



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년07월18일

(11) 등록번호 10-2685748

(24) 등록일자 2024년07월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *C07K 16/32* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/47 (2013.01)
C07K 14/70575 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7035641
- (22) 출원일자(국제) 2016년05월18일
 심사청구일자 2021년05월18일
- (85) 번역문제출일자 2017년12월11일
- (65) 공개번호 10-2018-0002855
- (43) 공개일자 2018년01월08일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2016/061071
- (87) 국제공개번호 WO 2016/184882
 국제공개일자 2016년11월24일
- (30) 우선권주장
 15167927.1 2015년05월18일
 유럽특허청(EPO)(EP)
 16150508.6 2016년01월08일
 유럽특허청(EPO)(EP)
- (56) 선행기술조사문헌
 JP2013544756 A
 JP2009545301 A
- (73) 특허권자
 피어이스 파마슈티컬즈 게엠베하
 독일 할베르크무스 85399 체플린슈트라세 3
- (72) 발명자
 허너, 말론
 독일 뮌헨 81247 오이젠 램스트슈트라세 9
 벨 아이바, 라시다, 시함
 독일 뮌헨 80469 에르하르트슈트라세 15
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 특허법인다나

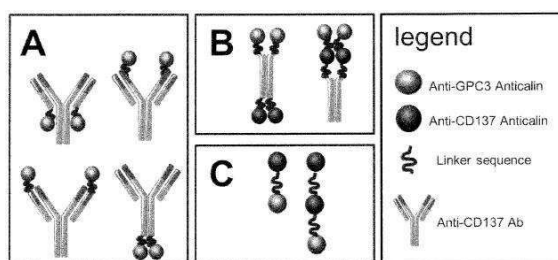
전체 청구항 수 : 총 13 항

심사관 : 한정선

(54) 발명의 명칭 항암 융합 폴리펩타이드

(57) 요약

본 개시물은 CD137 및 GPC3 모두에 특이적인 융합 폴리펩타이드를 제공하며, 융합 폴리펩타이드는 GPC3-양성 종양 세포에 CD137 클러스터링과 활성화를 유도하는데 유용할 수 있다. 그러한 융합 폴리펩타이드는 예를 들어 각종 종양들과 같은 인간 질환의 치료 또는 예방을 위한 항암제 및/또는 면역조절제로서 많은 약학적 적용에 사용될 수 있다. 본 개시물은 또한 여기에 기술된 융합 폴리펩타이드를 제조하는 방법 및 그러한 융합 폴리펩타이드를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 개시물은 또한 그러한 융합 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 분자 및 그러한 융합 폴리펩타이드 및 핵산 분자의 생성 방법에 관한 것이다. 또한, 본 출원은 하나 이상의 그러한 융합 폴리펩타이드를 포함하는 조성물뿐만 아니라 그러한 융합 폴리펩타이드의 치료적 및/또는 진단적 용도를 개시한다.

대표도

(52) CPC특허분류

C07K 16/2878 (2013.01)

C07K 16/32 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

C07K 2319/33 (2013.01)

(72) 발명자

로테, 크리스틴

독일 다하우 85221 하인리히-니콜라우스-슈트라쎈
26

울월, 쉘인

독일 프라이징 85354 암 발트랜드 23에이

솔로서, 코리나

독일 프라이징 85354 양거슈트라쎈 18씨

명세서

청구범위

청구항 1

적어도 두 개의 서브유닛을 포함하고, 제1 서브유닛은 CD137에 특이적이고, 제2 서브유닛은 GPC3에 특이적이며, 제1 서브유닛은 SEQ ID NOs: 18-33로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 CD137에 대해 결합 특이도를 갖는 리포칼린 뮤테인을 포함하고, 제2 서브유닛은 SEQ ID NOs: 4-17로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 GPC3에 대해 결합 특이도를 갖는 리포칼린 뮤테인을 포함하는 CD137 및 글리피칸-3(GPC3) 둘 다와 결합할 수 있는 융합 폴리펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서,

융합 폴리펩타이드는 5 nM 이하의 K_D 의 친화도로 CD137에 결합할 수 있고, 및/또는 융합 폴리펩타이드는 5 nM 이하의 K_D 의 친화도로 GPC3에 결합할 수 있는 융합 폴리펩타이드.

청구항 3

제1항에 있어서,

융합 폴리펩타이드는 CD137 및 GPC3에 동시에 결합할 수 있는 융합 폴리펩타이드.

청구항 4

제1항에 있어서,

융합 폴리펩타이드는 T-세포 반응을 보조-자극할 수 있고, T-세포의 자극의 존재에서 IL-2 생산을 유도할 수 있으며, 및/또는 표적 세포 상의 GPC3 존재에 의존하는 방식으로 T-세포 활성화를 보조-자극할 수 있는 융합 폴리펩타이드.

청구항 5

제1항에 있어서,

하나의 서브유닛은 $(Gly_4Ser)_3$, SEQ ID NO: 48 또는 SEQ ID NO: 49로부터 선택된 펩타이드 링커를 통해 다른 서브유닛에 연결되는 융합 폴리펩타이드.

청구항 6

제1항에 있어서,

융합 폴리펩타이드는 SEQ ID NOs: 36 및 37에서 나타난 아미노산 서열, SEQ ID NOs: 38 및 39에서 나타난 아미노산 서열, SEQ ID NOs: 40 및 41에서 나타난 아미노산 서열, SEQ ID NOs: 42 및 43에서 나타난 아미노산 서열, SEQ ID NO: 44에서 나타난 아미노산 서열, SEQ ID NO: 45에서 나타난 아미노산 서열, SEQ ID NO: 46에서 나타난 아미노산 서열, SEQ ID NO: 47에서 나타난 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NOs: 53 및 54에서 나타난 아미노산 서열을 포함하는 융합 폴리펩타이드.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 융합 폴리펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자.

청구항 8

융합 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산으로부터 출발하여 생산되는 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 융합 폴리펩

타이드의 인 비트로 생산방법.

청구항 9

CD137의 다운스트림 신호전달 경로를 활성화하고 동시에 GPC3-양성 종양 세포에 결합하기 위한 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 융합 폴리펩타이드를 포함하는 암의 예방, 개선 또는 치료를 위한 제제.

청구항 10

T 세포를 보조-자극하고 동시에 GPC3-양성 종양 세포에 결합하는 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 융합 폴리펩타이드를 포함하는 암의 예방, 개선 또는 치료를 위한 제제.

청구항 11

T 림프구 증식을 유도하고 동시에 GPC3-양성 종양 세포에 결합하는 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 융합 폴리펩타이드를 포함하는 암의 예방, 개선 또는 치료를 위한 제제.

청구항 12

CD137 클러스터링-유도된 활성화 된 T 세포를 GPC3-양성 종양 세포로 유도하는 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 융합 폴리펩타이드를 포함하는 암의 예방, 개선 또는 치료를 위한 제제.

청구항 13

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 융합 폴리펩타이드를 포함하는 암의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학적 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

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

- [0001] 글리피칸-3(Glypican-3, GPC3)은 글리코실-포스파티딜이노시톨이 고정된 헤파린 설페이트 프로테오글리칸(glycosyl-phosphatidylinositol-anchored heparin sulfate proteoglycans)의 글리피칸 패밀리에 속하는 종양 태아성 항원(oncofetal antigen)이다. GPC3는 발생 동안 태아 간 및 태반에서 발현되고 정상 성인 조직에서 하향-조절되거나 침묵된다. GPC3 유전자에서 돌연변이 및 고같은 인간의 Simpson-Golabi-Behmel 또는 심슨 변형장애 증후군의 원인이 된다. GPC3는 다양한 암 그리고 특히 간세포 암종("HCC"), 흑색종, 메르켈 세포 암종, 윌름스 종양 및 간모세포종에서 발현된다(He, H. et al Applied Immunohistochem Mol Morphol. 17:40-6 (2009); Jakubovic and Jothy; Ex. MoI. Path. 82:184-189 (2007); Nakatsura and Nishimura, Biodrugs 19(2):71-77 (2005)). HCC는 전 세계적으로 암 관련 사망의 세 번째 주요 원인이다. HCC는 매년 약 백만 명이 사망한다(Nakatsura and Nishimura, Biodrugs 19(2):71-77 (2005)).
- [0002] HCC와 같은 GPC3 발현 암들에 대한 효과적인 치료는 GPC3를 표적으로 하고 또한 항-종양 효과를 생산하는 치료 화합물을 필요로 한다.
- [0003] CD137은 보조-자극 면역 수용체이며 종양 괴사 인자 수용체(tumor necrosis factor receptor, TNFR) 슈퍼 패밀리의 구성원이다. 주로 활성화된 CD4+T 및 CD8+T 세포, 활성화된 B 세포 및 자연살해(NK) 세포에서 발현되거나 휴지기 단핵세포 및 수지상세포(Li, S. Y. et al., Clin Pharmacol 2013 5(Suppl 1):47-53) 또는 내피세포(Snell, L. M. et al., Immunol Rev 2011 Nov; 244(1):197-217)에서도 발견될 수 있다. CD137은 면역 반응 조절에 중요한 역할을 담당하므로 암 면역요법의 표적이 된다. CD137 리간드(CD137L)는 CD137의 유일하게 알려진 천연 리간드이며, 활성화된 B 세포, 단핵세포 및 비장의 수지상세포와 같은 몇 가지 유형의 APC에서 구성 요소로서 발현되며, T 림프구에서 유도될 수 있다.

- [0004] CD137L은 멤브레인 결합 형태 그리고 가용성 변이체로 존재하는 삼량체 단백질이다. 그러나 가용성 CD137L이 CD137을 활성화하는 능력은 예를 들어, CD137 발현 림프구에 한정되며, 효과를 유도하기 위해서는 큰 농도가 요구된다(Wyzgol, A. et al., J Immunol 2009 Aug 1; 183(3):1851-1861). 자연적으로 CD137을 활성화하는 방식은 CD137-양성 세포와 CD137L-양성 세포를 결합시키는 것이다. 곧이어, CD137 활성화는 TRAF1, 2 및 3을 통한 신호 전달(Snell, L. M. et al., Immunol Rev 2011 Nov; 244(1):197-217, Yao, S. et al., Nat Rev Drug Disc 2013 Feb; 12(2):130-146) 및 CD137 양성 T 세포에서 추가적인 동반 후속 효과들을 유도하여 대립 세포 상에서 CD137L를 통한 클러스터링에 의해 유도되는 것으로 생각된다. 그들의 각각의 동족 표적을 인식함으로써 활성화된 T-세포의 경우, CD137의 보조자극에 의해 유도된 효과들은 더욱 향상된 활성화, 향상된 생존 및 증식, 전-염증성 사이토카인의 생산 및 개선된 살상 능력이다.
- [0005] 암세포의 제거를 위한 CD137 보조자극의 이점은 여러 가지 전임상 인-비보 모델에서 입증되었다. 예를 들어, 종양에 대한 CD137L의 강제 발현은 종양 거부를 유도한다(Melero, I. et al., Eur J Immunol 1998 Mar; 28(3):1116-1121). 마찬가지로, 종양에 대한 항-CD137 scFv의 강제 발현은 종양의 CD4⁺ T-세포 및 NK-세포 의존적 제거를 초래한다(Ye, Z. et al., Nat Med 2002 Apr; 8(4):343-348, Zhang, H. et al., Mol Canc Ther 2006 Jan; 5(1):149-155, Yang, Y. et al., Canc Res 2007 Mar 1; 67(5):2339-2344). 전신 투여된 항-CD137 항체 역시 종양 성장의 지연을 초래하는 것으로 입증되었다(Martinet, O. et al., Gene Ther 2002 Jun; 9(12):786-792).
- [0006] CD137은 인간 종양에서 자연적으로 발생하는 종양-반응성 T 세포에 대한 우수한 마커이며(Ye, Q. et al., Clin Canc Res: 2014 Jan 1; 20(1):44-55), 항-CD137 항체들은 임상 T-세포 요법에 적용하기 위한 CD8⁺ 흑색종 종양 침윤 림프구의 확장 및 활성을 개선하는데 사용될 수 있음이 밝혀졌다(Chacon, J. A. et al., PloS One 2013 8(4):e60031).
- [0007] CD137 보조자극의 잠재적 치료 이점에 대한 전임상 입증은 CD137, BMS-663513(Jure-Kunkel, M. et al., 미국특허 제7288638호) 및 PF-05082566(Fisher, T. S. et al., Canc Immunol Immunother 2012 Oct; 61(10):1721-1733)를 표적으로 하는 치료 항체들의 개발을 촉진시켰다; 둘 다 현재 초기 임상 시험 중이다.
- [0008] 그러나 항체와 같은 2가 CD137-바인더는 그 자체로 T-세포 또는 NK-세포 상에 CD137을 클러스터링하기에 충분하지 않고, 활성이 결여된 3가의 가용성 CD137L과 유사하게 효율적인 활성화를 유도한다는 것이 최근에서야 평가되었다. 전임상 마우스 모델을 이용한 최근 간행물들에서, 다른 항-TNFR 항체들의 작용 방식이 사실상 Fc-감마-수용체 발현 세포 상에서 Fc-감마 수용체들과 그들의 Fc-부분을 통한 항체들의 상호작용을 필요로 한다는 생체 내 증거가 제시되었다(Bulliard, Y. et al., J Exp Med 2013 Aug 26; 210(9):1685-1693, Bulliard, Y. et al., Immunol Cell Biol 2014 Jul; 92(6):475-480). 따라서 현재 임상 개발 중인 항체들의 작용 방식은 종양 부근의 Fc-γ-발현 세포의 존재에 거의 무작위적으로 의존할 수 있는 Fc-감마 수용체들을 통한 비-표적화된 클러스터링이 지배적일 수 있다.
- [0009] 따라서, 특정 종양을 표적으로 하는 작용 방식으로 CD137을 클러스터링하고 활성화하는 치료제의 생성에 대한 충족되지 않은 요구가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

- [0010] 이러한 충족되지 않은 요구를 충족하기 위해, 본 출원은 다음 특성들이 있는 융합 폴리펩타이드를 통해 CD137 및 종양 항원 GPC3를 동시에 결합시키는 신규한 접근법을 제공한다:
- [0011] (a) CD137에 대한 결합 특이도; 및
- [0012] (b) GPC3에 대한 결합 특이도
- [0013] 이 융합 폴리펩타이드는 종양 세포에서 발현되는 GPC3를 통해 림프구에서 CD137의 종양-표적-의존적 활성화를 제공하도록 설계된다. 그러한 분자는 GPC3 양성 종양 근처에 위치한 T 세포 및/또는 NK 세포를 추가로 활성화할

것으로 기대된다. 그러한 이중특이성은 항-GPC3 또는 항-CD137 항체들보다 개선된 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[0014] **정의**

[0015] 다음 목록은 본 명세서 전반에 사용된 용어, 문구 및 약어를 정의한다. 여기에서 나열되고 정의된 모든 용어는 모든 문법적 형태를 포함하고자 한다.

[0016] 여기에 사용된 바와 같이, 달리 명시하지 않는 한, "CD137"은 인간 CD137을 의미하며, 인간 CD137의 변이체, 이성질체 및 중 상동체들을 포함한다. CD137은 "4-1BB" 또는 "tumor necrosis factor receptor superfamily member 9(TNFRSF9)" 또는 "induced by lymphocyte activation(ILA)"라고도 한다. 인간 CD137은 UniProt Q07011에 정의된 전장 단백질, 이의 단편 또는 이의 변이체를 의미한다.

[0017] 여기에 사용된 바와 같이, 달리 명시하지 않는 한, "GPC3"는 인간 GPC3를 의미하고, 인간 GPC3의 변이체, 이성질체 및 중 상동체들을 포함한다. GPC3는 "Glypican-3", "glypican proteoglycan 3", "GPC3", "OTTHUMP00000062492", "GTR2-2" "SGB", "DGSX", "SDYS", "SGBS", "OCI-5" 및 "SGBS1"라고도 하며, 상호교환적으로 사용된다. 인간 GPC3는 UniProt P51654에 정의된 전장 단백질, 이의 단편 또는 이의 변이체를 의미한다. 여기에 사용된 바와 같이, "검출 가능한 친화도"는 일반적으로 적어도 약 10^{-5} M 이하의 친화도 상수로 선택된 표적에 결합하는 능력을 의미한다. 낮은 친화도는 일반적으로 ELISA와 같은 일반적인 방법들로는 더는 측정할 수 없어 2차적으로 중요하다.

[0018] 여기에 사용된 바와 같이, 선택된 표적(이 경우, CD137 및/또는 GPC3)에 대한 본 개시물의 단백질(예를 들어, 리포칼린의 뮤테인) 또는 이의 융합 폴리펩타이드의 "결합 친화도"는 당업자에게 공지된 다수의 방법에 의해 측정될 수 있다(따라서, 뮤테인-리간드 복합체의 KD 값이 측정됨). 그러한 방법들은 형광 적정, 경쟁적 ELISA, 등온 적정 열량계(ITC)와 같은 열량 측정 방법들 그리고 표면 플라즈몬 공명(BIAcore)을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 그러한 방법들은 당업계에 잘 확립되어 있으며, 이의 예시들 역시 아래 구체적으로 기재되어 있다.

[0019] 또한, 각각의 바인더 및 그의 리간드 간의 복합체 형성은 각각의 결합 파트너의 농도, 경쟁자의 존재, pH 및 사용된 버퍼 시스템의 이온 강도 및 해리 상수 K_D 의 측정에 사용된 실험 방법(예를 들어, 형광 적정, 경쟁적 ELISA 또는 표면 플라즈몬 공명 등) 또는 심지어 실험 데이터의 평가에 사용되는 수학적 알고리즘과 같은 많은 상이한 인자들에 의해 영향을 받는다는 것을 특히 덧붙인다.

[0020] 따라서, K_D 값(각각의 바인더와 그의 표적/리간드 간에 형성된 복합체의 해리 상수)이 주어진 리간드에 대한 특정 리포칼린 뮤테인의 친화도를 측정하는데 사용되는 방법과 실험 설정에 의존하여 특정 실험 범위 내에서 변할 수 있음은 숙련된 자에게 역시 명백하다. 이는 K_D 값이 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명(Biacore), 경쟁적 ELISA 또는 직접 ELISA에 의해 측정되는지에 따라 측정된 K_D 값 또는 저항 범위에서 약간의 오차가 있을 수 있음을 의미한다.

[0021] 여기에 사용된 바와 같이, "뮤테인", "돌연변이 된" 존재(단백질 또는 핵산인지 여부), 또는 "돌연변이체"는 자연적으로 발생하는(야생형) 핵산 또는 단백질 "레퍼런스" 스캐폴드와 비교하여 하나 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 교환, 결실 또는 삽입을 의미한다. 상기 용어는 또한 여기에 기술된 바와 같이 뮤테인의 단편들 및 변이체들을 포함한다. 본 발명의 리포칼린 뮤테인, 이의 단편 또는 변이체들은 바람직하게는 여기에 기술된 바와 같이 CD137 및/또는 GPC3에 결합하는 기능을 보유한다.

[0022] 여기에 사용된 용어 "단편"은 본 개시물의 뮤테인과 관련하여 N-말단 및/또는 C-말단이 짧아진 즉, N-말단 및/또는 C-말단 아미노산 중 적어도 하나가 결핍된 전장의 성숙한 인간 눈물 리포칼린 또는 인간 리포칼린 2로부터 유래된 단백질 또는 펩타이드에 관한 것이다. 그러한 단편들은 성숙한 리포칼린의 1차 서열의 적어도 10개, 20개 또는 30개 이상의 연속적인 아미노산을 포함할 수 있고, 보통 성숙한 리포칼린의 면역분석법으로 검출할 수 있다. 일반적으로, 본 개시물의 리포칼린 뮤테인 또는 본 개시물에 따른 조합 또는 여기에 기술된 융합 단백질의 대응하는 단백질 리간드 CD137 및/또는 GPC3와 관련하여 여기에 기재된 용어 "단편"은 본 개시물에 따른 뮤테인에 의해 인식되거나 및/또는 결합되는 전장 리간드의 능력을 보유하는 N-말단 및/또는 C-말단이 짧아진 단백질 또는 펩타이드 리간드에 관한 것이다.

[0023] 여기에 사용된 용어 "돌연변이 유발"은 성숙한 리포칼린의 주어진 서열 위치에서 자연적으로 발생하는 아미노산이 각각의 천연 폴리펩타이드 서열에서 이 특정 위치에는 존재하지 않은 적어도 하나의 아미노산에 의해 치환될 수 있도록 실험 조건이 선택된다는 것을 의미한다. 용어 "돌연변이 유발"은 하나 이상의 아미노산의 결실 또는

삽입에 의해 서열 세그먼트의 길이의 (부가적인) 변형 역시 포함한다. 따라서, 예를 들어, 선택된 서열 위치에서 하나의 아미노산이 3개의 무작위 돌연변이의 스트레치로 대체되어 야생형 단백질의 각 세그먼트의 길이와 비교하여 2개의 아미노산 잔기의 삽입을 유도하는 것은 본 개시물의 범주에 내에 있다. 그러한 삽입 또는 결실은 본 개시물에서 돌연변이 유발에 적용될 수 있는 임의의 펩타이드 세그먼트에서 서로 독립적으로 도입될 수 있다. 본 개시물의 하나의 예시적인 구현예에서, 선택된 리포칼린 스캐폴드의 루프 AB에 몇 가지 돌연변이의 삽입이 도입될 수 있다(참고. 국제특허출원 제W02005/019256호, 여기에 그 전체가 참고로 포함됨).

[0024] 용어 "무작위 돌연변이 유발"은 특정 서열 위치에서 미리 결정된 단일 아미노산(돌연변이)이 존재하지 않지만 돌연변이 유발 동안 내장된 서열 위치에서 적어도 두 개의 아미노산이 특정 확률로 포함될 수 있음을 의미한다.

[0025] "동일성"은 그들의 유사성 또는 관계를 측정하는 서열의 특성이다. 본 개시물에 사용된 용어 "서열 동일성" 또는 "동일성"은 본 개시물의 폴리펩타이드의 서열을 문제의 서열과 (대응하는) 정렬 후 이들 두 서열 중 더 긴 부분에 있는 잔기의 수와 관련하여 쌍으로 동일한 잔기들의 비율을 의미한다. 서열 동일성은 동일한 아미노산 잔기의 수를 총 잔기의 수로 나누고 생성물에 100을 곱하여 측정한다.

[0026] 용어 "상동성"은 여기에서 그것의 통상적인 의미로 사용되며, 본 개시물의 폴리펩타이드의 선형 아미노산 서열 (예를 들어, 본 개시물의 임의의 리포칼린 뮤테인)에서 동등한 위치에서 보존적 치환(예를 들어, 글루타메이트 잔기가 아스파테이트 잔기로 교환)으로 간주되는 아미노산뿐만 아니라 동일한 아미노산을 포함한다.

[0027] 서열 상동성 또는 서열 동일성의 비율은 여기에서 예를 들어, BLASTP 프로그램, version blastp 2.2.5를 사용하여 측정될 수 있다(November 16, 2002; cf. Altschul, S. F. et al. (1997) *Nucl. Acids Res.* 25, 3389-3402). 이 구현예에서, 상동성의 비율은 바람직하게는 야생형 단백질 스캐폴드를 쌍 비교에서 레퍼런스로 사용하여 폴리펩타이드 서열을 포함하는 전체 폴리펩타이드 서열의 정렬(매트릭스: BLOSUM 62; 갭 코스트: 11.1; 컷 오프 값은 10^{-3} 로 설정)에 기초한다. BLASTP 프로그램 결과를 정렬을 위해 프로그램에서 선택된 아미노산의 총수로 나눈 값으로 표시되는 "양"의 수(일치하는 아미노산)의 백분율로 계산된다.

[0028] 특히 야생형 리포칼린과 상이한 리포칼린(뮤테인)의 아미노산 서열의 아미노산 잔기가 야생형 리포칼린의 아미노산 서열에서 특정 위치에 대응하는지를 측정하기 위해, 숙련된 기술자는 당업계에 널리 공지된 수단과 방법들, 예를 들어, 수동으로 또는 Basic Local Alignment Search Tool 또는 ClustalW를 나타내는 BLAST2.0 또는 서열 정렬을 생성하기에 적합한 임의의 다른 적합한 프로그램과 같은 컴퓨터 프로그램을 이용한 정렬을 사용할 수 있다. 따라서, 야생형 리포칼린은 "대상 서열" 또는 "레퍼런스 서열"로 제공할 수 있고, 여기에 기술된 야생형 리포칼린과 상이한 리포칼린의 아미노산 서열은 "질의 서열"로 제공한다. 용어 "레퍼런스 서열" 및 "야생형 서열"은 여기에서 상호교환적으로 사용된다. 바람직한 야생형 리포칼린은 각각 SEQ ID NO: 1(T1c) 또는 SEQ ID NO: 2(NGAL)에 제시되어 있다. 본 발명의 리포칼린 뮤테인이 각각 T1c 또는 NGAL에 기초하는지에 따라 대응하는 야생형 리포칼린의 레퍼런스 서열 또는 야생형 서열로 사용될 수 있다.

[0029] "갭"은 아미노산의 첨가 또는 결실의 결과인 정렬에서 공백이다. 따라서, 정확하게 동일한 서열의 두 개의 복제물은 100% 동일성을 갖지만, 덜 고도로 보존되고 결실, 첨가 또는 대체를 가진 서열은 더 낮은 정도의 서열 동일성을 가질 수 있다. 당업자는 몇몇 컴퓨터 프로그램들을 표준 파라미터를 사용한 서열 동일성 측정에 이용할 수 있음을 인식할 것이다. 예를 들어, Blast(Altschul, et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402), Blast2(Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215, 403-410) 및 Smith-Waterman(Smith, et al. (1981) *J. Mol. Biol.* 147, 195-197).

[0030] 본 개시물에 사용된 용어 "변이체"는 예를 들어, 치환, 결실, 삽입 또는 화학적 변형에 의한 아미노산 서열의 변형을 포함하는 단백질 또는 펩타이드의 유도체들 관한 것이다. 그러한 변형은 일부 구현예들에서, 단백질 또는 펩타이드의 기능을 감소시키지 않는다. 그러한 변이체들은 하나 이상의 아미노산이 그들의 각각의 D-입체 이성질체에 의해 대체되거나, 자연적으로 발생하는 20개의 아미노산 이외의 아미노산들, 예를 들어, 오르니틴, 하이드록시프롤린, 시트룰린, 호모세린, 하이드록시라이신, 노르발린에 의해 대체된 단백질들을 포함한다. 그러나 그러한 치환들 역시 보존적일 수도 있는데, 즉, 아미노산 잔기가 화학적으로 유사한 아미노산 잔기로 대체된다. 보존적 치환들의 예는 다음 그룹의 구성원 간의 교체이다: 1) 알라닌, 세린 및 트레오닌; 2) 아스파르트산 및 글루탐산; 3) 아스파라긴 및 글루타민; 4) 아르기닌 및 라이신; 5) 이소루신, 루신, 메티오닌 및 발린; 및 6) 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판. 여기에 사용된 바와 같이, 용어 "변이체"는 본 개시물의 리포칼린 뮤테인 또는 본 개시물에 따른 조합 또는 여기에 기술된 융합 단백질의 대응하는 단백질 리간드 CD137 및/또는 GPC3와 관련하여, 여기에 기술된 바와 같이 UniProt에 기탁된 CD137 또는 GPC3 레퍼런스 단백질과 같은 야생형 CD137 또는 GPC3와 각각 비교하여 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50,

60, 70, 80 이상의 아미노산 치환, 결실 및/또는 삽입과 같이 하나 이상을 갖는 각각 CD137 또는 이의 단편에 관한 것이다. CD137 변이체 각각은 바람직하게는 여기에 기술된 바와 같이 UniProt에 기탁된 CD137 또는 GPC3 레퍼런스 단백질과 같은 야생형 인간 CD137 또는 GPC3와 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95%의 아미노산 동일성을 가진다.

[0031] "네이티브 서열"에 의한 리포칼린은 자연에서 유래된 대응하는 폴리펩타이드와 동일한 아미노산 서열을 갖는 리포칼린을 의미한다. 따라서, 네이티브 서열 리포칼린은 임의의 유기체, 특히 포유동물에서 유래된 각각의 자연적으로-발생하는 리포칼린의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 그러한 네이티브 서열 폴리펩타이드는 자연에서 분리되거나 재조합 또는 합성 수단에 의해 생산될 수 있다. 용어 "네이티브 서열" 폴리펩타이드는 특히 리포칼린의 자연적으로-발생하는 절단되거나 분비된 형태, 그 대신에 접합된(spliced) 형태와 같은 자연적으로-발생하는 변이체 형태 및 리포칼린의 자연적으로-발생하는 대립형질 변이체들을 포함한다. 폴리펩타이드 "변이체"는 네이티브 서열 폴리펩타이드와 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 적어도 약 85% 아미노산 서열 동일성을 갖는 생물학적으로 활성이 있는 폴리펩타이드를 의미한다. 그러한 변이체들은, 예를 들어, 하나 이상의 아미노산 잔기가 폴리펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 첨가 또는 결실된 폴리펩타이드를 포함한다. 일반적으로, 변이체는 네이티브 서열 폴리펩타이드와 적어도 약 80%, 예를 들어, 적어도 약 85% 아미노산 서열 동일성, 적어도 약 90% 아미노산 서열 동일성 또는 적어도 약 95% 아미노산 서열 동일성을 포함하여 적어도 약 70%의 아미노산 서열 동일성을 갖는다. 예시적인 예로서, 첫 번째 4개의 N-말단 아미노산 잔기들(His-His-Leu-Leu) 및 마지막 2개의 C-말단 아미노산 잔기들(Ser-Asp)은 단백질의 생물학적 기능에 영향을 주지 않으면서 본 개시물의 뉴클레오타이드(Tlc) 뮤테인에서 결실될 수 있다. 또한, 다른 예시적인 예로서, 특정 아미노산 잔기들이 단백질의 생물학적 기능에 영향을 주지 않으면서 본 개시물의 리포칼린 2(NGAL) 뮤테인에서 결실될 수 있다(예를 들어, Lys-Asp-Pro, 위치 46-48).

[0032] 본 개시물에 따라 사용될 때, 용어 "위치"는 여기에 묘사된 아미노산 서열 내 아미노산 또는 여기에 묘사된 핵산 서열 내 뉴클레오타이드의 위치를 의미한다. 하나 이상의 리포칼린 뮤테인의 아미노산 서열 위치와 관련하여 여기에 사용된 용어 "대응하다" 또는 "대응하는"을 이해하기 위해, 대응하는 위치는 선행하는 뉴클레오타이드/아미노산의 수로만 측정되는 것은 아니다. 따라서, 치환될 수 있는 본 개시물에 따른 주어진 아미노산의 위치는 (돌연변이 또는 야생형) 리포칼린의 다른 곳에서 아미노산의 결실 또는 첨가로 인해 다양할 수 있다. 유사하게, 치환될 수 있는 본 개시물에 따른 주어진 뉴클레오타이드의 위치는 프로모터 및/또는 임의의 다른 조절 서열 또는 유전자(엑손과 인트론을 포함하여)를 포함하여 뮤테인 또는 야생형 리포칼린 5'-비번역 영역(UTR)의 다른 곳에서 결실 또는 추가 뉴클레오타이드로 인해 다양할 수 있다.

[0033] 따라서, 본 개시물에 따른 대응하는 위치의 경우, 뉴클레오타이드/아미노산의 위치가 유사한 이웃하는 뉴클레오타이드/아미노산보다 표시된 수가 다를 수 있지만, 교환, 결실 또는 첨가될 수 있는 상기 이웃하는 뉴클레오타이드/아미노산 또한 하나 이상의 대응하는 위치에 포함된다.

[0034] 또한, 본 개시물에 따른 레퍼런스 스캐폴드에 기초한 리포칼린 뮤테인의 대응하는 위치의 경우, 리포칼린 중 매우-보존된 전체 폴딩 패턴에 비추어 당업자에 의해 인식되는 바와 같이, 표시된 수가 다를지라도, 뉴클레오타이드/아미노산의 위치는 (돌연변이 또는 야생형) 리포칼린의 다른 위치에 구조적으로 대응하는 것으로 이해하는 것이 바람직하다.

[0035] 여기에 사용된 단어 "검출하다", "검출", "검출 가능한" 또는 "검출하는"은 정량적 및 정성적 수준 둘 다, 그리고 이의 조합으로 이해된다. 따라서, 이것은 관심 있는 분자의 정량적, 반-정량적 및 정성적 측정을 포함한다.

[0036] "대상체"는 척추동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간이다. 용어 "포유동물"은 여기에서 포유동물로 분류된 임의의 동물을 지칭하는데 사용되며, 단지 몇 가지 예시적 예를 들자면, 인간, 가정용 및 농가의 동물 및 동물원, 스포츠 또는 애완동물, 예를 들어, 양, 개, 말, 고양이, 소, 생쥐, 돼지, 유인원, 예를 들어 필리핀 원숭이 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 바람직하게는, 여기에서 포유동물은 인간이다.

[0037] "유효량"은 유익하거나 바람직한 결과를 얻기에 충분한 양이다. 유효량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다.

[0038] "시료"는 임의의 대상체에서 얻은 생물학적 시료로 정의된다. 생물학적 시료는 혈액, 혈청, 소변, 대변, 정액 또는 조직을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0039] 여기에 개시된 융합 폴리펩타이드의 "서브유닛"은 폴리펩타이드의 아미노산의 스트레치로 정의되며, 스트레치는 표적을 향하여 결합 모티프를 제공하는 것과 같은 상기 폴리펩타이드의 독특한 기능 유닛을 말한다.

[0040] 여기에 기술된 "융합 폴리펩타이드"는 둘 이상의 서브유닛을 포함하고, 이들 서브유닛 중 적어도 하나는 GPC3에

결합하고 추가의 서브유닛은 CD137에 결합한다. 융합 폴리펩타이드 내에서, 이들 서브유닛은 공유 또는 비-공유 결합으로 연결될 수 있다. 바람직하게는, 융합 폴리펩타이드는 둘 이상의 서브유닛 간의 번역 융합이다. 번역 융합은 추가의 서브유닛의 코딩 서열과 프레임 내 하나의 서브유닛에 대한 코딩 서열을 유전자 조작하여 생성될 수 있다. 서브유닛 둘 다 링커를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 배치될 수 있다. 그러나 본 개시물의 융합 폴리펩타이드의 서브유닛은 화학적 링커에 의해서도 연결될 수도 있다.

[0041]

본 개시물의 융합 폴리펩타이드에 의해 포함될 수 있는 "링커"는 여기에 기술된 융합 폴리펩타이드의 둘 이상의 서브유닛을 연결한다. 결합은 공유 또는 비-공유결합일 수 있다. 바람직한 공유결합은 아미노산 간의 펩타이드 결합과 같은 펩타이드 결합에 의한 것이다. 따라서, 바람직한 구현예에서, 상기 링커는 하나 이상의 아미노산, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 이상의 아미노산을 포함한다. 바람직한 링커들은 여기에 기술되어 있다. 다른 바람직한 링커는 화학적 링커들이다.

도면의 간단한 설명

[0042]

도 1은 표적 GPC3 및 CD137과 관련하여 이중특이적인 본 출원에서 기술된 융합 폴리펩타이드의 디자인에 대한 개요를 제공한다. 세 가지 접근법이 사용되었다: 도 1(A)에서 융합 폴리펩타이드의 제1세트는 CD137에 특이적인 항체(예를 들어, SEQ ID NOs: 34 및 35의 항체) 및 GPC3에 특이적인 리포칼린 뮤테인(예를 들어, SEQ ID NO: 10의 리포칼린 뮤테인)에 기초한다. 생성된 폴리펩타이드는 항체의 네 개의 말단 중 어느 하나에 대한 리포칼린 뮤테인의 단일 융합이다. 모든 융합은 그러한 신축성 (G4S)₃ 링커(예를 들어, SEQ ID NO: 49의 링커)와 같은 링커에 의해 연결된다; 도 1(B)에서, 융합 폴리펩타이드의 제2세트는 조작된 IgG4-Fc 단편(SEQ ID NO: 73)에 융합된 두 개의 리포칼린 뮤테인(예를 들어, SEQ ID NO: 10의 GPC3-특이 리포칼린 뮤테인 및 SEQ ID NO: 26의 CD137-특이 리포칼린 뮤테인)에 기초한다; 그리고, 도 1(C)에서, 융합 단백질의 제3세트는 (G4S)₂ 링커(예를 들어, SEQ ID NO: 48의 링커)와 같은 하나 이상의 링커에 의해 연결된 두 개의 리포칼린 뮤테인(예를 들어, SEQ ID NO: 10 및 SEQ ID NO: 26)에 기초하며, 그로 인해 GPC3-특이 리포칼린 뮤테인은 CD137-특이 리포칼린 뮤테인(예를 들어, SEQ ID NO: 46)에 융합되거나, GPC3-특이 리포칼린 뮤테인과 두 개의 CD137-특이 리포칼린 뮤테인이 서로 융합된다(예를 들어, SEQ ID NO: 47로).

도 2는 SEQ ID NOs: 36 및 37, SEQ ID NOs: 38 및 39, SEQ ID NOs: 40 및 41 그리고 SEQ ID NOs: 42 및 43의 융합 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO: 10의 리포칼린 뮤테인의 표적 GPC3에 대한 특이도를 측정한 대표 실험을 제공한다. GPC3를 마이크로타이터 플레이트 상에 코팅하고, 시험 물질을 적정하였다. 결합된 물질은 실시예 2에 기술된 바와 같이 HRP-표지된 항-인간 NGAL-특이 항체를 통해 검출하였다. EC₅₀ 값, 자유 파라미터로서의 최대 시그널 및 1로 고정된 기울기를 갖는 1:1 결합 모델을 사용하여 데이터를 조정하였다. 생성된 EC₅₀ 값은 표 1에 제공된다.

도 3은 SEQ ID NOs: 36 및 37, SEQ ID NOs: 38 및 39, SEQ ID NOs: 40 및 41의 융합 폴리펩타이드 및 SEQ ID NOs: 34 및 35의 항체의 표적 CD137에 대한 특이도를 측정한 대표 실험을 제공한다. 인간 CD137의 Fc-융합을 마이크로타이터 플레이트 상에 코팅하고, 시험 물질을 적정하였다. 결합된 물질은 실시예 3에 기술된 바와 같이 dHRP-표지된 항-인간 IgG Fc 항체를 통해 검출하였다. EC₅₀ 값, 자유 파라미터로서의 최대 시그널 및 1로 고정된 기울기를 갖는 1:1 결합 모델을 사용하여 데이터를 조정하였다. 생성된 EC₅₀ 값은 표 2에 제공된다.

도 4는 표적 GPC3 및 CD137 둘 다에 동시에 결합하는 SEQ ID NOs: 36 및 37, SEQ ID NOs: 38 및 39, SEQ ID NOs: 40 및 41의 융합 폴리펩타이드의 능력을 측정한 대표 실험을 제공한다. 재조합 CD137-Fc 융합 단백질을 마이크로타이터 플레이트 상에 코팅하고, 이어서 융합 단백질의 적정을 수행하였다. 이후에, 일정 농도의 비오틴화 된 인간 GPC3를 첨가하였고, 실시예 4에 기술된 바와 같이 HRP-표지된 엑스트라비딘을 통해 검출하였다. EC₅₀ 값, 자유 파라미터로서의 최대 시그널 및 1로 고정된 기울기를 갖는 1:1 결합 모델을 사용하여 데이터를 조정하였다. 생성된 EC₅₀ 값은 표 3에 제공된다.

도 5는 SEQ ID NOs: 36 및 37, SEQ ID NOs: 38 및 39, SEQ ID NOs: 40 및 41의 융합 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO: 10의 리포칼린 뮤테인의 표적 GPC3에 대한 친화도를 표면 플라즈몬 공명을 통해 측정한 대표 실험을 제공한다. 비오틴화 된 GPC3를 센서 칩 상에 고정하고, 융합 폴리펩타이드 및 리포칼린 뮤테인의 결합은 실시예 5에 기술된 바와 같이 농도별로 분석하였다. 생성된 K_D 값은 표 4에 제공된다.

도 6은 SEQ ID NOs: 36 및 37, SEQ ID NOs: 38 및 39, SEQ ID NOs: 40 및 41의 융합 폴리펩타이드 및 SEQ ID NOs: 34 및 35의 항체의 비오틴화 된 CD137-Fc 융합에 대한 친화도를 표면 플라즈몬 공명을 통해 측정한 대표 실험을 제공한다. 비오틴화 된 CD137-Fc를 센서 칩 상에 고정하고, 융합 단백질의 결합은 실시예 6에 기술된 바

와 같이 농도별로 분석하였다. 생성된 K_D 값은 표 5에 제공된다.

도 7은 SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45의 리포칼린 뮤테인-Fc 융합 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO: 10의 리포칼린 뮤테인의 표적 GPC3에 대한 특이도를 측정한 대표 실험을 제공한다. GPC3를 마이크로타이터 플레이트 상에 코팅하고, 시험 물질을 적정하였다. 결합된 물질은 실시예 7에 기술된 바와 같이 HRP-표지된 항-인간 NGAL-특이 항체를 통해 검출하였다. EC50 값, 자유 파라미터로서의 최대 시그널 및 1로 고정된 기울기를 갖는 1:1 결합 모델을 사용하여 데이터를 조정하였다. 생성된 EC50 값은 표 6에 제공된다.

도 8은 SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45의 리포칼린 뮤테인-Fc 융합 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO: 26의 리포칼린 뮤테인의 CD137에 대한 특이도를 측정한 대표 실험을 제공한다. 인간 CD137의 Fc-융합을 마이크로타이터 플레이트 상에 코팅하고, 시험 물질을 적정하였다. 결합된 물질은 실시예 8에 기술된 바와 같이 HRP-표지된 항-인간 IgG Fc 항체를 통해 검출하였다. EC50 값, 자유 파라미터로서의 최대 시그널 및 1로 고정된 기울기를 갖는 1:1 결합 모델을 사용하여 데이터를 조정하였다. 생성된 EC50 값은 표 7에 제공된다.

도 9는 표적 GPC3 및 CD137에 동시에 결합하는 SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45의 리포칼린 뮤테인-Fc 융합 폴리펩타이드의 능력을 측정한 대표 실험을 제공한다. 재조합 CD137-Fc 융합 단백질을 마이크로타이터 플레이트 상에 코팅하고, 이어서 리포칼린 뮤테인-Fc 융합 폴리펩타이드의 적정을 수행하였다. 이후에, 일정 농도의 비오틴화 된 인간 GPC3를 첨가하였고, 실시예 9에 기술된 바와 같이 HRP-표지된 엑스트라비딘을 통해 검출하였다. EC50 값, 자유 파라미터로서의 최대 시그널 및 1로 고정된 기울기를 갖는 1:1 결합 모델을 사용하여 데이터를 조정하였다. 생성된 EC50 값은 표 8에 제공된다.

도 10은 SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45의 리포칼린 뮤테인-Fc 융합 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO: 10의 리포칼린 뮤테인의 표적 GPC3에 대한 친화도를 표면 플라즈몬 공명을 통해 측정한 대표 실험을 제공한다. 비오틴화 된 GPC3를 센서 칩 상에 고정하고, 융합 폴리펩타이드 및 리포칼린 뮤테인의 결합은 농도별로 분석하였다. 생성된 K_D 값은 표 9에 제공된다.

도 11은 SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45의 리포칼린 뮤테인-Fc 융합 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO: 26의 리포칼린 뮤테인의 비오틴화 된 CD137-Fc에 대한 친화도를 표면 플라즈몬 공명을 통해 측정한 대표 실험을 제공한다. 비오틴화 된 CD137-Fc를 센서 칩 상에 고정하고 융합 폴리펩타이드 및 리포칼린 뮤테인의 결합은 농도별로 분석하였다. 생성된 K_D 값은 표 10에 제공된다.

도 12는 SEQ ID NOs: 53 및 54의 융합 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO: 10의 리포칼린 뮤테인의 표적 GPC3에 대한 특이도를 측정한 대표 실험을 제공한다. GPC3를 마이크로타이터 플레이트 상에 코팅하고 시험 물질을 적정하였다. 결합된 물질은 실시예 12에 기술된 바와 같이 HRP-표지된 항-인간 NGAL-특이 항체를 통해 검출하였다. EC50 값, 자유 파라미터로서의 최대 시그널 및 1로 고정된 기울기를 갖는 1:1 결합 모델을 사용하여 데이터를 조정하였다. 생성된 EC50 값은 표 11에 제공된다.

도 13은 표적 GPC3 및 CD137 둘 다에 동시에 결합하는 SEQ ID NOs: 53 및 54의 융합 폴리펩타이드의 능력을 측정한 대표 실험을 제공한다. 재조합 CD137-Fc 융합 단백질을 마이크로타이터 플레이트 상에 코팅하고, 이어서 융합 단백질의 적정을 수행하였다. 이후에, 일정 농도의 비오틴화 된 인간 GPC3를 첨가하였고, 실시예 13에 기술된 바와 같이 HRP-표지된 엑스트라비딘을 통해 검출하였다. EC50 값, 자유 파라미터로서의 최대 시그널 및 1로 고정된 기울기를 갖는 1:1 결합 모델을 사용하여 데이터를 조정하였다.

도 14는 SEQ ID NO: 46 및 SEQ ID NO: 47의 두 개의 이중특이적 융합 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO: 8의 리포칼린 뮤테인의 표적 GPC3에 대한 특이도를 측정한 대표 실험을 제공한다. GPC3를 마이크로타이터 플레이트 상에 코팅하고, 시험 물질을 적정하였다. 결합된 물질은 실시예 14에 기술된 바와 같이 HRP-표지된 인간 NGAL-특이 항체를 통해 검출하였다. EC50 값, 자유 파라미터로서의 최대 시그널 및 1로 고정된 기울기를 갖는 1:1 결합 모델을 사용하여 데이터를 조정하였다. 생성된 EC50 값은 표 12에 제공된다.

도 15는 SEQ ID NO: 46 및 SEQ ID NO: 47의 두 개의 이중특이적 융합 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO: 26의 리포칼린 뮤테인의 표적 CD137에 대한 특이도를 측정한 대표 실험을 제공한다. 인간 CD137의 Fc-융합을 마이크로타이터 플레이트 상에 코팅하고 시험 물질을 적정하였다. 결합된 물질은 실시예 15에 기술된 바와 같이 HRP-표지된 항-인간 IgG Fc 항체를 통해 검출하였다. EC50 값, 자유 파라미터로서의 최대 시그널 및 1로 고정된 기울기를 갖는 1:1 결합 모델을 사용하여 데이터를 조정하였다. 생성된 EC50 값은 표 13에 제공된다.

도 16은 표적 GPC3 및 CD137에 동시에 결합하는 SEQ ID NO: 46 및 SEQ ID NO: 47의 두 개의 이중특이적 융합

폴리펩타이드의 능력을 측정한 대표 실험을 제공한다. 재조합 CD137-Fc 융합 단백질을 마이크로타이터 플레이트 상에 코팅하고, 이어서 융합 단백질의 적정을 수행하였다. 이후에, 일정 농도의 비오틴화 된 인간 GPC3를 첨가하였고, 실시예 16에 기술된 바와 같이 HPR-표지된 엑스트라비딘을 통해 검출하였다. EC50 값, 자유 파라미터로서의 최대 시그널 및 1로 고정된 기울기를 갖는 1:1 결합 모델을 사용하여 데이터를 조정하였다. 생성된 EC50 값은 표 14에 제공된다.

도 17은 SEQ ID NO: 46 및 SEQ ID NO: 47의 두 개의 이중특이적 융합 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO: 8의 리포칼린 mutein의 표적 GPC3에 대한 친화도를 표면 플라즈몬 공명을 통해 측정한 대표 실험을 제공한다. 비오틴화 된 GPC3를 센서 칩 상에 고정하고, 융합 폴리펩타이드의 결합을 농도별로 분석하였다. 생성된 K_D 값은 표 15에 제공된다.

도 18은 SEQ ID NO: 46 및 SEQ ID NO: 47의 두 개의 이중특이적 융합 폴리펩타이드 및 SEQ ID NO: 26의 리포칼린 mutein의 CD137-Fc에 대한 친화도를 표면 플라즈몬 공명을 통해 측정한 대표 실험을 제공한다. 인간 CD137-Fc를 센서 칩 상에 고정하고, 융합 폴리펩타이드의 결합을 농도별로 분석하였다. 생성된 K_D 값은 표 16에 제공된다.

도 19는 플라스틱 배양 접시 상에 코팅될 때 T-세포 반응을 보조-자극하는 SEQ ID NOs: 36 및 37, SEQ ID NOs: 38 및 39, SEQ ID NOs: 40 및 41 그리고 SEQ ID NOs: 42 및 43의 융합 폴리펩타이드의 능력을 조사한 대표 실험을 제공한다. 융합 폴리펩타이드를 농도별로 플라스틱 접시에 항-인간 CD3 항체와 함께 코팅하고, 이후에, 정제된 T-세포를 가용성 항-인간 CD28 항체의 존재에서 코팅된 표면상에서 배양하였다. 상등액 IL-2 수준은 실시예 19에 기술된 바와 같이 전기화학발광(ELC) 분석에 의해 측정되었다. 음성 대조군으로, 인간 IgG4 이소타입 대조군을 사용하였다.

도 20은 GPC3-표적-의존적 방식으로 T-세포 활성화를 보조-자극하는 SEQ ID NOs: 36 및 37, SEQ ID NO: 44 그리고 SEQ ID NO: 45의 융합 폴리펩타이드의 능력을 조사한 대표 실험을 제공한다. 대조군으로, SEQ ID NOs: 34 및 35의 단일특이적, CD137-결합 항체를 사용하였다. 실험에서, 항-인간 CD3 항체(+) 또는 이소타입 대조군(-)을 플라스틱 배양 접시 상에 코팅하고, 이어서 GPC3-양성 HepG2 세포를 상기 접시에서 밤새도록 배양하였다. 다음날, 정제된 T-세포를 1 μ g/mL의 이중특이적 융합 폴리펩타이드 SEQ ID NOs: 36 및 37, SEQ ID NOs: 44, SEQ ID NOs: 45 또는 SEQ ID NOs: 34 및 35의 대조군 항체의 존재에서 코팅된 표면상에서 배양하였다. 상등액 IL-2 수준은 실시예 20에 기술된 바와 같이 전기화학발광 분석에 의해 측정되었다.

도 21은 GPC3-표적-의존적 방식으로 T-세포 활성화를 보조-자극하는 SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45의 융합 폴리펩타이드의 능력을 조사한 대표 실험을 제공한다. 실험에서, 항-인간 CD3 항체를 플라스틱 배양 접시 상에 코팅하고, 이후에, GPC3-양성 Hep3B-세포를 상기 접시 상에서 밤새도록 배양하였다. 다음날, 정제된 T-세포를 이중특이적 융합 폴리펩타이드 SEQ ID NO: 44(A) 및 SEQ ID NO: 45(C)의 다양한 농도의 존재에서 코팅된 표면상에서 배양하였다. 상등액의 IL-2는 ELISA로 측정되었다. GPC3에 대한 이중특이적 융합 폴리펩타이드의 결합을 차단하기 위해, 과량의 SEQ ID NO: 10의 존재에서 SEQ ID NO: 44 (B) 및 SEQ ID NO: 45 (D) 둘 다에 대해 실험을 수행하였다. 1:1 결합 모델을 사용하여 데이터를 조정하였다.

도 22는 상이한 세포주로 T-세포 활성화를 보조-자극하는 시험 물질의 능력을 조사한 대표 실험을 제공한다. 사용된 세포주는 GPC3 양성 HepG2 및 GPC3 음성 SKBR-3 및 MCF7이었다. 실험에서, 항-인간 CD3 항체를 플라스틱 배양 접시 상에 코팅하고, 이후에, 연구중인 세포주를 상기 접시에서 밤새도록 배양하였다. 다음날, 정제된 T-세포를 다음과 같은 이중특이적 융합 폴리펩타이드의 다양한 농도의 존재에서 3일 동안 코팅된 표면상에서 배양하였다: (A) SEQ ID NO: 44(원형), SEQ ID NO: 45(사각형) 또는 대조군 항체 트라스투주맙(삼각형). (B) 항-CD137 항체 SEQ ID NOs: 74 및 75. 상등액 IL-2 수준은 전기화학발광-기반 분석에 의해 측정되었다. 표시된 IL-2의 상대적인 반응은 시험 물질의 존재 및 부재("백그라운드")에서 얻은 반응의 비율에 해당한다.

도 23은 이중특이적 융합 폴리펩타이드, 대조군 항체인 트라스투주맙 및 양성 대조군인 케이홀 림프 헤모시아닌(KLH)의 인 비트로 T 세포 면역원성 평가 결과를 제공한다. 분석은 32명의 기증자와 전 세계 인구 분포를 반영한 인간 백혈구 항원(HLA) 동종형을 사용하여 실시예 23에 기술된 바와 같이 PBMC-기반 포맷을 사용하여 수행하였다: (A) 자극 지수(시험 물질의 존재 대 부재에서 증식). 평균 응답은 막대로 표시된다. 응답 기증자(자극 지수 > 2)를 정의하는 임계치는 점선으로 표시된다. (B) 응답자의 수.

도 24는 실시예 24 및 25에 기술된 바와 같이, Fc γ RI, Fc γ RIII 및 Fc γ Rn에 대한 폴리펩타이드의 친화도에 대한 대표 실험을 제공한다.

도 25는 마우스에서 이중특이적 융합 폴리펩타이드 SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45의 약물동력학 분석 결과를 제공한다. 수컷 CD-1 마우스(3마리/시점)에 10mg/kg의 투여량으로 융합 폴리펩타이드를 정맥내 주사하였다. 약물 수준은 샌드위치 ELISA를 사용하여 표적 GPC3 및 CD137을 통해 전체 이중특이적 구조물을 검출함으로써 검출되었다. 2-구획 모델을 사용하여 데이터를 조정하였다.

도 26은 필리핀 원숭이에서 이중특이적 융합 폴리펩타이드 SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45의 약물동력학 분석 결과를 제공한다. 수컷 필리핀 원숭이는 3mg/kg의 투여량으로 60분 동안 정맥내 주입을 통해 시험 물질을 받았다. 약물 수준은 샌드위치 ELISA를 사용하여 표적 GPC3 및 CD137을 통해 전체 이중특이적 구조물을 검출함으로써 검출되었다. 2-구획 모델을 사용하여 데이터를 조정하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0043] 일부 구현예들에서, 융합 폴리펩타이드는 임의의 순서로 적어도 두 개의 서브유닛을 포함한다: 제1 서브유닛은 GPC3에 특이적인 전장 면역글로불린, 이의 항원-결합 도메인 또는 리포칼린 뮤테인을 포함하고, 제2 서브유닛은 CD137에 특이적인 전장 면역글로불린, 이의 항원-결합 도메인 또는 리포칼린 뮤테인을 포함한다.
- [0044] 일부 구현예들에서, 융합 폴리펩타이드는 또한 제3 서브유닛을 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩타이드는 CD137에 특이적인 서브유닛을 포함할 수 있다. 일부 구현예들에서, 상기 제3 서브유닛은 CD137에 특이적인 리포칼린 뮤테인을 포함한다.
- [0045] 일부 구현예들에서, 하나의 서브유닛은 도 1에 필수적으로 기술된 바와 같이 다른 서브유닛에 연결될 수 있다.
- [0046] 예를 들어, 도 1A에 도시된 바와 같이 하나의 리포칼린 뮤테인은 펩타이드 결합을 통해 면역글로불린 중쇄 도메인(VH)의 C-말단, VH의 N-말단, 면역글로불린 경쇄(VL)의 C-말단, 및/또는 VL의 N-말단에 연결될 수 있다. 일부 특정 구현예들에서, 리포칼린 뮤테인 서브유닛은 그의 N-말단 및/또는 그의 C-말단에서 면역글로불린 서브유닛에 융합될 수 있다. 예를 들어, 리포칼린 뮤테인은 면역글로불린의 중쇄 불변 영역(CH)의 C-말단 및/또는 경쇄 불변 영역(CL)의 C-말단에 펩타이드 결합을 통해 연결될 수 있다. 또 다른 일부 구현예들에서, 펩타이드 결합은 링커, 특히 예를 들어, SEQ ID NO: 49에 나타난 바와 같이, 비구조식 (G4S)3 링커일 수 있다.
- [0047] 다른 예시적 예로서, 도 1B에 도시된 바와 같이 하나의 리포칼린 뮤테인은 펩타이드 결합을 통해 면역글로불린-Fc 단편의 C-말단 또는 N-말단에 연결될 수 있다.
- [0048] 추가적인 예로서, 도 1C에 도시된 바와 같이, 하나의 리포칼린 뮤테인은 펩타이드 결합을 통해 하나 이상의 다른 리포칼린 뮤테인에 연결될 수 있다.
- [0049] 이와 관련하여, 하나의 서브유닛은 그것의 N-말단 및/또는 그것의 C-말단에서 다른 서브유닛에 융합될 수 있다. 예를 들어, 하나의 서브유닛은 전장 면역글로불린을 포함하고, 다른 서브유닛은 펩타이드 결합을 통해 제2 서브유닛의 N-말단과 상기 면역글로불린의 중쇄 불변 영역(CH)의 C-말단에 연결될 수 있다. 일부 다른 구현예들에서, 제3 서브유닛은 펩타이드 결합을 통해 제3 결합 도메인의 N-말단과 상기 면역글로불린의 경쇄 불변 영역(CL)의 C-말단에 연결될 수 있다. 일부 또 다른 구현예들에서, 펩타이드 결합은 링커, 특히 예를 들어, SEQ ID NO: 49에 나타난 바와 같이, 비구조식 (G4S)3 링커이거나, 예를 들어, SEQ ID NO: 48에 나타난 바와 같이, 비구조식 (G4S)2 링커일 수 있다.
- [0050] 일부 구현예들에서, 제3 서브유닛은 제3 서브유닛의 리포칼린 뮤테인의 N-말단과 제1 서브유닛의 면역글로불린의 경쇄 불변 영역(CL)의 C-말단에 결합된 펩타이드에 의해 제1 서브유닛에 연결된다.
- [0051] 본 개시물의 융합 폴리펩타이드에 관련된 일부 구현예들에서, 그의 서브유닛 중 하나는 전장 면역글로불린을 포함하고, 폴리펩타이드는 GPC3 및 CD137과 동시에 결합하고, Fc 수용체-양성 세포에 대한 전장 면역글로불린의 Fc 영역의 Fc 기능은 동시에 보존될 수 있다.
- [0052] 본 개시물의 융합 폴리펩타이드에 관련된 일부 다른 구현예들에서, 그의 서브유닛 중 하나는 전장 면역글로불린을 포함하고, 폴리펩타이드는 GPC3 및 CD137과 동시에 결합하고, 전장 면역글로불린의 Fc 영역의 Fc 기능, 즉, Fc 감마 또는 FcRn 수용체-양성 세포에 결합하는 것은 단백질 조작에 의해 감소하거나 완전히 억제될 수 있다. 이것은 예를 들어, IgG2 또는 IgG4와 같은 Fc 감마 또는 FcRn 수용체들과의 낮은 상호작용을 보이는 백본을 사용하여 달성될 수 있다. Fc-감마 수용체들에 대한 추가 결합을 줄이기 위해, F234A 돌연변이 및/또는 L235A 돌연변이와 같이 IgG 백본에 돌연변이가 도입될 수 있다. 또한, IgG4 백본과 관련하여, S228P 돌연변이는 IgG4 절반-항체의 교환을 최소화하기 위해 도입될 수 있다. 일부 또 다른 구현예들에서, 천연 글리코실화 모티프를 제

거하기 위해 융합 폴리펩타이드의 면역글로불린 중쇄에서 추가적인 N297A 돌연변이가 존재할 수 있다.

- [0053] 일부 구현예들에서, 종양 세포에서 GPC3와 면역계, 예컨대, T-세포 또는 NK-세포 유래의 효과기 세포의 표면에서 CD137과 동시에 결합함으로써, 본 개시물의 융합 폴리펩타이드는 GPC3-의존적 효과기 세포 활성화를 나타낼 수 있어 면역계의 효과기 세포는 GPC3-발현 종양 세포를 적극적으로 용해한다.
- [0054] 일부 추가 구현예들에서, 융합 폴리펩타이드는 예를 들어, Chacon, J. A. et al., PloS one 2013 8(4):e60031에서 필수적으로 기술된 바와 같이 표적-의존적 종양-침윤 림프구의 엑스-비보 확장을 입증하는 분석에서 측정될 때, 그러한 융합 폴리펩타이드에 포함된 면역글로불린과 동등하거나 더 우수한 수준의 GPC3-의존적 CD137 활성화를 입증할 수 있다. 일부 추가 구현예들에서, 융합 폴리펩타이드는 예를 들어, Kohrt, H. et al, J Clin Invest. 2012 Mar;122(3):1066-75에서 필수적으로 기술된 것과 유사하게, 인간 간세포 암종("HCC"), 흑색종, 메르켈 세포 암종, 윌름스 종양 및 간모세포종의 인-비보 이중이식 모델에서 측정될 때, 그러한 융합 폴리펩타이드에 포함된 면역글로불린과 동등하거나 더 우수한 수준의 GPC3-의존적 CD137 활성화를 입증할 수 있다.
- [0055] 일부 구현예들에서, 본 개시물의 융합 폴리펩타이드에 포함된 면역글로불린의 Fc 부분은 체내에서의 안정성과 지속성에 중요한 융합 폴리펩타이드의 혈청 수준을 유지하는 데 기여할 수 있다. 예를 들어, Fc 부분이 내피세포 및 식세포의 Fc 수용체에 결합할 때, 융합 폴리펩타이드는 내재화되고 혈류로 재순환되어 체내 반감기를 향상시킬 수 있다.
- [0056] 일부 구현예들에서, 본 개시물의 융합 폴리펩타이드에 포함된 CD137-특이 서브유닛은 SEQ ID NO: 26의 리포칼린 뮤테인과 같이 CD137에 특이적인 리포칼린 뮤테인일 수 있다. 일부 구현예들에서, 본 개시물의 융합 폴리펩타이드에 포함된 CD137-특이 서브유닛은 단클론 항체(예를 들어, SEQ ID NOs: 34 및 35의 항체 또는 SEQ ID NO: 51 및 52의 항체)와 같이 CD137에 특이적인 전장 면역글로불린 또는 이의 항원-결합 도메인일 수 있다.
- [0057] 일부 구현예들에서, 본 개시물의 융합 폴리펩타이드에 포함된 GPC3-특이 서브유닛은 SEQ ID NO: 8의 리포칼린 뮤테인 또는 SEQ ID NO: 10의 리포칼린 뮤테인과 같이 GPC3에 특이적인 리포칼린 뮤테인일 수 있다. 일부 구현예들에서, 본 개시물의 융합 폴리펩타이드에 포함된 CD137-특이 서브유닛은 GPC3에 특이적인 전장 면역글로불린 또는 이의 항원-결합 도메인일 수 있다.
- [0058] 일부 구현예들에서, 본 개시물의 융합 폴리펩타이드에서, CD137-특이 서브유닛은 GPC3-특이 서브유닛에 융합된다.
- [0059] 일부 더 특정한 구현예들에서, GPC3-특이 서브유닛은 리포칼린 뮤테인을 포함하고, CD137-특이 서브유닛은 단클론 항체를 포함한다.
- [0060] 일부 추가 구현예들에서, 본 개시물의 융합 폴리펩타이드는 두 개의 GPC3-특이 서브유닛과 한 개의 CD137-특이 서브유닛을 갖는다. 일부 더 특정한 구현예들에서, GPC3-특이 서브유닛들 각각은 리포칼린 뮤테인을 포함하고, CD137-특이 서브유닛들 각각은 단클론 항체를 포함한다. 일부 추가 구현예들에서, 두 개의 GPC3-특이 서브유닛은 동일하다. 일부 또 다른 구현예들에서, 세 개의 서브유닛은 도 1A에 구조적으로 도시된 바와 같이 서로 융합된다. 일부 구현예들에서, 융합 폴리펩타이드는 SEQ ID NOs: 36 및 37, 38 및 39, 40 및 41, 또는 42 및 43으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0061] 일부 다른 특정 구현예들에서, GPC3-특이 서브유닛은 리포칼린 뮤테인을 포함하고, CD137-특이 서브유닛은 리포칼린 뮤테인을 포함한다. 일부 추가 구현예들에서, 두 개의 서브유닛은 도 1C에 구조적으로 도시된 바와 같이 서로 융합된다. 일부 구현예들에서, 융합 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 46의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0062] 일부 추가 특정 구현예들에서, 본 개시물의 융합 폴리펩타이드는 두 개의 CD137-특이 서브유닛과 한 개의 GPC3-특이 서브유닛을 갖는다. 일부 더 특정한 구현예들에서, GPC3-특이 서브유닛은 리포칼린 뮤테인을 포함하고, CD137-특이 서브유닛들은 각각 리포칼린 뮤테인을 포함한다. 일부 추가 구현예들에서, 두 개의 CD137-특이 서브유닛은 동일하다. 일부 추가 구현예들에서, 세 개의 서브유닛은 도 1C에 구조적으로 도시된 바와 같은 서로 융합된다. 일부 구현예들에서, 융합 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 47의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0063] 일부 추가 구현예들에서, 본 개시물의 융합 폴리펩타이드에서, GPC3-특이 서브유닛은 리포칼린 뮤테인을 포함하고 CD137-특이 서브유닛은 리포칼린 뮤테인을 포함하며, 두 개의 서브유닛은 면역글로불린-Fc 단편에 융합된다. 일부 추가 구현예들에서, 두 개의 서브유닛은 도 1B에 구조적으로 도시된 바와 같이 면역글로불린-Fc 단편에 각각 융합된다. 일부 특정 구현예들에서, 면역글로불린-Fc 단편은 IgG4-Fc 단편이다. 일부 추가 구현예들에서, IgG4-Fc 단편은 S228P 돌연변이를 갖고 인-비트로 및 인-비보에서 IgG4 절반-항체 교환을 최소화하도록 조작된

다. 일부 구현예들에서, IgG4-Fc 단편은 SEQ ID NO: 73의 아미노산 서열을 가진다. 일부 구현예들에서, 융합 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 44 또는 SEQ ID NO: 45의 아미노산 서열을 포함한다.

- [0064] 일부 구현예들에서, 본 개시물의 융합 폴리펩타이드에 포함된 면역글로불린은 IgG2 또는 IgG4 백본을 가진다. 일부 추가 구현예들에서, IgG4 백본은 S228P, N297A, F234A 및 L235A으로 구성된 군으로부터 선택된 다음의 돌연변이들 중 어느 하나를 가진다. 일부 추가 구현예들에서, IgG2 백본은 N297A, F234A 및 L235A로 구성된 군으로부터 선택된 다음의 돌연변이들 중 어느 하나를 가진다.
- [0065] 일부 구현예들에서, 융합 폴리펩타이드는 예를 들어, 폴리펩타이드가 실시예 3, 실시예 8 또는 실시예 15에 필수적으로 기술된 바와 같이 ELISA 분석에서 측정될 때, 적어도 약 5 nM 이하, 예컨대, 약 1 nM 이하, 약 0.6 nM 이하, 약 0.5 nM 이하, 약 0.4 nM 이하, 또는 약 0.3 nM 이하의 EC50 값으로 CD137에 결합할 수 있다.
- [0066] 일부 구현예들에서, 본 개시물의 융합 폴리펩타이드는 예를 들어, 상기 리포칼린 뮤테인 또는 항체 및 폴리펩타이드가 실시예 8 또는 실시예 15에 필수적으로 기술된 바와 같이 ELISA 분석에서 측정될 때, SEQ ID NO: 26의 리포칼린 뮤테인과 같이 그러한 융합 폴리펩타이드에 포함되는 CD137에 특이적인 리포칼린 뮤테인, 또는 SEQ ID NOs: 34 및 35의 항체 또는 SEQ ID NOs: 51 및 52의 항체와 같이 그러한 융합 폴리펩타이드에 포함되는 CD137에 특이적인 항체의 EC50 값과 적어도 동등하거나 그보다 우수한 EC50 값으로 CD137에 결합할 수 있다.
- [0067] 일부 구현예들에서, 융합 폴리펩타이드는 예를 들어, 실시예 6, 실시예 11 또는 실시예 18에 필수적으로 기술된 바와 같이 표면 플라즈몬 공명(SPR) 분석에서 측정될 때, 적어도 약 5 nM 이하, 예컨대, 약 1 nM 이하, 약 0.6 nM 이하, 약 0.5 nM 이하, 약 0.3 nM 이하, 약 200 pM 이하, 약 150 pM 이하, 약 100 pM 이하 또는 약 70 pM 이하, 또는 약 2 pM 이하의 K_D 의 친화도로 CD137에 결합할 수 있다.
- [0068] 다른 양태에서, 융합 폴리펩타이드는 예를 들어, 폴리펩타이드가 실시예 2, 실시예 7, 실시예 12 또는 실시예 14에 필수적으로 기술된 바와 같이 ELISA 분석에서 측정될 때, 적어도 약 5 nM 이하, 예컨대, 약 1 nM 이하, 약 0.6 nM 이하, 약 0.5 nM 이하, 약 0.4 nM 이하, 약 0.3 nM 이하, 또는 약 0.2 nM 이하의 EC50 값으로 GPC3에 결합할 수 있다.
- [0069] 일부 구현예들에서, 본 개시물의 융합 폴리펩타이드는 예를 들어, 실시예 7, 실시예 12 또는 실시예 14에 필수적으로 기술된 바와 같이 ELISA 분석에서 상기 리포칼린 뮤테인 및 융합 폴리펩타이드가 측정될 때, SEQ ID NO: 8의 리포칼린 뮤테인 또는 SEQ ID NO: 10의 리포칼린 뮤테인과 같이 그러한 융합 폴리펩타이드에 포함되는 GPC3에 특이적인 리포칼린 뮤테인의 EC50 값에 필적할만한 EC50 값으로 GPC3에 결합할 수 있다.
- [0070] 일부 구현예들에서, 융합 폴리펩타이드는 예를 들어, 실시예 5, 실시예 10 또는 실시예 17에 필수적으로 기술된 바와 같이 표면 플라즈몬 공명(SPR) 분석에서 측정될 때, 적어도 약 5 nM 이하, 예컨대, 약 1 nM 이하, 약 0.3 nM 이하, 약 100 pM 이하, 약 50 pM 이하, 약 20 pM 이하 또는 약 10 pM 이하의 K_D 의 친화도로 GPC3에 결합할 수 있다.
- [0071] 일부 구현예들에서, CD137 및 GPC3 둘 다에 특이적인 본 개시물의 융합 폴리펩타이드는 상기 융합 폴리펩타이드가 실시예 4, 실시예 9, 실시예 13 또는 실시예 16에 필수적으로 기술된 바와 같이 ELISA 분석에서 측정될 때, CD137 및 GPC3에 동시에 결합할 수 있다.
- [0072] 일부 구현예들에서, CD137 및 GPC3 둘 다에 특이적인 본 개시물의 융합 폴리펩타이드는 상기 융합 폴리펩타이드가 실시예 4, 실시예 9, 실시예 13 또는 실시예 16에 필수적으로 기술된 바와 같이 ELISA 분석에서 측정될 때, 적어도 약 10 nM 이하, 예컨대, 약 8 nM 이하, 약 5 nM 이하, 약 2.5 nM 이하, 약 2 nM 이하 또는 약 1.5 nM 이하의 EC50 값으로 CD137 및 GPC3에 동시에 결합할 수 있다.
- [0073] 일부 구현예들에서, CD137 및 GPC3 둘 다에 특이적인 본 개시물의 융합 폴리펩타이드는 실시예 19에서 필수적으로 기술된 기능적 T-세포 활성화 분석에서 T-세포 반응을 보조-자극할 수 있다. 일부 구현예들에서, 본 개시물의 융합 폴리펩타이드는 실시예 19에서 필수적으로 기술된 기능적 T-세포 활성화 분석에서 T-세포의 자극의 존재에서 IL-2 생산을 유도할 수 있고, 더 높은 코팅 농도에서 더 강한 IL-2 유도 경향을 나타낼 수도 있다. 일부 구현예들에서, 본 개시물의 융합 폴리펩타이드는 실시예 19에서 필수적으로 기술된 기능적 T-세포 활성화 분석에서 T-세포의 항-CD3 자극의 부재에서 IL-2 생산을 유도하지 않는다. 일부 추가 구현예들에서, CD137 및 GPC3 둘 다에 특이적인 본 개시물의 융합 폴리펩타이드는 실시예 19에서 필수적으로 기술된 기능적 T-세포 활성화 분석에서 차선의 농도에서 항-CD3 및 항-CD28 항체로 자극된 T-세포의 활성화를 보조-자극할 수 있다.
- [0074] 일부 구현예들에서, CD137 및 GPC3 둘 다에 특이적인 본 개시물의 융합 폴리펩타이드는 실시예 20에서 필수적으로

로 기술된 기능적 T-세포 활성화 분석에서 T-세포 반응을 보조-자극할 수 있다. 일부 구현예들에서, 본 개시물의 융합 폴리펩타이드는 실시예 20에서 필수적으로 기술된 기능적 T-세포 활성화 분석에서 IL-2 생산을 유도할 수 있다. 일부 구현예들에서, 본 개시물의 융합 폴리펩타이드는 실시예 20에서 필수적으로 기술된 기능적 T-세포 활성화 분석에서 GPC3 표적-의존적 방식으로 T-세포 활성화를 보조-자극할 수 있다.

[0075] A. 융합 폴리펩타이드에 포함되는 예시적인 면역글로불린

[0076] 일부 구현예들에서, 융합 폴리펩타이드와 관련하여, 제1 결합 도메인은 GPC3 또는 CD137에 특이적인 전장 면역글로불린 또는 이의 항원-결합 도메인을 포함한다. 예를 들어, 면역글로불린은 IgG1, IgG2 또는 IgG4일 수 있다. 추가 구현예들에서, 면역글로불린은 GPC3 또는 CD137에 대한 단클론 항체이다. GPC3-결합 면역글로불린의 예시적인 예는 GC33이다(Cancer Sci. 2014 Apr;105(4):455-62). CD137-결합 항체의 예시적인 예는 BMS-663513(Jure-Kunkel, M. et al., 미국특허 제7,288,638호) 및 PF-05082566(Fisher, T. S. et al., Canc Immunol Immunother 2012 Oct; 61(10):1721-1733)이다.

[0077] B. 융합 폴리펩타이드에 포함되는 예시적인 GPC3-특이 리포칼린 뮤테인

[0078] 본 개시물의 일 양태는 약 1 nM 이하의 K_D 로 측정된 친화도로 인간 글리피칸-3(GPC3)에 결합할 수 있는 리포칼린 뮤테인을 제공한다. 보다 바람직하게는, 뮤테인은 약 1 nM 또는 0.2 nM 이하의 K_D 로 측정된 친화도를 가질 수 있다.

[0079] 다른 구현예에서, 본 개시물은 리포칼린 뮤테인에 관한 것으로, 여기서, 상기 뮤테인은 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 2)의 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105, 106, 125, 127, 132, 134, 136 및/또는 175의 위치에 대응하는 하나 이상의 위치에서 치환, 바람직하게는 여기에 기술된 치환을 포함한다.

[0080] 특정 구현예들에서, 본 개시물의 뮤테인은 성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 2)의 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105, 106, 125, 127, 132, 134, 136 및/또는 175의 서열 위치에 대응하는 서열 위치에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20, 또는 그 이상, 예를 들어, 21, 22, 23, 24, 25 및 26개의 치환을 포함한다.

[0081] 추가 특정 구현예들에서, 본 개시물에 따른 리포칼린 뮤테인은 SEQ ID NOs: 4-17로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 뮤테인은 성숙한 hNGAL의 서열(SEQ ID NO: 2)과 적어도 70% 동일성을 가진다. 바람직하게는, 상기 뮤테인은 성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 2)의 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105, 106, 125, 127, 132, 134, 136 및/또는 175의 서열 위치에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20, 또는 그 이상, 예컨대, 21, 22, 23, 24, 25 및 26개의 돌연변이 된 아미노산 잔기들을 포함한다.

[0082] 일부 추가 구현예들에서, 진핵세포에서 발현을 용이하게 하기 위해, 성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 2)의 65번 위치에서 천연 N-글리코실화 부위 Asn은 예를 들어, 65번 위치에서 Asn이 Asp로의 돌연변이에 의해 본 개시물에 따른 리포칼린 뮤테인의 대응하는 서열 위치에서 제거된다. 더욱이, 본 개시물에 따른 리포칼린 뮤테인 상에 N-글리코실화 부위(Asn-X-Ser/Thr)가 존재하지 않은 것이 바람직하다.

[0083] 일부 다른 구현예들에서, 본 개시물에 따른 리포칼린 뮤테인은 예를 들어, 안정성을 추가로 최적화하기 위해 성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 2)의 28번 서열 위치에 대응하는 서열 위치에서 돌연변이를 포함하지 않는다.

[0084] 다른 구현예에서, 본 개시물의 뮤테인은 GPC3의 길항제이다.

[0085] 여기에 사용된 바와 같이, 본 개시물의 리포칼린 뮤테인은 결합 특이도가 절대적인 것이 아니라 상대적인 특성이기 때문에 그 표적과 하나 이상의 레퍼런스 표적을 구별할 수 있다면 표적(여기서, GPC3)에 "특이적으로 결합한다". "특이적 결합"은 예를 들어, 웨스턴 블랏, ELISA-, RIA-, ECL-, IRMA-검사, FACS, IHC 및 펩타이드 스크린에 따라 측정될 수 있다.

[0086] 마찬가지로, 다른 양태에서, 본 개시물은 hNGAL 뮤테인에 관한 것으로, 상기 뮤테인은 성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 2)의 36, 40, 41, 49, 52, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132, 및/또는 134의 위치에 대응하는 하나 이상의 위치에서 치환, 바람직하게는 여기에 기술된 치환을 포함한다.

- [0087] 다른 양태에서, 본 개시물은 hNGAL 뮤테인을 포함하는 폴리펩타이드에 관한 것으로, hNGAL 뮤테인은 성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 2)의 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105, 106, 125, 127, 132, 134, 136 및/또는 175의 위치에 대응하는 아미노산 위치에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20, 또는 그 이상, 예컨대 21, 22, 23, 24, 25 및 26개의 치환, 바람직하게는 여기에 기술된 치환을 포함한다.
- [0088] 유사하게, 본 개시물은 8개의 β -가닥이 하나의 말단에서 4개의 루프에 의해 쌍으로 연결되어 결합 포켓을 형성하는 실린더형 β -주름진 시트 슈퍼세컨더리 구조 영역을 갖는 hNGAL 유래의 리포칼린 뮤테인에 관한 것으로, 상기 4개의 루프 중 적어도 3개 각각의 적어도 하나의 아미노산이 돌연변이되어 있으며, 상기 리포칼린은 검출 가능한 친화도로 주어진 비-천연 표적으로서 GPC3에 결합하는데 효과적이다. 유리하게는 리포칼린 뮤테인은 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 1)의 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105, 106, 125, 127, 132, 134, 136 및/또는 175의 위치에서 아미노산에 대응하는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 아미노산 위치(들)에서 치환, 바람직하게는 여기에 기술된 치환을 포함한다. 본 개시물은 또한 이들 단백질을 인코딩하는 핵산에 관한 것이다.
- [0089] 따라서, 위를 감안하면, 숙련된 기술자는 여기에 기술된 바와 같이 hNGAL에서 돌연변이 된 어느 아미노산 위치가 hNGAL 이외의 스캐폴드의 아미노산에 대응하는지를 쉽게 측정할 수 있는 위치에 있다. 구체적으로, 숙련된 기술자는 상기 뮤테인의 어느 아미노산(들)이 상기 상이한 리포칼린의 아미노산 서열의 각각의 아미노산(들)에 대응하는지를 측정하기 위해 다른 뮤테인의 아미노산 서열과 여기에 기술된 뮤테인 특히 본 개시물의 hNGAL 뮤테인의 아미노산 서열을 정렬시킬 수 있다. 보다 구체적으로, 숙련된 기술자는 상기 상이한 리포칼린의 아미노산 서열의 어느 아미노산이 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 2)의 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105, 106, 125, 127, 132, 134, 136 및/또는 175의 위치(들)에서 아미노산에 대응하는지를 측정할 수 있다.
- [0090] GPC3를 겨냥하거나 특이적인 본 개시물의 단백질은 정의된 단백질 스캐폴드를 기반으로 하는 특이-결합 단백질 뮤테인의 임의의 수를 포함한다. 여기에 사용된 바와 같이, "뮤테인", "돌연변이 된" 개체(단백질 또는 핵산) 또는 "돌연변이체"는 자연적으로 발생하는(야생형) 핵산 또는 단백질 "레퍼런스" 스캐폴드와 비교하여 각각 하나 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 교환, 결실 또는 삽입을 지칭한다. 바람직하게는, 교환, 결실 또는 삽입된 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 수는 각각 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 그 이상, 예컨대, 21, 22, 23, 24, 25 및 26개이다. 그러나, 본 개시물의 뮤테인은 여전히 GPC3에 결합할 수 있는 것이 바람직하다.
- [0091] 일부 바람직한 구현예들에서, 본 개시물에 따른 뮤테인은 0.5 nM 이하, 0.3 nM 이하 및/또는 0.2 nM 이하를 포함하여 약 1 nM 이하의 K_D 로 인간 또는 마우스 GPC3에 결합한다. 본 개시물의 뮤테인은 GPC3의 성숙하고, 접힌 생활성 형태의 하나 이상의 연속, 불연속 또는 구조 에피토프(들)에 특이적으로 결합한다.
- [0092] 선택된 표적(본 경우에는 GPC3)에 대한 본 개시물의 단백질(예를 들어, 리포칼린의 뮤테인)의 결합 친화도는 당업자에게 공지된 다수의 방법에 의해 측정될 수 있다(따라서, 뮤테인-리간드 복합체의 K_D 값이 측정됨). 그러한 방법은 형광 적정, 경쟁적 ELISA, 등은 적정 열량계(ITC)와 같은 열량 측정 방법들 그리고 표면 플라즈몬 공명(BIAcore)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 그러한 방법들은 당업계에 잘 확립되어 있으며, 이의 예시들도 아래에 구체적으로 기재되어 있다.
- [0093] 본 개시물의 뮤테인의 아미노산 서열은 성숙한 인간 리포칼린 2에 높은 서열 동일성을 가질 수 있다. 이와 관련하여, 본 개시물의 단백질은 SEQ ID NO: 2의 서열로 구성된 군으로부터 선택된 단백질과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 82%, 적어도 85%, 적어도 87%, 적어도 95% 동일성을 포함하여 적어도 90% 동일성을 가질 수 있으며, 그러한 뮤테인은 SEQ ID NOs: 4-17로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가진다.
- [0094] 본 개시물은 또한 SEQ ID NOs: 4-17의 서열로 구성된 군으로부터 선택된 단백질들의 구조 동족체들을 포함하며, 이에 관하여 약 60%, 바람직하게는 65% 초과, 70% 초과, 75% 초과, 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 92% 초과, 가장 바람직하게는 95% 초과,의 아미노산 서열 상동성 또는 서열 동일성을 가진다.
- [0095] 상기와 비슷하게, 본 개시물의 뮤테인은 바람직하게는 GPC3의 길항제로 작용한다. 일부 구현예들에서, 본 개시물의 뮤테인은 GPC3 분자가 그의 동족 리간드에 결합하거나 그렇지 않고 상호작용하는 능력을 억제함으로써 GPC3의 길항제로 작용할 수 있다.

[0096] 또 다른 양태에서, 본 개시물은 GPC3에 특이적으로 결합하는 인간 리포칼린 2의 뮤테인을 포함한다. 이러한 의미에서, GPC3는 야생형 인간 리포칼린 2의 비-천연 리간드로 간주될 수 있고, 여기서 "비-천연 리간드"는 생리학적 조건하에서 인간 리포칼린 2에 결합하지 않는 화합물을 지칭한다. 본 발명자들은 특정 위치들에서 돌연변이를 갖도록 인간 리포칼린 2와 같은 야생형 리포칼린을 조작함으로써 비-천연 리간드에 대한 높은 친화도와 높은 특이도가 가능함을 입증하였다. 한 양태에서 성숙한 인간 리포칼린 2의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 2)의 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105, 106, 125, 127, 132, 134, 136 및/또는 175의 임의의 서열 위치들을 인코딩하는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및/또는 20개의 뉴클레오타이드 삼중항(들)에서, 뉴클레오타이드 삼중항의 서브세트에 의해 이들 위치에서 치환을 허용함으로써 무작위 돌연변이 유발이 수행될 수 있다.

[0097] 또한, 리포칼린은 성숙한 인간 리포칼린 2의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 2)의 36, 40, 41, 49, 52, 65, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105, 106, 125, 127, 132, 134, 136 및/또는 175의 서열 위치들에 대응하는 서열 위치들의 적어도 임의의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개를 포함하여 임의의 하나 이상에서 돌연변이된 아미노산 잔기를 갖는 뮤테인을 생성하는데 이용될 수 있다.

[0098] 서열 위치 36에서 치환은 예를 들어 치환 Leu 36 → Val 또는 Arg일 수 있다. 서열 위치 40에서 치환은 예를 들어 치환 Ala 40 → Leu, Val 또는 Gly일 수 있다. 서열 위치 41에서 치환은 예를 들어 치환 Ile 41 → Leu, Arg, Met, Gly 또는 Ala일 수 있다. 서열 위치 49에서 치환은 예를 들어 치환 Gln 49 → Pro 또는 Leu일 수 있다. 서열 위치 52에서 치환은 예를 들어 치환 Tyr 52 → Arg 또는 Trp일 수 있다. 서열 위치 68에서 치환은 예를 들어 치환 Asn 65 → Asp일 수 있다. 서열 위치 68에서 치환은 예를 들어 치환 Ser 68 → Val, Gly, Asn 또는 Ala일 수 있다. 서열 위치 70에서 치환은 예를 들어 치환 Leu 70 → Arg, Ser, Ala 또는 Val일 수 있다. 서열 위치 72에서 치환은 예를 들어 치환 Arg 72 → Asp, Trp, Ala, 또는 Gly일 수 있다. 서열 위치 73에서 치환은 예를 들어 치환 Lys 73 → Gly, Arg, Asn, Glu 또는 Ser일 수 있다. 서열 위치 76에서 치환은 예를 들어 치환 Cys 76 → Val 또는 Ile일 수 있다. 서열 위치 77에서 치환은 예를 들어 치환 Asp 77 → His, Met, Val, Leu, Thr 또는 Lys일 수 있다. 서열 위치 79에서 치환은 예를 들어 치환 Trp 79 → Lys, Ser 또는 Thr일 수 있다. 서열 위치 81에서 치환은 예를 들어 치환 Arg 81 → Gly일 수 있다. 서열 위치 87에서 치환은 예를 들어 치환 Cys 87 → Ser일 수 있다. 서열 위치 96에서 치환은 예를 들어 치환 Asn 96 → Arg, Asp, Gln 또는 Pro일 수 있다. 서열 위치 100에서 치환은 예를 들어 치환 Tyr 100 → Gly, Glu, Pro 또는 Gln일 수 있다. 서열 위치 103에서 치환은 예를 들어 치환 Leu 103 → Glu, Gln, Asn, Gly, Ser 또는 Tyr일 수 있다. 서열 위치 105에서 치환은 예를 들어 치환 Ser 105 → Ala일 수 있다. 서열 위치 106에서 치환은 예를 들어 치환 Tyr 106 → Asn, Ser 또는 Thr일 수 있다. 서열 위치 125에서 치환은 예를 들어 치환 Lys 125 → Glu일 수 있다. 서열 위치 127에서 치환은 예를 들어 치환 Ser 127 → Arg 또는 Tyr일 수 있다. 서열 위치 132에서 치환은 예를 들어 치환 Tyr 132 → Trp 또는 Ile일 수 있다. 서열 위치 134에서 치환은 예를 들어 치환 Lys 134 → Ala 또는 Phe일 수 있다. 서열 위치 136에서 치환은 예를 들어 치환 Thr 136 → Ile일 수 있다. 서열 위치 175에서 치환은 예를 들어 치환 Cys 175 → Ala일 수 있다. 현저하게, 레퍼런스 서열에서 대응하는 아미노산을 치환하는 임의의 아미노산은 대응하는 보존적 아미노산에 의해 교환될 수 있다. 특히, 보존적 치환들은 다음 그룹의 구성원들 사이의 대체물이다: 1) 알라닌, 세린 및 트레오닌; 2) 아스파르트산 및 글루탐산; 3) 아스파라긴 및 글루타민; 4) 아르닌 및 라이신; 5) 이소루신, 루신, 메티오닌 및 발린; 및 6) 페닐알라닌, 트립신 및 트립토판.

[0099] 일 구현예에서, GPC3에 결합하는 본 개시물의 뮤테인은 다음의 아미노산 대체물들을 포함한다:

[0100] (a) Leu 36 → Val; Ile 41 → Leu; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Arg; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Val; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Lys; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → Ala;

[0101] (b) Leu 36 → Val; Ala 40 → Val; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Arg; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Lys 73 → Gly; Asp 77 → His; Trp 79 → Lys; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Glu; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → Phe;

[0102] (c) Leu 36 → Val; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Met; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Arg; Asn 65 → Asp; Leu 70 → Ala; Lys 73 → Asn; Asp 77 → His; Trp 79 → Lys; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr

100 → Gly; Leu 103 → Glu; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → Phe;

[0103] (d) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Val; Ile 41 → Gly; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asn; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Leu; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Asn; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe; Thr 136 → Ile;

[0104] (e) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Val; Ile 41 → Gly; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asn; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Gly; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe; Thr 136 → Ile;

[0105] (f) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asn; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Val; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Pro; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Asn; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe; Thr 136 → Ile;

[0106] (g) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Val; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Arg; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Leu; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Arg; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Tyr; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe; Thr 136 → Ile;

[0107] (h) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Val; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Arg; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asn; Leu 70 → Val; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Gly; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Arg; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Asn; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe; Thr 136 → Ile;

[0108] (i) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Gly; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asn; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Met; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Ser; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe;

[0109] (j) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Val; Ile 41 → Gly; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asn; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Gly; Cys 76 → Val; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Thr; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Asn; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe; Cys 175 → Ala;

[0110] (k) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Val; Ile 41 → Gly; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Arg; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Glu; Cys 76 → Ile; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Gln; Leu 103 → Asp; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe; Thr 136 → Ile; Cys 175 → Ala; 또는

[0111] (l) Leu 36 → Arg; Ala 40 → Val; Ile 41 → Gly; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Arg; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Ser; Cys 76 → Val; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gln; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Asn; Ser 105 → Ala; Tyr 106 → Thr; Lys 125 → Glu; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Phe; Thr 136 → Ile; Cys 175 → Ala.

[0112] 넘버링은 바람직하게는 성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 2)에 관련된다. 따라서, 본 개시물의 교시에 따르면, 숙련된 기술자는 성숙한 hNGAL의 바람직한 레퍼런스 서열(SEQ ID NO: 2)에서 어느 아미노산이 상기 (a) 내지 (1)에서 기술된 것들에 대응하는지 쉽게 측정할 수 있다; 레퍼런스 서열에서 상기 아미노산을 돌연변이 시키기 위해.

[0113] **C. 융합 폴리펩타이드에 포함되는 예시적인 CD137-특이 리포칼린 뮤테인**

[0114] 한 양태에서, 본 개시물은 CD137에 결합하는 인간 리포칼린 뮤테인과 이를 위한 유용한 적용을 제공한다. 본 개시물은 또한 여기에 기술된 CD137 결합 단백질의 제조방법과 그러한 단백질을 포함하는 조성물을 제공한다.

본 개시물의 CD137 결합 단백질 및 이의 조성물은 시료에서 CD137을 검출하는 방법 또는 대상체에서 CD137의 결합 방법에 사용될 수 있다. 본 개시물에 의해 제공된 용도에 수반되는 이들 특징을 갖는 그러한 인간 리포칼린 뮤테인은 이전에 기술된 바 없었다.

- [0115] 본 개시물의 다른 구현에는 CD137에 결합하여 CD137의 다운스트림 신호전달 경로를 활성화할 수 있는 리포칼린 뮤테인을 제공한다.
- [0116] 일 구현예에서, 본 개시물은 CD137-결합 인간 눈물 리포칼린 뮤테인을 제공한다.
- [0117] 이와 관련하여, 본 개시물은 약 300 nM 이하 및 심지어 약 100 nM 이하의 K_D 로 측정된 친화도로 CD137에 결합할 수 있는 하나 이상의 T1c 뮤테인을 제공한다.
- [0118] 일부 구현예들에서, 그러한 T1c 뮤테인은 성숙한 인간 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 1)의 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 및 153의 위치들에 대응하는 하나 이상의 위치에서 돌연변이 된 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0119] 일부 특정 구현예들에서, 그러한 T1c 뮤테인은 성숙한 인간 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩타이드 서열의 26-34, 55-58, 60-61, 65, 104-106 및 108의 위치들에 대응하는 하나 이상의 위치에서 돌연변이 된 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.
- [0120] 추가 특정 구현예들에서, 그러한 T1c 뮤테인은 성숙한 인간 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩타이드 서열의 101, 111, 114 및 153의 위치들에 대응하는 하나 이상의 위치에서 돌연변이 된 아미노산 잔기를 추가로 포함할 수 있다.
- [0121] 다른 특정 구현예들에서, T1c는 성숙한 인간 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩타이드 서열의 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 및 153의 위치들에 대응하는 하나 이상의 위치에서 돌연변이 된 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.
- [0122] 일부 추가 구현예들에서, T1c 뮤테인은 성숙한 인간 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩타이드의 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 및 153의 서열 위치들에 대응하는 하나 이상의 서열 위치에서 적어도 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 또는 그 이상의 돌연변이 된 아미노산 잔기를 포함할 수 있고, 상기 폴리펩타이드는 CD137, 특히 인간 CD137에 결합한다.
- [0123] 일부 또 다른 구현예들에서, 본 개시물은 폴리펩타이드에 관한 것으로, 상기 폴리펩타이드는 T1c 뮤테인이며, 성숙한 인간 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩타이드 서열과 비교하여, 526-34, 55-58, 60-61, 65, 104-106 및 108의 서열 위치들에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 그 이상의 돌연변이 된 아미노산 잔기를 포함하고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 CD137, 특히 인간 CD137에 결합한다.
- [0124] 일부 구현예들에서, 본 개시물에 따른 리포칼린 뮤테인은 천연 시스테인 잔기 즉 세린 잔기에 의한 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 구현예들에서, 본 개시물에 따른 T1c 뮤테인은 세린 잔기와 같은 다른 아미노산에 의해 61 및/또는 153의 위치에서 천연 시스테인 잔기의 아미노산 치환을 포함한다. 이와 관련하여, 시스테인 잔기 61 및 153에 의해 형성된 야생형 눈물 리포칼린의 구조적 이황화 결합(각 나이브 핵산 라이브러리의 수준에서)의 제거(참조. Breustedt, et al., 2005, supra)는 안정적으로 접힐 뿐만 아니라 높은 친화도로 주어진 비-천연 리간드와 결합할 수 있는 눈물 리포칼린 뮤테인을 제공할 수 있음이 발견되었다는 것을 특히 덧붙인다. 일부 특정 구현예들에서, 본 개시물에 따른 T1c 뮤테인은 아미노산 치환 Cys 61 → Ala, Phe, Lys, Arg, Thr, Asn, Gly, Gln, Asp, Asn, Leu, Tyr, Met, Ser, Pro 또는 Trp 및 Cys 153 → Ser 또는 Ala를 포함한다. 그러한 치환은 Cys 61 및 Cys 153을 연결하는 자연적으로 발생하는 이황화 브릿지의 형성을 방지하여 뮤테인의 취급을 용이하게 하는데 유용하다는 것을 입증하였다. 그러나 CD137에 결합하고, Cys 61 및 Cys 153 사이에 형성된 이황화 브릿지를 갖는 눈물 리포칼린 뮤테인 역시 본 개시물의 일부이다.
- [0125] 일부 구현예들에서, 구조적 이황화 결합의 제거는 본 개시물의 뮤테인에 비-천연 인공 이황화 결합의 (자발적인) 생성 또는 고의적인 도입을 허용하여 뮤테인의 안정성을 증가시키는 추가의 이점을 제공할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예들에서, 61, 101 및 153의 위치에서 시스테인 코돈 중 2개 또는 3개 모두 다른 아미노산의 코돈에 의해 대체된다. 또한, 일부 구현예들에서, 본 개시물에 따른 T1c 뮤테인은 101의 위치에서 세린 잔기 또는 히스티딘 잔기에 의한 천연 시스테인 잔기의 아미노산 치환을 포함한다.

- [0126] 일부 구현예들에서, 본 개시물에 따른 뮤테인은 성숙한 인간 눈물 리포칼린의 아미노산 서열에 대하여 28 또는 105의 위치에서 시스테인 잔기에 의한 천연 아미노산의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0127] 또한, 일부 구현예들에서, 본 개시물에 따른 뮤테인은 111의 위치에서 프롤린 잔기에 의한 천연 아르기닌 잔기의 아미노산 치환을 포함한다. 또한, 일부 구현예들에서, 본 개시물에 따른 뮤테인은 114의 위치에서 트립토판 잔기 또는 글루탐산에 의한 천연 라이신 잔기의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0128] 일부 구현예들에서, 본 개시물에 따른 CD137-결합 T1c 뮤테인은 성숙한 인간 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 1)의 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 및 153의 위치들에 대응하는 하나 이상의 위치에서, 하나 이상의 하기 돌연변이된 아미노산 잔기를 포함한다: Ala 5 → Val 또는 Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Thr 42 → Ser; Gly 46 → Asp; Lys 52 → Glu; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg 또는 Asn; Thr 71 → Ala; Val 85 → Asp; Lys 94 → Arg 또는 Glu; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; Arg 148 → Ser; Ser 150 → Ile 및 Cys 153 → Ser. 일부 구현예들에서, 본 개시물에 따른 T1c 뮤테인은 성숙한 인간 눈물 리포칼린의 이들 서열 위치에서 둘 이상, 예컨대, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 심지어 그 이상, 예컨대, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 또는 모든 돌연변이된 아미노산 잔기들을 포함한다.
- [0129] 일부 추가 구현예들에서, CD137과 결합하는 T1c 뮤테인은 성숙한 인간 눈물 리포칼린의 선형 폴리펩타이드 서열과 비교하여 다음의 아미노산 치환 세트 중 하나를 포함한다:
- [0130] 1. Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;
- [0131] 2. Ala 5 → Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg; Val 85 → Asp; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; Cys 153 → Ser; 157 → Pro;
- [0132] 3. Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Asn; Lys 94 → Arg; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; Cys 153 → Ser;
- [0133] 4. Ala 5 → Val; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg; Lys 94 → Glu; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; Cys 153 → Ser; 157 → Pro;
- [0134] 5. Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Thr 42 → Ser; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 150 → Ile; Cys 153 → Ser; 157 → Pro;
- [0135] 6. Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Lys 52 → Glu; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Thr 71 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ala 133 → Thr; Arg 148 → Ser; Ser 150 → Ile; Cys 153 → Ser; 157 → Pro; 또는
- [0136] 7. Ala 5 → Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Gly 46 → Asp; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Thr 71 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser;

Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 150 → Ile; Cys 153 → Ser; 157 → Pro.

- [0137] 나머지 영역, 즉 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 및 153의 서열 위치들과는 다른 영역에서, 본 개시물의 T1c 뮤테인은 돌연변이 된 아미노산 서열 위치들 외에 야생형(천연) 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0138] 또 다른 구현예에서, 본 개시물에 따른 T1c 뮤테인은 성숙한 인간 눈물 리포칼린의 서열(SEQ ID NO: 1)과 적어도 70% 서열 동일성 또는 적어도 70%의 서열 상동성을 갖는다.
- [0139] 본 개시물에 따른 T1c 뮤테인은 인간 눈물 리포칼린의 자연적으로 발생하는 형태의 돌연변이 유발의 수단에 의해 얻을 수 있다. 돌연변이 유발의 일부 구현예들에서, 치환(또는 대체)은 보존적 치환이다. 그럼에도, 리포칼린 뮤테인이 CD137에 결합하는 능력을 보유하고/하거나 성숙한 인간 눈물 리포칼린의 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 예컨대, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85% 이상 서열 동일성이 있는 치환된 서열에 대해 서열 동일성을 갖는 한 비-보존적 치환 또는 아래의 예시적인 치환들로부터 하나 이상을 포함하여 임의의 치환이 예상된다(SWISS-PROT Data Bank Accession Number P31025).
- [0140] 다른 양태에서, 본 개시물은 CD137을 겨냥하거나 특이적인 신규한 특이적-결합을 하는 hNGAL 뮤테인에 관한 것이다.
- [0141] 이와 관련하여, 본 개시물은 200 nM 이하, 약 140 nM 이하, 약 50 nM 이하 및 심지어 약 10 nM 이하의 K_D 로 측정된 친화도로 CD137에 결합할 수 있는 하나 이상의 hNGAL 뮤테인을 제공한다. 보다 바람직하게는, hNGAL 뮤테인은 약 5 nM 이하의 K_D 로 측정된 친화도를 가질 수 있다.
- [0142] 일부 구현예들에서, 본 개시물의 hNGAL 뮤테인은 성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 2)의 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 및 134의 위치들에 대응하는 하나 이상의 위치에서의 치환을 포함한다.
- [0143] 특정 구현예들에서, 본 개시물의 리포칼린 뮤테인은 성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SWISS-PROT Data Bank Accession Number P80188; SEQ ID NO: 2)의 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 및 134의 서열 위치에 대응하는 서열 위치에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 그 이상의 치환(들)을 포함한다. 바람직하게는, 본 개시물은 성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열의 28, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 94, 100, 103, 106, 125, 127, 132 및 134의 위치들에 대응하는 하나 이상의 위치에서의 치환, 더불어 성숙한 인간 NGAL의 선형 폴리펩타이드 서열의 36, 87 및/또는 96의 위치들에 대응하는 위치들에서 하나 이상의 치환을 포함하는 리포칼린 뮤테인에 관한 것이 예상된다.
- [0144] 일부 또 다른 구현예들에서, 본 개시물은 폴리펩타이드에 관한 것으로, 상기 폴리펩타이드는 hNGAL 뮤테인이고, 성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SWISS-PROT Data Bank Accession Number P80188; SEQ ID NO: 2)과 비교하여 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 및 134의 서열 위치들에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 그 이상의 돌연변이 된 아미노산 잔기를 포함하고, 여기서, 상기 폴리펩타이드는 CD137, 특히 인간 CD137과 결합한다.
- [0145] 일부 구현예들에서, 본 개시물의 CD137-결합 hNGAL 뮤테인은 성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 2)의 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 및 134의 서열 위치들 중 임의의 하나 이상에서, 다음의 돌연변이 된 아미노산 잔기들 중 하나 이상을 포함한다: Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg 또는 Lys; Gln 49 → Val, Ile, His, Ser 또는 Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Met, Ala 또는 Gly; Leu 70 → Ala, Lys, Ser 또는 Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Met, Arg, Thr 또는 Asn; Trp 79 → Ala 또는 Asp; Arg 81 → Met, Trp 또는 Ser; Phe 83 → Leu; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu 및 Lys 134 → Tyr.
- [0146] 일부 구현예들에서, 본 개시물의 hNGAL 뮤테인은 성숙한 hNGAL의 이들 서열 위치에서 둘 이상, 예컨대, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 심지어 그 이상, 예컨대, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 모든 돌연변이 된 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0147] 일부 추가 구현예들에서, CD137에 결합하는 본 개시물의 hNGAL 뮤테인은 성숙한 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서

열과 비교하여 다음의 아미노산 대체물들을 포함한다:

- [0148] (a) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;
- [0149] (b) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Met; Leu 70 → Lys; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Met; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;
- [0150] (c) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Ala; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;
- [0151] (d) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Ala; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;
- [0152] (e) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Met; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;
- [0153] (f) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Val; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;
- [0154] (g) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → His; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;
- [0155] (h) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Phe 83 → Leu; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr; 또는
- [0156] (i) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr.
- [0157] 나머지 영역, 즉, 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 및 134의 서열 위치들과는 상이한 영역에서, 본 개시물의 hNGAL 뮤테인은 돌연변이 된 아미노산 서열 위치들 외에 야생형(천연) 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0158] 다른 구현예에서, hNGAL 뮤테인은 성숙한 인간 리포칼린 2의 아미노산 서열(SWISS-PROT Data Bank Accession Number P80188)에 적어도 70% 또는 그보다 더 높은 서열 동일성을 가진다.
- [0159] 추가의 특정 구현예들에서, 본 개시물에 따른 CD137-결합 리포칼린 뮤테인은 SEQ ID NOs: 18-33으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0160] 본 개시물의 CD137-결합 리포칼린 뮤테인의 아미노산 서열은 SEQ ID NOs: 18-33으로 이루어진 군으로부터 선택

된 서열에 대해 높은 서열 동일성, 예컨대, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 82%, 적어도 85%, 적어도 87%, 적어도 95% 동일성을 포함하여 적어도 90% 동일성을 가질 수 있다.

[0161] 본 개시물은 또한 SEQ ID NOs: 18-33으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 리포칼린 뮤테인의 구조 동족체들을 포함하고, 구조 동족체들은 상기 뮤테인과 관련하여 약 60% 초과, 바람직하게는 65% 초과, 70% 초과, 75% 초과, 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 92% 초과 및 가장 바람직하게는 95% 초과와 아미노산 서열 상동성 또는 서열 동일성을 가진다.

[0162] D. 융합 폴리펩타이드의 예시적인 용도, 적용 및 생산

[0163] 일부 구현예들에서, 본 개시물의 융합 폴리펩타이드는 CD137 및 GPC3의 이중-표적화를 통해 시너지 효과를 생산할 수 있다.

[0164] 따라서, 본 개시물의 융합 폴리펩타이드에 대한 수많은 가능한 적용들이 의약에 존재한다.

[0165] 일 양태에서, 본 개시물은 시료에서 CD137과 GPC3을 검출하기 위해 여기에 기술된 융합 폴리펩타이드의 용도 및 각각의 진단 방법에 관한 것이다.

[0166] 다른 양태에서, 본 개시물은 여기에 기술된 하나 이상의 융합 폴리펩타이드 또는 CD137 및 GPC3에 동시에 결합하기 위해 그러한 폴리펩타이드를 포함하는 하나 이상의 조성물의 용도를 특징으로 한다.

[0167] 본 개시물은 또한 CD137 및 GPC3와의 복합체 형성에 대해 기술된 바와 같은 하나 이상의 융합 폴리펩타이드의 용도를 포함한다.

[0168] 따라서, 본 개시물의 또 다른 양태에서, 개시된 하나 이상의 융합 폴리펩타이드는 CD137 및 GPC3의 검출에 사용된다. 그러한 용도는 하나 이상의 상기 융합 폴리펩타이드를 적당한 조건하에서 CD137 및 GPC3를 포함하는 것으로 의심되는 시료와 접촉시켜 융합 폴리펩타이드와 CD137 및 GPC3 사이에 복합체를 형성하고, 적당한 시그널로 복합체를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 검출 가능한 시그널은 상술한 바와 같이 표지에 의해 또는 결합 즉 복합체 형성 자체에 의한 물리적 특성들의 변화에 의해 야기될 수 있다. 일 예시는 표면 플라즈몬 공명이며, 그 값은 금박과 같은 표면에 고정된 결합 파트너의 결합 중에 변화된다.

[0169] 여기에 개시된 융합 폴리펩타이드는 또한 CD137 및 GPC3의 분리를 위해 사용될 수 있다. 그러한 용도는 하나 이상의 상기 융합 폴리펩타이드를 적당한 조건하에서 CD137 및 GPC3를 포함하는 것으로 의심되는 시료와 접촉시켜 융합 폴리펩타이드와 CD137 및 GPC3 사이에 복합체를 형성시키고, 시료로부터 복합체를 분리하는 단계를 포함할 수 있다.

[0170] 또 다른 양태에서, 본 개시물은 본 개시물에 따른 융합 폴리펩타이드를 포함하는 진단 또는 분석 키트를 특징으로 한다.

[0171] 진단에서의 그들의 용도에 더하여, 또 다른 양태에서, 본 개시물은 본 개시물의 융합 폴리펩타이드 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물을 고려한다.

[0172] 또한, 본 개시물은 항암제 및 면역조절제로서 사용하기 위한 CD137 및 GPC3에 동시에 결합하는 융합 폴리펩타이드를 제공한다. 따라서, 본 개시물의 그러한 융합 폴리펩타이드는 간세포 암종("HCC"), 흑색종, 메르켈 세포 암종, 윌름스 종양 및 간모세포종을 포함하는 다양한 종양과 같이 인간 질환의 치료 또는 예방 방법에 사용되는 것으로 예상된다. 따라서, 본 개시물의 하나 이상의 융합 폴리펩타이드의 약학적 유효량을 상기 대상체에 투여하는 것을 포함하는, 그것을 필요로 하는 대상체에서 간세포 암종, 흑색종, 메르켈 세포 암종, 윌름스 종양 및 간모세포종을 포함하는 다양한 종양과 같은 인간 질환의 치료 또는 예방 방법이 또한 제공된다.

[0173] 간세포 암종, 흑색종, 메르켈 세포 암종, 윌름스 종양 및 간모세포종과 같이 GPC3가 발현되는 종양 세포를 동시에 표적화하여, 그러한 종양 세포 또는 적응 면역계의 T-세포에 인접한 숙주의 선천 면역계에서 자연살해(NK) 세포를 활성화시킴으로써, 본 개시물의 융합 폴리펩타이드는 표적화된 항-종양 림프구 세포 활성을 증가시키고, 항-종양 면역계를 향상시키며, 동시에 종양 성장에 대한 직접적인 억제 효과를 가져 상승적 항-종양 결과를 생산할 수 있다. 또한, 종양유전자 활성을 국소적으로 억제하고 NK 세포 및/또는 T-세포에 의한 세포-매개 세포독성을 유도함으로써 본 개시물의 융합 폴리펩타이드는 건강한 세포에 대한 효과적 림프구의 부작용, 즉 표적 이외의 독성을 감소시킬 수 있다.

[0174] T 세포에서, CD137-매개 신호전달은 TRAF 패밀리의 구성원의 동원 및 ASK-1, MKK, MAPK3/MAPK4, p38 및 JNK/SAPK를 포함하여 몇몇 키나아제의 활성화를 유도한다. 키나아제 활성화 후 ATF-2, Jun, 및 NF- κ B를 포함하여 몇몇

전사 인자들의 활성화 및 핵 이동이 이어진다. 차선의 TCR-유도성 증식을 증가시키는 것 외에도, CD137-매개 신호전달은 T 세포, 특히 활성화-유도성 세포 죽음(AICD)으로부터 CD8+T 세포를 보호한다.

[0175] 본 개시물은 본 개시물의 융합 폴리펩타이드 또는 간세포 암종, 흑색종, 메르켈 세포 암종, 윌름스 종양 및 간모세포종과 같이 GPC3가 발현되는 종양 세포에 결합할 때 T-세포를 보조자극하고, 및/또는 CD137의 다운스트림 신호전달 경로를 활성화하는 그러한 융합 폴리펩타이드를 포함하는 조성물의 용도를 포함한다.

[0176] 본 개시물은 또한 본 개시물의 하나 이상의 융합 폴리펩타이드 또는 그러한 융합 폴리펩타이드를 포함하는 하나 이상의 조성물을 적용하는 것을 포함하는, 간세포 암종, 흑색종, 메르켈 세포 암종, 윌름스 종양 및 간모세포종과 같이 GPC3가 발현되는 종양 세포에 결합할 때 T-세포를 보조자극하고 및/또는 CD137의 다운스트림 신호전달 경로를 활성화하는 방법을 특징으로 한다.

[0177] 또한, 본 개시물은 본 개시물의 하나 이상의 융합 폴리펩타이드 또는 그러한 융합 폴리펩타이드를 포함하는 하나 이상의 조성물을 적용하는 것을 포함하는, 간세포 암종, 흑색종, 메르켈 세포 암종, 윌름스 종양 및 간모세포종과 같이 GPC3가 발현되는 종양 세포에 결합할 때 CD137의 다운스트림 신호전달 경로를 활성화하는 방법에 관한 것이다.

[0178] 본 개시물은 또한 본 개시물의 하나 이상의 융합 폴리펩타이드 또는 그러한 융합 폴리펩타이드를 포함하는 하나 이상의 조성물을 적용하는 것을 포함하는, 간세포 암종, 흑색종, 메르켈 세포 암종, 윌름스 종양 및 간모세포종과 같이 GPC3가 발현되는 종양 세포에 결합할 때 T 림프구 증식을 유도하는 방법을 고려한다.

[0179] 본 개시물은 간세포 암종, 흑색종, 메르켈 세포 암종, 윌름스 종양 및 간모세포종과 같이 GPC3가 발현되는 종양 세포에 대해 CD137 클러스터링 및 T-세포상의 활성화를 유도하는 본 개시물의 융합 폴리펩타이드 또는 그러한 융합 폴리펩타이드를 포함하는 조성물의 용도를 포함한다.

[0180] 다른 구현예에서, 본 개시물은 또한 여기에 개시된 융합 폴리펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자(DNA 및 RNA)에 관한 것이다. 또 다른 구현예에서, 본 개시물은 상기 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포를 포함한다. 유전자 암호의 축퇴성은 동일한 아미노산을 특징하는 다른 코돈에 의한 특정 코돈의 치환을 허용하기 때문에, 본 개시물은 여기에 기술된 바와 같은 융합 폴리펩타이드를 인코딩하는 특이 핵산 분자에 제한하지 않고 기능적 폴리펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 모든 핵산 분자를 포함한다. 이와 관련하여, 본 개시물은 또한 본 개시물의 융합 폴리펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 관한 것이다.

[0181] 일부 구현예들에서, 본 출원에 개시된 리포칼린 뮤테인을 인코딩하는 핵산 분자, 예컨대, DNA는 여기에 개시된 융합 폴리펩타이드가 발현되도록 본 개시물의 면역글로불린을 인코딩하는 다른 핵산 분자에 "작동 가능하게 연결"될 수 있다. 이와 관련하여, 작동 가능한 결합은 하나의 핵산 분자의 서열 요소들과 다른 핵산의 서열 요소들이 단일 폴리펩타이드로서 융합 폴리펩타이드의 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결되는 결합이다.

[0182] 본 개시물은 또한 유전 공학적 방법들에 의해 폴리펩타이드 또는 이의 임의의 서브유닛을 코딩하는 핵산으로부터 출발하여 생산되는 본 개시물의 융합 폴리펩타이드의 생산방법에 관한 것이다. 일부 구현예들에서, 방법은 인 비보에서 수행될 수 있고, 폴리펩타이드는 예를 들어, 세균 또는 진핵 숙주 유기체에서 생산된 다음 이 숙주 유기체 또는 그것의 배양물로부터 분리될 수 있다. 예를 들어 인 비트로 번역 시스템을 사용하여 인 비트로에서 본 개시물의 융합 폴리펩타이드를 생산하는 것도 가능하다.

[0183] 인 비보에서 융합 폴리펩타이드를 생산할 때, 그러한 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산이 재조합 DNA 기술(상기에서 이미 설명한 바와 같이)에 의해 적당한 세균 또는 진핵 숙주 유기체로 도입된다. 이 목적을 위해, 숙주 세포는 우선 확립된 표준 방법들을 사용하여 여기에 기술된 융합 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 클로닝 벡터에 형질전환된다. 이어서, 숙주 세포를 이중 DNA의 발현 및 대응하는 폴리펩타이드의 합성을 가능하게 하는 조건하에서 배양한다. 이후에, 폴리펩타이드는 세포 또는 배양 배지로부터 회수된다.

[0184] 본 개시물의 일 구현예에서, 이 방법은 hNGAL의 선형 폴리펩타이드 서열(SEQ ID NO: 2)의 28, 40-52, 60, 68, 65, 70, 71-81, 87, 89, 96, 98, 100-106, 114, 118, 120, 125-137 및 145의 서열 위치들에 대응하는 서열 위치들의 적어도 하나, 때로는 그 이상을 코딩하는 뉴클레오타이드 삼중항에서 hNGAL을 인코딩하는 적어도 하나의 핵산 분자에 돌연변이 유발을 받게 하는 것을 포함한다.

[0185] 또한, 일부 구현예들에서, Cys 76 및 Cys 175 사이의 자연적으로 발생하는 이황화 결합이 본 개시물의 hNGAL 뮤테인에서 제거될 수 있다. 따라서, 그러한 뮤테인은 예를 들어, 그람-음성 세균의 세포질에서 환원 레독스 환경

을 갖는 세포 구획에서 생산될 수 있다.

- [0186] 본 개시물은 또한 본 개시물의 리포칼린 뮤테인을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하고, 실험적 돌연변이 유발의 지시된 서열 위치들 외에 추가적인 돌연변이를 포함한다. 그러한 돌연변이는 예를 들어, 리포칼린 뮤테인의 개선된 폴딩 효율, 열적 안정성, 열 안정성 또는 리간드 결합 친화도에 기여하는 경우 종종 용인되거나 심지어 유리한 것으로 입증될 수 있다.
- [0187] 본 출원에 개시된 핵산 분자는 조절 서열(또는 조절 서열들)에 "작동 가능하게 연결"되어 이 핵산 분자의 발현을 가능하게 할 수 있다.
- [0188] DNA와 같은 핵산 분자는 그것이 전사 및/또는 번역 조절에 관한 정보를 포함하는 서열 요소들을 포함하고, 그러한 서열들이 폴리펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 "작동 가능하게 연결되어" 있다면, "핵산 분자를 발현할 수 있는" 또는 "뉴클레오타이드 서열의 발현을 가능하게 할 수 있는" 것으로 지칭된다. 작동 가능한 결합은 조절 서열 요소들과 발현될 서열이 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결되어 있는 결합이다. 유전자 발현에 필수적인 조절 영역의 정확한 성질은 종마다 다를 수 있지만 일반적으로 이들 영역은 원핵생물에서 프로모터 자체, 즉, 전사의 개시를 지시하는 DNA 요소들은 물론 RNA로 전사될 때 번역의 개시를 알리는 DNA 요소들 둘 다를 포함하는 프로모터를 포함한다. 그러한 프로모터 영역은 일반적으로 전사 및 번역의 개시에 결합하는 5' 비-코딩 서열, 예컨대 원핵생물에서 -35/-10 박스 및 샤인-달가노 요소 또는 진핵생물에서 TATA 박스, CAAT 서열 및 5'-캡핑 요소들을 포함한다. 이들 영역은 천연 폴리펩타이드를 숙주 세포의 특정 구획으로 표적화하기 위한 번역된 시그널 및 리더 서열뿐만 아니라 인핸서 또는 리프레서 요소들 역시 포함할 수 있다.
- [0189] 또한, 3' 비-코딩 서열은 전사 종결, 폴리아데닐화 등에 관련된 조절 요소들을 포함할 수 있다. 그러나 이들 종결 서열은 특정 숙주 세포에서 만족스러운 기능이 없다면 그 세포에서 기능성 시그널로 치환될 수 있다.
- [0190] 따라서, 본 개시물의 핵산 분자는 조절 서열, 예컨대, 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예들에서, 본 개시물의 핵산 분자는 프로모터 서열과 전사 종결 서열을 포함한다. 적당한 원핵생물 프로모터는 예를 들어, tet 프로모터, lacUV5 프로모터 또는 T7 프로모터이다. 진핵세포에서 발현에 유용한 프로모터의 예는 SV40 프로모터 또는 CMV 프로모터이다.
- [0191] 본 개시물의 핵산 분자는 또한 벡터 또는 임의의 다른 종류의 클로닝 비히클의 일부, 예를 들어, 플라스미드, 파지미드, 파지, 배큘로바이러스, 코스미드 또는 인공 염색체일 수 있다.
- [0192] 일 구현예에서, 핵산 분자는 파지미드에 포함된다. 파지미드 벡터는 M13 또는 f1과 같은 템퍼런트(temperant) 파지의 유전자 간 영역 또는 관심 있는 cDNA에 융합된 이의 기능적 일부를 인코딩하는 벡터를 뜻한다. 그러한 파지미드 벡터 및 적당한 헬퍼 파지(예를 들어, M13K07, VCS-M13 또는 R408)로 세균 숙주 세포를 중복감염시킨 후 온전한 파지 입자가 생산되어, 파지 표면에 표시된 그것의 대응하는 폴리펩타이드와 암호화된 이중 cDNA의 물리적 커플링을 가능하게 한다(예를 들어, Lowman, H.B. (1997) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 401-424, 또는 Rodi, D.J., and Makowski, L. (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 87-9 참조).
- [0193] 그러한 클로닝 비히클은 상기 기술된 조절 서열들 및 여기에 기술된 융합 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열을 제외하고, 발현에 사용되는 숙주 세포와 양립 가능한 종류로부터 유래된 복제 및 조절 서열들뿐만 아니라 형질전환 또는 형질감염된 세포에서 선별 가능한 표현형을 부여하는 선별 마커를 포함할 수 있다. 다수의 적당한 클로닝 벡터들이 당업계에 공지되어 있고, 상업적으로 이용가능하다.
- [0194] 여기에 기술된 융합 폴리펩타이드를 인코딩하는 DNA 분자(예를 들어, SEQ ID NOs: 20 및 31), 및 특히 그러한 폴리펩타이드의 코딩 서열을 포함하는 클로닝 벡터는 유전자를 발현할 수 있는 숙주 세포에 형질전환될 수 있다. 형질전환은 표준 기술들을 이용하여 수행될 수 있다. 따라서, 본 개시물은 또한 여기에 개시된 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0195] 형질전환된 숙주 세포는 본 개시물의 융합 폴리펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 발현에 적당한 조건하에서 배양된다. 적당한 숙주 세포는 원핵생물, 예컨대, 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) 또는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 또는 진핵생물, 예컨대 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), SF9 또는 High5 곤충세포, 불멸화 포유동물 세포주(예를 들어, HeLa 세포 또는 CHO 세포) 또는 프라이머리 포유동물 세포일 수 있다.
- [0196] 여기에 개시된 융합 폴리펩타이드에 포함되는 것을 포함하여 분자 내 이황화 결합을 포함하는 본 개시물의 리포칼린 뮤테인이 있는 일부 구현예들에서, 적당한 시그널 서열을 사용하여 산화 레독스 환경을 갖는 세포 구획으

로 신생 폴리펩타이드를 유도하는 것이 바람직할 수 있다. 그러한 산화 환경은 대장균과 같은 그람-음성 세균의 주변세포질 또는 그람-양성 세균의 세포외 환경 또는 진핵세포의 소포체의 내강에 의해 제공될 수 있고, 보통 구조적 이황화 결합의 형성을 선호한다.

[0197] 일부 구현예들에서, 숙주 세포, 바람직하게는 대장균의 세포질에서 본 개시물의 융합 폴리펩타이드를 생산하는 것도 가능하다. 이 경우, 폴리펩타이드는 가용성 및 접힘 상태로 직접 수득되거나 봉입체 형태로 회수되고 이어서 인 비트로에서 복원된다. 추가적인 선택은 산화 세포 내 환경을 갖는 특정 숙주 균주의 사용이며, 이로 인해 세포질에서 이황화 결합의 형성을 가능하게 할 수 있다(Venturi et al. (2002) *J. Mol. Biol.* 315, 1-8.).

[0198] 일부 구현예들에서, 여기에 기술된 본 개시물의 융합 폴리펩타이드는 유전 공학의 사용에 의해서만 생성되거나 생산될 필요는 없다. 오히려, 그러한 폴리펩타이드는 메리필드 고체상 폴리펩타이드 합성과 같은 화학적 합성 또는 인 비트로 전사 및 번역에 의해 얻을 수 있다. 예를 들어, 가능성이 큰 돌연변이가 분자 모델링을 사용하여 확인된 후 인 비트로에서 원하는(디자인된) 뮤테인 또는 폴리펩타이드를 합성하고 관심 표적에 대한 결합 활성을 조사하는 것이 가능하다. 단백질의 고체상 및/또는 용액상 합성법은 당업계에 잘 알려져 있다(예컨대, Bruckdorfer, T. et al. (2004) *Curr. Pharm. Biotechnol.* 5, 29-43 참조).

[0199] 다른 구현예에서, 본 개시물의 융합 폴리펩타이드는 당업자에게 공지된 잘-확립된 방법들을 사용하여 인 비트로 전사/번역에 의해 생산될 수 있다.

[0200] 숙련된 기술자는 본 개시물에 의해 고려되는 융합 폴리펩타이드를 제조하는데 유용한 방법을 이해할 것이나 그의 단백질 또는 핵산 서열은 여기에 명시적으로 개시되어 있지는 않는다. 개요로서, 아미노산 서열의 그러한 변형들은 특정 제한 효소들에 대한 절단 부위를 포함함으로써 폴리펩타이드 유전자 또는 그의 부분들의 서브클로닝을 단순화하기 위해 예를 들어 단일 아미노산 위치들의 지정 돌연변이 유발을 포함한다. 또한, 이들 돌연변이는 그것의 표적(예를 들어, CD137 및 GPC3)에 대한 융합 폴리펩타이드의 친화도를 더욱 개선하기 위해 포함될 수 있다. 또한, 필요하다면, 폴딩 안정성, 혈청 안정성, 단백질 내성 또는 물 용해성을 개선하거나 응집 경향을 감소시키는 것과 같이 폴리펩타이드의 특정 특징들을 조절하기 위해 돌연변이가 도입될 수 있다. 예를 들어, 자연적으로 발생하는 시스테인 잔기들은 이황화 브릿지 형성을 방지하기 위해 다른 아미노산으로 돌연변이 될 수 있다.

[0201] 이 개시물의 추가적인 목적, 이점 및 특징들은 하기 실시예들 및 이의 첨부된 도면들을 검토함으로써 당업자에게 명백해질 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다. 따라서, 본 개시물은 예시적인 구현예들 및 선택적 특징들에 의해 구체적으로 개시되었으나, 여기에 구체화된 본 개시물의 변형 및 변이는 당업자에 의해 의존될 수 있고, 그러한 변형 및 변이는 이 개시물의 범위 내에 있는 것으로 간주되는 것으로 이해되어야 한다.

[0202] V. 실시예

[0203] 실시예 1: 항체-리포칼린 뮤테인 융합 폴리펩타이드의 발현 및 분석

[0204] 우리는 표적인 GPC3 및 CD137에 동시에 결합할 수 있는 이중특이적 구조물을 생성하기 위해 세 가지 접근법을 사용하였다.

[0205] 첫 번째 접근법에서, 우리는 예를 들어, SEQ ID NOs: 34 및 35에 의해 제공된 중쇄 및 경쇄를 갖는 CD137-특이 항체 및 예를 들어, SEQ ID NO: 10의 GPC3 리포칼린 뮤테인에 기초한 항체-리포칼린 뮤테인 융합 폴리펩타이드를 생성하였다. 모든 경우에서 단백질을 서로 융합시키기 위해 비구조적 프로테아제에 둔감한 (G4S)₃ 링커(SEQ ID NO: 49)를 사용하였다. 디자인된 다양한 형태들은 도 1A에 도시되어 있다. 생성된 변이체들은 절반-항체 교환을 최소화하기 위해 돌연변이 된 IgG4 백본을 포함하는 항체의 4개의 말단 중 어느 하나에 리포칼린 뮤테인이 융합되어 있다(S228P 돌연변이, SEQ ID NO: 34 참조): SEQ ID NOs: 36 및 37, SEQ ID NOs: 38 및 39, SEQ ID NOs: 40 및 41, SEQ ID NOs: 42 및 43.

[0206] 두 번째 접근법에서, 우리는 Fc-감마 수용체 상호작용을 감소시키기 위한 F234A 및 L235A 돌연변이(Alegre 1992) 뿐만 아니라 인 비트로 및 인 비보에서 IgG4 절반-항체 교환을 최소화하기 위해 S228P 돌연변이를 포함하는 조작된 IgG4-Fc 단편(SEQ ID NO: 73)(Silva 2015 참조)에 두 개의 리포칼린 뮤테인(GPC3에 결합하는 SEQ ID NO: 10 및 CD137에 결합하는 SEQ ID NO: 26)의 융합을 생성하였다. 생성된 융합 폴리펩타이드(SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45)는 도 1B에 구조적으로 도시되어 있다.

[0207] 첫 번째 및 두 번째 접근법의 구조물은 유전자 합성에 의해 생성되었고, 포유동물 발현 벡터에 클로닝되었다. 이어서, CHO 세포에서 일시적으로 발현되었다. 세포 배양 배지에서 항체-리포칼린 뮤테인 융합 폴리펩타이드 및

IgG4Fc-리포칼린 뮤테인 융합 폴리펩타이드의 농도는 ForteBio ProteinA sensor(Pall Corp.)를 사용하여 측정되었고, 인간 IgG1 표준물질을 사용하여 정량하였다(미도시 됨).

[0208] 세 번째 접근법에서, 우리는 하나 이상의 (G4S)₂ 링커(SEQ ID NO: 48)에 의해 연결되고 도 1C에 도시된 두 개의 상이한 디자인을 사용하여 두 개의 리포칼린 뮤테인(SEQ ID NO: 10 및 SEQ ID NO: 26)의 융합을 생성하였다. 첫 번째 디자인에서, SEQ ID NO: 26은 SEQ ID NO: 10의 C-말단에 융합되어 SEQ ID NO: 46의 융합 폴리펩타이드를 생성하고, 두 번째 디자인에서, SEQ ID NO: 26의 2개의 카피는 SEQ ID NO: 10의 C-말단에 융합되어 SEQ ID NO: 47의 융합 폴리펩타이드를 생성하였다. 구조물은 친화도 크로마토그래피 정제를 위한 스트랩-태그(SEQ ID NO: 50)를 포함하였다. 구조물은 표준 방법들을 사용하여 클로닝되었고, 원형질막 분비를 이용하는 대장균(*E. coli*)에서 발현되었다.

[0209] 항체-리포칼린 뮤테인 융합 폴리펩타이드 및 IgG4Fc 단편-리포칼린 뮤테인 융합 폴리펩타이드는 10 mM 히스티딘 pH 5.5, 150 mM NaCl 또는 PBS, pH7.4에서 Protein A 크로마토그래피에 이어서 크기-배제 크로마토그래피(SEC)를 통해 정제되었다. SEC 정제 후 단량체 단백질을 포함하는 분획을 모으고 분석 SEC를 사용하여 다시 분석하였다. 이 분석에 따르면, 융합 폴리펩타이드는 검출 가능한 다량체 중 또는 응집체 없이 전적으로 단량체였다(미도시 됨).

[0210] **실시예 2: GPC3에 대한 융합 폴리펩타이드의 특이도**

[0211] 우리는 제조함 인간 GPC3(R&D Systems #2119-GP-050/CF)에 대한 SEQ ID NOs: 36 및 37, SEQ ID NOs: 38 및 39, SEQ ID NOs: 40 및 41 및 SEQ ID NOs: 42 및 43의 융합 폴리펩타이드의 특이도를 측정하기 위해 ELISA 분석을 사용하였다. 표적을 PBS(1μg/mL)에 녹이고, 4°C에서 밤새 마이크로타이터 플레이트 상에 코팅시켰다. 플레이트를 0.1%(v/v) Tween 20가 보충된 100μl PBS(PBS-T)로 각 배양 단계 후 5회 세척하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 PBS-T에 녹인 2% BSA(w/v)로 차단한 후 세척하였다. 리포칼린 뮤테인(SEQ ID NO: 10) 또는 융합 폴리펩타이드를 농도별로 각 웰에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고 이어서 세척 단계를 수행하였다. 결합된 융합 단백질 또는 리포칼린 뮤테인은 1:1000으로 희석된 2%(w/v) BSA가 보충된 PBS-T(PBS-TB)에 녹인 HRP에 컨쥬게이트 된 항-인간 NGAL 항체와 인큐베이션한 후 검출하였다. 추가 세척 단계 후, 형광 HRP 기질(QuantaBlu, Thermo)을 각 웰에 첨가하고 형광 마이크로플레이트 리더를 사용하여 형광 강도를 측정하였다.

[0212] 실험 결과는 EC₅₀ 값과 최대 시그널이 자유 파라미터이고, 기울기가 1로 고정된 1:1 결합 S자형 조정으로부터 생성된 조정 곡선과 함께 도 2에 도시하였다.

[0213] 생성된 EC₅₀ 값은 표 1에 제공되며, 데이터의 S자형 조정의 오류를 포함하여 여기에 표에 요약된 모든 데이터의 경우이다. 관찰된 EC₅₀ 값은 모든 항체-리포칼린 뮤테인 융합 폴리펩타이드(0.25 - 0.28 nM)에 대해 유사한 범위에 있으며, 모두 0.55 nM에 있는 리포칼린 뮤테인(SEQ ID NO: 10)보다 약간 양호하였다. 실험은 상기 기술된 융합 폴리펩타이드에 포함될 때, 리포칼린 뮤테인이 GPC3에 대한 활성의 손실 없이 항체의 4개의 말단 중 하나에 융합될 수 있음을 보여준다.

표 1

[0214] GPC3 결합에 대한 ELISA 데이터

명칭	EC ₅₀ GPC3 [nM]
SEQ ID NOs: 42 및 43	0.27 ± 0.03
SEQ ID NOs: 40 및 41	0.25 ± 0.02
SEQ ID NOs: 38 및 39	0.26 ± 0.02
SEQ ID NOs: 36 및 37	0.28 ± 0.02
SEQ ID NO: 10	0.55 ± 0.03

[0215] **실시예 3: 인간 CD137에 대한 융합 폴리펩타이드의 특이도**

[0216] 우리는 제조함 CD137-Fc 융합 단백질(#838-4B-100, R&D Systems)에 대한 SEQ ID NOs: 36 및 37, SEQ ID NOs: 38 및 39, SEQ ID NOs: 40 및 41 그리고 SEQ ID NOs: 42 및 43의 융합 폴리펩타이드의 특이도를 측정하기 위해 ELISA 분석을 사용하였다. SEQ ID NOs: 34 및 35의 항체를 양성 대조군으로 사용하였다. 표적을 PBS(1μg/mL)에 녹이고, 4°C에서 밤새 마이크로타이터 플레이트 상에 코팅하였다. 각 배양 단계 후 100μl/L의 PBS-T로 플레이트를 5회 세척하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 PBS-T에 녹인 2% BSA(w/v)로 차단한 후 세척하였다.

CD137-특이 항체 또는 융합 폴리펩타이드를 농도별로 웰에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 다음 세척 단계를 수행하였다. 결합된 융합 단백질은 PBS-TB에서 1:5000으로 희석된 HRP에 컨쥬게이트 된 마우스 항-인간 IgG Fab 항체(Jackson Laboratories)로 실온에서 1시간 동안 인큐베이션 한 후 검출되었다. 추가의 세척 단계 후, 형광성 HRP 기질(QuantaBlu, Thermo)을 각 웰에 첨가하고, 형광 마이크로플레이트 리더를 사용하여 형광 강도를 검출하였다.

[0217] 실험 결과는 EC50 값과 최대 시그널이 자유 파라미터이고, 기울기가 1로 고정된 1:1 결합 S자형 조정으로부터 생성된 조정 곡선과 함께 도 3에 도시되었다. 생성된 EC50 값은 표 2에 제공된다. 시험된 모든 분자에 대해 관찰된 EC50 값은 매우 유사하고, 1.5 nM 내지 2.3 nM 범위였다. 실험은 기술된 융합 폴리펩타이드에 포함될 때, 항체는 CD137에 대한 활성의 손실 없이 항체의 4개의 말단 중 어느 하나에서 리포칼린 뮤테인과 융합될 수 있음을 보여준다.

표 2

[0218] CD137 결합에 대한 ELISA 데이터

명칭	EC50 CD137 [nM]
SEQ ID NOs: 42 및 43	2.1 ± 0.03
SEQ ID NOs: 40 및 41	2.0 ± 0.02
SEQ ID NOs: 38 및 39	2.3 ± 0.02
SEQ ID NOs: 36 및 37	1.6 ± 0.02
SEQ ID NOs: 34 및 35	1.5 ± 0.03

[0219] 실시예 4: ELISA-기반 세팅에서 융합 폴리펩타이드의 동시 표적 결합의 입증

[0220] GPC3 및 CD137과의 SEQ ID NOs: 36 및 37, SEQ ID NOs: 38 및 39, SEQ ID NOs: 40 및 41 그리고 SEQ ID NOs: 42 및 43의 융합 폴리펩타이드의 동시 결합을 입증하기 위해, 이중-결합 ELISA 포맷이 사용되었다. PBS(1 µg/mL)에 녹인 재조합 인간 CD137-Fc 융합 단백질(R&D Systems)을 4°C에서 밤새 마이크로타이타 플레이트 상에 코팅하였다. 각 배양 단계 후 100µl PBS-T로 플레이트를 5회 세척하였다. PBS-T에 녹인 2% BSA(w/v)로 실온에서 1시간 동안 플레이트를 차단하고 나서 다시 세척하였다. 융합 폴리펩타이드를 농도별로 웰에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션 하고 나서 세척 단계를 수행하였다. 이후에, 비오틴화 된 인간 GPC3를 PBS-TB에 1µg/mL의 일정 농도로 첨가하였다. 세척 후 엑스트라비딘-HRP(Sigma-Aldrich, PBS-TB로 1:5000 희석)를 웰에 1시간 동안 첨가하였다. 추가 세척 단계 후, 형광성 HRP 기질(QuantaBlu, Thermo)을 각 웰에 첨가하고 형광 마이크로플레이트 리더를 사용하여 형광 강도를 측정하였다.

[0221] 실험 결과는 EC50 값과 최대 시그널이 자유 파라미터이고, 기울기가 1로 고정된 1:1 결합 S자형 조정으로부터 생성된 조정 곡선과 함께 도 4에 도시되었다. 생성된 EC50 값은 표 3에 제공된다. 모든 융합 폴리펩타이드는 융합 폴리펩타이드가 GPC3 및 CD137을 동시에 결합시킬 수 있음을 입증하는, 1.7-2.1 nM 범위의 EC50 값을 갖는 명확한 결합 시그널을 나타냈다.

표 3

[0222] 동시 표적 결합에 대한 ELISA 데이터

명칭	EC50 이중 결합 [nM]
SEQ ID NOs: 42 및 43	1.92 ± 0.27
SEQ ID NOs: 40 및 41	1.97 ± 0.32
SEQ ID NOs: 38 및 39	2.06 ± 0.36
SEQ ID NOs: 36 및 37	1.74 ± 0.25

[0223] 실시예 5: 인간 GPC3에 대한 항체 및 융합 폴리펩타이드의 친화도

[0224] 재조합 인간 GPC3(R&D Systems #2119-GP-050/CF)에 대한 SEQ ID NO: 10의 리포칼린 뮤테인과 SEQ ID NOs: 42 및 43뿐만 아니라 SEQ ID NOs: 36 및 37, SEQ ID NOs: 38 및 39, SEQ ID NOs: 40 및 41의 융합 폴리펩타이드의 결합 친화도는 Biacore T200 instrument(GE Healthcare)를 이용한 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 측정되었다. SPR 친화도 분석에서, 비오틴화 된 GPC3는 Biotin CAPture Kit(GE Healthcare)를 사용하여 센서

칩("CAP chip") 상에서 포획되었다: 센서 칩 캡은 ssDNA 올리고가 미리 고정되어 있다. 희석하지 않은 비오틴 캡처 시약(상보적 ss-DNA 올리고가 결합된 스트렙타비딘)을 300초 동안 2 μ l/min의 유속으로 처리하였다. 리포칼린 뮤테인의 분석을 위해, 1 μ g/mL의 농도의 비오틴화 된 GPC3를 사용하였고, 융합 단백질을 위해서는 0.25 μ g/mL의 비오틴화 된 GPC3가 사용되었다. 비오틴화 된 GPC3를 5 μ l/min의 유속으로 300초 동안 처리하였다. GPC3는 실온에서 2시간 동안 EZ-Link® NHS-PEG4-Biotin(5-배 물 초과, Thermo Scientific)와 인큐베이션 하여 비오틴화되었다. 과량의 미반응 비오틴 시약은 반응 혼합물을 Zeba™ Spin Desalting Plate(Thermo Scientific)에 로딩하여 제거하였다. 레퍼런스 채널에는 비오틴 캡처 시약만을 로딩하였다.

[0225] 친화도를 측정하기 위해, GPC3를 칩 표면에 고정하고, 각 시험된 시약(융합 폴리펩타이드 또는 리포칼린 뮤테인)의 4개의 다른 농도(11.1, 3.7, 1.2 및 0.4 nM)은 러닝 버퍼(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.05% v/v Surfactant P20, 3 mM EDTA, pH 7.4(GE Healthcare))에서 제조하고, 칩 표면에 처리하였다. 30 μ l/min의 유속으로 처리하면서, 시료 접촉 시간은 180초로 하고, 분리 시간은 1200초로 하였다. 모든 측정은 25°C에서 수행되었다. 센서 칩 캡 표면의 재생은 6 M guanidinium-HCl 및 0.25 M NaOH를 주입한 후 러닝 버퍼로 추가 세척하고 120초의 안정화 기간을 통해 달성되었다. 단백질 측정에 앞서, 컨디셔닝 목적을 위해 3회의 재생 사이클을 수행하였다. 데이터는 Biacore T200 평가 소프트웨어(V 2.0)로 평가되었다. 이중 참조가 사용되었고, 원시 데이터를 조정하기 위해 1:1 결합 모델을 사용하였다.

[0226] 데이터는 도 5에 도시되며, 조정 결과는 표 4에 요약하였다. 데이터로부터 융합 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 10의 리포칼린 뮤테인과 매우 유사한 친화도로 GPC3에 결합한다는 결론을 얻을 수 있다. 융합 폴리펩타이드의 경우 겔보기 결합 친화도는 17-30 pM의 범위이고, SEQ ID NO: 10의 리포칼린 뮤테인의 경우 겔보기 결합 친화도는 12 pM이었다.

표 4

[0227] GPC3에 대한 결합 친화도

명칭	K _D [pM]
SEQ ID NO: 10	12
SEQ ID NOs: 36 및 37	24
SEQ ID NOs: 42 및 43	30
SEQ ID NOs: 40 및 41	17
SEQ ID NOs: 38 및 39	20

[0228] 실시예 6: 인간 CD137에 대한 항체 및 융합 폴리펩타이드의 친화도

[0229] 재조합 인간 CD137-Fc 융합 단백질(#838-4B-100, R&D Systems)에 대한 SEQ ID NOs: 34 및 35의 항체와 SEQ ID NOs: 36 및 37, SEQ ID NOs: 38 및 39, SEQ ID NOs: 40 및 41 그리고 SEQ ID NOs: 42 및 43의 융합 폴리펩타이드의 결합 친화도는 실시예 5와 유사하게 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정되었다. 간략하게, 비오틴화 된 CD137-Fc는 센서 칩 캡 상에 포획되고, 각 시험된 시약(융합 단백질 또는 SEQ ID NOs: 34 및 35)의 4개의 희석액(20, 5, 1.3 및 0.3 nM)을 러닝 버퍼에서 제조하고, 칩 표면에 처리하였다. 30 μ l/min의 유속을 적용하면서, 시료 접촉 시간은 180초로 하고, 분리 시간은 600초로 하였다. 이외의 모든 실험은 실시예 5에 기술된 바와 같이 수행하고 분석하였다.

[0230] 결과는 표 5에 요약되었다. 데이터는 융합 폴리펩타이드가 항체와 매우 유사한 친화도로 CD137에 결합한다는 것을 보여준다. 겔보기 결합 친화도는 융합 단백질에 대해서는 71 - 179 pM, 항체 20H4.9(SEQ ID NOs: 34 및 35)에 대해서는 92 pM이었다.

표 5

[0231] CD137에 대한 결합 친화도

명칭	K _D [pM]
SEQ ID NOs: 34 및 35	92
SEQ ID NOs: 36 및 37	71
SEQ ID NOs: 42 및 43	62
SEQ ID NOs: 40 및 41	101
SEQ ID NOs: 38 및 39	179

[0232] 실시예 7: GPC3에 대한 리포칼린 뮤테인 Fc-융합 폴리펩타이드의 특이도

[0233] 우리는 재조합 인간 GPC3에 대한 융합 폴리펩타이드, SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45의 특이도를 측정하기 위해 실시예 2에 기술된 ELISA 분석을 사용하였다.

[0234] 실험 결과는 EC50 값과 최대 시그널이 자유 파라미터이고, 기울기가 1로 고정된 1:1 결합 S자형 조정으로부터 생성된 조정 곡선과 함께 도 7에 도시되었다. 생성된 EC50 값은 표 6에 제공된다. 리포칼린 뮤테인 Fc-융합 폴리펩타이드에 대한 관찰된 EC50 값은 GPC3-결합 리포칼린 뮤테인(SEQ ID NO: 10)보다 더 양호하였다.

표 6

[0235] GPC3 결합에 대한 ELISA 데이터

명칭	EC50 GPC3 [nM]
SEQ ID NO: 44	0.07 ± 0.04
SEQ ID NO: 45	0.12 ± 0.02
SEQ ID NO: 10	0.32 ± 0.04

[0236] 실시예 8: 인간 CD137에 대한 리포칼린 뮤테인 Fc-융합 폴리펩타이드의 특이도

[0237] 우리는 실시예 3에 기술된 바와 같이 재조합 CD137-Fc 융합 폴리펩타이드에 대한 SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45의 리포칼린 뮤테인 Fc-융합 폴리펩타이드의 특이도를 측정하기 위해 ELISA 분석을 사용하였다.

[0238] 실험 결과는 EC50 값과 최대 시그널이 자유 파라미터이고, 기울기가 1로 고정된 1:1 결합 S자형 조정으로부터 생성된 조정 곡선과 함께 도 8에 도시되었다. 생성된 EC50 값은 표 7에 제공된다. 리포칼린 뮤테인 Fc-융합 폴리펩타이드에 대한 관찰된 EC50 값은 CD137-결합 리포칼린 뮤테인(SEQ ID NO: 26)의 관찰된 EC50 값보다 양호하였다.

표 7

[0239] CD137 결합에 대한 ELISA 데이터

명칭	EC50 CD137 [nM]
SEQ ID NO: 44	0.13 ± 0.01
SEQ ID NO: 45	0.21 ± 0.01
SEQ ID NO: 26	0.43 ± 0.03

[0240] 실시예 9: ELISA-기반 세팅서 리포칼린 뮤테인 Fc-융합 폴리펩타이드의 동시 표적 결합의 입증

[0241] GPC3 및 CD137에 대한 SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45의 융합 폴리펩타이드의 동시 결합을 입증하기 위해, 실시예 4와 유사하게 이중-결합 ELISA 포맷이 사용되었다.

[0242] 실험 결과는 EC50 값과 최대 시그널이 자유 파라미터이고, 기울기가 1로 고정된 1:1 결합 S자형 조정으로부터 생성된 조정 곡선과 함께 도 9에 도시되었다. 생성된 EC50 값은 표 8에 제공된다. 두 융합 폴리펩타이드 모두 1.7 nM에 가까운 EC50 값을 갖는 명확한 결합 시그널을 보여, 융합 폴리펩타이드는 GPC3 및 CD137을 동시에 결합시킬 수 있음을 입증하였다.

표 8

[0243] 동시 표적 결합에 대한 ELISA 데이터

명칭	EC50 이중 결합[nM]
SEQ ID NO: 44	1.72 ± 0.26
SEQ ID NO: 45	1.70 ± 0.30

[0244] 실시예 10: 인간 GPC3에 대한 항체 및 융합 폴리펩타이드의 친화도

[0245] 재조합 인간 GPC3에 대한 SEQ ID NO: 10의 GPC3-결합 리포칼린 뮤테인 및 SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45의 융합 폴리펩타이드의 결합 친화도는 실시예 5에 기술된 바와 같이 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정되었다.

[0246] 데이터는 도 10에 도시되었고, 조정된 K_D 값은 표 9에 요약되어 있다. 데이터는 융합 폴리펩타이드가 리포칼린 뮤테인과 매우 유사한 친화도로 GPC3에 결합함을 보여준다. 리포칼린 뮤테인에 대한 33 pM의 겉보기 결합 친화도와 비교하여 융합 폴리펩타이드들에 대한 겉보기 결합 친화도는 각각 23 pM 및 29 pM이었다.

표 9

[0247] GPC3에 대한 결합 친화도

명칭	K_D [pM]
SEQ ID NO: 10	33
SEQ ID NO: 44	29
SEQ ID NO: 45	23

[0248] 실시예 11: 인간 CD137에 대한 항체 및 융합 폴리펩타이드의 친화도

[0249] 재조합 인간 CD137-Fc 융합 단백질에 대한 SEQ ID NO: 26의 CD137-결합 리포칼린 뮤테인 및 SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45의 융합 폴리펩타이드의 결합 친화도는 실시예 6과 유사하게 측정되었다.

[0250] SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45의 융합 폴리펩타이드에 대한 데이터는 도 11에 도시되었고, 모든 시험된 분자들에 대해 조정된 K_D 값은 표 10에 요약되어 있다. 데이터는 융합 폴리펩타이드들이 2.3 nM의 값을 가진 리포칼린 뮤테인의 K_D 값보다 우수한 각각 1 nM 또는 1.1 nM의 친화도로 CD137에 결합함을 보여준다.

표 10

[0251] CD137에 대한 결합 친화도

명칭	K_D [nM]
SEQ ID NO: 26	2.3
SEQ ID NO: 44	1.1
SEQ ID NO: 45	1.0

[0252] 실시예 12: GPC3에 대한 융합 폴리펩타이드의 특이도

[0253] 우리는 SEQ ID NOs: 51 및 52의 CD137-결합 항체 및 SEQ ID NO: 10의 GPC3-결합 리포칼린 뮤테인에 기초한 추가의 융합 폴리펩타이드를 생성하였다. 리포칼린 뮤테인은 (G4S)₃ 링커를 사용하여 중쇄의 C-말단에 융합되어 SEQ ID NOs: 53 및 54의 융합 폴리펩타이드를 생성하였다.

[0254] 우리는 재조합 인간 GPC3에 대한 SEQ ID NOs: 53 및 54의 융합 폴리펩타이드의 특이도를 측정하기 위해 실시예 2에 기술된 ELISA 분석을 수행하였다.

[0255] 실험 결과는 EC50 값과 최대 시그널이 자유 파라미터이고, 기울기가 1로 고정된 1:1 결합 S자형 조정으로부터 생성된 조정 곡선과 함께 도 12에 도시되었다. 생성된 EC50 값은 표 11에 제공된다. GPC3에 대한 EC50은 융합 폴리펩타이드 및 리포칼린 뮤테인과 유사하다. 데이터는 융합 폴리펩타이드에 포함될 때 리포칼린 뮤테인이 GPC3에 대한 활성의 손실 없이 항체에 융합될 수 있음을 보여준다.

표 11

[0256] GPC3 결합에 대한 ELISA 데이터

명칭	EC50 GPC3 [nM]
SEQ ID NOs: 53 및 54	0.62 ± 0.05
SEQ ID NO: 10	0.55 ± 0.03

[0257] 실시예 13: ELISA-기반 세팅에서 융합 폴리펩타이드의 동시 표적 결합의 입증

[0258] GPC3 및 CD137 둘 다에 대한 SEQ ID NOs: 53 및 54의 융합 폴리펩타이드의 동시 결합을 입증하기 위해 실시예 4와 유사하게 이중-결합 ELISA 포맷을 사용하였다.

[0259] 실험 결과는 EC50 값과 최대 시그널이 자유 파라미터이고, 기울기가 1로 고정된 1:1 결합 S자형 조정으로부터 생성된 조정 곡선과 함께 도 13에 도시되었다. 융합 폴리펩타이드는 4.66 ± 0.65 nM의 EC50 값으로 명확한 결합 시그널을 보여주어 폴리펩타이드가 GPC3 및 CD137에 동시에 결합할 수 있음을 입증하였다.

[0260] 실시예 14: GPC3에 대한 융합 폴리펩타이드의 특이도

[0261] 우리는 재조합 인간 GPC3에 대한 SEQ ID NO: 8의 리포칼린 뮤테인뿐만 아니라 SEQ ID NO: 46 및 SEQ ID NO: 47의 이중특이적 융합 폴리펩타이드의 특이도를 측정하기 위해 실시예 2에 기술된 ELISA 분석을 사용하였다.

[0262] 실험 결과는 EC50 값과 최대 시그널이 자유 파라미터이고, 기울기가 1로 고정된 1:1 결합 S자형 조정으로부터 생성된 조정 곡선과 함께 도 14에 도시되었다. 생성된 EC50 값은 표 12에 제공된다. 융합 폴리펩타이드들에 대한 EC50 값은 리포칼린 뮤테인의 EC50 값과 적어도 동일하거나 더 우수하다. 데이터는 2개의 융합 폴리펩타이드에 포함될 때 리포칼린 뮤테인이 GPC3에 대한 활성의 손실 없이 항체에 융합될 수 있음을 입증한다.

표 12

[0263] GPC3 결합에 대한 ELISA 데이터

명칭	EC50 GPC3 [nM]
SEQ ID NO: 46	0.14 ± 0.02
SEQ ID NO: 47	0.16 ± 0.03
SEQ ID NO: 8	0.24 ± 0.02

[0264] 실시예 15: 인간 CD137에 대한 융합 폴리펩타이드의 특이도

[0265] 우리는 재조합 CD137-Fc 융합 단백질에 대한 SEQ ID NO: 26의 리포칼린 뮤테인뿐만 아니라 SEQ ID NO: 46 및 SEQ ID NO: 47의 이중특이적 폴리펩타이드의 특이도를 측정하기 위해 실시예 3에 기술된 ELISA 분석을 사용하였다.

[0266] 실험 결과는 EC50 값과 최대 시그널이 자유 파라미터이고, 기울기가 1로 고정된 1:1 결합 S자형 조정으로부터 생성된 조정 곡선과 함께 도 15에 도시되었다. 생성된 EC50 값은 표 13에 제공된다. 융합 폴리펩타이드들에 대한 EC50 값은 리포칼린 뮤테인의 EC50 값과 적어도 동일하거나 더 우수하다. 데이터는 2개의 융합 폴리펩타이드에 포함될 때 항체가 CD137에 대한 활성의 손실 없이 리포칼린 뮤테인에 융합될 수 있음을 입증한다.

표 13

[0267] CD137 결합에 대한 ELISA 데이터

명칭	EC50 CD137 [nM]
SEQ ID NO: 46	0.20 ± 0.02
SEQ ID NO: 47	0.26 ± 0.01
SEQ ID NO: 26	0.28 ± 0.02

[0268] 실시예 16: ELISA-기반 세팅에서 융합 폴리펩타이드의 동시 표적 결합의 입증

[0269] GPC3 및 CD137에 대한 SEQ ID NO: 46 및 SEQ ID NO: 47의 이중특이적 폴리펩타이드의 동시 결합을 입증하기 위해 실시예 4와 유사하게 이중-결합 ELISA 포맷을 사용하였다.

[0270] 실험 결과는 EC50 값과 최대 시그널이 자유 파라미터이고, 기울기가 1로 고정된 1:1 결합 S자형 조정으로부터 생성된 조정 곡선과 함께 도 16에 도시되었다. 융합 폴리펩타이드 둘 다 $7.3-7.5$ nM의 EC50 값으로 명확한 결합 시그널을 나타내어 두 융합 폴리펩타이드가 GPC3 및 CD137에 동시에 결합할 수 있음을 입증하였다.

표 14

[0271]

동시 표적 결합에 대한 ELISA 데이터

명칭	EC50 이중 결합[nM]
SEQ ID NO: 46	7.30 ± 0.94
SEQ ID NO: 47	7.47 ± 0.79

[0272]

실시예 17: 인간 GPC3에 대한 융합 폴리펩타이드의 친화도

[0273]

제조합 인간 GPC3 및 제조합 인간 CD137에 대한 GPC3-결합 리포칼린 뮤테인 및 SEQ ID NO: 46 및 SEQ ID NO: 47의 이중특이적 폴리펩타이드의 결합 친화도는 실시예 5에 기술된 과정과 유사하게 러닝 버퍼로 HBS-EP+(1x; BR-1006-69; GE Healthcare)를 사용하여 Biacore T200 instrument(GE Healthcare) 상에서 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정되었다.

[0274]

Biotin CAPture Kit(GE Healthcare)를 칩 표면에 비오틴화 된 이중특이적 폴리펩타이드를 고정하는데 사용하였다. 이중특이적 폴리펩타이드는 표준 NHS 화학을 사용하여 비오틴화되었다. 회색하지 않은 비오틴 캡처 시약(ss-DNA 올리고와 결합된 스트렙타비딘)은 미리-고정된 상보적 ss-DNA 올리고로 센서 칩 캡 상에 포획되었다. 그 후, 1μg/mL의 비오틴화 된 뮤테인을 5μL/min의 유속으로 300초 동안 처리하였다.

[0275]

GPC3는 30μL/min의 유속에서 4개의 농도(300 nM, 100 nM, 33 nM 및 11 nM)로 처리되었다. GPC3는 180초 동안 주입되었고, 이후 분리 시간은 1200초로 설정되었다. 칩 표면의 재생은 10μL/min의 유속으로 6 M Guanidinium-HCl + 0.25 M NaOH (120초)를 주입하여 달성되었다. 재생 용액의 주입 후 HBS-EP+(1x; BR-1006-69; GE Healthcare) 러닝 버퍼로 추가 세척 단계 및 120초의 안정화 기간을 거쳤다.

[0276]

데이터는 대조 채널(비오틴 캡처 시약만 로딩함)에 대해 측정된 해당 시그널의 감산 및 결합 반응으로부터 버퍼 주입의 감산에 의해 이중-참조되었다. 결합 반응에 대한 결합 속도 상수 k_a 및 해리 속도 상수 k_d 는 Biacore T200 평가 소프트웨어 V2.0를 사용하여 데이터 처리 및 동역학적 조정을 위해 측정되었다.

[0277]

각각의 센서그램은 도 17에 도시되었다. 결과는 표 15에 요약되어 있다. 데이터는 이중특이적 폴리펩타이드가 각각 4.3 nM(SEQ ID NO: 46) 및 3.5 nM(SEQ ID NO: 47)의 친화도로 GPC3에 결합함을 보여준다.

표 15

[0278]

GPC3에 대한 결합 친화도

명칭	K_D [nM]
SEQ ID NO: 46	4.3
SEQ ID NO: 47	3.5

[0279]

실시예 18: 인간 CD137에 대한 융합 폴리펩타이드의 친화도

[0280]

제조합 인간 CD137-Fc 융합 단백질(#838-4B-100, R&D Systems)에 대한 CD137-결합 리포칼린 뮤테인 및 SEQ ID NO: 46 및 SEQ ID NO: 47의 이중특이적 폴리펩타이드의 결합 친화도는 실시예 6과 유사하게 Biacore T200 장비(GE Healthcare)를 사용하여 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정되었다. SPR 친화도 분석에 앞서, CM5 센서 칩을 Human Antibody Capture Kit(GE Healthcare # BR-1008-39)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 항-인간 Fc 항체로 유도체화하였다.

[0281]

친화도를 측정하기 위해, 인간 CD137-Fc 융합 단백질은 10μL/min의 유속 및 180초의 접촉 시간에서 0.25mg/mL의 농도로 칩 상에서 고정되었다. 4종의 농도(1000 nM, 200 nM, 40 nM 및 8 nM)의 이중특이적 폴리펩타이드를 러닝 버퍼(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.05% v/v Surfactant P20, 3 mM EDTA, pH 7.4(GE Healthcare))에서 제조하고 칩 표면에 처리하였다. 30μL/min의 유속을 가하면서, 시료 접촉 시간은 180초, 분리 시간은 600초로 하였다. 모든 측정은 25℃에서 수행하였다. 센서 칩 표면의 재생은 10 mM glycine pH 1.7의 주입 후 러닝 버퍼로 추가 세척 및 120초의 안정화 기간에 의해 달성되었다. 단백질 측정에 앞서, 3회의 재생 사이클이 컨디셔닝 목적으로 수행되었다. 데이터는 Biacore T200 평가 소프트웨어(V 2.0)로 평가되었다. 이중 참조가 사용되었고, 원시 데이터를 조정하기 위해 1:1 결합 모델을 사용하였다.

[0282]

결과는 도 18에 도시하였고, 표 16에 요약되어 있다. 데이터는 이중특이적 폴리펩타이드가 적어도 CD137에 대한

리포칼린 뮤테인의 친화도만큼 우수한 친화도로 CD137에 결합함을 보여준다.

표 16

[0283] CD137에 대한 결합 친화도

명칭	K _D [nM]
SEQ ID NO: 26	2.3
SEQ ID NO: 46	1.6
SEQ ID NO: 47	0.6

[0284] 실시예 19: 코팅된 융합 폴리펩타이드를 이용한 기능적 T-세포 활성화 분석

[0285] 우리는 T-세포 반응을 보조-자극하기 위한 SEQ ID NOs: 36 및 37, SEQ ID NOs: 38 및 39, SEQ ID NOs: 40 및 41, 그리고 SEQ ID NOs: 42 및 43의 융합 폴리펩타이드의 능력을 평가하기 위해 T-세포 활성화 분석을 사용하였다. 이 목적을 위해, 농도별로 융합 폴리펩타이드를 항-인간 CD3 항체(OKT3, eBioscience)와 함께 플라스틱 접시 위에 코팅하고, 이후 가용성 항-인간 CD28 항체(Clone 28.2; eBioscience)의 존재하에서 코팅된 표면에서 정제된 T-세포를 인큐베이션 하였다. 판독값으로서, 우리는 상등액의 인터루킨 2(IL-2) 수준을 측정하였다. 음성 대조군으로서, 인간 IgG4 이소타입을 사용하였다. 이후에 우리는 실험의 구체적인 설명을 제공한다.

[0286] Biochrom의 프로토콜에 따라 폴리수크로스 밀도 구배(Biocoll 1.077g/mL from Biochrom)를 통한 원심분리에 의해 버퍼 코트에서 건강한 기증자의 인간 말초혈액 단핵 세포(PBMC)를 분리하였다. Pan T-cell purification Kit(Miltenyi Biotec GmbH) 및 제조사의 프로토콜에 따라 생성된 PBMC로부터 T 림프구를 분리하였다. 정제된 T-세포는 90% FCS 및 10% DMSO로 구성된 버퍼에서 재현탁되고, 액체 질소를 사용하여 즉시 냉동하고, 추가로 사용할 때까지 액체 질소에서 저장하였다. 분석을 위해, T 세포를 16시간 동안 해동하고, 10% FCS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(Life Technologies)이 보충된 배양 배지(RPMI 1640, Life Technologies)에서 배양하였다.

[0287] 다음 과정은 각 실험 조건에 대해 3반복을 사용하여 수행되었다. 바닥이 평평한 조직 배양 플레이트를 0.5μg/mL의 항-CD3 항체 및 SEQ ID NOs: 36 및 37, SEQ ID NOs: 38 및 39, SEQ ID NOs: 40 및 41, 그리고 SEQ ID NOs: 42 및 43의 융합 폴리펩타이드의 희석 계열(25μg/mL, 2.5μg/mL, 및 0.25μg/mL) 또는 IgG4 이소타입 음성 대조군(25 μg/mL)의 혼합물 200μl를 사용하여 4℃에서 밤새 코팅하였다. 동일한 실험 조건을 갖는 다른 세팅에서, 융합 폴리펩타이드를 항-CD3 항체 대신에 IgG1 이소타입(추가 음성 대조군으로서)과 함께 코팅하였다. 다음날, PBS로 웰을 2회 세척하고, 2μg/mL의 항-hCD28 항체가 보충된 배양 배지에서 100μl의 T-세포 현탁액(5×10⁴ T 세포에 해당)을 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 가스 투과성 쉘(4titude)로 덮고 가습된 5% CO₂ 대기에서 37℃에서 3일 동안 배양하였다. 이후에, 세포 증식뿐만 아니라 상등액 중의 IL-2 농도를 평가하였다.

[0288] 풀드(pooled) 세포 배양 상등액에서 인간 IL-2 수준은 R&D Systems의 IL-2 DuoSet DuoSet kit를 이용하여 정량화되었다. 과정은 아래에 설명된 대로 수행되었다. 제1단계에서, PBS로 희석된 1μg/mL의 "인간 IL-2 캡처 항체"(R&D System)로 384-웰 플레이트를 실온에서 2시간 동안 코팅하였다. 이후에, 웰을 Biotek EL405 select CW washer(Biotek)를 사용하여 80μl의 PBS-T(0.05% Tween20를 포함하는 PBS)로 5회 세척하였다. 1% 카제인(w/w)을 추가로 포함하는 PBS-T에서 1시간 동안 차단한 후, 풀드 상등액 및 배양 배지로 희석된 IL-2 표준물질의 농도 계열을 384-웰 플레이트에서 4℃에서 밤새 인큐베이션 하였다. 포획된 IL-2의 검출 및 정량화를 가능케 하기 위해, 100ng/mL 비오틴화 된 염소 항-hIL-2-Bio 검출 항체(R&D System) 및 1μg/mL의 실포태그-표지된 스트렙타비딘(Mesoscale Discovery)의 혼합물을 0.5% 카제인을 포함하는 PBS-T에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다. 세척 후, 25μl의 리딩 버퍼를 각 웰에 첨가하고, 각 웰의 전기화학발광(ECL) 시그널을 메조스케일 디스커버리 리더를 이용하여 판독하였다. 분석 및 정량화는 메조스케일 디스커버리 소프트웨어를 이용하여 수행되었다.

[0289] 실험 결과는 도 19에 도시되어 있다. 4종의 융합 폴리펩타이드(SEQ ID NOs: 36 및 37, SEQ ID NOs: 38 및 39, SEQ ID NOs: 40 및 41 그리고 SEQ ID NOs: 42 및 43) 모두, 음성 대조군인 이소타입 IgG4과 비교하여 사용된 T-세포에 의한 IL-2 생산의 명백한 유도가 있었다. 데이터는 폴리펩타이드 융합들의 더 높은 코팅 농도들에서 더 강한 IL-2 유도 경향을 보여준다. T-세포의 항-CD3 자극이 없는 경우, 융합 폴리펩타이드는 T-세포에 의한 IL-2 생산을 유도하지 않았다. 이는 융합 폴리펩타이드가 항-CD3 및 항-CD28 항체로 자극된 T-세포의 활성화를 차선의 농도로 보조-자극할 수 있음을 입증한다.

[0290] **실시예 20: 종양 세포에 결합된 융합 폴리펩타이드를 이용한 기능적 T-세포 활성화 분석**

[0291] 우리는 GPC3-양성 세포주 상에 고정될 때 T-세포 반응을 보조자극하는 CD137 및 GPC3와 동시에 결합할 수 있는 SEQ ID NOs: 36 및 37, SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45의 융합 폴리펩타이드의 능력을 평가하기 위해 표적-세포 의존적 T-세포 활성화 분석을 사용하였다. 음성 대조군으로, SEQ ID NOs: 34 및 35의 단일특이적 CD137-결합 항체를 사용하였다. 실험에서, 항-인간 CD3 항체(OKT3, eBioscience)를 플라스틱 배양 접시에 코팅하고, 이후에 GPC3-양성 HepG2 세포를 접시에서 밤새 배양하였다. 다음날, 정제된 T-세포를 SEQ ID NOs: 36 및 37, SEQ ID NO: 44, 그리고 SEQ ID NO: 45의 융합 폴리펩타이드 또는 SEQ ID NOs: 34 및 35의 대조군 항체 1 μ g/mL의 존재에서 코팅된 표면에서 인큐베이션 하였다. 판독값으로, 상등액의 IL-2 수준을 측정하였다. 아래에 실험이 구체적으로 기술된다.

[0292] Biochrom의 프로토콜에 따라 폴리수크로스 밀도 구배(Biocoll 1.077g/mL from Biochrom)를 통한 원심분리에 의해 버퍼 코트에서 건강한 기증자의 인간 말초혈액 단핵 세포(PBMC)를 분리하였다. Pan T-cell purification Kit(Miltenyi Biotec GmbH)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 생성된 PBMC로부터 T 림프구를 분리하였다. 정제된 T-세포는 90% FCS 및 10% DMSO로 구성된 버퍼에서 재현탁하고, 액체 질소를 이용하여 즉시 동결하고, 이후 사용할 때까지 액체 질소에서 저장하였다. 분석을 위해, T 세포를 16시간 동안 해동하고, FCS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(Life Technologies)이 보충된 배양 배지(RPMI 1640, Life Technologies)에서 배양하였다.

[0293] 다음 과정은 각 실험 조건에 대해 3반복으로 수행되었다. 바닥이 평평한 조직 배양 플레이트를 0.25 μ g/mL 항-CD3 항체의 200 μ l를 사용하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 미리-코팅하거나 그렇지 않았다. 이후에 PBS로 웰을 2회 세척하였다. 웰당 1.25 $\times 10^4$ HepG2 종양 세포를 플레이팅하고, 가습된 5% CO₂ 대기에서 37 $^{\circ}$ C에서 밤새 부착되도록 하였다. HepG2 세포는 이전에 표준 조건하에서 배양하여 성장되었고, Accutase를 사용하여 탈착되었으며, 배양 배지로 재현탁되었다.

[0294] 다음날, 종양 세포에 그들의 증식을 차단하기 위해 10 μ g/mL의 농도의 마이토마이신 C(Sigma Aldrich)으로 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 처리하였다. 플레이트를 PBS로 2회 세척하고, 100 μ l의 T-세포 현탁액(5 $\times 10^4$ T 세포에 해당) 및 1 μ g/mL의 융합 폴리펩타이드 또는 음성 대조군을 각 웰에 첨가하였다. 가스 투과성 씰(4titude)로 플레이트를 덮고 가습된 5% CO₂ 대기에서 37 $^{\circ}$ C에서 3일 동안 배양하였다. 이후에, 상등액 내 IL-2 농도를 아래에 기술된 바와 같이 평가하였다.

[0295] 세포 배양 상등액 내 인간 IL-2 수준은 R&D Systems사의 IL-2 DuoSet 키트를 사용하여 정량화되었다. 과정은 아래에 기술된 대로 수행되었다. 제1단계에서, PBS로 희석된 1 μ g/mL의 "인간 IL-2 캡처 항체"(R&D System)로 384-웰 플레이트를 실온에서 2시간 동안 코팅하였다. 이후에, Biotek EL405 select CW washer(Biotek)를 사용하여 80 μ l의 PBS-T(0.05% Tween20를 포함하는 PBS)로 웰을 5회 세척하였다. 1% 카제인(w/w)을 추가로 포함하는 PBS-T에서 1시간 동안 차단한 후, 폴드 상등액 및 배양 배지로 희석된 IL-2 표준물질의 농도 계열을 384-웰 플레이트에서 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 인큐베이션하였다. 포획된 IL-2의 검출 및 정량화를 가능케 하기 위해, 100ng/mL의 비오틴화 된 염소 항-hIL-2-Bio 검출 항체(R&D System) 및 1 μ g/mL의 설포태그-표지된 스트렙타비딘(Mesoscale Discovery)의 혼합물을 0.5% 카제인을 포함하는 PBS-T에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다. 세척 후, 25 μ l의 리딩 버퍼를 각 웰에 첨가하고, 각 웰의 전기화학발광(ECL) 시그널을 메조스케일 디스커버리 리더를 이용하여 판독하였다. 분석 및 정량화는 메조스케일 디스커버리 소프트웨어를 이용하여 수행되었다.

[0296] 실험 결과는 도 20에 도시되었다. SEQ ID NOs: 36 및 37, SEQ ID NO: 44, 그리고 SEQ ID NO: 45의 3종의 융합 폴리펩타이드의 경우, SEQ ID NOs: 34 및 35의 대조군 항체와 비교하여 사용된 T-세포에 의한 IL-2 생산의 명백한 유도가 있었다. 이는 GPC3-결합 융합 폴리펩타이드가 대조군 항체보다 IL-2 생산 수준이 더 높다는 것을 입증함으로써 본 개시물의 융합 폴리펩타이드가 표적-의존적 방식으로 T-세포 활성화를 보조-자극할 수 있음을 보여준다.

[0297] **실시예 21: 이중특이적 결합의 차단의 유무에 따른 종양 세포에 결합된 융합 폴리펩타이드를 이용한 기능적 T 세포 활성화 분석**

[0298] 우리는 GPC3-양성 세포주에 결합될 때 T-세포 반응을 보조-자극하는 CD137 및 GPC3와 동시에 결합할 수 있는 SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45의 융합 폴리펩타이드의 능력을 평가하기 위해 실시예 20에 기술된 실험과 유사한 표적-세포 의존적 T-세포 활성화 분석을 사용하였다. 대조군으로, GPC3-양성 세포에 대한 결합으로부터 이중특이적 구조물 SEQ ID NO: 44 또는 SEQ ID NO: 45를 대체하기 위해 과량의 SEQ ID NO: 10의 단일특이적, GPC3-

결합 안티칼린의 존재에서 실험을 수행하였다. 실험에서, 항-인간 CD3 항체(OKT3, eBioscience)를 플라스틱 배양 접시에 코팅하고, 이후에, GPC3-양성 Hep3B 세포를 접시에서 밤새 배양하였다. 다음날, SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45($1\mu\text{g/mL}$, $0.1\mu\text{g/mL}$, $0.01\mu\text{g/mL}$, $0.001\mu\text{g/mL}$)의 융합 폴리펩타이드의 4종의 농도의 존재에서 코팅된 표면상에서 정제된 T-세포를 인큐베이션 하였다. 병행하여, 과량의 SEQ ID NO: 10(1mg/mL)를 첨가하여 실험을 수행하였다. 판독값으로서, 상등액의 IL-2 수준을 측정하였다. 아래에 실험이 구체적으로 기술된다.

[0299] Biochrom의 프로토콜에 따라 폴리수크로스 밀도 구배(Biocol 1.077 g/mL from Biochrom)를 통한 원심분리에 의해 버퍼 코트에서 건강한 기증자의 인간 말초혈액 단핵 세포(PBMC)를 분리하였다. Pan T-cell purification Kit(Miltenyi Biotec GmbH) 및 제조사의 프로토콜에 따라 생성된 PBMC로부터 T 림프구를 분리하였다. 정제된 T 세포는 10% FCS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(Life Technologies)이 보충된 배양 배지(RPMI 1640, Life Technologies)에서 배양하였다.

[0300] 다음 과정은 각 실험 조건에 대해 3반복을 사용하여 수행하였다. 평평한-바닥의 조직 배양 플레이트를 $0.25\mu\text{g/mL}$ 의 항-CD3 항체 $200\mu\text{L}$ 을 사용하여 37°C 에서 1시간 동안 미리 코팅하였다. 이후에 웰을 PBS로 2회 세척하였다. 웰당 1.25×10^4 Hep3B 종양 세포를 플레이팅하고 가습된 5% CO_2 대기에서 37°C 에서 밤새도록 정착되도록 하였다. Hep3B 세포는 표준 조건하에서 배양하여 성장시킨 후 Accutase를 사용하여 탈착시키고 배양 배지에서 재현탁하였다.

[0301] 다음날, 종양 세포의 증식을 차단하기 위해 $10\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 마이토마이신 C(Sigma Aldrich)를 37°C 에서 2시간 동안 처리하였다. PBS로 플레이트를 2회 세척하고, $100\mu\text{L}$ 의 T-세포 현탁액(5×10^4 T 세포에 해당)과 $1\mu\text{g/mL}$, $0.1\mu\text{g/mL}$, $0.01\mu\text{g/mL}$, $0.001\mu\text{g/mL}$ 농도의 SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45의 융합 폴리펩타이드를 과량의 SEQ ID NO: 10(1mg/mL)의 존재 또는 부재에서 첨가하였다. 가스 투과성 쉘(4titude)로 플레이트를 덮고, 가습된 5% CO_2 대기에서 37°C 에서 3일 동안 인큐베이션 하였다. 이후에, 제조사의 설명에 따라 BD Bioscience에 의한 인간 IL-2 ELISA 세트를 사용하여 ELISA에 의해 상등액 내 IL-2의 농도를 측정하였다.

[0302] 실험 결과는 도 21에 도시하였다. 2개의 융합 폴리펩타이드 SEQ ID NOs: 44(도 21A) 및 SEQ ID NO: 45(도 21C)의 경우 농도가 증가함에 따라 증가하는 사용된 T 세포에 의한 IL-2 생산의 명백한 유도가 있었다. 대조적으로, IL-2 생산 유도는 Hep3B 세포에 대한 이중 특이적 SEQ ID NOs: 44 및 SEQ ID NOs: 45의 결합을 억제하는 과량의 SEQ ID NO: 10의 존재에서 폐지된다. 이는 본 개시물의 융합 폴리펩타이드가 표적-의존적 방식으로 T-세포 활성화를 보조-자극할 수 있음을 나타낸다.

[0303] 특히, 유도된 IL-2의 함량은 SEQ ID NO: 45와 비교하여 SEQ ID NOs: 44에서 더 높으며, 이는 이중특이적 GPC3/CD137 융합의 기하학이 T 세포 활성화의 강도를 결정하는데 중요한 역할을 한다는 것을 나타내는 것이다.

[0304] **실시예 22: 높고 낮은 GPC3 수준을 갖는 종양 세포를 이용한 기능적 T-세포 활성화 분석**

[0305] 우리는 사용된 세포주의 GPC3 수준에 의존적인 T-세포 반응을 보조자극하는 SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45의 융합 폴리펩타이드의 능력을 평가하기 위해 실시예 20에 기술된 실험과 유사하게 표적-세포 의존적 T-세포 활성화 분석을 사용하였다. 음성 대조군으로서, HER2-결합 항체 트라스투주맙을 사용하였다. 비교를 위해, 우리는 SEQ ID NOs: 74 및 75의 표준 항-CD137 단클론 항체의 거동을 조사하였다. 실험에서, 항-인간 CD3 항체(OKT3, eBioscience)로 플라스틱 배양 접시를 코팅하고, 이후에, HepG2, SKBR3 또는 MCF7 세포를 접시에서 밤새도록 개별적으로 배양하였다. 다음날, 다양한 농도의 융합 폴리펩타이드 SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, 표준 항체 SEQ ID NOs: 74 및 75, 그리고 음성 대조군 트라스투주맙과 비히클(즉, 시험물질의 첨가가 없는)의 존재에서 코팅된 표면에서 정제된 T-세포를 인큐베이션 하였다. 판독값으로서, 상등액의 IL-2 수준을 측정하였다. 아래에 실험이 구체적으로 기술된다.

[0306] Biochrom의 프로토콜에 따라 폴리수크로스 밀도 구배(Biocol 1.077 g/mL from Biochrom)를 통한 원심분리에 의해 버퍼 코트에서 건강한 기증자의 인간 말초혈액 단핵 세포(PBMC)를 분리하였다. Pan T-cell purification Kit(Miltenyi Biotec GmbH) 및 제조사의 프로토콜에 따라 생성된 PBMC로부터 T 림프구를 분리하였다. 정제된 T 세포는 90% FCS 및 10% DMSO로 구성된 버퍼에서 재현탁하고, 액체 질소를 사용하여 즉시 동결하고, 추가 사용 때까지 액체 질소에서 저장하였다. T 세포는 16시간 동안 해동하고 10% FCS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(Life Technologies)이 보충된 배양 배지(RPMI 1640, Life Technologies)에서 배양하였다.

[0307] 다음 과정은 각 실험 조건에 대해 3반복을 사용하여 수행하였다. 평평한-바닥의 조직 배양 플레이트를 $0.25\mu\text{g/mL}$ 의 항-CD3 항체 $200\mu\text{L}$ 을 사용하여 37°C 에서 1시간 동안 미리 코팅하였다. 이후에 웰을 PBS로 2회

세척하였다. 웰당 5×10^4 표적 종양 세포를 플레이팅하고 가습된 5% CO₂ 대기에서 37℃에서 밤새도록 접촉되도록 하였다. 표적 세포는 표준 조건하에서 배양하여 성장시킨 후 Accutase를 사용하여 탈착시키고 배양 배지에서 재현탁하였다.

[0308] 다음날, 종양 세포의 증식을 차단하기 위해 30 μ g/mL의 농도로 마이토마이신 C(Sigma Aldrich)를 37℃에서 2시간 동안 처리하였다. PBS로 플레이트를 2회 세척하고, 100 μ L의 T-세포 현탁액(5×10^4 T 세포에 해당)을 0.05 nM 내지 5 nM 범위 농도의 시험물질 SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, 표준 항체 SEQ ID NOs: 74 및 75, 및 음성 대조군 트라스투주맙과 함께 각 웰에 첨가하였다. 가스 투과성 셀 (4titude)로 플레이트를 덮고, 가습된 5% CO₂ 대기에서 37℃에서 3일 동안 인큐베이션 하였다. 이후에, 아래 기술된 대로 상등액에서 IL-2의 농도를 평가하였다.

[0309] 세포 배양 상등액 중 인간 IL-2 수준은 IL-2 DuoSet kit from R&D Systems를 사용하여 정량화되었다. 과정을 수행하고, 아래에 기술하였다. 제1단계에서, PBS로 희석된 1 μ g/mL의 "인간 IL-2 포획 항체"(R&D System)로 실온에서 2시간 동안 384 웰 플레이트를 코팅하였다. 이후에, Biotek EL405 select CW washer(Biotek)를 사용하여 80 μ L의 PBS-T(0.05% Tween 20을 포함하는 PBS)로 웰을 5회 세척하였다. 추가로 1% 카제인(w/w)을 포함하는 PBS-T에서 1시간 동안 차단한 후 폴드 상등액과 배양 배지로 희석된 IL-2 표준물질의 농도 계열을 384-웰 플레이트에서 4℃에서 밤새도록 인큐베이션 하였다. 포획된 IL-2의 검출 및 정량화를 위해, 100ng/mL의 비오틴화 된 염소 항-hIL-2-Bio 검출 항체(R&D System) 및 1 μ g/mL의 세포태그-표지된 스트렙타비딘(Mesoscale Discovery)의 혼합물을 0.5% 카제인을 포함하는 PBS-T에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다. 세척 후, 25 μ L의 리딩 버퍼를 각 웰에 첨가하고, 모든 웰의 전기화학발광(ECL) 시그널을 메조스케일 디스커버리 리더를 사용하여 판독하였다. 분석 및 정량화는 메조스케일 디스커버리 소프트웨어를 사용하여 수행하였다.

[0310] 대표 실험 결과를 도 22에 도시하였다. 이 도면에서, 값은 시험물질의 부재하에서 백그라운드 IL-2 생산에 대해 상대적으로 표시되어 백그라운드와 비교된 배수(fold) 변화를 나타낸다. 음성 대조군인 트라스투주맙(도 22A, 삼각형)은 3개의 세포주 중 임의의 것과 T-세포에서 IL-2 유도를 일으키지 않지만, 이중특이적 융합 폴리펩타이드 SEQ ID NO: 44(도 22A, 원형) 및 SEQ ID NO: 45(도 22A, 사각형)의 농도가 증가함에 따라 T-세포를 유도하여 GPC3-발현 HepG2 세포의 존재에서 IL-2를 생산하도록 한다. 그러나 SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45로 인한 IL-2 증가는 GPC3 음성 SKBR3 및 MCF7 세포에 대해서는 명백하지 않다(도 22). 이 거동은 3개의 세포주 모두의 존재에서 T-세포상에 IL-2를 유도하는 항-CD137 항체 SEQ ID NOs: 74 및 75와는 현저하게 다르다(도 22B).

[0311] 실험은 SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45가 표적 세포 상의 GPC3의 존재에 의존하는 방식으로 T-세포를 활성화한다는 것을 명백하게 입증한다. GPC3-양성 HepG2 세포주는 IL-2 생산에 의해 측정된 바와 같이 명백한 T-세포 활성화를 나타내지만, GPC3의 검출 가능한 수준을 발현하지 않는 SKBR3 및 MCF7 세포에서는 이러한 효과가 일어나지 않는다. 이 효과는 GPC3의 존재에서 기인하고, 연구중인 GPC3 음성 세포주에서는 기인하지 않으며 잠재적으로 CD137 신호전달을 비효율적인 것으로 만드는 것은 항-CD137 항체 SEQ ID NOs: 74 및 75가 세 가지 세포 유형 모두와 CD137 신호전달을 통해 T-세포를 활성화할 수 있다는 사실에 의해 명백해진다.

[0312] **실시예 23: 융합 폴리펩타이드의 엑스 비보 T 세포 면역원성 평가**

[0313] 인간에서 항-약물 항체의 형성의 위험을 조사하기 위해, 이중특이적 융합 폴리펩타이드 SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45, 대조군 항체 트라스투주맙 및 양성 대조군 케이홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanine(KLH))의 인 비트로 T 세포 면역원성 평가를 수행하였다. 실험을 수행하기 위해, 전 세계 인구 분포를 반영한 인간 백혈구 항원(HLA) 동종형을 포함하기 위해 선택된 32명의 기증자 유래의 PBMC를 해동하고, 세척하고 96-웰 플레이트에 웰당 3×10^5 세포의 밀도로 씨딩하였다. 분석 배지로 희석된 시험물질을 30 μ g/mL의 농도로 세포에 첨가하였다. 분석 배지만 블랭크로 사용하고, 케이홀 림펫 헤모시아닌은 나이트 양성 대조군으로 사용하였다. PBMC는 가습된 대기에서 37℃ 및 5% CO₂에서 7일 동안 인큐베이션 하였다. 7일째에, PBMC는 표면 표현형 CD3⁺ 및 CD4⁺ 마커, 및 세포 증식 마커로 사용되는 DNA-결합된 EdU(5-ethynyl-2'-deoxyuridine)에 대해 표지되었다. CD3⁺CD4⁺EdU⁺ 증식 세포의 비율은 Guava easyCyte 8HT 플로우 사이토미터를 사용하여 측정하였고, GuavaSoft InCyte 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0314] 도 23은 32명 기증자 모두와 연구중인 모든 시험물질에 대해 이 분석의 결과를 제공한다. 도 23A에서, 시험물질의 유무에 따라 증식율에 의해 얻어진 자극 지수가 도시되었다. 응답 기증자(자극 지수 >2)를 정의하는 임계값은 점선으로 표시된다. 도 23B에서, 이 임계치에 의해 정의된 대로 응답하는 기증자의 수를 표시하였다.

분명히, 표준 트라스투주맵에 반응하는 기증자의 수는 1명에 불과하여 작으나, 32명의 기증자 모두 양성 대조군 KLH에 대해 임계치를 넘는 강한 증식으로 반응한다. 이중특이적 융합 폴리펩타이드 SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45의 경우, 응답 기증자의 수는 두 경우 모두 1이다.

[0315] 따라서, 이 실험은 이중특이적 융합 폴리펩타이드가 인 비트로 T 세포 면역원성 평가에서 거의 반응을 유도하지 않음을 나타내며, 이는 면역원성 반응을 유발할 위험이 낮음을 나타낸다.

[0316] **실시예 24: Fc-감마 수용체 hFc γ RI/CD64 및 hFc γ RIIIA/CD16a의 친화도**

[0317] Fc-감마 수용체 hFc γ RI/CD64(R&D Systems) 및 hFc γ RIIIA/CD16a(R&D Systems)에 대한 조작된 IgG4-기반 백본을 가진 폴리펩타이드 융합(SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45)의 결합 친화도를 평가하기 위해, 표면 플라즈몬 공명 기반 분석을 사용하였다. IgG1 백본을 가진 단일특이적 항체의 대조군으로 트라스투주맵을 제공하였다. SPR 친화도 분석에서, 폴리펩타이드 융합은 비오틴화되고, Biotin CAPture Kit(GE Healthcare)를 사용하여 센서 칩 캡 상에 포획되었다. 센서 칩 캡에는 ssDNA 올리고뉴클레오타이드가 미리 고정되어 있다. 회석하지 않은 비오틴 캡처 시약(상보적 ss-DNA 올리고뉴클레오타이드가 결합된 스트렙타비딘)은 2 μ l/min의 유속으로 300초 동안 처리되었다. 이후에, 10 μ g/mL의 비오틴화 된 폴리펩타이드 융합을 5 μ l/min의 유속으로 300초 동안 처리하였다. 트라스투주맵 및 폴리펩타이드 융합은 EZ-Link® NHS-PEG4-비오틴(Thermo Scientific)과 실온에서 2시간 동안 인큐베이션 하여 비오틴화되었다. 과량의 미반응 비오틴 시약은 반응 혼합물을 Zeba™ Spin Desalting Plate(Thermo Scientific)에 로딩하여 제거하였다. 레퍼런스 채널에는 비오틴 캡처 시약만 넣었다.

[0318] 친화도를 측정하기 위해, 러닝 버퍼(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.05% v/v Surfactant P20, 3 mM EDTA, pH 7.4(GE Healthcare))에서 hFc γ RI/CD64(100, 25 및 6.25 및 1.6 nM)의 4종의 희석 또는 hFc γ RIIIA/CD16a(1000, 333, 111, 37 및 12 nM)의 4종 내지 5종 희석을 제조하고 칩 표면에 처리하였다. 30 μ l/min의 유속을 적용하면서, 시료 접촉 시간은 180초, 분리 시간은 hFc γ RI/CD64에 대해서는 1800/2700초로 hFc γ RIIIA/CD16a에 대해서는 300초로 하였다. 모든 측정은 25℃에서 수행하였다. 센서 칩 캡 표면의 재생은 6 M Gua-HCl 및 0.25 M NaOH의 주입에 이어서 러닝 버퍼로 초과 세척하고, 120초의 안정화 시기를 거쳐 달성되었다. 단백질 측정 전에서 컨디셔닝 목적으로 3회의 재생 사이클을 수행하였다. 데이터는 Biacore T200 평가 소프트웨어(V 2.0)로 평가하였다. 이중 참조가 사용되었다. hFc γ RI/CD64의 경우, 원시 데이터를 조정하기 위해 1:1 결합 모델을 사용하였다. hFc γ RIIIA/CD16a의 경우 스테디 스테이트 친화도 모델을 사용하여 원시 데이터를 조정하였다.

[0319] 표 17은 hFc γ RI/CD64에 대한 데이터의 조정 결과를 보여준다. IgG1-기반 시험물질인 트라스투주맵은 0.3 nM의 친화도를 나타냈다. 폴리펩타이드 융합 SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45는 hFc γ RI/CD64에 대해 유의적인 결합을 보여주지 않았다. 이들 데이터는 hFc γ RI/CD64에 대한 결합이 이소타입을 IgG1에서 조작된 IgG4로 바꾸면 유의하지 않은 수준으로 감소될 수 있음을 입증한다.

표 17

클론 명칭	KD [nM]
트라스투주맵	0.3
SEQ ID NO: 44	검출되지 않음
SEQ ID NO: 45	검출되지 않음

[0321] 표 18은 hFc γ RIIIA/CD16a에 대한 데이터의 조정 결과를 보여준다. IgG1-기반 시험물질 트라스투주맵의 hFc γ RIIIA/CD16a에 대한 생성된 결합 친화도는 350 nM 근처이나 폴리펩타이드 융합 SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45는 hFc γ RIIIA/CD16a에 대해 유의적인 결합을 보여주지 않았다. 이들 데이터는 hFc γ RI/CD64에 대한 결합이 이소타입을 IgG1에서 조작된 IgG4로 바꾸면 유의하지 않은 수준으로 감소될 수 있음을 입증한다.

표 18

명칭	KD [nM]
트라스투주맵	335 $\pm$ 64
SEQ ID NO: 44	검출되지 않음
SEQ ID NO: 45	검출되지 않음

[0323] 실시예 25: 신생아 Fc 수용체에 대한 친화도

[0324] 조작된 IgG4-기반 백본을 가진 폴리펩타이드 융합(SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45)의 신생아 Fc 수용체(FcRn, Sino Biologicals, #CT009-H08H)에 대한 결합 친화도를 측정하기 위해, 표면 플라즈몬 공명 기반 분석을 사용하였다. 트라스투주맙을 IgG1 백본을 가진 단일특이적 항체의 대조군으로 제공하였다. SPR 친화도 분석에서, FcRn은 제조사의 설명서에 따라 CM5 센서 칩(GE Healthcare) 상에서 공유적으로 고정되었다. 간단히 말해, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide(EDC) 및 N-hydroxysuccinimide(NHS)로 텍스트란 매트릭스의 카르복실기를 활성화한 후, ~200 RU의 시그널이 도달할 때까지 표면상에서 FcRn 단백질의 1차 아민이 NHS 에스테르와 반응하도록 하였다. 마지막으로, 미반응 NHS-에스테르는 1M 에탄올아민의 용액을 표면을 통과시킴으로써 차단되었다. 고정화 과정 전반에 걸친 유속은 10 μ l/min이었다.

[0325] 그들의 친화도를 측정하기 위해, 러닝 버퍼(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.05% v/v Surfactant P20, 3 mM EDTA, pH 6.0)에서 모든 구조물의 6종의 희석액(1000 nM, 333 nM, 111 nM, 37 nM, 12 nM 및 4 nM)을 제조하고 칩 표면에 처리하였다. 30 μ l/min의 유속을 적용하면서, 시료 접촉 시간은 180초로, 분리 시간은 30초로 하였다. 모든 측정은 25 $^{\circ}$ C에서 수행하였다. 센서 칩 표면의 재생은 10 mM glycine pH 3.0의 주입으로 달성되었다. 단백질 측정 전에, 컨디셔닝 목적을 위해 3회 재생 사이클을 수행하였다. 데이터는 이중 참조를 사용하여 Biacore T200 평가 소프트웨어(V 2.0)로 평가되었다. 원시 데이터를 조정하기 위해 스테디 스테이트 친화도 모델을 사용하였다.

[0326] 표 19에 반영된 바와 같이, 모든 폴리펩타이드 융합의 FcRn에 대한 결합 친화도는 2 μ M 근처이었고, 이는 이소타입을 IgG1에서 조작된 IgG4로 바꾸는 것은 FcRn 결합에 검출 가능한 영향을 미치지 않음을 입증한다.

표 19

명칭	KD [μ M]
트라스투주맙	2.0
SEQ ID NO: 44	2.1
SEQ ID NO: 45	1.9

[0328] 실시예 26: 마우스에서 융합 폴리펩타이드의 약물동력학

[0329] SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45로 정의된 융합 폴리펩타이드의 약물동력학의 분석을 마우스에서 수행하였다. 약 5주령의 수컷 CD-1 마우스(시간대별로 3마리 마우스; Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH)의 꼬리 정맥 내로 10mg/kg의 투여량으로 융합 폴리펩타이드를 주사하였다. 시험물질은 5mL/kg의 부피를 볼루스로 사용하여 투여하였다. 마우스의 혈장 시료는 5분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 24시간, 48시간, 8일 및 14일의 시간대에 얻었다. 이소플루란 마취하에서 얻은 충분한 전혈을 수집하여 동물과 시간당 적어도 100 μ l의 Li-Heparin 혈장을 얻었다. 약물 수준은 표적 GPC3 및 CD137에 의해 전체 이중특이적 구조물을 검출하는 샌드위치 ELISA를 사용하여 검출되었다. 데이터는 Prism GraphPad 5 소프트웨어를 이용한 2-구획 모델을 사용하여 조정하였다.

[0330] 도 25는 구조물 SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45에 대한 시간별 혈장 농도의 도표를 보여주며, 내부에 대수 도표에서의 동일한 데이터를 보여준다. 약물동력학은 두 경우 모두 비슷하게 보였다. 약 150 μ g/mL의 혈장 농도에서 시작하여, 약 100시간 이내에 혈장 농도는 백그라운드 수준으로 떨어졌다. 2-구획 모델의 이중 지수 감쇠는 데이터를 정확하게 기재하기 위해 성공적으로 적용되었고, 이 모델을 이용한 데이터의 조정 시(도 25) SEQ ID NO: 44에 대해 13.7시간 그리고 SEQ ID NO: 45에 대해 10.0시간의 최종 반감기가 초래되었다.

[0331] 데이터는 이중특이적 융합이 Fc 융합 단백질에 대해 예상될 수 있는 중간 범위의 반감기를 갖는다는 것을 입증한다.

[0332] 실시예 27: 필리핀 원숭이에서 융합 폴리펩타이드의 약물동력학

[0333] SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45로 정의된 융합 폴리펩타이드의 약물동력학의 분석을 필리핀 원숭이에서 수행하였다. 수컷 필리핀 원숭이는 60분에 걸쳐 3mg/kg 시험물질의 투여량으로 정맥내 주사를 받았다. 15 min, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h, 3 d, 4 d, 5 d, 6 d, 7 d, 9 d, 11 d, 14 d, 18 d 및 24 d의 시간대별로 필리핀 원숭이에서 혈장 시료를 얻었다. 약물 수준은 표적 HER2 및 CD137에 의해 전체 이중특이적 구조물을 검출하는 샌드위치 ELISA를 사용하여 검출되었다. 트라스투주맙 혈장 수준은 표적 HER2 및 인간 Fc와 샌드위치

ELISA를 사용하여 측정되었다. 데이터는 Prism GraphPad 5 소프트웨어를 이용한 2-구획 모델을 사용하여 조정하였다. 도 26은 구조물 SEQ ID NO: 44 및 SEQ ID NO: 45에 대한 시간별 혈장 농도의 도표를 보여주며, 내부는 대수 도표에서의 동일한 데이터를 보여준다. 약물동력학은 두 경우 모두 비슷하게 보였다. SEQ ID NO: 44는 외관상 좀 더 긴 반감기를 나타낸다. 약 70 μ g/mL의 혈장 농도에서 시작하여, 혈장 수준은 200시간에 걸쳐 0에 가까운 수준으로 떨어졌다. 2-구획 모델의 이중 지수 감쇠는 데이터를 정확하게 기재하기 위해 성공적으로 적용되었고, 이 모델을 이용한 데이터의 조정 시(도 26) 각각 SEQ ID NO: 44에 대해 39시간 그리고 SEQ ID NO: 45에 대해 24.1시간의 최종 반감기가 초래되었다.

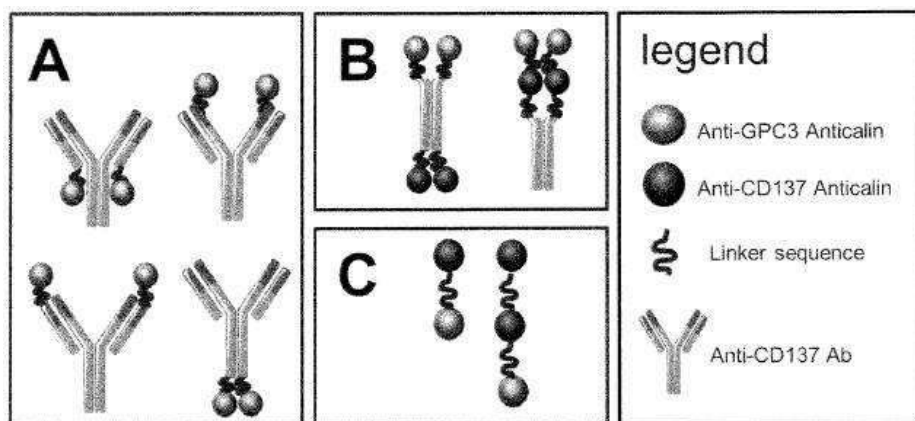
[0334] 그러므로 데이터는 이중특이적 융합이 마우스에서의 반감기와 비교하여 증가한 필리핀 원숭이에서의 최종 반감기를 가지며, 생물학적 치료제의 합리적인 범위를 가짐을 입증한다.

[0335] 여기에 예시적으로 기재된 구현예들은 여기에 구체적으로 개시되지 않은 임의의 요소 또는 요소들, 제한 또는 제한들이 없이 적당히 실시될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 용어 "포함하는", "함유하는", "내포하는" 등은 광범위하고 제한없이 읽혀져야 한다. 또한, 여기에 사용된 용어들 및 표현들은 설명의 용어들로서 사용되었을 뿐 제한은 아니며, 도시되고 기술된 특징들 또는 이의 일부의 임의의 등가물을 배제하는 그러한 용어들 및 표현들의 사용에 대한 의도는 없으나, 청구된 발명의 범위 내에서 다양한 변형들이 가능한 것으로 간주된다. 따라서, 본 구현예들이 바람직한 구현예들과 선택적 특징들에 의해 구체적으로 개시되었다고는 하나, 이의 변형 및 변이들이 당업자에 의해 이루어질 수 있고, 그러한 변형 및 변이들은 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 간주된다는 것으로 이해되어야 한다. 여기에 기재된 모든 특허, 특허출원, 교과서 및 동료 검토 논문들은 그들의 전체가 참조로 여기에 포함된다. 또한, 여기에 참조로 포함된 참고문헌에서 정의 또는 용어의 사용이 여기에 제공된 용어의 정의와 모순되거나 반대되는 경우, 여기에 제공된 해당 용어의 정의와 참조에서 해당 용어의 정의가 적용되지 않는다. 일반 개시물에 속하는 더 좋은 종 및 아속(sub-generic) 그룹화 각각 역시 본 발명의 일부를 형성한다. 삭제된 물질이 구체적으로 여기에 인용되는 지의 여부와 무관하게 속(genus)으로부터 임의의 대상을 제거하는 단서 또는 부정적 제한을 가진 발명의 일반적인 설명이 포함된다. 또한, 특징이 마쿠쉬 그룹으로 기재되는 경우, 당업자는 개시물이 마쿠쉬 그룹의 임의의 개별적인 구성원 또는 구성원들의 서브그룹의 관점에서 기재됨을 인식할 것이다. 추가의 구현예들은 다음의 청구범위로부터 명백해질 것이다.

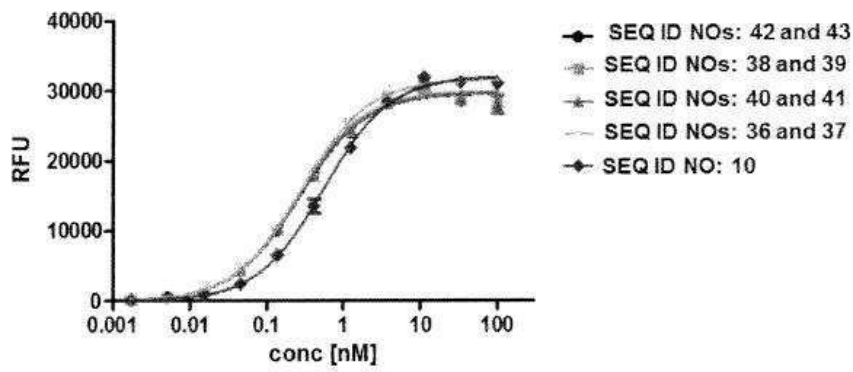
[0336] 등가물: 당업자는 일상적인 실험만을 사용하여 여기에 기재된 발명의 특정 구현예들에 대한 많은 등가물을 인식할 수 있거나 확인할 수 있다. 그러한 등가물은 하기 청구범위에 포함되도록 의도된다. 본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 여기에 참조로 포함되는 것처럼 동등한 정도로 본 명세서에 참조로 포함된다.

도면

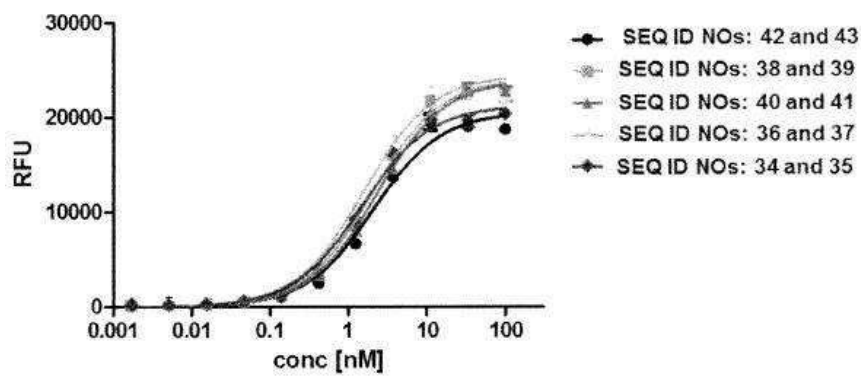
도면1



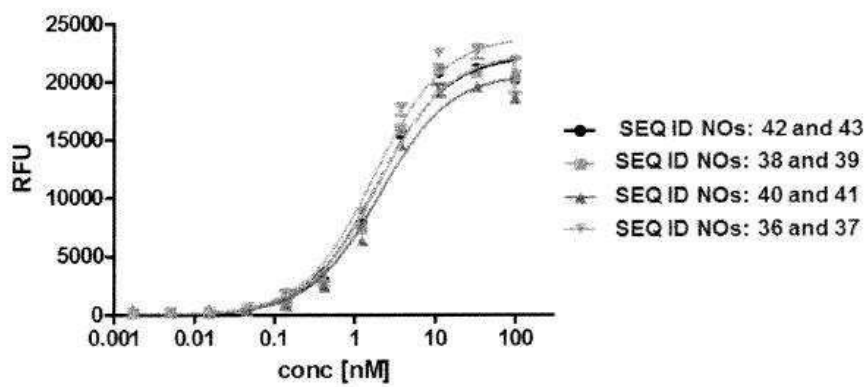
도면2



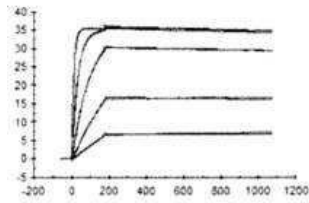
도면3



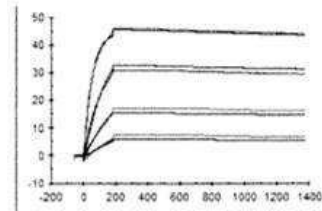
도면4



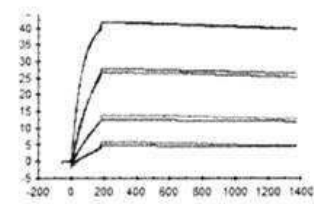
도면5



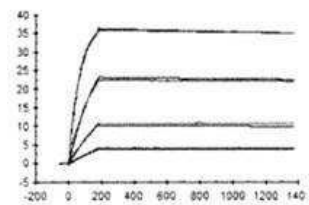
SEQ ID NO: 10



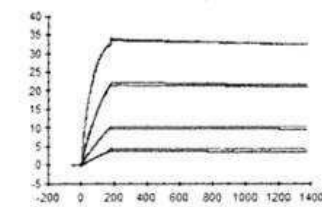
SEQ ID NOs: 36 and 37



SEQ ID NOs: 42 and 43

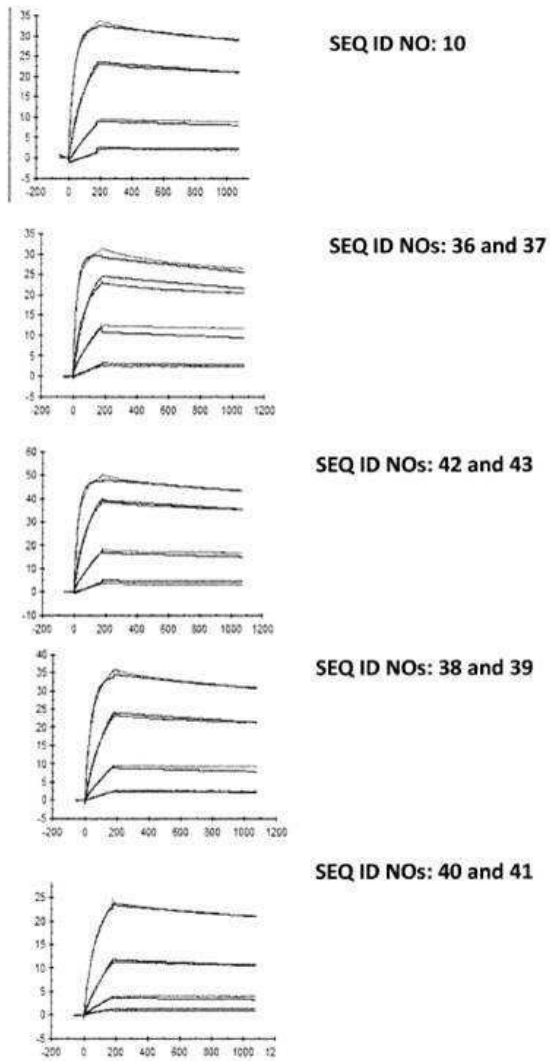


SEQ ID NOs: 38 and 39

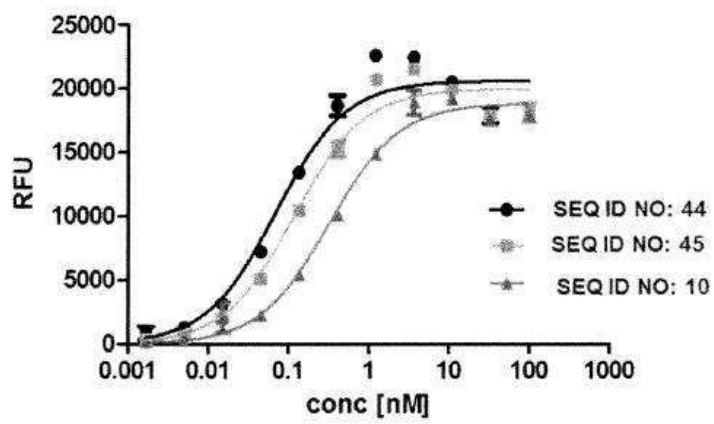


SEQ ID NOs: 40 and 41

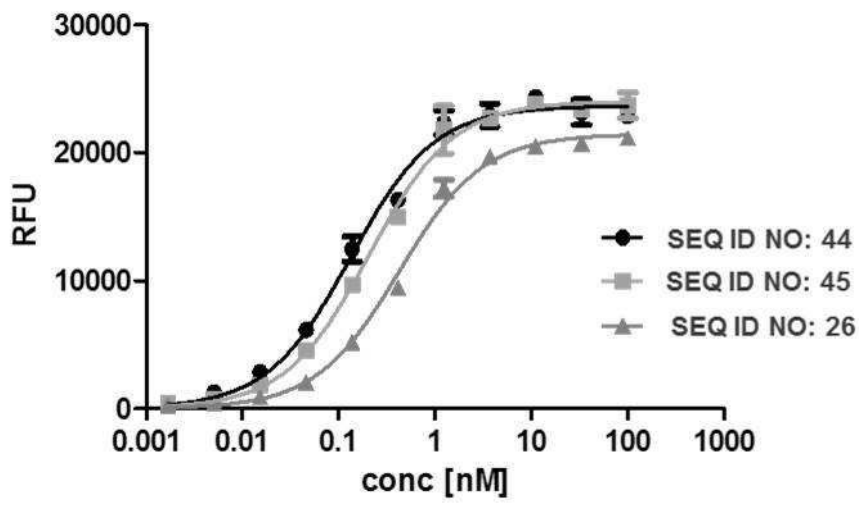
도면6



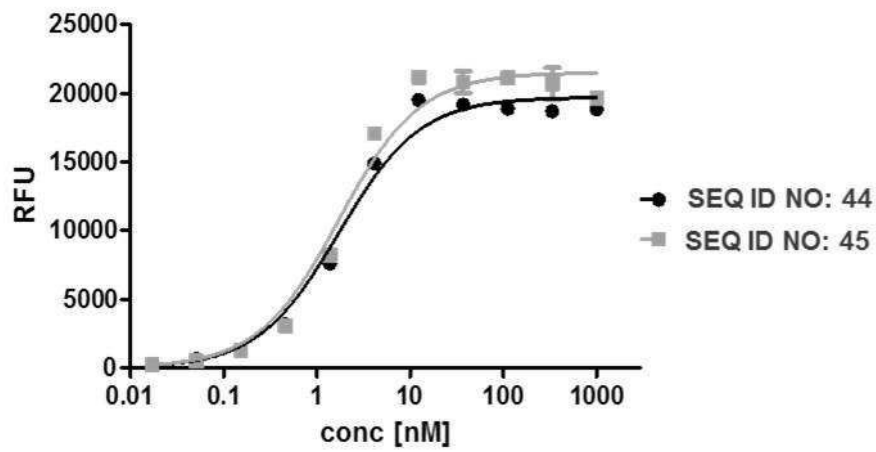
도면7



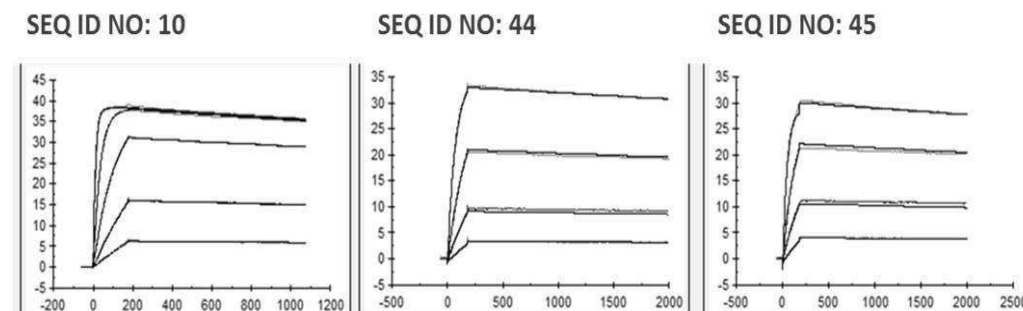
도면8



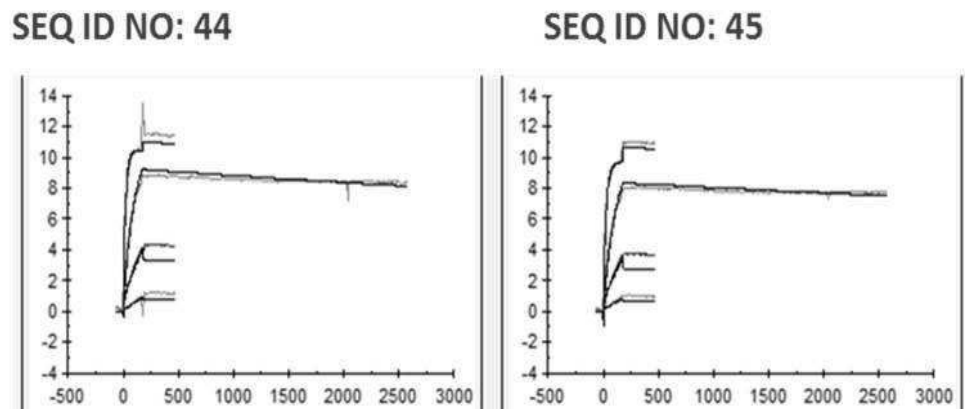
도면9



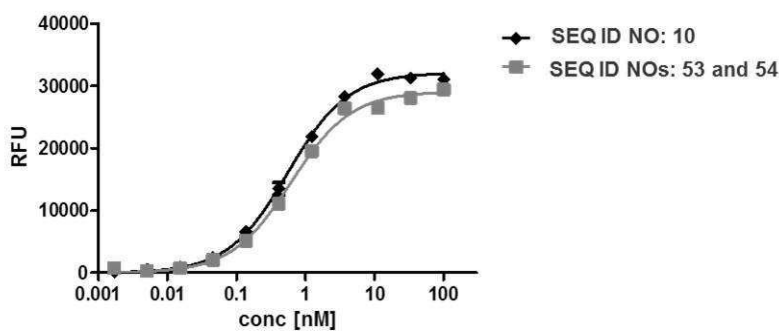
도면10



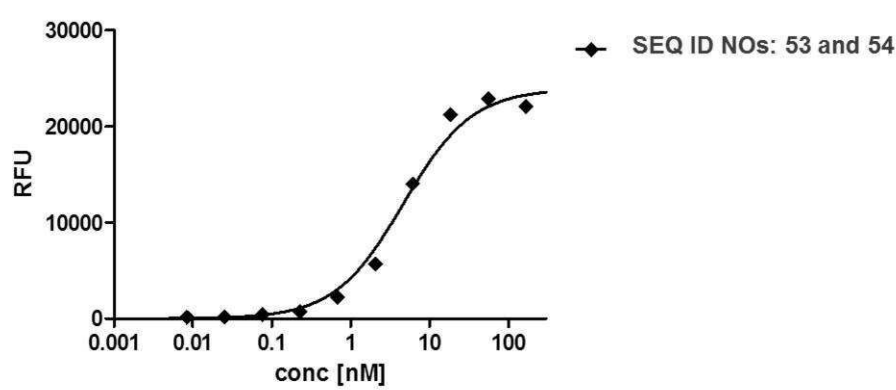
도면11



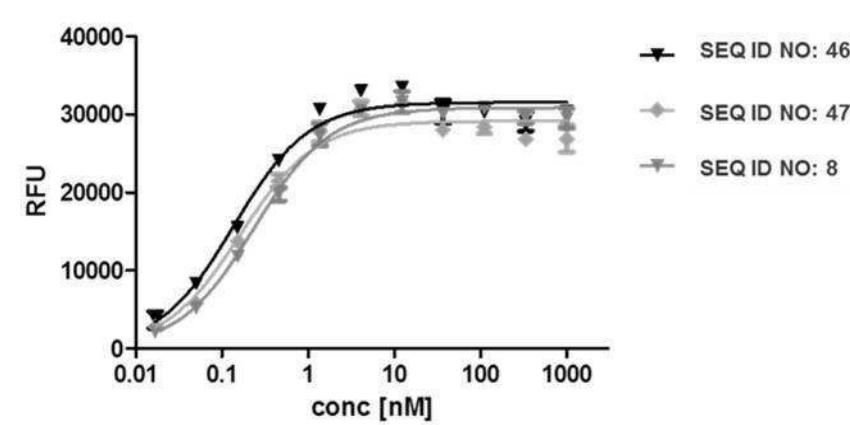
도면12



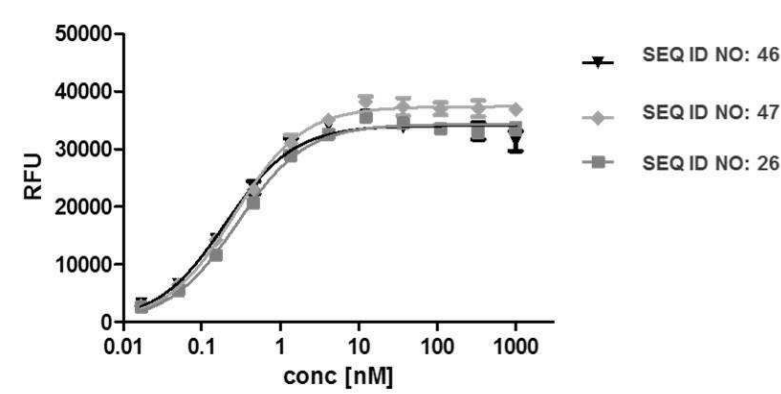
도면13



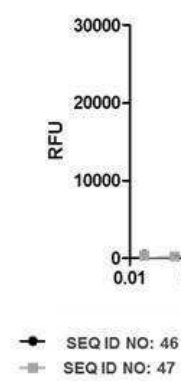
도면14



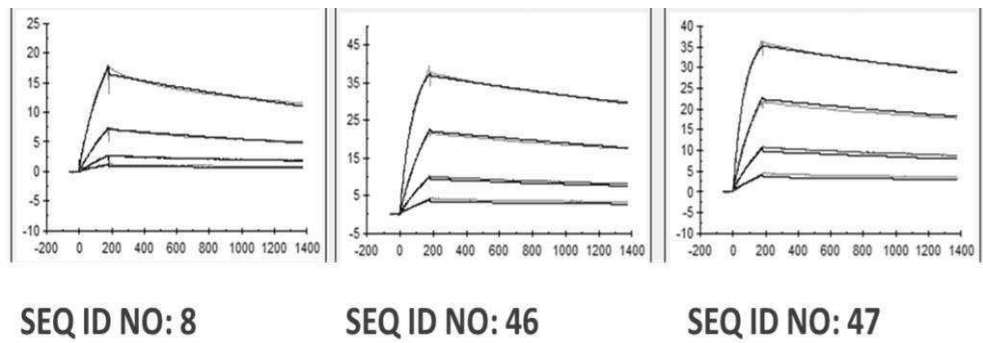
도면15



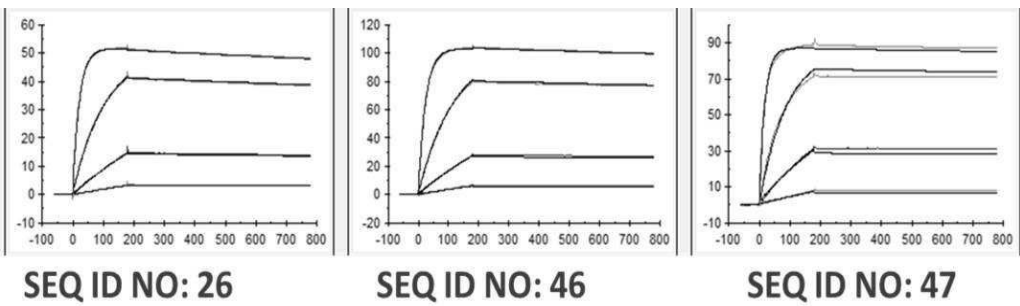
도면16



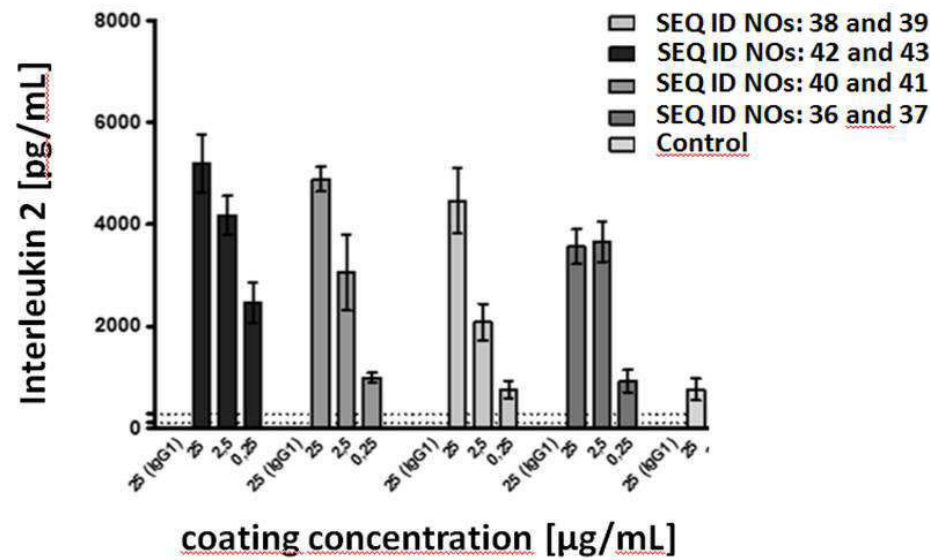
도면17



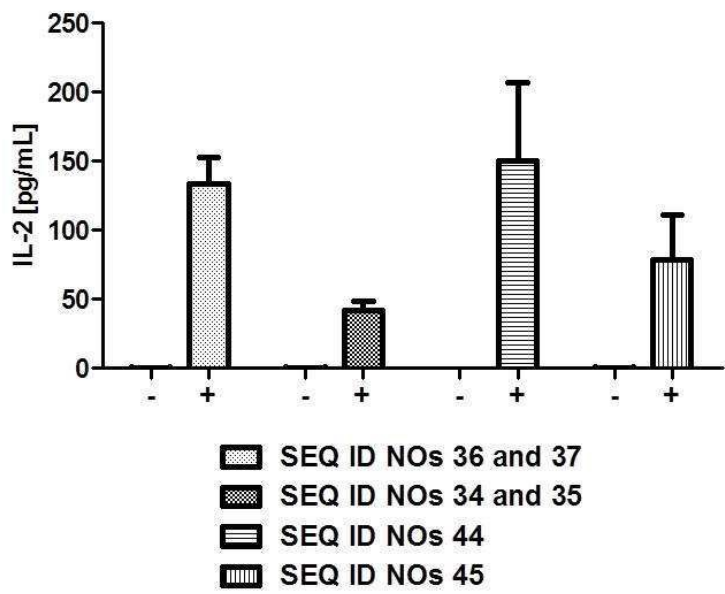
도면18



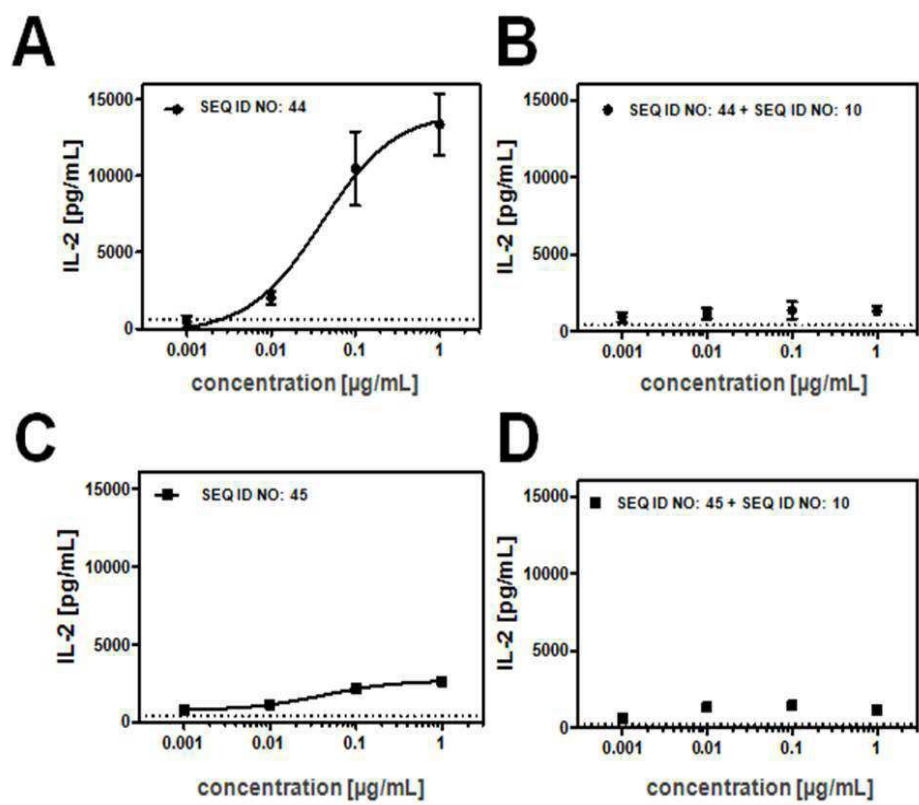
도면19



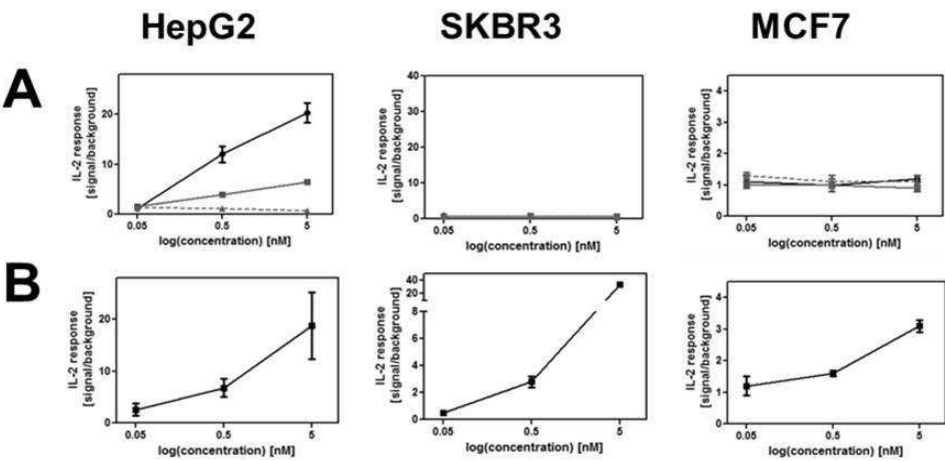
도면20



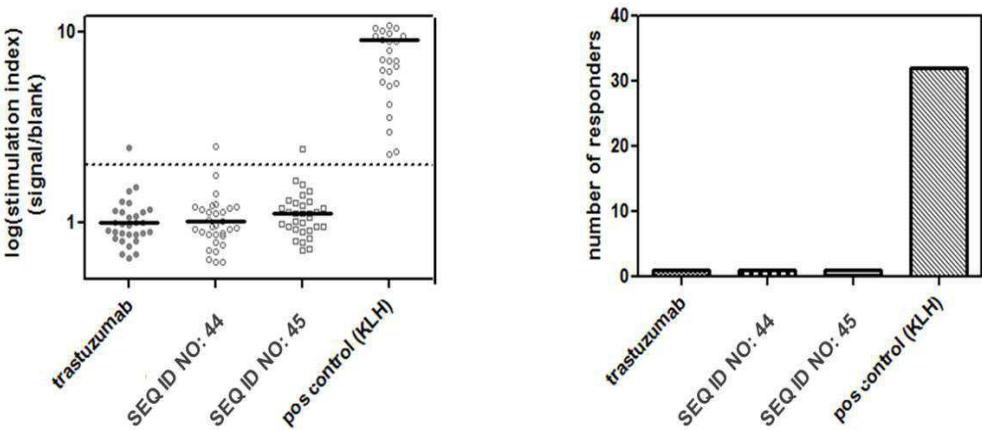
도면21



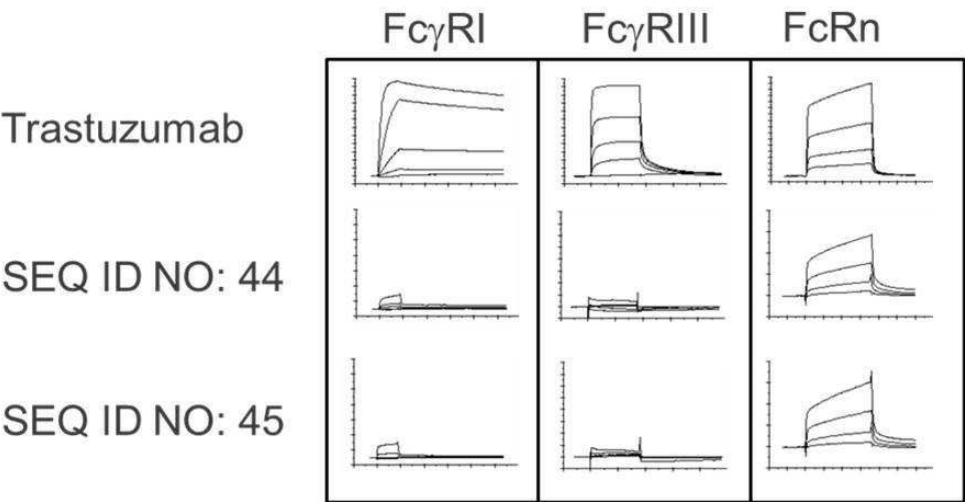
도면22



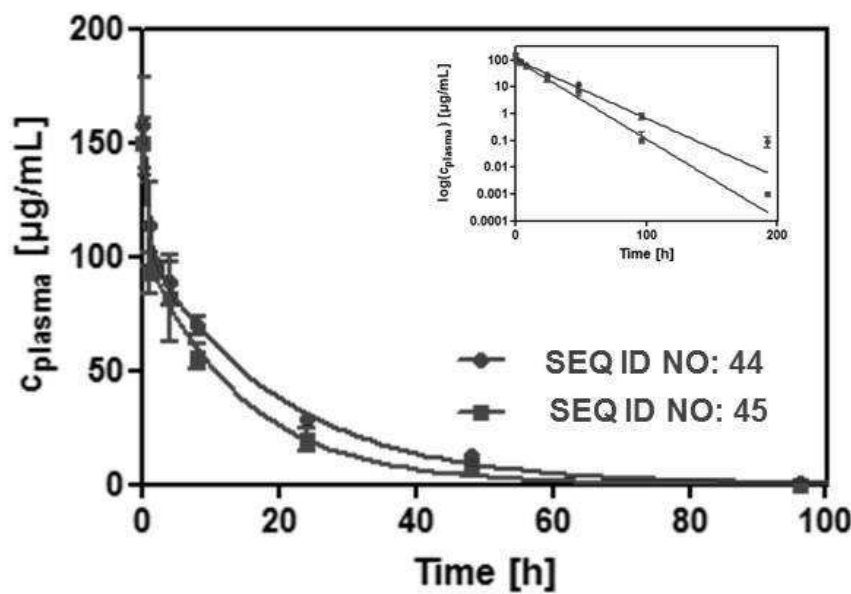
도면23



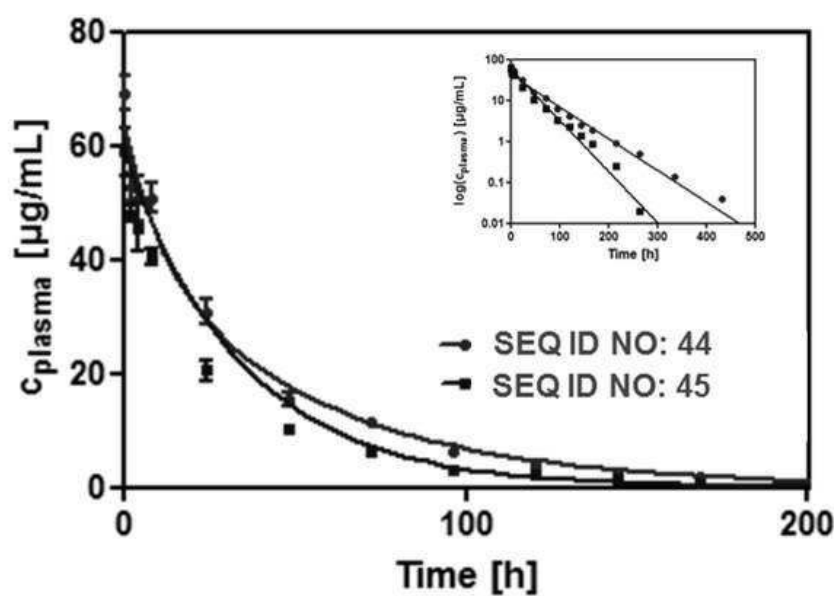
도면24



도면25



도면26



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Pieris AG

<120> Anti-Cancer fusion polypeptide

<130> PIE15362PCT

<150> EP15167927.1

<151> 2015-05-18

<150> EP16150508.6

<151> 2016-01-08

<160> 75

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 156

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> wildtype Tlc

<400> 1

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

1 5 10 15

Trp Tyr Leu Lys Ala Met Thr Val Asp Arg Glu Phe Pro Glu Met Asn

20 25 30

Leu Glu Ser Val Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn

35 40 45

Leu Glu Ala Lys Val Thr Met Leu Ile Ser Gly Arg Cys Gln Glu Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Gly Gly Lys His Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His

85 90 95

Tyr Ile Phe Tyr Cys Glu Gly Glu Leu His Gly Lys Pro Val Arg Gly

100 105 110

Val Lys Leu Val Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155

<210> 2

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Wildtype NGAL

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Val Gly Leu Ala Gly Asn Ala Ile Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

35 40 45

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

50 55 60

Asn Val Thr Ser Val Leu Phe Arg Lys Lys Lys Cys Asp Tyr Trp Ile

65 70 75 80

Arg Thr Phe Val Pro Gly Cys Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn

85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Leu Thr Ser Tyr Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Lys Val Ser Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Tyr Phe Lys Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 3

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> NGAL98 control

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Val Gly Leu Ala Gly Asn Ala Ile Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

35 40 45

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

50 55 60

Asn Val Thr Ser Val Leu Phe Arg Lys Lys Lys Cys Asp Tyr Trp Ile

65 70 75 80

Arg Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Asn

85 90 95

Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Leu Thr Ser Tyr Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Lys Val Ser Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Tyr Phe Lys Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 4

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Val Gly Val Ala Gly Asn Ala Met Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

35 40 45

Leu Lys Met Arg Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr

50 55 60

Asn Val Thr Gly Val Ser Phe Trp Arg Lys Lys Cys His Tyr Lys Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

Ile Lys Ser Gly Pro Gly Gln Thr Ser Asn Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Arg Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Trp Phe Ala Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 5

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein

<400> 5

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

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

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

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

Asp Gly

<210> 6

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein

<400> 6

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr

20 25 30
Val Val Gly Val Ala Gly Asn Ala Leu Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

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

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

Asp Gly

<210> 7

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein

<400> 7

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

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

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

Asp Gly

<210> 8

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein

<400> 8

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

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

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

Asp Gly

<210> 9

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein

<400> 9

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

Pro Lys Met Trp Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
 50 55 60

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

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

Asp Gly

<210> 10

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein

<400> 10

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

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

Gly Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gln
85 90 95
Ile Lys Ser Glu Pro Gly Gly Thr Ala Asn Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

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

Asp Gly

<210> 11

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein

<400> 11

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

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

Ile Lys Ser Glu Pro Gly Asn Thr Ala Ser Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Tyr Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Phe Ile Ile Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 12

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein

<400> 12

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

Val Val Gly Arg Ala Gly Asn Val Ala Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Pro Lys Met Arg Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asp Val Thr Ala Val Arg Phe Ala Arg Lys Lys Cys Leu Tyr Ser Ile
65 70 75 80

Gly Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Arg
85 90 95

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

100	105	110	
Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Tyr Gln			
115	120	125	
Asn Arg Glu Ile Phe Phe Ile Ile Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu			
130	135	140	
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly			
145	150	155	160
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile			
165	170	175	

Asp Gly

<210> 13

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein

<400> 13

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15
Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr
20 25 30
Val Val Gly Arg Ala Gly Asn Val Ala Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45
Pro Lys Met Arg Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60
Asp Val Thr Asn Val Val Phe Ala Gly Lys Lys Cys Lys Tyr Ser Ile
65 70 75 80
Gly Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Arg
85 90 95
Ile Lys Ser Pro Pro Gly Asn Thr Ala Asn Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

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

Asp Gly

<210> 14

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein

<400> 14

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

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

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Tyr Gln
115 120 125

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

Asp Gly

<210> 15

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein

<400> 15

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

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

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Tyr Gln
115 120 125
Asn Arg Glu Ile Phe Phe Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Ala Ile
 165 170 175

Asp Gly

<210> 16

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein

<400> 16

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

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

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Tyr Gln
 115 120 125
 Asn Arg Glu Ile Phe Phe Ile Ile Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Ala Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 17

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Lipocalin mutein

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Val Gly Arg Ala Gly Asn Val Gly Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

35 40 45

Pro Lys Met Arg Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ile Lys Ser Glu Pro Gly Asn Thr Ala Asn Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Tyr Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Phe Ile Ile Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165

170

175

Asp Gly

<210> 18

<211> 152

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> lipocalin mutein

<400> 18

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys

1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Glu Gly Cys Arg Pro Trp Asn Ile Phe Ser Val

20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys

35 40 45

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

50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His

65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr

85 90 95

Ser Glu Gly Val Cys Asp Gly Ser Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val

100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys

115 120 125

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

130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly

145 150

<210> 19

<211> 152

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> lipocalin mutein

<400> 19

Thr Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys

1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Glu Gly Cys Arg Pro Trp Asn Ile Phe Ser Val

20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys

35 40 45

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

50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His

65 70 75 80

Asp Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr

85 90 95

Ser Glu Gly Val Cys Asp Gly Ser Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val

100 105 110

Gly Arg Asp Pro Glu Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys

115 120 125

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

130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly

145 150

<210> 20

<211> 152

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> lipocalin mutein

<400> 20

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys

1 5 10 15

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

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

Gly Arg Asp Pro Glu Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
 115 120 125
 Thr Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
 130 135 140
 Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly
 145 150

<210> 21

<211> 152

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> lipocalin mutein

<400> 21

Val Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
 1 5 10 15

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

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Glu Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Val Cys Asp Gly Ser Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val
100 105 110

Gly Arg Asp Pro Glu Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys
115 120 125

Thr Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr Glu Ser Ile Leu Ile Pro Arg
130 135 140

Gln Ser Glu Thr Ser Ser Pro Gly

145 150

<210> 22

<211> 152

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> lipocalin mutein

<400> 22

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Glu Gly Cys Arg Pro Trp Asn Ile Phe Ser Val
20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Ser Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Val Thr Met Ala Ile Asp Gly Pro Ala Gln Glu Val Lys Ala Val Leu
50 55 60

Glu Lys Thr Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His
65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Val Cys Asp Gly Ser Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val

100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys

115 120 125

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

130 135 140

Gln Ile Glu Thr Ser Ser Pro Gly

145 150

<210> 23

<211> 152

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> lipocalin mutein

<400> 23

Ala Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys

1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Glu Gly Cys Arg Pro Trp Asn Ile Phe Ser Val

20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Gly Gly Asn Leu Glu Ala Glu

35 40 45

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

50 55 60

Glu Lys Ala Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His

65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr

85 90 95

Ser Glu Gly Val Cys Asp Gly Ser Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val

100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys

115 120 125

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

130 135 140

Gln Ile Glu Thr Ser Ser Pro Gly

145 150

<210> 24

<211> 152

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> lipocalin mutein

<400> 24

Thr Ser Asp Glu Glu Ile Gln Asp Val Ser Gly Thr Trp Tyr Leu Lys

1 5 10 15

Ala Met Thr Val Asp Glu Gly Cys Arg Pro Trp Asn Ile Phe Ser Val

20 25 30

Thr Pro Met Thr Leu Thr Thr Leu Glu Asp Gly Asn Leu Glu Ala Lys

35 40 45

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

50 55 60

Glu Lys Ala Asp Glu Pro Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Lys His

65 70 75 80

Val Ala Tyr Ile Ile Arg Ser His Val Lys Asp His Tyr Ile Phe Tyr

85 90 95

Ser Glu Gly Val Cys Asp Gly Ser Pro Val Pro Gly Val Trp Leu Val

100 105 110

Gly Arg Asp Pro Lys Asn Asn Leu Glu Ala Leu Glu Asp Phe Glu Lys

115 120 125

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

130 135 140

Gln Ile Glu Thr Ser Ser Pro Gly

145 150

<210> 25

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> lipocalin mutein

<400> 25

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

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

Asn Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asn Val Thr Gly Val Thr Phe Asp Asp Lys Lys Cys Thr Tyr Ala Ile
65 70 75 80

Ser Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys
85 90 95

Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly

<210> 26

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> lipocalin mutein

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Arg Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

35 40 45

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

50 55 60

Asp Val Thr Met Val Lys Phe Asp Asp Lys Lys Cys Met Tyr Asp Ile

65 70 75 80

Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Lys

85 90 95

Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 27

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> lipocalin mutein

<400> 27

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

1 5 10 15

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

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

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160
Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175
Asp Gly

<210> 28

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> lipocalin muen

<400> 28

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

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

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

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
 145 150 155 160
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175
 Asp Gly

<210> 29

<211> 175

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> lipocalin mutein

<400> 29

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15

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

Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr Asp Val Thr
 50 55 60
 Gly Val Ser Phe Asp Asp Lys Lys Cys Thr Tyr Ala Ile Met Thr Phe
 65 70 75 80

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

Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu
 145 150 155 160
 Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
 165 170 175

<210> 30

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> lipocalin mutein

<400> 30

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr

20 25 30

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

Ser Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Phe Gly Lys

85 90 95

Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly

<210> 31

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> lipocalin mutein

<400> 31

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Arg Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

35 40 45

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

50 55 60

Asp Val Thr Gly Val Thr Phe Asp Asp Lys Lys Cys Thr Tyr Ala Ile

65 70 75 80

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

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

145 150 155 160
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175

Asp Gly

<210> 32

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> lipocalin mutein

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30
 Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Lys Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

35 40 45

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

50 55 60

Asp Val Thr Gly Val Thr Phe Asp Asp Lys Lys Cys Thr Tyr Ala Ile

65 70 75 80

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

85 90 95
 Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser

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

145 150 155 160
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175
 Asp Gly

<210> 33

<211> 178

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> lipocalin mutein

<400> 33

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15
 Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr

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

85 90 95
 Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser
 100 105 110
 Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln

115 120 125
 Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
 130 135 140
 Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly

145 150 155 160
 Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175

Asp Gly

<210> 34

<211> 448

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> antibody heavy chain

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45
 Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu

50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

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

85 90 95
 Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly

210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser

225 230 235 240

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

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro

260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser

 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445
 <210> 35
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> antibody polypeptide chain
 <400> 35
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

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

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 36

<211> 641

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> fusion polypeptide heavy chain

<400> 36

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

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

 100 105 110
 Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

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

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

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

 485 490 495
 Val Gly Arg Ala Gly Asn Val Gly Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro Pro
 500 505 510
 Lys Met Trp Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr Asp
 515 520 525
 Val Thr Asn Val Arg Phe Ala Arg Lys Lys Cys Thr Tyr Ser Ile Gly
 530 535 540
 Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gln Ile

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

 610 615 620

Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile Asp
 625 630 635 640
 Gly

<210> 37

<211> 216

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> fusion polypeptide light chain

<400> 37

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

20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro

85 90 95
 Ala Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 115 120 125
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg

130 135 140
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn

145 150 155 160
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
180 185 190
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
195 200 205
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 38

<211> 641

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> fusion polypeptide heavy chain

<400> 38

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

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

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Tyr Gln
115 120 125
Asn Arg Glu Ile Phe Phe Ile Ile Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140
Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
 165 170 175

Asp Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 180 185 190

Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser
 195 200 205

Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly
 210 215 220

Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp
 225 230 235 240

Ile Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
 245 250 255

Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 260 265 270

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 275 280 285

Ala Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp
 290 295 300

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 305 310 315 320

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 325 330 335

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 340 345 350

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 355 360 365

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 370 375 380

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

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr

405 410 415
 Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
 420 425 430

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 435 440 445

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

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 465 470 475 480

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 485 490 495

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 500 505 510

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 515 520 525

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 530 535 540

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 545 550 555 560

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 565 570 575

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 580 585 590

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 595 600 605

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 610 615 620

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 625 630 635 640

Lys

<210> 39

<211> 216

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> fusion polypeptide light chain

<400> 39

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215

<210> 40

<211> 448

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> fusion polypeptide heavy chain

<400> 40

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

1

5

10

15

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

20

25

30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu

50

55

60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65

70

75

80

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

85

90

95

Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180	185	190	
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His			
195	200	205	
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly			
210	215	220	
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser			
225	230	235	240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
245	250	255	
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro			
260	265	270	
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
275	280	285	
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val			
290	295	300	
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			
305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr			
325	330	335	
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
340	345	350	
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			
355	360	365	
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
370	375	380	
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp			
385	390	395	400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser			
405	410	415	
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
420	425	430	

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

435

440

445

<210> 41

<211> 409

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> fusion polypeptide light chain

<400> 41

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Val Gly Arg Ala Gly Asn Val Gly Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

35

40

45

Pro Lys Met Trp Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ile Lys Ser Glu Pro Gly Gly Thr Ala Asn Leu Val Arg Val Val Ser

100

105

110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Tyr Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Phe Ile Ile Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165

170

175

Asp Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

180 185 190
 Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro
 195 200 205
 Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser
 210 215 220
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

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

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

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

<210> 42
 <211> 448
 <212> PRT

<213> artificial

<220><223> fusion polypeptide heavy chain

<

400> 42

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly

210 215 220

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

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

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

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

<210> 43
 <211> 408
 <212> PRT

<213> artificial

<220><223> fusion polypeptide light chain

<400> 43

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

210 215 220

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

225 230 235 240

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

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

 Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile
 370 375 380
 Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro
 385 390 395 400
 Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile Asp
 405

 <210> 44
 <211> 615
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> fusion polypeptide
 <400> 44

 Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
 1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

Val Val Gly Arg Ala Gly Asn Val Gly Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Pro Lys Met Trp Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asp Val Thr Asn Val Arg Phe Ala Arg Lys Lys Cys Thr Tyr Ser Ile
65 70 75 80

Gly Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gln
85 90 95

Ile Lys Ser Glu Pro Gly Gly Thr Ala Asn Leu Val Arg Val Val Ser
100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Tyr Gln
115 120 125

Asn Arg Glu Ile Phe Phe Ile Ile Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu
130 135 140

Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly
145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile
165 170 175

Asp Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
180 185 190

Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
195 200 205

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
210 215 220

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
225 230 235 240

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
245 250 255

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

260	265	270
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp		
275	280	285
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro		
290	295	300
Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
305	310	315
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn		
325	330	335
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
340	345	350
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
355	360	365
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg		
370	375	380
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys		
385	390	395
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
405	410	415
Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
420	425	430
Gly Gly Gly Gly Ser Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro		
435	440	445
Pro Leu Ser Lys Val Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe		
450	455	460
His Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly Gln Ala Gly Asn Ile Arg Leu Arg		
465	470	475
Glu Asp Lys Asp Pro Ile Lys Met Met Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys		
485	490	495
Glu Asp Lys Ser Tyr Asp Val Thr Met Val Lys Phe Asp Asp Lys Lys		
500	505	510

Cys Met Tyr Asp Ile Trp Thr Phe Val Pro Gly Ser Gln Pro Gly Glu
515 520 525

Phe Thr Leu Gly Lys Ile Lys Ser Phe Pro Gly His Thr Ser Ser Leu
530 535 540

Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe
545 550 555 560

Lys Phe Val Phe Gln Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly
565 570 575

Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe
580 585 590

Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro
595 600 605

Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
610 615

<210> 45
<211> 610
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> fusion polypeptide
<400> 45

Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val
1 5 10 15

Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr
20 25 30

Val Val Gly Arg Ala Gly Asn Val Gly Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro
35 40 45

Pro Lys Met Trp Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr
50 55 60

Asp Val Thr Asn Val Arg Phe Ala Arg Lys Lys Cys Thr Tyr Ser Ile
65 70 75 80

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

85

90

95

Ile Lys Ser Glu Pro Gly Gly Thr Ala Asn Leu Val Arg Val Val Ser

100

105

110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Tyr Gln

115

120

125

Asn Arg Glu Ile Phe Phe Ile Ile Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130

135

140

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

145

150

155

160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165

170

175

Asp Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Asp Ser Thr

180

185

190

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

195

200

205

Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly Gln

210

215

220

Ala Gly Asn Ile Arg Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro Ile Lys Met Met

225

230

235

240

Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr Asp Val Thr Met

245

250

255

Val Lys Phe Asp Asp Lys Lys Cys Met Tyr Asp Ile Trp Thr Phe Val

260

265

270

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

275

280

285

Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn

290

295

300

Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln Asn Arg Glu Glu

305

310

315

320

Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu

325

330

335

Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn
 340 345 350

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

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

 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 485 490 495
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 500 505 510
 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 515 520 525
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 530 535 540

 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 545 550 555 560
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 565 570 575
 Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

580 585 590
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 595 600 605

Gly Lys

610

<210> 46

<211> 366

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> fusion polypeptide

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Val Gly Val Ala Gly Asn Gly Met Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro

35 40 45

Leu Lys Met Arg Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr

50 55 60

Asp Val Thr Ser Val Ala Phe Arg Asn Lys Lys Cys His Tyr Lys Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Glu Val Arg Gln

115 120 125

Asn Arg Glu Trp Phe Phe Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile

165 170 175

Asp Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Asp Ser Thr

180 185 190

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

195 200 205

Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe His Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly Gln

210 215 220

Ala Gly Asn Ile Arg Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro Ile Lys Met Met

225 230 235 240

Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr Asp Val Thr Met

245 250 255

Val Lys Phe Asp Asp Lys Lys Cys Met Tyr Asp Ile Trp Thr Phe Val

260 265 270

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

275 280 285

Pro Gly His Thr Ser Ser Leu Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn

290 295 300

Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln Asn Arg Glu Glu

305 310 315 320

Phe Tyr Ile Thr Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu

325 330 335

Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn

340 345 350

His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly

355 360 365

<210> 47

<211> 554

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> fusion polypeptide

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Phe Phe Lys Phe Val Phe Gln Asn Arg Glu Glu Phe Tyr Ile Thr

500 505 510

Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe

515 520 525

Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe

530 535 540

Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly

545 550

<210> 48

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> peptide linker

<400> 48

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> peptide linker

<400> 49

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

1 5 10 15

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Strep tag

<400> 50

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5 10

<210> 51

<211> 442

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> antibody heavy chain

<400> 51

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr

195 200 205

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

<210> 52

<211> 214

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> antibody light chain

<400> 52

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

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210

<210> 53

<211> 635

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> fusion polypeptide heavy chain

<400> 53

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr

195 200 205
Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro

210 215 220
Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

225 230 235 240
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

245 250 255
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp

260 265 270
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

275 280 285
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val

290 295 300
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

305 310 315 320
Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly

325 330 335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

340 345 350
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

355 360 365
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

370 375 380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

385 390 395 400
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

405 410 415
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

420 425 430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly

435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu
450 455 460
Ile Pro Ala Pro Pro Leu Ser Lys Val Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln
465 470 475 480
Asp Asn Gln Phe Gln Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly Arg Ala Gly Asn
485 490 495
Val Gly Leu Arg Glu Asp Lys Asp Pro Pro Lys Met Trp Ala Thr Ile
500 505 510
Tyr Glu Leu Lys Glu Asp Lys Ser Tyr Asp Val Thr Asn Val Arg Phe
515 520 525
Ala Arg Lys Lys Cys Thr Tyr Ser Ile Gly Thr Phe Val Pro Gly Ser
530 535 540
Gln Pro Gly Glu Phe Thr Leu Gly Gln Ile Lys Ser Glu Pro Gly Gly
545 550 555 560
Thr Ala Asn Leu Val Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala
565 570 575
Met Val Phe Phe Lys Glu Val Tyr Gln Asn Arg Glu Ile Phe Phe Ile
580 585 590
Ile Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn
595 600 605
Phe Ile Arg Phe Ser Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val
610 615 620
Phe Pro Val Pro Ile Asp Gln Cys Ile Asp Gly
625 630 635
<210> 54
<211> 214
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> fusion polypeptide light chain
<400> 54
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu

 85 90 95

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

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

 180 185 190

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

 195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser

 210

<210> 55

<211> 1344

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> antibody heavy chain

<400> 55

caggtccagc tgcagcagtg gggggctggt ctgctgaagc caagtgaac tctgtcactg	60
acctgcgctg tgiacggcgg atcattctcc ggctactatt ggtcttgat cagacagagt	120
cccgagaaag gcctggaatg gatcgagag attaaccacg ggggttacgt gacctataat	180
cctagcctgg agtctagggt gaccatttcc gtcgacacaa gcaagaacca gtctctctg	240
aaactgtcca gcgtgacagc cgctgacact gcagtctact attgtgccag ggattatggc	300
cccgaaatt acgactggta ttttgatctg tggggcgagg gtacctggt gacagtctcg	360
agcgctagca ccaagggccc ctccgtgttc ccctggccc cttgtcccg gtccacctcc	420
gagtctaccg ccgtcttggg ctgcctggtg aaagactact tccccgagcc tgtgaccgtg	480
agctggaact ctggcgccct gacctccggc gtgcacacct tccctgccgt gctgcaatcc	540
tccggcctgt actccctgtc ctccgtggtg acagtgcct cctccagcct gggcaccaag	600
acctacacct gtaacgtgga ccacaagccc tccaacacca aggtggacaa gcgggtggaa	660
tctaaatacg gccctccctg cccccctgc cctgccctg aatttctggg cggaccttcc	720
gtgtttctgt tcccccaaa gccaaggac acctgatga tctcccgac ccccgaagtg	780
acctgcgtgg tggtagcgt gtcccaggaa gatccagagg tgcagttcaa ctggtatgtt	840
gacggcgtgg aagtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggaacagtt caactccacc	900
taccgggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaagagtac	960
aagtgaagg tgtccaacaa gggcctgccc tccagcatcg aaaagaccat ctccaaggcc	1020
aagggccagc cccgcgagcc ccaggtgtac acctgcccc ctagccagga agagatgacc	1080
aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aaaggcttct acccctccga cattgccgtg	1140
gaatgggagt ccaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc tgtgtggac	1200
tccgacggct ccttcttct gtactctcgg ctgacagtgg ataagtccg gtggcaggaa	1260
ggcaacgtgt tctcctgcag cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta taccagaag	1320
tccctgtccc tgagcctggg caag	1344

<210> 56

<211> 648

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> antibody light chain

<400> 56

gagattgtcc tgaccagtc ccccgcaaca ctgtcactgt ccccgccga gagggctact	60
---	----

ctgagttgcc gggcaagcca gtctgtgtcc agctacctgg cctggtatca gcagaagcca 120

gggcaggctc ccagactgct gatctacgac gcatctaaca gagccaccgg aattcctgcc 180

cgcttctcgg gttcaggctc cggaacagac ttaccctga caatctctag tctggagcca 240

gaagatttcg cagtctacta ttgtcagcag cgaagcaatt ggccccctgc tctgactttt 300

ggcggaggga ccaagggtga gatcaagcgt acggtcgcgg cgccttctgt gttcattttc 360

cccccatctg atgaacagct gaaatctggc actgcttctg tggctctgtct gctgaacaac 420

ttctacccta gagaggccaa agtccagtgg aaagtggaca atgctctgca gagtgggaat 480

tcccaggaat ctgtcactga gcaggactct aaggatagca catactccct gtctctact 540

ctgacactga gcaaggctga ttacgagaaa cacaaagtgt acgcctgtga agtcacacat 600

caggggctgt ctagtctgt gaccaaacc ttcaataggg gagagtgc 648

<210> 57

<211> 1923

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> fusion polypeptide heavy chain

<400> 57

caggtccagc tgcagcagtg gggggctggt ctgctgaagc caagtgaac tctgtcactg 60

acctgcgctg tgiacggcgg atcattctcc ggctactatt ggtcttgat cagacagagt 120

cccagaaaag gcctggaatg gatcgagag attaacaccg ggggttacgt gacctataat 180

cctagcctgg agtctagggt gaccatttcc gtcgacacaa gcaagaacca gttctctctg 240

aaactgtcca gcgtgacagc cgctgacact gcagtctact atttgccag ggattatggc 300

cccggaaatt acgactggtg ttttgatctg tgggggcggg gtaccctggt gacagtctcg 360

agcgctagca ccaaggggccc ctccgtgttc ccctggccc cttgctccc gtccacctcc 420

gagtctaccg ccgctctggg ctgcctggtg aaagactact tccccgagcc tgtgaccgtg 480

agctggaact ctggcgccct gacctccggc gtgcacacct tcctgccgt gctgcaatec 540

tccggcctgt actccctgtc ctccgtggtg acagtgcct cctccagcct gggcaccaag 600

acctacacct gtaactgga ccacaagccc tccaacacca aggtggacaa gcgggtggaa 660

tctaaatacg gccctccctg cccccctgc cctgcccctg aatttctggg cggaccttcc 720

gigtctctgt tcccccaaa gccaaggac acctgatga tctcccgac ccccgaagtg 780

acctgcgtgg tgggtggact gtcccaggaa gatccagagg tgcagttcaa ctggtatgtt 840

gacggcgtgg aagtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggaacagtt caactccacc 900

taccgggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaagagtac	960
aagtgaagg tgtccaacaa gggcctgccc tccagcatcg aaaagaccat ctccaaggcc	1020
aagggccagc cccgcgagcc ccaggtgtac accctgcccc ctagccagga agagatgacc	1080
aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aaaggcttct acccctccga cattgccgtg	1140
gaatgggagt ccaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccc tgtgctggac	1200
tccgacggct ctttcttct gtactctcgg ctgacagtgg ataagtccg gtggcaggaa	1260
ggcaactgtg tctcctgcag cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta taccagaag	1320
tccctgtccc tgagcctggg caaggcggt ggaggatccg ggggtggggg aagcgcgga	1380
ggaggtagcc aggactccac tagcgtctg atcccggctc cccctctgag taagggtccc	1440
ctgcaacaaa acttccaaga caatcagttt cagggcaaat ggtacgtggt cgggagagct	1500
ggtaacgtgg gactgcgaga ggacaaggac cccccaaaa tgtgggccac catctacgag	1560
ctgaaggaag aaaaaagcta tgatgtgaca aatgtcaggt tcgcacggaa gaaatgcact	1620
tactcaatcg gcaccttctg gcccggctcc cagcctgggg agtttacact gggccagatt	1680
aagagcgaac ctggcggaac agccaacctg gtgcgggtgg tctctactaa ctataatcag	1740
cacgtatagg tgttcttta agaggtctac cagaaccgag aaatcttctt tatcatctg	1800
tacggccgta ccaaggagct gacatccgag ctgaaagaaa acttcatccg cttttctaag	1860
agtctgggac tgccagaaaa tcataattgtg tttcctgtcc caatcgacca gtgtattgat	1920
ggg	1923
<210> 58	
<211> 648	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> fusion polypeptide light chain	
<400> 58	
gagattgtcc tgacceagtc ccccgcaaca ctgtcaactgt ccccgggcga gagggtact	60
ctgagttgcc gggcaagcca gtctgtgtcc agctacctgg cctggatatca gcagaagcca	120
gggcaggtc ccagactgct gatctacgac gcatacga gagccaccgg aattcctgcc	180
cgcttctcgg gttcaggtc cggaacagac ttaccctga caatctctag tctggagcca	240
gaagatttcg cagtctacta ttgtcagcag cgaagcaatt ggccccctgc tctgactttt	300
ggcggaggga ccaaggtgga gatcaagcgt acggtcgagg cgcttctgt gttcattttc	360
cccccatctg atgaacagct gaaatctggc actgcttctg tggctctgtct gctgaacaac	420

ttctacccta gagaggccaa agtccagtgg aaagtggaca atgctctgca gagtgggaat 480
tcccaggaat ctgtcactga gcaggactct aaggatagca catactccct gtcctctact 540
ctgacactga gcaaggctga ttacgagaaa cacaaagtgt acgcctgtga agtcacacat 600
caggggctgt ctagtctgtg gaccaaatcc ttcaataggg gagagtgc 648

<210> 59

<211> 1923

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> fusion polypeptide heavy chain

<400> 59

caggactcca ctacgatct gatcccggt cccctctga gtaaggtgcc cctgcaacaa 60
aacttccaag acaatcagtt tcagggcaaa tggtagctgg tcgggagagc tggtaacctg 120
ggactgcgag aggacaagga ccccccaaa atgtgggcca ccatctacga gctgaaggaa 180
gacaaaagct atgatgtgac aaatgtcagg ttgcacgga agaaatgcac ttactcaatc 240
ggcaccttcg tgcccggctc ccagcctggg gagtttacac tgggccagat taagagcgaa 300
cctggcggaa cagccaacct ggtgcgggtg gtctctacta actataatca gcacgctatg 360

gtgttttta aagaggtcta ccagaaccga gaaatcttct ttatcatcct gtacggccgt 420
accaaggagc tgacatccga gctgaaagaa aacttcatcc gcttttctaa gagtctggga 480
ctgccagaaa atcatattgt gtttctgtc ccaatcgacc agtgtattga tggggcggt 540
ggaggatccg ggggtggggg aagcggcgga ggaggtagcc aggtgcaact gcaacaatgg 600
ggcgcaggct tgttgaagcc ctctgagaca ctgagtctta cctgtgctgt gtacggtggc 660
agcttttccg gatactattg gtctggatt cggcagctc cagagaaaagg actggaatgg 720
atcggggaga tcaatcatgg aggctacgtt acttacaatc cctccctgga gagtgcagtg 780

acgatctctg tggatacatc taaaaaccag ttttctctca agctgagttc tgttacagcg 840
gctgacaccg ccgtatacta ttgtcgcgg gactatggcc ctggcaacta cgactggtac 900
tttgacctgt gggggagagg cacgtggtg acagtctcga gcgctagcac caagggtccc 960
tccgtgttcc ccttggcccc ttgtccccgg tccacctcag agtctaccgc cgctctgggc 1020
tgccgtgtga aagactactt ccccgagcct gtgacctga gctggaactc tggcgccctg 1080
acctccggcg tgcacacctt ccctgccgtg ctgcaatcct ccggcctgta ctccctgtcc 1140
tccgtgtgtga cagtgcctc ctccagcctg ggcaccaaga cctacacctg taacgtggac 1200

cacaagccct ccaacaccaa ggtggacaag cgggtggaat ctaaatacgg cctccctgc 1260

ccccctgcc ctgcccctga atttctgggc ggaccttccg tgtttctgtt cccccaaag 1320
 cccaaggaca cctgatgat ctcccggacc cccgaagtga cctgcgtggt ggtggacgtg 1380
 tcccaggaag atccagaggt gcagttcaac tggatatgtg acggcgtgga agtgcacaac 1440
 gccaagacca agcccagaga ggaacagttc aactccacct accgggtggt gtccgtgctg 1500
 accgtgctgc accaggactg gctgaacggc aaagagtaca agtgaaggt gtccaacaag 1560
 ggctgccct ccagcatcga aaagaccatc tccaaggcca agggccagcc ccgcgagccc 1620

caggtgtaca cctgcccc tagccaggaa gagatgacca agaaccaggt gtccctgacc 1680
 tgtctggtga aaggttcta cccctccgac attgccgtgg aatgggagtc caacggccag 1740
 cccgagaaca actacaagac cccccccct gtgctggact ccgacggctc ctcttctctg 1800
 tactctcggc tgacagtgga taagtcccgg tggcaggaag gcaacgtgtt ctctgcagc 1860
 gtgatgcagc aggccctgca caaccactat acccagaagt cctgtccct gagcctgggc 1920
 aag 1923

<210> 60

<211> 648

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> fusion polypeptide light chain

<400> 60

gagattgtcc tgaccagtc ccccgcaaca ctgtactgt ccccgccga gagggctact 60
 ctgagttgcc gggcaagcca gtctgtgtcc agctacctgg cctggtatca gcagaagcca 120
 gggcaggctc ccagactgct gatctacgac gcacttaaca gagccaccgg aattcctgcc 180
 cgcttctcgg gttcaggctc cggaacagac ttaccctga caatctctag tctggagcca 240
 gaagatttcg cagtctacta ttgtcagcag cgaagcaatt ggccccctgc tctgactttt 300
 ggccggaggga ccaaggtgga gatcaagcgt acggctcgcgg cgccttctgt gttcattttc 360

cccccatctg atgaacagct gaaatctggc actgcttctg tggctgtct getgaacaac 420
 ttctacccta gagaggccaa agtccagtgg aaagtggaca atgctctgca gagtgggaat 480
 tcccaggaat ctgtactga gcaggactct aaggatagca catactccct gtctctact 540
 ctgacactga gcaaggtgga ttacgagaaa cacaagtgt acgctgtga agtcacacat 600
 caggggctgt ctagtctgt gaccaaacc ttcaataggg gagagtgc 648

<210> 61

<211> 1344

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> fusion polypeptide heavy chain

<400> 61

caggtccagc tgcagcagtg gggggctggt ctgctgaagc caagtgaac tctgtcactg 60

acctgcgctg tgtacggcgg atcattctcc ggctactatt ggtcttgat cagacagagt 120

cccagaaaag gcctggaatg gatcggagag attaaccacg ggggttacgt gacctataat 180

cctagcctgg agtctagggt gaccatttcc gtcgacacaa gcaagaacca gttctctctg 240

aaactgtcca gcgtgacagc cgctgacact gcagtctact atttgtccag ggattatggc 300

cccggaaatt acgactggtt ttttgatctg tgggggcggg gtaccctggt gacagtctcg 360

agcgctagca ccaagggccc ctccgtgttc ccctggccc cttgtctccg gtccacctcc 420

gagttaccg ccgtcttggg ctgcctggtg aaagactact tccccgagcc tgtgaccgtg 480

agctggaact ctggcgccct gacctccggc gtgcacacct tccctgccgt gctgcaatcc 540

tccggcctgt actccctgtc ctccgtggtg acagtgcct cctccagcct gggcaccaag 600

acctacacct gtaacgtgga ccacaagccc tccaacacca aggtggacaa gcgggtggaa 660

tctaaatacg gccctccctg cccccctgc cctgcccctg aatttctggg cggaccttcc 720

gtgtttctgt tcccccaaa gccaaggac accctgatga tctcccgac ccccgaagtg 780

acctgcgtgg tgggtggact gtcccaggaa gatccagagg tgcagttcaa ctggtatgtt 840

gacggcgtgg aagtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggaacagtt caactccacc 900

taccgggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaagagtac 960

aagtgcagg tgtccaacaa gggcctgccc tccagcatcg aaaagacat ctccaaggcc 1020

aagggccagc cccgcgagcc ccaggtgtac accctgcccc ctagccagga agagatgacc 1080

aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aaaggcttct acccctccga cattgccgtg 1140

gaatgggagt ccaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc tgtgctggac 1200

tccgacggtc ctttcttct gtactctcgg ctgacagtgg ataagtccg gtggcaggaa 1260

ggcaacgtgt tctcctgcag cgtgatgcac gaggcctgc acaaccacta taccagaag 1320

tccctgtccc tgagcctggg caag 1344

<210> 62

<211> 1227

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> fusion polypeptide light chain

<400> 62

caggactcca ctagcgatct gatccccgct cccctctga gtaaggtgcc cctgcaacaa	60
aacttccaag acaatcagtt tcagggcaaa tggtagctgg tcgggagagc tggtaacgtg	120
ggactgcgag aggacaagga ccccccaaa atgtgggcca ccatctacga gctgaaggaa	180
gacaaaagct atgatgtgac aaatgtcagg ttcgcacgga agaaatgcac ttactcaatc	240
ggcaccttcg tgccccgctc ccagcctggg gagtttacac tgggccagat taagagcgaa	300
cctggcggaa cagccaacct ggtgcgggtg gtctctacta actataatca gcacgctatg	360
gtgttcttta aagaggtcta ccagaaccga gaaatcttct ttatcatcct gtacggccgt	420
accaaggagc tgacatccga gctgaaagaa aacttcatcc gcttttctaa gagtctggga	480
ctgccagaaa atcatattgt gtttctgtc ccaatcgacc agtgtattga tgggggcggt	540
ggaggatccg ggggtggggg aagcggcgga ggaggtagcg agattgtcct tacacagtca	600
ccagccacc tgiccttgc acccggtgag cgcgccacac tgtcctgcc ggcatcacia	660
agcgttagct cctacttggc atggtaccag cagaagcctg gacaggcccc aaggctgctg	720
atctatgatg ctagcaacag ggccaccggc attcccgcc gtttctctgg tagtgggagc	780
ggcactgact ttacattgac aatctcttca ttggagcccg aggactttgc tgtgtactac	840
tgtcagcagc ggagcaactg gcctccgcc ctgaccttcg gcgggggcac aaaggtggag	900
attaagcgta cggtcgcggc gccttctgtg ttcatcttcc ccccatctga tgaacagctg	960
aaatctggca ctgcttctgt ggtctgtctg ctgaacaact tctaccctag agaggccaaa	1020
gtccagtgga aagtggacaa tgctctgcag agtgggaatt cccaggaatc tgtcactgag	1080
caggactcta aggatagcac atactccctg tcctctactc tgacactgag caaggtgat	1140
tacgagaaac acaaagtgtg cgcctgtgaa gtcacacatc aggggctgtc tagtcctgtg	1200
accaaatect tcaatagggg agagtgc	1227

<210> 63

<211> 1029

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> fusion polypeptide heavy chain

<400> 63

tggatatttg atctgtgggg gcgggggtacc ctggtgacag tctcgagcgc tagcaccaag	60
ggccccctcg tgttccccct ggcccccttc tcccgtcca cctccgagtc taccgccgt	120
ctgggctgcc tgggtgaaaga ctacttcccc gagcctgtga ccgtgagctg gaactctggc	180

gccctgacct ccggcgtgca caccttcctt gccgtgctgc aatcctccgg cctgtactcc 240

ctgtcctccg tggtagacgt gccctcctcc agcctgggca ccaagaccta cacctgtaac 300

gtggaccaca agccctccaa caccaagggtg gacaagcggg tggaatctaa atacggccct 360

ccctgcccc ccigccctgc ccctgaattt ctgggcggac cttccgtgtt tctgttcccc 420

ccaaagccca aggacacctt gatgatctcc cggacccccg aagtacctg cgtgggtgtg 480

gacgtgtccc aggaagatcc agaggtgcag ttcaactggt atgttgacgg cgtggaagtg 540

cacaacgcca agaccaagcc cagagaggaa cagttcaact ccacctaccg ggtgggtgtcc 600

gtgctgaccg tgcctgacca ggactggctg aacggcaaag agtacaagtg caaggtgtcc 660

aacaagggcc tgcctccag catcgaaaag accatctcca aggccaagg ccagccccgc 720

gagccccagg tgtacacctt gcccctagc caggaagaga tgaccaagaa ccaggtgtcc 780

ctgacctgtc tggtagaaagg cttctacccc tccgacattg ccgtggaatg ggagtccaac 840

ggccagcccc agaacaacta caagaccacc cccctgtgc tggactccga cggtccttc 900

ttcctgtact ctcggtgac agtggataag tcccgggtggc aggaaggcaa cgtgttctcc 960

tgcagcgtga tgcacgagc cctgcacaac cactataccc agaagtcctt gtcctgagc 1020

ctgggcaag 1029

<210> 64

<211> 1224

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> fusion polypeptide light chain

<400> 64

gagattgtcc tgacceagtc ccccgaaca ctgtcaactgt ccccggcga gagggetact 60

ctgagttgcc gggcaagcca gtctgtgtcc agctacctgg cctggatatca gcagaagcca 120

gggcaggctc ccagactgct gatctacgac gcatctaaca gagccaccgg aattcctgcc 180

cgcttctcgg gttcaggctc cggaacagac ttaccctga caatctctag tetggagcca 240

gaagatttcg cagttacta ttgtcagcag cgaagcaatt ggccccctgc tctgactttt 300

ggcggaggga ccaaggtgga gatcaagcgt acggtcgcgg cgccttctgt gttcattttc 360

cccccatctg atgaacagct gaaatctggc actgcttctg tggctgtgtc gctgaacaac 420

ttctacccta gagaggccaa agtccagtgg aaagtggaca atgctctgca gagtgggaat 480

tcccaggaat ctgtcaactg gcaggactct aaggatagca catactccct gtcctctact 540

ctgacactga gcaaggctga ttacgagaaa cacaagtggt acgcctgtga agtcacacat 600

caggggctgt ctagtcctgt gaccaaacc ttcaataggg gagagtgcgg cggcggagga 660
tccgggggtg ggggaagcgg cggaggaggt agccaggact ccactagcga tctgatcccg 720
gctccccctc tgagtaaggt gcccctgcaa caaaacttcc aagacaatca gtttcagggc 780

aaatggtagc tggtcgggag agctggtaac gtgggactgc gagaggacaa ggaccccccc 840
aaaatgtggg ccaccatcta cgagctgaag gaagacaaaa gctatgatgt gacaaatgtc 900
aggttcgac ggaagaaatg cacttactca atcggcacct tcgtgcccg cccccagcct 960
ggggagttaa cactgggcca gattaagagc gaacctggcg gaacagccaa cctggtagcg 1020
gtggtctcta ctaactataa tcagcacgct atggtgttct ttaaagaggt ctaccagaac 1080
cgagaaatct tcattatcat cctgtacggc cgtaccaagg agctgacatc cgagctgaaa 1140
gaaaacttca tccgcttttc taagagtctg ggactgccag aaaatcatat tgtgtttcct 1200

gtcccaatcg accagtgtat tgat 1224

<210> 65
<211> 1845
<212> DNA
<213> artificial
<220><223> fusion polypeptide
<400> 65

caggactcca ctacgatct gatcccggt cccctctga gtaagggtcc cctgcaacaa 60
aacttccaag acaatcagtt tcagggcaaa tggtagctgg tcgggagagc tggtaacgtg 120
ggactgcgag aggacaagga ccccccaaa atgtgggcca ccatctacga gctgaaggaa 180
gacaaaagct atgatgtgac aaatgtcagg ttgcacgga agaaatgcac ttactcaatc 240
ggcaccttcg tgcccggtc ccagcctggg gagtttacac tgggccagat taagagcgaa 300

cctggcggaa cagccaacct ggtgcgggtg gtcttacta actataatca gcacgtatg 360
gtgttcttta aagaggtcta ccagaaccga gaaatcttct ttatcatcct gtacggccgt 420
accaaggagc tgacatccga gctgaaagaa aacttcatcc gcttttctaa gagtctggga 480
ctgccagaaa atcataatgt gtttctgtc ccaatcgacc agtgtattga tgggggcggt 540
ggaggatccg ggggtggggg aagcggcgga ggaggtagcg aatcgaaata cggccctccc 600
tgccccccct gccctgcccc tgaagctgcg ggcggacatt ccgtgtttct gttccccca 660
aagcccaagg acaccctgat gatctcccg acccccgaag tgacctgcgt ggtggtggac 720

gtgtcccagg aagatccaga ggtgcagttc aactggtagt ttgacggcgt ggaagtgcac 780
aacgccaaga ccaagcccag agaggaacag ttcaactcca cctaccgggt ggtgtccgtg 840

ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaagagt acaagtgcaa ggtgtccaac 900
aagggcctgc cctccagcat cgaaaagacc atctccaagg ccaagggcca gccccgcgag 960
ccccaggtgt acacctgcc ccctagccag gaagagatga ccaagaacca ggtgtccctg 1020
acctgtctgg tgaaaggctt ctaccctcc gacattgccg tggatggga gtccaacggc 1080
cagcccagaga acaactacaa gaccacccc cctgtgctgg actccgacgg ctcttcttc 1140

ctgtactctc ggetgacagt ggataagtcc cggtggcagg aaggcaatgt gttctcctgc 1200
agcgtgatgc acgaggcct gcacaaccac tataccaga agtcctgtc cctgagcctg 1260
ggcaaggcg gtggaggatc cgggggtggg ggaagcgcg gaggaggtag ccaggactct 1320
actagtatc tgatccggc accgccactg tcaaaagtcc ctctgcaaca aaactttcaa 1380
gacaatcagt ttacggcaa atggtatgtg gtcggccagg ccggaacat taggctgcgg 1440
gaggacaagg accccatcaa aatgatggct accatctacg agctgaagga agacaaatct 1500
tatgatgtga caatggtcaa gttcgacgat aagaaatgca tgtacgacat ctggaccttc 1560

gtgcccggct ccagccggg agagttcacc ctgggcaaga tcaagtcctt ccccgccac 1620
acttcagcc tggtcgcgt ggtctcgacc aactataatc agcatgctat ggtgttcttc 1680
aagttcgtct ttcagaatag agaggagtct tacatcacac tgtatggacg caccaaggag 1740
ctgacaagcg agctgaaaga aaacttcac aggttttcaa agtcctggg gctgcccga 1800
aatcatatcg tgttcccagt ccccatcgac cagtgtattg atggt 1845

<210> 66

<211> 1830

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> fusion polypeptide

<400> 66

caggactcta ctagtatct gattccagcc cctccactga gtaaggtgcc cctgcagcag 60

aacttcagg acaatcagtt tcagggaag tggatgtcg tgggaagagc aggaaacgtg 120
ggactgcgtg aggacaagga ccctcaaaa atgtgggcca ctatctacga gctgaaggaa 180
gacaaatcct atgatgtgac caatgtcaga ttcgtcgca agaaatgtac atactccatc 240
ggaactttcg tgcttggaag ccagccaggg gagtttacc tggggcagat taagtcagaa 300
ccaggcggaa ccgccaacct ggtgcgagt gtcctcaca actataatca gcacgctatg 360
gtgttcttta aagaggtcta ccagaacagg gaaatcttct ttatcatcct gtacggccgg 420
accaaggagc tgacatccga gctgaaagaa aacttcaccc gtttttcaa gtccctggga 480

ctgcccgaat atcatatcgt gttccccgtc cctatcgacc agtgcattga tgggggtggc 540
ggaggtccg gtggcggagg gagccaggac agcacatcgg atctgatccc ggcaccgcca 600
ctgtcgaaag tccactgca acaaaatatt caagacaatc agtttcacgg caagtggtag 660
gtggtcggc aggctggcaa cattaggctg cgggaggaca aggaccccat caagatgatg 720
gcaacaatct acgagctgaa ggaggacaaa tcttatgatg tgactatggt caagttcgac 780
gataagaaat gtatgtacga catctggacc ttcgtgcccg gctcccagcc tggcgagttc 840
acactgggca agatcaagtc cttccccggc cacacttcca gcctagtcag agtggtcagc 900

accaactata atcagcatgc tatggtgttc ttttaagttc tctttcagaa tagagaggag 960
ttctacatca cctgtatgg ccgactaag gagctgacct ctgagctgaa agagaatttc 1020
atccggttta gtaagtcact gggcctgcct gagaatcata tcgtgttccc agtccccatt 1080
gatcagtgca ttgatgtgg cggaggggga tccgggggtg ggggaagcgg cggaggaggt 1140
agcgaatcga aatacggccc tccctgcccc cctgcccctg cccctgaagc tgcgggcgga 1200
ccttccgtgt ttctgttccc cccaaagccc aaggacaccc tgatgatctc ccggaccccc 1260
gaagtgacct gcgtgggtgt ggacgtgtcc caggaagatc cagaggtgca gttcaactgg 1320

tatgttgacg gcgtggaagt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga acagtccaac 1380
tccacctacc ggggtgtgtc cgtgtgacc gtgtgcacc aggactggct gaacggcaaa 1440
gagtacaagt gcaaggtgtc caacaaggc ctgccctcca gcatcgaaaa gaccatctcc 1500
aaggccaagg gccagccccg cgagccccag gtgtacaccc tgccccctag ccaggaagag 1560
atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaaag gcttctaccc ctccgacatt 1620
gccgtggaat gggagtccaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccctgtg 1680
ctggactccg acggctcctt cttcctgtac tctcggtga cagtggataa gtcccgtgg 1740

caggaaggca atgtgttctc ctgcagcgtg atgcacgagg cctgcacaa ccactatacc 1800
cagaagtccc tgtccctgag cctgggcaag 1830

<210> 67
<211> 1098
<212> DNA
<213> artificial
<220><223> fusion polypeptide
<400> 67

caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaaggtccc tctgcagcag 60
aacttcagg acaaccaatt ccaagggaat tggatgtcg tgggcgttgc cggaatggt 120
atgtgcgtg aggataagga tccgttaaa atgaggcgca ccatttacga gttgaaagaa 180

gataaatcat atgacgtcac cagtgtggct tttcggaata agaaatgcca ttacaagatt	240
gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccagat taaaagtgg	300
ccgggcgaga catcaaattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca aggaggtgag gcagaaccgc gagtggtttt ttatcacact gtacgggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggcgggtgt	540
ggtggttctg gtgggtgggg atcgcaggac tccacctcag acctgatccc agccccacct	600
ctgagcaagg tccctctgca gcagaacttc caggacaacc aattccatgg gaaatggtac	660
gttgtcgggc aggccggaaa tattaggctg cgtgaggata aggatccgat taaaatgatg	720
gcgaccattt acgagttgaa agaagataaa tcatatgacg tcaccatggt gaagtttgat	780
gataaagaat gcatgtacga tatttggacc tttgtgccgg ggagccagcc gggcgagttt	840
actttaggca agattaaaag tttccgggc catacatcat cgttgggtccg cgtcgtgagc	900
accactaca accagcatgc catggtgttc ttcaagtttg tgtttcagaa ccgcgaggag	960
ttttatatca cactgtacgg gcgcacgaaa gaactgacaa gcgagctgaa ggaaaatttt	1020
atccgctttt ccaaattctt gggcctccct gaaaaccaca tcgtcttccc tgtccaatc	1080
gaccagtgtg tcgacggc	1098
<210> 68	
<211> 1662	
<212> DNA	
<213> artificial	
<220><223> fusion polypeptide	
<400> 68	
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag	60
aacttccagg acaaccaatt ccaagggaaa tggtatgtcg tgggcgttgc cggaaatggt	120
atgctgcgtg aggataagga tccgtttaa atgagggcga ccatttacga gttgaaagaa	180
gataaatcat atgacgtcac cagtgtggct tttcggaata agaaatgcca ttacaagatt	240
gggacctttg tgccggggag ccagccgggc gagtttactt taggccagat taaaagtgg	300
ccgggcgaga catcaaattt ggtccgcgtc gtgagcacca actacaacca gcatgccatg	360
gtgttcttca aggaggtgag gcagaaccgc gagtggtttt ttatcacact gtacgggcgc	420
acgaaagaac tgacaagcga gctgaaggaa aattttatcc gcttttccaa atctctgggc	480
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggcgggtgt	540

ggtgggttctg gtgggtggg atcgcaggac tccacctcag acctgatccc agccccacct 600
 ctgagcaagg tccctctgca gcagaacttc caggacaacc aattccatgg gaaatggtac 660
 gttgtcgggc aggccggaaa tattaggctg cgtgaggata aggatccgat taaaatgatg 720

 gcgaccatit acgagttgaa agaagataaa tcatatgacg tcaccatggt gaagtttgat 780
 gataaagaat gcatgtacga tatttggacc ttgtgtccgg ggagccagcc gggcgagttt 840
 actttaggca agattaaaag ttttcgggc catacatcat cgttgggtccg cgtcgtgagc 900
 accaactaca accagcatgc catggtgttc ttcaagtttg tgtttcagaa ccgcgaggag 960
 ttttatatca cactgtacgg gcgcacgaaa gaactgacaa gcgagctgaa gaaaaatit 1020
 atccgctttt ccaaattctt gggcctccct gaaaaccaca tcgtcttccc tgtccaatc 1080
 gaccagtgtg tcgacggcgg cggaggtggc tcaggaggtg gcggatcca ggactccacc 1140

 tcagacctga tcccagcccc acctctgagc aaggteccct tgcagcagaa ctccaggac 1200
 aaccaattcc atgggaaatg gtacgttgtc gggcaggccg gaaatattag gctgcgtgag 1260
 gataaggatc cgattaaaat gatggcgacc atttacgagt tgaaagaaga taaatcatat 1320
 gacgtcacca tgggtgaagt ttgatgataag aaatgcatgt acgatatttg gacctttgtg 1380
 ccggggagcc agccgggcga gtttacttta ggcaagatta aaagttttcc ggccataca 1440
 tcacgtttgg tccgcgtcgt gaggaccaac tacaaccagc atgcatggt gtcttcaag 1500
 ttgtgtttc agaaccgcga ggagttttat atcacactgt acgggcgcac gaaagaactg 1560

 acaagcgagc tgaaggaaaa ttttatccgc ttttcaaatt ctctgggcct cctgaaaac 1620
 cacatcgtct tccctgtccc aatcgaccag tgtatcgacg gc

1662

<210> 69

<211> 1326

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> antibody heavy chain

<400> 69

gaggtccagc tgggtcagag cgggtccgaa gtcaagaagc ctggcgagag cctgcggatt 60
 tcctgcaaag gaagcggata ctcatcagc acatactgga tctcttgggt caggcagatg 120
 ccaggcaagg gactggagtg gatggggaaa atctaccccg gagacagtta cactaactat 180

 tctccgagtt tccaaggcca ggtcactatc agcgtgata agtcaatttc caccgcctac 240
 ctgcaatggt ccagcctgaa agcctccgac accgctatgt actattgcgc tcgggggtac 300

ggatatctttg attattgggg ccagggaacc ctggtgacag tctcgagcgc tagcaccaag 360
ggccccctccg tgtttcctct ggcccccttgcc tccagatcca cctccgagtc taccgccgct 420
ctgggctgcc tcgtgaagga ctacttcccc gagcctgtga ccgtgtcctg gaactctggc 480
gctctgacct ctggcgtgca caccttccct gctgtgctgc agtctagcgg cctgtactcc 540
ctgtcctccg tcgtgaccgt gccctcctct aacttcggca ccagaccta cacctgtaac 600

gtggaccaca agccctccaa caccaagggtg gacaagaccg tggaacggaa gtgctgcgtg 660
gaatgcccc ctgtcctgc ccctcctgtg gctggcccta gcgtgttctt gttccccca 720
aagcccaagg acaccctgat gatctcccgg acccccgaag tgacctgcgt ggtggtggat 780
gtgtccacg aggacccga ggtgcagttc aattggtagc tggacggcgt ggaagtgcac 840
aacgccaaga ccaagcccag agaggaacag ttcaactcca cttccgggt ggtgtccgtg 900
ctgaccgtgg tgcatcagga ctggctgaac ggcaaagagt acaagtgcaa ggtgtccaac 960
aagggcctgc ctgcccccat cgaaaagacc atctctaaga ccaagggaca gccccgcgag 1020

ccccaggtgt acacactgcc tccatcacgg gaagagatga ccaagaacca ggtgtccctg 1080
acctgtctcg tgaaagctt ctaccctcc gatatcgccg tggaatggga gtccaacggc 1140
cagcccgaga acaactacaa gaccaccccc ccatgctgg actccgacgg ctattcttc 1200
ctgtactcca agctgacagt ggacaagtcc cgggtggcagc agggcaacgt gttctcctgc 1260
tccgtgatgc acgaggccct gcacaaccac tacaccaga agtcctgtc cctgagcccc 1320
gggaaa 1326

<210> 70

<211> 642

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> antibody light chain

<400> 70

tcctatgaac tgacacagcc tccttccgtg agcgtgagcc ctggacagac tgctttctatt 60
actttagcgg gggataacat cggggatcag tacgccact ggtatcagca gaagcccga 120
cagagtctgt tgctggtcat ctaccaggac aaaaacaggc catcaggcat tcccagcgg 180
ttctccggaa gcaactctgg gaataccgt acactgacta tctccggaac acaggcaatg 240
gacgaagccg attactattg cgctacctat acaggtttcg gctctctggc agtgtttggc 300
ggagggacta agctgaccgt cctgggccag cctaaagcgg cgccatccgt caccctgttc 360
ctcctcat ccgaggaact gcaggccaat aaggctacac tggctgtct gattagcgac 420

ttctaccctg gggccgtgac tgtggcttgg aaagccgatt cttctcccgt gaaagctgga 480
 gtggaaacaa ccacccctc taaacagagc aacaacaaat acgtgcctc ttcatactg 540
 tcctgaccc ctgaacagtg gaaatctcac cggctcttact catgccaggt gacacacgag 600
 ggatcaactg tggagaaaac cgtggctcct accgaatgtt ca 642
 <210> 71
 <211> 1905
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220><223> fusion polypeptide heavy chain
 <400> 71
 gaggtccagc tggcgcagag cggcgcgaa gtcaagaagc ctggcgagag cctgcggatt 60
 tcctgcaaag gaagcggata ctcatcagc acatactgga tctcttgggt caggcagatg 120

 ccaggcaagg gactggagtg gatggggaaa atctaccccg gagacagtta cactaactat 180
 tctccgagtt tccaaggcca ggctcactatc agcgtgata agtcaatttc caccgcctac 240
 ctgcaatggt ccagcctgaa agcctccgac accgctatgt actattgcgc tcgggggtac 300
 ggatctttt attattgggg ccagggaacc ctggtgacag tctcgagcgc tagcaccaag 360
 ggccctccg tgtttcctc ggcccttgc tccagatcca cctccgagtc taccgccgt 420
 ctgggctgcc tcgtgaagga ctacttccc gagcctgtga ccgtgtcctg gaactctggc 480
 gctctgacct ctggcgtgca cacttcctt gctgtgctgc agtctagcgg cctgtactcc 540

 ctgtcctccg tcgtgaccgt gccctcctct aattcggca cccagaccta cacctgtaac 600
 gtggaccaca agcctccaa caccaagggtg gacaagaccg tggaacggaa gtgctgcgtg 660
 gaatgcccc cttgtcctgc cctcctgtg gctggcccta gcgtgttcct gtcccccca 720
 aagcccaagg acaccctgat gatctcccgg acccccgaag tgacctgcgt ggtgggtgat 780
 gtgtcccacg aggacccga ggtgcagttc aattggtacg tggacggcgt ggaagtgcac 840
 aacgccaaga ccaagcccag agaggaacag ttcaactcca ccttccgggt ggtgtccgtg 900
 ctgacctgg tgcatcagga ctggctgaac ggcaaagagt acaagtgcaa ggtgtccaac 960

 aagggcctgc ctgccccat cgaaaagacc atctctaaga ccaagggaca gccccgcgag 1020
 cccaggtgt acacactgcc tccatcacgg gaagagatga ccaagaacca ggtgtccctg 1080
 acctgtctcg tgaaggctt ctaccctcc gatatgccg tggaatggga gtccaacggc 1140
 cagcccgaga acaactaaa gaccacccc ccatgctgg actccgacgg ctcatcttc 1200
 ctgtactcca agctgacagt ggacaagtcc cggcggcagc agggcaacgt gttctcctgc 1260
 tccgtgatgc acgaggcct gcacaaccac tacaccaga agtcctgtc cctgagcccc 1320

gggaaaggcg gcggaggatc cgggggtggg ggaagcggcg gaggaggtag ccaggactcc 1380

actagcgatc tgatcccggc tccccctctg agtaaggtgc ccctgcaaca aaacttccaa 1440

gacaatcagt ttcagggcaa atggtacgtg gtcgggagag ctggtaacgt gggactgcga 1500

gaggacaagg acccccccaa aatgtgggcc accatctacg agctgaagga agacaaaagc 1560

tatgatgtga caaatgtcag gttcgcacgg aagaaatgca cttactcaat cggcaccttc 1620

gtgcccggt cccagcctgg ggagtttaca ctgggccaga ttaagagcga acctggcgga 1680

acagccaacc tggcgggggt ggtctctact aactataatc agcacgctat ggtgttcttt 1740

aaagaggtct accagaaccg agaaatcttc tttatcatcc tgtacggccg taccaaggag 1800

ctgacatccg agctgaaaga aaacttcata cgcttttcta agagtctggg actgccagaa 1860

aatcatattg tgtttctgt cccaatcgac cagtgtattg atggg 1905

<210> 72

<211> 642

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> fusion polypeptide light chain

<400> 72

tcctatgaac tgacacagcc tccttcctg agcgtgagcc ctggacagac tgctttctatt 60

actttagtcg gggataacat cggggatcag tacgccact ggtatcagca gaagcccga 120

cagagtctg tgctggtcat ctaccaggac aaaaacaggc catcaggcat tcccagcgg 180

ttctccgaa gcaactctgg gaataccgct aactgacta tctccggaac acaggcaatg 240

gacgaagccg attactattg cgctacctat acaggtttcg gctctctggc agtgtttggc 300

ggagggacta agctgaccgt cctgggccag cctaaagcgg cgccatccgt caccctgttc 360

cctccctcat ccgaggaact gcaggccaat aaggctacac tggctctgtc gattagcgac 420

ttctaccctg gggccgtgac tgttgcttgg aaagccgatt cttctccgt gaaagctgga 480

gtggaacaa ccacccctc taaacagagc aacaacaaat acgtgcctc ttcataacctg 540

tcctgacct ctgaacagtg gaaatctac cgtcttact catgccaggt gacacacgag 600

ggatcaactg tggagaaaac cgtggctcct accgaatgtt ca 642

<210> 73

<211> 229

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> IgG4-Fc with mutations

<400> 73

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser

100 105 110

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

115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu

180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys

225

<210> 74

<211> 448

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> reference antibody

<400> 74

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

1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45
Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu

50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95
Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly

100 105 110
Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

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

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

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

 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445
 <210> 75

<211> 216

<212> PRT

<213> reference antibody

<400> 75

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215