



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0155600
(43) 공개일자 2023년11월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2809 (2013.01)
C07K 16/283 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7037174(분할)
(22) 출원일자(국제) 2015년04월02일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2022-7010016
원출원일자(국제) 2015년04월02일
심사청구일자 2022년04월25일
(85) 번역문제출일자 2023년10월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/024149
(87) 국제공개번호 WO 2015/153912
국제공개일자 2015년10월08일
(30) 우선권주장
61/974,738 2014년04월03일 미국(US)

(71) 출원인
아이취엠 바이오사이언스 인코포레이티드
미국 94043 캘리포니아주 마운틴뷰 이스트 미드필드 로드 325
(72) 발명자
케이트, 브루스
미국 94010 캘리포니아주 헬스보로우 레이크뷰 드라이브 1180
프레스타, 레오나르드, 조지
미국 94109 캘리포니아주 샌프란시스코 아파트먼트 206 코프 스트리트 1900
(74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 변형된 J-사슬

(57) 요약

본 발명은 변형된 재조합 J-사슬 폴리펩타이드, 결합 분자, 예컨대 이를 포함하는 항체 및 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도19

이중특이적 Ab에 대한 메뉴 추진 접근법
종양학 분야에 대한: 표적 세포 X 이펙터 세포

표적 연관 항원

면역 이펙터 세포

혈액 암
CDIM, CD19, CD20, CD22,
CD33, CD70, CD56, CD138
상피 종양
EpCAM, Her2, Eph-A2
PSMA, MCSP, AGS-5
GPNMB
탄수화물 종양
CEA, CA-125, TADG78
시알릴 루이스-X (CD15)
바이러스 항원
PreS1 (HBV), GP120 (HIV)

T 세포:
CD3 엑셀론

NK 세포,
CD16, CD64
NKG2D

대식세포
CD14

호중구
CD16b, CD177

(52) CPC특허분류

C07K 16/2887 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/52 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

(72) 발명자

장, 펜

미국 94127 캘리포니아주 샌프란시스코 주아니타
웨이 260

발리가, 라메쉬

미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 걸 애비뉴
1042

명세서

청구범위

청구항 1

본원에 기재된 항체의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본원은 2014년 4월 3일에 출원된 미국 가출원번호 제61/974,738호(이의 내용은 그 전문이 본 명세서에서 참조로 포함됨)의 우선권 및 이익을 주장한다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 변형된 재조합 J-사슬 폴리펩타이드 및 결합 분자, 예컨대 이를 포함하는 항체에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] J-사슬은 IgM μ 또는 IgA α 중쇄의 C 말단에서 18개 아미노산 분비 꼬리 조각(tail-piece: tp)에서 끝에서 두 번째 시스테인 잔기를 포함하는 다이설파이드 결합을 통해 오합체 IgM 및 이합체 IgA와 회합된 산성 15kDa 폴리펩타이드이다. 3개의 다이설파이드 브릿지는 각각 Cys 12와 100, Cys 71과 91과 Cys 108과 133 사이에 형성된다. 예를 들어, 문헌[Frutiger et al. 1992, *Biochemistry* 31, 12643-12647]을 참조한다. 인간 IgM 및 IgA로의 J-사슬의 혼입 및 J-사슬에 의한 중합체 면역글로불린 조립 및 회합을 위한 구조 요건은 각각 문헌[Sorensen et al. 2000, *Int. Immunol.* 12(1): 19-27 및 Yoo et al. 1999, *J. Biol. Chem.* 274(47):33771-33777]에 보고되어 있다. 이 콜라이에서의 가용성 J-사슬의 재조합 생성은 문헌[Redwan et al. 2006, *Human Antibodies* 15:95-102]에 보고되어 있다.

[0006] 하이브리드 IgA/IgG 및 IgM/IgG 항체를 제조하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 따라서, 하이브리드 IgA2/IgG1 항체의 재조합 생성은 문헌[Chintalacharuvu et al. 2001, *Clin Immunol* 101(1):21-31]에 보고되어 있다. IgG γ 중쇄의 말단에서의 α tp 또는 μ tp의 첨가가 중합을 수월하게 하고, 이펙터 기능, 예컨대 보체 활성화를 증대시키는 것으로 보고되어 있다(Smith et al., *J Immunol* 1995, 154:2226-2236). IgA/IgG 하이브리드 항체는 IgA 및 IgG 둘 다의 특성을 보유한다.

[0007] 항체의 설계에 이루어진 진전에도 불구하고, 개선된 특성, 예컨대 개선된 친화도, 특이성 및/또는 결합도(avidity)를 가지는 변형된 항체에 대한 필요성이 여전하다.

[0008] 이 분야가 진행되면서, 항체 기능은 단백질 조작의 창조적 수단을 통해 증대되어서, 예컨대 더 높은 친화도, 더 긴 반감기, 및/또는 더 우수한 조직 분포, 및 독성 페이로드 전달을 통한 세포 파괴의 증가한 집중에 대한 큰 분자와 작은 분자 기술의 조합(예를 들어, 항체-약물 접합체)을 제공한다. 항체 기능을 개선하는 또 다른 접근법은 1개의 IgG 분자가 2개의 항원에 결합하게 허용하는 면역글로불린 G(IgG) 구조의 2가 결합의 이점을 취한다. 실제로, 소정의 분야에서, 2개의 상이한 표적 항원에 동시에 결합함으로써 유용한 기능을 발휘하는 비대칭 항체에 대한 우수한 가능성이 존재한다. 이 필요성을 해소하기 위해, 다양한 작제물은, 자연에서 전에 결코 보이지 않은 기능을 허용하는, 2개의 상이한 항원에 결합할 수 있는, 단일 분자를 생성하도록 제조되었다. 이 이중특이적 접근법의 예는 각각 T 및 B 세포 상의 CD3 및 CD19 수용체에 결합하는 "블리나투모맵"(MT103 또는 AMG103)이다. 암성 B 세포에 대한 세포독성 T 세포의 이 테더링(tethering)은 B 세포 백혈병의 효과적인 치료를 허용한다.

[0009] 그러나, 이중특이적 항체의 작제, 발현 및 생성에서 상당한 기술적 어려움이 존재한다. 이중특이적 항체가 2개의 상이한 항원에 동시에 결합하는 이의 능력으로 인해 유망한 치료제로서 고려되지만, 안정성 및 제조 복잡성에 의한 문제로 인해 이의 이용이 제한된다.

[0010] 다양한 형태의 단백질 조작용 비상동성 중쇄를 일치시키기 위해, 그리고 이중특이적 IgG를 효율적으로 생성하기 위한 중쇄 및 경쇄의 적절한 쌍 짓기 일치에 사용된다. 또한, 다양한 이중특이적 항체 포맷은 쿼드로마 (quadroma), 화학 이중접합체, 선택된 이중이합체화 도메인을 사용한 재조합 작제물 및 2개의 최소 항원 결합 부위로 이루어진 최소 크기의 재조합 작제물을 포함한다.

[0011] 그러나, 모든 이들 노력이 어려움으로 좌절되었다.

[0012] 따라서, 조작된, 예컨대 이중특이적 항체의 개발에 대한 노력에도 불구하고, 더 효율적인 플랫폼을 개발할 큰 필요성이 여전히 존재한다. 이는 치료학적 항체의 경우에 특히 사실이고, 여기서 다중 특이성을 가지는 새로운, 변형된, 항체 및 항체 유사 분자의 설계 및 생성은 이러한 치료제의 발견과 임상 도입 사이의 시간표를 단축할 수 있다.

발명의 내용

[0013] 본 발명은, 적어도 부분적으로, IgM 또는 IgA 항체의 J-사슬이 네이티브 J-사슬 서열로 하나 이상의 결합 모이어터를 도입함으로써 변형될 수 있고, 변형된 J-사슬이 수혜자 항체의 기능 또는 표적에 대한 변형된 J-사슬의 결합을 손상시키지 않으면서 IgM, IgA, IgG/IgM 또는 IgG/IgA 항체로 도입될 수 있다는 인식에 기초한다. 이는 결합 모이어터를 가지는 변형된 J-사슬이 일 세트의 표적 항원과 상호작용하게 허용하는 반면, IgA, IgM, IgG/IgM 또는 IgG/IgA 항체는 상이한 세트의 표적 항원과 반응할 수 있다.

[0014] 본 발명은 추가로 이펙터 세포, 예컨대 T 세포, NK 세포, 대식세포 또는 호중구로 변형된 J-사슬을 지향시킴으로써, 신체의 면역 반응이 활성화될 수 있고, 항체 의존적 세포 세포독성(ADCC) 반응이 개선될 수 있다는 인식에 기초한다.

[0015] 일 양상에서, 본 발명은 네이티브 서열 J-사슬로 도입된 외인성 결합 모이어터를 포함하는 변형된 J-사슬에 관한 것이다.

[0016] 일 실시형태에서, 네이티브 서열 J-사슬은 서열 번호 1의 네이티브 인간 J-사슬 서열, 또는 이의 기능적 단편이다.

[0017] 또 다른 실시형태에서, 외인성 결합 모이어터는 직접 또는 간접 융합에 의해 서열 번호 1의 네이티브 인간 J-사슬 서열로 도입된다.

[0018] 훨씬 또 다른 실시형태에서, 결합 모이어터는 펩타이드 링커를 통해 간접 융합에 의해 도입된다.

[0019] 일 실시형태에서, 간접 융합은 결합 모이어터의 C 및/또는 N 말단에서 또는 이 주위에서 펩타이드 링커를 통해 달성된다.

[0020] 또 다른 실시형태에서, 외인성 결합 모이어터는 예컨대 C 말단 및/또는 N 말단으로부터 약 10개의 잔기 내에 C 말단 및/또는 N 말단에서 또는 이 주위에서 서열 번호 1의 네이티브 인간 J-사슬 서열로 도입된다.

[0021] 추가의 실시형태에서, 외인성 결합 모이어터는 서열 번호 1의 시스템 잔기 92번과 101번 사이에서 네이티브 인간 J-사슬 서열로 도입된다.

[0022] 훨씬 추가의 실시형태에서, 외인성 결합 모이어터는 글라이코실화 부위에서 또는 이 주위에서 서열 번호 1의 네이티브 인간 J-사슬 서열로 도입된다.

[0023] 펩타이드 링커는, 존재하는 경우, 예를 들어 약 10개 내지 20개의 아미노산 길이, 또는 약 15개 내지 20개의 아미노산 길이, 또는 15개의 아미노산 길이일 수 있다.

[0024] 추가의 실시형태에서, 외인성 결합 모이어터는 화학 또는 화학-효소 유도체화에 의해 서열 번호 1의 네이티브 인간 J-사슬 서열로 도입된다. 화학 링커는 절단 가능 또는 절단 불가 링커일 수 있고, 절단 가능 링커는 예를 들어 화학적으로 불안정 링커 또는 효소 불안정 링커일 수 있다.

[0025] 추가의 실시형태에서, 링커는 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜다이티오) 프로피오네이트(SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카복실레이트(SMCC), N-숙신이미딜-4-(2-피리딜티오) 펜타노에이트(SPP), 이미노티올란(IT), 이미노에스터, 활성 에스터, 알데하이드, 비스-아지도 화합물의 이작용성 유도체, 비스-다이아조늄 유도체, 다이아미소사이아네이트 및 비스-활성 불소 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0026] 상이한 실시형태에서, J-사슬은 효소 인식 부위의 삽입에 의해, 및 펩타이드 또는 비펩타이드 링커를 통해 효소

인식 부위에서 외인성 결합 모이어티를 번역후 부착함으로써 변형된다.

- [0027] 모든 실시형태에서, 외인성 결합 모이어티는 예를 들어 항체, 항체의 항원 결합 단편, 항체-약물 접합체, 항체 유사 분자, 항체 유사 분자의 항원 결합 단편, 가용성 및 막 결합 단백질, 리간드, 수용체, 바이러스 유사 입자, 단백질 독소, 효소, 및 대안적인 스캐폴드로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 대안적인 스캐폴드의 예는 다르핀, 피브로넥틴 도메인, 아드넥틴 및 크녹틴을 포함한다. 통상적인 항원 결합 단편은 $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab , Fv , $scFv$ 및 단일 도메인 항체를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 항원 결합 단편은 $scFv$ 이다.
- [0028] 일 실시형태에서, 변형된 J-사슬의 외인성 결합 모이어티는 이펙터 세포에 결합하고, 이펙터 세포는 예를 들어 T 세포, 자연 살해(natural killer: NK) 세포, 대식세포 및 호중구로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0029] 일 실시형태에서, 이펙터 세포는 T 세포이고, 외인성 결합 모이어티는 예를 들어 T 세포 상의 $CD3\epsilon$ 에 결합할 수 있다.
- [0030] 또 다른 실시형태에서, 이펙터 세포는 NK 세포이고, 변형된 J-사슬의 외인성 결합 모이어티에 대한 표적은 예를 들어 NK 세포 상의 $CD16$, $CD64$ 및 $NG2D$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0031] 훨씬 또 다른 실시형태에서, 이펙터 세포는 대식세포이고, 변형된 J-사슬의 외인성 결합 모이어티는 예를 들어 대식세포 상의 $CD14$ 에 결합할 수 있다.
- [0032] 추가의 실시형태에서, 이펙터 세포는 호중구이고, 변형된 J-사슬의 외인성 결합 모이어티는 예를 들어 호중구 상의 $CD16b$ 또는 $CD177$ 에 결합할 수 있다.
- [0033] 또 다른 양상에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 변형된 J-사슬을 포함하는 항체, 또는 이러한 항체의 항원 결합 단편에 관한 것이다. 항체는 IgM , IgA , IgG/IgM 또는 IgG/IgA 항체일 수 있고, 다중특이적, 예를 들어 이중특이적 항체를 포함한다.
- [0034] 일 실시형태에서, 항체는 꼬리 조각을 포함하는 IgM 항체, IgA 항체 또는 IgG 항체, 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0035] 또 다른 실시형태에서, 항체는 표적 세포, 가용성 결합 표적, 세포 표면 수용체, 매트릭스 단백질, 트랜스포터 수용체로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 결합 표적에 결합 특이성을 가진다.
- [0036] 훨씬 또 다른 실시형태에서, 항체는 종양 세포에 결합한다.
- [0037] 추가의 실시형태에서, 항체는 도 19에 기재된 종양 표적 연관 항원에 결합하고, J-사슬은 예를 들어 도 19에 기재된 임의의 이펙터 세포 표적에 결합하도록 변형될 수 있다.
- [0038] 훨씬 추가의 실시형태에서, 변형된 J-사슬은 V-링커-J 배향 또는 J-링커-V 배향으로 항체에 존재한다.
- [0039] 일 실시형태에서, 종양은 혈액학적 암 또는 고형 종양이고, 혈액학적 암은 예를 들어 구체적으로 급성 골수성 백혈병, 급성 림프아구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 또는 만성 림프구성 백혈병, 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종을 포함하는, 백혈병, 림프종, 골수종 및 골수이형성 증후군일 수 있다. 이러한 실시형태에서, 항체는 예를 들어 $CD11$, $CD19$, $CD20$, $CD22$, $CD33$, $CD70$, $CD56$, $CD138$ 중 하나 이상에 결합할 수 있고, 변형된 J-사슬은 $CD3\epsilon$ 에 결합할 수 있다.
- [0040] 또 다른 실시형태에서, 종양은 상피 종양이다.
- [0041] 훨씬 또 다른 실시형태에서, 항체는 종양 상의 탄수화물계 표적에 결합한다.
- [0042] 추가의 실시형태에서, 항체는 바이러스 항원, 예컨대 HBV 항원 또는 HIV 항원, 예를 들어 PreS1 또는 GP120에 결합한다.
- [0043] 추가의 양상에서, 본 발명은 기재된 바와 같은 변형된 J-사슬을 포함하는 IgM , IgA , IgG/IgM , IgG/IgA 항체를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 예를 들어 약제학적 조성물 또는 진단학적 조성물일 수 있다.
- [0044] 훨씬 추가의 양상에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 변형된 J-사슬을 가지는 유효량의 IgM , IgA , IgG/IgM , IgG/IgA 항체를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 종양 또는 바이러스 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0045] 또 다른 양상에서, 본 발명은 종양 또는 바이러스 질환의 치료에서 사용하기 위한 약제의 제조에서의, 본 명세

서에 기재된 바와 같은, 변형된 J-사슬을 가지는 IgM, IgA, IgG/IgM, IgG/IgA 항체의 용도에 관한 것이다.

[0046]

훨씬 또 다른 양상에서, 본 발명은 중앙 또는 바이러스 질환의 치료에서의, 본 명세서에 기재된 바와 같은, 변형된 J-사슬을 가지는 IgM, IgA, IgG/IgM, IgG/IgA 항체의 용도에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0047]

도 1은 J-사슬을 포함하는 IgM 오합체의 구조를 예시하고, 여기서 사슬 A 및 B는 네이티브 IgM에서 동일하다.

도2는 IgA, 이합체 IgA 및 분비 IgA(sIgA)의 도식적 구조를 나타낸다.

도 3은 성숙 인간 J-사슬(서열 번호 1)의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 4는 다양한 동물 종으로부터의 성숙 인간 J-사슬(서열 번호 1) 및 J-사슬(서열 번호 1 내지 44)의 정렬을 나타낸다.

Hum = 인간 NP_653247 23-159 (서열 번호 1)

Chm = 침팬치 XP_001160135 39-175 (서열 번호 2)

Gor = 고릴라 XP_004038830 23-159 (서열 번호 3)

Ora = 오랑우탄 NP_001125381 23-159 (서열 번호 4)

Gib = 긴팔원숭이 XP_003265761 39-175 (서열 번호 5)

Mar = 마모셋 XP_003732538 32-168 (서열 번호 6)

Cyn = 사이노몰거스 원숭이 NP_001247815 23-159 (서열 번호 7)

Bab = 개코원숭이 XP_003898844 23-159 (서열 번호 8)

Squ = 다람쥐 원숭이 XP_003931978 23-159 (서열 번호 9)

Shr = 나무두더쥐 XP_006142955 25-160 (서열 번호 10)

Dol = 돌고래 XP_004328961 25-158 (서열 번호 11)

Kil = 범고래 XP_004283629 25-158 (서열 번호 12)

Ele = 코끼리 XP_003414110 25-158 (서열 번호 13)

Sea = 물개 XP_006729388 25-158 (서열 번호 14)

Rhi = 코뿔소 XP_004419202 25-157 (서열 번호 15)

Cat = 집고양이 XP_003985350 25-158 (서열 번호 16)

Wol = 늑대 XP_532398 26-159 (서열 번호 17)

Pan = 사이언트 팬더 EFB23253 1-134 (서열 번호 18)

Fer = 페럿 XP_004766376 26-158 (서열 번호 19)

Hor = 말 NP_001271464 25-158 (서열 번호 20)

Gui = 기니아 피그 NP_001265705 25-160 (서열 번호 21)

Cam = 낙타 XP_006188738 25-158 (서열 번호 22)

Goa = 염소 XP_005681786 25-158 (서열 번호 23)

Chn = 친칠라 XP_005392838 94-229 (서열 번호 24)

Ham = 햄스터 XP_005068228 24-160 (서열 번호 25)

She = 양 XP_004009937 25-158 (서열 번호 26)

BBa = 갈색 박쥐 XP_006094475 25-158 (서열 번호 27)

Ant = 영양 XP_005983836 25-158(서열 번호 28)

Cow = 소 NP_786967 25-157 (서열 번호 29)

Mou = 마우스 NP_690052 23-159 (서열 번호 30)

Rat = 랫트 EDL88516 23-159 (서열 번호 31)

Hed = 고슴도치 XP_004703237 25-157 (서열 번호 32)

Rab = 토끼 P23108 1-136 (서열 번호 33)

Opo = 주머니쥐 XP_003341415 29-162 (서열 번호 34)

All = 악어 XP_006270094 26-159 (서열 번호 35)

Tur = 거북이 XP_005304167 26-159 (서열 번호 36)

Tas = 주머니곰 XP_003772863 27-160 (서열 번호 37)

Pla = 오리너구리 XP_003430954 36-160 (서열 번호 38)

Par = 잉꼬 XP_005142787 28-160 (서열 번호 39)

Duc = 오리 XP_005031370 28-160 (서열 번호 40)

Chi = 닭 NP_989594 26-158 (서열 번호 41)

Tur = 칠면조 XP_003205717 27-159 (서열 번호 42)

Fal = 매 XP_005243236 29-160 (서열 번호 43)

Spa = 참새 XP_005492217 29-158 (서열 번호 44)

도 5는 인간 및 박쥐(검은 날으는 박쥐, 프테로쿠스 알렉토(*Pteropus alecto*)) J-사슬 아미노산 서열(각각 서열 번호 1 및 45)의 아미노산 서열의 정렬을 나타낸다.

도 6: J-사슬이 결합된 IgM 항체(음성 대조군) 및 J-사슬을 포함하는 IgM은 환원 SDS PAGE에서 분리되고, 항-J-사슬 항체를 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 검출된다. 항-J-사슬 항체는 J-사슬을 포함하는 IgM과 오직 반응한다.

도 7: 형질감염된 CHO 세포로부터의 수확된 상청액은 항-mu 또는 항-myc 친화도 매트릭스에 의한 면역침전을 위해 동등하게 분할된다. 이 CHO 세포는 (세포사 유도 분자에 대해) CDIM으로 공지된 항-B 세포 특이성을 가지는 IgM을 발현한다. 이 IgM 항체는 IGM-55.5로 공지되어 있다. 면역침전된 단백질은 환원 SDS PAGE에서 분리되고, 항-J 또는 항-myc 항체에 의해 웨스턴 블롯에 의해 검출된다. N 말단 태그화된 항-CD3scFvJ 및 C 말단 태그화된 J-항-CD3scFv 형질감염된 세포 둘 다는 대략 51kD의 양의 밴드를 나타내고, 이것은 항-J 및 항-myc 항체 둘 다와 반응한다.

도 8은 T 세포(T 세포 항원 CD3)에 대해 결합 특이성을 가지는 변형된 J-사슬을 포함하는 이중특이적 IgM 오합체의 2개의 상이한 배향을 예시한다.

도 9: C 말단(항-CD3scFv-J)에서 J-사슬을 포함하는 항-CD3 단쇄 Fv의 서열(서열 번호 46) 및 구조. SP=신호 펩타이드.

도 10: N 말단(J-항-CD3scFv)에서 J-사슬을 포함하는 항-CD3 단쇄 Fv의 서열(서열 번호 47) 및 구조. SP=신호 펩타이드.

도 11은 이펙터 세포에 대해 결합 특이성을 가지는 J-사슬에 공유로 부착된 결합 도메인을 포함하는 표적 항원에 대한 결합 특이성을 가지는 비대칭 이중특이적 IgM 오합체의 도식적 예시이다.

도 12는 CD3 scFv 결합 도메인에 의해 공유로 변형된 J-사슬을 가지는 항-CD20 IgM 오합체의 웨스턴 블롯을 보여준다. 쿠마쉬 블루에 의해 염색된 비환원 PAGE는 대략 100만 달톤 MW의 IgM의 전체 크기를 관찰한다. 변형된 J-사슬은 CD3-J 및 J-CD3의 배향 둘 다에서 IgM 오합체로 혼입된다.

도 13은 CD3에 결합 특이성을 제공하는 변형된 J-사슬(CD3_J)에 의한 이중특이적 항-CD20 IgM(CD20_{IgM})의 중쇄

(HC), 경쇄(LC), 및 변형된 J-사슬의 일시적인 동시형질전환의 결과를 보여준다.

도 14는 항-CD20 IgM으로의 변형된 J-사슬의 혼입이 CDC 활성에 부정적인 효과를 가지지 않는다는 것을 보여준다. 또한, 데이터는 배향 중 어느 하나(V15J 또는 J15V(여기서, "15"는 링커의 길이를 지칭))의 변형된 J-사슬을 포함하는 IgM 분자가 항-CD20 IgG 항체보다 상당히 더 효력이 있다는 것을 보여준다.

도 15는 이중특이적 CD20_{IgM} x CD3_{J-사슬} 분자가 변형된 J-사슬의 CD3-특이성으로 인해 B 세포의 활성 T 세포 사멸의 결과로서 B 세포 고갈에서 매우 효력이 있다는 것을 보여준다. 라지(Raji), CD19+CD20+ B 세포주를 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 CD20 IgM x J-야생형 또는 CD20 IgM x CD3-J 사슬을 가지는 T-ALL인 CD8+ 세포용해 T 세포주와 동시배양하였다. 세포를 수확하고 CD3 및 CD19에 대해 형광 항체에 의해 염색하고 생존가능 B 세포를 평가하기 위해 유세포분석법에 의해 분석하였다.

도 16은 CD3에 결합 특이성을 제공하는 변형된 J-사슬을 가지는 이중특이적 항-CD20 IgM 분자가 야생형 J-사슬을 가지는 항-CD20 IgM 오합체에 비해 상당히 개선된 세포독성 활성을 가진다는 것을 보여준다. T 세포 관여 이중특이적 IgM 오합체는 1ng/ml의 농도에서 효과적이고, 야생형 J-사슬을 가지는 항-CD20 IgM과 비교하여 300배 더 효력이 있다.

도 17은 항-CD20 IgG, IgM 및 이중특이적 IgM을 가지는 생체내 B 세포 고갈을 보여준다. 인간 CD34+ 줄기 세포 (잭슨 래버러토리즈(Jackson Laboratory); 재고 번호: 007799)에 의해 재구성된 인간화 NSG 마우스를 구입하고, 전혈을 CD19+ B 세포의 투약전 수준에 대해 분석하였다. CD20 IgM x CD3-J 사슬을 0.5mg/kg로 동물에게 정맥내 투약하기 위해 제조하였다. 투약 6시간 후, 전혈을 동물로부터 얻고, 형광 표지된 CD19+ 항체를 사용하여 인간 B 세포의 순환 수준에 대해 유세포분석법에 의해 분석하였다.

도 18은 CD16 특이적 Vhh 카멜리드-J-사슬을 가지는 웨스턴 블롯이다.

도 19는 변형된 J-사슬에 대한 IgM 항체 표적 및 이펙터 세포 표적을 기재한 것이다. 표의 왼쪽 행에 기재된 임의의 IgM 항체 표적은 오른쪽 행에 기재된 임의의 변형된 J-사슬 표적과 조합될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 정의

본 발명을 더 자세히 기재하기 전에, 본 발명이 기재된 특정한 실시형태에 제한되지 않고, 그러므로 물론 변할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명의 범위가 청구항에 의해서만 제한되므로, 본 명세서에서 사용된 전문 용어가 오직 특정한 실시형태를 기술할 목적을 위한 것이고, 제한인 것으로 의도되지 않는 것으로 또한 이해되어야 한다.

값의 범위가 제공될 때, 문맥이 명확히 달리 기술하지 않는 한, 이 범위의 상한 및 하한과 이 언급된 범위에서의 임의의 다른 설명된 또는 개재하는 값 사이의, 하한의 단위의 1/10으로의, 각각의 개재하는 값이 본 발명 내에 포함되는 것으로 이해된다. 이 더 적은 범위의 상한 및 하한은, 언급된 범위에서의 임의의 구체적으로 배제된 범위로 처리된, 본 발명 내에 포함된 더 적은 범위에서 독립적으로 포함될 수 있다.

달리 정의되지 않은 한, 본 명세서에서 사용된 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당해 분야의 당업자가 보통 이해하는 것과 동일한 의미를 가진다. 문헌[Singleton *et al.*, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* 2nd ed., J. Wiley & Sons(New York, NY 1994)]은 당해 분야의 당업자에게 본원에 사용된 많은 용어에 대한 일반 가이드를 제공한다.

본 명세서에서 언급된 모든 공보는 본 명세서에서 참조로 명확히 인용되어서 공보가 인용되는 것과 연결되어 방법 및/또는 재료를 개시하고 기술한다.

용어 "항체"는 단일클론 항체(면역글로불린 Fc 영역을 가지는 전장 항체를 포함), 단쇄 분자, 및 항체 단편(예를 들어, Fab, F(ab')₂, 및 Fv)을 포함한다. 용어 "면역글로불린"(Ig)은 본 명세서에서 "항체"와 상호교환적으로 사용된다. 기본적인 4-사슬 항체 단위는 2개의 동일한 경쇄(L) 및 2개의 동일한 중쇄(H)로 이루어진 이중사슬체 당단백질이다. 달리 표시되지 않은 한, 용어 "항체"는 본 명세서에서 가장 광의로 사용되고, 구체적으로 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE 항체 및 이의 단편, 바람직하게는 항원 결합 단편을 포함하는, 항체의 모든 아이소유형, 하위유형 및 형태를 포함한다. 바람직한 항체는 본 명세서에서, 키메라 항체를 생성하기 위해, IgG와 같은 다른 아이소유형으로부터의 서열을 포함하도록 변형될 수 있는, IgM 및 IgA 항체 및 이의 항원 결합 단편을

포함한다.

- [0054] IgG의 경우에, 4-사슬 단위는 일반적으로 약 150,000 달톤이다. 각각의 L 사슬은 1개의 공유 다이설파이드 결합에 의해 H 사슬에 연결되는 반면, 2개의 H 사슬은 H 사슬 아이소유형에 따라 하나 이상의 다이설파이드 결합에 의해 서로 연결된다. 각각의 H 및 L 사슬은 또한 규칙적으로 이격된 사슬내 다이설파이드 브릿지를 가진다. 각각의 H 사슬은 N 말단에서 가변 도메인(V_H), 이어서 각각의 α 및 γ 사슬에 대해 3개의 불변 도메인(C_H) 및 μ 및 ϵ 아이소유형에 대해 4개의 C_H 도메인을 가진다. 각각의 L 사슬은 N 말단에서 가변 도메인(V_L), 이어서 이의 다른 말단에서 불변 도메인을 가진다. V_L 은 V_H 와 정렬되고, C_L 은 중쇄의 제1 불변 도메인(C_{H1})과 정렬된다. 특정한 아미노산 잔기는 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 사이에 인터페이스를 형성하는 것으로 생각된다. V_H 및 V_L 의 짝 짓기는 함께 단일 항원 결합 부위를 형성한다.
- [0055] IgM은 다수의 면역글로불린이 다이설파이드 결합에 의해 함께 공유로 연결된 중합체를 형성하는 당단백질이다. IgM은 대부분 오합체로서 존재하지만, 또한 육합체로서 존재하고, 따라서 10개 또는 12개의 항원 결합 부위를 함유한다. 오합체 형태는 통상적으로 J-사슬이라 불리는 추가적인 폴리펩타이드를 함유하지만, J-사슬의 부재 하에 또한 만들어질 수 있다. 오합체 IgM 분자는 대략 970kDa의 분자량을 가진다. 이의 중합체 성질로 인해, IgM은 높은 결합도를 보유하고, 보체 활성화에서 특히 효과적이다. IgG에서와 달리, IgM 단량체에서의 중쇄는 1개의 가변 도메인 및 4개의 불변 도메인으로 이루어진다. IgM 불변 도메인은 본 명세서에서 CM1 또는 $C_{\mu 1}$, CM2 또는 $C_{\mu 2}$, CM3 또는 $C_{\mu 3}$, 및 CM4 또는 $C_{\mu 4}$ 라 지칭되고, "CM" 및 C_{μ} 지칭은 상호교환적으로 사용된다. IgM 오합체의 구조는 도 1에 예시되어 있다.
- [0056] 용어 "IgM"은 본 명세서에서 가장 광의로 사용되고, 구체적으로 단일특이적 및 다중특이적(이중특이적 포함) IgM 분자, 예를 들어 PCT 출원 제PCT/US2014/054079호(이의 전체 개시내용은 본 명세서에 명확히 참조로 포함됨)에 개시된 다중특이적 IgM 결합 분자 등을 포함한다.
- [0057] 용어 "IgM 결합 단위" 또는 "IgM 항체 결합 단위"는 광의 의미로 사용되고, 구체적으로 연관 항체 경쇄 가변 도메인(V_L) 서열 없이 또는 이것과 함께 표적(예를 들어, 항원)에 결합하는 가변 도메인 서열(V_H)에 융합된 적어도 CM4 불변 도메인을 포함하는, IgM 항체 중쇄 불변 영역 폴리펩타이드를 포괄한다.
- [0058] 용어 "이중특이적 IgM 결합 단위" 또는 "이중특이적 IgM 항체 결합 단위"는 광의 의미로 사용되고, 구체적으로 가변 도메인 서열(V_H)에 융합된 적어도 CM4 불변 도메인을 포함하는 IgM 항체 중쇄 불변 영역 폴리펩타이드의 쌍을 포괄하고, 각각의 가변 도메인 서열은 연관 항체 경쇄 가변 도메인(V_L) 서열과 함께 또는 이것 없이 상이한 표적에 결합한다. 일 실시형태에서, 이중특이적 IgM 항체는 2개의 $V_H V_L$ 항원 결합 영역을 포함하고, 각각은 1개의 항원 상의 상이한 에피토프 또는 2개의 상이한 항원 상의 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이적 IgM 항체 결합 단위는 단일 종으로부터 전장일 수 있거나, 키메라화 또는 인간화될 수 있다. 본 발명의 이중특이적 IgM 항체는 5개 또는 6개의 이중특이적 IgM 결합 단위를 포함하는 오합체 또는 육합체 고리 구조를 가진다.
- [0059] 용어 "다중특이적 IgM"은 본 명세서에서 가장 광의로 사용되어서 2개 이상의 결합 특이성을 가지는 IgM 항체를 의미한다. 따라서, 용어 "다중특이적"은 적어도 2개의 단일특이적 하위단위(각각 상이한 항원(AA, BB)에 결합함), 또는 5개 또는 6개의 이중특이적 하위단위(각각 2개의 상이한 항원(AB, AB)에 결합함)를 포함하는 IgM 오합체를 포함하는, "이중특이적", 예를 들어 이중특이적 항체 또는 이중특이적 결합 단위를 포함한다. 따라서, 이중특이적 및 다중특이적 IgM 오합체는 5개의 동일한 이중특이적 결합 단위, 단일특이적 IgM 결합 단위(이들 중 적어도 2개는 상이한 결합 특이성을 가짐), 또는 임의의 이의 조합을 포함할 수 있다.
- [0060] "전장 IgM 항체 중쇄"는 항체 중쇄 가변 도메인(V_H), 항체 불변 중쇄 불변 도메인 1(CM1 또는 $C_{\mu 1}$), 항체 중쇄 불변 도메인 2(CM2 또는 $C_{\mu 2}$), 항체 중쇄 불변 도메인 3(CM3 또는 $C_{\mu 3}$), 및 항체 중쇄 불변 도메인 4(CM4 또는 $C_{\mu 4}$)의 N 말단에서 C 말단 방향으로 이루어진 폴리펩타이드이다. 본 명세서에서 정의된 바와 같은 이중특이적 전장 IgM 항체는, 2개의 상이한 결합 표적(에피토프)에 특이적으로 결합하는, 각각 2개의 항원 결합 부위를 가지는, 5개 또는 6개의 단량체(결합 단위)를 포함한다. 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C 말단은 중쇄 또는 경쇄의 C 말단에서의 마지막 아미노산을 의미한다. 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N 말단은 중쇄 또는 경쇄의 N 말단에서의 제1 아미노산을 의미한다.
- [0061] 네이티브 IgA는 2개의 동일한 경쇄(κ 또는 λ) 및 2개의 동일한 중쇄(α)를 포함하는 사합체 단백질이다. 인간에서, IgA1 및 IgA2의 2개의 IgA 아이소유형이 존재한다. IgA는, IgG와 유사하게, $C\alpha 1$ 도메인과 $C\alpha 2$ 도메인

사이의 힌지 영역과 함께 3개의 불변 도메인(CA1-CA3 또는 C α 1-C α 3)을 함유하고, "CA" 및 "C α " 지칭은 상호 교환적으로 사용된다. 모든 IgA 아이소유형은 중합체 Ig 형성이 가능하게 하는, C α 3 도메인에 대해 C 말단에 위치한, 18개의 아미노산 "꼬리 조각"을 가진다(예를 들어, 문헌[Garcia-Pardo et al., 1981, *J. Biol. Chem.* 256, 11734-11738 및 Davis et al., 1988, *Eur. J. Immunol.* 18, 1001-1008] 참조). 혈청 IgA는 단량체이지만, 또한 중합할 수 있다. 이의 분비 형태에서, IgA는 꼬리 조각을 포함할 수 있는 J-사슬에 의해 연결된 기본 4-사슬 단위의 2-5개를 포함하고, 분비 성분에 의해 회합될 수 있다. 분비 성분(sIgA)과 회합된 꼬리 조각, 이합체 IgA 및 분비 IgA의 구조는 도 2에 예시되어 있다. IgA 항체는 IgA1 및 IgA2 하위종류로 추가로 분할될 수 있다. 용어 "IgA" 항체는 본 명세서에서 사용되어 구체적으로 분비 성분과 함께 및 이것이 없는 이합체 및 다합체 형태를 포함하는 모든 하위종류, 즉 IgA1 및 IgA2 항체, 및 단편, 바람직하게는 이러한 항체의 항원 결합 단편을 포함한다. 본 발명의 목적을 위해, IgA 항체는 바람직하게는 이합체이고, 여기서 2개의 꼬리 조각은 J-사슬에 의해 연결된다(도 2 참조).

[0062] 용어 "IgA"는 본 명세서에서 가장 광의로 사용되고, 구체적으로 단일특이적 및 다중특이적 IgA 분자, 예를 들어 PCT 출원 제PCT/US2015/015268호(이의 전체 개시내용은 본 명세서에 명확히 참조로 포함됨)에 개시된 다중특이적 IgA 결합 분자 등을 포함한다.

[0063] 용어 "다중특이적 IgA"는 본 명세서에서 가장 광의로 사용되어서 2개 이상의 결합 특이성을 가지는 IgA 항체를 의미한다. 따라서, 용어 "다중특이적"은 2개의 단일특이적 하위단위(각각 상이한 항원(AA, BB)에 결합함), 또는 2개의 이중특이적 하위단위(각각 2개의 상이한 항원(AB, AB)에 결합함)를 포함하는 IgA 이합체를 포함하는, "이중특이적", 예를 들어 이중특이적 항체 또는 이중특이적 결합 단위를 포함한다.

[0064] 일 실시형태에서, 이합체 다중특이적 IgA 분자는 2개의 단일특이적 결합 단위로 이루어지고, 각각의 결합 단위는 상이한 결합 표적(AA, BB)에 결합 특이성을 가진다. 또 다른 실시형태에서, 이합체 IgA 분자에서, 2개의 결합 단위 중 적어도 하나는 2개의 상이한 결합 특이성(즉, 이중특이적, 예를 들어 AA, A,B 또는 AA, BC임)을 가진다. 또 다른 실시형태에서, 2개의 결합 단위의 각각은 2개의 상이성을 가지고, 이것은 동일(AB, AB) 또는 상이(예를 들어, AC, CD 또는 AB, AC)할 수 있다.

[0065] 용어 "이중특이적 IgA 항체 결합 단위"는 광의 의미로 사용되고, 구체적으로 가변 도메인 서열(V_H)에 융합된 적어도 CA3 불변 도메인을 포함하는 IgA 항체 중쇄 불변 영역 폴리펩타이드의 쌍을 포괄하고, 각각의 가변 도메인 서열은 연관 항체 경쇄 가변 도메인(V_L) 서열과 함께 또는 이것 없이 상이한 표적에 결합한다. 일 실시형태에서, 이중특이적 IgA 항체는 2개의 V_HV_L 항원 결합 영역을 포함하고, 각각은 1개의 항원 상의 상이한 에피토프 또는 2개의 상이한 항원 상의 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이적 IgA 항체 결합 단위는 단일 종으로부터 전장일 수 있거나, 키메라화 또는 인간화될 수 있다.

[0066] "전장 IgA 항체 중쇄"는 항체 중쇄 가변 도메인(VH), 항체 불변 중쇄 불변 도메인 1(CA1 또는 C α 1), 항체 불변 중쇄 불변 도메인 2(CA2 또는 C α 2), 및 항체 중쇄 불변 도메인 3(CA3 또는 C α 3)의 N 말단에서 C 말단 방향으로 이루어진 폴리펩타이드이다. 본 발명에 따른 이중특이적 또는 다중특이적 전장 IgA 항체는 2개의 단량체(결합 단위)를 포함하고, 이들의 각각은 분비 성분을 가지거나 가지지 않으면서 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다. 따라서, 본 발명의 다중특이적 IgA 항체는 단일특이적 및 이중특이적 결합 단위를 포함할 수 있되, 생성된 IgA 항체는 적어도 2개의 결합 특이성을 가진다. 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C 말단은 중쇄 또는 경쇄의 C 말단에서의 마지막 아미노산을 의미한다. 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N 말단은 중쇄 또는 경쇄의 N 말단에서의 제1 아미노산을 의미한다.

[0067] 상이한 종류의 항체의 구조 및 특성의 추가의 상세내용을 위해, 예를 들어 문헌[Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow(eds), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, page 71 and Chapter 6]을 참조한다.

[0068] 용어 "인터페이스"는, 본 명세서에 사용되는 바대로, 제2 IgM 중쇄 불변 영역에서의 하나 이상의 "접촉" 아미노산 잔기(또는 다른 비아미노산 기)와 상호작용하는 제1 IgM 중쇄 불변 영역에서의 이 "접촉" 아미노산 잔기(또는 다른 비아미노산 기, 예를 들어 탄수화물 기 등)를 포함하는 영역을 의미하도록 사용된다.

[0069] 용어 "비대칭 인터페이스"는 2개의 항체 사슬, 예컨대 제1 및 제2 IgM 중쇄 불변 영역 사이 및/또는 IgM 중쇄 불변 영역 및 이의 일치하는 경쇄 사이에 형성된 (상기 정의된 바와 같은) 인터페이스를 의미하도록 사용되고, 제1 및 제2 사슬에서의 접촉 잔기는 상보성 접촉 잔기를 포함하는 설계에 의해 다르다. 비대칭 인터페이스는 손잡이/홀 상호작용 및/또는 염 브릿지 커플링(전하 교환)에 의해 및/또는 당해 분야에 공지된 다른 기법, 예를

들어 μ 중쇄의 이의 일치하는 경쇄에 대한 커플링에 대한 크로스맵(CrossMap) 접근법 등에 의해 생성될 수 있다.

[0070] "동공" 또는 "홀"은 제2 폴리펩타이드의 인터페이스로부터 오목하게 되고 따라서 제1 폴리펩타이드의 인접한 인터페이스에서의 상응하는 돌기("손잡이")를 수용하는 적어도 하나의 아미노산 부사슬을 의미한다. 동공(홀)은 원래의 인터페이스에 존재할 수 있거나, 합성으로 (예를 들어, 인터페이스를 코딩하는 핵산을 변경함으로써) 도입될 수 있다. 보통, 제2 폴리펩타이드의 인터페이스를 코딩하는 핵산은 동공을 코딩하도록 변경된다. 이를 달성하기 위해, 제2 폴리펩타이드의 인터페이스에서의 적어도 하나의 "원래의" 아미노산 잔기를 코딩하는 핵산이 원래의 아미노산 잔기보다 작은 부사슬 용적을 가지는 적어도 하나의 "유입" 아미노산 잔기를 코딩하는 DNA에 의해 대체된다. 하나 초과와 원래의 및 상응하는 유입 잔기가 존재할 수 있는 것으로 이해될 것이다. 대체되는 원래의 잔기의 수에 대한 상한은 제2 폴리펩타이드의 인터페이스에서의 잔기의 전체 수이다. 동공의 형성을 위한 바람직한 유입 잔기는 보통 천연 발생 아미노산 잔기이고, 바람직하게는 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T), 발린(V) 및 글라이신(G)으로부터 선택된다. 가장 바람직한 아미노산 잔기는 세린, 알라닌 또는 트레오닌, 가장 바람직하게는 알라닌이다. 바람직한 실시형태에서, 돌기의 형성을 위한 원래의 잔기, 예컨대 타이로신(Y), 아르기닌(R), 페닐알라닌(F) 또는 트립토판(W)은 긴 부사슬 용적을 가진다.

[0071] "원래의" 아미노산 잔기는 원래의 잔기보다 작거나 큰 부사슬 용적을 가질 수 있는 "유입" 잔기에 의해 대체된 것이다. 유입 아미노산 잔기는 천연 발생 또는 비천연 발생 아미노산 잔기일 수 있지만, 바람직하게는 전자이다.

[0072] "비천연 발생" 아미노산 잔기란 유전자 코드에 의해 코딩되지 않지만, 폴리펩타이드 사슬에서의 인접한 아미노산 잔기(들)에 공유로 결합할 수 있는 잔기를 의미한다. 비천연 발생 아미노산 잔기의 예는 노르류신, 오르니틴, 노르발린, 호모세린 및 다른 아미노산 잔기 유사체, 예를 들어 문헌[Ellman et al., Meth. Enzym. 202:301-336(1991)]에 기재된 것 등이다. 이러한 비천연 발생 아미노산 잔기를 생성하기 위해, 문헌[Noren et al. Science 244: 182(1989)] 및 상기 엘만(Ellman) 등의 문헌의 절차를 이용할 수 있다. 간단히 말하면, 이것은 비천연 발생 아미노산 잔기에 의한 억제자 tRNA의 화학적 활성화, 이어서 RNA의 실험실내 전사 및 번역을 포함한다. 본 발명의 방법은, 소정의 실시형태에서, IgM 중쇄에서의 적어도 하나의 원래의 아미노산 잔기의 대체를 포함하지만, 하나 초과와 원래의 잔기가 대체될 수 있다. 보통, 제1 또는 제2 폴리펩타이드의 인터페이스에서의 전체 이하의 잔기는 대체되는 원래의 아미노산 잔기를 포함할 것이다. 대체를 위한 바람직한 원래의 잔기는 "매립"된다. "매립"이란 잔기가 용매에 본질적으로 접근 불가능하다는 것을 의미한다. 바람직한 유입 잔기는 시스테인이 아니어서, 다이설파이드 결합의 가능한 산화 또는 잘못된 짝짓기를 막는다.

[0073] 돌기는 동공에서 "배치 가능"하고, 이것은 각각 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드의 인터페이스 상의 돌기 및 동공의 공간 위치 및 돌기 및 동공의 크기가, 돌기가 인터페이스에서의 제1 및 제2 폴리펩타이드의 일반 회합을 상당히 방해하지 않으면서 동공에 배치될 수 있게 한다는 것을 의미한다. 돌기, 예컨대 Tyr, Phe 및 Trp가 통상적으로 인터페이스의 축으로부터 직각으로 연장되지 않고 바람직한 입체형태를 가지지 않으므로, 상응하는 동공에 의한 돌기의 정렬은 예컨대 X선 결정학 또는 핵 자기 공명(nuclear magnetic resonance: NMR)에 의해 얻은 3차원 구조에 기초하여 돌기/동공 쌍을 모델링하는 것에 의존한다. 이것은 분자 모델링의 기법을 포함하는 당해 분야에서 널리 승인된 기법을 이용하여 달성될 수 있다.

[0074] "원래의 핵산"이란 돌기 또는 동공을 코딩하도록 "변경"(즉, 유전 조작 또는 변형)될 수 있는 관심 있는 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산을 의미한다. 원래의 또는 시작 핵산은 천연 발생 핵산일 수 있거나, 이전의 변경으로 처리된 핵산(예를 들어, 인간화 항체 단편)을 포함할 수 있다. 핵산을 "변경한다"는 것은 원래의 핵산이 관심 있는 아미노산 잔기를 코딩하는 적어도 하나의 코돈을 삽입하거나 결실시키거나 대체시킴으로써 돌연변이된다는 것을 의미한다. 보통, 원래의 잔기를 코딩하는 코돈은 유입 잔기를 코딩하는 코돈에 의해 대체된다. 이러한 방식으로 DNA를 유전적으로 변형시키는 기법은 문헌[Mutagenesis: a Practical Approach, M. J. McPherson, Ed., (IRL Press, Oxford, UK. (1991))]에 검토되어 있고, 예를 들어 부위 지정 돌연변이유발, 카세트 돌연변이유발 및 중합효소 사슬 반응(PCR) 돌연변이유발을 포함한다.

[0075] 돌기 또는 동공은 합성 수단에 의해, 예를 들어 재조합 기법, 실험실내 펩타이드 합성, 이전에 기재된 비천연 발생 아미노산 잔기를 도입하는 기법, 펩타이드의 효소 또는 화학 커플링 또는 이들 기법의 여러 조합에 의해 제1 또는 제2 폴리펩타이드의 인터페이스로 "도입"될 수 있다. 따라서, "도입"된 돌기 또는 동공은 "비천연 발생" 또는 "비네이티브"이고, 비네이티브는 이것이 자연에서 또는 원래의 폴리펩타이드(예를 들어, 인간화 단일 클론 항체)에서 존재하지 않는다는 것을 의미한다.

- [0076] 바람직하게는, 돌기를 형성하기 위한 유입 아미노산 잔기는 비교적 적은 수(예를 들어, 약 3-6)의 "로타머"를 가진다. "로타머"는 아미노산 부사슬의 에너지에서 양호한 입체형태이다. 다양한 아미노산 잔기에 대한 로타머의 수는 문헌[Ponders and Richards, J. Mol. Biol. 193: 775-791(1987)]에 검토되어 있다.
- [0077] 달리 언급되지 않은 한, 용어 "항체"는 구체적으로 천연 발생 변이체를 포함하여, 네이티브 인간 및 비인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD 및 IgM 항체를 포함한다. 따라서, 예를 들어 인간 IgM 서열은 유전자 은행(GenBank) 수탁번호 X14940.1 하에 구입 가능한 반면, 변이체는 유전자은행 CAB37838.1, CAC20458.1, AFM37312.1, X57331.1 및 J00260.1로 보고되어 있다.
- [0078] 용어 "네이티브"는 폴리펩타이드(예를 들어, 항체 또는 J-사슬)와 관련하여 본 명세서에서 사용되어 이의 제조 방식과 무관하게 자연에서 생기는 서열을 가지는 폴리펩타이드를 의미한다. 따라서, 용어 "네이티브" 및 "네이티브 서열"은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되고, 자연에서 발견되는 서열을 가지는 재조합 폴리펩타이드를 명확히 포괄한다.
- [0079] 용어 "네이티브 서열 J-사슬" 또는 "네이티브 J-사슬"은 본 명세서에 사용되는 바대로 성숙 인간 J-사슬(이의 아미노산 서열은 도 3(서열 번호 1)에 도시됨)을 포함하는, 임의의 동물 종의 네이티브 서열 IgM 또는 IgA 항체의 J-사슬 및, 제한 없이, 도 4에 도시된 서열 번호 2 내지 44의 네이티브 서열 J-사슬 폴리펩타이드 또는 도 5에 도시된 박쥐 J-사슬 폴리펩타이드(서열 번호 45)를 포함하는, 비인간 동물 종의 J-사슬을 의미한다.
- [0080] 용어 "변형된 J-사슬"은 본 명세서에서 사용되어 네이티브 서열로 도입된 외인성 결합 모이어티를 포함하는 네이티브 서열 J-사슬 폴리펩타이드의 변이체를 의미한다. 도입은 외인성 결합 모이어티의 직접 또는 간접 융합을 포함하는 임의의 수단에 의해 또는 화학 링커를 통한 부착에 의해 달성될 수 있다. 용어 "변형된 인간 J-사슬"은 구체적으로, 제한 없이, 결합 모이어티의 도입에 의해 변형된 서열 번호 1의 아미노산 서열의 네이티브 서열 인간 J-사슬을 포괄한다. 상기 용어는 구체적으로, 제한 없이, IgM 또는 IgA의 효율적인 중합(이합체화) 및 표적에 대한 이러한 중합체(이합체)의 결합을 방해하지 않는, 외인성 결합 모이어티의 도입에 의해 변형된 서열 번호 1의 아미노산 서열의 네이티브 서열 인간 J-사슬을 포괄한다.
- [0081] 용어 "결합 모이어티"는 본 명세서에서 가장 광의로 사용되어서 표적, 예컨대 항원에 특이적 결합을 할 수 있는 임의의 화학 집합체를 포괄한다. 결합 모이어티의 예는, 제한 없이, 항체, 항체의 항원 결합 단편, 항체-약물 접합체, 항체 유사 분자, 항체 유사 분자의 항원 결합 단편, 가용성 및 막 결합 단백질, 리간드, 수용체, 바이러스 유사 입자, 단백질 독소, 효소, 및 대안적인 스캐폴드를 포함한다. 바람직한 결합 모이어티는 바람직하게는 생물학적 기능을 가지는 폴리펩타이드(펩타이드 포함)이다. 예시적인 생물학적 기능은 이펙터 세포, 예컨대 B 세포, T 세포 또는 자연 살해(NK) 세포에 결합하고 이를 활성화하는 결합 모이어티의 능력이다.
- [0082] 용어 "폴리펩타이드"는 본 명세서에서 가장 광의로 사용되고 펩타이드 서열을 포함한다. 용어 "펩타이드"는 일반적으로 펩타이드 결합에 의해 공유로 연결된 약 60개 이하, 바람직하게는 약 30개 이하의 아미노산을 함유하는 아미노산의 선형 분자 사슬을 의미한다.
- [0083] "결합 모이어티"와 관련하여 용어 "외인성"은 본 명세서에 사용되어서 동일한 위치에서 기준 네이티브 폴리펩타이드 서열에 존재하지 않는 결합 모이어티를 의미한다. 따라서, 외인성 폴리펩타이드 서열(펩타이드 서열 포함)은 상응하는 네이티브 서열 내에 그러나 상이한 위치에서 포함된다. 바람직한 실시형태에서, "외인성" 서열은 임의의 위치에서 상응하는 네이티브 서열에 존재하지 않는다.
- [0084] 용어 "단일클론 항체"는 본 명세서에 사용되는 바대로 실질적으로 균일한 항체의 집단으로부터 얻어진 항체를 의미하고, 즉 집단을 포함하는 개별 항체가 소량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 발생 돌연변이를 제외하고 동일하다. 단일클론 항체는 매우 특이적이어서, 단일 항원 부위에 대해 지향된다. 더구나, 상이한 결정부위(에피토프)에 대해 지향된 상이한 항체를 통상적으로 포함하는 종래의 (다중클론) 항체 제제와 반대로, 각각의 단일클론 항체는 항원 상의 단일 결정부위에 대해 지향된다. 수식어 "단일클론"은 항체의 실질적으로 균일한 집단으로부터 얻어지는 것으로서 항체의 특징을 표시하고, 임의의 특정한 방법에 의해 항체의 생성을 요하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 단일클론 항체는 우선 문헌[Köhler et al. (1975) *Nature* 256:495]에 의해 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 재조합 DNA 방법(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조)에 의해 제조될 수 있다. "단일클론 항체"는 예를 들어 문헌[Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628 및 Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597]에 기재된 기법을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 또한 단리될 수 있다.
- [0085] 단일클론 항체는 본 명세서에서 구체적으로 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정한 종으로부터 유래한 항체에서 상

응하는 서열과 동일하거나 이에 상동성이면서, 사슬(들)의 나머지가 또 다른 종으로부터 유래한 항체, 및 이 항체의 단편에서 상응하는 서열과 동일하거나 이에 상동성인 "키메라" 항체(면역글로불린)(이들이 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한)를 포함한다(미국 특허 제4,816,567호; 및 Morrison et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855).

[0086] 비인간(예를 들어, 쥐와) 항체의 "인간화" 형태는 비인간 면역글로불린으로부터 유래한 최소 서열을 함유하는 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수혜자의 추가변 영역으로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화도 및 역량을 가지는 비인간 종(공여자 항체), 예컨대 마우스, 랫트, 토끼 또는 비인간 영장류의 추가변 영역으로부터의 잔기에 의해 대체된 인간 면역글로불린(수혜자 항체)이다. 몇몇 경우에, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 영역(FR) 잔기는 상응하는 비인간 잔기에 의해 또한 대체된다. 더구나, 인간화 항체는 수혜자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이 변형은 항체 성능을 추가로 개선하도록 이루어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 및 통상적으로 2개의 가변 도메인의 실질적으로 모두를 포함할 것이고, 추가변 루프의 모두 또는 실질적으로 모두는 비인간 면역글로불린의 것에 상응하고, FR 영역의 모두 또는 실질적으로 모두는 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 인간화 항체는 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 통상적으로 인간 면역글로불린의 것을 임의로 또한 포함할 것이다. 추가의 상세내용을 위해, 문헌[Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-329; 및 Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596]을 참조한다.

[0087] "단리된" 항체는 본 명세서에서 확인되고, 재조합 숙주 세포에서 이의 천연 환경의 성분으로부터 분리되고/되거나 회수된 것이다. 천연 환경의 오염물질 성분은 항체에 대한 진단학적 또는 치료학적 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질, 및 제조의 원치않는 부산물을 포함할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 단리된 항체는 본 명세서에서 (1) SDS-PAGE 또는 SEC-HPLC 방법에 의해 결정된 바대로 95중량% 초과, 또는 98중량% 초과, 또는 99중량% 초과로, (2) 아미노산 서열분석기의 사용에 의해 N 말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마쉬 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 이용하여 환원 또는 비환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 동종성으로 정체될 것이다. 보통, 단리된 항체는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0088] 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합한다" 또는 "특이적인"은 결합 표적에 대한 결합 모이어티의 결합, 예컨대 특정한 폴리펩타이드, 펩타이드, 또는 다른 표적(예를 들어, 당단백질 표적)에서 표적 항원, 예를 들어 에피토프에 대한 항체의 결합을 의미하고, 비특이적 상호작용으로부터 측정 가능하게 다른 결합을 의미한다(예를 들어, 비특이적 상호작용은 소 혈청 알부민 또는 카제인에 대한 결합일 수 있음). 특이적 결합은 예를 들어 결합 모이어티, 또는 항체, 또는 결합 모이어티의 도입에 의해 변형된 항체의, 조절 분자에 대한 결합과 비교하여, 표적 분자에 대한 결합을 결정함으로써 측정될 수 있다. 예를 들어, 특이적 결합은 표적, 예를 들어 과량의 비표지된 표적과 유사한 조절 분자와의 경쟁에 의해 결정될 수 있다. 이 경우에, 프로브에 대한 표지된 표적의 결합이 과량의 비표지된 표적에 의해 경쟁적으로 저해되는 경우 특이적 결합이 나타난다. 본 명세서에 사용되는 바대로 특정한 폴리펩타이드 표적에서 특정한 폴리펩타이드 또는 에피토프의 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합한다" 또는 "특이적인"은 예를 들어 적어도 약 200nM, 대안적으로 적어도 약 150nM, 대안적으로 적어도 약 100nM, 대안적으로 적어도 약 60nM, 대안적으로 적어도 약 50nM, 대안적으로 적어도 약 40nM, 대안적으로 적어도 약 30nM, 대안적으로 적어도 약 20nM, 대안적으로 적어도 약 10nM, 대안적으로 적어도 약 8nM, 대안적으로 적어도 약 6nM, 대안적으로 적어도 약 4nM, 대안적으로 적어도 약 2nM, 대안적으로 적어도 약 1nM, 또는 초과 표적에 대한 Kd를 가지는 분자에 의해 나타날 수 있다. 소정의 경우에, 용어 "특이적 결합"은 임의의 다른 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 에피토프에 실질적으로 결합하지 않으면서 특정한 폴리펩타이드에서 분자가 특정한 폴리펩타이드 또는 에피토프에 결합하는 결합을 의미한다.

[0089] "결합 친화도"는 분자의 단일 결합 부위(예를 들어, 항체)와 이의 결합 파트너(예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 전체 합의 강도를 의미한다. 달리 표시되지 않은 한, 본 명세서에 사용되는 바대로, "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원(예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화도를 의미한다. 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화도는 일반적으로 해리 상수(Kd)에 의해 표시될 수 있다. 예를 들어, Kd는 약 200nM, 150nM, 100nM, 60nM, 50nM, 40nM, 30nM, 20nM, 10nM, 8nM, 6nM, 4nM, 2nM, 1nM, 또는 초과일 수 있다. 친화도는 본 명세서에 기재된 것을 포함하는 당해 분야에 공지된 일반 방법에 의해 측정될 수 있다. 저친화도 항체는 일반적으로 항원에 천천히 결합하고, 용이하게 해리하는 경향이 있는 반면, 고친화도 항체는 일반적으로 항원에 빠르게 결합하고, 더 오래 결합한 채 있는 경향이 있다. 결합 친화도를 측정하는 다양한 방법이 당해 분야에 공지되어 있다.

- [0090] 본 명세서에 사용되는 바대로, "Kd" 또는 "Kd 값"은 약 10 반응 단위(RU)에서 부동화된 항원 CM5 칩에 의해 25 °C에서 예를 들어 표면 플라스몬 공명 검정을 이용하여, 예를 들어 비아코어(BIAcore)(상표명)-2000 또는 비아코어(상표명)-3000(BIAcore, Inc.(뉴저지주 피츠카타웨이))을 이용하여 항체 및 표적 쌍에 적절한 기법에 의해 측정된 해리 상수를 의미한다.
- [0091] 용어 "접합체", "접합된" 및 "접합"은 공유 또는 비공유 연결의 임의의 및 모든 형태를 의미하고, 제한 없이, 직접적인 유전 또는 화학 융합, 링커 또는 가교결합체를 통한 커플링, 및 비공유 회합을 포함한다.
- [0092] 용어 "융합"은 본 명세서에서 사용되어 코딩 뉴클레오타이드 서열의 인프레임 조합에 의한 1개의 폴리펩타이드 사슬에서 상이한 기원의 아미노산 서열의 조합을 의미한다. 용어 "융합"은 말단 중 하나에 대한 융합 이외에 내부 융합, 즉 폴리펩타이드 사슬 내의 상이한 기원의 서열의 삽입을 명확히 포괄한다. 용어 "융합"은 본 명세서에서 사용되어 상이한 기원의 아미노산 서열의 조합을 의미한다.
- [0093] 용어 "원자가"는 본 명세서에 사용되는 바대로 항체에서 특정한 수의 결합 부위의 존재를 의미한다. 그러므로, 용어 "2가", "4가" 및 "6가"는 각각 2개의 결합 부위, 4개의 결합 부위 및 6개의 결합 부위의 존재를 나타낸다. 따라서, 본 발명에 따른 이중특이적 IgA 항체에서 각각의 결합 단위가 2가인 경우, 이중특이적 IgA 항체는 4의 원자가를 가질 것이다.
- [0094] 용어 "에피토프"는 항체에 특이적 결합을 할 수 있는 임의의 분자 결정부위를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 에피토프 결정부위는 분자의 화학 활성 표면 기, 예컨대 아미노산, 당 부사슬, 포스포릴 또는 설포닐을 포함하고, 소정의 실시형태에서, 특정한 3차원 구조 특징, 및 또는 특정한 전하 특징을 가질 수 있다. 에피토프는 항체에 의해 결합된 항원의 영역이다. "결합 영역"은 결합 분자에 의해 결합된 결합 표적 상의 영역이다.
- [0095] "폴리에피토프 특이성"은 동일한 또는 상이한 표적(들) 상의 2개 이상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합하는 능력을 의미한다. "단일특이적"은 오직 1개의 에피토프에 결합하는 능력을 의미한다. 일 실시형태에 따라, 이중특이적 IgM 항체는 적어도 10^{-7} M, 또는 10^{-8} M 또는 초과 친화도로 각각의 에피토프에 결합한다.
- [0096] 용어 "표적" 또는 "결합 표적"은 광의 의미로 사용되고, 구체적으로 이것이 자연에 있으면서 생물학적 기능을 가지거나 가지지 않는, 폴리펩타이드, 제한 없이, 핵산, 탄수화물, 지질, 세포, 및 다른 분자를 포함한다.
- [0097] 용어 "항원"은 항체에 결합하거나 세포 면역 반응을 촉발하는 전체 또는 이의 단편을 의미한다. 면역원은 인간을 포함하는 유기체, 특히 동물, 더 특히 포유류에서 면역 반응을 발생시킬 수 있는 항원을 의미한다. 용어 항원은 상기 정의된 바대로 항원 결정부위 또는 에피토프로서 공지된 영역을 포함한다.
- [0098] 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "면역원"은 항체의 생성을 발생시키고/시키거나, T 세포 및/또는 면역원의 항원에 대해 지향된 다른 반응성 면역 세포를 활성화하는 물질을 의미한다.
- [0099] 본 발명의 항체의 "항원 결합 부위" 또는 "항원 결합 영역"은 통상적으로 항원에 대한 결합 부위의 친화도에 변하는 정도로 기여하는 6개의 상보성 결정 영역(complementarity determining region: CDR)을 함유한다. 3개의 중쇄 가변 도메인 CDR(CDRH1, CDRH2 및 CDRH3) 및 3개의 경쇄 가변 도메인 CDR(CDRL1, CDRL2 및 CDRL3)이 존재한다. CDR 및 프레임워크 영역(framework region: FR)의 정도는 항체/항원 복합체로부터 서열 및/또는 구조 정보 중에서 영역이 가변성에 따라 정의된 아미노산 서열의 파일로 된 데이터베이스에 대한 비교에 의해 결정된다. 또한, 더 적은 CDR(즉, 여기서 결합 특이성은 3개, 4개 또는 5개의 CDR에 의해 결정됨)로 포함된 기능적 항원 결합 부위가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 6개의 CDR의 완전한 세트의 미만은 여러 결합 표적에 대한 결합에 충분하지 않을 수 있다. 따라서, 몇몇 경우에, VH 또는 VL 도메인의 CDR은 단독으로 충분할 것이다. 더구나, 소정의 항체는 항원에 대한 비-CDR 연관 결합 부위를 가질 것이다. 이러한 결합 부위는 본 정의 내에 구체적으로 포함된다.
- [0100] 용어 "숙주 세포"는 본원에 사용되는 바대로 본 발명에 따라 항체를 생성하도록 조작될 수 있는 임의의 종류의 세포계를 의미한다. 일 실시형태에서, 중국 햄스터 난소(Chinese hamster ovary: CHO) 세포는 숙주 세포로서 사용된다.
- [0101] 본 명세서에 사용되는 바대로, 표현 "세포", "세포주" 및 "세포 배양"은 상호교환적으로 사용되고, 모든 이러한 지칭은 자손을 포함한다. 따라서, 단어 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"는 전달의 수에 대해 관련 없이 1차 해당 세포 및 이로부터 유래한 배양물을 포함한다. 모든 자손이 고의적인 또는 부주의한 돌연변이로 인해 DNA 함량이 정확히 동일하지 않을 수 있는 것으로 또한 이해된다. 원래에 형질전환된 세포에서 스크리닝되는 것과

동일한 기능 또는 생물학적 활성을 가지는 변이체 자손이 포함된다.

[0102] 핵산은 또 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 있을 때 "작동적으로 연결"된다. 예를 들어, 프리서열 또는 분비 리더에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 프리단백질로서 발현될 때 폴리펩타이드에 대해 DNA에 작동적으로 연결되거나; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 미치는 경우 코딩 서열에 작동적으로 연결되거나; 리보솜 결합 부위는 번역을 수월하게 하도록 배치될 때 코딩 서열에 작동적으로 연결된다. 일반적으로, "작동적으로 연결된"은 연결된 DNA 서열이 인접하고, 분비 리더의 경우에, 인접하고 리딩 프레임에 있다는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서는 인접일 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서의 결합에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않을 때, 합성 올리고뉴클레오타이드 어답터 또는 링커는 종래의 실행에 따라 사용된다.

[0103] 상세한 설명

[0104] 변형된 J-사슬을 가지는 항체의 설계 및 생성

[0105] IgM은 항원에 의한 자극에 반응하여 B 세포에 의해 생성된 제1 면역글로불린이고, 5일의 반감기로 혈청 중에 대략 1.5mg/ml로 존재한다. IgM은 오합체 또는 육합체 분자이다. IgG에서처럼, IgM 단량체는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄로 이루어진다. 그러나, IgG가 3개의 중쇄 불변 도메인(CH1, CH2 및 CH3)을 함유하지만, IgM의 중쇄(μ)가 IgE에서의 ϵ 중쇄와 유사하게 제4 불변 도메인(CH4)을 추가적으로 함유한다. 이 추가의 불변 도메인은 IgG 및 IgA 항체의 Fc 도메인에 비해 항원 결합 Fab 도메인의 회전 유연성을 담당하는 IgG 및 IgA 프롤린 농후 힌지 영역 대신에 위치한다.

[0106] 5개의 IgM 단량체는 네이티브 IgM 분자를 형성하기 위해 추가적인 작은 폴리펩타이드 사슬(J-사슬)과 복합체를 형성한다. IgM이 항체 생성 세포로부터 분비되기 전에, J-사슬은 μ 사슬의 중합을 수월하게 하는 것으로 생각된다. IgM의 결정화가 주지사일로 도전인 것으로 증명되었지만, 차즈코위스키(Czajkowsky) 및 샤오(Shao)(PNAS 106(35):14960-14965, 2009)는 최근에 IgE Fc 도메인의 구조 및 공지된 다이설파이드 쌍 짓기에 기초하여 IgM의 상동성 기반 구조 모델을 공개하였다. 저자는 인간 IgM 오합체가 굴곡 바이어스로 버섯 형상 분자라는 것을 보고하였다. IgM 중쇄(μ)는 5개의 N 연결 글라이코실화 부위를 함유한다: Asn-171, Asn-332, Asn-395, Asn-402 및 Asn-563.

[0107] 면역글로불린 A(IgA)는, 대부분의 포유류의 점막 분비에 존재하는 항체의 주요 종류로서, 흡입되고 삼켜진 병원균에 의한 침입에 대한 방어의 주요 제1 선을 나타낸다. IgA는 또한 많은 종의 혈청에서 상당한 농도로 발견되고, 여기서 이것은 점막 표면에 구멍을 뚫는 병원균의 제거를 매개하는 방어의 제2 선으로서 작용한다. IgA의 Fc 영역에 특이적인 수용체인, Fc α R은, IgA 이펙터 기능의 주요 매개체이다. 인간 IgA는 2개의 하위종류를 생성시키는 IgA1 및 IgA2의 2개의 상이한 IgA 중쇄 불변 영역(C α) 유전자를 가질 수 있다. IgA1과 IgA2 사이의 주요 차이는 2개의 Fab 암(α arm)과 Fc 영역 사이에 있는 힌지 영역에 있다. IgA1은 IgA2에 부재한 아미노산의 중복 스트레치의 삽입으로 인해 연장된 힌지 영역을 가진다. IgA는, 2개의 중쇄 및 경쇄를 각각 포함하는 2개의 단량체 단위가 다이설파이드 브릿지 및 J-사슬의 혼입에 의해 안정화된 말단 대 말단 구성으로 배열되도록 상정된, 이합체를 형성하는 능력을 가진다. 점막 부위에서 국소로 생성된 이합체 IgA는 상피 세포 경계에 걸쳐 그리고 중합체 면역글로불린 수용체(pIgR)와의 상호작용에 의해 분비로 수송된다. 이 과정 동안, pIgR은 절단되고, 분비 성분(secretory component: SC)이라 칭하는 주요 단편은 IgA 이합체에 공유로 부착된다.

[0108] IgA 및 IgM 둘 다는 "꼬리 조각"(tp)이라 불리는 C 말단에서 18개 아미노산 연장을 보유한다. IgM(μ tp) 및 IgA(α tp) 꼬리 조각은 7개의 아미노산 위치에서 다르다. IgM 및 IgA 꼬리 조각은 다양한 동물 종 중에서 고도로 보존된다. 보존된 IgA 및 IgM 꼬리 조각에서의 끝에서 두 번째 시스테인 잔기는 중합에 관여하는 것으로 입증되었다. 꼬리 조각 둘 다는 N 연결 탄수화물 부가 부위를 함유하고, 이의 존재는 IgA에서의 이합체 형성 및 IgM에서의 J-사슬 혼입 및 오합체 형성에 필요하다. 그러나, 꼬리 조각에서의 N 연결 탄수화물의 구조 및 조성이 달라서, 글라이코실트랜스퍼라제에 의한 처리에 대한 글라이칸의 접근 가능성의 차이를 제시한다.

[0109] 인간, 및 다양한 척추 동물 종, 예컨대 소, 마우스, 조류, 양서류 및 토끼의 J-사슬의 뉴클레오타이드 및/또는 단백질 서열이 보고되어 있다. 인간 J-사슬은 8개의 시스테인 잔기를 함유하고, 2개의 (Cys13 및 Cys69)는 (각각 IgA 및 IgM에서) α 사슬 또는 μ 사슬과의 다이설파이드 브릿지에 관여되고, 6개는 사슬내 다이설파이드 브릿지에서 관여된다(Cys13: Cys101, Cys72: Cys92, Cys109: Cys134). J-사슬의 3차원 결정 구조가 보고되어 있다.

[0110] 본 발명은 적어도 부분적으로 IgM 및 IgA 항체의 J-사슬이 결합 표적(들)에 결합하는 IgM 또는 IgA 항체의 능력을 방해하지 않으면서 결합 특이성(결합 모이어티)의 도입에 의해 변형될 수 있다는 인식에 기초한다. 따라서,

본 발명은 네이티브 서열 J-사슬, 예컨대 서열 번호 1의 네이티브 서열 인간 J-사슬로 도입된 결합 모이어티를 포함하는 변형된 J-사슬에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 변형된 J-사슬을 포함하는 결합 분자에 관한 것이다. 결합 분자는 예를 들어 IgM 항체, IgA 항체, 또는 IgG/IgM 또는 IgG/IgA 하이브리드 항체일 수 있고, 이것은 IgG 중쇄에서 IgM 또는 IgA 꼬리 조각을 함유하고, 따라서 본 발명의 변형된 J-사슬과 혼입하고 중합체를 형성하는 능력을 포함하는 IgG 및 IgA 또는 IgA의 특성을 조합할 수 있다. IgG/IgM 및 IgG/IgA 하이브리드 항체에 대한 추가의 상세내용을 위해, 예를 들어 문헌[Koteswara et al., Clinical Immunology 2001, 101(1):21-31]을 참조한다.

[0111] 변형된 J-사슬은 결합 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 폴리펩타이드(펩타이드 포함), 또는 촉매 성분, 예컨대 효소 유사 프로테아제를 포함하는 외인성 결합 모이어티(이들로 제한되지는 않음)를 포함한다. 이전에 언급된 바대로, 결합 모이어티는, 제한 없이, 항체, 항체의 항원 결합 단편, 항체-약물 접합체, 항체의 항원 결합 단편-약물 접합체, 항체 유사 분자, 항체 유사 분자의 항원 결합 단편, 가용성 및 막 결합 단백질, 리간드, 수용체, 바이러스 유사 입자, 단백질 독소, 촉매 성분, 예컨대 효소 및 효소 유사 프로테아제, 및 대안적인 스캐폴드를 포함한다. 임의의 유형의 결합 모이어티가 위치, 부가의 유형(예를 들어, 직접 또는 간접 융합, 화학 테더링 등)을 적절히 선택함으로써 본 개시내용의 교시에 따라 J-사슬로 도입될 수 있다는 것이 강조된다.

[0112] 바람직한 실시형태에서, 결합 모이어티는 단일특이적, 이중특이적 및 다중특이적 항체 및 항체 단편을 포함하는 항체 또는 항체의 항원 결합 단편(또한 "항체 단편"이라 칭함)이다. 용어 "항체 단편"은 광의 의미로 사용되고, 제한 없이, 항체 단편으로부터 형성된 Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, 및(scFv)₂ 단편, 상보성 결정 영역(CDR) 단편, 선형 항체, 단쇄 항체 분자, 미니바디, 및 다중특이적 항체를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 항체 단편은 scFv이다.

[0113] 또 다른 바람직한 실시형태에서, 결합 모이어티는 항체 유사 분자, 예를 들어 인간 도메인 항체(dAb), 이중-친화도 Re-표적화(DART) 분자, 다이아바디, 다이-다이아바디, 이중-가변 도메인 항체, 적층 가변 도메인(Stacked Variable Domain) 항체, 소형 모듈 면역화학물질(Small Modular ImmunoPharmaceutical: SMIP), 수로바디(Surrobody), 가닥 교환 조작 도메인(strand-exchange engineered domain: SEED)-바디, 또는 TandAb 등이다.

[0114] 결합 모이어티는 리간드, 예컨대 뉴로트로핀, 인터류킨, 가용성 분자 인자 또는 성장 인자일 수 있다.

[0115] 수용체는, 결합 분자로서, 이온-채널 연결, G-단백질 연결 및 효소 연결 세포 표면 수용체를 포함한다. 특정한 예는, 제한 없이, ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4, TNFR, PDL1 및 CTLA-4를 포함한다.

[0116] 추가의 바람직한 실시형태에서, 결합 모이어티는 대안적인 스캐폴드이다. 이 문맥에서, 용어 "스캐폴드"는 특이적 표적에 결합하는 능력을 단백질 변이체에서 제공하는 변경된 아미노산 또는 서열 삽입을 보유할 수 있는 단백질 프레임워크를 기술하도록 의도된다. 단백질 대안적인 스캐폴드는, 제한 없이, CTLA-4, 텐다미스타트, 피브로넥틴, 네오키르노스타틴, 리포칼린, T 세포 수용체, CBM4-2, 단백질 A 도메인, Im9, 설계된 AR 단백질, 설계된 TPR 단백질, 아연 핑거, pVIII, 조류 체장 폴리펩타이드, GCN4, WW 도메인, SRC 상동성 도메인 2 및 3, PDZ 도메인, TEM-1, β-락타마제, GFP, 티오레독신, 스타필로코커스 뉴클레아제, PHD-핑거, c1-2, BPTI, APPI, HPSTI, 에코틴, LACI-D1, LDTI, MTI-II, 전갈 독소, 크녹틴, 곤충 데펜신 A 펩타이드, EETI-II, Min-23, CBD, PBP, 사이토크롬 b₅₆₂, LDL수용체 도메인 A, γ-크리스탈린, 유비퀴틴, 트랜스페린, C형 렉틴 유사 도메인을 포함한다. 바람직한 대안적인 스캐폴드는 다르핀, 피브로넥틴 도메인 및 아드넥틴이다. 추가의 상세내용을 위해, 문헌[Binz HK et al, 2005 *Nature Biotechnology* 23(10):1257-1268]을 참조한다.

[0117] 결합 모이어티는 결합 표적 또는 결합 표적들에 대한 수혜자 IgM, IgA, IgG/IgM 또는 IgG/IgA 분자의 결합을 방해하지 않으면서 결합 표적에 대한 결합 모이어티의 결합을 허용하는 임의의 위치에서 네이티브 J-사슬 서열로 도입될 수 있다. 바람직한 위치는 J-사슬의 3차원 구조에 기초하여 접근 가능한 C 말단에서 또는 근처, 또는 N 말단에서 또는 근처 또는 내부 위치에 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 결합 모이어티는 C 말단으로부터 약 10개의 잔기 없이 또는 N 말단으로부터 약 10개의 아미노산 잔기 없이 네이티브 서열 J-사슬로 도입되고, 네이티브 서열 J-사슬은 바람직하게는 서열 번호 1의 인간 J-사슬이다. 또 다른 실시형태에서, 결합 모이어티는 서열 번호 1의 시스테인 잔기 92번과 101번 사이의 서열 번호 1의 네이티브 서열 인간 J-사슬로, 또는 또 다른 네이티브 서열 J-사슬의 동등한 위치에서 도입된다. 추가의 실시형태에서, 결합 모이어티는 글라이코실화 부위에서 또는 근처에서 네이티브 서열 J-사슬, 예컨대 서열 번호 1의 J-사슬로 도입된다. 가장 바람직하게는, 결합 모이어티는 C 말단으로부터 약 10개의 아미노산 잔기 내에 서열 번호의 네이티브 서열 인간 J-사슬로 도입된다.

[0118] 도입은 직접 또는 간접 융합에 의해, 즉 펩타이드 링커와 함께 또는 이것 없이, 코딩 뉴클레오타이드 서열의 인

프레임 조합에 의한 1개의 폴리펩타이드 사슬에서의 J-사슬 및 결합 모이어티 아미노산 서열의 조합에 의해 달성될 수 있다. 펩타이드 링커(간접 융합)는 사용되는 경우 예를 들어 약 1개 내지 50개, 또는 약 1개 내지 40개, 또는 약 1개 내지 30개, 또는 약 1개 내지 20개, 또는 약 1개 내지 10개, 또는 약 10개 내지 20개의 아미노산 잔기일 수 있고, J-사슬 서열로 도입되는 결합 모이어티의 일 또는 양 말단에 존재할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 펩타이드 링커는 약 10개 내지 20개, 또는 10개 내지 15개의 아미노산 길이이다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, 펩타이드 링커는 15개의 아미노산 길이이다.

[0119] 결합 모이어티는 그 자체의 반응성 및 선택도를 가지는 2개의 상이한 작용기를 함유하는 이중작용성 단백질 가교결합제를 사용하여 화학 연결에 의해 네이티브 J-사슬 서열에 또한 부착될 수 있다. 이 가교결합제는 하나의 단계 공정에서 사용될 수 있거나, 별개의 단계에서 대개 보존되고 제2 바이오분자와 반응할 수 있는 활성화된 단백질을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 예를 들어 이중작용성 가교결합 시약은 J-사슬과 결합 모이어티 사이에 접합체를 형성하기 위해 사용될 수 있다. 반응성 기는, 제한 없이, 이민 반응성 기(예컨대, NHS 또는 설폰-NHS), 말레이미드 기 등을 포함한다. 절단 가능 또는 절단 불가할 수 있는 이러한 가교결합제는 합텐 운반 단백질의 형성에서 및 효소-항체 접합체를 제조하는 데 있어서 사용된다. 화학적으로, 절단 가능 가교결합제는 구체적으로, 제한 없이, 다이설파이드계 하이드라존 및 펩타이드 링커를 포함한다. 널리 공지되고 더 많이 연구된 효소 불안정 링커는 발린-시트룰린 링커이지만, 다른 펩타이드 링커가 또한 공지되어 있고 적합하다. 통상적인 대표적인 절단 불가 링커는 티오에터, 예컨대 SMCC(*N*-숙신이미딜-4-(*N*-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카복실레이트)를 포함한다. 추가의 상세내용을 위해, 예를 들어 문헌[Ducry L and Stump B, Bioconjugate Chem. 2010, 21:5-13](이의 전체내용은 본 명세서에 참조로 명확히 포함됨)을 참조한다. 추가의 적합한 링커의 목록을 위해 예를 들어 문헌[Klein et al., Protein Engineering, Design & Selection; 2014, 27(10): 325-330](이의 전체내용은 본 명세서에 참조로 명확히 포함됨)을 참조한다.

[0120] 변형된 J-사슬이 보통 1개의 외인성 결합 모이어티를 함유하지만, J-사슬로 하나 초과 결합 모이어티를 또한 도입할 수 있다.

[0121] 변형된 J-사슬은 적합한 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 유기체, 예컨대 CHO 세포 또는 이 콜라이에서 변형된 J-사슬을 코딩하는 핵산을 발현시킴으로써 제조할 DNA 기술의 널리 공지된 기법에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 변형된 J-사슬은 예를 들어 문헌[Symersky et al., Mol Immunol 2000, 37:133-140]에 기재된 바대로 이 콜라이에서 발현될 수 있다.

[0122] 일 실시형태에서, J-사슬은 효소 인식 부위의 삽입에 의해 초기에 변형될 수 있고, J-사슬에 임의의 외인성 결합 모이어티를 테더링할 수 있는 펩타이드 또는 비펩타이드 링커, 예를 들어 항체-약물 접합체(ADC)를 만들기 위한 세포독성 소형 분자 등에 의해 번역후 변형될 수 있다.

[0123] 변형된 J-사슬은 수혜자 IgM, IgA, IgG/IgM 또는 IgG/IgA 항체의 중쇄 및 경쇄와 또한 동시 발현될 수 있다. 이의 복잡한 구조로 인해, 재조합 IgM의 대규모 생성은 어렵지만, C6 신경교종 세포, CHO 세포 및 HeLa 세포에서 IgM 중쇄(H) 및 경쇄(L)의 동시발현을 포함하여서, 비립프성 세포를 사용한 IgM에 대한 몇몇 재조합 생성 시스템이 보고되어 있다(CHO 세포에서의 발현에 대해 예를 들어 W089/01975호 및 문헌[Wood et al., J. Immunol. 145, 3011-3016(1990)] 참조). J-사슬과 함께 또는 이것 없이 이 콜라이에서의 IgM 단일클론 항체의 발현은 예를 들어 문헌[Azuma et al., Clin Cancer Res 2007, 13(9):2745-2750]에 기재되어 있다. 아테노바이러스의 E1A 및 E1B 단백질을 발현하는 불활화 인간 망막 세포주에서의 IgM의 생성은 미국 출원 공보 제20060063234호에 기재되어 있다.

[0124] 수혜자 항체는 단일특이적, 이중특이적 또는 다중특이적일 수 있다. 항체를 포함하는 이중특이적 및 다중특이적 IgM 및 IgA 결합 분자는 예를 들어 미국 출원 제61/874,277호 및 제61/937,984호(이의 전체내용은 본 명세서에 참조로 명확히 포함됨)에 기재되어 있다.

[0125] 변형된 J-사슬을 가지는 항체의 적용

[0126] 본 발명의 변형된 J-사슬을 포함하는 항체는 광범위한 치료학적 및 진단학적 분야를 가진다.

[0127] 일 실시형태에서, 변형된 J-사슬을 포함하는 항체는 VEGF, TNF α 또는 IL6과 같은 동일한 가용성 표적 상의 2개 이상의 부위에 결합한다. 목적은 예를 들어 단백질 상의 다중 부위를 길항하는 것 및/또는 소정의 표적에 대한 결합도를 증가시키는 것일 수 있다.

[0128] 또 다른 실시형태에서, 변형된 J-사슬을 포함하는 항체는 본 명세서에서 EGFR 또는 HER2(ErbB2)와 같은 동일한 세포 표면(수용체) 표적 상의 2개 이상의 부위에 결합한다. 따라서, 예를 들어 이러한 항체는 HER2 분자 상의

4D5 및 2C4 에피토프 둘 다를 표적화할 것이다. 이 접근법은 소정의 표적에 대한 생물효력 및/또는 결합도를 증가시킬 수 있다.

[0129] 훨씬 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 변형된 J-사슬을 포함하는 항체는 2개 이상의 상이한 가용성 표적(구형 단백질 또는 펩타이드), 예를 들어 TNF α 및 IL6, VEGF α 및 Ang2, 또는 2개의 사이토카인에 결합한다. 이 접근법은 예를 들어 특이적 경로의 더 완전한 차단(소위 "사이토카인 폭풍", 즉 CD3 항원에 대한 소정의 다가 이중 특이적 항체, 예컨대 이중특이적 항체로부터 생긴 바람직하지 않은 T 세포 활성화의 차단)을 발생시키거나, 효소 및 이의 기질, 예를 들어 IXa 인자 및 X 인자를 조직화한다. 특정한 예는, 제한 없이, 변형된 J-사슬을 가지는 이중특이적 항체를 포함하고, 여기서 제1 특이성은 VEGF에 지향되고, 제2 특이성은 Ang2 또는 DLL4(혈관생성 억제)에 지향되거나, 제1 특이성은 TNF에 지향되고, 제2 특이성은 Ang2 또는 IL-17(소염 특성)에 지향되고, 특이성 중 어느 하나는 IgM, IgA, IgG/IgM 또는 IgG/IgA 항체, 또는 이의 항원 결합 단편의 J-사슬로 도입될 수 있다.

[0130] 추가의 실시형태에서, 변형된 J-사슬을 포함하는 항체는 하나 이상의 가용성 표적 및 하나 이상의 세포 표면 수용체 표적, 예컨대 혈관생성 인자 및 신생혈관 특이적 수용체에 결합할 수 있다. 이 접근법의 목적은 또한 특이적 부위 또는 조직에서의 증가한 전달 및 봉쇄될 수 있다.

[0131] 훨씬 추가의 실시형태에서, 변형된 J-사슬을 포함하는 항체는 2개 이상의 상이한 세포 표면 수용체 표적, 예를 들어 HER1, HER2(ErbB2) 및 HER3(ErbB3) 등에 결합하여, 동일한 또는 상이한 경로를 통해 다중 표적을 저해하도록 설계된다. 이것은 증대된 특이성 및 선택도 및/또는 소정의 경로의 더 완전한 차단을 발생시킬 수 있다. 이러한 항체의 특정한 예는, 제한 없이, 변형된 J-사슬을 가지는 이중특이적 항체를 포함하고, 여기서 하나의 특이성은 HER2에 지향되고, 또 다른 특이성은 HER3에 지향되거나; 하나의 특이성은 EGFR(HER1)에 지향되고, 또 다른 특이성은 HER2에 지향된다. 변형된 J-사슬을 가지는 다른 이중특이적 IgM, IgA, IgG/IgM 또는 IgG/IgA 항체는 예를 들어 EGFR 및 HER3, IL-1 α 및 IL-1 β , IL-4 및 IL-13, Ang-2 및 VEGF-A, IXA 인자 및 X 인자, 또는 IL-17A 및 IL-17F에 결합할 수 있다.

[0132] 본 발명의 변형된 J-사슬을 포함하는 항체는 하나 이상의 가용성 표적 또는 세포 표면 수용체 표적 및 하나 이상의 긴 잔류 시간 표적, 예를 들어 TNF α 및/또는 VEGF 및 혈청 알부민 등에 결합하도록 또한 설계될 수 있다. 이 분자는 알부민 특이성 없이 결합 분자보다 더 긴 순환 반감기를 가지는 것으로 예상된다.

[0133] 추가의 실시형태에서, 변형된 J-사슬을 포함하는 항체는 본 명세서에서 하나 이상의 가용성 표적 및 하나 이상의 매트릭스 단백질 및/또는 기질, 예를 들어 VEGF α 및 히알루론산 등에 결합할 수 있다. 생성된 다중특이적 결합 분자는 안내 공간에서 이의 증가한 잔류 시간으로 인해 눈 병태, 예컨대 연령 연관 황반변성(age-related macular degeneration: AMD)의 예를 들어 혈관생성억제 치료에서 이용성이 발견될 수 있다.

[0134] 변형된 J-사슬을 포함하고 하나 이상의 가용성 또는 수용체 표적에 결합하는 항체와, 항-트랜스페린 특이성과 조합된 교모세포종에 발견된 하나 이상의 트랜스포터 수용체(즉, 트랜스페린 수용체), 예를 들어 항-EGFRvIII(엑손 III이 결실된 돌연변이체 형태)는 혈액 뇌 장벽에 걸친 항체 전달에서 유용성이 발견될 수 있다.

[0135] 바람직한 실시형태에서, IgM, IgA, IgG/IgM 및 IgG/IgA 항체는 본 명세서에서 면역 세포, 예컨대 T 세포, NK 세포, 대식세포 또는 호중구에 대한 결합 특이성을 가지는 변형된 J-사슬을 포함하고, 질환 세포 또는 병원균에서 발현된 항원에 결합한다. IgM 분자가 5개의 결합 단위를 포함하고, IgA 분자가 2개의 결합 단위를 포함하는 이합체이므로, 이러한 분자는 이중특이적 IgG 항체보다 이의 더 높은 결합도로 인해 상당히 더 효력이 있다. 또한, 이펙터 세포, 예를 들어 이펙터 T 세포를 활성화하고 표적화된 질환 세포, 조직 또는 병원균에 대해 재지향시킴으로써, IgM, IgA, IgG/IgM 및 IgG/IgA 항체는 본 명세서에서 표적에 대해 면역 반응을 유도하여서, 효력 및 효율을 추가로 증가시킨다. 이들 유리한 특성으로 인해, 변형된 J-사슬을 포함하는 본 명세서에서의 IgM, IgA, IgG/IgM 및 IgG/IgA 항체는 IgG 항체가 낮은 친화도로 이의 표적에 결합하는 상황에서 특히 유리하다. 따라서, 일 실시형태에서, IgM, IgA, IgG/IgM 및 IgG/IgA 항체는 본 명세서에서 치료학적 IgG 항체의 결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0136] 소정의 실시형태에서, 변형된 J-사슬을 포함하는 본 명세서에서의 IgM, IgA, IgG/IgM 및 IgG/IgA 항체는 암의 치료에 사용될 수 있다. 종양의 임의의 유형 및 종양 연관 항원의 임의의 유형이 표적화될 수 있는 것으로 기대된다. 암의 예시적인 유형은, 제한 없이, 급성 림프아구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 담관암, 유방암, 자궁경부암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 대장암, 자궁내막암, 식도암, 두경부암, 호지킨 림프종, 폐암, 갑상선 수질암, 비호지킨 림프종, 다발성 골수종, 신장암, 난소암, 췌장암, 신경교종, 흑색종, 간암, 전

립선암 및 방광암을 포함한다. 그러나, 당업자는 종양 연관 항원이 실질적으로 임의의 유형의 암에 대해 당해 분야에 공지되어 있다는 것을 인식할 것이다.

[0137] 본 발명의 IgM, IgA, IgG/IgM 또는 IgG/IgA 항체에 의해 표적화될 수 있는 종양 연관 항원은, 제한 없이, 알파-태아단백질(alpha-fetoprotein: AFP), 연관 항원, Ba 733, BAGE, BrE3-항원, CA125, CAMEL, CAP-1, 탄산 무수화효소 IX, CASP-8/m, CCCL19, CCCL21, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD66a-e, CD67, CD70, CD70L, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD132, CD133, CD138, CD147, CD154, CDC27, CDK-4/m, CDKN2A, CTLA-4, CXCR4, CXCR7, CXCL12, HIF-1a, 대장 특이적 항원-p(CSAp), CEA(CEACAM5), CEACAM6, c-Met, DAM, EGFR(HER1, ErbB1), ErbB2(HER2), ErbB4(HER3), EGFRvIII, EGP-1(TROP-2), EGP-2, ELF2-M, Ep-CAM, 섬유아세포 성장 인자(fibroblast growth factor: FGF), Flt-1, Flt-3, 엽산 수용체, G250 항원, GAGE, gp100, GRO-베타, HLA-DR, HM1.24, 인간 융모성 고나도트로핀(human chorionic gonadotropin: HCG) 및 이의 하위단위, HER2/neu, HMGB-1, 저산소증 유도성 인자(hypoxia inducible factor: HIF-1), HSP70-2M, HST-2, Ia, IGF-1R, IFN- γ , IFN- α , IFN- β , IFN- λ , IL-4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, IL-25, 인슐린 유사 성장 인자-1(insulin-like growth factor-1: IGF-1), KC4-항원, KS-1-항원, KS1-4, Le-Y, LDR/FUT, 대식세포 이동 저해 인자(macrophage migration inhibitory factor: MIF), MAGE, MAGE-3, MART-1, MART-2, NY-ESO-1, TRAG-3, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, MIF, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5ac, MUC13, MUC16, MUM-1/2, MUM-3, NCA66, NCA95, NCA90, PAM4 항원, 췌장암 무신, PD-1 수용체, 태반 성장 인자, p53, PLAGL2, 산성 인산화효소, PSA, PRAME, PSMA, PIGF, ILGF, ILGF-1R, IL-6, IL-25, RS5, RANTES, T101, SAGE, S100, 서바이빈, 서바이빈-2B, TAC, TAG-72, 테나신, TRAIL 수용체, TNF-알파, Tn 항원, 톰슨-프리덴라이흐(Thomson-Friedenreich) 항원, 종양 괴사 항원, VEGFR, ED-B 피브로넥틴, WT-1, 17-1A-항원, 보체 인자 C3, C3a, C3b, C5a, C5, 혈관신생 마커, bcl-2, bcl-6, Kras를 포함한다.

[0138] 상기 기재된 바대로, 종양학 분야의 경우, 변형된 J-사슬을 포함하는 항체는 표적화된 암 세포에 대해 면역 세포의 사멸 기능을 촉발하도록 설계될 수 있다. 따라서, 예를 들어 IgM, IgA, IgG/IgM 또는 IgG/IgA 항체, 또는 이의 항원 결합 단편의 J-사슬은 면역 세포, 예컨대 T 세포 또는 자연 살해(NK) 세포에 대한 결합 특이성을 네이티브 J-사슬로 도입함으로써 변형될 수 있는 반면, IgA, IgG/IgM 또는 IgG/IgA 항체는 예를 들어 상기 기재된 임의의 또는 더 많은 종양 연관 항원을 포함하는 종양 세포의 표면 상의 표적 세포, 예를 들어 종양 마커, 예컨대 암유전자에 결합 특이성을 제공한다.

[0139] T 세포의 경우에, 분화 3의 클러스터(CD3)는 T3 복합체로서 역사적으로 공지된 다합체 단백질이고, 이합체의 3개의 쌍($\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$, $\zeta\zeta$)으로서 조립되고 작용하는 4개의 명확한 폴리펩타이드 사슬(ϵ , γ , δ , ζ)로 이루어진다. CD3 복합체는 T 세포 수용체(T cell receptor: TCR)와 비공유로 회합하는 T 세포 동시수용체로서 작용한다. 이 CD3 복합체의 성분, 특히 CD3 ϵ 는 종양 연관 항원에 특이적으로 결합하는 IgM 항체의 변형된 J-사슬에 대한 표적이다. 이펙터 T 세포에 대해 특이적인 변형된 J-사슬이 바람직하게는 CD3(CD3 ϵ) 항원에 결합하지만, 이펙터 T 세포에서 발현된 다른 항원이 공지되어 있고, 변형된 J-사슬에 의해 표적화될 수 있다. 예시적인 T 세포 항원은 CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD69 및 CD90을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0140] CD3 결합 특이성을 가지는 변형된 J-사슬을 포함하는 예시적인 IgM, IgA, IgG/IgM 또는 IgG/IgA 항체는 블리나투모맵(또한 MT103으로서 공지됨)(항-CD19), CD19hA19(항-CD19, 미국 특허 제7,109,304호), hPAM4(항-무신, 미국 특허 제7,282,567호), hA20(항-CD20, 미국 특허 제7,251,164호), hIMMU31(항-AFP, 미국 특허 제7,300,655호), hLL1(항-CD74, 미국 특허 제7,312,318호), hLL2(항-CD22, 미국 특허 제7,074,403호), hMu-9(항-CSAp, 미국 특허 제7,387,773호), hL243(항-HLA-DR, 미국 특허 제7,612,180호), hMN-14(항-CEACAM5, 미국 특허 제6,676,924호), hMN-15(항-CEACAM6, 미국 특허 제7,541,440호), hRS7(항-EGP-1, 미국 특허 제7,238,785호), hMN-3(항-CEACAM6, 미국 특허 제7,541,440호), Ab124 및 Ab125(항-CXCR4, 미국 특허 제7,138,496호)(이들의 개시내용은 본 명세서에 참조로 명확히 포함됨)와 같은 종양 연관 항원에 대한 공지된 IgG 항체의 결합 영역을 포함할 수 있다.

[0141] 특정한 실시형태에서, 블리나투모맵의 CD19 결합 영역을 포함하는 IgM, IgA, IgG/IgM 또는 IgG/IgA 항체는 블리나투모맵의 CD3 결합 영역을 포함하는 변형된 J-사슬을 포함한다. 이 항체는 예를 들어 비호지킨 림프종, 또는 B 세포 시리즈의 급성 림프아구 백혈병(B-ALL)의 치료에 사용될 수 있다.

- [0142] 또 다른 특정한 실시형태에서, 리툽시맙의 CD20 결합 영역을 포함하는 IgM, IgA, IgG/IgM 또는 IgG/IgA 항체는 CD3 특이성을 가지는 변형된 J-사슬, 예컨대 블리나투모맙의 CD3 결합 영역을 포함하는 변형된 J-사슬을 포함한다.
- [0143] 훨씬 또 다른 특이적 실시형태에서, MT110의 EpCAM 결합 영역을 포함하는 IgM, IgA, IgG/IgM 또는 IgG/IgA 항체는 CD3 특이성을 가지는 변형된 J-사슬, 예컨대 MT110의 CD3 결합 영역을 포함하는 변형된 J-사슬을 포함한다. 이러한 이중특이적 항체는 위장관암의 치료에 사용될 수 있다.
- [0144] CD3 결합 특이성을 가지는 변형된 J-사슬과 조합되어 사용하기 위한 결합 영역을 제공할 수 있는 대안적인 항체는 예를 들어 암시시맙(항-당단백질 IIb/IIIa), 알렘투주맙(항-CD52), 베바시주맙(항-VEGF), 세툽시맙(항-EGFR), 겐투주맙(항-CD33), 이브리투모맙(항-CD20), 파니투무맙(항-EGFR), 토시투모맙(항-CD20), 트라스투주맙(항-ErbB2), 람보플리주맙(항-PD-1 수용체), 니볼루맙(항-PD-1 수용체), 이필리무맙(항-CTLA-4), 아바코보맙(항-CA-125), 아데카투무맙(항-EpCAM), 아틀리주맙(항-IL-6 수용체), 베랄리주맙(항-CD125), 오비누투주맙(GA101, 항-CD20), CC49(항-TAG-72), AB-PG1-XG1-026(항-PSMA, 미국 특허 출원 제11/983,372호, ATCC PTA-4405 및 PTA-4406로 기탁), D2/B(항-PSMA, WO 제2009/130575호), 토실리주맙(항-IL-6 수용체), 바실리시맙(항-CD25), 다클리주맙(항-CD25), 에팔리주맙(항-CD11a), GA101(항-CD20; Glycart Roche), 아탈리주맙(항-.알파.4 인테그린), 오말리주맙(항-IgE); 항-TNF-알파 항체, 예컨대 CDP571(Ofei et al., 2011, Diabetes 45:881-85), MTNFAI, M2TNFAI, M3TNFAI, M3TNFABI, M302B, M303(Thermo Scientific(일리노이주 락포드)), 인필리시맙(Centocor(펜실베이니아주 맬버튼)), 세르톨리주맙 페골(UCB(벨기에 브뤼셀)), 항-CD40L(UCB(벨기에 브뤼셀)), 아달리무맙(Abbott(일리노이주 애보트 파크)), BENLYSTA.RTM.(Human Genome Sciences); 알츠하이머병의 치료를 위한 항체, 예컨대 Alz 50(Ksiezak-Reding et al., 1987, J Biol Chem 263:7943-47), 간테네루맙, 솔라네주맙 및 인필리시맙; 항-피브린 항체 유사 59D8, T2G1s, MH1; 항-CD38 항체, 예컨대 MOR03087(MorphoSys AG), MOR202(Celgene), HuMax-CD38(Genmab) 또는 다라투무맙(Johnson & Johnson); 항-HIV 항체, 예컨대 P4/D10(미국 특허 제8,333,971호), Ab 75, Ab 76, Ab 77(Paulik et al., 1999, Biochem Pharmacol 58:1781-90), 및 미국 특허 제5,831,034호, 미국 특허 제5,911,989호, 및 문헌[Vcelar et al., AIDS 2007; 21(16):2161-2170 및 Joos et al., Antimicrob. Agents Chemother. 2006; 50(5):1773-9]에 기재된 항-HIV 항체를 포함한다.
- [0145] 도 19는 혈액학적 암, 상피 종양, 및 글라이코실 농후 종양의 치료를 위한 예시적인 표적 항원, 및 변형된 J-사슬에 의한 표적화를 위한 T 세포, NK 세포, 대식세포 및 호중구 상의 예시적인 항원을 기재한다. 임의의 기재된 종양 항원에 결합하는 IgM 분자가 임의의 기재된 결합 특이성을 가지는 변형된 J-사슬과 조합될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 표의 왼쪽 행에 기재된 임의의 항체 표적은 표의 오른쪽 행에 기재된 임의의 변형된 J-사슬 표적과 조합될 수 있다.
- [0146] 바람직한 실시형태에서, IgM 오합체는 표적 세포, 예컨대 B 세포에 결합 특이성을 제공하는 반면, 이펙터 세포, 예를 들어 T 세포에 대한 결합 도메인은 IgM 항체의 J-사슬에 공유로 부착될 수 있다. 따라서, J-사슬은 CD3(CD3 ϵ) 결합 도메인의 공유 부착에 의해 변형될 수 있다. 이 구성에서, IgM 오합체(중쇄의 10개의 카피 및 경쇄의 10개의 카피를 포함)는 표적 B 세포에 결합 특이성을 제공하는 반면, J-사슬의 T 세포 테더링은 세포독성 효력을 전달한다. 즉, 종양 표적에 결합하는 IgM 항체는 추가적으로 T 세포 결합 기능을 획득한다. CD3 결합 도메인은 네이티브 J-사슬에 공유로 부착되거나, 네이티브 J-사슬의 변이체는 예를 들어 항-CD3 항체의 단쇄 Fv(scFv), 또는 천연 발생 중쇄로만 된 항체, 예를 들어 카멜리드(낙타, 라마, 알파카) 또는 언쿨 어류(상어, 가오리)의 단쇄 항체, 스캐폴드, 예를 들어 CD3 결합 특이성을 가지는 피브로넥틴(예를 들어, 피브로넥틴 III)일 수 있다. 소정의 바람직한 실시형태가 본 명세서에서 구체적으로 언급되지만, 임의의 T 세포 마커에 결합하는 변형된 J-사슬을 포함하는 임의의 표적, 예컨대 임의의 종양 항원에 결합 특이성을 가지는 IgM, IgA, IgG/IgM 및 IgG/IgA 항체가 고려되고, 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0147] 일 실시형태에서, 다중특이적 IgM, IgA, IgG/IgM 또는 IgG/IgA 항체는 상기 기재된 하나 이상의 종양 표적에 결합하는 반면, J-사슬은 CD3 ϵ 에 결합하도록 변형된다. 바람직한 실시형태에서, 다중특이적 IgM, IgA, IgG/IgM 또는 IgG/IgA 항체는 도 19에 기재된 하나 이상의 종양 표적에 결합하는 반면, J-사슬은 CD3 ϵ 에 결합하도록 변형된다.
- [0148] 자연 살해(NK) 세포는 선천성 면역의 중요한 성분이고, 사이토카인을 방출하고, 종양 세포 및 바이러스 감염된 세포에 대해 세포용해 활성을 매개하는 이의 능력에 의해 숙주 방어에서 중요한 역할을 한다. NK 세포 항원은, 제한 없이, CD16, CD32a, CD56, CD57, CD64, CD117(또는 c-kit), 림프구 연관 분자-2(LFA-2 또는 CD2), LFA-3(CD58) 및 LFA-1(CD11a/CD18)을 포함하는 부착 분자를 포함한다.

- [0149] 변형된 J-사슬을 가지는 NK 세포 관여 이중특이적 항체의 예는 NK 세포에 결합하는 변형된 J-사슬을 포함하는 상기 기재된 임의의 종양 항원에 결합 특이성을 가지는 IgM, IgA, IgG/IgM 및 IgG/IgA 항체를 포함한다. 특정 한 실시형태에서, HER2 결합 특이성을 가지는 이중특이적 IgM, IgA, IgG/IgM 및 IgG/IgA 항체는 CD16, CD32a, CD56 또는 CD64에 결합하도록 변형된 J-사슬을 포함한다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, 다중특이적 IgM, IgA, IgG/IgM 또는 IgG/IgA 항체는 도 19에서 표의 왼쪽 행에 기재된 임의의 종양 표적에 결합하고, J-사슬은 NK 세포 상의 CD16, CD64 또는 NKG2D에 결합하도록 변형된다.
- [0150] 본 발명의 J-사슬 변형된 항체에서의 대식세포 관여는 예를 들어 J-사슬로 CD14 특이성을 혼입함으로써 제공될 수 있다.
- [0151] 일 실시형태에서, 다중특이적 IgM, IgA, IgG/IgM 또는 IgG/IgA 항체는 상기 기재된 하나 이상의 종양 표적에 결합하는 반면, J-사슬은 CD14에 결합하도록 변형된다. 바람직한 실시형태에서, 다중특이적 IgM, IgA, IgG/IgM 또는 IgG/IgA 항체는 도 19에 기재된 하나 이상의 종양 표적에 결합하는 반면, J-사슬은 CD14에 결합하도록 변형된다.
- [0152] 변형된 J-사슬을 가지는 IgM, IgA, IgG/IgM 및 IgG/IgA 항체는 표적 탄수화물계 항원일 수 있고, 예를 들어 문헌[Cazet et al., Breast Cancer Research; 2010, 12:204]에 의해 검토 논문을 참조한다. 탄수화물계 종양 항원은, 반드시 높은 친화도가 아니지만 합당한 특이성으로 이러한 항원에 결합하는 IgG 항체의 생성을 허용하는 글라이코실화의 대안적인 형태로, 우수한 종양 연관성을 가지는 것으로 나타났다. 이 종류의 항원에 대해 연관된 증가한 결합도를 가지는 IgM, IgA, IgG/IgM 또는 IgG/IgA 항체를 사용하는 것은, 특히 J-사슬 변형에 의해 달성된 이펙터 세포 동원과 커플링되어, 새로운 치료학적 항체에 대한 큰 기회를 나타낸다. 바람직한 일 실시형태에서, IgM, IgA, IgG/IgM 및 IgG/IgA 항체는 하나 이상의 탄수화물계 종양 항원에 결합하는 반면, J-사슬은 도 19에 기재된 임의의 이펙터 세포에 결합하도록 변형된다.
- [0153] 또 다른 바람직한 실시형태에서, 변형된 J-사슬을 가지는 IgM, IgA, IgG/IgM 및 IgG/IgA 항체는 병원균에 지향된 IgM, IgA, IgG/IgM 또는 IgG/IgA 항체의 일부로서 사용될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 병원균은 미국 특허 제6,440,416호에 개시된 바대로 HIV 바이러스, 마이코박테륨 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 스트렙토코커스 아갈락티아(*Streptococcus agalactiae*), 메티실린 내성 스타필로코커스 아우레우스(*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), 레지오넬라 뉴모필리아(*Legionella pneumophila*), 스트렙토코커스 피오케네스(*Streptococcus pyogenes*), 에스체리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 네이세리아 고노르호에아(*Neisseria gonorrhoeae*), 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 뉴모코커스(*Pneumococcus*), 크립토코커스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 히스토플라스마 캡슐라툼(*Histoplasma capsulatum*), 헤모필루스 인플루엔자 B(*Hemophilis influenzae B*), 트레포네마 팔리둠(*Treponema pallidum*), 라임병 스피로체테스(*Lyme disease spirochetes*), 슈도모나스 아에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 마이코박테륨 레프라에(*Mycobacterium leprae*), 브루셀라 아보르투스(*Brucella abortus*), 광견병 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 사이토메갈로 바이러스, 단순 포진 바이러스 I, 단순 포진 바이러스 II, 인간 혈청 파보 유사 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 바리셀라 조스터 바이러스(*varicella-zoster virus*), B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 홍역 바이러스, 아데노바이러스, 인간 T 세포 백혈병 바이러스, 엡스테인-바 바이러스(*Epstein-Barr virus*), 쯏과 백혈병 바이러스, 볼거리 바이러스, 수포성 구내염 바이러스, 신드비스 바이러스(*sindbis virus*), 림프구성 맥락수막염 바이러스, 사마귀 바이러스, 블루 텅 바이러스(*blue tongue virus*), 센다이 바이러스(*Sendai virus*), 고양이 백혈병 바이러스, 레오바이러스(*reovirus*), 소아마비 바이러스, 원숭이 바이러스 40, 마우스 유방 종양 바이러스, 뎡기 바이러스, 루벨라 바이러스(*rubella virus*), 웨스트 나일 바이러스(*West Nile virus*), 플라스모듐 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*), 플라스모듐 비박스(*Plasmodium vivax*), 톡소플라스마 곤디(*Toxoplasma gondii*), 트리파노소마 란젤리(*Trypanosoma rangeli*), 트리파노소마 크루지(*Trypanosoma cruzi*), 트리파노소마 로데시엔세이(*Trypanosoma rhodesiense*), 트리파노소마 브루세이(*Trypanosoma brucei*), 스킴스토소마 만소니(*Schistosoma mansoni*), 스킴스토소마 야포니쿰(*Schistosoma japonicum*), 바베시아 보비스(*Babesia bovis*), 엘메리아 테넬라(*Elmeria tenella*), 온초세르카 볼볼루스(*Onchocerca volvulus*), 레이쉬마니아 트로피카(*Leishmania tropica*), 트리치넬라 스피랄리스(*Trichinella spiralis*), 테일레리아 파르바(*Theileria parva*), 타에니아 하이다티게나(*Taenia hydatigena*), 타에니아 오비스(*Taenia ovis*), 타에니아 사기나타(*Taenia saginata*), 에치노코커스 그라눌로수스(*Echinococcus granulosus*), 메소세스토이데스 코르티(*Mesocetoides corti*), 마이코플라스마 아르티리티디스(*Mycoplasma arthritidis*), 엠. 효르히니스(*M. hyorhinis*), 엠. 오랄레(*M. orale*), 엠. 아르기니니(*M. arginini*), 아홀레플라스마 라이드랄위(*Ancholeplasma laidlawii*), 엠. 살리바륨(*M. salivarium*) 및 엠. 뉴모니아에(*M.*

pneumoniae)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0154] 이 실시형태에서, 면역 이펙터 세포는 예를 들어 호중구일 수 있다.

[0155] 도 19는 구체적으로 이러한 항체의 변형된 J-사슬에 의해 표적화될 수 있는 호중구 마커와 조합된 본 명세서에서의 IgM, IgA, IgG/IgM 및 IgG/IgA 항체에 대한 표적으로서 바이러스 항원을 기재한다.

[0156] 본 명세서에서 IgM, IgA, IgG/IgM 및 IgG/IgA 항체가 또한 탄수화물 농후 암에서 탄수화물 항원을 표적화할 수 있다는 것에 주목한다. 이러한 항원은 예를 들어 CEA, CA-125, TADG78, 시알릴 루이스(Sialyl Lewis)-X(CD15)를 포함한다.

[0157] 모든 실시형태에서, 네이티브 J-사슬을 변형시키도록 사용된 결합 모이어티(결합 단위)는 J-사슬 전에 또는 후에 도입될 수 있다. 따라서, CD3 결합 특이성을 가지는 변형된 J-사슬은 항-CD3_{scFv}-J 또는 J-항-CD3_{scFv} 구성을 가질 수 있다. C 말단에서 J-사슬을 포함하는 항-CD3 단일 사슬 Fv(항-CD3_{scFv}-J)의 서열(서열 번호 46) 및 구조는 도 8에 도시되어 있다. N 말단에서 J-사슬을 포함하는 항-CD3 단일 사슬 Fv(J-항-CD3_{scFv})의 서열(서열 번호 47) 및 구조는 도 9에 도시되어 있다. 이의 증가한 결합도로 인해, 이러한 항체는 이중특이적 IgG 항체에 비해 더 우수하다. 예를 들어, 그 결과, 이것은 적은 카피수의 표적, 예컨대 낮은 수준의 CD20 발현을 특징으로 하는 리툭산 내성 버킷 림프종 세포를 표적화하는 데 적합하다. 또한, 변형된 J-사슬을 포함하는 본 명세서에서의 IgM, IgA, IgG/IgM 및 IgG/IgA 항체는 이중특이적 IgG 항체에 비해 더 증대된 효력을 가진다.

[0158] 변형된 J-사슬을 가지는 항체의 약제학적 조성물

[0159] 치료학적 용도를 위해, 변형된 J-사슬을 포함하는 항체는 약제학적 조성물로 제제화된다. 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 투여될 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 것처럼, 투여의 경로 및/또는 방식은 표적 질환 또는 병태 및 원하는 결과에 따라 변할 것이다. 소정의 투여 경로에 의해 본 발명의 화합물을 투여하기 위해, 이의 불활성화를 막는 물질에 의해 화합물을 코딩하거나 이 물질과 화합물을 동시 투여하는 것이 필요할 수 있다. 예를 들어, 화합물은 적절한 담체, 예를 들어 리포솜, 또는 희석제 중에 대상체에게 투여될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 희석제는 식염수 및 수성 완충 용액을 포함한다. 약제학적 담체는 무균 주사용 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 무균 수성 용액 또는 분산액 및 무균 분말을 포함한다. 약제학적으로 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 물질의 용도는 당해 분야에 공지되어 있다.

[0160] 조성물은 또한 부형제, 예컨대 보존제, 습윤제, 유화제 및/또는 분산제를 함유할 수 있다. 미생물의 존재의 예방은 무균 절차 및 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등의 포함 둘 다에 의해 보장될 수 있다. 조성물로 등장화제, 예컨대 당, 염화나트륨 등을 포함하는 것이 또한 바람직할 수 있다. 또한, 주사용 약제학적 형태의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 물질, 예컨대 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 포함에 의해 발생할 수 있다.

[0161] 본 발명의 약제학적 조성물에서의 활성 성분의 실제 투약량 수준은 환자에게 독성이 아니면서 특정한 환자, 조성물 및 투여 방식에 대한 원하는 치료학적 반응을 달성하기에 효과적인 활성 성분의 양을 얻도록 변할 수 있다. 선택된 투약량 수준은 사용된 본 발명의 특정한 조성물의 활성, 사용된 특정한 화합물의 투여 경로, 투여 시간, 배설 속도, 치료 기간, 사용된 특정한 조성물과 조합되어 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 연령, 성별, 체중, 상태, 일반 건강 및 치료되는 환자의 이전의 의학 병력, 의학 분야에 널리 공지된 유사한 인자를 포함하는 다양한 약동학적 인자에 따라 달라질 것이다.

[0162] 조성물은 무균이고 조성물이 주사기에 의해 전달 가능한 정도로 유체이어야 한다. 물 이외에, 담체는 바람직하게는 등장성 완충 식염수 용액이다.

[0163] 하기 예시 서열 목록 및 도면은 진정한 범위가 청구항에 기재된 본 발명의 이해를 돕기 위해 제공된다. 본 발명의 정신으로부터 벗어나지 않으면서 기재된 절차에서 변형이 이루어질 수 있는 것으로 이해된다.

[0164] 본 발명의 추가의 상세내용은 하기 비제한적인 실시예에 의해 예시된다.

[0165] 실시예 1

[0166] 변형된 J-사슬 결합 CD3을 포함하는 이중특이적 항-CDIM IgM 항체의 제조

[0167] 1. 설계된 돌연변이를 가지는 DNA 작제물의 생성

[0168] a. DNA 작제물 합성. 각각의 발현 벡터로 서브클로닝을 위한 양 말단에서의 양립 가능한 제한 부위를 가지는,

설계된 돌연변이를 가지는 모든 DNA 작제물을 상업용 판매자(Genescript)에 의해 합성하였다.

[0169] b. 발현 벡터의 작제. 합성된 DNA 작제물을 1 μ g/ml로 트리스-EDTA 완충제 중에 재현탁시켰다. DNA(1 μ g)을 효소 분해로 처리하고, 합성된 유전자를 전기영동에 의해 운반 플라스미드 DNA로부터 분리하였다. 분해된 DNA를 표준 분자 생물학 기법에 의해 미리 분해된 플라스미드 DNA(J-사슬에 대해 pCAGGS, Gene 108(1991) 193-200)에 결합하였다. 결합된 DNA를 수용성 박테리아로 형질전환시키고, 다수의 선택적 항생제와 LB 플레이트에 도말하였다. 몇몇 박테리아 클로니를 선별하고, 표준 분자 생물학 기법에 의해 DNA 제제를 제조하였다. 제조된 DNA를 서열분석에 의해 검증하였다. 설계된 DNA 서열과 DNA 서열의 100% 일치율을 가지는 박테리아 클론만을 플라스미드 DNA 제조 및 후속하여 세포 형질감염에 사용하였다.

[0170] c. 상이한 J-사슬. J-사슬 변이체가 IgM과 커플링할 수 있는지를 입증하기 위해, 2개의 상이한 J-사슬 변이체를 항-CD3 항체(OKT3 scFv)를 혼입하는 명확한 융합 부위로 작제하였다.

[0171] i. 이 작제물은 인간 J-사슬의 N 말단과 융합된 OKT3(항-CD3)의 scFv(CD3scFv-15 aa 링커-J)로 이루어진다:

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSR
GYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWG
QGTTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSY
MNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLGVPAPAFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYY
CQQWSSNPFTFGSGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQEDERIVLVDNKCKCARITS
RIIRSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSLDLCKKCDPT
EVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMOVETALT
PDACYPDGGGSEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH--

(서열 번호 46)

[0172]

[0173] 이 작제물은 약 45kD의 분자량을 가지고, CD3의 가용성 엡실론 사슬(Sino Biological), 또는 T 세포에 결합할 수 있고; 항-myc 단일클론 항체 4A6 또는 다른 항-myc 항체에 결합할 수 있다.

[0174] ii. 이 작제물은 인간 J-사슬의 C 말단과 융합된 OKT3(항-CD3)의 scFv(J-15 aa 링커-CD3scFv)로 이루어진다:

QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTS
PLRTRFVYHLSLDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCY
TAVVPLVYGGETKMOVETALTPDACYPDGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGAELAR
PGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKA
TLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTTLTVSSGGGG
SGGGGSGGGGSQIVLTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPK
RWIYDTSKLGVPAPAFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGS
GTKLEIKEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH--

(서열 번호 47)

[0175]

[0176] 이 J-CD3scFv 작제물은 약 45kD의 분자량을 가지고, CD3의 가용성 엡실론 사슬(Sino Biological), 또는 T 세포에 결합할 수 있고; 항-myc 단일클론 항체 4A6 또는 다른 항-myc 항체에 결합할 수 있다.

[0177] d. IgM 중쇄: 이 중쇄 작제물은 B 세포의 표면 상의 CDIM에 결합하는 IGM-55.5에 대한 전장 μ 사슬을 가진다:

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSG
STNYPNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGRMAWGASVNFYD
WGQGTLLTVSSGSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKY
KNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMOGTDEHVVCKVQHPNGNKEK
NVPLPVIAELPPKVSFVFPVRDGGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQ
VGSGVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQN
ASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTLCLVTDLTITYDSVTISWTRQNG
EAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNNGERFTCTVTHTDLPSPKQTIS
RPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADVVFVQWMQRGQPLSP
EKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTV
DKSTGKPTLYNVSLVMSDAGTCY

(서열 번호 3)

[0178]

[0179] 이 중쇄 작제물은 분자량 약 64kD의 분자량을 가지고, 경쇄와 동시발현될 때, 생성된 IgM은 CDIM 양성 B 세포에 결합할 수 있다.

[0180] e. B 세포의 표면 상의 CDIM(세포사 유도 분자)에 결합하는, IGM-55.5로서 공지된 IGM-55.5에 대한 경쇄:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ
SGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPITFGQGRLEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(서열 번호 5)

[0181]

[0182] 경쇄 작제물은 약 24kD의 분자량을 가지고, 적절한 중쇄(서열 번호 3)와 동시발현될 때, CDIM 양성 B 세포에 결합할 수 있다.

[0183] 2. 단백질 발현, 정제 및 규명

[0184] a. 형질감염. 중쇄, 경쇄 및 변형된 J-사슬 DNA를 CHO 세포에 의해 형질감염시켰다. 발현 벡터에 대한 DNA를 통상적으로 PEI와 1:1:1 비율로 혼합하고, 이후 CHO-S 세포에 첨가하였다. CHO-S 세포에 의한 PEI 형질감염을 확립된 기법에 따라 수행하였다(문헌["Biotechnology and Bioengineering, Vol 87, 553-545"] 참조).

[0185] b. 면역침전

[0186] i. 캡처 선택 IgM(Capture Select IgM)(BAC, Thermo Fisher). 형질감염된 CHO 세포 상청액으로부터의 IgM 단백질을 제조사의 프로토콜(GE Life Sciences)에 따라 캡처 선택 IgM 친화도 매트릭스에 의한 면역침전에 의해 부분적으로 정제하였다. 실온에서 2시간 동안 항온처리 후, 친화도 매트릭스를 원심분리에 의해 상청액으로부터 분리하였다. 매트릭스를 3회 동안 PBS에 의해 추가로 세척한 후 PBS를 조심스럽게 제거하였다. 포획된 단백질을 5분 동안 NuPage LDS 단백질 완충제(라이프 테크놀로지스)와 항온처리함으로써 매트릭스로부터 용리시켰다.

[0187] ii. 항-myc 아가로스 친화도 매트릭스(Sigma). 형질감염된 CHO 세포 상청액으로부터의 IgM 단백질을 제조사의 프로토콜에 따라 항-myc 친화도 매트릭스에 의한 면역침전에 의해 부분적으로 정제하였다. 실온에서 2시간 동안 항온처리 후, 친화도 매트릭스를 원심분리에 의해 상청액으로부터 분리하였다. 매트릭스를 3회 동안 PBS에 의해 추가로 세척한 후 최종 세척 후에 PBS를 조심스럽게 제거하였다. 포획된 단백질을 5분 동안 NuPage LDS 단백질 완충제(라이프 테크놀로지스)와 항온처리함으로써 매트릭스로부터 용리시켰다.

- [0188] c. 겔 전기영동
- [0189] i. 비환원 SDS PAGE
- [0190] ii. 비환원 SDS PAGE는 크기에 따라 네이티브 IgM 및 이의 돌연변이체 형태를 분리시킨다. 동종이합체 중쇄 및 경쇄로 이루어진, 오합체 IgM은 대략 1,000,000 분자량의 단백질 밴드를 생성한다. NuPage LDS 샘플 완충제(라이프 테크놀로지스)를 25℃에서 30분 동안 IgM 단백질 샘플에 첨가한 후 겔에 로딩하였다. NativePage Novex 3-12% 비스-트리스 겔(라이프 테크놀로지스)을 노벡스(Novex) 트리스-아세테이트 SDS 실행 완충제(라이프 테크놀로지스)와 사용하였다. 염료 앞쪽이 겔의 바닥에 도달할 때까지 겔을 실행하였다.
- [0191] iii. 환원 SDS-PAGE. NuPage LDS 샘플 완충제(라이프 테크놀로지스) 및 NuPage 환원제 다이티오프레이톨(라이프 테크놀로지스)을 IgM 단백질 샘플에 첨가하고, 10분 동안 80℃로 가열한 후 NuPage 노벡스 4-12% 비스-트리스 겔(라이프 테크놀로지스)에 로딩하였다. NuPage MES SDS 실행 완충제(라이프 테크놀로지스)를 겔 전기영동에 사용하였다. 염료 앞쪽이 겔의 바닥에 도달할 때까지 겔을 실행하였다. 전기영동을 완료한 후, 장치로부터 겔을 제거하고, 콜로이드성 청색 염색(Colloidal Blue Staining)(라이프 테크놀로지스)을 사용하여 겔을 염색하였다.
- [0192] iv. 웨스턴 블롯 검출. 전기영동을 완료한 후, XCell SureLock Mini-Cell로부터 겔을 제거하였다. 30볼트에서 1시간 동안 PVDF 막으로 옮겼다(라이프 테크놀로지스의 매뉴얼을 의미). 25℃에서 1시간 동안 PBST 중의 20ml의 3% BSA에 의해 차단하였다.
- [0193] 항-J-사슬 웨스턴 블롯을 위해, 4℃에서 밤새 PBST 중의 3% BSA 중의 1:500으로 항-J(SP105, Thermo Fisher)를 첨가하였다. 실온에서 4회 PBST에 의해 세척하였다. 실온에서 1시간 동안 PBST 중의 3% BSA 중의 1:5,000으로 HRP-Goat 항 토끼 IgG(Jackson Immunology)를 첨가하였다. 실온에서 4회 PBST에 의해 세척하였다. 10분 동안 10ml의 HRP 화학발광 기질(Thermo Fisher)을 첨가한 후 블롯을 필름에 노출시켰다. 항-J-사슬 항체만이 비변형된 J-사슬(도 6) 또는 변형된 J-사슬(도 7)과 동시발현된 IgM과 반응한다.
- [0194] 항-myc 웨스턴 블롯을 위해, 4℃에서 밤새 PBST 중의 3% BSA 중의 1:200으로 항-myc(4A6, Millipore)를 첨가하였다. 실온에서 4회 PBST에 의해 세척하였다. 실온에서 1시간 동안 PBST 중의 3% BSA 중의 1:5,000으로 HRP-Goat 항-마우스 IgG(Jackson Immunology)를 첨가하였다. 실온에서 4회 PBST에 의해 세척하였다. 10분 동안 10ml의 HRP 화학발광 기질(Thermo Fisher)을 첨가한 후 블롯을 필름에 노출시켰다. 항-myc 항체만이 myc 태그를 가지는 변형된 J-사슬과 반응하였다(도 2).
- [0195] 3. 이중특이적 기능적 분석
- [0196] a. 표적 결합의 FACS 분석
- [0197] CD3scFv-J를 가지는 IGM-55.5 또는 T 세포에 결합하는 J-CD3scFv를 가지는 IGM-55.5를 T 세포주(주르카트(Jurkat), CD3 양성 세포주) 및 B 세포주(Nalm6, 음성 대조군 세포주)에 대한 항체의 결합에 의해 확인하였다. 세척 후, 로다민 표지된 4A6을 세포 현탁액에 첨가하였다. 세포 표적 결합을 CD3 항원과 함께 또는 이것 없이 양성 및 음성 대조군 세포 둘 다의 MFI에 의해 검출하였다.
- [0198] CD3scFv-J를 가지는 IGM-55.5 또는 CDIM 발현 세포에 결합하는 J-CD3scFv를 가지는 IGM-55.5를 양성 세포주(다우디(Daudi), 양성 세포주) 및 음성 세포주(피어(Peer))에 대한 항체의 결합에 의해 확인하였다. 세척 후, 로다민 표지된 4A6을 세포 현탁액에 첨가하였다. 세포 표적 결합을 CDIM 항원과 함께 또는 이것 없이 양성 및 음성 대조군 세포 둘 다의 MFI에 의해 검출하였다.
- [0199] b. 동시배양에서의 T 세포 매개된 B 세포 사멸의 FACS 분석
- [0200] 라지(Raji)인 CD19+CD20+ B 세포주를 37℃, 5% CO2에서 24시간 동안 T-ALL과, CD8+ 세포용해 T 세포주를 CD20 IgM x J-야생형 또는 CD20 IgM x CD3-J 사슬과 동시배양하였다. 세포를 수확하고, CD3(552852/BD Biosciences) 및 CD19(555413/BD Biosciences)에 대해 형광 항체에 의해 염색하고, 생존가능한 B 세포를 평가하기 위해 유세포분석법에 의해 분석하였다.
- [0201] c. B 세포의 보체 의존적 세포독성
- [0202] 라모스(Ramos)인 CD20+ 세포주를 25,000개 세포/웰로 96웰 반면적 화이트 플레이트에 시딩하였다. 항체 및 인간 보체(5% 최종, Quidel)를 첨가하여 보체 의존적 세포독성을 개시시키고, 생존가능한 세포의 수를 셀 티터 글루(Cell Titer Glo) 및 제조사의 프로토콜을 이용하여 측정하였다. 웰당 0.1초 통합 시간을 이용하여 인비전 멀티모드 판독기(Envision multimode reader)(Perkin Elmer)에서 발광을 측정하였다. 약물이 첨가되지 않은 웰에

대해 발광 값(상대 발광 단위 - RLU)을 정규화함으로써 생존가능한 세포의 백분율을 계산하였다. 데이터를 각각 100 및 0% 생존능력에서 고정된 상부 및 하부 값으로 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 및 4개의 매개변수 피트를 이용하여 분석하였다.

[0203] 다중특이적 결합 및 다중특이적 기능적 분석을 당해 분야에 공지된 기법, 예컨대 상기 기재된 것을 이용하여 유사한 방식으로 수행할 수 있다.

[0204] **실시예 2**

[0205] 항-CD3 결합 scFv를 보유하는 변형된 J-사슬을 가지는 이중특이적 항-CD20 IgM 항체의 분자 클로닝, 발현 및 정제

[0206] 이 예는 CD3에 결합하는 변형된 J-사슬 및 상이한 B 세포 항원(CD20)을 표적화하는 추가의 IgM 항체의 분자 클로닝, 발현 및 정제의 준비를 기술한다. 하기 중쇄 및 경쇄 서열에 상응하는 DNA를 실시예 1에 기재된 바와 같은 방법을 이용하여 제조하였다.

[0207] 서열 번호 48: 항-CD20 항체(리톡시맵)의 IgM 경쇄 서열

MDMRVPAQLLGLLLWLRLGARCQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWYATSNL
ASGVFVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKKHVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC

[0208]
[0209] 서열 번호 49: 항-CD20 항체(리톡시맵)의 IgM 중쇄 서열

MGWSYIILFLVATATGVHSQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGN
DTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSSGSASAPTLFP
LVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEH
VVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSRQIQVSWLREGKQVSGSVT
TDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCPDQDTAIRVFAIPPSFASIF
LTKSTKLTLCLVTDLTYYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNNGERFTCTVTHTDL
PSPLKQTI SRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFS PADVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPE
PQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSD TAGTCY

[0210]
[0211] 이 중쇄 및 경쇄에 상응하는 DNA, 및 실시예 1에 기재된 야생형(wt) J-사슬인, 015J 또는 J150 J-사슬 서열에 상응하는 것을 상기 기재된 바대로 카멜리드 수지를 사용하여 발현되고 정제된 HEK293 세포 및 단백질로 동시형 질감염시켰다. 도 13에 도시된 바대로, 모든 4개의 단백질은 잘 발현하였다. J-사슬이 없는 항-CD20 IgM 옥합체는 야생형 J-사슬을 가지는 IgM 옥합체, 및 이중특이적 IgM(여기서, 항-CD3 scFv는 배향 중 어느 하나(015J 또는 J150)에서 J-사슬에 연결됨)에 대해 옥합체를 함유하는 J-사슬로부터 명확히 분리되었다.

[0212] **실시예 3**

[0213] 상이한 항-CD3 결합 scFv를 보유하는 변형된 J-사슬을 포함하는 이중특이적 항-CD20 IgM 항체의 분자 클로닝, 발현 및 정제

[0214] 이중특이적 IgM의 조립이 실시예 1 및 2에 사용된 것보다 상이한 서열의 항-CD3 scFv를 보유하는 변형된 J-사슬에 의해 실행 가능하다는 것을 확립하기 위해, 항체 비실리주맵(Nuvion)으로부터의 가변 영역을 보유하는 J-사슬을 수행하였다. V15J 및 J15V의 2개의 상이한 배향에서 15개의 aa를 함유하는 링커를 통해 J-사슬에 융합된 비실리주맵(V)에 상응하는 scFv를 가지는 2개의 J-사슬에 대한 서열이 하기 기재되어 있다.

[0215] 서열 번호 50: V15J에 대한 J-사슬 서열

MGWSYIIILFLVATATGVHSQVLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSG
YTHYNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSAYDYDGFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSG
GGGSDIQTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQKPKGAPKRLIYDTSKLGASGVPSRFSGSGSGTDF
LTISLQPEDFATYYCQWSSNPPTFGGGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSGQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRS
SEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATET
CYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMTETALTPDACYPD

[0216]

[0217] 서열 번호 51: J15V에 대한 J-사슬 서열

MKNHLLFWGVLAVFIKAVHVKAQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDP
TSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMTET
LTPDACYPDGGGGSGGGSGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYI
NPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSAYDYDGFAYWGQGLTVTVSSGGGGSG
GGSGGGGSDIQTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQKPKGAPKRLIYDTSKLGASGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISLQPEDFATYYCQWSSNPPTFGGGTKLEIK

[0218]

[0219] 실시예 1에 기재된 바대로, 이 서열에 상응하는 DNA를 합성하고, 단백질을 생성하기 위해 항-CD20 IgM에 대한 중쇄 및 경쇄와 함께 HEK293 세포로 형질감염시키고, 이 단백질을 이후 IgM에 특이적인 카멜리드 항체 친화도 매트릭스를 사용하여 정제하였다. 도 13에 도시된 바대로, 15개의 aa 링커에 의해 새로운 항-CD3 scFv에 융합된 J-사슬은 IgM으로 혼입될 수 있고, 상응하는 J-사슬을 가지는 이중특이적 IgM의 오합체 형태는 J-사슬 없이 옥합체 형태로부터 명확히 구별 가능하다.

[0220] **실시예 4**

[0221] 제2 이팩터 세포 결합 도메인의 항-CD16 카멜리드 변형된 J-사슬 버전(항-CD16 카멜리드)을 포함하는 IgM의 분자 클로닝, 발현 및 정제

[0222] 이 실시예는 scFv와 상이한 결합 모이어티를 J-사슬로 연결할 수 있다는 것을 입증하고, 이것은 상이한 이팩터 세포 집단에서 상이한 표적에 지향된다. 하기 도시된 카멜리드 Vhh 서열을 사용하고, 이것은 자연 살해 세포(NK 세포)에서 CD16 항원에 대한 결합에 대해 선택되었다. 다시 한번, 이 서열을 링커로서 가요성 15개의 aa를 사용하여 J-사슬에 연결하여 C15J를 생성하였다. 이중특이적 IgM을 발현시키고 실시예 1에 기재된 바대로 정제하고, 하이브리드 겔에서 분석하였다. 오합체 종의 형성이 명확히 보인다. 추가로, 오합체 IgM으로의 C15J J-사슬의 혼입을 웨스턴 블롯을 이용하여 확립하였다(도 18).

[0223] 서열 번호 52: C15J에 대한 J-사슬 서열

[0224] **실시예 5**

[0225] 혼입된 J-사슬을 가지거나 없는 IgM의 패밀리에 대한 보체 의존적 세포독성의 분석

[0226] 보체 의존적 세포독성은 항체에 의한 세포 사멸에 대한 중요한 기전이다. IgM 항체는 이의 다합체 형태로 인해 증대된 보체 의존적 세포 사멸(complement dependent cell killing: CDC)을 가지는 것으로 공지되어 있다. 본 발명의 중요한 양상은 C 또는 N 말단에서 이팩터 세포의 scFv 또는 카멜리드 Vhh 결합체를 보유하는 변형된 J-사슬의 혼입이 보체 경로의 중요한 성분인 C1q의 결합의 방해 발생시키는지를, 따라서 CDC를 저해할 수 있는지를 시험하는 것이다. 본 발명자들은 IgM 및 이중특이적 IgM 작제물의 각각의 CDC 활성을 측정하였다. 도 14에 도시된 바대로, 본 발명자들은 변형된 J-사슬의 혼입이, 예상치 못하게, 더구나 본 발명자들이 시험한 링커 길이로, 본 발명자들의 이중특이적 IgM의 CDC 활성에 대해 해로운 효과를 가지지 않는다는 것을 발견하였고, 본 발명자들은 이중특이적 IgM이 물 기준으로 상응하는 IgG에 비해 60-100배 증대된 CDC 활성을 가진다는 것을 발견하였다(도 14).

[0227] **실시예 6**

[0228] 실험실내 동시배양에서의 이중특이적 IgM에 의한 T 세포 의존적 B 세포 사멸의 분석

[0229] 변형된 J-사슬을 가지는 이중특이적 IgM 항체에 의한 이팩터 T 세포의 관여는 J-사슬 또는 야생형 J-사슬을 보유하지 않는 IgM과 비교하여 표적 B 세포 집단의 사멸을 더 증대시키는 것으로 예상된다. 동시배양에서 세포 사

멸을 시험하기 위해, 본 발명자들은 실시예 1에 기재된 바와 같은 세포 사멸 검정을 수행하였다. 단일 고농도 (100ng/ml)에서의 항체를 CD20+ 라지 세포 및 CD3+ 이팩터 T-ALL 세포와 항온처리하였다. 도 15에 도시된 바대로, J-사슬 상의 CD3 결합 scFv를 보유하는 이중특이적 IgM은 B 세포의 완전한 사멸을 발생시킬 수 있다. 용량 반응에서 수행된 동일한 실험은 T 세포를 관여시킬 수 있는 scFv를 보유하지 않는 IgM과 비교하여 B 세포 사멸의 300배 초과 개선이 존재한다는 것을 보여준다. 이중특이적 IgM에 의한 B 세포의 완전한 사멸은 10ng/ml만큼 낮은 농도에서 관찰되었다.

[0230] 실시예 7

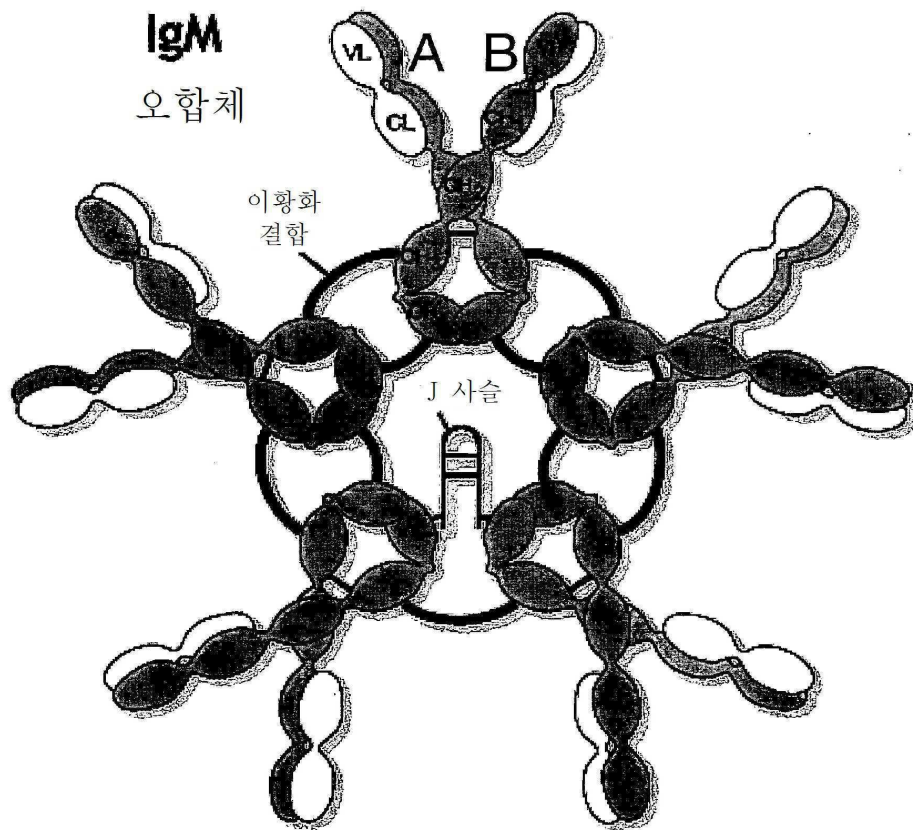
[0231] NSG 마우스 모델에서의 생체내 T 세포 의존적 B 세포 사멸의 입증

[0232] 생체내 상황에서 제조한 이중특이적 IgM을 시험하기 위해, 본 발명자들은 인간화 비만이 아닌 당뇨병 중증 복합 면역결핍 감마 무 (NSG) 마우스에 의해 실험을 수행하였다. 이 마우스는 심각하게 면역 기능이 손상되고 마우스 T 및 B 림프구가 결여되었다. 이것을 본질적으로 인간 림프구 집단에 의해 마우스를 생성하기 위해 인간 CD34+ 줄기 세포와 재구성하였다. CD20 IgM x CD3-J 사슬이 0.5mg/kg으로 이 동물에서 정맥내 투여되고, 전혈을 얻고 인간 B 세포의 순환 수준에 대해 유세포분석법에 의해 분석하였고, 본 발명자들은 6시간만큼의 짧은 치료에서도 B 세포 집단의 완전한 고갈을 관찰하였다(도 17).

[0233] 몇몇 실시형태가 본 개시내용에 제공되어 있지만, 개시된 시스템 및 방법이 본 개시내용의 정신 또는 범위로 부터 벗어나지 않으면서 많은 다른 특정한 형태에서 구현될 수 있다는 것을 이해해야 한다. 본 실시예는 예시로서 고려되어야 하고 제한이 아니며, 본 명세서에 제공된 상세내용에 제한되지 않도록 의도된다. 변경, 치환 및 변형의 다양한 예는 당해 분야의 당업자에 의해 확인되고, 본 명세서에 개시된 정신 및 범위로 부터 벗어나지 않으면서 이루어질 수 있다.

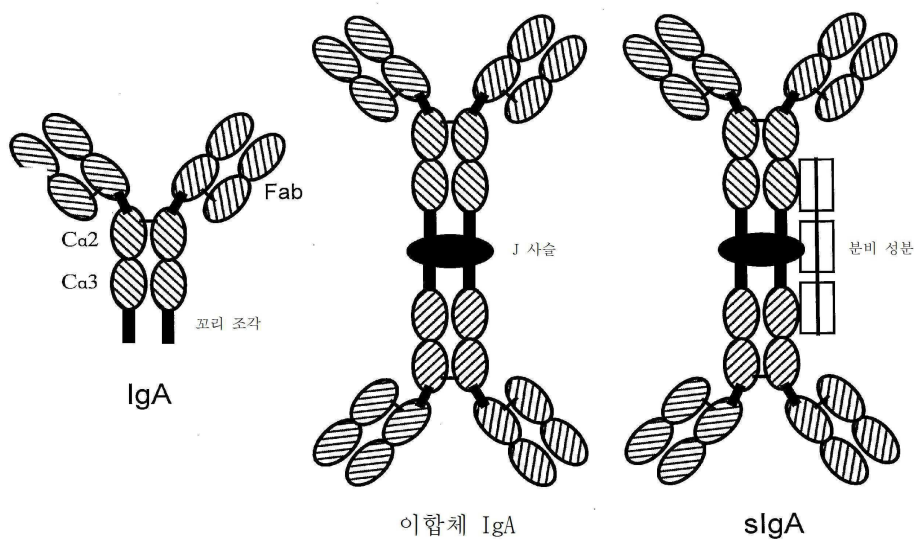
도면

도면1



중성 IgM 중의 5개의 (A,B) 단위, A = B

도면2



도면3

성숙 인간 J 사슬

- QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSDPNEDIVERNI
RIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPT
EVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYT
AVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPD (서열 번호 1)
- 아미노산의 수 : 137
- 분자량 : 15594.4
- 이론적 pI: 4.59

도면4a

Hum = 인간 NP_653247 23-159
 Chm = 침팬치 XP_001160135 39-175
 Gor = 고릴라 XP_004038830 23-159
 Ora = 오랑우탄 NP_001125381 23-159
 Gib = 긴팔원숭이 XP_003265761 39-175
 Mar = 마모셋 XP_003732538 32-168
 Cyn = 사이노몰거스 원숭이 NP_001247815 23-159
 Bab = 개코원숭이 XP_003898844 23-159
 Squ = 다람쥐원숭이 XP_003931978 23-159
 Shr = 나무두더쥐 XP_006142955 25-160
 Dol = 돌고래 XP_004328961 25-158
 Kil = 범고래 XP_004283629 25-158
 Ele = 코끼리 XP_003414110 25-158
 Sea = 물개 XP_006729388 25-158
 Rhi = 꼬빨소 XP_004419202 25-157
 Cat = 집고양이 XP_003985350 25-158
 Wol = 늑대 XP_532398 26-159
 Pan = 자이언트 팬더 EFB23253 1-134
 Fer = 페럿 XP_004766376 26-158
 Hor = 말 NP_001271464 25-158
 Gui = 기니아 피그 NP_001265705 25-160
 Cam = 낙타 XP_006188738 25-158
 Goa = 염소 XP_005681786 25-158
 Chn = 친칠라 XP_005392838 94-229
 Ham = 햄스터 XP_005068228 24-160
 She = 양 XP_004009937 25-158
 BBa = 갈색 박쥐 XP_006094475 25-158
 Ant = 영양 XP_005983836 25-158
 Cow = 소 NP_786967 25-157
 Mou = 마우스 NP_690052 23-159
 Rat = 랫트 EDL88516 23-159
 Hed = 고슴도치 XP_004703237 25-157
 Rab = 토끼 P23108 1-136
 Opo = 주머니쥐 XP_003341415 29-162
 All = 악어 XP_006270094 26-159
 Tur = 거북이 XP_005304167 26-159
 Tas = 주머니곰 XP_003772863 27-160
 Pla = 오리너구리 XP_003430954 36-160
 Par = 잉꼬 XP_005142787 28-160
 Duc = 오리 XP_005031370 28-160
 Chi = 닭 NP_989594 26-158
 Tur = 칠면조 XP_003205717 27-159
 Fal = 매 XP_005243236 29-160
 Spa = 참새 XP_005492217 29-158

도면4b

[illegible]

도면4c

	70	80	90	100	110	120	130
		100	110	120	130	140	150
Hum	KKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSAT-ETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMOVETALTPDACYPD						
Chm	R.....						
Gor	K.....						
Ora	I.....A.....						
Gib	I.....L.....						
Mar	F.....S.....S.....						
Cyn	T.....Q.....S.....						
Bab	L.....T.R.....Q.....S.....						
Squ	T.....F.....KAT.....S.....						
Shr	L.....TM.....IF.....K.....Q.....S.....						
Dol	V.....I---.....NR.....T.....K.....S.....						
Kil	L.....V.....I---.....NR.....T.....K.....S.....						
Ele	V.....V.....---.....NT.....I.....K.....T.....S.....R.....						
Sea	V.....V.I.S.....L.....---.....NW.....FT.....Q.....S.....						
Rhi	V.....---.I.A.....NR.....T.....V.....S.....						
Cat	V.....M.S.....E---.V.....NR.....FT.....V.R.....S.....						
Wol	LV.....V.I.S.....L.....T---.....NR.....IM.....Q.....S.....						
Pan	V.....G.....I.S.....L.....---.....NR.....FT.....Q.R.....S.....						
Fer	V.....I.S.....L.....---.....NW.....FT.....Q.....Q.....S.....						
Hor	V.....V.....S.....E---.A.....NR.....T.....Q.....I.....S.....						
Gui	V.....D.V.....L.ED.REP-.....N.....S.....K.L.TA.....S.....						
Cam	L.....G.RV.....L.D.I---.....NK.....FT.D.....S.....						
Goa	TR.....ED.V.....S.....R.T---.....NR.K.N.R.Q.....S.....						
Chn	V.....N.V.....L.E.GEP-.....A.N.....T.....P.KV.....S.....A.....						
Ham	V.....DH.....S.....T.....S.....VVP.....M.N.....M.....T.R.....PS.....S.....						
She	TR.....ED.V.....S.....R.T---.....NR.K.N.R.Q.....L.....S.....						
BBa	T.Q.....E.V.....N---.....NK.....FS.....K.V.....ES.....						
Ant	R.....TR.....ED.V.....S.....R.T---.....NR.K.N.R.Q.....S.....						
Cow	T.....ED.V.....S.....S.A---.....NR.K.S.R.Q.....S.....						
Mou	V.....ED.V.....N.....DGVP.....M.....TM.....R.H.....QA.....S.....						
Rat	V.....ED.V.....SG.....GVP.....M.....M.....R.H.....Q.....S.....						
Hed	V.....V.....V.....G.....---.....N.....T.....K.Y.....R.....S.....						
Rab	I.....VF.....S.....PD.DYS-.....TL.....ITHR.G.R.....KAT.....S.....						
Opo	L.....N.EV.....N.....DT---.....STAA.YLE.....RL.T.....ES.....N.....						
All	I.....GG.....Q.....TD.SKS---D.....TTF.FA.....Q.....NI.A.....AS.....A.....						
Tur	GDRV.....E.....N.SSS---D.....TTF.FF.....KINT.QA.....ES.....A.....						
Tas	R.....I.L.G.E.....NWSCG---.....STAL.DL.....KST.....T.....ES.....S.....						
Pla	Q.....Q.....HEV.....RG.S.....RPG---DD.....MSTI.FT.....V.N.V.....ES.....						
Par	V.F.....GGE.YK.Q.....S.....P---.....D.....TNF.FL.H.....NLQAV.....AS.....A.....						
Duc	V.....GGE.YE.Q.....TS.N.P---.....N.D.....TTF.FI.H.....HIQA.....AS.....A.....						
Chi	V.I.....GGETYQ.Q.....S.N.P---.....N.D.....TTF.F.H.....HIQA.....TS.....AE.....						
Tur	V.I.....GGETYQ.Q.....TS.N.P---.....N.D.....TTI.F.Q.....QIQA.....AS.....A.....						
Fal	V.....GGE.YK.Q.....TS.N.P---.....N.D.....TTF.FS.H.....V.K.QAV.....AS.....A.....						
Spa	N.E.I.ID.GGA.HQ.Q.G.S.E.P---Q.....E.....SSP.....LHH.....VMQ.PA.....S.F.....						

도면5

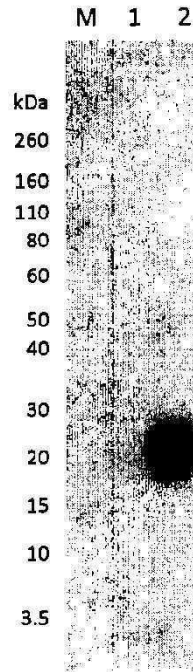
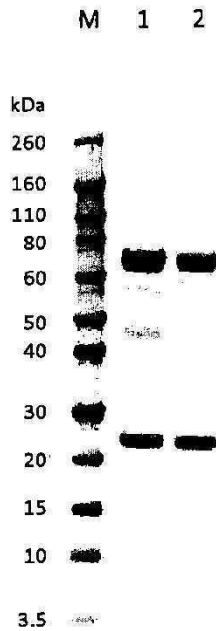
인간 대 Bat J 사슬

쿼리	2	EDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSDPNEDIVERNIRII-----	41
		EDERI+LVDNKCKCARITSRII S EDP++DIVERNIRI	
주제	25	EDERILLVDNKCKCARITSRIIPSQDIVERNIRIKLGDEKSMVNLWNCKLLCTAG	84
쿼리	42	-----VPLNNRENISDPTSP LRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTA	86
		VPLNNRENISDPTSP RT FVYHLSDLCK CDPTEVELDNQ+VT	
주제	85	LQSKEGSMVADTAGKVPLNNRENISDPTSPRRTNFVYHLSDLCKNCDPTEVELDNQVVTV	144
쿼리	87	TQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMOVETALTPDACYPD	137
		TQSNICDED+...ETCY YDRNKCYT VPL+YGG+T MVETALTPD+CYPD	
주제	145	TQSNICDEDN--ETCYAYDRNKCYTNRVPLLYGGKTIMVETALTPDSCYPD	193

도면6

쿠마쉬 염색

항-J 웨스턴 블롯



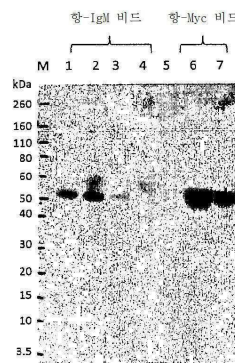
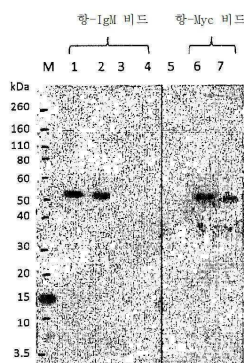
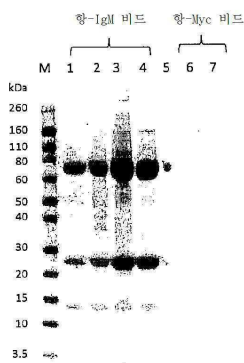
M- 마커
1- 55.5
2- 55.5J

도면7

쿠마쉬 염색

항-Myc 웨스턴 블롯

항-J 웨스턴 블롯



M- 마커
(항-IgM 비드를 가지는 IP)
1- 항CD3scFv-J
2- J- 항CD3scFv
3- J- 항CD3scFv+GFP
4- 55.5 부도 sup
5- 빈
(항-myc 비드를 가지는 IP)
6- 항CD3scFv-J
7- J- 항CD3scFv

도면8

J-사슬 작제물의 배향

J-αCD3:



αCD3-J:



도면9

항 CD3scFv-J

- MGWSYIILFLVATATGVHSQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTR
YTMHWVKQRPQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYM
QLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGG
 GGSQIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWI
 YDTSKLASGVPAPAFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTF
 GSGTKLEIKGGGGSGGGSGGGGSQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSS
EDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTE
VELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVE
TALTPDACYPDGGGSEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH-



도면10

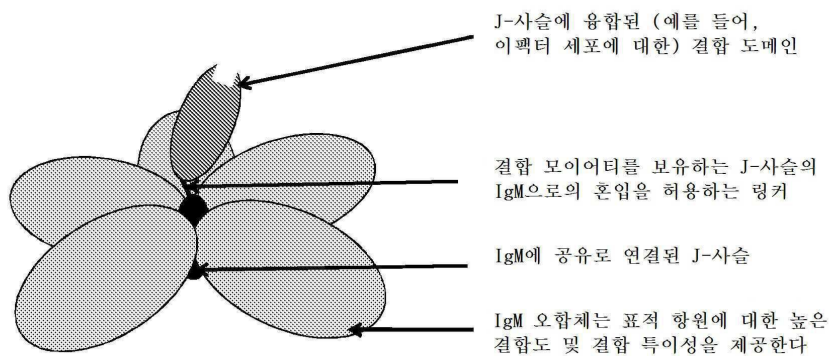
J-항 CD3scFv

- MKNHLLFWGVLA~~VF~~IKAVHVKAQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSED
PNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVE
LDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMTVETA
LTPDACYPDGGGSGGGSGGGSGGGSGVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASG
YTFTRYTMHWVKQRPQGGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSS
STAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSSGGGSGG
GGSGGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTS
PKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSSLTISGMEAEDAATYYCQQWSS
NPFTFGSGTKLEIKGGGSEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH-



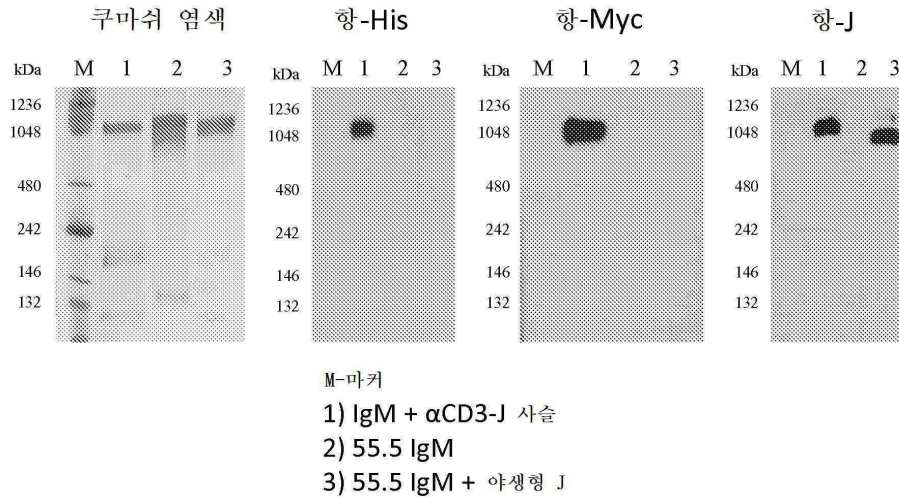
도면11

변형된 J-사슬을 가지는 비대칭 IgM 오합체



도면12

α CD3 scFv 가 α CD20 IgM 으로 합체로 혼입된 변형된 J 사슬

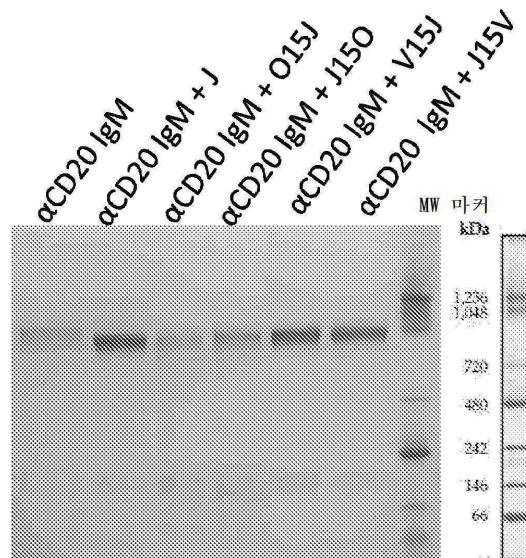


도면13

α CD20_{IgM} x α CD3_J 이중특이적 IgM 발현된

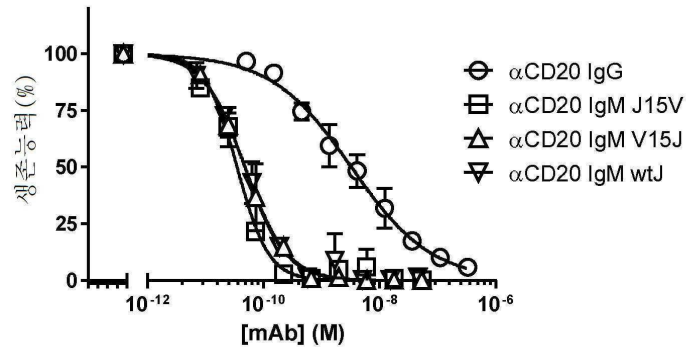
- 일시적 동시형질감염 :
HC, LC 및 JC

- 모든 5 J 변이체는
오합체이다



도면14

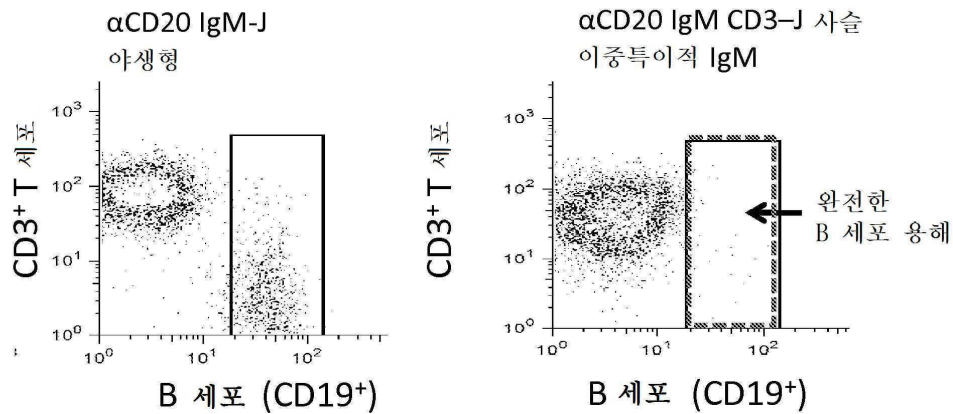
V15J/J15V 변이체는 CDC 활성을 보유한다



EC50(pM)			
αCD20 IgG	αCD20 IgM wt J	αCD20 IgM V15J	αCD20 IgM J15V
3292	48.4	47.9	35.2

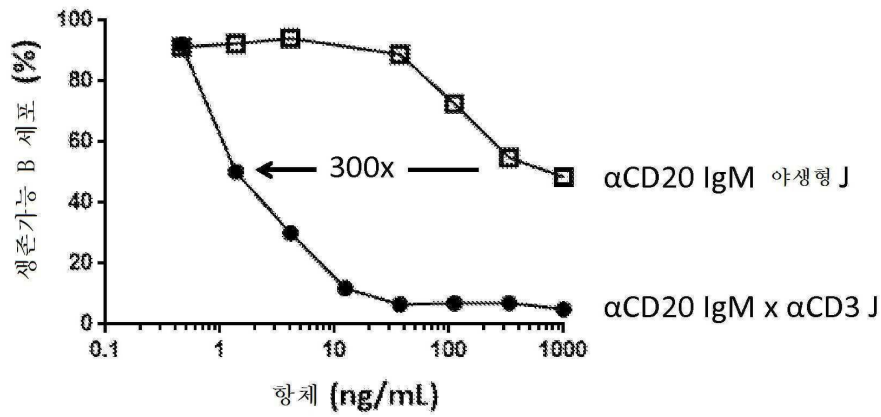
도면15

이중특이적 IgM: B 세포 결핍에서 매우 강력한 B 세포
 $\alpha\text{CD20}_{\text{IgM}} \times \alpha\text{CD3}_{\text{J}}$ 사슬의 활성 T 세포 사멸



도면16

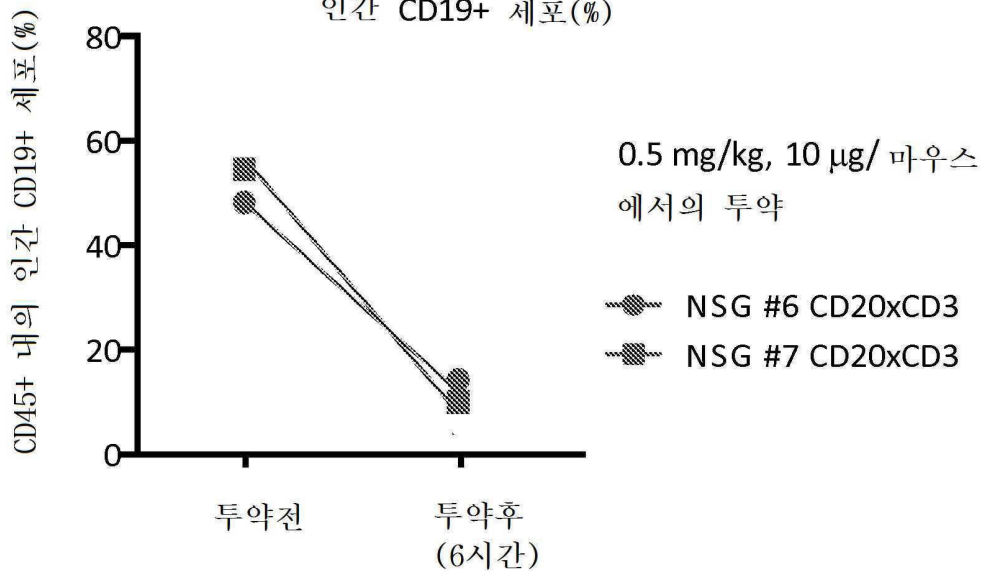
이중특이적 IgM: α CD20 x α CD3 IgM 을 가지는 T 세포에 의한
 α CD20 매우 활성 라지 세포(B 세포) 사멸



도면17

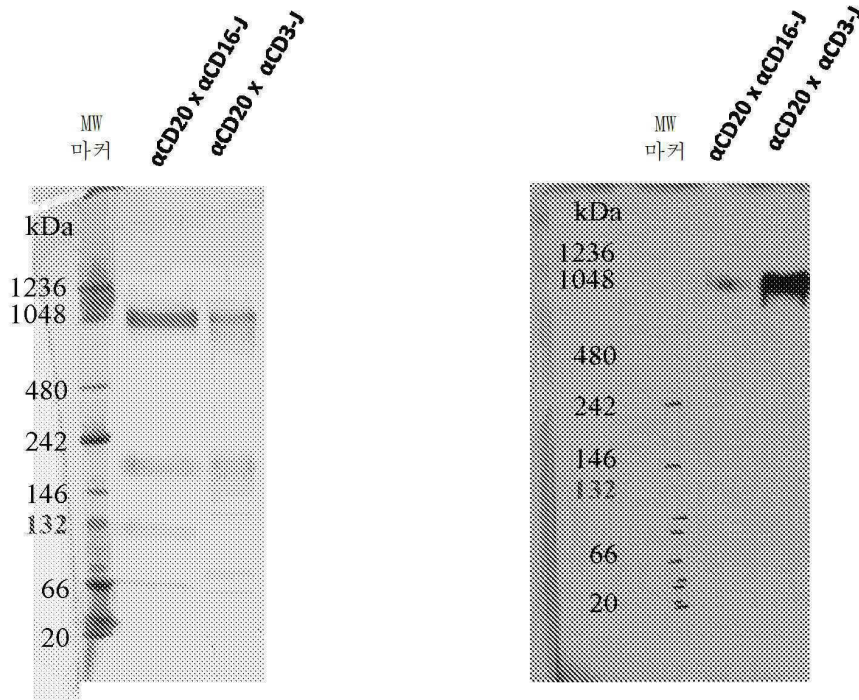
항-CD20을 가지는 생체내 B 세포 고갈
 IgG, IgM 및 이중특이적 IgM은 매우 활성이다

비-GLP NSG 인간화 마우스
 CD45+ 세포 말초 혈액에서의
 인간 CD19+ 세포 (%)



도면18

CD16 특이적 Vh 카멜리드-J 사슬



도면19

이중특이적 Ab에 대한 메뉴 추진 접근법

종양학 분야에 대한: 표적 세포 X 이펙터 세포

표적 연관 항원

면역 이펙터 세포

혈액 암
CDIM, CD19, CD20, CD22,
CD33, CD70, CD56, CD138
상피 종양
EpCAM, Her2, Eph-A2
PSMA, MCSP, AGS-5
GPNMB
탄수화물 종양
CEA, CA-125, TADG78
시알릴 루이스-X (CD15)
바이러스 항원
PreS1 (HBV), GP120 (HIV)

T 세포:
CD3 엡실론

NK 세포,
CD16, CD64
NKG2D

대식세포
CD14

호중구
CD16b, CD177

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> IGM BIOSCIENCES, INC.

<120> MODIFIED J-CHAIN

<130> WO 2015/153912

<140> PCT/US2015/024149

<141> 2015-04-02

<150> US 61/974,738

<151> 2014-04-03

<160> 57

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 137

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala

1 5 10 15

Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp

20 25 30

Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu

35 40 45

Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp

130 135

<210> 2

<211> 137

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<400> 2

Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala

1 5 10 15

Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp

20 25 30

Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu

35 40 45

Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp

130 135

<210> 3

<211> 574

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 3

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 Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 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 Gly Arg Met Ala Trp Gly Ala Ser Val Asn Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

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

 Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln
 245 250 255

Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu
260 265 270

Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu
275 280 285

Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr
290 295 300

Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val
305 310 315 320

Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val
325 330 335

Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe
340 345 350

Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr
355 360 365

Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn
370 375 380

Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn
385 390 395 400

Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp
405 410 415

Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro
420 425 430

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

Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu
450 455 460

Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala
465 470 475 480

Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu
485 490 495

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

500 505 510
Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr
515 520 525
Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg
530 535 540
Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr
545 550 555 560

Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr

565 570

<210> 4

<211> 137

<212> PRT

<213> Pongo abelii

<400> 4

Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala

1 5 10 15

Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp

20 25 30

Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu

35 40 45

Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Gln Ile Val Ile Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp

130 135

<210> 5

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 5

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

1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Ile

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

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

145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 6

<211> 137

<212> PRT

<213> *Callithrix jacchus*

<400> 6

Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala

1 5 10 15

Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Asn Asp Pro Asn Glu Asp

20 25 30

Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu

35 40 45

Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Lys Phe Val Tyr His

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Leu Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp

130 135

<210> 7

<211> 137

<212> PRT

<213> *Macaca mulatta*

<400> 7

Gln Glu Gly Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala
1 5 10 15
Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp
20 25 30
Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu
35 40 45
Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Lys Phe Val Tyr His
50 55 60
Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp
65 70 75 80
Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser
85 90 95
Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala
100 105 110
Val Val Pro Leu Thr Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Gln Thr Ala
115 120 125
Leu Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
130 135
<210> 8
<211> 137
<212> PRT
<213> Papio anubis
<400> 8
Gln Glu Gly Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala
1 5 10 15
Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp
20 25 30
Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu
35 40 45
Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Lys Phe Val Tyr His
50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Val Pro Leu Thr Tyr Arg Gly Glu Thr Lys Met Val Gln Thr Ala

115 120 125

Leu Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp

130 135

<210> 9

<211> 137

<212> PRT

<213> Saimiri boliviensis

<400> 9

Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Ala Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala

1 5 10 15

Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Asn Asn Pro Asn Glu Asp

20 25 30

Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Val Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu

35 40 45

Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Lys Phe Val Tyr His

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser

85 90 95

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

100 105 110

Val Val Pro Leu Val Phe Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Lys Ala Thr

115 120 125

Leu Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp

130

135

<210> 10

<211> 136

<212> PRT

<213> *Tupaia chinensis*

<400> 10

Glu Asp Lys Gly Thr Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala Gln

1

5

10

15

Val Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Pro Glu Asp Pro Asn Gln Asp Ile

20

25

30

Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Gly Asn Arg Glu Asn

35

40

45

Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Lys Phe Val Tyr His Leu

50

55

60

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

65

70

75

80

Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser Ala

85

90

95

Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Thr Met

100

105

110

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

115

120

125

Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp

130

135

<210> 11

<211> 134

<212> PRT

<213> *Tursiops truncatus*

<400> 11

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

1

5

10

15

Ile Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Ala Glu Asp Pro Ser Gln Asp Ile

20 25 30

Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Ser Arg Glu Asn

35 40 45

Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Lys Phe Val Tyr His Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Val Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ile Glu

85 90 95

Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Arg Val Pro

100 105 110

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

115 120 125

Asp Ser Cys Tyr Pro Asp

130

<210> 12

<211> 134

<212> PRT

<213> Orcinus orca

<400> 12

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

1 5 10 15

Ile Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Ala Glu Asp Pro Ser Gln Asp Ile

20 25 30

Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Ser Arg Glu Asn

35 40 45

Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Lys Phe Val Tyr His Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

<210> 13

<211> 134

<212> PRT

<213> *Loxodonta africana*

<400> 13

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

50 55 60
Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Val Glu Leu Asp Asn
65 70 75 80
Gln Val Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser Glu
85 90 95
Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Thr Val Pro
100 105 110
Leu Ile Tyr Gly Gly Lys Thr Lys Met Val Thr Thr Ala Leu Thr Pro
115 120 125
Asp Ser Cys Tyr Arg Asp
130

<210> 14

<211> 134

<212> PRT

<213> Leptonychotes weddellii

<400> 14

Glu Asp Gly Arg Thr Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Gln Cys Ala Arg

1 5 10 15

Ile Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Pro Glu Asn Pro Asn Glu Asp Ile

20 25 30

Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn

35 40 45

Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Val Arg Thr Lys Phe Val Tyr His Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Trp Val Pro

100 105 110

Phe Thr Tyr Gly Gly Gln Thr Lys Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro

115 120 125

Asp Ser Cys Tyr Pro Asp

130

<210> 15

<211> 133

<212> PRT

<213> Ceratotherium simum

<400> 15

Glu Asp Glu Arg Ile Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Val Arg Ile

1 5 10 15

Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Pro Glu Asp Pro Asn Glu Asp Ile Val

20 25 30

Glu Arg His Ile Arg Ile Val Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn Ile

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

85 90 95
 Cys Tyr Ala Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Arg Val Pro Leu
 100 105 110
 Thr Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Val Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro Asp
 115 120 125
 Ser Cys Tyr Pro Asp

130
 <210> 16

<211> 134

<212> PRT

<213> Felis catus

<400> 16

Glu Asp Glu Arg Thr Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Val Arg
 1 5 10 15

Val Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Ala Glu Asp Pro Asn Glu Asp Ile
 20 25 30

Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn
 35 40 45

Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Asn Phe Val Tyr His Leu
 50 55 60

Ser Asp Val Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Val Glu Leu Asp Asn
 65 70 75 80

Gln Ile Val Met Ala Ser Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Glu Ser Glu
 85 90 95

Val Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Arg Val Pro
 100 105 110

Phe Thr Tyr Gly Gly Val Thr Arg Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro
115 120 125

Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
130

<210> 17

<211> 134

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<

400> 17

Glu Glu Glu Arg Thr Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Gln Cys Ala Arg
1 5 10 15

Ile Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Pro Asp Asp Pro Asn Glu Asp Ile
20 25 30

Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn
35 40 45

Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Val Arg Thr Lys Phe Val Tyr His Leu
50 55 60

Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Leu Val Glu Val Glu Leu Asp Asn
65 70 75 80

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

Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Arg Val Pro
100 105 110

Ile Met Tyr Gly Gly Gln Thr Lys Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro
115 120 125

Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
130

<210> 18

<211> 134

<212> PRT

<213> *Ailuropoda melanoleuca*

<400> 18

Glu Asp Gly Arg Thr Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Gln Cys Ala Arg
1 5 10 15
Ile Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Pro Glu Asp Pro Asn Glu Asp Ile
20 25 30
Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn
35 40 45
Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Val Arg Thr Lys Phe Val Tyr His Leu
50 55 60
Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Val Glu Leu Gly Asn
65 70 75 80
Gln Ile Val Ile Ala Ser Gln Ser Asn Leu Cys Asp Glu Asp Ser Glu
85 90 95
Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Arg Val Pro
100 105 110
Phe Thr Tyr Gly Gly Gln Thr Arg Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro
115 120 125
Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
130
<210> 19
<211> 133
<212> PRT
<213> Mustela furo
<400> 19
Asp Gly Met Thr Val Leu Ala Asp Asn Lys Cys Gln Cys Val Arg Ile
1 5 10 15
Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Pro Glu Asp Pro Asn Glu Asp Ile Ile
20 25 30
Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn Ile
35 40 45
Ser Asp Pro Thr Ser Pro Val Arg Thr Asn Phe Val Tyr His Leu Ser
50 55 60
Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Val Glu Leu Asp Asn Gln

65 70 75 80
Ile Val Ile Ala Ser Gln Ser Asn Leu Cys Asp Glu Asp Ser Glu Thr
85 90 95

Cys	Tyr	Thr	Tyr	Asp	Arg	Asn	Lys	Cys	Tyr	Thr	Asn	Trp	Val	Pro	Phe
			100					105					110		
Thr	Tyr	Gly	Gly	Gln	Thr	Lys	Met	Val	Gln	Thr	Ala	Leu	Thr	Pro	Asp
			115				120					125			

Ser Cys Tyr Pro Asp

130

<210> 20

<211> 134

<212> PRT

<213> Equus caballus

<400> 20

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

1 5 10 15

Val Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Pro Glu Asn Pro Asn Glu Asp Ile

20 25 30

Leu Glu Arg His Ile Arg Ile Ile Ile Pro Val Asn Ser Arg Glu Asn
35 40 45

Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Val Arg Thr Lys Phe Val Tyr His Leu
50 55 60

Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Val Glu Leu Asp Asn
65 70 75 80

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

Thr Cys Tyr Ala Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Arg Val Pro

100 105 110

Leu Thr Tyr Gly Gly Gln Thr Lys Ile Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro
115 120 125

Asp Ser Cys Tyr Pro Asp

130

<210> 21

<211> 136

<212> PRT

<213> *Cavia porcellus*

<400>

> 21

Glu Glu Glu Arg Thr Val Leu Ala Asp Asn Lys Cys Gln Cys Ala Arg

1 5 10 15

Val Thr Ser Arg Val Ile Arg Asn Pro Asp Asn Pro Val Glu Asp Ile

20 25 30

Val Glu Arg His Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Ser Arg Glu Asn

35 40 45

Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Lys Phe Val Tyr His Leu

50 55 60

Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Val Glu Leu Asp Asp

65 70 75 80

Gln Val Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Leu Cys Glu Asp Asp Arg Glu

85 90 95

Pro Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Val

100 105 110

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

115 120 125

Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp

130 135

<210> 22

<211> 134

<212> PRT

<213> *Camelus ferus*

<400> 22

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

1 5 10 15

Ile Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Pro Glu Asp Pro Ser Gln Asp Ile

20 25 30

Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn
35 40 45

Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Lys Phe Glu Tyr His Leu
50 55 60

Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Leu Thr Glu Val Glu Leu Gly Asn
65 70 75 80

Arg Val Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Leu Cys Asp Asp Asp Ile Glu
85 90 95

Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Lys Val Pro
100 105 110

Phe Thr Tyr Asp Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro
115 120 125

Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
130

<210> 23

<211> 134

<212> PRT

<213> Capra hircus

<400> 23

Glu Asn Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg
1 5 10 15

Ile Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Ala Glu Asp Pro Ser Gln Asp Ile
20 25 30

Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Ser Arg Glu Asn
35 40 45

Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Met Arg Thr Lys Phe Val Tyr His Leu
50 55 60

Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Thr Arg Glu Val Glu Leu Glu Asp
65 70 75 80

Gln Val Val Thr Ala Ser Gln Ser Asn Ile Cys Asp Arg Asp Thr Glu
85 90 95

Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Arg Val Lys
100 105 110

Leu Asn Tyr Arg Gly Gln Thr Lys Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro
115 120 125

Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
130

<210> 24

<211> 136

<212> PRT

<213> Chinchilla lanigera

<400> 24

Glu Glu Lys Lys Thr Ile Leu Ala Asp Asn Lys Cys Gln Cys Ala Arg
1 5 10 15

Val Ser Ser Arg Val Ile Arg Ser Pro Glu Asn Pro Asn Glu Asp Ile
20 25 30

Val Glu Arg Tyr Ile Arg Ile Ile Val Pro Val Asn Asn Arg Glu Asn
35 40 45

Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Arg Arg Thr Gln Phe Val Tyr His Leu
50 55 60

Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Val Glu Leu Asn Asn
65 70 75 80

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

Pro Glu Thr Cys Tyr Ala Tyr Asn Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala Val
100 105 110

Val Pro Leu Thr Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Pro Val Lys Val Ala Leu
115 120 125

Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Ala Asp
130 135

<210> 25

<211> 137

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<400> 25

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

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

Leu Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
 130 135

<210> 26

<211> 134

<212> PRT

<213> Ovis aries

<400> 26

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

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

Leu Asn Tyr Arg Gly Gln Thr Lys Leu Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro
115 120 125
Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
130

<210> 27

<211> 134

<212> PRT

<213> Myotis lucifugus

<400> 27

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

Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Val Asn Asn Arg Glu Asn
35 40 45

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

Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Lys Val Pro
100 105 110
Phe Ser Tyr Gly Gly Lys Thr Val Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro

115 120 125
 Glu Ser Cys Tyr Pro Asp
 130
 <210> 28
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> *Pantholops hodgsonii*
 <400> 28
 Glu Asn Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg
 1 5 10 15

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

 Gln Val Val Thr Ala Ser Gln Ser Asn Ile Cys Asp Arg Asp Thr Glu
 85 90 95
 Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Arg Val Lys
 100 105 110
 Leu Asn Tyr Arg Gly Gln Thr Lys Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro
 115 120 125
 Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
 130
 <210> 29
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> *Bos taurus*
 <400> 29

 Glu Asn Glu Arg Ile Val Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg Ile

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

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

Ser Cys Tyr Pro Asp

130

<210> 30

<211> 137

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 30

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

50

55

60

Ser Asp Val Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Val Glu Leu Glu Asp
65 70 75 80

Gln Val Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asn Glu Asp Asp Gly
85 90 95
Val Pro Glu Thr Cys Tyr Met Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Thr
100 105 110
Met Val Pro Leu Arg Tyr His Gly Glu Thr Lys Met Val Gln Ala Ala
115 120 125
Leu Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
130 135
<210> 31
<211> 137
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus
<400> 31
Asp Asn Lys Gly Thr Ile Leu Ala Asp Asn Lys Cys Met Cys Thr Arg
1 5 10 15
Ile Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Pro Glu Asp Pro Asn Glu Asp Ile
20 25 30
Val Glu Arg Ser Ile Arg Ile Val Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn
35 40 45
Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Val Arg Thr Asn Phe Val Tyr His Leu
50 55 60
Ser Asp Val Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Val Glu Leu Glu Asp
65 70 75 80
Gln Val Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Ser Gly Asp Ser Gly
85 90 95
Val Pro Glu Thr Cys Tyr Met Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala
100 105 110
Met Val Pro Leu Arg Tyr His Gly Glu Thr Lys Met Val Gln Thr Ala
115 120 125
Leu Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
130 135
<210> 32

<211> 133

<212> PRT

<213> Echinops telfairi

<400> 32

Lys Asp Glu Gly Thr Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Val Arg

1 5 10 15

Val Thr Ala Arg Ser Ile Pro Ser Thr Glu Asp Pro Asn Glu Glu Ile

20 25 30

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

35 40 45

Ile Ser Asp Pro Asn Ser Pro Val Arg Thr Thr Phe Val Tyr His Met

50 55 60

Thr Asp Leu Tyr Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Val Glu Leu Asp Asn

65 70 75 80

Gln Val Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Gly Cys Asp Glu Asp Glu Thr

85 90 95

Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn Val Val Pro Leu

100 105 110

Thr Tyr Gly Gly Lys Thr Tyr Met Val Arg Thr Ala Leu Thr Pro Asp

115 120 125

Ser Cys Tyr Pro Asp

130

<210> 33

<211> 136

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 33

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

1 5 10 15

Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Asp Pro Asp Asn Pro Ser Glu Asp Ile

20 25 30

Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Thr Arg Glu Asn

35 40 45
 Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Glu Phe Lys Tyr Asn Leu
 50 55 60
 Ala Asn Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Ile Glu Leu Asp Asn

 65 70 75 80
 Gln Val Phe Thr Ala Ser Gln Ser Asn Ile Cys Pro Asp Asp Asp Tyr
 85 90 95
 Ser Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Thr Leu
 100 105 110
 Val Pro Ile Thr His Arg Gly Gly Thr Arg Met Val Lys Ala Thr Leu
 115 120 125
 Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp
 130 135

<210> 34

<211> 134

<212> PRT

<213> *Monodelphis domestica*

<400> 34

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

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

Leu Tyr Leu Glu Gly Glu Thr Arg Leu Val Thr Thr Ala Leu Thr Pro

115 120 125

Glu Ser Cys Tyr Asn Asp

130

<210> 35

<211> 134

<212> PRT

<213> Alligator mississippiensis

<400> 35

Glu Glu Trp Glu Glu His Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Gln Cys Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Leu Glu Arg Asn Ile Arg Val Ile Val Pro Leu Lys Ser Arg Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Thr Thr Phe Pro

100 105 110

Phe Ala Tyr Gly Gly Gln Thr Lys Asn Ile Glu Ala Ala Leu Thr Pro

115 120 125

Ala Ser Cys Tyr Ala Asp

130

<210> 36

<211> 134

<212> PRT

<213> Chrysemys picta

<400> 36

Glu Glu Ala Glu Glu His Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ser Lys Phe Val Pro Ser Lys Asp Asn Pro Gln Glu Glu
 20 25 30
 Val Leu Val Arg Asn Ile Arg Val Ile Val Pro Leu Leu Ser Arg Lys
 35 40 45
 Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Val Arg Thr Thr Phe Val Tyr Arg
 50 55 60
 Leu Ser Glu Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Gly
 65 70 75 80
 Asp Arg Val Val Thr Ala Glu Gln Ser Asn Asn Cys Ser Ser Ser Asp
 85 90 95
 Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Thr Thr Phe Pro
 100 105 110
 Phe Phe Tyr Gly Gly Lys Ile Asn Thr Val Gln Ala Ala Leu Thr Pro
 115 120 125
 Glu Ser Cys Tyr Ala Asp
 130
 <210> 37
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> *Sarcophilus harrisii*
 <400> 37
 Glu Asp Glu Gly Arg Ile Leu Val Asp Asn Lys Cys Gln Cys Val Arg
 1 5 10 15
 Val Thr Ser Arg Leu Val Pro Ser Lys Asp Asn Pro Glu Val Glu Val
 20 25 30
 Val Glu Arg Asn Ile Arg Leu Ile Val Pro Leu Lys Asn Arg Glu Asn
 35 40 45
 Ile Ser Asp Pro Asn Ser Pro Val Arg Thr Asn Phe Val Tyr Arg Leu
 50 55 60

Ser Asn Leu Cys Lys Lys Arg Asp Pro Ile Glu Leu Glu Leu Gly Asn

65					70					75					80
Glu	Ile	Val	Thr	Ala	Thr	Gln	Ser	Asn	Asn	Trp	Ser	Cys	Gly	Thr	Cys
					85				90						95
Tyr	Thr	Tyr	Asp	Arg	Asn	Lys	Cys	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	Leu	Leu	Asp
				100				105					110		
Leu	Gly	Gly	Lys	Ser	Thr	Met	Val	Thr	Thr	Ala	Leu	Thr	Pro	Glu	Ser
			115					120					125		
Cys	Tyr	Ser	Asp												
				130											
<210> 38															

<211> 125

<212> PRT

<213> Ornithorhynchus anatinus

<400> 38

Asn	Lys	Cys	Lys	Cys	Thr	Arg	Val	Thr	Ser	Lys	Phe	Val	Pro	Ser	Lys
1				5					10					15	
Glu	Asp	Pro	Ser	Val	Lys	Val	Leu	Glu	Arg	Asn	Ile	Arg	Val	Ile	Ile
			20					25					30		
Pro	Leu	Lys	Ala	Arg	Gln	Asn	Ile	Ser	Asp	Pro	Thr	Ser	Pro	Pro	Arg
		35					40					45			
Thr	Arg	Phe	Val	Tyr	Glu	Leu	Ser	Lys	Leu	Cys	Gln	Lys	Cys	Asp	Gln
	50					55					60				
Thr	Glu	Val	Glu	Leu	Asp	His	Glu	Val	Val	Thr	Ala	Thr	Arg	Gly	Asn
65					70					75				80	
Ser	Cys	Asp	Arg	Pro	Gly	Asp	Asp	Cys	Tyr	Thr	Tyr	Asp	Arg	Asn	Lys
				85					90					95	
Cys	Tyr	Met	Ser	Thr	Ile	Pro	Phe	Thr	Tyr	Gly	Gly	Glu	Thr	Lys	Val
			100					105					110		
Val	Asn	Thr	Val	Leu	Thr	Pro	Glu	Ser	Cys	Tyr	Pro	Asp			
		115					120					125			

<210> 39

<211> 133

<212> PRT

<213> *Melopsittacus undulatus*

<400> 39

Glu Asp Met Glu Arg Val Leu Val Asn Asn Lys Cys Gln Cys Val Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Ile Tyr Lys Ala Gln Gln Ser Asn Ser Cys Asp Glu Pro Glu Thr

85 90 95

Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asp Lys Cys Tyr Thr Thr Asn Phe Pro Phe

100 105 110

Leu Tyr His Gly Glu Thr Lys Asn Leu Gln Ala Val Leu Thr Pro Ala

115 120 125

Ser Cys Tyr Ala Asp

130

<210> 40

<211> 133

<212> PRT

<213> *Anas platyrhynchos*

<400> 40

Asp Gly Glu Glu Arg Val Leu Val Asn Asn Lys Cys Lys Cys Thr Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

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

Cys Tyr Thr Tyr Asn Arg Asp Lys Cys Tyr Thr Thr Thr Phe Pro Phe
 100 105 110
 Ile Tyr His Gly Glu Thr Lys His Ile Gln Ala Ala Leu Thr Pro Ala
 115 120 125
 Ser Cys Tyr Ala Asp
 130

<210> 41

<211> 133

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 41

Asp Gly Glu Glu Arg Val Leu Val Asn Asn Lys Cys Lys Cys Val Thr
 1 5 10 15
 Val Thr Ser Lys Phe Val Pro Ser Lys Asp Asn Pro Glu Glu Glu Val

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

100 105 110
Val Tyr His Gly Glu Thr Lys His Ile Gln Ala Ala Leu Thr Pro Thr
115 120 125

Ser Cys Tyr Ala Glu
130

<210> 42

<211> 133

<212> PRT

<213> Meleagris gallopavo

<400> 42

Asp Gly Glu Glu Arg Val Leu Val Asn Asn Lys Cys Lys Cys Val Thr

1 5 10 15
Val Thr Ser Lys Phe Val Pro Ser Lys Asp Asn Pro Glu Glu Glu Val
20 25 30

Leu Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Lys Ser Arg Gln Asn
35 40 45

Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Asn Phe Val Tyr Arg Met
50 55 60

Thr Glu Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Ile Glu Leu Gly Gly

65 70 75 80
Glu Thr Tyr Gln Ala Gln Gln Ser Thr Ser Cys Asn Glu Pro Glu Thr
85 90 95

Cys Tyr Thr Tyr Asn Arg Asp Lys Cys Tyr Thr Thr Thr Ile Pro Phe
100 105 110

Val Tyr Gln Gly Glu Thr Lys Gln Ile Gln Ala Ala Leu Thr Pro Ala
115 120 125

Ser Cys Tyr Ala Asp
130

<210

> 43

<211> 132

<212> PRT

<213> Falco peregrinus

<400> 43

Asp Asp Glu His Val Leu Val Asn Asn Lys Cys Gln Cys Val Thr Val
1 5 10 15

Thr Ser Lys Phe Val Pro Ser Lys Glu Asp Pro Gly Glu Glu Val Leu
20 25 30

Glu Arg Asn Ile Arg Ile Leu Val Pro Leu Arg Ala Arg Glu Asn Ile
35 40 45

Ser Asp Pro Met Ser Pro Leu Arg Thr Thr Phe Val Tyr Arg Met Thr

50 55 60

Glu Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Val Glu Val Glu Leu Gly Gly Glu
65 70 75 80

Ile Tyr Lys Ala Gln Gln Ser Thr Ser Cys Asn Glu Pro Glu Thr Cys
85 90 95

Tyr Thr Tyr Asn Arg Asp Lys Cys Tyr Thr Thr Thr Phe Pro Phe Ser
100 105 110

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

115 120 125

Cys Tyr Ala Asp

130

<210> 44

<211> 130

<212> PRT

<213> *Zonotrichia albicollis*

<400> 44

Asp Glu Glu Tyr Val Leu Val Asn Asn Lys Cys Gln Cys Val Thr Val
1 5 10 15

Thr Ser Lys Phe Val Pro Ser Gln Glu Asn Pro Gln Glu Glu Val Leu
20 25 30

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

35 40 45

Ser Asp Pro Leu Ser Pro Leu Arg Thr Thr Phe Val Tyr Arg Leu Ser

50 55 60

Glu Leu Cys Lys Asn Cys Glu Pro Ile Glu Ile Asp Leu Gly Gly Ala
65 70 75 80
Ile His Gln Ala Gln Gln Gly Asn Ser Cys Glu Glu Pro Gln Thr Cys
85 90 95
Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Glu Cys Tyr Ser Ser Pro Val Pro Leu Leu
100 105 110
His His Gly Glu Val Met Gln Val Pro Ala Ala Leu Thr Pro Asp Ser
115 120 125
Cys Phe
130
<210> 45
<211> 169
<212> PRT
<213> Pteropus alecto
<400> 45
Glu Asp Glu Arg Ile Leu Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg
1 5 10 15
Ile Thr Ser Arg Ile Ile Pro Ser Pro Glu Asp Pro Ser Gln Asp Ile
20 25 30
Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Lys Leu Gly Asp Glu Lys Ser Met Val
35 40 45
Asn Leu Trp Asn Cys Lys Leu Leu Cys Thr Ala Gly Leu Gln Ser Lys
50 55 60
Glu Gly Gly Met Val Ala Asp Thr Ala Gly Lys Val Pro Leu Asn Asn
65 70 75 80
Arg Glu Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Arg Arg Thr Asn Phe Val
85 90 95
Tyr His Leu Ser Asp Leu Cys Lys Asn Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu
100 105 110
Leu Asp Asn Gln Val Val Thr Val Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu
115 120 125
Asp Asn Glu Thr Cys Tyr Ala Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Asn

130 135 140
Arg Val Pro Leu Leu Tyr Gly Gly Lys Thr Ile Met Val Glu Thr Ala
145 150 155 160

Leu Thr Pro Asp Ser Cys Tyr Pro Asp

165

<210> 46

<211> 436

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 46

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg

20 25 30

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

35 40 45

Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn

65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp

115 120 125

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

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser

145 150 155 160

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

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

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

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

Thr Ala Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp Gly Gly Gly Ser Glu
405 410 415

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His
420 425 430

His His His His
435

<210> 47

<211> 439

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 47

Met Lys Asn His Leu Leu Phe Trp Gly Val Leu Ala Val Phe Ile Lys
1 5 10 15

Ala Val His Val Lys Ala Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp

20 25 30

Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser

35 40 45

Glu Asp Pro Asn Glu Asp Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val

50 55 60

Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg

65 70 75 80

Thr Arg Phe Val Tyr His Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Asn Lys Cys Tyr Thr Ala Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met

195 200 205

His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

275 280 285

Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

290 295 300

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

305 310 315 320

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser

325 330 335

Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys

340 345 350

Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His

355 360 365

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

370 375 380

Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser

385 390 395 400
Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly

 405 410 415
Gly Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val

 420 425 430
Asp His His His His His His

 435

<210> 48

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 48

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

1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

65 70 75 80

Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

100 105 110

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

115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235

<210> 49

<211> 593

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 49

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn

65 70 75 80

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

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

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

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

325					330					335						
Cys	Arg	Val	Asp	His	Arg	Gly	Leu	Thr	Phe	Gln	Gln	Asn	Ala	Ser	Ser	
340					345					350						
Met	Cys	Val	Pro	Asp	Gln	Asp	Thr	Ala	Ile	Arg	Val	Phe	Ala	Ile	Pro	
355					360					365						
Pro	Ser	Phe	Ala	Ser	Ile	Phe	Leu	Thr	Lys	Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Cys	
370					375					380						
Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Thr	Tyr	Asp	Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Trp	Thr	
385					390					395					400	
Arg	Gln	Asn	Gly	Glu	Ala	Val	Lys	Thr	His	Thr	Asn	Ile	Ser	Glu	Ser	
405					410					415						
His	Pro	Asn	Ala	Thr	Phe	Ser	Ala	Val	Gly	Glu	Ala	Ser	Ile	Cys	Glu	
420					425					430						
Asp	Asp	Trp	Asn	Ser	Gly	Glu	Arg	Phe	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	His	Thr	
435					440					445						
Asp	Leu	Pro	Ser	Pro	Leu	Lys	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Lys	Gly	Val	
450					455					460						
Ala	Leu	His	Arg	Pro	Asp	Val	Tyr	Leu	Leu	Pro	Pro	Ala	Arg	Glu	Gln	
465					470					475					480	
Leu	Asn	Leu	Arg	Glu	Ser	Ala	Thr	Ile	Thr	Cys	Leu	Val	Thr	Gly	Phe	
485					490					495						
Ser	Pro	Ala	Asp	Val	Phe	Val	Gln	Trp	Met	Gln	Arg	Gly	Gln	Pro	Leu	
500					505					510						
Ser	Pro	Glu	Lys	Tyr	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Met	Pro	Glu	Pro	Gln	Ala	
515					520					525						
Pro	Gly	Arg	Tyr	Phe	Ala	His	Ser	Ile	Leu	Thr	Val	Ser	Glu	Glu	Glu	
530					535					540						
Trp	Asn	Thr	Gly	Glu	Thr	Tyr	Thr	Cys	Val	Val	Ala	His	Glu	Ala	Leu	
545					550					555					560	
Pro	Asn	Arg	Val	Thr	Glu	Arg	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Gly	Lys	Pro	
565					570					575						

Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys
580 585 590

Tyr

<210> 50

<211> 412

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 50

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ile Ser Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr His Tyr Asn

65 70 75 80

Gln Lys Leu Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr

115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser

130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln

145 150 155 160

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

165 170 175

Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys

180 185 190

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala

195 200 205

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

210 215 220

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr

225 230 235 240

Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys

245 250 255

Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

260 265 270

Gly Gly Ser Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys

275 280 285

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

290 295 300

Asn Glu Asp Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn

305 310 315 320

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

325 330 335

Val Tyr His Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405

410

<210> 51

<211> 415

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 51

Met Lys Asn His Leu Leu Phe Trp Gly Val Leu Ala Val Phe Ile Lys

1 5 10 15

Ala Val His Val Lys Ala Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp

20 25 30

Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser

35 40 45

Glu Asp Pro Asn Glu Asp Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val

50 55 60

Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg

65 70 75 80

Thr Arg Phe Val Tyr His Leu Ser Asp Leu Cys Lys Lys Cys Asp Pro

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Asn Lys Cys Tyr Thr Ala Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190
Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr Thr Met

195 200 205
His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Tyr

210 215 220
Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr His Tyr Asn Gln Lys Leu Lys Asp

225 230 235 240
Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu

245 250 255
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

260 265 270
Ser Ala Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

275 280 285
Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

290 295 300
Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu

305 310 315 320
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser

325 330 335
Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

340 345 350
Lys Arg Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser

355 360 365
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

370 375 380
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser

385 390 395 400
Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

405 410 415
<210> 52

<211> 293

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 52

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Tyr Asn Met Gly Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Ala Asn Pro Trp Pro Val Ala Ala Pro Arg Ser Gly

115 120 125

Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Glu Asp Glu

145 150 155 160

Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg Ile Thr Ser

165 170 175

Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp Ile Val Glu Arg

180 185 190

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

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

260 265 270
Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro Asp
275 280 285
Ala Cys Tyr Pro Asp

290
<210> 53
<211> 137
<212> PRT
<213> Gorilla gorilla
<400> 53

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

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

85 90 95

Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala
100 105 110

Val Val Pro Leu Val Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Lys Thr Ala
115 120 125

Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp
130 135

<210> 54

<211> 137

<212> PRT

<213> Nomascus leucogenys

<400> 54

Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala

1 5 10 15
Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile His Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp
20 25 30

Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu
35 40 45

Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His
50 55 60

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

65 70 75 80
Asn Gln Ile Val Ile Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser
85 90 95

Ala Thr Glu Thr Cys Tyr Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala
100 105 110

Val Val Pro Leu Leu Tyr Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Thr Ala
115 120 125

Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp
130 135

<210> 55

<211> 417

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 55

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser

145 150 155 160

Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser

165 170 175

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro

180 185 190

Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

195 200 205

Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

210 215 220
 Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 225 230 235 240

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

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

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

<210> 56

<211> 413

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 56

Gln Glu Asp Glu Arg Ile Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala

1 5 10 15

Arg Ile Thr Ser Arg Ile Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp

20 25 30

Ile Val Glu Arg Asn Ile Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu

35 40 45

Asn Ile Ser Asp Pro Thr Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His

50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Gln Ile Val Thr Ala Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Leu Thr Pro Asp Ala Cys Tyr Pro Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly

145 150 155 160

Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala

165 170 175

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser
 225 230 235 240
 Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr
 245 250 255

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

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

Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
 385 390 395 400
 Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 405 410

<210> 57

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 6His tag"

<400> 57

His His His His His His

1

5