



등록특허 10-2528622



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년05월04일
(11) 등록번호 10-2528622
(24) 등록일자 2023년04월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/00 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *C40B 40/10* (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/005 (2013.01)
C07K 16/2866 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-7021174(분할)

(22) 출원일자(국제) 2012년09월28일
 심사청구일자 2021년07월06일

(85) 번역문제출일자 2021년07월06일

(65) 공개번호 10-2021-0091341

(43) 공개일자 2021년07월21일

(62) 원출원 특허 10-2014-7008483
 원출원일자(국제) 2012년09월28일
 심사청구일자 2017년09월25일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2012/006254

(87) 국제공개번호 WO 2013/046722
 국제공개일자 2013년04월04일

(30) 우선권주장
 JP-P-2011-218006 2011년09월30일 일본(JP)
 JP-P-2012-123479 2012년05월30일 일본(JP)

(73) 특허권자
추가이 세이야쿠 가부시키가이샤
일본국 도쿄도 기타쿠 우키마 5쵸메 5반 1고

(72) 발명자
이가와 토모유키
일본 시즈오카켄 고템바시 코마카도 1쵸메 135반
치 추가이 세이야쿠 가부시키가이샤 내
이시이 신야
일본 시즈오카켄 고템바시 코마카도 1쵸메 135반
치 추가이 세이야쿠 가부시키가이샤 내
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
제일특허법인(유)

(74) 대리인
제일특허법이(유)

(30) 우선권주장
JP-P-2011-218006 2011년09월30일 일본(JP)
JP-P-2012-123479 2012년05월30일 일본(JP)

(56) 선행기술조사문헌
JP2011507520 A*
KR1020110004435 A*

Megan L. Murtaugh et al., 'A Combinatorial Histidine Scanning Library Approach to Engineer Highly pH-Dependent Protein Switches', Protein Science, Vol.20, pp.1619-1631, 2011.07.15.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 45 항

심사관 : 문영준

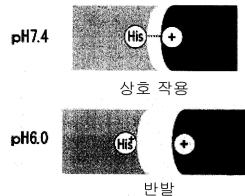
(54) 발명의 명칭 이온 농도 의존성 결합 분자 라이브러리

(57) 요약

이은 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기가 항원 결합 도메인에 포함되는 서로 서열이 다른 복수의 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리가 개시된다. 또한, 항원 결합 분자를 코트하는 복수의 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 조성물, 상기 폴리뉴클레오티

(뒷면에 계속)

대표도 - 도4a



드 문자를 포함하는 복수의 벡터를 포함하는 조성물, 상기 항원 결합 분자의 선택방법, 상기 폴리뉴클레오티드 분자의 단리방법, 상기 항원 결합 분자의 제조방법, 상기 항원 결합 분자를 포함하는 의약 조성물도 개시된다.

(52) CPC특허분류

C40B 40/10 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/21 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/567 (2013.01)
C07K 2317/72 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2317/94 (2013.01)

(72) 발명자

후나키 미호

일본 시즈오카켄 고템바시 코마카도 1쵸메 135번지
추가이 세이야쿠 가부시키가이샤 내

히로니와 나오카

일본 시즈오카켄 고템바시 코마카도 1쵸메 135번지
추가이 세이야쿠 가부시키가이샤 내

시미즈 슌

일본 시즈오카켄 고템바시 코마카도 1쵸메 135번지
추가이 세이야쿠 가부시키가이샤 내

명세서

청구범위

청구항 1

서로 서열이 다르고 상이한 항원에 결합하는 복수의 항원 결합 분자를 포함하는, 목적으로 하는 항원에 결합하는 항원 결합 분자의 검사(screening)를 위한 라이브러리로서,

상기 항원 결합 분자 중의 항원 결합 도메인은 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역이고, 중쇄 가변 영역의 Kabat 넘버링으로 정의되는 27위치, 31위치, 32위치, 33위치, 35위치, 50위치, 52위치, 53위치, 55위치, 57위치, 58위치, 59위치, 61위치, 62위치, 95위치, 96위치, 97위치, 98위치, 99위치, 100a위치, 100b위치, 100d위치, 100f위치, 100h위치, 102위치, 및 107위치 중 어느 하나 이상, 또는 경쇄 가변 영역의 Kabat 넘버링으로 정의되는 24위치, 27위치, 28위치, 30위치, 31위치, 32위치, 34위치, 50위치, 51위치, 52위치, 53위치, 54위치, 55위치, 56위치, 89위치, 90위치, 91위치, 92위치, 93위치, 94위치, 및 95a위치 중 어느 하나 이상에서 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 히스티딘 잔기를 포함하고, 상기 이온 농도의 조건은 pH 조건이고, 상기 항원 결합 분자의 경쇄 가변 영역은 생식 세포 계열의 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 라이브러리.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

중쇄 가변 영역의 Kabat 넘버링으로 정의되는 27위치, 31위치, 32위치, 33위치, 35위치, 50위치, 52위치, 53위치, 55위치, 57위치, 58위치, 59위치, 61위치, 62위치, 95위치, 96위치, 97위치, 98위치, 99위치, 100a위치, 100b위치, 100d위치, 100f위치, 100h위치, 102위치, 및 107위치 중 어느 하나 이상의 히스티딘 잔기 이외의 아미노산 서열은 나이브 서열의 아미노산 서열을 포함하는 라이브러리.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 생식 세포 계열의 서열은 Vk1 서열인 라이브러리.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 히스티딘 잔기는 경쇄 가변 영역의 CDR1에 포함되는 라이브러리.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 히스티딘 잔기는 경쇄의 CDR1의 Kabat 넘버링으로 정의되는 24위치, 27위치, 28위치, 30위치, 31위치, 32위치, 및 34위치 중 어느 하나 이상에 위치되는 라이브러리.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 히스티딘 잔기는 경쇄의 CDR2에 포함되는 라이브러리.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 히스티딘 잔기는 경쇄의 CDR2의 Kabat 넘버링으로 정의되는 50위치, 51위치, 52위치, 53위치, 54위치, 55위치, 및 56위치 중 어느 하나 이상에 위치되는 라이브러리.

청구항 8

제 1 항에 있어서,
상기 히스티딘 잔기는 경쇄의 CDR3에 포함되는, 라이브러리.

청구항 9

제 8 항에 있어서,
상기 히스티딘 잔기는 경쇄의 CDR3의 Kabat 넘버링으로 정의되는 89위치, 90위치, 91위치, 92위치, 93위치, 94위치, 및 95a위치 중 어느 하나 이상에 위치되는, 라이브러리.

청구항 10

제 1 항에 있어서,
항원 결합 분자 중의 항원 결합 도메인은 항체의 항원 결합 분절인 라이브러리.

청구항 11

제 1 항에 있어서,
항원 결합 분자 중의 항원 결합 도메인은 Fab, F(ab')2 또는 scFv인 라이브러리.

청구항 12

제 1 항에 기재된 항원 결합 분자를 포함하는 복수의 융합 폴리펩티드를 포함하는 라이브러리로서, 상기 융합 폴리펩티드는 항원 결합 분자의 중쇄 가변 영역과 바이러스 코트(coat) 단백질의 적어도 일부의 융합물인 것을 특징으로 하는 라이브러리.

청구항 13

제 12 항에 있어서,
상기 바이러스 코트 단백질은 단백질 pIII, 주요 코트 단백질 pVIII, pVII, pIX, Soc, Hoc, gpD 및 pv1로 이루어지는 군으로부터 선택되는 라이브러리.

청구항 14

제 1 항에 기재된 서로 서열이 다른 항원 결합 분자 또는 제 12 항에 기재된 서로 서열이 다른 융합 폴리펩티드를 각각 부호화하는 복수의 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 조성물.

청구항 15

제 14 항에 기재된 복수의 폴리뉴클레오티드 분자를 작용 가능하게 연결된 상태로 각각 포함하는 복수의 벡터를 포함하는 조성물.

청구항 16

제 15 항에 있어서,
상기 벡터는 복제 가능한 발현 벡터인 조성물.

청구항 17

제 16 항에 있어서,
복제 가능한 발현 벡터는, lacZ 프로모터계, 알칼리 포스파타아제 phoA 프로모터(Ap), 박테리오파지 λPL 프로모터(온도 감수성 프로모터), tac 프로모터, 트립토판 프로모터, pBAD 프로모터, 및 박테리오파지 T7 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 프로모터 영역에 상기 폴리뉴클레오티드가 작용 가능하게 연결되어 있는 발현 벡터인 조성물.

청구항 18

제 17 항에 있어서,

복제 가능한 발현 벡터는 M13, f1, fd, 또는 Pf3 과자 또는 그 유도체, 또는 람다형 과자 또는 그 유도체인 조성물.

청구항 19

제 15 항에 기재된 벡터를 각각 포함하는 복수의 바이러스를 포함하는 조성물.

청구항 20

제 1 항에 기재된 서로 서열이 다른 항원 결합 분자 또는 제 12 항에 기재된 서로 서열이 다른 융합 폴리펩티드가 각각 그 표면에 제시되어 있는 복수의 바이러스를 포함하는 조성물.

청구항 21

제 1 항에 기재된 서로 서열이 다른 항원 결합 분자 또는 제 12 항에 기재된 서로 서열이 다른 융합 폴리펩티드를 포함하는 라이브러리로서, 상기 라이브러리는 $1\times10^6\sim1\times10^{14}$ 의 서로 다른 가변 영역 서열을 갖는 라이브러리.

청구항 22

제 21 항에 있어서,

상기 라이브러리는 1×10^8 이상의 서로 다른 가변 영역 서열을 갖는 라이브러리.

청구항 23

서로 서열이 다르고 상이한 항원에 결합하는 복수의 항원 결합 분자를 포함하는, 목적으로 하는 항원에 결합하는 항원 결합 분자의 검사를 위한 라이브러리의 제조방법으로서,

상기 방법은, 항원 결합 분자 중의 항원 결합 도메인이 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역이고, 중쇄 가변 영역의 Kabat 넘버링으로 정의되는 27위치, 31위치, 32위치, 33위치, 35위치, 50위치, 52위치, 53위치, 55위치, 57위치, 58위치, 59위치, 61위치, 62위치, 95위치, 96위치, 97위치, 98위치, 99위치, 100a위치, 100b위치, 100d위치, 100f위치, 100h위치, 102위치, 및 107위치 중 어느 하나 이상, 또는 경쇄 가변 영역의 Kabat 넘버링으로 정의되는 24위치, 27위치, 28위치, 30위치, 31위치, 32위치, 34위치, 50위치, 51위치, 52위치, 53위치, 54위치, 55위치, 56위치, 89위치, 90위치, 91위치, 92위치, 93위치, 94위치, 및 95a위치 중 어느 하나 이상에서 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 히스티딘 잔기를 포함하도록 설계된 복수의 항원 결합 분자를 제조하는 것을 포함하고, 상기 이온 농도의 조건은 pH 조건이고, 상기 항원 결합 분자의 경쇄 가변 영역은 생식 세포 계열의 서열을 포함하는 제조방법.

청구항 24

제 23 항에 있어서,

상기 항원 결합 분자는 제 1 항에 기재된 항원 결합 분자인 제조방법.

청구항 25

제 24 항에 있어서,

상기 항원 결합 분자의 중쇄 가변 영역은 바이러스 코트 단백질의 적어도 일부와 융합되는 제조방법.

청구항 26

제 25 항에 있어서,

상기 바이러스 코트 단백질은 단백질 pIII, 주요 코트 단백질 pVIII, pVII, pIX, Soc, Hoc, gpD 및 pv1로 이루어지

는 군으로부터 선택되는 제조방법.

청구항 27

이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자를 선택하는 방법으로서, 상기 이온 농도의 조건은 pH 조건이고, 상기 방법은:

- a) 제 1 항 또는 제 12 항에 기재된 라이브러리를 제조하는 단계;
- b) 상기 라이브러리를 이온 농도가 다른 2 이상의 조건 하에서 항원과 접촉시키는 단계;
- c) 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자의 계군(subpopulation)을 상기 라이브러리로부터 분획하는 단계; 및
- d) c) 단계에서 분획된 계군으로부터 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자를 단리하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 28

이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자를 부호화하는 폴리뉴클레오티드를 단리하는 방법으로서, 상기 이온 농도의 조건은 pH 조건이고, 상기 방법은:

- a) 제 1 항에 기재된 서로 서열이 다른 항원 결합 분자 또는 제 12 항에 기재된 서로 서열이 다른 융합 폴리펩티드를 각각 부호화하는 복수의 폴리뉴클레오티드를 작용 가능하게 연결된 상태로 각각 포함하는 복수의 복제 가능한 발현 벡터를 포함하는 라이브러리를 제조하는 단계;
- b) 상기 라이브러리에 포함되는 각각의 발현 벡터로 감염된 복수의 바이러스의 표면에 상기 폴리뉴클레오티드에 의해 부호화되는 상기 서로 서열이 다른 항원 결합 분자 또는 융합 폴리펩티드를 발현하는 단계;
- c) 상기 복수의 바이러스를 이온 농도가 다른 2 이상의 조건 하에서 항원과 접촉시키는 단계;
- d) 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 바이러스의 계군을 상기 라이브러리로부터 분획하는 단계;
- e) d) 단계에서 분획된 바이러스의 계군으로부터 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 바이러스를 단리하는 단계; 및
- f) 단리된 바이러스로부터 폴리뉴클레오티드를 단리하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 29

제 28 항에 있어서,

추가적으로 상기 c) 및 d) 단계를 적어도 1회 반복하는 방법.

청구항 30

제 27 항에 있어서,

pH 산성 영역 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성이 pH 중성 영역 조건 하에서의 결합 활성보다 낮은 항원 결합 분자를 선택하는 방법.

청구항 31

제 30 항에 있어서,

pH 산성 영역 조건이 pH4.0~6.5인 방법.

청구항 32

제 31 항에 있어서,

pH 중성 영역 조건이 pH6.7~10.0인 방법.

청구항 33

이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자의 제조방법으로서, 상기 이온 농도의 조건은 pH 조건이고, 상기 제조방법은:

- a) 제 1 항에 기재된 서로 서열이 다른 항원 결합 분자 또는 제 12 항에 기재된 서로 서열이 다른 융합 폴리펩티드를 각각 부호화하는 복수의 폴리뉴클레오티드를 작용 가능하게 연결된 상태로 각각 포함하는 복수의 복제 가능한 발현 벡터를 포함하는 라이브러리를 제조하는 단계;
- b) 상기 라이브러리에 포함되는 각각 발현 벡터로 감염된 복수의 바이러스의 표면에 상기 폴리뉴클레오티드에 의해 부호화되는 상기 서로 서열이 다른 항원 결합 분자 또는 융합 폴리펩티드를 발현하는 단계;
- c) 상기 복수의 바이러스를 이온 농도가 다른 2 이상의 조건 하에서 항원과 접촉시키는 단계;
- d) 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 바이러스의 계균을 상기 라이브러리로부터 분획하는 단계;
- e) d) 단계에서 분획된 바이러스의 집단으로부터 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 바이러스를 단리하는 단계;
- f) 단리된 바이러스로부터 폴리뉴클레오티드를 단리하는 단계;
- g) 단리된 폴리뉴클레오티드가 작용 가능하게 연결된 삽입체(insert)를 갖는 벡터로 감염된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및
- h) g) 단계에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 분자를 회수하는 단계를 포함하는 제조방법.

청구항 34

이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자의 제조방법으로서, 상기 이온 농도의 조건은 pH 조건이고, 상기 제조방법은:

- a) 제 1 항에 기재된 서로 서열이 다른 항원 결합 분자 또는 제 12 항에 기재된 서로 서열이 다른 융합 폴리펩티드를 각각 부호화하는 복수의 폴리뉴클레오티드를 작용 가능하게 연결된 상태로 각각 포함하는 복수의 복제 가능한 발현 벡터를 포함하는 라이브러리를 제조하는 단계;
- b) 상기 라이브러리에 포함되는 각각의 발현 벡터로 감염된 복수의 바이러스의 표면에 상기 폴리뉴클레오티드에 의해 부호화되는 상기 서로 서열이 다른 항원 결합 분자 또는 융합 폴리펩티드를 발현하는 단계;
- c) 상기 복수의 바이러스를 이온 농도가 다른 2 이상의 조건 하에서 항원과 접촉시키는 단계;
- d) 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 바이러스의 계균을 상기 라이브러리로부터 분획하는 단계;
- e) d) 단계에서 분획된 바이러스의 계균으로부터 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 바이러스를 단리하는 단계;
- f) 단리된 바이러스로부터 폴리뉴클레오티드를 단리하는 단계;
- g) 단리된 폴리뉴클레오티드를 프레임에서 항체 정상 영역을 부호화하는 폴리뉴클레오티드와 연결하는 단계;
- h) g) 단계에서 연결된 폴리뉴클레오티드의 작용 가능하게 연결된 삽입체를 갖는 벡터로 감염된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및
- i) h) 단계에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 분자를 회수하는 단계를 포함하는 제조방법.

청구항 35

제 33 항에 있어서,

추가적으로 상기 c) 및 d) 단계를 적어도 1회 반복하는 제조방법.

청구항 36

제 33 항에 있어서,

pH 산성 영역 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성이 pH 중성 영역 조건 하에서의 결합 활성보다 낮은 항원 결합 분자를 선택하는 제조방법.

청구항 37

제 36 항에 있어서,

pH 산성 영역 조건이 pH4.0~6.5인 제조방법.

청구항 38

제 37 항에 있어서,

pH 중성 영역 조건이 pH6.7~10.0인 제조방법.

청구항 39

제 28 항에 있어서,

pH 산성 영역 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성이 pH 중성 영역 조건 하에서의 결합 활성보다 낮은 항원 결합 분자를 선택하는 방법.

청구항 40

제 39 항에 있어서,

pH 산성 영역 조건이 pH4.0~6.5인 방법.

청구항 41

제 40 항에 있어서,

pH 중성 영역 조건이 pH6.7~10.0인 방법.

청구항 42

제 34 항에 있어서,

추가적으로 상기 c) 및 d) 단계를 적어도 1회 반복하는 제조방법.

청구항 43

제 34 항에 있어서,

pH 산성 영역 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성이 pH 중성 영역 조건 하에서의 결합 활성보다 낮은 항원 결합 분자를 선택하는 제조방법.

청구항 44

제 43 항에 있어서,

pH 산성 영역 조건이 pH4.0~6.5인 방법.

청구항 45

제 44 항에 있어서,

pH 중성 영역 조건이 pH6.7~10.0인 방법.

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 출원은 일본 특허출원 2011-218006호(2011년 9월 30일 출원) 및 2012-123479호(2012년 5월 30일 출원)에 기초하여 우선권을 주장하고 있고, 이를 내용은 본 명세서에 참조로서 받아들여진다.
- [0002] 본 발명은 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자의 라이브러리 및 그 제조방법, 이러한 항원 결합 분자의 선택방법 및 제조방법, 및 이러한 항원 결합 분자를 포함하는 의약 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 항체는 혈장에서의 안정성이 높고 부작용도 적기 때문에 의약품으로서 주목받고 있다. 그 중에서도, IgG형의 항체 의약은 다수 출시되어 있고, 현재도 수많은 항체 의약이 개발되고 있다(비특허문헌 1, 비특허문헌 2). 한편, 제2세대의 항체 의약에 적용 가능한 기술로서 다양한 기술이 개발되어 있고, 반응기 기능, 항원결합능, 약물동태, 안정성을 향상시키거나 면역원성 리스크를 저감시키는 기술 등이 보고되어 있다(비특허문헌 3). 항체 의약은 일반적으로 투여량이 매우 높기 때문에 피하 투여 제제의 제조가 곤란하다는 점, 제조 비용이 높다는 점 등이 과제로서 생각된다. 항체 의약의 투여량을 저감시키는 방법으로서 항체의 약물동태를 향상시키는 방법과 항체와 항원의 친화성을 향상시키는 방법이 생각된다.
- [0004] 항체의 약물동태를 향상시키는 방법으로서 정상 영역의 인공적인 아미노산 치환이 보고되어 있다(비특허문헌 4, 5). 항원결합능, 항원중화능을 증강시키는 기술로서 친화성 성숙화 기술(비특허문헌 6)이 보고되어 있고, 가변 영역의 CDR 영역 등의 아미노산에 변이를 도입함으로써 항원에의 결합 활성을 증강시키는 것이 가능하다. 항원 결합능의 증강에 따라 *in vitro*의 생물 활성을 향상시키거나 투여량을 저감시키는 것이 가능하고, 또한 *in vivo*에서의 약효를 향상시키는 것도 가능하다(비특허문헌 7).

- [0005] 한편, 항체 1분자당 중화시킬 수 있는 항원량은 친화성에 의존하고, 친화성을 강하게 함으로써 적은 항체량으로 항원을 중화시키는 것이 가능하며, 다양한 방법으로 항체의 친화성을 강하게 하는 것이 가능하다(비특허문헌 6). 또한 항원에 공유 결합적으로 결합하여 친화성을 무한대로 할 수 있다면 1분자의 항체로 1분자의 항원(2개인 경우는 2항원)을 중화시키는 것이 가능하다. 그러나, 지금까지의 방법으로는 1분자의 항체로 1분자의 항원(2개인 경우는 2항원)의 화학량론적인 중화 반응이 한계이고, 항원량 이하의 항체량으로 항원을 완전하게 중화시키는 것은 불가능했다. 즉, 친화성을 강하게 하는 효과에는 한계가 존재했다(비특허문헌 9). 중화 항체의 경우, 그 중화 효과를 일정 기간 지속시키기 위해서는 그 기간에 생체 내에서 생산되는 항원량 이상의 항체량이 투여될 필요가 있고, 상술한 항체의 약물동태 향상, 또는 친화성 성숙화 기술만으로는 필요 항체 투여량의 저감에는 한계가 존재했다. 그 때문에, 항원량 이하의 항체량으로 항원의 중화 효과를 목적 기간 지속하기 위해서는 1개의 항체로 복수의 항원을 중화시킬 필요가 있다.

- [0006] 이것을 달성하는 새로운 방법으로서, 최근 항원에 대해서 pH 의존적으로 결합하는 항체가 보고되었다(특허문헌 1). 이 문헌은 항원 결합 분자에 히스티딘을 도입함으로써 pH 중성 영역과 pH 산성 영역에서 성질이 변화하는 pH 의존적 항원 결합 항체를 개시하고 있다. 항원에 대해서 혈장 중의 중성 조건 하에서는 강하게 결합하고, 엔도솜 내의 산성 조건 하에서 항원으로부터 해리되는 pH 의존적 항원 결합 항체는 엔도솜 내에서 항원으로부터

해리되는 것이 가능하다. pH 의존적 항원 결합 항체는 항원을 해리한 후에 항체가 FcRn에 의해서 혈장 중에 재생되면 다시 항원에 결합하는 것이 가능하기 때문에 1개의 항체로 복수의 항원에 반복 결합하는 것이 가능해진다.

[0007] 또한, 항원의 혈장 중 체류성은 FcRn에 결합해서 재생되는 항체와 비교해서 매우 짧다. 혈장 중 체류성이 긴 항체가 이러한 혈장 중 체류성이 짧은 항원에 결합하면 항체 항원 복합체의 혈장 중 체류성은 항체와 동일하게 길어진다. 그 때문에, 항원은 항체와 결합함으로써 오히려 혈장 중 체류성이 길어지고 혈장 중 항원 농도는 상승한다. 이러한 경우, 항체의 항원에 대한 친화성을 향상시켜도 항원의 혈장 중으로부터의 소실을 촉진시킬 수는 없다. 상술한 pH 의존적 항원 결합 항체는 통상의 항체와 비교해서 항원의 혈장 중으로부터의 소실을 촉진시키는 방법으로서도 유효하다는 것이 보고되어 있다(특허문헌 1).

[0008] 이러한 pH 의존적 항원 결합 항체는 1개의 항체로 복수의 항원에 결합해서 통상의 항체와 비교해서 항원의 혈장 중으로부터의 소실을 촉진시킬 수 있기 때문에 통상의 항체로는 이를 수 없었던 작용을 갖는다. 기존의 항체 서열을 치환함으로써 항원에 대한 pH 의존적인 결합 활성을 부여할 수 있다. 한편, 이러한 항체를 새로 취득하기 위해서는 면역 동물로부터 항체를 취득하는 방법 또는 인간 항체 라이브러리로부터 항체를 취득하는 방법에서 하기와 같은 제한이 생각된다.

[0009] 비인간 동물을 면역하는 방법으로는 pH 의존적 결합 항체를 얻을 가능성은 있지만, 다종류의 항원에 대한 pH 의존적 항원 결합 항체를 단기간에 얻는 것, 또는 특정한 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 선택적으로 얻는 것이 곤란한 경우가 있다. 또한, 인간 항체 라이브러리 중으로부터 pH 의존적인 항원에 대한 결합능을 지표로 항체를 농축하는 것이 가능하다. 그러나, 일반적으로(Kabat 데이터베이스에 등록됨) 인간 항체의 항체 가변 영역 부분에서 히스티딘 잔기의 출현 빈도는 중쇄 CDR1에서는 5.9%, 중쇄 CDR2에서는 1.4%, 중쇄 CDR3에서는 1.6%, 경쇄 CDR1에서는 1.5%, 경쇄 CDR2에서는 0.5%, 경쇄 CDR3에서는 2.2%로 높지 않은 것이 알려져 있고, 인간 항체 라이브러리 중에 pH 의존적 항원결합능을 유지시킬 수 있는 서열은 매우 적지 않다고 생각한다. 따라서, 항원과의 결합 부위에서 히스티딘 출현 빈도를 높인 pH 의존적인 항원에 대한 결합능을 유지시킬 수 있는 서열을 많이 포함하는 항체 라이브러리의 제공이 바람직하다.

[0010] 한편, 항원의 혈장 중으로부터의 소실을 촉진시키는 등의 효과는 pH 이외의 혈장 중과 조기 엔도솜 내의 환경 사이에서 다른 요소에 대한 항원에 대한 결합능의 의존성을 부여할 수 있으면 달성시킬 수 있다고 생각한다.

[0011] 또한, 본 발명의 선행기술문헌을 이하에 나타낸다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) WO2009125825A

비특허문헌

[0013] (비특허문헌 0001) Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz, Monoclonal antibody successes in the clinic, Nat. Biotechnol. (2005) 23, 1073-1078.

(비특허문헌 0002) Pavlou AK, Belsey NJ., The therapeutic antibodies market to 2008, Eur J Pharm Biopharm. (2005) 59 (3), 389-396.

(비특허문헌 0003) Kim SJ, Park Y, Hong HJ., Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies., Mol Cells. (2005) 20 (1), 17-29.

(비특허문헌 0004) Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N., An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life, J Immunol. (2006) 176 (1), 346-356.

(비특허문헌 0005) Ghetic V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES., Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis, Nat. Biotechnol. (1997) 15 (7), 637-640.

(비특허문헌 0006) Rajpal A, Beyaz N, Haber L, Cappuccilli G, Yee H, Bhatt RR, Takeuchi T, Lerner RA,

Crea R., A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2005) 102 (24), 8466-8471.

(비특허문헌 0007) Wu H, Pfarr DS, Johnson S, Brewah YA, Woods RM, Patel NK, White WI, Young JF, Kiener PA. Development of Motavizumab, an Ultra-potent Antibody for the Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection in the Upper and Lower Respiratory Tract, J. Mol. Biol. (2007) 368, 652-665.

(비특허문헌 0008) Hanson CV, Nishiyama Y, Paul S. Catalytic antibodies and their applications.Curr Opin Biotechnol, (2005) 16 (6), 631-6.

(비특허문헌 0009) Rathanaswami P, Roalstad S, Roskos L, Su QJ, Lackie S, Babcock J. Demonstration of an in vivo generated sub-picomolar affinity fully human monoclonal antibody to interleukin-8, Biochem. Biophys. Res. Commun. (2005) 334 (4), 1004-13.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014]

본 발명은 이러한 상황에 비추어서 이루어진 것이고, 그 목적은 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기가 항원 결합 도메인에 포함되어 있는 서로 서열이 다른 복수의 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리, 상기 항원 결합 분자를 부호화하는 복수의 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 조성물, 상기 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 복수의 벡터를 포함하는 조성물, 상기 항원 결합 분자의 선택방법, 상기 폴리뉴클레오티드 분자의 단리방법, 상기 항원 결합 분자의 제조방법, 상기 항원 결합 분자를 포함하는 의약 조성물을 제공하는 것에 있다.

과제의 해결 수단

[0015]

본 발명자들은 생체 내의 환경 요소의 차이에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기가 항원 결합 도메인에 포함되어 있는 서로 서열이 다른 복수의 항원 결합 분자를 포함한 라이브러리에 대해서 예의 연구를 행했다. 그 결과, 본 발명자들은 혈장 중과 조기 엔도솜 내에서의 이온 농도, 특히 칼슘 이온 농도의 차이나 pH에 착안하고, 칼슘 의존적 또는 pH 의존적인 항원에 대한 결합 활성을 갖는 항원 결합 분자를 사용함으로써 항원 결합 분자에 의한 항원의 세포 내로의 흡수 촉진, 혈장 중의 항원 농도의 감소를 일으키는 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리가 제조 가능하다는 것을 발견했다.

[0016]

즉, 본 발명은 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기가 항원 결합 도메인에 포함되어 있는 서로 서열이 다른 복수의 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리, 상기 항원 결합 분자를 부호화하는 복수의 폴리뉴클레오티드 분자를 포함한 조성물, 상기 폴리뉴클레오티드 분자를 포함한 복수의 벡터를 포함하는 조성물, 상기 항원 결합 분자의 선택방법, 상기 폴리뉴클레오티드 분자의 단리방법, 상기 항원 결합 분자의 제조방법, 상기 항원 결합 분자를 포함한 의약 조성물 등에 관한 것이다. 보다 구체적으로는 이하에 관한 것이다.

[0017]

[1] 서로 서열이 다른 복수의 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리로서, 상기 항원 결합 분자 중의 항원 결합 도메인은 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기를 포함하는 것을 특징으로 하는 라이브러리.

[0018]

[2] [1]에 있어서, 이온 농도는 칼슘 이온 농도인 라이브러리.

[0019]

[3] [2]에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 상기 항원 결합 분자의 중쇄의 항원 결합 도메인에 포함되는 라이브러리.

[0020]

[4] [3]에 있어서, 중쇄의 항원 결합 도메인은 중쇄 가변 영역인 라이브러리.

[0021]

[5] [4]에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 중쇄 가변 영역의 CDR3에 포함되는 라이브러리.

[0022]

[6] [2] 내지 [5] 중 어느 하나에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 중쇄 CDR3의 Kabat 넘버링으로 정의되는 95위치, 96위치, 100a위치 및 101위치 중 어느 하나 이상에 위치되는 라이브러리.

[0023]

[7] [2] 내지 [6] 중 어느 하나에 있어서, 상기 아미노산 잔기 이외의 아미노산 서열은 나이브(naive) 서열의

아미노산 서열을 포함하는 라이브러리.

- [0024] [8] [3] 내지 [7] 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 결합 분자의 경쇄 가변 영역은 나이브 서열의 아미노산 서열을 포함하는 라이브러리.
- [0025] [9] [2]에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 상기 항원 결합 분자의 경쇄의 항원 결합 도메인에 포함되는 라이브러리.
- [0026] [10] [9]에 있어서, 경쇄의 항원 결합 도메인은 경쇄 가변 영역인 라이브러리.
- [0027] [11] [10]에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 경쇄 가변 영역의 CDR1에 포함되는 라이브러리.
- [0028] [12] [11]에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 Kabat 넘버링으로 정의되는 30위치, 31위치 및 32위치 중 어느 하나 이상에 위치되는 라이브러리.
- [0029] [13] [10] 내지 [12] 중 어느 하나에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 경쇄 가변 영역의 CDR2에 포함되는 라이브러리.
- [0030] [14] [13]에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 경쇄 CDR2의 Kabat 넘버링으로 정의되는 50위치에 포함되는 라이브러리.
- [0031] [15] [10] 내지 [14] 중 어느 하나에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 경쇄 CDR3에 포함되는 라이브러리.
- [0032] [16] [15]에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 경쇄 CDR3의 Kabat 넘버링으로 정의되는 92위치에 위치되는 라이브러리.
- [0033] [17] [2] 및 [9] 내지 [16] 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 결합 분자의 경쇄의 프레임워크는 생식 세포 계열의 프레임워크 서열을 포함하는 라이브러리.
- [0034] [18] [2] 및 [9] 내지 [17] 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 결합 분자의 중쇄 가변 영역은 나이브 서열의 아미노산 서열을 포함하는 라이브러리.
- [0035] [19] [1] 내지 [18] 중 어느 하나에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 칼슘 결합 모티프(motif)를 구성하는 라이브러리.
- [0036] [20] [19]에 있어서, 칼슘 결합 모티브는 카데린(cadherin) 도메인, EF핸드, C2도메인, Gla도메인, C형 렉틴, 도메인, 아넥신, 트롬보스폰딘 3형 도메인, 및 EGF 유사 도메인, Vk5의 도메인, 서열 번호 10, 및 서열 번호 11로 표시되는 도메인으로부터 선택되는 어느 칼슘 결합 모티프인 라이브러리.
- [0037] [21] [2] 내지 [20] 중 어느 하나에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 금속 킬레이트 작용을 갖는 아미노산인 라이브러리.
- [0038] [22] [21]에 있어서, 금속 킬레이트 작용을 갖는 아미노산은 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 글루타민, 아스파라긴산, 및 글루타민산으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산인 라이브러리.
- [0039] [23] [1]에 있어서, 이온 농도의 조건이 pH 조건인 라이브러리.
- [0040] [24] [23]에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 상기 항원 결합 분자의 중쇄의 항원 결합 도메인에 포함되는 라이브러리.
- [0041] [25] [24]에 있어서, 중쇄의 항원 결합 도메인은 중쇄 가변 영역인 라이브러리.
- [0042] [26] [25]에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 중쇄 가변 영역의 Kabat 넘버링으로 정의되는 27위치, 31위치, 32위치, 33위치, 35위치, 50위치, 52위치, 53위치, 55위치, 57위치, 58위치, 59위치, 61위치, 62위치, 95위치, 96위치, 97위치, 98위치, 99위치, 100a위치, 100b위치, 100d위치, 100f위치, 100h위치, 102위치, 및 107위치 중 어느 하나 이상에 위치되는 라이브러리.
- [0043] [27] [26]에 있어서, 중쇄 가변 영역의 Kabat 넘버링으로 정의되는 27위치, 31위치, 32위치, 33위치, 35위치, 50위치, 52위치, 53위치, 55위치, 57위치, 58위치, 59위치, 61위치, 62위치, 95위치, 96위치, 97위치, 98위치, 99위치, 100a위치, 100b위치, 100d위치, 100f위치, 100h위치, 102위치, 및 107위치 중 어느 하나 이상의 아미노산 잔기 이외의 아미노산 서열은 나이브 서열의 아미노산 서열을 포함하는 라이브러리.
- [0044] [28] [23] 내지 [27] 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 결합 분자의 경쇄 가변 영역은 생식 세포 계열의 서열

을 포함하는 라이브러리.

- [0045] [29] [23]에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 상기 항원 결합 분자의 경쇄의 항원 결합 도메인에 포함되는 라이브러리.
- [0046] [30] [29]에 있어서, 경쇄의 항원 결합 도메인은 경쇄 가변 영역인 라이브러리.
- [0047] [31] [30]에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 경쇄 가변 영역의 Kabat 넘버링으로 정의되는 24위치, 27위치, 28위치, 30위치, 31위치, 32위치, 34위치, 50위치, 51위치, 52위치, 53위치, 54위치, 55위치, 56위치, 89위치, 90위치, 91위치, 92위치, 93위치, 94위치, 및 95a위치 중 어느 하나 이상에 위치되는 라이브러리.
- [0048] [32] [30] 또는 [31]에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 경쇄 가변 영역의 CDR1에 포함되는 라이브러리.
- [0049] [33] [32]에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 경쇄 CDR1의 Kabat 넘버링으로 정의되는 24위치, 27위치, 28위치, 30위치, 31위치, 32위치, 및 34위치 중 어느 하나 이상에 위치되는 라이브러리.
- [0050] [34] [30] 내지 [33] 중 어느 하나에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 경쇄의 CDR2에 포함되는 라이브러리.
- [0051] [35] [34]에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 경쇄 CDR2의 Kabat 넘버링으로 정의되는 50위치, 51위치, 52위치, 53위치, 54위치, 55위치, 및 56위치 중 어느 하나 이상에 위치되는 라이브러리.
- [0052] [36] [30] 내지 [35] 중 어느 하나에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 경쇄의 CDR3에 포함되는 라이브러리.
- [0053] [37] [36]에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 경쇄 CDR3의 Kabat 넘버링으로 정의되는 89위치, 90위치, 91위치, 92위치, 93위치, 94위치, 및 95a위치 중 어느 하나 이상에 위치되는 라이브러리.
- [0054] [38] [29] 내지 [37] 중 어느 하나에 있어서, 경쇄의 프레임워크 영역은 생식 세포 계열의 프레임워크 서열을 포함하는 라이브러리.
- [0055] [39] [29] 내지 [38] 중 어느 하나에 있어서, 중쇄 가변 영역은 나이브 서열을 갖는 라이브러리.
- [0056] [40] [23] 내지 [39] 중 어느 하나에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 4.0-8.0의 측쇄 pKa를 갖는 아미노산인 라이브러리.
- [0057] [41] [23] 내지 [40] 중 어느 하나에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 글루타민산인 라이브러리.
- [0058] [42] [23] 내지 [39] 중 어느 하나에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 5.5-7.0의 측쇄 pKa를 갖는 아미노산인 라이브러리.
- [0059] [43] [23] 내지 [40] 및 [42] 중 어느 하나에 있어서, 상기 아미노산 잔기는 히스티딘인 라이브러리.
- [0060] [44] [1] 내지 [43] 중 어느 하나에 기재된 항원 결합 분자를 포함하는 복수의 융합 폴리펩티드로 주로 이루어지는 라이브러리로서, 상기 융합 폴리펩티드는 항원 결합 분자의 중쇄 가변 영역과 바이러스 코트(coat) 단백질의 적어도 일부의 융합물인 것을 특징으로 하는 라이브러리.
- [0061] [45] [44]에 있어서, 상기 바이러스 코트 단백질은 단백질 pIII, 주요 코트 단백질 pVIII, pVII, pIX, Soc, Hoc, gpD, pv1, 및 그 변이체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 라이브러리.
- [0062] [46] [1] 내지 [43] 중 어느 하나에 기재되는 서로 다른 항원 결합 분자 또는 [44] 또는 [45]에 기재되는 서로 다른 융합 폴리펩티드를 각각 부호화하는 복수의 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 조성물.
- [0063] [47] [46]에 기재되는 복수의 폴리뉴클레오티드 분자가 작용 가능하게 연결된 상태로 각각 포함하는 복수의 벡터를 포함하는 조성물.
- [0064] [48] [47]에 있어서, 상기 벡터는 복제 가능한 발현 벡터인 조성물.
- [0065] [49] [48]에 있어서, 복제 가능한 발현 벡터는 lacZ 프로모터계, 알칼리 포스파타아제 phoA 프로모터(Ap), 박테리오파지 λPL 프로모터(온도 감수성 프로모터), tac 프로모터, 트립토판 프로모터, pBAD 프로모터, 및 박테리오파지 T7 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 프로모터 영역이 발현 벡터에 상기 폴리뉴클레오티드가 작용 가능하게 연결되어 있는 조성물.
- [0066] [50] [48] 또는 [49]에 있어서, 복제 가능한 발현 벡터는 M13, f1, fd, 또는 Pf3 파지 또는 그 유도체, 또는 람다형 파지 또는 그 유도체인 조성물.

- [0067] [51] [47] 내지 [50] 중 어느 하나에 기재되는 벡터를 각각 포함하는 복수의 바이러스를 포함하는 조성물.
- [0068] [52] [1] 내지 [43] 중 어느 하나에 기재되는 서로 서열이 다른 항원 결합 분자 또는 [44] 또는 [45]에 기재되는 서로 서열이 다른 융합 폴리펩티드가 각각 그 표면에 제시되어 있는 복수의 바이러스를 포함하는 조성물.
- [0069] [53] [1] 내지 [43] 중 어느 하나에 기재되는 서로 서열이 다른 항원 결합 분자 또는 [44] 또는 [45]에 기재되는 서로 서열이 다른 융합 폴리펩티드를 포함하는 라이브러리로서, 상기 라이브러리는 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{14}$ 의 서로 다른 가변 영역 서열을 갖는 라이브러리.
- [0070] [54] [53]에 있어서, 상기 라이브러리는 1×10^8 이상의 서로 다른 가변 영역 서열을 갖는 라이브러리.
- [0071] [55] 서로 서열이 다른 복수의 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리의 제조방법으로서, 상기 방법은 항원 결합 분자 중의 항원 결합 도메인이 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기를 포함하도록 설계된 복수의 항원 결합 분자를 제조하는 것을 포함하는 방법.
- [0072] [56] [55]에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 [2] 내지 [43] 중 어느 한 항에 기재된 항원 결합 분자인 제조방법.
- [0073] [57] [55] 또는 [56]에 있어서, 상기 항원 결합 분자의 종류 가변 영역은 바이러스 코트 단백질의 적어도 일부와 융합되는 제조방법.
- [0074] [58] [55] 내지 [57] 중 어느 하나에 있어서, 상기 바이러스 코트 단백질은 단백질 pIII, 주단백질 pVIII, pVII, pIX, Soc, Hoc, gpD, pv1, 및 그 변이체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 제조방법.
- [0075] [59] 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자를 선택하는 방법으로서, 상기 방법은:
- a) [1] 내지 [43] 중 어느 하나에 기재되는 서로 서열이 다른 항원 결합 분자 또는 [44] 또는 [45]에 기재되는 서로 서열이 다른 융합 폴리펩티드로 주로 이루어지는 라이브러리를 제조하는 단계;
 - b) 상기 라이브러리를 이온 농도가 다른 2 이상의 조건 하에서 항원과 접촉시키는 단계;
 - c) 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자의 계군(subpopulation)을 상기 라이브러리로부터 분획하는 단계; 및
 - d) c) 단계에서 분획시킨 계군으로부터 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자를 단리하는 단계를 포함하는 방법.
- [0080] [60] 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자를 부호화하는 폴리뉴클레오티드를 단리하는 방법으로서, 상기 방법은:
- a) [1] 내지 [43] 중 어느 하나에 기재되는 서로 서열이 다른 항원 결합 분자 또는 [44] 또는 [45]에 기재되는 서로 서열이 다른 융합 폴리펩티드를 각각 부호화하는 복수의 폴리뉴클레오티드를 작용 가능하게 연결된 상태로 각각 포함하는 복수의 복제 가능한 발현 벡터를 포함하는 라이브러리를 제조하는 단계;
 - b) 상기 라이브러리에 포함되는 각각의 발현 벡터로 감염된 복수의 바이러스의 표면에 상기 폴리뉴클레오티드에 의해 부호화되는 상기 서로 서열이 다른 항원 결합 분자 또는 융합 폴리펩티드를 발현하는 단계;
 - c) 상기 복수의 바이러스를 이온 농도가 다른 2 이상의 조건 하에서 항원과 접촉시키는 단계;
 - d) 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 바이러스의 계군을 상기 라이브러리로부터 분획하는 단계;
 - e) d) 단계에서 분획된 바이러스의 계군으로부터 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 바이러스를 단리하는 단계; 및
 - f) 단리시킨 바이러스로부터 폴리뉴클레오티드를 단리하는 단계를 포함하는 방법.
- [0087] [61] [60]에 있어서, 추가적으로 상기 c) 및 d) 단계를 적어도 1회 반복하는 방법.
- [0088] [62] [59] 내지 [61] 중 어느 하나에 있어서, 이온 농도가 칼슘 이온 농도인 방법.

- [0089] [63] [62]에 있어서, 저칼슘 농도의 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성이 고칼슘 농도의 조건 하에서의 결합 활성보다 낮은 항원 결합 분자를 선택하는 방법.
- [0090] [64] [63]에 있어서, 저칼슘 농도 조건이 $0.1 \mu M \sim 30 \mu M$ 인 방법,
- [0091] [65] [63] 또는 [64]에 있어서, 고칼슘 농도 조건이 $100 \mu M \sim 10 mM$ 인 방법,
- [0092] [66] [59] 내지 [61] 중 어느 하나에 있어서, 이온 농도 조건이 pH 조건인 방법,
- [0093] [67] [66]에 있어서, pH 산성 영역 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성이 pH 중성 영역 조건 하에서의 활성보다 낮은 항원 결합 분자를 선택하는 방법,
- [0094] [68] [66]에 있어서, pH 산성 영역 조건이 pH $4.0 \sim 6.5$ 인 방법,
- [0095] [69] [67] 또는 [68]에 있어서, pH 중성 영역 조건이 pH $6.7 \sim 10.0$ 인 방법,
- [0096] [70] 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자의 제조방법으로서, 상기 방법은:
- a) [1] 내지 [43] 중 어느 하나에 기재되는 서로 서열이 다른 항원 결합 분자 또는 [44] 또는 [45]에 기재되는 서로 서열이 다른 융합 폴리펩티드를 각각 부호화하는 복수의 폴리뉴클레오티드를 작용 가능하게 연결된 상태로 각각 포함하는 복수의 복제 가능한 발현 벡터를 포함하는 라이브러리를 제조하는 단계;
 - b) 상기 라이브러리에 포함되는 각각의 발현 벡터로 감염된 복수의 바이러스의 표면에 상기 폴리뉴클레오티드에 의해 부호화되는 상기 서로 서열이 다른 항원 결합 분자 또는 융합 폴리펩티드를 발현하는 단계;
 - c) 상기 복수의 바이러스를 이온 농도가 다른 2 이상의 조건 하에서 항원과 접촉시키는 단계;
 - d) 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 바이러스의 계균을 상기 라이브러리로부터 분획하는 단계;
 - e) d) 단계에서 분획시킨 바이러스의 집단으로부터 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 바이러스를 단리하는 단계;
 - f) 단리시킨 바이러스로부터 폴리뉴클레오티드를 단리하는 단계;
 - g) 단리시킨 폴리뉴클레오티드가 작용 가능하게 연결된 삽입체(insert)를 갖는 벡터로 감염된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및
 - h) g) 단계에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 분자를 회수하는 단계를 포함하는 제조방법.
- [0105] [71] 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자의 제조방법으로서, 상기 방법은:
- a) [1] 내지 [43] 중 어느 하나에 기재되는 서로 서열이 다른 항원 결합 분자 또는 [44] 또는 [45]에 기재되는 서로 서열이 다른 융합 폴리펩티드를 각각 부호화하는 복수의 폴리뉴클레오티드를 작용 가능하게 연결된 상태로 각각 포함하는 복수의 복제 가능한 발현 벡터를 포함하는 라이브러리를 제조하는 단계;
 - b) 상기 라이브러리에 포함되는 각각의 발현 벡터로 감염된 복수의 바이러스의 표면에 상기 폴리뉴클레오티드에 의해 부호화된 상기 서로 서열이 다른 항원 결합 분자 또는 융합 폴리펩티드를 발현하는 단계;
 - c) 상기 복수의 바이러스를 이온 농도가 다른 2 이상의 조건 하에서 항원과 접촉시키는 단계;
 - d) 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 바이러스의 계균을 상기 라이브러리로부터 분획하는 단계;
 - e) d) 단계에서 분획시킨 바이러스의 계균으로부터 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 바이러스를 단리하는 단계;
 - f) 단리시킨 바이러스로부터 폴리뉴클레오티드를 단리하는 단계;
 - g) 단리시킨 폴리뉴클레오티드를 프레임에서 항체 정상 영역을 부호화하는 폴리뉴클레오티드와 연결하는 단계;
 - h) g) 단계에서 연결시킨 폴리뉴클레오티드의 작용 가능하게 연결된 삽입체를 갖는 벡터로 감염된 숙주 세포를

배양하는 단계; 및

[0114] i) h) 단계에서 배양된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 분자를 회수하는 단계를 포함하는 제조방법.

[0115] [72] [70] 또는 [71]에 있어서, 추가적으로 상기 c) 및 d) 단계를 적어도 1회 반복하는 제조방법.

[0116] [73] [70] 내지 [72] 중 어느 하나에 있어서, 이온 농도가 칼슘 이온 농도인 제조방법.

[0117] [74] [73]에 있어서, 저칼슘 농도의 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성이 고칼슘 농도의 조건 하에서의 결합 활성보다 낮은 항원 결합 분자를 선택하는 제조방법.

[0118] [75] [74]에 있어서, 저칼슘 농도의 조건이 $0.1 \mu M$ ~ $30 \mu M$ 인 제조방법.

[0119] [76] [74] 또는 [75]에 있어서, 고칼슘 농도의 조건이 $100 \mu M$ ~ $10 mM$ 인 제조방법.

[0120] [77] [70] 내지 [72] 중 어느 하나에 있어서, 이온 농도의 조건이 pH의 조건인 제조방법.

[0121] [78] [77]에 있어서, pH 산성 영역 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성이 pH 중성 영역 조건 하에서의 결합 활성보다 낮은 항원 결합 분자를 선택하는 제조방법.

[0122] [79] [78]에 있어서, pH 산성 영역 조건이 pH4.0~6.5인 제조방법.

[0123] [80] [78] 또는 [79]에 있어서, pH 중성 영역 조건이 pH6.7~10.0인 제조방법.

[0124] [81] [70] 내지 [80] 중 어느 하나에 기재된 제조방법에 의해서 제조된 항원 결합 분자.

[0125] [82] [81]에 기재된 항원 결합 분자 또는 그 변이형(modified form)을 포함하는 의약 조성물을 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0126] 도 1은 pH 의존적으로 항원에 결합하는 항체 유전자 라이브러리가 도입된 대장균으로부터 단리된 132 클론의 서열 정보의 아미노산 분포(Library로 표시됨)와 디자인된 아미노산 분포(Design으로 표시됨)의 관계를 나타낸 그래프이다. 가로축은 Kabat 넘버링으로 정의되는 아미노산의 부위를 나타낸다. 세로축은 아미노산의 분포 비율을 나타낸다.

도 2는 항 IL-6R 항체(토실리주맵), 6RpH#01 항체, 6RpH#02 항체, 및 6RpH#03 항체의 pH7.4에서의 센서그램을 나타낸다. 가로축은 시간, 세로축은 RU 값을 나타낸다.

도 3은 항 IL-6R 항체(토실리주맵), 6RpH#01 항체, 6RpH#02 항체, 및 6RpH#03 항체의 pH6.0에서의 센서그램을 나타낸다. 가로축은 시간, 세로축은 RU값을 나타낸다.

도 4a는 pH 의존적 결합 항체의 혈장 중(pH7.4)과 엔도솜 내(pH6.0)의 항원에의 상호 작용의 패턴을 나타낸 도면이다.

도 4b는 칼슘 의존적 결합 항체의 혈장 중(Ca^{2+} 2 mM)과 엔도솜 내(Ca^{2+} 3 μM)의 항원에의 상호 작용의 패턴을 나타낸 도면이다.

도 4c는 pH 및 칼슘 의존적 결합 항체의 혈장 중(Ca^{2+} 2 mM)과 엔도솜 내(Ca^{2+} 3 μM)의 항원에의 상호 작용의 패턴을 나타낸 도면이다.

도 5는 인간 Vk5-2 서열을 포함하는 항체와 인간 Vk5-2 서열 중의 당쇄 부가 서열이 변이된 hVk5-2_L65 서열을 포함하는 항체의 이온 교환 크로마토그램이다. 실선은 인간 Vk5-2 서열을 포함하는 항체(중쇄: CIM_H, 서열 번호: 4 및 경쇄: hVk5-2, 서열 번호: 1에 서열 번호: 26이 융합된 것)의 크로마토그램, 과선은 hVk5-2_L65 서열을 갖는 항체(중쇄: CIM_H(서열 번호: 4), 경쇄: hVk5-2_L65(서열 번호: 5))의 크로마토그램을 나타낸다.

도 6은 LfVkl_Ca 서열을 포함하는 항체(중쇄: GC_H, 서열 번호: 48 및 경쇄: LfVkl_Ca, 서열 번호: 43)와 LfVkl_Ca 서열 중의 Asp (D) 잔기가 Ala (A) 잔기로 변이된 서열을 포함한 항체의 5°C 보존 후(실선) 또는 50°C 보존 후(점선)의 이온 교환 크로마토그램이다. 각각 5°C 보존 후의 이온 교환 크로마토그램의 가장 높은 피크를 메인 피크로 해서 메인 피크에서 y축 정규화한 도면이다.

도 7은 LfVkl_Ca 서열을 포함하는 항체(중쇄: GC_H, 서열 번호: 48 및 경쇄: LfVkl_Ca, 서열 번호: 43)와

LfV_k1_Ca 서열 중의 30위치(Kabat 넘버링)의 Asp (D) 잔기가 Ser (S) 잔기로 변이된 LfV_k1_Ca6 서열(중쇄: GC_H, 서열 번호: 48 및 경쇄: LfV_k1_Ca6, 서열 번호: 49)을 포함한 항체의 5°C 보존 후(실선) 또는 50°C 보존 후(점선)의 이온 교환 크로마토그램이다. 각각 5°C 보존 후의 이온 교환 크로마토그램의 가장 높은 피크를 메인 피크로 해서 메인 피크에서 y축 정규화한 도면이다.

도 8은 Ca 의존적으로 항원에 결합하는 항체 유전자 라이브러리가 도입된 대장균으로부터 단리된 290 클론의 서열 정보의 아미노산 분포(Library로 표시됨)와 디자인된 아미노산 분포(Design으로 표시됨)의 관계를 나타낸 그래프이다. 가로축은 Kabat 넘버링으로 정의되는 아미노산의 부위를 나타낸다. 세로축은 아미노산의 분포 비율을 나타낸다.

도 9는 고칼슘 이온 농도 조건(1.2 mM) 하에서의 항 IL-6R 항체(토실리주맙), 6RC1IgG_010 항체, 6RC1IgG_012 항체, 및 6RC1IgG_019 항체의 센서그램을 나타낸다. 가로축은 시간, 세로축은 RU 값을 나타낸다.

도 10은 저칼슘 이온 농도 조건(3 μM) 하에서의 항 IL-6R 항체(토실리주맙), 6RC1IgG_010 항체, 6RC1IgG_012 항체, 및 6RC1IgG_019 항체의 센서그램을 나타낸다. 가로축은 시간, 세로축은 RU값을 나타낸다.

도 11은 X선 결정 구조 해석으로 결정된 6RL#9 항체의 Fab 분절의 중쇄 CDR3의 구조를 나타낸다. 도 11(i)은 칼슘 이온이 존재하는 결정화 조건 하에서 얻어진 결정 구조의 중쇄 CDR3, 도 11(ii)은 칼슘 이온이 존재하지 않는 결정화 조건 하에서 얻어진 결정 구조의 중쇄 CDR3을 나타낸 도면이다.

도 12는 Biacore를 사용한 항 인간 IgA 항체와 Ca²⁺ 1.2 mM 및 Ca²⁺ 3 μM에서의 인간 IgA에의 상호 작용을 나타낸 센서그램을 나타낸 도면이다.

도 13은 ELISA법을 사용한 항 인간 글리피칸3 항체와 Ca²⁺ 1.2 mM 및 Ca²⁺ 3 μM에서의 재조합형의 인간 글리피칸3에의 상호 작용을 나타낸 도면이다.

도 14는 Biacore를 사용한 항 마우스 IgA 항체와 pH7.4 및 pH5.8에서의 마우스 IgA에의 상호 작용을 나타낸 센서그램을 나타낸 도면이다. 실선은 pH7.4, 파선은 pH5.8의 조건을 나타낸다.

도 15는 Biacore를 사용한 항 인간 HMGB1 항체와 pH7.4 및 pH5.8에서의 인간 HMGB1에의 상호 작용을 나타낸 센서그램을 나타낸 도면이다. 실선은 pH7.4, 파선은 pH5.8의 조건을 나타낸다.

도 16은 H54/L28-IgG1 항체, FH4-IgG1 항체, 및 6RL#9-IgG1 항체의 정상 마우스의 혈장 중의 항체 농도의 변화를 나타낸 도면이다.

도 17은 H54/L28-IgG1 항체, FH4-IgG1 항체, 또는 6RL#9-IgG1 항체가 투여된 정상 마우스의 혈장 중의 가용형 인간 IL-6 수용체(hsIL-6R)의 농도 변화를 나타낸 도면이다.

도 18은 H54/L28-N434W 항체, FH4-N434W 항체, 및 6RL#9-N434W 항체의 정상 마우스의 혈장 중의 항체 농도의 변화를 나타낸 도면이다.

도 19는 H54/L28-N434W 항체, FH4-N434W 항체, 및 6RL#9-N434W 항체가 투여된 정상 마우스의 혈장 중의 가용형 인간 IL-6 수용체(hsIL-6R)의 농도 변화를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0127] 본 발명의 개시에 의해서 이온 농도 등의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 서로 서열이 다른 복수의 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리가 제공된다. 또한, 본 발명의 개시에 의해서 금속 이온 농도 및/또는 수소 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 서로 서열이 다른 복수의 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리의 신규한 체계적인 제조방법이 제공된다. 이러한 라이브러리는, 예를 들면 금속 이온 농도 및/또는 수소 이온 농도의 조건에 따라 바람직한 활성, 예를 들면 결합 친화성 및 결합 활성이 있는 합성의 항원 결합 분자의 클론을 선택 및/또는 검사하는데 도움이 되고, 조합 라이브러리로서 사용될 수 있다.

[0128] 이들 라이브러리는 다종 다양한 대상 항원 중 어느 하나와 상호 작용할 수 있는 항원 결합 분자의 폴리펩티드의 서열을 확인하는데 유용하다. 예를 들면, 파지 디스플레이로서 발현하는 본 발명의 다양화된 항원 결합 분자의 폴리펩티드를 포함하는 라이브러리는 목적으로 하는 항원 결합 분자의 선택 및/또는 검사에 특히 유용하고, 또한 이를 위한 효율적인 높은 처리율의 자동화 가능한 시스템이 본 발명에 의해서 제공된다. 본 발명의 방법에

따르면, 대상 항원에 대해서 조건 의존적으로 결합하는 항원 결합 분자를 제공할 수 있다. 또한, 본 발명에 의해서 상기 항원 결합 분자를 활성 성분으로서 포함하는 의약 조성물이 제공된다.

[0129] 정의

[0130] 아미노산

본 명세서에 있어서, 예를 들면 Ala/A, Leu/L, Arg/R, Lys/K, Asn/N, Met/M, Asp/D, Phe/F, Cys/C, Pro/P, Gln/Q, Ser/S, Glu/E, Thr/T, Gly/G, Trp/W, His/H, Tyr/Y, Ile/I, 및 Val/V로 나타낸 바와 같이, 아미노산은 1문자 코드 또는 3문자 코드, 또는 그 모두로 표기되어 있다.

[0132] EU 넘버링 및 Kabat 넘버링

본 발명에서 사용된 방법에 의하면, 항체의 CDR과 FR에 할당된 아미노산 위치는 Kabat에 따라서 규정된다 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, Md., 1987년 및 1991년). 본 명세서에 있어서, 항원 결합 분자가 항체 또는 항원 결합 분절인 경우, 가변 영역의 아미노산은 Kabat 넘버링에 따르고 고정 영역의 아미노산은 Kabat의 아미노산 위치에 준한 EU 넘버링에 따라서 표시된다.

[0134] 아미노산의 변이

항원 결합 분자의 아미노산 서열 중의 아미노산은 부위 특이적 변이 유발법(Kunkel 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1985) 82, 488-492))이나 Overlap extension PCR 등의 공지의 방법이 적절하게 채용됨으로써 변이될 수 있다. 또한, 천연의 아미노산 이외의 아미노산으로 치환되는 아미노산의 변이방법으로서 복수의 공지의 방법도 또한 채용될 수 있다(Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006) 35, 225-249; 및 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (11), 6353-6357). 예를 들면, 종결 코돈인 UAG 코돈(앰버 코돈)에 상보적인 호박 억제자 tRNA와 비천연 아미노산이 결합된 tRNA가 포함된 무세포 번역계 시스템(Clover Direct(Protein Express, an R&D oriented company)) 등도 바람직하게 사용된다. 또한, 아미노산의 변이를 나타낸 표현으로서 특정한 위치를 나타낸 숫자 다음에 변이 전과 변이 후의 아미노산의 단일 문자 코드를 사용한 표현이 적절하게 사용될 수 있다. 예를 들면, 항체 정상 영역에 포함되는 Fc영역에 아미노산의 치환을 첨가할 때에 사용되는 P238D라고 하는 변이는 EU 넘버링으로 정의되는 238위치의 Pro의 Asp에의 치환을 나타낸다. 즉, 숫자는 EU 넘버링으로 정의되는 아미노산의 위치를 나타내고; 그 전에 기재되는 아미노산의 단일 문자 코드는 치환 전의 아미노산; 그 후에 기재되는 아미노산의 단일 문자 코드는 치환 후의 아미노산을 나타낸다.

[0136] 및/또는

본 명세서에 있어서, "및/또는"의 용어의 의미는 "및"과 "또는"이 적절하게 조합된 모든 조합을 포함한다. 구체적으로는, 예를 들면 "33위치, 55위치, 및/또는 96위치의 아미노산이 치환된"이란 이하의 아미노산의 변이의 버전이 포함되고;

[0138] (a) 33위치, (b) 55위치, (c) 96위치, (d) 33위치 및 55위치, (e) 33위치 및 96위치, (f) 55위치 및 96위치, 및 (g) 33위치, 55위치 및 96위치.

[0139] 항원 결합 분자

본 명세서에 있어서, 용어 "항원 결합 분자"는 항원 결합 도메인을 포함한 분자를 나타낸 가장 넓은 의미로서 사용되고 있고, 구체적으로는 그들이 항원에 대한 결합 활성을 나타내는 한, 다양한 분자형을 포함한다. 예를 들면, 항원 결합 도메인이 FcRn 결합 도메인과 결합한 분자의 예로서 항체를 들 수 있다. 항체에는 단일의 모노클로나ль 항체(작용제 및 길항제 항체를 포함), 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체 등이 포함될 수 있다. 또한 항체의 분절로서 사용될 경우에는 항원 결합 도메인 및 항원 결합 분절(예를 들면, Fab, F(ab')₂, scFv, 및 Fv)을 바람직하게 들 수 있다. 기존의 안정한 α/β 배럴 단백질 구조 등의 입체 구조가 스캐폴드(scaffold; 토대)로서 사용되고, 그 일부분의 구조만이 항원 결합 도메인의 구축을 위해 라이브러리화된 스캐폴드 분자도 본 발명의 항원 결합 분자에 포함될 수 있다.

[0141] 본 명세서에 있어서, "항원 결합 도메인"은 목적으로 하는 항원에 결합하는 한 어떠한 구조의 도메인도 사용될 수 있다. 이러한 도메인의 예로서, 예를 들면 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역, 생체 내에 존재하는 세포막 단백질인 Avimer에 포함되는 35아미노산 정도의 A도메인이라 불리는 모듈(WO2004044011, 및 WO2005040229), 세포막에 발현되는 당 단백질인 피브로넥틴(fibronectin) 중의 단백질에 결합하는 도메인인 10Fn3 도메인을 포함한 Adnectin(WO2002032925), ProteinA의 58아미노산으로 이루어지는 3개의 나선 뮤음(bundle)을 구성하는 IgG 결

합 도메인을 스캐폴드라 하는 Affibody(WO1995001937), 33아미노산 잔기를 포함한 턴과 2개의 역병행 나선, 및 루프의 서브유닛이 반복적으로 겹겹이 쌓인 구조를 갖는 안키린 반복(ankyrin repeat: AR)의 분자 표면에 노출되는 영역인 DARPins(Designed Ankyrin Repeat proteins)(WO2002020565), 호중구 겔라티나아제 결합 리포칼린(neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL)) 등의 리포칼린 분자에서 고도로 보존된 8개의 역병행 스트랜드가 중앙 방향으로 뒤틀린 배럴 구조의 한쪽을 지지하는 4개의 루프 영역인 Anticalin(WO2003029462), 및 칠성장어, 곱장어 등 무약류의 획득 면역 시스템으로서 면역 글로불린의 구조를 갖지 않는 가변성 림프구 수용체(variable lymphocyte receptor(VLR))의 류신 잔기에 풍부한 반복(leucine-rich-repeat(LRR)) 모듈이 반복적으로 겹겹이 쌓인 말발굽형 구조의 내부 병행형 시트 구조의 오목 영역(WO2008016854)을 바람직하게 들 수 있다. 본 발명의 항원 결합 도메인의 바람직한 예로서 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 포함한 항원 결합 도메인을 들 수 있다.

[0142] 본 명세서에 있어서, "항체"란 천연 또는 부분적 또는 완전 합성에 의해 제조된 면역 글로불린을 말한다. 항체는 그것이 천연으로 존재하는 혈장이나 혈청 등의 천연 자원이나 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 배양 상청으로부터 단리될 수 있고, 또는 유전자 재조합 등의 방법을 사용함으로써 부분적으로 또는 완전하게 합성될 수 있다. 항체의 예로서는 면역 글로불린의 아이소타이프 및 그들 아이소타이프의 서브클래스를 바람직하게 들 수 있다. 인간의 면역 글로불린으로서 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, 및 IgM의 9종류의 클래스(아이소타이프)가 알려져 있다. 본 발명의 항체에는 이들 아이소타이프 중 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4가 포함될 수 있다. 인간 IgG1, 인간 IgG2, 인간 IgG3, 및 인간 IgG4 정상 영역으로서는 유전자 다형에 의한 복수의 알로타이프 서열이 Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242에 기재되어 있지만, 본 발명에 있어서는 그 어느 것이어도 좋다. 특히, 인간 IgG1의 서열로서는 EU 넘버링으로 정의한 356~358위치의 아미노산 서열이 DEL이어도 EEM이어도 좋다. 인간 IgK(Kappa) 정상 영역과 인간 IgL7(Lambda) 정상 영역으로서는 유전자 다형에 의한 복수의 알로타이프 서열이 Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242에 기재되어 있지만, 본 발명에 있어서는 그 어느 것이어도 좋다. 원하는 결합 활성을 갖는 항체를 제조하는 방법은 당업자에게 알려져 있다.

[0143] 항체는 공지의 수단을 사용해서 폴리클로널 또는 모노클로널 항체로서 취득 될 수 있다. 모노클로널 항체로서는 포유 동물 유래의 모노클로널 항체가 바람직하게 제조될 수 있다. 포유 동물 유래의 모노클로널 항체로는 하이브리도마에 의해 생산되는 것, 및 유전자 공학적 방법에 의해 항체 유전자를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환된 숙주 세포에 의해서 생산되는 것 등이 포함된다.

[0144] 모노클로널 항체 생산 하이브리도마는 공지 기술을 사용함으로써 제조될 수 있다. 즉, 감작 항원에 의해서 통상의 면역방법에 따라서 포유 동물이 면역된다. 얻어지는 면역 세포가 통상의 세포 융합법에 의해서 공지의 친세포와 융합된다. 이어서, 통상의 검사법에 의해서 모노클로널 항체 생산 세포를 검사함으로써 해당 감작 항원에 대한 항체를 생산하는 하이브리도마를 선택할 수 있다.

[0145] 상기 감작 항원으로 면역된 포유 동물로서는 특정한 동물에 한정되는 것은 아니지만, 세포 융합에 사용되는 친세포와의 적합성을 고려해서 선택하는 것이 바람직하다. 일반적으로는 설치류의 동물, 예를 들면 마우스, 래트, 햄스터, 또는 토끼, 원숭이 등이 바람직하게 사용된다.

[0146] 공지의 방법에 따라서 상기의 동물이 감작 항원에 의해 면역된다. 예를 들면, 일반적인 방법으로서 감작 항원이 포유 동물의 복강 내 또는 피하에 주사에 의해서 투여됨으로써 면역이 실시된다. 구체적으로는, PBS(Phosphate-Buffered Saline)나 생리 식염수 등으로 적당한 회석 배율로 회석된 감작 항원이 원하는 통상의 애주번트, 예를 들면 프로인트 완전 애주번트와 혼합되고, 유화된 후에 상기 감작 항원이 포유 동물에 4~21일마다 수회 투여된다. 또한, 감작 항원의 면역시에는 적당한 담체가 사용될 수 있다. 특히 분자량이 작은 부분 펩티드가 감작 항원으로서 사용될 경우에는 알부민, 또는 키홀 립펫 헤모사이아닌 등의 담체 단백질과 결합한 상기 감작 항원 펩티드를 면역하는 것이 바람직한 경우도 있다.

[0147] 또한, 원하는 폴리펩티드에 대한 항체를 생산하는 하이브리도마는 DNA 면역을 사용하여 이하와 같이 해서 제조될 수 있다. DNA 면역이란 면역 동물 중에서 항원 단백질을 부호화하는 유전자가 발현될 수 있는 형태로 구축된 벡터 DNA가 투여된 해당 면역 동물 중에서 감작 항원이 해당 면역 동물의 생체 내에서 발현됨으로써 면역 자극이 주어지는 면역방법이다. 단백질 항원이 면역 동물에 투여되는 일반적인 면역방법과 비교해서 DNA 면역에는 다음과 같은 우위성이 기대된다.

[0148] -항원이 막 단백질인 경우, 그 구조를 유지해서 면역 자극이 주어질 수 있고;

- [0149] -면역 항원을 정제할 필요가 없다.
- [0150] 상기 면역 세포와 융합된 세포로서 포유 동물의 미엘로마 세포가 사용된다. 미엘로마 세포는 검사를 위한 적당한 선택 마커를 구비하는 것이 바람직하다. 선택 마커는 특정한 배양 조건 하에서 생존할 수 있는(또는 할 수 없는) 형질을 가리킨다. 선택 마커에는 히포크산틴-구아닌-포스포리보실트랜스페라아제 결손(이하 HGPRT 결손으로 기재함) 또는 티미딘 키나아제 결손(이하 TK 결손으로 기재함) 등이 알려져 있다. HGPRT나 TK의 결손을 갖는 세포는 히포크산틴-아미노프테린-티미딘 감수성(이하 HAT 감수성으로 기재함)을 갖는다. HAT 감수성의 세포는 HAT 선택 배지 중에서 DNA 합성을 행하지 못하고 사멸하지만, 정상인 세포와 융합하면 정상 세포의 샐비지 회로를 이용해서 DNA의 합성을 계속할 수 있기 때문에 HAT 선택 배지 중에서도 증식하게 된다.
- [0151] HGPRT 결손이나 TK 결손 세포는 각각 6티오구아닌, 8아자구아닌(이하 8AG로 기재함), 또는 5'브로모데옥시우리딘을 포함한 배지에서 선택될 수 있다. 이들 퍼리미딘 아날로그를 DNA 중에 도입한 정상적인 세포는 사멸한다. 한편, 이들 퍼리미딘 아날로그를 도입하지 않은 이들 효소를 결손한 세포는 선택 배지 중에서 생존할 수 있다. 이 밖에, G418 내성이라 불리는 선택 마커는 네오마이신 내성 유전자에 의해서 2-데옥시스트렙타민계 항생 물질(젠타마이신 유사체)에 대한 내성을 준다. 세포 융합에 바람직한 다양한 미엘로마 세포가 알려져 있다.
- [0152] 이러한 미엘로마 세포로서, 예를 들면 P3(P3x63Ag8.653)(J. Immunol. (1979) 123 (4), 1548-1550), P3x63Ag8U.1(Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7), NS-1(C. Eur. J. Immunol. (1976) 6 (7), 511-519), MPC-11(Cell (1976) 8 (3), 405-415), SP2/0(Nature (1978) 276 (5685), 269-270), FO(J. Immunol. Methods (1980) 35 (1-2), 1-21), S194/5.XX0.BU.1(J. Exp. Med. (1978) 148 (1), 313-323), 또는 R210(Nature (1979) 277 (5692), 131-133) 등이 바람직하게 사용될 수 있다.
- [0153] 기본적으로는 공지된 방법, 예를 들면 퀼러와 밀스테인 등의 방법(Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 등에 준해서 상기 면역 세포와 미엘로마 세포의 세포 융합이 행해진다.
- [0154] 보다 구체적으로는, 예를 들면 세포 융합 프로모터의 존재 하에서 통상의 영양 배양액 중에서 상기 세포 융합이 실시될 수 있다. 융합 프로모터로서는, 예를 들면 폴리에틸렌글리콜(PEG), 또는 일본 혈액 응집 바이러스(HVJ) 등이 사용되고, 융합 효율을 높이기 위해서 원하는 디메틸су폴시드 등의 보조제가 더 첨가되어 사용된다.
- [0155] 면역 세포와 미엘로마 세포의 사용 비율은 임의로 설정될 수 있다. 예를 들면, 미엘로마 세포에 대해서 면역 세포를 1~10배로 하는 것이 바람직하다. 상기 세포 융합에 사용되는 배양액으로서는, 예를 들면 상기 미엘로마 세포주의 증식에 바람직한 RPMI1640 배양액, 또는 MEM 배양액, 그 외에 이 종의 세포 배양에 사용되는 통상의 배양액이 사용되고, 우테아 혈청(FCS) 등의 혈청 보액(補液)이 바람직하게 더 첨가될 수 있다.
- [0156] 세포 융합은 상기 면역 세포와 미엘로마 세포의 소정량을 상기 배양액 중에서 충분히 혼합하고, 미리 37°C 정도로 가온된 PEG 용액(예를 들면, 평균 분자량 1000~6000 정도)이 통상적으로 30~60%(w/v)의 농도로 첨가된다. 혼합액이 천천히 혼합됨으로써 원하는 융합 세포(하이브리도마)가 형성된다. 이어서, 상기에 예를 든 적당한 배양액이 순서대로 첨가되고, 원심해서 상청을 제거하는 작업을 반복함으로써 하이브리도마의 생육에 바람직하지 않은 세포 융합제 등이 제거될 수 있다.
- [0157] 이렇게 해서 얻어진 하이브리도마는 통상의 선택 배양액, 예를 들면 HAT 배양액(히포크산틴, 아미노프테린, 및 티미딘을 포함한 배양액)에서 배양함으로써 선택될 수 있다. 원하는 하이브리도마 이외의 세포(비융합 세포)가 사멸하는데 충분한 시간(통상적으로, 관련된 충분한 시간은 며칠에서 몇주 사이임)에 상기 HAT 배양액을 사용한 배양이 계속될 수 있다. 이어서, 통상의 한계 희석법에 의해서 원하는 항체를 생산하는 하이브리도마의 검사 및 단일 복제가 실시된다.
- [0158] 이렇게 해서 얻어진 하이브리도마는 세포 융합에 사용된 미엘로마가 갖는 선택 마커에 따른 선택 배양액을 이용함으로써 선택될 수 있다. 예를 들면, HGPRT나 TK의 결손을 갖는 세포는 HAT 배양액(히포크산틴, 아미노프테린, 및 티미딘을 포함하는 배양액)에서 배양함으로써 선택될 수 있다. 즉, HAT 감수성의 미엘로마 세포를 세포 융합에 사용한 경우, HAT 배양액 중에서 정상 세포와의 세포 융합에 성공한 세포가 선택적으로 증식할 수 있다. 원하는 하이브리도마 이외의 세포(비융합 세포)가 사멸하는데 충분한 시간, 상기 HAT 배양액을 사용한 배양이 계속된다. 구체적으로는, 일반적으로 며칠에서 몇주 사이의 배양에 따라서 원하는 하이브리도마가 선택될 수 있다. 이어서, 통상의 한계 희석법에 의해서 원하는 항체를 생산하는 하이브리도마의 검사 및 단일 복제가 실시될 수 있다.
- [0159] 원하는 항체의 검사 및 단일 복제가 공지의 항원 항체 반응에 기초해서 검사방법에 의해서 바람직하게 실시될

수 있다. 이러한 모노클로널 항체는, 예를 들면 FACS(fluorescence activated cell sorting)에 의해서 검사될 수 있다. FACS는 형광 항체와 접촉시킨 세포를 레이저광으로 분석하고, 개개의 세포가 일으키는 형광을 측정함으로써 세포 표면에의 항체의 결합을 측정하는 것을 가능하게 하는 시스템이다.

[0160] 또한, 고정화한 항원에 대한 항체의 결합 활성이 ELISA의 원리에 기초해서 평가될 수 있다. 예를 들면, ELISA 플레이트의 웰에 항원이 고정화된다. 하이브리도마의 배양 상청을 웰 내의 항원에 접촉시켜 항원에 결합하는 항체가 검출된다. 모노클로널 항체가 마우스 유래인 경우, 항원에 결합한 항체는 항 마우스 면역 글로불린 항체에 의해서 검출될 수 있다. 이를 검사에 의해서 선택된 항원에 대한 결합능을 갖는 원하는 항체를 생산하는 하이브리도마는 한계 회석법 등에 의해 복제될 수 있다. 이렇게 해서 제조된 모노클로널 항체를 생산하는 하이브리도마는 통상의 배양액 중에서 계대 배양될 수 있다. 또한, 상기 하이브리도마는 액체 질소 중에서 장기간에 걸쳐서 보존될 수 있다.

[0161] 해당 하이브리도마를 통상의 방법에 따라서 배양하고, 그 배양 상청으로부터 원하는 모노클로널 항체가 취득될 수 있다. 또한, 하이브리도마를 이것과 적합성이 있는 포유 동물에 투여해서 증식시키고, 그 복수(腹水)로부터 모노클로널 항체가 취득될 수 있다. 전자의 방법은 고순도의 항체를 얻는데 바람직한 것이다.

[0162] 해당 하이브리도마 등의 항체 생산 세포로부터 복제되는 항체 유전자에 의해서 부호화되는 항체도 바람직하게 이용될 수 있다. 복제한 항체 유전자를 적당한 벡터에 삽입해서 숙주에 도입함으로써 해당 유전자에 의해서 부호화되는 항체가 발현된다. 항체 유전자의 단리와 벡터의 도입, 그리고 숙주 세포의 형질 전환을 위한 방법은, 예를 들면 Vandamme 등에 의해서 이미 확립된다(Eur. J. Biochem. (1990) 192 (3), 767-775). 하기에 설명한 바와 같이, 재조합형 항체의 제조방법도 또한 알려져 있다.

[0163] 예를 들면, 목적하는 항체를 생산하는 하이브리도마 세포로부터 해당 항체의 가변 영역(V영역)을 부호화하는 cDNA가 취득된다. 따라서, 통상적으로 우선 하이브리도마로부터 모든 RNA가 추출된다. 세포로부터 mRNA를 추출하기 위한 방법으로서, 예를 들면 다음과 같은 방법을 이용할 수 있다.

[0164] -구아닌 초원심법(Biochemistry (1979) 18 (24), 5294-5299), 및

[0165] -AGPC법(Anal. Biochem. (1987) 162 (1), 156-159).

[0166] 추출된 mRNA는 mRNA Purification Kit(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) 등을 사용해서 정제될 수 있다. 또한, QuickPrep mRNA Purification Kit(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) 등과 같이 세포로부터 직접 모든 mRNA를 추출하기 위한 키트도 시판되어 있다. 이러한 키트를 사용하여 하이브리도마로부터 mRNA가 취득될 수 있다. 얻어진 mRNA로부터 역전사 효소를 사용하여 항체 V영역을 부호화하는 cDNA가 합성될 수 있다. cDNA는 AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit(Seikagaku Corp.) 등에 의해 합성될 수 있다. 또한, cDNA의 합성 및 증폭을 위해서 SMART RACE cDNA 증폭 키트(Clontech Laboratories, Inc.) 및 PCR을 사용한 5'-RACE법(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85 (23), 8998-9002; 및 Nucleic Acids Res. (1989) 17 (8), 2919-2932)이 적절하게 이용될 수 있다. 또한, 이러한 cDNA의 합성 과정에서, cDNA의 양말단에 후술하는 적절한 제한 효소 사이트가 도입될 수 있다.

[0167] 얻어진 PCR 산물로부터 목적으로 하는 cDNA 분절이 정제되고, 이어서 벡터 DNA와 연결된다. 이와 같이 재조합형 벡터가 제조되고, 대장균 등에 도입된 콜로니가 선택된 후에 상기 콜로니를 형성한 대장균으로부터 원하는 재조합형 벡터가 조제될 수 있다. 그리고, 상기 재조합형 벡터가 목적으로 하는 cDNA의 염기 서열을 가지고 있는지 여부에 대해서 공지의 방법, 예를 들면 디데옥시뉴클레오티드 연쇄 종결법 등에 의해 확인된다.

[0168] 가변 영역을 부호화하는 유전자를 취득하기 위해서는 가변 영역 유전자 증폭용의 프라이머를 사용한 5'-RACE법을 이용하는 것이 간편하다. 우선, 하이브리도마 세포로부터 추출된 RNA를 주형으로서 cDNA가 합성되어 5'-RACE cDNA 라이브러리가 얻어진다. 5'-RACE cDNA 라이브러리의 합성에는 SMART RACE cDNA 증폭 키트 등의 시판 키트가 적절하게 사용된다.

[0169] 얻어진 5'-RACE cDNA 라이브러리를 주형으로서 PCR법에 의해서 항체 유전자가 증폭된다. 공지의 항체 유전자 서열을 바탕으로 마우스 항체 유전자 증폭용의 프라이머가 디자인될 수 있다. 이를 프라이머는 면역 글로불린의 서브클래스마다 다른 염기 서열이다. 따라서, 서브클래스는 미리 Iso Strip 마우스 모노클로널 항체 아이소타이핑 키트(Roche Diagnostics K.K.) 등의 시판 키트를 사용해서 결정하는 것이 바람직하다.

[0170] 구체적으로는, 예를 들면 마우스 IgG를 부호화하는 유전자의 취득을 목적으로 할 경우에는 중쇄로서 γ 1, γ 2a, γ 2b, 및 γ 3, 경쇄로서 κ 쇄와 λ 쇄를 부호화하는 유전자의 증폭이 가능한 프라이머가 사용될 수 있다. IgG의

가변 영역 유전자를 증폭하기 위해서는 일반적으로 3'측의 프라이머에는 가변 영역에 가까운 정상 영역에 상당하는 부분에 어닐링되는 프라이머가 사용된다. 한편, 5'측의 프라이머로는 5' RACE cDNA 라이브러리 제조 키트에 부속되는 프라이머가 사용된다.

[0171] 이렇게 증폭된 PCR 산물을 이용해서 중쇄와 경쇄의 조합으로 이루어지는 면역 글로불린이 재구성될 수 있다. 재구성된 면역 글로불린의 항원에 대한 결합 활성을 지표로서 원하는 항체가 검사될 수 있다. 예를 들면, 항원에 대한 항체의 취득을 목적으로 할 경우, 항체의 항원에의 결합은 특이적인 것이 더욱 바람직하다. 항원에 결합하는 항체는, 예를 들면 다음과 같이 해서 검사될 수 있다;

(1) 하이브리도마로부터 얻어진 cDNA에 의해서 부호화되는 V 영역을 포함하는 항체를 항원에 접촉시키는 공정;

(2) 항원과 항체의 결합을 검출하는 공정; 및

(3) 항원에 결합하는 항체를 선택하는 공정.

[0175] 항체와 항원의 결합을 검출하는 방법은 알려져 있다. 구체적으로는, 우선 설명한 FCAS나 ELISA 등의 방법에 의해서 항체와 항원의 결합이 검출될 수 있다.

[0176] 목적으로 하는 항체의 V 영역을 부호화하는 cDNA가 얻어진 후에 해당 cDNA의 양말단에 삽입된 제한 효소 사이트를 인식하는 제한 효소에 따라서 상기 cDNA가 소화된다. 바람직한 제한 효소는 항체 유전자를 구성하는 염기 서열에 출현하는 빈도가 낮은 염기 서열을 인식해서 소화한다. 또한, 1카피의 소화 분절을 벡터에 올바른 방향으로 삽입하기 위해서는 부착 말단을 주는 제한 효소의 삽입이 바람직하다. 상기와 같이 소화된 항체의 V 영역을 부호화하는 cDNA를 적당한 발현 벡터에 삽입함으로써 항체 발현 벡터가 취득될 수 있다. 이때, 항체 정상 영역(C 영역)을 부호화하는 유전자와 상기 V 영역을 부호화하는 유전자가 프레임에서 융합되어 키메라 항체가 취득된다. 여기에서, 키메라 항체란 정상 영역과 가변 영역의 유래가 다른 것을 말한다. 따라서, 마우스-인간 등의 이종 키메라 항체에 추가해서 인간-인간 동종 키메라 항체도 본 발명에서의 키메라 항체에 포함된다. 미리 정상 영역을 갖는 발현 벡터에 상기 V 영역 유전자를 삽입함으로써 키메라 항체 발현 벡터가 구축될 수 있다. 구체적으로는, 예를 들면 원하는 항체 정상 영역(C 영역)을 부호화하는 DNA를 유지한 발현 벡터의 5'측에 상기 V 영역 유전자를 소화하는 제한 효소의 제한 효소 인식 서열이 적절하게 배치될 수 있다. 같은 조합의 제한 효소로 소화된 양자가 프레임에서 융합됨으로써 키메라 항체 발현 벡터가 구축된다.

[0177] 원하는 항체를 제조하기 위해서, 항체 유전자가 제어 서열과 작용 가능하게 연결되어서 발현 벡터에 포함된다. 항체를 발현하기 위한 제어 서열이란, 예를 들면 개선제나 프로모터를 포함한다. 또한, 발현된 항체가 세포 외에 분비되도록 적절한 신호 서열이 아미노 말단에 부가될 수 있다. 예를 들면, 신호 서열로서 아미노산 서열 MGWSCIILFLVATATGVHS(서열 번호: 13)를 갖는 웨პ티드가 사용되지만, 이 이외에도 적합한 신호 서열이 부가된다. 발현된 폴리펩티드는 신호 서열의 카르복실 말단 부분에서 절단되고, 절단된 폴리펩티드가 성숙 폴리펩티드로서 세포 외에 분비될 수 있다. 이어서, 이 발현 벡터에 의해서 적당한 숙주 세포가 형질 전환됨으로써 원하는 항체를 부호화하는 DNA를 발현하는 재조합형 세포가 취득될 수 있다.

[0178] 항체 유전자의 발현을 위해서, 항체의 중쇄(H쇄) 및 경쇄(L쇄)를 부호화하는 DNA는 각각 다른 발현 벡터에 포함된다. 중쇄와 경쇄가 포함된 벡터에 의해서 동일한 숙주 세포에 동시에 형질 전환(co-transfect)됨으로써 중쇄와 경쇄를 포함한 항체 분자가 발현될 수 있다. 또한, 중쇄 및 경쇄를 부호화하는 DNA가 단일 발현 벡터에 포함됨으로써 숙주 세포가 형질 전환될 수 있다(WO19994011523 참조).

[0179] 단리된 항체 유전자를 적당한 숙주에 도입함으로써 항체를 제조하기 위한 숙주 세포와 발현 벡터의 많은 조합이 알려져 있다. 이를 발현계는 모두 본 발명의 항원 결합 분자를 단리하는데 응용될 수 있다. 진핵 세포가 숙주 세포로서 사용될 경우, 동물 세포, 식물 세포, 또는 진균 세포가 적절하게 사용될 수 있다. 구체적으로는, 동물 세포로서는 다음과 같은 세포가 예시될 수 있다.

(1) 포유류 세포: CHO(차이니즈 햄스터 난소 세포주), COS(원숭이 신장 세포주), 미엘로마(Sp2/0, NS0 등), BHK(베이비 햄스터 신장 세포주), HEK293(세어드 아데노바이러스를 가진 인간 배아의 신장 세포주 (Ad)5 DNA), PER.C6(아데노바이러스 5형(Ad5) E1A 및 E1B 유전자로 형질 전환된 인간 배아의 망막 세포주), HeLa 및 Vero(단백질 사이언스에서 현재 프로토콜, May, 2001, Unit 5.9, Table 5.9.1);

(2) 양서류 세포: 제노푸스 모세포 등; 및

(3) 곤충 세포: sf9, sf21, 및 Tn5 등.

- [0183] 또한, 식물 세포로서는 니코티아나 타바쿰(*Nicotiana tabacum*) 등의 니코티아나속 유래의 세포를 사용한 항체 유전자의 발현계가 알려져 있다. 식물 세포의 형질 전환에 사용되는 칼루스 배양한 세포가 적절하게 사용될 수 있다.
- [0184] 또한 진균 세포로서는 다음과 같은 세포를 사용할 수 있다.
- [0185] -효모: 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) 등의 사카로미세스속, 및 자화 효모 등의 피치아속
- [0186] -사상균: 아스페르길누스 니제르(*Aspergillus niger*) 등의 아스페르길누스속.
- [0187] 또한, 원핵 세포를 사용한 항체 유전자의 발현계도 알려져 있다. 예를 들면, 세균 세포를 사용할 경우, 대장균 (*E. coli*), 고초균 등의 세균 세포가 적절하게 사용될 수 있다. 이들 세포 중에 목적으로 하는 항체 유전자를 포함한 발현 벡터가 형질 전환에 의해서 도입된다. 형질 전환된 세포를 *in vitro*에서 배양함으로써 해당 형질 전환 세포의 배양물로부터 원하는 항체가 취득될 수 있다.
- [0188] 재조합형 항체의 생산에는 상기 숙주 세포에 추가해서 형질 전환 동물도 사용될 수 있다. 즉 원하는 항체를 부호화하는 유전자가 도입된 동물로부터 해당 항체를 얻을 수 있다. 예를 들면, 항체 유전자는 유즙 중에 고유하게 생산되는 단백질을 부호화하는 유전자의 내부에 프레임에서 삽입됨으로써 융합 유전자로서 구축될 수 있다. 유즙 중에 분비되는 단백질로서, 예를 들면 염소 β 카제인 등을 사용할 수 있다. 항체 유전자가 삽입된 융합 유전자를 포함한 DNA 분절은 염소의 배아에 주입되고, 해당 주입된 배아가 암컷의 염소에 도입된다. 배아를 수용한 염소로부터 생기는 형질 전환 염소(또는 그 자손)가 생산하는 유즙에서는 원하는 항체가 유즙 단백질과의 융합 단백질로서 취득될 수 있다. 또한, 형질 전환 염소로부터 생산되는 원하는 항체를 포함한 유즙량을 증가시키기 위해서 호르몬이 형질 전환 염소에 대해서 투여될 수 있다(Bio/Technology (1994), 12 (7), 699-702).
- [0189] 본 명세서에 있어서 기재되는 항원 결합 분자가 인간에 투여될 경우, 해당 분자에서의 항원 결합 도메인으로서 인간에 대한 이종 항원성을 저하시키는 것 등을 목적으로서 인위적으로 변이된 유전자 재조합형 항체 유래의 항원 결합 도메인이 적절하게 채용될 수 있다. 유전자 재조합형 항체에는, 예를 들면 인간화(Humanized) 항체 등이 포함된다. 이들 변이 항체는 공지의 방법을 사용해서 적절하게 제조된다.
- [0190] 본 명세서에 있어서 기재되는 항원 결합 분자에서의 항원 결합 도메인을 제조하기 위해 사용되는 항체의 가변 영역은, 통상적으로 4개의 프레임워크 영역(FR)에 끼워진 3개의 상보성 결정 영역(complementarity-determining region; CDR)으로 구성되어 있다. CDR은 실질적으로 항체의 결합 특이성을 결정하고 있는 영역이다. CDR의 아미노산 서열은 다양성으로 풍부하다. 한편, FR을 구성하는 아미노산 서열은 다른 결합 특이성을 갖는 항체 사이에서도 높은 동일성을 나타내는 경우가 많다. 따라서, 일반적으로 CDR의 이식에 따라서 어떤 항체의 결합 특이성을 다른 항체에 이식할 수 있다고 되어 있다.
- [0191] 인간화 항체는 재구성(reshaped) 인간 항체라고도 불린다. 구체적으로는, 인간 이외의 동물, 예를 들면 마우스 항체의 CDR을 인간 항체에 이식한 인간화 항체 등이 알려져 있다. 인간화 항체를 얻기 위한 일반적인 유전자 재조합형 방법도 알려져 있다. 구체적으로는, 마우스 항체의 CDR을 인간의 FR에 이식하기 위한 방법으로서, 예를 들면 오버랩·신장(Overlap Extension) PCR이 알려져 있다. 오버랩 신장 PCR에 있어서는 인간 항체의 FR을 합성하기 위한 프라이머에 이식해야 할 마우스 항체의 CDR을 부호화하는 염기 서열이 부가된다. 프라이머는 4개의 FR 각각에 대해서 준비된다. 일반적으로, 마우스 CDR의 인간 FR에의 이식에 있어서는 마우스 FR과 동일성이 높은 인간 FR을 선택하는 것이 CDR의 기능 유지에 있어서 유리하다. 즉, 일반적으로 이식해야 할 마우스 CDR에 인접하고 있는 FR의 아미노산 서열과 동일성이 높은 아미노산 서열로 이루어진 인간 FR을 이용하는 것이 바람직하다.
- [0192] 또한, 연결되는 염기 서열은 서로 프레임에서 접속되도록 디자인된다. 각각의 프라이머리에 대해서 인간 FR이 개별로 합성된다. 그 결과, 각 FR에 마우스 CDR을 부호화하는 DNA가 부가된 산물이 얻어진다. 각 산물의 마우스 CDR을 부호화하는 염기 서열은 서로 오버랩되도록 디자인되어 있다. 이어서, 인간 항체 유전자를 주형으로서 합성된 산물의 오버랩된 CDR 부분을 서로 어닐(anneal)시켜서 상보쇄 합성 반응이 행해진다. 이 반응에 의해서, 인간 FR이 마우스 CDR의 서열을 통해서 연결된다.
- [0193] 최종적으로 3개의 CDR과 4개의 FR이 연결된 V 영역 유전자는 그 5' 말단과 3' 말단에 어닐하여 적당한 제한 효소 인식 서열을 부가시킨 프라이머리에 대해서 그 전체 길이가 증폭된다. 상기와 같이 얻어진 DNA와 인간 항체 C 영역을 부호화하는 DNA를 프레임에서 융합되도록 발현 벡터 중에 삽입함으로써 인간형 항체 발현용 벡터가 작성될 수 있다. 해당 내장된 벡터를 숙주에 도입해서 재조합형 세포를 수립한 후에 해당 재조합형 세포를

배양하고, 해당 인간화 항체를 부호화하는 DNA를 발현시킴으로써 해당 인간화 항체가 해당 배양 세포의 배양물 중에 생성된다(EP239400 및 WO1996002576).

[0194] 상기와 같이 제조된 인간화 항체의 항원에의 결합 활성을 정성적 또는 정량적으로 측정하고, 평가함으로써 CDR을 통해서 연결되었을 때에 해당 CDR이 양호한 항원 결합 부위를 형성하도록 인간 항체의 FR이 바람직하게 선택될 수 있다. 필요에 따라, 재구성 인간 항체의 CDR이 적절한 항원 결합 부위를 형성하도록 FR의 아미노산 잔기를 치환할 수도 있다. 예를 들면, 마우스 CDR의 인간 FR에의 이식에 사용된 PCR법을 응용해서 FR에 아미노산 서열의 변이를 도입할 수 있다. 구체적으로는, FR에 어닐링하는 프라이머에 부분적인 염기 서열의 변이를 도입할 수 있다. 이러한 프라이머에 의해서 합성된 FR에는 염기 서열의 변이가 도입된다. 아미노산을 치환한 변이형 항체의 항원에의 결합 활성을 상기 방법으로 측정하여 평가함으로써 원하는 성질을 갖는 변이 FR 서열이 선택될 수 있다(Sato 등, Cancer Res (1993) 53, 851-856).

[0195] 또한, 인간 항체 유전자의 모든 레퍼토리를 갖는 형질 전환 동물(WO1993012227, WO1992003918, WO1994002602, WO1994025585, WO1996034096, 및 WO1996033735 참조)을 면역 동물로서 하여 DNA 면역에 따라 원하는 인간 항체가 취득될 수 있다.

[0196] 또한, 인간 항체 라이브러리를 사용해서 패닝에 의해 인간 항체를 취득하는 기술도 알려져 있다. 예를 들면, 인간 항체의 V 영역이 외가닥 항체(scFv)로서 파지 디스플레이법에 의해 파지의 표면에 발현된다. 항원에 결합하는 scFv를 발현하는 파지가 선택될 수 있다. 선택된 파지의 유전자를 해석함으로써 항원에 결합하는 인간 항체의 V 영역을 부호화하는 DNA 서열이 결정될 수 있다. 항원에 결합하는 scFv의 DNA 서열을 결정한 후, 해당 V 영역 서열을 원하는 인간 항체 C 영역의 서열과 프레임에서 융합시킨 후에 적당한 발현 벡터에 삽입함으로써 발현 벡터가 제조될 수 있다. 해당 발현 벡터를 상기에 언급한 바람직한 발현 세포 중에 도입하고, 해당 인간 항체를 부호화하는 유전자를 발현시킴으로써 해당 인간 항체가 취득된다. 이들 방법은 이미 알려져 있다(WO1992001047, WO1992020791, WO1993006213, WO1993011236, WO1993019172, WO1995001438, 및 WO1995015388 참조).

[0197] 본 명세서에 있어서 "항원 결합 도메인"이란 항원의 일부 또는 전부에 특이적으로 결합하고 또한 상보적인 영역을 말한다. 항원 결합 도메인의 예로서 항체의 항원 결합 도메인을 갖고 있는 도메인을 들 수 있다. 항체의 항원 결합 도메인의 예로서 CDR이나 가변 영역을 들 수 있다. 항체의 항원 결합 도메인이 CDR인 경우, 항체에 포함되는 6개의 CDR 모두가 포함될 수 있고, 1개 또는 2개 이상의 CDR도 포함될 수 있다. 항체의 결합 영역으로서 CDR이 포함될 경우, 항원에 대한 결합 활성을 갖는 한, 포함되는 CDR에는 아미노산의 결실, 치환, 부가, 및/또는 삽입 등이 행해질 수 있고, 또한 CDR의 일부분도 사용될 수 있다. 항원의 분자량이 큰 경우, 항체는 항원의 특정 부분에만 결합할 수 있다. 해당 특정 부분은 에피토프로 불린다. 항원 결합 도메인은 1 또는 복수의 항체의 가변 도메인으로부터 제공될 수 있다. 바람직하게는, 항원 결합 도메인은 항체 경쇄 가변 영역(VL)과 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함한다. 이러한 항원 결합 도메인의 예로서는 "scFv(단쇄 Fv)", "단쇄 항체", "Fv", "scFv2(단쇄 Fv2)", "Fab", "다이아바디", "선형 항체" 및 "F(ab')2" 등을 바람직하게 들 수 있다.

[0198] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "항체 가변 영역"이란 상보성 결정 영역(CDR; 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3) 및 프레임워크 영역(FR)의 아미노산 서열을 포함하는 항체 분자의 경쇄 및 중쇄 부분을 말한다. VH는 중쇄의 가변 영역(Heavy chain variable region)을 말한다. VL은 경쇄의 가변 영역(Light chain variable region)을 말한다. 본 발명에서 사용된 방법에 따르면, CDR과 FR에 할당된 아미노산 위치는 Kabat에 따라서 규정된다(Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, Md., 1987년 및 1991년). 본 명세서에 있어서, 항체 또는 항원 결합 분절의 아미노산의 넘버링도 Kabat의 아미노산 위치에 준한 Kabat 넘버링으로 정의한다.

[0199] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "상보성 결정 영역(CDR; 즉 CDR1, CDR2 및 CDR3)"이란 항원 결합을 위해 존재하고 있을 필요가 있는 항체 가변 영역의 아미노산 잔기를 말한다. 각 가변 영역은 일반적으로 CDR1, CDR2 및 CDR3로 나타내는 3개의 CDR 영역을 포함한다. 각 상보성 결정 영역은 Kabat가 기재하고 있는 "상보성 결정 영역"으로부터의 아미노산 잔기(즉, 경쇄 가변 영역의 잔기 24~34(CDR1), 50~56(CDR2), 및 89~97(CDR3) 및 중쇄 가변 영역의 31~35(CDR1), 50~65(CDR2) 및 95~102(CDR3); Kabat 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 제5판, Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD. (1991)), 및/또는 "초가변 루프"로부터의 잔기(즉, 경쇄 가변 영역의 잔기 26~32(CDR1), 50~52(CDR2) 및 91~96(CDR3) 및 중쇄 가변 영역의 26~32(CDR1), 53~55(CDR2) 및 96~101(CDR3); Chothia 및 Lesk, J. Mol. Biol. (1987) 196, 901-917)를 포함할 수 있다. 어떤 경우에는 상보성 결정 영역은 Kabat의 기재에 따라서 정의된 CDR 영역 및 초가변 루프 둘 다로부터 아미노산을 포함할 수 있다.

- [0200] 용어 "Fab" 분절은 경쇄의 가변 및 정상 영역과 중쇄의 가변 영역 및 제1의 정상 영역(CH1)을 포함한다. F(ab')2 항체 분절은 한쌍의 Fab 분절을 포함하고, 통상적으로 이들은 그 사이에 있는 헌지 영역 중의 시스테인에 의해서 그 카르복시 말단에 가까이에서 공유 결합에 의해 연결된다. 항체 분절의 다른 화학적 결합도 본 발명이 속하는 기술 분야에서 알려져 있다.
- [0201] 용어 "단쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 분절은 항체의 VH 및 VL 영역을 포함하고, 이들 영역은 단일 폴리펩티드쇄를 형성한다. 통상적으로, Fv 폴리펩티드는 VH 및 VL 영역 사이에서 폴리펩티드 연결을 더 포함하고, 이 연결은 scFv가 항원 결합에 따라서 바람직한 구조를 형성하는 것을 가능하게 한다. scFv의 총설은, 예를 들면 Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies (1994) Vol.113, 269-315(Rosenburg and Moore편, Springer-Verlag, New York) 등에 기재되어 있다.
- [0202] 용어 "다이아바디(diabody)"란 항원 결합 부위를 2개 갖춘 작은 항체 분절을 말하고, 이 항체 분절은 하나의 폴리펩티드쇄(VH 및 VL) 내에 경쇄 가변 영역(VL)에 연결된 중쇄 가변 영역(VH)이 포함된다. 동일한 쇄 상의 2개의 영역 사이에서 접합시키려면 너무 짧은 연결을 사용해서 이 영역을 다른 쇄의 상보성 영역과 강제적으로 접합시켜 2개의 항원 결합 부위가 형성된다. 다이아바디는, 예를 들면 유럽특허 제404097호, WO1993011161 등의 특허문헌이나 Holliger 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 6444-6448 등의 비특허문헌에서 상세하게 설명되어 있다.
- [0203] 용어 "선형 항체"는 Zapata 등, Protein Eng. (1995) 8 (10), 1057-1062에 기재되어 있는 항체를 말한다. 즉, 이들 항체는 상보성 경쇄 폴리펩티드와 함께 한쌍의 항원 결합 도메인을 형성하는 한쌍의 탠덤(tandem) Fd 분절(VH-CH1-VH-CH1)을 포함한다. 선형 항체는 이중 특이성 또는 단일 특이성을 일 수 있다.
- [0204] 항원
- [0205] 본 명세서에 있어서 "항원"은 항원 결합 도메인이 결합하는 에피토프를 포함하는 한 그 구조는 특정 구조에 한정되지 않는다. 다른 의미에서는, 항원은 무기물일 수 있고 유기물 수도 있다. 항원으로서는 하기와 같은 분자; 17-IA, 4-1BB, 4Dc, 6-케토-PGF1a, 8-이소-PGF2a, 8-옥소-dG, A1 아데노신 수용체, A33, ACE, ACE-2, 액티빈, 액티빈A, 액티빈AB, 액티빈B, 액티빈C, 액티빈RIA, 액티빈RIA ALK-2, 액티빈RIB ALK-4, 액티빈RIIA, 액티빈RIIB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, 어드레신(addressin), aFGF, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, 알파-1-안티트립신, 알파-V/베타-1 길항체, ANG, Ang, APAF-1, APE, APJ, APP, APRIL, AR, ARC, ART, 아르테민, 항Id, ASPARTIC, 심방성 나트륨 이뇨 인자, av/b3 인테그린, Ax1, b2M, B7-1, B7-2, B7-H, B-림프구 자극 인자(BlyS), BACE, BACE-1, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bc1, BCMA, BDNF, b-ECGF, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, BMP, BMP-2 BMP-2a, BMP-3 오스테오제닌, BMP-4 BMP-2b, BMP-5, BMP-6 Vgr-1, BMP-7(OP-1), BMP-8(BMP-8a, OP-2), BMPR, BMPR-IA(ALK-3), BMPR-IB(ALK-6), BRK-2, RPK-1, BMPR-II(BRK-3), BMP, b-NGF, BOK, 봄베신, 뼈유래 신경 영양 인자, BPDE, BPDE-DNA, BTC, 보체 인자 3(C3), C3a, C4, C5, C5a, C10, CA125, CAD-8, 칼시토닌, cAMP, 암태아성 항원(CEA), 암관련 항원, 카텝신A, 카텝신B, 카텝신C/DPPI, 카텝신D, 카텝신E, 카텝신H, 카텝신L, 카텝신O, 카텝신S, 카텝신V, 카텝신X/Z/P, CBL, CCI, CCK2, CCL, CCL1, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCR, CCR1, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27L, CD28, CD29, CD30, CD30L, CD32, CD33(p67 단백질), CD34, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD49a, CD52, CD54, CD55, CD56, CD61, CD64, CD66e, CD74, CD80(B7-1), CD89, CD95, CD123, CD137, CD138, CD140a, CD146, CD147, CD148, CD152, CD164, CEACAM5, CFTR, cGMP, CINC, 보툴리눔균 독소, 가스파저균 독소, CKb8-1, CLC, CMV, CMV UL, CNTF, CNTN-1, COX, C-Ret, CRG-2, CT-1, CTACK, CTGF, CTLA-4, CX3CL1, CX3CR1, CXCL, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, 시토케라틴 종양 관련 항원, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, 보체 제어 인자, des(1-3)-IGF-I(뇌 IGF-1), Dhh, 디곡신, DNAM-1, Dnase, Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR(ErbB-1), EMA, EMMPRIN, ENA, 엔도셀린 수용체, 엔케팔리나아제, eNOS, Eot, 이오틱신1, EpCAM, 에프린B2/EphB4, EPO, ERCC, E-셀렉틴, ET-1, 팩터IIa, 팩터VII, 팩터VIIIc, 팩터IX, 섬유 배아 세포 활성화 단백질(FAP), Fas, FcR1, FEN-1, 페리틴, FGF, FGF-19, FGF-2, FGF3, FGF-8, FGFR, FGFR-3, 피브린, FL, FLIP, Flt-3, Flt-4, 난포 자극 호르몬, 프랙탈킨, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, G250, Gas6, GCP-2, GCSF, GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-3(Vgr-2), GDF-5(BMP-14, CDMP-1), GDF-6(BMP-13,

CDMP-2), GDF-7(BMP-12, CDMP-3), GDF-8(마이오스타틴), GDF-9, GDF-15(MIC-1), GDNF, GDNF, GFAP, GFRa-1, GFR-알파1, GFR-알파2, GFR-알파3, GITR, 글루카곤, Glut4, 당단백질IIB/IIIa(GPIIb/IIIa), GM-CSF, gp130, gp72, GRO, 성장 호르몬 방출 인자, 합텐(NP-cap 또는 NIP-cap), HB-EGF, HCC, HCMV gB엔밸로프 당단백질, HCMV gH엔밸로프 당단백질, HCMV UL, 조혈 성장 인자(HGF), Hep B gp120, 해파라나아제, Her2, Her2/neu(ErbB-2), Her3(ErbB-3), Her4(ErbB-4), 단순 헤르페스 바이러스(HSV) gB당단백질, HSV gd당단백질, HGFA, 고분자량 흑색종 관련 항원(HMW-MAA), HIV gp120, HIV IIIB gp 120 V3 루프, HLA, HLA-DR, HM1.24, HMFG PEM, HRG, Hrk, 인간 심장 마이오신, 인간 세포 거대 바이러스(HCMV), 인간 성장 호르몬(HGH), HVEM, I-309, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-3, ICE, ICOS, IFNg, Ig, IgA수용체, IgE, IGF, IGF결합 단백질, IGF-1R, IGFBP, IGF-I, IGF-II, IL, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-5R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-18R, IL-23, 인터페론(INF)-알파, INF-베타, INF-감마, 인히빈, iNOS, 인슐린A쇄, 인슐린B쇄, 인슐린과 같은 증식 인자1, 인테그린 알파2, 인테그린 알파3, 인테그린 알파4, 인테그린 알파4/베타1, 인테그린 알파4/베타7, 인테그린 알파5(알파V), 인테그린 알파5/베타1, 인테그린 알파5/베타3, 인테그린 알파6, 인테그린 베타1, 인테그린 베타2, 인터페론 감마, IP-10, I-TAC, JE, 칼리크레인2, 칼리크레인5, 칼리크레인6, 칼리크레인11, 칼리크레인12, 칼리크레인14, 칼리크레인15, 칼리크레인L1, 칼리크레인L2, 칼리크레인L3, 칼리크레인L4, KC, KDR, 케라틴 세포 증식 인자(KGF), 라미닌5, LAMP, LAP, LAP(TGF-1), 잠재적TGF-1 bp1, LBP, LDGF, LECT2, 레프티, 루이스-Y항원, 루이스- Y관련 항원, LFA-1, LFA-3, Lfo, LIF, LIGHT, 리포단백질, LIX, LKN, Lptn, L-셀렉틴, LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, 폐표면, 황체 형성 호르몬, 림포톡신 베타 수용체, Mac-1, MAdCAM, MAG, MAP2, MARC, MCAM, MCAM, MCK-2, MCP, M-CSF, MDC, Mer, METALLOPROTEASES, MGDF수용체, MGMT, MHC(HLA-DR), MIF, MIG, MIP, MIP-1-알파, MK, MMAC1, MMP, MMP-1, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-2, MMP-24, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MPIF, Mpo, MSK, MSP, 뮤친(Muc1), MUC18, 뮤린 억제물질, Mug, MuSK, NAIP, NAP, NCAD, N-C아드헤린, NCA 90, NCAM, NCAM, 네프릴리신, 뉴로트로핀-3, -4, 또는 -6, 뉴르트린, 신경 성장 인자(NGF), NGFR, NGF-베타, nnos, NO, NOS, Npn, NRG-3, NT, NTN, OB, OGG1, OPG, OPN, OSM, OX40L, OX40R, p150, p95, PADPr, 부갑상선 호르몬, PARC, PARP, PBR, PBSF, PCAD, P-카데린, PCNA, PDGF, PDGF, PDK-1, PECAM, PEM, PF4, PGE, PGF, PGI2, PGJ2, PIN, PLA2, 태반성 알칼리 포스파타아제(PLAP), P1GF, PLP, PP14, 프로인슐린, 프로렐락신, 단백질C, PS, PSA, PSCA, 전립선 특이적 막 항원(PSMA), PTEN, PTHrp, Ptk, PTN, R51, RANK, RANKL, RANTES, RANTES, 렐락신A쇄, 렐락신B쇄, 레닌, 호흡기 다핵체 바이러스(RSV) F, RSV Fgp, Ret, 리우마이드 인자, RLIP76, RPA2, RSK, S100, SCF/KL, SDF-1, SERINE, 혈청 알부민, sFRP-3, Shh, SIGIRR, SK-1, SLAM, SLPI, SMAC, SMDF, SMOH, SOD, SPARC, Stat, STEAP, STEAP-II, TACE, TACI, TAG-72(종양 관련 당단백질-72), TARC, TCA-3, T세포 수용체(예를 들면, T세포 수용체 알파/베타), TdT, TECK, TEM1, TEM5, TEM7, TEM8, TERT, 고환PLAP와 같은 알칼리 포스파타아제, TfR, TGF, TGF-알파, TGF-베타, TGF-베타 Pan Specific, TGF-베타RI(ALK-5), TGF-베타RII, TGF-베타RIIb, TGF-베타RIII, TGF-베타1, TGF-베타2, TGF-베타3, TGF-베타4, TGF-베타5, 트롬빈, 흥선Ck-1, 갑상선 자극 호르몬, Tie, TIMP, TIQ, 조직 인자, TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, TNF, TNF-알파, TNF-알파-베타, TNF-베타2, TNFc, TNF-RI, TNF-RII, TNFRSF10A(TRAIL R1 Apo-2, DR4), TNFRSF10B(TRAIL R2 DR5, KILLER, TRICK-2A, TRICK-B), TNFRSF10C(TRAIL R3 DcR1, LIT, TRID), TNFRSF10D(TRAIL R4 DcR2, TRUNDD), TNFRSF11A(RANK ODF R, TRANCER), TNFRSF11B(OPG OCIF, TR1), TNFRSF12(TWEAK R FN14), TNFRSF13B(TACI), TNFRSF13C(BAFF R), TNFRSF14(HVEM ATAR, HveA, LIGHT R, TR2), TNFRSF16(NGFR p75NTR), TNFRSF17(BCMA), TNFRSF18(GITR AITR), TNFRSF19(TROY TAJ, TRADE), TNFRSF19L(RELT), TNFRSF1A(TNF RI CD120a, p55-60), TNFRSF1B(TNF RII CD120b, p75-80), TNFRSF26(TNFRH3), TNFRSF3(LTbR TNF RIII, TNFC R), TNFRSF4(OX40 ACT35, TXGP1 R), TNFRSF5(CD40 p50), TNFRSF6(Fas Apo-1, APT1, CD95), TNFRSF6B(DcR3 M68, TR6), TNFRSF7(CD27), TNFRSF8(CD30), TNFRSF9(4-1BB CD137, ILA), TNFRSF21(DR6), TNFRSF22(DcTRAIL R2 TNFRH2), TNFRST23(DcTRAIL R1 TNFRH1), TNFRSF25(DR3 Apo-3, LARD, TR-3, TRAMP, WSL-1), TNFSF10(TRAIL Apo-2리간드, TL2), TNFSF11(TRANCE/RANK리간드 ODF, OPG리간드), TNFSF12(TWEAK Apo-3리간드, DR3리간드), TNFSF13(APRIL TALL2), TNFSF13B(BAFF BLYS, TALL1, THANK, TNFSF20), TNFSF14(LIGHT HVEM리간드, LTg), TNFSF15(TL1A/VEGI), TNFSF18(GITR리간드 AITR리간드, TL6), TNFSF1A(TNF-a 코넥틴(Conectin), DIF, TNFSF2), TNFSF1B(TNF-b LTa, TNFSF1), TNFSF3(LTb TNFC, p33), TNFSF4(OX40리간드 gp34, TXGP1), TNFSF5(CD40리간드 CD154, gp39, HIGM1, IMD3, TRAP), TNFSF6(Fas리간드 Apo-1 리간드, APT1리간드), TNFSF7(CD27리간드 CD70), TNFSF8(CD30리간드 CD153), TNFSF9(4-1BB리간드 CD137 리간드), TP-1, t-PA, Tpo, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANCE, 트랜스페린 수용체, TRF, Trk, TROP-2, TSG, TSLP, 종양 관련 항원 CA125, 종양 관련 항원 발현 루이스Y 관련 탄수화물, TWEAK, TXB2, Ung, uPAR, uPAR-1, 우로카나아제, VCAM, VCAM-1, VECAD, VE-Cadherin, VE-cadherin-2, VEGFR-1(flt-1), VEGF, VEGFR, VEGFR-3(flt-4), VEGI, VIM, 바이러스 항원, VLA, VLA-1, VLA-4, VNR인테그린, 폰빌레브란트 인자,

WIF-1, WNT1, WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, XCL1, XCL2, XCR1, XEDAR, XIAP, XPD, HMGB1, IgA, A β , CD81, CD97, CD98, DDR1, DKK1, EREG, Hsp90, IL-17/IL-17R, IL-20/IL-20R, 산화LDL, PCSK9, prekallikrein, RON, TMEM16F, SOD1, Chromogranin A, Chromogranin B, tau, VAP1, 고분자 키니노겐, IL-31, IL-31R, Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9, EPCR, C1, C1q, C1r, C1s, C2, C2a, C2b, C3, C3a, C3b, C4, C4a, C4b, C5, C5a, C5b, C6, C7, C8, C9, factor B, factor D, factor H, properdin, sclerostin, fibrinogen, fibrin, prothrombin, thrombin, 조직 인자, factor V, factor Va, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor VIIIa, factor IX, factor IXa, factor X, factor Xa, factor XI, factor XIa, factor XII, factor XIIa, factor XIII, factor XIIIa, TFPI, antithrombin III, EPCR, 트롬보모듈린, TAPI, tPA, plasminogen, plasmin, PAI-1, PAI-2, GPC3, Syndecan-1, Syndecan-2, Syndecan-3, Syndecan-4, LPA, S1P, Acetylcholine receptor, AdipoR1, AdipoR2, ADP ribosyl cyclase-1, alpha-4/beta-7 integrin, alpha-5/beta-1 integrin, alpha-v/beta-6 integrin, alphavbeta1 integrin, Angiopoietin ligand-2, Angpt12, Anthrax, Cadherin, Carbonic anhydrase-IX, CD105, CD155, CD158a, CD37, CD49b, CD51, CD70, CD72, Claudin 18, Clostridium difficile toxin, CS1, Delta-like protein ligand 4, DHICA oxidase, Dickkopf-1 ligand, Dipeptidyl peptidase IV, EPOR, F protein of RSV, Factor Ia, FasL, Folate receptor alpha, Glucagon receptor, Glucagon-like peptide 1 receptor, Glutamate carboxypeptidase II, GMCSFR, Hepatitis C virus E2 glycoprotein, Hepcidin, IL-17 receptor, IL-22 receptor, IL-23 receptor, IL-3 receptor, Kit tyrosine kinase, Leucine Rich Alpha-2-Glycoprotein 1(LRG1), Lysosphingolipid receptor, Membrane glycoprotein OX2, Mesothelin, MET, MICA, MUC-16, Myelin associated glycoprotein, Neuropilin-1, Neuropilin-2, Nogo receptor, PLXNA1, PLXNA2, PLXNA3, PLXNA4A, PLXNA4B, PLXNB1, PLXNB2, PLXNB3, PLXNC1, PLXND1, Programmed cell death ligand 1, Proprotein convertase PC9, P-selectin glycoprotein ligand-1, RAGE, Reticulon 4, RF, RON-8, SEMA3A, SEMA3B, SEMA3C, SEMA3D, SEMA3E, SEMA3F, SEMA3G, SEMA4A, SEMA4B, SEMA4C, SEMA4D, SEMA4F, SEMA4G, SEMA5A, SEMA5B, SEMA6A, SEMA6B, SEMA6C, SEMA6D, SEMA7A, Shiga like toxin II, Sphingosine-1-phosphate receptor-1, ST2, Staphylococcal lipoteichoic acid, Tenascin, TG2, Thymic stromal lymphoprotein receptor, TNF superfamily receptor 12A, Transmembrane glycoprotein NMB, TREM-1, TREM-2, Trophoblast glycoprotein, TSH receptor, TTR, Tubulin, ULBP2 및 호르몬 또는 성장 인자를 위한 수용체가 예시될 수 있다. 그 외, 상기 수용체 중 생체의 체액 중에서 세포에 계류되지 않고 가용형으로 존재하는 분자도 예시될 수 있다.

[0206]

항원 중에 존재하는 항원 결정기를 의미하는 에피토프는 본 명세서에 있어서 개시되는 항원 결합 분자 중의 항원 결합 도메인이 결합하는 항원 상의 부위를 의미한다. 따라서, 예를 들면 에피토프는 그 구조에 따라서 정의될 수 있다. 또한, 해당 에피토프를 인식하는 항원 결합 분자 중의 항원에 대한 결합 활성에 따라서도 해당 에피토프가 정의될 수 있다. 항원이 웨პ티드 또는 폴리웨პ티드인 경우에는 에피토프를 구성하는 아미노산 잔기에 대해서 에피토프를 특정하는 것도 가능하다. 또한, 에피토프가 당쇄인 경우에는 특정 당쇄 구조에 대해서 에피토프를 특정하는 것도 가능하다.

[0207]

직선형 에피토프는 아미노산 1차 서열이 인식되는 에피토프를 포함한 에피토프이다. 직선형 에피토프는 전형적으로는 적어도 3개, 및 가장 보통으로는 적어도 5개, 예를 들면 약 8~약 10개, 또는 6~20개의 아미노산이 고유 서열에 포함된다.

[0208]

입체 구조 에피토프는 직선형 에피토프와는 대조적으로 에피토프를 포함한 아미노산의 1차 서열이 인식되는 에피토프의 단일 규정 성분이 아닌 에피토프(예를 들면, 아미노산의 1차 서열이 반드시 에피토프를 규정하는 항체에 의해 인식되지 않는 에피토프)이다. 입체 구조 에피토프는 직선형 에피토프에 대해서 증대한 수의 아미노산을 포함할지도 모른다. 입체 구조 에피토프의 인식에 관해서 항체는 웨პ티드 또는 단백질의 3차원 구조를 인식한다. 예를 들면, 단백질 분자가 접혀서 3차원 구조를 형성할 경우에는 입체 구조 에피토프를 형성하고 있는 아미노산 및/또는 폴리웨პ티드 주체는 병렬이 되고, 항체가 에피토프를 인식하는 것을 가능하게 한다. 에피토프의 입체 구조를 결정하는 방법으로는, 예를 들면 X선 결정학, 2차원 핵자기 공명 분광학, 및 부위 특이적인 스펀 표식 및 전자 상자성 공명 분광학이 포함되지만, 이것에 한정되지 않는다. 예를 들면, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology (1996), 제66권, Morris (편)를 참조.

[0209]

유전자 재조합형 방법

[0210]

용어 "코돈 세트"란 원하는 아미노산을 부호화하기 위해서 사용되는 한쌍의 다른 뉴클레오티드 트리플렛 서열을 말한다. 한쌍의 올리고뉴클레오티드는 코돈 세트에 대해서 제공되는 뉴클레오티드 트리플렛의 가능한 조합을 모

두 나타내는 서열로서 원하는 아미노산기를 부호화하는 서열을 포함한다. 이러한 한쌍의 올리고뉴클레오티드는, 예를 들면 고상법에 의해서 합성될 수 있다. 표준적인 코돈 지정 형식은 IUB 코드이고, 이 코드는 본 기술 분야에 알려져 있다. 코돈 세트는 일반적으로 3개의 대문자, 예를 들면 NNK, NNS, DVK, 또는 DVD 등으로 나타낸다.

- [0211] IUB 코드
- [0212] G 구아닌
- [0213] A 아데닌
- [0214] T 티민
- [0215] C 시토신
- [0216] R (A 또는 G)
- [0217] Y (C 또는 T)
- [0218] M (A 또는 C)
- [0219] K (G 또는 T)
- [0220] S (C 또는 G)
- [0221] W (A 또는 T)
- [0222] H (A, C 또는 T)
- [0223] B (C, G 또는 T)
- [0224] V (A, C 또는 G)
- [0225] D (A, G 또는 T)
- [0226] N (A, C, G 또는 T)
- [0227] 예를 들면, 코돈 세트 DVK에서 D는 뉴클레오티드 A, G 또는 T이고; V는 A, G 또는 C이며; K는 G 또는 T이다. 이 코돈 세트는 18개의 다른 코돈을 나타내고, 아미노산 Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly 및 Cys가 부호화될 수 있다.
- [0228] 특정 위치에 "축중(縮重)" 뉴클레오티드를 갖는 올리고뉴클레오티드의 디자인방법은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 알려져 있다(예를 들면, Garrard and Henner, Gene (1993) 128, 103-109). 그러한 어떤 종의 코돈 세트를 갖고 있는 올리고뉴클레오티드 세트는 시판의 핵산 신시사이저(Applied Biosystems, Foster City, CA 등으로부터 입수 가능)를 사용하여 합성될 수 있고, 또는 시판품을 입수할 수 있다(예를 들면, Life Technologies, Rockville, MD). 따라서, 특정 코돈 세트를 갖는 합성 올리고뉴클레오티드 세트는 일반적으로 다른 서열의 복수의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 또한, 본 발명의 비한정인 태양으로서, 예를 들면 복제에 도움이 되는 제한 효소 부위도 포함될 수 있다.
- [0229] "세포", "세포계" 및 "세포 배양"은 본 명세서에서는 동일한 의미로 사용되고, 이러한 호칭에는 세포 또는 세포계의 모든 자손이 포함될 수 있다. 이렇게, 예를 들면 "형질 전환체" 및 "형질 전환 세포"와 같은 용어는 계대수에 관계없이 그들에 유래하는 1차 대상 세포 및 배양물이 포함된다. 또한, 고의 또는 우발적인 돌연변이에 의해서 모든 자손에서 DNA의 내용이 정확하게 동일하다는 것은 아니라는 것도 또한 이해된다. 당초의 형질 전환 세포에서 검사된 바와 같이, 실질적으로 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 변이체의 자손도 포함될 수 있다. 다른 호칭을 의도하는 기재인 경우는 해당 기재의 전후 관계로부터 그러한 의도는 명백해질 것이다.
- [0230] 코드 서열의 발현으로 언급할 경우의 용어 "제어 서열"이란 특정한 숙주 생물에서 작용 가능하게 연결된 코드 서열의 발현을 위해서 필요한 DNA 염기 서열을 말한다. 예를 들면, 원핵 생물에 바람직한 제어 서열에는 프로모터, 경우에 따라서는 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합 부위, 및 아마도 아직 잘 이해되지 않는 다른 서열이 포함된다. 진핵 세포에서는 코드 서열의 발현을 위한 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및 인핸서를 이용하는 것이 알려져 있다.
- [0231] 핵산에 관해서 "작용 가능하게 연결된"은 그 핵산이 다른 핵산 서열과 기능적인 관계에 있다는 것을 의미한다. 예를 들면, 전서열 또는 분비 리더의 DNA는 어떤 폴리펩티드의 분비에 관여하는 전구체 단백질로서 발현할 경우

는 그 폴리펩티드의 DNA와 작동 가능하게 결합되어 있다. 프로모터 또는 인핸서는 그것이 어느 코드 서열의 전사에 영향을 주는 경우는 그 서열로 작용 가능하게 연결되어 있다. 또한, 리보솜 결합부는 그것이 번역을 용이하게 하는 위치에 있을 경우는 작용 가능하게 코드 서열과 연결되어 있다. 통상적으로, "작용 가능하게 연결된"은 결합한 DNA 서열이 연속하고 있고, 분비 리더의 경우는 연속해서 판독 범위 내에 있다는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서는 연속될 필요는 없다. 연결은 적절한 제한 부위에서 라이케이션에 의해서 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않을 경우, 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 연결이 종래의 관행에 따라서 사용된다. 또한, 상기의 Overlap Extension PCR의 방법에 따라서도 연결된 핵산이 제조될 수 있다.

[0232] "라이케이션"은 2개의 핵산 분절 사이에서 인산 디에스테르 결합을 형성하는 방법이다. 2개의 분절의 라이케이션을 위해서, 분절의 말단은 서로 적합해야 한다. 경우에 따라서는, 이 말단은 엔도뉴클레아제 소화 후에 바로 적합성을 갖는다. 그러나, 라이케이션에 적합시키기 위해서 우선 엔도뉴클레아제 소화 후에 일반적으로 형성되는 부착 말단은 평활 말단으로 바꿀 필요가 있다. 평활 말단으로 하기 위해서는 DNA가 적절한 완충액 중에서 15 °C에서 적어도 15분간, 4개의 데옥시리보뉴클레오티드 삼인산의 존재 하에서 DNA 폴리메라아제I 또는 T4 DNA 폴리메라아제의 클레노브 분절의 약 10단위에서 처리된다. 이어서 DNA가 폐놀클로로포름 추출과 에탄올 침전, 또는 실리카 정제에 의해서 정제된다. 연결해야 할 DNA 분절이 용액에 등몰량 가해진다. 이 용액에는 ATP, 리가아제 완충액에 추가해서 T4 DNA 리가아제와 같은 리가아제가 DNA 0.5 µg당 약 10단위 포함된다. DNA를 벡터에 연결할 경우, 벡터는 적당한 제한 엔도뉴클레아제에 의한 소화 작용에 의해서 우선 선형으로 된다. 선형으로 된 분절을 다음에 세균의 알칼리 포스파타아제 또는 송아지 창자의 포스파타아제로 처리함으로써 라이케이션의 단계 사이의 해당 분절의 셀프 라이케이션이 예방된다.

[0233] 용어 "코트 단백질"은 단백질 중 적어도 그 일부가 바이러스 입자의 표면에 존재하는 것을 말한다. 기능상의 관점으로부터는 코트 단백질은 숙주 세포에서의 바이러스의 구축 과정에서 바이러스 입자와 결합하는 임의의 단백질이고, 바이러스가 다른 숙주 세포에 감염될 때까지 그것과 결합한 상태이다. 코트 단백질은 주요한 코트 단백질일 수 있고, 마이너한 코트 단백질일 수 있다. 마이너한 코트 단백질은 통상 바이러스의 외피에 존재하는 코트 단백질이고, 바람직하게는 10억당 적어도 약 5개, 보다 바람직하게는 적어도 약 7개, 보다 바람직하게는 적어도 약 10개가 그 이상의 단백질의 카피가 존재한다. 주요한 코트 단백질은 10억당 수십, 수백 또는 수천의 카피가 존재할 수 있다. 주요한 코트 단백질의 예로서는 섬유 형상 파지의 p8 단백질을 들 수 있다.

[0234] 특정한 검정에서의 어느 화학적인 무기체, 유기체, 또는 생물 등의 물체의 "검출 한계"란 그 검정에서 백그라운드 레벨보다 높게 검출되는 그 물체의 최소한의 농도를 말한다. 예를 들면, 파지 ELISA에서는 특정한 항원 결합 분절을 제시하고 있는 특정한 파지의 "검출 한계"란 그 항원 결합 분절을 제시하지 않은 대조 파지에 의해서 생긴 것보다 많은 ELISA 신호를 특정한 파지가 생산하는 파지 농도를 말한다.

[0235] "파지 디스플레이"는 변이체 폴리펩티드를 파지, 예를 들면 섬유상 파지의 입자 표면에서 코트 단백질의 적어도 일부와 융합한 단백질로서 제시하는 방법이다. 파지 디스플레이의 유용함은 랜덤화 단백질 변이체가 큰 라이브러리로부터 대상 항원과 높은 친화성으로 결합하는 서열을 신속하고 효율적으로 선별할 수 있게 한다. 파지 상의 웨პ티드 및 단백질 라이브러리의 제시는 수백만개의 폴리펩티드를 특이적 결합 특성에 대해서 검사하기 위해서 이용될 수 있다. 다가 파지 디스플레이 방법은 섬유상 파지의 유전자III 또는 유전자VIII의 융합을 통해서 작은 랜덤 웨პ티드 및 소단백질을 제시하기 위해서 이용될 수 있다(Wells 및 Lowman, Curr. Opin. Struct. Biol. (1992) 3, 355-362); 및 그 중의 인용문헌). 1가의 파지 디스플레이에서는 단백질 또는 웨პ티드의 라이브러리가 유전자III 또는 그 일부에 융합되고, 파지 입자가 융합 단백질의 1개 또는 0개의 카피를 제시하도록 야생형 유전자III 단백질의 존재 하에서 저레벨에서 발현된다. 결합 활성 효과는 다가 파지와 비교해서 저하되어 있으므로 선별은 내인성의 리간드 친화성에 기초하고 있어 파지 플라스미드 벡터가 사용되지만, 이 벡터는 DNA 조작을 단순화한다(Lowman 및 Wells, Methods: A Companion to Methods in Enzymology (1991) 3, 205-216).

[0236] "파지미드"는 세균의 복제 기점, 예를 들면 CoIE1, 및 박테리오파지의 유전자간 영역의 카피를 갖는 플라스미드 벡터이다. 파지미드는 어떠한 공자의 박테리오파지, 예를 들면 섬유상 박테리오파지 및 람다형 박테리오파지도 적절하게 사용될 수 있다. 플라스미드는, 통상적으로 항생 물질 내성의 선택 마커도 포함한다. 이들 벡터로 복제된 DNA 분절은 플라스미드로서 증식할 수 있다. 이들 벡터가 도입된 세포가 파지 입자의 생산을 위해서 필요한 모든 유전자를 구비하고 있는 경우, 플라스미드의 복제 패턴은 롤링 서클 복제에 변화해서 플라스미드 DNA의 1개의 쇄의 카피와 패키지 파지 입자를 생성한다. 파지미드는 감염성 또는 비감염성 파지 입자를 형성할 수 있다. 이 용어는 이종 폴리펩티드가 파지 입자의 표면에 제시되도록 유전자 융합함으로써 이종 폴리펩티드의 유전자와 결합한 파지 코트 단백질 유전자, 또는 그 분절을 포함한 파지 플라스미드를 포함한다.

- [0237] 용어 "파지 벡터"는 이종 유전자를 포함해서 복제할 수 있는 박테리오파지의 이종 가닥 복제형을 의미한다. 파지 벡터는 파지 복제 및 파지 입자 형성을 가능하게 하는 파지 복제 기점을 갖는다. 파지는 바람직하게는 섬유상 박테리오파지, 예를 들면 M13, f1, fd, 또는 Pf3 파지 또는 그 유도체, 또는 람다형 파지, 예를 들면 람다, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434, 또는 그 외 또는 그 유도체이다.
- [0238] "올리고뉴클레오티드"는 공지의 방법(예를 들면, 고상방법, 예를 들면 EP266032에 기재되어 있는 방법을 이용한 인산 트리에스테르, 아인산염, 또는 포스포라미디트 화학; 또는 Froeschler 등; Nucl. Acids. Res. (1986) 14, 5399-5407에 기재되어 있는 데옥시뉴클레오티드 H-포스폰산염 중간체를 통한 방법)에 의해서 화학적으로 합성되는 짧은 외가닥 또는 이종 가닥의 폴리데옥시뉴클레오티드이다. 다른 방법으로는 이하에 기재된 폴리메라아제 연쇄 반응 및 다른 오토프라이머법, 및 고체 담체 상의 올리고뉴클레오티드 합성을 포함한다. 이들 방법 모두는 Engels 등, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl. (1989) 28, 716-734에 기재되어 있다. 유전자의 모든 핵산 서열이 알려져 있다면, 또는 코드 가닥과 상보적인 핵산의 서열을 이용할 수 있다면 이를 방법이 사용된다. 또한, 대상 아미노산 서열이 알려져 있다면, 각 아미노산 잔기를 코드화하는 공지 및 바람직한 염기를 사용하여 가능한 핵산 서열이 적절하게 추측될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 폴리아크릴아미드 젤 또는 분자 사이징 칼럼, 또는 침전법에 의해서 정제될 수 있다.
- [0239] 용어 "융합 단백질" 및 "융합 폴리펩티드"란 공유 결합으로 서로 결합된 2개의 분절을 갖는 폴리펩티드를 말하고, 이 분절은 다른 특성을 갖는 폴리펩티드이다. 이 특성은, 예를 들면 *in vitro* 또는 *in vivo* 활성 등의 생물학적 특성일 수 있다. 또한, 이 특성은 단일의 화학적 또는 물리적 성질, 예를 들면 대상 항원과의 결합, 또는 반응의 촉매 등에서도 있다. 이 2개의 분절은 단일 펩티드 결합에 의해서 직접, 또는 1개 또는 복수의 아미노산 잔기를 포함하고 있는 펩티드 연결기를 통해서 결합될 수 있다. 통상적으로, 이 2개의 분절과 연결기는 동일한 판독 프레임에 존재한다. 바람직하게는, 폴리펩티드의 2개의 분절은 이종 또는 다른 폴리펩티드로부터 얻어진다.
- [0240] 용어 "이종 DNA"란 숙주 세포에 도입되는 임의의 DNA를 말한다. DNA는 게놈DNA, cDNA, 합성 DNA, 및 이를 융합 또는 조합을 포함한 다양한 소스로부터 유래될 수 있다. DNA는 숙주 또는 수용 세포와 같은 동일한 세포 또는 세포형으로부터의 DNA, 또는 다른 세포형, 예를 들면 포유류 또는 식물로부터의 DNA를 포함할 수 있다. DNA는 임의적으로 선택에 마커 또는 선택 유전자, 예를 들면 항생 물질 내성 유전자, 또는 내열성 유전자 등을 포함할 수 있다.
- [0241] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "매우 다양한 위치"란 공지의 및/또는 천연 항체 또는 항원 결합 분절의 아미노산 서열을 비교한 경우에 그 위치에서 제시되는 여러가지의 다른 아미노산을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 영역 상의 아미노산의 위치를 말한다. 매우 다양한 위치는 일반적으로 CDR 영역에 존재한다. 일태양에서는, 공지의 및/또는 천연 항체의 매우 다양한 위치를 결정할 때에는 Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institute of Health Bethesda Md., 1987년 및 1991년)가 제공하는 데이터가 유효하다. 또한, 인터넷 상의 복수의 데이터베이스(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/> 및 <http://www.bioinf.org.uk/abs/index.html>)에는 수집된 다수의 인간 경쇄 및 중쇄의 서열과 그 배치가 제공되어 있고, 이를 서열과 그 배치 정보는 본 발명에서 매우 다양한 위치 결정에 유용하다. 본 발명에 의하면, 아미노산이 어느 위치에서 바람직하게는 약 2~약 20, 바람직하게는 약 3~약 19, 바람직하게는 약 4~약 18, 바람직하게는 5~17, 바람직하게는 6~16, 바람직하게는 7~15, 바람직하게는 8~14, 바람직하게는 9~13, 바람직하게는 10~12개의 가능한 다른 아미노산 잔기의 다양성을 갖는 경우는 그 위치는 매우 다양하다. 일부 실시형태에서는, 어느 아미노산 위치는 바람직하게는 적어도 약 2, 바람직하게는 적어도 약 4, 바람직하게는 적어도 약 6, 바람직하게는 적어도 약 8, 바람직하게는 약 10, 바람직하게는 약 12의 가능한 다른 아미노산 잔기의 다양성을 가질 수 있다. 본 명세서에 있어서는, 이러한 아미노산 잔기는 플렉시블 잔기라고도 불린다. 용어 "비랜덤 코돈 세트"란 본 명세서에서 기재되는 아미노산 선택을 위한 기준을 부분적으로 바람직하게는 완전하게 충족 선택된 아미노산을 부호화하는 코돈 세트를 말한다. 또한, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "랜덤 코돈 세트"란 20개의 아미노산(Ala/A, Leu/L, Arg/R, Lys/K, Asn/N, Met/M, Asp/D, Phe/F, Cys/C, Pro/P, Gln/Q, Ser/S, Glu/E, Thr/T, Gly/G, Trp/W, His/H, Tyr/Y, Ile/I, Val/V) 중 임의의 아미노산을 부호화하는 코돈이 조합된 코돈 세트를 말한다.
- [0242] 라이브러리
- [0243] 어느 일태양에 의하면, 본 발명은 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기가 항원 결합 도메인에 포함된 서로 서열이 다른 복수의 항원 결합 분자로

주로 이루어지는 라이브러리를 제공한다. 이온 농도의 예로서는 금속 이온 농도나 수소 이온 농도를 바람직하게 들 수 있다.

[0244] 본 명세서에 있어서 "라이브러리"란 복수의 항원 결합 분자, 항원 결합 분자를 포함한 복수의 융합 폴리펩티드, 또는 이를 서열을 부호화하는 핵산 또는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 라이브러리 중에 포함되는 복수의 항원 결합 분자 또는 항원 결합 분자를 포함한 복수의 융합 폴리펩티드의 서열은 단일의 서열은 아니고, 서로 서열이 다른 항원 결합 분자 또는 항원 결합 분자를 포함한 융합 폴리펩티드이다.

[0245] 본 명세서에 있어서 "금속 이온"이란 수소를 제외한 알칼리 금속 및 구리족 등의 제I족, 알칼리 토금속 및 아연족 등의 제II족, 붕소를 제외한 제III족, 탄소와 규소를 제외한 제IV족, 철족 및 백금족 등의 제VII족, 및 V, VI 및 VII족의 각 A 소집단에 속하는 원소, 또는 안티몬, 비스무트, 또는 폴로늄 등의 금속 원소의 이온을 말한다. 금속 원자는 원자가 전자를 방출해서 양이온으로 되는 성질을 갖고 있고, 이를 이온화 경향이라고 한다. 이온화 경향이 큰 금속은 화학적으로 활성이 풍부하게 된다.

[0246] 본 발명에서 바람직한 금속 이온의 예로서 칼슘 이온을 들 수 있다. 칼슘 이온은 많은 생명 현상의 조절에 관여하고 있고, 골격근, 평활근, 및 심근 등의 근육의 수축, 백혈구의 운동 및 탐식 등의 활성화, 혈소판의 변형 및 분비 등의 활성화, 럼프구의 활성화, 히스타민의 분비 등의 비만 세포의 활성화, 카데콜아민 a 수용체나 아세틸콜린 수용체를 통하는 세포의 응답, 엑소시토시스, 뉴런 종말에서의 전달 물질의 방출, 뉴런의 축삭 이동 등에 칼슘 이온이 관여하고 있다. 세포 내의 칼슘 이온 수용체로서 복수개의 칼슘 이온 결합 부위를 갖고, 분자 진화상 공통의 기원으로부터 유래한다고 생각되는 트로포닌C, 칼모듈린, 파브알부민, 및 마이오신 경쇄 등이 알려져 있으며, 그 결합 모티브도 많이 알려져 있다. 예를 들면, 카데린 도메인, 칼모듈린에 포함되는 EF핸드, 단백질 키나아제 C에 포함되는 C2도메인, 혈액 응고 단백질 FactorIX에 포함되는 Gla도메인, 아시알로글리코프로테인 수용체나 만노오스 결합 수용체에 포함되는 C형 헥틴, LDL 수용체에 포함되는 A도메인, 아넥신, 트롬보스폰단3형 도메인 및 EGF 유사의 도메인이 잘 알려져 있다.

[0247] 본 발명에 있어서는 금속 이온이 칼슘 이온인 경우에는 칼슘 이온 농도의 조건으로서 저칼슘 이온 농도의 조건과 고칼슘 이온 농도의 조건을 들 수 있다. 칼슘 이온 농도의 조건에 따라서 결합 활성이 변화하는 것은 저칼슘 이온 농도와 고칼슘 이온 농도의 조건의 차이에 따라 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성이 변화하는 것을 말한다. 예를 들면, 저칼슘 이온 농도의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성보다 고칼슘 이온 농도의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성의 쪽이 높은 경우를 들 수 있다. 또한, 고칼슘 이온 농도의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성보다 저칼슘 이온 농도의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성의 쪽이 높은 경우도 또한 들 수 있다.

[0248] 본 명세서에 있어서, 고칼슘 이온 농도란 특히 근본적인 수치에 한정되는 것은 아니지만, 바람직하게는 100 μM~10 mM에서 선택되는 농도일 수 있다. 또한, 다른 태양으로는 200 μM~5 mM에서 선택되는 농도에서도 있을 수 있다. 또한, 다른 태양으로는 500 μM~2.5 mM에서 선택되는 농도에서도 있을 수 있고, 다른 태양으로는 200 μM~2 mM에서 선택되는 농도에서도 있을 수 있다. 또한 400 μM~1.5 mM에서 선택되는 농도에서도 있을 수 있다. 특히, 생체 내의 혈장 중(혈중)에서의 칼슘 이온 농도에 가까운 500 μM~2.5 mM에서 선택되는 농도를 바람직하게 들 수 있다.

[0249] 본 명세서에 있어서, 저칼슘 이온 농도란 특히 근본적인 수치에 한정되는 것은 아니지만, 바람직하게는 0.1 μM~30 μM에서 선택되는 농도일 수 있다. 또한, 다른 태양으로는 0.2 μM~20 μM에서 선택되는 농도에서도 있을 수 있다. 또한, 다른 태양으로는 0.5 μM~10 μM에서 선택되는 농도에서도 있을 수 있고, 다른 태양으로는 1 μM~5 μM에서 선택되는 농도에서도 있을 수 있다. 또한 2 μM~4 μM에서 선택되는 농도에서도 있을 수 있다. 특히 생체 내의 조기 엔도솜 내에서의 이온화 칼슘 농도에 가까운 1 μM~5 μM에서 선택되는 농도를 바람직하게 들 수 있다.

[0250] 본 발명에 있어서, 항원 결합 분자의 저칼슘 이온 농도 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성이 고칼슘 이온 농도 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성보다 낮음이란 항원 결합 분자의 0.1 μM~30 μM에서 선택되는 칼슘 이온 농도에서의 항원에 대한 결합 활성이 100 μM~10 mM에서 선택되는 칼슘 이온 농도에서의 항원에 대한 결합 활성보다 약한 것을 의미한다. 바람직하게는, 항원 결합 분자의 0.5 μM~10 μM에서 선택되는 칼슘 이온 농도에서의 항원에 대한 결합 활성이 200 μM~5 mM에서 선택되는 칼슘 이온 농도에서의 항원에 대한 결합 활성보다 약한 것을 의미하고, 특히 바람직하게는 생체 내의 조기 엔도솜 내의 칼슘 이온 농도에서의 항원 결합 활성이 생체 내의 혈장 중의 칼슘 이온 농도에서의 항원 결합 활성보다 약한 것을 의미하며, 구체적으로는 항원 결합 분자의 1 μM~5 μM에서 선택되는 칼슘 이온 농도에서의 항원에 대한 결합 활성이 500 μM~2.5 mM에서 선택되는

칼슘 이온 농도에서의 항원에 대한 결합 활성보다 약한 것을 의미한다.

[0251] 금속 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성이 변화하고 있는지 여부는 공지의 측정방법을 사용함으로써 결정될 수 있다. 예를 들면, 저칼슘 이온 농도의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성보다 고칼슘 이온 농도의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성의 것이 높게 변화하는 것을 확인하기 위해서는 저칼슘 이온 농도 및 고칼슘 이온 농도의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성이 비교된다.

[0252] 또한 본 발명에 있어서, "항원 결합 분자의 저칼슘 이온 농도 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성이 고칼슘 이온 농도 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성보다 낮음"이란 항원 결합 분자의 고칼슘 이온 농도 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성이 저칼슘 이온 농도 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성보다 높다고 표현될 수도 있다. 또한 본 발명에 있어서는 "저칼슘 이온 농도 조건 하에서의 항원 결합 활성이 고칼슘 이온 농도 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성보다 낮음"을 "저칼슘 이온 농도 조건 하에서의 항원 결합능이 고칼슘 이온 농도 조건 하에서의 항원에 대한 결합능보다 약함"으로 기재하는 경우도 있고, 또한 "저칼슘 이온 농도 조건 하에서의 항원 결합 활성을 고칼슘 이온 농도 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성보다 저하시킴"을 "저칼슘 이온 농도 조건 하에서의 항원 결합능을 고칼슘 이온 농도 조건 하에서의 항원에 대한 결합능보다 약하게 함"으로 기재하는 경우도 있다.

[0253] 항원에의 결합 활성을 측정할 때의 칼슘 이온 농도 이외의 조건은 당업자가 적절하게 선택하는 것이 가능하고, 특별하게 한정되지 않는다. 예를 들면, HEPES 버퍼, 37°C의 조건에서 측정하는 것이 가능하다. 예를 들면, Biacore(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) 등을 사용해서 측정하는 것이 가능하다. 항원 결합 분자와 항원의 결합 활성의 측정은 항원이 가용형 항원인 경우는 항원 결합 분자를 고정화한 칩으로 항원을 어날라이트해서 주입함으로써 가용형 항원에의 결합 활성을 평가하는 것이 가능하고, 항원이 막형 항원인 경우는 항원을 고정화한 칩으로 항원 결합 분자를 어날라이트해서 주입함으로써 막형 항원에의 결합 활성을 평가하는 것이 가능하다.

[0254] 본 발명의 항원 결합 분자에 있어서, 저칼슘 이온 농도 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성이 고칼슘 이온 농도 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성보다 약한 한 저칼슘 이온 농도 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성과 고칼슘 이온 농도 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성의 비는 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 항원에 대한 저칼슘 이온 농도 조건 하에서의 KD(Dissociation constant: 해리 정수)와 고칼슘 이온 농도 조건 하에서의 KD의 비인 $KD(Ca 3 \mu M)/KD(Ca 2 mM)$ 의 값이 2 이상이고, 더욱 바람직하게는 $KD(Ca 3 \mu M)/KD(Ca 2 mM)$ 의 값이 10 이상이며, 더욱 바람직하게는 $KD(Ca 3 \mu M)/KD(Ca 2 mM)$ 의 값이 40 이상이다. $KD(Ca 3 \mu M)/KD(Ca 2 mM)$ 의 값의 상한은 특별히 한정되지 않고 당업자의 기술에서 제조 가능한 한 400, 1000, 10000 등 어떤 값이어도 좋다. 또한, $KD(Ca 3 \mu M)/KD(Ca 1.2 mM)$ 의 값으로도 특정될 수 있다. 즉, $KD(Ca 3 \mu M)/KD(Ca 1.2 mM)$ 의 값이 2 이상이고, 더욱 바람직하게는 $KD(Ca 3 \mu M)/KD(Ca 1.2 mM)$ 의 값이 10 이상이며, 더욱 바람직하게는 $KD(Ca 3 \mu M)/KD(Ca 1.2 mM)$ 의 값이 40 이상이다. $KD(Ca 3 \mu M)/KD(Ca 1.2 mM)$ 의 값의 상한은 특별히 한정되지 않고 당업자의 기술에서 제조 가능한 한 400, 1000, 10000 등 어떤 값이어도 좋다.

[0255] 항원에 대한 결합 활성의 값으로서 항원이 가용형 항원인 경우는 KD(해리 정수)를 사용하는 것이 가능하지만, 항원이 막형 항원인 경우는 겉보기 KD(Apparent dissociation constant: 겉보기 해리 정수)를 사용하는 것이 가능하다. KD(해리 정수), 및 겉보기 KD(겉보기 해리 정수)는 당업자 공지의 방법으로 측정하는 것이 가능하고, 예를 들면 Biacore(GE healthcare Bio-Sciences Corp.), 스캐차드 풀롯, 또는 플로우 사이토미터 등을 사용하는 것이 가능하다.

[0256] 또한, 본 발명의 항원 결합 분자의 저칼슘 농도 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성과 고칼슘 농도 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성의 비를 나타낸 다른 지표로서, 예를 들면 해리 속도 정수인 kd(Dissociation rate constant: 해리 속도 정수)도 또한 바람직하게 사용될 수 있다. 결합 활성의 비를 나타낸 지표로서 KD(해리 정수) 대신에 kd(해리 속도 정수)를 사용할 경우, 항원에 대한 저칼슘 농도 조건 하에서의 kd(해리 속도 정수)와 고칼슘 농도 조건 하에서의 kd(해리 속도 정수)의 비인 $kd(\text{저칼슘 농도 조건 하})/kd(\text{고칼슘 농도 조건 하에서의})$ 의 값은 바람직하게는 2 이상이고, 더욱 바람직하게는 5 이상이며, 더욱 바람직하게는 10 이상이고, 보다 바람직하게는 30 이상이다. $kd(\text{저칼슘 농도 조건 하})/kd(\text{고칼슘 농도 조건 하에서의})$ 의 값의 상한은 특별히 한정되지 않아 당업자의 기술 상식에서 제조 가능한 한 50, 100, 200 등 어떤 값이어도 좋다.

[0257] 항원 결합 활성의 값으로서 항원이 가용형 항원인 경우는 kd(해리 속도 정수)를 사용하는 것이 가능하고, 항원이 막형 항원인 경우는 겉보기 kd(Apparent dissociation rate constant: 겉보기 해리 속도 정수)를 사용하는 것이 가능하다. kd(해리 속도 정수), 및 겉보기 kd(겉보기 해리 속도 정수)는 당업자 공지의 방법으로 측정하는

것이 가능하고, 예를 들면 Biacore(GE healthcare Bio-Sciences Corp.), 또는 플로우 사이토미터 등을 사용하는 것이 가능하다. 또한 본 발명에 있어서, 다른 칼슘 이온 농도에서의 항원 결합 분자의 항원에 대한 결합 활성을 측정할 때는 칼슘 농도 이외의 조건은 동일하게 하는 것이 바람직하다.

[0258] 본 발명에서 양성자, 즉 수소 원자의 원자핵의 농도의 조건은 수소 지수(pH)의 조건과도 마찬가지로 취급된다. 수용액 중의 수소 이온의 활동량을 a_{H^+} 로 나타내고, pH는 $-\log 10_{\text{H}^+}$ 로 정의된다. 수용액 중의 이온 강도가(예를 들면 10^{-3} 미만) 낮으면 a_{H^+} 는 수소 이온 강도와 거의 동일하다. 예를 들면 25°C, 1기압에서의 물의 이온 곱은 $K_w = a_{\text{H}^+} \cdot a_{\text{OH}^-} = 10^{-14}$ 이기 때문에 순수에서는 $a_{\text{H}^+} \cdot a_{\text{OH}^-} = 10^{-7}$ 이다. 이 경우의 pH=7이 중성이고; pH가 7보다 작은 수용액은 산성; pH가 7보다 큰 수용액은 알칼리성이다.

[0259] 본 발명에 있어서는 수소 이온 농도의 조건으로서 pH의 조건이 사용되는 경우에는 pH의 조건으로서 pH 산성 영역의 조건과 pH 중성 영역의 조건을 들 수 있다. pH의 조건에 따라서 결합 활성이 변화함이란, pH 산성 영역과 pH 중성 영역의 조건의 차이에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성이 변화하는 것을 말한다. 예를 들면, pH 산성 영역의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성보다 pH 중성 영역의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성이 높은 경우를 들 수 있다. 또한, pH 중성 영역의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성보다 pH 산성 영역의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성이 높은 경우도 또한 들 수 있다.

[0260] 본 명세서에 있어서, pH 중성 영역이란 특히 근본적인 수치에 한정되는 것은 아니지만, 바람직하게는 pH 6.7~pH 10.0에서 선택될 수 있다. 또한, 다른 태양으로는, pH 6.7~pH 9.5에서 선택될 수 있다. 또한, 다른 태양으로는 pH 7.0~pH 9.0에서 선택될 수 있고, 다른 태양으로는 pH 7.0~pH 8.0에서 선택될 수 있다. 특히, 생체 내의 혈장 중(혈중)에서의 pH에 가까운 pH 7.4를 바람직하게 들 수 있다.

[0261] 본 명세서에 있어서, pH 산성 영역이란 특히 근본적인 수치에 한정되는 것은 아니지만, 바람직하게는 pH 4.0~pH 6.5에서 선택될 수 있다. 또한, 다른 태양으로는 pH 4.5~pH 6.5에서 선택될 수 있다. 또한, 다른 태양으로는 pH 5.0~pH 6.5에서 선택될 수 있고, 다른 태양으로는 pH 5.5~pH 6.5에서 선택될 수 있다. 특히 생체 내의 조기 엔도솜 내에서의 pH에 가까운 pH 5.8을 바람직하게 들 수 있다.

[0262] 본 발명에 있어서, 항원 결합 분자의 pH 산성 영역 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성이 pH 중성 영역 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성보다 낮은 것이란 항원 결합 분자의 pH 4.0~pH 6.5에서 선택되는 pH에서의 항원에 대한 결합 활성이 pH 6.7~pH 10.0에서 선택되는 pH에서의 항원에 대한 결합 활성보다 약한 것을 의미한다. 바람직하게는, 항원 결합 분자의 pH 4.5~pH 6.5에서 선택되는 pH에서의 항원에 대한 결합 활성이 pH 6.7~pH 9.5에서 선택되는 pH에서의 항원에 대한 결합 활성보다 약한 것을 의미하고, 보다 바람직하게는 항원 결합 분자의 pH 5.0~pH 6.5에서 선택되는 pH에서의 항원에 대한 결합 활성이 pH 7.0~pH 9.0에서 선택되는 pH에서의 항원에 대한 결합 활성보다 약한 것을 의미한다. 또한, 바람직하게는 항원 결합 분자의 pH 5.5~pH 6.5에서 선택되는 pH에서의 항원에 대한 결합 활성이 pH 7.0~pH 8.0에서 선택되는 pH에서의 항원에 대한 결합 활성보다 약한 것을 의미한다. 특히 바람직하게는, 생체 내의 조기 엔도솜 내의 pH에서의 항원 결합 활성이 생체 내의 혈장 중의 pH에서의 항원 결합 활성보다 약한 것을 의미하고, 구체적으로는 항원 결합 분자의 pH 5.8에서의 항원에 대한 결합 활성이 pH 7.4에서의 항원에 대한 결합 활성보다 약한 것을 의미한다.

[0263] pH의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성이 변화하고 있는지 여부는 예를 들면 상기 다른 pH의 조건 하에서의 결합 활성의 측정방법에 의해서 결정된다. 예를 들면, pH 산성 영역의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성보다 pH 중성 영역의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성이 높게 변화하는 것을 확인하기 위해서는 pH 산성 영역 및 pH 중성 영역의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성이 비교된다.

[0264] 또한 본 발명에 있어서, "항원 결합 분자의 pH 산성 영역의 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성이 pH 중성 영역의 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성보다 낮음"이란 항원 결합 분자의 pH 중성 영역의 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성이 pH 산성 영역의 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성보다 높다고 표현할 수 있다. 또한 본 발명에 있어서는 "pH 산성 영역의 조건 하에서의 항원 결합 활성이 pH 중성 영역의 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성보다 낮음"을 "pH 산성 영역의 조건 하에서의 항원 결합능이 pH 중성 영역의 조건 하에서의 항원에 대한 결합능보다 약함"으로 기재하는 경우도 있고, 또한, "pH 산성 영역의 조건 하에서의 항원 결합 활성을 pH 중성 영역의 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성보다 저하됨"을 "pH 산성 영역의 조건 하에서의 항원 결합능

을 pH 중성 영역의 조건 하에서의 항원에 대한 결합능보다 약하게 함"으로 기재하는 경우도 있다.

[0265] 상기와 같이 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 아미노산 잔기의 예로서, 예를 들면 금속 이온이 칼슘 이온인 경우에는 칼슘 결합 모티프를 형성하는 아미노산이면 그 종류는 상관없다. 칼슘 결합 모티프는 당업자에 주지이고, 상세하게 기재되어 있다(예를 들면 Springer 등(Cell (2000) 102, 275-277; Kawasaki 및 Kretsinger, Protein Prof. (1995) 2, 305-490; Moncrief 등, J. Mol. Evol. (1990) 30, 522-562; Chauvaux 등, Biochem. J. (1990) 265, 261-265; Bairoch 및 Cox, FEBS Lett. (1990) 269, 454-456; Davis, New Biol. (1990) 2, 410-419; Schaefer 등, Genomics (1995) 25, 638~643; Economou 등, EMBO J. (1990) 9, 349-354; 및 Wurzburg 등, Structure. (2006) 14, 6, 1049-1058). 즉, ASGPR, CD23, MBR, 및 DC-SIGN 등의 C형 헥타인 등의 임의의 공자의 칼슘 결합 모티프가 본 발명의 항원 결합 분자에 포함될 수 있다. 상기 이외에, 이러한 칼슘 결합 모티프의 바람직한 예로서 후술되는 바와 같이 V_k5-2 등의 생식 세포 계열의 서열을 갖는 항체의 경쇄 가변 영역에 존재하는 V_k5의 부분에 포함되는 칼슘 결합 모티프도 들 수 있다.

[0266] 또한, 칼슘 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 아미노산 잔기의 예로서 금속 퀄레이트 작용을 갖는 아미노산도 바람직하게 사용될 수 있다. 금속 퀄레이트 작용을 갖는 아미노산의 예로서, 예를 들면 세린(Ser (S)), 트레오닌(Thr (T)), 아스파라긴(Asn (N)), 글루타민(Gln (Q)), 아스파라긴산(Asp (D)) 및 글루타민산(Glu (E)) 등을 바람직하게 들 수 있다.

[0267] 상기 아미노산 잔기가 포함하는 항원 결합 도메인의 위치는 특정 위치로 한정되지 않고 칼슘 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 한, 항원 결합 도메인을 형성하는 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역 중의 어느 위치에서도 있을 수 있다. 즉, 본 발명의 일태양으로는 칼슘 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 아미노산 잔기가 중쇄의 항원 결합 도메인에 포함되어 있는 서로 서열이 다른 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리가 제공된다. 또한, 다른 태양으로는 해당 아미노산 잔기가 중쇄의 CDR3에 포함되어 있는 서로 서열이 다른 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리가 제공된다. 그 이외의 태양으로는 해당 아미노산 잔기가 중쇄의 CDR3의 Kabat 넘버링으로 정의되는 95위치, 96위치, 100a위치 및 101위치에 포함되어 있는 서로 서열이 다른 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리가 제공된다.

[0268] 또한, 본 발명의 일태양으로는 칼슘 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 아미노산 잔기가 경쇄의 항원 결합 도메인에 포함되어 있는 서로 서열이 다른 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리가 제공된다. 또한, 다른 태양으로는 해당 아미노산 잔기가 경쇄의 CDR1에 포함되어 있는 서로 서열이 다른 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리가 제공된다. 그 이외의 태양으로는 해당 아미노산 잔기가 경쇄의 CDR1의 Kabat 넘버링으로 정의되는 30위치, 31위치 및 32위치에 포함되어 있는 서로 서열이 다른 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리가 제공된다.

[0269] 또한, 다른 태양으로는 해당 아미노산 잔기가 경쇄의 CDR2에 포함되어 있는 서로 서열이 다른 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리가 제공된다. 그 이외의 태양으로는 해당 아미노산 잔기가 경쇄의 CDR2의 Kabat 넘버링으로 정의되는 50위치에 포함되어 있는 서로 서열이 다른 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리가 제공된다.

[0270] 또한 다른 태양으로는 해당 아미노산 잔기가 경쇄의 CDR3에 포함되어 있는 서로 서열이 다른 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리가 제공된다. 그 이외의 태양으로는 해당 아미노산 잔기가 경쇄의 CDR3의 Kabat 넘버링으로 정의되는 92위치에 포함되어 있는 서로 서열이 다른 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리가 제공된다.

[0271] 또한, 해당 아미노산 잔기가 상기 기재된 경쇄의 CDR1, CDR2, 및 CDR3로부터 선택되는 2개 또는 3개의 CDR에 포함되어 있는 서로 서열이 다른 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리도 또한 본 발명의 다른 태양으로서 제공된다. 또한, 해당 아미노산 잔기가 경쇄 Kabat 넘버링으로 정의되는 30위치, 31위치, 32위치, 50위치 및 92위치 어느 하나 이상에 포함되어 있는 서로 서열이 다른 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리도 또한 제공된다.

[0272] 특히 바람직한 실시형태로는 항원 결합 분자의 경쇄 및/또는 중쇄 가변 영역의 프레임워크 서열은 인간의 생식 세포계 프레임워크 서열을 갖고 있는 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명의 일태양에 있어서 프레임워크 서열이 완전하게 인간의 서열이면 인간에 투여(예를 들면 질병의 치료)될 경우, 본 발명의 항원 결합 분자는 면역원성

반응을 거의 또는 전혀 일으키지 않는다고 생각한다. 상기 의미로부터 본 발명의 "생식 세포 계열의 서열을 포함"이란 본 발명의 프레임워크 서열의 일부가 어느 인간의 생식 세포계 프레임워크 서열의 일부와 동일한 것을 의미한다. 예를 들면, 본 발명의 항원 결합 분자의 중쇄 FR2의 서열이 복수의 다른 인간의 생식 세포계 프레임워크 서열의 중쇄 FR2 서열을 조합시킨 서열인 경우도 본 발명의 "생식 세포 계열의 서열을 포함" 항원 결합 분자이다.

[0273] 프레임워크의 예로서는, 예를 들면 V-Base(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) 등의 웹 사이트에 포함되어 있는 현재 알려져 있는 완전하게 인간형의 프레임워크 영역의 서열을 바람직하게 들 수 있다. 이들 프레임워크 영역의 서열이 본 발명의 항원 결합 분자에 포함되는 생식 세포 계열의 서열로서 적절하게 사용될 수 있다. 생식 세포 계열의 서열은 그 유사성에 따라 분류될 수 있다(Tomlinson 등, J. Mol. Biol. (1992) 227, 776-798; Williams 및 Winter, Eur. J. Immunol. (1993) 23, 1456-1461; 및 Cox 등, Nat. Genetics (1994) 7, 162-168). 7개의 서브그룹에 분류되는 $V\kappa$ 10의 서브그룹에 분류되는 $V\lambda$, 7개의 서브그룹에 분류되는 VH 로부터 바람직한 생식 세포 계열의 서열이 적절하게 선택될 수 있다.

[0274] 완전하게 인간형의 VH 서열은 하기에만 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면 VH 서브그룹(예를 들면, VH 1-2, VH 1-3, VH 1-8, VH 1-18, VH 1-24, VH 1-45, VH 1-46, VH 1-58, 및 VH 1-69), VH 2 서브그룹(예를 들면, VH 2-5, VH 2-26, 및 VH 2-70), VH 3 서브그룹(VH 3-7, VH 3-9, VH 3-11, VH 3-13, VH 3-15, VH 3-16, VH 3-20, VH 3-21, VH 3-23, VH 3-30, VH 3-33, VH 3-35, VH 3-38, VH 3-43, VH 3-48, VH 3-49, VH 3-53, VH 3-64, VH 3-66, VH 3-72, VH 3-73, 및 VH 3-74), VH 4 서브그룹(VH 4-4, VH 4-28, VH 4-31, VH 4-34, VH 4-39, VH 4-59, 및 VH 4-61), VH 5 서브그룹(VH 5-51), VH 6 서브그룹(VH 6-1), 및 VH 7 서브그룹(VH 7-4 및 VH 7-81)의 VH 서열 등을 바람직하게 들 수 있다. 이들은 공지 문헌(Matsuda 등, J. Exp. Med (1998) 188, 1973-1975) 등에도 기재되어 있고, 당업자는 이들 서열 정보를 바탕으로 본 발명의 항원 결합 분자를 적절하게 디자인하는 것이 가능하다. 이들 이외의 완전하게 인간형의 프레임워크 또는 프레임워크의 관련 영역도 바람직하게 사용될 수 있다.

[0275] 완전하게 인간형의 $V\kappa$ 서열은 하기에만 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면 $V\kappa$ 1 서브그룹으로 분류되는 A20, A30, L1, L4, L5, L8, L9, L11, L12, L14, L15, L18, L19, L22, L23, L24, O2, O4, O8, O12, O14, 및 O18, $V\kappa$ 2 서브그룹으로 분류되는 A1, A2, A3, A5, A7, A17, A18, A19, A23, O1, 및 O11, $V\kappa$ 3 서브그룹으로 분류되는 A11, A27, L2, L6, L10, L16, L20, 및 L25, $V\kappa$ 4 서브그룹으로 분류되는 B3, $V\kappa$ 5 서브그룹으로 분류되는 B2(본 명세서에서는 $V\kappa$ 5-2 모두 지칭), 및 $V\kappa$ 6 서브그룹으로 분류되는 A10, A14, 및 A26 등(Kawasaki 등, Eur. J. Immunol. (2001) 31, 1017-1028; Schable 및 Zachau, Biol. Chem. Hoppe Seyler (1993) 374, 1001-1022; 및 Breising-Kuppers 등, Gene (1997) 191, 173-181)을 바람직하게 들 수 있다.

[0276] 완전하게 인간형의 VL 서열은 하기에만 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면 VL 1 서브그룹으로 분류되는 V1-2, V1-3, V1-4, V1-5, V1-7, V1-9, V1-11, V1-13, V1-16, V1-17, V1-18, V1-19, V1-20, 및 V1-22, VL 2 서브그룹으로 분류되는 V2-1, V2-6, V2-7, V2-8, V2-11, V2-13, V2-14, V2-15, V2-17, 및 V2-19, VL 3 서브그룹으로 분류되는 V3-2, V3-3, 및 V3-4, VL 4 서브그룹으로 분류되는 V4-1, V4-2, V4-3, V4-4, 및 V4-6, 및 VL 5 서브그룹으로 분류되는 V5-1, V5-2, V5-4, 및 V5-6 등(Kawasaki 등, Genome Res. (1997) 7, 250-261)을 바람직하게 들 수 있다.

[0277] 통상적으로 이들 프레임워크 서열은 1 또는 그 이상의 아미노산 잔기의 차이에 따라 서로 다르다. 이들 프레임워크 서열은 본 발명의 "이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기"와 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 "이온 농도 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기"와 함께 사용되는 완전하게 인간형의 프레임워크의 예로서는 이것에만 한정되는 것은 아니지만, 그 이외에도 KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY, 및 POM 등을 들 수 있다(예를 들면, Kabat 등, (1991); 및 Wu 등, J. Exp. Med (1970) 132, 211 - 250).

[0278] 본 발명은 특정한 이론에 구속되는 것은 아니지만, 생식 세포계의 서열의 사용이 대부분의 개인에 있어서 유해한 면역 반응을 배제한다면 기대되고 있는 하나의 이유는 이하와 같다고 생각된다. 통상의 면역 반응 중에 생기는 친화성 성숙 단계의 결과, 면역 글로불린의 가변 영역에 체세포의 돌연변이가 빈번하게 생긴다. 이들 돌연변이는 주로 그 서열이 초가변적인 CDR의 주변에 생기는데 프레임워크 영역의 잔기에도 영향을 미친다. 이들 프레임워크의 돌연변이는 생식 세포계의 유전자에는 존재하지 않고, 또한 환자의 면역원성으로 될 가능성은 적지 않다고 생각한다. 한편, 통상의 인간 집단은 생식 세포계의 유전자에 따라서 발현되는 프레임워크 서열의 대다수에 노출되어 있고, 면역 관용의 결과, 이들 생식 세포계의 프레임워크는 환자에 있어서 면역원성이 낮은 또는 비면역원성이라고 예상된다. 면역 관용의 가능성을 최대로 하기 위해서 가변 영역을 부호화하는 유전자가 보

통 존재하는 기능적인 생식 세포계 유전자의 집합으로부터 선택될 수 있다.

[0279] 본 발명의 "이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기"가 상기 프레임워크 서열에 포함되는 항원 결합 분자를 제조하기 위해서 부위 특이적 변이 유발법(Kunkel 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492)이나 Overlap extension PCR 등의 공지의 방법이 적절하게 채용될 수 있다.

[0280] 예를 들면, "이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기"가 미리 포함되어 있는 프레임워크 서열로서 선택된 경쇄 가변 영역과 랜덤화 가변 영역 서열 라이브러리로서 제조된 중쇄 가변 영역을 조합시킴으로써 본 발명의 복수의 서로 다른 항원 결합 분자를 포함한 라이브러리가 제조될 수 있다. 이러한 비한정적인 예로서 이온 농도가 칼슘 이온 농도인 경우에는, 예를 들면 서열 번호: 1(Vk5-2)에 기재된 경쇄 가변 영역 서열과 랜덤화 가변 영역 서열 라이브러리로서 제조된 중쇄 가변 영역을 조합시킨 라이브러리를 바람직하게 들 수 있다. 상기 Vk5-2 등의 생식 세포 계열의 서열을 갖는 항체의 경쇄 가변 영역에 존재하는 Vk5-2의 도메인을 포함한 경쇄 가변 영역 서열의 바람직한 예로서 서열 번호: 1(Vk5-2)에 기재된 경쇄 가변 영역 서열 이외에 후술하는 서열 번호: 2에서 나타내는 Vk5-2 변종 1 또는 서열 번호: 3에서 나타내는 Vk5-2 변종 2 등도 적절하게 사용된다. 이들 분자에 포함되는 "이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기"를 포함한 Vk5-2의 도메인이 본 발명의 칼슘 결합 모티프를 포함한 도메인으로서 사용될 수 있다. 본 발명의 비한정의 일태양으로는 칼슘 결합 모티프를 형성하는 적어도 하나의 아미노산이 본 발명의 "이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기"로서 사용될 수 있다.

[0281] 또한, 상기 "이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기"가 미리 포함되어 있는 프레임워크 서열로서 선택된 경쇄 가변 영역의 서열에 해당 아미노산 잔기 이외의 잔기로서 다양한 아미노산이 포함되도록 디자인하는 것도 가능하다. 본 발명에 있어서 그러한 잔기는 플렉시블 잔기로 지칭된다. 본 발명의 항원 결합 분자의 항원에 대한 결합 활성이 이온 농도의 조건에 따라서 변화되는 한, 해당 플렉시블 잔기의 수 및 위치는 특정한 태양에 한정되는 것은 아니다. 즉, 중쇄 및/또는 경쇄의 CDR서열 및/또는 FR 서열에 하나 또는 그 이상의 플렉시블 잔기가 포함될 수 있다. 예를 들면, 이온 농도가 칼슘 이온 농도인 경우에는 서열 번호: 1(Vk5-2)에 기재된 경쇄 가변 영역 서열에 도입되는 플렉시블 잔기의 비한정적인 예로서 표 13, 표 14, 표 17 또는 표 18에 기재된 아미노산 잔기를 들 수 있다.

[0282] 또한, 상기 "이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시는 적어도 하나의 아미노산 잔기"가 도입된 경쇄 가변 영역과 랜덤화 가변 영역 서열 라이브러리로서 제조된 중쇄 가변 영역을 조합시킴으로써 본 발명의 복수의 서로 다른 항원 결합 분자를 포함한 라이브러리가 제조될 수 있다. 이러한 비한정적인 예로서 이온 농도가 칼슘 이온 농도인 경우에는, 예를 들면 서열 번호: 6(Vk1), 서열 번호: 7(Vk2), 서열 번호: 8(Vk3), 서열 번호: 9(Vk4) 등의 생식 세포 계열의 특정 잔기가 "칼슘 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기"에 치환된 경쇄 가변 영역 서열과 랜덤화 가변 영역 서열 라이브러리로서 제조된 중쇄 가변 영역을 조합시킨 라이브러리를 바람직하게 들 수 있다. 해당 아미노산 잔기의 비한정인 예로서 경쇄의 CDR1에 포함되는 아미노산 잔기가 예시된다. 그 이외에도, 해당 아미노산 잔기의 비한정인 예로서 경쇄의 CDR2에 포함되는 아미노산 잔기가 예시된다. 또한, 해당 아미노산 잔기의 비한정인 다른 예로서 경쇄 CDR3에 포함되는 아미노산 잔기도 또한 예시된다.

[0283] 상기와 같이, 해당 아미노산 잔기가 경쇄의 CDR1에 포함되는 아미노산 잔기의 비한정인 예로서 경쇄 가변 영역의 CDR1 중의 Kabat 넘버링으로 정의되는 30위치, 31위치, 및/또는 32위치의 아미노산 잔기를 들 수 있다. 또한, 해당 아미노산 잔기가 경쇄의 CDR2에 포함되는 아미노산 잔기의 비한정인 예로서 경쇄 가변 영역의 CDR2 중의 Kabat 넘버링으로 정의되는 50위치의 아미노산 잔기를 들 수 있다. 또한, 해당 아미노산 잔기가 경쇄의 CDR3에 포함되는 아미노산 잔기의 비한정인 예로서 경쇄 가변 영역의 CDR3 중의 Kabat 넘버링으로 정의되는 92 위치의 아미노산 잔기를 들 수 있다. 또한, 이들 아미노산 잔기가 칼슘 결합 모티프를 형성하고, 및/또는 칼슘 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성이 변화하는 한, 이들 아미노산 잔기가 단독으로 포함될 수 있다. 이들 아미노산이 2개 이상 조합되어서 포함될 수 있다. 또한, 복수개의 칼슘 이온 결합 부위를 갖고, 분자 진화상 공통의 기원으로부터 유래한다고 생각되는 트로포닌 C, 칼모듈린, 파브알부민, 및 마이오신 경쇄 등이 알려져 있고, 그 결합 모티프가 포함되도록 경쇄 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3를 디자인하는 것도 가능하다. 예를 들면, 상기 목적으로 카데린 도메인, 칼모듈린에 포함되는 EF 핸드, 단백질 키나아제 C에 포함되는 C2 도메인, 혈액 응고 단백질 FactorIX에 포함되는 Gla 도메인, 아실알로글리코프로테인 수용체나 만노오스 결합 수용체에 포함되는 C형 렉틴, LDL수용체에 포함되는 A 도메인, 아넥신, 트롬보스폰딘 3형 도메인 및

EGF 유사의 도메인이 적절하게 사용될 수 있다.

[0284] 상기 "이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기"가 도입된 경쇄 가변 영역과 랜덤화 가변 영역 서열 라이브러리로서 제조된 중쇄 가변 영역을 조합시키는 경우에도 상기와 마찬가지로 플렉시블 잔기가 해당 경쇄 가변 영역의 서열에 포함되도록 디자인하는 것도 가능하다. 본 발명의 항원 결합 분자의 항원에 대한 결합 활성이 이온 농도의 조건에 따라서 변화하는 한, 해당 플렉시블 잔기의 수 및 위치는 특정한 태양에 한정되는 것은 아니다. 즉, 중쇄 및/또는 경쇄의 CDR 서열 및/또는 FR 서열에 하나 또는 그 이상의 플렉시블 잔기가 포함될 수 있다. 예를 들면, 이온 농도가 칼슘 이온 농도인 경우에는 경쇄 가변 영역 서열에 도입되는 플렉시블 잔기의 비한정적인 예로서 표 13, 표 14, 표 17 및 표 18에 기재된 아미노산 잔기를 들 수 있다.

[0285] 조합되는 중쇄 가변 영역의 예로서 랜덤화 가변 영역 라이브러리를 바람직하게 들 수 있다. 랜덤화 가변 영역 라이브러리의 제조방법은 공지의 방법이 적절하게 조합된다. 본 발명의 비한정인 일태양으로는 특정한 항원으로 면역된 동물, 감염증 환자나 백신 접종해서 혈중 항체값이 상한된 인간, 암 환자, 자기 면역 질환의 림프구 유래의 항체 유전자를 바탕으로 구축된 면역 라이브러리가 랜덤화 가변 영역 라이브러리로서 바람직하게 사용될 수 있다.

[0286] 또한, 본 발명의 비한정인 일태양으로는 게놈 DNA에서의 V유전자나 재구축된 기능적인 V유전자의 CDR 서열이 적당한 길이의 코돈 세트를 부호화하는 서열을 포함한 합성 올리고 뉴클레오티드 세트로 치환된 합성 라이브러리도 또한 랜덤화 가변 영역 라이브러리로서 바람직하게 사용될 수 있다. 이 경우, 중쇄의 CDR3의 유전자 서열의 다양성이 관찰되기 때문에 CDR3의 서열만을 치환하는 것도 또한 가능하다. 항원 결합 분자의 가변 영역에서 아미노산의 다양성을 만들어 내는 기준은 항원 결합 분자의 표면에 노출된 위치의 아미노산 잔기에 다양성을 갖게 하는 것이다. 표면에 노출된 위치는 항원 결합 분자의 구조, 구조 양상, 및/또는 모델화시킨 구조에 따라 표면 노출이 가능, 및/또는 항원과의 접촉이 가능하다고 판단되는 위치의 것을 말하지만, 일반적으로는 그 CDR이다. 바람직하게는 표면에 노출된 위치는 Insight II 프로그램(Acceleyes Inc.)과 같은 컴퓨터 프로그램을 사용해서 항원 결합 분자의 3차원 모델로부터의 좌표를 사용해서 결정된다. 표면에 노출된 위치는 상기 기술 분야에서 공지된 알고리즘(예를 들면, Lee 및 Richards, J.Mol.Biol. (1971) 55, 379-400; 및 Connolly, J.Appl.Cryst. (1983) 16, 548-558)을 사용해서 결정될 수 있다. 표면에 노출된 위치의 결정은 단백질 모델링에 적합한 소프트웨어 및 항체로부터 얻어지는 3차원 구조 정보를 이용해서 행할 수 있다. 이러한 목적을 위해 이용할 수 있는 소프트웨어로서 SYBYL 생체 고분자 모듈 소프트웨어(Tripes Associates Inc.)를 바람직하게 들 수 있다. 일반적으로, 또한 바람직하게는 알고리즘이 사용자의 입력 사이즈 파라미터를 필요로 할 경우는 계산에서 사용되는 프로브의 "사이즈"는 반경 약 1.4 Å 이하로 디자인된다. 또한, 퍼스널 컴퓨터용의 소프트웨어를 사용한 표면에 노출된 영역 및 영역의 결정법이 Pacios, Comput. Chem. (1994) 18 (4), 377-386 및 J.Mol.Model. (1995) 1, 46-53)에 기재되어 있다.

[0287] 또한, 본 발명의 비한정인 일태양으로는 건강한 인간의 림프구 유래의 항체 유전자로부터 구축되어 그 레퍼토리에 바이어스를 포함하지 않는 항체 서열인 나이브 서열로 이루어지는 나이브 라이브러리도 또한, 랜덤화 가변 영역 라이브러리로서 특히 바람직하게 사용될 수 있다(Gejima 등, Human Antibodies (2002) 11, 121-129; 및 Cardoso 등, Scand. J. Immunol. (2000) 51, 337-344). 본 발명에서 기재된 나이브 서열을 포함한 아미노산 서열이란 이러한 나이브 라이브러리로부터 취득되는 아미노산 서열을 말한다.

[0288] 본 발명의 일태양으로는 "이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기"가 미리 포함되어 있는 프레임워크 서열로서 선택된 중쇄 가변 영역과 랜덤화 가변 영역 서열 라이브러리로서 제조된 경쇄 가변 영역을 조합시킴으로써 본 발명의 복수의 서로 다른 항원 결합 분자를 포함한 라이브러리가 제조될 수 있다. 이러한 비한정적인 예로서 이온 농도가 칼슘 이온 농도인 경우에는, 예를 들면 서열번호: 10(6RL#9H-IgG1) 또는 서열 번호: 11(6KC4-1#85H-IgG1)에 기재된 중쇄 가변 영역 서열과 랜덤화 가변 영역 서열 라이브러리로서 제조된 경쇄 가변 영역을 조합시킨 라이브러리를 바람직하게 들 수 있다. 또한, 랜덤화 가변 영역 서열 라이브러리로서 제조된 경쇄 가변 영역 대신에 생식 세포 계열의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역의 중으로부터 적절하게 선택함으로써 제조될 수 있다. 예를 들면, 서열 번호: 10(6RL#9H-IgG1) 또는 서열 번호: 11(6KC4-1#85H-IgG1)에 기재된 중쇄 가변 영역 서열과 생식 세포 계열의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 조합시킨 라이브러리를 바람직하게 들 수 있다.

[0289] 또한, 상기 "이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기"가 미리 포함되어 있는 프레임워크 서열로서 선택된 중쇄 가변 영역의 서열에 플렉시블 잔기가

포함되도록 디자인하는 것도 가능하다. 본 발명의 항원 결합 분자의 항원에 대한 결합 활성이 이온 농도의 조건에 따라서 변화하는 한, 해당 플렉시블 잔기의 수 및 위치는 특정한 태양에 한정되는 것은 아니다. 즉, 중쇄 및/또는 경쇄의 CDR 서열 및/또는 FR 서열에 하나 또는 그 이상의 플렉시블 잔기가 포함될 수 있다. 예를 들면, 이온 농도가 칼슘 이온 농도인 경우에는 서열 번호: 10(6RL#9H-IgG1)에 기재된 중쇄 가변 영역 서열에 도입되는 플렉시블 잔기의 비한정적인 예로서 중쇄 CDR1 및 CDR2의 모든 아미노산 잔기 이외에 중쇄 CDR3의 95위치, 96위치 및/또는 100a위치 이외의 CDR3의 아미노산 잔기를 들 수 있다. 또한, 서열 번호: 11(6KC4-1#85H-IgG1)에 기재된 중쇄 가변 영역 서열에 도입되는 플렉시블 잔기의 비한정적인 예로서 중쇄 CDR1 및 CDR2의 모든 아미노산 잔기 이외에 중쇄 CDR3의 95위치 및/또는 101위치 이외의 CDR3의 아미노산 잔기도 또한 들 수 있다.

[0290] 또한, 상기 "이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기"가 도입된 중쇄 가변 영역과 랜덤화 가변 영역 서열 라이브러리로서 제조된 경쇄 가변 영역 또는 생식 세포 계열의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 조합시킴으로써 본 발명의 복수의 서로 다른 항원 결합 분자를 포함한 라이브러리가 제조될 수 있다. 이러한 비한정적인 예로서 이온 농도가 칼슘 이온 농도인 경우에는, 예를 들면 중쇄 가변 영역의 특정 잔기가 "칼슘 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기"에 치환된 중쇄 가변 영역 서열과 랜덤화 가변 영역 서열 라이브러리로서 제조된 경쇄 가변 영역 또는 생식 세포 계열의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 조합시킨 라이브러리를 바람직하게 들 수 있다. 해당 아미노산 잔기의 비한정인 예로서는 중쇄의 CDR1에 포함되는 아미노산 잔기가 예시된다. 그 이외에도, 해당 아미노산 잔기의 비한정인 예로서 중쇄의 CDR2에 포함되는 아미노산 잔기가 예시된다. 또한, 해당 아미노산 잔기의 비한정인 다른 예로서 중쇄 CDR3에 포함되는 아미노산 잔기도 또한 예시된다. 해당 아미노산 잔기가 중쇄 CDR3에 포함되는 아미노산 잔기의 비한정인 예로서 중쇄 가변 영역의 CDR3 중의 Kabat 넘버링으로 정의되는 95위치, 96위치, 100a위치 및/또는 101위치의 아미노산을 들 수 있다. 또한, 이들 아미노산 잔기가 칼슘 결합 모티프를 형성하고, 및/또는 칼슘 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성이 변화하는 한, 이들 아미노산 잔기가 단독으로 포함될 수 있으며, 이들 아미노산이 2개 이상 조합되어서 포함될 수 있다.

[0291] 상기 "이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기"가 도입된 중쇄 가변 영역과 랜덤화 가변 영역 서열 라이브러리로서 제조된 경쇄 가변 영역 또는 생식 세포 계열의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 조합시키는 경우에도 상기와 마찬가지로 플렉시블 잔기가 해당 중쇄 가변 영역의 서열에 포함되도록 디자인하는 것도 가능하다. 본 발명의 항원 결합 분자의 항원에 대한 결합 활성이 이온 농도의 조건에 따라서 변화하는 한, 해당 플렉시블 잔기의 수 및 위치는 특정 태양에 한정되는 것은 아니다. 즉, 중쇄 CDR 서열 및/또는 FR 서열에 1개 또는 그 이상의 플렉시블 잔기가 포함될 수 있다. 또한, "이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 아미노산 잔기" 이외의 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3의 아미노산 서열로서 랜덤화 가변 영역 라이브러리도 바람직하게 사용될 수 있다. 경쇄 가변 영역으로서 생식 세포 계열의 서열이 사용되는 경우에는, 예를 들면 서열 번호: 6(Vk1), 서열 번호: 7(Vk2), 서열 번호: 8(Vk3), 및 서열 번호: 9(Vk4) 등의 생식 세포 계열의 서열이 비한정인 예로서 들 수 있다.

[0292] 상기 칼슘 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 아미노산 잔기로서는 칼슘 결합 모티프를 형성하는 한, 어느 아미노산 잔기도 바람직하게 사용될 수 있지만, 그러한 아미노산 잔기로서는 구체적으로 전자 공여성을 갖는 아미노산을 들 수 있다. 이러한 전자 공여성을 갖는 아미노산으로서는 세린, 트레오닌 아스파라긴, 글루타민, 아스파라긴산, 및 글루타민산이 바람직하게 예시된다.

[0293] 본 발명의 일태양으로서 "수소 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기"가 도입된 경쇄 가변 영역과 랜덤화 가변 영역 서열 라이브러리로서 제조된 중쇄 가변 영역을 조합시킴으로써 본 발명의 복수의 서로 다른 항원 결합 분자를 포함한 라이브러리가 제조될 수 있다.

[0294] 해당 아미노산 잔기의 비한정적인 예로서 경쇄의 CDR1에 포함되는 아미노산 잔기가 예시된다. 그 이외에도, 해당 아미노산 잔기의 비한정적인 예로서 경쇄의 CDR2에 포함되는 아미노산 잔기가 예시된다. 또한, 해당 아미노산 잔기의 비한정적인 다른 예로서 경쇄의 CDR3에 포함되는 아미노산 잔기도 또한 예시된다.

[0295] 상기와 같이, 해당 아미노산 잔기가 경쇄의 CDR1에 포함되는 아미노산 잔기의 비한정적인 예로서 경쇄 가변 영역의 CDR1 중의 Kabat 넘버링으로 정의되는 24위치, 27위치, 28위치, 30위치, 31위치, 32위치 및/또는 34위치의 아미노산 잔기를 들 수 있다. 또한, 해당 아미노산 잔기가 경쇄의 CDR2에 포함되는 아미노산 잔기의 비한정적인

예로서 경쇄 가변 영역의 CDR2 중의 Kabat 넘버링으로 정의되는 50위치, 51위치, 52위치, 53위치, 54위치, 55위치 및/또는 56위치의 아미노산 잔기를 들 수 있다. 또한, 해당 아미노산 잔기가 경쇄의 CDR3에 포함되는 아미노산 잔기의 비한정적인 예로서 경쇄 가변 영역의 CDR3 중의 Kabat 넘버링으로 정의되는 89위치, 90위치, 91위치, 92위치, 93위치, 94위치 및/또는 95a위치의 아미노산 잔기를 들 수 있다. 또한, 이들 아미노산 잔기가 수소 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성이 변화하는 한, 이들 아미노산 잔기가 단독으로 포함될 수 있고, 이들 아미노산이 2개 이상 조합되어서 포함될 수 있다.

[0296] 상기 "수소 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기"가 도입된 경쇄 가변 영역과 웬덤화 가변 영역 서열 라이브러리로서 제조된 중쇄 가변 영역을 조합시키는 경우에도 상기와 마찬가지로 플렉시블 잔기가 해당 경쇄 가변 영역의 서열에 포함되도록 디자인하는 것도 가능하다. 본 발명의 항원 결합 분자의 항원에 대한 결합 활성이 수소 이온 농도의 조건에 따라서 변화하는 한, 해당 플렉시블 잔기의 수 및 위치는 특정 태양에 한정되는 것은 아니다. 즉, 중쇄 및/또는 경쇄의 CDR 서열 및/또는 FR 서열에 1개 또는 그 이상의 플렉시블 잔기가 포함될 수 있다. 예를 들면, 경쇄 가변 영역 서열에 도입되는 플렉시블 잔기의 비한정적인 예로서 표 4 및 표 5에 기재된 아미노산 잔기를 들 수 있다. 또한, 수소 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 아미노산 잔기나 플렉시블 잔기 이외의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열로서는 비한정적인 예로서 Vk1(서열 번호: 6), Vk2(서열 번호: 7), Vk3(서열 번호: 8), Vk4(서열 번호: 9) 등의 생식 세포 계열의 서열이 바람직하게 사용될 수 있다.

[0297] 조합되는 중쇄 가변 영역의 예로서 웬덤화 가변 영역 라이브러리를 바람직하게 들 수 있다. 웬덤화 가변 영역 라이브러리의 제조방법은 공지의 방법이 적절하게 조합된다. 본 발명의 비한정적인 일태양으로는 특정 항원으로 면역된 동물, 감염증 환자나 백신 접종해서 혈중 항체값이 상한된 인간, 암 환자, 자기 면역 질환의 림프구 유래의 항체 유전자를 바탕으로 구축된 면역 라이브러리가 웬덤화 가변 영역 라이브러리로서 바람직하게 사용될 수 있다.

[0298] 또한, 본 발명의 비한정적인 일태양으로는 상기와 마찬가지로 게놈 DNA에서의 V유전자나 재구축되는 기능적인 V유전자의 CDR 서열이 적당한 길이의 코돈 세트를 부호화하는 서열을 포함한 합성 올리고뉴클레오티드 세트로 치환된 합성 라이브러리도 또한, 웬덤화 가변 영역 라이브러리로서 바람직하게 사용될 수 있다.

[0299] 또한, 본 발명의 비한정적인 일태양으로는 건강한 인간의 림프구 유래의 항체 유전자로부터 구축되어 그 레퍼토리에 바이어스를 포함하지 않는 항체 서열인 나이브 서열로 이루어지는 나이브 라이브러리도 또한 웬덤화 가변 영역 라이브러리로서 특히 바람직하게 사용될 수 있다(Gejima 등, Human Antibodies (2002) 11, 121-129; 및 Cardoso 등, Scand. J. Immunol. (2000) 51, 337-344).

[0300] 본 발명의 다른 태양으로서 "수소 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기"가 도입된 중쇄 가변 영역과 웬덤화 가변 영역 서열 라이브러리로서 제조된 경쇄 가변 영역 또는 생식 세포 계열의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 조합시킴으로써 본 발명의 복수의 서로 서열이 다른 항원 결합 분자를 포함한 라이브러리가 제조될 수 있다. 이러한 비한정적인 예로서, 예를 들면 중쇄 가변 영역의 특정 잔기가 "수소 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기"에 치환된 중쇄 가변 영역 서열과 웬덤화 가변 영역 서열 라이브러리로서 제조된 경쇄 가변 영역 또는 생식 세포 계열의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 조합시킨 라이브러리를 바람직하게 들 수 있다. 해당 아미노산 잔기의 비한정적인 예로서 중쇄의 CDR1에 포함되는 아미노산 잔기가 예시된다. 이외에도, 해당 아미노산 잔기의 비한정적인 예로서 중쇄 CDR2에 포함되는 아미노산 잔기가 예시된다. 또한, 해당 아미노산 잔기의 비한정적인 다른 예로서 중쇄의 CDR3에 포함되는 아미노산 잔기도 또한 예시된다.

[0301] 해당 아미노산 잔기가 중쇄의 CDR1에 포함된 아미노산 잔기의 비제한적인 예로서 중쇄 가변 영역의 CDR1 중의 Kabat 넘버링으로 정의된 27위치, 31위치, 32위치, 33위치 및/또는 35위치의 아미노산을 들 수 있다. 중쇄의 CDR2에 포함된 아미노산 잔기의 비제한적인 예로서 중쇄 가변 영역의 CDR2 중의 Kabat 넘버링으로 정의된 50위치, 52위치, 53위치, 55위치, 57위치, 58위치, 59위치, 61위치 및/또는 62위치의 아미노산을 들 수 있다. 중쇄의 CDR3에 포함된 아미노산 잔기의 비제한적인 예로서 중쇄 가변 영역의 CDR3 중의 Kabat 넘버링으로 정의되는 95위치, 96위치, 97위치, 98위치, 99위치, 100a위치, 100b위치, 100d위치, 100f위치, 100h위치, 102위치 및/또는 107위치의 아미노산을 들 수 있다. 또한, 이들 아미노산 잔기가 수소 이온 농도 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성이 변화하는 한, 이들 아미노산 잔기가 단독으로 포함될 수 있고, 이들 아미노산이 2개 이상 조합되어서 포함될 수 있다.

[0302] 상기 "수소 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의

아미노산 잔기"가 도입된 중쇄 가변 영역과 랜덤화 가변 영역 서열 라이브러리로서 제조된 경쇄 가변 영역 또는 생식 세포 계열의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 조합하는 경우에도 상기와 마찬가지로 플렉시블 잔기가 해당 중쇄 가변 영역의 서열에 포함되도록 디자인하는 것도 가능하다. 본 발명의 항원 결합 분자의 항원에 대한 결합 활성이 수소 이온 농도의 조건에 따라서 변화하는 한, 해당 플렉시블 잔기의 수 및 위치는 특정 태양에 한정되는 것은 아니다. 즉, 중쇄의 CDR 서열 및/또는 FR 서열에 1개 또는 그 이상의 플렉시블 잔기가 포함될 수 있다. 또한, "수소 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 아미노산 잔기" 이외의 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3의 아미노산 서열로서 랜덤화 가변 영역 라이브러리도 바람직하게 사용될 수 있다. 또한, 경쇄 가변 영역으로서 생식 세포 계열의 서열이 사용될 경우에는, 예를 들면 서열 번호: 6(Vk1), 서열 번호: 7(Vk2), 서열 번호: 8(Vk3), 및 서열 번호: 9(Vk4) 등의 생식 세포 계열의 서열을 비한정적인 예로서 들 수 있다.

[0303] 상기 수소 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 아미노산 잔기로서는 어느 아미노산 잔기도 바람직하게 사용될 수 있지만, 그러한 아미노산 잔기로서는 구체적으로 측쇄의 pKa가 4.0~8.0인 아미노산을 들 수 있다. 이러한 전자 공여성을 갖는 아미노산으로서는 히스티딘 및 글루타민산 등의 천연의 아미노산 외에 히스티딘 아날로그(US20090035836), m-N02-Tyr(pKa 7.45), 3,5-Br2-Tyr(pKa 7.21) 및 3,5-I2-Tyr(pKa 7.38) 등의 비천연 아미노산(Bioorg. Med. Chem. (2003) 11 (17), 3761-2768이 바람직하게 예시된다. 또한, 해당 아미노산 잔기의 특히 바람직한 예로서는 측쇄의 pKa가 5.5~7.0인 아미노산을 들 수 있다. 이러한 전자 공여성을 갖는 아미노산으로서는 히스티딘이 바람직하게 예시된다.

[0304] 항원 결합 도메인의 아미노산의 변이를 위해서는 부위 특이적 변이 유발법(Kunkel 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492)이나 Overlap extension PCR 등의 공기 방법이 적절하게 채용될 수 있다. 또한, 천연의 아미노산 이외의 아미노산으로 치환되는 아미노산의 변이방법으로서 복수의 공기의 방법도 또한 채용될 수 있다(Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006) 35, 225-249, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2003) 100 (11), 6353-6357). 예를 들면, 종지 코돈의 1개인 UAG 코돈(앰버 코돈)의 상보적 앰버 억제 tRNA에 비천연 아미노산이 결합 된 tRNA가 포함된 무세포 번역계 시스템(Clover Direct(Protein Express, an R & D oriented company)) 등도 바람직하게 사용된다.

[0305] 조합되는 경쇄 가변 영역의 예로서 랜덤화 가변 영역 라이브러리를 바람직하게 들 수 있다. 랜덤화 가변 영역 라이브러리의 제조방법은 공기의 방법이 적절하게 조합된다. 본 발명의 비한정적인 일태양으로는 특정 항원으로 면역된 동물, 감염증 환자나 백신 접종해서 혈중 항체값이 상한된 인간, 암 환자, 자기 면역 질환의 림프구 유래의 항체 유전자를 바탕으로 구축된 면역 라이브러리가 랜덤화 가변 영역 라이브러리로서 바람직하게 사용될 수 있다.

[0306] 또한, 본 발명의 비한정적인 일태양으로는 게놈 DNA에서의 V유전자나 재구축된 기능적인 V유전자의 CDR 서열이 적당한 길이의 코돈 세트를 부호화하는 서열을 포함한 합성 올리고뉴클레오티드로 치환된 합성 라이브러리도 또한 랜덤화 가변 영역 라이브러리로서 바람직하게 사용될 수 있다. 이 경우, 중쇄의 CDR3 유전자 서열의 다양성이 관찰되기 때문에 CDR3의 서열만을 치환하는 것도 또한 가능하다. 항원 결합 분자의 가변 영역에서 아미노산의 다양성을 만들어 내는 기준은 항원 결합 분자의 표면에 노출된 위치의 아미노산 잔기에 다양성을 갖게 하는 것이다. 표면에 노출된 위치란 항원 결합 분자의 구조, 구고 양상불, 및/또는 모델화시킨 구조에 따라서 표면에 노출이 가능, 및/또는 항원과의 접촉이 가능하다고 판단되는 위치의 것을 말하지만, 일반적으로는 그 CDR이다. 바람직하게는 표면에 노출된 위치는 Insight II 프로그램(Accelrys Inc.)과 같은 컴퓨터 프로그램을 사용해서 항원 결합 분자의 3차원 모델로부터의 좌표를 사용해서 결정된다. 표면에 노출된 위치는 상기 기술 분야에서 공지한 알고리즘(예를 들면, Lee 및 Richards, J. Mol. Biol. (1971) 55, 379-400; 및 Connolly, J. Appl. Cryst. (1983) 16, 548-558)을 사용해서 결정될 수 있다. 표면에 노출된 위치의 결정은 단백질 모델링에 적합한 소프트웨어 및 항체로부터 얻어진 3차원 구조 정보를 사용해서 행해질 수 있다. 이러한 목적을 위해서 이용될 수 있는 소프트웨어로서 SYBYL 생체 고분자 모듈 소프트웨어(Tripos Associates Inc.)를 바람직하게 들 수 있다. 일반적으로, 또한 바람직하게는 알고리즘이 사용자의 입력 사이즈 파라미터를 필요로 하는 경우는 계산에서 사용되는 프로브의 "사이즈"는 반경 약 1.4 Å 이하로 설정된다. 또한, 퍼스널 컴퓨터용의 소프트웨어를 사용한 표면에 노출된 영역 및 영역 결정방법이 Pacios, Comput. Chem. (1994) 18 (4), 377-386 및 J. Mol. Model. (1995) 1, 46~53)에 기재되어 있다.

[0307] 또한, 본 발명의 비한정적인 일태양으로는 건강한 인간의 림프구 유래의 항체 유전자로부터 구축되어 그 레퍼토리에 바이어스를 포함하지 않는 항체 서열인 나이브 서열로 이루어지는 나이브 라이브러리도 또한 랜덤화 가변 영역 라이브러리로서 특히 바람직하게 사용될 수 있다(Gejima 등, Human Antibodies (2002) 11, 121-129; 및

Cardoso 등, Scand. J. Immunol. (2000) 51, 337-344).

[0308]

이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 아미노산 잔기 이외의 아미노산으로서는 본 발명의 항원 결합 분자가 항원에 결합하는 한 임의의 아미노산이 사용될 수 있지만, 바람직한 예로서 J. D. Marks 등, J. Mol. Biol. (1991) 222, 581-597) 등의 공지 항체 파지 디스플레이 라이브러리 기술이 적절하게 적용될 수 있다. 즉, 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 아미노산 잔기 이외의 아미노산 서열로서 상기의 항체 파지 라이브러리로 채용된다.

[0309]

본 발명의 서로 서열이 다른 복수의 항원 결합 분자라는 기재에서의 "서로 서열이 다른"의 용어는 라이브러리 중의 개개의 항원 결합 분자의 서열이 서로 다른 것을 의미한다. 즉, 라이브러리 중에서의 서로 다른 서열의 수는 라이브러리 중의 서열이 다른 독립 클론의 수가 반영되고, "라이브러리 사이즈"로 지칭되는 경우이다. 통상의 파지 디스플레이 라이브러리로는 $10^6 \sim 10^{12}$ 이고, 리보솜 디스플레이법 등의 공지의 기술을 적용함으로써 라이브러리 사이즈를 10^{14} 까지 확대하는 것이 가능하다. 그러나, 파지 라이브러리의 패닝 선택시에 사용되는 파지 입자의 실제 수는 통상적으로 라이브러리 사이즈보다 10~10,000배 크다. 이 과정 배수는 "라이브러리 당량수"라고도 불리지만, 동일한 아미노산 서열을 갖는 개개의 클론이 10~10,000 존재할 수 있는 것을 나타낸다. 따라서, 본 발명에서의 "서로 서열이 다른"의 용어는 라이브러리 당량수가 제외된 라이브러리 중의 개개의 항원 결합 분자의 서열이 서로 다른 것, 보다 구체적으로는 서로 서열이 다른 항원 결합 분자가 $10^6 \sim 10^{14}$ 분자, 바람직하게는 $10^7 \sim 10^{12}$ 분자, 더욱 바람직하게는 $10^8 \sim 10^{11}$ 특히 바람직하게는 $10^8 \sim 10^{10}$ 존재하는 것을 의미한다.

[0310]

또한, 본 발명의 복수의 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리로 기재된 "복수의"의 용어는 예를 들면 본 발명의 항원 결합 분자, 융합 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 분자, 백터 또는 바이러스는 통상적으로 그 물질의 2개 이상의 종류의 집합을 가리킨다. 예를 들면, 어느 2개 이상의 물질이 특정한 형질에 관해서 서로 다르다면, 그 물질에는 2종류 이상이 존재하는 것을 나타낸다. 그 예로서는 아미노산 서열 중의 특정한 아미노산 위치에서 관찰되는 변이체 아미노산을 들 수 있다. 예를 들면, 플렉시를 잔기 이외, 또는 표면에 노출된 매우 다양한 아미노산 위치의 특정 변이체 아미노산 이외는 실질적으로 같고, 바람직하게는 동일한 서열인 본 발명의 2개 이상의 항원 결합 분자가 있는 경우, 본 발명의 항원 결합 분자는 복수개 존재한다. 다른 실시예에서는 플렉시를 잔기를 부호화하는 염기 이외, 또는 표면에 노출된 매우 다양한 아미노산 위치의 특정한 변이체 아미노산을 부호화하는 염기 이외는 실질적으로 같고, 바람직하게는 동일한 서열인 본 발명의 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 분자가 있다면 본 발명의 폴리뉴클레오티드 분자는 복수개 존재한다.

[0311]

또한, 본 발명의 복수의 항원 결합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리로 기재된 "~으로 주로 이루어지는"의 용어는 라이브러리 중의 서열이 다른 독립 클론의 수 중, 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성이 다른 항원 결합 분자의 수가 반영된다. 구체적으로는, 그러한 결합 활성을 나타낸 항원 결합 분자가 라이브러리 중에 적어도 10^4 분자 존재하는 것이 바람직하다. 또한, 보다 바람직하게는 본 발명은 그러한 결합 활성을 나타낸 항원 결합 분자가 적어도 10^5 분자 존재하는 라이브러리를 제공한다. 더욱 바람직하게는 본 발명은 그러한 결합 활성을 나타낸 항원 결합 분자가 적어도 10^6 분자 존재하는 라이브러리를 제공한다. 특히 바람직하게는 본 발명은 그러한 결합 활성을 나타낸 항원 결합 분자가 적어도 10^7 분자 존재하는 라이브러리를 제공한다. 또한, 바람직하게는 본 발명은 그러한 결합 활성을 나타낸 항원 결합 분자가 적어도 10^8 분자 존재하는 라이브러리를 제공한다. 다른 표현으로는 라이브러리 중의 서열이 다른 독립 클론의 수 중, 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성이 다른 항원 결합 분자의 비율로서도 바람직하게 표현될 수 있다. 구체적으로는, 본 발명은 그러한 결합 활성을 나타낸 항원 결합 분자가 라이브러리 중의 서열이 다른 독립 클론의 수의 0.1%~80%, 바람직하게는 0.5%~60%, 보다 바람직하게는 1%~40%, 더욱 바람직하게는 2%~20%, 특히 바람직하게는 4%~10% 포함되는 라이브러리를 제공한다. 융합 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 분자 또는 백터의 경우도 상기와 마찬가지로 분자의 수나 분자 전체에서의 비율로 표현될 수 있다. 또한, 바이러스의 경우도 상기와 마찬가지로 바이러스 개체의 수나 개체 전체에서의 비율로 표현될 수 있다.

[0312]

항원 결합 분자를 포함한 융합 폴리펩티드

[0313]

본 발명에서의 일실시형태에서는 본 발명의 항원 결합 분자와 이종 폴리펩티드의 융합 분자가 제조될 수 있다. 어떤 실시형태에서는 융합 폴리펩티드는 바이러스 코트 단백질, 예를 들면 pIII, pVIII, pIX, Soc, Hoc, gpD, pVI 및 그 변이체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 바이러스 코트 단백질의 적어도 일부와 융합될 수 있다.

[0314] 어떤 실시형태에서는, 본 발명의 항원 결합 분자는 ScFv, Fab 분절, F(ab)2 또는 F(ab')2로 있기 때문에 다른 일실시형태에서는 이를 항원 결합 분자와 이종 폴리펩티드의 융합 분자이어도 서로 서열이 다른 복수의 융합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리가 제공된다. 구체적으로는, 이를 항원 결합 분자와 바이러스 코트 단백질, 예를 들면 pIII, pVIII, pVII, pIX, Soc, Hoc, gpD pVI 및 그 변이체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 바이러스 코트 단백질의 적어도 일부와 융합한 단백질이어서 서로 서열이 다른 복수의 융합 분자로 주로 이루어지는 라이브러리가 제공된다. 본 발명의 항원 결합 분자는 또한 이량체화 도메인을 포함할 수 있다. 어떤 실시형태에서는 상기 이량체화 도메인은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 가변 영역과 바이러스 코트 단백질의 적어도 일부 사이에 존재할 수 있다. 이 이량체화 도메인에는 이량체화 서열의 적어도 1개, 및/또는 1개 또는 복수의 시스테인 잔기를 포함한 서열이 포함될 수 있다. 이 이량체화 도메인은 바람직하게는 중쇄 가변 영역 또는 정상 영역의 C 말단과 연결될 수 있다. 이량체화 도메인은 상기 항체 가변 영역이 바이러스의 코트 단백질 성분과의 융합 단백질 성분으로서 제조되는(이량체화 도메인의 뒤에 앰버 종지 코돈을 갖지 않는) 여부에 따라서 또는 상기 항체 가변 영역이 주로 바이러스 코트 단백질 성분을 포함하지 않고 제조된(예를 들면, 이량체화 도메인의 뒤에 앰버 종지 코돈을 갖는) 여부에 따라서 다양한 구조를 취하는 것이 가능하다. 상기 항체 가변 영역이 주로 바이러스 코트 단백질 성분과의 융합 단백질로서 제조될 때는 1개 또는 복수의 이항화 결합 및/또는 단일 이량체화 서열에 따라서 2가 제시가 초래된다. 본 발명의 항원 결합 분자가 주로 바이러스 코트 단백질 성분과 융합되지 않고 제조되는 항체 가변 영역인(예를 들면, 앰버 종지 코돈을 갖는) 경우, 시스테인 잔기와 이량체화 서열 모두를 포함하는 이량체화 도메인을 갖는 것이 바람직하다. 어느 실시형태에서는, F(ab)2의 중쇄는 헌지 영역을 포함하지 않는 이량체화 도메인에 따라서 이량체화된다. 이 이량체화 도메인에는, 예를 들면 공지인 GCN4 서열: GRMKQLEDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGERG(서열 번호: 12) 등의 류신 지퍼(zipper) 서열이 포함될 수 있다.

항원 결합 분자를 부호화하는 폴리뉴클레오티드

[0315] [0316] 항원 결합 분자를 부호화하는 폴리뉴클레오티드를 제조하기 위해서 사용되는 올리고뉴클레오티드 또는 프라이머의 세트는 표준방법을 사용해서 합성될 수 있다. 예를 들면, 코돈 세트에 의해서 제공되는 뉴클레오티드 트리플렛의 가능한 조합의 모두를 포함하고, 원하는 아미노산기를 부호화하는 서열을 포함한 한쌍의 올리고뉴클레오티드가 고상법에 의해서 합성될 수 있다. 따라서, 특정 코돈 세트를 갖는 합성 올리고뉴클레오티드 세트는 일반적으로 다른 서열의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 이 차이는 서열 전체 중의 코돈 세트에 의한 것이다. 어느 위치에서의 선택된 "축중" 뉴클레오티드를 갖는 올리고뉴클레오티드의 합성은 상기 기술분야에 알려져 있다. 그런 일종의 코돈 세트를 갖고 있는 뉴클레오티드의 세트는 시판의 핵산 신시사이저(Applied Biosystems Inc.)를 사용해서 합성될 수 있고, 또는 그 시판품이 입수될 수 있다(예를 들면, Life Technologies). 본 발명에서 사용된 바와 같이, 올리고뉴클레오티드는 가변 도메인 핵산 주형에의 하이브리다이제이션을 가능하게 하는 서열을 갖고, 또한 복제에 도움이 되는 제한 효소 부위를 포함할 수 있다.

[0317] [0318] 라이브러리는 상류 및 하류의 올리고뉴클레오티드 세트를 사용함으로써 형성될 수 있다. 각 올리고뉴클레오티드 세트는 올리고뉴클레오티드의 서열 내에서 제공된 코돈 세트에 의해서 확립된 다른 서열을 갖는 복수의 올리고뉴클레오티드를 갖는다. 상류 및 하류의 올리고뉴클레오티드 세트는 가변 도메인 주형 핵산 서열과 함께 PCR 산물의 "라이브러리"를 제조하기 위해서 사용될 수 있다. PCR 산물은 확립된 문자 생물학적 방법을 사용해서 다른 관련된 또는 무관계인 핵산 서열, 예를 들면 바이러스의 코트 단백질 구성 성분 및 이량체화 도메인을 부호화하는 핵산 서열과 융합시킬 수 있기 때문에 이러한 올리고뉴클레오티드 세트는 "핵산 카세트"로 불리는 것이다.

[0319] PCR 프라이머 서열은 항원 결합 분자의 표면에 노출되어 매우 다양한 플렉시블 잔기를 위해서 디자인된 코돈 세트의 1개 또는 복수를 포함한다. 상기와 같이, 코돈 세트는 원하는 변이체 아미노산을 부호화하는데 사용되는 한쌍의 다른 뉴클레오티드 트리플렛 서열이다. 또한, 올리고뉴클레오티드 세트 서열의 길이는 주형 핵산에 하이브리다이즈하기 위해 충분한 길이이고, 또한 필수는 아니지만 제한 부위가 포함될 수 있다. DNA 주형은 박테리오파지 M13 벡터에 유래하는 벡터, 또는 Viera 등(Meth. Enzymol. (1987) 153, 3)에 기재되어 있는 외가닥 과지의 복제 기점을 포함한 벡터에 의해서 생성된다. 이와 같이, 돌연변이시켜야 할 DNA는 외가닥 주형을 생성하기 위해서 이를 벡터 중 1개에 삽입된다. 외가닥 주형의 생산은 Sambrook 등의 교과서에 기재되어 있다.

또한, 본 발명의 비한정적인 일실시형태에서 기재되는 선택된 아미노산을 항원 결합 분자에 도입하는 방법은 상기 기술분야에 확립되어 있고, 그 몇개는 본 명세서에 기재되어 있다. 예를 들면, Kunke1 등(Methods Enzymol. (1987) 154, 367-382)에 의한 쿤켈방법을 사용하여 적어도 1개의 항원 결합 분자의 표면에 노출하고 및/또는 "이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기"나 매우 다양한 플렉시블 잔기를 도입함으로써 라이브러리가 제조될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 "이온

농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기"가 도입된 경쇄 가변 영역과 랜덤 가변 영역 서열 라이브러리로서 제조된 중쇄 가변 영역과의 조합에 의해서 본 발명의 복수의 서로 서열이 다른 항원 결합 분자를 포함한 라이브러리가 제조될 경우에 이러한 방법이 적절하게 채용될 수 있을 것이다. 이러한 비제한적인 예로서 금속 이온이 칼슘 이온인 경우에, 예를 들면 서열 번호: 6(Vk1), 서열 번호: 7(Vk2), 서열 번호: 8(Vk3), 서열 번호: 9(Vk4) 등의 생식 세포 계열의 특정 잔기가 "칼슘 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기"에 치환된 경쇄 가변 영역 서열이 제조되는 것을 들 수 있지만, 이러한 경쇄 가변 영역의 제조에 이러한 방법이 채용될 수 있다.

[0320] 이 경우, 핵산 카세트를 제조하기 위한 주형으로서 가변 영역의 핵산 주형 서열이 사용되는 PCR 반응의 프라이머로서 올리고뉴클레오티드 세트가 사용될 수 있다. 가변 영역의 주형 서열은 대상 핵산 서열(즉, 치환의 대상으로 이루어지는 아미노산을 부호화하고 있는 핵산 서열)을 포함한 면역 글로불린의 경쇄 또는 중쇄의 어떤 부분도 바람직하게 사용된다. 상기 예에서 보면, 서열 번호: 6(Vk1), 서열 번호: 7(Vk2), 서열 번호: 8(Vk3), 서열 번호: 9(Vk4) 등의 생식 세포 계열의 가변 영역이 주형 서열로서 사용될 수 있다. 가변 영역의 주형 서열은 적어도 가변 영역의 일부를 포함하고, 또는 적어도 1개의 CDR을 포함한다. 경우에 따라서는 가변 영역의 주형 서열은 복수의 CDR을 포함한다. 가변 영역의 주형 서열의 상류부 및 하류부는 상류역의 올리고뉴클레오티드 세트 및 하류역의 올리고뉴클레오티드 세트의 구성 멤버에 의한 하이브리다이제이션의 대상으로 될 수 있다. 상류의 프라이머 세트의 제1의 올리고뉴클레오티드는 제1의 핵산 쇄에 하이브리다이즈할 수 있고, 하류의 프라이머 세트의 제2의 올리고뉴클레오티드는 제2의 핵산 쇄에 하이브리다이즈할 수 있다. 올리고뉴클레오티드 프라이머는 1개 또는 복수의 코돈 세트를 포함하고, 가변 영역의 주형 서열의 일부에 하이브리다이즈하도록 디자인될 수 있다. 이를 올리고뉴클레오티드의 사용에 의해서 PCR 뒤에 2개 이상의 코돈 세트가 PCR 산물(즉 핵산 카세트)에 도입될 수 있다. 항체 가변 영역을 부호화하는 핵산 서열의 영역에 하이브리다이즈하는 올리고뉴클레오티드 프라이머는 아미노산 치환의 대상으로 이루어지는 CDR 잔기를 부호화하는 부분이 포함될 수 있다.

[0321] 또한, 본 발명의 비한정적인 일실시형태에서 기재되는 선택된 아미노산을 항원 결합 분자에 도입하는 방법으로서 본 명세서에 기재된 바와 같이, Overlap Extension PCR법이 적절하게 채용될 수 있다(WO1993003151). 적어도 1개의 항원 결합 분자의 표면에 노출되고 및/또는 "이온 농도 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기" 또는 매우 다양한 플렉시블 잔기를 도입함으로써 라이브러리가 제조될 수 있다. Overlap Extension PCR법에 사용되는 상류역 및 하류역의 올리고뉴클레오티드 세트에는 "이온 농도 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기" 또는 매우 다양한 플렉시블 잔기와 함께 가변 영역의 주형 서열에 하이브리다이즈하기 위해 충분한 길이의 프레임워크의 서열이 포함될 수 있다.

[0322] 예를 들면, 본 발명의 비한정적인 일실시형태로서 기재되는 "이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기"가 도입된 경쇄 가변 영역을 부호화하는 폴리뉴클레오티드 분자를 제조하기 위해서 해당 아미노산 잔기의 코돈 세트 및 부가적으로 플렉시블 잔기의 코돈 세트를 부호화하는 올리고뉴클레오티드 세트가 제조된다. 해당 올리고뉴클레오티드 세트에는 가변 영역의 주형 서열에 하이브리다이즈하기 위해 충분한 길이의 프레임워크의 서열이 그 상류 또는 하류에 프레임에서 연결된다.

[0323] 예를 들면, 경쇄 가변 영역의 CDR2 및 CDR3에 해당 아미노산 잔기 또는 부가적인 플렉시블 잔기를 도입할 경우, 올리고뉴클레오티드 세트의 5' 말단에 CDR2에 인접하는 충분한 길이의 FR2의 아미노산 서열을 부호화하는 올리고뉴클레오티드가 연결되고, 3' 말단에 CDR2에 인접하는 FR3의 아미노산 서열을 부호화하는 올리고뉴클레오티드가 연결된 프라이머가 제조된다. 또한, 올리고뉴클레오티드와 상보적인 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 CDR3에 인접하는 충분한 길이의 FR4의 아미노산 서열을 부호화하는 올리고뉴클레오티드가 연결되며, 3' 말단에 CDR3에 인접하는 FR3의 아미노산 서열을 부호화하는 올리고뉴클레오티드가 연결된 상보 프라이머도 또한 제조된다. 해당 프라이머의 FR3의 아미노산을 부호화하는 올리고뉴클레오티드와 해당 상보 프라이머의 FR3의 아미노산을 부호화하는 올리고뉴클레오티드가 서로 하이브리다이즈하는 것이 가능한 정도의 길이의 오버랩되는 서열을 포함할 경우, 주형 서열이 존재하지 않는 조건 하에서 PCR 반응에 의해서 CDR2 및 CDR3에 해당 아미노산 잔기 또는 부가적인 플렉시블 잔기가 도입된 경쇄 가변 영역이 제조될 수 있다. 그러한 오버랩되는 서열을 포함하지 않는 경우, 예를 들면 서열 번호: 6(Vk1), 서열 번호: 7(Vk2), 서열 번호: 8(Vk3), 서열 번호: 9(Vk4) 등의 생식 세포 계열의 가변 영역을 주형 서열로 한 PCR 반응에 의해서 마찬가지로 CDR2 및 CDR3에 해당 아미노산 잔기 또는 부가적인 플렉시블 잔기가 도입된 경쇄 가변 영역이 제조될 수 있다.

[0324] 예를 들면, 경쇄 가변 영역의 CDR3에 해당 아미노산 잔기 또는 부가적인 플렉시블 잔기를 도입하고, CDR1 및

CDR2가 랜덤화된 가변 영역을 포함한 라이브러리를 제조할 경우, 올리고뉴클레오티드 세트와 상보적인 올리고뉴클레오티드 세트의 5' 말단에 CDR3에 인접하는 충분한 길이의 FR4의 아미노산 서열을 부호화하는 올리고뉴클레오티드가 연결되며, 3' 말단에 CDR3에 인접하는 FR3의 아미노산 서열을 부호화하는 올리고뉴클레오티드가 연결된 프라이머와 FR1을 부호화하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 프라이머를 사용한 나이브 서열 등의 랜덤화된 가변 영역을 포함한 라이브러리를 주형 서열로 하는 PCR에 의해서 마찬가지로 CDR2에 해당 아미노산 잔기 및 부가적인 플렉시블 잔기가 도입되고, CDR1 및 CDR2가 랜덤화된 경쇄 가변 영역을 부호화하여 폴리뉴클레오티드의 라이브러리가 제조될 수 있다. 상기 경쇄에 "이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기" 및/또는 플렉시블 잔기가 도입된 폴리뉴클레오티드 라이브러리의 제조방법은 중쇄에 해당 아미노산 잔기 및 부가적인 플렉시블 잔기가 도입된 폴리뉴클레오티드 라이브러리를 제조하기 위해서도 적절하게 채용된다.

[0325] 또한, 올리고뉴클레오티드 서열 내에 제한 부위를 포함하도록 상류 영역 및 하류 영역의 올리고뉴클레오티드 세트가 합성될 수 있다. 이들 제한 부위는 한층 더 항체 서열을 갖고 있는 밸현 벡터에의 핵산 카세트(즉 PCR 반응 생성물)의 도입을 용이하게 한다. 바람직하게는, 제한 부위는 외래의 핵산 서열을 도입하지 않고, 또는 원래의 CDR 또는 프레임워크 핵산 서열을 제거하지 않아 핵산 카세트의 복제를 용이하게 하도록 디자인되어 있다.

[0326] 제조된 본 발명의 항원 결합 분자를 구성하는 경쇄 또는 중쇄의 서열의 일부 또는 모든 발현을 위해서 핵산 카세트가 적절한 벡터에 복제될 수 있다. 본 발명에서 상술되는 방법에 의하면 핵산 카세트는 바이러스 코트 단백질의 모든 또는 일부와 융합한 경쇄 또는 중쇄 서열의 일부 또는 모든(즉, 융합 단백질을 형성) 생산을 가능하게 하는 벡터에 복제된다. 후술된 바와 같이, 이러한 벡터는 상기 융합 단백질이 입자 또는 세포의 표면에서 제시된 바와 같이 디자인된 발현 벡터일 수 있다. 이러한 목적을 위해 몇 종류의 벡터가 입수되고, 그것들은 본 발명의 실시에 사용되지만, 파지미드 벡터가 본 명세서에서의 사용에는 바람직한 벡터이다. 당업자에 공지인 바와 같이, 파지미드 벡터에는 통상적으로 프로모터, 신호 서열 등의 제어 서열, 표현형 선택 유전자, 복제 기점 부위 및 다른 필요한 구성 성분을 포함한 다양한 구성 성분을 포함할 수 있다.

[0327] 특정 변이체 아미노산의 조합이 발현되는 비한정적인 실시형태에서는 핵산 카세트에는 중쇄 또는 경쇄의 가변 영역의 모두 또는 일부가 부호화될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 비한정적인 일태양인 "이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 적어도 하나의 아미노산 잔기" 및/또는 플렉시블 잔기가 중쇄의 CDR3에 포함되도록 디자인할 경우, 중쇄 CDR3의 서열 다양성을 갖는 핵산 카세트가 제조된 후에 나이브 서열 등의 랜덤화된 가변 영역을 부호화하는 핵산 카세트에 연결될 수 있다. 라이브러리의 경우와 같이 이들 변이체 아미노산 또는 변이체 아미노산의 조합을 포함하는 항원 결합 분자의 제조를 위해서 핵산 카세트는 한층 더 항체 서열, 예를 들면 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 가변 또는 정상 영역의 모든 또는 일부를 포함하고 있는 발현 벡터에 도입될 수 있다. 이들 한층 더 항원 결합 분자의 서열은 다른 핵산 서열, 예를 들면 바이러스 코트 단백질 구성 성분을 부호화하고 있는 서열과 융합되고, 그 결과 융합 단백질의 생산이 가능해진다.

벡터

[0329] 본 발명의 비한정적인 일태양으로는 유전자 융합을 부호화하고 있는 핵산 서열을 포함하는 복제 가능한 발현 벡터를 포함하고, 상기 유전자 융합은 바이러스 코트 단백질의 모든 또는 일부와 융합하고, 1개의 항원 결합 분자의 가변 영역, 또는 1개의 항원 결합 분자의 가변 영역과 1개의 정상 영역을 포함한 융합 단백질을 부호화한다. 상기와 같이, 다양한 서열에서 생성된 서로 서열이 다른 복수의 항원 결합 분자의 가변 영역을 포함한 복수의 다른 융합 단백질을 부호화하는 복수의 유전자 융합을 포함하고, 다양하게 복제 가능한 발현 벡터의 라이브러리도 포함된다. 벡터는 다양한 구성 성분을 포함하는 것이 가능하고, 바람직하게는 다른 벡터 사이에서 항원 결합 분자의 가변 영역이 이동할 수 있도록 및/또는 다른 포맷으로 융합 단백질이 제시되도록 구축된다.

[0330] 벡터의 예로서 파지 벡터를 바람직하게 들 수 있다. 파지 벡터는 파지 복제 및 파지 입자 형성을 가능하게 하는 파지 복제 기점을 갖는다. 파지는 바람직하게는 M13, f1, fd, 및 Pf3 파지 또는 그 유도체가 포함되는 섬유상 박테리오파지, 및 람다, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434, 및 다른 파지 및 그 유도체가 포함되는 람다형 파지를 바람직한 예로서 들 수 있다.

[0331] 바이러스 코트 단백질의 예로는 감염성 단백질 PIII, 주요 코트 단백질 PVIII, pVII, pIX, Soc(T4), Hoc(T4), gpD(박테리오파지 λ), 및 마이너박테리오파지 코트 단백질 6(pVI)(섬유상 파지(J. Immunol. Methods. (1999) 231 (1-2), 39-51; 및 M13박테리오파지 주요 코트 단백질 변이체(P8)(Protein Sci. (2000) 9 (4), 647-654))가 포함된다. 융합 단백질은 파지의 표면에 제시되지만, 적절한 파지계에는 M13K07 헬퍼 파지, M13R408, M13-VCS 및 Phi X 174, pJuFo 파지계(J. Virol. (2001) 75 (15), 7107-7113), 하이퍼 파지(Nat. Biotechnol. (2001) 19

(1), 75-78), 및 KM13(Fold Des. (1998) 3 (5), 321-328)가 포함된다. 바람직한 헬퍼 파지는 M13K07이고, 바람직한 코트 단백질은 M13파지 유전자III 코트 단백질이다. 바람직한 숙주는 대장균, 및 대장균의 프로테아제 결손주이다. 예를 들면, fth1벡터(Nucleic Acids Res. (2001) 29 (10) e50) 등의 벡터는 융합 단백질의 발현에 유용할 수 있다.

[0332] 발현 벡터는 항원 결합 분자의 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역 또는 그 분절을 부호화하고 있는 DNA와 융합한 분비 신호 서열도 포함할 수 있다. 이 서열은 전형적으로는 융합 단백질을 부호화하고 있는 유전자의 인접하는 5'측에 위치하고, 따라서 융합 단백질의 아미노산 말단에서 전사된다. 그러나, 어떤 경우에는 신호 서열은 분비되어야 할 단백질을 부호화하고 있는 유전자의 5' 이외의 위치에 있다는 것이 증명되었다. 이 서열은 그것이 세균 세포의 내막을 가로질러서 결합하는 단백질을 대상으로 한다. 신호 서열을 부호화하고 있는 DNA는 신호 서열을 갖는 단백질을 부호화하고 있는 유전자의 어느 쪽에서든 제한 엔도뉴클레아제 분절으로서 얹어진다. 원핵 생물의 적당한 신호 서열은, 예를 들면 LamB 또는 OmpF(Wong 등, Gene (1983), 68 (2), 193-203), MalE, 또는 PhoA를 부호화하는 유전자 및 다른 유전자도 사용될 수 있다. 본 발명의 실시를 위한 바람직한 원핵 생물 신호 서열은 Chang 등, Gene (1987) 55 (2-3), 189-196에 기재되어 있는 대장균 내열성 엔테로톡신II(ST II) 신호 서열, pelB 또는 malE이다.

[0333] 벡터에는 일반적으로 융합 단백질의 발현을 촉진하는 제어 서열로서 프로모터가 포함된다. 원핵 생물 벡터에서 일반적으로 사용되는 프로모터에는 lacZ 프로모터계, 알칼리포스파타아제 phoA 프로모터(Ap), 박테리오파지 λ PL 프로모터(온도 감수성 프로모터), tac 프로모터(lac 리프레서에 의해서 제어되는 혼성 trp-lac 프로모터), 트립토판 프로모터, pBAD 프로모터 및 박테리오파지 T7 프로모터가 포함된다. 프로모터의 종설에 관해서는 상기 Sambrook 등의 교시서에 기재되어 있다. 이들이 가장 일반적으로 사용되는 프로모터이지만, 다른 적절한 미생물 프로모터도 마찬가지로 사용될 수 있다.

[0334] 벡터에는 또한 다른 핵산 서열, 예를 들면 gD 태그, c-Myc 에피토프, 폴리히스티딘 태그, 형광 단백질(예를 들면, GFP) 또는 파지 또는 세포의 표면에서 발현하는 융합 단백질의 검출 또는 정제에 도움이 되는 β-갈락토시다아제 단백질을 부호화하는 서열이 포함될 수 있다. 예를 들면, gD 태그를 부호화하는 핵산 서열에 의해서 융합 단백질을 발현하는 세포 또는 바이러스의 양 또는 음의 선택이 가능해진다. 몇 가지의 실시형태에서는 gD태그는 바람직하게는 바이러스 코트 단백질의 구성 성분에 융합하지 않는 항원 결합 분자의 가변 영역과 융합한다. 예를 들면, 폴리히스티딘 표식을 부호화하는 핵산 서열은 면역 조직화학 방법을 사용해서 특이적 항원과 결합하는 항원 결합 분자의 가변 영역을 포함한 융합 단백질을 확인하기 위해서 유익하다. 항원 결합의 검출에 도움이 되는 태그는 바이러스 코트 단백질 구성 성분에 융합하지 않는 항원 결합 분자의 가변 영역, 또는 바이러스 코트 단백질 구성 성분에 융합한 항원 결합 분자의 가변 영역에 융합될 수 있다.

[0335] 본 발명을 실천하는데 사용되는 벡터의 다른 유용 구성 성분으로서 표현형 선택 유전자는 바람직하게 들 수 있다. 전형적 표현 선택 유전자는 숙주 세포에 항생물질 내성을 주는 단백질을 부호화하는 유전자이다. 그러한 예로서 암피실린 내성 유전자(ampr) 및 테트라사이클린 내성 유전자(tetr) 등이 바람직하게 사용될 수 있다.

[0336] 벡터에는 독특한 제한 부위 및 제어성 종지 코돈을 포함하는 핵산 서열도 포함될 수 있다. 독특한 제한 부위는 다른 벡터 및 발현계 사이에서 항원 결합 분자의 가변 영역을 이동시키기 위해서 유용하다. 특히 세포 배양에 의한 완전 길이의 항원 결합 분자 또는 항원 결합 분절의 생산에 유용하다. 제어성 종지 코돈은 융합 단백질의 발현 레벨을 조절하는데 유용하고, 가용형의 항원 결합 분자의 분절의 정제를 용이하게 한다. 예를 들면, 앰버 종지 코돈은 파지 디스플레이를 가능하게 하는 supE 숙주에서는 Gln으로 변역될 수 있지만, 비supE 숙주에서는 파지 코트 단백질과 융합하지 않는 가용형의 항원 결합 분자의 분절을 생산하는 종지 코돈으로 해석된다. 이들 합성 서열은 벡터 내의 1개 또는 복수의 항원 결합 분자의 가변 영역과 융합될 수 있다.

[0337] 목적으로 하는 항원 결합 분자의 서열을 부호화하는 핵산이 벡터로부터 용이하게 검색된 다른 벡터에 넣을 수 있는 벡터가 바람직하게 사용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 항원 결합 분자 또는 그 가변 영역을 부호화하는 핵산 서열의 검색을 용이하게 하기 위해서 적당한 제한 부위가 벡터에 포함될 수 있다. 제한 서열은 통상적으로 효율적인 절단 및 새로운 벡터에의 결찰을 용이하게 하기 위해서 벡터 내에서 유일한 것이 선택된다. 항원 결합 분자 또는 그 가변 영역은 그 후 외래의 융합된 서열, 예를 들면 바이러스 코트 단백질 또는 다른 서열 태그를 포함하지 않는 구조를 갖는 분자로서 벡터로부터 발현될 수 있다.

[0338] 항원 결합 분자의 가변 영역 또는 정상 영역을 부호화하는 핵산(유전자 1)과 바이러스의 코트 단백질 구성 성분(유전자 2) 사이에 종결 또는 종지 코돈을 부호화하는 DNA가 삽입될 수 있다. 그러한 종결 코돈에는 UAG(앰버), UAA(오카) 및 UGA(오펠)가 포함된다(Davis 등, Microbiology (1980), P.237, 245-247, 및 374 Harper & Row,

New York). 야생형 숙주 세포에서 발현하는 종결 또는 종지 코돈은 유전자2 단백질이 결합하지 않는 유전자1 단백질 산물의 합성을 초래한다. 그러나, 억제 숙주 세포에서의 증식에 의해서 검출 가능한 양의 융합 단백질이 합성된다. 그러한 억제 숙주 세포는 알려져 있고, 대장균 억제 유전자주(Bullock 등, BioTechniques (1987) 5, 376-379) 등이 기재되어 있다. 그러한 종결 코돈이 융합 폴리펩티드를 부호화하는 mRNA에 삽입될 수 있다.

[0339]

제어성 코돈은 항원 결합 분자의 가변 또는 정상 영역을 부호화하는 제1의 유전자와 파지 코트 단백질의 적어도 일부를 부호화하는 제2의 유전자 사이에 삽입될 수 있다. 또한, 제어성 조절 코돈은 항원 결합 분자의 가변 영역의 최후의 아미노산 트리플렛 또는 파지 코트 단백질의 최초의 아미노산을 치환함으로써 융합 부위에 인접해서 삽입될 수 있다. 제어성 종결 코돈은 이량체화 도메인의 C 말단 또는 그 후에 삽입될 수 있다. 제어성 코돈을 포함하는 플라스미드가 억제 숙주 세포 중에서 복제된 경우, 검출 가능한 양의 폴리펩티드 및 코트 단백질을 포함하는 융합 폴리펩티드가 생산된다. 플라스미드가 비억제 숙주 세포 중에서 복제된 경우, 삽입된 억제성 트리플렛 UAG, UAA 또는 UGA에서의 번역의 종결을 위해서 실질적으로 파지 코트 단백질과 융합하지 않고 항원 결합 분자의 가변 영역이 합성된다. 따라서, 비억제 세포 중에서 발현된 항원 결합 분자의 가변 영역은 숙주 멤브레인에 고정되는 융합 파지 코트 단백질을 포함하지 않기 때문에 합성된 후에 숙주 세포로부터 분비된다.

[0340]

항원 결합 분자의 경쇄 및/또는 중쇄의 가변 영역 또는 정상 영역은 바이러스 입자 또는 세포의 표면에서 1개 또는 복수의 융합 폴리펩티드의 상호 작용을 가능하게 하는 웨პ티드에 더 융합될 수 있다. 이들 웨პ티드 서열은 본 명세서에서는 "이량체화 도메인"으로 지칭된다. 이량체화 도메인은 적어도 1개 또는 복수의 이량체화 서열, 또는 시스테인 잔기를 포함하는 서열을 적어도 1개, 또는 이 모두와 함께 포함될 수 있다. 적당한 이량체화 서열로는 소수 잔기가 일정한 간격을 두어서 존재하고, 각 단백질의 소수 잔기의 상호 작용에 의한 이량체의 형성을 가능하게 하는 양친매성의 α 헬릭스를 갖는 단백질의 그것이 포함된다. 그러한 단백질 및 단백질 부분에는, 예를 들면 류신 지퍼 영역이 포함된다. 이량체화 도메인은 또한 1개 또는 복수의 시스테인 잔기를 포함할 수 있다(예를 들면, 이량체화 도메인 내에 항체 힌지 서열을 포함함으로써 제공된다). 시스테인 잔기는 1개 또는 복수의 이황화 결합의 형성에 의한 이량체화를 가능하게 한다. 종지 코돈이 이량체화 도메인의 뒤쪽에 존재하는 일실시형태에서는 이량체화 도메인은 적어도 1개의 시스테인 잔기를 포함한다. 이량체화 도메인은 바람직하게는 항체 가변 또는 정상 도메인과 바이러스 코트 단백질 구성 성분 사이에 위치한다.

[0341]

경우에 따라서 백터는, 예를 들면 코트 단백질에 융합한 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 포함하는 단쇄 형태의 단일 항원 결합 분자의 파지 폴리펩티드를 부호화한다. 이 경우에서는 백터는 어느 종의 프로모터의 제어 하에서 1개의 전사 산물을 발현하는 "1시스템론성"으로 생각된다. 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 사이에 연결 웨პ티드를 갖고, VL 및 VH 도메인을 부호화하는 1시스템론성 서열의 발현을 촉진하기 위해서 알칼리 포스파타제(AP) 또는 Tac 프로모터를 이용하는 백터가 예시된다. 이러한 시스템론 서열은 5'말단에서 대장균의 malE 또는 내열성 엔테로톡신 II(STII) 신호 서열에 연결되고, 3'말단에서(예를 들면, pIII 단백질 등의) 바이러스 코트 단백질의 모든 또는 일부에 연결된다. 몇가지 제2의 가변 영역 서열과 바이러스 코트 단백질 서열 사이의 그 3'말단에(예를 들면 류신 지퍼 등의) 이량체화 도메인을 부호화하는 서열 번호: 12에서 나타낸 바와 같이 서열을 더 포함할 수 있다.

[0342]

그 외에 경우, 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 다른 폴리펩티드로서 발현되고, 이러한 백터는 "2시스템론성"이며 다른 전사 산물의 발현을 가능하게 한다. 이들 백터에서는 적절한 프로모터, 예를 들면 tac 또는 PhoA 프로모터는 2시스템론성 mRNA의 발현을 촉구하기 위해서 사용될 수 있다. 예를 들면, 경쇄 가변 영역 및 정상 영역을 부호화하는 제1의 시스템론이 5'말단에서 대장균의 malE, pelB 또는 내열성 엔테로톡신 II(STII) 신호 서열에 연결되고, 3'말단에서 gD 태그를 부호화하는 핵산 서열에 연결된다. 예를 들면, 중쇄 가변 영역 및 정상 영역 CH1을 부호화하는 제2의 시스템론은 5'말단에서 대장균의 malE 또는 내열성 엔테로톡신 II(STII) 신호 서열에 연결되고, 3'말단에서 바이러스 코트 단백질의 모든 또는 일부에 연결되고 있다.

[0343]

2시스템론성 mRNA를 생성하고, F(ab')₂-pIII을 제시하는 백터로는, 예를 들면 적절한 프로모터, 예를 들면 tac 또는 PhoA(AP) 프로모터는 5'말단에서 대장균 malE 또는 내열성 엔테로톡신 II(STII) 신호 서열과 작용 가능하게 연결되고, 3'말단에서 gD 태그를 부호화하는 핵산 서열과 연결된 경쇄 가변 영역 및 정상 영역을 부호화하는 제1의 시스템론의 발현을 촉진한다. 제2의 시스템론은, 예를 들면 5'말단에서 대장균의 malE 또는 내열성 엔테로톡신 II(STII) 신호 서열과 작용 가능하게 연결된 중쇄 가변 영역 및 정상 영역을 부호화하여 3'말단에는 IgG 힌지 서열 및 류신 지퍼 서열, 또한 그 뒤쪽에 적어도 일부 바이러스 코트 단백질을 포함한 이량체화 도메인을 포함한다.

[0344]

융합 폴리펩티드의 제시

- [0345] 항원 결합 분자의 가변 영역의 융합 폴리펩티드는 세포, 바이러스 또는 파지미드 입자의 표면에서 다양한 태양으로 제시될 수 있다. 이들 태양에는 단체 Fv분절(scFv), F(ab)분절 및 이들 분절의 다가의 형태가 포함된다. 다가의 형태는 바람직하게는 ScFv, Fab 또는 F(ab')의 이량체이고, 이들은 본 명세서에서는 (ScFv)2, F(ab)2 및 F(ab')2로 각각 지칭된다. 다가의 형태의 제시가 바람직한 이유의 하나는 다가의 형태의 제시에 따라서 통상적으로 저친화성 클론의 확인이 가능해지는 점, 또는 선택 과정에서 드문 클론의 보다 효율적인 선택을 가능하게 하는 복수의 항원 결합 부위를 갖는 점이라고 생각된다.
- [0346] 박테리오파지의 표면에서 항체 분절을 포함하는 융합 폴리펩티드를 제시하는 방법은 상기 기술분야에 알려져 있고, 예를 들면 WO1992001047 및 본 명세서에 기재되어 있다. 이외에도 WO1992020791, WO993006213, WO1993011236 및 1993019172에는 관련된 방법이 기재되어 있고, 당업자는 이를 방법을 적절하게 사용하는 것이 가능하다. 다른 공지문헌(H.R. Hoogenboom & G. Winter (1992) J. Mol. Biol. 227, 381-388, WO1993006213 및 WO1993011236)에는 파지 표면에 제시된 다양한 항원에 대한 인위적으로 재배치된 가변 영역 유전자 래퍼토리에 의한 항체의 확인을 나타내고 있다.
- [0347] scFv의 태양에서의 제시를 위해 벡터가 구축될 경우, 항원 결합 분자의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 부호화하는 핵산 서열이 이 벡터에 포함된다. 일반적으로는, 항원 결합 분자의 중쇄 가변 영역을 부호화하는 핵산 서열은 바이러스 코트 단백질 구성 성분에 융합한다. 항원 결합 분자의 경쇄 가변 영역을 부호화하는 핵산 서열은 펩티드 연결을 부호화하는 핵산 서열에 의해서 항원 결합 분자의 중쇄 가변 영역에 연결된다. 펩티드 연결은 일반적으로 약 5~15개의 아미노산을 포함한다. 임의로, 예를 들면 정제 또는 검출에 도움이 되는 표식을 부호화하는 다른 서열이 항원 결합 분자의 경쇄 가변 영역 또는 항원 결합 분자의 중쇄 가변 영역 중 하나 또는 모두를 부호화하는 핵산 서열의 3'말단에 융합될 수 있다.
- [0348] F(ab)의 태양에서의 제시를 위해 벡터가 구축될 경우, 항원 결합 분자의 가변 영역 및 항원 결합 분자의 정상 영역을 부호화하는 핵산 서열이 이 벡터에 포함된다. 경쇄 가변 영역을 부호화하는 핵산은 경쇄 정상 영역을 부호화하는 핵산 서열에 융합된다. 항원 결합 분자의 중쇄 가변 영역을 부호화하는 핵산 서열은 중쇄 정상 CH1영역을 부호화하는 핵산 서열에 융합된다. 일반적으로는 중쇄 가변 영역 및 정상 영역을 부호화하는 핵산 서열은 바이러스 코트 단백질의 전체 또는 일부를 부호화하는 핵산 서열에 융합된다. 중쇄 가변 영역 및 정상 영역은 바람직하게는 바이러스 코트 단백질의 적어도 일부의 융합체로서 발현되고, 경쇄 가변 영역 및 정상 영역은 중쇄 바이러스 코트 융합 단백질과는 개별적으로 발현된다. 중쇄 및 경쇄는 서로 결합하지만, 그 결합은 공유 결합이어도 비공유 결합일 수 있다. 임의로, 예를 들면 정제 또는 검출에 도움이 되는 폴리펩티드 표식을 부호화하는 다른 서열이 항원 결합 분자의 경쇄 정상 영역 또는 항원 결합 분자의 중쇄 정상 영역 중 하나 또는 모두를 부호화하는 핵산 서열의 3'말단에 융합될 수 있다.
- [0349] 숙주 세포에의 벡터의 도입
- [0350] 상기와 같이 구축된 벡터는 증폭 및/또는 발현되기 위해 숙주 세포에 도입된다. 벡터는 전기천공법 (electroporation), 인산칼슘 침전 등을 포함한 공지의 형질 전환법에 의해서 숙주 세포에 도입될 수 있다. 벡터가 바이러스와 같은 감염성의 입자인 경우, 벡터의 자체가 숙주 세포에 침입한다. 융합 단백질을 부호화하는 폴리뉴클레오티드가 삽입되는 복제 가능한 발현 벡터에 의한 숙주 세포의 트랜스펙션 및 공지의 방법에 의한 파지 입자의 생산에 의해서 융합 단백질이 파지 입자의 표면에 제시된다.
- [0351] 복제 가능한 발현 벡터는 다양한 방법을 사용해서 숙주 세포에 도입될 수 있다. 비한정적인 일실시태양으로는 벡터는 WO2000106717에 기재된 바와 같이 전기천공법을 사용해서 세포에 도입될 수 있다. 세포는 표준의 배양액 중에서 임의의 약 6~48시간(또는 600 nm에서의 OD가 0.6~0.8로 될 때까지), 37°C에서 배양하고, 이어서 배양액을 원심 분리함으로써(예를 들면 디캔테이션에 의해) 배양 상청이 취출된다. 정제의 초기 단계에서는 바람직하게는 완충액(예를 들면 1.0 mM의 HEPES(pH7.4) 중에 세포 펠릿이 재침전된다. 이어서, 다시 원심 분리기에 의해서 침전액으로부터 상청이 취출된다. 얻어진 세포 펠릿은 예를 들면 5-20% V/V에 희석된 글리세린에 재침전된다. 다시 원심 분리기에 의해서 침전액으로부터 상청을 제거함으로써 세포 펠릿이 얻어진다. 해당 세포 펠릿을 물 또는 희석된 글리세린 중에 재침전함으로써 얻어지는 균체 농도의 측정값을 기초로 해서 최종적인 균체 농도가 물 또는 희석된 글리세린을 사용해서 원하는 농도로 조제된다.
- [0352] 예를 들면, 바람직한 수용 세포로서 전기천공법 응답능력이 있는 대장균주 SS320(Sidhu 등, Methods Enzymol. (2000) 328, 333-363)을 들 수 있다. 대장균주 SS320은 임성 에피솜(F'플라스미드) 또는 XL1-BLUE를 MC1061 세포로 이전하는데 충분한 조건 하에서 MC1061세포를 XL1-BLUE 세포와 교접시켜서 제조되었다. ATCC(10801 University Boulevard, Manassas, Virginia)에 기탁된 대장균 SS320에 대해서 기탁 번호 98795가 주어진다. 이

균주에서의 파지 복제를 가능하게 하는 어느 F' 에피솜으로도 본 발명에서 사용될 수 있다. 적절한 에피솜은 ATCC에 기탁된 주로부터 입수 가능할 수 있고, 또는 시판품도 입수 가능하다(TG1, CJ236, CSH18, DHF', ER2738, JM101, JM103, JM105, JM107, JM109, JM110, KS1000, XL1-BLUE, 71-18 등).

[0353] 전기청공법에서 더 높은 DNA 농도(약 10배)를 사용하면 형질 전환율이 향상하고, 숙주 세포에 형질 전환되는 DNA의 양이 증가한다. 높은 균체 농도의 사용도 효율을 높인다(약 10배). 이전된 DNA량의 증가에 의해 더 큰 다양성이 갖고, 서열이 다른 독립 클론의 수가 큰 라이브러리가 제조될 수 있다. 형질 전환 세포는 통상적으로 항생물질을 포함한 배지 상의 증식 여부에 따라서 선택된다.

[0354] 조건에 따라서 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자의 선택방법 및 해당 분자를 부호화하는 폴리뉴클레오티드의 단리방법

[0355] 항원에 대해서 원하는 결합 활성을 나타낸 항원 결합 분자를 확인하기 위한 파지 디스플레이의 사용방법은 다양한 변이가 가해진 방법도 포함하고, 상기 기술분야에 확립되어 있다. 비한정적인 일태양으로는 융합 폴리뉴클레오티드를 부호화하는 유전자 융합체와 작용 가능하게 연결된 전사 조절 요소를 포함하도록 구축된 복제 가능한 백터의 라이브러리가 적절한 숙주 세포에 형질 전환된다. 형질 전환된 세포를 배양해서 상기 융합 폴리뉴클레오티드를 파지 입자 표면에 제시하는 파지 입자가 형성된다. 그 후, 선택의 과정에서 항원에 결합하지 않는 입자와 비교해서 결합하는 입자의 집단을 증가시키는 목적으로 적어도 입자 집단의 일부가 항원과 결합하도록 재조합형 파지 입자를 대상 항원과 접촉시키는 것에 의한 선택, 분획을 따라 "결합 분자를 선택하는" 단계가 실시된다. 다른 또는 같은 반응 조건에서 같은 집단을 1회 더 검사하기 위해서 분획된 집단을, 예를 들면 신선한 XL1-Blue 세포 등의 숙주 세포에 감염시킴으로써 해당 집단이 증폭된다. 즉, 얻어진 항원 결합 분자의 증폭된 집단과 이온 농도가 다른 조건 하에서 항원에 접촉되는 단계가 실시되고, 원하는 조건에서 항원에 결합하는 항원 결합 분자가 검사된다. 또한, 이온 농도가 다른 조건 하에서 항원에 접촉시키는 단계를 상기 선택방법의 최초의 단계에서 실시하는 것도 가능하고, "결합 분자를 선택하는" 단계와 이온 농도가 다른 조건 하에서 결합 활성이 변화하는 결합 분자를 선택하는 단계의 조합은 적절하게 변경될 수 있다. 또한 상기 선택 및 분획의 단계는 몇 번이라도 실시될 수 있다. 이를 이온 농도가 다른 조건 하에서 항원에 결합하는 항원 결합 분자는 생체에 투여 되었을 때에 병인이 되는 항원을 생체로부터 신속하게 제거하는 능력을 갖는 치료약으로서 유용하다.

[0356] 본 발명의 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성을 변화시키는 아미노산 및/또는 플렉시블 잔기를 포함하는 가변 영역 또는 그 일부의 융합 폴리펩티드는 파지, 파지미드 입자 또는 세포의 표면에 발현된다. 이어서 이온 농도가 다른 조건 하에서의 융합 폴리펩티드의 집단의 구성 멤버의 항원에 결합하는 능력에 대해서 선택 및/또는 분획될 수 있다. 융합 폴리펩티드에 대한 선택, 분획 및 검사방법은 protein L 또는 파지 상에서 제시되는 항원 결합 분자 또는 그 분절과 결합하는 표식 항체와 같은 항원 결합 분자의 가변 영역과 친화성을 갖는 일반적인 단백질 상에서의 선택, 분획 및 검사방법도 포함된다. 이러한 방법은 올바르게 폴드된 항원 결합 분자(를 포함한 융합 폴리펩티드)의 분절을 제시하는 라이브러리 사이즈 또는 라이브러리 당량 수를 풍부하게 하기 위해서 사용될 수 있다.

[0357] 상기의 선택, 분획 및 검사를 위한 2개의 주요 방책이 사용될 수 있다. 제1의 방책은 고체 담체방법 또는 플레이트 검사 또는 고정화 항원 검사이고, 제2의 방책은 용액 결합방법이다.

[0358] "고체 담체방법"에서 항원은 상기 기술분야에서 공지한 적절한 고체 또는 반고체 매트릭스, 예를 들면 아가로오스 비즈, 아크릴아미드 비즈, 유리 비즈, 셀룰로오스, 다양한 아크릴 코폴리머, 메타크릴산 헤드록시알킬 겔, 폴리아크릴 및 폴리메타크릴 코폴리머, 나일론 및 중성과 이온성 담체 등에 결합될 수 있다. 매트릭스에 대한 항원 결합은 Methods in Enzymology (1976) 44에 기재되어 있는 방법, 또는 상기 기술분야에서 공지한 다른 수단에 대해서 달성될 수 있다.

[0359] 매트릭스에의 항원의 결합 후, 파지 입자 집단의 적어도 1부분 집합으로 고정화 항원과의 결합에 적합한 조건 하에서 고정화된 항원과 융합 폴리펩티드를 발현하는 라이브러리를 접촉시킨다. 통상적으로, pH, 이온 강도, 온도 등을 포함한 조건은 생리학적 조건을 모방하는 조건이 선택된다. 상기 고정화 항원과 결합하는 입자("결합체")는 수세에 의해 대상과 결합하지 않는 입자로부터 분리된다. 세정 조건은 고친화성의 결합체 이외의 모든 것이 제거되도록 조절될 수 있다. 결합체는 다양한 방법에 대해서 고정화된 대상으로부터 해리될 수 있다. 이를 방법에는, 예를 들면 과잉한 항원 등의 야생형 리간드를 사용하는 경합적 해리, pH 및/또는 이온 강도의 변경, 및 상기 기술분야에서 공지한 방법이 포함된다. 결합체는 일반적으로 0.1 M의 HCl 등의 산 또는 리간드와 같은 적당한 용출 재료에 대해서 친화성 매트릭스로부터 용출될 수 있다. 리간드의 농도를 상한시켜서 용출함으로써 제시된 것보다 친화성이 높은 결합 분자를 용출시키는 것도 가능하다.

[0360] 단리된 결합체인 바이러스 입자(및, 예를 들면 바이러스 입자가 파지미드 입자인 경우는 필요에 따라서 헬퍼 패지)를 세포에 감염시킴으로써 결합체가 적절한 숙주 세포에서 재증폭될 수 있다. 이렇게 해서 얻어진 숙주 세포는 원하는 융합 폴리펩티드를 제시하는 입자의 증폭에 적합한 조건 하에서 배양된다. 이어서 파지 입자를 채취하고, 항원의 결합체가 상당한 비율을 차지할 때까지 선택 공정이 1회 또는 복수회 반복된다. 선택 또는 검사는 몇 번이나 행해질 수 있다. 선택 또는 검사방법의 하나로서 protein L 또는 제시되는 폴리펩티드에 존재하는 폴리펩티드 태그에 대한 항체, 예를 들면 gD 단백질 또는 폴리히스티딘 태그에 대한 항체와 같은 일반적인 친화성 단백질과 결합하는 결합체를 단리하는 것도 포함될 수 있다.

[0361] 본 발명의 일태양으로서 "용액 결합방법"으로 불리는 용액상 검사법이 적절하게 사용될 수 있다. 랜덤인 라이브러리로부터 또는 원하는 결합 클론 또는 클론군의 결합 활성을 개선하는 것을 목적으로 한 라이브러리로부터 개선된 결합체를 찾기 위해서 용액 결합방법이 사용될 수 있다. 복수의 폴리펩티드, 예를 들면 파지 또는 파지미드 입자(라이브러리) 상에 제시되는 폴리펩티드와 태그 분자에서 표식된 또는 태그 분자와 융합된 항원의 접촉이 이 방법에 포함된다. 태그는 비오틴 또는 다른 특이적 결합체가 이용 가능하다. 제1의 용액 결합상에서 농도를 단계적으로 낮춘 표식된 또는 융합된 항원을 사용해서 용액상의 스트린전시가 변화될 수 있다. 또한 스트린 전시를 높이기 위해서 제1의 용액상에서의 최초의 태그 분자에서 표식된 또는 표식 태그 분자와 융합된 항원과의 결합 후에 추가적으로 태그 분자에서 표식되지 않은 또는 표식 태그 분자와 융합되지 않은 고농도의 항원을 갖는 제2의 용액상과 접촉시키는 것도 적절하게 실시될 수 있다. 그 경우에는 통상적으로 표식 대상의 100~1000 배의 양의 태그 분자에서 표식되지 않는 또는 표식 태그 분자와 융합되지 않는 항원이 제2상에서 사용된다. 제1의 용액상의 배양 시간은 평행하게 이를 때까지 2, 3분~1,2시간 또는 그 이상의 범위이다. 결합 속도가 빠른 결합체는 이 제1상에서의 결합 시간이 짧은 성질을 갖는 경향이 있기 때문에 결합 시간을 짧게 하는 접촉의 조건이 채용될 수 있다. 제2상의 배양의 시간 및 온도는 스트린전시를 높이기 위해 변화시킬 수 있다. 이러한 배양의 조건의 변화에 대해서 대상으로부터 떨어지는 속도(해리 속도)가 느린 결합체에 대한 선택의 치우침이 생긴다. 파지/파지미드 입자 상에서 제시된 복수의 폴리펩티드와 항원을 접촉시킨 후에 태그 분자에서 표식된 또는 표식 태그 분자와 융합된 항원과 결합한 파지 또는 파지미드 입자가 결합하지 않은 파지 또는 파지미드 입자로부터 분리된다. 태그 분자에서 표식된 또는 표식 태그 분자와 융합된 항원의 결합이 가능하게 되도록 범위에서 짧은 시간(예를 들면 2~5분간), 파지 또는 파지미드 입자와 항원을 접촉시킴으로써 용액상으로부터 파지 또는 파지미드 입자와 항원의 혼합물이 단리된다. 태그 분자에서 표식된 또는 표식 태그 분자와 융합된 항원의 초기 농도의 범위는 약 0.1 nM~약 1000 nM까지이다. 해당 혼합물로부터 유행출된 입자는 다음 검사를 위해서 즉식될 수 있다. 각 회의 검사에서 태그 분자에서 표식된 또는 표식 태그 분자와 융합된 저농도의 항원을 사용해서 검사를 복수회 반복하는 것이 바람직하다. 후술하는 실시예에 기재된 바와 같이, 표식 태그 분자로서 비오틴이 사용될 경우에는 스트렙타아비딘이 코트된 자기 비즈(magnetic beads) 등이 용액 결합방법에서 적절하게 사용될 수 있다.

[0362] 고체 담체방법과 용액 결합방법의 조합은 원하는 특성을 갖고 있는 결합체를 단리하기 위해 적절하게 단독으로 또는 조합해서 실시될 수 있다. 항원에 대해서 2회, 3회 또는 4회 선택 및 검사를 반복한 후, 원하는 성질/특성을 갖는 특이적 결합체를 확인하기 위해 선택된 집단으로부터 개개의 클론의 검사가 통상적으로 실행된다. 바람직하게는, 검사의 프로세스는 라이브러리에 대한 높은 스루풋 검사를 가능하게 하는 자동화 시스템에 대해서 실행될 수 있다.

[0363] 결합체가 항원에 대한 결합에 의해 확인된 후, 해당 결합체로부터 핵산이 유출될 수 있다. 유출된 DNA는 다음에 대장균 주세포를 형질 전환하는데 직접 사용된다. 또는, 그 코드 서열이, 예를 들면 PCR에 의해서 적절한 프라이머리를 사용해서 증폭된 후에 전형적 서열방법에 의해서 그 서열이 결정될 수 있다. 다음에 그 부호화하는 항원 결합 분자의 발현을 위한 결합체의 가변 영역을 부호화하는 DNA가 제한 효소를 사용해서 소화시킨 백터에 삽입될 수 있다.

[0364] 본 발명의 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성이 변화한 항원 결합 분자 또는 그 융합 폴리펩티드를 발현하는 파지 입자를 선택하고, 검사하기 위해 고정화시킨 항원과 항원 결합 분자 또는 융합 폴리펩티드를 발현하는 파지 입자를 포함한 라이브러리를 접촉시키는 조건을 변화시킴으로써 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 파지 입자의 집단이 분획된다.

[0365] 예를 들면, 금속 이온의 바람직한 예로서 칼슘 이온이 착안될 경우에는, 칼슘 이온 농도의 조건으로서 저칼슘 이온 농도의 조건과 고칼슘 이온 농도의 조건을 들 수 있다. 칼슘 이온 농도의 조건에 따라서 결합 활성이 변화하는 것이란 저칼슘 이온 농도와 고칼슘 이온 농도의 조건의 차이에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성이 변화하는 것을 말한다. 예를 들면, 저칼슘 이온 농도의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결

합 활성보다 고칼슘 이온 농도의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성의 것이 높은 경우를 들 수 있다. 또한, 고칼슘 이온 농도의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성보다 저칼슘 이온 농도의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성의 것이 높은 경우도 또한 들 수 있다.

[0366] 본 명세서에 있어서, 고칼슘 이온 농도란 특히 근본적인 수치에 한정되는 것은 아니지만, 바람직하게는 100 μM ~10 mM로부터 선택되는 농도일 수 있다. 또한, 다른 태양으로는 200 μM ~5 mM로부터 선택되는 농도일 수 있다. 또한, 다른 태양으로는 500 μM ~2.5 mM로부터 선택되는 농도일 수 있고, 그 외의 태양으로는 200 μM ~2 mM로부터 선택되는 농도일 수 있다. 또한, 400 μM ~1.5 mM로부터 선택되는 농도일 수 있다. 특히 생체 내의 혈장 중(혈중)에서의 칼슘 이온 농도에 가까운 500 μM ~2.5 mM로부터 선택되는 농도를 바람직하게 들 수 있다.

[0367] 본 명세서에 있어서, 저칼슘 이온 농도란 특히 근본적인 수치에 한정되는 것은 아니지만, 바람직하게는 0.1 μM ~30 μM 로부터 선택되는 농도일 수 있다. 또한, 다른 태양으로는 0.2 μM ~20 μM 로부터 선택되는 농도일 수 있다. 또한, 다른 태양으로는 0.5 μM ~10 μM 로부터 선택되는 농도일 수 있고, 그 외의 태양으로는 1 μM ~5 μM 로부터 선택되는 농도일 수 있다. 또한, 2 μM ~4 μM 로부터 선택되는 농도일 수 있다. 특히 생체 내의 조기 엔도솜 내에서의 이온화 칼슘 농도에 가까운 1 μM ~5 μM 로부터 선택되는 농도를 바람직하게 들 수 있다.

[0368] 본 발명에 있어서, 항원 결합 분자의 저칼슘 이온 농도 조건에서의 항원에 대한 결합 활성이 고칼슘 이온 농도 조건에서의 항원에 대한 결합 활성보다 낮은 것은 항원 결합 분자의 0.1 μM ~30 μM 로부터 선택되는 칼슘 이온 농도에서의 항원에 대한 결합 활성이 100 μM ~10 mM로부터 선택되는 칼슘 이온 농도에서의 항원에 대한 결합 활성보다 약한 것을 의미한다. 바람직하게는, 항원 결합 분자의 0.5 μM ~10 μM 로부터 선택되는 칼슘 이온 농도에서의 항원에 대한 결합 활성이 200 μM ~5 mM로부터 선택되는 칼슘 이온 농도에서의 항원에 대한 결합 활성보다 약한 것을 의미하고, 특히 바람직하게는 생체 내의 조기 엔도솜 내의 칼슘 이온 농도에서의 항원 결합 활성이 생체 내의 혈장 중의 칼슘 이온 농도에서의 항원 결합 활성보다 약한 것을 의미하고, 구체적으로는 항원 결합 분자의 1 μM ~5 μM 로부터 선택되는 칼슘 이온 농도에서의 항원에 대한 결합 활성이 500 μM ~2.5 mM로부터 선택되는 칼슘 이온 농도에서의 항원에 대한 결합 활성보다 약한 것을 의미한다.

[0369] 예를 들면, 저칼슘 이온 농도의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성보다 고칼슘 이온 농도의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성의 것이 높은 항원 결합 분자 또는 그 융합 폴리펩티드를 발현하는 과정 입자를 선택하고, 검사하기 위해 최초에 고칼슘 농도의 조건 하에서 고정화된 항원에 결합하는 과정 입자의 집단이 분획된 후에 그 분획된 집단과 항원을 저칼슘 농도의 조건 하에서 고정화된 항원과 항원 결합 분자 또는 융합 폴리펩티드를 발현하는 과정 입자를 포함한 라이브러리를 접촉시킨다. 저칼슘 농도의 조건 하에서 고정화된 항원에 결합하지 않은 과정 입자가 상청 또는 그 후의 세정액에 분획된다. 고칼슘 농도 및 저칼슘 농도의 조건은 상기에 기재된 범위 내에서 적절하게 채용될 수 있다. 비한정적인 일태양으로는 0.1 μM ~30 μM 로부터 선택되는 칼슘 이온 농도에서의 항원에 대한 결합과 100 μM ~10 mM로부터 선택되는 칼슘 이온 농도에서의 항원에 대한 결합의 활성의 차이에 따라서 분획될 수 있다. 또한, 다른 비한정적인 태양으로는 0.5 μM ~10 μM 로부터 선택되는 칼슘 이온 농도에서의 항원에 대한 결합과 200 μM ~5 mM로부터 선택되는 칼슘 이온 농도에서의 항원에 대한 결합의 활성의 차이에 따라서 분획될 수 있다. 또한, 다른 비한정적인 태양으로는 생체 내의 조기 엔도솜 내의 칼슘 이온 농도에서의 항원에 대한 결합과 생체 내의 혈장 중의 칼슘 이온 농도에서의 항원에 대한 결합의 활성의 차이, 구체적으로는 1 μM ~5 μM 로부터 선택되는 칼슘 이온 농도에서의 항원에 대한 결합과 500 μM ~2.5 mM로부터 선택되는 칼슘 이온 농도에서의 항원에 대한 결합의 활성의 차이에 따라서 분획될 수 있다.

[0370] 예를 들면, 이온 농도의 바람직한 예로서 수소 이온 농도가 차안되는 경우에는 수소 이온 농도의 조건으로서 pH 산성 영역의 조건과 pH 중성 영역의 조건을 들 수 있다. pH의 조건에 따라서 결합 활성이 변화하는 것인 pH 산성 영역과 pH 중성 영역의 차이에 따라서 항원에 대한 항원 결합 활성 분자의 결합 활성이 변화하는 것을 말한다. 예를 들면, pH 산성 영역에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성보다 pH 중성 영역에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성의 것이 높은 경우를 들 수 있다. 또한, pH 중성 영역에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성보다 pH 산성 영역에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성의 것이 높은 경우도 또한 들 수 있다.

[0371] 본 명세서에 있어서, pH 산성 영역이란 특히 근본적인 수치에 한정되는 것은 아니지만, 바람직하게는 pH6.7~pH10.0로부터 선택될 수 있다. 또한, 다른 태양으로는 pH6.7~pH9.5로부터 선택될 수 있다. 또한, 다른 태양으로는 pH7.0~pH9.0로부터 선택될 수 있다. 다른 태양으로는 pH7.0~pH8.0로부터 선택될 수 있다. 특히 생체 내의 혈장 중(혈중)에서의 pH에 가까운 pH7.4를 바람직하게 들 수 있다.

[0372] 본 명세서에 있어서, pH 산성 영역이란 특히 근본적인 수치에 한정되는 것은 아니지만, 바람직하게는 pH4.0~pH6.5로부터 선택될 수 있다. 또한, 다른 태양으로는 pH4.5~pH6.5로부터 선택될 수 있다. 또한, 다른 태양으로는 pH5.0~pH6.5로부터 선택될 수 있고, 다른 태양으로는 pH5.5~pH6.5로부터 선택될 수 있다. 특히 생체 내의 조기 엔도솜 내에서의 이온화 칼슘 농도에 가까운 pH8.5를 바람직하게 들 수 있다.

[0373] 본 발명에 있어서, 항원 결합 분자의 pH 산성 영역 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성이 pH 중성 영역 조건 하에서의 항원에 대한 결합 활성보다 낮은 것이란 항원 결합 분자의 pH4.0~pH6.5로부터 선택되는 pH에서의 항원에 대한 결합 활성이 pH6.7~pH10.0로부터 선택되는 pH에서의 항원에 대한 결합 활성보다 약한 것을 의미한다. 바람직하게는, 항원 결합 분자의 pH4.5~pH6.5로부터 선택되는 pH에서의 항원에 대한 결합 활성이 pH6.7~pH9.5로부터 선택되는 pH에서의 항원에 대한 결합 활성보다 약한 것을 의미하고, 보다 바람직하게는 항원 결합 분자의 pH5.0~pH6.5로부터 선택되는 pH에서의 항원에 대한 결합 활성이 pH7.0~pH9.0로부터 선택되는 pH에서의 항원에 대한 결합 활성보다 약한 것을 의미한다. 또한, 바람직하게는 항원 결합 분자의 pH5.5~pH6.5로부터 선택되는 pH에서의 항원에 대한 결합 활성이 pH7.0~pH8.0로부터 선택되는 pH에서의 항원에 대한 결합 활성보다 약한 것을 의미한다. 바람직하게는 생체 내의 조기 엔도솜 내의 pH에서의 항원 결합 활성이 생체 내의 혈장 중의 pH에서의 항원 결합 활성보다 약한 것을 의미하고, 구체적으로는 항원 결합 분자의 pH5.8에서의 항원에 대한 결합 활성이 pH7.4에서의 항원에 대한 결합 활성보다 약한 것을 의미한다.

[0374] pH의 조건에 따라서 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성이 변화되는지 여부는, 예를 들면 상기 다른 pH의 조건 하에서의 결합 활성의 측정방법에 준해서 실시된다. 예를 들면, pH 산성 영역의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성보다 pH 중성 영역의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성의 것이 높게 변화하는 것을 확인하기 위해서는 pH 산성 영역 및 pH 중성 영역의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성이 비교된다.

[0375] 예를 들면, pH 산성 영역의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성보다 pH 중성 영역의 조건 하에서의 항원에 대한 항원 결합 분자의 결합 활성의 것이 높은 항원 결합 분자 또는 그 융합 폴리펩티드를 발현하는 과정 입자를 선택하고, 검사하기 위해서 최초에 pH 중성 영역의 조건 하에서 고정화시킨 항원에 결합하는 과정 입자의 집단이 분획된 후에 그 분획된 집단과 항원을 pH 산성 영역이 조건 하에서 고정화시킨 항원과 항원 결합 분자 또는 융합 폴리펩티드를 발현하는 과정 입자를 포함한 라이브러리를 접촉시킨다. pH 산성 영역의 조건 하에서 고정화시킨 항원에 결합하지 않는 과정 입자가 상청 또는 그 후의 세정액에 분획된다. pH 중성 영역 및 pH 산성 영역의 조건은 상기에 기재된 범위 내에서 적절하게 채용될 수 있다. 비한정적인 일태양으로는 pH4.0~pH6.5로부터 선택되는 pH에서의 항원에 대한 결합과 pH6.7~pH10.0로부터 선택되는 pH에서의 항원에 대한 결합의 활성의 차이에 따라서 분획될 수 있다. 또한, 다른 비한정적인 태양으로는 pH4.5~pH6.5로부터 선택되는 pH에서의 항원에 대한 결합과 pH6.7~pH9.5로부터 선택되는 pH에서의 항원에 대한 결합 활성의 차이에 따라서 분획될 수 있다. 또한, 다른 비한정적인 태양으로는 pH5.0~pH6.5로부터 선택되는 pH에서의 항원에 대한 결합과 pH7.0~pH9.0로부터 선택되는 pH에서의 항원에 대한 결합 활성의 차이에 따라서 분획될 수 있다. 그 이외에, pH5.5~pH6.5로부터 선택되는 pH에서의 항원에 대한 결합과 pH7.0~pH8.0로부터 선택되는 pH에서의 항원에 대한 결합 활성의 차이에 따라서 분획될 수 있다. 또 다른 비한정적인 태양으로는 생체 내의 조기 엔도솜 내의 pH에서의 항원에 대한 결합과 생체 내의 혈장 중의 pH에서의 항원에 대한 결합 활성의 차이, 구체적으로는 pH5.8에서의 항원에 대한 결합과 pH7.4에서의 항원에 대한 결합 활성의 차이에 따라서 분획될 수 있다.

조건에 따라서 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자의 제조방법

[0377] 본 발명의 비한정적인 일태양으로는 상기와 같이 선택된 조건에 따라서 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자를 부호화하는 폴리뉴클레오티드가 단리된 후에 해당 폴리뉴클레오티드가 적절한 발현 벡터에 도입된다. 즉, 목적으로 하는 항원 결합 분자의 가변 영역을 부호화하는 cDNA가 얻어진 후에 해당 cDNA의 양말단에 도입된 제한 효소 사이트를 인식하는 제한 효소에 의해서 상기 cDNA가 소화된다. 바람직한 제한 효소는 항원 결합 분자의 유전자를 구성하는 염기 서열에 출현하는 빈도가 낮은 염기 서열을 인식해서 소화한다. 또한 1카페의 소화 분절 벡터에 올바른 방향으로 삽입하기 위해서는 부착 말단을 주는 제한 효소의 삽입이 바람직하다. 상기와 같이 소화된 항원 결합 분자의 가변 영역을 부호화하는 cDNA를 적당한 발현 벡터에 삽입함으로써 본 발명의 항원 결합 분자의 발현 벡터가 취득될 수 있다. 이때, 항체 정상 영역(C영역)을 부호화하는 유전자와 상기 가변 영역을 부호화하는 유전자가 프레임에서 융합될 수 있다.

[0378] 원하는 항원 결합 분자를 제조하기 위해서 항원 결합 분자를 부호화하는 폴리뉴클레오티드가 제어 서열에 작용 가능하게 연결된 형태에서 발현 벡터에 포함된다. 제어 서열이란, 예를 들면 인핸서나 프로모터를 포함한다. 또

한, 발현된 항원 결합 분자가 세포 외에 분비되도록 적절한 신호 서열이 아미노 말단에 연결될 수 있다. 예를 들면 신호 서열로서 아미노산 서열 MGWSCIILFLVATATGVHS(서열 번호: 13)를 갖는 웨프티드가 사용되지만, 이 이외에도 적합한 신호 서열이 연결될 수 있다. 발현된 폴리펩티드는 상기 서열의 카르복실 말단 부분에서 절단되고, 절단된 폴리펩티드가 성숙 폴리펩티드로서 세포 외에 분비될 수 있다. 이어서, 이 발현 벡터에 의해서 적당한 숙주 세포가 형질 전환됨으로써 원하는 항원 결합 분자를 부호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현하는 재조합형 세포가 취득될 수 있다.

[0379] 항원 결합 분자를 부호화하는 폴리뉴클레오티드의 발현을 위해 항원 결합 분자의 중쇄 및 경쇄를 부호화하는 폴리뉴클레오티드는 각각 다른 발현 벡터에 포함된다. 중쇄와 경쇄가 재조합된 벡터에 의해서 같은 숙주 세포에 동시에 형질 전환(co-transfect)됨으로써 중쇄와 경쇄를 구비한 항원 결합 분자가 발현될 수 있다. 또는 중쇄 및 경쇄를 부호화하는 폴리뉴클레오티드가 단일의 발현 벡터에 포함됨으로써 숙주 세포가 형질 전화될 수 있다 (WO19994011523을 참조할 것).

[0380] 단리된 항원 결합 분자를 부호화하는 폴리뉴클레오티드를 적당한 숙주에 도입함으로써 항원 결합 분자를 제조하기 위한 숙주 세포와 발현 벡터의 많은 조합이 알려져 있다. 이들 발현계는 모두 본 발명의 항원 결합 분자를 단리하는데 응용될 수 있다. 진핵 세포가 숙주 세포로서 사용될 경우, 동물 세포, 식물 세포, 또는 진균 세포가 적절하게 사용될 수 있다. 구체적으로는 동물 세포로서는 다음과 같은 세포가 예시될 수 있다.

[0381] (1) 포유류 세포,: CHO(차이니즈 햄스터 난소 세포주), COS(원숭이 신장 세포주), 미엘로마(Sp2/0, NS0 등), BHK(베이비 햄스터 신장 세포주), HEK293(세어드 아데노바이러스를 가진 인간 배아의 신장 세포주 (Ad)5 DNA), PER.C6 cell(아데노바이러스 5형(Ad5) E1A 및 E1B 유전자로 형질 전환된 인간 배아의 망막 세포주), HeLa 및 Vero(단백질 사이언스에서 현재 프로토콜, May, 2001, Unit 5.9, Table 5.9.1);

[0382] (2) 양서류 세포: 제노푸스 모세포 등; 및

[0383] (3) 곤충 세포: sf9, sf21, 및 Tn5 등.

[0384] 또한, 식물 세포로서는 니코티아나 타바쿰(*Nicotiana tabacum*) 등의 니코티아나속 유래의 세포에 의한 항체 유전자의 발현계가 알려져 있다. 식물 세포의 형질 전환에 사용되는 칼스 배양한 세포가 적절하게 사용될 수 있다.

[0385] 또한 진균 세포로서는 다음과 같은 세포를 사용할 수 있다.

[0386] -효모: 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) 등의 사카로미세스속, 메탄올 자화 효모 등의 피치아속

[0387] -사상균: 아르페르길누스 니제르(*Aspergillus niger*) 등의 아스페루길루스속

[0388] 또한, 원핵 세포를 사용한 항원 결합 분자를 부호화하는 폴리뉴클레오티드의 발현계도 알려져 있다. 예를 들면, 세균 세포를 사용할 경우, 대장균(*E. coli*), 고초균 등의 세균 세포가 적절하게 이용될 수 있다. 이들 세포 중에 목적으로 하는 항원 결합 분자를 부호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한 발현 벡터가 형질 전환에 의해서 도입된다. 형질 전환된 세포를 *in vitro*에서 배양함으로써 해당 형질 전환 세포의 배양물로부터 원하는 항원 결합 분자가 취득될 수 있다.

[0389] 재조합형 항원 결합 분자의 생산에는 상기 숙주 세포에 추가해서 형질 전환 동물도 이용될 수 있다. 즉 원하는 항원 결합 분자를 부호화하는 폴리뉴클레오티드가 도입된 동물로부터 해당 항원 결합 분자를 얻을 수 있다. 예를 들면, 항원 결합 분자를 부호화하는 폴리뉴클레오티드는 유즙 중에 고유하게 생산되는 단백질을 부호화하는 유전자의 내부에 프레임에서 삽입함으로써 융합 유전자로서 구축될 수 있다. 유즙 중에 분비되는 단백질로서, 예를 들면 염소 β 카제인 등이 사용될 수 있다. 항원 결합 분자를 부호화하는 폴리뉴클레오티드가 삽입된 융합 유전자를 포함한 DNA 분절은 염소의 배아에 주입되고, 해당 주입된 배아가 암염소에 도입된다. 배아를 수용한 염소로부터 생기는 형질 전환 염소(또는 그 자손)가 생산하는 유즙에서는 원하는 항원 결합 분자가 유즙 단백질과의 융합 단백질로서 취득될 수 있다. 또한, 형질 전환 염소로부터 생산되는 원하는 항원 결합 분자를 포함한 유즙량을 증가시키기 위해 호르몬이 형질 전환 염소에 대해서 투여될 수 있다(Bio/Technology (1994), 12 (7), 699-702).

[0390] 본 명세서에 있어서 기재되는 항원 결합 분자가 인간에 투여될 경우, 해당 분자에서의 항원 결합 도메인으로서 인간에 대한 이종 항원성을 저하시키는 것 등을 목적으로서 인위적으로 변이한 유전자 재조합형 항체 유래의 항원 결합 도메인이 적절하게 채용될 수 있다. 유전자 재조합형 항체에는, 예를 들면 인간화(Humanized)된 항체

등이 포함된다. 이들 변이 항원 결합 분자는 공지의 방법을 사용해서 적절하게 제조된다.

[0391] 본 명세서에 있어서 기재되는 항원 결합 분자에서의 항원 결합 도메인을 제조하기 위해 사용되는 항원 결합 분자의 가변 영역은 통상적으로 4개의 프레임워크 영역(FR)에 끼워진 3개의 상보성 결정 영역(complementarity-determining region; CDR)으로 구성되어 있다. CDR은 실질적으로 항원 결합 분자의 결합 특이성을 결정하는 영역이다. CDR의 아미노산 서열은 다양성하게 풍부하다. 한편 FR을 구성하는 아미노산 서열은 다른 결합 특이성을 갖는 항원 결합 분자 사이에서도 높은 동일성을 나타내는 경우가 많다. 그 때문에, 일반적으로 CDR의 이식에 의해서 어떤 항원 결합 분자의 결합 특이성을 다른 항원 결합 분자의 이식할 수 있다.

[0392] 인간화 항체는 재구성(reshaped) 인간 항체로도 불린다. 구체적으로는, 인간 이외의 동물, 예를 들면 마우스 항체의 CDR을 인간 항체에 이식한 인간화 항체 등이 알려져 있다. 인간화 항체를 얻기 위한 일반적인 유전자 재조합 방법도 알려져 있다. 구체적으로는 마우스 항체의 CDR을 인간의 FR에 이식하기 위한 방법으로서, 예를 들면 Overlap Extension PCR이 알려져 있다. Overlap Extension PCR에서는 인간 항체의 FR을 합성하기 위한 프라이머에 이식해야 할 마우스 항체의 CDR을 부호화하는 염기 서열이 부가된다. 프라이머는 4개의 FR 각각에 대해서 준비한다. 일반적으로, 마우스 CDR의 인간 FR에 이식에서는 마우스의 FR과 동일성이 높은 인간 FR을 선택하는 것이 CDR의 기능 유지에 유리하다고 되어있다. 즉, 일반적으로 이식해야 할 마우스 CDR에 인접하고 있는 FR의 아미노산 서열과 동일성이 높은 아미노산 서열로 이루어진 인간 FR을 사용하는 것이 바람직하다.

[0393] 또한 연결되는 염기 서열은 서로 프레임으로 접속되도록 디자인된다. 각각의 프라이머에 의해서 인간 FR이 개별적으로 합성된다. 그 결과, 각 FR 마우스 CDR을 부호화하는 DNA가 부가된 산물이 얻어진다. 각 산물의 마우스 CDR을 부호화하는 염기 서열은 서로 오버랩되도록 디자인되어 있다. 이어서, 인간 항체 유전자를 주형으로서 합성된 산물의 오버랩한 CDR 부분을 서로 어닐시켜서 상보쇄 합성 반응이 행해진다. 이 반응에 의해서, 인간 FR이 마우스 CDR의 서열을 통해서 연결된다.

[0394] 최종적으로 3개의 CDR과 4개의 FR이 연결된 V 영역 유전자는 그 5' 말단과 3' 말단에 어닐되어 적당한 제한 효소 인식 서열을 부가시킨 프라이머에 의해서 그 전체 길이가 증폭된다. 상기와 같이 얻어진 DNA와 인간 항체 C영역을 부호화하는 DNA를 프레임에서 융합하도록 발현 벡터 중에 삽입함으로써 인간형 항체 발현용 벡터가 작성될 수 있다. 상기 내장된 벡터를 숙주에 도입해서 재조합형 세포를 수립한 후에 상기 재조합형 세포를 배양하고, 상기 인간화 항체를 부호화하는 DNA를 발현시킴으로써 상기 인간화 항체가 상기 배양 세포의 배양물 중에 생산된다(EP 239400 및 WO1996002576).

[0395] 상기와 같이 제조된 인간화 항체의 항원에의 결합 활성을 정성적 또는 정량적으로 측정하고, 평가함으로써 CDR을 통해서 연결되었을 때에 상기 CDR이 양호한 항원 결합 부위를 형성하는 인간 항체의 FR이 바람직하게 선택될 수 있다. 필요에 따라서, 재구성 인간 항체의 CDR이 적절한 항원 결합 부위를 형성하도록 FR의 아미노산 잔기를 치환할 수 있다. 예를 들면, 마우스 CDR의 인간 FR에의 이식에 사용된 PCR법을 응용해서 FR에 아미노산 서열의 변이를 도입할 수 있다. 구체적으로는 FR에 어닐링하는 프라이머에 부분적인 염기 서열의 변이를 도입할 수 있다. 이러한 프라이머에 의해서 합성된 FR에는 염기 서열의 변이가 도입된다. 아미노산을 치환한 변이형 항체의 항원에의 결합 활성을 상기의 방법으로 측정 평가함으로써 원하는 성질을 갖는 변이 FR 서열이 선택될 수 있다 (Sato 등, Cancer Res, (1993) 53, 851-856).

[0396] 본 발명의 비한정적인 일태양에 있어서, 상기와 같이 선택된 조건에 따라서 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자를 부호화하는 폴리뉴클레오티드가 단리된 후에 해당 폴리뉴클레오티드의 변이형이 적절한 발현 벡터에 도입된다. 이러한 변이형의 한가지로서 랜덤화 가변 영역 라이브러리로서 합성 라이브러리나 비인간 동물을 기원으로서 제조된 면역 라이브러리를 사용함으로써 검사된 본 발명의 항원 결합 분자를 부호화하는 폴리뉴클레오티드 서열이 인간화된 변이형을 바람직하게 들 수 있다. 인간화된 항원 결합 분자의 변이형의 제조방법은 상기의 인간화 항체의 제조방법과 마찬가지의 방법이 채용될 수 있다.

[0397] 또한, 변이형의 그 외의 태양으로서 랜덤화 가변 영역 라이브러리로서 합성 라이브러리나 나이브 라이브러리를 사용함으로써 검사된 본 발명의 항원 결합 분자의 항원에 대한 결합 친화성의 증강(친화성 성숙화)을 초래하는 변이가 단리된 폴리뉴클레오티드 서열에 실시된 변이형을 바람직하게 들 수 있다. 그러한 변이형은 CDR의 변이 유도(Yang 등, J. Mol. Biol. (1995) 254, 392-403), 쇄 셔플링(Marks 등, Bio/Technology (1992) 10, 779-783), E.coli의 변이 유발주의 사용(Low 등, J. Mol. Biol. (1996) 250, 359-368), DNA 셔플링(Patten 등, Curr. Opin. Biotechnol. (1997) 8, 724-733), 파지 디스플레이(Thompson 등, J. Mol. Biol. (1996) 256, 77-88) 및 유성 PCR(sexual PCR(Clameri 등, Nature (1998) 391, 288-291)을 포함한 다양한 친화성 성숙화의 공지된 절차에 따라서 취득될 수 있다.

[0398] 상기와 같이, 본 발명의 제조방법에 의해서 제조되는 항원 결합 분자로서 FcRn(특히 인간 FcRn) 결합 도메인을 포함한 항원 결합 분자를 들 수 있지만, FcRn(특히 인간 FcRn) 결합 도메인으로서 다양한 변이형이 사용될 수 있다. 이러한 FcRn(특히 인간 FcRn) 결합 도메인의 변이형을 부호화하는 폴리뉴클레오티드와 상기와 같이 선택된 조건에 따라서 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자 분자를 부호화하는 폴리뉴클레오티드가 프레임에서 연결된 중쇄를 갖는 항원 결합 분자를 부호화하는 폴리뉴클레오티드도 본 발명의 변이형의 일태양으로서 바람직하게 들 수 있다.

[0399] 본 발명의 비한정적인 일태양으로는 FcRn(특히 인간 FcRn) 결합 도메인으로서, 예를 들면 서열 번호: 14로 나타내는 IgG1(N말단에 A1a가 부가된 AAC82527.1), 서열 번호: 15로 나타낸 IgG2(N말단에 A1a가 부가된 AAB59393.1), 서열 번호: 16으로 나타낸 IgG3(CAA27268.1), 서열 번호: 17로 나타낸 IgG4(N말단에 A1a가 부가된 AAB59394.1) 등의 항체의 정상 영역을 바람직하게 들 수 있다. IgG분자의 혈장 중 체류성이 비교적 긴(혈장 중으로부터의 소실이 느린) 것은 IgG분자의 샐비지 수용체로서 알려진 FcRn이 기능하고 있기 때문이다. 음세포 작용에 대해서 엔도솜에 포함된 IgG 분자는 엔도솜 내의 산성 조건 하에서 엔도솜 내에 발현되고 있는 FcRn에 결합한다. FcRn에 결합할 수 없었던 IgG 분자는 리소좀으로 나아가 거기서 분해되지만, FcRn에 결합한 IgG 분자는 세포 표면으로 이행할 혈장 중의 중성 조건 하에서 FcRn으로부터 해리됨으로써 다시 혈장 중에 되돌아간다.

[0400] 항원에 대해서 혈장 중의 고칼슘 농도의 조건 하에서는 강하게 결합하고, 엔도솜 내의 저칼슘 농도의 조건 하에서 항원으로부터 해리되는 본 발명의 "칼슘 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자"는 엔도솜 내에서 항원으로부터 해리하는 것이 가능하다. 항원에 대해서 혈장 중의 고칼슘 농도의 조건 하에서는 강하게 결합하고, 엔도솜 내의 저칼슘 농도의 조건 하에서 항원으로부터 해리되는 본 발명의 "칼슘 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자"는 항원을 해리한 후에 FcRn에 대해서 혈장 중에 재생되면 다시 항원에 결합하는 것이 가능하다. 즉, 1분자의 해당 항원 결합 분자가 복수의 항원에 반복해서 결합하는 것이 가능해진다. 또한, 항원 결합 분자에 결합한 항원 엔도솜 내에서 해리함으로써 혈장 중에 재생되지 않기 위해서 항원 결합 분자에 의한 항원의 세포 내에의 취입을 촉진하고, 항원 결합 분자의 투여에 의해 항원의 소실을 촉진하고, 혈장 중의 항원 농도를 저하시키는 것이 가능해진다.

[0401] 또한, 항원에 대해서 혈장 중의 pH 중성 영역의 조건 하에서는 강하게 결합하고, 엔도솜 내의 산성 조건 하에서 항원으로부터 해리하는 본 발명의 "pH의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자"는 엔도솜 내에서 항원으로부터 해리하는 것이 가능하다. 항원에 대해서 혈장 중의 pH 중성 영역의 조건 하에서는 강하게 결합하고, 엔도솜 내의 산성 조건 하에서 항원으로부터 해리하는 본 발명의 "pH의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자"는 항원을 해리한 후에 FcRn에 대해서 혈장 중에 재생되면 다시 항원에 결합하는 것이 가능하다. 즉, 1분자의 해당 항원 결합 분자가 복수의 항원에 반복해서 결합하는 것이 가능해진다. 또한, 항원 결합 분자에 결합한 항원이 엔도솜 내에서 해리함으로써 혈장 중에 재생되지 않기 위해 항원 결합 분자에 의한 항원의 세포에의 취입을 촉진하고, 항원 결합 분자의 투여에 의해 항원의 소실을 촉진하고, 혈장 중의 항원 농도를 저하시키는 것이 가능해진다.

[0402] 항원에 대해서 혈장 중의 고칼슘 농도의 조건 하에서는 강하게 결합하고, 엔도솜 내의 저칼슘 농도의 조건 하에서 항원으로부터 해리되는 본 발명의 "칼슘 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자"에 혈장 중의 고칼슘 농도의 조건 하에서의 FcRn에 대한 결합을 부여함으로써 해당 항원 결합 분자와 항원의 복합체의 세포 내에의 취입이 촉진된다. 즉, 해당 항원 결합 분자의 투여에 대해서 혈장 중으로부터의 항원의 소실이 촉진되어 혈장 중의 항원 농도를 저하시키는 것이 가능해진다.

[0403] 또한, 항원에 대해서 혈장 중의 pH 중성 영역의 조건 하에서는 강하게 결합하고, 엔도솜 내의 pH 산성 조건 하에서 항원으로부터 해리되는 본 발명의 "pH의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자"에 혈장 중의 pH 중성 영역의 조건 하에서의 FcRn에 대한 결합을 부여함으로써 해당 항원 결합 분자와 항원의 복합체의 세포 내에의 취입이 촉진된다. 즉, 해당 항원 결합 분자의 투여에 대해서 혈장 중으로부터의 항원의 소실이 촉진되어 혈장 중의 항원 농도를 저하시키는 것이 가능해진다.

[0404] 통상의 Fc영역을 포함한 항체는 혈장 중의 pH 중성 영역의 조건 하에서 FcRn에 대한 결합 활성을 갖기 때문에 통상의 항체 및 항체-항원 복합체는 비특이적인 엔도시토시스에 대해서 세포에 취입되어 엔도솜 내의 pH 산성 영역의 조건 하에서 FcRn에 결합함으로써 세포 표면에 수송된다. FcRn은 항체를 엔도솜 내로부터 세포 표면에 수송하기 때문에 FcRn의 일부는 세포 표면에도 존재하고 있다고 생각되지만, 세포 표면의 pH 중성 영역의 조건 하에서는 항체는 FcRn으로부터 해리되기 위해서 항체는 혈장 중에 재생된다.

[0405] 상기의 FcRn 결합 도메인인 Fc영역을 포함한 항체의 생체 내에서의 동태를 고려하면, 항원에 대해서 혈장 중의

고칼슘 농도의 조건 하에서는 강하게 결합하고, 엔도솜 내의 저칼슘 농도의 조건 하에서 항원으로부터 해리되는 본 발명의 "칼슘 이온 농도의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자"는 혈장 중에서 항원에 결합하고, 엔도솜 내에서 결합하고 있는 항원을 해리하기 위해서 항원의 소실 속도는 비특이적인 엔도시토시스에 의한 세포에의 취입 속도와 같아진다고 생각된다. 항원 결합 분자의 항원에 대한 결합의 칼슘 이온 농도 의존성이 불충분한 경우는 엔도솜 내에서 해리하지 않는 항원이 혈장 중에 재생되어 버리지만 항원 결합 분자의 항원에 대한 결합의 칼슘 이온 농도 의존성이 충분한 경우는 항원의 소실 속도는 비특이적인 엔도시토시스에 의한 세포에의 취입이 유효하게 된다.

[0406] 또한, 항원에 대해서 혈장 중의 pH 중성 영역의 조건 하에서는 강하게 결합하고, 엔도솜 내의 pH 산성 조건 하에서 항원으로부터 해리되는 본 발명의 "pH의 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자"는 혈장 중에서 항원에 결합하고, 엔도솜 내에서 결합하고 있는 항원을 해리하기 위해서 항원의 소실 속도는 비특이적인 엔도시토시트에 의한 세포에의 취입 속도와 같아진다고 생각된다. 항원 결합 분자의 항원에 대한 결합의 pH 의존성이 불충분한 경우는 엔도솜 내에서 해리되지 않은 항원이 혈장 중에 재생되어 버리지만 항원 결합 분자의 항원에 대한 결합의 pH 의존성이 충분한 경우는 항원의 소실 속도는 비특이적인 엔도시토시스에 의한 세포에의 취입이 유효하게 된다.

[0407] 따라서, FcRn 결합 도메인을 포함한 항원 결합 분자에 pH, 중성 영역에서의 FcRn에의 결합능을 부여함으로써 세포 표면에 존재하는 FcRn에 결합한 해당 항원 결합 분자가 FcRn 의존적으로 세포에 취입된다. FcRn을 통해서 세포에의 취입 속도는 비특이적인 엔도시토시스에 의한 세포에의 취입 속도보다 빠르기 때문에 pH 중성 영역에서의 FcRn에의 결합능을 부여함으로써 항원의 혈장 중으로부터의 소실 속도를 더 빠르게 하는 것이 가능하다. 즉, pH 중성 영역에서 FcRn에 대한 결합능을 갖는 항원 결합 분자는 통상의 (혈장 중의 pH 중성 영역의 조건 하에서 FcRn에 대한 결합 활성을 갖지 않음) Fc영역을 포함한 항원 결합 분자보다 신속하게 항원을 세포 내에 보내고, 엔도솜 내에서 항원을 해리하여 다시 세포 표면 또는 혈장 중에 재생되어 거기서 다시 항원에 결합하고, 또한 FcRn을 통해서 세포 내에 취입된다. pH 중성 영역에 있어서 FcRn에 대한 결합능을 높임으로써 이 재생의 회전 속도를 빠르게 하는 것이 가능하기 때문에 혈장 중으로부터 항원을 소실시키는 속도가 빨라진다. 또한, 항원 결합 분자의 pH 산성 영역에서의 항원 결합 활성을 pH 중성 영역에서의 항원 결합 활성보다 저하시킴으로써 또 그 효율을 높이는 것이 가능하다. 또한 1분자의 항원 결합 분자에 의한 이 회전수가 많아짐으로써 1분자의 항원 결합 분자에 따라서 결합할 수 있는 항원의 수도 많아진다고 생각된다.

[0408] 본 발명의 항원 결합 분자는 항원 결합 도메인과 FcRn(특히 인간 FcRn) 결합 도메인으로 이루어지고, FcRn 결합 도메인은 항원에 대한 결합에 영향을 주지 않기 때문에, 또한 상술한 메커니즘으로부터 고려해도 항원의 종류에 의존하는 것이 없고, 항원 결합 분자의 저칼슘 이온 농도의 조건 하에서의 항원 결합 활성(결합능)을 고칼슘 이온 농도 조건 하에서의 항원 결합 활성보다 저하 및/또는 혈장 중에서의 pH 중성 영역에서의 FcRn에의 결합 활성을 증가시킴으로써 항원 결합 분자에 의한 항원의 세포 내에의 취입을 촉진시켜 항원의 소실 속도를 빠르게 하는 것이 가능하다고 생각된다.

[0409] 또한, 본 발명의 항원 결합 분자는 항원 결합 도메인과 FcRn 결합 도메인으로 이루어지고, FcRn 결합 도메인은 항원에 대한 결합에 영향을 주지 않기 때문에, 또한 상술한 메커니즘으로 고려해도 항원의 종류에 의존하는 것이 없고, 항원 결합 분자의 pH 산성 영역의 조건 하에서의 항원 결합 활성(결합능)을 pH 중성 영역의 조건 하에서의 항원 결합 활성보다 저하 및/또는 혈장 중에서의 pH 중성 영역에서의 FcRn에의 결합 활성을 증대시킴으로써 항원 결합 분자에 의한 항원의 세포 내에의 취입을 촉진시켜 항원의 소실 속도를 빠르게 하는 것이 가능하다고 생각된다.

[0410] 항체 정상 영역 등의 FcRn 결합 도메인의 FcRn에 대한 결합 활성은 상기 결합 활성의 항에서 기술되어 있듯이 당업자에 공지의 방법에 의해 측정되는 것이 가능해지고, pH 이외의 조건에 대해서는 당업자가 적절하게 결정하는 것이 가능하다. 항원 결합 분자의 항원 결합 활성과 인간 FcRn 결합 활성은 KD(Dissociation constant: 해리 정수), 겉보기의 KD(Apparent dissociation constant: 겉보기 해리 정수), 해리 속도인 kd(Dissociation rate: 해리 속도), 또는 겉보기의 kd(Apparent dissociation: 겉보기의 해리 속도) 등으로서 평가될 수 있다. 이들은 당업자 공지의 방법으로 측정될 수 있다. 예를 들면 Biacore(GE healthcare Bio-Sciences Corp.), 스캐차드 플롯, 또는 플로우 사이토미터 등을 사용할 수 있다.

[0411] 항체 정상 영역 등의 FcRn 결합 도메인의 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 측정할 때의 pH 이외의 조건은 당업자가 적절하게 선택하는 것이 가능하고, 특별히 한정되지 않는다. 예를 들면, WO2009125825에 기재되어 있는 바와 같이 MES 버퍼, 37°C의 조건에서 측정될 수 있다. 또한, 항체 정상 영역 등의 FcRn 결합 도메인의 인간 FcRn에

대한 결합 활성의 측정은 당업자 공지의 방법에 의해 행해지는 것이 가능하고, 예를 들면 Biacore(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) 등을 사용해서 측정될 수 있다. 항체 정상 영역 등의 FcRn 결합 도메인과 인간 FcRn의 결합 활성의 측정은 FcRn 결합 도메인 또는 FcRn 결합 도메인을 포함한 본 발명의 항원 결합 분자 또는 인간 FcRn을 고정화한 침에 각각 인간 FcRn 또는 FcRn 결합 도메인 또는 FcRn 결합 도메인을 포함한 본 발명의 항원 결합 분자를 어날라이트해서 주입함으로써 평가될 수 있다.

[0412] 항체 정상 영역 등의 FcRn 결합 도메인 또는 FcRn 결합 도메인을 포함한 항원 결합 분자와 FcRn의 결합 활성을 갖는 조건으로서의 pH 중성 영역이란 통상적으로 pH6.7~pH10.0을 의미한다. pH 중성 영역이란 바람직하게는 pH7.0~pH8.0의 임의의 pH값에 의해서 나타내는 범위이고, 바람직하게는 pH7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 및 8.0으로부터 선택되며, 특히 바람직하게는 *in vivo*의 혈장 중(혈중)의 pH에 가까운 pH7.4이다. pH7.4에서의 인간 FcRn 결합 도메인과 인간 FcRn의 결합 친화성이 낮기 때문에 그 결합 친화성을 평가하는 것이 어려울 경우에는 pH7.4 대신에 pH7.0을 사용할 수 있다. 본 발명에 있어서, 인간 FcRn 결합 도메인 또는 인간 FcRn 결합 도메인을 포함한 항원 결합 분자와 FcRn의 결합 활성을 갖는 조건으로서의 pH 산성 영역이란 통상적으로 pH4.0~pH6.5를 의미한다. 바람직하게는 pH5.5~pH6.5를 의미하고, 특히 바람직하게는 인비보의 초기 엔도솜 내의 pH에 가까운 pH5.8~pH6.0을 의미한다. 측정 조건에 사용되는 온도로서 인간 FcRn 결합 도메인 또는 인간 FcRn 결합 도메인을 포함한 항원 결합 분자와 인간 FcRn의 결합 친화성은 10°C~50°C의 임의의 온도에서 평가해도 좋다. 바람직하게는 인간 FcRn 결합 도메인 또는 인간 FcRn 결합 도메인을 포함한 항원 결합 분자와 인간 FcRn의 결합 친화성을 측정하기 위해서 15°C~40°C의 온도가 사용된다. 보다 바람직하게는 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 및 35°C 중 어느 1개와 같은 20°C에서 35°C까지의 임의의 온도도 마찬가지로 인간 FcRn 결합 도메인 또는 인간 FcRn 결합 도메인을 포함한 항원 결합 분자와 인간 FcRn의 결합 친화성을 결정하기 위해서 사용된다. 25°C라는 온도는 본 발명의 태양의 비한정적인 일례이다.

[0413] The Journal of Immunology(2009) 182: 7663-7671에 의하면 천연형 인간 IgG1의 인간 FcRn 결합 활성은 pH 산성 영역(pH6.0)에서 KD 1.7 μM이지만, pH 중성 영역에서는 활성을 거의 검출할 수 없었다. 따라서, 바람직한 태양에 있어서는 pH 산성 영역에서의 인간 FcRn 결합 활성이 KD 20 μM 또는 그것보다 강하고, pH 중성 영역에서의 인간 FcRn 결합 활성이 천연형 인간 IgG와 동등하거나 그것보다 강한 항원 결합 분자를 포함하며, pH 산성 영역 및 pH 중성 영역에서 인간 FcRn 결합 활성을 갖는 본 발명의 항원 결합 분자가 검사될 수 있다. 보다 바람직한 태양에 있어서는 pH 산성 영역에서의 인간 FcRn 결합 활성이 KD 2.0 μM 또는 그것보다 강하고, pH 중성 영역에 있어서의 인간 FcRn 결합 활성이 KD 40 μM 또는 그것보다 강한 항원 결합 분자가 검사될 수 있다. 또한, 보다 바람직한 태양에 있어서는 pH 산성 영역에서의 인간 FcRn 결합 활성이 KD 0.5 μM 또는 그것보다 강하고, pH 중성 영역에서의 인간 FcRn 결합 활성이 KD 15 μM 또는 그것보다 강한 항원 결합 분자가 검사될 수 있다. 상기의 KD값은 The Journal of Immunology(2009) 182: 7663-7671에 기재된 방법(항원 결합 분자를 침에 고정하여 어날라이트로서 인간 FcRn을 주입)에 의해서 결정된다.

[0414] 본 발명은 pH 산성 영역 및 pH 중성 영역에서 인간 FcRn 결합 활성을 갖는 FcRn 결합 도메인이 바람직하다. 해당 도메인은 미리 pH 산성 영역 및 pH 중성 영역에서 인간 FcRn 결합 활성을 갖고 있는 FcRn 결합 도메인으면 그대로 사용될 수 있다. 해당 도메인이 pH 산성 영역 및/또는 pH 중성 영역에서 인간 FcRn 결합 활성이 없는 또는 약한 경우에는 항원 결합 분자 중의 아미노산을 변이함으로써 원하는 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 FcRn 결합 도메인이 취득될 수 있지만, 인간 FcRn 결합 도메인 중의 아미노산을 변이함으로써 pH 산성 영역 및/또는 pH 중성 영역에서의 원하는 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 FcRn 결합 도메인도 적합하게 취득될 수 있다. 또한, 미리 pH 산성 영역 및/또는 pH 중성 영역에서 인간 FcRn 결합 활성을 갖고 있는 FcRn 결합 도메인 중의 아미노산의 변이에 따라서 원하는 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 FcRn 결합 도메인도 얻을 수 있다. 그러한 원하는 결합 활성을 초래하는 인간 FcRn 결합 도메인의 아미노산 변이는 아미노산 변이 전과 변이 후의 pH 산성 영역 및/또는 pH 중성 영역에서의 인간 FcRn 결합 활성을 비교함으로써 발견될 수 있다. 공지의 방법을 사용해서 당업자는 적절하게 아미노산의 변이를 실시할 수 있다.

[0415] 본 발명에 있어서, FcRn 결합 도메인의 "아미노산의 변경" 또는 "아미노산 변이"이란 출발 FcRn 결합 도메인의 아미노산 서열과는 다른 아미노산 서열에 변이되는 것을 포함한다. 출발 FcRn 결합 도메인의 수식 변이형이 pH 산성 영역 및/또는 중성 영역에서 인간 FcRn에 결합할 수 있는 한 (따라서, 출발 FcRn 결합 도메인은 pH 산성 영역 및/또는 중성 영역의 조건 하에서의 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 반드시 필요로 하는 것은 아니다) 어느 FcRn 결합 도메인도 출발 도메인으로서 사용될 수 있다. 출발 FcRn 결합 도메인의 예로서는 IgG 항체의 정상 영역, 즉 서열 번호: 14~17 중 어느 하나로 나타내는 천연형의 정상 영역을 바람직하게 들 수 있다. 또한, 이미 변이가 가해진 FcRn 결합 도메인을 출발 FcRn 결합 도메인으로서 새로운 변이가 가해진 변이 FcRn 결합 도메인

도 본 발명의 변이 FcRn 결합 도메인으로서 바람직하게 사용될 수 있다. 출발 FcRn 결합 도메인은 폴리펩티드 자체, 출발 FcRn 결합 도메인을 포함한 조성물 또는 출발 FcRn 결합 도메인을 부호화하는 아미노산 서열을 의미할 수 있다. 출발 FcRn 결합 도메인에는 항체의 항에서 설명된 재조합에 의해서 생산된 공지의 IgG 항체의 FcRn 결합 도메인이 포함될 수 있다. 출발 FcRn 결합 도메인의 기원은 한정되지 않지만 비인간 동물의 임의의 생물 또는 인간으로부터 취득될 수 있다. 바람직하게는, 임의의 생물로서는 마우스, 래트, 기니피그, 햄스터, 게르빌루스쥐, 고양이, 토끼, 개, 염소, 양, 소, 말, 낙타 및 비인간 영장류로부터 선택되는 생물을 바람직하게 들 수 있다. 다른 태양에 있어서, 출발 FcRn 결합 도메인은 또한 게먹이원숭이, 마모셋, 맹골원숭이, 침팬지 또는 인간으로부터 취득될 수 있다. 바람직하게는, 출발 Fc영역은 인간 IgG1로부터 취득될 수 있지만, IgG의 특정 클래스에 한정되는 것은 아니다. 이것은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 Fc영역을 출발 Fc영역으로서 적절하게 사용할 수 있다는 것을 의미한다. 인간 IgG1, 인간 IgG2, 인간 IgG3, 인간 IgG4 Fc영역으로서는 유전자 다형에 의한 복수의 알로타이프 서열이 Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242에 기재되어 있지만, 본 발명에 있어서는 그 어느 것이어도 좋다. 특히 인간 IgG1의 서열로서는 EU 넘버링 356-358번째의 아미노산 서열이 DEL이어도 EEM이어도 좋다. 마찬가지로, 본 명세서에 있어서, 상기 임의의 생물로부터의 IgG의 임의의 클래스 또는 서브클래스의 FcRn 결합 도메인을 바람직하게는 출발 FcRn 결합 도메인으로서 사용될 수 있다는 것을 의미한다. 천연에 존재하는 IgG의 변종 또는 조작된 형의 예는 공지의 문헌(Curr. Opin. Biotechnol. (2009) 20 (6), 685-91, Curr. Opin. Immunol. (2008) 20 (4), 460-470, Protein Eng. Des. Sel. (2010) 23 (4), 195-202, WO2009086320, WO2008092117, WO2007041635 및 WO2006105338)에 기재되지만 그것에 한정되지 않는다.

[0416]

FcRn(특히 인간 FcRn) 결합 도메인을 포함한 항원 결합 분자에 pH 중성 영역에서의 FcRn(특히 인간 FcRn)에의 결합능을 부여하기 위해 FcRn과의 결합에 관여하는 FcRn 결합 도메인 중의 아미노산에 적절한 변이가 추가된다. FcRn 결합 도메인으로서 항체 IgG 분자의 정상 영역이 사용되는 경우에는, 예를 들면 EU 넘버링으로 정의되는 221위치~225위치, 227위치, 228위치, 230위치, 232위치, 233~241위치, 243~252위치, 254~260위치, 262~272위치, 274위치, 276위치, 278~289위치, 291~312위치, 315~320위치, 324위치, 325위치, 327~339위치, 341위치, 343위치, 345위치, 360위치, 362위치, 370위치, 375~378위치, 380위치, 382위치, 385~387위치, 389위치, 396위치, 414위치, 416위치, 423위치, 424위치, 426~438위치, 440위치 및 442위치의 위치의 아미노산이 천연형 IgG의 정상 영역의 상당하는 아미노산과는 다른 변이된 정상 영역을 들 수 있다. 보다 구체적으로는, 예를 들면 EU 넘버링으로 정의되는 256위치의 아미노산이 Pro, 280위치의 아미노산이 Lys, 339위치의 아미노산이 Thr, 385위치의 아미노산이 His, 428위치의 아미노산이 Leu, 및/또는 434위치의 아미노산이 Trp, Tyr, Phe, Ala 또는 His 중 어느 하나인 정상 영역의 변이형을 들 수 있다. 이들 변이형을 사용함으로써 IgG형 면역 글로불린 Fc영역의 pH 중성 영역에서의 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 강하게 하는 것이 가능하다.

[0417]

또한, pH 산성 영역에서의 인간 FcRn에 대한 결합을 천연형 IgG의 정상 영역과 비교해서 강하게 할 수 있는 변이형도 적절하게 사용될 수 있다. 이들 변이형 중, pH 중성 영역에서도 인간 FcRn에 대한 결합을 강하게 하는 것이 생기는 변이형이 적절하게 선택되고, 본 발명에 사용하는 것이 가능하다. 그러한 예로서, 정상 영역에서의 EU 넘버링으로 정의되는 아미노산이 천연형 IgG의 정상 영역의 상당하는 아미노산과는 다른 변이된 정상 영역을 들 수 있다. 이러한 아미노산의 변이예로서 표 1에 든 아미노산을 포함한 정상 영역의 변이형이 바람직하게 사용될 수 있다.

표 1

위치	아미노산 개별	위치	아미노산 개별
221	Y, K	299	W, F, H, Y
222	Y	300	K, A, G, V, M, Q, N, E
223	E, K	301	E
224	Y, E	302	I
225	E, K, W	303	Y, E, A
227	K, E, G	304	N, T
228	Y, K, G	305	A, H
230	E, G	306	Y
232	K	307	A, E, M, G, Q, H
233	R, S, M, T, W, Y, G	308	A, R, F, C, Y, W, N, H
234	H, R, E, I, V, F, D, Y, G	311	A, I, K, L, M, V, W, T, H
235	Y, V, N, S, T, Q, D	312	A, P, H
236	I, V, K, P, E, Q, H, W, Y, D, T, M, A, F, S, N, R	315	T, H
237	I, W, S, T, E, R, N, Q, K, H, D, P, L, M	316	K
238	A, L, D, S, T, H, W, V, I, G, M, F, E, K	317	A, P, H
239	M, R, T, G, V, E, D, L, A	318	N, T, R, L, Y
240	I, M, T	319	L, I, W, H, M, V, A
241	E, W, L	320	L, W, H, N
243	E, W	324	T, D
244	L	325	F, M, D
245	R	326	A
246	Y, H	327	D, K, M, Y, H, L
247	D	328	G, A, W, R, F
248	Y	329	K, R, W
249	P, Q, Y, H	330	G, W, V, P, H, F
250	I, E, Q	331	L, F, Y
251	T, D	332	F, H, K, L, M, R, S, W, T, Q, E, Y, D, N, V
252	Y, W, Q	333	L, F, M, A
254	H	334	A
255	E, Y, H	335	H, F, N, V, M, W, I, S, P, L
256	A	336	E, K
257	A, I, M, N, S, V, T, L, Y, C	337	A
258	D, Y, H, A	338	A
259	I, F, N	339	N, W
260	S, D, E, H, Y	341	P
262	L, E	343	E, H, K, Q, R, T, Y
263	I	360	H, A
264	F, A, I, T, N, S, D	362	A
265	R, P, G, A	375	R
266	I	376	A, G, I, M, P, T, V
267	K, E, A	377	K
268	E, M	378	Q, D, N, W
269	M, W, K, P, I, S, G, V, F, Y, A	380	A, N, S, T, Q, R, H
270	K, S, I, A	382	A, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
271	A, V, S, Y, I, T	385	N, E
272	A, L, R, I, D, H, V, W, Y, P, T	386	H
274	M, F, G, E, I, T, N	387	H, Q
276	D, F, H, R, L, V, W, A	414	A
278	R, S, V, M, N, I, L, D	423	N
279	A, D, G, H, M, N, Q, R, S, T, W, Y, C, I	424	A
281	D, Y	426	H, L, V, R
282	G, K, E, Y	427	N
283	A, D, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, W, Y	428	F
284	T, L, Q, E	429	Q
285	N, Y, W, Q, K, E, D, Y	430	A, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, Y
286	F, L, Y, E, P, D, K, A	431	H, K
287	S, H	432	H
288	N, P, Y, H, D, I, V, C, E, G, L, Q, R	433	P
289	H	434	G, T, M, S,
291	Q, H	435	K
292	Y, E, D	436	I, L, T
293	V	437	H
294	I, K, G	438	K, L, T, W
295	V, T	440	K
296	E, I, L	442	K
298	F, E, T, H		

[0418]

[0419] 특히 바람직한 아미노산의 변이로서, 예를 들면 EU 넘버링으로 정의되는 237위치, 238위치, 239위치, 248위치, 250위치, 252위치, 254위치, 255위치, 256위치, 257위치, 258위치, 265위치, 270위치, 286위치, 289위치, 297위치, 298위치, 303위치, 305위치, 307위치, 308위치, 309위치, 311위치, 312위치, 314위치, 315위치, 317위치, 325위치, 332위치, 334위치, 360위치, 376위치, 380위치, 382위치, 384위치, 385위치, 386위치, 387위치, 389위치, 424위치, 428위치, 433위치, 434위치 및 436위치에서 아미노산을 천연형 IgG의 정상 영역의 상당하는 아미노산과 다른 아미노산으로 치환되는 변이를 들 수 있다. 이들 아미노산으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산을 다른 아미노산으로 변이함으로써 FcRn 결합 도메인의 pH 중성 영역에서의 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 높일 수 있다.

[0420]

특히 바람직한 변이로는, 예를 들면 천연형 IgG의 정상 영역의 EU 넘버링으로 정의되는;

[0421]

237위치의 아미노산이 Met,

[0422]

238위치의 아미노산이 Ala,

[0423]

239위치의 아미노산이 Lys,

- [0424] 248위치의 아미노산이 Ile,
- [0425] 250위치의 아미노산이 Ala, Phe, Ile, Met, Gln, Ser, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,
- [0426] 252위치의 아미노산이 Phe, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,
- [0427] 254위치의 아미노산이 Thr,
- [0428] 255위치의 아미노산이 Glu,
- [0429] 256위치의 아미노산이 Asp, Glu 또는 Gln 중 어느 하나,
- [0430] 257위치의 아미노산이 Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr 또는 Val 중 어느 하나,
- [0431] 258위치의 아미노산이 His,
- [0432] 265위치의 아미노산이 Ala,
- [0433] 270위치의 아미노산이 Phe,
- [0434] 286위치의 아미노산이 Ala 또는 Glu 중 어느 하나,
- [0435] 289위치의 아미노산이 His,
- [0436] 297위치의 아미노산이 Ala,
- [0437] 298위치의 아미노산이 Gly,
- [0438] 303위치의 아미노산이 Ala,
- [0439] 305위치의 아미노산이 Ala,
- [0440] 307위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,
- [0441] 308위치의 아미노산이 Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Gln 또는 Thr 중 어느 하나,
- [0442] 309위치의 아미노산이 Ala, Asp, Glu, Pro 또는 Arg 중 어느 하나,
- [0443] 311위치의 아미노산이 Ala, His 또는 Ile 중 어느 하나,
- [0444] 312위치의 아미노산이 Ala 또는 His 중 어느 하나,
- [0445] 314위치의 아미노산이 Lys 또는 Arg 중 어느 하나,
- [0446] 315위치의 아미노산이 Ala 또는 His 중 어느 하나,
- [0447] 317위치의 아미노산이 Ala,
- [0448] 325위치의 아미노산이 Gly,
- [0449] 332위치의 아미노산이 Val,
- [0450] 334위치의 아미노산이 Leu,
- [0451] 360위치의 아미노산이 His,
- [0452] 376위치의 아미노산이 Ala,
- [0453] 380위치의 아미노산이 Ala,
- [0454] 382위치의 아미노산이 Ala,
- [0455] 384위치의 아미노산이 Ala,
- [0456] 385위치의 아미노산이 Asp 또는 His 중 어느 하나,
- [0457] 386위치의 아미노산이 Pro,
- [0458] 387위치의 아미노산이 Glu,

- [0459] 389위치의 아미노산이 Ala 또는 Ser 중 어느 하나,
- [0460] 424위치의 아미노산이 Ala,
- [0461] 428위치의 아미노산이 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나,
- [0462] 433위치의 아미노산이 Lys,
- [0463] 434위치의 아미노산이 Ala, Phe, His, Ser, Trp 또는 Tyr 중 어느 하나, 및
- [0464] 436위치의 아미노산이 His
- [0465] 인 변이를 바람직하게 들 수 있다. 또한, 변이되는 아미노산의 수는 특별히 한정되지 않아 1개소만의 아미노산을 변경하여도 좋고, 2개소 이상의 아미노산을 변이되어도 좋다. 2개소 이상의 아미노산의 변이의 조합으로서는, 예를 들면 표 2에 기재되는 바와 같은 조합을 들 수 있다.

표 2

변이체	KD (M)	아미노산 개변 부위
F1	8.10E-07	N434W
F2	3.20E-06	M252Y/S254T/T256E
F3	2.50E-06	N434Y
F4	5.80E-06	N434S
F5	6.80E-06	N434A
F7	5.60E-06	M252Y
F8	4.20E-06	M252W
F9	1.40E-07	M252Y/S254T/T256E/N434Y
F10	6.90E-08	M252Y/S254T/T256E/N434W
F11	3.10E-07	M252Y/N434Y
F12	1.70E-07	M252Y/N434W
F13	3.20E-07	M252W/N434Y
F14	1.80E-07	M252W/N434W
F19	4.60E-07	P257L/N434Y
F20	4.60E-07	V308F/N434Y
F21	3.00E-08	M252Y/V308P/N434Y
F22	2.00E-06	M428L/N434S
F25	9.20E-09	M252Y/S254T/T256E/V308P/N434W
F26	1.00E-06	I332V
F27	7.40E-06	G237M
F29	1.40E-06	I332V/N434Y
F31	2.80E-06	G237M/V308F
F32	8.00E-07	S254T/N434W
F33	2.30E-06	S254T/N434Y
F34	2.80E-07	T256E/N434W
F35	8.40E-07	T256E/N434Y
F36	3.60E-07	S254T/T256E/N434W
F37	1.10E-06	S254T/T256E/N434Y
F38	1.00E-07	M252Y/S254T/N434W
F39	3.00E-07	M252Y/S254T/N434Y
F40	8.20E-08	M252Y/T256E/N434W
F41	1.50E-07	M252Y/T256E/N434Y
F42	1.00E-06	M252Y/S254T/T256E/N434A
F43	1.70E-06	M252Y/N434A
F44	1.10E-06	M252W/N434A
F47	2.40E-07	M252Y/T256Q/N434W
F48	3.20E-07	M252Y/T256Q/N434Y
F49	5.10E-07	M252P/T256D/N434W
F50	1.20E-06	M252F/T256D/N434Y
F51	8.10E-06	N434F/Y436H
F52	3.10E-06	H433K/N434F/Y436H
F53	1.00E-06	I332V/N434W
F54	8.40E-08	V308P/N434W
F56	9.40E-07	I332V/M428L/N434Y
F57	1.10E-05	G385D/Q386P/N389S
F58	7.70E-07	G385D/Q386P/N389S/N434W
F59	2.40E-06	G385D/Q386P/N389S/N434Y

[0466]

F60	1.10E-05	G385H
F61	9.70E-07	G385H/N434W
F62	1.90E-06	G385H/N434Y
F63	2.50E-06	N434F
F64	5.30E-06	N434H
F65	2.90E-07	M252Y/S254T/T256E/N434F
F66	4.30E-07	M252Y/S254T/T256E/N434H
F67	6.30E-07	M252Y/N434F
F68	9.30E-07	M252Y/N434H
F69	5.10E-07	M428L/N434W
F70	1.50E-06	M428L/N434Y
F71	8.30E-08	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434W
F72	2.00E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434Y
F73	1.70E-07	M252Y/M428L/N434W
F74	4.60E-07	M252Y/M428L/N434Y
F75	1.40E-06	M252Y/M428L/N434A
F76	1.00E-06	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434A
F77	9.90E-07	T256E/M428L/N434Y
F78	7.80E-07	S254T/M428L/N434W
F79	5.90E-06	S254T/T256E/N434A
F80	2.70E-06	M252Y/T256Q/N434A
F81	1.60E-06	M252Y/T256E/N434A
F82	1.10E-06	T256Q/N434W
F83	2.60E-06	T256Q/N434Y
F84	2.80E-07	M252W/T256Q/N434W
F85	5.50E-07	M252W/T256Q/N434Y
F86	1.50E-06	S254T/T256Q/N434W
F87	4.30E-06	S254T/T256Q/N434Y
F88	1.90E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434W
F89	3.60E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y
F90	1.90E-08	M252Y/T256E/V308P/N434W
F91	4.80E-08	M252Y/V308P/M428L/N434Y
F92	1.10E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434W
F93	7.40E-07	M252W/M428L/N434W
F94	3.70E-07	P257L/M428L/N434Y
F95	2.60E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434F
F99	6.20E-07	M252Y/T256E/N434H
F101	1.10E-07	M252W/T256Q/P257L/N434Y
F103	4.40E-08	P238A/M252Y/V308P/N434Y
F104	3.70E-08	M252Y/D265A/V308P/N434Y
F105	7.50E-08	M252Y/T307A/V308P/N434Y
F106	3.70E-08	M252Y/V303A/V308P/N434Y
F107	3.40E-08	M252Y/V308P/D376A/N434Y
F108	4.10E-08	M252Y/V305A/V308P/N434Y
F109	3.20E-08	M252Y/V308P/Q311A/N434Y
F111	3.20E-08	M252Y/V308P/K317A/N434Y
F112	6.40E-08	M252Y/V308P/E380A/N434Y
F113	3.20E-08	M252Y/V308P/E382A/N434Y

[0467]

F114	3.80E-08	M252Y/V308P/S424A/N434Y
F115	6.60E-06	T307A/N434A
F116	8.70E-06	E380A/N434A
F118	1.40E-05	M428L
F119	5.40E-06	T250Q/M428L
F120	6.30E-08	P257L/V308P/M428L/N434Y
F121	1.50E-08	M252Y/T256E/V308P/M428L/N434W
F122	1.20E-07	M252Y/T256E/M428L/N434W
F123	3.00E-08	M252Y/T256E/V308P/N434Y
F124	2.90E-07	M252Y/T256E/M428L/N434Y
F125	2.40E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434Y
F128	1.70E-07	P257L/M428L/N434W
F129	2.20E-07	P257A/M428L/N434Y
F131	3.00E-06	P257G/M428L/N434Y
F132	2.10E-07	P257I/M428L/N434Y
F133	4.10E-07	P257M/M428L/N434Y
F134	2.70E-07	P257N/M428L/N434Y
F135	7.50E-07	P257S/M428L/N434Y
F136	3.80E-07	P257T/M428L/N434Y
F137	4.60E-07	P257V/M428L/N434Y
F139	1.50E-08	M252W/V308P/N434W
F140	3.60E-08	S239K/M252Y/V308P/N434Y
F141	3.50E-08	M252Y/S298G/V308P/N434Y
F142	3.70E-08	M252Y/D270F/V308P/N434Y
F143	2.00E-07	M252Y/V308A/N434Y
F145	5.30E-08	M252Y/V308F/N434Y
F147	2.40E-07	M252Y/V308I/N434Y
F149	1.90E-07	M252Y/V308L/N434Y
F150	2.00E-07	M252Y/V308M/N434Y
F152	2.70E-07	M252Y/V308Q/N434Y
F154	1.80E-07	M252Y/V308T/N434Y
F157	1.50E-07	P257A/V308P/M428L/N434Y
F158	5.90E-08	P257T/V308P/M428L/N434Y
F159	4.40E-08	P257V/V308P/M428L/N434Y
F160	8.50E-07	M252W/M428I/N434Y
F162	1.60E-07	M252W/M428Y/N434Y
F163	4.20E-07	M252W/M428F/N434Y
F164	3.70E-07	P238A/M252W/N434Y
F165	2.90E-07	M252W/D265A/N434Y
F166	1.50E-07	M252W/T307Q/N434Y
F167	2.90E-07	M252W/V303A/N434Y
F168	3.20E-07	M252W/D376A/N434Y
F169	2.90E-07	M252W/V305A/N434Y
F170	1.70E-07	M252W/Q311A/N434Y
F171	1.90E-07	M252W/D312A/N434Y
F172	2.20E-07	M252W/K317A/N434Y
F173	7.70E-07	M252W/E380A/N434Y
F174	3.40E-07	M252W/E382A/N434Y

[0468]

F175	2.70E-07	M252W/S424A/N434Y
F176	2.90E-07	S239K/M252W/N434Y
F177	2.80E-07	M252W/S298G/N434Y
F178	2.70E-07	M252W/D270F/N434Y
F179	3.10E-07	M252W/N325G/N434Y
F182	6.60E-08	P257A/M428L/N434W
F183	2.20E-07	P257T/M428L/N434W
F184	2.70E-07	P257V/M428L/N434W
F185	2.60E-07	M252W/I332V/N434Y
F188	3.00E-06	P257I/Q311
F189	1.90E-07	M252Y/T307A/N434Y
F190	1.10E-07	M252Y/T307Q/N434Y
F191	1.60E-07	P257L/T307A/M428L/N434Y
F192	1.10E-07	P257A/T307A/M428L/N434Y
F193	8.50E-08	P257T/T307A/M428L/N434Y
F194	1.20E-07	P257V/T307A/M428L/N434Y
F195	5.60E-08	P257L/T307Q/M428L/N434Y
F196	3.50E-08	P257A/T307Q/M428L/N434Y
F197	3.30E-08	P257T/T307Q/M428L/N434Y
F198	4.80E-08	P257V/T307Q/M428L/N434Y
F201	2.10E-07	M252Y/T307D/N434Y
F203	2.40E-07	M252Y/T307F/N434Y
F204	2.10E-07	M252Y/T307G/N434Y
F205	2.00E-07	M252Y/T307H/N434Y
F206	2.30E-07	M252Y/T307I/N434Y
F207	9.40E-07	M252Y/T307K/N434Y
F208	3.90E-07	M252Y/T307L/N434Y
F209	1.30E-07	M252Y/T307M/N434Y
F210	2.90E-07	M252Y/T307N/N434Y
F211	2.40E-07	M252Y/T307P/N434Y
F212	6.80E-07	M252Y/T307R/N434Y
F213	2.30E-07	M252Y/T307S/N434Y
F214	1.70E-07	M252Y/T307V/N434Y
F215	9.60E-08	M252Y/T307W/N434Y
F216	2.30E-07	M252Y/T307Y/N434Y
F217	2.30E-07	M252V/K334L/N434Y
F218	2.60E-07	M252Y/G385H/N434Y
F219	2.50E-07	M252Y/T289H/N434Y
F220	2.50E-07	M252Y/Q311H/N434Y
F221	3.10E-07	M252Y/D312H/N434Y
F222	3.40E-07	M252Y/N315H/N434Y
F223	2.70E-07	M252Y/K360H/N434Y
F225	1.50E-06	M252Y/L314R/N434Y
F226	5.40E-07	M252Y/L314K/N434Y
F227	1.20E-07	M252Y/N286E/N434Y
F228	2.30E-07	M252Y/L309E/N434Y
F229	5.10E-07	M252Y/R255E/N434Y
F230	2.50E-07	M252Y/P387E/N434Y

[0469]

F236	8.90E-07	K248I/M428L/N434Y
F237	2.30E-07	M252Y/M428A/N434Y
F238	7.40E-07	M252Y/M428D/N434Y
F240	7.20E-07	M252Y/M428F/N434Y
F241	1.50E-06	M252Y/M428G/N434Y
F242	8.50E-07	M252Y/M428H/N434Y
F243	1.80E-07	M252Y/M428I/N434Y
F244	1.30E-06	M252Y/M428K/N434Y
F245	4.70E-07	M252Y/M428N/N434Y
F246	1.10E-06	M252Y/M428P/N434Y
F247	4.40E-07	M252Y/M428Q/N434Y
F249	6.40E-07	M252Y/M428S/N434Y
F250	2.90E-07	M252Y/M428T/N434Y
F251	1.90E-07	M252Y/M428V/N434Y
F252	1.00E-06	M252Y/M428W/N434Y
F253	7.10E-07	M252Y/M428Y/N434Y
F254	7.50E-08	M252W/T307Q/M428Y/N434Y
F255	1.10E-07	M252W/Q311A/M428Y/N434Y
F256	5.40E-08	M252W/T307Q/Q311A/M428Y/N434Y
F257	5.00E-07	M252Y/T307A/M428Y/N434Y
F258	3.20E-07	M252Y/T307Q/M428Y/N434Y
F259	2.80E-07	M252Y/D270F/N434Y
F260	1.30E-07	M252Y/T307A/Q311A/N434Y
F261	8.40E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F262	1.90E-07	M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F263	1.10E-07	M252Y/T307Q/Q311H/N434Y
F264	2.80E-07	M252Y/E382A/N434Y
F265	6.80E-07	M252Y/E382A/M428Y/N434Y
F266	4.70E-07	M252Y/T307A/E382A/M428Y/N434Y
F267	3.20E-07	M252Y/T307Q/E382A/M428Y/N434Y
F268	6.30E-07	P238A/M252Y/M428F/N434Y
F269	5.20E-07	M252Y/V305A/M428F/N434Y
F270	6.60E-07	M252Y/N325G/M428F/N434Y
F271	6.90E-07	M252Y/D376A/M428F/N434Y
F272	6.80E-07	M252Y/E380A/M428F/N434Y
F273	6.50E-07	M252Y/E382A/M428F/N434Y
F274	7.60E-07	M252Y/E380A/E382A/M428F/N434Y
F275	4.20E-08	S239K/M252Y/V308P/E382A/N434Y
F276	4.10E-08	M252Y/D270F/V308P/E382A/N434Y
F277	1.30E-07	S239K/M252Y/V308P/M428Y/N434Y
F278	3.00E-08	M252Y/T307Q/V308P/E382A/N434Y
F279	6.10E-08	M252Y/V308P/Q311H/E382A/N434Y
F280	4.10E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N434Y
F281	9.20E-08	M252Y/V308P/E382A/M428F/N434Y
F282	2.90E-08	M252Y/V308P/E382A/M428L/N434Y
F283	1.00E-07	M252Y/V308P/E382A/M428Y/N434Y
F284	1.00E-07	M252Y/V308P/M428Y/N434Y
F285	9.90E-08	M252Y/V308P/M428F/N434Y

[0470]

F286	1.20E-07	S239K/M252Y/V308P/E382A/M428Y/N434Y
F287	1.00E-07	M252Y/V308P/E380A/E382A/M428F/N434Y
F288	1.90E-07	M252Y/T256E/E382A/N434Y
F289	4.80E-07	M252Y/T256E/M428Y/N434Y
F290	4.60E-07	M252Y/T256E/E382A/M428Y/N434Y
F292	2.30E-08	S239K/M252Y/V308P/E382A/M428I/N434Y
F293	5.30E-08	M252Y/V308P/E380A/E382A/M428I/N434Y
F294	1.10E-07	S239K/M252Y/V308P/M428F/N434Y
F295	6.80E-07	S239K/M252Y/E380A/E382A/M428F/N434Y
F296	4.90E-07	M252Y/Q311A/M428Y/N434Y
F297	5.10E-07	M252Y/D312A/M428Y/N434Y
F298	4.80E-07	M252Y/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
F299	9.40E-08	S239K/M252Y/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
F300	8.30E-08	S239K/M252Y/V308P/D312A/M428Y/N434Y
F301	7.20E-08	S239K/M252Y/V308P/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
F302	1.90E-07	M252Y/T256E/T307P/N434Y
F303	6.70E-07	M252Y/T307P/M428Y/N434Y
F304	1.60E-08	M252W/V308P/M428Y/N434Y
F305	2.70E-08	M252Y/T256E/V308P/E382A/N434Y
F306	3.60E-08	M252W/V308P/E382A/N434Y
F307	3.60E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/N434Y
F308	1.90E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/M428Y/N434Y
F310	9.40E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/M428I/N434Y
F311	2.80E-08	S239K/M252W/V308P/M428F/N434Y
F312	4.50E-07	S239K/M252W/E380A/E382A/M428F/N434Y
F313	6.50E-07	S239K/M252Y/T307P/M428Y/N434Y
F314	3.20E-07	M252Y/T256E/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
F315	6.80E-07	S239K/M252Y/M428Y/N434Y
F316	7.00E-07	S239K/M252Y/D270F/M428Y/N434Y
F317	1.10E-07	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428Y/N434Y
F318	1.80E-08	S239K/M252Y/V308P/M428I/N434Y
F320	2.00E-08	S239K/M252Y/V308P/N325G/E382A/M428I/N434Y
F321	3.20E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/N434Y
F322	9.20E-08	S239K/M252Y/D270F/T307P/V308P/N434Y
F323	2.70E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/N434Y
F324	2.80E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/N434Y
F325	2.10E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F326	7.50E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/N434Y
F327	6.50E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/T307Q/Q311A/N434Y
F328	1.90E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428I/N434Y
F329	1.20E-08	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/N434Y
F330	3.60E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/N434Y
F331	3.00E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/P387E/N434Y
F333	7.40E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/L309E/Q311A/N434Y
F334	1.90E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/M428I/N434Y
F335	1.50E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/M428I/N434Y
F336	1.40E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F337	5.60E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/M428I/N434Y

[0471]

F338	7.70E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/M428I/N434Y
F339	1.90E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/M428I/N434Y
F343	3.20E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428L/N434Y
F344	3.00E-08	S239K/M252Y/V308P/M428L/N434Y
F349	1.50E-07	S239K/M252Y/V308P/L309P/M428L/N434Y
F350	1.70E-07	S239K/M252Y/V308P/L309R/M428L/N434Y
F352	6.00E-07	S239K/M252Y/L309P/M428L/N434Y
F353	1.10E-06	S239K/M252Y/L309R/M428L/N434Y
F354	2.80E-08	S239K/M252Y/T307Q/V308P/M428L/N434Y
F356	3.40E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/P387E/N434Y
F357	1.60E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/N325G/M428I/N434Y
F358	1.00E-07	S239K/M252Y/T307Q/N434Y
F359	4.20E-07	P257V/T307Q/M428I/N434Y
F360	1.30E-06	P257V/T307Q/M428V/N434Y
F362	5.40E-08	P257V/T307Q/N325G/M428L/N434Y
F363	4.10E-08	P257V/T307Q/Q311A/M428L/N434Y
F364	3.50E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428L/N434Y
F365	5.10E-08	P257V/V305A/T307Q/M428L/N434Y
F367	1.50E-08	S239K/M252Y/E258H/D270F/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F368	2.00E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/B382A/M428I/N434Y
F369	7.50E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428I/N434Y
F372	1.30E-08	S239K/M252W/V308P/M428Y/N434Y
F373	1.10E-08	S239K/M252W/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
F374	1.20E-08	S239K/M252W/T256E/V308P/M428Y/N434Y
F375	5.50E-09	S239K/M252W/N286E/V308P/M428Y/N434Y
F376	9.60E-09	S239K/M252Y/T256E/D270F/N286E/V308P/N434Y
F377	1.30E-07	S239K/M252W/T307P/M428Y/N434Y
F379	9.00E-09	S239K/M252W/T256E/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
F380	5.60E-09	S239K/M252W/T256E/N286E/V308P/M428Y/N434Y
F381	1.10E-07	P257V/T307A/Q311A/M428L/N434Y
F382	8.70E-08	P257V/V305A/T307A/M428L/N434Y
F386	3.20E-08	M252Y/V308P/L309E/N434Y
F387	1.50E-07	M252Y/V308P/L309D/N434Y
F388	7.00E-08	M252Y/V308P/L309A/N434Y
F389	1.70E-08	M252W/V308P/L309E/M428Y/N434Y
F390	6.80E-08	M252W/V308P/L309D/M428Y/N434Y
F391	3.60E-08	M252W/V308P/L309A/M428Y/N434Y
F392	6.90E-09	S239K/M252Y/N286E/V308P/M428I/N434Y
F393	1.20E-08	S239K/M252Y/N286E/V308P/N434Y
F394	5.30E-08	S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F395	2.40E-08	S239K/M252Y/T256E/V308P/N434Y
F396	2.00E-08	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F397	4.50E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/P387E/M428I/N434Y
F398	4.40E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F399	6.50E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/V308P/M428I/N434Y
F400	6.10E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F401	6.90E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/P387E/M428I/N434Y
F402	2.30E-08	P257V/T307Q/M428L/N434W

[0472]

F403	5.10E-08	P257V/T307A/M428L/N434W
F404	9.40E-08	P257A/T307Q/L309P/M428L/N434Y
F405	1.70E-07	P257V/T307Q/L309P/M428L/N434Y
F406	1.50E-07	P257A/T307Q/L309R/M428L/N434Y
F407	1.60E-07	P257V/T307Q/L309R/M428L/N434Y
F408	2.50E-07	P257V/N286E/M428L/N434Y
F409	2.00E-07	P257V/P387E/M428L/N434Y
F410	2.20E-07	P257V/T307H/M428L/N434Y
F411	1.30E-07	P257V/T307N/M428L/N434Y
F412	8.80E-08	P257V/T307G/M428L/N434Y
F413	1.20E-07	P257V/T307P/M428L/N434Y
F414	1.10E-07	P257V/T307S/M428L/N434Y
F415	5.60E-08	P257V/N286E/T307A/M428L/N434Y
F416	9.40E-08	P257V/T307A/P387E/M428L/N434Y
F418	6.20E-07	S239K/M252Y/T307P/N325G/M428Y/N434Y
F419	1.60E-07	M252Y/T307A/Q311H/K360H/N434Y
F420	1.50E-07	M252Y/T307A/Q311H/P387B/N434Y
F421	1.30E-07	M252Y/T307A/Q311H/M428A/N434Y
F422	1.80E-07	M252Y/T307A/Q311H/E382A/N434Y
F423	8.40E-08	M252Y/T307W/Q311H/N434Y
F424	9.40E-08	S239K/P257A/V308P/M428L/N434Y
F425	8.00E-08	P257A/V308P/L309E/M428L/N434Y
F426	8.40E-08	P257V/T307Q/N434Y
F427	1.10E-07	M252Y/P257V/T307Q/M428V/N434Y
F428	8.00E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F429	3.70E-08	M252Y/P257V/T307Q/N434Y
F430	8.10E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428V/N434Y
F431	6.50E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428F/N434Y
F432	9.20E-07	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428V/N434Y
F433	6.00E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/N434Y
F434	2.00E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428Y/N434Y
F435	2.50E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428F/N434Y
F436	2.50E-07	P257A/T307Q/M428V/N434Y
F437	5.70E-08	P257A/T307Q/N434Y
F438	3.60E-08	P257A/T307Q/M428V/N434Y
F439	4.00E-08	P257A/T307Q/M428F/N434Y
F440	1.50E-08	P257V/N286E/T307Q/Q311A/N325G/M428L/N434Y
F441	1.80E-07	P257A/Q311A/M428L/N434Y
F442	2.00E-07	P257A/Q311H/M428L/N434Y
F443	5.50E-08	P257A/T307Q/Q311A/M428L/N434Y
F444	1.40E-07	P257A/T307A/Q311A/M428L/N434Y
F445	6.20E-08	P257A/T307Q/Q311H/M428L/N434Y
F446	1.10E-07	P257A/T307A/Q311H/M428L/N434Y
F447	1.40E-08	P257A/N286E/T307Q/M428L/N434Y
F448	5.30E-08	P257A/N286E/T307A/M428L/N434Y
F449	5.70E-07	S239K/M252Y/D270F/T307P/N325G/M428Y/N434Y
F450	5.20E-07	S239K/M252Y/T307P/L309E/N325G/M428Y/N434Y
F451	1.00E-07	P257S/T307A/M428L/N434Y

[0473]

F452	1.40E-07	P257M/T307A/M428L/N434Y
F453	7.80E-08	P257N/T307A/M428L/N434Y
F454	9.60E-08	P257I/T307A/M428L/N434Y
F455	2.70E-08	P257V/T307Q/M428V/N434Y
F456	3.40E-08	P257V/T307Q/M428F/N434Y
F457	4.00E-08	S239K/P257V/V308P/M428L/N434Y
F458	1.50E-08	P257V/T307Q/V308P/N325G/M428L/N434Y
F459	1.30E-08	P257V/T307Q/V308P/Q311A/N325G/M428L/N434Y
F460	4.70E-08	P257V/T307A/V308P/N325G/M428L/N434Y
F462	8.50E-08	P257A/V308P/N325G/M428L/N434Y
F463	1.30E-07	P257A/T307A/V308P/M428L/N434Y
F464	5.50E-08	P257A/T307Q/V308P/M428L/N434Y
F465	2.10E-08	P257V/N286E/T307Q/N325G/M428L/N434Y
F466	3.50E-07	T256E/P257V/N434Y
F467	5.70E-07	T256E/P257T/N434Y
F468	5.70E-08	S239K/P257T/V308P/M428L/N434Y
F469	5.60E-08	P257T/V308P/N325G/M428L/N434Y
F470	5.40E-08	T256E/P257T/V308P/N325G/M428L/N434Y
F471	6.60E-08	P257T/V308P/N325G/E382A/M428L/N434Y
F472	5.40E-08	P257T/V308P/N325G/P387E/M428L/N434Y
F473	4.50E-07	P257T/V308P/L309P/N325G/M428L/N434Y
F474	3.50E-07	P257T/V308P/L309R/N325G/M428L/N434Y
F475	4.30E-08	T256E/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F476	5.50E-08	P257V/T307Q/E382A/M428L/N434Y
F477	4.30E-08	P257V/T307Q/P387E/M428L/N434Y
F480	3.90E-08	P257L/V308P/N434Y
F481	5.60E-08	P257T/T307Q/N434Y
F482	7.00E-08	P257V/T307Q/N325G/N434Y
F483	5.70E-08	P257V/T307Q/Q311A/N434Y
F484	6.20E-08	P257V/V305A/T307Q/N434Y
F485	9.70E-08	P257V/N286E/T307A/N434Y
F486	3.40E-07	P257V/T307Q/L309R/Q311H/M428L/N434Y
F488	3.50E-08	P257V/V308P/N325G/M428L/N434Y
F490	7.50E-08	S239K/P257V/V308P/Q311H/M428L/N434Y
F492	9.80E-08	P257V/V305A/T307A/N325G/M428L/N434Y
F493	4.90E-07	S239K/D270F/T307P/N325G/M428Y/N434Y
F497	3.10E-08	P257T/T307A/M428V/N434Y
F498	1.30E-06	P257A/M428V/N434Y
F499	5.20E-07	P257A/T307A/M428V/N434Y
F500	4.30E-08	P257S/T307Q/M428L/N434Y
F506	1.90E-07	P257V/N297A/T307Q/M428L/N434Y
F507	5.10E-08	P257V/N286A/T307Q/M428L/N434Y
F508	1.10E-07	P257V/T307Q/N315A/M428L/N434Y
F509	5.80E-08	P257V/T307Q/N384A/M428L/N434Y
F510	5.30E-08	P257V/T307Q/N389A/M428L/N434Y
F511	4.20E-07	P257V/N434Y
F512	5.80E-07	P257T/N434Y
F517	3.10E-07	P257V/N286E/N434Y

[0474]

F518	4.20E-07	P257T/N286E/N434Y
F519	2.60E-08	P257V/N286E/T307Q/N434Y
F521	1.10E-08	P257V/N286E/T307Q/M428Y/N434Y
F523	2.60E-08	P257V/V305A/T307Q/M428Y/N434Y
F526	1.90E-08	P257T/T307Q/M428Y/N434Y
F527	9.40E-09	P257V/T307Q/V308P/N325G/M428Y/N434Y
F529	2.50E-08	P257T/T307Q/M428P/N434Y
F533	1.20E-08	P257A/N286E/T307Q/M428F/N434Y
F534	1.20E-08	P257A/N286E/T307Q/M428Y/N434Y
F535	3.90E-08	T250A/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F538	9.90E-08	T250F/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F541	6.00E-08	T250I/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F544	3.10E-08	T250M/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F549	5.40E-08	T250S/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F550	5.90E-08	T250V/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F551	1.20E-07	T250W/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F552	1.10E-07	T250Y/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F553	1.70E-07	M252Y/Q311A/N434Y
F554	2.80E-08	S239K/M252Y/S254T/V308P/N434Y
F556	1.50E-06	M252Y/T307Q/Q311A
F559	8.00E-08	M252Y/S254T/N286E/N434Y
F560	2.80E-08	M252Y/S254T/V308P/N434Y
F561	1.40E-07	M252Y/S254T/T307A/N434Y
F562	8.30E-08	M252Y/S254T/T307Q/N434Y
F563	1.30E-07	M252Y/S254T/Q311A/N434Y
F564	1.90E-07	M252Y/S254T/Q311H/N434Y
F565	9.20E-08	M252Y/S254T/T307A/Q311A/N434Y
F566	6.10E-08	M252Y/S254T/T307Q/Q311A/N434Y
F567	2.20E-07	M252Y/S254T/M428L/N434Y
F568	1.10E-07	M252Y/T256E/T307A/Q311H/N434Y
F569	2.00E-07	M252Y/T256Q/T307A/Q311H/N434Y
F570	1.30E-07	M252Y/S254T/T307A/Q311H/N434Y
F571	8.10E-08	M252Y/N286E/T307A/Q311H/N434Y
F572	1.00E-07	M252Y/T307A/Q311H/M428L/N434Y
F576	1.60E-06	M252Y/T256E/T307Q/Q311H
F577	1.30E-06	M252Y/N286E/T307A/Q311A
F578	5.70E-07	M252Y/N286E/T307Q/Q311A
F580	8.60E-07	M252Y/N286E/T307Q/Q311H
F581	7.20E-08	M252Y/T256E/N286E/N434Y
F582	7.50E-07	S239K/M252Y/V308P
F583	7.80E-07	S239K/M252Y/V308P/E382A
F584	6.30E-07	S239K/M252Y/T256E/V308P
F585	2.90E-07	S239K/M252Y/N286E/V308P
F586	1.40E-07	S239K/M252Y/N286E/V308P/M428I
F587	1.90E-07	M252Y/N286E/M428L/N434Y
F592	2.00E-07	M252Y/S254T/E382A/N434Y
F593	3.10E-08	S239K/M252Y/S254T/V308P/M428L/N434Y
F594	1.60E-08	S239K/M252Y/T256E/V308P/M428I/N434Y

[0475]

F595	1.80E-07	S239K/M252Y/M428I/N434Y
F596	4.00E-07	M252Y/D312A/E382A/M428Y/N434Y
F597	2.20E-07	M252Y/E382A/P387E/N434Y
F598	1.40E-07	M252Y/D312A/P387E/N434Y
F599	5.20E-07	M252Y/P387E/M428Y/N434Y
F600	2.80E-07	M252Y/T256Q/E382A/N434Y
F601	9.60E-09	M252Y/N286E/V308P/N434Y
F608		G236A/S239D/I332E
F611	2.80E-07	M252Y/V305T/T307P/V308I/L309A/N434Y
F612	3.60E-07	M252Y/T307P/V308I/L309A/N434Y
F613		S239D/A330L/I332E
F616		S239D/K326D/L328Y
F617	7.40E-07	S239K/N434W
F618	6.40E-07	S239K/V308F/N434Y
F619	3.10E-07	S239K/M252Y/N434Y
F620	2.10E-07	S239K/M252Y/S254T/N434Y
F621	1.50E-07	S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F622	3.50E-07	S239K/M252Y/T256Q/N434Y
F623	1.80E-07	S239K/M252W/N434W
F624	1.40E-08	S239K/P257A/N286E/T307Q/M428L/N434Y
F625	7.60E-08	S239K/P257A/T307Q/M428L/N434Y
F626	1.30E-06	V308P
F629	3.90E-08	M252Y/V279L/V308P/N434Y
F630	3.70E-08	S239K/M252Y/V279L/V308P/N434Y
F633	2.40E-08	M252Y/V282D/V308P/N434Y
F634	3.20E-08	S239K/M252Y/V282D/V308P/N434Y
F635	4.50E-08	M252Y/V284K/V308P/N434Y
F636	4.80E-08	S239K/M252Y/V284K/V308P/N434Y
F637	1.50E-07	M252Y/K288S/V308P/N434Y
F638	1.40E-07	S239K/M252Y/K288S/V308P/N434Y
F639	2.70E-08	M252Y/V308P/G385R/N434Y
F640	3.60E-08	S239K/M252Y/V308P/G385R/N434Y
F641	3.00E-08	M252Y/V308P/Q386K/N434Y
F642	3.00E-08	S239K/M252Y/V308P/Q386K/N434Y
F643	3.20E-08	L235G/G236R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F644	3.00E-08	G236R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F645	3.30E-08	S239K/M252Y/V308P/L328R/N434Y
F646	3.80E-08	S239K/M252Y/N297A/V308P/N434Y
F647	2.90E-08	P238D/M252Y/V308P/N434Y
F648		P238D
F649	1.20E-07	S239K/M252Y/N286E/N434Y
F650	1.70E-07	S239K/M252Y/T256E/N434Y
F651	1.80E-07	S239K/M252Y/Q311A/N434Y
F652	2.40E-07	P238D/M252Y/N434Y
F654	3.20E-08	L235K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F655	3.40E-08	L235R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F656	3.30E-08	G237K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F657	3.20E-08	G237R/S239K/M252Y/V308P/N434Y

[0476]

F658	3.20E-08	P238K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F659	3.00E-08	P238R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F660	3.10E-08	S239K/M252Y/V308P/P329K/N434Y
F661	3.40E-08	S239K/M252Y/V308P/P329R/N434Y
F663	6.40E-09	S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F664	3.90E-08	M252Y/N286A/V308P/N434Y
F665	2.00E-08	M252Y/N286D/V308P/N434Y
F666	2.10E-08	M252Y/N286F/V308P/N434Y
F667	3.00E-08	M252Y/N286G/V308P/N434Y
F668	4.00E-08	M252Y/N286H/V308P/N434Y
F669	3.50E-08	M252Y/N286I/V308P/N434Y
F670	2.10E-07	M252Y/N286K/V308P/N434Y
F671	2.20E-08	M252Y/N286L/V308P/N434Y
F672	2.40E-08	M252Y/N286M/V308P/N434Y
F673	2.30E-08	M252Y/N286P/V308P/N434Y
F674	3.20E-08	M252Y/N286Q/V308P/N434Y
F675	5.10E-08	M252Y/N286R/V308P/N434Y
F676	3.20E-08	M252Y/N286S/V308P/N434Y
F677	4.70E-08	M252Y/N286T/V308P/N434Y
F678	3.30E-08	M252Y/N286V/V308P/N434Y
F679	1.70E-08	M252Y/N286W/V308P/N434Y
F680	1.50E-08	M252Y/N286Y/V308P/N434Y
F681	4.90E-08	M252Y/K288A/V308P/N434Y
F682	8.20E-08	M252Y/K288D/V308P/N434Y
F683	5.00E-08	M252Y/K288E/V308P/N434Y
F684	5.10E-08	M252Y/K288F/V308P/N434Y
F685	5.30E-08	M252Y/K288G/V308P/N434Y
F686	4.60E-08	M252Y/K288H/V308P/N434Y
F687	4.90E-08	M252Y/K288I/V308P/N434Y
F688	2.80E-08	M252Y/K288L/V308P/N434Y
F689	4.10E-08	M252Y/K288M/V308P/N434Y
F690	1.00E-07	M252Y/K288N/V308P/N434Y
F691	3.20E-07	M252Y/K288P/V308P/N434Y
F692	3.90E-08	M252Y/K288Q/V308P/N434Y
F693	3.60E-08	M252Y/K288R/V308P/N434Y
F694	4.70E-08	M252Y/K288V/V308P/N434Y
F695	4.00E-08	M252Y/K288W/V308P/N434Y
F696	4.40E-08	M252Y/K288Y/V308P/N434Y
F697	3.10E-08	S239K/M252Y/V308P/N325G/N434Y
F698	2.20E-08	M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F699	2.30E-08	S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F700	5.20E-08	M252Y/V308P/L328E/N434Y
F705	7.10E-09	M252Y/N286E/V308P/M428I/N434Y
F706	1.80E-08	M252Y/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F707	5.90E-09	M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F708	4.10E-09	M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F709	2.00E-08	S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F710	1.50E-08	P238D/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y

[0477]

F711	6.50E-08	S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F712	6.00E-08	P238D/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F713	2.00E-08	P238D/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F714	2.30E-07	P238D/M252Y/N325S/N434Y
F715	2.30E-07	P238D/M252Y/N325M/N434Y
F716	2.70E-07	P238D/M252Y/N325L/N434Y
F717	2.60E-07	P238D/M252Y/N325I/N434Y
F718	2.80E-07	P238D/M252Y/Q295M/N434Y
F719	7.40E-08	P238D/M252Y/N325G/N434Y
F720	2.40E-08	M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F721	1.50E-08	M252Y/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F722	2.70E-07	P238D/M252Y/A327G/N434Y
F723	2.80E-07	P238D/M252Y/L328D/N434Y
F724	2.50E-07	P238D/M252Y/L328E/N434Y
F725	4.20E-08	L235K/G237R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F726	3.70E-08	L235K/P238K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F729	9.20E-07	T307A/Q311A/N434Y
F730	6.00E-07	T307Q/Q311A/N434Y
F731	8.50E-07	T307A/Q311H/N434Y
F732	6.80E-07	T307Q/Q311H/N434Y
F733	3.20E-07	M252Y/L328E/N434Y
F734	3.10E-07	G236D/M252Y/L328E/N434Y
F736	3.10E-07	M252Y/S267M/L328E/N434Y
F737	3.10E-07	M252Y/S267L/L328E/N434Y
F738	3.50E-07	P238D/M252Y/T307P/N434Y
F739	2.20E-07	M252Y/T307P/Q311A/N434Y
F740	2.90E-07	M252Y/T307P/Q311H/N434Y
F741	3.10E-07	P238D/T250A/M252Y/N434Y
F744	9.90E-07	P238D/T250F/M252Y/N434Y
F745	6.60E-07	P238D/T250G/M252Y/N434Y
F746	6.00E-07	P238D/T250H/M252Y/N434Y
F747	2.80E-07	P238D/T250J/M252Y/N434Y
F749	5.10E-07	P238D/T250L/M252Y/N434Y
F750	3.00E-07	P238D/T250M/M252Y/N434Y
F751	5.30E-07	P238D/T250N/M252Y/N434Y
F753	1.80E-07	P238D/T250Q/M252Y/N434Y
F755	3.50E-07	P238D/T250S/M252Y/N434Y
F756	3.70E-07	P238D/T250V/M252Y/N434Y
F757	1.20E-06	P238D/T250W/M252Y/N434Y
F758	1.40E-06	P238D/T250Y/M252Y/N434Y
F759		L235K/S239K
F760		L235R/S239K
F761	1.10E-06	P238D/N434Y
F762	3.60E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F763	3.50E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F764	6.30E-07	P238D/T307Q/Q311A/N434Y
F765	8.50E-08	P238D/M252Y/T307Q/L309E/Q311A/N434Y
F766	6.00E-07	T307A/L309E/Q311A/N434Y

[0478]

F767	4.30E-07	T307Q/L309E/Q311A/N434Y
F768	6.40E-07	T307A/L309E/Q311H/N434Y
F769	4.60E-07	T307Q/L309E/Q311H/N434Y
F770	3.00E-07	M252Y/T256A/N434Y
F771	4.00E-07	M252Y/E272A/N434Y
F772	3.80E-07	M252Y/K274A/N434Y
F773	3.90E-07	M252Y/V282A/N434Y
F774	4.00E-07	M252Y/N286A/N434Y
F775	6.20E-07	M252Y/K338A/N434Y
F776	3.90E-07	M252Y/K340A/N434Y
F777	3.90E-07	M252Y/E345A/N434Y
F779	3.90E-07	M252Y/N361A/N434Y
F780	3.90E-07	M252Y/Q362A/N434Y
F781	3.70E-07	M252Y/S375A/N434Y
F782	3.50E-07	M252Y/Y391A/N434Y
F783	4.00E-07	M252Y/D413A/N434Y
F784	5.00E-07	M252Y/L309A/N434Y
F785	7.40E-07	M252Y/L309H/N434Y
F786	2.80E-08	M252Y/S254T/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F787	8.80E-08	M252Y/S254T/T307Q/L309E/Q311A/N434Y
F788	4.10E-07	M252Y/N315A/N434Y
F789	1.50E-07	M252Y/N315D/N434Y
F790	2.70E-07	M252Y/N315E/N434Y
F791	4.40E-07	M252Y/N315F/N434Y
F792	4.40E-07	M252Y/N315G/N434Y
F793	3.30E-07	M252Y/N315I/N434Y
F794	4.10E-07	M252Y/N315K/N434Y
F795	3.10E-07	M252Y/N315L/N434Y
F796	3.40E-07	M252Y/N315M/N434Y
F798	3.50E-07	M252Y/N315Q/N434Y
F799	4.10E-07	M252Y/N315R/N434Y
F800	3.80E-07	M252Y/N315S/N434Y
F801	4.40E-07	M252Y/N315T/N434Y
F802	3.30E-07	M252Y/N315V/N434Y
F803	3.60E-07	M252Y/N315W/N434Y
F804	4.00E-07	M252Y/N315Y/N434Y
F805	3.00E-07	M252Y/N325A/N434Y
F806	3.10E-07	M252Y/N384A/N434Y
F807	3.20E-07	M252Y/N389A/N434Y
F808	3.20E-07	M252Y/N389A/N390A/N434Y
F809	2.20E-07	M252Y/S254T/T256S/N434Y
F810	2.20E-07	M252Y/A378V/N434Y
F811	4.90E-07	M252Y/E380S/N434Y
F812	2.70E-07	M252Y/E382V/N434Y
F813	2.80E-07	M252Y/S424E/N434Y
F814	1.20E-07	M252Y/N434Y/Y436I
F815	5.50E-07	M252Y/N434Y/T437R
F816	3.60E-07	P238D/T250V/M252Y/T307P/N434Y

[0479]

F817	9.80E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F819	1.40E-07	P238D/M252Y/N286E/N434Y
F820	3.40E-07	L235K/S239K/M252Y/N434Y
F821	3.10E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y
F822	1.10E-06	P238D/T250Y/M252Y/W313Y/N434Y
F823	1.10E-06	P238D/T250Y/M252Y/W313F/N434Y
F828	2.50E-06	P238D/T250V/M252Y/I253V/N434Y
F831	1.60E-06	P238D/T250V/M252Y/R255A/N434Y
F832	2.60E-06	P238D/T250V/M252Y/R255D/N434Y
F833	8.00E-07	P238D/T250V/M252Y/R255E/N434Y
F834	8.10E-07	P238D/T250V/M252Y/R255F/N434Y
F836	5.00E-07	P238D/T250V/M252Y/R255H/N434Y
F837	5.60E-07	P238D/T250V/M252Y/R255I/N434Y
F838	4.30E-07	P238D/T250V/M252Y/R255K/N434Y
F839	3.40E-07	P238D/T250V/M252Y/R255L/N434Y
F840	4.20E-07	P238D/T250V/M252Y/R255M/N434Y
F841	1.10E-06	P238D/T250V/M252Y/R255N/N434Y
F843	6.60E-07	P238D/T250V/M252Y/R255Q/N434Y
F844	1.30E-06	P238D/T250V/M252Y/R255S/N434Y
F847	3.40E-07	P238D/T250V/M252Y/R255W/N434Y
F848	8.30E-07	P238D/T250V/M252Y/R255Y/N434Y
F849	3.30E-07	M252Y/D280A/N434Y
F850	2.90E-07	M252Y/D280E/N434Y
F852	3.30E-07	M252Y/D280G/N434Y
F853	3.20E-07	M252Y/D280H/N434Y
F855	3.20E-07	M252Y/D280K/N434Y
F858	3.20E-07	M252Y/D280N/N434Y
F860	3.30E-07	M252Y/D280Q/N434Y
F861	3.20E-07	M252Y/D280R/N434Y
F862	3.00E-07	M252Y/D280S/N434Y
F863	2.70E-07	M252Y/D280T/N434Y
F867	2.80E-07	M252Y/N384A/N389A/N434Y
F868	2.00E-08	G236A/S239D/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F869		G236A/S239D
F870	7.30E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F871	7.10E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F872	1.30E-07	I235K/S239K/M252Y/N286E/N434Y
F873	1.20E-07	L235R/S239K/M252Y/N286E/N434Y
F875	4.80E-07	M252Y/N434Y/Y436A
F877	8.30E-07	M252Y/N434Y/Y436E
F878	1.90E-07	M252Y/N434Y/Y436F
F879	9.20E-07	M252Y/N434Y/Y436G
F880	3.90E-07	M252Y/N434Y/Y436I
F881	3.10E-07	M252Y/N434Y/Y436K
F882	1.30E-07	M252Y/N434Y/Y436L
F883	2.10E-07	M252Y/N434Y/Y436M
F884	4.00E-07	M252Y/N434Y/Y436N
F888	4.80E-07	M252Y/N434Y/Y436S

[0480]

F889	2.20E-07	M252Y/N434Y/Y436T
F890	1.10E-07	M252Y/N434Y/Y436V
F891	1.70E-07	M252Y/N434Y/Y436W
F892	7.10E-08	M252Y/S254T/N434Y/Y436I
F893	9.80E-08	L235K/S239K/M252Y/N434Y/Y436I
F894	9.20E-08	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436I
F895	2.10E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N315E/N434Y
F896	2.00E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N315E/N434Y
F897	9.70E-08	M252Y/N315D/N384A/N389A/N434Y
F898	1.70E-07	M252Y/N315E/N384A/N389A/N434Y
F899	1.10E-07	M252Y/N315D/G316A/N434Y
F900	1.70E-07	M252Y/N315D/G316D/N434Y
F901	1.30E-07	M252Y/N315D/G316E/N434Y
F902	2.20E-07	M252Y/N315D/G316F/N434Y
F903	2.30E-07	M252Y/N315D/G316H/N434Y
F904	1.00E-07	M252Y/N315D/G316I/N434Y
F905	1.30E-07	M252Y/N315D/G316K/N434Y
F906	1.50E-07	M252Y/N315D/G316L/N434Y
F907	1.30E-07	M252Y/N315D/G316M/N434Y
F908	1.50E-07	M252Y/N315D/G316N/N434Y
F909	1.30E-07	M252Y/N315D/G316P/N434Y
F910	1.40E-07	M252Y/N315D/G316Q/N434Y
F911	1.30E-07	M252Y/N315D/G316R/N434Y
F912	1.20E-07	M252Y/N315D/G316S/N434Y
F913	1.10E-07	M252Y/N315D/G316T/N434Y
F914	1.50E-07	M252Y/N315D/G316V/N434Y
F915	2.30E-07	M252Y/N315D/G316W/N434Y
F917	2.50E-07	M252Y/N286S/N434Y
F918	2.80E-07	M252Y/D280E/N384A/N389A/N434Y
F919	3.30E-07	M252Y/D280G/N384A/N389A/N434Y
F920	2.50E-07	M252Y/N286S/N384A/N389A/N434Y
F921	1.20E-07	M252Y/N286E/N384A/N389A/N434Y
F922	5.90E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/N434Y/Y436I
F923	6.00E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/N434Y/Y436I
F924	3.40E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F925	3.20E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F926	1.10E-07	L235K/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436I
F927	1.00E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436I
F928	2.90E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F929	2.90E-08	M252Y/S254T/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F930	1.40E-07	P238D/T250V/M252Y/N286E/N434Y
F931	1.20E-07	P238D/T250V/M252Y/N434Y/Y436I
F932	3.20E-07	T250V/M252Y/N434Y
F933	3.00E-07	L234R/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F934	3.10E-07	G236K/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F935	3.20E-07	G237K/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F936	3.20E-07	G237R/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F937	3.10E-07	P238D/S239K/T250V/M252Y/N434Y

[0481]

F938	1.60E-07	L235K/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F939	1.50E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F940	1.50E-07	P238D/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F941	1.20E-08	M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F942	4.20E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F943	4.00E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F944	1.70E-07	T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F945	1.70E-08	T250V/M252Y/V308P/N434Y/Y436V
F946	4.30E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F947	1.10E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F954	5.30E-07	M252Y/N434Y/H435K/Y436V
F957	7.70E-07	M252Y/N434Y/H435N/Y436V
F960	8.00E-07	M252Y/N434Y/H435R/Y436V
F966	3.10E-07	M252Y/S254A/N434Y
F970	2.50E-06	M252Y/S254G/N434Y
F971	2.60E-06	M252Y/S254H/N434Y
F972	2.60E-07	M252Y/S254I/N434Y
F978	1.30E-06	M252Y/S254Q/N434Y
F980	1.80E-07	M252Y/S254V/N434Y
F987	4.00E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F988	6.90E-08	P238D/T250V/M252Y/N286E/N434Y/Y436V
F989	1.40E-08	L235R/S239K/M252Y/V308P/N434Y/Y436V
F990	9.40E-09	L235R/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F991	1.30E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F992	5.10E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F993	3.80E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F994	2.80E-07	M252Y/N325G/N434Y
F995	2.90E-07	L235R/P238D/S239K/M252Y/N434Y
F996	1.30E-07	L235R/P238D/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F997	3.80E-07	K248I/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F998	8.50E-07	K248Y/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F999	2.10E-07	T250V/M252Y/E258H/N434Y/Y436V
F1005		N325G
F1008	1.70E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F1009	1.20E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1010	1.90E-07	L235R/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F1011	4.50E-08	T250V/M252Y/V308P/N434Y
F1012	4.70E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/V308P/N434Y
F1013	3.00E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1014	3.20E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1015	2.20E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1016	3.80E-09	T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1017	4.20E-09	L235R/S239K/T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1018	3.20E-09	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1019	3.40E-07	P238D/T250V/M252Y/N325G/N434Y
F1020	8.50E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N325G/N434Y
F1021	3.30E-07	P238D/T250V/M252Y/N325A/N434Y
F1022		K326D/L328Y

[0482]

F1023	4.40E-08	S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1024	4.00E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/K326D/L328Y/N434Y/Y436V
F1025	3.60E-08	S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/K326D/L328Y/N434Y/Y436V
F1026	8.40E-08	M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V
F1027	8.60E-08	L235R/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V
F1028	4.60E-08	G236A/S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1029	5.10E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/I332E/N434Y/Y436V
F1030		I332E
F1031	5.30E-08	G236A/S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/I332E/N434Y/Y436V
F1032	4.30E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N325G/N434Y/Y436V
F1033	1.00E-06	P238D/N434W
F1034	1.50E-08	L235K/S239K/M252Y/V308P/N434Y/Y436V
F1035	1.00E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1036	1.40E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1037	6.10E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F1038	2.80E-07	L235K/P238D/S239K/M252Y/N434Y
F1039	1.30E-07	L235K/P238D/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F1040	2.00E-07	L235K/S239K/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F1041	1.40E-08	L235K/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1042	2.00E-07	L235K/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F1043	5.20E-08	L235K/S239K/T250V/M252Y/V308P/N434Y
F1044	3.50E-08	L235K/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1045	2.50E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1046	4.50E-09	L235K/S239K/T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1047	3.40E-09	L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1048	9.90E-08	L235K/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V
F1050	3.50E-09	L250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F1051	3.90E-09	L235R/S239K/T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F1052	3.20E-09	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F1053	4.23E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1058	1.31E-07	M252Y/Q386E/N434Y/Y436V
F1059	1.39E-07	M252Y/Q386R/N434Y/Y436V
F1060	1.43E-07	M252Y/Q386S/N434Y/Y436V
F1061	1.19E-07	M252Y/P387E/N434Y/Y436V
F1062	1.2E-07	M252Y/P387R/N434Y/Y436V
F1063	1.43E-07	M252Y/P387S/N434Y/Y436V
F1064	1.32E-07	M252Y/V422E/N434Y/Y436V
F1065	1.38E-07	M252Y/V422R/N434Y/Y436V
F1066	1.45E-07	M252Y/V422S/N434Y/Y436V
F1067	1.26E-07	M252Y/S424E/N434Y/Y436V
F1068	1.69E-07	M252Y/S424R/N434Y/Y436V
F1069	1.39E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438E
F1070	1.73E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R
F1071	1.24E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438S
F1072	1.35E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440E
F1073	1.34E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440R
F1074	1.32E-07	S239D/M252Y/N434Y/Y436V
F1075	1.4E-07	M252Y/K326D/L328Y/N434Y/Y436V
F1076	1.27E-07	S239D/M252Y/K326D/L328Y/N434Y/Y436V

[0483]

F1077	2.03E-06	K248N/M252Y/N434Y
F1078	4.7E-07	M252Y/E380N/E382S/N434Y
F1079	3.44E-07	M252Y/E382N/N384S/N434Y
F1080	3.19E-07	M252Y/S424N/N434Y
F1081	6.2E-07	M252Y/N434Y/Y436N/Q438T
F1082	2.76E-07	M252Y/N434Y/Q438N
F1083	3.45E-07	M252Y/N434Y/S440N
F1094	2.6E-07	M252Y/N434Y/S442N
F1095	2.86E-07	M252Y/S383N/G385S/N434Y
F1096	2.72E-07	M252Y/Q386T/N434Y
F1097	2.82E-07	M252Y/G385N/P387S/N434Y
F1098	2.58E-07	S239D/M252Y/N434Y
F1099	2.57E-07	M252Y/K326D/L328Y/N434Y
F1100	2.41E-07	S239D/M252Y/K326D/L328Y/N434Y
F1101	6.59E-08	S239D/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F1102	6.46E-08	M252Y/T307Q/Q311A/K326D/L328Y/N434Y
F1103	6.11E-08	S239D/M252Y/T307Q/Q311A/K326D/L328Y/N434Y
F1104	1.77E-07	M252Y/V422E/S424R/N434Y/Y436V
F1105	1.54E-07	M252Y/V422S/S424R/N434Y/Y436V
F1106	1.42E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1107	1.23E-07	M252Y/V422D/N434Y/Y436V
F1108	1.26E-07	M252Y/V422K/N434Y/Y436V
F1109	1.27E-07	M252Y/V422T/N434Y/Y436V
F1110	1.33E-07	M252Y/V422Q/N434Y/Y436V
F1111	1.65E-07	M252Y/S424K/N434Y/Y436V
F1112	1.23E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438V
F1113	1.18E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440D
F1114	1.31E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440Q
F1115	1.35E-07	M252Y/S424N/N434Y/Y436V
F1116	7.44E-08	M252Y/T307Q/Q311A/S424N/N434Y
F1117	4.87E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/S424N/N434Y/Y436V
F1118	1.32E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/S424N/N434Y/Y436V
F1119	1.03E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/V422E/N434Y/Y436V
F1120	1.04E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/S424R/N434Y/Y436V
F1121	1.04E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/V422E/S424R/N434Y/Y436V
F1122	1.37E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R
F1123	9.55E-09	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/S440E
F1124	1.22E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1125	5.18E-08	M252Y/T307Q/N434Y/Y436V
F1126	8.95E-08	M252Y/T307A/N434Y/Y436V
F1127	7.94E-08	M252Y/Q311A/N434Y/Y436V
F1128	1.17E-07	M252Y/Q311H/N434Y/Y436V
F1129	4.48E-08	M252Y/T307Q/Q311H/N434Y/Y436V
F1130	5.54E-08	M252Y/T307A/Q311A/N434Y/Y436V
F1131	1.29E-07	L235R/S239K/M252Y/V422E/N434Y/Y436V
F1132	1.4E-07	L235R/S239K/M252Y/V422S/N434Y/Y436V
F1133	1.58E-07	L235R/S239K/M252Y/S424R/N434Y/Y436V
F1134	1.66E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R
F1135	1.26E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/S440E

[0484]

F1136	1.63E-07	L235R/S239K/M252Y/V422E/S424R/N434Y/Y436V
F1137	1.58E-07	L235R/S239K/M252Y/V422S/S424R/N434Y/Y436V
F1138	1.65E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1139	1.52E-07	L235R/S239K/M252Y/S424N/N434Y/Y436V
F1140	1.62E-07	M252Y/V422E/S424R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1141	1.77E-07	M252Y/V422S/S424R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1142	1.87E-07	L235R/S239K/M252Y/V422E/S424R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1143	1.98E-07	L235R/S239K/M252Y/V422S/S424R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1144	1.44E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1145	5.23E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1146	6.24E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1147	7.19E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Q438R/S440E
F1148	7.63E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Q438R/S440E
F1151	2.51E-07	L235R/S239K/M252Y/S424N/N434Y
F1152	7.38E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/S424N/N434Y
F1153	4.85E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/S424N/N434Y/Y436V
F1154	1.34E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/S424N/N434Y/Y436V
F1157	2.09E-07	M252Y/N434Y/Q438R/S440E
F1158	2.44E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Q438R/S440E
F1159	4.79E-07	S424N/N434W
F1160	2.88E-07	V308P/S424N/N434Y
F1161	1.07E-06	I332V/S424N/N434Y
F1162	3.43E-07	P238D/T250Y/M252Y/N434Y/Y436V
F1163	1.54E-07	P238D/T250Y/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F1164	6.96E-08	P238D/T250Y/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1165	1.63E-08	P238D/T250Y/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1174	4.9E-07	P257I/N434H
F1176	1.98E-06	V308F
F1178	8.72E-07	V259I/V308F/M428L
F1183	1.28E-06	E380A/M428L/N434S
F1184	1E-06	T307A/M428L/N434S
F1185	9.17E-07	T307A/E380A/M428L/N434S
F1188	1.72E-06	T307A/E380A/N434H
F1189	1.57E-07	M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1190	2.4E-07	M252Y/H433E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1191	2.11E-07	M252Y/N434Y/Y436V/T437A/Q438R/S440E
F1192	1.27E-07	M252Y/N434Y/Y436V/T437G/Q438R/S440E
F1194	1.55E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/K439D/S440E
F1195	1.76E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E/L441A
F1196	1.51E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E/L441E
F1197	9.46E-08	M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1198	7.83E-08	M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1199	6.25E-08	M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1200	1.26E-07	T250V/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1201	1.07E-07	T250V/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1202	8.81E-08	T250V/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1203	1.52E-07	M252Y/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1204	1.18E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1205	1.98E-07	T250V/M252Y/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

[0485]

F1206	1.69E-07	T250V/M252Y/S254T/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1207	1.11E-06	I332E/M428L/N434S
F1208	5.71E-07	L251A/M252Y/N434Y/Y436V
F1211	1.23E-06	L251H/M252Y/N434Y/Y436V
F1213	6.33E-07	L251N/M252Y/N434Y/Y436V
F1216	1.16E-06	L251S/M252Y/N434Y/Y436V
F1217	1.14E-06	L251T/M252Y/N434Y/Y436V
F1218	2.51E-07	L251V/M252Y/N434Y/Y436V
F1229	2.81E-06	M252Y/I253V/N434Y/Y436V
F1230	1.12E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1231	9.73E-08	M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1232	9.79E-08	M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1243	1.25E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1244	1.02E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1245	8.2E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1246	1.73E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1247	1.45E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1248	1.2E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1249	2.06E-07	L235R/S239K/M252Y/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1250	1.66E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1251	2.77E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1252	2.33E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/S254T/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1253	1.12E-07	L235R/S239K/M252Y/T307A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1254	6.42E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1255	1.11E-07	L235R/S239K/M252Y/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1256	1.56E-07	L235R/S239K/M252Y/Q311H/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1257	7.81E-08	L235R/S239K/M252Y/T307A/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1258	1.05E-07	L235R/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1259	4.46E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1260	6.53E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311H/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1261	1.35E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1262	1.26E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1263	1.24E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1264	1.27E-07	L235R/S239K/M252Y/T256A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1265	1.57E-07	L235R/S239K/M252Y/T256G/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1266	9.99E-08	L235R/S239K/M252Y/T256N/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1267	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/S254A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1268	2E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1269	1.69E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1270	1.18E-07	L235R/S239K/M252Y/S254A/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1271	2.05E-07	L235R/S239K/M252Y/S254A/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1272	1.71E-07	L235R/S239K/M252Y/S254A/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1273	1.53E-07	L235R/S239K/M252Y/T256Q/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1274	2.48E-07	L235R/S239K/M252Y/T256Q/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1275	2.09E-07	L235R/S239K/M252Y/T256Q/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1276	1.02E-07	L235R/S239K/M252Y/T256A/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1277	1.69E-07	L235R/S239K/M252Y/T256A/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1278	1.4E-07	L235R/S239K/M252Y/T256A/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1279	1.23E-07	L235R/S239K/M252Y/T256G/N434Y/Y436V/Q438K/S440D

[0486]

F1280	2.09E-07	L235R/S239K/M252Y/T256G/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1281	1.74E-07	L235R/S239K/M252Y/T256G/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1282	7.69E-08	L235R/S239K/M252Y/T256N/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1283	1.34E-07	L235R/S239K/M252Y/T256N/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1284	1.12E-07	L235R/S239K/M252Y/T256N/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1285	9.36E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1286	1.57E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1287	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1288	7.95E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1289	1.33E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1290	1.11E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1291	1.51E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V
F1292	4.24E-07	L235R/S239K/H433D/N434W/Y436V/Q438R/S440E
F1293	1.61E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Q438R/S440E
F1294	2E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1295	9.84E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1296	2.27E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Q438R/S440E
F1297	2.5E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1298	1.47E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1299	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Q438K/S440D
F1300	1.63E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1301	8.3E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436F/Q438K/S440D
F1302	2.15E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Q438K/S440D
F1303	2.1E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1304	1.24E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440D
F1305	2.05E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1306	1.92E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1307	1.44E-07	L235R/S239K/M252Y/V422A/S424A/N434Y/Y436V
F1308	2.06E-07	L235R/S239K/M252Y/V422L/S424L/N434Y/Y436V
F1309	1.26E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438A/S440A
F1310	2.28E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438L/S440L
F1311	1.69E-07	L235R/S239K/M252Y/V422A/S424A/H433D/N434Y/Y436V
F1312	1.79E-07	L235R/S239K/M252Y/V422L/S424L/H433D/N434Y/Y436V
F1313	1.77E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438A/S440A
F1314	2.27E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438L/S440L
F1315	1.52E-07	G237K/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F1316	1.49E-07	G237R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F1317	1.38E-07	S239K/M252Y/P329K/N434Y/Y436V
F1318	1.43E-07	S239K/M252Y/P329R/N434Y/Y436V
F1319	2.67E-07	M252Y/L328Y/N434Y
F1320	1.22E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1321	1.03E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1322	1.6E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1323	1.49E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1324	1.32E-07	L234A/L235A/M252Y/N434Y/Y436V
F1325	2.13E-07	L234A/L235A/M252Y/N297A/N434Y/Y436V
F1326	1.09E-08	L234A/L235A/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1327	1.41E-08	L234A/L235A/T250V/M252Y/N297A/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1328	1.52E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

[0487]

F1329	1.29E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1330	1.03E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1331	7.75E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1333	1.23E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F1334	1.04E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1335	8.78E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1336	7.18E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1337	7.41E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1338	1.04E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1339	2.51E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1340	5.58E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1341	3.22E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1342	2.51E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1343	2.01E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1344	3.96E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1345	1.05E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1346	8.59E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1347	7.14E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1348	5.52E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1349	3.36E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1350	1.18E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1351	1.62E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1352	3.93E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1353	4.33E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1354	2.29E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1355	2.47E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1356	1.58E-07	G236R/M252Y/L328R/N434V/Y436V
F1357	2.81E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1358	9.07E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1359	1.28E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1360	3.12E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1361	3.52E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1362	1.41E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1363	1.9E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1364	7.49E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1365	3.14E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1366	1.17E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1367	1.79E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1368	5.49E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1369	7.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1370	9.14E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1371	1.09E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1372	2.28E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1373	8.67E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1374	1.2E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1375	1.03E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V
F1376	9.09E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V
F1377	8.27E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V
F1378	3.61E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T

[0488]

F1379	2.85E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F
F1410	1.90E-06	V308P/I332V
F1411	1.70E-07	V308P/I332V/M428L/N434S
F1413	3.70E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/T307Q/Q311A/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1414	5.60E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/T307Q/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1415	5.90E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/Q311A/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1416	1.30E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1417	5.90E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434W/Y436V/Q438K/S440E
F1418	7.50E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434W/Y436V/Q438R/S440E
F1419	1.50E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434W/Y436V/Q438R/S440E
F1420	1.30E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434W/Y436V/Q438K/S440E
F1421	3.20E-08	V308P/M428L/N434W
F1422	1.90E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1423	1.60E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V302D/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1424	1.60E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V302E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1425	1.90E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V303D/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1426	1.80E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V303E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1428	1.50E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/S304E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1430	3.10E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V305E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1433	4.50E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/T307D/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1434	3.60E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/T307E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1437	1.2E-07	V308P/M428L/N434F
F1438	2.2E-07	V308P/M428L/N434H
F1439	4.7E-08	V308P/M428Y/N434W
F1440	2.6E-07	V308P/M428L/N434W
F1441	2.5E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/M428L/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1442	2.4E-07	V308P/M428L/N434S
F1443	5.0E-07	T307A/V308P/M428L/N434S
F1444	2.6E-07	T307Q/V308P/M428L/N434S
F1445	2.1E-07	V308P/Q311A/M428L/N434S
F1446	2.1E-07	T307Q/V308P/Q311A/M428L/N434S
F1447	6.7E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1448	4.3E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1449	1.2E-07	L235R/S239K/M252W/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1450	8.6E-08	L235R/S239K/M252W/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1451	4.0E-07	L235R/S239K/D249A/M252Y/S254T/T256B/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1452	6.1E-07	L235R/S239K/D249E/M252Y/S254T/T256B/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1455	7.9E-07	L235R/S239K/D249H/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1460	5.8E-07	L235R/S239K/D249N/M252Y/S254T/T256B/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1464	8.4E-07	L235R/S239K/D249S/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1465	8.2E-07	L235R/S239K/D249T/M252Y/S254T/T256B/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1469	9.2E-08	L235R/S239K/T250A/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1472	5.3E-07	L235R/S239K/T250F/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1475	2.0E-07	L235R/S239K/T250I/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1478	2.0E-07	L235R/S239K/T250M/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1479	1.2E-06	L235R/S239K/T250N/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1481	1.1E-07	L235R/S239K/T250Q/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1483	1.8E-07	L235R/S239K/T250S/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

[0489]

F1484	1.5E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1486	3.1E-07	L235R/S239K/T250Y/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1490	4.6E-07	L235R/S239K/L251F/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1495	5.4E-07	L235R/S239K/L251M/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1504	6.3E-07	L235R/S239K/L251Y/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1520	1.3E-06	L235R/S239K/M252Y/I253V/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1523	1.8E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255A/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1524	1.4E-06	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255D/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1525	4.2E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255E/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1526	1.7E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255F/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1527	1.9E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255G/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1528	1.6E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255H/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1529	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255I/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1530	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255K/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1531	6.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1532	1.1E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255M/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S110E
F1533	3.2E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255N/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1535	2.7E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255Q/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1536	2.2E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255S/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1537	3.0E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1538	7.4E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255V/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1539	5.6E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255W/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1540	1.7E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255Y/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1541	1.2E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256B/E258A/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1542	5.7E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1543	1.2E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258F/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1544	8.2E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258G/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1545	9.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258H/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1546	6.2E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1547	7.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258K/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1548	6.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258L/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1549	7.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258M/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1550	1.2E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256B/E258N/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1552	8.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258Q/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1553	6.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256B/E258R/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1554	1.1E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258S/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1555	9.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256B/E258T/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1556	7.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258V/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1557	8.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258W/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1558	1.3E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256B/E258Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1559	1.4E-07	V308P/Q311A/I332V/M428L/N434S
F1560	2.4E-08	V308P/Q311A/M428L/N434W
F1561	2.5E-08	V308P/Q311A/M428Y/N434W
F1562	2.7E-07	K288D/V308P/I332V/M428L/N434S
F1563	5.0E-08	K288D/V308P/M428L/N434W
F1564	4.8E-08	K288D/V308P/M428Y/N434W
F1565	3.1E-08	V308P/I332V/M428Y/N434W
F1566	3.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1567	4.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

[0490]

F1568	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1569	2.6E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433F/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1570	2.1E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433G/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1571	1.7E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433I/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1572	4.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1573	1.3E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433L/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1574	9.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433M/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1575	8.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433N/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1576	4.3E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1577	6.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1578	4.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1579	5.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1580	9.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1581	1.4E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433V/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1582	1.9E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433W/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1583	2.7E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1586	5.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1587	6.1E-08	L235R/S239K/T250Q/M252Y/S254T/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1588	3.4E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F1589	4.2E-08	L235R/G236R/S239K/T250V/M252Y/V308P/N434Y
F1590	4.7E-08	L235R/G236R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1591	4.3E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1592	5.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1593	5.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258K/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1594	5.7E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258L/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1595	6.3E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258M/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1596	5.7E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258Q/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1597	5.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258R/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1598	6.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258V/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1599	7.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1600	8.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1601	3.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1602	3.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1603	5.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1604	6.0E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1605	6.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1606	3.2E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V302D/V308P/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1607	2.0E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V302D/V308P/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1608	2.9E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V302D/V308P/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1610	4.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1611	5.2E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E

[0491]

F1612	4.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1613	5.2E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1614	5.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1615	6.0E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1616	8.2E-08	L235R/S239K/T250Q/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1617	9.6E-08	L235R/S239K/T250Q/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1618	8.6E-08	L235R/S239K/T250Q/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1619	8.8E-08	L235R/S239K/T250Q/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1620	6.4E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1621	5.8E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1622	6.1E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1623	5.9E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1624	7.3E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1625	6.5E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1626	5.4E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1627	6.5E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1628	6.0E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1629	6.9E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1641	4.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1642	4.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1643	3.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1644	3.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1645	3.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1646	3.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1647	3.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1648	3.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1649	3.7E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1650	4.0E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1651	4.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1652	4.0E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1653	4.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1654	4.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1655	4.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1656	6.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1657	6.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1659	3.0E-06	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E
F1670	1.1E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1671	2.0E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436V
F1672	2.3E-06	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E
F1673	1.8E-06	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D
F1674	2.0E-06	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I
F1675	9.6E-07	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V
F1677	3.7E-06	L235R/S239K/S254T/T256E/N434H
F1680	1.3E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436T

[0492]

F1681	1.3E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1683	1.1E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1684	1.8E-06	L235R/S239K/N434Y
F1686	4.0E-06	L235R/S239K/N434A/Y436V/Q438R/S440E
F1689	1.5E-06	L235R/S239K/N434F/Y436V/Q438R/S440E
F1703	8.5E-07	L235R/S239K/N434W/Y436V/Q438R/S440E
F1705	2.0E-06	L235R/S239K/M428L/N434S
F1706	2.1E-06	L235R/G236R/S239K/M428L/N434S
F1708	2.4E-06	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/Q438R/S440E
F1709	1.7E-06	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/Q438R/S440E
F1710	2.1E-06	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/Q438R/S440E
F1711	1.8E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1712	9.3E-07	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1713	9.6E-07	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1714	1.2E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1715	1.0E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1716	1.0E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1717	9.6E-07	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1718	2.0E-06	N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1719	1.8E-06	N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1720	9.0E-07	N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1721	9.0E-07	N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1722	1.1E-06	H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1723	9.9E-07	H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1724	9.6E-07	H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1725	9.1E-07	H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1734	1.2E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436F/Q438R/S440D
F1735	8.1E-07	L235R/S239K/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1736	8.9E-07	L235R/S239K/N434Y/Y436F/Q438K/S440D
F1737	1.3E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1738	1.2E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440D
F1739	9.7E-07	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1740	1.1E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440D
F1741	1.1E-06	N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1742	1.1E-06	N434Y/Y436F/Q438R/S440D
F1743	8.2E-07	N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1744	9.2E-07	N434Y/Y436F/Q438K/S440D
F1745	1.1E-06	H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1746	1.2E-06	H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440D
F1747	9.6E-07	H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1748	1.0E-06	H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440D
F1749	1.3E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438R/S440D
F1750	1.1E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1751	1.1E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1752	1.4E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1753	1.3E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440D
F1754	1.1E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1755	1.3E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1756	1.2E-06	N434Y/Y436T/Q438R/S440E

[0493]

F1757	1.1E-06	N434Y/Y436T/Q438R/S440D
F1758	1.1E-06	N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1759	1.0E-06	N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1760	1.2E-06	H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1761	1.3E-06	H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440D
F1762	1.1E-06	H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1763	1.1E-06	H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1764	4.8E-06	L235R/S239K/N434Y/Q438R/S440D
F1765	1.7E-06	L235R/S239K/N434Y/Q438R/S440E
F1766	2.4E-06	L235R/S239K/N434Y/Q438K/S440D
F1767	1.5E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Q438R/S440E
F1768	1.5E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Q438R/S440D
F1769	1.9E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Q438K/S440E
F1770	1.4E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Q438K/S440D
F1771	1.9E-06	N434Y/Q438R/S440E
F1772	3.4E-06	N434Y/Q438R/S440D
F1773	1.7E-06	N434Y/Q438K/S440E
F1774	2.7E-06	N434Y/Q438K/S440D
F1775	1.3E-06	H433D/N434Y/Q438R/S440E
F1776	1.5E-06	H433D/N434Y/Q438R/S440D
F1777	1.4E-06	H433D/N434Y/Q438K/S440E
F1778	1.3E-06	H433D/N434Y/Q438K/S440D

[0494]

[0495]

변이의 예로서는 1 이상의 변이, 예를 들면 출발 Fc영역의 아미노산과는 다른 아미노산 잔기로 치환된 변이, 또는 출발 Fc영역의 아미노산에 대해서 1 이상의 아미노산 잔기의 삽입 또는 출발 Fc영역의 아미노산으로부터 1 이상의 아미노산의 결실 등이 포함된다. 바람직하게는, 변경 후 Fc영역의 아미노산 서열에는 천연으로 생기지 않는 Fc영역의 적어도 일부를 포함한 아미노산 서열을 포함한다. 그러한 변종은 필연적으로 출발 Fc영역과 100% 미만의 서열 동일성 또는 유사성을 갖는다. 바람직한 실시형태에 있어서, 변종은 출발 Fc영역의 아미노산 서열

과 약 75%~100% 미만의 아미노산 서열 동일성 또는 유사성, 보다 바람직하게는 약 80%~100% 미만, 보다 바람직 하게는 약 85%~100% 미만, 보다 바람직하게는 약 90%~100% 미만, 가장 바람직하게는 약 95%~100% 미만의 동일성 또는 유사성의 아미노산 서열을 갖는다. 본 발명의 비한정적인 일태양에 있어서, 출발 Fc영역 및 본 발명의 변이된 Fc영역 사이에는 적어도 1개의 아미노산의 차이가 있다. 출발 Fc영역과 변이 Fc영역의 아미노산의 차이는 특히 상술한 EU 넘버링으로 정의되는 아미노산 잔기 위치의 특정된 아미노산의 차이에 따라서도 바람직하게 특정 가능하다.

[0496] Fc영역의 아미노산의 변이를 위해서는 부위 특이적 변이 유발법(Kunkel 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492)이나 Overlap extension PCR 등의 공지의 방법이 적절하게 채용될 수 있다. 또한, 천연 아미노산 이외의 아미노산으로 치환하는 아미노산의 변이방법으로서 복수의 공지의 방법도 채용될 수 있다(Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006) 35, 225-249, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (11), 6353-6357). 예를 들면, 종지 코돈의 1개인 UAG 코돈(앰버 코돈)의 상보적 앰버 서프레서 tRNA에 비천연 아미노산이 결합된 tRNA가 포함되는 무세포 번역계 시스템(Clover Direct(Protein Express)) 등도 바람직하게 사용된다.

[0497] 상기와 같은 아미노산의 변이가 추가된 FcRn 결합 도메인의 변이형을 부호화하는 폴리뉴클레오티드와 상기와 같이 선택된 조건에 따라서 결합 활성이 변화하는 항원 결합 분자 분자를 부호화하는 폴리뉴클레오티드가 프레임에서 연결된 중쇄를 갖는 항원 결합 분자를 부호화하는 폴리뉴클레오티드도 본 발명의 변이형의 일태양으로서 제조된다.

[0498] 본 발명에 따라서, FcRn 결합 도메인을 부호화하는 폴리뉴클레오티드와 프레임에서 연결된 본 발명의 바이러스로부터 분리된 폴리뉴클레오티드가 작용 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 분자를 회수하는 것을 포함한 항원 결합 분자의 제조방법이 제공된다. 또한, 벡터 중에 미리 작용 가능하게 연결된 FcRn 결합 도메인을 부호화하는 폴리뉴클레오티드와 프레임에서 연결된 본 발명의 바이러스로부터 분리된 폴리뉴클레오티드가 작용 가능하게 연결된 벡터가 도입된 세포의 배양액으로부터 항원 결합 분자를 회수하는 것을 포함한 항원 결합 분자의 제조 방법도 제공된다.

의약 조성물

[0500] 본 발명은 특정 이론에 의해 구속되는 것은 아니지만, 예를 들면 pH 산성 영역에서의 항원에 대한 결합 활성이 pH 중성 영역의 조건에서의 항원에 대한 결합 활성보다 낮은 것처럼 이온 농도 조건에 따라서 항원에 대한 결합 활성이 변화하는 항원 결합 도메인 및 부가적으로 pH 중성 영역 조건 하에서 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 항체 정상 영역 등의 FcRn 결합 도메인을 포함한 항원 결합 분자가 생체에 투여될 때에 생체 중의 세포에의 흡수가 촉진됨으로써 1분자의 항원 결합 분자가 결합 가능한 항원의 수가 증가하는 이유, 및 혈장 항원 농도의 소실이 촉진되는 이유는 예를 들면 이하와 같이 설명되는 것이 가능하다.

[0501] 예를 들면, 항원 결합 분자가 막 항원에 결합하는 항체가 생체 내에 투여될 경우, 해당 항체는 항원에 결합한 후 항원에 결합한 채 항원과 함께 인터널리제이션에 의해서 세포 내의 엔도솜에 포함된다. 그 후, 항원에 결합한 채 리소좀으로 이행된 항체는 항원과 함께 리소좀에 의해서 분해된다. 인터널리제이션을 통한 혈장 중으로부터의 소실은 항원 의존적인 손실이라 불리고 있고, 많은 항체 분자로 보고되고 있다(Drug Discov Today (2006) 11(1-2), 81-88). 1분자의 IgG 항체가 2가로 항원에 결합한 경우, 1분자의 항체가 2분자의 항원에 결합한 상태에서 인터널라이즈되어 그대로 리소좀에서 분해된다. 따라서, 통상의 항체의 경우, 1분자의 IgG 항체가 3분자 이상의 항원에 결합하는 것은 불가능하다. 예를 들면, 중화 활성을 갖는 1분자의 IgG 항체의 경우, 3분자 이상의 항원을 중화할 수 없다.

[0502] IgG 분자의 혈장 중 체류성이 비교적 긴(손실이 느린) 것은 IgG 분자의 샐비지 수용체로서 알려져 있는 인간 FcRn이 기능하고 있기 때문이다. 음세포 작용에 의해서 엔도솜에 포함된 IgG 분자는 엔도솜 내의 산성 조건 하에서 엔도솜 내에 표현되는 인간 FcRn에 결합한다. 인간 FcRn에 결합할 수 없었던 IgG 분자는 그 후 이행하는 리소좀 내에서 분해된다. 한편, 인간 FcRn에 결합된 IgG 분자는 세포 표면으로 이행한다. 혈장 중의 중성 조건 하에서 IgG 분자는 인간 FcRn으로부터 분리되기 때문에 해당 IgG 분자는 다시 혈장 중으로 재생된다.

[0503] 또한 항원 결합 분자가 가용형 항원에 결합하는 항체의 경우, 생체 내에 투여된 항체는 항원에 결합하고, 그 후 항체는 항원에 결합한 채 세포 내에 포함된다. 세포 내에 포함된 항체의 대부분은 엔도솜 내에서 FcRn에 결합한 후에 세포 표면으로 이행한다. 혈장 중의 중성 조건 하에서 항체는 인간 FcRn으로부터 분리되기 때문에 세포 외에 방출된다. 그러나, pH 등의 이온 농도의 조건에 의해서 항원에 대한 결합 활성이 변화하지 않는 통상의 항원 결합 도메인을 포함한 항체는 항원과 결합한 채 세포 외에 방출되기 때문에 다시 항원에 결합할 수 없다. 따라

서, 막 항원에 결합하는 항체와 마찬가지로 pH 등의 이온 농도의 조건에 의해서 항원에 대한 결합 활성이 변화하지 않는 통상의 1분자의 IgG 항체는 3분자 이상의 항원에 결합할 수 없다.

[0504] 항원에 대해서 혈장 중의 pH 중성 영역 조건 하에서는 강하게 결합하고, 엔도솜 내의 pH 산성 영역의 조건 하에서 항원으로부터 해리되는 pH 의존적으로 항원에 대해서 결합하는 항체(항원에 대해서 pH 중성 영역의 조건 하에서 결합하고, pH 산성 영역의 조건 하에서 해리되는 항체)나 항원에 대해서 혈장 중의 고칼슘 이온 농도의 조건 하에서는 강하게 결합하고, 엔도솜 내의 저칼슘 이온 농도의 조건 하에서 항원으로부터 해리되는 칼슘 이온 농도 의존적으로 항원에 대해서 결합하는 항체(항원에 대해서 고칼슘 이온 농도의 조건 하에서 결합하고, 저칼슘 이온 농도의 조건 하에서 해리되는 항체)는 엔도솜 내에서 항원으로부터 해리되는 것이 가능하다. pH 의존적으로 항원에 대해서 결합하는 항체나 칼슘 이온 농도 의존적으로 항원에 대해서 결합하는 항체는 항원을 분리한 후에 FcRn에 의해서 혈장 중에 재생되면 다시 항원에 결합하는 것이 가능하다. 그 때문에 1분자의 항체가 복수의 항원 분자에 반복하여 결합하는 것이 가능해진다. 또한, 항원 결합 분자에 결합된 항원은 엔도솜 내에서 항체로부터 분리됨으로써 혈장 중에 재생되지 않고 리소좀 내에서 분해된다. 이러한 항원 결합 분자를 생체에 투여함으로써 항원의 세포 내로의 흡수가 촉진되어 혈장 중의 항원 농도를 저하시키는 것이 가능해진다.

[0505] 항원에 대해서 혈장 중의 pH 중성 영역의 조건 하에서는 강하게 결합하고, 엔도솜 내의 pH 산성 영역의 조건 하에서 항원으로부터 해리되는 pH 의존적으로 항원에 대해서 결합하는 항체(항원에 대해서 pH 중성 영역의 조건 하에서 결합하고, pH 산성 영역의 조건 하에서 해리되는 항체)나 항원에 대해서 혈장 중의 고칼슘 이온 농도의 조건 하에서는 강하게 결합하고, 엔도솜 내의 저칼슘 이온 농도의 조건 하에서 항원으로부터 해리되는 칼슘 이온 농도 의존적으로 항원에 대해서 결합하는 항체(항원에 대해서 고칼슘 이온 농도의 조건 하에서 결합하고, 저칼슘 이온 농도의 조건 하에서 해리되는 항체)에 pH 중성 영역의 조건 하(pH7.4)에서의 인간 FcRn에 대한 결합 능을 부여함으로써 항원 결합 분자가 결합하는 항원의 세포 내로의 흡수가 더 촉진된다. 즉, 이러한 항원 결합 분자의 생체에의 투여에 의해서 항원의 소실이 촉진되어 혈장 중의 항원 농도를 저하시키는 것이 가능해진다. pH 의존적인 항원에 대한 결합능, 또는 칼슘 이온 농도 의존적인 항원에 대한 결합능을 갖지 않는 통상의 항체 및 항체-항원 복합체는 비특이적인 엔도시토시스에 의해서 세포에 포함되고, 엔도솜 내의 산성 조건 하에서 FcRn에 결합함으로써 세포 표면에 수송되어 세포 표면의 중성 조건 하에서 FcRn으로부터 분리됨으로써 혈장 중에 재생된다. 그 때문에, 충분하게 pH 의존적으로 항원에 대해서 결합하는(pH 중성 영역의 조건 하에서 결합하고, pH 산성 영역의 조건 하에서 해리되는), 또는 충분하게 칼슘 이온 농도 의존적으로 항원에 대해서 결합하는(고칼슘 이온 농도의 조건 하에서 결합하고, 저칼슘 이온 농도의 조건 하에서 해리되는) 항체가 혈장 중에서 항원에 결합하고, 엔도솜 내에서 결합하고 있는 항원을 분리할 경우, 항원의 소실 속도는 비특이적인 엔도시토시스에 의한 항체 및 항체-항원 복합체의 세포에의 흡수 속도와 같아진다고 생각된다. 항체와 항원 사이의 결합의 pH 의존성 또는 칼슘 이온 농도 의존성이 불충분한 경우는 엔도솜 내에서 항체로부터 분리되지 않은 항원도 항체와 함께 혈장 중에 재생되어 버리지만, pH 의존성이 충분한 경우는 항원의 소실 속도는 비특이적인 엔도시토시스에 의한 세포에의 흡수 속도가 율속이 된다. 또한, FcRn 항체를 엔도솜 내로부터 세포 표면에 수송하기 위해 FcRn의 일부는 세포 표면에도 존재하는 것으로 생각된다.

[0506] 통상적으로, 항원 결합 분자의 일태양인 IgG형 면역 글로불린은 pH 중성 영역에서의 FcRn에 대한 결합 활성을 거의 갖지 않는다. 본 발명자들은 pH 중성 영역에서 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 IgG형 면역 글로불린은 세포 표면에 존재하는 FcRn에 결합하는 것이 가능하고, 세포 표면에 존재하는 FcRn에 결합함으로써 해당 IgG형 면역 글로불린이 FcRn 의존적으로 세포에 포함된다고 생각했다. FcRn을 통한 세포에의 흡수 속도는 비특이적인 엔도시토시스에 의한 세포에의 흡수 속도보다 빠르다. 그 때문에, pH 중성 영역에서 FcRn에 대한 결합능을 부여함으로써 항원 결합 분자에 의한 항원의 소실 속도를 더 빠르게 하는 것이 가능하다고 생각된다. 즉, pH 중성 영역에서 FcRn에 대한 결합능을 갖는 항원 결합 분자는 통상의(천연형 인간) IgG형 면역 글로불린보다 빠르게 항원을 세포에 보내고, 엔도솜 내에서 항원을 분리하여 다시 세포 표면 내지는 혈장 중에 재생되고, 거기서 다시 항원에 결합하며, 또한 FcRn을 통해서 세포 내에 포함된다. pH 중성 영역에서 FcRn에 대한 결합능을 높게 함으로써 이 사이클의 회전 속도를 빠르게 하는 것이 가능하기 때문에 혈장 중으로부터 항원을 소실시키는 속도가 빨라진다. 또는 항원 결합 분자의 pH 산성 영역에서의 항원에 대한 결합 활성을 pH 중성 영역에서의 항원에 대한 결합 활성보다 저하시킴으로써 더욱 혈장 중으로부터 항원을 소실시키는 속도를 높이는 것이 가능하다. 또한 이 사이클의 회전 속도를 빠르게 한 결과 생기는 그 사이클 수의 증대에 의해서 1분자의 항원 결합 분자가 결합 가능한 항원의 분자수도 많아진다고 생각된다. 본 발명의 항원 결합 분자는 항원 결합 도메인과 FcRn 결합 도메인으로 이루어지고, FcRn 결합 도메인은 항원에 대한 결합에 영향을 주지 않기 때문에, 또한 상술한 메커니즘으로부터 생각해도 항원의 종류에 의존하는 것 없이 항원 결합 분자의 pH 산성 영역 또는 저칼슘 이온 농도의 조건 등의 이온 농도의 조건에서의 항원에 대한 결합 활성(결합능)을 pH 중성 영역 또는 고칼슘 이온 농도 조건 등의

이온 농도의 조건에서의 항원에 대한 결합 활성(결합능)보다 저하, 및/또는 혈장 중에서의 pH에서의 FcRn에의 결합 활성을 증대시킴으로써 항원 결합 분자에 의한 항원의 세포 내로의 흡수를 촉진시켜서 항원의 소실 속도를 빠르게 하는 것이 가능하다고 생각된다. 따라서 본 발명의 항원 결합 분자는 항원이 초래하는 부작용의 저감, 항체의 투여량의 상승, 항체의 생체 내의 동태의 개선이라는 점에서 종래의 치료용 항체보다 뛰어난 효과를 발휘한다고 생각된다.

[0507] 즉, 본 발명은 본 발명의 항원 결합 분자, 본 발명의 검사방법에 의해 단리된 항원 결합 분자, 또는 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 항원 결합 분자를 포함한 의약 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 항원 결합 분자 또는 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 항원 결합 분자는 그 투여에 의해 통상의 항원 결합 분자와 비교해서 혈장 중의 항원 농도를 저하시키는 작용이 높기 때문에 의약 조성물로서 유용하다. 본 발명의 의약 조성물에는 의약적으로 허용되는 담체가 포함될 수 있다.

[0508] 본 발명에 있어서 의약 조성물이란 통상적으로 질환의 치료 또는 예방, 또는 검사, 진단을 위한 약제를 말한다.

[0509] 본 발명의 의약 조성물은 당업자에 공지된 방법을 이용하여 제제화될 수 있다. 예를 들면, 물 또는 그 이외의 약학적으로 허용할 수 있는 액과의 무균성 용액, 또는 혼탁액제의 주사제의 형으로 비경구적으로 사용될 수 있다. 예를 들면, 약리학상 허용되는 담체 또는 매체, 구체적으로는 멸균수나 생리 식염수, 식물유, 유화제, 혼탁제, 계면활성제, 안정제, 향미제, 부형제, 전색제, 방부제, 결합제 등과 적절하게 조합해서 일반적으로 인정된 제약 실시에 요구되는 단위 용량 형태로 혼합함으로써 제제화될 수 있다. 이를 제제에서의 유효 성분량은 지시된 범위의 적당한 용량을 얻을 수 있도록 설정된다.

[0510] 주사를 위한 무균 조성물은 주사용 증류수와 같은 전색제를 사용해서 통상의 제제 실시에 따라서 처방될 수 있다. 주사용의 수용액으로서는, 예를 들면 생리 식염수, 포도당이나 기타 보조약(예를 들면 D-소르비톨, D-만노오스, D-만니톨, 염화나트륨)을 포함한 등장액을 들 수 있다. 적절한 용해 보조제, 예를 들면 알콜(에탄올 등), 폴리알콜(프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 등), 비이온성 계면활성제(폴리소르베이트80(TM), HCO-50 등)가 병용될 수 있다.

[0511] 유성액으로서는 참기름, 콩기름을 들 수 있고, 용해 보조제로서 벤조산벤질 및/또는 벤질알콜도 병용될 수 있다. 또한, 완충제(예를 들면, 인산염 완충액 및 아세트산나트륨 완충액), 무통화제(예를 들면, 염산프로카인), 안정제(예를 들면, 벤질알콜 및 폐놀), 산화 방지제와 배합될 수 있다. 조제된 주사액은 통상적으로 적절한 앰플에 충전된다.

[0512] 본 발명의 의약 조성물은 바람직하게는 비경구 투여에 의해 투여된다. 예를 들면, 주사제형, 경비투여제형, 경폐투여제형, 경피투여형의 조성물이 투여된다. 예를 들면, 정맥 내 주사, 근육 내 주사, 복강 내 주사, 피하 주사 등에 의해 전신 또는 국부적으로 투여될 수 있다.

[0513] 투여방법은 환자의 연령, 증상에 따라 적절하게 선택될 수 있다. 항원 결합 분자를 함유하는 의약 조성물의 투여량은, 예를 들면 1회에 쟁 체중 1 kg당 0.0001 mg~1000 mg의 범위로 설정될 수 있다. 또는, 예를 들면 환자당 0.001~100000 mg의 투여량이 설정될 수 있지만, 본 발명은 이를 수치에 반드시 제한되는 것은 아니다. 투여량 및 투여방법은 환자의 체중, 연령, 증상 등에 따라 변동되지만, 당업자이면 이를 조건을 고려하여 적절한 투여량 및 투여방법을 설정하는 것이 가능하다.

[0514] 또한, 본 발명에 기재되어 있는 아미노산 서열에 포함되는 아미노산은 번역 후에 수식(예를 들면, N말단의 글루타민의 피로글루타밀화에 의한 피로글루타민산에의 수식은 당업자에게 잘 알려진 수식임)을 받는 경우도 있지만, 그러한 아미노산이 번역 후 수식된 경우이어도 당연히 본 발명에 기재되어 있는 아미노산 서열에 포함된다.

[0515] 또한 본 명세서에서 인용된 모든 선행 기술 문현은 참고로서 본 명세서에 추가된다.

[0516] 본 명세서에 있어서 사용할 경우, "...을 포함"이라는 표현에 의해 나타내는 태양은 "본질적으로 ...로 이루어지는"이라는 표현에 의해 나타내는 태양, 및 "...로 이루어지는"이라는 표현에 의해 나타내는 태양을 포함한다.

실시예

[0518] 이하 본 발명을 실시예에 의해 구체적으로 설명하지만, 본 발명은 이를 실시예에 제한되는 것은 아니다.

[0519] [실시예 1] pH 의존적 결합 항체 라이브러리의 디자인

[0520] (1-1) pH 의존적 결합 항체의 취득방법

[0521] WO2009125825는 항원 결합 분자에 히스티딘을 도입함으로써 pH 중성 영역과 pH 산성 영역으로 성질이 변화하는 pH 의존적 항원 결합 항체를 개시하고 있다. 개시된 pH 의존적 결합 항체는 원하는 항원 결합 분자의 아미노산 서열의 일부를 히스티딘으로 치환하는 변이에 의해서 취득된다. 변이하는 대상의 항원 결합 분자를 미리 얻는 것 없이 pH 의존적 결합 항체를 보다 효율적으로 취득하기 위해서 히스티딘을 가변 영역(보다 바람직하게는 항원 결합에 관여할 가능성이 있는 위치)에 도입한 항원 결합 분자의 집단(His 라이브러리로 불림)으로부터 원하는 항원에 결합하는 항원 결합 분자를 취득하는 방법이 생각된다. His 라이브러리로부터 얻어지는 항원 결합 분자는 통상의 항체 라이브러리보다 히스티딘이 높은 빈도로 출현하기 때문에 원하는 성질을 갖는 항원 결합 분자가 효율적으로 취득될 수 있다고 생각된다.

[0522] (1-2) pH 의존적으로 항원에 결합하는 결합 항체가 효율 좋게 취득되도록 히스티딘 잔기가 가변 영역에 도입된 항체 분자의 집단(His 라이브러리)의 디자인

[0523] 우선, His 라이브러리에 히스티딘을 도입하는 위치가 선택된다. WO2009125825에서는 IL-6 수용체 항체, IL-6 항체 및 IL-31 수용체 항체의 서열 중의 아미노산 잔기를 히스티딘으로 치환함으로써 pH 의존적 항원 결합 항체를 제조하는 것이 개시되어 있다. 또한, 항원 결합 분자의 아미노산 서열을 히스티딘에 치환함으로써 pH 의존적 항원 결합능을 갖는 항 난백 라이소자임 항체(FEBS Letter 11483, 309, 1, 85-88) 및 항 햅시딘 항체(WO2009139822)가 제조되고 있다. IL-6 수용체 항체, IL-6 항체, IL-31 수용체 항체, 난백 라이소자임 항체 및 햅시딘 항체 히스티딘을 도입한 위치를 표 3에 나타낸다. 표 3에 나타낸 위치는 항원과 항체의 결합을 제어할 수 있는 위치의 후보로서 들 수 있다. 또한 표 3에 나타낸 위치 이외에도 항원과 접촉할 가능성이 높은 위치도 히스티딘을 도입하는 위치로서 적절하다고 생각된다.

표 3

항체	쇄	위치 (Kabat 넘버링)									
IL-6 수용체 항체	H	27	31	32	35	50	58	62	100B	102	
	L	28	32	53	56	92					
IL-6 항체	H	32	59	61	99						
	L	53	54	90	94						
IL-31 수용체 항체	H	33									
	L										
난백 라이소자임 항체	H	33	98								
	L	54									
헵시딘 항체	H	52	56	95	100c						
	L	28	90								

[0524]

[0525] 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역으로 구성되는 His 라이브러리 중, 중쇄 가변 영역은 인간 항체 서열이 사용되어 경쇄 가변 영역에 히스티딘이 도입된다. His 라이브러리에 히스티딘을 도입하는 위치로서 상기에서 든 위치와 항원 결합에 관여하는 가능성이 있는 위치, 즉 경쇄의 30위치, 32위치, 50위치, 53위치, 91위치, 92위치 및 93위치(Kabat 넘버링, Kabat EA et al. 1991. Sequence of Proteins of Immunological Interest. NIH)가 선택되었다. 또한, 히스티딘을 도입하는 경쇄 가변 영역의 주형 서열로서 Vk1 서열이 선택되었다. 주형 서열에 복수의 아미노산을 출현시켜서 라이브러리를 구성하는 항원 결합 분자의 다양성이 펼쳐졌다. 복수의 아미노산을 출현시키는 위치는 항원과 상호 작용할 가능성이 높은 가변 영역의 표면에 노출되는 위치가 선택되었다. 구체적으로는, 경쇄의 30위치, 31위치, 32위치, 34위치, 50위치, 53위치, 91위치, 92위치, 93위치, 94위치 및 96위치(Kabat 넘버링, Kabat EA et al. 1991. Sequence of Proteins of Immunological Interest. NIH)가 이러한 플렉시블 잔기로서 선택되었다.

[0526] 이어서, 출현되는 아미노산 잔기의 종류와 그 출현율이 설정되었다. Kabat 데이터베이스(KABAT, E.A. ET AL.: 'Sequences of proteins of immunological interest', vol. 91, 1991, NIH PUBLICATION)에 등록되어 있는 hVk1과 hVk3의 서열 중의 플렉시블 잔기에서의 아미노산의 출현 빈도가 분석되었다. 분석 결과를 바탕으로 각 위치에서 출현 빈도가 높은 아미노산으로부터 His 라이브러리에서 출현되는 아미노산의 종류가 선택되었다. 이 때, 아미노산의 성질이 치우치지 않도록 분석 결과에서는 출현 빈도가 적다고 판정된 아미노산도 선택되었다. 또한, 선택된 아미노산의 출현 빈도는 Kabat 데이터베이스 분석 결과를 참고로 해서 설정되었다.

[0527] 상기와 같이 구성된 아미노산 및 출현 빈도를 고려함으로써 His 라이브러리로서 히스티딘이 각 CDR에서 1개 반드시 들어가도록 고정되어 있는 His 라이브러리 1과 His 라이브러리 1보다 서열의 다양성이 증시된 His 라이브

러리 2가 디자인되었다. His 라이브러리 1 및 His 라이브러리 2의 상세한 디자인은 표 4 및 표 5에 나타낸다(각 표 중의 위치는 Kabat 넘버링을 나타낸다). 또한, 표 4 및 표 5에서 기재되는 아미노산의 출현 빈도는 Kabat 넘버링으로 정의되는 92위치가 Asn (N)의 경우는 94위치는 Ser (S)를 제외할 수 있다.

표 4

위치	아미노산									
CDR1										
28	S:100 %									
29	I:100%									
30	N:25% %	S:25 %	R:25 %	H:25 %						
31	S:100 %									
32	H:100 %									
33	L:100 %									
34	A:50%	N:50 %								
CDR2										
50	H:100 %				또는	A:25%	D:25 %	G:25 %	K:25 %	
51	A:100 %					A:100 %				
52	S:100 %					S:100 %				
53	K:33.3 %	N:33. 3%	S:33. 3%			H:100 %				
54	L:100 %					L:100 %				
55	Q:100 %					Q:100 %				
56	S:100 %					S:100 %				
CDR3										
90	Q:100 %				또는	Q:100 %				
91	H:100 %					S:33.3 %	R:33. 3%	Y:33. 3%		
92	G:25%	N:25 %	S:25 %	Y:25 %		H:100 %				
93	H:33.3 %	N:33. 3%	S:33. 3%			H:33.3 %	N:33. 3%	S:33. 3%		
94	S:50%	Y:50 %				S:50%	Y:50 %			
95	P:100 %					P:100 %				
96	L:50%	Y:50 %				L:50%	Y:50 %			

[0528]

표 5

CDR	위치	아미노산				
CDR1	28	S : 100%				
	29	I : 100%				
	30	H : 30%	N : 10%	S : 50%	R : 10%	
	31	N : 35%	S : 65%			
	32	H : 40%	N : 20%	Y : 40%		
	33	L : 100%				
	34	A : 70%	N : 30%			
CDR2	50	A : 25%	D : 15%	G : 25%	H : 30%	K : 5%
	51	A : 100%				
	52	S : 100%				
	53	H : 30%	K : 10%	N : 15%	S : 45%	
	54	L : 100%				
	55	Q : 100%				
	56	S : 100%				
CDR3	90	Q : 100%				
	91	H : 30%	S : 15%	R : 10%	Y : 45%	
	92	G : 20%	H : 30%	N : 20%	S : 15%	Y : 15%
	93	H : 30%	N : 25%	S : 45%		
	94	S : 50%	Y : 50%			
	95	P : 100%				
	96	L : 50%	Y : 50%			

[0529]

[실시예 2] pH 의존적으로 항원에 결합하는 항체를 취득하기 위한 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리(His 라이브러리 1)의 제조

[0531]

인간 PBMC로부터 작성된 폴리A RNA나, 시판되고 있는 인간 폴리A RNA 등을 주형으로서 PCR법에 의해 항체 중쇄 가변 영역의 유전자 라이브러리가 증폭되었다. 실시예 1에 기재된 His 라이브러리 1로서 디자인된 항체 경쇄 가변 영역의 유전자 라이브러리가 PCR법을 사용해서 증폭되었다. 이렇게 제조된 항체 중쇄 가변 영역의 유전자 라이브러리와 항체 경쇄 가변 영역의 유전자 라이브러리의 조합이 파지미드 벡터에 삽입되어 인간 항체 서열로 이루어지는 Fab 도메인을 제시하는 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리가 구축되었다. 구축방법으로서(Methods Mol Biol. (2002) 178, 87-100)가 참고되었다. 상기 라이브러리를 구축할 때에는 파지미드의 Fab와 파지 pIII 단백질을 연결한 연결 부분, 및 헬퍼 파지 pIII 단백질 유전자의 N2 도메인과 CT 도메인 사이에 트립신 절단 서열이 삽입된 파지 디스플레이 라이브러리의 서열이 사용되었다. 항체 유전자 라이브러리가 도입된 대장균으로부터 단리된 항체 유전자 부분의 서열이 확인되어 132클론의 서열 정보가 얻어졌다. 디자인된 아미노산 분포와 확인된 서열 중의 아미노산의 분포를 도 1에 나타내었다. 디자인된 아미노산 분포에 대응하는 다양한 서열을 포함한 라이브러리가 구축되었다.

[0532]

[실시예 3] pH 의존적으로 IL-6R에 결합하는 항체의 취득

[0533]

(3-1) 비즈 패닝에 의한 라이브러리로부터의 pH 의존적으로 항원에 결합하는 항체 분절의 취득

[0534]

구축된 His 라이브러리 1로부터의 최초의 선발은 항원(IL-6R)에의 결합능을 갖는 항체 분절만의 농축에 의해서 실시되었다.

[0535]

구축한 파지 디스플레이용 파지미드를 유지한 대장균으로부터 파지 생산이 행해졌다. 파지 생산이 행해진 대장균의 배양액에 2.5 M NaCl/10% PEG를 첨가함으로써 침전된 파지의 집단을 TBS에서 희석함으로써 파지 라이브러리 액이 얻어졌다. 파지 라이브러리 액에 BSA 및 CaCl₂를 첨가함으로써 최종 농도 4% BSA, 1.2 mM 칼슘 이온이 되도록 조제했다. 패닝방법으로서 일반적인 방법인 자기 비즈에 고정화된 항원을 사용한 패닝방법이 참조되었다 (J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9, J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203, Biotechnol. Prog. (2002) 18(2) 212-20, Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9). 자기 비즈로서 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 또는 Streptavidin coated

beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)가 사용되었다.

[0536] 구체적으로는, 조제된 파지 라이브러리 액에 250 pmol의 비오틴 표식 항원을 추가함으로써 해당 파지 라이브러리 액을 실온에서 60분간 항원과 접촉시켰다. BSA로 차단된 자기 비즈가 더해져 항원과 파지의 복합체를 자기 비즈와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비즈는 1 mL의 1.2 mM CaCl₂/TBST(1.2 mM CaCl₂, 0.1% Tween20을 포함한 TBS)에서 3회 세정한 후, 1 mL의 1.2 mM CaCl₂/TBS(pH7.6)에서 2회 더 세정하였다. 그 후, 1 mg/mL 트립신 0.5 mL가 추가된 비즈는 실온에서 15분 혼탁된 후, 즉시 자기 스텐드를 사용해서 비즈가 분리되어 파지 용액이 회수되었다. 회수된 파지 용액이 대수 증식기(OD600이 0.4-0.7)가 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37°C에서 1시간 느리게 상기 대장균의 교반 배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염된 대장균은 225 mm x 225 mm의 플레이트에 파종되었다. 이어서, 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리 액이 조제되었다.

[0537] 2회째 이후의 패닝에서는 항원 결합능 또는 pH 의존적 결합능을 지표에 파지의 농축이 행해졌다. 구체적으로는, 조제한 파지 라이브러리 액에 40 pmol의 비오틴 표식 항원을 추가함으로써 파지 라이브러리를 실온에서 60 분간 항원과 접촉시켰다. BSA로 차단된 자기 비즈가 추가되어 항원과 파지의 복합체를 자기 비즈와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비즈는 1 mL의 1.2 mM CaCl₂/TBST와 1.2 mM CaCl₂/TBS에서 복수회 세정되었다. 그 후 항원 결합능을 지표로서 농축할 경우는 1 mg/mL 트립신 0.5 mL가 추가된 비즈는 실온에서 15분 혼탁된 후, 즉시 자기 스텐드를 사용해서 비즈가 분리되어 파지 용액이 회수되었다. pH 의존적 항원 결합능을 지표로 농축할 경우는 0.1 mL의 50 mM MES/1.2 mM CaCl₂/150 mM NaCl(pH5.5)이 더해진 비즈는 실온에서 혼탁된 후, 즉시 자기 스텐드를 사용해서 비즈가 분리되어 회수된 파지 용액에 100 mg/mL의 트립신 5 μL를 더함으로써 Fab를 제시하지 않은 파지의 pIII 단백질(헬퍼 파지 유래의 pIII 단백질)이 절단되어 Fab를 제시하지 않은 파지의 대장균에 대한 감염능을 잃게 했다. 회수된 파지가 대수 증식기(OD600이 0.4-0.7)가 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37°C에서 1시간 느리게 상기 대장균의 교반 배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염된 대장균은 225 mm x 225 mm의 플레이트에 파종되었다. 이어서, 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리 액이 회수되었다. 항원 결합능 또는 pH 의존적 결합능을 지표로 하는 패닝이 2회 반복되었다.

(3-2) 파지 ELISA에 의한 평가

[0539] 상기의 방법에 의해서 얻어진 대장균의 단일 콜로니로부터 상법(Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145)에 의해서 파지 함유 배양 상청이 회수되었다.

[0540] 최종 농도 4% BSA 및 칼슘 이온 농도 1.2 mM가 되도록 BSA 및 CaCl₂가 추가된 파지를 함유하는 배양 상청이 이하의 순서로 ELISA에 제공되었다. StreptaWell 96 마이크로터터 플레이트(F. Hoffmann-La Roche Ltd.)가 비오틴 표식 항원을 포함한 100 μL의 PBS에서 하룻밤 코트되었다. 해당 플레이트의 각 웰을 PBST(0.1% Tween20을 포함한 PBS)에서 세정함으로써 항원이 제거된 후, 해당 웰이 4% BSA-TBS 250 μL에서 1시간 이상 차단되었다. 4% BSA-TBS가 제거된 후 각 웰에 조제된 배양 상청이 더해진 해당 플레이트를 37°C에서 1시간 방치함으로써 파지를 제시하는 항체를 각 웰에 존재하는 항원에 결합시켰다. 1.2 mM CaCl₂/TBST에서 세정된 각 웰에 1.2 mM CaCl₂/TBS(pH7.6) 또는 1.2 mM CaCl₂/TBS(pH5.5)가 더해지고, 해당 플레이트는 37°C에서 30분간 정지 배양되었다. 1.2 mM CaCl₂/TBST에서 세정된 후에 4% BSA 및 이온화 칼슘 농도 1.2 mM로 한 TBS에 의해서 회색된 HRP 결합 항 M13항체(Amersham Pharmacia Biotech, Inc.)가 각 웰에 첨가된 플레이트를 1시간 배양시켰다. 1.2 mM CaCl₂/TBST에서 세정 후, TMB single 용액(ZYMED Laboratories, Inc.)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색 반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후, 450 nm의 흡광도에 의해서 해당 발색이 측정되었다.

[0541] 항원 결합능을 지표로 농축한 경우, 패닝을 2회 실시한 것에 대해서 파지 ELISA를 실시한 바, 항원 특이적으로 ELISA 양성으로 된 것은 96클론 중 17클론이기 때문에 패닝을 3회 실시한 것이 해석되었다. 한편, pH 의존적 항원 결합능을 지표로 농축한 경우, 패닝을 2회 실시한 것에 대해서 파지 ELISA를 실시한 바, ELISA 양성으로 된 것은 94클론 중 70클론이었기 때문에 패닝을 2회 실시한 것이 해석되었다.

[0542] 상기의 파지 ELISA를 실시한 클론에 대하여 특이적인 프라이머를 사용하여 증폭된 유전자의 염기 서열이 해석되었다.

[0543] 파지 ELISA 및 서열 해석 결과를 이하의 표 6에 나타내었다.

표 6

라이브러리	His 라이브러리 1	His 라이브러리 1
농축 지표	항원 결합능	pH 의존적 항원 결합능
패닝 횟수	3	2
시험한 클론수	80	94
ELISA 양성	76	70
ELISA 양성 클론 배열 종류	30	67
pH 의존적 결합 클론 배열 종류	22	47

[0544]

[0545] 마찬가지의 방법에 의해, 나이브 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리로부터 pH 의존적 항원 결합능을 가진 항체 취득이 행해졌다. 항원 결합능을 지표로 농축한 경우, 88클론 평가 중 13종류의 pH 의존적 결합 항체가 취득되었다. 또한 pH 의존적 항원 결합능을 지표로 농축한 경우, 83클론 평가 중 27종류의 pH 의존적 결합 항체가 취득되었다.

[0546]

[0546] 이상의 결과로부터, 나이브 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리와 비교하여 His 라이브러리 1의 것이 얻어지는 pH 의존적 항원 결합능을 가진 클론의 변종이 많은 것이 확인되었다.

[0547]

(3-3) 항체의 발현과 정제

[0548]

파지 ELISA 결과, pH 의존적인 항원에 대한 결합능이 있다고 판단된 클론이 동물 세포 발현용 플라스미드에 도입되었다. 항체의 발현은 이하의 방법을 사용하여 행해졌다. 인간 태아 신장 세포 유래 FreeStyle 293-F주 (Invitrogen Corp. Corp.)가 FreeStyle 293 Expression Medium 배지(Invitrogen Corp. Corp.)에 혼탁되어 1.33×10^6 세포/mL의 세포 밀도에서 6웰 플레이트의 각 웰에 3 mL씩 뿐만 아니라 넣었다. 제조된 플라스미드는 리포액션법에 의해서 세포에 도입되었다. CO₂ 배양(37도, 8% CO₂, 90 rpm) 중에서 4일간 배양이 행해졌다. rProtein A SepharoseTM Fast Flow(Amersham Biosciences, Inc.)를 이용하여 당업자 공지의 방법을 사용해서 상기에서 얻어진 배양 상청으로부터 항체가 정제되었다. 분광 광도계를 사용해서 정제된 항체 용액의 280 nm에서의 흡광도가 측정되었다. PACE법에 의해 산출된 흡광 계수를 사용함으로써 얻어진 측정값으로부터 항체 농도가 계산되었다(Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

[0549]

(3-4) 취득된 항체의 인간 IL-6 수용체에 대한 pH 의존적 결합능의 평가

[0550]

(3-3)에서 얻어진 항체 6RpH#01(중쇄 서열 번호: 18, 경쇄 서열 번호: 19), 및 6RpH#02(중쇄 서열 번호: 20), 경쇄 서열 번호: 21), 및 6RpH#03(중쇄 서열 번호: 22), 경쇄 서열 번호: 23)의 인간 IL-6 수용체에 대한 결합 활성이 pH 의존적인지 여부를 판단하기 위해서 이들 항체와 인간 IL-6 수용체와의 상호 작용이 Biacore T100(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)을 사용해서 해석되었다. 인간 IL-6 수용체에 대한 pH의존성의 결합 활성을 갖지 않는 대조 항체로서 토실리주맙(중쇄 서열 번호: 24), 경쇄 서열 번호: 25)이 사용되었다. 중성 영역 pH 및 산성 영역 pH의 조건으로서 각각 pH7.4 및 pH6.0의 용액 중에서 항원 항체 반응의 상호 작용이 해석되었다. 아민 커플링법으로 protein A/G(Invitrogen Corp. Corp.)가 적당량 고정화된 Sensor chip CM5(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) 상에 목적하는 항체가 각각 300RU 정도 캡쳐되었다. 런닝 버퍼는 20 mM ACES, 150 mM NaCl, 0.05%(w/v) Tween20, 1.2 mM CaCl₂(pH7.4) 또는 20 mM ACES, 150 mM NaCl, 0.05%(w/v) Tween20, 1.2 mM CaCl₂(pH6.0)의 2종류의 완충액이 사용되었다. 인간 IL-6 수용체의 회석에도 각각의 버퍼가 사용되었다. 측정은 모두 37°C에서 실시되었다.

[0551]

대조 항체인 토실리주맙 항체, 6RpH#01 항체 및 6RpH#02 항체 및 6RpH#03 항체를 사용한 항원 항체 반응의 상호 작용의 해석에 있어서, IL-6 수용체의 회석액과 블랭크인 런닝 버퍼를 유속 5 μL/min에서 3분간 주입함으로써 센서 칩 상에 캡처시킨 토실리주맙 항체, 6RpH#01 항체 및 6RpH#02 항체 및 6RpH#03 항체에 IL-6 수용체를 상호 작용시켰다. 그 후, 10 mM 글리신-HCl(pH1.5)을 유속 30 μL/min에서 30초간 주입함으로써 센서 칩이 재생되었다.

[0552]

상기의 방법에 의해 측정된 pH7.4에서의 센서그램을 도 2에 나타내고 있다. 또한 마찬가지의 방법으로 취득된 pH6.0의 조건 하에서의 센서그램이 도 3에 나타내고 있다.

- [0553] 상기의 결과로부터, 6RpH#01 항체, 6RpH#02 항체 및 6RpH#03 항체는 버퍼 중의 pH를 pH7.4~pH6.0으로 함으로써 IL6 수용체에 대한 결합능이 대폭으로 감소되는 것이 관찰되었다.
- [0554] [실시예 4] pH 의존적으로 항원에 결합하는 항체를 취득하기 위한 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리(His 라이브러리 2)의 제조
- [0555] 인간 PBMC로부터 작성된 폴리A RNA나 시판되고 있는 인간 폴리A RNA 등을 주형으로서 PCR법에 의해 항체 중쇄 가변 영역의 유전자 라이브러리가 증폭되었다. 실시예 1에 기재된 바와 같이, pH 의존적 항원 결합능을 가진 항체의 출현 빈도를 향상시키기 위해 항체 가변 영역의 경쇄 부분 중 항원 접촉 부위가 될 가능성이 높은 부위의 히스티딘 잔기의 출현 빈도를 높인 항체 가변 영역 경쇄 부분이 디자인된다. 또한, 플렉시블 잔기 중 히스티딘이 도입된 잔기 이외의 아미노산 잔기로서 천연 인간 항체의 아미노산 출현 빈도의 정보로부터 특정되는 출현 빈도가 높은 아미노산이 균등하게 분포된 항체 경쇄 가변 영역의 라이브러리가 디자인된다. 상기와 같이 디자인된 항체 경쇄 가변 영역의 유전자 라이브러리가 합성된다. 라이브러리의 합성은 상업적인 수탁 회사 등에 위탁하여 제조하는 것도 가능하다. 이와 같이 제조된 항체 중쇄 가변 영역의 유전자 라이브러리와 항체 경쇄 가변 영역의 유전자 라이브러리의 조합이 파지미드 벡터에 삽입되어 공지의 방법(Methods Mol Biol. (2002) 178, 87-100)에 준해서 인간 항체 서열로 이루어지는 Fab 도메인을 제시하는 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리가 구축된다. 실시예 2에 기재된 방법에 준해서 항체 유전자 라이브러리가 도입된 대장균으로부터 단리된 항체 유전자 부분의 서열이 확인된다.
- [0556] [실시예 5] pH 의존적으로 IL-6R에 결합하는 항체의 취득
- [0557] (5-1) 비즈 패닝에 의한 라이브러리로부터의 pH 의존적으로 항원에 결합하는 항체 분절의 취득
- [0558] 구축된 His 라이브러리 2로부터의 최초의 선발은 항원(IL-6 수용체)에의 결합능을 가진 항체 분절만의 농축에 의해서 실시된다.
- [0559] 구축한 파지 디스플레이용 파지미드를 유지한 대장균으로부터 파지 생산이 행해진다. 파지 생산이 행해진 대장균의 배양액에 2.5 M NaCl/10% PEG를 첨가함으로써 침전된 파지의 집단을 TBS에서 희석함으로써 파지 라이브러리 액이 얻어진다. 이어서, 파지 라이브러리 액에 차단제로서 BSA 또는 탈지유가 첨가된다. 패닝방법으로서 일반적인 방법인 자기 비즈에 고정화된 항원을 사용한 패닝방법이 참조된다(J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9, J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203, Biotechnol. Prog. (2002) 18(2) 212-20, Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9). 자기 비즈로서 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 또는 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)가 사용된다.
- [0560] 구체적으로는, 조제된 파지 라이브러리 액에 250 pmol의 비오틴 표식 항원을 더함으로써 해당 파지 라이브러리 액을 실온에서 60분간 항원과 접촉시킨다. 차단제로 차단된 자기 비즈가 더해지고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비즈와 실온에서 15분간 결합시킨다. 비즈는 1 mL의 TBST에서 3회 세정된 후, 1 mL의 TBS에서 2회 더 세정된다. 그 후, 1 mg/mL의 트립신 0.5 mL를 더한 비즈는 실온에서 15분 혼탁된 후, 즉시 자기 스탠드를 사용해서 비즈가 분리되어 파지 용액이 회수된다. 회수된 파지 용액이 대수 증식기(OD600이 0.4-0.7)로 된 10 mL의 대장균 주 ER2738에 첨가된다. 37°C에서 1시간 느리게 상기 대장균의 교반 배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시킨다. 감염시킨 대장균은 225 mm x 225 mm의 플레이트에 파종된다. 이어서, 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리 액이 조제된다.
- [0561] 2회째 이후의 패닝에서는 항원 결합능 또는 pH 의존적 결합능을 지표로 파지의 농축이 행해진다. 구체적으로는, 조제한 파지 라이브러리 액에 40 pmol의 비오틴 표식 항원을 더함으로써 파지 라이브러리를 실온에서 60분간 항원과 접촉시킨다. BSA 또는 탈지유로 차단된 자기 비즈가 더해져 항원과 파지의 복합체를 자기 비즈와 실온에서 15분간 결합시킨다. 비즈는 1 mL의 TBST와 TBS에서 세정된다. 그 후, 항원 결합능을 지표로서 농축할 경우는 1 mg/mL 트립신 0.5 mL를 더한 비즈는 실온에서 15분 혼탁된 후, 즉시 자기 스탠드를 사용하여 비즈가 분리되어 파지 용액이 회수된다. pH 의존적 항원 결합능을 지표로 농축할 경우는 0.1 mL의 50 mM MES/1.2 mM CaCl₂/150 mM NaCl(pH5.5)이 더해진 비즈는 실온에서 혼탁된 후, 즉시 자기 스탠드를 사용해서 비즈가 분리되어 파지 용액이 회수된다. 회수된 파지 용액에 100 mg/mL의 트립신 5 μL를 더함으로써 Fab를 제시하지 않은 파지의 pIII 단백질(헬퍼 파지 유래의 pIII 단백질)이 절단되어 Fab를 제시하지 않은 파지의 대장균에 대한 감염능을 잃는다. 회수된 파지가 대수 증식기(OD600이 0.4-0.7)로 된 10 mL의 대장균 주 ER2738에 첨가된다. 37°C에서 1시간 느리게 상기 대장균의 교반 배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시킨다. 감염시킨 대장균은 225 mm x 225 mm의 플레이트에 파종된다. 이어서, 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리 액이 회

수되었다. 항원 결합능 또는 pH 의존적 결합능을 지표로 하는 패닝이 복수회 반복된다.

[0562] (5-2) 과자 ELISA에 의한 평가

[0563] 상기 방법에 의해서 얻어진 대장균의 단일 콜로니로부터 상법(Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145)에 의해서 과자 함유 배양 상청이 회수된다.

[0564] BSA 및 CaCl_2 가 더해진 과자를 함유하는 배양 상청이 이하의 순서로 ELISA에 제공되었다. StreptaWell 96 마이크로터터 플레이트(F. Hoffmann-La Roche Ltd.)가 비오텐 표식 항원을 포함한 100 μL 의 PBS에서 하룻밤 코트된다. 해당 플레이트의 각 웰을 PBST에서 세정함으로써 항원이 제거된 후 해당 웰스가 4% BSA-TBS 250 μL 에서 1시간 이상 차단된다. 4% BSA-TBS가 제거된 각 웰에 제조된 배양 상청이 더해진 해당 플레이트를 37°C에서 1시간 정차함으로써 과자를 제시하는 항체를 각 웰에 존재하는 항원에 결합시킨다. 1.2 mM CaCl_2 /TBS에서 세정된 각 웰에 1.2 mM CaCl_2 /TBS(pH7.6) 또는 1.2 mM CaCl_2 /TBS(pH5.5)가 더해지고, 해당 플레이트는 37°C에서 30분간 정차 배양된다. 1.2 mM CaCl_2 /TBS에서 세정시킨 후에 4% BSA 및 이온화 칼슘 농도 1.2 mM로 한 TBS에 의해서 희석시킨 HRP 결합 항M13 항체(Amersham Pharmacia Biotech, Inc.)를 각 웰에 첨가시킨 플레이트를 1시간 배양시킨다. 1.2 mM CaCl_2 /TBS에서 세정 후, TMB 단일 용액(ZYMED Laboratories, Inc.)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색 반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후 450 nm의 흡광도에 의해서 해당 발색이 측정된다.

[0565] 상기 과자 ELISA의 결과, pH 의존적인 항원에 대한 결합능이 있다고 판단되는 항체 분절을 주형으로서 특이적인 프라이머에 의해서 증폭된 유전자의 염기 서열 해석이 행해진다.

[0566] (5-3) 항체의 발현과 정제

[0567] 과자 ELISA의 결과, pH 의존적인 항원에 대한 결합능이 있다고 판단된 클론이 동물 세포 발현용 플라스미드에 도입된다. 항체의 발현은 이하의 방법을 사용하여 행해진다. 인간 태아 신장 세포 유래 FreeStyle 293-F주(Invitrogen Corp. Corp.)가 FreeStyle 293 Expression Medium배지(Invitrogen Corp. Corp.)에 혼탁되어 1.33×10^6 세포/mL의 세포 밀도에서 6웰 플레이트의 각 웰에 3 mL씩 뿐려 넣었다. 제조된 플라스미드는 리포제션법에 의해서 세포에 도입된다. CO_2 배양(37도, 8% CO_2 , 90 rpm) 중에서 4일간 배양이 행해진다. rProtein A SepharoseTM Fast Flow(Amersham Biosciences, Inc.)를 이용하여 당업자 공지의 방법을 사용해서 상기에서 얻어진 배양 상청으로부터 항체가 정제된다. 분광 광도계를 사용해서 정제된 항체 용액의 280 nm에서의 흡광도가 측정된다. PACE법에 의해 산출된 흡광 계수를 사용함으로써 얻어진 측정값으로부터 항체 농도가 산출된다(Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

[0568] (5-4) 취득된 항체의 인간 IL-6 수용체에 대한 pH 의존적 결합능의 평가

[0569] 실시예 5에서 얻어진 항체의 인간 IL-6 수용체에 대한 결합 활성이 pH 의존적인지 여부를 판단하기 위해서 이들 항체와 인간 IL-6 수용체의 상호 작용 해석이 Biacore T100(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)을 사용해서 행해진다. 인간 IL-6 수용체에 대한 pH 의존성의 결합 활성을 갖지 않는 대조 항체로서 토실리주맵(중쇄 서열 번호: 24, 경쇄 서열 번호: 25)이 사용된다. 중성 영역 pH 및 산성 영역 pH의 조건으로서 각각 pH7.4 및 pH6.0의 용액 중에서 항원 항체 반응의 상호 작용 해석이 행해진다. 아민 커플링법으로 protein A/G(Invitrogen Corp. Corp.)가 적당량 고정화된 Sensor chip CM5(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) 상에 목적하는 항체가 캡쳐된다. 런닝 버퍼는 20 mM ACES, 150 mM NaCl, 0.05%(w/v) Tween20, 1.2 mM CaCl_2 (pH7.4) 또는 20 mM ACES, 150 mM NaCl, 0.05%(w/v) Tween20, 1.2 mM CaCl_2 (pH6.0)의 2종류의 완충액이 사용된다. 인간 IL-6 수용체의 희석에도 각각의 버퍼가 사용된다. 측정은 모두 37°C에서 실시된다.

[0570] 대조 항체인 토실리주맵 항체, 실시예 5에서 얻어진 항체를 사용한 항원 항체 반응의 상호 작용 해석에 있어서, IL-6 수용체의 희석액과 블랭크인 런닝 버퍼를 주입함으로써 센서 칩 상에 캡쳐된 항체에 IL-6 수용체를 상호 작용시킨다. 그 후, 10 mM 글리신-HCl(pH1.5)을 유속 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 에서 30초간 주입함으로써 센서 칩이 재생된다. pH6.0의 조건 하에서 센서그램도 마찬가지의 방법으로 취득한다.

[0571] [실시예 6] 칼슘 이온에 결합하는 인간 생식 세포 계열 서열의 탐색

[0572] (6-1) 칼슘 의존적으로 항원에 결합하는 항체

[0573] 칼슘 의존적으로 항원에 결합하는 항체(칼슘 의존적 항원 결합 항체)는 칼슘의 농도에 따라서 항원과의 상호 작

용이 변화하는 항체이다. 칼슘 의존적 항원 결합 항체는 칼슘 이온을 통해서 항원에 결합하는 것으로 생각되기 때문에 항원측의 에피토프를 형성하는 아미노산은 칼슘 이온을 칠레이트하는 것이 가능한 음전하의 아미노산 또는 수소 결합 수용체가 될 수 있는 아미노산이다(도 4B). 이러한 에피토프를 형성하는 아미노산의 성질로부터도 4A에 나타내는 히스티딘을 도입함으로써 제조되는 pH 의존적으로 항원에 결합하는 결합 분자 이외의 에피토프를 타겟하는 것이 가능해진다. 또한, 도 4C에 나타낸 바와 같이, 칼슘 의존적 및 pH 의존적으로 항원에 결합하는 성질을 겸비한 항원 결합 분자를 이용함으로써 폭넓은 성격을 갖는 다양한 에피토프를 개별적으로 타겟하는 것이 가능한 항원 결합 분자를 제조하는 것이 가능해진다고 생각된다. 그래서, 칼슘이 결합하는 모티프를 포함한 분자의 집합(Ca 라이브러리)을 구축하고, 이 분자의 집단으로부터 항원 결합 분자를 취득하면 칼슘 의존적 항원 결합 항체가 효율적으로 얻어진다고 생각된다.

[0574] (6-2) 인간 생식 세포 계열 서열의 취득

칼슘이 결합하는 모티프를 포함한 분자의 집합의 예로서 해당 분자가 항체인 예가 생각된다. 다시 말하면 칼슘이 결합하는 모티프를 포함한 항체 라이브러리가 Ca 라이브러리인 경우가 생각된다.

[0575] 인간 생식 세포 계열 서열을 포함한 항체로 칼슘 이온이 결합하는 것은 이제까지 보고되어 있지 않다. 그래서, 인간 생식 세포 계열 서열을 포함한 항체가 칼슘 이온과 결합하는지 여부를 판정하기 위해 Human Fetal Spleen Poly RNA(Clontech)로부터 조제된 cDNA를 주형으로서 인간 생식 세포 계열 서열을 포함한 항체의 생식 세포 계열의 서열이 복제되었다. 복제된 DNA 분절은 동물 세포 발현 벡터에 삽입되었다. 얻어진 발현 벡터의 염기 서열이 당업자 공지의 방법으로 결정되고, 아미노산 서열의 서열 번호를 표 7에 나타내고 있다. 서열 번호: 6(Vk1), 서열 번호: 7(Vk2), 서열 번호: 8(Vk3), 서열 번호: 9(Vk4) 및 서열 번호: 1(Vk5)을 부호화하는 폴리뉴클레오티드가 PCR법에 의해서 천연형 Kappa쇄의 정상 영역(서열 번호: 26)을 부호화하는 폴리뉴클레오티드와 연결된 DNA 분절이 동물 세포 발현용 벡터에 포함되었다. 또한, 서열 번호: 27(Vk1), 서열 번호: 28(Vk2), 서열 번호: 29(Vk3) 및 서열 번호: 30(Vk4)을 부호화하는 중쇄 가변 영역 폴리뉴클레오티드가 PCR법에 의해서 서열 번호: 14의 C-말단의 2아미노산이 결실된 IgG1을 부호화하는 폴리뉴클레오티드와 연결된 DNA 분절이 동물 세포 발현용 벡터에 포함되었다. 제조된 변이형의 서열은 당업자 공지의 방법으로 확인되었다. 또한, 인간의 Vk1은 hVk1, 인간의 Vk2는 hVk2, 인간의 Vk3은 hVk3, 인간의 Vk4는 hVk4로 기재하는 경우가 있다.

표 7

경쇄 생식 세포 계열 배열	중쇄(가변 영역) 배열 번호	경쇄 가변 영역 배열 번호
Vk1	2 7	6
Vk2	2 8	7
Vk3	2 9	8
Vk4	3 0	9
Vk5	4	1

[0577]

[0578] (6-3) 항체의 발현과 정제

[0579] 취득된 5종류의 인간 생식 세포 계열 서열을 포함한 DNA 분절이 삽입된 동물 세포 발현 벡터가 동물 세포에 도입되었다. 항체의 발현은 이하의 방법을 사용해서 행해졌다. 인간 태아 신장 세포 유래 FreeStyle 293-F주 (Invitrogen Corp. Corp.)가 FreeStyle 293 Expression Medium 배지(Invitrogen Corp. Corp.)에 혼탁되어 1.33×10^6 세포/mL의 세포 밀도에서 6웰 플레이트의 각 웰에 3 mL씩 파종되었다. 조제된 플라스미드는 리포펙션법에 의해서 세포에 도입된다. CO₂ 배양(37도, 8% CO₂, 90 rpm) 중에서 4일간 배양이 행해졌다. rProtein A SepharoseTM Fast Flow(Amersham Biosciences, Inc.)를 이용하여 당업자 공지의 방법을 사용해서 상기에서 얻어진 배양 상청으로부터 항체가 정제되었다. 분광 광도계를 사용해서 정제된 항체 용액의 280 nm에서의 흡광도가 측정되었다. PACE법에 의해 산출된 흡광 계수를 사용함으로써 얻어진 측정값으로부터 항체 농도가 산출되었다(Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

[0580] (6-4) 인간 생식 세포 계열 서열을 포함한 항체의 칼슘 이온 결합 활성의 평가

[0581] 정제된 항체의 칼슘 이온 결합 활성이 평가되었다. 항체에의 칼슘 이온 결합의 평가 지표로서 시차 주사형 열량 측정(DSC)에 의한 열 변성 중간 온도(T_m)가 측정되었다(MicroCal VP-Capillary DSC, MicroCal). 열 변성 중

간 온도(T_m)는 안정성의 지표이고, 칼슘 이온의 결합에 의해서 단백질이 안정화하면 열 변성 중간 온도(T_m)는 칼슘 이온이 결합하지 않은 경우에 비해서 높아진다(J. Biol. Chem. (2008) 283, 37, 25140-25149). 항체 용액 중의 칼슘 이온 농도의 변화에 따른 항체의 T_m 의 변화를 평가함으로써 항체에의 칼슘 이온의 결합 활성이 평가되었다. 정제된 항체가 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂(pH7.4) 또는 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 3 μM CaCl₂(pH7.4)의 용액을 외액으로 하는 투석(EasySEP, TOMY) 처리로 제공되었다. 투석에 사용된 용액을 사용하여 약 0.1 mg/mL로 조제된 항체 용액을 피험 물질로서 20°C~115°C까지 240°C/hr의 승온 속도로 DSC 측정이 행해졌다. 얻어진 DSC의 변성 곡선에 따라 산출된 각 항체의 Fab 도메인의 열 변성 중간 온도(T_m)를 표 8에 나타내고 있다.

표 8

경쇄 생식 세포 계열 배열	칼슘 이온 농도		ΔT_m (°C) 2 mM-3 μM
	3 μM	2 mM	
hV _k 1	80.32	80.78	0.46
hV _k 2	80.67	80.61	-0.06
hV _k 3	81.64	81.36	-0.28
hV _k 4	70.74	70.74	0
hV _k 5	71.52	74.17	2.65

[0582]

[0583] 그 결과, hV_k1, hV_k2, hV_k3, hV_k4 서열을 포함한 항체의 Fab 도메인의 T_m 은 해당 Fab 도메인을 포함한 용액 중의 칼슘 이온의 농도에 관계없이 변동되지 않았다. 한편, hV_k5 서열을 포함한 항체의 Fab 도메인의 T_m 은 해당 Fab 도메인을 포함한 항체 용액 중의 칼슘 이온의 농도에 따라서 변동된 것이기 때문에 hV_k5 서열이 칼슘 이온과 결합하는 것을 나타내었다.

[0584] (6-5) hV_k5-2 서열의 칼슘 결합 평가

[0585] 실시예 6의 (6-2)에서 V_k5-2(서열 번호: 1에 서열 번호: 26이 융합된 것) 외에 V_k5-2에 분류되는 V_k5-2 변종 1(서열 번호: 2) 및 V_k5-2 변종 2(서열 번호: 3)가 얻어졌다. 이들 변종에 대해서도 칼슘 결합 평가가 행해졌다. V_k5-2, V_k5-2 변종 1 및 V_k5-2 변종 2의 DNA 분절이 각각 동물 세포용 발현 벡터에 포함되었다. 얻어진 발현 벡터의 염기 서열은 당업자 공지의 방법으로 결정되었다. V_k5-2, V_k5-2 변종 1 및 V_k5-2 변종 2의 DNA 분절이 각각 포함된 동물 세포용 발현 벡터는 중쇄로서 CIM_H(서열 번호: 4)가 발현되도록 포함된 동물 발현용의 벡터와 실시예 6의 (6-3)에서 기재한 방법으로 함께 동물 세포 중에 도입되어 항체가 정제되었다. 정제된 항체의 칼슘 이온 결합 활성이 평가되었다. 정제된 항체가 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂(pH7.5) 또는 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl(pH7.5)의 용액(표 9에서는 칼슘 이온 농도 0 mM로 표기)을 외액으로 하는 투석(EasySEP, TOMY) 처리에 제공되었다. 투석에 사용된 용액을 사용하여 약 0.1 mg/mL로 조제된 항체 용액을 피험 물질로서 20°C~115°C까지 240°C/hr의 승온 속도로 DSC 측정이 행해졌다. 얻어진 DSC의 변성 곡선에 따라 산출된 각 항체의 Fab 도메인의 열 변성 중간 온도(T_m)를 표 9에 나타내었다.

표 9

중쇄	칼슘 이온 농도		ΔT_m (°C) 2 mM-0mM
	0 mM	2 mM	
V _k 5-2	71.65	74.38	2.73
V _k 5-2 변종 1	65.75	72.24	6.49
V _k 5-2 변종 2	66.46	72.24	5.78

[0586]

[0587] 그 결과, V_k5-2, V_k5-2 변종 1 및 V_k5-2 변종 2의 서열을 포함한 항체의 Fab 도메인의 T_m 은 해당 Fab 도메인을 포함한 항체 용액 중에 칼슘 이온의 농도에 따라서 변동되기 때문에 V_k5-2로 분류되는 서열을 가진 항체는 칼슘 이온과 결합하는 것을 나타내었다.

[0588] [실시예 7] 인간 V_k5(hV_k5) 서열의 평가

[0589] (7-1) hV_k5 서열

Kabat 데이터베이스 중에는 hV_k5 서열로서 hV_k5-2 서열만이 등록되어 있다. 이하에서는 hV_k5와 hV_k5-2는 같은 것으로 취급된다. WO2010136598에서는 hV_k5-2 서열의 생식 세포 계열 서열 중의 존재비는 0.4%로 기재되어 있다. 다른 보고에서도 hV_k5-2 서열의 생식 세포 계열 서열 중의 존재비는 0~0.06%로 기술되어 있다(J. Mol. Biol. (2000) 296, 57–86, Proc. Natl. Acad. Sci. (2009) 106, 48, 20216–20221). 상기와 같이, hV_k5-2 서열은 생식 세포 계열 서열 중에서 출현 빈도가 낮은 서열이기 때문에 인간 생식 세포 계열 서열로 구성되는 항체 라이브러리나 인간 항체를 발현하는 마우스에의 면역에 의해서 취득된 B세포로부터 칼슘과 결합하는 항체를 취득하는 것은 비효율적이라고 생각되었다. 그래서, 인간 hV_k5-2 서열을 포함한 Ca 라이브러리를 디자인할 가능성이 생각되지만, 보고되어 있는 합성 항체 라이브러리(WO2010105256이나 WO2010136598)에서는 hV_k5 서열은 포함되어 있지 않았다. 또한, hV_k5-2 서열의 물성은 보고되지 않고, 그 실현의 가능성은 미지였다.

[0591] (7-2) 당쇄 비부가형 hV_k5-2 서열의 구축, 발현 및 정제

hV_k5-2 서열은 20위치(Kabat 넘버링)의 아미노산에 N형 당쇄가 부가하는 서열을 갖는다. 단백질에 부가하는 당쇄에는 이질성이 존재하기 때문에 물질의 균일성의 관점으로부터 당쇄는 부가되지 않는 것이 바람직하다. 그래서, 20위치(Kabat 넘버링)의 Asn (N) 잔기가 Thr (T) 잔기로 치환된 변이형 hV_k5-2_L65(서열 번호: 5)가 제조되었다. 아미노산의 치환은 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene Corp.)를 사용하는 당업자 공지의 방법으로 행해졌다. 변이형 hV_k5-2_L65를 부호화하는 DNA가 동물 발현용 벡터에 포함되었다. 제조된 변이형 hV_k5-2_L65의 DNA가 포함된 동물 발현용 벡터는 중쇄로서 CIM_H(서열 번호: 4)가 발현되도록 포함된 동물 발현용 벡터와 실시예 6에서 기재한 방법으로 함께 동물 세포 중에 도입되었다. 도입된 동물 세포 중에서 발현된 hV_k5-2_L65 및 CIM_H를 포함한 항체가 실시예 6에서 기재한 방법으로 정제되었다.

[0593] (7-3) 당쇄 비부가형 hV_k5-2 서열을 포함한 항체의 물성 평가

취득된 변이 서열 hV_k5-2_L65를 포함한 항체가 변이에 제공된 것의 hV_k5-2 서열을 포함한 항체보다 그 이질성이 감소하고 있는지 여부를 이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 분석되었다. 이온 교환 크로마토그래피방법을 표 10에 나타내고 있다. 분석의 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이 당쇄 부가 부위가 변이된 hV_k5-2_L65는 원래 hV_k5-2 서열보다 이질성이 감소하고 있는 것을 나타냈다.

표 10

조건	
칼럼	TOSOH TSKgel DEAE-NPR
이동상	A; 10 mM Tris-HCl, 3 μM CaCl ₂ (pH8.0) B; 10 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 3 μM CaCl ₂ (pH8.0)
그라디언트 스케줄	%B = 0 - (5min) - 0 - 2%/1min
칼럼 온도	40°C
검출	280 nm
주입량	100 μL (5 μg)

[0595]

이어서, 이질성이 감소한 hV_k5-2_L65 서열을 포함한 항체가 칼슘 이온과 결합하는지 여부가 실시예 6에 기재된 방법을 사용해서 평가하였다. 그 결과, 표 11에 나타낸 바와 같이, 당쇄 부가 부위가 변이된 hV_k5-2_L65를 포함한 항체의 Fab 도메인의 T_m값도 항체 용액 중의 칼슘 이온 농도의 변화에 따라 변동되었다. 즉, 당쇄 부가 부위가 변이된 hV_k5-2_L65를 포함한 항체의 Fab 도메인에 칼슘 이온이 결합하는 것을 나타내었다.

표 11

경쇄.	당쇄 부가 배열	칼슘 이온 농도		ΔT_m (°C) 2 mM-3 μM
		3 μM	2 mM	
hV _k 5-2	있음	71.52	74.17	2.65
hV _k 5-2_L65	없음	71.51	73.66	2.15

[0597]

- [0598] [실시예 8] hV_k5-2 서열의 CDR 서열을 포함한 항체 분자에 대한 칼슘 이온의 결합 활성의 평가
- [0599] (8-1) hV_k5-2 서열의 CDR 서열을 포함한 변이 항체의 제조, 발현 및 정제
- [0600] hV_k5-2_L65 서열은 인간 V_k5-2 서열의 프레임워크에 존재하는 당쇄 부가 부위의 아미노산이 변이된 서열이다. 실시예 7에서 당쇄 부가 부위를 변이해도 칼슘 이온이 결합하는 것을 나타내었지만, 프레임워크 서열은 생식 세포 계열의 서열인 것이 면역원성의 관점으로부터 일반적으로는 바람직하다. 그래서, 항체의 프레임워크 서열을 해당 항체에 대한 칼슘 이온의 결합 활성을 유지하면서 당쇄가 부가되지 않은 생식 세포 계열 서열의 프레임워크 서열로 치환되는 것이 가능한지 여부가 검토되었다.
- [0601] 화학 합성된 hV_k5-2 서열의 프레임워크 서열이 hV_k1, hV_k2, hV_k3 및 hV_k4 서열로 변이된 서열(각각 CaV_k1(서열 번호: 31), CaV_k2(서열 번호: 32), CaV_k3(서열 번호: 33), CaV_k4(서열 번호: 34)를 부호화하는 폴리뉴클레오티드가 PCR법에 의해서 천연형 Kappa쇄의 정상 영역(서열 번호: 26)을 부호화하는 폴리뉴클레오티드와 연결된 DNA 분절이 동물 세포 발현용 벡터에 포함되었다. 제조된 변이형의 서열은 당업자 공지의 방법으로 확인되었다. 상기와 같이 제조된 각 플라스미드는 CIM_H(서열 번호: 4)를 부호화하는 폴리뉴클레오티드가 포함된 플라스미드와 함께 실시예 6에서 기재된 방법으로 동물 세포에 도입되었다. 상기와 같이 도입된 동물 세포의 배양액으로부터 발현된 원하는 항체 분자가 정제되었다.
- [0602] (8-2) hV_k5-2 서열의 CDR 서열을 포함한 변이 항체의 칼슘 이온 결합 활성의 평가
- [0603] hV_k5-2 서열 이외의 생식 세포 계열 서열(hV_k1, hV_k2, hV_k3, hV_k4)의 프레임워크 서열 및 hV_k5-2 서열의 CDR 서열을 포함한 변이 항체에 칼슘 이온이 결합하는지 여부가 실시예 6에 기재된 방법에 따라서 평가하였다. 평가된 결과를 표 12에 나타내었다. 각 변이 항체의 Fab 도메인의 T_m값은 항체 용액 중의 칼슘 이온 농도의 변화에 따라서 변동되는 것을 나타내었다. 따라서 hV_k5-2 서열의 프레임워크 서열 이외의 프레임워크 서열을 포함한 항체도 칼슘 이온과 결합되는 것을 나타내었다.

표 12

생식 세포 계열 (경쇄 프레임워크 배열)	칼슘 이온 농도		ΔT_m (°C) 2 mM-3 μM
	3 μM	2 mM	
hV _k 1	77.51	79.79	2.28
hV _k 2	78.46	80.37	1.91
hV _k 3	77.27	79.54	2.27
hV _k 4	80.35	81.38	1.03
hV _k 5-2	71.52	74.17	2.65

[0604]

- [0605] 또한, hV_k5-2 서열 이외의 생식 세포 계열 서열(hV_k1, hV_k2, hV_k3, hV_k4)의 프레임워크 서열 및 hV_k5-2 서열의 CDR 서열을 포함하도록 변이된 각 항체의 Fab 도메인의 열 안정성의 지표인 열 변성 온도(T_m값)는 변이로 제공된 원래 hV_k5-2 서열을 포함한 항체의 Fab 도메인의 T_m값보다 증가되는 것이 밝혀졌다. 이 결과로부터, hV_k1, hV_k2, hV_k3, hV_k4의 프레임워크 서열 및 hV_k5-2 서열의 CDR 서열을 포함한 항체는 칼슘 이온과 결합하는 성질을 갖는 것에 대해서 열 안정성의 관점에서도 뛰어난 분자인 것이 발견되었다.

- [0606] [실시예 9] 인간 생식 세포 계열 hV_k5-2 서열에 존재하는 칼슘 이온 결합 부위의 확인

- [0607] (9-1) hV_k5-2 서열의 CDR 서열 중의 변이 부위의 디자인

- [0608] 실시예 8에 기재되어 있는 바와 같이, hV_k5-2 서열의 CDR 부분이 다른 생식 세포 계열의 프레임워크 서열에 도입된 경쇄를 포함한 항체도 칼슘 이온과 결합하는 것을 나타내었다. 이 결과로부터 hV_k5-2에 존재하는 칼슘 이온 결합 부위는 CDR 중에 존재하는 것이 시사되었다. 칼슘 이온과 결합하는, 즉 칼슘 이온을 킬레이트하는 아미노산으로서 음전하의 아미노산 또는 수소 결합의 수용체가 될 수 있는 아미노산을 들 수 있다. 그래서, hV_k5-2 서열의 CDR 서열 중에 존재하는 Asp (D) 잔기 또는 Glu (E) 잔기가 Ala (A) 잔기로 치환된 변이 hV_k5-2 서열을 포함한 항체가 칼슘 이온과 결합하는지 여부가 평가되었다.

[0609] (9-2) hV_k5-2 서열의 Ala 치환체의 제조 및 항체의 발현 및 정제

[0610] hV_k5-2 서열의 CDR 서열 중에 존재하는 Asp 및/또는 Glu 잔기가 Ala 잔기에 변이된 경쇄를 포함한 항체 분자가 제조되었다. 실시예 7에서 기재된 바와 같이, 당쇄가 부가되지 않는 변이형 hV_k5-2_L65는 칼슘 이온 결합을 유지하고 있기 때문에 칼슘 이온 결합성이라는 관점에서는 hV_k5-2 서열과 동등하다고 생각된다. 본 실시예에서는 hV_k5-2_L65를 주형 서열로서 아미노산 치환이 행해졌다. 제조된 변이형을 표 13에 나타내었다. 아미노산의 치환은 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene Corp.), PCR 또는 In fusion Advantage PCR cloning kit(TAKARA Bio Inc.) 등의 당업자 공지의 방법에 의해서 행해지고, 아미노산이 치환된 변이 경쇄의 발현 벡터가 구축되었다.

표 13

경쇄 개변체명	개변 부위 (Kabat 넘버링)	배열 번호
hV _k 5-2_L65	야생형	5
hV _k 5-2_L66	30	3 5
hV _k 5-2_L67	31	3 6
hV _k 5-2_L68	32	3 7
hV _k 5-2_L69	50	3 8
hV _k 5-2_L70	30, 32	3 9
hV _k 5-2_L71	30, 50	4 0
hV _k 5-2_L72	30, 32, 50	4 1
hV _k 5-2_L73	92	4 2

[0611]

[0612] 얻어진 발현 벡터의 염기 서열은 당업자 공지의 방법으로 결정되었다. 제조된 변이 경쇄의 발현 벡터를 종쇄 CIM_H(서열 번호: 4)의 발현 벡터와 함께 인간 태아 신장암 세포 유래 HEK293H주(Invitrogen Corp. Corp.), 또는 FreeStyle293 세포(Invitrogen Corp. Corp.)에 일과성으로 도입함으로써 항체를 발현시켰다. 얻어진 배양 상청으로부터 rProtein A Sepharose(TM) Fast Flow(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)를 사용해서 당업자 공지의 방법으로 항체가 정제되었다. 정제된 항체 용액의 280 nm에서의 흡광도가 분광 광도계를 사용해서 측정되었다. PACE법에 의해 산출된 흡광 계수를 사용함으로써 얻어진 측정값으로부터 항체 농도가 산출됨(Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

[0613] (9-3) hV_k5-2 서열의 Ala 치환체를 포함한 항체의 칼슘 이온 결합 활성 평가

[0614] 얻어진 정제 항체가 칼슘 이온과 결합하는지 여부가 실시예 6에 기재된 방법에 의해서 판정되었다. 그 결과를 표 14에 나타내었다. hV_k5-2 서열의 CDR 서열 중에 존재하는 Asp 또는 Glu 잔기를 칼슘 이온의 결합 또는 퀄레이트에 관여할 수 없는 Ala 잔기로 치환함으로써 항체 용액의 칼슘 이온 농도의 변화에 따라서 그 Fab 도메인의 T_m값이 변동되지 않는 항체가 존재했다. Ala 치환에 의해서 T_m값이 변동되지 않는 치환 부위(32위치 및 92위치 (Kabat 넘버링))는 칼슘 이온과 항체의 결합에 특히 중요하다는 것을 나타내었다.

표 14

경쇄 개변체명	개변 부위 (Kabat 넘버링)	칼슘 이온 농도		ΔT_m (°C) 2 mM-0 mM
		0 mM	2 mM	
hV _k 5-2_L65	야생형	71.71	73.69	1.98
hV _k 5-2_L66	30	71.65	72.83	1.18
hV _k 5-2_L67	31	71.52	73.30	1.78
hV _k 5-2_L68	32	73.25	74.03	0.78
hV _k 5-2_L69	50	72.00	73.97	1.97
hV _k 5-2_L70	30, 32	73.42	73.60	0.18
hV _k 5-2_L71	30, 50	71.84	72.57	0.73
hV _k 5-2_L72	30, 32, 50	75.04	75.17	0.13
hV _k 5-2_L73	92	75.23	75.04	-0.19

[0615]

- [0616] [실시예 10] 칼슘 이온 결합 모티프를 갖는 hV_k1 서열을 포함한 항체의 평가
- [0617] (10-1) 칼슘 이온 결합 모티프를 갖는 hV_k1 서열의 제조 및 항체의 발현 및 정제
- [0618] 실시예 9에서 기재된 Ala 치환체의 칼슘의 결합 활성의 결과로부터 hV_k5-2 서열의 CDR 서열 중에서 Asp나 Glu 잔기가 칼슘 결합에 중요하다는 것을 나타냈다. 그래서, 30위치, 31위치, 32위치, 50위치 및 92위치(Kabat 넘버링)의 잔기만을 다른 생식 세포 계열의 가변 영역 서열에 도입해도 칼슘 이온과 결합할 수 있는지 여부를 평가했다. 구체적으로는, 인간 생식 세포계 서열인 hV_k1 서열의 30위치, 31위치, 32위치, 50위치 및 92위치(Kabat 넘버링)의 잔기가 hV_k5-2 서열의 30위치, 31위치, 32위치, 50위치 및 92위치(Kabat 넘버링)의 잔기로 치환된 변이형 LfV_k1_Ca(서열 번호: 43)가 제조되었다. 즉, hV_k5-2 서열 중의 이들 5잔기만이 도입된 hV_k1 서열을 포함한 항체가 칼슘과 결합할 수 있는지 여부가 판정되었다. 변이형의 제조는 실시예 9와 마찬가지로 행했다. 얻어진 경쇄 변이형 LfV_k1_Ca 및 경쇄 hV_k1 서열을 포함한 LfV_k1(서열 번호: 44)을 중쇄 CIM_H(서열 번호: 4)와 함께 발현시켰다. 항체의 발현 및 정제는 실시예 9와 마찬가지의 방법으로 실시되었다.

- [0619] (10-2) 칼슘 이온 결합 모티프를 갖는 인간 hV_k1 서열을 포함한 항체의 칼슘 이온 결합 활성 평가

- [0620] 상기와 같이 얻어진 정제 항체가 칼슘 이온과 결합하는지 여부가 실시예 6에 기재된 방법으로 판정되었다. 그 결과를 표 15에 나타낸다. hV_k1 서열을 갖는 LfV_k1을 포함한 항체의 Fab 도메인의 T_m값은 항체 용액 중의 칼슘 농도의 변화에 따라서는 변동되지 않는 반면, LfV_k1_Ca를 포함한 항체 서열의 T_m값은 항체 용액 중의 칼슘 농도의 변화에 따라서 1°C 이상 변화하기 때문에 LfV_k1_Ca를 포함한 항체가 칼슘과 결합하는 것을 나타냈다. 상기의 결과로부터, 칼슘 이온의 결합은 hV_k5-2의 CDR 서열이 모두 필요하지 않아 LfV_k1_Ca 서열을 구축할 때에 도입된 잔기만으로도 충분하다는 것을 나타냈다.

표 15

경쇄 개별체	칼슘 이온 농도		ΔT_m (°C)
	3 μM	2 mM	
LfV _k 1	83.18	83.81	0.63
LfV _k 1_Ca	79.83	82.24	2.41

- [0621]

- [0622] (10-3) 분해 억제형 LfV_k1_Ca 서열의 구축, 발현 및 정제

- [0623] 실시예 10의 (10-1)에서 인간 생식 세포계 서열인 hV_k1 서열의 30위치, 31위치, 32위치, 50위치 및 92위치(Kabat 넘버링)의 잔기가 hV_k5-2 서열의 30위치, 31위치, 32위치, 50위치 및 92위치(Kabat 넘버링)의 잔기로 치환된 변이형 LfV_k1_Ca(서열 번호: 43)가 제조되고, 칼슘 이온이 결합하는 것을 나타냈다. 그래서, LfV_k1_Ca 서열을 포함한 Ca 라이브러리를 디자인할 가능성을 생각하지만, LfV_k1_Ca 서열의 물성은 보고되지 않아 그 실현 가능성은 미지였다. LfV_k1_Ca 서열은 30위치, 31위치 및 32위치(Kabat 넘버링)에 Asp가 존재하고, 산성 조건 하에서 분해되는 것이 보고되고 있는 Asp-Asp 서열이 CDR1 서열 중에 존재한다(J. Pharm. Biomed. Anal. (2008) 47(1), 23-30). 보존 안정성의 관점으로부터, 산성 조건에서의 분해는 피하는 것이 바람직하다. 그래서, 분해될 가능성이 있는 Asp (D) 잔기가 Ala (A) 잔기로 치환된 변이형 LfV_k1_Ca1(서열 번호: 45), LfV_k1_Ca2(서열 번호: 46) 및 LfV_k1_Ca3(서열 번호: 47)이 제조되었다. 아미노산의 치환은 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene Corp.)를 이용하는 당업자 공지의 방법으로 행했다. 변이형을 부호화하는 DNA가 동물 발현용 백터에 포함되었다. 제조된 변이형의 DNA가 포함된 동물 발현용 백터는 중쇄로서 GC_H (서열 번호: 48)가 발현되도록 포함된 동물 발현용의 백터와 실시예 6에서 기재한 방법으로 동시에 동물 세포 중에 도입되었다. 도입된 동물 세포 중에서 발현된 항체가 실시예 6에서 기재한 방법으로 정제되었다.

- [0624] (10-4) 분해 억제형 LfV_k1_Ca 서열을 포함한 항체의 안정성 평가

- [0625] 실시예 10의 (10-3)에서 취득된 항체가 변이에 제공된 원래의 LfV_k1_Ca 서열을 포함한 항체보다 pH6.0 용액 중에서의 분해가 억제되는지 여부가 열 가속 후의 각 항체의 이질성의 비교에 의해서 평가되었다. 각 항체가 20 mM 히스티딘-HCl, 150 mM NaCl, pH6.0의 용액에 하룻밤 4°C의 조건으로 투석되었다. 투석된 항체는 0.5 mg/mL로 조제되고, 5°C 또는 50°C에서 3일간 보존되었다. 보존 후의 각 항체를 실시예 7에 기재된 방법으로 이온 교

환 크로마토그래피가 행해졌다. 분석한 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이 분해 부위가 변이된 LfVkl_Ca1은 원래 LfVkl_Ca 서열보다 이질성이 적고, 열 가속에 의한 분해가 현저하게 억제되는 것을 나타냈다. 즉, LfVkl_Ca 서열 중의 30위치에 존재하는 Asp (D) 잔기가 분해되는 것을 나타내고, 아미노산 변이에 의해서 회피될 수 있다는 것을 나타냈다.

[0626] (10-5) 경쇄 30위치 Asp 잔기 분해 억제형 LVk1_Ca 서열의 제조 및 항체의 발현 및 정제

[0627] 실시예 10의 (10-4)에서 기재된 Ala 치환체의 분해 억제의 결과로부터 LfVkl_Ca 서열의 CDR 서열 중에서 30위치 (Kabat 넘버링)의 Asp (D) 잔기가 산성 조건에서 분해되고, 30위치(Kabat 넘버링)를 다른 아미노산((10-4)에서 는 Ala (A) 잔기로 치환된)으로 치환함으로써 분해가 억제될 수 있다는 것을 나타냈다. 그래서, 30위치(Kabat 넘버링)의 잔기를 칼슘 이온이 칠레이트될 수 있는 잔기의 대표인 Ser (S) 잔기로 치환된 서열(LfVkl_Ca6으로 부른다. 서열 번호: 49)로서도 분해가 억제되는지 여부가 평가되었다. 변이형의 제조는 실시예 10과 동일하게 행해졌다. 얻어진 경쇄 변이형 LfVkl_Ca6 및 경쇄 LfVkl_Ca 서열을 중쇄 GC_H(서열 번호: 48)와 동시에 발현시켰다. 항체의 발현 및 정제는 실시예 10과 동일한 방법으로 실시되었다.

[0628] (10-5) 경쇄 30위치 Asp 잔기 분해 억제형 LVk1_Ca 서열의 평가

[0629] 상기와 같이 얻어진 정제 항체의 산성 조건 하에서 보존 안정성이 실시예 10의 (10-4)에 기재된 방법으로 판정되었다. 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, LfVkl_Ca6 서열을 포함한 항체는 원래 LfVkl_Ca 서열을 포함한 항체보다 분해가 억제되고 있다는 것을 나타냈다.

[0630] 또한, LfVkl_Ca 서열을 포함한 항체 및 LfVkl_Ca6 서열을 포함한 항체가 칼슘 이온과 결합하는지 여부가 실시예 6에 기재된 방법으로 판정되었다. 그 결과를 표 16에 나타낸다. LfVkl_Ca 서열을 포함한 항체 및 분해 억제형인 LfVkl_Ca6 서열을 포함한 항체의 Fab 도메인의 T_m 값은 각각 항체 용액 중의 칼슘 농도의 변화에 따라서 1°C 이상 변화했다.

표 16

경쇄 개변체	칼슘 이온 농도		ΔT_m (°C)
	3 μ M	2 mM	
LfVkl_Ca	78.45	80.06	1.61
LfVkl_Ca6	78.44	79.74	1.30

[0631]

[0632] [실시예 11] Ca 농도 의존적으로 항원에 결합하는 결합 항체가 효율적으로 검색될 수 있도록 칼슘 이온 결합 모티프가 가변 영역에 도입된 항체 분자의 집단(Ca 라이브러리)의 디자인

[0633] 칼슘 결합 모티프로서, 예를 들면 hVkl-2 서열이나 그 CDR 서열, 또한 잔기가 좁혀진 30위치, 31위치, 32위치, 50위치, 92위치(Kabat 넘버링)를 바람직하게 들 수 있다. 그 외에도, 칼슘과 결합하는 단백질을 갖는 EF 핸드 모티프(칼모듈린 등)나 C 타입 렉틴(ASGPR 등)도 칼슘 결합 모티프에 해당한다.

[0634] Ca 라이브러리는 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역으로 구성된다. 중쇄 가변 영역은 인간 항체 서열이 사용되고, 경쇄 가변 영역에 칼슘 결합 모티프가 도입되었다. 칼슘 결합 모티프가 도입되는 경쇄 가변 영역의 주형 서열로서 hVkl 서열이 선택되었다. hVkl 서열에 칼슘 결합 모티프 중 하나인 hVkl-2의 CDR 서열이 도입된 LfVkl_Ca 서열을 포함한 항체는 실시예 10에서 나타낸 바와 같이 칼슘 이온과 결합하는 것을 나타냈다. 주형 서열에 복수의 아미노산을 출현시켜서 라이브러리를 구성하는 항원 결합 분자의 다양성이 확대되었다. 복수의 아미노산을 출현시키는 위치는 항원과 상호 작용할 가능성이 높은 가변 영역의 표면에 노출되는 위치가 선택되었다. 구체적으로는 30위치, 31위치, 32위치, 34위치, 50위치, 53위치, 91위치, 92위치, 93위치, 94위치 및 96위치(Kabat 넘버링)가 이러한 플렉시블 잔기로서 선택되었다.

[0635] 이어서 출현되는 아미노산 잔기의 종류와 그 출현율이 설정되었다. Kabat 데이터베이스(KABAT, E.A. ET AL.: 'Sequences of proteins of immunological interest', vol. 91, 1991, NIH PUBLICATION)에 등록되어 있는 hVkl과 hVkl 서열 중의 플렉시블 잔기에서의 아미노산의 출현 빈도가 해석되었다. 해석 결과를 바탕으로, 각 위치에서 출현 빈도가 높은 아미노산으로부터 Ca 라이브러리에서 출현되는 아미노산의 종류가 선택되었다. 이때, 아미노산의 성질이 치우치지 않도록 분석 결과에서는 출현 빈도가 적다고 판정된 아미노산도 선택되었다. 또한,

선택된 아미노산의 출현 빈도는 Kabat 데이터베이스의 분석 결과를 참고로 해서 설정되었다.

[0636]

이상과 같이 설정된 아미노산 및 출현 빈도를 고려함으로써 Ca 라이브러리로서 칼슘 결합 모티프를 포함하고, 해당 모티프 이외의 각 잔기에서 복수의 아미노산을 포함한 서열의 다양성이 중시된 Ca 라이브러리가 디자인되었다. 표 17 및 표 18에 Ca 라이브러리의 상세한 디자인을 나타냈다(각 표 중의 위치는 Kabat 넘버링을 표시). 또한, 표 17 및 표 18에서 기재되는 아미노산의 출현 빈도는 Kabat 넘버링으로 정의된 92위치가 Asn (N)인 경우, 94위치는 Ser (S)가 아닌 Leu (L)로 할 수 있다.

표 17

CDR	위치	전체의 70%			
CDR1	28	S ; 100%			
	29	I ; 100%			
	30	E ; 72%	H ; 14%	S ; 14%	
	31	D ; 100%			
	32	D ; 100%			
	33	L ; 100%			
	34	A ; 70%	N ; 30%		
CDR2	50	E ; 100%			
	51	A ; 100%			
	52	S ; 100%			
	53	H ; 5%	N ; 25%	S ; 45%	T ; 25%
	54	L ; 100%			
	55	Q ; 100%			
	56	S ; 100%			
CDR3	90	Q ; 100%			
	91	H ; 25%	S ; 15%	R ; 15%	Y ; 45%
	92	D ; 80%	N ; 10%	S ; 10%	
	93	D ; 5%	G ; 10%	N ; 25%	S ; 50%
	94	S ; 50%	Y ; 50%		
	95	P ; 100%			
	96	L ; 50%	Y ; 50%		

[0637]

표 18

CDR	위치	전체의 30%의 아미노산				
CDR1	28	S : 100%				
	29	I : 100%				
	30	E : 83%	S : 17%			
	31	D : 100%				
	32	D : 100%				
	33	L : 100%				
	34	A : 70%	N : 30%			
CDR2	50	H : 100%				
	51	A : 100%				
	52	S : 100%				
	53	H : 5%	N : 25%	S : 45%	T : 25%	
	54	L : 100%				
	55	Q : 100%				
	56	S : 100%				
CDR3	90	Q:100%				
	91	H : 25%	S : 15%	R : 15%	Y : 45%	
	92	D : 80%	N : 10%	S : 10%		
	93	D : 5%	G : 10%	N : 25%	S : 50%	R : 10%
	94	S : 50%	Y : 50%			
	95	P : 100%				
	96	L : 50%	Y : 50%			

[0638]

[0639] [실시예 12] Ca 라이브러리의 제조

인간 PBMC로부터 작성된 폴리A RNA나 시판되고 있는 인간 폴리A RNA 등을 주형으로서 PCR법에 의해 항체 중쇄 가변 영역의 유전자 라이브러리가 증폭되었다. 항체 경쇄 가변 영역 부분에 대해서는 실시예 11에 기재된 바와 같이, 칼슘 결합 모티프를 유지하여 칼슘 농도 의존적으로 항원에 대해서 결합 가능한 항체의 출현 빈도를 높인 항체 가변 영역 경쇄 부분이 디자인되었다. 또한, 플렉시블 잔기 중 칼슘 결합 모티프가 도입된 잔기 이외의 아미노산 잔기로서 천연 인간 항체에서의 아미노산 출현 빈도의 정보(KABAT, E.A. ET AL.: 'Sequences of proteins of immunological interest', vol. 91, 1991, NIH PUBLICATION)가 참고로 되고, 천연 인간 항체의 서열 중에서 출현 빈도가 높은 아미노산을 균등하게 분포시킨 항체 경쇄 가변 영역의 라이브러리가 디자인되었다. 이와 같이 제조된 항체 중쇄 가변 영역의 유전자 라이브러리와 항체 경쇄 가변 영역의 유전자 라이브러리의 조합이 파지미드 벡터에 삽입되고, 인간 항체 서열로 이루어지는 Fab 도메인을 제시하는 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리(Methods Mol Biol. (2002) 178, 87-100)가 구축되었다.

[0641] 실시예 2에 기재된 방법에 준해서 항체 유전자 라이브러리가 도입된 대장균으로부터 단리된 항체 유전자 부분에 대해서 서열이 확인되었다. 얻어진 290종류의 클론 서열의 아미노산 분포와 디자인한 아미노산 분포를 도 8에 나타냈다.

[0642] [실시예 13] Ca 라이브러리에 포함되는 분자의 칼슘 이온 결합 활성의 평가

(13-1) Ca 라이브러리에 포함되는 분자의 칼슘 이온 결합 활성

[0644] 실시예 7에 나타낸 바와 같이, 칼슘 이온과 결합하는 것을 나타낸 hVlk5-2 서열은 생식 세포 계열 서열 중에서 출현 빈도가 낮은 서열이기 때문에 인간 생식 세포 계열 서열로 구성되는 항체 라이브러리나 인간 항체를 발현하는 마우스에의 면역에 의해서 취득된 B세포로부터 칼슘과 결합하는 항체를 취득하는 것은 비효율적이라고 생각되었다. 그래서, 실시예 12에서 Ca 라이브러리가 구축되었다. 구축된 Ca 라이브러리에 칼슘 결합을 나타낸 클론이 존재하는지 평가했다.

(13-2) 항체의 발현과 정제

[0646] Ca 라이브러리에 포함되는 클론이 동물 세포 발현용 플라스미드에 도입된다. 항체의 발현은 이하의 방법을 사용해서 행해졌다. 인간 태아 신장 세포 유래 FreeStyle 293-F주(Invitrogen Corp. Corp.)가 FreeStyle 293 Expression Medium 배지(Invitrogen Corp. Corp.)에 혼탁되고, 1.33×10^6 세포/mL의 세포 밀도에서 6웰 플레이트의 각 웰에 3 mL씩 퍼져나온다. 조제된 플라스미드는 리포펙션법에 의해서 세포에 도입되었다. CO₂ 배양(37도, 8% CO₂, 90 rpm) 중에서 4일간 배양을 행했다. rProtein A SepharoseTM Fast Flow(Amersham Biosciences, Inc.)를 이용하여 당업자 공지의 방법을 사용하여 상기에서 얻어진 배양 상청으로부터 항체가 정제되었다. 분광 광도계를 사용해서 정제된 항체 용액의 280 nm에서의 흡광도를 측정했다. PACE법에 의해 산출된 흡광 계수를 이용함으로써 얻어진 측정값으로부터 항체 농도를 산출했다(Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

(13-3) 취득된 항체에의 칼슘 이온 결합 평가

[0648] 상기와 같이 얻어진 정제 항체가 칼슘 이온과 결합하는지 여부가 실시예 6에 기재된 방법으로 판정되었다. 그 결과를 표 19에 나타낸다. Ca 라이브러리에 포함되는 복수의 항체의 Fab 도메인의 T_m은 칼슘 이온 농도에 따라서 변동하고, 칼슘 이온과 결합하는 분자를 포함하는 것을 나타냈다.

표 19

항체	배열 번호		칼슘 이온 농도		ΔT_m (°C) 2 mM-3 μM
	종쇄	경쇄	3 μM	2 mM	
Ca_B01	50	61	70.88	71.45	0.57
Ca_E01	51	62	84.31	84.95	0.64
Ca_H01	52	63	77.87	79.49	1.62
Ca_D02	53	64	78.94	81.1	2.16
Ca_E02	54	65	81.41	83.18	1.77
Ca_H02	55	66	72.84	75.13	2.29
Ca_D03	56	67	87.39	86.78	-0.61
Ca_C01	57	68	74.74	74.92	0.18
Ca_G01	58	69	65.21	65.87	0.66
Ca_A03	59	70	80.64	81.89	1.25
Ca_B03	60	71	93.02	93.75	0.73

[0649]

[0650] [실시예 14] Ca 의존적으로 IL-6 수용체에 결합하는 항체의 취득

[0651] (14-1) 비즈 패닝에 의한 라이브러리로부터의 Ca 의존적으로 항원에 결합하는 항체 분절의 취득

[0652] 구축된 Ca 라이브러리로부터의 최초 선발은 항원(IL-6 수용체)에의 결합능을 가진 항체 분절만이 농축에 의해서 실시되었다.

[0653] 구축한 파지 디스플레이용 파지미드를 유지한 대장균으로부터 파지 생산이 행해졌다. 파지 생산이 행해진 대장균의 배양액에 2.5 M NaCl/10% PEG를 첨가함으로써 침전된 파지의 집단을 TBS에서 희석함으로써 파지 라이브러리 액이 얻어졌다. 이어서, 파지 라이브러리 액에 BSA, 및 $CaCl_2$ 를 첨가함으로써 최종 농도 4% BSA, 1.2 mM 칼슘 이온이 되도록 조제되었다. 패닝방법으로서 일반적인 방법인 자기 비즈에 고정화한 항원을 사용한 패닝방법이 참조되었다(J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9, J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203, Biotechnol. Prog. (2002) 18(2) 212-20, Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9). 자기 비즈로서 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 또는 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)가 사용되었다.[0654] 구체적으로는, 조제된 파지 라이브러리 액에 250 pmol의 비오틴 표식 항원을 더함으로써 해당 파지 라이브러리 액을 실온에서 60분간 항원과 접촉시켰다. BSA로 차단된 자기 비즈가 더해지고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비즈와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비즈는 1 mL의 1.2 mM $CaCl_2$ /TBST(1.2 mM $CaCl_2$ 를 포함한 TBST)에서 3회 세정시킨 후, 1 mL의 1.2 mM $CaCl_2$ /TBS(1.2 mM $CaCl_2$ 를 포함한 TBS)에서 2회 세정시켰다. 그 후, 1 mg/mL의 트립신 0.5 mL가 더해진 비즈는 실온에서 15분 혼탁시킨 후, 즉시 자기 스텐드를 사용해서 비즈가 분리되어 파지 용액이 회수되었다. 회수된 파지 용액이 대수 증식기(OD600이 0.4-0.7)로 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37°C에서 1시간 느리게 상기 대장균의 교반 배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염된 대장균은 225 mm x 225 mm 플레이트에 파종되었다. 이어서, 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리 액이 조제되었다.

[0655] 2회째의 패닝에서는 항원 결합능 또는 Ca 의존적 결합능을 지표로 파지의 농축이 행해졌다.

[0656] 구체적으로는, 항원 결합능을 지표로 농축을 행했을 때에는 조제한 파지 라이브러리 액에 40 pmol의 비오틴 표식 항원을 더함으로써 파지 라이브러리를 실온에서 60분간 항원과 접촉시켰다. BSA로 차단된 자기 비즈가 더해지고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비즈와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비즈는 1 mL의 1.2 mM $CaCl_2$ /TBST에서 3회, 1.2 mM $CaCl_2$ /TBS에서 2회 세정시켰다. 그 후, 1 mg/mL의 트립신 0.5 mL를 더한 비즈는 실온에서 15분 혼탁시킨 후, 즉시 자기 스텐드를 사용해서 비즈가 분리되어 파지 용액이 회수되었다. 회수된 파지 용액에 100 mg/mL의 트립신 5 μL를 더함으로써 Fab를 제시하지 않은 파지의 pIII 단백질(헬퍼 파지 유래의 pIII 단백질)이 절단되고, Fab을 제시하지 않은 파지의 대장균에 대한 감염능을 잃게 했다. 회수된 파지 용액이 대수 증식기(OD600이 0.4-0.7)로 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37°C에서 1시간 느리게 상기 대장균의 교반 배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염시킨 대장균은 225 mm x 225 mm의 플레이트에 파종되었다. 이어서, 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리 액이 회수되었다.

[0657] Ca 의존적 결합능을 지표로 농축을 행했을 때에는 조제한 파지 라이브러리 액에 40 pmol의 비오틴 표식 항원을 더함으로써 파지 라이브러리를 실온에서 60분간 항원과 접촉시켰다. BSA로 차단된 자기 비즈가 더해지고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비즈와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비즈는 1 mL의 1.2 mM CaCl₂/TBST와 1.2 mM CaCl₂/TBS에서 세정시켰다. 그 후, 0.1 mL의 2 mM EDTA/TBS(2 mM의 EDTA를 포함한 TBS)가 더해진 비즈는 실온에서 혼탁된 후, 즉시 자기 스텐드를 사용해서 비즈가 분리되어 파지 용액이 회수되었다. 회수된 파지 용액에 100 mg/mL의 트립신 5 μL를 더함으로써 Fab를 제시하지 않은 파지의 pIII 단백질(헬퍼 파지 유래의 pIII 단백질)이 절단되어 Fab를 제시하지 않은 파지의 대장균에 대한 감염능을 잊게 했다. 회수된 파지 용액이 대수 증식기 (OD600이 0.4~0.7)로 된 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37°C에서 1시간 느리게 상기 대장균의 교반 배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염된 대장균은 225 mm x 225 mm의 플레이트에 파종되었다. 이어서, 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리 액이 회수되었다.

[0658] (14-2) 파지 ELISA의 평가

[0659] 상기의 방법에 의해서 얻어진 대장균의 단일 콜로니로부터 상법(Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145)에 의해서 파지 함유 배양 상청이 회수되었다.

[0660] BSA 및 CaCl₂가 더해진 파지를 함유하는 배양 상청이 이하의 순서로 ELISA에 제공되었다. StreptaWell 96 마이크로터터 플레이트(F. Hoffmann-La Roche Ltd.)가 비오틴 표식 항원을 포함한 100 μL의 PBS에서 하룻밤 코트되었다. 해당 플레이트의 각 웰을 PBST에서 세정함으로써 항원이 제거된 후, 해당 웰스가 4% BSA-TBS 250 μL에서 1시간 이상 차단되었다. 4% BSA-TBS가 제거된 각 웰에 조제된 배양 상청이 더해진 해당 플레이트를 37°C에서 1시간 정지함으로써 파지를 제시하는 항체를 각 웰에 존재하는 항원에 결합시켰다. 1.2 mM CaCl₂/TBST에서 세정된 각 웰에 1.2 mM CaCl₂/TBS 또는 1 mM EDTA/TBS가 더해지고, 해당 플레이트는 37°C에서 30분간 정지 배양되었다. 1.2 mM CaCl₂/TBST에서 세정시킨 후에 이온화 칼슘 농도 1.2 mM로 한 TBS에 의해서 희석된 HRP 결합 항 M13 항체(Amersham Pharmacia Biotech, Inc.)를 각 웰에 첨가시킨 플레이트를 1시간 배양시켰다. 1.2 mM CaCl₂/TBST에서 세정 후, TMB 단일 용액(ZYMED Laboratories, Inc.)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색 반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후, 450 nm의 흡광도에 의해서 해당 발색이 측정되었다.

[0661] 상기 파지 ELISA를 실시한 클론에 대하여 특이적인 프라이머를 사용해서 증폭된 유전자의 염기 서열 해석이 행해졌다. 파지 ELISA, 서열 해석의 결과를 이하의 표 20에 나타냈다.

표 20

라이브러리	Ca 라이브러리	Ca 라이브러리
농축 지표	항원 결합능	의존적 항원 결합능
패닝 횟수	2	2
시험한 클론수	85	86
ELISA 양성	77	75
ELISA 양성 클론 배열 종류	74	72
Ca 의존적 결합 클론 배열 종류	13	47

[0662]

(14-3) 항체의 발현과 정제

[0663] 파지 ELISA의 결과, Ca 의존적인 항원에 대한 결합능이 있다고 판단된 클론이 동물 세포 발현용 플라스미드에 도입되었다. 항체의 발현은 이하의 방법을 사용해서 행했다. 인간 태아 신장 세포 유래 FreeStyle 293-F주 (Invitrogen Corp. Corp.)가 FreeStyle 293 Expression Medium 배지(Invitrogen Corp. Corp.)에 혼탁되어 1.33 x 10⁶ 세포/mL의 세포 밀도에서 6웰 플레이트의 각 웰에 3 mL씩 파종되었다. 조제된 플라스미드는 리포팩션법에 의해서 세포에 도입되었다. CO₂ 배양(37도, 8% CO₂, 90 rpm) 중에서 4일간 배양을 행했다. rProtein A SepharoseTM Fast Flow(Amersham Biosciences, Inc.)를 이용하여 당업자 공지의 방법을 사용해서 상기에서 얻어진 배양 상청으로부터 항체가 정제되었다. 분광 광도계를 사용해서 정제된 항체 용액의 280 nm에서의 흡광도가 측정되었다. PACE법에 의해 산출된 흡광 계수를 사용함으로써 얻어진 측정값으로부터 항체 농도가 산출되었

다(Protein Science (1995)4, 2411-2423).

[0665] (14-4) 취득된 항체의 인간 IL-6 수용체에 대한 Ca 의존적 결합능의 평가

[0666] 실시예 14에서 취득된 항체 6RC1IgG_010(중쇄 서열 번호: 72, 경쇄 서열 번호: 73), 및 6RC1IgG_012(중쇄 서열 번호: 74, 경쇄 서열 번호: 75), 및 6RC1IgG_019(중쇄 서열 번호: 76, 경쇄 서열 번호: 77)의 인간 IL-6 수용체에 대한 결합 활성이 Ca 의존적인지 여부를 판단하기 위해서 이들 항체와 인간 IL-6 수용체의 상호 작용 해석이 Biacore T100(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)을 사용해서 행해졌다. 인간 IL-6 수용체에 대한 Ca 의존성의 결합 활성을 갖지 않는 대조 항체으로서 토실리주맵(중쇄 서열 번호: 24, 경쇄 서열 번호: 25)이 사용되었다. 고칼슘 이온 농도 및 저칼슘 이온 농도의 조건으로서 각각 1.2 mM 및 3 μM의 칼슘 이온 농도의 용액 중으로 상호 작용 해석이 행해졌다. 아민 커플링법으로 protein A/G(Invitrogen Corp. Corp.)가 적당량 고정화된 Sensor chip CM5(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) 상에 목적하는 항체가 캡쳐되었다. 런닝 버퍼에는 20 mM ACES, 150 mM NaCl, 0.05%(w/v) Tween20, 1.2 mM CaCl₂(pH7.4) 또는 20 mM ACES, 150 mM NaCl, 0.05%(w/v) Tween20, 3 μM CaCl₂(pH7.4)의 2종류의 완충액이 사용되었다. 인간 IL-6 수용체의 회석에도 각각의 버퍼가 사용되었다. 측정은 모두 37°C에서 실시되었다.

[0667] 대조 항체인 토실리주맵 항체, 6RC1IgG_010 항체 및 6RC1IgG_012 항체 및 6RC1IgG_019 항체를 사용한 항원 항체 반응의 상호 작용 해석에 있어서, IL-6 수용체의 회석액과 블랭크인 런닝 버퍼를 유속 5 μL/min에서 3분간 주입함으로써 센서 칩 상에 캡처시킨 토실리주맵 항체, 6RC1IgG_010 항체 및 6RC1IgG_012 항체 및 6RC1IgG_019 항체에 IL-6 수용체를 상호 작용시켰다. 그 후, 10 mM 글리신-HCl(pH1.5)을 유속 30 μL/min에서 30초간 주입함으로써 센서 칩이 재생되었다.

[0668] 이 방법에 의해 측정된 고칼슘 이온 농도에서의 센서그램을 도 9에 나타내었다.

[0669] 저칼슘 이온 농도의 조건 하에서 토실리주맵 항체, 6RC1IgG_010 항체 및 6RC1IgG_012 항체 및 6RC1IgG_019 항체에 대해서의 센서그램도 마찬가지의 방법으로 취득했다. 저칼슘 이온 농도에서의 센서그램을 도 10에 나타냈다.

[0670] 상기의 결과로부터, 6RC1IgG_010 항체 및 6RC1IgG_012 항체 및 6RC1IgG_019 항체는 버퍼 중의 칼슘 이온 농도를 1.2 mM~3 μM로 함으로써 IL6 수용체에 대한 결합능이 대폭으로 감소하는 것이 관찰되었다.

[0671] [실시예 15] 파지 디스플레이 기술을 이용한 인간 항체 라이브러리에서의 Ca 의존적으로 IL-6 수용체에 결합하는 항체의 취득

[0672] (15-1) 나이브 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리의 제조

[0673] 인간 PBMC로부터 작성된 폴리A RNA나 시판되고 있는 인간 폴리A RNA 등을 주형으로서 당업자에게 공지방법에 따라 서로 다른 인간 항체 서열의 Fab 도메인을 제시하는 복수의 파지로 이루어지는 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리가 구축되었다.

[0674] (15-2) 비즈 패닝에 의한 라이브러리에서의 Ca 의존적으로 항원에 결합하는 항체 분절의 취득

[0675] 구축된 나이브 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리에서의 최초의 선발은 항원(IL-6 수용체)에 대한 결합능을 갖는 항체 분절만을 농축, 또는 Ca 농도 의존적인 항원(IL-6 수용체)에의 결합능을 지표로 한 항체 분절의 농축에 대해서 실시되었다. Ca 농도 의존적인 항원(IL-6 수용체)에의 결합능을 지표로서 항체 분절의 농축은 Ca 이온을 키레이트하는 EDTA를 사용해서 Ca 이온 존재 하에서 IL-6 수용체와 결합시킨 파지 라이브러리로부터 파지를 용출시킴으로써 실시되었다. 항원으로서 비오틴 표식된 IL-6 수용체가 사용되었다.

[0676] 구축한 파지 디스플레이용 파지미드를 유지한 대장균으로부터 파지 생산이 행해졌다. 파지 생산이 행해진 대장균의 배양액에 2.5 M NaCl/10% PEG를 첨가함으로써 침전된 파지의 집단을 TBS에서 회석함으로써 파지 라이브러리 액이 얻어졌다. 이어서, 파지 라이브러리 액에 최종 농도 4% BSA 및 1.2 mM 칼슘 이온 농도가 되도록 BSA 및 CaCl₂를 첨가하였다. 패닝방법으로서 일반적인 방법인 자기 비즈에 고정화한 항원을 사용한 패닝방법이 참조되었다(J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9, J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203, Biotechnol. Prog. (2002) 18(2) 212-20, Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9). 자기 비즈로서 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 또는 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)가 사용되었다.

[0677] 구체적으로는 조제된 파지 라이브러리 액에 250 pmol의 비오틴 표식 항원을 더함으로써 해당 파지 라이브러리

액을 실온에서 60분간 항원과 접촉시켰다. BSA로 차단된 자기 비즈가 더해지고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비즈와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비즈는 1 mL의 1.2 mM CaCl₂/TBS(1.2 mM CaCl₂를 포함한 TBS)에서 1회 세정되었다. 그 후, IL-6 수용체에의 결합능을 갖는 항체 분절을 농축할 경우에는 일반적인 방법에 의한 용출에 의해서 Ca 농도 의존적인 IL-6 수용체에 결합능을 지표로서서 항체 분절을 농축할 경우에는 2 mM EDTA/TBS(2 mM EDTA를 포함한 TBS)에 혼탁된 비즈로부터의 용출에 의해서 파지 용액이 회수되었다. 회수된 파지 용액이 대수 증식기(OD600이 0.4-0.7)로 한 10 mL의 대장균 TG1에 첨가되었다. 37°C에서 1시간 느리게 상기 대장균의 교반 배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염된 대장균은 225 mm x 225 mm의 플레이트에 퍼종되었다. 이어서, 퍼종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리 액이 조제되었다.

[0678] 2회째 이후의 패닝은 Ca 의존적 결합능을 지표로 파지의 농축이 행해졌다. 구체적으로는 조제한 파지 라이브러리 액에 40 pmol의 비오틴 표식 항원을 더함으로써 파지 라이브러리를 실온에서 60분간 항원과 접촉시켰다. BSA로 차단된 자기 비즈가 더해지고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비즈와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비즈는 1 mL의 1.2 mM CaCl₂/TBST 및 1.2 mM CaCl₂/TBS에서 세정되었다. 그 후 0.1 mL의 2 mM EDTA/TBS가 더해진 비즈는 실온에서 혼탁된 후, 즉시 자기 스탠드를 사용해서 비즈가 분리되어 파지 용액이 회수되었다. 회수된 파지 용액이 대수 증식기(OD600이 0.4-0.7)로 한 10 mL의 대장균주 TG1에 첨가되었다. 37°C에서 1시간 느리게 상기 대장균의 교반 배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염된 대장균은 225 mm x 225 mm의 플레이트에 퍼종되었다. 이어서, 퍼종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리 액이 회수되었다. Ca 의존적 결합능을 지표로 하는 패닝이 복수회 반복되었다.

[0679] (15-3) 파지 ELISA에 의한 평가

[0680] 상기 방법에 의해서 얻어진 대장균의 단일 콜로니로부터 상법(Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145)에 의해서 파지 함유 배양 상청이 회수되었다.

[0681] 최종 농도 4% BSA 및 1.2 mM 칼슘 이온 농도가 되도록 BSA 및 CaCl₂가 더해진 파지를 함유하는 배양 상청이 이하의 순서로 ELISA에 제공되었다. StreptaWell 96 마이크로터터 플레이트(F. Hoffmann-La Roche Ltd.)가 비오틴 표식 항원을 포함한 100 μL의 PBS에서 하룻밤 코트되었다. 해당 플레이트의 각 웰을 PBST에서 세정함으로써 항원이 제거된 후, 해당 웰이 1시간 이상 250 μL의 4% BSA-TBS에서 차단되었다. 4% BSA-TBS가 제거된 각 웰에 조제된 배양 상청이 더해진 해당 플레이트를 37°C에서 1시간 방치함으로써 파지를 제시하는 항체를 각 웰에 존재하는 항원에 결합시켰다. 1.2 mM CaCl₂/TBST에서 세정된 각 웰에 1.2 mM CaCl₂/TBS 또는 1 mM EDTA/TBS가 더해지고, 해당 플레이트는 37°C에서 30분간 정지 배양되었다. 1.2 mM CaCl₂/TBST에서 세정된 후에 최종 농도 4%의 BSA 및 1.2 mM의 이온화 칼슘 농도로 한 TBS에 의해서 흐석된 HRP 결합 항 M13 항체(Amersham Pharmacia Biotech, Inc.)를 각 웰에 첨가된 플레이트를 1시간 반응시켰다. 1.2 mM CaCl₂/TBST에서 세정 후, TMB 단일 용액(ZYMED Laboratories, Inc.)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색 반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후, 450 nm의 흡광도에 의해서 해당 발색이 측정되었다.

[0682] 상기의 파지 ELISA의 결과, Ca 의존적인 항원에 대한 결합능이 있다고 판단되는 항체 분절을 주형으로서 특이적인 프라이머에 의해서 증폭된 유전자의 염기 서열 분석이 행해졌다.

[0683] (15-4) 항체의 발현과 정제

[0684] 파지 ELISA의 결과, Ca 의존적인 항원에 대한 결합능이 있다고 판단된 클론이 동물 세포 발현용 플라스미드에 도입되었다. 항체의 발현은 이하의 방법을 사용해서 행해졌다. 인간 태아 신장 세포 유래 FreeStyle 293-F주 (Invitrogen Corp. Corp.)가 FreeStyle 293 Expression Medium 배지(Invitrogen Corp. Corp.)에 혼탁되어 1.33 x 10⁶ 세포/mL의 세포 밀도에서 6웰 플레이트의 각 웰에 3 mL씩 뿐만 넣었다. 조제된 플라스미드는 리포펙션법에 의해서 세포에 도입되었다. CO₂ 배양(37도, 8% CO₂, 90 rpm) 중에서 4일간 배양이 행해진다. rProtein A SepharoseTM Fast Flow(Amersham Biosciences, Inc.)를 이용하여 당업자 공지의 방법을 사용해서 상기에서 얻어진 배양 상청으로부터 항체가 정제되었다. 분광 광도계를 사용하여 정제된 항체 용액의 280 nm에서의 흡광도가 측정되었다. PACE법에 의해 산출된 흡광 계수를 사용함으로써 얻어진 측정값으로부터 항체 농도가 산출되었다(Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

[0685] [실시예 16] 취득된 항체의 인간 IL-6 수용체에 대한 Ca 의존적 결합능의 평가

[0686] 실시예 15에서 취득된 항체 6RL#9-IgG1(중쇄(서열 번호: 78, 서열 번호: 10에 IgG1 유래 정상 영역이 연결된 서

열), 경쇄 서열 번호: 79), 및 FH4-IgG1(중쇄 서열 번호: 80, 경쇄 서열 번호: 81)의 인간 IL-6 수용체에 대한 결합 활성이 Ca 의존적인지 여부를 확인하기 위해서 이들 항체와 인간 IL-6 수용체의 항원 항체 반응의 속도론적 해석이 Biacore T100(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)를 사용하여 행해졌다. 인간 IL-6 수용체에 대한 Ca 의존성의 결합 활성을 갖지 않는 대조 항체로서 WO2009125825에 기재되어 있는 H54/L28-IgG1(중쇄 서열 번호: 82, 경쇄 서열 번호: 83)가 사용되었다. 고칼슘 이온 농도 및 저칼슘 이온 농도의 조건으로서 각각 2 mM 및 3 μ M의 칼슘 이온 농도의 용액 중에서 항원 항체 반응의 속도론적 해석이 행해졌다. 아민 커플링법으로 protein A(Invitrogen Corp.)가 적당량 고정된 Sensor chip CM4(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) 상에 목적하는 항체가 캡처되었다. 런닝 버퍼에는 10 mM ACES, 150 mM NaCl, 0.05%(w/v) Tween20, 2 mM CaCl₂(pH7.4) 또는 10 mM ACES, 150 mM NaCl, 0.05%(w/v) Tween20, 3 μ mol/L CaCl₂(pH7.4)의 2종류의 완충액이 사용되었다. 인간 IL-6 수용체의 희석에도 각각의 버퍼가 사용되었다. 측정은 모두 37°C에서 실시되었다.

[0687] H54/L28-IgG1 항체를 사용한 항원 항체 반응의 속도론적 해석에 있어서, IL-6 수용체의 희석액과 블랭크인 런닝 버퍼를 유속 20 μ L/min에서 3분간 주입함으로써 센서칩에 캡처시킨 H54/L28-IgG1 항체에 IL-6 수용체를 상호 작용시켰다. 그 후, 유속 20 μ L/min에서 10분간 런닝 버퍼를 흘려 IL-6 수용체의 해리가 관찰된 후, 10 mM 글리신-HCl(pH1.5)을 유속 30 μ L/min에서 30초간 주입함으로써 센서칩이 재생되었다. 측정에서 얻어진 센서그램으로부터 키네틱 파라미터인 결합 속도 정수 $ka(1/Ms)$, 및 해리 속도 정수 $kd(1/s)$ 가 산출되었다. 이를 값 사용해서 H54/L28-IgG1 항체의 인간 IL-6 수용체에 대한 해리 정수 KD(M)가 산출되었다. 각 파라미터의 산출에는 Biacore T100 Evaluation Software(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)가 사용되었다.

[0688] FH4-IgG1 항체 및 6RL#9-IgG1 항체를 사용한 항원 항체 반응의 속도론적 해석에 있어서는, IL-6 수용체의 희석 액과 블랭크인 런닝 버퍼를 유속 5 μ L/min에서 15분간 주입함으로써 센서칩에 캡처시킨 FH4-IgG1 항체 또는 6RL#9-IgG1 항체에 IL-6 수용체를 상호 작용시켰다. 그 후, 10 mM 글리신-HCl(pH1.5)을 유속 30 μ L/min에서 30초간 주입함으로써 센서칩이 재생되었다. 측정에서 얻어진 센서그램으로부터 steady state affinity model을 사용해서 해리 정수 KD(M)가 산출되었다. 각 파라미터의 산출에는 Biacore T100 Evaluation Software(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)가 사용되었다.

[0689] a) 방법에 의해 결정된 2 mM CaCl₂ 존재 하에서의 각 항체와 IL-6 수용체의 해리 정수 KD를 표 21에 나타내었다.

표 21

항체	H54/L28-IgG1	FH4-IgG1	6RL#9-IgG1
kD (M)	1.9E-9	5.9E-7	2.6E-7

[0690] [0691] Ca 농도가 3 μ M의 조건 하에서 H54/L28-IgG1 항체의 KD는 2 mM Ca 농도 존재 하와 동일한 방법으로 산출하는 것이 가능하다. Ca 농도가 3 μ M의 조건 하에서는 FH4-IgG1 항체 및 6RL#9-IgG1 항체는 IL-6 수용체에 대한 결합은 거의 관찰되지 않았기 때문에 상기의 방법에 의한 KD의 산출은 곤란하다. 그러나, 하기의 식 1(Biacore T100 Software Handbook, BR-1006-48, AE 01/2007)을 사용함으로써 Ca 농도가 3 μ M의 조건 하에서의 이들 항체의 KD를 예측하는 것이 가능하다.

[0692] [식 1]

$$\text{Req} = C \times R_{\max} / (KD - C) + RI$$

[0693] [0694] 상기 식 1 중의 각 항목의 의미는 하기;

[0695] Req (RU): 정상 상태 결합 레벨

[0696] R_{max} (RU): 분석물(analyte)의 표면 결합능

[0697] RI (RU): 시료 중의 용적 굴절률 기여

[0698] C (M): 분석물 농도

[0699] KD (M): 평형 해리 상수로 표시된다.

[0700] 상기 식 1을 사용한 Ca 농도가 3 $\mu\text{mol/L}$ 인 경우의 각 항체와 IL-6 수용체의 해리 정수 KD의 예측되는 추정 결과를 표 22에 나타내었다. 표 22 중의 Req, Rmax, RI, C는 측정 결과를 기초로 추정된 값이다.

표 22

항체	H54/L28-IgG1	FH4-IgG1	6RL#9-IgG1
Req (RU)	5	10	
Rmax (RU)	39	72	
RI (RU)	0	0	
C (M)	5E-06	5E-06	
KD (M)	2.2E-9	3.4E-05	3.1E-05

[0701]

[0702] 상기의 결과로부터, FH4-IgG1 항체 및 6RL#9-IgG1 항체는 버퍼 중의 CaCl_2 의 농도를 2 mM~3 μM 로 감소함으로써 IL-6 수용체에 대한 KD가 각각 약 60배, 약 120배 상승(60배, 120배 이상 친화성이 저감)한다고 예측되었다.

[0703]

표 23에 H54/L28-IgG1, FH4-IgG1, 6RL#9-IgG1의 3종류 항체의 2 mM CaCl_2 존재 하 및 3 μM CaCl_2 존재 하에서의 KD값, 및 KD값의 Ca 의존성에 대해 정리했다.

표 23

항체	H54/L28-IgG1	FH4-IgG1	6RL#9-IgG1
KD (M) (2 mM CaCl_2)	1.9E-9	5.9E-7	2.6E-7
KD (M) (3 μM CaCl_2)	2.2E-9	3.4E-5 이상	3.1E-5 이상
Ca 의존성	약 1 배	약 60 배 이상	약 120 배 이상

[0704]

[0705] Ca 농도 차이에 의한 H54/L28-IgG1 항체의 IL-6 수용체에 대한 결합의 차이는 관찰되지 않았다. 그 반면, 저농도의 Ca 조건 하에서는 FH4-IgG1 항체 및 6RL#9-IgG1 항체의 IL-6 수용체에 대한 결합의 현저한 감쇠가 관찰되었다(표 23).

[0706]

[실시예 17] 취득된 항체에의 칼슘 이온 결합 평가

[0707] 이어서, 항체에의 칼슘 이온 결합의 평가 지표로서 시차 주사형 열량 측정(DSC)에 의한 열 변성 중간 온도(T_m 값)가 측정되었다(MicroCal VP-Capillary DSC, MicroCal). 열 변성 중간 온도(T_m 값)는 안정성의 지표이고, 칼슘 이온의 결합에 의해서 단백질이 안정화하면 열 변성 중간 온도(T_m 값)는 칼슘 이온이 결합하지 않은 경우에 비해서 높아진다(J. Biol. Chem. (2008) 283, 37, 25140-25149). 항체 용액 중의 칼슘 이온 농도의 변화에 따른 항체의 T_m 값의 변화를 평가함으로써 항체에의 칼슘 이온의 결합 활성이 평가되었다. 정제된 항체가 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 (pH7.4) 또는 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 3 μM CaCl_2 (pH7.4)의 용액을 외액으로 하는 투석(EasySEP, Tomy) 처리로 제공되었다. 투석에 사용된 용액을 사용해서 약 0.1 mg/mL로 조제된 항체 용액을 피험 물질로서 20°C~115°C까지 240°C/hr의 승온 속도로 DSC 측정이 행해졌다. 얻어진 DSC의 변성 곡선에 따라 산출된 각 항체의 Fab 도메인의 열 변성 중간 온도(T_m 값)를 표 24에 나타내었다.

표 24

항체	칼슘 이온 농도		ΔT_m (°C) 2 mM-3 μM
	3 μM	2 mM	
H54/L28-IgG1	92.87	92.87	0.00
FH4-IgG1	74.71	78.97	4.26
6RL#9-IgG1	77.77	78.98	1.21

[0708]

[0709] 표 24의 결과로부터, 칼슘 의존적 결합능을 나타낸 FH4-IgG1 항체 및 6RL#9-IgG1 항체의 Fab의 T_m 값은 칼슘 이

온 농도의 변화에 따라 변동하고, 칼슘 의존적 결합능을 나타내지 않는 H54/L28-IgG1 항체의 Fab의 T_m 값은 칼슘 이온의 농도 변화에 따라 변동되지 않는 것을 나타냈다. FH4-IgG1 항체 및 6RL#9-IgG1 항체의 Fab의 T_m 값의 변동은 이들 항체에 칼슘 이온이 결합하여 Fab 부분이 안정화된 것을 나타내고 있다. 상기의 결과로부터, FH4-IgG1 항체 및 6RL#9-IgG1 항체에는 칼슘 이온이 결합하고, 한편으로 H54/L28-IgG1 항체에는 칼슘 이온이 결합하지 않는 것을 나타냈다.

[0710] [실시예 18] 6RL#9 항체의 칼슘 이온 결합 부위의 X선 결정 구조 해석에 의한 확인

[0711] (18-1) X선 결정 구조 해석

실시예 17에 나타낸 바와 같이, 6RL#9 항체는 칼슘 이온과 결합하는 것이 열 변성 온도 T_m 값의 측정에서 시사되었다. 그러나, 6RL#9 항체의 어느 부위가 칼슘 이온과 결합하고 있는지 예상할 수 없기 때문에 X선 결정 구조 해석의 방법을 이용함으로써 칼슘 이온이 상호 작용하는 6RL#9 항체 서열의 잔기가 특정되었다.

[0713] (18-2) 6RL#9 항체의 발현 및 정제

X선 결정 구조 해석에 사용하기 위해서 발현시킨 6RL#9 항체가 정제되었다. 구체적으로는 6RL#9 항체의 중쇄(서열 번호: 78)와 경쇄(서열 번호: 79)를 각각 발현시킬 수 있도록 조제된 동물 발현용 플라스미드를 동물 세포에 일시적으로 도입시켰다. 최종 세포 밀도 1×10^6 세포/mL가 되도록 FreeStyle 293 Expression Medium 배지 (Invitrogen Corp.)에 혼탁시킨 800 mL의 인간 태아 신장 세포 유래 FreeStyle 293-F주(Invitrogen Corp.)에 리포트션법에 의해 조제된 플라스미드가 도입되었다. 플라스미드가 도입된 세포는 CO_2 배양($37^\circ C$, 8% CO_2 , 90 rpm) 중에서 5일간 배양되었다. rProtein A SepharoseTM Fast Flow(Amersham Biosciences, Inc.)를 사용한 당업자 공지의 방법에 따라서 상기와 같이 얻어진 배양 상청으로부터 항체가 정제되었다. 분광 광도계를 사용해서 정제된 항체 용액의 280 nm에서의 흡광도가 측정되었다. PACE법에 의해 산출된 흡광 계수를 사용해서 측정값으로부터 항체 농도가 산출되었다(Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

[0715] (18-3) 6RL#9 항체에서의 Fab 분절의 정제

분자량 분획 크기 10000MWCO의 한외 여과막을 사용해서 6RL#9 항체를 21 mg/mL까지 농축시켰다. L-시스테인 4 mM, EDTA 5 mM, 20 mM 인산 나트륨 완충액(pH6.5)을 사용해서 5 mg/mL에 의해서 희석된 2.5 mL의 해당 항체의 시료가 조제되었다. 0.125 mg의 파파인(Roche Applied Science)을 더해서 교반된 해당 시료를 $35^\circ C$ 에서 2시간 정지했다. 정지 후, 프로테아제 억제제 칙테일 미니, EDTA 프리(Roche Applied Science) 1정을 녹인 10 mL의 25 mM MES 완충액(pH6)을 해당 시료에 더 첨가하고, 열음 중에 정지함으로써 파파인에 의한 프로테아제 반응이 정지되었다. 이어서, 해당 시료가 하류에 1 mL 크기의 ProteinA 담체 컬럼 HiTrap MabSelect Sure(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)가 텐덤에 연결된 25 mM MES 완충액 pH6에서 평형화된 1 mL 크기의 양이온 교환 컬럼 HiTrap SP HP(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)에 첨가되었다. 같은 완충액 중 NaCl 농도를 300 mM 까지 직선적으로 올려서 용출을 행함으로써 6RL#9 항체의 Fab 분절의 정제 분획을 얻었다. 이어서, 얻어진 정제 분획이 5000MWCO의 한외 여과막에 의해 0.8 mL정도까지 농축되었다. 50 mM NaCl을 포함한 100 mM HEPES 완충액 (pH8)으로 평형화된 겔 여과 컬럼 Superdex 200 10/300 GL(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)에 농축액이 첨가되었다. 결정화용의 정제 6RL#9 항체의 Fab 분절이 같은 완충액을 사용해서 컬럼으로부터 용출되었다. 또한, 상기 모든 컬럼 작업은 $6\sim7.5^\circ C$ 의 저온 하에서 실시되었다.

[0717] (18-4) 6RL#9 항체의 Fab 분절의 Ca 존재 하에서의 결정화

미리 일반적인 조건 설정에서 6RL#9 Fab 분절의 종 결정이 얻어졌다. 다음에 5 mM가 되도록 $CaCl_2$ 가 첨가된 정제 6RL#9 항체의 Fab 분절이 5000MWCO의 한외 여과막을 사용해서 12 mg/mL로 농축되었다. 다음에, 행잉 드롭 증기 확산법에 따라서 상기와 같이 농축된 시료의 결정화가 실시되었다. 리저버 용액으로서 20-29%의 PEG4000을 포함한 100 mM HEPES 완충액(pH7.5)이 사용되었다. 커버 글라스 상에서 0.8 μl 의 리저버 용액 및 0.8 μl 의 상기 농축 시료의 혼합액에 29% PEG4000 및 5 mM $CaCl_2$ 를 포함한 100 mM HEPES 완충액(pH7.5) 중에서 과쇄된 상기 종 결정이 100-10000배로 희석된 희석 계열의 용액 0.2 μl 를 첨가함으로써 결정화 드롭이 조제되었다. 해당 결정화 드롭을 $20^\circ C$ 에 2일~3일 정지함으로써 얻어진 얇은 판 형상 결정의 X선 회절 데이터가 측정되었다.

[0719] (18-5) 6RL#9 항체의 Fab 분절의 Ca 비존재 하에서의 결정화

정제 6RL#9 항체의 Fab 분절이 5000MWCO의 한외 여과막을 사용해서 15 mg/ml로 농축되었다. 다음에, 행잉 드롭 증기 확산법에 따라서 상기와 같이 농축된 시료의 결정화가 실시되었다. 리저버 용액으로서 18-25%의 PEG4000을

포함한 100 mM HEPES 완충액(pH7.5)이 사용되었다. 커버 글라스 상에서 0.8 μl의 리저버 용액 및 0.8 μl의 상기 농축 시료의 혼합액에 대해서 25% PEG4000을 포함한 100 mM HEPES 완충액(pH7.5) 중에서 파쇄된 Ca 존재 하에서 얻어진 6RL#9 항체의 Fab 분절의 결정이 100~10000배 희석된 희석 계열의 용액 0.2 μl를 첨가함으로써 결정화 드롭이 조제되었다. 해당 결정화 드롭을 20°C에 2일~3일 정치함으로써 얻어진 얇은 판 형상 결정의 X선 회절 데이터가 측정되었다.

[0721] (18-6) 6RL#9 항체의 Fab 분절의 Ca 존재 하에서의 결정의 X선 회절 데이터의 측정

35% PEG4000 및 5 mM CaCl₂를 포함한 100mM HEPES 완충액(pH7.5)의 용액에 담근 6RL#9 항체의 Fab 분절의 Ca 존재 하에서 얻어진 단결정 1개를 미소한 나일론 루프 부착 펀을 사용해서 외액과 함께 페념으로써 해당 단결정이 액체 질소 중에서 동결되었다. 고에너지 가속기 연구 기구의 방사광 시설 광자 공장의 범 라인 BL-17A를 사용해서 상기 동결 결정의 X선 회절 데이터가 측정되었다. 또한, 측정 중에는 항상 -178°C의 질소 기류 중에 동결 결정을 둠으로써 동결 상태가 유지되었다. 범 라인에 구비된 CCD 검출기 Quantum315r(ADSC)을 사용해서 결정을 1° 씩 회전시키면서 총 180장의 회절 화상이 수집되었다. 격자 정수의 결정, 회절 반점의 색인화, 및 회절 데이터의 처리가 프로그램 Xia2(CCP4 Software Suite), XDS Package(Walfgang Kabsch) 및 Scala(CCP4 Software Suite)에 의해서 행해졌다. 최종적으로 분해능 2.2 Å까지의 회절 강도 데이터가 얻어졌다. 본 결정은 공간군 P2₁2₁2₁에 속하고, 격자 정수 a=45.47 Å, b=79.86 Å, c=116.25 Å, α=90°, β=90°, γ=90° 였다.

[0723] (18-7) 6RL#9 항체의 Fab 분절의 Ca 비존재 하에서의 결정의 X선 회절 데이터의 측정

35% PEG4000을 포함한 100 mM HEPES 완충액(pH7.5)의 용액에 담근 6RL#9 항체의 Fab 분절의 Ca 비존재 하에서 얻어진 단결정 1개를 미소한 나일론 루프 부착 펀을 사용해서 외액과 함께 페념으로써 해당 단결정이 액체 질소 중에서 동결되었다. 고에너지 가속기 연구 기구의 방사광 시설 광자 공장의 범 라인 BL-5A를 사용해서 상기 동결 결정의 X선 회절 데이터가 측정되었다. 또한, 측정 중에는 항상 -178°C의 질소 기류 중에 동결 결정을 둠으로써 동결 상태가 유지되었다. 범 라인에 구비된 CCD 검출기 Quantum210r(ADSC)를 사용해서 결정을 1° 씩 회전시키면서 총 180장의 회절 화상이 수집되었다. 격자 정수의 결정, 회절 반점의 색인화, 및 회절 데이터의 처리가 프로그램 Xia2(CCP4 Software Suite), XDS Package(Walfgang Kabsch) 및 Scala(CCP4 Software Suite)에 의해서 행해졌다. 최종적으로 분해능 2.3 Å까지의 회절 강도 데이터가 얻어졌다. 본 결정은 공간군 P2₁2₁2₁에 속하고, 격자 정수 a=45.40 Å, b=79.63 Å, c=116.07 Å, α=90°, β=90°, γ=90°이며, Ca 존재 하의 결정과 같은 형이었다.

[0725] (18-8) 6RL#9 항체의 Fab 분절의 Ca 존재 하에서의 결정의 구조 해석

프로그램 Phaser(CCP4 Software Suite)를 사용한 문자 치환법에 의해서 6RL#9 항체의 Fab 분절의 Ca 존재 하에서의 결정 구조가 결정되었다. 얻어진 결정 격자의 크기와 6RL#9 항체의 Fab 분절의 문자량으로부터 비대칭 단위 중의 문자 수가 1개인 것으로 예상되었다. 1차 서열 상의 상동성을 바탕으로 PDB code: 1ZA6의 구조 좌표로부터 추출된 A쇄 112~220번 및 B쇄 116~218번의 아미노산 잔기 부분이 CL 및 CH1 영역의 탐색용 모델 문자가 되었다. 이어서 PDB code: 1ZA6의 구조 좌표로부터 추출된 B쇄 1~115번의 아미노산 잔기 부분이 VH 영역의 탐색용 모델 문자가 되었다. 최종으로 PDB code 2A9M의 구조 좌표로부터 추출된 경쇄 3~147번의 아미노산 잔기가 VL 영역의 탐색용 모델 문자가 되었다. 이 순서에 따라 각 탐색용 모델 문자의 결정 격자 내에서의 방향과 위치를 회전 함수 및 병진 함수로부터 결정함으로써 6RL#9 항체의 Fab 분절의 초기 구조 모델이 얻어졌다. 해당 초기 구조 모델에 대해서 VH, VL, CH1, CL의 각 도메인을 움직이는 강체 정밀화를 함으로써 25~3.0 Å의 반사 데이터에 대한 결정학적 신뢰도 인자 R값은 46.9%, Free R값은 48.6%가 되었다. 또한 프로그램 Refmac5(CCP4 Software Suite)를 사용한 구조 정밀화와 실험적으로 결정된 구조 인자 Fo와 모델로부터 계산된 구조 인자 Fc 및 위상을 사용한 계산된 2Fo-Fc, Fo-Fc를 계수로 하는 전자 밀도맵을 참조하면서 모델 수정을 반복 프로그램 Coot(Paul Emsley) 상에서 행함으로써 모델의 정밀화가 행해졌다. 최종으로 2Fo-Fc, Fo-Fc를 계수로 하는 전자 밀도맵을 바탕으로 Ca 이온 및 물 분자를 모델에 넣음으로써 프로그램 Refmac5(CCP4 Software Suite)를 사용해서 정밀화가 행해졌다. 분해능 25~2.2 Å의 21020개의 반사 데이터를 사용함으로써 최종적으로 3440원자의 모델에 대한 결정학적 신뢰도 인자 R값은 20.0%, Free R값은 27.9%가 되었다.

[0727] (18-9) 6RL#9 항체의 Fab 분절의 Ca 비존재 하에서의 결정의 X선 회절 데이터의 측정

6RL#9 항체의 Fab 분절의 Ca 비존재 하에서의 결정 구조는 같은 형인 Ca 존재 하 결정 구조를 사용해서 결정되었다. 6RL#9 항체의 Fab 분절의 Ca 존재 하에서의 결정 구조 좌표로부터 물 분자와 Ca 이온 분자가 제거되고, VH, VL, CH1, CL의 각 도메인을 움직이는 강체 정밀화가 행해졌다. 25~3.0 Å의 반사 데이터에 대한 결정학적

신뢰도 인자 R값은 30.3%, FreeR값은 31.7%가 되었다. 또한 프로그램 Refmac5(CCP4 Software Suite)를 사용한 구조 정밀화와 실험적으로 결정된 구조 인자 Fo와 모델로부터 계산된 구조 인자 Fc 및 위상을 사용한 계산된 2Fo-Fc, Fo-Fc를 계수로 하는 전자 밀도맵을 참조하면서 모델 수정을 반복 프로그램 Coot(Paul Emsley) 상에서 행함으로써 모델의 정밀화가 행해졌다. 최종으로 2Fo-Fc, Fo-Fc를 계수로 하는 전자 밀도맵을 바탕으로 물 분자를 모델에 넣음으로써 프로그램 Refmac5(CCP4 Software Suite)를 사용해서 정밀화가 행해졌다. 분해능 25.2.3 Å의 18357개의 반사 데이터를 사용함으로써 최종적으로 3351원자의 모델에 대한 결정학적 신뢰도 인자 R값은 20.9%, FreeR값은 27.7%가 되었다.

[0729] (18-10) 6RL#9 항체의 Fab 분절의 Ca 존재 또는 비존재 하에서의 결정의 X선 회절 데이터의 비교

[0730] 6RL#9 항체의 Fab 분절의 Ca 존재 하에서의 결정 및 Ca 비존재 하에서의 결정 구조를 비교하면 중쇄 CDR3에 큰 변화가 보였다. X선 결정 구조 해석에서 결정된 6RL#9 항체의 Fab 분절의 중쇄 CDR3의 구조를 도 11에 나타내었다. 구체적으로는 Ca 존재 하에서 6RL#9 항체의 Fab 분절의 결정에서는 중쇄 CDR3 루프 부분의 중심 부분에 칼슘 이온이 존재하고 있었다. 칼슘 이온은 중쇄 CDR3의 95위치, 96위치 및 100a위치(Kabat 넘버링)와 상호 작용하고 있다고 생각되었다. Ca 존재 하에서는 항원과의 결합에 중요한 중쇄 CDR3 루프가 칼슘과 결합함으로써 안정화하고, 항원과의 결합에 적합한 구조로 되어 있는 것이 생각되었다. 항체의 중쇄 CDR3에 칼슘이 결합하는 예는 지금까지 보고되지 않아 항체의 중쇄 CDR3에 칼슘이 결합한 구조는 신규한 구조이다.

[0731] 6RL#9 항체의 Fab 분절의 구조로부터 밝혀진 중쇄 CDR3에 존재하는 칼슘 결합 모티프도 실시예 11에서 기재되는 Ca 라이브러리의 디자인의 새로운 요소가 될 수 있다. 즉, 실시예 11에서는 경쇄 가변 영역에 칼슘 결합 모티프가 도입되었지만, 예를 들면 6RL#9 항체의 중쇄 CDR3을 포함하고 경쇄를 포함한 그 이외의 CDR에 플렉시블 잔기를 포함한 라이브러리가 생각된다.

[0732] [실시예 19] 파지 디스플레이 기술을 이용한 인간 항체 라이브러리에서의 Ca 의존적으로 IL-6에 결합하는 항체의 취득

[0733] (19-1) 나이브 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리의 제조

[0734] 인간 PBMC로부터 작성된 폴리A RNA 또는 시판되고 있는 인간 폴리A RNA 등을 주형으로서 당업자에게 공지한 방법에 따라 서로 다른 인간 항체 서열의 Fab 도메인을 제시하는 복수의 파지로 이루어지는 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리가 구축되었다.

[0735] (19-2) 비즈 패닝에 의한 라이브러리에서의 Ca 의존적으로 항원에 결합하는 항체 분절의 취득

[0736] 구축된 나이브 인간 항체 파지 디스플레이 라이브러리에서의 최초의 선발은 항원(IL-6)에의 결합능을 가진 항체 분절만의 농축에 의해서 실시되었다. 항원으로서 비오틴 표식된 IL-6이 사용되었다.

[0737] 구축한 파지 디스플레이용 파지미드를 유지한 대장균으로부터 파지 생산이 행해졌다. 파지 생산이 행해진 대장균의 배양액에 2.5 M NaCl/10% PEG를 첨가함으로써 침전된 파지의 집단을 TBS에서 희석함으로써 파지 라이브러리 액이 얻어졌다. 이어서, 파지 라이브러리 액에 최종 농도 4% BSA 및 1.2 mM 칼슘 이온 농도가 되도록 BSA 및 CaCl₂가 첨가되었다. 패닝방법으로서 일반적인 방법인 자기 비즈에 고정화된 항원을 사용한 패닝방법이 참조되었다(J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9, J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203, Biotechnol. Prog. (2002) 18(2) 212-20, Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9). 자기 비즈로서 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 또는 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)가 사용되었다.

[0738] 구체적으로는 조제된 파지 라이브러리 액에 250 pmol의 비오틴 표식 항원을 첨가함으로써 해당 파지 라이브러리 액을 실온에서 60분간 항원과 접촉시켰다. BSA로 차단된 자기 비즈가 첨가되고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비즈와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비즈는 1.2 mM CaCl₂/TBST(1.2 mM CaCl₂를 포함한 TBST)에서 3회 세정한 후, 1 mL의 1.2 mM CaCl₂/TBS(1.2 mM CaCl₂를 포함한 TBS)에서 2회 더 세정되었다. 그 후, 0.5 mL의 1 mg/mL의 트립신이 첨가된 비즈는 실온에서 15분 혼탁된 후, 즉시 자기 스텐드를 사용해서 비즈가 분리되어 파지 용액이 회수되었다. 회수된 파지 용액이 대수 증식기(OD600이 0.4-0.7)로 된 10 mL의 대장균주 TG1에 첨가되었다. 37°C에서 1시간 느리게 상기 대장균의 교반 배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염된 대장균은 225 mm x 225 mm의 플레이트에 과종되었다. 이어서, 과종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리 액이 조제되었다.

- [0739] 2회째 이후의 패닝에서는 Ca 의존적 결합능을 지표로 파지의 농축이 행해졌다. 구체적으로는 조제된 파지 라이브러리 액에 40 pmol의 비오틴 표식 항원을 첨가함으로써 파지 라이브러리를 실온에서 60분간 항원과 접촉시켰다. BSA로 차단된 자기 비즈가 첨가되고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비즈와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비즈는 1 mL의 1.2 mM CaCl₂/TBST 및 1.2 mM CaCl₂/TBS에서 세정되었다. 그 후, 0.1mL 2 mM EDTA/TBS가 첨가된 비즈는 실온에서 혼탁된 후, 즉시 자기 스탠드를 사용해서 비즈가 분리되어 파지 용액이 회수되었다. 회수된 파지 용액에 100 mg/mL의 트립신 5 μL를 첨가함으로써 Fab를 제시하지 않은 파지 pIII 단백질(헬퍼 파지 유래의 pIII 단백질)이 절단되고, Fab를 제시하지 않은 파지의 대장균에 대한 감염능을 잃었다. 트립신 처리된 파지 용액으로부터 회수된 파지가 대수 증식기(OD600이 0.4~0.7)로 된 10 mL의 대장균주 TG1에 첨가되었다. 37°C에서 1시간 느리게 상기 대장균의 교반 배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염된 대장균은 225 mm x 225 mm의 플레이트에 파종되었다. 이어서, 파종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리 액이 회수되었다. Ca 의존적 결합능을 지표로 하는 패닝이 3회 반복되었다.
- [0740] (19-3) 파지 ELISA에 의한 평가
- [0741] 상기 방법에 의해서 얻어진 대장균의 단일 콜로니로부터 상법(Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145)에 의해서 파지 함유 배양 상청이 회수되었다.
- [0742] 최종 농도 4% BSA 및 1.2 mM 칼슘 이온 농도가 되도록 BSA 및 CaCl₂가 첨가된 파지를 함유하는 배양 상청이 이하의 순서로 ELISA에 제공되었다. StreptaWell 96 마이크로터터 플레이트(F. Hoffmann-La Roche Ltd.)가 비오틴 표식 항원을 포함한 100 μL의 PBS에서 하룻밤 코트되었다. 해당 플레이트의 각 웰을 PBST에서 세정함으로써 항원이 제거된 후, 해당 웰이 1시간 이상 250 μL의 4% BSA-TBS에서 차단되었다. 4% BSA-TBS가 제거된 각 웰에 조제된 배양 상청이 첨가된 해당 플레이트를 37°C에서 1시간 정치함으로써 파지를 제시하는 항체를 각 웰에 존재하는 항원에 결합시켰다. 1.2 mM CaCl₂/TBST에서 세정된 각 웰에 1.2 mM CaCl₂/TBS 또는 1 mM EDTA/TBS가 첨가되고, 해당 플레이트는 37°C에서 30분간 정치 배양되었다. 1.2 mM CaCl₂/TBST에서 세정한 후에 최종 농도 4%의 BSA 및 1.2 mM의 이온화 칼슘 농도로 한 TBS에 의해서 회색된 HRP 결합 항 M13 항체(Amersham Pharmacia Biotech, Inc.)를 각 웰에 첨가된 플레이트를 1시간 배양시켰다. 1.2 mM CaCl₂/TBST에서 세정 후, TMB 단일 용액(ZYMED Laboratories, Inc.)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색 반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후, 450 nm의 흡광도에 의해서 해당 발색이 측정되었다.
- [0743] 단리된 96클론을 사용해서 파지 ELISA를 행함으로써 IL-6에 대한 Ca 의존적인 결합능을 갖는 6KC4-1#85 항체가 얻어진다. 상기의 파지 ELISA의 결과, Ca 의존적인 항원에 대한 결합능이 있다고 판단되는 항체 분절을 주형으로서 특이적인 프라이머에 의해서 증폭된 유전자의 염기 서열 해석이 행해졌다. 6KC4-1#85 항체의 중쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호: 11, 및 경쇄 가변 영역의 서열은 서열 번호: 84로 기재되어 있다. 6KC4-1#85 항체의 중쇄 가변 영역(서열 번호: 11)을 부호화하는 폴리뉴클레오티드가 PCR법에 의해서 IgG1 유래 서열을 부호화하는 폴리뉴클레오티드와 연결된 DNA 분절이 동물 세포 발현용 벡터에 포함되고, 서열 번호: 85로 표시되는 중쇄를 발현하는 벡터가 구축되었다. 6KC4-1#85 항체의 경쇄 가변 영역(서열 번호: 84)을 부호화하는 폴리뉴클레오티드가 PCR법에 의해서 천연형 Kappa쇄의 정상 영역(서열 번호: 26)을 부호화하는 폴리뉴클레오티드와 연결된 DNA 분절이 동물 세포 발현용 벡터에 포함되었다. 제조된 변이형의 서열은 당업자 공지의 방법으로 확인되었다. 제조된 변이형의 서열은 당업자 공지의 방법으로 확인되었다.
- [0744] (19-4) 항체의 발현과 정제
- [0745] 파지 ELISA의 결과, Ca 의존적인 항원에 대한 결합능이 있다고 판단된 클론 6KC4-1#85가 동물 세포 발현용 플라스미드에 도입되었다. 항체의 발현은 이하의 방법을 사용해서 행해졌다. 인간 태아 신장 세포 유래 FreeStyle 293-F주(Invitrogen Corp.)가 FreeStyle 293 Expression Medium 배지(Invitrogen Corp.)에 혼탁되고, 1.33 x 10⁶ 세포/mL의 세포 밀도에서 6웰 플레이트의 각 웰에 3 mL씩 파종되었다. 조제된 플라스미드는 리포액션법에 의해서 세포에 도입되었다. CO₂ 배양(37도, 8% CO₂, 90 rpm) 중에서 4일간 배양이 행해진다. rProtein A SepharoseTM Fast Flow(Amersham Biosciences, Inc.)를 사용해서 당업자 공지의 방법을 이용하여 상기에서 얻어진 배양 상청으로부터 항체가 정제되었다. 분광 광도계를 사용해서 정제된 항체 용액의 280 nm에서의 흡광도가 측정되었다. PACE법에 의해 산출된 흡광 계수를 사용함으로써 얻어진 측정값으로부터 항체 농도가 산출되었다(Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

[0746] [실시예 20] 6KC4-1#85 항체의 칼슘 이온 결합 평가

[0747] 인간 항체 라이브러리로부터 취득된 칼슘 의존적 항원 결합 항체 6KC4-1#85 항체가 칼슘과 결합하거나 평가되었다. 이온화 칼슘 농도가 다른 조건에서 측정되는 T_m 값이 변동하는지 여부가 실시예 6에 기재된 방법으로 평가되었다.

[0748] 6KC4-1#85 항체의 Fab 도메인의 T_m 값을 표 25에 나타내었다. 표 25에 나타낸 바와 같이, 6KC4-1#85 항체의 Fab 도메인의 T_m 값은 칼슘 이온의 농도에 따라서 변동하기 때문에 6KC4-1#85 항체가 칼슘과 결합하는 것이 밝혀졌다.

표 25

항체	칼슘 이온 농도		ΔT_m (°C)
	3 μ M	2 mM	
6KC4-1#85	71.49	75.39	3.9

[0749]

[0750] [실시예 21] 6KC4-1#85 항체의 칼슘 이온 결합 부위의 확인

[0751] 실시예 20에서 나타낸 바와 같이, 6KC4-1#85 항체는 칼슘 이온과 결합하는 것을 나타냈지만, 6KC4-1#85는 hV_k5-2 서열의 검토로부터 밝혀진 칼슘 결합 모티프를 갖지 않는다. 그래서, 칼슘 이온이 6KC4-1#85 항체의 중쇄에 결합하는지, 경쇄에 결합하는지 또는 모두에 결합하는지를 확인하기 위해서 칼슘 이온과 결합하지 않는 항 글리피칸 3 항체(중쇄 서열 GC_H(서열 번호: 48), 경쇄 서열 GC_L(서열 번호: 86))의 중쇄와 경쇄 각각 교환한 변이 항체에 대한 칼슘 이온의 결합이 평가되었다. 실시예 6에 나타내는 방법에 준해서 측정된 변이 항체의 T_m 값을 표 26에 나타내었다. 그 결과, 6KC4-1#85 항체의 중쇄를 갖는 변이 항체의 T_m 값이 칼슘 이온의 농도에 따라서 변화하기 때문에 6KC4-1#85 항체의 중쇄에서 칼슘과 결합한다고 생각되었다.

표 26

중쇄	경쇄	칼슘 이온 농도		ΔT_m (°C) 2 mM-3 μ M
		3 μ M	2 mM	
6KC4-1#85	6KC4-1#85	71.46	75.18	3.72
6KC4-1#85	GC_L	78.87	80.01	1.14
GC_H	6KC4-1#85	75.69	75.94	0.25
GC_H	GC_L	79.94	80.01	0.07

[0752]

[0753] 그래서, 6KC4-1#85 항체의 중쇄의 어느 잔기와 칼슘 이온이 결합하고 있는지 확인하기 위해서 6KC4-1#85 항체의 CDR에 존재하는 Asp (D) 잔기를 칼슘 이온의 결합 또는 퀄레이트에 관여할 수 없는 Ala (A) 잔기로 치환한 변이 중쇄(6_H1-11(서열 번호: 87), 6_H1-12(서열 번호: 88), 6_H1-13(서열 번호: 89), 6_H1-14(서열 번호: 90), 6_H1-15(서열 번호: 91)), 또는 변이 경쇄(6_L1-5(서열 번호: 92) 및 6_L1-6(서열 번호: 93))가 제조되었다. 변이 항체 유전자를 포함한 발현 벡터가 도입된 동물 세포의 배양액으로부터 변이 항체가 실시예 19에 기재된 방법에 따라서 정제되었다. 정제된 변이 항체의 칼슘 결합이 실시예 6에 기재된 방법에 따라서 측정되었다. 측정된 결과를 표 27에 나타내었다. 표 27에 나타낸 바와 같이, 6KC4-1#85 항체의 중쇄 CDR3의 95위치 또는 101위치(Kabat 넘버링)를 Ala 잔기로 치환함으로써 6KC4-1#85 항체의 칼슘 결합능을 잃기 때문에 이 잔기가 칼슘과의 결합에 중요하다고 생각된다. 6KC4-1#85 항체의 변이 항체의 칼슘 결합성으로부터 밝혀진 6KC4-1#85 항체의 중쇄 CDR3의 루프 밑 부근에 존재하는 칼슘 결합 모티프도 실시예 11에서 기재된 Ca 라이브러리의 디자인의 새로운 요소가 될 수 있다. 즉, 실시예 11에서는 경쇄 가변 영역에 칼슘 결합 모티프가 도입되었지만, 예를 들면 6KC4-1#85 항체의 중쇄 CDR3을 포함하고, 경쇄를 포함한 그 이외의 CDR에 플렉시블 잔기를 포함한 라이브러리가 생각된다.

표 27

종쇄	경쇄	개변 잔기	칼슘 이온 농도		ΔT_m (°C) 2 mM-3 μM
			3 μM	2 mM	
6KC4-1#85	6KC4-1#85	아생형	71.49	75.39	3.9
6H1-11	6KC4-1#85	H쇄 61 위치 (Kabat 넘버링)	71.73	75.56	3.83
6H1-12	6KC4-1#85	H쇄 95 위치 (Kabat 넘버링)	72.9	73.43	0.53
6H1-13	6KC4-1#85	H쇄 100a 위치 (Kabat 넘버링)	70.94	76.25	5.31
6H1-14	6KC4-1#85	H쇄 100g 위치 (Kabat 넘버링)	73.95	75.14	1.19
6H1-15	6KC4-1#85	H쇄 101 위치 (Kabat 넘버링)	65.37	66.25	0.87
6KC4-1#85	6L1-5	L쇄 50 위치 (Kabat 넘버링)	71.92	76.08	4.16
6KC4-1#85	6L1-6	L쇄 92 위치 (Kabat 넘버링)	72.13	78.74	6.61

[0754]

[0755] [실시예 22] Ca 의존적으로 인간 IgA에 결합하는 항체의 취득

[0756] (22-1) MRA-hIgA, GC-hIgA 및 비오틴을 부가한 인간 IgA-Fc의 조제

[0757]

인간 IgA로서 MRA-hIgA(종쇄 서열 번호 97, 경쇄 서열 번호 25) GC-hIgA(종쇄 서열 번호 98, 경쇄 서열 번호 99) 및 비오틴을 부가한 인간 IgA-Fc(비오틴 표식 hIgA-Fc라고 하고, hIgA_CH2-CH3-Avitag: 서열 번호 100)가 이하와 같이 조제되었다.

[0758]

(22-1-1) MRA-hIgA의 조제

[0759]

인간 IgA의 재조합형인 MRA-hIgA(이하 MRA-hIgA)는 이하와 같이 조제되었다. 밸현시킨 H(WT)-IgA1(서열 번호: 97)과 L(WT)(서열 번호: 25)을 포함한 hIgA가 당업자 공지의 방법에 의해서 이온 교환 크로마토그래피 및 겔 여과 크로마토그래피를 사용해서 정제되었다.

[0760]

(22-1-2) GC-hIgA의 조제

[0761]

인간 IgA의 재조합형인 GC-hIgA는 이하와 같이 조제되었다. GC-hIgA(종쇄 서열 번호: 98, 경쇄 서열 번호: 99)를 부호화하는 유전자 분절이 동물 세포 밸현용 벡터에 포함되었다. 구축된プラス미드 벡터는 FreeStyle293(Invitrogen Corp.)에 293Fectin(Invitrogen Corp.)을 사용해서 EBNA1을 발현하는 유전자와 함께 도입되었다. 그 후, 유전자 도입된 세포를 37°C, CO₂ 8%에서 6일간 배양하여 GC-hIgA 단백질을 배양 상청 중에 분비시켰다.

[0762]

GC-hIgA를 포함한 세포 배양액을 0.22 μm 보틀탑 필터로 여과하여 배양 상청이 얻어졌다. 20 mM Tris-HCl, pH8.0에서 평형화된 HiTrap Q HP(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)와 같은 용액으로 희석된 배양 상청을 부하하고, NaCl의 농도 구배에 의해 GC-hIgA가 용출되었다. 그 후, Superdex200에 의한 겔 여과 크로마토그래피에서 회합체의 제거와 20 mM His-HCl, 150 mM NaCl, pH6.0에의 치환을 행해서 정제 GC-hIgA가 얻어졌다.

[0763]

(22-1-3) 비오틴 표식 hIgA-Fc의 조제

[0764]

비오틴을 목적 단백질(인간 IgA-Fc)의 C말단에 부가하기 위해서 인간 IgA-Fc영역을 부호화하는 유전자 분절의 하류에 비오틴 리가아제에 의해서 비오틴이 부가되는 특이적인 서열(Avitag 서열)을 부호화하는 유전자 분절이 연결되었다. 인간 IgA와 Avitag 서열이 연결된 단백질(hIgA_CH2-CH3-Avitag(서열 번호: 100))를 부호화하는 유전자 분절이 동물 세포 밸현용 벡터에 포함되었다. 구축된プラス미드 벡터가 FreeStyle293(Invitrogen Corp.)

에 293Fectin(Invitrogen Corp.)을 사용해서 유전자 도입되었다. 이때 EBNA1을 발현하는 유전자 및 비오틴 리가 아제(BirA)를 발현하는 유전자를 동시에 도입하고, 비오틴을 첨가함으로써 비오틴 표식시켰다. 상술한 순서에 따라서 유전자가 도입된 세포를 37°C, CO₂ 8%에서 6일간 배양하여 목적하는 단백질을 배양 상청 중에 분비시켰다.

[0765] 목적하는 인간 IgA-Fc를 포함한 세포 배양액을 0.22 μm 보틀탑 필터로 여과하여 배양 상청이 얻어졌다. 20 mM Tris-HCl, pH7.4에서 평형화된 HiTrap Q HP(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)와 같은 용액으로 회석된 배양 상청을 부하하고, NaCl의 농도 구배에 의해 목적하는 인간 IgA-Fc가 용출되었다. 50 mM Tris-HCl, pH8.0로 회석된 HiTrap Q HP 용출액을 같은 용액으로 평형화한 SoftLink Avidin column에 부하하고, 5 mM Biotin, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH8.0로 용출시켰다. 그 후, Superdex200에 의한 겔 여과 크로마토그래피에서 회합체의 제거와 20 mM His-HCl, 150 mM NaCl, pH6.0에의 치환을 행해서 정제 인간 IgA-Fc가 얻어졌다.

[0766] (22-2) 비즈 패닝에 의한 Ca 라이브러리에서의 Ca 의존적으로 항원에 결합하는 항체 분절의 취득

[0767] 구축된 Ca 의존적으로 항원에 결합하는 항체 라이브러리(Ca 라이브러리)에서의 최초의 선발은 항원(인간 IgA-Fc)에 대한 결합능을 지표로서 실시되었다.

[0768] 구축된 파지 디스플레이용 파지미드를 유지한 대장균으로부터 파지가 생산되었다. 파지가 생산된 대장균의 배양 액에 2.5 M NaCl/10% PEG를 첨가해서 침전시킨 파지의 집단을 TBS에서 회석함으로써 파지 라이브러리 액이 얻어졌다. 이어서, 파지 라이브러리 액에 최종 농도 4% BSA, 1.2 mM 칼슘 이온 또는 3% SkimMilk, 1.2 mM 칼슘 이온이 되도록 BSA 또는 SkimMilk, 및 CaCl₂가 첨가되고, 차단된 파지 라이브러리 액이 조제되었다. 패닝방법으로서 일반적인 방법인 자기 비즈에 고정화한 항원을 사용한 패닝방법이 참조되었다(J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9, J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203, Biotechnol. Prog (2002) 18(2) 212-20, Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9). 자기 비즈로서 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 또는 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)가 사용되었다.

[0769] 구체적으로는 조제된 파지 라이브러리 액에 250 pmol의 비오틴 표식 항원(비오틴 표식 IgA-Fc)를 첨가함으로써 해당 파지 라이브러리 액을 실온에서 60분간 항원과 접촉시켰다. BSA 또는 SkimMilk로 차단된 자기 비즈가 첨가되고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비즈와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비즈는 1 mL의 1.2 mM CaCl₂/TBST(1.2 mM CaCl₂, 0.1% Tween20을 포함한 TBS)와 1 mL의 1.2 mM CaCl₂/TBS(1.2 mM CaCl₂를 포함한 TBS)에서 세정되었다. 그 후, 1 mg/mL의 트립신 0.5 mL가 첨가된 비즈는 실온에서 15분 혼탁된 후, 즉시 자기 스텐드를 사용해서 비즈가 분리되어 파지 용액이 회수되었다. 회수된 파지 용액이 대수 증식기(OD600 이 0.4-0.7)로 한 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37°C에서 1시간 느리게 상기 대장균의 교반 배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염된 대장균은 225 mm x 225 mm의 플레이트에 퍼종되었다. 이어서, 퍼종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리 액이 조제되었다.

[0770] 2회째, 3회째 패닝은 Ca 이온 농도 의존적 항원 결합능을 지표로 파지의 농축이 행해졌다. 구체적으로는 1회째의 패닝과 차단을 행해서 조제한 파지 라이브러리 액에 40 pmol의 비오틴 표식 항원을 첨가함으로써 파지 라이브러리를 실온에서 60분간 항원과 접촉시켰다. BSA로 차단된 자기 비즈가 첨가되고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비즈와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비즈는 1 mL의 1.2 mM CaCl₂/TBST와 1.2 mM CaCl₂/TBS에서 세정되었다. 그 후, 0.1 mL의 2 mM EDTA/TBS(2 mM의 EDTA를 포함한 TBS)가 첨가된 비즈는 실온에서 혼탁된 후, 즉시 자기 스텐드를 사용해서 비즈가 분리되어 파지 용액이 회수되었다. 회수된 파지 용액에 100 mg/mL의 트립신 5 μL를 첨가함으로써 Fab를 제시하지 않는 파지의 pIII 단백질(헬퍼 파지 유래의 pIII 단백질)이 절단되고, Fab를 제시하지 않는 파지의 대장균에 대한 감염능을 잃었다. 회수된 파지 용액이 대수 증식기(OD600이 0.4-0.7)로 한 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37°C에서 1시간 느리게 상기 대장균의 교반 배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염된 대장균은 225 mm x 225 mm의 플레이트에 퍼종되었다. 이어서, 퍼종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리 액이 회수되었다.

[0771] (22-3) Biacore에 의한 인간 IgA 결합 항체의 검사

[0772] 2회째의 패닝 종료 후 얻어진 대장균으로부터 취득된 파지미드로부터 추출된 항체 분절 유전자가 동물 세포 발현용 백터에 삽입되었다. 항체의 발현은 이하의 방법을 사용해서 행해졌다. 인간 태아 신장 세포 FreeStyle 293-F주(Invitrogen Corp.)가 FreeStyle 293 Expression Medium 배지(Invitrogen Corp.)에 혼탁되고, 2.63x10⁵ 세포/mL의 세포 밀도에서 96웰 플레이트의 각 웰에 190 uL씩 퍼종되었다. 제조된 플라스미드는 리

포펙션법에 의해서 세포에 도입되었다. CO₂ 배양(37도, 8% CO₂) 중에서 4일간 배양이 행해졌다.

- [0773] 상기 방법에 의해 얻어진 배양 상청을 사용하고, BiacoreA100을 사용해서 GC-hIgA에의 결합능이 해석되었다. 아민 커플링법 proteinA(Invitrogen Corp.)가 적당량 고정된 sensor chip CM5(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)에 대하여 배양 상청 중의 항체를 고정화시켰다. 런닝 버퍼에는 20 mM ACES, 150 mM NaCl, 0.05%(w/v) Tween20, 1.2 mM CaCl₂(pH7.4)의 완충액이 사용되었다. GC-hIgA의 희석에도 각각의 버퍼가 사용되었다. 측정은 모두 25°C에서 실시되었다.
- [0774] 상기의 IgG Biacore의 결합능 해석의 결과, GC-hIgA에 대한 결합능이 있다고 판단된 항체에 대해서 발현에 사용된 동물 세포 발현용 벡터로부터 특이적인 프라이머를 사용해서 증폭된 항체 유전자의 염기 서열이 해석되었다.
- [0775] (22-4) Phage ELISA에 의한 hIgA 결합 항체의 검사
- [0776] (22-2)에서 실시된 3회째의 패닝 후에 얻어진 대장균의 단일 콜로니로부터 상법(Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145)에 의해서 파지의 배양을 행해 파지 함유 배양 상청이 회수되었다. 최종 농도 4% BSA 및 1.2 mM 칼슘 이온 농도가 되도록 BSA 및 CaCl₂가 첨가된 파지를 함유하는 배양 상청이 이하의 순서로 ELISA에 제공되었다. StreptaWell 96 마이크로터터 플레이트(F. Hoffmann-La Roche Ltd.)가 비오틴 표식 IgA-Fc를 포함한 100 μL의 PBS에서 하룻밤 코트되었다. 해당 플레이트의 각 웰을 PBST에서 세정함으로써 항원이 제거된 후, 해당 웰이 1시간 이상 250 μL의 4% BSA-TBS에서 차단되었다. 4% BSA-TBS가 제거된 각 웰에 조제된 배양 상청이 첨가된 해당 플레이트를 37°C에서 1시간 정차함으로써 파지를 제시하는 항체를 각 웰에 존재하는 IgA-Fc에 결합시켰다. 1.2 mM CaCl₂/TBST에서 세정된 각 웰에 1.2 mM CaCl₂/TBS 또는 1 mM EDTA/TBS가 첨가되고, 해당 플레이트는 37 °C에서 30분간 정차 배양되었다. 1.2 mM CaCl₂/TBST에서 세정한 후에 최종 농도 4%의 BSA 및 1.2 mM의 이온화 칼슘 농도로 한 TBS에 의해서 희석된 HRP 결합 항 M13 항체(Amersham Pharmacia Biotech, Inc.)를 각 웰에 첨가된 플레이트를 1시간 배양시켰다. 1.2 mM CaCl₂/TBST에서 세정 후, TMB 단일 용액(ZYMED Laboratories, Inc.)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색 반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후 450 nm의 흡광도에 의해서 해당 발색이 측정되었다.
- [0777] 상기 파지 ELISA의 결과, Ca 이온 농도에 따라 IgA-Fc에의 결합능이 변화된다고 판단된 클론에 대하여 항체 분절 유전자의 염기 서열 해석이 행해졌다.
- [0778] (22-5) 고체층 패닝법에 의한 Ca 라이브러리에서의 Ca 의존적으로 항원에 결합하는 항체 분절의 취득
- [0779] 구축된 Ca 의존적으로 항원에 결합하는 항체 라이브러리(Ca 라이브러리)에서의 최초의 선발은 항원(인간 IgA-Fc)에의 결합능을 지표로서 실시되었다.
- [0780] 구축된 파지 디스플레이용 파지미드를 유지한 대장균으로부터 파지가 생산되었다. 파지가 생산된 대장균의 배양 액에 2.5 M NaCl/10% PEG를 첨가함으로써 침전된 파지의 집단을 TBS에서 희석함으로써 파지 라이브러리 액이 얻어졌다. 이어서, 파지 라이브러리 액에 최종 농도 4% BSA, 1.2 mM 칼슘 이온 또는 3% SkimMilk, 1.2 mM 칼슘 이온이 되도록 BSA 또는 SkimMilk, 및 CaCl₂가 첨가된 차단된 파지 라이브러리 액이 조제되었다. 패닝방법으로서 1회째의 패닝은 일반적인 방법인 자기 비즈에 고정화한 항원을 사용한 패닝방법이 참조되었다(J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2) 2-9, J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203, Biotechnol. Prog. (2002) 18(2) 212-20, Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2) 61-9). 자기 비즈로서 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 또는 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)가 사용되었다.
- [0781] 구체적으로는 조제된 파지 라이브러리 액에 250 pmol의 비오틴 표식 항원(비오틴 표식 IgA-Fc)를 첨가함으로써 해당 파지 라이브러리 액을 실온에서 60분간 항원과 접촉시켰다. SkimMilk로 차단된 자기 비즈가 첨가되고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비즈와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비즈는 1 mL의 1.2 mM CaCl₂/TBST(1.2 mM CaCl₂, 0.1% Tween20을 포함한 TBS)와 1 mL의 1.2 mM CaCl₂/TBS(1.2 mM CaCl₂를 포함한 TBS)에서 세정되었다. 그 후, 1 mg/mL의 트립신 0.5 mL가 첨가된 비즈는 실온에서 15분 혼탁된 후, 즉시 자기 스탠드를 사용해서 비즈가 분리되어 파지 용액이 회수되었다. 회수된 파지 용액이 대수 증식기(OD600이 0.4-0.7)로 한 10 mL의 대장균 주 ER2738에 첨가되었다. 37°C에서 1시간 느리게 상기 대장균의 교반 배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염된 대장균은 225 mm x 225 mm의 플레이트에 파종되었다. 이어서, 파종된 대장균의 배양액으로부터

파지를 회수함으로써 파지 라이브러리 액이 조제되었다.

[0782] 2회째의 패닝에서는 플레이트 상에 고정화된 항원을 사용해서 패닝이 행해졌다. 구체적으로는 스트렙타이비딘(Coating된 10웰 플레이트(Streptawell, F. Hoffmann-La Roche Ltd.)에 각 웰당 5 pmol의 비오틴 표식 항원이 첨가되고, 실온에서 60분간 항원과 접촉시킨 후, TBST(0.1% Tween20을 포함한 TBS)에서 3회 세정시킨 항원 고정화 플레이트가 제조되었다. 여기에, 1.2 mM Ca를 포함한 Skim Milk에서 차단된 파지 라이브러리를 첨가하고, 실온에서 60분간 항원과 접촉시켰다. 플레이트는 1.2 mM CaCl₂/TBST에서 플레이트 워셔(Skan WASHER, SKARON)에 의해 3회 세정시켰다. 그 후, 2 L의 1.2 mM CaCl₂/TBST에 침지되고, 60분간 느리게 흔들었다. 0.1 mL의 2 mM EDTA/TBS(2 mM의 EDTA를 포함한 TBS)가 첨가된 웰은 실온에서 혼탁된 후 파지 용액이 회수되었다. 회수된 파지 용액에 100 mg/mL의 트립신 5 μL를 첨가함으로써 Fab를 제거하지 않은 파지 pIII 단백질(헬퍼 파지 유래의 pIII 단백질)이 절단되고, Fab를 제거하지 않은 파지의 대장균에 대한 감염능을 잃었다. 회수된 파지 용액이 대수 증식기(OD600이 0.4~0.7)로 한 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37°C에서 1시간 느리게 상기 대장균의 교반 배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염시킨 대장균은 225 mm x 225 mm의 플레이트에 파종되었다.

[0783] (22-6) Phage ELISA에 의한 hIgA 결합 항체의 검사

[0784] 상기 패닝 후에 얻어진 대장균의 단일 콜로니로부터 상법(Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145)에 의해서 파지의 배양을 행해서 파지 함유 배양 상청이 회수되었다. (22-4)에 기재된 방법으로 PhageELISA를 실시하고, Ca 의존적 항원 결합능이 있다고 판단된 클론에 대하여 염기 서열 해석이 행해져 동물 세포 발현용 벡터에 삽입되어 항체로서 발현, 정제되었다.

[0785] [실시예 23] 취득된 항체의 인간 IgA에 대한 Ca 의존적 결합능의 평가

[0786] (23-1) 취득된 항 인간 IgA 항체의 발현 및 정제

[0787] 실시예 22에서 인간 IgA에 대한 결합능이 있다고 판단된 항체로서 취득된 항체 중, GA1-IgG1((22-3)에서 취득된 중쇄 서열 번호 101, 경쇄 서열 번호 102), GA2-IgG1((22-4)에서 취득된 중쇄 서열 번호 103, 경쇄 서열 번호 104), GA3-IgG1((22-6)에서 취득된 중쇄 서열 번호 105, 경쇄 서열 번호 106), GA4-IgG1((22-3)에서 취득된 중쇄 서열 번호 107, 경쇄 서열 번호 108)을 이하의 방법을 사용해서 발현해서 해당 항체의 정제가 행해졌다. FreeStyle 293 Expression Medium 배지(Invitrogen Corp.)에 혼탁된 인간 배아 세포 유래 FreeStyle 293-F 주(Invitrogen Corp.)가 1.33 x 10⁶ 세포/mL의 세포 밀도에서 6웰 플레이트의 각 웰에 3 mL씩 파종되었다. 제조된 플라스미드는 리포렉션법에 의해서 세포에 도입되었다. CO₂ 배양(37도, 8% CO₂, 90 rpm) 중에서 4일간 배양되었다. rProtein A SepharoseTM Fast Flow(Amersham Biosciences, Inc.)를 사용해서 당업자 공지의 방법을 이용하여 상기에서 얻어진 배양 상청으로부터 항체가 정제되었다. 분광 광도계를 사용해서 정제된 항체 용액의 280 nm에서의 흡광도가 측정되었다. PACE법에 의해 산출된 흡광 계수를 사용함으로써 얻어진 측정값으로부터 항체 농도가 산출되었다(Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

[0788] (23-2) 취득된 항체의 인간 IgA에 대한 Ca 의존적 결합능의 평가

[0789] Biacore T200(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)을 사용해서 (23-1)에서 취득된 항체(GA1-IgG1, GA2-IgG1, GA3-IgG1 및 GA4-IgG1)의 인간 IgA에 대한 결합 활성(해리 정수 K_D (M))이 평가되었다. 런닝 버퍼로서 3 μM 또는 1.2 mM CaCl₂를 함유하는 0.05% tween20, 20 mMol/L ACES, 150 mMol/L NaCl(pH7.4 및 pH5.8), 0.1 μM 또는 10 mM CaCl₂를 함유하는 0.05% tween20, 20 mMol/L ACES, 150 mMol/L NaCl, pH8.0을 사용해서 해당 결합 활성이 측정되었다.

[0790] Sensor chip CM5(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) 상에 아미노 커플링법으로 적절한 양이 고정된 재조합형 단백질 A/G(Thermo Scientific)에 항체를 결합시켰다. 어날라이트로서 적절한 농도의 MRA-hIgA((22-1)에 기재)를 주입하고, 센서 칩 상에 항체와 상호 작용시켰다. 그 후, 10 mMol/L 글리신-HCl, pH1.5를 주입하고, 센서 칩을 재생시켰다. 측정은 37°C에서 행해졌다. Biacore T200 Evaluation Software(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)를 사용한 측정 결과의 곡선 맞춤에 의한 해석 및 평형값 해석에 의해 해리 정수 K_D (M)가 산출되었다. 그 결과를 표 28에 나타냈다. 또한, 얻어진 센서그램을 도 12에 나타냈다. GA2-IgG1, GA3-IgG1, GA4-IgG1은 Ca²⁺ 농도가 1.2 mM에서는 인간 IgA에 강하게 결합하지만, Ca 이온 농도가 3 μM에서는 인간 IgA에 약하게 결합

하는 것이 분명하게 나타났다.

표 28

항체명	조건	피트	k_a	k_d	KD[M]
GA1-IgG1	pH8.0, 10mM Ca	1:1고정화 모델	1.2E+06	1.2E-01	1.0E-07
	pH8.0, 0.1μM Ca	1:1고정화 모델	1.1E+06	2.4E-01	2.2E-07
	pH7.4, 1.2mM Ca	1:1고정화 모델	5.7E+05	8.4E-02	1.5E-07
	pH7.4, 3μM Ca	1:1고정화 모델	6.4E+05	1.2E-01	1.9E-07
	pH5.8, 1.2mM Ca	1:1고정화 모델	6.8E+05	9.9E-02	1.4E-07
	pH5.8, 3μM Ca	1:1고정화 모델	7.1E+05	1.1E-01	1.5E-07
GA2-IgG1	pH7.4, 1.2mM Ca	1:1고정화 모델	4.0E+05	1.6E-02	3.9E-08
	pH7.4, 3μM Ca	정상 상태의 어피니티	-	-	6.7E-06
	pH5.8, 1.2mM Ca	정상 상태의 어피니티	-	-	4.0E-06
	pH5.8, 3μM Ca	정상 상태의 어피니티	-	-	5.0E-06
GA3-IgG1	pH7.4, 1.2mM Ca	1:1고정화 모델	4.3E+05	3.3E-02	7.9E-08
	pH7.4, 3μM Ca	정상 상태의 어피니티	-	-	-
	pH5.8, 1.2mM Ca	1:1고정화 모델	4.4E+05	3.5E-02	8.1E-08
	pH5.8, 3μM Ca	정상 상태의 어피니티	-	-	1.1E-06
GA4-IgG1	pH7.4, 1.2mM Ca	정상 상태의 어피니티	-	-	4.2E-07
	pH7.4, 3μM Ca	정상 상태의 어피니티	-	-	8.9E-07
	pH5.8, 1.2mM Ca	정상 상태의 어피니티	-	-	1.1E-06
	pH5.8, 3μM Ca	정상 상태의 어피니티	-	-	1.5E-06

[0791]

[0792] 실시예 14에서는 Ca 라이브러리에서 IL6 수용체에 대해서 Ca 이온 농도 의존적으로 항원(IL6 수용체)과의 상호 작용이 변화하는 항체가 취득되었지만, Ca 이온 농도 의존적으로 항원에 결합하는 항체는 IL6 수용체뿐만 아니라 인간 IgA에서도 취득할 수 있다는 것이 밝혀졌다.

[0793] [실시예 24] Ca 의존적으로 인간 글리피칸 3(GPC3)에 결합하는 항체의 취득

[0794] (24-1) 인간 글리피칸 3의 조제

[0795] 항원으로서 사용되는 재조합형 인간 글리피칸 3(이하 GPC3)이 이하와 같이 조제되었다. 인간 글리피칸 3의 막 관통 영역을 포함하지 않는 아미노산 서열에 6잔기의 히스티딘이 연결된 서열(서열 번호: 109)을 발현하는 플라스미드가 정상적으로 도입되어 있는 CHO세포의 배양 상청이 회수되었다. 얻어진 배양 상청을 이온 교환 크로마토그래피 정제 후, His 태그를 사용한 친화성 정제 및 겔 여과 크로마토그래피 정제를 행해서 GPC3가 얻어졌다. EZ-Link NHS-PEG4-Biotin(Thermo SCIENTIFIC)을 사용해서 해당 GPC3에 대해서 비오틴이 표식된 비오틴 표식 GPC3가 조제되었다.

[0796] (24-2) 비즈 패닝에 의한 라이브러리에서의 Ca 의존적으로 항원에 결합하는 항체 분절의 취득

[0797] 구축된 Ca 의존적으로 GPC3에 결합하는 항체 라이브러리에서의 최초의 선발은 항원(GPC3)에의 결합능을 지표로 실시되었다.

[0798] 구축된 파지 디스플레이용 파지미드를 유지한 대장균으로부터 파지가 생산되었다. 파지가 생산된 대장균의 배양 액에 2.5 M NaCl/10% PEG를 첨가함으로써 침전된 파지의 집단을 TBS에서 희석함으로써 파지 라이브러리 액이 얻어졌다. 이어서, 파지 라이브러리 액에 최종 농도 4% BSA, 1.2 mM 칼슘 이온 또는 3% SkimMilk, 1.2 mM 칼슘 이온이 되도록 BSA 또는 SkimMilk, 및 CaCl_2 가 첨가되어 차단된 파지 라이브러리 액이 조제되었다. 패닝방법으로서 일반적인 자기 비즈에 고정화한 항원을 사용한 패닝방법이 참조되었다(J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9, J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203, Biotechnol. Prog. (2002) 18(2) 212-20, Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9). 자기 비즈로 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 또는 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)가 사용되었다.

[0799] 구체적으로는 조제된 파지 라이브러리 액에 250 pmol의 비오틴 표식 항원(비오틴 표식 GPC3)을 첨가함으로써 해당 파지 라이브러리 액을 실온에서 60분간 항원과 접촉시켰다. BSA 또는 SkimMilk로 차단된 자기 비즈가 첨가되고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비즈와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비즈는 1 mL의 1.2 mM CaCl_2 /TBST(1.2 mM CaCl_2 를 포함한 TBST)와 1 mL의 1.2 mM CaCl_2 /TBS(1.2 mM CaCl_2 를 포함한 TBS)에서 세정되었다. 그 후, 1

mg/mL의 트립신 0.5 mL가 첨가된 비즈는 실온에서 15분 혼탁된 후, 즉시 자기 스탠드를 사용해서 비즈가 분리되어 파지 용액이 회수되었다. 회수된 파지 용액이 대수 증식기(OD600이 0.4-0.7)로 한 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37°C에서 1시간 느리게 상기 대장균의 교반 배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염된 대장균은 225 mm x 225 mm의 플레이트에 과종되었다. 이어서, 과종된 대장균 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리 액이 조제되었다.

[0800] 2회째 이후의 패닝에서는 Ca 의존적 결합능을 지표로 파지의 농축이 행해졌다. 구체적으로는 1회째의 패닝과 동일하게 차단을 행해 조제된 파지 라이브러리 액에 40 pmol의 비오틴 표식 항원을 첨가함으로써 파지 라이브러리를 실온에서 60분간 항원과 접촉시켰다. BSA 또는 Skim Milk로 차단된 자기 비즈가 첨가되고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비즈와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비즈는 1 mL의 1.2 mM CaCl₂/TBST 및 1.2 mM CaCl₂/TBS에서 세정되었다. 그 후, 0.1 mL의 2 mM EDTA/TBS(2 mM의 EDTA를 포함한 TBS)가 첨가된 비즈는 실온에서 혼탁된 후 즉시 자기 스탠드를 사용해서 비즈가 분리되어 파지 용액이 회수되었다. 회수된 파지 용액에 100 mg/mL의 트립신 5 μL를 첨가함으로써 Fab를 제시하지 않은 파지의 pIII 단백질(헬퍼 파지 유래의 pIII 단백질)이 절단되고, Fab를 제시하지 않은 파지의 대장균에 대한 감염능을 잃었다. 회수된 파지 용액이 대수 증식기(OD600이 0.4-0.7)로 한 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37°C에서 1시간 느리게 상기 대장균의 교반 배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염된 대장균은 225 mm x 225 mm의 플레이트에 과종되었다. 이어서, 과종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리 액이 회수되었다.

[0801] (24-3) Phage ELISA에 의한 GPC3 결합 항체의 검사

[0802] 상기 방법으로 실시된 2회째 및 3회째의 패닝 후에 얻어진 대장균의 단일 콜로니로부터 상법(Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145)에 의해서 파지의 배양을 행해 파지 함유 배양 상청이 회수되었다.

[0803] 최종 농도 4% BSA 및 1.2 mM 칼슘 이온 농도가 되도록 BSA 및 CaCl₂가 첨가된 파지를 함유하는 배양 상청이 이하의 순서로 ELISA에 제공되었다. StreptaWell 96 마이크로터터 플레이트(F. Hoffmann-La Roche Ltd.)가 비오틴 표식 항원을 포함한 100 μL의 PBS에서 하룻밤 코트되었다. 해당 플레이트의 각 웰을 PBST(0.1% Tween20을 포함한 PBS)에서 세정함으로써 항원이 제거된 후, 해당 웰이 1시간 이상 250 μL의 4% BSA-TBS에서 차단되었다. 4% BSA-TBS가 제거된 각 웰에 조제된 배양 상청이 추가된 해당 플레이트를 37°C에서 1시간 정지함으로써 파지를 제시하는 항체를 각 웰에 존재하는 항원에 결합시켰다. 1.2 mM CaCl₂/TBST에서 세정된 각 웰에 1.2 mM CaCl₂/TBS 또는 1 mM EDTA/TBS가 첨가되고, 해당 플레이트는 37°C에서 30분간 정지 배양되었다. 1.2 mM CaCl₂/TBST에서 세정된 후에 최종 농도 4%의 BSA 및 1.2 mM의 이온화 칼슘 농도로 한 TBS에 의해서 회색된 HRP 결합 항 M13 항체(Amersham Pharmacia Biotech, Inc.)를 각 웰에 첨가된 플레이트를 1시간 배양시켰다. 1.2 mM CaCl₂/TBST에서 세정 후, TMB 단일 용액(ZYMED Laboratories, Inc.)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색 반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후 450 nm의 흡광도에 의해서 해당 발색이 측정되었다.

[0804] 상기 파지 ELISA의 결과, Ca 의존적인 항원에 대한 결합능이 있다고 판단되는 항체 분절을 주형으로서 특이적인 프라이머에 의해서 증폭된 유전자의 염기 서열이 해석되었다.

[0805] (24-4) 인간 GPC3에 결합하는 항체의 발현과 정제

[0806] 파지 ELISA의 결과, Ca 의존적인 항원에 대한 결합능이 있다고 판단된 4항체, CSCM-01_005(중쇄 서열: 110, 경쇄 서열: 111), CSCM-01_009(중쇄 서열: 112, 경쇄 서열: 113), CSCM-01_015(중쇄 서열: 114, 경쇄 서열: 115), 및 CSCM-01_023(중쇄 서열: 116, 경쇄 서열: 117) 및 컨트롤로서 항 인간 GPC3 항체인 GC-IgG1(중쇄 서열: 118, 경쇄 서열: 119)이 각각 동물 세포 발현용 플라스미드에 삽입되었다. 항체를 이하의 방법을 사용해서 발현시켰다. FreeStyle 293 Expression Medium 배지(Invitrogen Corp.)에 혼탁된 인간 태아 신장 세포 유래 FreeStyle 293-F주(Invitrogen Corp.)가 1.33×10^6 개/mL의 세포 밀도에서 6웰 플레이트의 각 웰에 3 mL씩 과종되었다. 조제된 플라스미드는 리포펙션법에 의해서 세포에 도입되었다. CO₂ 배양(37°C, 8% CO₂, 90 rpm)에서 4일간 배양을 행했다. rProtein A Sepharose™ Fast Flow(Amersham Biosciences, Inc.)를 사용해서 당업자 공지의 방법을 이용하여 상기에서 얻어진 배양 상청으로부터 항체가 정제되었다. 분광 광도계를 사용해서 정제된 항체 용액의 280 nm에서의 흡광도가 측정되었다. PACE법에 의해 산출된 흡광 계수를 사용함으로써 얻어진 측정값으로부터 항체 농도가 산출되었다(Protein Science 1995; 4: 2411-2423). 또한, GC-IgG1 항체에 대해서는 GC-IgG1 항체를 정상적으로 발현하는 CHO세포 배양 상청으로부터 동일한 방법으로 항체를 정제하여 농도가 산출되

었다.

[0807] (24-5) 취득된 항체의 인간 GPC3에 대한 Ca 의존적 결합능 평가

[0808] 취득된 항체가 이하의 순서로 ELISA에 제공되었다. StreptaWell 96 마이크로터터 플레이트(F. Hoffmann-La Roche Ltd.)가 비오틴 표식 항원을 포함한 100 μ L의 PBS에서 하룻밤 코트되었다. 해당 플레이트의 각 웰을 ACES buffer(10 mM ACES, 150 mM NaCl, 100 mM CaCl₂, 0.05% Tween20, pH7.4)에서 세정함으로써 항원이 제거된 후, 해당 웰이 2% BSA를 포함한 ACES Buffer 250 μ L에서 1시간 이상 차단되었다. 2% BSA를 포함한 ACES Buffer가 제거된 각 웰에 미리 10 μ g/mL로부터 4배씩 희석을 행한 정제 IgG 각 100 μ L가 첨가된 해당 플레이트를 1시간 정지함으로써 IgG를 각 웰에 존재하는 항원에 결합시켰다. ACES Buffer에서 세정된 각 웰에 "10 mM ACES, 150 mM NaCl, 1.2 mM CaCl₂, pH7.4", "10 mM ACES, 150 mM NaCl, 3 μ M CaCl₂, pH7.4", "10 mM ACES, 150 mM NaCl, 1.2 mM CaCl₂, pH5.8" 또는 "10 mM ACES, 150 mM NaCl, 3 μ M CaCl₂, pH5.8"이 첨가되고, 해당 플레이트는 37°C에서 30분간 정지 배양되었다. ACES Buffer에서 세정된 후에 2% BSA를 포함한 ACES Buffer에 의해서 희석된 HRP 결합 항 인간 IgG 항체(BIOSOURCE)가 각 웰에 첨가된 플레이트를 1시간 배양시켰다. ACES Buffer에서 세정 후, TMB 단일 용액(ZYMED Laboratories, Inc.)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색 반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후, 450 nm의 흡광도에 의해서 해당 발색이 측정되었다.

[0809] 측정된 결과를 도 13에 나타냈다. GC-IgG1에서는 칼슘 이온의 농도에 관계없이 흡광도가 같은 반면, CSCM-01_005, CSCM-01_009, CSCM-01_015 및 CSCM-01_023은 1.2 mM 칼슘 이온 농도(고칼슘 이온 농도)에서의 흡광도와 비교해서 3 μ M 칼슘 이온 농도(저칼슘 이온 농도)에서의 흡광도는 현저하게 낮은 결과로 되었다. 이 결과로부터, CSCM-01_005, CSCM-01_009, CSCM-01_015 및 CSCM-01_023은 칼슘 이온의 농도에 따라서 항원과의 결합이 변화하는 성질을 갖는 것을 나타내고, 인간 글리피칸 3에 대해서도 칼슘 의존적 항체가 취득될 수 있다는 것이 나타났다.

[0810] [실시예 25] pH 의존적으로 마우스 IgA에 결합하는 항체의 취득

[0811] (25-1) GC-mIgA 및 비오틴을 부가한 마우스 IgA-Fc의 조제

[0812] 마우스 IgA로서 GC-mIgA(중쇄 서열 번호 120, 경쇄 서열 번호 121) 및 비오틴을 부가한 마우스 IgA-Fc(비오틴 표식 mIgA-Fc라고 하고, mIgA_CH2-CH3-Avitag: 서열 번호 122)가 이하와 같이 조제되었다.

[0813] (25-1-1) GC-mIgA의 조제

[0814] 마우스 IgA의 재조합형인 GC-mIgA는 이하와 같이 조제되었다. GC-mIgA(중쇄 서열 번호: 120, 경쇄 서열 번호: 121)를 부호화하는 유전자 분절이 동물 세포 발현용 벡터에 포함되었다. 구축된 플라스미드 벡터는 FreeStyle293(Invitrogen Corp.)에 293Fectin(Invitrogen Corp.)을 사용해서 EBNA1을 발현하는 유전자와 함께 도입되었다. 그 후, 유전자 도입된 세포를 37°C, CO₂ 8%에서 4일간 배양해서 GC-mIgA 단백질을 배양 상청 중에 분비시켰다.

[0815] GC-mIgA를 포함한 세포 배양액을 0.22 μ m 보틀탑 필터로 여과하여 배양 상청을 얻었다. 20 mM Tris-HCl, pH8.0에서 평형화시킨 후에 같은 용액으로 희석된 배양 상청이 부하된 HiTrap Q HP(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)로부터 NaCl의 농도 구배에 의해 GC-mIgA가 용출되었다. 그 후, Superdex200을 사용한 젤 여과 크로마토그래피에 의해서 회합체가 제거된 GC-mIgA를 포함한 베퍼를 20 mM His-HCl, 150 mM NaCl, pH6.0로 치환해서 정제 GC-mIgA를 얻었다.

[0816] (25-1-2) 비오틴 표식 mIgA-Fc의 조제

[0817] 비오틴을 목적 단백질(마우스 IgA-Fc)의 C말단에 부가하기 위해서 마우스 IgA-Fc영역을 부호화하는 유전자 분절의 하류에 비오틴 리가아제에 의해서 비오틴이 부가되는 특이적인 서열(Avitag 서열)을 부호화하는 유전자 분절이 연결되었다. 마우스 IgA와 Avitag 서열이 연결된 단백질(mIgA_CH2-CH3-Avitag(서열 번호: 122))를 부호화하는 유전자 분절이 동물 세포 발현용 벡터에 포함되었다. 구축된 플라스미드 벡터는 FreeStyle293(Invitrogen Corp.)에 293Fectin(Invitrogen Corp.)을 사용해서 유전자 도입되었다. 이때 EBNA1을 발현하는 유전자 및 비오틴 리가아제(BirA)를 발현하는 유전자를 동시에 도입하여 비오틴을 첨가함으로써 비오틴 표식시켰다. 상술한 순서에 따라서 유전자가 도입된 세포를 37°C, CO₂ 8%에서 6일간 배양하여 목적하는 단백질을 배양 상청 중에 분비시켰다.

- [0818] 목적하는 마우스 IgA-Fc를 포함한 세포 배양액을 0.22 μm 보틀탑 필터로 여과하여 배양 상청을 얻었다. 20 mM Tris-HCl, pH7.4에서 평형화시킨 후에 같은 용액으로 희석된 배양 상청이 부하된 HiTrap Q HP(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)로부터 NaCl의 농도 구배에 의해 목적하는 마우스 IgA-Fc를 용출시켰다. 이어서, 50 mM Tris-HCl, pH8.0에서 평형화시킨 후에 같은 용액으로 희석된 상기 HiTrap Q HP 용출액이 부하된 SoftLink Avidin column으로부터 5 mM Biotin, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH8.0에서 목적하는 마우스 IgA-Fc를 용출시켰다. 그 후, Superdex200을 사용한 젤 여과 크로마토그래피에 의해서 회합체가 제거된 마우스 IgA-Fc를 포함한 버퍼를 20 mM His-HCl, 150 mM NaCl, pH6.0으로 치환해서 정제 마우스 IgA-Fc를 얻었다.
- [0819] (25-2) 비즈 패닝에 의한 His 라이브러리에서의 pH 의존적으로 항원에 결합하는 항체 분절의 취득
- [0820] 구축된 pH 의존적으로 항원에 결합하는 항체 라이브러리(His 라이브러리 1)에서의 최초의 선발은 항원(마우스 IgA-Fc)에의 결합능을 지표로서 실시되었다.
- [0821] 구축된 파지 디스플레이용 파지미드를 유지한 대장균으로부터 파지가 생산되었다. 파지가 생산된 대장균의 배양 액에 2.5 M NaCl/10% PEG를 첨가해서 침전시킨 파지의 집단을 TBS에서 희석함으로써 파지 라이브러리 액이 얻어졌다. 이어서, 파지 라이브러리 액에 최종 농도 3% Skim Milk, 되도록 Skim Milk가 첨가되어 차단된 파지 라이브러리 액이 조제되었다. 패닝방법으로서 일반적인 방법인 자기 비즈에 고정화한 항원을 사용한 패닝방법이 참조되었다(J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9, J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203, Biotechnol. Prog. (2002) 18(2) 212-20, Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9). 자기 비즈로서 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 또는 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)가 사용되었다.
- [0822] 구체적으로는 조제된 파지 라이브러리 액에 비오틴 표식 항원(비오틴 표식 mIgA-Fc)을 첨가함으로써 해당 파지 라이브러리 액을 실온에서 60분간 항원과 접촉시켰다. 1회째의 패닝에서는 250 pmol, 2회째의 패닝에서는 40 pmol, 3회째의 패닝에서는 10pmol의 비오틴 표식 항원이 사용되었다. Skim Milk로 차단된 자기 비즈가 첨가되고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비즈와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비즈는 1 mL의 1.2 mM CaCl₂/TBST(1.2 mM CaCl₂, 0.1% Tween20을 포함한 TBS, pH7.6)와 1 mL의 1.2 mM CaCl₂/TBS(1.2 mM CaCl₂를 포함한 TBS, pH7.6)에서 세정되었다. 그 후, 1 mg/mL의 트립신 0.5 mL를 첨가한 비즈는 실온에서 15분 혼탁된 후, 즉시 자기 스탠드를 사용해서 비즈가 분리되어 파지 용액이 회수되었다. 회수된 파지 용액이 대수 증식기(OD600이 0.4-0.7)로 한 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37°C에서 1시간 느리게 상기 대장균의 교반 배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염된 대장균은 225 mm x 225 mm의 플레이트에 과종되었다. 이어서, 과종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리 액이 조제되었다. 패닝은 합계 3회 반복되었다.
- [0823] (25-3) Biacore에 의한 마우스 IgA 결합 항체의 결합능 평가
- [0824] 3회째의 패닝 종료 후에 얻어진 대장균으로부터 취득된 파지미드로부터 추출된 항체 분절 유전자가 동물 세포 발현용 벡터에 삽입되었다. 항체의 발현은 이하의 방법을 사용해서 행해졌다. 인간 태아 신장 세포 유래 FreeStyle 293-F주(Invitrogen Corp.)가 FreeStyle 293 Expression Medium 배지(Invitrogen Corp.)에 혼탁되고, 2.63×10^5 세포/mL의 세포 밀도에서 96웰 플레이트의 각 웰에 190 μL 씩 과종되었다. 제조된 플라스미드는 리포제션법에 의해서 세포에 도입되었다. CO₂ 배양(37°C, 8% CO₂) 중에서 4일간 배양이 행해졌다.
- [0825] 상기 방법에 의해 얻어진 배양 상청을 사용하고, BiacoreA100을 사용해서 GC-mIgA에의 결합능이 해석되었다. 아민 커플링법으로 적절한 양의 proteinA/G(PIERCE)가 고정화된 sensor chip CM5(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)에 대하여 배양 상청 중의 항체를 캡처시켰다. 런닝 버퍼에는 20 mM ACES, 150 mM NaCl, 0.05%(w/v) Tween20, 1.2 mM CaCl₂(pH7.4) 및 20 mM ACES, 150 mM NaCl, 0.05%(w/v) Tween20, 1.2 mM CaCl₂(pH5.8)의 2종의 완충액이 사용되고, 중성 영역 pH 및 산성 영역 pH의 조건 중에서의 항원 항체 반응의 상호 작용이 해석되었다. GC-mIgA의 희석에도 각각의 버퍼가 사용되고, 유속 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 에서 60초간 주입함으로써 센서 칩 상에 캡처된 항체와 상호 작용시켰다. 그 후, 10 mM 글리신-HCl(pH1.5)을 유속 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 에서 30초간 주입함으로써 센서 칩이 재생되었다. 측정은 모두 25°C에서 실시되었다.
- [0826] 상기 Biacore에서의 결합 평가의 결과, GC-mIgA에 대해서 pH 의존적 결합능을 갖는다고 판단된 항체로서 mIAP1B3-3_#024(중쇄 서열 번호: 123, 경쇄 서열 번호: 124), mIAP1B3-3_#130(중쇄 서열 번호: 125, 경쇄 서열 번호: 126), mIAP1B3-3_#230(중쇄 서열 번호: 127, 경쇄 서열 번호: 128)가 얻어졌다. 이를 항체의 pH7.4 및

pH5.8의 센서그램을 도 14에 나타냈다. 버퍼 중의 pH를 pH7.4~pH5.8로 함으로써 마우스 IgA에 대한 결합능이 저감되는 것이 관찰되었다.

[0827] 이들 항체에 대해서 발현에 사용된 동물 세포 발현용 백터로부터 항체 유전자의 염기 서열이 해석되었다.

[0828] 실시예 3에서는 His 라이브러리 1로부터 IL-6R에 대해서 pH 의존적으로 항원(IL-6R)과의 상호 작용이 변화하는 항체가 취득되지만, pH 의존적으로 항원에 결합하는 항체는 IL-6R뿐만 아니라 마우스 IgA에서도 취득될 수 있다는 것이 밝혀졌다.

[0829] [실시예 26] pH 의존적으로 인간 HMGB1에 결합하는 항체의 취득

[0830] (26-1) 인간 HMGB1 및 비오틴을 부가한 인간 HMGB1의 조제

[0831] 인간 HMGB1(서열 번호: 129), 및 비오틴을 부가한 인간 HMGB1-Avi(비오틴 표식 hHMGB1이라고 하고, hHMGB1-Avitag: 서열 번호 130)가 이하와 같이 조제되었다.

[0832] (26-1-1) 인간 HMGB1의 조제

[0833] 인간 HMGB1의 재조합형인 hHMGB1은 이하와 같이 조제되었다. hHMGB1(서열 번호: 129)을 부호화하는 유전자 분절이 동물 세포 발현용 백터에 포함되었다. 구축된 플라스미드 백터는 FreeStyle293(Invitrogen Corp.)에 293Fectin(Invitrogen Corp.)을 사용해서 EBNA1을 발현하는 유전자와 함께 도입되었다. 그 후, 유전자 도입된 세포를 37°C, CO₂ 8%에서 배양해서 hHMGB1 단백질을 배양 상청 중에 분비시켰다. PBS로 평형화된 후에 얻어진 배양 상청이 부하된 HiTrap SP Sepharose HP(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)를 PBS로 세정 후, 염화나트륨의 직선적 농도 구배에 의해서 칼럼에 흡착한 단백질을 용출시켰다. 20 mM 히스티딘-HCl, pH5.0에서 평형화된 후에 같은 완충액에서 3배로 희석된 상기의 hHMGB1을 포함한 용출 분획이 부하되었다. 같은 완충액에서 세정된 칼럼으로부터 칼럼에 흡착된 단백질을 염화나트륨의 직선적 농도 구배에 의해서 용출시켰다. 한외 여과막으로 농축된 hHMGB1을 포함한 분획을 300 mM NaCl, 20 mM 히스티딘, pH6.0에서 평형화된 Superdex200 칼럼(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)에 부하되었다. 같은 완충액으로 분리함으로써 hHMGB1 정제 분획이 얻어졌다.

[0834] (26-1-2) 비오틴 표식 인간 HMGB1의 조제

[0835] 비오틴을 목적 단백질(인간 HMGB1)의 C말단에 부가하기 위해서 인간 HMGB1 영역을 부호화하는 유전자 분절의 하류에 비오틴 리가아제에 의해서 비오틴이 부가되는 특이적인 서열(Avitag 서열)을 부호화하는 유전자 분절이 연결되었다. 인간 HMGB1과 Avitag 서열이 연결된 단백질(hHMGB1-Avitag(서열 번호: 130))을 부호화하는 유전자 분절이 동물 세포 발현용 백터에 포함되었다. 구축된 플라스미드 백터가 FreeStyle293(Invitrogen Corp.)에 293Fectin(Invitrogen Corp.)을 사용해서 유전자 도입되었다. 이때 EBNA1을 발현하는 유전자 및 비오틴 리가아제(BirA)를 발현하는 유전자를 동시에 도입하여 비오틴을 첨가함으로써 비오틴 표식시켰다. 상술한 순서에 따라서 유전자가 도입된 세포를 37°C, CO₂ 8%에서 배양하여 목적하는 단백질을 배양 상청 중에 분비시켰다.

[0836] PBS로 평형화된 후, 상기에서 얻어진 배양 상청이 부하된 HiTrap SP Sepharose HP(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)를 PBS에서 세정 후, 염화나트륨의 직선적 농도 구배에 의해서 칼럼에 흡착한 단백질을 용출시켰다. TBS로 평형화된 SoftLink Soft Release Avidin Resin 칼럼(Promega사)에 100 mM Tris-HCl, pH7.4로 2배 희석된 HMGB1-Avi를 포함한 분획이 부하되었다. TBS로 세정된 칼럼으로부터 칼럼에 흡착된 단백질을 5 mM Biotin을 포함한 TBS(pH8.0)에서 용출시켰다. 한외 여과막으로 농축된 HMGB1-Avi를 포함한 분획이 300 mM NaCl, 20 mM 히스티딘, pH6.0에서 평형화된 Superdex200 칼럼(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)에 부하되었다. 같은 완충액으로 분리함으로써 Biotin화된 HMGB1-Avi 정제 분획이 얻어졌다.

[0837] (26-2) 비즈 패닝에 의한 His 라이브러리에서의 pH 의존적으로 항원에 결합하는 항체 분절의 취득

[0838] 구축된 pH 의존적으로 항원에 결합하는 항체 라이브러리(His 라이브러리 1)에서의 최초의 선별은 항원(인간 HMGB1)의 결합능을 지표로서 실시되었다.

[0839] 구축된 과지 디스플레이용 과지미드를 유지한 대장균으로부터 과지가 생산되었다. 과지가 생산된 대장균의 배양 액에 2.5 M NaCl/10% PEG를 첨가해서 침전시킨 과지의 집단을 TBS에서 희석함으로써 과지 라이브러리 액이 얻어졌다. 이어서, 과지 라이브러리 액에 최종 농도 4% BSA, 1.2 mM 칼슘 이온이 되도록 BSA, 및 CaCl₂가 첨가되어 차단된 과지 라이브러리 액이 조제되었다. 패닝방법으로서 일반적인 방법인 자기 비즈에 고정화한 항원을 사용한 패닝방법이 참조되었다(J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9, J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203, Biotechnol. Prog. (2002) 18(2) 212-20, Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9). 자기

비즈로서 NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) 또는 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)가 사용되었다.

[0840] 구체적으로는 조제된 파지 라이브러리 액에 250 pmol의 비오틴 표식 항원(비오틴 표식 hHMGB1)을 첨가함으로써 해당 파지 라이브러리 액을 실온에서 60분간 항원과 접촉시켰다. BSA로 차단된 자기 비즈가 첨가되고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비즈와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비즈는 1 mL의 1.2 mM CaCl₂/TBST(50 mM Tris, 300mM NaCl, 1.2 mM CaCl₂, 0.1% Tween20, pH7.6)와 1 mL의 1.2 mM CaCl₂/TBS(50mM Tris, 300mM NaCl, 1.2 mM CaCl₂, pH7.6)에서 세정되었다. 그 후, 1 mg/mL의 트립신 0.5 mL가 첨가된 비즈는 실온에서 15분 혼탁된 후, 즉시 자기 스탠드를 사용해서 비즈가 분리되어 파지 용액이 회수되었다. 회수된 파지 용액이 대수 증식기(OD600이 0.4~0.7)로 한 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37°C에서 1시간 느리게 상기 대장균의 교반 배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염된 대장균은 225 mm x 225 mm의 플레이트에 퍼종되었다. 이어서, 퍼종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리 액이 조제되었다.

[0841] 2회째 이후의 패닝은 항원 결합능 또는 pH 의존적 결합능을 지표로 파지의 농축이 행해졌다. 구체적으로는 조제한 파지 라이브러리 액에 40 pmol의 비오틴 표식 항원을 첨가함으로써 파지 라이브러리를 실온에서 60분간 항원과 접촉시켰다. BSA로 차단된 자기 비즈가 첨가되고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비즈와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비즈는 1 mL의 1.2 mM CaCl₂/TBST 및 1.2 mM CaCl₂/TBS에서 복수회 세정되었다. 그 후 항원 결합능을 지표로서 농축할 경우는 1 mg/mL의 트립신 0.5 mL를 첨가한 비즈는 실온에서 15분 혼탁된 후, 즉시 자기 스탠드를 사용해서 비즈가 분리되어 파지 용액이 회수되었다. pH 의존적 항원 결합능을 지표로 농축할 경우는 Round2에서는 0.4 mL, Round3 이후에서는 0.1 mL의 50 mM MES/1.2 mM CaCl₂/150 mM NaCl(pH5.5)가 첨가되어 비즈는 실온에서 혼탁된 후, 자기 스탠드를 사용해서 비즈가 분리되었다. 회수된 파지 용액에 100 mg/mL의 트립신을 Round2에서는 20 μL, Round3 이후에서는 5 μL를 첨가함으로써 Fab를 제시하지 않은 파지의 pIII 단백질(헬퍼파지 유래의 pIII 단백질)이 절단되고, Fab를 제시하지 않은 파지의 대장균에 대한 감염능을 잃었다. 회수된 파지가 대수 증식기(OD600이 0.4~0.7)로 한 10 mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37°C에서 1시간 느리게 상기 대장균의 교반 배양을 행함으로써 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염된 대장균은 225 mmx 225 mm의 플레이트에 퍼종되었다. 이어서, 퍼종된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수함으로써 파지 라이브러리 액이 회수되었다. 항원 결합능 또는 pH 의존적 결합능을 지표로 하는 패닝은 3회 반복되었다.

[0842] (26-3) Phage ELISA에 의한 인간 HMGB1 결합 항체의 검사

[0843] (26-2)에서 실시된 3회째, 4회째의 패닝 후에 얻어진 대장균의 단일 콜로니로부터 상법(Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145)에 의해서 파지의 배양을 행해 파지 함유 배양 상청이 회수되었다. 최종 농도 4% BSA 및 1.2 mM 칼슘 이온 농도가 되도록 BSA 및 CaCl₂가 첨가된 파지를 함유하는 배양 상청이 이하의 순서로 ELISA에 제공되었다. Streptawell 96 마이크로터터 플레이트(F. Hoffmann-La Roche Ltd.)가 비오틴 표식 hHMGB1을 포함한 100 μL의 PBS에서 4시간 이상 코트되었다. 해당 플레이트의 각 웰을 PBST에서 세정함으로써 항원이 제거된 후, 해당 웰이 1시간 이상 250 μL의 4% BSA-TBS(50 mM Tris, 300 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, 4% BSA)에서 차단되었다. 4% BSA-TBS가 제거된 각 웰에 조제된 배양 상청이 첨가된 해당 플레이트를 37°C에서 1시간 정착함으로써 파지를 제시하는 항체를 각 웰에 존재하는 HMGB1에 결합시켰다. 1.2 mM CaCl₂/TBST(pH7.6)에서 세정된 각 웰에 1.2 mM CaCl₂/TBS(pH7.6) 또는 1.2 mM CaCl₂/150 mM NaCl/50 mM MES(pH5.5)가 첨가되고, 해당 플레이트는 37°C에서 30분간 정착 배양되었다. 1.2 mM CaCl₂/TBST(pH7.6)에서 세정한 후에 4% BSA-TBS에 의해서 회색된 HRP 결합 항 M13 항체(Amersham Pharmacia Biotech, Inc.)를 각 웰에 첨가된 플레이트를 1시간 배양시켰다. 1.2 mM CaCl₂/TBST(pH7.6)에서 세정 후, TMB 단일 용액(Invitrogen Corp.)이 첨가된 각 웰 중의 용액의 발색 반응이 황산의 첨가에 의해 정지된 후, 450 nm의 흡광도에 의해서 해당 발색이 측정되었다.

[0844] 상기 파지 ELISA의 결과, pH에 의해 인간 HMGB1에의 결합능이 변화된다고 판단된 복제에 포함되는 체분절 유전자의 염기 서열이 해석되었다.

[0845] (26-4) 인간 HMGB1에 결합하는 항체의 발현과 정제

[0846] 파지 ELISA의 결과, pH 의존적인 항원에 대한 결합능이 있다고 판단된 3항체, HM_3_2_R_017(중쇄 서열 번호: 131, 경쇄 서열 번호: 132), HM_3_2_R_054(중쇄 서열 번호: 133, 경쇄 서열 번호: 134), 및 HM_4_1_R_001(중쇄 서열 번호: 135, 경쇄 서열 번호: 136)가 각각 동물 세포 발현용 플라스미드에 삽입되었다. 항체를 이하의 방법

을 사용해서 발현시켰다.

- [0847] FreeStyle 293 Expression Medium 배지(Invitrogen Corp.)에 혼탁된 인간 태아 신장 세포 유래 FreeStyle 293-F주(Invitrogen Corp.)가 1.33×10^6 개/mL의 세포 밀도에서 6웰 플레이트의 각 웰에 3 mL씩 과종되었다. 조제된 플라스미드는 리포렉션법에 의해서 세포에 도입되었다. CO₂ 배양(37°C, 8% CO₂, 90 rpm)에서 4일간 배양이 행해졌다. rProtein A SepharoseTM Fast Flow(Amersham Biosciences, Inc.)를 사용해서 당업자 공지의 방법을 이용하여 상기에서 얻어진 배양 상청으로부터 항체가 정제되었다. 분광 광도계를 사용해서 정제된 항체 용액의 280 nm에서의 흡광도가 측정되었다. PACE법에 의해 산출된 흡광 계수를 사용함으로써 얻어진 측정값으로부터 항체 농도가 산출되었다(Protein Science 1995; 4: 2411-2423).
- [0848] (26-5) 취득된 항체의 인간 HMGB1에 대한 pH 의존적 결합능의 평가
- [0849] (26-4)에서 취득된 항체 HM_3_2_R_017(중쇄 서열 번호: 131, 경쇄 서열 번호: 132), HM_3_2_R_054(중쇄 서열 번호: 133, 경쇄 서열 번호: 134), 및 HM_4_1_R_001(중쇄 서열 번호: 135, 경쇄 서열 번호: 136)의 hHMGB1에 대한 결합 활성이 pH 의존적인지 여부를 판단하기 위해서 이들 항체와 hHMGB1과의 상호 작용이 Biacore T100(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)을 사용해서 해석되었다. 중성 영역 pH 및 산성 영역 pH의 조건으로서 각각 pH7.4 및 pH5.8의 용액 중에서 항원 항체 반응의 상호 작용이 해석되었다. 아민 커플링법으로 protein A/G(PIERCE)가 적당량 고정화된 Sensor chip CM4(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) 상에 목적하는 항체가 각각 200 RU 정도 캡쳐되었다. 런닝 버퍼에는 20 mM ACES, 150 mM NaCl, 0.05%(w/v) Tween20, 1.2 mM CaCl₂(pH7.4) 또는 20 mM ACES, 150 mM NaCl, 0.05% (w/v) Tween20, 1.2mM CaCl₂(pH5.8)의 2종류의 완충액이 사용되었다. hHMGB1의 회석에도 각각의 버퍼가 사용되었다. 측정은 모두 25°C에서 실시되었다.
- [0850] HM_3_2_R_017 항체 및 HM_3_2_R_054 항체 및 HM_4_1_R_001 항체를 사용한 항원 항체 반응의 상호 작용의 해석에 있어서, hHMGB1의 회석액과 블랭크인 런닝 버퍼를 유속 10 μL/min에서 60초간 주입함으로써 센서 칩 상에 캡쳐시켰다. HM_3_2_R_017 항체 및 HM_3_2_R_054 항체 및 HM_4_1_R_001 항체에 hHMGB1을 상호 작용시켰다. 그 후, 10 mM 글리신-HCl(pH1.5)을 유속 30 μL/min에서 30초간 주입함으로써 센서 칩이 재생되었다.
- [0851] 상기 방법에 의해 측정된 pH7.4, pH5.8에서의 센서그램을 도 15에 나타내었다.
- [0852] 상기 결과로부터, HM_3_2_R_017 항체, HM_3_2_R_054 항체 및 HM_4_1_R_001 항체는 버퍼 중의 pH를 pH7.4~pH5.8으로 함으로써 hHMGB1에 대한 결합능이 저감하는 것이 관찰되고, 인간 HMGB1에 대해서도 pH 의존적 결합 항체가 취득될 수 것을 나타냈다.
- [0853] [참고 실시예 1] 정상 마우스를 사용한 Ca 의존성 결합 항체의 항원의 혈장 중 체류성에의 영향 평가
- [0854] (1-1) 정상 마우스를 사용한 *in vivo* 시험
- [0855] 정상 마우스(C57BL/6J mouse, Charles River Japan)에 hsIL-6R(허용형 인간 IL-6 수용체: 참고 실시예 4에서 제조)을 단독 투여 또는 hsIL-6R 및 항 인간 IL-6 수용체 항체를 동시 투여한 후의 hsIL-6R 및 항 인간 IL-6 수용체 항체의 체내 동태가 평가되었다. hsIL-6R 용액(5 μg/mL), 또는 hsIL-6R과 항 인간 IL-6 수용체 항체의 혼합 용액이 미정맥에 10 mL/kg으로 단회 투여되었다. 항 인간 IL-6 수용체 항체로서는 상기의 H54/L28-IgG1, 6RL#9-IgG1, FH4-IgG1이 사용되었다.
- [0856] 혼합 용액 중의 hsIL-6R 농도는 모두 5 μg/mL이지만 항 인간 IL-6 수용체 항체 농도는 항체마다 달라 H54/L28-IgG1은 0.1 mg/mL, 6RL#9-IgG1 및 FH4-IgG1은 10 mg/mL, 이때, hsIL-6R에 대해서 항 인간 IL-6 수용체 항체는 충분량 과잉으로 존재하기 때문에 hsIL-6R은 대부분이 항체에 결합되어 있다고 생각된다. 투여 후 15분, 1시간, 1일, 2일, 4일, 7일, 14일, 21일, 28일의 시점에서 채혈이 행해졌다. 채취된 혈액을 즉시 4°C, 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리함으로써 혈장이 얻어졌다. 분리된 혈장은 측정을 실시할 때까지 -20°C 이하로 설정된 냉동실에 보존되었다.
- [0857] (1-2) ELISA법에 의한 정상 마우스 혈장 중의 항 인간 IL-6 수용체 항체 농도의 측정
- [0858] 마우스 혈장 중의 항 인간 IL-6 수용체 항체 농도는 ELISA법으로 측정되었다. 우선 Anti-Human IgG(γ -chain specific) F(ab')2 Fragment of Antibody(SIGMA)를 Nunc-Immuno Plate, MaxiSoup(Nalge nunc International)에 분주하고, 4°C에서 하룻밤 정치함으로써 Anti-Human IgG 고상화 플레이트가 작성되었다. 혈장 중 농도로서 0.64, 0.32, 0.16, 0.08, 0.04, 0.02, 0.01 μg/mL의 검량선 시료 및 100배 이상 회석된 마우스 혈장 측정 시료의 각각 분주된 Anti-Human IgG 고상화 플레이트가 25°C에서 1시간 배양되었다. 그 후 Biotinylated Anti-

human IL-6 R Antibody(R&D)를 25°C에서 1시간 반응시킨 후에 Streptavidin-PolyHRP80(Stereospecific Detection Technologies)을 25°C에서 0.5시간 반응시켰다. TMB One Component HRP Microwell Substrate(BioFX Laboratories)를 기질로서 사용해서 발색 반응이 행해졌다. 1N-Sulfuric acid(Showa Chemical)에 의해서 발색 반응이 정지된 후, 마이크로 플레이트 리더를 사용해서 발색액의 450 nm에서의 흡광도가 측정되었다. 해석 소프트웨어 SOFTmax PRO(Molecular Devices)를 사용해서 마우스 혈장 중 농도가 검량선의 흡광도를 기준으로서 산출되었다. 이 방법으로 측정된 정맥 내 투여 후의 정상 마우스에서 H54/L28-IgG1, 6RL#9-IgG1, FH4-IgG1의 혈장 중의 항체 농도의 추이를 도 16에 나타내었다.

[0859] (1-3) 전기 화학 발광법에 의한 혈장 중의 hsIL-6R 농도의 측정

[0860] 마우스의 혈장 중 hsIL-6R 농도는 전기 화학 발광법으로 측정되었다. 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 pg/mL로 조정된 hsIL-6R 검량선 시료 및 50배 이상 희석된 마우스 혈장 측정 시료와 SULFO-TAG NHS Ester(Meso Scale Discovery)에서 루테늄화한 Monoclonal Anti-human IL-6R Antibody(R&D) 및 Biotinylated Anti-human IL-6 R Antibody(R&D) 및 토실리주맙(중쇄 서열 번호: 24, 경쇄 서열 번호: 25) 용액의 혼합액을 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 샘플 중의 Free Ca 농도를 저하시켜 샘플 중의 거의 모든 hsIL-6R이 6RL#9-IgG1 또는 FH4-IgG1로부터 분리되고, 첨가한 토실리주맙과 결합한 상태로 하기 위해서 그때의 Assay buffer에는 10 mM EDTA가 포함되어 있었다. 그 후, 해당 반응액이 MA400 PR Streptavidin Plate(Meso Scale Discovery)에 분주되었다. 25°C에서 1시간 반응시킨 플레이트의 각 웰이 세정된 후, 각 웰에 Read Buffer T($\times 4$)(Meso Scale Discovery)가 더 분주되었다. 즉시 반응액은 SECTOR PR 400 reader(Meso Scale Discovery)를 사용해서 측정되었다. hsIL-6R 농도는 검량선의 응답을 해석 소프트웨어 SOFTmax PRO(Molecular Devices)를 사용해서 산출되었다. 상기 방법으로 측정된 정맥 내 투여 후의 정상 마우스에서 혈장 중의 hsIL-6R의 농도 추이를 도 17에 나타내었다.

[0861] 그 결과, hsIL-6R 단독으로는 매우 이른 소실을 나타낸 것에 대해서 hsIL-6R과 Ca 의존적인 결합이 없는 통상의 항체인 H54/L28-IgG1을 동시에 투여한 경우는 hsIL-6R의 소실을 대폭으로 느리게 했다. 그것에 대해서, hsIL-6R과 100배 이상의 Ca 의존적인 결합을 갖는 6RL#9-IgG1 또는 FH4-IgG1을 동시에 투여한 경우는 hsIL-6R의 소실이 대폭으로 가속되었다. H54/L28-IgG1을 동시에 투여한 경우와 비교해서 6RL#9-IgG1 및 FH4-IgG1을 동시에 투여한 경우는 1일 후의 혈장 중의 hsIL-6R 농도는 각각 39배 및 2배 저감되었다. 이보다 칼슘 의존적 결합 항체가 혈장 중으로부터의 항원의 소실을 가속 가능하게 하는지 확인되었다.

[0862] [참고 실시예 2] Ca 의존적 항원 결합 항체의 항원 소실 가속 효과의 향상 검토(항체 제조)

[0863] (2-1) IgG 항체의 FcRn에의 결합에 관해서

[0864] IgG 항체는 FcRn에 결합함으로써 긴 혈장 중 체류성을 갖는다. IgG와 FcRn의 결합은 산성 조건 하(pH6.0)에서만 인정되고, 중성 조건 하(pH7.4)에서 그 결합은 거의 인정되지 않는다. IgG 항체는 비특이적으로 세포에 포함되지만, 엔도솜 내의 산성 조건 하에서 엔도솜 내의 FcRn에 결합함으로써 세포 표면 상에 되돌아가고, 혈장 중의 중성 조건 하에서 FcRn으로부터 해리된다. IgG의 Fc영역에 변이를 도입하여 산성 조건 하에서 FcRn에의 결합을 잃으면 엔도솜 내에서 혈장 중에 재생되지 않기 때문에 항체의 혈장 중 체류성은 현저하게 손상된다.

[0865] IgG 항체의 혈장 중 체류성을 개선시키는 방법으로서 산성 조건 하에서 FcRn에의 결합을 향상시키는 방법이 보고되고 있다. IgG 항체의 Fc영역에 아미노산 치환을 도입하여 산성 조건 하의 FcRn에의 결합을 향상시킴으로써 엔도솜 내에서 혈장 중에의 IgG 항체의 재생 효율이 상승한다. 그 결과, IgG 항체의 혈중 중의 체류성이 개선된다. 아미노산의 치환을 도입할 때에 중요하게 고려하는 것은 중성 조건 하에서 FcRn에의 결합을 높이지 않는 것이다. 중성 조건 하에서 FcRn에 결합하는 IgG 항체는 엔도솜 내의 산성 조건 하에서 FcRn에 결합함으로써 세포 표면 상에 되돌아갈 수는 있어도 중성 조건 하의 혈장 중에서 IgG 항체가 FcRn으로부터 해리하지 않고 혈장 중에 재생되지 않기 때문에 반대로 IgG 항체의 혈장 중 체류성은 손상된다고 생각했다.

[0866] 예를 들면, Dall' Acqua 등(J. Immunol. (2002) 169 (9), 5171-5180)에 기재되어 있듯이 마우스에 투여된 아미노산 치환을 도입함으로써 중성 조건 하(pH7.4)에서 마우스 FcRn에 대한 결합이 인정받게 된 IgG1 항체의 혈장 중 체류성이 악화되는 것이 보고되고 있다. 또한, Yeung 등(J. Immunol. (2009) 182 (12), 7663-7671), Datta-Mannan 등(J. Biol. Chem. (2007) 282 (3), 1709-1717), Dall' Acqua 등(J. Immunol. (2002) 169 (9), 5171-5180)에 기재되어 있는 바와 같이, 아미노산 치환을 도입함으로써 산성 조건 하(pH6.0)에서 인간 FcRn의 결합이 향상되는 IgG1 항체 변이형은 동시에 중성 조건 하(pH7.4)에서 인간 FcRn에 대한 결합이 인정받게 된다. 게다가 원숭이에 투여된 해당 항체의 혈장 중 체류성은 개선되지 않고, 혈장 중 체류성에 변화가 인정되지 못한 것이 보고되고 있다. 그 때문에, 항체의 기능을 향상시키는 항체 공학 기술에 있어서는 중성 조건 하(pH7.4)에서 인

간 FcRn에 대한 결합을 증가시키지 않아 산성 조건 하에서 인간 FcRn에의 결합을 증가시킴으로써 항체의 혈장 중 체류성을 개선시키는 것에 주력하고 있었다. 즉, 그 Fc영역에 아미노산 치환을 도입함으로써 중성 조건 하(pH7.4)에서 인간 FcRn에 대한 결합이 증가한 IgG1 항체의 이점은 이제까지 보고되어 있지 않다.

[0867] Ca 의존적으로 항원에 결합하는 항체는 가용형 항원의 소실을 가속시키고, 1개의 항체 분자가 복수회 반복 가용형의 항원에 결합하는 효과를 갖기 때문에, 매우 유용하다. 이 항원 소실 가속 효과를 더욱 향상시키는 방법으로서 중성 조건 하(pH7.4)에서 FcRn에 대한 결합을 강화하는 방법이 검증되었다.

[0868] (2-2) 중성 조건 하에서 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 Ca 의존적 인간 IL-6 수용체 결합 항체의 조제

[0869] 칼슘 의존적 항원 결합능을 갖는 FH4-IgG1, 6RL#9-IgG1, 및 대조로서 사용된 칼슘 의존적 항원 결합능을 갖지 않는 H54/L28-IgG1의 Fc영역에 아미노산 변이를 도입함으로써 중성 조건 하(pH7.4)에서 FcRn에 대한 결합을 갖는 변이형이 제조되었다. 아미노산 변이의 도입은 PCR을 사용한 당업자 공지의 방법을 사용해서 행해졌다. 구체적으로는, IgG1의 중쇄 정상 영역에 대해서 EU 넘버링으로 정의되는 434위치의 아미노산인 Asn이 Trp로 치환된 FH4-N434W(중쇄 서열 번호: 94, 경쇄 서열 번호: 81)와 6RL#9-N434W(중쇄 서열 번호: 95, 경쇄 서열 번호: 79)와 H54/L28-N434W(중쇄 서열 번호: 96, 경쇄 서열 번호: 83)가 제조되었다. QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene Corp.)를 사용해서 첨부 설명서 기재된 방법을 사용해서 그 아미노산이 치환된 변이체를 부호화하는 폴리뉴클레오티드가 삽입된 동물 세포 발현 벡터가 제조되었다. 항체의 발현, 정제, 농도 측정은 실시예 15에 기재된 방법에 준해서 실시되었다.

[0870] [참고 실시예 3] 정상 마우스를 사용한 Ca 의존성 결합 항체의 소실 가속 효과의 평가

[0871] (3-1) 정상 마우스를 사용한 *in vivo* 시험

[0872] 정상 마우스(C57BL/6J mouse, Charles River Japan)에 hsIL-6R(허용형 인간 IL-6 수용체: 참고 실시예 4에서 제조)이 단독으로 투여된 또는 hsIL-6R 및 항 인간 IL-6 수용체 항체가 동시 투여된 후의 hsIL-6R 및 항 인간 IL-6 수용체 항체의 체내 동태가 평가되었다. hsIL-6R 용액(5 μg/mL), 또는 hsIL-6R과 항 인간 IL-6 수용체 항체의 혼합 용액이 미정맥에 10 mL/kg로 단회 투여되었다. 항 인간 IL-6 수용체 항체로서 상술한 H54/L28-N434W, 6RL#9-N434W, FH4-N434W가 사용되었다.

[0873] 혼합 용액 중의 hsIL-6R 농도는 모두 5 μg/mL이지만, 항 인간 IL-6 수용체 항체의 농도는 항체마다 달라 H54/L28-N434W는 0.042 mg/mL, 6RL#9-N434W는 0.55 mg/mL, FH4-N434W는 1 mg/mL로 조제되었다. 이때, hsIL-6R에 대해서 항 인간 IL-6 수용체 항체는 충분량 과잉으로 존재하기 때문에 hsIL-6R의 대부분은 항체에 결합되어 있다고 생각되었다. 투여 후 15분, 1시간, 1일, 2일, 4일, 7일, 14일, 21일, 28일의 시점에서 채혈이 행해졌다. 채취된 혈액을 즉시 4°C, 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리함으로써 혈장이 얻어졌다. 분리된 혈장은 측정을 실시할 때까지 -20°C 이하로 설정된 냉동실에서 보존되었다.

[0874] (3-2) ELISA법에 의한 정상 마우스 혈장 중의 항 인간 IL-6 수용체 항체의 농도 측정

[0875] 마우스 혈장 중의 항 인간 IL-6 수용체 항체 농도는 참고 실시예 1과 마찬가지로 ELISA법에 의해 측정되었다. 이 방법으로 측정된 정맥 내 투여 후의 정상 마우스에서 H54/L28-N434W, 6RL#9-N434W, FH4-N434W 항체의 혈장 중의 항체 농도의 추이를 도 18에 나타내었다.

[0876] (3-3) 전기 화학 발광법에 의한 혈장 중 hsIL-6R 농도 측정

[0877] 마우스의 혈장 중 hsIL-6R 농도가 전기 화학 발광법으로 측정되었다. 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 pg/mL로 조제된 hsIL-6R 검량선 시료 및 50배 이상 희석된 마우스 혈장 측정 시료와 SULFO-TAG NHS Ester(Meso Scale Discovery)으로 루테늄화한 Monoclonal Anti-human IL-6R Antibody(R&D) 및 Biotinylated Anti-human IL-6 R Antibody(R&D)의 혼합액을 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 샘플 중의 Free Ca 농도를 저하시키고, 샘플 중의 거의 모든 hsIL-6R이 6RL#9-N434W 또는 FH4-N434W로부터 분리되어 free체로서 존재하는 상태로 하기 위해서 그때의 Assay buffer에는 10 mM EDTA가 포함되어 있었다. 그 후, 해당 반응액이 MA400 PR Streptavidin Plate(Meso Scale Discovery)에 분주되었다. 25°C에서 1시간 반응시킨 플레이트의 각 웰을 세정한 후, 각 웰에 Read Buffer T(×4)(Meso Scale Discovery)가 분주되었다. 즉시 반응액은 SECTOR PR 400 reader(Meso Scale Discovery)를 사용해서 측정되었다. hsIL-6R 농도는 검량선의 응답으로부터 해석 소프트웨어 SOFTmax PRO(Molecular Devices)를 사용해서 산출되었다. 상기 방법으로 측정된 정맥 내 투여 후의 정상 마우스에서 혈장 중의 hsIL-6R의 농도 추이를 도 19에 나타내었다.

[0878] 그 결과, pH7.4에서 FcRn에 대한 결합 활성을 갖는 반면 hsIL-6R에 대한 Ca 의존적인 결합 활성을 갖지 않는

H54/L28-N434W 항체가 동시에 투여된 경우는 hsIL-6R이 단독으로 투여된 경우와 비교해서 hsIL-6R의 소실이 대폭으로 지연되었다. 대조적으로, hsIL-6R에 대해서 100배 이상의 Ca 의존적인 결합을 갖고, pH7.4에서 FcRn에 대한 결합을 갖는 6RL#9-N434W 항체 또는 FH4-N434W 항체가 동시에 투여된 경우는 hsIL-6R이 단독으로 투여된 경우보다 hsIL-6R의 소실이 가속되었다. hsIL-6R이 단독으로 투여된 경우와 비교해서 6RL#9-N434W 항체 또는 FH4-N434W 항체가 동시에 투여된 경우는 투여 후 1일에서의 혈장 중의 hsIL-6R 농도가 각각 3배 및 8배 저감했다. 이 결과, 칼슘 의존적으로 항원에 대해서 결합하는 항체에 대해서 pH7.4에서 FcRn에 대한 결합 활성을 부여함으로써 혈장 중으로부터 항원의 소실이 더 가속화될 수 있다는 것이 확인되었다.

[0879] hsIL-6R에 대한 Ca 의존적인 결합을 갖지 않는 H54/L28-IgG1 항체와 비교해서 hsIL-6R에 대해서 100배 이상의 Ca 의존적인 결합 활성을 갖는 6RL#9-IgG1 항체 또는 FH4-IgG1 항체는 hsIL-6R의 소실을 증대시키는 효과가 확인되었다. hsIL-6R에 대해서 100배 이상의 Ca 의존적인 결합을 갖고, pH7.4에서 FcRn에 대한 결합을 갖는 6RL#9-N434W 항체 또는 FH4-N434W 항체는 hsIL-6R의 소실을 hsIL-6R 단독 투여보다 가속하는 것이 확인되었다. 이를 데이터는 pH 의존적으로 항원에 결합하는 항체와 마찬가지로 Ca 의존적으로 항원에 결합하는 항체가 엔도솜 내에서 항원을 분리하는 것을 시사하고 있다.

[참고 실시예 4] 가용형 인간 IL-6 수용체(hsIL-6R)의 조제

[0881] 항원인 인간 IL-6 수용체의 재조합형 인간 IL-6 수용체는 이하와 같이 조제되었다. Mullberg 등(J. Immunol. (1994) 152, 4958-4968)에 보고되어 있는 N말단측 1번재~357번재의 아미노산 서열로 이루어지는 가용형 인간 IL-6 수용체(이하, hsIL-6R)의 CHO 정상 발현주가 당업자 공지의 방법으로 구축되었다. 해당 발현주를 배양함으로써 hsIL-6R이 발현되었다. 얻어진 배양 상청으로부터, Blue Sepharose 6 FF 칼럼 크로마토그래피, 젤 여과 칼럼 크로마토그래피에 의해서 hsIL-6R이 정제되었다. 최종 공정에서 메인 피크로서 용출된 분획이 최종 정제품으로서 사용되었다.

[참고 실시예 5] NMR에 의한 칼슘 이온 결합 모티프를 갖는 인간 hV_k1 서열을 포함한 항체의 칼슘 이온 결합 활성의 평가

[0883] (5-1) 항체의 발현과 정제

[0884] NMR 측정에 사용되기 위해서 발현시킨 LfV_k1_Ca를 포함한 항체와 LfV_k1을 포함한 항체가 정제되었다. 구체적으로는, LfV_k1_Ca를 포함한 항체(LfV_k1_Ca 항체라고도 함)는 중쇄(서열 번호: 24)와 경쇄(서열 번호: 43)를 각각 발현시킬 수 있도록 조제된 동물 발현용 플라스미드가 동물 세포에 일시적으로 도입되었다. 또한, LfV_k1을 포함한 항체(LfV_k1 항체라고도 함)는 중쇄(서열 번호: 24)와 경쇄(서열 번호: 44)를 각각 발현시킬 수 있도록 조제된 동물 발현용 플라스미드를 동물 세포에 일시적으로 도입시켰다. 최종 세포 밀도 $\times 10^6$ 세포/mL가 되도록 FreeStyle 293 Expression Medium 배지(Invitrogen Corp.)에 혼탁된 100 mL의 인간 태아 신장 세포 유래 FreeStyle 293-F주(Invitrogen Corp.)의 세포 혼탁액에 표지 아미노산이 첨가되었다. 구체적으로는 Asp/Glu/Gln/Asn 표지체에 대해서는 L-Aspartic acid-¹³C₄, ¹⁵N(10 mg), L-Glutamic acid-¹³C₅, ¹⁵N(2.5 mg), L-Glutamine-¹³C₅, ¹⁵N(60 mg), L-Asparagine-¹³C₄, ¹⁵N₂·H₂O(2.5 mg), β -chloro-L-alanine(6 mg)을 10 mL의 물에 혼탁한 용액을 0.22 μm 필터로 여과한 액을 첨가했다. Leu 표지체에 대해서는 L-Leucine-¹⁵N(30 mg), β -chloro-L-alanine(6 mg)을 10 mL의 물에 혼탁한 용액을 0.22 μm 필터로 여과한 액을 첨가했다. 리포펙션법에 의해 조제된 플라스미드를 세포에 도입시켰다. 플라스미드가 도입된 세포는 CO₂ 배양(37°C, 8% CO₂, 90 rpm) 중에서 5일간 배양되었다. rProtein A SepharoseTM Fast Flow(Amersham Biosciences, Inc.)를 사용한 당업자 공지의 방법에 따라 상기와 같이 얻어진 배양 상청으로부터 항체가 정제되었다. 분광 광도계를 사용해서 정제된 항체 용액의 280 nm에서의 흡광도가 측정되었다. PACE법에 의해서 산출된 흡광 계수를 사용해서 측정값으로부터 항체 농도가 산출되었다(Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

[0885] (5-2) Fab 분절의 조제

[0886] 분자량 분획 크기 30,000 MWCO의 한외 여과막을 사용해서 각종 항체가 8.2-11.8 mg/mL까지 농축되었다. L-시스테인 1 mM, EDTA 2 mM, 50 mM 아세트산/125 mM 트리스 완충액(pH 6.8)을 사용해서 8 mg/mL로 희석된 해당 항체의 시료가 조제되었다. 각 항체에 대해서 1/240 양의 과파인(Roche Applied Science)을 첨가해서 교반시킨 해당 시료가 37°C에서 1시간 정치되었다. 정치 후, 각각 하류에 1 mL 크기의 ProteinA 담체 칼럼 HiTrap MabSelect Sure(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)이 텐덤으로 연결된 50 mM 아세트산/125 mM 트리스 완충액(pH 6.8)으

로 평형화된 Gly-Gly-Tyr-Arg(Sigma) 펩티드를 결합한 1 mL 크기의 HiTrap NHS-activated HP(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)에 첨가되었다. 상류의 Gly-Gly-Tyr-Arg 펩티드에 의해서 활성화 파파인을 제거하는 동시에 하류의 ProteinA 담체 칼럼 Fc 분절 및 미소화 항체를 제거함으로써 Fab 분절의 정제 분획을 얻었다. Fab 분획에 포함되는 불활성 파파인이 활성화되는 것을 막기 위해서 Fab 분획에는 시스테인 프로테아제 저해제 E64(Sigma)를 10 μM 첨가했다. 또한, 상기 모든 칼럼 조작은 20-25°C의 실온 하에서 실시되었다.

[0887] (5-3) LfVkl_Ca 항체 및 LfVkl 항체의 Fab 분절의 NMR 시료 조제

항체 용액을 MWCO 5000의 한외 여과기 Vivaspin(Sartorius)를 사용해서 0.5 mL까지 원심에 의해 농축했다. 이어서 상기 한외 여과기에 다아필트레이션컵을 설치해서 NMR용 완충액: 5 mM d-BisTris, 20 mM NaCl, 0.001%(w/v) NaN₃, 5%(v/v) ²H₂O, pH7.0(NaOH, HCl을 사용해서 pH를 조제한)에 완충액 치환(디아필트레이션컵에 상기 완충액을 5 mL 더해서 0.5 mL까지 원심 농축하는 것을 3회 반복한)을 행하고, 최후에 0.25 mL까지 농축했다. 최후에, NMR 완충액으로 한외 여과기를 씻어 넣고, 농축액과 함께 항체 용액을 LfVkl_Ca 항체에 대해서는 420 μL, LfVkl 항체에 대해서는 270 μL로 했다. 이 단계에서 다시 pH를 확인하고, 필요에 따라서 NaOH, HCl에 의해 pH7.0으로 조정했다. UV측정기 Nanodrop(Thermo Fisher Scientific)를 사용해서 280 nm에서의 흡광도를 측정하고, 280 nm에서의 물 흡광 계수를 70000 M⁻¹ · cm⁻¹로서 Fab 분절을 정량했다. Leu 표지 LfVkl_Ca 항체, Leu 표지 LfVkl 항체는 0.12 mM, Asp, Glu, Asn, Gln 표지 LfVkl_Ca 항체, Asp, Glu, Asn, Gln 표지 LfVkl 항체는 0.24 mM로 되었다. 이를 시료 내, LfVkl_Ca 항체에 대해서는 직경 5 mm의 NMR 시료관(shigemi)에 LfVkl 항체에 대해서는 직경 5 mm의 수용액용 대칭형 마이크로 시료관(shigemi)에 패스퇴르 피펫을 사용해서 충전했다. LfVkl_Ca 항체의 Ca²⁺ 적정 실험에서는 항체 용액에 항체에 대해서 Ca²⁺가 1, 2, 5, 10, 20를 등량이 되도록 CaCl₂ 용액을 순서대로 첨가했다. 첨가에 사용한 CaCl₂ 용액에는 NMR 베퍼에 용해시킨 10, 20, 50, 100 mM CaCl₂ 용액을 준비했다. 주사기 부분을 기성품으로부터 연장한 특주 마이크로 주사기(ITO)에 의해 첨가 용량이 3-10 μL의 범위가 되도록 CaCl₂ 용액의 필요량을 직접 NMR 시료관에 충전된 항체 용액에 첨가하고, 시료관을 볼텍스 먹서에 의해 교반 후, 수동 원심기(Shimadzu)에 의해 원심 분리했다.

[0889] (5-3) LfVkl_Ca 항체 및 LfVkl_Ca 항체의 Fab 분절의 아미드기 신호를 관측하기 위한 NMR 측정

NMR 측정에는 TCI CryoProbe를 설치한 NMR 분광기 DRX750(Bruker Biospin)를 사용했다. 설정 온도를 307K(GasFlow 535 L/h)로 했다. 아미드기 신호를 관측하기 위한 NMR 측정에는 ¹H-¹⁵N HSQC를 사용했다. 측정법으로서는 ¹⁵N 전개기에 α 탄소와 카르보닐 탄소의 동시 ¹³C 디커플링, 및 용매수 신호 제거를 위한 3-9-19 펄스 트레인을 따르는 ¹H-¹⁵N FHSQC를 사용하고, 그것을 제어하는 펄스 프로그램에는 메이커(Bruker Biospin)에 의해 표준으로 준비되어있는 것을 사용했다. NMR의 측정 조건은 이하와 같다. 스펙트럼 폭: 12019 Hz (f2), 1976 Hz (f1), 데이터 포인트: 2048 (f2), 128 (f1). 데이터 처리에는 Topspin 3.0(Bruker Biospin)를 사용했다. 데이터 처리 조건은 이하와 같다. f2, f1과 함께 윈도우 함수로서 shifted Sine(QSINE)을 곱하고, 2배의 데이터 포인트수가 되도록 제로 필팅을 행한 후에 푸우리에 변환을 행했다. 신호의 화학 시프트는 NMR 해석 소프트웨어 Sparky(UCSF)을 사용해서 산출했다.

[0891] (5-4) 주쇄 아미드기의 NMR 신호의 귀속

이제까지 토실리주맵(중쇄 서열 번호: 24, 경쇄 서열 번호: 25)의 Fab 분절의 주쇄 아미드기의 NMR 신호 내, 80%가 귀속되었다(데이터 미공개). LfVkl_Ca 항체의 Fab 분절의 아미노산 서열은 경쇄 CDR1, CDR2, CDR3의 일부, 및 경쇄 73, 83번의 아미노산 잔기를 제외하고, 토실리주맵과 Fab 분절의 아미노산 서열과 같다. 양항체 아미노산 서열이 같은 부분에 대해서는 그 NMR 신호가 동일한 화학 시프트를 갖거나 그들이 가깝기 때문에 토실리주맵의 귀속 정보를 이행하는 것이 가능했다. Leu 표지 시료는 경쇄11, (33), (46), (47), (54), (78), 125, 135, 136, 154, 175, 179, 181, 201, 중쇄18, 46, 64, 71, 81, 83, 114, 144, 147, 165, 176, 181, 184, 195 이 귀속을 이행하는 것이 가능했다. 상기, 팔호가 붙지 않은 번호는 토실리주맵과 동일한 화학 시프트이기 때문에 귀속이 이행될 수 있었던 잔기 번호, 팔호가 붙은 번호는 토실리주맵과 가까운 화학 시프트를 갖고 있고, 그 이외에 가까운 화학 시프트를 갖는 신호가 없기 때문에 귀속이 가능한 잔기 번호였다. 한편, Asp, Glu, Asn, Gln 표지 시료에 대해서는 LfVkl_Ca 항체와 LfVkl 항체의 스펙트럼을 비교하여 4개의 신호가 LfVkl_Ca에서 새롭게 관측되고 있었다. 이것은, 이 양항체 사이에서 Asp, Glu, Asn, Gln 잔기 내, Ca²⁺ 결합 모티프로서 도입한

서열이 다른 경쇄 Asp30, 31, 32, 92, Glu50의 5잔기 내의 어느 하나가 4잔기 유래라고 분류될 수 있었다.

[0893] (5-5) Ca^{2+} 의 LfVkl_Ca 항체의 결합 부위의 확인

[0894] LfVkl_Ca 항체의 Fab 분절의 Ca^{2+} 미첨가 상태와 20몰 등량 첨가의 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC 스펙트럼을 비교해서 화학 시프트가 변화하고 있는 신호를 추출했다. 그 결과, Leu 표지 시료로부터는 경쇄 Leu33이 결합에 관여하고 있고, 그 이외의 Leu 잔기는 결합에 관여하지 않는 것으로 나타났다. 또한, Asp, Glu, Asn, Gln 표지 시료로부터는 경쇄 Asp30, 31, 32, 92, Glu50의 5잔기 내의 어느 하나가 4잔기가 결합에 관여하고, 그 이외의 Asp, Glu, Asn, Gln 잔기 내의 1잔기를 제외한 모든 것이 결합에 관여하지 않는 것으로 밝혀졌다. 이상의 것으로부터, Ca^{2+} 결합 모티프로서 도입된 아미노산 서열 내, 적어도 경쇄 CDR1, 이것에 더해서 경쇄 CDR2, CDR3 모두 또는 어느 하나의 아미노산이 Ca^{2+} 결합에 관여하고 있다고 확인되었다. 이것은 실시예 15에서 확인된 30위치, 31위치, 32위치, 50 위치 및 92위치(Kabat 넘버링) 중 4개가 hVkl5-2 서열의 아미노산인 것이 칼슘 이온의 결합에 중요한 결과와 일치하고 있다.

[0895] (5-6) 적정 실험에서 Ca^{2+} 해리 정수의 산출

[0896] Ca^{2+} 농도가 LfVkl_Ca 항체의 Fab 분절에 대해서 0, 1, 2, 5, 10, 20 몰등량할 때의 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC 스펙트럼을 이용했다. 결합 부위로서 확인된 경쇄 Leu33 신호의 ^1H 또는 ^{15}N 화학 시프트를 세로축에, 상기 Ca^{2+} 의 몰등량을 가로축에 플롯하고, 그래프 작성 소프트웨어 Gnuplot을 사용해서 이하의 식 2로 나타내는 함수의 피팅을 행했다.

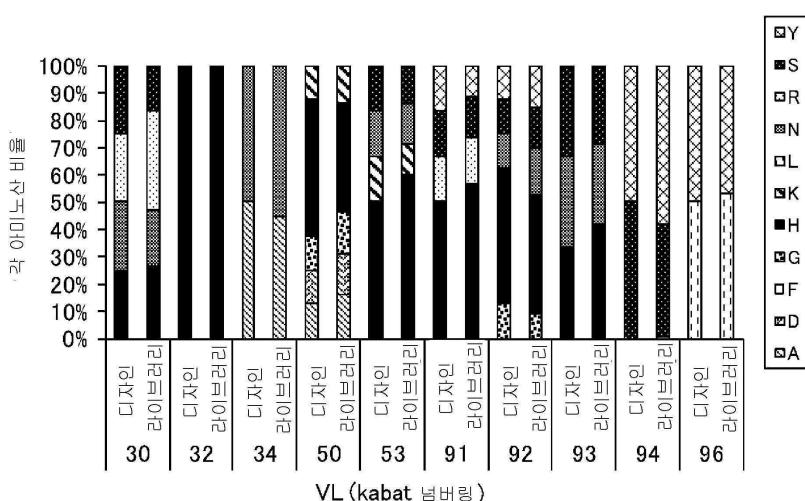
[식 2]

$$f(x) = s \times [1 - 0.5/a \times \{(a \times x + a + Kd) - ((a \times x + a + Kd)^2 - 4 \times x \times a^2)^{0.5}\}] + t \times [0.5/a \times \{(a \times x + a + Kd) - ((a \times x + a + Kd)^2 - 4 \times x \times a^2)^{0.5}\}]$$

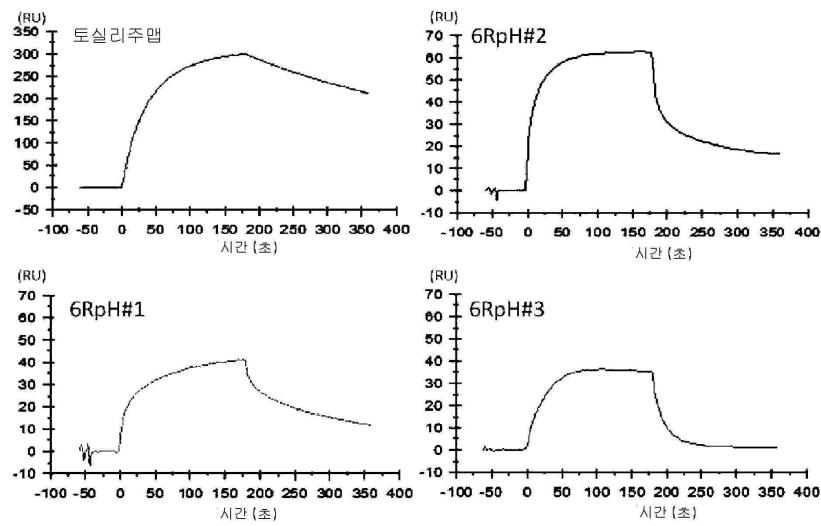
[0899] 식 2로 표시되는 함수에 대해서 s, t는 각각 Ca^{2+} 비결합시의 화학 시프트[ppm], Ca^{2+} 포화 결합시의 추정 화학 시프트[ppm], a는 항체 Fab 분절 농도[M], Kd는 해리 정수, x는 항체 Fab 분절에 대해서 첨가한 Ca^{2+} 의 몰등량을 나타내고 있다. 피팅할 때에는 s, t, Kd를 피팅 파라미터로 했다. 그 결과, ^1H 화학 시프트로부터는 $Kd = 7.1 \times 10^{-5} [\text{M}]$, ^{15}N 화학 시프트로부터는 $Kd = 5.9 \times 10^{-5} [\text{M}]$ 로서 책정되었다.

도면

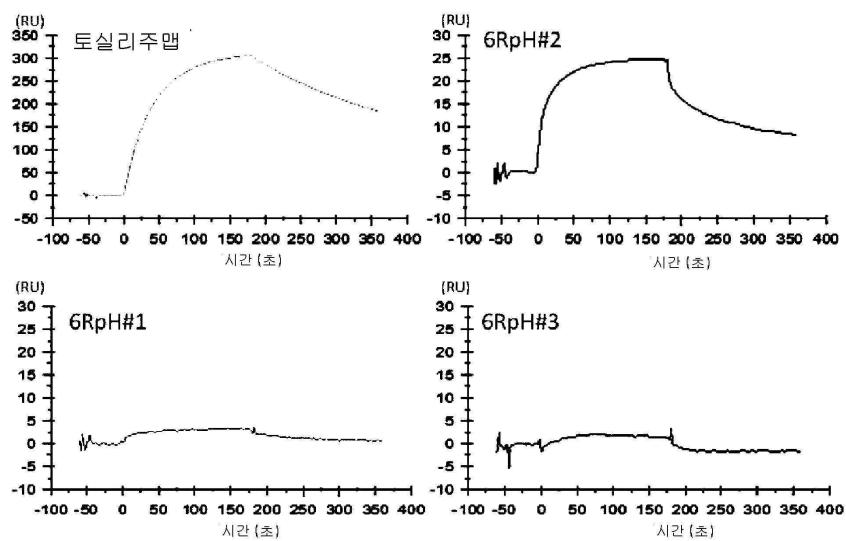
도면1



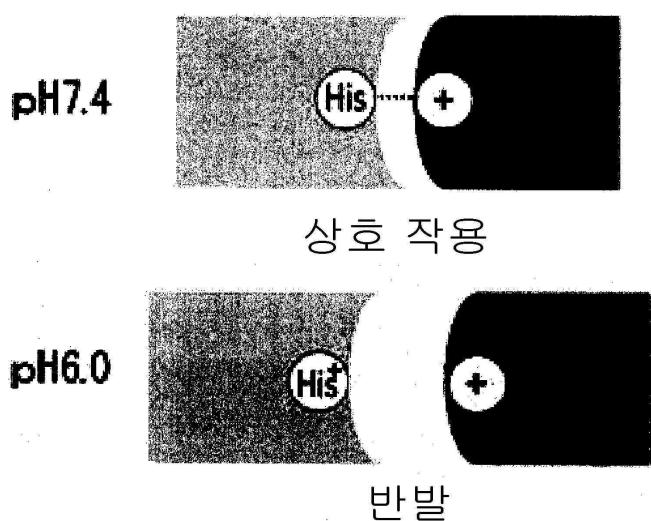
도면2



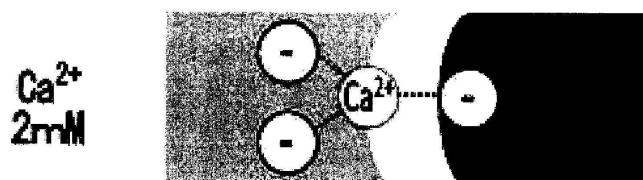
도면3



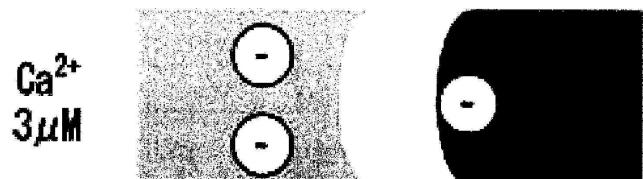
도면4a



도면4b

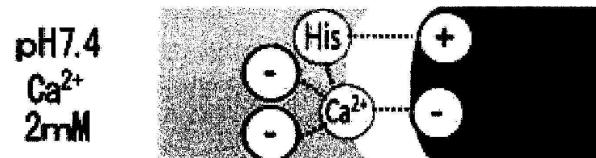


상호 작용

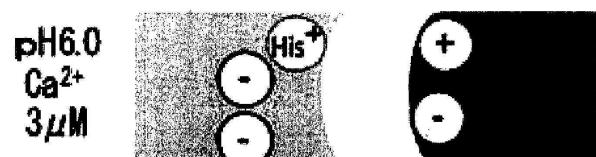


반발

[図4C]

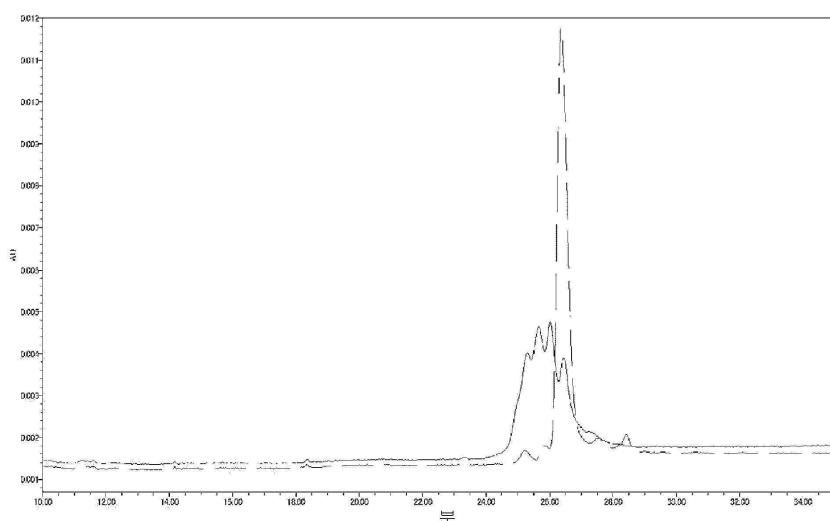


상호 작용

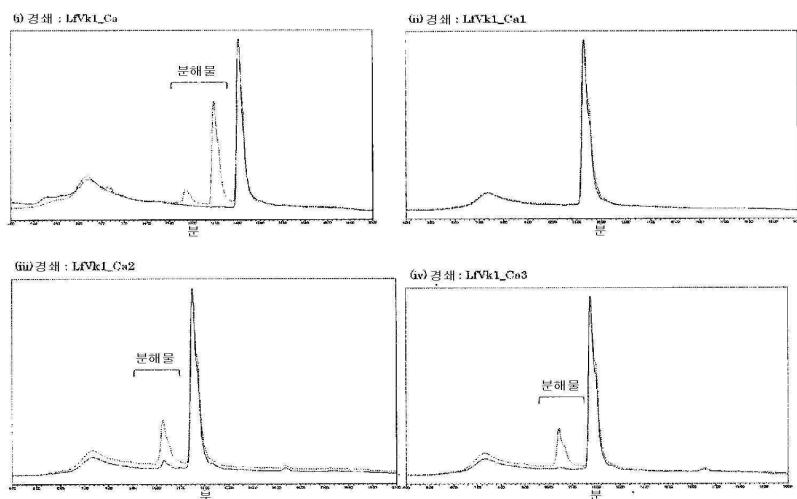


반발

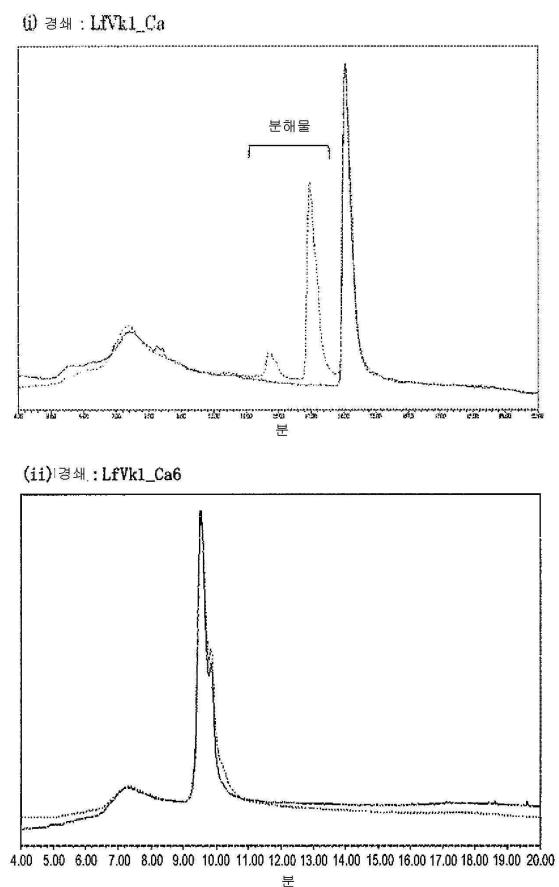
도면5



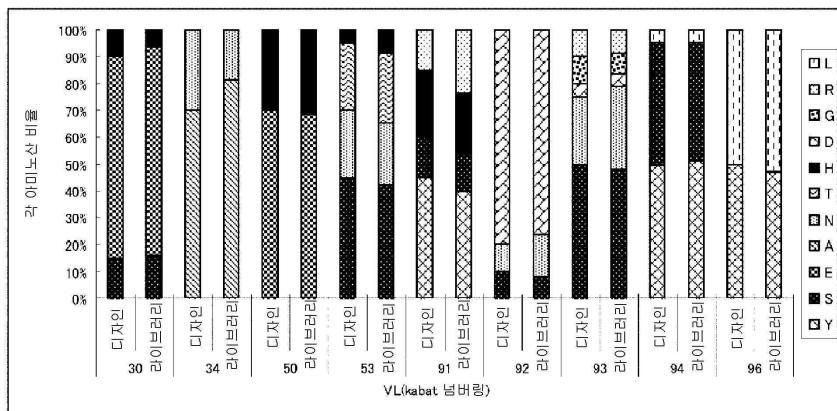
도면6



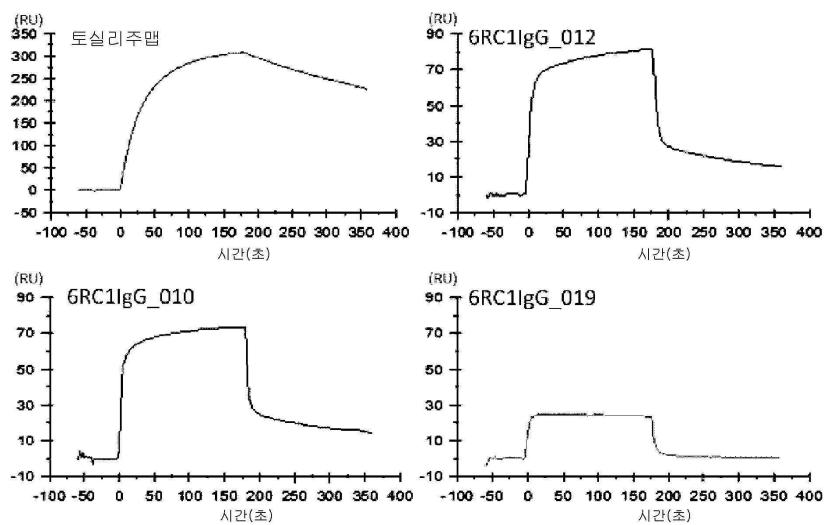
도면7



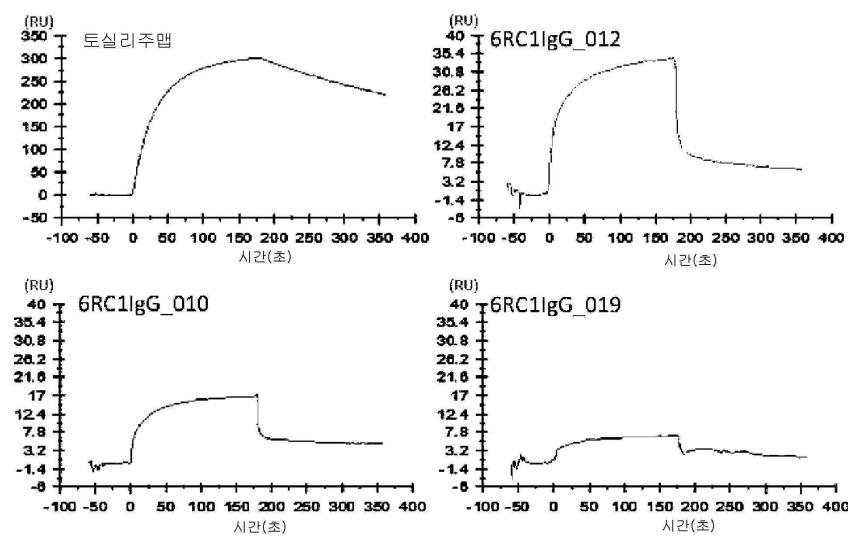
도면8



도면9

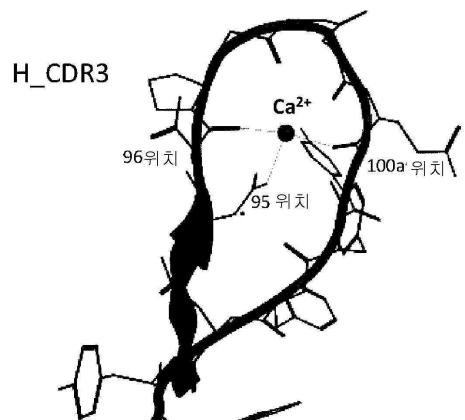


도면10

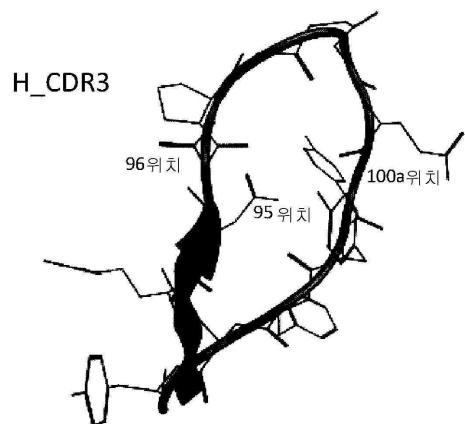


도면11

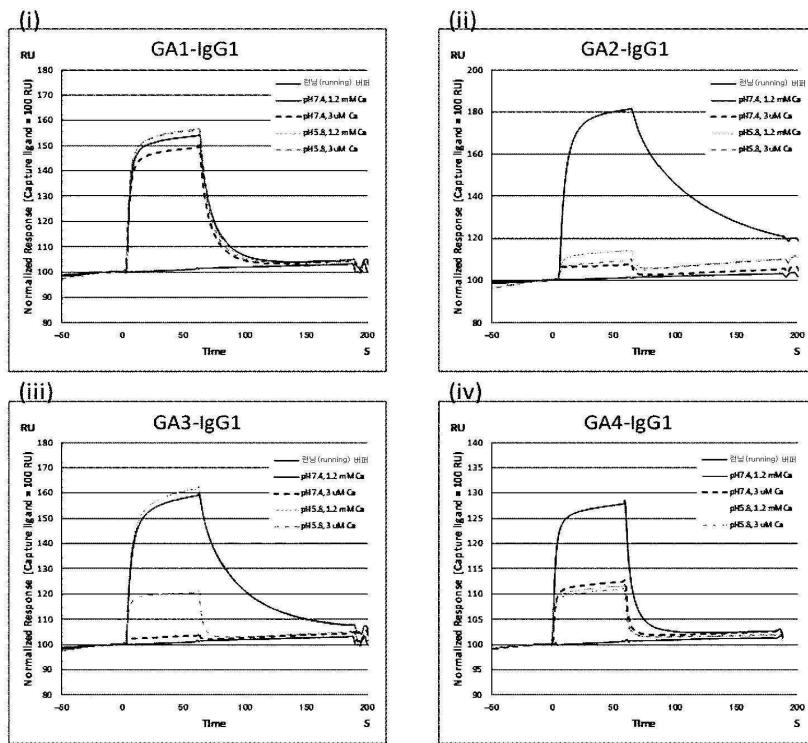
(i) 칼슘 이온 존재 하에서의 결정 구조



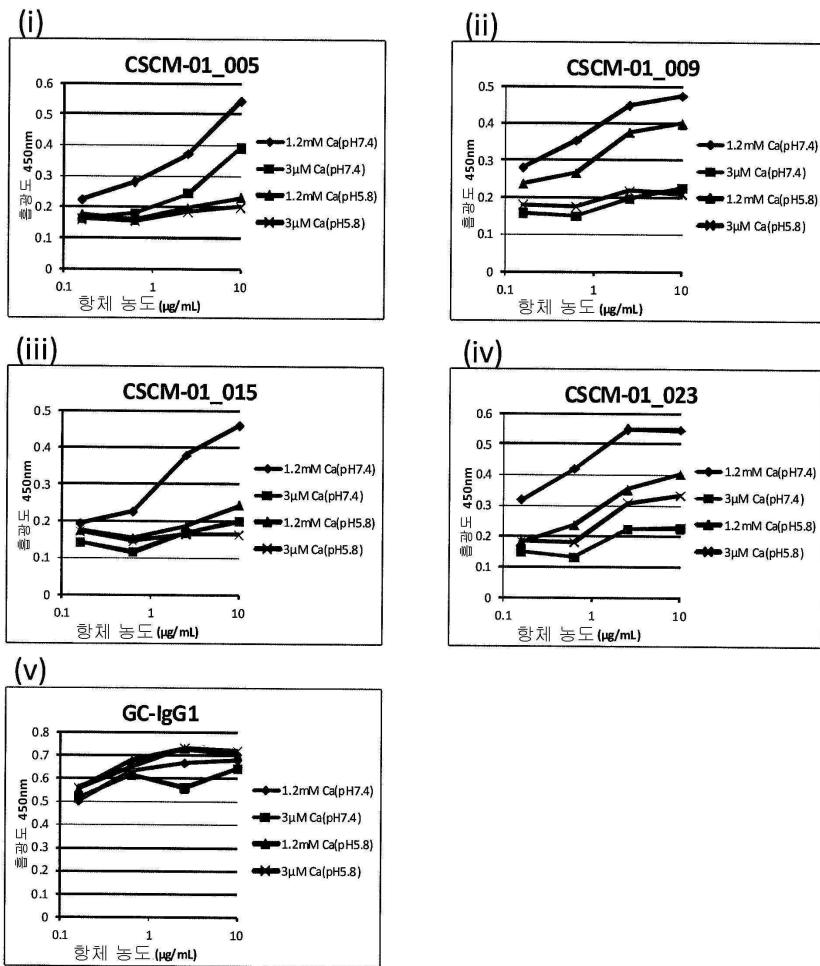
(ii) 칼슘 이온 비존재 하에서의 결정 구조



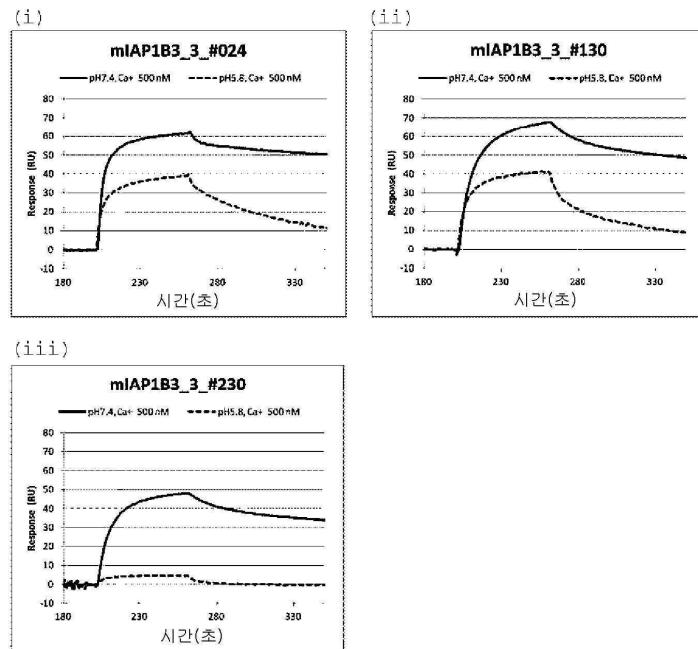
도면12



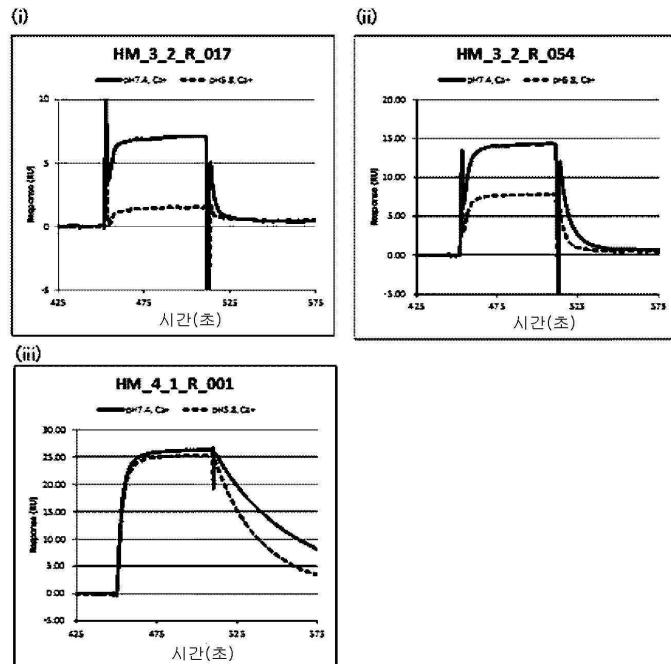
도면13



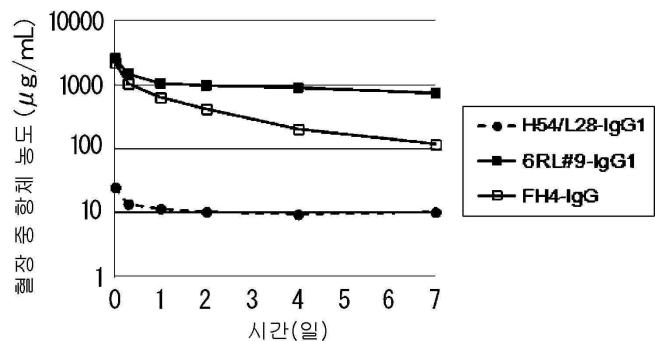
도면14



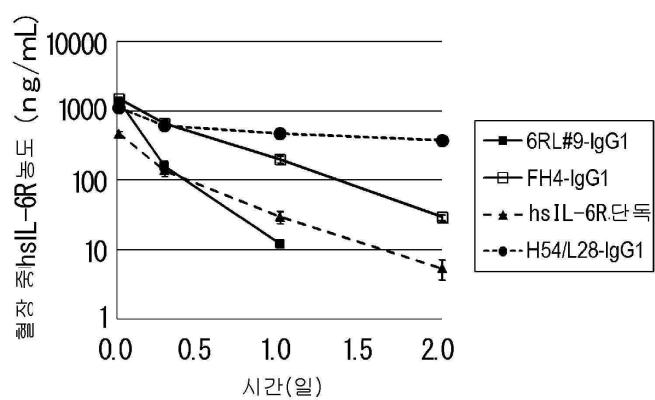
도면15



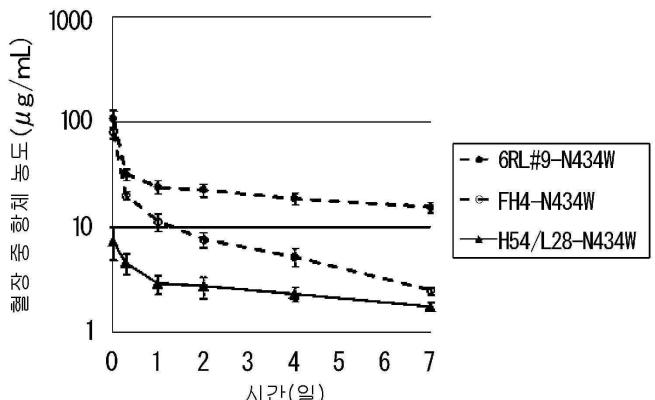
도면16



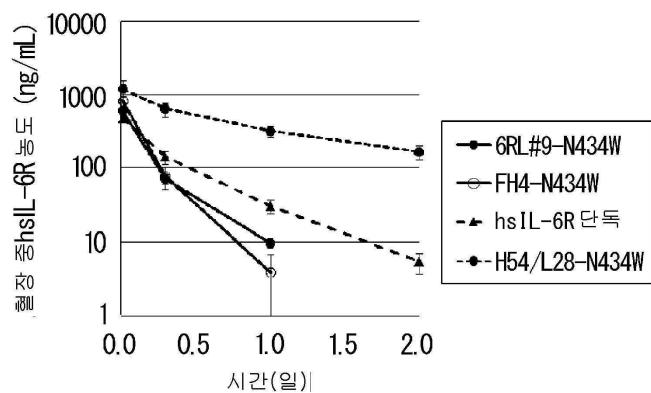
도면17



도면18



도면19



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha
<120> library of ionic concentration-dependent binding molecules
<130> PCG-9036WO
<150> JP 2011-218006
<151> 2011-09-30
<150> JP 2012-123479
<151> 2012-05-30
<160> 136
<170> PatentIn version 3.1
<210> 1
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> modified antibody fragment
<400> 1
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
1 5 10 15
Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp
20 25 30
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile
35 40 45
Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 2

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 2

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp

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

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 3

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 3

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

Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser			
65	70	75	80

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Leu			
85	90	95	

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 4			
<211> 445			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> modified antibody fragment			
<400> 4			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr			
20	25	30	
Ile Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
35	40	45	
Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Pro Gln Phe			
50	55	60	
Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Asp Gly Tyr Asp Asp Gly Pro Tyr Thr Leu Glu Thr Trp Gly			
100	105	110	
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser			

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

435 440 445

<210> 5

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 5

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln 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> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 6

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105

<210> 7

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Gly Asp Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

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

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

100	105	110
-----	-----	-----

<210> 10

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Asp Pro Gly Gly Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 11

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 12
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> modified antibody fragment
 <400> 12
 Gly Arg Met Lys Gln Leu Glu Asp Lys Val Glu Glu Leu Leu Ser Lys
 1 5 10 15
 Asn Tyr His Leu Glu Asn Glu Val Ala Arg Leu Lys Lys Leu Val Gly
 20 25 30
 Glu Arg Gly

35
 <210> 13
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> modified antibody fragment
 <400> 13
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser

<210> 14

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
<210> 15
<211> 326
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> modified antibody fragment
<400> 15
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 16

<211> 377

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro

100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg

115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys

130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195	200	205
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu		
210	215	220
Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		
225	230	235
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys		240
245	250	255
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln		
260	265	270
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met		
275	280	285
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro		
290	295	300
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn		
305	310	315
Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu		320
325	330	335
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile		
340	345	350
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln		
355	360	365
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
370	375	
<210> 17		
<211> 327		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> modified antibody fragment		
<400> 17		
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg		
1	5	10
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		15

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

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

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

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe		
165	170	175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
180	185	190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu		
195	200	205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
210	215	220

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

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 18

<211> 458

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 18

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ala Ser Ile Tyr Cys Ser Ser Thr Ser Cys Tyr Glu Pro Pro
 100 105 110

Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Met Val Thr Val
 115 120 125

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

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

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 385 390 395 400

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 405 410 415

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 420 425 430

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 435 440 445

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455

<210> 19

<211> 214

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 19

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser His
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Asn Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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
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> 447
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> modified antibody fragment
<400> 20

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr		

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

85	90	95
Met Ile Asn Gly Val Trp Glu Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly		

100	105	110
Thr Thr 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
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
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
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 Asp Glu Leu 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

435 440 445

<210> 21

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 21

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile His Ser His

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Gly Asn Ser Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 22
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> modified antibody fragment
 <400> 22

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

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

Tyr Cys Val Ala Asp Val Pro Ala Ser Asn Pro Tyr Gly Phe Asp Tyr

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 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val

195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys 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 Gly 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 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln		
355	360	365
Val Ser Leu Thr Cys Leu 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
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr 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		
450		
<210> 23		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> modified antibody fragment		
<400> 23		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser His		
20	25	30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Ile		
35	40	45
Tyr Asp Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Asn Tyr Pro Leu		

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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	215	220
-----	-----	-----

<210> 24

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 24

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

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

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

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu

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

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

 <210> 25
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> modified antibody fragment
 <400> 25
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 26		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> modified antibody fragment		
<400> 26		
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		
1	5	10
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
20	25	30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 27

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 28

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 28

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

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

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

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

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

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

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Leu Asp Thr Gly Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp

100	105	110
-----	-----	-----

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115	120
-----	-----

<210> 29

<211> 124

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 29

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

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

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

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

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Pro Val Pro Gly Val Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp

100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 30

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 30

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 31

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 31

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

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

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 32

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

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp

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

Met Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile

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

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

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

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

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

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

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

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 33

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

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp

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

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

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

<210> 34

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 35

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 35

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln 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> 36

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 36

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln 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> 37

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 37

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly

1 5 10 15

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

20	25	30
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile		
35	40	45
Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser		
65	70	75
Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln 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> 38		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> modified antibody fragment		
<400> 38		
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly		

1	5	10	15
Asp Lys Val Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp			
20	25	30	
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile			
35	40	45	
Gln Ala Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser			
65	70	75	80
Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr			
85	90	95	
Thr Phe Gly Gln 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> 39			
<211> 214			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> modified antibody fragment			

<400> 39

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly

1 5 10 15
Asp Lys Val Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Ala Asp Ala20 25 30
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile35 40 45
Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly50 55 60
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys210
<210> 40

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 40

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln 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> 41

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 41

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly

1	5	10	15
Asp Lys Val Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Ala Asp Ala			
20	25	30	
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile			
35	40	45	
Gln Ala Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser			
65	70	75	80
Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr			
85	90	95	
Thr Phe Gly Gln 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> 42		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> modified antibody fragment		
<400> 42		
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly		
1	5	10
Asp Lys Val Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp		
20	25	30
Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile		
35	40	45
Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser		
65	70	75
Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Ala Asn Phe Pro Tyr		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln 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
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> 43		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> modified antibody fragment		
<400> 43		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Asp Asp		
20	25	30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Thr Pro Tyr		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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
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> 44		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> modified antibody fragment		
<400> 44		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr		
20	25	30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 45

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 45

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Thr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 46

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 46

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

1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ala Asp

20 25 30

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

35 40 45
Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Thr Pro Tyr

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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
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> 47
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> modified antibody fragment
<400> 47

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

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

65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Thr Pro Tyr			

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 48

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 48

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe

50 55 60

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

65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr			
100	105	110	
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro			
115	120	125	
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val			
130	135	140	
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala			
145	150	155	160
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly			
165	170	175	
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly			
180	185	190	
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys			
195	200	205	
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys			
210	215	220	
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu			
225	230	235	240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu			
245	250	255	
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys			
260	265	270	
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
275	280	285	
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu			
290	295	300	
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys			
305	310	315	320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440
 <210> 49
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> modified antibody fragment
 <400> 49
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Asp
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Thr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 50

<211> 456

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 50

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

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

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

450 455

<210> 51

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 51

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35	40	45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Lys Ala Pro Gly Ile Gln Leu Trp Leu Arg Pro Ser Tyr Phe Asp		
100	105	110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys		
115	120	125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly		
130	135	140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro		
145	150	155
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr		
165	170	175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val		
180	185	190
Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn		
195	200	205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro		
210	215	220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu		
225	230	235
240		
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
245	250	255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
260	265	270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
275	280	285

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

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

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

<210> 52
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> modified antibody fragment
<400> 52

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

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

Ser Asp Tyr Trp Gly Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Thr Thr Gln Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg His Arg Gly Pro Thr Gly Val Asp Gln Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu 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
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 Asp Glu Leu 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
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		
435	440	445
<210> 53		
<211> 449		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> modified antibody fragment		
<400> 53		
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg		
1	5	10
Ser Leu Thr Leu Ser Cys Val Gly Tyr Gly Phe Thr Phe His Glu Asn		
20	25	30
Asp Met His Trp Leu Arg Gln Pro Leu Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		

35	40	45
Ser His Ile Gly Trp Asn Asn Asn Arg Val Ala Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Ala Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe		
65	70	75
Leu His Met Asn Ser Leu Arg Pro Asp Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Lys Asp Leu Gly Asn Pro Ile Tyr Asp Val Phe Asp Val Trp Gly		
100	105	110
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
115	120	125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
130	135	140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
145	150	155
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
165	170	175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
180	185	190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
195	200	205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys		
210	215	220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
225	230	235
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
245	250	255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
260	265	270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
275	280	285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro

<210> 54

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 54

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

Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Val Leu Gly Asp Ala Phe Asp

100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

245 250 255

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

260 265 270

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

275	280	285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn		
290	295	300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp		
305	310	315
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro		320
325	330	335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
340	345	350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn		
355	360	365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
370	375	380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
385	390	395
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		400
405	410	415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
420	425	430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
435	440	445
Ser Leu Ser Pro		
450		
<210> 55		
<211> 454		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> modified antibody fragment		
<400> 55		
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln		
1	5	10
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn		15

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

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro

450

<210> 56

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 56

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val

85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Lys Asp Pro Arg Val Trp Ala Phe Asp Ile Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260	265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
275	280	285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr		
290	295	300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
305	310	315
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro		
325	330	335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
340	345	350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val		
355	360	365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
370	375	380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
385	390	395
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
405	410	415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
420	425	430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
435	440	445
Ser Pro		
450		
<210> 57		
<211> 449		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> modified antibody fragment		
<400> 57		

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Val Leu Ala Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr His Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ser Ala Gly Tyr Gly Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

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

<210> 58

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 58

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Asn Ile Arg Ala Asp Gly Gly Gln Met Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Ile Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Pro Phe Ala Ser Gly Leu Asp Gln Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Met 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 Asp Glu Leu 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

435 440 445

<210> 59

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 59

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Leu Ile Ser His Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Asp Arg Val Arg Tyr Phe Asp Ser Tyr Gly Met Asp Val Trp

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu

225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro
 450
 <210> 60
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 60

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Phe

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu His Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg His Arg Tyr Leu Gly Gln Leu Ala Pro Phe Asp Pro Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

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

<210> 61

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 61

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asp Asn Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 62

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 62

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 63

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 63

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 64

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 64

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Gly Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 65
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> modified antibody fragment
<400> 65
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

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

65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ser Ser Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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>	66		
<211>	214		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	modified antibody fragment		
<400>	66		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp			
20	25	30	
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Tyr			
85	90	95	
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 67
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> modified antibody fragment
<400> 67

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Ser Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 68

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 68

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

1 5 10 15

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

20

25

30

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

35

40

45

Tyr His Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Tyr Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 69

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 69

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asp Ser Ser Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 70
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> modified antibody fragment
 <400> 70
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

 35 40 45
 Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Asp Tyr Pro Tyr		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 71		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> modified antibody fragment		
<400> 71		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp		
20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		

35	40	45
Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asp Asn Tyr Pro Tyr		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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
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> 72		
<211> 453		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> modified antibody fragment		
<400> 72		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr		

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

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro

450

<210> 73

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 73

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asp Ser Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 74

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 74

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ala Thr Tyr Tyr Asp Ser Ser Ala Pro Ala Phe Asp Ile

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met 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 Lys 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 Gly 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 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

 Val Ser Leu Thr Cys Leu 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 Tyr 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
 450
 <210> 75
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 75

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asp Asp Ser Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 76

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 76

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Phe Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

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

<210> 77

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 77

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Arg Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 78

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 78

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Asp Pro Gly Gly Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

305 310 315 320

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

325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435

440

445

Pro

<210> 79

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 79

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Leu Leu Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Leu Ile Ser His Asn Thr His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser His Asp Ser Ser

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 80

<211> 453

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 80

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Arg Asp Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Asp Ala Phe

100 105 110

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr

115 120 125

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

130 135 140

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

145	150	155	160
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His			
165	170	175	
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser			
180	185	190	
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys			
195	200	205	
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu			
210	215	220	
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro			
225	230	235	240
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys			
245	250	255	
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val			
260	265	270	
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp			
275	280	285	
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr			
290	295	300	
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp			
305	310	315	320
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu			
325	330	335	
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg			
340	345	350	
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys			
355	360	365	
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp			
370	375	380	
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys			
385	390	395	400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Pro
 450
 <210> 81
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> modified antibody fragment
 <400> 81
 Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Thr Asp Ile Asp Asp Asp
 20 25 30
 Met Asn Trp Phe Gln Gln Glu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Ser Glu Gly Asn Ile Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
 50 55 60
 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Lys Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln 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> 82
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> modified antibody fragment
 <400> 82

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

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

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

435	440	445
<210> 83		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> modified antibody fragment		
<400> 83		

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
		15

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala		
65	70	75
		80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Tyr		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu 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> 84
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> modified antibody fragment
 <400> 84

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

Phe Asp Ala Ser Asn Arg Ala Ala Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Lys Trp Val Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Thr Val Glu Ile Arg
 100 105
 <210> 85

<211> 454

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 85

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Ala Pro Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Ala

100 105 110

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 210 215 220
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

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

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

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

 435 440 445
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro

450
<210> 86
<211> 219
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> modified antibody fragment
<400> 86

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

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

Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln 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> 87

<211> 454

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 87

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Ala Pro Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Ala

100 105 110

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180	185	190
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		
195	200	205
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
210	215	220
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
225	230	235
Pro Glu Leu Leu Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
245	250	255
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
260	265	270
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
275	280	285
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
290	295	300
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
305	310	315
Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
325	330	335
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
340	345	350
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr		
355	360	365
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
370	375	380
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
385	390	395
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
405	410	415
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
420	425	430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro

450

<210> 88

<211> 454

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 88

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ala Ala Pro Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Ala

100 105 110

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165	170	175
-----	-----	-----

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

180	185	190
-----	-----	-----

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

195	200	205
-----	-----	-----

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

210	215	220
-----	-----	-----

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

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

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

245	250	255
-----	-----	-----

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

260	265	270
-----	-----	-----

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

275	280	285
-----	-----	-----

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

290	295	300
-----	-----	-----

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

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

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

325	330	335
-----	-----	-----

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

340	345	350
-----	-----	-----

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

355	360	365
-----	-----	-----

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

370	375	380
-----	-----	-----

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

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

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

405	410	415
-----	-----	-----

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450

<210> 89

<211> 454

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 89

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asp Ala Pro Tyr Tyr Ala Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Ala
 100 105 110

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 130 135 140

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

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

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

165	170	175
-----	-----	-----

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

180	185	190
-----	-----	-----

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

195	200	205
-----	-----	-----

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

210	215	220
-----	-----	-----

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

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

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

245	250	255
-----	-----	-----

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

260	265	270
-----	-----	-----

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

275	280	285
-----	-----	-----

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

290	295	300
-----	-----	-----

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

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

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

325	330	335
-----	-----	-----

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

340	345	350
-----	-----	-----

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

355	360	365
-----	-----	-----

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

370	375	380
-----	-----	-----

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

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

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

405 410 415

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

420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro

450

<210> 90

<211> 454

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 90

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Ala Pro Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Thr Ala Ala

100 105 110

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115 120 125

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

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

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450

<210> 91

<211> 454

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 91

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Ala Pro Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Ala
 100 105 110

Phe Ala Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115	120	125
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr		
130	135	140
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		
145	150	155
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val		
165	170	175
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser		
180	185	190
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		
195	200	205
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
210	215	220
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
225	230	235
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
245	250	255
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
260	265	270
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
275	280	285
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
290	295	300
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
305	310	315
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
325	330	335
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
340	345	350
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr		
355	360	365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

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

435	440	445
Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
450		
<210> 92		
<211> 213		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> modified antibody fragment		
<400> 92		

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

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

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

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

210

<210> 93

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 93

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

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

65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Ala Lys Trp Val Thr			

85 90 95

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

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

195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 94
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> modified antibody fragment
 <400> 94

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

35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Glu Arg Asp Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Asp Ala Phe			
100	105	110	
Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr			
115	120	125	
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser			
130	135	140	
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu			
145	150	155	160
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His			
165	170	175	
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser			
180	185	190	
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys			
195	200	205	
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu			
210	215	220	
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro			
225	230	235	240
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys			
245	250	255	
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val			
260	265	270	
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp			
275	280	285	
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr			
290	295	300	
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp			
305	310	315	320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys

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

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

<210> 95
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> modified antibody fragment
<400> 95

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

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

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

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

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

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

<210> 96
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> modified antibody fragment
<400> 96
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

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

50	55	60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser		
65	70	75
Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly		
100	105	110
Thr Leu 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
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
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 Asp Glu Leu 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 Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
<210> 97
<211> 464
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><233> modified antibody fragment
<400> 97
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu

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

Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr

305 310 315 320

Phe Thr Cys Thr Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu

370 375 380

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

385 390 395 400

Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile

405 410 415

Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys

420 425 430

Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile

435 440 445

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

450 455 460

<210> 98

<211> 458

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 98

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

85 90 95

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

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

210 215 220

Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Cys Cys His Pro
 225 230 235 240
 Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser
 245 250 255
 Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp Ala Ser Gly
 260 265 270
 Val Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser Ala Val Gln Gly

275 280 285

Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val Ser Ser Val Leu
 290 295 300
 Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr Phe Thr Cys Thr
 305 310 315 320
 Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala Thr Leu Ser Lys
 325 330 335
 Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser
 340 345 350
 Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg
 355 360 365
 Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln
 370 375 380
 Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro
 385 390 395 400
 Ser Gln Gly Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala
 405 410 415
 Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His
 420 425 430
 Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala
 435 440 445
 Gly Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
 450 455
 <210> 99
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> modified antibody fragment

 <400> 99
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln 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> 100

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 100

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr Phe

65 70 75 80

Thr Cys Thr Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala Thr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met

180 185 190

Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp

195 200 205

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

210 215 220

Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu

225 230

<210> 101

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 101

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285

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

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

 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro
 450
 <210> 102
 <211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 102

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asp Ser Ser Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 103
<211> 451
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> modified antibody fragment
<400> 103

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Arg Trp Glu Thr Ala Ile Ser Ser Asp Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met 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 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val

195	200	205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys 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
Leu Gly Gly 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
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 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln		
355	360	365
Val Ser Leu Thr Cys Leu 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
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr 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

450

<210> 104

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 104

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ser Ser Ser Pro Leu

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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 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> 105

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 105

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Asn Gly Asp Tyr Leu Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu 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 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 Asp Glu Leu 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
<210> 106		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> modified antibody fragment		
<400> 106		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Asp		
20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asp Ser Ser Pro Leu		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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
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> 107

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 107

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ile Leu Gly Gly Ser Ile Ser Gly His

20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Asp Asn Trp Asp Phe Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Trp Phe Asp

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys

405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro
 450
<210> 108

<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> modified antibody fragment
<400> 108
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asp Asp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr His Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Asn Ser Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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>	109		
<211>	545		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	modified antibody fragment		
<400>	109		
Gln Pro Pro Pro Pro Pro Asp Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser			
1	5	10	15
Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro			
20	25	30	
Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys			
35	40	45	
Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn			
50	55	60	
Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile			
65	70	75	80
Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg			
85	90	95	
His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala Met Phe Lys Asn Asn Tyr Pro Ser			
100	105	110	
Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val			
115	120	125	
Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp Ile Asn Val Asp Asp Met Val Asn			

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

Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn
 385 390 395 400
 Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly

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

465 470 475 480
 Cys Ile Gly Gly Ala Gly Asp Gly Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu
 485 490 495
 Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro
 500 505 510
 Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe
 515 520 525
 His Asn Leu Gly Asn Val His Ser Pro Leu Lys His His His His His

530 535 540
 His
 545
<210> 110
<211> 443
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> modified antibody fragment
<400> 110
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Ala Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

245 250 255

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

260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

275

280

285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

290

295

300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

305 310 315 320

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

325

330

335

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

340

345

350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

355

360

365

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

370

375

380

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

385 390 395 400

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

405

410

415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

420

425

430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435

440

<210> 111

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 111

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

1 5 10 15

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

20

25

30

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 112
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment
 <400> 112
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Pro Ala Gly Arg His Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr
 100 105 110
 Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
 115 120 125
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 130 135 140
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 145 150 155 160
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 165 170 175
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 180 185 190
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 195 200 205
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 210 215 220
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 225 230 235 240
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 245 250 255
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

260	265	270
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys		
275	280	285
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
290	295	300
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
305	310	315
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		320
325	330	335
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
340	345	350
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
355	360	365
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
370	375	380
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
385	390	395
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		400
405	410	415
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
420	425	430
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
435	440	445
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
450	455	
<210> 113		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> modified antibody fragment		
<400> 113		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 114

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 114

Gln Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Asp Arg Thr Pro Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Leu Asp Tyr

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

355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu 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 Tyr 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

450

<210> 115

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 115

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asp Ser Ser Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 116

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 116

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Asp Thr Ser Thr Ser Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Pro Leu Leu Trp Phe Gly Glu Pro Phe Asp Tyr

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 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val

195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys 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 Gly 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 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Thr Cys Leu 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 Tyr 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
 450

<210> 117

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 117

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 118

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 118

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

1 5 10 15

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

20

25

30

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

35

40

45

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe

50

55

60

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

65 70 75 80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145 150 155 160
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly

165

170

175

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

180	185	190
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys		
195	200	205
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys		
210	215	220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu		
225	230	235
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys		
260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
290	295	300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
305	310	315
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
325	330	335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
340	345	350
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
355	360	365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
370	375	380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
385	390	395
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
405	410	415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
420	425	430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 119
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> modified antibody fragment
 <400> 119

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

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

Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
 85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln 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> 120

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 120

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

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

Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

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

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

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

100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Ala Arg Asn Pro Thr Ile Tyr Pro Leu Thr Leu
 115 120 125

Pro Pro Val Leu Cys Ser Asp Pro Val Ile Ile Gly Cys Leu Ile His
 130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Phe Gly Thr Met Asn Val Thr Trp Gly Lys Ser Gly
 145 150 155 160
 Lys Asp Ile Thr Thr Val Asn Phe Pro Pro Ala Leu Ala Ser Gly Gly

165	170	175
Arg Tyr Thr Met Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Val Glu Cys Pro		
180	185	190
Glu Gly Glu Ser Val Lys Cys Ser Val Gln His Asp Ser Asn Pro Val		
195	200	205
Gln Glu Leu Asp Val Asn Cys Ser Gly Pro Thr Pro Pro Pro Ile		
210	215	220
Thr Ile Pro Ser Cys Gln Pro Ser Leu Ser Leu Gln Arg Pro Ala Leu		
225	230	235
Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser Asp Ala Ser Ile Thr Cys Thr Leu Asn		
245	250	255
Gly Leu Arg Asn Pro Glu Gly Ala Ala Phe Thr Trp Glu Pro Ser Thr		
260	265	270
Gly Lys Asp Ala Val Gln Lys Lys Ala Ala Gln Asn Ser Cys Gly Cys		
275	280	285
Tyr Ser Val Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Arg Trp Asn Ser		
290	295	300
Gly Ala Ser Phe Lys Cys Thr Val Thr His Pro Glu Ser Gly Thr Leu		
305	310	315
Thr Gly Thr Ile Ala Lys Val Thr Val Asn Thr Phe Pro Pro Gln Val		
325	330	335
His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Leu		
340	345	350
Ser Leu Thr Cys Leu Val Arg Ala Phe Asn Pro Lys Glu Val Leu Val		
355	360	365
Arg Trp Leu His Gly Asn Glu Glu Leu Ser Pro Glu Ser Tyr Leu Val		
370	375	380
Phe Glu Pro Leu Lys Glu Pro Gly Glu Gly Ala Thr Thr Tyr Leu Val		
385	390	395
Thr Ser Val Leu Arg Val Ser Ala Glu Thr Trp Lys Gln Gly Asp Gln		
405	410	415

Tyr Ser Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Met Asn Phe Thr Gln

420 425 430

Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ser Gly Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp

435 440 445

Lys

<210> 121

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 121

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg

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

<210> 122

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 122

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

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

Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Leu Ser Leu Thr Cys			
115	120	125	
Leu Val Arg Ala Phe Asn Pro Lys Glu Val Leu Val Arg Trp Leu His			

130	135	140	
Gly Asn Glu Glu Leu Ser Pro Glu Ser Tyr Leu Val Phe Glu Pro Leu			
145	150	155	160
Lys Glu Pro Gly Glu Gly Ala Thr Thr Tyr Leu Val Thr Ser Val Leu			
165	170	175	
Arg Val Ser Ala Glu Thr Trp Lys Gln Gly Asp Gln Tyr Ser Cys Met			
180	185	190	
Val Gly His Glu Ala Leu Pro Met Asn Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp			
195	200	205	
Arg Leu Ser Gly Lys Gly Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe			
210	215	220	
Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu			
225	230		
<210> 123			
<211> 449			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> modified antibody fragment			
<400> 123			
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln			
1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Lys Thr			
20	25	30	
Tyr Ser Tyr Trp Ala Trp Ile Arg Gln His Pro Val Lys Gly Leu Glu			
35	40	45	
Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Thr His Tyr Asn Pro Ser			
50	55	60	
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Thr Ser Lys Asn His Phe			
65	70	75	80
Ser Leu Asn Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr			
85	90	95	
Cys Ala Arg Ser Gly Phe Arg Val Phe Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly			

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

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

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

435 440 445
 Pro

<210> 124
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> modified antibody fragment
 <400> 124
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Ser His
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 125

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 125

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65	70	75	80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr			
85	90	95	
Cys Ala Arg His Gly Pro Ser Gly Ser Tyr Tyr Ala Phe Asp Ile Trp			
100	105	110	
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro			
115	120	125	
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr			
130	135	140	
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr			
145	150	155	160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro			
165	170	175	
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr			
180	185	190	
Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn			
195	200	205	
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser			
210	215	220	
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu			
225	230	235	240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu			
245	250	255	
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser			
260	265	270	
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu			
275	280	285	
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr			
290	295	300	
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn			
305	310	315	320

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

325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

435 440 445

Ser Pro

450

<210> 126

<211> 214

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 126

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser His

20 25 30

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

35 40 45

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

50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg His His Ser Pro Leu		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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>	127	
<211>	452	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	modified antibody fragment	
<400>	127	
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu		
1	5	10
15		
Ser Leu Ser Leu Thr Cys Asn Val Ser Gly Tyr Tyr Ile Ser Ser Gly		
20	25	30
Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		

35	40	45
Ile Gly Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Thr Ser His Tyr Asn Pro Ser Leu		
50	55	60
Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser		
65	70	75
Leu Lys Leu Ser Ser Leu Ser Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Ala Gly Val Ile Ala Gly Gly Pro Arg Thr Tyr Ala Phe Asp		
100	105	110
Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys		
115	120	125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly		
130	135	140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro		
145	150	155
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr		
165	170	175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val		
180	185	190
Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn		
195	200	205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro		
210	215	220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu		
225	230	235
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
245	250	255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
260	265	270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
275	280	285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro
 450
 <210> 128
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> modified antibody fragment
 <400> 128
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Ser His
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His His Ser Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 129
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> modified antibody fragment
 <400> 129
 Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala
 1 5 10 15

Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp

20 25 30

Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp

35 40 45

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

50 55 60

Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro

65 70 75 80

Lys Gly Glu Thr Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu

130 135 140

Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp

180 185 190

Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu

195 200 205

Glu Asp Asp Asp Asp Glu

210

<210> 130

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 130

Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala

1 5 10 15

Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp

20 25 30

Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp

35 40 45

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

50 55 60

Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro

65 70 75 80

Lys Gly Glu Thr Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu

130 135 140

Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp

180 185 190

Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Asp

195 200 205

Glu Asp Asp Asp Asp Glu Gly Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile

210 215 220

Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu

225 230

<210> 131

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 131

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Thr Val Tyr Phe Asn Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Glu Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

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

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

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

<210> 132

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 132

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Ser Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 133

<211> 459

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 133

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Phe Trp Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180	185	190
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly		
195	200	205
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys		
210	215	220
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys		
225	230	235
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu		
245	250	255
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
260	265	270
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys		
275	280	285
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
290	295	300
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
305	310	315
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
325	330	335
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
340	345	350
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
355	360	365
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
370	375	380
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
385	390	395
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
405	410	415
Ser Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
420	425	430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

435 440 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

450 455

<210> 134

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 134

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile His Ser His

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 135

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 135

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ser Asp Gly Trp Tyr Pro Ser Trp Phe Asp

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu

340 345 350

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

355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

435 440 445

Ser Leu Ser Pro

450

<210> 136

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified antibody fragment

<400> 136

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr His Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ser Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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