



공개특허 10-2024-0093725

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0093725
(43) 공개일자 2024년06월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/78 (2024.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01) *A61P 43/00* (2006.01)
C07K 14/765 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 14/78 (2024.01)
A61K 38/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-7016329(분할)

(22) 출원일자(국제) 2016년03월11일

심사청구일자 2024년06월03일

(62) 원출원 특허 10-2017-7028780

원출원일자(국제) 2016년03월11일

심사청구일자 2021년03월10일

(85) 번역문제출일자 2024년05월16일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/022003

(87) 국제공개번호 WO 2016/145307

국제공개일자 2016년09월15일

(30) 우선권주장

62/132,198 2015년03월12일 미국(US)

(71) 출원인
메디뮨 엘엘씨
미국 20878 메릴랜드주 게이테르스부르크 원 메디뮨 웨이

(72) 발명자
팝스트 티모시
미국 20878 메릴랜드주 게이테르스부르크 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨 내

존세카 마리코
미국 20878 메릴랜드주 게이테르스부르크 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨 내
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
김진희, 김태홍

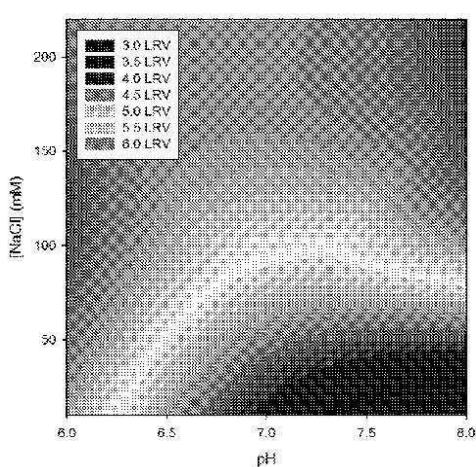
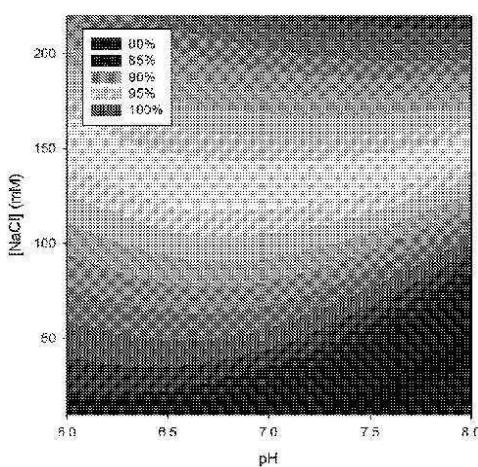
전체 청구항 수 : 총 40 항

(54) 발명의 명칭 알부민 융합 단백질의 정제 방법

(57) 요약

본 발명은 취약한 아미노산 잔기의 산화 수준을 감소시키기 위한 알부민 융합 단백질을 정제하는 방법에 관한 것이다. 이러한 방법은 친화성 매트릭스 크로마토그래피 단계 및 음이온 교환 크로마토그래피 단계를 포함한다. 정제된 알부민 융합 단백질은 낮은 수준의 산화를 나타내며, 생체 내에서 향상된 반감기 및 생체 활성을 유지한다. 일부 구현예에서, 알부민 융합 단백질은 인간 테나신 C 스파스카폴드와 같은 스파스카폴드를 포함한다. 이러한 알부민 융합 단백질을 포함하는 조성물이 추가적으로 개시된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

A61K 47/643 (2017.08)

A61P 43/00 (2018.01)

C07K 14/765 (2013.01)

C07K 2319/31 (2013.01)

(72) 발명자

톰슨 크리스토퍼

미국 20878 메릴랜드주 게이티드스부르크 원 메디
문 웨이 메디뮨 엘엘씨 내

헌터 앤런

미국 20878 메릴랜드주 게이티드스부르크 원 메디
문 웨이 메디뮨 엘엘씨 내

왕 시양양

미국 20878 메릴랜드주 게이티드스부르크 원 메디
문 웨이 메디뮨 엘엘씨 내

티에 리우

미국 20878 메릴랜드주 게이티드스부르크 원 메디
문 웨이 메디뮨 엘엘씨 내

리 위밍

미국 20878 메릴랜드주 게이티드스부르크 원 메디
문 웨이 메디뮨 엘엘씨 내

명세서

청구범위

청구항 1

CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는 Tn3 스카폴드를 포함하는 조성물로서,

상기 단량체 서브유닛은 A, B, C, D, E, F 및 G로 명명되는 7개의 베타 가닥과 AB, BC, CD, DE, EF 및 FG로 명명되는 6개의 루프 영역을 포함하고,

상기 AB 루프는 서열 번호 4를 포함하고, BC 루프는 서열 번호 86을 포함하고, CD 루프는 서열 번호 6을 포함하고, DE 루프는 서열 번호 96을 포함하고, EF 루프는 서열 번호 8을 포함하고, FG 루프는 서열 번호 139를 포함하고,

상기 복수의 Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛의 DE 루프 서열에 산화되지 않은 트립토판 잔기를 포함하는, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 산화되지 않은 트립토판 잔기는 서열 번호 145의 W46인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 산화되지 않은 트립토판 잔기는 서열 번호 145의 W151인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 Tn3 스카폴드는 제2 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는 것인 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 산화되지 않은 트립토판 잔기는 서열 번호 145의 W46 및/또는 W151에 있는 것인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 서열번호 167의 폴리펩티드 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 CD40L 특이적 단량체 서브유닛과 상기 제2 CD40L 특이적 단량체 서브유닛이 폴리펩티드 링커에 의해 직렬로 연결되는 것인 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 폴리펩티드 링커가 서열 번호 131, 서열 번호 132, 서열 번호 142, 및 서열 번호 143으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 폴리펩티드 링커가 서열 번호 142의 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 폴리펩티드 링커가 서열 번호 143의 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 11

제4항에 있어서, 상기 CD40L 특이적 단량체 서브유닛 중 하나가 이종 잔기에 결합되는 것인 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 이종 잔기가 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 세포독성제, 방사성 핵종, 영상화제, 비오틴, 이량체화 도메인, 인간 혈청 알부민(HSA) 또는 이의 FcRn 결합 부분, 항체의 단편 또는 도메인, 단일쇄 항체, 도메인 항체, 알부민 결합 도메인, IgG 분자, 효소, 리간드, 수용체, 결합 웨პ티드, 비 FnIII 스캐폴드, 에피토프 태그, 재조합 폴리펩티드 중합체 및 사이토카인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 이종 잔기가 HSA인 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 HSA가 야생형(WT) HSA와 비교하여 변이체 HSA인 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 변이체 HSA가 서열 번호 133을 포함하는 것인 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 CD40L 특이적 단량체 서브유닛과 상기 제2 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 서열이 동일한 것인 조성물.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 CD40L 특이적 단량체 서브유닛과 상기 제2 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 서열이 상이한 것인 조성물.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 베타 A 가닥은 서열 번호 11로 이루어지고, 상기 베타 B 가닥은 서열 번호 12로 이루어지고, 상기 베타 C 가닥은 서열 번호 14로 이루어지고, 상기 베타 D 가닥은 서열 번호 15로 이루어지고, 상기 베타 E 가닥은 서열 번호 16으로 이루어지고, 상기 베타 F 가닥은 서열 번호 17로 이루어지고, 베타 G 가닥은 서열 번호 18로 이루어지는 것인 조성물.

청구항 19

제14항에 있어서, 상기 Tn3 스캐폴드는 서열 번호 145의 폴리펩티드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 20

(a) CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는 Tn3 스캐폴드로서,

상기 단량체 서브유닛은 A, B, C, D, E, F 및 G로 명명되는 7개의 베타 가닥과 AB, BC, CD, DE, EF 및 FG로 명명되는 6개의 루프 영역을 포함하고,

상기 AB 루프는 서열 번호 4를 포함하고, BC 루프는 서열 번호 86을 포함하고, CD 루프는 서열 번호 6을 포함하고, DE 루프는 서열 번호 96을 포함하고, EF 루프는 서열 번호 8을 포함하고, FG 루프는 서열 번호 139를 포함하고,

상기 복수의 Tn3 스캐폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛의 DE 루프 서열에 산화되지 않은 트립토판 잔기를 포함하는 Tn3 스캐폴드; 및

(b) 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물.

청구항 21

두 개의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는 Tn3 스캐폴드를 포함하는 조성물로서,

상기 단량체 서브유닛은 A, B, C, D, E, F 및 G로 명명되는 7개의 베타 가닥과 AB, BC, CD, DE, EF 및 FG로 명

명되는 6개의 루프 영역을 포함하고,

상기 AB 루프는 서열 번호 4를 포함하고, BC 루프는 서열 번호 86을 포함하고, CD 루프는 서열 번호 6을 포함하고, DE 루프는 서열 번호 96을 포함하고, EF 루프는 서열 번호 8을 포함하고, FG 루프는 서열 번호 139를 포함하고,

상기 복수의 Tn3 스카폴드는 서열 번호 145의 W46 및 W151에 있는 산화되지 않은 트립토판을 포함하는 조성물.

청구항 22

CD40 매개 면역 반응 치료용 약제 제조에 있어서의 Tn3 스카폴드의 용도로서, 상기 치료는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는 Tn3 스카폴드를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하고,

상기 단량체 서브유닛은 A, B, C, D, E, F 및 G로 명명되는 7개의 베타 가닥과 AB, BC, CD, DE, EF 및 FG로 명명되는 6개의 루프 영역을 포함하고,

상기 AB 루프는 서열 번호 4를 포함하고, BC 루프는 서열 번호 86을 포함하고, CD 루프는 서열 번호 6을 포함하고, DE 루프는 서열 번호 96을 포함하고, EF 루프는 서열 번호 8을 포함하고, FG 루프는 서열 번호 139를 포함하고,

상기 복수의 Tn3 스카폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛의 DE 루프 서열에 산화되지 않은 트립토판 잔기를 포함하고,

상기 투여는 Cd40 매개 면역 반응을 감소시키는 데 효과적인 용도.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 산화되지 않은 트립토판 잔기는 서열 번호 145의 W46인 용도.

청구항 24

제22항에 있어서, 상기 산화되지 않은 트립토판 잔기는 서열 번호 145의 W151인 용도.

청구항 25

제22항에 있어서, 상기 Tn3 스카폴드는 제2 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는 것인 용도.

청구항 26

제22항에 있어서, 상기 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 서열번호 167의 폴리펩티드 서열을 포함하는 것인 용도.

청구항 27

제25항에 있어서, 상기 산화되지 않은 트립토판 잔기는 서열 번호 145의 W46 및 W151인 용도.

청구항 28

제25항에 있어서, 상기 CD40L 특이적 단량체 서브유닛과 상기 제2 CD40L 특이적 단량체 서브유닛이 폴리펩티드 링커에 의해 직렬로 연결되는 것인 용도.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 폴리펩티드 링커가 서열 번호 131, 서열 번호 132, 서열 번호 142, 서열 번호 143, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 것인 용도.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 폴리펩티드 링커가 서열 번호 142의 서열을 포함하는 것인 용도.

청구항 31

제29항에 있어서, 상기 폴리펩티드 링커가 서열 번호 143의 서열을 포함하는 것인 용도.

청구항 32

제25항에 있어서, 상기 CD40L 특이적 단량체 서브유닛 중 하나가 이종 잔기에 결합되는 것인 용도.

청구항 33

제25항에 있어서, 상기 이종 잔기가 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 세포독성제, 방사성 핵종, 영상화제, 비오틴, 이량체화 도메인, 인간 혈청 알부민(HSA) 또는 이의 FcRn 결합 부분, 항체의 단편 또는 도메인, 단일쇄 항체, 도메인 항체, 알부민 결합 도메인, IgG 분자, 효소, 리간드, 수용체, 결합 웹티드, 비 FnIII 스캐폴드, 에피토프 태그, 재조합 폴리웹티드 중합체 및 사이토카인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 용도.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 이종 잔기가 HSA인 용도.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 HSA가 야생형(WT) HSA와 비교하여 변이체 HSA인 용도.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 변이체 HSA가 서열 번호 133을 포함하는 것인 용도.

청구항 37

제35항에 있어서, 상기 CD40L 특이적 단량체 서브유닛과 상기 제2 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 서열이 동일한 것인 용도.

청구항 38

제35항에 있어서, 상기 CD40L 특이적 단량체 서브유닛과 상기 제2 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 서열이 상이한 것인 용도.

청구항 39

제32항에 있어서, 상기 베타 A 가닥은 서열 번호 11로 이루어지고, 상기 베타 B 가닥은 서열 번호 12로 이루어지고, 상기 베타 C 가닥은 서열 번호 14로 이루어지고, 상기 베타 D 가닥은 서열 번호 15로 이루어지고, 상기 베타 E 가닥은 서열 번호 16으로 이루어지고, 상기 베타 F 가닥은 서열 번호 17로 이루어지고, 베타 G 가닥은 서열 번호 18로 이루어지는 것인 용도.

청구항 40

제25항에 있어서, 상기 Tn3 스캐폴드는 서열 번호 145의 폴리웹티드를 포함하는 것인 용도.

발명의 설명**기술 분야**

[0001]

<서열 목록에 대한 참조>

[0002]

본 출원은 2015년 3월 12일 생성된 228 킬로바이트 크기의 "CD40L-300P1_SL.TXT"라는 명칭의 텍스트 파일로 EFS-웹을 통해 본 출원과 함께 제출된 서열 목록을 참조로 포함한다.

[0003]

<기술분야>

[0004]

본 발명은 일반적으로, 단백질의 트립토판 및/또는 메티오닌 잔기가 낮은 수준의 산화를 나타내는 알부민 융합 단백질을 정제하는 방법에 관한 것이다. 이를 잔기의 낮은 수준의 산화는 정제된 알부민 융합 단백질이 상대적인 효능 및 생물 활성을 유지할 수 있게 한다. 이러한 알부민 융합 단백질은 예를 들어 유용한 인간 테나신 C의 제3 피브로넥틴 III형 도메인으로부터 유래된 스캐폴드와 같은 스캐폴드를 포함할 수 있다. 본 발명은 알부민 융합 단백질을 정제하는 방법, 이러한 방법으로부터 수득된 정제된 단백질 및 정제된 알부민 융합 단백질을 포

함하는 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [0005] 최근 몇 년간 단백질을 잠재적인 치료제로 사용하는 것에 대한 관심이 증가했다. 단백질 약물의 한 가지 단점은 생체 내에서 짧은 반감기를 나타내는 경향이 있다는 점이다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 단백질과 펩티드를 다른 분자들과 접합하거나 융합할 수 있다. 반감기 연장을 위한 한 가지 옵션은 여러 가지 이용할 수 있는 화학을 통해 폴리(에틸렌글리콜) 또는 PEG를 단백질에 공유적으로 부착시키는 공정인 폐길화(PEGylation)에 의한 것이다. 반감기 연장 이외에도, 폐길화는 아마도 불활성 PEG 사슬에 의해 단백질 표면을 차폐하여 면역원성을 감소시킬 수도 있다. 폐길화의 단점은 접합 반응 단계가 필요하다는 점과 종종 반응하지 않은 PEG 사슬을 제거하기 위해 추가적인 정제 단계가 필요하다는 점이다. 이러한 문제점에도 불구하고 폐길화 기술은 여러 상업적인 생물 약제에 성공적으로 이용되었다.
- [0006] 반감기를 연장하기 위한 두 번째 옵션은 융합 단백질 기술이다. 이 경우, 생체 내에서 반감기를 연장하기 위해 설계된 제2의 단백질에 치료 단백질을 유전적으로 융합시킨다. 이러한 옵션은 폐길화와 비슷한 반감기 연장을 제공한다. 그러나 이러한 융합 단백질은 단일 개체로 발현되고 정제되므로 추가적인 제조 단계들(접합 반응 및 관련된 정제)이 필요 없다. 융합 단백질의 예로는 Fc 융합체, 트랜스페린 융합체 및 알부민 융합체가 있다. 이러한 단백질 전부는 인간 혈장에서 높은 수준으로 발견되며, 약물로 인해 증가된 수준의 영향력을 완화한다.
- [0007] 반감기 연장 및 제조의 용이함이라는 장점 이외에도, 융합 단백질은 정제에 대한 플랫폼 접근법을 이용할 수도 있다. 이는 많은 경우에 운반 단백질이 융합 단백질의 많은 부분을 차지하여, 다양한 융합 단백질 사이에 비슷한 물리화학적 특성이 존재하기 때문이다. 플랫폼 접근법이 성공적이기 위해서는 정제 작업이 운반 단백질에 대해 선택적이어야 한다.
- [0008] 본 발명은 알부민 융합 단백질을 정제하는 방법에 관한 것이다.
- [0009] 본 설명의 참조에 대한 인용 또는 논의는 그것이 본 발명에 대한 선행 기술임을 인정하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

발명의 내용

- [0010] 특정 양태에서, 본 설명의 개시 내용은 알부민 융합 단백질을 정제하는 동안 트립토판 및/또는 메티오닌의 산화를 감소시키는 방법에 관한 것으로, 이러한 방법은 알부민 융합 단백질을 포함하는 조성물을 다음의 정제 공정: (a) 친화성 매트릭스; (b) 음이온 교환 매트릭스에 적용시키는 것을 포함하는데, 이때, 알부민 융합 단백질은 옥타노에이트를 포함하는 용리 완충액을 적용하여 친화성 매트릭스로부터 용리된다.
- [0011] 추가적인 양태에서, 본 설명의 개시 내용은 알부민 융합 단백질을 정제하는 동안 트립토판 및/또는 메티오닌의 산화를 감소시키는 방법에 관한 것으로, 이러한 방법은 알부민 융합 단백질을 포함하는 조성물을 다음의 정제 공정: (a) 친화성 매트릭스; (b) 음이온 교환 매트릭스에 적용시키는 것을 포함하는데, 이때, 친화성 매트릭스는 (1) 약 2% 내지 약 20% 폴리올(이때, 이러한 폴리올은 1,2-프로판디올, 1,3-프로판디올, 1,2-부탄디올, 1,3-부탄디올, 1,4-부탄디올, 1,6-헥산디올, 및 2-메틸-2,4-펜탄디올로 구성된 군으로부터 선택된다); (2) 0.05 M 내지 2.0 M 염(이때, 이러한 염은 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 염화리튬, 브롬화나트륨, 브롬화칼륨 및 브롬화리튬으로부터 선택된다); (3) 약 0.02 M 내지 약 0.2 M 황산나트륨; (4) 약 0.01% 내지 약 1% 비 이온성 계면활성제; (5) 약 0.05 M 내지 약 1.0 M 요소; 또는 (6) 약 0.02 M 내지 약 0.5 M 니코틴아미드를 포함하는 세척 완충액으로 세척된다.
- [0012] 추가적인 양태에서, 본 설명의 개시 내용은 산화된 트립토판 잔기가 본질적으로 없는 알부민 융합 단백질을 포함하는 조성물을 수득하는 방법에 관한 것으로, 이러한 방법은 산화된 트립토판 알부민 융합 단백질 및 산화되지 않은 트립토판 알부민 융합 단백질을 포함하는 조성물을 소수성 상호작용 매트릭스에 적용시키며, 이때, 산화된 트립토판 알부민 융합 단백질과 산화되지 않은 트립토판 알부민 융합 단백질은 상이한 시간에 소수성 상호작용 매트릭스로부터 용리되어, 산화되지 않은 트립토판 알부민 융합 단백질로부터 산화된 트립토판 알부민 융합 단백질을 분리하는 것을 포함한다.
- [0013] 특정 양태에서, 본 설명의 개시 내용은 트립토판/메티오닌 잔기의 산화가 본질적으로 없는 알부민 융합 단백질을 단리하는 방법에 관한 것으로, 이러한 방법은 알부민 융합 단백질을 다음의 정제 공정: (a) 친화성 매트릭스 크로마토그래피 공정; (b) 음이온 교환 크로마토그래피 공정; 및 (c) 소수성 상호작용 매트릭스 크로마토그래피

공정에 적용시키며, 이때, 옥타노에이트를 포함하는 용리 완충액이 친화성 매트릭스에 적용되고, 산화된 트립토판 알부민 융합 단백질과 산화되지 않은 트립토판 알부민 융합 단백질은 상이한 시간에 소수성 상호작용 매트릭스로부터 용리되어, 산화되지 않은 트립토판 알부민 융합 단백질로부터 산화된 트립토판 알부민 융합 단백질을 분리하는 것을 포함한다.

[0014] 추가적인 양태에서, 본 설명의 개시 내용은 알부민 융합 단백질을 정제하는 방법에 관한 것으로, 이러한 방법은 알부민 융합 단백질을 포함하는 조성물을 소수성 상호작용 매트릭스 및 다음의 정제 공정들: (a) 친화성 매트릭스(이때, 옥타노에이트를 포함하는 용리 완충액이 친화성 매트릭스에 적용된다); 및/또는 (b) 음이온 교환 매트릭스 중 하나 이상에 적용시키는 것을 포함하고; 이때, 친화성 매트릭스는 (1) 약 2% 내지 약 20% 폴리올(이때, 이러한 폴리올은 1,2-프로판디올, 1,3-프로판디올, 1,2-부탄디올, 1,3-부탄디올, 1,4-부탄디올, 1,6-헥산디올, 및 2-메틸-2,4-펜탄디올로 구성된 군으로부터 선택된다); (2) 0.05 M 내지 2.0 염(이때, 이러한 염은 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 염화리튬, 브롬화나트륨, 브롬화칼륨 및 브롬화리튬으로부터 선택된다); (3) 약 0.02 M 내지 약 0.2 M 황산나트륨; (4) 약 0.01% 내지 약 1% 비 이온성 계면활성제; (5) 약 0.05 M 내지 약 1.0 M 요소; 또는 (6) 약 0.02 M 내지 약 0.5 M 니코틴아미드를 포함하는 세척 완충액으로 세척되고, 이때, 그 결과로 얻어지는 정제된 알부민 융합 단백질은 산화된 트립토판 잔기가 본질적으로 없다.

[0015] 추가적인 양태에서, 본 설명의 개시 내용은 알부민 융합 단백질을 정제하는 방법에 관한 것으로, 이러한 방법은 (a) 알부민 융합 단백질을 포함하는 조성물을 친화성 매트릭스에 적용하기; (b) 알부민 융합 단백질을 (a)의 친화성 매트릭스로부터 용리시켜 제1 용리액을 수득하기; (c) 제1 용리액을 음이온 교환 매트릭스에 적용하기; (d) 알부민 융합 단백질을 음이온 교환 매트릭스로부터 용리시켜 제2 용리액을 수득하기; (e) 제2 용리액을 음이온 교환 막에 적용하기; 알부민 융합 단백질을 음이온 교환 막 사이로 통과시켜 플로 스루(flow through)를 수득하기; (f) 플로 스루를 소수성 상호작용 매트릭스에 적용하기; 알부민 융합 단백질을 소수성 상호작용 매트릭스로부터 용리시켜 제3 용리액을 수득하기를 포함하며, 이때, 제3 용리액은 정제된 알부민 융합 단백질을 포함한다.

[0016] 또한, 본 설명의 개시 내용은 본 설명에 개시된 방법들 중 임의의 것에 의해 수득된 알부민 융합 단백질 조성물에 관한 것이다.

[0017] 추가적으로, 본 설명의 개시 내용은 알부민 융합 단백질을 포함하는 조성물로, 이때, 이러한 조성물은 20 ng/mg 미만의 숙주 세포 단백질을 가지며, 트립토판 잔기의 15% 미만은 산화된 것인, 알부민 융합 단백질을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0018] 추가적으로, 본 설명의 개시 내용은 알부민 융합 단백질을 포함하는 조성물로, 이때, 이러한 조성물은 5×10^{-3} ng/mg 미만의 DNA를 가지며, 트립토판 잔기의 15% 미만이 산화된 것인, 알부민 융합 단백질을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0019] 추가적으로, 본 설명의 개시 내용은 알부민 융합 단백질을 포함하는 조성물로, 이때, 이러한 조성물은 20 ng/mg 미만의 숙주 세포 단백질을 가지며, 알부민 융합 단백질은 >90%의 상대적인 활성을 나타내는 것인, 알부민 융합 단백질을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0020] 또한, 본 설명의 개시 내용은 알부민 융합 단백질을 포함하는 조성물로, 이때, 이러한 조성물은 5×10^{-3} ng/mg 미만의 DNA를 가지며, 알부민 융합 단백질은 >90%의 상대적인 활성을 나타내는 것인, 알부민 융합 단백질을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0021] 추가적으로, 본 설명의 개시 내용은 서열 번호 134, 135, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207 또는 208의 알부민 융합 단백질을 포함하는 조성물에 관한 것으로, 이때, 이러한 조성물은 20 ng/mg 미만의 숙주 세포 단백질을 가지며, 46번 위치, 151번 위치, 또는 둘 다에 있는 트립토판은 산화되지 않은 것이다.

[0022] 또한, 본 설명의 개시 내용은 (a) 본 설명에 개시된 임의의 조성물; (b) 완충액 (c) 당; 및 (d) 유화제를 포함하는 약학적으로 허용 가능한 제형에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0023] 본 발명을 설명하기 위한 목적으로, 본 발명의 특정 구현예가 도면에 도시되어 있다. 그러나 본 발명은 도면에 도시된 구현예의 정확한 배열 및 수단으로 한정되지 않는다.

도 1은 rHSA 정제 공정의 일 구현예에 대한 흐름도를 도시한 것이다.

도 2는 300 cm/h로 조작한 rHSA에 대한 시바크론 블루(Cibacron blue) 염료 크로마토그래피의 대표적인 크로마토그램을 도시한 것이다.

도 3은 알부민 용합 정제 공정의 일 구현예에 대한 흐름도를 도시한 것이다.

도 4는 300 cm/h로 조작한 알부민 용합 단백질 #1(AFP-1)에 대한 시바크론 블루 염료 크로마토그래피의 대표적인 크로마토그램을 도시한 것이다.

도 5는 300 cm/hr로 조작한 AFP-1에 대한 대표적인 캡토(Capto) Q 크로마토그램을 도시한 것이다.

도 6은 10 MV/hr로 조작한 대표적인 무스탕(Mustang) Q 막 크로마토그램을 도시한 것이다.

도 7은 130 cm/hr로 밴드 및 용리(band-and-elute) 모드에서 조작한 대표적인 토요펄(Toyopearl) PPG-600M 크로마토그램을 도시한 것이다.

도 8a 내지 도 8b는 (A) 25mM 옥타노에이트 및 (B) 2M NaCl 용리 완충액을 이용한 알부민 용합 단백질의 시바크론 블루 염료 크로마토그래피를 도시한 것이다.

도 9a 내지 도 9b는 단계 수득률(도 7a) 및 DNA 로그 감소값(log reduction value, LRV)(도 7b)을 무스탕 Q 막 크로마토그래피를 위한 pH 및 NaCl 농도의 함수로서 도시한 것이다.

도 10은 알부민 용합 단백질의 상대적인 효능을 산화의 함수로서 도시한 것이다. □는 AFP-1의 메티오닌 M498을 나타내고, ○는 AFP-1의 트립토판 W46/W151을 나타내고, ◇는 AFP-1의 메티오닌 잔기 M74/M179를 나타내고, △는 AFP-1의 메티오닌 M529를 나타낸다.

도 11은 SEC-HPLC로 측정한 캡토 블루(Capto Blue, "블루") 및 캡토 Q("Q") 공정으로부터의 공정 중간물질에 대한 시간(일) 경과에 따른 트립토판 산화 개요를 도시한 것이다.

도 12는 캡토 MMC, 부틸-S 패스트 플로, 토요펄 PPG-600M 및 토요펄 페닐-650M을 비롯한, AFP-1에 대한 대표적인 HIC 크로마토그램을 보여준다.

도 14는 정제된 알부민 용합 단백질의 상대적인 효능을 부틸-S 패스트 플로(●) 또는 PPG-600M(○) 크로마토그래피 실행 도중 취한 HIC 분획 내의 HIC-HPLC 초기 종 함량의 함수로 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024]

정의

본 발명을 상세히 기술하기 전에, 본 발명은 특정 조성물 또는 공정 단계로 한정되지 않음을 이해해야 하는데, 이러한 조성물 또는 공정 단계는 변경될 수 있기 때문이다. 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바와 같이, 문맥이 명백히 달리 명시하지 않는 한, 단수형("a", "an" 및 "the")은 복수형의 지시대상을 포함함을 인식해야 한다. 용어 "하나"("a" 또는 "an")와 용어 "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본 설명에서 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0026]

나아가, 본 설명에 사용된 "및/또는"은 다른 특징 또는 성분과 함께 또는 다른 특징 또는 성분 없이 2개의 특정된 특징들 또는 성분들 각각의 특정한 개시 내용으로 간주되어야 한다. 따라서, 본 설명의 "A 및/또는 B"와 같은 어구에 사용된 용어 "및/또는"은 "A 및 B", "A 또는 B", "A"(단독) 및 "B"(단독)를 포함하고자 한 것이다. 마찬가지로, "A, B 및/또는 C"와 같은 어구에 사용된 용어 "및/또는"은 다음의 구현예 각각을 포함하고자 한 것이다: A, B 및 C; A, B 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A 및 B; B 및 C; A(단독); B(단독); 및 C(단독).

[0027]

달리 정의되어 있지 않은 한, 본 설명에 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 예를 들면, the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; 및 the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press은 본 발명에 사용된 용어들 대부분의 일반적인 사전을 당업자에게 제공한다.

[0028]

단위, 접두사 및 부호는 그것들의 국제 단위계(SI) 인정 형태로 표시된다. 수치 범위는 범위를 한정하는 수치를 포함한다. 달리 표시되어 있지 않은 한, 아미노산 서열은 아미노 배향으로부터 카르복시 배향으로 좌측부터 우

측으로 기재된다. 본 설명에 제공된 제목은 본 발명의 다양한 양태 또는 구현예를 제한한 것이 아니고, 본 명세서에 전체적으로 참조로 포함될 수 있다. 따라서, 바로 아래에 정의된 용어들은 본 명세서를 전체적으로 참조함으로써 보다 완전히 정의된다.

- [0029] 구현예가 본 설명에서 용어 "포함하는"으로 기술되는 모든 경우에, "~으로 구성된" 및/또는 "필수적으로 ~으로 구성된"의 관점에서 기술된 다른 유사한 구현예도 제공된다는 것이 이해된다.
- [0030] 아미노산은 통상적으로 공지된 세 글자 부호에 의해 또는 IUPAC-IUB 생화학 명명 협회가 권장한 한 글자 부호에 의해 본 설명에 언급되어 있다. 마찬가지로, 뉴클레오티드는 통상적으로 받아들여지는 한 글자 코드에 의해 지칭된다.
- [0031] 본 설명에 사용된 용어 "에피토프"는 본 발명의 스캐폴드에 결합할 수 있는 단백질 결정인자를 지칭한다. 에피토프는 일반적으로 분자의 화학적 활성 표면 기, 예컨대, 아미노산 또는 당 측쇄로 구성되고, 일반적으로 특이적인 3차원적 구조 특성뿐만 아니라 특이적인 전하 특성을 갖는다. 입체구조적 에피토프 및 비 입체구조적 에피토프는, 입체구조적 에피토프와의 결합은 변성 용매의 존재 하에서 상실되지만 비 입체구조적 에피토프와의 결합은 그러하지 않다는 점에서 구별된다.
- [0032] 용어 "파브로넥틴 III형(FnIII) 도메인", "FnIII 도메인" 및 "FnIII 스캐폴드"는, 스스로 서로 팩킹되어 단백질의 코어를 형성하는 2개의 베타 시트 사이에 분포된 적어도 7개의 베타 가닥을 갖고 이러한 베타 가닥들을 서로 연결하는 용매 노출된 루프를 추가로 함유하는 인간 파브로넥틴 III형 도메인에 대해 상동성을 나타내는 폴리펩티드를 지칭한다. 베타 시트 샌드위치의 각각의 가장자리에는 적어도 3개의 이러한 루프가 존재하고, 이때 이러한 가장자리는 베타 가닥의 방향과 직각을 이루는 단백질의 경계이다. 일부 구현예에서, FnIII 도메인은 AB, BC, CD, DE, EF 및 FG로 명명된 6개의 루프 영역에 연결된 A, B, C, D, E, F 및 G로 명명된 7개의 베타 가닥을 포함하는데, 이때 루프 영역은 각각의 베타 가닥을 연결한다.
- [0033] 본 설명에 사용된 용어 "Tn3 스캐폴드"는 적어도 하나의 FnIII 스캐폴드를 포함하는 분자로서, 이때, A 베타 가닥은 서열 번호 11을 포함하고, B 베타 가닥은 서열 번호 12를 포함하고, C 베타 가닥은 서열 번호 13 또는 14를 포함하고, D 베타 가닥은 서열 번호 15를 포함하고, E 베타 가닥은 서열 번호 16을 포함하고, F 베타 가닥은 서열 번호 17을 포함하고, 베타 가닥 G는 서열 번호 18을 포함하며, 적어도 하나의 루프는 "모(parent) Tn3 스캐폴드" 내 루프 중 비 자연발생적 변이체인 것인 분자를 지칭한다. 일부 구현예에서, Tn3 모들의 베타 가닥 중 하나 이상은 C 베타 가닥의 시스테인 잔기(예컨대, 서열 번호 13 또는 14의 시스테인) 및 F 베타 가닥(서열 번호 17)은 치환되지 않는다는 점을 제외하고는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0034] 본 설명에 사용된 용어 "모 Tn3"은 서열 번호 3을 포함하는 FnIII 스캐폴드, 즉, 인간 테나신 C의 제3 FnIII 도메인으로부터 유래된, 열적으로 안정화된 시스테인 조작된 FnIII 스캐폴드를 지칭한다.
- [0035] 용어 "다량체" 또는 "다량체 스캐폴드"는 적어도 2개의 FnIII 스캐폴드가 연결되어 포함하는 분자를 지칭한다. 다량체 스캐폴드를 형성하는 스캐폴드는 각각의 스캐폴드가 독립적으로 기능하게 하는 링커를 통해 연결될 수 있다.
- [0036] 용어 "단량체", "단량체 서브유닛" 또는 "단량체 스캐폴드"는 오로지 하나의 FnIII 스캐폴드를 포함하는 분자를 지칭한다.
- [0037] 본 설명에 사용된 용어 "CD40L 특이적 단량체 서브유닛"은 "모 Tn3"로부터 유래된 Tn3 단량체로, 이때, Tn3 단량체가 CD40L 또는 이의 단편, 예컨대, CD40L의 가용성 형태에 특이적으로 결합하는 것인 Tn3 단량체를 지칭한다.
- [0038] 용어 "DNA"는 둘 이상의 공유적으로 결합된, 자연적으로 발생하거나 변형된 데옥시리보뉴클레오티드로 이루어진 서열을 지칭한다.
- [0039] 용어 "융합 단백질"은 (ii) 제2의, 상이한 단백질(즉, "이종" 단백질)에 연결된 (i) 하나 이상의 치료 단백질 또는 단편을 포함하는 단백질을 지칭한다. 본 발명의 범위 내에서, 알부민(HSA, HSA의 변이체, 또는 단편 HSA)은 치료 단백질 또는 단편과 연결된다.

[0040]

"모 Tn3"의 서열 및 성분들의 서열 번호

명칭/간단한 설명	서열	서열 번호
Tn3	IEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGCELTGYGIKDVP GDRTTIDLTEDENQYSIGNLKPDTYEVSLICRRG DMSSNPAKETFTT (이황화결합의 시스테인 잔기는 밑줄로 표시하였다)	3
테나신 C의 제3 FnIII, AB 루프 (Tn3)	KDVTDTT	4
테나신 C의 제3 FnIII, BC 루프 (Tn3)	FKPLAEIDG	5
테나신 C의 제3 FnIII, CD 루프 (Tn3)	KDVPGDR	6
테나신 C의 제3 FnIII, DE 루프 (Tn3)	TEDENQ	7
테나신 C의 제3 FnIII, EF 루프 (Tn3)	GNLKPDT	8
테나신 C의 제3 FnIII, FG 루프 (Tn3)	RRGDMSSNPA	9
테나신 C의 제3 FnIII, 베타 가닥 A (Tn3)	RLDAPSQIEV	10
테나신 C의 제3 FnIII, 베타 가닥 A (Tn3) N 말단 절단	IEV	11
테나신 C의 제3 FnIII, 베타 가닥 B (Tn3)	ALITW	12
테나신 C의 제3 FnIII, 베타 가닥 C (Tn3 변이체)	CELAYGI	13
테나신 C의 제3 FnIII, 베타 가닥 C (Tn3)	CELTYGI	14
테나신 C의 제3 FnIII, 베타 가닥 D (Tn3)	TTIDL	15
테나신 C의 제3 FnIII, 베타 가닥 E (Tn3)	YSI	16
테나신 C의 제3 FnIII, 베타 가닥 F (Tn3)	YEVSLIC	17
테나신 C의 제3 FnIII, 베타 가닥 G (Tn3)	KETFTT	18

[0041]

용어 "이종 모이어티"는 본 발명의 Tn3 스캐폴드로의 조성물의 부가를 표시하기 위해 본 설명에서 사용된 것으로, 이때 이러한 조성물은 보통은 FnIII 도메인의 일부가 아니다. 예시적인 이종 모이어티는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 세포독성제, 방사성핵종, 조영제, 바이오틴, 이량체화 도메인(예를 들면, 류신 지퍼 도메인), 인간 혈청 알부민(HSA) 또는 이의 FcRn 결합 부분, 항체의 도메인 또는 단편(예를 들면, 항체 가변 도메인, CH1 도메인, C 카파 도메인, C람다 도메인, CH2 도메인 또는 CH3 도메인), 단일쇄 항체, 도메인 항체, 알부민 결합 도메인, IgG 분자, 효소, 리간드, 수용체, 결합 웹티드, 비 FnIII 스캐폴드, 에피토프 태그, 재조합 폴리펩티드 중합체, 사이토카인 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는, 단백질, 웹티드, 단백질 도메인, 링커, 약물, 독소, 조영제, 방사성 화합물, 유기 중합체, 무기 중합체, 및 FnIII 도메인 자체에 내재하지 않는 활성을 제공할 임의의 기타 조성물을 포함한다. 본 설명에 사용된 용어 "링커"는 2개 이상의 스캐폴드를 이어주거나 연결하는 임의의 문자 조립체를 지칭한다. 링커는 스캐폴드 내의 모듈 사이의 "스페이서"로 작용하는 기능을 갖는 문자일 수 있거나, 추가적인 기능을 갖는 문자(즉, "기능성 모이어티")일 수도 있다. "이종 모이어티"의 정의에 포함되는 문자는 링커로서 작용할 수도 있다.

[0042]

용어 "연결된", "접합된" 및 "융합된"은 상호교환적으로 사용된다. 이들 용어는 2개 이상의 스캐폴드, 이종 모이어티, 또는 링커가 화학적 접합 또는 재조합 수단을 포함하는 임의의 수단에 의해 서로 연결되어 있음을 지칭한다.

[0043]

용어 "도메인" 또는 "단백질 도메인"은 종종 단백질의 나머지 영역과 무관하게 안정적인 3차원적 구조로 접힐 수 있고 특정 기능을 제공받을 수 있는 단백질의 영역을 지칭한다. 이 구조는 원래의 단백질 내의 도메인 기능과 관련된 특정 기능, 예를 들면, 효소 활성, 또 다른 분자에 대한 인식 모티프의 생성, 또는 단백질이 단백질의 특정 환경에 존재하기 위해 필요한 구조적인 성분들을 제공하는 기능을 유지한다. 단백질 과(family) 내에서 및 관련 단백질 상과(superfamily) 내에서, 단백질 도메인은 진화적으로 보존된 영역일 수 있다. 다량체 스캐폴드의 성분을 기술할 때, 용어 "도메인", "단량체 스캐폴드", "단량체 서브유닛" 및 "모듈"은 상호교환적으로 사용될 수 있다. "네이티브 FnIII 도메인"은 살아있는 유기체에 의해 암호화되는 임의의 비 재조합성 FnIII 도메인을 의미한다.

[0044]

"단백질 서열" 또는 "아미노산 서열"은 폴리펩티드 내의 아미노산 성분이 아미노 말단으로부터 카르복시 말단 방향으로 선형으로 표시되어 있는 것을 의미하고, 이때 이러한 표시에서 서로 인접해 있는 잔기들은 이러한 폴리펩티드의 일차 구조에서 인접하여 존재한다.

- [0045] 용어 "핵산"은 임의의 2개 이상의 공유 결합된 뉴클레오티드, 또는 뉴클레오티드 유사체 또는 유도체를 지칭한다. 본 설명에 사용된 바와 같이, 이 용어는 제한 없이, DNA, RNA 및 PNA를 포함한다. "핵산" 및 "폴리뉴클레오티드"는 본 설명에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0046] 용어 "폴리뉴클레오티드"는 단일 핵산뿐만 아니라 복수의 핵산을 포괄하기 위한 것이고, 단리된 핵산 분자 또는 구조체, 예를 들면, 메신저 RNA(mRNA) 또는 플라스미드 DNA(pDNA)를 지칭한다. 용어 "단리된" 핵산 또는 폴리뉴클레오티드는 그의 고유의 환경으로부터 제거된 핵산 분자인 DNA 또는 RNA를 지칭한다. 예컨대, 벡터 내에 함유된 본 발명의 스캐폴드를 암호화하는 재조합 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 목적을 위해 단리된 것으로 간주된다. 단리된 폴리뉴클레오티드의 추가적인 예로는 이중 숙주 세포 내에 유지된 재조합 폴리뉴클레오티드 또는 용액 중의 (부분적으로 또는 실질적으로) 정제된 폴리뉴클레오티드가 있다. 단리된 RNA 분자는 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 생체 내 또는 시험관 내 RNA 전사체를 포함한다. 본 발명에 따른 단리된 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 합성적으로 제조된 이러한 분자들을 추가로 포함한다. 또한, 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 조절 요소, 예컨대, 프로모터, 리보좀 결합 부위 또는 전사 종결자일 수 있거나, 조절 요소, 예컨대, 프로모터, 리보좀 결합 부위 또는 전사 종결자를 포함할 수 있다.
- [0047] 용어 "약학적으로 허용 가능한"은 유의미하게 불리한 의학적 결과를 초래하지 않으면서 동물(예를 들면, 포유동물)에 투여될 수 있는 화합물 또는 단백질을 지칭한다.
- [0048] 용어 "생리학적으로 허용 가능한 담체"는 치료받는 숙주에 유의미한 유해한 영향을 미치지 않고, 함께 투여되는 화합물의 치료 성질을 유지하는 담체를 지칭한다. 한 예시적인 생리학적으로 허용 가능한 담체는 생리 식염수이다. 기타 생리학적으로 허용 가능한 담체 및 이들의 제형은 당업자에게 공지되어 있고, 예를 들면, 본 설명에 참고로 포함된 Remington's Pharmaceutical Sciences, (18th edition), ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, Pa.에 기재되어 있다.
- [0049] "폴리펩티드"는 길이, 번역 후 변형 또는 기능과 관계 없이 아미드 결합(펩티드 결합)에 의해 선형으로 연결된 2개 이상의 아미노산으로 구성된 임의의 서열을 의미한다. "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 본 설명에서 상호교환적으로 사용된다. 따라서, 웨프티드, 디펩티드, 트리펩티드 또는 올리고펩티드는 "폴리펩티드"의 정의에 포함되고, 용어 "폴리펩티드"는 이들 용어들 중 임의의 용어 대신에 사용될 수 있거나 이들 용어들 중 임의의 용어와 상호교환적으로 사용될 수 있다. 또한, 용어 "폴리펩티드"는 글리코실화, 아세틸화, 인산화, 아미드화, 공지된 보호기/차단기에 의한 유도체화, 단백질 분해성 절단, 또는 비 자연발생적 아미노산에 의한 변형을 제한 없이 포함하는 폴리펩티드의 발현 후 변형의 생성물을 지칭하기 위한 것이다. 폴리펩티드는 자연적인 생물학적 공급원으로부터 유래될 수 있거나 재조합 기술에 의해 생성될 수 있으나, 반드시 지정된 핵산 서열로부터 번역 되지는 않는다. 폴리펩티드는 화학적 합성을 포함하는 임의의 방식에 의해 생성될 수 있다.
- [0050] 전술한 폴리펩티드의 단편, 유도체, 유사체 또는 변이체 및 이들의 임의의 조합도 본 발명의 폴리펩티드로서 포함된다. 변이체는 자연적으로 발생할 수 있거나 비 자연적으로 발생할 수 있다. 비 자연적으로 발생하는 변이체는 당업계에 공지되어 있는 돌연변이유발 기법을 이용함으로써 생성될 수 있다. 변이체 폴리펩티드는 보존적 또는 비 보존적 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 포함할 수 있다. 20개의 표준 아미노산의 1개 이상의 자연발생적인 아미노산 유도체를 함유하는 웨프티드도 "유도체"로서 포함된다.
- [0051] "무작위화된" 또는 "돌연변이된"은 주형 서열에 대한 1개 이상의 아미노산의 결실, 치환 또는 부가를 포함하는 변경을 포함하는 것을 의미한다. "무작위화하는" 또는 "돌연변이를 유발하는"은 이러한 아미노산 변경을 서열 내로 도입하는 과정을 의미한다. 무작위화 또는 돌연변이는 일반적으로 핵산 암호화 서열의 의도적, 비 의도적 또는 자발적 서열 변이를 통해 달성될 수 있고 임의의 기법, 예를 들면, PCR, 오류 유발(error-prone) PCR 또는 화학적 DNA 합성에 의해 일어날 수 있다. 용어 "무작위화하는", "무작위화된", "돌연변이를 유발하는", "돌연변이된" 등은 본 설명에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0052] "동족체" 또는 "동족체, 돌연변이되지 않은 단백질"은 무작위화된 또는 돌연변이된 변이체 단백질 내로 도입된 아미노산 돌연변이를 제외하고, 서열 면에서 변이체 단백질과 동일한 단백질을 의미한다.
- [0053] "RNA"는 2개 이상의 공유 결합된 자연발생적인 또는 변형된 리보뉴클레오티드로 구성된 서열을 의미한다. 이 용어 내에 포함되는 변형된 RNA의 일례는 포스포로티오에이트 RNA이다.
- [0054] 본 설명에 사용된 용어 "본 발명의 스캐폴드" 또는 "본 발명의 스캐폴드들"은 단량체 Tn3 스캐폴드뿐만 아니라 다량체 Tn3 스캐폴드를 지칭한다. 용어 "표적"은 본 발명의 특이적 스캐폴드에 의해 인식되는 화합물을 지칭한다. 용어 "표적" 및 "항원"은 본 설명에서 상호교환적으로 사용된다. 예를 들어, 용어 "특이적으로 결합한다"

또는 "특이적 결합"에서, 본 설명에 사용된 용어 "특이성"은 본 발명의 Tn3 스캐폴드가 하나 이상의 항원 결합 도메인을 통해 하나 이상의 항원에 결합하기 위한 상대적 친화성을 지칭하고, 그러한 결합은 1개 이상의 항원 결합 도메인과 1개 이상의 항원 사이의 약간의 상보성을 수반한다. 이 정의에 따르면, 본 발명의 Tn3 스캐폴드가 임의의, 관련 없는 에피토프에 결합하는 경우보다 더 용이하게 한 에피토프에 결합하는 경우, 그러한 에피토프에 "특이적으로 결합한다"고 한다.

[0055] "친화 성숙된(affinity matured)" 스캐폴드는 변형(들)을 보유하지 않는 모 Tn3 스캐폴드에 비해 에피토프에 대한 Tn3 스캐폴드의 친화성 개선을 가져오는 하나 이상의 변형을 일반적으로 루프 내에 가진 스캐폴드이다.

[0056] 본 설명에 사용된 용어 "친화성(affinity)"은 본 발명의 일부 Tn3 스캐폴드와 개별 에피토프의 결합 강도의 척도를 지칭한다.

[0057] 본 설명에 사용된 용어 "결합력(avidity)"은 본 발명의 Tn3 스캐폴드의 접단과 특정 에피토프 사이의 복합체의 전체 안정성, 즉 복수의 Tn3 스캐폴드의 항원과의 결합이 기능적으로 조합된 강도를 지칭한다. 결합력은 개별 항원 결합 도메인과 특이적 에피토프의 친화성 및 본 발명의 스캐폴드의 원자가 둘 다와 관련이 있다.

[0058] 용어 "표적에 대한 작용"은 본 발명의 Tn3 스캐폴드와 1개 이상의 표적의 결합, 및 이러한 결합으로부터 비롯된 생물학적 효과를 지칭한다. 이와 관련하여, Tn3 스캐폴드 내의 다수의 항원 결합 유닛은 다양한 표적 및/또는 에피토프와 상호작용할 수 있고, 예를 들면, 2개의 표적을 물리적으로 더 가깝게 위치시킬 수 있고, 상이한 표적들과의 상호작용을 통해 대사 캐스케이드(metabolic cascades)를 유발할 수 있다. CD40L과 관련하여, "표적에 대한 작용"은 예를 들어, CD40L의 하나 이상의 생물학적 활성의 증진, 자극 또는 활성화에 의해, 달성된 효과를 지칭한다.

[0059] 본 설명에 사용된 용어 "원자가"는 잠재적 항원 결합 모듈의 수, 예를 들면, 본 발명의 스캐폴드 내의 FnIII 모듈의 수를 지칭한다. 본 발명의 Tn3 스캐폴드가 1개 초파의 항원 결합 모듈을 포함하는 경우, 각각의 결합 모듈은 예를 들면, 동일한 표적 또는 상이한 표적 내의 동일한 에피토프 또는 상이한 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0060] 본 설명에 사용된 용어 "이항화 결합"은 2개의 항원 사이에 형성된 공유결합을 포함한다. 아미노산 시스테인은 제2의 티올 기와 이항화 결합 또는 가교를 형성할 수 있는 티올 기를 포함한다.

[0061] 용어 "면역글로불린" 및 "항체"는 생화학적으로 구별될 수 있는 폴리펩티드의 다양한 넓은 부류를 포함한다. 당업자는 중쇄가 감마, 뮤, 알파, 델타 또는 엡실론으로서 분류된다는 것을 인식할 것이다. 항체의 "부류"를 각각 IgG, IgM, IgA IgG 또는 IgE로서 결정하는 것은 이러한 쇄의 성질이다. 이들 부류 각각의 변형된 벼전은 당업자에게 용이하게 인식될 수 있다. 본 설명에 사용된 용어 "항체"는 온전한 항체, 변형된 항체, 항체 VL 또는 VL 도메인, CH1 도메인, C카파 도메인, C람다 도메인, Fc 도메인(아래 참조), CH2 도메인 또는 CH3 도메인을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0062] 본 설명에 사용된 용어 "Fc 도메인" 도메인은 항체 불변 영역의 일부분을 지칭한다. 전통적으로, 용어 Fc 도메인은 항체의 CH2, CH3 및 헌지 영역 쌍들을 아우르는 단백질 분해효소(예컨대, 파파인) 절단 생성물을 지칭한다. 본 개시의 맥락에서, 용어 Fc 도메인 또는 Fc는, 생산 수단과는 관계 없이, 면역글로불린 폴리펩티드의 CH2, CH3 및 헌지 영역들 전부 또는 일부를 포함하는 임의의 폴리펩티드(또는 그러한 폴리펩티드를 암호화하는 핵산)를 지칭한다.

[0063] 본 설명에 사용된 용어 "변형된 항체"는 자연적으로 발생하는 항체가 안 되도록 변경된 항체의 형태, 예를 들면, 적어도 2개의 중쇄 부분을 포함하나 2개의 완전한 중쇄를 포함하지 않는 항체(예를 들면, 도메인이 결실된 항체 또는 미니바디(minibody)처럼); 2개 이상의 항원 또는 단일 항원의 상이한 에피토프에 결합하도록 변경된 항체의 다중특이적 형태(예를 들면, 이중특이적, 삼중특이적 등)를 포함한다. 또한, 용어 "변형된 항체"는 항체의 다가 형태(예를 들면, 동일한 항원의 3개 이상의 카페에 결합하는 3가 항체, 4가 항체 등)를 포함한다. (예를 들면, Antibody Engineering, Kontermann & Dubel, eds., 2010 Springer Protocols, Springer 참조).

[0064] 용어 "생체 내 반감기"는 그의 일반적인 의미, 즉, 폴리펩티드의 생물학적 활성의 50%가 체내/표적 기간에 여전히 존재하는 시간, 또는 이러한 폴리펩티드의 활성이 그것의 초기 값의 50%인 시간으로 사용된다. 기능성 생체 내 반감기를 결정하는 대안으로서, "혈청 반감기", 즉 폴리펩티드 분자의 50%가 제거되기 전에 혈장 또는 혈류에서 순환하는 시간을 결정할 수 있다. 혈청 반감기의 결정은 종종 기능성 생체 내 반감기의 결정보다 더 간단하고, 혈청 반감기의 규모는 통상적으로 기능성 생체 내 반감기 규모를 잘 나타낸다. 혈청 반감기에 대한 대안적 용어는 "혈장 반감기", 순환 반감기(circulating half-life), 순환적 반감기(circulatory half-life), 혈청

제거율, 혈장 제거율 및 제거 반감기를 포함한다. 보유되는 기능은 통상적으로 응혈촉진 활성, 단백질분해 활성, 보조인자 결합 활성, 수용체 결합 활성, 또는 특정 단백질과 관련된 기타 유형의 생물학적 활성으로부터 선택된다.

- [0065] 기능성 생체 내 반감기 또는 혈장 반감기와 관련된 용어 "증가된"은 폴리펩티드의 관련 반감기가 비교 가능한 조건 하에서 결정될 때 기준 문자(예를 들면, 변형되지 않은 폴리펩티드)의 관련 반감기에 비해 통계적으로 유의미하게 증가된다는 것을 표시하기 위해 사용된다.
- [0066] 기능성 생체 내 반감기 또는 혈장 반감기와 관련된 용어 "감소된"은 폴리펩티드의 관련 반감기가 비교 가능한 조건 하에서 결정될 때 기준 문자(예를 들면, 변형되지 않은 폴리펩티드)의 관련 반감기에 비해 통계적으로 유의미하게 감소된다는 것을 표시하기 위해 사용된다.
- [0067] 본 설명에 사용된 용어 "발현"은 유전자가 생화학 물질, 예를 들면, 본 발명의 스캐폴드 또는 이의 단편을 생성하는 과정을 지칭한다. 이러한 과정은 유전자 뉙다운 뿐만 아니라 일시적 발현 및 안정적 발현을 제한 없이 포함하는, 세포 내에 유전자가 기능적으로 존재한다는 것에 대한 임의의 정후를 포함한다. 그것은 유전자의 1개 이상의 mRNA로의 전사, 및 이러한 mRNA의 1개 이상의 폴리펩티드로의 번역을 제한 없이 포함한다. 최종적인 원하는 생성물이 생화학 물질인 경우, 발현은 그러한 생화학 물질 및 임의의 전구체의 생성을 포함한다.
- [0068] "발현 생성물"은 핵산, 예를 들면, 유전자의 전사에 의해 생성된 메신저 RNA, 또는 폴리펩티드일 수 있다. 본 설명에 기술된 발현 생성물은 전사 후 변형, 예를 들면, 폴리아데닐화가 있는 핵산, 또는 번역 후 변형, 예를 들면, 메틸화, 글리코실화, 지질의 부가, 다른 단백질 서브유닛과의 결합, 단백질분해성 절단 등이 있는 폴리펩티드를 추가로 포함한다.
- [0069] 용어 "벡터" 또는 "발현 벡터"는 숙주 세포 내로 도입되어 원하는 발현 생성물을 발현하는 비히클로서 본 발명에 따라 사용되는 벡터를 의미하기 위해 본 설명에 사용된다. 당업자에게 공지된 바와 같이, 이러한 벡터는 플라스미드, 파지, 바이러스 및 레트로바이러스로 구성된 균으로부터 용이하게 선택될 수 있다. 일반적으로, 본 발명과 상용 가능한 벡터는 선택 마커, 원하는 핵산의 클로닝을 촉진하기 위한 적절한 제한 부위, 및 진핵세포 또는 원핵세포 내로 들어가고/들어가거나 진핵세포 또는 원핵세포에서 복제하는 능력을 포함할 것이다.
- [0070] 용어 "숙주 세포"는 재조합 DNA 기법을 이용하여 구축되고 적어도 한 개의 발현 생성물을 암호화하는 벡터를 보유하는 세포를 지칭한다. 재조합 숙주로부터 발현 생성물을 단리하는 과정의 설명에 있어서, 용어 "세포" 및 "세포 배양물"은, 명백히 달리 특정되어 있지 않은 한, 발현 생성물의 공급원을 표시하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 즉, "세포"로부터의 발현 생성물의 회수는 스픈 다운된 전체 세포로부터의 회수, 또는 배지와 혼탁된 세포 둘 다를 함유하는 세포 배양물로부터의 회수를 의미한다.
- [0071] 본 설명에 사용된 용어 "치료하다" 또는 "치료"는 치유적 치료 및 예방적 또는 방지적 조치 둘 다를 지칭하는 것으로, 이때 목적은 대상체 내에서 원하지 않는 생리학적 변화 또는 장애, 예컨대, 염증성 질환 또는 병태의 진행을 방지하거나 늦추는(줄이는) 것이다. 유리한 또는 원하는 임상적 결과는 검출가능하든 검출불가능하든 증상의 경감, 질병 정도의 감소, 질병의 안정화된(즉, 악화되지 않는) 상태, 질병 진행의 지연 또는 늦춤, 질병 상태의 개선 또는 완화, 및 (부분적 또는 전체적) 관해를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0072] 또한, 용어 "치료"는 치료를 제공받지 않은 경우 예측된 생존에 비해 생존을 연장시키는 것을 의미한다. 치료가 필요한 대상체는 병태 또는 장애를 이미 앓고 있는 대상체뿐만 아니라 병태 또는 장애를 앓기 쉬운 대상체 또는 병태 또는 장애가 예방되어야 하는 대상체도 포함한다.
- [0073] 용어 "대상체", "개체", "동물", "환자" 또는 "포유동물"은 진단, 예후 또는 치료를 원하는 임의의 개체, 환자 또는 동물, 구체적으로 포유동물 대상체를 지칭한다. 포유동물 대상체는 인간, 가축, 농장 동물, 및 동물원, 스포츠 또는 애완 동물, 예컨대, 개, 고양이, 기니 피그, 토키, 랫트, 마우스, 말, 소, 젖소 등을 포함한다.
- [0074] 본 설명에 사용된 용어 "CD40L"은 제한 없이 T 세포의 표면에 발현된 CD40L, 재조합으로 발현된 CD40L, 대장균 또는 기타 적절한 재조합 단백질 발현 시스템으로부터 발현되어 정제된 CD40L, 비당쇄화 CD40L, 및 CD40L의 가용성 단편을 지칭한다. 또한, 본 설명에 사용된 "CD40L"은 메가CD40L(MegaCD40L)을 지칭한다. 메가CD40L(MegaCD40LTM)은 두 개의 삼량체 CD40 리간드가 ACRP30/아디포넥틴의 콜라겐 도메인을 통해 인위적으로 연결된 높은 활성의 구조체이다. 이 구조체는 생체 내에서 CD40L의 천연 막 보조 응집을 매우 효과적으로 시뮬레이션한다. 그것은 [CD40L+인핸서] 조합(알렉시스 바이오케미컬즈)에 대한 간단하면서도 똑같이 강력한 대안을 제공한다. 용어 "CD40L"은 CD40L의 단량체 형태뿐만 아니라 올리고머 형태, 예컨대, 삼량체 CD40L도 지칭한다.

- [0075] 용어 "CD40L"은 전체 길이 CD40L 및 가용성 단편, 예컨대, 단백질 가수분해로부터 기인하는 CD40L의 세포 외 도메인 형태 둘 다를 지칭한다. 인간 CD40L(Swissprot: P29965)의 막 결합성 형태 및 가용성 형태의 아미노산 서열을 각각 서열 번호 1과 서열 번호 2로 나타냈다.
- [0076] 용어 "CD40L 길항제" 또는 "길항제"는 가장 광범위한 의미로 사용되며, CD40L 및 이의 생물학적으로 활성을 나타내는 변이체의 한 가지 이상의 생물학적 활성을 시험관 내에서, 원 위치에서, 또는 생체 내에서 부분적으로 또는 완전히 억제하거나, 감소시키거나 불활성화하는 임의의 분자를 포함한다. 예를 들어, CD40L 길항제는 그것이 CD40L과 결합한 결과, 한 개 이상의 CD40L 분자들, 또는 CD40이나 기타 표적에 결합된 한 개 이상의 CD40L 분자들의 한 가지 이상의 생물학적 활성을 생체 내에서, 시험관 내에서, 또는 원 위치에서 부분적으로 또는 완전히 억제하거나, 감소시키거나 불활성화하도록 기능할 수 있다.
- [0077] 용어 "CD40L 효현제" 또는 "효현제"는 가장 광범위한 의미로 사용되며, CD40L 및 이의 생물학적으로 활성을 나타내는 변이체의 한 가지 이상의 생물학적 활성을 시험관 내에서, 원 위치에서, 또는 생체 내에서 부분적으로 또는 완전히 증진시키거나, 자극하거나 활성화하는 임의의 분자를 포함한다. 예를 들어, CD40L 효현제는 그것이 CD40L과 결합한 결과, 한 개 이상의 CD40L 분자들, 또는 CD40R이나 기타 표적에 결합된 한 개 이상의 CD40L 분자들의 한 가지 이상의 생물학적 활성을 생체 내에서, 시험관 내에서, 또는 원 위치에서 부분적으로 또는 완전히 증진시키거나, 자극하거나 활성화하도록 기능할 수 있다.
- [0078] 본 설명에 사용된 용어 "결정"은 원자들이 3차원에서 주기적으로 반복되는 패턴으로 정렬되어 전형적으로 격자를 형성하는 물질의 고체 상태의 한 형태를 지칭한다.
- [0079] 본 설명에 사용된 용어 "공간군 대칭"은 결정성 격자의 병진 대칭과 점군 대칭을 조합하는 결정의 전체 대칭을 지칭한다. "공간군"은 격자 군을 확인시켜주는 대문자(P, A, F 등) 다음에 회전 및 반사 요소가 나사축 및 활주면을 포함하도록 확장되어 있는 점군 부호로 표기되어 있다. 주어진 공간군에 대한 점군 대칭은 공간군의 셀 중심 부호를 제거하고 모든 나사축을 유사한 회전축으로 교체하고 모든 활주면을 거울면으로 교체함으로써 확인할 수 있음에 주의한다. 공간군에 대한 점군 대칭은 그의 역 격자의 진정한 대칭을 기술한다.
- [0080] 본 설명에 사용된 용어 "단위 셀"은 규칙적으로 반복된 패턴으로 정렬된 결정 내의 원자를 의미하고, 이때 가장 작은 반복 단위가 단위 셀이라 지칭된다. 전체 구조는 3개의 길이(a, b 및 c) 및 3개의 각도(α , β 및 γ)를 특징으로 하는 단위 셀에 대한 지식으로부터 재구축할 수 있다. 양 a 및 b는 셀의 기저 면의 길이이고, γ 는 이들 2개의 면들 사이의 각도이다. 양 c는 단위 셀의 높이이다. 각도 α 및 β 는 단위 셀의 기저 면과 수직 면 사이의 각도를 기술한다.
- [0081] 본 설명에 사용된 용어 "기계 판독 가능한 데이터 저장 매체"는 기계 판독 가능한 데이터가 암호화된 데이터 저장 물질을 의미하고, 이때 기계는 이러한 데이터를 사용하기 위한 명령어로 프로그래밍되어 있고 데이터를 원하는 포맷, 예를 들면, 문자 또는 문자 복합체의 그래픽 3차원 표현을 디스플레이할 수 있다.
- [0082] 용어 "X선 회절 패턴"은 결정 내의 분자 또는 원자의 주기적인 조립의 X선 산란으로부터 수득된 패턴을 의미한다. X선 결정학은 X선이 결정에 의해 회절된다는 사실을 활용하는 기법이다. X선은 비슷한 크기의 원자의 전자 구름에 의해 산란되기에 적당한 파장(옹스트롬 범위, 대략 10^{-8} cm)을 갖는다. 결정 내의 분자 또는 원자의 주기적인 조립의 X선 산란으로부터 수득된 회절 패턴에 기초하여, 전자 밀도를 재구축할 수 있다. 회절 데이터 또는 보충 회절 실험으로부터 추가 위상 정보를 추출하여 이러한 재구축을 완결할 수 있다(결정학에서의 위상 문제). 모델을 데이터에 대해 정련된 실험 전자 밀도로 점진적으로 구축하여 정확한 분자 구조를 생성한다. X선 구조 좌표는 공간에서의 점의 고유한 배열을 한정한다. 당업자는 단백질 또는 단백질-리간드 복합체, 또는 이의 부분에 대한 구조 좌표 세트가 결국 3차원에서의 배열을 정의하는 상대적인 점 세트를 한정한다는 점을 이해한다. 유사한 또는 동일한 배열은 전체적으로 상이한 좌표 세트에 의해 한정될 수 되며, 좌표들 사이의 거리 및 각도는 본질적으로 동일하게 남아있다. 또한, 각도를 본질적으로 동일하게 유지하면서 좌표들 사이의 거리를 스칼라 인자만큼 증가시키거나 감소시킴으로써 점의 배열을 한정할 수 있다.
- [0083] 본 설명에 사용된 용어 "결정 구조"는 결정성 물질에서 반복 원자 또는 문자 유닛의 3차원 또는 격자 공간 정렬을 지칭한다. 결정성 물질의 결정 구조는 X선 결정학적 방법에 의해 결정할 수 있다. 예를 들어, "Principles of Protein X-Ray Crystallography" by Jan Drenth, Springer Advanced Texts in Chemistry, Springer Verlag, 2nd ed., February 199, ISBN: 0387985875 및 "Introduction to Macromolecular Crystallography" by Alexander McPherson, Wiley-Liss, Oct. 18, 2002, ISBN: 0471251224 참조.
- [0084] 용어 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역(네이티브 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인할 수 있는

항체 또는 항체 단편의 생물학적 활성을 지칭하고 항체 동종형에 따라 달라진다. 항체 이팩터 기능의 예로는 C1q 결합 및 보체 의존적 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC); 식균작용; 세포 표면 수용체(예를 들면, B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화가 있다.

[0085] 용어 "항체 의존적 세포 매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 특정 세포독성 세포(예를 들면, 천연 살해(NK) 세포, 호중구 및 대식세포) 상에 존재하는 Fc 수용체(FcR) 상에 결합된 분비된 Ig가 이를 세포독성 이팩터 세포로 하여금 항원 보유 표적 세포에 특이적으로 결합한 후 이러한 표적 세포를 세포독소로 살해할 수 있게 하는 형태의 세포독성을 지칭한다.

[0086] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기술한다. FcR은 네이티브 서열 인간 FcR 일 수 있다. FcR은 IgG 항체(감마 수용체)에 결합할 수 있고 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII 서브클래스의 수용체들(이들 수용체들의 대립형질 변이체 및 대안적으로 스플라이싱된 형태를 포함함)을 포함한다. 이러한 용어는 신생아 수용체 FcRn도 포함한다.

[0087] 용어 "공통 서열"은 다수의 서열들이 정렬된 후, 특정 위치에서 가장 공통된 아미노산을 보여주는 단백질 서열을 지칭한다. 공통 서열은 관련된 서열들이 서로 비교되는 다수의 서열 정렬의 결과를 표현하는 한 방식이다. 공통 서열은 어떤 잔기가 각각의 위치에서 정렬에서 가장 풍부한지, 및 각각의 위치에서의 가변성의 정도를 보여준다.

[0088] 용어 "본질적으로 없는"은 단백질 내의 아미노산 잔기의 총 수와 비교하여 10% 미만의 산화 트립토판 잔기, 단백질 내의 아미노산 잔기의 총 수와 비교하여 8% 미만의 산화 트립토판 잔기, 단백질 내의 아미노산 잔기의 총 수와 비교하여 5% 미만의 산화 트립토판 잔기, 단백질 내의 아미노산 잔기의 총 수와 비교하여 4% 미만의 산화 트립토판 잔기, 단백질 내의 아미노산 잔기의 총 수와 비교하여 3% 미만의 산화 트립토판 잔기, 단백질 내의 아미노산 잔기의 총 수와 비교하여 2% 미만의 산화 트립토판 잔기, 단백질 내의 아미노산 잔기의 총 수와 비교하여 1% 미만의 산화 트립토판 잔기를 갖는 조성물을 지칭한다. 일부 구현예에서, 용어 "본질적으로 없는"은 단백질 내의 아미노산 잔기의 총 수와 비교하여 5% 미만의 산화 트립토판 잔기를 갖는 조성물을 지칭한다.

[0089] 용어 "생물 활성" 또는 "활성"은 치료 단백질, 예컨대, TN3 스캐폴드의 생물학적 활성 및 그것의 생체 내에서 의도된 방식으로 기능하는 능력, 예컨대, CD40L과의 결합을 지칭한다. 일부 구현예에서, 활성은 "상대적인 활성", 즉, 산화되지 않은 치료 단백질과 비교한 정제된 치료 단백질의 활성을 지칭한다. 일부 구현예에서, 정제된 치료 단백질의 상대적인 활성은 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 92% 초과, 94% 초과, 95% 초과, 98% 초과 또는 99% 초과이다.

[0090] 일부민의 치료 단백질에의 융합은 융합된 치료 단백질의 생체 내 또는 혈청 반감기를 증가시키거나 연장하는 것으로 밝혀졌다. 그러나 그러한 일부민 융합 단백질을 정제하는 동안, 특정 아미노산 잔기들은 산화에 취약할 수 있어, 일부민 융합 단백질의 생물 활성을 감소시키거나 제한할 수 있음이 밝혀졌다. 본 발명은 일부민 융합 단백질에서 취약한 아미노산 잔기들의 산화를 감소시키는 방법 및 그러한 일부민 융합 단백질의 정제를 대상으로 한다. 일부 구현예에서, 일부민 융합 단백질은 스캐폴드를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 스캐폴드는 Fn3 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 이러한 스캐폴드는 CD40L과 결합할 수 있는 인간 테나신 C (Tn3) 스캐폴드를 포함한다.

[0092] 일부민 융합 단백질의 산화를 감소시키기 위한 공정

[0093] 일부민 융합 단백질의 정제 공정 중, 일부 아미노산 잔기들은 산화에 취약해질 수 있는데, 이는 일부민 융합 단백질의 생물 활성 및 상대적인 효능을 억제할 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 트립토판 및/또는 메티오닌 잔기는 산화에 취약해질 수 있다. 본 발명에 따르면, 일부민 융합 단백질의 취약한 아미노산 잔기들의 산화는 일부민 융합 단백질을 포함하는 용액을 적절한 조건 하에서 친화성 크로마토그래피 매트릭스 및 음이온 교환 크로마토그래피 매트릭스에 적용시킴으로써 감소된다.

[0095] 친화성 매트릭스 크로마토그래피

[0096] 친화성 크로마토그래피 단계는 일부민과 우선적으로 결합하는 친화성 매트릭스를 활용한다. 예를 들어, 적절한 매트릭스로는 시바크론 블루 염료, 반응성 블루 2, 프로시온 블루(Procion Blue) HB, 캡토 블루, 캡토 블루(하이 서브(hight sub)), 토요필, AF-블루 HC-650M, 블루 세파로스, 블루 트리스아크릴, 미메틱 블루 1, 미메틱 블

루 SA, 미메틱 블루 SA HL 및 기타 안트라퀴논형 화합물, 니트로셀룰로스 매트릭스, 항체 기반의 매트릭스, 예컨대, 라이프 테크놀로지스(Life Technologies)의 캡처 셀렉트(Capture Select), 지방산 기반의 매트릭스를 포함한다. 일부 구현예에서, 시바크론 블루 염료 크로마토그래피는 그것의 일부분에 대한 친화성 덕분에 세포 배양 배지로부터 일부분 용합 단백질의 정제를 위한 이상적인 선택이다. 여러 시바크론 블루 염료 크로마토그래피 수지가 상업적으로 이용 가능하지만, 그것들 대부분은 일부분 용합 단백질의 대규모 정제에는 결코 이상적이지 않다. 대규모 정제를 위해, 이러한 수지는 숙주 관련 불순물과의 비 특이적인 상호작용을 최소화하고, 우수한 압력-흐름 특성을 나타내며, 위생 처리 목적을 위해 pH 극단에서 안정적인 (부식성 조건 하에서 바람직한 안정성의) 물질로 제조되어야 한다. 이러한 성질들을 염두에 두면, 몇몇 상업적으로 이용 가능한 시바크론 블루 염료 크로마토그래피 수지가 임상적 및 상업적 규모의 정제를 위한 잠재적인 수지로서 눈에 띈다: GE 헬스케어 (Healthcare)의 캡토 블루와 캡토 블루(하이 서브), 토소 바이오사이언스(Tosoh Biosciences)의 토요필 AF-블루 HC-650M. 두 가지 캡토 블루 옵션 가운데, 일부 구현예에서는, 하이 서브 버전이 더 높은 리간드 밀도와 그로 인한 더 높은 결합 능력 때문에 바람직하다.

- [0097] 전형적인 정제 공정에서, 시바크론 블루 염료 컬럼을 완충액(예컨대, 인산염, 트리스, 비스-트리스 등)으로 중성 pH 또는 약산성 pH 주변에서 평형화한 다음, 정제된 세포 배양액 또는 일부분 용합 단백질을 함유하는 공정 중간물질(시바크론 블루 염료 컬럼이 초기 정제 단계가 아닌 경우)로 로딩한다.
- [0098] 다양한 양의 단백질이 컬럼에 로딩될 수 있다. 일부 구현예에서, 약 5 g 단백질/L 수지 내지 약 100 g 단백질/L 수지, 약 10 g 단백질/L 내지 약 50 g 단백질/L 수지, 또는 약 25 g 단백질/L 수지가 친화성 컬럼에 로딩될 수 있다.
- [0099] 시료를 로딩한 후, 결합된 일부분 용합 단백질을 함유하는 친화성 크로마토그래피 컬럼을 선택적으로 재평형화한 다음, 더 공격적인 완충액으로 추가적으로 세척하여 (비 특이적인 상호작용을 통해) 컬럼에 결합된, 또는 (단백질-단백질 상호작용을 통해) 일부분-용합 단백질에 결합된 숙주 세포 불순물을 제거할 수 있다. 이러한 세척 완충액은 이를 불순물을 제거하기 위해 최적화될 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 세척 완충액은 폴리올; 염; 황산나트륨; 비 이온성 계면활성제; 요소; 및/또는 니코틴아미드를 함유한다.
- [0100] 일부 구현예에서, 이러한 세척 완충액은 약 2% 내지 약 20% 폴리올을 포함한다. 폴리올은 1,2-프로판디올, 1,3-프로판디올, 1,2-부탄디올, 1,3-부탄디올, 1,4-부탄디올, 1,6-헥산디올 및 2-메틸-2,4-펜тан디올로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0101] 다양한 농도의 염이 세척 완충액에 존재할 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 염은 적절한 양, 예컨대, 약 0.05 M 내지 약 2.0 M 염, 약 0.1 M 내지 약 1.8 M 염, 약 0.2 M 내지 약 1.5 M 염, 약 0.3 M 내지 약 1.0 M 염, 약 0.4 M 내지 약 0.8 M 염, 또는 약 0.5 M 염으로 존재한다. 이러한 염은 당해 분야에서 흔히 사용되는 염, 예컨대, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 염화리튬, 브롬화나트륨, 브롬화칼륨 및 브롬화리튬으로부터 선택될 수 있다.
- [0102] 다양한 농도의 황산나트륨이 이용될 수 있다. 이러한 황산나트륨은 약 0.01 M 내지 약 0.5 M, 0.02 M 내지 약 0.3 M, 약 0.04 M 내지 약 0.2 M, 또는 약 0.05 M 내지 약 0.1 M의 양으로 존재할 수 있다.
- [0103] 다양한 비 이온성 계면활성제가 이용될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 이러한 비 이온성 계면활성제는 트리톤(Triton) X-100, 트윈(Tween) 80, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 논옥시눌-9, 폴리옥사머, 스테아릴 알코올, 또는 소르비탄 모노스테아레이트로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 다양한 농도의 비 이온성 계면활성제가 이용될 수 있다. 예를 들어 일부 구현예에서, 이러한 비 이온성 계면활성제는 약 0.01% 내지 약 1%, 약 0.02%, 약 0.4%, 약 0.05% 내지 약 0.2%, 또는 약 0.08% 내지 약 0.01%의 농도로 세척 완충액에 존재한다.
- [0104] 다양한 카오트로픽제(chaotropic agent)가 당해 분야에 공지되어 있다. 본 발명에서, 요소는 세척 완충액에 사용되는 카오트로픽제이다. 요소는 세척 완충액의 약 0.02 M 내지 약 1.5 M, 약 0.05 M 내지 약 1.0 M, 또는 약 0.08 M 내지 약 1.0 M의 양으로 존재할 수 있다.
- [0105] 일부 구현예에서, 니코틴아미드는 세척 완충액에 사용된다. 니코틴 아미드는 세척 완충액의 약 0.01 M 내지 약 1.0 M, 약 0.02 M 내지 약 0.5 M, 약 0.04 M 내지 약 0.3 M, 약 0.06 M 내지 약 0.2 M, 또는 약 0.1 M의 양으로 존재할 수 있다.
- [0106] 세척 완충액은 다양한 pH 수준을 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, 세척 완충액의 pH는 약 5.0 초과, 약 5.5 초과, 또는 약 6.0 초과이다. 일부 구현예에서, 이러한 세척 완충액의 pH는 약 8.0 미만, 약 7.5 미만, 약 7.0 미만이다.

미만, 또는 약 6.5 미만이다. 일부 구현예에서, 이러한 세척 완충액의 pH는 약 5.0 내지 약 8.0, 약 5.5 내지 약 7.5, 약 5.5 내지 약 7.0, 약 6.0 내지 약 7.0 또는 약 6.5 내지 약 7.0이다.

[0107] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 이러한 세척 완충액은 약 5% 내지 약 15% 폴리올, 약 0.2 M 내지 약 0.8 M 염, 약 0.2 M 내지 약 0.8 M 황산나트륨, 약 0.02% 내지 약 0.2% 비 이온성 계면활성제, 및/또는 약 0.2 M 내지 약 1.0 M 요소를 포함한다. 본 발명의 일 양태에서, 이러한 세척 완충액은 폴리올, 1,2-프로판디올, 염, 염화나트륨, 및 비 이온성 계면활성제인 트리톤 X-100을 포함한다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 이러한 세척 완충액은 약 0.5 M 염화나트륨; 약 0.5 M 황산나트륨; 또는 약 10% 1,3-프로판디올을 포함한다. 본 발명의 일 양태에 따르면, 이러한 세척 완충액은 약 5.5 내지 약 7.0의 pH를 나타낸다.

[0108] 일부 구현예에서, 세척 완충액은 DNA 농도를 약 5×10^2 ng/mg 미만의 DNA, 약 2×10^2 ng/mg 미만의 DNA, 또는 약 50 ng/mg 미만의 DNA까지 감소시키는 데 적합하다. 일부 구현예에서, 이러한 세척 완충액은 숙주 세포 단백질(HCP)을 50,000 ng/mg 미만, 20,000 ng/mg 미만, 또는 10,000 ng/mg 미만까지 감소시키기에 적합하다.

[0109] 일부 구현예에서, 정제된 생성물은 높은 pH 완충액을 걸럼에 적용하거나, 높은 농도의 염, 순한 유기용매, 또는 생성물의 결합을 방해하는 조합물을 첨가하여 친화성 매트릭스로부터 용리시킨다. 일 구현예에서, 용리 완충액은 염기, 예컨대, 비스-트리스, 트리스, 또는 인산염 염기를 포함한다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 용리 완충액의 염기는 50 mM의 비스-트리스이다. 또 다른 구현예에서, 이러한 용리 완충액은 용리 염, 예컨대, 옥타노에이트, NaCl, 또는 카프릴레이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 또는 노나노에이트의 나트륨 및/또는 칼륨 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 용리 완충액은 카프릴레이트 나트륨을 포함한다. 이러한 염은 용리 완충액 내에 약 5 mM 내지 약 500 mM, 약 20 mM 내지 약 250 mM, 약 50 mM 내지 약 200 mM 또는 약 75 mM 내지 약 150 mM의 양으로 존재할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 이러한 용리 완충액은 EDTA, 또는 다른 칼레이트화제를 포함한다. 일 구현예에서, 친화성 매트릭스 용리 완충액은 적절한 양의 EDTA, 예컨대, 약 2 mM 내지 약 20 mM EDTA를 포함한다. 추가적인 구현예에서, 친화성 매트릭스 용리 완충액은 옥타노에이트를 포함한다.

[0110] 본 발명에 따르면, 친화성 크로마토그래피는 낮은 수준의 산화 생성물을 갖는다. 일 구현예에서, 친화성 크로마토그래피 후 일부민 용합 단백질을 함유하는 중간 생성물은 전체 단백질에 비해 약 100% 미만, 약 90% 미만, 약 80% 미만, 약 70% 미만, 약 60% 미만, 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 약 10% 미만, 약 9% 미만, 약 8% 미만, 약 7% 미만, 약 6% 미만, 약 5% 미만, 또는 약 4% 미만의 산화 생성물을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 친화성 크로마토그래피 후 일부민 용합 단백질을 함유하는 중간 생성물은 트립토판 잔기의 총 수에 비해 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 약 10% 미만, 약 9% 미만, 약 8% 미만, 약 7% 미만, 약 6% 미만, 약 5% 미만, 또는 약 4% 미만의 산화 트립토판 잔기를 갖는다. 또 다른 구현예에서, 친화성 매트릭스 단계는 본래의 시료로부터 적어도 1, 2, 3, 1 내지 2, 또는 2 내지 3 자릿수의 숙주 세포 단백질을 제거한다. 본 발명의 구현예에서, 친화성 매트릭스 단계는 본래의 시료로부터 적어도 1, 2, 3, 4, 1 내지 2, 2 내지 3, 3 내지 4 자릿수의 DNA 불순물을 제거한다.

0112] 바이러스 불활성화

[0113] 본 발명의 일 구현예에서, 일부민 용합 단백질을 함유하는 분획 또는 시료는 존재할 수 있는 바이러스를 불활성화하기 위해 처리될 수 있다. 이 방식에서, 분획/시료는 바이러스 불활성화제, 예컨대, 트리톤 X-100, 트원 80, 트원 20, 트리-n-부틸 포스페이트, 또는 요소로 처리될 수 있다. 일 구현예에서, 이러한 바이러스 불활성화 단계는 친화성 크로마토그래피와 음이온 교환 크로마토그래피 단계(들) 사이에서 일어난다. 이 방식에서, 바이러스 불활성화제, 예컨대, 트리톤 X-100은 약 1초 내지 약 10시간, 약 30초 내지 약 5시간, 약 30분 내지 약 3시간, 또는 약 2시간 동안 약 0.05% 내지 약 3%, 약 0.01% 내지 약 1%, 또는 약 0.1% 내지 약 0.5%의 양으로 첨가될 수 있다. 일 구현예에서, 이러한 바이러스 불활성화제는 0.5% 트리톤 X-100(w/w)이고, 이것은 약 30 내지 약 240분, 예컨대, 130분 동안 유지된다.

0115] 음이온 교환 크로마토그래피

[0116] 본 발명의 또 다른 양태에서, 일부민 용합 단백질을 함유하는 분획 또는 시료는 음이온 교환 크로마토그래피에 적용된다. 음이온 교환은 결합 및 용리(bind-and-elute) 시스템 또는 플로 스루(flow through) 시스템 또는 둘 다를 통해 수행될 수 있다. 임의의 적절한 음이온 교환 매트릭스가 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 이러한 음

이온 교환 매트릭스는 예를 들어, 수지, 예컨대, 아가로스 또는 세파로스, 또는 합성 미세다공성 막 또는 거대 다공성 막일 수 있다. 적절한 결합 및 용리 음이온 교환 매트릭스로 예를 들어, Q-수지, 4차 아민, DEAE가 포함된다. 상업적으로 이용 가능한 매트릭스로는 예를 들어, 캡토 Q, 토요필 수퍼Q(SuperQ), ANX, DEAE, Q-세파로스, Q-세파로스 FF, Q-세파로스 HP 및 Q-세파로스 XL, Q-하이퍼 D, DEAE-셀룰로스, QAE-셀룰로스, TMAE, DMAE, 또는 DEAE 프락토겔(Fractogel), 무스탕 Q, 사토바인드(Sartobind) Q, 또는 사토바인드 STIC PA가 포함된다. 그러한 매트릭스는 고도로 가교 결합된 아가로스를 포함할 수 있거나, 예를 들어, 폴리에테르셀론 폴리프로필렌, 메타크릴레이트, 또는 폴리프로필레이트 염기를 가진 중합체일 수 있다. 컬럼 로드 챈린지는 약 0.1 내지 약 50 g/L, 약 0.5 내지 약 40 g/L, 약 1 내지 약 30 g/L, 또는 약 5 내지 약 25 g/L의 범위 내이다. 막 로드 챈린지는 약 0.1 내지 약 10 g/mL, 약 0.2 내지 약 5.0 g/mL, 약 0.5 내지 약 2.5 g/mL, 또는 약 1.0 내지 약 2.0 g/mL의 범위 내이다.

[0117] 또 다른 구현예에서, 이러한 매트릭스는 일부민 용합 단백질의 정제를 증진시키기 위해 개질된다. 예를 들어, 일 구현예에서, 이러한 매트릭스는 텍스트란 표면 중량제를 지니는 고도로 가교 결합된 아가로스이다. 또 다른 구현예에서, 폴리에테르셀론 염기 매트릭스는 4차 아민으로 개질된다. 또 다른 구현예에서, 폴리프로필렌 염기 매트릭스는 4차 아민으로 개질된다.

[0118] 결합 및 용리 시스템을 이용할 때, 음이온 교환 크로마토그래피 단계는 중성 또는 약산성 pH의 인산염, 트리스 및 비스-트리스와 같은 완충액을 이용한 평형화 단계를 수반할 수 있다. 시료를 로딩하고, 매트릭스를 선택적으로 재평형화시킨다. 당업자에 공지된 바와 같이 pH 및 사용되는 수지를 기반으로, 그리고 표적 일부민 용합 단백질의 분리를 최적화하기 위해, 로딩 완충액은 최적화된다. 적절한 로딩 완충액으로는 약 5 mM 내지 약 200 mM, 약 10 mM 내지 약 150 mM, 약 20 mM 내지 약 100 mM, 약 30 mM 내지 약 80 mM, 또는 약 50 mM 범위의 트리스 또는 비스-트리스와 같은 염기, 및 약 5 mM 내지 약 100 mM, 약 10 mM 내지 약 50 mM, 또는 약 20 mM의 양의 NaCl 또는 옥타노에이트와 같은 염이 포함된다. 일 구현예에서, 음이온 교환을 위한 적절한 로딩 완충액은 pH 7.0에서 50 mM 비스-트리스, 20 mM NaCl을 포함한다.

[0119] 결합 및 용리 시스템에서, 음이온 교환 매트릭스의 평형화 후, 일부민 용합 단백질을 함유하는 시료가 로딩되고, 원하는 단백질이 음이온 교환 매트릭스에 결합된다. 결합된 일부민 용합 단백질을 함유하는 친화성 크로마토그래피 컬럼은 일부민 용합 단백질 외에 용액에 존재하는 물질을 제거하기 위해 세척 완충액으로 세척된다. 일부 구현예에서, 세척 완충액은 로딩 완충액과 동일하다. 일부 구현예에서, 세척 완충액은 pH 7.0에서 50 mM 비스-트리스, 20 mM NaCl을 포함한다.

[0120] 결합된 일부민 용합 단백질은 단계 용리 또는 기울기 용리에 의해 음이온 교환 매트릭스로부터 용리된다. 일 구현예에서, 음이온 교환 매트릭스 용리 완충액은 NaCl, CaCl₂, 또는 KCl과 같은 염을 이용한다. 이러한 완충액의 염 농도는 범위가 10 mM 초과부터, 약 10 mM 내지 약 150 mM, 약 20 mM 내지 약 400 mM, 약 50 mM 내지 약 300 mM, 약 20 mM 내지 약 140 mM, 약 30 mM 내지 약 130 M, 약 40 mM 내지 약 120 mM, 또는 약 50 mM 내지 약 110 mM이다. 용리를 위한 pH 범위는 약 9 미만, 약 6 내지 약 8, 약 6 내지 약 7.5, 약 6 내지 약 7, 또는 약 6.5 내지 약 7의 pH 사이에서 달라진다. 일부 구현예에서, 결합된 일부민 용합 단백질은 약 10 mM 내지 약 600 mM 염, 예컨대, NaCl, 또는 약 20 mM 내지 약 400 mM 염, 예컨대, NaCl의 선형 기울기를 이용하여 매트릭스로부터 용리된다.

[0121] 본 발명에 따르면, 음이온 교환 결합 및 용리 시스템은 응집 생성물을 감소시켜 그 결과 증가된 단량체 함량을 초래하고, 일부민 용합 단백질의 산화의 원인이 되고 낫은 수준의 산화 생성물을 갖는 불순물을 제거한다. 일 구현예에서, 일부민 용합 단백질을 함유하는 이 단계로부터의 중간 생성물은 전체 단백질에 비해 약 100% 미만, 약 90% 미만, 약 80% 미만, 약 70% 미만, 약 60% 미만, 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 약 10% 미만, 약 9% 미만, 약 8% 미만, 약 7% 미만, 약 6% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만 또는 약 2% 미만의 산화 생성물을 갖는다. 일 구현예에서, 일부민 용합 단백질을 함유하는 이 단계로부터의 중간 생성물은 트립토판 잔기의 총 수에 비해 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 약 10% 미만, 약 9% 미만, 약 8% 미만, 약 7% 미만, 약 6% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만 또는 약 2% 미만의 산화 트립토판 잔기를 갖는다. 또 다른 구현예에서, 이러한 결합 및 용리 음이온 교환 단계는 본래의 시료로부터 5, 10, 15, 20, 또는 30 자릿수를 초과하거나 적어도 5 내지 30, 10 내지 30, 10 내지 40, 15 내지 30, 15 내지 40, 20 내지 30, 또는 20 내지 40 자릿수의 숙주 세포 단백질을 제거한다. 본 발명의 구현예에서, 결합 및 용리 음이온 교환 단계는 본래의 시료로부터 적어도 3, 4, 5, 또는 6 자릿수, 또는 1 내지 2, 2 내지 3, 3 내지 4 사이 자릿수의 DNA 불순물을 제거한다.

- [0122] 일부 구현예에서, 음이온 교환 크로마토그래피 매트릭스는 막을 활용하는 플로 스루 모드이다. 일부 구현예에서, 일부민 용합 단백질은 음이온 교환 크로마토그래피 매트릭스와 음이온 교환 막 둘 다에 적용된다. 막은 사전에 적용시키고 로딩 전에 평형화시킬 수 있다. 나아가, 로딩 완충액의 pH는 표적 일부민 용합 단백질이 음이온 교환 매트릭스와 결합하지 않도록 조정될 수 있다. 이러한 방식으로, DNA, 숙주 세포 단백질(HCP), 바이러스 및 소분자 불순물을 포함하는 임의의 오염 물질이 표적 일부민 용합 단백질로부터 분리될 수 있다.
- [0123] 본 발명에 따르면, 일 구현예에서, 막은 약 9 미만, 약 6 내지 약 8, 약 6.5 내지 약 7.5, 약 6 내지 약 7.5, 또는 약 7 내지 약 7.5의 범위의 pH 또는 약 6, 7, 8 또는 9의 pH에서 조작된다. 또 다른 구현예에서, 완충액의 염 농도는 10 mM 초과 또는 약 10 mM 내지 약 200 mM, 약 40 mM 내지 약 180 mM, 약 50 mM 내지 약 150 mM, 약 60 mM 내지 약 120 mM, 약 60 mM 내지 약 80 mM의 범위일 것이다. 일부 구현예에서, 이러한 완충액의 염 농도는 약 50 mM, 약 60 mM, 또는 약 70 mM이다. 다른 구현예에서, 플로 스루 완충액은 10 mM 내지 150 mM의 염 농도와 6 내지 8의 pH를 나타낸다. 또 다른 구현예에서, 플로 스루 완충액은 10 mM을 초과하는 염 농도와 8 미만의 pH를 나타낸다. 특히, 낮은 pH, 예컨대, 약 7 내지 약 7.5와 더 높은 염 농도, 예컨대, 60 mM을 초과하는 염에서 수득률 및 DNA 제거율 모두가 최적이었음이 관찰되었다.
- [0124] 본 발명에 따르면, 음이온 교환 플로 스루 시스템은 낮은 수준의 산화 생성물을 갖는 증가된 단량체 함량 및 HCP와 DNA를 포함한 불순물의 제거를 가져온다. 일 구현예에서, 일부민 용합 단백질을 함유하는 이 단계로부터의 생성물은 전체 단백질에 비해 약 10% 미만, 약 9% 미만, 약 8% 미만, 약 7% 미만, 약 6% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만 또는 약 2% 미만의 산화 생성물을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 일부민 용합 단백질을 함유하는 이 단계로부터의 생성물은 트립토판 잔기의 총 수에 비해 약 10% 미만, 약 9% 미만, 약 8% 미만, 약 7% 미만, 약 6% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만 또는 약 2% 미만의 산화 트립토판 잔기를 갖는다. 또 다른 구현예에서, 플로 스루 음이온 교환 단계는 1자릿수를 초과하거나 2자릿수를 초과하는 숙주 세포 단백질을 본래의 시료로부터 제거한다. 본 발명의 구현예에서, 플로 스루 음이온 교환 단계는 본래의 시료로부터 적어도 3, 4, 5, 또는 6, 8, 9, 또는 10 자릿수 또는 3 내지 6, 4 내지 6, 또는 5 내지 6, 8 내지 10 또는 9 내지 10 자릿수의 DNA 불순물을 제거한다.
- [0125] 본 발명에 따르면, 음이온 교환의 결합 대 용리 모드는 음이온 교환의 플로 스루 모드와 조합하여 수행될 수 있다. 추가적인 옵션의 정제 단계들이 음이온 교환 단계(들) 전에, 그 사이에, 또는 음이온 교환 단계(들) 후에 수행될 수 있다. 예를 들어, 일부민 용합 단백질을 포함하는 시료가 트리톤 X-100으로 처리되어, 외피보유 바이러스를 불활성화할 수 있다. 대안적으로, 이러한 시료는 투석여과 또는 한외여과를 거칠 수 있다. 염은 적절한 농도로 첨가될 수 있다. 일 구현예에서, 일부민 용합 단백질을 함유하는 용리액은 pH 7.0의 50 mM 비스-트리스, 20 mM NaCl에 대하여 투석여과된다.
- [0127] **추가적인 정제 단계**
- [0128] 추가적인 정제 단계는 일부민 용합 단백질을 포함하는 용리액/분획을 소수성 상호작용 매트릭스 또는 다중모드 매트릭스에 적용시키는 것을 포함할 수 있다. 소수성 상호작용 매트릭스는 임의의 적절한 매트릭스일 수 있다. 일부 예에서 이러한 소수성 상호작용 매트릭스는 페닐, 옥틸 또는 부틸 소수성 기를 포함한다. 소수성 상호작용 매트릭스는 상업적으로 이용 가능하고, 당업자에게 공지되어 있다. 예컨대, 캡토 부틸, 캡토 페닐, 캡토 부틸, 부틸-S 패스트 플로(Fast Flow)(GE 헬스케어 라이프 사이언스(Healthcase Life Sciences), 미국 뉴저지 주 피스카타웨이 소재), 토요필 헥실, 토요필 부틸, 토요필 페닐, 토요필 PPG, 토요필 에테르, 토요필 PPG-600M, 및 토요필 페닐-650M, 토요필 PPG-600M, TSK겔(TSKgel) 페닐, TSK겔 에테르(토소 코포레이션(TOSOH Corporations), 일본 도쿄 소재), 매크로-프렙(Macro-Prep) 메틸(바이오라드 래버리토리즈(Bio-Rad Laboratories), 미국 캘리포니아 주 허클러스 소재). 다중모드 매트릭스는 임의의 적절한 매트릭스일 수 있다. 일부 예에서 이러한 다중모드 매트릭스는 양이온 또는 음이온 교환기와 함께 페닐, 옥틸 또는 부틸 소수성 기를 포함한다. 다중모드 매트릭스는 상업적으로 이용 가능하고, 당업자에게 공지되어 있다. 예컨대, 캡토 MMC, 에쉬무노(Eshmuno) HCX, 누비아(Nuvia) 씨프라임(cPrime), 또는 토요필 MX-Trp-650M. 일부민 용합 단백질은 선택적으로, 양이온으로서 암모늄염, 리튬염, 칼륨염, 마그네슘염, 칼슘염, 알루미늄염, 또는 구아니디늄염, 및/또는 음이온으로서 황산염, 인산염, 시트르산염, 타르타르산염, 염화염, 브롬화염, 요오드화염, 질산염, 또는 염소산염과 같은 염을 함유하는 완충액으로 평형화된다는 점이 밝혀졌다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 이러한 염은 적절한 양의 염화나트륨, 황산나트륨, 시트르산 나트륨, 또는 황산암모늄, 예컨대, 약 100 mM 내지 약 2 M, 약 200 mM 내지 약 1.5 M, 약 300 mM 내지 약 1 M, 약 400 mM 내지 약 800 mM 염, 예컨대, 시트르산염이다. 평형

화 후, 일부민 용합 단백질을 함유하는 시료/분획은 컬럼에 로딩된다. 일 구현예에서, 이러한 컬럼은 재평형화된 다음, 감소된 염 농도의 완충액까지의 단계 또는 기울기로 용리된다.

[0129] 또 다른 구현예에서, 이러한 분획들은 일부민 용합 단백질을 포함하는 용리액/분획을 나노여과에 적용시킴으로써 추가로 정제될 수 있다. 일부 구현예에서, 나노여과는 잠재적인 바이러스 입자들을 제거하는 데 이용될 수 있고, 당업자에게 일반적인 방법에서 수행될 수 있다.

[0130] 다른 구현예에서, 이러한 분획들은 크기 배제 크로마토그래피에 적용되어 일부민 용합 단백질을 추가로 정제할 수 있다.

[0131] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 산화된 트립토판 잔기가 본질적으로 없는 일부민 용합 단백질을 포함하는 조성물을 수득하는 방법이 제공된다. 이 구현예에 따르면, 이러한 방법은 산화된 트립토판 일부민 용합 단백질 및 산화되지 않은 트립토판 일부민 용합 단백질을 포함하는 조성물을 소수성 상호작용 매트릭스에 적용시키며, 이 때, 산화된 트립토판 일부민 용합 단백질과 산화되지 않은 트립토판 일부민 용합 단백질은 상이한 시간에 소수성 상호작용 매트릭스로부터 용리되어, 산화되지 않은 트립토판 일부민 용합 단백질로부터 산화된 트립토판 일부민 용합 단백질을 분리하는 것을 포함한다.

[0132] 본 발명의 또 다른 구현예는 트립토판 및/또는 메티오닌 잔기의 산화가 본질적으로 없는 일부민 용합 단백질을 단리하는 방법을 대상으로 한다. 이 구현예에 따르면, 일부민 용합 단백질을 포함하는 조성물을 다음의 정제 공정에 적용시킨다: (a) 친화성 매트릭스 크로마토그래피 공정; (b) 음이온 교환 크로마토그래피 공정; 및 (c) 소수성 상호작용 매트릭스 크로마토그래피 공정. 카프릴레이트/옥타노에이트 및 일부 구현예에서는 추가적으로 EDTA를 포함하는 친화성 매트릭스 크로마토그래피 공정을 위한 용리 완충액은 친화성 매트릭스에 적용된다. 또한, 산화된 트립토판 일부민 용합 단백질과 산화되지 않은 트립토판 일부민 용합 단백질은 상이한 시간에 소수성 상호작용 매트릭스로부터 용리되어, 산화되지 않은 트립토판 일부민 용합 단백질로부터 산화된 트립토판 일부민 용합 단백질을 분리한다.

[0133] 본 발명의 또 다른 양태는 일부민 용합 단백질을 포함하는 조성물을 소수성 상호작용 매트릭스 및 다음 정제 공정 중 하나 이상에 적용시키는 것을 포함하는 일부민 용합 단백질을 정제하는 방법이다: (a) 친화성 매트릭스 (이때, 카프릴레이트/옥타노에이트 및 일부 구현예에서 추가적으로 EDTA를 포함하는 용리 완충액이 친화성 매트릭스에 적용된다); 및/또는 (b) 음이온 교환 매트릭스. 이 구현예에 따르면, 이러한 친화성 매트릭스는 (1) 약 2% 내지 약 20% 폴리올(이때, 이러한 폴리올은 1,2-프로판디올, 1,3-프로판디올, 1,2-부탄디올, 1,3-부탄디올, 1,4-부탄디올, 1,6-헥산디올, 및 2-메틸-2,4-펜탄디올로 구성된 군으로부터 선택된다); (2) 0.05 M 내지 2.0 염(이때, 이러한 염은 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 염화리튬, 브롬화나트륨, 브롬화칼륨 및 브롬화리튬으로부터 선택된다); (3) 약 0.02 M 내지 약 1 M 황산나트륨; (4) 약 0.01% 내지 약 1% 비 이온성 계면활성제; (5) 약 0.05 M 내지 약 1.0 M 요소; 및/또는 (6) 약 0.02 M 내지 약 0.5 M 니코틴아미드를 포함하는 세척 완충액으로 세척될 수 있다. 그에 따른 정제된 일부민 용합 단백질은 산화된 트립토판 잔기가 본질적으로 없다.

[0134] 일부민 용합 단백질을 정제하는 방법으로서, 이러한 방법은 일부민 용합 단백질을 포함하는 조성물을 친화성 매트릭스에 적용하기; 친화성 매트릭스로부터 일부민 용합 단백질을 용리시켜 제1 용리액을 수득하기; 제1 용리액을 음이온 교환 매트릭스에 적용하기; 음이온 교환 매트릭스로부터 일부민 용합 단백질을 용리시켜 제2 용리액을 수득하기; 제2 용리액을 음이온 교환 막에 적용하기; 일부민 용합 단백질을 음이온 교환 막 사이로 통과시켜 플로 스루를 수득하기; 플로 스루를 소수성 상호작용 매트릭스에 적용하기; 소수성 상호작용 매트릭스로부터 일부민 용합 단백질을 용리시켜 제3 용리액을 수득하기를 포함하며, 이때, 제3 용리액은 정제된 일부민 용합 단백질을 포함하는 것인, 일부민 용합 단백질을 정제하는 방법. 이 구현예에 따르면, 그에 따른 정제된 일부민 용합 단백질은 5% 이하의 트립토판 잔기가 산화되었다.

정제된 일부민 용합 단백질의 조성물

[0135] 정제된 일부민 용합 단백질을 포함하는 조성물은 본 발명의 범위 내에 있다. 이들 조성물은 낮은 수준의 숙주 세포 단백질, DNA 및 바이러스 활성을 기여한다. 추가적으로, 정제된 일부민 용합 단백질을 포함하는 이들 조성물은 낮은 수준의 산화 및 보유된 생물 활성을 나타낸다.

[0136] 본 발명에 따라 정제된 일부민 용합 단백질을 포함하는 조성물 또는 분획은 약 1000 ng/mg 미만, 200 ng/mg, 100 ng/mg, 50 ng/mg, 40 ng/mg, 30 ng/mg, 20 ng/mg 또는 10 ng/mg의 숙주 세포 단백질을 보유한다. 일 구현 예에서, 이러한 일부민 용합 단백질을 함유하는 조성물은 20 ng/mg 미만의 숙주 세포 단백질을 보유한다. 일부

구현예에서, 이러한 알부민 융합 단백질 조성물은 인간 대상체에 투여하기 위하여, 정부 조직, 예컨대, 미국 식품의약관리국이 인정할 수 있는 수준의 숙주 세포 단백질을 보유한다.

[0139] 또한, 본 발명에 따라 정제된 알부민 융합 단백질을 포함하는 조성물 또는 분획은 약 5×10^{-2} 미만, 1×10^{-2} , 5×10^{-3} , 1×10^{-3} , 5×10^{-4} , 또는 1×10^{-4} ng/mg를 보유한다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따라 정제된 알부민 융합 단백질은 5×10^{-3} ng/mg 미만의 DNA를 보유한다. 일부 구현예에서, 이러한 알부민 융합 단백질 조성물은 인간 대상체에 투여하기 위하여, 정부 조직, 예컨대, 미국 식품의약관리국이 인정할 수 있는 DNA 수준을 보유한다.

[0140] 알부민 융합 단백질의 트립토판/메티오닌 잔기들의 산화가 단백질의 생물 활성 및 상대적인 효능에 영향을 미칠 수 있음이 밝혀진 바 있다. 본 발명의 방법에 따라 정제되고 수득된 알부민 융합 단백질은 낮은 산화 수준을 나타낸다. 본 발명의 구현예에서, 알부민 융합 단백질의 상대적인 효능은 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94% 또는 적어도 95%이다. 또 다른 구현예에서, 알부민 융합 단백질은 단백질 내의 트립토판 잔기의 총 양에 비해 25% 미만, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 또는 5% 미만의 산화된 트립토판 잔기를 갖는다. 일부 구현예에서, 알부민 융합 단백질은 단백질의 총 양에 비해 약 20% 미만의 산화된 트립토판 잔기를 갖는다. 또 다른 구현예에서, 이러한 알부민 융합 단백질은 단백질 내의 총 트립토판 잔기의 수에 비해 10% 미만, 9% 미만, 8% 미만, 7% 미만, 6% 미만, 또는 5% 미만의 산화된 트립토판 잔기를 갖는다. 본 발명의 구현예에서, 알부민 융합 단백질은 단백질 내의 트립토판 잔기의 총 수에 비해 약 5% 미만의 트립토판 잔기를 갖는다.

[0141] 본 발명의 범위 내의 조성물은 알부민 융합 단백질을 포함하는데, 이때, 이러한 조성물은 5×10^{-3} ng/mg 미만의 DNA를 보유하고, 이때, 15% 미만의 트립토판 잔기들이 산화된다. 일부 구현예에서, 이러한 조성물은 5×10^{-3} ng/mg 미만의 DNA를 보유하고, 5% 미만의 트립토판 잔기들이 산화되는 알부민 융합 단백질을 보유한다.

[0142] 본 발명의 또 다른 조성물은 알부민 융합 단백질을 포함하는데, 이때, 이러한 조성물은 20 ng/mg 미만의 숙주 세포 단백질을 보유하고, 이때, 이러한 알부민 융합 단백질은 >90%의 상대 활성을 나타낸다.

[0143] 본 발명의 일부 구현예는 알부민 융합 단백질을 포함하는 조성물로, 이때, 이러한 조성물은 5×10^{-3} ng/mg 미만의 DNA를 보유하고, 알부민 융합 단백질은 >90%의 상대 활성을 나타내는 것인, 알부민 융합 단백질을 포함하는 조성물이다.

알부민 융합 단백질

[0146] 인간 혈청 알부민(HSA)과 같은 알부민, 또는 이의 단편 또는 변이체는 혈류에서 단백질의 반감기 및/또는 그것의 조직 침투를 증가시키거나 연장하기 위해 치료 단백질과 융합되거나 접합될 수 있다. 일부 구현예에서, HSA 변이체와의 접합에 의해 개선된 성질은 혈장 반감기이다. 알부민 융합 단백질의 혈장 반감기의 개선은 혈장 반감기의 증가 또는 감소와 같은 그러한 성질의 변경, 또는 기타 약동학 파라미터의 변화일 수 있다.

[0147] 치료 단백질의 생체 내 또는 혈청 반감기를 연장하거나 증가시키는 알부민 또는 HSA의 단편 또는 변이체는 본 발명의 범위 내에 있다. 적어도 아미노산 치환, 결실, 또는 서열 절단을 포함하는 HSA 변이체, 즉, 전체 길이 HSA로부터 유래된 분자(서열 번호 139)는 이전에 개시된 바 있다. 예를 들어, 다음의 공개공보는 이용될 수 있는 HSA 변이체를 기술한다: WO 2011/103076, WO2011/051489 및 WO 2012/112188. 일부 구현예에서, 알부민은 HSA이다. 또 다른 구현예에서, 이러한 알부민은 변이체 HSA이다.

[0148] 일부 구현예에서, HSA 변이체는 전체 길이 HSA(서열 번호 138)로부터 유래된 돌연변이체이다. 특정 구현예에서, HSA 변이체는 34번 위치에서 시스테인의 세린으로의 치환을 포함한다(서열 번호 133). 예를 들어, Tn3 스캐폴드의 혈장 반감기를 변경하는 데 이용될 수 있는 HSA 변이체는 예를 들어, 국제 공개공보 WO 2011/103076 및 WO 2011/051489에 기술되어 있는데, 이들은 전체가 참조로 포함된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 치료 단백질의 혈장 반감기는 치료 단백질을 HSA의 도메인 III에 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 HSA 변이체와 융합 시킴으로써 증가된다. 또 다른 구현예는 변이체 HSA의 아미노산 서열이 서열 번호 133인 경우를 포함한다.

[0149] 일부 구현예에서, 본 발명의 알부민 융합 단백질은 전체 길이의 성숙한 HSA 내의 위치에 대해 넘버링된 407, 415, 463, 500, 506, 508, 509, 511, 512, 515, 516, 521, 523, 524, 526, 535, 550, 557, 573, 574, 및 580으로 구성된 군으로부터 선택된 위치에서의 적어도 하나의 아미노산 치환을 제외한, 전체 길이의 성숙한 HSA(서열 번호 138) 또는 이의 단편의 서열을 포함하는 HSA 변이체를 포함하는데, 이때, 적어도 하나의 아미노산 치환

은 573번 위치에서 리신(K)의 글루탐산(E)으로의 치환을 포함하지 않고, 치료 단백질은 HSA 변이체에 접합되지 않은 동일한 치료 단백질의 혈장 반감기보다 긴 혈장 반감기를 나타낸다.

[0150] 일부 다른 구현예에서, 전체 길이의 성숙한 HSA에서의 위치에 대해 넘버링된 적어도 하나의 아미노산 치환은 463, 508, 523, 및 524로 구성된 군으로부터 선택된 위치에 있고, 이때, 치료 단백질은 HSA 변이체에 접합되지 않은 치료 단백질의 혈장 반감기보다 긴 혈장 반감기를 나타낸다.

[0151] 다른 구현예에서, 본 발명의 일부민 융합 단백질은

[0152] (a) 407번 위치에서 류신(L)의 아스파라긴(N) 또는 티로신(Y)으로의 치환;

[0153] (b) 415번 위치에서 발린(V)의 트레오닌(T)으로의 치환;

[0154] (c) 463번 위치에서 류신(L)의 아스파라긴(N)으로의 치환;

[0155] (d) 500번 위치에서 리신(K)의 아르기닌(R)으로의 치환;

[0156] (e) 506번 위치에서 트레오닌(T)의 티로신(Y)으로의 치환;

[0157] (f) 508번 위치에서 트레오닌(T)의 아르기닌(R)으로의 치환;

[0158] (g) 509번 위치에서 페닐알라닌(F)의 메티오닌(M) 또는 트립토판(W)으로의 치환;

[0159] (h) 511번 위치에서 알라닌(A)의 페닐알라닌(F)으로의 치환;

[0160] (i) 512번 위치에서 아스파르트산(D)의 티로신(Y)으로의 치환;

[0161] (j) 515번 위치에서 트레오닌(T)의 글루타민(Q)으로의 치환;

[0162] (k) 516번 위치에서 류신(L)의 트레오닌(T) 또는 트립토판(W)으로의 치환;

[0163] (l) 521번 위치에서 아르기닌(R)의 트립토판(W)으로의 치환;

[0164] (m) 523번 위치에서 이소류신(I)의 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 글리신(G), 리신(K), 또는 아르기닌(R)으로의 치환;

[0165] (n) 524번 위치에서 리신(K)의 류신(L)으로의 치환;

[0166] (o) 526번 위치에서 글루타민(Q)의 메티오닌(M)으로의 치환;

[0167] (p) 535번 위치에서 히스티딘(H)의 프롤린(P)으로의 치환;

[0168] (q) 550번 위치에서 아스파르트산(D)의 글루탐산(E)으로의 치환;

[0169] (r) 557번 위치에서 리신(K)의 글리신(G)으로의 치환;

[0170] (s) 573번 위치에서 리신(K)의 페닐알라닌(F), 히스티딘(H), 프롤린(P), 트립토판(W), 또는 티로신(Y)으로의 치환;

[0171] (t) 574번 위치에서 리신(K)의 아스파라긴(N)으로의 치환;

[0172] (u) 580번 위치에서 글루타민(Q)의 리신(K)으로의 치환; 및

[0173] (v) 상기 치환 중 둘 이상의 조합

[0174] 으로 구성된 군으로부터 선택된, 전체 길이의 성숙한 HSA에서의 위치에 대해 넘버링된 적어도 하나의 아미노산 치환을 제외한, 전체 길이의 성숙한 HSA(서열 번호 133 또는 138) 또는 이의 단편의 서열을 포함하는 HSA 변이체를 포함하는데, 이때, 이러한 치료 단백질은 상기 HSA 변이체에 접합되지 않은 동일한 치료 단백질의 혈장 반감기보다 더 긴 혈장 반감기를 나타낸다.

[0175] 일부 구현예에서, 이러한 일부민 융합 단백질은

[0176] (a) 463번 위치에서 류신(L)의 아스파라긴(N)으로의 치환;

[0177] (b) 508번 위치에서 트레오닌(T)의 아르기닌(R)으로의 치환;

[0178] (c) 523번 위치에서 이소류신(I)의 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 글리신(G), 리신(K), 또는 아르기닌(R)으로

의 치환;

[0179] (d) 524번 위치에서 리신(K)의 류신(L)으로의 치환; 및

[0180] (e) 상기 치환 중 둘 이상의 조합

[0181] 으로 구성된 군으로부터 선택된, 전체 길이의 성숙한 HSA에서의 위치에 대해 넘버링된 적어도 하나의 아미노산 치환을 제외한, 전체 길이의 성숙한 HSA(서열 번호 133 또는 138) 또는 이의 단편의 서열을 포함하는 HSA 변이체를 포함하는데, 이때, 상기 치료 단백질은 상기 HSA 변이체에 접합되지 않은 동일한 치료 단백질의 혈장 반감 기보다 더 긴 혈장 반감기를 나타낸다.

[0182] 일부민 융합 단백질은 일반적인 기법에 의해, 예를 들어, 공개적으로 이용할 수 있는 유전자 서열을 이용하여 구축된 재조합 융합 유전자로부터 이러한 융합 단백질의 발현에 의해 생성될 수 있다.

[0183] 이러한 치료 단백질은 그것의 반감기를 증가시키거나 연장하기 위해 일부민에 융합 또는 접합시킬 수 있는 임의의 단백질일 수 있다. 일 구현예에서, 이러한 치료 단백질은 트립토판 잔기를 포함하는 스캐폴드 모이어티를 포함하는데, 이때, 이러한 트립토판의 산화는 일부민 융합 단백질의 생물학적 활성을 감소시킨다. 또 다른 구현예에서, 이러한 단백질은 CD40L과 결합할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 이러한 치료 단백질은 CD40L과 결합할 수 있는 스캐폴드 모이어티이다. 또 다른 구현예는 이러한 스캐폴드 모이어티가 제3의 피브로넥틴 III형(FnIII) 도메인을 포함함을 규정한다. FnIII 도메인을 포함하는 스캐폴드는 예를 들어, WO 98/56915, WO 2009/023184, WO 2009/05379, WO 2010/051274, WO 2010/093627에서 이전에 기술된 바 있다. 일부 구현예에서, 이러한 FnIII 도메인은 인간 테나신 C로부터 유래될 수 있다(Tn3 스캐폴드). 그러한 Tn3 스캐폴드는 예를 들어, WO 2009/05379, WO 2010/051274 및 WO2013/055745에 기술된 바 있다.

[0185] 스캐폴드에 융합된 일부민

[0186] 본 발명의 구현예에서, 일부민 융합 단백질은 스캐폴드를 포함한다. 예를 들어, 이러한 스캐폴드는 인간 테나신 C의 제3의 FnIII 도메인(Tn3)으로부터 유래된 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함할 수 있는데, 이때, 적어도 하나의 비 자연발생적 문자 내 이황화 결합은 조작된 것이다. 본 발명의 Tn3 스캐폴드를 구성하는 단량체 서브유닛들은 서로 독립적으로 정확하게 폴딩되고, 그것들의 결합 특이성 및 친화성을 보유하며, 단량체 스캐폴드 각각은 그의 기능성 성질을 보유한다. 단량체 서브유닛이 고 원자가 다량체 Tn3 스캐폴드로 조립될 때, 단량체 서브유닛들은 서로 독립적으로 정확히 폴딩되고, 결합 특이성 및 친화성을 보유하며, 단량체들 각각은 그의 기능적 성질을 보유한다.

[0187] 둘 이상의 단량체 서브유닛을 포함하는 본 발명의 스캐폴드는 다수의 에피토프에 결합할 수 있다. 예컨대, (i) 단일 표적 내의 다수의 에피토프에 결합하거나, (ii) 다수의 표적 내의 단일 에피토프에 결합하거나, (iii) 한 표적의 상이한 서브유닛들 상에 위치한 다수의 에피토프에 결합하거나, (iv) 다수의 표적 상의 다수의 에피토프에 결합할 수 있으며, 따라서 결합력을 증가시킬 수 있다.

[0188] 또한, 링커를 통해 다수의 단량체 사이의 거리를 바꿀 가능성으로 인해, 다량체 Tn3 스캐폴드는 표면(동일한 세포/표면 또는 상이한 세포/표면) 상의 다수의 표적 문자와 결합할 수 있다. 둘 이상의 표적에 동시적으로 결합하는 그것들의 능력 때문에, 본 발명의 Tn3 다량체 스캐폴드는 다수의 경로를 조절하고/조절하거나, 세포 표면 상의 수용체들을 가교연결하고/가교연결하거나, 별도의 세포 상의 세포 표면 수용체들과 결합하고/결합하거나, 표적 문자 또는 세포를 기질에 결합시키는 데 사용될 수 있다.

[0189] 또한, 본 발명은 특정 표적에 대한 스캐폴드의 친화성이 돌연변이를 통해 조절되는 친화 성숙된 스캐폴드를 제공한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 스캐폴드를 제조하는 방법뿐만 아니라 바람직한 물리화학적, 약학적 또는 면역학적 성질을 구비한 스캐폴드를 조작하는 방법도 제공한다. 나아가, 본 발명은 그러한 스캐폴드의 용도 및 치료적, 예방적 및 진단적 사용을 위한 방법을 제공한다.

[0190] 일 구현예에서, 이러한 일부민 융합 단백질은 2012년 10월 10일 제출되고 본 설명에 참조로 포함된 PCT 출원 공개 번호 WO 2013/055745에서 기술된 바와 같은 Tn3 스캐폴드를 보유한다. 이러한 일부민-Tn3 스캐폴드 융합 단백질을 정제할 때, 트립토판과 메티오닌 잔기들이 산화에 취약하다는 점이 발견된 바 있다. 예를 들어, Tn3 스캐폴드가 서열 번호 134, 135, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207 또는 208의 일부민 융합 단백질로부터 선택되는 경우, 정제 공정 중에 Tn3의 결합 루프에서 트립토판 아미노산 잔기 W46/151 및 Tn3 및 인간 혈청 일부민의 메티오닌 아미노산 잔기 M74/179, M498, M529에서 산화가 발생할 수 있음이 밝혀졌다. 영향 연구는 일부민-

Tn3 스캐폴드 단백질의 W46/151, M74/179, M498 및 M529에서의 산화가 생물 활성에 영향을 미칠 수 있음을 밝혔다. 특히, Tn3의 결합 루프 상의 W46/151에서의 산화는 MEDI4920의 생물 활성 및 상대적인 효능에 부정적으로 영향을 미쳤음이 밝혀졌다. 그러나 M74/179, M498 및 M529에서의 산화는 이러한 융합 단백질의 생물 활성에 미치는 영향이 적었다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 목표는 알부민 융합 단백질의 취약한 아미노산의 산화를 제어하기 위한 정제 공정을 통해 알부민 융합 단백질의 산화 종을 감소시키는 것이다.

[0192] FnIII 구조적 모티프

본 발명의 적절한 스캐폴드는 생물 및 바이러스의 모든 세 개의 도메인에 광범위하게 걸쳐 발견되는, 그리고 다수의 단백질 클래스에서 발견되는 도메인인 III형 피브로넥틴 모듈(FnIII)의 구조를 기초로 한 것들을 포함한다. 특정 구현예에서, 본 발명의 스캐폴드는 인간 테나신 C의 제3의 FnIII 도메인으로부터 유래된다(WO 2009/058379로 공개된 국제 출원 번호 국제 출원 번호 PCT/US2008/012398; WO 2011/130324로 공개된 PCT/US2011/032184; 및 WO2011130328로 공개된 국제 출원 번호 PCT/US2011/032188 참조).

일 특정 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 모 Tn3 스캐폴드로부터 유래된 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다. 이러한 단량체의 전체적인 3차원 폴드는 낙타 및 낙타과(예를 들면, 라마)의 단일 도메인 항체에서 전체 항원 인식 유닛을 포함하는 가장 작은 기능성 항체 단편인 중쇄의 가변 영역(VH)의 전체 3차원 폴드와 밀접하게 관련되어 있다.

본 발명의 Tn3 단량체 서브유닛 및 테나신 C로부터의 네이티브 FnIII 도메인은 동일한 3차원 구조, 즉 6개의 루프 영역들에 의해 연결된, 한쪽에 3개의 베타 가닥(A, B 및 E)과 다른 쪽에 4개의 베타 가닥(C, D, F 및 G)을 갖는 베타-샌드위치 구조를 특징으로 한다. 이들 루프 영역들은 각각의 루프의 N 말단 및 C 말단에 연결된 베타 가닥에 따라 표기된다. 따라서, AB 루프는 베타 가닥 A와 B 사이에 위치하고, BC 루프는 가닥 B와 C 사이에 위치하고, CD 루프는 베타 가닥 C와 D 사이에 위치하고, DE 루프는 베타 가닥 D와 E 사이에 위치하고, EF 루프는 베타 가닥 E와 F 사이에 위치하고, FG 루프는 베타 가닥 F와 G 사이에 위치한다. FnIII 도메인은 높은 친화성으로 특정 표적에 결합할 수 있는 단백질 스캐폴드들의 다양한 폴(pool)의 발생을 용이하게 하는 무작위화를 견뎌내는 용매 노출된 루프를 보유한다.

본 발명의 일 양태에서, Tn3 단량체 서브유닛은 항체 가변 영역의 상보성 결정 영역(CDR)과 유사한 하나 이상의 루프를 무작위화하도록 설계된 유도 진화를 겪는다. 이러한 유도 진화 접근법은 관심 있는 표적, 예를 들면, CD40L에 대한 높은 친화성을 갖는 항체 유사 분자의 생성을 가져온다.

또한, 일부 구현예에서, 본 설명에 기술된 Tn3 스캐폴드는 이러한 도입된 루프에 결합하는 문자의 진화를 유도하기 위해 한정된 노출된 루프(예를 들면, 표적 결합을 기초로 하여 이전에 무작위화되고 선택된 루프)를 디스플레이하는 데에 사용될 수 있다. 이러한 유형의 선택은 임의의 개별 CDR 유사 루프에 대한 인식 문자를 확인하기 위해, 또는 대안적으로, 비 선형 에피토프 결합 모이어티로 조합된 2개 또는 모든 3개의 CDR 유사 루프의 인식을 확인하기 위해 수행될 수 있다. 특이적인 표적 결합을 제공할 수 있는 3개 루프(BC, DE 및 FG로 표기됨) 세트는 각각 B와 C 가닥 사이, D와 E 가닥 사이, 및 F와 G 베타 가닥 사이에서 위치한다. 인간 테나신 C의 제3 FnIII 도메인의 BC, DE 및 FG 루프는 각각 9개, 6개 및 10개 아미노산 잔기 길이이다. 이들 루프의 길이는 각각 7개 내지 10개, 4개 내지 8개 및 4개 내지 28개 아미노산 길이인, 항체 중쇄에서 발견되는 동족 항원-인식 루프의 좁은 범위 내에 있다. 유사하게, 루프의 제2 세트인 AB, CD 및 EF 루프(각각 7개, 7개 및 8개 아미노산 길이)는 각각 A와 B 베타 가닥 사이, C와 D 베타 가닥 사이 및 E와 F 베타 가닥 사이에 위치한다.

일단 무작위화되고 표적에 대한 높은 친화성 결합에 대해 선택되면, Tn3 단량체 스캐폴드 내의 이러한 루프는 항체 내의 동족 CDR 루프의 접촉과 동등하게 표적과 접촉할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, AB, CD 및 EF 루프는 무작위화되고 하나 이상의 표적, 예를 들면, CD40L에 대한 높은 친화성 결합에 대해 선택된다. 일부 구현예에서, 이 무작위화 및 선택 과정은 BC, DE 및 FG 루프의 무작위화와 동시에 수행될 수 있는 반면, 다른 구현예에서는 이 무작위화 및 선택 과정이 연속적으로 수행된다.

[0200] CD40L 특이적 단량체 서브유닛

본 발명은 다수의 루프 영역들에 연결된 다수의 베타 가닥 도메인을 포함하는 CD40L 특이적인 재조합의 비 자연 발생적 Tn3 스캐폴드를 제공하는데, 이때, 상기 루프 영역들 중 하나 이상은 적어도 한 개의 아미노산의 결실,

치환 또는 부가에 의해 야생형 Tn3(서열 번호 3) 내의 동족 루프와 상이하다(표 1 참조).

[0202] 신규 결합 특성을 갖는 개선된 CD40L 특이적 Tn3 단량체 서브유닛을 발생시키기 위해, 모 Tn3에 대해 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 수행한다. CD40L 특이적 Tn3 단량체 서브유닛의 서열을 모 Tn3의 서열과 비교할 때 베타 가닥 및 루프에 대한 동일한 정의가 사용된다는 것이 이해될 것이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 CD40L 특이적 Tn3 단량체 서브유닛은 아미노산 서열:

IEV(X_{AB})_nALITW(X_{BC})_nCELX₁YGI(X_{CD})_nTTIDL(X_{DE})_nYSI(X_{EF})_nYEVSLIC(X_{FG})_nKETFTT

을 포함하는데, 이때,

(a) X_{AB}, X_{BC}, X_{CD}, X_{DE}, X_{EF}, 및 X_{FG}는 각각 AB, BC, CD, DE, EF 및 FG 루프의 서열에 존재하는 아미노산 잔기를 나타내고;

(b) X₁은 아미노산 잔기 알라닌(A) 또는 트레오닌(T)을 나타내고;

(c) 루프의 길이 n은 2 내지 26 사이의 정수이다.

표 2

본 연구에 사용된 Tn3 클론의 루프 서열

클론	AB 루프 서열 번호	BC 루프 서열 번호	CD 루프 서열 번호	DE 루프 서열 번호	EF 루프 서열 번호	FG 루프 서열 번호*
Tn3	4	5	6	7	8	9
309 패밀리						
309FGwt	4	83	6	94	8	9
309	4	83	6	94	8	99
340	4	84	6	95	8	9
341	4	85	6	94	8	9
342	4	86	6	96	8	9
343	4	87	6	97	8	9
344	4	88	6	95	8	9
345	4	89	6	94	8	9
346	4	90	6	94	8	9
347	4	91	6	95	8	9
348	4	92	6	98	8	9
349	4	93	6	94	8	9
309FGwt 공통	4	168	6	169	8	170
311 패밀리**						
311	4	100	6	118	8	129
311K4E	136	100	6	118	137	129
311K4E_1	136	101	6	119	8	129
311K4E_2	136	102	6	120	8	129
311K4E_3†	136	103	6	121	8	129
311K4E_4†	136	104	6	122	8	129
311K4E_5†	136	105	6	121	8	129
311K4E_7	136	106	6	123	8	129
311K4E_8†	136	107	6	123	8	129
311K4E_9	136	108	6	118	8	129
311K4E_10†	136	109	6	123	8	129
311K4E_11	136	110	6	121	8	129
311K4E_12†	136	111	6	123	8	130
311K4E_13	136	108	6	121	8	129
311K4E_14	136	112	6	124	8	129
311K4E_15	136	113	6	125	8	129
311K4E_16	136	114	6	118	8	129
311K4E_19	136	115	6	126	8	129
311K4E_20	136	116	6	127	8	129
311K4E_21	136	117	6	128	8	129
311 공통	173	174	6	175	176	177

[0208]

[0209] † 서열 CELAYGI(서열 번호 14)을 갖는 C 베타 가닥을 포함하는 클론, 모든 다른 클론들은 서열 CELTYGI(서열 번호 13)을 갖는 C 베타 가닥을 포함한다.

[0210] * 309 패밀리의 일부 변이체, 예를 들어, 342에서, FG 루프는 서열 번호 139로 교체될 수 있다.

[0211] ** 311 패밀리의 일부 변이체에서, BC 루프는 21번 위치에서 티로신을 교체하도록 조작될 수 있다. 교체 아미노산 잔기가 작은 측쇄를 가질 수 있음이 구체적으로 고려된다.

[0212] 일부 구현예에서, 본 발명의 CD40L 특이적 Tn3 단량체 서브유닛은 아미노산 서열:

- [0213] $\text{IEV}(\text{X}_{\text{AB}})_n \text{ALITW}(\text{X}_{\text{BC}})_n \text{CELX}_1 \text{YGI}(\text{X}_{\text{CD}})_n \text{TTIDL}(\text{X}_{\text{DE}})_n \text{YSI}(\text{X}_{\text{EF}})_n \text{YEVSLIC}(\text{X}_{\text{FG}})_n \text{KETFTT}$
- [0214] 로 구성되는데, 이때,
- [0215] (a) X_{AB} , X_{BC} , X_{CD} , X_{DE} , X_{EF} , 및 X_{FG} 는 각각 AB, BC, CD, DE, EF 및 FG 루프의 서열에 존재하는 아미노산 잔기를 나타내고;
- [0216] (b) X_i 은 아미노산 잔기 알라닌(A) 또는 트레오닌(T)을 나타내고;
- [0217] (c) 루프의 길이 n 은 2 내지 26 사이의 정수이다.
- [0218] 일 구현예에서, CD40L 특이적 Tn3 단량체 스캐폴드의 베타 가닥은 모 Tn3 스캐폴드(서열 번호 3)의 베타 가닥에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는다. 이러한 서열 동일성 백분율을 계산하기 위해, 당해 분야에서 공지된 방법을 적용하여 아미노산 서열들을 정렬한다. 서열 동일성의 백분율은 (a) 서열 정렬에서 동일한 베타 가닥에 위치하는 아미노산의 수와 (b) 베타 가닥에 위치하는 아미노산의 총 수 사이의 비로서 정의된다.
- [0219] 일 구현예에서, AB 루프의 서열은 서열 번호 4 또는 서열 번호 136을 포함한다. 또 다른 구현예에서, CD 루프의 서열은 서열 번호 6을 포함한다. 또 다른 구현예에서, EF 루프의 서열은 서열 번호 8 또는 서열 번호 137을 포함한다. 일 구현예에서, AB 루프의 서열은 서열 번호 4 또는 서열 번호 136으로 이루어진다. 또 다른 구현예에서, CD 루프의 서열은 서열 번호 6으로 이루어진다. 또 다른 구현예에서, EF 루프의 서열은 서열 번호 8 또는 서열 번호 137로 이루어진다.
- [0220] 일 구현예에서, BC 루프의 서열은 서열 번호 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 및 93으로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, BC 루프의 서열은 서열 번호 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 및 93으로 구성된 군으로부터 선택된 서열로 이루어진다.
- [0221] 일 구현예에서, DE 루프의 서열은 서열 번호 94, 95, 96, 97 및 98로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, DE 루프의 서열은 서열 번호 94, 95, 96, 97 및 98로 구성된 군으로부터 선택된 서열로 이루어진다.
- [0222] 일 구현예에서, FG 루프의 서열은 서열 번호 9, 99 및 139로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, FG 루프의 서열은 서열 번호 9, 99 및 139로 구성된 군으로부터 선택된 서열로 구성된다.
- [0223] 일 구현예에서, BC 루프의 서열은 서열 번호 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116 및 117로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, BC 루프의 서열은 서열 번호 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116 및 117로 구성된 군으로부터 선택된 서열로 구성된다.
- [0224] 일부 구현예에서, DE 루프의 서열은 서열 번호 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127 및 128로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, DE 루프의 서열은 서열 번호 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127 및 128로 구성된 군으로부터 선택된 서열로 구성된다.
- [0225] 일부 구현예에서, FG 루프의 서열은 서열 번호 129 및 130으로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, FG 루프의 서열은 서열 번호 129 및 130으로 구성된 군으로부터 선택된 서열로 구성된다.
- [0226] 일부 구현예에서, BC 루프의 서열은 서열 번호 83을 포함하고, DE 루프의 서열은 서열 번호 94를 포함하고, FG 루프의 서열은 서열 번호 9 또는 139를 포함한다. 일부 구현예에서, BC 루프의 서열은 서열 번호 83으로 구성되고, DE 루프의 서열은 서열 번호 94로 구성되고, FG 루프의 서열은 서열 번호 9 또는 139로 구성된다.
- [0227] 일부 구현예에서, BC 루프의 서열은 서열 번호 83을 포함하고, DE 루프의 서열은 서열 번호 94를 포함하고, FG 루프의 서열은 서열 번호 99를 포함한다. 다른 구현예에서, BC 루프의 서열은 서열 번호 83으로 구성되고, DE 루프의 서열은 서열 번호 94로 구성되고, FG 루프의 서열은 서열 번호 99로 구성된다.
- [0228] 일부 구현예에서, BC 루프의 서열은 서열 번호 84를 포함하고, DE 루프의 서열은 서열 번호 95를 포함하고, FG 루프의 서열은 서열 번호 9 또는 139를 포함한다. 다른 구현예에서, BC 루프의 서열은 서열 번호 84로 구성되고, DE 루프의 서열은 서열 번호 95로 구성되고, FG 루프의 서열은 서열 번호 9 또는 139로 구성된다.
- [0229] 일부 구현예에서, BC 루프의 서열은 서열 번호 85를 포함하고, DE 루프의 서열은 서열 번호 94를 포함하고, FG 루프의 서열은 서열 번호 9 또는 139를 포함한다. 다른 구현예에서, BC 루프의 서열은 서열 번호 85로

구성되고, DE 루프의 서열은 서열 번호 94로 구성되고, FG 루프의 서열은 서열 번호 9 또는 139로 구성된다.

AB 루프의 서열은 서열 번호 136으로 구성되고, BC 루프의 서열은 서열 번호 104로 구성되고, DE 루프의 서열은 서열 번호 122로 구성되고, FG 루프의 서열은 서열 번호 129로 구성된다.

- [0255] 일부 구현예에서, AB 루프의 서열은 서열 번호 136을 포함하고, BC 루프의 서열은 서열 번호 115를 포함하고, DE 루프의 서열은 서열 번호 126을 포함하고, FG 루프의 서열은 서열 번호 129를 포함한다. 다른 구현예에서, AB 루프의 서열은 서열 번호 136으로 구성되고, BC 루프의 서열은 서열 번호 115로 구성되고, DE 루프의 서열은 서열 번호 126으로 구성되고, FG 루프의 서열은 서열 번호 129로 구성된다.
- [0256] 일부 구현예에서, AB 루프의 서열은 서열 번호 136을 포함하고, BC 루프의 서열은 서열 번호 116을 포함하고, DE 루프의 서열은 서열 번호 127을 포함하고, FG 루프의 서열은 서열 번호 129를 포함한다. 다른 구현예에서, AB 루프의 서열은 서열 번호 136으로 구성되고, BC 루프의 서열은 서열 번호 116으로 구성되고, DE 루프의 서열은 서열 번호 127로 구성되고, FG 루프의 서열은 서열 번호 129로 구성된다.
- [0257] 일부 구현예에서, AB 루프의 서열은 서열 번호 136을 포함하고, BC 루프의 서열은 서열 번호 117을 포함하고, DE 루프의 서열은 서열 번호 128을 포함하고, FG 루프의 서열은 서열 번호 129를 포함한다. 다른 구현예에서, AB 루프의 서열은 서열 번호 136으로 구성되고, BC 루프의 서열은 서열 번호 117로 구성되고, DE 루프의 서열은 서열 번호 128로 구성되고, FG 루프의 서열은 서열 번호 129로 구성된다.
- [0258] 일부 구현예에서, BC 루프의 서열은 서열 번호 174를 포함하고, DE 루프의 서열은 서열 번호 175를 포함하고, FG 루프의 서열은 서열 번호 177를 포함한다. 다른 구현예에서, BC 루프의 서열은 서열 번호 174로 구성되고, DE 루프의 서열은 서열 번호 175로 구성되고, FG 루프의 서열은 서열 번호 177로 구성된다.
- [0259] 일부 구현예에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 서열 번호 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 및 146으로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 서열 번호 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 및 146으로 구성된 군으로부터 선택된 서열로 구성된다.
- [0260] 일부 구현예에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 서열 번호 28 또는 146을 포함한다. 다른 구현예에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 서열 번호 28 또는 146으로 구성된다.
- [0261] 일부 구현예에서, 본 발명의 CD40L 특이적 Tn3 단량체 서브유닛은 아미노산 서열:
- [0262] IEVKDVTDTALITWX₁DX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈CELTYGIKDVPGDRTTIDLWX₉HX₁₀AX₁₁YSIGNLKDTEYEVSLICRX₁₂GDMSSNPAKETFTT(서열 번호 167)
- [0263] 을 포함하는데, 이때,
- [0264] (a) X₁은 아미노산 잔기 세린(S) 또는 류신(L)을 나타내고;
- [0265] (b) X₂는 아미노산 잔기 아스파르트산(D) 또는 글루탐산(E)을 나타내고;
- [0266] (c) X₃은 아미노산 잔기 히스티딘(H), 이소류신(I), 발린(V), 폐닐알라닌(F) 또는 트립토판(W)을 나타내고;
- [0267] (d) X₄는 아미노산 잔기 알라닌(A), 글리신(G), 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;
- [0268] (e) X₅는 아미노산 잔기 글루탐산(E), 류신(L), 글루타민(Q), 세린(S), 아스파르트산(D) 또는 아스파라긴(N)을 나타내고;
- [0269] (f) X₆은 아미노산 잔기 폐닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0270] (g) X₇은 아미노산 잔기 이소류신(I), 발린(V), 히스티딘(H), 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;
- [0271] (h) X₈은 아미노산 잔기 글리신(G), 트립토판(W) 또는 발린(V)을 나타내고;
- [0272] (i) X₉는 아미노산 잔기 트립토판(W), 폐닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0273] (j) X₁₀은 아미노산 잔기 세린(S), 글루타민(Q), 메티오닌(M) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;
- [0274] (k) X₁₁은 아미노산 잔기 트립토판(W) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;
- [0275] (l) X₁₂는 아미노산 잔기 아르기닌(R) 또는 세린(S)을 나타낸다.

- [0276] 일부 구현예에서, 본 발명의 CD40L 특이적 Tn3 단량체 서브유닛은 아미노산 서열:
- [0277] IEVKDVTDTALITWX₁DX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈CELYGIKDVPGRRTIDLWX₉HX₁₀AX₁₁YSIGNLKPDTYEVSLICRX₁₂GDMSSNPAKETFTT(서열 번호 167)
- [0278] 로 구성되는데, 이때,
- [0279] (a) X₁은 아미노산 잔기 세린(S) 또는 류신(L)을 나타내고;
- [0280] (b) X₂는 아미노산 잔기 아스파르트산(D) 또는 글루탐산(E)을 나타내고;
- [0281] (c) X₃은 아미노산 잔기 히스티딘(H), 이소류신(I), 발린(V), 페닐알라닌(F) 또는 트립토판(W)을 나타내고;
- [0282] (d) X₄는 아미노산 잔기 알라닌(A), 글리신(G), 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;
- [0283] (e) X₅는 아미노산 잔기 글루탐산(E), 류신(L), 글루타민(Q), 세린(S), 아스파르트산(D) 또는 아스파라긴(N)을 나타내고;
- [0284] (f) X₆은 아미노산 잔기 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0285] (g) X₇은 아미노산 잔기 이소류신(I), 발린(V), 히스티딘(H), 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;
- [0286] (h) X₈은 아미노산 잔기 글리신(G), 트립토판(W) 또는 발린(V)을 나타내고;
- [0287] (i) X₉는 아미노산 잔기 트립토판(W), 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0288] (j) X₁₀은 아미노산 잔기 세린(S), 글루타민(Q), 메티오닌(M) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;
- [0289] (k) X₁₁은 아미노산 잔기 트립토판(W) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;
- [0290] (l) X₁₂는 아미노산 잔기 아르기닌(R) 또는 세린(S)을 나타낸다.
- [0291] 일부 구현예에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 서열 번호 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80 및 82로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 서열 번호 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80 및 82로 구성된 군으로부터 선택된 서열로 구성된다.
- [0292] 일부 구현예에서, 본 발명의 CD40L 특이적 Tn3 단량체 서브유닛은 아미노산 서열:
- [0293] IEVX₁DVTDTALITWX₂X₃RSX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀CEGX₁₁YGIKDVPGRRTIDLX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅YVHYSIGNLKPDTX₁₆YEVSLICLTTDGTYX₁₇NPAKETFTT(서열 번호 171)
- [0294] 을 포함하는데, 이때,
- [0295] (a) X₁은 아미노산 잔기 리신(K) 또는 글루탐산(E)을 나타내고;
- [0296] (b) X₂는 아미노산 잔기 트레오닌(T) 또는 이소류신(I)을 나타내고;
- [0297] (c) X₃은 아미노산 잔기 아스파라긴(N) 또는 알라닌(A)을 나타내고;
- [0298] (d) X₄는 아미노산 잔기 세린(S), 류신(L), 알라닌(A), 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0299] (e) X₅는 아미노산 잔기 티로신(Y), 알라닌(A), 글리신(G), 발린(V), 이소류신(I) 또는 세린(S)을 나타내고;
- [0300] (f) X₆은 아미노산 잔기 티로신(Y), 세린(S), 알라닌(A) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;
- [0301] (g) X₇은 아미노산 잔기 아스파라긴(N), 아스파르트산(D), 히스티딘(H) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0302] (h) X₈은 아미노산 잔기 류신(L), 페닐알라닌(F), 히스티딘(H) 또는 티로신(Y)을 나타내고;

- [0303] (i) X_9 는 아미노산 잔기 히스티딘(H), 프롤린(P), 세린(S), 류신(L) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;
- [0304] (j) X_{10} 은 아미노산 잔기 글리신(G), 페닐알라닌(F), 히스티딘(H) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0305] (k) X_{11} 은 아미노산 잔기 알라닌(A) 또는 트레오닌(T)을 나타내고;
- [0306] (l) X_{12} 는 아미노산 잔기 세린(S), 아스파라긴(N), 글루탐산(E), 아스파라긴(R) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;
- [0307] (m) X_{13} 은 아미노산 잔기 세린(S), 글루타민(Q), 트레오닌(T), 아스파라긴(N) 또는 알라닌(A)을 나타내고;
- [0308] (n) X_{14} 는 아미노산 잔기 프롤린(P), 발린(V), 이소류신(I) 또는 알라닌(A) 또는 아미노산의 부재를 나타내고;
- [0309] (o) X_{15} 는 아미노산 잔기 이소류신(I) 또는 아미노산의 부재를 나타내고;
- [0310] (p) X_{16} 은 아미노산 잔기 글루탐산(E) 또는 리신(K)을 나타내고;
- [0311] (q) X_{17} 은 아미노산 잔기 세린(S) 또는 아스파라긴(N)을 나타낸다.
- [0312] 일부 구현예에서, 본 발명의 CD40L 특이적 Tn3 단량체 서브유닛은 아미노산 서열:
- [0313] IEVX₁DVTDTTALITWX₂X₃RSX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀CELX₁₁YGIKDVPGDRTTIDLX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅YVHYSIGNLKPDTX₁₆YEVSLICLTTDGTYX₁₇NPAKETFT
T(서열 번호 171)
- [0314] 으로 구성되는데, 이때,
- [0315] (a) X_1 은 아미노산 잔기 리신(K) 또는 글루탐산(E)을 나타내고;
- [0316] (b) X_2 는 아미노산 잔기 트레오닌(T) 또는 이소류신(I)을 나타내고;
- [0317] (c) X_3 은 아미노산 잔기 아스파라긴(N) 또는 알라닌(A)을 나타내고;
- [0318] (d) X_4 는 아미노산 잔기 세린(S), 류신(L), 알라닌(A), 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0319] (e) X_5 는 아미노산 잔기 티로신(Y), 알라닌(A), 글리신(G), 발린(V), 이소류신(I) 또는 세린(S)을 나타내고;
- [0320] (f) X_6 은 아미노산 잔기 티로신(Y), 세린(S), 알라닌(A) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;
- [0321] (g) X_7 은 아미노산 잔기 아스파라긴(N), 아스파르트산(D), 히스티딘(H) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0322] (h) X_8 은 아미노산 잔기 류신(L), 페닐알라닌(F), 히스티딘(H) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0323] (i) X_9 는 아미노산 잔기 히스티딘(H), 프롤린(P), 세린(S), 류신(L) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;
- [0324] (j) X_{10} 은 아미노산 잔기 글리신(G), 페닐알라닌(F), 히스티딘(H) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0325] (k) X_{11} 은 아미노산 잔기 알라닌(A) 또는 트레오닌(T)을 나타내고;
- [0326] (l) X_{12} 는 아미노산 잔기 세린(S), 아스파라긴(N), 글루탐산(E), 아스파라긴(R) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;
- [0327] (m) X_{13} 은 아미노산 잔기 세린(S), 글루타민(Q), 트레오닌(T), 아스파라긴(N) 또는 알라닌(A)을 나타내고;
- [0328] (n) X_{14} 는 아미노산 잔기 프롤린(P), 발린(V), 이소류신(I) 또는 알라닌(A) 또는 아미노산의 부재를 나타내고;
- [0329] (o) X_{15} 는 아미노산 잔기 이소류신(I) 또는 아미노산의 부재를 나타내고;
- [0330] (p) X_{16} 은 아미노산 잔기 글루탐산(E) 또는 리신(K)을 나타내고;

- [0331] (q) X₁₇은 아미노산 잔기 세린(S) 또는 아스파라긴(N)을 나타낸다.
- [0332] 일부 구현예에서, CD40L 특이적 단량체 스캐폴드는 Tn3 모듈을 포함하는데, 이때 C 및 F 베타 가닥(각각 서열 번호 13 또는 14; 및 서열 번호 17)의 시스테인 잔기는 치환될 수 없다는 점 이외에, 베타 가닥들 중 하나 이상은 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0333] CD40L 특이적 단량체 서브유닛의 다양한 베타 가닥들을 연결하는 루프들은 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화될 수 있다. 일부 구현예에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화되는 적어도 하나의 루프를 갖는다. 일부 구현예에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛의 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 또는 적어도 6개의 루프는 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다. 일부 구현예에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛의 적어도 1개의 루프는 불변 상태로 유지되지만, 적어도 1개의 추가적인 루프는 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다. 또 다른 구현예에서, 루프 AB, CD 및 EF 중 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 모든 3개의 루프가 불변 상태로 유지되지만, 루프 BC, DE 및 FG 중 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 모든 3개의 루프는 길이 또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다. 또 다른 구현예에서, 루프 AB, CD 및 EF 중 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 모든 3개의 루프는 무작위화되지만, 루프 BC, DE 및 FG 중 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 모든 3개의 루프는 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다. 또 다른 구현예에서, 루프 AB, CD, EF, BC, DE 및 FG 중 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개의 루프, 적어도 4개, 적어도 5개, 또는 모든 6개의 루프는 길이 또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다.
- [0334] 일부 구현예에서, 루프 내의 하나 이상의 잔기는 불변 상태로 유지되지만, 다른 잔기들은 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다. 일부 구현예에서, 루프 내의 하나 이상의 잔기는 소정의, 그리고 제한된 수의 상이한 아미노산으로 유지되지만, 다른 잔기는 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다. 따라서, 본 발명의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 축퇴 공통 서열 및/또는 하나 이상의 불변 아미노산 잔기를 갖는 하나 이상의 루프를 포함할 수 있다.
- [0335] 일부 구현예에서, 본 발명의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 무작위화되는 AB 루프를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 무작위화되는 BC 루프를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 무작위화되는 CD 루프를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 무작위화되는 DE 루프를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 무작위화되는 EF 루프를 포함한다.
- [0336] 특정 구현예에서, 본 발명의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 인간 테나신 C의 제3 FnIII 도메인의 동족 FG 루프보다 적어도 하나의 아미노산 잔기만큼 더 짧도록 유지되고 하나 이상의 위치에서 더 무작위화된 FG 루프를 포함한다.
- [0337] 특정 구현예에서, 루프 BC, DE 및 FG 중 적어도 하나의 루프가 무작위화되고, 이때 A 베타 가닥은 서열 번호 10 또는 11을 포함하고, B 베타 가닥은 서열 번호 12를 포함하고, C 베타 가닥은 서열 번호 13 또는 14를 포함하고, D 베타 가닥은 서열 번호 15를 포함하고, E 베타 가닥은 서열 번호 16를 포함하고, F 베타 가닥은 서열 번호 17을 포함하고, G 베타 가닥은 서열 번호 18을 포함하고, AB 루프는 서열 번호 4 또는 136을 포함하고, CD 루프는 서열 번호 6을 포함하고, EF 루프는 서열 번호 8 또는 137을 포함한다.
- [0338] 다른 특정 구현예에서, 루프 AB, CD 및 EF 중 적어도 하나의 루프가 무작위화되고, 이때 A 베타 가닥은 서열 번호 10 또는 11을 포함하고, B 베타 가닥은 서열 번호 12를 포함하고, C 베타 가닥은 서열 번호 13 또는 14를 포함하고, D 베타 가닥은 서열 번호 15를 포함하고, E 베타 가닥은 서열 번호 16를 포함하고, F 베타 가닥은 서열 번호 17을 포함하고, G 베타 가닥은 서열 번호 18을 포함하고, BC 루프는 서열 번호 5를 포함하고, DE 루프는 서열 번호 7을 포함하고, FG 루프는 서열 번호 9 또는 139를 포함한다.
- [0339] 본 발명의 Tn3 스캐폴드의 안정성을 여러 상이한 방법들에 의해 증가될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 N 및/또는 C 말단 영역을 연장시킴으로써 안정화될 수 있다. N 및/또는 C 말단 영역은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 10개 초과의 아미노산에 의해 연장될 수 있다. 다른 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 본 설명에 기술된 바와 같이 혈청 반감기를 증가시키는 변경을 도입함으로써 안정화될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 스캐폴드의 소수성 코어를 안정화시키기 위해 적어도 한 개의 아미노산 잔기의 추가, 결실 또는 치환을 포함한다.
- [0340] 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 국제 특허 출원 번호 PCT/US2011/032184에 개시된 바와 같이 비 자연적 이황화 결합을 조작함으로써 효과적으로 안정화될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 스캐폴드는 PCT 공개 번호 WO

2009/058379에 기술된 바와 같이 비 자연발생적 이황화 결합을 포함한다. 생물정보학 방법을 이용하여 이황화결합의 조작에 적합한 후보 위치를 확인할 수 있다.

[0341] 일 구현예에서, 본 발명의 Tn3 단량체 서브유닛은 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 비 자연발생적 분자 내 이황화 결합을 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 Tn3 단량체 서브유닛은 적어도 1개의 비 자연발생적 분자 내 이황화 결합을 포함하는데, 이때 상기 적어도 1개의 비 자연발생적 이황화 결합은 이러한 단량체를 안정화한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 적어도 1개의 비 자연발생적 이황화 결합을 포함하는데, 이때 이러한 결합은 2개의 상이한 단량체 또는 다량체 Tn3 스캐폴드들 사이에 위치한다. 즉, 이러한 이황화 결합은 분자 간 이황화 결합이다. 예를 들면, 이황화 결합은 상이한 스캐폴드들(예를 들면, 2개의 CD40L 특이적 단량체 스캐폴드들)을 연결할 수 있거나, Tn3 스캐폴드와 링커를 연결할 수 있거나, Tn3 스캐폴드와 Fc 도메인을 연결할 수 있거나, 또는 Tn3 스캐폴드와 항체 또는 이의 단편을 연결할 수 있다.

[0342] 일부 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 Tn3 단량체 서브유닛과 단리된 이종 모이어티를 연결하거나, 동일한 Tn3 스캐폴드에 융합되거나 접합된 이종 모이어티와 Tn3 단량체 서브유닛을 연결하거나, 또는 상이한 Tn3 스캐폴드에 융합되거나 접합된 이종 모이어티와 Tn3 단량체 서브유닛을 연결하는 적어도 1개의 비 자연발생적 분자 간 이황화 결합을 포함한다.

[0343] 일부 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개 이상의 단량체 서브유닛으로 구성된 Tn3 다량체 스캐폴드를 형성하는 이황화 결합을 포함한다.

[0344] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 N 및/또는 C 말단 영역의 연장을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 본 설명에 기술된 바와 같이 혈청 반감기를 증가시키기 위한 변경을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 스캐폴드는 이 스캐폴드의 소수성 코어를 안정화시키기 위해 적어도 1개의 아미노산 잔기의 추가, 결실 또는 치환을 포함한다.

다량체 Tn3 스캐폴드

[0345] 본 발명의 일 양태는 직렬로 연결된 적어도 2개의 본 발명의 Tn3 단량체 서브유닛을 포함하는 다량체 Tn3 스캐폴드를 제공하는데, 이때 이러한 단량체들 중 적어도 한 개의 단량체는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛이다. 이러한 다량체 Tn3 스캐폴드는 다수의 포맷으로 조립될 수 있다. 특정 양태에서, 본 발명은 다량체 Tn3 스캐폴드를 제공하는데, 이때 적어도 2개의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 웨პ티드 링커를 통해 직렬로 연결되어 있다. 일부 구현예에서, 다량체 Tn3 스캐폴드는 원자가 및/또는 표적 결합의 결합력, 또는 표적(들)의 다른 작용의 증가를 나타낸다. 일부 구현예에서, 다수의 단량체 서브유닛들이 동일한 표적에 결합할 때 원자가 및/또는 표적 결합의 결합력의 증가는 달성된다. 일부 구현예에서, 원자가의 증가는 표적 단백질의 이량체화를 증가시키는 것과 같이 표적에 대한 특정 작용을 향상시킨다.

[0346] 특정 구현예에서, 본 발명의 다량체 Tn3 스캐폴드는 직렬로 연결된 적어도 2개의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 각각의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 적어도 1개의 표적에 결합하고, 각각의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 복수의 루프 영역에 연결된 복수의 베타 가닥을 포함하고, 이때 적어도 1개의 루프는 모 Tn3 스캐폴드(서열 번호 3)의 동쪽 루프의 비 자연발생적 변이체이다.

[0347] 일 구현예에서, 다량체 Tn3 스캐폴드는 예를 들면, CD40L 특이적 단량체 서브유닛들의 직접적인 연결에 의해, 또는 링커, 예를 들면, 웨პ티드 링커의 포함에 의해, CD40L 특이적 단량체 서브유닛들 사이의 공유 결합을 통해 생성된다. 구체적인 예에서, 공유 결합된 Tn3 스캐폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 암호화하는 융합 유전자를 구축함으로써, 또는 대안적으로, 시스테인 잔기에 대한 코돈을 CD40L 특이적 단량체 서브유닛 내로 조작하여 도입하고 발현 생성물들 사이에 이황화 결합을 형성할 수 있게 함으로써 생성된다.

[0348] 일 구현예에서, 본 발명의 다량체 Tn3 스캐폴드는 임의의 추가적인 개재 아미노산 없이 서로 직접적으로 연결된 적어도 2개의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛들을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 다량체 Tn3 스캐폴드는 링커, 예를 들면, 웨პ티드 링커를 통해 직렬로 연결된 적어도 2개의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛들을 포함한다.

[0349] 특정 구현예에서, 본 발명의 다량체 Tn3 스캐폴드는 웨პ티드 링커를 통해 직렬로 연결된 적어도 2개의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛들을 포함하는데, 이때 웨პ티드 링커는 1개 내지 약 1000개, 1개 내지 약 500개, 1개 내지

약 250개, 1개 내지 약 100개, 1개 내지 약 50개, 또는 1개 내지 약 25개의 아미노산을 포함한다. 특정 구현예에서, 다량체 Tn3 스캐폴드는 웨티드 링커를 통해 직렬로 연결된 적어도 2개의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛들을 포함하는데, 이때 웨티드 링커는 1개 내지 약 20개, 1개 내지 약 15개, 1개 내지 약 10개, 또는 1개 내지 약 5개의 아미노산을 포함한다.

[0352] 특정 구현예에서, 다량체 Tn3 스캐폴드는 링커, 예를 들면, 웨티드 링커를 통해 직렬로 연결된 적어도 2개의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 링커는 기능성 모이어티이다. 기능성 모이어티는 이러한 다량체 Tn3 스캐폴드의 원하는 기능 및/또는 특성에 기초하여 선택될 것이다. 예를 들면, 정제에 유용한 기능성 모이어티(예를 들면, 히스티딘 태그)가 링커로서 사용될 수 있다. 링커로서 유용한 기능성 모이어티는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 세포독성제, 방사성 핵종, 조영제, 비오틴, 이량체화 도메인, 인간 혈청 알부민(HSA) 또는 이의 FcRn 결합 부분, 항체의 도메인 또는 단편, 단일쇄 항체, 도메인 항체, 알부민 결합 도메인, IgG 분자, 효소, 리간드, 수용체, 결합 웨티드, 비 Tn3 스캐폴드, 에피토프 태그, 재조합 폴리펩티드 중합체, 사이토카인 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 링커로서 사용될 수 있는 구체적인 웨티드 링커 및 기능성 모이어티는 아래에 개시되어 있다.

[0353] 특정 구현예에서, 기능성 모이어티는 면역글로불린 또는 이의 단편이다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 또는 이의 단편은 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 적어도 하나의 Fc γ R 매개 이팩터 기능, 예컨대, ADCC(항체 의존적 세포 매개 세포독성)를 유도하지 못한다. Fc 도메인은 적어도 한 가지의 Fc γ R 매개성 이팩터 기능을 감소시키거나 제거하도록 변경될 수 있다는 것이 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들면, 미국 특허 번호 5,624,821 및 6,737,056호 참조.

[0354] 일부 구현예에서, 다량체 Tn3 스캐폴드는 하나 이상의 링커를 통해 연결된 적어도 2개의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때 각각의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛 사이에 개재된 링커는 동일한 링커 또는 상이한 링커일 수 있다. 일부 구현예에서, 링커는 동일한 링커 또는 상이한 링커일 수 있는 다수의 링커를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 복수의 링커들이 연결되어 있을 때, 일부 또는 모든 링커들은 기능성 모이어티일 수 있다.

스캐폴드 결합 화학양론

[0357] 일부 구현예에서, 단량체 또는 다량체 Tn3 스캐폴드는 단일 CD40L 분자 또는 상이한 CD40L 표적 분자들 상의 상이한 에피토프들일 수 있는 상이한 에피토프들에 대해 특이적인 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 다량체 Tn3 스캐폴드는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함할 수 있는데, 이때, 각각의 서브유닛은 하나 이상의 CD40L 분자 상의 하나 이상의 상이한 에피토프를 표적화한다.

[0358] 다른 구현예에서, 단량체 또는 다량체 Tn3 스캐폴드는 동일한 CD40L 분자 상의 2개 이상의 상이한 에피토프들에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 상이한 에피토프들은 비중첩 에피토프들이다. 다른 구현예에서, 상이한 에피토프들은 중첩 에피토프들이다.

[0359] 또 다른 특정 구현예에서, 단량체 또는 다량체 Tn3 스캐폴드는 CD40L 분자 상의 하나 이상의 에피토프에 결합할 수 있고, 추가적으로 제2 CD40L 분자 상의 하나 이상의 에피토프에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 상이한 표적 분자들은 올리고머 복합체, 예를 들면, 삼량체 CD40L 복합체의 일부분이다.

[0360] 또 다른 특정 구현예에서, 단량체 또는 다량체 Tn3 스캐폴드는 CD40L 삼량체 상의 단일 에피토프에 결합할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 단량체 또는 다량체 Tn3 스캐폴드는 적어도 2개의 CD40L 삼량체 상의 동일한 에피토프에 결합할 수 있다.

[0361] 특정 구현예에서, 단량체 또는 다량체 Tn3 스캐폴드는 인접 세포 표면 상의 2개 이상의 카피의 CD40L 분자 상의 동일한 에피토프에 결합할 수 있다. 특정 구현예에서, 단량체 또는 다량체 Tn3 스캐폴드는 용액 중의 2개 이상의 카피의 CD40L 분자 상의 동일한 에피토프에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 단량체 또는 다량체 Tn3 스캐폴드는 동일한 또는 상이한 결합 친화성 및/또는 결합력으로 CD40L 상의 동일한 에피토프 또는 상이한 에피토프에 결합할 수 있다.

[0362] 또 다른 구현예에서, 단량체 또는 다량체 Tn3 스캐폴드는 하나 이상의 카피의 CD40L 상의 에피토프에 결합할 수 있고, 표적에 대한 원하는 작용을 (예를 들면, 상승 작용에 의해) 달성할 수 있거나 향상시킬 수 있다. 예컨대, 수용체와의 결합을 막거나 올리고머화를 막을 수 있다.

[0363] 또한, 본 발명의 단량체 또는 다량체 Tn3 스캐폴드가 복수의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛들, 예를 들면, 상이한 단량체들을 포함하고, 이때 각각의 단량체는 CD40L 상의 상이한 에피토프들을 표적화할 때, 이러한 단량체 서브유닛들은 특정 패턴 또는 특별한 배향에 따라 정렬되어 특정 생물학적 효과를 달성할 수 있거나 향상시킬 수 있다. 단량체 서브유닛들의 이러한 조합들은 조립된 후 당해 분야에 공지된 방법을 이용하여 평가될 수 있다.

[0364] 나아가, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 마커 서열, 예컨대, 정제를 용이하게 하기 위한 웹티드에 융합될 수 있다. 일부 구현예에서, 마커 아미노산 서열은 폴리히스티딘 웹티드(His-태그), 예를 들면, 옥타-히스티딘-태그(His-8-태그) 또는 헥사-히스티딘-태그(His-6-태그), 예컨대, 다른 벡터들(이들 중 대부분은 상업적으로 이용 가능함) 중에서도 pQE 발현 벡터(큐아젠 인코포레이티드(QIAGEN, Inc.), 미국 캘리포니아주 91311 채스워쓰 에튼 애비뉴 9259 소재)에 제공된 태그이다. 예를 들면, Gentz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, 1989에 기술된 바와 같이, 폴리히스티딘은 융합 단백질을 편리하게 정제할 수 있게 한다. 정제에 유용한 다른 웹티드 태그에는 인플루엔자 혈구응집소 단백질(예컨대, Wilson *et al.*, Cell 37:767, 1984 참조)로부터 유래된 에피토프에 상응하는 혈구응집소("HA") 태그, FLAG 태그, Strep-태그, myc-태그, V5 태그, GFP-태그, AU1-태그, AU5-태그, ECS-태그, GST-태그 또는 OLLAS 태그가 포함되나, 이에 한정되지 않는다.

[0365] 본 발명의 Tn3 스캐폴드를 포함하는 추가적인 융합 단백질은 유전자 셔플링, 모티프 셔플링, 엑손 셔플링 및/또는 코돈 셔플링 기법("DNA 셔플링"으로 총칭됨)을 통해 생성될 수 있다.

[0366] DNA 셔플링은 표적에 대한 Tn3 스캐폴드의 작용을 변경시키는 데에(예를 들면, 보다 높은 친화성 및 보다 낮은 해리 속도를 갖는 스캐폴드를 생성하는 데에) 이용될 수 있다. Tn3 스캐폴드는 오류 유발 PCR에 의한 무작위 돌연변이유발, 무작위 뉴클레오티드 삽입, 또는 재조합 이전의 기타 방법에 의해 변경될 수 있다. 특정 표적에 결합하는 스캐폴드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 하나 이상의 부분은 하나 이상의 이종 분자의 하나 이상의 성분, 모티프, 구획, 부분, 도메인, 단편 등과 재조합될 수 있다.

항체 및 Fc 도메인 융합체

[0369] 일부 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 Fc 도메인을 포함하나 이에 한정되지 않는 항체(예를 들면, IgG)의 도메인 또는 단편에 융합된 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다.

[0370] 일부 구현예에서, 단지 1개의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 항체의 도메인 또는 단편에 접합되거나 융합된다. 예를 들면, 단일 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 항체의 도메인 또는 단편(예를 들면, 항체의 중쇄 또는 경쇄)의 폴리웹티드의 N 말단에 융합될 수 있다. 다른 구현예에서, Tn3 스캐폴드는 하나 이상의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 항체의 도메인 또는 단편(예를 들면, 항체의 중쇄 및/또는 경쇄, 또는 Fc 도메인)의 폴리웹티드의 N 말단 및/또는 C 말단에 융합시키거나 접합시킴으로써 생성된다.

[0371] 일부 구현예에서, 항체의 도메인 또는 단편에 융합된 일부 또는 모든 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 동일하다. 몇몇 다른 구현예에서, 항체의 도메인 또는 단편에 융합된 일부 또는 모든 CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 상이하다.

[0372] 특정 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 Fc 도메인에 융합된 1개의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 Fc 도메인에 융합된 적어도 2개의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다. 일 특정 구현예에서, Fc 도메인에 융합된 CD40L 특이적 단량체 서브유닛들 중 2개는 동일하다. 일 특정 구현예에서, Fc 도메인에 융합된 CD40L 특이적 단량체 서브유닛들 중 2개는 상이하다. 일 특정 구현예에서, Fc 도메인에 융합된 2개의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛들은 서로 직렬로 연결되고, CD40L 특이적 단량체 서브유닛들 중 하나는 Fc 도메인에 융합된다.

[0373] 일부 구현예에서, 본 발명의 상이한 Tn3 스캐폴드들은 이종이량체 형성에 유리한 Fc 도메인 돌연변이를 이용하여 이량체화될 수 있다. Fc 영역의 변이체(예를 들면, 아미노산 치환 및/또는 부가 및/또는 결실)는 항체의 이벡터 기능을 향상시키거나 감소시키고, 항체의 약동학적 성질(예를 들면, 반감기)을 변경시킬 수 있다는 것이 당해 분야에 공지되어 있다. 따라서, 특정 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는, Tn3 스캐폴드의 기능적 및/또는 약동학적 성질을 바꾸기 위해 하나 이상의 변경이 Fc 영역 내에서 이루어진, 변경된 Fc 영역을 포함하는 Fc 도메인(들)을 포함한다. 특정 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는, 적어도 하나의 Fc γR 매개 이벡터 기능을 감소시키거나 제거하기 위해 하나 이상의 변경이 Fc 영역 내에서 이루어진, 변경된 Fc 영역을 포함하는 Fc

도메인(들)을 포함한다.

[0374] Fc 영역의 글리코실화는 이팩터 기능 및/또는 항염증 활성을 증가시키거나 감소시키도록 변경될 수 있다는 점도 공지되어 있다. 따라서, 일 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는, Tn3 스캐폴드의 세포독성 및/또는 항염증 성질을 바꾸기 위해 아미노산 잔기의 변경된 글리코실화를 갖는 Fc 영역을 포함한다.

[0376] Tn3 스캐폴드 위상기하학

[0377] 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 임의의 적합한 공간적 정렬로 Fc 도메인, 항체 경쇄 및 항체 중쇄의 C 말단에 융합될 수 있다. 예를 들어, 고려되는 스캐폴드 위상기하학에 대한 상세한 설명은 국제 공개공보 PCT/US2011/032184 참조.

[0379] 스캐폴드의 생성

[0380] 본 설명에 기술된 Tn3 스캐폴드는 새로운 또는 개선된 표적 결합 단백질을 개발하기 위한 임의의 기법에서 사용될 수 있다. 한 구체적인 예에서, 이러한 표적은 고체 지지체, 예컨대, 컬럼 수지 또는 마이크로타이터 플레이트 웰 상에 고정되고, 이러한 표적은 후보 스캐폴드-기반 결합 단백질의 라이브러리와 접촉된다. 이러한 라이브러리는 CDR 유사 루프들의 서열 및/또는 길이의 무작위화를 통해, Tn3 스캐폴드로부터 구축된 클론들로 구성될 수 있다.

[0381] 이와 관련하여, 박테리오파지(파지) 디스플레이의 큰 올리고펩티드 라이브러리를 스크리닝하여 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 그러한 라이브러리의 구성원(들)을 확인할 수 있게 하는 잘 공지된 한 가지 기법이다. 파지 디스플레이의 변이체 폴리펩티드가 박테리오파지 입자 표면의 외피 단백질과의 융합 단백질로 디스플레이되는 기법이다(Scott, J. K. and Smith, G. P. (1990) Science 249: 386). 생물정보학 접근법을 이용하여 자연발생적인 FnIII 도메인의 루프 길이 및 다양성 선호도를 결정할 수 있다. 이 분석을 이용하여 루프 길이 및 서열 다양성에 대한 선호도는 "제한된 무작위화" 접근법을 개발하는 데에 이용될 수 있다. 이 제한된 무작위화에서, 상대적인 루프 길이 및 서열 선호도가 라이브러리 전략의 개발에 도입된다. 루프 길이 및 서열 다양성 분석을 라이브러리 개발에 통합하면 제한된 무작위화가 초래된다(즉, 무작위화된 루프 내의 특정 위치는 어떤 아미노산이 그 위치에 존재할 수 있는지가 한정된다).

[0382] 또한, 본 발명은 비 자연발생적 Tn3 스캐폴드의 다양한 집단을 포함하는 재조합 라이브러리를 제공한다. 일 구현예에서, 이러한 라이브러리는 복수의 루프 영역에 연결된 복수의 베타 가닥 도메인을 포함하는 비 자연발생적 Tn3 스캐폴드를 포함하는데, 이때, 상기 루프들 중 하나 이상은 적어도 하나의 아미노산에 의한 결실, 치환 또는 부가에 의해 달라진다. 특정 구현예에서, 이러한 라이브러리는 야생형 Tn3 스캐폴드로부터 유도된 Tn3 스캐폴드를 포함한다.

[0383] 위에서 상술된 바와 같이, 스캐폴드의 다양한 베타 가닥들을 연결하는 루프들은 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화될 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 라이브러리는 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화된 적어도 1개의 루프를 갖는 Tn3 스캐폴드를 포함한다. 일 구현예에서, Tn3 스캐폴드의 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 적어도 6개의 루프는 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다. 일 구현예에서, 적어도 1개의 루프는 불변 상태로 유지되지만, 적어도 1개의 추가적인 루프는 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다. 또 다른 구현예에서, 루프 AB, CD 및 EF 중 적어도 1개, 적어도 2개 또는 모든 3개의 루프는 불변 상태로 유지되지만, 루프 BC, DE 및 FG 중 적어도 1개, 적어도 2개 또는 모든 3개의 루프는 길이 또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다. 또 다른 구현예에서, 루프 AB, CD 및 EF 중 적어도 1개, 적어도 2개 또는 모든 3개의 루프는 무작위화되지만, 루프 BC, DE 및 FG 중 적어도 1개, 적어도 2개 또는 모든 3개의 루프는 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다.

[0384] 특정 구현예에서, 본 발명의 라이브러리는 FnIII 스캐폴드를 포함하는데, 이때 A 베타 가닥은 서열 번호 10 또는 11을 포함하고, B 베타 가닥은 서열 번호 12를 포함하고, C 베타 가닥은 서열 번호 13 또는 14를 포함하고, D 베타 가닥은 서열 번호 15를 포함하고, E 베타 가닥은 서열 번호 16을 포함하고, F 베타 가닥은 서열 번호 17을 포함하고, G 베타 가닥은 서열 번호 18을 포함한다.

[0385] 특정 구현예에서, 본 발명의 라이브러리는 FnIII 스캐폴드를 포함하는데, 이때 A 베타 가닥은 서열 번호 10 또는 11로 구성되고, B 베타 가닥은 서열 번호 12로 구성되고, C 베타 가닥은 서열 번호 13 또는 14로 구성되고,

D 베타 가닥은 서열 번호 15로 구성되고, E 베타 가닥은 서열 번호 16으로 구성되고, F 베타 가닥은 서열 번호 17로 구성되고, G 베타 가닥은 서열 번호 18로 구성된다.

[0386] 특정 구현예에서, 본 발명의 라이브러리는 FnIII 스캐폴드를 포함하는데, 이때 A 베타 가닥은 필수적으로 서열 번호 10 또는 11로 구성되고, B 베타 가닥은 필수적으로 서열 번호 12로 구성되고, C 베타 가닥은 필수적으로 서열 번호 13 또는 14로 구성되고, D 베타 가닥은 필수적으로 서열 번호 15로 구성되고, E 베타 가닥은 필수적으로 서열 번호 16으로 구성되고, F 베타 가닥은 필수적으로 서열 번호 17로 구성되고, G 베타 가닥은 필수적으로 서열 번호 18로 구성된다.

[0387] 위에서 상술된 바와 같이, 루프 내의 하나 이상의 잔기는 불변 상태로 유지될 수 있지만, 다른 잔기는 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다. 선택적으로 또는 대안적으로, 루프 내의 하나 이상의 잔기는 소정의, 그리고 제한된 수의 상이한 아미노산으로 유지될 수 있지만, 다른 잔기는 길이 및/또는 서열 다양성을 위해 무작위화된다. 따라서, 본 발명의 라이브러리는 축퇴 공통 서열 및/또는 하나 이상의 불변 아미노산 잔기를 갖는 하나 이상의 루프를 포함할 수 있는 Tn3 스캐폴드를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 라이브러리는 무작위화된 BC 루프를 갖는 Tn3 스캐폴드를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 라이브러리는 무작위화된 BC 루프를 갖는 Tn3 스캐폴드를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 라이브러리는 무작위화된 BC 루프를 갖는 Tn3 스캐폴드를 포함한다.

[0388] 일 구현예에서, 본 발명의 라이브러리는 무작위화된 DE 루프를 갖는 Tn3 스캐폴드를 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 라이브러리는 무작위화된 FG 루프를 갖는 Tn3 스캐폴드를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 라이브러리는 무작위화된 FG 루프를 갖는 FnIII 스캐폴드를 포함한다.

[0389] 특정 구현예에서, 본 발명의 라이브러리는 스캐폴드를 포함하는데, 이때 이러한 스캐폴드는 아미노산 서열:

[0390] IEV(X_{AB})_nALITW(X_{BC})_nCELX₁YGI(X_{CD})_nTTIDL(X_{DE})_nYSI(X_{EF})_nYEVSLIC(X_{FG})_nKETFTT

[0391] 을 포함하는데, 이때,

[0392] (a) X_{AB}, X_{BC}, X_{CD}, X_{DE}, X_{EF}, 및 X_{FG}는 각각 AB, BC, CD, DE, EF 및 FG 루프의 서열에 존재하는 아미노산 잔기를 나타내고;

[0393] (b) X₁은 아미노산 잔기 A 또는 T를 나타내고;

[0394] (c) 루프의 길이 n은 2 내지 26사이의 정수이다.

[0395] 일부 구현예에서, 본 발명의 라이브러리는 아미노산 서열:

[0396] IEVKDVTDTTALITWX₁DX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈CELYGIKDVPGRRTTIDLWX₉HX₁₀AX₁₁YSIGNLKPDEYEVSLICRX₁₂GDMSSNPAKETFTT(서열 번호 167)

[0397] 을 포함하는 본 발명의 CD40L 특이적 Tn3 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때,

[0398] (a) X₁은 아미노산 잔기 세린(S) 또는 류신(L)을 나타내고;

[0399] (b) X₂는 아미노산 잔기 아스파르트산(D) 또는 글루탐산(E)을 나타내고;

[0400] (c) X₃은 아미노산 잔기 히스티딘(H), 이소류신(I), 발린(V), 페닐알라닌(F) 또는 트립토판(W)을 나타내고;

[0401] (d) X₄는 아미노산 잔기 알라닌(A), 글리신(G), 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;

[0402] (e) X₅는 아미노산 잔기 글루탐산(E), 류신(L), 글루타민(Q), 세린(S), 아스파르트산(D) 또는 아스파라긴(N)을 나타내고;

[0403] (f) X₆은 아미노산 잔기 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)을 나타내고;

[0404] (g) X₇은 아미노산 잔기 이소류신(I), 발린(V), 히스티딘(H), 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;

[0405] (h) X₈은 아미노산 잔기 글리신(G), 트립토판(W) 또는 발린(V)을 나타내고;

- [0406] (i) X_9 는 아미노산 잔기 트립토판(W), 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0407] (j) X_{10} 은 아미노산 잔기 세린(S), 글루타민(Q), 메티오닌(M) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;
- [0408] (k) X_{11} 은 아미노산 잔기 트립토판(W) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;
- [0409] (l) X_{12} 는 아미노산 잔기 아르기닌(R) 또는 세린(S)을 나타낸다.
- [0410] 일부 구현예에서, 본 발명의 라이브러리는 아미노산 서열:
- [0411] IEVX₁DVTDTTALITWX₂X₃RSX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀CELX₁₁YGIKDVPGDRTTIDLX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅YVHYSIGNLKPDTX₁₆YEVSLICLTTDGTYX₁₇NPAKETFT
T(서열 번호 171)
- [0412] 을 포함하는 본 발명의 CD40L 특이적 Tn3 단량체 서브유닛을 포함하는데, 이때,
- [0413] (a) X_1 은 아미노산 잔기 리신(K) 또는 글루탐산(E)을 나타내고;
- [0414] (b) X_2 는 아미노산 잔기 트레오닌(T) 또는 이소류신(I)을 나타내고;
- [0415] (c) X_3 은 아미노산 잔기 아스파라긴(N) 또는 알라닌(A)을 나타내고;
- [0416] (d) X_4 는 아미노산 잔기 세린(S), 류신(L), 알라닌(A), 페닐알라닌(F) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0417] (e) X_5 는 아미노산 잔기 티로신(Y), 알라닌(A), 글리신(G), 발린(V), 이소류신(I) 또는 세린(S)을 나타내고;
- [0418] (f) X_6 은 아미노산 잔기 티로신(Y), 세린(S), 알라닌(A) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;
- [0419] (g) X_7 은 아미노산 잔기 아스파라긴(N), 아스파르트산(D), 히스티딘(H) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0420] (h) X_8 은 아미노산 잔기 류신(L), 페닐알라닌(F), 히스티딘(H) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0421] (i) X_9 는 아미노산 잔기 히스티딘(H), 프롤린(P), 세린(S), 류신(L) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;
- [0422] (j) X_{10} 은 아미노산 잔기 글리신(G), 페닐알라닌(F), 히스티딘(H) 또는 티로신(Y)을 나타내고;
- [0423] (k) X_{11} 은 아미노산 잔기 알라닌(A) 또는 트레오닌(T)을 나타내고;
- [0424] (l) X_{12} 는 아미노산 잔기 세린(S), 아스파라긴(N), 글루탐산(E), 아스파라긴(R) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;
- [0425] (m) X_{13} 은 아미노산 잔기 세린(S), 글루타민(Q), 트레오닌(T), 아스파라긴(N) 또는 알라닌(A)을 나타내고;
- [0426] (n) X_{14} 는 아미노산 잔기 프롤린(P), 발린(V), 이소류신(I) 또는 알라닌(A) 또는 아미노산의 부재를 나타내고;
- [0427] (o) X_{15} 는 아미노산 잔기 이소류신(I) 또는 아미노산의 부재를 나타내고;
- [0428] (p) X_{16} 은 아미노산 잔기 글루탐산(E) 또는 리신(K)을 나타내고;
- [0429] (q) X_{17} 은 아미노산 잔기 세린(S) 또는 아스파라긴(N)을 나타낸다.
- [0430] 본 발명은 본 발명의 라이브러리를 스크리닝함으로써 표적, 예를 들면, CD40L에 결합하고, 모 Tn3 스캐폴드에 비해 증가된 안정성 또는 표적, 예를 들면, CD40L에 대한 개선된 작용을 갖는 재조합 Tn3 스캐폴드를 확인하는 방법을 더 제공한다.
- [0431] 특정 구현예에서, 모 Tn3 스캐폴드에 비해 증가된 단백질 안정성을 갖고 표적에 특이적으로 결합하는 재조합 Tn3 스캐폴드를 확인하는 방법은
- [0432] 스캐폴드: 표적 리간드 복합체를 형성하기에 적합한 조건 하에서 표적 리간드를 본 발명의 라이브러리와 접촉시키는 단계;

- [0433] 이러한 복합체로부터 표적 리간드에 결합하는 스캐폴드를 수득하는 단계; 및
- [0434] 단계 (b)에서 수득된 스캐폴드의 안정성이 야생형 Tn3 스캐폴드의 안정성보다 큰지를 결정하는 단계
- [0435] 를 포함한다.
- [0436] 동일한 방법을 이용하여 표적에 대한 개선된 결합 친화성, 결합력 등을 갖는 재조합 Tn3 스캐폴드를 확인할 수 있다. 일 구현예에서, 단계 (a)에서 본 발명의 스캐폴드 라이브러리는 고정된 표적과 함께 항온처리된다. 일 구현예에서, 단계 (b)에서 스캐폴드:표적 리간드 복합체를 세척하여 비 특이적 결합제를 제거하고, 가장 단단히 밀착된 결합제를 매우 엄격한 조건 하에서 용리시키고 PCR로 분석하여 서열 정보를 회수한다. 단계 (b)에서 수득된 결합제 및/또는 서열 정보는, 선택 과정을 반복하는 데에 이용될 수 있는 본 설명에 개시된 또는 당업자에게 공지된 방법을 이러한 서열의 추가적인 돌연변이유발과 함께 또는 이러한 추가적인 돌연변이유발 없이 이용하여, 새로운 라이브러리를 생성하는 데에 사용될 수 있다는 것이 구체적으로 고려된다. 일부 구현예에서, 항원에 대한 충분한 친화성을 갖는 결합제가 수득될 때까지 여러 라운드의 선별이 수행될 수 있다.
- [0437] 본 발명의 추가적인 구현예는 위에 기술된 바와 같이 본 발명의 스캐폴드를 포함하는 라이브러리를 암호화하는 단리된 핵산 문자들의 집합물(collection)이다.
- [0438] 본 발명의 스캐폴드는 친화성 성숙의 대상이 될 수 있다. 당해 분야에서 인정된 이 방법에서, 특이적 결합 단백질은 특정 표적에 대해 증가된 친화성을 선택하는 계획의 대상이 된다(Wu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95(11):6037-42) 참조). 그에 따른 본 발명의 스캐폴드는 친화성 성숙 전의 스캐폴드와 비교할 때 적어도 이 스캐폴드만큼 높은 결합 특성을 나타낼 수 있다.
- [0439] 또한, 본 발명은 표적에 결합하여 스캐폴드:표적 복합체를 형성할 수 있는 단백질 스캐폴드의 아미노산 서열을 확인하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 이러한 방법은 (a) 본 발명의 라이브러리를 고정된 또는 분리 가능한 표적과 접촉시키는 단계; (b) 스캐폴드:표적 복합체를 자유로운 스캐폴드로부터 분리하는 단계; (c) (b)의 분리된 스캐폴드의 복제를 유발하여, 낮아진 다양성을 갖는 것에 의해, 그리고 표적에 결합할 수 있는 디스플레이된 스캐폴드가 강화됨에 의해, (a)에서의 라이브러리와 구별되는 새로운 폴리펩티드 디스플레이 라이브러리를 발생시키는 단계; d) (c)의 신규 라이브러리를 사용하여 단계 (a) 및 단계 (b)를 선택적으로 반복하는 단계; 및 e) 단계 (d)로부터 수득된 종의 디스플레이된 스캐폴드를 암호화하는 영역의 핵산 서열을 결정하여, 표적에 결합할 수 있는 펩티드 서열을 유추하는 단계를 포함한다.
- [0440] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 라이브러리 스크린으로부터의 확인 후 더 무작위화될 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 본 설명에 기술된 방법을 이용하여 라이브러리로부터 확인된 스캐폴드의 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 적어도 6개의 루프를 더 무작위화하는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 이러한 더 무작위화된 스캐폴드는 표적에 결합할 수 있는 스캐폴드를 확인하는 후속 방법의 대상이 된다. 이 방법은 (a) 상기 더 무작위화된 스캐폴드를 고정된 또는 분리 가능한 표적과 접촉시키는 단계, (b) 더 무작위화된 스캐폴드:표적 복합체를 자유로운 스캐폴드로부터 분리하는 단계, (c) (b)의 분리된 스캐폴드의 복제를 유발하고, 단계 (a) 내지 (c)를 선택적으로 반복하는 단계, 및 (d) 상기 더 무작위화된 스캐폴드를 암호화하는 영역의 핵산 서열을 결정하여, 표적에 결합할 수 있는 펩티드 서열을 유추하는 단계를 포함한다.
- [0441] 추가적인 구현예에서, 이러한 더 무작위화된 스캐폴드는 제1 라이브러리에서 이전에 무작위화된 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 또는 적어도 6개의 무작위화된 루프를 포함한다. 대안적인 추가 구현예에서, 이러한 더 무작위화된 스캐폴드는 제1 라이브러리에서 이전에 무작위화되지 않은 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 또는 적어도 6개의 무작위화된 루프를 포함한다.
- [0442] 또한, 본 발명은 적어도 하나 이상의 표적에 결합하는 적어도 2개의 Tn3 스캐폴드를 수득하는 방법을 제공한다. 이 방법은 상호협력적으로 작용하여 특정 반응을 이끌어내는 물질들의 스크리닝을 가능하게 한다. 둘 이상의 스캐폴드의 상호협력을 요구하는 효율 활성이 요구될 때, 이러한 스크리닝을 이용하는 것이 유리할 수 있다. 이 방법은 라이브러리의 재구성(reformatting) 없이 다양체 복합체를 형성하는 상호협력적 물질들의 스크리닝을 가능하게 한다. 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 스캐폴드:표적 리간드 복합체가 형성될 수 있게 하는 조건 하에서 표적 리간드를 본 발명의 라이브러리와 접촉시키기, 상기 스캐폴드들을 (적어도 2개의 동일하거나 상이한 스캐폴드를 가까이 인접하여 함께 존재하게 하는 물질로 정의된) 가교제로 가교 연결시키기(이때 이러한 스캐폴드의 가교 연결은 검출 가능한 반응을 이끌어내는 것이다), 및 표적에 결합하는 상기 스캐폴드들을 이러한 복합체로부터 수득하기를 포함한다. 추가적인 구현예에서, 가교제는 스캐폴드 특이적 항체 또는 이의 단편, 에피토프 태그

특이적 항체 또는 이의 단편, 이량체화 도메인, 예컨대, Fc 영역, 이중나선 모티프(예를 들면, 류신 지퍼, 그러나 이에 한정되지 않음), 화학적 가교제, 또는 당해 분야에 공지된 또 다른 이량체화 도메인이다.

[0444] 친화성 성숙

본 발명의 Tn3 스캐폴드의 개발은 하나 이상의 시험관 내 또는 생체 내 친화성 성숙 단계를 수반할 수 있다. 일부 구현예에서, Tn3 단량체 서브유닛은 단일 친화성 성숙 단계를 거칠 수 있다. 다른 구현예에서, Tn3 단량체 서브유닛은 2개 이상의 친화성 성숙 단계를 거칠 수 있다. 일반적으로 모 Tn3 스캐폴드에서 아미노산 변화를 야기하거나, 또는 구체적으로 친화성 성숙된 Tn3 스캐폴드와 원하는 항원의 결합을 개선하는 아미노산 변화를 모 Tn3 스캐폴드의 루프에서 야기하는 임의의 친화성 성숙 접근법이 이용될 수 있다.

[0446] 이를 아미노산 변화는 예를 들면, 무작위 돌연변이유발, "워크 스루(walk through)" 돌연변이유발 및 "룩 스루(look through)" 돌연변이유발을 통해 달성될 수 있다. 이러한 돌연변이유발은 예를 들면, 오류 유발 PCR, 효모 또는 세균의 "돌연변이유발자" 균주, FnIII에 기반한 결합 분자의 전부 또는 일부의 초기의 합성 중에 무작위 또는 한정된 핵산 변화의 도입을 이용함으로써 달성될 수 있다. 친화성 성숙 및/또는 돌연변이유발을 수행하는 방법은 예를 들면, 미국 특허 번호 7,195,880, 6,951,725, 7,078,197, 7,022,479, 5,922,545, 5,830,721, 5,605,793, 5,830,650, 6,194,550, 6,699,658, 7,063,943; 5,866,344 및 PCT 공개공보 WO06023144에 기술되어 있다.

[0447] 이러한 친화성 성숙 방법은 항원에 대한 개선된 친화성을 갖는 Tn3 스캐폴드를 선택하기 위해 항원 결합 스크리닝 분석의 염격성이 증가될 것을 더 요구할 수 있다. 단백질-단백질 상호작용 분석의 염격성을 증가시키는, 당분야에서 인정된 방법이 여기에 이용될 수 있다. 일 구현예에서, 원하는 항원에 대한 Tn3 스캐폴드의 친화성을 감소시키기 위해 하나 이상의 분석 조건(예를 들면, 분석 완충액의 염 농도)이 변경된다. 또 다른 구현예에서, Tn3 스캐폴드가 원하는 항원에 결합하도록 허용된 시간의 길이가 감소된다.

[0448] 또 다른 구현예에서, 경쟁적 결합 단계가 단백질-단백질 상호작용 분석에 추가될 수 있다. 예를 들면, Tn3 스캐폴드가 먼저 원하는 고정된 항원에 결합하도록 허용될 수 있다. 그 다음, 항원에 대해 가장 낮은 친화성을 나타내는 Tn3 스캐폴드가 고정된 항원으로부터 용출되어 개선된 항원 결합 친화성을 갖는 Tn3 스캐폴드가 선택되도록 고정된 항원과의 결합을 두고 경쟁 작용하는 특정 농도의 고정되지 않은 항원을 추가한다. 분석에 첨가되는 고정되지 않은 항원의 농도를 증가시킴으로써 분석 조건의 염격성을 더 증가시킬 수 있다.

[0449] 또한, 개선된 항원 결합을 갖는 하나 이상의 Tn3 스캐폴드를 강화하기 위해, 스크리닝 방법은 다회 라운드의 선택이 필요할 수 있다. 일 구현예에서, 각각의 라운드의 선택에서, 추가적인 아미노산 돌연변이가 Tn3 스캐폴드 내로 도입된다. 또 다른 구현예에서, 각각의 라운드의 선택에서, 원하는 항원에 대한 결합의 염격성을 증가시켜, 항원에 대해 증가된 친화성을 갖는 Tn3 스캐폴드를 선택한다.

[0450] 일부 구현예에서, 친화성 성숙은 Tn3의 BC, DE 및 FG 루프의 부분의 포화 돌연변이유발에 의해 수행된다. 일부 구현예에서, 포화 돌연변이유발은 쿤켈(Kunkel) 돌연변이유발을 이용함으로써 수행된다. 다른 구현예에서, 포화 돌연변이유발은 PCR을 이용함으로써 수행된다.

[0451] 일부 구현예에서, 적어도 1회, 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회, 적어도 5회 또는 5회 초파의 라운드의 친화성 성숙이 적용된다. 일부 구현예에서, 포화 돌연변이유발은 1개의 루프에만 적용되는 반면, 일부 다른 구현예에서는 1개의 루프 또는 루프의 일부만이 1회 라운드의 친화성 성숙 동안 돌연변이된다. 일부 구현예에서, 1개 초파의 루프 또는 1개 초파의 루프의 일부가 동일한 라운드의 친화성 성숙 동안 돌연변이된다.

[0452] 다른 구현예에서, BC, DE 및 FG 루프는 동일한 라운드의 친화성 성숙 동안 동시에 돌연변이된다.

[0453] 단량체들이 동일한 표적의 상이한 에피토프들에 결합하는 다량체 Tn3 스캐폴드로 조립되는 경우, 각각의 결합 특이성은 독립적으로 스크리닝될 수 있다.

[0454] 일부 구현예에서, 파지 디스플레이 라이브러리를 이용하여 루프를 무작위화한다. 일부 구현예에서, 당해 분야에서 인정된 방법을 이용하여 Tn3 스캐폴드와 원하는 표적의 결합을 결정할 수 있다. 또한, 당해 분야에서 인정된 방법을 이용하여 스크리닝에서 확인된 Tn3 스캐폴드의 아미노산 서열을 결정할 수 있다.

[0455] 일부 구현예에서, 본 발명의 단량체 친화성 성숙된 스캐폴드는, 표면 플라스몬 공명 또는 당해 분야에 공지된 기타 분석법에 의해 측정할 때, 친화성 성숙 전의 동일한 Tn3 스캐폴드에 비해 적어도 5배, 적어도 10배, 적어

도 20배, 적어도 40배, 적어도 60배, 적어도 80배 또는 적어도 100배 이상의 증가된 CD40L에 대한 친화성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 본 발명의 단량체 친화성 성숙된 스캐폴드는, 표면 플라스몬 공명 또는 당해 분야에 공지된 기타 분석법에 의해 측정한 5 μM 미만, 1 μM 미만, 500 μM 미만, 250 μM 미만, 100 μM 미만 또는 50 μM 미만의 해리 상수(K_d)를 갖는다.

[0456] 이들 친화성 성숙 방법은 바람직한 개선된 결합 성질, 예컨대, 증가된 친화성 또는 기타 바람직한 특성, 예컨대, 유리한 약동학적 성질, 높은 효능, 낮은 면역원성, 증가된 또는 감소된 교차반응성 등을 갖는 Tn3 스캐폴드를 개발하는 데에 적용될 수 있다.

[0458] 직렬 반복부의 생성

[0459] 2개의 CD40L 특이적 단량체 서브유닛들을 연결하여 형성된 이량체인 직렬 구조체의 연결은 II형 제한효소 및 IIS형 제한효소를 포함하나 이에 한정되지 않는, 당해 분야에 공지된 제한효소를 사용하여 제한 부위에서 올리고뉴클레오티드들을 결찰시킴으로써 생성할 수 있다.

[0460] 본 발명의 다량체 Tn3 스캐폴드는 본 설명에 기술된 바와 같이 C 말단 및/또는 N 말단에서, 및/또는 도메인들 사이에서 링커를 포함할 수 있다. 또한, 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개 또는 적어도 8개의 폴리펩티드 스캐폴드를 포함하는 본 발명의 스캐폴드는

[0461] (i) VL, CL, VH 및 CH1 도메인을 갖는 Fab 단편;

[0462] (ii) CH1 도메인의 C 말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 갖는 Fab 단편인 Fab' 단편;

[0463] (iii) VH 및 CH1 도메인을 갖는 Fd 단편;

[0464] (iv) VH 및 CH1 도메인을 갖고 CH1 도메인의 C 말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 갖는 Fd' 단편;

[0465] (v) 항체의 한 팔의 VL 및 VH 도메인을 갖는 Fv 단편;

[0466] (vi) VH 도메인으로 구성된 dAb 단편;

[0467] (vii) 단리된 CDR 영역;

[0468] (viii) 헌지 영역에서 이황화 가교에 의해 연결된 2개의 Fab' 단편들을 포함하는 2가 단편인 F(ab')2 단편;

[0469] (ix) 단일쇄 항체 분자(예를 들면, 단일쇄 Fv; scFv);

[0470] (x) 동일한 폴리펩티드 쇄 내의 경쇄 가변 도메인(VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하는, 2개의 항원 결합 부위를 갖는 "디아바디";

[0471] (xi) 상보적인 경쇄 폴리펩티드와 함께 한 쌍의 항원 결합 영역을 형성하는 한 쌍의 직렬 Fd 절편(VH-CH1-VHCH1)을 포함하는 "선형 항체";

[0472] (xii) 전체 길이의 항체; 및

[0473] (xiii) 헌지 영역 및/또는 CH1 영역의 전부 또는 일부를 추가로 포함할 수 있는, CH2-CH3을 포함하는 Fc 영역

[0474] 으로부터 선택되는 항체 모이어티를 포함하나, 이에 한정되지 않는, 이량체화 도메인에 융합될 수 있거나 접합될 수 있다.

[0476] Tn3 스캐폴드 제조

[0477] 본 발명의 Tn3 스캐폴드의 재조합 발현은 Tn3 스캐폴드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 발현 벡터의 구축을 요구한다. 일단 Tn3 스캐폴드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 수득되었으면, Tn3 스캐폴드를 제조하기 위한 벡터는 당해 분야에서 잘 공지된 기법을 이용한 재조합 DNA 기술에 의해 제조할 수 있다. 따라서, Tn3 스캐폴드 암호화 뉴클레오티드 서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드를 발현시켜 단백질을 제조하는 방법이 본 설명에 기술되어 있다. 당업자에게 잘 공지된 방법을 이용하여, 스캐폴드 폴리펩티드 암호화 서열 및 적절한 전사 및 번역 조절 신호를 함유하는 발현 벡터를 구축할 수 있다. 이들 방법들은 예를 들면, 시험관 내 재조합 DNA 기법, 합성 기법 및 생체 내 유전자 재조합을 포함한다. 따라서, 본 발명은 프로모터에 작동가능하게 연결된,

본 발명의 Tn3 스캐폴드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 복제 가능한 벡터를 제공한다.

[0478] 발현 벡터를 통상적인 기법으로 숙주 세포에게 전달한 다음, 형질감염된 세포를 통상적인 기법으로 배양하여 본 발명의 Tn3 스캐폴드를 제조한다. 따라서, 본 발명은 이종 프로모터에 작동 가능하게 연결된, 본 발명의 스캐폴드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 숙주 세포를 포함한다. 적합한 숙주 세포는 미생물, 예컨대, 세균(예를 들면, 대장균 및 *B. 서브틸리스*(*subtilis*))을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0479] 다양한 숙주-발현 벡터 시스템을 이용하여 본 발명의 Tn3 스캐폴드를 발현시킬 수 있다. 이러한 숙주-발현 시스템은 관심 있는 암호화 서열을 제조한 후에 정제할 수 있는 비히클을 나타낼 뿐만 아니라, 적절한 뉴클레오티드 암호화 서열로 형질전환되거나 형질감염될 때 본 발명의 스캐폴드를 제자리에서 발현할 수 있는 세포도 나타낸다. 이들은 스캐폴드 암호화 서열을 함유하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 미생물, 예컨대, 세균(예를 들면, 대장균 및 *B. 서브틸리스*), 또는 포유동물 세포 시스템(예를 들면, COS, CHO, BHK, 293, NSO 및 3T3 세포)을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0480] 본 발명의 Tn3 스캐폴드의 제조에 유용한 방법은 예를 들면, 국제 특허 출원 공개공보 번호 WO 2009/058379에 개시되어 있다. 본 발명의 스캐폴드가 일단 재조합 발현에 의해 제조되었으면, 단백질 정제를 위한 당해 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 그것을 정제할 수 있다.

[0481] 일부 구현예에서, 재조합 발현 중에 글리코실화될 수 있는 아미노산 잔기를 치환시킴으로써 본 발명의 스캐폴드를 글리코실화 결여 형태로 제조할 수 있다. 일부 특정 구현예에서, 재조합 발현 중에 글리코실화를 방지하기 위해, 글리신-세린 링커(예를 들면, 서열 번호 131 또는 서열 번호 132)에서 세린 아미노산을 다른 아미노산 잔기, 예컨대, 알라닌, 글리신, 류신, 이소류신 또는 발린(예를 들면, 서열 번호 140, 141, 142 및 143 참조)으로 치환시킬 수 있다. 일부 특정 구현예에서, N-글리코실화 부위를 본 발명의 Tn3 스캐폴드로부터 제거한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 스캐폴드를 재조합 발현 후에 탈글리코실화할 수 있다. 재조합 발현 후, 예를 들면, 효소 칙테일을 사용하는 시험관 내 탈글리코실화 방법이 당해 분야에 공지되어 있다(예를 들면, 큐에이-바이오(QA-bio)(미국 캘리포니아주 팜 테저트 소재)에 의해 시판되는 PFGase F, 엔도(Endo) F 멀티(Multi), 오렐라(Orela) O-연결된 글리칸 릴리즈(Glycan Release), 효소 카보릴리즈(CarboRelease) 및 효소 데글리코Mx(DeGlycoMx) 탈글리코실화 키트).

[0482] 미국 특허 공개 번호 US 2010-0298541 A1에 기술된 바와 같이, 연구 실험실에서의 본 발명의 Tn3 스캐폴드의 제조를 규모 확대하여 분석적 규모의 반응기 또는 생산 규모의 반응기에서 스캐폴드를 제조할 수 있다.

분비된 Tn3 스캐폴드의 규모 확대 가능한 제조

[0485] 본 발명의 Tn3 스캐폴드를 세포 내에서 제조할 수 있거나 분비된 형태로서 제조할 수 있다. 일부 구현예에서, 분비된 스캐폴드는 적절하게 폴딩되고 전체적으로 기능성을 나타낸다. 본 발명의 Tn3 스캐폴드를 규모 확대 가능한 방법으로 제조할 수 있다. 일부 구현예에서, 분석적 규모의 생물반응조(예를 들면, 5L, 10L, 15L, 30L 또는 50L 생물반응조, 그러나 이에 한정되지 않음)에서 본 발명의 스캐폴드를 제조하기 위해 규모 확대될 수 있는 본 발명의 규모 확대 가능한 방법으로 연구 실험실에서 스캐폴드를 제조할 수 있다. 다른 구현예에서, 생산 규모의 생물반응조(예를 들면, 75L, 100L, 150L, 300L 또는 500L, 그러나 이에 한정되지 않음)에서 본 발명의 Tn3 스캐폴드를 제조하기 위해 규모 확대될 수 있는 본 발명의 규모 확대 가능한 방법으로 연구 실험실에서 Tn3 스캐폴드를 제조할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 규모 확대 가능한 방법은 연구 실험실에서 수행된 제조 방법에 의해 제조 효율의 감소를 거의 또는 전혀 초래하지 않는다.

링커

[0488] 다량체 Tn3 스캐폴드 내의 단량체 서브유닛은 단백질 및/또는 비 단백질 링커에 의해 연결될 수 있는데, 이때 각각의 링커는 적어도 2개의 단량체 서브유닛에 융합된다. 적합한 링커는 단백질 링커, 비 단백질 링커 및 이들의 조합물로 구성될 수 있다. 링커들의 조합물은 동종체 또는 이종체일 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 다량체 Tn3 스캐폴드는 복수의 단량체 서브유닛들을 포함하는데, 이때 모든 링커들이 동일하다. 다른 구현예에서, 다량체 Tn3 스캐폴드는 복수의 단량체 서브유닛들을 포함하는데, 이때 적어도 하나의 링커는 나머지 링커들과 기능적으로 또는 구조적으로 상이하다. 일부 구현예에서, 링커 자체가 표적과의 결합에 직접적으로 또는 간접적으로 참여함으로써 다량체 Tn3 스캐폴드의 활성에 기여할 수 있다.

- [0489] 일부 구현예에서, 단백질 링커는 폴리펩티드이다. 링커 폴리펩티드는 2개 이상의 단량체 서브유닛들이 원하는 활성을 보유하도록 서로에 대해 정확한 입체구조를 취하는 방식으로 2개 이상의 단량체 서브유닛들을 연결하는데에 적당한 길이를 가져야 한다.
- [0490] 일부 구현예에서, 폴리펩티드 링커는 1개 내지 약 1000개의 아미노산 잔기, 1개 내지 약 50개의 아미노산 잔기, 1개 내지 25개의 아미노산 잔기, 1개 내지 20개의 아미노산 잔기, 1개 내지 15개의 아미노산 잔기, 1개 내지 10개의 아미노산 잔기, 1개 내지 5개의 아미노산 잔기, 또는 1개 내지 3개의 아미노산 잔기를 포함한다. 본 발명은 폴리펩티드 링커 서열을 암호화하는 핵산, 예컨대, DNA, RNA 또는 이들 둘다의 조합물을 추가로 제공한다. 폴리펩티드 링커에 포함되기 위해 선택된 아미노산 잔기는 본 발명의 다량체 Tn3 스캐폴드의 활성 또는 기능을 유의미하게 방해하지 않는 성질을 나타내야 한다. 따라서, 폴리펩티드 링커는 본 발명의 Tn3 다량체 스캐폴드의 활성 또는 기능과 일치하지 않거나, 내부 폴딩을 방해하거나, 또는 본 발명의 다량체 Tn3 스캐폴드와 CD40L의 결합을 심각하게 방해할 하나 이상의 단량체 서브유닛 내의 아미노산 잔기와 결합 또는 다른 상호작용을 형성할 전하를 전체적으로 나타내지 않아야 한다.
- [0491] 폴리펩티드들을 신규의 연결된 융합 폴리펩티드로 연결하기 위한 자연발생적인 웨პ티드 링커뿐만 아니라 인공적인 웨პ티드 링커의 사용은 문헌에 잘 공지되어 있다. 따라서, 2개 이상의 단량체 서브유닛을 융합하는 링커는 천연 링커, 인공 링커 또는 이들의 조합물이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 Tn3 다량체 스캐폴드에 존재하는 모든 웨პ티드 링커들의 아미노산 서열은 동일하다. 다른 구현예에서, 본 발명의 다량체 Tn3 스캐폴드에 존재하는 웨პ티드 링커들 중 적어도 2개의 아미노산 서열은 상이하다.
- [0492] 일부 구현예에서, 폴리펩티드 링커는 입체구조적 유연성을 보유한다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드 링커 서열은 (G-G-G-G-X)_m 아미노산 서열을 포함하는데, 이때 X는 알라닌(A), 세린(S), 글리신(G), 이소류신(I), 류신(L) 또는 발린(V)이고, m은 양의 정수이다(예를 들면, 서열 번호 209 참조). 특정 구현예에서, 폴리펩티드 링커 서열은 (G-G-G-G-S)_m 아미노산 서열을 포함하는데, 이때 m은 양의 정수이다(예를 들면, 서열 번호 147 참조). 또 다른 특정 구현예에서, 폴리펩티드 링커 서열은 (G-G-G-G-G)_m 아미노산 서열을 포함하는데, 이때 m은 양의 정수이다(예를 들면, 서열 번호 148 참조). 또 다른 특정 구현예에서, 폴리펩티드 링커 서열은 (G-G-G-G-A)_m 아미노산 서열을 포함하는데, 이때 m은 양의 정수이다(예를 들면, 서열 번호 149 참조). 일부 구현예에서, 폴리펩티드 링커는 본질적으로 비구조화된 천연 또는 인공 폴리펩티드이다(예를 들면, Schellenberger *et al.*, Nature Biotechnol. 27:1186-1190, 2009 참조; 또한, Sickmeier *et al.*, Nucleic Acids Res. 35:D786-93, 2007 참조).
- [0493] 웨პ티드 링커는 비 폴리펩티드 모이어티에 대한 부착 기를 포함하는 아미노산 잔기가 도입되는 방식으로 변경될 수 있다. 이러한 아미노산 잔기의 예는 (추후에 비 폴리펩티드 모이어티가 부착되는) 시스테인 잔기일 수 있거나, 이러한 아미노산 서열은 생체 내 N-글리코실화 부위를 포함할 수 있다(이로써 (생체 내에서) 당 모이어티를 웨პ티드 링커에 부착시킬 수 있다).
- [0494] 일부 구현예에서, 폴리펩티드 다량체에 존재하는 모든 웨პ티드 링커들의 아미노산 서열은 동일하다. 대안적으로, 폴리펩티드 다량체에 존재하는 모든 웨პ티드 링커들의 아미노산 서열은 상이할 수 있다.
- [0495] 본 발명은 치료 모이어티에 접합된 Tn3 스캐폴드의 용도를 추가로 포함한다. Tn3 스캐폴드는 치료 모이어티, 예컨대, 세포독소, 예를 들면, 세포증식억제제, 세포파괴제, 치료제 또는 방사성 금속 이온, 예를 들면, 알파 방사체에 접합될 수 있다. 세포독소 또는 세포독성제는 세포에 유해한 임의의 물질을 포함한다.
- [0497] **CD40L 특이적 Tn3 스캐폴드**
- [0498] 본 발명은 CD40L에 특이적으로 결합하는 Tn3 스캐폴드를 제공한다. 특정 구현예에서, 본 발명의 스캐폴드는 인간 CD40L에 특이적으로 결합한다. 다른 특정 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 마우스, 닭, 붉은털 원숭이, 사이노몰구스, 랙트 또는 토끼의 CD40L 상동체에 결합한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 CD40L의 노출된 에피토프에 결합한다. 이러한 구현예는 세포 및/또는 수용체를 이소적으로 발현하도록 형질감염된 세포 상에서 내생적으로 발현된 CD40L을 포함한다.
- [0499] 일부 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 단량체 CD40L 상에 디스플레이된 에피토프를 인식한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 삼량체 형태의 CD40L 상에 디스플레이된 에피토프를 인식한다. 다른 구현예

에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 막 결합된 CD40L 상에 디스플레이된 에피토프를 인식한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 가용성 CD40L 상에 디스플레이된 에피토프를 인식한다.

[0500] 다른 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 단량체 CD40L에 결합하고 CD40L 분자의 올리고머화를 막거나 저해한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 스캐폴드는 CD40L과 CD40의 상호작용을 감소시키거나 억제한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 CD40L에 의해 매개된 세포 신호전달을 작동시킨다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 CD40L에 의해 매개된 세포 신호전달을 길항한다.

[0501] 또한, 본 발명은 본 설명에 기술된 Tn3 스캐폴드를 사용하여 CD40L 활성을 조절하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 CD40L을 CD40L 특이적 스캐폴드와 접촉시키기 및 CD40과 CD40L 사이의 상호작용을 차단하기를 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 CD40L을 발현하는 세포를 CD40L 특이적 Tn3 스캐폴드와 접촉시키기 및 세포 표면으로부터의 CD40L의 단백질 가수분해성 절단을 방해하기를 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 CD40L 단량체를 CD40L 특이적 Tn3 스캐폴드와 접촉시키기 및 CD40L 올리고머화를 방해하기를 포함한다. 다른 구현예에서, CD40L의 이량체화 또는 올리고머화는 다량체 Tn3 스캐폴드의 사용을 통해 달성될 수 있다.

[0502] 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 당해 분야에 공지된 통상적인 분석법에 의해 측정할 때 CD40L에 대한 CD40의 결합에 의해 개시된 CD40 매개 면역 반응(예를 들면, Elqueta *et al.* 229: 152-172, 2009 참조) 또는 하류 신호전달 경로를 감소시키는 CD40L 특이적 스캐폴드의 투여를 포함한다.

[0503] 임의의 특정 이론에 의해 구속받기를 원치 않지만, 본 발명의 CD40L 스캐폴드는, CD40L과 CD40의 결합을 방해함으로써, 가용성 CD40L에 결합하여 이를 격리시킴으로써, CD40L과 CD40의 상호작용을 변경시키되 결합을 방해하지 않음으로써, 세포 표면으로부터의 CD40L의 메탈로프로테아제 매개 효소적 절단을 방해하거나 향상시켜 가용성 CD40L을 생성함으로써, 세포 표면 CD40L 세포 내 이입을 방해하거나 향상시킴으로써 등에 의해 작용할 수 있다.

특이적 CD40L 결합 서열

[0506] 일부 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 CD40L에 결합하는 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 적어도 6개의 루프 서열을 포함하는 CD40L 특이적 단량체 서브유닛을 포함한다.

[0507] 일부 구현예에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 309(천연(naïve) Tn3 라이브러리로부터 단리된 모 309 패밀리 클론; 서열 번호 20), 309FGwt(인간화된 FG 루프를 갖는 모 309 클론; 서열 번호 22), 340(친화성 성숙된 309 클론; 서열 번호 24), 341(친화성 성숙된 309 클론; 서열 번호 26), 342(친화성 성숙된 309 클론; 서열 번호 28 또는 서열 번호 146), 343(친화성 성숙된 309 클론; 서열 번호 30), 344(친화성 성숙된 309 클론; 서열 번호 32), 345(친화성 성숙된 309 클론; 서열 번호 34), 346(친화성 성숙된 309 클론; 서열 번호 36), 347(친화성 성숙된 309 클론; 서열 번호 38), 348(친화성 성숙된 309 클론; 서열 번호 40), 349(친화성 성숙된 309 클론; 서열 번호 42), 311(천연 Tn3 라이브러리로부터 단리된 모 311 패밀리 클론; 서열 번호 44), 311K4E(제1 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열 번호 46); 311K4E_1(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열 번호 50), 311K4E_3(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열 번호 52), 311K4E_4(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열 번호 54), 311K4E_5(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열 번호 56), 311K4E_7(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열 번호 60), 311K4E_9(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열 번호 62), 311K4E_10(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열 번호 64), 311K4E_11(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열 번호 66), 311K4E_12(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열 번호 70), 311K4E_14(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열 번호 72), 311K4E_15(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열 번호 74), 311K4E_16(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열 번호 76), 311K4E_19(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열 번호 78), 311K4E_20(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패밀리 클론; 서열 번호 80) 및 311K4E_21(제2 라운드의 친화성 성숙으로부터의 변이체 311 패

밀리 클론; 서열 번호 82)로부터 선택된 CD40L 결합 단량체 클론들 중 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 적어도 6개의 루프 서열을 포함한다.

[0508] 일부 구현예에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 표 2에 나열된 루프 서열들로부터 선택된 적어도 하나의 루프 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 표 2에 나열된 BC 루프 서열들로부터 선택된 적어도 하나의 BC 루프 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 표 2에 나열된 DE 루프 서열들로부터 선택된 적어도 하나의 DE 루프 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 표 2에 나열된 FG 루프 서열들로부터 선택된 적어도 하나의 FG 루프 서열을 포함한다.

[0509] 일부 구현예에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 표 2에 나열된 BC 루프 서열들로부터 선택된 BC 루프 서열; 및 표 2에 나열된 DE 루프 서열들로부터 선택된 DE 루프 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 표 2에 나열된 BC 루프 서열들로부터 선택된 BC 루프 서열; 및 표 2에 나열된 FG 루프 서열들로부터 선택된 FG 루프 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 표 2에 나열된 DE 루프 서열; 및 표 2에 나열된 FG 루프 서열들로부터 선택된 FG 루프 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, CD40L 특이적 단량체 서브유닛은 1개, 2개 또는 3개의 상이한 Tn3 클론들로부터의 루프 서열에 상응하는 루프 서열을 포함한다.

[0510] 일부 구현예에서, CD40L 특이적 단량체 스캐폴드 서열이 서열의 C 말단에서 또는 추가적인 N 말단 아미노산에서 링커 및/또는 히스티딘 태그(예를 들면, His-8 태그)를 함유하는 경우, 이들 C 말단 링커 및/또는 히스티딘 태그 및 추가적인 N 말단 아미노산은 제거될 수 있으며, 따라서, 상응하는 아미노산 서열은 C 말단 링커 및 His 태그 서열 및 N 말단의 추가적인 아미노산 또는 아미노산들의 결실을 함유할 수 있다.

[0511] 일부 구현예에서, CD40L 특이적 Tn3 스캐폴드는 단일 단량체 서브유닛, 예를 들면, 342 클론 서열(친화성 성숙된 309 클론; 서열 번호 28 및/또는 서열 번호 146)을 포함한다. 다른 구현예에서, CD40L 특이적 스캐폴드는 한 개를 초과하는 단량체 서브유닛, 예를 들면, 2개의 342 클론 단량체 서브유닛(서열 번호 28 및/또는 서열 번호 146)을 직렬로 포함한다(예를 들면, 서열 번호 135 참조). 특정 구현예에서, 본 발명의 Tn3 스캐폴드는 변이체 HSA에 접합된다(예를 들면, 서열 번호 134 및 서열 번호 135 참조). 추가적인 구현예에서, HSA는 다량체 Tn3 스캐폴드의 N 말단 또는 C 말단에서 접합될 수 있다.

[0512] 특정 구현예에서, CD40L 특이적 Tn3 스캐폴드는 단일 311K4E_12 단량체 서브유닛, GS 링커, 및 C34S HSA 변이체를 포함한다(예를 들면, 서열 번호 201 참조). 다른 특정 구현예에서, CD40L 특이적 Tn3 스캐폴드는 베타 가닥 C CELTYG 변이체, 1개의 전부 글리신 링커 및 C34S HSA 변이체와 함께 단일 311K4E_12 단량체 서브유닛을 포함한다(예를 들면, 서열 번호 202 참조). 또 다른 특정 구현예에서, CD40L 특이적 Tn3 스캐폴드는 직렬로 연결된 2개의 311K4E_12 서브유닛, 및 2개의 GS 링커를 포함하는데, 이때 1개의 GS 링커는 이러한 서브유닛들을 서로 연결하고 제2의 GS 링커는 1개의 서브유닛을 C34S HSA 변이체에 연결한다(예를 들면, 서열 번호 203 참조). 또 다른 특정 구현예에서, CD40L 특이적 Tn3 스캐폴드는 직렬로 연결된 2개의 311K4E_12 서브유닛, 및 2개의 전부 글리신 링커를 포함하는데, 이때 1개의 전부 글리신 링커는 이러한 서브유닛들을 서로 연결하고, 제2의 전부 글리신 링커는 1개의 서브유닛을 C34S HSA 변이체에 연결한다(예를 들면, 서열 번호 204 참조).

[0513] 한 특정 구현예에서, CD40L 특이적 Tn3 스캐폴드는 GS 링커를 통해 직렬로 연결된 2개의 309 서브유닛을 포함한다(예를 들면, 서열 번호 205 참조). 또 다른 특정 구현예에서, CD40L 특이적 Tn3 스캐폴드는 C34S HSA 변이체에 연결된 단일 309 서브유닛을 포함한다(예를 들면, 서열 번호 206 참조). 또 다른 특정 구현예에서, CD40L 특이적 Tn3 스캐폴드는 직렬로 연결된 2개의 309 서브유닛, 및 2개의 GS 링커를 포함하는데, 이때 1개의 GS 링커는 이러한 서브유닛들을 서로 연결하고 제2의 GS 링커는 1개의 서브유닛을 C34S HSA 변이체에 연결한다(예를 들면, 서열 번호 207 참조).

[0514] 특정 구현예에서, CD40L 특이적 Tn3 스캐폴드는 단일 342 단량체 서브유닛, GS 링커, 및 C34S HSA 변이체를 포함한다(예를 들면, 서열 번호 134 참조). 또 다른 특정 구현예에서, CD40L 특이적 Tn3 스캐폴드는 단일 342 단량체 서브유닛, 1개의 전부 글리신 링커 및 C34S HSA 변이체를 포함한다(예를 들면, 서열 번호 144 참조). 또 다른 특정 구현예에서, CD40L 특이적 Tn3 스캐폴드는 직렬로 연결된 2개의 342 서브유닛, 및 2개의 GS 링커를 포함하는데, 이때 1개의 GS 링커는 이러한 서브유닛들을 서로 연결하고 제2의 GS 링커는 1개의 서브유닛을 C34S HSA 변이체에 연결한다(예를 들면, 서열 번호 135 참조). 또 다른 특정 구현예에서, CD40L 특이적 Tn3 스캐폴드는 직렬로 연결된 2개의 342 서브유닛, 및 2개의 전부 글리신 링커를 포함하는데, 이때 1개의 전부 글리신 링커는 이러한 서브유닛들을 서로 연결하고, 제2의 전부 글리신 링커는 1개의 서브유닛을 C34S HSA 변이체에 연결한다(예를 들면, 서열 번호 145 참조). 또 다른 특정 구현예에서, CD40L 특이적 Tn3 스캐폴드는 GS 링커에 의해

직렬로 연결된 2개의 342 서브유닛을 포함한다(예를 들면, 서열 번호 208 참조).

[0515] 특정 구현예에서, CD40L 특이적 Tn3 스캐폴드는 포함한다. 또 다른 특정 구현예에서, CD40L 특이적 Tn3 스캐폴드는 직렬로 연결된 311 서브유닛 또는 311로부터 유래된 서브유닛(예를 들면, 311K4E_12) 및 309 서브유닛 또는 309로부터 유래된 서브유닛(예를 들면, 342), 및 2개의 GS 링커를 포함하는데, 이때 1개의 GS 링커는 이러한 서브유닛들을 서로 연결하고 제2의 GS 링커는 1개의 서브유닛을 C34S HSA 변이체에 연결한다(예를 들면, 서열 번호 135 참조). 또 다른 특정 구현예에서, CD40L 특이적 Tn3 스캐폴드는 직렬로 연결된 311 서브유닛 또는 311로부터 유래된 서브유닛(예를 들면, 311K4E_12) 및 309 서브유닛 또는 309로부터 유래된 서브유닛(예를 들면, 342), 및 2개의 전부 글리신 링커를 포함하는데, 이때 1개의 전부 글리신 링커는 이러한 서브유닛들을 서로 연결하고 제2의 전부 글리신 링커는 1개의 서브유닛을 C34S HSA 변이체에 연결한다(예를 들면, 서열 번호 145 참조).

[0516] CD40L 특이적 직렬 2가 Tn3 스캐폴드 및 혈청 알부민(SA) 융합체의 예는 도 2a에 제시되어 있다(도 9a 또한 참조). 특정 링커가 도 2a에 제공되어 있지만, 다른 링커들도 본 설명에 제공된 것으로 고려된다. 야생형 성숙 SA, 예를 들면, 뮤린 혈청 알부민(MSA) 또는 인간 혈청 알부민(HSA)이 사용될 수 있지만, 성숙 SA 내의 하나 이상의 시스테인(C) 아미노산 잔기가 예를 들면, 세린(S), 알라닌(A), 글리신(G) 등으로 치환될 수 있다는 것이 고려된다.

[0517] 대표적인 구조체들을 아래에 나타냈다. SA의 서열은 밑줄로 표시되어 있다. 링커는 상자로 표시되어 있다. 다수의 변경이 본 발명의 범위 내에 있다는 것이 이해될 것이다. 예를 들면, 링커가 변경될 수 있고(몇몇 비 한정된 예가 본 설명에 제공되어 있음), 최초의 1개 또는 2개의 N 말단 아미노산 잔기(SQ)가 부재할 수 있고/있거나 대안적인 아미노산 잔기로 치환될 수 있고, 태그(예를 들면, 6xHis 태그)가 도입될 수 있고, 대안적인 CD40L 특이적 스캐폴드(예를 들면, 피브로넥틴의 제10 Fn3 도메인에 기초한 스캐폴드)가 유사한 구조체, 등에서 사용될 수 있다.

[0519] 342 1가 HSA 구조체 1(서열 번호 134)

[0520] [342 단량체]-(G₄S)₂ 링커-HSA_{C34S}

```

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPD
TEYEVSЛИCRSGDMSSNPAKETFTIGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
AFAQYLQQSPFEDHVKLNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG
EMADCCAQKEPERNECFLQHKDDNPNLPRVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARR
HPYFYAPELLFFAKRYKAFTЕCCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQK
FGERAFKAWAVARLSQRFPKAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC
ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADPLPSLAADFVESKDVKNYAEAKDV
FLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQ
NLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKR
MPCADEYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYPKEFNAE
TFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKE
TCFAEEGKKLVAASQAALGL

```

[0523] 342 1가 HSA 구조체 2(서열 번호 144)

[0524]

[342 단량체]-G₁₀ 링커-HSA_{C34S}:

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGRRTTIDLWYHHAHYSIGNLKD
 TEYEVLICRSGDMSSNPAKETFTT GGGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
AFAQYLQQSPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG
 EMADCCAKQEPEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARR
 HPYFYAPELLFFAKRYKAAC TECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQLKCASLQK
FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC
ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKNYAEAKDV
FLGMFLYELYARRHPDYSVVVLLRLAKTYETTLEKCCAADPHECYAKVDFKFPLVEEPQ
NLIKQNCELFEOLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKR
MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAE
TFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKE
TCFAEEGKKLVAASQAALGL

[0525]

[0527]

342 2가 HSA 구조체 1(서열 번호 135)

[0528]

[342 단량체]-(G_{4S})₃ 링커-[342 단량체]-(G_{4S})₂ 링커-HSA_{C34S}:

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGRRTTIDLWYHHAHYSIGNLKD
 TEYEVLICRSGDMSSNPAKETFTT GGGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
 TWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGRRTTIDLWYHHAHYSIGNLKDTEYEVLICRSGDMSS
 SNAKETFTT GGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQQSPFEDHV
KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPEPERNE
CFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYAPELLFFAKR
YKAACTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQLKCASLQKFGERAFAVARLS
QRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCE
KPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKNYAEAKDVFLGMFLYELYARRHPD
YSVVVLLRLAKTYETTLEKCCAADPHECYAKVDFKFPLVEEPONLIKQNCELFEOLGE
YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL
CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE
RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQ
AALGL

[0529]

[0531]

342 2가 HSA 구조체 2(서열 번호 145)

[0532]

[342 단량체]-G₁₅ 링커-[342 단량체]-G₁₀ 링커-HSA_{C34S}:

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELYGIKDVGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKD
 TEYEVSPLICRSGDMSSNPAKETFTT GGGGGGGGGGGGGGGG RLDAPSQIEVKDVTDTTALI
 TWSDDFGEYVWCELYGIKDVGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPDTYEVSPLICRSGDMS
SNPAKETFTT GGGGGGGGGGG DAKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAAQYLQQSPFEDHV
KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPEPERNE
CFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPFYAPELLFFAKR
YKAATTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQLKCASLQKFGERAKAWARLS
QRFPKAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCE
KPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKNYAEAKDVF LGMFLYELYARRHPD
YSVVLLRLAKTYETTLEKCAAADPHECYAKVDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGE
YKFQNALLVRYTKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL
CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE
RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQ
AALGL

[0533]

[0535]

311K4E_12 1가 HSA 구조체 1(서열 번호 201)

[0536]

[311K4E_12 단량체]-(G₄S)₂ 링커-HSA_{C34S}:

SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLK
PDEYEVSPLICLTTDGTYNNPAKETFTT GGGGSGGGGS DAKSEVAHRFKDLGEENFKAL
VLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRE
TYGEMADCCAKQEPEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEI
ARRHPFYAPELLFFAKRYKAATTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQLKCAS
LQKFGERAKAWARLSQRFPKAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAK
YICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKNYAEA
KDVF LGMFLYELYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCAAADPHECYAKVDEFKPLVE
EPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPE
AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEF
NAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKAD
DKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

[0537]

[0539]

311K4E_12 1가 HSA 구조체 2(서열 번호 202)

[0540] [311K4E_12 단량체]-G₁₀ 링커-HSA_{C34S}:

SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELYGIKVPGDRTTIDLNPQYVHYSIGNLK
PDTEYEVSPLICLTDGTYNNPAKETFTT **GGGGGGGGGG** DAHKSEVAHRFKDLGEENFKAL
VLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRE
TYGEMADCCAKQEPPERNECFLQHKDDNPNLPLRVPEVDVMCTAFHDNEETFLKKLYEI
ARRHPYFYAPELLFFAKRYKAACTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQLRKAS
LQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAK
YICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCTIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKNYAEA
KDVF LGMFLYEYARRHPDYSVULLRLAKTYETTL EKCAAADPHECYAKVFDEFKPLVE
EPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKVQPVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPE
AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEF
NAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCCAD
DKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

[0541]

[0543] 311K4E_12 2가 HSA 구조체 1(서열 번호 203)

[0544] [311K4E_12 단량체]-G₄S₃ 링커-[311K4E_12 단량체]-(G₄S)₂ 링커-HSA_{C34S}:

SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYNSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNLQPYVHYSIGNLKPDT
PDTEYEVSЛИCLTDGTYNNAKETFTTGGGGSGGGGSRLDAPSQIEVEDVTDTT
ALITWTNRSSYNSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNLQPYVHYSIGNLKPDT
TTDGTYNNAKETFTTGGGGSGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLOQS
PFEDHVVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQ
EPERNECFLQHKDDNPNLPLRVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPFYAPEL
LFFAKRYKAATTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQLKCASLQKFGERAKW
AVARLSQRFPKAEEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLEADDRADLAKYICENQDSISSK
LKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKKNYAEAKDVFGLGMFLYEY
ARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVDFEFKPLVEEPQNLIKONCEL
FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLKGVGSKCKHPEAKRMPCAEDYL
VVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADIC
TLSEKERQIKKQTALEVLVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEGKK
LVAASQAALGL

[0545]

[0547] 311K4E_12 2가 HSA 구조체 2 (서열 번호 204)

[0548] [311K4E_12 단량체]-G₁₅ 링커-[311K4E_12 단량체]-G₁₀ 링커-HSA_{C34S}:

SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELTGYIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLK
 PDTEYEVSЛИCLTDGTYNNAKETFTT **GGGGGGGGGGGGGGGG** RLDAPSQIEVEDVTDTT
 ALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLKPDEYEVSЛИCL
 TTDGTYNNAKETFTT **GGGGGGGGGG** DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQS
 PFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQ
 EPERNECFLQHKDDNPNLPRLRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPEL
 LFFAKRYKAAFT ECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAKAW
 AVARLSQRFPKAFAEVSKLVTDLTKVTECCHGDLLEADDRADLAKYICENQDSISSK
 LKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEF
 ARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHCYAKVFDFKPLVEEPQNLIKQNCCEL
 FEQLGEYKFQNALLVRYTKVPOVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLS
 VVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETTFHADIC
 TLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKK
LVAASQAALGL

[0549]

약학적 조성물

[0552]

또 다른 양태에서, 본 발명은 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 제형화된, 본 발명의 일부민 용합 단백질 중 하나 또는 이들의 조합물을 함유하는 조성물, 예를 들면, 약학적 조성물(그러나, 이것으로 한정되지 않음)을 제공한다. 일부 구현예에서, 이러한 약학적 조성물은 Tn3 스캐폴드와 같은 스캐폴드가 있는 일부민 용합 단백질을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 이러한 약학적 조성물은 서열 번호 134, 135, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207 또는 208의 일부민 용합 단백질을 포함하는데, 이때, 이러한 조성물은 20 ng/mg 미만의 숙주 세포 단백질을 보유하고, 46번, 151번 위치, 또는 두 위치에서의 트립토판은 산화되지 않는다. 다른 구현예는 본 발명에 따라 정제된 일부민 용합 단백질을 포함하는 약학적으로 허용 가능한 제형에 관한 것이다. 이러한 제형은 적절히 완충액, 당, 및 유화제를 포함할 수 있다. 한 구현예에서, 이러한 완충액은 인산나트륨 완충액이고, 당은 수크로스이며, 유화제는 폴리소르베이트 80이다. 청구항 제100항 또는 청구항 제101항의 약학적 제형, 이때, 이러한 제형은 동결건조된다.

[0554]

균등물

[0555]

당업자는 단지 통상적인 실험을 이용하여 본 설명에 기술된 발명의 특정 구현예에 대한 여러 균등물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 균등물은 다음의 청구범위에 의해 포함된다.

[0556]

본 명세서에서 언급된 모든 공개문헌, 특히 및 특허출원은 각각의 개별적인 공개문헌, 특히 또는 특허출원이 본 설명에 참고로 포함되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 표시되어 있는 것처럼 동일한 정도로 본 명세서 내로 참고로 포함된다.

[0558]

실시예

[0559]

이하 본 발명을 다음의 실시예와 관련하여 기술한다. 이를 실시예는 오로지 예시적인 것으로, 본 발명이 결코 이를 실시예로 한정되는 것으로 해석되어서는 안 되며, 오히려 본 설명에 제공된 교시의 결과로서 자명해지는 임의의 모든 변형들을 포함하는 것으로서 해석되어야 한다.

[0561]

실시예 1

[0562]

화학물질

[0563]

프로필렌글리콜은 알파 아에사르(Alfa Aesar, 미국 매사추세츠 주 와드힐 소재)로부터 입수하였다. 수크로스는 판스티엘(Pfanstiehl, 미국 일리노이 주 와키건 소재)로부터 입수하였다. 트리톤 X-100과 황산나트륨은 EMD 밀리포어(Millipore, 미국 마이애미 주 빌러리카 소재)로부터 입수하였다. 비스-트리스, 비스-트리스 HCl 및 니코틴아미드는 시그마알드리치(Sigma-Aldrich, 미국 미주리 주 세인트루이스 소재)로부터 입수하였다. 빙초산, 아르기닌, 글리신, 아세트산 나트륨, 카프릴레이트 나트륨, 염화나트륨, 시트르산 나트륨, 수산화나트륨, 인산나트륨, 트리스 및 요소는 JT 베이터(JT Baker, 미국 펜실베이니아 주, 센터 밸리 소재)로부터 입수하였다.

[0565]

단백질

[0566]

이 연구에 사용된 단백질인 알부민 융합 단백질 #1(AFP-1)(서열 번호 145)은 인간 혈청 알부민에 융합된, 인간 피브로넥틴 III형 단백질 도메인으로부터 유래된, 두 개의 동일한 테나신 C(TnC) 도메인으로 구성된 CD40L 길항제이다. (인간 TnC의 제3 피브로넥틴 III형 단백질 도메인으로부터 유래된) 각각의 Tn3 도메인은 인간 CD40L과 결합하며, 그것의 인간 CD40과의 상호작용을 저해한다. 인간 혈청 알부민 융합체는 이러한 분자의 적절한 약동학적 성질을 보장한다. 이러한 단백질은 당해 분야에서 숙련된 자들에게 익숙한 기법을 이용하여 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서 발현된다. 재조합 인간 알부민(rHSA; 쌀에서 발현됨)을 시그마 앤드리치로부터 동결건조된 분말로 구입하였다(카달로그 번호 A9731). 표 3은 rHSA와 AFP-1의 성질을 요약한 것이다.

표 3

단백질 성질의 요약

분자	실험실 코드	pI	분자량(kDa)
재조합 인간 알부민	rHSA	5.3 ^a	67.0 ^a
항-CD40L-알부민 융합체	AFP-1	5.4~5.5 ^b	87.7

^a 제조업체의 데이터

^b cIEF로 측정한 것임.

[0567]

[0569]

총 단백질 농도 측정

[0570]

(정제된 배지 및 일부 사례에서 시바크론 블루 염료 크로마토그래피 풀을 제외한) 모든 공정 중간물질의 단백질 농도를 당해 산업에서 통상적인 표준 분광측정 절차를 이용하여 280 nm에서의 흡광도로 측정하였다. AFP-1에 대해서는 $0.98 \text{ (mg/mL)}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 의 흡광 계수를 사용하였고, rHSA에 대해서는 $0.531 \text{ (mg/mL)}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 을 사용하였다.

[0572]

HSA 친화성 고성능 액체 크로마토그래피

[0573]

라이프 테크놀로지스(Life Technologies, 미국 뉴저지 주 그랜드 아일랜드 소재)로부터 입수한 포리스 캡처셀렉트(Poros CaptureSelect) HSA 컬럼을 애질런트(Agilent) 1200 HPLC 시스템(미국 캘리포니아 주 팔로 Alto 소재)과 함께 사용하여, 분석적 고성능 HSA 친화성 크로마토그래피(HSA-HPLC)를 수행하였다. 평형화 완충액 상은 $3.5 \text{ mL}/\text{분의 } 10\text{--}50 \text{ mM}$ 인산나트륨, pH 7.2였고, 생성물을 100 mM 글리신, pH 2.0 완충액으로 용리시켰다. $10\text{--}100 \text{ ug}$ 의 시료를 깔끔하게 주입하고, 용리 프로파일을 280 nm에서 분광광도계를 이용하여 모니터링하였다. 애질런트의 켐스테이션(ChemStation) 소프트웨어를 이용하여 데이터를 수집하고 분석하였고, 정제된 단백질로 생성된 표준 곡선으로부터 생성물 특이적 농도를 결정하였다.

[0575] 염료 친화성 크로마토그래피

20 cm 베드 높이를 갖는 소규모 크로마토그래피 컬럼에서 전형적인 결합 및 용리 조건 하에서 시바크론 블루 염료 친화성 크로마토그래피를 수행하였다. 모든 실험은 GE 헬스케어(미국 뉴저지 주 피스카타웨이 소재)의 AKTA 익스플로러(Explorer) 액체 크로마토그래피 시스템을 이용하여 수행하였으며, 컬럼은 300 cm/h로 조작하였다. 바탕선 조건 하에서, 컬럼을 50 mM 비스-트리스(또는 인산염), 50 mM NaCl, pH 6.0으로 평형화한 다음, 최대 25 g의 단백질/수지 L을 로딩하였다(정제된 세포배양액에서의 HSA-HPLC 역가를 기준으로 함). 로딩 후, 컬럼을 재평형화하고, 50 mM 비스-트리스(또는 인산염), pH 7.0으로 세척한 다음, 50 mM 비스-트리스(또는 인산염), 25 mM 옥타노에이트 나트륨, 10 mM EDTA, pH 7.0으로 용리시켰다. 생성물 피크의 앞쪽과 뒤쪽에서 100 mAU의 흡광도 기준을 기초로 생성물 피크를 수집하였다. 최적화하는 동안(실시예 2 참조), 재평형화 및 50 mM 인산염, pH 7 세척 사이에 컬럼에 추가적인 세척을 수행하였다. GE 헬스케어(미국 뉴저지 주 피스카타웨이 소재)로부터 캡토 블루(하이 서브) 수지를 입수했다. 토요펫 AF-블루 HC-650M 수지는 토쇼 바이오사이언스(Tosho Biosciences, 미국 펜실베이니아 주 킹 오브 프리시아 소재)로부터 입수했다.

[0578] 음이온 교환 크로마토그래피

20 cm 베드 높이까지 충전된 소형 크로마토그래피 컬럼에서 전형적인 결합 및 용리 조건 하에서 음이온 교환 크로마토그래피(AEX)를 수행하였다. 모든 실험은 GE 헬스케어의 AKTA 익스플로러 액체 크로마토그래피 시스템을 이용하여 수행하였으며, 컬럼은 300 cm/h로 조작하였다. 바탕선 조건 하에서, 컬럼을 50 mM 비스-트리스, 20 mM 염화나트륨, pH 7.0으로 평형화하고, 단백질을 로딩한 다음, 평형화 완충액으로 세척하였다. 컬럼을 pH 7.0에서 비스-트리스 완충액 내의 20 내지 400 mM 염화나트륨의 단계별 또는 10 컬럼 부피(CV)의 선형 기울기를 이용하여 용리시켰다. 생성물 피크의 앞쪽과 뒤쪽에서 100 mAU의 흡광도 기준을 기초로 생성물 피크를 수집하였다. 캡토 Q 수지는 GE 헬스케어(미국 뉴저지 주 피스카타웨이 소재)로부터 입수하였다.

[0581] 음이온 교환 막 크로마토그래피

전형적인 플로 스루 조건 하에서 음이온 교환 막 크로마토그래피(AEMC)를 수행하였다. 모든 실험은 GE 헬스케어의 AKTA 익스플로러 액체 크로마토그래피 시스템을 이용하여 수행하였으며, 컬럼은 10 MV/분으로 조작하였다. 바탕선 조건 하에서, 막을 50 mM 비스-트리스, 50 mM 염화나트륨, pH 7.0으로 평형화한 다음, 로드 물질을 막에 통과시켰다. 생성물 피크의 앞쪽과 뒤쪽에서 100 mAU의 흡광도 기준을 기초로 플로 스루 생성물 피크를 수집하였다. 최적화(실시예 2 참조)하는 동안, 10 내지 220 mM NaCl과 pH 6 내지 8 사이의 완충액 조건을 이용하였다. 무스탕 Q 막은 폴 라이프 사이언스(Pall Life Sciences, 미국 뉴욕 주 포트 워싱턴 소재)로부터 입수하였다.

[0584] 소수성 상호작용 크로마토그래피

20 cm 벤치 높이의 소규모 크로마토그래피 컬럼에서 전형적인 결합 및 용리 조건 하에서 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)를 수행하였다. 모든 실험은 GE 헬스케어(미국 뉴저지 주 피스카타웨이 소재)의 AKTA 익스플로러 액체 크로마토그래피 시스템을 이용하여 수행하였으며, 컬럼은 130~300 cm/h로 조작하였다. 바탕선 조건 하에서, 컬럼을 50 mM 비스-트리스, 1 M 시트르산 나트륨, pH 7.0으로 평형화하였다. (중량 기준) 1부의 단백질 용액을 2부의 50 mM 비스-트리스, 2 M 시트르산 나트륨, pH 7.0으로 희석하여 로드를 준비한 다음, 컬럼에 최대 25 g의 단백질/수지 L을 로딩하였다. 로딩 후, 컬럼을 평형화 완충액으로 재평형화한 다음, 20 컬럼 부피에 걸쳐 1 M부터 10 mM 시트르산 나트륨까지의 시트르산 나트륨의 선형 기울기로 용리시켰다. 생성물 피크를 분획으로 수집하였는데, 초기 용리 물질은 산화 생성물이 강화되었다. 토요펫 PPG 600M과 토요펫 페닐 650M 수지는 토소 바이오사이언스(미국 펜실베이니아 주 킹 오브 프리시아 소재)에서 입수하였고, 캡토 MMC와 부틸-S 패스트 플로 수지는 GE 헬스케어(미국 뉴저지 주 피스카타웨이 소재)에서 입수하였다.

[0587] 분석적 크기 배제 크로마토그래피

토소 바이오사이언스(미국 펜실베이니아 주 킹 오브 프리시아 소재)에서 입수한 TSK-GEL G3000SWXL 컬럼(7.8 mm × 30 cm)을 애질런트 1200 HPLC 시스템(미국 캘리포니아 주 팔로 알토 소재)과 함께 사용하여 분석적 고성능

크기 배제 크로마토그래피(SEC-HPLC)를 수행하였다. 이동상은 30°C에서 22분 동안 0.8 mL/분의 0.1 M 인산나트륨, 0.1 M 황산나트륨, 10% 이소프로파놀, pH 6.8이었다. 250 ug의 시료를 깔끔하게 주입하고, 바이오라드(미국 캘리포니아 주 허큘러스 소재)의 분자량 표준물질을 이용하여 컬럼을 보정하였다. 280 nm에서 분광광도계를 이용하여 용리 프로파일을 모니터링하였고, 애질런트의 캔스테이션 소프트웨어를 이용하여 데이터를 수집하고 분석하였다. 결과를 대략 12분에서 관찰된 완충액 관련된 피크를 제외하고 모든 다른 피크들과 비교한 생성물 단량체 피크의 면적 퍼센트로 보고한다. 이동상에 10% 이소프로파놀 없이 SEC-HPLC 방법을 실행할 때, 트립토판 산화된 단량체로 확인된 단량체 피크에 (완전히 분리되지 않은) 앞쪽 솔더가 관찰된다. 따라서, 어떻게 SEC-HPLC 분석을 가동하는지에 따라, 단량체와 응집체를 측정하거나, 트립토판 산화를 추산하는 것이 이용될 수 있다.

[0590] 실시예 2

[0591] 알부민 융합 단백질의 정제(500L 규모)

[0592] 3개의 결합 및 용리 크로마토그래피 컬럼, 플로 스루 크로마토그래피 막, 트리톤 바이러스 불활성화 단계 및 한 외여과/투석여과 단계를 포함하는 공정으로 재조합 인간 알부민(rHSA)을 정제하였다. rHSA 공정을 위한 출발물질을 제조하기 위해, 단백질 A 크로마토그래피 실행 중에 결합되지 않은 물질을 수집하여 단일클론성 항체(mAb) 공정으로부터의 세포 배양액 상층액에서 항체를 고갈시킨 다음, 동결건조된 rHSA 분말을 항체가 없는 상층액에 용해시켰다. 이 출발물질은 숙주 세포 단백질, DNA 및 CHO 세포 배양액에서 발현된 알부민 융합 단백질의 세포 배양액 상층액에 전형적으로 존재하는 소분자 불순물을 포함한다.

[0593] 도 1에 나타낸 rHSA 정제 공정은 약 700 mL의 상층액을 정제하는 데에 사용되었다. 표 4는 1L 규모의 정제에서의 성능 파라미터를 보여준다. 표에서 볼 수 있듯, 크로마토그래피 유닛 조작에 대한 단계 수득률은 일반적으로 높았으나, 캡토 블루(하이 서브)는 예외였다. 도 2는 rHSA의 시바크론 블루 (하이 서브) 염료 친화성 크로마토그램을 나타낸 것이다. 도표에서 볼 수 있듯, 로딩 중에, 그리고 0.5 M NaCl 세척 중에 큰 흡광 피크가 관찰된다. 이 실행만으로는 낮은 수득률의 이유가 컬럼이 오버로드되었기 때문(즉, 컬럼이 rHSA로 포화되었으며, rHSA의 전부가 상층액으로부터 포획되지는 않았다)인지 또는 0.5 M NaCl 세척 때문인지 알 수 없다. 두 경우 모두, 컬럼 로딩 및 세척 단계 조건의 최적화에 의해 수득률 손실을 최소화할 수 있는 가능성이 크다.

표 4

rHSA 정제 성능 파라미터 요약

공정 단계	CV 또는 MV ^a (mL)	로드 철린지 (g/L)	단계 수득률 ^b (%)
캡토 블루(하이 서브)	41.8	20	40
캡토 Q	41.8	15	88
무스탕 Q	0.86	1000	98
PPG-600M	19.7	20	94

[0595] ^a CV = 컬럼 부피; MV = 막 부피. ^b 로드의 HSA-HPLC 생성물 농도와 풀의 A280 흡광 농도를 기초로 캡토 블루 단계 수득률을 계산한다. 모든 다른 단계 수득률은 로드와 풀에 대한 A280 흡광 농도를 이용하여 계산한다.

[0596] rHSA 공정 중간물질의 품질 속성 요약을 표 5에 나타냈다. 표에서 볼 수 있듯, HCP와 DNA는 이러한 정제 공정으로 낮은 수준까지 잘 제거되며, 완전히 정제된 물질에서 HCP는 <10 ng/mg으로 측정되었고, DNA는 1.7×10^{-4} ng/mg으로 측정되었다. HCP는 캡토 블루 컬럼에 대해 2로그를 초과하여 감소되고, 캡토Q 및 PPG-600M 컬럼으로부터는 1로그 (이상) 더 감소된다. 캡토Q 컬럼에 의해 5로그 초과의 DNA가 제거되고, 캡토 블루 및 무스탕Q 단계에 의해 1로그 (이상) 더 제거된다. 추가적인 응집체에서, 정제 공정의 여러 단계에 걸쳐 제거가 관찰되었다. 전체적으로, 이러한 공정은 rHSA를 정제하는 데 매우 성공적이었고, 알부민 융합 단백질의 정제를 위한 출발점으로 이용할 수 있었다.

표 5

[0597]

rHSA의 생성물 품질 요약

공정 중간물질	HCP		DNA		단량체
	ng/mg	LRV ^a	ng/mg	LRV ^a	
적응용 배지	514,028	-	3.0×10^3	-	-
캡토 블루(하이 서브)	1838	2.8	3.8×10^2	1.3	8.5
캡토 Q	<80	>1.4	1.3×10^{-3}	5.6	5.8
무스탕 Q	100	0	6.2×10^{-5}	1.4	4.7
PPG-600M	<10	>1.4	1.7×10^{-4}	0	4.0

[0598]

^a LRV = 로그 감소값. \log_{10} (로드의 불순물의 ng/풀의 불순물의 ng)으로 계산됨.

[0599]

실시예 3

[0600]

알부민 융합 단백질의 정제(500L 규모)

[0601]

재조합 인간 혈청 알부민 융합 단백질(HSA-융합체 또는 알부민 융합체)인 AFP-1을 CHO 세포에서 발현시키고, 3 개의 결합 및 용리 크로마토그래피 컬럼, 플로 스루 크로마토그래피 막, 트리톤 바이러스 불활성화 단계, 나노 필터, 및 두 개의 중간물질 한외여과/투석여과 단계를 포함하는 공정으로 정제한다.

[0602]

이러한 알부민 융합 정제 공정을 도 3에 나타냈다. 도 3에 나타낸 정제 공정을 두 개의 500 L 생물반응조를 정제하기 위해 규모를 증가시켰다. 표 6은 두 개의 500 L 생물반응조 규모의 정제로부터의 성능 파라미터를 보여준다. 표에서 볼 수 있듯, 크로마토그래피 유닛 조작에 대한 단계 수득률 및 풀 부피는 로트별로 일관된다. (UF/DF 및 나노여과를 포함한) 전체 공정 수득률은 로트 1과 로트 2에 대해 각각 48%와 53%였다. 공정 중간물질의 품질 속성 요약을 표 7에 나타냈다. 전체적인 성능(즉, 공정 수득률) 및 제품 품질(절대적인 수준 및 LRV)은 rHSA를 정제하는 데 사용된 정제 공정과 매우 비슷하다. 이는 대부분의 HCP 제거(캡토 블루(하이 서브) 및 캡토 Q)와 DNA 제거율(캡토 Q 및 무스탕 Q)의 원인이 되는 단계의 경우 특히 그러하다.

표 6

AFP-1 정제 성능 파라미터 요약

공정 단계	CV 또는 MV ^a (mL)	로드 캘린지 (g/L)	단계 수득률 ^b (%)
로트 1			
캡토 블루(하이 서브)	33.9	19.8-22	68
캡토 Q	35.0	12.1-12.8	92
무스탕 Q	0.78	997.1	92
PPG-600M	13.6	14.4-18.2	106
로트 2			
캡토 블루(하이 서브)	33.9	20-22	78
캡토 Q	35.0	10.5-19.9	93
무스탕 Q	0.78	1221	99
PPG-600M	13.6	21.2-21.9	104

[0604]

^a CV = 컬럼 부피; MV = 막 부피. ^b 로드의 HSA-HPLC 생성물 농도와 풀의 A280 흡광 농도를 기초로 캡토 블루 단계 수득률을 계산한다. 모든 다른 단계 수득률은 로드와 풀에 대한 A280 흡광 농도를 이용하여 계산한다.

표 7

AFP-1의 생성물 품질 요약

공정 중간물질	HCP		DNA		단량체	산화
	ng/mg	LRV ^a	ng/mg	LRV ^a		

로트 1						
적응용 배지	257,496 ^b	-	4.3×10^3 ^b	-	-	-
캡토 블루(하이 서브)	505	2.9	1.3×10^3	0.7	98.0	3.4
캡토 Q	17	1.5	2.5×10^{-4}	6.7	99.5	3.3
무스탕 Q	< 11	> 0.2	< 6.5×10^{-5}	> 0.6	99.9	3.5
PPG-600M	< 9	> 0.5	< 6.6×10^{-5}	-	99.6	3.1
로트 2						
적응용 배지	264,097 ^b	-	7.6×10^2 ^b	-	-	-
캡토 블루(하이 서브)	661 ^c	2.7	2.4×10^2 ^c	0.6	99.5	4.6
캡토 Q	34 ^c	1.3	2.5×10^{-4} ^c	6.0	99.6	6.0
무스탕 Q	12	0	< 2.3×10^{-5}	> 1.0	99.8	6.1
PPG-600M	< 8	> 0.6	-	-	99.6	6.4

[0606] ^a LRV = 로그 감소값. \log_{10} (로드의 불순물의 ng/풀의 불순물의 ng)으로 계산됨. ^b 주어진 값은 여러 생성물 수집 백의 가중 평균이다.

[0607] ^c 주어진 값은 여러 컬럼 사이클의 가중 평균이다.

[0608] 캡토 블루(하이 서브) 수지를 이용하는 시바크론 블루 염료 친화성 크로마토그래피를 AFP-1 정제 공정을 위한 포획 컬럼으로 사용한다. 도 4는 300 cm/h에서 조작된 AFP-1에 대한 시바크론 블루 염료 크로마토그래피의 대표적인 크로마토그램을 나타낸 것이다. 도 4에서 볼 수 있듯, 약 6 컬럼 부피(CV)에서 시작하는 큰 OD 신호로 나타난 바와 같이, 로딩 중에 큰 플로 스루 피크가 보인다. 이 플로 스루 피크는 숙주 세포 단백질(HCP)과 DNA를 포함하는, 적응용 배지에 존재하는 공정 관련 불순물 대부분을 함유한다. 로딩 후, 컬럼을 재평형화한 다음, 상이한 완충액으로 세척한다: pH 6.0의 0.5 M NaCl을 함유하는 첫 번째 완충액에 이어 재평형화한 다음, pH 7.0의 10% 프로필렌 글리콜. 세척은 시바크론 블루 염료 리간드 및/또는 일부민 용합 단백질로부터 이들 불순물을 해리시켜 생성물 풀에서 HCP 및 DNA 수준을 감소시킨다. 그런 다음, 컬럼을 옥타노에이트 나트륨 및 EDTA를 함유하는 완충액으로 용리시킨다. 표 7에서 볼 수 있듯, 캡토 블루(하이 서브) 크로마토그래피 후, 생성물 중간물질은 적응용 배지에 비해 더 낮은 DNA(0.6 내지 0.7 로그의 제거율) 및 더 낮은 HCP(2.7 내지 2.9 로그의 제거율)를 갖는다. 또한, 이러한 캡토 블루(하이 서브) 생성물은 높은 단량체($\geq 98.0\%$) 및 낮은 수준의 산화 생성물을 갖는다.

[0609] 시바크론 블루 염료 크로마토그래피를 이용한 초기 포획 후, 생성물을 트리톤 X-100으로 처리하여 잠재적인 외피보유 바이러스를 불활성화한다. 이 예에서 캡토 블루(하이 서브) 풀에 0.5% 트리톤 X-100(w/w)의 최종 농도까지 10% 트리톤 X-100을 첨가하고, 실온에서 130분 동안 유지시켰다. 이러한 조건 하에서 효율적인 바이러스 불활성화가 달성된다(상세한 내용은 실시예 5 참조).

[0610] 트리톤 X-100 처리 후, 캡토 Q 컬럼을 이용하여 결합 및 용리 모드에서 음이온 교환 크로마토그래피로 일부민 용합 단백질을 정제한다. 도 5는 300 cm/h으로 조작된 AFP-1에 대한 대표적인 캡토 Q 크로마토그램을 나타낸 것이다. 도 5에서 볼 수 있듯, 약 7 CV에서 시작하는 큰 OD 신호로 나타난 바와 같이, 로딩 중에 큰 플로 스루 피크가 보인다. 이 플로 스루 피크는 이전 단계의 트리톤 X-100을 함유한다. 로딩 후, 컬럼을 재평형화한 다음, 10 CV에 걸쳐 (pH 7.0에서) 0.4 M NaCl까지 선형 NaCl 기울기로 용리시킨다. 표 7에서 볼 수 있듯, 캡토 Q 중간물질은 캡토 블루(하이 서브) 풀보다 더 낮은 HCP(1.3 내지 1.5 로그의 제거율) 및 훨씬 더 낮은 DNA(6 내지 6.7 로그의 제거율)를 갖는다. 또한, 캡토 Q는 (응집 생성물을 감소시킴으로써) 단량체 함량을 증가시키는 능력을 가지고 있으며, AFP-1의 산화의 원인이 되는 불순물을 제거하는 것을 볼 수 있다(상세한 내용은 실시예 7 참조).

[0611] 이러한 캡토 Q 생성물을 50 mM 비스-트리스, 50 mM NaCl, pH 7.0에 대해 디필터링(difilter)하여 무스탕 Q 막 크로마토그래피 단계를 이용한 정제를 준비하였다. 도 6은 10 MV/hr로 작동된 대표적인 무스탕 Q 막 크로마토그램을 나타낸 것이다. 막을 적응시키고 평형화한 후, 생성물을 막에 적용시켜 풀로 스루에서 수집하고, 불순물은

막에 결합시킨다. 2 M NaCl로 벗겨낼 때, 불순물과 일부 생성물을 함유하는 큰 피크가 관찰된다(스트립 피크는 도 6의 크로마토그램에 포함되지 않는다). 표 7에서 볼 수 있듯, DNA는 무스탕 Q 막에 의해 더 제거된다(0.6 내지 1 로그의 제거율).

[0612] 최종 크로마토그래피 단계는 토요필 PPG-600M을 이용하는 소수성 상호작용 컬럼이다. 도 7은 130 cm/h으로 작동된 AFP-1에 대한 대표적인 토요필 PPG-600M 크로마토그램을 나타낸 것이다. 1 M 시트르산염을 함유하는 완충액에서 평형화한 후, 생성물을 컬럼에 로딩한다. 이러한 생성물은 정제 공정의 이 단계까지 순수하므로, 어떠한 플로 스루 피크도 관찰되지 않는다. 로딩 후, 컬럼을 재평형화한 다음, 어떠한 시트르산염도 함유하지 않는 완충액까지의 기울기로 용리시킨다. 이러한 생성물은 뾰족한 피크로 용리되며, 이는 HIC-HPLC에 의해 산화 생성물 함량이 분석되는 분획으로 수집된다. HIC-HPLC에 의한 15% 미만의 산화 종을 함유하는 모든 분획을 모으고, 나노여파를 위해 다음으로 전달한다.

[0613] 비리졸브 브이프로플러스(Viresolve Vpro+)를 이용하는 나노여파를 단백질 정제 분야의 당업자에게 일반적인 기법을 이용하여 수행한다. 나노여파의 목표는 잠재적인 바이러스 입자를 제거하는 것이다. 나노여파 후, 생성물을 농축하고, 회석여파시키고, 10 mM 인산염, 250 mM 수크로스, 0.02% 폴리소르베이트 80에 제형화한다. 나노여파(또는 제형화) 완료 시, 정제 공정 중에 생성물로 도입되는 추가적인 불순물에 대해 생성물 풀을 시험한다. 표 8은 공정 관련 불순물 시험을 요약한 것이다. 표 8에서 볼 수 있듯, 초기 공정 단계(블루 염료 크로마토그래피 및 바이러스 불활성화 단계)에서 공정에 도입되는 완충액 성분 및 시바크론 블루 염료 리간드는 후속 정제 단계에 의해 매우 낮은 수준까지 감소된다.

표 8

공정 관련 불순물 요약

불순물	불순물이 공정에 도입되는 단계	정제 후 측정된 값(µg/mL)	
		로트 1	로트 2
프로필렌 글리콜	캡토 블루(하이 서브) 세척	< 2.5	< 2.5
EDTA	캡토 블루(하이 서브) 용리	< 0.25	< 0.25
시바크론 블루 염료 리간드	캡토 블루(하이 서브)	-	< 0.05
트리톤 X-100	트리톤 바이러스 불활성화	< 0.1	< 0.1

실시예 4

시바크론 블루 염료 친화성 크로마토그래피

[0615] 결합 능력 및 정제된 세포 배양 배지로부터 불순물 제거라는 견지에서 캡토 블루(하이 서브)와 토요필 AF-블루 HC-650M을 비교하였다. 표 9는 정제된 세포 배양 배지에서 AFP-1의 동적 결합 능력을 요약한 것이다. 캡토 블루(하이 서브)의 경우, 동적 결합 능력은 pH와 간접적인 상관관계를 나타냈는데, 여기서 pH 5는 가장 높은 결합 능력(수지 L당 37.4 g AFP-1)을 나타냈고, pH 8은 가장 낮은 결합 능력(12.3 g/L)을 나타냈다. 높은 결합 능력은 바람직하지만, pH 6 이하에서의 분자의 증가된 응집 속도 때문에 pH 5에서의 조작은 덜 바람직하다(데이터 미도시). 따라서, 높은 결합 능력과 생성물 안정성의 균형을 유지하기 위하여 최적의 pH로서 pH 6을 선택하였다. 캡토 블루(하이 서브)와 토요필 AF-블루 HC-650M에 대한 동적 결합 능력을 비교한 결과, pH 6에서 캡토 블루(하이 서브)에 대한 동적 결합 능력이 거의 두 배인 것으로 나타났다.

표 9

수지	pH	10% 파괴에서의 DBC (g/L)
캡토 블루(하이 서브)	5	37.4
	6	22.0
	7	15.6
	8	12.3
토요필 AF-블루 HC-650M	6	13.3

[0619]

이들 두 수지의 정제된 세포 배양 배지로부터 불순물 제거율을 비교하기 위하여, 각각의 컬럼을 바탕선 조건 하에서 작동시켰는데, 컬럼을 동적 결합 능력의 75 내지 80%(캡토 블루(하이 서브)의 경우 17.5 g/L, 토요필 AF-블루 HC-650M의 경우 10.0 g/L)까지 로딩하였고, 25 mM 옥타노에이트 나트륨을 이용하여 컬럼으로부터 용리시켰다. 표 10은 정제된 세포 배양 배지로부터 AFP-1의 포획 및 정제에 사용된 두 가지 시바크론 블루 염료 수지의 비교 결과를 나타낸 것이다. 표 10에서 볼 수 있듯, 두 가지 수지에 대한 수득률은 비슷하여(25 mM 옥타노에이트로의 용리의 경우), 일반적은 수득률은 >90%였다. 나아가, 두 가지 수지 모두 정제된 세포 배양 배지로부터 HCP와 DNA 수준을 효과적으로 감소시킨다. 그러나 토요필 AF-블루 HC-650M 크로마토그래피는 캡토 블루(하이 서브)에 비해 약간 더 우수한 HCP 및 DNA 제거율을 나타냈다.

표 10

시바크론 블루 염료 크로마토그래피를 이용한 알부민 융합체 정제의 최적화

컬럼 로딩 (g/L)	용리 염	수득률 ^a (%)	HCP (ng/mg)	DNA (ng/mg)	HPSEC (% 단량체)
정제된 세포 배양 배지					
해당 없음	해당 없음	해당 없음	241,210	2.26×10^3	해당 없음
캡토 블루(하이 서브)					
10.0	25 mM 옥타노에이트	95	6,166	2.79×10^2	99.2
17.5	25 mM 옥타노에이트	94	9,306	2.81×10^2	98.9
25.0	25 mM 옥타노에이트	93	6,722	2.55×10^2	99.0
17.5	2 M NaCl	60	119,419	1.11×10^3	82.2
토요필 AF-블루 HC-650M					
10.0	25 mM 옥타노에이트	103	5,660	1.48×10^2	99.0

^a 수득률은 로드 및 풀에서의 HSA-HPLC 농도 측정치를 기초로 한다.

[0620]

AFP-1의 경우, 더 높은 결합 능력 때문에 제조 공정을 위해 캡토 블루(하이 서브) 수지를 선택했다. 캡토 블루(하이 서브)를 이용한 포획 단계를 최적화하기 위해, 컬럼 로딩 및 세척 및 용리 완충액 조성을 포함한 몇몇 인자들을 고려했다. 표 10에서 볼 수 있듯이, 컬럼 로딩은 DNA에 어떠한 영향도 미치지 않았으나, HCP 제거율에는 약간의 영향을 나타냈다. 시험한 컬럼 로딩의 극단(10 g/L 또는 25 g/L 로딩)에서, HCP 제거율은 중간 로딩(17.5 g/L 로딩)에서보다 더 효과적이다. 따라서, 처리량을 증가시키기 위해, 그리고 HCP 제거를 증가시키기 위해서도, 동적 결합 능력에서 또는 그 가까이에서 컬럼을 조작하는 것이 유리하다.

[0622]

시바크론 블루 염료 크로마토그래피 포획 단계를 위해 용리 완충액 조성을 최적화하였다. 도 8은 시바크론 블루 염료 크로마토그래피를 위한 용리 완충액을 비교한 것을 보여준다. 도 8 및 표 10에서 볼 수 있듯이, 시바크론 블루 염료 컬럼으로부터의 용리를 위해서는 2 M NaCl에 의해 옥타노에이트가 훨씬 더 효과적인 선택이다. 이 예의 경우, 60% 수득률 및 크로마토그램에서 보이는 넓은 용리 프로파일을 기초로 2 M NaCl은 컬럼으로부터 AFP-1의 불완전한 용리를 제공하였다. 2 M NaCl 실행의 생성물 품질은 25 mM 옥타노에이트를 이용한 용리에 의해 HCP 수준은 훨씬 더 높았고, 단량체 수준은 훨씬 더 낮았음을 보여주었다. 더구나, 2 M NaCl의 (단독 또는 용매들과의 조합으로의) 사용은 제조의 관점에서 덜 바람직한데, 이는 이를 용리 완충액이 비싸고 공정의 다음 크로마토그래피 컬럼에 대한 결합을 촉진시키기 위해서는 이러한 공정이 완충액 교환 단계를 요구할 수 있기 때문이다.

[0623]

시바크론 블루 염료 포획 단계 개발의 마지막 단계는 세척 최적화였다. 알부민은 여러 유형의 분자와 결합할 수 있다는 점은 잘 알려져 있으며, 이는 알부민 융합 단백질의 경우에도 그러하다. 따라서, (HCP 및 DNA와 같은) 불순물이 알부민 융합 단백질과 상호작용할 수 있으며, 원하는 생성물과 함께 정제될 수 있다고 예상된다. 시바크론 블루 염료 크로마토그래피 수지 상의 알부민 융합 단백질과의 강력한 결합을 이용하여, 불순물 및 시바크

론 블루 염료 리간드 사이의 상호작용 또는 불순물 및 리간드에 결합된 일부민 용합 단백질 사이의 상호작용을 파괴함으로써 불순물 제거율을 개선하기 위한 노력으로 몇 가지 세척제를 시험하였다. 이온성 계면활성제, 카오토로픽 계면활성제, 코스모트로픽 계면활성제 및 순한 용매를 포함한, 다양한 유형의 세척제를 이용하였다. 나아가, pH의 영향이 있다면 그것을 결정하기 위하여 각각의 세척제를 pH 6 및 pH 7에서 시험하였다.

[0624] 표 11은 시바크론 블루 염료 크로마토그래피에서 시험한 세척제를 요약한 것이다. 표 11에서 볼 수 있듯이, 세척제의 pH는 HCP 제거에 매우 중요하다. pH 7에서, 시험했던 모든 세척제는 HCP를 감소시키는 데 더 효과적이었고, 대부분의 세척제는 pH 6에서의 동일한 세척제에 비해 HCP를 2배 이상 감소시켰다. 시험했던 세척제 중에서도, pH 7에서의 0.5 M NaCl이 HCP를 감소시키는 데 가장 효과적이었는데, 대조군 실행과 비교하여 HCP의 7배 초과의 감소를 나타냈다. HCP 제거율과 달리, DNA 제거율은 pH 6과 pH 7 사이에서 pH에 의해 영향을 받지 않았다. 시험했던 모든 세척제 중에서, 이온성 세척제(NaCl과 Na₂SO₄)만이 대조군 실행에 의해 개선된 DNA 제거율을 보여주었다. 이를 사례에서, 대조군 실행에 의해 DNA의 4 내지 5배의 감소가 관찰되었다. 또한, 10% 프로필렌 글리콜을 함유하는 실행으로 더 높은 단량체 수준이 관찰되었다는 점을 주목해야 한다. 그러나 시험했던 다수의 세척제들로는 단량체 수준의 미미한 증가가 관찰되었다. pH로는 단량체 순도에 미치는 어떠한 영향도 관찰되지 않았다.

[0625] 표 11의 데이터를 기초로, 0.5 M NaCl은 HCP 및 DNA 제거율의 관점에서 매우 효율적인 세척제이고, 10% 프로필렌 글리콜은 단량체 순도를 증가시키기 위한 효과적인 세척제이다. 여기서 10% 프로필렌 글리콜 세척제도 캡토블루 풀에서 생성물의 산화 가능성을 감소시키는 데 효과적이었음을 주목해야 한다(추가적인 상세한 내용은 실시예 7 참조). 수득률은 0.5 M NaCl 세척제에 의해 가장 부정적으로 영향을 받았는데, pH 6과 pH 7에서 각각 수득률 손실이 5%와 14%였다. 흥미롭게도, 시험했던 다른 세척제들로는 어떠한 수득률 손실도 관찰되지 않았다. 이러한 결과를 기초로, pH 6의 0.5 M NaCl을 함유하는 세척제와 pH 7의 10% 프로필렌 글리콜을 함유하는 세척제가 실시예 3의 제조 공정에 도입되었다.

표 11

시바크론 블루 염료 크로마토그래피 세척 최적화 요약

세척제 종	세척 pH	수득률 ^a (%)	HCP (ng/mg)	DNA (ng/mg)	HPSEC (% 단량체)
정제된 세포 배양 배지					
해당 없음	해당 없음	해당 없음	241,210	2.26 x 10 ³	해당 없음
대조군					
0.05 M NaCl	6	95	7,332	2.25 x 10 ²	99.1
세척제 개발 실행					
0.5 M NaCl	6	90	2,125	6.35 x 10 ¹	98.8
	7	81	1,004	5.07 x 10 ¹	98.9
0.5 M Na ₂ SO ₄	6	96	5,629	5.29 x 10 ¹	98.8
	7	95	2,939	3.97 x 10 ¹	98.9
10% 프로필렌 글리콜	6	98.4	8,665	1.70 x 10 ²	99.4
	7	95	5,311	2.09 x 10 ²	99.4
0.1% 트리톤 X-100	6	100	5,540	1.70 x 10 ²	99.6
	7	101	2,878	2.04 x 10 ²	99.3
0.5 M 요소	6	100	7,133	1.02 x 10 ²	99.3
	7	99	4,321	1.84 x 10 ²	99.1
0.1 M 니코틴아미드	6	100	9,407	1.69 x 10 ²	99.2
	7	97	3,567	1.49 x 10 ²	99.4

^a 수득률은 로드 및 풀에서의 HSA-HPLC 농도 측정치를 기초로 한다.

[0626]

[0628] 실시예 5

[0629] 트리톤 X-100 바이러스 불활성화

[0630]

5.4 내지 5.5 범위의 등전점을 갖는 일부민 용합 분자인 AFP-1의 경우, 낮은 pH 처리는 분자의 품질에 유해한 것으로 나타났다(관찰된 응집 및 침전). 따라서, 바이러스 불활성화를 위해 트리톤 X-100 처리를 선택했다. 낮은 pH 처리와 비슷하게, 트리톤 X-100의 첨가는 바이러스 주변의 외피를 파괴하여 불활성 상태를 만들 것이다. 낮은 pH 처리와 달리, 트리톤 X-100은 AFP-1의 품질에 측정 가능한 영향을 미치지 않는다.

[0631]

트리톤 X-100을 이용한 바이러스 불활성화는 모델 외피 바이러스로서 이종향성 뮤린 백혈병 바이러스(XMuLV)를 이용하여 시험하였다. 간략히, 시바크론 블루 염료 크로마토그래피로 정제한 물질에 0.5% (w/w) 트리톤 X-100의 최종 농도까지 10% (w/w) 트리톤 X-100을 첨가하였고, 주어진 시간 동안 항온배양한 다음, 당업자에게 일반적인 플레이트 기반 방법을 이용하여 감염성에 대해 시험하였다. 트리톤 X-100 처리 전과 후의 시료에 대한 감염성 분석 실행으로부터의 XMuLV 역가를 기초로 로그 감소값(LRV)을 계산하였다.

[0632]

표 12는 XMuLV 바이러스 불활성화에 대해 얻은 LRV를 요약한 것이다. 표에서 볼 수 있듯이, 0.5% (w/w) 트리톤 X-100 처리는 XMuLV 불활성화를 위한 효과적인 방법이다. 트리톤 X-100 처리 직후 측정한 시료의 경우, 2반복 실험에 대해 4.73 및 >5.15의 LRV 값이 얻어졌다. 120분의 항온배양 종료 시, 두 연구는 >5.15 로그의 XMuLV의 불활성화를 보여주었다. 이러한 LRV는 단일클론성 항체를 위한 낮은 pH 처리를 이용해 얻은 값과 동일한 범위이

다.

표 12

알부민 융합 단백질의 트리톤 X-100 처리에 대한 XMuLV LRV 요약

연구	0.5% (w/w) 트리톤 X-100과의 배양 후 LRV				
	0분	30분	60분	90분	120분
1	4.73	4.43	5.21	4.73	> 5.21
2	> 5.15	5.15	4.03	5.15	> 5.15

[0633]

[0634] 트리톤 X-100 처리 후, 생성물을 음이온 교환 크로마토그래피로 정제한다(정제 공정에 대해서는 도 3 참조). 음이온 교환 크로마토그래피 중에, 알부민 융합체는 고정상에 강하게 결합되지만, 일부 불순물이 컬럼 사이로 흐른다. 트리톤 X-100은 음이온 교환 컬럼에 의해 보유되지 않으며, 280 nm에서의 흡광도 때문에 음이온 교환 컬럼의 플로 스루에서 볼 수 있다. 도 5는 컬럼 로딩 중에 강한 280 nm 흡광 신호를 가진 대표적인 음이온 교환 크로마토그램을 보여준다. 트리톤 X-100의 추가적인 제거는 소수성 상호작용 크로마토그래피 중에 달성될 수 있다. 그러나 트리톤 X-100은 생성물과 함께 소수성 컬럼에 결합할 것으로 예상된다. 따라서, 생성물로부터 트리톤 X-100의 제거는 덜 활발하며, 트리톤 X-100과 알부민 융합 단백질 사이의 선택성에 의존한다. 도 3에 나타낸 공정에 의한 정제 후, 트리톤 X-100 수준은 0.1 µg/mL 미만으로 측정되었다(표 5 참조).

[0636] 실시예 6

[0637] 음이온 교환 막 크로마토그래피

[0638] 플로 스루 방식으로 작동된 음이온 교환(AEX) 막은 숙주 세포 단백질(HCP), DNA 및 바이러스와 같은 숙주 세포 불순물의 우수한 제거를 제공할 수 있다. pI가 전형적으로 7.5 내지 9.5인 단일클론성 항체(mAb)의 경우, 플로 스루 AEX 막이 중성 pH 주변에서 조작되고 수득률이 종종 >95%일 때 (염 농도 또는 전도성에 상관없이) 생성물 결합은 최소한의 관심사이다. 작동 pH가 mAb의 pI에 접근함에 따라, 결합이 일어날 수 있고 수득률은 손실될 수 있다. mAb의 경우, 숙주 세포 불순물 제거는 높은 pH 및 낮은 염(또는 전도성)의 조건 하에서 달성된다. 따라서, 전형적인 mAb의 경우, 전도성이 최소화되고, pH는 가능한 한 높으면서, pI 미만으로 유지하도록 조작 조건이 최적화된다.

[0639] 낮은 pI의 알부민 융합 단백질의 경우, 플로 스루 AEX 막 크로마토그래피 단계의 개발 및 최적화는 더 복잡하고, 연역적으로 예측할 수 없다. 전형적인 mAb와는 달리, 중성 주변의 모든 pH 값에서 AEX 막에 대한 표적 분자의 일부 결합이 있을 가능성이 있으며, (더 낮은 단백질 전하 때문에) 더 낮은 pH에서, 그리고 (알부민 융합 단백질과 크로마토그래피 리간드 사이의 상호작용을 보호함) 더 높은 염 농도에서 더 적은 결합이 예상된다. 따라서, 더 낮은 pH와 더 높은 염 농도에서 더 높은 수득률이 기대된다. 다른 한편으로는, 염 및 pH와 관련한 불순물 제거 추세는 더 높은 pH와 더 낮은 염 농도가 더 큰 불순물 제거율을 초래하는 mAb에서 보이는 추세를 잘 보여주리라 예상된다. 따라서, 높은 수득률(낮은 pH와 높은 염)과 높은 순도(높은 pH와 낮은 염) 사이에서 균형을 맞추어야 하며, pH, 염 농도 및 막 로딩은 주어진 생성물에 대해 최적화되어야 한다.

[0640] AFP-1을 위해 AEX 막 크로마토그래피 단계를 최적화하기 위해, pH(pH 6.0 내지 8.0), NaCl 농도(10~220 mM) 및 막 로드 챈린지(0.5~2.5 g/막 mL)를 다변량 설계의 실험(DoE)에서 조사하였다. 이 연구를 위해, 단계 수득률 및 불순물 제거율에 미치는 영향을 결정하기 위하여 두 개의 중심점 조건 및 가장자리를 따라 두 개의 추가점과 함께 설계 공간의 모서리를 시험한 스크리닝 설계를 사용하였다. 표 13은 AFP-1에 대한 AEX 막 최적화 실험을 요약한 것이다. 표 13에서 볼 수 있듯이, 수득률은 모든 세 가지 요인에 의해 영향을 받았으며, 일반적으로 낮은 pH, 낮은 염 및 더 높은 로딩에서 얻어진 더 높은 수득률에서 예상했던 추세를 따랐다. 다른 한편으로는, DNA 제거율은 더 높은 pH와 더 낮은 염에서 더 우수한 제거율의 예상 추세를 따르지 않았다. 대신, DNA 제거율은 pH 8에서 10 mM NaCl에서 가장 좋지 않은 것으로 판찰되었다. 흥미롭게도, 이러한 영향은 단일 요인에 의해 유발되지 않았다. 예를 들어, 증가된 불순물 제거율은 강한 결합 조건(pH 8.0, 10 mM NaCl)과 비교할 때 약한 결합 조건(pH 6, 220 mM NaCl) 및 중간 결합 조건(pH 6, 10 mM NaCl 또는 pH 8, 110 mM NaCl) 하에서 판찰되었다. 시

험했던 가장 강한 결합 조건 하에서만 불순물 제거율이 부정적으로 영향을 받았다. 이러한 결과에 대한 한 가지 설명은 일부민 용합 단백질과 불순물 사이의 경쟁적 결합일 수 있다. 강한 결합 조건 하에서는 일부민 용합 단백질이 결합 자리에 대해 경쟁할 수 있으며, 이는 DNA에 대해서는 더 낮은 결합 능력을, 생성물에 대해서는 더 낮은 수득률을 초래할 것이다. 또한, 시험했던 모든 조건의 경우, 어떠한 HCP 제거도 관찰되지 않았으며, 응집체 수준은 상대적으로 변화되지 않은 채로 유지되었음을 주목해야 한다.

[0641] 무스탕 Q 단계를 위한 위의 최적화 연구를 완료하기 전에는, 수득률과 불순물 제거 사이에 균형을 맞출 필요가 있음이 예상되었다. 그러나 실제로는 그 반대가 본 연구에서 관찰되었다. 도 9는 pH와 NaCl 농도의 함수로서 단계 수득률과 DNA 농도 감소값(LRV)을 보여준 것이다. 도 9에서 볼 수 있듯이, 수득률과 DNA 제거율은 낮은 pH와 더 높은 NaCl 농도에서 최적인 것으로 나타났다(적색 등고선으로 나타냄). 이것은 DNA에 대한 예상하지 못했던 발견이었고, 비슷한 효과가 바이러스 제거율에서 관찰될 수 있다.

표 13

무스탕 Q 막 크로마토그래피에 대한 공정 및 분석 데이터 요약

pH	[NaCl] (mM)	막 로딩(g/mL)	수득률 (%)	HCP (ng/mg)	DNA (LRV)	단량체 (%)
-	-	-	-	2,241	-	99.6
6	10	0.5	83	2,764	5.5	99.5
6	10	2.5	90	2,802	5.7	99.2
6	110	0.5	90	2,898	6.0	99.2
6	110	2.5	92	2,720	6.4	99.1
6	220	1.5	98	2,210	5.8	-
7	60	1.5	89	2,520	4.6	99.6
7	60	1.5	89	2,294	4.8	99.5
8	10	0.5	73	2,672	2.9	99.5
8	10	2.5	85	2,432	2.6	99.4
8	110	0.5	87	2,438	5.7	99.8
8	110	2.5	91	2,328	5.9	99.5
8	190	1.5	98	2,535	6.3	-

실시예 7

소수성 상호작용 크로마토그래피를 이용한 산화 변이체의 제어

본 연구에 사용된 단백질은 재조합 인간 혈청 일부민에 연결된 두 개의 Tn3 스캐폴드를 함유하는 일부민 용합 단백질이다. 각각의 Tn3 스캐폴드는 CD40L 리간드에 결합할 수 있는 활성 자리를 함유한다. 이러한 일부민 용합 단백질은 여덟 개의 메티오닌 잔기(여섯 개는 분자의 일부민 부분에, 그리고 각각의 Tn3 스캐폴드에 한 개씩)와 일곱 개의 트립토판 잔기(다섯 개는 분자의 일부민 부분에, 그리고 각각의 Tn3 스캐폴드에 한 개씩)를 함유한다. 표면 영역에 가까운 메티오닌과 트립토판 잔기들은 세포 배양 및/또는 정제 공정 중에 산화될 수 있다. 도 10은 웨티드 매핑 질량 분광분석법에 의해 결정된 산화의 함수로 상대적인 효능을 나타낸 것이다. 보다 시피, 일부민 상의 메티오닌 산화(M498 및 M529)와 분자의 Tn3 부분의 메티오닌 산화(M74 및 M17)는 효능의 상실에 기여하지 않는다. 다른 한편으로는, 분자의 (BC 루프 상의) 활성 자리 근처의 Tn3 스캐폴드에서 일어나는 트립토판 산화(W46 및 W151)는 분자의 효능 상실을 초래한다. 따라서, 트립토판 산화는 제조 공정 전반에 걸쳐 잘 제어되어야 한다.

[0646] AFP-1의 개발 및 제조 중에 트립토판 산화를 모니터링하기 위해, 웨티드 매핑 질량 분광분석법, SEC-HPLC 및 HIC-HPLC를 개발의 여러 단계에서 활용하였다. 질량 분광분석법은 메티오닌과 트립토판 수준을 꽤 정확하게 결정하는 데 사용될 수 있지만, 처리량이 낮고 더 많은 시간과 자원을 수반하므로, 전형적으로는 중요한 시료의 특성분석에 사용된다. 반면, 더 빠른 HPLC 방법들은 공정 중 시험에 사용될 수 있다. 그러나 두 가지 HPLC 분석 법은 단점이 있다. 예를 들어, SEC-HPLC는 트립토판 산화를 측정할 수 있지만, 트립토판 솔루션 네이티브 분자로부터 완전히 분리되지 않으므로 단지 추정에 불과하고, HIC-HPLC는 산화 수준을 정확하게 측정할 수 있지만, 메티오닌 산화와 트립토판 산화를 구별할 수 없다. AFP-1 산화에 대해 더 잘 이해하기 위해, 개발 및 제조 중에 세 가지 방법 모두를 이용하였다. AFP-1 산화 정량의 특이성을 개선하기 위해, TN3 트립토판(W46 및 W151) 산화를 함유하는 웨티드 검출에 초점을 두고자 RP-HPLC 방법을 개발했다. 이러한 방법은 AFP-1의 앞으로의 공정 중

시험 및 품질 제어에 이용될 수 있다.

[0647] 성공적인 산화 제어 전략은 산화의 억제뿐만 아니라, 제조 공정 중에 형성되는 산화 종의 제거를 포함한다. 도 11은 캡토 블루 및 캡토 Q 폴에 대한 시간의 함수로 트립토판 산화를 나타낸 것이다. 이들 실행의 경우, 폴은 표면상 pH 7 내지 pH 8이었는데, 이는 정제 공정의 작동 pH를 대표한다. 도 11에서 볼 수 있듯이, 캡토 블루 폴에서 (SEC-HPLC로 측정한) 트립토판 산화는 생물반응조에 따라 달랐으며, 10% 프로필렌 글리콜 세척제가 사용되었을 때, 그리고 폴을 더 낮은 온도에 보관했을 때도 감소되었다. 또한, 캡토 블루 폴로의 10 mM EDTA의 첨가는 트립토판 산화를 늦추었다(데이터 미도시). 도 9에서 볼 수 있듯이, 캡토 Q 폴에서의 트립토판 산화는 미미한 것으로 보이며, 캡토 Q 폴은 실온에서도 꽤 안정적이다.

[0648] AFP-1 트립토판 산화의 근본 원인을 더 연구하기 위해, 시바크론 블루 염료의 존재 및/또는 높은 염 농도가 산화를 유발하지 않을 것이라는 점을 밝히기 위한 실험을 수행했다. AFP-1 트립토판 산화는 초기 공정 시료(적응 용 배지 또는 캡토 블루 폴)에서 발견되는 성분들의 독특한 조합과 빛 노출을 필요로 한다는 점이 관찰되었다. 한 가지 가능성 있는 트립토판 산화의 출처는 트립토판 2,3-디옥시게나제(TD02), 또는 트립토판 수산화효소 (TPH)와 같은 효소로, 이들 둘 다는 트립토판을 특이적으로 산화할 수 있다. TD02는 항-TD02 웨스턴 블로트를 이용하여 CM에서 양으로 확인된 바 있고(도 12 참조), AFP-1의 트립토판 산화를 유발할 수 있음을 주목해야 한다.

[0649] 일단 초기 공정 단계 중에 산화가 일어나면, 산화된 변이체의 수준은 나중에 하류 공정에서 제어될 필요가 있을 수 있다. AFP-1의 경우, 트립토판 산화를 포함한 과량의 산화를 제거하는 데에 소수성 상호작용 크로마토그래피 단계를 이용하였다. 도 13은 AFP-1에 대한 대표적인 HIC 크로마토그램을 나타낸 것이다. 도 13에서 볼 수 있듯이, AFP-1의 정제를 위해 여러 HIC 수지와 다중 모드의 (양이온 교환/HIC) 수지를 조사하였다. 시험했던 모든 수지의 경우, AFP-1은 기울기의 중심 근처에서 용리되었고, 트립토판 산화의 제거에 적합하였다. HIC가 AFP-1을 위한 기울기 용리에 사용될 때, (메티오닌 및 트립토판 산화를 포함한) 산화 생성물은 네이티브 생성물보다 더 일찍 용리되었으며, 피크 앞쪽에 놓축된다. 예비적 규모의 조건 하에서, 산화된 종들은 피크의 앞쪽에 놓축된다. 그러나 뚜렷한 산화 생성물 피크를 보기에는 충분한 분리가 없다.

[0650] 개발 도중, 부틸-S 패스트 폴로(부틸-S)와 토요펄 PPG-600M(PPG-600M) 둘 다의 규모를 확대하였고, 각각의 컬럼이 산화 생성물을 제거하는 데 이용될 수 있는지를 보기 위해 선형 기울기로 작동시켰다. 각각의 사례에서, 용리액 폴을 피크 최대가 될 때까지 0.5 컬럼 부피 분획으로 분획화한 다음, 나머지 생성물 피크를 단일의 최종 분획으로 수집하였다. 두 가지 실행에서, 분획들을 대상으로 산화된 내용물(HIC-HPLC에 의해)과 효능을 시험하였다. 도 14는 부틸-S 또는 PPG-600M 크로마토그래피 실행 중에 취한 분획에 대한 상대적인 효능 대 HIC-HPLC 초기 종 함량을 나타낸 것이다. 두 사례에서, (도면의 오른쪽부터 시작하는) 초기 용리 분획은 나중에 용리되는 분획(도면의 왼쪽)보다 (HIC-HPLC로 측정한) 더 많이 산화 생성물을 함유하였고, 더 낮은 효능을 나타냈다. 이들 조건 하에서, 예비적 HIC는 산화 수준을 제어하는 데 사용될 수 있고, 그 결과, 생성물의 효능을 제어할 수 있다.

결론

[0653] 위의 설명은 임상적 또는 상업적 제조에 적합할 수 있는 규모 확대 가능한 기법을 이용하여 재조합 인간 알부민 (rHSA) 및 알부민 융합 단백질을 정제하는 다양한 접근법을 약술한 것이다. 숙주 관련된 불순물, 예컨대, HCP, DNA 및 바이러스를 감소시키기 위해 공정의 초기 단계들을 최적화하였다. 시바크론 블루 염료 크로마토그래피 포획 단계는 활동적인 세척을 포함하여 HCP를 감소시켰고, 옥타노에이트를 이용한 선택적인 용리를 활용하였다. 트리톤 X-100 바이러스 불활성화는 생성물 품질에 영향을 미치지 않고 외피 바이러스를 불활성화하는 강력한 방법인 것으로 밝혀졌다. DNA를 매우 낮은 수준까지 감소시키기 위해 AEX 컬럼과 막 크로마토그래피 단계를 최적화하였다. 흥미롭게도, 막 크로마토그래피 단계는 낮은 pH와 높은 염에서 최적인 것으로 밝혀졌는데, 이는 본 연구 전에는 예상하지 못했다. 마지막으로, 이러한 정제 공정을 덜 강력한 것으로 밝혀진 산화된 변이체의 수준을 제어하고자 설계하였다. 이러한 제어 전략은 시바크론 블루 크로마토그래피 단계 도중 프로필렌 글리콜 세척뿐만 아니라, 트립토판 산화 제한을 보조하기 위해 용리 완충액에 EDTA를 첨가하는 것을 포함했다. 또한, 소수성 상호작용 크로마토그래피를 산화 생성물의 제거를 위한 효과적인 옵션으로 사용했다. 이러한 정제 공정은 500 L 생물반응조들을 정제하기 위해 규모를 확대하였고, 배치별로 수득률 및 생성물 품질의 관점에서 일관된 것으로 나타났다.

[0654] 위에 제시된 실시예들은 본 발명의 다양한 양태 및 본 발명의 방법의 실시를 예시한다. 이들 실시예들은 본 발

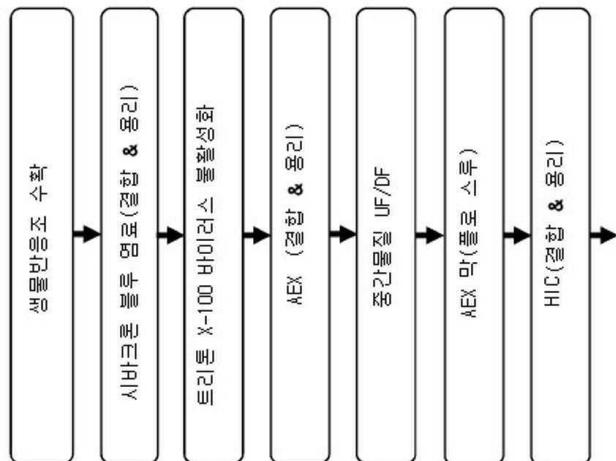
명의 여러 상이한 구현예의 배타적인 설명을 제공하고자 한 것이 아니다. 따라서, 본 발명은 명확한 이해를 목적으로 예증 및 예시에 의해 다소 상세히 기술되었지만, 당업자는 첨부된 청구범위의 사상 또는 범위로부터 벗어나지 않으면서 여러 가지 변경 및 수정이 이루어질 수 있다는 점을 용이하게 인식할 것이다.

[0655]

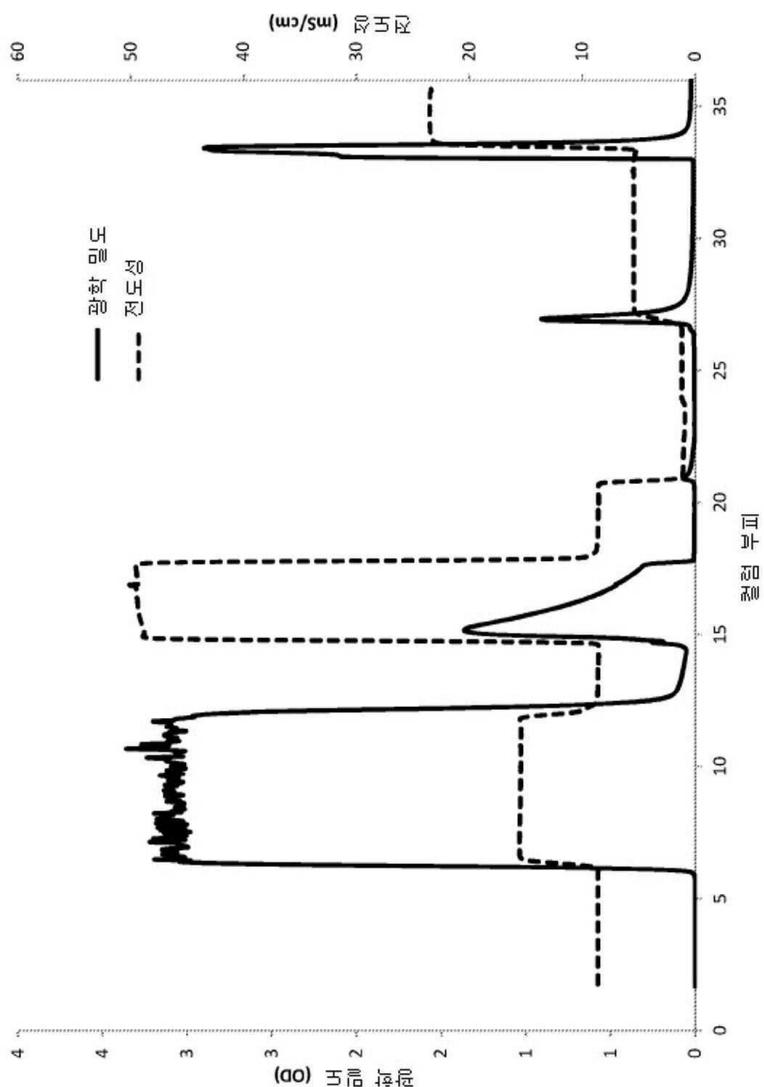
본 명세서에서 언급된 모든 공개문헌, 특히 및 특허출원은 각각의 개별적인 공개문헌, 특히 또는 특허출원이 본 설명에 참고로 포함되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 표시되어 있는 것처럼 동일한 정도로 본 명세서 내로 참고로 포함된다.

도면

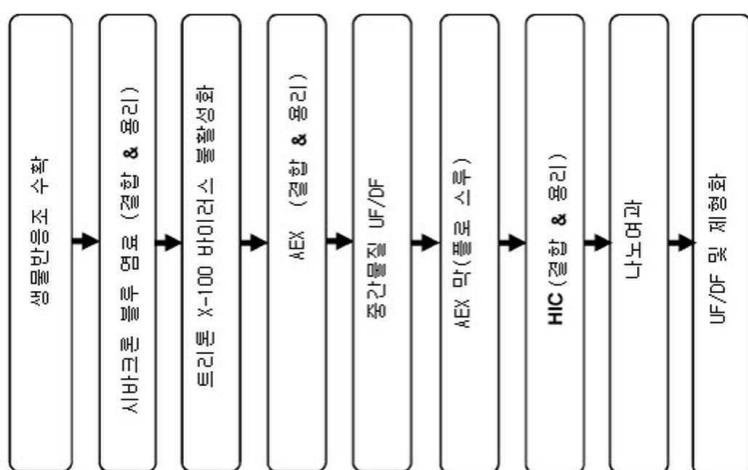
도면1



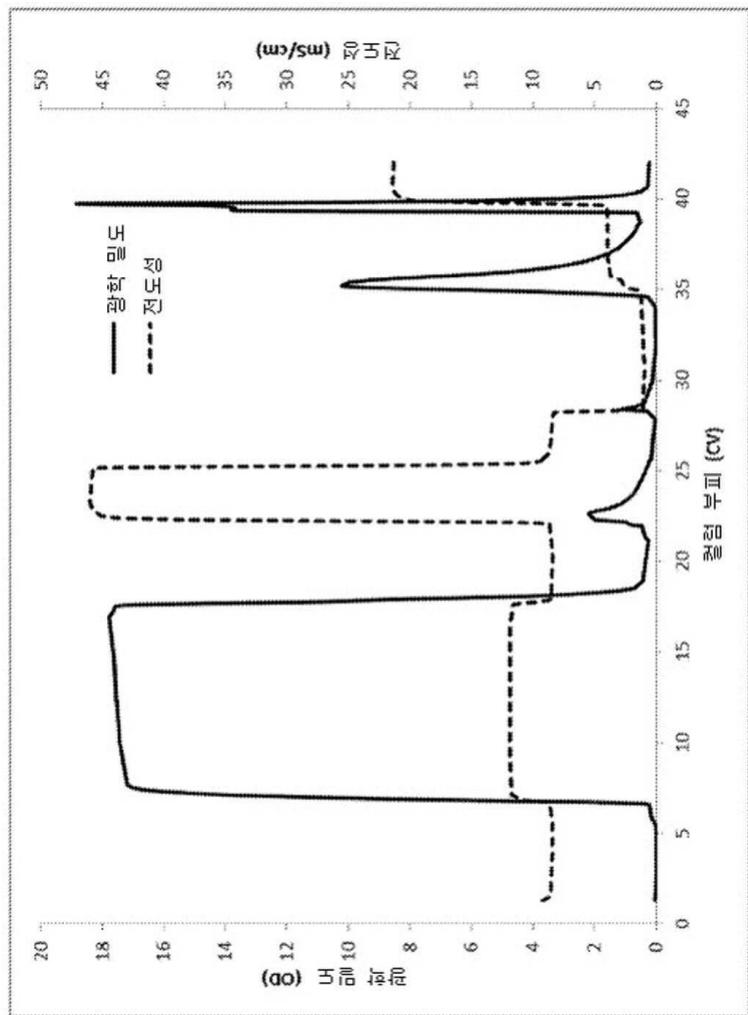
도면2



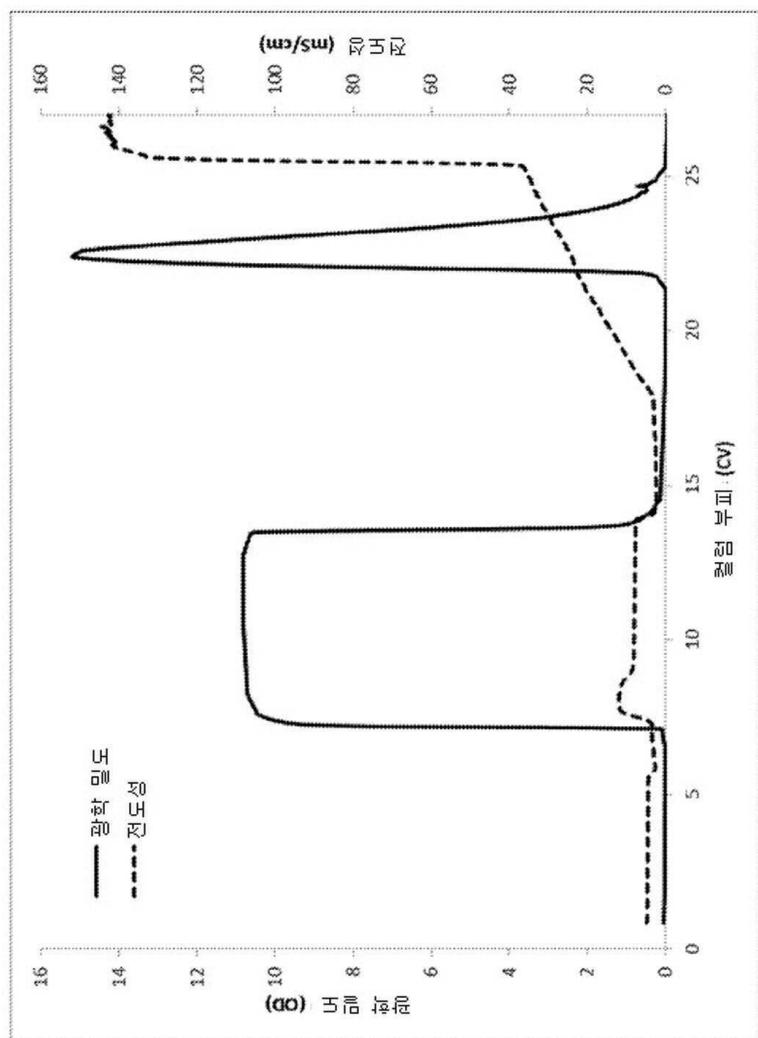
도면3



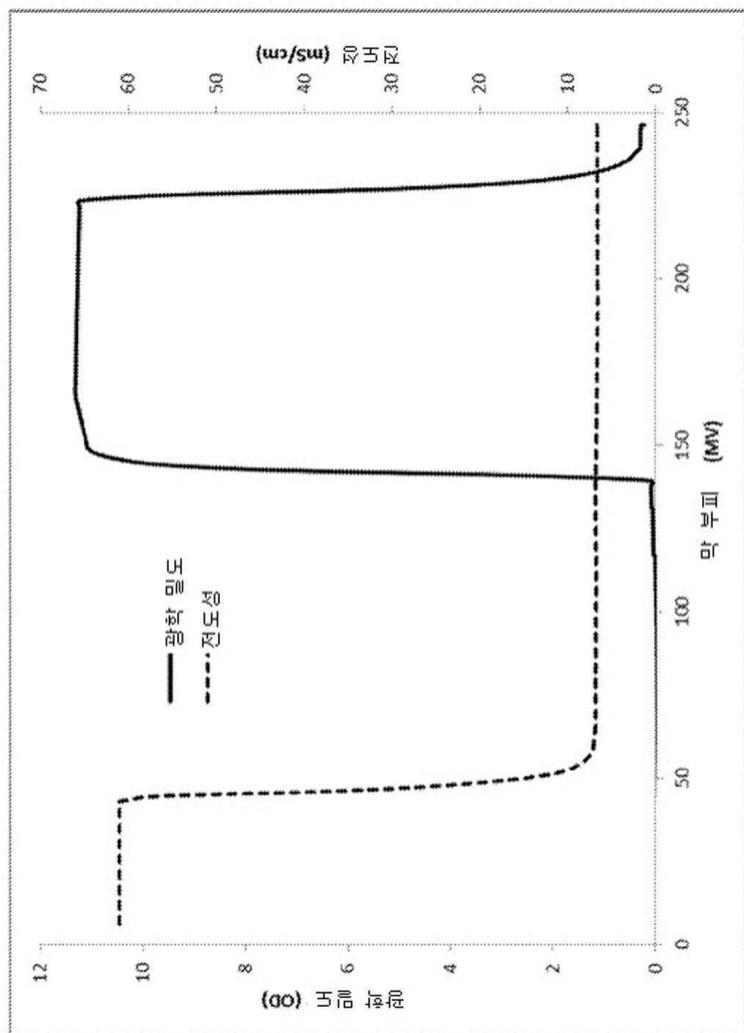
도면4



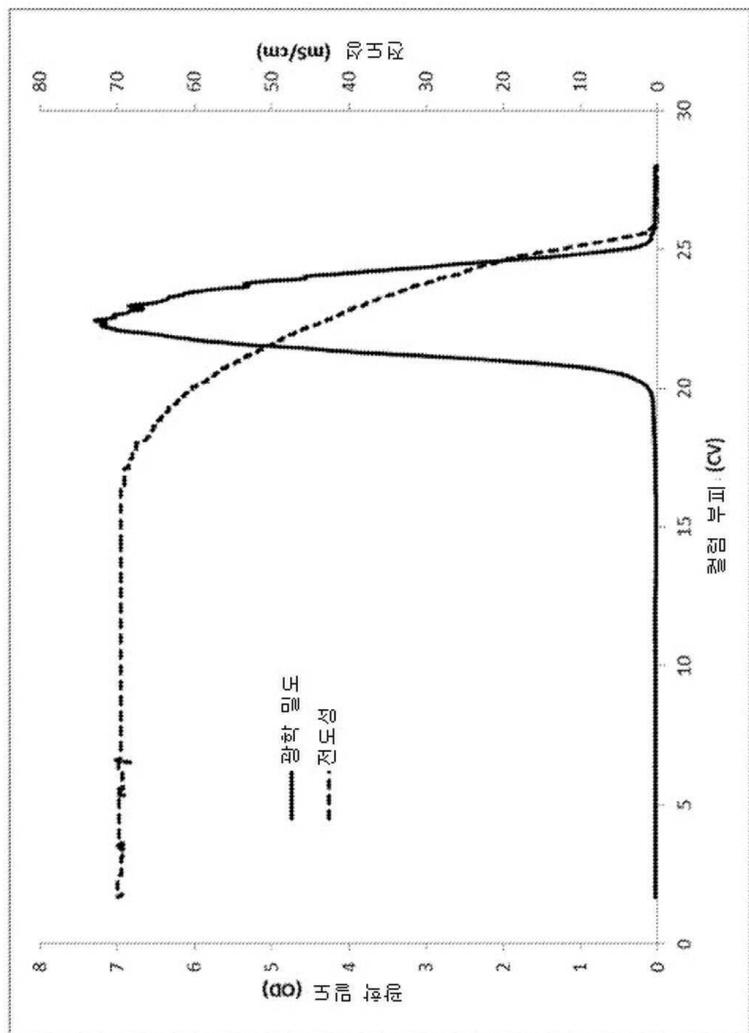
도면5



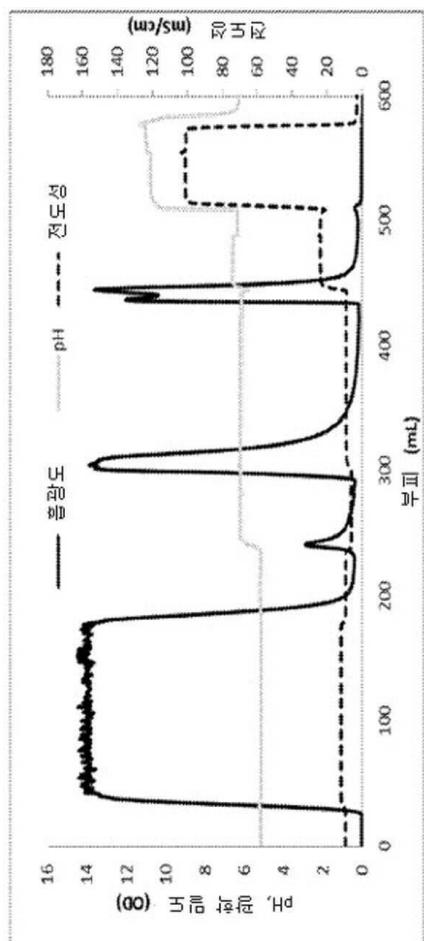
도면6



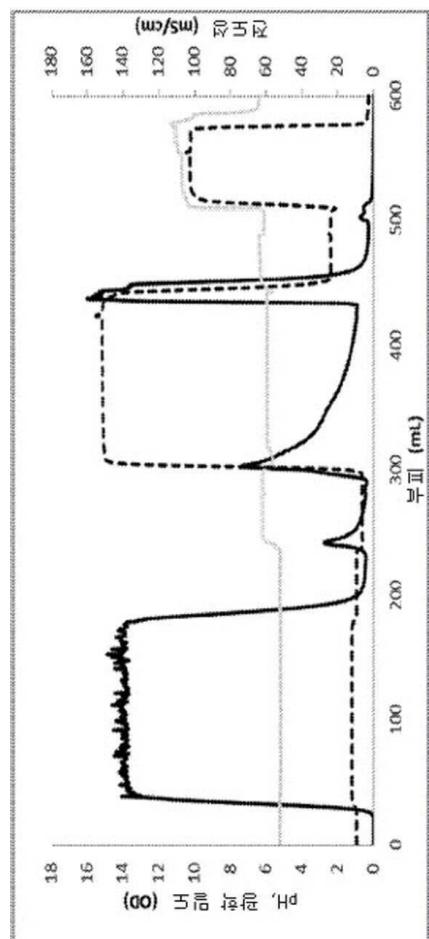
도면7



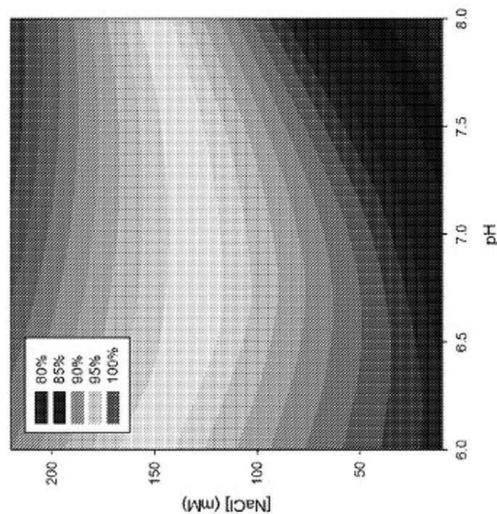
도면 8a



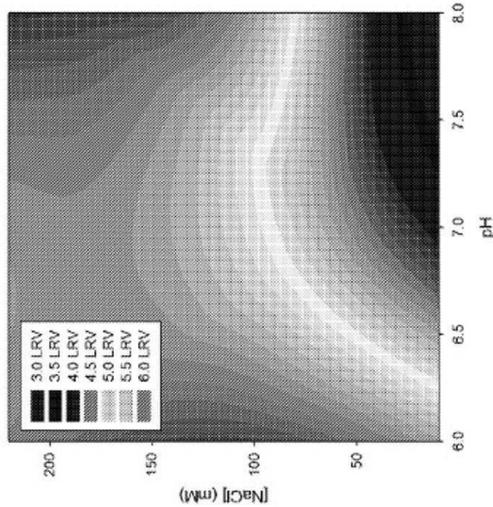
도면8b



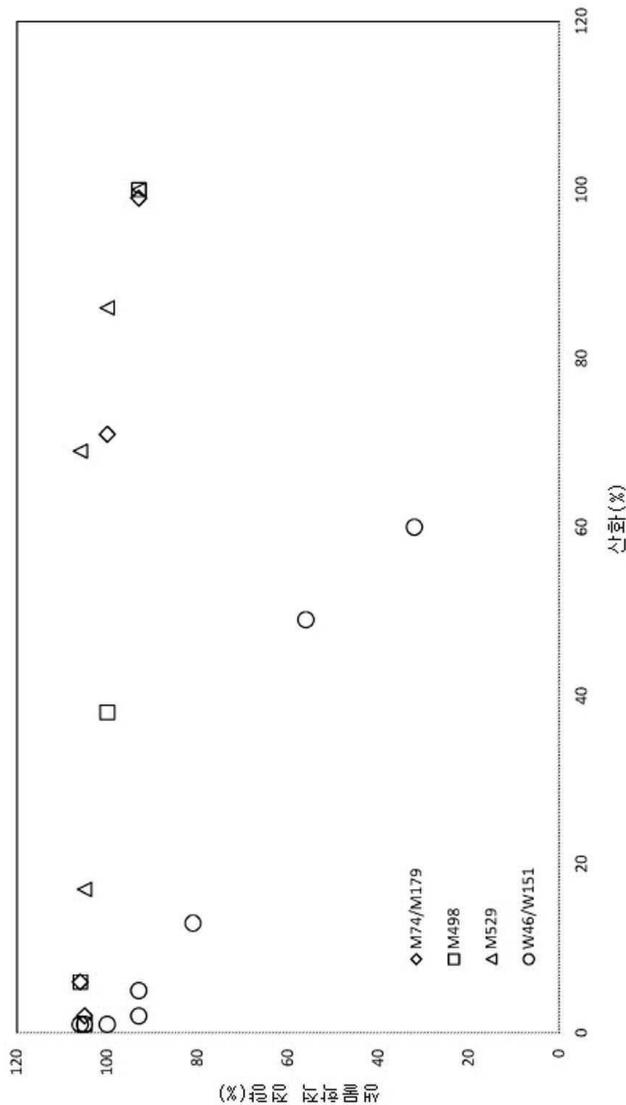
도면9a



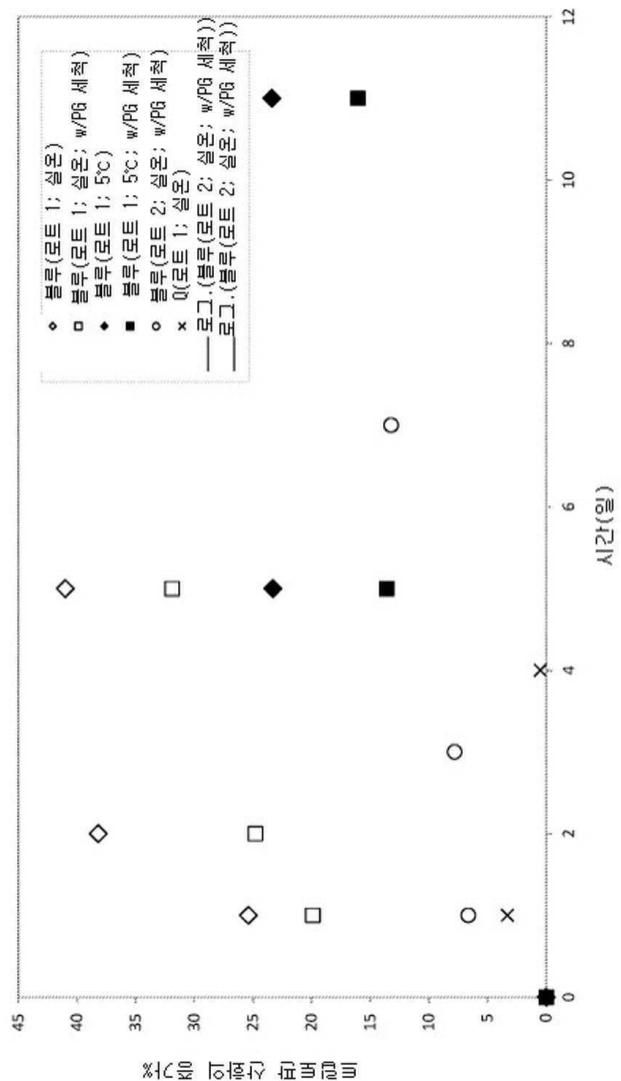
도면9b



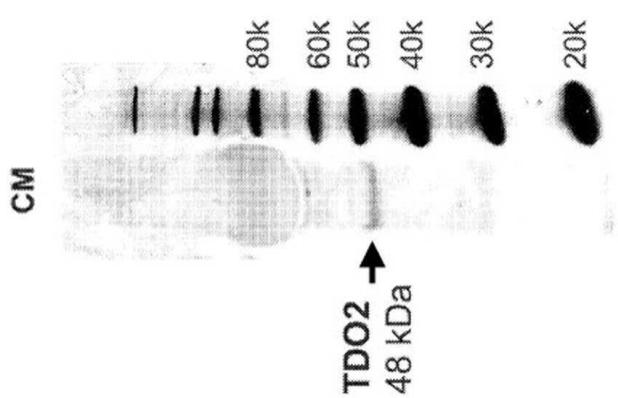
도면10



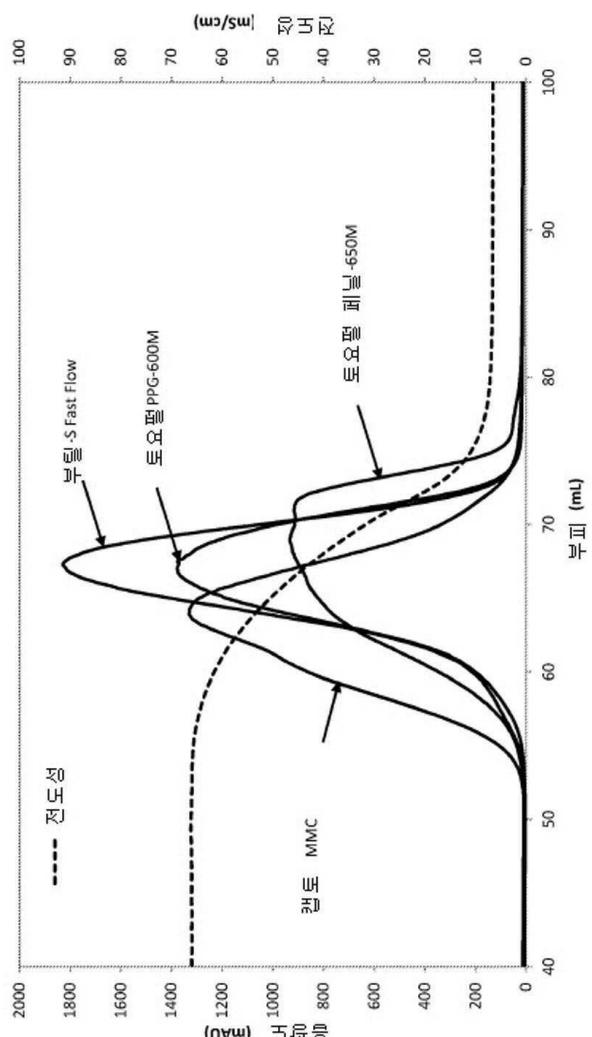
도면11



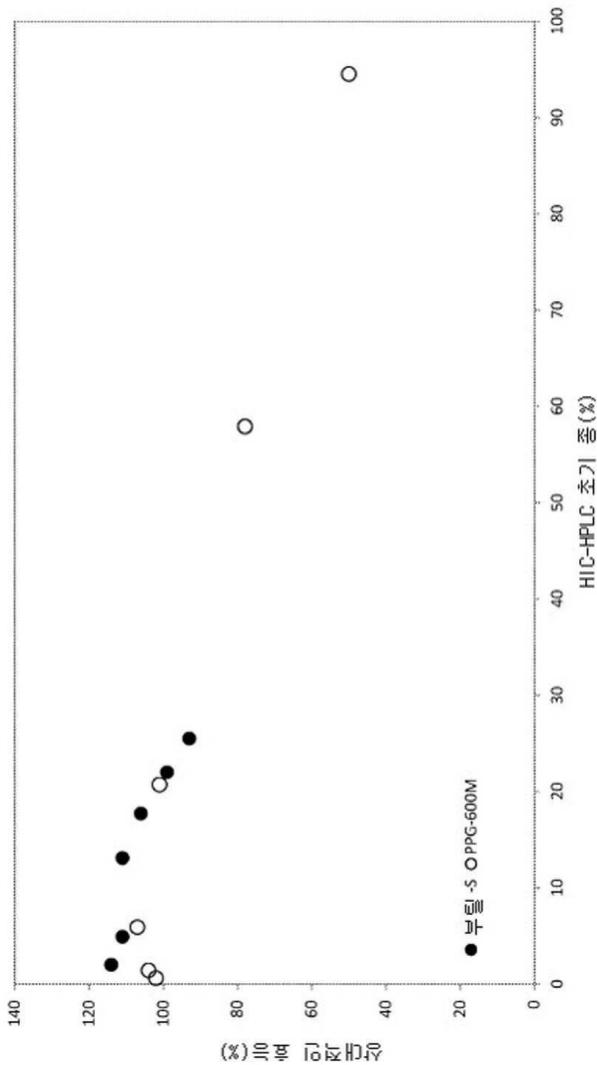
도면12



도면13



도면14



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> MedImmune LLC

<120> METHOD OF PURIFYING ALBUMIN-FUSION PROTEINS

<130> CD40L-300P1

<160> 210

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

245	250	255
Gly Leu Leu Lys Leu		
260		
<210> 2		
<211> 149		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 2		
Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser		
1	5	10
Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly		
20 25 30		
Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln		
35	40	45
Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr		
50	55	60
Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser		
65	70	75
Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala		
85 90 95		
Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His		
100	105	110
Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn		
115	120	125
Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe		
130	135	140
Gly Leu Leu Lys Leu		
145		
<210		
> 3		
<211> 83		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		

<220><223> synthetic construct

<400> 3

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Phe

1 5 10 15

Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr

65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 4

Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 5

Phe Lys Pro Leu Ala Glu Ile Asp Gly

1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 6

Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg

1 5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 7

Thr Glu Asp Glu Asn Gln

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 8

Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu

1 5

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 9

Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 10

Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu Val

1 5 10

<210> 11

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 11

Ile Glu Val

1

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 12

Ala Leu Ile Thr Trp

1 5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 13

Cys Glu Leu Ala Tyr Gly Ile

1 5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 14

Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile

1 5

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic construct
<400> 15

Thr Thr Ile Asp Leu

1 5

<210> 16
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic construct
<400> 16

Tyr Ser Ile

1

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic construct
<400> 17

Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys

1 5

<210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct
<400> 18

Lys Glu Thr Phe Thr Thr

1 5

<210> 19

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 19

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Ser Asp Glu Phe Gly His Tyr Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His

85 90 95

His His

<210> 20

<211> 83

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 20

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser

1 5 10 15

Asp Glu Phe Gly His Tyr Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

20 25 30

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

35 40 45

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

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

<210> 21

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 21

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

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

Ser Asp Glu Phe Gly His Tyr Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile

20	25	30	
Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His Ser			

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

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

50	55	60	
Ser Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu			

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

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His

85	90	95	
His His			

<210> 22

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 22

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

<210> 23
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 23

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

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

<210> 24

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 24

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser

1 5 10 15

Asp Asp Phe Asp Asn Tyr Glu Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr

65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 25

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 25

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu
 65 70 75 80
 Thr Phe Thr Thr Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His
 85 90 95
 His His

<210> 26
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 26

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser

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

65 70 75 80
 Phe Thr Thr

<210> 27
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 27

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His

85 90 95

His His

<210> 28

<211> 83

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 28

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr

65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 29

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 29

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Leu Asp Asp Trp Gly Ser Tyr His Val Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His

85 90 95

His His

<210> 30

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 30

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Leu

1 5 10 15

Asp Asp Trp Gly Ser Tyr His Val Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr

65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 31

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 31

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Ser Asp Glu Val Gly Asp Tyr Val Val Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His

85 90 95

His His

<210> 32

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 32

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser

1 5 10 15

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

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

<210> 33

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 33

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

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

<210> 34

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 34

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser

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

<210> 35

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 35

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

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

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

His His

<210> 36

<211> 83

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 36

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser

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

Asp Asp Phe Glu Glu Tyr Val Val Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

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

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

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

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

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

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr

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

Phe Thr Thr

<210> 37

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 37

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

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

Ser Asp Glu Val Gly Gln Tyr Val Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile

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

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

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

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

<210> 38
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 38

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

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

<210> 39
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 39

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1	5	10	15
Ser	Asp	Asp	Ile
Gly	Leu	Tyr	Val
Trp	Cys	Glu	Leu
	Thr	Tyr	Gly
Lys	Asp	Val	Ile
Pro	Gly	Arg	Asp
		Thr	Leu
		Ile	Trp
		Phe	His
			Gln
35	40	45	
Ala	Trp	Tyr	Ser
Ile	Gly	Asn	Leu
Lys	Pro	Asp	Thr
		Glu	Tyr
			Glu
50	55	60	
Ser	Leu	Ile	Cys
Arg	Arg	Gly	Asp
		Met	Ser
		Ser	Asn
		Pro	Ala
		Lys	Glu
65	70	75	80
Thr	Phe	Thr	Gly
			Gly
			Thr
			Leu
			Gly
			His

<210> 40

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 40

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser

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

Asp Asp Ile Gly Leu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Ile Lys

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

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Phe His Gln Ala

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

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

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

Leu Ile Cys Arg Arg Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr

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

Phe Thr Thr

<210> 41

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 41

Ala Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Thr Leu Gly His His His His His His

85 90 95

His His

<210> 42

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 42

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser

1 5 10 15

Asp Glu His Ala Glu Phe Ile Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

20 25 30

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

35 40 45

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

<210> 43
<211> 101
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic construct
<400> 43

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

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

<210>
> 44
<211> 86
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic construct
<400> 44

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr

1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Tyr Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 45

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 45

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Tyr Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro

65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Thr Leu Gly His His His

85 90 95

His His His His His

100

<210> 46

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 46

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr

1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Tyr Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 47

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 47

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Ile Asn Arg Ser Tyr Tyr Ala Asp Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr

20 25 30

Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asp Gln

35 40 45

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

50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro

65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Gly His His His

85 90 95

His His His His His

100

<210> 48

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 48

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ile

1 5 10 15

Asn Arg Ser Tyr Tyr Ala Asp Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asp Gln Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 49

<211> 102

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 49

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser His Leu Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Ser Ala
 35 40 45
 Ala Ile Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu
 50 55 60
 Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn
 65 70 75 80
 Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Thr Leu Gly His His
 85 90 95
 His His His His His
 100

<210> 50
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 50

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr

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

65 70 75 80
 Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr
 85
 <210> 51
 <211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 51

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Ile Asn Arg Ser Ser Tyr His Asn Phe Pro His Cys Glu Leu Ala Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro

65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Thr Leu Gly His His His

85 90 95

His His His His His

100

<210

> 52

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 52

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ile

1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr His Asn Phe Pro His Cys Glu Leu Ala Tyr Gly

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
 65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 53

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 53

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn His Leu Gly Cys Glu Leu Ala Tyr

20 25 30

Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn Asn

35 40 45

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

50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro

65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Thr Leu Gly His His His

85 90 95

His His His His

100

<210> 54

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 54

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr

1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn His Leu Gly Cys Glu Leu Ala Tyr Gly

20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn Asn Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 55

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 55

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Phe His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro

65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Thr Leu Gly His His His

85 90 95

His His His His

100

<210> 56

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 56

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr

1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Phe His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr Gly

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 57

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 57

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Phe Tyr Ser Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro

65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Thr Leu Gly His His His

85	90	95
His His His His His		
100		
<210> 58		
<211> 86		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> synthetic construct		
<400> 58		
Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr		
1	5	10
Asn Arg Ser Phe Tyr Ser Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly		
20	25	30
Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn Gln Pro		
35	40	45
Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu		
50	55	60
Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala		
65	70	75
Lys Glu Thr Phe Thr Thr		
85		
<210> 59		
<211> 101		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> synthetic construct		
<400> 59		
Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp		
1	5	10
Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Tyr Leu His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr		
20	25	30
Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn Gln		

35 40 45

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

50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro

65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Thr Leu Gly His His His

85 90 95

His His His His His

100

<210

> 60

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 60

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr

1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Tyr Leu His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr Gly

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 61

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 61

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
 1 5 10 15
 Ile Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr

20 25 30
 Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Ser Ser

35 40 45
 Pro Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr
 50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro
 65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Thr Leu Gly His His His

85 90 95
 His His His His
 100

<210> 62

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 62

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ile

1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
 20 25 30

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

35 40 45

Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu
 50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 63

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 63

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

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

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro

65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Thr Leu Gly His His His
85 90 95

His His His His His

100

<210> 64

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 64

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr

1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Tyr His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr Gly

20 25 30

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

35 40 45

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

<210> 65

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 65

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

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

<210> 66

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 66

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 67

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 67

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Asn Pro

65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Thr Leu Gly His His His

85 90 95

His His His His His

100

<210>

> 68

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 68

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr

1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr Gly

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 69

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 69

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Ile Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

<210> 70
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 70

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

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

85
 <210> 71
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 71

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ser Ala Tyr Ser His His Tyr Cys Glu Leu Thr Tyr

20 25 30

Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Arg Gln

35 40 45

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

50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro

65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Thr Leu Gly His His His

85 90 95

His His His His

100

<210> 72

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 72

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr

1 5 10 15

Ala Arg Ser Ala Tyr Ser His His Tyr Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Arg Gln Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 73

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 73

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Tyr His His Cys Glu Leu Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Thr Leu Gly His His His His

85 90 95

His His His His

100

<210> 74

<211> 85

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 74

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr

1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Tyr His His Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Glu Leu Tyr

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 75

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 75

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asp Leu Pro Gly Cys Glu Leu Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro

65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Thr Leu Gly His His His

85 90 95

His His His His

100

<210

> 76

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 76

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr

1 5 10 15

Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asp Leu Pro Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 77

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 77

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Thr His Arg Ser Ala Tyr Ser Asn His Ser Phe Cys Glu Leu Thr Tyr

20 25 30

Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn Thr

35 40 45

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

50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro

65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Thr Leu Gly His His His

85 90 95

His His His His

100

<210> 78

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 78

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr

1 5 10 15

His Arg Ser Ala Tyr Ser Asn His Ser Phe Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn Thr Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 79

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 79

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp

1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Leu Tyr Ala Asn Phe His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro

65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Thr Leu Gly His His His
 85 90 95
 His His His His His
 100

<210> 80

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 80

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr
 1 5 10 15
 Asn Arg Ser Leu Tyr Ala Asn Phe His Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20 25 30

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

Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu
 50 55 60

Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala
 65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr
 85

<210> 81

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 81

Ala Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp
 1 5 10 15

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Leu Pro Gly Cys Glu Leu Thr Tyr
 20 25 30

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

35

40

45

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

50

55

60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro

65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Thr Leu Gly His His His

85

90

95

His His His His His

100

<210> 82

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 82

Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr

1

5

10

15

Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Leu Pro Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 83

Ser Asp Glu Phe Gly His Tyr Asp Gly

1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 84

Ser Asp Asp Phe Asp Asn Tyr Glu Trp

1 5

<210> 85

<211>

9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 85

Ser Asp Asp Phe Ala Asp Tyr Val Trp

1 5

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 86

Ser Asp Asp Phe Gly Glu Tyr Val Trp

1 5

<210> 87

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 87

Leu Asp Asp Trp Gly Ser Tyr His Val

1 5

<210> 88
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 88

Ser Asp Glu Val Gly Asp Tyr Val Val
 1 5

<210> 89
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 89

Ser Asp Asp Phe Ala Glu Tyr Val Gly

1 5

<210> 90
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 90

Ser Asp Asp Phe Glu Glu Tyr Val Val

1 5

<210> 91
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 91

Ser Asp Glu Val Gly Gln Tyr Val Gly

1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 92

Ser Asp Asp Ile Gly Leu Tyr Val Trp

1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 93

Ser Asp Glu His Ala Glu Phe Ile Gly

1 5

<210> 94

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 94

Trp Trp His Ser Ala Trp

1 5

<210> 95

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 95

Trp Tyr His Met Ala Trp

1 5

<210> 96

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 96

Trp Tyr His His Ala His

1 5

<210> 97

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 97

Trp Tyr His Gln Ala Trp

1 5

<210> 98

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 98

Trp Phe His Gln Ala Trp

1 5

<210> 99

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 99

Tyr Thr Asp Gln Glu Ala Gly Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 100

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 100

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Tyr Asn Leu His Gly

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

<210> 101

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 101

Ile Asn Arg Ser Tyr Tyr Ala Asp Leu His Gly

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

<210> 102

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 102

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser His Leu Asp Gly

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

<210> 103

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 103

Ile Asn Arg Ser Ser Tyr His Asn Phe Pro His

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

<210> 104

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 104

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn His Leu Gly

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

<210> 105

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 105

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Phe His Gly

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

<210> 106

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 106

Thr Asn Arg Ser Phe Tyr Ser Asn Leu His Gly

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

<210> 107

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 107

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Tyr Leu His Gly

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

<210> 108

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 108

Ile Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Leu His Gly

1 5 10

<210> 109

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 109

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Tyr His Gly

1 5 10

<210> 110

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 110

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Leu Pro Gly

1 5 10

<210> 111

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 111

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Leu His Gly

1 5 10

<210> 112

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 112

Thr Ala Arg Ser Ala Tyr Ser His His His Tyr

1 5 10

<210> 113

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 113

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ala Asn Tyr His His

1 5 10

<210> 114

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 114

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asp Leu Pro Gly

1 5 10

<210> 115

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 115

Thr His Arg Ser Ala Tyr Ser Asn His Ser Phe

1 5 10

<210> 116

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 116

Thr Asn Arg Ser Leu Tyr Ala Asn Phe His Gly

1 5 10

<210> 117

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 117

Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Leu Pro Gly

1 5 10

<210> 118

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 118

Ser Ser Pro Tyr Val His

1 5

<210> 119

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 119

Asp Gln Ile Tyr Val His

1 5

<210> 120

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> synthetic construct

<400> 120

Ser Ala Ala Ile Tyr Val His

1 5

<210> 121

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 121

Asn Ser Pro Tyr Val His

1 5

<210> 122

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 122

Asn Asn Ile Tyr Val His

1 5

<210> 123

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 123

Asn Gln Pro Tyr Val His

1 5

<210> 124

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 124

Arg Gln Pro Tyr Val His

1 5

<210> 125

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 125

Glu Leu Tyr Val His

1 5

<210> 126

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 126

Asn Thr Pro Tyr Val His

1 5

<210> 127

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 127

Glu Gln Val Tyr Val His

1 5

<210> 128

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 128

Asn Gln Val Tyr Val His

1 5

<210> 129

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 129

Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 130

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 130

Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 131

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 131

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 132

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 132

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

1 5 10 15

<210> 133

<211> 585

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 133

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu

1	5	10	15
Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln			
20	25	30	
Gln Ser Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu			
35	40	45	
Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys			
50	55	60	
Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu			
65	70	75	80
Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro			
85	90	95	
Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu			
100	105	110	
Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His			
115	120	125	
Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg			
130	135	140	
Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg			
145	150	155	160
Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala			
165	170	175	
Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser			
180	185	190	
Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu			
195	200	205	
Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro			
210	215	220	
Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys			
225	230	235	240
Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp			
245	250	255	

Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser

260 265 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His

275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser

290 295 300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala

305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg

325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu

385 390 395 400

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp

500	505	510
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala		
515	520	525
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu		
530	535	540
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys		
545	550	555
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val		
565	570	575
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu		
580	585	
<210> 134		
<211> 680		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> synthetic construct		
<400> 134		
Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr		
1	5	10
Trp Ser Asp Asp Phe Gly Glu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly		
20	25	30
Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His		
35	40	45
His Ala His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu		
50	55	60
Val Ser Leu Ile Cys Arg Ser Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys		
65	70	75
Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp		
85	90	95
Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu		
100	105	110
Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln		

115

120

125

Ser Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe

130

135

140

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

145 150 155 160

Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg

165

170

175

Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu

180

185

190

Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro

195

200

205

Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp

210

215

220

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

225 230 235 240

His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr

245

250

255

Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys

260

265

270

Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser

275

280

285

Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg

290

295

300

Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys

305 310 315 320

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

325

330

335

His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg

340

345

350

Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser

355

360

365

Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys

370 375 380

Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu

385 390 395 400

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

405 410 415

Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg

420 425 430

His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr

435 440 445

Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Asp Pro His Glu Cys

450 455 460

Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln

465 470 475 480

Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr

485 490 495

Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln

500 505 510

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

515 520 525

Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala

530 535 540

Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile

595 600 605

Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu

610	615	620
Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys		
625	630	635
Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala		640
645	650	655
Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala		
660	665	670
Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu		
675	680	
<210> 135		
<211> 785		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> synthetic construct		
<400> 135		
Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr		
1	5	10
		15
Trp Ser Asp Asp Phe Gly Glu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly		
20	25	30
Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His		
35	40	45
His Ala His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu		
50	55	60
Val Ser Leu Ile Cys Arg Ser Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys		
65	70	75
		80
Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly		
85	90	95
Gly Gly Gly Ser Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp		
100	105	110
Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser Asp Asp Phe Gly Glu		
115	120	125
Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp		

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

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys

385 390 395 400

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val

405 410 415

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser

420 425 430

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly

435 440 445

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile

450 455 460

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu

465 470 475 480

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp

485 490 495

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser

500 505 510

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly

515 520 525

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val

530 535 540

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys

545 550 555 560

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu

565 570 575

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys

580 585 590

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu

595 600 605

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe

675 680 685

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala

690 695 700

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu

705 710 715 720

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

725 730 735

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala

740 745 750

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe

755 760 765

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

770 775 780

Leu

785

<210> 136

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 136

Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr

1 5

<210> 137

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 137

Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Lys

1 5

<210> 138

<211> 585

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu

1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln

20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu

35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys

50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu

65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro

85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu

100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His

115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg

130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg

145 150 155 160

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

165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190
 Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205

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

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335

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

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys

420	425	430
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys		
435	440	445
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His		
450	455	460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser		
465	470	475
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr		
485	490	495
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp		
500	505	510
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala		
515	520	525
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu		
530	535	540
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys		
545	550	555
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val		
565	570	575
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu		
580	585	
<210> 139		
<211> 10		
<212> PRT		
<		
213> Artificial Sequence		
<220><223> synthetic construct		
<400> 139		
Arg Ser Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala		
1	5	10
<210> 140		
<211> 10		
<212> PRT		

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is any of Ala, Gly, Leu, Ile and Val

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is any of Ala, Gly, Leu, Ile and Val

<400> 140

Gly Gly Gly Gly Xaa Gly Gly Gly Gly Xaa

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

<210> 141

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is any of Ala, Gly, Leu, Ile and Val

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is any of Ala, Gly, Leu, Ile and Val

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> Xaa is any of Ala, Gly, Leu, Ile and Val

<400> 141

Gly Gly Gly Gly Xaa Gly Gly Xaa Gly Gly Gly Gly Xaa

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

<210> 142

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 142

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 143

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 143

Gly Gly

1 5 10 15

<210> 144

<211> 680

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> synthetic construct

<400> 144

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

1 5 10 15

Trp Ser Asp Asp Phe Gly Glu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20 25 30

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

35 40 45

His Ala His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu

50 55 60

Val Ser Leu Ile Cys Arg Ser Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys

65 70 75 80

Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp

85 90 95

Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu

100 105 110

Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln

115	120	125
-----	-----	-----

Ser Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe

130	135	140
-----	-----	-----

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

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg

165	170	175
-----	-----	-----

Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu

180	185	190
-----	-----	-----

Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro

195	200	205
-----	-----	-----

Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp

210	215	220
-----	-----	-----

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

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr

245	250	255
-----	-----	-----

Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys

260	265	270
-----	-----	-----

Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser

275	280	285
-----	-----	-----

Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg

290	295	300
-----	-----	-----

Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

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

325	330	335
-----	-----	-----

His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg

340	345	350
-----	-----	-----

Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser

355	360	365
-----	-----	-----

Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys

370 375 380

Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu

385 390 395 400

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

405 410 415

Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg

420 425 430

His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr

435 440 445

Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys

450 455 460

Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln

465 470 475 480

Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr

485 490 495

Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln

500 505 510

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

515 520 525

Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala

530 535 540

Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile

595 600 605

Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu

610	615	620
Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys		
625	630	635
		640
Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala		
645	650	655
Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala		
660	665	670
Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu		
675	680	
<210> 145		
<211> 785		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> synthetic construct		
<400> 145		
Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr		
1 5 10 15		
Trp Ser Asp Asp Phe Gly Glu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly		
20	25	30
Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His		
35	40	45
His Ala His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu		
50	55	60
Val Ser Leu Ile Cys Arg Ser Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys		
65 70 75 80		
Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly		
85	90	95
Gly Gly Gly Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp		
100	105	110
Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser Asp Asp Phe Gly Glu		
115	120	125

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

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

370	375	380
Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys		
385	390	395
Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val		
405	410	415
Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser		
420	425	430
Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly		
435	440	445
Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile		
450	455	460
Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu		
465	470	475
Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp		
485	490	495
Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser		
500	505	510
Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly		
515	520	525
Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val		
530	535	540
Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys		
545	550	555
Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu		
565	570	575
Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys		
580	585	590
Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu		
595	600	605
Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val		
610	615	620

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 625 630 635 640
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 645 650 655
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 660 665 670
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 675 680 685
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 690 695 700
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 705 710 715 720
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 725 730 735
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 740 745 750
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 755 760 765
 Ala Glu Glu Gly Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 770 775 780
 Leu
 785
 <210> 146
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 146
 Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser
 1 5 10 15
 Asp Asp Phe Gly Glu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys
 20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ile Cys Arg Ser Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr

65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 147

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is any of Ser, Ala, Gly, Leu, Ile, and Val

<400> 147

Gly Gly Gly Gly Xaa

1 5

<210> 148

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 148

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 149

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 149

Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 150

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 150

Gly Gly Gly Gly Ala

1 5

<210> 151

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 151

His His His His His His His

1 5

<210> 152

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 152

Gly Gly Gly Gly Ser His His His His His His His

1 5 10

<210> 153

<211> 584

<212> PRT

<213> mus muscus

<400> 153

Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala His Arg Tyr Asn Asp Leu Gly Glu

1 5 10 15

Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30
 Lys Cys Ser Tyr Asp Glu His Ala Lys Leu Val Gln Glu Val Thr Asp
 35 40 45
 Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Ala Asn Cys Asp Lys
 50 55 60
 Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Ala Ile Pro Asn Leu
 65 70 75 80
 Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala Asp Cys Cys Thr Lys Gln Glu Pro
 85 90 95
 Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Ser Leu
 100 105 110
 Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala Glu Ala Met Cys Thr Ser Phe Lys
 115 120 125
 Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly His Tyr Leu His Glu Val Ala Arg
 130 135 140
 Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala Glu Gln
 145 150 155 160
 Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys Cys Ala Glu Ala Asp Lys Glu Ser
 165 170 175
 Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Gly Val Lys Glu Lys Ala Leu Val Ser
 180 185 190
 Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys Ser Ser Met Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205
 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Thr Phe Pro
 210 215 220
 Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr Lys Leu Ala Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240
 Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255
 Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met Cys Glu Asn Gln Ala Thr Ile Ser

260	265	270
Ser Lys Leu Gln Thr Cys Cys Asp Lys Pro Leu Leu Lys Lys Ala His		
275	280	285
Cys Leu Ser Glu Val Glu His Asp Thr Met Pro Ala Asp Leu Pro Ala		
290	295	300
Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp Gln Glu Val Cys Lys Asn Tyr Ala		
305	310	315
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Thr Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg		
325	330	335
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Lys		
340	345	350
Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Glu Ala Asn Pro Pro Ala		
355	360	365
Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu Phe Gln Pro Leu Val Glu Glu Pro		
370	375	380
Lys Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys Asp Leu Tyr Glu Lys Leu Gly Glu		
385	390	395
400		
Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu Val Arg Tyr Thr Gln Lys Ala Pro		
405	410	415
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ala Ala Arg Asn Leu Gly Arg		
420	425	430
Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu Pro Glu Asp Gln Arg Leu Pro Cys		
435	440	445
Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Asn Arg Val Cys Leu Leu His		
450	455	460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His Val Thr Lys Cys Cys Ser Gly Ser		
465	470	475
Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Thr Val Asp Glu Thr		
485	490	495
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ser Asp		
500	505	510

Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu Lys Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala

515

520

525

Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Ala Glu Gln Leu

530

535

540

Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala Gln Phe Leu Asp Thr Cys Cys Lys

545 550 555 560

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

565

570

575

Thr Arg Cys Lys Asp Ala Leu Ala

580

<210> 154

<211> 584

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 154

Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala His Arg Tyr Asn Asp Leu Gly Glu

1 5 10 15

Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln

20

25

30

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

35

40

45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Ala Asn Cys Asp Lys

50

55

60

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

65 70 75 80

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

85

90

95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Ser Leu

100

105

110

Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala Glu Ala Met Cys Thr Ser Phe Lys

115	120	125
Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly His Tyr Leu His Glu Val Ala Arg		
130	135	140
Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala Glu Gln		
145	150	155
Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys Cys Ala Glu Ala Asp Lys Glu Ser		
165	170	175
Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Gly Val Lys Glu Lys Ala Leu Val Ser		
180	185	190
Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys Ser Ser Met Gln Lys Phe Gly Glu		
195	200	205
Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Thr Phe Pro		
210	215	220
Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr Lys Leu Ala Thr Asp Leu Thr Lys		
225	230	235
Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp		
245	250	255
Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met Cys Glu Asn Gln Ala Thr Ile Ser		
260	265	270
Ser Lys Leu Gln Thr Cys Cys Asp Lys Pro Leu Leu Lys Lys Ala His		
275	280	285
Cys Leu Ser Glu Val Glu His Asp Thr Met Pro Ala Asp Leu Pro Ala		
290	295	300
Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp Gln Glu Val Cys Lys Asn Tyr Ala		
305	310	315
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Thr Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg		
325	330	335
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Lys		
340	345	350
Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Glu Ala Asn Pro Pro Ala		
355	360	365

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

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

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

Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe Ser Thr Glu Gly Pro Asn Leu Val
 565 570 575
 Thr Arg Ser Lys Asp Ala Leu Ala
 580

<210> 155

<211> 84

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 155

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp His

1 5 10 15

Asp Ala Phe Gly Tyr Asp Phe Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp His Phe His

35 40 45

Asn Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser

50 55 60

Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Asn Pro Ala Lys Glu

65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr

<210> 156

<211> 84

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 156

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp His

1 5 10 15

Asp Ala Phe Gly Tyr Asp Phe Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp His Phe His

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Asn Pro Ala Lys Glu

65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr

<210> 157

<211> 183

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 157

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

1 5 10 15

Trp His Asp Ala Phe Gly Tyr Asp Phe Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp His

35 40 45

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

50 55 60

Val Ser Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Asn Pro Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Trp His Asp Ala Phe Gly Tyr Asp Phe Gly Cys Glu Leu Thr Tyr

115 120 125

Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp

130 135 140

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

145 150 155 160

Glu Val Ser Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Asn Pro

165 170 175

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr

180

<210> 158

<211> 685

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 158

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

1 5 10 15

Trp His Asp Ala Phe Gly Tyr Asp Phe Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp His

35 40 45

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

50 55 60

Val Ser Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Asn Pro Ala

65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

85 90 95

Gly Gly Gly Ser Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala His Arg Tyr

100 105 110

Asn Asp Leu Gly Glu Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu Ile Ala Phe

115 120 125

Ser Gln Tyr Leu Gln Lys Ser Ser Tyr Asp Glu His Ala Lys Leu Val

130 135 140

Gln Glu Val Thr Asp Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala

145 150 155 160

Ala Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys

165 170 175

Ala Ile Pro Asn Leu Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala Asp Cys Cys

180 185 190

Thr Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp

195 200 205

Asp Asn Pro Ser Leu Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala Glu Ala Met

210	215	220
Cys Thr Ser Phe Lys Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly His Tyr Leu		
225	230	235
His Glu Val Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu		
245	250	255
Tyr Tyr Ala Glu Gln Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys Cys Ala Glu		
260	265	270
Ala Asp Lys Glu Ser Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Gly Val Lys Glu		
275	280	285
Lys Ala Leu Val Ser Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys Ser Ser Met		
290	295	300
Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu		
305	310	315
Ser Gln Thr Phe Pro Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr Lys Leu Ala		
325	330	335
Thr Asp Leu Thr Lys Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu		
340	345	350
Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met Cys Glu Asn		
355	360	365
Gln Ala Thr Ile Ser Ser Lys Leu Gln Thr Cys Cys Asp Lys Pro Leu		
370	375	380
Leu Lys Lys Ala His Cys Leu Ser Glu Val Glu His Asp Thr Met Pro		
385	390	395
Ala Asp Leu Pro Ala Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp Gln Glu Val		
405	410	415
Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Thr Phe Leu		
420	425	430
Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu Leu Leu		
435	440	445
Arg Leu Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Glu		
450	455	460

Ala Asn Pro Pro Ala Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu Phe Gln Pro

465 470 475 480

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

485 490 495

Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu Val Arg Tyr

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

Gln Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Asn Arg

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

Thr Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu Thr Phe

595 600 605

Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu Lys Gln Ile

610 615 620

Lys Lys Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala

625 630 635 640

Thr Ala Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala Gln Phe Leu

645 650 655

Asp Thr Cys Cys Lys Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe Ser Thr Glu

660 665 670

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

675 680 685

<210> 159

<211> 782

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 159

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

1 5 10 15

Trp His Asp Ala Phe Gly Tyr Asp Phe Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp His

35 40 45

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

50 55 60

Val Ser Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Asn Pro Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Trp His Asp Ala Phe Gly Tyr Asp Phe Gly Cys Glu Leu Thr Tyr

115 120 125

Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp

130 135 140

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

145 150 155 160

Glu Val Ser Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Asn Pro

165 170 175

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

180 185 190

Ser Gly Gly Gly Ser Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala His Arg

195 200 205

Tyr Asn Asp Leu Gly Glu Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu Ile Ala

210 215 220

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

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

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

 Leu Ser Gln Thr Phe Pro Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr Lys Leu
 420 425 430
 Ala Thr Asp Leu Thr Lys Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly Asp Leu
 435 440 445
 Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met Cys Glu
 450 455 460
 Asn Gln Ala Thr Ile Ser Ser Lys Leu Gln Thr Cys Cys Asp Lys Pro

465	470	475	480
-----	-----	-----	-----

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

485	490	495	
-----	-----	-----	--

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

500	505	510	
-----	-----	-----	--

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

515	520	525	
-----	-----	-----	--

Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu Leu

530	535	540	
-----	-----	-----	--

Leu Arg Leu Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala

545	550	555	560
-----	-----	-----	-----

Glu Ala Asn Pro Pro Ala Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu Phe Gln

565	570	575	
-----	-----	-----	--

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

580	585	590	
-----	-----	-----	--

Tyr Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu Val Arg

595	600	605	
-----	-----	-----	--

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

610	615	620	
-----	-----	-----	--

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

625	630	635	640
-----	-----	-----	-----

Asp Gln Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Asn

645	650	655	
-----	-----	-----	--

Arg Val Cys Leu Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His Val Thr

660	665	670	
-----	-----	-----	--

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

675	680	685	
-----	-----	-----	--

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

690	695	700	
-----	-----	-----	--

Phe Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu Lys Gln

705	710	715	720
-----	-----	-----	-----

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

725 730 735

Ala Thr Ala Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala Gln Phe

740 745 750

Leu Asp Thr Cys Cys Lys Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe Ser Thr

755 760 765

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

770 775 780

<210> 160

<211> 84

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 160

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp His

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp His Phe His

35 40 45

Asn Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Phe Thr Thr

<210> 161

<211> 84

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 161

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

<210> 162
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 162

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

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

Thr Trp His Asp Pro Ser Gly Tyr Asp Phe Trp Cys Glu Leu Thr Tyr

115 120 125

Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp

130 135 140

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

145 150 155 160

Glu Val Ser Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Tyr Pro

165 170 175

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr

180

<210> 163

<211> 685

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 163

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

1 5 10 15

Trp His Asp Pro Ser Gly Tyr Asp Phe Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp His

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

85 90 95

Gly Gly Gly Ser Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala His Arg Tyr

100 105 110

Asn Asp Leu Gly Glu Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu Ile Ala Phe

115 120 125

Ser Gln Tyr Leu Gln Lys Ser Ser Tyr Asp Glu His Ala Lys Leu Val

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

370	375	380
Leu Lys Lys Ala His Cys Leu Ser Glu Val Glu His Asp Thr Met Pro		
385	390	395
Ala Asp Leu Pro Ala Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp Gln Glu Val		
405	410	415
Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Thr Phe Leu		
420	425	430
Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu Leu Leu		
435	440	445
Arg Leu Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Glu		
450	455	460
Ala Asn Pro Pro Ala Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu Phe Gln Pro		
465	470	475
Leu Val Glu Glu Pro Lys Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys Asp Leu Tyr		
485	490	495
Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu Val Arg Tyr		
500	505	510
Thr Gln Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ala Ala		
515	520	525
Arg Asn Leu Gly Arg Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu Pro Glu Asp		
530	535	540
Gln Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Asn Arg		
545	550	555
Val Cys Leu Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His Val Thr Lys		
565	570	575
Cys Cys Ser Gly Ser Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu		
580	585	590
Thr Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala Glu Thr Phe		
595	600	605
Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu Lys Gln Ile		
610	615	620

Lys Lys Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala
 625 630 635 640
 Thr Ala Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala Gln Phe Leu

645 650 655
 Asp Thr Cys Cys Lys Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe Ser Thr Glu

660 665 670
 Gly Pro Asn Leu Val Thr Arg Ser Lys Asp Ala Leu Ala
 675 680 685

<210> 164

<211> 782

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 164

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

Trp His Asp Pro Ser Gly Tyr Asp Phe Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly
 20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp His
 35 40 45

Phe His Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu
 50 55 60

Val Ser Leu Ile Cys Ala Asn Asp His Gly Phe Asp Ser Tyr Pro Ala
 65 70 75 80

Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Ser Arg Leu Asp Ala
 85 90 95

Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile
 100 105 110

Thr Trp His Asp Pro Ser Gly Tyr Asp Phe Trp Cys Glu Leu Thr Tyr
 115 120 125

Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Pro Asp

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

Glu Lys Ala Leu Val Ser Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys Ser Ser
 385 390 395 400

Met Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg
 405 410 415

Leu Ser Gln Thr Phe Pro Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr Lys Leu
 420 425 430

Ala Thr Asp Leu Thr Lys Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly Asp Leu
 435 440 445

Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met Cys Glu
 450 455 460

Asn Gln Ala Thr Ile Ser Ser Lys Leu Gln Thr Cys Cys Asp Lys Pro
 465 470 475 480

Leu Leu Lys Lys Ala His Cys Leu Ser Glu Val Glu His Asp Thr Met
 485 490 495

Pro Ala Asp Leu Pro Ala Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp Gln Glu
 500 505 510

Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Thr Phe
 515 520 525

Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser Leu Leu
 530 535 540

Leu Arg Leu Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala
 545 550 555 560

Glu Ala Asn Pro Pro Ala Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu Phe Gln
 565 570 575

Pro Leu Val Glu Glu Pro Lys Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys Asp Leu
 580 585 590

Tyr Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu Val Arg
 595 600 605

Tyr Thr Gln Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Ala
 610 615 620

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

625 630 635 640

Asp Gln Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Asn

645 650 655

Arg Val Cys Leu Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His Val Thr

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

Phe Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu Lys Gln

705 710 715 720

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

725 730 735

Ala Thr Ala Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala Gln Phe

740 745 750

Leu Asp Thr Cys Cys Lys Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe Ser Thr

755 760 765

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

770 775 780

<210> 165

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 165

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser

1 5 10 15

Pro Gly Glu Arg Ile Trp Met Phe Thr Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

20 25 30

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

35 40 45

Glu Asn Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu
 50 55 60

Val Ser Leu Ile Cys Pro Asn Tyr Glu Arg Ile Ser Asn Pro Ala Lys
 65 70 75 80

Glu Thr Phe Thr Thr Thr

85

<210> 166

<211> 784

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 166

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

Trp Ser Pro Gly Glu Arg Ile Trp Met Phe Thr Gly Cys Glu Leu Thr
 20 25 30

Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Thr
 35 40 45

Glu Asp Glu Asn Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu
 50 55 60

Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Pro Asn Tyr Glu Arg Ile Ser Asn Pro
 65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Ser Arg Leu Asp
 85 90 95

Ala Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Ala Leu
 100 105 110

Ile Thr Trp Ser Pro Gly Glu Arg Ile Trp Met Phe Thr Gly Cys Glu
 115 120 125

Leu Thr Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp
 130 135 140

Leu Thr Glu Asp Glu Asn Gln Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp
 145 150 155 160

Thr Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Pro Asn Tyr Glu Arg Ile Ser
 165 170 175
 Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 180 185 190
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala
 195 200 205

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

Lys Leu Cys Ala Ile Pro Asn Leu Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala
 275 280 285
 Asp Cys Cys Thr Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 290 295 300
 His Lys Asp Asp Asn Pro Ser Leu Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Met Cys Thr Ser Phe Lys Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly
 325 330 335

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

Ser Ser Met Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val

405	410	415
Ala Arg Leu Ser Gln Thr Phe Pro Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr		
420	425	430
Lys Leu Ala Thr Asp Leu Thr Lys Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly		
435	440	445
Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Glu Leu Ala Lys Tyr Met		
450	455	460
Cys Glu Asn Gln Ala Thr Ile Ser Ser Lys Leu Gln Thr Cys Cys Asp		
465	470	475
Lys Pro Leu Leu Lys Lys Ala His Cys Leu Ser Glu Val Glu His Asp		
485	490	495
Thr Met Pro Ala Asp Leu Pro Ala Ile Ala Ala Asp Phe Val Glu Asp		
500	505	510
Gln Glu Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly		
515	520	525
Thr Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Ser		
530	535	540
Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys		
545	550	555
Cys Ala Glu Ala Asn Pro Pro Ala Cys Tyr Gly Thr Val Leu Ala Glu		
565	570	575
Phe Gln Pro Leu Val Glu Pro Lys Asn Leu Val Lys Thr Asn Cys		
580	585	590
Asp Leu Tyr Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Ile Leu		
595	600	605
Val Arg Tyr Thr Gln Lys Ala Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val		
610	615	620
Glu Ala Ala Arg Asn Leu Gly Arg Val Gly Thr Lys Cys Cys Thr Leu		
625	630	635
Pro Glu Asp Gln Arg Leu Pro Cys Val Glu Asp Tyr Leu Ser Ala Ile		
645	650	655

Leu Asn Arg Val Cys Leu Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu His
 660 665 670

Val Thr Lys Cys Cys Ser Gly Ser Leu Val Glu Arg Arg Pro Cys Phe
 675 680 685

Ser Ala Leu Thr Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Lys Ala
 690 695 700

Glu Thr Phe Thr Phe His Ser Asp Ile Cys Thr Leu Pro Glu Lys Glu
 705 710 715 720

Lys Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Ala Glu Leu Val Lys His Lys
 725 730 735

Pro Lys Ala Thr Ala Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Asp Asp Phe Ala
 740 745 750

Gln Phe Leu Asp Thr Cys Cys Lys Ala Ala Asp Lys Asp Thr Cys Phe
 755 760 765

Ser Thr Glu Gly Pro Asn Leu Val Thr Arg Ser Lys Asp Ala Leu Ala
 770 775 780

<210> 167

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 167

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser

1 5 10 15

Asp Asp Phe Gly Glu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys
 20 25 30

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His His Ala
 35 40 45

His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser
 50 55 60

Leu Ile Cys Arg Ser Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr
 65 70 75 80

Phe Thr Thr

<210> 168

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Ser or Leu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> Xaa is Asp or Glu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> Xaa is any of His, Ile, Val, Phe or Trp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa is any of Ala, Gly, Glu or Asp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa is any of Glu, Leu, Gln, Ser, Asp or Asn

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa is any of Phe or Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> Xaa is any of Ile, Val, His, Glu or Asp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa is any of Gly, Trp or Val

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (45)..(45)

<223> Xaa is any of Trp, Phe or Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (47)..(47)

<223> Xaa is any of Ser, Gln, Met or His

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (49)..(49)

<223> Xaa is any Trp or His

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (69)..(69)

<223> Xaa is any of Arg or Ser

<400> 168

Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Xaa

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

Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys

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

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Xaa His Xaa Ala

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

Xaa Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser

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

Leu Ile Cys Arg Xaa Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr

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

Phe Thr Thr

<210> 169

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is any of Ser or Leu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is any of Asp or Glu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is any of His, Ile, Val, Phe or Trp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is any of Ala, Gly, Glu or Asp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is any of Glu, Leu, Gln, Ser, Asp or Asn

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is any of Phe or Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is any of Ile, Val, His, Glu or Asp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is any of Gly, Trp or Val

<400> 169

Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 170

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is any of Trp, Phe or Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is any of Ser, Gln, Met or His

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is any of Trp or His

<400> 170

Trp Xaa His Xaa Ala Xaa

1 5

<210> 171

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Arg or Ser

<400> 171

Arg Xaa Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala

1 5 10

<210> 172

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is Lys or Glu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Thr or Ile

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa is Asn or Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa is any of Ser, Leu, Ala, Phe and Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223>

Xaa is any of Tyr, Ala, Gly, Val, Ile and Ser

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa is any of Tyr, Ser, Ala and His

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> Xaa is any of Asn, Asp, His and Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa is any of Leu, Phe, His and Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (25)..(25)

<223> Xaa is any of His, Pro, Ser, Leu and Asp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(26)

<223> Xaa is any of Gly, Phe, His and Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> Xaa is Ala or Thr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (46)..(46)

<223> Xaa is any of Ser, Asn, Glu, Arg and Asp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (47)..(47)

<223> Xaa is any of Ser, Gln, Thr, Asn and Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (48)..(48)

<223> Xaa is absent or is any of Pro, Val, Ile and Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (49)..(49)

<223> Xaa is absent or is Ile

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (63)..(63)

<223> Xaa is Glu or Lys

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (78)..(78)

<223> Xaa is any of

<400> 172

Ile Glu Val Xaa Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Xaa

1 5 10 15

Xaa Arg Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Glu Leu Xaa Tyr Gly

20 25 30

Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Xaa Xaa Xaa

35 40 45

Xaa Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Xaa Tyr

50 55 60

Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Xaa Asn Pro

65 70 75 80

Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr

85

<210> 173

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is Ala or Thr

<400> 173

Cys Glu Leu Xaa Tyr Gly Ile

1 5

<210> 174

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is Lys or Glu

<400> 174

Xaa Asp Val Thr Asp Thr Thr

1	5
---	---

<210> 175

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is Thr or Ile

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Asn or Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is any of Ser, Leu, Ala, Phe and Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is any of Tyr, Ala, Gly, Val, Ile and Ser

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is any of Tyr, Ser, Ala and His

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is any of Asn, Asp, His and Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is any of Leu, Phe, His and Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is any of His, Pro, Ser, Leu and Asp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is any of Gly, Phe, His and Tyr

<400> 175

Xaa Xaa Arg Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

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

<210> 176

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is any of Ser, Asn, Glu, Arg and Asp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is any of Ser, Gln, Thr, Asn and Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is not present or is any of Pro, Val, Ile and Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is not present or is Ile

<400> 176

Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Val His

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

<210> 177

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..()

<223> Xaa is Glu or Lys

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400

> 177

Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Xaa

1	5
---	---

<210> 178

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is Ser or Asn

<400> 178

Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Xaa Asn Pro Ala

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

<210> 179

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> N is any of G, A, T, and C

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> N is any of G, A, T, and C

<220><221> misc_feature
<222> (28)..(28)

<223> N is any of G, A, T, and C

<220><221> misc_feature
<222> (34)..(34)

<223> N is any of G, A, T, and C

<220><221> misc_feature
<222> (37)..(37)

<223> N is any of G, A, T, and C

<220><221> misc_feature
<222> (40)..(40)

<223> N is any of G, A, T, and C

<400> 179

accgcgtga ttacctgggnh tnhtscgnht gstnhtnhtn htggctgtga actgacctat	60
ggcattaaa	69

<210> 180

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> N is any of G, A, T and C

<220>

><221> misc_feature

<222> (37)..(37)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (40)..(40)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (43)..(43)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (46)..(46)

<223> N is any of G, A, T and C

<400> 180

accgcgctga ttacctggnh tnhtbstnht nhtnhtnhtn htntnhtgg ctgtgaactg	60
--	----

acctatggca ttaaa	75
------------------	----

<210> 181

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (43)..(43)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (49)..(49)

<223> N is any of A, G, T and C

<400> 181

accgcgtga ttacctggnh tvmaccgnht nhtnhrrcr gcnhtvttnh tggctgtcaa	60
---	----

ctgacccatag gcattaaa	78
----------------------	----

<210> 182

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (29)..(29)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (32)..(32)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (38)..(38)

<223> N is any of A, G, T and C

<400> 182

cgatgcacc accatagatc tgnhtnhtnh tnhtnhtnht tatagcattg gtaacctgaa 60

accg 64

<210> 183

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (40)..(40)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (43)..(43)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (46)..(46)

<223> N is any of A, G, T and C

<400> 183

gaatatgaag tgagcctgat ttgcnhtams nhtnhtggtn htnhtnhtkc gaaagaaacc 60

tttaccaccc gtg 73

<210> 184

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> N is any of A, G, T and C
<220><221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> N is any of A, G, T and C
<220><221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature
<222> (37)..(37)
<223> N is any of A, G, T and C
<220><221> misc_feature
<222> (40)..(40)
<223> N is any of A, G, T and C
<220><221> misc_feature
<222> (46)..(46)
<223> N is any of A, G, T and C

<400> 184
gaatatgaag tgagcctgat ttgcnhtams nhtnhtnhtn htrgcnhtcc ggcgaaagaa 60
accttacca ccggtg 76
<210> 185
<211> 79
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic construct

<220><221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> N is any of A, G, T and C
<220><221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> N is any of A, G, T and C
<220><221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (40)..(40)

<223> N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (43)..(43)

<223> N is any of A, G, T and C

<400> 185

gaatatgaag tgagcctgat ttgcnhtams nhtnhtggtn htnhtagcaa cccggcgaaa	60
---	----

gaaaccttta ccacccgtg	79
----------------------	----

<210> 186

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 186

cagatctatg gtggtgcat cgccggcac atcttaatg ccataggta gttcaca	57
--	----

<210> 187

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 187

gcaaatcagg ctcacttcat attcggtatc cggttcagg ttaccaatgc tat	53
---	----

<210> 188

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 188

cgggtcggtt ggggtaccgc caccgggtggtaaaggttct tt	42
---	----

<210> 189

<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic construct	
<400>	189	
cggttcggtt gggta		16
<210>	190	
<211>	67	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic construct	
<400>	190	
ggcccgccg gccatggccg ccattgaagt gaaagatgt accgatacca ccgcgttat		60
tacctgg		67
<210>	191	
<211>	73	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> synthetic construct		
<220><221>	misc_feature	
<222>	(22)..(24)	
<223>	NNN encodes for all amino acids except Cys	
<220><221>	misc_feature	
<222>	(25)..(27)	
<223>	NNN encodes for Ala or Pro	
<220><221>	misc_feature	
<222>	(28)..(30)	
<223>	NNN encodes for all amino acids except Cys	
<220><221>	misc_feature	
<222>	(31)..(33)	
<223>	NNN encodes for Ala or Gly	
<220><221>	misc_feature	
<222>	(34)..(36)	
<223>	NNN encodes for all amino acids except Cys	

<220><221> misc_feature

<222> (37)..(39)

<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<220><221> misc_feature

<222> (40)..(42)

<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<400> 191

accgcgtga ttacctggc tnnnnnnnnn nnnnnnnnn nngctgtga actgacccat	60
---	----

ggcattaaag atg	73
----------------	----

<210> 192

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(20)

<223> each N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(23)

<223> each N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(29)

<223> each N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(35)

<223> each N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (37)..(38)

<223> each N is any of A, G, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (40)..(41)

<223> each N is any of A, G, T and C

<400> 192

accgcgtga ttacctggnn knnksgnnk gtnnnknknk nkggctgtga actgacccat	60
---	----

ggcattaaa	69
-----------	----

<210> 193

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(20)

<223> each N is any of A, T, C or T

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(23)

<223> each N is any of G, A, C and T

<220><221> misc_feature

<222> (25)..(26)

<223> each N is any of G, A, C and T

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(29)

<223> each N is any of G, A, C and T

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(32)

<223> each N is any of G, A, C and T

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(35)

<223> each N is any of G, A, C and T

<220><221> misc_feature

<222> (37)..(37)

<223> N is any of G, A, C and T

<220><221> misc_feature

<222> (40)..(41)

<223> each N is any of G, A, C and T

<220><221> misc_feature

<222> (43)..(44)

<223> each N is any of G, A, C and T

<400> 193

accgcgctga ttacctggnn knnnknnknnk nnknnknhtn nknnktgtga actgacctat	60
--	----

ggcattaaa	69
-----------	----

<210> 194

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(36)

<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<220><221> misc_feature

<222> (37)..(39)

<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<220><221> misc_feature

<222> (40)..(42)

<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<220><221> misc_feature

<222> (43)..(45)

<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<220><221> misc_feature

<222> (46)..(49)

<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<220><221> misc_feature

<222> (50)..(51)

<223> NNN encodes for all amino acids except Cys

<400> 194

gatgtgccgg gcgatcgac caccatagat ctgnnnnnnn nnnnnnnnnn ntatagcatt	60
--	----

ggtaacctga aaccgg	76
-------------------	----

<210> 195

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 195

ccaggtataatc agcgccgtgg tat 23

<210> 196

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 196

cagatctatg gtggtgcgat cgc 23

<210> 197

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 197

tgtgaactga cctatggcat taaagatgt 29

<210> 198

<211> 75

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)
<223> N is any of G, A, T and C
<220><221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> N is any of G, A, T and C
<220><221> misc_feature
<222> (34)..(34)

<223> N is any of G, A, T and C
<220><221> misc_feature
<222> (37)..(37)
<223> n is a, c, g, or t
<220><221> misc_feature
<222> (38)..(38)
<223> N is any of G, A, T and C
<220><221> misc_feature
<222> (40)..(40)
<223> N is any of G, A, T and C
<220><221> misc_feature
<222> (43)..(43)
<223> N is any of G, A, T and C
<220><221> misc_feature
<222> (46)..(46)
<223> N is any of G, A, T and C
<400> 198

accgcgctga ttacctgggnh tnhtvntnht nhnhtnhtn htnhtnhtgg ctgtgaactg 60

acctatggca ttaaa 75
<210> 199
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic construct
<220><221> misc_feature
<222> (19)..(19)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221>

> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (37)..(37)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (40)..(40)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (43)..(43)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222> (46)..(46)

<223> N is any of G, A, T and C

<220><221> misc_feature

<222>

> (49)..(49)

<223> N is any of G, A, T and C

<400> 199

accgcgctga ttacctgggnh tnhtvntnht nhtnhtnhtn httnhtnhtnh ttgtgaactg

60

acctatggca ttaaa		75	
<210> 200			
<211> 67			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> synthetic construct			
<400> 200			
ggcccagccg gccatggccg ccattgaagt ggaagatgt accgatacca ccgcgcgtat		60	
tacctgg		67	
<210> 201			
<211> 585			
<			
212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> synthetic construct			
<400> 201			
Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu			
1	5	10	15
Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln			
20	25	30	
Gln Ser Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu			
35	40	45	
Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys			
50	55	60	
Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu			
65	70	75	80
Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro			
85	90	95	
Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu			
100	105	110	
Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His			
115	120	125	
Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg			

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

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Asn His
 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Leu Lys Gln Thr Ala
 515 520 525
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Leu Val
 565 570 575
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 580 585
 <210> 202
 <211> 683
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 202

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

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

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

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

Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile
 225 230 235 240
 Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala

245	250	255
Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys		
260	265	270
Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys		
275	280	285
Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe		
290	295	300
Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg		
305	310	315
Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu		
325	330	335
Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala		
340	345	350
Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser		
355	360	365
Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys		
370	375	380
Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu		
385	390	395
Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn		
405	410	415
Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr		
420	425	430
Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala		
435	440	445
Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro		
450	455	460
His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu		
465	470	475
Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu		
485	490	495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val

545 550 555 560

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

565 570 575

Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp

580 585 590

Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His

595 600 605

Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln

610 615 620

Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu

625 630 635 640

Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys

645 650 655

Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys

660 665 670

Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu

675 680

<210> 203

<211> 683

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 203

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

1 5 10 15

Trp Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr
 20 25 30
 Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn
 35 40 45
 Gln Pro Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu
 50 55 60
 Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Asn
 65 70 75 80
 Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 85 90 95
 Gly Gly Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu
 100 105 110
 Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr
 115 120 125
 Leu Gln Gln Ser Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val
 130 135 140
 Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys
 145 150 155 160
 Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala
 165 170 175
 Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln
 180 185 190
 Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro
 195 200 205
 Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala
 210 215 220
 Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile
 225 230 235 240
 Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala
 245 250 255
 Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys

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

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

515 520 525

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

530 535 540

Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val

545 550 555 560

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

565 570 575

Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp

580 585 590

Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His

595 600 605

Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln

610 615 620

Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu

625 630 635 640

Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys

645 650 655

Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys

660 665 670

Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu

675 680

<210> 204

<211> 791

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 204

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

1 5 10 15

Trp Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Ala

20 25 30

Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn

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

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

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

Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Asn

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

Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

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

Gly Ser Gly Gly Ser Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu

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

Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr Asn Arg

115	120	125
-----	-----	-----

Ser Ser Tyr Ser Asn Leu His Cys Glu Leu Ala Tyr Gly Ile Lys

130	135	140
-----	-----	-----

Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn Gln Pro Tyr Val

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

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

165	170	175
-----	-----	-----

Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Asn Pro Ala Lys Glu

180	185	190
-----	-----	-----

Thr Phe Thr Thr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ala

195	200	205
-----	-----	-----

His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn

210	215	220
-----	-----	-----

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

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala

245	250	255
-----	-----	-----

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

260	265	270
-----	-----	-----

His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu

275	280	285
Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg		
290	295	300
Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg		
305	310	315
Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn		
325	330	335
Glu Glu Thr Phe Leu Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His		
340	345	350
Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys		
355	360	365
Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu		
370	375	380
Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala		
385	390	395
Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala		
405	410	415
Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala		
420	425	430
Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His		
435	440	445
Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala		
450	455	460
Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys		
465	470	475
Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile		
485	490	495
Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala		
500	505	510
Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala		
515	520	525

Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His

530 535 540

Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu

545 550 555 560

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

565 570 575

Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn

580 585 590

Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys

595 600 605

Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val

610 615 620

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

625 630 635 640

Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu

645 650 655

Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys

705 710 715 720

Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val

725 730 735

Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala

740 745 750

Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp

755 760 765

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

770	775	780	
Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu			
785	790		
<210> 205			
<211> 791			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> synthetic construct			
<400> 205			
Ser Gln Ile Glu Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr			
1	5	10	15
Trp Thr Asn Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Thr			
20	25	30	
Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn			
35	40	45	
Gln Pro Tyr Val His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu			
50	55	60	
Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Asn			
65	70	75	80
Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly			
85	90	95	
Gly Gly Gly Gly Gly Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu			
100	105	110	
Val Glu Asp Val Thr Asp Thr Ala Leu Ile Thr Trp Thr Asn Arg			
115	120	125	
Ser Ser Tyr Ser Asn Leu His Gly Cys Glu Leu Ala Tyr Gly Ile Lys			
130	135	140	
Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Asn Gln Pro Tyr Val			
145	150	155	160
His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser			
165	170	175	
Leu Ile Cys Leu Thr Thr Asp Gly Thr Tyr Asn Asn Pro Ala Lys Glu			

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

Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His

435 440 445

Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala

450 455 460

Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys

465 470 475 480

Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile

485 490 495

Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala

500 505 510

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

515 520 525

Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His

530 535 540

Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu

545 550 555 560

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

565 570 575

Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn

580 585 590

Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys

595 600 605

Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val

610 615 620

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

625 630 635 640

Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu

645 650 655

Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys

660 665 670

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

675	680	685
Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val		
690	695	700
Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr His Ala Asp Ile Cys		
705	710	715
720		
Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val		
725	730	735
Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala		
740	745	750
Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp		
755	760	765
Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala		
770	775	780
Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu		
785	790	
<210> 206		
<211> 190		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> synthetic construct		
<400> 206		
Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr		
1	5	10
15		
Trp Ser Asp Glu Phe Gly His Tyr Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly		
20	25	30
Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His		
35	40	45
Ser Ala Trp Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu		
50	55	60
Val Ser Leu Ile Cys Tyr Thr Asp Gln Glu Ala Gly Asn Pro Ala Lys		
65	70	75
80		
Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly		

85	90	95
Gly Gly Gly Ser Arg Leu Asp Ala Pro Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp		
100	105	110
Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser Asp Glu Phe Gly His		
115	120	125
Tyr Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp		
130	135	140
Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His Ser Ala Trp Tyr Ser Ile Gly		
145	150	155
Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Tyr Thr		
165	170	175
Asp Gln Glu Ala Gly Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr		
180	185	190
<210> 207		
<211> 680		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> synthetic construct		
<400> 207		
Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr		
1	5	10
Trp Ser Asp Glu Phe Gly His Tyr Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly		
20	25	30
Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His		
35	40	45
Ser Ala Trp Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu		
50	55	60
Val Ser Leu Ile Cys Tyr Thr Asp Gln Glu Ala Gly Asn Pro Ala Lys		
65	70	75
Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp		
85	90	95

Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu

100 105 110

Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln

115 120 125

Ser Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg

165 170 175

Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu

180 185 190

Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro

195 200 205

Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp

210 215 220

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

225 230 235 240

His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr

245 250 255

Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys

260 265 270

Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser

275 280 285

Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg

290 295 300

Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys

305 310 315 320

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

325 330 335

His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg

340	345	350
Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser		
355	360	365
Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys		
370	375	380
Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu		
385	390	395
Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu		
405	410	415
Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg		
420	425	430
His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr		
435	440	445
Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys		
450	455	460
Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln		
465	470	475
Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr		
485	490	495
Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln		
500	505	510
Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val		
515	520	525
Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala		
530	535	540
Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu		
545	550	555
Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu		
565	570	575
Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr		
580	585	590

Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile
 595 600 605
 Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu

610 615 620
 Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys
 625 630 635 640
 Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala
 645 650 655
 Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala
 660 665 670
 Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 675 680

<210> 208

<211> 785

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 208

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

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

100	105	110
Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser Asp Glu Phe Gly His		
115	120	125
Tyr Asp Gly Cys Glu Leu Thr Tyr Gly Ile Lys Asp Val Pro Gly Asp		
130	135	140
Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Trp His Ser Ala Trp Tyr Ser Ile Gly		
145	150	155
Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu Val Ser Leu Ile Cys Tyr Thr		
165	170	175
Asp Gln Glu Ala Gly Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly		
180	185	190
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala		
195	200	205
His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu		
210	215	220
Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Ser Pro Phe Glu Asp His Val		
225	230	235
Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp		
245	250	255
Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp		
260	265	270
Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala		
275	280	285
Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln		
290	295	300
His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val		
305	310	315
Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys		
325	330	335
Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro		
340	345	350

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys

355 360 365

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu

370 375 380

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys

385 390 395 400

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val

405 410 415

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser

420 425 430

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly

435 440 445

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile

450 455 460

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu

465 470 475 480

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp

485 490 495

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser

500 505 510

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly

515 520 525

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val

530 535 540

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys

545 550 555 560

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu

565 570 575

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys

580 585 590

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu

595	600	605
Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val		
610	615	620
Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His		
625	630	635
640		
Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val		
645	650	655
Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg		
660	665	670
Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe		
675	680	685
Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala		
690	695	700
Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu		
705	710	715
720		
Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys		
725	730	735
Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala		
740	745	750
Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe		
755	760	765
Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly		
770	775	780
Leu		
785		
<210> 209		
<211> 190		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> synthetic construct		
<400> 209		
Ser Gln Ile Glu Val Lys Asp Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr		

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

Trp Ser Asp Asp Phe Gly Glu Tyr Val Trp Cys Glu Leu Thr Tyr Gly

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

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

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

His Ala His Tyr Ser Ile Gly Asn Leu Lys Pro Asp Thr Glu Tyr Glu

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

Val Ser Leu Ile Cys Arg Ser Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys

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

Glu Thr Phe Thr Thr Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

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

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

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

Val Thr Asp Thr Thr Ala Leu Ile Thr Trp Ser Asp Asp Phe Gly Glu

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

Arg Thr Thr Ile Asp Leu Trp Tyr His His Ala His Tyr Ser Ile Gly

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

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

165	170	175
-----	-----	-----

Gly Asp Met Ser Ser Asn Pro Ala Lys Glu Thr Phe Thr Thr

180	185	190
-----	-----	-----

<210> 210

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 210

Met Thr Asn Ile Thr Lys Arg Ser Leu Val Ala Ala Gly Val Leu Ala

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

Ala Leu Met Ala Gly Asn Val Ala Met Ala

20

25