(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0041626
(43) 공개일자 2015년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2851 (2013.01)
A61K 39/3955 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7003176
(22) 출원일자(국제) 2013년08월06일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2015년02월05일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2013/066432
(87) 국제공개번호 WO 2014/023709
국제공개일자 2014년02월13일
(30) 우선권주장
61/681,239 2012년08월09일 미국(US)

(71) 출원인
로슈 글리카트 아게
스위스 슐리렌-취리히 체하-8952 바기슈트라쎄 18
(72) 발명자
호퍼 토마스
스위스 체하-8046 취리히 알테 뮐라커스트라쎄 50
지 창후아
미국 뉴저지주 07039 리빙스톤 노스 드라이브 31
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인

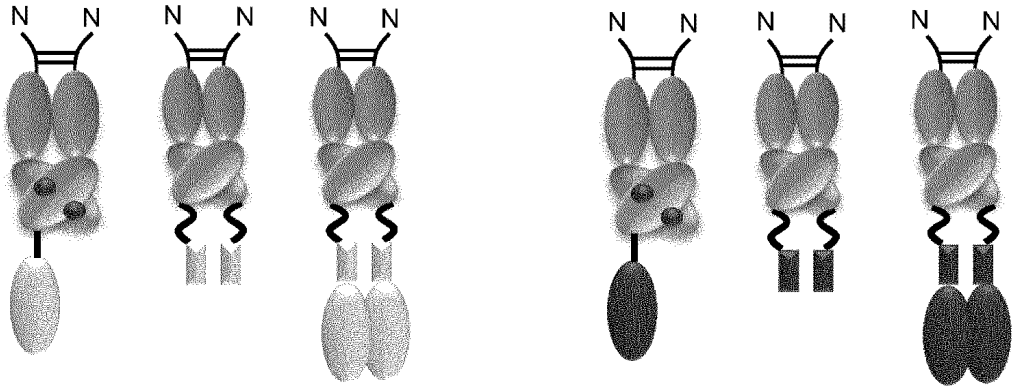
전체 청구항 수 : 총 86 항

(54) 발명의 명칭 **아시알로당단백질 수용체 항체 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 일반적으로 아시알로당단백질 수용체(ASGPR: asialoglycoprotein receptor)에 특이적인 항체 및 세포 활성에 영향을 주는 효과기 잔기를 선택적으로 전달하기 위한 이들의 용도에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이러한 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 이러한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 숙주 세포에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 본 발명의 항체를 생산하는 방법, 및 질병의 치료에 이들을 사용하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12N 15/63 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/71 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2319/01 (2013.01)
(72) 발명자
뫼쓰너 에케하드
스위스 체하-8280 크로이즈린겐 펠센부르그베그 5
우마나 파블로
스위스 체하-8832 볼러라우 펠센라인스트라쎄 28

명 세 서

청구범위

청구항 1

a) 서열 번호 16의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 14의 경쇄 가변 영역 서열;

b) 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 2의 경쇄 가변 영역 서열;

c) 서열 번호 8의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 6의 경쇄 가변 영역 서열;

d) 서열 번호 12의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 10의 경쇄 가변 영역 서열;

e) 서열 번호 20의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 18의 경쇄 가변 영역 서열;

f) 서열 번호 24의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 22의 경쇄 가변 영역 서열;

g) 서열 번호 28의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 26의 경쇄 가변 영역 서열;

h) 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 30의 경쇄 가변 영역 서열;

i) 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 32의 경쇄 가변 영역 서열;

j) 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 34의 경쇄 가변 영역 서열; 또는

k) 서열 번호 24의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 22의 경쇄 가변 영역 서열

을 포함하는, 아시알로당단백질 수용체(ASGPR: asialoglycoprotein receptor)에 특이적으로 결합할 수 있는 항체.

청구항 2

제1항에 있어서,

서열 번호 16의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 14의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체.

청구항 3

아시알로당단백질 수용체(ASGPR)의 에피토프에 결합하기 위해 제2항에 따른 항체와 경쟁하는, ASGPR에 특이적으로 결합할 수 있는 항체.

청구항 4

제3항에 있어서,

ASGPR의 자루(stalk) 영역에서 에피토프를 인식하는 항체.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서,

제2항에 따른 항체의 친화도 성숙된 변형체인 항체.

청구항 6

제3항 내지 제5항중 어느 한 항에 있어서,

서열 번호 16의 서열에 약 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 서열, 및 서열 번호 14의 서열에 약 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체.

청구항 7

제3항 내지 제6항중 어느 한 항에 있어서,

1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개, 특히 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 14의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체.

청구항 8

제3항 내지 제7항중 어느 한 항에 있어서,

1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개, 특히 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 16의 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체.

청구항 9

제1항에 있어서,

서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 2의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체.

청구항 10

아시알로당단백질 수용체(ASGPR)의 에피토프에 결합하기 위해 제9항에 따른 항체와 경쟁하는, ASGPR에 특이적으로 결합할 수 있는 항체.

청구항 11

제10항에 있어서,

ASGPR의 탄수화물 인식 도메인(CRD: carbohydrate recognition domain)에서 에피토프를 인식하는 항체.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서,

제9항에 따른 항체의 친화도 성숙된 변형체인 항체.

청구항 13

제10항 내지 제12항중 어느 한 항에 있어서,

서열 번호 4의 서열에 약 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 서열, 및 서열 번호 2의 서열에 약 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체.

청구항 14

제10항 내지 제13항중 어느 한 항에 있어서,

1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개, 특히 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 2의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체.

청구항 15

제10항 내지 제14항중 어느 한 항에 있어서,

1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개, 특히 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체.

청구항 16

제10항 내지 제14항중 어느 한 항에 있어서,

a) 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 36의 경쇄 가변 영역 서열;

b) 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 38의 경쇄 가변 영역 서열;

c) 서열 번호 8의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 40의 경쇄 가변 영역 서열;

d) 서열 번호 12의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 42의 경쇄 가변 영역 서열;

e) 서열 번호 20의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 44의 경쇄 가변 영역 서열;

f) 서열 번호 24의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 46의 경쇄 가변 영역 서열; 또는

g) 서열 번호 28의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 48의 경쇄 가변 영역 서열

을 포함하는 항체.

청구항 17

제1항 내지 제16항중 어느 한 항에 있어서,

인간 및 사이노몰구스(cynomolgus) 원숭이 ASGPR에 특이적으로 결합할 수 있는 항체.

청구항 18

제1항 내지 제17항중 어느 한 항에 있어서,

표면 플라스몬 공명(SPR: Surface Plasmon Resonance)에 의해 Fab 단편으로서 측정시 1 μM 미만, 특히 100 nM 미만, 더욱 특히 1 nM 미만의 해리 상수(K_D)를 갖고 인간 ASGPR에 결합하는 항체.

청구항 19

제1항 내지 제18항중 어느 한 항에 있어서,

형광 공명 에너지 전달(FRET: fluoresecence resonance energy transfer)에 의해 IgG_1로서 측정시 1 μM 미만, 특히 500 nM 미만, 더욱 특히 100 nM 미만, 또는 심지어 10 nM 미만의 K_D를 갖고 인간 ASGPR에 결합하는 항체.

청구항 20

제1항 내지 제19항중 어느 한 항에 있어서,

ASGPR에 결합하기 위해 ASGPR의 천연 리간드와 경쟁하지 않는 항체.

청구항 21

제20항에 있어서,

ASGPR의 천연 리간드가 아시알로페투인(asialofetuin)인 항체.

청구항 22

제1항 내지 제21항중 어느 한 항에 있어서,

CLEC10A, 특히 인간 CLEC10A에 검출가능하게 결합하지 않는 항체.

청구항 23

제1항 내지 제22항중 어느 한 항에 있어서,

ASGPR 발현이 결핍된 세포, 특히 인간 세포, 더욱 특히 인간 혈액 세포에 특이적으로 결합하지 않는 항체.

청구항 24

제1항 내지 제23항중 어느 한 항에 있어서,

세포의 표면 상에서 ASGPR에 항체가 결합할 때 ASGPR을 발현하는 세포내로 내재화(internalizing)되는 항체.

청구항 25

제24항에 있어서,

항체가 세포내로 내재화되는 것과 대략 동일한 속도로 상기 세포의 표면으로 다시 재순환되는 항체.

청구항 26

제1항 내지 제25항중 어느 한 항에 있어서,

항체가 세포의 표면 상에서 ASGPR에 결합할 때 세포의 표면에서 ASGPR 발현의 하향조절(downregulation)을 유의하게 유도하지 않는 항체.

청구항 27

제1항 내지 제26항중 어느 한 항에 있어서,

인간 항체인 항체.

청구항 28

제1항 내지 제27항중 어느 한 항에 있어서,

인간 Fc 영역, 특히 IgG Fc 영역, 더욱 특히 IgG_1 Fc 영역을 포함하는 항체.

청구항 29

제1항 내지 제28항중 어느 한 항에 있어서,

전장 항체인 항체.

청구항 30

제1항 내지 제29항중 어느 한 항에 있어서,

IgG 부류 항체, 특히 IgG_1 하위부류 항체인 항체.

청구항 31

제28항 내지 제30항중 어느 한 항에 있어서,

Fc 수용체, 특히 Fcɣ 수용체로의 항체의 결합 친화도를 감소시키는 개질을 Fc 영역에 포함하는 항체.

청구항 32

제31항에 있어서,

Fc 수용체가 활성화 Fc 수용체인 항체.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서,

Fc 수용체가 FcɣRIIIa(CD16a), FcɣRI(CD64), FcɣRIIa(CD32) 및 FcαRI(CD89)로 구성된 군으로부터 선택되는 항체.

청구항 34

제31항 내지 제33항중 어느 한 항에 있어서,

Fc 수용체가 FcɣRIIIa, 특히 인간 FcɣRIIIa인 항체.

청구항 35

제31항 내지 제34항중 어느 한 항에 있어서,

Fc 영역에서, EU 번호매김에 따른 P329, L234 및 L235로부터 선택되는 위치에 아미노산 치환을 포함하는 항체.

청구항 36

제31항 내지 제35항중 어느 한 항에 있어서,

EU 번호매김에 따른 아미노산 치환 P329G, L234A 및 L235A를 Fc 영역에서 포함하는 항체.

청구항 37

제28항 내지 제36항중 어느 한 항에 있어서,

2개의 동일하지 않은 항체 중쇄의 이종이량체화를 촉진시키는 개질을 Fc 영역에서 포함하는 항체.

청구항 38

제37항에 있어서,

개질이, 2개의 항체 중쇄중 하나에 노브(knob) 개질을 포함하고 2개의 항체 중쇄중 나머지 하나에 홀(hole) 개질을 포함하는 노브-인투-홀(knob-into-hole) 개질인 항체.

청구항 39

제28항 내지 제38항중 어느 한 항에 있어서,

CH3 도메인에서 2개의 항체 중쇄 사이의 계면내에 개질을 포함하는 항체로서, i) 1개의 중쇄의 CH3 도메인에서, 아미노산 잔기가 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체됨으로써 1개의 중쇄의 CH3 도메인에서 계면내에 돌출부(노브)를 생성하되, 상기 돌출부가 나머지 중쇄의 CH3 도메인에서 계면내의 강(cavity)(홀)에 위치가능하고, ii) 나머지 중쇄의 CH3 도메인에서, 아미노산 잔기가 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체됨으로써 제2 CH3 도메인에서 계면내에 강(홀)을 생성하되, 이의 내부에 제1 CH3 도메인에서의 계면내의 돌출부(노브)가 위치가능한 항체.

청구항 40

제28항 내지 제39항중 어느 한 항에 있어서,

항체 중쇄중 하나에서 아미노산 치환 T366W 및 선택적으로 아미노산 치환 S354C를 포함하고, 항체 중쇄중 나머지 하나에서 아미노산 치환 T366S, L368A, Y407V 및 선택적으로 Y349C를 포함하는 항체.

청구항 41

제1항 내지 제40항중 어느 한 항에 있어서,

효과기 잔기가 부착된 항체.

청구항 42

제41항에 있어서,

1개 이하의 효과기 잔기가 부착되는 항체.

청구항 43

제41항 또는 제42항에 있어서,

효과기 잔기가 사이토킨(cytokine) 분자인 항체.

청구항 44

제43항에 있어서,

사이토킨 분자가 그의 아미노-말단 아미노산에서 항체 중쇄중 하나의 카복시-말단 아미노산에, 선택적으로 펩티드 연결기를 통해 융합되는 항체.

청구항 45

제43항 또는 제44항에 있어서,

사이토킨 분자가 인간 사이토킨인 항체.

청구항 46

제43항 내지 제45항중 어느 한 항에 있어서,

사이토킨 분자가 인터페론 분자인 항체.

청구항 47

제46항에 있어서,

인터페론 분자가 인터페론 알파, 특히 인간 인터페론 알파, 더욱 특히 인간 인터페론 알파 2 또는 인간 인터페론 알파 2a인 항체.

청구항 48

제46항 또는 제47항에 있어서,

표면상에 ASGPR을 발현하는 세포에서 항-바이러스 활성을 갖는 항체.

청구항 49

제48항에 있어서,

표면상에 ASGPR을 유의한 수준으로 발현하지 않는 세포에서 항-바이러스 활성을 갖지 않는 항체.

청구항 50

제48항 또는 제49항에 있어서,

항-바이러스 활성이 바이러스성 감염의 저해, 바이러스 복제의 저해, 세포 사멸의 저해, 및 인터페론-자극된 유전자의 유도로부터 선택되는 항체.

청구항 51

제1항 내지 제50항중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 52

제51항에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 특히 발현 벡터.

청구항 53

제51항에 따른 폴리뉴클레오티드 또는 제52항에 따른 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 54

(i) 제1항 내지 제50항중 어느 한 항에 따른 항체의 발현에 적합한 조건하에 제53항에 따른 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 (ii) 상기 항체를 회수하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제50항중 어느 한 항에 따른 항체의 제조 방법.

청구항 55

제54항에 따른 제조 방법에 의해 제조된, 아시알로당단백질 수용체(ASGPR)에 특이적으로 결합할 수 있는 항체.

청구항 56

제1항 내지 제50항 및 제55항중 어느 한 항에 따른 항체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 57

약제로서 사용하기 위한, 제1항 내지 제50항 및 제55항중 어느 한 항에 따른 항체, 또는 제56항에 따른 약학 조성물.

청구항 58

간 질환을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한, 제1항 내지 제50항 및 제55항중 어느 한 항에 따른 항체, 또는 제56항에 따른 약학 조성물.

청구항 59

제58항에 있어서,

간 질환이 바이러스성 감염인 항체 또는 약학 조성물.

청구항 60

제58항 또는 제59항에 있어서,

간 질환이 간염 바이러스 감염, 특히 간염 B 바이러스(HBV) 감염인 항체 또는 약학 조성물.

청구항 61

암을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한, 제1항 내지 제50항 및 제55항중 어느 한 항에 따른 항체, 또는 제56항에 따른 약학 조성물.

청구항 62

제61항에 있어서,

암이 간암인 항체.

청구항 63

제62항에 있어서,

간암이 간세포 암종(HCC: hepatocellular carcinoma)인 항체.

청구항 64

질환의 치료가 필요한 개체에서의 질환의 치료용 약제를 제조하기 위한, 제1항 내지 제50항 및 제55항중 어느 한 항에 따른 항체의 용도.

청구항 65

제64항에 있어서,

질환이 간 질환인 용도.

청구항 66

제65항에 있어서,

간 질환이 바이러스성 감염인 용도.

청구항 67

제65항 또는 제66항에 있어서,

간 질환이 간염 바이러스 감염, 특히 간염 바이러스 B(HBV) 감염인 용도.

청구항 68

제64항에 있어서,

질환이 암인 용도.

청구항 69

제68항에 있어서,

암이 간암인 용도.

청구항 70

제69항에 있어서,

간암이 간세포 암종(HCC)인 용도.

청구항 71

제64항 내지 제70항중 어느 한 항에 있어서,

개체가 포유동물, 특히 인간인 용도.

청구항 72

제1항 내지 제50항 및 제55항중 어느 한 항에 따른 항체를 약학적으로 허용가능한 형태로 포함하는 치료 효과량의 조성물을 개체에게 투여함을 포함하는, 개체에서 질환을 치료하는 방법.

청구항 73

제72항에 있어서,

질환이 간 질환인 방법.

청구항 74

제73항에 있어서,

간 질환이 바이러스성 감염인 방법.

청구항 75

제73항 또는 제74항에 있어서,

간 질환이 간염 바이러스 감염, 특히 간염 바이러스 B(HBV) 감염인 방법.

청구항 76

제72항에 있어서,

질환이 암인 방법.

청구항 77

제76항에 있어서,

암이 간암인 방법.

청구항 78

제77항에 있어서,

간암이 간세포 암종(HCC)인 방법.

청구항 79

제72항 내지 제78항중 어느 한 항에 있어서,

개체가 포유동물, 특히 인간인 방법.

청구항 80

제1항 내지 제50항 및 제55항중 어느 한 항에 있어서,

개체에서 ASGPR을 발현하는 세포를 표적화하기 위한 항체.

청구항 81

제80항에 있어서,

세포가 간의 세포, 특히 간세포인 항체.

청구항 82

제80항 또는 제81항에 있어서,

개체가 포유동물, 특히 인간인 항체.

청구항 83

제1항 내지 제50항 및 제55항중 어느 한 항에 따른 항체를 약학적으로 허용가능한 형태로 포함하는 조성물을 개체에게 투여함을 포함하는, 개체에서 아시알로당단백질 수용체(ASGPR)를 발현하는 세포를 표적화하는 방법.

청구항 84

제83항에 있어서,

세포가 간의 세포, 특히 간세포인 방법.

청구항 85

제83항 또는 제84항에 있어서,

개체가 포유동물, 특히 인간인 방법.

청구항 86

상기된 바와 같은 발명.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 일반적으로 아시알로당단백질 수용체(ASGPR: asialoglycoprotein receptor)에 특이적인 항체, 및 세포 활성에 영향을 주는 효과기 잔기를 선택적으로 전달하기 위한 이들의 용도에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이러한 항체를 코딩(encoding)하는 폴리뉴클레오티드, 및 이러한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 숙주 세포에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 본 발명의 항체를 생산하는 방법, 및 질병의 치료에 이들을 사용하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 아시알로당단백질 수용체(ASGPR)는 2개의 서브유닛, H1 및 H2로 구성된 막간 수용체이다. 서브유닛은 이들의 세포외 자루(stalk) 영역 전체를 통해 올리고머화하는 것으로 여겨진다. ASGPR은 C-유형 렉틴(lectin) 계열(칼슘-이온 의존성 렉틴)의 일원이고, 다양한 탈시알릴화된 당단백질의 세포내 섭취(endocytosis) 및 분해를 중재한다. ASGPR은 간 실질(parenchymal) 세포(간세포) 상에서 선택적으로 발현되고, 이로써 간-특이적 치료법에 대한 관심 있는 표적이 된다. 많은 간 질환, 예를 들어 간염, 간 경변증 또는 간세포 암종(HCC: hepatocellular carcinoma)은, 직접적으로 또는 간접적으로 감염, 예컨대 간염 바이러스 B(HBV) 또는 C(HCV) 감염에 의해 초래될 수 있다. HCV에 의한 만성 감염은 간경변 및 HCC의 주요 원인들중 하나이다. 유사하게, 만성 HBV 감염은 미국에서 만성 간 질환 및 간경변의 5 내지 10%를 차지한다. HBV 및 HCV 감염에 대해 승인된 치료법으로는 인터페론(IFN), 예컨대 인터페론 알파가 포함된다. 그러나, 부작용은 많은 경우에 이들 치료법의 개발 및 광범위한 사용을 방해한다. 이러한 IFN-연관된 부작용은 부분적으로는 IFN으로의 전신 노출후 수반되는 말초 혈액 세포에서의 인터페론-자극된 유전자(ISG: interferon-stimulated gene)의 유도에 기인하는 것으로 생각된다. 따라서, 간 질환을 위한 IFN 치료법과 연관된 부작용을 최소화하기 위해서, 및 또한 종래의 인터페론의 항바이러스성 효과를 증대시키기 위해서, IFN을 간으로 선택적으로 전달시키는 것이 요망된다. ASGPR은

이러한 선택적 전달을 위한 간세포 상의 잠재적 표적 분자로서 인식되어 왔다. 예를 들면, 국제 특허출원공개 제WO 92/22310호는 재조합 IFN의 아시알로당단백질로의 접합(conjugation)에 의해 간에 인터페론을 표적화하려는 시도를 기재한다. 유사한 시도에서, 인터페론 분자 그 자체는 ASGPR로의 결합을 위해 아시알로-인터페론을 생산하도록 개질되었다[에토(Eto) 및 다카하시(Takahashi)의 문헌[Nat Med 5, 577-581 (1999)]]. 더욱 최근에, 항-ASGPR 단일 가변 도메인(dAb) 항체에 기초한 시도가 기재되었다(국제 특허출원공개 제WO 2011/086143호).

[0003] 그러나, 이들 시도중 어느 것도 이제까지 임상적으로 성공적인 것으로 보이지 않았고, 치료학적 분자, 예를 들어 인터페론을 간으로 선택적으로 전달하기 위한 개선된 표적화 분자에 대한 필요성이 남아 있다. 본 발명의 항체는 몇몇 유리한 특성들을 조합하고, 이로써 효과기 잔기, 예컨대 인터페론을 ASGPR-발현 세포에 표적화하기에, 예를 들어 간 질환을 치료하기에 특히 적합하게 된다.

발명의 내용

[0004] 하나의 양태에서, 본 발명은 아시알로당단백질 수용체(ASGPR)에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 제공하고, 여기서 이러한 항체는 a) 서열 번호 16의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 14의 경쇄 가변 영역 서열; b) 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 2의 경쇄 가변 영역 서열; c) 서열 번호 8의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 6의 경쇄 가변 영역 서열; d) 서열 번호 12의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 10의 경쇄 가변 영역 서열; e) 서열 번호 20의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 18의 경쇄 가변 영역 서열; f) 서열 번호 24의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 22의 경쇄 가변 영역 서열; g) 서열 번호 28의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 26의 경쇄 가변 영역 서열; h) 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 30의 경쇄 가변 영역 서열; i) 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 32의 경쇄 가변 영역 서열; j) 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 34의 경쇄 가변 영역 서열; 또는 k) 서열 번호 24의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 22의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0005] 하나의 구체적인 실시태양에서, 항체는 서열 번호 16의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 14의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 다른 구체적인 실시태양에서, 항체는 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 2의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0006] 추가의 양태에서, 본 발명은 ASGPR의 에피토프에 결합하기 위해 서열 번호 16의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 14의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체와 경쟁하는, ASGPR에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 제공한다. 하나의 실시태양에서, 상기 항체는 ASGPR의 자루 영역에서 에피토프를 인식한다. 하나의 실시태양에서, 상기 항체는 서열 번호 16의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 14의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체의 친화도 돌연변이된 변형체이다. 하나의 실시태양에서, 상기 항체는 서열 번호 16의 서열에 약 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 서열, 및 서열 번호 14의 서열에 약 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 항체는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개, 특히 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 14의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 항체는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개, 특히 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 16의 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0007] 또 다른 양태에서, 본 발명은 ASGPR의 에피토프에 결합하기 위해 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 2의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체와 경쟁하는, ASGPR에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 제공한다. 하나의 실시태양에서, 상기 항체는 ASGPR의 탄수화물 인식 도메인(CRD: carbohydrate recognition domain)에서 에피토프를 인식한다. 하나의 실시태양에서, 상기 항체는 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 2 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항체의 친화도 돌연변이된 변형체이다. 하나의 실시태양에서, 상기 항체는 서열 번호 4의 서열에 약 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 서열, 및 서열 번호 2의 서열에 약 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 항체는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개, 특히 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 2의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 항체는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개, 특히 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 항체는 a) 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 36의 경쇄 가변 영역 서열; b) 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 38의 경쇄 가변 영역 서열; c) 서열 번호 8의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 40의 경쇄 가변 영역 서열; d) 서열 번호 12의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열

번호 42의 경쇄 가변 영역 서열; e) 서열 번호 20의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 44의 경쇄 가변 영역 서열; f) 서열 번호 24의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 46의 경쇄 가변 영역 서열; 또는 g) 서열 번호 28의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 48의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0008] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 항체는 인간 및 사이노몰구스(cynomolgus) 원숭이 ASGPR에 특이적으로 결합할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 항체는 표면 플라스몬 공명(SPR: Surface Plasmon Resonance)에 의해 Fab 단편으로서 측정시 1 μM 미만, 특히 100 nM 미만, 더욱 특히 1 nM 미만의 해리 상수(K_D)를 갖고 인간 ASGPR에 결합한다. 하나의 실시태양에서, 항체는 형광 공명 에너지 전달(FRET: fluoresecence resonance energy transfer)에 의해 IgG_1로서 측정시 1 μM 미만, 특히 500 nM 미만, 더욱 특히 100 nM 미만, 또는 심지어 10 nM 미만의 K_D를 갖고 인간 ASGPR에 결합한다. 하나의 실시태양에서, 항체는 ASGPR에 결합하기 위해 ASGPR의 천연 리간드와 경쟁하지 않는다. 특정 실시 태양에서, ASGPR의 상기 천연 리간드는 아시알로페투인(asialofetuin)이다. 하나의 실시태양에서, 항체는 CLEC10A, 특히 인간 CLEC10A에 검출가능하게 결합하지 않는다. 하나의 실시태양에서, 항체는 ASGPR 발현이 결핍된 세포, 특히 인간 세포, 더욱 특히 인간 혈액 세포에 특이적으로 결합하지 않는다. 하나의 실시태양에서, 항체는 상기 세포의 표면 상에서 항체가 ASGPR에 결합할 때 ASGPR을 발현하는 세포내로 내재화(internalizing)된다. 하나의 구체적인 실시태양에서, 항체는 이것이 상기 세포내로 내재화될 때와 대략 동일한 속도로 상기 세포의 표면으로 다시 재순환된다. 하나의 실시태양에서, 항체는 상기 세포의 표면 상에서 항체가 ASGPR에 결합될 때 세포의 표면에서 ASGPR 발현의 하향조절(downregulation)을 유의하게 유도하지 않는다.

[0009] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 항체는 인간 항체이다. 하나의 실시태양에서, 항체는 인간 Fc 영역, 특히 IgG Fc 영역, 더욱 특히 IgG_1 Fc 영역을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 항체는 전장 항체이다. 하나의 실시태양에서, 항체는 IgG 부류 항체, 특히 IgG_1 하위부류 항체이다. 하나의 실시태양에서, 항체는 Fc 영역에 Fc 수용체, 특히 Fcγ 수용체로의 항체의 결합 친화도를 감소시키는 개질을 포함한다. 하나의 구체적인 실시태양에서, 상기 Fc 수용체는 활성화 Fc 수용체이다. 추가의 구체적인 실시태양에서, 상기 Fc 수용체는 FcγRIIIa(CD16a), FcγRI(CD64), FcγRIIa(CD32), 및 FcαRI(CD89)로 구성된 군으로부터 선택된다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 Fc 수용체는 FcγRIIIa, 특히 인간 FcγRIIIa이다. 하나의 실시태양에서, 항체는 Fc 영역에서 P329, L234 및 L235(EU 번호매김)로부터 선택된 위치에 아미노산 치환을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 항체는 아미노산 치환 P329G, L234A 및 L235A를 Fc 영역(EU 번호매김)에 포함한다. 추가의 실시태양에서, 항체는 2개의 동일하지 않은 항체 중쇄의 이종이량체화(heterodimerization)를 촉진시키는 개질을 Fc 영역에 포함한다. 하나의 구체적인 실시태양에서, 상기 개질은 노브-인투-홀(knob-into-hole) 개질이고, 이는 둘 이상의 항체 중쇄중 하나에서의 노브 개질 및 나머지 하나에서의 홀 개질을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 항체는 CH3 도메인에서 2개의 항체 중쇄 사이의 계면내에 개질을 포함하고, 여기서 i) 1개의 중쇄의 CH3 도메인에서, 아미노산 잔기는 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체됨으로써 1개의 중쇄의 CH3 도메인에서 계면내에 돌출부("노브")를 생성하는데, 이는 다른 중쇄의 CH3 도메인에서 계면내의 강(cavity)("홀")에 위치가능하고, ii) 나머지 중쇄의 CH3 도메인에서, 아미노산 잔기는 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체됨으로써 제2 CH3 도메인에서 계면내에 강("홀")을 생성하고, 이의 내부에 제1 CH3 도메인에서의 계면내의 돌출부("노브")가 위치가능하다. 하나의 실시태양에서, 항체는 항체 중쇄중 하나에서 아미노산 치환 T366W 및 선택적으로 아미노산 치환 S354C를 포함하고, 항체 중쇄중 나머지 하나에서 아미노산 치환 T366S, L368A, Y407V 및 선택적으로 Y349C를 포함한다.

[0010] 하나의 양태에서, 본 발명은 임의의 상기 실시태양에 따라 ASGPR에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 제공하고, 여기서 효과기 잔기는 항체에 결합한다. 하나의 실시태양에서, 1개 이하의 효과기 잔기가 항체에 결합된다. 하나의 실시태양에서, 상기 효과기 잔기는 사이토킨(cytokine) 분자이다. 하나의 실시태양에서, 상기 사이토킨 분자는, 선택적으로 펩티드 연결기를 통해, 그의 아미노-말단 아미노산에서 항체 중쇄중 하나의 카복시-말단 아미노산에 융합된다. 하나의 실시태양에서, 상기 사이토킨 분자는 인간 사이토킨이다. 하나의 실시태양에서, 상기 사이토킨 분자는 인터페론 분자이다. 하나의 구체적인 실시태양에서, 상기 인터페론 분자는 인터페론 알파, 특히 인간 인터페론 알파, 더욱 특히 인간 인터페론 알파 2(서열 번호 138 참조) 또는 인간 인터페론 알파 2a(서열 번호 139 참조)이다. 사이토킨 분자가 인터페론 분자인 하나의 실시태양에서, 항체는 표면 상에서 ASGPR을 발현하는 세포에서 항-바이러스 활성을 갖는다. 하나의 구체적인 실시태양에서, 항체는 표면 상에서 유의한 수준의 ASGPR을 발현하지 않는 세포에서 항-바이러스 활성을 갖지 않는다. 추가의 구체적인 실시태양에서, 상기 항-바이러스 활성은 바이러스성 감염의 저해, 바이러스 복제의 저해, 세포 사멸의 저해 및 인

터페론-자극된 유전자의 유도로부터 선택된다.

[0011] 본 발명은 추가로 본 발명의 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 특히 발현 벡터가 추가로 제공된다. 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 본 발명은 또한 (i) 본 발명의 숙주 세포를 상기 항체의 발현에 적합한 조건하에 배양하는 단계, 및 (ii) 상기 항체를 회수하는 단계를 포함하는, 본 발명의 항체의 제조 방법을 제공한다. 또한, 상기 방법에 의해 제조된, ASGPR에 특이적으로 결합할 수 있는 항체가 제공된다.

[0012] 하나의 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 본 발명의 항체 또는 약학 조성물은 또한 약제로서 사용하기 위해서, 및 간 질환, 구체적으로 바이러스성 감염, 더욱 구체적으로 간염 바이러스 감염, 특히 간염 B 바이러스(HBV) 감염의 치료 또는 예방에 사용하기 위해서 제공된다. 본 발명의 항체 또는 약학 조성물은 또한 암, 구체적으로 간암, 더욱 구체적으로 간세포 암종(HCC)의 치료 또는 예방을 위해 제공된다. 질환의 치료가 필요한 개체에서의 질환의 치료용 약제의 제조를 위한 본 발명의 항체의 용도, 및 본 발명의 항체를 약학적으로 허용가능한 형태로 포함하는 치료 효과량의 조성물을 개체에게 투여함을 포함하는, 상기 개체에서 질환을 치료하는 방법이 추가로 제공된다. 하나의 실시태양에서, 상기 질환은 간 질환이다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 간 질환은 바이러스성 감염이다. 더욱 더 구체적인 실시태양에서, 상기 간 질환은 간염 바이러스 감염, 특히 HBV 감염이다. 다른 실시태양에서, 상기 질환은 암이다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 암은 간암이다. 더욱 더 구체적인 실시태양에서, 상기 간암은 간세포 암종(HCC)이다. 하나의 실시태양에서, 상기 개체는 포유동물, 특히 인간이다. 추가의 양태에서, 본 발명의 항체는 개체에서 ASGPR을 발현하는 세포를 표적화하기 위해 제공된다. 또한 본 발명의 항체를 약학적으로 허용가능한 형태로 포함하는 조성물을 개체에게 투여함을 포함하는, 상기 개체에서 ASGPR을 발현하는 세포를 표적화하는 방법이 제공된다. 하나의 실시태양에서, 상기 세포는 간의 세포, 특히 간세포이다. 하나의 실시태양에서, 상기 개체는 포유동물, 특히 인간이다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1. 생성된 항원 구조물의 개략적 다이어그램. 모든 항원의 뉴클레오티드 서열은 인간-유래된 IgG_1 Fc 서열의 C-말단 종결부에 융합되었다. ASGPR1- 및 CLEC10A-유래된 CRD는 Fc(홀) 단편을 코딩하는 서열에 융합되고, Fc(노브) 단편을 코딩하는 서열에 의해 공동-발현되어, Fc 이량체당 단량체 표시를 생성하였다. 왼쪽으로부터 오른쪽으로: Fc-CRD(ASGPR1), Fc-자루(ASGPR1), Fc-자루-CRD(ASGPR1), Fc-CRD(CLEC10A), Fc-자루(CLEC10A), Fc-자루-CRD(CLEC10A). 두꺼운 곡선: $(G_4S)_3$ 연결기; 두꺼운 직선: Xa 및 IgAse 분할 부위.

도 2. 중쇄 및 경쇄의 CDR3 영역에서 랜덤화된 포괄적 Fab 라이브러리(library)의 생성에 대한 개략적 고찰. 제1 단계에서, 3개의 PCR 단편이 생성되었고, 이어서 이는 PCR에 의해[중첩 연장에 의한 스플리싱: SOE(splicing by overlapping extension)] 융합되었다. 최종 단편은 겔-정제화되고, 유사하게 처리된 억셉터 파지미드(acceptor phagimid)와 함께 *Nco*I/*Nhe*I에 의해 소화되고, 결찰되고, 박테리아내로 형질전환되었다. PCR1(A, B, C): (1) LMB3; (2) (A) VI_3_19_L3r_V/(B) VI_3_19_L3r_HV/(C) VI_3_19_L3r_HLV. PCR2: (3) RJH80; (4) DP47CDR3_ba(mod). PCR3(A, B, C): (5) (A) DP47 v44/(B) DP47 v46/(C) DP47 v48; (6) fdseqlong.

도 3. 인간 IgG_1 항체로서의 HepG2 세포에 대한 선택된 항-인간 ASGPR H1-특이적 클론의 결합 분석. 항체 농도는 30 ㎍/㎖였다. 이소타입 대조군 항체는 음성 대조군으로서 작용하였다.

도 4. 테르븀으로 표지된 막간 ASGPR H1-SNAP 태그 융합 단백질을 발현하는 일시적으로 형질감염된 세포 상에서의 FRET 분석. 분석은, 항체를 50 내지 0.39 nM 범위의 농도로 첨가한 다음, 억셉터 분자로서 항-인간Fc-d2(웰당 최종 200 nM)를 첨가함으로써 실행되었다. 특이적 FRET 신호는 3 시간 이후 측정되었고, KD 값이 계산되었다(KD_{51A12} = 200 nM, KD_{R7F12} = 22 nM, KD_{R9E10} = 6.2 nM, KD_{R5C2} = 5.9 nM, KD_{4F3} = 4.5 nM).

도 5 및 6. 아시알로페투인(asialofetuin), ASGPR에 대한 천연 리간드, 및 항-ASGPR H1 항체의 경쟁. HepG2 세포는 표지된 아시알로페투인과 함께 예비-항온처리되고, 이후 지시된 항체는 연속 희석되어 세포에 첨가되었다. 두 성분의 세포로의 결합은 FACS 분석에 의해 분석되었다. (a) 항체 검출; (b) 아시알로페투인 검출.

도 7. IgG로서의 2개의 항-인간 ASGPR H1 항체 클론 51A12 및 4F3의 내재화 분석. (a) 항체는 HepG2 세포와

함께 4℃에서 항온처리되어 내재화를 방지하고, 4℃에서 세척된 후, 세포는 예비-가온된 배지에서 배양되고, 37℃에서 120 분 이하 동안 항온처리되었다. 샘플은 지시된 시점에 채취되고, 얼음 위에서 2차 항체로 표지화되고, PFA를 사용하여 고정된다. (b) 항체가 세포와 함께 37℃에서 항온처리되어 ASGPR이 내재화되는 것을 허용함을 제외하고, (a)하에 기재된 바와 동일한 단계가 수행되었다. (c) 직접적으로 FITC-표지화된 항체를 사용함을 제외하고, (a)하에 기재된 바와 동일한 단계가 수행되었다. 세포 표면-결합된 항체는 PE-접합된 항-Fc 항체를 사용하여 검출되었다. (d) 표면 노출되고 내재화된 항체 둘다를 나타내는 FITC 신호를 보여줌을 제외하고, (c)하에서와 동일한 실험이 수행되었다.

도 8. 클론 51A12의 LCDR3 영역에 대한 랜덤화 전략. (a) 모 클론 51A12의 LCDR3 단백질 서열, (b) 시스테인 및 글리코실화 서열이 없는 라이브러리를 위한 주형으로서 작용하는 플라스미드의 LCDR3 단백질 서열, 및 (c) LCDR3에서의 랜덤화된 위치가 도시된다. 라이브러리의 생성 동안, 트라이뉴클레오티드 프라이머(primer)는 글리코실화 부위의 형성에 기여하는 아미노산 또는 시스테인을 코딩하는 삼중물(triplet)을 배제할 수 있다.

도 9. 주형 51A12(A82G, C112S, C113S, S116A)(서열 번호 33)의 LCDR3에서 랜덤화된 친화도 돌연변이 라이브러리의 생성에 대한 개략적 고찰. 제1 단계에서, 2개의 PCR 단편이 생성되었고, 이어서 이는 (SOE) PCR에 의해 융합되었다. 최종 단편은 겔-정제화되고, 유사하게 처리된 억셉터 파지미드와 함께 *Nco*I/*Pst*I에 의해 소화되고, 결찰되고, 박테리아내로 형질전환되었다. PCR1: (1) LMB3, (2) LCDR3rev. PCR2: (3) LCDR3r 및 (4) fdseqlong.

도 10. 인간 Fab 단편으로서 HepG2 세포로의 친화도-돌연변이된 51A12-유래된 클론의 결합 분석. 10, 3.3, 및 1.1 ㎍/㎖의 Fab 농도를 사용하였다. 모 클론 51A12(서열 번호 2 및 4), 51A12(S116A)(서열 번호 4 및 30), 글리코실화 서열이 없는 클론, 및 51A12(A82G, C112S, C113S, S116A)(서열 번호 4 및 34), 친화도 돌연변이 라이브러리를 위한 주형 클론이 대조군으로서 작용하였다.

도 11. 인간 IgG_1 항체로서의 HepG2 세포로의 친화도-돌연변이된 51A12-유래된 클론의 결합 분석. 0.01 내지 20 ㎍/㎖ 범위의 연속 희석된 농도를 사용하였다. 모 클론 51A12(서열 번호 2 및 4)가 대조군 (a)로서 사용되었다. 10 ㎍/㎖의 농도에서 Hela 세포에 대한 결합 분석이 음성 대조군 (b)로서 사용되었다.

도 12. 생성된 항체-사이토킨 접합체(conjugate)의 개략적 다이어그램. 인터페론-α2a를 코딩하는 유전자는 노브 개질을 포함하는 ASGPR H1-특이적 항체 중쇄의 C 말단 종결부에 융합되었다. 항체-사이토킨 단백질의 2가 ASGPR 결합이 홀 개질을 포함하는 상응하는 ASGPR H1-특이적 중쇄 및 경쇄의 공동-발현에 의해 달성되는 반면((a), 2:1 원자가), Fc(홀) 단편 서열의 발현은 분자당 단지 1개의 ASGPR H1-특이적 결합 부위를 갖는 단량체성 항체-사이토킨 접합체를 생성하였다((b), 1:1 원자가). 작은 검정색 점: FcγR 결합을 방지하는 개질(예를 들면 L234A L235A P329G). 큰 검정색 점: 이종이량체화를 촉진하는 개질(예를 들면 노브-인투-홀).

도 13 내지 19. 선택된 항체-IFNα 면역접합체의 정제 및 분석적 특징화(도 13: 51A12 kih IgG-IFNα; 도 14: 4F3 kih IgG-IFNα; 도 15: 51A12(C7) kih IgG-IFNα; 도 16: 51A12(C1) kih IgG-IFNα; 도 17: 51A12(E7) kih IgG-IFNα; 도 18: 이소타입 대조군 kih IgG-IFNα; 도 19: 1가 51A12 kih IgG-IFNα). 정제 방법은 친화도 단계(단백질 A)(a), 및 이후의 크기 배제 크로마토그래피[수퍼덱스(Superdex) 200, GE 헬쓰케어(Healthcare)](b)를 포함한다. 최종 생성물이 분석되고, 분석용 크기 배제 크로마토그래피(수퍼덱스 200 칼럼)(c) 및 미소 유체(micro fluidic) 단백질 분석[캘리퍼(Caliper)] 또는 SDS-PAGE(d)에 의해 특징지워졌다.

도 20. ASGPR-특이적 IgG kih IFNα 융합 구조물 51A12(a) 및 4F3(b)의 결합 선택도. HepG2, 주요 인간 간세포, Huh-7 세포, A549 세포, Hela 세포, 및 293T 세포는 1 ㎍/㎖의 51A12-IFNα(a) 또는 4F3-IFNα(b)와 함께 45 분 동안 얼음 상에서 항온처리되었다. 3회의 세척 이후, 세포는 2차 염소 항-인간 IgG 항체에 의해 얼음 상에서 30 분 동안 염색되었고, 세포는 3회 세척된 후 칼리부르(Calibur) 유세포 분석기를 사용하여 분석되었다. 인간 PBMC로의 결합은 제조업체의 지시에 따라 제논(Zenon: 등록상표) R-파이코에리트린(Phycoerythrin) 인간 IgG 표지화 키트에 의해 1 ㎍/㎖의 직접적으로 표지화된 51A12 IgG kih IFNα(a) 및 4F3 IgG kih IFNα(b)를 사용함으로써 수행되었고, 이소타입 IgG kih IFNα 및 CD81 mAb는 각각 음성 및 양성 대조군으로서 사용되었다.

도 21. 주요 인간 간세포 및 HepG2 세포 상에서의 ASGPR mAb 4F3-IFNα의 결합 포화 곡선. 3종의 상이한 도너(donor)(a-c) 및 HepG2 세포(d)로부터 유래된 인간 간세포 상에서의 ASGPR mAb 4F3-IFNα의 결합 포화. 세포는 연속적으로 희석된 4F3 IgG kih IFNα와 함께 45 분 동안 얼음 상에서 항온처리되었다. 3회 세척 후, 세포는 2차 염소 항-인간 IgG 항체에 의해 얼음 상에서 30 분 동안 염색되었고, 다시 3회 세척된 후, 칼리부르 유세포 분석기를 사용하여 분석되었다.

도 22. 특이적 항체의 존재하의 시간에 따른 ASGPR의 표면-노출된 수준의 분석. HepG2 세포는 ASGPR-특이적 클론 51A12 IgG 또는 상응하는 1가 또는 2가 항체-사이토킨 접합체와 함께 항온처리되었다. 세포 샘플을 5 시간 이하 이후 채취하고, IgG 구조물의 ASGPR로의 결합은 항체(a) 또는 사이토킨(b)의 검출에 의해 측정하였다. 항-CD20 항체(GA101)는 음성 대조군으로서 사용되었다.

도 23. 클론 51A12 항체-사이토킨 접합체의 신속한 내재화. 알렉사(Alexa)488-표지화된 51A12 IgG kih IFNα 구조물은 HepG2 세포와 함께 항온처리되고 구조물의 ASGPR-중재된 내재화는 10개 적층물(stack)(z-수준) 위에서 1 시간 동안 공초점 현미경에 의해 기록되었다. 세표 표면 상에서의 항체-사이토킨 접합체의 결합은 균일한 분포라기 보다는 군집으로 발생된다(a). 일단 세포 표면에 결합되면, 접합체는 세포 몸체내로 수송되는 소낭에 매우 신속히 내재화된다(b, 둘러싸인 단일 세포). 이어서 소낭은 세포의 상단부로 다시 재순환된다(도시되지 않음).

도 24. EMCV CPE(a) 및 HCV 레플리콘(replicon)(b) 검정에서 ASGPR mAb-IFNα 분자 및 다른 대조 IFN 분자의 항바이러스 활성. (a) Hela 세포는 연속적으로 희석된 IFN 분자에 의해 3 시간 동안 예비처리된 후, EMCV 바이러스가 첨가된다. 세포는 24 시간 동안 배양되고, 세포 생존능은 셀타이터 글로(CellTiter Glo)를 첨가함으로써 측정된다. (b) Huh-7 2209 레플리콘 세포는 연속적으로 희석된 IFN 분자로 처리되고, 루시퍼라아제 활성은 3 일 이후 측정되었다.

도 25. 다양한 간의 세포 및 간 이외의 세포에서의 51A12-IFNα에 의한 ISG의 유도. 간의 세포(주요 간세포(b) 및 HepG2(a)) 및 간 이외의 세포(인간 PBMC(d) 및 Hela(c))는 다양한 연속적으로 희석된 IFNα 분자에 의해 6 시간 동안 처리되었고, 전체 RNA가 추출되고, TaqMan RT-PCR을 사용하여 ISG MX1(a, c) 및 Rsad2(b, d) 유전자 발현이 정량화되었다. 3회 이상의 실험으로부터 데이터가 제시된다.

도 26. 주요 인간 간세포(PHH)(b) 및 Huh7(a) 세포에서의 51A12-IFNα 및 4F3-IFNα에 의한 지연된 ISG 유도. 주요 인간 간세포(PHH) 및 Huh7 세포는 연속적으로 희석된 IFNα 분자에 의해 6 시간(왼쪽) 및 72 시간(오른쪽) 동안 처리되었고, 전체 RNA가 추출되고 TaqMan RT-PCR을 사용하여 ISG MX1(a) 및 Rsad2(b) 유전자 발현이 정량화되었다.

도 27. 원숭이 간 샘플에서의 대표적 ISG 발현. 상이한 시점에서 수집된 4개의 투약 그룹으로부터의 원숭이 간 샘플은 마이크로어레이(microarray)에 의해 분석되었다. 4가지 대표적인 ISG 유전자의 발현은 3D 그래프로 도시되어 있다. 4개의 투약 그룹이 지시된다. 각각의 투약 그룹에 있어서, 왼쪽으로부터 오른쪽으로, 막대는 3마리 원숭이의 5 일 전, 2 일, 4 일, 및 8 일째의 ISG 유도 배수를 나타낸다.

도 28. 혈액 및 간 유전자 발현 히트맵(heatmap)(IFN 모듈 M3.1). mRNA 마이크로어레이 분석은 혈액 PBMC 및 간 생검 샘플 상에서 수행되었고, 이들의 IFNα 반응은 혈액 전사체학(transcriptomics) 연구로부터 결정된 유전자 모듈에 의해 분석되었다[차우스사벨(Chaussabel) 등의 문헌 [(2008), Immunity 29, 150-64]]. 패널 (a)에서, 인터페론 모듈 M3.1의 유전자에 대한 기선으로부터의 발현 값 배수-변화(삽입물 참조)가 혈액 및 간 샘플 둘다에 대해 R 통계학 패키지(www.r-project.org)를 사용하여 히트맵 형태로 도표화되었다. 간 인터페론-유도된 유전자의 비-감시된 계층적 군집화는 10 ㎍/kg 투약량의 51A12에서 높게 유도된 하위집합(점선 직사각형)을 보여주지만, 1 일 및 3 일째 이소타입-IFNα 화합물은 그렇지 않다. (b) 유전자의 이러한 하위집합은 간 및 혈액 둘다에 대해 도표화되었다. 이러한 하위집합의 비-감시된 계층적 군집화는 혈액 및 간 사이에서 상이한 발현 패턴을 보여주고, 여기서 히트맵의 상위 반은 10 ㎍/kg의 투약량에서 51A12의 경우 간에서의 유도를 보여주지만, 이소타입-IFNα는 그렇지 않고, 하위 반에서, 높은 투약량에서 이소타입-IFNα에 대해서만 혈액에서 유도된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] **정의**

[0015] 용어들은, 하기에 달리 정의되지 않는 한, 일반적으로 당분야에 사용되는 바와 같이 본원에 사용된다. ASGPR로서 약자화된 "아시알로당단백질 수용체"는, 달리 지시되지 않는 한, 포유동물, 예컨대 영장류(예를 들어 인간), 인간 이외의 영장류(예를 들어 사이노몰구스 원숭이) 및 설치류(예를 들어 마우스 및 래트)를 비롯한 임의의 척추동물로부터 유래된 임의의 고유의 ASGPR을 지칭한다. 이 용어는 "전장(full-length)"의 미처리 ASGPR뿐만 아니라 세포에서 처리되어 생성된 ASGPR의 임의의 형태를 내포한다. 이 용어는 또한 ASGPR의 자연 발생 변형체, 예를 들어, 스플라이스(splice) 변형체 또는 대립형질 변형체를 내포한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 항체는 인간 ASGPR, 특히 인간 ASGPR H1, 더욱 특히 인간 ASGPR H1의 세포외 도메인에 특이적으로 결합할 수

있다.

[0016] 인간 ASGPR H1의 아미노산 서열(CLEC4H1로서도 공지됨)은 유니포트(UniProt)(www.uniprot.org) 수탁 번호 P07306(버전 131), 또는 NCBI (www.ncbi.nlm.nih. gov/) RefSeq NP_001662.1에 제시된다. 인간 ASGPR H1의 세포외 도메인(ECD: extracellular domain)은 아미노산 위치 62에서 291로 연장된다. 인간 Fc 영역에 융합된 인간 ASGPR H1 ECD의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 각각 서열 번호 129 및 130으로 제시된다. ASGPR H1 ECD는 전체 서열의 아미노산 위치 62로부터 대략 아미노산 위치 160으로 연장되는 자루 영역(서열 번호 123 및 124는 인간 Fc 영역에 융합되는 인간 ASGPR H1 자루 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 제시함), 및 전체 서열의 아미노산 위치 161로부터 대략 아미노산 위치 278로 연장되는 탄수화물 인식 도메인(CRD)(서열 번호 117 및 118은 인간 Fc 영역에 융합되는 인간 ASGPR H1 CRD 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 제시함)을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 항체는 사이노몰구스 ASGPR, 특히 사이노몰구스 ASGPR H1, 더욱 특히 사이노몰구스 ASGPR H1의 세포외 도메인에 결합할 수 있다. 사이노몰구스 ASGPR H1의 서열은 NCBI 진뱅크(GenBank) 수탁 번호 EHH57654.1로 제시된다. 서열 번호 131 및 132는 각각 인간 Fc 영역에 융합된 사이노몰구스 ASGPR H1 ECD의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 제시한다.

[0017] "인간 CLEC10A"는 유니프로트 수탁 번호 Q8IUN9(버전 86)에 기재된 단백질, 특히 전체 서열의 아미노산 위치 61로부터 아미노산 위치 316으로 연장된 상기 단백질의 세포외 도메인을 의미한다. 서열 번호 133 및 134는 각각 인간 Fc 영역에 융합된 인간 CLEC10A ECD의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 제시한다.

[0018] 본원에 사용될 경우, 용어 "접합체"는 하나의 효과기 잔기 및 추가의 펩티드 분자, 특히 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드 분자를 지칭한다. 항체 및 효과기 잔기의 융합 단백질은 "면역 접합체"로서 지칭된다. 본원에 지칭되는 바와 같은 (면역)접합체는 융합 단백질이고, 즉, (면역)접합체의 성분은 직접적으로 또는 펩티드 연결기를 통해 펩티드-결합에 의해 서로 연결된다.

[0019] "에피토프(epitope)"는 항체에 의해 결합된 항원의 영역이다. 이 용어는 항체가 결합하여 항체-항원 착체를 형성하는 폴리펩티드 거대분자 상의 부위(예를 들어 아미노산의 인접 신장부, 또는 비-인접 아미노산의 상이한 영역으로 구성되는 입체배좌 형태)를 지칭한다.

[0020] 기준 항체와 "에피토프로의 결합에 대해 경쟁하는 항체"는 기준 항체가 그의 항원에 결합하는 것을 경쟁 검정에서 50% 이상으로 차단하는 항체를 지칭하고, 역으로, 기준 항체는 항체가 그의 항원에 결합하는 것을 경쟁 검정에서 50% 이상으로 차단한다. 예시적인 경쟁 검정이 본원에 제공된다.

[0021] "특이적 결합"은 결합이 항원에 특이적임을 의미하고, 원치않거나 비-특이적 상호작용으로부터 구별될 수 있다. 특정 항원에 결합하는 항체의 능력은 효소-연결된 면역흡착 검정(ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay) 또는 당분야의 숙련가에게 친숙한 다른 기법, 예를 들어 표면 플라스몬 공명(SPR) 기법[비아코어(BIAcore) 기기상에서 분석됨][릴제블래드(Liljeblad) 등의 문헌[Glyco J 17, 323-329 (2000)]], 및 전통적 결합 검정[힐레이(Heeley)의 문헌[Endocr Res 28, 217-229 (2002)]]을 통해 측정될 수 있다. 하나의 실시태양에서, 항체의 관련되지 않은 단백질로의 결합 정도는, 예를 들어 SPR에 의해 측정시 항체의 항원으로의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 실시태양에서, 항원에 결합하는 항체는 1 μM 이하, 100 nM 이하, 10 nM 이하, 1 nM 이하, 0.1 nM 이하, 0.01 nM 이하, 또는 0.001 nM 이하(예를 들어 10^{-8} M 이하, 예를 들어 10^{-8} M 내지 10^{-13} M, 예를 들어 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수(K_D)를 갖는다.

[0022] "친화도" 또는 "결합 친화도"는 분자(예를 들어 항체)의 단일 결합 부위 및 그의 결합 파트너(예를 들어 항원) 사이의 비-공유적 상호작용의 총 합계의 강도를 지칭한다. 달리 지시되지 않는다면, 본원에 사용될 경우, "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원(예를 들어 항체 및 항원) 사이에 1:1 상호작용을 반영하는 고유의 결합 친화도를 지칭한다. 분자 X의 그의 파트너 Y에 대한 친화도는 해리 상수(K_D)에 의해 표시되고, 이는 해리 및 회합 속도 상수(각각 $k_{해리}$ 및 $k_{회합}$)의 비이다. 이와 같이, 동등한 친화도는, 속도 상수의 비가 동일하게 유지되는 한, 상이한 속도 상수를 포함할 수 있다. 친화도는, 본원에 기재된 방법들을 비롯하여, 당분야에 공지된 통상의 방법에 의해 측정될 수 있다. 친화도를 측정하는 하나의 구체적인 방법은 표면 플라스몬 공명(SPR)이다.

[0023] "감소된 결합", 예를 들면 Fc 수용체로의 감소된 결합은, 예를 들면 SPR에 의해 측정시, 개개의 상호작용에 대한 친화도의 감소를 지칭한다. 명확하게 하기 위해, 이 용어는 0(또는 분석 방법의 검출 한계 아래)으로의 친화도의 감소, 즉 상호작용의 완전한 제거를 포함한다. 역으로, "증가된 결합"은 개개의 상호작용에 대한 결합 친화도의 증가를 지칭한다.

[0024] "내재화"는 세포내 공간으로 분자를 섭취함으로써 세포로부터의 표면으로부터 상기 분자를 제거함을 의미한다. 내재화의 구체적인 형태는 수용체-중재된 세포내 섭취이고, 이는 리간드 또는 항체의 세포 표면[막-스패닝(spanning)] 수용체로의 결합시 수용체 및 결합된 리간드 또는 항체를 포함하는 혈장 막 소낭의 내측 출아(budding)에 의해 초래된다. 내재화는 당분야에 공지된 기법을 사용하여 평가될 수 있다. FACS에 의해 세포 표면 상에서 단백질 수준을 결정함에 기초하는 방법이 이후 실시예에 기재된다.

[0025] 용어 "재순환"은 본원에 사용될 경우 하나의 분자가 하나의 세포내로 미리 내재화된 이후 상기 세포의 표면 상에서의 상기 분자의 재출현을 지칭한다. 재순환은 분자가 내재화시 세포 내에서 분해되지 않음을 내포한다. 재순환이 내재화와 동일한 속도로 초래된다면, 세포 표면 상의 분자의 수가 본질적으로 일정하게 유지되는 동력학적 정지 상태가 도달된다. 재순환은 당분야에 잘 공지된 기법에 의해, 예를 들어 이후 실시예에 기재된 바와 같이 FACS에 의해 또는 (공초점) 현미경 방법을 사용하여 세포 표면 상의 단백질 수준을 결정함으로써 검출될 수 있다.

[0026] "하향조절"은 세포내에서 또는 이의 표면에서의 특정 단백질, 예를 들어 세포 표면 수용체의 복사 수의 감소를 의미한다. 하향조절은 본원에 사용될 경우 특히, 예를 들어 내재화 및/또는 분해, 또는 감소된 발현에 의한 세포 표면에 존재하는 세포 표면 단백질의 복사 수의 감소를 지칭한다. 단백질 수준의 하향조절은 당분야에 확립된 다양한 방법, 예컨대 예를 들어 웨스턴 블롯(Western blot)(전체 단백질 수준을 위해) 또는 FACS(표면 단백질 수준을 위해)에 의해 검출될 수 있다.

[0027] 본원에 사용될 경우, 용어 "효과기 잔기"는 예를 들면, 신호 전달 또는 다른 세포 경로를 통해 세포 활성에 영향을 주는 분자, 특히 폴리펩티드 분자(예를 들어 단백질 또는 당단백질)를 지칭한다. 따라서, 효과기 잔기는 세포 막 외부로부터의 신호를 전달하여 효과기 잔기에 대한 하나 이상의 수용체를 갖는 세포에서 반응을 조절하는 수용체-중재된 신호전달과 연관될 수 있다. 하나의 실시태양에서, 효과기 잔기는 효과기 잔기에 대한 하나 이상의 수용체를 갖는 세포에서 세포독성 반응을 이끌어낼 수 있다. 다른 실시태양에서, 효과기 잔기는 효과기 잔기에 대한 하나 이상의 수용체를 갖는 세포에서 증식 반응을 이끌어낼 수 있다. 다른 실시태양에서, 효과기 잔기는 효과기 잔기에 대한 수용체를 갖는 세포에서 분화를 이끌어낼 수 있다. 다른 실시태양에서, 효과기 잔기는 효과기 잔기에 대한 수용체를 갖는 세포에서 내생성 세포 단백질의 발현을 변경(즉, 상향조절 또는 하향조절)할 수 있다. 효과기 잔기의 비제한적인 예로는 소분자, 사이토킨, 성장 인자, 호르몬, 효소, 기질 및 보조인자가 포함된다. 효과기 잔기는 다양한 입체형태로 항체와 회합될 수 있다.

[0028] 용어 "부착된"은 화학적 결합 또는 펩티드 결합을 비롯하여, 임의의 종류의 상호작용에 의한 연결을 포함한다.

[0029] "융합된"은 직접적으로 또는 하나 이상의 펩티드 연결기를 통해 펩티드 결합에 의해 연결되는 성분을 지칭한다.

[0030] 본원에 사용될 경우, 용어 "사이토킨"은 생물학적 또는 세포적 기능 또는 과정(예를 들어, 면역력, 염증 및 조혈작용)을 중재 및/또는 조절하는 분자를 지칭한다. 용어 "사이토킨"은 본원에 사용될 경우 림포카인(lymphokine), 케모카인(chemokine), 모노카인(monokine) 및 인터류킨(interleukin)을 포함한다. 사이토킨의 예로는, 제한되지 않지만, GM-CSF, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, MIP-1α, MIP-1β, TGF-β, TNF-α 및 TNF-β가 포함된다. 구체적인 사이토킨은 인터페론(IFN), 특히 IFN-α이다. 구체적인 실시태양에서, 사이토킨은 인간 사이토킨이다. 구체적인 사이토킨인 인간 IFNα2 및 IFNα2a의 서열은 각각 서열 번호 138 및 139로 제시된다.

[0031] "인터페론-자극된 유전자"(ISG)는 임의의 세포에서의 발현이 상기 세포와 인터페론 분자, 특히 IFNα 분자와의 접촉에 의해 자극될 수 있는 유전자를 지칭한다. 전형적으로, ISG는 하나 이상의 인터페론-활성화된 신호전달 분자(예를 들어 STAT)가 결합되어 ISG의 증진된 발현을 유도하는 인식 서열[예를 들어 인터페론-자극된 반응 요소(ISRE: Interferon-stimulated response element)]를 포함한다. ISG의 예로는 MX1[믹소(myxo)바이러스 내성 1, 또한 인터페론-유도된 단백질 p78로서도 공지됨], RSAD2(라디칼 S-아데노실 메티오닌 도메인 함유 2, 또한 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus)-유도된 유전자 5로서도 공지됨), HRASLS2(HRAS-유사 억제제 2), IFIT1(테트라트리코펩티드 반복부 1을 갖는 인터페론-유도된 단백질), 및 IFITM2(인터페론-유도된 막간 단백질 2)가 포함된다.

[0032] 본원에 사용될 경우, 용어 "단일-쇄"는 펩티드 결합에 의해 선형으로 연결된 아미노산 단량체를 포함하는 분자를 지칭한다. 하나의 실시태양에서, 효과기 잔기는 단일-쇄 펩티드 분자이다. 단일-쇄 효과기 잔기의 비제한적인 예로는 사이토킨, 성장 인자, 호르몬, 효소, 기질 및 보조 인자가 포함된다. 효과기 잔기가 사이토킨이고 관심있는 사이토킨이 자연에서 다량체로서 정상적으로 발견될 때, 다량체성 사이토킨의 각각의 서브유닛은 효과

기 잔기의 단일-쇄에 의해 순차적으로 코딩된다. 따라서, 유용한 단일-쇄 효과기 잔기의 비제한적인 예로는 GM-CSF, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, MIP-1α, MIP-1β, TGF-β, TNF-α, 및 TNF-β가 포함된다.

[0033] 본원에 사용될 경우, 용어 "효과기 잔기 수용체"는 효과기 잔기에 특이적으로 결합할 수 있는 폴리펩티드 분자를 지칭한다. 효과기 잔기가 1개 보다 많은 수용체에 특이적으로 결합하는 경우, 효과기 잔기에 특이적으로 결합하는 모든 수용체는 효과기 잔기에 대한 "효과기 잔기 수용체"이다. 예를 들면, IFNα가 효과기 잔기인 경우, IFNα 분자에 결합된 효과기 잔기 수용체[예를 들어 IFNα에 융합된 항체)는 IFNα 수용체 1 또는 2(유니프로트 수탁 번호 P17181(버전 121) 및 인간 IFNα 수용체 1을 위한 NCBI RefSeq NP_000620.2, 및 유니프로트 수탁 번호 P48551(버전 131) 및 인간 IFNα 수용체 2를 위한 NCBI RefSeqs NP_997467.1 및 NP_997468.1]이다.

[0034] 용어 "항체"는 본원에서 가장 넓은 의미로 사용되고 다양한 항체 구조물, 예컨대 제한되지 않지만 단일클론성 항체, 다중클론성 항체, 다중특이적 항체(예를 들어 이중특이적 항체), 및 항체 단편을, 이들이 원하는 항원-결합 활성을 나타내는 한, 내포한다.

[0035] "항체 단편"은 손상되지 않은 항체가 결합하는 항원에 결합하는 손상되지 않은 항체의 일부를 포함하는 손상되지 않은 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예로는, 제한되지 않지만, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, 다이아바디(diabody), 선형 항체, 단일-쇄 항체 분자(예를 들어 scFv), 및 항체가 포함된다. 특정 항체 단편에 대한 고찰을 위해, 허드슨(Hudson) 등의 문헌[Nat Med 9, 129-134 (2003)]을 참조한다. scFv 단편에 대한 고찰을 위해, 예를 들어 플럭천(Pluckthun)의 문헌[The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조하고; 또한 국제 특허출원공개 제WO 93/16185호; 및 미국 특허 제5,571,894호 및 제5,587,458호를 참조한다. 에피토프 잔기에 결합하는 샐비지(salvage) 수용체를 포함하고 생체내 반감기가 증가된 Fab 및 $F(ab')_2$ 단편에 대한 논의를 위해, 미국 특허 제5,869,046호를 참조한다. 다이아바디는 2가 또는 이중특이적일 수 있는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 항체 단편이다. 예를 들면, EP 제404,097호; 국제 특허출원공개 제WO 1993/01161호; 허드슨 등의 문헌[Nat. Med. 9: 129-134 (2003)]; 및 홀린거(Hollinger) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)]을 참조한다. 트라이아바디 및 테트라바디는 또한 허드슨 등의 문헌[Nat. Med. 9: 129-134 (2003)]에 기재되어 있다. 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전체 또는 일부, 또는 경쇄 가변 도메인의 전체 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정 실시태양에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체이다[도만티스 인코포레이티드(Domantis, Inc.), 미국 매사추세츠주 왈탐 소재; 예를 들어, 미국 특허 제6,248,516 B1호 참조]. 항체 단편은 다양한 기법, 예로서 제한되지 않지만, 손상되지 않은 항체의 단백질분해적 소화, 및 본원에 기재된 바와 같은 재조합 숙주 세포[예를 들어 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) 또는 파아지]에 의한 생산에 의해 제조될 수 있다.

[0036] 용어 "전장 항체", "손상되지 않은 항체", 및 "전체 항체"는 본원에서 상호교환적으로 고유의 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖는 항체 또는 본원에 정의된 바와 같은 Fc 영역을 포함하는 중쇄를 갖는 항체를 지칭하기 위해 사용된다.

[0037] "고유의 항체"는 다양한 구조를 갖는 자연 발생 면역글로불린 분자를 지칭한다. 예를 들면, 고유의 IgG 부류 항체는 다이설파이드-결합된 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄로 구성된 약 150,000 달톤의 이종성사량체 당단백질이다. N-말단에서 C-말단까지, 각각의 중쇄는, 중쇄 불변 영역으로도 불리는 3개의 불변 도메인(CH1, CH2, 및 CH3)이 뒤따르는 가변성 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인으로도 불리는 가변 영역(VH)을 갖는다. 유사하게, N-말단에서 C-말단까지, 각각의 경쇄는, 경쇄 불변 영역으로도 불리는 경쇄 불변 도메인(CL)이 뒤따르는 가변성 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인으로도 불리는 가변 영역(VL)을 갖는다. 항체의 중쇄는 α(IgA), δ(IgD), ε(IgE), γ(IgG), 또는 μ(IgM)로 지칭되는 5가지 유형중 하나로 할당될 수 있고, 이중 몇몇은 하위유형, 예를 들어 γ_1(IgG_1), γ_2(IgG_2), γ_3(IgG_3), γ_4(IgG_4), α_1(IgA_1) 및 α_2(IgA_2)로 추가로 분류될 수 있다. 항체의 경쇄는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 카파(κ) 및 람다(λ)로 불리는 2가지 유형중 하나로 할당될 수 있다. IgG 부류 항체는 본질적으로 면역글로불린 힌지 영역을 통해 연결되는 2개의 Fab 단편 및 Fc 도메인으로 구성된다.

[0038] 본원에 사용될 경우, "Fab 단편"은 경쇄(CL)의 VL 도메인 및 불변 도메인을 포함하는 경쇄 단편, 및 중쇄의 VH 도메인 및 제1 불변 도메인(CHI)을 포함하는 항체 단편을 지칭한다.

[0039] 항체 또는 면역글로불린의 "부류"는 그의 중쇄에 의해 소유되는 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을

지칭한다. 항체의 5가지 주요 부류인 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이 존재하고, 이들중 몇몇은 추가로 하위부류(이소타입), 예를 들어, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, 및 IgA_2로 분류될 수 있다. 면역글로불린의 상이한 부류에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α, δ, ε, γ, 및 μ로 지칭된다.

[0040] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항원으로의 항체의 결합에 관여되는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 고유의 항체의 중쇄 및 경쇄(각각 VH 및 VL)의 가변 도메인은 일반적으로 유사한 구조를 갖고, 각각의 도메인은 4개의 보존된 골격구조 영역(FR: framework region) 및 3개의 초가변 영역(HVR)을 포함한다[예를 들어, 킨드트(Kindt) 등의 문헌[Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)]을 참조한다]. 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원-결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다.

[0041] 용어 "초가변 영역" 또는 "HVR"은, 서열에서 초가변성이고/이거나 구조적으로 한정된 루프(loop)("초가변 루프")를 형성하는 항체 가변 도메인의 각각의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 고유의 4개-쇄 항체는 6개의 HVR을 포함한다; VH에 3개(H1, H2, H3), VL에 3개(L1, L2, L3). HVR은 일반적으로 초가변 루프로부터 및/또는 "상보성 결정 영역"(CDR)으로부터의 아미노산 잔기를 포함하고, 후자는 가장 높은 서열 가변성이고/이거나 항원 인식에 연관된다. 예시적인 초가변 루프는 아미노산 잔기 26 내지 32(L1), 50 내지 52(L2), 91 내지 96(L3), 26 내지 32(H1), 53 내지 55(H2), 및 96 내지 101(H3)에서 초래된다[코티아(Chothia) 및 레스크(Lesk)의 문헌[J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]]. 예시적인 CDR(CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3)은 L1의 아미노산 잔기 24 내지 34, L2의 50 내지 56, L3의 89 내지 97, H1의 31 내지 35B, H2의 50 내지 65, 및 H3의 95 내지 102에서 초래된다[카밧 등의 문헌[Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]]. VH에서의 CDR1을 제외하고, CDR은 일반적으로 초가변 루프를 형성하는 아미노산 잔기를 포함한다. CDR은 또한 항원에 접촉하는 잔기인 "특이성 결정 잔기" 또는 "SDR(specificity determining residue)"을 포함한다. SDR은 CDR의 영역내에 포함되고, 약자화된-CDR, 또는 a-CDR로 불린다. 예시적인 a-CDR(a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2, 및 a-CDR-H3)은 L1의 아미노산 잔기 31 내지 34, L2의 50 내지 55, L3의 89 내지 96, H1의 31 내지 35B, H2의 50 내지 58, 및 H3의 95 내지 102에서 초래된다[알마그로(Almagro) 및 프란손(Fransson)의 문헌[Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)] 참조]. 달리 지시되지 않는 한, 가변 도메인중 HVR 잔기 및 기타 잔기(예를 들어, FR 잔기)는 본원에서 상기 카밧 등의 문헌에 따라 번호매김된다("카밧 번호매김"으로서 지칭됨).

[0042] "골격구조" 또는 "FR"은 초가변 영역(HVR) 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 다음의 4가지 FR 도메인으로 구성된다: FR1, FR2, FR3, 및 FR4. 따라서, HVR 및 FR 서열은 일반적으로 VH(또는 VL)에서 하기 서열로 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

[0043] "친화도 성숙된" 항체는 변경되지 않는 모 항체에 비하여 하나 이상의 초가변 영역(HVR: hypervariable region)에서 하나 이상의 변경을 갖는 항체를 지칭하고, 이러한 변경으로 인하여 항원에 대한 항체의 친화도가 개선된다.

[0044] 용어 "모 항체"는 본원에서 항체 변형체의 제조를 위한 출발점 또는 기초로서 작용하는 항체를 지칭한다. 하나의 실시태양에서, 모 항체는 인간화된 항체 또는 인간 항체이다.

[0045] "인간 항체"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생산되거나, 인간 항체 레파토리(repertoiry) 또는 다른 인간 항체-코딩 서열을 이용하는 인간 이외의 근원으로부터 유래된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 소유하는 항체이다. 인간 항체에 대한 이러한 정의는 인간 이외의 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화된 항체를 특히 배제한다.

[0046] 용어 "단일클론성 항체"는 본원에 사용될 경우 실질적으로 동종성인 항체의 모집단으로부터 수득된 항체를 지칭하고, 즉 모집단을 구성하는 개별 항체는 동일하고/하거나 동일한 에피토프에 결합하지만, 예를 들어, 자연 발생 돌연변이를 포함하거나 단일클론성 항체 제제의 생산 동안 야기된 가능한 변형 항체는 제외하고, 이러한 변형체는 일반적으로 소량으로 존재한다. 전형적으로 상이한 결정자(에피토프)에 대해 유도되는 상이한 항체를 포함하는 다중클론성 항체 제제와 대조적으로, 단일클론성 항체 제제의 각각의 단일클론성 항체는 항원 상의 단일한 결정자에 대해 유도된다. 이와 같이, 수식어 "단일클론성"은, 항체의 실질적으로 동종성인 모집단으로부터 수득된 항체의 특성을 지시하고, 이는 임의의 특정 방법에 의해 항체를 생산함을 필요로 하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 예를 들면, 본 발명에 따라 사용되는 단일클론성 항체는 다양한 기법에 의해 제조될 수 있고, 제한되지 않지만, 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파아지-표시 방법, 및 인간 면역글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부를 포함하는 유전자이식 동물을 이용하는 방법이 포함되고, 이러한 방법 및 단일클론성 항체를

제조하는 다른 예시적인 방법은 본원에 기재되어 있다.

[0047] 용어 "Fc 도메인" 또는 "Fc 영역"은 본원에서 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 항체 중쇄의 C-말단 영역을 규정하기 위해 사용된다. 이 용어는 고유의 서열 Fc 영역 및 변형 Fc 영역을 포함한다. IgG Fc 영역은 IgG CH2 및 IgG CH3 도메인을 포함한다. 인간 IgG Fc 영역의 "CH2 도메인"은 대체적으로 대략 위치 231에서의 아미노산 잔기로부터 대략 위치 340에서의 아미노산 잔기로 연장된다. 하나의 실시태양에서, 탄수화물 쇄는 CH2 도메인에 부착된다. CH2 도메인은 본원에서 고유의 서열 CH2 도메인 또는 변형 CH2 도메인일 수 있다. "CH3 도메인"은 잔기 C-말단에서 CH2 도메인으로의 연장부를 Fc 영역에 포함한다(즉, IgG의 대략 위치 341에서의 아미노산 잔기로부터 대략 위치 447에서의 아미노산 잔기까지). CH3 영역은 본원에서 고유의 서열 CH3 도메인 또는 변형 CH3 도메인일 수 있다(예를 들어 그의 하나의 쇄에 도입된 "돌출부"("노브")를 갖고 그의 나머지 쇄에 상응하는 도입된 "강"("홀")을 갖는 CH3 도메인; 명백히 본원에 참고로 인용된 미국 특허 제5,821,333호 참조). 이러한 변형 CH3 도메인은 본원에 기재된 바와 같이 2개의 동일하지 않은 항체 중쇄의 이종이량체화를 촉진시키기 위해 사용될 수 있다. 하나의 실시태양에서, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 Cys226으로부터, 또는 Pro230으로부터 중쇄의 카복실-말단까지 연장된다. 그러나, Fc 영역의 C-말단 라이신(Lys447)은 존재하거나 존재하지 않을 수 있다. 본원에 달리 구체화되지 않는 한, Fc 영역 또는 불변 영역에서 아미노산 잔기의 번호매김은 카밧(Kabat, E.A.) 등의 문헌[Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에 기재된 바와 같이, EU 색인으로도 불리는 EU 번호매김 체제에 따른다.

[0048] 용어 "효과기 기능"은 항체 이소타입에 따라 상이한, 항체의 Fc 영역에 기인하는 생물 활성을 지칭한다. 항체 효과기 기능의 예로는: Clq 결합 및 보체 의존성 세포독성(CDC), Fc 수용체 결합, 항체-의존성 세포-매개된 세포독성(ADCC: cell-mediated cytotoxicity), 항체-의존성 세포 식세포작용(ADCP: antibody-dependent cellular phagocytosis), 사이토킨 분비, 항원 제공 세포에 의한 면역 착체-중재된 항원 섭취, 세포 표면 수용체(예를 들어 B 세포 수용체)의 하향 조절, 및 B 세포 활성화가 포함된다.

[0049] "활성화 Fc 수용체"는 항체의 Fc 영역에 의한 수반되는 작용이 효과기 기능을 수행하도록 수용체-함유 세포를 자극하는 신호전달 사건을 이끌어내는 Fc 수용체이다. 활성화 Fc 수용체로는 FcγRIIIa(CD16a), FcγRI(CD64), FcγRIIa(CD32), 및 FcαRI(CD89)가 포함된다. 구체적인 활성화 Fc 수용체는 인간 FcγRIIIa(유니프로트 수탁번호 P08637(버전 141) 참조)이다.

[0050] 용어 "펩티드 연결기"는 하나 이상의 아미노산, 전형적으로 약 2 내지 20개 아미노산을 포함하는 펩티드를 지칭한다. 펩티드 연결기는 당분야에 공지되거나 본원에 기재되어 있다. 적합한, 비-면역원성 연결기 펩티드로는, 예를 들면, $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$ 또는 $G_4(SG_4)_n$ 펩티드 연결기가 포함된다. "n"은 일반적으로 1 내지 10, 전형적으로 2 내지 4의 수이다.

[0051] "개질 촉진 이종이량체화"는 펩티드 주쇄의 조작 또는 폴리펩티드의 번역후 개질이고, 예를 들어 폴리펩티드와 동일한 폴리펩티드가 회합하여 동종이량체를 형성하는 것을 감소시키거나 방지하는 항체 중쇄이다. 개질 촉진 이종이량체화는 본원에 사용될 경우 특히 이량체를 형성하고자 하는 2개의 폴리펩티드 각각에 이루어지는 별도의 개질을 포함하고, 여기서 개질은 2개의 폴리펩티드의 회합을 촉진시키도록 서로 상보적이다. 예를 들면, 개질 촉진 이종이량체화는 이량체를 형성하고자 하는 폴리펩티드중 하나 또는 둘다의 구조 또는 전하를 변경시켜, 이들의 회합을 각각 입체적으로 또는 정전기적으로 우호적으로 만든다. 이종이량체화는 2종의 동일하지 않은 폴리펩티드, 예컨대 2개의 항체 중쇄 사이에 초래되고, 여기서 각각의 중쇄에 부착된 추가의 성분(예를 들어 효과기 잔기)은 동일하지 않다. 본 발명에 따른 항체에서, 개질 촉진 이종이량체화는 Fc 도메인, 특히 CH3 도메인에 존재한다. 몇몇 실시태양에서, 개질 촉진 이종이량체화는 아미노산 돌연변이, 구체적으로 아미노산 치환을 포함한다. 하나의 구체적인 실시태양에서, 개질 촉진 이종이량체화는 별도의 아미노산 돌연변이, 구체적으로 아미노산 치환을 두개의 항체 중쇄 각각에 포함한다.

[0052] "노브-인투-홀 개질"은 CH3 도메인에서 2개의 항체 중쇄 사이의 계면내의 개질을 지칭하고, 여기서 i) 1개의 중쇄의 CH3 도메인에서, 아미노산 잔기는 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체됨으로써 1개의 중쇄의 CH3 도메인에서 계면내에 돌출부("노브")를 생성하는데, 이는 다른 중쇄의 CH3 도메인에서 계면내의 강("홀")에 위치가능하고, ii) 나머지 중쇄의 CH3 도메인에서, 아미노산 잔기는 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체됨으로써 제2 CH3 도메인에서 계면내에 강("홀")을 생성하고, 이의 내부에 제1 CH3 도메인에서의 계면내의 돌출부("노브")가 위치가능하다. 하나의 실시태양에서, "노브-인투-홀 개질"은 항체 중쇄중 하나에서 아미노산 치환 T366W 및 선택적으로 아미노산 치환 S354C를 포함하고, 항체 중쇄중 나머지 하나에서 아미노산 치환

T366S, L368A, Y407V 및 선택적으로 Y349C를 포함한다.

[0053] 아미노산 "치환"은 폴리펩티드에서 하나의 아미노산이 다른 아미노산으로 대체됨을 지칭한다. 하나의 실시태양에서, 아미노산은 유사한 구조적 및/또는 화학적 특성을 갖는 다른 아미노산으로 대체된다(예를 들어, 보존적 아미노산 대체). "보존적" 아미노산 치환은 관여된 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성, 및/또는 양친매성 성질에서의 유사성에 기초하여 이루어질 수 있다. 예를 들면, 비극성(소수성) 아미노산으로는 알라닌, 로이신, 이소로이신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판 및 메티오닌이 포함되고; 극성 중성 아미노산으로는 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민이 포함되고; 양성적으로 하전된 (염기성) 아미노산으로는 아르기닌, 라이신, 및 히스티딘이 포함되고; 음성적으로 하전된 (산성) 아미노산으로는 아스파르트산 및 글루탐산이 포함된다. 비-보존적 치환은 이들 부류중 하나의 구성원을 다른 부류로 교환함을 필요로 할 것이다. 예를 들면, 아미노산 치환은 또한 하나의 아미노산을 상이한 구조적 및/또는 화학적 특성을 갖는 다른 아미노산으로 대체할 수 있고, 예를 들면, 하나의 군(예를 들어 극성)으로부터의 아미노산을 상이한 군(예를 들어, 염기성)으로부터의 다른 아미노산으로 대체할 수 있다. 아미노산 치환은 당분야에 잘 공지된 유전적 또는 화학적 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 유전적 방법으로는 부위-지향된 돌연변이생성, PCR, 유전자 합성 등이 포함될 수 있다. 유전적 조작 이외의 다른 방법, 예컨대 화학적 개질에 의한 아미노산의 측쇄 기를 변경하는 방법이 또한 유용할 수 있는 것으로 고려된다. 동일한 아미노산 치환을 나타내기 위해 다양한 명칭이 본원에서 사용될 수 있다. 예를 들면, Fc 도메인의 위치 329에서 프롤린으로부터 글리신으로의 치환은 329G, G329, G_{329}, P329G, 또는 Pro329Gly로서 지시될 수 있다.

[0054] 기준 폴리펩티드 서열에 대한 "아미노산 서열 동일성 퍼센트(%)"는, 필요할 경우, 최대 서열 동일성 퍼센트를 달성하기 위해 서열을 정렬하고 갭(gap)을 도입한 후, 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존적 치환을 고려하지 않고, 기준 폴리펩티드 서열중의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열중의 아미노산 잔기의 백분율로 정의된다. 아미노산 서열 동일성 퍼센트를 결정하기 위한 정렬은 당분야의 기술에 속하는 다양한 방식으로, 예를 들어 공개적으로 입수가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 메그얼라인(Megalign)(DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성될 수 있다. 당분야의 숙련가라면, 비교되는 서열의 전장에 대하여 최대 정렬을 달성하기 위해 요구되는 임의의 알고리즘을 비롯하여, 서열 정렬을 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적을 위해, 아미노산 서열 동일성% 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크 인코포레이티드(Genentech, Inc.)에 의해 제조되고, 원시 코드(source code)는 사용자 기록문서와 함께 미국 워싱턴 디 씨 20559 소재의 미국 저작권 사무소(Copyright Office)에 보관되어 있고, 여기서 이는 미국 저작권 등록 번호 제TXU510087호하에 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 미국 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코 소재의 제넨테크 인코포레이티드로부터 공개적으로 입수가능하거나, 원시 코드로부터 컴파일링될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은, 디지털 유닉스(UNIX) V4.0D를 비롯하여, 유닉스 작동 시스템 상에서 사용하기 위해 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 매개변수는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되고, 달라지지 않는다. ALIGN-2가 아미노산 서열 비교를 위해 이용되는 상황에서, 소정의 아미노산 서열 B로의, B와의, 또는 B에 대한 소정의 아미노산 서열 A의 아미노산 서열 동일성%(이는 다르게는 소정의 아미노산 서열 B로의, B와의 또는 B에 대한 특정한 아미노산 서열 동일성%를 갖거나 포함한 소정의 아미노산 서열 A로서도 표현될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다:

[0055] X/Y 분율 × 100

[0056] 상기 식에서,

[0057] X는 A 및 B의 프로그램 정렬에서 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2와의 동일한 부합성으로서 획득된 아미노산 잔기의 수이고;

[0058] Y는 B에서의 아미노산 잔기의 총 수이다.

[0059] 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우, B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성%는 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성%와 동일하지 않을 것임을 이해할 것이다. 달리 특히 언급되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 아미노산 서열 동일성% 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 바로 앞 문단에서 기재된 바와 같이 수득된다.

[0060] "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 본원에서 상호교환적으로 사용될 경우, 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체를 지칭하고, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 개질된 뉴클레오티드 또는 염기, 및/또는 이들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 폴리머라아제(polymerase)에 의해 또는 합

성 반응에 의해 중합체내로 혼입될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 개질된 뉴클레오티드, 예컨대 메틸화된 뉴클레오티드 및 이들의 유사체를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드의 서열은 비-뉴클레오티드 성분들에 의해 가로막힐 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 합성, 예컨대 표지로의 접합 이후 개질을 포함할 수 있다.

[0061] 용어 "벡터"는, 본원에서 사용될 경우, 이것이 연결되는 다른 핵산을 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 이 용어는 자가-복제 핵산 구조물, 및 이것이 도입되는 숙주 세포의 게놈내로 혼입된 벡터를 포함한다. 특정 벡터는 이들이 작동적으로 연결된 핵산의 발현을 유도할 수 있다. 이러한 벡터는 "발현 벡터"로서 본원에 지칭된다.

[0062] 용어 "숙주 세포", "숙주 세포주", 및 "숙주 세포 배양액"은 상호교환적으로 사용되고, 이러한 세포의 자손체를 비롯하여 외래성 핵산이 도입되어진 세포를 지칭한다. 숙주 세포는 "형질전환체" 및 "형질전환 세포"를 포함하고, 이는 계대배양의 수와 무관하게 1차 형질전환된 세포 및 이로부터 유래된 자손체를 포함한다. 자손체는 핵산 함량에 있어서 모 세포와 완전히 동일하지 않을 수 있고, 돌연변이를 포함할 수 있다. 고유적으로 형질전환된 세포에서 스크리닝되거나 선택될 때 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이 자손체가 본원에 포함된다. 숙주 세포는 본 발명의 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있는 임의의 유형의 세포 시스템이다. 숙주 세포로는 배양된 세포, 예를 들어 포유동물 배양된 세포, 예컨대 CHO 세포, BHK 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마(hybridoma) 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 및 식물 세포, 몇개만 예를 들자면, 또한 세포 유전자이식 동물, 유전자이식 식물 또는 배양된 식물 또는 동물 조직내에 포함된 세포가 포함된다.

[0063] 제제의 "효과량"은 제제가 투여되는 세포 또는 조직에서 생리학적 변화를 초래하기에 필요한 양을 지칭한다.

[0064] 제제, 예를 들어 약학 조성물의 "치료 효과량"은, 원하는 치료학적 또는 예방학적 결과를 달성하기 위해, 필수적인 시간 기간 동안 투여량에서 효과적인 양이다. 제제의 치료 효과량은 예를 들면 질환의 부정적 영향을 제거, 감소, 지연, 최소화 또는 방해한다.

[0065] "개체" 또는 "피험체"는 포유동물이다. 포유동물로는, 제한되지 않지만, 가축 동물(예를 들어, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류(예를 들어, 인간 및 인간 이외의 영장류, 예컨대 원숭이), 토끼, 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)가 포함된다. 특히, 개체 또는 피험체는 인간이다.

[0066] 용어 "약학 조성물"은 이에 포함된 활성 구성성분의 생물학적 활성이 효과적이도록 허용하는 형태이고, 제형이 투여되는 피험체에 허용되지 않도록 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다.

[0067] "약학적으로 허용가능함 담체"는 피험체에 무독성인 활성 구성성분 이외의 약학 제형중의 구성성분을 지칭한다. 약학적으로 허용가능함 담체로는, 제한되지 않지만, 완충액, 부형제, 안정화제 또는 보존제가 포함된다.

[0068] 본원에서 사용될 경우, "치료"(및 이의 문법적인 변형어, 예컨대 "치료하다" 또는 "치료하는")는 치료될 개체에서 질환의 자연적 과정을 변경시키는 시도에 있어서의 임상적 개입을 지칭하고, 임상적 병리 과정 동안 또는 예방을 위해 수행될 수 있다. 요망되는 치료 효과로는, 제한되지 않지만, 질환의 발생 또는 재발의 방지, 증후의 경감, 질병의 임의의 직접적인 또는 간접적인 병리학적 결과의 감소, 전이의 방지, 질병 진행 속도의 감소, 질병 상태의 개선 또는 일시적 억제, 및 경감 또는 개선된 예후가 포함된다. 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 항체는 질병의 전개를 지연시키거나 질병의 진행을 둔화시키기 위해 사용된다.

[0069] **본 발명의 항체**

[0070] 본 발명은 아시알로당단백질 수용체(ASGPR)에 결합하는 신규한 항체, 특히 단일클론성 항체를 제공한다.

[0071] 제1 양태에서, 본 발명은 아시알로당단백질 수용체(ASGPR)에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 제공하고, 여기서 이러한 항체는 a) 서열 번호 16의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 14의 경쇄 가변 영역 서열; b) 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 2의 경쇄 가변 영역 서열; c) 서열 번호 8의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 6의 경쇄 가변 영역 서열; d) 서열 번호 12의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 10의 경쇄 가변 영역 서열; e) 서열 번호 20의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 18의 경쇄 가변 영역 서열; f) 서열 번호 24의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 22의 경쇄 가변 영역 서열; g) 서열 번호 28의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 26의 경쇄 가변 영역 서열; h) 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 30의 경쇄 가변 영역 서열; i) 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 32의 경쇄 가변 영역 서열; j) 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 34의 경쇄 가변 영역 서열; 또는 k) 서열 번호 24의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열

번호 22의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0072] 본 발명에 따른 구체적인 항체는 서열 번호 16의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 14의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 이러한 항체 클론은 4F3으로 지정된다. 본 발명에 따른 다른 구체적인 항체는 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 2의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 이러한 항체는 51A12로 지정된다.

[0073] 본 발명은 ASGPR에 특이적으로 결합할 수 있고 ASGPR의 에피토프에 결합하기 위해 항체 4F3과 경쟁하는 항체를 제공한다. 하나의 실시태양에서, 이러한 항체는 4F3과 동일한 에피토프에 결합한다. 4F3 항체는 ASGPR의 자루 영역에서 에피토프를 인식한다. 따라서, 하나의 실시태양에서, 이러한 항체는 ASGPR의 자루 영역에서 에피토프를 인식한다. 또한 4F3 항체의 친화도 성숙된 변형체가 본 발명에 의해 고려된다. 하나의 실시태양에서, 이러한 항체는 서열 번호 16의 서열에 약 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 14의 서열에 약 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 이러한 항체는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개, 특히 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 14의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 이러한 항체는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개, 특히 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 16의 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 4F3 항체의 변형체는 또한 4F3의 중쇄 가변 영역과 동일한 중쇄 가변 영역을, 변형체 경쇄 가변 영역과 함께 포함할 수 있거나, 그 반대이다.

[0074] 본 발명은 추가로 ASGPR에 특이적으로 결합할 수 있고 ASGPR의 에피토프에 결합하기 위해 항체 51A12와 경쟁하는 항체를 제공한다. 하나의 실시태양에서, 이러한 항체는 51A12와 동일한 에피토프에 결합한다. 51A12 항체는 ASGPR의 탄수화물 인식 도메인(CRD)에서 에피토프를 인식한다. 따라서, 하나의 실시태양에서, 이러한 항체는 ASGPR의 CRD에서 에피토프를 인식한다. 또한 51A12 항체의 친화도 성숙된 변형체, 특히 경쇄 CDR3 또는 51A12의 랜덤화에 의해 수득된 변형체가 본 발명에 의해 고려된다. 하나의 실시태양에서, 이러한 항체는 서열 번호 4의 서열에 약 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 2의 서열에 약 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 이러한 항체는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개, 특히 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 2의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 이러한 항체는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개, 특히 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 51A12 항체의 변형체는 또한 51A12의 중쇄 가변 영역과 동일한 중쇄 가변 영역을, 변형체 경쇄 가변 영역과 함께 포함할 수 있거나, 그 반대이다. 하나의 실시태양에서, 이러한 항체는 a) 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 36의 경쇄 가변 영역 서열; b) 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 38의 경쇄 가변 영역 서열; c) 서열 번호 8의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 40의 경쇄 가변 영역 서열; d) 서열 번호 12의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 42의 경쇄 가변 영역 서열; e) 서열 번호 20의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 44의 경쇄 가변 영역 서열; f) 서열 번호 24의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 46의 경쇄 가변 영역 서열; 또는 g) 서열 번호 28의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 48의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0075] 바람직하게는, 본 발명의 항체는 인간 항체이고, 즉 항체는 인간 가변성 및 불변 영역을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 항체는 인간 Fc 영역, 특히 인간 IgG Fc 영역, 더욱 특히 인간 IgG_1 Fc 영역을 포함한다. 본 발명에 따른 구체적인 항체는 전장 항체, 특히 전장 IgG 부류 항체, 더욱 특히 전장 IgG_1 하위부류 항체이다. 다르게는, 항체는 항체 단편일 수 있다. 하나의 실시태양에서, 항체는 Fab 단편 또는 scFv 단편이다. 몇몇 실시태양에서, 항체는 면역글로불린 힌지 영역, 특히 인간 IgG 힌지 영역, 더욱 특히 인간 IgG_1 힌지 영역에 의해 연결된, Fab 단편 및 Fc 영역, 특히 인간 IgG Fc 영역, 더욱 특히 인간 IgG_1 Fc 영역을 포함한다. 구체적으로, 항체는 추가의 Fab 단편이 존재하지 않는 면역글로불린 힌지 영역에 의해 연결된 Fab 단편 및 Fc 영역을 포함할 수 있다. 이러한 실시태양에서, 항체는 본질적으로 Fab 단편이 결핍된 전장 항체이다.

[0076] 본 발명의 항체에 포함된 Fc 영역은 고유의 Fc 영역과 비교하여 다양한 개질을 포함할 수 있다.

[0077] Fc 도메인이 항체에 우호적인 약동학적(pharmacokinetic) 특성, 예컨대 표적 조직에서의 양호한 축적 및 우호적인 조직-혈액 분포 비에 기여하는 긴 혈청 반감기를 부여하는 반면, 이는 동시에 바람직한 항원-함유 세포를 표적화하기 보다는 Fc 수용체를 발현하는 세포에 항체를 원치않게 표적화할 수 있다. 게다가, Fc 수용체 신호전달 경로의 공동-활성화는 사이토킨 방출을 유도하고, 이는 특히 부착된 효과기 잔기(예를 들어 사이토킨)를 갖는 항체에서, 전신 투여시 심각한 부작용 및 사이토킨 수용체의 과도한 활성화를 초래한다. 따라서, 몇몇 실시태양에서, 항체는, 개질되지 않은 Fc 영역을 포함하는 상응하는 항체와 비교하여, Fc 수용체, 특히 Fcγ 수용체

로의 항체의 결합 친화도를 감소시키는 개질을 Fc 영역에 포함한다. Fc 수용체로의 결합은 예를 들어 ELISA에 의해, 또는 표면 플라스몬 공명(SPR)에 의해 표준 기기, 예컨대 비아코어 기기(GE 헬쓰케어)를 사용하여 쉽게 결정될 수 있고, Fc 수용체는 예컨대 재조합 발현에 의해 수득될 수 있다. 결합 친화도를 측정하기 위한 구체적인 예시적 실시태양은 하기에 기재된다. 하나의 실시태양에 따라서, Fc 수용체로의 결합 친화도는 표면 플라스몬 공명에 의해 비아코어(등록상표) T100 기계(GE 헬쓰케어)를 사용하여, 25℃에서 CM5 칩 상에 고정화된 리간드(Fc 수용체)에 의해 측정된다. 간단히, 카복시메틸화된 덱스트란 바이오센서 칩(CM5, GE 헬쓰케어)은 N-에틸-N'-(3-다이메틸아미노프로필)-카보다이미드 하이드로클로라이드(EDC) 및 N-하이드록시석신이미드(NHS)에 의해 공급자의 지시에 따라 활성화된다. 재조합 리간드는 10 mM 아세트산 나트륨(pH 5.5)에 의해 0.5 내지 30 ㎍/㎖로 희석된 후, 10 ㎕/분의 유동 속도로 주입되어 커플링된 단백질의 약 100 내지 5000 응답 단위(RU: response unit)를 달성한다. 리간드의 주입 이후, 1 M 에탄올아민이 주입되어 미반응된 기를 차단한다. 동역학 측정을 위해, 항체의 3배 내지 5배의 연속적 희석물(약 0.01 nM 내지 300 nM의 범위)이 HBS-EP+(GE 헬쓰케어, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% 계면활성제 P20, pH 7.4)에서 25℃하에 대략 30 내지 50 ㎕/분의 유동 속도로 주입된다. 회합 속도($k_{회합}$) 및 해리 속도($k_{해리}$)는, 단순 1 대 1 랑뮤(Langmuir) 결합 모델[비아코어(등록상표) T100 평가 소프트웨어 버전 1.1.1]을 사용하여 회합 및 해리 센서그램을 동시에 정합시킴으로써 계산된다. 평형 해리 상수(K_D)는 $k_{해리}/k_{회합}$ 비로 계산된다. 예를 들어, 첸(Chen) 등의 문헌[J Mol Biol 293, 865-881 (1999)]을 참조한다. 다르게는, Fc 수용체에 대한 항체의 결합 친화도는 구체적인 Fc 수용체를 발현하는 것으로 공지된 세포주, 예컨대 FcγIIIa 수용체를 발현하는 NK 세포를 사용하여 평가될 수 있다.

[0078] 개질은 Fc 수용체로의 항체의 결합 친화도를 감소시키는 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함한다. 전형적으로, 동일한 하나 이상의 아미노산 돌연변이는 Fc 도메인중 2개의 항체 중쇄 각각에 존재한다. 하나의 실시태양에서, 상기 아미노산 돌연변이는 Fc 수용체로의 항체의 결합 친화도를 적어도 2배, 적어도 5배, 또는 적어도 10배 감소시킨다. Fc 수용체로의 항체의 결합 친화도를 감소시키는 아미노산 돌연변이가 1개 보다 많이 존재하는 실시태양에서, 이들 아미노산 돌연변이의 조합은 Fc 수용체로의 항체의 결합 친화도를 적어도 10배, 적어도 20배, 또는 심지어 적어도 50배 감소시킬 수 있다. 하나의 실시태양에서, 항체는 개질되지 않은 Fc 도메인을 포함하는 항체와 비교하여, 20% 미만, 특히 10% 미만, 더욱 특히 5% 미만의 Fc 수용체로의 결합 친화도를 나타낸다. 하나의 실시태양에서, Fc 수용체는 활성화 Fc 수용체이다. 하나의 구체적인 실시태양에서, Fc 수용체는 Fcγ 수용체, 더욱 구체적으로 FcγRIIIa, FcγRI 또는 FcγRIIa 수용체이다. 바람직하게는, 각각의 이들 수용체로의 결합이 감소된다. 몇몇 실시태양에서, 보체 성분에 대한 결합 친화도, 구체적으로 Clq에 대한 결합 친화도가 또한 감소된다. 하나의 실시태양에서, 신생 Fc 수용체(FcRn)에 대한 결합 친화도는 감소되지 않는다. FcRn으로의 실질적으로 유사한 결합, 즉 상기 수용체로의 항체의 결합 친화도의 보존은, 항체가 항체의 개질되지 않은 형태의 FcRn으로의 결합 친화도의 약 70%를 초과할 때 달성된다. 본 발명의 항체는 이러한 친화도의 약 80% 이상 및 심지어 약 90% 이상을 나타낼 수 있다. 하나의 실시태양에서, 아미노산 돌연변이는 아미노산 치환이다. 하나의 실시태양에서, 항체는 Fc 영역에서 위치 P329(EU 번호매김)에 아미노산 치환을 포함한다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 아미노산 치환은 P329A 또는 P329G, 특히 P329G이다. 하나의 실시태양에서, 항체는 추가의 아미노산 치환을 Fc 영역에서 S228, E233, L234, L235, N297 및 P331로부터 선택된 위치에 포함한다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 추가의 아미노산 치환은 S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D 또는 P331S이다. 하나의 구체적인 실시태양에서, 항체는 아미노산 치환을 Fc 영역에서 위치 P329, L234 및 L235에 포함한다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 항체는 아미노산 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G(LALA P329G)를 포함한다. 아미노산 치환의 이러한 조합은, 본원에 참고로 그의 전체가 인용된 PCT 특허출원 제PCT/EP2012/055393호에 기재된 바와 같이, 인간 IgG 항체의 Fcγ 수용체 결합을 거의 완전히 제거한다. PCT 특허출원 제PCT/EP2012/055393호는 또한 이러한 개질된 항체를 제조하는 방법, 및 그의 특성, 예컨대 Fc 수용체 결합 또는 효과기 기능을 결정하기 위한 방법을 기재한다.

[0079] Fc 영역에서 개질을 포함하는 항체는 아미노산 결실, 치환, 삽입 또는 개질에 의해 당분야에 잘 공지된 유전적 또는 화학적 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 유전적 방법으로는 코딩 DNA 서열의 부위-특이적 돌연변이생성, PCR, 유전자 합성 등을 포함할 수 있다. 정확한 뉴클레오티드 변화는 예를 들면 서열분석(sequencing)에 의해 확인될 수 있다.

[0080] Fc 수용체 결합을 감소시키는 개질을 포함하는 항체는 일반적으로 상응하는 개질되지 않은 항체에 비해 감소된 효과기 기능, 특히 감소된 ADCC를 갖는다. 몇몇 실시태양에서, 항체는 감소된 ADCC를 갖는다. 구체적인 실시태양에서, 감소된 ADCC는 개질되지 않은 Fc 영역을 포함하는 상응하는 항체에 의해 유도된 ADCC의 20% 미만이다. 항체의 효과기 기능은 당분야에 공지된 방법에 의해 측정될 수 있다. 관심있는 분자의 ADCC 활성을

평가하기 위한 시험관내 검정의 예는 미국 특허 제5,500,362호; 헬스트롬(Hellstrom) 등의 문헌[Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986)] 및 헬스트롬 등의 문헌[Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985)]; 미국 특허 제5,821,337호; 브루그게만(Bruggemann) 등의 문헌[J Exp Med 166, 1351-1361 (1987)]에 기재되어 있다. 다르게는, 비-방사성 검정 방법이 사용될 수 있다[예를 들면, 유세포분석을 위한 ACTI(등록상표) 비-방사성 세포독성 검정(셀테크놀로지 인코포레이티드(CellTechnology, Inc.), 미국 캘리포니아주 마운틴뷰 소재); 및 사이토톡스(CytoTox) 96(등록상표) 비-방사성 세포독성 검정[프로메가(Promega), 미국 위스콘신주 매디슨 소재)]. 이러한 검정에 유용한 효과기 세포로는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 천연 킬러(NK) 세포가 포함된다. 다르게는, 또는 추가적으로, 관심있는 분자의 ADCC 활성은 생체내, 예를 들어, 동물 모델, 예컨대 클리네스(Clynes) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 평가될 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 보체 성분, 구체적으로 Clq로의 항체의 결합이 또한 감소될 수 있다. 따라서, 보체-의존성 세포독성(CDC) 또한 감소될 수 있다. Clq 결합 검정은 항체가 Clq에 결합할 수 있고 이에 따라 CDC 활성을 갖는지의 여부를 결정하기 위해 실행될 수 있다. 예를 들어, 국제 특허출원공개 제WO 2006/029879호 및 제WO 2005/100402호에서의 Clq 및 C3c 결합 ELISA를 참조한다. 보체 활성화를 평가하기 위해, CDC 검정이 수행될 수 있다[예를 들면, 가자노-산토로(Gazzano-Santoro) 등의 문헌[J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]; 크래그(Cragg, M.S.) 등의 문헌[Blood 101:1045-1052 (2003)]; 및 크래그 및 글레니(M.J. Glennie) 등의 문헌[Blood 103:2738-2743 (2004)] 참조].

[0081] 상기 기재된 항체 및 PCT 특허출원 제PCT/EP2012/055393호에 기재된 항체에 더하여, Fc 수용체 결합 및/또는 효과기 기능이 감소된 항체로는 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329중 하나 이상이 치환된 항체가 포함된다(미국 특허 제6,737,056호). 이러한 Fc 돌연변이체로는 2개 이상의 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327에서 치환된 Fc 돌연변이체가 포함되고, 예로서 잔기 265 및 297이 알라닌으로 치환된, 소위 "DANA" Fc 돌연변이체가 있다(미국 특허 제7,332,581호).

[0082] IgG_4 항체는 IgG_1 항체에 비하여 Fc 수용체로의 감소된 결합 친화도 및 감소된 효과기 기능을 나타낸다. 따라서, 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 항체는 IgG_4 하위부류 항체, 특히 인간 IgG_4 하위부류 항체이다. 하나의 실시태양에서, IgG_4 항체는 Fc 영역에서 위치 S228에 아미노산 치환을, 구체적으로 아미노산 치환 S228P를 포함한다. Fc 수용체로의 그의 결합 친화도 및/또는 그의 효과기 기능을 추가로 감소시키기 위해, 하나의 실시태양에서, IgG_4 항체는 아미노산 치환을 위치 L235에서, 구체적으로 아미노산 치환 L235E를 포함한다. 다른 실시태양에서, IgG_4 항체는 위치 P329에 아미노산 치환을, 구체적으로 아미노산 치환 P329G를 포함한다. 하나의 구체적인 실시태양에서, IgG_4 항체는 위치 S228, L235 및 P329에 아미노산 치환을, 구체적으로 아미노산 치환 S228P, L235E 및 P329G를 포함한다. 이러한 개질된 IgG_4 항체 및 이들의 $Fc\gamma$ 수용체 결합 특성은 본원에 참고로 그의 전체가 인용된 PCT 특허출원 제PCT/EP2012/055393호에 기재된다.

[0083] 본 발명에 따른 항체는 부착된 효과기 잔기, 예컨대 사이토킨을 가질 수 있다. 구체적인 실시태양에서, 항체는 2개의 항체 중쇄중 하나에 융합된, 단지 하나의 단일 효과기 잔기를 포함하고, 이에 따라 이들 항체는 2개의 동일하지 않은 폴리펩티드 쇄를 포함한다. 유사하게, 본 발명의 항체는 Fab 단편중 하나가 결핍된 전장 항체일 수 있고, 이에 따라 전체 항체 중쇄 및 VH 및 CHI 도메인이 결핍된 항체 중쇄를 포함한다. 이들 폴리펩티드 및 후속적인 이량체화의 재조합 공동-발현은 2개의 폴리펩티드의 몇몇 가능한 조합을 유도하고, 이들중 2개의 동일하지 않은 폴리펩티드의 이종이량체만이 유용하다. 재조합 생산에서 이러한 항체의 수율 및 순도를 개선시키기 위해, 2개의 동일한 폴리펩티드(예를 들어 효과기 잔기를 포함하는 2개의 폴리펩티드, 또는 효과기 잔기가 결핍된 2개의 폴리펩티드)의 동종이량체의 형성을 방해하고/하거나 효과기 잔기를 포함하는 폴리펩티드 및 효과기 잔기가 결핍된 폴리펩티드의 이종이량체의 형성을 촉진시키는 개질을 항체의 Fc 영역에 도입하는 것이 유리할 수 있다. 따라서, 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 항체는 2개의 동일하지 않은 항체 중쇄의 이종이량체화를 촉진시키는 개질을 Fc 영역에 포함한다. 인간 IgG 항체의 2개의 중쇄 사이의 가장 광범위한 단백질-단백질 상호작용의 부위는 Fc 영역의 CH3 도메인에 존재한다. 이와 같이, 하나의 실시태양에서, 상기 개질은 Fc 영역의 CH3 도메인에 존재한다. 하나의 구체적인 실시태양에서, 상기 개질은 노브-인투-홀 개질이고, 2개의 항체 중쇄중 하나에 노브 개질을 포함하고 나머지 하나에 홀 개질을 포함한다. 노브-인투-홀 기술은 예를 들어 미국 특허 제5,731,168호; 미국 특허 제7,695,936호; 리지웨이(Ridgway) 등의 문헌[Prot Eng 9, 617-621 (1996)] 및 카터(Carter)의 문헌[J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)]에 기재되어 있다. 일반적으로, 이 방법은 돌출부가 강에 위치되어 이종이량체 형성을 촉진시키고 동종이량체 형성을 방해할 수 있도록 돌출부("노브")를 제1 폴리펩티드의 계면에 도입하고 상응하는 강("홀")을 제2 폴리펩티드의 계면에 도입함을 포함한다. 돌출부는 제1 폴

리펩티드의 계면으로부터의 작은 아미노산 측쇄를 더 큰 측쇄(예를 들어 티로신 또는 트립토판)로 대체함으로써 구조화된다. 돌출부에 동일하거나 유사한 크기의 상보적 강은, 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 아미노산(예를 들어 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체함으로써 제2 폴리펩티드의 계면에서 생성된다. 따라서, 하나의 실시태양에서, 항체는 CH3 도메인에서 2개의 항체 중쇄 사이의 계면에 개질을 포함하고, 여기서 i) 1개의 중쇄의 CH3 도메인에서, 아미노산 잔기는 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체됨으로써 1개의 중쇄의 CH3 도메인에서 계면내에 돌출부("노브")를 생성하는데, 이는 다른 중쇄의 CH3 도메인에서 계면내의 강("홀")에 위치가능하고, ii) 나머지 중쇄의 CH3 도메인에서, 아미노산 잔기는 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체됨으로써 제2 CH3 도메인에서 계면내에 강("홀")을 생성하고, 이의 내부에 제1 CH3 도메인에서의 계면내의 돌출부("노브")가 위치가능하다. 돌출부 및 강은 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 변경시킴으로써, 예를 들어 부위-특이적 돌연변이생성에 의해, 또는 펩티드 합성에 의해 이루어질 수 있다. 하나의 구체적인 실시태양에서, 노브 개질은 2개의 항체 중쇄중 하나에 아미노산 치환 T366W(EU 번호매김)를 포함하고, 홀 개질은 2개의 항체 중쇄중 나머지 하나에 아미노산 치환 T366S, L368A 및 Y407V(EU 번호매김)를 포함한다. 추가의 구체적인 실시태양에서, 노브 개질을 포함하는 항체 중쇄는 추가적으로 아미노산 치환 S354C를 포함하고, 홀 개질을 포함하는 항체 중쇄는 추가적으로 아미노산 치환 Y349C를 포함한다. 이들 2개의 시스테인 잔기의 도입은 2개의 항체 중쇄 사이에 다이설파이드 가교의 형성을 Fc 영역중에 형성하고, 추가로 이량체를 안정화시킨다[카터(Carter)의 문헌[J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)]]. 대안의 실시태양에서, 2개의 동일하지 않은 항체 중쇄의 이종이량체화를 촉진시키는 개질은, 예를 들어 PCT 공개공보 제WO 2009/089004호에 기재된 바와 같은 정전기적 조정 효과를 중재하는 개질을 포함한다. 일반적으로, 이러한 방법은 동종이량체 형성이 정전기적으로 바람직하지 않지만 이종이량체화는 정전기적으로 바람직하도록, 2개의 항체 중쇄의 계면에서 하전된 아미노산 잔기에 의한 하나 이상의 아미노산 잔기의 대체를 포함한다. 항체가 이에 부착된 효과기 잔기를 갖는 하나의 구체적인 실시태양에서, 효과기 잔기는 노브 개질을 포함하는 항체 중쇄의 아미노- 또는 카복시-말단 아미노산에 융합된다. 이론에 얽매려는 것은 아니지만, 효과기 잔기의 노브-함유 중쇄로의 융합은 추가로 2개의 효과기 잔기를 포함하는 동종이량체성 항체의 생성(2개의 노브-함유 폴리펩티드의 입체적 충돌)을 최소화할 것이다. 유사하게, 항체가 Fc 영역에 융합된 단지 1개의 단일 Fab 단편을 포함하는 실시태양에서, Fab 단편은 바람직하게는 노브 개질을 포함하는 Fc 영역의 중쇄에 융합된다.

[0084] 본 발명의 항체는, 예를 들면 치료학적 적용을 위해 특히 유리한 다수의 특성을 조합한다. 예를 들면, 항체는 인간 및 사이노몰구스 원숭이에 대해 교차-반응성이고, 이는 예를 들어 생체내 연구를 인간 사용 이전에 사이노몰구스 원숭이에서 가능하게 한다. 따라서, 하나의 실시태양에서, 본 발명의 항체는 인간 및 사이노몰구스 원숭이 ASGPR에 특이적으로 결합할 수 있다. 더욱이, 본 발명의 항체는 ASGPR에 특히 강한 친화도 및/또는 친화력(avidity)을 갖고 결합한다. 하나의 실시태양에서, 항체는 표면 플라스몬 공명(SPR)에 의해 Fab 단편으로서 측정시 1 μM 미만, 특히 100 nM 미만, 더욱 특히 1 nM 미만의 해리 상수(K_D)를 갖고 인간 ASGPR에 결합한다. SPR에 의한 결합 친화도를 측정하기 위한 방법이 본원에 기재된다. 구체적으로, 측정은 25℃의 온도에서 이루어진다. 하나의 실시태양에서, Fab 단편으로서의 항체의 친화도(K_D)는 뉴트라비딘(neutravidin) 포획에 의해 NLC 칩 상에 고정화된 비오티닐화된 모노-(avi-Fc-인간 ASGPR H1 CRD, 서열 번호 118) 또는 2가(avi-Fc-인간 ASGPR H1 자루-CRD, 서열 번호 130) ASGPR H1 항원에 의해 프로테온(ProteOn) XPR36 기기[바이오래드(Biorad)]를 사용하여 25℃에서 SPR에 의해 측정된다. 하나의 예시적인 방법에서, 고정화를 위한 항원은 PBST(10 mM 인산염, 150 mM NaCl pH 7.4, 0.005% 트윈-20)에 의해 10 ㎍/㎖로 희석되고, 다양한 접촉 시간에서 30 ㎕/분으로 주입되어, 수직 배향으로 200, 400 또는 800 응답 단위(RU)의 고정화 수준을 달성한다. 후속적으로, 분석물(항체)이 주입된다. 1회-시도(one-shot) 동역학 측정을 위해, 주입 방향은 수평 배향으로 변화되고, 정제된 Fab 단편의 일련의 2배 희석물(100 내지 6.25 nM의 다양한 농도 범위)이 별도의 채널 1 내지 5를 따라 50, 60 또는 100 ㎕/분으로 동시에 주입되고, 150 또는 200 초의 회합 시간, 및 240 또는 600 초의 해리 시간을 갖는다. 완충액(PBST)은 6번째 채널을 따라 주입되어 참고를 위해 "직렬식(in-line)" 블랭크(blank)를 제공한다. 회합 속도 상수($k_{회합}$) 및 해리 속도 상수($k_{해리}$)는 회합 및 해리 센서그램을 동시에 정합시킴으로써 프로테온 매니저(Manager) v3.1 소프트웨어에서 단순 1 대 1 랑뮤 결합 모델을 사용하여 계산된다. 평형 해리 상수(K_D)는 $k_{해리}/k_{회합}$ 비로서 계산된다. 재생은 수평 배향으로 10 mM 글리신(pH 1.5)을 100 ㎕/분의 유동 속도로 30 초의 접촉 시간 동안 사용하여 수행된다. 다른 실시태양에서, 항체는 형광 공명 에너지 전달(FRET: fluoresecence resonance energy transfer)에 의해 IgG_1로서 측정시 인간 ASGPR에 1 μM 미만, 특히 500 nM 미만, 더욱 특히 100 nM 미만 또는 심지어 10 nM 미만의 K_D를 갖고 결합된다. 결합 친화도(또는 친화력)를 FRET에 의해 측정하는 방법은 본원에 기재된다. 하나의 실시태양에서, 측정은 FRET 도너 분자로 표지화된 전장

ASGPR 단백질을 발현하는 세포를 항체와 접촉시키고, 결합된 항체를 적합한 FRET 억셉터 분자로 표지화된 2차 항체에 의해 검출함으로써 수행된다. 하나의 예시적인 방법에서, SNAP 태그(Tag)[시스바이오(Cisbio)로부터 구입된 플라스미드]를 코딩하는 DNA 서열은 PCR에 의해 증폭되고, 전장 인간 ASGPR H1 서열[오리진(Origene)]을 함유하는 발현 벡터내로 결찰된다. 생성된 융합 단백질은 C-말단 SNAP 태그를 갖는 전장 ASGPR H1로 구성된다. HEK293 세포는 형질감염 시약으로서 리포펙타민(Lipofectamine) 2000을 사용하여 10 ㎍의 DNA로 형질감염된다. 20 시간의 항온처리 시간 이후, 세포는 PBS로 세척되고 1 시간 동안 37℃에서 100 nM SNAP-Lumi4Tb(시스바이오)가 함유된 랩메드(LabMed) 완충액(시스바이오)중에서 항온처리되어, SNAP 태그의 특이적 표지화를 유도한다. 후속적으로, 세포는 랩메드 완충액으로 4회 세척되어 결합되지 않은 염료를 제거한다. 표지화 효능은 완충액과 비교하여 615 nm에서 테르븀의 방출을 측정함으로써 결정된다. 이어서 세포는 -80℃에서 동결되어 6 개월 이하 동안 저장될 수 있다. 친화력은 ASGPR-특이적 항체를 50 내지 0.39 nM 범위의 농도로 표지화된 세포(웰당 100 개 세포)에 첨가하고, 이후 항-인간 Fc-d2(시스바이오, 웰당 최종 200 nM)를 FRET를 위한 억셉터 분자로서 첨가함으로써 측정된다. 실온에서 3 시간의 항온처리 시간 이후, 억셉터 염료의 방출(665 nm)뿐만 아니라 도너 염료의 방출(615 nm)은 형광 판독기[빅터(Victor) 3, 퍼킨 엘머(Perkin Elmer)]를 사용하여 결정된다. 억셉터 대 도너 방출의 비가 계산되고, 배경 대조군(항-인간 Fc-d2를 갖는 세포)의 비는 차감된다. 곡선은 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism)5 소프트웨어에서 분석될 수 있고 K_D 값이 계산된다. 본 발명의 항체의 추가의 이점은,

이들이 ASGPR로의 결합을 위해 수용체(아시알로당단백질, 예를 들어 아시알로페투인)의 천연 리간드와 경쟁하지 않는다는 것, 즉, 항체 결합이 ASGPR 리간드의 존재에 의해 영향받지 않고 ASGPR의 천연 기능에 의해 간섭받지 않는다는 것이다. 하나의 실시태양에서, 항체는 ASGPR로의 결합을 위해 ASGPR의 천연 리간드와 경쟁하지 않는다. 하나의 구체적인 실시태양에서, ASGPR의 상기 천연 리간드는 아시알로페투인이다. 경쟁은 당분야에 잘 공지된 방법에 의해 측정될 수 있다. 하나의 실시태양에서, ASGPR의 천연 리간드와의 경쟁은 FACS에 의해, 예를 들면 ASGPR-발현 세포주, 형광 표지화된 리간드, 및 상이한 형광 표지를 갖는 2차 항체와 결합된 항체의 검출을 사용하여 측정된다. 하나의 예시적인 방법에서, 간세포 암종 세포주 HepG2가 사용된다. 96 웰 환저 플레이트에서 웰당 0.2의 미오(mio) 세포는 40 ㎕의 알렉사488 표지화된 아시알로페투인[태내 송아지 혈청으로부터, 시그마 알드리치(Sigma Aldrich) #A4781, 최종 농도 100 ㎍/㎖]과 함께 4℃에서 30 분 동안 항온처리된다. 결합은 칼슘의 존재하에 수행되는데, ASGPR에 결합하는 리간드가 칼슘 의존성이기 때문이다. 결합되지 않은 단백질은 세포를 0.1% BSA가 함유된 HBSS로 1회 세척함으로써 제거된다. 이어서 40 ㎕의 항-ASGPR 항체(30, 6, 및 1.25 ㎍/㎖ 최종 농도)를 100 ㎍/㎖의 아시알로페투인의 존재하에 세포에 첨가한다. 세포는 30 분 동안 4℃에서 항온처리되고, 결합되지 않은 단백질은 세포를 1회 세척함으로써 제거된다. APC-접합된 어피니퓨어(AffiniPure) 염소 항-인간 IgG Fc 감마 단편-특이적 2차 F(ab')2 단편[잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch) #109-136-170; 작업 용액 0.1% BSA가 함유된 HBSS중 1:50]이 2차 항체로서 사용된다. 4℃에서 30 분 동안 항온처리한 후, 결합되지 않은 2차 항체는 세척에 의해 제거된다. 세포는 1% PFA를 사용하여 고정되고, 리간드뿐만 아니라 항체의 결합은 BD FACS 칸토(Canto)II(소프트웨어 BD DIVA)를 사용하여 분석된다. 본 발명의 항체의 주요 이점은 ASGPR에 대한 이들의 높은 특이성이다. 예를 들면, 인간 ASGPR H1로의 이들의 강한 결합에도 불구하고, 항체는 인간 ASGPR H1의 가장 가까운 상동체로서 확인된 CLEC10A에 검출가능하게 결합하지 않는다. 하나의 실시태양에서, 항체는 CLEC10A, 특히 인간 CLEC10A에 검출가능하게 결합하지 않는다. 구체적으로, 항체는 CLEC10A에 검출가능하게 결합하지 않고, 여기서 결합은 SPR에 의해 측정된다(본원에 기재된 바와 같음). 게다가, 항체는 상응하는 표적화되지 않은 항체(이소타입 대조군)와 유사한 정도로만 ASGPR을 발현하지 않는 세포에 결합한다. 따라서, 하나의 실시태양에서, 항체는 ASGPR 발현이 결핍된 세포, 특히 인간 세포, 더욱 특히 인간 혈액 세포에 특이적으로 결합하지 않는다. ASGPR 발현이 결핍된 예시적인 세포로는 Hela 세포(경부암으로부터 유래된 인간 세포주), A459 인간 비-소세포 폐암 세포, 인간 배아 신장(HEK) 세포, 및 (인간) PBMC가 포함된다. 특정 세포로의 결합, 또는 결합 결핍은 예를 들면 FACS에 의해 쉽게 결정될 수 있다. 이러한 방법은 당분야에 잘 확립되어 있고, 또한 하기 실시예에 기재되어 있다. 항-ASGPR 항체의 중요한 특징은 이들의 내재화 특징이다. 예를 들면, 만일 항체가 ASGPR-발현 세포로 효과기 잔기를 표적화하기 위해 사용된다면, 항체는 효과기 잔기 수용체의 활성화를 위해 충분히 긴 시간 동안 세포 표면 상에 존재하는 것이 요망된다. 본 발명의 항체는, ASGPR에 결합될 때, ASGPR-발현 세포내로 내재화되지만, 이들은 세포 내부에서 분해되지 않으면서 세포 표면으로 다시 재순환된다. 따라서, 하나의 실시태양에서, 항체는 세포의 표면 상에서 ASGPR로 항체가 결합될 때 ASGPR을 발현하는 상기 세포내로 내재화된다. 하나의 구체적인 실시태양에서, 항체는 세포내로 이것이 내재화되는 것과 대략 동일한 속도로 상기 세포의 표면으로 다시 재순환된다. 세포 표면 단백질 또는 이에 결합되는 항체의 내재화 및 재순환은 확립된 방법, 예컨대 FACS 또는 (공초점) 현미경 기법에 의해 쉽게 측정될 수 있다. 하나의 실시태양에서, 내재화 및/또는 재순환은 FACS에 의해 측정된다. 항체가 지속되는 효과를 갖기 위해, 그의 표적 항원이 본질적으로 일정한 수준으로 존재하는 것이 중요하다. 빈번히, 항

체의 표적 항원으로의 결합은 후자의 하향조절을 유도하여, 항체의 효능을 감소시킨다. 그러나, 본 발명의 항체는 이러한 영향을 갖지 않는다. 하나의 실시태양에서, 항체는 항체가 세포의 표면 상에서 ASGPR에 결합될 때 상기 세포의 표면에서 ASGPR 발현의 하향조절을 유의하게 유도하지 않는다. 세포의 표면에서의 항원 발현의 수준은 확립된 방법, 예컨대 FACS에 의해 쉽게 결정될 수 있다.

[0085] **효과기 잔기가 부착된 항체**

[0086] 본 발명에 따른 특히 유용한 항체는 효과기 잔기를 갖는, 예를 들어 사이토킨이 부착된 항체이다. 효과기 잔기, 예컨대 사이토킨에 융합된 항체는 또한 본원에서 면역 접합체로서 지칭된다. 부착된 효과기 잔기를 갖는 항체는 본 발명의 항체에 관하여 상기 본원에 기재된 임의의 특징을 한가지만 또는 조합하여 혼입할 수 있다.

[0087] 따라서, 하나의 양태에서, 본 발명은 임의의 상기 실시태양에 따라 ASGPR에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 제공하고, 여기서 효과기 잔기는 항체에 부착된다. 하나의 실시태양에서, 1개 이하의 효과기 잔기가 항체에 부착된다. 추가의 효과기 잔기의 부재는 개개의 효과기 잔기 수용체가 존재하는 부위에 항체를 표적화함을 감소시킬 수 있고, 이에 따라 항체의 실질적 표적 항원인 ASGPR이 존재하는 부위로 표적화하고 이에 축적됨을 개선시킨다. 더욱이, 개개의 효과기 잔기 수용체를 위한 친화력 효과의 부재는, 항체의 정맥내 투여시 말초 혈액에서 효과기 잔기 수용체-양성 세포의 활성화를 감소시킬 수 있다. 본 발명에 사용하기 위한 효과기 잔기는 일반적으로, 예를 들면, 신호 전달 경로를 통해 세포 활성에 영향을 주는 폴리펩티드이다. 따라서, 본 발명에 유용한 효과기 잔기는 세포내에서 반응을 조절하기 위해 세포 막 바깥쪽으로부터 신호를 전달하는 수용체-중재된 신호전달과 연관될 수 있다. 예를 들면, 효과기 잔기는 사이토킨일 수 있다. 구체적인 실시태양에서, 효과기 잔기는 인간이다. 구체적인 실시태양에서, 효과기 잔기는 펩티드 분자이고, 펩티드 결합을 통해 항체에 융합된다(즉, 항체 및 효과기 잔기는 융합 단백질을 형성함). 하나의 실시태양에서, 효과기 잔기는 단일-쇄 펩티드 분자이다. 추가의 실시태양에서, 효과기 잔기는, 선택적으로 펩티드 연결기를 통해, 그의 아미노-말단 아미노산에서 항체의 중쇄중 하나의 카복시-말단 아미노산에 융합된다. 적합한 비면역원성 펩티드 연결기로는, 예를 들면, $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$ 또는 $G_4(SG_4)_n$ 펩티드 연결기가 포함되고, "n"은 일반적으로 1 내지 10, 전형적으로 2 내지 4의 수이다. 상기 기재된 바와 같이 항체가 노브-인투-홀 개질을 Fc 영역에 포함하는 실시태양에서, 노브 개질을 포함하는 항체 중쇄에 효과기 잔기를 융합하는 것이 바람직하다.

[0088] 하나의 실시태양에서, 상기 효과기 잔기는 사이토킨 분자이다. 유용한 사이토킨의 예로는, 제한되지 않지만, GM-CSF, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-21, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, MIP-1α, MIP-1β, TGF-β, TNF-α, 및 TNF-β가 포함된다. 하나의 실시태양에서, 상기 사이토킨 분자는, 선택적으로 펩티드 연결기를 통해, 그의 아미노-말단 아미노산에서 항체 중쇄중 하나의 카복시-말단 아미노산으로 융합된다. 하나의 실시태양에서, 상기 사이토킨 분자는 인간 사이토킨이다. 하나의 실시태양에서, 상기 사이토킨 분자는 인터페론 분자이다. 하나의 구체적인 실시태양에서, 상기 인터페론 분자는 인터페론 알파, 특히 인간 인터페론 알파, 더욱 특히 인간 인터페론 알파 2(서열 번호 138 참조) 또는 인간 인터페론 알파 2a(서열 번호 139 참조)이다. 인터페론 알파는 항-바이러스성 활성을 갖는 것으로 공지되어 있다. 따라서 인터페론 분자를 본 발명의 항체에 부착시킴은 바이러스-감염된 ASGPR-발현 세포를 표적화하는데 특히 유용하다. 사이토킨 분자가 인터페론 분자인 하나의 실시태양에서, 항체는 표면 상에 ASGPR을 발현하는 세포에서 항-바이러스 활성을 갖는다. 하나의 실시태양에서, 상기 세포는 간의 세포, 특히 간세포, 더욱 특히 인간 간세포이다. 하나의 실시태양에서, 상기 항-바이러스성 활성은 선택적이다. 하나의 구체적인 실시태양에서, 항체는 표면 상에 ASGPR을 유의한 수준으로 발현하지 않는 세포에서 항-바이러스 활성을 갖지 않는다. 하나의 실시태양에서, 상기 세포는 혈액 세포, 특히 인간 혈액 세포이다. 하나의 실시태양에서, 본 발명에 따른 항-ASGPR 항체에 부착된 인터페론 분자의 이러한 선택성은, 임의의 의도된 표적 세포(예를 들어 간세포) 및 영향받지 않아야 할 세포(예를 들어 혈액 세포) 사이를 구별하지 않는 표적화되지 않은 인터페론 분자와 대조적이고, 큰 독성 문제 없이 가능한 치료학적 용도를 위해 중요하다. 추가의 구체적인 실시태양에서, 상기 항-바이러스 활성은 바이러스성 감염의 저해, 바이러스 복제의 저해, 세포 사멸의 저해, 및 하나 이상의 인터페론-자극된 유전자의 유도로부터 선택된다. 하나의 구체적인 실시태양에서, 하나 이상의 인터페론-자극된 유전자는 MX1(믹소바이러스 내성 1, 또한 인터페론-유도된 단백질 p78로서도 공지됨), RSAD2(라디칼 S-아데노실 메티오닌 도메인 함유 2, 또한 사이토메갈로바이러스-유도된 유전자 5로서도 공지됨), HRASLS2(HRAS-유사 억제제 2), IFIT1(테트라트리코펩티드 반복부 1을 갖는 인터페론-유도된 단백질), 및 IFITM2(인터페론-유도된 막간 단백질 2)로 구성된 군으로부터 선택된다. 하나의 실시태양에서, 하나 이상의 인터페론-자극된 유전자의 유도는, 인터페론 분자가 부착되지 않은 상응하는 항체에 의한 유도에 비해, mRNA 수준에서 적어도 1.5배, 특히 적어도 2배, 더욱 특히 적어도 5배이다. mRNA 수준에서의 유전자 유도는 당분야에 잘 확립된 방법, 예컨대 본원에 기재된 바와 같은 정량적 역-전

사(RT: reverse-transcription) PCR 또는 마이크로어레이 분석에 의해 측정될 수 있다. 세포 사멸의 저해는, 세포가 시험 화합물과 예비항온처리되고, 이후 바이러스가 첨가되고 항온처리후 살아있는 세포를 정량화하는 바이러스 보호 검정에 의해 결정될 수 있다. 하나의 예시적인 이러한 검정은 실시예에 기재되어 있다. 마딘-다비 소 신장(MDBK: Madin-Darby bovine kidney) 세포는 항체 및 대조군과 함께 1 내지 4 시간 동안 예비-항온처리된다. 이어서 수포성 구내염 바이러스가 추가의 16 내지 24 시간 동안 첨가된다. 이러한 항온처리 단계의 종결시, 살아있는 세포는 크리스탈 바이올렛(crystal violet) 염색 용액(0.5%)으로 염색되고, 살아있는 세포의 정량화는 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 550 내지 600 nm에서 690 nm의 기준 파장을 갖고 수행된다. 바이러스 복제의 평가를 위한 예시적인 검정이 또한 실시예에 제공된다. 이러한 검정은, HCV IRES에 의해 구동된 제1 개방 판독 프레임이 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자(NPTII)와 융합된 레닐라 루시퍼라아제(renilla luciferase) 유전자를 함유하고 EMCV IRES에 의해 구동된 제2 개방 판독 프레임이 NK5.1 레플리콘 주쇄로부터 유래된 HCV 비-구조적 유전자 NS3, NS4a, NS4b, NS5A 및 NS5B를 함유하는 비시스트론성(bicistronic) 간염 C 바이러스(HCV) 레플리콘에 의해 안정하게 형질감염된 Huh 7-유래된 간암종 세포주를 사용한다. 세포는 37℃에서 5% CO_2를 갖는 습윤화된 대기하에 글루타맥스(Glutamax: 등록상표) 및 100 mg/㎖의 피루브산 나트륨이 보충된 DMEM에서 배양된다. 배지는 10%(v/v) FBS(v/v) 페니실린/스트렙토마이신 및 1%(v/v) 제네티신(geneticin)으로 추가로 보충되었다. 5%(v/v) FBS가 함유된 DMEM중 세포는 96-웰 플레이트에 90 ㎕ 부피중 5000개 세포/웰로 플레이팅된다. 플레이팅후 24 시간째, 항체(또는 대조군으로서의 배지)는 3배 희석되어 12개의 웰(0.01 내지 2000 pM) 상에서, 10 ㎕의 부피로 세포에 첨가되어, 항체의 첨가후 최종 부피가 100 ㎕이도록 한다. 레닐라 루시퍼라아제 리포터(reporter) 신호는 레닐라 루시퍼라아제 검정 시스템[프로메가(Promega), #E2820]을 사용하여 항체 첨가후 72 시간째 판독된다. EC_{50} 값은, 레닐라 루시퍼라아제 리포터의 수준의 50% 감소가 대조 샘플(항체의 부재)과 비교하여 관찰되는 화합물 농도로서 계산된다. 투약량-반응 곡선 및 EC_{50} 값은 XLfit4 프로그램[아이디 비지니스 솔루션스 리미티드(ID Business Solutions Ltd.), 영국 서레이 소재]에 의해 수득된다. 하나의 구체적인 실시태양에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 번호 16의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 14의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 전장 인간 IgG_1 항체이고, 상기 항체는 Fc 영역에 FcγRIIIa에 대한 항체의 결합 친화도를 감소시키는 개질 및 노브-인투-홀 개질을 포함하고, 상기 노브-인투-홀 개질은 항체 중쇄중 하나에 노브 개질 및 항체 중쇄중 다른 하나에 홀 개질을 포함하고, 상기 항체는 N-말단 아미노산에서 펩티드 연결기를 통해 항체 중쇄중 하나의 C-말단 아미노산에 융합된 IFNα2 분자를 갖는다. 하나의 구체적인 실시태양에서, FcγRIIIa에 대한 항체의 결합 친화도를 감소시키는 상기 개질은 아미노산 치환 L234A, L235A 및 P329G(EU 번호매김)를 각각의 항체 중쇄에 포함한다. 추가의 구체적인 실시태양에서, 상기 노브 개질은 아미노산 치환 T366W를 포함하고 홀 개질은 아미노산 치환 T366S, L368A 및 Y407V를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시태양에서, 상기 IFNα2 분자는 노브 개질을 포함하는 항체 중쇄에 융합된다. 더욱 더 구체적인 실시태양에서, 상기 항체는 서열 번호 68, 서열 번호 70 및 서열 번호 72의 폴리펩티드 서열, 또는 작용성을 보유하는 이의 변형체를 포함한다.

[0089] 다른 구체적인 실시태양에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 2의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 전장 인간 IgG_1 항체이고, 상기 항체는 Fc 영역에 FcγRIIIa에 대한 항체의 결합 친화도를 감소시키는 개질 및 노브-인투-홀 개질을 포함하고, 상기 노브-인투-홀 개질은 항체 중쇄중 하나에 노브 개질 및 항체 중쇄중 다른 하나에 홀 개질을 포함하고, 상기 항체는 N-말단 아미노산에서 펩티드 연결기를 통해 항체 중쇄중 하나의 C-말단 아미노산에 융합된 IFNα2 분자를 갖는다. 하나의 구체적인 실시태양에서, FcγRIIIa에 대한 항체의 결합 친화도를 감소시키는 상기 개질은 아미노산 치환 L234A, L235A 및 P329G(EU 번호매김)를 각각의 항체 중쇄에 포함한다. 추가의 구체적인 실시태양에서, 상기 노브 개질은 아미노산 치환 T366W를 포함하고 홀 개질은 아미노산 치환 T366S, L368A 및 Y407V를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시태양에서, 상기 IFNα2 분자는 노브 개질을 포함하는 항체 중쇄에 융합된다. 더욱 더 구체적인 실시태양에서, 상기 항체는 서열 번호 50, 서열 번호 52 및 서열 번호 54의 폴리펩티드 서열, 또는 작용성을 보유하는 이의 변형체를 포함한다.

[0090] 또 다른 구체적인 실시태양에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 36, 서열 번호 38, 서열 번호 40, 서열 번호 42, 서열 번호 44, 서열 번호 46 및 서열 번호 48로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 전장 인간 IgG_1 항체이고, 상기 항체는 Fc 영역에 FcγRIIIa에 대한 항체의 결합 친화도를 감소시키는 개질 및 노브-인투-홀 개질을 포함하고, 상기 노브-인투-홀 개질은 항체 중쇄중 하나에 노브 개질 및 항체 중쇄중 다른 하나에 홀 개질을 포함하고, 상기 항체는 N-말단 아미노산에서 펩티드

연결기를 통해 항체 중쇄중 하나의 C-말단 아미노산에 융합된 IFNα2 분자를 갖는다. 하나의 구체적인 실시태양에서, FcγRIIIa에 대한 항체의 결합 친화도를 감소시키는 상기 개질은 아미노산 치환 L234A, L235A 및 P329G(EU 번호매김)를 각각의 항체 중쇄에 포함한다. 추가의 구체적인 실시태양에서, 상기 노브 개질은 아미노산 치환 T366W를 포함하고 홀 개질은 아미노산 치환 T366S, L368A 및 Y407V를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시태양에서, 상기 IFNα2 분자는 노브 개질을 포함하는 항체 중쇄에 융합된다. 더욱 더 구체적인 실시태양에서, 상기 항체는 서열 번호 52, 서열 번호 54의 폴리펩티드 서열, 및 서열 번호 96, 서열 번호 98, 서열 번호 100, 서열 번호 102, 서열 번호 104, 서열 번호 106 및 서열 번호 108로 구성된 군으로부터 선택된 폴리펩티드 서열, 또는 작용성을 보유하는 이의 변형체를 포함한다.

[0091] 추가의 실시태양에서, 본 발명의 항체는 서열 번호 92, 서열 번호 52 및 서열 번호 54의 폴리펩티드 서열, 또는 작용성을 보유하는 이의 변형체를 포함한다. 다른 실시태양에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 번호 94, 서열 번호 52 및 서열 번호 54의 폴리펩티드 서열, 또는 작용성을 보유하는 이의 변형체를 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 번호 56, 서열 번호 58 및 서열 번호 60의 폴리펩티드 서열, 또는 작용성을 보유하는 이의 변형체를 포함한다. 추가의 실시태양에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 번호 62, 서열 번호 64 및 서열 번호 66의 폴리펩티드 서열, 또는 작용성을 보유하는 이의 변형체를 포함한다. 추가의 실시태양에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 번호 74, 서열 번호 76 및 서열 번호 78의 폴리펩티드 서열, 또는 작용성을 보유하는 이의 변형체를 포함한다. 추가의 실시태양에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 번호 80, 서열 번호 82 및 서열 번호 84의 폴리펩티드 서열, 또는 작용성을 보유하는 이의 변형체를 포함한다. 추가의 실시태양에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 번호 86, 서열 번호 88 및 서열 번호 90의 폴리펩티드 서열, 또는 작용성을 보유하는 이의 변형체를 포함한다.

[0092] 대안의 실시태양에서, 본 발명에 따른 항체는 2개의 Fab 단편중 1개가 결핍되고, 서열 번호 16의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 14의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 전장 인간 IgG_1 항체이고, 상기 항체는 Fc 영역에 FcγRIIIa에 대한 항체의 결합 친화도를 감소시키는 개질 및 노브-인투-홀 개질을 포함하고, 상기 노브-인투-홀 개질은 항체 중쇄중 하나에 노브 개질 및 항체 중쇄중 다른 하나에 홀 개질을 포함하고, 상기 항체는 N-말단 아미노산에서 펩티드 연결기를 통해 항체 중쇄중 하나의 C-말단 아미노산에 융합된 IFNα2 분자를 갖는다. 하나의 구체적인 실시태양에서, FcγRIIIa에 대한 항체의 결합 친화도를 감소시키는 상기 개질은 아미노산 치환 L234A, L235A 및 P329G(EU 번호매김)를 각각의 항체 중쇄에 포함한다. 추가의 구체적인 실시태양에서, 상기 노브 개질은 아미노산 치환 T366W를 포함하고 홀 개질은 아미노산 치환 T366S, L368A 및 Y407V를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시태양에서, 상기 IFNα2 분자는 노브 개질을 포함하는 항체 중쇄에 융합된다. 더욱 더 구체적인 실시태양에서, 상기 항체는 서열 번호 68, 서열 번호 70 및 서열 번호 116의 폴리펩티드 서열, 또는 작용성을 보유하는 이의 변형체를 포함한다.

[0093] 다른 대안의 실시태양에서, 본 발명에 따른 항체는 2개의 Fab 단편중 1개가 결핍되고, 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 2의 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 전장 인간 IgG_1 항체이고, 상기 항체는 Fc 영역에 FcγRIIIa에 대한 항체의 결합 친화도를 감소시키는 개질 및 노브-인투-홀 개질을 포함하고, 상기 노브-인투-홀 개질은 항체 중쇄중 하나에 노브 개질 및 항체 중쇄중 다른 하나에 홀 개질을 포함하고, 상기 항체는 N-말단 아미노산에서 펩티드 연결기를 통해 항체 중쇄중 하나의 C-말단 아미노산에 융합된 IFNα2 분자를 갖는다. 하나의 구체적인 실시태양에서, FcγRIIIa에 대한 항체의 결합 친화도를 감소시키는 상기 개질은 아미노산 치환 L234A, L235A 및 P329G(EU 번호매김)를 각각의 항체 중쇄에 포함한다. 추가의 구체적인 실시태양에서, 상기 노브 개질은 아미노산 치환 T366W를 포함하고 홀 개질은 아미노산 치환 T366S, L368A 및 Y407V를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시태양에서, 상기 IFNα2 분자는 노브 개질을 포함하는 항체 중쇄에 융합된다. 더욱 더 구체적인 실시태양에서, 상기 항체는 서열 번호 50, 서열 번호 52 및 서열 번호 116의 폴리펩티드 서열, 또는 작용성을 보유하는 이의 변형체를 포함한다.

[0094] 또 다른 대안의 실시태양에서, 본 발명에 따른 항체는 2개의 Fab 단편중 1개가 결핍되고, 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 번호 36, 서열 번호 38, 서열 번호 40, 서열 번호 42, 서열 번호 44, 서열 번호 46 및 서열 번호 48로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 전장 인간 IgG_1 항체이고, 상기 항체는 Fc 영역에 FcγRIIIa에 대한 항체의 결합 친화도를 감소시키는 개질 및 노브-인투-홀 개질을 포함하고, 상기 노브-인투-홀 개질은 항체 중쇄중 하나에 노브 개질 및 항체 중쇄중 다른 하나에 홀 개질을 포함하고, 상기 항체는 N-말단 아미노산에서 펩티드 연결기를 통해 항체 중쇄중 하나의 C-말단 아미노산에 융합된 IFNα2 분자를 갖는다. 하나의 구체적인 실시태양에서, FcγRIIIa에 대한 항체의 결합 친화도를 감소시키는 상기 개질은

아미노산 치환 L234A, L235A 및 P329G(EU 번호매김)를 각각의 항체 중쇄에 포함한다. 추가의 구체적인 실시태양에서, 상기 노브 개질은 아미노산 치환 T366W를 포함하고 홀 개질은 아미노산 치환 T366S, L368A 및 Y407V를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시태양에서, 상기 IFNα2 분자는 노브 개질을 포함하는 항체 중쇄에 융합된다. 더욱 더 구체적인 실시태양에서, 상기 항체는 서열 번호 52, 서열 번호 116의 폴리펩티드 서열, 및 서열 번호 96, 서열 번호 98, 서열 번호 100, 서열 번호 102, 서열 번호 104, 서열 번호 106 및 서열 번호 108로 구성된 군으로부터 선택된 폴리펩티드 서열, 또는 작용성을 보유하는 이의 변형체를 포함한다.

[0095] 추가의 실시태양에서, 본 발명의 항체는 서열 번호 92, 서열 번호 52 및 서열 번호 116의 폴리펩티드 서열, 또는 작용성을 보유하는 이의 변형체를 포함한다. 다른 실시태양에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 번호 94, 서열 번호 52 및 서열 번호 116의 폴리펩티드 서열, 또는 작용성을 보유하는 이의 변형체를 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 번호 56, 서열 번호 58 및 서열 번호 116의 폴리펩티드 서열, 또는 작용성을 보유하는 이의 변형체를 포함한다. 추가의 실시태양에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 번호 62, 서열 번호 64 및 서열 번호 116의 폴리펩티드 서열, 또는 작용성을 보유하는 이의 변형체를 포함한다. 추가의 실시태양에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 번호 74, 서열 번호 76 및 서열 번호 116의 폴리펩티드 서열, 또는 작용성을 보유하는 이의 변형체를 포함한다. 추가의 실시태양에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 번호 80, 서열 번호 82 및 서열 번호 116의 폴리펩티드 서열, 또는 작용성을 보유하는 이의 변형체를 포함한다. 추가의 실시태양에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 번호 86, 서열 번호 88 및 서열 번호 116의 폴리펩티드 서열, 또는 작용성을 보유하는 이의 변형체를 포함한다.

[0096] 본 발명의 항체는 서열 번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108 및 116으로 제시된 서열에 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 이상 동일한 서열을 갖는 항체, 및 이의 작용성 단편 또는 변형체를 포함한다. 본 발명은 또한 보존적 아미노산 치환을 갖는 이들 서열을 포함하는 항체를 내포한다.

[0097] **폴리뉴클레오티드**

[0098] 본 발명은 추가로 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0099] 본 발명의 폴리뉴클레오티드로는 서열 번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 및 117로 제시된 서열에 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 이상 동일한 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드, 및 이의 작용성 단편 또는 변형체를 포함한다.

[0100] 본 발명의 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 전체 항체를 코딩하는 단일 폴리뉴클레오티드로서 또는 공동-발현되는 다수의(예를 들어, 둘 이상의) 폴리뉴클레오티드로서 발현될 수 있다. 공동-발현된 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 폴리펩티드는, 예를 들어, 다이설파이드 결합 또는 다른 수단을 통해 회합되어 작용성 항체를 형성할 수 있다. 예를 들면, 항체의 경쇄 부분은 항체의 중쇄 부분과는 별도의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다. 공동-발현될 경우, 중쇄 폴리펩티드는 항체를 형성하기 위해 경쇄 폴리펩티드와 회합될 것이다. 다른 예에서, 효과기 잔기를 포함하는 항체의 중쇄 부분은 항체의 다른 중쇄 부분과는 별도의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다. 공동-발현될 경우, 중쇄 폴리펩티드는 회합되어 작용성 항체를 형성할 것이다(경쇄 폴리펩티드와 함께).

[0101] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 서열 번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 또는 48로 제시된 바와 같은 가변 영역 서열을 코딩하는 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 다른 실시태양에서, 본 발명은 서열 번호 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108 또는 116으로 제시된 바와 같은 폴리펩티드 서열을 코딩하는 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 다른 실시태양에서, 본 발명은 추가로 서열 번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 또는 117로 제시된 핵산 서열에 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상 동일한 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한

것이다. 다른 실시태양에서, 본 발명은 서열 번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 또는 117로 제시된 바와 같은 핵산 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 다른 실시태양에서, 본 발명은 서열 번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 또는 48의 아미노산 서열에 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상 동일한 가변 영역 서열을 코딩하는 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 다른 실시태양에서, 본 발명은 서열 번호 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108 또는 116의 아미노산 서열에 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상 동일한 폴리펩티드 서열을 코딩하는 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 본 발명은 보존적 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 또는 48의 가변 영역 서열을 코딩하는 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 내포한다. 본 발명은 또한 보존적 아미노산 치환을 갖는 서열 번호 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108 또는 116의 폴리펩티드 서열을 코딩하는 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 내포한다.

[0102] 특정 실시태양에서, 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 DNA이다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 예를 들면, 메신저 RNA(mRNA) 형태의 RNA이다. 본 발명의 RNA는 단일 가닥이거나 이중 가닥일 수 있다.

[0103] **재조합 방법**

[0104] 본 발명의 항체는, 예를 들면, 고체-상태 펩티드 합성[예를 들어 메리필드(Merrifield) 고체 상 합성] 또는 재조합 생산에 의해 수득될 수 있다. 재조합 생산을 위해, 예를 들어, 상기 기재된 바와 같은, 항체(단편)를 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드는 단리되고, 숙주 세포에서 추가의 클로닝 및/또는 발현을 위해 하나 이상의 벡터내로 삽입된다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 종래의 절차를 사용하여 쉽게 단리되고 서열화된다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 바람직하게는 발현 벡터가 제공된다. 당분야의 숙련가에게 잘 공지된 방법은 적절한 전사/번역 제어 신호에 따라 항체(단편)의 코딩 서열을 함유하는 발현 벡터를 구조화하기 위해 사용될 수 있다. 이들 방법으로는 시험관내 재조합 DNA 기법, 합성 기법 및 생체내 재조합/유전적 재조합이 포함된다. 예를 들면, 마니아티스(Maniatis) 등의 문헌[MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989)]; 및 어수벨(Ausubel) 등의 문헌[CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y (1989)]에 기재된 기법을 참조한다. 발현 벡터는 플라스미드, 바이러스의 일부일 수 있거나, 핵산 단편일 수 있다. 발현 벡터로는 발현 카세트(cassette)를 포함하고, 이 안으로 항체(단편)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(즉, 코딩 영역)가 프로모터 및/또는 다른 전사 또는 번역 제어 요소와 작동가능하게 회합하여 클로닝된다. 본원에 사용될 경우, "코딩 영역"은 아미노산내로 번역되는 코돈으로 구성되는 핵산의 일부분이다. "정지 코돈(stop codon)"(TAG, TGA, 또는 TAA)이 아미노산으로 번역되지 않을 지라도, 이는 존재한다면 코딩 영역의 일부로 고려되지만, 임의의 플랭킹(flanking) 서열, 예를 들면 프로모터, 리보솜(ribosome) 결합 부위, 전사 종결자, 인트론(intron), 5' 및 3' 비번역 영역 등은 코딩 영역의 일부가 아니다. 둘 이상의 코딩 영역은 단일 폴리뉴클레오티드 구조물에, 예를 들어 단일 벡터 상에서, 또는 별도의 폴리뉴클레오티드 구조물에, 예를 들어 별도의 (상이한) 벡터 상에서 존재할 수 있다. 더욱이, 임의의 벡터는 단일 코딩 영역을 포함하거나, 2개 이상의 코딩 영역을 포함할 수 있고, 예를 들어 본 발명의 벡터는 하나 이상의 폴리펩티드를 코딩할 수 있고, 이는 단백질분해적 분할을 통해 최종 단백질로 번역후에 또는 번역과 동시에 분리된다. 또한, 본 발명의 벡터, 폴리뉴클레오티드, 또는 핵산은 본 발명의 항체(단편)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 이의 변형체 또는 유도체에 융합되거나 융합되지 않은 이종성 코딩 영역을 코딩할 수 있다. 이종성 코딩 영역으로는, 제한없이, 특수화된 요소 또는 모티프(motif), 예컨대 분비 신호 펩티드 또는 이종성 작용성 도메인이 포함된다. 작동가능한 회합은, 유전자 생성물의 발현이 조절 서열의 영향 또는 제어하에 놓이도록 하는 방식으로 유전자 생성물, 예를 들어 폴리펩티드를 위한 코딩 영역이 하나 이상의 조절 서열과 회합될 때 존재한다. 2개의 DNA 단편(예컨대 폴리펩티드 코딩 영역 및 이와 회합된 프로모터)은, 프로모터 기능의 유도가 원하는 유전자 생성물을 코딩하는 mRNA의 전사를 초래하는 경우, 및 2개의 DNA 단편 사이의 연결기의 성질이 유전자 생성물의 발현을 유도하는 발현 조절 서열의 능력에 간섭하지 않거나 전사되는 DNA 주형의 능력에 간섭하지 않을 경우 "작동적으로 회합"된다. 이와 같이, 프로모터 영역은, 프로모터가 핵산의 전사에 영향을 줄 수 있다면, 폴리펩티드를 코딩하는 핵

산과 작동적으로 회합될 것이다. 프로모터는 단지 예정된 세포에서 DNA의 실질적인 전사를 유도하는 세포-특이적 프로모터일 수 있다. 프로모터 이외의 다른 전사 제어 요소, 예를 들면 인헨서(enhancer), 오퍼레이터(operator), 리프레서(repressor), 및 전사 종결 신호는 폴리뉴클레오티드와 작동적으로 회합되어 세포-특이적 전사를 지시한다. 적합한 프로모터 및 다른 전사 제어 영역이 본원에 개시된다. 다양한 전사 제어 영역은 당분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 이들로는, 제한없이, 척추동물 세포에서 작용하는 전사 제어 영역, 예컨대, 제한되지 않지만, 사이토메갈로바이러스(cytomegaloviruse)(예를 들어 급초기 프로모터, 인트론-A와 함께), 시미안(simian) 바이러스 40(예를 들어 초기 프로모터), 및 레트로바이러스(retroviruse)[예컨대, 예를 들어 라우스(Rous) 육종 바이러스]로부터의 프로모터 및 인헨서 분절이 포함된다. 다른 전사 제어 영역으로는 척추동물 유전자로부터 유래된 영역 예컨대 액틴(actin), 열 충격 단백질, 소 성장 호르몬 및 토끼 a-글로빈, 및 진핵생물 세포에서 유전자 발현을 제어할 수 있는 다른 서열이 포함된다. 추가의 적합한 전사 제어 영역으로는 조직-특이적 프로모터 및 인헨서, 및 유도성 프로모터(예를 들어 프로모터 유도성 테트라사이클린)가 포함된다. 유사하게, 다양한 번역 제어 요소가 당분야의 숙련가에게 공지된다. 이들로는, 제한되지 않지만, 리보솜 결합 부위, 번역 개시 및 종결 코돈, 및 바이러스 시스템으로부터 유래된 요소(특히 내부 리보솜 진입 부위, 또는 IRES, 또는 CITE 서열로서 지칭됨). 발현 카세트는 또한 다른 특징부, 예컨대 복제의 기원, 및/또는 염색체 통합 요소, 예컨대 레트로바이러스성 긴 말단 반복부(LTR: retroviral long terminal repeat), 또는 아데노-회합된 바이러스성(AAV: adeno-associated viral) 역전된 말단 반복부(ITR: inverted terminal repeat)를 포함한다.

[0105] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 핵산 코딩 영역은, 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 폴리펩티드의 분비를 유도하는 분비 또는 신호 펩티드를 코딩하는 추가의 코딩 영역과 회합될 수 있다. 예를 들면, 항체의 분비가 요망된다면, 신호 서열을 코딩하는 DNA는 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 코딩하는 핵산의 상류에 위치될 수 있다. 신호 가설에 따라서, 포유동물 세포에 의해 분비된 단백질은 신호 펩티드 또는 분비 리더(leader) 서열을 갖는데, 이는 거친 소포체를 가로질러 성장하는 단백질 쇄의 배출이 개시된다면 성숙한 단백질로부터 분할된다. 당분야의 숙련가라면 척추동물 세포에 의해 분비된 폴리펩티드가 일반적으로 폴리펩티드의 N-말단에 융합되는 신호 펩티드를 갖고, 이는 번역된 폴리펩티드로부터 분할되어 폴리펩티드의 분비된 또는 "성숙" 형태를 생성함을 인식한다. 특정 실시태양에서, 고유의 신호 펩티드, 예를 들어 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 신호 펩티드가 사용되거나, 폴리펩티드의 분비를 지시하는 능력을 보유하는 서열의 작용성 유도체가 이와 작동적으로 회합된다. 다르게는, 이종성 포유동물 신호 펩티드, 또는 이의 작용성 유도체가 사용될 수 있다. 예를 들면, 야생형 리더 서열은 인간 조직 플라스미노겐 활성화제(TPA: ticuue plasminogen activator) 또는 마우스 β-글루쿠로니다아제(glucuronidase)의 리더 서열로 치환될 수 있다. 분비 신호 펩티드의 예시적인 아미노산 서열은 서열 번호 135 내지 137로 제시된다.

[0106] 이후의 정제를 촉진하거나(예를 들어 히스티딘 태그) 항체 표지화를 보조하기 위해 사용될 수 있는 짧은 단백질 서열을 코딩하는 DNA는 항체 (단편) 코딩 폴리뉴클레오티드 또는 이의 단부에 포함될 수 있다.

[0107] 추가의 실시태양에서, 본 발명의 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 하나 이상의 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 폴리뉴클레오티드 및 벡터는 각각 폴리뉴클레오티드 및 벡터에 관하여 본원에 기재된 임의의 특징들을 단일하게 또는 조합하여 혼입할 수 있다. 하나의 이러한 실시태양에서, 숙주 세포는 본 발명의 항체(의 일부)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함한다(예를 들어 이로 형질전환되거나 형질감염된다). 본원에 사용될 경우, 용어 "숙주 세포"는 본 발명의 항체 또는 이의 단편을 생성하도록 조작될 수 있는 임의의 종류의 세포 시스템을 지칭한다. 항체를 복제하거나 이의 발현을 지지하기에 적합한 숙주 세포는 당분야에 잘 공지되어 있다. 이러한 세포는 구체적인 발현 벡터에 의해 적절히 형질감염 또는 형질도입될 수 있고, 세포를 함유한 다량의 벡터는 임상적 적용을 위해 충분량의 항체를 수득하도록 대규모 발효기를 접종하기 위해 성장될 수 있다. 적합한 숙주 세포로는 원핵 미생물, 예컨대 에스케리치아 콜라이, 또는 다양한 진핵, 예컨대 중국 햄스터 난소 세포(CHO), 곤충 세포 등이 포함된다. 예를 들면, 폴리펩티드는 특히 글리코실화가 필요하지 않을 경우 박테리아에서 생산될 수 있다. 발현 후, 폴리펩티드는 가용성 분별물에서 박테리아 세포 페이스트로부터 단리될 수 있고, 추가로 정제될 수 있다. 원핵생물에 더하여, 진핵 미생물, 예컨대 사상균 또는 효모는 폴리펩티드-코딩 벡터를 위해 적합한 클로닝 또는 발현 숙주(예컨대 글리코실화 경로가 "인간화"된 곰팡이 및 효모 균주를 포함)여서, 부분적 또는 전체적 인간 글리코실화 패턴으로 폴리펩티드의 생산을 초래한다. 게른그로스(Gerngross)의 문헌[Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004)], 및 리(Li) 등의 문헌[Nat Biotech 24, 210-215 (2006)]을 참조한다. (글리코실화된) 폴리펩티드의 발현에 적합한 숙주 세포는 또한 다세포 유기체(무척추동물 및 척추동물)로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예로는 식물 및 곤충 세포가 포함된다. 특히 스포돕테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포의 형

질감염을 위해, 곤충 세포와 함께 사용될 수 있는 다수의 바큘로바이러스성 균주가 식별되었다. 식물 세포 배양물은 또한 숙주로서 이용될 수도 있다. 예를 들어 미국 특허 제5,959,177호, 제6,040,498호, 제6,420,548호, 제7,125,978호, 및 제6,417,429호[유전자이식 식물에서 항체를 생산하기 위한 플랜티바디스(PLANTIBODIES: 등록상표) 기술을 기재함]를 참조한다. 척추동물 세포는 숙주로서 사용될 수도 있다. 예를 들면, 현탁액에서 성장하도록 적응된 포유동물 세포주가 유용할 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는 SV40(COS-7)에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주; 인간 배아 신장 세포주[예를 들어, 그라함(Graham) 등의 문헌[J. Gen Virol. 36:59 (1977)]에 기재된 바와 같은 293 또는 293T 세포]; 베이비 햄스터 신장 세포(BHK); 마우스 세르톨리(sertoli) 세포[예를 들어, 매터(Mather)의 문헌[Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]에 기재된 바와 같은 TM4 세포]; 원숭이 신장 세포(CV1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76); 인간 뇌 암종 세포(HELA); 개과 동물 신장 세포(MDCK); 버팔로 래트 간의 세포(BRL 3A); 인간 폐 세포(W138); 인간 간의 세포(Hep G2); 마우스 유방 종양 세포(MMT 060562); TRI 세포[예를 들어, 매터 등의 문헌[Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]에 기재된 바와 같음]; MRC 5 세포; 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주로는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 예컨대 dhfr-CHO 세포[우를라우브(Urlaub) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]; 및 골수종 세포주, 예컨대 Y0, NS0, P3X63 및 Sp2/0가 포함된다. 단백질 생산에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주를 고찰하기 위해, 예를 들어, 야자키(Yazaki) 및 우(Wu)의 문헌[Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)]을 참조한다. 숙주 세포로는 배양된 세포, 예를 들어, 포유동물 배양된 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 박테리아 세포 및 식물 세포, 및 몇개만 예를 들자면, 유전자이식 동물, 유전자이식 식물 또는 배양된 식물 또는 동물 조직내에 포함된 세포가 포함된다. 하나의 실시태양에서, 숙주 세포는 진핵 세포, 바람직하게는 포유동물 세포, 예컨대 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 인간 배아 신장(HEK) 세포 또는 림프 세포(예를 들어, Y0, NS0, Sp20 세포)이다. 이들 시스템에서 외래 유전자를 발현시키는 표준 기술이 당분야에 공지되어 있다. 항체의 중쇄 또는 경쇄를 포함하는 폴리펩티드를 발현하는 세포는, 발현된 생성물이 중쇄 및 경쇄 둘다를 갖는 항체이도록 항체 쇄의 나머지를 또한 발현하기 위해 조작될 수 있다.

[0108] 하나의 실시태양에서, 본 발명에 따른 항체의 제조 방법이 제공되고, 여기서 방법은 본원에 제공된 바와 같이 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를 항체의 발현에 적합한 조건하에 배양하는 단계, 및 항체를 숙주 세포(또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 회수하는 단계를 포함한다.

[0109] 항체가 효과기 잔기에 융합되는 경우, 이들 성분은 서로 유전자적으로 융합된다. 항체는 이의 성분들이 직접적으로 서로, 또는 간접적으로 연결기 서열을 통해 융합되도록 고안될 수 있다. 연결기의 조성 및 길이는 당분야에 공지된 방법에 따라 결정될 수 있고, 효능에 대해 시험될 수 있다. 원한다면 융합물의 개별적 성분들을 분리하기 위해 분할 부위를 혼합하도록 추가적인 서열이 또한 포함될 수 있고, 예를 들면 엔도펩티다아제(endopeptidase) 인식 서열이다.

[0110] 특정 실시태양에서, 본 발명의 항체는 ASGPR에 결합할 수 있는 항체 가변 영역을 적어도 하나 포함한다. 가변 영역은 자연 발생 또는 비자연 발생 항체 및 이의 단편의 일부를 형성하거나 이로부터 유래될 수 있다. 다중클론성 항체 및 단일클론성 항체의 제조 방법은 당분야에 공지되어 있다[예를 들어 할로우(Harlow) 및 래인(Lane)의 문헌[Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]을 참조한다]. 비자연 발생 항체는 고체 상-펩티드 합성을 사용하여 구조화될 수 있거나, 재조합적으로 생산될 수 있거나(예를 들어 미국 특허 제4,186,567호에 기재된 바와 같음), 예를 들면 가변성 중쇄 및 가변성 경쇄를 포함하는 조합적 라이브러리를 스크리닝함으로써 수득될 수 있다[예를 들어 맥카퍼티(McCafferty)에게 허여된 미국 특허 제5,969,108호].

[0111] 항체의 임의의 동물 종이 본 발명에 사용될 수 있다. 본 발명에 유용한 비제한적인 항체는 뮤린(murine), 영장류, 또는 인간 기원의 것일 수 있다. 항체가 인간 사용을 위해 의도된다면, 항체의 키메라성 형태가 사용될 수 있는데, 여기서 항체의 불변 영역은 인간으로부터이다. 항체의 인간화된 형태 또는 완전한 인간 형태는 또한 당분야에 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다[예를 들어 윈터(Winter)에게 허여된 미국 특허 제5,565,332호 참조]. 인간화는 다양한 방법에 의해 달성될 수 있고, 제한되지 않지만 (a) 인간 이외의(예를 들어, 도너 항체) CDR을 인간(예를 들어 억셉터 항체) 골격구조, 및 중요 골격구조 잔기(예를 들어 양호한 항원 결합 친화도 또는 항체 기능을 보유하기 위에 중요한 잔기)를 보유하거나 하지 않는 불변 영역 상으로 그래프팅하는 방법, (b) 단지 인간 이외의 특이성-결정 영역(SDR 또는 a-CDR; 항체-항원 상호작용에 중요한 잔기)을 인간 골격구조 및 불변 영역 상으로 그래프팅하는 방법, 또는 (c) 전체 인간 이외의 가변 도메인을 이식하지만, 표면 잔기의 대체에 의해 이들을 인간-유사 구간으로 "클로킹(cloaking)"하는 방법이 포함된다. 인간화된 항체 및 이의 제조 방법

은, 예를 들어, 알마그로(Almagro) 및 프란손(Fransson)의 문헌[Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)]에 검토되어 있고, 추가로, 예를 들어, 리에흐만(Riechmann) 등의 문헌[Nature 332:323-329 (1988)]; 퀸(Queen) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)]; 미국 특허 제5,821,337호, 제7,527,791호, 제6,982,321호, 및 제7,087,409호; 존스(Jones) 등의 문헌[Nature 321, 522-525 (1986)]; 모리슨(Morrison) 등의 문헌[Proc Natl Acad Sci 81, 6851-6855 (1984)]; 모리슨 및 오이(Oi) 등의 문헌[Adv Immunol 44, 65-92 (1988)]; 베르회옌(Verhoeyen) 등의 문헌[Science 239, 1534-1536 (1988)]; 패들란(Padlan)의 문헌[Molec Immun 31(3), 169-217 (1994)]; 카쉬미르(Kashmiri) 등의 문헌[Methods 36:25-34 (2005)(SDR (a-CDR) 그라프팅에 대해 기재)]; 패들란(Padlan)의 문헌[Mol. Immunol. 28:489-498 (1991)("재보수(resurfacing)"에 대해 기재)]; 달라쿠아(Dall'Acqua) 등의 문헌[Methods 36 (2005) 43-60("FR 셔플링(shuffling)"에 대해 기재)]; 및 오스본(Osbourn) 등의 문헌[Methods 36:61-68 (2005)] 및 클림카(Klimka) 등의 문헌[Br. J. Cancer 83:252-260 (2000)(FR 셔플링에 대한 "안내된 선택" 접근에 대해 기재)]에 기재되어 있다. 구체적인 본 발명에 따른 항체는 인간 항체이다. 인간 항체 및 인간 가변 영역은 당분야에 공지된 다양한 기법을 사용하여 생산될 수 있다. 인간 항체는 일반적으로 반 디지크(van Dijk) 및 반 데 윈켈(van de Winkel)의 문헌[Curr Opin Pharmacol 5, 368-74 (2001)] 및 론베르그(Lonberg)의 문헌[Curr Opin Immunol 20, 450-459 (2008)]에 기재되어 있다. 인간 가변 영역은 하이브리도마 방법에 의해 제조된 인간 단일클론성 항체의 일부를 형성하거나 이로부터 유래될 수 있다[예를 들어 문헌[Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)] 참조]. 인간 항체 및 인간 가변 영역은 손상되지 않은 인간 항체 또는 인간 가변 영역을 갖는 손상되지 않은 항체를 항원 챌린지(challenge)에 반응하여 생산하도록 개질된 유전자이식 동물에게 면역원을 투여함으로써 또한 제조될 수 있다[예를 들어 론베르그(Lonberg)의 문헌 [Nat Biotech 23, 1117-1125 (2005)] 참조]. 인간 항체 및 인간 가변 영역은 또한 인간-유래된 파아지(phage) 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 영역 서열을 단리함으로써 생성될 수도 있다[예를 들어, 후겐붐(Hoogenboom) 등의 문헌[Methods in Molecular Biology 178, 1-37 (O'Brien et al, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)]; 및 맥카퍼티(McCafferty) 등의 문헌[Nature 348, 552-554]; 클락슨(Clackson) 등의 문헌 [Nature 352, 624-628 (1991)] 참조]. 파아지는 전형적으로 항체 단편을 단일-쇄 Fv(scFv) 단편으로서 또는 Fab 단편으로서 표시한다. 파아지 디스플레이에 의한 항체의 제조에 대한 상세한 설명은 실시예에서 찾아볼 수 있다.

[0112] 특정 실시태양에서, 본 발명의 항체는, 예를 들면, PCT 공개공보 제WO 2011/020783호(친화도 성숙에 관한 실시예 참조) 또는 미국 특허출원공개 제2004/0132066호(이의 전체 내용은 본원에 참고로 인용됨)에 개시된 방법에 따라 증진된 결합 친화도를 갖도록 조작된다. 특이적 항원 결정자에 결합하는 본 발명의 항체의 능력은 효소-연결된 면역흡착 검정(ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay) 또는 당분야의 숙련가에게 친숙한 다른 기법, 예를 들어 표면 플라스몬 공명 기법[릴제블래드 등의 문헌[Glyco J 17, 323-329 (2000)]], 및 전통적 결합 검정[힐레이의 문헌[Endocr Res 28, 217-229 (2002)]]을 통해 측정될 수 있다. 경쟁 검정은 구체적인 항원에 결합하는 기준 항체와 경쟁하는 항체, 예를 들어 ASGPR에 결합하기 위해 51A12 항체와 경쟁하는 항체를 식별하기 위해 사용될 수 있다. 특정 실시태양에서, 이러한 경쟁 항체는 기준 항체에 의해 결합되는 동일한 에피토프(예를 들어 선형 또는 입체배좌 에피토프)에 결합한다. 항체가 결합하는 에피토프를 매핑(mapping)하기 위한 상세한 예시적 방법은 모리스(Morris)의 문헌[Methods in Molecular Biology vol. 66 (1996) (Humana Press, Totowa, NJ)]의 에피토프 매핑 프로토콜(Epitope Mapping Protocols)에 제공되어 있다. 예시적인 경쟁 검정에서, 고정화된 항원(예를 들어 ASGPR)은 항원에 결합하는 제1의 표지화된 항체(예를 들어 51A12 항체) 및 항원에 결합하기 위해 제1 항체와 경쟁하는 능력에 대해 시험된 제2 표지화되지 않은 항체를 포함하는 용액내에서 항온처리된다. 제2 항체는 하이브리도마 상청액에 존재할 수 있다. 대조군으로서 고정화된 항원이 제1의 표지화된 항체는 포함하지만 제2의 표지화되지 않은 항체는 포함하지 않는 용액내에서 항온처리된다. 항원으로 제1 항체가 결합할 수 있는 조건하에 항온처리한 후, 과량의 결합되지 않은 항체가 제거되고, 고정화된 항원과 회합된 표지의 양이 측정된다. 고정화된 항원과 회합된 표지의 양이 대조 샘플에 비해 시험 샘플에서 실질적으로 감소된다면, 이는 제2 항체가 항원에 결합하기 위해 제1 항체와 경쟁함을 지시한다. 할로우(Harlow) 및 래인(Lane)의 문헌[Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (1988) (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)]을 참조한다.

[0113] 본원에 기재된 바와 같이 제조된 항체는 당분야에 공지된 기법, 예컨대 고 성능 액체 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 겔 전기영동, 친화도 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 등에 의해 정제된다. 구체적인 단백질을 정제하기 위해 사용되는 실제 조건은 인자들, 예컨대 순 전하, 소수성, 친수성 등에 좌우될 것이고, 당분야의 숙련가에게 명백할 것이다. 항체의 친화도 크로마토그래피 정제를 위해, 항체에 결합하는 리간드, 수용체 또는 항원이 사용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 항체의 친화도 크로마토그래피 정제를 위해,

단백질 A 또는 단백질 G와의 매트릭스가 사용될 수 있다. 순차적 단백질 A 또는 G 친화도 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피가 사용되어 본질적으로 실시예에 기재된 바와 같은 항체를 단리할 수 있다. 항체의 정제는 겔 전기영동, 고압 액체 크로마토그래피 등과 같은 다양한 임의의 공지된 분석적 방법에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, 실시예에 기재된 바와 같은 중쇄 융합 단백질은 SDS-PAGE를 감소시킴으로써 입증되는 바와 같이 손상되지 않고 적절히 조립되는 것으로 보여졌다(예를 들어 도 13 내지 19 참조).

[0114] **조성물, 제형 및 투여 경로**

[0115] 추가의 양태에서, 본 발명은, 예를 들어 하기 임의의 치료학적 방법에서 사용하기 위한 본원에 제공된 임의의 항체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 하나의 실시태양에서, 약학 조성물은 본원에 제공된 임의의 항체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 다른 실시태양에서, 약학 조성물은 본원에 제공된 임의의 항체 및, 예를 들어 하기 기재된 바와 같은 적어도 하나의 추가의 치료제를 포함한다.

[0116] 생체내 투여에 적합한 형태로 본 발명의 항체를 제조하는 방법이 추가로 제공되고, 이러한 방법은 (a) 본 발명에 따른 항체를 수득하는 단계, 및 (b) 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체에 의해 항체를 제형화함으로써 항체 제제를 생체내 투여하도록 제형화하는 단계를 포함한다.

[0117] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체에 용해되거나 분산된 치료 효과량의 하나 이상의 항체를 포함한다. "약학적 또는 약리학적으로 허용가능한"이라는 문구는 일반적으로 이용되는 투여량 및 농도에서 수여자에게 무독성인, 즉 적절할 경우 동물, 예컨대, 예를 들면, 인간에게 투여될 경우 역 반응, 알러지 반응 또는 다른 부적절한 반응을 생성하지 않는 분자 실체 및 조성물을 지칭한다. 적어도 하나의 항체 및 선택적으로 추가의 활성 구성성분을 함유하는 약학 조성물의 제조는 본원에 참고로 인용된 레밍턴(Remington)의 문헌[Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990]에서 예시되는 바와 같이, 본원의 견지에서 당분야의 숙련가에게 공지될 것이다. 게다가, 동물(예를 들어, 인간) 투여의 경우, 제조는 생물학적 표준물에 대한 FDA 미국 식품의약국 또는 다른 나라에서의 상응하는 기관에 의해 요구되는 바와 같은 멸균, 발열원성, 일반적 안전성 및 순도 표준을 충족시켜야 한다. 바람직한 조성물은 동결건조된 제형 또는 수성 용액이다. 본원에 사용될 경우, "약학적으로 허용가능한 담체"로는, 당분야의 숙련가에게 공지된 바와 같이, 임의의 및 모든 용매, 완충액, 분산 배지, 코팅물, 계면활성제, 항산화제, 보존제(예를 들어 항생제, 항곰팡이제), 등장성 제제, 흡수 지연제, 염, 보존제, 항산화제, 단백질, 약물, 약물 안정화제, 중합체, 겔, 결합제, 부형제, 붕해제, 윤활제, 감미제, 풍미제, 염료, 이와 같은 물질 및 이의 조합물이 포함된다[예를 들면, 본원에 참고로 인용된 레밍턴(Remington)의 문헌[Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329]을 참조한다]. 임의의 종래의 담체가 활성 구성성분과 비상용성일 수 있지만, 치료 또는 약학 조성물에서의 이의 용도가 고려된다.

[0118] 조성물은 이것이 고체, 액체 또는 에어로졸 형태로 투여되는지의 여부, 및 이것이 주입과 같은 투여 경로를 위해 멸균될 필요가 있는지의 여부에 따라 상이한 유형의 담체를 포함할 수 있다. 본 발명의 항체(및 임의의 추가의 치료제)는 당분야의 숙련가에게 공지된 바와 같이 정맥내, 피내, 동맥내, 복강내, 병변내, 두개(頭蓋)내, 관절내, 전립선내, 비장내, 신장내, 늑막내, 기관(氣管)내, 비측내, 유리체내, 질내, 직장내, 종양내, 근육내, 복강내, 피하, 결막하, 소낭내, 점막, 심막내, 태내(intraumbilically), 안구내, 경구, 국소, 국부, 흡입(예를 들어 에어로졸 흡입), 주사, 주입, 연속 주입, 직접적인 국소화된 관류 배딩(perfusion bathing) 표적 세포, 카테터(catheter) 경유, 장기세척(lavage) 경유, 크림, 액체 조성물(예를 들어 리포좀), 또는 다른 방법 또는 전술된 방법의 임의의 조합으로 투여된다[예를 들면, 본원에 참고로 인용된 레밍턴(Remington)의 문헌[Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990] 참조]. 비경구 투여는, 구체적인 정맥내 주사에서, 폴리펩티드 분자, 예컨대 본 발명의 항체를 투여하기 위해 가장 흔히 사용된다.

[0119] 비경구 조성물로는 주사, 예를 들어 피하, 피내, 병변내, 정맥내, 동맥내, 근육내, 척수강내 또는 복강내 주사에 의해 투여하도록 고안된 조성물이 포함된다. 주사를 위해, 본 발명의 항체는 수성 용액중에, 바람직하게는 생리학적으로 상용성인 완충액, 예컨대 행크(Hank)의 용액, 링거(Ringer)의 용액, 또는 생리학적 염수 완충액중에 제형화될 수 있다. 용액은 배합 제제(formulatory agent), 예컨대 현탁제, 안정화제, 및/또는 분산제를 함유할 수 있다. 다르게는, 항체는 사용전에 적합한 비히클, 예를 들어 멸균 피로겐-부재의 물과의 구성을 위해 분말 형태일 수 있다. 멸균의 주사가능한 용액은 본 발명의 항체를 필요한 양으로 필요할 경우 아래에 열거된 다양한 다른 구성성분들과 함께 적절한 용매중에 혼입함으로써 제조된다. 멸균성은, 예를 들어, 멸균 여과 막에 의해 쉽게 달성될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 다양한 멸균된 활성 구성성분을 염기성 분산 배지 및/또는 다른 구성성분이 함유된 멸균 비히클내로 혼입함으로써 제조된다. 멸균 주사가능한 용액, 현탁액 또는 유화

액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제제의 바람직한 방법은 진공-건조 또는 동결-건조 기법이고, 이는 활성 구성성분의 분말 + 이의 이전의 멸균 여과된 액체 배지로부터의 임의의 추가의 원하는 구성성분을 수득한다. 액체 배지는 필요하다면 적절하게 완충되고 액체 희석제는 먼저 충분한 염수 또는 글루코스에 의해 주사전에 등장성이 되어야 한다. 조성물은 제조 및 저장의 조건하에 안정할 필요가 있고, 미생물, 예컨대 박테리아 및 곰팡이의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 내독소 오염은 안전한 수준에서, 예를 들면, 0.5 ng/mg 단백질 미만으로 최소한으로 유지되어야 함을 인식할 것이다. 적합한 약학적으로 허용가능한 담체로는, 제한되지 않지만, 완충액, 예컨대 인산염, 시트르산염, 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 비롯한 항산화제; 보존제(예컨대 옥타데실다이메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 사이클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레솔); 저분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐 피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 라이신; 일당류, 이당류, 및 기타 탄화수소, 예로서 글루코스, 만노스, 또는 덱스트린; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당류, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨; 염-형성 대이온, 예컨대 나트륨; 금속 착체(예를 들어 Zn-단백질 착체); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이 포함된다. 수성 주사 현탁액은 헌탁액의 점도를 증가시키는 화합물, 예컨대 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 솔비톨, 덱스트란 등을 함유할 수 있다. 선택적으로, 현탁액은 또한 적합한 안정화제, 또는 매우 농축된 용액의 제조를 허용하도록 화합물의 용해도를 증가시키는 제제를 함유할 수 있다. 추가적으로, 활성 화합물의 현탁액은 적절한 오일성 주사 현탁액으로서 제조될 수 있다. 적합한 친유성 용매 또는 비히클로는 지방 오일, 예컨대 참깨유, 또는 합성 지방산 에스테르, 예컨대 에틸 클리트(cleat) 또는 트라이글리세라이드 또는 리포좀이 포함된다.

[0120] 활성 구성성분들은, 예를 들면, 코아세르베이션 기법에 의해 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들면, 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸 메타크릴레이트) 마이크로캡슐에, 각각, 콜로이드성 약물 전달 시스템(예를 들면, 리포솜, 알부민 미소구체, 마이크로에멀젼(microemulsion), 나노-입자 및 나노캡슐) 또는 매크로에멀젼(macroemulsion)으로 트랩핑(entrapping)될 수 있다. 이러한 기법들은 레밍턴의 문헌[Pharmaceutical Sciences (18th Ed, Mack Printing Company, 1990)]에 개시되어 있다. 서방성(sustained-release) 제제가 제조될 수 있다. 서방성 제제의 적합한 예로는 폴리펩티드를 포함한 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함되고, 이러한 매트릭스는 성형 제품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 구체적인 실시태양에서, 주사가능한 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예컨대, 알루미늄 모노스테아레이트, 젤라틴 또는 이의 조합물의 조성물에 사용함으로써 이루어질 수 있다.

[0121] 이전에 기재된 조성물에 더하여, 항체는 또한 데포제(depot preparation)로서 제형화될 수 있다. 이러한 긴 작용의 제형은 이식(예를 들면 피하 또는 근육내)에 의해 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 이와 같이, 예를 들면, 항체는 적합한 중합체성 또는 소수성 물질(예를 들면 허용가능한 오일중의 유화액으로서) 또는 이온 교환 수지에 의해, 또는 약간 가용성의 유도체, 예를 들면, 약간 가용성의 염으로서 제형화될 수 있다.

[0122] 본 발명의 항체를 포함하는 약학 조성물은 종래의 혼합, 용해, 유화, 캡슐화, 트랩핑 또는 동결건조 공정에 의해 제조될 수 있다. 약학 조성물은 단백질을 약학적으로 사용될 수 있는 제제로 가공시킴을 보조하는 하나 이상의 생리학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 부형제 또는 보조제를 사용하여 종래의 방식으로 제형화될 수 있다. 적절한 제형은 선택된 투여의 경로에 의존한다.

[0123] 항체는 유리 산 또는 염기, 중성 또는 염 형태로 조성물로 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 염은 유리 산 또는 염기의 생물학적 활성을 실질적으로 보유하는 염이다. 이들로는 산 부가 염, 예를 들어, 단백질 조성물의 유리 아미노 기에 의해 형성된 염, 또는 무기산, 예를 들면, 염산 또는 인산, 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산 또는 만델산과 같은 유기산에 의해 형성된 염이 포함된다. 유리 카복실 기에 의해 형성된 염은 또한 무기 염기, 예를 들면, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 수산화제2철; 또는 이소프로필아민, 트라이메틸아민, 히스티딘 또는 프로카인(procaine)과 같은 유기 염기로부터 유래될 수 있다. 약학적 염은 상응하는 유리 염기 형태인 수성 용매 및 다른 양성자성 용매에 더욱 가용성인 경향이 있다.

[0124] **치료학적 방법 및 조성물**

[0125] 본원에 제공된 임의의 항체가 치료학적 방법에 사용될 수 있다.

[0126] 치료학적 방법에 사용하기 위해, 본 발명의 항체는 양호한 의학적 실행과 일치하는 방식으로 제형화되고, 투약되고, 투여될 것이다. 이와 관련하여 고려되는 인자로는 치료될 구체적인 질병, 치료될 구체적인 포유동물, 개

별 환자의 임상적 증상, 질병의 원인, 제제의 전달 부위, 투여 방법, 및 투약 계획, 및 의사에게 공지된 다른 인자가 포함된다.

[0127] 하나의 양태에서, 약제로서 사용하기 위한 본 발명의 항체가 제공된다. 추가의 양태에서, 질환을 치료하는데 사용하기 위한 본 발명의 항체가 제공된다. 특정 실시태양에서, 치료 방법에 사용하기 위한 본 발명의 항체가 제공된다. 하나의 실시태양에서, 본 발명은 질환의 치료가 필요한 개체에서 이러한 질환을 치료하는데 사용하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 항체를 제공한다. 특정 실시태양에서, 본 발명은 질환을 갖는 개체에게 치료 효과량의 항체를 투여함을 포함하는, 이러한 개체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 항체를 제공한다. 특정 실시태양에서, 치료되는 질환은 간 질환이다. 예시적인 간 질환으로는 간염, 간경변, 또는 간암, 예컨대 간세포 암종이 포함된다. 하나의 구체적인 실시태양에서, 질환은 바이러스성 감염, 특히 간염 바이러스 감염, 더욱 특히 HBV 감염이다. 다른 구체적인 실시태양에서, 질환은 암, 특히 간암, 더욱 특히 간세포 암종(HCC)이다. 특정 실시태양에서, 방법은 개체에게 치료 효과량의 적어도 하나의 추가의 치료 제제, 예를 들어, 치료될 질환이 바이러스성 감염인 경우 항-바이러스성 제제, 또는 치료될 질환이 암인 경우 항암제를 투여함을 추가로 포함한다. 임의의 상기 실시태양에 따른 "개체"는 포유동물, 바람직하게는 인간이다.

[0128] 추가의 양태에서, 본 발명은 질환의 치료가 필요한 개체에서 질환의 치료를 위한 약제의 제작 또는 제조에서의 본 발명의 항체의 용도를 제공한다. 하나의 실시태양에서, 약제는 질환을 앓는 개체에게 치료 효과량의 약제를 투여함을 포함하는, 질환을 치료하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 특정 실시태양에서, 치료될 질환은 간 질환이다. 하나의 구체적인 실시태양에서, 질환은 바이러스성 감염, 특히 간염 바이러스 감염, 더욱 특히 HBV 감염이다. 다른 실시태양에서, 치료될 질환은 암이다. 하나의 구체적인 실시태양에서, 질환은 간암, 특히 간세포 암종(HCC)이다. 하나의 실시태양에서, 방법은 개체에게 치료 효과량의 적어도 하나의 추가의 치료 제제, 예를 들어, 치료될 질환이 바이러스성 감염인 경우 항-바이러스성 제제, 또는 치료될 질환이 암인 경우 항암제를 투여함을 추가로 포함한다. 임의의 상기 실시태양에 따른 "개체"는 포유동물, 바람직하게는 인간일 수 있다.

[0129] 추가의 양태에서, 본 발명은 개체에게 치료 효과량의 본 발명의 항체를 투여함을 포함하는, 개체에서 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 항체를 약학적으로 허용가능한 형태로 포함하는 조성물은 상기 개체에 투여된다. 특정 실시태양에서, 치료될 질환은 간 질환이다. 하나의 구체적인 실시태양에서, 질환은 바이러스성 감염, 특히 간염 바이러스 감염, 더욱 특히 HBV 감염이다. 다른 실시태양에서, 치료될 질환은 암이다. 하나의 구체적인 실시태양에서, 질환은 간암, 특히 간세포 암종(HCC)이다. 특정 실시태양에서, 방법은 개체에게 치료 효과량의 적어도 하나의 추가의 치료 제제, 예를 들어, 치료될 질환이 바이러스성 감염인 경우 항-바이러스성 제제, 또는 치료될 질환이 암인 경우 항암제를 투여함을 추가로 포함한다. 임의의 상기 실시태양에 따른 "개체"는 포유동물, 바람직하게는 인간일 수 있다.

[0130] 본 발명의 항체는 진단 시약으로서 또한 유용하다. 항체의 항원 결정자로의 결합은 항체에 부착된 표지에 의해, 또는 본 발명의 항체에 대해 특이적인 표지화된 2차 항체를 사용함으로써 쉽게 검출될 수 있다.

[0131] 몇몇 실시태양에서, 효과량의 본 발명의 항체는 세포에 투여된다. 다른 실시태양에서, 치료 효과량의 본 발명의 항체는 질환의 치료를 위해 개체에 투여된다.

[0132] 질환의 예방 또는 치료를 위해, 본 발명의 항체의 적절한 투여량(단독으로 또는 하나 이상의 다른 추가의 치료 제제와 조합하여 사용될 경우)은 치료될 질환의 유형, 투여 경로, 환자의 체중, 항체의 유형, 질환의 위중성 및 경과, 항체가 예방적 또는 치료학적 목적으로 투여되는지의 여부, 이전 또는 동시적 치료학적 개입, 환자의 임상적 병력 및 항체에 대한 반응, 및 참여 의사의 재량에 좌우된다. 투여에 대해 책임있는 의사는 임의의 사례에서 조성물중 활성 구성성분의 농도 및 개별 환자에 적절한 투약량을 결정할 것이다. 제한되지 않지만, 단일 투여 또는 다양한 시점에 걸쳐서의 다중 투여, 거환 투여, 및 맥동 주입을 비롯한 다양한 투약 계획이 본원에서 고려된다.

[0133] 항체는 적합하게는 환자에게 1회로 또는 일련의 치료로 투여된다. 질환의 유형 및 위중성에 따라서, 약 1 ㎍/kg 내지 15 mg/kg(예를 들어 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg)의 항체는, 예를 들면 하나 이상의 별도의 투여에 의해서인지 연속적인 주입에 의해서인지와 무관하게, 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량일 수 있다. 하나의 전형적인 1일 투여량은 상기 언급된 인자들에 따라서, 약 1 ㎍/kg 내지 100 mg/kg 이상의 범위일 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복된 투여를 위해, 증상에 따라서, 치료는 질환 증후의 원하는 억제가 초래될 때까지 유지될 것이다. 항체의 한 예시적인 투여량은 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 범위내일 수 있다. 다른 비제한적 실시예에서, 투약량은 또한 투여당 약 1 ㎍/kg 체중, 약 5 ㎍/kg 체중, 약 10 ㎍/kg 체중, 약 50 ㎍/kg 체중, 약 100 ㎍/kg 체중, 약 200 ㎍/kg 체중, 약 350 ㎍/kg 체중, 약 500 ㎍/kg 체중, 약 1 mg/kg 체중, 약 5 mg/kg

체중, 약 10 mg/kg 체중, 약 50 mg/kg 체중, 약 100 mg/kg 체중, 약 200 mg/kg 체중, 약 350 mg/kg 체중, 약 500 mg/kg 체중 내지 약 1000 mg/kg 체중 또는 그 이상, 및 여기서 유추가능한 임의의 범위를 포함할 수 있다. 본원에 열거된 수로부터 유래가능한 범위의 비제한적인 예에서, 약 5 mg/kg 체중 내지 약 100 mg/kg 체중, 약 5 ㎍/kg 체중 내지 약 500 mg/kg 체중 등의 범위가 상기 기재된 수에 기초하여 투여될 수 있다. 이와 같이, 약 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 5.0 mg/kg 또는 10 mg/kg(또는 이의 임의의 조합)중 하나 이상의 투약량이 환자에게 투여될 수 있다. 이러한 투약량은 간헐적으로, 예를 들어 매주 또는 3주 마다(예를 들어 환자가 항체의 약 2 내지 약 12, 또는 예를 들어 약 6회 투약량을 투여받도록) 투여될 수 있다. 하나 이상의 더 낮은 투약량이 수반되는 초기의 더 높은 적재 투약량이 투여될 수 있다. 그러나, 다른 투여 섭생이 유용할 수 있다. 이러한 치료법의 진행은 종래의 기법 및 검정에 의해 쉽게 모니터링된다.

[0134] 본 발명의 항체는 일반적으로 의도된 목적을 달성하기에 효과적인 양으로 사용될 것이다. 질환 증상을 치료 또는 예방하도록 사용하기 위해, 본 발명의 항체, 또는 이의 약학 조성물은 치료 효과량으로 투여되거나 적용된다. 치료 효과량의 결정은, 특히 본원에 제공된 상세한 개시내용의 견지에서, 당분야의 숙련가의 능력내이다.

[0135] 전신 투여를 위해, 치료 효과적 투약량은 시험관내 검정, 예컨대 세포 배양 검정으로부터 초기에 추정될 수 있다. 이어서 투약량은 동물 모델에서 공식화되어 세포 배양액에서 결정되는 IC_{50}을 포함하는 순환 농도 범위를 달성한다. 이러한 정보는 인간에서 유용한 투약량을 보다 정확히 결정하기 위해 사용될 수 있다.

[0136] 초기 투여량은 또한 생체내 데이터, 예를 들어, 동물 모델로부터, 당분야에 공지된 기법을 사용하여 추정될 수 있다. 당분야의 숙련가라면 동물 데이터에 기초하여 인간으로의 투여를 쉽게 최적화할 수 있다.

[0137] 투여량 및 간격은 치료 효과를 유지하기에 충분한 항체의 혈장 수준을 제공하도록 개별적으로 조정될 수 있다. 주사에 의한 투여에 유용한 환자 투여량은 약 0.1 내지 50 mg/kg/일, 전형적으로 약 0.5 내지 1 mg/kg/일의 범위이다. 치료 효과적 혈장 수준은 각각의 날짜에 다수의 투약량을 투여함으로써 달성될 수 있다. 혈장중 수준은, 예를 들면 HPLC에 의해 측정될 수 있다.

[0138] 국소 투여 또는 선택적 섭취의 경우, 항체의 효과적인 국소적 농도는 혈장 농도와 관련되지 않는다. 당분야의 숙련가라면 과도한 실험없이 치료 효과적 국소 투여량을 최적화할 수 있을 것이다.

[0139] 본원에 기재된 항체의 치료 효과적 투약량은 일반적으로 유의한 독성을 일으키지 않으면서 치료학적 이점을 제공할 것이다. 항체의 독성 및 치료 효능은 세포 배양액 또는 실험 동물에서 표준 약학 절차에 의해 결정될 수 있다. 세포 배양액 검정 및 동물 연구가 사용되어 LD_{50}(모집단의 50%가 치명적인 투약량) 및 ED_{50}(모집단의 50%에서 치료 효과적인 투약량)을 결정할 수 있다. 독성 효과 및 치료 효과 사이의 투약량 비는 치료학적 지수이고, 이는 비 LD_{50}/ED_{50}으로서 표시된다. 치료학적 지수가 큰 항체가 바람직하다. 하나의 실시태양에서, 본 발명에 따른 항체는 높은 치료학적 지수를 나타낸다. 세포 배양액 검정 및 동물 연구로부터 수득된 데이터는 인간에서 사용하기에 적합한 투여량의 제형 범위에서 사용될 수 있다. 투여량은 바람직하게는 독성이 거의 또는 전혀없는 ED_{50}을 포함하는 순환 농도의 범위내에 놓인다. 투여량은 다양한 인자, 예를 들어, 이용되는 투여형, 이용되는 투여 경로, 피험체의 증상 등에 따라 이러한 범위내에서 달라질 수 있다. 정확한 제형, 투여 경로 및 투여량은 환자의 증상의 관점에서 개별 의사에 의해 선택될 수 있다[예를 들어, 본원에 참고로 그의 전체가 인용된 핀글(Fingl) 등의 문헌[1975, in: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1, p. 1] 참조].

[0140] 본 발명의 항체로 치료되는 환자를 위한 담당 의사는 독성, 기관 부전 등에 기인하여 투여를 종결, 중단 또는 조정하는 방법 및 시기를 알 것이다. 역으로, 담당 의사는 또한 임상적 반응이 적절하지 않을 경우(독성 방지) 치료를 더 높은 수준으로 조정함을 알 것이다. 관심있는 질병의 처치시 투여되는 투약량의 크기는 치료되는 증상의 위중성, 투여 경로 등에 따라 달라질 것이다. 증상의 위중성은, 예를 들면, 부분적으로 표준 예후 평가 방법에 의해 평가될 수 있다. 추가로, 투약량 및 아마도 투약 빈도는 또한 개별 환자의 연령, 체중 및 반응에 따라 달라질 것이다.

[0141] **기타 제제 및 치료**

[0142] 본 발명의 항체는 치료법에서 하나 이상의 다른 제제와 조합하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 적어도 하나의 추가의 치료 제제와 공동-투여될 수 있다. 용어 "치료 제제"는 치료가 필요한 개체에서 증후 또는 질환을 치료하기 위해 투여되는 임의의 제제를 내포한다. 이러한 추가적인 치료 제제는 치료될 구체적인 징후에 적합한 임의의 활성 구성성분, 바람직하게는 서로 부정적 영향을 주지 않는 상보적 활성을 갖는 구성성

분을 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 추가적인 치료 제제는 항-바이러스제이다. 다른 실시태양에서, 추가적인 치료 제제는 항암제이다.

[0143] 이러한 다른 제제는 적합하게는 의도되는 목적에 효과적인 양으로 조합하여 존재한다. 이러한 다른 제제의 효과량은 사용되는 항체의 양, 질병 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 기타 인자에 좌우된다. 항체는 일반적으로 본원에 기재된 바와 같은 동일한 투여량으로 및 투여 경로에 의해, 또는 본원에 기재된 투여량의 약 1 내지 99%, 또는 실험적으로/임상적으로 적절한 것으로 결정된 임의의 투여량 및 임의의 경로에 의해 사용된다.

[0144] 상기 주지된 이러한 조합 치료법은 조합된 투여(둘 이상의 치료제가 동일하거나 별도의 조성물로 포함됨), 및 별도의 투여를 포함하고, 이러한 경우, 본 발명의 항체의 투여는 추가의 치료 제제 및/또는 보조제의 투여 이전에, 동시에 및/또는 이후에 초래된다.

[0145] **제품**

[0146] 본 발명의 다른 양태에서, 상기 기재된 질병의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질을 함유하는 제품이 제공된다. 제품은 용기 및 이의 위에 또는 이와 연결된 라벨 또는 패키지 삽입물을 포함한다. 적합한 용기로는, 예를 들면, 병, 바이알, 주사기, IV 용액 백 등이 포함된다. 용기는 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로 형성될 수 있다. 용기는 그 자체의, 또는 증상을 치료, 예방 및/또는 진단하는데 효과적인 다른 조성물과 조합된 조성물을 보유하고, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들면 용기는 피하내 주사 바늘에 의해 침투가능한 스토퍼(stopper)를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있음). 조성물중 적어도 하나의 활성화제는 본 발명의 항체이다. 라벨 또는 패키지 삽입물은, 조성물이 선택된 증상을 치료하기 위해 사용됨을 지시한다. 게다가, 제품은 (a) 조성물이 포함된 제1 용기(여기서 조성물은 본 발명의 항체를 포함함); 및 (b) 조성물이 포함된 제2 용기(여기서 조성물은 추가의 치료 제제를 포함함)를 포함할 수 있다. 본 발명의 이러한 실시태양에서, 제품은 조성물이 특정 증상을 치료하기 위해 사용될 수 있음을 지시하는 패키지 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 다르게는 또는 추가적으로, 제품은 약학적으로 허용가능한 완충액, 예컨대 주사용 정균수(BWFI: bacteriostatic water for injection), 포스페이트-완충된 염수, 링거의 용액 및 덱스트로즈 용액을 포함하는 제2(또는 제3) 용액을 추가로 포함할 수 있다. 추가로 다른 완충액, 희석제, 충전제, 바늘, 및 주사기를 비롯하여, 상업적 관점 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0147] **실시예**

[0148] 본 발명의 방법 및 조성물의 예는 다음과 같다. 상기에 일반적 설명이 제공되었지만 다양한 다른 실시태양이 실행될 수 있음을 알아야 한다.

[0149] **재조합 DNA 기법**

[0150] 샘브룩(Sambrook, J.) 등의 문헌[Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold spring Harbor, New York, 1989]에 기재된 바와 같이 DNA를 조작하기 위해 표준 방법을 사용하였다. 분자 생물 시약을 제조업체의 지시에 따라 사용하였다.

[0151] 인간 면역글로불린 경쇄 및 중쇄의 뉴클레오티드 서열에 관한 일반적 정보가 카밧(Kabat, E.A.) 등의 문헌[(1991) Sequence of Proteins of Immunological Interest, Fifth Ed., NIH Publication No 91-3242]에 제공된다.

[0152] **DNA 서열분석**

[0153] DNA 서열은 이중 가닥 서열분석에 의해 결정되었다

[0154] **유전자 합성**

[0155] 필요할 경우, 적절한 주형을 사용하는 PCR에 의해 원하는 유전자 분절을 생성하거나, 진아트 아게(Geneart AG)(독일 레겐스버그 소재)에서 합성 올리고뉴클레오티드 및 PCR 생성물로부터 자동화된 유전자 합성에 의해 합성하였다. 정확한 유전자 서열이 이용가능하지 않은 경우에, 올리고뉴클레오티드 프라이머를 가장 가까운 상동체로부터의 서열에 기초하여 고안하고, 유전자를 RT-PCR에 의해 적절한 조직으로부터 기원된 RNA로부터 단리한다. 단일 제한 엔도뉴클라아제 분할 부위에 의해 플랭킹된 유전자 분절을 표준 클로닝/서열분석 벡터내로 클로닝하였다. 플라스미드 DNA를 형질전환된 박테리아로부터 정제하고, 농도를 UV 분광법에 의해 결정하였다. 서브클로닝된 유전자 단편의 DNA 서열을 DNA 서열분석에 의해 확인하였다. 유전자 분절을 적합한 제한 부위를 갖도록 고안하여 서브클로닝이 개개의 발현 벡터내로 허용되게 하였다. 진핵 세포에서의 분비에 대해 단백질을 표적화

하는 리더 펩티드를 위해 5'-말단 DNA 서열 코딩을 갖도록 모든 구조물을 고안하였다. 서열 번호 135 내지 137은 예시적인 리더 펩티드를 제공한다.

[0156] **항원 발현 벡터의 클로닝**

[0157] 용해도 및 정제 태그로서 작용하는 인간 IgG_1 Fc 코딩 단편의 하류에서 포유동물 수여자 벡터내로 관심있는 항원을 코딩하는 증폭된 DNA 단편을 골격구조에 삽입하였다(도 1). 야생형 Fc 서열(서열 번호 123, 125, 127, 129, 131, 133)과의 항원-Fc 융합물의 발현은 동종이량체 분자(avi-Fc-인간 ASGPR H1 자루: 서열 번호 124, avi-Fc-사이노몰구스 ASGPR H1 자루: 서열 번호 126, avi-Fc-인간 ASGPR H1 자루 CRD: 서열 번호 130, avi-Fc-사이노몰구스 ASGPR H1 자루 CRD: 서열 번호 132)를 생성한다. 단백질 CLEC10A는 ASGPR H1에 가장 가까운 상동체로서 식별되었고, 구조물 avi-Fc-인간 CLEC10A 자루(서열 번호 128) 및 avi-Fc-인간 CLEC10A 자루 CRD(서열 번호 134)를 선택된 결합제의 특이성을 시험하기 위해 발현시켰다. 단량체 상태로 항원을 발현하기 위해, DNA 단편을 "홀" 돌연변이가 함유된 Fc 부분(서열 번호 117, 119)으로 융합하고, Fc-"노브"(서열 번호 121) 대응물(Fc-인간 ASGPR H1 CRD: 서열 번호 118 및 122, avi-Fc-인간 CLEC10A CRD: 서열 번호 120 및 122)과 공동-발현시켰다. 항원 발현을 일반적으로 MPSV 프로모터로 구동시키고, CDS의 하류에 위치된 합성 폴리A 신호 서열에 의해 전사를 종결시켰다. 또한, 모든 구조물은 Bir A 비오틴 리가아제(ligase)와의 공동-발현 동안 특정 비오티닐화를 허용하는 N-말단 Avi 태그를 함유하였다. 발현 카세트에 더하여, 각각의 벡터는 EBV-EBNA 발현 세포주에서 자율적 복제를 위해 EBV oriP 서열을 함유하였다.

[0158] **항원 및 항체의 생산 및 정제**

[0159] 항원 및 항체 둘다를 HEK 293 세포내로 일시적으로 형질감염시켜, EBV-유래된 단백질 EBNA를 안전하게 발현하였다. 비오틴 리가아제 Bir A를 코딩하는 자발적으로 공동-형질감염된 플라스미드는 생체내 Avi 태그-특이적 비오티닐화를 허용하였다. 이어서 단백질을 단백질 A 칼럼에 의해 정제하고, 이후 겔 여과하였다.

[0160] **포괄적 람다 Fab-라이브러리의 생성**

[0161] Fab-포맷의 포괄적 람다 항체 라이브러리를 하기 V-도메인 쌍을 사용하여 인간 생식계열 유전자에 기초하여 생성하였다: VH3_23 중쇄를 갖는 V13_19 람다 경쇄는 DP47-람다 라이브러리를 초래하였다. 경쇄(L3)의 CDR3 및 중쇄(H3)의 CDR3에서 라이브러리를 랜덤화하고, "중첩 연장에 의한 스플리싱"(SOE) PCR에 의해 3개의 단편으로부터 조립하였다. 단편 1은 랜덤화된 L3을 포함하는 항체 유전자의 5' 말단을 포함하고, 단편 2는 L3의 말단으로부터 H3의 시작점에 이르는 범위의 중심 불변 단편인 반면, 단편 3은 랜덤화된 H3 및 Fab 단편의 3' 부분을 포함한다. 하기 프라이머 조합을 사용하여 라이브러리를 위한 라이브러리 단편을 생성하였다: 단편 1(LMB3(서열 번호 146) - V1_3_19_L3r 프라이머(서열 번호 143 내지 145)), 단편 2(RJH80(서열 번호 148) - DP47CDR3_ba(mod)(서열 번호 149)), 단편 3(DP47-v4 프라이머(서열 번호 140 내지 142) - fdseqlong(서열 번호 147))(표 1). 라이브러리 단편의 생산을 위한 PCR 매개변수는 94℃에서의 5 분 초기 변성, 94℃에서 60 초, 55℃에서 60 초, 72℃에서 60 초의 25 주기 및 72℃에서 10 분 동안의 말단 연장이다. 주형으로서의 동몰 비의 3개 단편을 사용하는 PCR 조립을 위해, 매개변수는 94℃에서 3 분 초기 변성, 5 주기의 60 초 94℃, 60 초 55℃, 120 초 72℃였다. 이러한 단계에서, 외부 프라이머를 첨가하고, 72℃에서 10 분 동안의 말단 연장 이전에 추가의 20 주기를 수행하였다(도 2). 충분량의 전장의 랜덤화된 Fab 단편의 조립 이후, 이들을 *Nco*I/*Nhe*I에 의해, 유사하게 처리된 억셉터 파지미드 벡터와 함께 분해하였다. 15 μg의 Fab 라이브러리 삽입물을 13.3 μg의 파지미드 벡터로 결찰시켰다. 정제된 결찰물을 60개의 형질전환에 대해 사용하여, 1.5×10^9개의 형질전환체를 생성하였다. Fab 라이브러리를 표시하는 파지미드 입자를 구하고, 선택을 위해 사용되는 PEG/NaCl 정제에 의해 정제하였다.

표 1

포괄적 람다 라이브러리의 생성을 위해 사용되는 프라이머 서열

서열 번호	명칭	서열
140	DP47-v4-4	CGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCG-5-1–2-2-3-4-GAC-TAC- TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG 1 : G/D=20, E/V/S=10, A/P/R/L/T/Y=5%; 2 : G/Y/S=15, A/D/T/R/P/L/V/N/W/F/I/E=4,6%; 3 : G/A/Y=20, P/W/S/D/T=8%; 4 : F=46, L/M=15, G/I/Y=8%; 5 : K=70, R=30%
141	DP47-v4-6	CGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCG-5-1–2-2-2-2-3-4-GAC-TAC- TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG 1 : G/D=20, E/V/S=10, A/P/R/L/T/Y=5%; 2 : G/Y/S=15, A/D/T/R/P/L/V/N/W/F/I/E=4,6%; 3 : G/A/Y=20, P/W/S/D/T=8%; 4 : F=46, L/M=15, G/I/Y=8%; 5 : K=70, R=30%
142	DP47-v4-8	CGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCG-5-1–2-2-2-2-2-2-3-4-GAC-TAC- TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG 1 : G/D=20, E/V/S=10, A/P/R/L/T/Y=5%; 2 : G/Y/S=15, A/D/T/R/P/L/V/N/W/F/I/E=4,6%; 3 : G/A/Y=20, P/W/S/D/T=8%; 4 : F=46, L/M=15, G/I/Y=8%; 5 : K=70, R=30%
143	Vl_3_19_L3r_V	GGACGGTCAGCTTGGTCCCTCCGCCGAATAC V***HV*** A***TT*** A***CC*** G***CT*** A***CT*** A***TC*** A***CG*** GGAGTTACAGTAATAGTCAGCCTCATCTTCCGC 밑줄: 60% 고유 염기 및 40% 랜덤화(M으로서) 진한 이탤릭체: 60% 고유 염기 및 40% 랜덤화(N으로서)
144	Vl_3_19_L3r_HV	GGACGGTCAGCTTGGTCCCTCCGCCGAATAC C***MM*** A***TG*** A***TT*** A***CC*** G***CT*** A***CT*** A***TC*** A***CG*** GGAGTTACAGTAATAGTCAGCCTCATCTTCCGC 밑줄: 60% 고유 염기 및 40% 랜덤화(M으로서) 진한 이탤릭체: 60% 고유 염기 및 40% 랜덤화(N으로서)
145	Vl_3_19_L3r_HLV	GGACGGTCAGCTTGGTCCCTCCGCCGAATAC R***HM*** V***WG*** A***TG*** A***TT*** A***CC*** G***CT*** A***CT*** A***TC*** A***CG*** GGAGTTACAGTAATAGTCAGCCTCATCTTC CGC 밑줄: 60% 고유 염기 및 40% 랜덤화(M으로서) 진한 이탤릭체: 60% 고유 염기 및 40% 랜덤화(N으로서)
146	LMB3	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC
147	fdseqlong	GACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGG
148	RJH80	TTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCC
149	DP47CDR3_ba (mod)	CGCACAGTAATATACGGCCGTGTCC

[0162]

[0163] **포괄적 람다 Fab 라이브러리로부터의 항-인간 ASGPR H1 결합제의 선택**

[0164] 인간 ASGPR H1의 세포외 도메인(ECD)의 완전체 또는 단편에 대한 선택을, 인간 IgG1 항체의 Fc-부분(서열 번호 118, 120, 124, 126, 128, 130, 132, 134)에 융합된 HEK293-발현된 단량체성 또는 이량체성 인간 ASGPR 단백질 단편을 사용하여 실행하였다. ASGPR H1 CRD 및 CLEC10A CRD는 Fc "노브-인투-홀" 포맷을 사용하는 단량체성 Fc 융합물로써 발현되는 반면(C-말단 융합된 CRD를 수반하는 단지 1개의 Fc), 모든 자루 단편 및 총 ECD는 동종이량체성 Fc 융합 단백질로서 발현되었다(도 1). N-말단 avi-태그를 경유하여 비오틴 리가아제 Bir A의 공동-발현에 의해 항원을 효소적으로 비오티닐화하였다. 하기 패턴에 따라서 용액중에서 패닝 라운드(panning round)를 수행하였다: (1) Fc-결합제를 방지하기 위해 눈크 맥시소프(NUNC maxisorp) 플레이트 상으로 10 ㎍/㎖로 코팅된 인간 IgG_1을 사용하는 약 10^{12}개 파지미드 입자의 예비클리어링(preclearing), (2) 예비클리어링 반응의 상청액으로부터의 비-Fc 결합 파지미드 입자의 0.5 시간 동안 1 ㎖의 총 부피로의 100 nM 비오티닐화된 항원 단백질로의 결합, (3) 10 분 동안 5.4 × 10^7개 스트렙타비딘(streptavidin)-코팅된 자기 비이드의 첨가에 의한 비오티닐화된 항원 및 부착된 특이적 결합 파아지의 포획, (4) 5 × 1 ㎖의 PBS/트윈(Tween)-20 및 5 × 1 ㎖의

PBS를 사용하는 비이드의 세척, (5) 10 분 동안 1 ㎖의 100 mM 트라이에틸아민(TEA)의 첨가에 의한 파아지 입자의 용출 및 500 ㎕의 1 M 트리스(Tris)/HCl(pH 7.4)의 첨가에 의한 중화, (6) 상청액중 파아지 입자에 의한 로그-기 에스케리치아 콜라이 TGI 세포의 재-감염, 헬퍼파아지 VCSM13에 의한 감염, 및 후속적인 선택 라운드에서 사용되는 파지미드 입자의 후속적인 PEG/NaCl 침전. 일정한 또는 감소되는(10^{-7} M에서 2 × 10^{-9} M로) 항원 농도를 사용하여 3 내지 5 라운드에 걸쳐 선택을 실행하였다. 2 라운드에서, 스트렙타비딘 비이드 대신 뉴트라비딘(neutravidin) 플레이트를 사용하여 항원-파아지 착체의 포획을 수행하였다. 특이적 결합제를 다음과 같이 ELISA에 의해 식별하였다: 웰당 100 ㎕의 50 nM 비오티닐화된 인간 Fc-자루-CRD, Fc-CRD, 또는 Fc-자루를 뉴트라비딘 플레이트 상에 코팅하였다. Fab-함유 박테리아 상청액을 첨가하고, 항-Flag/HRP 2차 항체를 사용함으로써 결합 Fab를 이들의 Flag-태그를 경유하여 검출하였다. 배경에 비해 중요한 신호를 나타내는 클론이 서열분석(서열 번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 및 27) 및 추가의 분석을 위해 간단히 요약되어 있다.

[0165] **Fab의 정제**

[0166] 박테리아 배양물로부터의 Fab(서열 번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 및 28로서 열거된 가변 도메인의 단백질 서열)를 동역학적 매개변수의 정확한 분석을 위해 정제하였다. 각각의 클론의 경우, 500 ㎖의 배양물에 상응하는 파지미드를 갖는 박테리아로 접종하고, OD_{600} 0.9에서 1 mM IPTG로 유도하였다. 이후, 배양물을 25℃에서 하룻밤 항온처리하고 원심분리에 의해 수거하였다. 20 분 동안 25 ㎖의 PPB 완충액(30 mM 트리스-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 20% 수크로스) 중에서 재현탁된 펠릿을 항온처리한 후, 박테리아를 다시 원심분리하고 상청액을 수거하였다. 이러한 항온처리 단계를 25 ㎖의 5 mM $MgSO_4$ 용액으로 1회 반복하였다. 양쪽 항온처리 단계의 상청액을 모으고, 여과하고, IMAC 칼럼[히스 그래비트랩(His gravitrap), GE 헬쓰케어] 상에 적재하였다. 후속적으로, 칼럼을 40 ㎖의 세척 완충액(500 mM NaCl, 20 mM 이미다졸, 20 mM NaH_2PO_4 pH 7.4)으로 세척하였다. 용출(500 mM NaCl, 500 mM 이미다졸, 20 mM NaH_2PO_4 pH 7.4) 후, 용출물을 PD10 칼럼(GE 헬쓰케어)에 의해 재완충하였다. 이어서 정제된 Fab의 동역학적 매개변수를 SPR-분석[프로테온(Proteon) XPR36, 바이오래드]에 의해 200 nM 내지 6.25 nM 범위로 연속 희석하여 연구하였다.

[0167] **SPR에 의한 친화도-결정**

[0168] 선택된 Fab 클론의 친화도(K_D)를, 뉴트라비딘 포획에 의해 NLC 칩 상에 고정화된 비오티닐화된 모노-(avi-Fc-인간 ASGPR H1 CRD, 서열 번호 118) 또는 2가(avi-Fc-인간 ASGPR H1 자루-CRD, 서열 번호 130) ASGPR H1 항원에 의해 프로테온 XPR36 기기(바이오래드)를 사용하여 표면 플라스몬 공명으로 25℃에서 측정하였다. 재조합 항원(리간드)의 고정화: 항원을 PBST(10 mM 인산염, 150 mM NaCl pH 7.4, 0.005% 트윈-20)에 의해 10 ㎍/㎖로 희석하고, 이어서 상이한 접촉 시간에 30 ㎕/분으로 주입하여 수직 배향으로 200, 400 또는 800 응답 단위(RU)의 고정화 수준을 달성하였다. 분석물의 주입: 1회-시도 동역학 측정을 위해, 주입 방향을 수평 배향으로 바꾸고, 정제된 Fab의 일련의 2배 희석물(100 내지 6.25 nM의 상이한 농도 범위)을 동시에 50, 60 또는 100 ㎕/분으로 별도의 채널 1 내지 5에 따라, 150 또는 200 초의 회합 시간, 및 240 또는 600 초의 해리 시간으로 주입하였다. 완충액(PBST)을 6번째 채널을 따라 주입하여 참고용 "직렬식" 블랭크를 제공하였다. 회합 및 해리 센서그램을 동시에 정합함으로써 프로테온 매니저 v3.1 소프트웨어에서 단순 1 대 1 랑뮤 결합 모델을 사용하여 회합 속도 상수($K_{회합}$) 및 해리 속도 상수($K_{해리}$)를 계산하였다. 평형 해리 상수(K_D)를 $k_{해리}/k_{회합}$ 비로서 계산하였다. 10 mM 글리신(pH 1.5)을 100 ㎕/분의 유동 속도로 30 초의 접촉 시간 동안 사용하여 재생을 수평 배향으로 수행하였다. 2개의 클론, 51A12(서열 번호 002 및 004) 및 52C4(서열 번호 006 및 008)는 ASGPR H1 CRD에 특이적인 것으로 밝혀졌다. 주목할만하게, 클론 51A12는 서브나노몰(subnanomolar) 범위의 친화도를 나타내었다. 클론 5A4(서열 번호 010 및 012), 4F3(서열 번호 014 및 016), R5C2(서열 번호 018 및 020), R9E10(서열 번호 022 및 024), 및 R9E10(서열 번호 026 및 028)이 ASGPR H1의 자루 영역 또는 자루와 CRD 사이의 계면에 대해 상승하였다. 이들의 상응하는 인간 및 사이노몰구스 에피토프로의 친화도는 유사하였다. 대조적으로, avi-Fc-인간 CLEC10A 자루 CRD(서열 번호 134)로의 결합은 검출되지 않았고, 이는 이들 결합제의 높은 특이성을 입증한다. 흥미롭게도, 클론 5A4는 자루 항원에 대한 강한 결합을 나타내었지만, 자루-CRD에 대한 결합은 나타내지 않았다. 모든 측정에 대한 동역학적 및 열역학적 데이터가 표 2에 요약되어 있다.

표 2

항-ASGPR H1 Fab의 동역학적 및 열역학적 매개변수

항체 클론	huASGPR H1 자루 ka (1/Ms) kd (1/s) **KD (M)**	cyASGPR H1 자루 ka (1/Ms) kd (1/s) **KD (M)**	huASGPR H1 자루 CRD ka (1/Ms) kd (1/s) **KD (M)**	cyASGPR H1 자루 CRD ka (1/Ms) kd (1/s) **KD (M)**	hu/cyASGPR H1 CRD ka (1/Ms) kd (1/s) **KD (M)**	huCLEC10A 자루 CRD ka (1/Ms) kd (1/s) **KD (M)**
52C4					1.39×10^{5} 3.96×10^{-3} **2.86×10^{-8}**	비결합
51A12					1.10×10^{5} 6.28×10^{-5} **5.70×10^{-10}**	비결합
5A4	2.44×10^{5} 1.05×10^{-3} **4.30×10^{-9}**	3.72×10^{5} 1.40×10^{-3} **3.76×10^{-9}**				비결합
4F3	1.51×10^{5} 4.45×10^{-3} **2.95×10^{-8}**	1.43×10^{5} 4.80×10^{-3} **3.36×10^{-8}**	2.24×10^{5} 4.08×10^{-3} **1.82×10^{-8}**	1.69×10^{5} 3.65×10^{-3} **2.16×10^{-8}**		비결합
R9E10			5.86×10^{5} 2.11×10^{-3} **3.60×10^{-9}**	4.60×10^{5} 1.99×10^{-3} **4.34×10^{-9}**		비결합
R7E12			2.94×10^{5} 2.68×10^{-3} **9.12×10^{-9}**	2.47×10^{5} 2.36×10^{-3} **9.55×10^{-9}**		비결합
R5C2			4.23×10^{5} 1.12×10^{-3} **2.65×10^{-9}**	3.34×10^{5} 1.14×10^{-3} **3.41×10^{-9}**		비결합

[0169]

[0170] **가변성 항체 도메인의 발현 벡터내로의 클로닝**

[0171] SPR에 의해 상응하는 항원에 특이적으로 결합함을 입증하는 모든 Fab를 IgG_1/람다 항체로 전환시켰다. 따라서, 중쇄 및 경쇄 v-도메인의 PCR-증폭된 DNA 단편을 각각의 수여자 포유동물 발현 벡터가 함유된 인간 IgG_1 불변 중쇄 또는 인간 불변 람다 경쇄중 하나로 골격구조내에 삽입하였다. 항체 발현을 MPSV 프로모터로 구동시키고, 전사를 CDS 하류에 위치된 합성 폴리A 신호 서열로 종결시켰다. 발현 카세트에 더하여, 각각의 벡터는 EBV-EBNA 발현 세포주에서 자율적 복제를 위해 EBV oriP 서열을 함유하였다.

[0172] **항체의 HepG2 세포로의 결합 분석**

[0173] 인간 IgG_1 항-ASGPR 항체의 간세포 암종 세포주 HepG2로의 결합을 FACS에 의해 측정하였다. 간단히, 96 웰 환저 플레이트에서 웰당 0.2의 mio 세포를 30 ㎍/㎖의 농도로 항-ASGPR 항체와 함께 300 ㎕ 중에서 30 분 동안 4℃에서 항온처리하였다. 세포를 0.1% BSA가 함유된 PBS로 세척함으로써 결합되지 않은 항체를 제거하였다. 결합된 항체를 FITC-접합된 어피니퓨어 염소 항-인간 IgG Fc 감마 단편-특이적 2차 F(ab')2 단편[잭슨 이뮤노리서치 #109-096-098; PBS중 작업 용액 1:20, 0.1% BSA]에 의해 검출하였다. 4℃에서 30 분 동안 항온처리한 후, 세척에 의해 결합되지 않은 항체를 제거하고, 세포를 1% PFA로 고정하였다. 세포를 BD FACS 칸토II(소프트웨어 BD DIVA)에 의해 분석하였다(도 3). 모든 항체는 HepG2 세포에 강한 결합을 나타내었다.

[0174] **형광 공명 에너지 전달 검정**

[0175] IgG의 ASGPR-발현 세포 상에서의 이들 에피토프에 대한 친화력을 형광 공명 에너지 전달(FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer) 분석에 의해 결정하였다. 이러한 분석을 위해, SNAP 태그(시스바이오로부터 구입한 플라스미드)를 코딩하는 DNA 서열을 PCR에 의해 증폭시키고, 전장 인간 ASGPR H1 서열(오리진)을 함유하는 발현 벡터내로 결찰시켰다. 생성된 융합 단백질은 C-말단 SNAP 태그를 갖는 전장 ASGPR H1로 구성되었다. 리포펙타민(Lipofectamine) 2000을 형질감염 시약으로서 사용하여 HEK293 세포를 10 ㎍의 DNA로 형질감염하였다.

20 시간의 항온처리 시간 후, 세포를 PBS로 세척하고, 1 시간 동안 37℃에서 100 nM SNAP-Lumi4Tb(시스바이오)가 함유된 랩메드 완충액(시스바이오)중에서 항온처리하여, SNAP 태그의 특이적 표지화를 이끌어 내었다. 후속적으로, 세포를 랩메드 완충액으로 4회 세척하여 결합되지 않은 염료를 제거하였다. 완충액과 비교하여 615 nm에서 테르븀의 발산을 측정함으로써 표지화 효능을 결정하였다. 이어서 세포를 -80℃에서 6 개월 이하 동안 동결 저장하였다. ASGPR-특이적 항체를 50 내지 0.39 nM 범위의 농도에서 표지화된 세포(웰당 100개 세포)에 첨가하고, 이어서 항-인간 Fc-d2(웰당 최종 200 nM)를 FRET를 위한 억셉터 분자로서 첨가함으로써 친화력을 측정하였다. RT에서 3 시간의 항온처리 시간 후, 억셉터 염료의 발산(665 nm)뿐만 아니라 도너 염료의 발산(615 nm)을 형광 판독기[빅터(Victor) 3, 퍼킨 엘머]에 의해 결정하였다. 도너 발산에 대한 억셉터 발산의 비를 계산하고, 배경 대조군(항-huFc-d2를 갖는 세포)의 비를 차감하였다. 곡선을 그래프패드 프리즘5에서 분석하고 K_D 값을 계산하였다(도 4). 클론 4F3이 SPR에 의해 측정시 ASGPR H1 자루-CRD에 대해 가장 낮은 친화도를 나타내는 반면(표 2), 세포 표면으로의 IgG로서의 결합 강도는 낮은 농도에서 가장 강한 결합 강도를 갖는 클론으로 4F3을 만드는 강한 친화력에 의해 구동된다. 대조적으로, CRD에 결합되는 클론 51A12는 SPR 연구에서 낮은 항체 농도에서 정제된 항원에 비해 세포에 상당히 더 약한 결합 강도를 나타낸다.

[0176] **천연 ASGPR 리간드와의 결합 경쟁**

[0177] ASGPR에 대한 천연 리간드로서의 탈시알릴화 당단백질, 예컨대 아시알로페투인과 ASGPR 항체의 경쟁을 간세포 암종 세포주 HepG2를 사용하여 분석하였다. 96웰 환저 플레이트에서 웰당 0.2의 mio 세포를 40 ㎕의 알렉사488 표지화된 아시알로페투인(태내 송아지 혈청, 시그마 알드리치 #A4781, 최종 농도 100 ㎍/㎖)과 함께 4℃에서 30 분 동안 항온처리하였다. ASGPR에 결합하는 리간드가 칼슘 의존성이므로, 결합을 칼슘의 존재하에 수행하였다. 0.1% BSA가 함유된 HBSS로 1회 세포를 세척함으로써 결합되지 않은 단백질을 제거하였다. 이어서 40 ㎕의 항-ASGPR 항체(30, 6, 및 1.25 ㎍/㎖의 최종 농도)를 100 ㎍/㎖의 아시알로페투인의 존재하에 세포에 첨가하였다. 30 분 동안 4℃에서 세포를 항온처리하고, 세포를 1회 세척함으로써 결합되지 않은 단백질을 제거하였다. APC-접합된 어피니퓨어 염소 항-인간 IgG Fc 감마 단편-특이적 2차 F(ab')2 단편(잭슨 이뮤노리서치 #109-136-170; 0.1% BSA가 함유된 HBSS중 작업 용액 1:50)을 2차 항체로서 사용하였다. 4℃에서 30 분 동안 항온처리한 후, 결합되지 않은 2차 항체를 세척에 의해 제거하였다. 1% PFA를 사용하여 세포를 고정시키고, BD FACS 칸토II(소프트웨어 BD DIVA)를 사용하여 분석하였다. CRD-특이적 및 자루-CRD-특이적 항체 둘다의 분석으로부터, 항체는 아시알로페투인의 존재와 무관하게 ASGPR H1에 결합하고, 또한 그 반대도 가능하고, 결합 경쟁은 일어나지 않음을 알 수 있었다(도 5 및 6).

[0178] **내재화 연구**

[0179] ASGPR에 결합한 후 탈시알릴화된 당단백질의 간의 세포로의 섭취는 매우 신속히 일어나는 것으로 공지되어 있다. 이러한 수용체-중재된 세포내 섭취 동안, 엔도솜(endosome)의 내강(lumen)은 산성이 되어 수용체-리간드 착체가 해리될 수 있도록 허용한다. 리간드가 라이소좀(lysosome)에서의 분해에 대해 표적화되는 반면, ASGPR은 세포 표면으로 다시 재순환되는 것으로 보였다. 세포 표면 상에서의 항체의 보유 시간을 분석하기 위해, ASGPR-항체 착체의 내재화를 간세포 암종 세포주 HepG2를 사용하여 분석하였다. 내재화를 저해하기 위해 ASGPR-양성 HepG2 세포를 세포 배양 배지에서 4℃로 전이시켰다. 항체(30 ㎍/㎖)와 함께 진탕기 상에서 4℃에서 45 분간 항온처리한 후, 결합되지 않은 항체를 차가운 PBS로 2회 세척함으로써 제거하고, 세포를 재현탁하고 37℃에서 예비-가온된 배지에서 배양하여 수용체-중재된 세포내 섭취를 비롯한 세포 대사작용을 재활성화하였다. 1회 분취량을 즉시 취하고 얼음 위에서 저장하였고, 이는 제로 시점을 나타낸다. 남은 세포를 37℃에서 항온처리하고, 5, 15, 30 및 120 분 후 추가의 샘플을 취하고 차가운 PBS로 세척하여 추가의 내재화를 중지시켰다. PE-접합된 어피니퓨어 염소 항-인간 IgG Fc 감마-특이적 2차 F(ab')2 항체 단편(잭슨 이뮤노리서치 #109-116-170, 작업 용액 1:50)을 사용하여 세포 표면-결합된 항체를 검출하였다. 4℃에서 30 분 항온처리한 후, 결합되지 않은 항체를 0.1% BSA가 함유된 PBS로 세척함으로써 제거하였다. 세포를 1% PFA로 고정하고, BD FACS 칸토II(소프트웨어 BD DIVA)를 사용하여 분석하였다. 도 7a는 클론 4F3 및 51A12의 예시적인 세포 표면 노출된 항체 수준을 제시한다. 흥미롭게도, 세포외 항체 신호는 처음 30 분 동안 크게 감소하였지만(60%까지 신호 감소), 이어서 나머지 시간 경과 동안 감소는 지연되었다. 이러한 결과는, 항체가 매우 효과적으로 내재화되었지만, 결국 세포 표면으로 다시 재순환되어 일정한 내재화 및 재순환의 동적 정지 상태 조건을 이끌어냄을 지시한다. 이러한 가설을 지지하기 위해, 동일한 실험을 수행하였지만, 항체와의 세포의 항온처리를 세포 배양 배지에서 45 분 동안 37℃에서 수행하였다. 이들 조건은 수용체-항체 착체가 형성되고 전체 항온처리 시간 동안 내재화될 수 있도록 허용하여, 결국 불변성 세포내 섭취의 정지 상태 및 재순환을 이끌어내었다. 이후, 결합되지 않은 항체를 따뜻한 PBS로 2회 세척하여 제거하고, 세포를 따뜻한 배지에 재현탁시켰다. 하나의

샘플을 즉시 취하여 얼음 상에 저장하였고, 이는 제로 시점을 나타낸다. 남은 세포를 37℃에서 항온처리하고, 5, 15, 30 및 120 분 후 추가의 샘플을 취하고 차가운 PBS로 세척하여 추가의 내재화를 중지시켰다. 표면-노출된 항체의 검출을 상기 기재된 바와 같이 수행하였다. FACS 분석 결과, 신호 강도의 감소는 4℃에 비해 37℃에서 항체를 항온처리한 후 실험의 시간 경과 동안 덜 현저하였음을 알 수 있고, 이는 37℃에서의 항체의 항온처리가 내재화의 평형 및 항체-수용체 착체의 재순환을 수득함을 제시한다(도 7b). 일정한 내재화 및 재순환의 가설을 더욱 지지하기 위해, 직접적으로 FITC-표지화된 항체 세트를 사용하여 ASGPR H1-특이적 항체의 내재화를 추가로 분석하였다. 이전과 같이, 표지화된 항체를 4℃에서 HepG2 세포와 항온처리하여 항체가 ASGPR H1에 결합하지만 내재화되지 않도록 허용한다. 항체(30 ㎍/㎖)와 함께 진탕기에서 4℃에서 45 분간 항온처리한 후, 결합되지 않은 항체를 차가운 PBS로 2회 세척하여 제거하고, 세포를 재현탁시키고, 예비-가온된 배지중에서 37℃에서 배양하여 수용체-중재된 세포내 섭취를 비롯한 세포 대사작용을 재활성화시켰다. 세포 분취량을 0, 5, 15, 30 및 120 분째 취하고, 차가운 PBS로 세척하여 추가의 내재화를 중단시켰다. PE-접합된 어피니퓨어 염소 항-인간 IgG Fc 감마-특이적 2차 F(ab')2 항체 단편(잭슨 이뮤노리서치 #109-116-170, 작업 용액 1:50)을 사용하여 세포 표면-결합된 항체를 검출하였다. 앞서 볼 수 있듯이, 표면-노출된 검출 수준은 이것이 안정화되기 전에 처음 30 분 동안 크게 감소하였다(도 7c). 그러나, 표면-노출된 항체 및 내재화된 항체 둘다를 나타내는 FITC 신호에 의한 IgG의 검출로부터, 항체의 총량은 시간에 대하여 일정하게 유지됨을 알 수 있었다(도 7d). 이러한 결과는, 항체가 일정한 내재화 및 재순환의 동적 정지 상태 조건에 있다는 발견을 크게 뒷받침한다.

[0180] **클론 51A12-기제의 L3 친화도 라이브러리의 생성**

[0181] 항체 서열을 분석한 결과, 51A12 경쇄의 CDR3 영역중의 2개의 핫 스팟(hot spot), 즉 2개의 인접한 시스테인 및 글리코실화 부위(도 8)가 밝혀졌다. 시스테인 및 글리코실화 부재의 51A12-유래된 클론을 생성하기 위해, LCDR3에서 랜덤화된 돌연변이 라이브러리를 생성하였다. 클론 51A12(A82G, C112S, C113S, S116A)의 서열(서열 번호 33)을 랜덤화를 위해 주형으로서 사용하였다. 위치 "RDISSNRAVRN"을 코딩하는 삼중물을 분절 전체를 통해 랜덤화하였다. 라이브러리의 생성을 위해, 2개-단편 중첩 PCR 생성물로부터 초래된 DNA 부분을 파아지 벡터내로 클로닝하였다. 단편 1을 생성하기 위해, 주형으로서 클론 51A12(A82G, C112S, C113S, S116A)를 사용하여, 프라이머 조합 LCDR3 rand(서열 번호 151) 및 fdseqlong(서열 번호 147)(표 1 및 3)를 사용하였다. 증폭 조건으로는 초기 5 분 동안 94℃에서의 항온처리 단계, 이후 25 주기(각각의 주기는 30 초 동안 94℃에서의 변성, 30 초 동안 60℃에서의 어닐링(annealing), 및 90 초 동안 72℃에서의 연신 단계로 구성됨), 이후 최종 10 분 동안 72℃에서의 연신 단계가 포함된다. 생성된 단편을 아가로스 겔 상에서 정제하였다. 단편 2를 프라이머 조합 LCDR3rev(서열 번호 150) 및 LMB3(서열 번호 146)(표 1 및 3)에 의해 생성하였다. 증폭 조건으로는 초기 5 분 동안 94℃에서의 항온처리 단계, 이후 25 주기(각각의 주기는 30 초 동안 94℃에서의 변성, 30 초 동안 60℃에서의 어닐링, 및 30 초 동안 72℃에서의 연신 단계로 구성됨), 이후 최종 10 분 동안 72℃에서의 연신 단계가 포함된다. 두 단편의 조립을 위해, 동몰량의 단편 1 및 2를 사용하였다. 증폭 조건으로는 초기 5 분 동안 94℃에서의 항온처리 단계, 이후 프라이머 부재하의 5 주기(각각의 주기는 1 분 동안 94℃에서의 변성, 1 분 동안 60℃에서의 어닐링, 및 120 초 동안 72℃에서의 연신 단계로 구성됨)가 포함된다. 외부 프라이머 LMB3 및 fdseqlong의 첨가 후, 20회의 추가의 주기를 동일한 매개변수로 수행하였다. 종결시, 최종 10 분 동안 72℃에서의 항온처리 단계를 수행하였다. 둘다, 생성된 겔-정제된 DNA 단편 및 클론 51A12(A82G, C112S, C113S, S116A)(서열 번호 33)를 *Nco*I/*Pst*I로 분해하였다(도 9). 라이브러리의 생성을 위해, 결찰을 10 ㎍의 삽입물 및 30 ㎍의 벡터로 수행하였다. 정제된 결찰을 전기천공에 의해 TGI 박테리아내로 형질전환시켜, 3×10^9개의 형질전환체를 생성하였다. Fab 라이브러리를 표시하는 파지미드 입자를 구하고, 선택을 위해 사용되는 PEG/NaCl 정제에 의해 정제하였다.

표 3

L3 친화도 돌연변이 라이브러리의 생성을 위해 사용되는 프라이머의 서열

서열 번호	명칭	서열
150	LCDR3rev	GGAGTTACAGTAATAGTCAGCCTC
151	LCDR3 rand	GAGGCTGACTATTACTGTAACTCC 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11 TTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTC 1: 50% R, 3.1% 나머지 (S, T, C 없음); 2: 50% D, 2.8% 나머지 (C 없음); 3: 50% I, 2.8% 나머지 (C 없음); 4: 50% S, 2.8% 나머지 (C 없음); 5: 50% S. 2.8% 나머지 (C 없음); 6: 50% N, 2.8% 나머지 (C 없음); 7: 50% R, 2.8% 나머지 (C 없음); 8: 50% A, 3.1% 나머지 (S, T, C 없음); 9: 50% V, 2.8% 나머지 (C 없음); 10: 50% R, 2.8% 나머지 (C 없음); 11: 50% N, 2.8% 나머지 (C 없음)

[0182]

[0183] **시스테인 및 글리코실화 부위 부재의 친화도 성숙된 51A12-유래된 클론의 선택**

[0184] LCDR3 내에 시스테인 및 글리코실화 부위가 없는 친화도-돌연변이된 51A12-유래된 Fab의 생성을 파아지 디스플레이에 의해 표준 프로토콜을 사용하여 실행하였다[실라씨(Silacci) 등의 문헌[(2005), Proteomics 5, 2340-50)]]. 제1 패닝 라운드에서, 선택을 하기 절차에 따라 용액 중에서 실행하였다: (1) 0.5 시간 동안 1 ㎖의 총 부피로의 약 10^{12}개 파지미드 입자의 10 nM 비오티닐화된 Fc-CRD로의 결합, (2) 5.4 × 10^{7}개의 스트렙타비딘-코팅된 자기 비이드의 10 분 동안의 첨가에 의한 비오티닐화된 Fc-CRD 및 특이적으로 결합된 파아지 입자의 포획, (3) 5 × 1 ㎖의 PBS/트윈-20 및 5 × 1 ㎖의 PBS를 사용한 비이드의 세척, (4) 10 분 동안 1 ㎖ 100 mM TEA의 첨가에 의한 파아지 입자의 용출 및 500 ㎕의 1 M 트리스/HCl(pH 7.4)의 첨가에 의한 중성화, (5) 기하급수적으로 성장하는 에스케리치아 콜라이 TGI 박테리아의 재-감염, 및 (6) 헬퍼파아지 VCSM13에 의한 감염, 및 후속적 선택 라운드에서 사용되는 파지미드 입자의 후속적인 PEG/NaCl 침전. 감소되는(10×10^{-9} M 내지 0.5×10^{-9} M) 항원 농도를 사용하여 3 라운드에 걸쳐 선택을 실행하였다. 2 및 3 라운드에서, 스트렙타비딘 비이드 대신 뉴트라비딘 플레이트를 사용하여 항원-파아지 착체의 포획을 수행하였다. 또한, 뉴트라비딘 플레이트를 3 시간 동안 2 ℓ의 PBS에서 세척하였다. 특이적 결합제를 다음과 같이 ELISA에 의해 식별하였다: 웰당 100 ㎕의 50 nM 비오티닐화된 Fc-CRD를 뉴트라비딘 플레이트 상에 코팅하였다. Fab-함유 박테리아 상청액을 첨가하고, 항-Flag/HRP 2차 항체를 사용함으로써 결합 Fab를 이들의 Flag-태그를 경유해 검출하였다. ELISA-양성 클론을 96-웰 포맷으로 가용성 Fab 단편으로서 박테리아에 의해 발현시키고, 프로테온 XPR36을 사용하여 SPR-분석에 의해 상청액을 동역학적 스크리닝 실험하였다. 가장 높은 친화도 상수를 갖는 Fab를 발현하는 클론을 식별하고, 상응하는 파지미드의 경쇄를 서열분석하였다(51A12_C1, 서열 번호 35; 51A12_C7, 서열 번호 37; 51A12_E7, 서열 번호 39; 51A12_H3, 서열 번호 41; 51A12_A6, 서열 번호 43; 51A12_D1, 서열 번호 45; 51A12_H6, 서열 번호 47). 모든 클론은 경쇄의 CDR3 영역에 어떠한 중요한 아미노산도 존재하지 않았다.

[0185] **SPR에 의한 51A12-기제의 친화도 성숙된 클론의 친화도 결정**

[0186] 모 중쇄(서열 번호 4) 및 친화도-성숙된 경쇄(51A12_C1, 서열 번호 36; 51A12_C7, 서열 번호 38; 51A12_E7, 서열 번호 40; 51A12_H3, 서열 번호 42; 51A12_A6, 서열 번호 44; 51A12_D1, 서열 번호 46; 51A12_H6, 서열 번호 48)로 구성된 정제된 51A12-유래된 Fab 단편의 친화도(K_D)를, 뉴트라비딘 포획에 의해 NLC 칩 상에 고정화된 비오티닐화된 모노-(avi-Fc-인간 ASGPR H1 CRD, 서열 번호 118) 또는 2가(avi-Fc-인간 ASGPR H1 자루-CRD, 서열 번호 130) ASGPR H1 항원에 의해 프로테온 XPR36 기기(바이오래드)를 사용하여 25℃에서 표면 플라스몬 공명으로 측정하였다. 재조합 항원(리간드)의 고정화: 항원을 PBST(10 mM 인산염, 150 mM NaCl pH 7.4, 0.005% 트윈-20)에 의해 10 ㎍/㎖로 희석하고, 이어서 상이한 접촉 시간에서 30 ㎕/분으로 주입하여 수직 배향으로 200, 400 또는 800 응답 단위(RU)의 고정화 수준을 달성하였다. 분석물의 주입: 1회-시도 동역학 측정을 위해, 주입 방향을 수평 배향으로 바꾸고, 정제된 Fab의 일련의 2배 희석물(12.5 내지 0.78 nM의 다양한 농도 범위)을 동시에 100 ㎕/분에 별도의 채널 1 내지 5에 따라, 150 또는 200 초의 회합 시간 및 3600 초의 해리 시간으로 주입하였다. 완충액(PBST)을 6번째 채널을 따라 주입하여 참고용 "직렬식" 블랭크를 제공하였다. 회합 및 해리 센서그램을 동시에 정합함으로써 프로테온 매니저 v3.1 소프트웨어에서 단순 1 대 1 랑뮤 결합 모델을 사용하여

회합 속도 상수($K_{회합}$) 및 해리 속도 상수($K_{해리}$)를 계산하였다. 평형 해리 상수(K_D)를 $k_{해리}/k_{회합}$ 비로서 계산하였다. 10 mM 글리신(pH 1.5)을 100 ㎕/분의 유동 속도로 30 초의 접촉 시간 동안 사용하여 재생을 수평 배향으로 수행하였다. 선택된 클론의 대부분이 모 클론과 유사한 친화도를 나타냈지만, 클론 51A12_A6(서열 번호 44)은 상당히 개선된 친화도를 나타내었다(표 4).

표 4

친화도-성숙된 항-ASGPR1 Fab의 동역학적 및 열역학적 매개변수

ASGPR CRD-특이적 결합체	인간 / 사이노몰구스 ASGPR1 CRD		
	ka(1/Ms)	**kd(1/s)**	**KD(M)**
51A12	1.10E+05	6.28E-05	**5.70E-10**
51A12 A82G S116A	1.27E+05	1.60E-04	**1.25E-09**
51A12 S116A	1.31E+05	1.78E-4	**1.43E-09**
51A12 _C1	1.74E+05	4.19E-05	**2.41E-10**
51A12_ E7	2.15E+05	9.64E-05	**4.48E-10**
51A12 _H3	1.63E+05	8.30E-05	**5.10E-10**
51A12_A6	3.26E+05	2.61E-05	**8.01E-11**
51A12_C7	1.99E+05	4.67E-05	**2.35E-10**
51A12_D1	4.00E+05	8.85E-05	**2.21E-10**
51A12_H6	0.86E+05	2.79E-05	**3.25E-10**

[0187]

[0188] **친화도 성숙된 51A12 유도체의 HepG2 세포로의 결합 분석**

[0189] 선택된 친화도 성숙된 51A12 유도체의 ASGPR-양성 간세포 암종 세포주 HepG2로의 결합을 FACS로 측정하였다. 음성 대조군으로서, ASGPR-음성 세포주 Hela를 사용하였다. 96웰 환저 플레이트에서 웰당 0.2의 mio 세포를 정제된 Fab 단편(1.1, 3.3 및 10 ㎍/㎖) 또는 인간 IgG_1-전환된 항체(0.01, 0.04, 0.1, 0.4, 1.1, 3.3 및 10 ㎍/㎖)와 함께 300 ㎕에서 30 분 동안 4℃에서 항온처리하였다. 0.1% BSA를 함유하는 PBS로 세포를 세척함으로써 결합되지 않은 분자를 제거하였다. 결합된 분자를 FITC-접합된 어피니퓨어 염소 항-인간 F(ab')2 단편-특이적 2차 F(ab')2 단편(잭슨 이뮤노리서치 Lab #109-096-097) 또는 FITC-접합된 어피니퓨어 염소 항-인간 IgG Fc 감마 단편-특이적 2차 F(ab')2 단편(잭슨 이뮤노리서치 #109-096-098; PBS중 작업 용액 1:20, 0.1% BSA)에 의해 검출하였다. 4℃에서 30 분 동안 항온처리한 후, 결합되지 않은 항체를 세척에 의해 제거하고 세포를 1% PFA에 의해 고정하였다. BD FACS 칸토II(소프트웨어 BD DIVA)를 사용하여 세포를 분석하였다. HepG2 세포로의 Fab 결합에 대한 분석 결과, 모든 클론의 강한 결합이 밝혀졌다(도 10). 변형체 51A12_A6(서열 번호 44)은 양쪽 SPR 분석 및 세포 결합 연구에서 가장 강한 결합제였다. IgG_1-전환된 항체로서의 클론 변형체의 HepG2 세포로의 결합 분석 결과 모든 클론에 대하여 유사하게 강한 결합 패턴을 나타낸 반면(도 11a), 가장 높은 항체 농도로의 Hela 세포로의 결합은 매우 약하거나 검출불가능하였고(도 11b), 이들 클론 변형체의 특이성을 하회하였다.

[0190] **IgG-IFNα DNA 구조물의 생성**

[0191] ASGPR H1-표적화된 IgG-IFNα 융합 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 ASGPR H1-항체 51A12, 51A12(S116A), 51A12(A82G, S116A), 52C4, 5A4, 4F3, R5C2, R9E10, R7E12, 51A12_C1, 51A12_C7, 51A12_E7, 51A12_H3, 51A12_A6, 51A12_D1 및 51A12_H6에 기초하여 생성하였고, 여기서 하나의 인터페론-α2a(IFNα)를 도 12a에 제시된 바와 같이 하나의 이종이량체성 중쇄의 C-말단에 융합시켰다. 간세포로의 표적화(여기서 ASGPR H1이 선택적으로 발현됨)를 2가 항체 Fab 영역(친화력 효과)을 통해 달성하였다. 단일 IFNα의 존재하에 야기된 이종이량체화는 노브-인투-홀(kih) 기술의 적용에 의해 달성된다. 동종이량체성 IgG-사이토킨 융합의 생성을 최소화하기 위해, 사이토킨을 노브-함유 IgG 중쇄의 C-말단에 $(G_4S)_3$ 연결기를 경유하여 융합시킨다(C-말단 Lys 잔기의

결실에 의해). 항체-사이토킨 융합은 IgG-유사 특성을 갖는다. FcγR 결합/효과기 기능을 감소시키고 FcR 공동-활성화를 방지하기 위해, P329G L234A L235A (LALA) 돌연변이를 Fc 도메인에 도입하였다. 그러나, FcRn 결합은 손상되지 않는다. 이들 면역 접합체를 코딩하는 DNA 서열은 서열 번호 49, 51 및 53(51A12), 서열 번호 55, 57 및 59(52C4), 서열 번호 93, 51 및 53(51A12 A82G, S116A), 서열 번호 91, 51 및 53(51A12, S116A), 서열 번호 61, 63 및 65 (5A4), 서열 번호 67, 69 및 71(4F3), 서열 번호 73, 75 및 77(R5C2), 서열 번호 79, 81 및 83(R9E19), 서열 번호 85, 87 및 89(R7E12), 서열 번호 95, 51 및 53(51A12_C1), 서열 번호 97, 51 및 53(51A12_C7), 서열 번호 99, 51 및 53(51A12_E7), 서열 번호 101, 51 및 53(51A12_H3), 서열 번호 103, 51 및 53(51A12_A6), 서열 번호 105, 51 및 53(51A12_D1), 서열 번호 107, 51 및 53 (51A12_H6)으로 제공된다. 또한, 대안의 홀-중쇄를 생성하였고, 여기서 양쪽 VH 및 CHI 도메인이 결실되었다(서열 번호 115). 생성된 Fc 단편은 전장 노브 중쇄와 이종이량체화되어 단일 사이토킨 융합물을 갖는 1가 항체를 유도할 수 있다(도 12b). 기능 검정을 위한 음성 대조군으로서, 대조군 DP47GS/DPL16 비-표적화된 IgG-IFNα 단백질(여기서 IgG는 특정 표적에 결합하지 않음)을 코딩하는 상응하는 DNA 구조물을 생성하였다. 이러한 이소타입 면역 접합체의 DNA 서열은 서열 번호 109, 111 및 113으로 제공된다.

[0192] **항체-사이토킨 구조물의 발현 및 정제**

[0193] 기하급수적으로 성장하는 HEK293-EBNA 세포를 포유동물 발현 벡터에 의해 인산 칼슘-형질감염을 사용하여 형질감염시킴으로써 면역접합체를 생산하였다. 다르게는, 현택액에서 성장중인 HEK293-EBNA 세포를 각각의 발현 벡터로 폴리에틸렌이민(PEI)에 의해 형질감염시켰다. 후속적으로, IgG-사이토킨 융합 단백질을 하나의 친화도 단계(단백질 A), 및 이후의 크기 배제 크로마토그래피(수퍼덱스 200, GE 헬쓰케어)로 구성된 방법에 의해 상청액으로부터 정제하였다. 단백질 A 칼럼[하이트랩 프로트에이(HiTrap ProtA), GE 헬쓰케어]을 20 mM 인산 나트륨, 20 mM 시트르산 나트륨(pH 7.5)에서 평형화시켰다. 상청액을 적재한 후, 칼럼을 우선 20 mM 인산 나트륨, 20 mM 시트르산 나트륨(pH 7.5)으로 세척하고, 후속적으로 13.3 mM 인산 나트륨, 20 mM 시트르산 나트륨, 500 mM 염화 나트륨(pH 5.45)으로 세척하였다. IgG-사이토킨 융합 단백질을 20 mM 시트르산 나트륨, 100 mM 염화 나트륨, 100 mM 글리신(pH 3)으로 용출하였다. 분별물을 중화하고, 모으고, 크기 배제 크로마토그래피[하이로드(HiLoad) 16/60 수퍼덱스 200, GE 헬쓰케어]로 최종 배합 완충액(25 mM 인산 칼륨, 125 mM 염화 나트륨, 100 mM 글리신 pH 6.7 또는 20 mM 히스티딘, 140 mM NaCl, pH 6.0)중에서 정제하였다. 아미노산 서열에 기초하여 계산된 몰 흡광 계수(molar extinction coefficient)를 사용하여 광학 밀도(OD)를 280 nm에서 측정함으로써 정제된 단백질 샘플의 단백질 농도를 결정하였다. 면역접합체의 순도 및 분자량을 환원제(5 mM 1,4-다이티오트레이톨)의 존재 및 부재하에 SDS-PAGE 또는 캘리퍼에 의해 분석하였다. 누파게(NuPAGE: 등록상표) 프리-캐스트(Pre-Cast) 겔 시스템[인비트로겐(Invitrogen)]을 제조업체의 지시에 따라 사용하였다(4 내지 20% 트리스-글리신 겔 또는 3 내지 12% 비스-트리스). 면역 접합체 샘플의 응집물 함량을 수퍼덱스 200 10/300GL 분석용 크기-배제 칼럼(GE 헬쓰케어)에 의해 2 mM MOPS, 150 mM NaCl, 0.02% NaN_3(pH 7.3) 이동 완충액중에서 25℃에서 분석하였다. 분석 데이터의 요약이 선택된 클론에 대해 도 13(51A12 kih IgG IFNα, 서열 번호 50, 52, 54), 도 14(4F3 kih IgG IFNα, 서열 번호 68, 70, 72), 도 15(51A12_C1 kih IgG IFNα, 서열 번호 96, 52, 54), 도 16(51A12_E7 kih IgG IFNα, 서열 번호 100, 52, 54), 도 17(51A12_C7 kih IgG IFNα, 서열 번호 98, 52, 54), 도 18(표적화되지 않은 kih IgG IFNα, 서열 번호 110, 112, 114) 및 도 19(1가 51A12 kih IgG IFNα, 서열 번호 50, 52, 116)에 제시되어 있다.

[0194] **SPR에 의한 IgG-IFNα 면역접합체의 ASGPR H1로의 친화도 결정**

[0195] 예시적인 IgG-IFNα 면역 접합체로서 사용된 클론 51A12 및 52C4의 ASGPR H1 결합 활성을 표면 플라스몬 공명(SPR)에 의해 프로테온 XPR36 기기(바이오래드) 상에서 결정하고, 상응하는 비개질된 IgG 항체와 비교하였다. 비오티닐화된 avi-Fc 인간 ASGPR H1 CRD 항원을 뉴트라비딘 포획에 의해 NLC 칩 상에 고정화시켰다. 재조합 항원(리간드)의 고정화: 항원을 PBST(10 mM 인산염, 150 mM NaCl pH 7.4, 0.005% 트윈-20)에 의해 10 ㎍/㎖로 희석하고, 이어서 상이한 접촉 시간에서 30 ㎕/분으로 주입하여 수직 배향으로 400 응답 단위(RU)의 고정화 수준을 달성하였다. 분석물의 주입: 1회-시도 동역학 측정을 위해, 주입 방향을 수평 배향으로 바꾸고, 정제된 IgG, 1가 및 2가 항체-사이토킨 융합물의 일련의 2배 희석물(50 내지 3.25 nM의 상이한 농도 범위)을 동시에 50 ㎕/분으로 별도의 채널 1 내지 5에 따라, 120 또는 200 초의 회합 시간, 및 300 초의 해리 시간으로 주입하였다. 완충액(PBST)을 6번째 채널을 따라 주입하여 참고용 "직렬식" 블랭크를 제공하였다. 회합 및 해리 센서그램을 동시에 정합함으로써 프로테온 매니저 v3.1 소프트웨어에서 단순 1 대 1 랑뮤 결합 모델을 사용하여 회합 속도 상수($K_{회합}$) 및 해리 속도 상수($K_{해리}$)를 계산하였다. 평형 해리 상수(K_D)를 $k_{해리}/k_{회합}$ 비로서 계산하였다. 수평 배향으로 10 mM 글리신(pH 1.5)을 100 ㎕/분의 유동 속도로 30 초의 접촉 시간 동안 사용하여

재생을 수행하였다. 데이터로부터, -방법의 오차 이내에서- 인간 ASGPR H1에 대한 친화도(1가 표시) 및 친화력(이량체 표시)이 클론 51A12-기제(서열 번호 50, 52, 54) 및 클론 52C4-기제(서열 번호 56, 58, 60)의 면역 접합체 둘다에 대해 보유됨을 알 수 있다(표 5).

표 5

클론 51A12 및 52C4의 ASGPR H1로의 1가 및 2가 결합 포맷의 동역학적 및 열역학적 매개변수

결합체의 명칭	결합 팔의 수	인간 / 사이노몰구스 ASGPR1 CRD		
		$k_{회합}$(1/Ms)	$k_{해리}$(1/s)	K_D(M)
51A12 IgG	2	3.5×10^{5}	7.34×10^{-5}	**2.1×10^{-10}**
51A12 kih IgG-IFNα	2	6.74×10^{5}	15.7×10^{-5}	**2.33×10^{-10}**
51A12 Fab	1	1.10×10^{5}	6.28×10^{-5}	**5.71×10^{-10}**
1가 51A12 kih IgG-IFNα	1	2.45×10^{5}	13.9×10^{-5}	**5.68×10^{-10}**
52C4 IgG	2	5.57×10^{5}	49.9×10^{-5}	**0.89×10^{-9}**
52C4 kih IgG-IFNα	2	4.26×10^{5}	49E $\times 10^{-5}$	**1.15×10^{-9}**
52C4 Fab	1	1.39×10^{5}	396×10^{-5}	**28.6×10^{-9}**
1가 52C4 kih IgG-IFNα	1	1.14×10^{5}	302×10^{-5}	**26.5×10^{-9}**

[0196]

[0197] **IgG-IFNα 면역접합체의 ASGPR-양성 및 -음성 세포로의 결합**

[0198] 항체 접합체의 특이성을 특징짓기 위해, 항체-사이토킨 접합체를 ASGPR-양성 및 -음성 세포 둘다와 함께 항온처리하고, 특이적 결합을 FACS 분석에 의해 측정하였다. 이를 위해, 주요 인간 간세포[3개의 도너로부터; 셀시스 인 비트로 테크놀로지스(Celsis In Vitro Technologies)(미국 매릴랜드주 발티모어 소재)로부터 구입], Huh-7 세포, HepG2 세포, A549 세포, Hela 세포, 및 293T 세포(각각 1 × 10^{5})를 1 ㎍의 ASGPR H1-특이적 IgG kih IFNα 샘플과 함께 45 분 동안 얼음 상에서 항온처리하였다. 세척 후, 세포를 표지화된 염소 항-인간 IgG 2차 항체[비디 바이오사이언시즈(BD Biosciences), 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재]와 함께 30 분 동안 얼음 상에서 항온처리하였다. 3회 세척후, 염색된 세포를 FACS 분석에 의해 칼리부르 유세포 분석기를 사용하여 분석하였다. 모든 FACS 검정에서, 이소타입 대조군 접합체(표적화되지 않은 kih IgG IFNα, 서열 번호 110, 112, 114)를 사용하여 배경을 결정하였고, 이를 시험되는 항체에 대한 MFI 값으로부터 차감하였다. 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC: peripheral blood mononuclear cell)에 대한 결합 분석을 제조업체의 지시에 따라 직접적으로 표지화된 항체 접합체[제논(등록상표) R-파이코에리트린 인간 IgG 표지화 키트, 라이프 테크놀로지스(Life Technologies)]를 사용하여 수행하였다. 결합 분석 결과, 클론 51A12 IgG kih IFNα(서열 번호 50, 52, 54) 및 4F3 IgG kih IFNα(서열 번호 68, 70, 72)가 ASGPR-양성 세포에 대해 매우 특이적인 결합을 나타낸 반면, ASGPR-음성 세포 상에서의 신호는 이소타입 대조군 접합체에 필적할만 함을 알 수 있었다(도 20). 또한, 클론 4F3 IgG kih IFNα의 결합 포화 곡선을 분석하였다. 이를 위하여, 항체-IFNα 접합체를 0.0001 내지 6.7 ㎍/㎖의 일련의 희석 범위로 주요 인간 간세포(3명의 도너로부터)와 함께 항온처리하였고, 결합 강도를 FACS 분석에 의해 기록하였다. 도 21에 제시된 바와 같이, 주요 인간 간세포뿐만 아니라 대조군 세포주 HepG2 상에서의 결합 포화는 0.25 내지 0.74 ㎍/㎖의 항체 농도에서 도달하였고, 더 높은 항체 농도는 결합 신호를 유의하게 더 증가시키지 않았다.

[0199] **HepG2 세포 상에서의 표면-노출된 ASGPR 수준의 시간에 대한 분석**

[0200] ASGPR에 결합한 후 탈시알릴화된 당단백질의 간의 세포로의 섭취는 매우 신속히 일어나는 것으로 공지되어

있다. 이러한 수용체-중재된 세포내 섭취 동안, 엔도솜의 내강은 산성이 되어 수용체-리간드 착체가 해리되도록 허용한다. 리간드가 라이소좀에서 분해에 대해 표적화되는 반면, ASGPR은 세포 표면으로 다시 재순환되는 것으로 보였다. 내재화가 뒤따르는 수용체 결합이 몇몇 수용체의 경우 수용체 발현의 하향조절을 개시하는 것으로 보였으므로, 항 ASGPR H1 항체의 존재하의 표면-노출된 ASGPR의 수준을 시간에 대해 측정하였다. 이러한 실험을 위해, HepG2 세포를 5 시간 이하 동안 IgG로서 또는 1가 또는 2가 항체-IFNα 융합 단백질로서의 클론 51A12-유래된 항체와 함께 항온처리하였다. 음성 대조군으로서, HepG2 세포에 대한 결합 특이성이 없는 관련되지 않은 항체를 사용하였다(GA101)(모든 항체: 30 ㎍/㎖). 37℃에서 항온처리하는 동안, 샘플을 30, 60, 120, 180, 및 300 분 후에 취하고, 차가운 PBS로 세척하였다. APC-접합된 염소 항-인간 IgG Fcg 단편 특이적c F(ab')2 단편(잭슨 이뮤노리서치 Lab, 작업 용액 1:50)을 사용하여 세포 표면 결합된 항체를 검출하였다. 4℃에서 30 분 동안 항온처리한 후, 결합되지 않은 항체를 0.1% BSA가 함유된 PBS로 세척함으로써 제거하였다. 1% PFA를 사용하여 세포를 고정시키고, BD FACS 칸토II(소프트웨어 BD DIVA)를 사용하여 분석하였다. 항체-사이토킨 융합의 완전성을 입증하기 위해, IFNα의 존재를 또한 검출하였다. 세포를 인간 인터페론 알파에 대한 마우스 단일클론성 항체[MMHA-1, #21105-1, 알앤디 시스템스(R&D Systems), 5 ㎍/㎖]와 함께 30 분 동안 4℃에서 항온처리하였다. 결합되지 않은 항체를 0.1% BSA가 함유된 PBS로 세척함으로써 제거하고, FITC-접합된 항-마우스 F(ab')2 단편[세로텍(Serotec), STAR105F; 작업 용액 1:50]을 2차 항체로서 사용하였다. 1% PFA를 사용하여 세포를 고정시키고 BD FACS 칸토II(소프트웨어 BD DIVA)를 사용하여 분석하였다. 도 22에 제시된 결과는 측정된 시간 기간에 걸쳐 수용체의 임의의 결합-유도된 하향조절없이 ASGPR에 결합된 표면-노출된 항체의 일정한 수준을 입증하였다. 중요하게, 가장 그럴듯하게는 ASGPR 착체당 단량체성 IgG-IFNα 분자 수의 2배가 결합할 수 있다는 사실에 기인하여 단량체성 IgG-IFNα 구조물은 가장 강한 신호를 제공하였다(도 22a).

[0201] **공초점 현미경**

[0202] 항체-사이토킨 융합 구조물의 ASGPR-중재된 내재화에 대한 3차원 및 시간-해상된 분석을 공초점 현미경에 의해 수행하였다. 이러한 분석을 위해, HepG2 세포를 세포 항온처리기에서 유리-바닥 접시(눈크) 상에서 50 내지 60%의 증식도(confluency)로 성장시켰다. 이어서 접시를 예비-가온된 PBS(37℃)로 2회 헹궈서 배지를 PBS로 대체하고, 신속하게 현미경 스테이지(stage) 위에 올렸다(37℃, 5% CO_2에서). 이러한 실험을 위해, 클론 51A12 kih IgG IFNα를 알렉사488로 직접적으로 표지화하였다. 표지화된 구조물(20 ㎍/㎖)을 현미경 스테이지에서 HepG2 세포에 직접적으로 첨가하였다. 회전-원반 공초점 현미경을 사용하여 항체 첨가 후 5 분째 수집을 시작하였다. 데이터 수집은 전체 세포 두께를 커버하는 10개의 적층물(z-수준) 상에서 1 시간 동안 매 3 초마다 일어났다(100배 확대). 항체-사이토킨 구조물의 표면-노출된 ASGPR로의 결합은 동일하게 분포되지 않았지만, 군집화된 것으로 밝혀졌다(도 23a). 군집물을 전체 표면에 대해 폈다. 이러한 실험에 대한 시간-해상된 분석으로부터 항체-사이토킨 융합 구조물의 분 단위의 즉각적 내재화가 명백히 밝혀졌다(도 23b). 소낭에서의 IgG-사이토킨 구조물의 내재화 이후, 단백질은 이어서 세포의 선단부 상의 표면으로 다시 수송된다(데이터는 제시되지 않음).

[0203] **SPR에 의한 IgG-IFNα 면역 접합체의 인터페론-알파 수용체 2로의 친화도-결정**

[0204] IgG-IFNα 면역 접합체의 높은 친화도 인터페론-알파 수용체 2(IFNAR2)로의 결합 활성을 표면 플라스몬 공명(SPR)에 의해 프로테온 XPR36 기기(바이오래드) 상에서 결정하고 로페론(Roferon)과 비교하였다. 상업적으로 입수가능한 IFNAR2-Fc 융합 단백질(알앤디 시스템스)을 표준 아민 커플링에 의해 수직 배향으로 센서칩 표면 상에 고정화하였다. 1회-시도 동역학 측정을 위해, 주입 방향을 수평 배향으로 바꾸고, 정제된 항체-사이토킨 융합물의 연속 2배 희석물(50 내지 3.25 nM의 상이한 농도 범위)을 동시에 50 ㎕/분으로 별도의 채널 1 내지 5에 따라, 120 또는 200 초의 회합 시간, 및 300 초의 해리 시간으로 주입하였다. 완충액(PBST)을 6번째 채널을 따라 주입하여 참고용 "직렬식" 블랭크를 제공하였다. 회합 및 해리 센서그램을 동시에 정합함으로써 프로테온 매니저 v3.1 소프트웨어에서 단순 1 대 1 랑뮤 결합 모델을 사용하여 회합 속도 상수($K_{회합}$) 및 해리 속도 상수($K_{해리}$)를 계산하였다. 평형 해리 상수(K_D)를 $k_{해리}/k_{회합}$ 비로서 계산하였다. 수평 배향으로 10 mM 글리신(pH 1.5)을 100 ㎕/분의 유동 속도로 30 초의 접촉 시간 동안 사용하여 재생을 수행하였다. 항체-사이토킨 융합 단백질의 측정된 친화도는 대략적이고($K_{회합}$ 1.57 × 10^6 ℓ/Ms; $K_{해리}$ 6.15 × 10^{-3} ℓ/s; K_D 4 nM), 이에 따라 재조합적으로 생산된 단백질 로페론의 공개된 친화도에 필적할만 하며, 이는 IgG의 C-말단 종결부로의 IFNα의 융합이 IFNAR2에 대한 결합 친화도에 영향을 미치지 못함을 지시한다.

[0205] **ASGPR mAb-IFNα의 항바이러스 활성에 대한 결정**

[0206] IgG-사이토킨 융합물의 일부로서의 IFNα의 작용적 활성을 분석하고, 이를 로페론과 분석하기 위해, IFNα 융합 구조물의 생물 활성을 바이러스 보호 검정에서 시험하였다. 이러한 연구를 위해, MDBK 세포를 로페론 또는 항체-사이토킨 융합물과 함께 1 내지 4 시간 동안 예비-항온처리하였다. 이어서 수포성 구내염 바이러스를 추가의 16 내지 24 시간 동안 첨가하였다. 이러한 항온처리 단계의 종결시, 살아있는 세포를 크리스탈 바이올렛 염색 용액(0.5%)으로 염색하고, 살아있는 세포의 정량화를 690 nm의 기준 파장을 갖고 550 내지 600 nm에서 마이크로플레이트 판독기에 의해 수행하였다. 모든 IgG-사이토킨 구조물의 생물 활성을, 4 파라미터-로지스틱스(Parameter-Logistics) 정합 함수에 의해 표준화된 로페론 용액에 대하여 전체 투약량-응답 곡선 분석으로 결정하였다. 표 6에 제시된 바와 같이, 항체-IFNα 융합 구조물은, 항체의 결합가와 무관하게, 로페론의 활성의 약 5%에 상응하는 활성을 나타낸다. IgG의 C-말단 종결부로의 IFNα의 융합이 IFNAR2에 대한 결합 친화도에 영향을 미치지 못하므로(상기 제시됨), 낮은 친화도 인터페론-알파 수용체 1(IFNAR1)에 대한 상호작용이 입체구조적으로 손상되어, 궁극적으로 IFNAR 완전복합체의 신호전달을 감소시키는 것으로 보인다.

표 6

로페론에 비교된 항체-사이토킨 접합체의 작용적 IFNα 활성

[0207]

샘플 명칭	픽토그램	로페론에 비교된 손실률(%)
ASGPR 51A12 kih IFNa		-94.3
1가 ASGPR 51A12 kih IFNa		-94.9
1가 ASGPR 52C4 kih IFNa		-94.8

[0208] **HCV 레플리콘 및 EMCV CPE 검정에서의 ASGPR-특이적 IgG-IFNα 접합체의 항바이러스 활성**

[0209] IgG-IFNα 융합 단백질의 작용성 활성을 특징화하고 상업적으로 입수가능한 로페론 및 페가시스(Pegasys)(페가인터페론-α2a)와 비교하기 위해, ASGPR-양성 (Huh7-2209-3) 및 ASGPR-음성 세포(Hela)를 사용하여 항바이러스 활성을 연구하였다.

[0210] ASGPR-음성 세포 상에서의 화합물의 항바이러스 활성을 분석하기 위해, HeLa 세포를 96-웰 불투명벽 플레이트에서 15,000/웰로 접종하였다. 하룻밤 배양 후, 웰을 진공처리하고, EMEM(10% FBS 함유)에 희석된 50 ㎕의 항체-사이토킨 접합체를 첨가하였다. HeLa 세포를 IgG-IFNα 구조물로 3 시간 동안 37℃에서 예비처리한 후, 50 ㎕의 EMCV(VR-1762, ATCC)를 각각의 웰에 첨가하였다(EMEM중 2,000 TCID50/웰). 생존가능한 세포를 감염 후 24 시간째 셀타이터-글로(CellTiter-Glo) 키트(G7572, 프로메가)를 사용하여 측정하였다. 100 ㎕의 셀타이터-글로 시약을 각각의 웰에 첨가하고, 실온에서 10 분 동안 온화하게 진탕하며 항온처리하였다. 이어서, 베르톨드 미트라스 루미노미터(Berthold Mithras Luminometer)[베르톨드 테크놀로지스(Berthold Technologies)]를 사용하여 발광 신호를 기록하였다. 결과는 생존 세포의 백분율을 나타내고(도 24a), 모든 EC_{50} 값, 및 실험 반복 횟수가 표 7에 요약되어 있다. ASGPR-음성 Hela 세포 상에서, 로페론에 대한 EC_{50}은 다른 화합물, 예컨대 4F3 IgG kih IFNα의 경우에 비해 75 배까지 더 작고, 이는 이러한 화합물의 작용성 활성이 시험된 다른 화합물에 비해 훨씬 더 높음을 지시한다. 대조적으로, 페가시스의 활성은 ASGPR-특이적 IgG kih IFNα 접합체의 활성에 필적할만 하였다.

[0211] HCV IRES에 의해 구동된 제1 개방 판독 골격구조가 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자(NPTII)와 융합된 레닐라 루시퍼라아제 유전자를 함유하고, EMCV IRES에 의해 구동된 제2 개방 판독 골격구조가 NK5.1 레플리콘 주쇄로부터 유래된 HCV 비-구조적 유전자 NS3, NS4a, NS4b, NS5A 및 NS5B를 함유하는 비시스트론성 HCV 레플리

콘의 안정한 형질감염에 의해 ASGPR-양성 Huh 7-유래된 간 암종 세포주 2209-23을 개발하였다. 세포를 37℃에서 5% CO_2를 갖는 습윤된 대기하에 글루타맥스(등록상표) 및 100 mg/㎖ 피루브산 나트륨(#10569-010)이 보충된 DMEM 중에서 배양하였다. 배지를 추가로 10%(v/v) FBS(#10082-139), 1%(v/v) 페니실린/스트렙토마이신(#15140-122) 및 1%(v/v) 제네티신(geneticin)으로 보충하였다. 모든 시약을 인비트로겐으로부터 수득하였다.

[0212] 5%(v/v) 태내 소 혈청이 함유된 DMEM중의 Huh 7 2209-23 세포를 96-웰 플레이트에 5000 세포/웰로 90 ㎕의 부피로 플레이팅하였다. 플레이팅 후 24 시간째, 항체-사이토킨 접합체(또는 대조군으로서의 배지)를 세포에 3배 희석물로 12개의 웰에(0.01 내지 2000 pM) 10 ㎕의 부피로 첨가하였다. 화합물의 첨가 후 최종 부피는 100 ㎕였다. 레닐라 루시퍼라아제 검정 시스템(프로메가, # E2820)을 사용하여 레닐라 루시퍼라아제 리포터 신호를 화합물 첨가후 72 시간째 판독하였다. EC_{50} 값을 화합물 농도로서 계산하였고, 여기서 레닐라 루시퍼라아제 리포터의 수준에서의 50% 감소는 대조군 샘플(화합물의 부재)과 비교하여 관찰되었다. 투약량-응답 곡선 및 EC_{50} 값을 XLfit4 프로그램(아이디 비지니스 솔루션스 리미티드, 영국 서레이 소재)을 사용하여 수득하였다. ASGPR-음성 세포에 노출될 경우 항체-사이토킨 구조물의 감소된 항바이러스 활성에도 불구하고(표 6 및 도 24a), 클론 51A12 IgG kih IFNα 및 4F3 IgG kih IFNα는, ASGPR-양성 세포주 Huh7 2209-23과 항온처리될 경우, 로페론에 비해 바이러스성 감염 및 증식으로부터 세포를 보호하는데 있어서 더욱 강력하였다(도 24b 및 표 7). 대조적으로, 이소타입 대조군(표적화되지 않은 IgG kih IFNα)의 효능은 상당히 더 낮았고, ASGPR H1로 IgG kih IFNα 접합체를 표적화시키는 긍정적 결과를 분명히 보여주었다.

표 7

다양한 ASGPR H1-특이적 항체-IFNα 접합체의 항바이러스 활성에 대한 요약

[0213]

IFNa 분자	HCV 레플리콘 (Huh-7)			EMCV 검정 (Hela)		
	평균 EC50 (pM)	STDEV	n=	평균 EC50 (pM)	STDEV	n=
로페론	0.07	0.03	4	1.8	0.4	6
페가시스	0.96	0.46	5	61.2	9.4	9
이소타입-IFN	0.59	0.12	3	108.3	5.0	6
51A12-IFN	0.02	0.01	4	68.2	14.4	6
4F3-IFNa	0.04	0.01	4	135.6	29.1	6
R7E12-IFN	0.11	0.04	3	29.2	2.3	6
R9E10-IFN	0.43	0.21	3	49.0	5.6	6
R5C2-IFN	0.54	0.23	3	56.3	4.9	6
5A4-IFN	0.86	0.4	3	58.7	5.8	6

[0214] **간의 세포 및 간 이외의 세포에서의 ASGPR-특이적 IgG-IFNα 접합체의 IFNα 활성**

[0215] IFNα는 수 백개의 IFN-자극된 유전자(ISG)의 유도를 통해 그의 항바이러스성 활성을 부여한다. 항바이러스성 활성을 입증하고, 추가로 ASGPR-표적화 중재된 증진된 IFNα 활성을 확인하기 위해, 본 발명자들은 간의 세포 및 간 이외의 세포에서 ISG 발현을 결정하였다. 간의 세포(주요 간세포 및 HepG2) 및 간 이외의 세포(인간 PBMC 및 Hela)를 다양한 연속적으로 희석된 IFNα 분자로 6 시간 동안 처리하고, 5프라임(PRIME) RNA 추출 키트(#FP2302530, 5프라임, 미국 매릴랜드주 게이터스버그 소재)를 사용하여 전체 RNA를 세포로부터 추출하였다.

[0216] ISG 유전자 MX1 및 RSAD2에 대한 TaqMan(실시간 PCR) 검정을 주문 설계하였다. 관심있는 어피메트릭스(Affymetrix) 탐침자 서열 이내에 또는 관심있는 기준 mRNA의 3' 코딩 서열 이내에 위치하도록 검정을 선택하였다.

[0217] 모든 유전자 발현 검정을 ABI 프리즘(PRISM)(등록상표) 7900HT 서열 검출 시스템[어플라이드 바이오시스템스(Applied Biosystems)] 상에서 수행하였다. PCR 믹스는 각각의 반응의 경우 10 ㎕의 퍼펙타(PerfeCTa: 등록상표) qPCR 패스트믹스(FastMix), ROX(등록상표)[퀀타(Quanta)], 1 ㎕의 TaqMan 또는 0.06 ㎕의 IDT 검정, 및 2 ㎕의 DEPC-처리된 물[앰비온(Ambion), 어플라이드 바이오시스템스]로 구성되었다. cDNA 샘플을 RNase-부재의 물(앰비온, 어플라이드 바이오시스템스)에서 10 ng/㎕로 희석하고, 7 ㎕를 13 ㎕의 예비-분포된 검정 PCR 믹스

가 함유된 384-웰 광학 플레이트(어플라이드 바이오시스템스)에 첨가하였다. 표적 유전자를 위한 하나의 검정 또는 내생성 대조군 유전자 검정, 18S, GAPDH[레서스(Rhesus)], ACTB(레서스) 및 GUSB(레서스)(TaqMan 유전자 발현 검정, 어플라이드 바이오시스템스)에 의해 모든 샘플에 대해 질의 제기하였다. 각각의 측정을 3중으로 측정하였다. 다음의 PCR 조건을 사용하였다: 45℃에서 2 분 동안, 이어서 95℃에서 3 분 동안, 이후 40 주기(95℃에서 15 초 동안 및 60℃에서 45 초 동안).

[0218] 표적 유전자의 발현 수준을 18S, ACTB, GAPDH 및 GUSB의 기하 평균으로 정규화하고, 상대적 발현(E)dm로서 표시하고, $E = 2^{(\triangle Ct)}$이고, 여기서 △Ct는 기준 유전자 및 표적 유전자 주기 사이의 차이이고, 여기서 증폭은 전체적 임계값(arbitrary threshold)을 초과한다. 도 25에 제시된 바와 같이, 이소타입 IgG kih IFNα 대조군은 로페론과 비교하여 감소된 ISG 유도를 나타내었고, 모든 세포에서 페가시스(PEG-IFNα)와 유사한 활성을 가졌다. ASGPR-음성 Hela 및 PBMC 세포에서, 클론 51A12 IgG kih IFNα는 또한 이소타입 대조군과 유사한, 감소된 활성을 나타내었다. 그러나, ASGPR-양성 간의 세포 HepG2 및 주요 인간 간세포에서, 클론 51A12 IgG kih IFNα는 이소타입 대조군에 비해 증진된 IFNα 활성을 나타내었고, 로페론과 유사한 수준이었다. 이러한 결과는 51A12 항체-IFNα 접합체의 상기-기재된 증진된 항바이러스 활성을 확인하였다.

[0219] 이들 ASGPR-표적화된 IFNα 분자가 지속된 IFNα 활성을 갖는지의 여부를 이해하기 위해, 본 발명자들은 72 시간 이하 동안 Huh-7 및 주요 간세포에서 ISG 발현을 모니터링하였다. 도 26에 제시된 바와 같이, ASGPR-표적화 IFNα 분자 51A12 IgG kih IFNα 및 4F3 IgG kih IFNα 둘다는 처리 후 72 시간째 지속된 ISG 유도를 나타낸 반면, 페가시스 및 로페론은 72 시간째 상당히 감소된 ISG 유도를 나타내었다.

[0220] **사이노몰구스 원숭이 단일 투약량 PK/PD 연구**

[0221] ASGPR 항체-기제의 표적화된 IFNα 분자가 간 이외의 세포에서 감소된 IFNα 활성을 나타내고 간의 세포에서 증진된 IFNα 활성(간-표적화된 IFNα 효과)을 나타낸다는 시험관내 결과에 의해 고무되어, 생체내 간-표적화된 IFNα 효과를 확인하기 위해 사이노몰구스 원숭이 연구를 고안하였다. ASGPR-특이적 클론 51A12가 인간 및 원숭이 ASGPR에 동일한 친화도를 갖고 결합하고 인간 IFNα가 원숭이에서 유사한 활성을 가지므로, 원숭이는 간-표적화된 IFNα 개념 증명(proof-of-concept) 연구를 위한 PK/PD 모델로서 사용될 수 있다. 원숭이 연구에서, 본 발명자들은 직접적으로 51A12 IgG kih IFNα 및 이소타입 IgG kih IFNα 대조군을 비교하였다. 양쪽 분자 모두를 피하로 1 또는 10 ㎍/kg의 투여 수준으로 주사하였고, 원숭이 혈액 및 간 생검 샘플을 투약 전 및 후에 수집하고, 이들의 PK(약동역학) 및 PD(약력학)를 모니터링하였다. 투여량 그룹은 표 8에 열거되어 있다.

표 8

12 마리 사이노몰구스 원숭이는 하기 제시된 바와 같이 4개 그룹으로 분할되었다

[0222]

그룹	투약량(㎍/kg), 화합물	동물의 수	제형 강도(㎍/㎖)
1	10 ㎍/kg, 51A12, 피하, 단일 투약량	3	20
2	1 ㎍/kg, 51A12, 피하, 단일 투약량	3	2
3	10 ㎍/kg, 이소-대조군, 피하, 단일 투약량	3	20
4	1 ㎍/kg, 이소-대조군, 피하, 단일 투약량	3	2

[0223] **샘플 수집, 전달 및 저장**

[0224] 혈액(대략 1 ㎖)을 투여 전 5 일 및 주사 후 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 168, 및 336 시간째 각각의 동물로부터 수집하였다. 약동역학을 위한 샘플을 항응집제가 없는 튜브내로 수집하였다. 약동역학을 위한 혈액을 약역학적 혈액 수집 이전에 수집하였다.

[0225] 유전자 발현 연구를 위해, 혈액(약 2.5 ㎖)을 투여 전 5 일 및 주사 후 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 168, 및 336 시간째 각각의 동물로부터 수집하였다. 샘플을 PAXgene(등록상표) 혈액 RNA 수집 튜브내로 수집하고, 8 내지 10회 역전(inverting)시킴으로써 튜브를 혼합하였다. PAXgene(등록상표) 혈액 RNA 수집 튜브는 사혈(phlebotomy) 순서에서 채취된 마지막 튜브였다(즉, 임상 병리학 및 약동역학 수집 이후).

[0226] 간 조직을 각각의 동물로부터 복강경 절차를 경유하여 -5 일 및 2 일, 4 일 및 8 일째 간에서 2개의 별도의 위

치로부터 수집하였다(적어도 25 mg/샘플). 각각의 조직 샘플을 절제하고, 즉시 별도의 예비-칭량되고 표지화된 저온-바이알(cryo-vial) 튜브에 옮기고, 액체 질소에서 급속-동결하였다. 즉각적인 동결이 필요하므로, 샘플 바이알을 간 샘플의 수집 후 칭량하지 않았다. -5 일 및 2 일의 경우, 각각의 동물에 대한 제1 간 조직 분취량을 좌측 간엽으로부터 취하고, 각각의 동물의 제2 간 조직 분취량을 우측 간엽으로부터 취하였다. 4 일 및 8 일의 경우, 각각의 동물에 대한 제1 간 조직 분취량을 좌내측 간엽으로부터 취하고, 각각의 동물의 제2 간 조직 분취량을 우내측 간엽으로부터 취하였다. 간 생검 샘플을 2 ㎖ 튜브에서 스냅-동결시켰다(snap-frozen). 드라이 아이스 상에서 예비-냉각된 RNAlater-ICE[P/N 7031, 앰비온(Ambion)]를 동결된 조직에 첨가하고 -80℃에서 저장하였다. 혈액 샘플을 프로토콜에 따라 PAXgene(등록상표) 튜브에 수용하고 가공전에 -80℃에서 저장하였다.

[0227] **원숭이 혈청 샘플에서의 클론 51A12 IgG kin IFNα 및 이소타입 IgG kin IFNα 대조군의 측정**

[0228] 포획 시약으로서의 항-IFNα 항체[제품 번호 34495-28, 로슈 너틀리(Roche Nutley), 미국 뉴저지주 소재] 및 검출 시약으로서의 HRP-표지화된 항-인간 Fc 항체[제품 번호 Wbr72_MM_090602, 로슈 디애그노스틱스(Roche Diagnostics), 독일 펜츠버그 소재]를 사용하는 샌드위치(sandwich) ELISA 검정을 사용하여 분취량의 사이노몰구스 원숭이 혈청을 투약된 화합물에 대해 분석하였다. 항-IFNα 항체로 실온에서 1 시간 동안 플레이트를 코팅한 후, 플레이트를 1 시간 동안 2% BSA 차단 완충액으로 처리하였다. 세척 후, HRP-표지화된 항-인간 Fc 항체를 각각의 웰에 첨가하고, 1 시간 동안 온화하게 진탕하면서 항온처리하였다. 세척 후, 100 ㎕/웰의 TMB 기질 용액(#11 484 281 001, 로슈 디애그노스틱스, 독일 펜츠버그 소재)을 약 20 분 동안 첨가하였다. 이어서 50 ㎕/웰의 2N HC1을 첨가함으로써 반응을 중단시켰다. 플레이트를 2 분 이내에 450 nm에서 650 nm의 기준 파장을 갖고 판독하였다. 이 방법의 더 낮은 정량 한계(LLOQ)는 10 ng/㎖였다. 검정의 정밀성(% CV) 및 정확성(% 상대 오차)은 허용 판단기준을 충족시켰다. 샘플과 함께 분석된 QC 샘플의 분석에 의해 모니터링된 검정 성능은 표 9에 제시된 바와 같았다. 혈청 농도는 표 10 내지 13에 제시되어 있다. 10 ㎍/kg에서의 이소타입 IgG kih IFNα의 단일 주입은 1 주 동안 대략 100 ng/㎖에서 피이크를 갖는 혈액중의 상당한 노출을 수득하였다. 대조적으로, 동일한 투약량 수준에서, 51A12 IgG kih IFNα는 임의의 시점에 정량 수준 아래였다. 양쪽 분자 모두 혈액내에서 1 ㎍/kg의 투약량 수준에서 검출불가능하였다. PK 매개변수는 표 14에 요약되어 있다.

표 9

사이노몰구스 원숭이 혈청에서의 클론 51A12 IgG kih IFNα 품질 대조군 샘플의 분석적 성능

	수행일	곡선 번호	QC1 30.0 ng/mL	QC2 90.0 ng/mL	QC3 270 ng/mL
	13-Dec-2011	1	24.3	78.8	252
			29.1	95.2	236
	13-Dec-2011	2	*	76.4	251
			26.5	94.7	247
	20-Dec-2011	3	21.7	74.7	245
			28.6	84.3	264
		4	25.4	82.6	288
			28.2	91.2	279
	평균		26.3	84.7	258
	%CV		10.2	9.6	6.9
	상대 오차(%)		-12.3	-5.9	-4.4
	*실활됨				

[0229]

표 10

1 ㎍/kg의 이소타입 IgG kih IFNα의 혈청 농도(ng/㎖)

시간 [h]	피험체 1	피험체 2	피험체 3	평균	S.D.	%CV	n
0	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
2	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
6	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
12	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
24	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
48	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
72	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
96	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
168	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
336	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				

[0230]

표 11

1 ㎍/kg의 51A12 IgG kih IFNα의 혈청 농도(ng/㎖)

시간 [h]	피험체 1	피험체 2	피험체 3	평균	S.D.	%CV	n
0	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
2	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
6	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
12	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
24	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
48	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
72	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
96	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
168	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
336	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				

[0231]

표 12

10 ㎍/kg의 51A12 IgG kih IFNα의 혈청 농도(ng/㎖)

시간 [h]	피험체 1	피험체 2	피험체 3	평균	S.D.	%CV	n
0	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
2	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
6	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
12	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
24	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
48	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
72	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
96	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
168	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
336	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				

[0232]

표 13

10 ㎍/kg의 이소타입 IgG kih IFNα의 혈청 농도(ng/㎖)

시간 [h]	피험체 1	피험체 2	피험체 3	평균	S.D.	%CV	n
0	BLQ<10.0	BLQ<10.0	BLQ<10.0				
2	BLQ<10.0	33.7	12.4	23.1			2
6	49.8	40.9	61.5	50.7	10.3	20.3	3
12	66.4	44.3	67.9	59.5	13.2	22.2	3
24	109	63.1	71.1	81.1	24.5	30.2	3
48	119	99.3	88.3	102	15.6	15.3	3
72	105	88.2	94.0	95.7	8.53	8.9	3
96	124	85.0	95.2	101	20.2	20.0	3
168	78.9	56.5	58.3	64.6	12.4	19.2	3
336	19.6	11.0	BLQ<10.0	15.3			2

[0233]

표 14

10 ㎍/kg의 이소타입-IFNα의 사이노몰구스 원숭이 혈청 PK 매개변수

매개변수	단위	피험체 1	피험체 2	피험체 3	평균	S.D.	%CV	n
고유 투약량	μg/kg	10	10	10				
$C_{최대값}$	ng/ml	124	99	95	106	16	14.8	3
$T_{최대값}$	시간	96	48	96	80	28	34.6	3
AUC	ng*시간/ml	25251	18124	13279	18885	6022	31.9	3
AUC 간격	시간	(0-336)	(0-336)	(0-168)				
AUC/투약량	ng*시간/ml/μg/kg	2525	1812	1328	1888	602	31.9	3
AUC 외삽	ng*시간/ml	27615	19253	21839	22903	4281	18.7	3
% AUC 외삽	%	8.6	5.9	39	17.9	18.5	104	3
AUC 외삽 /	ng*시간/ml/μg/kg	2762	1925	2184	2290	428	18.7	3
투약량								
$T_{1/2}$	시간	83.6	71.1	102	85.5	15.4	18.0	3

[0234]

[0235] **RNA 추출**

[0236] 퀴아겐 알엔이지 미니 키트(Qiagen RNeasy Mini Kit)(P/N 74104)를 사용하여 전체 RNA를 96개의 간 생검 샘플(샘플링당 48 마리 동물 × 2회 생검)로부터 추출하고, 나노드롭(Nanodrop) 8000 상에서 정량화하였다. 간 샘플의 전체 RNA 품질을 캘리퍼 랩칩(LabChip) GX 상에서 평가하였다. 모든 샘플로부터의 RNA는 qPCR 및 마이크로어레이(microarray)-기초 유전자 발현 측정을 수행하기에 충분한 양 및 품질이었다.

[0237] 120개의 혈액 샘플로부터의 전체 RNA 단리 및 정량을 발현 분석(미국 노쓰 캐롤라이나주 라레이 소재)에서 수행하였다. 혈액 샘플의 전체 RNA 품질을 아길런트 바이오애널라이저(Agilent Bioanalyzer) 2100 상에서 평가하였다. 모든 샘플로부터의 RNA는 qPCR 및 마이크로어레이-기초 유전자 발현 측정을 수행하기에 충분한 양 및 품질이었다.

[0238] **마이크로어레이 분석**

[0239] 2개의 별도의 프로토콜을 사용하여 전체 RNA를 cDNA로 전환시켰다: 어피메트릭스 진칩(Genechip) HT 3' IVT 익스프레스(Express)(P/N 901225) 및 누겐 오베이션(NuGEN Ovation) RNA 증폭 시스템 V2(P/N 3100-60).

[0240] 혈액

[0241] 간 생검 샘플로부터의 100 ng의 전체 RNA를 2중-가닥 cDNA 및 증폭된 RNA(aRNA)로 유전자칩 HT 3' IVT 익스프레스 키트를 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 전환시켰다. 하이브리드화 믹스는 12.5 ㎍의 aRNA, 2x 하이브리드화 믹스(P/N 900720), DMSO, 20x 하이브리드화 대조군, 및 올리고 B2 대조군을 함유하였다.

[0242] 간

[0243] 혈액 샘플로부터의 50 ng의 전체 RNA를 단일-가닥 cDNA로 누겐 오베이션 RNA 증폭 시스템 V2 키트를 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 전환시켰다. 하이브리드화 믹스는 3 ㎍의 SPIA-증폭된 cDNA, 2x 하이브리드화 믹스(P/N 900720), DMSO, 20x 하이브리드화 대조군, 및 올리고 B2 대조군을 함유하였다.

[0244] 간 및 혈액 샘플을 위한 하이브리드화 믹스를 어피메트릭스 유전자칩 인간 게놈 U133 플러스 2.0 어레이로 하이브리드화하였다. 염색 및 세척 단계를 제조업체(어피메트릭스)에 의해 제안된 바와 같이 수행하였다. 각각의 하이브리드화된 어피메트릭스 유전자칩 어레이를 유전자칩 스캐너 3000 7G(아길런트/어피메트릭스)로 스캐닝하였다. 영상 분석을 어피메트릭스 GCOS 소프트웨어로 수행하였다. 생성된 .cel 파일을 표준화된 품질 대조군

메트릭스(metrics)에 의해 평가하였다. 데이터를 정규화하고, 발현 값 계산/차등 발현을 표준 데이터 분석 패키지에 의해 결정하였다.

[0245] 도 27에서, 원숭이 간 샘플에서의 4개의 대표적인 ISG HRASLS2, ITI44, IFIT1, 및 IFITM2의 발현이 그래프화되어 있다. 이들 4개의 ISG의 발현에 대한 더욱 강한 유도가 이소타입 IgG kih IFNα 투약된 원숭이와 비교하여 51A12 IgG kih IFNα 투약된 원숭이에서 발견되었다.

[0246] **IFN 유전자 발현 분석(M3.1 히트맵)**

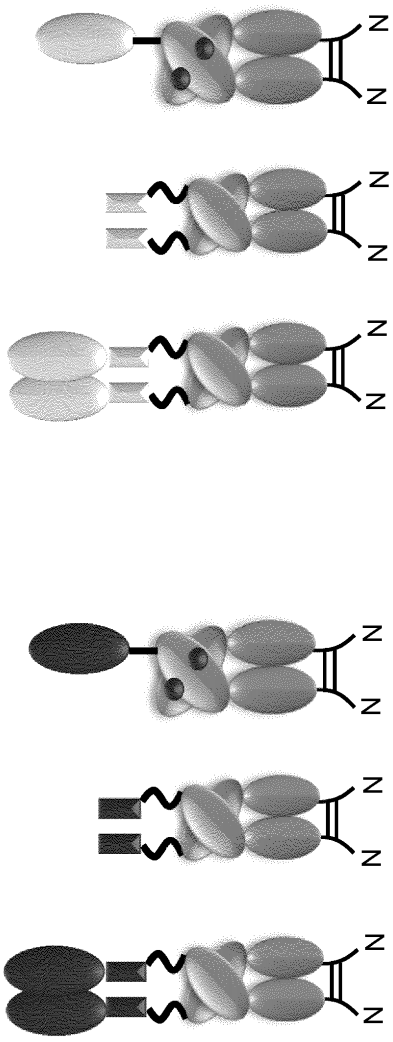
[0247] IFNα 자극된 유전자 발현을 IFNα 분자에 의해 더욱 철저히 분석하기 위해, IFNα 반응을 혈액 전사체학 연구로부터 결정된 IFN 유전자 모듈로 분석하였다[차우스사벨 등의 문헌[(2008), Immunity 29, 150-64]]. 도 28a에 제시된 바와 같이, 인터페론 모듈 M3.1의 유전자에 대한 기선으로부터의 발현 값의 배수 변화를 히트맵 형태로 혈액 및 간 샘플 둘다에 대해 R 통계학 패키지(www.r-project.org)를 사용하여 도표화하였다. 간 인터페론-유도된 유전자의 감시되지 않은 계층적 군집화는 51A12의 10 ㎍/kg 투약량에서 매우 유도된 하위집합(점선 사각형)을 나타내지만, 1 및 3 일째 이소타입 IFNα 화합물은 그렇지 않다. 이러한 하위집합의 감시되지 않은 계층적 군집화는 혈액 및 간 사이의 발현에 대한 차등적 패턴을 보여주고, 여기서 몇몇 유전자는 이소타입-IFNα가 아닌 51A12에 의해 10 ㎍/kg의 투약량에서 더욱 크게 유도되고, 다른 유전자는 이소타입 IFNα에 의해 높은 투약량에서 더욱 크게 유도되었다(도 28b).

[0248] 요약하면, ASGPR-표적화 IFNα 분자 51A12 IgG kih IFNα는 혈액중에 검출불가능한 노출을 나타내었고, 이소타입 IFNα 대조군에 비하여 혈액에서 더 낮은 IFNα 활성(ISG 발현 자극)을 나타내었지만 원숭이 간에서 더 높은 IFNα 활성을 나타내었다.

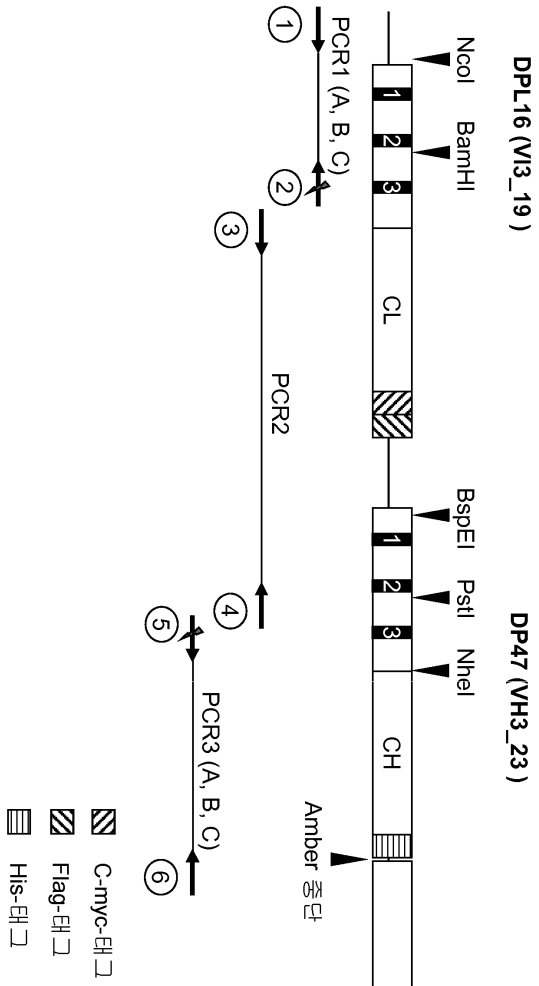
[0249] 상기 발명이 이해의 명확성을 위하여 예시 및 실시예에 의해 상세히 설명되었지만, 설명 및 실시예는 본 발명의 범주를 제한하려는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본원에 언급된 모든 특허 및 과학 문헌의 개시내용은 이들의 전체가 참고로 명백히 혼입되어 있다.

도면

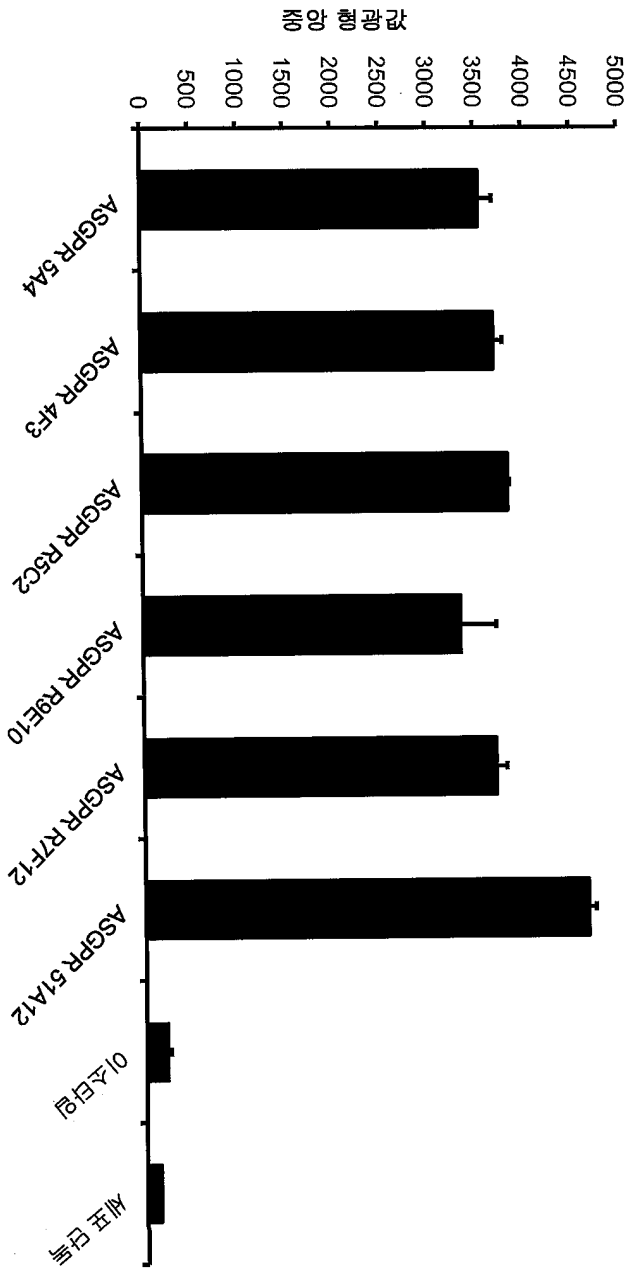
도면1



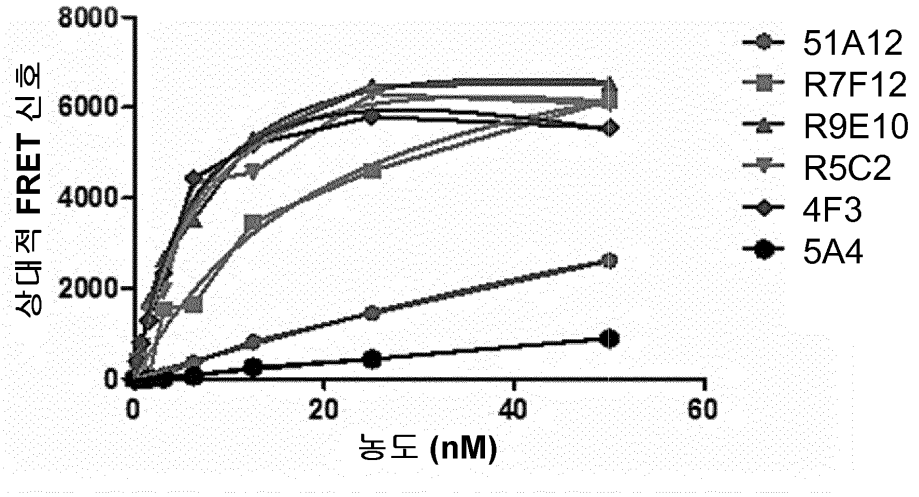
도면2


DPL16 (VI3_19)
DP47 (VH3_23)
NcoI
BamHI
BspEI
PstI
NheI
CL
CH
유전자 III
Amber 종단
PCR1 (A, B, C)
PCR2
PCR3 (A, B, C)
C-myc-태그
Flag-태그
His-태그

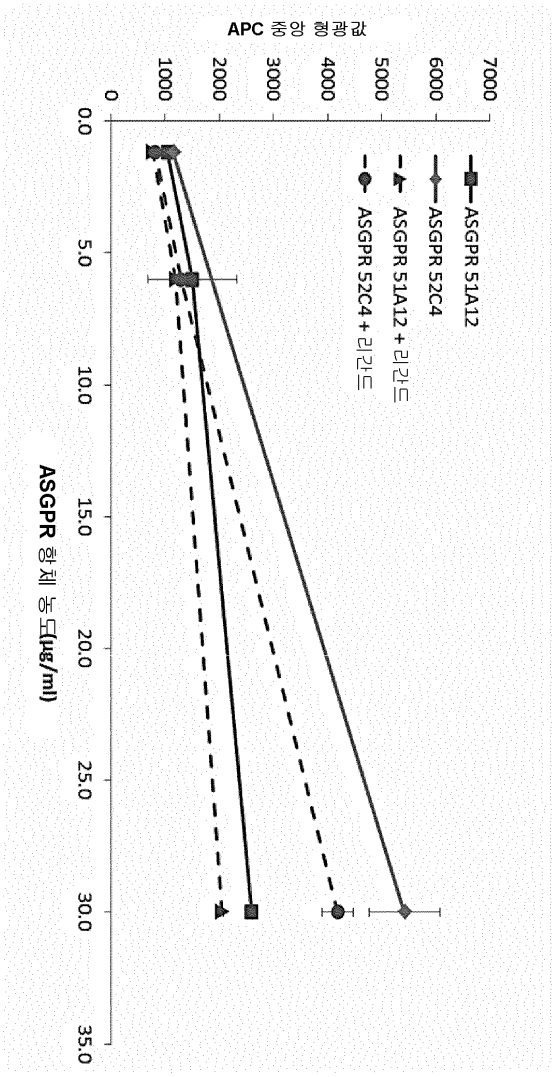
도면3


중앙 형광값
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500
5000
ASGPR 5A4
ASGPR 4F3
ASGPR R5C2
ASGPR R9E10
ASGPR R7F12
ASGPR 5A12
아소타입
세포 단독

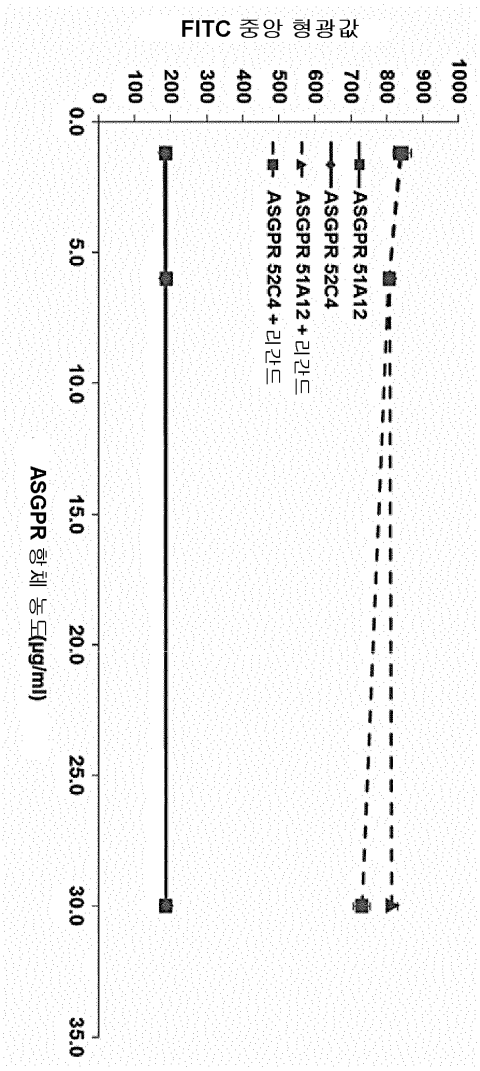
도면4


8000
6000
4000
2000
0
상대적 FRET 신호
0
20
40
60
농도 (nM)
51A12
R7F12
R9E10
R5C2
4F3
5A4

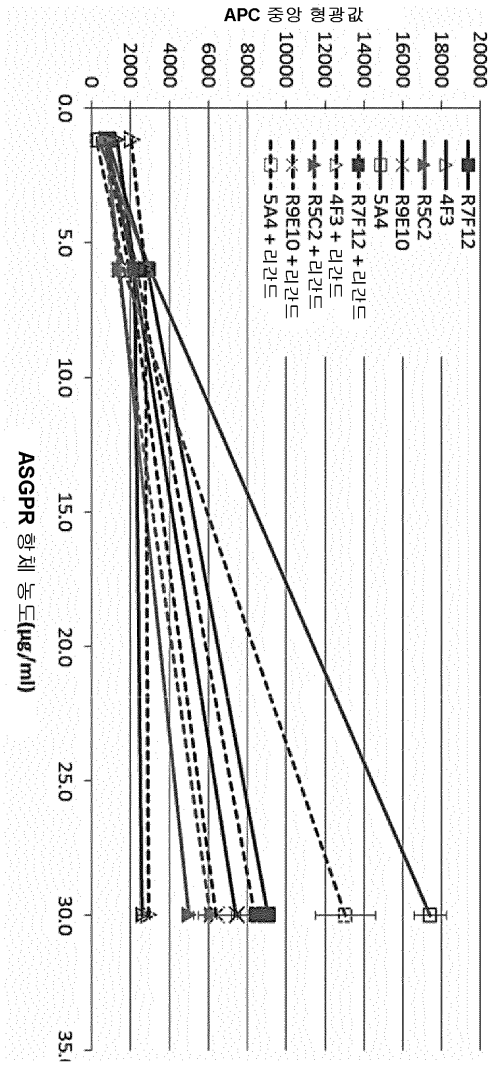
도면5a


APC 중앙 형광값
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
ASGPR 항체 농도(μg/ml)
ASGPR 51A12
ASGPR 52C4
ASGPR 51A12 + 리간드
ASGPR 52C4 + 리간드

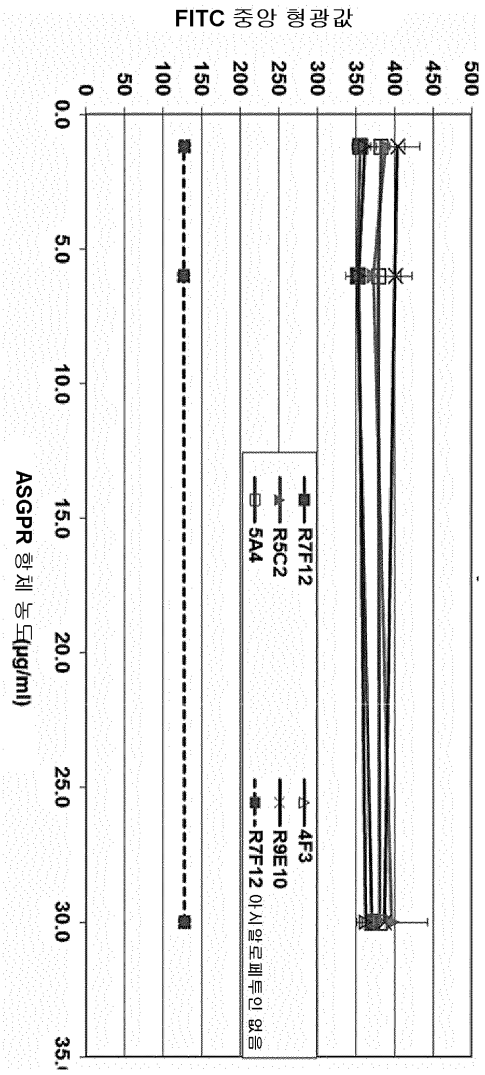
도면5b


FITC 중앙 형광값
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
ASGPR 항체 농도(μg/ml)
ASGPR 51A12
ASGPR 52C4
ASGPR 51A12 + 리간드
ASGPR 52C4 + 리간드

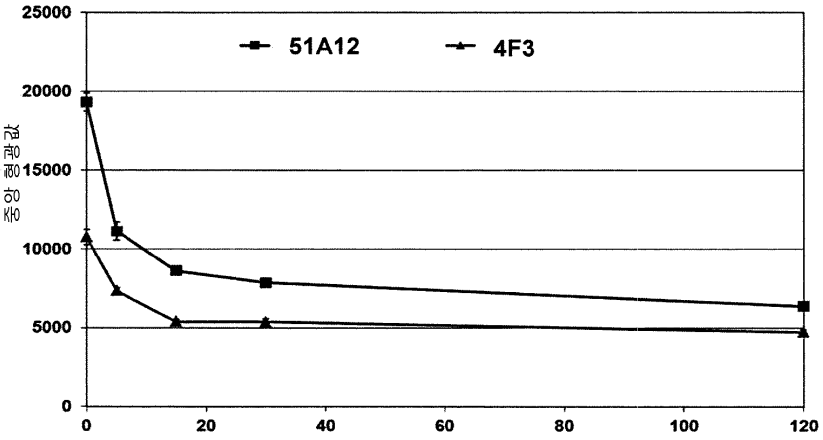
도면6a


APC 중앙 형광값
20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.
ASGPR 항체 농도(μg/ml)
R7F12
4F3
R5C2
R9E10
5A4
R7F12 + 리간드
4F3 + 리간드
R5C2 + 리간드
R9E10 + 리간드
5A4 + 리간드

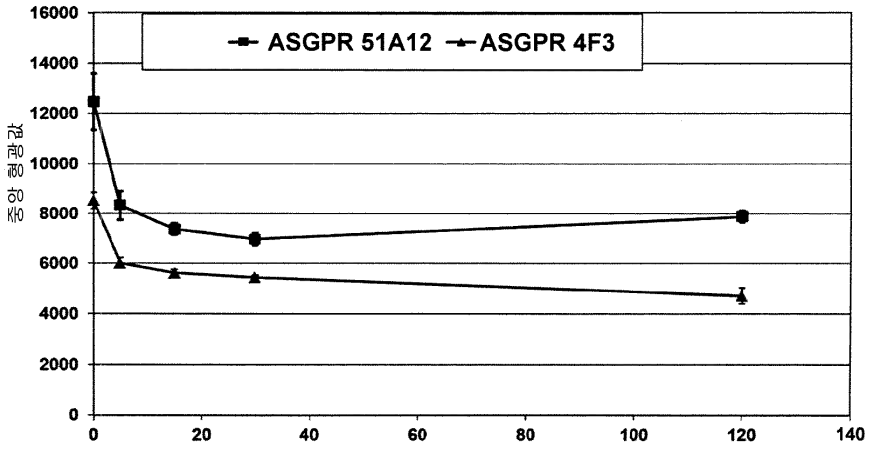
도면6b


FITC 중앙 형광값
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
ASGPR 항체 농도(μg/ml)
R7F12
R5C2
5A4
4F3
R9E10
R7F12 아시알로페투인 없음

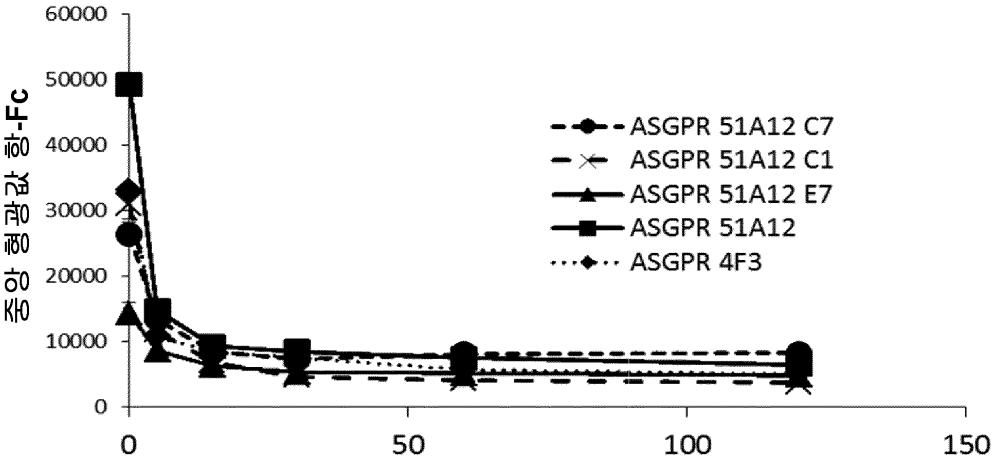
도면7a


25000
20000
15000
10000
5000
0
중앙 형광값
51A12
4F3
0
20
40
60
80
100
120

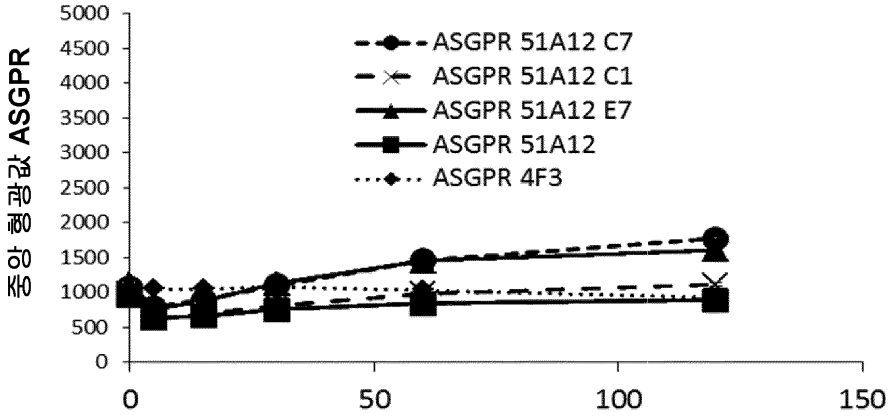
도면7b



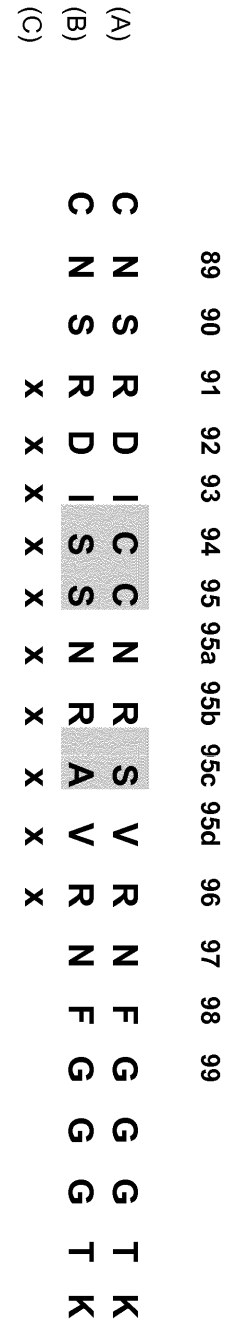
도면7c



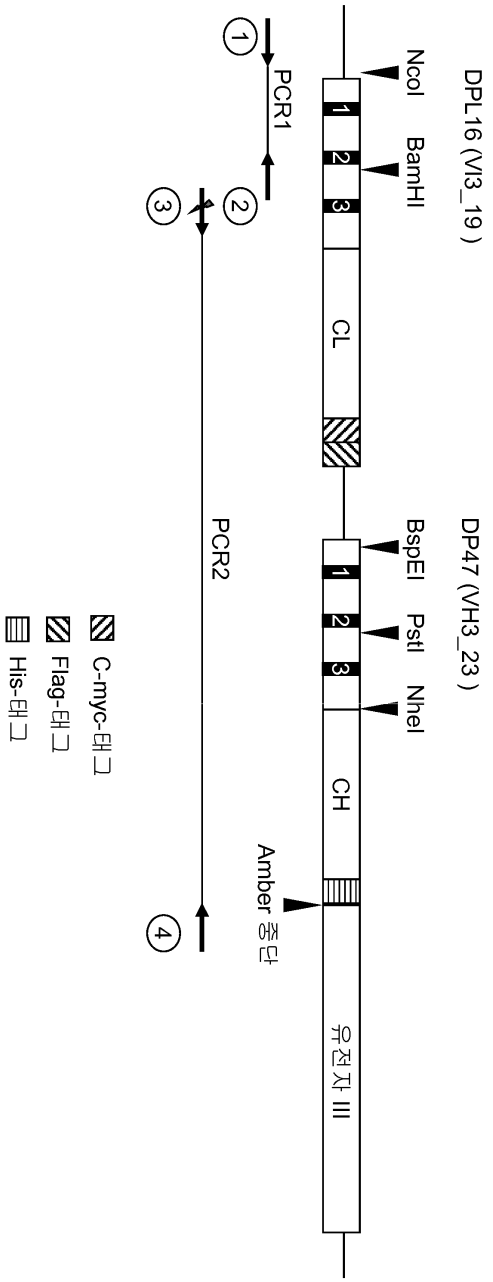
도면7d



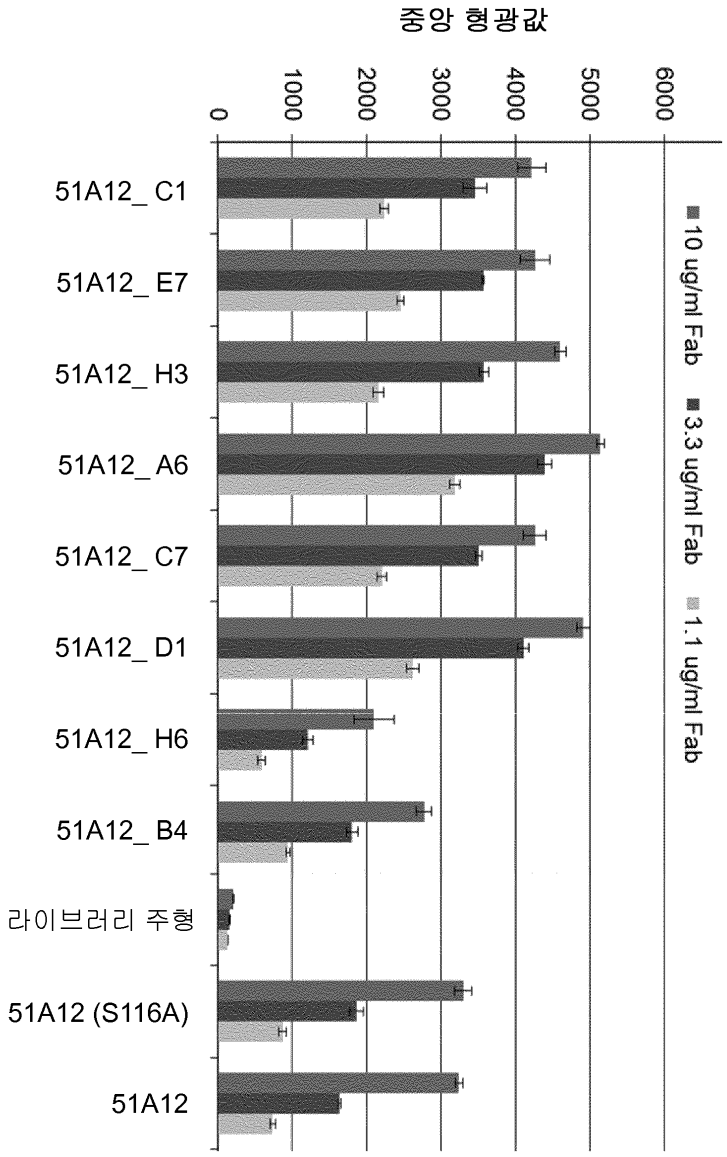
도면8


(A)
(B)
(C)
89 90 91 92 93 94 95 95a 95b 95c 95d 96 97 98 99
C N S R D I C C N R S V R N F G G G T K
C N S R D I S S N R A V R N F G G G T K
x x x x x x x x x x x x

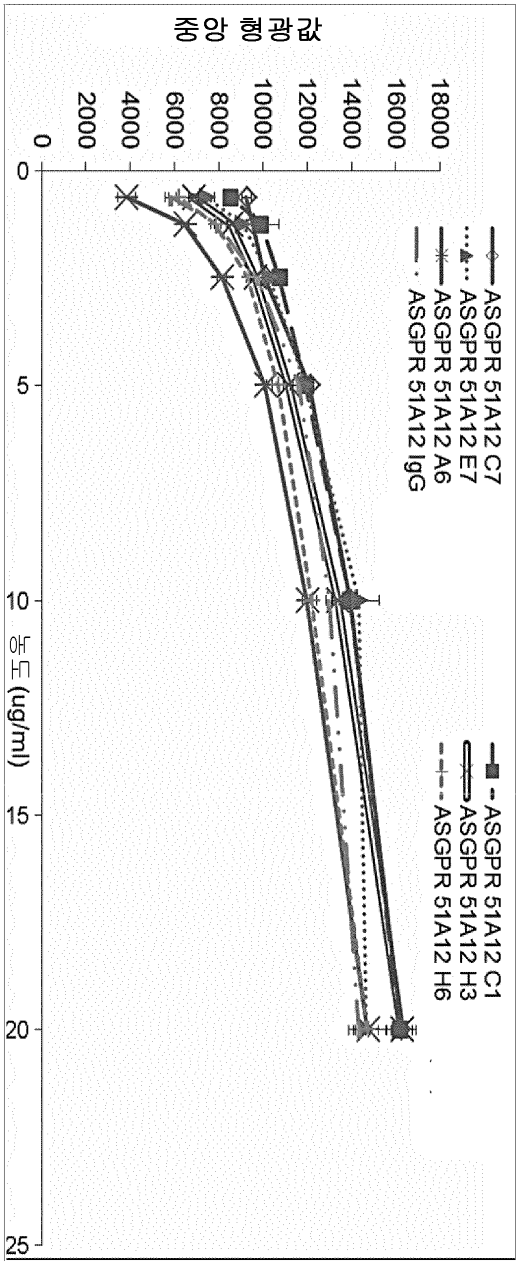
도면9


DPL16 (VI3_19)
NcoI
BamHI
1
2
3
CL
DP47 (VH3_23)
BspEI
PstI
NheI
1
2
3
CH
Amber 종단
유전자 III
①
PCR1
②
③
PCR2
④
C-myc-태그
Flag-태그
His-태그

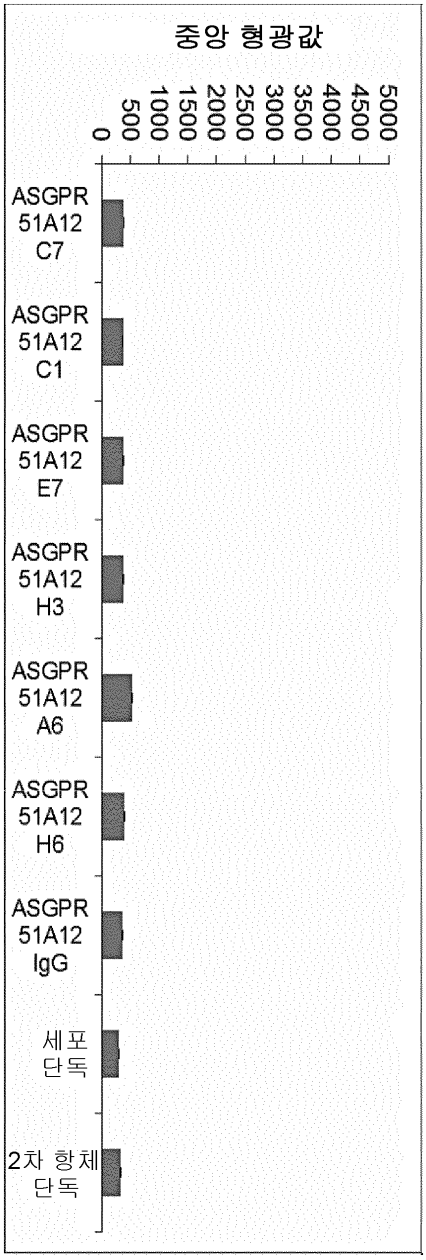
도면10


중앙 형광값
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
51A12_ C1
51A12_ E7
51A12_ H3
51A12_ A6
51A12_ C7
51A12_ D1
51A12_ H6
51A12_ B4
라이브러리 주형
51A12 (S116A)
51A12
10 ug/ml Fab
3.3 ug/ml Fab
1.1 ug/ml Fab

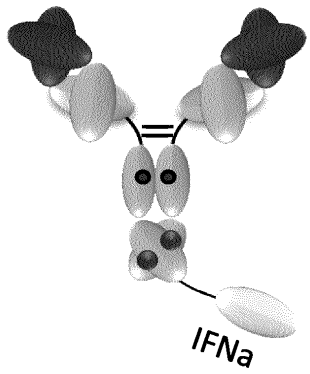
도면11a


중앙 형광값
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
16000
18000
0
5
10
15
20
25
농도 (ug/ml)
ASGPR 51A12 C7
ASGPR 51A12 E7
ASGPR 51A12 A6
ASGPR 51A12 IgG
ASGPR 51A12 C1
ASGPR 51A12 H3
ASGPR 51A12 H6

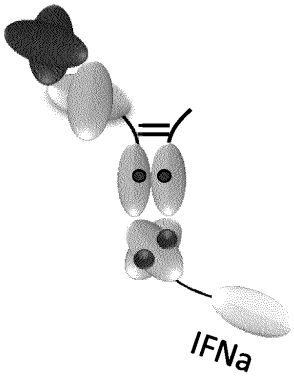
도면11b


중앙 형광값
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500
5000
ASGPR 51A12 C7
ASGPR 51A12 C1
ASGPR 51A12 E7
ASGPR 51A12 H3
ASGPR 51A12 A6
ASGPR 51A12 H6
ASGPR 51A12 IgG
세포 단독
2차 항체 단독

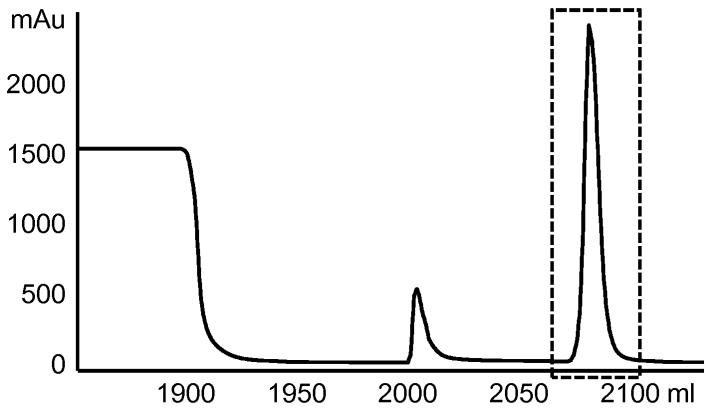
도면12a



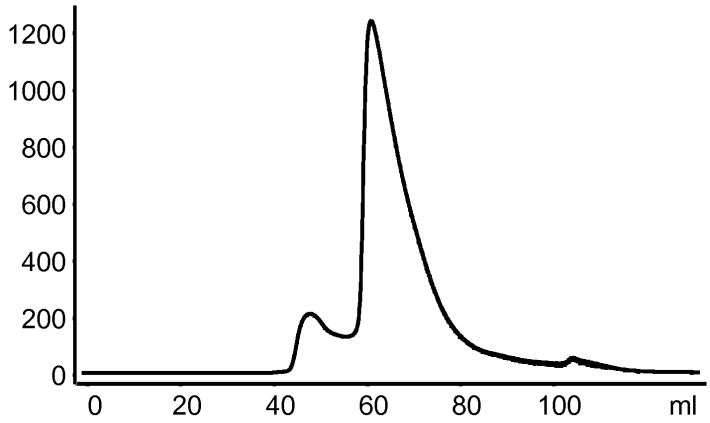
도면12b



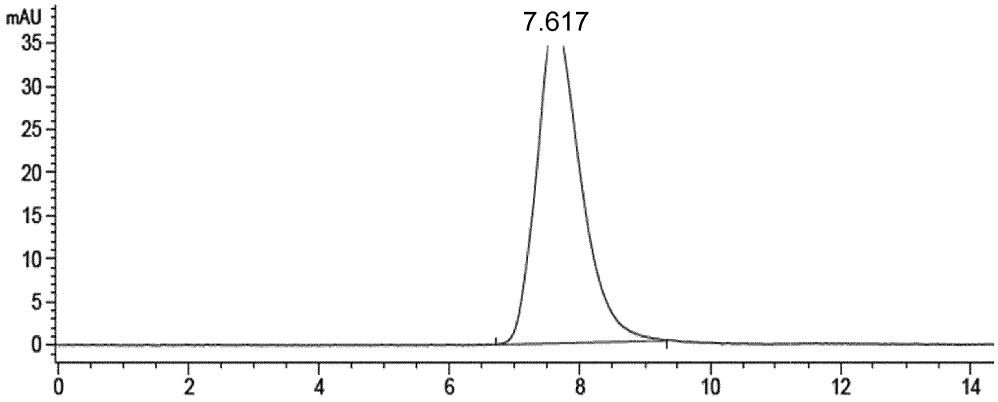
도면13a



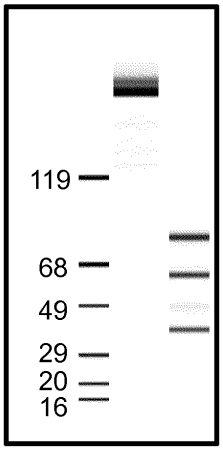
도면13b



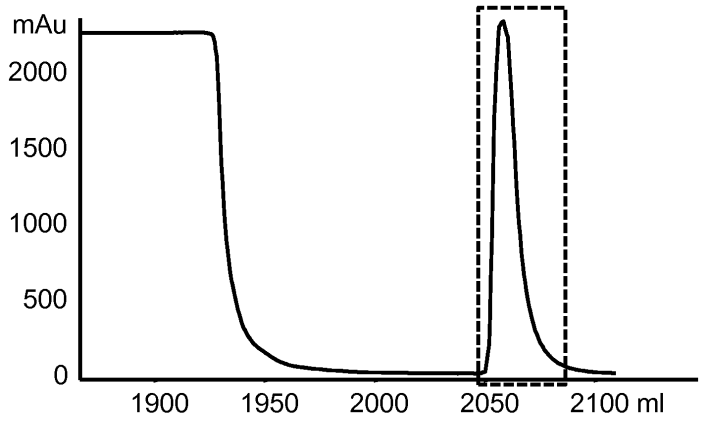
도면13c



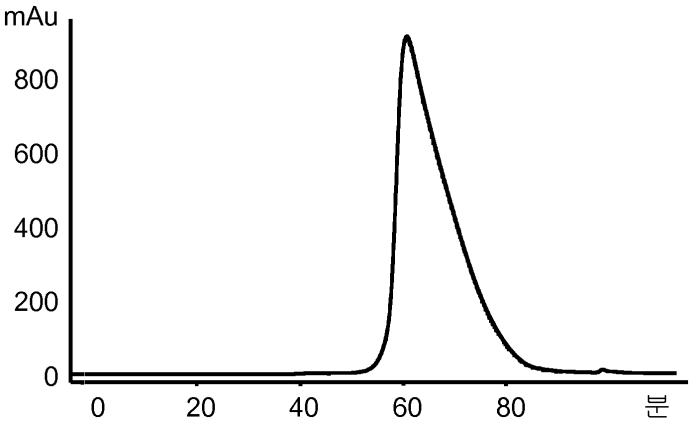
도면13d



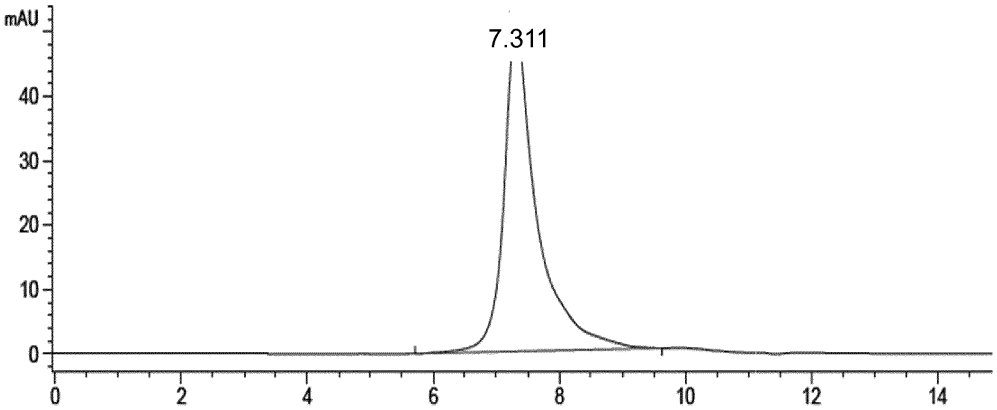
도면14a



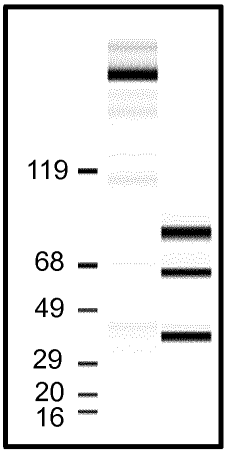
도면14b



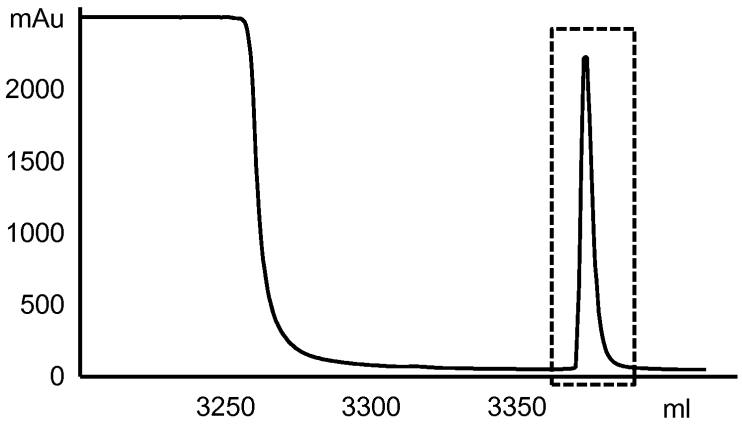
도면14c



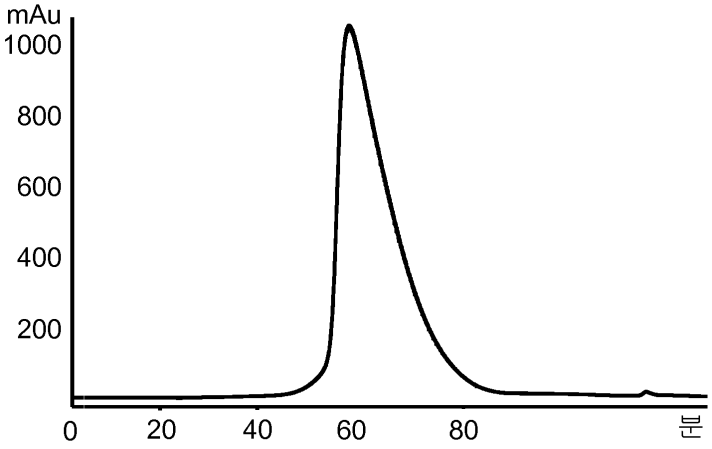
도면14d



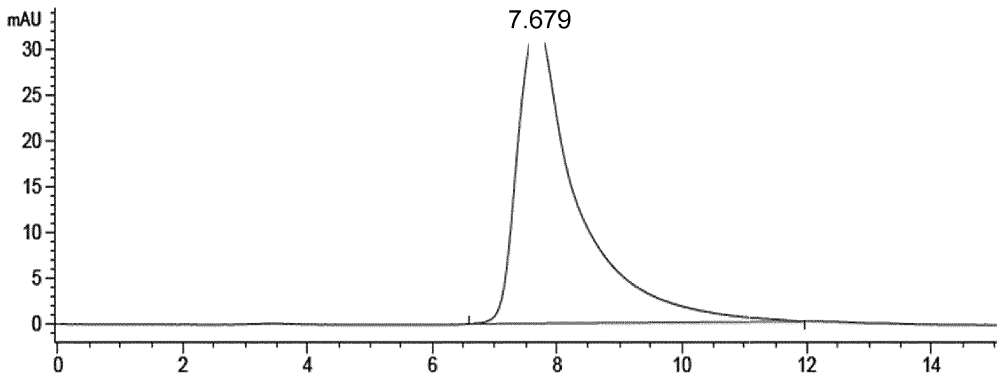
도면15a



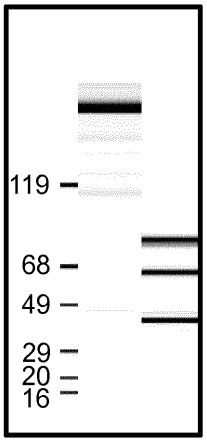
도면15b



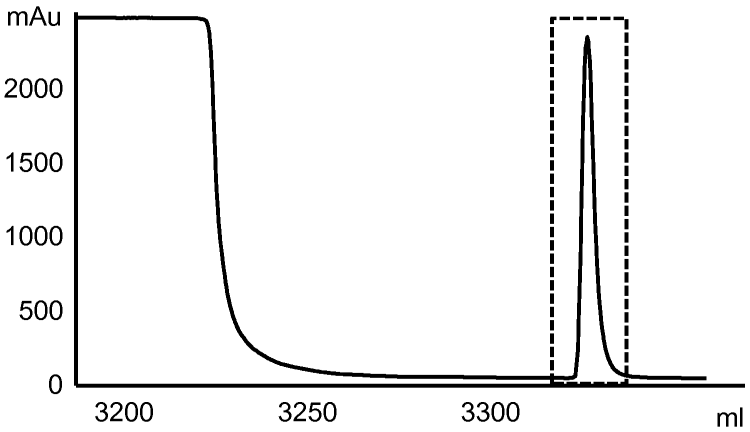
도면15c



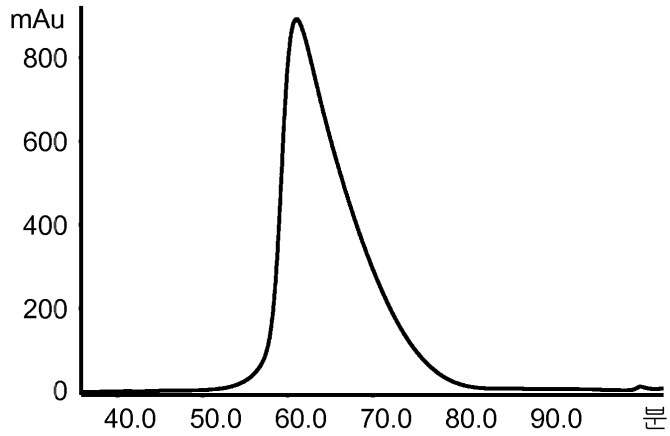
도면15d



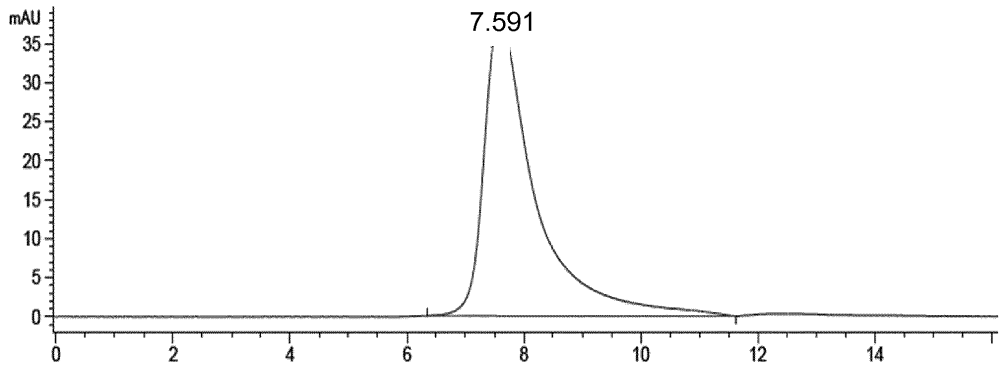
도면16a



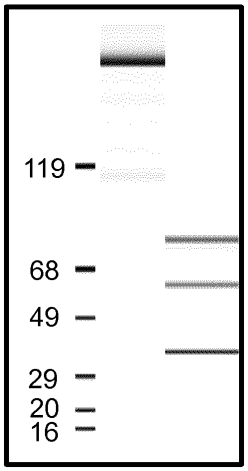
도면16b



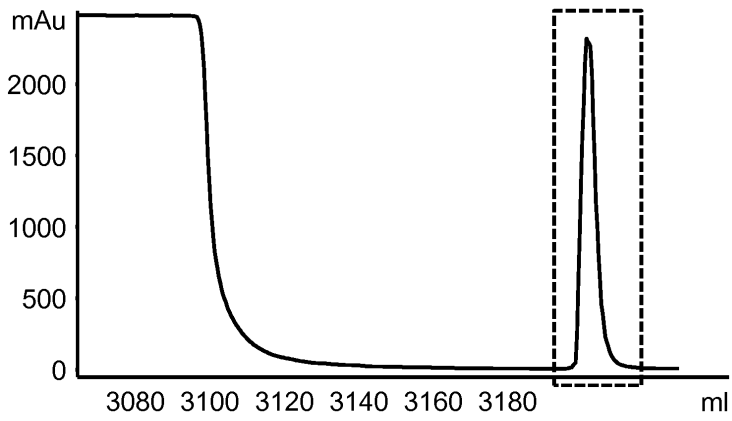
도면16c



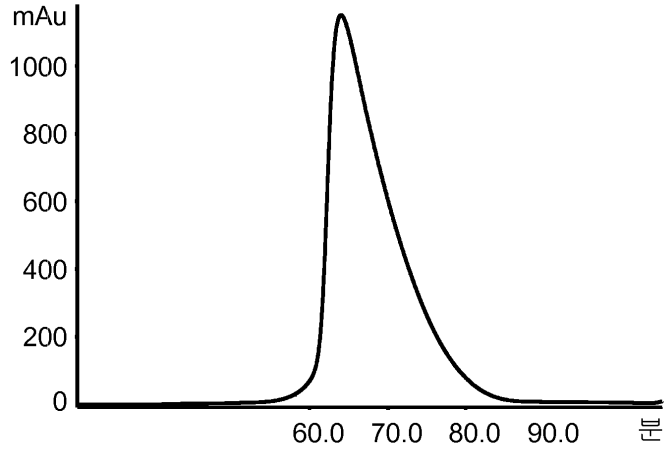
도면16d



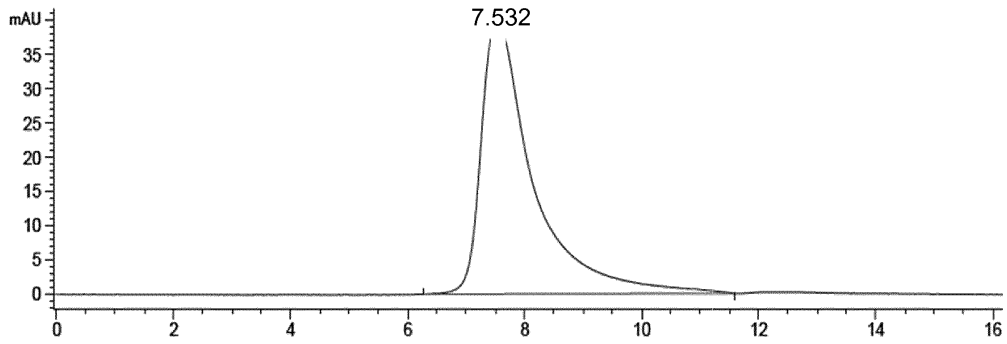
도면17a



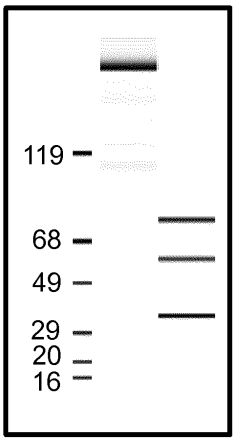
도면17b



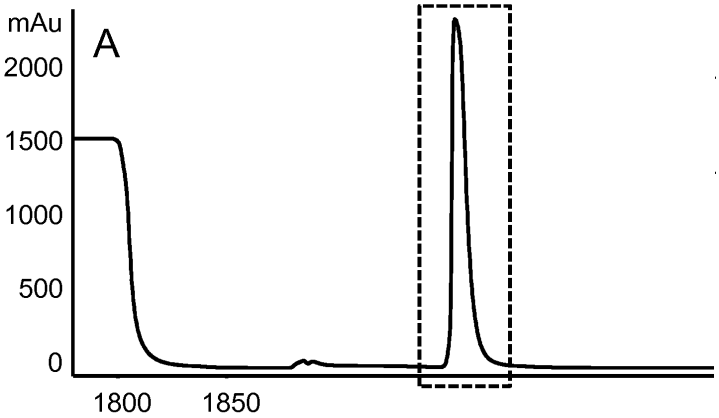
도면17c



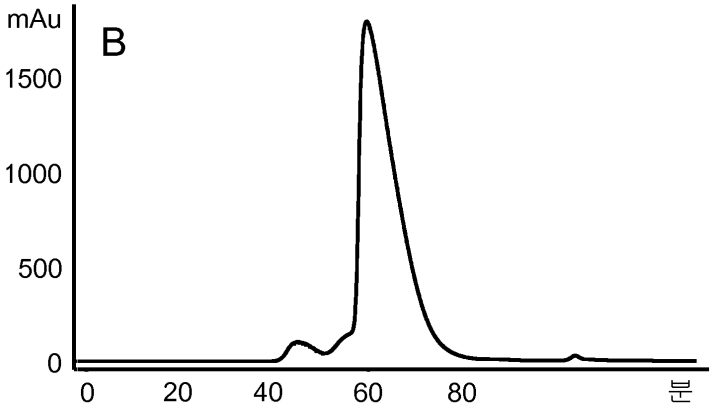
도면17d



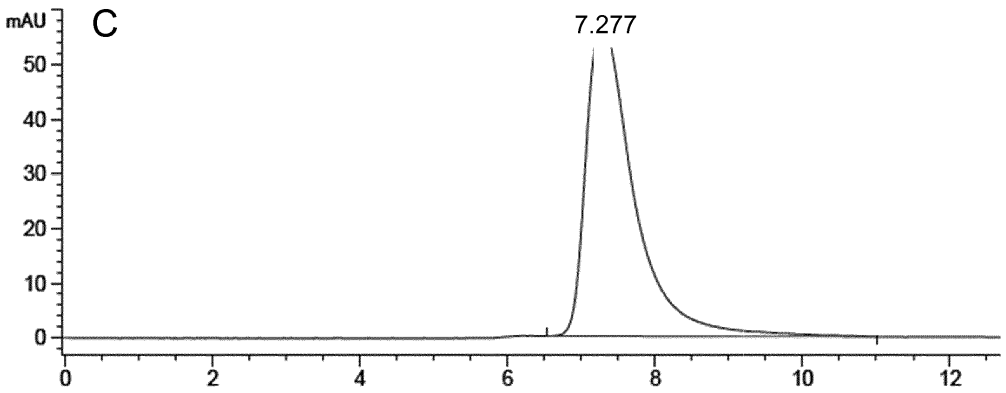
도면18a



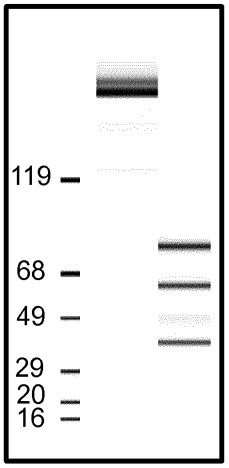
도면18b



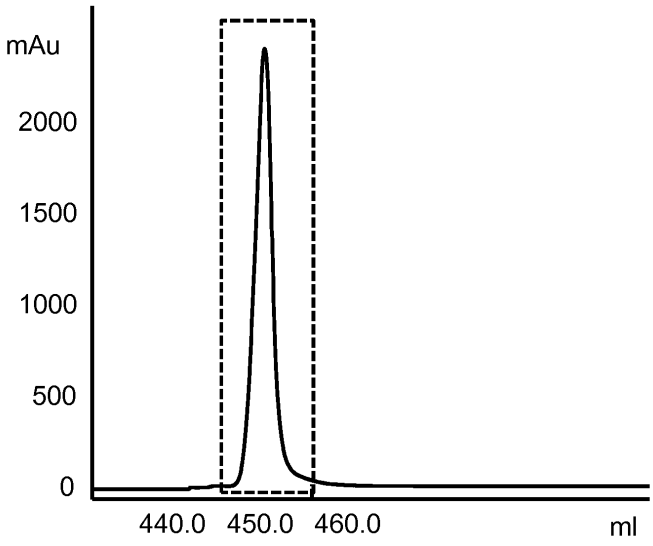
도면18c



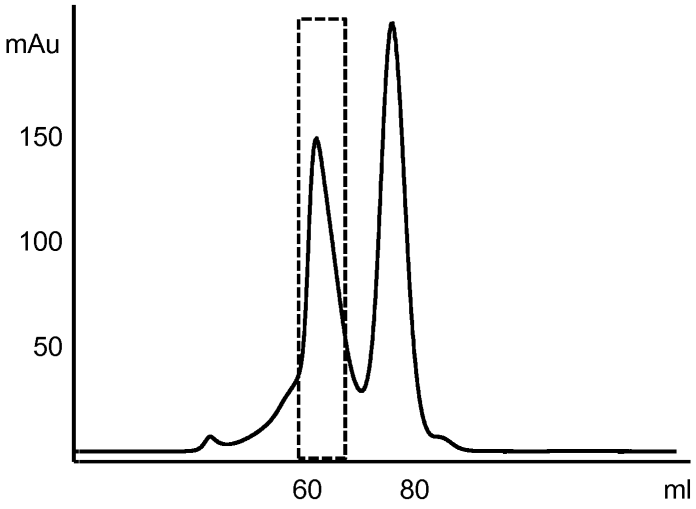
도면18d



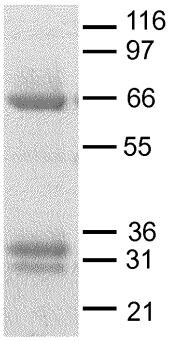
도면19a



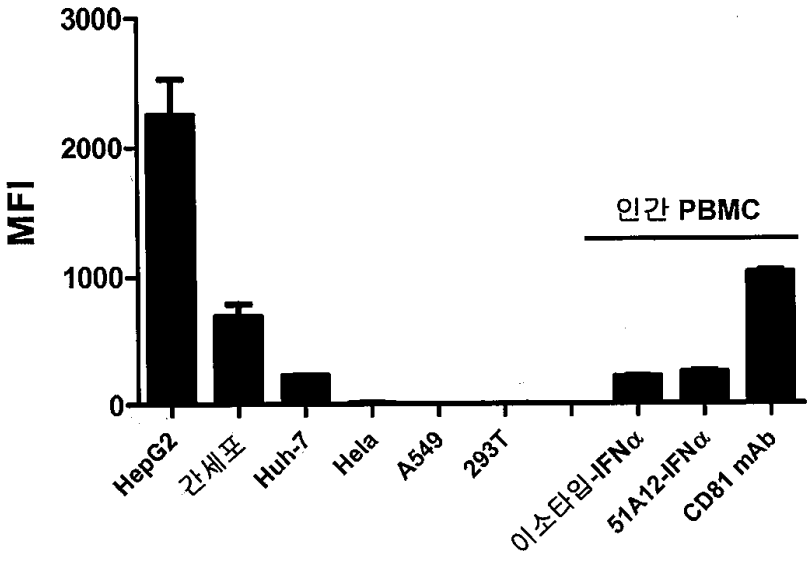
도면19b



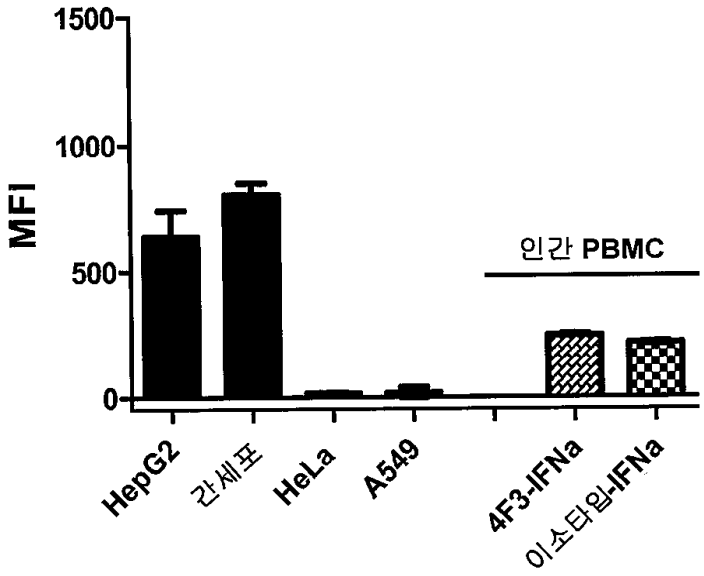
도면19d



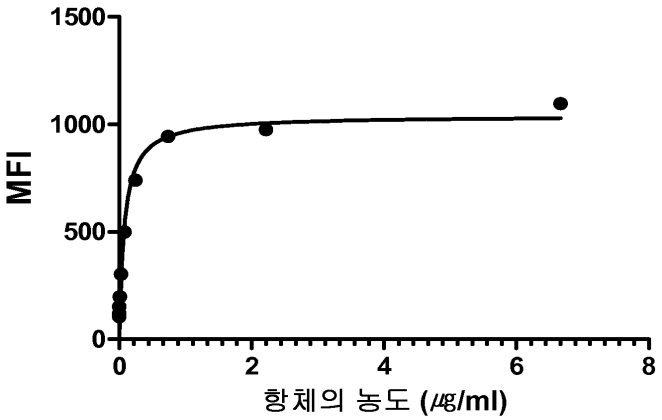
도면20a



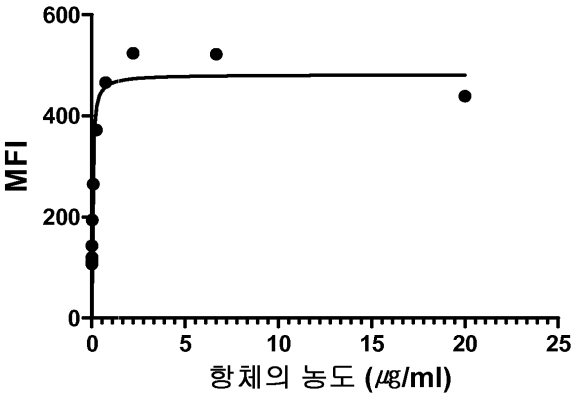
도면20b



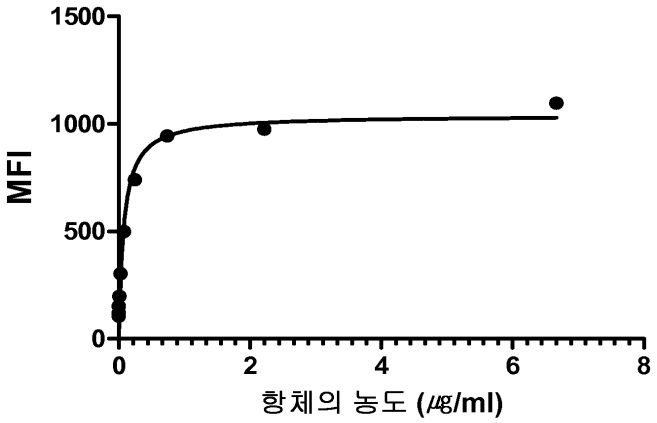
도면21a



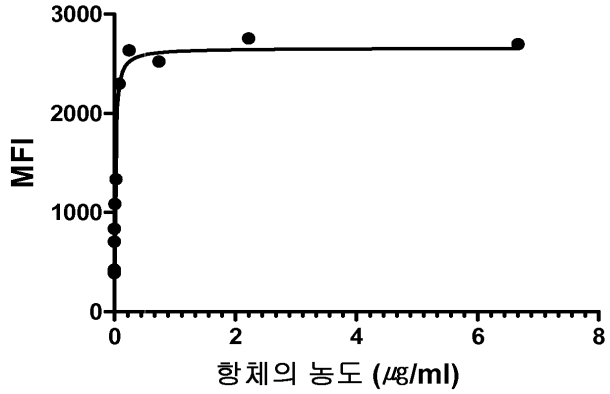
도면21b



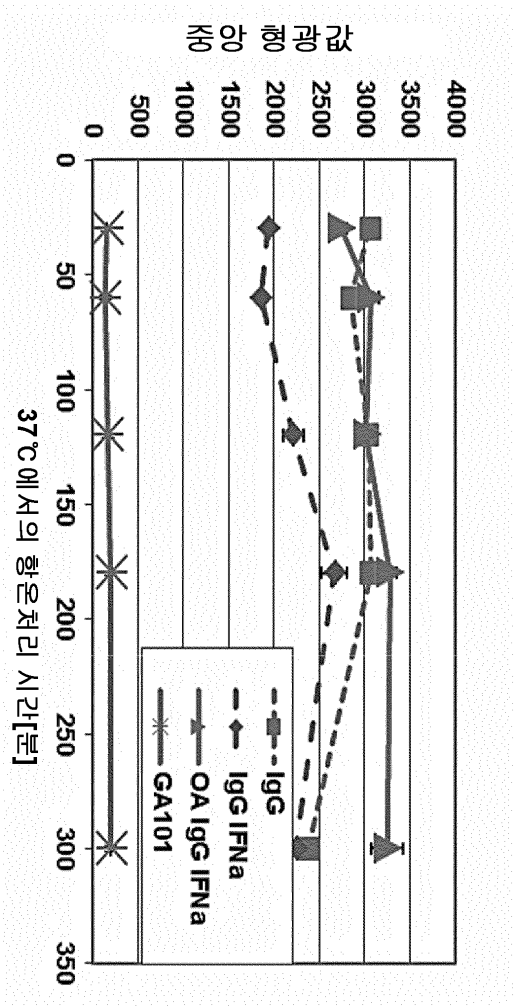
도면21c


1500
1000
500
0
MFI
0
2
4
6
8
항체의 농도 (㎍/ml)

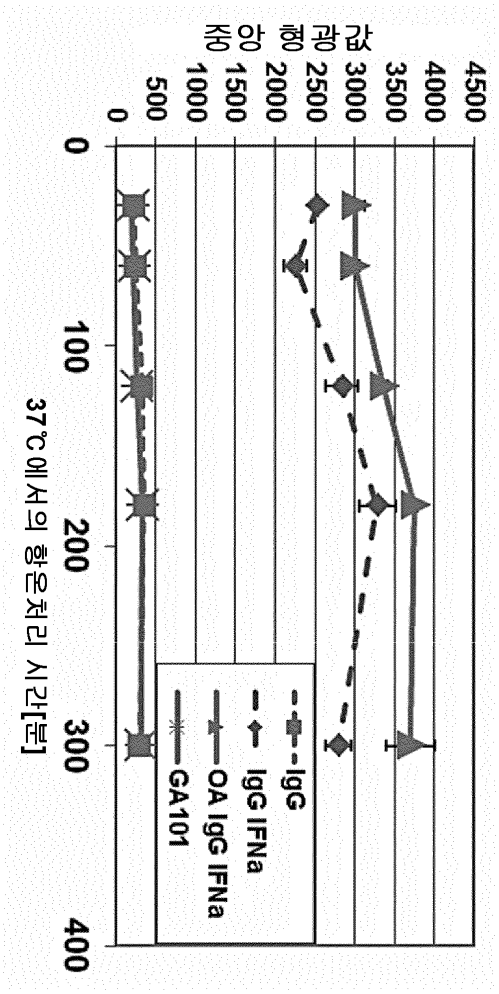
도면21d


3000
2000
1000
0
MFI
0
2
4
6
8
항체의 농도 (㎍/ml)

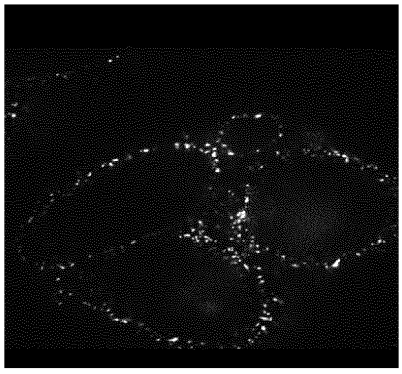
도면22a


중앙 형광값
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
50
100
150
200
250
300
350
37℃에서의 항온처리 시간[분]
IgG
IgG IFNa
OA IgG IFNa
GA101

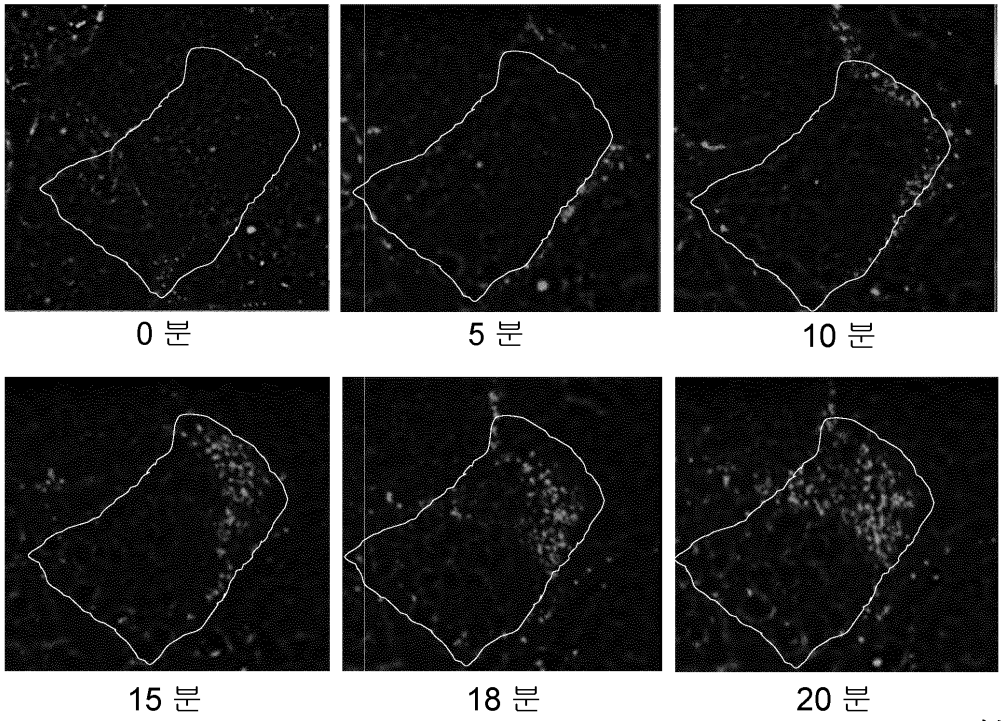
도면22b


중앙 형광값
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
100
200
300
400
37℃에서의 항온처리 시간[분]
IgG
IgG IFNa
OA IgG IFNa
GA101

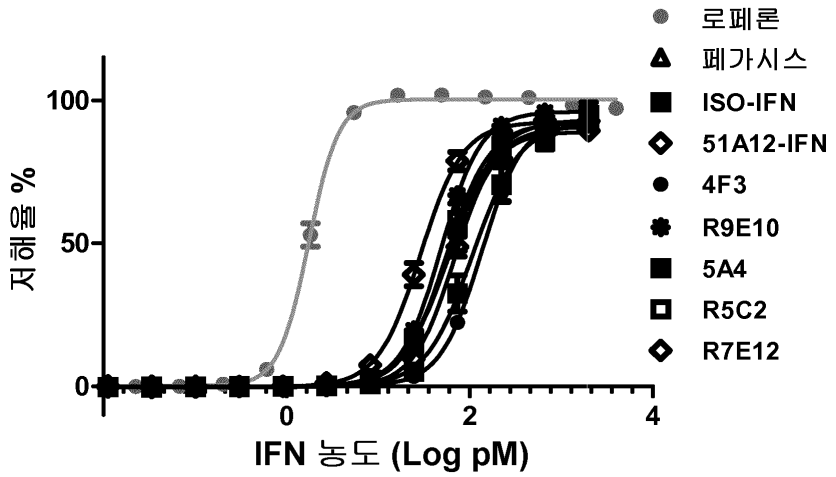
도면23a



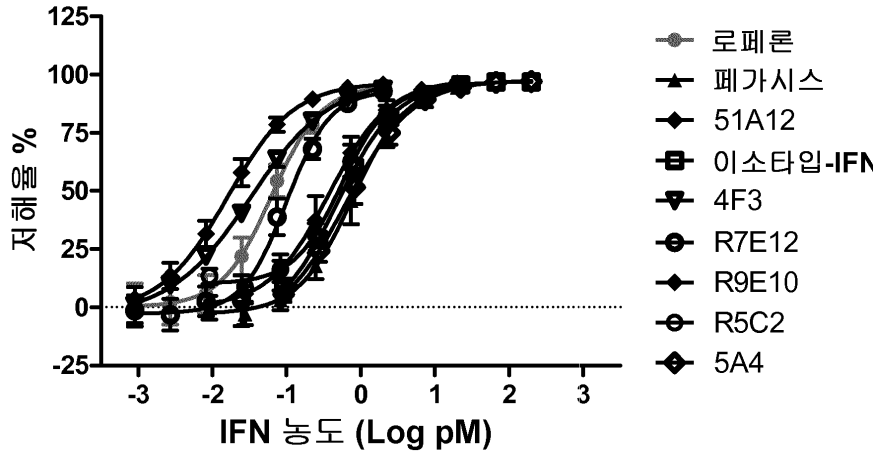
도면23b


0 분
5 분
10 분
15 분
18 분
20 분

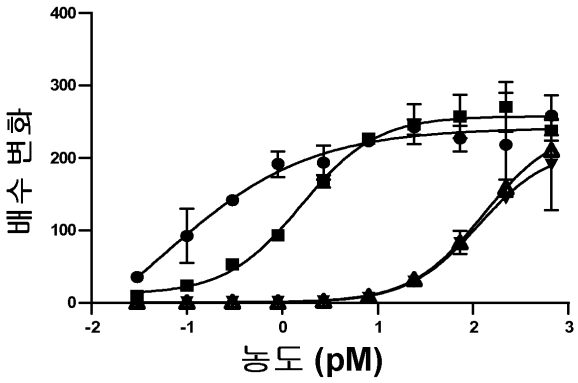
도면24a


로페론
페가시스
ISO-IFN
51A12-IFN
4F3
R9E10
5A4
R5C2
R7E12
100
50
0
0
2
4
저해율 %
IFN 농도 (Log pM)

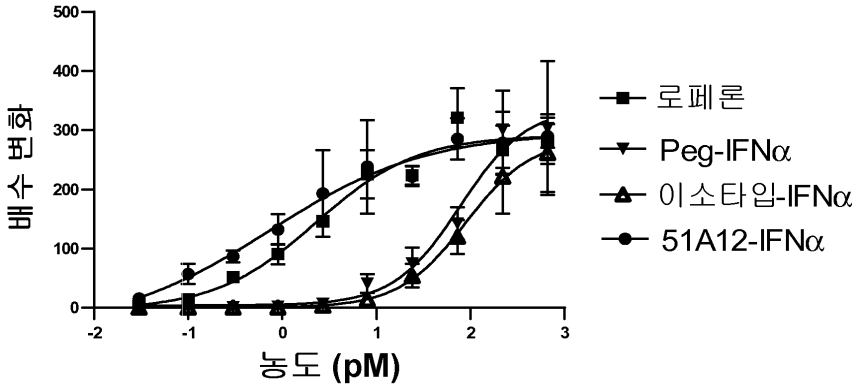
도면24b



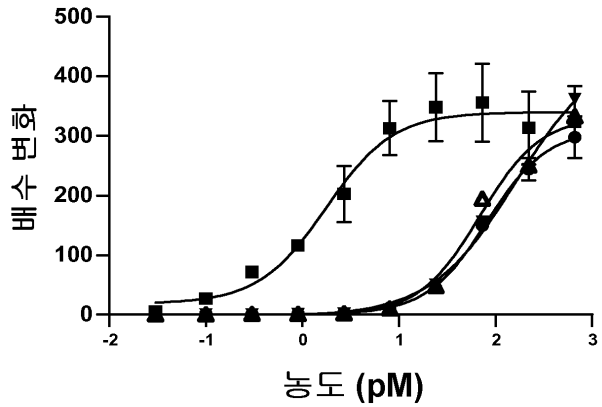
도면25a



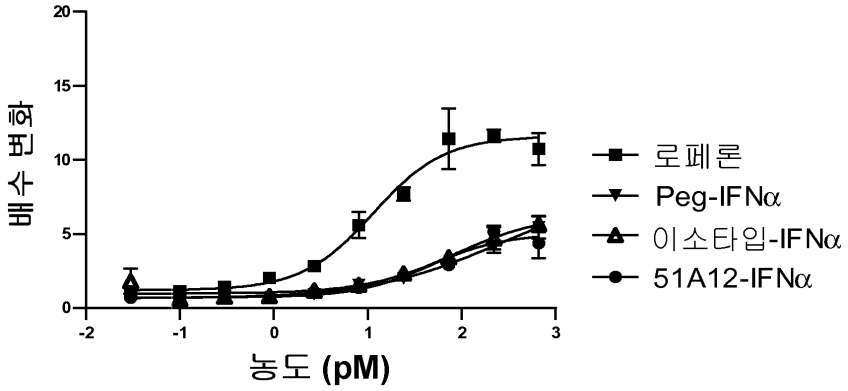
도면25b



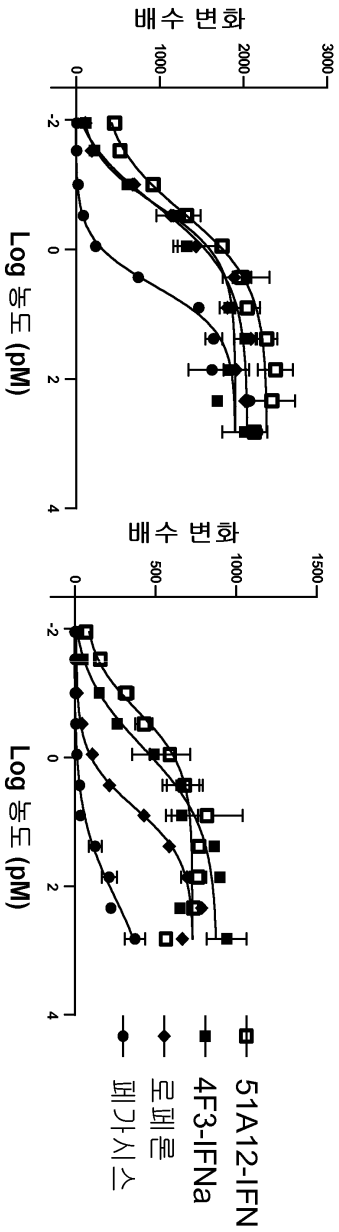
도면25c


500
400
300
200
100
0
-2
-1
0
1
2
3
배수 변화
농도 (pM)

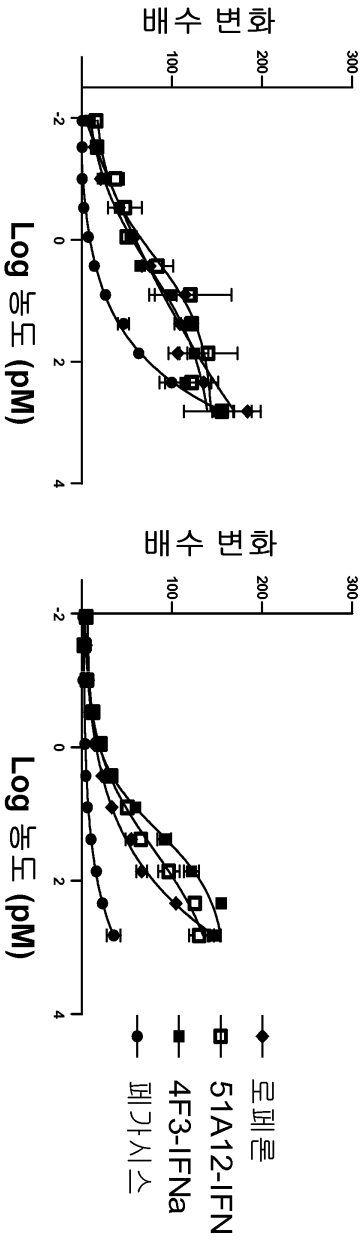
도면25d


20
15
10
5
0
-2
-1
0
1
2
3
배수 변화
농도 (pM)
로페론
Peg-IFNα
이소타입-IFNα
51A12-IFNα

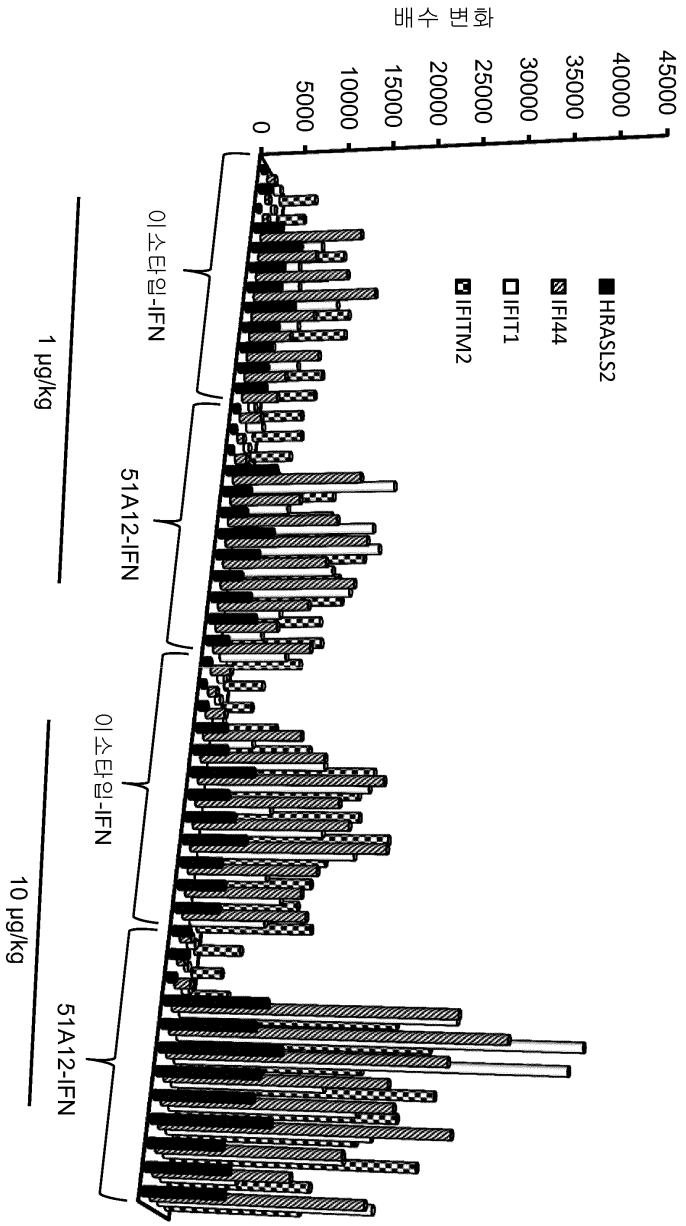
도면26a


배수 변화
0
1000
2000
3000
-2
0
2
4
Log 농도 (pM)
배수 변화
0
500
1000
1500
-2
0
2
4
Log 농도 (pM)
51A12-IFN
4F3-IFNa
로페론
페가시스

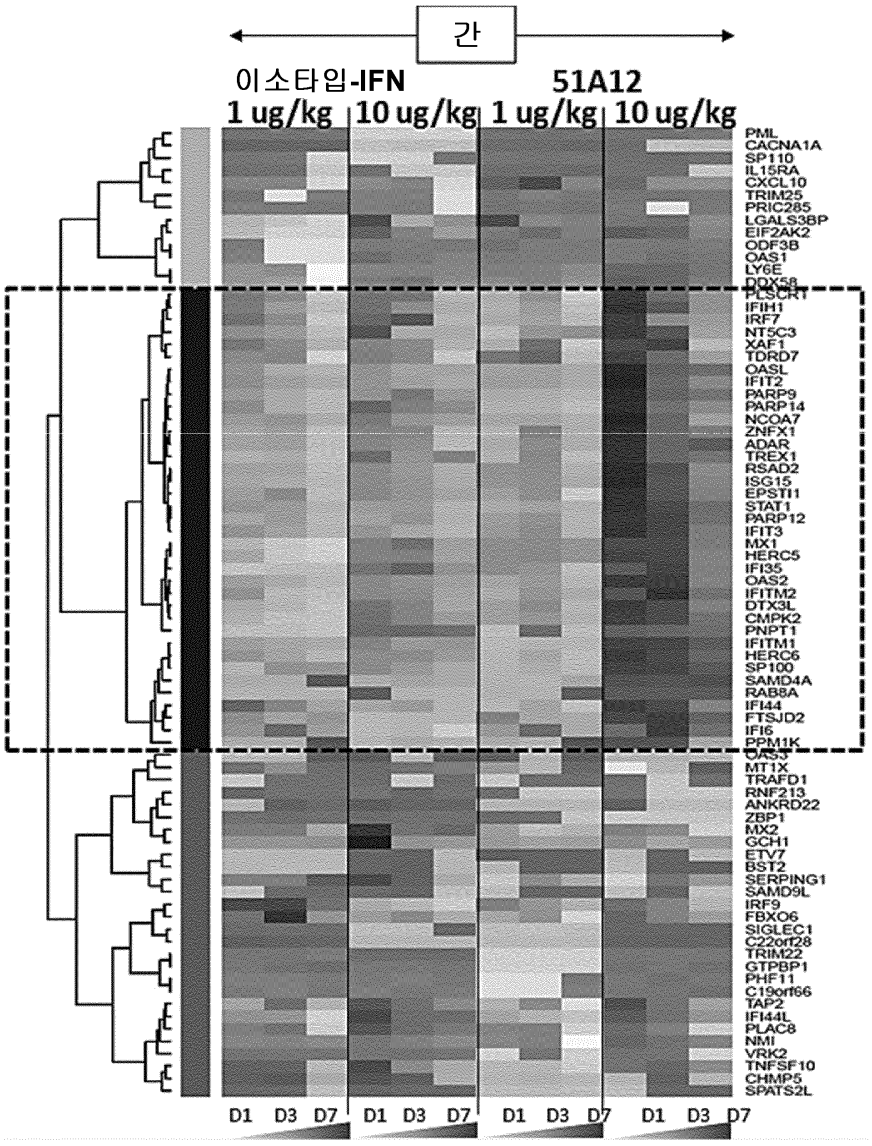
도면26b


배수 변화
100
200
300
-2
0
2
4
Log 농도 (pM)
배수 변화
100
200
300
-2
0
2
4
Log 농도 (pM)
로페론
51A12-IFN
4F3-IFNa
페가시스

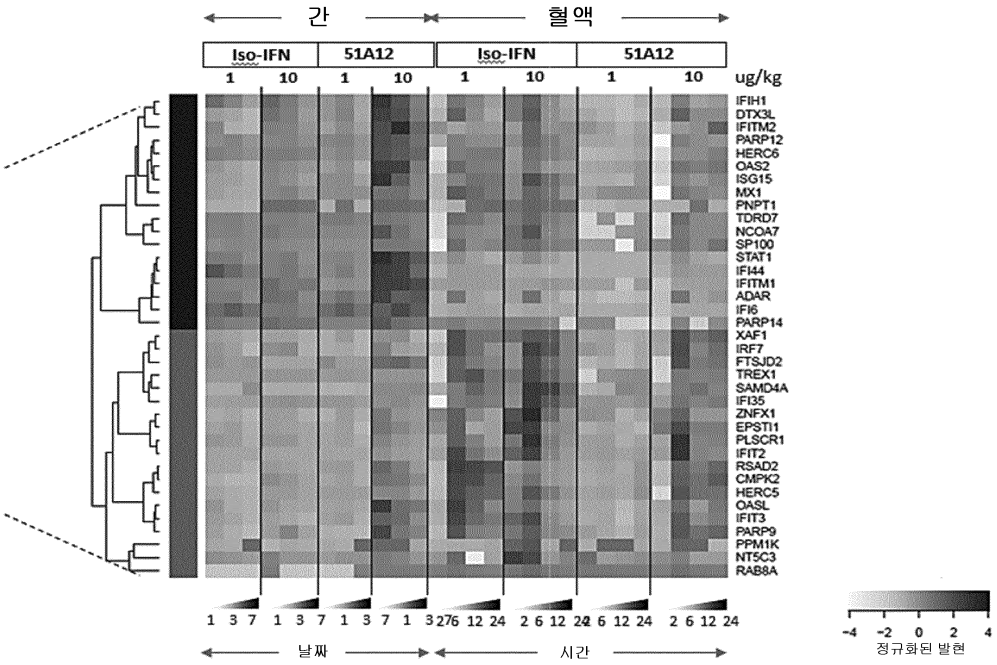
도면27


배수 변화
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
35000
40000
45000
HRASLS2
IFI44
IFIT1
IFITM2
이소타입-IFN
51A12-IFN
이소타입-IFN
51A12-IFN
1 μg/kg
10 μg/kg

도면28a


간
이소타입-IFN
1 ug/kg
10 ug/kg
51A12
1 ug/kg
10 ug/kg
PML
CACNA1A
SP110
IL15RA
CXCL10
TRIM25
PRIC285
LGALS3BP
EIF2AK2
ODF3B
OAS1
LY6E
DDX58
PLSCR1
IFIH1
IRF7
NT5C3
XAF1
TDRD7
OASL
IFIT2
PARP9
PARP14
NCOA7
ZNFX1
ADAR
TREX1
RSAD2
ISG15
EPSTI1
STAT1
PARP12
IFIT3
MX1
HERC5
IFI35
OAS2
IFITM2
DTX3L
CMPK2
PNPT1
IFITM1
HERC6
SP100
SAMD4A
RAB8A
IFI44
FTSJD2
IFI6
PPM1K
OAS3
MT1X
TRAFD1
RNF213
ANKRD22
ZBP1
MX2
GCH1
ETV7
BST2
SERPING1
SAMD9L
IRF9
FBXO6
SIGLEC1
C22orf28
TRIM22
GTPBP1
PHF11
C19orf66
TAP2
IFI44L
PLAC8
NMI
VRK2
TNFSF10
CHMP5
SPATS2L
D1 D3 D7 D1 D3 D7 D1 D3 D7 D1 D3 D7

도면28b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> ROCHE GLYCART AG

<120> ASGPR ANTIBODIES AND USES THEREOF

<130> 31129

<140> PCT/EP2013/066432

<141> 2013-08-06

<150> US 61/681,239

<151> 2012-08-09

<160> 151

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12 VL

<400> 1

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctgcct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgt gatatttgtt gtaatcgatc tgtgcgtaat 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 2

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12 VL

<400> 2

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ile Cys Cys Asn Arg
85 90 95

Ser Val Arg Asn Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 3

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12 VH

<400> 3

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaccgtac 300

ctgggttaca ctattgacta ctggggccaa ggaaccctgg tcaccgtctc gagt 354

<210> 4

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12 VH

<400> 4

Glu Val Gln Leu Leu 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

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 Pro Tyr Leu Gly Tyr Thr Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 5

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 52C4 VL

<400> 5

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactccggt gctagtagcg gtaatcagtt ggtattcggc 300

ggagggacca agctgaccgt ccta 324

<210> 6

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 52C4 VL

<400> 6

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Gly Ala Ser Ser Gly Asn Gln

85 90 95

Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 7

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 52C4 VH

<400> 7

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agtcgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaccggct 300

ggttactctt acggttactt cgactactgg ggccaaggaa ccctggtcac cgtctcgagt 360

<210> 8

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 52C4 VH

<400> 8

Glu Val Gln Leu Leu 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

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 Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Pro Ala Gly Tyr Ser Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A4 VL

<400> 9

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgt ttgaggagcg ggaagatggt ggtattcggc 300

ggagggacca agctgaccgt ccta 324

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A4 VL

<400> 10

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Leu Arg Ser Gly Lys Met
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 11

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A4 VH

<400> 11

cattcggagg tgcaattgtt ggagtctggg ggaggcttgg tacagcctgg ggggtccctg 60

agactctcct gtgcagcctc cggattcacc tttagcagtt atgccatgag ctgggtccgc 120

caggctccag ggaaggggct ggagtgggtc tcagctatta gtggtagtgg tggtagcaca 180

tactacgcag actccgtgaa gggccggttc accatctcca gagacaattc caagaacacg 240

ctgtatctgc agatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgcgaaa 300

agttggtacc tgccgggtcg tggtttcgac tactggggcc aaggaaccct ggtcaccgtc 360

tcgagt 366

<210> 12

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A4 VH

<400> 12

Glu Val Gln Leu Leu 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

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 Ser Trp Tyr Leu Pro Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4F3 VL

<400> 13

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactccctg gagaggatcg ggtatctttc ttatgtattc 300

ggcggaggga ccaagctgac cgtccta 327

<210> 14

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4F3 VL

<400> 14

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Leu Glu Arg Ile Gly Tyr Leu
85 90 95

Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 15

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4F3 VH

<400> 15

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagacttc 300

tcttctcgtc gttggtacct ggaatactgg ggccaaggaa ccctggtcac cgtctcgagt 360

<210> 16

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4F3 VH

<400> 16

Glu Val Gln Leu Leu 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

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 Phe Ser Ser Arg Arg Trp Tyr Leu Glu Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R5C2 VL

<400> 17

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgg gatcgtagag gttattcggt attcggcgga 300

gggaccaagc tgaccgtcct a 321

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R5C2 VL

<400> 18

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gly Arg Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Arg Arg Gly Tyr Ser
85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 19

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R5C2 VH

<400> 19

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcgg cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaatcttct 300

ttctcttacc tgcgtgcttt cgactactgg ggccaaggaa ccctggtcac cgtctcgagt 360

<210> 20

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R5C2 VH

<400> 20

Glu Val Gln Leu Leu 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

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 Ser Ser Phe Ser Tyr Leu Arg Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> R9E10 VL
<400> 21
tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60
acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180
ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240
gatgaggctg actattactg taactcccgg aatgttcgcg gtaagctcgt attcggcgga 300
gggaccaagc tgaccgtcct a 321

<210> 22
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> R9E10 VL
<400> 22
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asn Val Arg Gly Lys Leu

85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 23

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R9E10 VH

<400> 23

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaaactct 300

tacacttacg gtcgtgctct ggactactgg ggccaaggaa ccctggtcac cgtctcgagt 360

<210> 24

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R9E10 VH

<400> 24

Glu Val Gln Leu Leu 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

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 Asn Ser Tyr Thr Tyr Gly Arg Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 25

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R7E12 VL

<400> 25

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgt aagagtagct cgaagaatgt tgtgttcggc 300

ggagggacca agctgaccgt ccta 324

<210> 26

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R7E12 VL

<400> 26

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Lys Ser Ser Ser Lys Asn
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 27

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R7E12 VH

<400> 27

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaatcttct 300

ttcactttcg gtcgttactt cgactactgg ggccaaggaa ccctggtcac cgtctcgagt 360

<210> 28

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R7E12 VH

<400> 28

Glu Val Gln Leu Leu 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

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 Ser Ser Phe Thr Phe Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 29

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12 S116A VL

<400> 29

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctgcct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgt gatatttgtt gtaatcgagc tgtgcgtaat 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 30

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12 S116A VL

<400> 30

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ile Cys Cys Asn Arg
85 90 95
Ala Val Arg Asn Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 31
<211> 330
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 51A12 A82G S116A VL
<400> 31
tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60
acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180
ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240
gatgaggctg actattactg taactcccgt gatatttgtt gtaatcgagc tgtgcgtaat 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330
<210> 32
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 51A12 A82G S116A VL
<400> 32
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ile Cys Cys Asn Arg
85 90 95
Ala Val Arg Asn Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 33
<211> 330
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 51A12 A82G C112S C113S S116A VL
<400> 33
tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60
acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180
ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240
gatgaggctg actattactg taactcccgt gatattagta gtaatcgagc tgtgcgtaat 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 34
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 51A12 A82G C112S C113S S116A VL
<400> 34
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ile Ser Ser Asn Arg

85 90 95

Ala Val Arg Asn Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 35

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_C1 VL

<400> 35

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgt tcttacgctt tcaaccgtgt tgttcgtaac 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 36

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_C1 VL

<400> 36

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Ser Tyr Ala Phe Asn Arg

85 90 95

Val Val Arg Asn Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 37

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_C7 VL

<400> 37

tctgagctga ctcaggaccc tgctgtgtct gtggccttgg gacagacagt caggatcaca 60

tgccaaggag acagcctcag aagttattat gcaagctggt accagcagaa gccaggacag 120

gcccctgtac ttgtcatcta tggtaaaaac aaccggccct cagggatccc agaccgattc 180

tctggctcca gctcaggaaa cacagcttcc ttgaccatca ctggggctca ggcggaagat 240

gaggctgact attactgtaa ctcccgtgac atccgttaca accgtgttgt tcgtccgttc 300

ggcggaggga ccaagctgac cgtccta 327

<210> 38

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_C7 VL

<400> 38

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ile Arg Tyr Asn Arg

85 90 95

Val Val Arg Pro Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 39

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_E7 VL

<400> 39

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgt gactaccgtt acaaccgtgc tgttcgtccg 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 40

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_E7 VL

<400> 40

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Tyr Arg Tyr Asn Arg

85 90 95

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

100 105 110

<210> 41

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_H3 VL

<400> 41

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgt gactacaaat tcaaccgtgt tgttcgtaac 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 42

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_H3 VL

<400> 42

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Tyr Lys Phe Asn Arg

85 90 95

Val Val Arg Asn Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 43

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_A6 VL

<400> 43

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgt acttactctt acaaccgtgc tgttcgtaac 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 44

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_A6 VL

<400> 44

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg

85 90 95

Ala Val Arg Asn Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 45

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_D1 VL

<400> 45

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgt acttactctt acaaccgtgc tgttcgtccg 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 46

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_D1 VL

<400> 46

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg

85 90 95

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

100 105 110

<210> 47

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_H6 VL

<400> 47

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgc gactacaaat ggaaccgtgt tgttcgtcat 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 48

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_H6 VL

<400> 48

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Tyr Lys Trp Asn Arg

85 90 95

Val Val Arg His Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 49

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12 LC

<400> 49

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctgcct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgt gatatttgtt gtaatcgatc tgtgcgtaat 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 50

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12 LC

<400> 50

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

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

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

<210> 51
<211> 1881
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 51A12 HC (knob)
<400> 51
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaccgtac 300

ctgggttaca ctattgacta ctggggccaa ggaaccctgg tcaccgtctc gagtgctagc 360

accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420

gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480

tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540

tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 660

tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagctgcagg gggaccgtca 720

gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780

acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960

aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catgccggga tgagctgacc 1080

aagaaccagg tcagcctgtg gtgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1140

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200

tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1320

agcctctccc tgtctccggg tggcggcgga ggctccggag gcggaggatc tggcggcgga 1380

ggcagctgtg acctgcctca gacacacagc ctgggcagcc ggcggaccct gatgctgctg 1440

gcccagatgc ggaagatcag cctgttcagc tgcctgaagg accggcacga cttcggcttc 1500

cctcaggaag agttcggcaa ccagttccag aaggccgaga caatccccgt gctgcacgag 1560

atgatccagc agattttcaa cctgttcagc accaaggaca gcagcgccgc ctgggacgag 1620

acactgctgg acaagttcta caccgagctg taccagcagc tgaacgacct ggaagcctgc 1680

gtgatccagg gcgtgggcgt gaccgagaca cccctgatga aggaagatag catcctggcc 1740

gtgcggaagt atttccagcg gatcaccctg tacctgaaag agaagaagta cagcccctgc 1800

gcctgggagg tcgtgcgggc cgagatcatg cggagcttca gcctgagcac caacctgcag 1860

gaaagcctgc ggagcaaaga g 1881

<210> 52

<211> 627

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12 HC (knob)

<400> 52

Glu Val Gln Leu Leu 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

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 Pro Tyr Leu Gly Tyr Thr Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

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

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

385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
435 440 445
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Asp

450 455 460
Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu

465 470 475 480

Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His

485 490 495

Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala

500 505 510

Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu

580 585 590

Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu

595 600 605

Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg

610 615 620

Ser Lys Glu

625

<210> 53

<211> 1344

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12 HC (hole)

<400> 53

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaccgtac 300

ctgggttaca ctattgacta ctggggccaa ggaaccctgg tcaccgtctc gagtgctagc 360

accaagggcc cctccgtgtt cccccctggcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420

gccgctctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480

agcggagccc tgacctccgg cgtgcacacc ttccccgccg tgctgcagag ttctggcctg 540

tatagcctga gcagcgtggt caccgtgcct tctagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600

tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaggtgga gcccaagagc 660

tgcgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagctgcagg gggaccgtca 720

gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780

acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960

aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtgc accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1080

aagaaccagg tcagcctctc gtgcgcagtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1140

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200

tccgacggct ccttcttcct cgtgagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1320

agcctctccc tgtctccggg taaa 1344

<210> 54

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12 HC (hole)

<400> 54

Glu Val Gln Leu Leu 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

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 Pro Tyr Leu Gly Tyr Thr Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

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

                165                 170                 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
            180                 185                 190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
        195                 200                 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
    210                 215                 220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser

225                 230                 235                 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                245                 250                 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
            260                 265                 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
        275                 280                 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

    290                 295                 300
```

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

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

420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 55
<211> 642
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 52C4 LC
<400> 55

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60
acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120
caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240
gatgaggctg actattactg taactccggt gctagtagcg gtaatcagtt ggtattcggc 300
ggagggacca agctgaccgt cctaggtcaa cccaaggctg cccccagcgt gaccctgttc 360
cccccagca gcgaggaact gcaggccaac aaggccaccc tggtctgcct gatcagcgac 420
ttctacccag gcgccgtgac cgtggcctgg aaggccgaca gcagccccgt gaaggccggc 480

gtggagacca ccacccccag caagcagagc aacaacaagt acgccgccag cagctacctg 540

agcctgaccc ccgagcagtg gaagagccac aggtcctaca gctgccaggt gacccacgag 600

ggcagcaccg tggagaaaac cgtggccccc accgagtgca gc 642

<210> 56

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 52C4 LC

<400> 56

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Gly Ala Ser Ser Gly Asn Gln
85 90 95

Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210

<210> 57

<211> 1887

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 52C4 HC (knob)

<400> 57

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agtcgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaccggct 300

ggttactctt acggttactt cgactactgg ggccaaggaa ccctggtcac cgtctcgagt 360

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420

ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660

aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatg ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtggc ggcggaggct ccggaggcgg aggatctggc 1380

ggcggaggca gctgtgacct gcctcagaca cacagcctgg gcagccggcg gaccctgatg 1440

ctgctggccc agatgcggaa gatcagcctg ttcagctgcc tgaaggaccg gcacgacttc 1500

ggcttccctc aggaagagtt cggcaaccag ttccagaagg ccgagacaat ccccgtgctg 1560

cacgagatga tccagcagat tttcaacctg ttcagcacca aggacagcag cgccgcctgg 1620

gacgagacac tgctggacaa gttctacacc gagctgtacc agcagctgaa cgacctggaa 1680

gcctgcgtga tccagggcgt gggcgtgacc gagacacccc tgatgaagga agatagcatc 1740

ctggccgtgc ggaagtattt ccagcggatc accctgtacc tgaaagagaa gaagtacagc 1800

ccctgcgcct gggaggtcgt gcgggccgag atcatgcgga gcttcagcct gagcaccaac 1860

ctgcaggaaa gcctgcggag caaagag 1887

<210> 58

<211> 629

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 52C4 HC (knob)

<400> 58

Glu Val Gln Leu Leu 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

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 Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Pro Ala Gly Tyr Ser Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr 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 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Gly Ala Pro Ile Glu

325 330 335

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

340 345 350

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
450 455 460

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
465 470 475 480

Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
485 490 495

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
500 505 510

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
515 520 525

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
530 535 540

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
545 550 555 560

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
565 570 575

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
580 585 590

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg

595 600 605

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser

610 615 620

Leu Arg Ser Lys Glu

625

<210> 59

<211> 1350

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 52C4 HC (hole)

<400> 59

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agtcgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaccggct 300

ggttactctt acggttactt cgactactgg ggccaaggaa ccctggtcac cgtctcgagt 360

gctagcacca agggcccctc cgtgttcccc ctggccccca gcagcaagag caccagcggc 420

ggcacagccg ctctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480

tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagttct 540

ggcctgtata gcctgagcag cgtggtcacc gtgccttcta gcagcctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagccc 660

aagagctgcg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 60

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 52C4 HC (hole)

<400> 60

Glu Val Gln Leu Leu 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

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 Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Pro Ala Gly Tyr Ser Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr 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 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Gly Ala Pro Ile Glu
325 330 335

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

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

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

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

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

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

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly Lys

450

<210> 61

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A4 LC

<400> 61

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgt ttgaggagcg ggaagatggt ggtattcggc 300

ggagggacca agctgaccgt cctaggtcaa cccaaggctg cccccagcgt gaccctgttc 360

ccccccagca gcgaggaact gcaggccaac aaggccaccc tggtctgcct gatcagcgac 420

ttctacccag gcgccgtgac cgtggcctgg aaggccgaca gcagccccgt gaaggccggc 480

gtggagacca ccaccccccag caagcagagc aacaacaagt acgccgccag cagctacctg 540

agcctgaccc ccgagcagtg gaagagccac aggtcctaca gctgccaggt gacccacgag 600

ggcagcaccg tggagaaaac cgtggccccc accgagtgca gc 642

<210> 62

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A4 LC

<400> 62

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Leu Arg Ser Gly Lys Met

85 90 95

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

100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser

180 185 190

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

195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210

<210> 63

<211> 1892

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A4 HC (knob)

<400> 63

cattcggagg tgcaattgtt ggagtctggg ggaggcttgg tacagcctgg ggggtccctg 60

agactctcct gtgcagcctc cggattcacc tttagcagtt atgccatgag ctgggtccgc 120

caggctccag ggaaggggct ggagtgggtc tcagctatta gtggtagtgg tggtagcaca 180

tactacgcag actccgtgaa gggccggttc accatctcca gagacaattc caagaacacg 240

ctgtatctgc agatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgcgaaa 300
agttggtacc tgccgggtcg tggtttcgac tactggggcc aaggaaccct ggtcaccgtc 360
tcgagtgcta gcaccaaggg cccatcggtc ttcccccctgg caccctcctc caagagcacc 420
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 600
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 660

gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaagctgca 720
gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 780
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 840
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 900
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 960
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcg gcgcccccat cgagaaaacc 1020
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatgccgg 1080

gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg tggtgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1140
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1200
cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1260
aggtggagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact 1320
acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtggcggcgg aggctccgga ggcggaggat 1380
ctggcggcgg aggcagctgt gacctgcctc agacacacag cctgggcagc cggcggaccc 1440
tgatgctgct ggcccagatg cggaagatca gcctgttcag ctgcctgaag gaccggcacg 1500

acttcggctt ccctcaggaa gagttcggca accagttcca gaaggccgag acaatccccg 1560
tgctgcacga gatgatccag cagattttca acctgttcag caccaaggac agcagcgccg 1620
cctgggacga gacactgctg gacaagttct acaccgagct gtaccagcag ctgaacgacc 1680
tggaagcctg cgtgatccag ggcgtgggcg tgaccgagac acccctgatg aaggaagata 1740
gcatcctggc cgtgcggaag tatttccagc ggatcaccct gtacctgaaa gagaagaagt 1800
acagcccctg cgcctgggag gtcgtgcggg ccgagatcat gcggagcttc agcctgagca 1860
ccaacctgca ggaaagcctg cggagcaaag ag 1892

<210> 64

<211> 629

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A4 HC (knob)

<400> 64

Glu Val Gln Leu Leu 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

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 Ser Trp Tyr Leu Pro Gly Arg Gly Phe Asp Tyr 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 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Gly Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

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

435 440 445
Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

450 455 460

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met

465 470 475 480

Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp

485 490 495

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln

500 505 510

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe

515 520 525

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu

530 535 540

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu

545 550 555 560

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

565 570 575

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu

580 585 590

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg

595 600 605

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser

610 615 620

Leu Arg Ser Lys Glu

625

<210

> 65

<211> 1350

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A4 HC (hole)

<400> 65

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaagttgg 300

tacctgccgg gtcgtggttt cgactactgg ggccaaggaa ccctggtcac cgtctcgagt 360

gctagcacca agggcccctc cgtgttcccc ctggccccca gcagcaagag caccagcggc 420

ggcacagccg ctctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480

tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagttct 540

ggcctgtata gcctgagcag cgtggtcacc gtgccttcta gcagcctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagccc 660

aagagctgcg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgccccatc ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 66

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A4 HC (hole)

<400> 66

Glu Val Gln Leu Leu 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

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

210 215 220

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

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

405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Lys
450

<210> 67
<211> 645
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 4F3 LC
<400> 67
tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120
caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180
ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactccctg gagaggatcg ggtatctttc ttatgtattc 300

ggcggaggga ccaagctgac cgtcctaggt caacccaagg ctgcccccag cgtgaccctg 360

ttcccccccа gcagcgagga actgcaggcc aacaaggcca ccctggtctg cctgatcagc 420

gacttctacc caggcgccgt gaccgtggcc tggaaggccg acagcagccc cgtgaaggcc 480

ggcgtggaga ccaccacccc cagcaagcag agcaacaaca agtacgccgc cagcagctac 540

ctgagcctga cccccgagca gtggaagagc cacaggtcct acagctgcca ggtgacccac 600

gagggcagca ccgtggagaa aaccgtggcc cccaccgagt gcagc 645

<210> 68

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4F3 LC

<400> 68

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Leu Glu Arg Ile Gly Tyr Leu
85 90 95

Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
100 105 110

Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
115 120 125

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 69

<211> 1887

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4F3 HC (knob)

<400> 69

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagacttc 300

tcttctcgtc gttggtacct ggaatactgg ggccaaggaa ccctggtcac cgtctcgagt 360

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420

ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660

aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatg ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtggc ggcggaggct ccggaggcgg aggatctggc 1380

ggcggaggca gctgtgacct gcctcagaca cacagcctgg gcagccggcg gaccctgatg 1440

ctgctggccc agatgcggaa gatcagcctg ttcagctgcc tgaaggaccg gcacgacttc 1500

ggcttccctc aggaagagtt cggcaaccag ttccagaagg ccgagacaat ccccgtgctg 1560

cacgagatga tccagcagat tttcaacctg ttcagcacca aggacagcag cgccgcctgg 1620

gacgagacac tgctggacaa gttctacacc gagctgtacc agcagctgaa cgacctggaa 1680

gcctgcgtga tccagggcgt gggcgtgacc gagacacccc tgatgaagga agatagcatc 1740

ctggccgtgc ggaagtattt ccagcggatc accctgtacc tgaaagagaa gaagtacagc 1800

ccctgcgcct gggaggtcgt gcgggccgag atcatgcgga gcttcagcct gagcaccaac 1860

ctgcaggaaa gcctgcggag caaagag 1887

<210> 70

<211> 629

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4F3 HC (knob)

<400> 70

Glu Val Gln Leu Leu 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

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 Phe Ser Ser Arg Arg Trp Tyr Leu Glu Tyr 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 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Gly Ala Pro Ile Glu

325 330 335

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

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

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

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

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

450 455 460

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met

465 470 475 480

Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp

485 490 495

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln

500 505 510

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe

515 520 525

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu

530 535 540

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu

545 550 555 560

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
565 570 575

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu

580 585 590

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
595 600 605

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
610 615 620

Leu Arg Ser Lys Glu
625

<210> 71

<211> 1350

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4F3 HC (hole)

<400> 71

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagacttc 300

tcttctcgtc gttggtacct ggaatactgg ggccaaggaa ccctggtcac cgtctcgagt 360

gctagcacca agggcccctc cgtgttcccc ctggccccca gcagcaagag caccagcggc 420

ggcacagccg ctctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480

tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagttct 540

ggcctgtata gcctgagcag cgtggtcacc gtgccttcta gcagcctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagccc 660

aagagctgcg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcaggggа acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 72

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4F3 HC (hole)

<400> 72

Glu Val Gln Leu Leu 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

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 Phe Ser Ser Arg Arg Trp Tyr Leu Glu Tyr 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 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Gly Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365
Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

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

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly Lys

450

<210> 73

<211> 639

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R5C2 LC

<400> 73

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgg gatcgtagag gttattcggt attcggcgga 300

gggaccaagc tgaccgtcct aggtcaaccc aaggctgccc ccagcgtgac cctgttcccc 360

cccagcagcg aggaactgca ggccaacaag gccaccctgg tctgcctgat cagcgacttc 420

tacccaggcg ccgtgaccgt ggcctggaag gccgacagca gccccgtgaa ggccggcgtg 480

gagaccacca cccccagcaa gcagagcaac aacaagtacg ccgccagcag ctacctgagc 540

ctgacccccg agcagtggaa gagccacagg tcctacagct gccaggtgac ccacgagggc 600

agcaccgtgg agaaaaccgt ggcccccacc gagtgcagc 639

<210> 74

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R5C2 LC

<400> 74

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

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

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

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

<210> 75
<211> 1887
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> R5C2 HC (knob)

<400> 75

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcgg cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaatcttct 300

ttctcttacc tgcgtgcttt cgactactgg ggccaaggaa ccctggtcac cgtctcgagt 360

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420

ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660

aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatg ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtggc ggcggaggct ccggaggcgg aggatctggc 1380

ggcggaggca gctgtgacct gcctcagaca cacagcctgg gcagccggcg gaccctgatg 1440

ctgctggccc agatgcggaa gatcagcctg ttcagctgcc tgaaggaccg gcacgacttc 1500

ggcttccctc aggaagagtt cggcaaccag ttccagaagg ccgagacaat ccccgtgctg 1560

cacgagatga tccagcagat tttcaacctg ttcagcacca aggacagcag cgccgcctgg 1620

gacgagacac tgctggacaa gttctacacc gagctgtacc agcagctgaa cgacctggaa 1680

gcctgcgtga tccagggcgt gggcgtgacc gagacacccc tgatgaagga agatagcatc 1740

ctggccgtgc ggaagtattt ccagcggatc accctgtacc tgaaagagaa gaagtacagc 1800

ccctgcgcct gggaggtcgt gcgggccgag atcatgcgga gcttcagcct gagcaccaac 1860

ctgcaggaaa gcctgcggag caaagag 1887

<210> 76

<211> 629

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R5C2 HC (knob)

<400> 76

Glu Val Gln Leu Leu 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

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 Ser Ser Phe Ser Tyr Leu Arg Ala Phe Asp Tyr 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 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Gly Ala Pro Ile Glu
325 330 335

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

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

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

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

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

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

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

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

450 455 460

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met

465 470 475 480

Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp

485 490 495

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln

500 505 510

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe

515 520 525

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu

530 535 540

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu

545 550 555 560

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

565 570 575

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu

580 585 590

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg

595 600 605

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser

610 615 620

Leu Arg Ser Lys Glu

625

<210> 77

<211> 1350

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R5C2 HC (hole)

<400> 77

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgagactc 60

tcctgtgcgg cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaatcttct 300

ttctcttacc tgcgtgcttt cgactactgg ggccaaggaa ccctggtcac cgtctcgagt 360

gctagcacca agggcccctc cgtgttcccc ctggccccca gcagcaagag caccagcggc 420

ggcacagccg ctctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480

tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagttct 540

ggcctgtata gcctgagcag cgtggtcacc gtgccttcta gcagcctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagccc 660

aagagctgcg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 78

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R5C2 HC (hole)

<400> 78

Glu Val Gln Leu Leu 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

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 Ser Ser Phe Ser Tyr Leu Arg Ala Phe Asp Tyr 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 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Gly Ala Pro Ile Glu
325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 79

<211> 639

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R9E10 LC

<400> 79

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgg aatgttcgcg gtaagctcgt attcggcgga 300

gggaccaagc tgaccgtcct aggtcaaccc aaggctgccc ccagcgtgac cctgttcccc 360

cccagcagcg aggaactgca ggccaacaag gccaccctgg tctgcctgat cagcgacttc 420

tacccaggcg ccgtgaccgt ggcctggaag gccgacagca gccccgtgaa ggccggcgtg 480

gagaccacca cccccagcaa gcagagcaac aacaagtacg ccgccagcag ctacctgagc 540

ctgacccccg agcagtggaa gagccacagg tcctacagct gccaggtgac ccacgagggc 600

agcaccgtgg agaaaaccgt ggcccccacc gagtgcagc 639

<210> 80

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R9E10 LC

<400> 80

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asn Val Arg Gly Lys Leu

85 90 95

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

100 105 110

Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser

165 170 175

Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr

180 185 190

Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala

195 200 205

Pro Thr Glu Cys Ser

210

<210> 81

<211> 1887

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R9E10 HC (knob)

<400> 81

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaaactct 300

tacacttacg gtcgtgctct ggactactgg ggccaaggaa ccctggtcac cgtctcgagt 360

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420

ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660

aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatg ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtggc ggcggaggct ccggaggcgg aggatctggc 1380

ggcggaggca gctgtgacct gcctcagaca cacagcctgg gcagccggcg gaccctgatg 1440

ctgctggccc agatgcggaa gatcagcctg ttcagctgcc tgaaggaccg gcacgacttc 1500

ggcttccctc aggaagagtt cggcaaccag ttccagaagg ccgagacaat ccccgtgctg 1560

cacgagatga tccagcagat tttcaacctg ttcagcacca aggacagcag cgccgcctgg 1620

gacgagacac tgctggacaa gttctacacc gagctgtacc agcagctgaa cgacctggaa 1680

gcctgcgtga tccagggcgt gggcgtgacc gagacacccc tgatgaagga agatagcatc 1740

ctggccgtgc ggaagtattt ccagcggatc accctgtacc tgaaagagaa gaagtacagc 1800

ccctgcgcct gggaggtcgt gcgggccgag atcatgcgga gcttcagcct gagcaccaac 1860

ctgcaggaaa gcctgcggag caaagag 1887

<210> 82

<211> 629

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R9E10 HC (knob)

<400> 82

Glu Val Gln Leu Leu 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

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 Asn Ser Tyr Thr Tyr Gly Arg Ala Leu Asp Tyr 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 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Gly Ala Pro Ile Glu

325 330 335

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

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

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

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

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

450 455 460

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met

465 470 475 480

Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp

485 490 495

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln

500 505 510

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe

515 520 525

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu

530 535 540

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
545 550 555 560
Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys

565 570 575
Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
580 585 590
Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
595 600 605
Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
610 615 620
Leu Arg Ser Lys Glu
625

<210
> 83
<211> 1350
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> R9E10 HC (hole)
<400> 83

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaaactct 300
tacacttacg gtcgtgctct ggactactgg ggccaaggaa ccctggtcac cgtctcgagt 360

gctagcacca agggcccctc cgtgttcccc ctggccccca gcagcaagag caccagcggc 420
ggcacagccg ctctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagttct 540
ggcctgtata gcctgagcag cgtggtcacc gtgccttcta gcagcctggg cacccagacc 600
tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagccc 660
aagagctgcg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 84

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R9E10 HC (hole)

<400> 84

Glu Val Gln Leu Leu 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

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

210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Gly Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys

340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

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

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

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

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly Lys

450

<210> 85

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R7E12 LC

<400> 85

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgt aagagtagct cgaagaatgt tgtgttcggc 300

ggagggacca agctgaccgt cctaggtcaa cccaaggctg cccccagcgt gaccctgttc 360

ccccccagca gcgaggaact gcaggccaac aaggccaccc tggtctgcct gatcagcgac 420

ttctacccag gcgccgtgac cgtggcctgg aaggccgaca gcagccccgt gaaggccggc 480

gtggagacca ccaccccccag caagcagagc aacaacaagt acgccgccag cagctacctg 540

agcctgaccc ccgagcagtg gaagagccac aggtcctaca gctgccaggt gacccacgag 600

ggcagcaccg tggagaaaac cgtggccccc accgagtgca gc 642

<210> 86

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R7E12 LC

<400> 86

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala

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

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

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

<210> 87

<211> 1887

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R7E12 HC (knob)

<400> 87

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaatcttct 300

ttcactttcg gtcgttactt cgactactgg ggccaaggaa ccctggtcac cgtctcgagt 360

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420

ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660

aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatg ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtggc ggcggaggct ccggaggcgg aggatctggc 1380

ggcggaggca gctgtgacct gcctcagaca cacagcctgg gcagccggcg gaccctgatg 1440

ctgctggccc agatgcggaa gatcagcctg ttcagctgcc tgaaggaccg gcacgacttc 1500

ggcttccctc aggaagagtt cggcaaccag ttccagaagg ccgagacaat ccccgtgctg 1560

cacgagatga tccagcagat tttcaacctg ttcagcacca aggacagcag cgccgcctgg 1620

gacgagacac tgctggacaa gttctacacc gagctgtacc agcagctgaa cgacctggaa 1680

gcctgcgtga tccagggcgt gggcgtgacc gagacacccc tgatgaagga agatagcatc 1740

ctggccgtgc ggaagtattt ccagcggatc accctgtacc tgaaagagaa gaagtacagc 1800

ccctgcgcct gggaggtcgt gcgggccgag atcatgcgga gcttcagcct gagcaccaac 1860

ctgcaggaaa gcctgcggag caaagag 1887

<210> 88

<211> 629

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R7E12 HC (knob)

<400> 88

Glu Val Gln Leu Leu 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

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

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Gly Ala Pro Ile Glu

325 330 335

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

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

450 455 460
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
465 470 475 480
Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
485 490 495
Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
500 505 510
Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe

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

580 585 590
Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
595 600 605
Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
610 615 620
Leu Arg Ser Lys Glu
625
<210> 89
<211> 1350

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R7E12 HC (hole)

<400> 89

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaatcttct 300

ttcactttcg gtcgttactt cgactactgg ggccaaggaa ccctggtcac cgtctcgagt 360

gctagcacca agggcccctc cgtgttcccc ctggccccca gcagcaagag caccagcggc 420

ggcacagccg ctctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480

tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagttct 540

ggcctgtata gcctgagcag cgtggtcacc gtgccttcta gcagcctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagccc 660

aagagctgcg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 90

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R7E12 HC (hole)

<400> 90

Glu Val Gln Leu Leu 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

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 Ser Ser Phe Thr Phe Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr 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 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Gly Ala Pro Ile Glu

325 330 335

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

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

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

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly Lys

450

<210> 91

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12 S116A LC

<400> 91

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctgcct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgt gatatttgtt gtaatcgagc tgtgcgtaat 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtcaaccca aggctgcccc cagcgtgacc 360

ctgttccccc ccagcagcga ggaactgcag gccaacaagg ccaccctggt ctgcctgatc 420

agcgacttct acccaggcgc cgtgaccgtg gcctggaagg ccgacagcag ccccgtgaag 480

gccggcgtgg agaccaccac ccccagcaag cagagcaaca acaagtacgc cgccagcagc 540

tacctgagcc tgacccccga gcagtggaag agccacaggt cctacagctg ccaggtgacc 600

cacgagggca gcaccgtgga gaaaaccgtg gcccccaccg agtgcagc 648

<210> 92

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12 S116A LC

<400> 92

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ile Cys Cys Asn Arg
85 90 95

Ala Val Arg Asn Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 93

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12 A82G S116A LC

<400> 93

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgt gatatttgtt gtaatcgagc tgtgcgtaat 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtcaaccca aggctgcccc cagcgtgacc 360

ctgttccccc ccagcagcga ggaactgcag gccaacaagg ccaccctggt ctgcctgatc 420

agcgacttct acccaggcgc cgtgaccgtg gcctggaagg ccgacagcag ccccgtgaag 480

gccggcgtgg agaccaccac ccccagcaag cagagcaaca acaagtacgc cgccagcagc 540

tacctgagcc tgacccccga gcagtggaag agccacaggt cctacagctg ccaggtgacc 600

cacgagggca gcaccgtgga gaaaaccgtg gcccccaccg agtgcagc 648

<210> 94

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12 A82G S116A LC

<400> 94

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ile Cys Cys Asn Arg
85 90 95

Ala Val Arg Asn Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 95

<211> 649

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_C1 LC

<400> 95

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgt tcttacgctt tcaaccgtgt tgttcgtaac 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtcaaccca aggctgcccc cagcgtgacc 360

ctgttccccc ccagcagcga ggaactgcag gccaacaagg ccaccctggt ctgcctgatc 420

agcgacttct acccaggcgc cgtgaccgtg gcctggaagg ccgacagcag ccccgtgaag 480

gccggcgtgg agaccaccac ccccagcaag cagagcaaca acaagtacgc cgccagcagc 540

tacctgagcc tgacccccga gcagtggaag agccacaggt cctacagctg ccaggtgacc 600

cacgagggca gcaccgtgga gaaaaccgtg gcccccaccg agtgcagct 649

<210> 96

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_C1 LC

<400> 96

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Ser Tyr Ala Phe Asn Arg

85 90 95

Val Val Arg Asn Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 97

<211> 649

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_C7 LC

<400> 97

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgt gacatccgtt acaaccgtgt tgttcgtccg 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtcaaccca aggctgcccc cagcgtgacc 360

ctgttccccc ccagcagcga ggaactgcag gccaacaagg ccaccctggt ctgcctgatc 420

agcgacttct acccaggcgc cgtgaccgtg gcctggaagg ccgacagcag ccccgtgaag 480

gccggcgtgg agaccaccac ccccagcaag cagagcaaca acaagtacgc cgccagcagc 540

tacctgagcc tgacccccga gcagtggaag agccacaggt cctacagctg ccaggtgacc 600

cacgagggca gcaccgtgga gaaaaccgtg gcccccaccg agtgcagct 649

<210> 98

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_C7 LC

<400> 98

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ile Arg Tyr Asn Arg

85 90 95

Val Val Arg Pro Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 99

<211> 649

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_E7 LC

<400> 99

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgt gactaccgtt acaaccgtgc tgttcgtccg 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtcaaccca aggctgcccc cagcgtgacc 360

ctgttccccc ccagcagcga ggaactgcag gccaacaagg ccaccctggt ctgcctgatc 420

agcgacttct acccaggcgc cgtgaccgtg gcctggaagg ccgacagcag ccccgtgaag 480

gccggcgtgg agaccaccac ccccagcaag cagagcaaca acaagtacgc cgccagcagc 540

tacctgagcc tgacccccga gcagtggaag agccacaggt cctacagctg ccaggtgacc 600

cacgagggca gcaccgtgga gaaaaccgtg gcccccaccg agtgcagct 649

<210> 100

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_E7 LC

<400> 100

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Tyr Arg Tyr Asn Arg
85 90 95

Ala Val Arg Pro Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 101

<211> 649

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_H3 LC

<400> 101

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgt gactacaaat tcaaccgtgt tgttcgtaac 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtcaaccca aggctgcccc cagcgtgacc 360

ctgttccccc ccagcagcga ggaactgcag gccaacaagg ccaccctggt ctgcctgatc 420

agcgacttct acccaggcgc cgtgaccgtg gcctggaagg ccgacagcag ccccgtgaag 480

gccggcgtgg agaccaccac ccccagcaag cagagcaaca acaagtacgc cgccagcagc 540

tacctgagcc tgaccccga gcagtggaag agccacaggt cctacagctg ccaggtgacc 600

cacgagggca gcaccgtgga gaaaaccgtg gcccccaccg agtgcagct 649

<210> 102

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_H3 LC

<400> 102

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Tyr Lys Phe Asn Arg

85 90 95

Val Val Arg Asn Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 103

<211> 649

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_A6 LC

<400> 103

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgt acttactctt acaaccgtgc tgttcgtaac 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtcaaccca aggctgcccc cagcgtgacc 360

ctgttccccc ccagcagcga ggaactgcag gccaacaagg ccaccctggt ctgcctgatc 420

agcgacttct acccaggcgc cgtgaccgtg gcctggaagg ccgacagcag ccccgtgaag 480

gccggcgtgg agaccaccac ccccagcaag cagagcaaca acaagtacgc cgccagcagc 540

tacctgagcc tgaccccga gcagtggaag agccacaggt cctacagctg ccaggtgacc 600

cacgagggca gcaccgtgga gaaaaccgtg gcccccaccg agtgcagct 649

<210> 104

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_A6 LC

<400> 104

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg

85 90 95

Ala Val Arg Asn Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 105

<211> 649

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_D1 LC

<400> 105

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgt acttactctt acaaccgtgc tgttcgtccg 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtcaaccca aggctgcccc cagcgtgacc 360

ctgttccccc ccagcagcga ggaactgcag gccaacaagg ccaccctggt ctgcctgatc 420

agcgacttct acccaggcgc cgtgaccgtg gcctggaagg ccgacagcag ccccgtgaag 480

gccggcgtgg agaccaccac ccccagcaag cagagcaaca acaagtacgc cgccagcagc 540

tacctgagcc tgacccccga gcagtggaag agccacaggt cctacagctg ccaggtgacc 600

cacgagggca gcaccgtgga gaaaaccgtg gcccccaccg agtgcagct 649

<210> 106

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_D1 LC

<400> 106

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

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

<210> 107
<211> 649
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_H6 LC
<400> 107

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgc gactacaaat ggaaccgtgt tgttcgtcat 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtcaaccca aggctgcccc cagcgtgacc 360

ctgttccccc ccagcagcga ggaactgcag gccaacaagg ccaccctggt ctgcctgatc 420

agcgacttct acccaggcgc cgtgaccgtg gcctggaagg ccgacagcag ccccgtgaag 480

gccggcgtgg agaccaccac ccccagcaag cagagcaaca acaagtacgc cgccagcagc 540

tacctgagcc tgaccccga gcagtggaag agccacaggt cctacagctg ccaggtgacc 600

cacgagggca gcaccgtgga gaaaaccgtg gcccccaccg agtgcagct 649

<210> 108

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 51A12_H6 LC

<400> 108

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Tyr Lys Trp Asn Arg

85 90 95

Val Val Arg His Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 109

<211> 643

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DPL16 LC

<400> 109

tcgtctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaag gagacagcct cagaagttat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa 240

gatgaggctg actattactg taactcccgt gatagtagcg gtaatcatgt ggtattcggc 300

ggagggacca agctgaccgt cctaggtcaa cccaaggctg cccccagcgt gaccctgttc 360

ccccccagca gcgaggaact gcaggccaac aaggccaccc tggtctgcct gatcagcgac 420

ttctacccag gcgccgtgac cgtggcctgg aaggccgaca gcagccccgt gaaggccggc 480

gtggagacca ccacccccag caagcagagc aacaacaagt acgccgccag cagctacctg 540

agcctgaccc ccgagcagtg gaagagccac aggtcctaca gctgccaggt gacccacgag 600

ggcagcaccg tggagaaaac cgtggccccc accgagtgca gct 643

<210> 110

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DPL16 LC

<400> 110

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210

<210> 111

<211> 1872

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DP47GS HC (knob)

<400> 111

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300

ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc 360

ccatcggtct tcccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg 420

ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 480

ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540

agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600

aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa 660

actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc 720

ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 960

gtctccaaca aagccctcgg cgcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatgccggg atgagctgac caagaaccag 1080

gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200

tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320

ctgtctccgg gtggcggcgg aggctccgga ggcggaggat ctggcggcgg aggcagctgt 1380

gacctgcctc agacacacag cctgggcagc cggcggaccc tgatgctgct ggcccagatg 1440

cggaagatca gcctgttcag ctgcctgaag gaccggcacg acttcggctt ccctcaggaa 1500

gagttcggca accagttcca gaaggccgag acaatccccg tgctgcacga gatgatccag 1560

cagattttca acctgttcag caccaaggac agcagcgccg cctgggacga gacactgctg 1620

gacaagttct acaccgagct gtaccagcag ctgaacgacc tggaagcctg cgtgatccag 1680

ggcgtgggcg tgaccgagac acccctgatg aaggaagata gcatcctggc cgtgcggaag 1740

tatttccagc ggatcaccct gtacctgaaa gagaagaagt acagcccctg cgcctgggag 1800

gtcgtgcggg ccgagatcat gcggagcttc agcctgagca ccaacctgca ggaaagcctg 1860

cggagcaaag ag 1872

<210> 112

<211> 624

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DP47GS HC (knob)

<400> 112

Glu Val Gln Leu Leu 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

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 Gly Ser Gly Phe Asp 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 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 Ala Ala 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 Gly 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 Cys
340 345 350
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp 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 Gly Gly Gly Gly Gly

435 440 445

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Asp Leu Pro Gln

450 455 460

Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met

465 470 475 480

Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly

485 490 495

Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile

500 505 510

Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr

515 520 525

Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr

530 535 540

Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln

545 550 555 560

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

565 570 575

Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys

580 585 590

Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg

595 600 605

Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu

610 615 620

<210> 113

<211> 1335

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DP47GS HC (hole)

<400> 113

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300

ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc 360

ccctccgtgt tccccctggc ccccagcagc aagagcacca gcggcggcac agccgctctg 420

ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgag cccgtgaccg tgtcctggaa cagcggagcc 480

ctgacctccg gcgtgcacac cttccccgcc gtgctgcaga gttctggcct gtatagcctg 540

agcagcgtgg tcaccgtgcc ttctagcagc ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600

aaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaggtgg agcccaagag ctgcgacaaa 660

actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc 720

ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 960

gtctccaaca aagccctcgg cgcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020

ccccgagaac cacaggtgtg caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1080

gtcagcctct cgtgcgcagt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200

tccttcttcc tcgtgagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320

ctgtctccgg gtaaa 1335

<210> 114

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DP47GS HC (hole)

<400> 114

Glu Val Gln Leu Leu 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

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 Gly Ser Gly Phe Asp 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 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 Ala Ala 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 Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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 Val 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> 115
<211> 681
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Fc (hole)
<400> 115

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 60

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtgcacc ctgccccccat cccgggatga gctgaccaag 420
aaccaggtca gcctctcgtg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540
gacggctcct tcttcctcgt gagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctccgggtaa a 681

<210> 116
<211> 227
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Fc (hole)
<400> 116

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1 5 10 15

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

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly Lys

225

<210> 117

<211> 1206

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> avi-Fc-huASGPR H1 CRD (hole)

<400> 117

ggcctgaacg atatttttga agcccagaaa atcgaatggc atgaggacaa aactcacaca 60

tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca 120

aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 180

gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 240

aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 300

ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 360

aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 420

ccacaggtgt gcaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctc 480

tcgtgcgcag tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 540

cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc 600

ctcgtgagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 660

tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 720

ggtggatccg gcggtggtag tccgacacct ccgacacccg ggggtggtag caatggtagc 780

gaacgtacct gttgtccggt taattgggtt gaacatgaac gtagctgcta ttggtttagc 840

cgtagcggta aagcatgggc agatgcagat aattattgtc gtctggaaga tgcacatctg 900

gttgttgtga ccagctggga agaacagaaa tttgttcagc atcatattgg tccggtgaat 960

acctggatgg gtctgcatga tcagaatggt ccgtggaaat gggttgatgg caccgattat 1020

gaaaccggtt ttaaaaattg gcgtccggaa cagccggatg attggtatgg tcatggtctg 1080

ggtggtggtg aagattgtgc acattttacc gatgatggtc gttggaatga tgatgtttgt 1140

cagcgtccgt atcgttgggt ttgtgaaacc gaactggata aagcaagcca ggaaccgccg 1200

ctgctg 1206

<210> 118

<211> 402

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> avi-Fc-huASGPR H1 CRD (hole)

<400> 118

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Asp
1 5 10 15

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
20 25 30

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
35 40 45

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
50 55 60

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
65 70 75 80

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
85 90 95

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

100 105 110

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

115 120 125

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

130 135 140

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp

195 200 205

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

210 215 220

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

225 230 235 240

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Pro Pro Thr Pro Gly Gly Gly

245 250 255

Ser Asn Gly Ser Glu Arg Thr Cys Cys Pro Val Asn Trp Val Glu His

260 265 270

Glu Arg Ser Cys Tyr Trp Phe Ser Arg Ser Gly Lys Ala Trp Ala Asp

275 280 285

Ala Asp Asn Tyr Cys Arg Leu Glu Asp Ala His Leu Val Val Val Thr

290 295 300

Ser Trp Glu Glu Gln Lys Phe Val Gln His His Ile Gly Pro Val Asn

305 310 315 320

Thr Trp Met Gly Leu His Asp Gln Asn Gly Pro Trp Lys Trp Val Asp

325 330 335

Gly Thr Asp Tyr Glu Thr Gly Phe Lys Asn Trp Arg Pro Glu Gln Pro

340 345 350

Asp Asp Trp Tyr Gly His Gly Leu Gly Gly Gly Glu Asp Cys Ala His
355 360 365

Phe Thr Asp Asp Gly Arg Trp Asn Asp Asp Val Cys Gln Arg Pro Tyr
370 375 380

Arg Trp Val Cys Glu Thr Glu Leu Asp Lys Ala Ser Gln Glu Pro Pro
385 390 395 400

Leu Leu

<210> 119

<211> 1179

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> avi-Fc-huCLEC10A CRD (hole)

<400> 119

ggcctgaacg atatttttga agcccagaaa atcgaatggc atgaggacaa aactcacaca 60

tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttcct cttccccca 120

aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 180

gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 240

aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 300

ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 360

aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 420

ccacaggtgt gcaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctc 480

tcgtgcgcag tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 540

cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc 600

ctcgtgagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 660

tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 720

ggtggatccg gcggtggtag tccgacacct ccgacacccg ggggtggtag ctgtccggtt 780

aattgggttg aacatcagga tagctgctat tggtttagcc atagcggtat gagctgggca 840

gaagcagaaa aatattgcca gctgaaaaat gcccatctgg ttgttattaa tagccgtgaa 900

gaacagaatt ttgtgcagaa atatctgggt agcgcatata cctggatggg tctgagcgat 960

ccggaaggtg catggaaatg ggttgatggc accgattatg caaccggttt tcagaattgg 1020

aaaccgggtc agccggatga ttggcagggt catggtctgg gtggtggtga agattgtgca 1080

cattttcatc cggatggtcg ttggaatgat gatgtttgtc agcgtccgta tcattgggtt 1140

tgtgaagcag gtctgggtca gaccagccag gaaagccat 1179

<210> 120

<211> 402

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> avi-Fc-huCLEC10A CRD (hole)

<400> 120

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Asp
1 5 10 15

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
20 25 30

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
35 40 45

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
50 55 60

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
65 70 75 80

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
85 90 95

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
100 105 110

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
115 120 125

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
130 135 140

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
145 150 155 160

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
165 170 175

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

180 185 190

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp

195 200 205

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

210 215 220

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

225 230 235 240

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Pro Pro Thr Pro Gly Gly Gly

245 250 255

Ser Asn Gly Ser Glu Arg Thr Cys Cys Pro Val Asn Trp Val Glu His

260 265 270

Glu Arg Ser Cys Tyr Trp Phe Ser Arg Ser Gly Lys Ala Trp Ala Asp

275 280 285

Ala Asp Asn Tyr Cys Arg Leu Glu Asp Ala His Leu Val Val Val Thr

290 295 300

Ser Trp Glu Glu Gln Lys Phe Val Gln His His Ile Gly Pro Val Asn

305 310 315 320

Thr Trp Met Gly Leu His Asp Gln Asn Gly Pro Trp Lys Trp Val Asp

325 330 335

Gly Thr Asp Tyr Glu Thr Gly Phe Lys Asn Trp Arg Pro Glu Gln Pro

340 345 350

Asp Asp Trp Tyr Gly His Gly Leu Gly Gly Gly Glu Asp Cys Ala His

355 360 365

Phe Thr Asp Asp Gly Arg Trp Asn Asp Asp Val Cys Gln Arg Pro Tyr

370 375 380

Arg Trp Val Cys Glu Thr Glu Leu Asp Lys Ala Ser Gln Glu Pro Pro

385 390 395 400

Leu Leu

<210> 121

<211> 726

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> avi-Fc (hole)

<400> 121

ggcctgaacg atatttttga agcccagaaa atcgaatggc atgaggacaa aactcacaca 60

tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttcct cttccccca 120

aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 180

gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 240

aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 300

ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 360

aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 420

ccacaggtgt acaccctgcc cccatgccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 480

tggtgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 540

cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc 600

ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 660

tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 720

ggtaaa 726

<210> 122

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> avi-Fc (hole)

<400> 122

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

85 90 95

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

100 105 110

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

115 120 125

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

130 135 140

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

195 200 205

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

210 215 220

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

225 230 235 240

Gly Lys

<210> 123

<211> 1056

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> avi-Fc-huASGPR H1 stalk

<400> 123

ggcctgaacg atatttttga agcccagaaa atcgaatggc atgaggacaa aactcacaca 60

tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttcct cttccccca 120

aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 180

gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 240

aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 300

ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 360

aaagccctcg gcgcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 420

ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 480

acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 540

cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc 600

ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 660

tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 720

ggtggcggag ggggatctgg aggtggcggc tccggaggcg gaggatctgg cggaggcgga 780

tcccagaata gccagctgca agaggaactg cgtggtctgc gtgaaacctt tagcaatttc 840

accgcaagca ccgaagcaca ggttaaaggt ctgagcaccc agggtggtaa tgttggtcgt 900

aaaatgaaaa gcctggaaag ccagctggaa aaacagcaga aagatctgag cgaagatcat 960

tcatcactgc tgctgcatgt taaacagttt gttagcgatc tgcgtagcct gagctgtcag 1020

atggcagcac tgcagggtaa tggtagcgaa cgtacc 1056

<210> 124

<211> 352

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> avi-Fc-huASGPR H1 stalk

<400> 124

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

85 90 95

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

100 105 110

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu

115 120 125

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

130 135 140

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

195 200 205

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

210 215 220

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

225 230 235 240

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

245 250 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Asn Ser Gln Leu Gln Glu Glu Leu Arg Gly

260 265 270

Leu Arg Glu Thr Phe Ser Asn Phe Thr Ala Ser Thr Glu Ala Gln Val

275 280 285

Lys Gly Leu Ser Thr Gln Gly Gly Asn Val Gly Arg Lys Met Lys Ser

290 295 300

Leu Glu Ser Gln Leu Glu Lys Gln Gln Lys Asp Leu Ser Glu Asp His

305 310 315 320

Ser Ser Leu Leu Leu His Val Lys Gln Phe Val Ser Asp Leu Arg Ser

325 330 335

Leu Ser Cys Gln Met Ala Ala Leu Gln Gly Asn Gly Ser Glu Arg Thr

340 345 350

<210> 125

<211> 1056

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> avi-Fc-cyASGPR H1 stalk

<400> 125

ggcctgaacg atatttttga agcccagaaa atcgaatggc atgaggacaa aactcacaca 60

tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttcct cttccccca 120

aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 180

gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 240

aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 300

ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 360

aaagccctcg gcgcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 420

ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 480

acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 540

cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc 600

ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 660

tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 720

ggtggcggag gggatctgg aggtggcggc tccggaggcg gaggatctgg cggaggcgga 780

tcccaaaacg cccagctgca gcgggagctg cggggcctga gagagacgct cagcaacttc 840

acagcgagca ccgaggccca ggtcaagggc ttgagcaccc agggaggcaa tgtgggaaga 900

aagatgaagt cgctggagtc ccagctggag aaacagcaga aggacttgag tgaagatcac 960

tccagcctgc tgctccacgt gaagcagttc gtgtctgacc tgcggagcct gagctgtcag 1020

atggcggcgc tccagggcaa tggctcggaa agggcc 1056

<210> 126

<211> 352

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> avi-Fc-cyASGPR H1 stalk

<400> 126

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

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

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

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

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

245 250 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Asn Ala Gln Leu Gln Arg Glu Leu Arg Gly

260 265 270

Leu Arg Glu Thr Leu Ser Asn Phe Thr Ala Ser Thr Glu Ala Gln Val

275 280 285

Lys Gly Leu Ser Thr Gln Gly Gly Asn Val Gly Arg Lys Met Lys Ser

290 295 300

Leu Glu Ser Gln Leu Glu Lys Gln Gln Lys Asp Leu Ser Glu Asp His

305 310 315 320

Ser Ser Leu Leu Leu His Val Lys Gln Phe Val Ser Asp Leu Arg Ser

325 330 335

Leu Ser Cys Gln Met Ala Ala Leu Gln Gly Asn Gly Ser Glu Arg Ala

340 345 350

<210> 127

<211> 1023

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> avi-Fc-huCLEC10A stalk

<400> 127

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 60

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 420

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540

gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660

ctctccctgt ctccgggtgg cggaggggga tctggaggtg gcggctccgg aggcggagga 720

tctggcggag gcggatccca gaacagcaag ttccagcggg acctggtcac cctgcggacc 780

gacttcagca acttcaccag caacaccgtg gccgagatcc aggccctgac cagccagggc 840

agcagcctgg aagagacaat cgccagcctg aaggccgagg tggaaggctt caagcaggaa 900

cggcaggccg tccacagcga gatgctgctg cgggtgcagc agctggtgca ggacctgaag 960

aaactgacct gccaggtggc caccctgaac aacaacggcg aggaagctag cactgaaggg 1020

acc 1023

<210> 128

<211> 356

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> avi-Fc-huCLEC10A stalk

<400> 128

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

85 90 95

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

100 105 110

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu

115 120 125

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

130 135 140

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

195 200 205

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

210 215 220

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

225 230 235 240

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

245 250 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Asn Ser Lys Phe Gln Arg Asp Leu Val Thr

260 265 270

Leu Arg Thr Asp Phe Ser Asn Phe Thr Ser Asn Thr Val Ala Glu Ile

275 280 285

Gln Ala Leu Thr Ser Gln Gly Ser Ser Leu Glu Glu Thr Ile Ala Ser

290 295 300

Leu Lys Ala Glu Val Glu Gly Phe Lys Gln Glu Arg Gln Ala Val His

305 310 315 320

Ser Glu Met Leu Leu Arg Val Gln Gln Leu Val Gln Asp Leu Lys Lys

325 330 335

Leu Thr Cys Gln Val Ala Thr Leu Asn Asn Asn Gly Glu Glu Ala Ser

340 345 350

Thr Glu Gly Thr

355

<210> 129

<211> 1473

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> avi-Fc-huASGPR H1 stalk CRD

<400> 129

ggcctgaacg atatttttga agcccagaaa atcgaatggc atgaggacaa aactcacaca 60

tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttcct cttccccca 120

aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 180

gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 240

aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 300

ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 360

aaagccctcg gcgcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 420

ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 480

acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 540

cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc 600

ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 660

tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 720

ggtggcggag ggggatctgg aggtggcggc tccggaggcg gaggatctgg cggaggcgga 780

tcccagaata gccagctgca agaggaactg cgtggtctgc gtgaaacctt tagcaatttc 840

accgcaagca ccgaagcaca ggttaaaggt ctgagcaccc agggtggtaa tgttggtcgt 900

aaaatgaaaa gcctggaaag ccagctggaa aaacagcaga aagatctgag cgaagatcat 960

tcatcactgc tgctgcatgt taaacagttt gttagcgatc tgcgtagcct gagctgtcag 1020

atggcagcac tgcagggtaa tggtagcgaa cgtacctgtt gtccggttaa ttgggttgaa 1080

catgaacgta gctgctattg gtttagccgt agcggtaaag catgggcaga tgcagataat 1140

tattgtcgtc tggaagatgc acatctggtt gttgtgacca gctgggaaga acagaaattt 1200

gttcagcatc atattggtcc ggtgaatacc tggatgggtc tgcatgatca gaatggtccg 1260

tggaaatggg ttgatggcac cgattatgaa accggtttta aaaattggcg tccggaacag 1320

ccggatgatt ggtatggtca tggtctgggt ggtggtgaag attgtgcaca ttttaccgat 1380

gatggtcgtt ggaatgatga tgtttgtcag cgtccgtatc gttgggtttg tgaaaccgaa 1440

ctggataaag caagccagga accgccgctg ctg 1473

<210> 130

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> avi-Fc-huASGPR H1 stalk CRD

<400> 130

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Asp
1 5 10 15

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
20 25 30

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
35 40 45

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
50 55 60

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
65 70 75 80

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
85 90 95

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
100 105 110

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
115 120 125

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
130 135 140

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
145 150 155 160

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
165 170 175

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
180 185 190

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
195 200 205

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
210 215 220

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Asn Ser Gln Leu Gln Glu Glu Leu Arg Gly
260 265 270

Leu Arg Glu Thr Phe Ser Asn Phe Thr Ala Ser Thr Glu Ala Gln Val
275 280 285

Lys Gly Leu Ser Thr Gln Gly Gly Asn Val Gly Arg Lys Met Lys Ser
290 295 300

Leu Glu Ser Gln Leu Glu Lys Gln Gln Lys Asp Leu Ser Glu Asp His
305 310 315 320

Ser Ser Leu Leu Leu His Val Lys Gln Phe Val Ser Asp Leu Arg Ser
325 330 335

Leu Ser Cys Gln Met Ala Ala Leu Gln Gly Asn Gly Ser Glu Arg Thr
340 345 350

Cys Cys Pro Val Asn Trp Val Glu His Glu Arg Ser Cys Tyr Trp Phe
355 360 365

Ser Arg Ser Gly Lys Ala Trp Ala Asp Ala Asp Asn Tyr Cys Arg Leu
370 375 380

Glu Asp Ala His Leu Val Val Val Thr Ser Trp Glu Glu Gln Lys Phe
385 390 395 400

Val Gln His His Ile Gly Pro Val Asn Thr Trp Met Gly Leu His Asp
405 410 415

Gln Asn Gly Pro Trp Lys Trp Val Asp Gly Thr Asp Tyr Glu Thr Gly
420 425 430

Phe Lys Asn Trp Arg Pro Glu Gln Pro Asp Asp Trp Tyr Gly His Gly
435 440 445

Leu Gly Gly Gly Glu Asp Cys Ala His Phe Thr Asp Asp Gly Arg Trp
450 455 460

Asn Asp Asp Val Cys Gln Arg Pro Tyr Arg Trp Val Cys Glu Thr Glu
465 470 475 480

Leu Asp Lys Ala Ser Gln Glu Pro Pro Leu Leu

485 490

<210> 131

<211> 1473

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> avi-Fc-cyASGPR H1 stalk CRD

<400> 131

ggcctgaacg atatttttga agcccagaaa atcgaatggc atgaggacaa aactcacaca 60

tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttcct cttccccca 120

aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 180

gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 240

aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 300

ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 360

aaagccctcg gcgcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 420

ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 480

acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 540

cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc 600

ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 660

tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 720

ggtggcggag gggatctgg aggtggcggc tccggaggcg gaggatctgg cggaggcgga 780

tcccaaaacg cccagctgca gcgggagctg cggggcctga gagagacgct cagcaacttc 840

acagcgagca ccgaggccca ggtcaagggc ttgagcaccc agggaggcaa tgtgggaaga 900

aagatgaagt cgctggagtc ccagctggag aaacagcaga aggacttgag tgaagatcac 960

tccagcctgc tgctccacgt gaagcagttc gtgtctgacc tgcggagcct gagctgtcag 1020

atggcggcgc tccagggcaa tggctcggaa agggcctgct gcccagtcaa ctgggtggag 1080

cacgagcgca gctgctactg gttctctcgc tccgggaagg cctgggccga cgccgacaac 1140

tactgccggc tggaggacgc gcacctggtg gtggtcacgt cctgggagga gcagaaattt 1200

gtccagcacc acataggtcc tgtgaacacc tggatgggcc tccacgacca aaacgggccc 1260

tggaagtggg tggacgggac ggactacgag acgggcttca agaactggag accggagcag 1320

ccggacgact ggtacggcca cgggctcggg ggaggggagg actgtgccca cttcaccgac 1380

gacggccgct ggaacgacga cgtctgccag aggccctacc gctgggtctg cgagacagag 1440

ctggacaagg ccagccagga gccacctctc ctt 1473

<210> 132

<211> 491

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> avi-Fc-cyASGPR H1 stalk CRD

<400> 132

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

85 90 95

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

100 105 110

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu

115 120 125

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

130 135 140

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

195 200 205

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

210 215 220

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

225 230 235 240

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

245 250 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Asn Ala Gln Leu Gln Arg Glu Leu Arg Gly

260 265 270

Leu Arg Glu Thr Leu Ser Asn Phe Thr Ala Ser Thr Glu Ala Gln Val

275 280 285

Lys Gly Leu Ser Thr Gln Gly Gly Asn Val Gly Arg Lys Met Lys Ser

290 295 300

Leu Glu Ser Gln Leu Glu Lys Gln Gln Lys Asp Leu Ser Glu Asp His

305 310 315 320

Ser Ser Leu Leu Leu His Val Lys Gln Phe Val Ser Asp Leu Arg Ser

325 330 335

Leu Ser Cys Gln Met Ala Ala Leu Gln Gly Asn Gly Ser Glu Arg Ala

340 345 350

Cys Cys Pro Val Asn Trp Val Glu His Glu Arg Ser Cys Tyr Trp Phe

355 360 365

Ser Arg Ser Gly Lys Ala Trp Ala Asp Ala Asp Asn Tyr Cys Arg Leu

370 375 380

Glu Asp Ala His Leu Val Val Val Thr Ser Trp Glu Glu Gln Lys Phe

385 390 395 400

Val Gln His His Ile Gly Pro Val Asn Thr Trp Met Gly Leu His Asp

405 410 415

Gln Asn Gly Pro Trp Lys Trp Val Asp Gly Thr Asp Tyr Glu Thr Gly

420 425 430

Phe Lys Asn Trp Arg Pro Glu Gln Pro Asp Asp Trp Tyr Gly His Gly

435 440 445

Leu Gly Gly Gly Glu Asp Cys Ala His Phe Thr Asp Asp Gly Arg Trp

450 455 460

Asn Asp Asp Val Cys Gln Arg Pro Tyr Arg Trp Val Cys Glu Thr Glu

465 470 475 480

Leu Asp Lys Ala Ser Gln Glu Pro Pro Leu Leu

485 490

<210> 133

<211> 1434

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> avi-Fc-huCLEC10A stalk CRD

<400> 133

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 60

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 420

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540

gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660

ctctccctgt ctccgggtgg cggaggggga tctggaggtg gcggctccgg aggcggagga 720

tctggcggag gcggatccca gaacagcaag ttccagcggg acctggtcac cctgcggacc 780

gacttcagca acttcaccag caacaccgtg gccgagatcc aggccctgac cagccagggc 840

agcagcctgg aagagacaat cgccagcctg aaggccgagg tggaaggctt caagcaggaa 900

cggcaggccg tccacagcga gatgctgctg cgggtgcagc agctggtgca ggacctgaag 960

aaactgacct gccaggtggc caccctgaac aacaacggcg aggaagctag cactgaaggg 1020

acctgctgtc cggttaattg ggttgaacat caggatagct gctattggtt tagccatagc 1080

ggtatgagct gggcagaagc agaaaaatat tgccagctga aaaatgccca tctggttgtt 1140

attaatagcc gtgaagaaca gaattttgtg cagaaatatc tgggtagcgc atatacctgg 1200

atgggtctga gcgatccgga aggtgcatgg aaatgggttg atggcaccga ttatgcaacc 1260

ggttttcaga attggaaacc gggtcagccg gatgattggc agggtcatgg tctgggtggt 1320

ggtgaagatt gtgcacattt tcatccggat ggtcgttgga atgatgatgt ttgtcagcgt 1380

ccgtatcatt gggtttgtga agcaggtctg ggtcagacca gccaggaaag ccat 1434

<210> 134

<211> 493

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> avi-Fc-huCLEC10A stalk CRD

<400> 134

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

85 90 95

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

100 105 110

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu

115 120 125

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

130 135 140

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

195 200 205

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

210 215 220

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

225 230 235 240

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

245 250 255

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Asn Ser Lys Phe Gln Arg Asp Leu Val Thr

260 265 270

Leu Arg Thr Asp Phe Ser Asn Phe Thr Ser Asn Thr Val Ala Glu Ile

275 280 285

Gln Ala Leu Thr Ser Gln Gly Ser Ser Leu Glu Glu Thr Ile Ala Ser

290 295 300

Leu Lys Ala Glu Val Glu Gly Phe Lys Gln Glu Arg Gln Ala Val His

305 310 315 320

Ser Glu Met Leu Leu Arg Val Gln Gln Leu Val Gln Asp Leu Lys Lys

325 330 335

Leu Thr Cys Gln Val Ala Thr Leu Asn Asn Asn Gly Glu Glu Ala Ser

340 345 350

Thr Glu Gly Thr Cys Cys Pro Val Asn Trp Val Glu His Gln Asp Ser

355 360 365

Cys Tyr Trp Phe Ser His Ser Gly Met Ser Trp Ala Glu Ala Glu Lys

370 375 380

Tyr Cys Gln Leu Lys Asn Ala His Leu Val Val Ile Asn Ser Arg Glu

385 390 395 400

Glu Gln Asn Phe Val Gln Lys Tyr Leu Gly Ser Ala Tyr Thr Trp Met

405 410 415

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

420 425 430

Tyr Ala Thr Gly Phe Gln Asn Trp Lys Pro Gly Gln Pro Asp Asp Trp

435 440 445

Gln Gly His Gly Leu Gly Gly Gly Glu Asp Cys Ala His Phe His Pro

450 455 460

Asp Gly Arg Trp Asn Asp Asp Val Cys Gln Arg Pro Tyr His Trp Val

465 470 475 480

Cys Glu Ala Gly Leu Gly Gln Thr Ser Gln Glu Ser His

485 490

<210> 135

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> leader 1

<400> 135

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 136

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> leader 2

<400> 136

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys

20

<210> 137

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> leader 3

<400> 137

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 138

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160
Leu Arg Ser Lys Glu
165

<210> 139
<211> 165
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> IFNa2a
<400> 139

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

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

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

Leu Arg Ser Lys Glu
165

<210> 140

<211> 82

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DP47-v4-4: pos. 32-34 (nnn): G/D=20, E/V/S=10, A/P/R/L/T/Y=5%;
pos. 35-40 (2x nnn), each: G/Y/S=15, A/D/T/R/P/L/V/N/W/F/I/E
=4,6%; pos. 41-43 (nvn): G/A/Y=20, P/W/S/D/T=8%; pos. 44-46
(ndn): F=46, L/M=15, G/I/Y=8%; pos. 29-31 (mrn): K=70, R=30%

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(41)

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

<220><221> misc_feature

<222> (43)..(44)

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

<220><221> misc_feature

<222> (46)..(46)

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

<400> 140

cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgmr nnnnnnnnnn nvnndngact actggggcca 60

aggaaccctg gtcaccgtct cg 82

<210> 141

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DP47-v4-6: pos. 32-34 (nnn): G/D=20, E/V/S=10, A/P/R/L/T/Y=5%;
pos. 35-46 (4x nnn), each: G/Y/S=15, A/D/T/R/P/L/V/N/W/F/I/E
=4,6%; pos. 47-49 (nvn): G/A/Y=20, P/W/S/D/T=8%; pos. 50-52

(ndn): F=46, L/M=15, G/I/Y=8%; pos. 29-31 (mrn): K=70, R=30%

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(47)

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

<220><221> misc_feature

<222> (49)..(50)

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

<220><221> misc_feature

<222> (52)..(52)

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

<400> 141

cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgmr nnnnnnnnnn nnnnnnnvnn dngactactg 60

gggccaagga accctggtca ccgtctcg 88

<210> 142

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DP47-v4-8: pos. 32-34 (nnn): G/D=20, E/V/S=10, A/P/R/L/T/Y=5%;
pos. 35-52 (6x nnn), each: G/Y/S=15, A/D/T/R/P/L/V/N/W/F/I/E
=4,6%; pos. 53-55 (nvn): G/A/Y=20, P/W/S/D/T=8%; pos. 56-58
(ndn): F=46, L/M=15, G/I/Y=8%; pos. 29-31 (mrn): K=70, R=30%

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(53)

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

<220><221> misc_feature

<222> (55)..(56)

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

<220><221> misc_feature

<222> (58)..(58)

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

<400

> 142

cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgmr nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnvnndnga 60

ctactggggc caaggaaccc tggtcaccgt ctcg 94

<210> 143

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Vl_3_19_L3r_V: pos. 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50: 60% original base
and 40% randomization as M; pos. 33-34, 36-37, 39-40, 42-43,

45-46, 48-49, 51-52: 60% original base and 40% randomization as N

<400> 143

ggacggtcag cttggtccct ccgccgaata cvhvattacc gctactatca cgggagttac 60

agtaatagtc agcctcatct tccgc 85

<210> 144

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Vl_3_19_L3r_HV: pos. 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53: 60% original base and 40% randomization as M; pos. 33-34, 36-37, 39-40, 42-43, 45-46, 48-49, 51-52, 54-55: 60% original base and 40% randomization as N

<400> 144

ggacggtcag cttggtccct ccgccgaata ccmmatgatt accgctacta tcacgggagt 60

tacagtaata gtcagcctca tcttccgc 88

<210> 145

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Vl_3_19_L3r_HLV: pos. 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56: 60% original base and 40% randomization as M; pos. 33-34, 36-37, 39-40, 42-43, 45-46, 48-49, 51-52, 54-55, 57-58: 60% original base and 40% randomization as N

<400> 145

ggacggtcag cttggtccct ccgccgaata crhmvwgatg attaccgcta ctatcacggg 60

agttacagta atagtcagcc tcatcttccg c 91

<210> 146

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LMB3

<400> 146

caggaaacag ctatgaccat gattac 26

<210> 147

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fdseqlong

<400> 147

gacgttagta aatgaatttt ctgtatgagg 30

<210> 148

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RJH80

<400> 148

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcc 28

<210

> 149

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DP47CDR3_ba (mod)

<400> 149

cgcacagtaa tatacggccg tgtcc 25

<210> 150

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR3rev

<400> 150

ggagttacag taatagtcag cctc 24

<210> 151

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR3 rand: pos. 25-27: 50% R, Z; 28-30: 50% D, X; 31-33: 50% I,

X; 34-36: 50% S, X; 37-39: 50% S; X; 40-42: 50% N, X; 43-45: 50%

R, X; 46-48: 50% A, Z; 49-51: 50% V, X; 52-54: 50% R, X; 55-57: 50% N, X. X=2.8% rest (no C); Z=3.1% rest (no S, T, C).

<220><221> misc_feature

<222> (25)..(57)

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

<400> 151

gaggctgact attactgtaa ctccnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnttc 60

ggcggaggga ccaagctgac cgtc 84