



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년04월28일

(11) 등록번호 10-2392142

(24) 등록일자 2022년04월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/54 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01) C07K 14/715 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/36 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/5443 (2013.01)
A61K 38/005 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-7015704(분할)

(22) 출원일자(국제) 2017년10월21일

심사청구일자 2021년06월01일

(85) 번역문제출일자 2021년05월24일

(65) 공개번호 10-2021-0062749

(43) 공개일자 2021년05월31일

(62) 원출원 특허 10-2019-7014404

원출원일자(국제) 2017년10월21일

심사청구일자 2019년05월24일

(86) 국제출원번호 PCT/US2017/057757

(87) 국제공개번호 WO 2018/075989

국제공개일자 2018년04월26일

(30) 우선권주장

62/411,216 2016년10월21일 미국(US)

62/513,964 2017년06월01일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020140020228 A

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 12 항

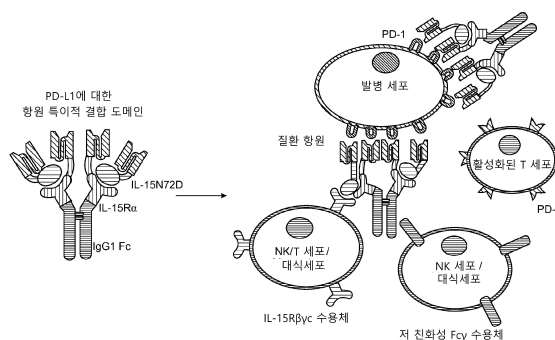
심사관 : 김수진

(54) 발명의 명칭 다량체 IL-15 기반 분자

(57) 요약

본 발명은, IL-15 또는 이의 기능성 변이체를 포함하는 하나의 도메인과, 질환 항원, 면역 관문 분자 또는 신호 전달 분자에 특이적인 결합 도메인을 가지는 다중 특이적 단백질 복합체를 특징으로 한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/3955 (2013.01)
A61P 31/18 (2018.01)
C07K 14/7155 (2013.01)
C07K 16/1045 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/36 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/60 (2013.01)

(72) 발명자

리우 바이

미국 33024 플로리다, 쿠파 씨티, 엔더블유 39티에
 이치 스트리트 9631

수 웬신

미국 33025 플로리다, 램브룩 파인즈, 에스더블유
 12티에이치 스트리트 11917

뉴먼 로비

미국 33025 플로리다, 미라마르, 노스 커머스 파크
 웨이2810

케이지 카렌

미국 33025 플로리다, 미라마르, 노스 커머스 파크
 웨이2810

유 리징

미국 33025 플로리다, 미라마르, 노스 커머스 파크
 웨이 2810

로데 피터

미국 33185 플로리다, 마이애미, 에스더블유 42엔
 디 레인14857

순-시웅 패트릭

미국 90232 캘리포니아, 컬버 시티, 제퍼슨 블러바
 드 9920

(56) 선행기술조사문헌

KR1020180126632 A
 Oncotarget, Vol. 7, No. 13,
 pp.16130-16145(2016.02.18.) 1부.*
 J. Biol. Chem., Vol. 291, No. 46,
 pp.23869-23881(2016. 09. 20.) 1부.*
 US20060263857 A1
 US20090324538 A1
 US20120177595 A1
 US20120177598 A1
 US20120230946 A1
 US20140242025 A1
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

적어도 2개의 가용성 단백질을 포함하는 단리된 가용성 융합 단백질 복합체로서,

제1 가용성 단백질은 N72D 돌연변이를 포함하는 인터루킨-15(IL-15) 폴리펩티드 도메인(IL-15N72D)을 포함하고, 제2 가용성 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인에 융합된 가용성 IL-15 수용체 알파 스시 결합 도메인(IL-15R α Su)을 포함하고,

(i) 상기 제1 가용성 단백질은 서열번호 2이고 상기 제2 가용성 단백질은 서열번호 4이거나, 또는 (ii) 상기 제1 가용성 단백질은 서열번호 6이고 상기 제2 가용성 단백질은 서열번호 8이며,

상기 제1 가용성 단백질의 IL-15 도메인이 상기 제2 가용성 단백질의 IL-15R α Su 도메인과 결합하여 가용성 융합 단백질 복합체를 형성하며, 그리고

상기 제1 가용성 단백질은 IL-15N72D이고, 그리고 상기 제2 가용성 단백질은 항-PD-L1scAb/IL-15R α Su/Fc를 포함하는 것인, 가용성 융합 단백질 복합체.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 제1 가용성 단백질은 서열번호 2 또는 서열번호 6이고, 상기 제2 가용성 단백질은 서열번호 4 또는 서열번호 8인, 가용성 융합 단백질 복합체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 결합 도메인은 폴리펩티드 링커 서열에 의해 면역글로불린 중쇄 가변 도메인에 공유 결합된 면역글로불린 경쇄 가변 도메인을 포함하는 가용성 융합 단백질 복합체.

청구항 5

제1항에 의한 제2 가용성 융합 단백질 복합체에 공유 결합된, 제1항에 의한 제1 가용성 융합 단백질을 포함하는 가용성 융합 단백질 복합체.

청구항 6

제5항에 의한 제1 가용성 단백질을 암호화하는 핵산으로서, 상기 핵산은 서열번호 1, 3, 5 또는 7에 제시된 하나 이상의 서열을 포함하는 핵산.

청구항 7

제1항의 가용성 융합 단백질 복합체를 포함하는, 대상체에서 신생물형성, 감염성 질환 또는 자가면역성 질환과 연관된 세포에 대해 면역 반응을 유도하기 위한 약학 조성물.

청구항 8

제1항의 가용성 융합 단백질 복합체를 포함하는, 신생물형성, 감염성 질환 또는 자가면역성 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이 질환들을 치료하기 위한 것으로, 상기 감염성 질환은 인간 면역결핍증 바이러스(HIV)를 포함하는 약학 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 신생물형성은 교모세포종, 전립선암, 혈액학적 암, B세포 신생물형성, 다발성 골수종, B세포 림프종, B세포 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 피부 T 세포

림프종, T 세포 림프종, 고형 종양, 요로상피/방광 암종, 흑색종, 폐암, 신세포 암종, 유방암, 위 및 식도 암, 전립선암, 췌장암, 결장직장암, 난소암, 비소세포폐암 및 편평세포 두경부 암종으로 이루어진 군으로 부터 선택 되는, 약학 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 신생물형성은 유방암인, 약학 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 신생물형성은 비소세포폐암인, 약학 조성물.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 신생물형성은 췌장암인, 약학 조성물.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 신생물형성은 편평세포 두경부 암종인, 약학 조성물.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 관한 상호 참조

[0002] 본 출원은 미국 가명세서 특허출원 제62/513,964호(2017년 6월 1일 출원) 및 미국 가명세서 특허출원 제 62/411,216호(2016년 10월 21일 출원)의 이익을 주장한다. 상기 출원들의 전체 내용은 전체로서 본원에 참조로 인용되어 있다.

[0003] 본 발명의 분야

[0004] 본 발명은, 일반적으로 다량체 융합 분자 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 종래, 비 특이 면역 활성화와 연관된 부작용이 일어나지 않으면서 다양한 효과기 분자를 질환이 발병한 부위에 표적화하여 치료적 이익을 제공하고자 하는 신규 전략 개발의 필요성이 있어 왔으며, 그러한 필요에 응하여 연구된 것 중의 하나가 IL-15 초효능제(IL-15N72D)와 세포외 IL-15R_{sushi} 도메인(IL-15R_{Su}) 사이의 고친화성 상호작용을 이용하여, 제1 가용성 단백질과 제2 가용성 단백질을 결합한 융합 단백질 복합체를 기능적 스캐폴드(functional scaffold)로 사용하는 것이다. (Journal of Biochemistry Vol. 291, Number 46. pp.23869-23881, 2016. 9. 20 발표)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 적어도 부분적으로, 다중 특이 IL-15 기반 단백질 복합체가, 면역 세포의 자극을 증진시키고, 이 면역 세포의 질환 세포에 대한 활성을 촉진함으로써 질환의 완화 또는 예방을 초래한다는 놀라운 발견을 바탕으로 한다. 이러한 IL-15 기반 단백질 복합체는 또한 질환 항원(disease antigen) 및 표적 항원에 대한 결합의 증가를 보이기도 한다. 본원에는 IL-15 또는 기능성 변이체를 포함하는 하나의 도메인과, 질환 항원, 면역 관문 또는 신호전달 분자에 특이적인 결합 도메인을 가지는 다중 특이적 단백질 복합체가 제공된다. 구체적으로 본원에는, 프로그래밍된 사멸 리간드 1(PD-L1), 프로그래밍된 사멸 1(PD-1), 세포독성 T 림프구 연관 단백질 4(CTLA-

4), 분화 클러스터 47(CD47), TIM-3(T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3; TIM3), 또는 글루코코르티코이드 유도성 종양 괴사 인자 수용체(TNFR) 과 관련 유전자(GITR)를 인지하는 결합 도메인에 융합된 IL-15N72D:IL-15R αSu-Ig Fc 스캐폴드(scaffold)를 포함하는 단백질 복합체가 기술되어 있다. 이 복합체는 IL-15 활성을 통하여 NK 세포 반응 및 T 세포 반응을 유도하고, 나아가 항 PD-L1, PD-1, CTLA-4, CD47, TIM3 또는 GITR 결합 도메인에 의한 면역 관문 봉쇄를 통하여 면역 반응을 증가시킨다(도 1). 몇몇 경우에 있어서, 이 복합체는 또한 질환 세포에 발현되는 항원, 예컨대 PD-L1, 단일 가닥 데옥시리보핵산(ssDNA), CD20, 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2), 표피 성장 인자 수용체(EGFR), CD19, CD38, CD52, 디시알로강글리오사이드(GD2), CD33, Notch1, 세포간 부착 분자 1(ICAM-1), 조직 인자 또는 HIV 외피를 인지하고, Fc 결합 도메인을 통해 질환 세포에 대한 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC) 및 보체 의존적 세포독성(CDC)을 자극한다.

[0007] 적어도 2개의 가용성 단백질을 포함하는, 단리된 가용성 융합 단백질 복합체가 제공된다. 예를 들어 제1 단백질은 인터루킨-15(IL-15) 폴리펩티드, 예컨대 N72D 돌연변이를 포함하는 변이체 IL-15 폴리펩티드(IL-15N72D)를 포함한다. 제2 단백질은 가용성 IL-15 수용체 알파 스시(sushi)-결합 도메인(IL-15R αSu)에 면역글로불린 Fc 도메인이 융합된 것(IL-15R αSu/Fc)을 포함한다. 단리된 가용성 융합 단백질 복합체의 제3 성분은 질환 항원, 면역 관문 분자 또는 신호전달 분자, 예컨대 PD-L1, PD-1, CTLA-4, CD47, TIM3 또는 GITR을 인지하는 결합 도메인을 포함하는데, 다만 이 결합 도메인은 IL-15N72D 단백질 또는 IL-15R αSu/Fc 단백질 중 어느 하나에 융합된다. 몇몇 경우에 있어서, 이러한 결합 도메인은 IL-15N72D 단백질 및 IL-15R αSu/Fc 단백질 둘 다에 융합된다. 다른 경우에 있어서, 이러한 결합 도메인들 중 하나는 IL-15N72D 단백질 또는 IL-15R αSu/Fc 단백질에 결합하고, 제2의 결합 도메인, 즉 면역 관문 분자 또는 신호전달 분자 또는 질환 항원에 특이적인 결합 도메인은 또 다른 단백질에 융합된다. 일 양태에서, 질환 항원은 신생물형성, 또는 자가면역성 질환과 연관되어 있다. 몇몇 경우에 있어서, 제1 가용성 단백질 또는 제2 가용성 단백질은 질환 세포상에 발현되는 질환 항원, 예컨대 PD-L1, ssDNA, CD20, HER2, EGFR, CD19, CD38, CD52, GD2, CD33, Notch1, 세포간 부착 분자 1(ICAM-1), 조직 인자 또는 HIV 외피 또는 기타 공지의 항원을 인지하는 결합 도메인을 추가로 포함한다. 대안적으로 IL-15N72D 단백질 또는 IL-15R αSu/Fc 단백질 중 어느 하나는 질환 항원, 면역 관문 분자 또는 신호전달 분자에 특이적인 결합 도메인을 포함하고, 또 다른 단백질(IL-15R αSu/Fc 또는 IL-15N72D 단백질 각각)은 융합된 추가의 결합 도메인을 포함하지 않는다. 제1 단백질의 IL-15N72D 도메인은 제2 단백질의 가용성 IL-15R αSu 도메인과 결합하여, 가용성 융합 단백질 복합체를 형성한다. 예시적 융합 단백질 복합체는 IL-15N72D 및/또는 IL-15R αSu/Fc 융합 단백질에 공유 결합된 항 PD-L1 항체를 포함한다(도 1 및 도 2). 대안적으로 제1 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인에 융합된 가용성 IL-15 수용체 알파 스시 결합 도메인(IL-15R αSu)에 공유 결합된 항 PD-L1 항체를 포함하는 반면에, 제2 단백질은 N72D 돌연변이를 포함하는 변이체 인터루킨-15(IL-15) 폴리펩티드(IL-15N72D)와 공유 결합된 질환 항원을 인지하는 결합 도메인을 포함한다.

[0008] 몇몇 경우에 있어서, 결합 도메인은 단일 사슬 항체(scAb 또는 scFv)를 포함하는데, 이 경우 면역글로불린 경쇄 가변 도메인은 폴리펩티드 링커 서열에 의해 면역글로불린 중쇄 가변 도메인에 공유 결합되어 있다. 대안적으로 결합 도메인은 면역 관문 억제제 또는 면역 효현제로서의 역할을 할 수 있는 가용성 또는 세포 외 리간드나 수용체 도메인을 포함한다.

[0009] 예시적 제1 단백질은 서열 번호 2, 6, 10, 18, 20, 24, 28, 32 또는 38에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 예시적 제2 단백질은 서열 번호 4, 8, 12, 14, 16, 22, 26, 30, 34, 36, 40, 42, 44, 46, 51, 52, 53 또는 54에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 제1 단백질을 암호화하는 예시적 핵산 서열은 서열 번호 1, 5, 9, 17, 19, 23, 27, 31 또는 37에 제시된 서열을 포함한다. 제2 단백질을 암호화하는 예시적 핵산 서열은 서열 번호 3, 7, 11, 13, 15, 21, 25, 29, 33, 35, 39, 41, 43, 45, 47, 48, 49 또는 50에 제시된 서열을 포함한다. 일 양태에서, 핵산 서열(들)은 융합 단백질을 암호화하는 서열에 작동가능하도록 결합된 리더 서열, 번역 개시 신호 및 촉진인자를 추가로 포함한다. 본원에 기술된 핵산 서열을 포함하는 DNA 벡터(들)도 또한 제공된다. 예를 들어 핵산 서열은 복제용 벡터, 발현용 벡터, 아니면 이들 벡터 둘 다의 내부에 있다.

[0010] 제2 가용성 융합 단백질 복합체에 공유 결합된 제1 가용성 융합 단백질 복합체를 포함하는 가용성 융합 단백질 복합체도 또한 제공된다. 예를 들어 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체는 다량체화, 예컨대 이량체화, 삼량체화되거나, 또는 다중 복합체화된다(예컨대 4 복합체 형성, 5 복합체 형성 등). 예를 들어 다량체는 동중다량체 또는 이중다량체이다. 가용성 융합 단백질 복합체는 공유 결합, 예컨대 이황화 결합 형성 화학 가교제에 의해 연결된다. 몇몇 경우들에서, 하나의 가용성 융합 단백질은 이황화 결합에 의해 또 다른 가용성 융합 단백질에 공유 결합되고, 그 결과 제1 가용성 단백질의 Fc 도메인과 제2 가용성 단백질의 Fc 도메인이 연결된다.

[0011] Fc 도메인 또는 이의 기능성 단편은, IgG Fc 도메인, 인간 IgG1 Fc 도메인, 인간 IgG2 Fc 도메인, 인간 IgG3

Fc 도메인, 인간 IgG4 Fc 도메인, IgA Fc 도메인, IgD Fc 도메인, IgE Fc 도메인 및 IgM Fc 도메인; 마우스 IgG2A 도메인; 또는 이것들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 Fc 도메인을 포함한다. 선택적으로 Fc 도메인은 변경된 보체 또는 Fc 수용체 결합 특성 또는 변경된 이량체화 또는 당화 프로필을 보이는 Fc 도메인을 초래하는 아미노산 변화를 포함한다. 변경된 보체 또는 Fc 수용체 결합 특성 또는 변경된 이량체화 또는 당화 프로필을 보이는 Fc 도메인을 제조하기 위한 아미노산 변화는 당 분야에 공지되어 있다. 예를 들어 IgG1 CH2의 234번 및 235번 위치 루신 잔기들(번호매김은 항체 공통 서열을 기반으로 함)(즉 ... P E L L G G ...)의, 알라닌 잔기들(즉 ... P E A A G G ...)로의 치환은 Fc 감마 수용체 결합능의 상실을 초래하는 한편, IgG1 CH2의 322번 위치 리신 잔기(번호매김은 항체 공통 서열을 기반으로 함)(즉 ... K C K S L ...)의, 알라닌 잔기(즉 ... K C A S L ...)로의 치환은 보체 활성화 능력의 상실을 초래한다. 몇몇 예들에서, 이러한 돌연변이는 조합되어 발생한다.

[0012] 몇몇 양태들에서, 결합 도메인은 폴리펩티드 링커 서열에 의해 IL-15 폴리펩티드(또는 이의 기능성 단편)에 공유 결합된다. 이와 유사하게, 결합 도메인은 폴리펩티드 링커 서열에 의해 IL-15R α 폴리펩티드(또는 이의 기능성 단편)에 공유 결합된다. 선택적으로 IL-15R α 폴리펩티드(또는 이의 기능성 단편)는 폴리펩티드 링커 서열에 의해 Fc 도메인(또는 이의 기능성 단편)에 공유 결합된다. 각각의 폴리펩티드 링커 서열은 독립적으로 선택될 수 있다. 선택적으로 폴리펩티드 링커 서열은 동일하다. 대안적으로 폴리펩티드 링커 서열은 상이하다.

[0013] 선택적으로 가용성 융합 단백질 중 적어도 하나가 검출 가능한 표지를 포함하는, 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체가 제공된다. 검출 가능한 표지로서는 바이오틴, 스트렙타비딘, 효소 또는 이의 촉매 활성 단편, 방사성 핵종, 나노입자, 상자성 금속 이온 또는 형광 분자, 인광 분자 또는 화학발광 분자, 아니면 이것들의 임의의 조합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 몇몇 양태들에서, 제1 가용성 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 서열 번호 1, 5, 9, 17, 19, 23, 27, 31 또는 37 중 하나에 제시된 서열을 포함한다. 몇몇 구현예에서, 제2 가용성 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 서열 번호 3, 7, 11, 13, 15, 21, 25, 29, 33, 35, 39, 41, 43, 45, 47, 48, 49 또는 50 중 하나에 제시된 서열을 포함한다.

[0015] 몇몇 구현예에서, 핵산 서열은 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, 48, 49 또는 50을 포함한다.

[0016] 본 핵산 서열은 가용성 단백질을 암호화하는 서열에 작동가능하도록 결합된 리더 서열, 번역 개시 신호 및 촉진 인자를 추가로 포함한다.

[0017] 다른 구현예에서, 펩티드는 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, 51, 52, 53 또는 54를 포함한다.

[0018] 본 발명은 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체를 제조하기 위한 방법을 제공한다. 이 방법은, a) 적당한 제어 서열을 가져 제1 단백질을 암호화하는 DNA 벡터를 제1 숙주 세포에 도입하는 단계; b) 세포 또는 배지 중 제1 단백질이 발현되기 충분한 조건 하에서 제1 숙주 세포를 배지 중에서 배양하는 단계; c) 숙주 세포나 배지로부터 제1 단백질을 정제하는 단계; d) 적당한 제어 서열을 가져 제2 단백질을 암호화하는 DNA 벡터를 제2 숙주 세포에 도입하는 단계; e) 세포 또는 배지 중 제2 단백질이 발현되기 충분한 조건 하에서 제2 숙주 세포를 배지 중에서 배양하는 단계; f) 숙주 세포 또는 배지로부터 제2 단백질을 정제하는 단계, 그리고 g) 제1 단백질의 IL-15 도메인과, 제2 단백질의 가용성 IL-15R α 도메인 사이의 결합을 허용하여 가용성 융합 단백질 복합체 형성을 달성하기 충분한 조건 하에서 제1 단백질과 제2 단백질을 혼합하는 단계를 포함한다.

[0019] 몇몇 경우들에 있어서, 본 방법은 발현 벡터로부터 발현되는 폴리펩티드들 간에 이황화 결합의 형성을 허용하기 충분한 조건 하에서 제1 단백질과 제2 단백질을 혼합하는 단계를 추가로 포함한다.

[0020] 대안적으로, 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체를 제조하기 위한 방법은, a) 적당한 제어 서열을 가져 제1 단백질을 암호화하는 DNA 벡터와, 적당한 제어 서열을 가져 제2 단백질을 암호화하는 DNA 벡터를 숙주 세포에 도입하는 단계; b) 단백질을 세포나 배지에서 발현시키고, 제1 단백질의 IL-15 도메인과 제2 단백질의 가용성 IL-15R α 도메인 간 결합을 허용하여, 가용성 융합 단백질 복합체의 형성을 달성하기 충분한 조건 하에 숙주 세포를 배지 중에서 배양하는 단계; 및 c) 숙주 세포나 배지로부터 가용성 융합 단백질 복합체를 정제하는 단계에 의해 수행된다.

[0021] 일 양태에서, 본 방법은 발현 벡터로부터 발현된 폴리펩티드들 간 이황화 결합의 형성을 허용하기에 충분한 조

건 하에 제1 단백질과 제2 단백질을 혼합하는 단계를 추가로 포함한다.

- [0022] 가용성 융합 단백질 복합체를 제조하기 위한 방법으로서, a) 적당한 제어 서열을 가져 제1 단백질 및 제2 단백질을 암호화하는 DNA 벡터를 숙주 세포에 도입하는 단계; b) 단백질을 세포나 배지에서 발현시키고, 제1 단백질의 IL-15 도메인과 제2 단백질의 가용성 IL-15R α 도메인 간 결합을 허용하여, 가용성 융합 단백질 복합체의 형성을 달성하고, 폴리펩티드들 간 이황화 결합 형성을 허용하기 충분한 조건 하에 숙주 세포를 배지 중에서 배양하는 단계; 및 c) 숙주 세포나 배지로부터 가용성 융합 단백질 복합체를 정제하는 단계를 포함하는 방법도 또한 제공된다.
- [0023] 선택적으로 본 방법은, 발현 벡터로부터 발현된 폴리펩티드들 간 이황화 결합의 형성을 허용하기에 충분한 조건 하에 제1 단백질과 제2 단백질을 혼합하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0024] 신생물형성, 감염성 질환 또는 자가면역성 질환을, 이 질환들의 치료를 필요로 하는 대상체에서 치료하기 위한 방법은, 본원에 기술된 가용성 융합 단백질 복합체, 예컨대 가용성 항 PD-L1 scAb/IL-15N72D:항 PD-L1 scAb/IL-15R α Su/Fc 융합 단백질 복합체를 포함하는 약학 조성물 유효량을 대상체에 투여하여, 신생물형성, 감염성 질환 또는 자가면역성 질환을 치료함으로써 수행된다. 예를 들어 고형 악성종양 또는 혈액학적 악성종양의 치료를 필요로 하는 대상체 내에서 이 고형 악성종양 또는 혈액학적 악성종양을 치료하기 위한 방법은, 가용성 항 인간 PD-L1 scAb/huIL-15N72D:항 인간 PD-L1 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 융합 단백질 복합체를 포함하는 약학 조성물 유효량을 대상체에 투여하여, 이 악성종양을 치료함으로써 수행된다. 예시적 항 인간 PD-L1 scAb/huIL-15N72D 단백질은 서열 번호 2 및 6에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 예시적 항 인간 PD-L1 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 단백질은 서열 번호 4 및 8에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0025] 본원에 기술된 방법으로 치료하는데 적합한 신생물형성은, 교모세포종, 전립선암, 급성 골수성 백혈병, B 세포 신생물형성, 다발성 골수종, B 세포 림프종, B 세포 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 피부 T 세포 림프종, T 세포 림프종, 고형 종양, 요로상피/방광 암종, 흑색종, 폐암, 신세포 암종, 유방암, 위 및 식도 암, 두경부암, 전립선암, 췌장암, 결장직장암, 난소암, 비 소세포 폐 암종 및 편평 세포 두경부 암종을 포함한다.
- [0026] 본원에 기술된 방법을 사용하여 치료될 예시적 감염으로서 인간 면역결핍증 바이러스(HIV) 감염이 있다. 예시적 핵산 서열은 서열 번호 47, 48, 49 또는 50을 포함한다. 예시적 아미노산 서열은 서열 번호 51, 52, 53 또는 54를 포함한다. 본원에 기술된 방법은 또한 세균 감염(예컨대 그람 양성 또는 그람 음성 세균 감염)을 치료하는데 유용하다(Oleksiewicz et al. 2012. Arch Biochem Biophys. 526:124-31). 본원에 기술된 방법을 사용하여 치료될 예시적 자가면역성 질환으로서 B 세포에 의해 매개되는 자가면역성 질환이 있다. 이러한 자가면역성 질환으로서 류머티즘성 관절염, 다발성 경화증, 특발성 혈소판감소증, IgM 매개 말초신경병증, VIII 인자 결핍증, 전신홍반성루푸스, 쇼그렌 증후군, 염증성 근염, 심장성천포창, 지속적수염, ANCA 연관 혈관염, 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증, 자가면역성 빈혈, 진성적혈구무형성증, 혈전성혈소판감소성자반(TTP), 특발성 혈소판감소성자반(ITP), 에반증후군, 혈관염(예컨대 육아종증다발혈관염, 구 베게너증), 수포성 피부 장애(예컨대 천포창, 유천포창), 제1형 진성당뇨병, 항 NMDA 수용체 뇌염, 데비병, 그레이브스 안구병증, 자가면역성 췌장염, 안구간대경련-근간대경련 증후군(OMS) 및 IgG4 관련 질환을 포함한다.
- [0027] 융합 단백질 복합체를 포함하는 약학 조성물이 유효량만큼 투여된다. 예를 들어 약학 조성물의 유효량은 약 1 μ g/kg 내지 약 100 μ g/kg, 예컨대 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100 μ g/kg이다. 대안적으로 TxM은 고정 용량으로 투여되거나, 체표면적을 기반으로(즉 1 m² 당) 투여된다.
- [0028] 융합 단백질 복합체를 포함하는 약학 조성물은 1개월에 적어도 1회 투여되는데, 예컨대 1 개월에 2회, 1 주일에 1회, 1 주일에 2회, 1 일 1회, 1 일 2회, 8 시간 마다, 4 시간 마다, 2 시간 마다 또는 매시간 투여된다. 본 약학 조성물에 적합한 투여 방식은 전신 투여, 정맥내 투여, 국소 투여, 피하 투여, 근육내 투여, 종양내 투여, 흡입 및 복막내 투여를 포함한다.
- [0029] 바람직하게 본 융합 단백질 복합체는 인터페론 감마(IFN- γ)의 혈청 중 수준을 상승시키고/상승시키거나, CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 및 NK 세포가 대상체 내 발병 세포 또는 종양 세포를 사멸시키도록 자극한다.
- [0030] 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체에 관한 임의의 양태들에서, IL-15 폴리펩티드는 원산(native) IL-15 폴리펩티드의 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 가지는 IL-15 변이체이다. 인간 IL-15 폴리펩티드는 본원에

서 huIL-15, hIL-15, huIL15, hIL15, IL-15 야생형(wt)이라 지칭되고, 이의 변이체는 원산 아미노산, 성숙 서열 중 이의 위치 및 변이체 아미노산을 이용하여 지칭된다. 예를 들어 huIL15N72D는, 72번 위치에 N → D의 치환을 포함하는 인간 IL-15를 지칭한다. 일 양태에서, IL-15 변이체는, 예컨대 원산 IL-15 폴리펩티드의 IL-15/IL-2β γC 수용체(IL-15R)와의 결합 활성보다 증가한, IL-15/IL-2β γC 수용체와의 결합 활성으로 입증되는 바와 같이, IL-15 효현제로서의 역할을 한다. 대안적으로 IL-15 변이체는, 예컨대 원산 IL-15 폴리펩티드의 IL-15R과의 결합 활성보다 감소한, IL-15R과의 결합 활성으로 입증되는 바와 같이, IL-15 길항제로서의 역할을 한다.

[0031] 표적 세포를 사멸하기 위한 방법은, a) 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체를 다수의 세포와 접촉시키는 단계 [다만 이 다수의 세포는 IL-15 도메인에 의해 인지되는 IL-15R 사슬을 보유하는 면역 세포, 또는 관문 억제제 또는 면역 효현제 결합 도메인에 의해 조정되는 관문 또는 신호전달 분자를 보유하는 면역 세포, 그리고 표적 질환 세포를 추가로 포함함]; b) IL-15R 또는 신호전달 분자나, 관문 분자의 봉쇄를 통하여 면역 세포를 활성화하는 단계; 그리고 c) 활성화된 면역 세포에 의해 표적 질환 세포를 사멸하는 단계에 의해 수행된다. 예를 들어 표적 질환 세포는 종양 세포, 자가면역 세포 또는 바이러스 감염 세포이다. 몇몇 경우에 있어서, 결합 도메인은 항 PD-L1 항체를 포함한다.

[0032] 표적 세포를 사멸하기 위한 방법은 a) 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체와 다수의 세포를 접촉시키는 단계 [다만 이 다수의 세포는 Fc 도메인에 의해 인지되는 Fc 수용체 사슬을 보유하는 면역 세포와, 항원 특이적 scAb와 같은 결합 도메인에 의해 인지되는 항원을 보유하는 표적 질환 세포를 추가로 포함함]; b) 면역 세포에 결합하여 이를 활성화하기에 충분한, 표적 질환 세포상 항원 및 면역 세포상 Fc 수용체 사슬 간의 특이적 결합 복합체(가교)를 형성하는 단계; 그리고 c) 결합되어 활성화된 면역 세포에 의해 표적 질환 세포를 사멸하는 단계를 추가로 포함한다. 예를 들어 표적 질환 세포는 종양 세포, 자가면역 세포 또는 바이러스 감염 세포이다. 몇몇 경우에 있어서, 결합 도메인은 항 PD-L1 항체를 포함한다.

[0033] 환자에서 질환을 예방 또는 치료하기 위한 방법도 또한 제공되는데, 이 방법은 a) 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체를 환자에 투여하는 단계; b) 환자에서 면역 세포를 활성화하는 단계; 그리고 c) 환자에서 질환을 예방 또는 치료하기 충분하게 활성화된 면역 세포를 통해 질환 세포를 손상 또는 사멸시키는 단계를 포함한다.

[0034] 본 발명은 또한 환자(발병된 세포)에서 질환을 예방 또는 치료하기 위한 방법을 제공하는데, 이 방법은 a) IL-15R 사슬, 또는 관문 또는 신호전달 분자를 보유하는 면역 세포를, 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체와 혼합하는 단계; b) 이 면역 세포를 활성화하는 단계; c) 환자에게 이 활성화된 면역 세포를 투여하는 단계; 그리고 d) 환자에서 질환을 예방 또는 치료하기 충분하게 활성화된 면역 세포를 통하여 질환 세포를 손상 또는 사멸시키는 단계를 포함한다.

[0035] 본 발명의 융합 단백질 복합체 투여는 대상체 내에서 면역 반응을 유도한다. 예를 들어 본 발명의 융합 단백질 복합체 투여는 신생물형성, 감염성 질환 또는 자가면역성 질환과 연관된 세포에 대해 면역 반응을 유도한다. 일 양태에서, 본 발명의 융합 단백질 복합체는 면역 세포 증식을 증가시킨다.

[0036] 본 발명은 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체 유효량을 포유동물에 투여함으로써 포유동물 내에서 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명의 임의의 구현예의 가용성 융합 단백질 복합체 유효량만큼 포유동물에 투여함으로써, 포유동물 내 면역 반응을 억제하는 방법을 제공한다.

[0037] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어와 과학 용어는 본 발명이 속한 분야의 당 업자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 가진다. 이하 참고문헌들은 본 발명에 사용된 다수의 용어에 관한 일반적인 정의와 함께 기술 하나를 제공한다: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); 및 Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). 본원에 사용된 바와 같은 하기 용어들은 달리 명시되지 않는 한 이 용어들에 부여된 하기 의미들을 가진다.

[0038] "제제"란, 펩티드, 핵산 분자 또는 소형 화합물을 의미한다.

[0039] "TxM"이란, 결합 도메인에 결합된 IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc 스캐폴드를 포함하는 복합체를 의미한다(도 2). 예시적 TxM은, PD-L1을 특이적으로 인지하는 결합 도메인에 대한 융합체를 포함하는 IL-15N72D:IL-15R α Su 복합체(PD-L1 TxM)이다.

[0040] "완화하다"란, 질환의 발달 또는 진행을 늦추거나, 억제하거나, 경감시키거나, 감소시키거나, 정지시키거나 또

는 안정화하는 것을 의미한다.

- [0041] "유사체"란, 동일하지는 않지만 유사한 기능상 특징 또는 구조상 특징을 가지는 분자를 의미한다. 예를 들어 폴리펩티드 유사체는, 이 유사체의 기능을 자연 발생 폴리펩티드의 기능에 비하여 증진시키는 임의의 생화학적 변형을 가지면서, 이 유사체에 상응하는 자연 발생 폴리펩티드의 생물 활성도 보유한다. 이러한 생화학적 변형은, 예를 들어 리간드 결합능을 변경시키지 않으면서, 유사체의 프로테아제 내성, 막 투과성 또는 반감기를 증가시킬 수 있었다. 유사체는 비 자연 발생 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0042] "결합 도메인"이란 용어는, 당 분야에 공지된 항체, 단일 사슬 항체, Fab, Fv, T 세포 수용체 결합 도메인, 리간드 결합 도메인, 수용체 결합 도메인 또는 기타 항원 특이적 폴리펩티드를 포함하도록 의도된다.
- [0043] 본 발명은 어떤 항체 또는 항체의 단편이 원하는 생물 활성을 보이는 한, 이 항체 또는 항체의 단편을 포함한다. 키메라 항체, 예컨대 인간화 항체도 또한 본 발명에 포함된다. 일반적으로 인간화 항체는, 인간이 아닌 공급원으로부터 유래한 아미노산 잔기 하나 이상이 도입되어 있다. 인간화는, 예를 들어 당 분야에 기술된 방법을 이용하여 인간 항체의 상보성 결정 영역을, 이에 상응하는 설치류의 상보성 결정 영역 최소한의 부분으로 치환함으로써 수행될 수 있다.
- [0044] "항체" 또는 "면역글로불린"이란 용어는, 폴리클로날 항체와 모노클로날 항체 둘 다를 포함하도록 의도된다. 바람직한 항체는 항원과 반응성인 모노클로날 항체이다. "항체"란 용어는 또한, 항원과 반응성인 항체 하나 초과만큼의 혼합물(예컨대 항원과 반응성인 상이한 유형들의 모노클로날 항체 콕테일)을 포함한다. "항체"란 용어는, 전 항체, 이의 생물 기능성 단편, 단일 사슬 항체, 그리고 유전자 변경된 항체, 예컨대 하나를 초과하는 종으로부터 유래하는 부분들을 포함하는 키메라 항체, 이기능성 항체, 항체 접합체, 인간화 항체 및 인간 항체를 포함하도록 또한 의도된다. 추가로 사용될 수도 있는 생물 기능성 항체 단편으로서의 항원과의 결합에 충분한 항체 유래 펩티드 단편이 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "항체"는, 관심 에피토프, 항원 또는 항원 단편과 결합할 수 있는 전체 항체뿐만 아니라, 임의의 항체 단편(예컨대 $F(ab')_2$, Fab', Fab, Fv)을 포함하는 의미이다.
- [0045] 어떤 분자"에 결합하는"이란, 해당 분자에 대하여 물리화학적 친화성을 가지는 것을 의미한다.
- [0046] "검출하다"란, 검출될 피분석물의 존재, 부재 또는 그 양을 동정하는 것을 의미한다.
- [0047] "질환"이란, 세포, 조직 또는 장기의 정상 기능을 손상시키거나 방해하는 임의의 병태나 장애를 의미한다. 질환의 예로서는 신생물형성, 자가면역성 질환 및 바이러스 감염을 포함한다.
- [0048] 제제 또는 제제 성분의 "유효량"및 "치료적 유효량"이란 용어는, 해당 제제 또는 성분이 단독으로 또는 조합하여 원하는 효과를 제공하기 충분한 양을 의미한다. 예를 들어 "유효량"이란, 치료전인 환자에 있어서 어떤 질환의 증상들에 비해 해당 질환의 증상을 완화하는데 필요한, 화합물 단독의 양 또는 다른 성분과 합한 양을 의미한다. 어떤 질환의 치료적 처치를 위하여 본 발명을 수행하는데 사용되는 활성 화합물(들)의 유효량은, 투여 방식, 대상체의 나이, 체중 및 전반적 건강 상태에 따라 달라진다. 궁극적으로 참여 전문의나 수의사가 적당한 양과 투여 계획을 결정할 것이다. 이러한 양은 "유효"량이라 지칭된다.
- [0049] "단편"이란, 폴리펩티드 또는 핵산 분자의 일부를 의미한다. 이 일부는, 바람직하게 기준 핵산 분자 또는 폴리펩티드의 전체 길이의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%를 함유한다. 예를 들어 단편은 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000 개의 뉴클레오티드 또는 아미노산을 함유할 수 있다. 그러나, 본 발명은 또한 폴리펩티드 및 핵산 단편이 각각 전장 폴리펩티드 및 핵산의 원하는 생물 활성을 보이는 한, 이 폴리펩티드 및 핵산 단편도 포함한다. 거의 모든 길이를 가지는 핵산 단편이 사용된다. 예를 들어 총 길이가 약 10,000, 약 5,000, 약 3,000, 약 2,000, 약 1,000, 약 500, 약 200, 약 100, 약 50 개 염기쌍(이 중간 길이도 모두 포함)인 예시적 폴리뉴클레오티드 분절이 본 발명의 다수의 실시예에 포함된다. 이와 유사하게, 거의 모든 길이를 가지는 폴리펩티드 단편이 사용된다. 예를 들어 총 길이가 약 10,000, 약 5,000, 약 3,000, 약 2,000, 약 1,000, 약 500, 약 200, 약 100 또는 약 50 개 아미노산(이 중간 길이도 모두 포함)인 예시적 폴리펩티드 분절이 본 발명의 다수의 실시예에 포함된다.
- [0050] "단리된", "정제된" 또는 "생물학적으로 순수한"이란 용어는, 어떤 물질이 자체의 원산 상태로서 발견될 때 보통 수반되는 성분들로부터 다양한 정도로 벗어난 상태를 지칭한다. "단리하다"란, 원래의 공급원이나 주위환경으로부터 어느 정도 분리되는 것을 나타낸다. "정제하다"란, 단리시보다 더 높은 정도로 분리되는 것을 나타낸

다.

- [0051] "정제된" 또는 "생물학적으로 순수한" 단백질은, 어떠한 불순물도 해당 단백질의 생물 특성에 거의 영향을 미치지 않거나 여타의 부정적인 결과를 초래하지 않도록 다른 물질로부터 충분히 벗어나 있다. 즉 만일 본 발명의 핵산이나 펩티드가 재조합 DNA 기술에 의해 생산되었을 때 세포성 물질, 바이러스 물질 또는 배양 배지를 실질적으로 포함하지 않거나, 또는 만일 화학적으로 합성되었을 때 화학 전구체 또는 기타 화학물질을 실질적으로 포함하지 않는다면 해당 핵산이나 펩티드는 정제된 것이다. 순도와 균질성은 통상 분석 화학 기술, 예컨대 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피가 사용되어 측정된다. "정제된"이란 용어는, 전기영동 겔에서 핵산이나 단백질이 본질적으로 하나의 밴드를 보일 때를 가리킬 수 있다. 변형, 예를 들어 인산화 또는 당화가 일어날 수 있는 단백질의 경우, 상이한 변형은 별도로 정제될 수 있는 상이한 단리 단백질들을 생성할 수 있다.
- [0052] 이와 유사하게 "실질적으로 순수한"이란, 어떤 뉴클레오티드나 폴리펩티드가, 자연에서 이 뉴클레오티드나 폴리펩티드와 함께 발생하는 성분들로부터 분리된 경우를 의미한다. 통상적으로 뉴클레오티드 및 폴리펩티드가, 자연에서 이것과 결합되어 존재하는 단백질 및 자연 발생 유기 분자로부터 적어도 60 중량%, 70 중량%, 80 중량%, 90 중량%, 95 중량% 또는 심지어 99% 중량% 분리되어 있다면, 해당 뉴클레오티드 및 폴리펩티드는 실질적으로 순수한 것이다.
- [0053] "단리된 핵산"이란, 어떤 핵산의 기원이 된 유기체의 자연 발생 게놈 내 이 핵산에 측접하는 유전자로부터 벗어난 핵산을 의미한다. 이 용어는, 예를 들어 (a) 자연 발생 게놈 DNA 분자의 일부이긴 하지만, 유기체 게놈 내 자연 발생되는 DNA 분자의 해당 일부와 측접하는 핵산 서열이 양쪽으로 측접되어 있지 않은 DNA; (b) 생성될 분자가 임의의 자연 발생 벡터 또는 게놈 DNA와 동일하지 않게 되는 방식으로 원핵생물 또는 진핵생물 게놈 DNA 내 또는 벡터 내에 통합된 핵산; (c) 별도의 분자, 예컨대 cDNA, 게놈 단편, 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 생성된 단편, 또는 제한 단편; 그리고 (d) 하이브리드 유전자, 즉 융합 단백질을 암호화하는 유전자의 일부인 재조합 뉴클레오티드 서열을 아우른다. 본 발명에 따른 단리 핵산 분자는 합성에 의해 생산된 분자뿐만 아니라, 화학적으로 변경되었고/변경되었거나 변형 골격을 가지는 임의의 핵산들을 추가로 포함한다. 예를 들어 단리된 핵산은 정제 cDNA 또는 RNA 폴리뉴클레오티드이다. 단리된 핵산 분자는 또한 전령 리보핵산(mRNA) 분자를 포함하기도 한다.
- [0054] "단리된 폴리펩티드"란, 자연에서 함께 발생하는 성분들로부터 분리된 본 발명의 폴리펩티드를 의미한다. 통상적으로 본 폴리펩티드는, 그것이 자연에서 결합하고 있는 단백질 및 자연 발생 유기 분자로부터 적어도 60 중량% 벗어났을 때 단리된 것이다. 바람직하게 본 제제는 본 발명의 폴리펩티드 적어도 75 중량%, 더욱 바람직하게는 적어도 90 중량%, 그리고 가장 바람직하게는 적어도 99 중량%이다. 본 발명의 단리된 폴리펩티드는, 예를 들어 자연 공급원으로부터의 추출, 이러한 폴리펩티드를 암호화하는 재조합 핵산의 발현, 또는 단백질의 화학 합성에 의해 획득될 수 있다. 순도는 적당한 임의의 방법, 예를 들어 컬럼 크로마토그래피, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 HPLC 분석에 의해 측정될 수 있다.
- [0055] "마커"란, 어떤 질환이나 장애와 연관된 발현 수준 또는 활성이 변경된 임의의 단백질 또는 폴리뉴클레오티드를 의미한다.
- [0056] "신생물형성"이란, 과도한 증식 또는 감소한 세포자멸에 의해 특징지어지는 질환이나 장애를 의미한다. 본 발명이 사용될 수 있는 예시적 신생물형성으로서는 백혈병(예컨대 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 골수아구성 백혈병, 급성 전골수성 백혈병, 급성 골수단핵구성 백혈병, 급성 단핵구성 백혈병, 급성 적백혈병, 만성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병), 진성 다혈구증, 림프종(호지킨 질환, 비호지킨 질환), 발덴스트롬 매크로гло불린혈증, 증쇄병 및 고형 종양, 예컨대 육종 및 암종(예컨대 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골원성 육종, 척색종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피모세포종, 활막종, 증피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 평평세포암종, 기저세포 암종, 선암종, 한선암종, 피지선암종, 유두갑상선암종, 유두갑상선선암종, 낭샘암종, 수질암종, 기관지원성암종, 신세포암종, 간세포암, 담관암종, 용모막암종, 정상피종, 태생성암종, 빌름 종양, 자궁경부암, 자궁암, 고환암, 폐암종, 소세포 폐암종, 방광 암종, 상피암종, 신경교종, 다형성신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 상의세포종, 송과체부종양, 혈관모세포종, 청신경종, 핏지교종, 신경초종, 뇌수막종, 흑색종, 신경아세포종 및 망막모세포종)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 특정 구현예들에서, 신생물형성은 다발성 골수종, 베타 세포 림프종, 요로상피/방광 암종 또는 흑색종이다. 본원에 사용된 바와 같이 "제제를 획득하는 것"에서와 같이 "수득하는 것"은, 해당 제제를 합성, 구매 또는 취득하는 것을 포함한다.

- [0057] "감소하다"란, 적어도 5%, 10%, 25%, 50%, 75% 또는 100%만큼의 "-"변경을 의미한다.
- [0058] "기준"이란, 표준 또는 대조군인 조건을 의미한다.
- [0059] "기준 서열"은, 서열 비교의 기초로서 사용되는 한정된 서열이다. 기준 서열은 지정 서열의 종속 서열 또는 전체 서열일 수 있는데; 예를 들어 전장 cDNA 또는 유전자 서열의 분절, 또는 전체 cDNA 또는 유전자 서열일 수 있다. 폴리펩티드에 있어서, 기준 폴리펩티드 서열의 길이는, 일반적으로 적어도 약 16개 아미노산, 바람직하게 적어도 약 20개 아미노산, 더욱 바람직하게 적어도 약 25개 아미노산, 그리고 더욱더 바람직하게 약 35개 아미노산, 약 50개 아미노산, 또는 약 100개 아미노산일 것이다. 핵산에 있어서, 기준 핵산 서열의 길이는, 일반적으로 적어도 약 50개 뉴클레오티드, 바람직하게 적어도 약 60개 뉴클레오티드, 더욱 바람직하게 적어도 약 75개 뉴클레오티드, 그리고 더욱더 바람직하게 약 100개 뉴클레오티드 또는 약 300개 뉴클레오티드, 또는 이 범위 정돈이나 이 범위 사이의 임의의 정수만큼의 개수의 뉴클레오티드일 것이다.
- [0060] "특이적으로 결합하다"란, 어떤 화합물 또는 항체가 본 발명의 폴리펩티드를 인지하고 이에 결합하되, 자연에서 본 발명의 폴리펩티드를 포함하는 시료(예컨대 생물 시료) 중 다른 분자는 실질적으로 인지하지 않고 결합하지 않는 경우를 의미한다.
- [0061] 본 발명의 방법에 유용한 핵산 분자는 본 발명의 폴리펩티드 또는 이의 단편을 암호화하는 임의의 핵산 분자를 포함한다. 이러한 핵산 분자는 내부 핵산 서열과 100% 동일할 필요는 없지만, 통상 실질적인 동일성을 보일 것이다. 내부 서열과의 "실질적 동일성"을 가지는 폴리뉴클레오티드는, 통상 이중 가닥 핵산 분자의 적어도 한 가닥과 잡종화될 수 있다. 본 발명의 방법에 유용한 핵산 분자는 본 발명의 폴리펩티드 또는 이의 단편을 암호화하는 임의의 핵산 분자를 포함한다. 이러한 핵산 분자는 내부 핵산 서열과 100% 동일할 필요는 없지만, 통상 실질적인 동일성을 보일 것이다. 내부 서열과 "실질적 동일성"을 가지는 폴리뉴클레오티드는, 통상 이중 가닥 핵산 분자의 적어도 한 가닥과 잡종화될 수 있다. "잡종화하다"란, 다양한 엄중도 조건(stringency condition) 하에 쌍을 이루어 상보성 폴리뉴클레오티드 서열들(예컨대 본원에 기술된 유전자) 또는 이의 일부들 간에 이중 가닥 분자를 형성하는 경우를 의미한다. 예를 들어 문헌(Wahl, G. M. and S. L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399; Kimmel, A. R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507)을 참조한다.
- [0062] 예를 들어 엄중한 염 농도는 보통 약 750 mM 미만 NaCl 및 약 75 mM 미만의 시트르산삼나트륨, 바람직하게 약 500 mM 미만 NaCl 및 약 50 mM 미만의 시트르산삼나트륨, 그리고 더욱 바람직하게 약 250 mM 미만 NaCl 및 약 25 mM 미만의 시트르산삼나트륨일 것이다. 저 엄중도 잡종화는 유기 용매, 예컨대 포름아미드의 부재하에 이루어질 수 있는 반면, 고 엄중도 잡종화는 적어도 약 35%의 포름아미드, 더욱 바람직하게는 적어도 약 50%의 포름아미드의 존재 하에 이루어질 수 있다. 엄중한 온도 조건은 보통 적어도 약 30℃, 더욱 바람직하게는 적어도 약 37℃, 그리고 가장 바람직하게는 적어도 약 42℃의 온도를 포함할 것이다. 추가의 가변적 매개변수, 예컨대 잡종화 시간, 세제(예컨대 도데실황산나트륨(SDS)) 농도, 그리고 운반체 DNA의 포함 또는 배제는 당 업자들에게 널리 공지되어 있다. 다양한 엄중도 수준은 필요에 따라 다양한 조건들을 조합함으로써 달성된다. 바람직한 구현예에서, 잡종화는 30℃ 및 750 mM NaCl, 75 mM 시트르산삼나트륨 및 1% SDS 중에서 일어날 것이다. 더욱 바람직한 구현예에서, 잡종화는 37℃ 및 500 mM NaCl, 50 mM 시트르산삼나트륨 및 1% SDS, 35% 포름아미드 및 100 μ g/ml 변성 연어 정자 DNA(ssDNA) 중에서 일어날 것이다. 가장 바람직한 구현예에서, 잡종화는 42℃ 및 250 mM NaCl, 25 mM 시트르산삼나트륨 및 1% SDS, 50% 포름아미드 및 200 μ g/ml ssDNA 중에서 일어날 것이다. 이러한 조건들에 있어서 유용한 변동은 당 업자들이 용이하게 알 것이다.
- [0063] 대부분의 응용에 있어서, 잡종화에 뒤이어 행해지는 세척 단계도 또한 엄중도가 다양할 것이다. 세척 엄중도 조건은 염의 농도와 온도에 의해 한정될 수 있다. 상기와 같이 세척 엄중도는, 염 농도를 낮추거나 온도를 높임으로써 증가할 수 있다. 예를 들어 세척 단계에 있어 엄중한 염 농도는, 바람직하게 약 30 mM 미만의 NaCl 및 약 3 mM 미만의 시트르산삼나트륨이고, 가장 바람직하게는 약 15 mM 미만의 NaCl 및 약 1.5 mM 미만의 시트르산삼나트륨일 것이다. 세척 단계에 있어 엄중한 온도 조건은, 보통 적어도 약 25℃, 더욱 바람직하게 적어도 약 42℃, 더욱더 바람직하게는 적어도 약 68℃를 포함할 것이다. 바람직한 구현예에서, 세척 단계는 25℃ 및 30 mM NaCl, 3 mM 시트르산삼나트륨 및 0.1% SDS 중에서 진행될 것이다. 더욱 바람직한 구현예에서, 세척 단계는 42℃ 및 15 mM NaCl, 1.5 mM 시트르산삼나트륨 및 0.1% SDS 중에서 진행될 것이다. 더욱 바람직한 구현예에서, 세척 단계는 68℃ 및 15 mM NaCl, 1.5 mM 시트르산삼나트륨 및 0.1% SDS 중에서 진행될 것이다. 이러한 조건에 대한 추가의 변동은 당 업자들이 용이하게 알 것이다. 잡종화 기술은 당 업자들에게 널리 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌(Benton and Davis (*Science* 196:180, 1977); Grunstein and Hogness (*Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 72:3961, 1975); Ausubel et al. (*Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York,

2001); Berger and Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York); and Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)에 기술되어 있다.

- [0064] "실질적으로 동일한"이란, 어떤 폴리펩티드 또는 핵산 분자가 기준 아미노산 서열(예를 들어 본원에 기술된 아미노산 서열들 중 임의의 하나) 또는 핵산 서열(예를 들어 본원에 기술된 핵산 서열들 중 임의의 하나)에 대해 적어도 50%의 동일성을 보이는 경우를 의미한다. 바람직하게 이러한 서열은 비교에 사용된 서열과 아미노산 수준 또는 핵산 수준에서 적어도 60%, 더욱 바람직하게는 80% 또는 85%, 더욱더 바람직하게는 90%, 95% 또는 심지어 99% 동일하다.
- [0065] 서열 동일성은, 통상적으로 서열 분석 소프트웨어(예를 들어 Sequencher(Gene Codes Corporation, 775 Technology Drive, Ann Arbor, MI); Vector NTI(Life Technologies, 3175 Staley Rd. Grand Island, NY)가 사용되어 측정된다. 이러한 소프트웨어는 다양한 치환, 결실 및/또는 기타 변형에 상동성의 정도를 할당함으로써 동일하거나 유사한 서열을 매칭시킨다. 보존적 치환은, 통상적으로 하기 군들, 즉 글리신, 알라닌; 발린, 이소루신, 루신; 아스파르트산, 글루탐산, 아스파라긴, 글루타민; 세린, 트레오닌; 리신, 아르기닌; 및 페닐알라닌, 티로신 내에서의 치환을 포함한다. 동일성의 정도를 측정하기 위한 예시적 접근법에 있어서, BLAST 프로그램이 사용될 수 있는데, 이 프로그램에서 확률 스코어 e^{-3} 내지 e^{-100} 이라 함은, 두 서열이 관련성이 매우 큰 서열임을 나타낸다.
- [0066] "대상체"란, 포유동물, 예컨대 인간 또는 인간 이외의 포유동물, 예컨대 소, 말, 개, 양 또는 고양이(이에 한정되는 것은 아님)를 의미한다. 대상체는, 바람직하게 B 세포 림프종 또는 이에 대한 소인의 치료를 필요로 하는 포유동물로서, 예를 들어 B 세포 림프종이라 진단되었거나 이에 대한 소인이 있는 것으로 진단된 대상체이다. 포유동물은 임의의 포유동물, 예컨대 인간, 영장류, 마우스, 래트, 개, 고양이, 말뿐만 아니라, 식용으로 기른 가축이나 동물, 예컨대 송아지, 양, 돼지, 닭 및 염소이다. 바람직한 구현예에서, 포유동물은 인간이다.
- [0067] 본원에 제공된 범위들은 해당 범위 내의 모든 값들에 대한 약칭인 것으로 이해된다. 예를 들어 "1 내지 50의 범위"는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50으로 이루어진 군에 속하는 임의의 수, 수들의 조합 또는 이 범위의 중속 범위를 포함하는 것으로 이해된다.
- [0068] 본원에 사용된 바와 같은 "치료하는 것" 및 "치료"란 용어는, 어떤 제제(agent)나 제제(formulation)를, 불리한 병태, 장애 또는 질환이 걸린 개체로서, 임상 증상을 보이는 개체에 투여하여, 해당 증상의 중증도 및/또는 발생 빈도의 감소, 해당 증상 및/또는 이 증상의 기저 원인의 제거, 그리고/또는 손상의 개선 또는 교정의 가속화를 달성하는 것을 지칭한다. 어떤 장애나 병태를 치료하는 것은 해당 장애, 병태 또는 이러한 장애나 병태와 연관된 증상이 완전히 없어져야 하는 것은 아니지만, 그렇다고 이처럼 해당 장애, 병태 또는 이러한 장애나 병태와 연관된 증상이 완전히 없어져서는 안 될 것까지는 없음이 이해될 것이다.
- [0069] "예방하는 것" 및 "예방"이란 용어는, 특정의 불리한 병태, 장애 또는 질환에 취약하거나 이미 소인이 있는 임상 무증상 개체에 제제 또는 조성물을 투여하는 것을 지칭하므로, 증상의 발생 및/또는 해당 증상의 기저 원인을 예방하는 것에 관한 것이다.
- [0070] 달리 특별히 진술되거나, 내용으로부터 명백하지 않다면, 본원에 사용된 바와 같은 "또는"이란 용어는, 포괄적인 것으로 이해된다. 특별히 달리 진술되거나, 내용으로부터 명백하지 않다면, 본원에 사용된 바와 같은 "하나", "하나의" 및 "본"이란 용어는 단수 또는 복수를 나타내는 것으로 이해된다.
- [0071] 특별히 진술되거나, 내용으로부터 명백하지 않다면, 본원에 사용된 바와 같은 "약"이란 용어는, 당 분야에서 보통 관용되는 범위 내, 예를 들어 평균의 2 표준 편차 내에 속하는 것으로 이해된다. "약"은 진술된 값의 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05% 또는 0.01% 이내인 것으로 이해될 수 있다. 내용으로부터 분명하지 않다면, 본원에 제공된 모든 수치 값은 용어 "약"에 의해 수식된다.
- [0072] 본원의 변인에 관한 임의의 정의에 있어서 화학기의 나열에 대한 설명은 해당 변인의 정의를, 임의의 단일 군 또는 나열된 군들의 조합으로서 포함한다. 본원의 변인 또는 양태에 대한 한 구현예의 설명은, 해당 구현예를 임의의 구현예 하나로서, 또는 또 다른 임의의 구현예들이나 이미 일부와의 조합으로서 포함한다.
- [0073] 본원에 제공된 임의의 조성물 또는 방법은, 본원에 제공된 방법 및 기타 조성물들 중 임의의 것 하나 이상과 조합될 수 있다.

[0074] "~를 포함하는(including)", "~를 함유하는" 또는 "~에 의해 특징지어지는"과 밀접한 전이적 용어 "~를 포함하는(comprising)"은 포괄적이거나 개방적인 용어로서, 언급되지 않은 추가의 요소나 방법의 단계들을 배제하지 않는다. 이와는 대조적으로, 전이적 어구 "~으로 이루어진"은, 청구항에 지정되지 않은 임의의 요소, 단계 또는 성분을 배제한다. 전이적 어구 "본질적으로 ~으로 이루어진"은, 지정된 물질이나 단계에 대한 특허청구범위와, 청구된 발명의 "기본적이고 신규한 특징(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 물질이나 단계"를 한정하는 어구이다.

[0075] 본 발명의 기타 특징 및 이점은 이하 본 발명의 바람직한 구현예들에 관한 설명과, 특허청구범위로부터 명백할 것이다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어와 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 의해 보통 이해되는 바와 동일한 의미를 가진다. 비록 본원에 기술된 방법 및 물질과 유사하거나 균등한 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적합한 방법과 물질이 이하에 기술되어 있다. 본원에 인용된 공개 외국 특허 및 특허출원 모두는 본원에 참조로 인용되어 있다.

[0076] 본원에 언급된 승인 번호에 의해 표시되는 GenBank 및 NCBI 제출에 관한 사항은 본원에 참조로 인용되어 있다. 본원에 언급된 기타 공표된 모든 참고문헌, 서류, 논문 및 과학 문헌은 본원에 참조로 인용되어 있다. 상충될 경우, 용어의 정의를 포함하는 본 발명의 설명이 이를 조정할 것이다. 또한 물질, 방법 및 실시에는 오로지 예시적인 것일뿐, 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0077] 도 1은, 항 PD-L1 scAb/huIL-15N72D 및 항 PD-L1 scAb/huIL-15R α Su/Fc 융합 단백질을 포함하는 PD-L1 TxM 복합체의 활성과, PD-L1 항원을 발현하는 질환 세포에 대한 이 복합체의 면역 매개 효과를 보여주는 개략적 도해이다.

도 2는, 면역 관문 분자, 면역 신호전달 분자 및/또는 질환 항원을 인지하는 결합 도메인에 융합된, IL-15/IL-15R α Su/Fc 스캐폴드를 포함하는 상이한 TxM 복합체들을 보여주는 개략적 도해이다.

도 3은, 이황화 결합 환원을 거친 TxM 복합체의 황산도데실나트륨 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 분석 결과를 보여주는 사진이다. 우측 레인: PD-L1 TxM; 좌측 레인: 마커.

도 4a는, 인간 IL-15 및 인간 IgG에 특이적인 항체에 대한, 항 인간 PD-L1 TxM 복합체의 결합 활성을 보여주는 선 그래프이다. 도 4b는, 인간 IL-15 및 인간 IgG에 특이적인 항체에 대한, 제2의 항 인간 PD-L1 TxM 복합체의 결합 활성을 보여주는 선 그래프이다. 도 4c는, 인간 IL-15 및 마우스 IgG에 특이적인 항체에 대한, 항 마우스 PD-L1 TxM 복합체의 결합 활성을 보여주는 선 그래프이다.

도 5a는, PD-L1 보유 인간 MB231 종양 세포에 대한, PD-L1 TxM 복합체의 결합 활성을 보여주는 선 그래프이다. 도 5b는, 인간 MB231 종양 세포 상에 발현되는 PD-L1에 대한, PD-L1 TxM 복합체의 차단 활성을 보여주는 선 그래프이다. 도 5c는, PD-L1 보유 인간 MB231 종양 세포에 대한, PD-L1 TxM 복합체의 결합 활성을 보여주는 선 그래프이다.

도 6a는, 마우스 5T33P 종양 세포 상에 발현되는 PD-L1에 대한, PD-L1 TxM 복합체의 차단 활성을 보여주는 선 그래프이다. 도 6b는, 마우스 MB491uc 종양 세포 상에 발현되는 PD-L1에 대한, PD-L1 TxM 복합체의 차단 활성을 보여주는 선 그래프이다.

도 7a 및 도 7b는, 마우스 A20 종양 세포 상에 발현되는 PD-L1에 대한, 항 PD-L1 Ab의 차단 활성 및 PD-L1 TxM 복합체의 차단 활성을 비교하는 선 그래프이다.

도 8은 PD-L1 TxM 복합체에 의해 매개되는 IL-15 의존적 32Dβ 세포의 증식을 보여주는 선 그래프이다.

도 9a는 "4두형(4 headed)" 및 "2두형(2 headed)" PD-L1 TxM 복합체를 보여주는 개략적 도해이다. 도 9b는 이황화 결합 환원을 거친 4두형 및 2두형 마우스 특이적 PD-L1 TxM 복합체의 SDS-PAGE 분석 결과를 보여주는 사진이다. 도 9c 및 도 9d는, 분석용 크기별 배제 컬럼상에서 용리된 이후의 2두형 및 4두형 마우스 특이적 PD-L1 TxM 복합체 각각의 크로마토그래피 프로필을 나타내는 선 그래프를 보여주는 것으로서, 단백질 응집체로부터 TxM 복합체가 분리되었음을 입증한다.

도 10a는 IL-2Rβ γ 보유 32Dβ 세포에 대한, 2두형 및 4두형 마우스 특이적 PD-L1 TxM 복합체의 결합 활성을 보여주는 선 그래프이다. 도 10b 및 도 10c는, 5T33P 골수종 세포 상에 발현되는 PD-L1에 대한, 2두형 및 4두형 마우스 특이적 PD-L1 TxM 복합체의 차단 활성을 입증하는 선 그래프를 보여주는 것이다.

도 11a는, ALT-803(IL-15N72D:IL-15R α /Fc 복합체)에 의해 매개되는 IL-15 의존적 32D β 세포의 증식과 비교되는, 2두형 마우스 특이적 PD-L1 TxM 복합체에 의해 매개되는 IL-15 의존적 32D β 세포의 증식을 보여주는 선 그래프이다. 도 11b는, ALT-803에 의해 매개되는 IL-15 의존적 32D β 세포의 증식과 비교되는, 4두형 마우스 특이적 PD-L1 TxM 복합체에 의해 매개되는 IL-15 의존적 32D β 세포의 증식을 보여주는 선 그래프이다.

도 12a는, 이황화 결함 환원을 거친 2두형 및 4두형 인간 특이적 PD-L1 TxM 복합체의 SDS-PAGE 분석 결과를 보여주는 사진이다. 도 12b 및 도 12c는, 분석용 크기별 배제 컬럼상에서 용리된 이후의 2두형 및 4두형 인간 특이적 PD-L1 TxM 복합체 각각의 크로마토그래피 프로필을 나타내는 선 그래프를 보여주는 것으로서, 단백질 응집체로부터 TxM 복합체가 분리되었음을 입증한다.

도 13은, PC-3 인간 전립선 암 세포 상에 발현되는 PD-L1에 대한, 2두형 및 4두형 인간 특이적 PD-L1 TxM 복합체의 차단 활성을 보여주는 선 그래프이다.

도 14a는, ALT-803에 의해 매개되는 IL-15 의존적 32D β 세포의 증식과 비교되는, 2두형 인간 특이적 PD-L1 TxM 복합체에 의해 매개되는 IL-15 의존적 32D β 세포의 증식을 보여주는 선 그래프이다. 도 14b는, ALT-803에 의해 매개되는 IL-15 의존적 32D β 세포의 증식과 비교되는, 4두형 인간 특이적 PD-L1 TxM 복합체에 의해 매개되는 IL-15 의존적 32D β 세포의 증식을 보여주는 선 그래프이다.

도 15a는, PBS, ALT-803, 4두형 마우스 특이적 PD-L1 TxM(T4M-mPD-L1) 및 2두형 마우스 특이적 PD-L1 TxM(T2M-mPD-L1)으로 처리된 마우스의 비장 중량을 보여주는 막대 도표이다. 도 15b 및 도 15c는 PBS, ALT-803, 4두형 마우스 특이적 PD-L1 TxM(T4M-mPD-L1) 및 2두형 마우스 특이적 PD-L1 TxM(T2M-mPD-L1)으로 처리된 마우스의 비장 및 림프절 각각에 있어서 상이한 면역 세포 서브세트의 백분율을 나타내는 막대 도표를 보여주는 것이다.

도 16은, PD-L1 TxM, 항 PD-L1 Ab 또는 ALT-803에 의해 유도된, 5T33 골수종 세포에 대한 면역 세포의 세포독성을 나타내는 막대 도표이다.

도 17은, 항 인간 PD-L1 Ab, 2두형 인간 특이적 PD-L1 TxM(T4M-mPD-L1) 또는 4두형 인간 특이적 PD-L1 TxM(T2M-mPD-L1)에 의해 유도되는, PD-L1 양성 SW1990 인간 췌장 암 세포에 대한 인간 면역 세포의 세포독성을, 배지 단독에 의해 유도되는, PD-L1 양성 SW1990 인간 췌장 암 세포에 대한 인간 면역 세포의 세포독성과 비교하여 나타내는 막대 도표이다.

도 18은, PD-L1 TxM 복합체, ALT-803, ALT-803 및 항 PD-L1 Ab, 또는 PBS 처리 후 5T33 골수종 종양을 보유한 마우스의 생존률을 나타내는 선 그래프이다.

도 19는, 2H PD-L1 TxM 복합체, ALT-803, ALT-803 및 항 PD-L1 Ab, 또는 PBS 처리 후 동소성 MB491luc 방광 종양을 보유한 마우스의 생존률을 나타내는 선 그래프이다.

도 20은, 분석용 크기별 배제 컬럼상에서 용리된 이후 정제된 상이한 TxM 단백질의 크로마토그래피 프로필을 나타내는 선 그래프로써, 단백질 응집체로부터 TxM 복합체가 분리되었음을 입증한다.

도 21a는 마우스 림프구 상에 발현되는 CTLA-4에 대한, CTLA-4 TxM 복합체의 차단 활성을 보여주는 선 그래프이다. 도 21b는 인간 림프구 상에 발현되는 CTLA-4에 대한, CTLA-4 TxM 복합체의 차단 활성을 보여주는 선 그래프이다.

도 22a는 마우스 5T33P 종양 세포 상에 발현되는 PD-L1에 대한, PD-L1/CTLA-4 TxM 복합체의 차단 활성을 보여주는 선 그래프이다. 도 22b는 마우스 림프구 상에 발현되는 CTLA-4에 대한, PD-L1/CTLA-4 TxM 복합체의 차단 활성을 보여주는 선 그래프이다.

도 23a는 CD47 보유 마우스 B16F10 흑색종 종양 세포에 대한, CD47 TxM 복합체의 결함 활성을 보여주는 선 그래프이다. 도 23b는, CD47 보유 인간 Jurkat T 세포에 대한, CD47 TxM 복합체의 결함 활성을 보여주는 선 그래프이다.

도 24a는, 단일 가닥 DNA에 대한 TNT scAb TxM 복합체의 결함 활성을 나타내는 선 그래프이다. 도 24b는, 단일 가닥 DNA에 대한 TNT scAb/항 PD-L1 scAb TxM 복합체의 결함 활성을 나타내는 선 그래프이다.

도 25a는 투과처리된 인간 MB231 유방암 세포에 대한, TNT scAb TxM, TNT scAb/항 PD-L1 scAb TxM 및 2두형 항 PD-L1 scAb TxM 복합체의 결함 활성을 보여주는 선 그래프이다. 도 25b는, 투과처리된 인간 A549 폐암 세포에 대한, TNT scAb TxM, TNT scAb/항 PD-L1 scAb TxM 및 2두형 항 PD-L1 scAb TxM 복합체의 결함 활성을 보여주는

선 그래프이다.

도 26은 인간 TF 양성-PD-L1 양성 SW1990 인간 췌장암 세포에 대한, 2두형 hOAT scAb TxM, 항 인간 PD-L1 scAb/hOAT scAb TxM, 2두형 항 인간 PD-L1 scAb TxM 복합체 및 Hoat와, 항 인간 PD-L1 대조군 Ab의 결합 활성을 보여주는 선 그래프이다.

도 27a는, 인간 IL-15 및 인간 IgG에 특이적인 항체에 대한 LFA-1 TxM 복합체의 결합 활성을 보여주는 선 그래프이다. 도 27b는 ICAM-1에 대한 LFA-1 TxM 복합체의 결합 활성을 보여주는 막대 그래프이다.

도 28은 인간 IL-15 및 인간 IgG에 특이적인 항체에 대한, Notch1 특이적 TxM 복합체의 결합 활성을 보여주는 선 그래프이다.

도 29는 인간 IL-15 및 인간 IgG에 특이적인 항체에 대한, 항 인간 TIM3 scAb TxM 복합체의 결합 활성을 보여주는 선 그래프이다.

도 30a 및 도 30b는 인간 IL-15 및 인간 IgG에 특이적인 항체에 대한, HIV 특이적 bNAb scFv TxM 복합체의 결합 활성을 보여주는 선 그래프이다. 도 30c 내지 도 30f는 HIV 외피 단백질에 대한, HIV 특이적 bNAb TxM 복합체의 결합 활성을 보여주는 선 그래프를 보여주는 것이다.

도 31은 2두형 hOAT scAb TxM 또는 hOAT 대조군 Ab에 의해 유도되는, 인간 TF 양성 SW1990 인간 췌장암 세포에 대한 인간 면역 세포의 세포독성을, 배지 단독에 의해 유도되는, 인간 TF 양성 SW1990 인간 췌장암 세포에 대한 인간 면역 세포의 세포독성과 비교하여 나타내는 막대 도표이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0078] 본 발명은 최소한 부분적으로 다중 특이적 IL-15 기반 단백질 복합체가 면역 세포의 활성을 증진시키고, 질환 세포에 대한 이 면역 세포의 활성을 촉진함으로써, 질환의 완화 또는 예방을 초래한다는 놀라운 발견에 바탕을 두고 있다. 이러한 단백질 복합체는 또한 질환 항원 및 표적 항원에 대한 증가한 결합을 보이기도 한다. 본원에는 IL-15 또는 기능성 변이체를 포함하는 하나의 도메인과, 질환 특이적 결합 도메인, 면역 관문 억제제 또는 면역 효현제를 포함하는 결합 도메인을 가지는 다중 특이적 단백질 복합체가 제공된다. 이러한 단백질 복합체는 대상체 내 신생물형성, 감염성 질환 또는 자가면역 질환을 치료하기 위한 방법에 사용된다. 구체적으로 이하에 상세히 기술된 바와 같이, 가용성 항 PD-L1 scAb/huIL-15N72D:항 PD-L1 scAb/huIL-15R αSu/huIgG1 Fc 복합체 ("PD-L1 TxM")는 면역 세포를 자극하여 종양 표적 세포를 사멸시키도록 하였다(도 1). 그러므로 본원에는 PD-L1 TxM을 특징으로 하는 조성물과, 신생물형성(예컨대 고형 종양 및 혈액학적 종양)에 대한 면역 반응을 증진시키기 위해 이러한 조성물을 사용하는 방법이 제공된다.

[0079] 본원에는 기술된 바와 같이, 숙주 면역 인지 및 면역 반응에 대해 발병 세포를 표적화하는 능력을 가지는 단백질을 사용하는 것은, 암, 감염성 질환 및 자가면역성 질환을 치료하는데 유효한 전략이다. 미국 특허 제8,507,222호(본원에 참조로 인용됨)에 기술된 바와 같이, IL-15 및 IL-15 수용체 α 도메인을 포함하는 단백질 스캐폴드는 질환 세포상 항원과 면역 세포상 수용체를 인지할 수 있는 다중 특이적 단백질을 제조하는데 사용되었다. 미국 특허 제8,507,222호의 실시예 15를 참조한다. 본원에는 면역 관문 분자 또는 신호전달 분자를 인지하는 결합 도메인 하나 이상에 결합된, IL-15 및 IL-15 수용체 α를 포함하는 가용성 다중 특이적 단백질 복합체의 제조에 대해 기술되어 있다. 몇몇 경우에 있어서, 이러한 복합체는 또한 질환 세포에 발현되는 항원, 예컨대 PD-L1, ssDNA, CD20, HER2, EGFR, CD19, CD38, CD52, GD2, CD33, Notch1, 세포간 부착 분자 1(ICAM-1), 조직 인자, HIV 외피, 또는 기타 종양 항원을 인지하는 결합 도메인도 포함한다.

[0080] 몇몇 경우에 있어서, 결합 도메인은 면역글로불린 경쇄 가변 도메인이 폴리펩티드 링커 서열에 의해 면역글로불린 중쇄 가변 도메인에 공유 결합되어 있는 단일 사슬 항체를 포함한다. 단일 사슬 항체 도메인은 VH-링커-VL 형태 또는 VL-링커-VH 형태 중 어느 하나의 형태로 정렬될 수 있다. 대안적으로 결합 도메인은 면역 관문 억제제 또는 면역 효현제로서 작용할 수 있는 가용성 또는 세포의 리간드 또는 수용체 도메인을 포함한다. 면역 관문 분자 또는 신호전달 분자를 인지하는 결합 도메인은 결합 활성이 유지되는 한, 추가의 링커 서열을 통하거나, 아니면 이 추가의 링커 서열 없이 IL-15 또는 IL-15 수용체 α 단백질의 N-말단 또는 C-말단 중 어느 하나와 결합한다. 바람직하게 결합 도메인은 인간 IL-15N72D 강력 효현제(superagonist) 단백질(huIL-15N72D)의 N-말단에 결합되어 있다. 대안적으로 결합 도메인은 인간 IL-15N72D 단백질의 C-말단에 결합되어 있다. 바람직하게 결합 도메인은 인간 IL-15 수용체 α 스시 도메인(huIL-15R αSu)의 N-말단에 결합되어 있다. 대안적으로 결합 도메인은 huIL-15R αSuFc 단백질의 C-말단에 결합되어 있다. 몇몇 경우, 본 발명의 다중 특이적

단백질 복합체는 면역 세포 상 CD16 수용체의 인지 및 단백질 이량체화를 위한 IgG Fc 도메인을 추가로 포함한다. 이러한 도메인은 표적 세포에 대하여 항체 의존적 세포성 세포독성(ADCC), 항체 의존적 세포성 식세포작용(ADCP) 및 보체 의존적 세포독성(CDC)의 자극을 매개한다. 몇몇 예에 있어서, 증진 또는 감소한 CD16 결합 활성을 가지는 Fc 도메인을 사용하는 것이 유용하다. 일 양태에서, Fc 도메인은, ADCC 활성은 감소시키지만, 이항화 결합 이량체를 형성하는 능력은 보유하게 하는, 아미노산 치환 L234A 및 L235A(LALA)(번호는 Fc 공통 서열을 바탕으로 함)를 함유한다.

[0081] 인터루킨-15

[0082] 인터루킨-15(IL-15)는 효과기 NK 세포와 CD8⁺ 기억 T 세포의 발달, 증식 및 활성화에 중요한 시토카인이다. IL-15는 IL-15 수용체 α(IL-15Rα)에 결합한 후, 이를 경유하여(in trans) 효과기 세포 상 IL-2/IL-15 수용체 β-공통 γ 사슬(IL-15Rβ γ_c) 복합체에 제시된다. IL-15 및 IL-2는 둘 다 IL-15Rβ γ_c와 결합하고, STAT3 및 STAT5 경로를 통해 신호를 전달한다. 그러나 IL-2와는 달리, IL-15는 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 조절 T(Treg) 세포의 유지를 지원하지 않거나, 또는 활성화된 CD8⁺ T 세포의 세포 사멸을 유도하지 않기 때문에, 이러한 특성들은 다발성 골수종에 대한 IL-2의 치료 활성을 제한할 수 있다. 뿐만 아니라 IL-15는 항 세포사멸 신호를 효과기 CD8⁺ T 세포에 제공하는 것으로 알려진 유일한 시토카인이다. 단독으로 투여되거나 또는 IL-15Rα와의 복합체로서 투여된 IL-15는 실험 동물 모델에서 잘 확립된 고형 종양에 강력한 항종양 활성을 보이므로, 잠재적으로 암을 치료할 수 있었던 면역치료 약물로서 가장 촉망받는 것들 중 하나인 것으로 확인되었다.

[0083] IL-15 기반 암 치료제의 임상 개발을 가속화하기 위하여, IL-15에 비해 생물 활성이 증가한 IL-15 돌연변이체(IL-15N72D)가 동정되었다(Zhu et al., J Immunol, 183: 3598-3607, 2009). 이 IL-15 강력 효현제(IL-15N72D)의 약동학적 특성과 생물 활성은 IL-15N72D:IL-15Rα/Fc 융합 복합체(ALT-803)를 만듦으로써 더욱 향상되었으며, 그 결과 강력 효현성 복합체는 생체 내에서 원산 시토카인의 활성보다 적어도 25배 큰 활성을 갖게 되었다(Han et al., Cytokine, 56: 804-810, 2011).

[0084] 면역 관문 억제제 및 면역 효현성 도메인

[0085] 다른 구현예에서, 결합 도메인은 면역 관문 분자나 신호전달 분자, 또는 이의 리간드에 특이적이며, 면역 관문 억제 활성의 억제제 또는 면역 자극 활성의 효현제로서 작용을 한다. 이러한 면역 관문 분자 및 신호전달 분자, 그리고 리간드로서는 PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, CD28, CD80, CD86, B7-H3, B7-H4, B7-H5, ICOS-L, ICOS, BTLA, CD137L, CD137, HVEM, KIR, 4-1BB, OX40L, CD70, CD27, CD47, CIS, OX40, GITR, IDO, TIM3, GAL9, VISTA, CD155, TIGIT, LIGHT, LAIR-1, Siglecs 및 A2aR을 포함한다(Pardoll DM. 2012. Nature Rev Cancer 12:252-264, Thaventhiran T, et al. 2012. J Clin Cell Immunol S12:004). 또한, 본 발명의 바람직한 항체 도메인은 이필리무맙 및/또는 트레멜리무맙(항 CTLA4), 니볼루맙, 펌브롤리주맙, 피딜리주맙, TSR-042, ANB011, AMP-514 및 AMP-224(리간드-Fc 융합체)(항 PD1), 아테졸리주맙(MPDL3280A), 아벨루맙(MSB0010718C), 더발루맙(MEDI4736), MEDI0680 및 BMS-9365569(항 PDL1), MEDI6469(항 OX40 효현제), BMS-986016, IMP701, IMP731, IMP321(항 LAG3) 및 GITR 리간드를 포함할 수 있다.

[0086] 항원 특이적 결합 도메인

[0087] 항원 특이적 결합 도메인은 발병 세포상 표적들과 특이적으로 결합하는 폴리펩티드들로 이루어져 있다. 대안적으로 이러한 도메인은 병상(diseased state)을 지원하는 기타 세포상 표적, 예컨대 종양의 성장을 지원하는 기질 세포상 표적 또는 질환 매개성 면역억제를 지원하는 면역세포상 표적에 결합할 수 있다. 항원 특이적 결합 도메인은 당 분야에 공지된 항체, 단일 사슬 항체, Fab, Fv, T 세포 수용체 결합 도메인, 리간드 결합 도메인, 수용체 결합 도메인, 도메인 항체, 단일 도메인 항체, 미니바디, 나노바디, 펩티바디 또는 기타 다양한 항체 모의체(예컨대 아피머, 아피틴, 알파바디, 아트리머, CTLA4 기반 분자, 아드넥틴, 안티칼린, Kunitz 도메인 기반 단백질, 아비머, 노틴, 파이노머, 다르핀, 아피바디, 아필린, 모노바디 및 아르마딜로 반복 단백질 기반 단백질(Weidle, UH, et al. 2013. Cancer Genomics & Proteomics 10: 155-168))을 포함한다.

[0088] 임의의 구현예들에서, 항원 특이적 결합 도메인에 대한 항원은 세포 표면 수용체 또는 리간드를 포함한다. 추가의 구현예에서, 항원은 CD 항원, 시토카인 또는 케모카인 수용체 또는 리간드, 성장 인자 수용체 또는 리간드, 조직 인자, 세포 부착 분자, MHC/MHC-유사 분자, Fc 수용체, Toll-유사 수용체, NK 수용체, TCR, BCR, 양성/음성 보조자극 수용체 또는 리간드, 사멸 수용체 또는 리간드, 종양 연관 항원, 또는 바이러스 암호화 항원을 포

함한다.

[0089]

바람직하게 항원 특이적 결합 도메인은 종양 세포상 항원과 결합할 수 있다. 종양 특이적 결합 도메인은 암 환자 치료용으로 승인된 항체, 예컨대 리톡시맙, 오패무맙 및 오비누투주맙(항 CD20 Ab); 트라스투주맙 및 퍼투주맙(항 HER2 Ab); 세툽시맙 및 파니투무맙(항 EGFR Ab); 그리고 알렘투주맙(항 CD52 Ab)로부터 유래할 수 있다. 이와 유사하게, 승인된 항체-효과기 분자 접합체로서, CD20에 특이적인 것(⁹⁰Y-표지화 이브리투모맙 티옥세탄, ¹³¹I-표지화 토시투모맙), HER2에 특이적인 것(아도-트라스투주맙 엠탄신), CD30에 특이적인 것(브렌톡시맙 베도틴) 및 CD33에 특이적인 것(젬투주맙 오조가미신)으로부터 유래하는 결합 도메인이 사용될 수 있었다 (Sliwkowski MX, Mellman I. 2013 Science 341:1192).

[0090]

또한, 본 발명의 바람직한 결합 도메인은 당 분야에 공지된 기타 다양한 종양 특이적 항체 도메인을 포함할 수 있다. 암 치료를 위한 항체와 이의 각각의 표적으로서의 니볼루맙(항 PD-1 Ab), TA99(항 gp75), 3F8(항 GD2), 8H9(항 B7-H3), 아바코보맙(항 CA-125(이미타티온)), 아테카투무맙(항 EpCAM), 아프투주맙(항 CD20), 알라시주맙 페골(항 VEGFR2), 알투모맙 펜테테이트(항 CEA), 아마톡시맙(항 메소텔린), AME-133(항 CD20), 아나투모맙 마페나톡스(항 TAG-72), 아폴리주맙(항 HLA-DR), 아르시투모맙(항 CEA), 바비톡시맙(항 포스포티딜세린), 벡투모맙(항 CD22), 벨리무맙(항 BAFF), 베실레소맙(항 CEA-관련 항원), 베바시주맙(항 VEGF-A), 비바투주맙 메르탄신(항 CD44 v6), 블리나투모맙(항 CD19), BMS-663513(항 CD137), 브렌톡시맙 베도틴(항 CD30(TNFRSF8)), 칸투주맙 메르탄신(항 뮤신 CanAg), 칸투주맙 라브탄신(항 MUC1), 카프로맙 펜테타이드(항 전립선암종세포), 카를루맙(항 MCP-1), 카투막소맙(항 EpCAM, CD3), cBR96-독소루비신 면역접합체(항 루이-Y 항원), CC49(항 TAG-72), 세텔리주맙(항 CD4), Ch.14.18(항 GD2), ch-TNT(항 DNA 연관 항원), 시타투주맙 보가톡스(항 EpCAM), 식수투무맙(항 IGF-1 수용체), 클리바투주맙 테트라세탄(항 MUC1), 코나투무맙(항 TRAIL-R2), CP-870893(항 CD40), 다세투주맙(항 CD40), 다클리주맙(항 CD25), 달로투주맙(항 인슐린 유사 성장 인자 I 수용체), 다라투무맙(항 CD38(사이클릭 ADP 리보스 하이드롤라아제)), 덴시주맙(항 DLL4), 데투모맙(항 B-림프종 세포), 드로지투맙(항 DR5), 돌리고투맙(항 HER3), 두시기투맙(항 ILGF2), 에크로멕시맙(항 GD3 강글리오사이드), 에드레콜로맙(항 EpCAM), 엘로투주맙(항 SLAMF7), 엘시리모맙(항 IL-6), 에나바투주맙(항 TWEAK 수용체), 에노티쿠맙(항 DLL4), 엔시톡시맙(항 5AC), 에피투모맙 시톡세탄(항 에피시알린), 에프라투주맙(항 CD22), 에르투막소맙(항 HER2/neu, CD3), 에타라시주맙(항 인테그린 $\alpha v \beta 3$), 파칼리모맙(항 인터페론 수용체), 파클레투주맙(항 엽산염 수용체 1), FBTA05(항 CD20), 피클라투주맙(항 HGF), 피기투무맙(항 IGF-1 수용체), 플란보투맙(항 TYRP1(당단백질 75)), 프레슬리무맙(항 TGF β), 푸톡시맙(항 EGFR), 갈릭시맙(항 CD80), 가니투맙(항 IGF-I), 젬투주맙 오조가미신(항 CD33), 기렉톡시맙(항 탄산무수화효소 9(CA-IX)), 글렘바투무맙 베도틴(항 GPNMB), 구셀쿠맙(항 IL13), 이발리주맙(항 CD4), 이브리투모맙 티옥세탄(항 CD20), 이크루쿠맙(항 VEGFR-1), 이코보맙(항 CA-125), IMAB362(항 CLDN18.2), IMC-CS4(항 CSF1R), IMC-TR1(TGF β RII), 임가투주맙(항 EGFR), 인클라쿠맙(항 셀렉틴 P), 인다톡시맙 라브탄신(항 SDC1), 이노투주맙 오조가미신(항 CD22), 인테투무맙(항 CD51), 이필리무맙(항 CD152), 이라투무맙(항 CD30(TNFRSF8)), KM3065(항 CD20), KW-0761(항 CD194), LY2875358(항 MET) 라베투주맙(항 CEA), 람브롤리주맙(항 PDCD1), 렉사투무맙(항 TRAIL-R2), 린투주맙(항 CD33), 리틸루맙(항 KIR2D), 로르보투주맙 메르탄신(항 CD56), 루카투무맙(항 CD40), 루밀릭시맙(항 CD23(IgE 수용체)), 마파투무맙(항 TRAIL-R1), 마르게톡시맙(항 ch4D5), 마투주맙(항 EGFR), 마브릴리무맙(항 GMCSF 수용체 α -사슬), 밀라투주맙(항 CD74), 민레투모맙(항 TAG-72), 미투모맙(항 GD3 강글리오사이드), 모가물리주맙(항 CCR4), 목세투모맙 파수도톡스(항 CD22), 나콜로맙 타페나톡스(항 C242 항원), 납투모맙 에스타페나톡스(항 5T4), 나르나투맙(항 RON), 네시투무맙(항 EGFR), 네스바쿠맙(항 안지오프이에틴 2), 니모투주맙(항 EGFR), 니볼루맙(항 IgG4), 노페투모맙 메르펜탄, 오크렐리주맙(항 CD20), 오키라투주맙(항 CD20), 올라라투맙(항 PDGF-R α), 오나르투주맙(항 c-MET), 온톡시주맙(항 TEM1), 오포르투주맙 모나톡스(항 EpCAM), 오레고보맙(항 CA-125), 오틀레르투주맙(항 CD37), 판코맙(MUC1의 항 종양 특이적 당화), 파르사투주맙(항 EGFL7), 파스콜리주맙(항 IL-4), 파트리투맙(항 HER3), 펜투모맙(항 MUC1), 페르투주맙(항 HER2/neu), 피딜리주맙(항 PD-1), 피나투주맙 베도틴(항 CD22), 핀투모맙(항 선암종 항원), 플라투주맙 베도틴(항 CD79B), 프리투무맙(항 비멘틴), PR0131921(항 CD20), 퀴리주맙(항 IGHE), 라코투모맙(항 N-글리코실뉴라민산), 라드레투맙(항 피브로넥틴 여분 도메인-B), 라무시투맙(항 VEGFR2), 리로투무맙(항 HGF), 로바투무맙(항 IGF-1 수용체), 로레두맙(항 RHD), 로벨리주맙(항 CD11 및 CD18), 사말리주맙(항 CD200), 사투모맙 펜테타이드(항 TAG-72), 세리반투맙(항 ERBB3), SGN-CD19A(항 CD19), SGN-CD33A(항 CD33), 시브로투주맙(항 FAP), 신평시맙(항 IL-6), 솔리토맙(항 EpCAM), 손투주맙(항 에피시알린), 타발루맙(항 BAFF), 타카투주맙 테트라세탄(항 알파-태아단백질), 타플리투모맙 팍톡스(항 CD19), 텔리모맙 아리톡스, 테나투모맙(항 테나신 C), 테네릭시맙(항 CD40), 테프로투무맙(항 CD221), TGN1412(항

CD28), 티실리무맙(항 CTLA-4), 티가투주맙(항 TRAIL-R2), TNX-650(항 IL-13), 토시투모맙(항 CS20), 토베투주맙(항 CD140a), TRBS07(항 GD2), 트레갈리주맙(항 CD4), 트레멜리주맙(항 CTLA-4), TRU-016(항 CD37), 투코투주맙 셀모루킨(항 EpCAM), 우블리톡시맙(항 CD20), 우렐루맙(항 4-1BB), 반틱투맙(항 프리즐드(Frizzled) 수용체), 바팔리시맙(항 AOC3(VAP-1)), 바텔리주맙(항 ITGA2), 벨투주맙(항 CD20), 베센쿠맙(항 NRP1), 비실리주맙(항 CD3), 볼로식시맙(항 인테그린 $\alpha 5 \beta 1$), 보르세투주맙 마포도틴(항 CD70), 보투무맙(항 종양 항원 CTAA16.88), 잘루투무맙(항 EGFR), 자눌리무맙(항 CD4), 자특시맙(항 HER1), 지랄리무맙(항 CD147(바시킨)), RG7636(항 ETBR), RG7458(항 MUC16), RG7599(항 NaPi2b), MPDL3280A(항 PD-L1), RG7450(항 STEAP1) 및 GDC-0199(항 Bcl-2)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0091]

본 발명에 유용한 기타 항체 도메인 또는 종양 결합 단백질(예컨대 TCR 도메인)로서는 하기 항원들과 결합하는 것들을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다(주의; 명시된 암의 적응증들은 비 제한적 예를 나타냄): 아미노펩티다아제 N(CD13), 어넥신 A1, B7-H3(CD276, 다수의 암), CA125(난소암), CA15-3(암종), CA19-9(암종), L6(암종), 루이 Y(암종), 루이 X(암종), 알파 태아단백질(암종), CA242(결장직장암), 태반 알칼리성 포스파타아제(암종), 전립선 특이 항원(전립선), 전립선산 포스파타아제(전립선), 표피 성장 인자(암종), CD2(호지킨병, NHL 림프종, 다발성 골수종), CD3 엡실론(T 세포 림프종, 폐암, 유방암, 위암, 난소암, 자가면역성 질환, 악성 복수), CD19(B 세포 악성종양), CD20(비호지킨 림프종, B-세포 신생물형성, 자가면역성 질환), CD21(B 세포 림프종), CD22(백혈병, 림프종, 다발성 골수종, SLE), CD30(호지킨 림프종), CD33(백혈병, 자가면역성 질환), CD38(다발성 골수종), CD40(림프종, 다발성 골수종, 백혈병(CLL)), CD51(전이성 흑색종, 육종), CD52(백혈병), CD56(소세포 폐암, 난소암, Merkel 세포 암종, 및 액상 종양, 다발성 골수종), CD66e(암종), CD70(전이성 신세포 암종 및 비호지킨 림프종), CD74(다발성 골수종), CD80(림프종), CD98(암종), CD123(백혈병), 뮤신(암종), CD221(고형 종양), CD227(유방암, 난소암), CD262(NSCLC 및 기타 암), CD309(난소암), CD326(고형 종양), CEACAM3(결장직장암, 위암), CEACAM5(CEA, CD66e)(유방암, 결장직장암, 폐암), DLL4(A-유사-4), EGFR(다수의 암), CTLA4(흑색종), CXCR4(CD 184, 혈액종양, 고형 종양), 엔도글린(CD 105, 고형 종양), EPCAM(상피 세포 부착 분자, 방광, 두부, 경부, 결장, NHL 전립선, 및 난소의 암), ERBB2(폐, 유방 및 전립선의 암), FCGR1(자가면역성 질환), FOLR(엽산염 수용체, 난소암), FGFR(암종), GD2 ganglioside(암종), G-28(세포 표면 항원 당지질, 흑색종), GD3 이디오타입(암종), 열충격 단백질(암종), HER1(폐암, 위암), HER2(유방, 폐 및 난소의 암), HLA-DR10(NHL), HLA-DRB(NHL, B 세포 백혈병), 인간 융모막 성선자극호르몬(암종), IGF1R(고형 종양, 혈액암), IL-2 수용체(T 세포 백혈병 및 림프종), IL-6R(다발성 골수종, RA, 캐슬만씨병, IL6 의존성 종양), 인테그린 (다수의 암에 대한 $\alpha v \beta 3$, $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha 6 \beta 4$, $\alpha 11 \beta 3$, $\alpha 5 \beta 5$, $\alpha v \beta 5$), MAGE-1(암종), MAGE-2(암종), MAGE-3(암종), MAGE 4(암종), 항 트랜스페린 수용체(암종), p97(흑색종), MS4A1(막 확장성 4-도메인 아파 A 일원 1, 비호지킨 B 세포 림프종, 백혈병), MUC1(유방, 난소, 자궁경부, 기관지 및 위장관의 암), MUC16(CA125)(난소암), CEA(결장직장암), gp100(흑색종), MART1(흑색종), MPG(흑색종), MS4A1(막 확장성 4-도메인 아파 A, 소세포 폐암, NHL), 뉴클레올린, Neu 발암유전자 생성물(암종), P21(암종), 넥틴-4(암종), 항 (N-글리코실뉴라민산, 유방암, 흑색종)의 파라토프, PLAP-유사 고환 알칼리성 포스파타아제(난소암, 고환암), PSMA(전립선 종양), PSA(전립선), ROB04, TAG 72(종양 연관 당단백질 72, AML, 위암, 결장직장암, 난소암), T 세포 경막 단백질(암), Tie(CD202b), 조직 인자, TNFRSF10B(종양 괴사 인자 수용체 상과 일원 10B, 암종), TNFRSF13B(종양 괴사 인자 수용체 상과 일원 13B, 다발성 골수종, NHL, 기타 암, RA 및 SLE), TPBG(세포영양막 당단백질, 신세포 암종), TRAIL-R1(종양 괴사성 세포자멸 유도 리간드 수용체 1, 림프종, NHL, 결장직장암, 폐암), VCAM-1(CD106, 흑색종), VEGF, VEGF-A, VEGF-2(CD309)(다수의 암). 기타 몇몇 종양 연관 항원 표적에 관하여도 검토된 바 있다 (Gerber, et al, Mabs 2009 1:247-253; Novellino et al, Cancer Immunol Immunother. 2005 54:187-207, Franke, et al, Cancer Biother Radiopharm. 2000, 15:459-76, Guo, et al., Adv Cancer Res. 2013; 119: 421-475, Parmiani et al. J Immunol. 2007 178:1975-9). 이러한 항원의 예들로서는 분화클러스터들(CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD12w, CD14, CD15, CD16, CDw17, CD18, CD21, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD31, CD32, CD34, CD35, CD36, CD37, CD41, CD42, CD43, CD44, CD45, CD46, CD47, CD48, CD49b, CD49c, CD53, CD54, CD55, CD58, CD59, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD68, CD69, CD71, CD72, CD79, CD81, CD82, CD83, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD95, CD96, CD100, CD103, CD105, CD106, CD109, CD117, CD120, CD127, CD133, CD134, CD135, CD138, CD141, CD142, CD143, CD144, CD147, CD151, CD152, CD154, CD156, CD158, CD163, CD166, .CD168, CD184, CDw186, CD195, CD202(a, b), CD209, CD235a, CD271, CD303, CD304), 어넥신 A1, 뉴클레올린, 엔도글린(CD105), ROB04, 아미노-펩티다아제 N, -유사-4(DLL4), VEGFR-2(CD309), CXCR4(CD184), Tie2, B7-H3, WT1, MUC1, LMP2, HPV E6 E7, EGFRvIII, HER-2/neu, 이디오타입, MAGE A3, p53 비돌연변이체, NY-ESO-1, GD2, CEA, MelanA/MART1, Ras 돌연변이체,

gp100, p53 돌연변이체, 프로티나아제 3(PR1), bcr-abl, 티로시나아제, 서바이빈, hTERT, 육종 전좌 중단점(sarcoma translocation breakpoint), EphA2, PAP, ML-IAP, AFP, EpCAM, ERG(TMPRSS2 ETS 융합 유전자), NA17, PAX3, ALK, 안드로젠 수용체, 사이클린 B 1, 폴리시알산, MYCN, RhoC, TRP-2, GD3, 푸코실 GM1, 메소텔린, PSCA, MAGE A1, sLe(a), CYPIB 1, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GloboH, ETV6-AML, NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, 탄산무수화효소 IX, PAX5, OY-TES1, 정자 단백질 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, 레규마인, Tie 2, Page4, VEGFR2, MAD-CT-1, FAP, PDGFR-β, MAD-CT-2, Notch1, ICAM1 및 Fos-관련 항원 1을 포함한다.

[0092] 추가로 본 발명의 바람직한 결합 도메인으로서, 당 분야에 공지된, 감염 세포 연관 에피토프 표적 및 항원 표적에 특이적인 것들을 포함한다. 이러한 표적들로서는 하기 관심 감염성 체제로부터 유래하는 것들을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다:

[0093] HIV 바이러스(구체적으로 HIV 외피 스파이크 유래 항원 및/또는 gp120 및 gp41 에피토프), 인유두종바이러스(HPV), 마이코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 스트렙토코커스 아가락티아에(*Streptococcus agalactiae*), 메티실린 내성 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 레지오넬라 뉴모필리아(*Legionella pneumophila*), 스트렙토코커스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*), 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 네이세리아 고노로에아에(*Neisseria gonorrhoeae*), 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 뉴모코커스(*Pneumococcus*), 크립토코커스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 히스토플라스마 캡슐라툼(*Histoplasma capsulatum*), - 인플루엔자 B, 트레포네마 팔리둠(*Treponema pallidum*), 라임병 스피로헤타, 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 마이코박테리움 레프라에(*Mycobacterium leprae*), 브루셀라 아보르투스(*Brucella abortus*), 공수병 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 거대세포바이러스, 헤르페스 심플렉스(herpes simplex) 바이러스 I, 헤르페스 심플렉스 바이러스 II, 인간 혈청 파르보 유사 바이러스, 호흡기세포융합 바이러스, 바리셀라-조스터(varicella-zoster) 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 홍역 바이러스, 아데노바이러스, 인간 T 세포 백혈병 바이러스, 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스, 마우스 백혈병 바이러스, 이하선염 바이러스, 수포성구내염 바이러스, 신드비스(sindbis) 바이러스, 림프구성 맥락수막염 바이러스, 사마귀 바이러스, 청설병 바이러스, 센다이(Sendai) 바이러스, 고양이 백혈병 바이러스, 레오바이러스, 소아마비 바이러스, 유인원 바이러스 40, 마우스 유방 종양 바이러스, 뎡기열 바이러스, 풍진 바이러스, 웨스트 나일(West Nile) 바이러스, 플라스모듐 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*), 플라스모듐 비벡스(*Plasmodium vivax*), 톡소플라스마 곤디이(*Toxoplasma gondii*), 트리파노소마 란젤리(*Trypanosoma rangeli*), 트리파노소마 크루지(*Trypanosoma cruzi*), 트리파노소마 로데시엔세이(*Trypanosoma rhodesiense*), 트리파노소마 브루세이(*Trypanosoma brucei*), 쉬스토소마 만소니(*Schistosoma mansoni*), 쉬스토소마 자포니쿰(*Schistosoma japonicum*), 바베시아 보비스(*Babesia bovis*), 엘메리아 테넬라(*Elmeria tenella*), 온코세르카 볼볼루스(*Onchocerca volvulus*), 레이슈마니아 트로피카(*Leishmania tropica*), 트리키넬라 스피랄리스(*Trichinella spiralis*), 테일레리아 파르바(*Theileria parva*), 타에니아 히단티게나(*Taenia hydatigena*), 타에니아 오비스(*Taenia ovis*), 타에니아 사기나타(*Taenia saginata*), 에키노코커스 그레눌로서스(*Echinococcus granulosus*), 메소세스토이데스 코르티(*Mesocestoides corti*), 마이코플라스마 아르트리티디스(*Mycoplasma arthritidis*), 엠.하이오리니스(*M. hyorhinis*), 엠.오랄레(*M. orale*), 엠.아르기니니(*M. arginini*), 아콜레플라스마 라이드로이이(*Acholeplasma laidlawii*), 엠. 살리바리움(*M. salivarium*) 및 엠. 뉴모니아에(*M. pneumoniae*).

[0094] T 세포 수용체(TCR)

[0095] T 세포는 기타 면역 세포 유형들(다형핵 세포, 호산구, 호염기구, 비만 세포, B 세포, NK 세포)과 함께 면역계의 세포성 성분을 이루는 세포의 하위군이다. 생리적 조건 하에서 T 세포는 면역 감시와 외래 항원 제거의 역할을 담당한다. 그러나 병리학적 조건 하에서는 T 세포가 질환의 유발과 확산에 중요한 역할을 한다는 강력한 증거가 있다. 이러한 장애에 있어서, T 세포 면역 관용성의 파괴는, 그것이 중심적인 것인지 아니면 주변적인 것인지간에 자가면역성 질환의 유발에 있어 근본적인 과정인 것이다.

[0096] TCR 복합체는, 적어도 7개의 경막 단백질로 이루어져 있다. 이항화 결합된(ab 또는 γδ) 이중이량체는 단형속 항원 인지 단위를 형성하는 한편, e, g, d, z 및 h 사슬들로 이루어져 있는 CD3의 불변 사슬은 신호전달 경로에 리간드 결합을 연계하여, T 세포 활성화와 세포성 면역반응을 도모하는데 관여한다. TCR 사슬의 유전자 다양성에도 불구하고, 공지된 모든 서브유닛들에는 2가지 구조적 특징이 공통으로 존재한다. 첫 번째 구조적 특징은 이 TCR 사슬이(아마도 알파-나선형일) 경막 확장성 도메인 하나를 가지는 경막 단백질이라는 점이다. 두 번째 구조적 특징은, 모든 TCR 사슬들은 예측 경막 도메인 내에 하전된 아미노산을 가지는 것과 같은 일반적이지 않은

특징을 가진다는 점이다. 불변 사슬은 하나의 음전하를 가지고, 마우스와 인간 간에 보존되어 있으며, 가변 사슬은 하나의 양전하를 가지거나(TCR-b) 또는 2개의 양전하를 가진다(TCR-a). TCR-a의 경막 서열은 다수의 종들 간에 매우 보존적이어서, 계통발생상 중요한 기능상의 역할을 담당할 수 있다. 친수성 아미노산 아르기닌과 리신을 함유하는 옥타펩티드 서열은 종들 간에 동일하다.

[0097] T 세포 반응은 TCR에의 항원 결합에 의해 조정된다. TCR의 일 유형은, 면역글로불린 가변 영역(V) 및 불변 영역(C)을 닮은, α 사슬 및 β 사슬로 이루어진 막 결합 이종이량체이다. TCR α 사슬은 공유 결합된 V-α 사슬 및 C-α 사슬을 포함하는 한편, TCR β 사슬은 C-β 사슬에 공유 결합된 V-β 사슬을 포함한다. V-α 사슬 및 V-β 사슬은 주 조직적합성 복합체(MHC)(인간의 경우에는 HLA 복합체로 알려짐)의 환경 중 항원 또는 초항원과 결합할 수 있는 포켓 또는 틈을 형성한다. 문헌(Davis *Ann. Rev. of Immunology* 3: 537(1985); *Fundamental Immunology* 3rd Ed., W. Paul Ed. Rsen Press LTD. New York(1993))을 참조한다.

[0098] TCR 사슬(α 또는 β)의 세포외 도메인은 또한 세포 표면상 발현을 위해 이종 경막 도메인과의 융합체로서 조작될 수 있다. 이러한 TCR은 CD3, CD28, CD8, 4-1BB 및/또는 키메라 활성화 수용체(CAR) 경막 도메인 또는 활성화 도메인과의 융합체를 포함할 수 있다. TCR은 또한 α 또는 β 사슬의 항원 결합 도메인들 중 하나 이상을 포함하는 가용성 단백질일 수 있다. 이러한 TCR은 TCR 불변 도메인들과 결합되어 있거나 결합되어 있지 않은 TCR 가변 도메인 또는 이의 기능성 단편을 포함할 수 있다. 가용성 TCR은 이종이량체이거나 단일 사슬 분자일 수 있다.

[0099] Fc 도메인

[0100] 본 발명의 단백질 복합체는 Fc 도메인을 함유할 수 있다. 예를 들어 PD-L1 TxM은 항 PD-L1 scAb/huIL-15N72D: 항 PD-L1 scAb/huIL-15RαSu/huIgG1 Fc 융합 복합체를 포함한다. IgG의 Fc 영역과, 또 다른 단백질(예컨대 다양한 시토카인)의 도메인 및 가용성 수용체를 합한 융합 단백질이 보고된 바 있다(예컨대 문헌(Capon et al., *Nature*, 337:525-531, 1989; Chamow et al., *Trends Biotechnol.*, 14:52-60, 1996); 미국특허 제 5,116,964호 및 동 제5,541,087호) 참조). 원형 융합 단백질은 IgG Fc의 힌지 영역 내 시스테인 잔기들을 통해 결합되어, 중쇄 가변 도메인과 C_H1 도메인, 그리고 경쇄를 포함하지 않는, IgG 분자와 유사한 분자를 이루는 동종이량체 단백질이다. Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질의 이량체로서의 성질은, 다른 분자와의 고차원적 상호작용(즉 2가 또는 이중 특이적 결합)을 제공함에 있어서 유리할 수 있다. 구조상의 상동성으로 말미암아, Fc 융합 단백질은, 유사한 이소타입을 보이는 인간 IgG의 생체 내 약동학적 프로필과 거의 동일한 생체 내 약동학적 프로필을 보인다. IgG군의 면역글로불린은 인간 혈액에 가장 많이 존재하는 단백질로서, 이의 혈행 반감기(circulation half-life)는 21일까지에 이를 수 있다. IL-15 또는 IL-15 융합 단백질의 혈행 반감기를 연장시키고/연장시키거나 이의 생물 활성을 증가시키기 위한, 인간 중쇄 IgG 단백질의 Fc부에 공유 결합된 IL-15Rα와 비공유 결합하고 있는 IL-15 도메인을 함유하는 융합 단백질 복합체가 본원에 기술되어 있다.

[0101] "Fc"란 용어는, Fc 수용체라 칭하여지는 세포 표면 수용체와, 보체계의 몇몇 단백질과 상호작용하는 항체의 불변 영역인 결정화가능 단편 영역(fragment crystallizable region)을 지칭한다. 이러한 "Fc"는 이량체 형태를 가진다. 원산 Fc의 원천 면역글로불린 공급원은, 바람직하게 인간 기원 면역글로불린 중 임의의 것일 수 있지만, IgG1 및 IgG2가 바람직하다. 원산 Fc들은 공유 결합(즉 이황화 결합)과 비공유 결합에 의해 이량체 형태 또는 다량체 형태로 결합될 수 있는, 단량체 폴리펩티드들로 이루어져 있다. 원산 Fc 분자들의 단량체 서브유닛들 사이의 분자간 이황화 결합의 수는, 군(예컨대 IgG, IgA, IgE) 또는 하위군(예컨대 IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgA2)에 따라서 1개 내지 4개의 범위이다. 원산 Fc의 일례로서는 IgG의 과폐인 분해에 의해 생성되는 이황화 결합 이량체가 있다(문헌(Ellison et al.(1982), *Nucleic Acids Res.* 10: 4071-9) 참조). 본원에 사용된 바와 같은 "원산 Fc"란 용어는, 단량체 형태, 이량체 형태 및 다량체 형태를 총칭하는 것이다. Fc 도메인은 단백질 A, 단백질 G, 다양한 Fc 수용체 및 보체 단백질에 대한 결합 부위들을 함유한다. 몇몇 구현예들에서 복합체의 Fc 도메인은 Fc 수용체와 상호작용하여, 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC) 및/또는 항체 의존적 세포성 식세포작용(ADCP)을 매개할 수 있다. 다른 응용예에서, 복합체는 ADCC 또는 ADCP를 효과적으로 매개할 수 없는 Fc 도메인(예컨대 IgG4 Fc)을 포함한다.

[0102] 몇몇 구현예들에서, "Fc 변이체"란 용어는, 원산 Fc로부터 변형되었지만, 구조 수용체(salvage receptor), 즉 FcRn에 대한 결합 부위를 여전히 포함하는 분자 또는 서열을 지칭한다. 국제특허출원공보 WO 97/34631 및 WO 96/32478는, 예시적 Fc 변이체뿐만 아니라, 구조 수용체와의 상호작용을 기술하고 있으며, 이 문헌들은 본원에 참조로 인용되어 있다. 그러므로 "Fc 변이체"란 용어는, 비인간 원산 Fc로부터 유래하여 인간화된 분자 또는 서열을 포함한다. 게다가 원산 Fc는, 본 발명의 융합 분자에 불필요한 구조적 특징 또는 생물 활성을 제공함으로써

말미암아 제거될 수 있는 부위들을 포함한다. 그러므로 임의의 구현예들에서, "Fc 변이체"란 용어는, (1) 이황화 결합 형성, (2) 선택된 숙주 세포와의 양립불가능, (3) 선택된 숙주 세포 내 발현시 N-말단의 이질성, (4) 당화, (5) 보체와의 상호작용, (6) 구조 수용체 이외의 Fc 수용체와의 결합, (7) 항체 의존적 세포성 세포독성 (ADCC) 또는 (8) 항체 의존적 세포성 식세포작용(ADCP)에 영향을 미치거나 이에 수반되는 하나 이상의 원산 Fc 부위들 또는 잔기들이 변경된, 분자 또는 서열을 포함한다. 이러한 변경은 이와 같은 Fc의 특성들 중 임의의 것 하나 이상을 증가시킬 수 있거나 감소시킬 수 있다. Fc 변이체는 이하에 더욱 상세히 기술되어 있다.

[0103] "Fc 도메인"이란 용어는, 상기 정의된 바와 같이 원산 Fc 및 Fc 변이체 분자들 및 서열들을 포함한다. Fc 변이체 및 원산 Fc와 같이, "Fc 도메인"이란 용어는, 그것이 전 항체로부터 분해되었건, 아니면 재조합 유전자 발현 또는 기타 수단에 의해 생산되었건 간에 단량체 형태 또는 다량체 형태의 분자들을 포함한다.

[0104] 융합 단백질 복합체

[0105] 본 발명은 융합 단백질 복합체를 제공한다(도 1 및 도 2). 몇몇 경우들에 있어서, 제1 단백질은, 인터루킨-15(IL-15) 또는 이의 기능성 단편에 공유 결합되는 제1 생물 활성 폴리펩티드를 포함하고; 제2 단백질은 가용성 인터루킨-15 수용체 알파(IL-15Ra) 폴리펩티드 또는 이의 기능성 단편에 공유 결합되는 제2의 생물 활성 폴리펩티드를 포함하는데, 여기서 제1 단백질의 IL-15 도메인은 제2 단백질의 가용성 IL-15Ra 도메인과 결합하여, 가용성 융합 단백질 복합체를 형성한다. 본 발명의 융합 단백질 복합체는 또한 제1 단백질 및 제2 단백질 중 어느 하나 또는 둘다에 결합된 면역글로불린 Fc 도메인 또는 이의 기능성 단편을 포함한다. 바람직하게 융합 단백질에 결합된 Fc 도메인들은 상호작용하여 융합 단백질 복합체를 형성한다. 이러한 복합체는 면역글로불린 Fc 도메인들 간에 이황화 결합을 형성함으로써 안정화될 수 있다. 일 양태에서, 본 발명의 가용성 융합 단백질 복합체는 IL-15 폴리펩티드, IL-15 변이체 또는 이의 기능성 단편과, 가용성 IL-15Ra 폴리펩티드 또는 이의 기능성 단편을 포함하는데, 여기서 IL-15 폴리펩티드 및 IL-15Ra 폴리펩티드 중 어느 하나 또는 둘 다는 면역글로불린 Fc 도메인 또는 이의 기능성 단편을 추가로 포함한다.

[0106] 임의의 예들에서, 제1 및 제2 단백질 중 어느 하나 또는 둘 다는 항체 또는 이의 기능성 단편을 포함한다. 예를 들어 결합 도메인 중 하나는 가용성 항 PD-L1 단일 사슬 항체 또는 이의 기능성 단편을 포함한다. 다른 예에 있어서, 또 다른 제2 결합 도메인은 항 CTLA4 단일 사슬 항체 또는 질환 항원 특이적 항체 또는 이의 기능성 단편을 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명은 가용성 항 PD-L1 scAb/huIL-15N72D:항 PD-L1 scAb/huIL-15Ra Su/huIgG1 Fc 융합 단백질 복합체를 포함하는 PD-L1 TxM을 제공한다. 이 복합체에서 huIL-15N72D 도메인 및 huIL-15Ra Su 도메인은 2개의 항 PD-L1 scAb/huIL-15Ra Su/huIgG1 Fc 융합 단백질상 huIgG1 Fc 도메인과 상호작용하여 다중 사슬 융합 단백질 복합체를 형성한다.

[0107] 본원에 사용된 바와 같은 "생물 활성 폴리펩티드" 또는 "효과기 분자"란 용어는, 본원에 논의된 바와 같이 원하는 효과를 발휘할 수 있는 아미노산 서열, 예컨대 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드; 당체 또는 다당체; 지질 또는 당지질, 당단백질 또는 지단백질을 의미한다. 효과기 분자는 또한 화학 제제를 포함한다. 생물 활성 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드나, 또는 효과기 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드를 암호화하는 효과기 분자 핵산도 또한 고려된다. 그러므로 적합한 분자로서는 조절 인자, 효소, 항체 또는 약물뿐만 아니라, DNA, RNA 및 올리고뉴클레오티드도 포함한다. 생물 활성 폴리펩티드 또는 효과기 분자는 자연 발생될 수 있거나, 또는, 예컨대 재조합 또는 화학 합성법에 의해 공지의 성분으로부터 합성될 수 있으며, 이중 성분을 포함할 수 있다. 생물 활성 폴리펩티드 또는 효과기 분자는, 일반적으로 표준 분자 크기분석 기술, 예컨대 원심분리나 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 판단되는 바에 따라 약 0.1 내지 100 KD 또는 이 이상으로부터 약 1000 KD까지이며, 바람직하게는 약 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30 내지 50 KD이다. 본 발명의 원하는 효과로서는, 예를 들어 결합 활성이 증가한 본 발명의 융합 단백질 복합체의 형성, 예컨대 질환의 예방 또는 치료에 있어 세포 증식 또는 세포 사멸을 유도하기 위한 표적 세포의 사멸, 면역 반응의 개시, 또는 진단을 목적으로 하는 검출 분자로서의 기능을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 검출을 위하여, 일련의 단계들을 포함하는 검정법, 예를 들어 세포를 증식시키기 위해 이 세포를 배양하는 단계와, 세포와 본 발명의 융합 복합체를 접촉시키는 단계, 그리고 이후 융합 복합체가 세포의 추후 발달을 억제하는지 여부를 평가하는 단계를 포함하는 검정법이 사용될 수 있었다.

[0108] 본 발명에 따라 효과기 분자를 본 발명의 융합 단백질 복합체에 공유 결합시키는 것은, 다수의 유의미한 이점을 제공한다. 하나의 효과기 분자, 예컨대 공지의 구조를 가지는 펩티드를 함유하는 본 발명의 융합 단백질 복합체가 제조될 수 있다. 추가로 다양한 효과기 분자가 유사한 DNA 벡터들에서 제조될 수 있다. 다시 말해, 상이한 효과기 분자 라이브러리는 감염 세포 또는 발병 세포의 인지를 위하여 융합 단백질 복합체에 결합될 수 있다.

또한 치료적 응용을 위해서는, 본 발명의 융합 단백질 복합체를 대상체에 투여하기 보다, 이 융합 단백질 복합체를 암호화하는 DNA 발현 벡터를 투여하여 융합 단백질 복합체를 생체 내 발현시킬 수 있다. 이러한 접근법은, 통상적으로 재조합 단백질 제조와 관련된 고비용의 정제 단계들을 수행하지 않고, 항원 흡수의 복잡성을 초래하지 않으며, 종래 접근법과 연관된 처리를 수행하지 않게 해준다.

[0109] 지적된 바와 같이, 본원에 개시된 융합 단백질의 성분들, 예를 들어 효과기 분자, 예컨대 시토카인, 케모카인, 성장 인자, 단백질 독소, 면역글로불린 도메인 또는 기타 생물 활성 분자와, 임의의 펩티드 링커는 거의 모든 방식으로 조직될 수 있되, 다만 융합 단백질은 의도되었던 기능을 가진다. 구체적으로 융합 단백질의 각 성분은, 원한다면 다른 성분과 적어도 하나의 적합한 펩티드 링커 서열에 의해 이격될 수 있다. 뿐만 아니라, 융합 단백질은, 예컨대 융합 단백질의 변형, 동정 및/또는 정제를 가속화하기 위한 태그를 포함할 수 있다. 더욱 구체적인 융합 단백질은 이하 기술된 실시예에 제시되어 있다.

[0110] 링커

[0111] 본 발명의 융합 복합체는 또한, 바람직하게 IL-15 또는 IL-15Ra 도메인들과 생물 활성 폴리펩티드 사이에 놓인 가요성 링커 서열을 포함하기도 한다. 링커 서열은 IL-15 또는 IL-15Ra 도메인들에 대하여 생물 활성 폴리펩티드가 효과적으로 배치되는 것을 허용함으로써, 상기 두 도메인의 기능상의 활성이 발휘될 수 있도록 만들어야 한다.

[0112] 임의의 경우들에 있어서, 가용성 융합 단백질 복합체는 링커를 가지는데, 이때 제1 생물 활성 폴리펩티드는 폴리펩티드 링커 서열에 의하여 IL-15(또는 이의 기능성 단편)에 공유 결합된다. 다른 양태들에서, 본원에 기술된 바와 같은 가용성 융합 단백질 복합체는 링커를 가지는데, 이때 제2 생물 활성 폴리펩티드는 폴리펩티드 링커 서열에 의하여 IL-15Ra 폴리펩티드(또는 이의 기능성 단편)에 공유 결합된다.

[0113] 링커 서열은, 바람직하게 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되고, 그로 말미암아 항원을 인지하기 위한 항체 분자의 결합 도메인 또는 제시되는 항원을 인지하기 위한 TCR 분자의 결합 홈(binding groove)을 효과적으로 배치할 수 있는 펩티드가 생성된다. 본원에 사용된 바와 같이 "IL-15 또는 IL-15Ra 도메인에 대하여 생물 활성 폴리펩티드를 효과적으로 배치하는 것"이란 어구 또는 기타 유사한 어구는, IL-15 또는 IL-15Ra 도메인에 결합된 생물 활성 폴리펩티드가, IL-15 또는 IL-15Ra 도메인이 서로간에 상호작용을 하여 단백질 복합체를 형성할 수 있도록 배치되는 것을 의미하도록 의도된다. 예를 들어 IL-15 또는 IL-15Ra 도메인은, 면역 세포와의 상호작용이 면역 반응을 개시 또는 억제하거나, 세포의 발달을 억제 또는 자극하는 것을 허용하도록 효과적으로 배치된다.

[0114] 본 발명의 융합 복합체는 또한, 바람직하게 IL-15 또는 IL-15Ra 도메인들과 면역글로불린 Fc 도메인 사이에 놓인 가요성 링커 서열을 포함한다. 링커 서열은 Fc 도메인, 생물 활성 폴리펩티드, 그리고 IL-15 또는 IL-15Ra 도메인들의 효과적 배치를 허용함으로써, 각각의 도메인의 기능상 활성을 발휘시킬 수 있어야 한다. 예를 들어 Fc 도메인은 적절한 융합 단백질 복합체의 형성을 허용하고/허용하거나 면역 세포상 Fc 수용체 또는 보체계의 단백질과의 상호작용을 허용하여 옵소닌화, 세포 용해, 비만 세포, 호염기구 및 호산구의 탈과립화와, 기타 Fc 의존적 과정; 보체 경로의 활성화; 및 융합 단백질 복합체의 생체 내 반감기 연장을 비롯한 Fc 매개 효과를 자극하도록 효과적으로 배치된다.

[0115] 링커 서열은 또한 생물 활성 폴리펩티드의 폴리펩티드 2개 이상을 결합시켜, 원하는 기능상 활성을 가지는 단일 사슬 분자를 제조하는데 사용될 수 있다.

[0116] 바람직하게 링커 서열은 약 7개 아미노산 내지 약 20개 아미노산, 더욱 바람직하게 약 10개 아미노산 내지 약 20개 아미노산을 포함한다. 링커 서열은 생물 활성 폴리펩티드 또는 효과기 분자가 하나의 원치않는 형상으로 고정되지 않도록 가요성인 것이 바람직하다. 링커 서열은, 예를 들어 융합된 분자로부터 인지 부위를 이격시키는데 사용될 수 있다. 구체적으로 펩티드 링커 서열은 생물 활성 폴리펩티드와 효과기 분자 사이에 배치되어, 예컨대 이 생물 활성 폴리펩티드와 효과기 분자를 화학적으로 가교시키고, 분자 가요성을 제공할 수 있다. 링커는 가요성을 제공하기 위해, 바람직하게 주로 소형 측쇄를 가지는 아미노산, 예컨대 글리신, 알라닌 및 세린을 포함한다. 바람직하게 링커 서열 약 80% 또는 약 90%, 또는 이 이상은 글리신, 알라닌 또는 세린 잔기를 포함하며, 특히 글리신 및 세린 잔기를 포함한다.

[0117] 항체의 가변 영역들을 하나로 성공적으로 결합시키는데 사용되었던 다수의 가요성 링커 디자인들 중 임의의 것을 비롯한 상이한 링커 서열이 사용될 수 있었다(문헌(Whitlow, M. et al.,(1991) Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 2:97-105) 참조).

[0118] 약학 치료제

[0119] 본 발명은 치료제로서 사용되기 위한 융합 단백질 복합체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 일 양태에서, 본 발명의 융합 단백질 복합체는, 예를 들어 약학적으로 허용 가능한 완충제, 예컨대 생리 식염수 중에 제제화되어 진신 투여된다. 환자에 본 조성물 유효 수준만큼을 연속적이면서도 지속적으로 제공하는데 바람직한 투여 경로로서는, 예를 들어 방광에의 점적 주입, 피하, 정맥내, 복막내, 근육내, 종양내 또는 피내 주사를 포함한다. 인간 환자 또는 기타 동물의 치료는, 생리적으로 허용 가능한 담체 중 본원에 동정된 치료제 치료적 유효량이 사용되어 수행된다. 적합한 담체 및 이의 제제는, 예를 들어 문헌(Remington's Pharmaceutical Sciences by E. W. Martin)에 기술되어 있다. 투여될 치료제의 양은, 투여 방식, 환자의 나이와 체중, 그리고 신생물형성의 임상 증상에 따라서 달라진다. 일반적으로 그 양은, 신생물형성, 자가면역성 질환 또는 감염성 질환과 연관된 기타 질환의 치료에 사용되는 기타 제제에 적용되는 양의 범위일 것이지만, 임의의 경우 화합물의 증가한 특이성으로 말미암아 그보다 더 적은 양이 필요할 것이다. 화합물은, 당 업자에게 공지된 방법에 의해 측정되는 바에 따르면, 대상체의 면역 반응을 증진시키거나, 신생물형성, 감염 또는 자가면역 세포의 증식, 생존 또는 침습을 감소시키는 투여량으로 투여된다.

[0120] 약학 조성물의 제제화

[0121] 신생물형성, 감염성 질환 또는 자가면역성 질환을 치료하기 위한 본 발명의 융합 단백질 복합체의 투여는, 다른 성분들과 혼합하였을 때 상기 신생물형성, 감염성 질환 또는 자가면역성 질환을 완화, 감소 또는 안정화하기 효과적인 치료제 농도를 달성하는데 적합한 임의의 방법에 의해 이루어진다. 본 발명의 융합 단백질 복합체는 임의의 적당량만큼 임의의 적합한 담체 물질 중에 용해되어 함유될 수 있는데, 일반적으로는 본 조성물 총 중량을 기준으로 1 중량% 내지 95 중량%의 양만큼 존재한다. 본 조성물은 비경구 투여 경로(예컨대 피하, 정맥내, 근육내, 방광내, 종양내 또는 복막내 투여 경로)에 적합한 투여형으로 제공될 수 있다. 예를 들어 본 약학 조성물은 종래의 약학 실무에 따라 제제화된다(예를 들어 문헌(Remington: The Science and Practice of Pharmacy(20th ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 and Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York) 참조).

[0122] 인간에의 투여량은 숙련자가, 동물 모델에 대한 투여량에 비준하여 인간에 대한 투여량을 맞추는 것이 통상적인 일이라 당 업자가 인지하는 바와 같이, 처음에 마우스나 인간 이외의 영장류에 적용되었던 화합물 양으로부터 외삽함으로써 결정된다. 예를 들어 투여량은 체중 1 kg당 화합물 약 1 mg 내지 체중 1 kg당 화합물 약 5000 mg; 또는 체중 1 kg당 화합물 약 5 mg 내지 체중 1 kg당 화합물 약 4000 mg; 또는 체중 1 kg당 화합물 약 10 mg 내지 체중 1 kg당 화합물 약 3000 mg; 또는 체중 1 kg당 화합물 약 50 mg 내지 체중 1 kg당 화합물 약 2000 mg; 또는 체중 1 kg당 화합물 약 100 mg 내지 체중 1 kg당 화합물 약 1000 mg; 또는 체중 1 kg당 화합물 약 150 mg 내지 체중 1 kg당 화합물 약 500 mg으로 다양할 수 있다. 예를 들어 용량은 체중 1 kg당 약 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1,000, 1,050, 1,100, 1,150, 1,200, 1,250, 1,300, 1,350, 1,400, 1,450, 1,500, 1,600, 1,700, 1,800, 1,900, 2,000, 2,500, 3,000, 3,500, 4,000, 4,500 또는 5,000 mg이다. 대안적으로, 용량은 체중 1 kg당 화합물 약 5 mg 내지 체중 1 kg당 화합물 약 20 mg의 범위에 있다. 다른 예에서, 용량은 체중 1 kg당 약 8, 10, 12, 14, 16 또는 18 mg이다. 바람직하게 본 융합 단백질 복합체는 0.5 mg/kg 내지 약 10 mg/kg(예컨대 0.5, 1, 3, 5, 10 mg/kg)으로 투여된다. 물론 상기 투여량은, 이러한 치료 프로토콜에서 통상적으로 행하여지는 바와 같이 초기 임상 시험 결과와 특정 환자의 필요에 따라 상향 또는 하향 조정될 수 있다.

[0123] 약학 조성물은 적당한 부형제와 함께 투여시 제어되는 방식으로 치료제를 방출하는 약학 조성물로 제제화된다. 그 예로서는 단일 또는 다수 단위 정제 또는 캡슐 조성물, 오일 용액, 현탁액, 에멀전, 마이크로캡슐, 미소구, 분자 복합체, 나노입자, 패치 및 리포솜을 포함한다. 바람직하게 본 융합 단백질 복합체는 비경구 투여에 적합한 부형제 중에 제제화된다.

[0124] 비경구 조성물

[0125] 본 발명의 융합 단백질 복합체를 포함하는 약학 조성물은 투여형, 제제로서 주사, 주입 또는 이식(피하, 정맥내, 근육내, 종양내, 방광내, 복막내)에 의해 비경구 투여되거나, 또는 종래의 약학적으로 허용 가능한 무독성 담체 및 보조제를 함유하는 적합한 전달 장치나 이식물을 통하여 비경구 투여된다. 이러한 조성물의 제제 및 제조물은 약학 제제 분야의 숙련자들에게 널리 공지되어 있다. 제제에 관하여는 문헌(Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 상동)에서 살펴볼 수 있다.

- [0126] 본 발명의 융합 단백질 복합체를 포함하는 비경구 투여용 조성물은 단위 투여형(예컨대 단일 용량 앰플)으로 제공된다. 대안적으로 본 조성물은 수 회의 용량이 담겨 있으며, 적합한 보존제가 첨가될 수 있는 바이알로서 제공된다(하기 참조). 본 조성물은 용액, 현탁액, 에멀전, 주입 장치 또는 이식용 전달 장치의 형태를 가지거나, 또는 사용전 물이나 다른 적합한 비이클로 재구성될 건조 분말로서 제공된다. 신생물형성, 감염성 질환 또는 자가면역성 질환을 감소 또는 완화하는 활성 제제와는 별도로, 본 조성물은 비경구 투여가 허용되는 적합한 담체 및/또는 부형제를 포함한다. 활성 치료제(들)는 제어 방출을 위해 미소구, 마이크로캡슐, 나노입자, 리포솜에 혼입될 수 있다. 더욱이 본 조성물은 현탁제, 가용화제, 안정화제, pH 조정제, 긴장성 조정제 및/또는 분산제를 포함할 수 있다.
- [0127] 상기 명시된 바와 같이, 본 발명의 융합 단백질 복합체를 포함하는 약학 조성물은 멸균 주사에 적합한 형태를 가질 수 있다. 이러한 조성물을 제조하기 위하여, 적합한 활성 치료제(들)가 비경구 투여가 허용되는 액체 비이클에 용해 또는 현탁된다. 사용될 수 있는 허용 가능 비이클 및 용매로서는 물이 있는데, 이 물의 pH는 적당량의 염화수소산, 수산화나트륨 또는 적합한 완충제, 1,3-부탄디올, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액 및 텍스트로스 용액을 첨가함으로써 적합하게 조정된다. 수성 제제는 또한 보존제(예컨대 메틸, 에틸 또는 n-프로필 p-하이드록시벤조에이트) 하나 이상을 함유할 수 있다. 화합물들 중 하나가 물에 거의 녹지 않거나 약간만 녹는 경우, 용해촉진제 또는 가용화제가 첨가될 수 있거나, 아니면 용매는 프로필렌글리콜을 10 %w/w 내지 60 %w/w 포함할 수 있다.
- [0128] 본 발명은 신생물형성, 감염성 질환 또는 자가면역성 질환이나 이의 증상들을 치료하는 방법으로서, 본원의 화학식을 가지는 화합물을 포함하는 약학 조성물 치료적 유효량만큼을 대상체(예컨대 포유동물, 예컨대 인간)에 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 그러므로 일 구현에는, 신생물형성, 감염성 질환 또는 자가면역성 질환이나 이의 증상들을 앓고 있거나 이에 취약한 대상체를 치료하는 방법이다. 이 방법은 질환 또는 장애가 치료되는 조건 하에 해당 질환 또는 장애 또는 이의 증상들을 치료하기 충분한, 본원의 화합물 치료량만큼을 포유동물에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0129] 본원의 방법은, 본원에 기술된 화합물 또는 본원에 기술된 조성물 유효량을 대상체(상기와 같은 치료를 필요로 하는 것으로 확인된 대상체 포함)에 투여하여 상기와 같은 효과를 얻는 단계를 포함한다. 상기와 같은 치료를 필요로 하는 대상체를 확인하는 것은, 대상체 또는 건강 관리 전문가의 판단에 의할 수 있으므로, 주관적일 수 있거나(예컨대 의견에 의할 수 있거나) 또는 객관적일 수 있다(예컨대 시험 또는 진단 방법에 의해 확인될 수 있다).
- [0130] (예방적 치료를 포함하여) 본 발명의 치료 방법은, 일반적으로 본원의 화합물, 예컨대 본원의 화학식을 가지는 화합물 치료적 유효량을, 포유동물, 구체적으로 인간을 포함하여 치료를 필요로 하는 대상체(예컨대 동물, 인간)에 투여하는 단계를 포함한다. 이러한 치료는 신생물형성, 감염성 질환, 자가면역성 질환, 장애 또는 이의 증상들을 앓고 있거나, 발병하였거나, 취약하거나 또는 발병 위험이 있는 대상체, 구체적으로는 인간에게 적합하게 수행될 것이다. 이처럼 "발병 위험이 있는" 대상체인지의 결정은 진단 시험이나, 대상체 또는 건강 관리 제공자의 의견에 따라(예컨대 유전자 시험, 효소 또는 단백질 마커, (본원에 정의된 바와 같은) "마커(Marker)" 및 가족력 등에 따라) 임의의 객관적 결정 또는 주관적 결정에 의해 이루어질 수 있다. 본 발명의 융합 단백질 복합체는 면역 반응의 증가가 요망되는 기타 임의의 장애를 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0131] 본 발명은 또한 치료 과정을 모니터링하는 방법도 제공한다. 이 방법은, 본원의 화합물이 어떤 질환 또는 이의 증상을 치료하는데 충분한 치료량만큼 투여된 대상체로서, 신생물형성과 연관된 해당 장애 또는 이의 증상을 앓고 있거나 이에 취약한 대상체를 대상으로, 진단 마커("마커")(예컨대 본원의 화합물, 단백질 또는 이의 지표 등에 의해 조정되는, 본원에 기술된 임의의 표적)의 수준을 측정하는 단계, 또는 진단을 위한 측정 단계(예컨대 스크리닝, 검정)를 포함한다. 본 방법에서 측정된 "마커"의 수준은, 건강한 정상 대조군 또는 다른 발병 환자에 대해 공지된 "마커"수준과 비교될 수 있으며, 이로써 대상체의 질환 상태가 확립될 수 있다. 몇몇 경우들에 있어서, 대상체 내 "마커"의 2차 수준은 1차 수준의 측정 시점보다 나중의 시점에 측정되고, 이 두 가지 수준이 비교되어, 해당 질환의 경과와 치료법의 효능이 모니터링된다. 임의의 양태들에서, 대상체 내 "마커"의 치료전 수준은, 본 발명에 따른 치료를 시작하기 전에 측정되고; 추후 "마커"의 이 같은 치료전 수준은 치료 개시후 대상체 내 "마커" 수준과 비교될 수 있으며, 그 결과 치료의 효능이 확인될 수 있다.
- [0132] 병행 치료법
- [0133] 선택적으로 본 발명의 융합 단백질 복합체는 기타 임의의 표준 치료법이 수행됨과 아울러 투여되는데; 이러한 방법은 당 업자에게 공지된 방법으로서, 문헌(Remington's Pharmaceutical Sciences by E. W. Martin)에 기술

되어 있다. 원한다면 본 발명의 융합 단백질 복합체는 종래의 임의 항신생물형성 치료법, 예컨대 면역요법, 치료 항체 투여, 표적 치료법, 수술, 방사선 요법 또는 화학 요법(이에 한정되는 것은 아님)이 수행됨과 아울러 투여된다.

[0134] 키트 또는 약학 시스템

[0135] 본 발명의 융합 단백질 복합체를 포함하는 약학 조성물은, 신생물형성, 감염성 질환 또는 자가면역성 질환을 완화하는데 사용되기 위한 키트나 약학 시스템에 통합될 수 있다. 본 발명의 이러한 양태에 따른 키트 또는 약학 시스템은 내부에 하나 이상의 용기 수단, 예컨대 바이알, 튜브, 앰플 및 병 등이 뿔뿔하게 담겨있는 운반 수단, 예컨대 박스, 갑, 튜브를 포함한다. 본 발명의 키트나 약학 시스템은 본 발명의 융합 단백질 복합체 사용에 관련된 지침을 하나의 구성품으로서 포함할 수 있다.

[0136] 재조합 단백질 발현

[0137] 일반적으로 본 발명의 융합 단백질 복합체(예컨대 TxM 복합체의 성분들)의 제조는 본원에 개시된 방법과, 인지된 재조합 DNA 기술에 의해 달성될 수 있다.

[0138] 일반적으로 재조합 폴리펩티드는 적합한 숙주 세포를, 폴리펩티드 암호화 핵산 분자 또는 이의 단편 전부 또는 일부를 포함하는 적합한 발현 비이클로 형질전환시킴으로써 제조된다. 분자생물학 분야의 숙련자들은, 다양한 발현계들 중 임의의 것이 재조합 단백질을 제공하는데 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 사용된 숙주 세포가 정확히 무엇인지는 본 발명에 있어서 중요하지 않다. 재조합 폴리펩티드는 실질적으로 임의의 진핵생물 숙주(예컨대 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 곤충 세포, 예컨대 Sf21 세포, 또는 포유동물 세포, 예컨대 NIH 3T3, HeLa, 또는 바람직하게 COS 세포) 내에서 생산될 수 있다. 이러한 세포는 다양한 공급처(예컨대 미국 모식균 배양 수집소(American Type Culture Collection)(Rockland, Md.)로부터 입수 가능하다(예를 들어 문헌(Ausubel et al., Current Protocol in Molecular Biology, New York: John Wiley and Sons, 1997)도 참조). 형질감염 방법과 발현 비이클을 선택하는 것은, 선택된 숙주계에 따라 달라질 것이다. 형질전환 방법은, 예컨대 문헌(Ausubel et al. (상동))에 기술되어 있으며; 발현 비이클은, 예컨대 문헌(Cloning Vectors: A Laboratory Manual (P. H. Pouwels et al., 1985, Supp. 1987)에 제공된 것들로부터 선택될 수 있다.

[0139] 다양한 발현계가 재조합 폴리펩티드의 제조를 위해 존재한다. 이러한 폴리펩티드를 제조하는데 유용한 발현 벡터로서는 염색체, 에피솜 및 바이러스 유래 벡터, 예컨대 세균 플라스미드 유래 벡터, 박테리오파지 유래 벡터, 트랜스포존 유래 벡터, 효모 에피솜 유래 벡터, 삽입 요소 유래 벡터, 효모 염색체 요소 유래 벡터, 바큇로 바이러스, 파포바 바이러스(예컨대 SV40), 백시니아 바이러스, 아데노바이러스, 계두바이러스, 위광견병 바이러스 및 레트로바이러스와 같은 바이러스 유래 벡터, 그리고 이것들의 조합으로부터 유래하는 벡터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0140] 일단 재조합 폴리펩티드가 발현되면, 이 폴리펩티드는, 예컨대 친화성 크로마토그래피를 사용하여 분리된다. 일례에서, (예컨대 본원에 기술된 바와 같이 제조된) 항체로서, 이 폴리펩티드에 대해 생성된 항체는 컬럼에 부착되어, 재조합 폴리펩티드를 분리하는데 사용될 수 있다. 친화성 크로마토그래피 전 폴리펩티드를 품은 세포의 용해 및 분획화는 표준적 방법에 의해 수행될 수 있다(예컨대 문헌(Ausubel et al., 상동) 참조). 일단 분리되면, 재조합 단백질은 원할 경우, 예컨대 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 더 정제될 수 있다(예컨대 문헌(Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry and Molecular Biology, eds., Work and Burdon, Elsevier, 1980) 참조).

[0141] 본원에 사용된 바와 같이, 본 발명의 생물 활성 폴리펩티드 또는 효곽 분자는 시토카인, 케모카인, 성장 인자, 단백질 독소, 면역글로불린 도메인 또는 기타 생물 활성 단백질, 예컨대 효소와 같은 인자들을 포함할 수 있다. 또한 생물 활성 폴리펩티드는 다른 화합물, 예컨대 비단백질성 독소, 세포독성 제제, 화학요법제, 검출 가능한 표지, 방사성 물질 등과의 접합체를 포함할 수 있다.

[0142] 본 발명의 시토카인은 다른 세포에 영향을 미치고 세포성 면역의 여러 다효성 중 임의의 것에 관여하는, 세포에 의해 생산되는 임의의 인자에 의해 한정된다. 시토카인의 예들로서는 IL-2 과, 인터페론(IFN), IL-10, IL-1, IL-17, TGF 및 TNF 시토카인 과, 그리고 IL-1 내지 IL-35, IFN-a, IFN-b, IFN γ , TGF-b, TNF-a 및 TNFb를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0143] 본 발명의 일 양태에서, 제1 단백질은 인터루킨-15(IL-15) 도메인 또는 이의 기능성 단편에 공유 결합된 제1 생물 활성 폴리펩티드를 포함한다. IL-15는 T 세포 활성화와 증식에 영향을 미치는 시토카인이다. 면역 세포 활성화

화 및 증식에 영향을 미치는 IL-15 활성은 어떤 면에서 IL-2의 활성과 유사하지만, 근본적인 차이점에 대해서는 특성규명이 잘 되어 있다(Waldmann, T A, 2006, *Nature Rev. Immunol.* 6:595-601).

[0144] 본 발명의 또 다른 양태에서, 제1 단백질은, IL-15 변이체(본원에서는 IL-15 돌연변이체라고도 지칭됨)인 인터루킨-15(IL-15) 도메인을 포함한다. IL-15 변이체는, 바람직하게 원산(또는 야생형) IL-15 단백질의 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 포함한다. IL-15 변이체는, 바람직하게 IL-15R α 폴리펩티드와 결합하여, IL-15 효현제 또는 길항제로서 작용한다. 바람직하게 효현제 활성을 가지는 IL-15 변이체는 강력 효현제 활성을 가진다. IL-15 변이체는 IL-15R α 와의 결합 여부에 의존하지 않고 IL-15 효현제 또는 길항제로서의 작용을 할 수 있다. IL-15 효현제는 야생형 IL-15의 생물 활성과 거의 동일하거나 증가한 생물 활성에 의해 실증된다. IL-15 길항제는 야생형 IL-15의 생물 활성에 비하여 감소한 생물 활성 또는 IL-15 매개 반응을 억제하는 능력에 의해 실증된다. 몇몇 예들에 있어서, IL-15 변이체는 IL-15R β 수용체에 증가한 활성 또는 감소한 활성으로 결합한다. 몇몇 경우들에 있어서, IL-15 변이체의 서열은 원산 IL-2 서열에 비하여 적어도 하나의 아미노산 변화, 예컨대 치환 또는 결실을 가지고, 이러한 변화는 IL-15 효현제 활성 또는 길항제 활성을 초래한다. 바람직하게 아미노산 치환/결실은, IL-15R β 및/또는 gC와 상호작용하는 IL-15의 도메인에서 일어난다. 더욱 바람직하게 아미노산 치환/결실은 IL-15R α 폴리펩티드와의 결합 또는 IL-15 변이체 생산능에 영향을 미치지 않는다. IL-15 변이체를 생산하기 적합한 아미노산 치환/결실은 추정적 또는 공지된 IL-15 구조, 구조가 공지되어 있는 상동성 분자, 예컨대 IL-2와 IL-15의 비교, 합리적이거나 무작위의 돌연변이유발 및 기능 검증법(본원에 제공된 바와 같음) 또는 기타 실험 방법들을 바탕으로 동정될 수 있다. 추가로 적합한 아미노산 치환은 추가 아미노산들의 삽입과 보존적 또는 비보존적 변화일 수 있다. 바람직하게 본 발명의 IL-15 변이체는, 성숙한 인간 IL-15 서열상 6, 8, 10, 61, 65, 72, 92, 101, 104, 105, 108, 109, 111 또는 112번 위치에 1개 또는 1개 초과개의 아미노산 치환/결실을 함유하고; 구체적으로 D8N("D8"은 원산 성숙 인간 IL-15 서열의 아미노산 및 잔기 위치를 나타내고, "N"은 IL-15 변이체 내 해당 위치에 있는 치환된 아미노산 잔기를 나타냄), I6S, D8A, D61A, N65A, N72R, V104P 또는 Q108A 치환은 길항제 활성을 가지는 IL-15 변이체를 생성하고, N72D 치환은 효현제 활성을 가지는 IL-15 변이체를 생성한다.

[0145] 케모카인은 시토카인과 유사하게, 다른 세포에 노출되었을 때 세포성 면역의 여러 다효성 중 임의의 것에 관여하는 임의의 화학 인자 또는 분자로서 정의된다. 적합한 케모카인으로는 CXC, CC, C 및 CX₃C 케모카인과, CCL-1 내지 CCL-28, CXC-1 내지 CXC-17, XCL-1, XCL-2, CX3CL1, MIP-1b, IL-8, MCP-1, 및 Rantes를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0146] 성장 인자는 특정 세포에 노출될 때 노출된 세포의 증식 및/또는 분화를 유도하는 임의의 분자들을 포함한다. 성장 인자로서는 단백질 및 화학 분자를 포함하고, 이것들 중 몇몇은 GM-CSF, G-CSF, 인간 성장 인자 및 줄기세포 성장 인자를 포함한다. 추가의 성장 인자도 또한 본원에 기술된 용도로서 적합할 수 있다.

[0147] 독소 또는 세포독성 제제로서는 세포에 노출되었을 때 성장에 치사 효과 또는 억제 효과를 보이는 임의의 물질을 포함한다. 더욱 구체적으로 효과기 분자는, 예컨대 식물이나 세균 기원의 세포 독소, 예컨대 디프테리아 독소(DT), 쉬가 독소, 아브린, 콜레라 독소, 리신, 사포린, 슈도모나스 외독소(PE), 미국자리공 항바이러스 단백질 또는 겔로닌일 수 있다. 이러한 독소의 생물 활성 단편은 당 분야에 널리 공지되어 있으며, 예컨대 DT A 사슬 및 리신 A 사슬을 포함한다. 추가로 독소는 세포 표면에서 활성인 제제, 예컨대 포스포리파아제 효소(예컨대 포스포리파아제 C)일 수 있다.

[0148] 또한 효과기 분자는 화학요법 약물, 예컨대 빈데신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 메토트렉세이트, 아드리아마이신, 블레오마이신 또는 시스플라틴일 수 있다.

[0149] 추가로, 효과기 분자는 진단 연구 또는 영상화 연구에 적합한, 검출 가능하게 표지화된 분자일 수 있다. 이러한 표지로서는 바이오틴 또는 스트렙타비딘/아비딘, 검출 가능한 나노입자 또는 결정, 효소 또는 이의 촉매 활성 단편, 형광 표지, 예컨대 녹색 형광 단백질, FITC, 피코에리트린, 사이클, 텍사스 레드 또는 양자점; 방사성핵종, 예컨대 요오드-131, 이트륨-90, 레늄-188 또는 비스무트-212; 인광 분자, 화학발광 분자, 또는 PET, 초음파 또는 MRI에 의해 검출 가능한 표지, 예컨대 Gd³⁺ 또는 상자성 금속 이온 기반 조영제를 포함한다. 예를 들어 문헌(Moskaug, et al. *J. Biol. Chem.* 264, 15709 (1989); Pastan, I. et al. *Cell* 47, 641, 1986; Pastan et al., Recombinant Toxins as Novel Therapeutic Agents, *Ann. Rev. Biochem.* 61, 331, (1992); "Chimeric Toxins" *Olsnes and Phil, Pharmac. Ther.*, 25, 355 (1982); 공개된 PCT 특허출원공보 WO 94/29350; 공개된 PCT 특허출원공보 WO 94/04689; 공개된 PCT 특허출원공보 WO2005046449 및 미국특허 제5,620,939호(효과기 또는 태그를 포함하는 단백질을 제조 및 사용하는 것에 관하여 개시됨))을 참조한다.

- [0150] IL-15 및 IL-15R α 도메인들이 공유 결합되어 포함되어 있는 단백질 융합 또는 접합 복합체는 몇 가지 중요한 용도를 가진다. 예를 들어 항 PD-L1 scAb를 포함하는 단백질 융합 또는 접합 복합체는 IL-15:IL-15R α 복합체를 임의의 세포, 예컨대 PD-L1을 발현하는 종양 세포에 전달하는데 사용될 수 있다. 따라서 이 단백질 융합 또는 접합 복합체는 리간드를 포함하는 세포를 선택적으로 손상 또는 사멸하는 수단을 제공한다. 본 단백질 융합 또는 접합 복합체에 의해 손상 또는 사멸될 수 있는 세포나 조직의 예들로서는 종양 및 바이러스 감염 세포 또는 세균 감염 세포로서, 하나 이상의 리간드를 발현하는 세포를 포함한다. 손상 또는 사멸에 취약한 세포나 조직은 본원에 개시된 방법에 의해 용이하게 검정될 수 있다.
- [0151] 본 발명의 IL-15 및 IL-15R α 폴리펩티드는 적합하게, 그 아미노산 서열이 자연 발생 IL-15 및 IL-15R α 분자, 예컨대 인간, 마우스 또는 기타 설치류 또는 기타 포유동물의 IL-15 및 IL-15R α 분자의 아미노산 서열과 상응한다. 이러한 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 핵산의 서열은, 예를 들어 인간 인터루킨 15(IL15) mRNA - GenBank: U14407.1 (본원에 참조로 인용됨), Mus 근육 인터루킨 15(IL15) mRNA - GenBank: U14332.1 (본원에 참조로 인용됨), 인간 인터루킨-15 수용체 알파 사슬 전구체(IL15RA) mRNA - GenBank: U31628.1 (본원에 참조로 인용됨), Mus 근육 인터루킨 15 수용체, 알파 사슬 - GenBank: BC095982.1 (본원에 참고로 인용됨)와 같이 문헌에 공지되어 있다.
- [0152] 몇몇 경우에 있어서, 예를 들어 sc-항체의 역가를 증가시키기 위해 본 발명의 단백질 융합 또는 접합 복합체를 다가로 만드는 것이 유용할 수 있다. 구체적으로 융합 단백질 복합체의 IL-15 도메인 및 IL-15R α 도메인 간 상호작용은 다가 복합체를 제조하는 수단을 제공한다. 또한, 다가 융합 단백질은, 예를 들어 표준 바이오틴-스트렙타비딘 표지화 기술을 사용하거나, 또는 적합한 고정 지지체, 예컨대 라텍스 비드에의 접합을 통해, 1개 내지 4개의 단백질(동일하거나 상이한 단백질들)을 서로 공유 결합 또는 비공유 결합시켜 제조될 수 있다. 화학 가교된 단백질(예컨대 덴드리머에 가교된 단백질)은 또한 적합한 다가 종이다. 예를 들어 단백질은, 변형될 수 있는 태그 서열, 예컨대 바이오틴화 BirA 태그, 또는 Cys 또는 His와 같이 화학 반응성 측쇄를 가지는 아미노산 잔기를 암호화하는 서열을 포함시킴으로써 변형될 수 있다. 이러한 아미노산 태그 또는 화학 반응성 아미노산은 융합 단백질 내 다양한 위치, 바람직하게는 생물 활성 폴리펩티드 또는 효과기 분자의 활성 부위로부터 멀리 떨어진 위치에 배치될 수 있다. 예를 들어 가용성 융합 단백질의 C-말단은, 이처럼 반응성 아미노산(들)을 포함하는 기타 융합 단백질 또는 태그에 공유 결합될 수 있다. 2개 이상의 융합 단백질을 적합한 덴드리머 또는 기타 나노입자에 화학적으로 결합시켜 다가 분자를 제조하기 위해서는 적합한 측쇄가 포함될 수 있다. 덴드리머는 자체의 표면에 다수의 상이한 작용기 중 임의의 것 하나를 가질 수 있는 합성 화학 중합체이다(D. Tomalia, Aldrichimica Acta, 26:91:101 (1993)). 본 발명에 따라 사용되는 예시적 덴드리머로서는, 예컨대 시스테인 잔기들을 결합시킬 수 있는 E9 불꽃형(combust) 폴리아민 덴드리머 및 E9 성상형(starburst) 폴리아민 덴드리머를 포함한다. 예시적 나노입자로서는 리포솜, 코어-외피(core-shell) 입자 또는 PLGA 기반 입자를 포함한다.
- [0153] 다른 양태에서, 융합 단백질 복합체의 폴리펩티드들 중 하나 또는 둘 다는 면역글로불린 도메인을 포함한다. 대안적으로 단백질 결합 도메인-IL-15 융합 단백질은 면역글로불린 도메인에 추가로 결합될 수 있다. 바람직한 면역글로불린 도메인은 다른 면역글로불린 도메인과의 상호작용을 허용하여, 상기 제공된 바와 같은 다중 사슬 단백질을 형성하도록 만들 수 있는 영역들을 포함한다. 예를 들어 면역글로불린 중쇄 영역, 예컨대 IgG1 C μ 2-C μ 3은 안정적으로 상호작용하여, Fc 영역을 형성할 수 있다. Fc 도메인을 포함하여 바람직한 면역글로불린 도메인은 또한 효과기 기능, 예컨대 Fc 수용체 또는 보체 단백질 결합 활성을 가지고/가지거나 당화 부위들을 가지는 영역들을 포함한다. 몇몇 양태들에서, 융합 단백질 복합체의 면역글로불린 도메인은, Fc 수용체 또는 보체 결합 활성 또는 당화 또는 이량체화를 감소 또는 증가시켜, 생성되는 단백질의 생물 활성에 영향을 미치는 돌연변이를 함유한다. 예를 들어 Fc 수용체와의 결합을 감소시키는 돌연변이를 함유하는 면역글로불린 도메인이, 특히 항원을 인지 또는 검출하도록 디자인된 시약에 유리할 수 있도록, Fc 수용체 보유 세포에 대한 결합 활성이 낮은 본 발명의 융합 단백질 복합체를 제조하는데 사용될 수 있었다.
- [0154] 핵산 및 벡터
- [0155] 본 발명은 핵산 서열, 구체적으로 본 융합 단백질(예컨대 TxM의 성분들)을 암호화하는 DNA 서열을 추가로 제공한다. 바람직하게 DNA 서열은 염색체의 복제에 적합한 벡터, 예컨대 파아지, 바이러스, 플라스미드, 파지미드, 코스미드, YAC 또는 에피솜에 의해 운반된다. 구체적으로 원하는 융합 단백질을 암호화하는 DNA 벡터는, 본원에 기술된 제조 방법들을 가속화하고, 융합 단백질을 유의미한 양만큼 수득하기 위해 사용될 수 있다. DNA 서열은 적당한 발현 벡터, 즉 삽입된 단백질 암호화 서열의 전사 및 번역에 필요한 요소를 함유하는 벡터로 삽입될 수 있다. 다양한 숙주-벡터계는 단백질 암호화 서열을 발현시키는데 이용될 수 있다. 이러한 계로서는 바이러스(예

컨대 백시니아 바이러스, 아데노바이러스 등)으로 감염된 포유동물 세포계; 바이러스(예컨대 마를로바이러스)로 감염된 곤충 세포계; 미생물, 예컨대 효모 벡터를 함유하는 효모, 또는 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA로 형질전환된 세균을 포함한다. 이용된 숙주-벡터계에 따라서, 다수의 적합한 전사 요소 및 번역 요소 중 임의의 하나가 사용될 수 있다. 문헌((Sambrook et al., 상동) 및 (Ausubel et al., 상동))을 참조한다.

[0156] 가용성 융합 단백질 복합체를 제조하기 위한 방법이 본 발명에 포함되는데, 이 방법은 본원에 기술된 바와 같이 제1 및 제2 단백질들을 암호화하는 DNA 벡터를 숙주 세포에 도입하는 단계, 세포나 배지 중 융합 단백질을 발현하기 충분한 조건 하에 이 숙주 세포를 배지 중에서 배양하여, 제1 단백질의 IL-15 도메인과 제2 단백질의 가용성 IL-15R α 도메인간 결합을 허용함으로써, 가용성 융합 단백질 복합체를 형성하는 단계, 그리고 숙주 세포나 배지로부터 가용성 융합 단백질 복합체를 정제하는 단계를 포함한다.

[0157] 일반적으로 본 발명에 따라 바람직한 DNA 벡터에는, 효과기 분자를 암호화하는 서열에 작동가능하도록 결합된, 생물 활성 폴리펩티드를 암호화하는 제1 뉴클레오티드 서열 도입용 제1 클로닝 부위를 5'→3' 방향으로 포함하는 뉴클레오티드 서열이 포스포디에스테르 결합에 의해 결합되어 포함되어 있다.

[0158] DNA 벡터에 의해 암호화된 융합 단백질 성분들은 카세트 형태로 제공될 수 있다. "카세트"란 용어는, 각각의 성분이 표준 재조합 방법에 의해 다른 성분 대신 용이하게 치환될 수 있는 구조를 의미한다. 구체적으로 카세트 형태로 구성된 DNA 벡터는, 암호화된 융합 복합체가 혈청형을 발생시킬 능력을 가질 수 있거나 가지는 병원체에 맞서 사용될 때 특히 요망된다.

[0159] 융합 단백질 복합체를 암호화하는 벡터를 제조하기 위하여, 생물 활성 폴리펩티드를 암호화하는 서열은, 적합한 리가아제를 사용하여 효과기 펩티드를 암호화하는 서열에 결합된다. 제시 펩티드를 암호화하는 DNA는, 적합한 세포주와 같은 자연 공급원으로부터 DNA를 단리하거나, 또는 공지의 합성 방법, 예컨대 포스페이트 트리에스테르 방법에 의해 수득될 수 있다. 예컨대 문헌(Oligonucleotide Synthesis, IRL Press (M. J. Gait, ed., 1984))을 참조한다. 합성 올리고뉴클레오티드는 또한 시판되고 있는 자동화 올리고뉴클레오티드 합성기를 사용하여 제조될 수 있다. 생물 활성 폴리펩티드를 암호화하는 유전자가 일단 단리되면, 이 유전자는 중합효소 연쇄 반응(PCR) 또는 기타 당 분야에 공지된 방법에 의해 증폭될 수 있다. 생물 활성 폴리펩티드 유전자를 증폭시키는데 적합한 PCR 프라이머는 PCR 생성물에 제한 부위들을 부가할 수 있다. PCR 생성물은, 바람직하게 효과기 펩티드에 대한 스플라이싱 부위들과, 생물 활성 폴리펩티드-효과기 융합 복합체의 적절한 발현 및 분비에 필요한 선도 서열을 포함한다. PCR 생성물은 또한, 바람직하게 링커 서열을 암호화하는 서열이나, 또는 이러한 서열을 결합하기 위한 제한 효소 부위를 포함한다.

[0160] 본원에 기술된 융합 단백질은, 바람직하게 표준 재조합 DNA 기술에 의해 생산된다. 예를 들어 생물 활성 폴리펩티드를 암호화하는 DNA 분자가 일단 단리되면, 이 서열은 효과기 폴리펩티드를 암호화하는 또 다른 DNA 분자에 결합될 수 있다. 생물 활성 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은, 효과기 펩티드를 암호화하는 DNA 서열과 직접 연결될 수 있거나, 또는 더욱 통상적으로 본원에 논의된 바와 같은 링커 서열을 암호화하는 DNA 서열은, 생물 활성 폴리펩티드를 암호화하는 서열과, 효과기 펩티드를 암호화하는 서열 사이에 끼워진 후, 적합한 리가아제가 사용되어 연결될 수 있다. 생성된 하이브리드 DNA 분자는 적합한 숙주 세포 내에서 발현되어 융합 단백질 복합체로 생성될 수 있다. DNA 분자는, 결합 후 암호화되는 폴리펩티드의 번역 틀이 변경되지 않도록 서로 5'→3'방향으로 결합된다(즉 DNA 분자는 서로에 대해 틀 내(in-frame) 결합된다). 생성된 DNA 분자는 틀 내 융합 단백질을 암호화한다.

[0161] 또 다른 뉴클레오티드 서열도 또한 유전자 구조체에 포함될 수 있다. 예를 들어 효과기 펩티드에 융합된 생물 활성 폴리펩티드를 암호화하는 서열의 발현을 제어하는 촉진인자 서열, 또는 융합 단백질을 세포 표면이나 배양 배지로 안내하는 선도 서열이, 구조체에 포함될 수 있거나 또는 이 구조체가 삽입된 발현 벡터 내에 존재할 수 있다. 면역글로불린 또는 CMV 촉진인자가 특히 바람직하다.

[0162] 변이체 생물 활성 폴리펩티드, IL-15, IL-15R α 또는 Fc 도메인 암호화 서열을 수득함에 있어서, 당 업자들은 생물 활성의 소실 또는 감소가 초래되지 않은 채 폴리펩티드가 임의의 아미노산 치환, 부가, 결실 및 번역후 변형에 의해 변형될 수 있음을 인지할 것이다. 구체적으로 보존적 아미노산 치환이 일어나면, 즉 하나의 아미노산이 유사한 크기, 전하, 극성 및 형태를 가지는 또 다른 아미노산으로 치환되면, 단백질 기능은 유의미하게 변경되지 않을 것임은 널리 공지되어 있다. 단백질의 구성성분인 20개의 표준 아미노산은 넓게 보존적 아미노산으로 이루어진 군 4 가지로 하기와 같이 분류될 수 있다: 비극성(소수성) 군은 알라닌, 이소루신, 루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 트립토판 및 발린을 포함하고; 극성(비하전, 중성) 군은 아스파라긴, 시스테인, 글루타민,

글리신, 세린, 트레오닌 및 티로신을 포함하며; 극성 하전(염기성) 군은 아르기닌, 히스티딘 및 리신을 포함하고; 음 하전(산성) 군은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 어떤 단백질에 있어서 하나의 아미노산의, 동일 군에 속하는 또 다른 아미노산으로의 치환은 단백질의 생물 활성에 부정적인 영향을 미치지 않을 것이다. 다른 예에서, 단백질의 생물 활성을 감소 또는 증가시키기 위해 아미노산 위치에 대한 변형이 이루어질 수 있다. 이러한 변화는 표적이 된 잔기(들)의 공지되었거나 추정되는 구조적 특성 또는 기능상 특성을 바탕으로 부위 특이적 돌연변이를 통하여 도입될 수 있거나 또는 무작위로 도입될 수 있다. 변이체 단백질이 발현된 후, 변형으로 말미암은 생물 활성 변화는 결합 또는 기능 검정을 사용하여 용이하게 평가될 수 있다.

[0163] 뉴클레오티드 서열들간의 상동성은 DNA 잡종화 분석에 의해 결정될 수 있는데, 여기서 이중 가닥 DNA 하이브리드의 안정성은 일어난 염기 쌍 형성 정도에 의존적이다. 높은 온도 및/또는 낮은 염 함량의 조건은, 하이브리드의 안정성을 감소시키고, 선택된 상동성 정도에 못미치는 상동성을 가지는 서열의 어닐링(annealing)을 방지하도록 달라질 수 있다. 예를 들어 G-C 함량이 약 55%인 서열에 있어서, 40°C ~ 50°C, 6 x SSC(염화나트륨/시트르산나트륨 완충제) 및 0.1% SDS(도데실황산나트륨)의 잡종화 및 세척 조건은 약 60% ~ 약 70%의 상동성을 초래하고, 50°C ~ 65°C, 1 x SSC 및 0.1% SDS의 잡종화 및 세척 조건은 약 82% ~ 약 97%의 상동성을 초래하며, 52°C, 0.1 x SSC 및 0.1% SDS의 잡종화 및 세척 조건은 약 99% ~ 약 100%의 상동성을 초래한다. 뉴클레오티드와 아미노산 서열을 비교하기 위한(그리고 상동성의 정도를 측정하기 위한) 여러 컴퓨터 프로그램도 또한 입수 가능하고, 시판중인 소프트웨어와 무료 소프트웨어 둘 다의 공급처를 제공하는 목록은 문헌(Ausubel et al. (1999))에서 찾아볼 수 있다. 용이하게 입수 가능한 서열 비교 및 다중 서열 정렬 알고리즘으로서는 각각 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)(Altschul et al., 1997) 및 ClustalW 프로그램이 있다. BLAST는 www.ncbi.nlm.nih.gov에서 입수 가능하고, ClustalW 버전은 2.ebi.ac.uk에서 입수 가능하다.

[0164] 융합 단백질의 성분들은, 각각이 의도로 하는 기능을 수행할 수 있도록 제공된 임의의 순서에 가깝게 조직될 수 있다. 예를 들어 일 구현예에서, 생물 활성 폴리펩티드는 효과기 분자의 C-말단 또는 N-말단에 위치한다.

[0165] 본 발명의 바람직한 효과기 분자는 도메인들이 의도로 하는 기능을 유도하는 크기를 가질 것이다. 본 발명의 효과기 분자는 제조된 후, 널리 공지된 화학 가교 방법을 비롯한 다양한 방법에 의해 생물 활성 폴리펩티드에 융합될 수 있다. 예를 들어 문헌(Means, G. E. and Feeney, R. E. (1974), *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day. See also, S. S. Wong (1991), *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press)을 참조한다. 그러나 일반적으로 틀 내 융합 단백질을 제조하기 위해 제조합 조작법을 사용하는 것이 바람직하다.

[0166] 언급된 바와 같이, 본 발명에 따른 융합 분자 또는 접합체 분자는 몇 가지 방식으로 조직될 수 있다. 예시적 구성에 있어서, 생물 활성 폴리펩티드의 C-말단은 효과기 분자의 N-말단에 작동 가능하도록 결합된다. 이러한 결합은 원한다면 제조합 방법에 의해 달성될 수 있다. 그러나 다른 구성에 있어서, 생물 활성 폴리펩티드의 N-말단은 효과기 분자의 C-말단에 결합된다.

[0167] 대안적으로 또는 추가로, 필요에 따라 하나 이상의 추가 효과기 분자가 생물 활성 폴리펩티드 또는 접합 복합체에 삽입될 수 있다.

[0168] 백터 및 발현

[0169] 본 발명의 융합 단백질 복합체(예컨대 TxM)의 성분들을 발현하는데 다수의 전략이 사용될 수 있다. 예를 들어 본 발명의 융합 단백질 복합체 성분 하나 이상을 암호화하는 구조체는, 구조체 삽입을 위해 백터를 절단하는 제한 효소를 사용하여 적합한 백터에 통합된 다음 결합될 수 있다. 이후 유전자 구조체를 함유하는 백터는 융합 단백질의 발현에 적합한 숙주에 도입된다. 일반적으로 문헌(Sambrook et al., 상동)을 참조한다. 적합한 백터의 선택은 클로닝 프로토콜에 관한 인자들을 바탕으로 실험을 통하여 이루어질 수 있다. 예를 들어 백터는 사용되고 있는 숙주와 양립 가능하여야 하며, 이러한 숙주에 적절한 레플리콘(replicon)을 가져야 한다. 백터는 발현될 융합 단백질 복합체를 암호화하는 DNA 서열을 수용할 수 있어야 한다. 적합한 숙주 세포로서는 진핵생물 및 원핵생물 세포, 바람직하게 용이하게 형질전환되어 배양 배지 중에서 신속한 성장을 보일 수 있는 세포를 포함한다. 특히 바람직한 숙주 세포로서는 원핵생물, 예컨대 이.콜라이, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 등과, 진핵생물, 예컨대 동물 세포 및 효소 균주, 예컨대 에스.세레비지아에를 포함한다. 포유동물 세포, 특히 J558, NS0, SP2-O 또는 CHO가 일반적으로 바람직하다. 기타 적합한 숙주로서는, 예를 들어 곤충 세포, 예컨대 Sf9를 포함한다. 종래의 배양 조건이 적용된다. 문헌(Sambrook, 상동)을 참조한다. 이후 안정적으로 형질전환되었거나 형질감염된 세포주가 선택될 수 있다. 본 발명의 융합 단백질 복합체를 발현하는 세포는 공지의 방법에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어 면역글로불린에 결합된 융합 단백질 복합체의 발현은, 결합된 면역글로불린에

특이적인 ELISA 및/또는 면역 블롯팅(immunoblotting)에 의해 확인될 수 있다. IL-15 또는 IL-15R α 도메인들에 결합된 생물 활성 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질의 발현을 확인하기 위한 다른 방법들이 실시예들에 개시되어 있다.

- [0170] 상기에서 일반적으로 언급된 바와 같이, 원하는 융합 단백질을 암호화하는 핵산을 증식시키기 위한 예비적 목적으로 숙주 세포가 사용될 수 있다. 그러므로 숙주 세포는 특별히 융합 단백질 생산이 의도되는 원핵생물 또는 진핵생물 세포를 포함할 수 있다. 따라서 숙주 세포는, 구체적으로 융합체를 암호화하는 핵산을 증식시킬 수 있는 효모, 파리, 벌레, 식물, 개구리, 포유동물 세포 및 장기를 포함한다. 사용될 수 있는 포유동물 세포주의 비제한적 예들로서는 CHO dhfr-세포(Urlaub and Chasm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)), 293 세포(Graham et al., *J Gen. Virol.*, 36:59 (1977)) 또는 골수종 세포, 예컨대 SP2 또는 NSO(Galfre and Milstein, *Meth. Enzymol.*, 73(B):3 (1981))를 포함한다.
- [0171] 원하는 융합 단백질 복합체를 암호화하는 핵산을 증식시킬 수 있는 숙주 세포는 포유동물 이외의 진핵생물 세포, 예컨대 곤충 세포(예컨대 에스피. 프루기페르다(*Sp. frugiperda*)), 효모(예컨대 에스.세레비지아에, 에스. 폼베(*S. pombe*), 피.파스토리스(*P. pastoris*), 케이. 락티스(*K. lactis*), 에이치. 폴리모르파(*H. polymorpha*); Fleer, R.에 의해 일반적으로 검토된 바와 같은 것들(*Current Opinion in Biotechnology*, 3(5):486496 (1992)), 진균 세포 및 식물 세포도 포함한다. 이.콜라이 및 바실러스와 같은 임의의 원핵생물도 또한 고려된다.
- [0172] 세포를 형질감염시키기 위한 표준 기술에 의해 원하는 융합 단백질을 암호화하는 핵산이 숙주 세포에 도입될 수 있다. "형질감염시키는 것" 또는 "형질감염"이란 용어는, 핵산을 숙주 세포에 도입하기 위한 종래의 모든 기술, 예컨대 인산칼슘 공침전법, DEAE-텍스트란 매개 형질감염, 리포펙션(lipofection), 전기영동, 미세주입, 바이러스에 의한 형질도입 및/또는 통합을 포함하는 것으로 의도된다. 숙주 세포를 형질감염시키기 적합한 방법은 문헌(Sambrook et al., 상동) 및 기타 실험 교과서에서 찾아볼 수 있다.
- [0173] 다수의 촉진인자(전사 개시 조절 영역)가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 적당한 촉진인자의 선택은 제안된 발현 숙주에 따라서 달라진다. 이중 공급원으로부터 유래하는 촉진인자는, 그것이 선택된 숙주 내에서 기능을 발휘하는 한, 사용될 수 있다.
- [0174] 촉진인자 선택은 또한 원하는 효능과, 펩티드 또는 단백질 생성 수준에 따라 달라진다. 유도성 촉진인자, 예컨대 tac는 종종 이.콜라이 내 단백질 발현 수준을 극적으로 증가시키기 위해 사용된다. 단백질 과발현은 숙주 세포에 유해할 수 있다. 결과적으로 숙주 세포 성장이 제한될 수 있다. 유도성 촉진인자가 사용되면, 숙주 세포는 허용 가능한 밀도로 배양된 후 유전자 발현이 유도되고, 이로써 생성물 수율이 더 높아지는 것이 가속화되는 것이다.
- [0175] 본 발명에 따라 다양한 신호 서열이 사용될 수 있다. 생물 활성 폴리펩티드 암호화 서열에 상동성인 신호 서열이 사용될 수 있다. 대안적으로 발현 숙주 내에서의 효율적 분비와 처리를 위해 선택 또는 디자인된 신호 서열도 또한 사용될 수 있다. 예를 들어 적합한 신호 서열/숙주 세포 쌍은 비.서브틸리스 sacB 신호 서열(비.서브틸리스 내 분비용)과, 사카로마이세스 세레비지아에 a-메이팅 인자(mating factor) 또는 피.파스토리스 산 포스파타아제 phoI 신호 서열(피.파스토리스 내 분비용)을 포함한다. 신호 서열은 신호 펩티다아제 절단 부위를 암호화하는 서열, 또는 보통은 10개 이하의 코돈으로 이루어진 짧은 뉴클레오티드 가교를 통하여 단백질 암호화 서열에 직접 연결될 수 있는데, 이 경우 상기 가교는 하류 TCR 서열의 올바른 해독률을 보장한다.
- [0176] 전사 및 번역을 증진시키기 위한 요소들이 진핵생물 단백질 발현계에 대해 동정되었다. 예를 들어 이중 촉진인자 양쪽 중 어느 한쪽으로부터 1,000 bp 떨어져 꽃양배추 모자이크 바이러스(CaMV) 촉진인자가 배치되면, 식물 세포에서 전사 수준은 10배 ~ 400배까지 증가할 수 있다. 발현 구조체는 또한 적당한 번역 개시 서열을 포함하여야 한다. 적당한 번역 개시를 위하여 Kozak 공통 서열을 포함하도록 발현 구조체가 변형되면, 번역 수준은 10배까지 증가할 수 있다.
- [0177] 발현 구조체의 일부일 수 있거나, 또는 이로부터 분리되어 존재할 수 있는(예를 들어 발현 벡터에 의해 운반될 수 있는) 선택 마커가 종종 사용되므로, 이러한 마커는 관심 유전자 부위와 상이한 부위에 통합될 수 있다. 그 예로서는 항생제에 대한 내성을 부여하는 마커(예컨대 bla는 이.콜라이 숙주 세포에 암피실린에 대한 내성을 부여하고, nptII는 다양한 원핵생물 및 진핵생물 세포에 카나마이신에 대한 내성을 부여함) 또는 숙주가 최소 배지에서 성장하는 것을 허용하는 마커(예컨대 HIS4는 피.파스토리스 또는 His⁻ 에스.세레비지아에 히스티딘 부재 하에서도 성장할 수 있도록 함)를 포함한다. 선택 마커는 자체만의 전사 및 번역 개시 및 종료 조절 영역을

가져서, 마커의 독립적 발현을 허용한다. 만일 항생제 내성이 마커로서 사용되면, 선택을 위한 항생제의 농도는 항생제에 따라서 달라질 것인데, 일반적으로 항생제 농도는 배지 1 mL당 항생제 10 mg 내지 600 mg의 범위이다.

[0178] 발현 구조체는, 공지의 재조합 DNA 기술을 이용하여 조립된다(Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1999). 제한 효소 분해 및 절찰은, 2개의 DNA 단편을 연결하는데 이용되는 기본 단계들이다. DNA 단편의 말단들은 절찰 전에 변형을 필요로 할 수 있는데, 이 변형은 돌출 말단(overhang)을 채우거나, 뉴클레아제(예컨대 ExoIII)로 단편(들)의 말단부를 절실시키거나, 부위 유도적 돌연변이유발법에 의하거나, 또는 PCR에 의해 신규 염기쌍들을 부가함으로써 달성될 수 있다. 선택된 단편들의 연결을 돕기 위해 폴리링커(polylinker)와 어댑터(adaptor)가 사용될 수 있다. 발현 구조체는 통상적으로 이.콜라이의 제한, 절찰 및 형질전환 라운드를 이용하는 단계들에서 조립된다. 발현 구조체를 구성하는데 적합한 클로닝 벡터 다수(IZAP 및 pBLUESCRIPT SK-1(Stratagene, La Jolla, CA), pET(Novagen Inc., Madison, WI); Ausubel et al., 1999에 예시됨)가 당 분야에 공지되어 있으며, 본 발명에 있어서 벡터에 관한 구체적인 선택은 중요하지 않다. 클로닝 벡터의 선택은 발현 구조체를 숙주 세포에 도입하기 위해 선택된 유전자 이동계에 의해 영향을 받을 것이다. 생성된 구조체는 각 단계의 말미에 제한 분석, DNA 서열 분석, 잡종화 및 PCR 분석에 의해 분석될 수 있다.

[0179] 발현 구조체는 클로닝 벡터 구조체(선형 또는 환형)로서 숙주를 형질전환시킬 수 있거나, 또는 클로닝 벡터로부터 분리되어 그대로 사용되거나 전달 벡터에 도입되어 사용될 수 있다. 전달 벡터는 선택된 숙주 세포 유형 내에 발현 구조체를 도입하여 이를 유지시키는 것을 돕는다. 발현 구조체는 다수의 공지된 유전자 이동계(예컨대 자연 순응성, 화학물질 매개 형질전환, 원형질체 형질전환, 전기천공, 유전자총 형질전환, 형질감염 또는 접합) 중 임의의 것에 의해 숙주 세포에 도입된다(Ausubel et al., 1999; Sambrook et al., 1989). 선택된 유전자 이동계는 사용된 숙주 세포와 벡터계에 의존적이다.

[0180] 예를 들어 발현 구조체는 원형질체 형질전환 또는 전기천공에 의해 에스.세레비지아에 세포에 도입될 수 있다. 에스.세레비지아에의 전기천공은 용이하게 달성되며, 그 결과 세포벽불완전체거균(spheroplast) 형질전환과 거의 동일한 형질전환 효율을 보이게 된다.

[0181] 본 발명은 또한 관심 융합 단백질을 분리하기 위한 제조 방법을 추가로 제공한다. 이 방법에 있어서, 조절 서열에 작동 가능하도록 연결된, 관심 단백질을 암호화하는 핵산이 내부에 도입된 숙주 세포(예컨대 효모, 진균, 곤충, 세균 또는 동물 세포)는 관심 융합 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 전사가 자극되는 배양 배지 중에서 생산 규모로 성장한다. 이후 관심 융합 단백질은 수득된 숙주 세포 또는 배양 배지로부터 분리된다. 배지 또는 수득된 세포로부터 관심 단백질을 분리하기 위해 표준 단백질 정제 기술이 사용될 수 있다. 구체적으로 정제 기술은 원하는 융합 단백질을 다양한 도구, 예컨대 회전병, 스피너 플라스크, 조직 배양 평판, 생물반응기 또는 발효조로부터 대규모로(즉 적어도 밀리그램 단위의 양만큼) 발현 및 정제하기 위해 사용될 수 있다.

[0182] 발현된 단백질 융합 복합체는 공지의 방법에 의해 분리 및 정제될 수 있다. 통상적으로 배양 배지는 원심분리 또는 여과되고, 이후 상정액은 발현된 융합 복합체와 결합하는 모노클로날 항체를 사용하는 것을 포함하는 면역 친화성 프로토콜, 또는 친화성 또는 면역친화성 크로마토그래피, 예컨대 단백질-A 또는 단백질-G 친화성 크로마토그래피에 의해 정제된다. 본 발명의 융합 단백질은 공지의 기술들을 적당히 병행하여 분리 및 정제될 수 있다. 이러한 방법들로서는, 예를 들어 용해도를 이용하는 방법, 예컨대 염 침전법 및 용매 침전법, 분자량의 차이를 이용하는 방법, 예컨대 투석, 한외여과, 겔여과 및 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동법, 전기적 하전량의 차이를 이용하는 방법, 예컨대 이온 교환 컬럼 크로마토그래피, 특이적 친화성을 이용하는 방법, 예컨대 친화성 크로마토그래피, 소수성의 차이를 이용하는 방법, 예컨대 역상 고성능 액체 크로마토그래피, 그리고 등전점 차이를 이용하는 방법, 예컨대 등전점 맞춤 전기영동, 금속 친화성 컬럼, 예컨대 Ni-NTA를 이용하는 방법을 포함한다. 일반적으로 이러한 방법에 관하여 개시되어 있는 문헌(Sambrook et al.(상동) 및 Ausubel et al.(상동))을 참조한다.

[0183] 본 발명의 융합 단백질은 실질적으로 순수한 것이 바람직하다. 즉, 본 융합 단백질은 자연에서 이를 수반하는 세포 대체물(cell substituent)로부터 분리되고, 이로써 융합 단백질은, 바람직하게 적어도 80%(w/w) 또는 90%(w/w) 또는 95%(w/w)의 균질성을 보이며 존재한다. 적어도 98%(w/w) 내지 99%(w/w)의 균질성을 보이는 융합 단백질이 다수의 약학적 응용, 임상 응용 및 연구적 응용에 가장 바람직하다. 융합 단백질이 일단 실질적으로 정제되면, 이 단백질에는 치료적 응용을 위하여 오염물이 실질적으로 존재하지 않아야 한다. 가용성 융합 단백질이 일단 부분적으로나 실질적으로 순수한 상태로 정제되면, 이 단백질은 치료적으로 사용될 수 있거나, 또는 본원에 개시된 바와 같이 시험관 내 또는 생체 내 검정을 수행하는데 사용될 수 있다. 실질적 순도는, 다양한 표준적 기술, 예컨대 크로마토그래피 및 겔 전기영동에 의해 측정될 수 있다.

- [0184] 본 융합 단백질 복합체는, 암성이거나 감염되었거나 하나 이상의 질환에 의해 감염성을 보이게 될 수 있는 여러 세포와 함께 시험관 내 또는 생체 내에서 사용되기 적합하다.
- [0185] 인간의 인터루킨-15(huIL-15)는, 항원 제시 세포상에 발현되는 인간 IL-15 수용체 α 사슬(huIL-15R α)에 의하여 면역 효과기 세포에 경유 제시(trans-presenting)된다. IL-15R α 는, 주로 세포의 스시 도메인을 통하여 높은 친화도(38 pM)로 huIL-15와 결합한다(huIL-15R α Su). 본원에 기술된 바와 같이 huIL-15 및 huIL-15R α Su 도메인은 다중 도메인 융합 복합체를 구성하기 위한 스캐폴드로서 사용될 수 있다.
- [0186] IgG 도메인, 구체적으로 Fc 단편은 승인된 생물의약품을 비롯하여 다수의 치료용 분자에 대한 이량체 스캐폴드로서 성공적으로 사용된 바 있다. 예를 들어 에타너셉트는 가용성 인간 p75 종양 괴사 인자- α (TNF- α) 수용체 (sTNFR)가, 인간 IgG1의 Fc 도메인에 결합되어 있는 이량체이다. 이와 같은 이량체화는 TNF- α 활성 억제에 대해 에타너셉트로 하여금 단량체 sTNFR보다 1000배 이하로 더 강력하게 될 수 있도록 만들고, 단량체 형태의 혈청 중 반감기보다 5배 더 긴 혈청 중 반감기를 융합체에 제공한다. 결과적으로 에타너셉트는 TNF- α 의 생체 내 전염증 활성을 중화하고, 다수의 상이한 자가면역성 적응증에 대한 환자의 치료결과를 개선하는데 효과적이다.
- [0187] Fc 단편의 이량체화 활성에 더하여, 이 Fc 단편은 또한 보체 활성화, 그리고 자연살해(NK) 세포, 호중구, 식세포 및 수지상 세포 상에 제시되는 Fc γ 수용체와의 상호작용을 통해 세포독성 효과기 기능도 제공한다. 항암 치료 항체 및 기타 항체 도메인-Fc 융합 단백질에 관한 내용 중, 이러한 활성은 동물 종양 모델 및 암 환자에서 관찰되는 효능에 중요한 역할을 담당할 수 있을 것이다. 그러나 이와 같은 세포독성 효과기 반응은 다수의 치료적 응용에 있어 충분치 못할 수 있다. 그러므로 Fc 도메인의 효과기 활성을 개선 및 증진하고, 세포용해성 면역 반응, 예컨대 T 세포 활성을 표적화된 치료 분자를 통해 질환 부위에 보충하는 기타 수단을 개발하는 것에 상당한 관심이 모아지고 있다. IgG 도메인은 전통적인 하이브리도마 융합 기술에 의해 생성된 생성물의 품질과 양을 개선/증가시키는 이중 특이적 항체를 생성하기 위한 스캐폴드로서 사용되어 왔다. 비록 이 방법은 다른 스캐폴드의 단점들을 우회하지만, 포유동물 세포에서 이중 특이적 항체를 임상 개발 및 사용을 지원하기 충분한 수준으로 제조하는 것은 어려운 일이었다.
- [0188] 인간 유래 면역자극성 다량체 스캐폴드를 개발하고자 하는 노력으로, 인간 IL-15(huIL-15) 및 IL-15 수용체 도메인이 사용되었다. huIL-15는, huIL-15 수용체 α -사슬(huIL-15R α)과 높은 결합 친화도(평형 해리 상수 (KD) 약 10^{-11} M)로 결합하는, 시토카인의 소형 4중 α -나선 묶음(bundle) 과의 일원이다. 생성된 복합체는 이후 T 세포 및 NK 세포 표면에 제시되는 인간 IL-2/15 수용체 β /공통 γ 사슬(huIL-15R β γ C) 복합체들에 경유 제시된다. 이 시토카인/수용체 상호작용을 통해 바이러스 감염 세포 및 악성 세포를 근절하는데 중요한 역할을 담당하는 효과기 T 세포와 NK 세포의 증식 및 활성화가 초래된다. 보통 huIL-15 및 huIL-15R α 는 수지상 세포 내에서 함께 생성되어, 주후 세포 내에 이중이량체 분자로서 분비되어 세포 표면에 제시되는 복합체를 이룬다. 그러므로 huIL-15 및 huIL-15R α 상호작용의 특성들은, 이와 같은 사슬간 결합 도메인이 인간 유래 면역자극 스캐폴드로서 사용되어, 표적 특이적 결합이 가능한 가용성 이량체 분자를 형성함을 암시한다.
- [0189] 이하에 상세히 기술된 바와 같이, huIL-15:huIL-15R α Su 기반 스캐폴드는 PD-L1 TxM을 제조하는데 사용되었다. 이 이량체 융합 단백질 복합체는 이의 huIL-15 도메인들과 결합 도메인들의 면역자극 및 표적 특이적 생물 활성을 보유하였는데, 이 점은 huIL-15 및 huIL-15R α 의 부가가 융합 도메인들의 공간적 배열을 유의미하게 변경시키지 않았고, 시토카인 활성화에 영향을 미치지 않으면서 형태상의 가요성을 적당한 정도로 제공하였음을 말해주는 것이다. 그러므로 이 스캐폴드는 다가 융합 복합체, 예컨대 PD-L1 TxM을 형성하여, 분자의 전체 결합 친화성을 증가시키는데 사용될 수 있었다. 가용성 융합 단백질은 제조한 CHO 세포 배양액 중에서 비교적 높은 수준(과도한 세포주 스크리닝 또는 최적화 없이도 세포 배양 상청액 1 리터당 mg 단위)으로 제조되었으며, 세포 배양 상청액으로부터 용이하게 정제될 수 있었다.
- [0190] 본 발명의 실시예는, 달리 명시되지 않은 한, 당 업자의 이해범위 내에서 널리 알려진 종래의 분자 생물학 기술(재조합 기술 포함), 미생물학 기술, 세포 생물학 기술, 생화학 기술 및 면역학 기술이 사용된다. 이러한 기술은 문헌(예컨대 "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991))에 상세히 설명되어 있다. 이러한 기술은 본 발명의 폴리뉴클레오티드와 폴리펩티드의 제조에 적용될 수 있으며, 마찬가지로 본 발명을 제조하고 실시하는 데에도 사용될 수 있다. 특정 구현예들에 특히 유용한 기술은 이하 문단들

에서 논의될 것이다.

[0191] 림프종

[0192] 림프종은 B 림프구 또는 T 림프구가 정상 세포보다 더 빠르게 분열하고, 의도된 시간보다 더 오래 생존할 때 발생하는 혈액 암의 한 유형이다. 예를 들어 B 세포 림프종은 호지킨 림프종과 대부분의 비호지킨 림프종 둘 다를 포함한다. B 세포 림프종은 CD20을 발현한다.

[0193] 림프종은 림프절, 비장, 골수, 혈액 또는 기타 장기에서 발달할 수 있다. 이러한 악성 세포는 종종 림프절에서 기원하여, 소절의 비대(즉 림프양 세포의 고형 종양)로서 제시하기도 한다. 림프종은 림프절 생검(즉 림프절의 일부 또는 전부를 절개하여 현미경으로 검사하는 것)에 의해 제한적으로 진단된다. 이러한 검사는, 림프종을 나타낼 수 있는 병리조직학적 특징들을 규명할 수 있다. 치료는 화학요법, 방사선요법 및/또는 골수 이식을 수반할 수 있다.

[0194] 이하 실시예들은 본 발명의 검정, 스크리닝 및 치료 방법이 어떻게 실시되고 이용되는지에 대한 완전한 개시 및 설명을 당업자들에게 제공하기 위해 제시되는 것이지, 본 발명의 발명자들이 자신들의 발명이라고 간주하는 것에 대한 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다.

[0195] 실시예

[0196] 실시예 1: 항 PD-L1 결합 도메인을 포함하는 IL-15 기반 융합 단백질 복합체(PD-L1 TxM)의 제조 및 특성규명

[0197] 암 세포는 면역 관문 분자 및 리간드, 예컨대 PD-L1에 의해 조절되는 다양한 면역 억제 경로를 가동시킬 수 있다. 이러한 관문 분자를 차단하는 항체가 항 종양 면역성을 증진시키는 것으로 보였다. IL-15는 NK 및 CD8⁺ 세포의 세포용해 활성을 증가시키면서 이 세포들을 활성화 및 증식시킨다. Ig 분자의 Fc 영역은 NK 세포 및 대식세포 상 Fcγ 수용체와 상호작용할 수 있으며, 표적 질환 세포에 대한 항체 의존적 세포성 세포독성(ADCC) 또는 항체 의존적 세포성 식세포작용(ADCP)을 매개한다. 하기에 상세히 기술된 바와 같이, 항 PD-L1 결합 도메인에 융합된 IL-15N72D:IL-15Rα Su/Fc 스캐폴드를 포함하는 단백질 복합체가 제조되었다. 이 복합체는 항 PD-L1 결합 도메인을 통해 종양 세포를 인지하고, IL-15 활성을 통해 NK 세포 반응 및 T 세포 반응을 유도하며, Fc 결합 도메인을 통해 ADCC 및 CDC를 자극한다.

[0198] 구체적으로 구조체는 단일 사슬 항 PD-L1 항체를 huIL-15N72D 및 IL-15Rα Su/Fc 사슬들에 결합하여 제조되었다. 항 PD-L1 단일 사슬 항체(항 PD-L1 scAb) 서열은 가요성 링커 서열을 통해 결합된, 항체의 중쇄 및 경쇄 V 항체 도메인 암호화 영역을 포함한다. 단일 사슬 항체 도메인은 VH-링커-VL 또는 VL-링커-VH 형태 중 어느 하나의 형태로 배열될 수 있다. 몇몇 경우에 있어서, 항 PD-L1 scAb는 IL-15N72D 및/또는 IL-15Rα Su/Fc 사슬의 C-말단에 결합된다. 다른 경우에 있어서, 항 PD-L1은 IL-15N72D 및/또는 IL-15Rα Su/Fc 사슬의 N-말단에 결합된다. 마우스 PD-L1 분자 또는 인간 PD-L1 분자 중 어느 하나에 특이적인 항 PD-L1 scAb가 이러한 구조체에 사용되었다.

[0199] 1) huIL-15N72D 및 huIL-15Rα Su/huIgG1 Fc 사슬의 N-말단에 결합된 항 인간 PD-L1 scAb를 포함하는 구조체의 핵산 및 단백질 서열은 이하에 보였다. (신호 펩티드 서열 및 종결 코돈을 포함하는) 항 인간 PD-L1 scAb/IL-15N72D 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 1):

(신호 펩티드)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(항 인간 PD-L1 scAb)

(VL)

AACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCGTGTCCGCCTCCGTGGGAGATCGGGTG
 ACCATCACCTGTAGGGCCTCCCAGGACATCTCCAGGTGGCTGGCCTGGTACCAGCAG
 AAGCCCCGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCCTCCCTGCAGTCCGGA
 GTGCCTAGCAGGTTCTCCGGCTCCGGATCCGGCACAGACTTCGCCCTGACCATCTCC
 TCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGCCGACTCCAGGTTT
 TCCATCACCTTCGGCCAGGGCACCAGGCTGGAGATCAAGAGG

(링커)

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

(VH)

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCCCTGAG
 GCTGTCCTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCAGCTCCTACTCCATGAACTGGGTGAG
 GCAGGCCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCTTACATCTCCAGCTCCTCCTCCAC
 CATCCAGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTTACCATCTCCAGGGACAACGCCA
 AGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGACGAGGACACCGCCGTGTAC
 TACTGCGCCAGGGGCGACTATTACTACGGCATGGACGTGTGGGGCCAGGGAACCAC
 CGTGACCGTGTCTCTCC

(인간 IL-15N72D)

AACTGGGTAAACGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATG
 CATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTTACCCCCAGTTGCAAAGTAACA
 GCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCA
 AGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTTGTCTTCT
 AATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAA
 ATATTAAAGAATTTTTGCAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTC
 TTAA

(신호 펩티드 서열을 포함하는) 항 인간 PD-L1 scAb/IL-15N72D 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열 번호 2):

(신호 펩티드)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(항 인간 PD-L1 scAb)

(VL)

NIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQDISRWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
 RFSGSGSGTDFALTISSLPEDFATYYCQQADSRFSITFGQGRLEIKR

(링커)

GGGSGGGGSGGGGS

(VH)

EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSTIQ
 YADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARGDYGGMDVWGQGTITV
 VSS

(인간 IL-15N72D)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLES GDASIH
DTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0204]

[0205]

몇몇 경우에서, 리더 펩티드는 성숙 폴리펩티드로부터 절단된다.

[0206]

(리더 서열을 포함하는) 항 인간 PD-L1 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 3):

(리더 서열)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(항 인간 PD-L1 scAb)

(VL)

AACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCGTGTCCGCCTCCGTGGGAGATCGGGTG
ACCATCACCTGTAGGGCCTCCCAGGACATCTCCAGGTGGCTGGCCTGGTACCAGCAG
AAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCCTCCCTGCAGTCCGGA
GTGCCTAGCAGGTTCTCCGGCTCCGGATCCGGCACAGACTTCGCCCTGACCATCTCC
TCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGCCGACTCCAGGTTT
TCCATCACCTTCGGCCAGGGCACCAGGCTGGAGATCAAGAGG

(링커)

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

(VH)

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCCCTGAG
GCTGTCTCTGTGCCGCTTCCGGCTTACCTTCAGCTCCTACTCCATGAACTGGGTGAG
GCAGGCCCCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCTTACATCTCCAGCTCCTCCTCCAC
CATCCAGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCAGGACAAACGCCA
AGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGACGAGGACACCGCCGTGTAC
TACTGCGCCAGGGGCGACTATTACTACGGCATGGACGTGTGGGGCCAGGGAACCAC
CGTGACCGTGTCTCTCC

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
AGCTTGTA CTCCAGGGAGCGGTACATTTGTA ACTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGC

[0207]

ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCCACTGGAC
AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(인간 *IgG1 CH2-CH3 (Fc)* 도메인)

GAGCCGAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACT
CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCCT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA
CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

[0208]

[0209]

(리더 서열을 포함하는) 항 인간 PD-L1 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열 번호 4):

(리더 펩티드)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(항 인간 *PD-L1 scAb*)

(VL)

NIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDISRWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFALTISLQPEDFATYYCQQADSRFSITFGQGTRLEIKR

(링커)

GGGGSGGGSGGGGS

(VH)

[0210]

EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSTIQ
YADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARGDYYYGMDVWGQGTITV
VSS

(인간 *IL-15R α* 스시 도메인)

ITCPPMMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
LKCIR

(인간 *IgG1 CH2-CH3 (Fc)* 도메인)

EPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0211]

[0212]

몇몇 경우에 있어서, 리더 펩티드는 성숙 폴리펩티드로부터 절단된다.

[0213]

2) huIL-15N72D 및 huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 사슬의 N-말단에 결합된 제2 항 인간 PD-L1 scAb(아벨루맵)를 포함하는 구조체의 핵산 및 단백질 서열은 하기에 보였다. (신호 펩티드 서열 및 종결 코돈을 포함하는) 항 인간 PD-L1 scAb/IL-15N72D 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 5):

(신호 펩티드)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(항 인간 PD-L1 scAb)

(VL)

CAGTCCGCTCTGACCCAGCCTGCTTCCGTGTCCGGCTCCCCTGGACAGTCCATCACC
ATCTCCTGTACCGGCACCTCCTCCGATGTGGGCGGCTACAACCTACGTGTCTGCTGAC
CAGCAGCACCCCGGCAAAGCCCCCAAGCTGATGATCTATGACGTGTCCAACCGGCC
CTCCGGCGTGTCCAACAGGTTCTCCGGCTCCAAGTCCGGCAACACCGCCTCCCTGAC
AATCTCCGGCCTGCAGGCCGAGGATGAGGCTGACTACTACTGCTCCTCCTACACCTC
CTCCTCCACCAGGGTGTTCCGGCACCGGCACCAAGGTGACCGTGCTG

(링커)

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

(VH)

GAGGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGAGGCGGACTGGTGCAGCCTGGAGGATCCCTGAG
GCTGTCTGCGCTGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCTCCTACATCATGATGTGGGTGAGG
CAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCTCCATCTACCCCTCCGGCGGCATC
ACCTTCTACGCCGATACCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCCGGGACAACCTCCAAG
AACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCTGAGGACACCGCCGTGTACTA
CTGCGCCAGGATCAAGCTGGGCACCGTGACCACAGTGGACTACTGGGGACAGGGCA
CCCTGGTGACCGTGTCTCTCC

(인간 IL-15N72D)

AACTGGGTAAACGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATG
CATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCCCAGTTGCAAAGTAACA
GCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCA
AGTATTCATGATACAGTAGAAAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTTGTCTTCT
AATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAA
ATATTAAAGAATTTTGCAGAGTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTC
TTAA

(신호 펩티드 서열을 포함하는) 항 인간 PD-L1 scAb/IL-15N72D 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열 번호 6):

(신호 펩티드)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(항 인간 PD-L1 scAb)

(VL)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSG
VSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYCYSSYTSSSTRVFGTGTKVTVL

(링커)

GGGSGGGSGGGGS

(VH)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITF
YADTVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGLVT
VSS

(인간 IL-15N72D)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIH
DTVENLILANDSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0218]

[0219]

몇몇 경우에 있어서, 리더 펩티드는 성숙 폴리펩티드로부터 절단된다.

[0220]

(리더 서열을 포함하는) 항 인간 PD-L1 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 7):

(리더 서열)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

(항 인간 PD-L1 scAb)

(VL)

CAGTCCGCTCTGACCCAGCCTGCTTCCGTGTCCGGCTCCCCTGGACAGTCCATCACC
ATCTCCTGTACCGGCACCTCCTCCGATGTGGGCGGCTACAAC TACGTGTCCTGGTAC
CAGCAGCACCCCGCAAAGCCCCCAAGCTGATGATCTATGACGTGTCCAACCGGCC
CTCCGGCGTGTCCAACAGGTTCTCCGGCTCCAAGTCCGGCAACACCGCCTCCCTGAC
AATCTCCGGCCTGCAGGCCGAGGATGAGGCTGACTACTACTGCTCCTCCTACACCTC
CTCCTCCACCAGGGTGTTCCGGCACCGGCACCAAGGTGACCGTGCTG

(링커)

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

(VH)

GAGGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGAGGCGGACTGGTGCAGCCTGGAGGATCCCTGAG
GCTGTCCTGCGCTGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCTCCTACATCATGATGTGGGTGAGG
CAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCTCCATCTACCCCTCCGGCGGCATC
ACCTTCTACGCCGATACCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCCGGGACAAC TCCAAG
AACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCTGAGGACACCGCCGTGTACTA
CTGCGCCAGGATCAAGCTGGGCACCGTGACCACAGTGGACTACTGGGGACAGGGCA
CCCTGGTGACCGTGTCTCC

[0221]

(인간 *IL-15R α* 스시 도메인)

ATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
AGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAAGTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGC
ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCCTGGAC
AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(인간 *IgG1 CH2-CH3 (Fc)* 도메인)

GAGCCGAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACT
CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
TCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA
CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

[0222]

[0223]

(리더 서열을 포함하는) 항 인간 PD-L1 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열 번호 8):

(리더 서열)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(항 인간 *PD-L1 scAb*)

(VL)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSG
VSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGKVTVL

(링커)

GGGSGGGSGGGGS

[0224]

(VH)

EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITF
YADTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGLTVT
VSS

(인간 *IL-15R α* 스시 도메인)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
LKCIR

(인간 *IgG1 CH2-CH3 (Fc)* 도메인)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWFYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0225]

[0226]

몇몇 경우에 있어서, 리더 펩티드는 성숙 폴리펩티드로부터 절단된다.

[0227]

3) huIL-15N72D 및 huIL-15R α Su/muIgG2A Fc 사슬의 N-말단에 결합된 항 마우스 PD-L1 scAb를 포함하는 구조체

의 핵산 및 단백질 서열은 하기에 보였다. (신호 펩티드 서열 및 종결 코돈을 포함하는) 항 마우스 PD-L1 scAb/IL-15N72D 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 9):

(신호 펩티드)

ATGACATGGACTCTACTATTCCTTGCCTTCCTTCATCACTTAACAGGGTCATGTGCCC
AGTTTGTGCTTACTCAGCCAAACTCT

(항 마우스 PD-L1 scAb)

(VL)

GTGTCTACGAATCTCGGAAGCACAGTCAAGCTGTCTTGCAACCGCAGCACTGGTAAC
ATTGGAAACAATTATGTGAACTGGTACCAGCAGCATGAAGGAAGATCTCCACCAC
TCTGATTATTGGGATGATAGGAGACCAGATGGAGTTCCTGACAGGTTCTCTGGCTC
CATTGACAGATCTTCCAACCTCAGCCCTCCTGACAATCAATAATGTGCAGACTGAGGA
TGAAACTGACTACTTCTGTCACTTACAGTAGTGGTATGTATATTTTCGGCGGTGG
AACCAAGCTCACTGTCCTA

(링커)

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

(VH)

GAGGTTCACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTAAA
GTTGTCCTGCAAACTTCTGGTTACACCTTCAGCAATTACTATATGAGTTGGTTGAA
GCAGATGCCTGGACAGAATATTGAGTGGATCGGAAACATTTATGGTGGAAATGGTG
GTGCTGGCTATAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACAGTGGACAAATCT
TCCAGCACAGCGTACATGGATCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGCCTCTGCAGTCTAT
TTTTGTGCAAGGGTCGGACTTCCCGGCCTTTTGTGATTACTGGGGCCAGGGAGTCATG
GTCACAGTCTCCTCA

(인간 IL-15N72D)

AACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATG
CATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCCAAGTTGCAAAGTAACA
GCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCA
AGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTTGTCTTCT
AATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAA
ATATTAAAGAATTTTGCAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTC
TTAA

(신호 펩티드)

MTWTLLFLAFLHHLTGSCAQFVLTQPNS

(항 마우스 PD-L1 scAb)

(VL)

VSTNLGSTVKLSCNRSTGNIGNNYVNWYQQHEGRSPTTLIYWDDRRPDGVPDRFSGSID
RSSNSALLTINNVQTEDETDYFCQSYSSGMYIFGGGKLTVL

(링커)

GGGSGGGSGGGGS

(VH)

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKTSGYTFSNYYMSWLKQMPGQNIEWIGNIYGGNGGA
GYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMDLSSLTSEASAVYFCARVGLPGLFDYWGQGVMVT
VSS

(인간 *IL-15N72D*)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIH
DTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0232]

[0233]

몇몇 경우에 있어서, 리더 펩티드는 성숙 폴리펩티드로부터 절단된다.

[0234]

(리더 서열을 포함하는) 항 마우스 PD-L1 scAb/huIL-15R α Su/muIgG2A Fc 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 11):

(신호 펩티드)

ATGACATGGACTCTACTATTCCTTGCCTTCCTTCATCACTTAACAGGGTCATGTGCCC
AGTTTGTGCTTACTCAGCCAAACTCT

(항 마우스 *PD-L1 scAb*)

(VL)

GTGTCTACGAATCTCGGAAGCACAGTCAAGCTGTCTTGCAACCGCAGCACTGGTAAC
ATTGGAAACAATTATGTGAACTGGTACCAGCAGCATGAAGGAAGATCTCCCACCAC
TCTGATTTATTGGGATGATAGGAGACCAGATGGAGTTCCTGACAGGTTCTCTGGCTC
CATTGACAGATCTTCCAACCTCAGCCCTCCTGACAATCAATAATGTGCAGACTGAGGA
TGAAACTGACTACTTCTGTCACTTACAGTAGTGGTATGTATATTTTCGGCGGTGG
AACCAAGCTCACTGTCCTA

(링커)

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

(VH)

GAGGTTCACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTAAA
GTTGTCCTGCAAACTTCTGGTTACACCTTCAGCAATTACTATATGAGTTGGTTGAA
GCAGATGCCTGGACAGAATATTGAGTGGATCGGAAACATTTATGGTGGAAATGGTG
GTGCTGGCTATAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCCACTGACAGTGGACAAATCT
TCCAGCACAGCGTACATGGATCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGCCTCTGCAGTCTAT

[0235]

TTTTGTGCAAGGGTCGGACTTCCCGGCCTTTTGTACTGTTGGGCCAGGGAGTCATG
GTCACAGTCTCCTCA

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
AGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGC
ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCCTGGAC
AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(마우스 IgG2a CH2-CH3 도메인)

GAACCAAGAGGGCCACAATCAAGCCCTGTCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAA
CCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATG
ATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCA
GATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACA
AACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCA
GCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACC
TCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCA
CAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCT
GACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACA
ACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGT
TCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAA
TAGCTACTCCTGTTCACTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGAG
CTTCTCCCGGACTCCAGGTAAATAA

[0236]

[0237]

(리더 서열을 포함하는) 항 마우스 PD-L1 scAb/huIL-15R α Su/muIgG2A Fc 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열 번호 12):

(신호 펩티드)

MTWTLLFLAFLHHLTGSCAQFVLTQPNS

(항 마우스 PD-L1 scAb)

(VL)

VSTNLGSTVKLSCNRSTGNIGNNYVNWYQQHEGRSPTTLIYWDDRRPDGVPDRFSGSID
RSSNSALLTINNVQTEDETDYFCQSYSSGMYIFGGGTKLTVL

[0238]

(링커)

GGGSGGGSGGGGS

(VH)

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKTSGYTFSNYYMSWLKQMPGQNIWIGNIYGGNGGA
GYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMDLSSLTSEASAVYFCARVGLPGLFDYWGQGVMT
VSS

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
LKCIR

(마우스 IgG2a CH2-CH3 도메인)

EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQIS
WVFNNEVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPIAPIER
TISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYK
NTEPVLDSGDSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

[0239]

[0240]

몇몇 경우에 있어서, 리더 펩티드는 성숙 폴리펩티드로부터 절단된다.

- [0241] 항 PD-L1 scAb/IL-15N72D 및 항 PD-L1 scAb/IL-15R α Su/Fc 서열은 앞서(본원에 참조로 인용된 미국 특허 제 8,507,222호) 기술된 바와 같이 발현 벡터에 클로닝되었으며, 발현 벡터는 CHO 세포를 형질감염시켰다. CHO 세포 내에서 2개의 구조체의 공동 발현은 가용성 항 PD-L1 scAb/IL-15N72D:항 PD-L1 scAb/IL-15R α Su/Fc 복합체의 형성 및 분비를 허용하였는데, 이 복합체는 단백질 A 친화성 크로마토그래피가 사용되어 CHO 세포 상청액으로부터 정제되었다.
- [0242] 정제된 항 PD-L1 scAb/IL-15N72D:항 PD-L1 scAb/IL-15R α Su/Fc 단백질 복합체의 SDS-PAGE 분석 결과는 도 3에 보였다. 가용성 항 마우스 PD-L1 scAb/huIL-15R α Su/muIgG2A 및 항 마우스 PD-L1 scAb/IL-15N72D 단백질에 해당하는 밴드들은 각각 약 60 kDa 및 약 40 kDa의 위치에서 관찰되었다.
- [0243] 실시예 2: PL-L1 TxM의 시험관 내 특성규명
- [0244] ELISA 기반 방법은 PD-L1 TxM의 형성을 확인시켜주었다. 도 4a에 있어서, 형질감염된 CHO 세포 유래 배양 상청액 중 항 인간 PD-L1 scAb/IL-15N72D:항 인간 PD-L1 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 융합 단백질 복합체는 포착 항체, 항 인간 IgG 항체(Jackson ImmunoResearch), 검출 항체, 바이오틴화 항 인간 IL-15 항체(BAM 247, R&D Systems)와 함께 huIgG1/huIL15 특이적 ELISA가 사용되어 검출되었다. 이는, 비형질감염 CHO 세포를 함유하는 배지의 상청액만이 사용되어 대조군 시료와 비교되었다. 형질감염 CHO 세포로부터 유래한 배양 상청액에서 관찰된 신호의 증가는 PD-L1 TxM 복합체가 생성되었음을 확인시켜주는 것이다 제2 항 인간 PD-L1 scAb/IL-15N72D:항 인간 PD-L1 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 융합 단백질 복합체(아벨루맘 TxM)로부터 유사한 결과가 얻어졌다(도 4b).
- [0245] 마우스 특이적 PD-L1 TxM에 있어서, 융합 단백질 복합체는 포착 항체, Affinipure 당나귀 항 마우스 IgG(Jackson ImmunoResearch) 또는 인간/영장류 IL15 항체(MAB647, R&D system), 그리고 검출 항체 호오스래디시 퍼옥시다아제-Affinipure 당나귀 항 마우스 IgG(Jackson ImmunoResearch) 또는 바이오틴화 항 인간 IL-15 항체(BAM 247, R&D Systems) 각각과 함께, mIgG2a 특이적 또는 huIL15 특이적 ELISA가 사용되어 검출되었다(도 4c). 정제된 마우스 특이적 PD-L1 TxM에 대한 항체 반응성은, 양성 대조군의 경우와 비교되었을 때, 복합체가 형성되었음을 확인시켜주었다.
- [0246] 이러한 융합 단백질 복합체가 종양 세포 상의 PD-L1과 결합하는 능력도 또한 검토되었다. 인간 특이적 PD-L1 TxM의 결합은 MB231 종양 세포를 보유하는 수용체가 사용되는 유세포분석에 의해 평가되었다. 이러한 연구에서, 1×10^5 개 세포는 PD-L1 TxM 복합체로 염색되었다. 도 5a에 보인 바와 같이, 유세포분석은, APC 접합 마우스 항 인간 Fc Ab(Biolegend)가 사용되어 검출되었을 때 MB231 세포에 PD-L1 TxM 복합체가 결합하였음을 입증하였다. 도 5b에 있어서, 이러한 결합의 특이성은 PD-L1 TxM 복합체를 사용하여, 시판중인 APC 접합 항 인간 PD-L1 Ab(Biolegend)로 MB231 세포가 염색되는 것을 차단함으로써 시험되었다. 이와 유사하게, 유세포분석은, 아벨루맘 기반 PD-L1 TxM 복합체가 MB231 종양 세포에 결합함을 입증하였다(도 5c).
- [0247] 마우스 특이적 PD-L1 TxM 복합체의 결합을 평가하기 위하여, PD-L1 양성 5T33P 골수종 및 MB491uc 방광 종양 세포(시험당 5×10^5 개 세포)는 처음에 PE 또는 Brilliant Violet 표지화 항 마우스 PD-L1 Ab(시험당 100 μL 중 2 μg)로 염색되었다(도 6a 및 도 6b). 이러한 결합의 특이성은 정제된 마우스 특이적 PD-L1 TxM 복합체를 첨가하여, 항체와 PD-L1 리간드의 결합을 차단함으로써 시험되었다. 정제된 항 mPD-L1 Ab(S1-PD-L1)는 양성 대조군으로 사용되었다. 흥미롭게도, PD-L1 TxM 복합체는 종양 세포 상 PD-L1 염색을 동량의 항 PD-L1 Ab보다 더 잘 차단하였음이 발견되었다. 이 점은, A20 B 세포 림프종 세포가 사용되는 차단 연구에서 추가로 평가되었다. 역가 분석은, 종양 세포 표면에 발현되는 PD-L1과의 상호작용을 차단함에 있어 PD-L1 TxM이 항 PD-L1 Ab보다 적어도 5배 더 유효하였음을 나타내었다(도 7a 및 도 7b).
- [0248] PD-L1 TxM 복합체의 IL-15 면역 자극 활성을 평가하기 위해, IL-15 의존적 32Dβ 세포(마우스 조혈 세포주)의 증식이 평가되었다. PD-L1 TxM의 수준을 높이면서 이 PD-L1 TxM은 32Dβ 세포(10^4 개 세포/웰)에 첨가되었으며, 이로부터 2일 후 WST-1 증식 시약을 이용하여 세포 증식이 확인되었다. 도 8에 보인 바와 같이, 32Dβ 세포 증식의 용량 의존적 증가는 PD-L1 TxM에 의해 매개되었는데, 이는 이 복합체의 면역자극 활성을 입증해준다.
- [0249] PD-L1 TxM 복합체의 상이한 형태들의 특징과 활성을 평가하기 위해 추가 연구가 수행되었다. 항 PD-L1 scAb/IL-15N72D 및 항 PD-L1 scAb/IL-15R α Su/Fc 단백질을 포함하는 복합체는, 4개의 항 PD-L1 scAb 결합 도메인을 가지는 것으로(즉 4두형(4H)인 것으로) 예상되는 반면에, IL-15N72D 및 항 PD-L1 scAb/IL-15R α Su/Fc 단백질을 포함하는 복합체는 2개의 항 PD-L1 scAb 결합 도메인을 가질 것으로(즉 2두형(2H)인 것으로) 예상된다(도 9a).

이 복합체들은, 2H TxM에 비하여 4H TxM의 표적 세포에 대한 결합성 결합(avidity binding)이 더 크다는 점을 바탕으로 하였을 때, 상이한 활성을 가질 것으로 예상된다. IL-15N72D에 대한 단백질 융합은 또한 IL-15의 생물 활성을 감소시키는 것으로 보이기도 하였다. 그러므로 4H TxM 형태는 2H TxM보다 IL-15 활성이 더 작을 것으로 예상된다. 이러한 차이점은, 큰(항체와 유사한) 표적화 활성 및 더 작은 면역자극 활성이 바람직할 경우(즉 4H TxM 형태일 경우), 아니면 더 작은 표적화 활성 및 더 큰 면역 자극 활성(면역시토카인)이 바람직할 경우에 이 점을 제공할 것으로 예상된다.

[0250] 이러한 형태를 평가하기 위하여, 항 마우스 PD-L1 scAb/IL-15N72D 및 항 마우스 PD-L1 scAb-/IL-15R α Su/Fc 발현 벡터, 또는 IL-15N72D 및 항 마우스 PD-L1 scAb-/IL-15R α Su/Fc 발현 벡터 각각으로 CHO 세포를 형질감염시키므로써, 4H 마우스 특이적 PD-L1 TxM(2C2) 및 2H 마우스 특이적 PD-L1 TxM(PDN3)이 제조되었다. 그 다음, TxM 복합체는 형질감염 CHO 세포 상청액으로부터 단백질 A 크로마토그래피에 의해 정제되었으며, 정제된 단백질은 환원 SDS-PAGE에 의해 평가되었다(도 9b). 각각 약 60 kDa, 약 40 kDa 및 약 16 kDa의 위치에서 가용성 항 마우스 PD-L1 scAb/huIL-15R α Su/muIgG2A, 항 마우스 PD-L1 scAb/IL-15N72D 및 IL-15N72D 단백질에 해당하는 밴드들이 관찰되었다. 뿐만 아니라, 정제된 4H PD-L1 TxM(2C2) 및 2H PD-L1 TxM(PDN3) 복합체들은 분석용 크기별 배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 분석되었을 때 단일 단백질 피크로서 이동하였다(도 9c 및 도 9d). 이러한 결과는, 2개의 상이한 PD-L1 TxM 복합체들이 예상되는 구조적 특성을 가지는 가용성 단백질로서 제조 및 정제될 수 있음을 보여준다.

[0251] 전술된 연구와 유사하게, 이러한 융합 단백질 복합체가 면역 세포상 IL-2Rβ/γ 및 종양 세포상 PD-L1과 결합하는 능력이 연구되었다. IL-2Rβ/γ 양성 32Dβ 세포는 4H PD-L1 TxM(2C2), 2H PD-L1 TxM(PDN3) 또는 대조군 ALT-803 복합체들과 함께 항온처리되었다. 세척 단계를 거친 후, 유세포분석으로 결합형 TxM/ALT-803 복합체를 검출하기 위해 항 인간 IL-15 Ab-PE(또는 이소타입 대조군 Ab)가 첨가되었다. 도 10a에 보인 바와 같이, 4H PD-L1 TxM(2C2), 2H PD-L1 TxM(PDN3) 및 ALT-803 단백질은 대조군과 달리 32Dβ 세포와 결합할 수 있었다. PD-L1과의 결합을 평가하기 위해, PD-L1 양성 5T33P 골수종 세포는 처음에 Brilliant Violet 421(BV421) 표지화 항 마우스 PD-L1 Ab로 염색되었다(10F.9G2). 이 결합의 특이성은, 정제된 4H PD-L1 TxM(2C2) 및 2H PD-L1 TxM(PDN3) 복합체들을 첨가하여, BV421 항체가 PD-L1 리간드에 결합하는 것을 차단함으로써 시험되었다(도 10b 및 도 10c). 정제된 항 mPD-L1 Ab(NJI6)는 양성 대조군으로 사용되었다. 이의 높은 결합성과 일치되게, 4H PD-L1 TxM 1 μg은 항 PD-L1 Ab 염색을 차단함에 있어 2H PD-L1 TxM 6 μg만큼 유효하였다. 이러한 결과는, 4H PD-L1 및 2H PD-L1 TxM 복합체들이 IL-2Rβ/γ 및 PD-L1 표적 결합 활성을 보유함을 확인시켜주는 것이다.

[0252] 전술된 바와 같이, 마우스 특이적 4H PD-L1 및 2H PD-L1 TxM 복합체들의 IL-15 면역 자극 활성은 IL-15 의존적 32Dβ 세포의 증식을 바탕으로 분석되었다. 도 11a 및 도 11b에 보인 바와 같이, 32Dβ 세포 증식의 용량 의존적 증가는 4H PD-L1 및 2H PD-L1 TxM 복합체들 중 어느 하나에 의해 매개되었는데, 이 점은 이 TxM 형태들의 면역 자극 활성을 입증해주는 것이다. 2H PD-L1 TxM 복합체(PDN-3)는 ALT-803에 비하여 IL-15 생체활성에 있어 약간의 감소를 보였던 반면에, 4H PD-L1 TxM 복합체(2C2)는 IL-15 생체활성에 있어 대략 30배만큼의 감소를 보였다. 이 점은, 이전의 결합 도메인-IL-15N72D 융합 단백질의 더 작은 IL-15 활성과 일치한다.

[0253] 4H 인간 특이적 PD-L1 TxM 복합체 및 2H 인간 특이적 PD-L1 TxM 복합체를 대상으로 유사한 연구가 수행되었다. 이 단백질은, CHO 세포를 항 인간 PD-L1 scAb/IL-15N72D 및 항 인간 PD-L1 scAb-/IL-15R α Su/Fc 발현 벡터, 또는 IL-15N72D 및 항 인간 PD-L1 scAb-/IL-15R α Su/Fc 발현 벡터 각각으로 형질감염시킨 다음, 단백질 A 크로마토그래피를 통해 세포 배양 상청액으로부터 정제함으로써 제조되었다. 환원 SDS-PAGE 분석은, 정제된 4H 인간 특이적 PD-L1 TxM 및 2H 인간 특이적 PD-L1 TxM 제제에 있어서 예상되는 단백질 밴드를 확인하였다(도 12a). 이와 유사하게, 분석용 SEC는, 정제된 4H 인간 특이적 PD-L1 TxM 및 2H 인간 특이적 PD-L1 TxM 복합체들이 단일 단백질 피크로서 이동하였음을 나타내었다(도 12b 및 도 12c).

[0254] 이러한 융합 단백질 복합체가 종양 세포상 PD-L1과 결합하는 능력이 분석되었다. PD-L1 양성 PC-3 인간 전립선암 세포가, 10 nM의 정제 인간 특이적 4H PD-L1 TxM, 2H PD-L1 TxM 또는 대조군 2H 항 CD20 scAb(2B8) TxM 복합체의 존재 또는 부재 하에 APC 표지화 항 마우스 PD-L1 Ab로 염색되었다(도 13). 결과는, 인간 특이적 4H PD-L1 및 2H PD-L1 TxM 복합체들이, 항 PD-L1 Ab와 인간 종양 세포의 결합을 차단할 수 있었던 반면에, 대조군 TxM 복합체는 그렇지 않았음을 보여준다. 이전의 결과들과 일치되게, 4H PD-L1 TxM 복합체는 2H PD-L1 TxM 복합체보다 더 우수한 결합 활성을 보였다. 이러한 결과는, 인간 특이적 4H PD-L1 및 2H PD-L1 TxM 복합체들이 인간 종양 세포 상 PD-L1 표적 결합 활성을 보유함을 확인시켜주는 것이다.

[0255] 전술된 바와 같이, 인간 특이적 4H PD-L1 TxM 복합체 및 2H PD-L1 TxM 복합체들의 IL-15 면역 자극 활성은,

IL-15 의존적 32D β 세포의 증식을 기반으로 분석되었다. 도 14a 및 도 14b에 보인 바와 같이, 32D β 세포 증식의 용량 의존적 증가는 4H PD-L1 TxM 복합체 및 2H PD-L1 TxM 복합체 중 어느 하나에 의해 매개되었는데, 이 점은 이 TxM 형태들의 면역 자극 활성을 입증하여주는 것이다. 2H PD-L1 TxM 복합체는 ALT-803에 비하여 IL-15 생체활성에 있어 약간의 증가를 보였던 반면에, 4H PD-L1 TxM 복합체는 ALT-803에 비하여 IL-15 생체활성에 있어 대략 5배의 감소를 보였다. 이 점은, 이전 결합 도메인-IL-15N72D 융합 단백질의 더 작은 IL-15 활성과 일치한다.

[0256] 실시예 3: PD-L1 TxM의 시험관 내 및 생체 내 면역 자극 활성 및 항 종양 활성

[0257] PD-L1 TxM이 생체 내에서 면역 반응을 자극하는 능력이 마우스에서 평가되었다. C57BL/6 마우스는 PBS 200 μ l, ALT-803(0.4 mg/kg, 대조군), 4H 마우스 특이적 PD-L1 TxM(200 μ g, 2C2 (T4M-mPD-L1)), 또는 2H 마우스 특이적 PD-L1 TxM(200 μ g, PDN3(T2M-mPD-L1))로 피하 주사되었다. 처리후 3일에, 비장 및 림프절이 수집되었다. 비장 세포와 림프구는 항 CD4, CD8, NK 및 CD19 Ab가 사용되는 면역 세포 하위세트 염색을 거쳐 유세포분석용으로 준비되었다. 도 15a에 보인 바와 같이, ALT-803, 2H PD-L1 TxM 및 4H PD-L1 TxM 처리는, 이 단백질들의 면역 자극 활성과 일치되게, 비장 중량의 증가를 유도하였다. 구체적으로 2H PD-L1 TxM 처리는 4H PD-L1 TxM 처리보다 더 많은 비장 중량 증가를 유도하였는데, 이 점은 이 복합체들로서 관찰되는 IL-15 활성에 있어서의 차이와 일치한다. 2H PD-L1 TxM 및 4H PD-L1 TxM 처리는 또한 PBS 대조군에 비하여 마우스 비장 및 림프절 내 CD8 T 세포 및 NK 세포 백분율의 증가를 초래하였다(도 15b 및 도 15c). 이러한 면역 반응은, 이 TxM 복합체들의 IL-15 생체활성과 일치하였다.

[0258] 추가로, PD-L1 TxM이 종양 세포에 대해 면역 세포의 세포독성을 자극하는 능력이 시험관 내에서 평가되었다. 제조사의 지침에 따라 PD-L1 양성 세포가 CellTrace Violet(Invitrogen)으로 표지화된 다음, 면역 효과기 세포(즉 비장 세포)와 함께 R10 배지(10% 소 태아 혈청 포함 RPMI-1640) 중에서 효과기:5T33P 골수종 표적 비율 10:1로 배양되었다(37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$). 효과기 세포는, P-mel 마우스 비장 세포를 3일 동안 항 CD3 Ab(2C11: 4 μ g/ml)으로 자극함으로써 준비되었다. 종양 및 효과기 세포는 4일 동안 마우스 특이적 PD-L1 TxM과 함께 항온처리되었으며, 이후 표적 세포 생존율을 확정하기 위해 유세포분석을 통해 분석되었다. PBS는 음성 대조군으로서 사용되었고, ALT-803(IL-15N72D:IL-15R α /Fc), 항 PD-L1 Ab 및 ALT-803 + 항 PD-L1 Ab는 양성 대조군으로서 사용되었다. 도 16에 보인 바와 같이, PBS 처리 군에 비하여 PD-L1 TxM 2.1 μ g 처리 군에서 5T33P 종양 세포의 유의미한 사멸이 관찰되었다.

[0259] 인간 특이적 2H PD-L1 TxM 및 4H PD-L1 TxM 복합체들이 사용되어 유사한 시험관 내 항 종양 활성이 평가되었다. 2명의 상이한 공여자로부터 유래한 인간 NK 세포는 NK 세포 분리 키트(Stemcell Technologies)에 의해 혈액 백혈구연층(blood buffy coat)으로부터 정제되어, 효과기 세포로서 사용되었다. PD-L1 양성 인간 췌장 종양 세포 SW1990은 Celltrace-Violet으로 표지화되어 표적 세포로서 사용되었다. 인간 NK 세포 및 SW1990 종양 세포는 E:T 비율 5:1로 배지 단독, 또는 50nM 항 인간 PD-L1 Ab(대조군), 인간 특이적 2H PD-L1 TxM 복합체 또는 4H PD-L1 TxM 복합체를 함유하는 배지 중에서 혼합되었다. 40시간 후, Violet 표지화 표적 세포의 요오드화프로피딘 염색을 기반으로 하는 유세포분석에 의해 표적 세포 사멸 %가 평가되었다. 도 17에 보인 바와 같이, 인간 특이적 2H PD-L1 TxM 복합체 또는 4H PD-L1 TxM 복합체 중 어느 하나와 항온처리된 인간 NK 세포는 미처리 NK 세포, 또는 항 인간 PD-L1 Ab로 처리된 NK 세포의 PD-L1 양성 인간 종양 세포에 대한 세포독성(즉 기존의 ADCC)보다 더 큰, PD-L1 양성 인간 종양 세포에 대해 세포독성을 매개할 수 있었다. 이러한 결과는 항 PD-L1 Ab의 면역 세포 매개성 표적화 항 종양 활성에 비하여 PD-L1 TxM 복합체의 면역 세포 매개성 표적화 항 종양 활성이 유의미하게 개선되었음을 나타낸다.

[0260] 종양 보유 동물 내에서 PD-L1 TxM의 효능을 평가하기 위해 동소성 5T33P 골수종 모델이 사용되었다. 0일에 암컷 C57BL/6NHsd 마우스(군당 4 마리 마우스)에 5T33P 골수종 세포(1×10^7 개/마우스)가 정맥내 주사되었다. 그 다음, 7일과 14일에 저용량 PD-L1 TxM(0.11 mg/kg, 0.05 mg/kg ALT-803에 대한 몰 등가 용량) 또는 고용량 PD-L1 TxM(52.5 μ g/용량, 25 μ g/용량 항 PD-L1 Ab에 대한 몰 등가 용량)가 피하 투여되었다. ALT-803(0.15 mg/kg) 및 ALT-803(0.05 mg/kg) + 항 PD-L1 Ab(25 μ g/용량)는 양성 대조군으로 사용되었고, PBS는 음성 대조군으로 사용되었다. 생존률(또는 뒷 다리 마비로 말미암은 이환율)이 연구 종말점(study endpoint)으로서 모니터링되었다. 분명한 점은, 고용량 PD-L1 TxM(52.5 μ g/마우스) 처리가 PBS 처리에 비하여 종양 보유 마우스의 생존을 연장시키는 것으로 확인되었다(도 18). 이 효과는, 거의 동일한 ALT-803 + 항 PD-L1 Ab 병용 요법에서 관찰되었던 효과와 동등하였다. 종양 보유 동물에 PD-L1 TxM 처리가 행하여진 후에는 겉으로 드러나는 독성은 관찰되지 않았다.

[0261] 추가로, 동소성 MB491uc 종양 보유 마우스를 대상으로 PD-L1 TxM 복합체의 항 종양 활성이 평가되었다. 0일에 C57BL/6NHsd 마우스(군당 6마리 마우스)의 방광에 MB491uc 방광 종양 세포(3×10^4 개/마우스)가 서서히 주입되었다. 7, 11, 14 및 18 일에 종양 보유 마우스에 마우스 특이적 2H PD-L1 TxM(2.8 mg/kg)이 피하 처리되었다. ALT-803 처리(0.2 mg/kg, 피하) 및 ALT-803(0.2 mg/kg, 피하) + 항 PD-L1 Ab(50 μ g/용량, 피하)는 양성 대조군으로 사용되었고, PBS는 음성 대조군으로 사용되었다. 생존률(또는 이환율)이 연구 종말점으로서 모니터링되었다. 도 19에 보인 바와 같이, 2H PD-L1 TxM 처리는 PBS 처리에 비하여 MB491uc 종양 보유 마우스의 생존을 연장시키는 것으로 확인되었다. 2H PD-L1 TxM의 항 종양 효과는 ALT-803 및 ALT-803 + 항 PD-L1 Ab 양성 대조군으로 관찰되는 바만큼 우수하였거나, 그보다 더 우수하였다.

[0262] 실시예 4: 항 CTLA4 결합 도메인을 포함하는 IL-15 기반 융합 단백질(CTLA4 TxM) 및 항 PD-1 결합 도메인을 포함하는 IL-15 기반 융합 단백질(PD-1 TxM)의 제조

[0263] 본 발명의 융합 단백질이, 실시예 1 ~ 3에 기술된 융합 단백질 복합체와 유사하게 CTLA4 및 PD-1을 인지하는 결합 도메인을 포함하도록 제조되었다. 구체적으로, 단일 사슬 항 CTLA4 항체를 huIL-15N72D 및 IL-15R α Su/Fc 사슬에 결합함으로써 구조체가 제조되었다. 항 CTLA4 단일 사슬 항체(항 CTLA4scAb) 서열은 가요성 링커 서열을 통하여 결합된 항체의 중쇄 및 경쇄 V 항체 도메인의 암호화 영역을 포함한다. 단일 사슬 항체 도메인은 VH-링커-VL 형태 또는 VL-링커-VH 형태 중 어느 하나의 형태로 배열될 수 있다. 몇몇 경우에 있어서, 항 CTLA4scAb는 IL-15N72D 및/또는 IL-15R α Su/Fc 사슬의 C-말단에 결합되어 있다. 다른 경우에 있어서, 항 CTLA4는 IL-15N72D 및/또는 IL-15R α Su/Fc 사슬의 N-말단에 결합되어 있다. 마우스 CTLA4 분자 또는 인간 CTLA4 분자 중 어느 하나에 특이적인 항 CTLA4scAb가 이러한 구조체에 사용되었다.

[0264] (리더 서열을 포함하는) 항 인간 CTLA-4 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 13):

(신호 펩티드)

ATGAAGTGGGTGACCTTTATCTCCCTGCTGTTTCCTGTTTTCTCCGCCTACAGC-

(항 인간 CTLA-4 scAb)

(VL)

ATCGTGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGAGCGCTAGCGTGGGAGACCGGGTGAC
CATCACCTGTGGGCTCCAGAGCATTTCCAGCTACCTGAACTGGTACCAGCAGAA
GCCCCGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATTTACGTGCCAGCAGCCTGCAGTCCGGAGT
GCCTCCAGGTTTAGCGGCTCCGGATCCGGCACCGAGTTCACCCTGACCATCTCCTC
CCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAGCAGGCCAACAGCTTTCCCCC
CACCTTTGGCCAAGGAACCAAGGTGGACATCAAGAGGACCGTGGCC

(링커)

GGAGGCGGAGGCTCCGGCGGCGGGCTCCGGCGGCGGGCTCC

(VH)

CTGGTGACAGTCCGGCGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTG
CGAGGCCCTCCGGCTACACCTTCACCAACTACTACATCCACTGGCTGAGGCAGGCTCC
TGGACAGGGCTGGAGTGGATGGGCATCATCAACCCCTCCGGAGGCTCCACCACCT
ACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAGGATCACCATGACAAGGGACACCTCCACCAACACC
CTGTACATGGAAGTGTCTCCCTCCGGTCCGAGGACACCGCCATCTACTACTGCGCC
AGGAGGGATTGCAGGGGCCCTAGCTGCTACTTCGCTTACTGGGGCCAGGGAACCAC
CGTGACCGTGTCTCCGCTCCACCAAGGGC

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
AGCTTGTAAGTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAAGTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGC

[0265]

ACGTCCAGCCTGACGGAGTGC GTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCACTGGAC
AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(인간 *IgG1 CH2-CH3 (Fc)* 도메인)

GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACT
CCTGGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
TCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA
CGTCTTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

[0266]

[0267] (리더 서열을 포함하는) 인간 CTLA-4 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열 번호 14):

(신호 펩티드)

MKWVTFISLLFLFSSAYS-

(항 인간 *CTLA-4 scAb*)

(VL)

IVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPPRF
SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPPTFGQGTKVDIKRTVA

(링커)

GGGGSGGGSGGGGS

(VH)

LVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTFTNYYIHWLRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTTYA
QKFQGRITMTRDTSTNTLYMELSSLRSEDTAIYYCARRDCRGPSCYFAYWGQGTTVTVS
SASTKG

[0268]

(인간 *IL-15R α* 스시 도메인)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTTPS
LKCIR

(인간 *IgG1 CH2-CH3 (Fc)* 도메인)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0269]

[0270] 몇몇 경우에 있어서, 리더 펩티드는 성숙 폴리펩티드로부터 절단된다.

[0271] 유사하게, (리더 서열을 포함하는) 항 마우스 CTLA-4 scAb/huIL-15R α Su/mIgG2a 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 15):

(신호 펩티드)

ATGAAGTGGGTAACCTTTATTTCCCTTCTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATTC

(항 마우스 : CTLA-4 scAb)

(VL)

GACATCATGATGACCCAGTCCCCCTTCCTCCCTGTCCGTGAGCGCTGGCGAGAAGGCT
 ACCATCAGCTGCAAGTCCTCCCAGTCCCTGTTCAACAGCAACGCCAAGACCAACTAC
 CTGAACTGGTACCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCCAAGCTGCTGATCTATTACGCT
 AGCACCAGGCATACCGGCGTGCCCGACAGGTTTAGGGGATCCGGCAGCGGCACCGA
 CTTACCCCTGACCATCTCCAGCGTGACAGGACGAGGACCTCGCTTTCTACTACTGCCA
 GCAATGGTACGATTACCTTACACCTTCGGCGCTGGCACCAAGGTGGAGATTAAGA
 GG

(링커)

GGCGGAGGCGGATCCGGCGGCGGCGGCTCCGGCGGCGGAGGCTCC

(VH)

CAGATTCAGCTGCAGGAGTCCGGCCCTGGACTGGTCAACCCTAGCCAGTCCCTGAGC
 CTGTCCTGTTCCTGTGACAGGCTATAGCATCACCAGCGGCTACGGCTGGAAGTGGATC
 AGGCAGTTTCCCGGCCAGAAAGTGGAGTGGATGGGCTTCATCTACTACGAGGGCTC
 CACCTACTATAACCCCTCCATCAAGTCCCGGATCAGCATCACCAGGGATACCTCAA

GAACCAGTTCTTCCTGCAAGTCAACTCCGTGACCACCGAAGACACCGCCACCTACTA
 CTGCGCCAGGCAGACAGGCTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACAATGGTGACCG
 TCAGCAGCGCC

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
 AGCTTGTAAGTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAAGTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGC
 ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCACTGGAC
 AACCCCAAGTCTCAAATGCATTAGA

(마우스 IgG2a CH2-CH3 도메인)

GAACCAAGAGGGCCACAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAA
 CCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATG
 ATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCA
 GATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACA
 AACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCA
 GCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACC
 TCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCA
 CAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCT
 GACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACA
 ACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGT
 TCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAA
 TAGCTACTCCTGTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGAG
 CTTCTCCCGGACTCCAGGTAAATAA

(리더 서열을 포함하는) 항 마우스 CTLA-4 scAb/huIL-15R α Su/mIgG2a 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열 번호 16):

(신호 펩티드)

MKWVTFISLLFLFSSAYS-

(항 마우스 *CTLA-4 scAb*)

(VL)

DIMMTQSPSSLSVSAGEKATISCKSSQSLFNSNAKTNLYLNWYLQKPGQSPKLLIYYASTR
HTGVPDRFRGSGSGTDFTLTISVQDEDLAFYYCQQWYDYPYTFGAGTKVEIKR

(링커)

GGGGSGGGSGGGGS

(VH)

QIQLQESGPGLVNPSQSLSLSCSVTGYSITSGYGWNWIRQFPGQKVEWMGFIYYEGSTY
YNPSIKSRISITRDTSKNQFFLQVNSVTTEDTATYYCARQTGYFDYWGQGTMTVSSA-

(인간 *IL-15R α* 스시 도메인)

ITCPPMPSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
LKCIR

(마우스 *IgG2a CH2-CH3* 도메인)

EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQIS
WVFNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIER
TISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYK
NTEPVLDSGGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

몇몇 경우에 있어서, 리더 펩티드는 성숙 폴리펩티드로부터 절단된다.

상기 명시된 바와 같이 항 인간 및 마우스 CTLA4 scAb 도메인들은 또한 IL-15N72D 단백질에의 융합체로서 제조되었다.

유사하게, (신호 펩티드 서열 및 종결 코돈을 포함하는) 항 인간 PD1 scAb/IL-15N72D 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 17):

(신호 펩티드)

ATGGAATGGAGCTGGGTGTTCTCTTCTGTCCGTGACCACCGGTGTCCACTCC

(항 인간 *PD1 scAb*)

(VL)

CTGCCTGTGCTGACTCAACCACCCTCGGTGTCTGAAGTCCCCGGGCAGAGGGTCACC
ATTTCCTGTTCTGGAGGCATCTCCAACATCGGAAGCAATGCTGTAACTGGTACCAG
CACTTCCCAGGAAAGGCTCCCAAACTCCTCATCTATTATAATGATCTGCTGCCCTCA
GGGGTCTCTGACCGATTCTCTGCCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATC

AGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAA
TCTGAGTGCTTATGTCTTCGCAACTGGGACCAAGGTCACCGTCTCTGAGT

(링커)

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

(VH)

CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAA
GGTCTCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCG
ACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTA
ACACAAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCC
ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTA
TTACTGTGCGAGAGGGTTATACGGTGACGAGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGG
TCACCGTGAGCTCA

(인간 IL-15N72D)

AACTGGGTAAACGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAAT
CTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAGTGATGTTACCCCAAGTTGCAAAG
TAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAG
ATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTTGT
CTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAA
AAAAATATTAAGAATTTTTGCAGAGTTTTGTACATATTGTCAAATGTTTCATCAAC
ACTTCTTAA

[0281]

[0282]

(신호 펩티드 서열을 포함하는) 항 PD1 scAb-IL-15N72D 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열 번호 18):

(신호 펩티드)

MEWSWVFLFFLSVTTGVHS-

(항 인간 PD1 scAb)

(VL)

LPVLTQPPSVSEVPGQRVTISCSGGISNIGSNAVNWYQHFPKGAPKLLIYYNDLLPSGVSD
RFSASKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDNLSAYVFATGTKVTVLS

[0283]

(링커)

GGGSGGGSGGGGS

(VH)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPQGQLEWMGWISAYNGN
TNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGLYGDEDYWGQGLVT
VSS

(인간 IL-15N72D)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIH
DTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0284]

[0285]

몇몇 경우에 있어서, 리더 펩티드는 성숙 폴리펩티드로부터 절단된다, 상기 명시된 바와 같이, 항 인간 PD-1 scAb 도메인도 또한 huIL-15R α Su/Fc 구조체에 대한 융합체로서 제조되었다.

[0286]

실시에 1 및 선행 문헌(미국 특허 제8,507,222호의 실시예 1 및 2; 본원에 참조로서 인용됨)에 기술된 바와 같이, 서열은 발현 벡터에 클로닝되었으며, 이 발현 벡터는 CHO를 형질감염시켰다. 몇몇 경우에 있어서, CHO 세포는 동일하거나 상이한(즉 항 PD-L1 및 항 CTLA4 scAb) 결합 도메인을 가지는 huIL-15N72D 및 huIL-15R α Su/Fc 융합 단백질 둘 다를 암호화하는 벡터로 형질감염되었다. 전술된 바와 같이, 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 통하여 CHO 세포 배양 상청액으로부터 융합 단백질 복합체가 정제되었다.

- [0287] 전술된 항 인간 PD-1 scAb/항 인간 CTLA-4 scAb TxM 복합체에 더하여, CHO 세포를 항 인간 PD-L1 scAb/IL-15N72D(서열 번호 1) 구조체 및 항 인간 CTLA-4 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc(서열 번호 15) 구조체를 포함하는 발현 벡터로 공동 형질감염시킴으로써, 항 인간 PD-L1 scAb/항 인간 CTLA-4 scAb TxM 복합체가 제조되었다. 이 융합 단백질 복합체는 전술된 바와 같이 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 통해 CHO 세포 배양 상청액으로부터 정제되었다.
- [0288] 실시예 5: 다른 결합 도메인을 포함하는 IL-15 기반 융합 단백질 복합체의 제조
- [0289] 실시예 1 ~ 4에 기술된 융합 단백질 복합체와 유사하게, 본 발명의 융합 단백질은 CD47, G1TR, ssDNA 및 기타 질환 관련 표적(즉 CD20, CD19 등)을 인지하는 결합 도메인을 포함하도록 제조되었다.
- [0290] CD47은 대식세포 상 억제 수용체로서 사용되는 신호-조절 단백질 알파(SIRP α)를 차지함으로써 면역 회피를 촉진하는 세포 표면 분자이다. 이 "나를 먹지 말라는 신호"는 CD47 및 SIRP α의 상호작용을 차단하여, 대식세포에 의한 항체 의존적 세포성 식세포작용(ADCP)을 회피시킴으로써 파괴될 수 있다. 본 발명의 IL-15 도메인은, 자체의 세포용해 활성을 증가시키면서 NK 세포 및 CD8⁺ 세포를 활성화 및 증식시킨다. 본 발명의 Fc 영역이 충분히 고농도일 때, 이 영역은 ADCC 또는 ADCP 각각을 위해 NK 세포 및 대식세포 상 Fc γ 수용체와 상호작용할 수 있다. 본 실시예는 CD47/SIRP α 경로, IL-15 도메인을 통한 NK 세포 및 CD8⁺ 세포의 활성화를 차단하고, Fc-매개 ADCC/ADCP를 통한 종양 제거를 허용하는, 나노바디 Vh 영역(NbVh; PNAS 2016 113 (19) E2646-E2654)을 포함하는 융합 단백질의 제조 및 초기 특성규명에 관하여 기술하고 있다. 이하에 상세히 기술된 바와 같이, 항 마우스 CD47 NbVh/huIL-15N72D 및 항 마우스 CD47 NbVh/huIL-15R α Su/mIgG2a Fc를 포함하는 단백질 복합체가 제조되었다.
- [0291] 구체적으로, 항 마우스 CD47 NbVh를 huIL-15N72D 사슬에 결합시킴으로써 구조체가 제조되었다. 항 마우스 CD47 NbVh 서열은 알파카 나노바디의 중쇄 가변 도메인의 암호화 영역을 포함한다. 항 마우스 CD47 NbVh는 huIL-15N72D의 N-말단에 결합된다. huIL-15N72D의 N-말단에 결합된 항 마우스 CD47 NbVh를 포함하는 구조체의 핵산 및 단백질 서열이 이하에 제시되어 있다.
- [0292] (신호 펩티드 서열을 포함하는) 항 마우스 CD47 NbVh/huIL-15N72D 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 19):
- (신호 펩티드)
- ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC
- (나노바디의 항 마우스 CD47 Vh 사슬)
- CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGTGGAGCCTGGAGGATCCCTGAG
GCTGTCTGTGCCGCCAGCGGCATCATCTTCAAGATCAACGACATGGGCTGGTATCG
GCAGGCCCTGGCAAAAGGAGGGAGTGGGTGGCCGCTTCCACAGGAGGCGATGAG
GCCATCTACAGGGACTCCGTGAAGGACAGGTTCAACATCTCCAGGGACGCCAAGAA
CTCCGTGTTCTGCGAGATGAACTCCCTGAAGCCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTG
CACCGCCGTGATCTCCACCGATAGGGACGGCACCGAGTGGAGGAGGTACTGGGGCC
AGGGCACACAGGTGACTGTGTCCTCCGGCGGC
- [0293]
- (인간 IL-15N72D)
- AACTGGGTAAACGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATG
CATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTTACCCCAAGTTGCAAAGTAACA
GCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCA
AGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTTGTCTTCT
AATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAA
ATATTAAAGAATTTTTCAGAGTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTC
TTAA
- [0294]
- [0295] (신호 펩티드 서열을 포함하는) 항 마우스 CD47 NbVh/IL-15N72D 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열 번호 20):

(신호 펩티드)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(나노바디의 항 마우스 CD47 Vh 사슬)

QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGIIFKINDMGWYRQAPGKRREWVAASTGGDEAI
YRDSVKDRFTISRDAKNSVFLQMNSLKPEDTAVYYCTAVISTDRDGTWRRYWGQGTQ
VTVSSGG

(인간 IL-15N72D)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIH
DTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0296]

[0297]

(리더 서열을 포함하는) 항 마우스 CD47 NbVh/huIL-15R α Su/mIgG2a Fc 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 21):

(신호 펩티드)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

(나노바디의 항 마우스 CD47 Vh 사슬)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCTGGTGGAGCCTGGAGGATCCCTGAG
GCTGTCCTGTGCCGCCAGCGGCATCATCTTCAAGATCAACGACATGGGCTGGTATCG
GCAGGCCCTGGCAAAAGGAGGGAGTGGGTGGCCGCTTCCACAGGAGGCGATGAG

[0298]

GCCATCTACAGGGACTCCGTGAAGGACAGGTTACCATCTCCAGGGACGCCAAGAA
CTCCGTGTTCTGCAGATGAACTCCCTGAAGCCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTG
CACCGCCGTGATCTCCACCGATAGGGACGGCACCGAGTGGAGGAGGTACTGGGGCC
AGGGCACACAGGTGACTGTGTCCTCCGGCGGC

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ATCACGTGTCCTCCTCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
AGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAAGTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGC
ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTGTAACAAGGCCACGAATGTCGCCCCACTGGAC
AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(마우스 IgG2a CH2-CH3 (Fc) 도메인)

GAACCAAGAGGGCCCAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGCCAGCACCTAA
CCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATG
ATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCA
GATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACA
AACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCA
GCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACC
TCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCA
CAGGTATATGTCTTGCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCT
GACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACA
ACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCTGGACTCTGATGGT
TCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAA
TAGCTACTCCTGTTCAAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGAG
CTTCTCCCGGACTCCAGGTAAA

[0299]

[0300]

(리더 서열을 포함하는) 항 마우스 CD47 NbVh/huIL-15R α Su/mIgG2a Fc 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열 번호 22):

(신호 펩티드)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(나노바디의 항마우스 CD47 Vh 사슬)

[0301]

QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGIIIFKINDMGWYRQAPGKRREWVAASTGGDEAI
YRDSVKDRFTISRDAKNSVFLQMNSLKPEDTAVYYCTAVISTDRDGTWRRYWGQGTQ
VTVSSGG

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
LKCIR

(마우스 IgG2a CH2-CH3 (Fc) 도메인)

EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQIS
WVFNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIER
TISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYK
NTEPVLDSGDSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

[0302]

[0303]

상기 명시된 바와 같이, 몇몇 경우에 있어서 리더 펩티드는 성숙 폴리펩티드로부터 절단된다.

[0304]

인간 CD47에 특이적인 항체로부터 유래한 단일 사슬 항체 도메인이 사용되어 유사한 구조체가 제조되었다. (신호 펩티드 서열을 포함하는) 항 인간 CD47 scAb/huIL-15N72D 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 23):

(신호 펩티드)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCTACTCC

(항 인간 CD47 scAb)

(VL)

AACATCCAGATGACCCAGTCCCTTCCGCCATGAGCGCTTCCGTGGGCGACAGGGTG
ACCATCACCTGCAAGGCCTCCCAGGACATCCACAGGTACCTGTCCTGGTTCCAGCAG
AAGCCCGGCAAGGTGCCAAGCACCTGATCTACAGGGCTAACAGGCTGGTGTCCGG
CGTGCCTTCCAGGTTTTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCGAGTTCACCCTGACCATCTCC
AGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGTACGACGAGTTCCCC
TACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAG

(링커)

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

[0305]

(VH)

CAGATGCAGCTGGTACAGTCCGGCGCCGAGGTGAAGAAGACCGGCTCCAGCGTGAA
GGTGTCTGCAAGGCCTCCGGCTTCAACATCAAGGACTACTACCTGCACTGGGTGAG
GCAGGCCCCCTGGACAAGCCCTGGAGTGGATGGGCTGGATCGACCCCGACAACGGCG
ACACCGAGTACGCCAGAAGTTCAGGACAGGGTGACCATCACCAGGGACAGGTCC
ATGAGCACCGCCTACATGGAGCTGTCTCCCTGAGGTCCGAGGACACCGCCATGTAC
TACTGCAACGCCGCCTACGGCTCCTCCTCCTACCCCATGGACTACTGGGGCCAGGGC
ACCACCGTGACCGTG

(인간 IL-15N72D)

AACTGGGGTTAACGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATG
CATATTGATGCTACTTTATATACGAAAGTGATGTTACCCCCAGTTGCAAAGTAACA
GCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCA
AGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTTGTCTTCT
AATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAA
ATATTAAAGAATTTTGCAGAGTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTC
TTAA

[0306]

[0307]

(신호 펩티드 서열을 포함하는) 항 인간 CD47 scAb/huIL-15N72D 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열 번호 24):

(신호 펩티드)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(항 인간 CD47 scAb)

(VL)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVITITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK

(링커)

GGGSGGGSGGGSGGGS

(VH)

QMLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYHLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNG
DTEYAQKFQDRVITITDRSMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPM DYWGQG
TTVTV

[0308]

(인간 IL-15N72D)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLES GDASIH
DTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0309]

[0310]

(리더 서열을 포함하는) 항 인간 CD47 scAb/huIL-15R α Su/hIgG1 Fc 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 25):

(신호 펩티드)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(항 인간 CD47 scAb)

(VL)

AACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCGCCATGAGCGCTTCCGTGGGCGACAGGGTG
ACCATCACCTGCAAGGCCTCCAGGACATCCACAGGTACCTGTCCTGGTTCCAGCAG
AAGCCCGGCAAGGTGCCAAGCACCTGATCTACAGGGCTAACAGGCTGGTGTCCGG
CGTGCCTTCCAGGTTTTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCGAGTTCACCCTGACCATCTCC
AGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGTACGACGAGTTCCTCC
TACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAG

(링커)

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

(VH)

CAGATGCAGCTGGTACAGTCCGGCGCCGAGGTGAAGAAGACCGGCTCCAGCGTGAA
GGTGTCTTGCAAGGCCTCCGGCTTCAACATCAAGGACTACTACCTGCACTGGGTGAG
GCAGGCCCCGTGGACAAGCCCTGGAGTGGATGGGCTGGATCGACCCCGACAACGGCG
ACACCGAGTACGCCCAGAAGTTCCAGGACAGGGTGACCATCACCAGGGACAGGTCC
ATGAGCACCGCCTACATGGAGCTGTCTCCCTGAGGTCCGAGGACACCGCCATGTAC
TACTGCAACGCCGCTACGGCTCCTCCTCCTACCCCATGGACTACTGGGGCCAGGGC
ACCACCGTGACCGTG

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ATCAGTGTCTCTCTCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
AGCTTGTA TCCAGGGAGCGGTACATTTGTA ACTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGC

[0311]

ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCCTGGAC
AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(인간 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 도메인)

GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACT
CCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
TCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA
CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

[0312]

[0313]

(리더 서열을 포함하는) 항 인간 CD47 scAb/huIL-15R α Su/hIgG1 Fc 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다 (서열 번호 26):

(신호 펩티드)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(항 인간 CD47 scAb)

(VL)

NIQMTQSPSAMSASVGDRTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIRANRLVSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK

(링커)

GGGSGGGSGGGGS

(VH)

[0314]

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSKASGFNIKDYHLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNG
DTEYAQKFQDRVTITRDSMSTAYMELSSLRSEDAMYCCNAAYGSSSYPM DYWGQG
TTVT

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
LKCIR

(인간 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 도메인)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0315]

[0316]

GITR 리간드 및 GITR 간 상호작용은, 면역 세포에 자극 신호 전달을 제공하는 것으로 공지되어 있으므로, GITR 리간드(GITRL)는 IL-15의 면역 자극 활성화와 잠재적으로 상승작용을 할 수 있었던 면역 효현제 분자인 것으로 공지되어 있다. 따라서, 구조체는 인간 GITRL 및 huIL-15N72D 사슬을 결합하여 제조되었다.

[0317] (신호 펩티드 서열을 포함하는) 인간 GITRL/huIL-15N72D 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 27):

(신호 펩티드)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

(인간 GITRL)

ACCGCCAAGGAGCCCTGCATGGCCAAGTTCGGCCCTCTGCCCTCCAAGTGGCAGAT
GGCCTCCTCCGAGCCTCCCTGTGTGAACAAGGTGTCCGACTGGAAGCTGGAGATCCT
GCAGAACGGCCTGTACCTGATCTACGGCCAGGTGGCCCCAACGCCAACTACAACG
ACGTGGCCCCCTTCGAGGTGCGGCTGTACAAGAACAAGGACATGATCCAGACCCTG
ACCAACAAGTCCAAGATCCAGAACGTGGGCGGCACCTATGAGCTGCACGTGGGCGA
CACCATCGACCTGATCTTCAACTCCGAGCACCAGGTGCTGAAGAACAACACCTACTG
GGGCATC

(인간 IL-15N72D)

[0318]

AACTGGGTAAACGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATG
CATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAAGTGATGTTACCCCCAGTTGCAAAGTAACA
GCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCA
AGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTTGTCTTCT
AATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAA
ATATTAAAGAATTTTGCAGAGTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTC
TTAA

[0319]

[0320] (신호 펩티드 서열을 포함하는) 인간 GITRL/IL-15N72D 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열 번호 28):

(신호 펩티드)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(인간 GITRL)

TAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYGQVAPNANYNDV
APFEVRLYKNKDMIQTLTNKSKIQNVGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKNNTYWGI

(인간 IL-15N72D)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIH
DTVENLILANDSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0321]

[0322] (리더 서열을 포함하는) 인간 GITRL/huIL-15R α Su/hIgG1 Fc 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 29):

(신호 펩티드)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

(인간 GITRL)

ACCGCCAAGGAGCCCTGCATGGCCAAGTTCGGCCCTCTGCCCTCCAAGTGGCAGAT
GGCCTCCTCCGAGCCTCCCTGTGTGAACAAGGTGTCCGACTGGAAGCTGGAGATCCT
GCAGAACGGCCTGTACCTGATCTACGGCCAGGTGGCCCCAACGCCAACTACAACG
ACGTGGCCCCCTTCGAGGTGCGGCTGTACAAGAACAAGGACATGATCCAGACCCTG
ACCAACAAGTCCAAGATCCAGAACGTGGGCGGCACCTATGAGCTGCACGTGGGCGA

[0323]

CACCATCGACCTGATCTTCAACTCCGAGCACCAGGTGCTGAAGAACAAACACCTACTG
GGGCATC

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ATCACGTGTCTCCTCCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
AGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAAGTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGC
ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCCACTGGAC
AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(인간 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 도메인)

GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACT
CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACAGCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA
CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

[0324]

[0325]

(리더 서열을 포함하는) 인간 GITRL/huIL-15R α Su/hIgG1 Fc 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기과 같다(서열 번호 30):

(신호 펩티드)

MKWVTFISLLFLFSAYS

(인간 GITRL)

TAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYGQVAPNANYNDV
APFEVRLYKNKMDIQTLTNKSQIYNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKNNTYWG

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

[0326]

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPS
LKCIR

(인간 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 도메인)

EPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0327]

[0328]

발명 세포에 의해 발현되는 항원을 표적화하는 결합 도메인을 포함하는 본 발명의 융합 단백질 복합체도 또한 제조될 수 있었다. 이러한 항원은 종양 세포를 비롯한 질환 세포에 의해 방출되는 단일 가닥 DNA(ssDNA)를 포함할 수 있었다. 따라서, ssDNA를 인지하는 단일 사슬 Ab 도메인(Hu51-4 항체로부터 유래하는 TNT scAb)을 가지는 본 발명의 융합 단백질 복합체가 제조되었다.

[0329] (신호 펩티드 서열을 포함하는) TNT scAb/huIL-15N72D 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 31):

(신호 펩티드)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCCTGTTCTCCAGCGCCTACTCC

(TNT scAb)

(VL)

GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCTACCCTGTCCCTGTCCCCTGGCGAGAGGGCT
ACCCTGTCCTGCAGGGCCAGGCAATCCATCTCCAACCTACCTGCACTGGTACCAGCAG
AAACCTGGCCAGGCCCCAGGCTGCTGATCTACTACGCCTCCCAGTCCATCTCCGGC
ATCCCTGACAGGTTTCAGCGGATCCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCC
AGGCTGGAGCCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCCAACCTCCTGGCCT
CTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGG

(링커)

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

(VH)

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCCGGAGCCTCCGTGAA
GGTGTCTCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTACCAGGTACTGGATGCACTGGGTGAG

[0330]

GCAGGCCCCTGACAGGGACTGGAGTGGATCGGCGCCATCTACCCCGGCAACTCCG
ACACCTCCTACAACCAGAAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCATCACCGCCGACACCTCC
ACCAACACCCGCTACATGGAGCTGTCTCCCTGAGGTCCGAGGACACCGCCGTGTAC
TACTGCGCTAGGGGCGAGGAGATCGGCGTGAGGAGGTGGTTCGCCTACTGGGGACA
GGGCACCCTGGTGACCGTGTCCAGC

(인간 IL-15N72D)

AACTGGGTAAACGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATG
CATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCAGTTGCAAAGTAACA
GCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCA
AGTATTTCATGATACAGTAGAAAACTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTTGTCTTCT
AATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAA
ATATTAAAGAATTTTTGCAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTC
TTAA

[0331]

[0332] (신호 펩티드 서열을 포함하는) TNT scAb/IL-15N72D 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열 번호 32):

(신호 펩티드)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(TNT scAb)

(VL)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRARQISNYLHWYQQKPGQAPRLLIYYASQISGIPDRF
SGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQSNSWPLTFGQGKVEIKR

(링커)

GGGGSGGGSGGGGS

(VH)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGNSD
TSYNQKFKGKATITADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGEEIGVRRWFAYWGQGT
LVTVSS

(인간 IL-15N72D)

[0333]

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIH
DTVENLILANDSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0334]

[0335] (리더 서열을 포함하는) TNT/huIL-15R α Su/hIgG1 Fc 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 33):

(신호 펩티드)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

(TNT scAb)

(VL)

GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCTACCCTGTCCCTGTCCCCTGGCGAGAGGGCT
ACCCTGTCTGCAGGGCCAGGCAATCCATCTCCAACCTACCTGCACTGGTACCAGCAG
AAACCTGGCCAGGCCCCAGGCTGCTGATCTACTACGCCTCCCAGTCCATCTCCGGC
ATCCCTGACAGGTTACGCGGATCCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCC
AGGCTGGAGCCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCCAACCTCTGGCCT
CTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGG

(링커)

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

(VH)

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCCGAGCCTCCGTGAA
GGTGTCTTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTACCAGGTACTGGATGCACTGGGTGAG
GCAGGCCCTTGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGCGCCATCTACCCCGCAACTCCG
ACACCTCCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCATCACCGCCGACACCTCC
ACCAACACCCGCTACATGGAGCTGTCTCCCTGAGGTCCGAGGACACCGCCGTGTAC
TACTGCGCTAGGGGCGAGGAGATCGGCGTGAGGAGGTGGTTCGCCTACTGGGGACA
GGGCACCCTGGTGACCGTGTCCAGC

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ATCACGTGTCCTCCTCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
AGCTTGTAAGTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAAGTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGC
ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCACTGGAC
AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

[0336]

(인간 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 도메인)

GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACT
CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA
CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

[0337]

[0338] (리더 서열을 포함하는) TNT scAb/huIL-15R α Su/hIgG1 Fc 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열 번호 34):

(신호 펩티드)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(TNT scAb)

(VL)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRARQSSISNYLHWYQQKPGQAPRLLIYYASQSIGIPDRF
SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSNSWPLTFGQGTKVEIKR

(링커)

GGGSGGGGSGGGGS

(VH)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGNSD
TSYNQKFKGKATITADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGEEIGVRRWFAYWGQGT
LVTVSS

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
LKCIR

(인간 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 도메인)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0341] 발병 세포에 의해 발현되는 기타 항원을 표적화하는 결합 도메인을 포함하는 본 발명의 융합 단백질 복합체도 또한 제조될 수 있었다. 이러한 항원은 종양 세포를 비롯한 질환 세포 상에 발현되는 CD33 또는 조직 인자나, 면역 세포 상에 발현되는 관문 억제 인자를 포함할 수 있었다.

[0342] 조직 인자(TF)는 몇몇 종양 세포 유형에서 과발현된다고 보고된 경막 당단백질이다. 중요한 점은, 증가한 TF 발현은 암세포 신호전달, 종양 세포 이동 및 감소한 세포자멸에 연루되어, 전이 가능성의 증갈로 초래한다는 것이다. 그러므로 TF의 표적화는 이 단백질을 과발현하는 종양 세포 유형에 대한 면역 요법 전략에서 유익할 수 있다. 키메라 항 조직 인자 항체인 ALT-836은 이미 제조되어 임상 시험된 바 있다. 이 항체의 인간화된 가변 사슬(hOAT)도 또한 특성규명된 바 있다. 그러므로 인간 조직 인자를 인지하는 단일 사슬 Ab 도메인(hOAT scAb)을 가지는 본 발명의 융합 단백질 복합체가 제조되었다.

[0343] (리더 서열을 포함하는) hOAT scAb/huIL-15R α Su/hIgG1 Fc 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 35):

(신호 펩티드)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

(hOAT scAb)

(VL)

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTGCTTCCCTGTCCGCTTCCGTGGGCGACAGGGTG
ACCATCACCTGCCTGGCCTCCCAGACCATCGACACCTGGCTGGCCTGGTACCTGCAG
AAGCCCGGCAAGTCCCCCAGCTGCTGATCTACGCCGCTACCAACCTGGCCGACGG
CGTGCCTAGCAGGTTTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCGACTTCTCCTTACCATCTCC

TCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGTGTACTCCTCCCC
TTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

(링커)

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

(VH)

CAGATCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGGCGAAGTGAAAAAGCCCGGCGCCAGCGTGAG
GGTGTCTGTAAAGGCCTCCGGCTACTCCTTACCGACTACAACGTGTACTGGGTGAG
GCAGTCCCCCGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCTACATCGACCCCTACAACGGCA
TCACCATCTACGACCAGAACTTCAAGGGCAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCC
ACCTCCACAGCCTACATGGAGCTGTCTCCCTGAGGTCCGAGGACACCGCCGTGTAC
TTCTGCGCCAGGGACGTGACCACCGCTCTGGACTTCTGGGGACAGGGCACACCGT
GACCGTGAGCTCC

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ATCACGTGTCTCCTCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
AGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGC
ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTGAAACAAGGCCACGAATGTCGCCCCACTGGAC
AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(인간 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 도메인)

GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCACAGCACCTGAACT
CCTGGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTCT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA
CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAA

[0345]

[0346]

(신호 펩티드 서열을 포함하는) h0AT scAb/huIL-15R α Su/hIgG1 Fc 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다
(서열 번호 36):

(신호 펩티드)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(hOAT scAb)

(VL)

DIQMTQSPASLSASVGDRTITCLASQTIDTWLAWYLQKPGKSPQLLIYAATNLADGVPS

RFSGSGSGTDFSTISLQPEDFATYYCQQVYSSPFTFGQGTKLEIK

(링커)

GGGSGGGSGGGGS

(VH)

QIQLVQSGGEVKKPGASVRVSCASGYSFTDYNVYVWRQSPGKGLEWIGYIDPYNGITI

YDQNFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARDVTTALDFWGQGTTVTVSS

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ITCPPMVSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPPS

LKCIR

(인간 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 도메인)

EPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF

NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI

EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY

KTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0347]

[0348]

몇몇 경우에 있어서, 리더 펩티드는 성숙 폴리펩티드로부터 절단된다.

[0349]

hOAT scAb/huIL-15N72D 융합 단백질을 발현하는 유사한 구조체가 제조될 수 있었다.

[0350]

실시예 1과, 앞서(본원에 참조로서 인용되어 있는 미국 특허출원 제8,507,222호의 실시예 1 및 2) 기술된 바와 같이 서열이 발현 벡터에 클로닝되었으며, 이 발현 벡터는 CHO 세포를 형질감염시켰다. 몇몇 경우에 있어서, CHO 세포는 본 발명의 동일하거나 상이한 결합 도메인들을 가지는 huIL-15N72D 및 huIL-15R α Su/Fc 융합 단백질 둘 다를 암호화하는 벡터로 형질감염되었다. 융합 단백질 복합체는 전술된 바와 같이, 단백질 A 친화성 크로마토그래피가 사용되어 CHO 세포 배양 상청액으로부터 정제되었다.

[0351]

CD33을 인지하는 단일 사슬 Ab 도메인(CD33 scAb)을 가지는 본 발명의 융합 단백질 복합체도 또한 제조되었다. (신호 펩티드 서열을 포함하는) CD33 scAb/huIL-15N72D 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 37):

(신호 펩티드)

ATGGATTTCAGGTGCAGATTATCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCTTCAGTCATAATGT
CAAGAGGA

(CD33 scAb)

(VL)

CAGGTGCAGCTGGTTCAGAGCGGTGCGGAAGTTAAAAAGCCGGGCTCTTCCGTGAA
AGTTAGCTGCAAAGCGTCTGGTTATACCTTCACCGACTACAACATGCACTGGGTCCG
CCAGGCCCCAGGCCAGGGTCTGGAATGGATCGGTTATATTTACCCGTACAACGGTGG
CACGGGATATAACCAGAAATTCAAATCCAAAGCTACCATCACTGCGGACGAAAGCA
CCAACACCGCATATATGGAATTGTCTTCTCTGCGTAGCGAAGATACCGCGGTTTACT
ATTGCGCTCGTGGTCGTCCAGCGATGGATTACTGGGGTCAGGGCACCTGGTGACCG
TGAGCTCT

(링커)

GGCGGAGGCGGATCTGGTGGTGGCGGATCCGGTGGAGGCGGAAGC

(VH)

GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACCGCGTG
ACTATCACCTGCCGTGCGTCCGAAAGCGTGGATAACTACGGCATTTCCTTTATGAAC
TGTTCCAGCAGAAACCGGGTAAAGCCCCGAAACTGCTGATTATGCGGCCTCTAAC
CAGGGCAGCGGTGTGCCGAGCCGCTTTCCGGCAGCGGTTCCGGGGACCGATTTCACT
CTGACCATTCTAGCCTGCAGCCAGATGACTTCGCGACCTACTACTGCCAACAGTCT
AAAGAAGTTCCGTGGACCTTCGGTCAGGGTACCAAAGTTGAAATTA

(인간 IL-15N72D)

AACTGGGTTAACGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATG
CATATTGATGCTACTTTATATACGGAAGTGATGTTACCCCAAGTTGCAAAGTAACA

[0352]

GCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCA
AGTATTTCATGATACAGTAGAAAACTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTTGTCTTCT
AATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAA
ATATTAAAGAATTTTTCAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTC
TTAA

[0353]

[0354]

(신호 펩티드 서열을 포함하는) CD33 scAb/IL-15N72D 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열 번호 38):

(신호 펩티드)

MDFQVQIISFLLISASVIMSRG

(CD33 scAb)

(VL)

QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPYNGG
TGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPAMDYWGQGLTVTVS
S

(링커)

GGGSGGGSGGGGS

(VH)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGS
GVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPDFFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIK

(인간 IL-15N72D)

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIH
DTVENLILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0355]

[0356] 몇몇 경우에 있어서, 리더 펩티드는 성숙 폴리펩티드로부터 절단된다.

[0357] (리더 서열을 포함하는) CD33 scAb/huIL-15R α Su/hIgG1 Fc 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 39):

(신호 펩티드)

ATGGATTTTCAGGTGCAGATTATCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCTTCAGTCATAATGT
CAAGAGGA

(CD33 scAb)

(VL)

CAGGTGCAGCTGGTTCAGAGCGGTGCGGAAGTTAAAAAGCCGGGCTCTTCCGTGAA
AGTTAGCTGCAAAGCGTCTGGTTATACCTTCACCGACTACAACATGCACTGGGTCCG
CCAGGCCCCAGGCCAGGGTCTGGAATGGATCGGTTATATTTACCCGTACAACGGTG
CACGGGATATAACCAGAAATTCAAATCCAAAGCTACCATCACTGCGGACGAAAGCA
CCAACACCGCATATATGGAATTGTCTTCTCTGCGTAGCGAAGATACCGCGGTTTACT
ATTGCGCTCGTGGTCTCCAGCGATGGATTACTGGGGTCAGGGCACCTGGTGACCG
TGAGCTCT

(링커)

GGCGGAGGCGGATCTGGTGGTGGCGGATCCGGTGGAGGCGGAAGC

(VH)

GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACCGCGTG
ACTATCACCTGCCGTGCGTCCGAAAGCGTGGATAACTACGGCATTTCTTTATGAAC
TGGTTCCAGCAGAAACCGGGTAAAGCCCCGAAACTGCTGATTTATGCGGCCTCTAAC
CAGGGCAGCGGTGTGCCGAGCCGCTTTTCCGGCAGCGGTTCCGGGACCGATTTCACT
CTGACCATTTCTAGCCTGCAGCCAGATGACTTCGCGACCTACTACTGCCAACAGTCT
AAAGAAGTTCCGTGGACCTTCGGTTCAGGGTACCAAAGTTGAAATTAAA

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ATCACGTGTCTCCTCCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
AGCTTGTAAGTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAAGTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGC
ACGTCCAGCCTGACGGAGTGC GTTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCCACTGGAC
AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(인간 IgG1 C_H2-C_H3 (Fc) 도메인)

GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACT
CCTGGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT

[0358]

GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
TCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCTCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCGACCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA
CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

[0359]

[0360] (리더 서열을 포함하는) CD33 scAb/huIL-15R α Su/hIgG1 Fc 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열 번호 40):

(신호 펩티드)

MDFQVQIISFLLISASVIMSRG

(CD33 scAb)

(VL)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPYNGG
TGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPAMDYWGQGTLLVTVS
S

(링커)

GGGSGGGSGGGGS

(VH)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGS
GVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIK

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ITCPPMSEVHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPPS
LKCIR

(인간 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 도메인)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI

EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

몇몇 경우에 있어서, 리더 펩티드는 성숙 폴리펩티드로부터 절단된다.

실시에 1과, 앞서(본원에 참조로서 인용되어 있는 미국 특허출원 제8,507,222호의 실시예 1 및 2) 기술된 바와 같이, 서열이 발현 벡터에 클로닝되었으며, 이 발현 벡터는 CHO 세포를 형질감염시켰다. 몇몇 경우에 있어서, CHO 세포는, 본 발명의 동일하거나 상이한 결합 도메인들을 가지는 huIL-15N72D 및 huIL-15R α Su/Fc 융합 단백질 둘 다를 암호화하는 벡터로 형질감염되었다. 융합 단백질 복합체는 전술된 바와 같이, 단백질 A 친화성 크로마토그래피가 사용되어 CHO 세포 배양 상청액으로부터 정제되었다.

세포내 부착 분자 1(ICAM-1)은 면역글로불린 상과의 세포 표면 당단백질이다. 세포 표면 상에서의 ICAM-1 단백질 발현 수준은 다양한 고형 종양의 전이 잠재성과 양의 상관관계가 있음이 입증되었다. 림프구 기능 연관 항원 1(LFA-1)은 모든 T 세포와 B 세포, 대식세포, 호중구 및 NK 세포에서 발견된다. 구체적으로 "I 도메인"을 통한 ICAM-1과의 결합은, 세포 부착(면역학/세포융해 시냅스 형성) 또는 (혈관외유출 이전 혈류 중 세포의 이동을 늦추기 위한) 롤링(rolling)을 지탱함이 공지되어 있다. I 도메인은 단독으로 2개의 돌연변이, 즉 K287C 및 K294C가 부가된 ICAM-1과의 큰 친화성 결합을 지원할 수 있다. 따라서 huIL-15N72D: huIL-15R α Su 복합체를 통해 종양을 표적화하고, 효과기 면역 세포의 활성화 및 국소화를 촉진하기 위해, 돌연변이와 함께 LFA-1 I 도메인을 포함하는 TxM이 제조되었다.

(리더 서열을 포함하는) 인간 LFA-1 I 도메인(K287C/K294C)/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 41):

(신호 펩티드)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

(인간 LFA-1 I 도메인 (K287C/K294C))

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCTCCAGCGCCTACTC
CGATTTAGTGTCTTCTGTTTCGACGGCTCCATGTCTTTACAGCCCGATGAGTTCCAGAAG
ATTTTAGACTTCATGAAGGACGTGATGAAGAACTGTCCAACACCAGCTACCAGTTC

GCTGCCGTGCAGTTCTCCACCTCCTACAAGACCGAGTTCGACTTCTCCGACTACGTG
AAGCGGAAGGACCCCGATGCTTTACTGAAGCACGTCAAGCACATGCTGCTGCTCAC
CAACACCTTTGGCGCCATCAACTACGTGGCCACCGAGGTGTTTCGTGAGGAACTGGG
AGCTCGGCCCGATGCCACCAAGGTGCTGATTATCATCACCGACGGCGAAGCCACCG
ATAGCGGAAACATCGATGCCGCCAAGGACATCATCCGGTACATTATCGGCATCGGC
AAGCACTTCCAGACCAAGGAGAGCCAAGAGACTTTACACAAGTTCGCCTCCAAGCC
CGCTTCCGAGTTCGTGTGCATTTTAGACACCTTCGAGTGTTAAAGGATTTATTTACC
GAGCTGCAGAAAGAAGATCTACGTGATTGAGGGCACCAGCAAGCAAGATCTGACCTC
CTTCAACATGGAGCTGTCCAGCAGCGGCATTTCCGCTGATTTATCTCGTGGCCACGC
C

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ATCACGTGTCTCTCTCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
AGCTTGTAAGGAGCGGTACATTTGTAAGTCTGGTTCAAGCGTAAAGCCGGC
ACGTCCAGCCTGACGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCCTGGAC
AACCCCACTCTCAAATGCATTAGA

(인간 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 도메인)

GAGCCGAAATCTTGTCACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGGCCAGCACCTGAACT
CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAAACAAAGCCC
TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA
CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCTGGTAAATAA

[0368]

[0369]

(리더 서열을 포함하는) 성숙 인간 LFA-1 I 도메인(K287C/K294C)/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열 번호 42):

(신호 펩티드)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(인간 LFA-1 I 도메인 (K287C/K294C))

DLVFLFDGMSLQPDFQKILDFMKDVMKKLSNTSYQFAAVQFSTSYKTEFDFSDYVVR
KDPDALLKHVKHMLLLTNTFGAINYVATEVFREELGARPDATKVLIIITDGEATDSGNID
AAKDIIRYIIGIKHFQTKESQETLHKFASKPASEFVCILDTFECLKDLFTELQKKIYVIEGT
SKQDLTSFNMELSSSGISADLSRGHA

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ITCPPMMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
LKCIR

(인간 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 도메인)

EPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0370]

- [0371] 몇몇 경우에 있어서, 리더 펩티드는 성숙 폴리펩티드로부터 절단된다.
- [0372] 인간 LFA-1 I 도메인(K287C/K294C)/huIL-15N72D 융합 단백질을 발현하는 유사한 구조체가 제조될 수 있었다.
- [0373] 실시예 1과, 앞서(본원에 참조로서 인용되어 있는 미국 특허출원 제8,507,222호의 실시예 1 및 2) 기술된 바와 같이, 서열이 발현 벡터에 클로닝되었으며, 이 발현 벡터는 CHO 세포를 형질감염시켰다. 몇몇 경우에 있어서, CHO 세포는, 본 발명의 동일하거나 상이한 결합 도메인들을 가지는 huIL-15N72D 및 huIL-15R α Su/Fc 융합 단백질 둘 다를 암호화하는 벡터로 형질감염되었다. 융합 단백질 복합체는 전술된 바와 같이, 단백질 A 친화성 크로마토그래피가 사용되어 CHO 세포 배양 상청액으로부터 정제되었다.
- [0374] 예를 들어 CHO 세포는 huIL-15N72D 발현 벡터가 형질감염되었다. 세포는 또한 인간 LFA-1 I 도메인(K287C/K294C)/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 구조체를 발현하는 벡터로 형질감염되었다. CHO 세포에서의 두 구조체의 공동 발현은, 가용성 huIL-15N72D: 인간 LFA-1 I 도메인(K287C/K294C)/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 복합체(2*hlFA1/TxM라 지칭됨)의 형성과 분비를 허용하였다.
- [0375] Notch1은 다수의 표피 성장 인자(EGF) 유사 반복부로 이루어진 세포외 도메인과, 다수의 상이한 도메인 유형으로 이루어진 세포내 도메인을 포함하는, 구조적 특징들을 공유하는 제I형 경막 단백질 과의 일원이다. 이의 과발현이 몇몇 종양 유형에서 입증되었는데, 이 점은 Notch1을 면역 요법에 매력적인 표적으로 만들어준다. 델타 유사 단백질 4(DLL4)는 Notch1에 대한 몇몇 리간드 중 하나로서, Notch1에 대하여 최고의 친화성을 가지는 것으로 보였다. 그러므로 DLL4의 세포외 도메인(27번 ~ 529번)은 TxM 복합체의 생성에 있어 Notch1을 표적화하기 위해 사용되었다.
- [0376] (리더 서열을 포함하는) hDLL4/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 43):

(신호 펩티드)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

(hDLL4)

AGCGGCGTGTTCAGCTGCAGCTGCAAGAGTTTATCAACGAGAGGGGCGTGCTGGC
TTCCGGTCGTCCTTGTGAGCCCGGTTGTAGGACCTTTTCCGGGTGTGTTAAAGCAT
TTTCAAGCTGTGGTGTCCCCGGACCTTGTACCTTCGGCACCGTGTCCACCCCGTTT
TGGGCACCAACTCCTTCGCCGTTCTGTGACGACAGCTCCGGAGGAGGTCTGAATCCTT
TACAGCTGCCCTTTCAACTTTACTTGGCCCCGGCACCTTCTCCCTCATCATCGAAGCTTG
GCATGCCCCCGGTGACGATCTGCGGCCCGAAGCTCTGCCCCCGATGCTTTAATCAG
CAAGATTGCCATTCAAGGTTCTTTAGCCGTGGGCCAGAACTGGCTGCTGGACGAGCA
GACCAGCACACTCACTCGTCTGAGGTACTCCTATCGTGTGATCTGCAGCGACAACCTA
CTACGGCGACAATTGCAGCCGGCTGTGCAAGAAGAGGAACGACCACTTCGGCCATT
ACGTCTGCCAGCCCCGACGGCAATTTATCTTGTCTGCCCGGTTGGACCGGCGAGTACT
GTCAGCAGCCCATCTGTTTAAAGCGGCTGCCACGAGCAGAACGGCTACTGCAGCAAG
CCCGCTGAGTGTCTGTGTAGGCCCGGCTGGCAAGGTAGGCTGTGCAACGAGTGCATC
CCCCACAATGGCTGTGGGCACGGCACTTGTTCACCCCTTGGCAGTGCACCTTGTGAC
GAGGGCTGGGGAGGTTTATCTGCGACCAAGATCTGAACTACTGCACCCACCACAG
CCCTTGTAAGAACGGAGCTACTTGTTCACAGCGGCCAGAGGTCCTACACTTGTAC

[0377]

TTGTAGGCCCGGTTACACGGCGTCGACTGCGAACTGGAAGTGAAGCGAATGCGATA
GCAACCCCTTGTCGTAACGGCGGCAGCTGCAAGGACCAAGAAGACGGCTACCACTGT
TTATGCCCTCCCGGATACTACGGTTTACACTGCGAGCACTCCACACTGTCTTGTGCC
GACTCCCCTTGTTTCAACGGCGGAAGCTGTCGTGAGAGGAACCAAGGTGCCAACTA
CGCTTGAGAGTGCCCTCCCAACTTCAACGGCTCCAACTGCGAGAAGAAGGTGGATCG
TTGCACCTCCAACCCCTTGCGCCAACGGCGGCCAGTGTTTAAATAGGGGCCCTTCCCG
GATGTGTCGTTGTCGTCCCGGTTTACCGGCACCTACTGCGAGCTGCACGTCAGCGA
TTGCGCCCGGAATCCTTGCGCTCACGGCGGAAGTGTACGATTTAGAGAACGGTTT
AATGTGCACTTGTCGCTGGATTACGCGGTCGTAGGTGTGAGGTGAGGACCTCCAT
CGACGCTTGTCGAGCAGCCCTTGCTTCAATCGTGCCACTTGTTACACCGATTATCC
ACCGACACCTTCGTGTGCAACTGCCCCCTACGGCTTCGTGGGATCTCGTTGCGAGTTC
CCCGTTGGCCTGCCTCCTAGCTTTCCTGG

(인간 *IL-15R α* 스시 도메인)

ATCACGTGTCTCCTCCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGA
GCTACAGCTTGTAAGGAGCGGTACATTTGTAAGTCTGGTTTCAAGCGTAAAG
CCGGCAGCTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCAC
TGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(인간 *IgG1 CH2-CH3 (Fc)* 도메인)

GAGCCGAAATCTTGTCGACAAAACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACT
CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
TCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA
CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

[0378]

[0379]

(리더 서열을 포함하는) 성숙 hDLL4/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열 번호 44):

(신호 펩티드)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(hDLL4)

SGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCPGCRFTFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGT
NSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIEAWHAPGDDLRLPEALPPDALISKIAIQG
SLAVGQNWLLDEQSTLTLRLRYSYRVICSDNYYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGN
LSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAECLCRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTC
STPWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATCSNSGQRSYTCTCRPGYTGVDG
EELSECDSPNCRNGGCKDQEDGYHCLCPPGYYGLHCEHSTLSCADSPCFNGGSCRER
NQGANACECPNFTGSNCEKKVDRCSTNPCANGGQCLNRGPSRMCRCRPGFTGTyce
LHVSDCARNPCAHHGTCHDLNGLMCTCPAGFSRRCEVRTSIDACASSPCFNATCYT
DLSTDTFVCNCPYGFVGSRCFVGLPPSPFW

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ITCPPMSEVHADIVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
LKCIR

(인간 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 도메인)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0380]

[0381] 몇몇 경우에 있어서, 리더 펩티드는 성숙 폴리펩티드로부터 절단된다.

[0382] hDLL4 도메인/huIL-15N72D 융합 단백질을 발현하는 유사한 구조체가 제조될 수 있었다.

[0383] 실시예 1과, 앞서(본원에 참조로서 인용되어 있는 미국 특허출원 제8,507,222호의 실시예 1 및 2) 기술된 바와 같이, 서열이 발현 벡터에 클로닝되었으며, 이 발현 벡터는 CHO 세포를 형질감염시켰다. 몇몇 경우에 있어서, CHO 세포는, 본 발명의 동일하거나 상이한 결합 도메인들을 가지는 huIL-15N72D 및 huIL-15R α Su/Fc 융합 단백질을 둘 다를 암호화하는 벡터로 형질감염되었다. 융합 단백질 복합체는 전술된 바와 같이, 단백질 A 친화성 크로마토그래피가 사용되어 CHO 세포 배양 상청액으로부터 정제되었다.

[0384] 예를 들어 huIL-15N72D 및 hDLL4/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 발현 벡터의 CHO 세포 내 공동 발현은 2*hDLL4/TxM이라 지칭되는 가용성 TxM 복합체의 형성과 분비를 허용하였다.

[0385] Tim-3(T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3)은 IFN-γ 생산 CD4⁺ T 조력 1(Th1) 및 CD8⁺ T 세포독성 1(Tc1) T 세포에서 발견되는 면역 관문 수용체이다. 그러므로 이 Tim-3은 암 면역 요법에 매력적인 표적이다. 따라서 인간 Tim-3을 인지하는 단일 사슬 Ab 도메인(haTIM3scFv)을 가지는 본 발명의 융합 단백질 복합체가 제조되었다.

[0386] (리더 서열을 포함하는) haTIM3scFv/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 45):

(신호 펩티드)

ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCTTCCTGTCAGTAACCACCGGTGTCCACTCC

(*haTIM3scFv*: VL- 링커 -VH *scFv*)

(VL)

TCCTATGTGCTGACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACC
ATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTAATAATAACTATGTCTCCTGGTAC
CAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACATGATTTATGATGTCAGTAATCGGCC
CTCAGGGGTTTCTACTCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGAC
CATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCATATACAAC
CAGCAGTACTTATGTCTTCGGAAGTGGGACCAAGCTGACCGTCCTGGGGCAGCCAA
AGGCG

(링커)

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

(VH)

CTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTG
CAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCC

[0387]

TGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACAACT
ATGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGAACACCTCCATAAGCACA
GCCTACATGGAGTTGAGCAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCG
AGAGAGATGTATTACTATGGTTCGGGGTACAACCTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGG
AACCCTGGTCACCGTGAGCTCA

(인간 *IL-15R α* 스시 도메인)

ATCACGTGTCCTCCTCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
AGCTTGTAAGTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAAGTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGC
ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCCACTGGAC
AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(인간 *IgG1 CH2-CH3 (Fc)* 도메인)

GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACT
CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTCT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
TCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA
CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

[0388]

[0389] (리더 서열을 포함하는) 성숙 *haTIM3scFv/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc* 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다 (서열 번호 46):

(신호 펩티드)

MEWSWVFLFFLSVTTGVHS

(*haTIM3scFv*: VL- 링커 -VH *scFv*)

[0390]

(VL)

SYVLTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGNNNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSG
VSTRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTTSSYVFGTGTCLTVLGQPKA

(링커)

GGGGSGGGSGGGGS

(VH)

LVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTN
YAKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSDDTAVYYCAREMYYYGSGYNWFDPWGQG
TLVTVSS

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
LKCIR

(인간 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 도메인)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0391]

[0392] 몇몇 경우에 있어서, 리더 펩티드는 성숙 폴리펩티드로부터 절단된다.

[0393] haTIM3scFv/huIL-15N72D 융합 단백질을 발현하는 유사한 구조체가 제조될 수 있었다.

[0394] 실시예 1과, 앞서(본원에 참조로서 인용되어 있는 미국 특허출원 제8,507,222호의 실시예 1 및 2) 기술된 바와 같이, 서열이 발현 벡터에 클로닝되었으며, 이 발현 벡터는 CHO 세포를 형질감염시켰다. 몇몇 경우에 있어서, CHO 세포는, 본 발명의 동일하거나 상이한 결합 도메인들을 가지는 huIL-15N72D 및 huIL-15R α Su/Fc 융합 단백질을 둘 다를 암호화하는 벡터로 형질감염되었다. 융합 단백질 복합체는 전술된 바와 같이, 단백질 A 친화성 크로마토그래피가 사용되어 CHO 세포 배양 상청액으로부터 정제되었다.

[0395] 예를 들어 CHO 세포는 huIL-15N72D 발현 벡터로 형질감염되었다. 이 세포는 또한 haTIM3scFv/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 구조체를 발현하는 벡터로 형질감염되었다. 2개의 구조체의 CHO 세포 내 공동 발현은 가용성 huIL-15N72D: haTIM3scFv/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 복합체(2*haTIM3/TxM이라 지칭됨)의 형성 및 분비를 허용하였다.

[0396] 종양 표적화 분자 이외에도, 바이러스 감염 세포를 검출하고 이에 맞서 싸우는 역할을 하는 TxM 복합체가 제조될 수 있다. 효능이 크고, 광범위하게 중화하며, HIV에 특이적인 모노클로날 항체(bNAb)의 최근의 발견은, 잠재적 치료제의 신규 군을 제공한다. 중화 항체가 HIV 외피(Env)를 표적화하고, 시험관 내에서 바이러스 복제를 효과적으로 억제한다는 사실은 오랫동안 공지되어 왔다. 이 Ab 매개 억제와, 잠복성 바이러스 복제를 깨워, (IL-15 자극을 통해) 활성화된 효과기 세포로 이를 사멸시키는 "치고 사멸시키는(kick and kill)"접근법을 결합하기 위해, bNAb의 단일 사슬 항체 도메인(scFv)을 포함하는 TxM 복합체가 제조되었다. bNAb N6, 2G12, VRC07 및 10-1074 유래 scFv를 포함하는, 4개의 상이한 항 HIV TxM의 제조 및 특성규명이 이하에 기술되어 있다.

[0397] (리더 서열을 포함하는) N6scFv/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 47):

(신호 펩티드)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

(N6 scFv: VL-링커-VH scFv)

(VL)

TACATCCACGTGACCCAGTCCCCCTCCTCTTTAAGCGTGAGCATCGGAGATCGTGTG
ACCATCAACTGCCAGACCTCCCAAGGTGTGGGCTCCGATTACACTGGTACCAGCAC
AAGCCCGGTGCGGGCCCCCAAGCTGCTGATCCACCACACCAGCTCCGTGGAGGATGG
CGTGCCCTCTCGTTTCTCCGGCTCCGGCTTCCATACCTCCTTCAATTTAACCATCAGC
GATTTACAAGCTGACGACATCGCCACCTACTACTGCCAAGTTCTCCAGTTCTTCGGC
CGGGGCTCTCGTCTGCATATCAAG

(링커)

GGAGGCGGCGGATCCGGCGGCGGAGGCAGCGGCGGAGGCGGATCT

(VH)

CGTGCTCATCTGGTGCAGAGCGGAACCGCCATGAAGAAGCCCGGTGCTAGCGTGCG
GGTGTCTGTGACAGCAGCGGATACACCTTACC GCCCACATTTTATTCTGGTTTCGT
CAAGCTCCCGGTGCTGGACTGGAATGGGTGGGCTGGATCAAGCCCCAGTATGGCGC

[0398]

CGTGAACTTTGGCGGCGGCTTTCGTGATCGGGTGACTTTAACTCGTGACGTGTATCG
GGAGATCGCCTACATGGACATTAGGGGTTTAAAGCCCGACGATACCGCCGTGTACT
ACTGCGCTCGTGATCGTTTCTACGGCGATAGCAGCTGGGCTTTAGATGCTTGGGGCC
AAGGTACCACAGTGTGGTCCGCC

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ATCACGTGTCTCTCTCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
AGCTTGTAATCCAGGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGC
ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTGTAACAAGGCCACGAATGTCGCCCCACTGGAC
AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(인간 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 도메인)

GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACT
CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGC
TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA
CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCTCTGGTAAATAA

[0399]

[0400] (리더 서열을 포함하는) 2G12scFv/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 48):

(신호 펩티드)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

(2G12 scFv: VL-링커-VH scFv)

(VL)

[0401]

GTGGTGATGACCCAGTCCCCCTTCCACCCTGTCCGCTTCCGTGGGCGACACCATCACC
ATCACCTGCAGGGCCTCCCAGTCCATCGAGACCTGGCTGGCCTGGTACCAGCAGAA
GCCCCGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACAAGGCCTCCACCCTGAAGACCGGCG
TGCCCTCCAGGTTTTCCGGATCCGGCTCCGGCACCGAGTTACCCTGACCATCAGCG
GCCTGCAGTTCGACGACTTCGCCACCTACCACTGCCAGCACTACGCCGGCTACTCCG
CCACCTTTGGACAGGGCACCAGGGTGGAGATCAAG

(링커)

GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

(VH)

GAGGTGCAGCTGGTGGAATCCGGAGGCGGCCTGGTGAAAGCTGGCGGAAGCCTGAT
CCTGAGCTGCGGCGTGTCCAACCTTCAGGATCTCCGCCCACACCATGAACTGGGTGAG
GAGGGTGCCTGGAGGAGGACTGGAGTGGGTGGCCAGCATCTCCACCTCCTCCACCT
ACAGGGACTACGCCGACGCCGTGAAGGGCAGGTTACCGTGAGCAGGGACGACCTG
GAGGACTTCGTGTACCTGCAGATGCACAAGATGCGGGTGGAGGACACCGCCATCTA
CTACTGCGCCAGGAAGGGCTCCGACAGGCTGTCCGACAACGACCCCTTTGACGCCT
GGGGCCCTGGAACCGTGGTGACAGTGTCCCCC

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ATCAGTGTCTCTCTCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
AGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGC
ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCCTGGAC
AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(인간 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 도메인)

GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACT
CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
TCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA

[0402]

ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA
CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

[0403]

[0404]

(리더 서열을 포함하는) VRC07(523)scFv/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 49):

(신호 펩티드)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

(VRC07(523) scFv: VL-링커-VH scFv)

(VL)

TCCTCCCTGACCCAGAGCCCCGGAACACTCTCCCTCTCCCCGGTGAGACCGCTATC
ATCTCTTGTAAGGACCAGCCAGTACGGCTCTTTAGCTTGGTATCAACAGAGGCCCGGC
CAAGCTCCTAGGCTGGTCATTTACAGCGGCAGCACAAGGGCCGCCGGCATCCCCGA
TAGGTTCTCCGGCTCCCGGTGGGGCCCCGATTACAATTTAACAATCTCCAATTTAGA
GTCCGGAGACTTCGGCGTCTACTACTGCCAGCAGTACGAGTTCTTCGGCCAAGGTAC
CAAAGTGCAAGTTGATATCAAG

(링커)

GGCGGCGGAGGCTCCGGCGGCGGCGGATCCGGCGGAGGAGGATCC

(VH)

CAAGTTAGGCTGTCCCAGAGCGGAGGCCAGATGAAGAAGCCCGGTGACTCCATGCG
GATCAGCTGTCGTGCCAGCGGTACGAGTTCATCAACTGCCCCATCAACTGGATTTCG
TCTGGCCCCCGGTAAGCGGCCCGAATGGATGGGCTGGATGAAACCTCGTCACGGCG
CTGTGTCTACGCTCGTCAGCTGCAAGGTCGTGTGACCATGACTCGTGACATGTACA
GCGAGACCGCCTTTTTAGAGCTGAGGTCTTTAACCTCCGACGACACCGCTGTGTACT
TCTGCACCCGGGGCAAGTACTGCACCGCTCGGGACTACTACAACCTGGGACTTCGAG
CACTGGGGCCAAGGTACACCCGTGACAGTGTCTCTCC

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ATCACGTGTCTCCTCTCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
AGCTTGTAAGTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAAGTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGC

[0405]

ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCCTGGAC
AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(인간 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 도메인)

GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACT
CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
TCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA
CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

[0406]

[0407]

(리더 서열을 포함하는) 10-1074scFv/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 구조체의 핵산 서열은 하기와 같다(서열 번호 50):

(신호 펩티드)

ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

(10-1074 scFv: VL -링커-VH scFv)

(VL)

TCCAGCTACGTGAGGCCTCTCTCCGTGGCTCTGGGCGAAACAGCTCGTATCAGCTGC
GGTCGTCAAGCTCTGGGATCTCGTGCTGTGCAGTGGTACCAGCACCGGCCCCGGTCAA
GCTCCCATTTTACTGATCTACAACAACCAAGATCGGCCCTCCGGCATCCCCGAAAGG
TTTAGCGGCACCCCCGATATCAACTTCGGCACAAGGGCCACTTTAACCATTAGCGGA
GTGGAGGCCGGCGACGAGGCCGACTACTACTGCCACATGTGGGACTCCCGGTCCGG
CTTTTCTTGGAGCTTTGGCGGCGCTACTCGTCTGACAGTGCTG

(링커)

GGCGGAGGCGGCTCCGGAGGCGGCGGCAGCGAGGAGGCGGATCC

(VH)

CAAGTTCAGCTGCAAGAATCCGGACCCGGTTTAGTGAAGCCCAGCGAGACTTTAAG
CGTGACTTGTAGCGTGAGCGGCGACAGCATGAACAATACTACTGGACTTGGATTTCG
TCAGAGCCCCGGTAAGGGTTTAGAGTGGATCGGCTACATCTCCGACCGGGAGTCCG
CCACCTACAACCCCTCTTTAAACTCCCGGGTGGTGATCTCTCGTGACACCTCCAAGA
ACCAGCTGTCTTTAAAGCTGAACCTCCGTGACCCCCGTGACACCGCCGTGTACTACT
GCGCTACCGCTAGGCGGGGCCAGAGGATCTACGGCGTGGTGAGCTTCGGCGAGTTC
TTCTACTACTACAGCATGGACGTGTGGGGCAAAGGCACCACCGTGACCGTGTCTCTCC

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ATCACGTGTCTCTCCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTAC
AGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGC
ACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCCACTGGAC
AACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

(인간 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 도메인)

GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACT
CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
TCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAATACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA
CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

(리더 서열을 포함하는) 성숙 N6scFv/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열 번호 51):

(신호 펩티드)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(N6 scFv: VL-링커-VH scFv)

(VL)

YIHVTQSPSSLSVSGIDRVITNCQTSQGVGSDLHWYQHKPGRAPKLLIHHTSSVEDGVPS
RFGSGGFHTSFNLTISDLQADDIATYYCQVLQFFGRGSRLLHIK

(링커)

GGGGSGGGSGGGGS

(VH)

RAHLVQSGTAMKKPGASVRVSCQTSQGYTFTAHILFWFRQAPGRGLEWVGWIKPQYGA
VNFGGGFRDRVTLTRDVYREIAYMDIRGLKPDDTAVYYCARDRSYGDSSWALDAWGQ
GTTVWSA

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
LKCIR

(인간 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 도메인)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0411]

[0412]

(리더 서열을 포함하는) 성숙 2G12scFv/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열 번호 52):

(신호 펩티드)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(2G12 scFv: VL-링커-VH scFv)

(VL)

VVMTQSPSTLSASVGDITITCRASQSIETWLAWYQKPGKAPKLLIYKASTLKTGVPSR
FSGSGSGTEFTLTISGLQFDDFATYHCQHYAGYSATFGQGTRVEIK

[0413]

(링커)

GGGGSGGGSGGGGS

(VH)

EVQLVESGGGLVKAGGSLILSCGVSNFRISAHTMNWVRRVPGGGLEWVASISTSSTYRD
YADAVKGRFTVSRDDLEDFVYLQMHKMRVEDTAIYYCARKGSDRLSDNDPFDAGWGP
TVVTVSP

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ITCPPMSVEHADIWVKSYLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
LKCIR

(인간 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 도메인)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0414]

[0415]

(리더 서열을 포함하는) 성숙 VRC07(523)scFv/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다(서열 번호 53):

(신호 펩티드)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(VRC07(523) scFv: VL-링커-VH scFv)

(VL)

SSLTQSPGTLSPGETAIISCRTSQYGSLAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSGS
RWGPDYNTLTISNLESGDFGVYYCQQYEFGGQGTKVQVDIK

(링커)

GGGGSGGGSGGGGS

(VH)

QVRLSQSGGQMKKPGDSMRISCRASGYEFINCPINWIRLAPGKRPEWMGWMKPRHGAV
SYARQLQGRVTMTRDMYSETAFLELRSLTSDDTAVYFCTRGKYCTARDYYNWDFEHW
GQGTPVTVSS

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ITCPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
LKCIR

(인간 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 도메인)

EPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(리더 서열을 포함하는) 성숙 10-1074scFv/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기와 같다 (서열 번호 54):

(신호 펩티드)

MKWVTFISLLFLFSSAYS

(10-1074) scFv: VL-링커-VH scFv)

(VL)

SSYVRPLSVALGETARISCGRQALGSRAVQWYQHRPGQAPILLIYNNQDRPSGIPERFSG
TPDINFGTRATLTISGVEAGDEADYYCHMWDSRSGFSWSFGGATRLTVL

(링커)

GGGGSGGGSGGGGS

(VH)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCVSGDSMNYYWTWIRQSPGKGLEWIGYISDRESATY
NPSLNSRVVISRDTSKNQLSLKNSVTPADTAVYYCATARRGQRIYGVVSFGEFFYYYS
MDVWGKGTITVTVSS

(인간 IL-15R α 스시 도메인)

ITCPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPS
LKCIR

(인간 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 도메인)

EPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

몇몇 경우에 있어서, 리더 펩티드는 성숙 폴리펩티드로부터 절단된다.

전술된 바와 같이 bNAb scFv/huIL-15N72D 융합 단백질을 발현하는 유사 구조체가 제조될 수 있었다.

- [0422] 실시예 1과, 앞서(본원에 참조로서 인용되어 있는 미국 특허출원 제8,507,222호의 실시예 1 및 2) 기술된 바와 같이, 서열이 발현 벡터에 클로닝되었으며, 이 발현 벡터는 CHO 세포를 형질감염시켰다. 몇몇 경우에 있어서, CHO 세포는, 본 발명의 동일하거나 상이한 결합 도메인들을 가지는 huIL-15N72D 및 huIL-15R α Su/Fc 융합 단백질 둘 다를 암호화하는 벡터로 형질감염되었다. 융합 단백질 복합체는 전술된 바와 같이, 단백질 A 친화성 크로마토그래피가 사용되어 CHO 세포 배양 상청액으로부터 정제되었다.
- [0423] 예를 들어 CHO 세포 내 huIL-15N72D 및 N6scFv/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 발현 벡터의 공동 발현은, 2*^hN6/TxM이라 지칭되는 가용성 TxM 복합체의 형성과 분비를 허용하였다. CHO 세포 내 huIL-15N72D 및 2G12scFv/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 발현 벡터의 공동 발현은, 2*^h2G12/TxM이라 지칭되는 가용성 TxM 복합체의 형성과 분비를 허용하였다. CHO 세포 내 huIL-15N72D 및 VRC07(523)scFv/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 발현 벡터의 공동 발현은 2*^hVRC07(523)/TxM이라 지칭되는 가용성 TxM 복합체의 형성과 분비를 허용하였다. CHO 세포 내 huIL-15N72D 및 10-1074scFv/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 발현 벡터의 공동 발현은 2*^h10-1074/TxM이라 지칭되는 가용성 TxM 복합체의 형성과 분비를 허용하였다.
- [0424] 상기 명시된 바와 같이, TxM 단백질은 CHO 세포 상청액으로부터 단백질 A 크로마토그래피 및 기타 분리 방법(즉 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피 및/또는 크기별 배제 크로마토그래피와, 여과 방법)에 의해 정제될 수 있었다. 더욱이 정제된 단백질은 겔 크로마토그래피 및 기타 분석 방법에 의해 특성규명될 수 있었다. 예를 들어 도 20은, 2개의 scAb 또는 결합 도메인을 가지는 것(즉 2두형(2H) IL-15N72D: 항 PD-L1 scAb/IL-15R α Su/Fc 복합체) 또는 4개의 scAb 또는 결합 도메인을 가지는 것(즉 4두형(4H) 항 PD-L1 scAb/IL-15N72D: 항 PD-L1 scAb/IL-15R α Su/Fc 복합체) 또는 상이한 표적화 도메인의 조합(즉 중앙 표적화 도메인/항 PDL1scAb TxM 복합체)을 비롯하여 다양한 TxM 복합체의 크기별 배제 크로마토그래피 분석 결과를 보여준다. SEC 크로마토그래피는, 단백질 A 정제된 TxM 단백질은 주로 IL-15N72D: IL-15R α Su/Fc 복합체의 이동 패턴과 일치하는 이동 패턴을 보이는 주 단백질 피크를 보임을 나타냈다.
- [0425] scAb 또는 결합 도메인을 포함하는 유사 TxM 구조체는 다른 CD 항원, 시토카인 또는 케모카인 수용체 또는 리간드, 성장 인자 수용체 또는 리간드, 세포 부착 분자, MHC/MHC-유사 분자, Fc 수용체, Toll-유사 수용체, NK 수용체, TCR, BCR, 양성/음성 보조자극 수용체 또는 리간드, 사멸 수용체 또는 리간드, 중앙 연관 항원, 바이러스 암호화 항원 및 세균 암호화 항원, 그리고 세균 특이적 에 특이적인 항체 서열로 용이하게 제조될 수 있었다. 특히 관심이 가는 것은, 항원 CD4, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44, CD51, CD52, CD70, CD74, CD80, CD123, CD152, CD147, CD221, EGFR, HER-2/neu, HER-1, HER-3, HER-4, CEA, OX40 리간드, cMet, 조직 인자, Nectin-4, PSA, PSMA, EGFL7, FGFR, IL-6 수용체, IGF-1 수용체, GD2, CA-125, EpCam, 사멸 수용체 5, MUC1, VEGFR1, VEGFR2, PDGFR, Trail R2, 엽산염 수용체, 안지오프로테틴-2, 알파베타3 인테그린 수용체, HLA-DR 항원 및 본원에 기술된 기타 질환 표적에 대한 질환 특이적 결합 도메인(예컨대 scAb)을 가지는 TxM이다. HIV, HCV, HBC, CMV, HTLV, HPV, EBV, RSV 및 기타 바이러스 유래 바이러스 항원에 대한 항체 도메인, 특히 HIV 외피 스파이크 및/또는 gp120 및 gp41 에피토프를 인지하는 것도 또한 관심이 간다. 이러한 항체 도메인은 당 분야에 공지된 서열로부터 제조될 수 있거나, 또는 당 분야에 공지된 다양한 공급원(즉 척추동물 숙주 또는 세포, 조합 라이브러리, 무작위 합성 라이브러리, 컴퓨터 모델링 등)으로부터 새로이 단리될 수 있다.
- [0426] 실시예 6: 기타 TxM 활성의 특성규명
- [0427] CTLA-4 TxM의 결합 활성은, CTLA-4 양성 면역 세포가 사용되어 평가되었다. 마우스 특이적 CTLA-4 TxM에 관한 연구에 있어서, 마우스 림프구 내 CTLA-4의 발현이 처음에 항 CD3 Ab(2C11, 4 μg/ml)에 의해 4일 동안 유도되었다. CTLA-4 발현은, PE 항 마우스 CTLA-4 항체(클론 UC10-4B9) 또는 PE 아르메니아 햄스터 IgG 이소타입 대조군으로 염색함으로써 평가되었다. 도 21a에 보인 바와 같이 유세포 분석은 마우스 CTLA-4가 눈에 띄게 유도되었음을 입증하였다. 마우스 특이적 CTLA-4 TxM(100 μl 상청액)의 첨가는, 양성 대조군 항 mCTLA-4 항체(클론 HB304)가 그러하였듯이, 항 마우스 CTLA-4 항체 결합을 차단할 수 있었다. 인간 특이적 CTLA-4 TxM를 사용하여 연구하기 위해서, 인간 PBMC 내 CTLA-4의 발현이 항 CD3 Ab(OKT3 :4 μg/ml)에 의해 3일 동안 유도되었다. 그 다음, 세포는 PE 항 인간 CTLA-4 항체(클론 BNI3, Biolegend) 또는 PE 마우스 IgG2a, κ 이소타입 대조군으로 염색되었다. 전술된 결과들과 일치되게, 인간 특이적 CTLA-4 TxM(CL-8, 100 ul)은 인간 면역 세포 표면상 CTLA-4를 차단할 수 있었다(도 21b). 이러한 결과는 CTLA-4 TxM 복합체의 특이성을 입증해준다.
- [0428] 이와 유사하게, 마우스 특이적 PD-L1/CTLA-4 TxM 복합체의 결합 활성은 PD-L1 양성 5T33 골수종 중앙 세포(실시예 2에 기술된 방법 참조) 및 CTLA-4 양성 면역 세포를 대상으로 평가되었다. 도 22a 및 도 22b에 보인 바와 같

이, PD-L1/CTLA-4 TxM(상청액)은 세포 표면에 발현되는 PD-L1 및 CTLA-4 둘 다와의 결합을 차단할 수 있었다. 이 점은 또한 다중 특이적 TxM 복합체가, 결합된 결합 도메인들 각각의 반응성을 보유함을 나타낸다.

[0429] CD47 TxM 구조체의 직접 결합은 CD47 양성 세포가 사용되어 평가되었다. 도 23a 및 도 23b에 보인 바와 같이, 마우스 및 인간 특이적 CD47 TxM 복합체는 마우스 B16F10 흑색종과 인간 Jurkat T 세포 각각을 염색할 수 있었다. 이러한 결과는, 이 복합체가 CD47 결합 활성을 보유하였음을 나타낸다.

[0430] TNT scAb 도메인을 포함하는 TxM 복합체의 결합을 평가하기 위해 단일 가닥 DNA ELISA 방법(ALPCO ssDNA ELISA 키트 35-SSSHU-E01)이 사용되었다. 요약하면, TNT scAb 도메인을 포함하는 정제 TxM 단백질은 연속 희석되었고, 이 단백질 100 μ L가 인간 재조합 단일 가닥 DNA로 코팅된 ELISA 웰에 첨가되었다. 항온처리한지 30분 후, 웰은 세척되었고, 이후 HRP-항 인간 IgG 항체 100 μ L가 첨가되었다. 추가 항온처리 및 세척 단계 이후, 결합되었던 TxM 단백질은 TMB 기질로 검출되었다. 웰의 흡광도는 450 nm에서 판독되었다. 도 24a 및 도 24b에 보인 바와 같이, TNT scAb TxM 및 TNT scAb/항 인간 PD-L1 scAb TxM 복합체는 단일 가닥 DNA와 결합할 수 있었는데, 이 경우 TNT scAb TxM의 Kd(188 pM)는 TNT scAb/항 인간 PD-L1 scAb TxM의 Kd(10279 pM)에 비하여 더 낮았는데, 이는 아마도 TNT scAb TxM 중 4H TNT scAb의 결합력이 TNT scAb/항 인간 PD-L1 scAb TxM 중 2H TNT scAb의 결합력보다 더 컸기때문인 것으로 생각된다.

[0431] TNT scAb TxM 복합체가 종양 세포와 결합하는 능력도 또한 평가되었는데, 이때 종양 세포 DNA는 이 세포를 고정 및 투과처리함으로써 노출되었다. 초기 연구에서, MB231 유방암 세포는 처음에 1.5% 파라포름알데히드로 고정되었고, 0.1% 사포닌으로 투과처리된 다음, 10^5 개 세포(10^6 개 세포/mL)는 실온에서 30분 동안 0.01 nM ~ 100 nM의 TNT scAb TxM, TNT scAb/항 인간 PD-L1 scAb TxM 또는 2H-항 인간 PD-L1 scAb TxM(음성 대조군)과 함께 항온처리되었다. 세포는 세척되고 나서, 항 인간 IgG Fc-APC로 염색된 다음, 유세포분석에 의해 분석되었다. 도 25a는, 상이한 TxM 농도로 MB231 세포가 염색되었을 때의 평균 형광도 세기(MFI)를 보여주는데, 이는 투과처리된 유방 종양 세포에 대한, TNT scAb TxM 및 TNT scAb/항 인간 PD-L1 scAb TxM의 특이적이고 농도 의존적인 결합을 확인시켜주는 것이다. 음성 대조군 PD-L1 scAb TxM 복합체와는 최소한의 결합이 확인되었는데, 이 점은 MB231 세포주 상 PD-L1의 발현 수준이 낮다는 것과 일치한다. 고정 및 투과처리된 PD-L1 음성 A549 인간 폐 종양 세포를 대상으로 유사한 연구가 수행되었다. 역시, 결과(도 25b)는 투과처리된 폐 종양 세포에 대한, TNT scAb TxM 및 TNT scAb/항 인간 PD-L1 scAb TxM의 특이적이고 농도 의존적인 결합을 확인시켜주었다.

[0432] 게다가, hOAT scAb 및/또는 항 인간 PD-L1 scAb 도메인을 포함하는 TxM 복합체가 종양 세포와 결합하는 능력이 평가되었다. SW1990 인간 췌장암 세포주는 인간 TF를 높은 수준으로 발현하였고, 인간 PD-L1을 낮은 수준으로 발현하였다. 연구에서, 10^5 개 SW1990 세포(10^6 개 세포/mL)가 실온에서 30분 동안 0.01 nM ~100 nM의 2두형(h2) hOATscAb/TxM, 항 인간 PD-L1scAb/hOATscAb/TxM, h2*항 인간 PD-L1scAb/TxM 또는 대조군 hOAT Ab 또는 대조군 항 인간 PD-L1 Ab(아벨루맵)와 함께 항온처리되었다. 세포는 세척되었고, 항 인간 IgG Fc-APC로 염색된 다음, 유세포분석에 의해 분석되었다. 도 26은, 상이한 단백질 농도에서의 SW1990 세포 염색의 평균 형광도 세기(MFI)를 보여준다. 결과는 hOAT scAb를 포함하는 TxM 복합체(h2*hOATscAb/TxM 및 항 인간 PD-L1scAb/hOATscAb/TxM)가, 대조군 hOAT Ab와 유사하게 높은 수준의 염색을 SW1990 종양 세포 상 인간 TF에 대해 보였음을 확인시켜주었다. 항 인간 PD-L1 scAb를 포함하는 TxM 복합체(h2*항 인간 PD-L1scAb/TxM)는, 대조군 항 인간 PD-L1 Ab(아벨루맵)와 유사하게 더 낮은 수준의 염색을 SW1990 종양 세포 상 인간 PD-L1에 대해 보였다.

[0433] huIL-15N72D: 인간 LFA-1 I 도메인(K287C/K294C)/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 복합체 형성을 확인하는데 ELISA 기반 방법이 사용되었다. huIL-15N72D 및 인간 LFA-1 I 도메인(K287C/K294C)/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 발현 벡터가 공동 형질감염된 CHO 세포 유래 배양 상청액 중 결합 활성이 평가되었다. 도 27a에 있어서, 융합 단백질 복합체는 포착 항체, 항 인간 IL-15 항체(R&D Systems) 및 검출 항체, 항 인간 IgG 항체(Jackson ImmunoResearch)가 사용되어 huIL15/huIgG1 특이적 ELISA에 의해 검출되었다. 이러한 결합은, 비형질감염 CHO 세포를 함유하는 배지의 상청액만이 사용되어 대조군 시료의 결합과 비교되었다. 결과는, 2*hlFA1/TxM가 생산되었음과 이의 적당한 복합체 형성이 이루어졌음을 보여준다.

[0434] 게다가, 2*hlFA1/TxM과 ICAM-1의 결합이 ELISA에 의해 평가되었다(도 27b). 이뮤노플레이트(immunoplate)의 웰을 인간 ICAM-1-Fc(Biolegend) 1 μ g으로 코팅하였다. 세척 단계 후, 2*hlFA1/TxM을 함유하는 CHO 배양 상청액이 세포에 첨가되었다. 항온처리와 추가의 세척 단계들 이후, HRP-결합 항 인간 IL-15 항체(R&D Systems)를 사용하여 융합 단백질 복합체의 결합이 확인되었다. 웰의 흡광도는 ABTS와의 항온처리 이후 405 nm에서 판독되었다. 도 27b의 결과는, 이 복합체가 ICAM-1을 인지함을 나타낸다.

- [0435] 유사한 ELISA 기반 방법은, 형질감염된 CHO 세포 배양 상청액 중 huIL-15N72D: hDLL4/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 복합체가 형성되었음을 확인시켜주었다. 도 28에 있어서, 배양 상청액 중 융합 단백질 복합체는 포착 항체, 항 인간 IL-15 항체(R&D Systems) 및 검출 항체, 항 인간 IgG 항체(Jackson ImmunoResearch)가 사용되어 huIL15/huIgG1 특이적 ELISA에 의해 검출되었다. 시료는 비형질감염 CHO 세포를 함유하는 배지의 상청액만이 사용되어 대조군 시료의 경우와 비교되었다. 결과는, 2*hDLL4/TxM 복합체가 생산되었고, 이 복합체의 적당한 복합체 형성이 이루어졌음을 나타낸다.
- [0436] ELISA 기반 방법도 또한 huIL-15N72D: haTIM3scFv/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc 복합체가 형성되었음을 확인시켜주었다. 도 29에 있어서, 형질감염된 CHO 배양 상청액 중 융합 단백질 복합체는 포착 항체, 항 인간 IL-15 항체(R&D Systems) 및 검출 항체, 항 인간 IgG 항체(Jackson ImmunoResearch)가 사용되어 huIL15/huIgG1 특이적 ELISA에 의해 검출되었다. 이러한 결합은, 비형질감염 CHO 세포를 함유하는 배지의 상청액만이 사용되어 대조군 시료의 경우와 비교되었다. 결과는, 2*haTIM3/TxM 복합체가 생산되었고, 이 복합체의 적당한 복합체 형성이 이루어졌음을 나타낸다.
- [0437] bNAb scFv TxM 발현 벡터가 공동 형질감염된 CHO 세포로부터 유래하는 상청액은 TxM 복합체의 발현 및 결합 능력을 측정하기 위해 사용되었다. ELISA 기반 방법은 bNAb scFv TxM 복합체가 형성되었음을 확인시켜주었다. 도 30a 및 도 30b에 있어서, 형질감염된 CHO 배양 상청액 중 융합 단백질 복합체는 포착 항체, 항 인간 IL-15 항체(R&D Systems) 및 검출 항체, 항 인간 IgG 항체(Jackson ImmunoResearch)가 사용되어 huIL15/huIgG1 특이적 ELISA에 의해 검출되었다. 양성 대조군 TxM은 hCD20을 인지하는 것이다. 결과는, 상이한 bNAb scFv TxM 복합체 4개가 생산되었고, 이의 적당한 복합체 형성이 이루어졌음을 나타낸다.
- [0438] 더욱이, bNAb scFv TxM과 HIV 단백질 표적(gp120(SF162.LS) 및 gp140 (SF162.LS))의 결합은 ELISA에 의해 평가되었다. 이 연구를 위해, 이뮤노플레이트 웰이 HIV gp120(SF162.LS) 또는 gp140(SF162.LS)(ProtTech, Inc.) 0.1 μg으로 코팅되었다. 세척 단계 이후, bNAb scFv TxM을 함유하는 CHO 배양 상청액이 세포에 첨가되었다. 음성 대조군 TxM은 hCD20을 인지하는 것이다. 항온처리 및 추가의 세척 단계 이후에, HRP-접합 항 인간 IgG 항체(Jackson ImmunoResearch)가 사용되어 융합 단백질 복합체의 결합이 확인되었다. 웰 내 흡광도는 ABTS와의 항온처리 후에 405 nm에서 관독되었다. 도 30c ~ 도 30f의 결과들은 bNAb scFv TxM 복합체가 HIV 단백질 표적을 인지하였음을 나타낸다.
- [0439] 전반적으로 이러한 결과는, 다양한 면역 관문 분자 및 신호전달 분자에 특이적인 결합 도메인을 가지는 TxM 복합체가 제조될 수 있으며, 이 복합체는 표적 분자에 증진된 결합 활성을 제공할 수 있음을 입증한다. 이러한 복합체는 IL-15 면역자극 활성을 보였고, 세포상 표적 항원에 대해 면역 매개 세포독성을 유도할 수 있었다. 이러한 복합체는 또한 동물 중앙 모델에 있어서 매우 효과적이었다.
- [0440] 실시예 7: TxM 복합체의 면역자극 및 항 중앙 활성
- [0441] 실시예 2에 나타난 바와 같이, TxM 복합체의 IL-15 면역자극 활성은 IL-2Rβ/γ 보유 면역 세포, 예컨대 32Dβ 세포주의 증식을 기반으로 평가되었다. 요약하면, 정제된 TxM 단백질은, 그 농도를 증가시키면서 IMDM:10% FBS 배지 200 μL 중 32Dβ 세포(10⁴ 개 세포/웰)에 첨가되었고, 이 세포는 37℃에서 3일 동안 항온처리되었다. 그 다음, PrestoBlue 세포 생존능 시약(cell viability reagent)이 첨가되었다(20 μL/웰). 4시간 후, 레자주린 기반 용액인 PrestoBlue의 대사 활성 세포에 의한 환원을 기반으로 세포 증식을 확인하기 위해, 570 nm에서의 흡광도가 측정되었다(다만 이 때 정규화를 위한 기준 파장(reference wavelength)은 600 nm였음). 그 다음, 흡광도와 TxM 단백질 농도 간 관계를 기반으로 TxM 복합체에 대한 IL-15 생체활성의 반수 최대 유효 농도(EC50)가 확정되었다. 표 1은, 본 발명의 결합 도메인들을 포함하는 다양한 TxM 복합체에 대한 IL-15 EC50 값을 보여준다. 결과는, 2개의 scAb/결합 도메인을 가지는 TxM 복합체(즉 2두형(2H) 항 PD-L1 scAb/IL-15N72D: 항 PD-L1 scAb/IL-15R α Su/Fc 복합체) 또는 4개의 scAb/결합 도메인을 가지는 TxM 복합체(즉 4두형(4H) 항 PD-L1 scAb/IL-15N72D: 항 PD-L1 scAb/IL-15R α Su/Fc 복합체) 또는 상이한 표적화 도메인들의 조합(즉 중앙 표적화 도메인/항 PDL1scAb TxM 복합체)을 비롯하여 다양한 정제 TxM 복합체의 면역자극 활성을 확인시켜주었다.

표 1

TxM 복합체의 IL-15 활성

	EC50 (pM TxM)
2H-항 인간 PD-L1 scAb TxM	14
4H-항 인간 PD-L1 scAb TxM	220
2H-항마우스 PD-L1 scAb TxM	58
항 인간 CTLA-4 scAb /항 인간 PD-L1 scAb TxM	73
TNT scAb TxM	1013
TNT scAb/항 인간 PD-L1 scAb TxM	8498
2H-hOAT TxM	115
hOAT/항 인간 PD-L1 scAb TxM	202

[0442]

[0443]

hOAT scAb TxM이 종양 세포에 대한 면역 세포의 세포독성을 자극하는 능력이 시험관 내에서 평가되었다. 인간 NK 세포가 NK 세포 단리 키트(Stemcell Technologies사)가 사용되어 혈액의 백혈구 연층으로부터 정제되어, 효과기 세포로서 사용되었다. TF 양성 인간 체장 종양 세포인 SW1990은 Celltrace-Violet으로 표지화되어 표적 세포로서 사용되었다. 인간 NK 세포 및 SW1990 종양 세포는 E:T 비율 1:1로, 배지(단독) 중에 또는 10nM hOAT Ab(대조군) 또는 2H hOAT scAb TxM 복합체를 함유하는 배지 중에 혼합되었다. 40시간 후, 표적 세포 사멸%가 바이올렛-표지화 표적 세포의 요오드화프로피듐 염색을 기반으로 유세포분석에 의해 평가되었다. 도 31에 보인 바와 같이, 2H hOAT scAb TxM 복합체와 함께 항온처리된 인간 NK 세포는 미처리 NK 세포 또는 hOAT Ab 처리된 NK 세포(즉 기존의 ADCC)보다 TF 양성 인간 종양 세포에 대해 더 큰 세포독성을 매개할 수 있었다. 이러한 결과는, 항 TF TxM 복합체의 면역 세포 매개 표적화 항 종양 활성이 항 TF Ab의 면역 세포 매개 표적화 항 종양 활성에 비하여 유의미하게 개선되었음을 보여준다.

[0444]

TxM 복합체가 T 세포 활성의 관문 매개 억제를 극복하는 능력이, 이미 기술된 시험관 내 검정법(Steward, R, et al Cancer Immunol Res 2015 3(9):1052-1062)을 통해 평가되었다. 예를 들어 증가한 면역 세포 증식(BrDU 혼입에 의해 측정됨) 및 IFN γ 방출(ELISA에 의해 측정됨)을 입증하기 위하여, 새로이 단리된 1차 인간 T 세포는 항 CD3 및 항 CD28 코팅 비드와 함께 배양되었다. 비드에 PD-L1 항체가 첨가되었을 때, PD-L1/PD-1 상호작용의 억제 신호전달로 말미암아 T 세포 증식과 IFN γ 방출은 유의미하게 감소하였다. 항 CD3, 항 CD28, PD-L1 코팅 비드 및 T 세포와 같은 환경에 가용성 PD-L1 TxM 또는 PD-1 TxM이 첨가되었을 때, PD-L1/PD-1 상호작용의 봉쇄로 말미암아 T 세포 증식과 IFN γ 방출은 증가하였다. 항 CD3, 항 CD28, 항 CTLA-4 코팅 비드 및 T 세포와 같은 환경에서 CTLA-4 TxM이 사용되는 유사한 검정법은 또한 CTLA-4 TxM의 면역 관문 억제 활성을 입증하였다.

[0445]

이러한 복합체의 항 종양 활성은 마우스 이중이식편 모델에서 인간 종양 세포주 및 환자 유래 종양 세포가 사용되어 평가되었다(Morton, J.J., et al. Cancer Research 2016 doi: 10.1158/0008-5472). 시판중인 인간화 마우스 모델(즉 Hu-CD34 NSGTM, Jackson laboratory)은 인간 종양 세포주 및 환자 유래 종양 세포로부터 유래하는 종양에 대한 인간 면역 세포 반응의 면역요법 활성을 평가하기 위해 개발되었다. 예를 들어 PD-L1 양성 피하 인간 MDA-MB-231 유방암 종양을 보유하는 Hu-CD34 NSGTM 마우스는 PBS로 처리되었거나, 아니면 PD-L1 TxM 또는 PD-1 TxM으로 그 용량 수준을 증가시키면서 처리되었으며(즉 2주 동안 매주 2회씩 피하 투여), 종양 성장이 평가되었다. 종양 부피의 용량 의존적 감소는 PD-L1 양성 인간 종양에 대한 PD-L1 TxM 및/또는 PD-1 TxM의 치료적 활성에 대한 증거를 제공한다. 고휘 종양 마우스 모델은 또한 환자 유래 PD-L1 양성 종양 세포(즉 BR1126(TM00098), LG1306(TM00302))가 사용되어 제작될 수 있었다. BR1126 종양 보유 Hu-CD34 NSGTM 마우스에 있어 PD-L1 TxM 및/또는 PD-1 TxM의 활성은 처리 후 종양 성장 또는 마우스 생존을 평가함으로써 평가될 수 있었다. 뿐만 아니라, 혈액 및 종양 미세환경에서의 T 세포 반응의 처리 의존적 변화가 이 모델에서 평가되었다.

PD-L1 TxM 및/또는 PD-1 TxM 처리 후 혈액 또는 종양 중 T 세포 수준 또는 활성화(즉 IFN γ 양성 세포)의 증가는, 종양 보유 마우스 내 이 복합체의 면역자극 활성화의 증거를 제공한다. 종합하였을 때, 이 연구들은 생체 내 인간 종양에 대한 PD-L1 TxM 및/또는 PD-1 TxM의 면역 세포 매개 활성을 입증하여 주었다.

[0446] **기타 구현예들**

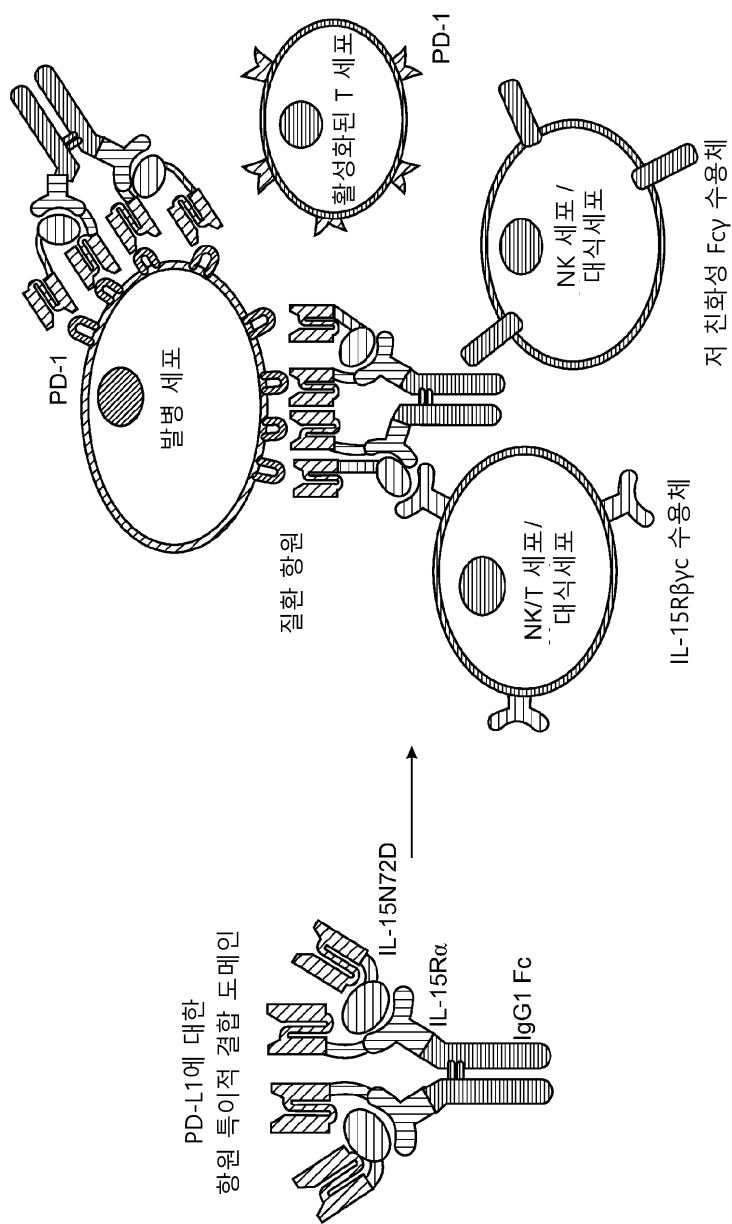
[0447] 본 발명은, 본 발명의 상세한 설명과 함께 기술되어 있지만, 전술된 기술은 본 발명의 범위를 예시하기 위한 것이지 제한하고자 하는 것은 아니며, 본 발명의 범위는 첨부된 특허청구범위에 의해 한정된다. 다른 양태들, 이 점들, 그리고 변형예들은 하기 청구항들의 범위 내에 있다.

[0448] 본원에 인용된 특허 문헌 및 과학 문헌은, 당 분야의 숙련자들이 이용 가능한 지식을 확립해준다. 본원에 인용된 모든 미국 특허와, 공개 또는 미공개 미국 특허 출원은 참조로 인용되어 있는 것이다. 본원에 인용된 모든 공개 외국 특허 및 특허출원은 본원에 참조로 인용되어 있는 것이다. 본원에 인용된 승인 번호로서 명시된 Genbank 및 NCBI 제출에 관한 사항도 본원에 참조로 인용되어 있는 것이다. 본원에 인용된 기타 모든 공표 참고 문헌, 서류, 논문 및 과학 문헌은 본원에 참조로 인용되어 있는 것이다.

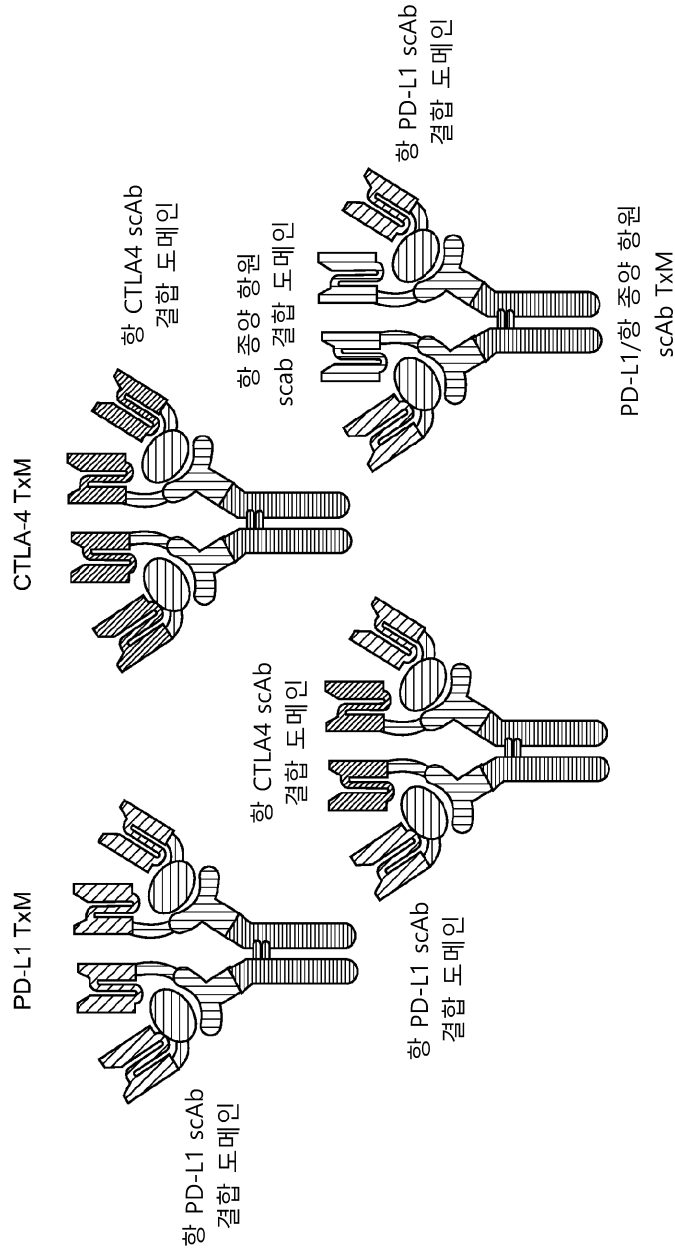
[0449] 본 발명은, 본 발명의 바람직한 구현예를 참고로 하여 구체적으로 보였을 뿐만 아니라 기술되어 있긴 하지만, 그 형태와 세부사항에 대한 다양한 변화가, 첨부된 청구항들에 의해 포함되는 본 발명의 범위로부터 벗어나지 않고 내부적으로 가하여질 수 있음은 당 업자에 의해 이해될 것이다.

도면

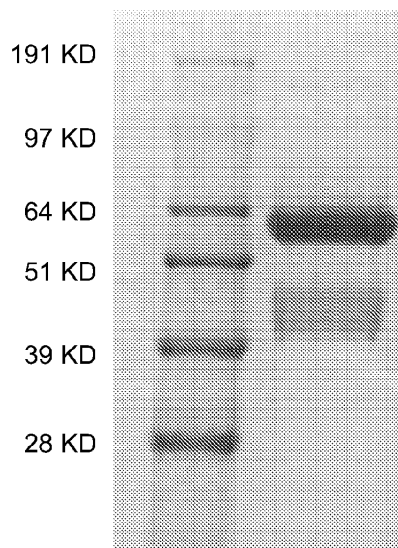
도면1



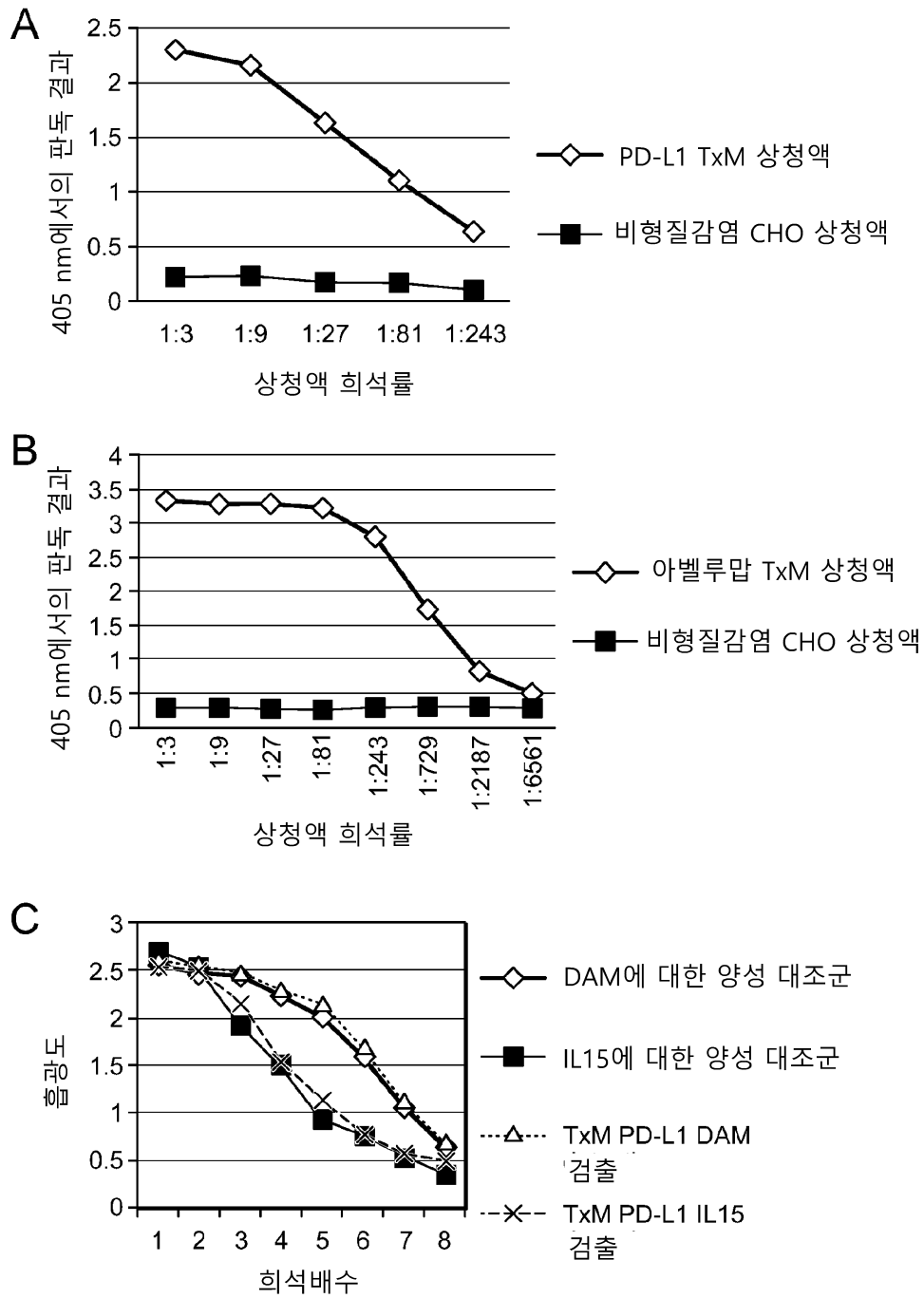
도면2



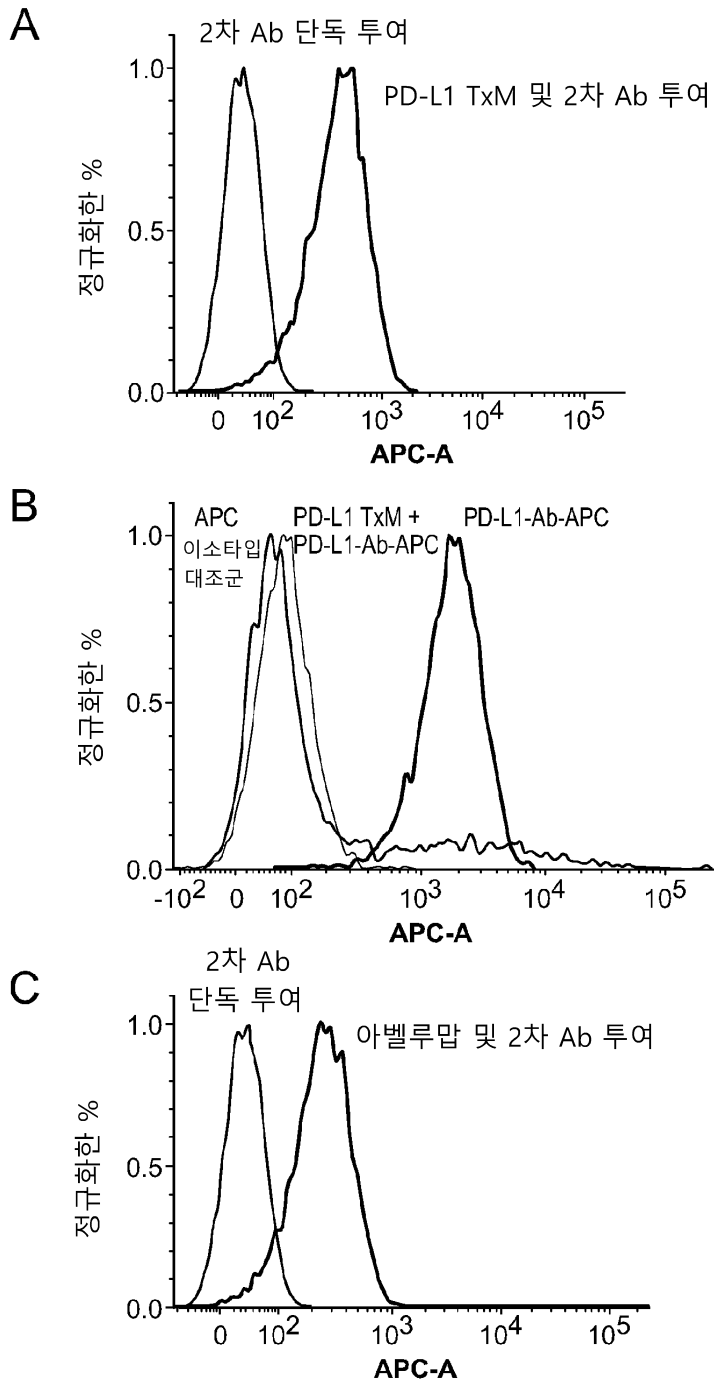
도면3



도면4

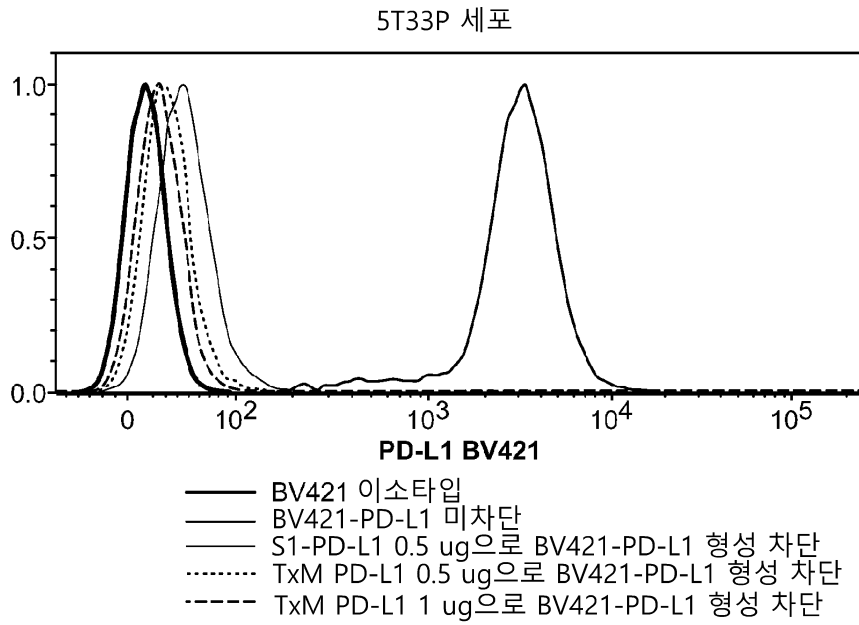


도면5

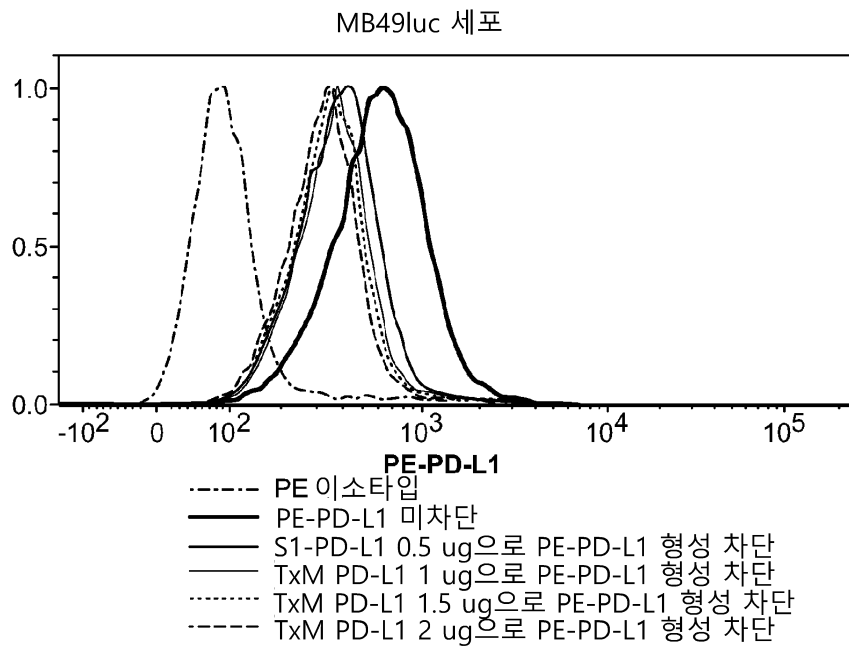


도면6

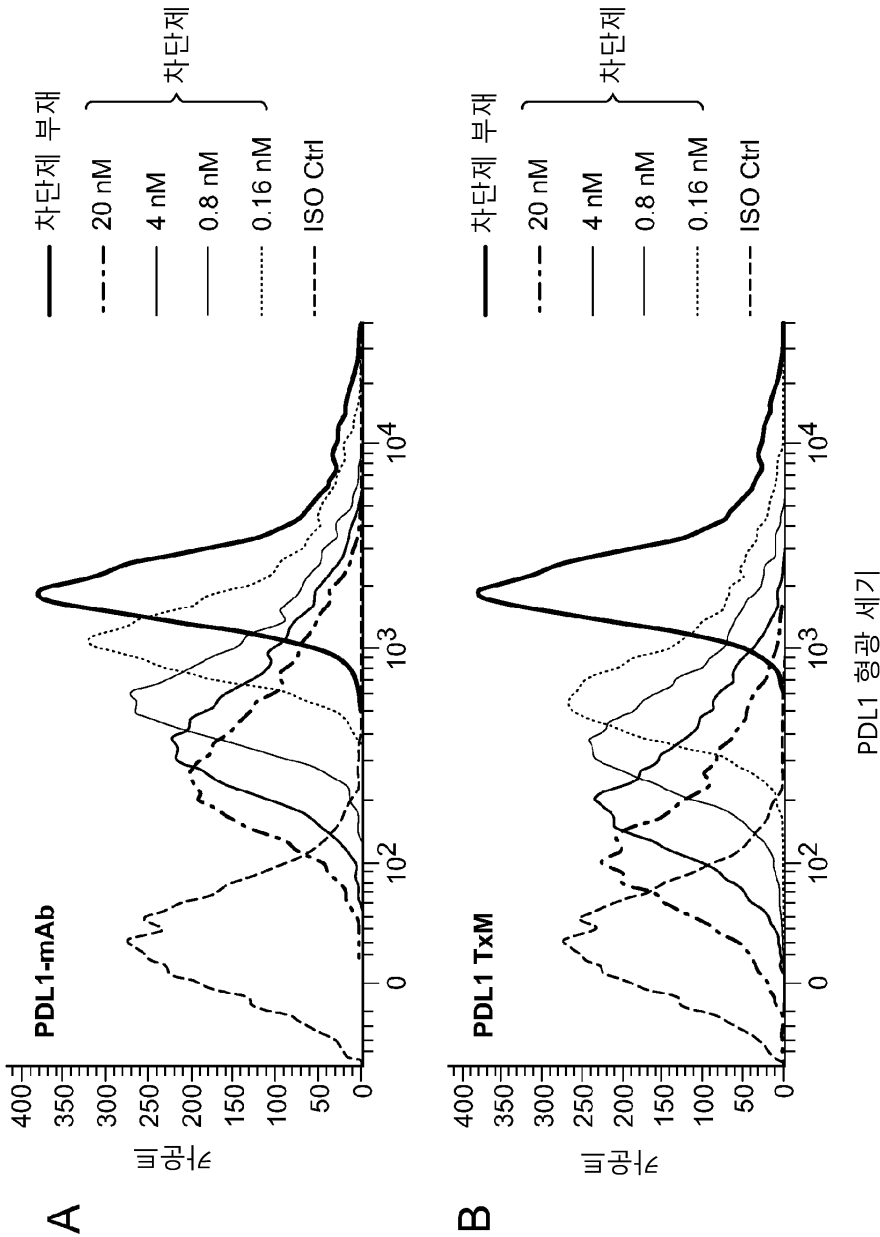
A



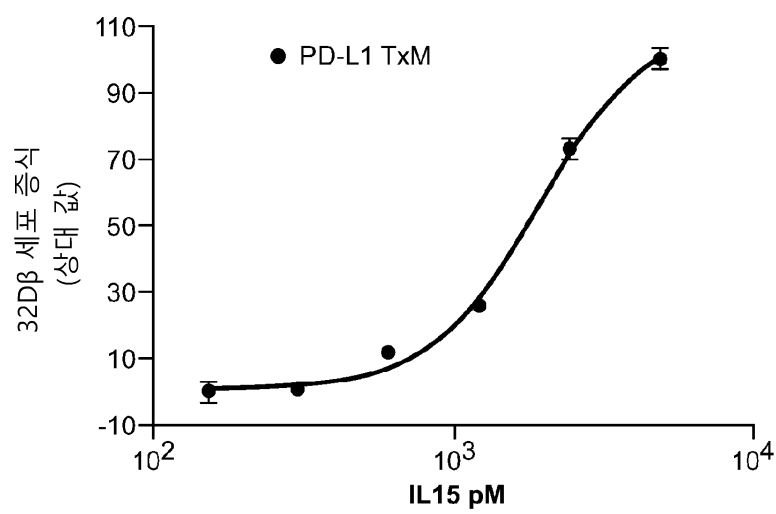
B



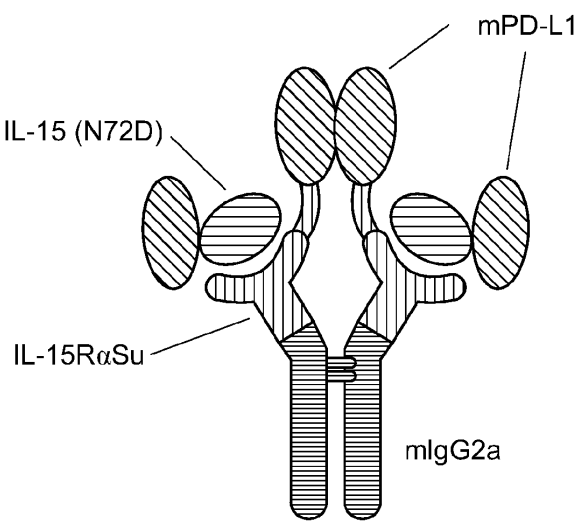
도면7



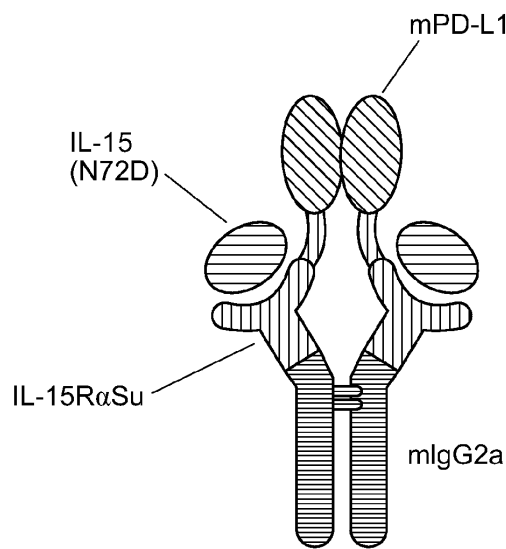
도면8



도면9a

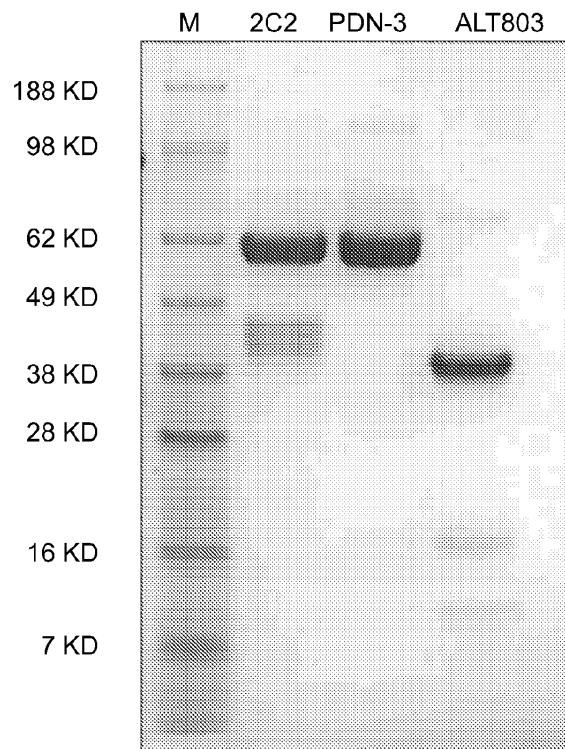


2C2
"4두형"

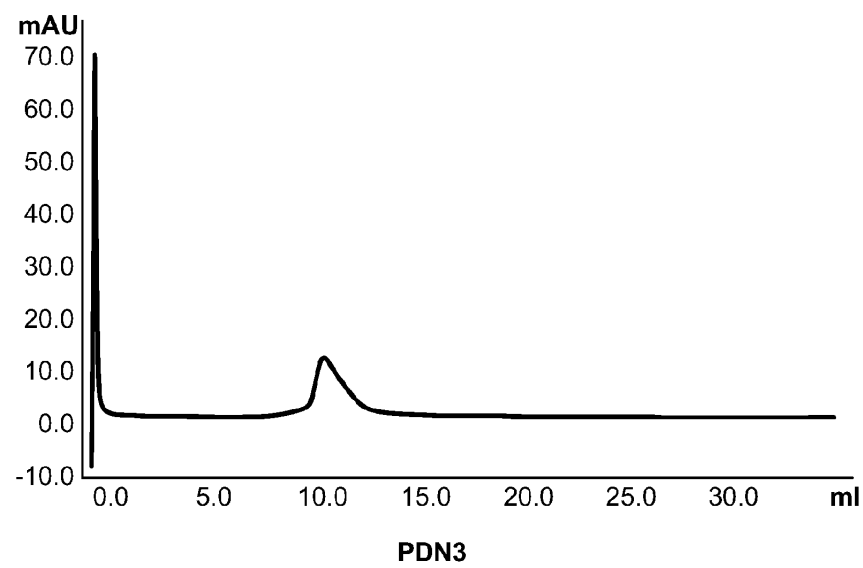


PDN3
"2두형"

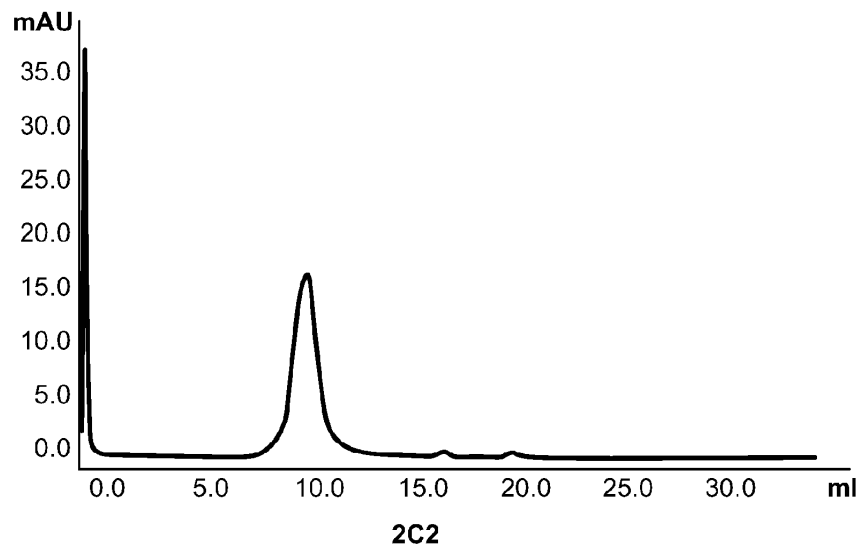
도면9b



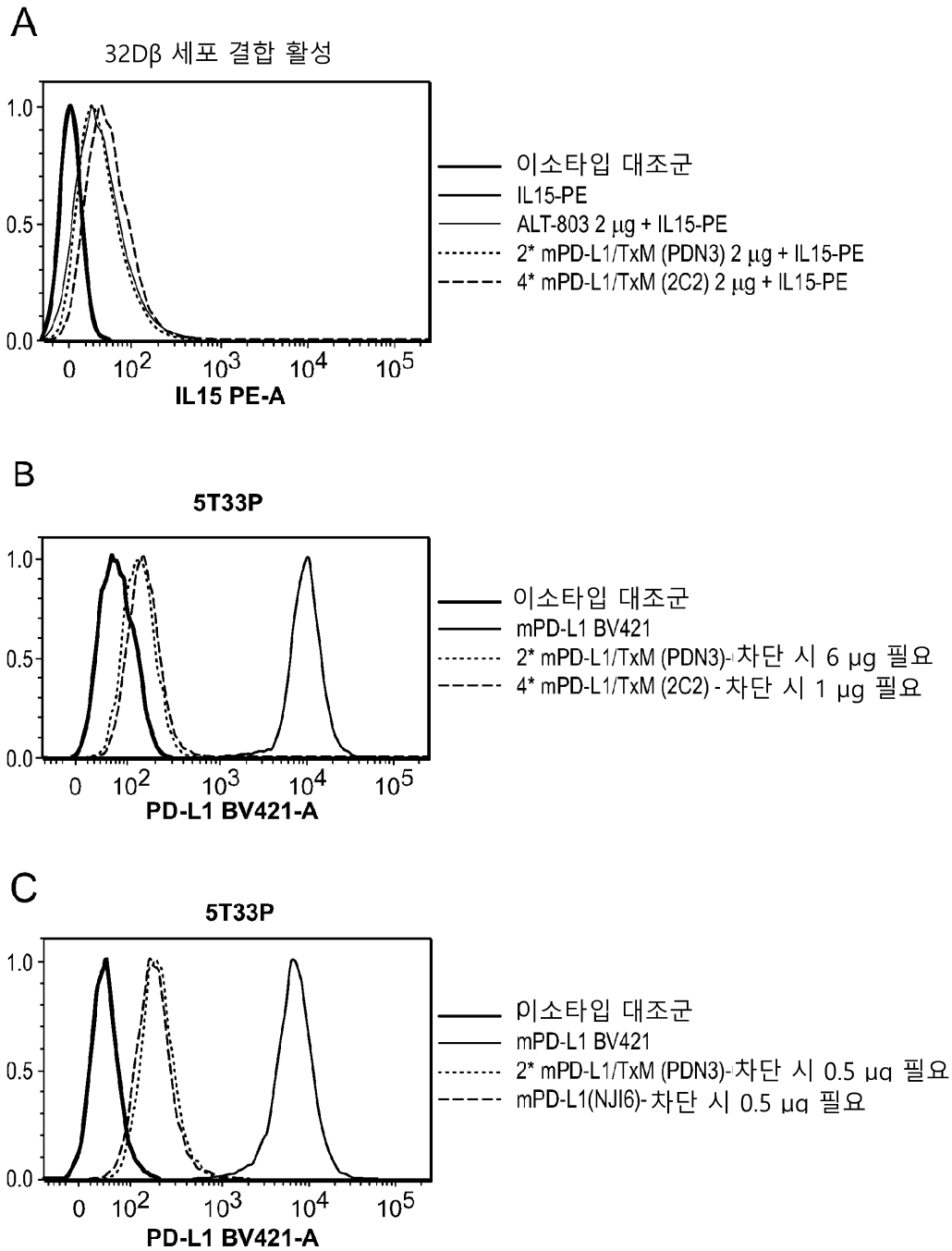
도면9c



도면9d

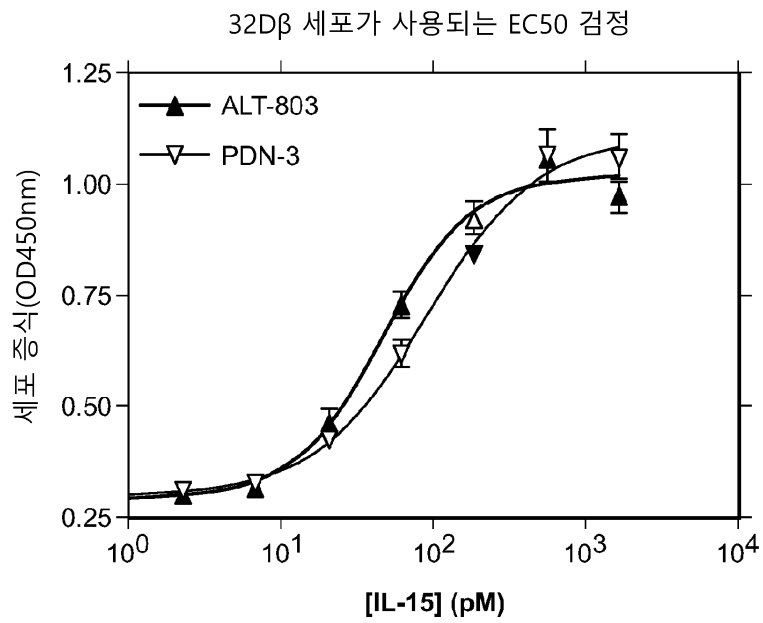


도면10

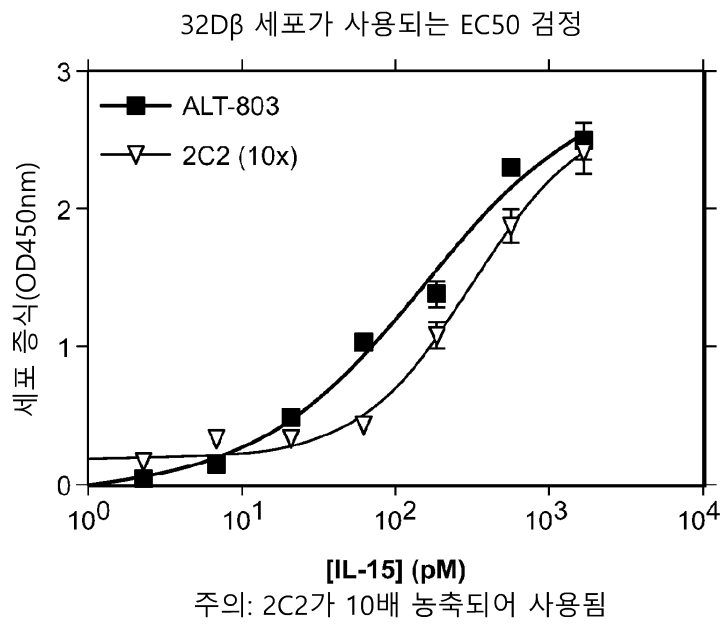


도면11

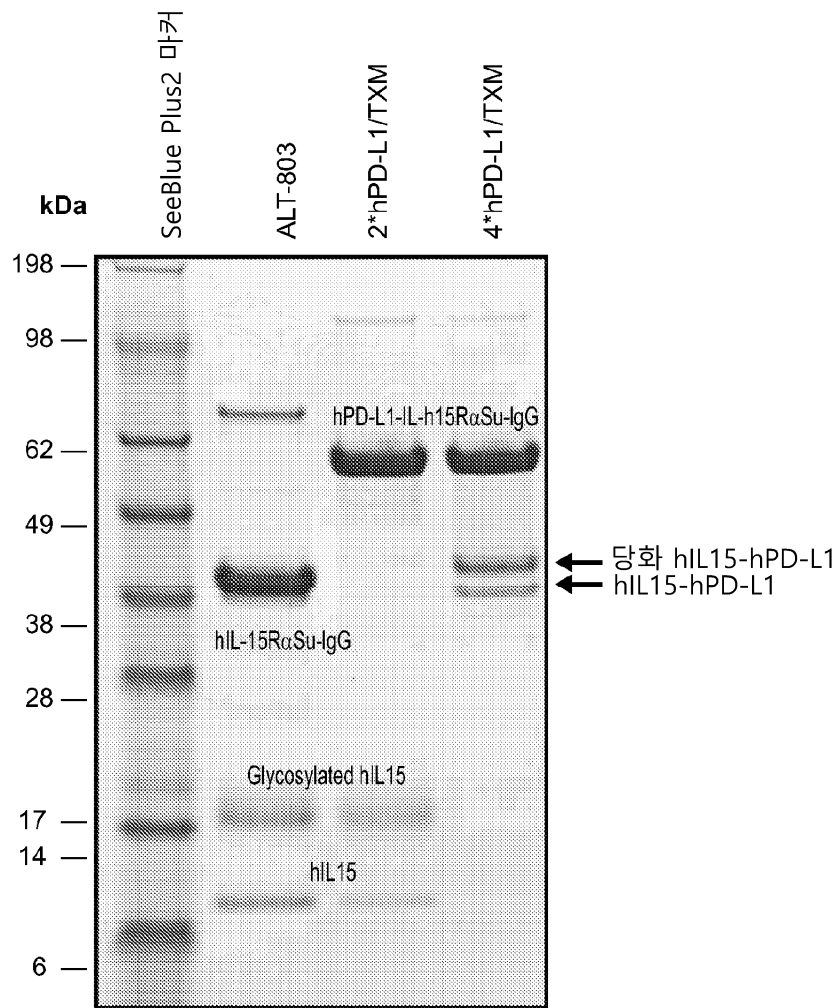
A



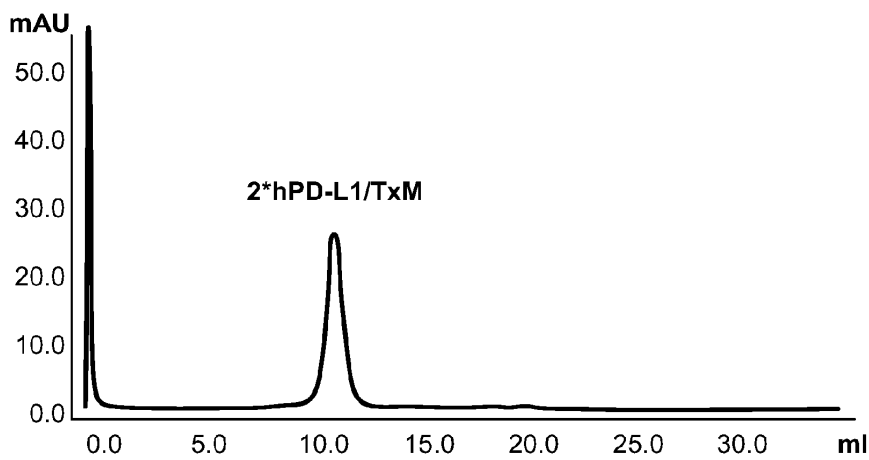
B



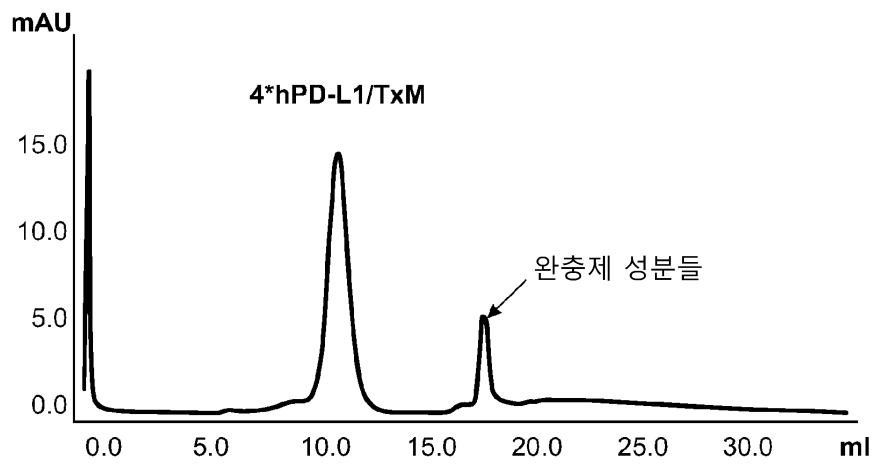
도면12a



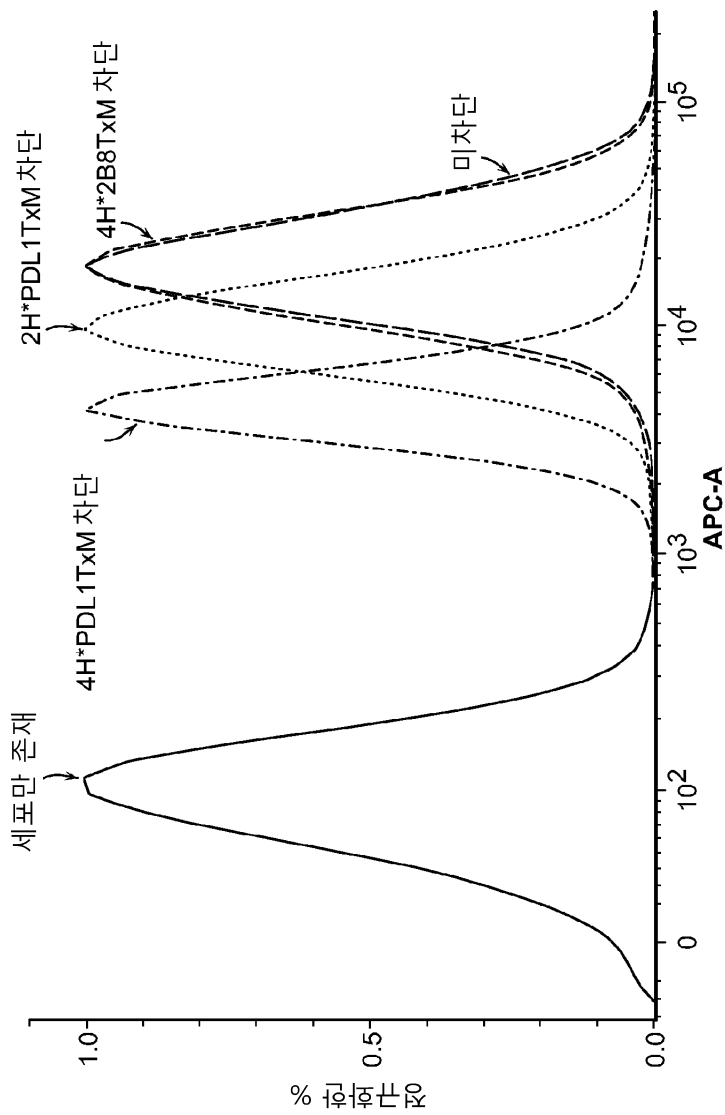
도면12b



도면12c

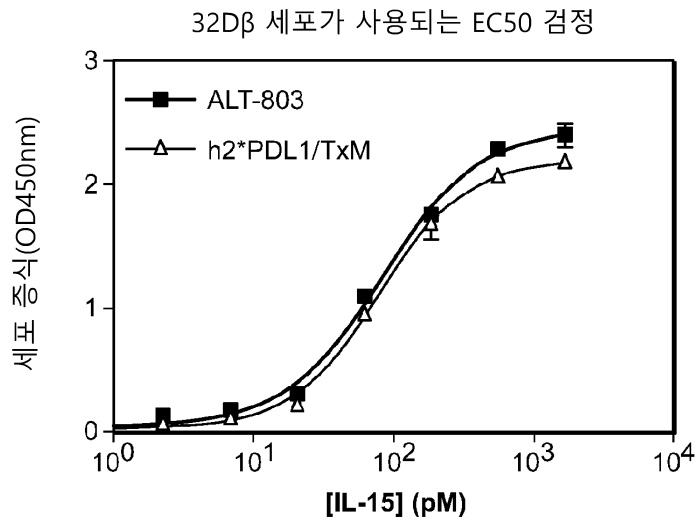


도면13



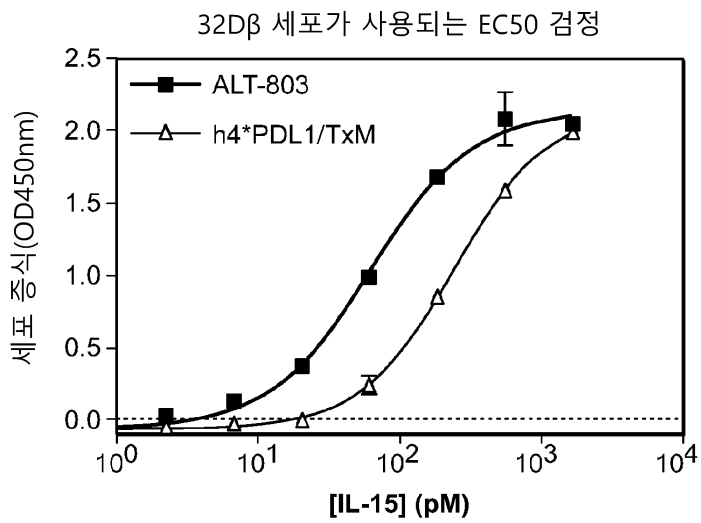
도면14

A



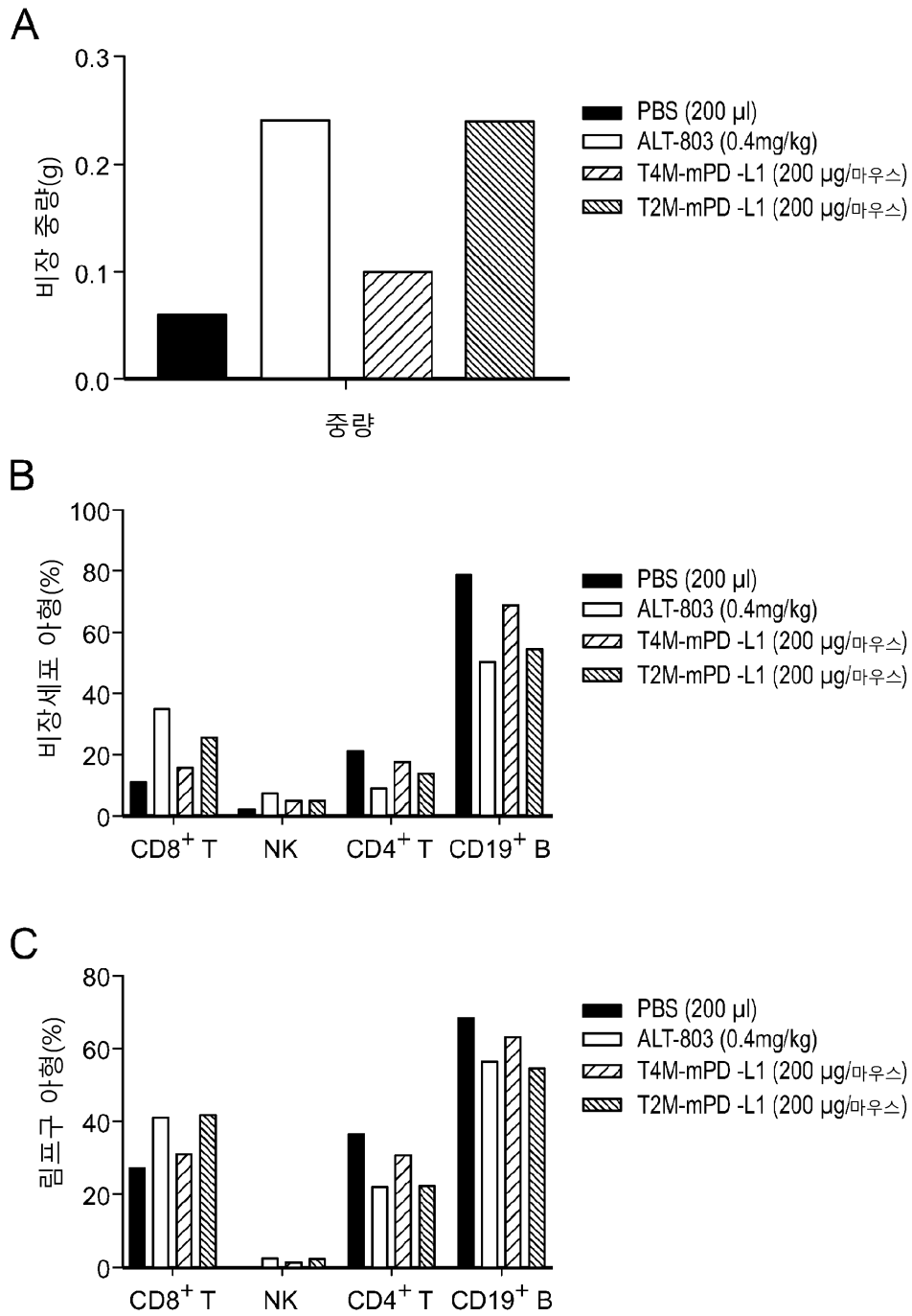
h2*PDL1/TxM의 EC50값은 ALT-803의 EC50값보다
약 1배~ 약 1.5배 더 큼

B

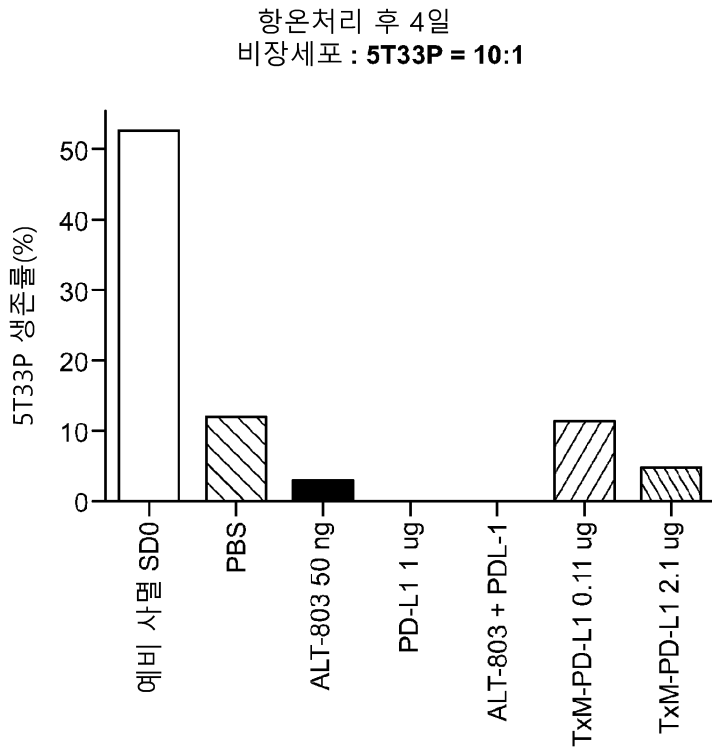


h4*PDL1/TxM의 EC50값은 ALT-803의 EC50값보다
약 5배 더 큼

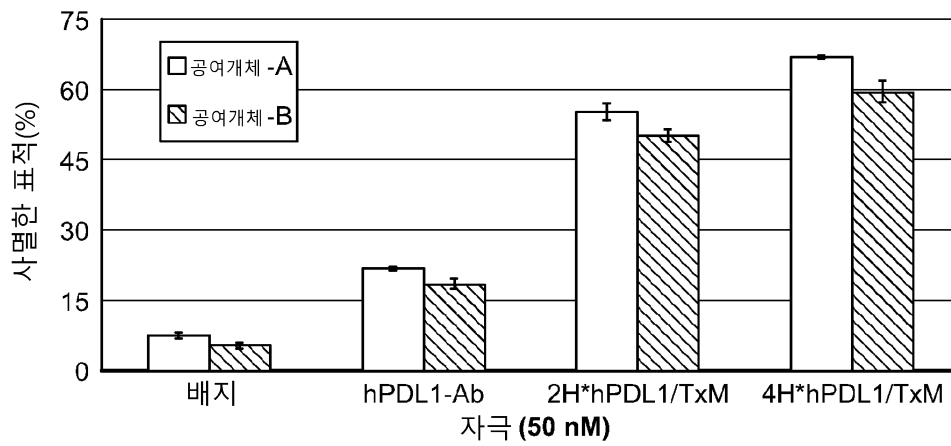
도면15



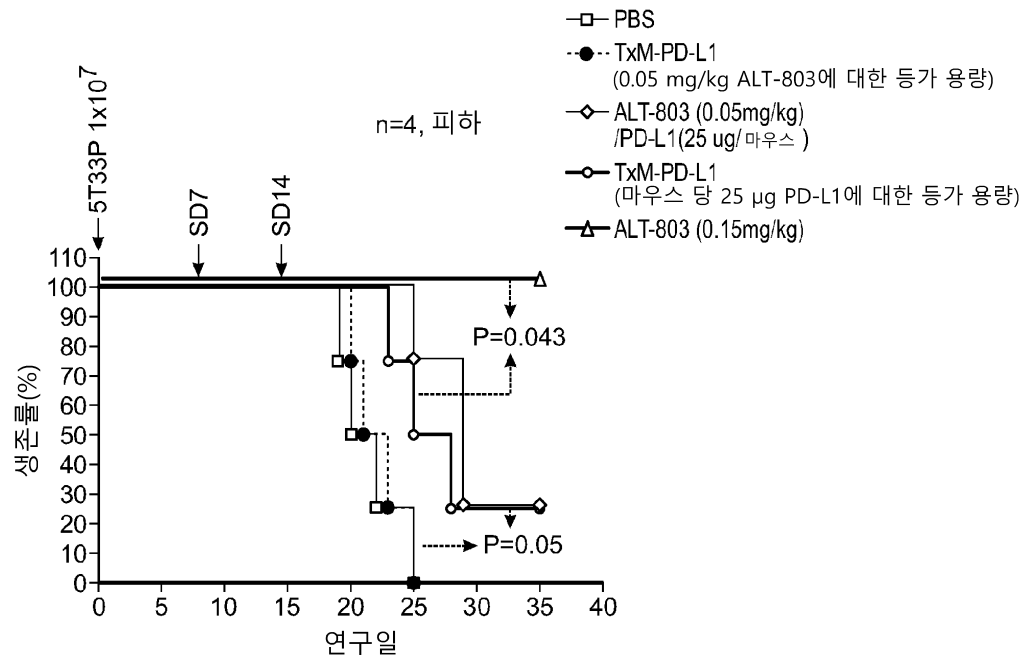
도면16



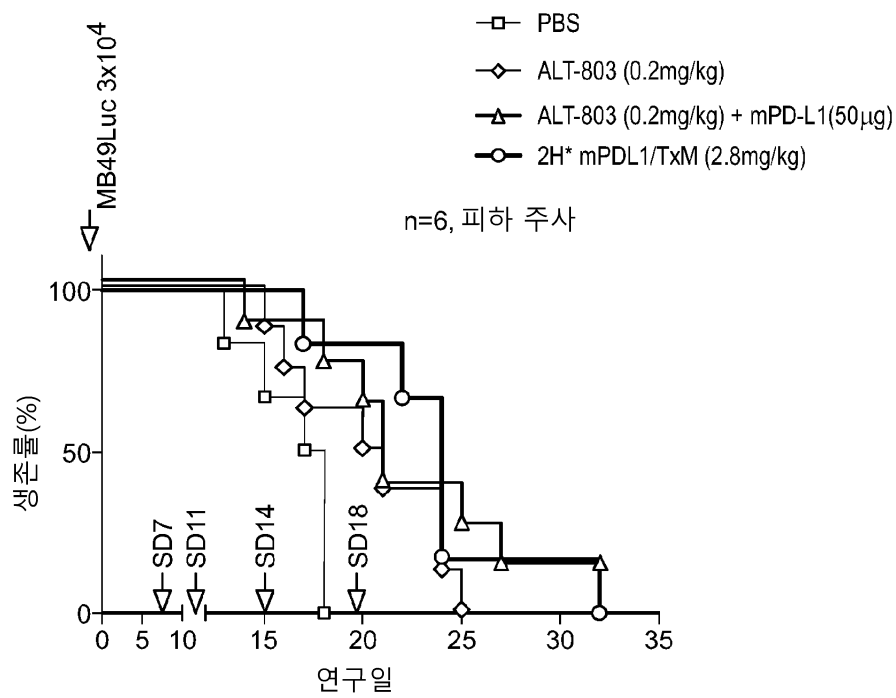
도면17



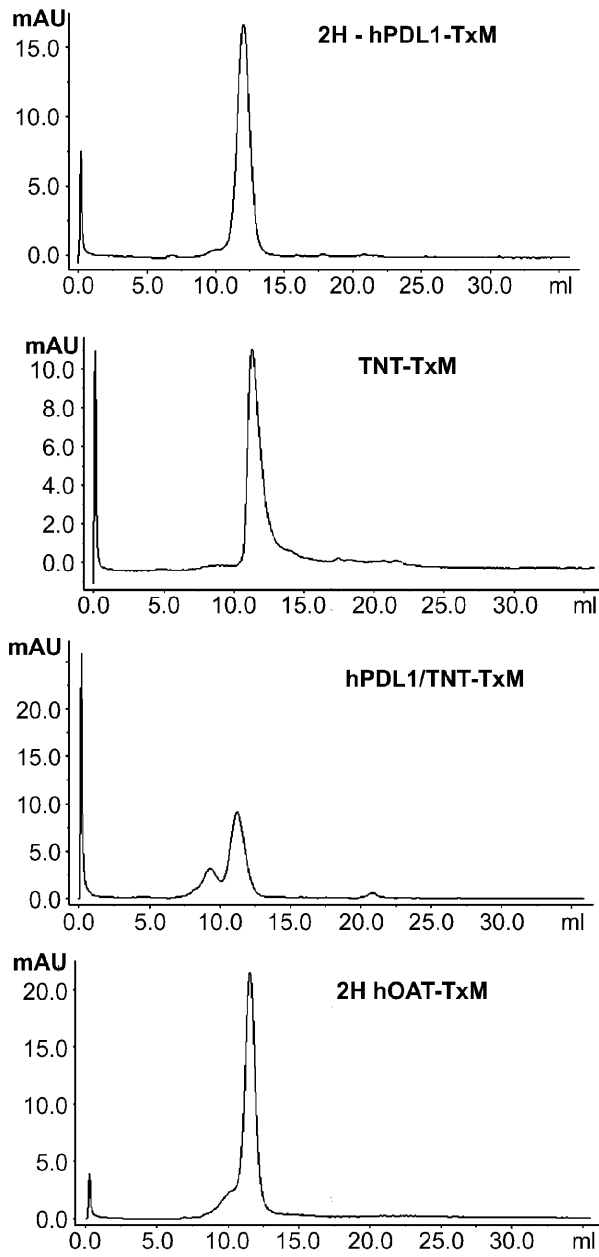
도면18



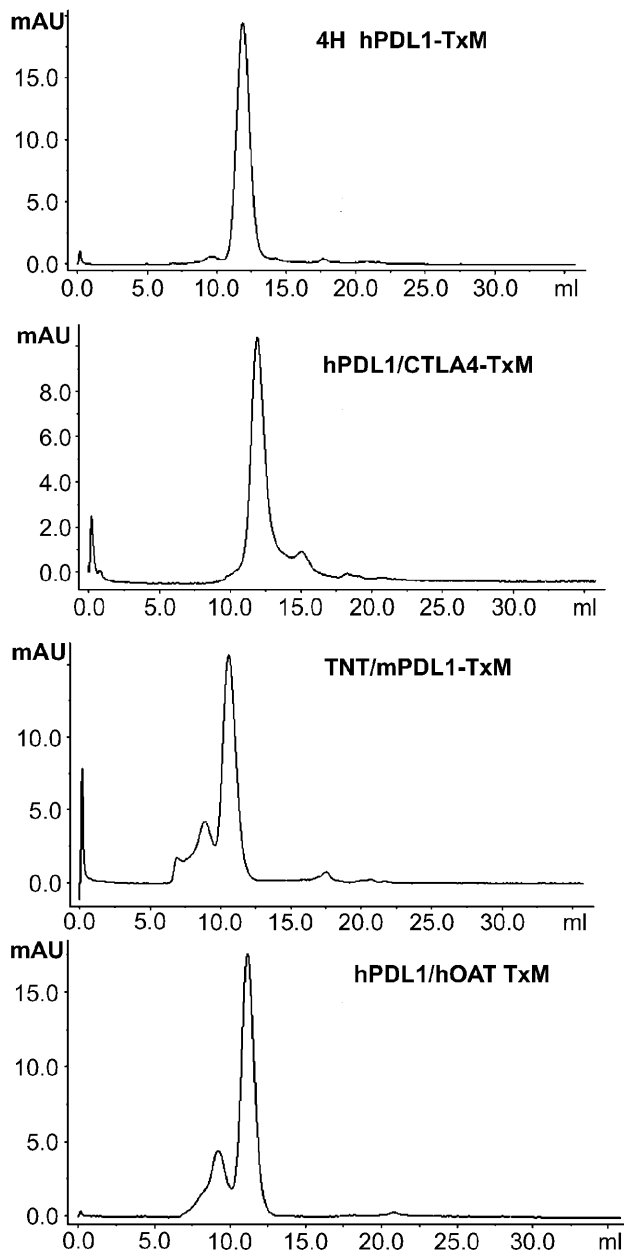
도면19



도면20a



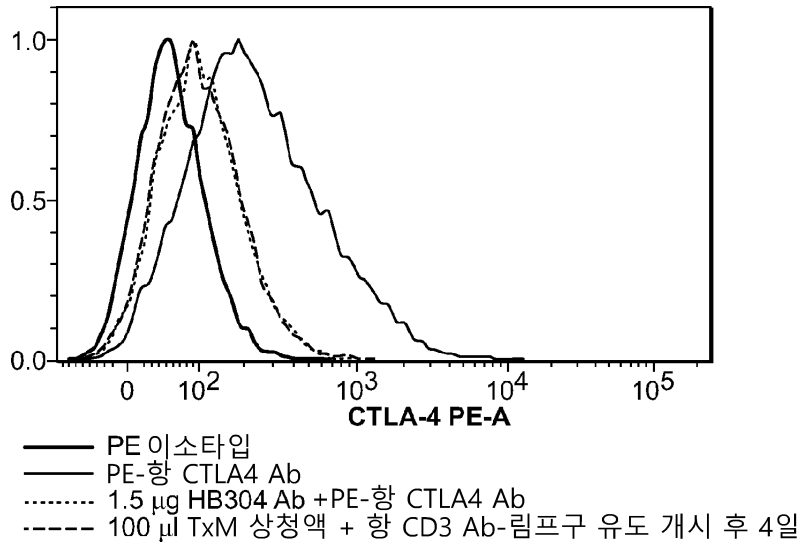
도면20b



도면21

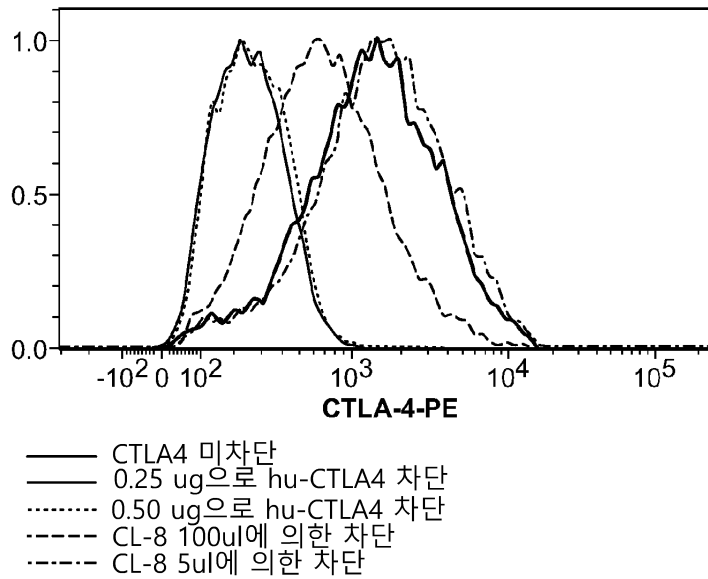
A

항 CD3 Ab-림프구 유도 개시 후 4일



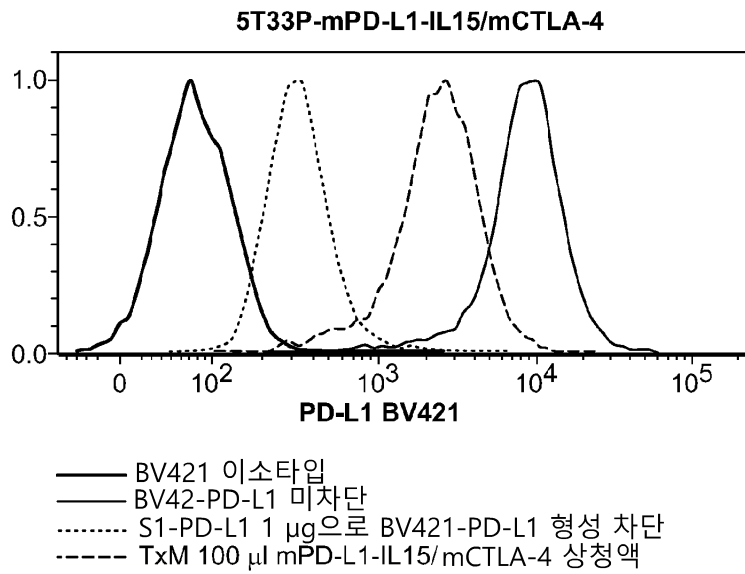
B

OKT3에 의한 3일간의 HuPBMC-CTLA-4 유도

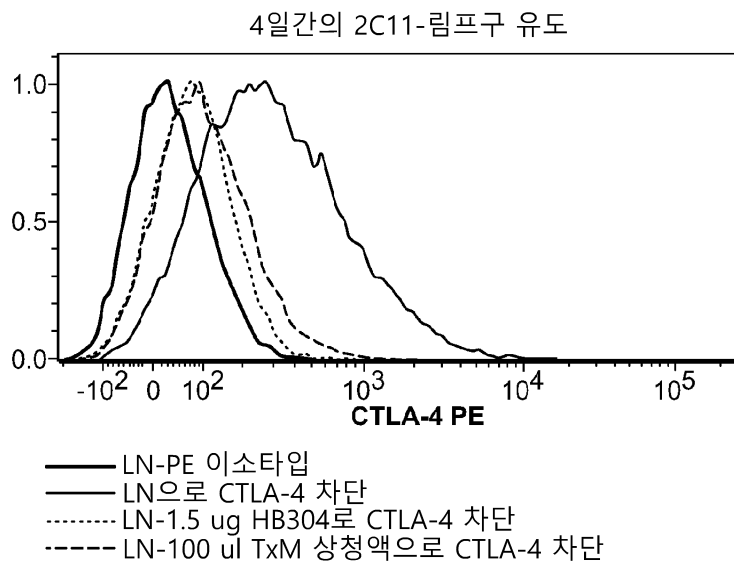


도면22

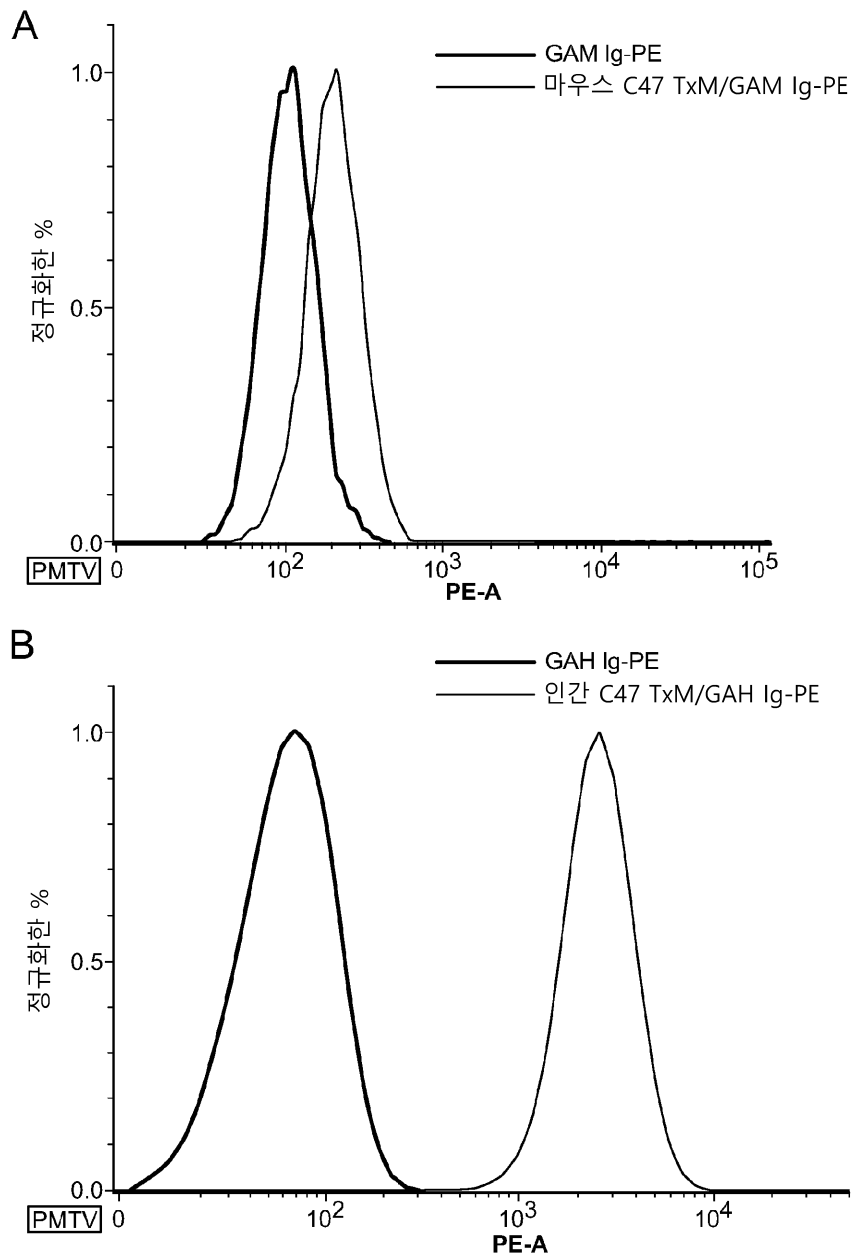
A



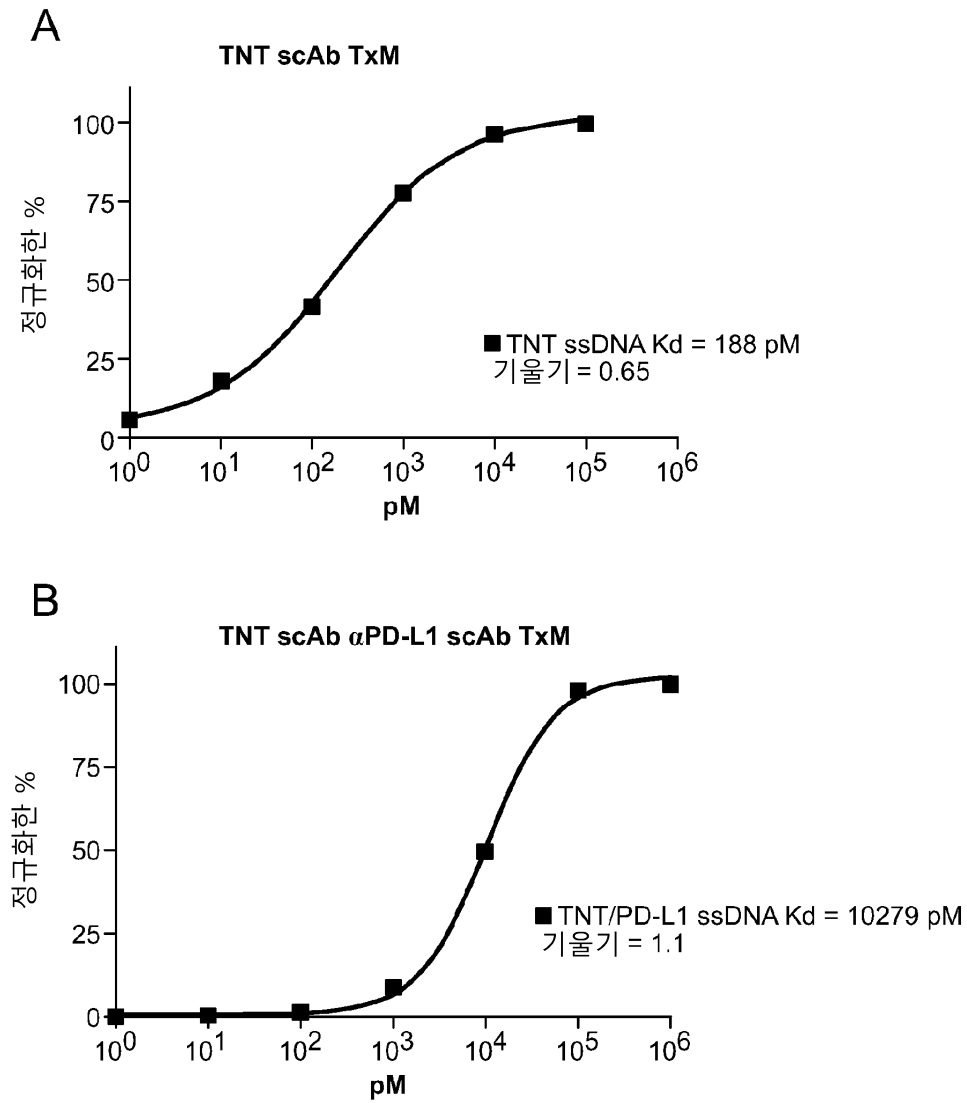
B



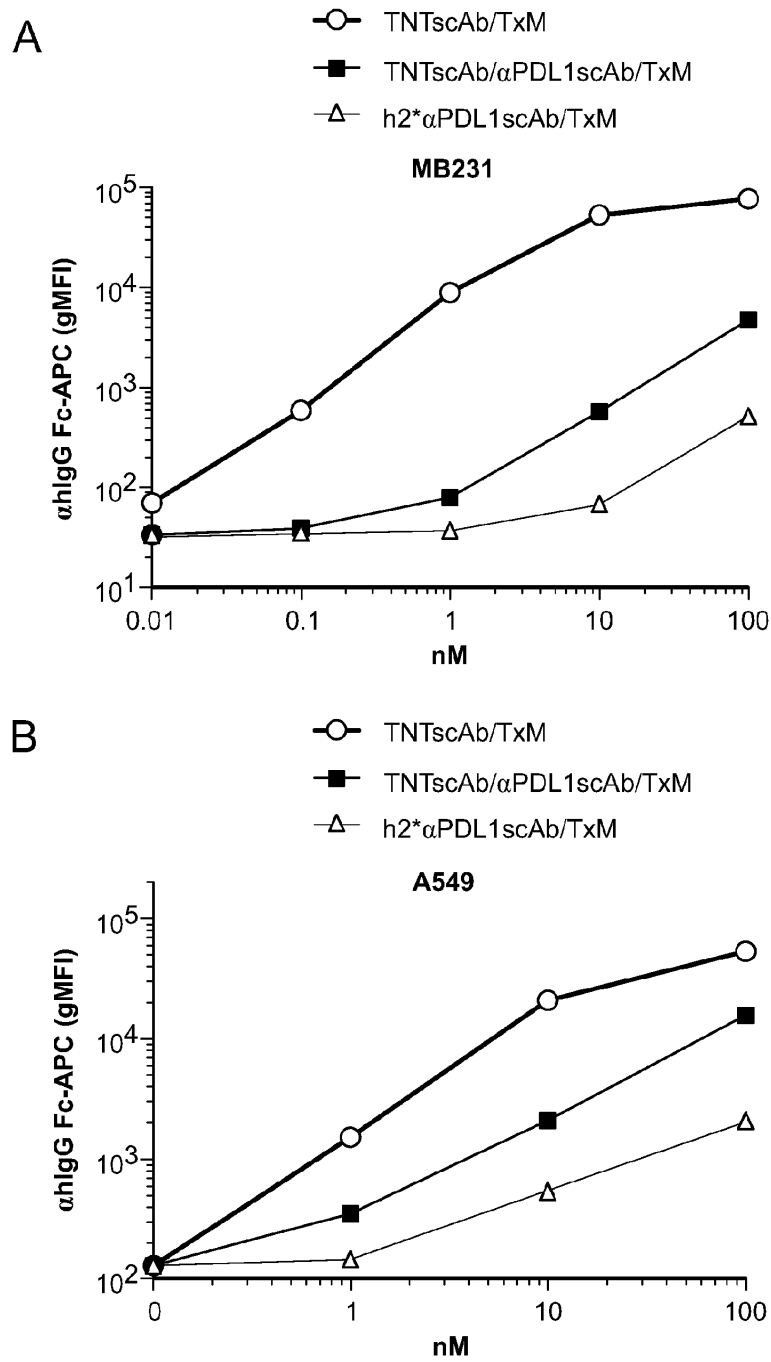
도면23



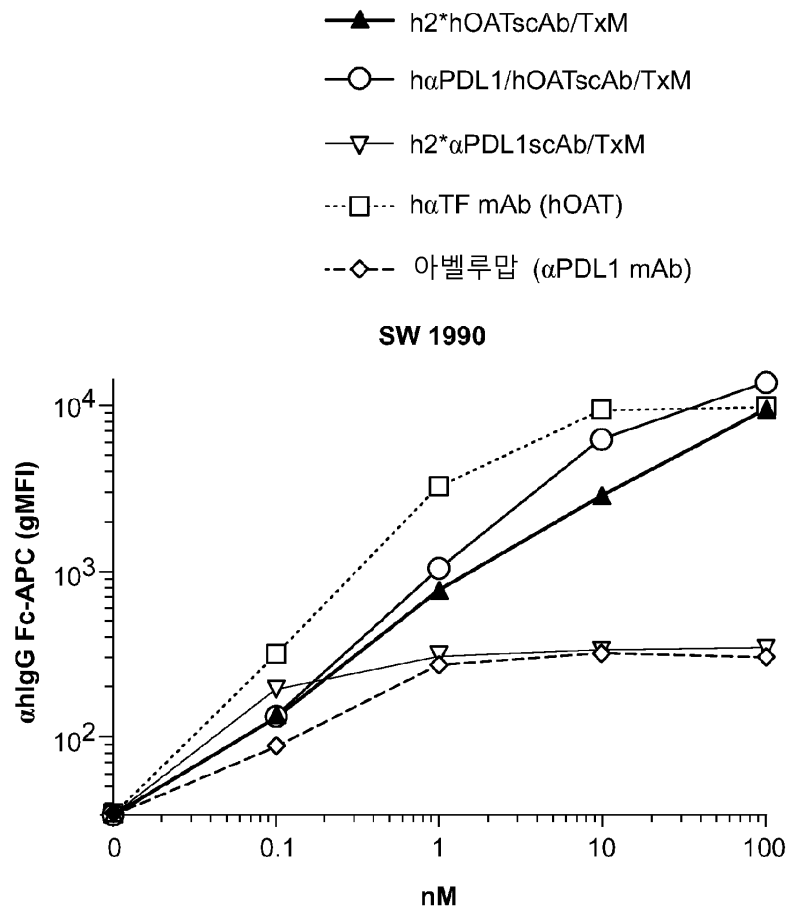
도면24



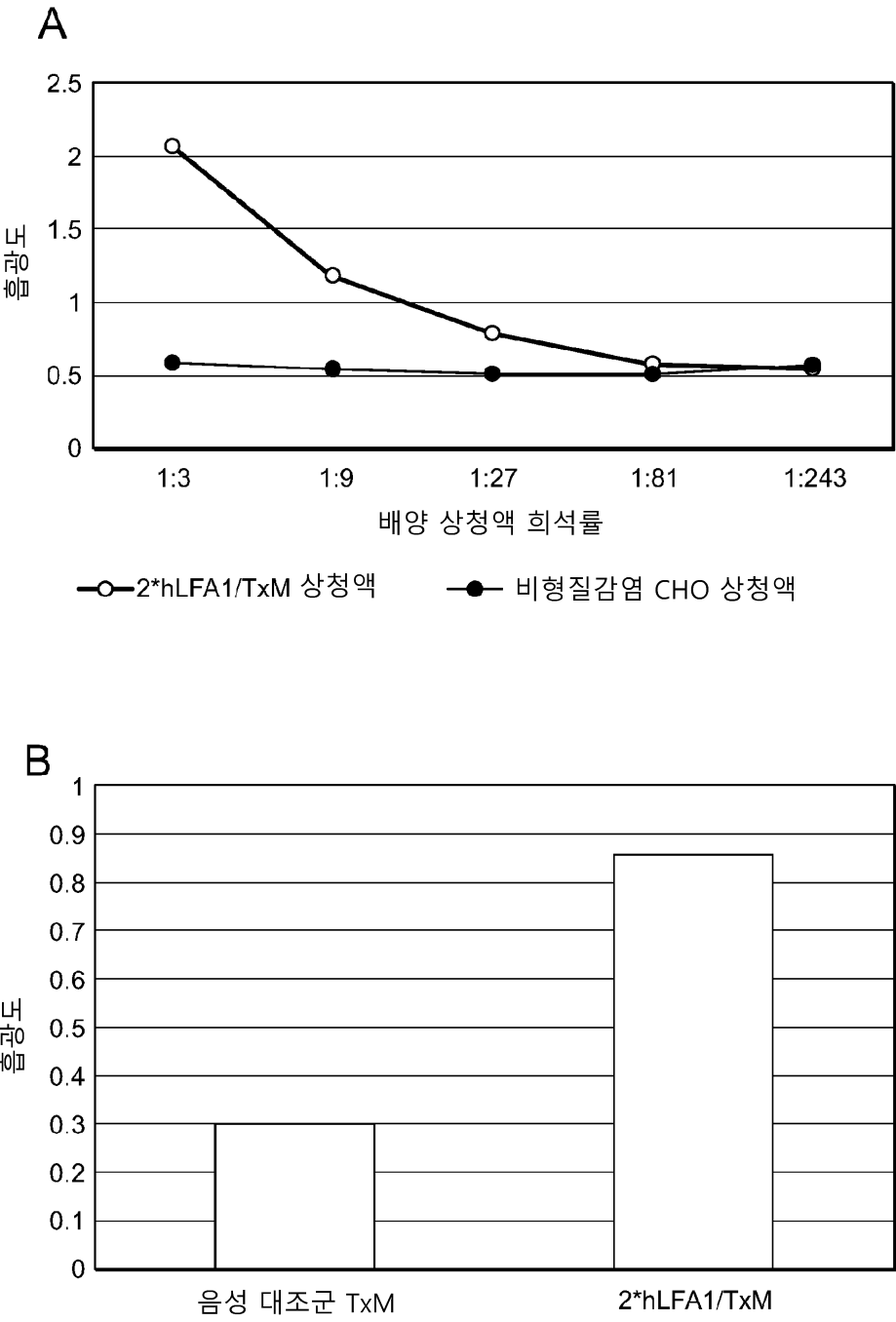
도면25



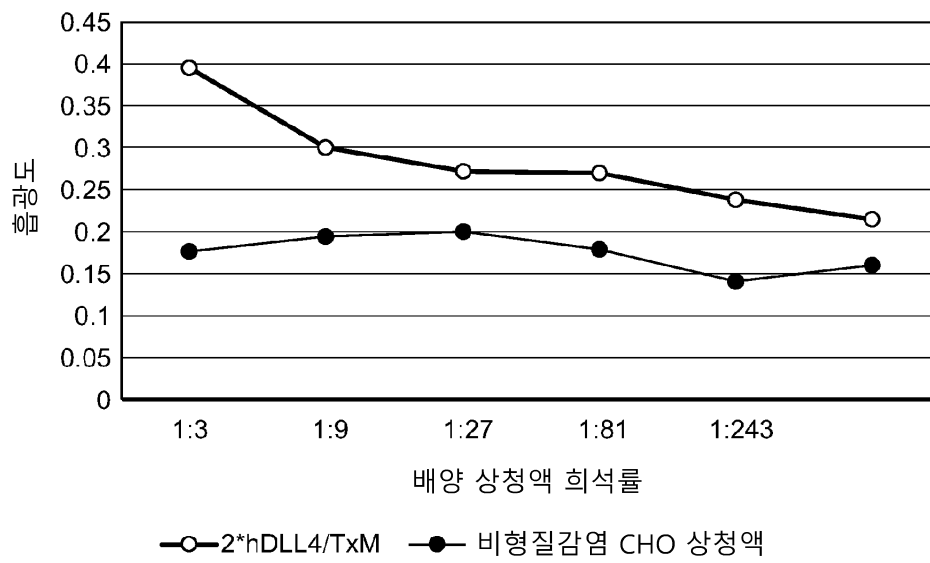
도면26



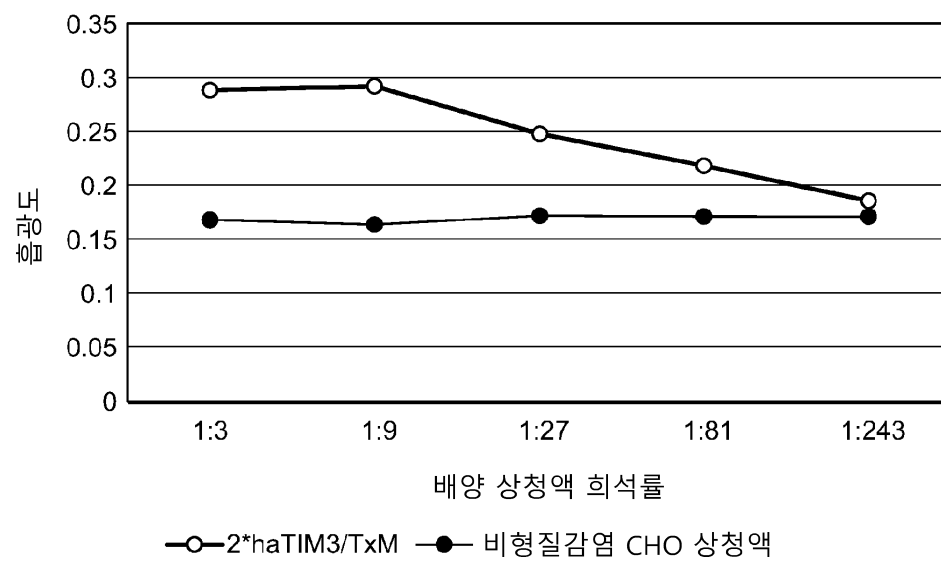
도면27



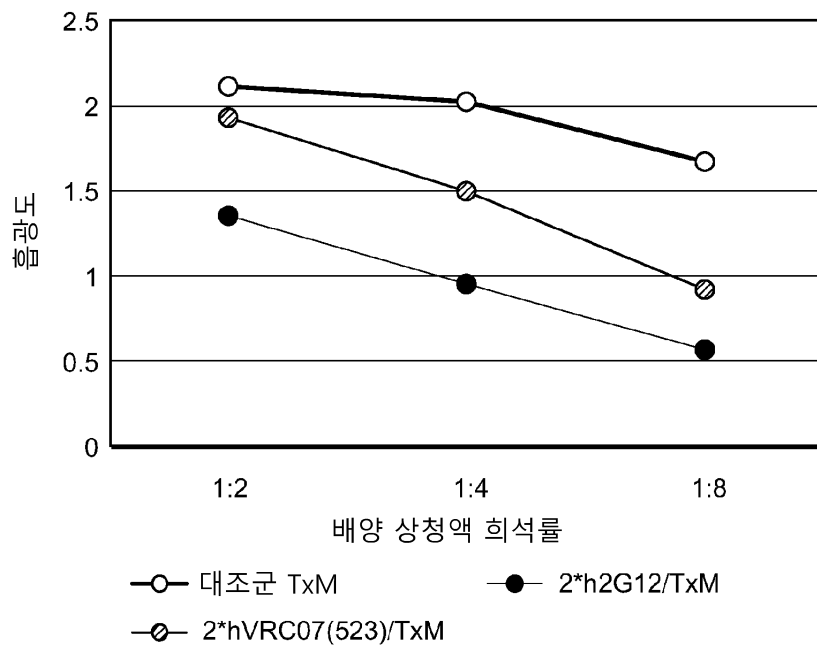
도면28



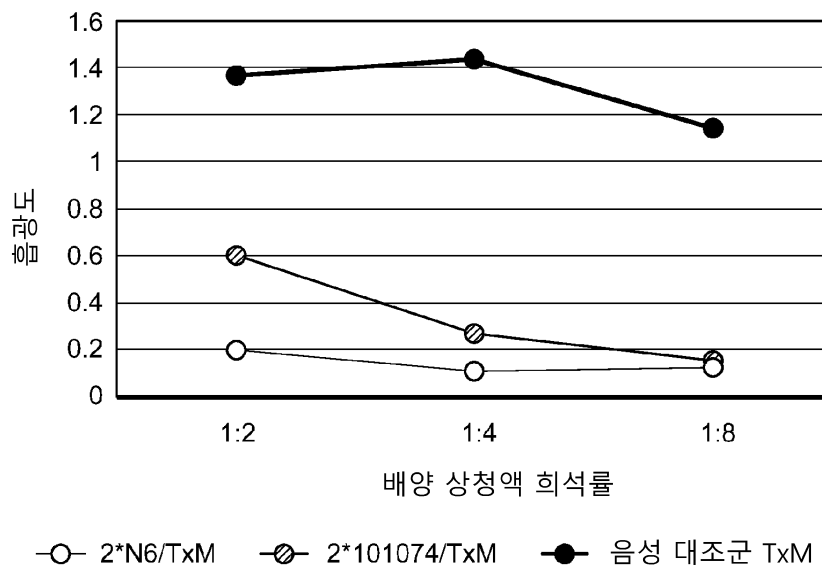
도면29



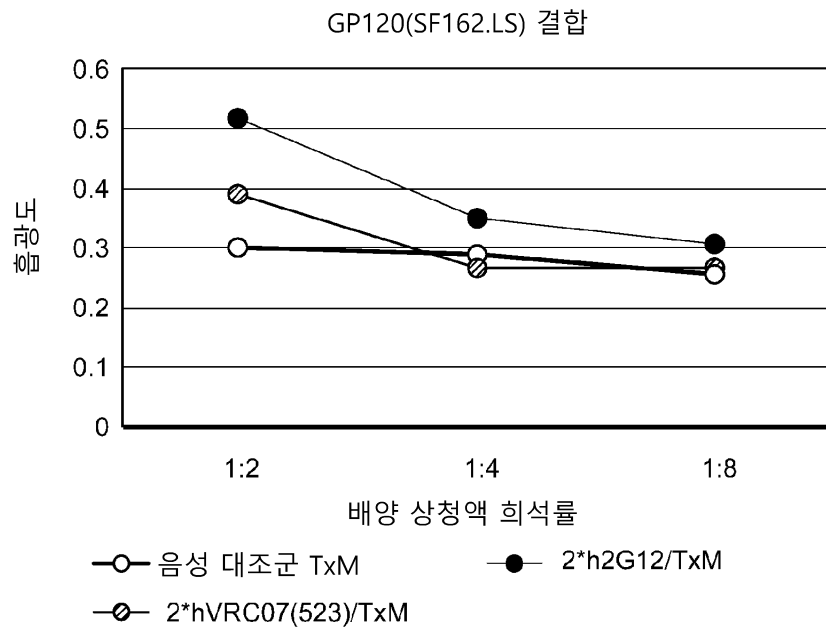
도면30a



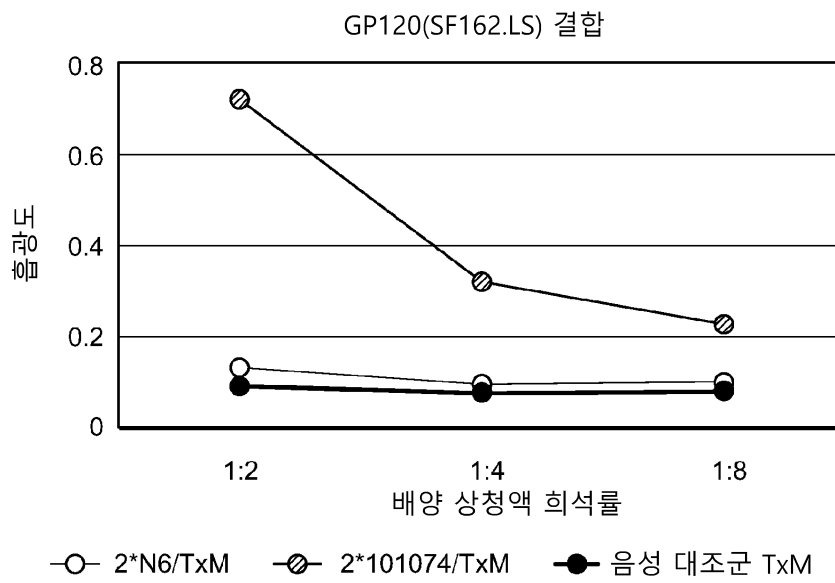
도면30b



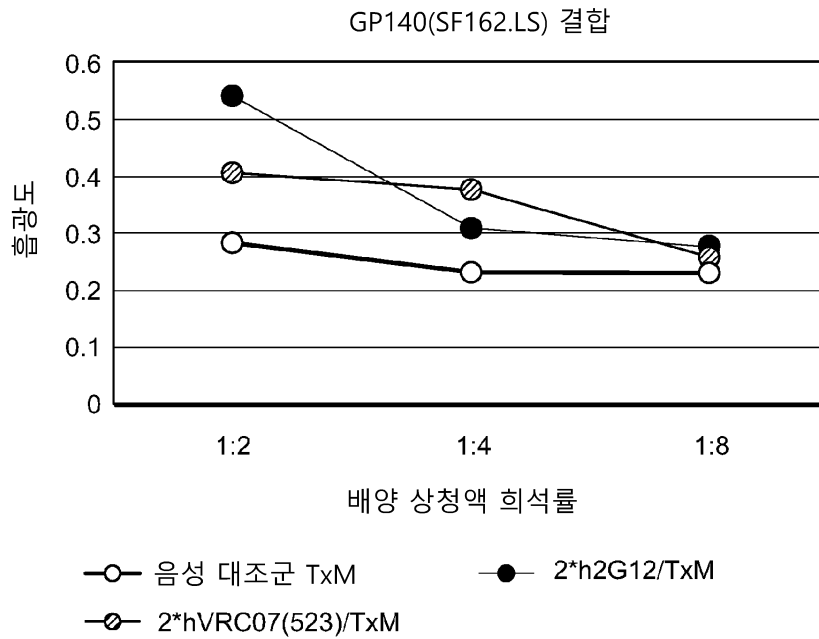
도면30c



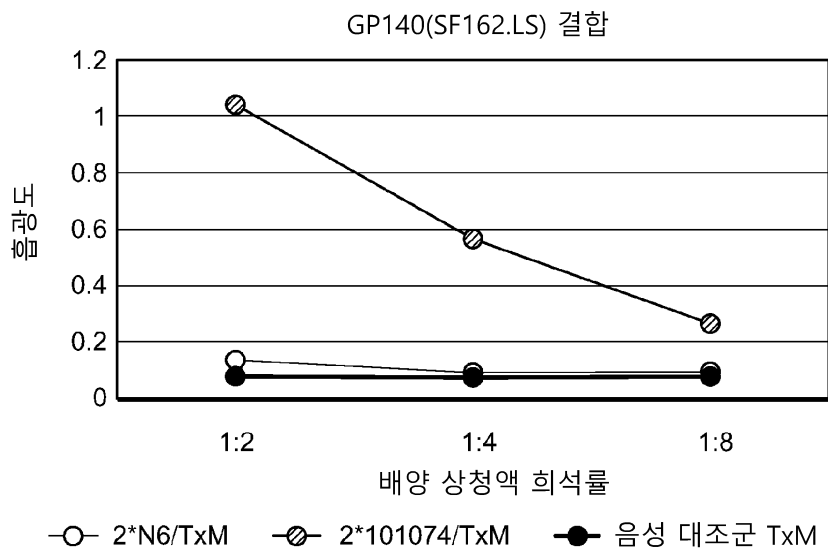
도면30d



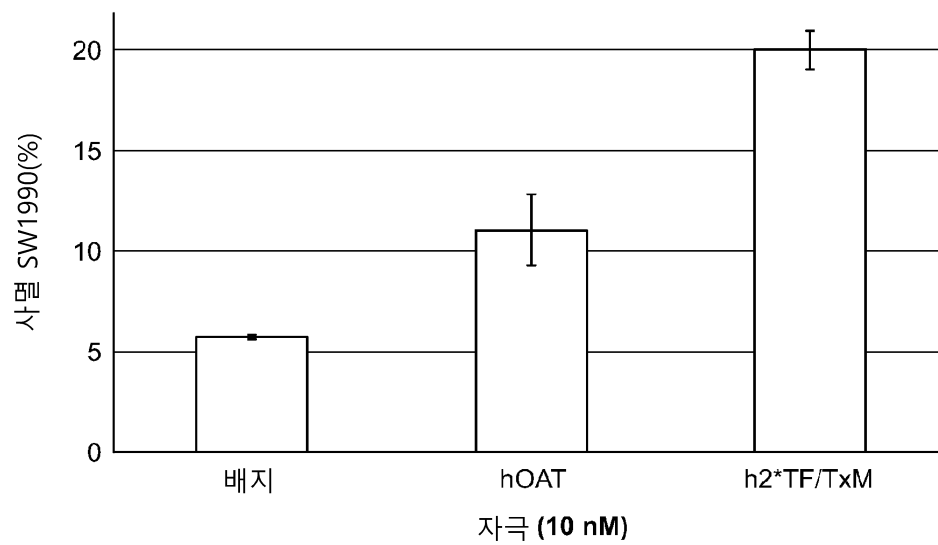
도면30e



도면30f



도면31



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ALTOR BIOSCIENCE CORPORATION

NANTCELL, INC.

<120> MULTIMERIC IL-15-BASED MOLECULES

<130> 48277-529001WO

<140> PCT/US2017/057757

<141> 2017-10-21

<150> 62/513,964

<151> 2017-06-01

<150> 62/411,216

<151> 2016-10-21

<160> 58

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1125

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 1

atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttctgttct ccagcgccta ctccaacatc 60

cagatgacct agtcccctag ctccgtgtcc gcctccgtgg gagatcgggt gaccatcacc 120

tgtagggcct cccaggacat ctccaggtgg ctggcctggg accagcagaa gcccggcaag 180

gcccccaagc tgcctgatcta cgccgcctcc tcctgcagt ccggagtgcc tagcaggttc 240

tccggtccg gatccggcac agacttcgcc ctgacctct cctccctgca gcccaggagc 300

ttcgccacct actactgcca gcaggccgac tccaggttct ccatcacctt cggccagggc 360

accaggctgg agatcaagag gggaggtggc ggatccggag gtggaggttc tggaggaggt 420

gggagtgagg tgcagctggg gcagtcgga ggaggactgg tgcagcctgg cggatccctg 480

aggctgtcct gtgccgcttc cggcttcacc ttcagctcct actccatgaa ctgggtgagg 540

caggccccctg gaaaggcct ggagtgggtg tcctacatct ccagctctc ctccaccatc 600

cagtacgccg actccgtgaa gggcaggttc accatctcca gggacaacgc caagaactcc 660

ctgtacctgc agatgaacag cctgagggac gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 720

ggcgactatt actacggcat ggacgtgtgg ggccaggga ccaccgtgac cgtgtcctcc 780

aactgggtta acgtaataag tgatttgaaa aaaattgaag atcttattca atctatgcat 840

attgatgcta cttatatac ggaaagtgat gttcaccca gttgcaaagt aacagcaatg 900

aagtgtttc tcttgagtt acaagttatt tcacttgagt ccggagatgc aagtattcat 960

gatacagtag aaaatctgat catcctagca aacgacagtt tgtcttctaa tgggaatgta 1020

acagaatctg gatgcaaaga atgtaggaa ctggaggaaa aaaatattaa agaatttttg 1080

cagagttttg tacatattgt ccaaattgtc atcaacactt cttaa 1125

<210> 2

<211> 374

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 2

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser

20 25 30

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

35 40 45
 Arg Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 50 55 60
 Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

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

 130 135 140
 Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
 145 150 155 160
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met
 165 170 175
 Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr
 180 185 190
 Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Gln Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

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

 260 265 270
 Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu
 275 280 285

Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu
290 295 300

Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His
305 310 315 320

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

325 330 335
Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu
340 345 350

Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln
355 360 365

Met Phe Ile Asn Thr Ser

370

<210> 3

<211> 1674

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 3

atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttccctgttct ccagcgccta ctccaacatc 60
cagatgacct agtcccctag ctccgtgtcc gcctccgtgg gagatcgggt gaccatcacc 120
tgtagggcct cccaggacat ctccaggtgg ctggcctgg accagcagaa gcccggcaag 180
gcccccaagc tgctgatcta cgccgcctcc tcctgcagt ccggagtgcc tagcaggttc 240
tccggtccg gatccggcac agacttcgcc ctgaccatct cctccctgca gcccaggac 300
ttcgccacct actactgcca gcaggccgac tccaggttct ccatcacctt cggccagggc 360
accaggctgg agatcaagag gggagggtggc ggatccggag gtggaggttc tggaggagg 420

gggagtgagg tgcagctggt gcagtccgga ggaggactgg tgcagcctgg cggatccctg 480
aggctgtcct gtgccgttc cggttcacc ttcagtcct actccatgaa ctgggtgagg 540
caggcccctg gaaaggcct ggagtgggtg tcctacatct ccagctctc ctccaccatc 600
cagtacgcc actccgtgaa gggcagggtt accatctcca gggacaacgc caagaactcc 660
ctgtacctgc agatgaacag cctgaggggac gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 720
ggcgactatt actacggcat ggacgtgtgg ggccaggga ccaccgtgac cgtgtcctcc 780

atcacgtgcc ctccccccat gtccgtggaa cacgcagaca tctgggtcaa gagctacagc 840

ttgtactcca gggagcggta catttgtaac tctggtttca agcgtaaagc cggcacgtcc 900

agcctgacgg agtgcgtgtt gaacaaggcc acgaatgtcg cccactggac aacccccagt 960

ctcaaataca ttagagagcc gaaatcttgt gacaaaactc acacatgccc accgtgcccc 1020

gcacctgaac tcttgggggg accgtcagtc ttctcttccc ccccaaaacc caaggacacc 1080

ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 1140

cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 1200

ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 1260

caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc 1320

cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1380

ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa 1440

ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1500

tacaagacca cgcctccctg gctggactcc gacggctcct tcttctctta cagcaagctc 1560

accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgtccgt gatgcatgag 1620

gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctctggttaa ataa 1674

<210> 4

<211> 557

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 4

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65	70	75	80
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ala Leu Thr Ile Ser Ser Leu			
	85	90	95
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asp Ser Arg			
	100	105	110
Phe Ser Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Gly			
	115	120	125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val			
	130	135	140
Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu			
145	150	155	160
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met			
	165	170	175
Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr			
	180	185	190
Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Gln Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly			
	195	200	205
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln			
	210	215	220
Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg			
225	230	235	240
Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val			
	245	250	255
Thr Val Ser Ser Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala			
	260	265	270
Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile			
	275	280	285
Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu			
	290	295	300
Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser			
305	310	315	320

Leu Lys Cys Ile Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 325 330 335
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 340 345 350
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 355 360 365

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

 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 435 440 445
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 450 455 460
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 465 470 475 480
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 485 490 495

 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 500 505 510
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 515 520 525
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 530 535 540
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 545 550 555

<210>

<211> 1134

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 5

atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttctgttct ccagcgcta ctcccagtc	60
gctctgacct agcctgttc cgtgtccggc tccctggac agtccatcac catctcctgt	120
accggcacct cctccgatgt gggcggctac aactacgtgt cctggtacca gcagcacccc	180
ggcaaagccc ccaagctgat gatctatgac gtgtccaacc ggccctccgg cgtgtccaac	240
aggtttctcg gctccaagtc cggcaacacc gcctccctga caatctccgg cctgcaggcc	300
gaggatgagg ctgactacta ctgtctctcc tacacctcct cctccaccag ggtgttcggc	360
accggcacca aggtgaccgt gctgggaggt ggcgatccg gaggtggagg ttctggtgga	420
ggtgggagtg aggtgcagct gctggagtcc ggaggcggac tggtcagcc tggaggatcc	480
ctgaggctgt cctgcgctgc ctccggcttc accttctcct cctacatcat gatgtgggtg	540
aggcaggctc ctggcaaggg cctggagtgg gtgtctcca tctaccctc cggcggcatc	600
accttctacg ccgataccgt gaagggcagg ttcacatct cccgggacaa ctccaagaac	660
accctgtacc tgcagatgaa ctccctgagg gctgaggaca ccgccgtgta ctactgcgcc	720
aggatcaagc tgggcaccgt gaccacagtg gactactggg gacagggcac cctggtgacc	780
gtgtctcca actgggttaa cgtaataagt gatttgaaaa aaattgaaga tcttattcaa	840
tctatgcata ttgatgtac tttatatacg gaaagtgatg ttcaccccag ttgcaaagta	900
acagcaatga agtgctttct cttggagtta caagttattt cacttgagtc cggagatgca	960
agtattcatg atacagtaga aaatctgac atcctagcaa acgacagttt gtcttcta	1020
gggaatgtaa cagaatctgg atgcaaagaa tgtgaggaac tggaggaaaa aaatattaaa	1080
gaatttttgc agagttttgt acatatgtc caaatgttca tcaacacttc ttaa	1134

<210> 6

<211> 377

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 6

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
Tyr Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro
20 25 30
Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly
35 40 45
Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60
Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn
65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser
85 90 95
Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr
100 105 110
Ser Ser Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
130 135 140
Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
145 150 155 160
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ile
165 170 175
Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
180 185 190
Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val Lys
195 200 205
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
210 215 220
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
225 230 235 240
Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

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

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

Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser
 370 375

<210> 7

<211> 1683

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 7

atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttctgttct ccagcgcta ctcccagtc	60
gctctgacct agcctgcttc cgtgtccggc tcccctggac agtccatcac catctcctgt	120
accggcacct cctccgatgt gggcggctac aactacgtgt cctggtacca gcagcacccc	180
ggcaaagccc ccaagctgat gatctatgac gtgtccaacc ggcctccgg cgtgtccaac	240
aggttctccg gctccaagtc cggcaacacc gcctccctga caatctccgg cctgcaggcc	300
gaggatgagg ctgactacta ctgtcctcc tacacctct cctccaccag ggtgttcggc	360
accggcacca aggtgacct gctgggaggt ggcggatccg gaggtggagg ttctggtgga	420
ggtgggagtg aggtgcagct gctggagtcc ggaggcggac tggtgcagcc tggaggatcc	480

ctgaggctgt cctgcgctgc ctccggcttc accttctcct cctacatcat gatgtgggtg 540
aggcaggctc ctggcaaggg cctggagtgg gtgtcctcca tctacccttc cggcggcatc 600
accttctacg ccgataccgt gaagggcagg ttcacatct cccgggacaa ctccaagaac 660

accctgtacc tgcagatgaa ctccctgagg gctgaggaca ccgccgtgta ctactgcgcc 720
aggatcaagc tgggcaccgt gaccacagtg gactactggg gacagggcac cctggtgacc 780
gtgtcctcca tcacgtccc tcccccatg tccgtggaac acgcagacat ctgggtcaag 840
agctacagct tgiactccag ggagcggtag atttctaact ctggtttcaa gcgtaaagcc 900
ggcacgtcca gcctgacgga gtgcgtgttg aacaaggcca cgaatgtcgc cactggaca 960
acccccagtc tcaaatgcat tagagagccg aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc 1020
ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 1080

aaggacaccc tcagtatctc cgggaccct gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc 1140
cacgaagacc ctgaggtaaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 1200
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1260
gtcctgcacc aggactggct gaattggcaag gactacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 1320
ctccagccc ccacgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggagccccg agaaccacag 1380
gtgtacacc tgccccatc cgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 1440
ctggtaaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1500

gagaacaact acaagaccac gcctccctg ctggactccg acggtcctt ctctcttac 1560
agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1620
atgcatgagg ctctgcacaa cactacacg cagaagagcc tctccctgtc tcctggtaaa 1680
taa 1683

<210> 8

<211> 560

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 8

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

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

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

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

 130 135 140
 Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ile
 165 170 175
 Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 180 185 190
 Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val Lys

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

 260 265 270

Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu
 275 280 285
 Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser
 290 295 300
 Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr
 305 310 315 320
 Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 325 330 335
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 340 345 350
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 355 360 365
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 370 375 380
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 385 390 395 400
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 405 410 415
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 420 425 430
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 435 440 445
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 450 455 460
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 465 470 475 480
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 485 490 495
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 500 505 510
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

515	520	525	
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
530	535	540	
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
545	550	555	560
<210> 9			
<211> 1131			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic			
polynucleotide			
<400> 9			
atgacatgga ctctactatt ccttgccttc cttcatcact taacagggtc atgtgccag	60		
tttgtctta ctcagccaaa ctctgtgtct acgaatctcg gaagcacagt caagctgtct	120		
tgcaaccgca gcaactggtaa cattggaaac aattatgtga actggtacca gcagcatgaa	180		
ggaagatctc ccaccactct gatttattgg gatgatagga gaccagatgg agttcctgac	240		
aggtttctctg gctccattga cagatcttcc aactcagccc tctgacaat caataatgtg	300		
cagactgagg atgaaactga ctacttctgt cagtcttaca gtagtggtat gtatatattc	360		
ggcgggtggaa ccaagctcac tgtcctagga ggtggcggat ccggaggtgg aggttctggt	420		
ggaggtggga gtgaggttca gctgcagcag tctggggctg agctggtgaa gcctggggct	480		
tcagtaaagt tgtcctgcaa aacttctggt tacaccttca gcaattacta tatgagttgg	540		
ttgaagcaga tgcctggaca gaatattgag tggatcggaa acatttatgg tggaaatggt	600		
ggtgctggct ataatacagaa gttcaagggc aaggccacac tgacagtgga caaatcttcc	660		
agcacagcgt acatggatct cagcagcctg acatctgagg cctctgcagt ctatttttgt	720		
gcaagggctg gacttcccgg cttttttgat tactggggcc agggagtcac ggtcacagtc	780		
tcctcaaact ggggtgaatgt aataagtgt ttgaaaaaaaa ttgaagatct tattcaatct	840		
atgcatattg atgctacttt atatacggaa agtgaatgtt accccagttg caaagtaaca	900		
gcaatgaagt gcitttctct ggagttacaa gttatttcac ttgagtcagg agatgcaagt	960		
attcatgata cagtagaaaa tctgatcatc ctagcaaacg acagtttgtc ttctaattggg	1020		
aatgtaacag aatctggatg caaagaatgt gaggaactgg agggaaaaaaaa tattaagaa	1080		
tttttgcaga gttttgtaca tattgtccaa atgttcatca acacttctta a	1131		
<210> 10			

<211> 376

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 10

Met Thr Trp Thr Leu Leu Phe Leu Ala Phe Leu His His Leu Thr Gly

1 5 10 15
Ser Cys Ala Gln Phe Val Leu Thr Gln Pro Asn Ser Val Ser Thr Asn

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

35 40 45
Gly Asn Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Glu Gly Arg Ser Pro

50 55 60
Thr Thr Leu Ile Tyr Trp Asp Asp Arg Arg Pro Asp Gly Val Pro Asp

65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Arg Ser Ser Asn Ser Ala Leu Leu Thr

85 90 95
Ile Asn Asn Val Gln Thr Glu Asp Glu Thr Asp Tyr Phe Cys Gln Ser

100 105 110
Tyr Ser Ser Gly Met Tyr Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val

115 120 125
Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

130 135 140
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

145 150 155 160
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr

165 170 175
Tyr Met Ser Trp Leu Lys Gln Met Pro Gly Gln Asn Ile Glu Trp Ile

180 185 190
Gly Asn Ile Tyr Gly Gly Asn Gly Gly Ala Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

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

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

325 330 335
 Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu
 340 345 350
 Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile
 355 360 365
 Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser
 370 375

<210> 11

<211> 1683

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 11

atgacatgga ctctactatt ccttgccctt cttcatcact taacagggtc atgtgccag 60

tttgtgctta ctacgcaaaa ctctgtgtct acgaatctcg gaagcacagt caagctgtct 120

tgcaaccgca gcactggtaa cattggaaac aattatgtga actggtacca gcagcatgaa 180
 ggaagatctc ccaccactct gatttattgg gatgatagga gaccagatgg agttcctgac 240
 aggttctctg gctccattga cagatcttcc aactcagccc tctgacaat caataatgtg 300
 cagactgagg atgaaactga ctacttctgt cagtcttaca gtagtggtat gtatatatttc 360
 ggcggtggaa ccaagctcac tgccttagga ggtggcggat ccggaggtgg aggttctggt 420

 ggaggtggga gtgaggttca gctgcagcag tctggggctg agctggtgaa gcctggggct 480
 tcagtaaagt tgcctgcaa aacttctggt tacaccttca gcaattacta tatgagttgg 540
 ttgaagcaga tgcctggaca gaatatggag tggatcggaa acatttatgg tggaaatggt 600
 ggtgctggct ataatcagaa gttcaagggc aaggccacac tgacagtgga caaatcttcc 660
 agcacagcgt acatggatct cagcagcctg acatctgagg cctctgcagt ctatttttgt 720
 gcaaggtcgc gacttcccgg cctttttgat tactggggcc agggagtcac ggtcacagtc 780
 tcctcaatca cgtgccctcc ccccatgtcc gtggaacacg cagacatctg ggtcaagagc 840

 tacagcttgt actccagga gcggtacatt tgtaactctg gtttcaagcg taaagccggc 900
 acgtccagcc tgacggagtg cgtgttgaac aaggccacga atgtcgccca ctggacaacc 960
 cccagtctca aatgcattag agaaccaaga gggcccacaa tcaagccctg tcttccatgc 1020
 aaatgcccag cacctaacct cttgggtgga ccatccgtct tcatcttccc tccaaagatc 1080
 aaggatgtac tcatgatctc cctgagcccc atagtcacat gtgtggtggt ggatgtgagc 1140
 gaggatgacc cagatgtcca gatcagctgg tttgtgaaca acgtggaagt acacacagct 1200
 cagacacaaa cccatagaga ggattacaac agtactctcc gggtggtcag tgccctcccc 1260

 atccagcacc aggactggat gagtggcaag gaggttcaat gcaaggtaa caacaagac 1320
 ctcccagcgc ccatcgagag aaccatctca aaacccaaag ggtcagtaag agctccacag 1380
 gtatatgtct tgcctccacc agaagaagag atgactaaga aacaggtcac tctgacctgc 1440
 atggtcacag acttcatgcc tgaagacatt tacgtggagt ggaccaacaa cgggaaaaca 1500
 gagctaaact acaagaacac tgaaccagtc ctggactctg atggttctta cttcatgtac 1560
 agcaagctga gagtggaaaa gaagaactgg gtggaaagaa atagctactc ctgttcagtg 1620
 gtccacgagg gtctgcacaa tcaccacacg actaagagct tctcccggac tccaggtaaa 1680

 taa 1683
 <210> 12
 <211> 560
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 12

Met Thr Trp Thr Leu Leu Phe Leu Ala Phe Leu His His Leu Thr Gly

1 5 10 15

Ser Cys Ala Gln Phe Val Leu Thr Gln Pro Asn Ser Val Ser Thr Asn

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asn Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Glu Gly Arg Ser Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ile Asn Asn Val Gln Thr Glu Asp Glu Thr Asp Tyr Phe Cys Gln Ser

100 105 110

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

115 120 125

Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Met Ser Trp Leu Lys Gln Met Pro Gly Gln Asn Ile Glu Trp Ile

180 185 190

Gly Asn Ile Tyr Gly Gly Asn Gly Gly Ala Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Ala Arg Val Gly Leu Pro Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val

245 250 255

Met Val Thr Val Ser Ser Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu

260 265 270

His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg

275 280 285

Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu

290 295 300

Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr

305 310 315 320

Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro

325 330 335

Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser

340 345 350

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

355 360 365

Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro

370 375 380

Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala

385 390 395 400

Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val

405 410 415

Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe

420 425 430

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr

435 440 445

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

450 455 460

Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys

465 470 475 480
Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn

 485 490 495
Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp

 500 505 510
Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys

 515 520 525
Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly

 530 535 540
Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys

545 550 555 560

<210> 13

<211> 1692

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 13

atgaagtggg tgacctttat ctccctgctg ttctgtttt cctccgcta cagcatcgtg 60

atgaccaggt cccttagctc cctgagcgt agcgtgggag accgggtgac catcacctgt 120

cgggcctccc agagcatttc cagctacctg aactggtacc agcagaagcc cggcaaggcc 180

cctaagctgc tgatttacgc tgccagcagc ctgcagtcg gagtgcctcc caggttttagc 240

ggctccggat ccggcaccga gttcaccttg accatctcct cctgcagcc cgaggacttc 300

gccacctact actgtcagca ggccaacagc ttcccccca ctttggcca aggaaccaag 360

gtggacatca agaggaccgt ggccggaggc ggaggctccg gcggcggcgg ctccggcggc 420

ggcggctccc tgggtgcagtc cggcgctgaa gtgaagaagc ctggcgcttc cgtgaagggtg 480

ttctgcgagg cctccggcta cacttcacc aactactaca tccactggct gaggcaggct 540

cctggacagg gcctggagtg gatgggcata atcaaccct ccggaggctc caccacctac 600

gcccagaagt tccagggcag gatcacatg acaagggaca cctccaccaa caccctgtac 660

atggaactgt cctccctccg gtccgaggac accgcatct actactgcgc caggagggat 720

tgcaggggcc ctagctgcta cttcgcttac tggggccagg gaaccaccgt gaccgtgtcc 780

tccgcctcca ccaagggcat cacgtgccct ccccccattgt ccgtggaaca cgcagacatc 840
 tgggtcaaga gctacagctt gtactccagg gagcgttaca ttgttaactc tggtttcaag 900
 cgtaaagccg gcacgtccag cctgacggag tgcgtgttga acaaggccac gaatgtcgcc 960
 cactggacaa cccccagtct caaatgcatt agagagccga aatcttgtga caaaactcac 1020
 acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtcctt cctcttcccc 1080

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg 1140
 gacgtgagcc acgaagacct tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1200
 cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1260
 gtcttcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggctctc 1320
 aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1380
 gaaccacagg tgtacaccct gcccctatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1440
 ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1500

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1560
 ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1620
 tgctccgtga tgcatgagcg tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1680
 cctggttaat aa 1692

<210> 14

<211> 563

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 14

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

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

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

65 70 75 80

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln

85 90 95

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

100 105 110

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Tyr Ile His Trp

165 170 175

Leu Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Ile Ile Asn

180 185 190

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

195 200 205

Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Leu Tyr Met Glu Leu Ser

210 215 220

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

225 230 235 240

Cys Arg Gly Pro Ser Cys Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

245 250 255

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Ile Thr Cys Pro Pro Pro

260 265 270

Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr

275 280 285

Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly

290 295 300

Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala

305 310 315 320
 His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Glu Pro Lys Ser Cys

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

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

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

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

Pro Gly Lys

<210> 15

<211> 1689

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 15

atgaagtggg taacctttat ttcccttctt tttctcttta gctcggctta ttccgacatc	60
atgatgacct agtccccctt ctcctgtgcc gtgagcgtg gcgagaaggc taccatcagc	120
tgcaagtcct cccagtcctt gttcaacagc aacgccaaga ccaactacct gaactggtac	180
ctgcagaagc cgggccagtc cccaagctg ctgacttatt acgctagcac caggcatacc	240
ggcgtgcccc acaggttttag gggatccggc agcggcacgc acttcaccct gaccatctcc	300
agcgtgcagg acgaggacct cgctttctac tactgccagc aatggtacga ttacccttac	360
accttcggcg ctggcaccaa ggtggagatt aagaggggcg gaggcggatc cggcggcggc	420
ggctccggcg ggggaggtc ccagattcag ctgcaggagt ccggccctgg actggtcaac	480
cctagccagt cctgagcct gtccgttcc gtgacaggct atagcatcac cagcggctac	540
ggctggaact ggatcaggca gtttccggc cagaaagtgg agtggatggg cttcacttac	600
tacgagggt ccacctacta taaccctcc atcaagtcgc ggatcagcat caccagggat	660
acctcaaga accagttctt cctgcaagtc aactccgtga ccaccgaaga caccgccacc	720
tactactgcg ccaggcagac aggtacttc gactactggg gccagggcac aatggtgacc	780
gtcagcagcg ccatcacgtg cctccccc atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc	840
aagagctaca gttgtactc caggagcggg tacatttgta actctggttt caagcgtaaa	900
gccggcacgt ccagcctgac ggagtgcgtg ttgaacaagg ccacgaatgt cgcccactgg	960
acaaccccc gtctcaaatg cattagagaa ccaagagggc ccacaatcaa gcctgtcct	1020
ccatgcaaat gccagcacc taacctcttg ggtggacct cgtcttcat ctccctcca	1080
aagatcaagg atgtactcat gatctccctg agcccatag tcacatgtgt ggtgggtgat	1140
gtgagcgagg atgaccaga tgtccagatc agctggtttg tgaacaacgt ggaagtacac	1200
acagctcaga cacaaacca tagagaggat tacaacagta ctctccgggt ggtcagtgcc	1260
ctcccatcc agcaccagga ctggatgagt ggcaaggagt tcaaatgcaa ggtcaacaac	1320

aaagacctcc cagcgcccat cgagagaacc atctcaaac ccaaagggtc agtaagagct 1380
ccacaggtat atgtcttgcc tccaccagaa gaagagatga ctaagaaaca ggctactctg 1440
acctgcatgg tcacagactt catgcctgaa gacatttacg tggagtggac caacaacggg 1500
aaaacagagc taaactacaa gaacactgaa ccagtcctgg actctgatgg ttcttacttc 1560
atgtacagca agctgagagt ggaaaagaag aactgggtgg aaagaaatag ctactcctgt 1620
tcagtgggcc acgaggggtc gcacaatcac cacacgacta agagcttctc ccggactcca 1680

ggtaaataa 1689

<210> 16

<211> 562

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 16

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Gly Glu Lys Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

130 135 140

Gly Gly Ser Gln Ile Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Asn
 145 150 155 160
 Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile

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

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

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

 355 360 365
 Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp
 370 375 380
 Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His

385 390 395 400
Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg

 405 410 415
Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys

 420 425 430
Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu

 435 440 445
Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr

 450 455 460
Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu

465 470 475 480
Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp

 485 490 495
Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val

 500 505 510
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu

 515 520 525
Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His

 530 535 540
Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro

545 550 555 560
Gly Lys

<210> 17

<211> 1131

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 17

atggaatgga gctgggtgtt cctgttcttt ctgtccgtga ccaccggtgt ccactccctg 60
cctgtgctga ctcaaccacc ctcggtgtct gaagtcccg ggcagagggt caccatttcc 120

tgttctggag gcatctccaa catcggaagc aatgctgtaa actggtacca gcacttccca 180
ggaaaggctc ccaaactcct catctattat aatgatctgc tgcctcagg ggtctctgac 240

cgattctctg cctccaagtc tggcacctca gcctccctgg ccatcagtgg getccggtec 300
gaggatgagg ctgattatta ctgtgcagca tgggatgaca atctgagtgc ttatgtcttc 360
gcaactggga ccaaggtcac cgtcctgagt ggaggtggcg gatccggagg tggaggttct 420
ggtggaggtg ggagtcaggt tcagctgggt cagtctgggg ctgaggtgaa gaagcctggg 480
gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta tggatcagc 540
tgggtgcgac aggccccctg acaagggtt gagtggatgg gatggatcag cgttacaat 600
ggtaacacaa actatgcaca gaagctccag ggcagagtca ccatgaccac agacacatcc 660

acgagcacag cctacatgga gctgaggagc ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac 720
tgtgagagag ggttatacgg tgacgaggac tactggggcc agggaaacct ggtcacctg 780
agctcaaact gggtaacgt aataagtgt ttgaaaaaa ttgaagatct tattcaatct 840
atgcatattg atgctacttt atatacgga agtgatgttc acccagttg caaagtaaca 900
gcaatgaagt gctttctctt ggagttacaa gttatttcac ttgagtccgg agatgcaagt 960
attcatgata cagtagaaaa tctgatcatc ctgcaaacg acagtttgtc ttctaaggg 1020
aatgtaacag aatctggatg caaagaatgt gaggaactgg aggaaaaaaa tattaagaa 1080

tttttcaga gttttgtaca tattgtccaa atgttcatca acacttctta a 1131

<210> 18
<211> 376
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<400> 18
Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Glu Val
20 25 30
Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Ile Ser Asn Ile
35 40 45
Gly Ser Asn Ala Val Asn Trp Tyr Gln His Phe Pro Gly Lys Ala Pro

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

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

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

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

 290 295 300

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

 355 360 365
 Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser
 370 375

<210> 19

<211> 768

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide

<400> 19

atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttcctgttct ccagcgccta ctcccaggtg 60
 cagctggtgg agtccggagg aggcctgggtg gagcctggag gatccctgag gctgtcctgt 120
 gccgccagcg gcatcatctt caagatcaac gacatgggct ggtatcggca ggcccctggc 180

aaaaggaggg agtgggtggc cgcttcaca ggaggcgatg aggccatcta cagggactcc 240
 gtgaaggaca ggttcacat ctccaggac gccaagaact ccgtgttcct gcagatgaac 300
 tccctgaagc ccgaggatac cgccgtgtac tactgcaccg ccgtgatctc caccgatagg 360
 gacggcaccg agtggaggag gtactggggc cagggcacac aggtgactgt gtcctccggc 420
 ggcaactggg ttaacgtaat aagtgatttg aaaaaattg aagatcttat tcaatctatg 480
 catattgatg ctactttata tacggaaagt gatgttcacc ccagttgcaa agtaacagca 540
 atgaagtgct ttctcttggg gttacaagtt atttcacttg agtccggaga tgcaagtatt 600

catgatacag tagaaaatct gatcatccta gcaaacgaca gtttgtcttc taatgggaat 660
 gtaacagaat ctggatgcaa agaattgtgag gaactggagg aaaaaatat taaagaattt 720
 ttgcagagtt ttgtacatat tgtccaaatg ttcacaaaca cttcttaa 768

<210> 20

<211> 255

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 20

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ile Asn Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Glu

50 55 60

Trp Val Ala Ala Ser Thr Gly Gly Asp Glu Ala Ile Tyr Arg Asp Ser

65 70 75 80

Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ala Lys Asn Ser Val Phe

85 90 95

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

100 105 110

Thr Ala Val Ile Ser Thr Asp Arg Asp Gly Thr Glu Trp Arg Arg Tyr

115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Asn Trp Val

130 135 140

Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met

145 150 155 160

His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys

165 170 175

Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser

180 185 190

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

195 200 205

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

<210> 21

<211> 1317

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide

<400> 21

atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttctgtttct ccagcgccta ctcccaggtg	60
cagctggtgg agtccggagg aggctgtgtg gagcctggag gatccctgag gctgtcctgt	120
gccgccagcg gcatcatctt caagatcaac gacatgggct ggtatcggca ggcccctggc	180
aaaaggaggg agtgggtggc cgcttccaca ggaggcgatg aggccatcta cagggactcc	240
gtgaaggaca gggtcacat ctccaggga gccaagaact ccgtgttctt gcagatgaac	300
ttcctgaagc ccgaggatac cgccgtgtac tactgcaccg ccgtgatctc caccgatagg	360
gacggcaccg agtggaggag gtactggggc cagggcacac aggtgactgt gtcctccggc	420
ggcatcacgt gtctctctcc tatgtccgtg gaacacgcag acatctgggt caagagctac	480
agcttgtaact ccagggagcg gtacatttgt aactctgggt tcaagcgtaa agccggcacg	540
tccagcctga cggagtgcgt gttgaacaag gccacgaatg tcgcccactg gacaaccccc	600
agtctcaaat gcattagaga accaagaggg ccacaaatca agccctgtcc tccatgcaaa	660
tgcccagcac ctaacctctt ggggtggacca tccgtcttca tcttccctcc aaagatcaag	720
gatgtactca tgatctcctt gagccccata gtcacatgtg tgggtgggga tgtgagcgag	780
gatgaccag atgtccagat cagctgggtt gtgaacaacg tggaagtaca cacagctcag	840
acacaaacc atagagagga ttacaacagt actctccggg tggtcagtgc cctccccatc	900
cagcaccagg actggatgag tggcaaggag ttcaaatgca aggtcaacaa caaagacctc	960
ccagcgccta tcgagagaac catctcaaaa cccaaagggt cagtaagagc tccacaggta	1020
tatgtcttgc ctccaccaga agaagagatg actaagaaac aggtcactct gacctgcatg	1080
gtcacagact tcatgcctga agacatttac gtggagtggg ccaacaacgg gaaaacagag	1140

ctaaactaca agaactga accagtcctg gactctgatg gttcttactt catgtacagc 1200
aagctgagag tggaaaagaa gaactgggtg gaaagaaata gctactcctg ttcagtggtc 1260

cacgagggtc tgcacaatca ccacacgact aagagcttct cccggactcc aggtaaa 1317

<210> 22

<211> 439

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 22

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ile Asn Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Arg Glu

50 55 60

Trp Val Ala Ala Ser Thr Gly Gly Asp Glu Ala Ile Tyr Arg Asp Ser

65 70 75 80

Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ala Lys Asn Ser Val Phe

85 90 95

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

100 105 110

Thr Ala Val Ile Ser Thr Asp Arg Asp Gly Thr Glu Trp Arg Arg Tyr

115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ile Thr Cys

130 135 140

Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr

145 150 155 160

Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg

165	170	175	
Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr			
180	185	190	
Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Glu Pro			
195	200	205	
Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro			
210	215	220	
Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys			
225	230	235	240
Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val			
245	250	255	
Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn			
260	265	270	
Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr			
275	280	285	
Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp			
290	295	300	
Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu			
305	310	315	320
Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg			
325	330	335	
Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys			
340	345	350	
Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp			
355	360	365	
Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys			
370	375	380	
Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser			
385	390	395	400
Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser			
405	410	415	

Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser

420

425

430

Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys

435

<210> 23

<211> 1119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 23

atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttctgttct ccagcgccta ctccaacatc 60

cagatgacct agtccccttc cgccatgagc gcttccgtgg gcgacagggt gaccatcacc 120

tgcaaggcct cccaggacat ccacaggtag ctgtcttggt tccagcagaa gcccggaag 180

gtgccaagc acctgatcta cagggtctaac aggttggtgt ccggcgtgcc ttccaggttt 240

tccggctccg gctccggcac cgagttcacc ctgacctct ccagcctgca gcccgaggac 300

ttcgccacct actactgctt gcagtacgac gaggttccct acaccttcgg cggcggcacc 360

aaggtggaga tcaagggagg tggcggtacc ggaggtggag gttctggtgg aggtgggagt 420

cagatgcagc tggtagagtc cggcgccgag gtgaagaaga ccggctccag cgtgaaggtag 480

tcctgcaagg cctccggctt caacatcaag gactactacc tgactgggt gaggcaggcc 540

cctggacaag cctggagtag gatgggctgg atcgaccccg acaacggcga caccgagtag 600

gccagaagt tccaggacag ggtgacctc accagggaca ggtccatgag caccgcctac 660

atggagctgt cctccctgag gtccgaggac accgcatgt actactgca cggcgctac 720

ggctcctct cctaccccat ggactactgg ggccagggca ccaccgtgac cgtgaactgg 780

gttaacgtaa taagtattt gaaaaaatt gaagatctta ttcaatctat gcatattgat 840

gctactttat atacggaag tgatgttcac ccagttgca aagtaacagc aatgaagtgc 900

tttctcttg agttacaagt tatttcactt gaggccggag atgcaagtat tcatgataca 960

gtagaaaatc tgatcatcct agcaaacgac agtttgtctt ctaatgggaa tgtaacagaa 1020

tctggatgca aagaatgtga ggaactggag gaaaaaata ttaaagaatt ttgcagagt 1080

ttgtacata ttgtccaaat gttcatcaac acttcttaa 1119

<210> 24

<211> 372

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 24

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser

20 25 30

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His

35 40 45

Arg Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu

85 90 95

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

100 105 110

Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly

115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Met Gln Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Leu His Trp

165 170 175

Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asp

180 185 190

Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Asp Arg Val

195 200 205

Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser
210 215 220

Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Asn Ala Ala Tyr
225 230 235 240

Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
245 250 255

Thr Val Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp
260 265 270

Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp
275 280 285

Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu
290 295 300

Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr
305 310 315 320

Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asp Ser Leu Ser Ser Asn Gly
325 330 335

Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys
340 345 350

Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe
355 360 365

Ile Asn Thr Ser
370

<210> 25

<211> 1668

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 25

atgaagtggg tgaccttcac cagcctgctg ttctgttct ccagcgccta ctccaacatc 60

cagatgaccc agtccccctc cgccatgagc gcttccgtgg gcgacagggt gaccatcacc 120

tgcaaggcct cccaggacat ccacaggtac ctgtcctggt tccagcagaa gcccggcaag 180

gtgccaagc accgatcta cagggctaac aggctggtgt ccggcgtgcc ttccagttt 240

tccggtccg gtcgggcac cgagttacc ctgaccatct ccagcctgca gcccaggac 300

ttcgccacct actactgcct gcagtacgac gagttccct acaccttcgg cggcggcacc 360

aaggtggaga tcaaggagg tggcggatcc ggaggtggag gttctggtgg aggtgggagt 420

cagatgcagc tggtaagtc cggcgccgag gtgaagaaga ccggtccag cgtgaagtg 480

tcctgcaagg cctccggctt caacatcaag gactactacc tgcactgggt gaggcaggcc 540

cctggacaag ccttgagtg gatgggctgg atcgaccccg acaacggcga caccgagtac 600

gcccagaagt tccaggacag ggtgaccatc accagggaca ggtccatgag caccgcctac 660

atggagctgt cctccctgag gtccgaggac accgcatgt actactgca cggcgcctac 720

ggctcctcct cctacccat ggactactgg ggccagggca ccaccgtgac cgtgatcacg 780

tgtcctctc ctatgtcgt ggaacacgca gacatctggg tcaagagcta cagcttgta 840

tccagggagc ggtacattg taactctggt ttcaagcgta aagccggcac gtccagcctg 900

acggagtgcg tgtgaacaa ggccacgaat gtgcgccact ggacaacccc cagtctcaaa 960

tgcattagag agccgaaatc ttgtgacaaa actcacacat gcccaccgtg cccagcacct 1020

gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc tccccccaa aaccaagga caccctcatg 1080

atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 1140

gtcaagtta actggtactg ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 1200

gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 1260

tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc 1320

gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc 1380

ccatccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaagcttc 1440

tatcccagcg acatgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1500

accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagaa gtcaccgtg 1560

gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1620

cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctctg gtaaataa 1668

<210> 26

<211> 555

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 26

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

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

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

130 135 140
Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser Ser Val Lys Val
145 150 155 160
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Leu His Trp
165 170 175
Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asp
180 185 190
Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Asp Arg Val

195 200 205
Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser
210 215 220
Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Asn Ala Ala Tyr

225 230 235 240
 Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 245 250 255
 Thr Val Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile

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

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

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

 450 455 460
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 465 470 475 480

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
485 490 495
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
500 505 510
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

515 520 525
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
530 535 540
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
545 550 555

<210> 27

<211> 744

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 27

atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttctgttct ccagcgccta ctccacgcc 60

aaggagccct gcatggccaa gttcggccct ctgccctcca agtggcagat ggcctcctcc 120

gagcctccct gtgtgaacaa ggtgtccgac tggaagctgg agatcctgca gaacggcctg 180

tacctgatct acggccaggt ggcccccaac gccaactaca acgacgtggc ccccttcgag 240

gtgcggctgt acaagaacaa ggacatgac cagaccctga ccaacaagtc caagatccag 300

aacgtggcgc gcacctatga gctgcacgtg ggcgacacca tcgacctgat cttaactcc 360

gagcaccagg tgctgaagaa caacacctac tggggcatca actgggttaa cgtataaagt 420

gatttgaaaa aaattgaaga tcttattcaa tctatgcata ttgatgtac tttatatacg 480

gaaagtgatg ttaccccag ttgcaaagta acagcaatga agtgctttct cttggagtta 540

caagttatct cacttgagtc cggagatgca agtattcatg atacagtaga aaatctgac 600

atcctagcaa acgacagttt gtcttctaata gggaatgtaa cagaatctgg atgcaaagaa 660

tgtgaggaac tggaggaaaa aaatatataa gaatttttgc agagttttgt acatattgtc 720

caaatgttca tcaacacttc ttaa 744

<210> 28

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 28

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser Thr Ala Lys Glu Pro Cys Met Ala Lys Phe Gly Pro Leu Pro

20 25 30

Ser Lys Trp Gln Met Ala Ser Ser Glu Pro Pro Cys Val Asn Lys Val

35 40 45

Ser Asp Trp Lys Leu Glu Ile Leu Gln Asn Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr

50 55 60

Gly Gln Val Ala Pro Asn Ala Asn Tyr Asn Asp Val Ala Pro Phe Glu

65 70 75 80

Val Arg Leu Tyr Lys Asn Lys Asp Met Ile Gln Thr Leu Thr Asn Lys

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr

145 150 155 160

Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe

165 170 175

Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile

180 185 190

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

195 200 205

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

210

215

220

Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val

225

230

235

240

Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser

245

<210> 29

<211> 1293

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 29

atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttctgtttct ccagcgccta ctccaccgcc	60
aaggagccct gcatggccaa gttcggccct ctgccctcca agtggcagat ggcctcctcc	120
gagcctccct gtgtgaacaa ggtgtccgac tggaagctgg agatcctgca gaacggcctg	180
tacctgatct acggccaggt ggcccccaac gccaaactaca acgacgtggc ccccttcgag	240
gtgcggctgt acaagaacaa ggacatgatc cagaccctga ccaacaagtc caagatccag	300
aacgtgggcg gcacctatga gctgcacgtg ggcgacacca tcgacctgat cttcaactcc	360
gagcaccagg tgctgaagaa caacacctac tggggcatca tcacgtgtcc tcctcctatg	420
tccgtggaac acgcagacat ctgggtcaag agctacagct tgtactccag ggagcggtag	480
atttgtaact ctggtttcaa gcgtaaagcc ggcacgtcca gcctgacgga gtgcgtgttg	540
aacaaggcca cgaatgtcgc ccactggaca acccccagtc tcaaatgcat tagagagccg	600
aaatcttgtg aaaaaacta cacatgccca ccgtgcccag cactgaact cctgggggga	660
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacc aaggacacce tcatgatctc ccggaccctt	720
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	780
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	840
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcttcacc gtccctgacc aggactggct gaatggcaag	900
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	960
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag	1020
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	1080
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg	1140

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1200

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1260

cagaagagcc tctccctgtc tcttggtaaa taa 1293

<210> 30

<211> 430

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 30

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser Thr Ala Lys Glu Pro Cys Met Ala Lys Phe Gly Pro Leu Pro

20 25 30

Ser Lys Trp Gln Met Ala Ser Ser Glu Pro Pro Cys Val Asn Lys Val

35 40 45

Ser Asp Trp Lys Leu Glu Ile Leu Gln Asn Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr

50 55 60

Gly Gln Val Ala Pro Asn Ala Asn Tyr Asn Asp Val Ala Pro Phe Glu

65 70 75 80

Val Arg Leu Tyr Lys Asn Lys Asp Met Ile Gln Thr Leu Thr Asn Lys

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Thr Tyr Trp Gly Ile Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His

130 135 140

Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr

145 150 155 160

Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr

165	170	175
Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro		
180	185	190
Ser Leu Lys Cys Ile Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		
195	200	205
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe		
210	215	220
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
225	230	235
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val		
245	250	255
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
260	265	270
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
275	280	285
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
290	295	300
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
305	310	315
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro		
325	330	335
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val		
340	345	350
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
355	360	365
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
370	375	380
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
385	390	395
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
405	410	415

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

420 425 430

<210> 31

<211> 1131

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 31

atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttctgttct ccagcgccta ctccgagatc 60
gtgtgacct agtccccctg taccctgtcc ctgtccccctg gcgagagggc taccctgtcc 120
tgcagggccca ggcaatccat ctccaactac ctgcactggt accagcagaa acctggccag 180
gccccaggc tgctgatcta ctacgcctcc cagtccatct ccggcatccc tgacaggttc 240

agcggatccg gctccggcac cgacttcacc ctgacctct ccaggctgga gcctgaggac 300
ttcgccgtgt actactgcca gcagtcacac tcttggcctc tgaccttcgg ccagggcacc 360
aaggtggaga tcaagcgggg aggtggcgga tccggagggtg gaggttctgg tggaggtggg 420
agtgaagtg agctggtgca gtccggcgcc gaagtgaaga agcccgagc ctccgtgaag 480
gtgtctgca aggcctccgg ctacaccttc accaggtact ggatgcactg ggtgaggcag 540
gccccggac agggactgga gtggatcggc gccatctacc ccggcaactc cgacacctcc 600
tacaaccaga agttcaaggg caaggccacc atcaccgccg acacctccac caacaccgcc 660

tacatggagc tgtcctccct gaggtccgag gacaccgccg tgtactactg cgctaggggc 720
gaggagatcg gcgtgaggag gtggttcgcc tactggggac agggcaccct ggtgaccgtg 780
tccagcaact ggggttaact aataagtgt ttgaaaaaaa ttgaagatct tattcaatct 840
atgcatattg atgtacttt atatacgga agtgatgttc acccagttg caaagtaaca 900
gcaatgaagt gctttctctt ggagttacaa gttatttcac ttgagtcagg agatgcaagt 960
attcatgata cagtagaaaa tctgatcatc ctacgaaacg acagtttgc ttctaattggg 1020
aatgtaacag aatctggatg caaagaatgt gaggaactgg aggaaaaaaa tattaagaa 1080

tttttcaga gttttgtaca tattgtccaa atgttcatca acacttctta a 1131

<210> 32

<211> 376

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 32

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser

20 25 30

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

35 40 45

Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu

50 55 60

Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Trp Met His

165 170 175

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile

180 185 190

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

195 200 205

Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu

210 215 220

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

225 230 235 240

Glu Glu Ile Gly Val Arg Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

245 250 255

Leu Val Thr Val Ser Ser Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys

260 265 270

Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr

275 280 285

Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys

290 295 300

Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser

305 310 315 320

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

325 330 335

Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu

340 345 350

Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile

355 360 365

Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser

370 375

<210> 33

<211> 1680

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 33

atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttcctgttct ccagcgcta ctccgagatc 60

gtgctgacct agtcccctgc taccctgtcc ctgtcccctg gcgagagggc taccctgtcc 120

tgcagggccca ggcaatccat ctccaactac ctgcaactgg accagcagaa acctggccag 180

gccccaggc tgctgatcta ctacgcctcc cagtccatct ccggcatccc tgacaggttc 240

agcggatccg gctccggcac cgacttcacc ctgacatctt ccaggctgga gcctgaggac 300
 ttcgccgtgt actactgcca gcagtccaac tcttgccctc tgaccttcgg ccagggcacc 360
 aaggtggaga tcaagcgggg aggtggcgga tccggagggtg gaggttctgg tggaggtggg 420
 agtgagggtc agctggtgca gtccggcgcc gaagtgaaga agcccggagc ctccgtgaag 480
 gtgtcctgca aggcctccgg ctacaccttc accaggtact ggatgcactg ggtgaggcag 540
 gcccctggac agggactgga gtggatcggc gccatctacc ccggcaactc cgacacctcc 600

tacaaccaga agttcaaggg caaggccacc atcaccgccg acacctccac caacaccgcc 660
 tacatggagc tgtcctccct gaggtccgag gacaccgccg tgtactactg cgctaggggc 720
 gaggagatcg gcgtgaggag gtggttcgcc tactggggac agggcaccct ggtgaccgtg 780
 tccagcatca cgtgtcctcc tcctatgtcc gtggaacacg cagacatctg ggtcaagagc 840
 tacagcttgt actccaggga gcggtacatt tgtaactctg gtttcaagcg taaagccggc 900
 acgtccagcc tgacggagtg cgtgttgaac aaggccacga atgtcgcca ctggacaacc 960
 cccagtctca aatgcattag agagccgaaa tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg 1020

tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag 1080
 gacacctca tgatctcccg gaccttgag gtcacatcg tggtggtgga cgtgagccac 1140
 gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 1200
 acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacctc 1260
 ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtga aggtctccaa caaagccctc 1320
 ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg 1380
 tacacctgc ccccatcccg ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1440

gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1500
 aacaactaca agaccacgcc tcccgctgtg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 1560
 aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 1620
 catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct cctgtcttcc tggtaaataa 1680

<210> 34

<211> 559

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 34

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser

20 25 30

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

35 40 45

Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu

50 55 60

Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Trp Met His

165 170 175

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile

180 185 190

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

195 200 205

Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu

210 215 220

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

225 230 235 240

Glu Glu Ile Gly Val Arg Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

245 250 255
Leu Val Thr Val Ser Ser Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu

260 265 270
His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg

275 280 285
Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu

290 295 300
Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr

305 310 315 320
Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His

325 330 335
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val

340 345 350
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

355 360 365
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

370 375 380
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

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

405 410 415
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

420 425 430
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

435 440 445
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

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

465 470 475 480
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

485 490 495

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 500 505 510
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

515 520 525
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 530 535 540
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 545 550 555

<210> 35

<211> 1662

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 35

atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttctgttct ccagcgcta ctccgacatc 60

cagatgacce agtccccgcg ttccctgtcc gcttccgtgg ggcacagggt gaccatcacc 120

tgcttgccct ccagacatc cgacacctgg ctggcctggg acctgcagaa gcccggcaag 180

tccccccagc tgctgatcta cgccgtacc aacctggccg acggcgtgcc tagcaggttt 240

tccggctccg gctccggcac cgacttctcc ttaccatct cctccctgca gcccaggagc 300

ttcgccacct actactgcca gcaggtgtac tctccccct tcaccttcgg ccagggcacc 360

aagctggaga tcaagggagg tggcggatcc ggaggtggag gttctggtgg aggtgggagt 420

cagatccagc tgggtgcagtc cggcggcgaa gtgaaaaagc ccggcgccag cgtgagggtg 480

ttctgtaagg cctccggcta ctcttcacc gactacaacg tgtactgggt gaggcagtc 540

cccggcaagg gactggagtg gatcggttac atcgaccctt acaacggcat caccatctac 600

gaccagaact tcaagggcaa ggccacctg accgtggaca agtccacctc cacagcctac 660

atggagctgt cctccctgag gtccgaggac accgccgtgt acttctgcgc caggacgtg 720

accaccgtc tggacttctg gggacagggc accaccgtga ccgtgagctc catcacgtgt 780

cctcctcta tgtccgtgga acacgcagac atctgggtca agagctacag cttgtactcc 840

agggagcggg acatttgtaa ctctggtttc aagcgtaaag ccggcacgtc cagcctgacg 900

gagtgcgtgt tgaacaaggc cacgaatgtc gccactgga caacccccag tctcaaatgc 960

attagagagc cgaaatcttg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa 1020
ctcctggggg gaccgtcagt cttctctctc ccccaaaac ccaaggacac cctcatgac 1080
tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 1140
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 1200
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 1260
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 1320

aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1380
tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggttcttat 1440
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1500
acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctct acagcaagct caccgtggac 1560
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1620
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctcctggta aa 1662

<210> 36

<211> 554

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 36

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu

85 90 95

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

100 105 110
 Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly

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

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

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

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

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 355 360 365
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 370 375 380
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 385 390 395 400
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 405 410 415
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 420 425 430
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 435 440 445
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 450 455 460
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 465 470 475 480
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 485 490 495
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 500 505 510
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 515 520 525
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 530 535 540
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 545 550
 <210> 37
 <211> 1137
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 37

atggattttc aggtgcagat tatcagcttc ctgctaata gtccttcagt cataatgtca	60
agaggacagg tgcagctggg tcagagcggg gcggaagtta aaaagccggg ctcttccgtg	120
aaagttagct gcaaagcgtc tggttatacc ttcaccgact acaacatgca ctgggtccgc	180
caggccccag gccagggtct ggaatggatc ggttatatit acccgtaaa cgggtggcacg	240
ggatataacc agaaattcaa atccaaagct accatcactg cggacgaaag caccaacacc	300
gcataatatg aattgtcttc tctgcgtagc gaagataacc cggtttacta ttgcgctcgt	360
ggtcgtccag cgatggatta ctggggtcag ggcaccctgg tgaccgtgag ctctggcgga	420
ggcggatctg gtggtggcgg atccgggtga ggcggaagcg atatccagat gaccagttcc	480
ccgagctccc tgtctgccag cgtgggcgac cgcgtgacta tcacctgccg tgcgtccgaa	540
agcgtggata actacggcat ttcctttatg aactgggtcc agcagaaacc gggtaaagcc	600
ccgaaactgc tgatttatgc ggcctctaac cagggcagcg gtgtgccgag ccgcttttcc	660
ggcagcgggt cggggaccga tttcactctg accatttcta gcctgcagcc agatgacttc	720
gcgacctact actgccaaca gtctaaagaa gttccgtgga ccttcggtca gggtacaaaa	780
gttgaaatta aaaactgggt taacgtaata agtgatttga aaaaaattga agatcttatt	840
caatctatgc atattgatgc tactttatat acggaagtgt atgttcaccc cagttgcaaa	900
gtaacagcaa tgaagtgttt tctcttggag ttacaagtta tttcacttga gtccggagat	960
gcaagtattc atgatacagt agaaaatctg atcatcctag caaacgacag tttgtcttct	1020
aatgggaatg taacagaatc tggatgcaaa gaatgtgagg aactggagga aaaaaatatt	1080
aaagaatttt tgcagagttt tgtacataat gtccaaatgt tcatcaacac ttcttaa	1137

<210> 38

<211> 378

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 38

Met	Asp	Phe	Gln	Val	Gln	Ile	Ile	Ser	Phe	Leu	Leu	Ile	Ser	Ala	Ser
1				5				10					15		
Val	Ile	Met	Ser	Arg	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu
				20				25					30		

Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
35 40 45

Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
50 55 60

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr
65 70 75 80

Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu
85 90 95

Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
100 105 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Pro Ala Met Asp Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
145 150 155 160

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
165 170 175

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp
180 185 190

Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala
195 200 205

Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
210 215 220

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe
225 230 235 240

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly
245 250 255

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp
260 265 270

Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr

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

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

<210> 39

<211> 1686

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide

<400> 39

atggattttc aggtgcagat tatcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtca	60
agaggacagg tgcagctggt tcagagcggg gcggaagtta aaaagccggg ctcttccgtg	120
aaagttagct gcaaagcgtc tggttatacc ttcaccgact acaacatgca ctgggtccgc	180
caggccccag gccagggctc ggaatggatc ggttatattt acccgtacaa cgggtggcacg	240
ggatataacc agaaattcaa atccaaagct accatcactg cggacgaaag caccaacacc	300
gcataatatgg aattgtcttc tctgcgtagc gaagataccg cggtttacta ttgcgctcgt	360
ggtcgtccag cgatggatta ctggggtcag ggcaccctgg tgaccgtgag ctctggcgga	420
ggcggatctg gtggtggcgg atccggtgga ggcggaagcg atatccagat gacccagtcc	480
ccgagctccc tgtctgccag cgtgggagac cgcgtgacta tcacctgccg tgcgtccgaa	540
agcgtggata actacggcat ttctttatg aactggttcc agcagaaacc gggtaaagcc	600
ccgaaactgc tgatttatgc ggcctctaac cagggcagcg gtgtgccgag ccgcttttcc	660

ggcagcggtt cggggaccga ttctactctg accatttcta gcctgcagcc agatgacttc 720

gcgacctact actgccaaca gtctaaagaa gttccgtgga ccttcggtca gggtacaaaa 780

gttgaaatta aaatcacgtg tcctcctect atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc 840

aagagctaca gcttgtagtc caggagcggg tacatttgta actctggttt caagcgtaaa 900

gccggcacgt ccagcctgac ggagtgcgtg ttgaacaagg ccacgaatgt cgcctactgg 960

acaaccccc gtctcaaatg cattagagag ccgaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc 1020

ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa 1080

ccaaggaca cctcatgat ctcccgacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg 1140

agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 1200

gccaagacaa agccgcggga ggagcagtag aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcttc 1260

accgtctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 1320

gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca 1380

caggtgtaca cctgcccc atcccggtat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc 1440

tgcttggtca aaggcttcta tccagcgac atgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1500

ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc 1560

tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1620

gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctcctggt 1680

aaataa 1686

<210> 40

<211> 561

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 40

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu

20 25 30

Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35 40 45

Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 50 55 60
 Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr
 65 70 75 80

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

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

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

 Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg
 275 280 285
 Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser

290	295	300	
Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp			
305	310	315	320
Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys			
	325	330	335
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro			
	340	345	350
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
	355	360	365
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
	370	375	380
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
385	390	395	400
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
	405	410	415
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
	420	425	430
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys			
	435	440	445
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
	450	455	460
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			
465	470	475	480
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
	485	490	495
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu			
	500	505	510
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys			
	515	520	525
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
	530	535	540

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

545 550 555 560

Lys

<210> 41

<211> 1626

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 41

atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttctgttct ccagcgcta ctccatgaag 60

tgggtgacct tcatcagcct gctgttctg ttctccagcg cctactccga tttagtgtt 120

ctgttcgacg gtcctatgic ttacagccc gatgagtcc agaagatttt agacttcatg 180

aaggacgtga tgaagaaact gtccaacacc agctaccagt tcgctgccgt gcagtcttcc 240

acctcctaca agaccgagtt cgacttctcc gactacgtga agcggaagga ccccgatgct 300

ttactgaagc acgtcaagca catgctgctg ctaccaaca ctttggcgc catcaactac 360

gtggccaccg aggtgtttcg tgaggaactg ggagctcggc ccgatgccac caaggigctg 420

attatcatca ccgacggcga agccaccgat agcggaaca tcgatgccgc caaggacatc 480

atccgttaca ttatcgcat cggaagcac ttccagacca aggagagcca agagacttta 540

cacaagttag cctccaagcc cgttccgag ttctgtgca ttttagacac cttcagtggt 600

ttaaaggatt tatttaccga gctgcagaag aagatctacg tgattgaggg caccagcaag 660

caagatctga cctccttcaa catggagctg tccagcagcg gcatttccgc tgatttatct 720

cgtggccacg ccatcacgtg tctctctct atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc 780

aagagctaca gcttgactc caggagcgg tacatttgta actctggtt caagcgtaaa 840

gccggcacgt ccagcctgac ggagtgctg ttgaacaagg ccacgaatgt cgccactgg 900

acaaccccca gtctcaaatg cattagagag ccgaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc 960

ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa 1020

cccaaggaca cctcatgat ctccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg 1080

agccacgaag acctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 1140

gccaagacaa agccgaggga ggagcagtag aacagcacgt accgtgtggt cagcgtctc 1200

accgtctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 1260

gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca 1320
caggtgtaca ccttgccccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc 1380

tgccctggta aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1440
ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc 1500
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1560
gtgatcatg aggtcttca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctcttgg 1620
aaataa 1626

<210> 42

<211> 523

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 42

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

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

Glu Ala Thr Asp Ser Gly Asn Ile Asp Ala Ala Lys Asp Ile Ile Arg

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

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

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 515 520

<210> 43

<211> 2457

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide

<400> 43

atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttctgttct ccagcgcta ctccagcggc	60
gtgttccagc tgcagctgca agagtttatt aacgagaggg gcgtgctggc ttccggtcgt	120
ccttgtgagc ccggtttagt gacctttttc cgggtgtgtt taaagcattt tcaagctgtg	180
gtgtccccc gacctgttac cttcggcacc gtgtccacc cgttctggg caccaactcc	240
ttcgccgttc gtgacgacag ctccggagga ggtcgtaate ctttacagct gcctttcaac	300
tttacttggc ccggcacctt ctccctcatt atcgaagctt ggcatgcccc cggtagcat	360
ctgcggcccg aagctctgcc ccccgatgct ttaatcagca agattgcat tcaaggttct	420

ttagccgtgg gccagaactg gctgctggac gagcagacca gcacactcac tcgtctgagg 480
 tactcctatc gtgtgatctg cagcgacaac tactacggcg acaattgcag ccggctgtgc 540
 aagaagagga acgaccactt cggccattac gtctgccagc ccgacggcaa tttatcttgt 600
 ctgcccgggtt ggaccggcga gtactgtcag cagcccatct gtttaagcgg ctgccacgag 660

 cagaacggct actgcagcaa gcccgtgag tgtctgtgta ggcccggctg gcaaggtagg 720
 ctgtgcaacg agtgcattcc ccacaatggc tgtcggcacg gcaattgttc cacccttgg 780
 cagtgcactt gtgacgaggg ctggggagggt ttattctgcg accaagatct gaactactgc 840
 acccaccaca gcccttgtaa gaacggagct acttgttcca acagcggcca gaggtcttac 900
 acttgtactt gtaggcccgg ttacaccggc gtcgactgcg aactggaact gagcgaatgc 960
 gatagcaacc ctgtcgttaa cggcggcagc tgcaaggacc aagaagacgg ctaccactgt 1020
 ttatgccctc ccggatacta cggtttacac tgcgagcact ccacactgtc ttgtgccgac 1080

 tccccttgtt tcaacggcgg aagctgtcgt gagaggaacc aaggtgccaa ctacgttgt 1140
 gagtgcctc ccaacttcac cggctccaac tgcgagaaga aggtggatcg ttgcacctcc 1200
 aacccttgcg ccaacggcgg ccagtgttta aataggggcc cttcccggat gtgtcgttgt 1260
 cgtcccgggtt ttaccggcac ctactgcgag ctgcacgtca gcgattgcgc ccggaatcct 1320
 tgcgtcacg gcggaacttg tcacgattta gagaacggtt taatgtgcac ttgtcccgt 1380
 ggattcagcg gtcgtagggt tgaggtaggg acctccatcg acgttgtgc cagcagccct 1440
 tgcttcaatc gtgccacttg ttacaccgat ttatccaccg acaccttcgt gtgcaactgc 1500

 ccctacggct tcgtgggata tcgttgcgag ttccccgttg gcctgcctcc tagctttccc 1560
 tggatcacgt gtctctctcc tatgtccgtg gaacacgcag acatctgggt caagagctac 1620
 agcttgtact ccagggagcg gtacatttgt aactctggtt tcaagcgtaa agccggcacg 1680
 tccagcctga cggagtgcgt gttgaacaag gccacgaatg tcgcccactg gacaaccccc 1740
 agtctcaaat gcattagaga gccgaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 1800
 ccagcacctg aactcttggg gggaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac 1860
 acctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtaggacgt gagccacgaa 1920

 gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacttg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 1980
 aagccgctgg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 2040
 caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca 2100
 gcccccatcg agaaaacat ctcaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 2160
 acctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 2220
 aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC 2280

aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct cttcttcct ctacagcaag 2340

ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 2400

gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctcctgg taaataa 2457

<210> 44

<211> 818

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 44

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser Ser Gly Val Phe Gln Leu Gln Leu Gln Glu Phe Ile Asn Glu

20 25 30

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

35 40 45

Phe Phe Arg Val Cys Leu Lys His Phe Gln Ala Val Val Ser Pro Gly

50 55 60

Pro Cys Thr Phe Gly Thr Val Ser Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser

65 70 75 80

Phe Ala Val Arg Asp Asp Ser Ser Gly Gly Gly Arg Asn Pro Leu Gln

85 90 95

Leu Pro Phe Asn Phe Thr Trp Pro Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu

100 105 110

Ala Trp His Ala Pro Gly Asp Asp Leu Arg Pro Glu Ala Leu Pro Pro

115 120 125

Asp Ala Leu Ile Ser Lys Ile Ala Ile Gln Gly Ser Leu Ala Val Gly

130 135 140

Gln Asn Trp Leu Leu Asp Glu Gln Thr Ser Thr Leu Thr Arg Leu Arg

145 150 155 160

Tyr Ser Tyr Arg Val Ile Cys Ser Asp Asn Tyr Tyr Gly Asp Asn Cys

165	170	175
Ser Arg Leu Cys Lys Lys Arg Asn Asp His Phe Gly His Tyr Val Cys		
180	185	190
Gln Pro Asp Gly Asn Leu Ser Cys Leu Pro Gly Trp Thr Gly Glu Tyr		
195	200	205
Cys Gln Gln Pro Ile Cys Leu Ser Gly Cys His Glu Gln Asn Gly Tyr		
210	215	220
Cys Ser Lys Pro Ala Glu Cys Leu Cys Arg Pro Gly Trp Gln Gly Arg		
225	230	235
240		
Leu Cys Asn Glu Cys Ile Pro His Asn Gly Cys Arg His Gly Thr Cys		
245	250	255
Ser Thr Pro Trp Gln Cys Thr Cys Asp Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe		
260	265	270
Cys Asp Gln Asp Leu Asn Tyr Cys Thr His His Ser Pro Cys Lys Asn		
275	280	285
Gly Ala Thr Cys Ser Asn Ser Gly Gln Arg Ser Tyr Thr Cys Thr Cys		
290	295	300
Arg Pro Gly Tyr Thr Gly Val Asp Cys Glu Leu Glu Leu Ser Glu Cys		
305	310	315
320		
Asp Ser Asn Pro Cys Arg Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Glu Asp		
325	330	335
Gly Tyr His Cys Leu Cys Pro Pro Gly Tyr Tyr Gly Leu His Cys Glu		
340	345	350
His Ser Thr Leu Ser Cys Ala Asp Ser Pro Cys Phe Asn Gly Gly Ser		
355	360	365
Cys Arg Glu Arg Asn Gln Gly Ala Asn Tyr Ala Cys Glu Cys Pro Pro		
370	375	380
Asn Phe Thr Gly Ser Asn Cys Glu Lys Lys Val Asp Arg Cys Thr Ser		
385	390	395
400		
Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Gln Cys Leu Asn Arg Gly Pro Ser Arg		
405	410	415

Met Cys Arg Cys Arg Pro Gly Phe Thr Gly Thr Tyr Cys Glu Leu His
420 425 430

Val Ser Asp Cys Ala Arg Asn Pro Cys Ala His Gly Gly Thr Cys His
435 440 445

Asp Leu Glu Asn Gly Leu Met Cys Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser Gly
450 455 460

Arg Arg Cys Glu Val Arg Thr Ser Ile Asp Ala Cys Ala Ser Ser Pro
465 470 475 480

Cys Phe Asn Arg Ala Thr Cys Tyr Thr Asp Leu Ser Thr Asp Thr Phe
485 490 495

Val Cys Asn Cys Pro Tyr Gly Phe Val Gly Ser Arg Cys Glu Phe Pro
500 505 510

Val Gly Leu Pro Pro Ser Phe Pro Trp Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met
515 520 525

Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser
530 535 540

Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr
545 550 555 560

Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His
565 570 575

Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp
580 585 590

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
595 600 605

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
610 615 620

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
625 630 635 640

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

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

740 745 750

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

755 760 765

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

770 775 780

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

785 790 795 800

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

805 810 815

Gly Lys

<210> 45

<211> 1701

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 45

atggaatgga gctgggtctt tctctcttc ctgtcagtaa ccaccggtgt ccactcctcc 60

tatgtgctga ctcagcctcc ctccgcgtcc gggctctcctg gacagtcagt caccatctcc 120

tgcaactggaa ccagcagtga cgttggtaat aataactatg tctcctggta ccaacagcac 180

ccaggcaaaag cccccaaact catgatattat gatgtcagta atcggccctc aggggtttct 240
actcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccatctc tgggtccag 300
gctgaggacg aggctgatta ttactgcagc tcatatacaa ccagcagtac ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaagctgac cgtcctgggg cagccaaagg cgggaggtgg cggatccgga 420
ggtggaggtt ctggtggagg tgggagtctg gtgcaatctg gggctgaggt gaagaagcct 480
ggggcctcag tgaaggtctc ctgcaaggct tctggataca ccttcaccgg ctactatatg 540
cactgggtgc gacaggcccc tggacaaggg cttgagtga tgggatggat caaccctaac 600

agtgggtgga caaactatgc acagaagttc cagggcagag tcaccatgac caggaacacc 660
tcataagca cagcctacat ggagttgagc agcctgagat ctgacgacac ggccgtgtat 720
tactgtcga gagagatgta ttactatggt tgggggtaca actggttcga cccctggggc 780
cagggaaacc tggtcaccgt gagtcaatc acgtgtctc ctctatgtc cgtggaacac 840
gcagacatct gggtaagag ctacagcttg tactccaggg agcggatcat ttgtaactct 900
ggtttcaagc gtaaagccgg cagctccagc ctgacggagt gcgtgttgaa caagccacg 960
aatgtcgccc actggacaac cccagttctc aaatgcatta gagagccgaa atcttgtgac 1020

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc 1080
ctttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 1140
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 1200
gtggaggtgc ataatgcca gacaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 1260
gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1320
aaggtctcca acaaagccct ccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1380
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1440

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatgc cgtggagtgg 1500
gagagcaatg ggagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1560
ggctccttct tctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggaac 1620
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggt ctgcacaacc actacacgca gaagacctc 1680
tccctgtctc ctggtaaata a 1701

<210> 46

<211> 566

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 46

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asn Asn Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Leu Gly Gln Pro Lys Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln

195 200 205

Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr

210 215 220

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

225 230 235 240
 Tyr Cys Ala Arg Glu Met Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Tyr Asn Trp Phe
 245 250 255

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

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

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

 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 450 455 460
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

530 535 540

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

545 550 555 560

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

565

<210> 47

<211> 1665

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 47

atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttctgttct ccagcgcta ctcctacatc	60
cacgtgacct agtccccctc ctctttaagc gtgagcatcg gagatcgtgt gaccatcaac	120
tgccagacct cccaaggtgt gggctccgat ttacactggt accagcacia gcccggtcgg	180
gcccccaagc tgetgatcca ccacaccagc tccgtggagg atggcgtgcc ctctcgtttc	240
tccggctccg gttccatac ctcttcaat ttaacatca gcatattaca agctgacgac	300
atgccacct actactgcca agttctccag ttcttcggcc ggggtctctg tctgcatatc	360

aaggaggcgc gcggatccgg cggcggaggc agcggcggag gcggatctcg tgctcatctg	420
gtgcagagcg gaaccgccat gaagaagccc ggtgctagcg tgcgggtgtc ttgtcagacc	480
agcggataca ccttcacgc ccacatttta ttctggtttc gtcaagctcc cggctgtgga	540
ctggaatggg tgggctggat caagccccag tatggcgccg tgaactttgg cggcggcttt	600
cgtgatcggg tgactttaac tctgacgtg tatcgggaga tcgctacat ggacattagg	660
ggtttaaagc ccgacgatac cgccgtgtac tactgcgctc gtgatcgttc ctacggcgat	720

agcagctggg ctttagatgc ttggggccaa ggtaccacag tgtggtccgc catcacgtgt 780

cctcctccta tgtccgtgga acacgcagac atctgggtca agagctacag ctgtactcc 840

aggagacggt acattttgaa ctctggtttc aagcgtaaag ccggcacgtc cagcctgacg 900

gagtgcgtgt tgaacaaggc cacgaatgtc gccactgga caacccccag tctcaaatgc 960

attagagagc cgaaatcttg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa 1020

ctcctggggg gaccgtcagt ctctctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgac 1080

tcccggaacc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 1140

aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 1200

gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 1260

ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 1320

aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1380

tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggtttctat 1440

cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1500

acgcctcccg tgetggactc cgacggctcc ttcttctct acagcaagct caccgtggac 1560

aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgtccg tgatgcatga ggctctgcac 1620

aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctcctggta aataa 1665

<210> 48

<211> 1680

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 48

atgaagtggg tgaccttcac cagcctgctg ttctgttct ccagcgcta ctccgtggtg 60

atgaccagct cccttccac cctgtccgt tccgtggcg acaccatcac catcacctgc 120

agggcctccc agtccatcga gacctggctg gcctgtacc agcagaagcc cggcaaggcc 180

cccaagctgc tgatctacaa ggctccacc ctgaagaccg gcgtgccctc caggttttcc 240

ggatccggt cggcaccca gttcacctg accatcagcg gcctgcagtt cgacgacttc 300

gccacctacc actgccagca ctacccggc tactccgcca cctttggaca gggcaccagg 360

gtggagatca agggaggtgg cggatccgga ggtggaggtt ctggtggagg tgggagttag 420

gtgcagctgg tggaatccgg aggcggcctg gtgaaagctg gcggaagcct gatcctgagc 480

tgcggcgtgt ccaacttcag gatctccgcc cacacatga actgggtgag gagggcgcct 540
 ggaggaggac tggagtgggt ggccagcatc tccacctcct ccacctacag ggactacgcc 600
 gacgccgtga agggcaggtt caccgtgagc agggacgacc tggaggactt cgtgtacctg 660

 cagatgcaca agatgcgggt ggaggacacc gccatctact actgcgccag gaaggcctcc 720
 gacagctgt cgcacaacga cccctttgac gcctggggcc ctggaaccgt ggtgacagtg 780
 tccccatca cgtgtectcc tcctatgtcc gtggaacacg cagacatctg ggtcaagagc 840
 tacagcttgt actccaggga gcggtacatt tgtaactctg gtttcaagcg taaagccggc 900
 acgtccagcc tgacggagtg cgtgttgaac aaggccacga atgtcgccca ctggacaacc 960
 cccagctca aatgcattag agagccgaaa tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg 1020
 tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag 1080

 gacacctca tgatctcccg gaccttgag gtacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac 1140
 gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 1200
 acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 1260
 ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtga aggtctccaa caaagccctc 1320
 ccagccccc tgcagaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg 1380
 tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1440
 gtcaaaggct tctatcccg cgacatgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1500

 aacaactaca agaccagcc tcccgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 1560
 aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 1620
 catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct cctgtctcc tggtaataa 1680

 <210> 49
 <211> 1674
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide
 <400> 49

 atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttcctgttct ccagegcta ctctctctcc 60
 ctgaccaga gccccgaac actctccctc tccccgggtg agaccgtat catctcttgt 120

 aggaccagcc agtacggctc tttagcttgg tatcaacaga ggcccggcca agctcctagg 180
 ctggtcattt acagcggcag cacaagggcc gccggcatcc ccgataggtt ctccggctcc 240

cggtggggcc ccgattacaa tttacaatc tccaatttag agtccggaga cticggcgtc 300
tactactgcc agcagtagca gttcttcggc caaggtacca aagtgaagt tgatatcaag 360
ggcggcggag gctccggcgg cggcggatcc ggcggaggag gatcccaagt taggctgtcc 420
cagagcggag gccagatgaa gaagcccggg gactccatgc ggatcagctg tcgtgccagc 480
ggctacgagt tcatcaactg ccccatcaac tggattcgtc tggccccggg taagcggccc 540

gaatggatgg gctggatgaa acctcgtcac ggcgtgtgt cctacgtcg tcagctgcaa 600
ggtcgtgtga ccatgactcg tgacatgtac agcagaccg cttttttaga gctgaggtct 660
ttaacctcg acgacaccg tgtgtacttc tgcacccggg gcaagtactg caccgtcgg 720
gactactaca actgggactt cgagcactgg ggccaaggta caccgtgac agtgtcctcc 780
atcacgtgtc ctctcctat gtccgtggaa cacgcagaca tctgggtcaa gagctacagc 840
ttgtactcca gggagcggta catttgtaac tctggtttca agcgtaaagc cggcacgtcc 900
agcctgacgg agtgcgtgtt gaacaaggcc acgaatgtcg cccactggac aacccccagt 960

ctcaaatgca ttagagagcc gaaatcttgt gacaaaactc acacatgcc accgtgccca 1020
gcacctgaac tctgggggg accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 1080
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 1140
cctgaggtea agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 1200
ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca ggcctctcac cgtcctgcac 1260
caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc 1320
cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1380

ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gccigacctg cctggicaaa 1440
ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1500
tacaagacca cgcctccgt gctggactcc gacggctcct tcttctcta cagcaagctc 1560
accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctcgt gatgcatgag 1620
gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctcttggtaa ataa 1674

<210> 50

<211> 1716

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 50

atgaagtggg tgaccttcat cagcctgctg ttctgttct ccagcgccta ctctccagc 60
 tacgtgaggc ctctctccgt ggctctgggc gaaacagctc gtatcagctg cggctcgtcaa 120
 gctctgggat ctctgtctgt gcagtggtag cagcaccggc cgggtcaagc tccccatcta 180
 ctgatctaca acaaccaaga tcggccctcc ggcatccccg aaaggttttag cggcaccccc 240
 gatatcaact tcggcacaag ggccacttta accattagcg gagtggaggc cggcgacgag 300
 gccgactact actgccacat gtgggactcc cggctccggc tttcttgag ctttgccggc 360
 gctactcgtc tgacagtgtt gggcggaggc ggctccggag gcggcggcag cggaggaggc 420

ggatcccaag ttcagctgca agaatccgga cccggttttag tgaagcccag cgagacttta 480
 agcgtgactt gtagcgtgag cggcgacagc atgaacaact actactggac ttggattcgt 540
 cagagccccg gtaagggttt agagtggatc ggctacatct ccgaccggga gtccgccacc 600
 tacaaccctt ctttaaactc cgggtggtg atctctcgtg acacctcaa gaaccagctg 660
 tctttaagc tgaactcgt gacccccgt gacaccgccg tgtactactg cgctaccgt 720
 aggcggggcc agaggatcta cggcgtggtg agcttcggcg agttcttcta ctactacagc 780
 atggacgtgt ggggcaaagg caccaccgtg accgtgtcct ccatcacgtg tcctcctcct 840

atgtccgtgg aacacgcaga catctgggtc aagagctaca gcttgactc caggagcgg 900
 tacatttgta actctggtt caagcgtaaa gccggcacgt ccagcctgac ggagtgcgtg 960
 ttgaacaagg ccacgaatgt gcgccactgg acaaccccc gttcaaatg cattagagag 1020
 ccgaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 1080
 ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc 1140
 cctgaggta catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttaac 1200
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtag 1260

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtctc accgtctgc accaggactg gctgaatggc 1320
 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gcctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1380
 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca cctgcccc atccgggat 1440
 gagtgacca agaaccaggt cagcctgacc tgctgtgta aaggttcta tccagcgac 1500
 atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1560
 gtgtggact ccgacggctc tttctctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1620
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtctgca caaccactac 1680

acgcagaaga gcctctccct gtctcctggt aaataa 1716

<210> 51

<211> 554

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 51

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser Tyr Ile His Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ser Asp Leu His Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Leu

50 55 60

Leu Ile His His Thr Ser Ser Val Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe

65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Phe His Thr Ser Phe Asn Leu Thr Ile Ser Asp Leu

85 90 95

Gln Ala Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Val Leu Gln Phe Phe

100 105 110

Gly Arg Gly Ser Arg Leu His Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Ala His Leu Val Gln Ser Gly

130 135 140

Thr Ala Met Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg Val Ser Cys Gln Thr

145 150 155 160

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ala His Ile Leu Phe Trp Phe Arg Gln Ala

165 170 175

Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp Ile Lys Pro Gln Tyr Gly

180 185 190

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

195 200 205

Asp Val Tyr Arg Glu Ile Ala Tyr Met Asp Ile Arg Gly Leu Lys Pro

210 215 220
 Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ser Tyr Gly Asp

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

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

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

 420 425 430
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 435 440 445
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 450 455 460

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 465 470 475 480
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 485 490 495
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 500 505 510
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 515 520 525
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 530 535 540
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 545 550

<210> 52

<211> 559

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 52

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

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

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
355 360 365

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
370 375 380

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
385 390 395 400

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

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
420 425 430

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
435 440 445

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
450 455 460

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
465 470 475 480

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
485 490 495

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
500 505 510

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
515 520 525

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
530 535 540

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
545 550 555

<210> 53

<211> 557

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 53

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Glu Thr Ala Ile Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Tyr Gly Ser Leu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Trp Gly Pro Asp Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Ser Gly

85 90 95

Asp Phe Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Phe Phe Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Lys Val Gln Val Asp Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Arg Leu Ser Gln Ser Gly Gly

130 135 140

Gln Met Lys Lys Pro Gly Asp Ser Met Arg Ile Ser Cys Arg Ala Ser

145 150 155 160

Gly Tyr Glu Phe Ile Asn Cys Pro Ile Asn Trp Ile Arg Leu Ala Pro

165 170 175

Gly Lys Arg Pro Glu Trp Met Gly Trp Met Lys Pro Arg His Gly Ala

180 185 190

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

195 200 205

Met Tyr Ser Glu Thr Ala Phe Leu Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp

210 215 220

Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Gly Lys Tyr Cys Thr Ala Arg

225 230 235 240
 Asp Tyr Tyr Asn Trp Asp Phe Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val
 245 250 255
 Thr Val Ser Ser Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala
 260 265 270
 Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile
 275 280 285
 Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu
 290 295 300

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

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

 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 435 440 445
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 450 455 460
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 465 470 475 480

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
485 490 495

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
500 505 510

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
515 520 525

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
530 535 540

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
545 550 555

<210>

54

<211> 571

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 54

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

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

Ala Arg Ile Ser Cys Gly Arg Gln Ala Leu Gly Ser Arg Ala Val Gln
35 40 45

Trp Tyr Gln His Arg Pro Gly Gln Ala Pro Ile Leu Leu Ile Tyr Asn
50 55 60

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

Asp Ile Asn Phe Gly Thr Arg Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu
85 90 95

Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys His Met Trp Asp Ser Arg Ser
100 105 110

Gly Phe Ser Trp Ser Phe Gly Gly Ala Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
130 135 140

Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu
145 150 155 160

Ser Val Thr Cys Ser Val Ser Gly Asp Ser Met Asn Asn Tyr Tyr Trp
165 170 175

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

Ile Ser Asp Arg Glu Ser Ala Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Asn Ser Arg
195 200 205

Val Val Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu Ser Leu Lys Leu
210 215 220

Asn Ser Val Thr Pro Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Ala
225 230 235 240

Arg Arg Gly Gln Arg Ile Tyr Gly Val Val Ser Phe Gly Glu Phe Phe
245 250 255

Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val
260 265 270

Ser Ser Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile
275 280 285

Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn
290 295 300

Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val
305 310 315 320

Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys
325 330 335

Cys Ile Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
340 345 350

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro

355	360	365
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		
370	375	380
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn		
385	390	395
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg		
405	410	415
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val		
420	425	430
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser		
435	440	445
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys		
450	455	460
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp		
465	470	475
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe		
485	490	495
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu		
500	505	510
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe		
515	520	525
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly		
530	535	540
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr		
545	550	555
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
565	570	
<210> 55		
<211> 6		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 55

Pro Glu Leu Leu Gly Gly

1 5

<210> 56

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 56

Pro Glu Ala Ala Gly Gly

1 5

<210> 57

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 57

Lys Cys Lys Ser Leu

1 5

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 58

Lys Cys Ala Ser Leu

1 5