



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0035112
(43) 공개일자 2020년04월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/31 (2006.01) B01D 15/38 (2006.01)
B01J 20/289 (2006.01) B01J 20/32 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/31 (2013.01)
B01D 15/3809 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7006385
(22) 출원일자(국제) 2018년08월06일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년03월04일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/071232
(87) 국제공개번호 WO 2019/030156
국제공개일자 2019년02월14일
(30) 우선권주장
PCT/EP2017/069976 2017년08월07일
유럽특허청(EPO)(EP)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
리플리젠 코퍼레이션
미국 매사추세츠주 02453 월섬 스위트 100 빌딩
#1 세운 스트리트 41
(72) 발명자
피플러, 에리크
독일 06120 할레/잘레 하인리히 다메로브 스트라
췌 1 나피고 프로타인스 게엠베하
하우프츠, 올리히
독일 06120 할레/잘레 하인리히 다메로브 스트라
췌 1 나피고 프로타인스 게엠베하
(74) 대리인
양영준, 김영

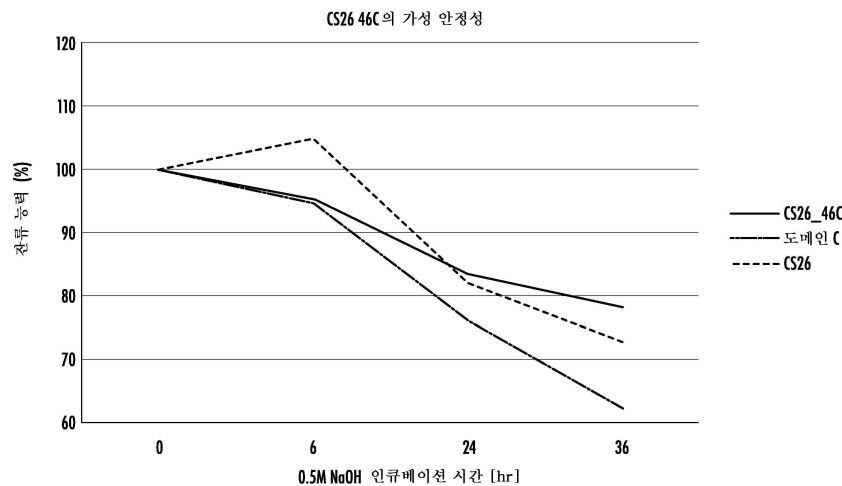
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 C-말단 나선형 영역에 시스테인을 갖는 FC 결합 단백질

(57) 요약

본 발명은 C-말단 나선형 영역에 시스테인을 갖는 1개 이상의 도메인을 포함하는 Fc 결합 단백질에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 본 발명의 Fc 결합 단백질을 포함하는 친화성 매트릭스에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이뮤노글로불린의 친화성 정제를 위한 이들 Fc 결합 단백질 또는 친화성 매트릭스의 용도, 및 본 발명의 Fc 결합 단백질을 사용하는 친화성 정제 방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

B01J 20/289 (2013.01)
B01J 20/3204 (2013.01)
B01J 20/3208 (2013.01)
B01J 20/3219 (2013.01)
B01J 20/3274 (2013.01)

(30) 우선권주장

18154731.6 2018년02월01일
유럽특허청(EPO)(EP)
18163964.2 2018년03월26일
유럽특허청(EPO)(EP)

명세서

청구범위

청구항 1

1개 이상의 도메인을 포함하는 Fc 결합 단백질이며, 여기서 서열식별번호: 2에 상응하는 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54에서의 적어도 1개의 아미노산이 시스테인인 Fc 결합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 적어도 1개의 도메인이 서열식별번호: 2의 아미노산 서열 또는 그에 대해 적어도 89.5% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 서열식별번호: 2에 상응하는 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54에서의 적어도 1개의 아미노산이 시스테인인 Fc 결합 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 적어도 1개의 도메인이 서열식별번호: 3-16의 아미노산 서열 또는 각각 그에 대해 적어도 89.5% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 서열식별번호: 3-16에 상응하는 위치 40, 42, 43, 46, 47, 50, 51, 53 또는 54에서의 적어도 1개의 아미노산이 시스테인인 Fc 결합 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서, 적어도 1개의 도메인이 서열식별번호: 7-8의 아미노산 서열 또는 각각 그에 대해 적어도 89.5% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 서열식별번호: 7-8에 상응하는 위치 40, 42, 43, 46, 47, 50, 51, 53 또는 54에서의 적어도 1개의 아미노산이 시스테인인 Fc 결합 단백질.

청구항 5

제1항에 있어서, 서열식별번호: 2에 상응하는 위치 43, 46 또는 47에서의 적어도 1개의 아미노산이 시스테인인 Fc 결합 단백질.

청구항 6

제1항에 있어서, 적어도 1개의 도메인이 서열식별번호: 17-86, 90-99의 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 각각 그에 대해 적어도 89.5% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 Fc 결합 단백질.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 도메인이 그의 N-말단의 처음 4개 아미노산 내에 1, 2 또는 3개 아미노산의 결실 및/또는 그의 C-말단의 처음 2개 아미노산 내에 1 또는 2개 아미노산의 결실을 갖는 것인 Fc 결합 단백질.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 서로 연결된 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 도메인을 포함하는 Fc 결합 단백질.

청구항 9

제8항에 있어서, 동종다량체 또는 이종다량체인 Fc 결합 단백질.

청구항 10

제9항에 있어서, 1개 이상의 도메인이 서로 직접 연결되거나 또는 1개 이상의 링커, 바람직하게는 펩티드 링커와 연결되는 것인 Fc 결합 단백질.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 바람직하게는 위치 40, 42, 43, 46, 47, 50, 51, 53 또는 54에서

의 시스테인을 통해 고체 지지체에 접합되는 Fc 결합 단백질.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, IgG₁, IgG₂, IgG₄, IgM, IgA, Fc 영역을 포함하는 Ig 단편, Ig의 Fc 영역을 포함하는 융합 단백질, 및 Ig의 Fc 영역을 포함하는 접합체에 결합하는 Fc 결합 단백질.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 Fc 결합 단백질을 포함하는 친화성 분리 매트릭스.

청구항 14

Fc 서열을 포함하는 임의의 단백질의 친화성 정제를 위한, 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 Fc 결합 단백질 또는 제13항의 친화성 분리 매트릭스의 용도.

청구항 15

(a) Fc 서열을 포함하는 단백질을 함유하는 액체를 제공하는 단계; (b) 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 적어도 1개의 Fc 결합 단백질을 포함하는 친화성 분리 매트릭스를 제공하는 단계이며, 상기 단백질이 상기 친화성 분리 매트릭스에 커플링되어 있는 것인 단계; (c) 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 적어도 1개의 Fc 결합 단백질이 Fc 서열을 포함하는 단백질에 결합하는 것을 허용하는 조건 하에 상기 친화성 분리 매트릭스를 상기 액체와 접촉시키는 단계; 및 (d) 상기 Fc 서열을 포함하는 단백질을 상기 친화성 정제 매트릭스로부터 용리시키는 단계를 포함하는, Fc 서열을 포함하는 단백질의 친화성 정제 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 C-말단 나선형 영역에 시스테인을 갖는 1개 이상의 도메인을 포함하는 Fc 결합 단백질에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 본 발명의 Fc 결합 단백질을 포함하는 친화성 매트릭스에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이뮤노글로불린의 친화성 정제를 위한 이들 Fc 결합 단백질 또는 친화성 매트릭스의 용도, 및 본 발명의 Fc 결합 단백질을 사용하는 친화성 정제 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 많은 생물공학 및 제약 적용분야는 항체를 함유하는 샘플로부터 오염물을 제거하는 것을 필요로 한다. 항체를 포획 및 정제하기 위한 확립된 절차는 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)로부터의 박테리아 세포 표면 단백질을 이뮤노글로불린에 대한 선택적 리간드로서 사용하는 친화성 크로마토그래피이다 (예를 들어, 문헌 [Huse et al., J. Biochem. Biophys. Methods 51, 2002: 217-231]에 의한 검토 참조). 야생형 단백질 A는 높은 친화도 및 선택성으로 IgG 분자의 Fc 영역에 결합하고, 고온 및 광범위한 pH 값에서 안정하다. 알칼리성 안정성과 같은 개선된 특성을 갖는 단백질 A의 변이체가 항체를 정제하는데 이용가능하고, 단백질 A 리간드를 포함하는 다양한 크로마토그래피 매트릭스가 상업적으로 입수가능하다. 그러나, 특히 야생형 단백질 A 기반 크로마토그래피 매트릭스는 알칼리성 조건에 노출된 후 이뮤노글로불린에 대한 결합 능력의 상실을 나타낸다.

발명의 내용

[0003] 본 발명의 기저를 이루는 기술적 문제

[0004] 항체 또는 Fc-함유 융합 단백질에 대한 대부분의 대규모 생산 공정은 친화성 정제를 위해 단백질 A를 사용한다. 그러나, 친화성 크로마토그래피에서 단백질 A를 적용하는 것의 한계로 인해, 이뮤노글로불린의 친화성 정제를 용이하게 하기 위해 이뮤노글로불린에 특이적으로 결합하는 개선된 특성을 갖는 신규 Fc 결합 단백질을 제공하는 것이 관련 기술분야에서 필요하다. Fc 결합 단백질을 포함하는 크로마토그래피 매트릭스의 가치를 최대한 활용하기 위해서는, 친화성 리간드 매트릭스를 다수회 사용하는 것이 바람직하다. 크로마토그래피 주기 사이에, 매트릭스 상의 잔류 오염물의 위생처리 및 제거를 위해 철저한 세정 절차가 요구된다. 이러한 절차에서, 높은 농도의 NaOH를 갖는 알칼리성 용액을 친화성 리간드 매트릭스에 적용하는 것이 일반적인 관행이다.

야생형 단백질 A 도메인은 이러한 혹독한 알칼리성 조건을 장기간 동안 견딜 수 없고, 이뮤노글로불린에 대한 결합 능력을 빠르게 상실한다. 따라서, 알칼리성 조건 하에 장기간 처리를 견딜 수 있는 신규 Fc 결합 단백질을 수득하는 것이 본 분야에서 계속 필요하다.

[0005] 본 발명은 특히 이뮤노글로불린의 친화성 정제에 매우 적합하며 선행 기술의 단점을 극복하는 Fc 결합 단백질을 제공한다. 특히, 본 발명의 Fc 결합 단백질의 유의한 이점은 높은 동적 결합 능력과 조합되어 Fc 결합 능력을 감소시키지 않으면서 장기간 동안 높은 pH에서 그의 안정성이 개선되었다는 것이다. 추가로, 신규 Fc 결합 단백질은 pH 3.5 이상에서 매트릭스에 고정화된 Fc 결합 단백질로부터 결합된 Fc 단백질의 95% 초과가 용리되도록 한다.

[0006] 상기 개관은 본 발명에 의해 해결되는 모든 문제점을 반드시 기재하는 것은 아니다.

[0007] 발명의 개요

[0008] 본 발명의 제1 측면은 친화성 정제에 적합한 Fc 결합 단백질을 제공하는 것이다. 이는 1개 이상의 Fc 결합 도메인을 포함하고, 여기서 서열식별번호: 2에 상응하는 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54에서의 적어도 1개의 아미노산이 시스테인인 Fc 결합 단백질로 달성된다. 헬릭스 3 내의 1 또는 2개의 아미노산이 시스테인인 것이 바람직하다. 일부 실시양태에서, Fc 결합 단백질은 1개 이상의 Fc 결합 도메인을 포함하고, 여기서 적어도 1개의 도메인은 서열식별번호: 2의 아미노산 서열 또는 그에 대해 적어도 89.5% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 본질적으로 이루어지거나 또는 그로 이루어지고, 여기서 서열식별번호: 2에 상응하는 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54에서의 적어도 1개의 아미노산은 시스테인이다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 도메인은 서열식별번호: 3-16의 아미노산 서열 또는 각각 그에 대해 적어도 89.5% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 본질적으로 이루어지거나 또는 그로 이루어지고, 여기서 서열식별번호: 3-16에 상응하는 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54에서의 적어도 1개의 아미노산은 시스테인이다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 도메인은 서열식별번호: 7-8의 아미노산 서열 또는 각각 그에 대해 적어도 89.5% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 본질적으로 이루어지거나 또는 그로 이루어지고, 여기서 서열식별번호: 7-8에 상응하는 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54에서의 적어도 1개의 아미노산은 시스테인이다. 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 2에 상응하는 위치 43, 46 또는 47에서의 1 또는 2개의 아미노산, 바람직하게는 위치 43, 46 또는 47에서의 1개의 아미노산, 또는 위치 43 및 46 또는 43 및 47에서의 2개의 아미노산은 시스테인이다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 도메인은 서열식별번호: 17-77, 90-99의 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그에 대해 적어도 89.5% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 본질적으로 이루어지거나 또는 그로 이루어진다.

[0009] 제2 측면에서, 본 발명은 제1 측면의 Fc 결합 단백질을 포함하는 친화성 분리 매트릭스에 관한 것이다.

[0010] 제3 측면에서, 본 발명은 이뮤노글로불린 또는 이뮤노글로불린의 Fc 부분을 포함하는 단백질의 친화성 정제를 위한 제1 측면의 Fc 결합 단백질 또는 제2 측면의 친화성 분리 매트릭스의 용도에 관한 것이다.

[0011] 제4 측면에서, 본 발명은 (a) 이뮤노글로불린을 함유하는 액체를 제공하는 단계; (b) 제1 측면의 고정화된 Fc 결합 단백질을 포함하는 친화성 분리 매트릭스를 제공하는 단계이며, 상기 단백질이 상기 친화성 분리 매트릭스에 커플링되어 있는 것인 단계; (c) 상기 액체와 상기 친화성 분리 매트릭스를 접촉시키는 단계이며, 여기서 상기 이뮤노글로불린이 상기 고정화된 Fc 결합 단백질에 결합하는 것인 단계; 및 (d) 상기 이뮤노글로불린을 상기 매트릭스로부터 용리시켜, 상기 이뮤노글로불린을 함유하는 용리액을 수득하는 단계를 포함하는, 이뮤노글로불린 또는 이뮤노글로불린의 Fc 부분을 포함하는 단백질의 친화성 정제 방법에 관한 것이다.

[0012] 이러한 본 발명의 개요는 본 발명의 모든 특색을 반드시 기재하는 것은 아니다. 다른 실시양태는 다음 상세한 설명의 검토로부터 분명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1. c-말단 나선형 영역 (헬릭스 3)에 시스테인을 갖는 Fc 결합 도메인의 아미노산 서열. 상단 열 내의 숫자는 Fc 결합 도메인 내의 상응하는 아미노산 위치를 지칭한다. 도 1a. 서열식별번호: 2의 Fc 결합 도메인. 도 1b. 헬릭스 3에 Cys를 갖는 Fc 결합 도메인에 대한 예.

도 2. 헬릭스 3에 시스테인을 갖는 Fc 결합 도메인의 고정화. 도 2a. 에폭시매트릭스에 대한 위치 43, 46, 47, 50 또는 58에서 시스테인을 갖는 IB14 단백질의 커플링 효율. Y축: 커플링된 단백질 양 (nmol/ml). 도 2b. 에폭시-활성화된 세파로스 6B 매트릭스에 대한 cs14 43C 및 cs14 46C의 커플링. Y축: n(단백질/ml 수지)

(nmol)

도 3. 헬릭스 33에 시스테인을 갖는 Fc 결합 단백질의 가성 안정성. 도 3a. 위치 43, 46, 47, 50 또는 58에서 시스테인을 갖는 IB14의 알칼리성 안정성의 분석. Y축: Fc 결합 단백질 IB14 및 Cys 변이체의 잔류 IgG 결합 활성 (%). 회색 칼럼: 6시간의 연속 0.5 M NaOH 처리 후 IgG 결합 활성. 흑색 칼럼: NaOH 부재 하의 IgG 결합 활성. 도 3b. 위치 43 또는 46에서 시스테인을 갖는 cs14의 가성 안정성 및 DBC 10%. Y축: DBC 10% (mg/ml). 흑색: DBC 10% (mg/ml), 0시간 NaOH, 담회색: DBC 10% (mg/ml), 18시간 NaOH, 암회색: DBC 10% (mg/ml), 72시간 NaOH. Cys 변이체를 (위치 58 뒤에) C-말단 시스테인을 갖는 cs14 및 단백질 A와 비교하였다.

도 4. 위치 46에서 Cys를 갖지 않는 cs26과 비교하여 및 야생형 단백질 A 도메인 C와 비교하여 cs26 46C에 대해 6, 24 및 36시간의 연속 0.5 M NaOH 처리 후 잔류 결합 능력 (%)이 제시된다. x축은 0.5 M NaOH 인큐베이션의 시간 (hr)을 나타낸다.

도 5. 위치 46에서 Cys를 갖지 않는 cs26과 비교하여 및 재조합 야생형 단백질 A와 비교하여 cs26 46C (단량체 및 이량체)에 대해 동적 결합 능력 (DBC; mg/ml)이 제시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 정의
- [0015] 하기에서 본 발명을 상세하게 기재하기 전에, 본 발명은 본원에 기재된 특정한 방법론, 프로토콜 및 시약이 달라질 수 있기 때문에 이들에 제한되지는 않는 것으로 이해되어야 한다. 또한 본원에 사용된 용어는 특정한 실시양태만을 기재하기 위한 목적을 위한 것이고, 본 발명의 범주를 제한하고자 의도되지 않으며, 본 발명의 범주는 첨부된 청구범위에 의해서만 제한될 것으로 이해되어야 한다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.
- [0016] 바람직하게는, 본원에 사용된 용어는 문헌 ["A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. and Koelbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland)]에 제공된 정의와 일치한다.
- [0017] 하기하는 본 명세서 및 청구범위 전반에 걸쳐, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단어 "포함하다" 및 변형어, 예컨대 "포함한다" 및 "포함하는"은 언급된 구성원, 정수 또는 단계, 또는 구성원, 정수 또는 단계의 군을 포함하는 것을 의미하지만 임의의 다른 구성원, 정수 또는 단계, 또는 구성원, 정수 또는 단계의 군을 배제하는 것을 의미하지는 않는 것으로 이해될 것이다.
- [0018] 본 발명의 설명 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바와 같이, 문맥이 달리 명백하게 나타내지 않는 한, 단수 형태는 복수 형태와 상호교환가능하게 사용되고, 또한 복수 형태를 포함하며 각각의 의미 내에 속하는 것으로 의도된다. 또한, 본원에 사용된 "및/또는"은 열거된 항목 중 하나 이상의 임의의 및 모든 가능한 조합, 뿐만 아니라 대안적 ("또는")으로 해석되는 경우 조합의 결여를 지칭하고 포괄한다. 본원에 사용된 용어 "약"은 명백하게 언급된 양뿐만 아니라 그로부터 $\pm$ 10%의 편차를 포괄한다. 보다 바람직하게는, 5%의 편차가 용어 "약"에 포괄된다.
- [0019] 여러 문헌 (예를 들어, 특허, 특허 출원, 과학 출판물, 제조업체의 설명서 등)이 본 명세서의 본문 전반에 걸쳐 인용된다. 본원에서의 어떠한 것도 본 발명이 선행 발명에 의한 상기 개시내용보다 선행할 권리를 가지지 않음을 인정하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본원에 인용된 문헌 중 일부는 "참조로 포함되는" 것을 특징으로 한다. 상기 포함된 참고문헌의 정의 또는 교시와 본 명세서에 언급된 정의 또는 교시 사이에 상충되는 경우, 본 명세서의 본문이 우선한다.
- [0020] 본원에 언급된 모든 서열은 첨부된 서열 목록에 개시되어 있으며, 그의 전체 내용 및 개시내용은 본 명세서의 일부이다.
- [0021] 본 발명의 문맥에서, 용어 "Fc 결합 단백질" 또는 "이뮤노글로불린-결합 단백질" 또는 "Ig 결합 단백질"은 이뮤노글로불린의 Fc 영역에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질을 기재하기 위해 사용된다. Fc 결합 단백질은 적어도 1개의 "Fc 결합 도메인" 또는 "이뮤노글로불린-결합 도메인" 또는 "Ig 결합 도메인"을 포함하며, 이는 아미노산 잔기 7-19로부터의 헬릭스 1, 아미노산 잔기 23-37로부터의 헬릭스 2 및 아미노산 잔기 40-55로부터의 헬

릭스 3을 갖는 58개 아미노산의 3개-헬릭스 다발을 특징으로 한다. Fc 결합 도메인은 결실, 예를 들어 3개-헬릭스 다발 구조를 잃지 않으면서 N-말단에서 6개 이하의 아미노산 또는 C-말단에서 4개 이하의 아미노산의 결실을 포함할 수 있다.

[0022] 본원에서 이해되는 "이뮤노글로불린"은 포유동물 IgG, 예컨대 예를 들어 인간 IgG₁, 인간 IgG₂, 인간 IgG₄, 마우스 IgG, 래트 IgG, 염소 IgG, 소 IgG, 기니 피그 IgG, 토끼 IgG; 인간 IgM, 인간 IgA; 및 Fc 영역을 포함하는 이뮤노글로불린 단편을 포함할 수 있으나 반드시 이에 제한되지는 않는다. Fc 영역에 대한 특이적 결합으로 인해, 본 발명의 "Fc 결합 단백질" 또는 "Ig 결합 단백질"은 전체 이뮤노글로불린, 및 Fc 영역을 포함하는 이뮤노글로불린 단편, 이뮤노글로불린의 Fc 영역을 포함하는 융합 단백질, 및 이뮤노글로불린의 Fc 영역을 포함하는 접합체에 결합할 수 있다. 본 발명의 Fc 결합 단백질이 본원에서 이뮤노글로불린의 Fc 영역에 대한 특이적 결합을 나타내지만, Fc 결합 단백질이 추가적으로 다른 영역, 예컨대 이뮤노글로불린의 Fab 영역에 감소된 친화도로 결합할 수 있다는 것이 배제되지는 않는다.

[0023] 본 발명에 따른 용어 "결합"은 바람직하게는 특이적 결합에 관한 것이다. "특이적 결합"은 Fc 결합 단백질 또는 Fc 결합 도메인이 또 다른 비-이뮤노글로불린 표적에 대한 결합과 비교하여 특이적인 이뮤노글로불린에 더 강하게 결합한다는 것을 의미한다.

[0024] 용어 "결합 활성"은 이뮤노글로불린에 결합하는 본 발명의 Fc 결합 단백질의 능력을 지칭한다. 예를 들어, 결합 활성은 알칼리성 처리 전 및/또는 후에 결정될 수 있다. 결합 활성은 Fc 결합 단백질에 대해 또는 매트릭스에 커플링된 Fc 결합 단백질에 대해, 즉 고정화된 결합 단백질에 대해 결정될 수 있다. 용어 "인공"은 자연 발생이 아닌 대상을 지칭하고, 즉 이러한 용어는 인간에 의해 생산되거나 변형된 대상을 지칭한다. 예를 들어, 인간에 의해 생성되거나 (예컨대 예를 들어 실험실에서 유전 공학에 의해, 서플링 방법에 의해 또는 화학 반응 등에 의해) 또는 의도적으로 변형된 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열이 인공이다.

[0025] 용어 "해리 상수" 또는 " K_D "는 특이적 결합 친화도를 정의한다. 본원에 사용된 용어 " K_D " (통상적으로 "mol/L"로 측정됨, 때때로 "M"으로 약칭됨)는 제1 단백질과 제2 단백질 사이의 특정한 상호작용의 해리 평형 상수를 지칭하는 것으로 의도된다. 본 발명의 문맥에서, 용어 K_D 는 특히 Fc 결합 단백질과 이뮤노글로불린 사이의 결합 친화도를 기재하기 위해 사용된다. 본 발명의 Fc 결합 단백질은 이뮤노글로불린에 대한 해리 상수 K_D 가 적어도 1 μ M 이하, 또는 바람직하게는 100 nM 이하, 보다 바람직하게는 50 nM 이하, 훨씬 더 바람직하게는 10 nM 이하인 경우 이뮤노글로불린에 결합하는 것으로 간주된다.

[0026] 용어 "단백질" 및 "폴리펩티드"는 펩티드 결합에 의해 연결된 2개 이상의 아미노산의 임의의 선형 분자 쇄를 지칭하고, 특정 길이의 생성물을 지칭하지는 않는다. 따라서, "펩티드", "단백질", "아미노산 쇄", 또는 2개 이상의 아미노산의 쇄를 지칭하는데 사용되는 임의의 다른 용어가 "폴리펩티드"의 정의 내에 포함되고, 용어 "폴리펩티드"는 이들 용어 중 임의의 것을 대신하여 또는 이와 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 용어 "폴리펩티드"는 또한 글리코실화, 아세틸화, 인산화, 아미드화, 단백질분해 절단, 비-자연 발생 아미노산에 의한 변형 및 관련 기술분야에 널리 공지된 유사한 변형을 비제한적으로 포함한다. 폴리펩티드의 번역후 변형의 생성물을 지칭하는 것으로 의도된다. 따라서, 2개 이상의 단백질 도메인을 포함하는 Fc 결합 단백질은 또한 용어 "단백질" 또는 "폴리펩티드"의 정의 하에 속한다.

[0027] 용어 "알칼리성 안정한" 또는 "알칼리성 안정성" 또는 "가성 안정한" 또는 "가성 안정성" (또한 본원에서 "cs"로 약칭됨)은 이뮤노글로불린에 결합하는 능력을 유의하게 잃지 않으면서 알칼리성 조건을 견디는 본 발명의 Fc 결합 단백질의 능력을 지칭한다. 이러한 분야의 통상의 기술자는, 예를 들어 실시예에 기재된 바와 같이 Fc 결합 단백질을 수산화나트륨 용액과 함께 인큐베이션하고, 이후 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 상용 실험에 의해, 예를 들어 크로마토그래피 접근법에 의해 이뮤노글로불린에 대한 결합 활성을 시험함으로써, 알칼리성 안정성을 용이하게 시험할 수 있다.

[0028] 본 발명의 Fc 결합 단백질 뿐만 아니라 본 발명의 Fc 결합 단백질을 포함하는 매트릭스는 "증가된" 또는 "개선된" 알칼리성 안정성을 나타내고, 이는 상기 Fc 결합 단백질을 포함하는 분자 및 매트릭스가 참조 단백질에 비해 장기간 동안 알칼리성 조건 하에 안정하다는 것을 의미한다.

[0029] 용어 "모 단백질" 또는 "모 도메인"에서의 용어 "모"는 상기 모 단백질 또는 도메인의 변이체를 생성하도록 후속적으로 변형되는 Fc 결합 단백질을 지칭한다. 상기 모 단백질 또는 도메인은 인공 도메인 (예를 들어, 비제한적으로, 서열식별번호: 78-83), 자연 발생 스타필로코쿠스 아우레우스 단백질 A 도메인 (예를 들어, 도메인 C

에 대한 서열식별번호: 84, 도메인 B에 대한 서열식별번호: 85), 또는 자연 발생 스타필로코쿠스 아우레우스 단백질 A 도메인의 변이체 또는 조작된 버전 (예를 들어, 도메인 Z에 대한 서열식별번호: 86)일 수 있다.

- [0030] 본원에 사용된 용어 "변이체"는 적어도 1개의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입에 의해 또 다른 아미노산 서열과 상이한 Fc 결합 단백질 또는 도메인의 아미노산 서열을 포함한다. 이들 변형은 인간에 의해 수행되는 유전 공학 또는 화학적 합성 또는 화학적 반응에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 서열식별번호: 27 (cs26 A46C)은 서열식별번호: 7 (cs26)의 변이체이다.
- [0031] 본원에 사용된 용어 "접합체"는 적어도 다른 물질, 예컨대 제2 단백질 또는 비-단백질성 모이어티에 화학적으로 부착된 제1 단백질을 포함하거나 또는 그로 본질적으로 이루어진 분자에 관한 것이다.
- [0032] 용어 "변형" 또는 "아미노산 변형"은 모 폴리펩티드 서열 내의 특정한 위치에서의 아미노산이 또 다른 아미노산에 의해 교환, 결실 또는 삽입되는 것을 지칭한다. 공지된 유전자 코드, 및 재조합 및 합성 DNA 기술을 고려하여, 숙련된 과학자는 아미노산 변이체를 코딩하는 DNA를 용이하게 구축할 수 있다.
- [0033] 용어 "치환" 또는 "아미노산 치환"은 모 폴리펩티드 서열 내의 특정한 위치에서의 아미노산이 또 다른 아미노산에 의해 교환되는 것을 지칭한다. 예를 들어, 치환 G46C는 위치 46에서의 글리신이 시스테인에 의해 대체된 Fc 결합 단백질을 지칭한다. 상기 예의 경우, 46C는 위치 46에서의 시스테인을 지칭한다. 본원의 목적을 위해, 다중 치환은 전형적으로 슬래쉬에 의해 분리된다. 예를 들어, A1I/S11A/K35R/A46C는 치환 A1I, S11A, K35R 및 A46C의 조합을 포함하는 변이체를 지칭한다.
- [0034] 용어 "결실" 또는 "아미노산 결실"은 모 폴리펩티드 서열 내의 특정한 위치에서의 아미노산의 제거를 지칭한다.
- [0035] 용어 "삽입" 또는 "아미노산 삽입"은 모 폴리펩티드 서열에 대한 아미노산의 부가를 지칭한다.
- [0036] 본 명세서 전반에 걸쳐, 도 1의 아미노산 잔기 위치 넘버링 규정이 사용되고, 위치 번호는, 예를 들어 서열식별번호: 1-16에서의 것에 상응하게 지정된다.
- [0037] 용어 "아미노산 서열 동일성"은 2개 이상의 단백질의 아미노산 서열의 동일성 (또는 차이)의 정량적 비교를 지칭한다. 참조 폴리펩티드 서열에 대한 "퍼센트 (%) 아미노산 서열 동일성" 또는 "퍼센트 동일한" 또는 "퍼센트 동일성"은, 서열을 정렬하고 필요한 경우 갭을 도입하여 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성한 후, 참조 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로 정의된다.
- [0038] 서열 동일성을 결정하기 위해, 질의 단백질의 서열이 참조 단백질의 서열에 정렬된다. 정렬 방법은 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 참조 아미노산 서열에 대한 임의적 폴리펩티드의 아미노산 서열 동일성 정도를 결정하기 위해, SIM 로컬 유사성 프로그램이 바람직하게 사용되며 (Xiaoquin Huang and Webb Miller (1991), Advances in Applied Mathematics, vol. 12: 337-357), 이는 자유롭게 이용가능하다 (또한 <http://www.expasy.org/tools/sim-prot.html> 참조). 다중 정렬을 위해 분석 클러스탈W가 바람직하게 사용된다 (Thompson et al. (1994) Nucleic Acids Res., 22(22): 4673-4680). 바람직하게는, 서열 동일성 백분율을 계산할 때 SIM 로컬 유사성 프로그램 또는 클러스탈W의 디폴트 파라미터가 사용된다.
- [0039] 본 발명의 문맥에서, 서열 동일성 정도는 달리 명백하게 언급되지 않는 한 일반적으로 비변형 서열의 총 길이에 대해 계산된다.
- [0040] 주어진 위치에서 참조 아미노산 서열과 상이한 질의 서열의 각각의 아미노산을 1개의 차이로 계수한다. 이어서 차이의 합계를 참조 서열의 길이와 관련시켜 비-동일성의 백분율을 산출한다. 동일성의 정량적 백분율은 100 마이너스 비-동일성의 백분율로 계산한다.
- [0041] 본원에 사용된 바와 같이, 2개의 폴리펩티드 서열과 관련하여 어구 "퍼센트 동일한" 또는 "퍼센트 (%) 아미노산 서열 동일성" 또는 "퍼센트 동일성"은, 2개 이상의 서열 또는 하위서열을 최대 상응도로 비교 및 정렬한 경우 하기 서열 비교 알고리즘 중 하나를 사용하거나 육안 검사에 의해 측정시, 일부 실시양태에서 적어도 약 80%, 일부 실시양태에서 적어도 82%, 일부 실시양태에서 적어도 84%, 일부 실시양태에서 적어도 86%, 일부 실시양태에서 적어도 87%, 일부 실시양태에서 적어도 89.5%, 일부 실시양태에서 적어도 91%, 일부 실시양태에서 적어도 93%, 일부 실시양태에서 적어도 94%, 일부 실시양태에서 적어도 96%, 일부 실시양태에서 적어도 98%, 및 일부 실시양태에서 100% 아미노산 잔기 동일성을 갖는 것을 지칭한다. 명확성을 이유로, 예를 들어 적어도 89.5% 동일성을 갖는 서열은 89.5% 초과 동일성의 동일성을 갖는 모든 서열, 예를 들어 적어도 91%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 98%, 100% 아미노산 동일성을 갖는 실시양태를 포함한다.

- [0042] 퍼센트 동일성은 일부 실시양태에서 적어도 50개 잔기, 적어도 52개 잔기의 영역에 걸쳐, 일부 실시양태에서 적어도 53개 잔기의 영역에 걸쳐, 일부 실시양태에서 적어도 54개 잔기의 영역에 걸쳐, 일부 실시양태에서 적어도 55개 잔기의 영역에 걸쳐, 일부 실시양태에서 적어도 56개 잔기의 영역에 걸쳐, 일부 실시양태에서 적어도 57개 잔기의 영역에 걸쳐, 및 일부 실시양태에서 적어도 58개 잔기의 영역에 걸쳐 존재한다.
- [0043] 용어 "융합된"은 성분이 펩티드 결합에 의해 직접 또는 펩티드 링커를 통해 연결되는 것을 의미한다.
- [0044] 용어 "융합 단백질"은 적어도 제2 단백질에 유전자적으로 연결된 적어도 제1 단백질을 포함하는 단백질에 관한 것이다. 융합 단백질은 원래 별개 단백질을 코딩하는 2개 이상의 유전자의 연결을 통해 생성된다. 따라서, 융합 단백질은 단일의 선형 폴리펩티드로서 발현되는 동일하거나 상이한 단백질의 다량체를 포함할 수 있다.
- [0045] 본원에 사용된 용어 "링커"는 그의 가장 넓은 의미에서 적어도 2개의 다른 분자를 공유 연결하는 분자를 지칭한다. 본 발명의 전형적인 실시양태에서, "링커"는 Fc 결합 도메인을 적어도 1개의 추가의 Fc 결합 도메인과 연결하는 모이어티, 즉 2개의 단백질 도메인을 서로 연결하여 다량체를 생성하는 모이어티로서 이해되어야 한다. 바람직한 실시양태에서, "링커"는 펩티드 링커이고, 즉 2개의 단백질 도메인을 연결하는 모이어티는 1개의 단일 아미노산 또는 2개 이상의 아미노산을 포함하는 펩티드이다.
- [0046] 용어 "크로마토그래피"는 샘플에서 한 유형의 분자 (예를 들어 이뮤노글로불린)를 다른 분자 (예를 들어 오염물)로부터 분리하기 위해 이동상 및 고정상을 사용하는 분리 기술을 지칭한다. 액체 이동상은 분자들의 혼합물을 함유하고, 고정상 (예컨대 고체 매트릭스)을 가로질러 또는 통해 이들을 수송한다. 이동상 내의 상이한 분자들과 고정상의 차등 상호작용으로 인해, 이동상 내의 분자들이 분리될 수 있다.
- [0047] 용어 "친화성 크로마토그래피"는 고정상에 커플링된 리간드가 이동상 (샘플) 내의 분자 (즉 이뮤노글로불린)와 상호작용하는, 즉 리간드가 정제될 분자에 대한 특이적 결합 친화성을 갖는 특이적 방식의 크로마토그래피를 지칭한다. 본 발명의 문맥에서 이해되는 바와 같이, 친화성 크로마토그래피는 크로마토그래피 리간드, 예컨대 본 발명의 Fc 결합 단백질을 포함하는 고정상에 이뮤노글로불린을 함유하는 샘플을 첨가하는 것을 포함한다.
- [0048] 용어 "고체 지지체" 또는 "고체 매트릭스"는 고정상에 대해 상호교환가능하게 사용된다.
- [0049] 본원에서 상호교환가능하게 사용되는 용어 "친화성 매트릭스" 또는 "친화성 분리 매트릭스" 또는 "친화성 크로마토그래피 매트릭스"는 친화성 리간드, 예를 들어 본 발명의 Fc 결합 단백질이 부착되는 매트릭스, 예를 들어 크로마토그래피 매트릭스를 지칭한다. 리간드 (예를 들어 Fc 결합 단백질)는 혼합물로부터 정제 또는 제거될 관심 분자 (예를 들어 상기 정의된 바와 같은 이뮤노글로불린)에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0050] 본원에 사용된 용어 "친화성 정제"는 상기 정의된 바와 같은 이뮤노글로불린을 매트릭스에 고정화된 Fc 결합 단백질에 결합시킴으로써 상기 정의된 바와 같은 이뮤노글로불린을 액체로부터 정제하는 방법을 지칭한다. 이로써, 이뮤노글로불린을 제외한 혼합물의 모든 다른 성분이 제거된다. 추가 단계에서, 결합된 이뮤노글로불린은 정제된 형태로 용리된다.
- [0051] 본 발명의 실시양태
- [0052] 본 발명은 이제 추가로 기재될 것이다. 하기 단락에서 본 발명의 다른 측면이 보다 상세하게 정의된다. 하기 정의된 각각의 측면은 달리 명확히 나타내지 않는 한 임의의 다른 측면 또는 측면들과 조합될 수 있다. 특히, 바람직하거나 유리한 것으로 나타낸 임의의 특색은 바람직하거나 유리한 것으로 나타낸 임의의 다른 특색 또는 특색들과 조합될 수 있다.
- [0053] 제1 측면에서, 본 발명은 Fc 결합 단백질에 관한 것이고, 여기서 Fc 결합 단백질은 1개 이상의 도메인을 포함하고, 여기서 서열식별번호: 2에 상응하는 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54에서의 적어도 1개의 아미노산은 시스테인이고, 바람직하게는 서열식별번호: 2에 상응하는 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 및 54의 군으로부터 선택된 1개의 아미노산은 시스테인이다. 제1 측면의 한 실시양태에서, 서열식별번호: 2에 상응하는 위치 43에서의 아미노산, 위치 46에서의 아미노산, 위치 47에서의 아미노산, 위치 50에서의 아미노산, 위치 51에서의 아미노산, 또는 위치 53에서의 아미노산은 시스테인이다. 제1 측면에서, Fc 단백질은 1개 이상의 도메인을 포함하고, 여기서 적어도 1개의 도메인은 서열식별번호: 2의 아미노산 서열 또는 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 84%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 89.5%, 적어도 91%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 98% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산을 포함하거나 또는 그로 본질적으로 이루어지거나 또는 그로 이루어지고, 여기서 서열식별번호: 2에 상응하는 위치 40, 42, 43, 46, 47, 50, 51, 53 또는 54에서의 적어도 1개의 아미노산은 시스테인이다. 서열식별번호: 2-86, 90-99 또는 그에 대해 적어도 89.5% 동

일성을 갖는 아미노산 서열의 헬릭스 3에 2개 이하의 시스테인 잔기가 있는 것이 바람직하다.

[0054] 본 발명의 Fc 결합 도메인은 전형적으로 아미노산 잔기 7-19로부터의 헬릭스 1, 아미노산 잔기 23-37로부터의 헬릭스 2 및 아미노산 잔기 40-55로부터의 헬릭스 3을 갖는 전형적으로 58개 아미노산의 3개-헬릭스 다발로 이해된다. Fc 결합은 헬릭스 1 및 헬릭스 2에 의해 매개된다. 헬릭스 3에 시스테인을 갖는 Fc 결합 단백질의 놀라운 이점은 이들이 Fc-결합 특성을 손상시키지 않으면서, 및 높은 결합 능력을 제공하는 매트릭스에 대한 부위 지정 커플링 효율을 가지면서, 장기간 동안 알칼리 안정성을 부여한다는 것이다. 본 발명의 Fc 결합 단백질은 0.5 M NaOH 중에서 적어도 6시간 내지 최대 적어도 72시간 동안 인큐베이션한 후 결합 능력의 20% 미만의 감소를 나타낸다. 이러한 특색은, 예를 들어 매트릭스가 수회 사용될 수 있도록 매트릭스 상의 오염물을 제거하기 위해 높은 NaOH 농도를 갖는 알칼리성 용액을 사용하는 세정 절차를 동반하는 크로마토그래피 접근법에 중요하다. 추가로, 높은 가성 안정성을 갖는 것 이외에, 헬릭스 3에 Cys를 갖는 Fc 결합 단백질은 높은 커플링 효율을 나타낸다. 예를 들어, 예컨대 위치 46에서 Cys를 갖는 변이체의 동적 결합 능력은 재조합 단백질 A와 비교하여 더 우수하다 (도 5 참조).

[0055] 헬릭스 3에 시스테인을 갖는 바람직한 Fc 결합 단백질. 일부 실시양태는 서열식별번호: 1-86, 90-99로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산을 갖는 서열에 관한 것이다. 일부 실시양태는 서열식별번호: 1-86, 90-99로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산에 대해 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 84%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 89.5%, 적어도 91%, 적어도 93%, 적어도 94.5%, 적어도 96%, 적어도 98% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열에 관한 것이며, 단 이들은 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54에서 적어도 1개의 시스테인을 갖는다. 서열식별번호: 1-86, 90-99로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산에 대해 적어도 89.5% 동일성을 가지며 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54, 바람직하게는 위치 43 또는 /및 46, 보다 바람직하게는 위치 46에서 적어도 1개의 시스테인을 갖는 서열을 갖는 실시양태가 바람직하다. 헬릭스 3에 1 또는 2개의 시스테인을 갖는 Fc 결합 단백질의 실시양태가 바람직하다.

[0056] 본 발명의 Fc 결합 단백질의 아미노산 서열은 추가의 변형, 예컨대 삽입, 결실, 또는 추가의 치환을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, Fc 결합 도메인은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가의 치환을 갖는다. 일부 실시양태에서, Fc 결합 도메인은 그의 N-말단의 처음 4개 아미노산 내에 1, 2, 3 또는 4개 아미노산의 결실 및/또는 C-말단에 1 또는 2개 아미노산의 결실을 갖는다. 일부 실시양태에서, Fc 결합 도메인은 N-말단에서, 예를 들어 위치 1, 2 및 4에서, 또는 위치 1, 2 및 3에서 결실을 갖는다. 일부 실시양태에서, Fc 결합 도메인은 C-말단에서, 예를 들어 위치 57 및/또는 58에서 결실을 갖는다 (예를 들어, 비제한적으로 서열식별번호: 33-34에 제시된 바와 같음). 일부 실시양태는 상기 언급된 서열 (예를 들어, 비제한적으로 서열식별번호: 1-86, 90-99) 중 임의의 것의 아미노산 서열에 대해 적어도 89.5% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열에 관한 것이다. 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54에서 적어도 1개의 Cys, 바람직하게는 1개의 Cys를 갖는 Fc 결합 도메인에 대한 예는, 예를 들어 도 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0057] 서열식별번호: 7 (cs26) 및 변이체. 일부 실시양태에서, Fc 결합 단백질은 서열식별번호: 7의 아미노산 서열 또는 시스테인을 갖는 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54에서의 변형에 적합한 그에 대해 적어도 89.5% 동일성을 갖는 아미노산 서열의 1개 이상의 도메인을 포함한다. 예를 들어, 서열식별번호: 7에 대해 적어도 89.5% 동일성을 갖는 아미노산 서열은 cs24 (서열식별번호: 8)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54에서 Cys를 갖는 cs26의 변이체에 대한 예는, 예를 들어 서열식별번호: 26-39, 90-99를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0058] 서열식별번호: 8 (cs24) 및 변이체. 일부 실시양태에서, Fc 결합 단백질은 서열식별번호: 8의 아미노산 서열 또는 시스테인을 갖는 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54에서의 변형에 적합한 그에 대해 적어도 89.5% 동일성을 갖는 아미노산 서열의 1개 이상의 도메인을 포함한다. 예를 들어, 서열식별번호: 8에 대해 적어도 89.5% 동일성을 갖는 아미노산 서열은 cs26 (서열식별번호: 7)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54에서 Cys를 갖는 cs24의 변이체에 대한 예는, 예를 들어 서열식별번호: 26-39, 90-99를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0059] 서열식별번호: 3 (cs14) 및 변이체. 일부 실시양태에서, Fc 결합 단백질은 서열식별번호: 3의 아미노산 서열 또는 시스테인을 갖는 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54에서의 변형에 적합한 그에 대해 적어도 89.5% 서열 동일성을 갖는 서열의 1개 이상의 도메인을 포함한다. 예를 들어, 서열식별번호: 3에 대해 적어도 89.5% 동일성을 갖는 아미노산 서열은 서열식별번호: 10 (cs25), 서열식별번호: 11 (cs47h3), 서열식별번호: 12 (cs47h4), 서열식별번호: 13 (cs74h1) 및 서열식별번호: 14 (cs74h2)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54에서 Cys를 갖는 cs14의 변이체에 대한 예는, 예를 들어 서열식별번호: 17-20, 40-52, 64, 65, 70, 71, 74-76을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0060] 서열식별번호: 4 (cs27) 및 변이체. 일부 실시양태에서, Fc 결합 단백질은 서열식별번호: 4의 아미노산 서열 또는 시스테인을 갖는 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54에서의 변형에 적합한 그에 대해 적어도 89.5% 동일성을 갖는 아미노산 서열의 1개 이상의 도메인을 포함한다. 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54에서 Cys를 갖는 cs27의 변이체에 대한 예는, 예를 들어 서열식별번호: 21-25를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0061] 서열식별번호: 5 (cs20) 및 변이체. 일부 실시양태에서, Fc 결합 단백질은 서열식별번호: 5의 아미노산 서열 또는 시스테인을 갖는 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54에서의 변형에 적합한 그에 대해 적어도 89.5% 동일성을 갖는 아미노산 서열의 1개 이상의 도메인을 포함한다. 예를 들어, 서열식별번호: 5에 대해 적어도 89.5% 동일성을 갖는 아미노산 서열은 서열식별번호: 9 (cs17)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54에서 Cys를 갖는 cs20의 변이체에 대한 예는, 예를 들어 서열식별번호: 53-57을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0062] 서열식별번호: 6 (cs42) 및 변이체. 일부 실시양태에서, Fc 결합 단백질은 서열식별번호: 6의 아미노산 서열 또는 시스테인을 갖는 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54에서의 변형에 적합한 그에 대해 적어도 89.5% 동일성을 갖는 아미노산 서열의 1개 이상의 도메인을 포함한다. 예를 들어, 서열식별번호: 16에 대해 적어도 89.5% 동일성을 갖는 아미노산 서열은 cs28 (위치 4에서 상이함) 또는 cs41 (서열식별번호: 15)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54에서 Cys를 갖는 cs42의 변이체에 대한 예는, 예를 들어 서열식별번호: 58-63을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0063] 서열식별번호: 16 (cs43) 및 변이체. 일부 실시양태에서, Fc 결합 단백질은 서열식별번호: 16의 아미노산 서열 또는 시스테인을 갖는 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54에서의 변형에 적합한 그에 대해 적어도 89.5% 동일성을 갖는 아미노산 서열의 1개 이상의 도메인을 포함한다. 예를 들어, 서열식별번호: 16에 대해 적어도 89.5% 동일성을 갖는 아미노산 서열은 cs44 (위치 44에서 상이함), cs31 (위치 25 및 54에서 상이함), 또는 cs45 (위치 25 및 26에서 상이함)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54에서 Cys를 갖는 cs43의 변이체에 대한 예는, 예를 들어 서열식별번호: 66-69, 72를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0064] Fc 결합 단백질의 서열; 바람직한 아미노산 위치.

[0065] 놀랍게도, Fc 결합 도메인의 헬릭스 3 내의 시스테인은 도면 및 실시예에서 제시된 바와 같이 헬릭스 3에 시스테인을 갖지 않는 도메인과 비교하여 Fc 결합 도메인의 알칼리성 안정성을 증가시키고, Fc 결합 단백질의 매트릭스에 대한 부위-특이적 커플링을 개선시켜 매트릭스의 능력을 개선시킨다.

[0066] 일부 실시양태에서, 상기 Fc 결합 도메인은 위치 1에서 이소류신을 포함한다. Fc 결합 도메인의 위치 1에서의 아미노산이 트레오닌 (T)이 아닌 것이 바람직하다. 위치 1에서의 아미노산이 이소류신 (I) 또는 알라닌 (A)인 것이 바람직하다. 대안적으로, 위치 1은 결실될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 Fc 결합 도메인은 위치 11에서 알라닌 (A), 글루탐산 (E) 또는 이소류신 (I)을 포함한다. 위치 11에서의 아미노산이 아스파라긴 (N) 또는 리신 (K)이 아닌 것이 바람직하다. 위치 11에서의 아미노산이 알라닌 (A), 이소류신 (I), 글루탐산 (E), 히스티딘 (H) 또는 프롤린 (P)인 것이 바람직하고, A, I 또는 E인 것이 보다 바람직하고, A인 것이 가장 바람직하다. 대안적으로, 위치 11에서의 아미노산은 세린 (S)이다. 일부 실시양태에서, 상기 Fc 결합 도메인은 위치 35에서 아르기닌 (R) 또는 이소류신 (I)을 포함한다. 위치 35에서의 아미노산이 프롤린 (P), 아스파라긴 (N), 글리신 (G), 트립토판 (W), 알라닌 (A), 글루타민 (Q) 또는 메티오닌 (M)이 아닌 것이 바람직하다. 일부 실시양태에서, 상기 Fc 결합 도메인은 위치 42에서 류신 (L)을 포함한다. 위치 42에서의 아미노산이 티로신 (Y)이 아닌 것이 바람직하다. 일부 실시양태에서, 40C, 42C, 43C, 46C, 47C, 49C, 50C, 51C, 53C 또는 54C 이외에, Fc 결합 도메인은 1I, 11A, 11S, 35R 및 42L로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치 중 2, 3 또는 4개를 포함한다. 일부 실시양태에서, 위치 1I, 3A, 6D, 9Q, 10Q, 12A, 13F, 14Y, 15E, 16I, 17L, 18H, 19L, 20P, 21N, 22L, 23T, 24E, 26Q, 27R, 28N, 29A, 30F, 31I, 32Q, 33S, 34L, 36D, 37D, 38P, 39S, 41S, 42L, 45L, 48A, 52N, 55Q, 56A, 57P 중 적어도 90%는 본 발명의 Fc 결합 도메인에서 동일하다. 위치 2는 A 또는 D이고, 위치 4는 K 또는 Q이고, 위치 5는 H 또는 F이고, 위치 7은 K 또는 E이고, 위치 8은 D, A 또는 E이고, 위치 11은 A, S, I 또는 E이고, 위치 25는 D 또는 E이고, 위치 35는 R 또는 I이고, 위치 40은 V, T, Q 또는 C이고, 위치 42는 L 또는 C이고, 위치 43은 E, S 또는 C이고, 위치 44는 I, V 또는 L이고, 위치 46은 C, A 또는 G이고, 위

치 47은 E 또는 C이고, 위치 49는 K, Q 또는 C이고, 위치 50은 K 또는 C이고, 위치 51은 L 또는 C이고, 위치 53은 D 또는 E 또는 C이고, 위치 54는 A, S 또는 C이고, 위치 58은 P 또는 K인 것이 바람직하다.

[0067] 본 발명의 Fc 결합 단백질은 서열식별번호: 2의 아미노산 서열 또는 그에 대해 적어도 89.5% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 본질적으로 이루어지거나 또는 그로 이루어진 1개 이상의 Fc 결합 도메인을 포함한다. 서열식별번호: 2의 아미노산 서열은 하기 아미노산 서열이다:

[0068] $IX_2AX_4X_5DX_7X_8QQX_{11}AFYEILHLPNLTEX_{25}QRNAFIQSLX_{35}DDPSX_{40}SLX_{43}X_{44}LX_{46}X_{47}AX_{49}X_{50}X_{51}NX_{53}X_{54}QAPX_{58}$ 여기서 위치 1에서의 아미노산은 I로부터 선택되거나 결실되고, 위치 2에서의 아미노산 (X_2)은 A 또는 D로부터 선택되거나 결실되고, 위치 3에서의 아미노산은 A로부터 선택되거나 결실되고, 위치 4에서의 아미노산 (X_4)은 K 또는 Q로부터 선택되거나 결실되고, 위치 5에서의 아미노산 (X_5)은 H 또는 F로부터 선택되고, 위치 7에서의 아미노산 (X_7)은 K 또는 E로부터 선택되고, 위치 8에서의 아미노산 (X_8)은 D, A 또는 E로부터 선택되고, 위치 11에서의 아미노산 (X_{11})은 A, S, I 또는 E로부터 선택되고, 위치 25에서의 아미노산 (X_{25})은 D 또는 E로부터 선택되고, 위치 35에서의 아미노산 (X_{35})은 R 또는 I로부터 선택되고, 위치 40에서의 아미노산 (X_{40})은 Q, T, V 또는 C로부터 선택되고, 위치 42에서의 아미노산 (X_{42})은 L 또는 C로부터 선택되고, 위치 43에서의 아미노산 (X_{43})은 E, S 또는 C로부터 선택되고, 위치 44에서의 아미노산 (X_{44})은 I, L 또는 V로부터 선택되고, 위치 46에서의 아미노산 (X_{46})은 G, A 또는 C로부터 선택되고, 위치 47에서의 아미노산 (X_{47})은 E 또는 C로부터 선택되고, 위치 49에서의 아미노산 (X_{49})은 K 또는 Q 또는 C로부터 선택되고, 위치 50에서의 아미노산 (X_{50})은 K 또는 C이고, 위치 51에서의 아미노산 (X_{51})은 L 또는 C이고, 위치 53에서의 아미노산 (X_{53})은 D, E 또는 C로부터 선택되고, 위치 54에서의 아미노산 (X_{54})은 A 또는 S 또는 C로부터 선택되고, 위치 57에서의 아미노산은 P로부터 선택되거나 결실되고, 위치 58에서의 아미노산 (X_{58})은 P 또는 K로부터 선택되거나 결실된다. 본 발명의 Fc 결합 단백질은 하기 위치: 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54 중 1 또는 2개에서 시스테인을 갖는다. 본 발명의 Fc 결합 도메인에 대한 선택된 예는, 예를 들어 서열식별번호: 17-73, 90-99를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0069] Fc 결합 단백질의 c-말단 영역 내의 시스테인의 결과로서 높은 알칼리성 안정성. 일부 실시양태에서, 헬릭스 3에 시스테인을 갖는 Fc 결합 단백질은 실시예 및 도면에 제시된 바와 같이 놀랍게도 특히 Fc 결합 단백질의 우수한 알칼리성 안정성을 제공한다. 헬릭스 3에 시스테인을 갖는 Fc 결합 단백질이 수시간 동안의 알칼리성 처리 후에도 Ig에 결합할 수 있다는 것이 가장 놀랍고도 예상외였다. Fc 결합 단백질의 알칼리성 안정성은 0.5 M NaOH 중에서 적어도 6시간 인큐베이션한 후 Ig 결합 활성의 손실을 비교함으로써 결정된다 (도 3 참조). 예를 들어, cs26 46C의 결합 능력은 0.5 M NaOH와 함께 장기간 (예를 들어, 36시간) 인큐베이션한 후 야생형 도메인 C보다 적어도 20% 더 높게 유지된다 (도 4 참조).

[0070] 이뮤노글로불린에 대한 친화도. 본 발명의 모든 Fc 결합 단백질은 바람직하게는 500 nM 미만 또는 100 nM 미만, 보다 더 바람직하게는 10 nM 이하의 해리 상수 K_D 로 이뮤노글로불린에 결합한다. Fc 결합 단백질 또는 도메인의 결합 친화도를 결정하는 방법, 즉 해리 상수 K_D 를 결정하는 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 예를 들어 관련 기술분야에 공지된 하기 방법으로부터 선택될 수 있다: 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 기반 기술, 생물층 간섭측정법 (BLI), 효소-연결 면역흡착 검정 (ELISA), 유동 세포측정법, 등은 적정 열량측정법 (ITC), 분석 초원심분리, 방사성면역검정 (RIA 또는 IRMA) 및 증진된 화학발광 (ECL). 방법 중 일부는 실시예에 추가로 기재된다. 전형적으로, 해리 상수 K_D 는 20°C, 25°C 또는 30°C에서 결정된다. 달리 구체적으로 나타내지 않는 한, 본원에서 언급된 K_D 값은 표면 플라즈몬 공명에 의해 22°C +/- 3°C에서 결정된다. 제1 측면의 한 실시양태에서, Fc 결합 단백질은 인간 IgG₁에 대한 해리 상수 K_D 가 0.1 nM 내지 100 nM, 바람직하게는 0.1 nM 내지 50 nM 범위이다.

[0071] 다량체. 본 발명의 한 실시양태에서, Fc 결합 단백질은 서로 연결된 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개, 바람직하게는 2, 3, 4, 5 또는 6개의 Fc 결합 도메인을 포함하고, 즉 Fc 결합 단백질은, 예를 들어 단량체, 이량체, 삼량체, 사량체, 오량체 또는 육량체일 수 있다. 다량체는 2, 3, 4개 또는 훨씬 더 많은 결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0072] 본 발명의 다량체는 일반적으로 통상의 기술자에게 널리 공지된 재조합 DNA 기술에 의해 인공적으로 생성된 용

합 단백질이다.

- [0073] 일부 실시양태에서, 다량체는 동중-다량체이고, 예를 들어 Fc 결합 단백질의 모든 Fc 결합 도메인의 아미노산 서열은 동일하다.
- [0074] 다량체는 2개 이상의 Fc 결합 도메인을 포함할 수 있고, 여기서 상기 Fc 결합 도메인은 바람직하게는 상기 기재된 바와 같은 서열을 포함하거나 또는 그로 본질적으로 이루어지며, 단 이들은 헬릭스 3에 적어도 1개의 시스테인을 갖는다.
- [0075] 예를 들어, 서열식별번호: 27 또는 서열식별번호: 22를 사용하여 본원 실시예 1에 기재된 동중-다량체 융합 구축물을 생성하였다 (예를 들어, 서열식별번호: 32, 서열식별번호: 35 또는 서열식별번호: 25 참조).
- [0076] 일부 실시양태에서, 다량체는 이중-다량체이고, 예를 들어 적어도 1개의 알칼리성 안정한 Fc 결합 도메인은 이 류노글로불린-결합 단백질 내의 다른 Fc 결합 도메인과 상이한 아미노산 서열을 갖는다.
- [0077] 링커. 제1 측면의 일부 실시양태에서, 1개 이상의 Fc 결합 도메인은 서로 직접 연결된다. 다른 실시양태에서, 1개 이상의 Fc 결합 도메인은 1개 이상의 링커와 서로 연결된다. 이들 전형적인 실시양태에서 펩티드 링커가 바람직하다. 이는 펩티드 링커가 제1 Fc 결합 도메인을 제2 Fc 결합 도메인과 연결하는 아미노산 서열이라는 것을 의미한다. 펩티드 링커는 제1 Fc 결합 도메인 및 제2 Fc 결합 도메인에, 도메인의 C-말단과 N-말단 사이의 펩티드 결합에 의해 연결되어, 단일의 선형 폴리펩티드 쇄를 생성한다. 링커의 길이 및 조성은 적어도 1개 내지 최대 약 30개 아미노산으로 달라질 수 있다. 보다 구체적으로, 펩티드 링커는 1 내지 30개 아미노산: 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30개 아미노산의 길이를 갖는다. 펩티드 링커의 아미노산 서열은 가성 조건 및 프로테아제에 대해 안정한 것이 바람직하다. 링커는 Fc 결합 단백질 내의 도메인의 입체형태를 탈안정화시키지 않아야 한다. 글리신 및 세린과 같은 소형 아미노산을 포함하거나 또는 그로 이루어진 링커는 널리 공지되어 있다. 링커는 글리신-풍부할 수 있다 (예를 들어, 링커 내의 잔기 중 50% 초과가 글리신 잔기일 수 있음). 추가의 아미노산을 포함하는 링커가 또한 바람직하다. 본 발명의 다른 실시양태는 알라닌, 프롤린 및 세린으로 이루어진 링커를 포함한다. 단백질의 융합을 위한 다른 링커가 관련 기술분야에 공지되어 있고 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, Fc 결합 단백질의 다량체는 Fc 결합 도메인을 연결하는 1개 이상의 링커를 포함하고, 여기서 링커는 동일하거나 상이하다.
- [0078] 고체 지지체에 대한 접합. 본 발명의 일부 실시양태에서, Fc 결합 단백질은 고체 지지체에 접합된다. Fc 결합 도메인의 헬릭스 3 내의 시스테인은 고체 지지체에 대한 Fc 결합 단백질의 부위-특이적 공유 커플링을 위한 부착 부위를 포함한다. 위치 40, 42, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 53 또는 54에서의 적어도 1개의 시스테인은, 예를 들어 N-히드록시숙신이미드, 아이오도아세트아미드, 말레이미드, 에폭시 또는 알켄 기로부터 선택된, 고체 상의 반응성 기 또는 고체 상과 단백질 사이의 링커와 특이적 화학 반응을 가능하게 한다.
- [0079] 본 발명의 일부 실시양태에서, Fc 결합 단백질은 또한 N- 및/또는 C-말단 단부에서 추가의 아미노산 잔기, 예컨대 예를 들어 N- 및/또는 C-말단 단부에서 태그를 갖거나 갖지 않는 추가의 서열을 포함할 수 있다.
- [0080] 친화성 분리 매트릭스. 또 다른 측면에서, 본 발명은 제1 측면의 Fc 결합 단백질을 포함하는 친화성 분리 매트릭스에 관한 것이다.
- [0081] 제2 측면의 바람직한 실시양태에서, 친화성 분리 매트릭스는 고체 지지체이다. 친화성 분리 매트릭스는 본 발명의 적어도 1개의 Fc 결합 단백질을 포함한다.
- [0082] 친화성 매트릭스는 류노글로불린의 분리에 유용하고, 세정 과정 동안 적용된 고도 알칼리성 조건 후에도 Ig 결합 특성을 보유할 것이다. 이러한 매트릭스 세정은 매트릭스의 장기간 반복적 사용에 필수적이다.
- [0083] 친화성 크로마토그래피를 위한 고체 지지체 매트릭스는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 아가로스 및 아가로스의 안정화된 유도체 (예를 들어 세파로스 6B, 프레스토™퓨어(Praesto™Pure); 캡티브A(CaptivA)®, r 프로테인 A 세파로스 패스트 플로우, 맵셀렉트(Mabselect)®, 프리즘A(Prisma)® 및 기타), 셀룰로스 또는 셀룰로스의 유도체, 제어형 세공 유리 (예를 들어 프로셉(ProSep)® vA 수지), 단일체 (예를 들어 CIM® 단일체), 실리카, 산화지르코늄 (예를 들어 CM 지르코니아 또는 CPG®), 산화티타늄, 또는 합성 중합체 (예를 들어 폴리스티렌, 예컨대 포로스 50A 또는 포로스 맵캡처(MabCapture)® A 수지, 폴리비닐에테르, 폴리비닐 알콜, 폴리히드록시알킬 아크릴레이트, 폴리히드록시알킬 메타크릴레이트, 폴리아크릴아미드, 폴리메타크릴아미드 등) 및 다양한 조성물의 히드로겔을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 지지체는 폴리히드록시 중합

체, 예컨대 폴리사카라이드를 포함한다. 지지체에 적합한 폴리사카라이드의 예는 한천, 아가로스, 텍스트란, 진분, 셀룰로스, 폴루란 등 및 이들의 안정화된 변이체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

- [0084] 고체 지지체 매트릭스의 포맷은 임의의 적합한 널리 공지된 종류일 수 있다. 본 발명의 Fc 결합 단백질을 커플링시키기 위한 이러한 고체 지지체 매트릭스는, 예를 들어 하기 중 하나를 포함할 수 있다: 칼럼, 모세관, 입자, 막, 필터, 단일체, 섬유, 패드, 겔, 슬라이드, 플레이트, 카세트 또는 크로마토그래피에 통상적으로 사용되고 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 다른 포맷.
- [0085] 한 실시양태에서, 매트릭스는 비드, 예를 들어 세파로스 또는 아가로스 비드로도 공지된 실질적으로 구형인 입자로 구성된다. 적합한 입자 크기는 5-500 μm , 예컨대 10-100 μm , 예컨대 20-80 μm , 예컨대 40-70 μm 의 직경 범위 내에 있을 수 있다. 입자 형태의 매트릭스는 충전층으로서 또는 확장층을 포함하는 현탁 형태로 사용될 수 있다.
- [0086] 대안적 실시양태에서, 고체 지지체 매트릭스는 막, 예를 들어 히드로겔 막이다. 일부 실시양태에서, 친화성 정제는 매트릭스로서 제1 측면의 Fc 결합 단백질이 공유 결합된 막을 포함한다. 고체 지지체는 또한 카트리지 내의 막의 형태일 수 있다.
- [0087] 일부 실시양태에서, 친화성 정제는 제1 측면의 Fc 결합 단백질이 공유 결합된 고체 지지체 매트릭스를 함유하는 크로마토그래피 칼럼을 포함한다.
- [0088] 본 발명의 Fc 결합 단백질은 통상적인 커플링 기술을 통해 적합한 고체 지지체 매트릭스에 부착될 수 있다. 고체 지지체에 대한 단백질 리간드의 고정화 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 표준 기술 및 장치를 사용하여 본 분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 수행될 수 있다.
- [0089] Fc 결합 단백질의 용도. 제3 측면에서, 본 발명은 이뮤노글로불린 또는 그의 변이체의 친화성 정제를 위한 제1 측면의 Fc 결합 단백질 또는 제2 측면의 친화성 매트릭스의 용도에 관한 것이고, 즉 본 발명의 Fc 결합 단백질은 친화성 크로마토그래피를 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 Fc 결합 단백질은 본 발명의 제2 측면에 기재된 바와 같은 고체 지지체 상에 고정화된다.
- [0090] 이뮤노글로불린의 친화성 정제 방법. 제4 측면에서, 본 발명은 (a) 이뮤노글로불린을 함유하는 액체를 제공하는 단계; (b) 제1 측면의 고정화된 Fc 결합 단백질을 포함하는 친화성 분리 매트릭스를 제공하는 단계이며, 상기 단백질이 상기 친화성 분리 매트릭스에 커플링되어 있는 것인 단계; (c) 상기 액체와 상기 친화성 분리 매트릭스를 접촉시키는 단계이며, 여기서 상기 이뮤노글로불린이 상기 고정화된 Fc 결합 단백질에 결합하는 것인 단계; 및 (d) 상기 이뮤노글로불린을 상기 매트릭스로부터 용리시켜, 상기 이뮤노글로불린을 함유하는 용리액을 수득하는 단계를 포함하는, 이뮤노글로불린의 친화성 정제 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 친화성 정제 방법은 친화성 분리 매트릭스로부터 그에 비-특이적으로 결합된 일부 또는 모든 분자를 제거하기에 충분한 조건 하에서 단계 (c)와 (d) 사이에 수행되는 1개 이상의 세척 단계를 추가로 포함할 수 있다. 비-특이적으로 결합된 분원은 본원에 개시된 대상의 적어도 1개의 결합 도메인과 이뮤노글로불린 사이의 상호작용을 포함하지 않는 임의의 결합을 의미한다.
- [0091] 개시된 용도 및 방법에 적합한 친화성 분리 매트릭스는 상기 기재된 실시양태에 따른 및 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 바와 같은 매트릭스이다.
- [0092] 제4 측면의 일부 실시양태에서, 단계 (d)에서 매트릭스로부터의 이뮤노글로불린의 용리는 pH의 변화 및/또는 염 농도의 변화를 통해 수행된다. 임의의 적합한 용액은, 예를 들어 pH 5 이하인 용액에 의해 (예를 들어 실시예 9에서의 표 3 참조) 또는 pH 11 이상인 용액에 의해 사용될 수 있다.
- [0093] 일부 실시양태에서, 친화성 매트릭스의 효율적인 세정 및 위생처리를 위한 추가의 단계 (f)가, 바람직하게는 예를 들어 pH 13-14인 알칼리성 액체를 사용함으로써 추가된다. 특정 실시양태에서, 세정 액체는 0.1 - 1.0 M NaOH 또는 KOH, 바람직하게는 0.25 - 0.5 M NaOH 또는 KOH를 포함한다. 본 발명의 Fc 결합 단백질의 높은 알칼리성 안정성으로 인해, 이러한 강 알칼리성 용액이 세정 목적을 위해 사용될 수 있다.
- [0094] 일부 실시양태에서, 친화성 매트릭스는 단계 (a) 내지 (e)의 반복으로 인해 적어도 10회, 적어도 20회, 적어도 30회, 적어도 40회, 적어도 50회, 적어도 60회, 적어도 70회, 적어도 80회, 적어도 90회 또는 적어도 100회 재사용될 수 있고, 임의로 (a) 내지 (f)는 적어도 10회, 적어도 20회, 적어도 30회, 적어도 40회, 적어도 50회, 적어도 60회, 적어도 70회, 적어도 80회, 적어도 90회 또는 적어도 100회 반복될 수 있다.
- [0095] 일반적으로, 친화성 정제 방법을 수행하는데 적합한 조건은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어

있다. 일부 실시양태에서, 개시된 Fc 결합 도메인을 포함하는 친화성 정제의 개시된 용도 또는 방법은 pH 3.5 이상 (예를 들어, 약 4.0, 약 4.5, 약 5.0, 약 5.5, 약 6.0 또는 약 6.5)에서 Fc-함유 단백질의 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%의 용리를 제공할 수 있다.

[0096] 핵산 분자. 제5 측면에서, 본 발명은 상기 개시된 임의의 실시양태의 Fc 결합 단백질을 코딩하는 핵산 분자, 바람직하게는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 본 발명은 핵산 분자를 포함하는 벡터에 관한 것이다. 벡터는 단백질 코딩 정보를 숙주 세포 내로 전달하는데 사용될 수 있는 임의의 분자 또는 개체 (예를 들어, 핵산, 플라스미드, 박테리오파지 또는 바이러스)를 의미한다. 한 실시양태에서, 벡터는 발현 벡터이다.

[0097] 제6 측면에서, 본 발명은 상기 개시된 바와 같은 핵산 또는 벡터를 포함하는 발현 시스템, 예를 들어 원핵 숙주 세포, 예를 들어 이. 콜라이(*E. coli*), 또는 진핵 숙주, 예를 들어 효모 사카로미세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 또는 포유동물 세포, 예컨대 CHO 세포에 관한 것이다.

[0098] Fc 결합 단백질의 생산 방법. 제7 측면에서, 본 발명은 (a) 제6 측면의 숙주 세포를 본 발명의 Fc 결합 단백질의 발현에 적합한 조건 하에 배양하여 상기 Fc 결합 단백질을 수득하는 단계; 및 (b) 임의로 상기 Fc 결합 단백질을 단리하는 단계를 포함하는, 본 발명의 Fc 결합 단백질의 생산 방법에 관한 것이다. 원핵 또는 진핵 숙주를 배양하기에 적합한 조건은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다.

[0099] 본 발명의 Fc 결합 분자는 임의의 많은 통상적이고 널리 공지된 기술, 예컨대 보통의 유기 합성 전략, 고체 상-보조 합성 기술 또는 상업적으로 입수가능한 자동화 합성기에 의해 제조될 수 있다. 다른 한편으로, 이들은 또한 통상적인 재조합 기술을 단독으로 또는 통상적인 합성 기술과 조합하여 사용함으로써 제조될 수 있다.

[0100] 본 발명의 한 실시양태는 (a) 상기 정의된 바와 같은 Fc 결합 단백질을 코딩하는 핵산을 제조하는 단계; (b) 상기 핵산을 발현 벡터 내로 도입하는 단계; (c) 상기 발현 벡터를 숙주 세포 내로 도입하는 단계; (d) 숙주 세포를 배양하는 단계; (e) 숙주 세포를 Fc 결합 단백질이 발현되는 배양 조건에 적용하여, 이로써 (e) 상기 기재된 바와 같은 Fc 결합 단백질을 생산하는 단계; 임의로 (f) 단계 (e)에서 생산된 단백질을 단리하는 단계; 및 (g) 임의로 단백질을 상기 기재된 바와 같은 고체 매트릭스에 접합시키는 단계를 포함하는, 상기 상술된 바와 같은 본 발명에 따른 Fc 결합 단백질의 제조 방법에 관한 것이다.

[0101] 본 발명의 추가 실시양태에서, Fc 결합 단백질의 생산은 세포-무함유 시험관내 전사 / 번역에 의해 수행된다.

[0102] 실시예

[0103] 하기 실시예는 본 발명의 추가 예시를 위해 제공된다. 그러나, 본 발명은 이에 제한되지 않고, 하기 실시예는 단지 상기 설명에 기초하여 본 발명의 실행가능성을 나타낸다.

[0104] 실시예 1. Fc에 결합하는 인공 모자이크 단백질의 생성

[0105] 먼저 자연 발생 단백질 A 도메인 (E, B, D, A, C, Z)의 서플링 과정에 의해 Fc 결합 단백질을 생성하였다. 보다 상세하게, 본원에서 이해되는 서플링 과정은 동일하지 않은 공지의 아미노산 서열의 세트로부터 출발하여 인공 아미노산 서열을 생성하는 조합 과정이다. 서플링 과정은 하기 단계를 포함하였다: a) 5개의 자연 발생 단백질 A 도메인 E, B, D, A 및 C, 및 단백질 A 변이체 도메인 Z의 서열을 제공하는 단계; b) 상기 서열을 정렬하는 단계; c) 인 실리코 통계적 단편화에 의해 재조합된 하위서열들을 확인하는 단계, 및 이어서 d) 다양한 단편의 새로운 인공 서열을 조합하여 모자이크 생성물, 즉 신규 및 인공 아미노산 서열을 생산하는 단계. 단계 c)에서 생성된 단편은 임의의 길이를 갖고, 예를 들어 단편화된 모 서열이 길이 n을 갖는 경우에 단편은 길이 1 내지 n-1을 가졌다.

[0106] 모자이크 생성물 내의 아미노산의 상대 위치는 출발 아미노산 서열에 대해 유지되었다. 예를 들어 IB14, IB27, IB24, IB26, IB28, IB20 (서열식별번호: 78-83)의 인공 모자이크 아미노산 서열과 자연 발생 단백질 A 도메인 또는 단백질 A 도메인 변이체 사이에 위치 Q9, Q10, A12, F13, Y14, L17, P20, L22, Q26, R27, F30, I31, Q32, S33, L34, D36, D37, P38, S39, S41, L45, E47, A48, K50, L51, Q55, A56, P57 중 적어도 90%가 동일하다. 모자이크 도메인 및 자연 발생 단백질 A 도메인 또는 단백질 A 도메인 변이체는 아미노산 잔기 7-19로부터의 헬릭스 1, 아미노산 잔기 23-37로부터의 헬릭스 2 및 아미노산 잔기 40-55로부터의 헬릭스 3을 갖는 58개 아미노산의 3개-헬릭스 다발을 특징으로 한다. 예를 들어 인공 Fc 결합 도메인 IB14, IB26 및 IB27의 전체 아미노산 서열은 임의의 자연 발생 단백질 A 도메인 또는 도메인 Z의 전체 아미노산 서열에 대해 85% 이하 동일하다는 점

에서 인공이다. 초기 인공 Fc 결합 단백질을 생성한 후, 일부 경우에 단백질을 아미노산 서열의 부위-특이적 무작위화에 의해 추가로 변형시켜 생화학적 특성을 추가로 변형시켰다. 개별 아미노산 잔기의 부위-포화 돌연변이유발에 의해 추가 변형을 도입하였다.

- [0107] 통상의 기술자에게 공지된 표준 방법을 사용하여 인공 Fc 결합 단백질을 위한 유전자를 합성하고 이. 콜라이 발현 벡터 내로 클로닝하였다. DNA 서열분석을 사용하여 삽입된 단편의 정확한 서열을 확인하였다.
- [0108] 다량체 Fc 결합 단백질을 생성하기 위해, 2 또는 3개의 동일한 Fc 결합 도메인을 유전자 융합시켰다.
- [0109] 특이적 정제를 위해, 임의로 스트랩-태그 (WSHPQFEK; 서열식별번호: 89)를 Fc 결합 단백질의 C-말단에 부가하였다.
- [0110] 실시예 2. 변이체를 생성하기 위한 돌연변이유발
- [0111] 부위-지정 돌연변이유발을 위해, Q5® 부위-지정 돌연변이유발 키트 (NEB; 카탈로그 번호 E0554S)를 제조업체의 지침에 따라 사용하였다. 각각의 특이적 치환을 코딩하는 올리고뉴클레오타이드 각각 및 주형을 함유하는 플라스미드를 사용하여 PCR을 수행하였다. 생성물을 라이게이션하고, 전기천공을 통해 이. 콜라이 XL2-블루 세포 (스트라타젠(Stratagene)) 내로 형질전환시켰다. 단일 콜로니를 단리하고, 삽입물 함유 클론에 대해 DNA 서열분석을 사용하여 정확한 서열을 확인하였다.
- [0112] 진아트(GeneArt)™스트링스(Strings)™ 합성 (써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific))에 의해 여러 점 돌연변이의 조합을 생성하였다. 스트링스 DNA 단편은 정제된 PCR 생성물에 상응하였고, 이를 pET28a 벡터의 유도체 내로 클로닝하였다. 라이게이션 생성물을 전기천공을 통해 이. 콜라이 XL2-블루 세포 내로 형질전환시켰다. 단일 콜로니를 PCR에 의해 스크리닝하여 바른 크기의 삽입물을 함유하는 구축물을 확인하였다. DNA 서열분석을 사용하여 정확한 서열을 확인하였다. 점 돌연변이를 갖는 일부 변이체가, 예를 들어 도 1에 제시된다.
- [0113] 실시예 3. Fc 결합 단백질의 발현
- [0114] Fc 결합 단백질을 코딩하는 발현 플라스미드로 BL21 (DE3) 적격 세포를 형질전환시켰다. 세포를 선택적 한천 플레이트 (카나마이신) 상에 스프레딩하고, 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 100 ml 2xYT 배지 중 단일 콜로니로부터 사전배양물을 접종하고, 통상적인 오비탈 진탕기에서 락토스 및 소포제가 함유되지 않고 150 µg/ml 카나마이신이 보충된 배플형 1 L 삼각 플라스크 내에서 160 rpm으로 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. OD₆₀₀ 관독값은 6-12의 범위 내일 것이다. 150 µg/ml 카나마이신이 보충된 1 L 후벽 삼각 플라스크 내 400 ml 초풍부 배지 (개질된 H15 배지 2% 글루코스, 5% 효모 추출물, 0.89% 글리세롤, 0.76% 락토스, 250 mM MOPS, 202 mM 트리스, pH 7.4, 소포제 SE15) 중에서 조정된 출발-OD₆₀₀ 0.5를 갖는 이전 밤샘 배양물로부터 본 배양물을 접종하였다. 배양물을 공명 음향 혼합기 (RAMbio)로 옮기고, 37°C에서 20 x g로 인큐베이션하였다. 옥시-펌프 마개에 의해 통기를 용이하게 하였다. 글루코스를 대사하고 후속적으로 락토스가 세포에 진입하게 함으로써 재조합 단백질 발현을 유도하였다. 미리 정해진 시점에서 OD₆₀₀을 측정하고, 5/OD₆₀₀으로 조정된 샘플을 회수하고, 펠릿화하고, -20°C에서 동결시켰다. 세포를 밤새 대략 24시간 동안 성장시켜 최종 OD₆₀₀ 약 45-60에 도달하도록 하였다. 바이오매스를 수집하기 위해, 세포를 20°C에서 10분 동안 16000 x g로 원심분리하였다. 펠릿을 칭량 (습윤 칭량)하고, 상청액에서 pH를 측정하였다. 세포를 처리 전 -20°C에서 저장하였다.
- [0115] 실시예 4: Fc 결합 단백질의 발현 및 용해도의 SDS-PAGE 분석
- [0116] 발효 동안 취한 샘플을 300 µl 추출 완충제 (0.2 mg/ml 리소자임, 0.5x 버그부스터, 7.5 mM MgSO₄, 40 U 벤조나제가 보충된 PBS) 중에 재현탁시키고, 700 rpm, 실온에서 15분 동안 써모믹서에서의 교반에 의해 가용화시켰다. 원심분리 (16000 x g, 2분, 실온)에 의해 불용성 단백질로부터 가용성 단백질을 분리하였다. 상청액 (가용성 분획)을 회수하고, 펠릿 (불용성 분획)을 동량의 우레아 완충제 (8 M 우레아, 0.2 M 트리스, 2 mM EDTA, pH 8.5) 중에 재현탁시켰다. 가용성 및 불용성 분획 둘 다로부터 50 µl를 취하고, 12 µl 5x 샘플 완충제뿐만 아니라 5 µl 0.5 M DTT를 첨가하였다. 샘플을 95°C에서 5분 동안 비등시켰다. 최종적으로, 이러한 샘플 8 µl를 누페이지 노박스 4-12% 비스-트리스 SDS 겔에 적용하고, 제조업체의 권고에 따라 구동시키고, 쿠마시로 염색하였다. 선택된 기간 내에 최적화된 조건 하에서 모든 Fc 결합 단백질의 높은 수준 발현이 발견되었다 (데이터는 제시되지 않음). 모든 발현된 Fc 결합 단백질은 SDS-PAGE에 따라 95% 초과로 가용성이었다.
- [0117] 실시예 5: Fc 결합 단백질의 정제

- [0118] Fc 결합 단백질을 C-말단 스트랩 태크II (WSHPQFEK)와 함께 이. 콜라이의 가용성 분획에서 발현시켰다. 2회의 냉동/해동 주기에 의해 세포를 용해시키고, 제조업체의 지침에 따라 스트랩-택틴(Strep-Tactin)®-수지 (IBA, 독일 괴팅겐)를 사용하여 정제 단계를 수행하였다. 디설피드 형성을 피하기 위해, 완충제에 1 mM DTT를 보충하였다.
- [0119] 대안적으로, Fc 결합 단백질을 C-말단 스트랩 태크II와 함께 이. 콜라이의 가용성 분획에서 발현시켰다. 세포를 세포 파괴 완충제 중에 재현탁시키고, 2회의 주기 동안 1 kbar에서 일정한 세포 파괴 시스템 (유닛 F8B, 홀리 팜 비즈니스 파크(Holly Farm Business Park))에 의해 용해시켰다. 제조업체의 지침에 따라 AKTExpress 시스템 (지이 헬스케어(Ge Healthcare))를 사용하여 스트랩-택틴-수지 (IBA, 독일 괴팅겐) 및 추가의 겔 여과 (슈퍼팩스 75 16/60; 지이 헬스케어)에 의해 정제 단계를 수행하였다. 디설피드 형성을 피하기 위해, 스트랩-택틴-정제용 완충제에 1 mM DTT를 보충하고, 겔 여과용 구동 완충제로서 시트레이트-완충제 (20 mM 시트레이트, 150 mM NaCl, pH 6.0)를 사용하였다.
- [0120] 실시예 6. Fc 결합 단백질은 높은 친화도로 IgG에 결합한다 (ELISA에 의해 결정됨).
- [0121] 효소 연결 면역흡착 검정 (ELISA)을 사용하여 IgG₁ 또는 IgG₂ 또는 IgG₄에 대한 Fc 결합 단백질의 친화도를 결정하였다. IgG₁ 또는 IgG₂ 또는 IgG₄ 함유 항체 (예를 들어 IgG₁의 경우 세특시맵, IgG₂의 경우 파니투무맵, 또는 IgG₄의 경우 나탈리주맵)를 96 웰 눈크 맥시소르브 ELISA 플레이트 상에 고정화시켰다 (2 µg/ml). 4°C에서 16 시간 동안 인큐베이션한 후, 웰을 PBST (PBS + 0.1% 트윈 20)로 3회 세척하고, 웰을 PBS 중 3% BSA (실온에서 2시간)로 차단하였다. 음성 대조군은 BSA로만 차단한 웰이었다. 차단 후, 웰을 PBST로 3회 세척하고, Fc 결합 단백질 (PBST 중)과 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션한 후, 웰을 PBST로 3회 세척하고, 후속적으로 스트랩-택틴-HRP (1:10000) (IBA, 독일 괴팅겐)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 웰을 PBST로 3회 및 PBS로 3회 세척하였다. TMB-플러스 기질을 첨가함으로써 양고추냉이 퍼옥시다제의 활성을 시각화하였다. 30분 후, 0.2 M H₂SO₄를 첨가하여 반응을 정지시키고, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 예를 들어, ELISA를 통해 결정시, 인간 IgG₁에 대한 K_D는 IB14의 경우 4.9 nM; 도메인 Z의 경우 3.4 nM; 도메인 B의 경우 3.1 nM; 및 도메인 C의 경우 2.8 nM이다.
- [0122] 실시예 7. Fc 결합 단백질은 높은 친화도로 IgG에 결합한다 (표면 플라즈몬 공명 실험으로 결정됨).
- [0123] CM5 센서 칩 (지이 헬스케어)을 SPR 구동 완충제로 평형화시켰다. 표면-노출된 카르복실 기를 EDC와 NHS의 혼합물의 통과에 의해 활성화시켜 반응성 에스테르 기를 획득하였다. 700-1500 RU의 온-리간드를 유동 세포 상에 고정화시키고, 오프-리간드를 또 다른 유동 세포 상에 고정화시켰다. 리간드 고정화 후 에탄올아민을 주입하여 비-공유 결합된 Fc 결합 단백질을 제거한다. 리간드 결합시, 단백질 분석물이 표면 상에 축적되어 굴절률을 증가시켰다. 이러한 굴절률 변화를 실시간으로 측정하고, 시간에 대한 반응 또는 공명 단위 (RU)로서 플롯팅하였다. 분석물을 연속 희석물로 적합한 유량 (µl/분)으로 칩에 적용하였다. 각각의 구동 후에, 칩 표면을 재생 완충제로 재생시키고, 구동 완충제로 평형화시켰다. 대조군 샘플을 매트릭스에 적용하였다. 앞서 언급한 바와 같이 재생 및 재평형화를 수행하였다. 25°C에서 비아코어(Biacore)® 3000 (지이 헬스케어)의 사용에 의해 결합 연구를 수행하고; 제조업체에 의해 제공된 비아이벨루에이션 3.0 소프트웨어를 통해 랭뮤어 1:1 모델 (RI=0)을 사용하여 데이터 평가를 실시하였다. 평가된 해리 상수 (K_D)를 오프-타겟에 대해 표준화하였으며, 인간 IgG₁-Fc에 대한 상이한 인공 Fc 결합 단백질, 세특시맵 (IgG₁), 나탈리주맵 (IgG₄) 또는 파니투무맵 (IgG₂)에 대한 K_D 값이 표 1에 제시된다.

[0124] 표 1. Ig에 대한 Fc 결합 단백질의 K_D 값

Fc 결합 단백질	SEQ ID NO:	Kd [nM] IgG-Fc	Kd [nM] IgG ₁	Kd [nM] IgG ₄	Kd [nM] IgG ₂
IB14	78	1.28			
IB14 E43C	74	45.5			
IB14 G46C	75	72.9			
IB14 E47C	76	48.8			
IB14 K50C	77	42.8			
cs14	3	6.48	2.9	2.51	7.42
cs14 G46C	18		4.88	3.38	35.6
cs14 E43C	17		0.453	0.302	1.75
cs27	4		3.64	2.54	21.6
cs27 G46C	22		0.518	0.302	2.74
cs26	7		6.5	5.81	66.6
cs26 A46C	27		5.75	3.00	101
cs26 A46C (이량체)	32		2.59	1.86	20.5
cs26 A46C (삼량체)	35		2.23	1.98	13.3
도메인 C	84		4.91	3.95	58.1

[0125]

[0126]

실시예 8. 에폭시-활성화된 매트릭스 (세파로스 6B)에 커플링된 Fc 결합 단백질

[0127]

정제된 Fc 결합 단백질을 에폭시-활성화 매트릭스 (세파로스 6B, 지이; 카탈로그 번호 17-0480-01)에 제조업체의 지침 (커플링 조건: pH 9.0, 밤새, 에탄올아민으로 5시간 동안 차단)에 따라 커플링시켰다. 세특시map을 IgG 샘플로서 사용하였다 (5mg; 1 mg/ml 매트릭스). 세특시map을 고정화된 Fc 결합 단백질을 포함하는 매트릭스에 포화량으로 적용하였다. 매트릭스를 100 mM 글리신 완충제 (pH 2.5)로 세척하여 고정화된 IgG-결합 단백질에 결합된 세특시map을 용리시켰다. 용리된 IgG의 농도를 BLI에 의해 측정하여 (단백질 A 옥텟-센서 및 세특시map을 표준물로서 사용하여 정량화) Fc 결합 단백질의 결합 활성을 결정하였다.

[0128]

도 2a는 IB14 (서열식별번호: 78) 및 위치 43, 46, 47, 50 또는 58에서 시스테인을 갖는 IB14 변이체 (각각 서열식별번호: 74-77)의 커플링 효율을 보여준다. 위치 43, 46, 47, 50 또는 58에서 Cys를 갖는 모든 IB14 변이체의 커플링 효율은 IB14에 대한 것보다 더 높았다. 도 2b는 C-말단 Cys를 갖는 cs14와 비교하여 및 상업적으로 입수가 가능한 단백질 A와 비교하여 에폭시 활성화된 세파로스 6B 매트릭스에 대한 cs14 46C (서열식별번호: 18) 또는 cs14 43C (서열식별번호: 17)의 커플링을 보여준다. 커플링 조건은 450 μ M, 4500 nmol/ml, pH 9, 2 시간 또는 18시간, 30°C, 1mM TCEP, 1 M (NH₄)₂SO₄였다. 2시간과 18시간 사이에 네트 커플링 속도의 경미한 차이만이 관찰되었다. 커플링 속도는 nmol (도메인)/ml로 제시된다.

[0129]

실시예 9. 에폭시-활성화된 매트릭스에 커플링된 Fc 결합 단백질의 알칼리성 안정성

[0130]

칼럼을 0.5 M NaOH와 함께 0시간, 6시간, 18시간, 24시간, 36시간 또는 72시간 동안 실온 (22°C +/- 3°C)에서 인큐베이션하였다. 0.5 M NaOH와 함께 인큐베이션하기 전 및 후에 고정화된 단백질의 Ig 결합 활성을 분석하였다. NaOH 처리 전 고정화된 단백질의 Ig 결합 활성을 100%로 정의하였다. IB14 변이체 (서열식별번호: 74-77)에 대해 6시간 동안 연속 0.5 M NaOH 처리 후 잔류 IgG 결합 활성이 도 3a에 제시된다. 도 3b는 cs14 46C, cs14 43C, cs14 및 상업적으로 입수가 가능한 단백질 A에 대해 0시간, 18시간 또는 72시간 동안 연속 0.5 M NaOH 처리 후 가성 안정성을 보여준다. 단백질을 30°C에서 2시간 동안 에폭시 세파로스에 고정화시켰다 (4500 nmol/ml). 5분 체류 시간에서 동적 결합 능력 DBC 10%를 결정하였다. cs14 46C는 72시간의 연속 0.5 NaOH 처리 후 19.5 mg/ml의 가장 높은 DBC10%를 나타내며, 이는 상업적으로 입수가 가능한 단백질 A에 대해 측정된 값보다 20% 초과로 더 크다. 도 4는 6, 24 및 36시간 동안 연속 0.5 M NaOH 처리 후 cs26 46C (서열식별번호: 27)에 대한 잔류 결합 능력을 cs26 (서열식별번호: 7) 및 야생형 도메인 C (서열식별번호: 84)와 비교하여 보여준다.

cs26 A46C (단량체 또는 이량체)의 결합 능력은 적어도 36시간 0.5 M NaOH 인큐베이션한 후 > 20%로 유지된다 (표 2 참조).

[0131] 표 2. cs26 및 야생형 도메인 C와 비교한 cs26 A46C의 가성 안정성

Fc 결합 단백질	0 h	6 h	24 h	36 h	vs C @ 36 h
cs26 A46C	100	95	83	78	42%
cs26 A46C (이량체)	100	92	81	72	24.8 %
cs26	100	105	82	73	27.7 %
도메인 C	100	95	76	62	

[0132]

[0133] 실시예 10. 아가로스-기반 크로마토그래피 비드 프레스토™ 퓨어45에 커플링된 Fc 결합 단백질

[0134] 정제된 Fc 결합 단백질을 아가로스-기반 크로마토그래피 비드 (프레스토™ 퓨어45, 퓨로라이트(Purolite); 카탈로그 번호 PR01262-166)에 제조업체의 지침 (커플링 조건: pH 9.5, 3시간, 35℃, 4.1 M NaSO₄, 에탄올아민으로 발쇄 차단)에 따라 커플링시켰다. 폴리클로날 인간 IgG 감마놈(Gammanorm)® (옥타파마(Octapharma))을 IgG 샘플로서 사용하였다 (농도 2.2 mg/ml). 폴리클로날 hIgG 샘플을 고정화된 Fc 결합 단백질을 포함하는 매트릭스에 포화량으로 적용하였다. 매트릭스를 100 mM 시트레이트 완충제 (pH 2.0)로 세척하여 고정화된 Fc 결합 단백질에 결합된 hIgG를 용리시켰다. 6분 체류 시간에서 10% 통과구에서 주입된 hIgG의 질량 기준으로 재조합 야생형 단백질 A와 비교하여 cs26 46C (단량체 및 이량체; 서열식별번호: 27, 32)에 대해 동적 결합 능력을 결정하였다. 도 5는 Cs26 46C가 재조합 단백질 A보다 6분 체류 시간에서 61.2% 더 높은 DBC를 갖는다는 것을 보여준다.

[0135] 실시예 11. 아가로스-기반 크로마토그래피 비드 프레스토™ 퓨어45 및/또는 퓨어85에 커플링된 Fc 결합 단백질로부터 IgG의 용리

[0136] 정제된 Fc 결합 단백질 (cs26 46C)을 제조업체의 지침에 따라 아가로스-기반 크로마토그래피 비드 (프레스토™ 퓨어45 또는 퓨어5)에 커플링시켰다. 폴리클로날 인간 IgG 감마놈® 및 모노클로날 IgG₁ 항체 세톡시맙을 IgG 샘플로서 사용하여 (농도 2.2 mg/ml), DBC10% 까지 로딩하였다. 폴리클로날 hIgG 샘플을 고정화된 Fc 결합 단백질을 포함하는 매트릭스에 포화량으로 적용하였다. 2-단계 과정으로, 먼저 매트릭스를 100 mM 시트레이트 완충제 (pH 3.5)로 세척하고, 이어서 100 mM 시트레이트 완충제 (pH 2.0)로 세척하여, 고정화된 Fc 결합 단백질에 결합된 hIgG를 용리시켰다. 표 3은 pH 3.5에서 cs26 46C와 커플링된 비드로부터 결합된 IgG의 거의 100%가 용리되었다는 것을 나타낸다.

[0137] 표 3. 비드에 커플링된 cs26 46C로부터 IgG의 용리

항체	0.1 M 시트레이트 pH 3.5에서 용리된 단백질 (%)	0.1 M 시트레이트 pH 2.0에서 용리된 단백질 (%)	회수율: 로드/용리 (%)
감마놈	99.8	0.2	85
세톡시맙	100	0	86

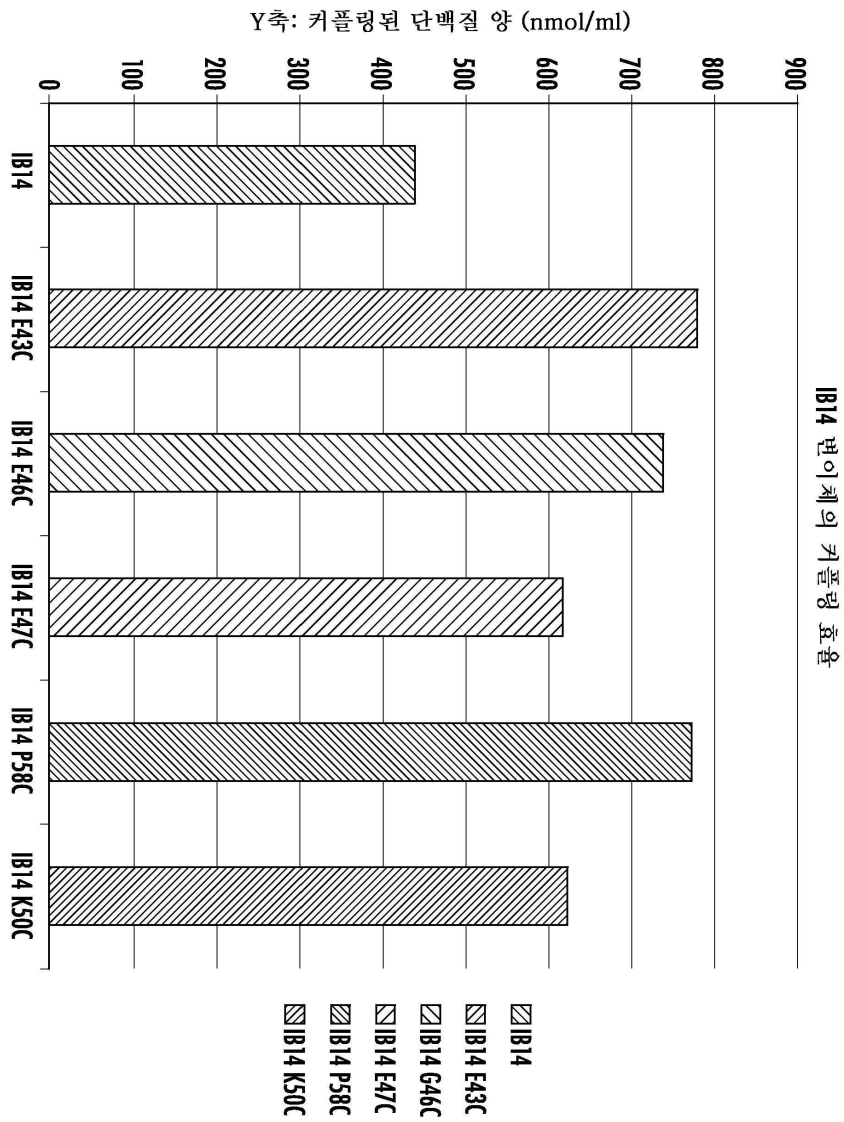
[0138]

도면 1b

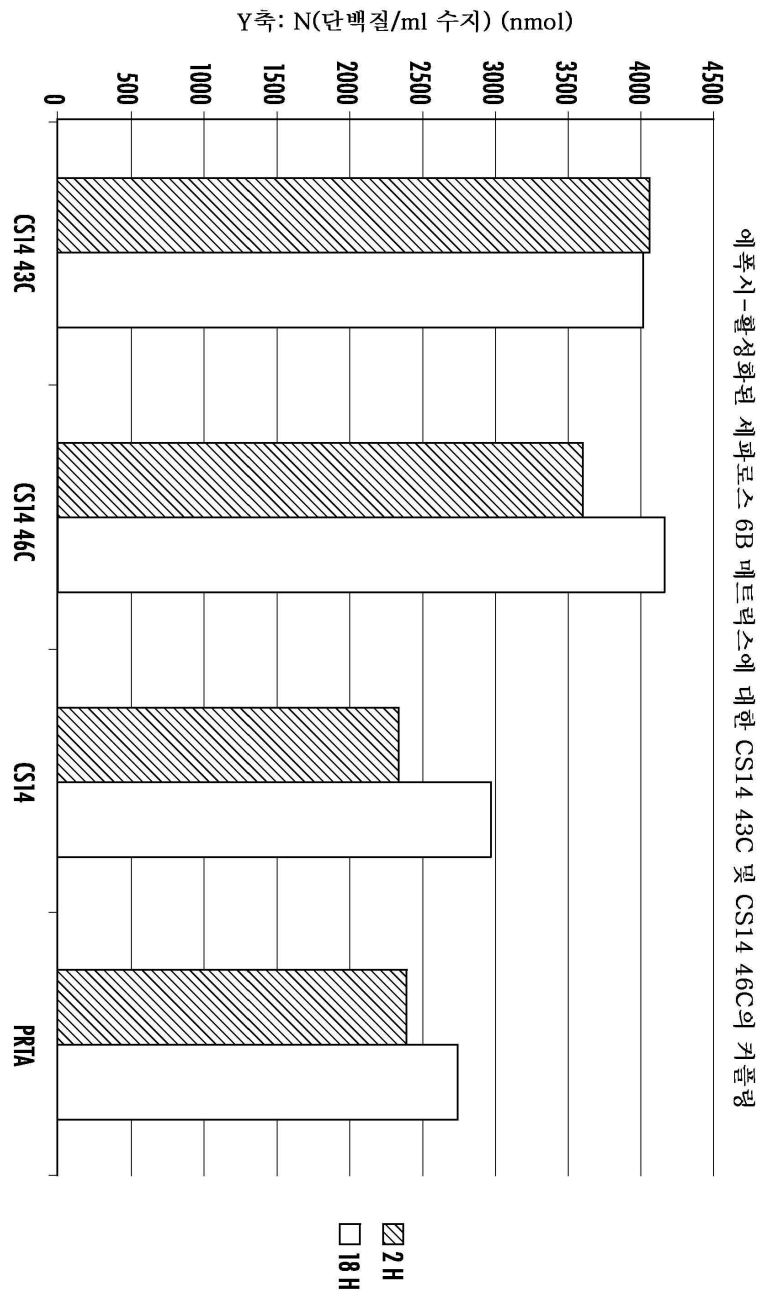
헬릭스 3에 CYS를 갖는 FC 결합 도메인에 대한 예

[illegible]

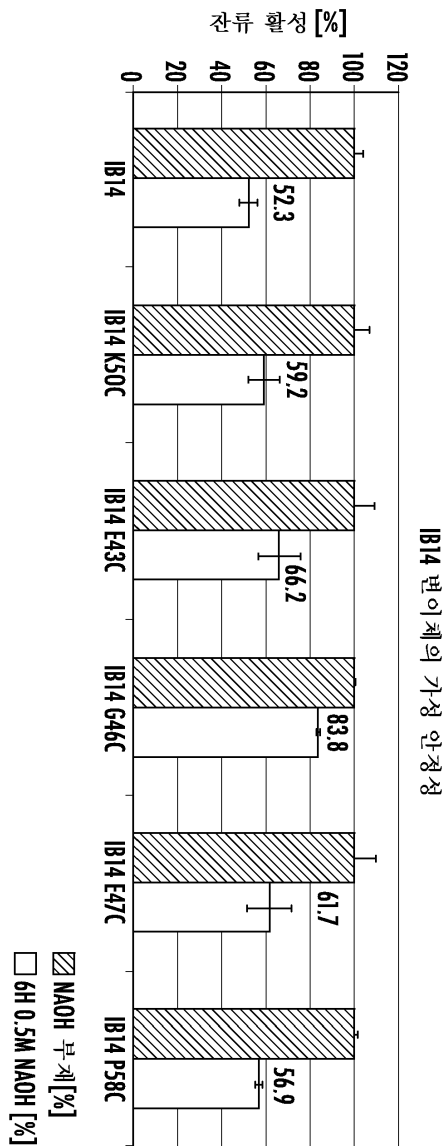
도면2a



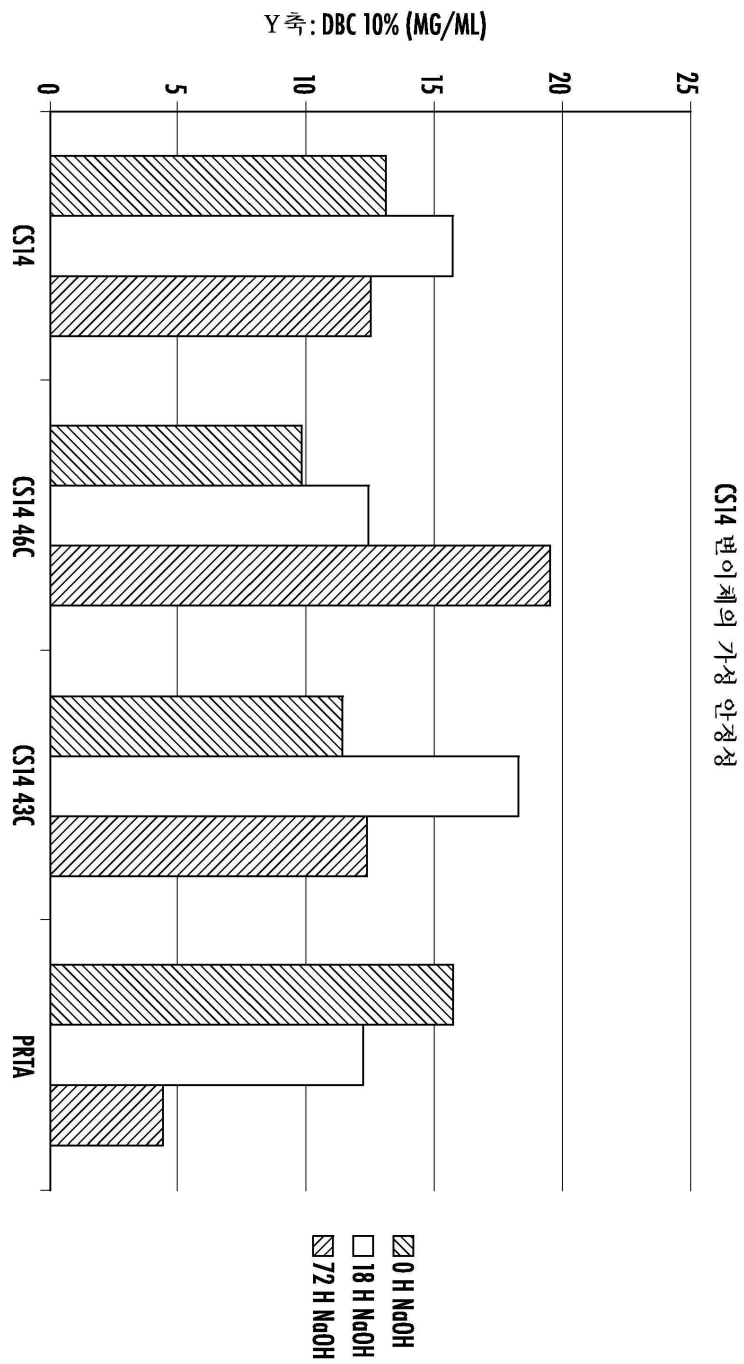
도면2b



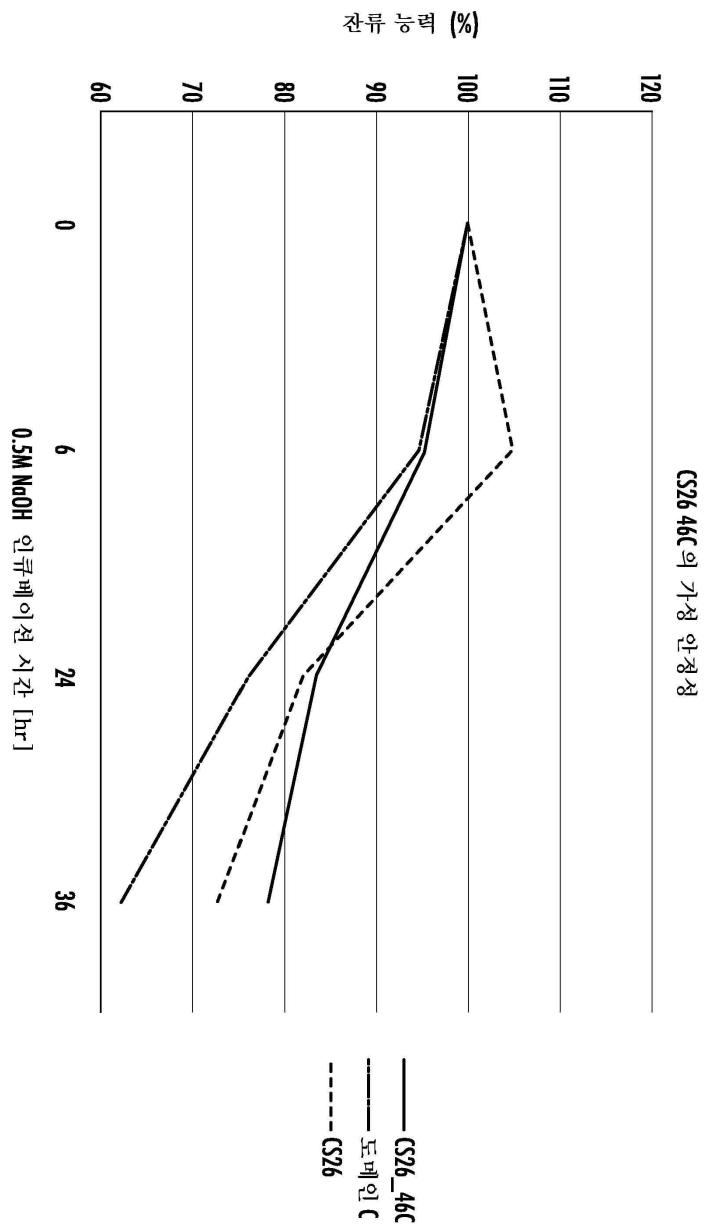
도면3a



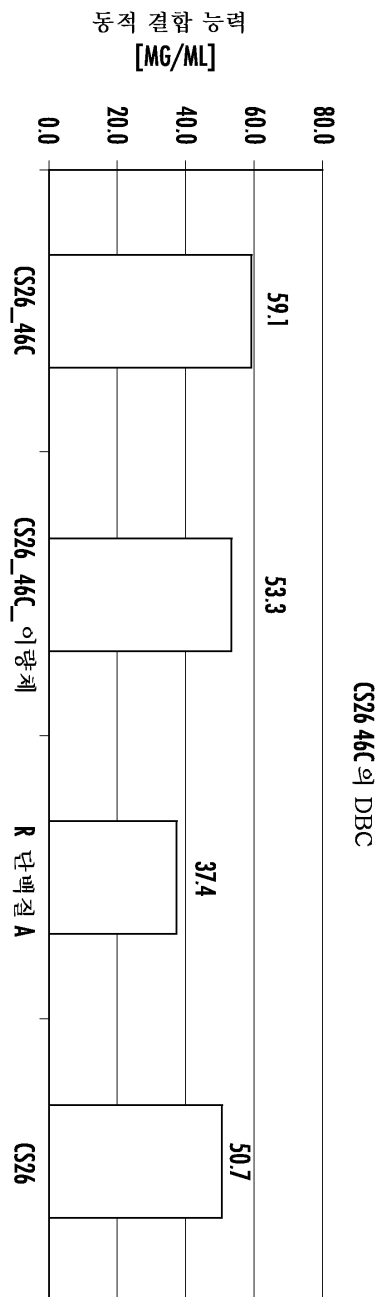
도면3b



도면4



도면5



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Navigo Proteins GmbH

<120> Fc binding proteins with Cysteine in helix 3

<130> SP33 EP2

<160> 99

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> consensus sequence 1

<220><221> variant

<222> (1)..(1)

<223> may be replaced by A, N, Q, V, or deleted

<220><221> variant

<222> (2)..(2)

<223> may be replaced by D or Q, or deleted

<220><221> variant

<222> (3)..(3)

<223> may be replaced by N, or deleted

<220><221> variant

<222> (4)..(4)

<223> may be replaced by Q or N, or deleted

<220><221> variant

<222> (5)..(5)

<223> may be replaced by F, or deleted

<220><221> variant

<222> (6)..(6)

<223> may be replaced by N, or deleted

<220><221> variant

<222> (7)..(7)

<223> may be replaced by E

<220><221> variant

<222> (8)..(8)

<223> may be replaced by A or E

<220><221> variant

<222> (11)..(11)

<223> may be replaced by S, N, I ,or E

<220><221> variant

<222> (15)..(15)

<223> may be replaced by Q
 <220><221> variant
 <222> (16)..(16)
 <223> may be replaced by V
 <220><221> variant
 <222> (18)..(18)
 <223> may be replaced by N
 <220><221> variant
 <222> (19)..(19)
 <223> may be replaced by M
 <220><221> variant
 <222> (23)..(23)
 <223> may be replaced by N
 <220><221> variant
 <222> (24)..(24)
 <223> may be replaced by A
 <220><221> variant
 <222> (25)..(25)
 <223> may be replaced by E
 <220><221>
 > variant
 <222> (29)..(29)
 <223> may be replaced by G
 <220><221> variant
 <222> (35)..(35)
 <223> may be replaced by K or I
 <220><221> variant
 <222> (40)..(40)
 <223> may be replaced by Q or T
 <220><221> variant
 <222> (42)..(42)
 <223> may be replaced by A, K, or T
 <220><221> variant
 <222> (43)..(43)
 <223> may be replaced by S, N, or C

<220><221> variant

<222> (44)..(44)

<223> may be replaced by L or V

<220><221> variant

<222> (46)..(46)

<223> may be replaced by C or A

<220><221> variant

<222> (47)..(47)

<223> may be replaced by C

<220><221> variant

<222> (49)..(49)

<223> may be replaced by Q

<220><221> variant

<222> (50)..(50)

<223> may be replaced by C

<220><221> variant

<222> (51)..(51)

<223> may be replaced by C

<220><221> variant

<222> (53)..(53)

<223> may be replaced by E or C

<220><221> variant

<222> (54)..(54)

<223> may be replaced by S, or deleted

<220><221> variant

<222> (57)..(57)

<223> may be deleted

<220><221> variant

<222> (58)..(58)

<223> may be replaced by K, or deleted

<400> 1

Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
 20 25 30
 Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly Glu Ala
 35 40 45
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro

50 55
 <210> 2
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> consensus sequence 2
 <220><221> variant
 <222> (1)..(1)
 <223> may be deleted
 <220><221> variant
 <222> (2)..(2)
 <223> may be replaced by D, or deleted
 <220><221> variant
 <222> (3)..(3)
 <223> may be replaced by N or deleted
 <220><221> variant
 <222> (4)..(4)
 <223> may be replaced by Q, or deleted
 <220><221> variant
 <222> (5)..(5)
 <223> may be replaced by F, or deleted
 <220><221> variant
 <222> (6)..(6)
 <223> may be deleted
 <220><221> variant
 <222> (7)..(7)
 <223> may be replaced by E
 <220><221> variant

<222> (8)..(8)
 <223> may be replaced by A or E
 <220><221> variant
 <222> (11)..(11)
 <223> may be replaced by S, I, or E
 <220><221> variant
 <222> (25)..(25)
 <223> may be replaced by E
 <220><221> variant
 <222> (35)..(35)
 <223> may be replaced by I
 <220><221> variant
 <222> (40)..(40)
 <223> may be replaced by Q or T
 <220>
 ><221> variant
 <222> (43)..(43)
 <223> may be replaced by S, or C
 <220><221> variant
 <222> (44)..(44)
 <223> may be replaced by L or V
 <220><221> variant
 <222> (46)..(46)
 <223> may be replaced by C or A
 <220><221> variant
 <222> (47)..(47)
 <223> may be replaced by C
 <220><221> variant
 <222> (49)..(49)
 <223> may be replaced by Q
 <220><221> variant
 <222> (50)..(50)
 <223> may be replaced by C
 <220><221> variant
 <222> (51)..(51)

<223> may be replaced by C

<220><221> variant

<222> (53)..(53)

<223> may be replaced by E or C

<220><221> variant

<222> (54)..(54)

<223> may be replaced by S

<220><221> variant

<222> (57)..(57)

<223> may be deleted

<220><221> variant

<222> (58)..(58)

<223> may be replaced by K, or deleted

<400> 2

Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro

50 55

<210> 3

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs14

<400> 3

Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro
50 55

<210> 4

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs27

<400> 4

Ile Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Gly Glu Ala
35 40 45

Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 5

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs20

<400> 5

Ile Asp Ser Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Ser Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Thr Ser Leu Ser Leu Leu Gly Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro
50 55

<210> 6

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs42

<400> 6

Ile Asp Ala Lys His Asp Glu Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 7

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs26

<400> 7

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 8

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs24

<400> 8

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

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly Glu Ala
 35 40 45
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 9

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs17

<400> 9

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

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Ser Leu Leu Gly Glu Ala
 35 40 45
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro
 50 55

<210> 10

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs25

<400> 10

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

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 11

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs47h3

<400> 11

Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Gly Glu Ala
35 40 45

Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 12

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs47h4

<400> 12

Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Gly Glu Ala
35 40 45

Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 13

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs74h1

<400> 13

Ile Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro

50 55

<210> 14

<211> 58

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs74h2

<400> 14

Ile Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro

50 55

<210> 15

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs41

<400> 15

Ile Ala Ala Lys His Asp Glu Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys

50

55

<210> 16

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs43

<400> 16

Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys

50

55

<210> 17

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs14 43C

<400> 17

Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Cys Ile Leu Gly Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro

50 55

<210> 18

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs14 46C

<400> 18

Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Cys Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro

50 55

<210> 19

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs14 47C

<400> 19

Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly Cys Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro

50 55

<210> 20

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs14 11S 46C

<400> 20

Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Cys Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro
50 55

<210> 21

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs27 43C

<400> 21

Ile Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Cys Val Leu Gly Glu Ala
35 40 45

Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 22

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs27 46C

<400> 22

```

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

```

<210> 23

<211> 58

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs27 47C

<400> 23

```

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

```

<210> 24

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs27 11S 46C

<400> 24

```

Ile Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile
1           5           10          15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln

```

20 25 30
Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Cys Glu Ala
35 40 45

Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 25

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs27 46C dimer

<400> 25

Ile Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Cys Glu Ala

35 40 45
Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Ile Ala Ala Lys Phe Asp

50 55 60
Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu

65 70 75 80
Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro

85 90 95
Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Cys Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser

100 105 110
Gln Ala Pro Lys

115

<210> 26

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs26 43C

<400> 26

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Cys Ile Leu Ala Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 27

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs26 46C

<400> 27

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Cys Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 28

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs26 47C

<400> 28

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30
Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Ala Cys Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 29

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs26 11S 46C

<400> 29

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Cys Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 30

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs26 9H 46C

<400> 30

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp His Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Cys Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 31

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs26 36H 46C

<400

> 31

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg His Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Cys Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 32

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs26 46C dimer

<400> 32

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Cys Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ile Ala Ala Gln His Asp

50 55 60

Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu

65 70 75 80

Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro

85 90 95

Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Cys Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 100 105 110

Gln Ala Pro Lys
 115

<210> 33

<211> 55

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs26 delN 46C

<400> 33

Ala His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu
 1 5 10 15

Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg
 20 25 30

Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Cys Glu Ala Lys Lys Leu
 35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 34

<211> 53

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs26 delNC 46C

<400> 34

Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu
 1 5 10 15

Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg
 20 25 30

Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Cys Glu Ala Lys Lys Leu
 35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala

50

<210> 35

<211> 174

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs26 46C trimer

<400> 35

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Cys Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ile Ala Ala Gln His Asp

50 55 60

Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu

65 70 75 80

Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro

85 90 95

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

100 105 110

Gln Ala Pro Lys Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala

115 120 125

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Cys Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

165 170

<210> 36

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs24 43C

<400> 36

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Cys Ile Leu Gly Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 37

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs24 46C

<400> 37

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Cys Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 38

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs24 47C

<400> 38

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30
Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly Cys Ala

35 40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 39

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs24 11S 46C

<400> 39

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Glu Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Cys Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 40

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs47h3 43C

<400> 40

Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 41

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs47h3 46C

<400> 41

Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Cys Glu Ala

35 40 45

Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 42

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs47h3 47C

<400> 42

Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 43

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs47h3 11S 46C

<400> 43

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

<210> 44

<211>

58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs47h4 43C

<400> 44

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

<210> 45

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs47h4 46C

<400> 45

Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
 1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Cys Glu Ala
35 40 45

Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 46

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs47h4 47C

<400> 46

Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Gly Cys Ala
35 40 45

Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 47

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs74h1 43C

<400> 47

Ile Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Cys Ile Leu Gly Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro

50

55

<210> 48

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs74h1 46C

<400> 48

Ile Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1

5

10

15

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

20

25

30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Cys Glu Ala

35

40

45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro

50

55

<210> 49

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs74h1 47C

<400> 49

Ile Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1

5

10

15

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

20

25

30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly Cys Ala

35

40

45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro

50

55

<210> 50

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs74h2 43C

<400> 50

Ile Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

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

<210> 51

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs74h2 46C

<400>

> 51

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

<210> 52

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs74h2 47C

<400> 52

Ile Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

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

50 55

<210> 53

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs20 46C

<400> 53

Ile Asp Ser Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15
 Leu His Leu Pro Ser Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Thr Ser Leu Ser Leu Leu Cys Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro

50 55

<210> 54

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs20 43C

<400> 54

Ile Asp Ser Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15
 Leu His Leu Pro Ser Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln

20 25 30

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

35 40 45
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro
 50 55
 <210> 55
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cs20 47C
 <400> 55
 Ile Asp Ser Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
 1 5 10 15
 Leu His Leu Pro Ser Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
 20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Thr Ser Leu Ser Leu Leu Gly Cys Ala
 35 40 45
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro
 50 55
 <210> 56
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cs20 11S 46C
 <400> 56
 Ile Asp Ser Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile
 1 5 10 15
 Leu His Leu Pro Ser Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
 20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Thr Ser Leu Ser Leu Leu Cys Glu Ala
 35 40 45
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro
 50 55
 <210> 57
 <211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs17 46C

<400> 57

Ile Asp Ser Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Ser Leu Leu Cys Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro

50 55

<210> 58

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs42 46C

<400> 58

Ile Asp Ala Lys His Asp Glu Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Gln Ser Leu Glu Ile Leu Cys Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 59

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs42 47C

<400> 59

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

<210> 60

<211> 58

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs42 43C

<400> 60

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

<210> 61

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs42 11S 46C

<400> 61

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

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 62

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs41 46C

<400> 62

Ile Ala Ala Lys His Asp Glu Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Cys Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 63

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs28 46C

<400> 63

Ile Asp Ala Gln His Asp Glu Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Gln Ser Leu Glu Ile Leu Cys Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 64

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs23 46C

<400> 64

Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Thr Ser Leu Ser Ile Leu Cys Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro

50 55

<210> 65

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs25 46C

<400> 65

Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Cys Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 66

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs31 46C

<400> 66

Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

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

<210> 67

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs43 46C

<400> 67

Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

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

<210> 68

<211> 58

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs44 46C

<400> 68

Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Cys Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 69

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs45 46C

<400> 69

Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Cys Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asp Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 70

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs15 46C

<400> 70

Ile Asp Asn Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Cys Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro

50 55

<210> 71

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs16 46C

<400> 71

Ile Asp Ser Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Cys Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro

50 55

<210> 72

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs35 46C

<400> 72

Ile Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Gln Ser Leu Glu Leu Leu Cys Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 73

<211> 61

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs17 11S 46C

<400> 73

Ile Asp Ser Ile Asp Ser Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ser Ala Phe
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala
20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Ser Leu Leu
35 40 45

Cys Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro
50 55 60

<210> 74

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IB14 43C

<400> 74

Pro Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Ser Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Cys Ile Leu Gly Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro
50 55

<210> 75

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IB14 46C

<400> 75

Pro Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Cys Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro
50 55

<210> 76

<211> 58

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IB14 47C

<400> 76

Pro Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Ser Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Gly Cys Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro

50 55

<210> 77

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IB14 50C

<400> 77

Pro Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Ser Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Gly Glu Ala
35 40 45

Lys Cys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro

50 55

<210> 78

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IB14

<400> 78

Pro Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro

50 55

<210> 79

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IB27

<400> 79

Ala Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 80

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IB24

<400> 80

Ala Ala Ala Gln His Asp Lys Glu Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 81

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IB26

<400> 81

Ala Ala Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 82

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IB28

<400> 82

Ala Asp Ala Gln His Asp Glu Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Lys Glu Ile Leu Gly Glu Ala
35 40 45
Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys
50 55
<210> 83
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> IB20
<400> 83

Ala Asp Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Thr Ser Lys Ser Leu Leu Gly Glu Ala
35 40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro
50 55
<210> 84
<211> 58
<212>
PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> domain C
<400> 84

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

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50

55

<210> 85

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> domain B

<400> 85

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile

1

5

10

15

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

20

25

30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala

35

40

45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50

55

<210> 86

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> domain Z

<400> 86

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile

1

5

10

15

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

20

25

30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala

35

40

45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50

55

<210> 87

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> spacer

<400> 87

Ala Ser Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ser Ala

1 5 10

<210> 88

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> spacer and taq

<400> 88

Ala Ser Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ser Ala Cys Ala Ser Trp Ser His

1 5 10 15

Pro Gln Phe Glu Lys

20

<210> 89

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> taq for purification

<400> 89

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5

<210> 90

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs26 50C

<400> 90

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30
Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Cys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 91

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs26 51C

<400> 91

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Cys Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 92

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs26 53C

<400> 92

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Cys Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 93

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs24 50C

<400> 93

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Lys Cys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 94

<211> 58

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs24 51C

<400> 94

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Lys Lys Cys Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 95

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs24 53C

<400> 95

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Cys Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 96

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs26 40C

<400> 96

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Cys Ser Leu Glu Ile Leu Ala Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 97

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs26 42C

<400> 97

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Cys Glu Ile Leu Ala Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 98

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs26 49C

<400> 98

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Cys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 99

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cs26 54C

<400> 99

Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Cys Gln Ala Pro Lys

50

55