


| | | |
|--|--|--|
|  | (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A) | (11) 공개번호 10-2014-0019385 (43) 공개일자 2014년02월14일 |
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C07K 16/46</i> (2006.01) <i>C07K 16/28</i> (2006.01) <i>A61K 39/395</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2013-7027330</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2012년03월15일 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2013년10월16일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/IL2012/050093</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2012/123949 국제공개일자 2012년09월20일</p> <p>(30) 우선권주장 61/453,591 2011년03월17일 미국(US)</p> | | <p>(71) 출원인 라모트 앳 텔-아비브 유니버시티 리미티드 P.O박스 39296, 61392 텔아비브, 이스라엘</p> <p>(72) 발명자 벤하르 이타이 이스라엘 7622785 레호보트, 바레켓 스트리트 38 바크스 밀라호 이스라엘 6729703 텔-아비브, 마에필레이 예고르 스트리트 6/13</p> <p>(74) 대리인 황의만</p> |

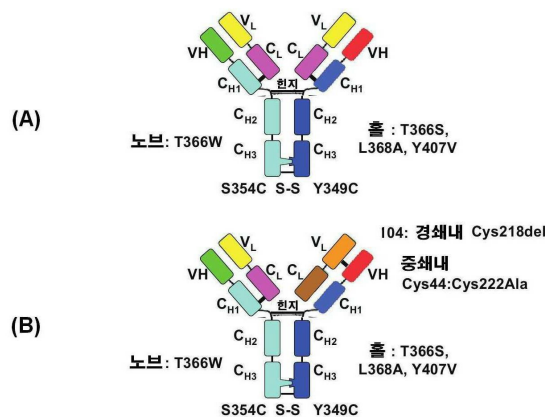
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 **이중특이성 및 단일특이성, 비대칭성 항체 및 이의 제조방법**

(57) 요약

항체가 제공된다. 상기 항체는 Fc 부위 및 Fab 부위를 포함하고, (i) 상기 Fc 부위는 2개의 비동일성 중쇄를 포함하며, 이러한 2개의 비동일성 중쇄 중 적어도 하나는 상기 2개의 비동일성 중쇄 간에 상보성을 형성하기 위해 아미노산 변이를 포함함으로써 상기 비동일성 중쇄의 이중 이합체를 형성할 확률을 증가시키고 동일한 중쇄의 동중 이합체를 형성할 확률을 감소시키며; (ii) 상기 Fab 부위는 Fab 부위의 제1 중쇄와 제1 경쇄 사이에 제1 공유 결합, 및 상기 Fab 부위의 제2 중쇄와 제2 경쇄 사이에 제2 공유결합을 포함하며, 제1 중쇄에 대한 제1 공유 결합의 위치는 제2 중쇄에 대한 제2 공유 결합의 위치와 상이한 것을 특징으로 한다. 이를 제조하는 방법 및 이의 용도 또한 제공된다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

Fc 부위 및 Fab 부위를 포함하는 이중특이성 항체에 있어서:

(i) 상기 Fc 부위는 2개의 비동일성 중쇄를 포함하고, 이러한 2개의 비동일성 중쇄중 적어도 하나는 상기 2개의 비동일성 중쇄 간에 입체적 상보성을 형성하기 위해 아미노산 변이를 포함하며, 상기 Fc 부위는 상기 Fc 부위의 하나의 중쇄의 돌기, 및 상기 Fc 부위의 제2 중쇄 상에 입체적으로 상보적인 공동부(cavity)를 포함하고, 상기 돌기는 상기 상보적인 공동부로 돌출되며, 상기 상보성은

(a) 상기 하나의 중쇄의 CH3 도메인 상에 하나의 위치에서 아미노산을 원 아미노산보다 더 큰 측쇄 부피를 가지는 다른 아미노산으로 치환함으로써 발생되고, 더 큰 측쇄를 가지는 상기 아미노산은 상기 돌기를 발생시키도록 타이로신, 아르기닌, 페닐알라닌, 이소류이신 및 트립토판으로 구성되는 군으로부터 선택되며;

(b) 상기 제2 중쇄의 CH3 도메인 상에 하나의 위치에서 아미노산을 원 아미노산보다 더 작은 측쇄 부피를 가지는 다른 아미노산으로 치환하여, 상기 상보적인 공동부를 발생시키고, 더 작은 측쇄를 가지는 상기 아미노산은 알라닌, 글리신, 발린 및 트레오닌으로 구성되는 군으로부터 선택되며;

(ii) 상기 Fab 부위는 상기 Fab 부위의 제1 중쇄와 제1 경쇄 사이에 제1 공유 결합, 및 상기 Fab 부위의 제2 중쇄와 제2 경쇄 사이에 제2 공유 결합을 포함하고, 상기 제1 공유 결합은 상기 하나의 중쇄의 CH1 도메인 및 상기 하나의 경쇄의 CL 도메인 사이의 천연적으로 발생하는 디설파이드 결합이고; 상기 제2 공유 결합은 상기 제2 중쇄의 V_H 도메인의 위치 44에서의 시스테인과 상기 제2 경쇄의 V_L 도메인의 위치 100에서의 시스테인 사이의 디설파이드 결합이며, 상기 위치의 번호 매김은 Kabat 및 Wu에 따르고, 상기 제2 중쇄는 상기 제2 경쇄와의 그것의 천연 디설파이드 결합이 없으며, 상기 천연 디설파이드 결합은 중쇄를 자연 발생 생식계열 항체 유전자에 의해 암호화되는 그의 동족 경쇄에 연결시키는 사슬간 디설파이드 결합인, 이중특이성 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 키메라 항체, 인간화 항체 및 완전 인간 항체로 구성되는 군으로부터 선택되는, 이중특이성 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 제1 중쇄의 상기 CH3 도메인은 상기 제2 중쇄의 상기 CH3 도메인과 공유결합적으로 연결되는, 이중특이성 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항체의 제1 항원 결합 부위는 항원의 제1 에피토프와 결합하고, 상기 항체의 제2 항원 결합부위는 상기 항원의 제2 에피토프와 결합하는, 이중특이성 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항체의 제1 항원 결합 부위는 제1 항원의 에피토프와 결합하고 상기 항체의 제2 항원 결합 부위는 제2 항원의 에피토프와 결합하는, 이중특이성 항체.

청구항 6

제1항에 있어서, 각 경쇄는 단일 디설파이드 결합을 통해 그 동족 중쇄와 연결되어 있는, 이중특이성 항체.

청구항 7

제1항에 있어서, 온전한(intact) 항체인, 이중특이성 항체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 항체는 IgA, IgD, IgE 및 IgG로 구성되는 군으로부터 선택되는, 이중특이성 항체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4를 포함하는, 이중특이성 항체.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 제1 중쇄는 T366W 변이를 포함하고; 제2 중쇄는 T366S, L368A, Y407V 변이를 포함하는, 이중특이성 항체.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 제1 중쇄는 S354C 변이를 포함하고, 상기 제2 중쇄는 Y349C 변이를 포함하는, 이중특이성 항체.

청구항 12

제5항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 부위는 CD30과 결합하고, 상기 제2 항원 결합 부위는 erbB2와 결합하는, 이중특이성 항체.

청구항 13

제5항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 부위는 CD30과 결합하고, 상기 제2 항원 결합 부위는 슈도모나스 외독소(PE)와 결합하는, 이중특이성 항체.

청구항 14

제5항에 있어서, 상기 제1 항원 결합 부위는 CD30과 결합하고, 상기 제2 항원 결합 부위는 스트렙타비딘과 결합하는, 이중특이성 항체.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 중쇄들 중 적어도 하나는 치료적 분체에 부착되어 있는, 이중특이성 항체.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 중쇄들 중 적어도 하나는 확인가능한 분체에 부착되어 있는, 이중특이성 항체.

청구항 17

제1항에 있어서, 영장류 항체, 돼지 항체, 쥐 항체, 소 항체, 염소 항체 및 말 항체로 구성되는 군으로부터 선택되는, 이중특이성 항체.

청구항 18

제1항의 항체를 제조하는 방법에 있어서,

- (a) 상기 제1 중쇄를 암호화하는 제1 핵산 분자를 제공하는 단계;
- (b) 상기 제2 중쇄를 암호화하는 제2 핵산 분자를 제공하는 단계;
- (c) 상기 제1 경쇄를 암호화하는 제3 핵산 분자를 제공하는 단계;
- (d) 상기 제2 경쇄를 암호화하는 제4 핵산 분자를 제공하는 단계;
- (e) 제1, 제2, 제3, 및 제4 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포를 상기 핵산 분자들의 발현을 허용하는 조건 하에서 배양하는 단계; 및
- (f) 제1 항의 항체를 회수하는 단계를 포함하는, 제조 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 숙주 세포는 박테리아 세포를 포함하는, 제조 방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 숙주 세포는 포유류 세포를 포함하는, 제조 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 발현은 박테리아 세포의 봉입체로 나타나는, 제조 방법.

청구항 22

제18항에 있어서, 상기 핵산 분자 각각은 상이한 숙주세포에 형질감염되는, 제조 방법.

청구항 23

제18항에 있어서, 상기 핵산 분자 각각은 동일한 숙주세포에 형질감염되는, 제조 방법.

청구항 24

제19항에 있어서, 상기 박테리아 세포는 그람 음성 박테리아 세포를 포함하는, 제조 방법.

청구항 25

제18항에 있어서, 단계 (f) 후에, 상기 항체를 단백질 A, 단백질 G 및 단백질 L로 이루어지는 군으로부터 선택된 단백질 상에서 정제하는 단계를 더 포함하는, 제조 방법.

청구항 26

활성 성분으로서 제 1항의 항체, 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 27

제1항에 있어서, 감염 또는 염증성 질환 또는 염증성 장애의 치료시 사용하기 위한, 이중특이성 항체.

청구항 28

제1항에 있어서, 상기 염증성 장애는 암인, 제27항에 따라 사용하기 위한 이중특이성 항체.

명세서

기술 분야

[0001] 발명의 분야 및 배경기술

[0002] 본 발명은 특정 구체예에서, 이중특이성, 단일특이성, 비대칭 항체 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 이중특이성 항체 (BsAbs)는 각각 상이한 목표 항원을 지향하는 두 개 결합 부위를 가진 항체로서, 동시에 이에 결합할 수 있다 (Baeuerle and Reinhardt, 2009). 이러한 특성은 통상적인 단일클론 항체로는 불가능한 치료 전략을 수립할 수 있게 한다. 이중특이성 항체의 일차적인 적용은 a) 두 개의 타겟 (예를 들어, 가용성 리간드들의 수용체, 수용체 및 리간드 또는 두 개 상이한 리간드)의 동시 저해, b) 하나의 결합 특이성이 타겟 세포 (통상 종양 세포)로 지향되는 반면 다른 결합 부위를 사용하여 독성 활성 또는 분체를 타겟 세포 (T 또는 NK 세포들: 전구약물 활성화 효소; 사이토카인, 방사능핵종, 바이러스, 독소)로 채용하는 경우 재목표화하는 것, c) 양쪽 항체 팔을 동시에 체결함으로써 증대되는 강력한 결합이 양쪽 항원을 발현하는 세포에서만 일어나는 경우, 증가된 특이성을 포함한다 (Fischer 및 Leger, 2007; Amann 등, 2009; Lutterbuese 등, 2010). 이중특이성 항체들은 확실한 치료제로 간주되기 때문에, 몇몇의 이중특이성 방식들이 개발되었으며, 이들의 유용성은 안정성과 제조상의 복잡성의 문제로 인해 한정된다. 이중특이성 항체들을 제조하는 데 대한 몇 가지 전략이 지난 20년간 제안되어 왔으나, 많은 시도와 제안된 다양한 항체 형식에도 불구하고, BsAb들은 생산품 균일성의 결여와 생산 문제에 대한 도전에 약점이 있었다 (Fischer and Leger, 2007; Chames and Baty, 2009).

[0004] 먼저, 각각 다른 항체를 생성하는 두 가지 하이브리도마들을 융합하여 이중특이성 항체들을 생성하는 시도가 있

있고, 이는 소위 “퀴드로마스”로 지칭되는 또는 하이브리드 하이브리도마를 결과하였다. 그러나, 퀴드로마스들은 유전적인 불안정성을 겪고 있으며, 중쇄 및 경쇄들의 비균일적인 혼합물을 생성하게 되었다. L 사슬과 H 사슬과의 무작위적 연합은 두 개의 항체성으로 나타나며, 오직 적은 분율로 바람직한 이중특이성 항체들이 나타날 뿐이라는 것을 발견되었다 (De Lau 등, 1991; Massino 등, 1997). 두 개의 단일특이성 항체들 A와 B로부터 이중특이성 항체를 생성한다고 고려하면, IgG 형식의 이중특이성 항체의 효과적인 조합은 두 가지 기본적인 요구사항을 가지며, 그 중 한가지는 각 중쇄가 둘째 항체의 중쇄와 연합하고 (중쇄 A가 중쇄 B와 연합), 동일 연합 (A+A 또는 B+B) 일어나지 않는다는 것이다. 두 번째 요구사항은 각 경쇄가 그와 동종의 중쇄와 연합하는 것이다 (경쇄 A는 중쇄 A와 연합하나 경쇄 B는 중쇄 A와 또는 경쇄 A는 중쇄 B와는 연합하지 않는다). 퀴드로마스들에서 항체 사슬들의 무작위적 연합은 이러한 요구사항을 만족하지 않는다.

[0005] 이중특이성 항체들의 효율적인 생성은 항체 엔지니어링의 발달로 가능하게 되었다. 발전된 항체 엔지니어링은 탠덤 단일-사슬 가변 절편 (scFv) (Robinson 등, 2008), 이가항체들(diabodies) (Hudson and Kortt, 1999), 탠덤 이가항체들 (Kipriyanov, 2009), 투인원 항체 (Bostrom 등, 2009), 및 이중 가변 도메인 항체들 (Wu 등, 2007)과 같은 새로운 제조항체 형태를 창출할 수 있게 하였다. 이러한 새로운 항체 형태들은 어떤 제작 문제를 해결하면서, 동종의 제조물을 제공하였다. 하지만, 이러한 구조체들 대부분, 작은 크기로 인해, 열악한 약동학적 특성을 나타내며, 이에 따라 빈번히 투약하는 것 또는 반감기를 개선하기 위해 더 큰 담체 분자와의 접합을 필요로 한다 (Constantinou 등, 2009).

[0006] Ridgway 등, 1996은 이중특이성 항체들을 만드는 두가지 중 한가지에 대한 해법을 제공하면서, IgG-기반 이중특이성 항체들을 기술적으로 용이하게 하도록 다시 생각하는 것을 가능하게 하였다. 이들은 소위 “노브인투홀(knobs into holes)”이라는 엔지니어링 방법을 설명하였는데, 이는 “항체 A 및 B” 사이의 중쇄 사이에 이중이합체화(heterodimerization) 만이 형성되기 하면서, 동종이합체화는 허용하지 않는 것이다. 중쇄 연합에 대한 법칙들을 연구하면서, 상기 저자들은 그것이 두 개 중쇄의 C_{H3} 도메인들 사이에 계면 상호작용에 일차적으로 의존한다고 가정하였다. 단백질 도메인 또는 서브도메인이 상호작용할 때, 노브는 반대 도메인으로 돌출된 벌키 측쇄이고 여기서 그러한 침입을 가능하게 하는 작은 측쇄와 정렬된다. 이들의 방법에서, 노브와 홀 변이체들이, 파트너 CH3 도메인 상에서 적절히 고안된 홀로 삽입되는 노브 덕분에, 이중이합체화되는 것으로 예상되고 있다. 노브들은 작은 측쇄들을 가장 큰 측쇄인 타이로신이나 트립토판으로 교체함으로써 작제될 수 있었다. 큰 측쇄를 더 작은 것, 이 경우, 알라닌이나 트레오닌으로 교체함으로써 노브와 동일하거나 유사한 크기의 홀이 제작되었다. 이러한 방식으로, 노브 변이체인 두 개의 중쇄들은 측쇄 충돌로 인하여 동종연합할 수 없고, 두 개 홀 변이체들의 동종연합은, 안정화 측쇄 상호작용이 없기 때문에 선호되지 않는다. 후속적으로, 이러한 기는 C_{H3} 도메인의 c-말단 근처의 디설파이드 결합을 조작하게 되어 상기 조립된 이중특이성 항체들을 더 안정화시킨다 (Merchant 등, 1998).

[0007] 미국 특허 제 7,183,076호는 상기 노브 및 홀 방식을 사용하여 이중기능성 항체들을 생성하는 방법을 교시한다.

[0008] 그러나, 상기 홀속으로 노브 방식은 중쇄의 이중연합에 대해서만 해법을 제공하지만, 각 중쇄를 그의 동종 경쇄와 올바르게 연합시키는 해법을 제공하지 못하고 있다. 그러므로, 그 연구에 있어서, 인간 수용체인 HER3 및 cMpl에 동시에 결합할 수 있는 이중특이성 IgG를, 공통의 경쇄 및 상응하는 재모델화된 중쇄들을 공발현시킨 후 단백질 A 크로마토그래피하여 제조하였다. 상기 조작된 중쇄들은 항-HER2 항체로 증명되는 바와 같이, 항체-의존성 세포-매개 세포독성을 지지하는 그들의 능력을 유지하고 있다 (Merchant 등, 1998).

[0009] 국제특허출원 제2010/115589호는 삼가 이중특이성 항체들을 교시하고 있는 데, 여기서, 제2 특이성의 VH 및 VL 이 두 개 CH3 도메인의 C-말단에서 노브인투홀 변이를 가지는 단일특이성 IgG로 융합되어 있다.

[0010] 유사한 분자들이 미국 특허 출원 제2010/0256340호에 기술되어 있다.

[0011] 디설파이드-안정화된 Fv들은 먼저 안드레아스 플뤼크툰(Andreas Pluckthun) 그룹에 의해 (Glockshuber 등, 1990) 그리고, 나중에는 이라 파스탄 (Ira Pastan) 그룹에 의해 기술되었다 (Brinkmann 등, 1993; Reiter 등, 1994a; Reiter 등, 1994b; Reiter 등, 1995). 상기 파스탄 그룹은 dsFv들에 상당한 연구를 하였고, 분자 모델링을 사용하여 항체 Fv 절편들 (Fvs)의 보존된 구조 부위들에서 위치들을 확인하였고, 이들은 CDR들과 떨어져 있으며, 구조적으로 보존된 구조적 위치 사이에 조작된 사슬간 디설파이드 결합에 의해 불안정한 VH 및 VL 이중이합체들이 안정화된 제조항체 Fv를 만드는데 잠재적으로 사용될 수 있다. 디설파이드 결합이 이러한 위치들 중 하나에 도입되었고, VH44-VL105 또는 VH111-VL48는 온전한 결합 및 특이성을 유지하는 다양한 Fv들을 안정화시키는 것으로 나타났다.

[0012] 미국 특허 제5,747,654호, 6,147,203호 및 6,558,672호는 디설파이드-안정화된 Fvs를 교시하고 있는 데 상기 Fvs를 조작하여 경쇄와 중쇄 사이에 추가적인 디설파이드 결합을 소개하였다.

[0013] 추가의 배경 기술은 Jackman 등, Journal of Biological Chemistry Vol 285, No.27, pp. 20850-20859, July 2, 2010, 및 Schaefer 등, Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 July 5; 108(27): 11187-11192를 포함한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 발명의 요약

[0015] 본 발명의 특정 구체예의 일 관점에 따라서, Fc 부위 및 Fab 부위를 포함하는 항체가 제공되며, 상기에서:

[0016] (i) 상기 Fc 부위는 두 개의 비동일성 중쇄를 포함하며, 이러한 두 개의 비동일성 중쇄중 적어도 하나는 상기 두 개의 비동일성 중쇄 간에 상보성을 형성하기 위해 아미노산 변이를 포함하며, 이럼으로써 상기 비동일성 중쇄의 이중이합체를 형성할 확률을 증가시키고 동일한 중쇄의 동종이합체를 형성할 확률을 감소시키며; 및

[0017] (ii) 상기 Fab 부위는 Fab 부위의 제1 중쇄와 제1 경쇄 사이에 제1 공유 결합, 및 상기 Fab 부위의 제2 중쇄와 제2 경쇄 사이에 제2 공유결합을 포함하며, 여기서 제1 중쇄에 대하여 제1 공유 결합의 위치는 제2 중쇄에 대한 제2 공유 결합의 위치와 상이한 것을 특징으로 한다.

과제의 해결 수단

[0018] 본 발명의 특정 구체예의 일관점에 따라서, 항체를 제조하는 방법을 제공하는 바, 상기 방법은:

[0019] (a) 제1 중쇄를 암호화하는 제1 핵산 분자를 제공하는 단계;

[0020] (b) 제2 중쇄를 암호화하는 제2 핵산 분자를 제공하는 단계;

[0021] (c) 제1 경쇄를 암호화하는 제3 핵산 분자를 제공하는 단계;

[0022] (d) 제2 경쇄를 암호화하는 제4 핵산 분자를 제공하는 단계;

[0023] (e) 제1, 제2, 제3, 및 제4 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포를 상기 핵산 분자들의 발현을 허용하는 조건 하에서 배양하는 단계; 및

[0024] (f) 상기 항체를 회수하는 단계를 포함한다.

[0025] 본 발명의 특정 구체예의 일관점에 따라서, 활성 제제로서 본 발명에서 개시된 항체 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.

[0026] 본 발명의 특정 구체예의 일관점에 따라서, 감염 또는 염증성 질환 또는 장애를 치료하는 항체가 제공된다.

[0027] 본 발명의 특정 구체예의 일관점에 따라서, 필요한 대상체에게 감염 또는 염증성 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서, 상기 대상체에 본 발명에서 개시된 항체의 치료적 유효량을 투여하여, 상기 감염 또는 염증성 질환이나 장애를 치료하는 것을 포함하는 방법이 제공된다.

[0028] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 항체는 이중특이성 항체이다.

[0029] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 항체는 비대칭성, 단일특이성 항체이다.

[0030] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 상보성은 입체적 상보성을 포함한다.

[0031] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 상보성은 전하 상보성을 포함한다.

[0032] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 Fc 부위는 Fc 부위의 하나의 중쇄의 돌기, 및 상기 Fc 부위의 제2 중쇄 상에 입체적으로 상보적인 공동부(cavity)를 포함하며, 상기 돌기는 상기 상보적인 공동부로 돌출된다.

[0033] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 돌기는 하나의 중쇄의 CH3 도메인 상에 하나의 위치에서 아미노산을 원 아미노산보다 더 큰 측쇄 부피를 가지는 다른 아미노산으로 치환함으로써 발생된다.

[0034] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 상보적인 공동부는 제2 중쇄의 CH3 도메인 상의 하나의 위치에 아미노산을 원 아미노산보다 더 작은 측쇄 부피를 가지는 다른 아미노산으로 치환함으로써 발생된다.

- [0035] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 제1 공유 연결은 하나의 중쇄의 CH1 도메인 및 하나의 경쇄의 CL 도메인 사이에 있고; 및 제2 공유 연결은 제2 중쇄의 VH 도메인 및 제2 경쇄의 VL 도메인 사이에 있다.
- [0036] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 제1 및 제2 공유 연결은 디설파이드 결합이다.
- [0037] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 원 아미노산보다 더 큰 측쇄 부피를 가지는 아미노산은 타이로신, 아르기닌, 페닐알라닌, 이소류이신 및 트립토판으로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0038] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 원 아미노산보다 더 작은 측쇄 부피를 가지는 아미노산은 알라닌, 글리신, 발린 및 트레오닌으로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0039] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 항체는 키메라 항체, 인간화 항체 및 완전 인간 항체로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0040] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 제1 중쇄의 C_{H3} 도메인은 상기 제2 중쇄의 C_{H3} 도메인과 공유결합적으로 연결된다.
- [0041] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 항체의 제1 항원 결합 부위는 항원의 제1 에피토프와 결합하고, 상기 항체의 제2 항원 결합 부위는 항원의 제2 에피토프와 결합한다.
- [0042] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 항체의 제1 항원 결합 부위는 제1 항원의 에피토프와 결합하고 상기 항체의 제2 항원 결합 부위는 제2 항원의 에피토프와 결합한다.
- [0043] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 각 경쇄는 단일 디설파이드 결합을 통해 그 동족 중쇄와 연결되어 있다.
- [0044] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 항체는 온전한 항체이다.
- [0045] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 항체는 IgA, IgD, IgE 및 IgG로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0046] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4을 포함한다.
- [0047] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 제1 중쇄는 T366W 변이를 포함하고; 및 제2 중쇄는 T366S, L368A, Y407V 변이를 포함한다.
- [0048] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 제1 중쇄는 S354C 변이를 포함하고 및 상기 제2 중쇄는 Y349C 변이를 포함한다.
- [0049] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 제1 항원 결합 부위는 CD30와 결합하고 및 상기 제2 항원 결합 부위는 erbB2와 결합한다.
- [0050] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 제1 항원 결합 부위는 CD30와 결합하고 및 상기 제2 항원 결합 부위는 슈도모나스 외독소 (PE)와 결합한다.
- [0051] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 제1 항원 결합 부위는 CD30과 결합하고 상기 제2 항원 결합 부위는 스트렙타비딘과 결합한다.
- [0052] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 중쇄들 중 적어도 하나는 치료적 분체에 부착되어 있다.
- [0053] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 중쇄들 중 적어도 하나는 확인가능한 분체에 부착되어 있다.
- [0054] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 항체는 영장류 항체, 돼지 항체, 쥐 항체, 소 항체, 염소 항체 및 말 항체로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0055] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 숙주 세포는 박테리아 세포를 포함한다.
- [0056] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 숙주 세포는 포유류 세포를 포함한다.
- [0057] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 발현은 박테리아 세포의 봉입체로 나타난다.
- [0058] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 핵산 분자 각각은 상이한 숙주세포에 형질감염된다.
- [0059] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 핵산 분자 각각은 동일한 숙주세포에 형질감염된다.
- [0060] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 박테리아 세포는 그람 음성 박테리아 세포를 포함한다.

[0061] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 방법은 단계 (f) 후에, 상기 항체를 단백질 A/G/L 상에서 정제하는 단계를 더 포함한다.

[0062] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 염증성 장애는 암이다.

[0063] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 염증성 질환 또는 장애는 암이다.

[0064] 별달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술 및/또는 학술적 용어들은 본 발명이 속한 분야에서 통상의 기술자가 공통적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 가진다. 비록 본 명세서에서 설명된 것과 유사한 또는 동일한 방법과 재료들이 본 발명의 구체예의 실제 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 하기 설명되는 것은 예증적인 방법 및/또는 재료들이다. 모순이 있는 경우, 정의를 포함하는 특허 명세서가 수정될 것이다. 또한, 재료, 방법 및 실시예들은 예증적으로만 사용되며, 필수적으로 제한하기 위한 것으로 의도된 것이 아니다.

도면의 간단한 설명

[0065] 본 발명의 특정 구체예가, 첨부 도면을 참조하여 오직 예증적 방식으로 설명된다. 이제 도면을 상세히 참조하여, 도시된 상세점들은 실시예의 방식으로 및 본 발명의 구체예의 예증적 토론을 목적하고 있다는 것이 강조된다. 이와 관련해서, 도면의 설명은 본 발명의 구체예가 어떻게 실행될 수 있는 지에 대하여 당해분야의 숙련자들에게 명백히 나타낸다.

도면에서:

도 1A-B는 이중특이성 항체들을 생성하기 위한 신규 전략의 개략적 구조이다. (A) 노브 인투홀 방식에 의해 생성된 IgG 항체의 개략도, 중쇄는 상이한 것 두 개이지만, 하나의 공통적인 경쇄가 있다. (B) 본 발명의 구체예에 따라 제조한 이중특이성 항체의 개략도. 두 개의 상이한 중쇄가 있고, 각각은 그 동종 경쇄와 쌍을 이룬다. 상기 “노브” 변이는 T366W와 상응하며, 상기 “홀” 변이는 T366S, L368A Y407V 치환과 상응한다. 각각 “노브” 또는 “홀” 중쇄의 CH3 부위에서 시스테인 치환 변이 S354C 및 Y349C는 95 % 이중이합체를 제공한다 (Merchant 등, 1998).

도 2A-H는 E. coli에서 단일- 및 이중특이성 항체들을 발현하기 위한 pHAK-IgH- 및 pHAK-IgL-기반 플라스미드 지도의 개괄적 도면이다: 인간 κ 및 경쇄를 가진 항체들의 발현용 pHAK-IgL, dsFv-유사 사슬내 디설파이드 결합을 포함하는 경쇄 발현용 pHAK-LC-Cys, 인간 $\gamma 1$ 중쇄를 가진 항체들의 발현용 pHAK-IgH, 불변부위에서의 S354C 및 T366W “노브” 변이를 함유하는 중쇄의 발현용 pHAK-HC-knob, 불변 부위에서의 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V “홀” 변이를 함유하는 중쇄 발현용 pHAK-HC-hole, 슈도모나스 외독소 A (PE38)의 절단 형태에 융합된 “홀” 변이를 포함하는 중쇄의 발현용 pHAK-HC-hole-PE38, dsFv-유사 디설파이드 사슬내 결합을 포함하는 중쇄 발현용 pHAK-HC-Cys, 불변 부위에서의 “노브” 변이 및 dsFv-유사 사슬내 디설파이드 결합을 포함하는 중쇄 발현용 pHAK-HC-Cys-knob.

도 3은 중쇄 및 경쇄 정제물을 SDS-PAGE 분석한 사진이다. 발현된 단백질들은 봉입체로 수집되었고, 연속적인 원심분리 단계로 정제하였고, 6M 구아니디늄 염화수소 완충액에 용해하였다. (1) T427 IgL, (2) T427 IgH, (3) T427-IgH-knob, (4) T427-IgH-PE38, (5) T427-IgH-hole-PE38. “노브” 변이는 S354C:T366W와 상응한다. “홀” 변이는 Y349C:T366S:L368A:Y407V와 상응한다.

도 4A-B 는 이중특이성 IgG-유사 단백질의 분석을 제공한다. (A) IgG 중쇄 및 경쇄의 개략적 구조 및 형성될 수 있는 이론적으로 가능한 IgG 분자. 각 변이체들은 분자량에서의 유의한 차이에 따라 쉽게 검출될 수 있다. (B) 단백질 A 정제화 생성물의 SDS-PAGE (10% 아크릴아미드) 분석: 중쇄 상에서 PE38을 나타내는 wt T427 항체 (1), T427 항체(S354C:T366W/Y349C:T366S:L368A:Y407V 변이)의 “노브인투홀” 버전 (2), wt FRP5 항체 (3).

도 5A-B는 단백질 A 정제화 생성물의 SDS-PAGE (10% 아크릴아미드) 분석을 제공한다. (1) T427 “노브-노브” 버전 (IgL + IgH-knob S354C:T366W 변이). (2) T427 항체 (S354C:T366W/Y349C:T366S:L368A:Y407V 변이)의 “노브인투홀” 버전. (3) T427 “홀-홀” 버전 (IgL + IgH-hole-PE38 Y349C:T366S:L368A:Y407V 변이). (4) 중쇄 상에서 PE38를 나타내는 wt T427 항체. (M) 마커.

도 6은 IgG 및 IgG-유사 단백질의 젤 여과 분석을 나타낸다. T427 IgG 항체 (150 kDa)가 Sephadex 200 젤 여과 컬럼으로부터 11.5 분에 용출된다. IgG-유사 T427 이중이합체 (2 IgL + IgH-knob + IgH-hole-PE38), 190 kDa는 10.3 분에 용출된다. 노브-노브 동종이합체 (150 kDa)의 작은 분획물이 11.5 분에 용출된다. 홀-홀 동종이합체 (230 kDa)는 아마도 빈 부피로 용출된다 (6.5 분 (미도시)).

도 7A-C는 단백질 A 정제화 생성물의 SDS-PAGE (7.5% 아크릴아미드) 및 밀도 분석을 나타낸다. (A) T427 IgG wt의 SDS-PAGE 분석 (1), T427-knob-hole-PE38 (2) 및 T427-PE38 (3) 단백질. (B) ImageMaster 1D 스캐닝 레이저 밀도측정법에 의한 SDS-PAGE의 단백질 밴드 밀도 분석. (C) 이중이합체화율의 파이 크립은 밴드 위치에서 픽셀 강도에 따라 측정되었다. T427-knob-hole-PE38 (2)는 2IgL+IgH-knob+IgH-hole-PE38로 구성된다. T427-PE38 (3)는 2IgL+2IgH-PE38로 구성된다. “노브” 변이는 S354C:T366W에 상응한다. “홀” 변이는 Y349C:T366S:L368A:Y407V에 상응한다.

도 8A-B는 IgG 및 IgG-유사 단백질들의 ELISA 분석을 설명한다. FRP5 IgG 및 이중특이성 FRP5-T437-PE38 (T427 중쇄에 융합된 PE38)의 결합 능력. (A) ELISA 플레이트는 erbB2 (FRP5 항체의 항원)로 코팅되어 있고, 항체들은 항-인간 이차 항체로 검출되었다. (B) ELISA 플레이트는 erbB2 (FRP5 항체의 항원)으로 코팅되었고 항체들은 항-PE 이차 항체로 검출되었다 (이중특이성 항체들의 검출).

상기 FRP5-T427-PE38 항체는 IgL-FRP5+IgL-T427+IgH-FRP5-knob+IgH-T427-hole-PE38 단백질로 구성된다. “노브-인투홀” 변이: S354C:T366W/Y349C:T366S:L368A:Y407V.

도 9A-B는 단백질 A 정제화 IgG 및 IgG-유사 단백질의 SDS-PAGE (12% 및 6% 아크릴아미드) 분석을 나타낸다. (1) FRP5 IgG wt. (2) T427 IgG wt. (3) T427 IgG-Cys (IgH-Cys44:Cys222Ala+IgL-Cys104:Cys218del). (4) 이중특이성 T427-FRP5 IgG (IgH-FRP5-hole+IgL-FRP5+IgH-T427-knob-Cys44:Cys222Ala+IgL-T427-Cys104:Cys218del IgG. “Knob” 변이는 S354C:T366W에 상응한다. “홀” 변이는 Y349C:T366S:L368A:Y407V에 상응한다.

도 10은 단백질 A 정제화 IgG 및 IgG-유사 단백질의 SDS-PAGE (10% 아크릴아미드) 분석이다. (1) T427 IgG wt. (2) Anti-Tac IgG wt. (3) T427 IgG-Cys 대조군 A (IgH wt + IgL-Cys104:Cys218del). (4) T427 IgG-Cys 대조군 B (IgH-Cys44:Cys222Ala+IgL wt).

도 11은 αPE (B11)의 중쇄 및 경쇄의 SDS-PAGE 분석이다, T427 및 αSA 항체들은 봉입체로 정제되었고, 6 M 구아니디늄 염화수소에 재현탁되었다. 샘플들은 환원 조건에서 12 % 아크릴아미드 겔상에서 분리하였다.

도 12A-B는 αSA (항-스트렙타비딘) 항체들의 ELISA 분석이다. T427, αSA (단일클론성) 및 T427-αSA (이중특이성) 단백질 A 정제화 항체들을 CD30에 결합하는 능력에 대하여 분석하였다 (A). 이 결합은 염소-항-인간 HRP 접합 항체들을 사용하여 검출하였다. 소혈청 알부민 (BSA)으로의 코팅은 대조군으로 사용하였다 (B).

도 13A-C는 αPE (항-슈도모나스 외독소 38kDa 절편) 항체들의 ELISA 분석이다. T427, αPE B11 클론 (단일클론성) 및 T427-αPE (이중특이성) 단백질 A 정제화 항체들이 avitag-PE38 (A) 및 dsFv-PE38 (B) 항원에 결합하는 능력에 대하여 분석하였다. 이러한 결합은 염소-항-인간 HRP 접합 항체들을 사용하여 검출되었다. 소혈청 알부민 (BSA)으로 코팅한 것을 대조군으로 사용하였다 (C).

도 14는 pDual 벡터 시스템의 개괄적 표시이다. pDual 벡터들은 이중-시스템론성, CMV 프로모터-기반 플라스미드로서, 포유동물 세포에서 IgG들을 발현하기 위한 것이다. 이것들은 pMAZ 벡터에서 출처된 중쇄 및 경쇄 발현 카세트를 조합함으로써 제작되었다 (Mazor Y, J Immunol Methods. 2007 Apr 10;321(1-2):41-59).

도 15A-B는 CaCl2 형질감염된 293 트렉스(Trex) 세포의 배지로 분비된 IgG를 분석한 것을 나타낸다. (A) pDual wt, pDual L(Cys)+H(wt) 또는 pMAZ-IgL + pMAZ-IgH 벡터 시스템으로 형질감염된 세포 배지의 웨스턴 블랏 분석. 상기 항체들은 염소-항-인간 HRP 접합 이차 항체로 검출하였다. 배지에서의 항체 농도는 Erbitux 항체 (B)의 이차 희석액과 비교하여 결정되었다.

도 16은 pDual 단일특이성 및 이중특이성 벡터 또는 벡터들의 조합물로 형질감염된 293 트렉스 세포의 웨스턴 블랏 분석을 나타낸다. 상기 항체들은 염소-항-인간 HRP 접합 항체로 검출하였다.

도 17은 항체 분비 클론들의 도트 블랏 분석 예증적 결과를 나타낸다. 세포 배지를 니트로셀룰로즈 막에 흡수시키고, 항체들을 염소-항-인간 HRP 접합 항체로 검출하였다. 분비 수준은 다른 클론들과 비교하여 결정되었다. 비처리된 세포 배지를 대조군으로 사용하였다.

도 18A-B는 이중특이성 클론들의 결합 활성을 확인한 것을 설명한다. 세포 배지를 erbB2 (18A) 또는 CD30 (18B) 항원과 배양하였다. 결합은 염소-항-인간 HRP 접합 항체로 검출하였다. 표식된 클론들은 양 쪽 항원들과 결합하는 능력을 나타낸다.

도 19A-B HEK 293 T-RExTM 포유동물 세포에서 생성된 IgG를 단백질 A 정제 후 SDS-PAGE 분석한 것을 나타낸다. 상기 단백질들을 비환원 조건에서 10 % 아크릴아미드 겔 상에서 분리하여 150 kDa IgG들을 평가하였고 (A) 및

환원 조건하에서 12 % 아크릴아미드 겔 상에서 분리하여 (B) T427과 FRP5 중쇄 및 경쇄 사이의 최소 차이를 평가하고, 및 이중특이성 T427-FRP5 분자에서 이중 결합을 결정하였다.

도 20A-B는 포유동물 세포에서 생성된 IgG들의 단백질 A 정제물의 ELISA 분석을 설명한다. A5는 4 개 플라스미드, 두개는 단일특이성 T427 항체를 암호화하고 있고, 두 개는 단일특이성 FRP5 항체를 암호화하고 있는 플라스미드로 형질감염된 대조군 세포주이다. 이중특이성 T427-FRP5는 이중특이성 항체를 분비하는, 각 항원 (erbB2 및 CD30)에 일가 결합능을 지닌 클론 D3을 나타낸다. 상기 결합은 염소-항-인간 HRP 접합 이차 항체를 사용하여 검출되었다.

도 21A-B는 포유동물 세포에서 생성된 IgG의 단백질 A 정제물에 대하여 ELISA 분석한 것을 나타낸다. T427 및 FRP5는 이가 결합능을 지닌 단일특이성 항체들을 나타낸다. 이중특이성 T427-FRP5는 각 항원 (erbB2 및 CD30)에 일가 결합능을 지닌 이중특이성 항체-분비 안정한 클론 D3을 나타낸다. Erbitux는 음성대조군으로 사용되었다. 결합은 염소-항-인간 HRP 접합 이차 항체를 사용하여 검출되었다.

도 22는 T427-FRP5 이중특이성 항체 (상기 안정한 클론의 조건화된 배지로부터 단백질 A-정제)를 분비하는 B3 클론의 A431/CD30 및 SKBR3 (erbB2+) 세포에 대한 결합능을 세포-ELISA 분석을 나타내는 그래프이다. 상기 결합은 염소-항-인간 HRP 접합 이차 항체를 사용하여 검출되었다.

도 23은 본 발명의 구체예의 단일특이성 항체를 개괄적으로 표시한 것이다.

도 24는 T427 KIH를 ELISA 분석한 것이다. T427 항체 (2×IgL+IgH-knob+IgH-hole-PE38)의 노브인투홀 (KIH) 버전에 대비한 T427 IgG 및 T427-PE38 (중쇄에 융합된 PE38)의 결합능.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0066] 발명의 구체예의 설명
- [0067] 본 발명은 이의 특정 구체예에서, 이중특이성 항체들, 단일특이성 항체들, 비대칭적 항체들 및 이를 생성하는 방법에 관한 것이다.
- [0068] 본 발명의 적어도 일 관점을 상세히 설명하기 전에, 본 발명은 하기 설명에서 설정된 또는 실시예에서 예증된 상제물에 그 적용이 제한될 필요가 없다는 것이 이해될 것이다. 본 발명은 다른 구체예를 할 수 있거나 다양한 방식으로 실행되거나 수행될 수 있다.
- [0069] 과거에, 실험실 및 초기 임상 연구 둘 다는 이중특이성 항체들 (BsAbs)이 종양세포에, 효과기 (effector) 세포, 핵종, 약물 및 독소를 위시한 세포독성 제제를 목표화시킴으로써 또는 두 개의 관계된 종양 타겟, 즉 성장인자 수용체나 그들의 리간드를 동시에 차단하여 다중 수용체 활성화와 하위 신호 전달 경로를 무력화시킴으로써, 암요법에 상당한 유효한 적용을 할 수 있다는 것을 증명하였다. BsAb의 개발에 주요한 장애물은 하이브리드 하이브리도마 및 화학적 접합 방법과 같은 전통적인 기술에 의해 충분한 질과 양으로 그러한 물질들을 생성하기 어렵다는 것이다. 따라서, 치료제제로서 IgG-유사 BsAb들을 개발하는 것은 재조합 BsAb 작제물 및 생산 효율을 계획할 때 나타나는 발전에 상당히 달려있다고 믿어진다.
- [0070] 항체들 “A” 및 “B”의 중쇄간의 이중이합체화를 확실히 형성하게 하고, 항체 “A”를 항체 “A”에 및 항체 “B”를 항체 “B”에 동종이합체화하는 것을 방지하기 위해, 노브와 홀 (knob and hole) 방식이 미국 특허 제 7,183,076호에 개시된 바와 같이, 제안되었다. 그러나, 상기 노브인투홀 (knobs into holes) 방식은 상기 중쇄들의 이중연합에 대해서만 해법을 제시할 뿐이고, 각 중쇄가 그 동족 경쇄와 올바르게 짝지는 것에 대한 해법을 제공하지 못한다.
- [0071] 본 발명은 이중특이성 항체들을 IgG 형태로 효율적으로 조합하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 상기 노브인투홀 방식을 적용함으로써 상기 두 개 중쇄를 이중이합체화하고, 각 중쇄를 그 동족 경쇄로만 용이하게 짝지도록 하는 것과 조합한 것을 포함한다.
- [0072] 본 발명자들은 하나의 천연 CH1-CL을 결합하는 디설파이드 결합 및 하나의 비천연 VH-VL 결합을 결합하는 dsFv-유사 디설파이드 결합을 사용하여 동일한 항체의 중쇄 및 경쇄를 짝짓는 것을 제시한다 (도 1B에 설명된 바와 같이). 이러한 방식으로, 하나의 항체 분자는 분자적으로 처리되지 않은 채로 남아있는 반면 다른 항체 분자는 wt S-S 결합 대신에, 가변 부위에서 새로운 디설파이드 공유 결합을 달성할 수 있을 것이다. 잘못 짝지어진 경쇄 및 중쇄들은 S-S 안정화 계면을 형성하지 못하며 안정적인 IgG 분자를 생성하지 못하게 될 것이다. 따라서, 이러한 전략은 어떠한 친화성 또는 안정성의 손실없이, 하나의 항체 분자를 dsFv-유사 분자로 전환하는 것을 제

시한다.

- [0073] 본 발명을 실행하는 동안, 본 발명자들은 항-CD30 (T427) 및 항-erbB2 (FRP5) 항체를 조합함으로써 이중특이성 항체를 생성하였다. erbB2 항체에서, 중쇄-경쇄 연합은 중쇄의 C_H1 도메인과 경쇄의 C_L 도메인을 공유결합적으로 연결하는 천연 디설파이드 결합에 의해 촉진되었다. 항-CD30 항체에서, C_H1에서의 시스테인은 알라닌으로 변이되었고, C_L의 C-말단 시스테인을 삭제하여, 천연 H-L 디설파이드 결합을 형성하는 것을 방지하였다. 없어진 디설파이드 결합을 대신하여, 두 개 시스테인, 하나는 중쇄의 가변 도메인에 있고, 다른 하나는 경쇄의 가변 도메인에 있는 시스테인을 디설파이드-안정화된 Fv 절편 (dsFvs)의 법칙에 따라 도입하였다. 그 결과, 상기 항-CD30 항체의 중쇄 및 경쇄들은, 이러한 두 개 시스테인 잔기를 통해 V_H과 V_L 사이에 형성된 디설파이드 결합을 통해 공유결합적으로 연합하였다. 따라서, 본 발명은 이중 관능성 항체의 하나의 팔에서 중쇄 및 그의 동족 경쇄 사이의 신규 디설파이드 다리를 형성하는 것과, 및 정확한 조합을 더 향상시키기 위해, 동일한 중쇄와 그의 동족 경쇄 사이의 천연 발생 디설파이드 다리를 삭제하는 것 둘 다에 관한 것이다.
- [0074] 도 9A-B에 설명된 바와 같이, 이러한 방법을 사용하여, 전장 이중기능성 항체들을 박테리아 세포에서 생성하였다. 항-CD30 항체의 중쇄 및 경쇄들이 전술한 바와 같이 변이되지 않았을 때는 전장 이중기능성 항체들이 생성되지 않았다 (도 10).
- [0075] 또한, 이중특이성 벡터를 사용하여, 본 발명자들은 포유동물에서의 전장 이중기능성 항체들의 생성이 노브인투홀 방식을 적용하고, 각 중쇄를 오직 그의 동족 경쇄에만 짝짓는 것을 결합함으로써 (도 17-22에 설명한 대로), 촉진될 수 있다는 것을 나타냈다.
- [0076] 따라서, 본 발명의 일 관점에 따라서, Fc 부위 및 Fab 부위를 포함하는 항체로서:
- [0077] (i) 상기 Fc 부위는 두 개의 비동일성 중쇄를 포함하고, 이 두 개 비동일성 중쇄 중 하나는 아미노산 변이를 포함하여 두 개 비동일성 중쇄 사이의 상보성을 형성하고, 이럼으로써 비동일성 중쇄들의 이중이합체의 형성 확률을 높이고, 동일성 중쇄들의 동종이합체 형성 확률을 낮추며; 및
- [0078] (ii) 상기 Fab 부위는 상기 Fab 부위의 제1 중쇄와 제1 경쇄 사이의 제1 공유결합 연결, 및 상기 Fab 부위의 제2 중쇄와 제2 경쇄 사이의 제2 공유결합 연결을 포함하고, 상기 제1 중쇄에 대한 상기 제1 공유결합 연결의 위치는 상기 제2 중쇄에 대한 상기 제2 공유결합 연결의 위치와 상이한 항체가 제공된다.
- [0079] 항체는 일련의 역평행 (antiparallel) 베타 스트란드를 면역글로불린-유사 접힘체로 안정화시키는 중앙에 위치한 디설파이드 다리를 특징으로 한다. 항체 중쇄 또는 경쇄는 N-말단 (NH₂) 가변 부위 (V), 및 C-말단 (—COOH) 불변 부위 (C)를 가진다. 상기 중쇄 가변 부위는 V_H로 지칭되고, 경쇄 가변 부위 V_L로 지칭된다. V_H 및 V_L 절편은 함께 “Fv” 로 지칭된다. 가변 부위는 항체의 동족 항원에 결합하는 분자의 일부분이고, 불변 부위는 항체의 이펙터 기능 (예를 들어, 보체 고정, 옵소닌 작용)을 결정한다. 전장 면역글로불린 또는 항체 “경쇄” (일반적으로 약 25 킬로달톤 (Kd), 약 214 아미노산)은 N 말단에서 가변 부위 유전자에 의해 (일반적으로 약 110 아미노산) 및 COOH-말단에서 불변 부위 유전자에 의해 암호화된다. 전장 면역글로불린 또는 항체 “중쇄” (일반적으로 약 50 Kd, 약 446 아미노산)는 유사하게, 가변 부위 유전자 (일반적으로 약 116 아미노산을 암호화) 및 상기 불변 부위 유전자 중 하나 (약 330 아미노산을 암호화)에 의해 암호화되어 있다. 항체 경쇄 또는 중쇄 가변 부위는 소위 상보성 결정 부위 또는 CDR로 지칭되는 세 개의 초가변 부위를 포함하는 데, 이는 4 개의 상대적으로 보존된 구조체 부위 또는 FR 옆에 있다.
- [0080] 본 발명의 이러한 관점의 일 구체예에 따라서 상기 항체는 이중특이성 항체이다.
- [0081] 본 명세서에서 사용하는 바와 같이, 용어 “이중특이성 항체”는 각각 항원의 상이한 에피토프에 결합하는 두 개 항원 결합 부위를 포함하는 항체를 지칭한다. 본 발명의 이러한 관점의 이중특이성 항체들은 공통적인 경쇄도 공통적인 중쇄도 공유하지 않는다.
- [0082] 일 구체예에 따라서, 상기 두 개 항원 결합 부위는 각각 동일한 항원의 상이한 에피토프에 결합한다. 다른 구체예에 따라서, 상기 두 개 항원 결합 부위는 각각 상이한 항원의 상이한 에피토프에 결합한다.
- [0083] 본 발명의 이러한 관점의 다른 구체예에 따라서, 상기 항체는 단일특이성, 비대칭적 항체이다.
- [0084] 본 발명의 이러한 관점의 단일특이성 항체들은 동일한 항원과 결합하는 양 쪽 아암 상에서 동일한 파라토프를 가진다. 그러나, 두 개 동일 중쇄 및 두 개 동일 경쇄들의 대칭적 조합물인 통상적인 단일클론성 항체들과

달리, 본 발명에서 설명된 단일특이성 항체들은 두 개 비동일 중쇄 및 두 개 비동일 경쇄들의 비대칭적 조합물이다. 두 개 중쇄들 사이, 및 두 개 경쇄들 사이의 차이점은 불변 도메인들에, 및 사슬의 이중이합체화를 허용하는 가변도메인의 구조 부위에 있다. 따라서, 가변 도메인들의 CDR 및 파라토프를 포함할 수 있는 지지 가변 도메인 잔기들은 사슬 쌍에서 동일하다 - 참조 도 23.

- [0085] 특정 구체예에서, 상기 단일특이성 항체는 IgG4이다.
- [0086] 바람직하게는, 항체의 항원 결합 부위들 각각의 타겟에 대한 친화도는 동일한 타겟에 대한 상응하는 단일클론성 항체의 하나의 팔과 비교하여 실질적으로 감소되지 않는다. 특정 구체예에 따라서, 상기 친화도는 100 배 이상, 더욱 바람직하게는 50 배 이상, 더욱 바람직하게는 20 배 이상, 더욱 바람직하게는 10 배 이상, 및 더더욱 바람직하게는 5 배 이상 감소되지 않는다.
- [0087] 이중특이성 항체들의 예는 제1 성장 인자 리간드로 지향된 하나의 항원 결합 부위 및 제2 성장 인자 리간드로 지향된 제2 항원 결합 부위; 제1 성장 인자 수용체로 지향된 하나의 항원 결합 부위 및 제2 성장 인자 수용체로 지향된 제2 항원 결합 부위; 제1 사이토카인으로 지향된 하나의 항원 결합 부위 및 제2 사이토카인으로 지향된 제2 항원 결합 부위; 제1 사이토카인 수용체로 지향된 하나의 항원 결합 부위 및 제2 사이토카인 수용체로 지향된 제2 항원 결합 부위; 성장 인자 수용체로 지향된 하나의 항원 결합 부위 및 성장 인자 리간드로 지향된 제2 항원 결합 부위; 사이토카인 수용체로 지향된 하나의 항원 결합 부위 및 사이토카인 리간드로 지향된 제2 항원 결합 부위를 포함한다. 성장인자들, 성장 인자 수용체들, 사이토카인류 및 사이토카인 수용체들의 추가적인 조합 또한 고려된다.
- [0088] 다른 구체예에 따라서, 상기 이중특이성 항체는 혈관 형성의 두 개 경로를 차단하는 데, 하나의 항원 결합 부위가 제1 경로와 연관된 수용체 또는 리간드로 지향하는 것이고, 다른 항원 결합 부위가 제2 경로와 연관된 수용체 또는 리간드로 지향하는 것이다.
- [0089] 특정 구체예에 따라서, 상기 이중특이성 항체는 종양 세포 항원에 대하여 지향된 하나의 항원 결합 부위 및 세포 독성 개시 분자에 대하여 지향된 다른 항원 결합 부위를 포함하며, 이의 예는 항-Fc γ RI/항-CD15, 항-p185HER2/Fc γ RIII (CD16), 항-CD3/항-악성 B-세포 (1D10), 항-CD 3/항-p185HER2, 항-CD3/항-p97, 항-CD3/항-신장 세포암, 항-CD3/항-OVCAR-3, 항-CD3/L-D1 (항-대장암), 항-CD3/항-멜라닌세포 자극 호르몬 유사체, 항-EGF 수용체/항-CD3, 항-CD3/항-CAMA1, 항-CD3/항-CD19, 항-CD3/MoV18, 항-중성 세포 부착 분자 (NCAM)/항-CD3, 항-플레이트 결합 단백질 (FBP)/항-CD3, 항-범 암종 연관 항원 (AMOC-31)/항-CD3가 있다.
- [0090] 종양 항원에 특이적으로 결합하는 하나의 항원 결합 부위 및 독소에 결합하는 하나의 항원 결합 부위를 지니는 이중특이성 항체들은 예를 들어, 항-사포린/항-Id-1, 항-CD22/항-사포린, 항-CD7/항-사포린, 항-CD38/항-사포린, 항-CEA/항-리신 A 사슬, 항-인터페론- α (IFN- α)/항-하이드리도마 이디오타입, 항-CEA/항-빈카 알칼로이드를 포함한다.
- [0091] 고려되는 다른 이중특이성 항체들은 항-CD30/항-알카라인 포스파타제 (미토마이신 포스페이트 전구약물을 미토마이신 알코올로 전환을 촉매하는)과 같이, 전환 효소 활성화 전구약물용에 사용되는 것들을 포함한다.
- [0092] 고려되는 다른 이중특이성 항체들은 항-피브린/항-조직 플라스미노겐 활성인자 (tPA), 항-피브린/항-유로키나제 유형 플라스미노겐 활성인자 (uPA)와 같이, 피브린분해 제제로서 사용될 수 있는 것들을 포함한다.
- [0093] 추가로 고려되는 이중특이성 항체들은 항-저밀도 지단백질 (LDL)/항-Fc 수용체 (예를 들어, Fc γ RI, Fc γ RII 또는 Fc γ RIII)와 같은 세포 표면 수용체에 염역 복합체를 목표화시키는 것들을 포함한다.
- [0094] 추가로 고려되는 이중특이성 항체들은 항-CD3/항-단순성 포진 바이러스 (HSV), 항-T-세포 수용체:CD3 복합체/항-인플루엔자, 항-Fc γ R/항-HIV와 같이 감염성 질환의 치료에 사용되는 것들을 포함한다. 시험관 내 또는 생체 내 종양 검출용 이중특이성 항체들은 항-CEA/항-EOTUBE, 항-CEA/항-DPTA, 항-p185HER2/항-합텐을 포함한다.
- [0095] 이중특이성 항체들은 백신 보조제로서 사용될 수 있다 (참조 Fanger 등, Critical Reviews in Immunology 12(3,4):101-124 (1992)).
- [0096] 이중특이성 항체들은 항-토끼 IgG/항-페리틴, 항-겨자무 페록시다제 (HRP)/항-호르몬, 항-소마토스타틴/항-서브스탄스 P, 항-HRP/항-FITC, 항-CEA/항- β -갈락토시다제와 같이, 진단 도구로 사용될 수 있다.
- [0097] 추가로 고려되는 이중특이성 항체들은 제1 항원 결합 부위가 CD30와 결합하고 및 제2 항원 결합 부위가 erbB2와 결합하는 경우의 것; 제1 항원 결합 부위가 CD30와 결합하고 및 제2 항원 결합 부위가 슈도모나스 외독소 (PE)

와 결합하는 경우의 것; 제1 항원 결합 부위가 CD30와 결합하고 및 제2 항원 결합 부위가 스트렙타비딘과 결합하는 경우의 것을 포함한다.

- [0098] 삼중특이성 항체들의 예는 항-CD3/항-CD4/항-CD37, 항-CD3/항-CD5/항-CD37 및 항-CD3/항-CD8/항-CD37을 포함한다.
- [0099] 본 발명의 항체들의 Fc 부위들은 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 아형, IgA, IgE, IgD 또는 IgM와 같이 임의의 항체로부터 얻을 수 있다.
- [0100] 일 구체예에 따라서, 상기 Fc 부위는 IgG Fc 부위이다.
- [0101] 언급한 바와 같이, 본 발명에서 기술된 항체들의 Fc 부위는 두 개 동일하지 않은 중쇄들 (예를 들어, 가변 도메인들의 서열에서 상이한)을 포함하는 데, 상기 두 개 동일하지 않은 중쇄들 중 적어도 하나는 상기 동일하지 않은 중쇄들의 안정한 이중이합체를 형성하는 확률을 높이고 동일한 중쇄들의 안정한 동중이합체를 형성할 확률을 낮추기 위해, 아미노산 변이를 포함한다.
- [0102] 일 구체예에 따라서, 적어도 하나의 중쇄는 유전적으로 변이되어 계면에 걸쳐서 변형된 전하 극성이 창출된다. 그 결과, 정전기적으로 어울리는 Fc 사슬들 간의 안정한 이중이합체가 촉진되며, 원치않는 Fc 동중이합체 형성이 거슬리는 반발성 전하 상호작용으로 인해 억제된다.
- [0103] 어떤 아미노산들이 개질되고, 및 어떤 아미노산에 개질되어야 하는 것을 결정하는 것이 또한 Gunasekaran K, Pentony M, Shen M, Garrett L, Forte C, Woodward A, Ng SB, Born T, Retter M, Manchulenko K, Sweet H, Foltz IN, Wittekind M, Yan W. Enhancing 항체 Fc 이중이합체 formation through electrostatic steering effects: applications to bispecific molecules and monovalent IgG. J Biol Chem. 2010 Jun 18;285(25):19637-46. Epub 2010 Apr 16에 설명되어 있고, 이 문헌은 참조문헌으로 기재되어 있다.
- [0104] 일 구체예에 따라서, 상기 아미노산 변이 (전하 상보성에 영향을 끼치는)는 두 개 중쇄들 사이의 계면 가장 자리에서 실행되고, 상기 계면의 소수성 중심에서 구조적으로 보존된 묻혀있는 잔기에는 실행치 않는다.
- [0105] 다른 구체예에 따라서, 적어도 하나의 중쇄를 유전적으로 변이시켜, 동일한 중쇄 (예, 동중이합체)와는 달리 동일하지 않은 (비동일성) 중쇄 (예, 이중이합체)에 더 효율적으로 결합하는 3D 구조를 가지는 중쇄를 형성한다. 이중이합체의 형성은 입체적 상보성으로 인해 더 힘을 받고, 동중이합체들의 형성은 입체 장애로 인해 힘을 잃는다.
- [0106] 이러한 구체예에 따라, 하나의 중쇄를 유전적으로 변이시켜 돌기를 만들고, 상기 제2 중쇄를 유전변이시켜 입체적으로 상보적인 공동을 만들어, 상기 돌기가 상기 상보적 공동에 돌출되게 한다
- [0107] “돌기”는 제1 중쇄의 계면에 있는 작은 아미노산 측쇄를 더 큰 측쇄 (예, 타이로신, 아르기닌, 페닐알라닌, 이소류이신, 루이신 또는 트립토판)으로 치환함으로써 제조된다. 상기 돌기와 동일한 또는 유사한 크기의 상보성 “공동”은 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 것 (예, 알라닌, 글리신, 세린, 발린, 또는 트레오닌)으로 치환함으로써 상기 제2중쇄의 계면상에 조건적으로 만들 수 있다.
- [0108] 상기 돌기 또는 공동은 합성 수단, 예를 들어, 재조합 기술, 시험관 내 펩타이드 합성, 전술한 비천연 발생 아미노산 잔기를 도입하는 그러한 기술에 의해, 펩타이드의 효소적 또는 화학적 결합에 의해, 또는 이들 기술의 특정 조합에 의해 제1 또는 제2 중쇄의 계면으로 “도입”될 수 있다. 따라서, “도입”되는 상기 돌기, 또는 공동은 “비천연적으로 발생” 또는 “비천연적”이며, 이는 자연적으로 또는 원래 폴리펩타이드에는 존재하지 않는 것을 의미한다 (예, 인간화된 단일클론성 항체).
- [0109] 바람직하게는, 상기 돌기를 형성하기 위한 도입 아미노산 잔기는 상대적으로 적은 수의 “회전이성질체 (rotamer)”를 가진다 (예, 약3 6). “회전이성질체”는 아미노산 측쇄의 에너지적으로 선호되는 형태이다. 다양한 아미노산 잔기의 회전이성질체의 수는 Ponders 및 Richards, J. Mol. Biol. 193:775 791 (1987)에서 검토될 수 있다.
- [0110] 돌기 및/또는 공동을 형성하기 위한 원래 잔기를 선택하는 제1단계에 대하여, 상기 항체들의 3차원 구조는 X-선 결정화법 또는 NMR와 같이 당해분야에 공지된 기술을 사용하여 얻는다. 3차원 구조에 기반하여, 당해 분야의 숙련자는 계면 잔기를 확인할 수 있을 것이다.
- [0111] 바람직한 계면은 면역글로불린 불변 도메인의 CH3 도메인이다. 치환될 잔기로 “묻혀있는” 잔기를 선택하는 것이 바람직하다. IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM의 CH3 도메인의 계면 잔기는 확인되었고 (참고, 예를 들어,

PCT/US96/01598, 전체가 참조됨), 도입될 잔기와 치환되기에 최적인 것들을 포함한다; 다양한 IgG 아형 및 “묻혀있는” 잔기들의 계면인 것으로서, 바람직한 C_H3 도메인은 인간 IgG1와 같은 IgG 항체로부터 유도된다.

- [0112] 인간 IgG1의 C_H3/C_H3 계면은 각 표면으로부터 1090개 ANG2 를 매립하고 있는 네 개 역평행 β-스트랜드 상에 위치한 각 도메인 상에 16 개 잔기를 포함한다. 두 개 중앙 역평행 β-스트랜드 상에 위치한 잔기가 바람직한 변이 목표이다. 목적은 창출되는 돌기들이 파트너 C_H3 도메인에서 상보적인 공동에 의해서라기 보다는, 주위 용매로 돌출됨으로써 수용되는 위험을 최소화하기 위한 것이다.
- [0113] 상기 중쇄 상의 특정 위치 선택 방법은 미국 특허 제7,183,076호에 기술되어 있고, 이는 참조함으로써 본 발명에 기입된다.
- [0114] 특정 구체예에 따라서, 상기 제1 중쇄는 T366W 변이 (예, 트레오닌을 트립토판으로)를 포함하고; 및 상기 제2 중쇄는 T366S, L368A, Y407V 변이 (예, 트레오닌을 세린으로; 루이신을 알라닌으로; 및 타이로신을 발린으로)를 포함한다.
- [0115] 일 구체예에 따라서, 상기 아미노산 변이 (구조적 상보성에 영향을 끼치는)가 상기 계면의 소수성 중심에 있는 구조적으로 보존된 묻혀있는 잔기에서 실행되나, 두 개 중쇄 사이의 계면 가장자리에서는 수행되지 않는다.
- [0116] 중쇄 상에서 잔기 치환 효과는 InsightTM 프로그램 (Biosym Technologies)과 같은 분자 그래픽 모델링 프로그램을 사용하여 연구될 수 있다.
- [0117] 일단 바람직한 원래/도입 잔기가 분자 모델링에 의해 확인되면, 상기 아미노산 치환은 당해분야에 공지된 기술을 사용하여 중쇄로 도입될 수 있다.
- [0118] 올리고뉴클레오타이드-매개 돌연변이화는 제1 또는 제2 중쇄를 암호화하는 DNA의 치환 변이체를 제조하는 바람직한 방법이다. 이러한 기술은 Adelman 등, DNA, 2:183 (1983)에 기술된 바와 같이 당해분야에 공지되어 있다. 상세하게, 제1 또는 제2 폴리펩타이드-암호화 DNA는 원하는 변이를 암호화하는 올리고뉴클레오타이드를 DNA 주형에 하이브리드화 시킴으로써 변경되며, 여기서 상기 주형은 이중다합체의 미변경 또는 천연 DNA 서열을 함유하는 플라스미드 또는 박테리오파지의 단일본쇄 형태이다. 하이브리드화 후, DNA 폴리머라제를 사용하여 주형의 전체적인 제2 상보 본쇄를 합성하고 이는 따라서, 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 병합하게 되며, 이중다합체 DNA에서 선택된 변경을 암호화하게 될 것이다.
- [0119] 카세트 돌연변이화는 Wells 등 Gene 34:315 (1985)에 설명된 바와 같이, 목표 DNA 부위를, 상보 올리고뉴클레오타이드와 어닐링 함으로써 생성된 합성 변이 절편과 치환함으로써 수행될 수 있다. PCR 돌연변이화 또한 제1 또는 제2 폴리펩타이드 DNA의 변이체를 만드는 데 적합하다. 하기 논의가 DNA를 참조하고 있지만, 상기 기술은 또한 RNA에 적용될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 상기 PCR 기술은 일반적으로 하기 과정을 참조한다 (참조 Erlich, Science, 252:1643 1650 (1991), R. Higuchi에 의한 챕터, p. 61 70).
- [0120] 두 개 중쇄 사이에 상호작용의 특이성을 더 개선하도록 추가 개질이 또한 고려된다. 따라서, 본 발명은 두 개 중쇄 사이에 공유결합 연결을 포함한다 (예, CH3 도메인 상에서).
- [0121] 본 발명에 의해 고려되는 공유결합 연결의 예는 아미드 연결 및 디설파이드 연결을 포함한다.
- [0122] 따라서, 예를 들어, 본 발명은 자유 티올의 도입을 고려하며, 이는 항체의 두 개 중쇄 사이의 분자간 디설파이드 결합을 형성한다. 자유 티올은 중쇄의 자연 발생 잔기를, 예를 들어, 시스테인과, 중쇄 사이에 디설파이드 결합을 형성하도록 하는 위치에서 치환함으로써 상기 중쇄들 중 하나의 계면 상으로 도입될 수 있다.
- [0123] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 “자유 티올-함유 화합물”은 본 발명의 폴리펩타이드 계면의 아미노산에 혼입 또는 반응할 수 있수 있어서, 상기 화합물의 자유 티올 분체가 본 발명의 추가의 폴리펩타이드에서 자유 티올과 상호작용하도록 위치하여 디설파이드 결합을 형성하도록 하는 그러한 화합물을 지칭한다. 바람직한 자유 티올-함유 화합물을 시스테인이다.
- [0124] 특정 구체예에 따라서, 상기 제1 중쇄는 S354C 변이를 (즉 세린에서 시스테인으로); 및 상기 제2 중쇄는 Y349C 변이 (타이로신에서 시스테인으로)를 포함한다.
- [0125] 본 발명에서 기술된 항체들의 적어도 하나의 경쇄는 그들 중쇄에서 개질이 있는 것은 물론, 제1 중쇄와 제1 경쇄 사이에 제1 공유결합 연결, 및 제2 중쇄와 제2 경쇄 사이에 제2 공유결합 연결이 있고, 제1 중쇄에 대한 제1

공유결합 연결의 위치는 제2 중쇄에 대한 제2 공유결합 연결의 위치와 상이하도록 변경된다.

- [0126] 제1 및 제2 공유결합 연결의 위치는 중쇄와 이의 동중 경쇄와의 짝지음이 촉진되지만 상기 항체의 특이성과 안정성이, 그들로부터 제조되는 개별 항체들과 비교하여, 20 % 이상, 바람직하게는 10 % 이상, 또는 더더욱 바람직하게는 5 % 이상 감소되지 않도록 선택된다.
- [0127] 다른 구체예에 따라서, 제1 중쇄와 이의 동중 경쇄간의 공유결합 연결은 C_H1 와 C_L 부위 간에, 및 제2 중쇄와 이의 동중 경쇄 간의 공유결합 연결은 V_H 와 V_L 부위 사이에 위치한다.
- [0128] 본 발명에 의해 고려되는 공유결합 연결의 예는 디설파이드 연결, 및 비천연 아미노산을 위시한 부위-특이적으로 삽입한 아미노산 잔기 간에 발생한 공유결합의 추가적인 형태를 포함한다 (참조 Wu, X., Schultz, P.G. “Synthesis at the Interface of Chemistry and Biology.” J. Am. Chem. Soc., 131(35):12497-515, 2009; Hutchins BM, Kazane SA, Staflin K, Forsyth JS, Felding-Habermann B, Schultz PG, Smider WV. Site-specific coupling and sterically controlled formation of multimeric antiobdy fab fragments with unnatural amino acids J Mol Biol. 2011 Mar 4;406(4):595-603. Epub 2011 Jan 13; Liu CC, Schultz PG. Adding new chemistries to the genetic code. Annu Rev Biochem. 2010;79:413-44. Review, 이들 모두는 참조함으로써 기입된다).
- [0129] 따라서, 본 발명은 상기 중쇄들 중 적어도 하나 및 이의 동중 경쇄를 변이시켜 두 개 분자를 연결하는 적어도 하나의 자연 발생 (즉 천연) 디설파이드 결합이 더 이상 발생하지 않도록 하는 것을 고려한다. 일반적으로, 이것은 전술한 위치에서 시스테인을 삭제 (또는 치환)함으로써 실행된다.
- [0130] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 용어, “천연 디설파이드 결합”은 중쇄를 자연 발생 생식계열 항체 유전자에 의해 암호화되는 그의 동중 경쇄 (전형적으로 경쇄의 불변 부위와, 중쇄의 C_H1 부위 사이에서)와 연결하는 사슬 간 디설파이드 결합을 지칭한다.
- [0131] 시스테인의 치환은 전형적으로 그 아미노산을 크기 및 전하가 유사한 것 (예, 보존적 아미노산, 시스테인에서 알라닌으로와 같이)과 치환함으로써 실행된다.
- [0132] 본 발명은 상기 제1 공유결합 연결이 자연발생 디설파이드 결합이고 및 상기 제2 공유결합 연결이 비-자연발생 공유결합이며, (예, 조작된 디설파이드 결합), 여기서, 적어도 하나의 시스테인 아미노산 잔기는 상기 사슬에 삽입된 것 - 즉, 조작된 (engineered) 시스테인인 것임을 기획한다.
- [0133] 용어, “조작된 시스테인”은 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 시스테인이 천연 생식계열 항체 서열에서는 발생하지 않는 위치에서 항체 절편 서열로 도입된 시스테인을 지칭한다.
- [0134] 대안적으로, 상기 제1 및 제2 공유결합 연결 둘 다는 비-자연발생일 수 있고, 상기 시스테인 (개질되지 않은 항체에서, 아미노산 잔기로 작용하여 디설파이드 결합을 형성하는)은 아미노산 잔기로 작용하여 공유결합을 형성할 수 없는 다른 아미노산으로 치환될 수 있다.
- [0135] 표적 항체에 대한 정보는 디설파이드 결합의 적절한 위치시킴을 나타내기 위해 필요하다. 관심의 가변부위의 아미노산 서열을, 참조하여 본 명세서에 기입되는 Kabat 및 Wu에 의해 공지된 문헌 [Sequences of Proteins of Immunological Interest,” E. Kabat, 등, U.S. Government Printing Office, NIH Publication No. 91-3242 (1991)]에 있는 유사한 서열들과 정렬시킴으로써 비교하여, 어떤 서열이 변이되어 시스테인이 각 중쇄 및 경쇄 가변 부위의 적절한 위치에서 암호화되어 원하는 항체의 구조적 부위에 디설파이드 결합을 제공할 수 있을 것인가를 결정한다.
- [0136] 서열들을 정렬한 후, Kabat 및 Wu에 의해 사용되는 번호매김 시스템에서 하기 위치와 정렬되는 관심의 서열에서의 아미노산 위치를 확인한다: 중쇄 가변 부위의 위치 43, 44, 45, 46과 47 (그룹 1), 및 위치 103, 104, 105와 106 (그룹 2); 및 경쇄 가변 부위의 위치 42, 43, 44, 45와 46 (그룹 3) 및 위치 98, 99, 100과 101 (그룹 4). 특정의 경우, 이러한 위치들의 일부가 빠질 수 있고, 이는 상기 정렬에서 간격(gap)을 표시한다.
- [0137] 다음, 이러한 확인된 위치의 두 곳에서 상기 아미노산들을 암호화하는 핵산 서열들을 변화시켜 이러한 두 개 아미노산을 시스테인 잔기로 변이시킨다. 선택될 아미노산들의 고려되는 쌍은 다음과 같다: V_H44-V_L100 , V_H105-V_L43 , V_H105-V_L42 , V_H44-V_L101 , V_H106-V_L43 , V_H104-V_L43 , V_H44-V_L99 , V_H45-V_L98 , V_H46-V_L98 , V_H103-V_L43 , V_H103-V_L44 , V_H103-V_L45 .

- [0138] 가장 바람직하게는, 하기 위치에서 시스테인을 치환하는 것이다: V_H44-V_L100 ; 또는 V_H105-V_L43 . (표시 V_H44-V_L100 은, 예를 들어, 위치 44에서 시스테인을 가지는 V_H 를 가지는, 및 V_L 의 위치 100에서 시스테인을 가지는 폴리펩타이드를 지칭한다; 상기 위치는 Kabat 및 Wu에 의해 제시된 번호매김에 따른 것이다.)
- [0139] 참조 사항으로, Kabat 및 Wu에 따른 위치의 정렬시, 위치의 번호매김은 주어진 항체에서 정의된 보존된 잔기를 참조하며, 실제 연속적으로 번호매겨진 아미노산 위치를 지칭하지 않는다. 예를 들어, 하기 실시예에서 설명되는 바와 같이, ds(Fv)B3를 생성하는 데 사용되는 CysL100 (Kabat 및 Wu의)은 B3(VL)의 위치 105와 실제적으로 상응한다.
- [0140] 일 구체예에 따라서, 어떤 아미노산이 변이될 것인가를 선택하는 것은 참조함으로써 기입된, 미국특허 제 5,747,654호에 설정된 법칙에 따라 실행될 수 있다. 시스테인 잔기에 대한 변이 부위는 하기 예증되는 바와 같이, 관심의 실제 항체나 모델 항체를 검토함으로써 확인될 수 있다. 항체와 같은 단백질의 모델을 창출하는 컴퓨터 프로그램은 일반적으로 이용가능하고 당해분야 숙련자에게 공지되어 있다 (참조 Kabat 및 Wu; Loew, 등, Int. J. Quant. Chem., Quant. Biol. Symp., 15:55-66 (1988); Bruccoleri, 등, Nature, 335:564-568 (1988); Chothia, 등, Science, 233:755-758 (1986), 이들 모두는 참조함으로써 기입된다. 상업적 이용가능한 컴퓨터 프로그램을 사용하여 이러한 모델을 컴퓨터 모니터 상에 표시할 수 있고, 원자 사이의 거리를 계산하고, 및 상이한 아미노산 상호작용의 가능성을 유추할 수 있다 (참조, Ferrin, 등, J. Mol. Graphics, 6:13-27 (1988), 참조함으로써 본 발명에 기입된다). 예를 들어, 컴퓨터 모델은 결합에 접근가능하고 관계있는 하전된 아미노산을 예측할 수 있고, 그 다음은 형태적으로 제한된 유기 분자들이 합성될 수 있다. 참조, 예를 들어, Saragovi, 등, Science, 253:792 (1991), 참조로써 본 발명에 기입됨. 다른 경우, 상기 항체의 실험적으로 결정된 실제 구조가 이용될 수 있다.
- [0141] 일 구체예에 따라서, 한 쌍의 적당한 아미노산 잔기는 (1) 8 Å보다 작거나 동일한, 바람직하게는 6.5 Å보다 작거나 동일한 두 개 잔기 사이의 C α -C α 거리를 가지고 (Brookhaven Protein Data Bank로부터 출처된 것과 같은 이용가능한 항체들의 결정 구조로부터 결정된) 및 (2) CDR 부위로부터 가능한 멀리 떨어져 있어야 한다. 일단 확인되면, 이들은 시스테인과 치환될 수 있다.
- [0142] 목표 위치에서 시스테인을 암호화하는 유전자를 개질하는 것은 올리고뉴클레오타이드-지정 돌연변이화 (전술한 바와 같이), 부위 지정 돌연변이화 (참조 Gillman 및 Smith, Gene, 8:81-97 (1979) 및 Roberts, S., 등, Nature, 328:731-734 (1987), 둘 다는 참조함으로써 본 발명에 기입된다)과 같은 공지된 기술에 의해, 참조함으로써 기입된, Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492 (1985)에서 설명된 방법에 의해, 총 유전자 합성에 의해 (Hughes, R.A. 등, Methods in Enzymology, Volume 498 p. 277-309 (2011)) 또는 당해분야에 공지된 임의의 다른 수단에 의해 용이히 수행될 수 있다.
- [0143] 본 발명의 일정 구체예의 항체들은 인간, 돼지, 쥐, 소, 염소, 말, 개, 고양이, 양 등을 포함하는 임의의 포유동물 기원일 수 있다. 상기 항체는 이종유래 항체일 수 있다.
- [0144] 사용되는 바와 같이, “이종유래 항체”는 항체를 발현하는 식물과 같이 형질전환 (transgenic) 숙주와 관련하여 정의된다.
- [0145] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 항체는 분리된 온전한 항체이다 (예, 상이한 항원성 특이성을 가지는 세포성 물질 및/또는 다른 화학물질이 실질적으로 없는 항체).
- [0146] 사용되는 바와 같이, “재조합 항체”는 (a) 면역글로불린 유전자 (e.g., 인간 면역글로불린 유전자)에 형질전환된 동물 (예, 마우스)로부터 분리된 항체들, 또는 이들로부터 제조된 하이브리도마; (b) 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주 세포로부터 분리된 항체들; (c) 재조합 항체 라이브러리로부터 분리된 항체들; 및 (d) 면역글로불린 유전자 서열을 다른 DNA 서열로 스폴라이싱하는 것을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 창출 또는 분리된 항체들과 같은, 임의의 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 창출, 또는 분리된 온전한 항체들을 지칭한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 면역글로불린은 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유도된 가변 및 불변 부위를 가질 수 있다. 다른 구체예에서, 그러한 재조합 인간 항체들은 시험관 내 돌연변이 처리할 수 있고, 따라서 상기 재조합 항체들의 VH 및 VL 부위의 아미노산 서열들은 인간 생식계열 V_H 및 V_L 서열로부터 유도되고 및 이와 관련되지만, 생체 내에서 인간 항체 생식계열 자원 내에 천연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열을 포함한다.
- [0147] 항체들의 하기 예증적 구체예는 본 발명의 범위 내에 포함된다.

- [0148] 사용되는 바, “인간 항체”는 예를 들어, Kabat 등에 의해 설명되는 바와 같이, 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 구조 및 CDR 부위가 유도되는 가변 부위를 가지는 온전한 항체를 지칭한다 (참조 Kabat 1991, Sequences of proteins of immunological Interest, 5th Ed. NIH Publication No. 91-3242). 인간 항체의 불변 부위는 또한 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 설명된다. 상기 인간 항체들은 인간 생식계열 면역글로불린 서열에 의해 암호화 되지 않은 아미노산 서열들을 포함할 수 있다 (참조, 시험관 내 무작위 또는 부위 지정 돌연변이화에 의해 유도된 돌연변이, 또는 생체내 체세포 돌연변이). 그러나, 용어 “인간 항체”는, 사용되는 바와 같이, 마우스와 같이, 다른 포유동물 종의 생식계열로부터 유도된 CDR 서열이 인간 구조 서열에 이식된 항체들을 포함하는 것을 의도하지 않는다.
- [0149] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, “키메라 항체”는 가변 부위가 제1 종으로부터 유도되고, 불변 부위가 제2 종으로부터 유도된 온전한 항체를 지칭한다. 키메라 면역글로불린은 상이한 종에 속해있는 면역글로불린 유전자 세그먼트들로부터 유전 조작함으로써 만들 수 있다 (예, 인간 유래 불변 도메인을 가진 마우스 항체로부터 유도된 V_H 및 V_L 도메인).
- [0150] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, “인간화 면역글로불린” 비-인간 (예, 쥐) 항체에서 나온 최소 마우스 부분이 인간 항체로 이식된 온전한 항체를 지칭한다; 일반적으로 인간화 항체들 5-10 % 마우스 및 90-95 % 인간 구성이다.
- [0151] 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 하나의, 및 전형적으로는 두 개 가변 도메인들의 실질적으로 모든 것을 포함하는 데, 여기서, CDR 부위의 전체, 또는 실질적으로 전체는 비-인간 면역글로불린의 것과 상응하며, FR 부위의 전체 또는 실질적인 전체는 인간 면역글로불린 컨센서스 서열의 것과 상응한다. 인간화 항체는 면역글로불린 불변 부위 (Fc)의 적어도 일부분, 전형적으로는 인간 면역글로불린의 일부분을 또한 포함할 것이다 [Jones 등, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann 등, Nature, 332:323-329 (1988); 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)].
- [0152] 비-인간 항체들을 인간화하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비인간 원천으로부터 거기에 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 가진다. 이러한 비-인간 아미노산 잔기는 때로는 도입잔기로 지칭되며, 이는 일반적으로 도입 가변 도메인으로부터 취한 것이다. 인간화는 기본적으로 Winter와 그 동료의 방법에 따라 [Jones 등, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann 등, Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen 등, Science, 239:1534-1536 (1988)] 설치류 CDR류 또는 CDR 서열을 인간 항체의 상응하는 서열 대신 치환함으로써 수행된다. 따라서, 그러한 인간화 항체들은 키메라 항체들이고 (미국 특허 제 4,816,567호), 여기서, 온전한 인간 가변 도메인이 비-인간 종으로부터 유래된 상응하는 서열로 치환되었다. 실제, 인간화 항체들은 특정 CDR 잔기 및 십중팔구는 특정 FR 잔기들이 설치류 항체들에서의 유사 부위에서 나온 잔기들로 치환된 인간 항체들이다.
- [0153] 인간 항체들은 또한 파지 디스플레이 라이브러리를 위시한, 당해분야에 공지된 다양한 기술을 사용하여 생성될 수 있다 [Hoogenboom 및 Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks 등, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]. Cole 등 및 Boerner 등의 방법들 또한 인간 단일항체 항체들의 제조에 이용가능하다 (Cole 등, Monoclonal 항체들 및 Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) 및 Boerner 등, J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]. 유사하게, 인간 항체들은, 형질전환 동물, 예를 들어, 내재적 면역글로불린 유전자가 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 마우스로 인간 면역글로불린 부위를 도입함으로써 만들어질 수 있다. 면역시, 인간 항체 생성이 관찰되며, 이는 유전자 재배치, 조립, 및 항체 레퍼토리를 위시한 모든 면에서 인간에서 볼 수 있는 것과 근사하게 닮았다. 이러한 방법은, 예를 들어, 미국 특허 제5,545,807호; 5,545,806호; 5,569,825호; 5,625,126호; 5,633,425호; 5,661,016호, 및 하기 과학 문헌에 기술되어 있다: Marks 등, Bio/Technology 10,: 779-783 (1992); Lonberg 등, Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368 812-13 (1994); Fishwild 등, Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996); 및 Lonberg 및 Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13, 65-93 (1995).
- [0154] 본 발명의 항체들은 검출성 또는 치료적 실체와 같은 기능적 분체에 접합될 수 있다.
- [0155] 다양한 유형의 검출성이나 리포터 실체가 본 발명의 항체에 접합될 수 있다. 이러한 것은, 방사성 동위원소 (¹²⁵요오드와 같은), 인광성 화합물, 화학발광성 화합물, 형광성 화합물 (형광단), 효소, 형광 폴리킵타이드, 친화성 태그, 및 양전자 방출 단층촬영술 (PET) 또는 자기공명 이미징 (MRI)에 의해 검출될 수 있는 분자 (조영제)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

- [0156] 적절한 형광단의 예는, 피코에리트린 (PE), 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC), Cy-크롬, 로다민, 녹색 형광 단백질 (GFP), 청색 형광 단백질 (BFP), 텍사스 레드, PE-Cy5, 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 형광 단 선택 및 다양한 유형의 분자에 형광단을 연결하는 방법과 관련한 추가의 안내는, Richard P. Haugland, “Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes 및 Research Chemicals 1992?1994”, 5th ed., Molecular Probes, Inc. (1994); 미국 특허 6,037,137, Oncoimmunin Inc.; Hermanson, “Bioconjugate Techniques”, Academic Press New York, N.Y. (1995); Kay M. 등, 1995. Biochemistry 34:293; Stubbs 등, 1996. Biochemistry 35:937; Gakamsky D. 등, “Evaluating Receptor Stoichiometry by Fluorescence Resonance Energy Transfer,” in “Receptors: A Practical Approach,” 2nd ed., Stanford C. 및 Horton R. (eds.), Oxford University Press, UK. (2001); 미국 특허 번호 제 6,350,466, Targesome, Inc.]를 참조하라. 형광 검출성 분체에 접합될 때, 항체를 검출하는 데 사용될 수 있는 형광 검출 방법은 예를 들어, 형광 활성화 유세포 분석법 (FACS), 면역형광 공초점 현미경술, 형광 인-사이추 하이브리드화 (FISH) 및 형광 공명 에너지 전달법 (FRET)을 포함한다.
- [0157] 다양한 유형의 효소가 본 발명의 항체에 부착될 수 있고 [예, 겨자무 페록시다제 (HRP), 베타-갈락토시다제, 및 알카라인 포스파타제 (AP)], 효소 접합된 항체들의 검출은 ELISA (예, 용액에서), 효소-연계 면역조직학 분석법 (예, 고정된 조직에서), 효소-연계 화학발광 분석법 (예, 전기영동적으로 분리된 단백질 혼합물에서) 또는 본 분야에서 공지된 다른 방법 [참조, 예, Khatkhatay MI. 및 Desai M., 1999. J Immunoassay 20:151-83; Wisdom GB., 1994. Methods Mol Biol. 32:433-40; Ishikawa E. 등, 1983. J Immunoassay 4:209-327; Oellerich M., 1980. J Clin Chem Clin Biochem. 18:197-208; Schuurs AH. 및 van Weemen BK., 1980. J Immunoassay 1:229-49)을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0158] 친화성 태그 (또는 결합쌍의 일원)는 상응하는 항체에 의해 확인될 수 있는 항원 [예, 항-DIG 항체에 의해 확인되는 디곡시제닌 (DIG)] 또는 태그에 대하여 높은 친화도를 가지는 분자 [예, 스트렙타비딘 및 비오틴]일 수 있다. 친화성 태그와 결합하는 항체 또는 분자는 전술한 바와 같은 효소에 형광적으로 표지 또는 접합된다.
- [0159] 당해분야에서 실행되는, 다양한 방법을 사용하여 스트렙타비딘 또는 비오틴 분자를 본 발명의 항체에 부착할 수 있다. 예를 들어, 비오틴 분자를, 하기 실시예 및 Denkberg, G. 등, 2000. Eur. J. Immunol. 30:3522-3532에서 설명되는 바와 같이, 비오틴 단백질 리가제 (예, BirA)의 인식 서열을 통해, 본 발명의 분자에 부착할 수 있다. 대안적으로, 스트렙타비딘 분자는 단일 사슬 Fv와 같은 항체 절편에, Cloutier SM. 등, 2000. Molecular Immunology 37:1067-1077; Dubel S. 등, 1995. J Immunol Methods 178:201; Huston JS. 등, 1991. Methods in Enzymology 203:46; Kipriyanov SM. 등, 1995. Human antibodies Hybridomas 6:93; Kipriyanov SM. 등, 1996. Protein Engineering 9:203; Pearce LA. 등, 1997. Biochem Molec Biol Intl 42:1179-1188)에서 설명한 바와 같이, 부착될 수 있다.
- [0160] 스트렙타비딘에 접합된, 형광단과 같은 기능성 실체는 기본적으로 면역형광 유세포분석 시약의 모든 주요 공급자 (예, Pharmingen 또는 Becton-Dickinson)으로부터 상업적으로 이용가능하다.
- [0161] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 비오틴 접합 항체들은 스트렙타비딘 분자와 결합되어 다가 조성물 (예, 항체의 이량체 또는 사량체 유형)을 형성한다.
- [0162] 표 1은 본 발명의 항체에 접합될 수 있는 확인가능한 실체의 비제한적 예를 제공한다.

표 1

[0163]

| | | |
|-------------|---|--|
| 녹색 형광 단백질 | AAL33912 | AF435427 |
| 알카라인 포스파타제 | AAK73766 | AY042185 |
| 페록시다제 | CAA00083 | A00740 |
| 히스티딘 태그 | GenBank 수탁번호. AAK09208의 아미노산 264-269 | |
| Myc tag | | GenBank 수탁번호. AF329457의 뉴클레오타이드 817-849 |
| 비오틴 라이가제 태그 | LHHILDAQKMVWNHR/ | |
| 오렌지 형광 단백질 | AAL33917 | AF435432 |
| 베타 갈락토시다제 | ACH42114 | EU626139 |
| 스트렙타비딘 | AAM49066 | AF283893 |

[0164] 전술한 바와 같이, 상기 항체는 치료적 실체에 접합될 수 있다. 치료적 실체는, 예를 들어, 세포독성 실체, 독성 실체, 사이토카인 실체, 및 본 발명의 항체들에 상이한 특이성을 포함하는 제2 항체 실체일 수 있다.

[0165] 본 발명의 항체에 접합될 수 있는 치료적 실체의 비제한적 예는 하기, 표 2에 나타나 있다.

표 2

| | | | | |
|------------------|-------------|---------|-------------|---------|
| [0166] 슈도모나스 외독소 | ABU63124 | 서열번호:42 | EU090068 | 서열번호:51 |
| 디프테리아 독소 | AAV70486 | 서열번호:43 | AY820132.1 | 서열번호:52 |
| 인터루킨 2 | CAA00227 | 서열번호:44 | A02159 | 서열번호:53 |
| CD3 | P07766 | 서열번호:45 | X03884 | 서열번호:54 |
| CD16 | NP_000560.5 | 서열번호:46 | NM_000569.6 | 서열번호:55 |
| 인터루킨 4 | NP_000580.1 | 서열번호:47 | NM_000589.2 | 서열번호:56 |
| HLA-A2 | P01892 | 서열번호:48 | K02883 | 서열번호:57 |
| 인터루킨 10 | P22301 | 서열번호:49 | M57627 | 서열번호:58 |
| 리신 독소 | EEF27734 | 서열번호:50 | EQ975183 | 서열번호:59 |

[0167] 기능성 실체는 N- 또는 C-말단에서 V_H 또는 V_L 서열에 접합되거나, 적합한 위치에서 다른 단백질 서열 내로 삽입될 수 있다. 예를 들어, 슈도모나스 외독소 (PE) 유도 융합 단백질을 경우, V_H 또는 V_L 는 상기 독소의 N-말단에 연결되거나 PE의 도메인 III에 삽입되어야 한다. 디프테리아 독소-유래 항체들의 경우, V_H 또는 V_L 는 바람직하게는 상기 독소의 C-말단에 연결되어 있다.

[0168] 그러한 융합체들은 화학적 접합(즉, 재조합 DNA 기술에 의해서가 아닌)을 사용하여 실행될 수도 있음이 이해될 것이다.

[0169] 본 발명에서 적용하는 V_H 및 V_L 서열은 당해분야에 공지된 다양한 기술 중 임의의 하나에 의해 생성된 항체들로부터 수득할 수 있다.

[0170] 다중클론성 및 단일클론성 항체들을 생성하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다 (참조, 예를 들어, Harlow 및 Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988, 참조함으로써 기입됨).

[0171] 일반적으로, 항체들은 비-인간 동물, 바람직하게는 마우스를 원하는 항원 또는 면역원을 포함하는 면역원으로 면역화시킴으로써 제공된다. 대안적으로, 항체들은 예를 들어, Ward 등 (Nature 341 (1989) 544)에서 개시된 바와 같이, 면역글로불린들의 조합적 라이브러리를 선택함으로써 제공될 수 있다. 따라서, 면역글로불린 항체가 박테리아 숙주에서 최종적으로 발현되는 한, 임의의 항체 제조 방법이 본 교시에 따라 포함된다.

[0172] 비-인간 포유동물을 항원으로 면역화시키는 단계는 아우스에서 항체 생산을 자극하는, 당 분야에 공지된 임의의 방식으로 수행될 수 있다 (참조, 예를 들어, E. Harlow 및 D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988)). 바람직한 구체예에서, 상기 비-인간 동물은 설치류 (예, 마우스, 래트 등), 소, 돼지, 말, 토끼, 염소, 양 등과 같은 포유동물이다. 언급한 바와 같이, 상기 비-인간 포유동물을 유전적으로 변형 또는 조작하여 XenomouseTM (Abgenix) 또는 HuMAb-MouseTM (Medarex)와 같은 “인간” 항체를 생산할 수 있다. 일반적으로, 면역원을, 완전 프로인트 보조제와 같은 보조제를 조건적으로 가지는 완충액에 현탁 또는 용해한다. 면역원의 양, 완충액의 유형, 및 보조제의 양을 결정하는 방법은 당해 분야의 숙련자에게 공지되어 있고, 여하간 본 발명을 제한하지 않는다. 이러한 매개변수들은 상이한 면역원에 대해서 상이할 수 있으나, 쉽게 설명된다.

[0173] 유사하게, 항체 생산을 촉진하는 데 충분한 면역화의 위치와 빈도 또한 당해분야에 공지되어 있다. 전형적인 면역화 방법에서, 상기 비-인간 동물은 1 일차에 항원으로 복강 주사되고, 일주일 뒤 다시 주사된다. 이 후, 20일차에 조건적으로 불완전 프로인트 보조제와 같은 보조제와 같이, 재주사한다. 이러한 재주사는 정맥내 또는 복강내로 시행되며, 수 번의 연속으로 몇일간 반복할 수 있다. 이후, 40일차에 정맥내, 또는 복강내로, 일반적인

로는 보조제없이 증강 주사한다. 이러한 방법은 약 40일 후 항원-특이성 항체-생산 B 세포의 생성을 결과한다. 면역화에 사용된 항원에 지향된 항체를 발현하는 B 세포의 생산을 결과하는 한 다른 방식 또한 유용할 수 있다.

[0174] 다른 구체예에서, 비면역화된 비-인간 포유동물 출처의 임파구를 분리하고, 시험관 내 배양하고, 및 세포 배양액에서 면역원에 노출시킨다. 다음, 상기 임파구를 수집하고, 하기 설명된 융합 단계를 수행한다.

[0175] 단일클론성 항체들의 경우, 다음 단계는 면역화된 비-인간 포유동물로부터 비장세포를 분리하고 이를 불멸 세포와 융합하여 및 항체-생산 하이브리도마를 형성하는 것이다. 비-인간 포유동물로부터 비장세포를 분리하는 것은 당해분야에 공지되어 있고, 일반적으로 비장을 마취된 비-인간 포유동물로부터 제거하고, 이를 작은 조각으로 절단하고, 이러한 비장 피막으로부터 및 세포 체의 나일론 메쉬를 통해 비장세포를 적절한 완충액으로 압착하여 단일 세포 현탁액을 만드는 것을 포함한다. 세포를 세척하고, 원심분리하고, 및 임의의 적혈구를 용혈하는 완충액에 재현탁시킨다. 이 용액을 다시 원심분리하고, 펠렛으로 남은 임파구를 최종적으로 신선한 완충액에 재현탁시킨다.

[0176] 일단 단일 세포 현탁액으로 분리되고 존재한다면, 임파구를 불멸 세포주에 융합시킨다. 이것은, 비록 하이브리도마를 만드는데 유용한 많은 다른 불멸 세포주가 당해분야에 공지되어 있지만, 전형적으로 마우스 골수종 세포주이다. 바람직한 쥐의 골수종 세포주는, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재 Salk Institute Cell Distribution Center로부터 이용가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양으로부터, 및 미국 메릴랜드주 록빌 소재 American Type Culture Collection로부터 이용가능한 X63 Ag8653 및 SP-2 세포로부터 유래된 것을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 융합은 폴리에틸렌 글리콜 등을 사용하여 수행된다. 다음, 결과된 하이브리도마를 미융합된, 모 골수종 세포의 성장이나 생존을 저해하는 하나 이상의 물질을 포함하는 선택 배지에 성장시킨다. 예를 들어, 모골수종 세포가 효소 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제(HGPRT 또는 HPRT)가 결여되어 있다면, 하이브리도마용 세포 배지는 HGPRT-결여 세포의 성장을 방지하는 물질인 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘(HAT 배지)을 통상적으로 포함한다.

[0177] 상기 하이브리도마는 대식세포의 배양보조세포층(feeder layer) 상에서 성장된다. 상기 대식세포는 비장세포를 분리하는 데 사용된 바람직하게는 비-인간 포유동물의 한배 새끼로부터 출처되고, 및 통상적으로는 하이브리도마를 플레이팅하기 수일 전에 불완전 프로인트 보조제 등으로 프라임처리한다. 융합 방법은 (Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice," pp. 59-103 (Academic Press, 1986)에 설명되어 있다.

[0178] 상기 세포는 콜로니 형성과 항체 생산에 충분한 시간동안 선택배지에서 성장된다. 이것은 통상 7 내지 14 일간이다. 다음, 하이브리도마 콜로니들을 면역원/항원과 결합하는 항체 생산에 대하여 분석하였다. 상기 분석은, 비록 상기 하이브리도마가 성장되는 웰에 적용될 수 있는 임의의 분석법을 사용할 수 있지만, 통상적으로 비색성 ELISA-유형 분석법이다. 다른 분석법들은 면역침전과 방사성면역분석법을 포함한다. 원하는 항체 생산에 양성인 웰을 조사하여 하나 이상의 뚜렷한 콜로니가 존재하는 지를 결정한다. 하나 이상의 콜로니가 존재한다면, 세포를 재클론화하고 성장시켜 오직 단일 세포가 원하는 항체를 생성하는 콜로니로 생성되는 지를 확실하게 한다. 단일의 확실한 콜로니를 가지는 양성 웰을 재클론화하고 재분석하여 오직 하나의 단일클론성 항체가 검출되고 생성되는 지를 확고히 한다.

[0179] 다음, 단일클론성 항체를 생산하는 것으로 확인된 하이브리도마를 DMEM 또는 RPMI-1640과 같은 적절한 배지에서 더 큰 양으로 성장시킨다. 대안적으로, 상기 하이브리도마 세포를 동물에서 복수 종양으로서 생체 내 성장시킬 수 있다.

[0180] 바람직한 단일클론성 항체를 생성하기에 충분한 성장 후, 단일클론성 항체를 함유하는 성장 배지 (또는 복수)를 세포로부터 멀리 분리하고, 그 속에 존재하는 단일클론성 항체를 정제한다. 정제는 일반적으로 전기영동, 투석, 단백질 A나 단백질 G-세파로즈, 또는 아가로즈나 세파로즈 비드와 같은 고정 지지체에 연결된 항-마우스 Ig를 사용하는 크로마토그래피에 의해 완수된다 (모두, 예를 들어, the Antibody Purification Handbook, Amersham Biosciences, publication No. 18-1037-46, Edition AC에 설명, 이의 내용은 참조함으로 본 발명에 기입됨). 결합된 항체는 낮은 pH 완충액 (pH 3.0 이하의 글리신 또는 아세트이트 완충액)을 사용하여 단백질 A, 단백질 G 또는 단백질 L 컬럼으로부터 용출하고, 즉시 항체-함유 분획을 중성화한다. 이러한 분획물을 모으고, 투석하고, 및 필요시 농축한다.

[0181] 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 DNA는 용이하게 분리되며 통상적인 절차를 사용하여 (예, 쥐 또는 인간과 같은 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전체에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 탐침자를 사용함으로써) 서열분석 할 수 있다. 일단 분리되면, DNA를 발현백터로 도입하고 난 후 숙주세포로 형질전환시킨

다.

- [0182] 본 발명에 따른 항체들은 재조합 수단에 의해 생성된다.
- [0183] 면역글로불린 경쇄 및 중쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 서열을 각각의 재조합 벡터 또는 임의의 벡터일 수 있고, 재조합 DNA 방법에 편리하게 사용될 수 있는 하나의 단일 벡터에 독립적으로 삽입할 수 있고, 벡터의 선택은 그것이 도입될 숙주 세포에 의존될 것이다.
- [0184] 재조합 생산 방법은 당해분야에 널리 공지되어 있고, 원핵 및 진핵 세포에서 단백질 발현 및 후속적으로 항체 분리와 통상적으로 약학적 허용 순도로 정제하는 것을 포함한다.
- [0185] 숙주 세포에서 전술한 바와 같이 항체를 발현시키기 위해, 각각의 변형된 경쇄와 중쇄를 암호화하는 핵산을 표준 방법을 사용하여 발현 벡터에 삽입한다.
- [0186] 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 서열, 프로모터 (예, 구성적 또는 유도성) 및 조건적으로 종결 신호를 각각 결합하는 데 사용되는 및 이들을 복제에 필요한 정보를 함유하는 적당한 벡터에 삽입하는 방법은 당해분야의 숙련자에게 공지되어 있다 (참조, 예를 들어, Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).
- [0187] 발현은 CHO 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, HEK293 세포, COS 세포, PER.C6 세포, 효모, 또는 박테리아 세포와 같은 적절한 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 수행되고, 및 상기 항체는 세포(용혈후 상청액 또는 세포)로부터 회수된다.
- [0188] 본 발명은 상기 항체의 각 성분을 그 자신의 개별 숙주 세포에서, 또는 항체 성분들의 다양한 조합을 그들 자신의 숙주 세포에서 발현하는 것에 관한 것이다. 따라서, 예를 들어, 상기 경쇄들은 일 숙주 세포에서 중쇄들은 다른 숙주 세포에서 발현될 수 있다. 대안적으로, 하나의 경쇄 및 하나의 중쇄가 일 숙주 세포에서 발현되고, 및 제2 경쇄와 제2 중쇄가 다른 숙주세포에서 발현된다. 대안적으로, 양쪽 중쇄들 및 양쪽 경쇄들이 동일한 숙주세포에서 발현될 수 있다.
- [0189] 양 쪽 중쇄들 및 양 쪽 경쇄들이 동일한 숙주세포에서 발현될 때, 사슬들의 시험관 내 조합은 필요치 않고, 오직, 예를 들어, 단백질 A 크로마토그래피에 의해, 상기 조건화된 배지로부터 항체를 정제하는 것이 요구되는 것이 이해될 것이다 (참조, 예를 들어: Jackman J, J Biol Chem. 2010 Jul 2;285(27):20850-9. Epub 2010 May 5).
- [0190] 적어도 하나 사슬이 다른 세 개 사슬과 상이한 숙주세포에서 발현될 때, 상기 사슬들의 시험관 내 조립이 필요하다.
- [0191] 특정 구체예에 따라서, 상기 숙주세포는 박테리아 세포를 포함한다.
- [0192] 다른 구체예에 따라서 상기 항체들은 참조에 의해 기입되는 WO2009/107129에 설명되는 바와 같이, 인클로날 (inclonal)로서 생성된다.
- [0193] 상기 박테리아 숙주는 상기 재조합 단백질 (예, 중쇄 및 경쇄들)을 봉입체 (예, 염색할 수 있는 물질의 핵 또는 세포질 집합체)로서 생산할 수 있는 것이 선택될 수 있다.
- [0194] 사용된 숙주세포 (예, 제1 숙주세포 및 제2 숙주세포)는 동일 종 또는 상이한 종일 수 있다.
- [0195] 본 발명의 특정 구체예에 따라서, 상기 숙주세포는 그람-음성 박테리아로부터 선택된다.
- [0196] 사용되는 바와 같이, “그람 음성 박테리아”는 현미경 하에서 특색적인 염색 특성을 가지는 박테리아를 지칭하는 것으로, 여기서 이들은 그람의 염색 방법 동안 염색되지 않거나 알코올에 탈색된다. 그람 음성 박테리아는 일반적으로 하기 특성을 가진다: (i) 그들의 세포벽은 펩티도글리칸의 수 개 층만을 포함한다 (그람 양성균에는 더 높은 수준으로 존재); (ii) 세포는 상기 펩티도글리칸층 외부에 있는 리포폴리사카라이드를 포함하는 외막에 의해 둘러 싸인다 (이는 지질 A, 중심 다당체, 및 O-다당체로 구성); (iii) 포린류는 외막에 존재하고, 특정 분자에 대하여 공극과 같이 행동한다; (iv) 펩티도글리칸의 층들과 이차 세포막간에, 소위 주변세포질 공간으로 불리우는, 공간이 존재한다; (v) S-층이 펩티도글리칸보다는 외막에 직접적으로 부착되어 있다; (vi) 지질단백질들이 다당 백본에 부착되나, 그람 양성균은 리보단백질이 없다.
- [0197] 본 교시에 따라 사용될 수 있는 그람음성균의 예는 에스케리키아 콜리, 슈도모나스, 어위니아 및 세라티아를 포함하나 이에 한정되지 않는다. E. coli 보다, 슈도모나스와 같은 그람음성균을 사용하면 슈도모나스의 대사성

및 생리적 특성으로 인해 큰 경제적 가치를 제공할 수 있음이 제시된다. 특정 조건하에서, 슈도모나스는, 예를 들어, E. coli 보다 더 높은 세포 배양 밀도로 성장될 수 있고, 따라서, 잠재적으로 더 높은 생성물 수율을 제공한다.

- [0198] 본 발명의 교시에 따라 사용하는 데 적절한 세균 발현 벡터의 예는 당해 기술분야에 공지되어 있는, pET™ 시스템, T7 시스템 및 pBAD™ 시스템을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0199] 발현 벡터를 세균 숙주세포로 도입하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 주로 사용된 숙주 시스템에 의존한다.
- [0200] 상기 숙주세포는 동일 배지에서 공배양되거나, 별도로 배양된다.
- [0201] 숙주세포는 재조합 중쇄 및 경쇄의 높은 양의 발현을 허용하는 효과적인 조건에서 배양된다. 효과적인 배양 조건은, 재조합 단백질 생산을 허용하는 효과적인 배지, 생물반응기, 온도, pH 및 산소 조건을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 효과적인 배지는 박테리아를 배양하여 본 발명의 재조합 단백질을 생성하는 임의의 배지를 지칭한다. 그러한 배지는 통상 동화성 탄소, 질소와 인산원, 및 적절한 염, 미네라, 금속과 비타민과 같은 다른 양분을 포함한다. 본 발명의 세균 숙주는 원하는 양에 따라, 통상적인 발효 생물반응기, 진탕 플라스크, 시험관, 미세적정 용기와 페트리 플레이트에서 배양될 수 있다. 배양은 재조합 숙주에 적절한 온도, pH 및 산소 함량에서 수행될 수 있다. 그러한 배양 조건은 당해 분야의 통상적 기술자의 전문기술 내에 있다.
- [0202] 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 적절한 발현 수준이 얻어지면, 상기 폴리펩타이드를 봉입체로부터 회수한다. 세균 봉입체로부터 재조합 단백질을 회수하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 통상적으로 세포 용해후, 변성제에서 용해하는 것을 포함한다 [예, De Bernardez-Clark 및 Georgiou, "Inclusion bodies and recovery of proteins from the aggregated state" Protein Refolding Chapter 1:1-20 (1991). 또한 "E. coli에서의 인클로날의 발현" 하의 실시예를 참조].
- [0203] 상세하게는, 봉입체를 간단한 원심분리에 의해 많은 세포질 단백질로부터 분리할 수 있고, 이는 효과적인 정제 전략일 수 있다. 다음, 이를 우레아 (예, 8 M) 또는 구아니디늄 염화수소와 같은 강한 변성제 및 때로, 극단적인 pH 또는 온도를 사용하여 용해시킬 수 있다. 변성제 농도, 노출 시간과 온도는 각 단백질에 표준화되어야 한다. 완전 용해 전에, 봉입체를 변성제와 계면제의 묽은 용액으로 세척하여 오염 단백질을 제거할 수 있다.
- [0204] 최종적으로, 상기 용해된 봉입체를 변성 조건하에서 크로마토그래피 기술을 통해 추가의 정제단계로 직접적으로 처리할 수 있고, 또는 중쇄 및 경쇄들을 정제전에 천연 형태로 재폴딩할 수 있다.
- [0205] 따라서, 재구성된/재폴딩된 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드 (예, 용해된 환원 폴리펩타이드)의 추가 정제는 재폴딩 전에, 대안적으로, 또는 추가적으로, 후에 실행될 수 있다.
- [0206] 항체 정제 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 상기에서, 및 후술하는 실시예에서 설명되어 있다. IgG의 다른 정제 방법은 "Purification of IgG and insulin on supports grafted by sialic acid developing "thiophilic-like" interactions Hamid Lakharia and Daniel Muller, Journal of Chromatography B Volume 818, Issue 1, 15 April 2005, Pages 53-59에 설명되어 있다.
- [0207] 대안적으로 또는 추가적으로, 정제는 확인될 수 있는 또는 치료적 실체를 통한 친화도 기반일 수 있다 (예를 들어, PE38와 결합하는 친화성 컬럼을 사용하여 PE38에 융합된 항체들을 정제하는 것).
- [0208] 알카라인/SDS 처리, CsCl 밴딩, 컬럼 크로마토그래피, 아가로스 젤 전기영동, 및 다른 당해 분야에 공지된 것을 포함하는 표준 기술을 사용하여 항체의 추가 정제를 수행하여 세포성 성분이나 다른 오염물, 예를 들어, 다른 세포성 핵산 또는 단백질을 제거한다. 참조 Ausubel, F., 등, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing 및 Wiley Interscience, New York (1987). 미생물 단백질을 사용하는 친화성 크로마토그래피 (예, 단백질 A 또는 단백질 G 친화성 크로마토그래피), 이온 교환 크로마토그래피 (예, 양이온 교환 (카르복시메틸 수지), 음이온 교환 (아미노 에틸 수지) 및 혼합 모드 교환), 친티오 흡수 (예, 베타-머캅토에탄올 및 다른 SH 리간드를 사용하는), 소수성 상호작용이나 방향족 흡수 크로마토그래피 (예, 페닐-세파로스, 아자-친아레노 수지, 또는 m-아미노페닐보론 산을 사용하는), 금속 킬레이트 친화성 크로마토그래피 (예 Ni(II)- 및 Cu(II)-친화성 물질을 사용하는), 크기 배제 크로마토그래피, 및 전기영동적 방법 (젤 전기영동, 모세관 전기영동)과 같이 단백질 정제를 위해 상이한 방법들이 확립되었고 널리 퍼져 있다 (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102).
- [0209] 재폴딩 수율을 개선시키기 위해, 재구성된 중쇄들과 재구성된 경쇄들을 온전한 항체를 형성하는 데 최대가 되도록

록 선택된 비율로 제공한다. 이를 위해, 중쇄 대 경쇄 몰비는 약 1:1 내지 1:3, 1:1.5 내지 1:3, 1:2 내지 1:3 이다. 예증적 구체예에서, 상기 중쇄 대 경쇄 몰비는 약 1:1이다.

- [0210] 필요시, 상기 면역글로불린은 지정된 시험관 내 글리코실화할 수 있고, 이는 Isabelle Meynial-salles 및 Didier Combes에 의해 설명된 방법에 따라 수행될 수 있다. In vitro glycosylation of proteins: An enzymatic approach. Journal of Biotechnology Volume 46, Issue 1, 18 April 1996, Pages 1-14.
- [0211] 본 발명의 일 관점은 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약학 조성물이다. 본 발명의 다른 관점은 본 발명에 따른 항체를 약학 조성물의 제조에 사용하는 용도이다. 본 발명의 다른 관점은 본 발명에 따른 항체를 함유하는 약학 조성물의 제조방법이다. 다른 관점에서, 본 발명은 조성물, 예, 본 발명에 따른 항체를 함유하고, 약학적 담체와 제제된 약학 조성물을 제공한다.
- [0212] 항체 및 이를 포함하는 조성물 (예, 약학 조성물)을 진단 및 치료 적용에 사용될 수 있고, 그러한 것으로서 치료 또는 진단 키트에 포함될 수 있다.
- [0213] 따라서, 본 발명의 조성물은, 필요시, 활성 성분, 즉 항체를 함유하는 하나 이상의 단일 투약 형태를 포함하는, FDA 승인 키트와 같은, 팩이나 분배 장치에 제공될 수 있다. 상기 팩은, 예를 들어, 블리스터 팩과 같이, 금속이나 플라스틱 호일을 포함한다. 상기 팩이나 분배 기구는 투여용 안내서가 동봉될 수 있다. 팩이나 분배기구는 용기와 연계된 통지문이 약물의 제조, 사용 또는 판매를 관장하는 정부기관에 의해 규정된 형태로 수용될 수 있는데, 상기 통지서는 상기 조성물의 형태 또는 인간이나 동물 투여에 대한 관청의 승인을 나타낸다. 그러한 통지서는, 예를 들어, 처방된 약물에 대한 미국 식약청의 승인된 표지문 또는 승인된 간지 형태일 수 있다. 양립되는 약학적 담체와 제제화된 본 발명의 제조물을 포함하는 조성물이 제조되어, 적절한 용기에 담겨서, 전술한 바와 같이, 지시된 상태의 치료에 대하여 표지될 수 있다.
- [0214] 본 발명에 따른 항체의 하나의 용도는 염증 및 감염과 관련된 질병의 치료에 관한 것이다.
- [0215] 사용되는 바와 같이, 용어 “염증”은 세포의 이동 (예, 림프절로)이 염증 발생이나 진행에 기여하는 염증 반응을 포함하는 임의의 의학적 상태를 지칭한다.
- [0216] 만성 염증 질환과 급성 염증 질환 둘 다를 포함하는 염증 반응을 포함하는 많은 질병과 상태는 전술한 바와 같은 방법을 사용하여 치료될 수 있다.
- [0217] 그러한 질환의 예는 과민반응과 연관된 염증성 질환을 포함한다.
- [0218] 과민반응의 예는 타입 I 과민반응, 타입 II 과민반응, 타입 III 과민반응, 타입 IV 과민반응, 즉각적 과민반응, 항체 매개 과민반응, 면역 복합체 매개 과민반응, T 임파구 매개 과민반응 및 DTH를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0219] 본 발명에서 개시된 이중기능성 항체들로 치료될 수 있는 다른 유형의 염증성 질환은 자가면역 질환, 감염성 질환, 이식거부 반응, 알레르기 질환 및 암성 질환이다.
- [0220] 용어 “암”은, 여기서 사용되는 바와 같이, 암종, 임파종, 아세포종, 육종 및 백혈병을 포함하나 이에 한정되지 않는 증식성 질병을 지칭한다. 암성 질병의 특정 예는 만성 골수성 백혈병, 급성 성숙 골수성 백혈병, 급성 전골수성 백혈병, 급성 호염구성, 비림프성 백혈병, 급성 단핵구성 백혈병, 급성 호산구성, 골수단구성 백혈병과 같은 골수성 백혈병; 버킷, 비호지킨과 같은 악성 림프종; 급성 임파아구성 백혈병, 만성 임파구성 백혈병과 같은 임파구성 백혈병; 고형암, 양성 뇌수막종, 침샘의 혼합 종양, 대장 선종과 같은 골수 증식성 질환; 소세포폐암, 신장, 자궁, 전립선, 방광, 난소, 대장, 육종, 지방육종, 점액, 횡막근종, 횡문근육종 (치조), 연부조직 점액성 연골육종, 이형 종양과 같은 선종양을 포함하나 이에 한정되지 않는다; 다른 것은 고환 및 난소 미분화 배세포종, 망막아세포종, 윌름 종양, 신경모세포종, 악성 흑색종, 중피세포종, 유방암, 피부암, 전립선암 및 난소암을 포함한다.
- [0221] 질병의 치료는 상기 항체 단독 또는 담체와 함께 약학조성물로서 투여함으로써 실행될 수 있다.
- [0222] 본 발명에서 사용되는 바, “약학 담체”는 생리적으로 양립되는 임의의 및 모든 용매, 분산매, 코팅물, 향균 및 항진균제, 등장제와 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게는, 상기 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척수 또는 표피 투여에 적합하다 (예, 주사 또는 주입에 의해).
- [0223] 본 발명의 조성물은 당 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 투여될 수 있다. 숙련자에게 이해되는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 양상은 원하는 결과에 따라 변한다. 본 발명의 화합물을 특정 투여 방법으로 투여하기 위해,

상기 화합물을 이의 불활성화를 방지하는 물질로 코팅하거나 같이 투여하는 것이 필요할 수 있다. 예를 들어, 상기 화합물을 적합한 담체, 예를 들어, 리포좀이나 희석제 내에서 대상체에 투여될 수 있다.

- [0224] 약학적 허용 희석제는 식염수 및 수성 완충액을 포함한다. 약학 담체는 멸균 수성액이나 분산액, 및 멸균 주사액이나 분산액의 임시적인 제조물용 멸균 분말을 포함한다. 그러한 약학적 활성 물질용 배지와 제제의 사용은 당해분야에 공지되어 있다.
- [0225] 용어 “비경구 투여” 및 “비경구로 투여되는”은 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 장관 및 국소외의 투여 방식을 지칭하는 것으로 통상 주사에 의한 것으로, 정맥내, 근육내, 동맥내, 수막내, 관절강내, 안내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관내, 피하, 각피하, 관절내, 관절강하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사와 주입을 포함한다.
- [0226] 이러한 조성물은 또한 보존제, 습윤제, 에멀전제, 및 분산제와 같은 보조제를 포함한다. 미생물 존재를 방지하는 상기 멸균 과정에 의해, 및 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 등과 같은 다양한 항균 및 항진균제를 포함함으로써 수행될 수 있다. 당, 염화 나트륨 등과 같은 등장제를 상기 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 수 있다.
- [0227] 또한, 주사용 약학 형태를 장기간 흡수하게 하는 것은 알루미늄 모노스테아레이트와 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 제제를 포함함으로써 수행될 수 있다.
- [0228] 선택된 투여 경로와 무관하게, 본 발명의 화합물은 적절한 수화 형태 및/또는 본 발명의 약학 조성물에서 사용될 수 있는 데, 당해 분야의 숙련자에게 공지된 통상적인 방법으로 약학 허용 투약형태로 제제화된다.
- [0229] 본 발명의 약학 조성물에서 활성 성분의 실제 투약 수준은 특정 환자의 원하는 치료적 반응을 달성하는데 효과적인 양, 조성 및 투여 양상을 환자에 독성적이지 않게 얻기 위해서 변할 수 있다. 선택된 투여 수준은 사용되는 본 발명의 특정 조성물의 활성, 투여 경과, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배출 속도, 치료 기간, 사용되는 특정 조성물과 조합 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료되는 환자의 나이, 성별, 몸무게, 상태, 일반적 건강 및 이전 의학 이력, 및 의학 분야에 공지된 다른 요소를 포함하는 다양한 약동학적 요소에 달려있다.
- [0230] 상기 조성물은 멸균이고, 조성물이 주사에 의해 전달될 수 있는 정도로 유동성이어야 한다. 물 외에, 상기 담체는 바람직하게는 등장성 완충 식염액이다.
- [0231] 적절한 유동성이, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅물의 사용에 의해, 분산액의 경우 원하는 입자 크기를 유지시킴으로써, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우, 등장성 제제, 예를 들어, 당, 만니톨이나 소르비톨과 같은 다가알코올, 및 염화 나트륨을 조성물에 포함하는 것이 바람직하다.
- [0232] 본 발명의 이중특이성 항체들의 고려되는 다른 용도는 분석물의 정제를 포함한다; 면역조직화학 및 효소 면역분석에서; 방사성이미징과 방사성면역요법에 대하여 및 약물 전달을 위해. 고려되는 다른 용도는 Cao Y, Suresh MR. Bispecific antibodies as novel bioconjugates. Bioconjug Chem. 1998 Nov-Dec;9(6):635-44에 설정되어 있고, 이는 참조로써 기입된다.
- [0233] 사용되는 바, 용어 “약”은 $\pm 10\%$ 를 지칭한다.
- [0234] 용어 “포함하다”, “포함하는”, “내포하다”, “내포하는”, “가지는” 및 이의 연관말들은 “포함하나 그에 한정되지 않는”을 의미한다.
- [0235] 용어 “구성되는”은 “포함하고 및 그에 한정되는”을 의미한다.
- [0236] 용어 “기본적으로 구성되는”은 조성물, 방법 또는 구조들이 추가의 성분, 단계 및/또는 부분들을 포함할 수 있으나, 오직 추가 성분, 단계 및/또는 부분들이 청구되는 조성물, 방법 또는 구조의 기본적인 그리고 신규한 특성을 물질적으로 변경하지 않는 범위이다.
- [0237] 본 발명에서 사용되는 바와 같이, 용어 “방법”은 화학적, 약학적, 생물학적, 생화학적 및 의학적 분야의 실시자에게 공지되었거나, 그에 의해 공지된 방식, 수단, 기술 및 절차로부터 용이하게 개발된 그러한 방식, 수단, 기술 및 절차를 포함하나 이에 한정되지 않는, 주어진 임무를 완수하기 위한 방식, 수단, 기술 및 절차를 지칭한다.
- [0238] 사용되는 바, 용어 “치료하는”은 상태 진행의 폐지, 실질적으로 저해, 늦춤 또는 역전, 상태의 임상적 또는

심미적 증상을 실질적으로 개선시키는 것, 또는 상태의 임상적 또는 심미적 증상의 발현을 실질적으로 방지하는 것을 포함한다.

[0239] 별개의 구체예의 맥락에서 간결함을 위해 설명된 본 발명의 특정 특징들이 또한 단일 구체예에서 복합적으로 제공될 수 있음이 이해될 것이다. 역으로, 단일 구체예의 맥락에서 간단함을 위해 설명된 본 발명의 다양한 특징들이 본 발명의 임의의 다른 설명된 구체예에서, 별개로, 또는 임의의 적당한 다른 조합으로 또는 적당히 제동될 수도 있다. 다양한 구체예의 맥락에서 설명된 특정 특징은, 그 구체예가 그러한 요소 없이는 작동하지 않는 한, 그러한 구체예의 필수적인 특징으로 간주되지 않을 것이다.

[0240] 전술한 바와 같이 및 청구범위에서 청구되는 바와 같이, 본 발명의 다양한 구체예 및 관점은 하기 실시예에서 그 실험적으로 지지됨을 발견하게 된다.

[0241] 실시예

[0242] 이제 하기 실시예를 참조한다, 이는 상기 설명과 함께, 본 발명의 구체예를 비제한적 방식으로 설명한다.

[0243] 일반적으로, 여기서 사용된 용어 및 본 발명에서 이용된 실험실 절차는 분자, 생화학, 미생물학 및 재조합 DNA 기술을 포함한다. 그러한 기술은 문헌에 철저히 설명되어 있다. 참조, 예를 들어, “Molecular Cloning: A laboratory Manual” Sambrook 등, (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel 등, “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, New York (1988); Watson 등, “Recombinant DNA”, Scientific American Books, New York; Birren 등 (eds) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 미국 특허 제 4,666,828호; 4,683,202 호; 4,801,531 호; 5,192,659 호 및 5,272,057 호에 설정된 방법론; “Cell Biology: A Laboratory Handbook”, Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); “Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique” by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; “Current Protocols in Immunology” Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites 등 (eds), “Basic and Clinical Immunology” (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell 및 Shiigi (eds), “Selected Methods in Cellular Immunology”, W. H. Freeman and Co., New York (1980); 이용가능한 면역분석법은 특허와 과학 문헌에 방대히 설명되어 있다. 참조. 예를 들어, 미국 특허 제 3,791,932 호; 3,839,153 호; 3,850,752 호; 3,850,578 호; 3,853,987 호; 3,867,517 호; 3,879,262 호; 3,901,654; 3,935,074 호; 3,984,533 호; 3,996,345 호; 4,034,074 호; 4,098,876 호; 4,879,219 호; 5,011,771 호 및 5,281,521 호; “Oligonucleotide Synthesis” Gait, M. J., ed. (1984); “Nucleic Acid Hybridization” Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); “Transcription and Translation” Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); “Animal Cell Culture” Freshney, R. I., ed. (1986); “Immobilized Cells and Enzymes” IRL Press, (1986); “A Practical Guide to Molecular Cloning” Perbal, B., (1984) 및 “Methods in Enzymology” Vol. 1-317, Academic Press; “PCR Protocols: A Guide To Methods and Applications”, Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak 등, “Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual” CSHL Press (1996); 이들 모두는 여기서 완전히 설정된 것 처럼, 참조함으로써 기입된다. 다른 일반적인 참조문헌이 본 문헌을 통틀어서 제공된다. 거기서의 방법들은 당해 분야에 공지된 것으로 여겨지며 독자의 편의상 제공된다. 그에 포함된 모든 정보는 참조함으로써 본 명세서에 기입된다.

[0244] 실시예 1-4에 대한 재료와 방법

[0245] 중쇄 및 경쇄에 대한 발현 벡터 작제: 항체 중쇄 및 경쇄를 E. coli 에서 생산하기 위한 벡터가 pHAK 벡터의 골격 위에 작제되었다 (Hakim 및 Benhar, 2009). 중쇄 벡터를 CH2-CH3 불변 부위에서 Kunkel 돌연변이화 방법을 사용하여 (Kunkel, 1985) 변형하여 “노브-인트루-홀” 방식에 따라 (Merchant 등, 1998) 중쇄-중쇄 이중이합체-선호 변이를 포함하였다. 이를 위해, pHAK-IgH 벡터의 DNA를 E. coli CJ236 균주에서 제조하고, M13K07 헬퍼 파지로 감염하고, 및 방출된 단일본쇄 우라실-함유 플라스미드 DNA를 다음날 페놀-클로로포름 정제방법을 사용하여 수집하였다. DNA 샘플을 프라이머 1 (“노브” 변이를 도입하기 위해) 또는 프라이머 2, 프라이머 3 및 프라이머 4의 혼합물 (“홀” 변이 도입을 위해) (하기 표 3)과 TM 완충액 (0.01 M MgCl2, 0.05 M Tris pH

7.5)에서 항온처리하였다. 다음 단계에서, 상기 DNA 샘플을 T7 폴리머라제 및 T4 리가제 효소 존재하에서 처리하고 (0.4 mM ATP, 0.4 mM dNTPs, 6mM DTT가 제공) 및 DH5α E. coli 박테리아로 형질전환시켰다. 결과된 작제물은 pHAK-HC-knob (변이 T366W, S354C 포함) 및 pHAK-HC-hole (변이 T366S, L368A, Y407V, Y349C포함)으로 명명하였다. 상기 변이 함유 부위를 NsiI-NdeI 제한효소를 사용하여 pHAK-IgH-PE38 벡터(Hakim 및 Benhar, 2009)로 서브클론하였고 이는 pHAK-HC-knob-PE38 및 pHAK-HC-hole-PE38 벡터를 생성하였다. 상기 작제물들은 PE38 독소에 융합된 항체 중쇄를 발현한다.

표 3

[0246]

| 프라이머 명칭 | 서열 5' 에서 3' | 참조 |
|-------------------|---|--|
| 프라이머1 S →C:T→W | GAAGCCTTTGACCAGGCACcaCAGGCTGACCTGGTTCTTGGTCA TCTCCTCCCGGcATGGGGGCAGGGGTACAC서열번호: 1 | pHAK-IgH 벡터상에서 S354C 및 T366W 치환을 제공하는 Kunkel 돌연변이화용 역방향 프라이머 |
| 프라이머2 Y→C | GGATGGGGGCAGGGTgcACACCTGTGGTTCTCG서열번호: 2 | pHAK-IgH 벡터상에서 Y349C 치환을 제공하는 Kunkel 돌연변이화용 역방향 프라이머. |
| 프라이머3 T →S:L→A | GGATAGAAGCCTTTGACCgcGC AGcTCAGGCTGACCTGGTTCTTG 서열번호: 3 | pHAK-IgH 벡터상에서 L368A 및 T366S 치환을 제공하는 Kunkel 돌연변이화용 역방향 프라이머 |
| 프라이머4 Y→V | GTCCACGGTGAGCTTGCTAacG AGGAAGAAGGAGCCGTC 서열번호: 4 | pHAK-IgH 벡터상에서 Y407 치환을 제공하는 Kunkel 돌연변이화용 역방향 프라이머 |
| 프라이머5 | ATATACATATGGACATTGTGCTG NdeI 서열번호: 5 | pHAK-T427-IgL 벡터상에서 경쇄의 가변부위의 PCR 증폭용 정방향 프라이머 |
| 프라이머6 | tatatacgtacgTTTGATTTCAGTTTGG BsiWI TGCCgcaACCGAACGTCCGAGG 서열번호: 6 | T427-IgL의 가변 도메인에서의 A104C 치환용 역방향 프라이머 |
| 프라이머7 | tatataGAATTCCTTACTCTCCCTGTT EcoRI GAAGCTCTTTGTG 서열번호: 7 | 경쇄 서열로부터 C218 아미노산 코돈을 제거하기 위한 역방향 프라이머 |
| 프라이머8 | AAACAGAGGCCTGGACAGtGTC StuI TGGAATGGATTG 서열번호: 8 | T427-IgH의 가변 도메인에서의 G44C 치환용 정방향 프라이머 |
| 프라이머9 | tatataGCTAGCGGAGGAGACTGTG NheI AG 서열번호: 9 | pHAK-T427-IgH 벡터상에서 중쇄의 가변부위를 PCR 증폭하기 위한 역방향 프라이머 |
| 프라이머10 | GCCCAAATCTgccGACAAAACACACATGCCACC 서열번호: 10 | pHAK-IgH 벡터상에서 C222A 치환용 정방향 프라이머 |
| 프라이머11 | TGTGTGAGTTTTGTCggcAGATTTGGGCTCAACTCTCTTG 서열번호: 11 | pHAK-IgH 벡터상에서 중쇄 불변 부위에서의 C222A 치환용 역방향 프라이머 |
| 프라이머12 | GAGGAGATGACCAAGAACAGGT 서열번호: 12 | pHAK-IgH 벡터의 중쇄 불변 부위의 증폭용 역방향 프라이머 |
| 프라이머13 | atataCATATGCAGGTCAAATGC NdeI 서열번호: 13 | pHAK-T427-IgH 벡터의 중쇄 가변 부위의 증폭용 정방향 프라이머 |

- [0247] 중쇄-경쇄의 효율적인 짝짓기를 제공하기 위해, 천연 사슬간 디설파이드 결합은 IgH/IgL 쌍의 대안적 위치에서 조작된 결합으로 대체되었다. pHAK-LC-Cys에 삽입된 변이들은 VL에서 A104C 및 C-카파에서 C218del이었다. pHAK-HC-Cys에 삽입된 변이들은 VH에서 A44C 및 CH1에서 C222A이었다. pHAK-LC-Cys 벡터의 제조는 두 개 연속적인 클로닝 단계를 포함한다. 먼저, 선택된 항체의 경쇄 가변 도메인을 프라이머 5 및 프라이머 6로 증폭시키고, NdeI-BsiWI 제한 효소로 절단하고, 및 동일한 효소로 미리 절단된 pHAK-IgL로 클론시켰다. 결과된 벡터를 주형으로 사용하여 프라이머 5 및 프라이머 7로 IgL를 증폭하고, 이를 NdeI-EcoRI 효소로 절단하고 pHAK-IgL(NdeI-EcoRI 절단된)로 클론하였다. pHAK-HC-Cys (A44C)를 작제하기 위해, StuI-NheI 절단 및 pHAK-IgH 벡터로 클로닝한 후 선택된 항체의 중쇄 가변 부위를 프라이머 8 및 프라이머 9로 증폭하였다. C222A 변이를 CH1로 삽입하는 것은 프라이머 10 및 12 또는 프라이머 11 및 13으로 생성된 두 개 PCR 단편물 중 두 개를 증폭한 후, 프라이머 12 및 프라이머 13를 사용하여 조립 PCR을 수행함으로써 실행되었다. 조립된 DNA 절편을 NdeI 및 BsrGI 제한 효소로 절단하고, 및 미리 작제된 pHAK-HC-Cys (A44C) 벡터로 클론하였다.
- [0248] 조합된 pHAK-HC-Cys-knob 벡터 (A44C, C222A, T366W, 및 S354C)는 pHAK-HC-Cys의 NdeI-SacII 절단 부위를 pHAK-HC-knob 벡터에 삽입시킴으로써 작제되었다. 원하는 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 부위를 pHAK-LC-기반 벡터 (NdeI-BsiWI 서브클로닝 사용) 또는 pHAK-HC-기반 벡터 (NdeI-NheI 서브클로닝 사용) 상에 클론하였다.
- [0249] E. coli에서 IgG 생산: 각각 pHAK-IgH 및 pHAK-IgL에 기반한 중쇄 및 경쇄 작제물을 개별 E. coli BL21 (DE3) pUBS500 세균 배양물에서 봉입체로서 발현시켰다. 상기 봉입체를 인클로날스 IgG 생성 방법 (Hakim 및 Benhar, 2009)에 따라서 정제하고, 변성시키고, 혼합하고 및 재폴딩하였다. 이중특이성 IgG 생산을 위해, 보체 중쇄들을 1:1 몰비로 첨가하였다. 동일한 규칙을 경쇄에 적용하였다.
- [0250] 단백질 A 정제: 상기 재폴딩 과정 후, IgG 및 IgG-기반 융합 단백질을 단백질 A 친화성 컬럼에 적재하고, 세균성 오염물과 비효율적인 재폴딩 단백질로부터 분리하였다. 상기 단백질을 0.1 mM 구연산으로 용출하고, 1M Tris (HCl) pH 8.5로 중성화한 후, 20 mM 인산염 완충액 (PBS) pH 7.4에 대하여 투석하였다. 단백질 최종 농도를 280 nm에서의 흡광도로 결정하였다.
- [0251] 젤 여과 크로마토그래피: 젤 여과 분석을 Amersham Pharmacia AKTA FPLC System에서 수행하여 정제된 항체들의 분자량을 결정하였다. 단백질 A로 정제된 단백질들을 PBS (pH 7.4)로 미리 평형화된 Superdex 200 컬럼에 적용하고, 동일한 완충액을 0.5 ml/min의 유동 속도로 사용하여 분리하였다. 조사된 IgG-유사 단백질들의 분자량은 그의 용출부위를 표준 IgG (150 kDa) 및 IgG-기반 면역독소 IgG-PE38 (225 kDa)의 것과 비교함으로써 결정되었다.
- [0252] SDS-PAGE 분석: 단백질의 폴리아크릴아미드 젤 전기영동을 Laemmli (Laemmli, 1970)에 따라 실시하였다. 5x 샘플 완충액의 1/5 부피를 단백질 샘플에 첨가한 후, 5 분간 끓이고, 젤에 적재하였다. 7.5 %, 10 % 및 12 % 미니-젤에서 120 V에서 전개하였다. 전장 IgG를 평가하기 위해, 비환원 샘플 (β-머캅토에탄올이 없는)을 적재하였는데, 환원된 단백질 샘플은 중쇄 및 경쇄 성분들로 분리되었다. 젤을 쿠마시 블루 액 (0.05 % 쿠마시 R-250, 20 % 에탄올, 10 % 빙초산)으로 2 시간 염색하고, 단백질 밴드가 명확히 보일 때까지, 탈색 용액 (20 % 에탄올, 10 % 빙초산)에서 세척하였다. 단백질 밴드 밀도를 ImageMaster 1D 스캐닝 레이저 밀도계 (Pharmacia, Sweden)로 측정하였다. 염색된 젤에 비정제된 분획을 위해 라인당 20 μg 단백질 또는 정제된 단백질 분획을 위해 3-5 μg를 적재하였다. 면역블랏팅에 의해 더 가공된 젤 그것의 1/10의 양으로 적재하였다.
- [0253] 웨스턴 블랏 분석: SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질을 (Towbin 등, 1992)에 따라서 니트로셀룰로스 막으로 전기전이시켰다. 이 막을 5 % 탈지분유를 포함하는 PBS로, 적어도 1시간동안 실온에서 느리게 진탕하면서 차단하였다. 상기 막을 PBS로 세척한 후, HRP 접합 염소-항-인간 이차항체로 처리하였다 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). 0.05 % Tween-20 (PBST)을 함유하는 PBS로 세번 세척하고 및 PBS로 한 번 세척한 후 상기 니트로셀룰로스 필터를 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, USA)를 공급자가 설명한 대로 사용하여 발색하였다.
- [0254] ELISA 분석: 단일- 및 이중특이성 IgGs에 의한 항원 결합은 하기와 같이 결정되었다: 96-웰 ELISA 플레이트를 순수 항원 5 μg/ml 을 포함한 PBS 100 μl/well로 밤새 4 °C에서 코팅하고 및 3 % 탈지유 (PBS에 포함)로 1 시간 동안 37 °C에서 차단하였다. 모든 후속 단계는 실온 (25°C)에서 수행하였다. 단백질 A 정제된 단백질을 PBST에서 3 배 연속 희석액으로 플레이트에 적용하여 1 시간 항온처리하고 PBST로 세번 세척하였다. HRP 접합 이차 항체 (1:5000 희석, PBST 내에서, 100 μl/well)로 1 시간 처리 후, 플레이트를 PBST에서 세척하고, 색원성 HRP 기질 TMB를 사용하여 발색시키고, 발색은 1M H2SO4로 종결하였다 플레이트를 450 nm에서 판독하였다.

- [0255] 실시예 1
- [0256] 인클로날스 방법을 사용하여 E. coli에서 전장 IgG의 생산
- [0257] E. coli 세균에서 전장 IgG을 생산하는 인클로날스 방법(Hakim 및 Benhar, 2009)은 IgH 및 IgL를 개별 세균 배양물에서 생산하기 위해 pHAK-IgH 및 pHAK-IgL 벡터를 각각 사용하는 것을 포함한다. 중쇄 및 경쇄의 가변부위는 항체 특이성을 정하고, 불변 부위는 각 벡터에 공통적이다. 단백질 발현, 정제 및 재폴딩은 인클로날스 방법에 따라 수행되고, 인클로날스 방법 및 정제된 단백질을 SDS-PAGE, 웨스턴 블랏, 크기 배제 크로마토그래피 및 항원 결합 분석을 사용하여 평가하였다. 단일특이성 항체와는 달리, 상기 이중특이성 IgGs는 2 개 상이한 중쇄 및 2개 상이한 경쇄로 구성되며, 따라서, 발현과 재폴딩 단계는 4 개 단백질의 동시적 작업을 포함한다.
- [0258] 실시예 2
- [0259] 중쇄-중쇄 이중이합체의 작제 및 평가
- [0260] “노브-인트루-홀” 방법 (Ridgway 등, 1996)을 E. coli에서 이중특이성 IgG 생산을 위한 상이한 중쇄들의 바람직한 이중이합체화에 대한 해법으로서 이행하였다.
- [0261] 4 개 변이 (“노브” 중쇄에서 T366W 및 “홀” 중쇄에서 T366S, L368A, Y407V)의 도입 및 비대칭적 디설파이드 결합 (보체 중쇄 상에서 S354C 및 Y349C)은 포유동물 세포에서 생성된 IgG에 있어서 중쇄의 높은 (>95%) 이중이합체화 수준을 제공하는 것이 이미 증명되었다 (Merchant 등, 1998) (도 1A). 상기 변이는 pHAK-HC-knob 및 pHAK-HC-hole 벡터를 작제하는 데 사용하였고 이들은 중쇄들의 발현과 조사에 사용되었으며, 반면 공통적인 비변형 경쇄는 모든 IgG 작제물을 위해 사용되었다 (도 2A-H). T427 (항-CD30) 및 FRP5 (항-erbB2) 항체들은 방법 평가를 위한 모델 IgG로 사용하였다 (Harwerth 등, 1992; Nagata 등, 2004). 상기 항체 중쇄 및 경쇄들을 봉입체로서 발현하고, 원심분리하고 정제하고, 및 SDS-PAGE로 분석하였다 (도 3). 인클로날스 방법에 따라 4 항체 사슬을 같이 재폴딩한 후 단백질 A 정제하여 전장 IgG를 생산할 수 있었다.
- [0262] 이중이합체화 수율의 상세한 특성화를 위해, “홀-중쇄”를 단백질 무게가 38 kDa 추가되는 PE38 독소 (Kreitman 등, 1992)를 가진 융합단백질로서 발현하였다. 도 4A-B에서 설명한 대로, SDS-PAGE 분석을 사용하여, “노브” 중쇄의 동종이합체 (150 kDa), “홀” 독소-융합 중쇄의 동종이합체 (230 kDa) 및 두 개 상이한 중쇄들의 이중이합체 (190 kDa) 간에 구별하는 것이 가능하였다. 도 4B는 인클로날스에 의해 생성된 T427 “노브-인트루-홀” 항체가 비환원 폴리아크릴아미드 겔 상에서 190 kDa 밴드로 이동하며, 환원 조건하에서 3 성분으로 분리될 수 있다 (IgL, IgH 및 IgH-PE38)는 것을 나타낸다.
- [0263] 재폴딩 용액에 오직 하나의 중쇄 유형 (“노브” 또는 “홀”)을 제공하여 IgG의 “노브-노브” 및 “홀-홀” 버전을 제조하는 시도는 IgG의 조립 및 부분 크기 분자의 성능에서 실패하였다 (도 5A-B).
- [0264] 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 이중특이성 인클로날스 “노브-인트루-홀” 항체들을 평가한 것에서, 단백질 주요분이 190 kDa 분자로서 이동하며 오직 작은 단백질 분해물만이 동종이합체를 나타냈다 (도 6). 인클로날스 “노브-인트루-홀” 항체의 밀도 분석 SDS-PAGE에 의하면, E. coli 생산된 IgG들의 90 % 넘는 비율이 중쇄 이중이합체화를 나타냈다 (도 7A-C).
- [0265] 이중특이성 분자들의 결합 활성을 평가하기 위해, “노브-인트루-홀” 이중특이성 T427-FRP5 항체를 제조하였다. 이러한 IgG는 4 개 상이한 사슬로 구성됐다: FRP5-knob 및 T427-hole-PE38 중쇄, 및 FRP5 wt 및 T427 wt 경쇄. 이러한 작제물 내의 PE38 독소를 T427 중쇄 존재에 대한 검출 신호로서 사용하였다. 단일특이성 T427 및 FRP5 IgG들을 대조군으로 사용하였다. 간접적 ELISA를 사용하여, 본 발명자들은 그의 항원에 대한 상기 항체들의 결합 능력을 증명하였다 (FRP5에 대한 erbB2 (도 8A) 및 T427에 대한 CD30 (미도시)). 특수 ELISA (도 8B) 분석으로 FRP5 항원에 결합하는 항체를 조사하고, T427-PE38 사슬을 검출하였다. 이러한 분석법으로, 두 개 항원들에 결합할 수 427-FRP5 이중이합체의 존재가 증명되었다.
- [0266] 실시예 3
- [0267] 중쇄-경쇄 특이적 짝짓기의 제조 및 평가

- [0268] 두 개 가변 도메인들 사이에 디설파이드 결합을 도입하여 천연 중쇄-경쇄 사슬간 S-S 결합을 대체하기 위해서, T427 항체를 사용하였다. 이러한 항체는 많이 연구되었고 그의 dsFv에 대한 시스테인 위치는 잘 정의되어 있다 (Nagata 등, 2004). 벡터 pHAK-HC-Cys 및 pHAK-LC-Cys를 통상적인 시스테인 위치를 정의된 dsFv로 대체함으로써 제조하였다. dsFv-유사 변형 단일특이성 IgG가 생성됨으로써 단일 dsFv-유사 중쇄-경쇄 사슬간 S-S 결합에 의해 안정화된 전장 IgGdml 효율적인 형성이 증명되었다 (도 9, 라인 3).
- [0269] pHAK-HC-Cys-knob를 제조함으로써, 완전히 이중특이성인 전장 T427-FRP5 IgG를 생성할 수 있게 되었다 (도 9, 라인 4). 중쇄의 이중이합체화는 “노브-인트루-홀” 전략에 의해 제공되었고, 및 중쇄-경쇄 짝짓기는 비대칭적 사슬간 디설파이드 결합에 의해 확고해 졌다. 또한, 짝짓지 못한 중쇄 및 경쇄이 있는 IgG 제조용액은 완전한 IgG 분자를 생성하지 못하였다 (도 10).
- [0270] 실시예 4
- [0271] 두 개의 추가 이중특이성 항체들이 상기 재료 및 방법에서 설명한 바대로 생성, 정제 및 평가되었다
- [0272] 1. T427- α SA IgG: CD30 및 스트렙타비딘 (SA)에 결합. 이러한 이중특이성 항체는 4 개 사슬로 구성됨: IgL-T427-Cys (Cys104:Cys218del), IgH-T427-knob-Cys (Cys44:Cys222A1a + S354C:T366W), IgL- α SA 및 IgH- α SA-hole (Y349C:T366S:L368A:Y407V).
- [0273] 2. T427- α PE (B11 클론) IgG: CD30 및 PE38에 결합 (슈도모나스 외독소 38kDa 절편). 이러한 이중특이성 항체 4개 사슬로 구성됨: IgL-T427-Cys (Cys104:Cys218del), IgH-T427-knob-Cys (Cys44:Cys222A1a + S354C:T366W), IgL- α PE 및 IgH- α PE-hole (Y349C:T366S:L368A:Y407V).
- [0274] 상기 항-스트렙타비딘 (α SA) 및 항-PE B11 클론 (α PE) 항체들을 친화성 “Ronit1” 항체 파지 디스플레이 라이브러리 (Azriel-Rosenfeld 등, 2004, J Mol Biol 335, 177-92)를 선택하는 친화성으로 scFv들로서 분리하였다. 중쇄 및 경쇄 도메인들을 pHAK-IgH-hole 및 pHAK-IgL로 각각 클론하였다 (전술한 바와 같이). 상기 사슬들을 E. coli 균에서 봉입체로서 생성하고, 원심분리고 정제하고, 및 SDS-PAGE 전기영동으로 분석하였다 (도 11). 적절한 중쇄 및 경쇄를 혼합하고, 재폴딩하고, 단백질 A 친화성 정제로 정제하여 단일특이성 T427, α SA, α PE 및 이중특이성 T427- α SA 및 T427- α PE 항체들을 인클로달스 방법에 따라 생성하였다 (Hakim 및 Benhar, 2009). 상기 항체들을 각 항원으로의 결합 활성에 대하여 ELISA 분석하였다 (도 12 및 13). 나타난 바와 같이, 이러한 이중특이성 항체들이 성공적으로 생성되었고, 두 개 팔의 특이성에 따라 두 개 항원을 결합하였다. 특이성은 소혈청 알부민 (BSA)에 대한 사소한 결합으로 증명하였다.
- [0275] 실시예 5-9에 대한 재료와 방법
- [0276] 포유동물 세포에서 IgG발현용 pDual 벡터의 작제: E. coli 항체 중쇄 및 경쇄를 생산하기 위한 벡터를 pMAZ 벡터 (Mazor Y., 등 J Immunol Methods. 2007 Apr 10;321(1-2):41-59.)의 백본 상에서 제조하였다. 두 개 이중-시스트론성 pMAZ 벡터를 제조하였다 - pMAZ-IgH, 상기 중쇄 및 네오마이신 선택 마커를 포함; 및 pMAZ-IgL, 상기 경쇄 및 하이그로마이신 선택 마커를 포함. IgG 발현을 두 개 벡터의 공 형질전환으로 배개한 후, 이중 약물 선택으로 안정한 형질감염체를 얻었다.
- [0277] 상기 pDual 벡터는 IgH-Apael-NheI-For 및 IgH-BsrGI-Rev 프라이머들을 사용하여 이미 변형되어 불변 부위에서 ApaI 제한 부위를 삭제한 pMAZ-IgH 벡터 기초한 것이다. 다음 단계는 pCMV-IgL-term 카세트를 작제하고, 이를 pMAZ-IgH-Apael 벡터의 KpnI-EcoRI 제한효소 부위 사이에 클로닝하는 것이다. 1) BssHI가 ApaI 제한 부위로 치환되게 하는 pCMV-KpnI-For 및 pCMV-Rev 프라이머를 사용하여 pCMV 프로모터를 증폭하는 것 (이러한 ApaI 부위는 상기 플라스미드에서 유일한 것으로 될 것인데, 이는 Fc 코딩 부위에서 존재하는 ApaI 부위가 변이되었기 때문이다); 2) XbaI가 NotI 제한 부위로 치환되게 하는 T427L-For 및 T427L-Rev 프라이머들을 사용하여 T427 경쇄 항체 (VL+LC)를 증폭하는 것; 3) BGH-polyA-For 및 BGH-polyA-EcoRI-Rev 프라이머들을 사용하여 BGH 폴리아데닐화 부위를 증폭하는 것을 포함하는 세 가지 PCR 산물을 조합함으로써 상기 pCMV-IgL-term 카세트를 제작하였다. 상기 PCR 산물들을 오버랩-확장 폴리머라제 사슬 반응 (조립 PCR)에 의해 pCMV-IgL-term 카세트로 조립한 후, 전술한 바와 같이, KpnI 및 EcoRI 제한 효소로 처리하고 pMAZ-IgH-Apael 벡터로 클로닝하였다. 결과된 벡터를 pDual로 지칭하고 VL(카파 경쇄, 람다 경쇄의 경우, 람다 경쇄를 포함하는 별도 벡터가 필요하고,

이 속으로 V-람다 가변 도메인이 ApaI-AvrII 제한효소 절편으로서 그 클론되어야만 한다)에 대하여 ApaI-BsiWI 제한 부위 및 VH에 대해서는 BssHI-NheI 제한 부위를 사용하여 상이한 항체들의 가변 도메인을 클로닝하는 데 사용하였다.

[0278] 하이그로마이신 선택 마커를 포함하는 유사한 pDual 벡터를 제조하였다.

[0279] 상술한 벡터들을 생성하는 데 사용된 프라이머 목록이 하기 표 4에 정리되어 있다.

표 4

[0280]

| 프라이머 명칭 | 서열 5'에서 3' | 특징 |
|---------------------|---|---|
| IgH-ApadeI-NheI-For | tcctcaGCTAGCaccaaggAccatcggtcttccctg NheI | 사일런트 변이에 의해 IgH 불변 도메인에서 ApaI 제한 부위 제거용 정방향 프라이머 |
| IgH-BsrGI-Rev | gcaggTGTACAacctgtggttc BsrGI 서열번호: 61 | IgH-ApadeI-NheI-For용 역방향 프라이머 |
| pCMV-KpnI-For | actgaaccttgagtgcaGTTACcattgat KpnI Tattgagtagttattaatag 서열번호: 62 | CMV 프로모터 증폭용 정방향 프라이머 |
| pCMV-Rev | GGGCCCtgtggagagaaggcaagtggatg ApaI 서열번호: 63 | CMV 프로모터의 증폭 및 ER 분비 신호 및 VL 항체 부위간의 ApaI 제한 부위 삽입용 역방향 프라이머. |
| T427L-For | ctttgcctttctctccacagGGGCCActccgac ApaI attgtgctgacccaatc 서열번호: 64 | T427 IgL 증폭 및 pCMV 절편과의 조합용 정방향 프라이머 |
| T427L-Rev | cggtttaaaaaacgggacctctggaGCGCCGCTt NotI attaacactctccctgttgaagctctttgtg 서열번호: 65 | XbaI을 NotI 제한 부위로 치환하게 하는 T427 IgL의 증폭용 역방향 프라이머 |
| BGH-polyA-For | tccagaggtcccgttttttaaacgggttttttaaacgctg atcagcctcg 서열번호: 66 | 폴리아데닐화의 증폭 및 T427 IgL 절편과의 조합용 정방향 프라이머. |
| BGH-polyA-EcoRI-Rev | tagctcgatccgtcgagaGAATTCccccagcat EcoRI gcctgctattg 서열번호: 67 | 폴리아데닐화 부위의 증폭용 역방향 프라이머 |

[0281] HEK293 T-RExTM 세포의 형질전환: 칼슘-인산염 형질전환 방법을 적용하여 pDual 또는 pMAZ 플라스미드 1 µg 을 형질전환 24시간 전에 3×10⁵ 세포/웰로 6-웰 플레이트에 시딩된 T-REx 293 세포로 도입하였다. 일시적인 형질전환을 위해, 상기 배지 샘플을 형질 전환 후 24, 48 및 72 시간 만에 수집하였다. 안정한 형질전환체를 얻기 위해, 상기 세포를 형질전환 후 24 시간 만에 수집하고, 적절한 항생제가 보충된 (1.2 mg/ml G418 및 0.2 mg/ml 하이그로마이신)에 시딩하였다. 안정한 클론들을 수집하고 그 배지를 항체 존재 여부에 대하여 조사하였다.

[0282] HEK293 T-RExTM 세포에서의 IgG 생성: 이전에 수득한 안정한 클론들을 0.9 mg/ml G418 및 0.15 mg/ml 하이그로마이신 (정규 농도의 75 %)을 함유한 DMEM을 가진 조직 배양 플라스크(250 cm³)로 옮겼다. 다음날 (또는 세포가 80% 콘플루언스에 도달시) 배지를 50 % DMEM (+L-Glu, PNS 및 소혈청) 및 50 % DCCM1 (+L-Glu, PNS, 무혈청) + 항생제 농도의 75% (0.9 mg/ml G418 및 0.15 mg/ml 하이그로마이신)으로 24 hours시간 교체하였다. 다음날, 배지를 100 % 무혈청 DCCM1 (+L-Glu, PNS)으로 교체하였다. 세포로부터 DCCM1배지를 매 2-4 일마다 수집하고 및

새로운 무혈청 배지로 부드럽게 교체하였다. 플라스크로부터 최대 4 개까지 수확물을 수집하였다.

- [0283] 포유동물 세포에서 생성된 IgG의 단백질 A 정제: 항체 분비 세포로부터 분리한 DCCM1 배지를 5500 rpm에서 15 분간 원심분리하고, 0.45 μ m 필터를 사용하여 여과하였다. 배지를 $\times 20$ 농축 인산염 완충액(400mM)으로 1:20 배로 최종 농도 20 mM Na₂HPO₄ 및 20 mM NaH₂PO₄ 로 희석하고 및 혼합물을 단백질 A 컬럼에 1 ml/min의 유동속도로 적재하였다. 상기 단백질을 0.1 mM 구연산 (pH 3)으로 용출하고, 1M Tris (HCl) pH 8.5로 중성화한 다음, 20 mM 인산염 완충액 (PBS) pH 7.4에 대하여 투석하였다. 최종 단백질 농도는 280 nm에서의 흡광도로 결정하였다.
- [0284] ELISA 분석: 단일 및 이중특이성 IgG에 의한 항원 결합은 하기와 같이 결정되었다: 96-웰 ELISA 플레이트를 5 μ g/ml 순수 항원을 포함하는 PBS 100 μ l/웰로 밤새 4 $^{\circ}$ C에서 코팅하고, 3 % 우유(PBS에 포함)로 1 시간 37 $^{\circ}$ C에서 차단하였다. 모든 후속 단계는 실온 (25 $^{\circ}$ C)에서 수행하였다. 단백질-A 정제된 단백질 (또는 조건화된 배지)를 PBST에서 3 배 연속 희석액으로 플레이트에 적용하여 1 시간 항온처리하고 PBST로 세번 세척하였다. HRP 접합 이차 항체 (1:5000 희석, PBST 내에서, 100 μ l/well)로 1 시간 처리 후, 플레이트를 PBST에서 세척하고, 색원성 HRP 기질 TMB를 사용하여 발색시키고, 발색은 1M H₂SO₄로 종결하였다. 플레이트를 450 nm에서 판독하였다.
- [0285] 세포 ELISA 분석: A431/CD30 (CD30 발현, T427에 대한 타겟 항원) 및 SKBR3 (ErbB2 발현, FRP5에 대한 타겟 항원) 세포주를 10 % 우태아혈청, 1 % L-글루타민 및 1 % 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 DMEM에서 유지하고 및 37 $^{\circ}$ C에서 5 % CO₂하의 조건에서 배양하였다. 상기 세포(2 \times 10⁴/well)를 100 μ l 배지가 들어있는 96-웰 조식배양 플레이트에 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양하였다. 밤새 배양후, 상기 배지를 부드럽게 따라버리고, 세포를 3 % 글루타르알데히드 수용액에서 15분간 실온에서 혼합하였다. 상기 세포를 PBS로 세척하고 및 5 % BSA를 함유한 PBS로 2 시간동안 37 $^{\circ}$ C에서 차단하였다. 모든 후속 단계는 정규 ELISA 방법에 따라 실온(25 $^{\circ}$ C)에서 수행하였다.
- [0286] 닷 블랏 분석: 형질전환 72 시간 후의 세포 조건화된 배지의 100 μ l 샘플들을 동일한 부피의 PBS에 희석시키고, 및 닷-블랏 기구 (Schleicher and Schuell, USA)를 사용하여 진공 매니폴드를 통해 니트로셀룰로즈 막 필터로 적용하였다. 막을 3 % (v/v) 탈지우유를 함유한 PBS로 1 시간 37 $^{\circ}$ C에서 차단한 후, 상기 막을 PBS로 간단히 세척하고, 염소-항-인간 HRP 접합 이차 항체로 1 시간동안 실온에서 배양처리하였다. PBS로 세 번 세척 후, 상기막을 ECL 시약으로 발색시켰다 (Pierce, USA).
- [0287] SDS-PAGE 분석: 단백질의 폴리아크릴아미드 젤 전기영동을 Laemmli (Laemmli, 1970)에 따라 수행하였다. 5x 샘플 완충액의 1/5 부피를 단백질 샘플에 첨가한 후, 5 분간 끓이고, 젤에 적재하였다. 7.5 %, 10 % 및 12 % 미니-젤에서 120 V에서 전개하였다. 전장 IgG를 평가하기 위해, 비환원 샘플 (β -머캅토에탄올이 없는)을 적재하였는데, 환원된 단백질 샘플은 중쇄 및 경쇄 성분들로 분리되었다. 젤을 쿠마시 블루 액 (0.05 % 쿠마시 R-250, 20 % 에탄올, 10 % 빙초산)으로 2 시간 염색하고, 단백질 밴드가 명확히 보일 때까지, 탈색 용액 (20 % 에탄올, 10 % 빙초산)에서 세척하였다. 단백질 밴드 밀도를 ImageMaster 1D 스캐닝 레이저 밀도계 (Pharmacia, Sweden)로 측정하였다. 염색된 젤에 비정제된 분획을 위해 라인당 20 μ g 단백질 또는 정제된 단백질 분획을 위해 3-5 μ g를 적재하였다. 면역블랏팅에 의해 더 가공된 젤 그것의1/10의 양으로 적재하였다.
- [0288] 웨스턴 블랏 분석: SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질을 (Towbin 등, 1992)에 따라서 니트로셀룰로스 막으로 전기 전이시켰다. 이 막을 5 % 탈지분유를 포함하는 PBSfh, 적어도 1시간동안 실온에서 느리게 진탕하면서 차단하였다. 상기 막을 PBS로 세척한 후, HRP 접합 염소-항-인간 이차항체로 처리하였다 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). 0.05 % Tween-20 (PBST)을 함유하는 PBS로 세번 세척하고 및 PBS로 한 번 세척한 후 상기 니트로셀룰로스 필터를 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, USA)로 공급자가 설명한 대로 사용하여 발색하였다.
- [0289] EXAMPLE 5
- [0290] 포유동물 세포에서의 IgG 생산
- [0291] 이중특이성 항체들을 생성하기 위한 포유동물 세포에서의 IgG 생성용에 사용되는 벡터 시스템은 포유동물 세포 배양에서 단일클론성 항체들의 생산용 pMAZ 벡터에 기반한다 (Mazor Y 등, 2007). 벡터 pMAZ-IgH는 인간 γ 1 중

쇄 발현용으로 고안되고, pMAZ-IgL는 인간 κ 경쇄 발현용으로 고안되었다. 경쇄 및 중쇄의 가변 도메인들을 적절한 벡터에 도입하고, HEK293 세포에 공형질전환시키고, 및 안정한 항체 분비 클론들을 확인하고 유지하였다. 세포 클론들을 혈청 금식한 결과 원하는 항체를 배양액 리터당 최대 20 mg까지 총 수율로 분비하였다.

[0292] 실시예 6

[0293] 포유동물 세포에서의 IgG 분자 생산용 듀얼 벡터의 작제

[0294] 항체들의 경쇄 및 중쇄를 생산하는 데 독립적으로 사용된 (도 14) pMAZ-IgL 및 pMAZ-IgH 벡터(Mazor Y 등, 2007)로부터 유도된 DNA 절편들을 융합함으로써 pDual 벡터를 작제하여, 동일한 벡터를 사용하여 항체 경쇄 및 중쇄 를 생산하는 키메릭 작제물을 얻었다. IgL 및 IgH를 pDual 벡터내에서 별도의 CMV 프로모터 제어하에 있는 별도의 카세트로 만들었다. 경쇄 카세트에서 BssHI를 ApaI 제한 부위로 치환함으로써, 가변 경쇄 및 중쇄 도메인을 이중 벡터로 클로닝하는 것이 단순화되었다: ApaI-BsiWI를 VL의 클로닝에 사용하였고 및 BssHI-NheI를 VH의 클로닝에 사용하였다.

[0295] 실시예 7

[0296] 포유동물 세포로의 형질전환용 이중특이성 벡터의 작제

[0297] 이중특이성 분자 생성용 pDual-기반 벡터를 만들기 위해, “노브”, “홀” 및 “Cys” 관련 변이물을 상기 pHAK 벡터로부터 pDual 시스템으로 클론하였다. 상기 클로닝 방법으로, 표 4에 기록된 일련의 작제물을 얻었다. pDual-T427 벡터에서 NeoR 를 항Hygro 카세트로 교체하는 것은 AvrII 및 KpnI 제한 효소를 사용하여 pMAZ-IgL 벡터로부터 상기 카세트를 서브클로닝함으로써 수행되었다. 결과된 pDual-NeoR 및 pDual-HygroR 벡터들의 쌍을 포유동물에서의 형질전환 및 4 상이한 항체 사슬: 두 개 중쇄 및 두 개 경쇄를 하나의 세포주에서 생성하는 안정한 클론들을 선택하는 데 사용하였다.

표 5

[0298]

| 벡터 명칭 | 생성물 |
|--|------------------------------------|
| pDual-T427 wt Neo ^R | IgL-T427 + IgH-T427 |
| pDual-FRP5 wt Neo ^R | IgL-FRP5 + IgH-FRP5 |
| pDual-T427-L(wt)-H(knob) Neo ^R | IgL-T427 + IgH-T427(knob) |
| pDual-FRP5-L(wt)-H(hole) Neo ^R | IgL-FRP5 + IgH-FRP5(hole) |
| pDual-T427-L(Cys)-H(wt) Neo ^R | IgL-T427(Cys) + IgH-T427 |
| pDual-T427-L(Cys)-H(knob) Neo ^R | IgL-T427(Cys) + IgH-T427(knob) |
| pDual-T427-L(wt)-H(Cys-knob) Neo ^R | IgL-T427 + IgH-T427(Cys-knob) |
| pDual-T427-L(Cys)-H(Cys-knob) Neo ^R | IgL-T427(Cys) + IgH-T427(Cys-knob) |
| pDual-T427 wt Hygro ^R | IgL-T427 + IgH-T427 |
| pDual-T427-L(Cys)-H(Cys-knob) Hygro ^R | IgL-T427(Cys) + IgH-T427(Cys-knob) |

[0299] 실시예 8

[0300] 임시 형질전환된 HEK293 T-RExTM 세포에서의 이중특이성 IgG 분자의 생성 및 평가

[0301] 하기 실시예는 IgG 분비 시스템에서 항체의 경쇄 및 중쇄 사이의 S-S 다리의 중요성을 나타내며, 및 이중특이성

항체의 적절한 경쇄 및 중쇄를 짝짓기 위한 “대안적 시스테인” 이론이 포유동물 생산 시스템에 관계한다는 것을 증명하는 것은 물론, E. coli가 이중특이성 “인클로날스”를 생성한 것을 증명하였다. HEK293 T-RExTM 세포주를 이 연구에 사용하였다. 상기 세포를 일시적으로 pDual-T427 wt (wt IgG 암호화), pDual-T427-L(Cys)-H(wt) (C-kappa 시스테인이 결여되고 및 VL에서 조작된 시스테인을 함유하지 않는 wt 중쇄 및 경쇄를 암호화, 이것은 IgG를 형성하지 않는 사슬들의 쌍이어야 한다) 또는 대조군으로서 pMAZ-IgL+pMAZ-IgH (wt IgG 생산용 이전 시스템) 쌍으로 형질전환시켰다. 웨스턴 블랏 분석에 의한 형질전환후 배지의 분석 결과, 어떠한 전체 크기 항체들도 pDual-T427-L(Cys)-H(wt) 형질전환된 세포의 배지에서 검출되지 않았고, pDual wt 작제물의 형질전환은 분비된 항체를 검출할 만한 수준으로 생성하였다 (Erbixutx 희석물에 비하여 최대 1 µg/ml 까지는 것이 나타났다 (도 15A 및 B)).

[0302] 이중특이성 IgG 분자의 분비또한 증명되었고, 및 “노브-인트루-홀” 및 “대안적 시스테인” (또한 “디설파이드 안정화”로 불림) 방법을 사용하여 이중특이성 IgG 형성의 선호도를 평가하였다. 상기 pDual 벡터를 HEK293 TRex 세포로 일시적으로 형질전환시켰고 및 분비된 항체들을 조건화된 배지를 웨스턴 블랏 분석하여 검출하였다. 네 개 pMAZ 벡터들 (pMAZ-T427-IgL, pMAZ-T427-IgH, pMAZ-FRP5-IgL 및 pMAZ-FRP5-IgH)로 형질전환된 세포를 대조군으로 사용하였다. 실험 분석을 통해, 다음이 증명되었다: 1) 상기 “노브-인트루-홀” 방법은 상이한 중쇄들의 효율적인 이중이합체화에 대한 해법이다, 2) “대안적 Cys” 방법은 동일한 항체의 경쇄 및 중쇄를 짝짓는 데에 대한 해법을 제공한다, 3) 상기 두 개 방법을 조합하면 포유동물 세포 생성 시스템에서 전장 이중특이성 IgG 항체들의 분비를 만들 수 있다. 도 16에 도시된 바와 같이, 사슬의 “오류” 조합물이 사용될 때, 어떠한 전장 IgG도 조건화 배지의 면역블랏 분석에서 나타날 수 없다. 온전한 IgG는 단일특이성 IgG를 발현하는 세포에서 (레인 1 및 2), 두 개 단일특이성 IgGs를 발현하는 세포에서 (레인 5, 두 개 pDual 벡터 및 레인 4 네 개 pMAZ 벡터) 및 이중특이성 IgG를 발현하는 세포에서 (레인 7) 관찰될 수 있다.

[0303] 실시예 9

[0304] 안정한 형질전환 HEK293 T-RExTM 세포에서의 이중특이성 IgG 분자의 생산과 평가, 및 항원 결합의 평가

[0305] 안정한 항체-분비 클론을 얻기 위해, 본 발명자들은 HEK293 T-RExTM 세포를 pDual-FRP5-L(wt)-H(hole) NeoR 및 pDual-T427-L(Cys)-H(Cys-knob) HygroR 벡터로 공동형질전환시켰다. 네 Neo + 네 Hygro 클론을: 1) 항체를 분비하는 능력, 2) 양쪽 항원들과 결합하는 능력, 3) 추가의 정제를 위하여 전장 IgG를 분비하는 능력에 대하여 증명되었다. 일차 항체 분비 시험을 닷 블랏 분석법으로 수행하였고 (시험 실시에는 도 17에 증명됨) 및 낮은, 중간 및 높은 분비 클론들을 확인하였다. 중간 및 높은 분비체로서 표시되는 클론들을 그들의 항원 결합 활성에 대하여 조사하였다. ELISA를 수행하여 erbb2 (FRP5) 및 CD30 (T427) 재조합 항체들에 대한 각 클론의 결합 수준을 조사하였다 (도 18). 각 항원에 결합할 수 있는 몇 개 클론들은 제3 단계를 계속하고, 단백질 A 친화성 컬럼 상에서 정제하였다 (도 19). 정제된 항체들을 분석하여, 크기, 순도, 및 재조합 항원 또는 항원-제시 세포에 대한 결합 활성을 결정하였다 (도 20 및 21). 도 18에 나타난 바와 같이, ELISA에서의 결합 신호는 이러한 클론들의 분비 수준과 상호관계가 있었다. 도 20 및 21에 나타난 바와 같이, 단백질 A-정제된 이중특이성 IgG는 CD30 및 Erbb2 항원 둘 다에 결합하였다. 그러한 ELISA에서 (도 21) 상기 단일특이성 IgG들 (2가인)은 각각의 그들의 동종 항원 상에서 탐욕 효과로 인하여 더 강한 결합 신호를 나타낼 것이 예상된다. 일차 세포-ELISA (도 22)는 클론 D3에 의해 분비된 이중특이성 항체는 항원-양성 세포들을 염색한다는 것이 나타난다.

[0306] 실시예 10

[0307] 단일특이성 항체들의 작제

[0308] 먼저, 노브인트루홀 (KIH) 변이를 포함하는 단일특이성 항체 (T427 IgG)를 생성하였다. KIH T427 IgG 분자의 결합 활성을 평가하기 위해, ELISA를 수행하였다. ELISA 플레이트를 MBP-CD30으로 코팅하고, T427 KIH IgG (PE38에 융합된)과 배양하였다. T427 KIH 분자의 결합 특성은 개질되지 않는 T427 IgG 및 T427-PE38 IgG-PE38의 결합과 유사한 것이 나타났다 (도 24).

[0309] 후속적으로, 전술한 바와 같이 경쇄에서 KIH 변이 및 시스테인 변이 둘다를 포함하는 단일특이성 항체 (T427 IgG)를 제조하였다.

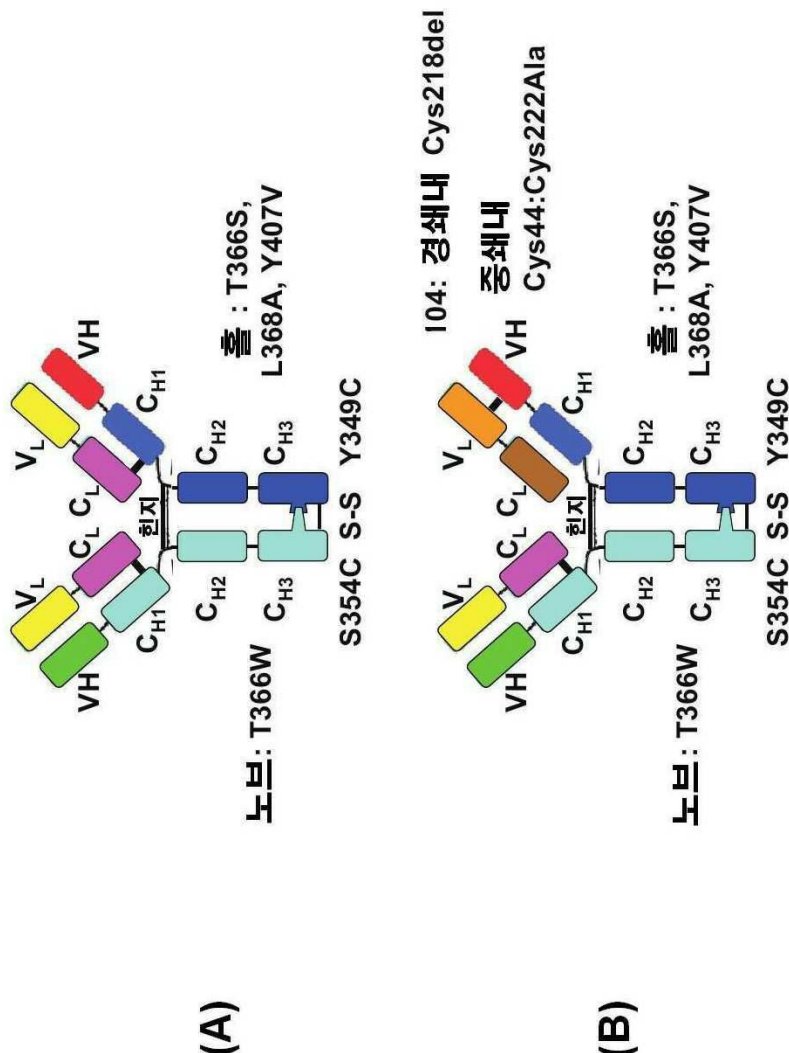
[0310] 단일특이성 T427 항체를 생성하기 위해, 4 개 사슬을 만들었다: IgL-PE38, IgH-knob, IgH-Cys-hole 및 IgL-Cys. VL-비변형된 경쇄에 융합된 38 kDa PE38가 존재한다는 것은 적절한 중쇄 및 경쇄들의 짝짓기 (KIH 이중이 합체화 분석과 유사) 및 전장 단일 이중특이성 분자의 형성을 분석할 수 있는 가능성을 제공한다 (도면 부제).

[0311] 본 발명이 비록 이의 특정 구체예와 연계하여 설명되었으나, 많은 대안적, 변경 및 다양성이 당해 분야의 숙련 자에게 명백하다는 것이 확실하다. 따라서, 모든 그러한 대안, 변경 및 다양성은 첨부된 청구범위의 사상과 범 위에 포함되는 것으로 의도된다.

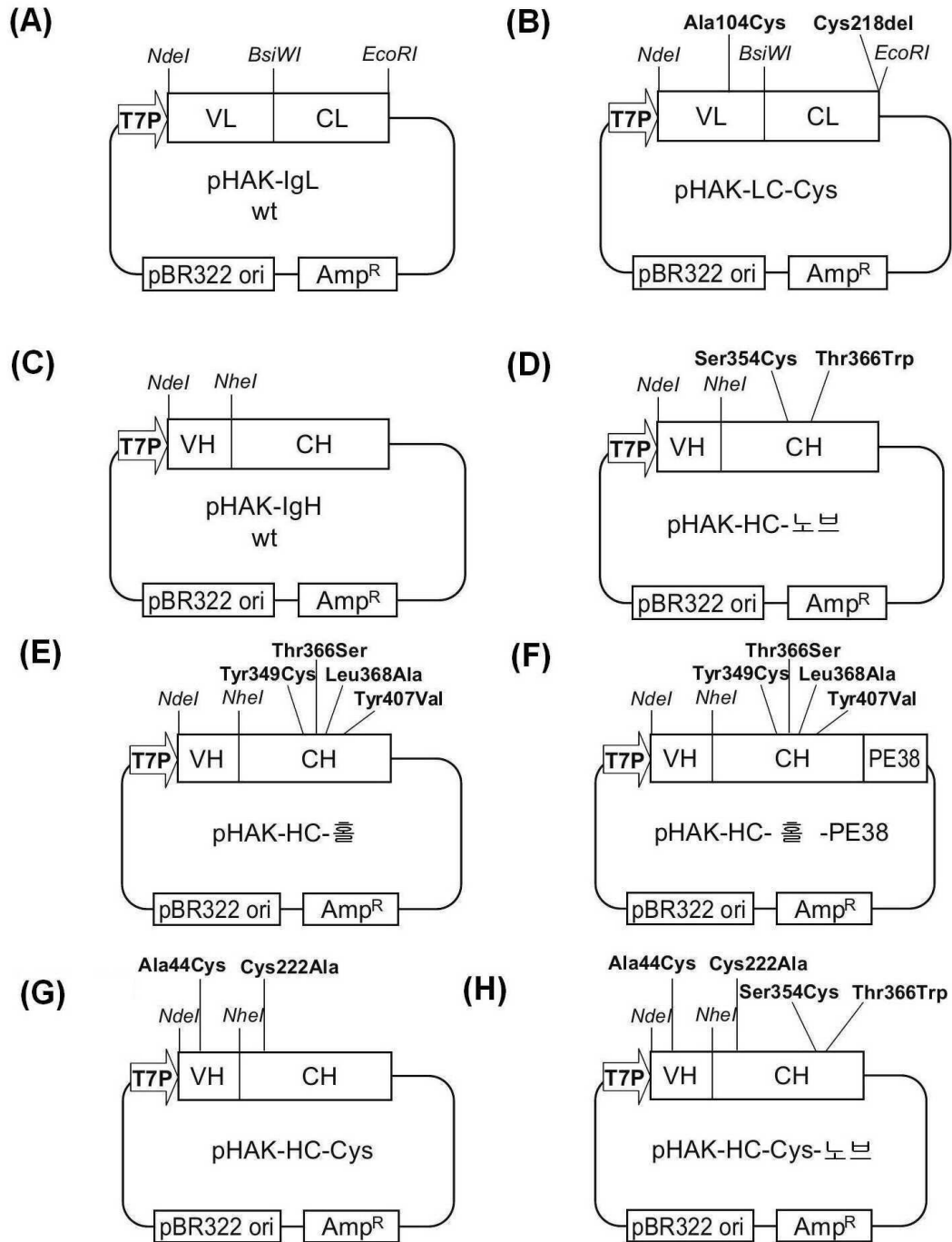
[0312] 본 명세서에서 언급된 모든 공개물, 특허, 및 특허 출원서는 참조함으로써 그 전체가 본 명세서에, 마치 각 개별 공개물, 특허 또는 특허 출원서가 특이적으로 개별적으로 참조로써 본 명세서에 기입되는 것과 동일한 정도로 기입된다. 또한, 본 출원에서의 임의의 참조문헌의 인용 또는 인증은 그러한 참조 문헌이 본 발명에 선행 기술로서 이용가능한 것으로 허락된 것으로 해석되어서는 안된다. 문단 제목이 사용되는 정도로, 이들은 필수적으로 제한점으로 해석되어서는 안된다.

도면

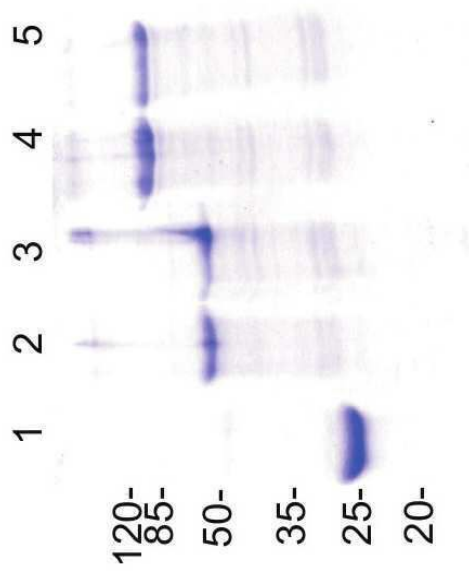
도면1



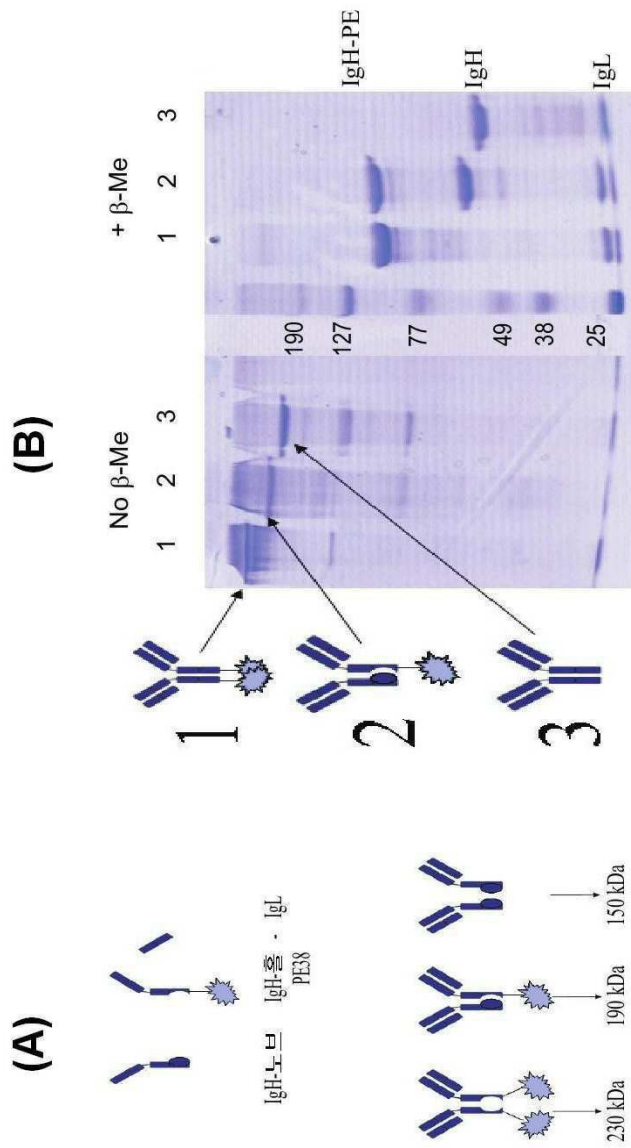
도면2



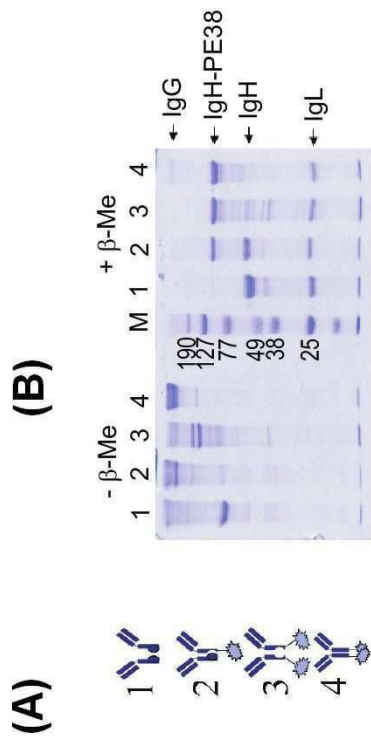
도면3



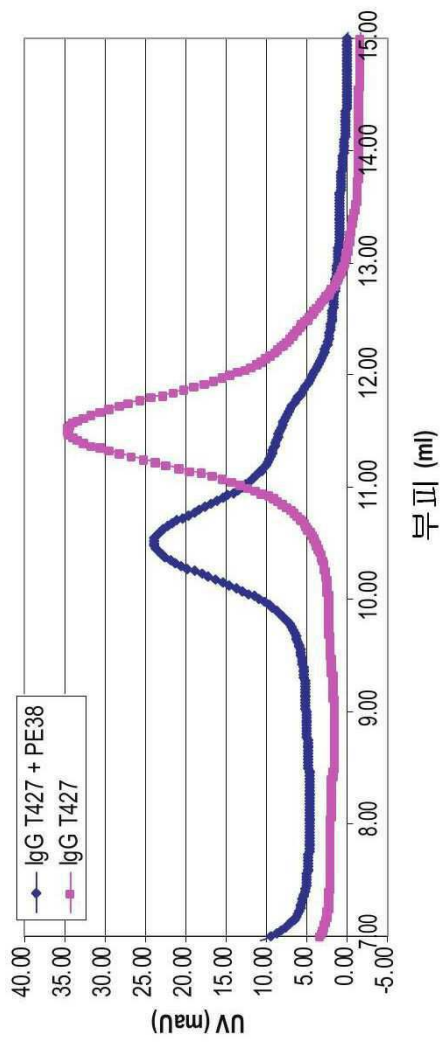
도면4



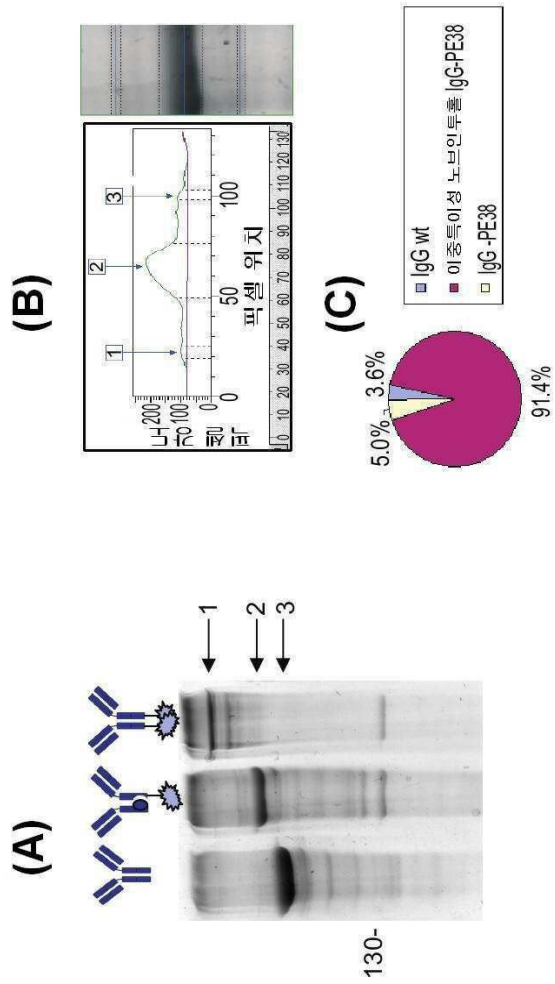
도면5



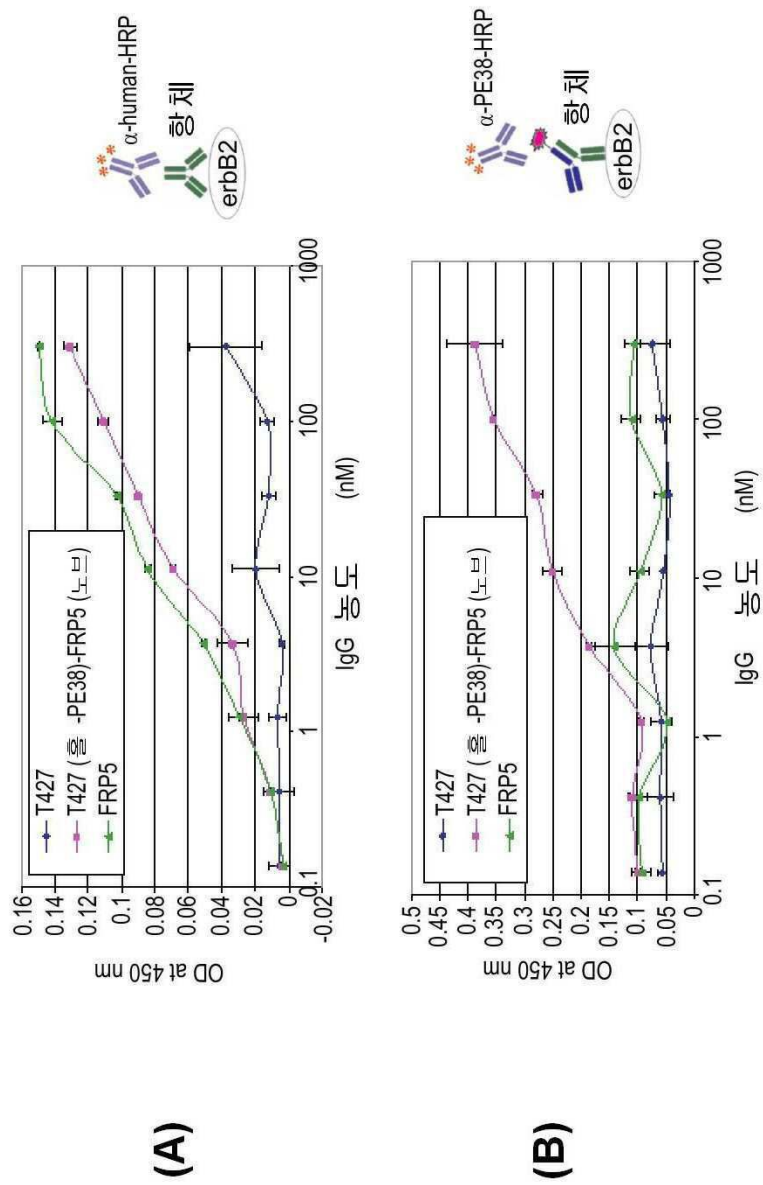
도면6



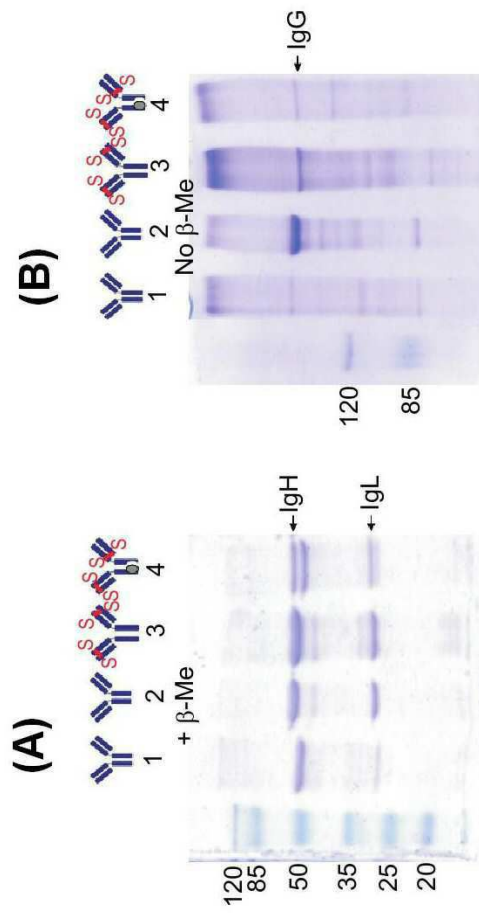
도면7



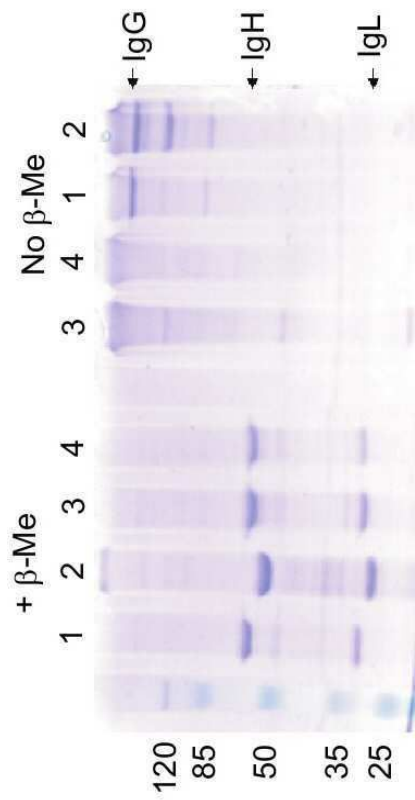
도면8



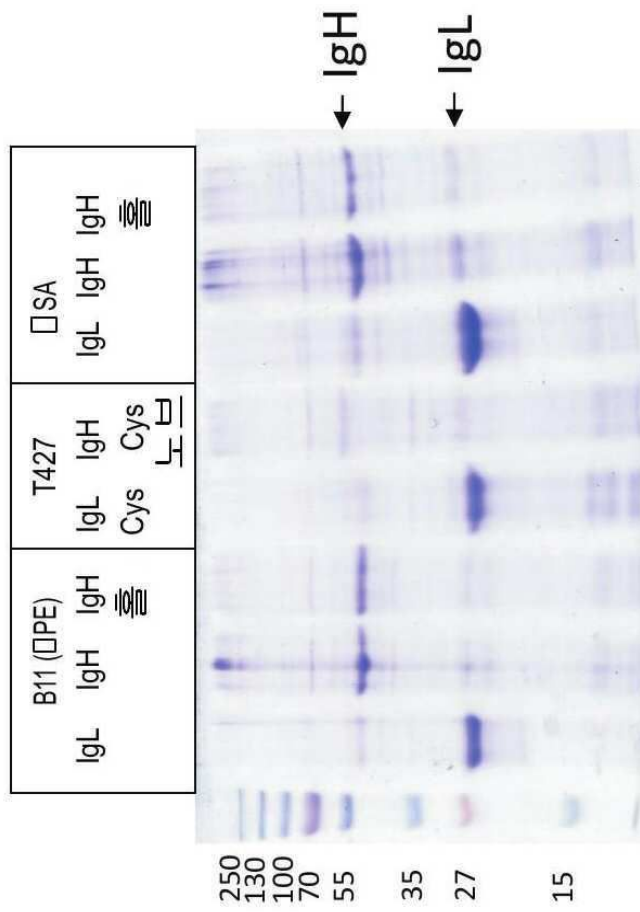
도면9



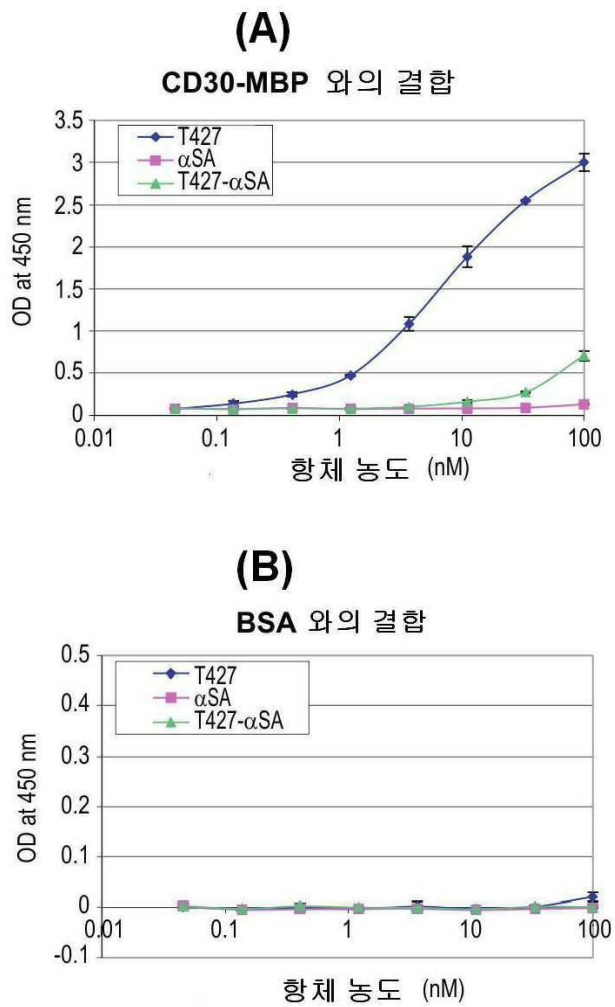
도면10



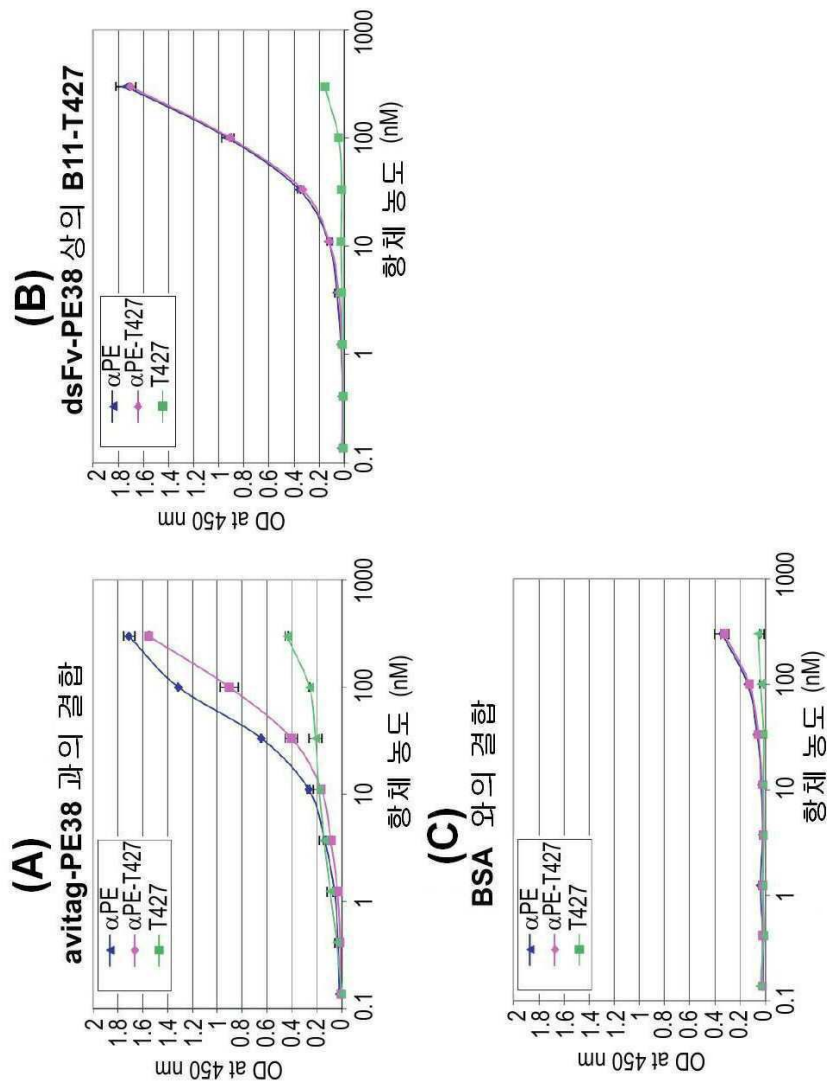
도면11



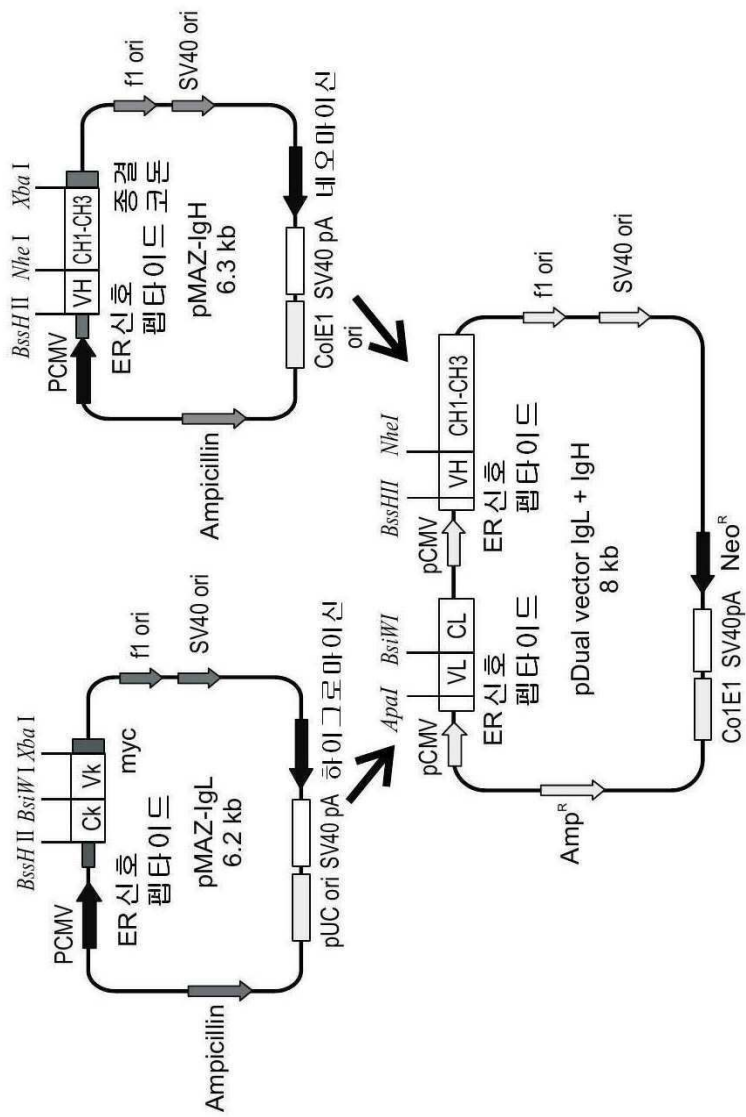
도면12



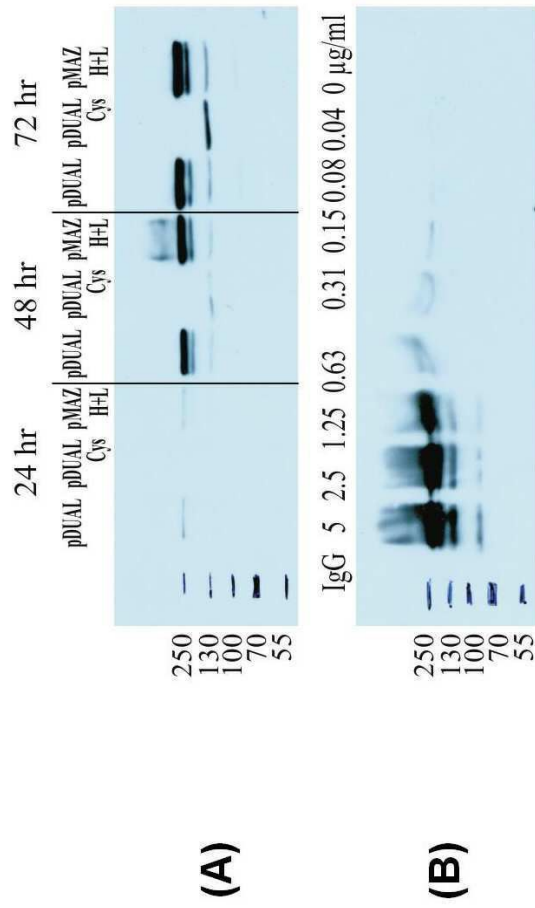
도면13



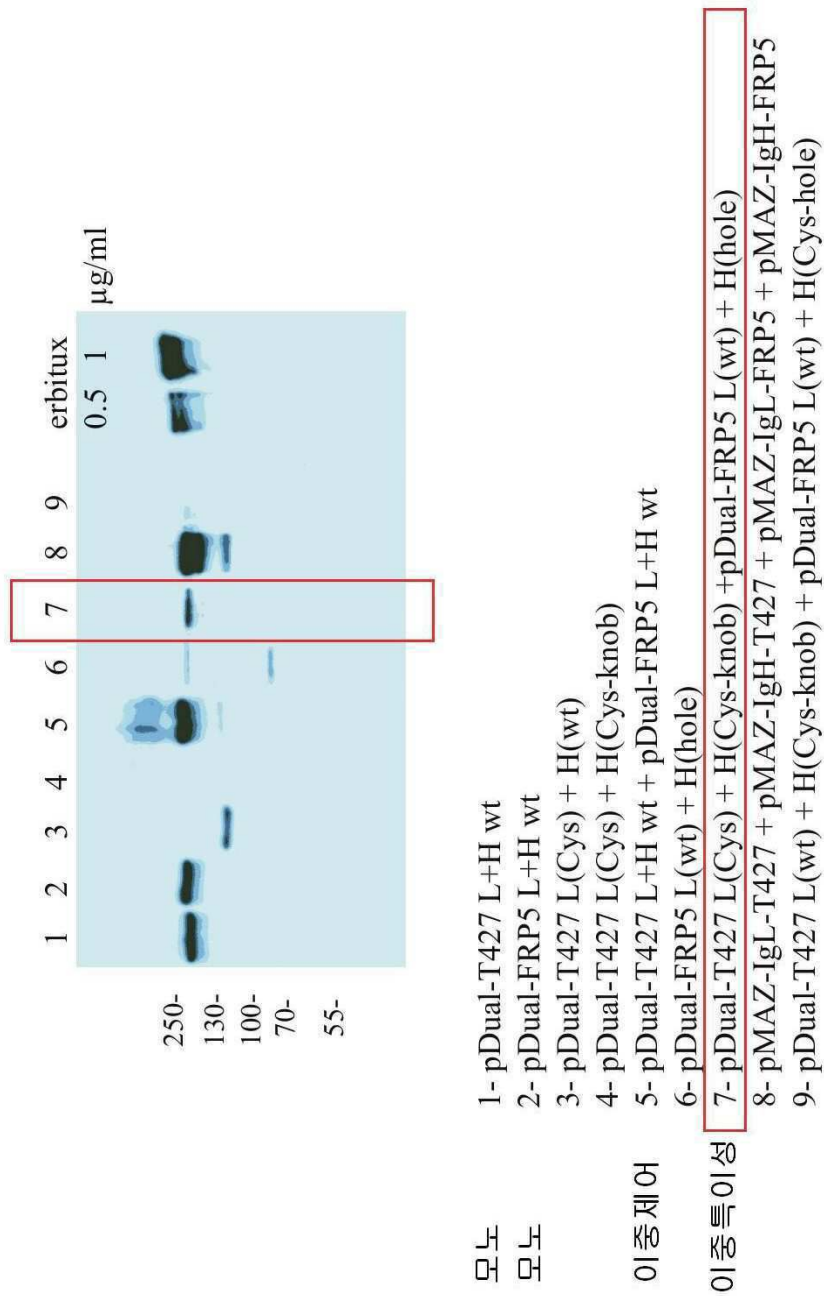
도면14



도면15

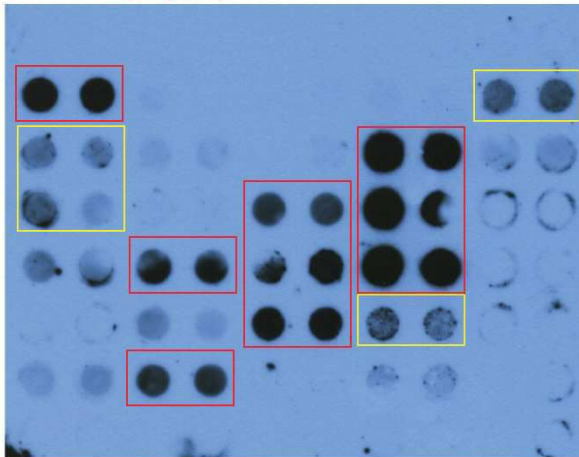


도면16

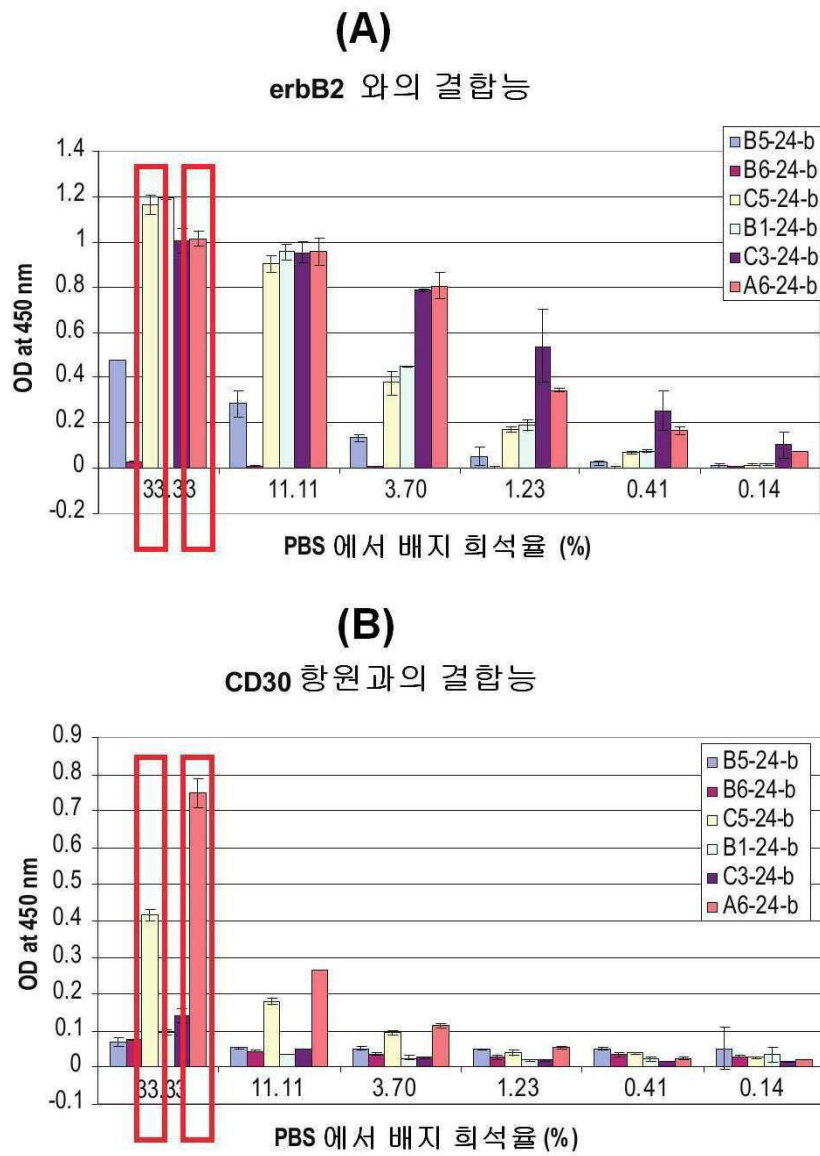


도면17

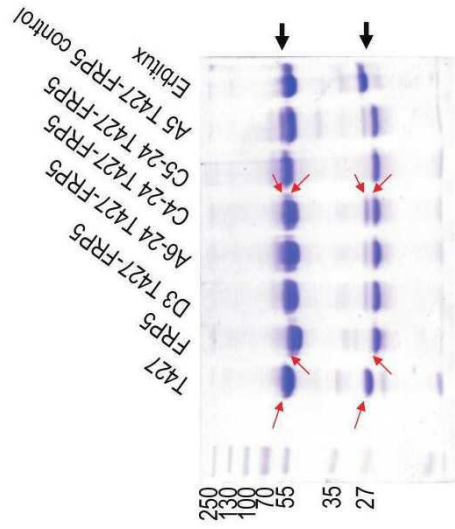
| | | | | | | | | | |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| A3-c | A3-c | B2-c | B2-c | C2-b | C2-b | D2-b | D2-b | A2-b | A3-b |
| A4-c | A4-c | B3-c | B3-c | C3-b | C3-b | D3-b | D3-b | 293 | 293 |
| A5-c | A5-c | B4-b | B4-b | C4-b | C4-b | D4-b | D4-b | | |
| A6-c | A6-c | B5-b | B5-b | C5-b | C5-b | D5-b | D5-b | | |
| B1-c | B1-c | B6-b | B6-b | C6-b | C6-b | D6-b | D6-b | | |
| 293 | 293 | C1-b | C1-b | D1-b | D1-b | A1-b | A1-b | | |



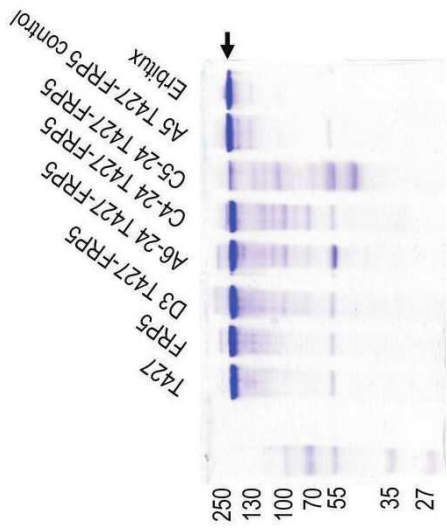
도면18



도면19

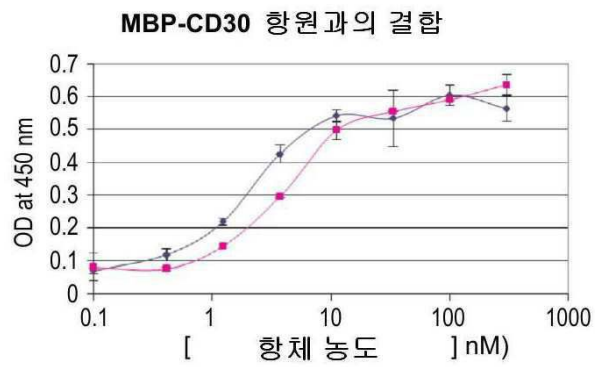


(B)



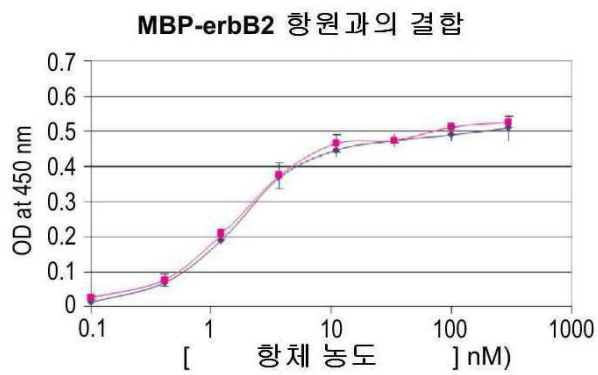
(A)

도면20



A5: 단일특이성 FRP5 및
T427의 4 개 혼합 사슬

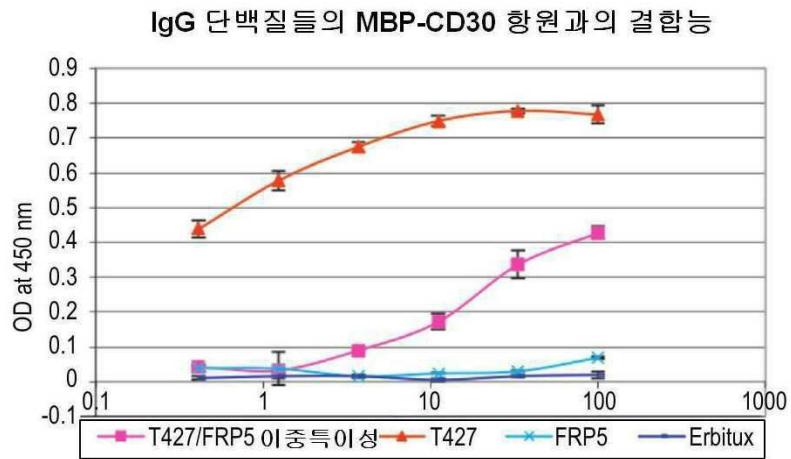
(A)



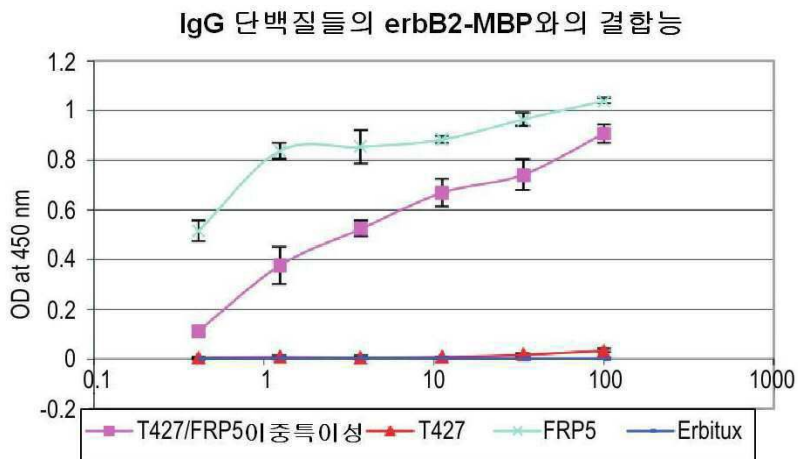
D3: 이중특이성

(B)

도면21

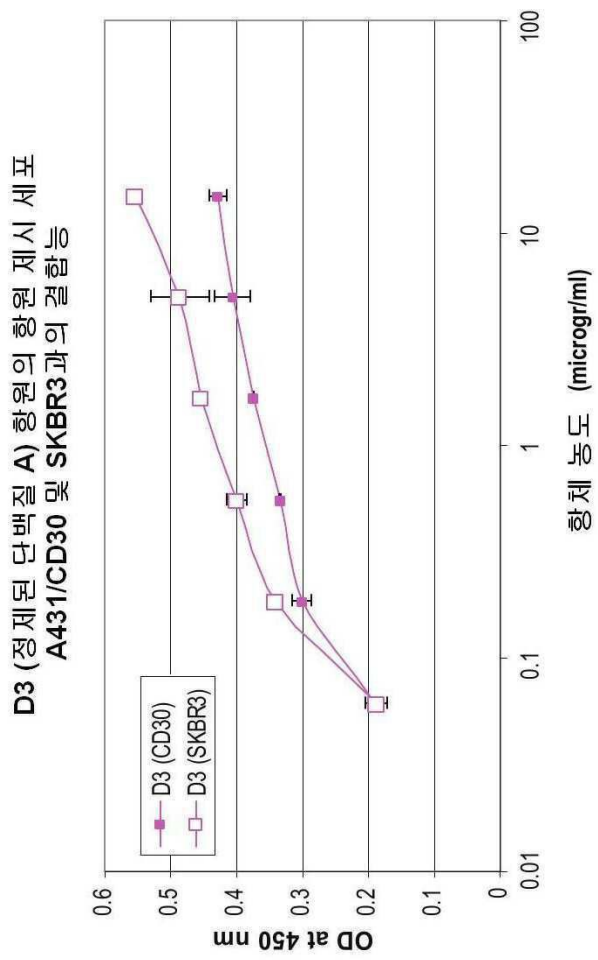


(A)

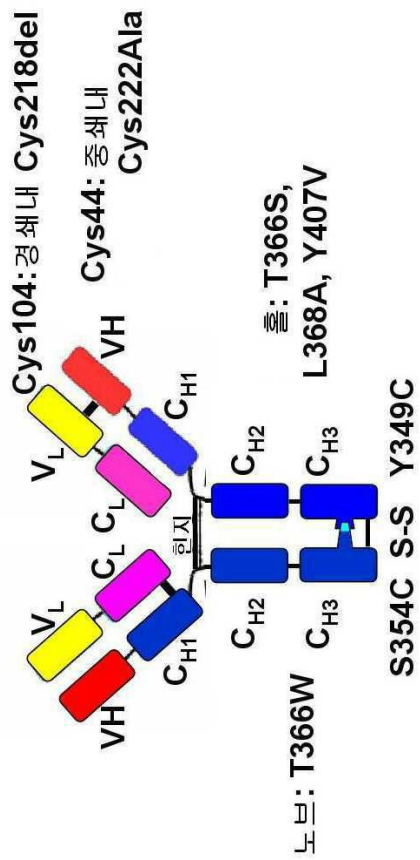


(B)

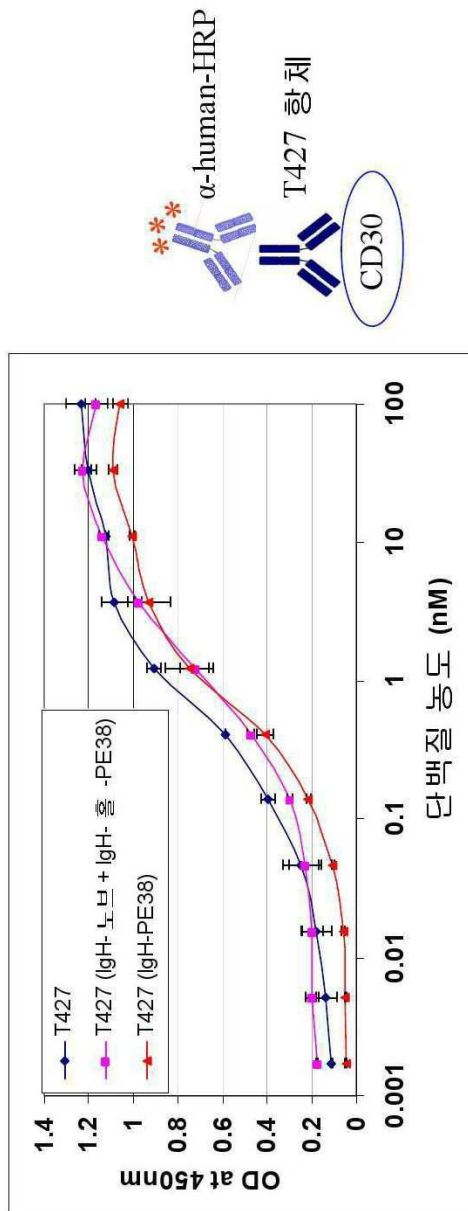
도면22



도면23



도면24



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Ramot at Tel-Aviv University Ltd.

Benhar, Itai

Vaks, Lilach

<120> BISPECIFIC AND MONOSPECIFIC, ASYMMETRIC ANTIBODIES AND METHODS OF GENERATING SAME

<130> 52585

<150> US 61/453,591

<151> 2011-03-17

<160> 75

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 1

gaagcctttg accaggcacc acaggctgac ctggttcttg gtcatctcct cccggcatgg 60

gggcagggtg tacac 75

<210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 2

ggatgggggc aggtgcaca cctgtggttc tcgg 34

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 3

ggatagaagc ctttgaccgc gcagctcagg ctgacctggt tcttg 45

<210> 4

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 4

gtccacggtg agcttgctaa cgaggaagaa ggagccgtc 39

<210> 5

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 5
 atatacatat ggacattgtg ctg 23
 <210> 6
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 6
 tatatacgtg cgtttgattt ccagtttggg gccgcaaccg aacgtccgag g 51
 <210> 7
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 7
 tatatagaat tcttactctc ccctgttgaa gctctttgtg 40
 <210> 8
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 8
 aaacagaggc ctggacagtg tctggaatgg attg 34
 <210> 9
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 9

| | |
|--|----|
| tatatagcta gcggaggaga ctgtgag | 27 |
| <210> 10 | |
| <211> 36 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial sequence | |
| <220><223> Single strand DNA oligonucleotide | |
| <400> 10 | |
| gccc aaatct gccgacaaa ctcacacatg cccacc | 36 |
| <210> 11 | |
| <211> 40 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial sequence | |
| <220><223> Single strand DNA oligonucleotide | |
| <400> 11 | |
| tgtgtgagtt ttgtcggcag atttgggctc aactctcttg | 40 |
| <210> 12 | |
| <211> 23 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial sequence | |
| <220><223> Single strand DNA oligonucleotide | |
| <400> 12 | |
| gaggagatga ccaagaacca ggt | 23 |
| <210> 13 | |
| <211> 24 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial sequence | |
| <220><223> Single strand DNA oligonucleotide | |
| <400> 13 | |
| atatacatat gcaggtcaaa ctgc | 24 |
| <210> 14 | |
| <211> 660 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial sequence | |
| <220><223> Light chain T427 (wt IgG) coding sequence | |

<400> 14

atggacattg tgctgaccca atctccaact tctttgctg tgtctctagg gcagagggcc 60
accatatacct gcagagccag tgaagtgtt gatagttatg gcaatagttt tatgcactgg 120
ttccagcaga aaccaggaca gccacccaaa ctctcatct atcgtgcac caacctagaa 180
tctgggatcc ctgccagggt cagtggcagt gggctcttga cagacttcac cctcaccatt 240
aatcctgtgg aggtgatga tgttgcaacc tattactgtc agcaaagtaa tgaggatcct 300
cggaggttcg gtggaggcac caaactggaa atcaaacgta cggtaggtgc accatctgtc 360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtga aggtggataa cgccctccaa 480
tcgggtaact ccagagagag tgctacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacagaaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
gtcacccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttaa 660

<210> 15

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Light chain T427 (wt IgG)

<400> 15

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

1 5 10 15

Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser

20 25 30

Tyr Gly Asn Ser Phe Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro

50 55 60

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Trp Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

65 70 75 80

Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser

85 90 95

Asn Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 16

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Light chain FRP5 (wt IgG) coding sequence

<400> 16

atggacatcc agctgaccca gtctcacaaa ttctgtcca cttcagtagg agacagggtc 60
 agcatcacct gcaaggccag tcaggatgtg tataatgctg ttgcctggta tcaacagaaa 120
 ccaggacaat ctctaaact tctgatttac tcggcatcct cccggtacac tggagtcctt 180
 tctcgttca ctggcagtgg ctctgggccg gatttcaatt tcaccatcag cagtgtgcag 240

gctgaagacc tggcagttta tttctgtcag caacattttc gtactccatt cacgttcggc 300
 tcggggacaa aattggagat caaacgtacg gtggtgcac catctgtctt catcttccc 360
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggttaactcc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540
 acgtgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttaa

648

<210> 17

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Light chain FRP5 (wt IgG)

<400> 17

Met Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser His Lys Phe Leu Ser Thr Ser Val

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Pro Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln

65 70 75 80

Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln His Phe Arg Thr Pro

85 90 95

Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 18

<211> 645

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Light chain anti-Tac (wt IgG) coding sequence

<400> 18

atgcaaattg ttctcaccca gtctccagca atcatgtctg catctccagg ggagaaggtc 60

accataacct gcagtgccag ctcaagtata agttacatgc actggttcca gcagaagcca 120

ggcacttctc ccaaactctg gatttatacc acatccaacc tggtctctgg agtccttct 180

cgcttcagtgc gcagtggatc tgggacctct tactctctca caatcagccg aatggaggct 240

gaagatgctg ccacttatta ctgccatcaa aggagtactt acccactcac gttcggttct 300

gggaccaagc tggaaataaa acgtacgggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttaa 645

<210> 19

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Light chain anti-Tac (wt IgG)

<400> 19

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

1 5 10 15

Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr

20 25 30

Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile

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

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

145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 20

<211> 657

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Light chain T427 A104C:Cys218del (Cys) coding sequence

<400> 20

atggacattg tgctgaccca atctccaact tctttgctg tgtctctagg gcagagggcc 60
accatatacct gcagagccag tgaaagtgtt gatagttatg gcaatagttt tatgcactgg 120
ttccagcaga aaccaggaca gccacccaaa ctctcatct atcgtgcatc caacctagaa 180

tctgggatcc ctgccaggtt cagtggcagt gggctttgga cagacttcac cctcaccatt 240
aatcctgtgg aggcctgatga tgttgcaacc tattactgtc agcaaagtaa tgaggatcct 300

cggacgttcg gttgtggcac caaactggaa atcaaacgta cggtggtgc accatctgtc 360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtga aggtggataa cgcctccaa 480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
gtcacccatc agggcctgag ctgccccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtaa 657

<210> 21

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Light chain T427 A104C:Cys218del (Cys)

<400> 21

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

1 5 10 15

Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser

20 25 30

Tyr Gly Asn Ser Phe Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro

50 55 60

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Trp Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

65 70 75 80

Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser

85 90 95

Asn Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

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

115 120 125

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

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 130 | 135 | 140 | |
| Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser | | | |
| | 165 | 170 | 175 |
| Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu | | | |
| | 180 | 185 | 190 |
| Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser | | | |
| | 195 | 200 | 205 |
| Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu | | | |
| | 210 | 215 | |

<210> 22

<211> 1353

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain T427 (wt IgG human gamma 1) coding sequence

<400> 22

| | |
|--|-----|
| atgcaggctcc aactgcagca gccggggact gaactggtga ggcctggagc ttcagtgaag | 60 |
| ctgtcctgca aggtttctgg cttctccttc accagttact ggatgaactg ggtgaagcag | 120 |
| | |
| aggcctggac aaggccttga gtggattggc atgattcatc cttccgatag tgaaactagg | 180 |
| ttaaatacaga agttcaagga cagggccaca ttgactgtag acaaatcctc cagcacagcc | 240 |
| tacatgcaac tcagcagccc gacatctgag gactctgcgg tctattactg tgcaagtgag | 300 |
| atggattatt actttgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca | 360 |
| gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg | 420 |
| ggcacagcgg ccttgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg | 480 |
| tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca | 540 |
| | |
| ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc | 600 |
| tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc | 660 |
| aaatcttgtg acaaaactca cacatgccc cctgccccag cacctgaact cctgggggga | 720 |
| ccgtcagtct tctcttcccc cccaaaaccc aaggacaccc tcattgatctc ccggaccct | 780 |
| gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg | 840 |
| tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcggggagga gcagtacaac | 900 |

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtccctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgcceccatc ccgggaggag 1080

atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt ctctctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa tga 1353

<210> 23

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain T427 (wt IgG human gamma 1)

<400> 23

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Val Arg Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ile Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

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

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

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 24

<211> 1353

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain FRP5 (wt IgG human gamma 1) coding sequence

<400> 24

| | |
|--|-----|
| atgcaggtag aactgcagca gtctggacct gaactgaaga agcctggaga gacagtcaag | 60 |
| atctctcgca aggcctctgg gtatcctttc aaaaactatg gaatgaactg ggtgaagcag | 120 |
| gctccaggac agggttttaa gtggatgggc tggattaaca cctccactgg agagtcaaca | 180 |
| | |
| tttgctgatg acttcaaggg acggtttgac ttctctttgg aaacctctgc caaactgcc | 240 |
| tatttgaga tcaacaacct caaaagtga gacatggcta catatttctg tgcaagatgg | 300 |
| gaggtttacc acggctacgt tccttactgg ggccaaggga ccacggtcac cgtttcctct | 360 |
| gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacct cctccaagag cacctctggg | 420 |
| ggcacagcgg cctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg | 480 |
| tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcct acagtcctca | 540 |
| ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc | 600 |
| | |
| tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc | 660 |
| aaatcttgtg aaaaaactca cacatgcca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga | 720 |
| ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct | 780 |
| gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg | 840 |
| tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgaggagga gcagtacaac | 900 |
| agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag | 960 |

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag 1080

atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgtccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa tga 1353

<210> 25

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain FRP5 (wt IgG human gamma 1)

<400> 25

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

1 5 10 15

Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Asn

20 25 30

Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp

35 40 45

Met Gly Trp Ile Asn Thr Ser Thr Gly Glu Ser Thr Phe Ala Asp Asp

50 55 60

Phe Lys Gly Arg Phe Asp Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Asn Thr Ala

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe

85 90 95

Cys Ala Arg Trp Glu Val Tyr His Gly Tyr Val Pro Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

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

 435 440 445
 Gly Lys

 450

<210> 26

<211> 1344

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain anti-Tac (wt IgG human gamma 1) coding sequence

<400> 26

| | |
|---|------|
| atgcaggatca aactgcagga gtctggggct gaactggcaa aacctggggc ctcagtgaag | 60 |
| atgtcctgca aggtttctgg ctacaccttt actagctaca ggatgcactg ggtaaaacag | 120 |
| aggcctggac aggttctgga atggattgga tatattaatc ctactactgg gtatactgaa | 180 |
| tacaatcaga agttcaagga caaggccaca ttgactgcag acaaatcttc cagcacagcc | 240 |
| | |
| tacatgcaac ttagcagcct gacatttgag gactctgcag tctattactg tgcaagaggg | 300 |
| gggggggtct ttgactactg gggccaagga accactctca cagtctcttc cgctagcacc | 360 |
| aagggcccat cggttctccc cctggcaccc tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg | 420 |
| gcctctgggt gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca | 480 |
| ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggtgtcc tacagtcttc aggactctac | 540 |
| tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc | 600 |
| aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt | 660 |
| | |
| gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tctgggggg accgtcagtc | 720 |
| ttctcttccc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca | 780 |
| tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac | 840 |
| ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgaggagg agcagtacaa cagcacgtac | 900 |
| cgtgtggtca gcgtctctac cgtctctcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag | 960 |
| tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa | 1020 |

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 1080

aaccaggtca gcctgacctg cctgttcaaa ggctttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccggt gctggactcc 1200

gacggctcct tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320

ctctccctgt ccccggttaa atga 1344

<210> 27

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain anti-Tac (wt IgG human gamma 1)

<400

> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190

 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

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

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

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

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

<210> 28

<211> 1353

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain T427 T366W:S354C (knob) coding sequence

<400> 28

| | |
|--|------|
| atgcaggtcc aactgcagca gccggggact gaactggtga ggcctggagc ttcagtgaag | 60 |
| ctgtcctgca aggtctctgg cttctccttc accagttact ggatgaactg ggtgaagcag | 120 |
| aggcctggac aaggccttga gtggattggc atgattcatc cttccgatag tgaaactagg | 180 |
| ttaaatacaga agttcaagga cagggccaca ttgactgtag acaaatcctc cagcacagcc | 240 |
| tacatgcaac tcagcagccc gacatctgag gactctgcgg tctattactg tgcaagtgag | 300 |
| | |
| atggattatt actttgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca | 360 |
| gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacctt cctccaagag cacctctggg | 420 |
| ggcacagcgg cctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg | 480 |
| tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca | 540 |
| ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc | 600 |
| tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc | 660 |
| aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga | 720 |
| | |
| ccgtcagttt tctcttccc cccaaaacc aaggacacce tcatgatctc ccggaccctt | 780 |
| gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg | 840 |
| tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac | 900 |
| agcacgtacc gtgtggtcag cgtcttcacc gtccctgacc aggactggct gaatggcaag | 960 |
| gagtacaagt gcaaggtctc caacaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc | 1020 |
| aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatg ccgggaggag | 1080 |
| atgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc | 1140 |

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gacgaggtgg 1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa tga 1353

<210> 29

<211> 465

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain T427 T366W:S354C (knob) coding sequence

<400> 29

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Val Arg Pro Gly

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

65 70 75 80
Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Ser Glu Met Asp Tyr Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Glu Pro
 245 250 255
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Met Ile Ser
 260 265 270
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 275 280 285
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 290 295 300
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 305 310 315 320
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 325 330 335
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 340 345 350
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 355 360 365
 Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
 370 375 380
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 385 390 395 400
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 405 410 415
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

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

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

450 455 460
Lys

465

<210> 30

<211> 1352

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain T427 T366S:L368A:Y407V:Y349C (hole) coding sequence

<400> 30

atgcaggtcc aactgcagca gccggggact gaactggtga ggccctggagc ttcagtgaag 60

ctgtcctgca aggccttctgg cttctccttc accagttact ggatgaactg ggtgaagcag 120

aggcctggac aaggccttga gtggattggc atgattcatc cttccgatag tgaaactagg 180

ttaaatacaga agttcaagga cagggccaca ttgactgtag acaaatcctc cagcacagcc 240

tacatgcaac tcagcagccc gacatctgag gactctgcgg tctattactg tgcaagtgaag 300

atggattatt actttgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacctt cctccaagag cacctctggg 420

ggcacagcgg ccttgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg 480

tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 600

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660

aaatcttgtg aaaaaactca cacatgccc aacgtgcccag cacctgaact gaacaaggac 720

cgtcagtcctt cctcttcccc ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggacccttg 780

aggtcacatg cgtgggtgtg gacgtgagcc acgaagacct tgaggtaag ttcaactggt 840

acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca 900

gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg 960

agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca 1020

aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtgcaccct gcccctatcc cgggaggaga 1080

tgaccaagaa ccaggtcagc ctgagctgcg cgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg 1140
ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc 1200
tggactccga cggtccttc ttctcgtta gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc 1260
agcaggggaa cgicttttca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc 1320
agaagagcct ctcctgtcc ccgggtaaat ga 1352

<210> 31

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain T427 T366S:L368A:Y407V:Y349C (hole)

<400> 31

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Val Arg Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ile Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

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

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

 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

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

Gly Lys

450

<210> 32

<211> 2406

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain T427-PE38 coding sequence

<400> 32

| | |
|---|------|
| atgcaggctcc aactgcagca gccggggact gaactggtga ggcctggagc ttcagtgaag | 60 |
| ctgtcctgca aggtctctgg cttctccttc accagttact ggatgaactg ggtgaagcag | 120 |
| aggcctggac aaggccttga gtggattggc atgattcatc cttccgatag tgaaactagg | 180 |
| ttaaatacaga agttcaagga cagggccaca ttgactgtag acaaatcctc cagcacagcc | 240 |
| tacatgcaac tcagcagccc gacatctgag gactctgcgg tctattactg tgcaagtgag | 300 |
| | |
| atggattatt actttgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca | 360 |
| gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacctt cctccaagag cacctctggg | 420 |
| ggcacagcgg ccttgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg | 480 |
| tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca | 540 |
| ggactctact ccttcagcag cgtggtgacc gtgcctcca gcagcttggg caccagacc | 600 |
| tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc | 660 |
| aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga | 720 |
| | |
| ccgtcagtct tctcttccc cccaaaacc aaggacacce tcatgatctc ccggaccctt | 780 |
| gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg | 840 |
| tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac | 900 |
| agcacgtacc gtgtggtcag cgtctcacc gtccctgacc aggactggct gaatggcaag | 960 |
| gagtacaagt gcaaggtctc caacaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc | 1020 |
| aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag | 1080 |
| atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc | 1140 |

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
ctggactccg acggctcctt ttctctctat agcaagctca ccgtggacaa gaggaggtgg 1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa gcttccggag gtcccagagg cggcagcctg 1380
gccgcgtga ccgcgcacca ggcttgccac ctgccgtgg agactttcac ccgtcatcgc 1440
cagccgcgcg gctgggaaca actggagcag tgcggctatc cggtcagcgc gctggtcgcc 1500
ctctacctgg cggcgcggct gtcgtggaac caggctgacc aggtgatccg caacgcctg 1560

gccagccccg gcagcggcgg cgacctgggc gaagcgatcc gcgagcagcc ggagcaggcc 1620
cgtctggccc tgacctggc cgcccccag agcgagcgct tcgtccggca gggcacccggc 1680
aacgacgagg ccggcgcggc caacggcccc ggcgacagcg gcgacgcct gctggagcgc 1740
aactatccca ctggcgcgga gtctctcggc gacggcggcg acgtcagctt cagcacccgc 1800
ggcacgcaga actggacggt ggagcggctg ctccaggcgc accgccaact ggaggagcgc 1860
ggctatgtgt tcgtcggcta ccacggcacc ttctcgaag cggcgcaaag catcgtcttc 1920
ggcggggtgc gcgcgcgag ccaggacctc gacgcgatct ggcgcggttt ctatatcgcc 1980

ggcgatccgg cgctggccta cggctacgcc caggaccagg aaccgacgc acgcggccgg 2040
atccgcaacg gtgccctgct gcgggtctat gtccgcgct cgagcctgcc gggtttctac 2100
cgcaccagcc tgacctggc cgcccccag gcggcgggag aggtcgaacg gctgatcggc 2160
catccgtgc cgctgcgcct ggacgccatc accggccccg aggaggaagg cgggcgcctg 2220
gagaccattc tcggctggcc gctggccgag cgcaccgtgg tgattccctc ggcgatcccc 2280
accgaccgc gcaacgtcgg cggcgacctc gaccgtcca gcatccccga caaggaacag 2340
gcgatcagcg ccctgccgga ctacgccagc cagcccgga aaccgccgcg cgaggacctg 2400

aagtaa 2406

<210> 33

<211> 800

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain T427-PE38

<400> 33

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys Ala Ser Gly Gly Pro Glu Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala
 450 455 460
 His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln
 465 470 475 480
 Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg

 485 490 495
 Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp
 500 505 510
 Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu
 515 520 525

Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr
 530 535 540
 Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn

 545 550 555 560
 Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu
 565 570 575
 Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly
 580 585 590
 Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg
 595 600 605
 Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val

 610 615 620
 Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly
 625 630 635 640
 Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe
 645 650 655
 Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln
 660 665 670
 Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val

 675 680 685
 Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Leu Thr
 690 695 700
 Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His
 705 710 715 720
 Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly
 725 730 735
 Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val

 740 745 750
 Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp
 755 760 765
 Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu

770 775 780

Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys

785 790 795 800

<210> 34

<211> 2406

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain T427-PE38 T366S:L368A:Y407V:Y349C (hole) coding sequence

<400> 34

atgcaggtcc aactgcagca gccggggact gaactggtga ggccctggagc ttcagtgaag 60

ctgtcctgca aggccttctgg cttctccttc accagttact ggatgaactg ggtgaagcag 120

aggcctggac aaggccttga gtggattggc atgattcatc cttccgatag tgaaactagg 180

ttaaactcaga agttcaagga cagggccaca ttgactgtag acaaatectc cagcacagcc 240

tacatgcaac tcagcagccc gacatctgag gactctgcgg tctattactg tgcaagtgag 300

atggattatt actttgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacccct cctccaagag cacctctggg 420

ggcacagcgg ccttgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgcg 480

tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540

ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 600

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660

aaatcttgtg aaaaaactca cacatgcca cgtgcccag cacctgaact cctgggggga 720

ccgtcagtct tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgccccatc ccgggaggag 1080

atgaccaaga accaggtcag cctgagctgc gcggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttctctgtt agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
 cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa gcttccggag gtcccagagg cggcagcctg 1380
 gccgcgtga ccgcgcacca ggcttgccac ctgccgttgg agactttcac ccgtcatcgc 1440
 cagccgcgcg gctgggaaca actggagcag tgcggctatc cggtcagcg gctggtcgcc 1500
 ctctacctgg cggcgcggct gtcgtggaac caggtcgacc aggtgatccg caacgccctg 1560
 gccagccccg gcagcggcgg cgacctgggc gaagcgatcc gcgagcagcc ggagcaggcc 1620

cgtctggccc tgacctggc cgcccccag agcagcgct tcgtccggca gggcacccgc 1680
 aacgacgagg ccggcgcgcg caacggcccc gcggacagcg gcgacgcct gctggagcgc 1740
 aactatccca ctggcgcgga gttctcggc gacggcggcg acgtcagctt cagcacccgc 1800
 ggcacgcaga actggacggt ggagcggctg ctccagcgcg accgccaact ggaggagcgc 1860
 ggctatgtgt tcgtcggcta ccacggcacc ttctcgaag cggcgcaaag catcgtcttc 1920
 ggcggggtgc gcgcgcgcag ccaggacctc gacgcgatct ggcgcggttt ctatatcgcc 1980
 ggcgatccgg cgctggccta cggctacgcc caggaccagg aaccgcagcg acgcggccgg 2040

atccgcaacg gtgccctgct gcgggtctat gtgccgcgct cgagcctgcc gggctttctac 2100
 cgcaccagcc tgacctggc cgcccgagg gcggcggcg aggtcgaacg gctgatcggc 2160
 catccgtgc cgctgcgct ggacccatc accggccccg aggaggaagg cgggcgcctg 2220
 gagaccattc tcggctggcc gctggccgag cgcaccgtgg tgattccctc ggcgatcccc 2280
 accgaccgc gcaacgtcgg cggcgacctc gacccgtcca gcatccccga caaggaacag 2340
 gcgatcagcg ccttgccgga ctacccagc cagcccgga aaccgccgcg cgaggacctg 2400
 aagtaa 2406

<210> 35

<211> 800

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain T427-PE38 T366S:L368A:Y407V:Y349C (hole)

<400> 35

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45
 Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Glu Met Asp Tyr Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
355 360 365

Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

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

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

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

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

Lys Ala Ser Gly Gly Pro Glu Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala
450 455 460

His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln
465 470 475 480

Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg
485 490 495

Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp
500 505 510

Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu
515 520 525

Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr

530 535 540
 Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn
 545 550 555 560

 Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu
 565 570 575
 Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly
 580 585 590
 Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg
 595 600 605
 Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val
 610 615 620

 Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly
 625 630 635 640
 Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe
 645 650 655
 Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln
 660 665 670
 Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val
 675 680 685

 Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Leu Thr
 690 695 700
 Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His
 705 710 715 720
 Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly
 725 730 735
 Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val
 740 745 750

 Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp
 755 760 765
 Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu
 770 775 780

Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys

785 790 795 800

<210> 36

<211> 1353

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain FRP5 T366W:S354C (knob) coding sequence

<400> 36

| | |
|---|------|
| atgcaggtag aactgcagca gtctggacct gaactgaaga agcctggaga gacagtcaag | 60 |
| atctcctgca aggcctctgg gtatcctttc acaaactatg gaatgaactg ggtgaagcag | 120 |
| gtccaggac agggtttaaa gtggatgggc tggattaaca cctccactgg agagtcaaca | 180 |
| tttgctgatg acttcaaggg acggtttgac ttctctttgg aaacctctgc caaactgcc | 240 |
| tatttgcaga tcaacaacct caaaagtga gacatggcta catatttctg tgcaagatgg | 300 |
| gaggtttacc acggctacgt tccttactgg ggccaaggga ccacggtcac cgtttcctct | 360 |
| gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacct cctccaagag cacctctggg | 420 |
| ggcacagcgg ccttgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg | 480 |
| tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcct acagtctca | 540 |
| ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc | 600 |
| tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc | 660 |
| aaatcttgtg aaaaaactca cacatgcccc ccgtgccag cacctgaact cctgggggga | 720 |
| ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcattgatct ccggaccct | 780 |
| gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg | 840 |
| tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac | 900 |
| agcacgtacc gtgtggtcag gtctctcacc gtctgcacc aggcactggct gaatggcaag | 960 |
| gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc | 1020 |
| aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacacc tgccccatg ccgggaggag | 1080 |
| atgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc | 1140 |
| gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccctg | 1200 |
| ctggactccg acggctcctt ctctctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg | 1260 |
| cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg | 1320 |
| cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa tga | 1353 |

<210> 37

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain FRP5 T366W:S354C (knob)

<400> 37

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

1 5 10 15

Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Asn

20 25 30

Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp

35 40 45

Met Gly Trp Ile Asn Thr Ser Thr Gly Glu Ser Thr Phe Ala Asp Asp

50 55 60

Phe Lys Gly Arg Phe Asp Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Asn Thr Ala

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe

85 90 95

Cys Ala Arg Trp Glu Val Tyr His Gly Tyr Val Pro Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

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

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

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

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

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

Gly Lys

450

<210> 38

<211> 1353

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain FRP5 T366S:L368A:Y407V:Y349C (hole) coding sequence

<400> 38

atgcaggtag aactgcagca gtctggacct gaactgaaga agcctggaga gacagtcaag 60

atctcttgca aggcctctgg gtatcctttc acaactatg gaatgaactg ggtgaagcag 120

gtccaggac agggttttaa gtggatgggc tggattaaca cctccactgg agagtcaaca 180

tttgctgatg acttcaaggg acggtttgac ttctctttgg aaacctctgc caacactgcc 240

tatttgaga tcaacaacct caaaagtga gacatggcta catatttctg tgcaagatgg 300

gaggtttacc acggctacgt tccttactgg ggccaaggga ccacggcac cgtttcctct 360

gctagacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420

ggcacagcgg cctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgctg 480

tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcct acagtctca 540

ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 600

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660

aaatcttgtg acaaaactca cacatgcca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 720

ccgtcagctt tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt 780

gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtgcaccc tgccccatc ccgggaggag 1080

atgaccaaga accaggtcag cctgagctgc gcggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt ctctctctgt agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgtccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa tga 1353

<210> 39

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain FRP5 T366S:L368A:Y407V:Y349C (hole)

<400> 39

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

1 5 10 15

Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Asn

20 25 30

Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp

35 40 45

Met Gly Trp Ile Asn Thr Ser Thr Gly Glu Ser Thr Phe Ala Asp Asp

50 55 60

Phe Lys Gly Arg Phe Asp Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Asn Thr Ala

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe

85 90 95

Cys Ala Arg Trp Glu Val Tyr His Gly Tyr Val Pro Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

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

 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys

 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

 355 360 365
 Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

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

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

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

 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 40

<211> 1353

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain T427 T366W:S354C (knob) and A44C:C222A (Cys) coding sequence

<400> 40

| | |
|--|------|
| atgcaggtcc aactgcagca gccggggact gaactggtga ggcttggagc ttcagtgaag | 60 |
| ctgtcctgca aggtttcttg ctctctcttc accagttact ggatgaactg ggtgaagcag | 120 |
| aggcctggac aatgccttga gtggattggc atgattcatc cttccgatag tgaaactagg | 180 |
| ttaaactcaga agttcaagga cagggccaca ttgactgtag acaaatectc cagcacagcc | 240 |
| tacatgcaac tcagcagccc gacatctgag gactctcgcg tctattactg tgcaagtgag | 300 |
| atggattatt actttgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca | 360 |
| gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg | 420 |
| ggcacagcgg ccttgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg | 480 |
| tggaactcag gcgccctgac cagcggcgctg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca | 540 |
| ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc | 600 |
| tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc | 660 |
| aaatctgccg aaaaaactca cacatgccc cgtgcccag cacctgaact cctgggggga | 720 |
| ccgtcagctt tctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt | 780 |
| gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg | 840 |
| tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac | 900 |
| agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag | 960 |
| gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc | 1020 |
| aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacacce tgccccatg ccgggaggag | 1080 |
| atgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc | 1140 |
| gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg | 1200 |
| ctggactccg acggctcctt ctctctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg | 1260 |
| cagcagggga acgtcttctc atgtccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg | 1320 |
| cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa tga | 1353 |

<210> 41

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain T427 T366W:S354C (knob) and A44C:C222A (Cys)

<400> 41

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Val Arg Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

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

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

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

 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 42

<211> 216

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 42

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

1 5 10 15

Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu

20 25 30

Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu

35 40 45

Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp

50 55 60

Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu

65 70 75 80

Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile

85 90 95

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

100 105 110

Gly Phe Tyr Arg Thr Gly Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly

115 120 125

Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala

130 135 140

Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly

145 150 155 160

Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr

165 170 175

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

180 185 190

Gln Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly

195 200 205

Lys Pro Ser Arg Glu Asp Leu Lys

210 215

<210> 43

<211> 536

<212> PRT

<213> Corynebacterium diphtheriae

<400> 43

Met Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Asp Asp Trp Lys Gly Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys

85 90 95

Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr

100 105 110

Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe

115 120 125

Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly

130 135 140

Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu

145 150 155 160

Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln

165 170 175

Asp Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val

180 185 190

Arg Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 195 | 200 | 205 | |
| Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu | | | |
| 325 | 330 | 335 | |
| Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val | | | |
| 340 | 345 | 350 | |
| Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu | | | |
| 355 | 360 | 365 | |
| Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly | | | |
| 370 | 375 | 380 | |
| His Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly | | | |
| 405 | 410 | 415 | |
| His Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly | | | |
| 420 | 425 | 430 | |
| Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys | | | |
| 435 | 440 | 445 | |

Thr His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala

450 455 460

Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val

465 470 475 480

Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser

485 490 495

Ser Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val

500 505 510

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

515 520 525

Ser Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser

530 535

<210> 44

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> interleukin 2

<400> 44

Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln

1 5 10 15

Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg

20 25 30

Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys

35 40 45

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

50 55 60

Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile

65 70 75 80

Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr

85 90 95

Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu

100 105 110
 Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 115 120 125
 <210> 45
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 45
 Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
 20 25 30
 Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
 35 40 45
 Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
 50 55 60
 Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
 65 70 75 80
 His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
 85 90 95
 Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
 100 105 110
 Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
 115 120 125
 Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
 130 135 140
 Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
 145 150 155 160
 Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
 165 170 175
 Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
 180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile

195 200 205

<210> 46

<211> 290

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Met Gly Gly Gly Ala Gly Glu Arg Leu Phe Thr Ser Ser Cys Leu Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln Cys Gly Ile Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu

35 40 45

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

50 55 60

Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr

65 70 75 80

Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp

85 90 95

Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp

130 135 140

Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile

145 150 155 160

His Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr

165 170 175

Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp

180 185 190

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

195 200 205
 Arg Gly Leu Phe Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile
 210 215 220
 Thr Ile Thr Gln Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro
 225 230 235 240
 Pro Gly Tyr Gln Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala
 245 250 255
 Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser

260 265 270
 Thr Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln
 275 280 285

Asp Lys

290

<210> 47

<211> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

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

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

Phe His Arg His Lys Gln Leu Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg
 100 105 110
 Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala
 115 120 125
 Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met
 130 135 140
 Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser Ser
 145 150
 <210> 48
 <211> 365
 <212> PRT

 <213> Homo sapiens
 <400> 48
 Met Ala Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Val Leu Leu Leu Ser Gly Ala
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Thr Gln Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe
 20 25 30
 Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala
 35 40 45
 Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala
 50 55 60

 Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly
 65 70 75 80
 Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln
 85 90 95
 Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser
 100 105 110
 Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly
 115 120 125

 Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala

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

 Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala
 195 200 205
 Pro Lys Thr His Met Thr His His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr
 210 215 220
 Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr
 225 230 235 240
 Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu
 245 250 255

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

 Val Ile Thr Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser
 325 330 335
 Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser
 340 345 350
 Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala Cys Lys Val
 355 360 365

 <210> 49
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 49

Met His Ser Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Val Leu Leu Thr Gly Val
1 5 10 15

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

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

Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu
145 150 155 160
Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile
165 170 175

Arg Asn

<210> 50

<211> 576

<212> PRT

<213> Ricinus communis

<400> 50

Met Lys Pro Gly Gly Asn Thr Ile Val Ile Trp Met Tyr Ala Val Ala
1 5 10 15

Thr Trp Leu Cys Phe Gly Ser Thr Ser Gly Trp Ser Phe Thr Leu Glu

20 25 30

Asp Asn Asn Ile Phe Pro Lys Gln Tyr Pro Ile Ile Asn Phe Thr Thr

35 40 45

Ala Gly Ala Thr Val Gln Ser Tyr Thr Asn Phe Ile Arg Ala Val Arg

50 55 60

Gly Arg Leu Thr Thr Gly Ala Asp Val Arg His Glu Ile Pro Val Leu

65 70 75 80

Pro Asn Arg Val Gly Leu Pro Ile Asn Gln Arg Phe Ile Leu Val Glu

85 90 95

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

100 105 110

Asn Ala Tyr Val Val Gly Tyr Arg Ala Gly Asn Ser Ala Tyr Phe Phe

115 120 125

His Pro Asp Asn Gln Glu Asp Ala Glu Ala Ile Thr His Leu Phe Thr

130 135 140

Asp Val Gln Asn Arg Tyr Thr Phe Ala Phe Gly Gly Asn Tyr Asp Arg

145 150 155 160

Leu Glu Gln Leu Ala Gly Asn Leu Arg Glu Asn Ile Glu Leu Gly Asn

165 170 175

Gly Pro Leu Glu Glu Ala Ile Ser Ala Leu Tyr Tyr Tyr Ser Thr Gly

180 185 190

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

195 200 205

Met Ile Ser Glu Ala Ala Arg Phe Gln Tyr Ile Glu Gly Glu Met Arg

210 215 220

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

225 230 235 240

Thr Leu Glu Asn Ser Trp Gly Arg Leu Ser Thr Ala Ile Gln Glu Ser

245 250 255

Asn Gln Gly Ala Phe Ala Ser Pro Ile Gln Leu Gln Arg Arg Asn Gly

260 265 270
 Ser Lys Phe Ser Val Tyr Asp Val Ser Ile Leu Ile Pro Ile Ile Ala

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

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

 405 410 415
 Ser Ser Leu Val Leu Ala Ala Thr Ser Gly Asn Ser Gly Thr Thr Leu
 420 425 430
 Thr Val Gln Thr Asn Ile Tyr Ala Val Ser Gln Gly Trp Leu Pro Thr
 435 440 445
 Asn Asn Thr Gln Pro Phe Val Thr Thr Ile Val Gly Leu Tyr Gly Leu
 450 455 460
 Cys Leu Gln Ala Asn Ser Gly Gln Val Trp Ile Glu Asp Cys Ser Ser

 465 470 475 480
 Glu Lys Ala Glu Gln Gln Trp Ala Leu Tyr Ala Asp Gly Ser Ile Arg
 485 490 495
 Pro Gln Gln Asn Arg Asp Asn Cys Leu Thr Ser Asp Ser Asn Ile Arg
 500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

Leu Val Leu Asp Val Arg Ala Ser Asp Pro Ser Leu Lys Gln Ile Ile

545 550 555 560

Leu Tyr Pro Leu His Gly Asp Pro Asn Gln Ile Trp Leu Pro Leu Phe

565 570 575

<210> 51

<211> 651

<212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 51

gcggagttcc tcggcgacgg cggcgacgtc agcttcagca cccgcggcac gcagaactgg 60

acggtggagc ggctgctcca ggcgaccgc caactggagg agcgcggcta tgtgttcgtc 120

ggctaccacg gcaccttctt cgaagcggcg caaagcatcg tcttcggcgg ggtgcgcgcg 180

cgcagccagg accttgacgc gatctggcgc ggtttctata tcgccggcga tccggcgctg 240

gcctacggct acgcccagga ccaggaaccc gacgcgcgcg gccggatccg caacggtgcc 300

ctgctcgggg tctatgtgcc gcgctcgagt ctgccgggt tctaccgcac cggcctgacc 360

ctggccgcgc cggaggcggc gggcgaggtc gaacggctga tcggccatcc gctgccgctg 420

cgcttgagc ccatcaccgg ccccgaggag gaaggcgggc gcctggagac cattctcggc 480

tggccgctgg ccgagcgcac cgtggtgatt cctcggcga tccccaccga cccacgcaac 540

gtcggcggcg acctcgcccc gtccagcatc cccgaccagg aacaggcgat cagcgcctg 600

ccggactacg ccagccagcc cggcaaaccg tcgcgcgagg acctgaagta a 651

<210> 52

<211> 1611

<212> DNA

<213> Corynebacterium diphtheriae

<400> 52

atgggcgctg atgatgttgt tgattcttct aaatcttttg tgatggaaaa cttttcttcg 60

taccacggga ctaaacctgg ttatgtagat tccattcaaa aaggtataca aaagccaaaa 120

tctggtacac aaggaaatta tgacgatgat tggaaagggt tttatagtac cgacaataaa 180

tacgacgtg cgggatactc tntagataat gaaaacccgc tctctggaaa agctggaggc 240

gtggtcaaag tgacgtatcc aggactgacg aaggttctcg cactaaaagt ggataatgcc 300

gaaactatta agaaagagtt aggtttaagt ctactgaac cgttgatgga gcaagtcgga 360

acggaagagt ttatcaaaag gttcggtgat ggtgcttcgc gtgtagtgt cagccttccc 420

ttcgtcgagg ggagttctag cgttgaatat attaataact gggaacaggc gaaagcgta 480

agcgtagaac ttgagattaa ttttgaaacc cgtggaaaac gtggccaaga tgcgatgtat 540

gagtatatgg ctcaagcctg tgcaggaaat cgtgtcaggc gatcagtagg tagctcattg 600

tcatgcataa atcttgattg ggatgtcata agggataaaa ctaagacaaa gatagagtct 660

ttgaaagagc atggccctat caaaaataaa atgagcgaaa gtccaataa aacagtatct 720

gaggaaaaag ctaacaataa cctagaagaa tttcatcaaa cggcattaga gcatcctgaa 780

ttgtcagaac ttaaaccgt tactgggacc aatcctgtat tcgtggggc taactatgcg 840

gcgtgggcag taacgttgc gcaagttatc gatagcgaaa cagctgataa ttggaaaag 900

acaactgctg ctctttcgat acttcctggt atcggtagcg taatgggcat tgcagacggt 960

gccgttcacc acaatacaga agagatagtg gcacaatcaa tagctttatc atctttaatg 1020

gttgctcaag ctattccatt ggtaggagag ctagttgata ttggtttcgc tgcataaat 1080

ttttagaga gtattatcaa tttatttcaa gtagttcata attcgataa tcgtcccgcg 1140

tattctccgg ggcataaaac gcaaccattt ctcatgacg ggtatgctgt cagttggaac 1200

actgttgaag attcgataat ccgaactggt tttcaagggg agagtgggca cgacataaaa 1260

attactgctg aaaatacccc gcttccaatc gcgggtgtcc tactaccgac tattcctgga 1320

aagctggacg ttaataagtc caagactcat atttccgtaa atggtcggaa aataaggatg 1380

cgttgacag ctatagacgg tgatgtaact tttgtcgcc taaatctcc tgtttatgtt 1440

ggtaatggtg tgcattcgaa tcttcacgtg gcatttcaca gaagcagctc ggagaaaatt 1500

cattctaattg aaatttcacg ggattccata ggcgttcttg ggtaccagaa aacagtagat 1560

cacaccaagg ttaattctaa gctatcgcta tttttgaaa tcaaaagctg a 1611

<210> 53

<211> 698

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> interleukin 2

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

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

<400> 53

ggnggggga caaagaaaac acagctacaa ctggagcatt tacttctgga tttacagatg 60
athttgaatg gaattaataa ttacaagaat cccaaactca ccaggatgct cacatttaag 120
ttttacatgc ccaagaaggc cacagaactg aaacatcttc agtgtctaga agaagaactc 180

aaacctctgg aggaagtgct aaatttagct caaagcaaaa actttcactt aagaccagg 240
gacttaatca gcaatatcaa cgtaatagtt ctggaactaa agggatctga aacaacattc 300
atgtgtgaat atgctgatga gacagcaacc attgtagaat ttctgaacag atggattacc 360
ttttgtcaaa gcatcatctc aacactgact tgataattaa gtgcttccca cttaaaacat 420
atcaggcctt ctatttattt aaatatatta attttatatt tattgttgaa tgtatggttt 480
gctacctatt gtaactatta ttcttaatct taaaactata aatatggatc ttttatgatt 540
ctttttgtaa gccctagggg ctctaaaatg gtttacttta tttatcccaa aatatttatt 600

attatgttga atgttaaata tagtatctat gtagattggt tagtaaaact atttaataaa 660
tttgataaat ataaacaaaa aaaaaaaaaac cccccccc 698

<210> 54

<211> 1311

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 54

gtaagtctgc tggcctccgc catcttagta aagtaacagt cccatgaaac aaagatgcag 60
tcgggcactc actggagagt tctgggcctc tgcctcttat cagttggcgt ttgggggcaa 120
gatggtaatg aagaaatggg tggattaca cagacacat ataaagtctc catctctgga 180
accacagtaa tattgacatg ccctcagtat cctggatctg aaatactatg gcaacacaat 240

gataaaaaca taggcggtga tgaggatgat aaaaacatag gcagtgatga ggatcacctg 300
tactgaagg aattttcaga attggagcaa agtgggttatt atgtctgcta cccagagga 360
agcaaaccag aagatgcgaa cttttatctc tacctgaggg caagagtgtg tgagaactgc 420
atggagatgg atgtgatgc ggtggccaca attgtcatag tggacatctg catcactggg 480
ggcttgctgc tgetggttta ctactggagc aagaatagaa aggccaaggc caagcctgtg 540
acacgaggag cgggtgctgg cggcaggcaa aggggacaaa acaaggagag gccaccacct 600
gttccaacc cagactatga gcccatccgg aaaggccagc gggacctgta ttctggcctg 660

aatcagagac gcactgacc ctctggagaa cactgcctcc cgctggccca ggtctcctct 720

ccagtcctccc tgcgactccc tgtttcctgg gctagtcttg gacccacga gagagaatcg 780
 ttctcagcc tcatggtgaa ctgcgcctt ccagcctgat ccccgctcc ctctccctg 840
 ctttctctgc tggtaaccag tcttaaaata ttgtgtcttc ctcttcttt gaagcatcat 900
 cagtagtcac accctcacag ctggcctgcc ctcttgccag gatatttatt tgtgctattc 960
 actcccttcc ctttggatgt aacttctccg ttcagttccc tctttttctt gcatgtaagt 1020
 tgtcccccatt cccaaagtat tccatctact ttctatcgc cgtccccctt tgcagccctc 1080

tctggggatg gactgggtgaa atgttgacag aggccttgcc ccgttcacag atcctggccc 1140
 tgagccagcc ctgtgtctct ccttccccca aactcccta ccaacccct aatccctac 1200
 tccctccaac cccccctcc actgtaggcc actggatggt catttggcat ctccgtatat 1260
 gtgctctggc tctcagctg agagagaaaa aaataaactg tatttggctg c 1311

<210> 55

<211> 2406

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 55

gattctgtgt gtgtctcag atgtcagcc acagacctt gagggagtaa agggggcaga 60
 cccaccacc ttgcctccag gctctttct tcttggtct gttctatgt ggggtcctt 120

tgccagactt cagactgaga agtcagatga agtttcaaga aaaggaaatt ggtgggtgac 180
 agagatgggt ggaggggctg gggaaaggct gtttacttcc tctgtctag tcggtttggt 240
 ccttttaggg ctccgatat ctttggtag ttgtccactc cagtgtggca tcatgtggca 300
 gctgtctctc ccaactgtc tgtacttct agtttcagct ggcatgcgga ctgaagatct 360
 cccaaaggct gtggtgttcc tggagcctca atggtacagg gtgtctgaga aggacagtgt 420
 gactctgaag tgccaggag cctactccc tgaggacaat tccacacagt ggtttcaca 480
 tgagagcctc atctcaagg aggcctcgag ctacttcatt gacgtgcca cagtcgacga 540

cagtggagag tacaggtgcc agacaaact ctccaccctc agtgacccgg tgcagctaga 600
 agtccatctc ggctggctgt tgtccaggc cctcgggtgg gtgttcaagg aggaagacct 660
 tattcacctg aggtgtcaca gctggaagaa cactgtcttg cataaggtca catatttaca 720
 gaatggcaaa ggcaggaagt atttcatca taattctgac ttctacattc caaaagccac 780
 actcaaagac agcggctcct acttctgcag ggggcttttt gggagtaaaa atgtgtcttc 840
 agagactgtg aacatcacca tcaactaagg ttggcagtg tcaaccatct catattctt 900
 tccacctggg taccaagtct ctttctgctt ggtgatggta ctctttttg cagtggacac 960

aggactatat ttctctgtga agacaaacat tcgaagctca acaagagact ggaaggacca 1020

taaatttaaa tggagaaagg accctcaaga caaatgaccc ccatcccatg ggggtaataa 1080

gagcagtagc agcagcatct ctgaacattt ctctggattt gcaaccccat catctcagg 1140

cctctctaca agcagcagga aacatagaac tcagagccag atcccttata caactctcga 1200

cttttccttg gtctccagtga gaagggaataa gcccatgata ttcaagcagg gaagccccag 1260

tgagtagctg catctctaga aattgaagtt tcagagctac acaaacactt ttctctgtccc 1320

aaccgttccc tcacagcaaa gcaacaatac aggctaggga tggtaatcct ttaaacatac 1380

aaaaattgct cgtgttataa attaccagtt ttagagggga aaaaaaaca attattccta 1440

aataaatgga taagtagaat taatgggtga ggcaggacca tacagagtgt gggaactgct 1500

ggggatctag ggaattcagt gggaccaatg aaagcatggc tgagaaatag caggtagtcc 1560

aggatagtct aaggagggtg ttcccatctg agcccagaga taagggtgtc ttcctagaac 1620

attagccgta gtggaattaa caggaaatca tgagggtgac gtagaattga gtcttcagg 1680

ggactctatc agaactggac catctccaag tatataacga tgagtcctct taatgctagg 1740

agtagaaaat ggtcctagga aggggactga ggattgcggt ggggggtggg gtggaaaaga 1800

aagtacagaa caaacctgt gtcactgtcc caagttgcta agtgaacaga actatctcag 1860

catcagaatg agaaagcctg agaagaaaga accaaccaca agcacacagg aaggaaagcg 1920

caggagggtga aaatgctttc ttggccaggg tagtaagaat tagagggtta tgcagggact 1980

gtaaaaccac cttttctgct tcaatatcta attcctgtgt agctttgttc attgcattta 2040

ttaaacaaat gttgtataac caatactaaa tgtactactg agcttcgctg agttaagtta 2100

tgaaactttc aaatccttca tcatgtcagt tccaatgagg tggggatgga gaagacaatt 2160

gttgcttatg aaagaaagct ttagctgtct ctgttttgta agctttaagc gcaacatttc 2220

ttggttccaa taaagcattt tacaagatct tgcagtctac tcttagatag aagatgggaa 2280

aacctggta ataaatatg aatgataaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2340

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2400

aaaaaa 2406

<210> 56

<211> 921

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 56

ttctatgcaa agcaaaaagc cagcagcagc cccaagctga taagattaat ctaaagagca 60

aattatggtg taatttccta tgctgaaact ttgtagttaa ttttttaaaa aggtttcatt 120

tctctattgg tctgatttca caggaacatt ttacctgttt gtgaggcatt ttttctcctg 180

gaagagaggt gctgattggc cccaagtac tgacaatctg gtgtaacgaa aatttccaat 240

glaaactcat tttccctcgg ttccagcaat tttaaatcta tataatagaga tatctttgtc 300

agcattgcat cgttagcttc tctgataaa ctaattgcct cacattgtca ctgcaaatcg 360

acacctatta atgggtctca cctcccaact gcttccccct ctgttcttcc tgctagcatg 420

tgccggcaac ttgtccacg gacacaagtg cgatatcacc ttacaggaga tcatcaaac 480

tttgaacagc ctcacagagc agaagactct gtgcaccgag ttgaccgtaa cagacatctt 540

tgctgcctcc aagaacacaa ctgagaagga aaccttctgc agggctgcga ctgtgctccg 600

gcagtcttac agccaccatg agaaggacac tcgtgcctg ggtgcgactg cacagcagtt 660

ccacaggcac aagcagctga tccgattcct gaaacggctc gacaggaacc tctggggcct 720

ggcgggcttg aattcctgtc ctgtgaagga agccaaccag agtacgttgg aaaacttctt 780

ggaaaggcta aagacgatca tgagagagaa atattcaaag tgttcgagct gaatatatta 840

atttatgagt ttttgatagc tttatTTTTT aagtatttat atatttataa ctcataataa 900

aataaagtat atataaatc t 921

<210> 57

<211> 4000

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 57

aagcttactc tctggcacca aactccatgg gatgattttt ccttcctaga agagtccagg 60

tggacaggta aggagtggga gtcaggaggt ccagttccag ggacagagat tacgggataa 120

aaagtgaaag gagaggagac gggcccatgc cgagggtttc tcccttgitt ctcagacagc 180

tcttgggcca agactcaggg agacattgag acagagcgct tggcacagaa gcagaggggt 240

cagggcgaag tccaggggcc caggcggttg ctctcagggt ctcaggcccc gaaggcgggtg 300

tatggatttg ggagtccag ccttggggat tcccaactc cgcagtttct tttctcctc 360

tcccaaccta tgtagggtec ttcttctctg atactcacga cgcggacca gtctcactc 420

ccattgggtg tcgggtttcc agagaagcca atcagtgtcg tcgcggtcgc ggttctaaag 480

tccgcacgca cccaccggga ctcagattct cccagacgc cgaggatggc cgtcatggcg 540

ccccgaacc tcgtctgtct actctcgggg gctctggccc tgaccagac ctgggcgggt 600

gagtgcgggg tcgggaggga aacggcctct gtggggagaa gcaacgggcc gcctggcggg 660

| | |
|---|------|
| ggcgcaggac ccgggaagcc gcgccgggag gagggtcggg cgggtctcag ccactcctcg | 720 |
| tccccaggct ctactccat gaggtatttc ttcacatccg tgtcccgcc cggccgcggg | 780 |
| | |
| gagccccgct tcatcgcagt gggctacgtg gacgacacgc agttcgtgcg gttcgacagc | 840 |
| gacgccgga gccagaggat ggagccgcgg gcgccgtgga tagagcagga gggtcggag | 900 |
| tattgggacg gggagacacg gaaagtgaag gcccactcac agactcaccg agtggacctg | 960 |
| gggaccctgc ggggtacta caaccagagc gagggcgggtg agtgaccccg gcccggggcg | 1020 |
| caggtcacga cctctcatcc ccacaggacg ggccaggtcg ccacagtct ccgggtccga | 1080 |
| gateccccc gaagccgcgg gaccccgaga cccttgcccc gggagaggcc caggcgcctt | 1140 |
| taccgggttt cattttcagt ttagccaaa aatccccca ggttggtcgg ggcggggcgg | 1200 |
| | |
| ggctcggggg accgggctga ccgcggggtc cgggccaggt tctcacaccg tccagaggat | 1260 |
| gtatggctgc gacgtggggt cggactggcg ctctctccgc gggtagacc agtacgccta | 1320 |
| cgacggcaag gattacatcg ccctgaaaga ggacctgcgc tcttggaccg cggcggacat | 1380 |
| ggcagctcag accaccaagc acaagtggga ggcgcccat gtggcggagc agttgagagc | 1440 |
| ctacctggag ggcacgtgcg tggagtggct ccgcagatac ctggagaacg ggaaggagac | 1500 |
| gctgcagcgc acgggtacca ggggccacgg ggcgcctccc tgatcgctg tagatctccc | 1560 |
| gggctggcct ccacaagga ggggagacaa ttgggaccaa cactagaata tcgcctccc | 1620 |
| | |
| tctggctctg agggagagga atcctcctgg gtttccagat cctgtaccag agagtgactc | 1680 |
| tgaggttccg cctgtctc tcacacaatt aagggataaa atctctgaag gaatgacggg | 1740 |
| aagacgatec ctgaatact gatgagtgt tccctttgac acacacagc agcagccttg | 1800 |
| ggccccgtgac tttcctctc aggccttgtt ctctgcttca cactcaatgt gtgtgggggt | 1860 |
| ctgagtcag cacttctgag tcttcagcc tccactcagg tcaggaccag aagtcgtgt | 1920 |
| tccctcttca gggactagaa tttccacgga ataggagatt atccaggtg cctgtgtcca | 1980 |
| ggctgggtgc tgggttctgt gctcccttc ccatccagg tgtctgtcc attctcaaga | 2040 |
| | |
| tagccacatg tgtgtggag gagtgtccca tgacagatcg aaaatgcctg aatgatctga | 2100 |
| ctcttcctga cagacgcccc caaaacgcat atgactcacc acgtgtctc tgaccatgaa | 2160 |
| gccaccctga ggtgtgggc cctgagcttc taccctgcgg agatcacact gacctggcag | 2220 |
| cgggatggg aggaccagac ccaggacacg gagctcgtgg agaccaggcc tgcaggggat | 2280 |
| ggaaccttcc agaagtgggc ggctgtgtg gtgccttctg gacaggagca gagatacacc | 2340 |
| tgccatgtgc agcatgaggg ttgcccgaag ccctcacc tgagatgggg taaggaggga | 2400 |

gacgggggtg tcatgtcttt tagggaaagc aggagcctct ctgaccttta gcagggtcag 2460

ggccccctcac ctccccctct tttcccagag cgtcttccc agcccacat ccccatcgtg 2520

ggcatcattg ctggcctggg tctctttgga gctgtgatca ctggagctgt ggtcgtctgt 2580

gtgatgtgga ggaggaagag ctgaggtggg gaaggggtga aggggtgggtc tgagatttct 2640

tgtctcactg agggttccaa gaccaggta gaagtgtgcc ctgcctcgtt actgggaagc 2700

accaccaca attatgggcc taccagcct gggccctgtg tgccagcact tactcttttg 2760

taaagcacct gttaaatga aggacagatt tatcaccttg attacagcgg tgatgggacc 2820

tgatcccagc agtcacaagt cacaggggaa ggtccctgag gaccttcagg agggcggttg 2880

gtccaggacc cacacctgct ttcttcattg ttcttgatcc cgcctgggt ctgcagtcac 2940

acatttcttg aaacttctct gaggtccaag acttgaggt tctcttagga ccttaaggcc 3000

ctgactcttt tctggtatct cacaggacat tttcttccca cagatagaaa aggagggagc 3060

tactctcagg ctgcaagtaa gtatgaagga ggctgatgcc tgaggtcctt gggatattgt 3120

gtttgggagc ccatggggga gtcacccac ccacaaattc ctctctagc cacatcttct 3180

gtgggatctg accaggttct gttttgttc taccagcagg agtgacagtg ccagggctc 3240

tgatgtgtct ctacacgctt gtaaaggtga gacctggag ggcctgatgt gtgttgggtg 3300

ttgggcggaa cagtggacac agctgtgcta tggggtttct ttccattgga tgtattgagc 3360

atgcgatggg ctgtttaaag tgtgaccct cactgtgaca gatacgaatt tgttcatgaa 3420

tatttttttc tatagtgtga gacagctgcc ttgtgtggga ctgagaggca agagtgttc 3480

ctgcccttc ctttgtgact tgaagaacc tgactttgtt tctgcaaagg cacctgcatg 3540

tgtctgtgtt cgtgtaggca taatgtgagg aggtggggag accacccac ccccatgtcc 3600

accatgacc tttcccacg ctgacctgtg ctccctcccc aatcatcttt cctgttccag 3660

agaggtgggg ctgaggtgtc tccatctctg tctcaacttc atggtgcact gagctgtaac 3720

ttcttccttc cctattaaaa ttagaacctg agtataaatt tactttctca aattcttgcc 3780

atgagaggtt gatgagttaa ttaaaggaga agattcctaa aatttgagag acaaaataaa 3840

tggaacacat gagaaccttc cagagtccac gtgttgctta tgctgatttg ttgcagggga 3900

ggagagtaga tggggctgtg cccagtttct gttccggcca ctatgggctt tatgtggtca 3960

ctgcttggtt gggtcattct tgctgtccca ttgtccttgg 4000

<210> 58

<211> 1601

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 58

| | |
|---|------|
| aaaccacaag acagacttgc aaaagaaggc atgcacagct cagcactgct ctgttgcctg | 60 |
| | |
| gtcctcctga ctggggtgag ggccagccca ggccagggca cccagtctga gaacagctgc | 120 |
| accacttcc caggcaacct gcctaacatg cttcgagatc tccgagatgc cttcagcaga | 180 |
| gtgaagactt tctttcaaat gaaggatcag ctggacaact tgttgttaaa ggagtccttg | 240 |
| ctggaggact ttaagggtta cctgggttgc caagccttgt ctgagatgat ccagttttac | 300 |
| ctggaggagg tgatgcccc agetgagaac caagaccag acatcaaggc gcatgtgaac | 360 |
| tccttggggg agaacctgaa gacctcagg ctgaggctac ggcgctgtca tcgatttctt | 420 |
| ccctgtgaaa acaagagcaa ggccgtggag cagggtgaaga atgcctttta taagctccaa | 480 |
| | |
| gagaaaggca tctacaaagc catgagttag tttgacatct tcatcaacta catagaagcc | 540 |
| tacatgacaa tgaagatagc aaactgagac atcagggtgg cgactctata gactctagga | 600 |
| cataaattag aggtctccaa aatcggatct ggggctctgg gatagctgac ccagccctt | 660 |
| gagaaacctt attgtacctc tcttatagaa tattttattac ctctgatacc tcaaccccca | 720 |
| tttctattta tttactgagc ttctctgtga acgatttaga aagaagccca atattataat | 780 |
| ttttttcaat atttattatt ttcacctgtt ttttaagctgt ttccataggg tgacacacta | 840 |
| tggtatttga gtgttttaag ataaattata agttacataa gggaggaaaa aaaatgttct | 900 |
| | |
| ttggggagcc aacagaagct tccattccaa gcctgaccac gctttctagc tgttgagctg | 960 |
| ttttccctga cctccctcta atttatcttg tctctgggct tggggcttcc taactgctac | 1020 |
| aaatactctt aggaagagaa accagggagc ccttttgatg attaattcac ctccagtg | 1080 |
| ctcggaggga ttccccaac ctcatcctcc aaccacttca ttcttgaaag ctgtggccag | 1140 |
| cttgttattt ataacaacct aaatttggtt ctaggccggg cgcggtggct cagcctgta | 1200 |
| atcccagcac tttgggaggc tgaggcgggt ggatcacttg aggtcaggag ttcctaacca | 1260 |
| gcctgtgcaa catggtgaaa ccccgctctc actaaaaata caaaaattag ccgggcatgg | 1320 |
| | |
| tggcgcgcac ctgtaatccc agctacttgg gaggtgagg caagagaatt gcttgaaccc | 1380 |
| aggagatgga agttgcagtg agctgatatc atgcccctgt actccagcct gggtgacaga | 1440 |
| gcaagactct gtctcaaaaa aataaaaaata aaaataaatt tggtttctaat agaactcagt | 1500 |
| tttaactaga atttattcaa ttcccttggg aatgttacat tgtttgtctg tcttcatagc | 1560 |
| agattttaat ttigaataaa taaatgtatc ttattcacat c | 1601 |

<210> 59

<211> 12150

<212> DNA

<213> Ricinus communis

<400> 59

| | |
|--|------|
| atatttcacg aactgataca atatagcaag agattgaaaa aactcaaatt cttacaaaac | 60 |
| | |
| tgaactgaaa taaaacaaga gatgcataat aaaaaaatac aaatcttgat acttattaca | 120 |
| actggaatat gcgactaagc tgaaataaac tgacattaaa gacatgacag aaatacatgt | 180 |
| tttggctctat aacaacctaa gtagaaatcg cagcctgttg atgcacagat acatgtattc | 240 |
| ttatatatatt gtattaatat tttaatttat gtacatatcg agatgaatga aaataagcta | 300 |
| atatttgcata tttagaaatt attccaaaac tgaatcatct tacttgagtt atttaattaa | 360 |
| taaaattaaa tatatttcat taaacaatgc attttctctt taaaacaatc catttgaatc | 420 |
| ttactttata ggaagacctt gatagataaa caatgtattg gatatacggt ttttttagat | 480 |
| | |
| gctctaaaga ttgcattaga atgaaataaa actttttact ttttaagattt ttgctcttta | 540 |
| aaataaaaag tacaactttt gataagtttt atataacctt aaaagaaatt gtaacatgtg | 600 |
| agtttgagat gtcttatata atctacaaag atattttaaag agtataaaca gtaaagcaat | 660 |
| aatacttagg tgatgaaaat acctcactta gtactaatac aacaaagcaa gatatcgaac | 720 |
| aaatctttaa tctttgcaa actgaactga agtaaaacaa gaaatgcata ataataagac | 780 |
| aaatcttgga acttattata gctggaatat gccagtaagc tgaaataaat tgatactaag | 840 |
| gacacaacag aaacacatgc gtctgcaacc taagaagaag ttgcaacctg tcgatgcata | 900 |
| | |
| aatatacata tgcgacgtat attgctatgt atgaaaataa gcgaatactt atcatttgga | 960 |
| atttattcca aaattggatc atcttgctga gttattcaat taataataat gaatatattt | 1020 |
| tattaagaaa taaaaattt accttttcct ctttaaacg atttatttga atattacttt | 1080 |
| atgagaagac tttttataat cagaaaactt gatataataa gaatgtattt gataatgttt | 1140 |
| cttttagagat gctctaaaga ttgtattgca cttaaataaa accttttact cttaatagtt | 1200 |
| tagtatttct caaaattatt actcttttaa gtaaatagct caaactttga gaagtcttat | 1260 |
| gtaaactaaa caaaaattgt aacctacgag tttagagatgt cttatacaac ctaaaataaa | 1320 |
| | |
| atttaaagaa tataaacttt aagatgtctt ttcttatata atcaatttta ttttgaaaaa | 1380 |
| ccaccaaagc aaaaaaatt taggtgatgg aaatataccta cctagaacta ataaaatata | 1440 |
| gcaaagatt aaacaaatct caaattctta taaaattgaa ctgaagtaaa acaagagatg | 1500 |
| tataataaca aattttggta cttatacaaa aaatatgtca ttaagctaaa gtaaagtgat | 1560 |
| aataaggaca caatataaac acatgctttg gcctccagca atctaataag aaattgcaac | 1620 |
| ctatcgatgc acaaatcac gtatctttat atgcttatat aagtatttta atttgtgtac | 1680 |

| | |
|--|------|
| gtgtattcaa atgactgaaa ataaactaaa acttgtcata taaaattttt tcaaaattaa | 1740 |
| | |
| atgatcttgc taagttattc actaataata ataaatatat ttcattaaaa ataaaaattt | 1800 |
| gtcctttctc tataaaagag tccattagaa tcttactata tatgaagget ttttataatt | 1860 |
| aaaaaacttg atatataaag aatgtattgg aggtgcattt ttttttgag atgttctgaa | 1920 |
| gattgcattg gactacaata aaagttttta cttttacttc ttagaattct tgctctttaa | 1980 |
| aataataagc acaaactttg agatgtcttg tagaacctaa gaaaaaattt acaatttgtg | 2040 |
| attttagat gtttataca atctaaaaag agatttgaag agtataaatt ttaagatgtt | 2100 |
| ttatacaacc taaaacaaat tgtaatctgt cgacgcacag acacgtattt ttatatattt | 2160 |
| | |
| ataaagatca ttttaattta tgtacttata tttagataaa taaaaataag ctaatatttg | 2220 |
| tcatatataa attatttcat aactgaattg tctgatttgt tagtgttatt aaattaataa | 2280 |
| taatagttaa attttattaa ataataaaag atttaccttt tctctataaa aagggaaga | 2340 |
| aatgtggtta ctaaaacctt ctcataattc tccgctttct tccicagctg ctcactttgt | 2400 |
| aagtattacg acttttcaa acttctact tgttttcaat taatgttatt ctacctgact | 2460 |
| tcatatatat ctctttctt ttgggatcat tattactgct actgtaatga tcgagaaaaa | 2520 |
| tctctcttc ttatcattat gacttcatat attatcatct tctatcactt catataatgt | 2580 |
| | |
| ttttgatttt atgattcaat atatttataa ttaagttcta tctttaaacg agagcaacca | 2640 |
| attaaagaaa caagagtaaa tatatataaa ttgtaaggta ttatttggtt gatttaaattc | 2700 |
| attaaatagc tagatcttct ttttctttt ttttttctt tctcatccaa agtttttatg | 2760 |
| aattgcaggc tattagtaat atagatggta gaaagaaaat taaaattaaa acttcttcaa | 2820 |
| tcatcacaaa tgagagtacc aactaaacta tgtgattttg gtaaaaaatg caaaacaagt | 2880 |
| acttatatat atatatatat atatatatat atatatatat tcttttataa | 2940 |
| atcagtatat acattttact ctgattacca taatattata gattttacta aggtgacact | 3000 |
| | |
| aatgttatat attttggtta gaatggtagt gttttctttt cttaaagatg ctctagagga | 3060 |
| ttcttaacaa aagaatataa tatataaata atatattaaa gatgccttag aaaatgcatt | 3120 |
| tactgtactt aaataacctg ttttgctctt aatattttat tatttttatt tctataataa | 3180 |
| aaaatatttt aagaaatatt taagtataaa aaataaagta ttttattgat gtccactgta | 3240 |
| ctttttatat ttttttctt attttacttt tgtttccaag ggcatcaata tcttcttctt | 3300 |
| ttttctgttt aatttttatt aataaaaaaa ataattacaa atattaatta atcaaataca | 3360 |
| tagaaattta tttttataaa aaaaatcctt caaattcttt taaaatgtca ttttgaccct | 3420 |

| | |
|---|------|
| aaatttcttt taatagttag tgttctaata aaaaaaatTT acccaataat ttttctaata | 3480 |
| tttcattatt cttttataag acaaactctt agcctctaga attatTTTaa ggatatatat | 3540 |
| aatttgctc tctttctctt taacatagcc ttagtttcca ataaataaat aatgaaatat | 3600 |
| atttcactct tcaatttctt aaacttctta catTTTTTT tgtagcattc ttgtgaagtg | 3660 |
| gaatgacaaa accgttaatg atgttctttt aaaagtgaat gatgtttata tattgcagta | 3720 |
| cagataatga tatatctact gcactacata aaacaattta aatctccctg tttatTTTaa | 3780 |
| gaagttatat tttctttctt tctcatccta agaaagttaa attactgtaa tcgacattat | 3840 |
| | |
| atgaatttta actaattccg tttctaattt ataattattt cgtaaacca atcaattccc | 3900 |
| tttaaacact gcttatgcat attctgtctc aatttatata tggcatgcat ctcccgattt | 3960 |
| aatttataag ttcattttta ttgatcaagt atttgggtt tctttatat aaaaaatgt | 4020 |
| attagtgttt tctgtatta attttataag ttcacttcta tgagaatgct aatgtatttg | 4080 |
| gacagccaat aaaattccaa gaattgctgc aatcaaagat gaaaccggga ggaaatacta | 4140 |
| ttgtaatatg gatgtatgca gtggcaacat ggctttgttt tggatccacc tcagggtggt | 4200 |
| ctttcacatt agaggataac aacatattcc ccaaacaata cccaattata aactttacca | 4260 |
| | |
| cagcgggtgc cactgtgcaa agctacacaa actttatcag agctgttcgc ggtcgtttaa | 4320 |
| caactggagc tgatgtgaga catgaaatac cagtgttgcc aaacagagtT ggtttgccta | 4380 |
| taaaccaacg gtttatTTta gttgaactct caaatcatgc agagctttct gttacattag | 4440 |
| cgctggatgt caccaatgca tatgtggtcg gctaccgtgc tggaaatagc gcataTTTct | 4500 |
| ttcatcctga caatcaggaa gatgcagaag caatcactca tcttttact gatgttcaaa | 4560 |
| atcgatatac attcgctttt ggtggtaatt atgatagact tgaacaactt gctggtaatc | 4620 |
| tgagagaaaa tatcgagttg ggaaatggtc cactagagga ggctatctca gcgctttatt | 4680 |
| | |
| attacagtac tgggtggcact cagcttccaa ctctggctcg ttctttata atttgcattc | 4740 |
| aaatgatttc agaagcagca agattccaat atattgaggg agaaatgcgc acgagaatta | 4800 |
| ggtacaaccg gagatctgca ccagatccta gcgtaattac acttgagaat agttggggga | 4860 |
| gactttccac tgcaattcaa gagtctaacc aaggagcctt tgctagtcca attcaactgc | 4920 |
| aaagacgtaa tggttccaaa ttcagtgtgt acgatgtgag tatattaatc cctatcatag | 4980 |
| ctctcatggt gtatagatgc gcacctccac catcgtcaca gttttctttg cttataaggc | 5040 |
| cagtggatcc aaattttaat gctgatgttt gtatggatcc tgagcccata gtgcgtatcg | 5100 |
| | |
| taggtcgaaa tggctatgt gttgatgtta gggatggaag attccacaac ggaaacgcaa | 5160 |
| tacagtgtg gccatgcaag tctaatacag atgcaaatca gctctggact ttgaaaagag | 5220 |
| acaatactat tcgatctaTt ggaaagtgtt taactactta cgggtacagt ccgggagtct | 5280 |

atgtgatgat ctatgattgc aatactgctg caactgatgc caccgctgg caaatatggg 5340
ataatggaac catcataaat cccagatcta gtctagtttt agcagcgaca tcaggaaca 5400
gtggtaccac acttacagtg caaaccaaca ttatgccgt tagtcaaggt tggcttccta 5460
ctaataatac acaacctttt gtgacaacca ttgttgggct atatggtctg tgcttgcaag 5520

caaatagtgg acaagtatgg atagaggact gtagcagtga aaaggctgaa caacagtggg 5580
ctctttatgc agatggttca atacgtctc agcaaacccg agataattgc ctacaagtg 5640
attctaatat acgggaaaca gttgtcaaga tcctctcttg tggccctgca tcctctggcc 5700
aacgatggat gttcaagaat gatggaacca ttttaaattt gtatagtggg ttggtgttag 5760
atgtgagggc atcggatccg agccttaaac aaatcattct ttaccctctc catggtgacc 5820
caaacaaat atggttacca ttattttgat agacagatta ctctcttgca gtgtgtatgt 5880
cctgccatga aaatagatgg cttaataaaa aaggacattg taaattttgt aactgaaagg 5940

acagcaagtt attgcatcc agtatcta atagagcaca ctattgtctt gtgcattcta 6000
aatttatgga tgaattgat gaattaagct aattattttg gtcacagac ttgatatctt 6060
tttgaataaa ataaataata tgttttttca aacttataaa actatgaatg atatgaatat 6120
aatgaggaga ctagtcaatc ttttatgtaa ttctatgatg ataaaagctt gtctctaac 6180
ttagtgaatt tgtatccaag taaaaaacag cctactaagt catggattcc ttcaaattta 6240
cgctcttatt ataagcttaa ttttcatcca cgatcatccc tattcatgtg atgcacaaga 6300
acttaaggta tatagatttg aagtaattcc ttaattataa tttttaagtt taccatttc 6360

tttactttct aatttctttt tctcaattg tactaattaa ctcatgaag aatttaacaa 6420
cttggtcatc agttccatag taattctcaa taaatttatg gtctcacaac tcaagcatcc 6480
atgggttcat aagttgtgat aatcaggcag ctctcatat attgaaatta acataaggag 6540
taaagtgggt tgagcaatgc cagggtgtac atccaggtgg tacatccata tatacttctt 6600
cctccaaatc accatgtaaa aaagtatttt ttacatcaaa ttgtcttaac gccatcctt 6660
tagttgtctg aatagaaatc agtattcaaa tcgtaccaag ttctgccaca ggtgcaaacg 6720
tttctggta gtcaattcca tacttctgag taaatccttt cgtaccagt ctgcttttc 6780

gcctgtctag actcccatct gccttaagct tcaactgata gatcattta cagccaatcg 6840
tattcttccc ctctggtaat ttacaaaact cccatgttgc attcttctct agggctttca 6900
cctcttctc catcgctctt ttcatattca agtcttgc atgcctctgc aactatttag 6960
gaatcgcaat cccggataat tcaactagtgc taagtgcata ataactgtt aaatgattat 7020
gtcgaatacc attcttagtt aaaaaattac ttaaatgact atccataaat tcctttgcat 7080
tatcagtttg ccaaactaaa acccatgtac gatattgatt tctaataaaa ttcaaaaat 7140

| | |
|--|------|
| cacaaaaagc ttiacttacc tcacttttgt tccgaagtaa ggttatccaa gtcatacgag | 7200 |
| | |
| tacattcgtc tataaaagtt ccgaaatata tagcacctga taatgaagga atttttgcag | 7260 |
| gaccccaaac atcagaatgt ataacagcaa atgggttcagt acttttatta aaactaggca | 7320 |
| aataagtagc acggtggctc ttaccaagtt cacacacatc acaattaaac acggaatcat | 7380 |
| ccaaattaac aaacaattca ggtttttaatt ttttcaaata actaatgac aaatgtccaa | 7440 |
| ggcgtcgatg ccatagccaa attctttcca ttgtattact taagctttca gtcgtgtaaa | 7500 |
| cctcacttat tttcttctct cctatctcag tcaagtctag ataataaagt ttgcctcggt | 7560 |
| taacaccata accaagagtc tcccagatca ggatgtcctg aaaaacacaa tatgaaggcc | 7620 |
| | |
| agaaagttac agtiacagtt agagacgagg ttatttgtcc aaccgagagt aagttacaag | 7680 |
| acagtgttag aacaatcaat acagatttta aattcagatt ttttgaaaga gtaatggatc | 7740 |
| cttctccact aacaatacat ttggatccat ttgttattga cacggtaaaa tgagaggatg | 7800 |
| gaatgaaaga ataaattcga tcagaattgc ataccatatg atcagatgca ccagggtcta | 7860 |
| ttgtccacaa tgttcacaca gcaagttaca tttttttcca gtcctatctt tctgttttt | 7920 |
| tccataatc tggtcaaacct gaaatacagt aggtccaca gttgcatttg ttcctcccat | 7980 |
| tgtcttcat tgttgatctt ctcttcgaac ataagcatat gtttgttcta aatcaagttt | 8040 |
| | |
| agggtctttg cgcaaaatct cacctcggac ttgatcaaag tttgaatcaa gccactgag | 8100 |
| gaagatatgc atgcgtagcc ttgccatggc agaatgcaac gctactactc catccactgt | 8160 |
| accttcatgt gactgagtac gatgatctat ctcttgaaag atttccatca actcagagta | 8220 |
| atacgtaggc aatggctcgc cctcttggtt gatgacgaaa gacttctgat tcaattcgaa | 8280 |
| taacctcggt tcatcagttc catcataaaa tgtttttgct gctgcctccc aaacatcttt | 8340 |
| ggcagtagga agtctgatga aatgttgcat cagtgaaggt atcatcgaat caatcagcca | 8400 |
| gctctttacc ttttgattct cagttatcca ggtagagtat ctcgtatctg tagttgcagg | 8460 |
| | |
| cttcacttcc gatccgggta aatacccagt tttatttctg gctccaatac gcacttccat | 8520 |
| gagctgtgac catagagaat aattcgattc atccagtata acactggttag ggaatgatac | 8580 |
| attatcttgt tgaatgataa ttgtattcga agacggattc atgatttgag tatgaggtgg | 8640 |
| atcttctgta ctcataatc tgttttagga ttcagttttg atttgaaaaa aatttgtttt | 8700 |
| cagtatgggt agcggctgtt gtgataccat gtgagtaatg aaactctaata aattgattaa | 8760 |
| ttttcatcct ttttctctat tcattcaacc tgaatatata caaaagtttg ttacaaggat | 8820 |
| aacttctaac tacttatgta acaagcaacc ttatcaaaaa tacaattaga ataacatcta | 8880 |

| | |
|--|-------|
| actactacag cttatacata cttatctctta tactaacaaa ttaactaaat atagttaaca | 8940 |
| agttctgaat catagtaatt ttagtctctta taatattaac aaatgaggga ctaaaatact | 9000 |
| tttcttttct taaatatgat tctattttta aaagcgggag atagaaaaat ttatataatt | 9060 |
| tcttactaaa aaaaagtaag gataatttta ttaattctta agaacaaaag caaaggaaaa | 9120 |
| tgggaaagtt tataatttga tctaatttct ttgcatgata gacaggtaac tgattctcaa | 9180 |
| tacgattcta agatgatcca atataaatta tttgtgggaa ataggttcac gaaaaagcca | 9240 |
| tttgttgggg attcaatgtt tattgatttg tttgtgttag tatgttttgc atcaattaat | 9300 |
| | |
| tagatcagct agtcatttac atattcttgc aaatttgc catttacaaa tgaattatct | 9360 |
| gaatttagtg taatttgatt aatttaatta gacgggtttt cttcttcag taatcaacat | 9420 |
| acacaaagt aaaggcaaac gatttctagc aatttaattg attaggttca agttaattaa | 9480 |
| ttaatttgat aatttatggt tcagtcgtt actgaaaatt taaaaagaag tagcatgcat | 9540 |
| ctttagattc ttctctatt ttatgcatgc cttttctga ttaattgtat atgttcgttc | 9600 |
| ttcttgatta agtatttata tttattttt atttgattag tgagctatat atatttttaa | 9660 |
| gagaatcttg atgtatttgg acaactaaaa aaattccaag aattgctaca attggagatg | 9720 |
| | |
| aaactgaaag gaaacactat ggtgtggata tacgcagtgg caacgtggct ctgcttggga | 9780 |
| tcagccttgg ggtggaatt caatgccact gtaagctaca cattcccaac tgtaagcttt | 9840 |
| accactgttg atgccacgga gcaaatgtac agagagtgtt gtagaaaata agaataagta | 9900 |
| tataacttta tcggcttagt agccaagaag tcttttggtta acctacaact cttaaacatc | 9960 |
| atatacttaa tacataagtt acacgttaa tgaatatata tgtaacttac atatttaata | 10020 |
| ggtgactctt taatttcata acttaagcat taaaaactat acataatgat tattaaatta | 10080 |
| aatttagttt ttcaacactc cttaaattha atttcagatc aaaccgagtc ttgctcttaa | 10140 |
| | |
| tctggcaaaa tcttcaaact ttaatgcctt cgtcaaaaata tcagcaagtt gatcttgcca | 10200 |
| cttgacatac ttcagctcta ttctcttctt acggatactt tctctgatga aatgatatct | 10260 |
| tctattaatg tatttactct taacatgtaa aataggattc ttgctcaatg ctatagacga | 10320 |
| tttattatca ataaaaatat caattgggtc ttcgtttgaa accaatagca cctctaacac | 10380 |
| ctttctaac catgtggcat gacaacaca agcagcagca acaacatact taacttcaca | 10440 |
| agttgaaaga attacaatag attacttctt tgaactccat gtaaaagcag tctctccaat | 10500 |
| agaaaacaca aaaccattg tactctttcg atcatcaata tcacctctc aatcactatc | 10560 |
| | |
| actatagcct actagactga aactttttga aggtgagtaa aacaaacat aatctaaagt | 10620 |
| tccttcgaca tatctcaaaa ttcttttacc agccttcatg tgcgaaatctg ttggtgcctc | 10680 |
| catgtagcga ctaataagtc ctactccata aagaatatca ggtctagtac aagtcaagta | 10740 |

cctcaagttt ccaacaaatc ttgaaacaa aattggattc accttctcag tattatcata 10800
tcttgacagc ttactccac attcaactag tgtgctgaca agctgacatt gctccatgcc 10860
aaactccttt aagatctttc ttacatagct cttgtgagaa ataaaaatgc catcattagt 10920
ttgtttcact ttgattccca gataataaga catcaaccct atatctgtca tctcaaattc 10980

agcagccatc tcctttttga attattcaat cattgctgaa ttatttttct gtaaagatca 11040
aatcatcaac atacaagcac accacaagaa catcaccatt ctctttcttc ttagaataaa 11100
gagaatattc atgaggatat ttcagaaaat ttttcttttt gaaataatca tcaatcctgt 11160
tgtaccatgc ctttagtact tgcctcaatc catacaaagg taccttcagt tttaaaactt 11220
tgttttcttc cctctcaaca acatatctga aagggtgttt tagatatact tcttcttcta 11280
agtatccatt caagaacgcc gatttcacgt ccatttgaaa aattcttcat ctcttttgtg 11340
cagctaaagc aatgattaaa caaattatit ccaatcgagc aactactaca aagacttcat 11400

catagtcaat tccatgttgt tggctaaacc cttttgcaac aagtcgagcc ttgtatttct 11460
cgacatctcc gttttcattc tttttaactt ttataaaac catttcacac caacaacttg 11520
cttgccttag gaaagattgc taattcccaa gtgtcattct tttgaattga ttttatttcg 11580
tcatctatgg ctactctcca ttttcattt ttcacgctt cttcaaaatt cattgggtca 11640
glatctgcag aaatacaata atgaacaaaa tctaaaactt catcaatgtt agcatatatg 11700
tcctacagat ttctcatctt tgtaggtttt tcagatgac ttgaacgact tgaatctcct 11760
tgaatacttg ctggagtctt tggaagtgtc aagtctgtga catcaaaatt aaaatgttga 11820

acatcttgat ctgaataatc aaaaattgga aaaaaattat aattttctga ttgattctcc 11880
caatttcac catcagcttc ctcaacttg acatctcgac tcaggataat ctttttgctt 11940
gtcggattgt acaacttgta gactttagac ttgcatcat atccaacaaa aatgaatit 12000
ccacttttat catccagctt aattctgggt tcatctgcaa catgaacata agcaacataa 12060
ccaaaaactc taagatgaga aagagttggc tttcttcac tccatgcttc ctgtggtata 12120
gacttctgca aactctttat aggacatatg 12150

<210> 60

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 60

tcctcagcta gcaccaaggg accatcggtc ttccccctg

39

<210> 61
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 61
 gcagggtgta cacctgtggt tc 22
 <210> 62
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 62
 actgaacctt ggagtcaggt accacattga ttattgagta gttattaata g 51
 <210> 63
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 63
 gggccctgt ggagagaaag gcaaagtgga tg 32
 <210> 64
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 64
 ctttgcttt ctctccacag gggccctc cgacattgtg ctgaccaat c 51
 <210> 65
 <211> 67
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 65
 cggttttaaaa aacgggacct ctggagcggc cgcttattaa cactctcccc tgttgaagct 60
 ctttgtg 67
 <210> 66
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 66
 tccagaggtc ccgtttttta aaccggtttt ttaaaccgct gatcagcctc g 51
 <210> 67
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 67
 tagctcgatc cgtcgagaga attccccag catgcctgct attg 44
 <210> 68
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Light chain of anti-streptavidin (anti-SA)
 <400> 68
 atggatatcg tgctgactca gccaccctca gcgtctggga cccccgggca gagggtcacc 60
 ctctcttgta ctggaagcag ctccaacatc ggaagttatt ctgtaagctg gtaccagcag 120
 ctccaggaa cggtcctcaa actctctatc tatgacaata ataagcgacc ctcaggggtc 180
 tctgaccggt tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccttgccat cagtgggctc 240
 cgggtccgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gactggttcc 300
 gtggatattcg gcggaggcac ccagctcacc gtcctaggctc agcccaaggc tgccccctcg 360
 gtcactctgt tcccgcctc ctctgaggag ctccaagcca acaaggccac actggtgtgt 420
 ctcataagtg acttctacce gggagccgtg acagtggcct ggaaggcaga tagcagcccc 480
 gtcaaggcgg gagtggagac caccacacc tcacaacaaa gcaacaacaa gtacgcggcc 540
 agcagctatc tgagcctgac gcctgagcag tggaagtccc acagaagcta cagctgccag 600

gtcacgcatg aaggagcac cgtggagaag acagtggccc ctgcagaatg ttcttaa 657

<210> 69

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Light chain of anti-streptavidin (anti-SA)

<400> 69

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

1 5 10 15

Gln Arg Val Thr Leu Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser

20 25 30

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

35 40 45

Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Thr Gly Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu

100 105 110

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

115 120 125

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp

130 135 140

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro

145 150 155 160

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

165 170 175

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys

180 185 190

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val

195 200 205

Glu Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser

210 215

<210> 70

<211> 657

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Light chain of anti-PE clone B11

<400> 70

atggatatcg tgctgactca gccaccctca gcgtctggga cccccgggca gagggtcacc 60

atctcttgct ctggaaccag cagtgatgtt gggaattcta accttgtctc ttgtaccag 120

cagctcccag gaacggctcc caaactctc atttatggga acagcaatcg gcctcaggg 180

gtccctgacc ggttctctgg ctccaagtct ggcaactcag cctccctggc catcagtggg 240

ctgcggctcg aggatgagge tgattattac tgctgctcat atgcaggtagc ttgctccct 300

gatgtcttcg gaactggcac caagctgacc gtccctaggc agcccaagge tgccccctcg 360

gtcactctgt tcccgcctc ctctgaggag ctcaagcca acaaggccac actgggtgtgt 420

ctcataagtg acttctaccc gggagccgtg acagtggcct ggaaggcaga tagcagcccc 480

gtcaaggcgg gagtggagac caccacacc tcacaacaaa gcaacaacaa gtacgcggcc 540

agcagctatc tgagcctgac gcctgagcag tggaagtccc acagaagcta cagctgccag 600

gtcacgcatg aaggagcac cgtggagaag acagtggccc ctgcagaatg ttcttaa 657

<210> 71

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Light chain of anti-PE clone B11

<400> 71

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

1 5 10 15

Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asn

20 25 30

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

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

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

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

<210> 72

<211> 1347

<212>

> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain of anti-streptavidin (anti-SA)

<400> 72

atggaggtgc agctgttggg gtctggggga ggcttggtac agcctggggg gtcctgaga 60
 ctctcctgtg cagcctctgg attcaccttc agtggctact ggatgcactg ggtccgccag 120
 gctccaggca aggggctgga gtgggtttca gaaattagtg gtagtggtga tagcacacac 180

tacggagact ccgtgaaggg ccggttcacc atctccagag acaattccaa gaacacgctg 240
tatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag gacacggccg tgtattactg tgcaagagga 300
cggaacggat ccttcgacta ctggggccag ggcacctgg tcacagtctc ctcagctagc 360

accaagggcc catcggtctt ccccttggca ccttcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
gcggcccttg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tctacagtc ctcaggactc 540
tactcctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc 600
tgcaactga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtga gccc aaatct 660
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gagaccgtca 720
gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac cctgaggtc 780

acatgcgtgg tgggtgacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960
aagtgaagg tctccaacaa agcctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc 1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtgc accctgcccc catcccgga ggagatgacc 1080
aagaaccagg tcagcctgag ctgcgcggtc aaaggcttct atccagcga catgccgtg 1140
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200

tccgacggt ctttcttct cgttagcaag ctccacgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260
gggaacgtct tctcatgtc cgtgatgat gaggtctgc acaaccacta cagcagaag 1320
agcctctccc tgtccccggg taaatga 1347

<210> 73

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain of anti-streptavidin (anti-SA)

<400> 73

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

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

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

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

 275 280 285

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

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

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

<210> 74

<211> 1362

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Heavy chain of anti-PE clone B11

<400> 74

atggaggtgc agctgttgga gactggggga ggcttggtac agcctggggg gtcctgaga 60

ctctcctgtg cagcctctgg attcaccttt gacaactatg ccataaactg ggtccgccag 120

gctccaggca aggggctgga gtgggtctca ggtattagtt ggaatagtgg tagcataggc 180

tatgcggact ctgtgaaggc cggattcacc atctccagag acaattccaa gaacacgctg 240

tatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag gacacggccg tatattactg tgcgagaggg 300

gcccccaact acggtgggag gggggagttt gacttctggg gccagggcac cctgggtcacg 360

gtctctcag ctagcaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcacctc ctccaagagc 420
acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 480

acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 540
cagtctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc 600
accagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga 660
gttgagccca aatcttga caaaactcac acatgccac cgtgccagc acctgaactc 720
ctggggagac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaacca aggacacct catgatctcc 780
cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 840
ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 900

cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg tctgcacca ggactggctg 960
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa 1020
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtgcaccct gccccatcc 1080
cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgagctgcg cggtaaagg ctctatccc 1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccag 1200
cctccgtgc tggactccga cggctcctt ttctctgta gcaagctcac cgtggacaag 1260
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgagc tctgcacaac 1320

cactacacgc agaagagcct ctccctgtcc ccgggtaaat ga 1362

<210> 75
<211> 453
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Heavy chain of anti-PE clone B11
<400> 75

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

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

305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

 355 360 365
 Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450