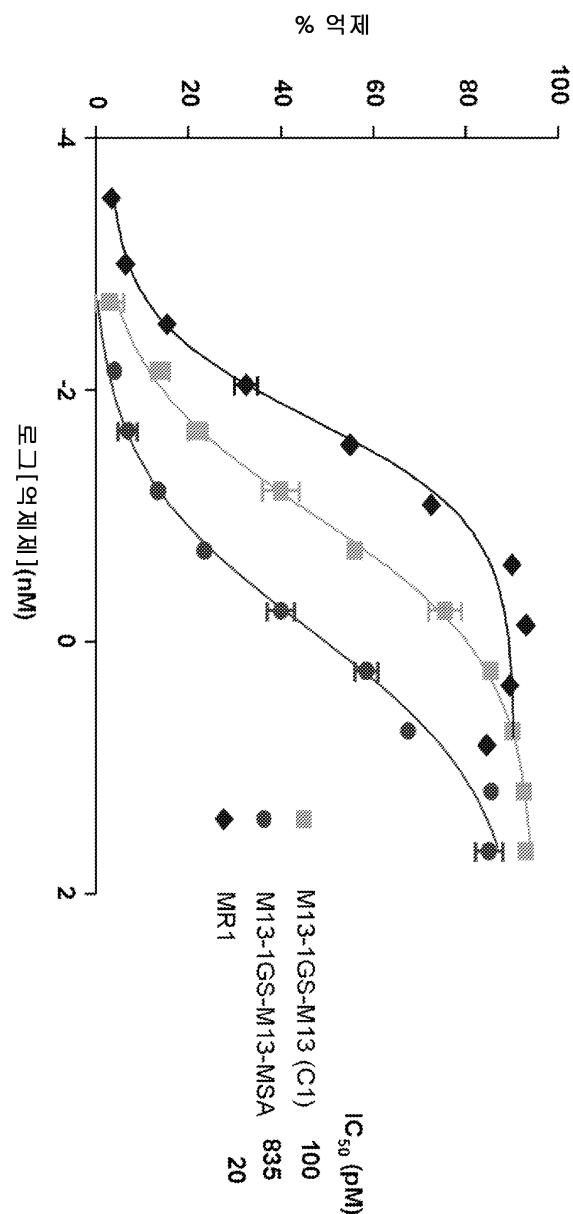
도면2d



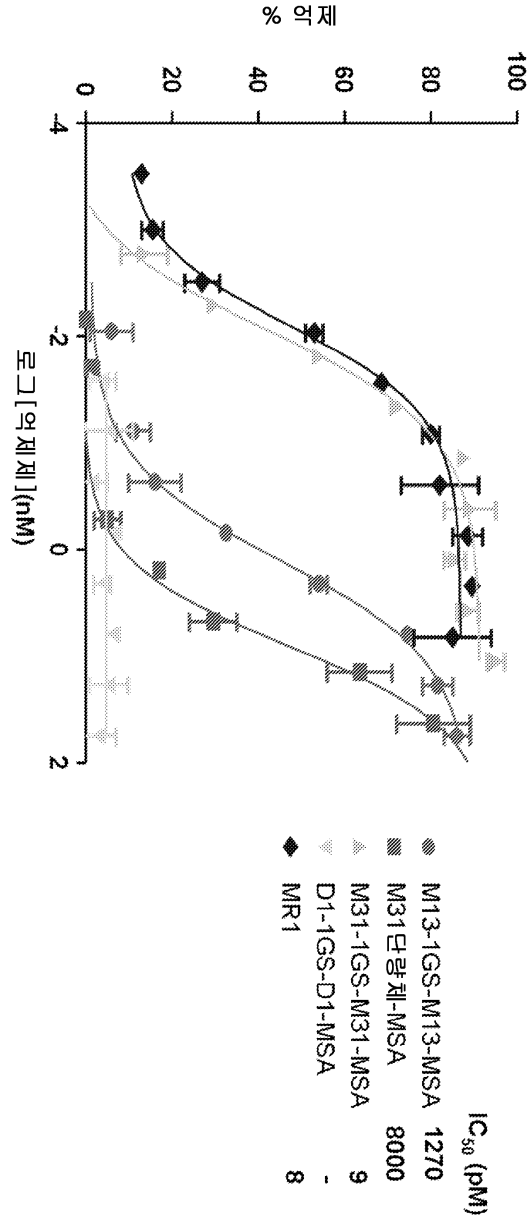
도면3a



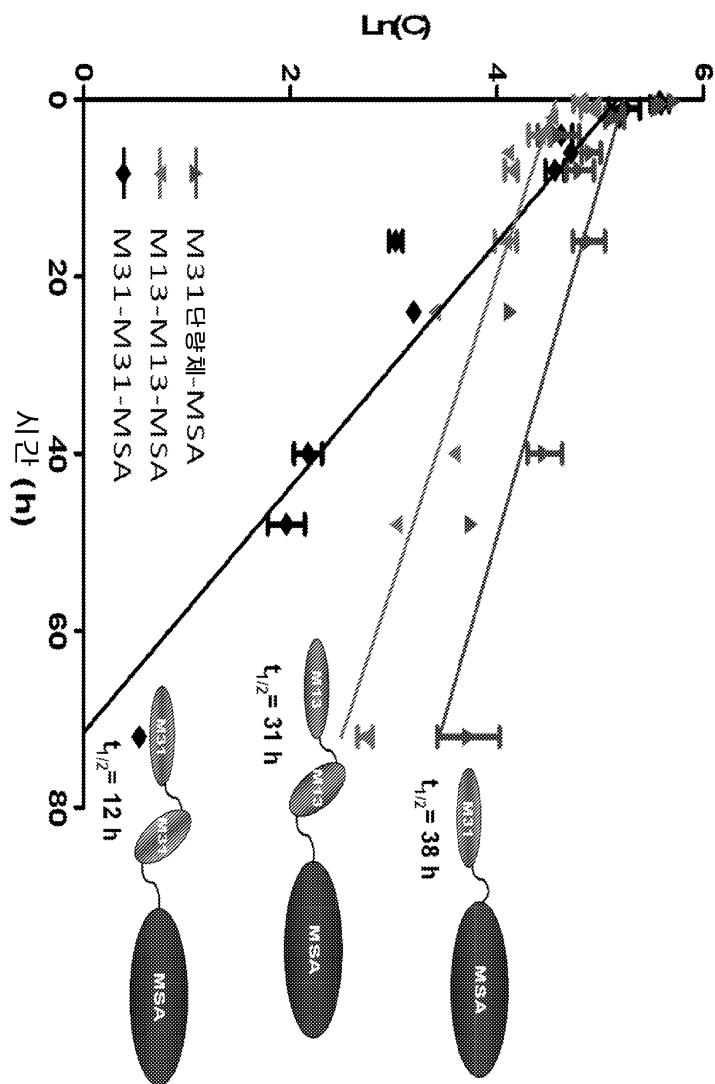
도면3b



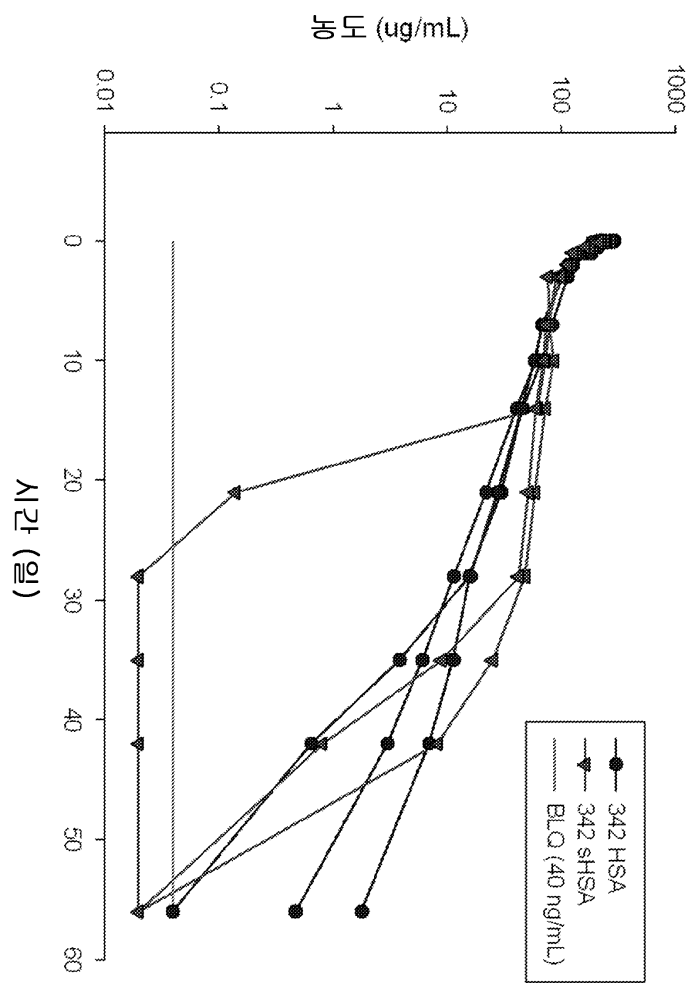
도면3c



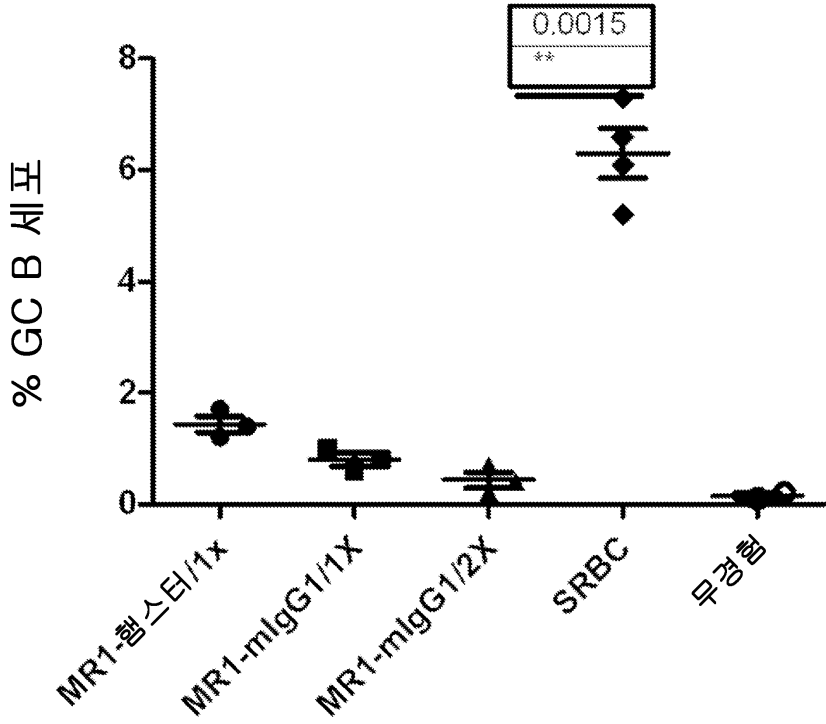
도면4a



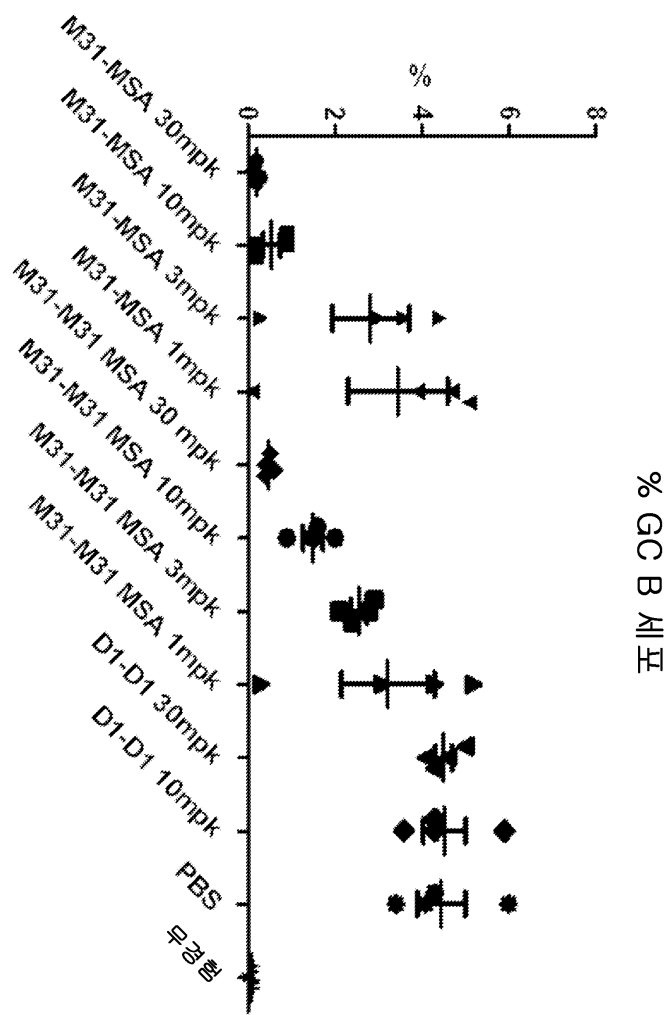
도면4b



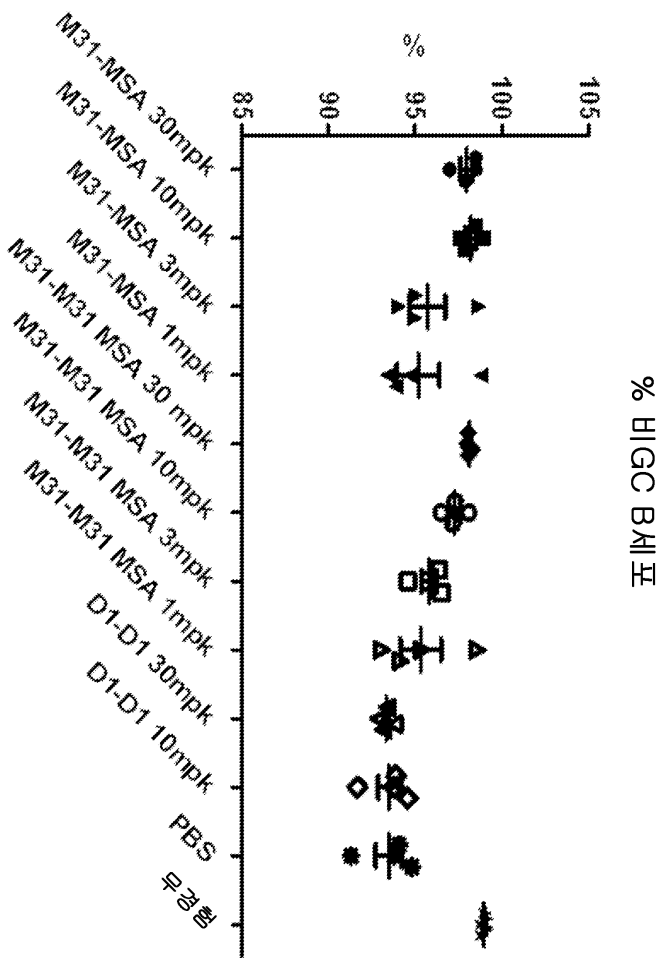
도면5a



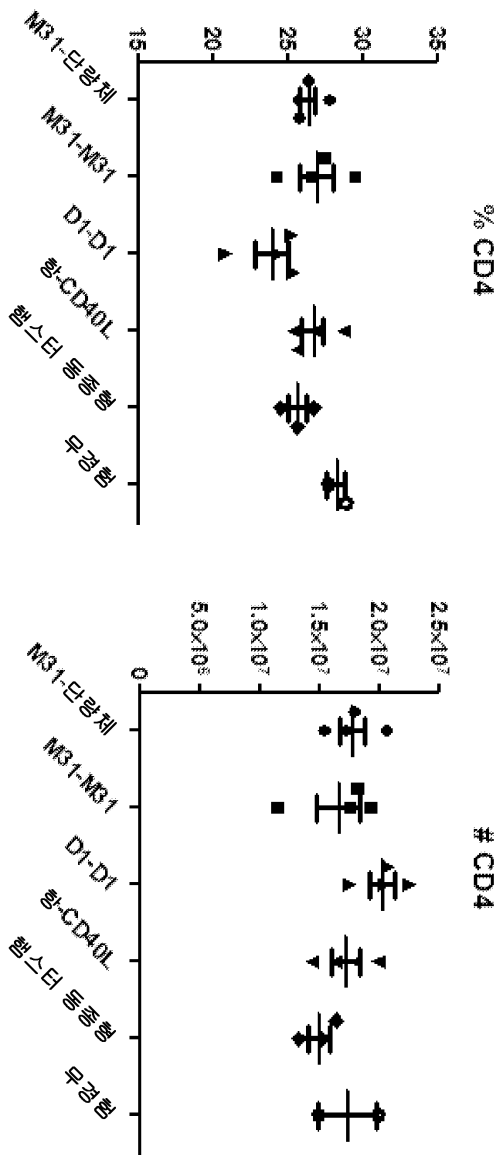
도면5b



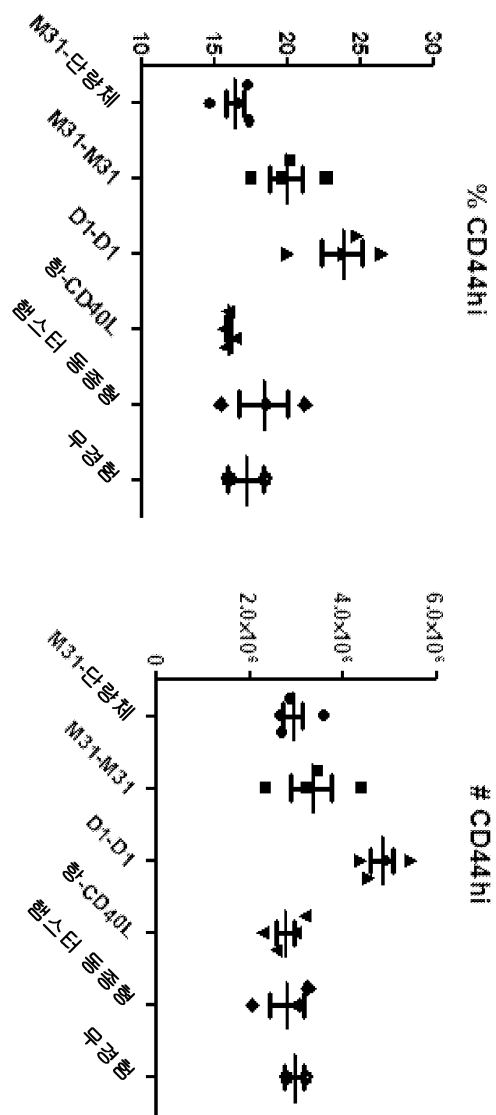
도면5c



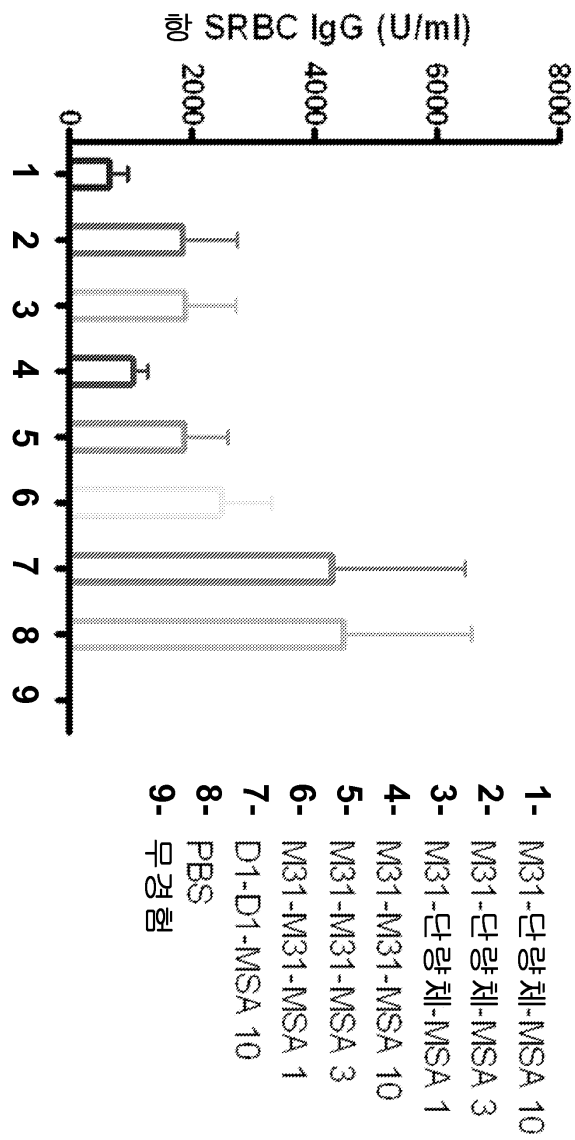
도면5d



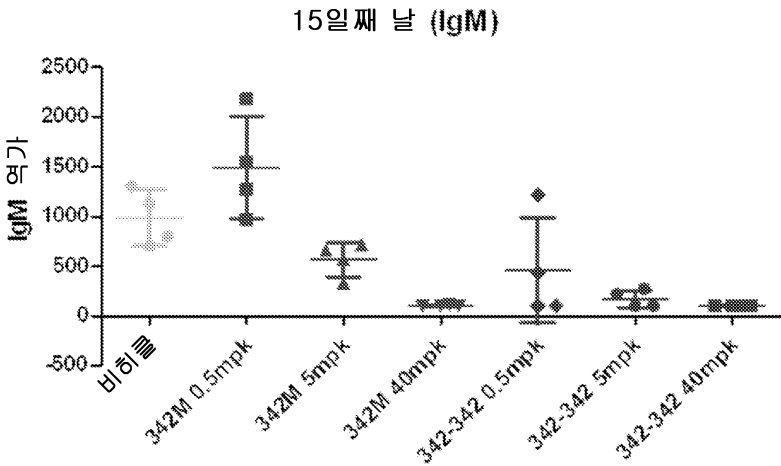
도면5e



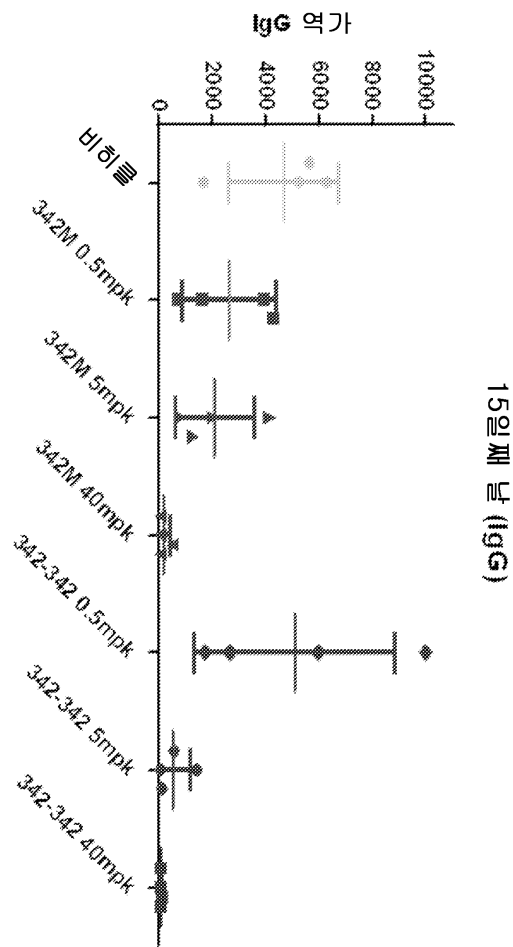
도면5f



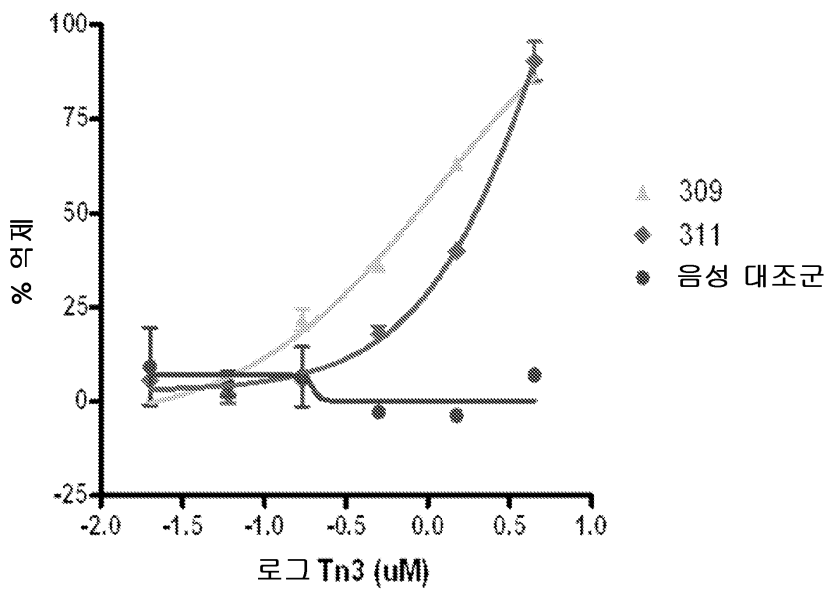
도면5g



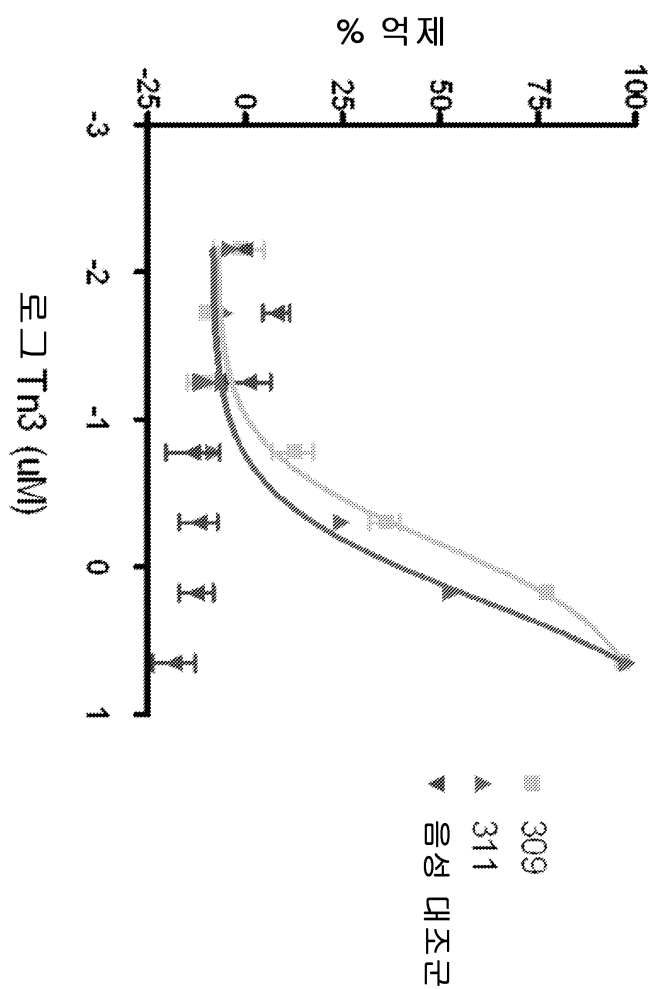
도면5h



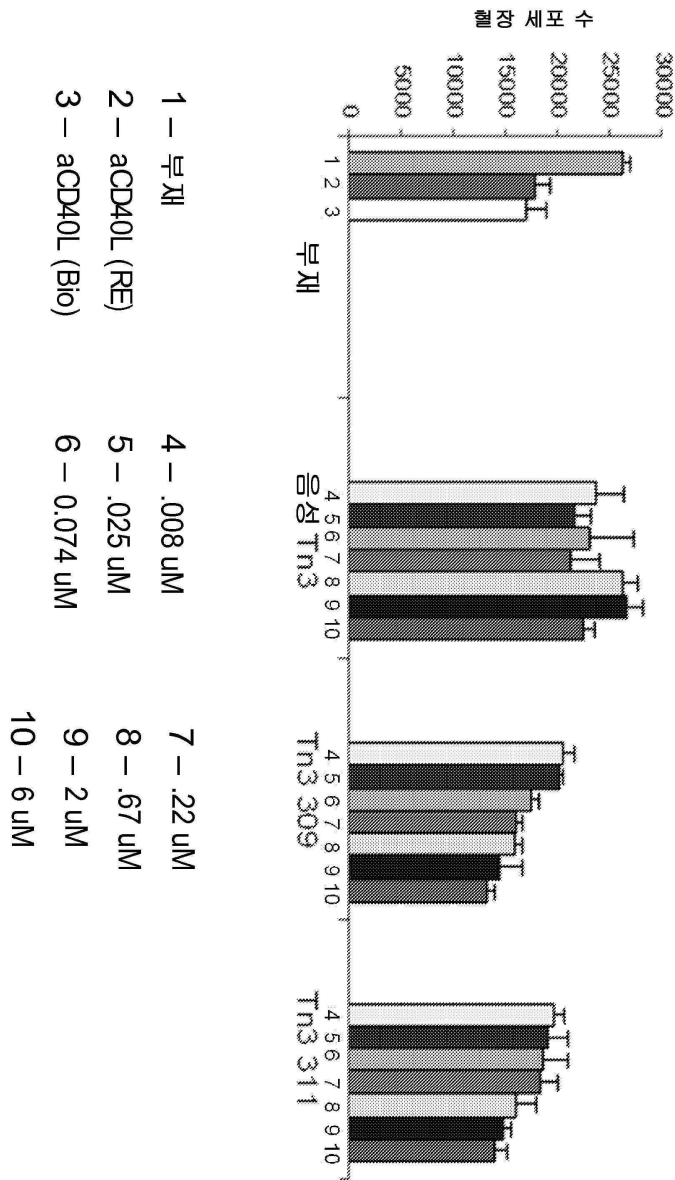
도면6a



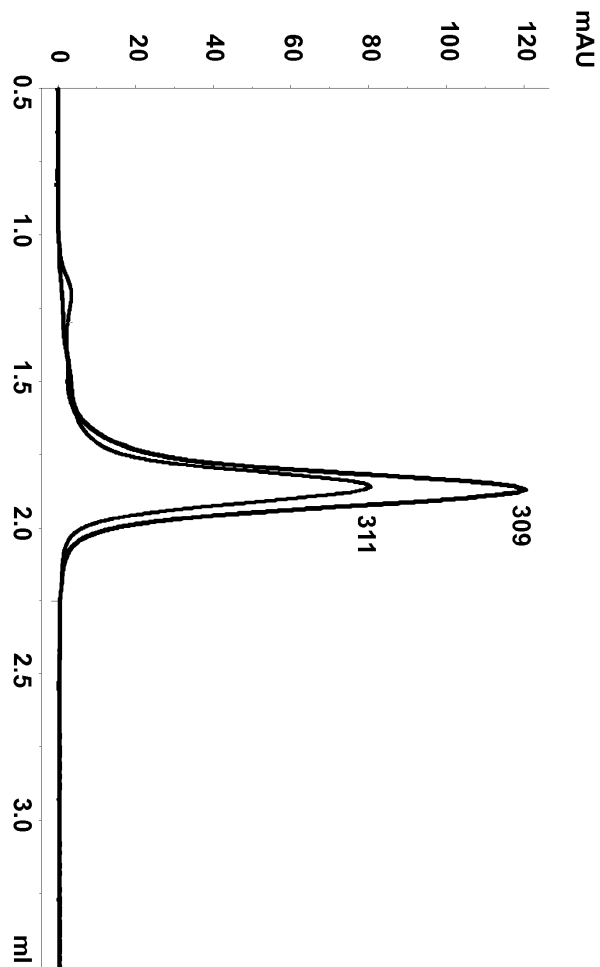
도면6b



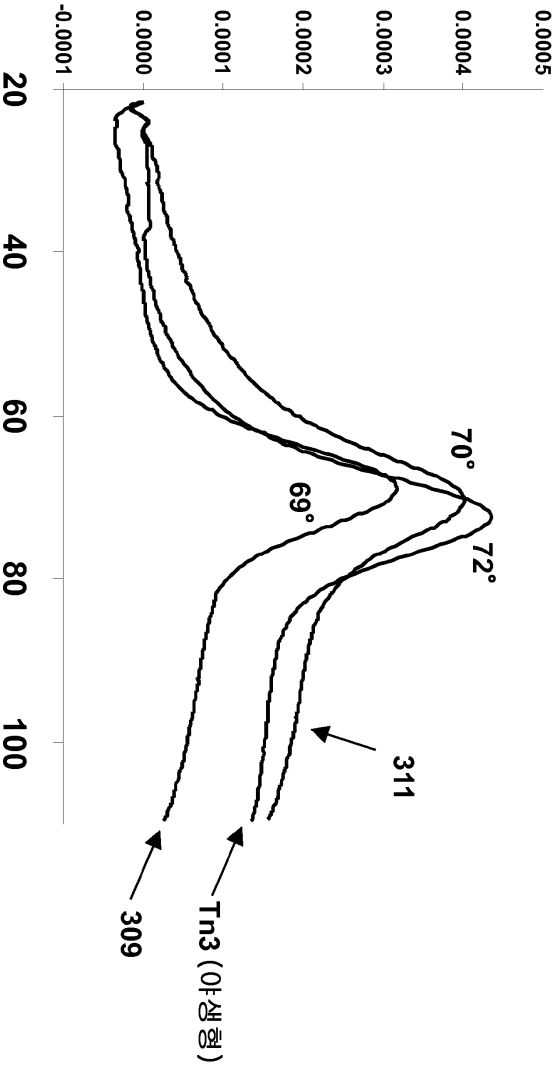
도면6c



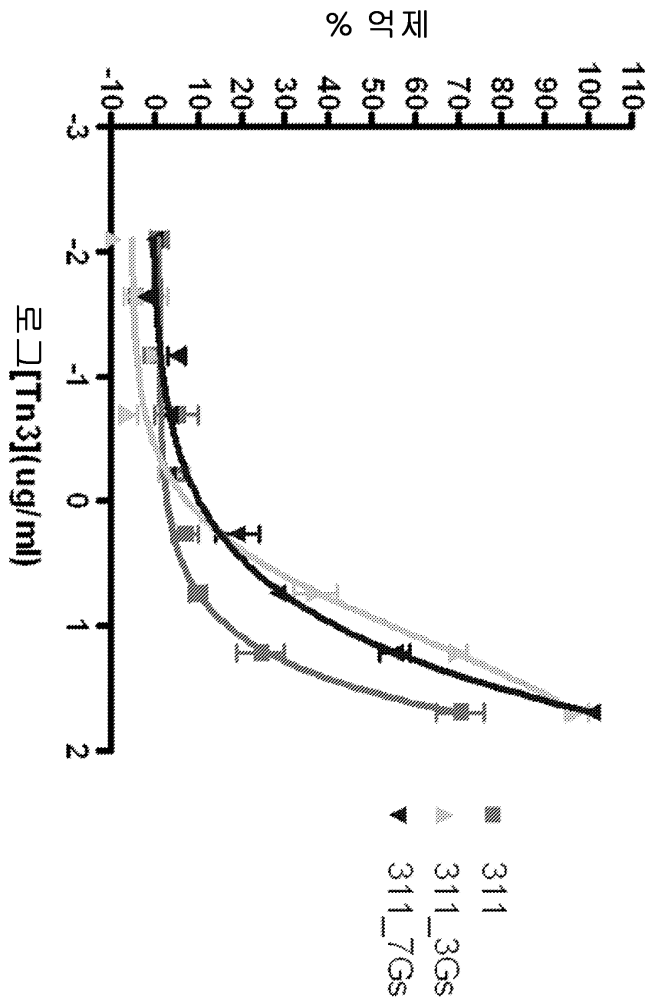
도면7a



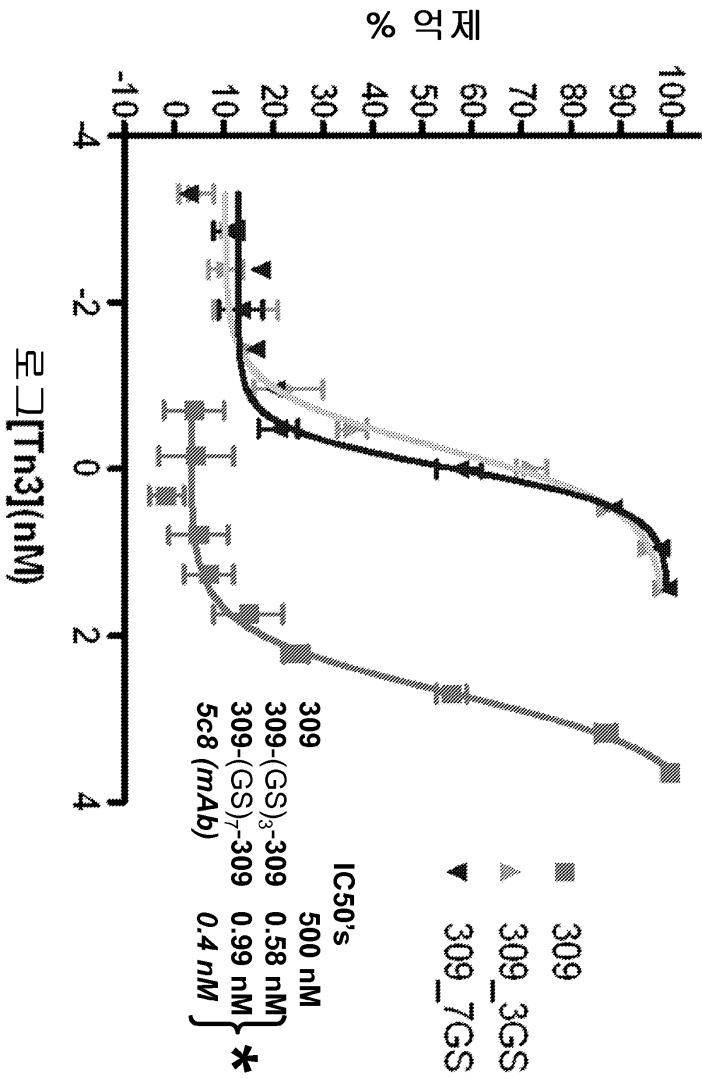
도면7b

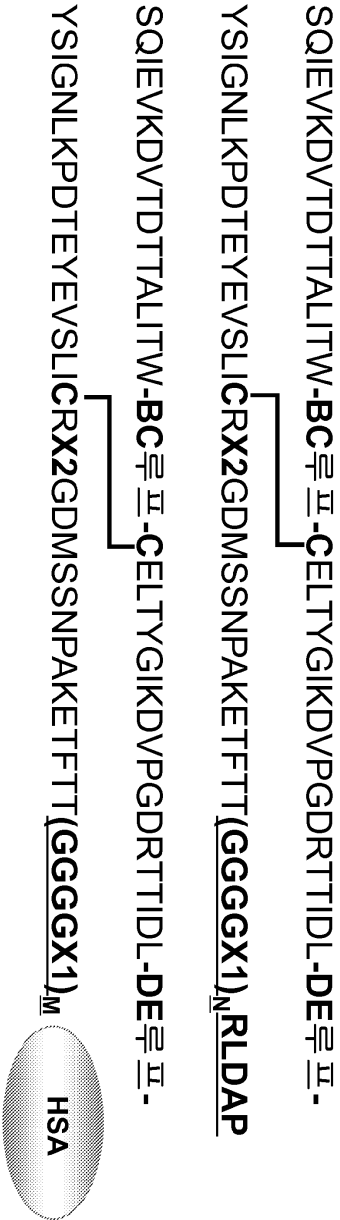


도면8a



도면8b

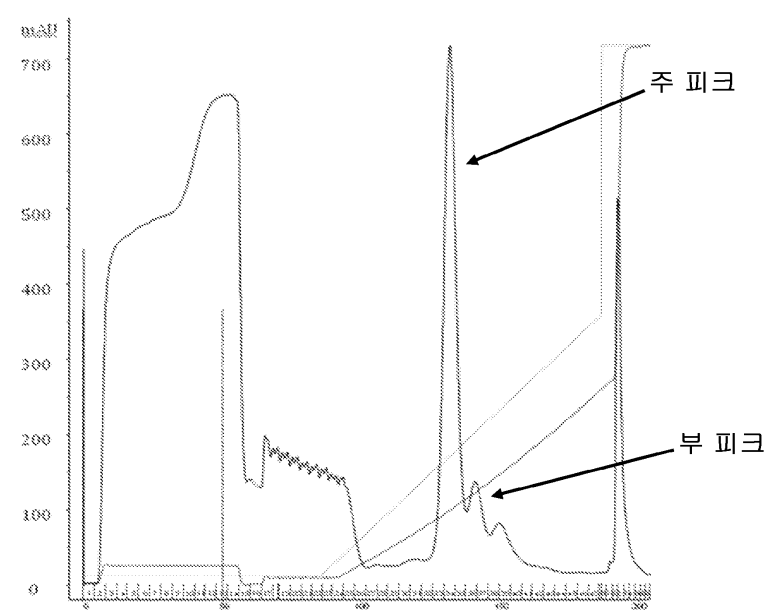




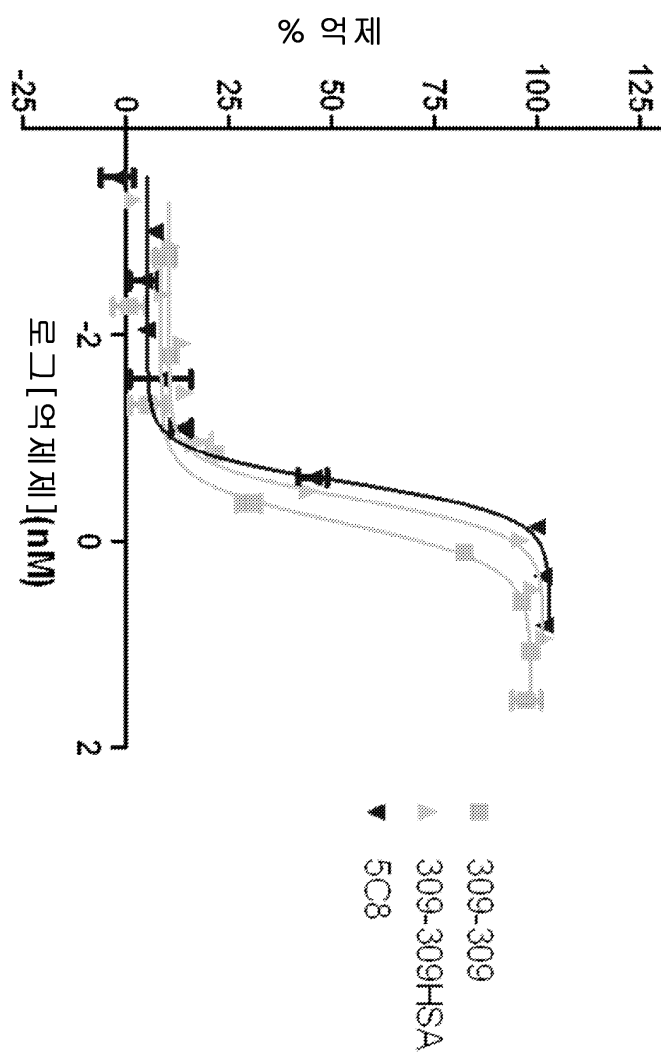
X1=S 또는 G 또는 A
X2=R 또는 S 또는 A
N=1-7
M=1-7

도면9a

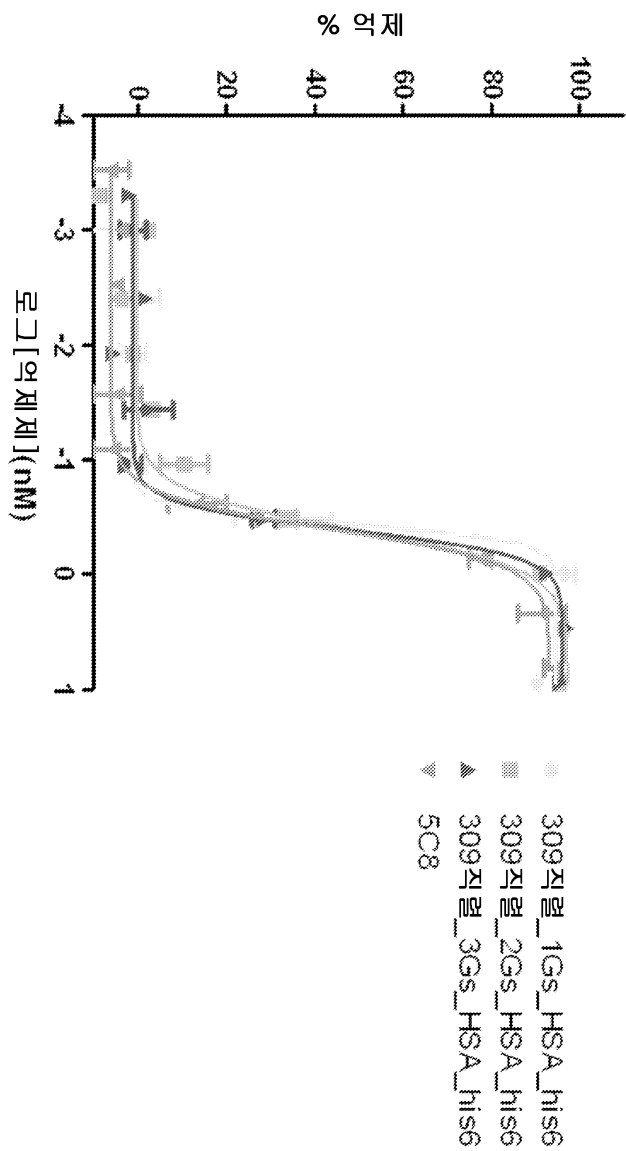
도면9b



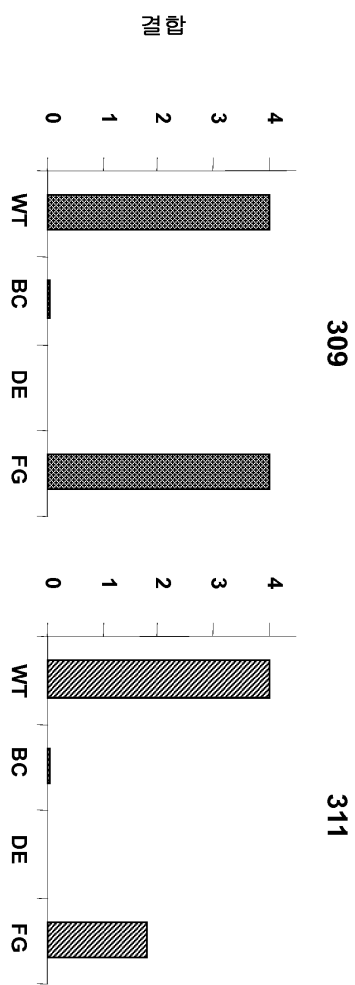
도면9c



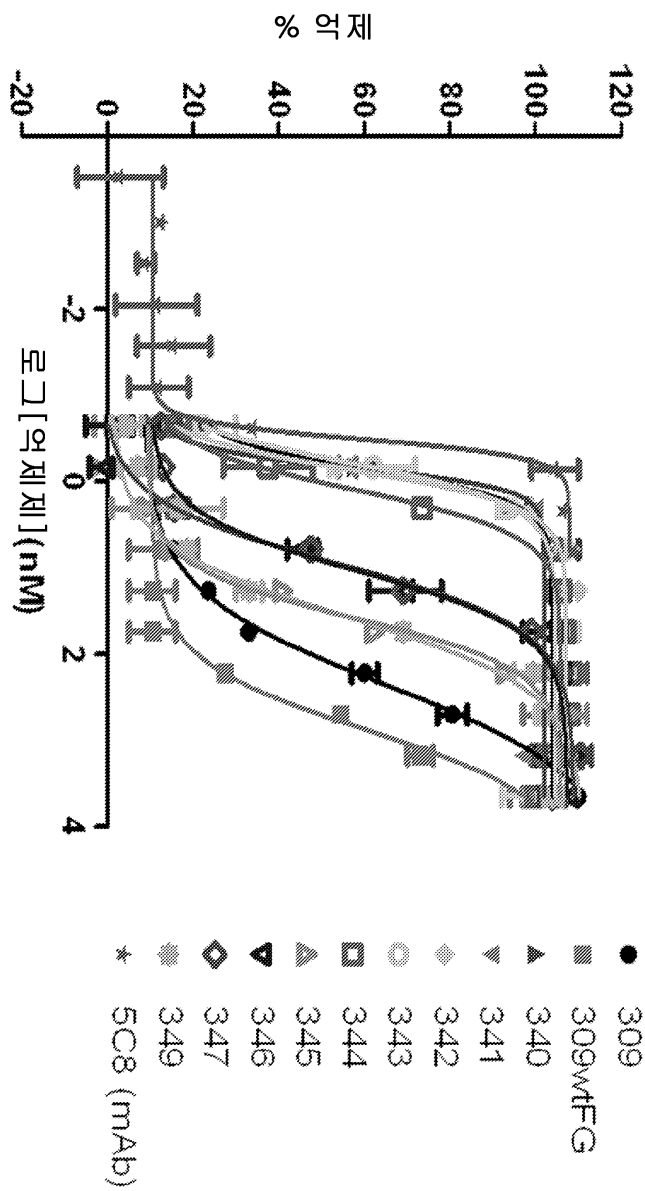
도면9d



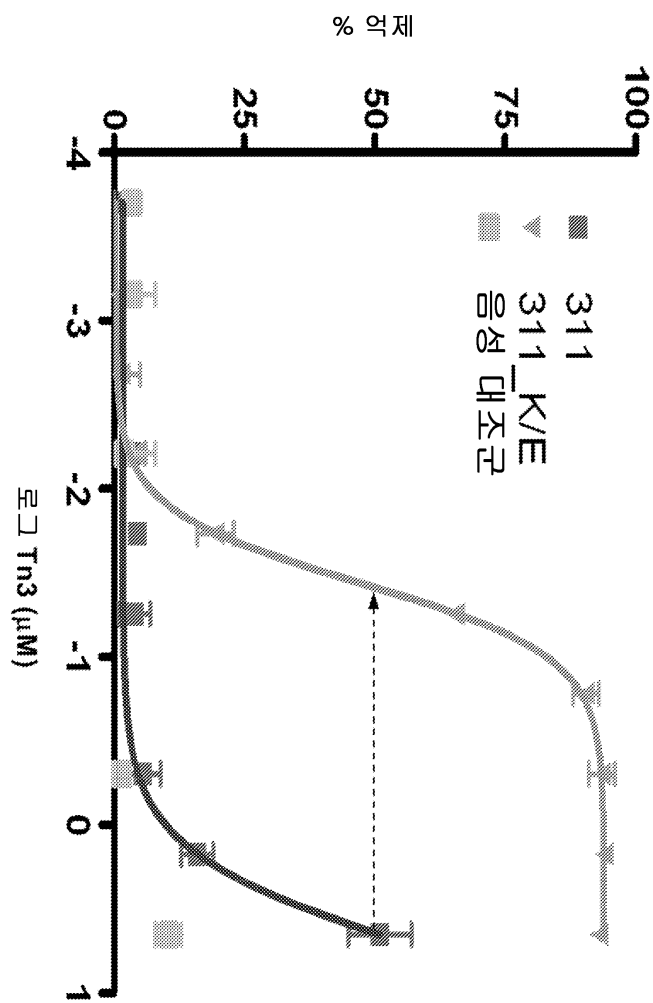
도면10a



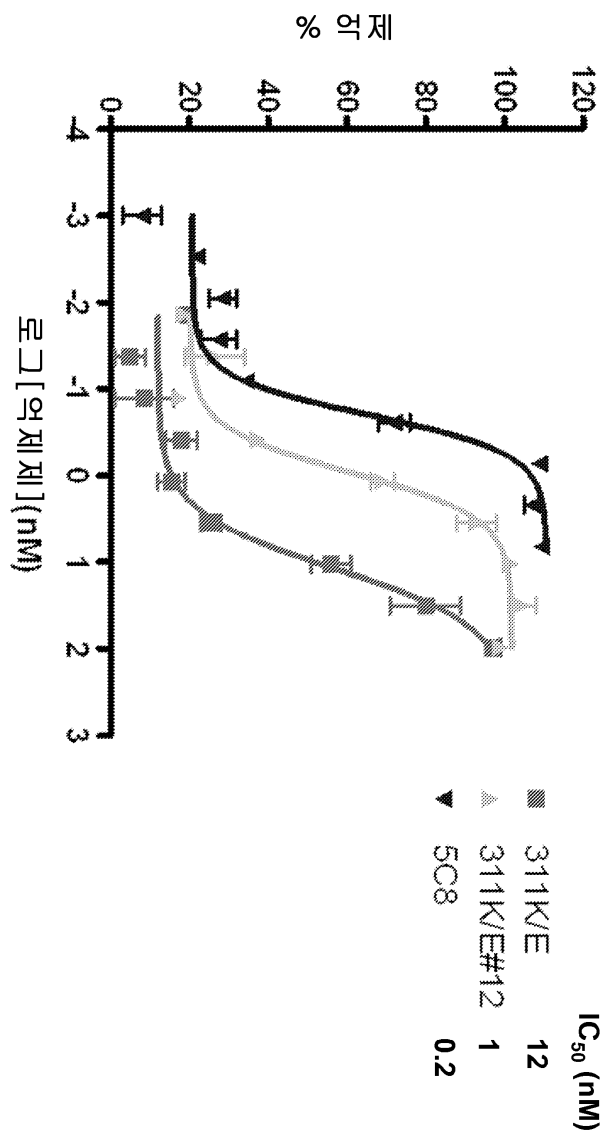
도면10b



도면10c



도면10d



도면11a

309	I E V K D V T D T T A L I T W	S D E F G H Y D G C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
309FGwt	I E V K D V T D T T A L I T W	S D E F G H Y D G C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
340	I E V K D V T D T T A L I T W	S D D F D N Y E W C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
341	I E V K D V T D T T A L I T W	S D D F A D Y V W C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
342	I E V K D V T D T T A L I T W	S D D F G E Y V W C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
343	I E V K D V T D T T A L I T W	S D D M G S I H V C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
344	I E V K D V T D T T A L I T W	S D E Y G D Y V V C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
345	I E V K D V T D T T A L I T W	S D D F A E Y V V C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
346	I E V K D V T D T T A L I T W	S D D F E E Y V V C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
347	I E V K D V T D T T A L I T W	S D E V G Q Y V G C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
348	I E V K D V T D T T A L I T W	S D D I G I Y V W C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
349	I E V K D V T D T T A L I T W	S D E H A E F I G C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42
컨테이너	I E V K D V T D T T A L I T W	X D X X X X X X X C E L T Y G I K D V P G D R T T I D	42

BC 루프

도면 11b

DE 루프		FG 루프	
309	L W W H S A W Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C	Y T D Q E A G N P A K E T F T T	83
309FGwt	L W W H S A W Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C	K R G D M S S N P A K E T F T T	83
340	L W Y H M A W Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C	R R G D M S S N P A K E T F T T	83
341	L W W H S A W Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C	R R G D M S S N P A K E T F T T	83
342	L W Y H H A H Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C	R R G D M S S N P A K E T F T T	83
343	L W Y H Q A W Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C	R R G D M S S N P A K E T F T T	83
344	L W Y H M A W Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C	R R G D M S S N P A K E T F T T	83
345	L W W H S A W Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C	R R G D M S S N P A K E T F T T	83
346	L W W H S A W Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C	R R G D M S S N P A K E T F T T	83
347	L W Y H M A W Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C	R R G D M S S N P A K E T F T T	83
348	L W F H Q A W Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C	R R G D M S S N P A K E T F T T	83
349	L W W H S A W Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C	R R G D M S S N P A K E T F T T	83
컨트롤스	L W W H X A X Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C	R X G D M S S N P A K E T F T T	83

도면12a

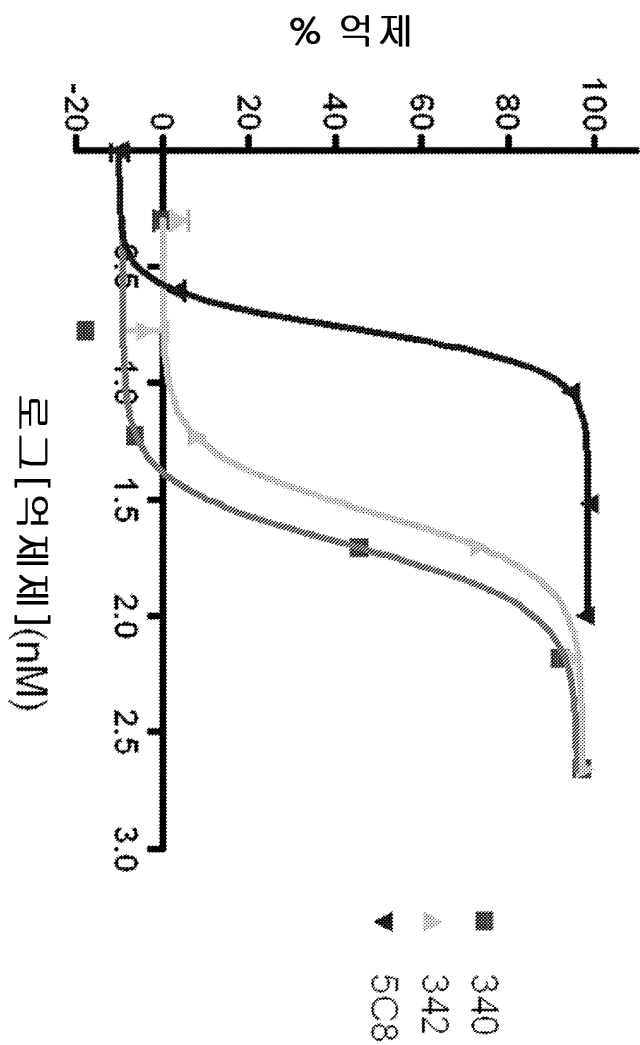
311	I E V	K D V	T D T	T A L	I T W	I N R	S S Y	I N L	H G	C E L	T Y G	I K D	V P G	D R T	T I D	44
311K4E	I E V	E D V	T D T	T A L	I T W	T N R	S S Y	I N L	H G	C E L	T Y G	I K D	V P G	D R T	T I D	44
311K4E_1	I E V	E D V	T D T	T A L	I T W	I N R	S S Y	A D L	H G	C E L	T Y G	I K D	V P G	D R T	T I D	44
311K4E_2	I E V	E D V	T D T	T A L	I T W	I N R	S S Y	S H L	D G	C E L	T Y G	I K D	V P G	D R T	T I D	44
311K4E_3	I E V	E D V	T D T	T A L	I T W	I N R	S S Y	H N F	P H	C E L	T Y G	I K D	V P G	D R T	T I D	44
311K4E_4	I E V	E D V	T D T	T A L	I T W	I N R	S S Y	S N H	L G	C E L	A Y G	I K D	V P G	D R T	T I D	44
311K4E_5	I E V	E D V	T D T	T A L	I T W	T N R	S S Y	S N F	H G	C E L	A Y G	I K D	V P G	D R T	T I D	44
311K4E_7	I E V	E D V	T D T	T A L	I T W	T N R	S S Y	S N L	H G	C E L	T Y G	I K D	V P G	D R T	T I D	44
311K4E_8	I E V	E D V	T D T	T A L	I T W	I N R	S S Y	A Y L	H G	C E L	A Y G	I K D	V P G	D R T	T I D	44
311K4E_9	I E V	E D V	T D T	T A L	I T W	I N R	S S Y	A N L	H G	C E L	T Y G	I K D	V P G	D R T	T I D	44
311K4E_10	I E V	E D V	T D T	T A L	I T W	T N R	S S Y	A N Y	H G	C E L	T Y G	I K D	V P G	D R T	T I D	44
311K4E_11	I E V	E D V	T D T	T A L	I T W	I N R	S S Y	A N L	P G	C E L	T Y G	I K D	V P G	D R T	T I D	44
311K4E_12	I E V	E D V	T D T	T A L	I T W	T N R	S S Y	S N L	H G	C E L	A Y G	I K D	V P G	D R T	T I D	44
311K4E_13	I E V	E D V	T D T	T A L	I T W	I N R	S S Y	A N L	H G	C E L	T Y G	I K D	V P G	D R T	T I D	44
311K4E_14	I E V	E D V	T D T	T A L	I T W	T A R	S A Y	S H H	Y	C E L	T Y G	I K D	V P G	D R T	T I D	44
311K4E_15	I E V	E D V	T D T	T A L	I T W	T N R	S S Y	A N Y	H	C E L	T Y G	I K D	V P G	D R T	T I D	44
311K4E_16	I E V	E D V	T D T	T A L	I T W	T N R	S S Y	S D L	P G	C E L	T Y G	I K D	V P G	D R T	T I D	44
311K4E_19	I E V	E D V	T D T	T A L	I T W	T H R	S A Y	S N H	S F	C E L	T Y G	I K D	V P G	D R T	T I D	44
311K4E_20	I E V	E D V	T D T	T A L	I T W	T N R	S L Y	A N F	H G	C E L	T Y G	I K D	V P G	D R T	T I D	44
311K4E_21	I E V	E D V	T D T	T A L	I T W	T N R	S S Y	S N L	P G	C E L	T Y G	I K D	V P G	D R T	T I D	44
컨텐츠	I E V	X D V	T D T	T A L	I T W	X X R	S X Y	X X X	X X	C E L	X Y G	I K D	V P G	D R T	T I D	44

BC 루프

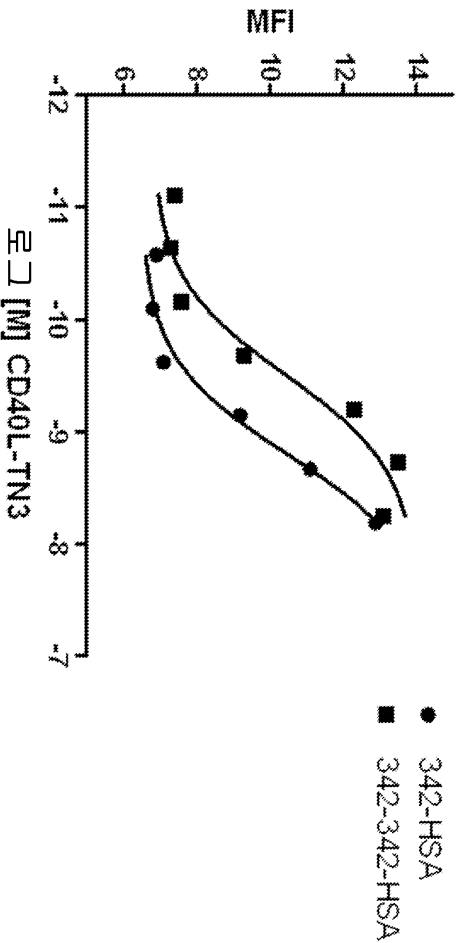
도면12b

DE 루프				FG 루프			
311	LSSP-yvH	YSIGNLKPDTEYEVS	LICLTITDGTYSNPAKETFT	86			
311K4E	LSSP-yvH	YSIGNLKPDTEYEVS	LICLTITDGTYSNPAKETFT	86			
311K4E_1	LDQI-yvH	YSIGNLKPDTEYEVS	LICLTITDGTYSNPAKETFT	86			
311K4E_2	LSSAI-yvH	YSIGNLKPDTEYEVS	LICLTITDGTYSNPAKETFT	87			
311K4E_3	LNSP-yvH	YSIGNLKPDTEYEVS	LICLTITDGTYSNPAKETFT	86			
311K4E_4	LNNI-yvH	YSIGNLKPDTEYEVS	LICLTITDGTYSNPAKETFT	86			
311K4E_5	LNSP-yvH	YSIGNLKPDTEYEVS	LICLTITDGTYSNPAKETFT	86			
311K4E_7	LNSP-yvH	YSIGNLKPDTEYEVS	LICLTITDGTYSNPAKETFT	86			
311K4E_8	LNSP-yvH	YSIGNLKPDTEYEVS	LICLTITDGTYSNPAKETFT	86			
311K4E_9	LSSP-yvH	YSIGNLKPDTEYEVS	LICLTITDGTYSNPAKETFT	86			
311K4E_10	LNSP-yvH	YSIGNLKPDTEYEVS	LICLTITDGTYSNPAKETFT	86			
311K4E_11	LNSP-yvH	YSIGNLKPDTEYEVS	LICLTITDGTYSNPAKETFT	86			
311K4E_12	LNSP-yvH	YSIGNLKPDTEYEVS	LICLTITDGTYSNPAKETFT	86			
311K4E_13	LNSP-yvH	YSIGNLKPDTEYEVS	LICLTITDGTYSNPAKETFT	86			
311K4E_14	LNSP-yvH	YSIGNLKPDTEYEVS	LICLTITDGTYSNPAKETFT	86			
311K4E_15	LEL--yvH	YSIGNLKPDTEYEVS	LICLTITDGTYSNPAKETFT	85			
311K4E_16	LSSP-yvH	YSIGNLKPDTEYEVS	LICLTITDGTYSNPAKETFT	86			
311K4E_19	LNSP-yvH	YSIGNLKPDTEYEVS	LICLTITDGTYSNPAKETFT	86			
311K4E_20	LEQV-yvH	YSIGNLKPDTEYEVS	LICLTITDGTYSNPAKETFT	86			
311K4E_21	LNSP-yvH	YSIGNLKPDTEYEVS	LICLTITDGTYSNPAKETFT	86			
컨센스	LSSP-yvH	YSIGNLKPDTEYEVS	LICLTITDGTYSNPAKETFT	87			

도면13

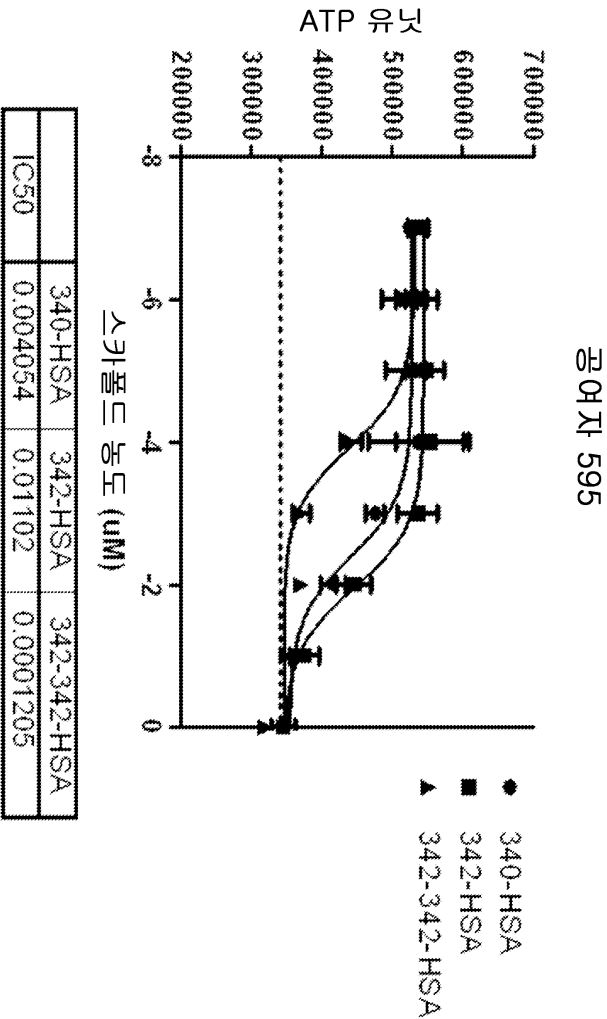


24H 활성화된 CD4+ T 세포에 결합하는 항-CD40L-TN3

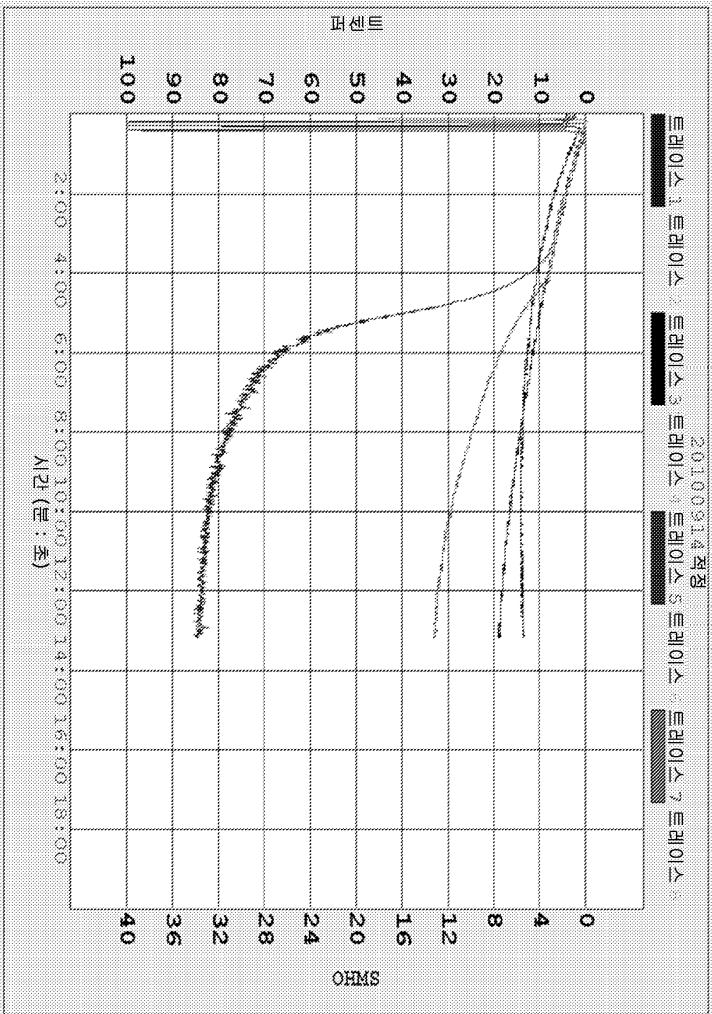


도면14

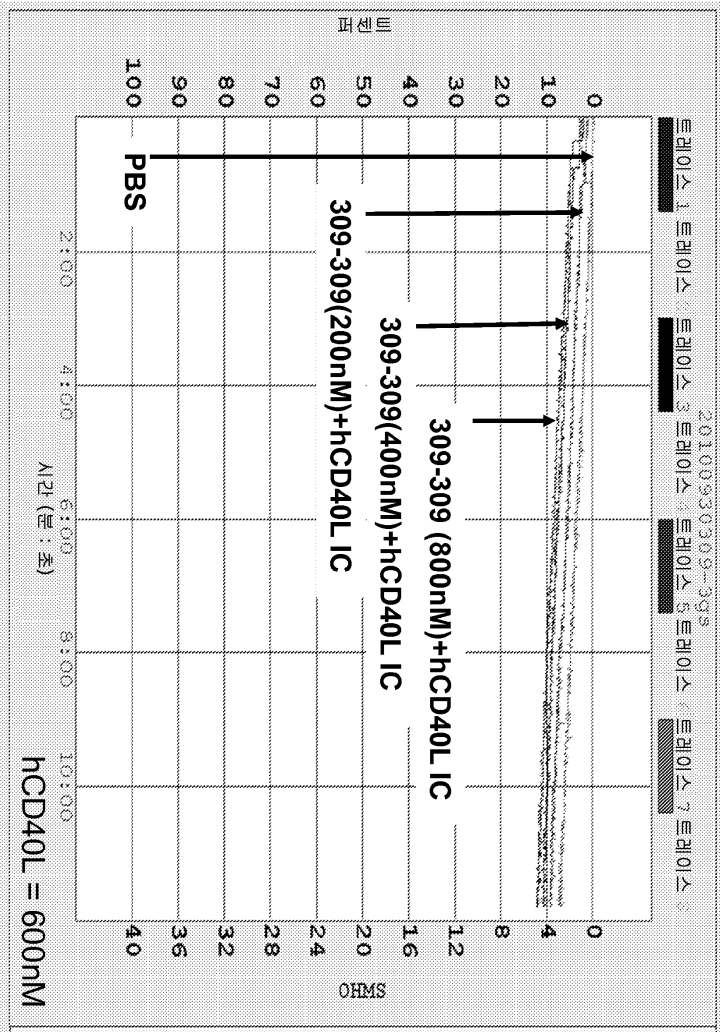
도면15



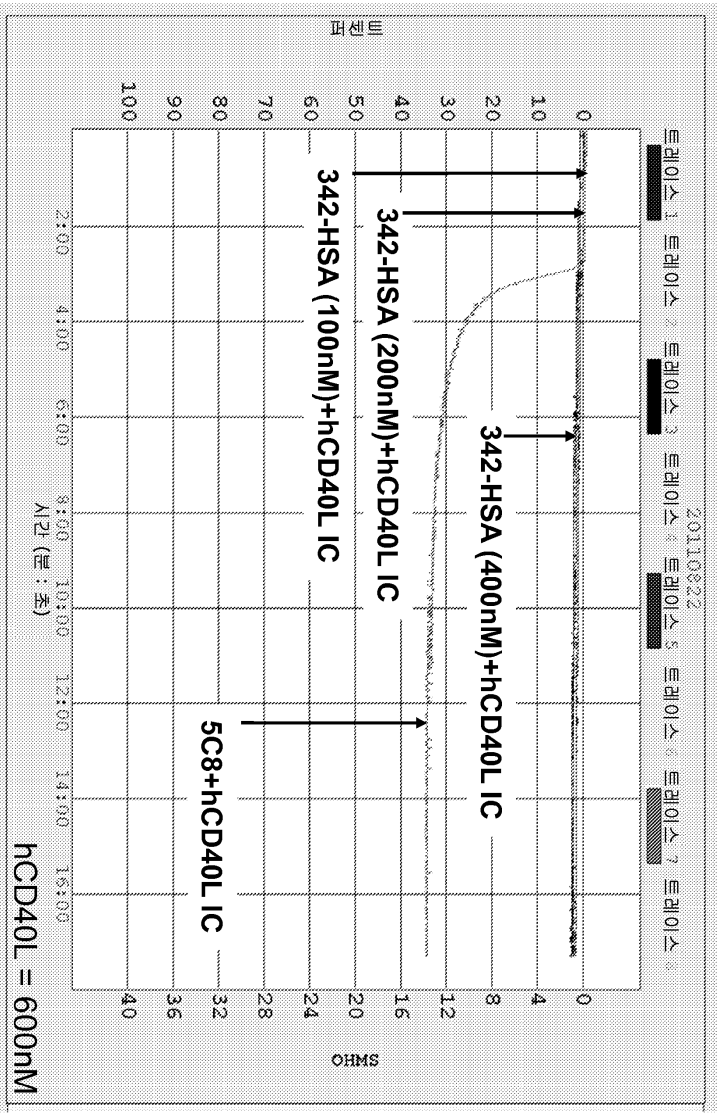
도면16a



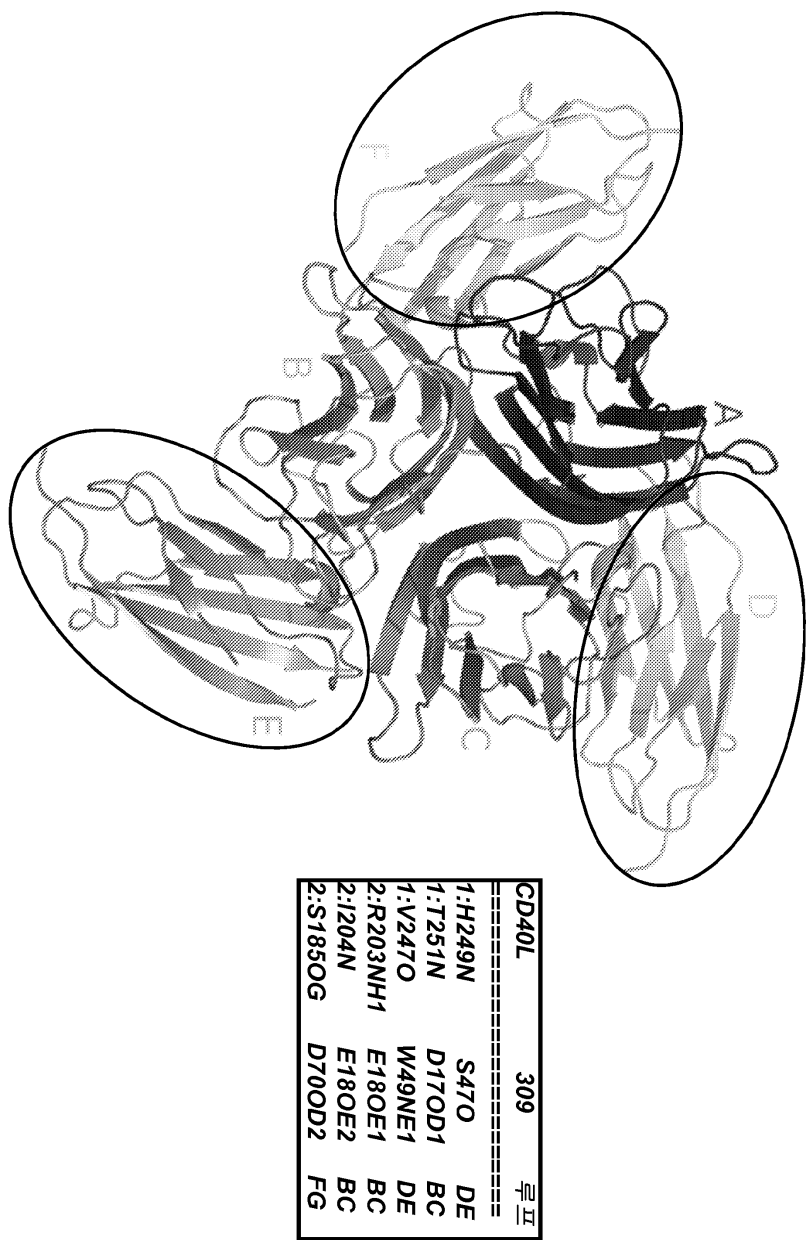
도면16b



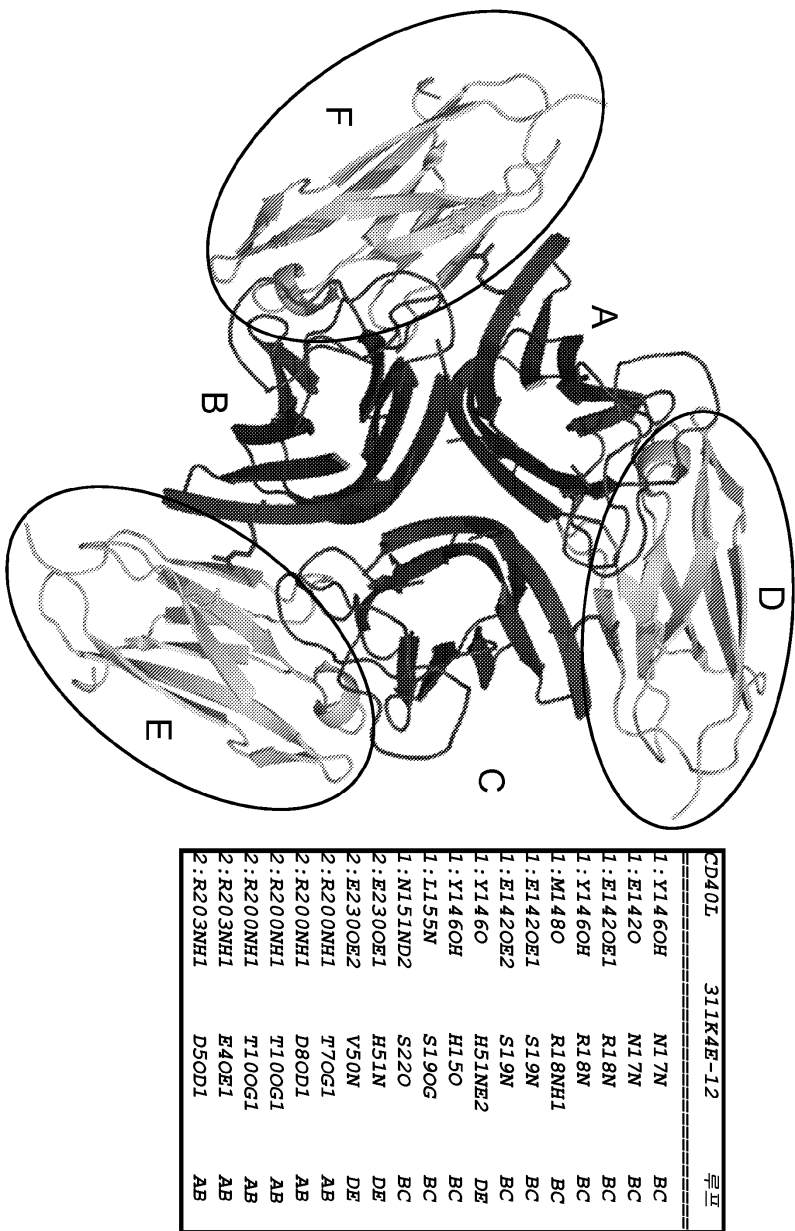
도면16c



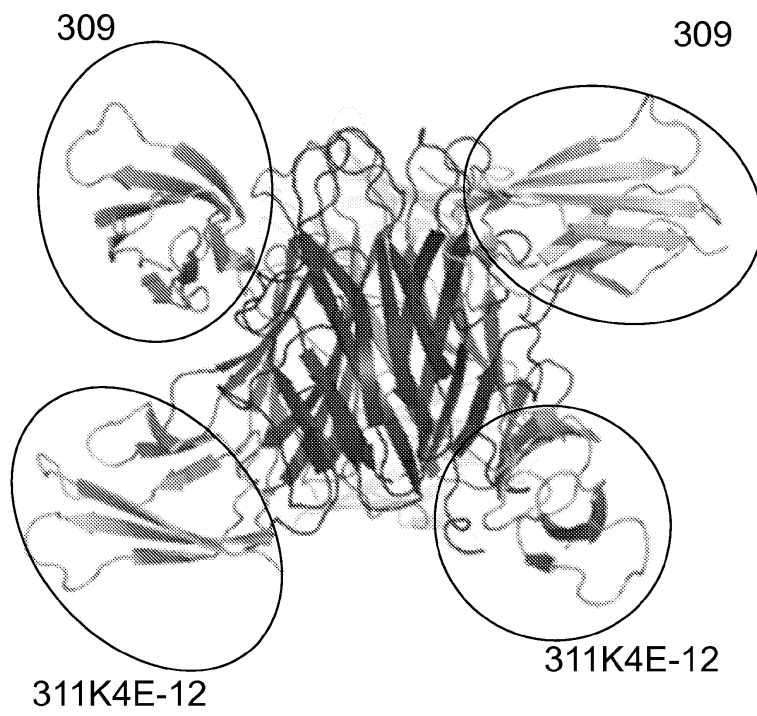
도면17a



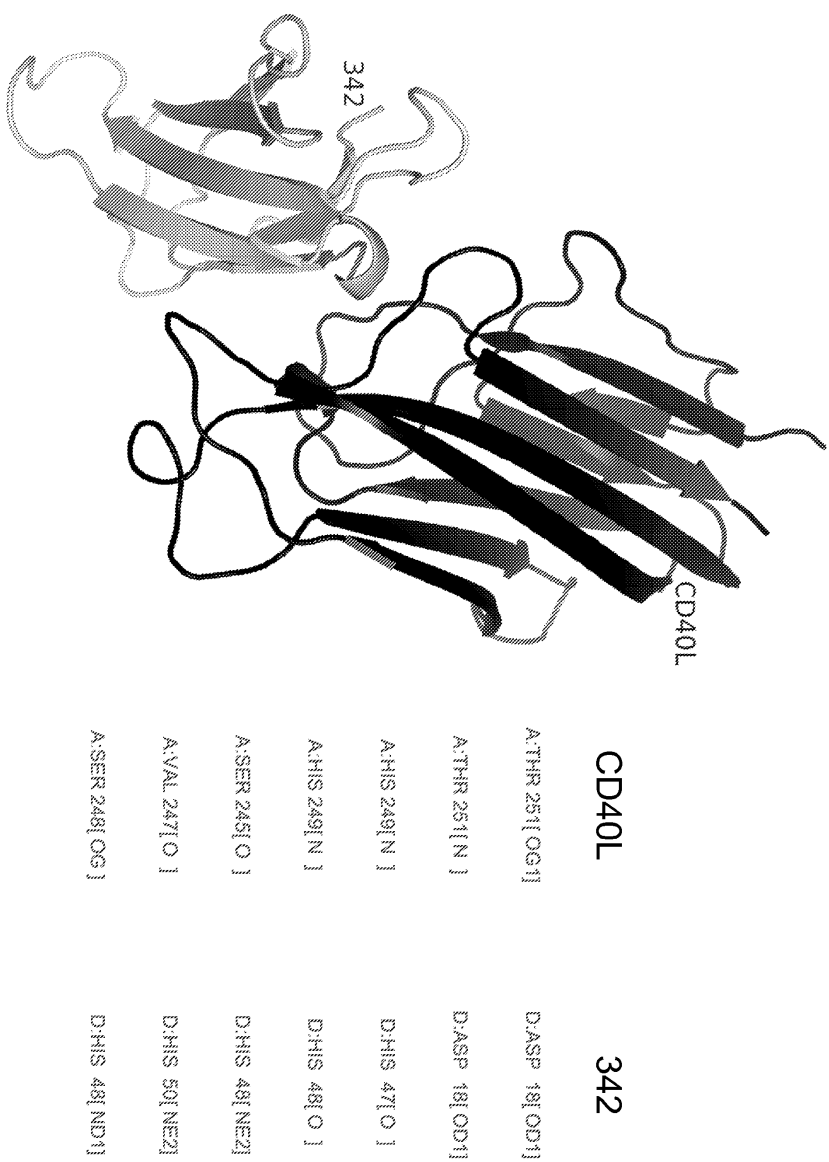
도면17b



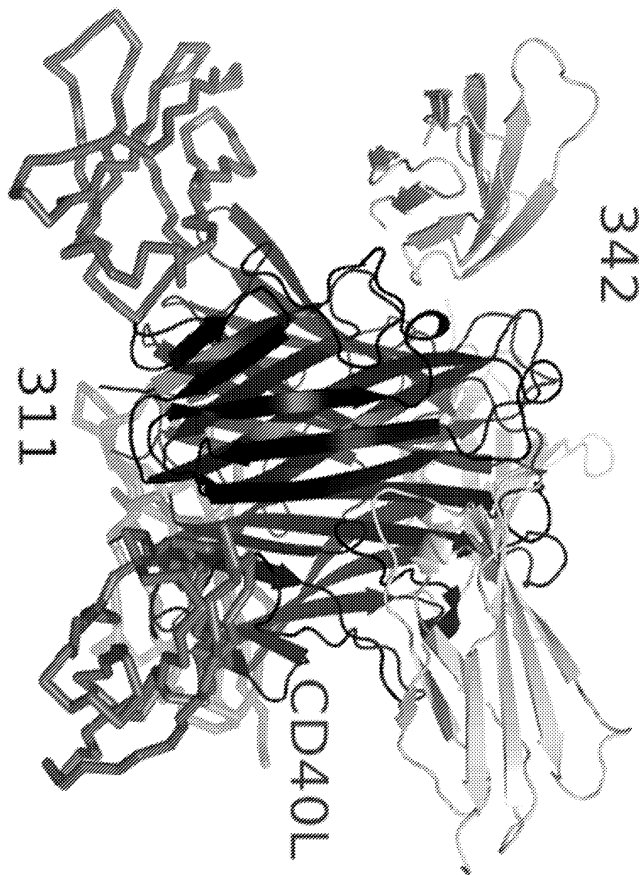
도면17c



도면17d



도면17e



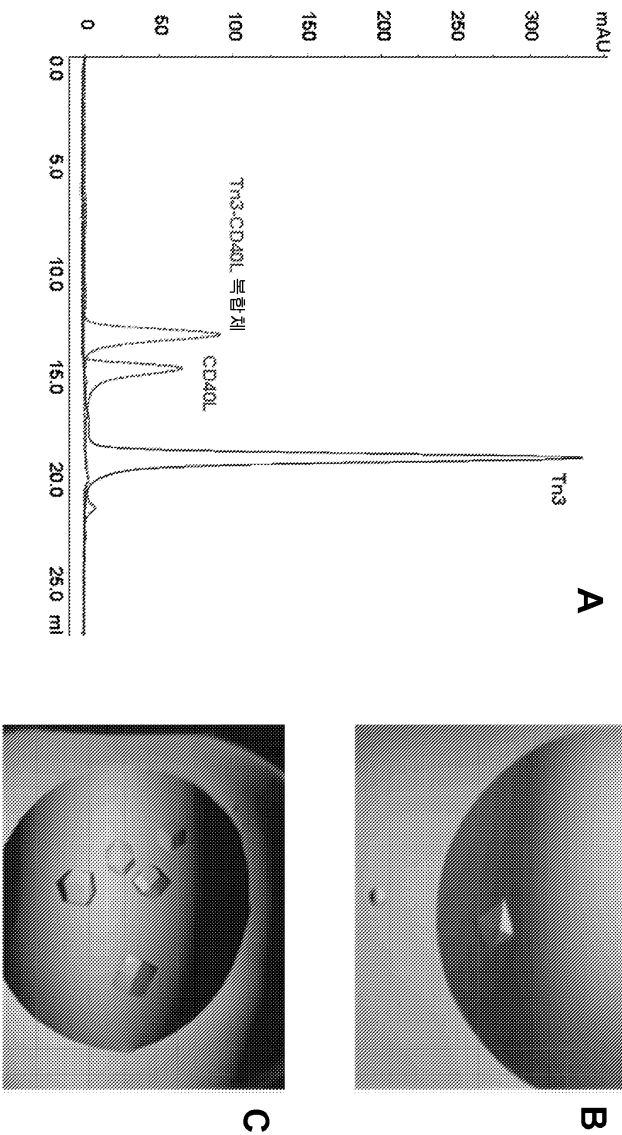
도면18a

MIETYNQTSR RSAATGLPIS MNIFMLITY FLITQMGSA LFVYIHRRL DNIEDERNLH 60
 EDFVFKTIQ RNTGERSLS LINCETNSQ FEGFVKDINL NKEETNKENS FEMOKGDONP 120
 QIAHVISEA SSNTSVLOW A[KGY]I[SN] LVT[ENKQ] LTVKROGLYX IYAQVTFCSN 180
 REASSQPFPI ASLOIKSPGR FERILLRAN THSSAKPOGO OSIHLGVTE LOPGASVFN 240
 VTDPQVSHG TGFTSEGLK L 261

도면18b

MIETYNQTS P RSAATGLPIS MKIEMYLTV FLITQMIGSA LFVYVYLRRL DKIEDERNLH 60
EDFVEMKTIQ RCNTGERSLS ILNCEIKSQ FEGFVKDIML NKEETKKENS FEMQKGDQNP 120
QIAHVISEA SSKTTSVLQW AEKGYTMSN NLVTLENGKQ LTVKROGLYY IYAOVTECSN 180
REAS[S]CAPFI ASLCIKSPGR FE[R]LLRAAN THSSAKPCGQ QSIHLGVFE LQPGASVEVN 240
VTDPSQ[S]HG[T]GFTSFGLLK L 261

도면19



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> MedImmune LLC
- <120> CD40L-SPECIFIC TN3-DERIVED SCAFFOLDS AND METHODS OF USE THEREOF
- <130> CD40L-101W01
- <160> 210
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 261
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val

50 55 60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu

100 105 110

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser

115 120 125

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

130 135 140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln

145 150 155 160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr

165 170 175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser

180 185 190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala

195 200 205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His

210 215 220

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn

225 230 235 240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu
260

<210> 2

<211> 149

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
1 5 10 15

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
20 25 30

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
35 40 45

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

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
65 70 75 80

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
85 90 95

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
100 105 110

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
115 120 125

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
130 135 140

Gly Leu Leu Lys Leu
145

<210> 3

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 3

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Phe

1 5 10 15

Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Thr Glu Asp Glu Asn

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr

65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 4

Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 5

Phe Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly

1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 6

Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg

1 5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 7

Thr Glu Asp Glu Asn Gln

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 8

Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu

1 5

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 9

Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 10

Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu Val

1 5 10

<210> 11

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 11

Ile Glu Val

1

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 12

Ala Leu Ile Thr Trp

1 5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 13

Cys Glu Leu Ala Tyr Gly Ile

1 5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 14

Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile

1 5

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 15

Thr Thr Ile Asp Leu

1 5

<210> 16

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 16

Tyr Ser Ile

1

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 17

Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys

1 5

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 18

Lys Glu Thr Phe Thr Thr

1 5
 <210> 19
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 19
 Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
 1 5 10 15
 Ser Asp Glu Phe Gly His Tyr Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile
 20 25 30
 Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His Ser
 35 40 45
 Ala Trp Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val
 50 55 60
 Ser Leu Ile Cys Tyr Thr Asp Gln Glu Ala Gly Asn Pro Ala Lys Glu
 65 70 75 80
 Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His

85 90 95
 His His
 <210> 20
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 20
 Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser
 1 5 10 15
 Asp Glu Phe Gly His Tyr Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys
 20 25 30
 Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His Ser Ala

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

<210> 21

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 21

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

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

65 70 75 80
Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His
85 90 95
His His

<210> 22

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 22

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser
 1 5 10 15
 Asp Glu Phe Gly His Tyr Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

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

<210> 23

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 23

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

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

<210> 24

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 24

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

1 5 10 15
Asp Asp Phe Asp Asn Tyr Glu Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

20 25 30
Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His Met Ala

35 40 45
Trp Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser

50 55 60
Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr

65 70 75 80
Phe Thr Thr

<210> 25

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 25

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15
Ser Asp Asp Phe Ala Asp Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile

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

35 40 45
Ala Trp Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val

50 55 60

Ser Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu
65 70 75 80
Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His
85 90 95
His His

<210> 26

<211> 83

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 26

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

50 55 60

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr
65 70 75 80
Phe Thr Thr

<210> 27

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 27

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His His

35 40 45

Ala His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val

50 55 60

Ser Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu

65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His

85 90 95

His His

<210> 28

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His His Ala

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr

65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 29

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 29

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Leu Asp Asp Trp Gly Ser Tyr His Val Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile

20 25 30

Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His Gln

35 40 45

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

50 55 60

Ser Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu

65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His

85 90 95

His His

<210> 30

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 30

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Leu

1 5 10 15

Asp Asp Trp Gly Ser Tyr His Val Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His Gln Ala

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr
 65 70 75 80
 Phe Thr Thr

<210> 31

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 31

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

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

<210> 32

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 32

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser
 1 5 10 15

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

65 70 75 80
 Phe Thr Thr

<210> 33

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 33

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

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

<210> 34

<211> 83

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His Ser Ala

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr

65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 35

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 35

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His Ser

35 40 45

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

50 55 60

Ser Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu

65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His

85 90 95

His His

<210> 36

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 36

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

1 5 10 15

Asp Asp Phe Glu Glu Tyr Val Val Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His Ser Ala

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr

65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 37

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 37

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Ser Asp Glu Val Gly Gln Tyr Val Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile

20 25 30

Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His Met
35 40 45

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

Ser Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu

65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His
85 90 95

His His

<210> 38

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 38

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser
1 5 10 15

Asp Glu Val Gly Gln Tyr Val Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His Met Ala
35 40 45

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

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr
65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 39

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 39

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Ser Asp Asp Ile Gly Leu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile

20 25 30

Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Phe His Gln

35 40 45

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

50 55 60

Ser Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu

65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His

85 90 95

His His

<210> 40

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 40

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

1 5 10 15

Asp Asp Ile Gly Leu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Phe His Gln Ala

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr

65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 41

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 41

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Ser Asp Glu His Ala Glu Phe Ile Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile

20 25 30

Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His Ser

35 40 45

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

50 55 60

Ser Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu

65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His

85 90 95

His His

<210> 42

<211> 83

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 42

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

1 5 10 15

Asp Glu His Ala Glu Phe Ile Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His Ser Ala

35 40 45
Trp Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser

50 55 60
Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr
65 70 75 80
Phe Thr Thr

<210> 43

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 43

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
1 5 10 15
Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Tyr Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr

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

85 90 95
His His His His His
100

<210> 44

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 44

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr
1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Tyr Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
20 25 30

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

35 40 45

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

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

Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 45

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 45

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Tyr Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro

65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His

85 90 95

His His His His His

100

<210> 46

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 46

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr

1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Tyr Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala

65

70

75

80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 47

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 47

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Ile Asn Arg Ser Tyr Tyr Ala Asp Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr

20

25

30

Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asp Gln

35

40

45

Ile Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Lys Tyr

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

100
 <210> 48
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 48

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ile

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

65 70 75 80
 Lys Glu Thr Phe Thr Thr
 85

<210> 49
 <211> 102
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 49

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
 1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser His Leu Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Ser Ala
 35 40 45
 Ala Ile Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu
 50 55 60
 Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn
 65 70 75 80
 Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His
 85 90 95
 His His His His His His
 100

<210> 50

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 50

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

50 55 60
 Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro
 65 70 75 80
 Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr
 85

<210> 51

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 51

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Ile Asn Arg Ser Ser Tyr His Asn Phe Pro His Cys Glu Leu Ala Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro

65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His

85 90 95

His His His His His

100

<210> 52

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 52

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

Lys Glu Thr Phe Thr Thr
85

<210> 53

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 53

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

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

65 70 75 80
Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
85 90 95
His His His His His
100

<210> 54

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 54

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr
1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn His Leu Gly Cys Glu Leu Ala Tyr Gly

20 25 30
Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn Asn Ile
35 40 45
Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu
50 55 60
Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
65 70 75 80
Lys Glu Thr Phe Thr Thr
85

<210> 55

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 55

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
1 5 10 15
Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Phe His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr
20 25 30
Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn Ser
35 40 45
Pro Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr
50 55 60
Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro
65 70 75 80
Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
85 90 95
His His His His His
100

<210> 56

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 56

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr

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

20 25 30
Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn Ser Pro

35 40 45
Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu

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

65 70 75 80
Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 57

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 57

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

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

20 25 30
Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn Gln

35 40 45
Pro Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr

50 55 60
Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro

65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
85 90 95
His His His His His
100

<210

> 58

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 58

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

50 55 60
Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
65 70 75 80
Lys Glu Thr Phe Thr Thr
85

<210> 59

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 59

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

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

85 90 95
 His His His His His
 100

<210> 60

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 60

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

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

85

<210> 61

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 61

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

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

65 70 75 80
Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
85 90 95
His His His His His
100

<210> 62

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 62

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ile

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

20 25 30
Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Ser Ser Pro
35 40 45
Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu
50 55 60
Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 63

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 63

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Tyr His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr

20 25 30

Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn Gln

35 40 45

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

50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro

65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His

85 90 95

His His His His His

100

<210> 64

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 64

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr

1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Tyr His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr Gly

20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn Gln Pro

35 40 45
Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu
50 55 60
Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala

65 70 75 80
Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 65

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 65

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45
Pro Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr

50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro

65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His

85 90 95

His His His His His

100

<210

> 66

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 66

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr
1 5 10 15

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

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn Ser Pro
35 40 45

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

50 55 60

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

Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 67

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 67

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr

20 25 30

Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn Gln
35 40 45

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

50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Asn Pro
65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His

85 90 95

His His His His His

100

<210> 68

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 68

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr

1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr Gly

20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn Gln Pro

35 40 45

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

50 55 60

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Asn Pro Ala

65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 69

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 69

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Ile Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro

65 70 75 80
Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
 85 90 95
His His His His His
 100

<210> 70

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 70

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ile
1 5 10 15
Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

 20 25 30
Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn Ser Pro
 35 40 45
Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu
 50 55 60
Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
65 70 75 80
Lys Glu Thr Phe Thr Thr
 85

<210> 71

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 71

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ser Ala Tyr Ser His His His Tyr Cys Glu Leu Thr Tyr
20 25 30

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

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

50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro
65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
85 90 95

His His His His His

100

<210> 72

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 72

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr

1 5 10 15

Ala Arg Ser Ala Tyr Ser His His His Tyr Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
20 25 30

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

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

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala

65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 73

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 73

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Tyr His His Cys Glu Leu Thr Tyr

20 25 30

Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Glu Leu

35 40 45

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

50 55 60

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala

65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His His

85 90 95

His His His His

100

<210> 74

<211> 85

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 74

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr

1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Tyr His His Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Glu Leu Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala Lys
65 70 75 80

Glu Thr Phe Thr Thr
85

<210> 75

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 75

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asp Leu Pro Gly Cys Glu Leu Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro

65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His

85 90 95

His His His His His

100

<210> 76

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 76

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr

1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asp Leu Pro Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20 25 30
Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Ser Ser Pro

35 40 45
Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu

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

65 70 75 80
Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 77

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 77

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

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

20 25 30
Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn Thr

35 40 45
Pro Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr

50 55 60
Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro

65 70 75 80
Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His

85 90 95
His His His His His

100

<210> 78

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 78

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn Thr Pro

35 40 45

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

50 55 60

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala

65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 79

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 79

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Glu Gln

35 40 45

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

50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro

65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His

85 90 95
 His His His His His
 100
 <210> 80
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 80
 Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr

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

65 70 75 80
 Lys Glu Thr Phe Thr Thr
 85

<210> 81
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 81

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

35 40 45
Val Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr
50 55 60
Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro
65 70 75 80
Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His
85 90 95
His His His His His
100

<210

> 82

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 82

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

50 55 60
Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
65 70 75 80
Lys Glu Thr Phe Thr Thr
85

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 83

Ser Asp Glu Phe Gly His Tyr Asp Gly

1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> synthetic construct

<400> 84

Ser Asp Asp Phe Asp Asn Tyr Glu Trp

1 5

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 85

Ser Asp Asp Phe Ala Asp Tyr Val Trp

1 5

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 86

Ser Asp Asp Phe Gly Glu Tyr Val Trp

1 5

<210> 87

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 87

Leu Asp Asp Trp Gly Ser Tyr His Val

1 5
 <210> 88
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 88
 Ser Asp Glu Val Gly Asp Tyr Val Val

1 5
 <210> 89
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 89
 Ser Asp Asp Phe Ala Glu Tyr Val Gly

1 5
 <210> 90
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 90
 Ser Asp Asp Phe Glu Glu Tyr Val Val

1 5
 <210> 91
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 91
 Ser Asp Glu Val Gly Gln Tyr Val Gly

1 5
 <210> 92

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 92
 Ser Asp Asp Ile Gly Leu Tyr Val Trp

1 5
 <210> 93
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 93
 Ser Asp Glu His Ala Glu Phe Ile Gly

1 5
 <210> 94
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 94
 Trp Trp His Ser Ala Trp

1 5
 <210> 95
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 95
 Trp Tyr His Met Ala Trp

1 5
 <210> 96
 <211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 96

Trp Tyr His His Ala His

1 5

<210> 97

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 97

Trp Tyr His Gln Ala Trp

1 5

<210> 98

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 98

Trp Phe His Gln Ala Trp

1 5

<210> 99

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 99

Tyr Thr Asp Gln Glu Ala Gly Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 100

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 100

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Tyr Asn Leu His Gly

1 5 10

<210> 101

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 101

Ile Asn Arg Ser Tyr Tyr Ala Asp Leu His Gly

1 5 10

<210> 102

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 102

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser His Leu Asp Gly

1 5 10

<210> 103

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 103

Ile Asn Arg Ser Ser Tyr His Asn Phe Pro His

1 5 10

<210> 104

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 104

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn His Leu Gly

1 5 10

<210> 105

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 105

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Phe His Gly

1 5 10

<210> 106

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 106

Thr Asn Arg Ser Phe Tyr Ser Asn Leu His Gly

1 5 10

<210> 107

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 107

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Tyr Leu His Gly

1 5 10

<210> 108

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 108

Ile Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Leu His Gly

1 5 10

<210> 109

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 109

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Tyr His Gly

1 5 10

<210> 110

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 110

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Leu Pro Gly

1 5 10

<210> 111

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 111

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Leu His Gly

1 5 10

<210> 112

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 112

Thr Ala Arg Ser Ala Tyr Ser His His His Tyr

1 5 10

<210> 113

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 113

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Tyr His His

1 5 10

<210> 114

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 114

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asp Leu Pro Gly

1 5 10

<210> 115

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 115

Thr His Arg Ser Ala Tyr Ser Asn His Ser Phe

1 5 10

<210> 116

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 116

Thr Asn Arg Ser Leu Tyr Ala Asn Phe His Gly

1 5 10

<210> 117

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 117
 Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Leu Pro Gly
 1 5 10
 <210> 118
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 118
 Ser Ser Pro Tyr Val His
 1 5
 <210> 119
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> synthetic construct
 <400> 119
 Asp Gln Ile Tyr Val His
 1 5
 <210> 120
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 120
 Ser Ala Ala Ile Tyr Val His
 1 5
 <210> 121
 <211> 6
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 121
 Asn Ser Pro Tyr Val His
 1 5
 <210> 122
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > synthetic construct
 <400> 122
 Asn Asn Ile Tyr Val His
 1 5
 <210> 123
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 123
 Asn Gln Pro Tyr Val His
 1 5
 <210> 124
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 124
 Arg Gln Pro Tyr Val His
 1 5
 <210> 125
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 125

Glu Leu Tyr Val His

1 5

<210> 126

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 126

Asn Thr Pro Tyr Val His

1 5

<210> 127

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 127

Glu Gln Val Tyr Val His

1 5

<210> 128

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 128

Asn Gln Val Tyr Val His

1 5

<210> 129

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 129

Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 130

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 130

Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 131

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<400> 131

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 132

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 132

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 133

<211> 585

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 133

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu

1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln

20 25 30

Gln Ser Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu

35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys

50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu

65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro

85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu

100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His

115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg

130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg

145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala

165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser

180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu

195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro

210 215 220

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys

225 230 235 240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp

245 250 255
Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser

260 265 270
Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His

275 280 285
Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser

290 295 300
Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala

305 310 315 320
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg

325 330 335
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr

340 345 350
Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu

355 360 365
Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro

370 375 380
Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu

385 390 395 400
Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro

405 410 415
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys

420 425 430
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys

435 440 445
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His

450 455 460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser

465 470 475 480
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr

485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 580 585

 <210> 134
 <211> 680
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 134
 Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr
 1 5 10 15
 Trp Ser Asp Asp Phe Gly Glu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
 20 25 30
 Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His
 35 40 45

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

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

Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser
355 360 365

Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys
370 375 380

Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu
385 390 395 400

Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu
405 410 415

Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg
420 425 430

His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr
435 440 445

Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys
450 455 460

Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln
465 470 475 480

Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr
485 490 495

Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln
500 505 510

Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val
515 520 525

Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala
530 535 540

Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu
545 550 555 560

Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu
565 570 575

Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr
580 585 590

Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile

595 600 605
Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu
610 615 620

Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys
625 630 635 640

Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala
645 650 655

Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala
660 665 670

Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
675 680

<210> 135

<211> 785

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 135

Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr
1 5 10 15

Trp Ser Asp Asp Phe Gly Glu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His
35 40 45

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

Val Ser Leu Ile Cys Arg Ser Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys
65 70 75 80

Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
85 90 95

Gly Gly Gly Ser Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp
100 105 110

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

115	120	125
Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp		
130	135	140
Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His His Ala His Tyr Ser Ile Gly		
145	150	155
160		
Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Arg Ser		
165	170	175
Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly		
180	185	190
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala		
195	200	205
His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu		
210	215	220
Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Ser Pro Phe Glu Asp His Val		
225	230	235
240		
Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp		
245	250	255
Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp		
260	265	270
Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala		
275	280	285
Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln		
290	295	300
His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val		
305	310	315
320		
Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys		
325	330	335
Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro		
340	345	350
Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys		
355	360	365

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 370 375 380

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 385 390 395 400

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 405 410 415

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 420 425 430

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 435 440 445

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 450 455 460

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 465 470 475 480

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 485 490 495

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 500 505 510

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 515 520 525

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 530 535 540

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 545 550 555 560

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 565 570 575

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 580 585 590

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 595 600 605

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val

610 615 620
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 625 630 635 640

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 645 650 655
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 660 665 670
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 675 680 685
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 690 695 700

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 705 710 715 720
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 725 730 735
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 740 745 750
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 755 760 765

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 770 775 780

Leu

785

<210> 136

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 136

Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr

1 5

<210> 137

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 137

Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Lys

1 5

<210> 138

<211> 585

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu

1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln

20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu

35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys

50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu

65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro

85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu

100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His

115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg

130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg

145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 165 170 175
 Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190
 Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205
 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220
 Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240
 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro

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

435 440 445
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
450 455 460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
485 490 495
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp

500 505 510
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val

565 570 575
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
580 585

<210> 139

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 139

Arg Ser Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 140

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa is any of Ala, Gly, Leu, Ile and Val

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa is any of Ala, Gly, Leu, Ile and Val
 <400> 140

Gly Gly Gly Gly Xaa Gly Gly Gly Gly Xaa

1 5 10

<210> 141
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa is any of Ala, Gly, Leu, Ile and Val
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa is any of Ala, Gly, Leu, Ile and Val
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)
 <223> Xaa is any of Ala, Gly, Leu, Ile and Val
 <400> 141

Gly Gly Gly Gly Xaa Gly Gly Gly Gly Xaa Gly Gly Gly Gly Xaa

1 5 10 15

<210> 142
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 142

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 143

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400>

143

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

<210> 144

<211> 680

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 144

Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr

1 5 10 15

Trp Ser Asp Asp Phe Gly Glu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His

35 40 45

His Ala His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu

50 55 60

Val Ser Leu Ile Cys Arg Ser Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys

65 70 75 80

Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp

85 90 95

Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu

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

Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser
355 360 365

Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys
370 375 380

Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu
385 390 395 400

Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu
405 410 415

Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg
420 425 430

His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr
435 440 445

Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys
450 455 460

Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln
465 470 475 480

Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr
485 490 495

Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln
500 505 510

Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val
515 520 525

Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala
530 535 540

Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu
545 550 555 560

Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu
565 570 575

Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr
580 585 590

Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile

595 600 605
 Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu
 610 615 620
 Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys
 625 630 635 640
 Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala
 645 650 655
 Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala
 660 665 670

 Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 675 680
 <210> 145
 <211> 785
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 145
 Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr
 1 5 10 15
 Trp Ser Asp Asp Phe Gly Glu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
 20 25 30
 Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His

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

 100 105 110

Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser Asp Asp Phe Gly Glu
115 120 125

Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp
130 135 140

Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His His Ala His Tyr Ser Ile Gly
145 150 155 160

Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Arg Ser
165 170 175

Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly
180 185 190

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
195 200 205

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
210 215 220

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Ser Pro Phe Glu Asp His Val
225 230 235 240

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
245 250 255

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
260 265 270

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
275 280 285

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
290 295 300

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
305 310 315 320

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
325 330 335

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
340 345 350

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys

355 360 365
 Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 370 375 380
 Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 385 390 395 400
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 405 410 415
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser

 420 425 430
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 435 440 445
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 450 455 460
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 465 470 475 480
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp

 485 490 495
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 500 505 510
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 515 520 525
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 530 535 540
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys

 545 550 555 560
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 565 570 575
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 580 585 590
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 595 600 605

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val

610

615

620

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His

625

630

635

640

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val

645

650

655

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

660

665

670

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe

675

680

685

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala

690

695

700

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu

705

710

715

720

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys

725

730

735

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala

740

745

750

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe

755

760

765

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

770

775

780

Leu

785

<210> 146

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 146

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

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

65 70 75 80
 Phe Thr Thr

<210> 147
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa is any of Ser, Ala, Gly, Leu, Ile, and Val
 <400> 147

Gly Gly Gly Gly Xaa

1 5
 <210> 148
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 148

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5
 <210> 149
 <211> 5
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 149

Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 150

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 150

Gly Gly Gly Gly Ala

1 5

<210> 151

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 151

His His His His His His His His

1 5

<210> 152

<211>

> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 152

Gly Gly Gly Gly Ser His His His His His His His His

1 5 10

<210> 153

<211> 584

<212> PRT

<213> mus muscus

<400> 153

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

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

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

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

 Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr Lys Leu Ala Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240
 Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp

245	250	255	
Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met Cys Glu Asn Gln Ala Thr Ile Ser			
260	265	270	
Ser Lys Leu Gln Thr Cys Cys Asp Lys Pro Leu Leu Lys Lys Ala His			
275	280	285	
Cys Leu Ser Glu Val Glu His Asp Thr Met Pro Ala Asp Leu Pro Ala			
290	295	300	
Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp Gln Glu Val Cys Lys Asn Tyr Ala			
305	310	315	320
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Thr Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg			
325	330	335	
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Lys			
340	345	350	
Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Glu Ala Asn Pro Pro Ala			
355	360	365	
Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu Phe Gln Pro Leu Val Glu Glu Pro			
370	375	380	
Lys Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys Asp Leu Tyr Glu Lys Leu Gly Glu			
385	390	395	400
Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu Val Arg Tyr Thr Gln Lys Ala Pro			
405	410	415	
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ala Ala Arg Asn Leu Gly Arg			
420	425	430	
Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu Pro Glu Asp Gln Arg Leu Pro Cys			
435	440	445	
Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Asn Arg Val Cys Leu Leu His			
450	455	460	
Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His Val Thr Lys Cys Cys Ser Gly Ser			
465	470	475	480
Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Thr Val Asp Glu Thr			
485	490	495	

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ser Asp
500 505 510
Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu Lys Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525
Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Ala Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala Gln Phe Leu Asp Thr Cys Cys Lys
545 550 555 560
Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe Ser Thr Glu Gly Pro Asn Leu Val
565 570 575
Thr Arg Cys Lys Asp Ala Leu Ala
580

<210> 154

<211> 584

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 154

Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala His Arg Tyr Asn Asp Leu Gly Glu

1 5 10 15
Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln
20 25 30
Lys Ser Ser Tyr Asp Glu His Ala Lys Leu Val Gln Glu Val Thr Asp
35 40 45
Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Ala Asn Cys Asp Lys
50 55 60
Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Ala Ile Pro Asn Leu
65 70 75 80
Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala Asp Cys Cys Thr Lys Gln Glu Pro
85 90 95
Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Ser Leu
100 105 110

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

355 360 365
Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu Phe Gln Pro Leu Val Glu Glu Pro

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

385 390 395 400
Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu Val Arg Tyr Thr Gln Lys Ala Pro

405 410 415
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ala Ala Arg Asn Leu Gly Arg

420 425 430
Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu Pro Glu Asp Gln Arg Leu Pro Cys

435 440 445
Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Asn Arg Val Cys Leu Leu His

450 455 460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His Val Thr Lys Cys Cys Ser Gly Ser

465 470 475 480
Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Thr Val Asp Glu Thr

485 490 495
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ser Asp

500 505 510
Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu Lys Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala

515 520 525
Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Ala Glu Gln Leu

530 535 540
Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala Gln Phe Leu Asp Thr Cys Cys Lys

545 550 555 560
Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe Ser Thr Glu Gly Pro Asn Leu Val

565 570 575
Thr Arg Ser Lys Asp Ala Leu Ala

580

<210> 155

<211> 84

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 155

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp His

1 5 10 15

Asp Ala Phe Gly Tyr Asp Phe Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp His Phe His

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Asn Pro Ala Lys Glu

65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr

<210> 156

<211> 84

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 156

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp His

1 5 10 15

Asp Ala Phe Gly Tyr Asp Phe Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp His Phe His

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Asn Pro Ala Lys Glu

65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr

<210> 157

<211> 183

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 157

Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr

1 5 10 15

Trp His Asp Ala Phe Gly Tyr Asp Phe Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp His

35 40 45

Phe His Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu

50 55 60

Val Ser Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Asn Pro Ala

65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Arg Leu Asp Ala

85 90 95

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

100 105 110

Thr Trp His Asp Ala Phe Gly Tyr Asp Phe Gly Cys Glu Leu Thr Tyr

115 120 125

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

130 135 140

His Phe His Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr

145 150 155 160

Glu Val Ser Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Asn Pro

165 170 175

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr

180

<210> 158

<211> 685

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 158

Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr

1 5 10 15

Trp His Asp Ala Phe Gly Tyr Asp Phe Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp His

35 40 45

Phe His Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu

50 55 60

Val Ser Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Asn Pro Ala

65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

85 90 95

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala His Arg Tyr

100 105 110

Asn Asp Leu Gly Glu Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu Ile Ala Phe

115 120 125

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

130 135 140

Gln Glu Val Thr Asp Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala

145 150 155 160

Ala Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys

165 170 175

Ala Ile Pro Asn Leu Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala Asp Cys Cys

180 185 190

Thr Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp

195 200 205

Asp Asn Pro Ser Leu Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala Glu Ala Met
 210 215 220
 Cys Thr Ser Phe Lys Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly His Tyr Leu
 225 230 235 240

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

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

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

 Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu Leu Leu
 435 440 445
 Arg Leu Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Glu

450 455 460
 Ala Asn Pro Pro Ala Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu Phe Gln Pro
 465 470 475 480
 Leu Val Glu Glu Pro Lys Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys Asp Leu Tyr
 485 490 495

 Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu Val Arg Tyr
 500 505 510
 Thr Gln Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ala Ala
 515 520 525
 Arg Asn Leu Gly Arg Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu Pro Glu Asp
 530 535 540
 Gln Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Asn Arg
 545 550 555 560

 Val Cys Leu Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His Val Thr Lys
 565 570 575
 Cys Cys Ser Gly Ser Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu
 580 585 590
 Thr Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu Thr Phe
 595 600 605
 Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu Lys Gln Ile
 610 615 620

 Lys Lys Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
 625 630 635 640
 Thr Ala Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala Gln Phe Leu
 645 650 655
 Asp Thr Cys Cys Lys Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe Ser Thr Glu
 660 665 670
 Gly Pro Asn Leu Val Thr Arg Ser Lys Asp Ala Leu Ala
 675 680 685

<210> 159

<211> 782

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 159

Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr

1 5 10 15

Trp His Asp Ala Phe Gly Tyr Asp Phe Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp His

35 40 45

Phe His Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu

50 55 60

Val Ser Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Asn Pro Ala

65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Arg Leu Asp Ala

85 90 95

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

100 105 110

Thr Trp His Asp Ala Phe Gly Tyr Asp Phe Gly Cys Glu Leu Thr Tyr

115 120 125

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

130 135 140

His Phe His Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr

145 150 155 160

Glu Val Ser Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Asn Pro

165 170 175

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

180 185 190

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala His Arg

195 200 205

Tyr Asn Asp Leu Gly Glu Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu Ile Ala

210 215 220

Phe Ser Gln Tyr Leu Gln Lys Ser Ser Tyr Asp Glu His Ala Lys Leu
 225 230 235 240
 Val Gln Glu Val Thr Asp Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser

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

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

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

 435 440 445
 Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met Cys Glu
 450 455 460
 Asn Gln Ala Thr Ile Ser Ser Lys Leu Gln Thr Cys Cys Asp Lys Pro

465 470 475 480
 Leu Leu Lys Lys Ala His Cys Leu Ser Glu Val Glu His Asp Thr Met
 485 490 495
 Pro Ala Asp Leu Pro Ala Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp Gln Glu

 500 505 510
 Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Thr Phe
 515 520 525
 Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu Leu
 530 535 540
 Leu Arg Leu Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala
 545 550 555 560
 Glu Ala Asn Pro Pro Ala Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu Phe Gln

 565 570 575
 Pro Leu Val Glu Glu Pro Lys Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys Asp Leu
 580 585 590
 Tyr Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu Val Arg
 595 600 605
 Tyr Thr Gln Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ala
 610 615 620
 Ala Arg Asn Leu Gly Arg Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu Pro Glu

 625 630 635 640
 Asp Gln Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Asn
 645 650 655
 Arg Val Cys Leu Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His Val Thr
 660 665 670
 Lys Cys Cys Ser Gly Ser Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala
 675 680 685
 Leu Thr Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu Thr

 690 695 700
 Phe Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu Lys Gln
 705 710 715 720

Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys
725 730 735

Ala Thr Ala Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala Gln Phe
740 745 750

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

755 760 765
Glu Gly Pro Asn Leu Val Thr Arg Ser Lys Asp Ala Leu Ala
770 775 780

<210> 160

<211> 84

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 160

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

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp His Phe His
35 40 45

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

Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Tyr Pro Ala Lys Glu
65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr

<210> 161

<211> 84

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

synthetic construct

<400> 161

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

Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Tyr Pro Ala Lys Glu
 65 70 75 80
 Thr Phe Thr Thr

<210> 162

<211> 183

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 162

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

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

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

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

Glu Val Ser Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Tyr Pro
 165 170 175
 Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr
 180

<210> 163

<211> 685

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 163

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala His Arg Tyr
 100 105 110
 Asn Asp Leu Gly Glu Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu Ile Ala Phe
 115 120 125

Ser Gln Tyr Leu Gln Lys Ser Ser Tyr Asp Glu His Ala Lys Leu Val
 130 135 140
 Gln Glu Val Thr Asp Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala
 145 150 155 160

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

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

Lys Ala Leu Val Ser Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys Ser Ser Met
 290 295 300
 Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu
 305 310 315 320
 Ser Gln Thr Phe Pro Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr Lys Leu Ala
 325 330 335
 Thr Asp Leu Thr Lys Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu
 340 345 350

Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met Cys Glu Asn
 355 360 365
 Gln Ala Thr Ile Ser Ser Lys Leu Gln Thr Cys Cys Asp Lys Pro Leu

370	375	380	
Leu Lys Lys Ala His Cys Leu Ser Glu Val Glu His Asp Thr Met Pro			
385	390	395	400
Ala Asp Leu Pro Ala Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp Gln Glu Val			
405	410	415	
Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Thr Phe Leu			
420	425	430	
Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu Leu Leu			
435	440	445	
Arg Leu Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Glu			
450	455	460	
Ala Asn Pro Pro Ala Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu Phe Gln Pro			
465	470	475	480
Leu Val Glu Glu Pro Lys Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys Asp Leu Tyr			
485	490	495	
Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu Val Arg Tyr			
500	505	510	
Thr Gln Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ala Ala			
515	520	525	
Arg Asn Leu Gly Arg Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu Pro Glu Asp			
530	535	540	
Gln Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Asn Arg			
545	550	555	560
Val Cys Leu Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His Val Thr Lys			
565	570	575	
Cys Cys Ser Gly Ser Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu			
580	585	590	
Thr Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu Thr Phe			
595	600	605	
Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu Lys Gln Ile			
610	615	620	

Lys Lys Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
625 630 635 640
Thr Ala Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala Gln Phe Leu
 645 650 655
Asp Thr Cys Cys Lys Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe Ser Thr Glu
 660 665 670

Gly Pro Asn Leu Val Thr Arg Ser Lys Asp Ala Leu Ala
 675 680 685

<210> 164

<211> 782

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 164

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

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

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

His Phe His Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr
 145 150 155 160
 Glu Val Ser Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Tyr Pro

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

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

 290 295 300
 Asp Asp Asn Pro Ser Leu Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala Glu Ala
 305 310 315 320
 Met Cys Thr Ser Phe Lys Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly His Tyr
 325 330 335
 Leu His Glu Val Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu
 340 345 350
 Leu Tyr Tyr Ala Glu Gln Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys Cys Ala

 355 360 365
 Glu Ala Asp Lys Glu Ser Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Gly Val Lys
 370 375 380
 Glu Lys Ala Leu Val Ser Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys Ser Ser

385 390 395 400
 Met Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg
 405 410 415
 Leu Ser Gln Thr Phe Pro Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr Lys Leu

 420 425 430
 Ala Thr Asp Leu Thr Lys Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly Asp Leu
 435 440 445
 Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met Cys Glu
 450 455 460
 Asn Gln Ala Thr Ile Ser Ser Lys Leu Gln Thr Cys Cys Asp Lys Pro
 465 470 475 480
 Leu Leu Lys Lys Ala His Cys Leu Ser Glu Val Glu His Asp Thr Met

 485 490 495
 Pro Ala Asp Leu Pro Ala Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp Gln Glu
 500 505 510
 Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Thr Phe
 515 520 525
 Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu Leu
 530 535 540
 Leu Arg Leu Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala

 545 550 555 560
 Glu Ala Asn Pro Pro Ala Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu Phe Gln
 565 570 575
 Pro Leu Val Glu Glu Pro Lys Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys Asp Leu
 580 585 590
 Tyr Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu Val Arg
 595 600 605
 Tyr Thr Gln Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ala

 610 615 620
 Ala Arg Asn Leu Gly Arg Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu Pro Glu
 625 630 635 640

Asp Gln Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Asn
 645 650 655
 Arg Val Cys Leu Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His Val Thr
 660 665 670
 Lys Cys Cys Ser Gly Ser Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala
 675 680 685
 Leu Thr Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu Thr
 690 695 700
 Phe Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu Lys Gln
 705 710 715 720
 Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys
 725 730 735
 Ala Thr Ala Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala Gln Phe
 740 745 750
 Leu Asp Thr Cys Cys Lys Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe Ser Thr
 755 760 765
 Glu Gly Pro Asn Leu Val Thr Arg Ser Lys Asp Ala Leu Ala
 770 775 780
 <210> 165
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 165
 Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser
 1 5 10 15
 Pro Gly Glu Arg Ile Trp Met Phe Thr Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
 20 25 30
 Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Thr Glu Asp
 35 40 45
 Glu Asn Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu
 50 55 60

Val Ser Leu Ile Cys Pro Asn Tyr Glu Arg Ile Ser Asn Pro Ala Lys
65 70 75 80

Glu Thr Phe Thr Thr Thr
85

<210> 166

<211> 784

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 166

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

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

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

165	170	175
Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
180	185	190
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala		
195	200	205
His Arg Tyr Asn Asp Leu Gly Glu Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu		
210	215	220
Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln Lys Ser Ser Tyr Asp Glu His Ala		
225	230	235
		240
Lys Leu Val Gln Glu Val Thr Asp Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp		
245	250	255
Glu Ser Ala Ala Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp		
260	265	270
Lys Leu Cys Ala Ile Pro Asn Leu Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala		
275	280	285
Asp Cys Cys Thr Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln		
290	295	300
His Lys Asp Asp Asn Pro Ser Leu Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala		
305	310	315
Glu Ala Met Cys Thr Ser Phe Lys Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly		
325	330	335
His Tyr Leu His Glu Val Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro		
340	345	350
Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala Glu Gln Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys		
355	360	365
Cys Ala Glu Ala Asp Lys Glu Ser Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Gly		
370	375	380
Val Lys Glu Lys Ala Leu Val Ser Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys		
385	390	395
Ser Ser Met Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val		
405	410	415

Ala Arg Leu Ser Gln Thr Phe Pro Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr
420 425 430

Lys Leu Ala Thr Asp Leu Thr Lys Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly
435 440 445

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met
450 455 460

Cys Glu Asn Gln Ala Thr Ile Ser Ser Lys Leu Gln Thr Cys Cys Asp
465 470 475 480

Lys Pro Leu Leu Lys Lys Ala His Cys Leu Ser Glu Val Glu His Asp
485 490 495

Thr Met Pro Ala Asp Leu Pro Ala Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp
500 505 510

Gln Glu Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
515 520 525

Thr Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser
530 535 540

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys
545 550 555 560

Cys Ala Glu Ala Asn Pro Pro Ala Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu
565 570 575

Phe Gln Pro Leu Val Glu Glu Pro Lys Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys
580 585 590

Asp Leu Tyr Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu
595 600 605

Val Arg Tyr Thr Gln Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
610 615 620

Glu Ala Ala Arg Asn Leu Gly Arg Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu
625 630 635 640

Pro Glu Asp Gln Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile
645 650 655

Leu Asn Arg Val Cys Leu Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His

660 665 670
Val Thr Lys Cys Cys Ser Gly Ser Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe
675 680 685

Ser Ala Leu Thr Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala
690 695 700
Glu Thr Phe Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu
705 710 715 720
Lys Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys
725 730 735
Pro Lys Ala Thr Ala Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala
740 745 750

Gln Phe Leu Asp Thr Cys Cys Lys Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe
755 760 765
Ser Thr Glu Gly Pro Asn Leu Val Thr Arg Ser Lys Asp Ala Leu Ala
770 775 780

<210> 167

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 167

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser
1 5 10 15

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

Phe Thr Thr

<210> 168

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Ser or Leu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> Xaa is Asp or Glu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> Xaa is any of His, Ile, Val, Phe or Trp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa is any of Ala, Gly, Glu or Asp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa is any of Glu, Leu, Gln, Ser, Asp or Asn

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa is any of Phe or Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> Xaa is any of Ile, Val, His, Glu or Asp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa is any of Gly, Trp or Val

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (45)..(45)

<223> Xaa is any of Trp, Phe or Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (47)..(47)

<223> Xaa is any of Ser, Gln, Met or His

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (49)..(49)

<223> Xaa is any Trp or His

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (69)..(69)

<223> Xaa is any of Arg or Ser

<400> 168

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Xaa

1 5 10 15

Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Xaa His Xaa Ala

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ile Cys Arg Xaa Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr

65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 169

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is any of Ser or Leu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is any of Asp or Glu
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa is any of His, Ile, Val, Phe or Trp
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa is any of Ala, Gly, Glu or Asp
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa is any of Glu, Leu, Gln, Ser, Asp or Asn
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa is any of Phe or Tyr
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa is any of Ile, Val, His, Glu or Asp
 <220><221> MISC_FEATURE

 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa is any of Gly, Trp or Val
 <400> 169
 Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5
 <210> 170
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa is any of Trp, Phe or Tyr
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa is any of Ser, Gln, Met or His
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is any of Trp or His

<400> 170

Trp Xaa His Xaa Ala Xaa

1 5

<210> 171

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Arg or Ser

<400> 171

Arg Xaa Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 172

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is Lys or Glu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Thr or Ile

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa is Asn or Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa is any of Ser, Leu, Ala, Phe and Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa is any of Tyr, Ala, Gly, Val, Ile and Ser

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa is any of Tyr, Ser, Ala and His

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> Xaa is any of Asn, Asp, His and Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222>

> (24)..(24)

<223> Xaa is any of Leu, Phe, His and Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (25)..(25)

<223> Xaa is any of His, Pro, Ser, Leu and Asp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(26)

<223> Xaa is any of Gly, Phe, His and Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> Xaa is Ala or Thr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (46)..(46)

<223> Xaa is any of Ser, Asn, Glu, Arg and Asp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (47)..(47)

<223> Xaa is any of Ser, Gln, Thr, Asn and Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (48)..(48)

<223> Xaa is absent or is any of Pro, Val, Ile and Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (49)..(49)

<223> Xaa is absent or is Ile

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (63)..(63)

<223> Xaa is Glu or Lys

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (78)..(78)

<223> Xaa is any of

<400> 172

Ile Glu Val Xaa Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Xaa

1 5 10 15

Xaa Arg Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Glu Leu Xaa Tyr Gly

20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Xaa Xaa Xaa

35 40 45

Xaa Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Xaa Tyr

50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Xaa Asn Pro

65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 173

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is Ala or Thr

<400> 173

Cys Glu Leu Xaa Tyr Gly Ile

1 5

<210> 174

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)
 <223> Xaa is Lys or Glu

<400> 174
 Xaa Asp Val Thr Asp Thr Thr
 1 5

<210> 175
 <211> 11

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)

<223> Xaa is Thr or Ile
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)
 <223> Xaa is Asn or Ala

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)

<223> Xaa is any of Ser, Leu, Ala, Phe and Tyr
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)
 <223> Xaa is any of Tyr, Ala, Gly, Val, Ile and Ser

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)

<223> Xaa is any of Tyr, Ser, Ala and His
 <220><221>

> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)

<223> Xaa is any of Asn, Asp, His and Tyr
 <220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is any of Leu, Phe, His and Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is any of His, Pro, Ser, Leu and Asp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is any of Gly, Phe, His and Tyr

<400> 175

Xaa Xaa Arg Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10

<210> 176

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is any of Ser, Asn, Glu, Arg and Asp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is any of Ser, Gln, Thr, Asn and Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is not present or is any of Pro, Val, Ile and Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is not present or is Ile

<400> 176

Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Val His

1 5

<210> 177

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..()
 <223> Xaa is Glu or Lys
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 177

Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Xaa

1 5

<210> 178

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is Ser or Asn

<400> 178

Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Xaa Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 179

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> N is any of G, A, T, and C

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> N is any of G, A, T, and C

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> N is any of G, A, T, and C

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> N is any of G, A, T, and C

<220><221> misc_feature

<222> (37)..(37)

<223> N is any of G, A, T, and C

<220><221> misc_feature

<222> (40)..(40)

<223> N is any of G, A, T, and C

<400> 179

accgcgctga ttacctggnh tnhtscgnht gsnhtnhtn htggctgtga actgacctat 60

ggcattaaa 69

<210> 180

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (37)..(37)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (40)..(40)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (43)..(43)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (46)..(46)

<223> N is any of G, A, T and C

<400> 180

accgcgctga ttacctggnh tnhtbstnht nhtnhtnhtn htnhtnhtgg ctgtgaactg 60

acctatggca ttaaa 75

<210> 181

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature
 <222> (43)..(43)
 <223> N is any of A, G, T and C
 <220><221> misc_feature
 <222> (49)..(49)
 <223> N is any of A, G, T and C
 <400> 181
 accgcgctga ttacctggnh tvmaccgnt nhtnhtrrcr gcnhvttnh tggctgtgaa 60
 ctgacctatg gcattaaa 78

 <210> 182
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> N is any of A, G, T and C
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> N is any of A, G, T and C
 <220><221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> N is any of A, G, T and C
 <220><221> misc_feature
 <222> (32)..(32)
 <223> N is any of A, G, T and C
 <220><221> misc_feature
 <222> (35)..(35)
 <223> N is any of A, G, T and C
 <220>
 ><221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> N is any of A, G, T and C
 <400> 182

cgatcgcacc accatagatc tgnhtnhtnh tnhtnhtnht tatagcattg gtaacctgaa 60

accg 64

<210> 183

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> N is any of A, G, T and C

<220>

><221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (40)..(40)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (43)..(43)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (46)..(46)

<223> N is any of A, G, T and C

<400> 183

gaatatgaag tgagcctgat ttgcnhtams nhtnhtggtn htnhtnhtkc gaaagaaacc 60

tttaccaccg gtg 73

<210> 184

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> N is any of A, G, T and C
 <220><221> misc_feature
 <222> (31)..(31)
 <223> N is any of A, G, T and C
 <220><221> misc_feature
 <222> (34)..(34)
 <223> N is any of A, G, T and C
 <220><221> misc_feature
 <222> (37)..(37)
 <223> N is any of A, G, T and C
 <220><221> misc_feature
 <222> (40)..(40)
 <223> N is any of A, G, T and C
 <220><221> misc_feature

 <222> (46)..(46)
 <223> N is any of A, G, T and C
 <400> 184
 gaatatgaag tgagcctgat ttgcnhtams nhtnhtnhtn htrgcnhtcc ggcgaaagaa 60
 acctttacca ccggtg 76
 <210> 185
 <211> 79
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> N is any of A, G, T and C
 <220><221> misc_feature
 <222> (31)..(31)
 <223> N is any of A, G, T and C
 <220><221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (40)..(40)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (43)..(43)

<223> N is any of A, G, T and C

<400> 185

gaatatgaag tgagcctgat ttgcnhtams nhtnhtggtn htnhtagcaa cccggcgaaa 60

gaaaccttta ccaccggtg 79

<210> 186

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 186

cagatctatg gtggtgcgat cgcccggcac atctttaatg ccataggtca gttcaca 57

<210> 187

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 187

gcaaatacagg ctcaattcat attcggtatc cggtttcagg ttaccaatgc tat 53

<210> 188

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 188

cgggtcgggtt ggggtaccgc caccggtggt aaaggtttct tt 42

<210> 189

<211> 16

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 189
 cgggtcgggtt ggggta 16

<210> 190
 <211> 67
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 190
 ggcccagccg gccatggccg ccattgaagt gaaagatgtg accgatacca ccgcgctgat 60
 tacctgg 67

<210> 191
 <211> 73
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(24)
 <223> NNN encodes for all amino acids except Cys
 <220><221> misc_feature
 <222> (25)..(27)

<223> NNN encodes for Ala or Pro
 <220><221> misc_feature
 <222> (28)..(30)
 <223> NNN encodes for all amino acids except Cys
 <220><221> misc_feature
 <222> (31)..(33)
 <223> NNN encodes for Ala or Gly
 <220><221> misc_feature
 <222> (34)..(36)
 <223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<220><221> misc_feature
 <222> (37)..(39)
 <223> NNN encodes for all amino acids except Cys
 <220><221> misc_feature
 <222> (40)..(42)
 <223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<400> 191
 accgcgctga ttacctggtc tnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnggctgtga actgacctat 60
 ggcattaaag atg 73

<210> 192
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> each N is any of A, G, T and C
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> each N is any of A, G, T and C
 <220><221> misc_feature
 <222> (28)..(29)
 <223> each N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature
 <222> (34)..(35)
 <223> each N is any of A, G, T and C
 <220><221> misc_feature
 <222> (37)..(38)
 <223> each N is any of A, G, T and C
 <220><221> misc_feature
 <222> (40)..(41)
 <223> each N is any of A, G, T and C
 <400> 192

accgcgctga ttacctggnn knnksmgnnk gsnknknkn nkggctgtga actgacctat 60
 ggcattaaa 69

<210> 193
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct

<220><221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> each N is any of A, T, C or T
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> each N is any of G, A, C and T
 <220><221> misc_feature
 <222> (25)..(26)
 <223> each N is any of G, A, C and T
 <220><221> misc_feature
 <222> (28)..(29)
 <223> each N is any of G, A, C and T
 <220><221> misc_feature
 <222> (31)..(32)
 <223> each N is any of G, A, C and T
 <220><221> misc_feature
 <222> (34)..(35)
 <223> each N is any of G, A, C and T

<220><221> misc_feature
 <222> (37)..(37)
 <223> N is any of G, A, C and T
 <220><221> misc_feature
 <222> (40)..(41)
 <223> each N is any of G, A, C and T
 <220><221> misc_feature
 <222> (43)..(44)

<223> each N is any of G, A, C and T

<400> 193

accgcgctga ttacctggnn knnknknknk nnknknkhtn nknnktgtga actgacctat 60

ggcattaaa 69

<210> 194

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<220><221> misc_feature

<222> (37)..(39)

<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<220><221> misc_feature

<222> (40)..(42)

<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<220><221> misc_feature

<222> (43)..(45)

<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<220><221> misc_feature

<222> (46)..(49)

<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<220><221> misc_feature

<222> (50)..(51)

<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<400> 194

gatgtgccgg gcgatgcac caccatagat ctgnnnnnnn nnnnnnnnnn ntatagcatt 60

ggtaacctga aaccgg 76

<210> 195

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 195
 ccaggtaatc agcgcggtgg tat 23
 <210> 196
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 196
 cagatctatg gtggtgcgat cgc 23
 <210> 197
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 197
 tgtgaactga cctatggcat taaagatgt 29
 <210> 198
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> N is any of G, A, T and C
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223>
 > N is any of G, A, T and C
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> N is any of G, A, T and C
 <220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)
 <223> N is any of G, A, T and C
 <220><221> misc_feature
 <222> (31)..(31)
 <223> N is any of G, A, T and C
 <220><221> misc_feature
 <222> (34)..(34)
 <223> N is any of G, A, T and C
 <220><221> misc_feature
 <222> (37)..(37)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220><221> misc_feature
 <222> (38)..(38)
 <223> N is any of G, A, T and C

 <220><221> misc_feature
 <222> (40)..(40)
 <223> N is any of G, A, T and C
 <220><221> misc_feature
 <222> (43)..(43)
 <223> N is any of G, A, T and C
 <220><221> misc_feature
 <222> (46)..(46)
 <223> N is any of G, A, T and C
 <400> 198
 accgcgctga ttacctggnh tnhtvntnht nhtnhtnhtn htnhtnhtgg ctgtgaactg 60
 acctatggca ttaaa 75
 <210> 199
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct

 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (37)..(37)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (40)..(40)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (43)..(43)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (46)..(46)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (49)..(49)

<223> N is any of G, A, T and C

<400> 199

accgcgctga ttacctggnh tnhtvntnht nhtnhtnhtn htnhtnhtnh ttgtgaactg

60

acctatggca ttaaa

75

<210> 200

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 200

ggcccagccg gccatggccg ccattgaagt ggaagatgtg accgatacca ccgcgtgat

60

tacctgg

67

<210> 201

<211> 585

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 201

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu

1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln

20 25 30

Gln Ser Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu

35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys

50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu

65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro

85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu

100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His

115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg

130 135 140
 Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
 145 150 155 160
 Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 165 170 175
 Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190
 Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205

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

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

 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
385 390 395 400

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
405 410 415

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
420 425 430

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Asn His
450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Leu Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
580 585

<210> 202

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 202

Ser Gln Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr
1 5 10 15

Trp Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Ala
20 25 30

Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn
35 40 45

Gln Pro Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu

50 55 60

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

Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
85 90 95

Gly Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu
100 105 110

Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr

115 120 125

Leu Gln Gln Ser Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val

130 135 140

Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys
145 150 155 160

Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala
165 170 175

Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln

180 185 190

Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro
195 200 205

Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala
210 215 220

Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile
225 230 235 240

Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala

245 250 255

Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys

260 265 270

Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys

275 280 285

Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe

290 295 300

Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg

305 310 315 320

Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu

325 330 335

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

340 345 350

Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser

355 360 365

Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys

370 375 380

Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu

385 390 395 400

Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn

405 410 415

Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr

420 425 430

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

435 440 445

Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro

450 455 460

His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu

465 470 475 480

Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu

485 490 495
Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys

500 505 510
Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu

515 520 525
Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met

530 535 540
Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val

545 550 555 560
Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr

565 570 575
Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp

580 585 590
Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His

595 600 605
Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln

610 615 620
Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu

625 630 635 640
Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys

645 650 655
Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys

660 665 670
Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu

675 680

<210> 203

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 203

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

 Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Asn
 65 70 75 80
 Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 85 90 95
 Gly Gly Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu
 100 105 110
 Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr
 115 120 125

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

 Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro
 195 200 205
 Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala
 210 215 220
 Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile
 225 230 235 240
 Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala

245	250	255
Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys		
260	265	270
Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys		
275	280	285
Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe		
290	295	300
Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg		
305	310	315
		320
Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu		
325	330	335
Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala		
340	345	350
Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser		
355	360	365
Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys		
370	375	380
Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu		
385	390	395
Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn		
405	410	415
Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr		
420	425	430
Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala		
435	440	445
Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro		
450	455	460
His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu		
465	470	475
Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu		
485	490	495

Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys
500 505 510

Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu
515 520 525

Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met
530 535 540

Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val
545 550 555 560

Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr
565 570 575

Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp
580 585 590

Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His
595 600 605

Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln
610 615 620

Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu
625 630 635 640

Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys
645 650 655

Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys
660 665 670

Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
675 680

<210> 204

<211> 791

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 204

Ser Gln Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr

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

 65 70 75 80
 Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 85 90 95
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu
 100 105 110
 Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr Asn Arg
 115 120 125
 Ser Ser Tyr Ser Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr Gly Ile Lys

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

 195 200 205
 His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn
 210 215 220
 Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Ser
 225 230 235 240
 Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala
 245 250 255

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

260 265 270

His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu

275 280 285

Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg

290 295 300

Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg

305 310 315 320

Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn

325 330 335

Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His

340 345 350

Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys

355 360 365

Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu

370 375 380

Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala

385 390 395 400

Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala

405 410 415

Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala

420 425 430

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

435 440 445

Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala

450 455 460

Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys

465 470 475 480

Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile

485 490 495

Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala

500 505 510
Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala

515 520 525
Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His

530 535 540
Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu

545 550 555 560
Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr

565 570 575
Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn

580 585 590
Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys

595 600 605
Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val

610 615 620
Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly

625 630 635 640
Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu

645 650 655
Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys

660 665 670
Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val

675 680 685
Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val

690 695 700
Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys

705 710 715 720
Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val

725 730 735
Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala

740 745 750

Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp
755 760 765
Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala
770 775 780
Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
785 790
<210> 205
<211> 791
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic construct
<400> 205
Ser Gln Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr
1 5 10 15
Trp Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr
20 25 30
Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn
35 40 45
Gln Pro Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu
50 55 60
Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Asn
65 70 75 80
Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
85 90 95
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu
100 105 110
Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr Asn Arg
115 120 125
Ser Ser Tyr Ser Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr Gly Ile Lys
130 135 140
Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn Gln Pro Tyr Val
145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Asn Pro Ala Lys Glu

180 185 190

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp Ala

195 200 205

His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn

210 215 220

Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Ser

225 230 235 240

Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala

245 250 255

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

260 265 270

His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu

275 280 285

Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg

290 295 300

Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg

305 310 315 320

Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn

325 330 335

Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His

340 345 350

Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys

355 360 365

Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu

370 375 380

Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala

385 390 395 400

Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala

405 410 415
Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala

420 425 430
Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His

435 440 445
Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala

450 455 460
Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys

465 470 475 480
Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile

485 490 495
Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala

500 505 510
Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala

515 520 525
Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His

530 535 540
Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu

545 550 555 560
Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr

565 570 575
Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn

580 585 590
Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys

595 600 605
Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val

610 615 620
Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly

625 630 635 640
Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu

645 650 655

Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys
660 665 670

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

675 680 685
Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val
690 695 700

Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys
705 710 715 720

Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val
725 730 735

Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala

740 745 750
Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp
755 760 765

Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala
770 775 780

Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu

785 790

<210> 206

<211> 190

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 206

Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr

1 5 10 15
Trp Ser Asp Glu Phe Gly His Tyr Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His
35 40 45

Ser Ala Trp Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu
50 55 60

Val Ser Leu Ile Cys Tyr Thr Asp Gln Glu Ala Gly Asn Pro Ala Lys

65 70 75 80

Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Tyr Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp

130 135 140

Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His Ser Ala Trp Tyr Ser Ile Gly

145 150 155 160

Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Tyr Thr

165 170 175

Asp Gln Glu Ala Gly Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr

180 185 190

<210> 207

<211> 680

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 207

Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr

1 5 10 15

Trp Ser Asp Glu Phe Gly His Tyr Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His

35 40 45

Ser Ala Trp Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu

50 55 60

Val Ser Leu Ile Cys Tyr Thr Asp Gln Glu Ala Gly Asn Pro Ala Lys

65	70	75	80
Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp			
	85	90	95
Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu			
	100	105	110
Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln			
	115	120	125
Ser Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe			
	130	135	140
Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser			
	145	150	155
Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg			
	165	170	175
Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu			
	180	185	190
Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro			
	195	200	205
Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp			
	210	215	220
Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg			
	225	230	235
His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr			
	245	250	255
Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys			
	260	265	270
Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser			
	275	280	285
Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg			
	290	295	300
Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys			
	305	310	315
			320

Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val
325 330 335

His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg
340 345 350

Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser
355 360 365

Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys
370 375 380

Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu
385 390 395 400

Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu
405 410 415

Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg
420 425 430

His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr
435 440 445

Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys
450 455 460

Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln
465 470 475 480

Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr
485 490 495

Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln
500 505 510

Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val
515 520 525

Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala
530 535 540

Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu
545 550 555 560

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

565

570

575

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

580

585

590

Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile

595

600

605

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

610

615

620

Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys

625

630

635

640

Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala

645

650

655

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

660

665

670

Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu

675

680

<210> 208

<211> 785

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 208

Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr

1

5

10

15

Trp Ser Asp Glu Phe Gly His Tyr Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20

25

30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His

35

40

45

Ser Ala Trp Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu

50

55

60

Val Ser Leu Ile Cys Tyr Thr Asp Gln Glu Ala Gly Asn Pro Ala Lys

65

70

75

80

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

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

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

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

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

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys

580 585 590
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 595 600 605
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 610 615 620
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 625 630 635 640
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val

645 650 655
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 660 665 670
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 675 680 685
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 690 695 700
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu

705 710 715 720
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 725 730 735
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 740 745 750
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 755 760 765
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly

770 775 780

Leu

785

<210> 209

<211> 190

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 209

Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr

1 5 10 15

Trp Ser Asp Asp Phe Gly Glu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His

35 40 45

His Ala His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu

50 55 60

Val Ser Leu Ile Cys Arg Ser Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys

65 70 75 80

Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His His Ala His Tyr Ser Ile Gly

145 150 155 160

Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Arg Ser

165 170 175

Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr

180 185 190

<210> 210

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 210

Met Thr Asn Ile Thr Lys Arg Ser Leu Val Ala Ala Gly Val Leu Ala

1 5 10 15

Ala Leu Met Ala Gly Asn Val Ala Met Ala

20 25