



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0087523
(43) 공개일자 2019년07월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/00 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 47/64* (2017.01)
A61P 29/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C40B 30/04 (2006.01) *C40B 40/10* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/00 (2013.01)
A61K 47/64 (2017.08)
- (21) 출원번호 10-2019-7017805
- (22) 출원일자(국제) 2017년11월28일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2019년06월20일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2017/042542
- (87) 국제공개번호 WO 2018/097307
 국제공개일자 2018년05월31일
- (30) 우선권주장
 JP-P-2016-229794 2016년11월28일 일본(JP)

- (71) 출원인
 추가이 세이야쿠 가부시키키가이샤
 일본국 도쿄도 기타쿠 우키마 5초메 5반 1코
- (72) 발명자
 이가와 도모유키
 일본 시즈오카켄 고텐바시 고마카도 1초메 135반
 치 추가이 세이야쿠 가부시키키가이샤 내
 이시카와 히로유키
 일본 시즈오카켄 고텐바시 고마카도 1초메 135반
 치 추가이 세이야쿠 가부시키키가이샤 내
 히로니와 나오카
 일본 시즈오카켄 고텐바시 고마카도 1초메 135반
 치 추가이 세이야쿠 가부시키키가이샤 내
- (74) 대리인
 제일특허법인(유)

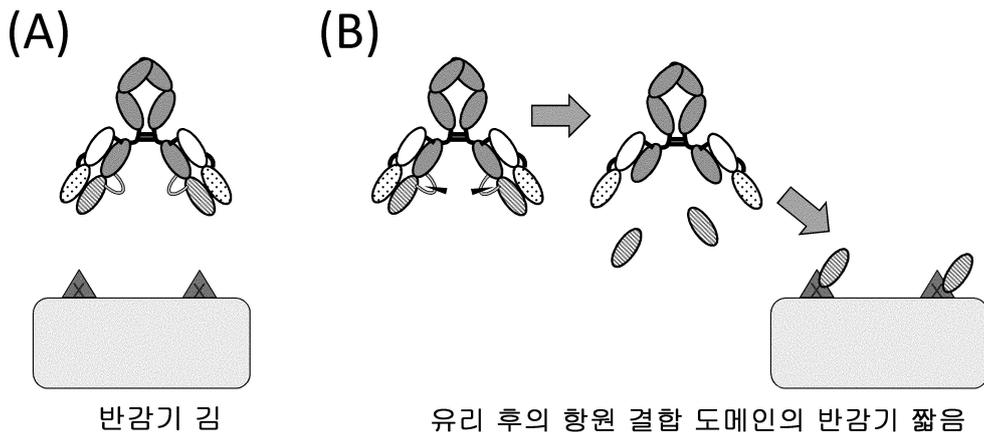
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **항원 결합 도메인 및 운반 부분을 포함하는 폴리펩티드**

(57) 요약

본 발명은, 항원 결합 도메인과, 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 억제하는 억제 도메인을 갖는 운반 부분을 포함하고, 또한 단독으로 존재하는 항원 결합 도메인보다 긴 반감기를 갖는 폴리펩티드, 당해 폴리펩티드의 제조 방법 및 스크리닝 방법, 당해 폴리펩티드를 포함하는 의약 조성물, 특정한 VL/VH/VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단도메인 항체의 제조 방법 및 스크리닝 방법, 및 특정한 VL/VH/VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드의 라이브러리에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 29/00 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 37/06 (2018.01)

C07K 16/005 (2013.01)

C07K 16/2809 (2013.01)

C07K 16/2866 (2013.01)

C40B 30/04 (2013.01)

C40B 40/10 (2013.01)

G01N 33/6845 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

폴리펩티드로서, 당해 폴리펩티드는 항원 결합 도메인과 운반 부분을 포함하고, 당해 운반 부분은 상기 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 억제하는 억제 도메인을 가지며, 상기 항원 결합 도메인은 상기 운반 부분보다 짧은 혈중반감기를 갖는, 폴리펩티드.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 항원 결합 도메인은 상기 폴리펩티드로부터 유리 가능하고, 상기 항원 결합 도메인은 상기 폴리펩티드로부터 유리됨으로써, 항원 결합 활성이 유리 전보다 높아지는, 폴리펩티드.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 항원 결합 도메인과 상기 운반 부분의 상기 억제 도메인이 회합함으로써 상기 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성이 억제되는, 폴리펩티드.

청구항 4

제 2 항 또는 제 3 항에 있어서,

상기 폴리펩티드는 절단 사이트를 포함하고, 당해 절단 사이트가 절단되는 것에 의해, 상기 항원 결합 도메인이 상기 폴리펩티드로부터 유리 가능하게 되는, 또는/및 상기 항원 결합 도메인과 상기 운반 부분의 상기 억제 도메인의 회합이 해소되는, 폴리펩티드.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 절단 사이트는 프로테아제 절단 서열을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항원 결합 도메인은 단(單)도메인 항체를 포함하거나, 혹은 단도메인 항체이며, 상기 운반 부분의 상기 억제 도메인은 당해 단도메인 항체의 항원 결합 활성을 억제하는, 폴리펩티드.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항원 결합 도메인은 단도메인 항체를 포함하고, 상기 운반 부분의 상기 억제 도메인은 VHH, 또는 항체 VH, 또는 항체 VL이며, 상기 단도메인 항체는 당해 VHH, 또는 항체 VH, 또는 항체 VL에 의해 항원 결합 활성이 억제되는, 폴리펩티드.

청구항 8

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 운반 부분은 항체 정상 영역을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 9

제 7 항에 있어서,

상기 폴리펩티드는 프로테아제 절단 서열을 갖고 있고, 당해 프로테아제 절단 서열은, 상기 항원 결합 도메인과 상기 항체 정상 영역의 경계 부근에 위치하는, 폴리펩티드.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드를 포함하는 의약 조성물.

청구항 11

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 기재된 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 12

특정한 VL과 회합함으로써, 혹은 특정한 VH와 회합함으로써, 혹은 특정한 VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단도메인 항체를 스크리닝하는 방법.

청구항 13

특정한 VL과 회합함으로써, 혹은 특정한 VH와 회합함으로써, 혹은 특정한 VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단도메인 항체를 제조하는 방법.

청구항 14

단도메인 항체와 제 1 회합 지지 도메인을 연결시킨 융합 폴리펩티드를 복수 포함하는 라이브러리로서, 상기 단도메인 항체 중에는, 특정한 VL과 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체, 또는 특정한 VH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체, 또는 특정한 VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체를 포함하는, 라이브러리.

청구항 15

제 14 항에 기재된 라이브러리로부터, 특정한 VL과 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체, 또는 특정한 VH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체, 또는 특정한 VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드를 스크리닝하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 항원 결합 도메인과, 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 억제하는 억제 도메인을 갖는 운반 부분을 포함하고, 또한 단독으로 존재하는 항원 결합 도메인보다 긴 반감기를 갖는 폴리펩티드, 당해 폴리펩티드의 제조 방법 및 스크리닝 방법, 당해 폴리펩티드를 포함하는 의약 조성물, 특정한 VL/VH/VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단(單)도메인 항체의 제조 방법 및 스크리닝 방법, 및 특정한 VL/VH/VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드의 라이브러리에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 항체는 혈장 중에서의 안정성이 높고, 부작용도 적으므로 의약품으로서 주목받고 있다. 그 중에서도 IgG형의 항체 의약은 다수 출시되어 있고, 현재도 수많은 항체 의약이 개발되고 있다(비특허문헌 1, 비특허문헌 2).

[0003] 항체 의약을 이용한 암치료약으로서, 지금까지의 CD20 항원에 대한 리툭산, EGFR 항원에 대한 세특시맵, HER2 항원에 대한 허셉틴 등이 승인되어 있다(비특허문헌 3). 이들 항체 분자는, 암세포에 발현하고 있는 항원에 대해서 결합하여, ADCC 활성 등에 의해 암세포에 대한 상해 활성을 발휘한다. 이러한 ADCC 활성 등에 의한 세포 상해 활성은, 치료용 항체의 표적 세포에 발현하는 항원의 수에 의존함이 알려져 있기(비특허문헌 4) 때문에, 표적이 되는 항원의 발현량이 많은 것이 치료용 항체의 효과의 관점에서는 바람직하다. 그러나, 항원의 발현량

이 많아도, 정상 조직에 항원이 발현하고 있으면, 정상 세포에 대해서 ADCC 활성 등의 상해 활성을 발휘해 버리기 때문에, 부작용이 큰 문제가 된다. 그 때문에, 암치료약으로서 치료용 항체가 표적으로 하는 항원은, 암세포에 특이적으로 발현하고 있는 것이 바람직하다. 예를 들어, 암항원으로서 알려져 있는 EpCAM 항원에 대한 항체 분자는, 암치료약으로서 유망하다고 생각되고 있었지만, EpCAM 항원은 체장에도 발현하고 있음이 알려져 있고, 실제, 임상 시험에 있어서, 항EpCAM 항체를 투여하는 것에 의해, 체장에 대한 세포 상해 활성에 의해 체염의 부작용이 나타남이 보고되어 있다(비특허문헌 5).

[0004] ADCC 활성에 의한 세포 상해 활성을 발휘하는 항체 의약의 성공을 받아, 천연형 인간 IgG1의 Fc 영역의 N형 당쇄의 푸코스를 제거하는 것에 의한 ADCC 활성의 증강(비특허문헌 6), 천연형 인간 IgG1의 Fc 영역의 아미노산치환에 의해 Fc γ RIIIa로의 결합을 증강하는 것에 의한 ADCC 활성의 증강(비특허문헌 7) 등에 의해 강력한 세포 상해 활성을 발휘하는 제 2 세대의 개량 항체 분자가 보고되어 있다. 진술한 NK 세포가 개재하는 ADCC 활성 이외의 메커니즘으로 암세포에 상해 활성을 발휘하는 항체 의약으로서, 강력한 세포 상해 활성이 있는 약물을 항체와 컨주게이트한 Antibody Drug Conjugate(ADC)(비특허문헌 8), 및 T 세포를 암세포로 리크루트하는 것에 의해 암세포에 대한 상해 활성을 발휘하는 저분자 항체(비특허문헌 9) 등의 보다 강력한 세포 상해 활성을 발휘하는 개량 항체 분자도 보고되어 있다.

[0005] 이러한 보다 강력한 세포 상해 활성을 발휘하는 항체 분자는, 항원의 발현이 많지는 않은 암세포에 대해서도 세포 상해 활성을 발휘할 수 있는 한편으로, 항원의 발현이 적은 정상 조직에 대해서도 암세포와 마찬가지로 세포 상해 활성을 발휘해 버린다. 실제, EGFR 항원에 대한 천연형 인간 IgG1인 세톡시맙과 비교하여, CD3과 EGFR에 대한 이중 특이성 항체인 EGFR-BiTE는 T 세포를 암세포에 리크루트 하는 것에 의해 암세포에 대해서 강력한 세포 상해 활성을 발휘하여 항종양 효과를 발휘할 수 있다. 그 한편으로, EGFR은 정상 조직에 있어서도 발현하고 있기 때문에, EGFR-BiTE를 필리핀원숭이에 투여했을 때에 심각한 부작용이 나타남도 확인되고 있다(비특허문헌 10). 또한, 암세포에서 고발현하고 있는 CD44v6에 대한 항체에 mertansine를 결합시킨 ADC인 bivatumab mertansine는, CD44v6이 정상 조직에 있어서도 발현하고 있으므로, 임상에 있어서 중독(重篤)한 피부 독성 및 간 독성이 확인되고 있다(비특허문헌 11).

[0006] 이와 같이 항원의 발현이 적은 암세포에 대해서도 강력한 세포 상해 활성을 발휘할 수 있는 항체를 이용했을 경우, 표적 항원이 극히 암특이적으로 발현하고 있을 필요가 있지만, 허셉틴의 표적 항원인 HER2나 세톡시맙의 표적 항원인 EGFR이 정상 조직에도 발현하고 있듯이, 극도로 암특이적으로 발현하고 있는 암항원의 수는 한정되어 있다고 생각된다. 그 때문에, 암에 대한 세포 상해 활성을 강화할 수 있지만, 정상 조직에 대한 세포 상해 작용에 의한 부작용이 문제가 될 수 있다.

[0007] 또한, 최근, 암에 있어서의 면역 억제에 기여하고 있는 CTLA4를 저해하는 것에 의해 종양 면역을 증강하는 이필리무맙이 전이성 펠라노마에 대해서 Overall survival을 연장시킴이 나타났다(비특허문헌 12). 그렇지만, 이필리무맙은 CTLA4를 전신적으로 저해하기 때문에, 종양 면역이 증강되는 한편으로, 전신적으로 면역이 활성화되는 것에 의한 자기면역 질환-유사한 중독한 부작용을 나타냄이 문제가 되고 있다(비특허문헌 13).

[0008] 한편, 암 이외의 질환에 대한 항체 의약으로서, 염증성·자기면역 질환에 있어서 염증 사이토카인을 저해함으로써 치료 효과를 발휘하는 항체 의약이 알려져 있다(비특허문헌 14). 예를 들어 TNF를 표적으로 하는 레미케이드나 휴미라, 및 IL-6R을 표적으로 하는 악텡라는, 관절 류머티즘에 대해서 높은 치료 효과를 발휘하지만, 한편, 이들 사이토카인을 전신적으로 중화함으로써 감염증의 부작용을 나타낼 수 있음도 알려져 있다(비특허문헌 15).

[0009] 제 2 세대의 항체 의약에 적용 가능한 기술로서 다양한 기술이 개발되고 있고, 이펙터 기능, 항원 결합능, 약물동태, 안정성을 향상시키거나, 혹은, 면역원성 리스크를 저감시키는 기술 등이 보고되어 있지만(비특허문헌 16), 상기와 같은 부작용을 해결하기 위한, 항체 의약을 표적 조직에 특이적으로 작용시키는 것을 가능하게 하는 기술에 관한 보고는 아직 적다. 보고되어 있는 기술로서, 암조직이나 염증성 조직과 같은 병변 부위에서 발현하는 프로테아제로 절단되는 링커로 마스킹 펩티드와 항체를 연결함으로써, 항체의 항원 결합 부위를 마스킹 펩티드로 마스킹하여, 항체의 항원 결합 활성을 저해하고, 이 링커가 프로테아제로 절단됨으로써 마스킹 펩티드를 해리시켜, 항체의 항원 결합 활성을 회복시켜, 표적의 병태 조직에 있어서 항원에 결합하는 것을 가능하게 하는 방법이 있다(비특허문헌 17, 18, 특허문헌 1).

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 국제 공개 W02010/081173호

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) Monoclonal antibody successes in the clinic. Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz, Nat. Biotechnol. (2005) 23, 1073 - 1078
- (비특허문헌 0002) The therapeutic antibodies market to 2008. Pavlou AK, Belsey MJ., Eur. J. Pharm. Biopharm. (2005) 59 (3), 389-396
- (비특허문헌 0003) Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. Weiner LM, Surana R, Wang S., Nat. Rev. Immunol. (2010) 10 (5), 317-327
- (비특허문헌 0004) Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C, Shepard HM, Cancer Immunol. Immunotherapy (1993) 37, 255-263
- (비특허문헌 0005) ING-1, a monoclonal antibody targeting Ep-CAM in patients with advanced adenocarcinomas. de Bono JS, Tolcher AW, Forero A, Vanhove GF, Takimoto C, Bauer RJ, Hammond LA, Patnaik A, White ML, Shen S, Khazaeli MB, Rowinsky EK, LoBuglio AF, Clin. Cancer Res. (2004) 10 (22), 7555-7565
- (비특허문헌 0006) Non-fucosylated therapeutic antibodies as next-generation therapeutic antibodies. Satoh M, Iida S, Shitara K., Expert Opin. Biol. Ther. (2006) 6 (11), 1161-1173
- (비특허문헌 0007) Optimizing engagement of the immune system by anti-tumor antibodies: an engineer's perspective. Desjarlais JR, Lazar GA, Zhukovsky EA, Chu SY., Drug Discov. Today (2007) 12 (21-22), 898-910
- (비특허문헌 0008) Antibody-drug conjugates: targeted drug delivery for cancer. Alley SC, Okeley NM, Senter PD., Curr. Opin. Chem. Biol. (2010) 14 (4), 529-537
- (비특허문헌 0009) BiTE: Teaching antibodies to engage T-cells for cancer therapy. Baeuerle PA, Kufer P, Bargou R., Curr. Opin. Mol. Ther. (2009) 11 (1), 22-30
- (비특허문헌 0010) T cell-engaging BiTE antibodies specific for EGFR potently eliminate KRAS- and BRAF-mutated colorectal cancer cells. Lutterbuese R, Raum T, Kischel R, Hoffmann P, Mangold S, Rattel B, Friedrich M, Thomas O, Lorenczewski G, Rau D, Schaller E, Herrmann I, Wolf A, Urbig T, Baeuerle PA, Kufer P., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2010) 107 (28), 12605-12610
- (비특허문헌 0011) Phase I trial with the CD44v6-targeting immunoconjugate bivatuzumab mertansine in head and neck squamous cell carcinoma. Riechelmann H, Sauter A, Golze W, Hanft G, Schroen C, Hoermann K, Erhardt T, Gronau S., Oral Oncol. (2008) 44 (9), 823-829
- (비특허문헌 0012) Ipilimumab in the treatment of melanoma. Trinh VA, Hwu WJ., Expert Opin. Biol. Ther., (2012) Apr 14 (doi:10.1517/14712598.2012.675325)
- (비특허문헌 0013) IPILIMUMAB - A NOVEL IMMUNOMODULATING THERAPY CAUSING AUTOIMMUNE HYPOPHYSITIS: A CASE REPORT AND REVIEW. Juszczak A, Gupta A, Karavitaki N, Middleton MR, Grossman A., Eur. J. Endocrinol. (2012) Apr 10 (doi:10.1530/EJE-12-0167)
- (비특허문헌 0014) The Japanese experience with biologic therapies for rheumatoid arthritis. Takeuchi T, Kameda H., Nat. Rev. Rheumatol. (2010) 6 (11), 644-652
- (비특허문헌 0015) Current evidence for the management of rheumatoid arthritis with biological disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the EULAR

recommendations for the management of RA. Nam JL, Winthrop KL, van Vollenhoven RF, Pavelka K, Valesini G, Hensor EM, Worthy G, Landewe R, Smolen JS, Emery P, Buch MH., Ann. Rheum. Dis. (2010) 69 (6), 976-986

(비특허문헌 0016) Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. Kim SJ, Park Y, Hong HJ., Mol. Cells. (2005) 20 (1), 17-29

(비특허문헌 0017) Tumor-specific activation of an EGFR-targeting probody enhances therapeutic index. Desnoyers LR, Vasiljeva O, Richardson JH, Yang A, Menendez EE, Liang TW, Wong C, Bessette PH, Kamath K, Moore SJ, Sagert JG, Hostetter DR, Han F, Gee J, Flandez J, Markham K, Nguyen M, Krimm M, Wong KR, Liu S, Daugherty PS, West JW, Lowman HB. Sci Transl Med. 2013 Oct 16;5(207):207ra144.

(비특허문헌 0018) Probody therapeutics for targeting antibodies to diseased tissue. Polu KR, Lowman HB. Expert Opin Biol Ther. 2014 Aug;14(8):1049-53.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명자들은, 상기와 같은 프로테아제 절단에 의해 항체의 항원 결합 활성을 저해하는 마스크 펩티드를 해리시켜, 항체의 항원 결합 활성을 회복시키는 기술에서는, 프로테아제에 의한 절단이 불가역이기 때문에, 병변 부위에서 절단된 항체가 혈류를 타고 정상 조직에 분포하여, 부작용을 일으켜 버릴 가능성이 있다고 생각했다.
- [0013] 본 발명은, 이와 같은 생각에 기초하여 이루어진 것으로, 그 목적의 하나는, 부작용을 저감한 질환 치료에 유용한 의약 조성물, 및 그 유효 성분을 제공하는 것에 있다. 또한, 그 목적의 하나는, 당해 의약 조성물 및 당해 유효 성분의 스크리닝 방법 및 제조 방법을 제공하는 것에 있다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명자들은, 예의 연구를 진행한 바, 항원 결합 도메인과, 항원 결합 도메인의 결합 활성을 억제하는 억제 도메인을 갖는 운반 부분을 포함하고, 또한 단독으로 존재하는 항원 결합 도메인보다 긴 반감기를 갖는 폴리펩티드를 창작했다. 당해 폴리펩티드를 이용함으로써, 질환 조직에 있어서 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성이 회복되어, 질환 조직에 있어서 항원 결합 활성을 발휘할 수 있다고 생각된다. 또한, 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성이 억제된 상태의 폴리펩티드와, 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성이 회복된 상태의 폴리펩티드의 반감기의 차이에 의해, 활성화 상태의 항원 결합 도메인의 전신으로의 분포를 억제할 수 있다. 또한, 본 발명자들은, 당해 폴리펩티드 또는 당해 폴리펩티드를 포함하는 의약 조성물이, 질환 치료에 유용함을 발견함과 함께, 당해 폴리펩티드를 투여하는 것을 포함하는 질환 치료에 유용함, 및 질환 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 당해 폴리펩티드가 유용함을 발견했다. 또한, 본 발명자들은, 당해 폴리펩티드의 스크리닝 방법 및 제조 방법, 특정한 VL 또는 VH 또는 VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단도메인 항체의 제조 방법 및 스크리닝 방법, 및 특정한 VL 또는 VH 또는 VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단도메인 항체를 포함하는 라이브러리를 창작하여 본 발명을 완성시켰다.
- [0015] 본 발명은 이와 같은 지견에 기초하는 것으로, 구체적으로는 이하에 예시적으로 기재하는 실시태양을 포함하는 것이다.
- [0016] (1) 폴리펩티드로서, 당해 폴리펩티드는 항원 결합 도메인과 운반 부분을 포함하고, 당해 운반 부분은 상기 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 억제하는 억제 도메인을 가지며, 상기 항원 결합 도메인은 상기 운반 부분보다 짧은 혈중반감기를 갖는, 폴리펩티드.
- [0017] (2) 상기 항원 결합 도메인의 분자량은 상기 운반 부분의 분자량보다 작은, (1)에 기재된 폴리펩티드.
- [0018] (3) 상기 항원 결합 도메인의 분자량은 60 kDa 이하인, (1) 또는 (2)에 기재된 폴리펩티드.
- [0019] (4) 상기 운반 부분은 FcRn 결합 활성을 갖고, 상기 항원 결합 도메인은 FcRn 결합 활성을 갖지 않거나 또는 상기 운반 부분보다 약한 FcRn 결합 활성을 갖는, (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.
- [0020] (5) 상기 항원 결합 도메인은 상기 폴리펩티드로부터 유리 가능하고, 상기 항원 결합 도메인은 상기 폴리펩티드

로부터 유리됨으로써, 항원 결합 활성이 유리 전보다 높아지는, (1) 내지 (4) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.

- [0021] (6) 상기 항원 결합 도메인과 상기 운반 부분의 상기 억제 도메인이 회합함으로써 상기 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성이 억제되는, (1) 내지 (5) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.
- [0022] (7) 상기 폴리펩티드는 절단 사이트를 포함하고, 당해 절단 사이트가 절단되는 것에 의해 상기 항원 결합 도메인이 상기 폴리펩티드로부터 유리 가능하게 되는, (5)에 기재된 폴리펩티드.
- [0023] (8) 상기 폴리펩티드는 절단 사이트를 포함하고, 당해 절단 사이트가 절단되는 것에 의해 상기 항원 결합 도메인과 상기 운반 부분의 상기 억제 도메인의 회합이 해소되는, (6)에 기재된 폴리펩티드.
- [0024] (9) 상기 절단 사이트는 프로테아제 절단 서열을 포함하는, (7) 또는 (8)에 기재된 폴리펩티드.
- [0025] (10) 상기 프로테아제는, 표적 조직 특이적 프로테아제인, (9)에 기재된 폴리펩티드.
- [0026] (11) 상기 표적 조직은 암조직 또는 염증 조직인, (10)에 기재된 폴리펩티드.
- [0027] (12) 상기 프로테아제는, 마트립타제, 유로키나제(uPA), 메탈로프로테아제로부터 선택되는 적어도 하나의 프로테아제인, (9)에 기재된 폴리펩티드.
- [0028] (13) 상기 프로테아제는, MT-SP1, uPA, MMP2, MMP9, ADAMTS5, MMP7, MMP13으로부터 선택되는 적어도 하나의 프로테아제인, (12)에 기재된 폴리펩티드.
- [0029] (14) 상기 프로테아제 절단 서열은, 서열 번호: 12, 25, 34, 35, 70~73, 75, 76, 91, 178, 193~195로부터 선택되는 서열을 포함하는, (9)에 기재된 폴리펩티드.
- [0030] (15) 상기 프로테아제 절단 서열의 일단에, 제 1 가동 링커가 추가로 부가되어 있는, (9) 내지 (14) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.
- [0031] (16) 상기 프로테아제 절단 서열의 타단에, 제 2 가동 링커가 추가로 부가되어 있는, (15)에 기재된 폴리펩티드.
- [0032] (17) 상기 제 1 가동 링커는, 글리신-세린 폴리머로 이루어지는 가동 링커인, (15)에 기재된 폴리펩티드.
- [0033] (18) 상기 제 2 가동 링커는, 글리신-세린 폴리머로 이루어지는 가동 링커인, (16)에 기재된 폴리펩티드.
- [0034] (19) 상기 항원 결합 도메인은 단도메인 항체를 포함하거나, 혹은 단도메인 항체이며, 상기 운반 부분의 상기 억제 도메인은 당해 단도메인 항체의 항원 결합 활성을 억제하는, (1) 내지 (18) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.
- [0035] (20) 상기 단도메인 항체는, VHH, 또는 단도메인이고 항원 결합 활성을 갖는 VH, 또는 단도메인이고 항원 결합 활성을 갖는 VL인, (19)에 기재된 폴리펩티드.
- [0036] (21) 상기 항원 결합 도메인은 단도메인 항체를 포함하고, 상기 운반 부분의 상기 억제 도메인은 VHH, 또는 항체 VH, 또는 항체 VL이며, 상기 단도메인 항체는 당해 VHH, 또는 항체 VH, 또는 항체 VL에 의해 항원 결합 활성이 억제되는, (1) 내지 (20) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.
- [0037] (22) 상기 항원 결합 도메인은 단도메인 항체를 포함하고, 상기 운반 부분의 상기 억제 도메인은 VHH, 또는 항체 VH, 또는 항체 VL이며, 상기 단도메인 항체는 당해 VHH, 또는 항체 VH, 또는 항체 VL과 회합하는 것에 의해 항원 결합 활성이 억제되는, (1) 내지 (21) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.
- [0038] (23) 상기 단도메인 항체는 VHH, 또는 단도메인이고 항원 결합 활성을 갖는 VH이며, 상기 운반 부분의 상기 억제 도메인은 항체 VL이고, 상기 VHH 또는 단도메인이고 항원 결합 활성을 갖는 VH는, 상기 항체 VL과 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는, (19) 내지 (22) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.
- [0039] (24) 상기 단도메인 항체는 VHH이며, 당해 VHH는 37번, 44번, 45번, 또는 47번(모두 Kabat 넘버링)의 아미노산으로부터 선택되는 적어도 하나의 포지션에 있어서 아미노산 치환되어 있는, (19) 내지 (23) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.
- [0040] (25) 상기 단도메인 항체는 VHH이며, 당해 VHH는 37V, 44G, 45L, 또는 47W(모두 Kabat 넘버링)의 아미노산으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산을 포함하는, (19) 내지 (23) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.

- [0041] (26) 상기 단도메인 항체는 VHH이며, 당해 VHH는 F37V, Y37V, E44G, Q44G, R45L, H45L, G47W, F47W, L47W, T47W, 또는 S47W(모두 Kabat 넘버링)의 아미노산 치환으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는, (19) 내지 (23) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.
- [0042] (27) 상기 단도메인 항체는 VHH이며, 당해 VHH는 37번/44번, 37번/45번, 37번/47번, 44번/45번, 44번/47번, 45번/47번, 37번/44번/45번, 37번/44번/47번, 37번/45번/47번, 44번/45번/47번, 37번/44번/45번/47번(모두 Kabat 넘버링)으로부터 선택되는 적어도 1조의 포지션에 있어서 아미노산 치환되어 있는, (19) 내지 (23) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.
- [0043] (28) 상기 단도메인 항체는 VHH이며, 당해 VHH는 37V/44G, 37V/45L, 37V/47W, 44G/45L, 44G/47W, 45L/47W, 37V/44G/45L, 37V/44G/47W, 37V/45L/47W, 44G/45L/47W, 37V/44G/45L/47W(모두 Kabat 넘버링)로부터 선택되는 적어도 1조의 아미노산을 포함하는, (19) 내지 (23) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.
- [0044] (29) 상기 단도메인 항체는 VHH이며, 당해 VHH는 F37V/R45L, F37V/G47W, R45L/G47W, F37V/R45L/G47W(모두 Kabat 넘버링)로부터 선택되는 적어도 1조의 아미노산 치환을 포함하는, (19) 내지 (23) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.
- [0045] (30) 상기 단도메인 항체는 단도메인이고 항원 결합 활성을 갖는 VL이며, 상기 운반 부분의 상기 억제 도메인은 항체 VH이고, 상기 단도메인이고 항원 결합 활성을 갖는 VL은, 상기 항체 VH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는, (19) 내지 (22) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.
- [0046] (31) 상기 운반 부분은 FcRn 결합 영역을 갖는, (1) 내지 (30) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.
- [0047] (32) 상기 운반 부분은 항체 정상 영역을 포함하는, (1) 내지 (31) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.
- [0048] (33) 상기 운반 부분의 항체 정상 영역과 상기 항원 결합 도메인은, 링커를 개재시켜, 또는 링커를 개재시키지 않고 융합되어 있는, (32)에 기재된 폴리펩티드.
- [0049] (34) 상기 운반 부분은 항체 중쇄 정상 영역을 포함하고, 당해 항체 중쇄 정상 영역과 상기 항원 결합 도메인은, 링커를 개재시켜, 또는 링커를 개재시키지 않고 융합되어 있는, (32)에 기재된 폴리펩티드.
- [0050] (35) 상기 운반 부분은 항체 경쇄 정상 영역을 포함하고, 당해 항체 경쇄 정상 영역과 상기 항원 결합 도메인은, 링커를 개재시켜, 또는 링커를 개재시키지 않고 융합되어 있는, (32)에 기재된 폴리펩티드.
- [0051] (36) 상기 폴리펩티드는 상기 운반 부분의 항체 중쇄 정상 영역의 N말단과 상기 항원 결합 도메인의 C말단이 링커를 개재시켜 또는 링커를 개재시키지 않고 융합되어 있고, 추가로 프로테아제 절단 서열을 가지며, 당해 프로테아제 절단 서열은, 상기 항원 결합 도메인의 서열 중, 또는 상기 중쇄 항체 정상 영역의 122번(EU 넘버링)의 아미노산보다 상기 항원 결합 도메인측에 위치하는, (34)에 기재된 폴리펩티드.
- [0052] (37) 상기 폴리펩티드는 상기 운반 부분의 항체 경쇄 정상 영역의 N말단과 상기 항원 결합 도메인의 C말단이 링커를 개재시켜 또는 링커를 개재시키지 않고 융합되어 있고, 추가로 프로테아제 절단 서열을 가지며, 당해 프로테아제 절단 서열은, 상기 항원 결합 도메인의 서열 중, 또는 상기 경쇄 항체 정상 영역의 113번(EU 넘버링)(Kabat 넘버링 113번)의 아미노산보다 상기 항원 결합 도메인측에 위치하는, (35)에 기재된 폴리펩티드.
- [0053] (38) 상기 폴리펩티드는 상기 운반 부분의 항체 정상 영역의 N말단과 상기 항원 결합 도메인의 C말단이 링커를 개재시켜 또는 링커를 개재시키지 않고 융합되어 있고, 상기 항원 결합 도메인은 VH로부터 제작된 단도메인 항체 또는 VHH이며, 상기 폴리펩티드는 추가로 프로테아제 절단 서열을 갖고, 당해 프로테아제 절단 서열은, 상기 항체 정상 영역의 서열 중, 또는 상기 항원 결합 도메인의 단도메인 항체의 109번(Kabat 넘버링)의 아미노산보다 상기 항체 정상 영역측에 위치하는, (33) 내지 (35) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.
- [0054] (39) 상기 폴리펩티드는 상기 운반 부분의 항체 정상 영역의 N말단과 상기 항원 결합 도메인의 C말단이 링커를 개재시켜 또는 링커를 개재시키지 않고 융합되어 있고, 추가로 프로테아제 절단 서열을 가지며, 당해 프로테아제 절단 서열은, 상기 항원 결합 도메인과 상기 항체 정상 영역의 경계 부근에 위치하는, (33)에 기재된 폴리펩티드.
- [0055] (40) 상기 폴리펩티드는 상기 운반 부분의 항체 중쇄 정상 영역의 N말단과 상기 항원 결합 도메인의 C말단이 링커를 개재시켜 또는 링커를 개재시키지 않고 융합되어 있고, 추가로 프로테아제 절단 서열을 가지며, 당해 프로테아제 절단 서열은, 상기 항원 결합 도메인과 상기 항체 중쇄 정상 영역의 경계 부근에 위치하는, (34)에 기재된 폴리펩티드.

된 폴리펩티드.

- [0056] (41) 상기 폴리펩티드는 상기 운반 부분의 항체 경쇄 정상 영역의 N말단과 상기 항원 결합 도메인의 C말단이 링커를 개재시켜 또는 링커를 개재시키지 않고 융합되어 있고, 추가로 프로테아제 절단 서열을 가지며, 당해 프로테아제 절단 서열은, 상기 항원 결합 도메인과 상기 항체 경쇄 정상 영역의 경계 부근에 위치하는, (35)에 기재된 폴리펩티드.
- [0057] (42) 상기 항원 결합 도메인은 VH로부터 제작된 단도메인 항체 또는 VHH이며, 상기 프로테아제 절단 서열은, 상기 항원 결합 도메인의 단도메인 항체의 109번(Kabat 넘버링)의 아미노산과 상기 항체 중쇄 정상 영역의 122번(EU 넘버링)의 아미노산의 사이에 위치하는, (40)에 기재된 폴리펩티드.
- [0058] (43) 상기 항원 결합 도메인은 VH로부터 제작된 단도메인 항체 또는 VHH이며, 상기 프로테아제 절단 서열은, 상기 항원 결합 도메인의 단도메인 항체의 109번(Kabat 넘버링)의 아미노산과 상기 항체 경쇄 정상 영역의 113번(EU 넘버링)(Kabat 넘버링 113번)의 아미노산의 사이에 위치하는, (41)에 기재된 폴리펩티드.
- [0059] (44) 상기 항원 결합 도메인은 VL로부터 제작된 단도메인 항체이며, 상기 프로테아제 절단 서열은, 상기 항원 결합 도메인의 단도메인 항체의 104번(Kabat 넘버링)의 아미노산과 상기 항체 중쇄 정상 영역의 122번(EU 넘버링)의 아미노산의 사이에 위치하는, (40)에 기재된 폴리펩티드.
- [0060] (45) 상기 항원 결합 도메인은 VL로부터 제작된 단도메인 항체이며, 상기 프로테아제 절단 서열은, 상기 항원 결합 도메인의 단도메인 항체의 109번(Kabat 넘버링)의 아미노산과 상기 항체 경쇄 정상 영역의 113번(EU 넘버링)(Kabat 넘버링 113번)의 아미노산의 사이에 위치하는, (41)에 기재된 폴리펩티드.
- [0061] (46) 상기 폴리펩티드의 항체 정상 영역은 IgG 항체 정상 영역인, (32)내지 (45) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.
- [0062] (47) 상기 폴리펩티드는 IgG 항체-유사 분자인, (1) 내지 (46) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.
- [0063] (48) 상기 항원 결합 도메인이 미유리 상태에 있어서, BLI(Bio-Layer Interferometry)법(Octet)을 이용하여 측정을 행할 때, 항원 결합 도메인과 항원의 결합이 나타나지 않는, (1) 내지 (47) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.
- [0064] (49) 상기 항원 결합 도메인에 추가로 제 2 항원 결합 도메인이 연결되어 있는, (1) 내지 (48) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.
- [0065] (50) 상기 제 2 항원 결합 도메인은, 상기 항원 결합 도메인과 상이한 항원 결합 특이성을 갖는, (49)에 기재된 폴리펩티드.
- [0066] (51) 상기 제 2 항원 결합 도메인은 제 2 단도메인 항체를 포함하는, (49) 또는 (50)에 기재된 폴리펩티드.
- [0067] (52) 상기 항원 결합 도메인은 단도메인 항체이고, 상기 제 2 항원 결합 도메인은 제 2 단도메인 항체이며, 상기 항원 결합 도메인 및 상기 제 2의 항원 결합 도메인은 상기 폴리펩티드로부터 유리 가능하고, 상기 항원 결합 도메인 및 상기 제 2 항원 결합 도메인의 유리 상태에 있어서, 상기 단도메인 항체와 상기 제 2 단도메인 항체가 이중 특이적 항원 결합 분자를 형성하고 있는, (51)에 기재된 폴리펩티드.
- [0068] (53) 상기 제 2 항원 결합 도메인은, HER2 또는 GPC3을 표적 항원으로 하는, (49) 내지 (52) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.
- [0069] (54) 상기 폴리펩티드는, 상기 항원 결합 도메인과 별도의 항원 결합 도메인을 추가로 갖고, 당해 별도의 항원 결합 도메인도 상기 폴리펩티드의 상기 운반 부분과 연결하는 것에 의해 항원 결합 활성이 억제되는, (1) 내지 (53) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.
- [0070] (55) 상기 별도의 항원 결합 도메인과 상기 항원 결합 도메인과 상이한 항원 결합 특이성을 갖는, (54)에 기재된 폴리펩티드.
- [0071] (56) 상기 항원 결합 도메인은, PlexinA1, IL6R 또는 CD3을 표적 항원으로 하는 항원 결합 도메인인, (1) 내지 (55) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드.
- [0072] (57) (1) 내지 (56) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드를 포함하는 의약 조성물.
- [0073] (58) (1) 내지 (56) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드를 제조하는 방법.

- [0074] (59) 이하의 공정:
- [0075] (a) 표적 항원에 결합하는 단도메인 항체를 취득하는 공정;
- [0076] (b) (a) 공정에서 취득한 단도메인 항체의 항원 결합 활성이 운반 부분의 억제 도메인에 의해 억제되도록, 당해 단도메인 항체와 당해 운반 부분을 연결시켜 폴리펩티드 전구체를 형성시키는 공정;
- [0077] (c) 상기 폴리펩티드 전구체에 프로테아제 절단 서열을 도입하는 공정;
- [0078] 을 포함하는, (58)에 기재된 제조 방법.
- [0079] (60) 이하의 공정:
- [0080] (a) 표적 항원에 결합하는 단도메인 항체를 취득하는 공정;
- [0081] (b) (a) 공정에서 취득한 단도메인 항체의 항원 결합 활성이 운반 부분의 억제 도메인에 의해 억제되도록, 당해 단도메인 항체와 당해 운반 부분을 연결시켜 폴리펩티드 전구체를 형성시키는 공정;
- [0082] (c) 상기 단도메인 항체와 상기 운반 부분의 경계 부근에 프로테아제 절단 서열을 도입하는 공정;
- [0083] 을 포함하는, (58)에 기재된 제조 방법.
- [0084] (61) 이하의 공정:
- [0085] (a) 표적 항원에 결합하는 단도메인 항체를 취득하는 공정;
- [0086] (b) (a) 공정에서 취득한 단도메인 항체의 항원 결합 활성이 운반 부분의 억제 도메인에 의해 억제되도록, 당해 단도메인 항체를, 프로테아제 절단 서열을 개재시켜 당해 운반 부분과 연결시켜 폴리펩티드를 형성시키는 공정;
- [0087] 을 포함하는, (58)에 기재된 제조 방법.
- [0088] (62) 추가로 이하의 공정:
- [0089] (d) 상기 폴리펩티드 또는 상기 폴리펩티드 전구체 내에 짜넣어진 상기 단도메인 항체의 상기 표적 항원에 대한 결합 활성이 약해지거나, 혹은 상실되어 있음을 확인하는 공정;
- [0090] 을 포함하는, (59) 내지 (61) 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.
- [0091] (63) 추가로 이하의 공정:
- [0092] (e) 상기 프로테아제 절단 서열을 프로테아제로 절단함으로써 상기 단도메인 항체를 유리시켜, 유리의 단도메인 항체가 항원에 결합하는 것을 확인하는 공정;
- [0093] 을 포함하는, (59) 내지 (62) 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.
- [0094] (64) 상기 폴리펩티드는 IgG 항체-유사 분자인, (58)에 기재된 제조 방법.
- [0095] (65) 이하의 공정:
- [0096] (a) 표적 항원에 결합하는 단도메인 항체를 취득하는 공정;
- [0097] (b) (a) 공정에서 취득한 단도메인 항체의 항원 결합 활성이 억제되도록, 당해 단도메인 항체를 IgG 항체의 VH 대신으로서 VL과 회합시키거나, 또는 당해 단도메인 항체를 IgG 항체의 VL 대신으로서 VH와 회합시키는 것에 의해, 상기 단도메인 항체가 도입된 IgG 항체-유사 분자 전구체를 형성시키는 공정;
- [0098] (c) 상기 단도메인 항체가 도입된 IgG 항체-유사 분자 전구체에 프로테아제 절단 서열을 도입하는 공정;
- [0099] 을 포함하는, (64)에 기재된 제조 방법.
- [0100] (66) 이하의 공정:
- [0101] (a) 표적 항원에 결합하는 단도메인 항체를 취득하는 공정;
- [0102] (b) (a) 공정에서 취득한 단도메인 항체의 항원 결합 활성이 억제되도록, 당해 단도메인 항체를 IgG 항체의 VH 대신으로서 VL과 회합시키거나, 또는 당해 단도메인 항체를 IgG 항체의 VL 대신으로서 VH와 회합시키는 것에 의해, 상기 단도메인 항체가 도입된 IgG 항체-유사 분자 전구체를 형성시키는 공정;

- [0103] (c) 상기 단도메인 항체와 상기 IgG 항체-유사 분자 전구체 내의 항체 정상 영역의 경계 부근에 프로테아제 절단 서열을 도입하는 공정;
- [0104] 을 포함하는, (64)에 기재된 제조 방법.
- [0105] (67) 이하의 공정:
- [0106] (a) 표적 항원에 결합하는 단도메인 항체를 취득하는 공정;
- [0107] (b) (a) 공정에서 취득한 단도메인 항체의 항원 결합 활성이 억제되도록, 당해 단도메인 항체를 IgG 항체 VH 또는 VL 대신으로서 프로테아제 절단 서열을 개재시켜 IgG 항체의 중쇄 정상 영역 또는 경쇄 정상 영역과 연결시켜, 상기 단도메인 항체가 도입된 IgG 항체-유사 분자를 형성시키는 공정;
- [0108] 을 포함하는, (64)에 기재된 제조 방법.
- [0109] (68) 추가로 이하의 공정:
- [0110] (d) 상기 IgG 항체-유사 분자 또는 상기 IgG 항체-유사 분자 전구체에 도입된 상기 단도메인 항체의 상기 표적 항원에 대한 결합 활성이 약해지거나 혹은 상실되어 있음을 확인하는 공정;
- [0111] 을 포함하는, (65) 내지 (67) 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.
- [0112] (69) 추가로 이하의 공정:
- [0113] (e) 상기 프로테아제 절단 서열을 프로테아제로 절단함으로써 상기 단도메인 항체를 유리시키고, 유리된 단도메인 항체가 상기 표적 항원에 결합하는 것을 확인하는 공정;
- [0114] 을 포함하는, (65) 내지 (68) 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.
- [0115] (70) 이하의 공정:
- [0116] (a) 단도메인 항체 중의, 항체 VH와의 회합에 관여하는 아미노산 잔기를 치환하거나, 또는 단도메인 항체 중의, 항체 VL과의 회합에 관여하는 아미노산 잔기를 치환하여, 당해 단도메인 항체의 표적 항원에 대한 결합 활성을 유지하는 개변 단도메인 항체를 제작하는 공정;
- [0117] (b) (a) 공정에서 제작한 개변 단도메인 항체의 항원 결합 활성을 억제하도록, 당해 개변 단도메인 항체를 항체 VL과 회합시키거나, 또는 당해 개변 단도메인 항체를 항체 VH와 회합시키는 것에 의해, 당해 개변 단도메인 항체가 도입된 당해 IgG 항체-유사 분자 전구체를 형성시키는 공정;
- [0118] (c) 상기 개변 단도메인 항체가 도입된 IgG 항체-유사 분자 전구체에 프로테아제 절단 서열을 도입하는 공정;
- [0119] 을 포함하는, (64)에 기재된 제조 방법.
- [0120] (71) 이하의 공정:
- [0121] (a) 단도메인 항체 중의, 항체 VH와의 회합에 관여하는 아미노산 잔기를 치환하거나, 또는 단도메인 항체 중의, 항체 VL과의 회합에 관여하는 아미노산 잔기를 치환하여, 당해 단도메인 항체의 표적 항원에 대한 결합 활성을 유지하는 개변 단도메인 항체를 제작하는 공정;
- [0122] (b) (a) 공정에서 제작한 개변 단도메인 항체의 항원 결합 활성을 억제하도록, 당해 개변 단도메인 항체를 항체 VL과 회합시키거나, 또는 당해 개변 단도메인 항체를 항체 VH와 회합시키는 것에 의해, 당해 개변 단도메인 항체가 도입된 당해 IgG 항체-유사 분자 전구체를 형성시키는 공정;
- [0123] (c) 상기 개변 단도메인 항체와 상기 IgG 항체-유사 분자 전구체의 정상 영역의 경계 부근에 프로테아제 절단 서열을 도입하는 공정;
- [0124] 을 포함하는, (64)에 기재된 제조 방법.
- [0125] (72) 이하의 공정:
- [0126] (a) 단도메인 항체 중의, 항체 VH와의 회합에 관여하는 아미노산 잔기를 치환하거나, 또는 단도메인 항체 중의, 항체 VL과의 회합에 관여하는 아미노산 잔기를 치환하여, 당해 단도메인 항체의 표적 항원에 대한 결합 활성을 유지하는 개변 단도메인 항체를 제작하는 공정;
- [0127] (b) (a) 공정에서 제작한 개변 단도메인 항체의 항원 결합 활성을 억제하도록, 당해 개변 단도메인 항체를 프로

테아제 절단 서열을 개재시켜 IgG 항체의 중쇄 정상 영역과 연결시키거나, 또는 당해 개변 단도메인 항체를 프로테아제 절단 서열을 개재시켜 IgG 항체의 경쇄 정상 영역과 연결시켜, 당해 개변 단도메인 항체가 도입된 당해 IgG 항체-유사 분자를 형성시키는 공정;

- [0128] 을 포함하는, (64)에 기재된 제조 방법.
- [0129] (73) 추가로 이하의 공정:
- [0130] (d) 상기 IgG 항체-유사 분자 또는 상기 IgG 항체-유사 분자 전구체에 도입된 상기 개변 단도메인 항체의 상기 표적 항원에 대한 결합 활성이 약해지거나 혹은 상실되어 있음을 확인하는 공정;
- [0131] 을 포함하는, (70) 내지 (72) 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.
- [0132] (74) 추가로 이하의 공정:
- [0133] (e) 상기 프로테아제 절단 서열을 프로테아제로 절단함으로써 상기 개변 단도메인 항체를 유리시키고, 유리된 개변 단도메인 항체가 상기 표적 항원에 결합하는 것을 확인하는 공정;
- [0134] 을 포함하는, (70) 내지 (73) 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.
- [0135] (75) (1) 내지 (56) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [0136] (76) (75)에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.
- [0137] (77) (75)에 기재된 폴리뉴클레오티드 또는 (76)에 기재된 벡터를 포함하는 숙주 세포.
- [0138] (78) (77)에 기재된 숙주 세포를 배양하는 공정을 포함하는, (1) 내지 (56) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드를 제조하는 방법.
- [0139] (79) 특정한 VL과 회합함으로써, 혹은 특정한 VH와 회합함으로써, 혹은 특정한 VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단도메인 항체를 스크리닝하는 방법.
- [0140] (80) 특정한 VL과 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단도메인 항체를 스크리닝하는, (79)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0141] (81) 이하의 공정:
- [0142] (a) 표적 항원 결합 활성을 갖는 단도메인 항체를 취득하는 공정;
- [0143] (b) (a) 공정에서 취득한 단도메인 항체를 특정한 VL과 회합시키는 공정;
- [0144] (c) (b) 공정에서 특정한 VL과 회합시킨 상기 단도메인 항체의 상기 항원에 대한 결합 활성이 회합 전과 비교하여 약해지거나 혹은 상실되어 있음을 확인하는 공정;
- [0145] 을 포함하는, (80)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0146] (82) 이하의 공정:
- [0147] (a) 단도메인 항체를 특정한 VL과 회합시키는 공정;
- [0148] (b) (a) 공정에서 특정한 VL과 회합시킨 상기 단도메인 항체의 상기 항원에 대한 결합 활성이 없거나 혹은 일정치 이하인, VL과 단도메인 항체의 회합체를 선택하는 공정;
- [0149] (c) (b) 공정에서 선택한 회합체 내의 단도메인 항체의, 상기 특정한 VL과 회합하고 있지 않는 상태에서의 상기 항원에 대한 결합 활성이 회합 시와 비교하여 강해지고 있음을 확인하는 공정;
- [0150] 을 포함하는, (80)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0151] (83) 특정한 VH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단도메인 항체를 스크리닝하는, (79)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0152] (84) 이하의 공정:
- [0153] (a) 표적 항원 결합 활성을 갖는 단도메인 항체를 취득하는 공정;
- [0154] (b) (a) 공정에서 취득한 단도메인 항체를 특정한 VH와 회합시키는 공정;

- [0155] (c) (b) 공정에서 특정한 VH와 회합시킨 상기 단도메인 향체의 상기 향원에 대한 결합 활성이 회합 전과 비교하여 약해지거나 혹은 상실되어 있음을 확인하는 공정;
- [0156] 을 포함하는, (83)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0157] (85) 이하의 공정:
- [0158] (a) 단도메인 향체를 특정한 VH와 회합시키는 공정;
- [0159] (b) (a) 공정에서 특정한 VH와 회합시킨 상기 단도메인 향체의 상기 향원에 대한 결합 활성이 없거나 혹은 일정치 이하인, VH와 단도메인 향체의 회합체를 선택하는 공정;
- [0160] (c) (b) 공정에서 선택한 회합체 내의 단도메인 향체의, 상기 특정한 VH와 회합하고 있지 않는 상태에서의 상기 향원에 대한 결합 활성이 회합 시와 비교하여 강해지고 있음을 확인하는 공정;
- [0161] 을 포함하는, (83)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0162] (86) 특정한 VHH와 회합함으로써 향원 결합 활성이 억제되는 단도메인 향체를 스크리닝하는, (79)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0163] (87) 이하의 공정:
- [0164] (a) 표적 향원 결합 활성을 갖는 단도메인 향체를 취득하는 공정;
- [0165] (b) (a) 공정에서 취득한 단도메인 향체를 특정한 VHH와 회합시키는 공정;
- [0166] (c) (b) 공정에서 특정한 VHH와 회합시킨 상기 단도메인 향체의 상기 향원에 대한 결합 활성이 회합 전과 비교하여 약해지거나 혹은 상실되어 있음을 확인하는 공정;
- [0167] 을 포함하는, (86)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0168] (88) 이하의 공정:
- [0169] (a) 단도메인 향체를 특정한 VHH와 회합시키는 공정;
- [0170] (b) (a) 공정에서 특정한 VHH와 회합시킨 상기 단도메인 향체의 상기 향원에 대한 결합 활성이 없거나 혹은 일정치 이하인, VHH와 단도메인 향체의 회합체를 선택하는 공정;
- [0171] (c) (b) 공정에서 선택한 회합체 내의 단도메인 향체의, 상기 특정한 VHH와 회합하고 있지 않는 상태에서의 상기 향원에 대한 결합 활성이 회합 시와 비교하여 강해지고 있음을 확인하는 공정;
- [0172] 을 포함하는, (86)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0173] (89) 특정한 VL과 회합함으로써, 혹은 특정한 VH와 회합함으로써, 혹은 특정한 VHH와 회합함으로써 향원 결합 활성이 억제되는 단도메인 향체를 제조하는 방법.
- [0174] (90) 특정한 VL과 회합함으로써 향원 결합 활성이 억제되는 단도메인 향체를 제조하는, (89)에 기재된 제조 방법.
- [0175] (91) 이하의 공정:
- [0176] (a) 단도메인 향체 중의, 향체 VL과의 회합에 관여하는 아미노산 잔기를 치환하여, 당해 단도메인 향체의 표적 향원에 대한 결합 활성을 유지하는 개변 단도메인 향체를 제작하는 공정;
- [0177] 을 포함하는, (90)에 기재된 제조 방법.
- [0178] (92) 추가로 이하의 공정:
- [0179] (b) (a) 공정에서 제작된 개변 단도메인 향체를 상기 VL과 회합시키는 공정;
- [0180] (c) 당해 VL과 회합시킨 상기 개변 단도메인 향체의 향원 결합 활성이 회합 전과 비교하여 약해지거나 혹은 상실되어 있음을 확인하는 공정;
- [0181] 을 포함하는, (91)에 기재된 제조 방법.
- [0182] (93) 특정한 VH와 회합함으로써 향원 결합 활성이 억제되는 단도메인 향체를 제조하는, (89)에 기재된 제조 방

법.

- [0183] (94) 이하의 공정:
- [0184] (a) 단도메인 항체 중의, IgG 항체-유사 분자의 VH와의 회합에 관여하는 아미노산 잔기를 치환하여, 당해 단도메인 항체의 표적 항원에 대한 결합 활성을 유지하는 개변 단도메인 항체를 제작하는 공정;
- [0185] 을 포함하는, (93)에 기재된 제조 방법.
- [0186] (95) 추가로 이하의 공정:
- [0187] (b) (a) 공정에서 제작된 개변 단도메인 항체를 상기 VH와 회합시키는 공정;
- [0188] (c) 당해 VH와 회합시킨 상기 개변 단도메인 항체의 항원 결합 활성이 회합 전과 비교하여 약해지거나 혹은 상실되어 있음을 확인하는 공정;
- [0189] 을 포함하는, (94)에 기재된 제조 방법.
- [0190] (96) 특정한 VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단도메인 항체를 제조하는, (89)에 기재된 제조 방법.
- [0191] (97) 이하의 공정:
- [0192] (a) 단도메인 항체 중의, VHH와의 회합에 관여하는 아미노산 잔기를 치환하여, 당해 단도메인 항체의 표적 항원에 대한 결합 활성을 유지하는 개변 단도메인 항체를 제작하는 공정;
- [0193] 을 포함하는, (96)에 기재된 제조 방법.
- [0194] (98) 추가로 이하의 공정:
- [0195] (b) (a) 공정에서 제작된 개변 단도메인 항체를 상기 VHH와 회합시키는 공정;
- [0196] (c) 당해 VHH와 회합시킨 상기 개변 단도메인 항체의 항원 결합 활성이 회합 전과 비교하여 약해지거나 혹은 상실되어 있음을 확인하는 공정;
- [0197] 을 포함하는, (97)에 기재된 제조 방법.
- [0198] (99) 단도메인 항체와 제 1 회합 지지 도메인을 연결시킨 융합 폴리펩티드를 복수 포함하는 라이브러리로서, 상기 단도메인 항체는, 특정한 VL과 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체, 또는 특정한 VH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체, 또는 특정한 VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체를 포함하는, 라이브러리.
- [0199] (100) 상기 라이브러리 중의 융합 폴리펩티드의 단도메인 항체 부분은, 낙타과 동물 혹은 단도메인 항체를 산생할 수 있는 유전자가 도입된 유전자 도입 동물로부터 취득한 단도메인 항체 혹은 그의 인간화 항체, 또는 낙타과 동물 혹은 단도메인 항체를 산생할 수 있는 유전자가 도입된 유전자 도입 동물을 면역시킴으로써 취득한 단도메인 항체 혹은 그의 인간화 항체, 또는 인간 항체 VH 혹은 VL로부터 출발하여 인공적으로 작성된 단도메인 항체를 포함하는, (99)에 기재된 라이브러리.
- [0200] (101) 단도메인 항체와 제 1 회합 지지 도메인을 연결시킨 융합 폴리펩티드를 복수 포함하는 라이브러리로서, 상기 단도메인 항체는, 특정한 VL과 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체를 포함하는, (99) 또는 (100)에 기재된 라이브러리.
- [0201] (102) 단도메인 항체와 제 1 회합 지지 도메인을 연결시킨 융합 폴리펩티드를 복수 포함하는 라이브러리로서, 상기 단도메인 항체는, 특정한 VH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체를 포함하는, (99) 또는 (100)에 기재된 라이브러리.
- [0202] (103) 단도메인 항체와 제 1 회합 지지 도메인을 연결시킨 융합 폴리펩티드를 복수 포함하는 라이브러리로서, 상기 단도메인 항체는, 특정한 VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체를 포함하는, (99) 또는 (100)에 기재된 라이브러리.
- [0203] (104) (99) 또는 (100)에 기재된 라이브러리로부터, 특정한 VL과 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체, 또는 특정한 VH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체, 또는 특정한 VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체를 포함

하는 융합 폴리펩티드를 스크리닝하는 방법.

- [0204] (105) (101)에 기재된 라이브러리로부터, 특정한 VL과 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드를 스크리닝하는 방법.
- [0205] (106) 이하의 공정:
- [0206] (a) 상기 라이브러리의 융합 폴리펩티드를 인비트로 디스플레이시키는 공정;
- [0207] (b) 특정한 VL과 제 2 회합 지지 도메인을 융합한 회합 파트너를 준비하는 공정;
- [0208] (c) (a) 공정에서 디스플레이된 융합 폴리펩티드와 (b) 공정에서 준비한 회합 파트너를 회합시켜, 단도메인 항체와 상기 VL이 회합하는 상태에서 항원과 결합하지 않거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이하인 융합 폴리펩티드를 선택하는 공정;
- [0209] (d) (c) 공정에서 선택된 융합 폴리펩티드로부터, 포함되는 단도메인 항체와 상기 VL이 회합하지 않은 상태에서 항원과 결합하거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이상인 융합 폴리펩티드를 선택하는 공정;
- [0210] 을 포함하는, (105)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0211] (107) 상기 (b) 공정에서 준비된 회합 파트너는 프로테아제 절단 서열을 추가로 포함하고, 상기 (d) 공정에서는, 프로테아제 처리에 의해 상기 회합 파트너를 절단하여, 상기 단도메인 항체와 상기 VL 회합을 해소시키는, (106)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0212] (108) 상기 (b) 공정에서 준비된 회합 파트너의 상기 프로테아제 절단 서열은, 상기 특정한 VL과 상기 제 2 회합 지지 도메인의 경계 부근에 위치하는, (107)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0213] (109) 상기 라이브러리의 융합 폴리펩티드는 프로테아제 절단 서열을 추가로 포함하고, 상기 (d) 공정에서는, 프로테아제 처리에 의해 상기 융합 폴리펩티드를 절단하여, 상기 단도메인 항체와 상기 VL 회합을 해소시키는, (106)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0214] (110) 상기 융합 폴리펩티드에 포함되는 프로테아제 절단 서열은, 상기 단도메인 항체와 상기 제 1 회합 지지 도메인의 경계 부근에 위치하는, (109)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0215] (111) 상기 (d) 공정에서는, 상기 (c) 공정에서 선택된 융합 폴리펩티드의 전장 혹은 단도메인 항체를 포함하는 부분을 재차 인비트로 디스플레이시키는, (106)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0216] (112) 상기 (d) 공정에서는, 상기 (c) 공정에서 선택된 융합 폴리펩티드의 전장을 재차 인비트로 디스플레이시켜, 제 2 회합 지지 도메인과만 회합시킨 상태에서 항원과 결합하거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이상인 융합 폴리펩티드를 선택하는, (106)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0217] (113) (102)에 기재된 라이브러리로부터, 특정한 VH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드를 스크리닝하는 방법.
- [0218] (114) 이하의 공정:
- [0219] (a) 상기 라이브러리의 융합 폴리펩티드를 인비트로 디스플레이시키는 공정;
- [0220] (b) 특정한 VH와 제 2 회합 지지 도메인을 융합한 회합 파트너를 준비하는 공정;
- [0221] (c) (a) 공정에서 디스플레이한 융합 폴리펩티드와 (b) 공정에서 준비한 회합 파트너를 회합시켜, 단도메인 항체와 상기 VH가 회합하는 상태에서 항원과 결합하지 않거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이하인 융합 폴리펩티드를 선택하는 공정;
- [0222] (d) (c) 공정에서 선택된 융합 폴리펩티드로부터, 포함되는 단도메인 항체와 상기 VH가 회합하지 않은 상태에서 항원과 결합하거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이상인 융합 폴리펩티드를 선택하는 공정;
- [0223] 을 포함하는, (113)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0224] (115) 상기 (b) 공정에서 준비된 회합 파트너는 프로테아제 절단 서열을 추가로 포함하고, 상기 (d) 공정에서는, 프로테아제 처리에 의해 상기 회합 파트너를 절단하여, 상기 단도메인 항체와 상기 VH의 회합을 해소시키는, (114)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0225] (116) 상기 (b) 공정에서 준비된 회합 파트너의 상기 프로테아제 절단 서열은, 상기 특정한 VH와 상기 제 2 회

합 지지 도메인의 경계 부근에 위치하는, (115)에 기재된 스크리닝 방법.

- [0226] (117) 상기 라이브러리의 융합 폴리펩티드는 프로테아제 절단 서열을 추가로 포함하고, 상기 (d) 공정에서는, 프로테아제 처리에 의해 상기 융합 폴리펩티드를 절단하여, 상기 단도메인 항체와 상기 VH 회합을 해소시키는, (114)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0227] (118) 상기 융합 폴리펩티드에 포함되는 프로테아제 절단 서열은, 상기 단도메인 항체와 상기 제 1 회합 지지 도메인의 경계 부근에 위치하는, (117)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0228] (119) 상기 (d) 공정에서는, 상기 (c) 공정에서 선택된 융합 폴리펩티드의 전장 혹은 단도메인 항체를 포함하는 부분을 재차 인비트로 디스플레이시키는, (114)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0229] (120) 상기 (d) 공정에서는, 상기 (c) 공정에서 선택된 융합 폴리펩티드의 전장을 재차 인비트로 디스플레이시켜, 제 2 회합 지지 도메인과만 회합시킨 상태에서 항원과 결합하거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이상인 융합 폴리펩티드를 선택하는, (114)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0230] (121) (103)에 기재된 라이브러리로부터, 특정한 VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드를 스크리닝하는 방법.
- [0231] (122) 이하의 공정:
- [0232] (a) 상기 라이브러리의 융합 폴리펩티드를 인비트로 디스플레이시키는 공정;
- [0233] (b) 특정한 VHH와 제 2 회합 지지 도메인을 융합한 회합 파트너를 준비하는 공정;
- [0234] (c) (a) 공정에서 디스플레이한 융합 폴리펩티드와 (b) 공정에서 준비한 회합 파트너를 회합시켜, 단도메인 항체와 상기 특정한 VHH가 회합하는 상태에서 항원과 결합하지 않거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이하인 융합 폴리펩티드를 선택하는 공정;
- [0235] (d) (c) 공정에서 선택된 융합 폴리펩티드로부터, 포함되는 단도메인 항체와 상기 VHH가 회합하지 않은 상태에서 항원과 결합하거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이상인 융합 폴리펩티드를 선택하는 공정;
- [0236] 을 포함하는, (121)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0237] (123) 상기 (b) 공정에서 준비된 회합 파트너는 프로테아제 절단 서열을 추가로 포함하고, 상기 (d) 공정에서는, 프로테아제 처리에 의해 상기 회합 파트너를 절단하여, 상기 단도메인 항체와 상기 VHH의 회합을 해소시키는, (122)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0238] (124) 상기 (b) 공정에서 준비된 회합 파트너의 상기 프로테아제 절단 서열은, 상기 특정한 VHH와 상기 제 2 회합 지지 도메인의 경계 부근에 위치하는, (123)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0239] (125) 상기 라이브러리의 융합 폴리펩티드는 프로테아제 절단 서열을 추가로 포함하고, 상기 (d) 공정에서는, 프로테아제 처리에 의해 상기 융합 폴리펩티드를 절단하여, 상기 단도메인 항체와 상기 VHH의 회합을 해소시키는, (122)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0240] (126) 상기 융합 폴리펩티드에 포함되는 프로테아제 절단 서열은, 상기 단도메인 항체와 상기 제 1 회합 지지 도메인의 경계 부근에 위치하는, (125)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0241] (127) 상기 (d) 공정에서는, 상기 (c) 공정에서 선택된 융합 폴리펩티드의 전장 혹은 단도메인 항체를 포함하는 부분을 재차 인비트로 디스플레이시키는, (122)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0242] (128) 상기 (d) 공정에서는, 상기 (c) 공정에서 선택된 융합 폴리펩티드의 전장을 재차 인비트로 디스플레이시켜, 제 2 회합 지지 도메인과만 회합시킨 상태에서 항원과 결합하거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이상인 융합 폴리펩티드를 선택하는, (122)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0243] (129) 상기 (b) 공정 중의 회합 파트너를 준비하는 공정은, 회합 파트너와 융합 폴리펩티드를 동시에 디스플레이시키는 공정한, (106) 내지 (112), (114) 내지 (120), (122) 내지 (128) 중 어느 하나에 기재된 스크리닝 방법.
- [0244] (130) 상기 제 1 회합 지지 도메인은 IgG 항체 CH1 도메인 또는 항체 경쇄 정상 영역을 포함하는, (99) 내지 (103) 중 어느 하나에 기재된 라이브러리.

- [0245] (131) 상기 제 1 회합 지지 도메인은 IgG 항체 CH1 도메인을 포함하고, 상기 제 2 회합 지지 도메인은 항체 경쇄 정상 영역을 포함하는, (106) 내지 (112), (114) 내지 (120), (122) 내지 (128) 중 어느 하나에 기재된 스크리닝 방법.
- [0246] (132) 상기 제 1 회합 지지 도메인은 항체 경쇄 정상 영역을 포함하고, 상기 제 2 회합 지지 도메인은 IgG 항체 CH1 도메인을 포함하는, (106) 내지 (112), (114) 내지 (120), (122) 내지 (128) 중 어느 하나에 기재된 스크리닝 방법.
- [0247] (133) 이하의 공정:
- [0248] (a) 상기 라이브러리의 융합 폴리펩티드를 인비트로 디스플레이시키는 공정;
- [0249] (b) 특정한 VL과 제 2 회합 지지 도메인을 융합한 회합 파트너를 준비하는 공정;
- [0250] (c) 상기 융합 폴리펩티드에 포함되는 단도메인 항체가 항원과 결합하거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이상인 융합 폴리펩티드를 선택하는 공정;
- [0251] (d) (c) 공정에서 선택된 융합 폴리펩티드와 (b) 공정에서 준비한 회합 파트너를 회합시켜, 단도메인 항체와 상기 VL이 회합하는 상태에서 항원과 결합하지 않거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이하인 융합 폴리펩티드를 선택하는 공정;
- [0252] 을 포함하는, (105)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0253] (134) 상기 (d) 공정에서는, 상기 (c) 공정에서 선택된 융합 폴리펩티드를 재차 인비트로 디스플레이시키는, (129)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0254] (135) 상기 (c) 공정에서는, 상기 융합 폴리펩티드를 제 2 회합 지지 도메인과만 회합시키거나, 또는 융합 폴리펩티드를 제 2 회합 지지 도메인과만 회합시킨 상태에서 융합 폴리펩티드에 포함되는 단도메인 항체의 항원 결합을 확인하는, (133)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0255] (136) 이하의 공정:
- [0256] (a) 상기 라이브러리의 융합 폴리펩티드를 인비트로 디스플레이시키는 공정;
- [0257] (b) 특정한 VH와 제 2 회합 지지 도메인을 융합한 회합 파트너를 준비하는 공정;
- [0258] (c) 상기 융합 폴리펩티드에 포함되는 단도메인 항체가 항원과 결합하거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이상인 융합 폴리펩티드를 선택하는 공정;
- [0259] (d) (c) 공정에서 선택된 융합 폴리펩티드와 (b) 공정에서 준비한 회합 파트너를 회합시켜, 단도메인 항체와 상기 VH가 회합하는 상태에서 항원과 결합하지 않거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이하인 융합 폴리펩티드를 선택하는 공정;
- [0260] 을 포함하는, (113)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0261] (137) 상기 (d) 공정에서는, 상기 (c) 공정에서 선택된 융합 폴리펩티드를 재차 인비트로 디스플레이시키는, (136)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0262] (138) 상기 (c) 공정에서는, 상기 융합 폴리펩티드를 제 2 회합 지지 도메인과만 회합시키거나, 또는 융합 폴리펩티드를 제 2 회합 지지 도메인과만 회합시킨 상태에서 융합 폴리펩티드에 포함되는 단도메인 항체의 항원 결합을 확인하는, (136)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0263] (139) 이하의 공정:
- [0264] (a) 상기 라이브러리의 융합 폴리펩티드를 인비트로 디스플레이시키는 공정;
- [0265] (b) 특정한 VH와 제 2 회합 지지 도메인을 융합한 회합 파트너를 준비하는 공정;
- [0266] (c) 상기 융합 폴리펩티드에 포함되는 단도메인 항체가 항원과 결합하거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이상인 융합 폴리펩티드를 선택하는 공정;
- [0267] (d) (c) 공정에서 선택된 융합 폴리펩티드와 (b) 공정에서 준비한 회합 파트너를 회합시켜, 단도메인 항체와 상기 VH가 회합하는 상태에서 항원과 결합하지 않거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이하인 융합 폴리펩티드를

선택하는 공정;

- [0268] 을 포함하는, (121)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0269] (140) 상기 (d) 공정에서는, 상기 (c) 공정에서 선택된 융합 폴리펩티드를 재차 인비트로 디스플레이시키는, (139)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0270] (141) 상기 (c) 공정에서는, 상기 융합 폴리펩티드를 제 2 회합 지지 도메인과만 회합시키거나, 또는 융합 폴리펩티드를 제 2 회합 지지 도메인과만 회합시킨 상태에서 융합 폴리펩티드에 포함되는 단도메인 항체의 항원 결합을 확인하는, (139)에 기재된 스크리닝 방법.
- [0271] (142) 상기 (d) 공정 중의 융합 폴리펩티드와 회합 파트너를 회합시키는 공정은, 회합 파트너와 융합 폴리펩티드를 동시에 디스플레이시키는 공정인, (133) 내지 (141) 중 어느 하나에 기재된 스크리닝 방법.
- [0272] (143) 상기 제 1 회합 지지 도메인은 IgG 항체 CH1 도메인을 포함하고, 상기 제 2 회합 지지 도메인은 항체 경쇄 정상 영역을 포함하는, (133) 내지 (142) 중 어느 하나에 기재된 스크리닝 방법.
- [0273] (144) 상기 제 1 회합 지지 도메인은 항체 경쇄 정상 영역을 포함하고, 상기 제 2 회합 지지 도메인은 IgG 항체 CH1 도메인을 포함하는, (133) 내지 (142) 중 어느 하나에 기재된 스크리닝 방법.

도면의 간단한 설명

- [0274] 도 1은 Probody 기술의 개념을 나타내는 도면이다. 항체의 항원 결합 부위를 마스킹하는 펩티드를 병변 부위에서 발현하는 프로테아제로 절단되는 링커로 항체와 연결함으로써 항체의 항원 결합 활성을 저해한 항체 분자이다.
- 도 2는 Probody가 부작용을 나타낼 가능성이 있는 1원인을 나타내는 도면이다. 혈중에 축적된 활성화된 Probody는 정상 조직에 발현하는 항원에 결합함으로써 부작용을 발휘해 버릴 가능성이 있다.
- 도 3은 Probody가 부작용을 나타낼 가능성이 있는 1원인을 나타내는 도면이다. Probody는, 링커에 의해 연결된 마스크 펩티드가 항원 결합 부위에 결합한 상태와 해리된 상태의 평형 상태에 있고, 해리된 상태의 분자는 항원에 결합하는 것이 가능하게 된다.
- 도 4는 Probody가 부작용을 나타낼 가능성이 있는 1원인을 나타내는 도면이다. 마스크 펩티드에 대한 항약물 항체(항마스크 펩티드 항체)는, 활성화되기 전의 Probody의 마스크 펩티드에 결합함으로써, 프로테아제에 의한 절단이 일어나지 않아도 Probody를 활성화해 버릴 가능성이 있다.
- 도 5는 항원 결합 도메인과 운반 부분을 포함하는 폴리펩티드의 개념을 나타내는 도면이다. (A) 항원 결합 도메인과 운반 부분이 연결된 상태의 폴리펩티드는 긴 반감기를 갖고, 항원에 결합하지 않는다. (B) 절단 사이트의 절단 등에 의해 항원 결합 도메인이 유리되어 항원에 결합하고, 유리 후의 항원 결합 도메인은 짧은 반감기를 갖는다.
- 도 6은 본 발명의 폴리펩티드를 제조하는 방법의 일 실시태양을 나타내는 도면이다. 본 실시태양에 있어서, 목적하는 폴리펩티드는 IgG 항체-유사 분자이다. (A) 표적 항원에 결합하는 단도메인 항체를 취득한다. (B) 단도메인 항체의 항원 결합 활성이 억제되도록, 단도메인 항체를 IgG 항체의 VH 대신으로서 VL과 회합시킨다. (C) 단도메인 항체가 도입된 IgG 항체-유사 분자 전구체에 프로테아제 절단 서열을 도입한다.
- 도 7은 본 발명의 폴리펩티드의 일 실시태양을 나타내는 도면이다. 본 실시태양에 있어서, 폴리펩티드가 IgG 항체-유사 분자이며, IgG 항체의 2개의 가변 영역에 상당하는 부분에 각각 항원 결합 도메인을 마련한다. 2개의 항원 결합 도메인은 동일한 항원 결합 특이성을 가지고 있어도 되고, 다른 항원 결합 특이성을 가지고 있어도 된다.
- 도 8은 본 발명의 항원 결합 도메인에, 추가로 제 2 항원 결합 도메인이 연결되어 있는 실시태양을 나타내는 도면이다. 이 실시태양에서는, 유리 후의 항원 결합 도메인과 제 2 항원 결합 도메인이 이중 특이적 항원 결합 분자를 형성한다. (A) 미유리 상태의 폴리펩티드를 나타내는 도면이다. 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성은 억제되어 있다. (B) 항원 결합 도메인과 제 2 항원 결합 도메인이 형성하고 있는 이중 특이적 항원 결합 분자의 유리를 나타내는 도면이다. (C) 유리 후의 이중 특이적 항원 결합 분자의 예로서, 예를 들어 T 세포 표면 항원과 암세포 표면 항원에 대한 이중 특이적 항원 결합 분자를 나타내는 도면이다.
- 도 9a는 단도메인 항체와 제 1 회합 지지 도메인을 연결시킨 융합 폴리펩티드를 복수 포함하는 라이브러리로부터

터, 특정한 억제 도메인과 회합함으로써 항원 결합 활성이 감약되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드를 스크리닝하는 방법의 일례를 나타내는 도면이다. (1) 단도메인 항체와 제 1 회합 지지 도메인을 연결시킨 융합 폴리펩티드를 복수 포함하는 라이브러리를 나타내는 도면이다. (2) 융합 폴리펩티드와 회합 파트너가 회합하는 상태에서, 단도메인 항체의 항원 결합 활성을 확인하는 것을 나타내는 도면이다. 이 회합 상태에서, 표적 항원에 결합하지 않거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이하인 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드가 선택된다. (3) (2)에서 선택된 융합 폴리펩티드 중의 단도메인 항체와 회합 파트너 중의 억제 도메인의 회합을 해소하고, 단도메인 항체의 항원 결합 활성을 확인하는 것을 나타내는 도면이다. 이 비회합 상태에서, 표적 항원에 결합하거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이상인 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드가 선택된다. (2') 융합 폴리펩티드 중의 단도메인 항체의 항원 결합 활성을 확인하는 것을 나타내는 도면이다. 이 융합 폴리펩티드의 단독 존재 상태에서, 표적 항원에 결합하거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이상인 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드가 선택된다. (3') (2')에서 선택된 융합 폴리펩티드와 회합 파트너가 회합하는 상태에서, 단도메인 항체의 항원 결합 활성을 확인하는 것을 나타내는 도면이다. 이 회합 상태에서, 표적 항원에 결합하지 않거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이하인 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드가 선택된다.

도 9b는 단도메인 항체와 제 1 회합 지지 도메인을 연결시킨 융합 폴리펩티드를 복수 포함하는 라이브러리로부터, 특정한 억제 도메인과 회합함으로써 항원 결합 활성이 감약되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드를 스크리닝하는 방법의 보다 구체적인 일례를 나타내는 도면이다. (1) 단도메인 항체와 제 1 회합 지지 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드와, 억제 도메인과 제 2 회합 지지 도메인의 사이에 프로테아제 절단 서열이 도입된 회합 파트너를 동시에 디스플레이시켜, Fab상 구조를 형성시키고; (2) 디스플레이 된 Fab상 구조 중에, 항원과 결합하지 않거나, 혹은 항원에 대한 결합 활성이 일정치 이하인 것을 선택하고; (3) 프로테아제에 의해 회합 파트너를 절단하여, 항원에 결합하거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이상인 단도메인 항체를 포함하는 단편을 선택한다.

도 9c는 단도메인 항체와 제 1 회합 지지 도메인을 연결시킨 융합 폴리펩티드를 복수 포함하는 라이브러리로부터, 특정한 억제 도메인과 회합함으로써 항원 결합 활성이 감약되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드를 스크리닝하는 방법의 보다 구체적인 다른 예를 나타내는 도면이다. (1) 단도메인 항체와 제 1 회합 지지 도메인 사이에 프로테아제 절단 서열을 도입한 융합 폴리펩티드와, 억제 도메인과 제 2 회합 지지 도메인이 연결된 회합 파트너를 동시에 디스플레이시켜, Fab상 구조를 형성시키고; (2) 디스플레이된 Fab상 구조 중에, 항원과 결합하지 않거나, 혹은 항원에 대한 결합 활성이 일정치 이하인 것을 선택하고; (3) 프로테아제에 의해 융합 폴리펩티드를 절단하여, 항원에 결합하거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이상인 단도메인 항체를 포함하는 단편을 선택한다.

도 9d는 단도메인 항체와 제 1 회합 지지 도메인을 연결시킨 융합 폴리펩티드를 복수 포함하는 라이브러리로부터, 특정한 억제 도메인과 회합함으로써 항원 결합 활성이 감약되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드를 스크리닝하는 방법의 다른 예를 나타내는 도면이다. (1) 단도메인 항체와 제 1 회합 지지 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드와, 억제 도메인과 제 2 회합 지지 도메인이 연결된 회합 파트너를 동시에 디스플레이시켜, Fab상 구조를 형성시키고, 디스플레이된 Fab상 구조 중에, 항원과 결합하지 않거나, 혹은 항원에 대한 결합 활성이 일정치 이하인 것을 선택하고; (2) (1)에서 선택된 Fab상 구조 중의 단도메인 항체를 포함하는 부분을, 억제 도메인을 동시에 발현시키지 않는 형태로 재차 디스플레이시켜, 항원과 결합하거나, 혹은 항원에 대한 결합 활성이 일정치 이상인 단편을 선택한다. (2')와 (2'')는, (2) 중의, 단도메인 항체를 포함하는 부분을, 억제 도메인을 동시에 발현시키지 않는 형태로 재차 디스플레이시키는 다른 실시태양을 나타내는 도면이다. 한편, (1)과 (2)/(2')/(2'')의 순번은 (2)/(2')/(2'')로부터 (1)이어도 되고, 즉, 단도메인 항체를 포함하는 부분을, 억제 도메인을 동시에 발현시키지 않는 형태로 디스플레이시켜, 항원에 대한 결합 활성이 일정치 이상인 단편을 선택한다. 다음에, 결합이 일정 이상인 단편을 포함하는 단도메인 항체와 제 1 회합 지지 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드와 억제 도메인과 제 2 회합 지지 도메인이 연결된 회합 파트너를 동시에 디스플레이시켜, Fab상 구조를 형성시키고, 디스플레이된 Fab상 구조 중에, 항원과 결합하지 않거나, 혹은 항원에 대한 결합 활성이 일정치 이하인 것을 선택한다.

도 10은 항인간 IL6R VHH(IL6R90)를 인간 IgG1의 정상 영역(CH1-hinge-CH2-CH3)에 융합한 IL6R90-G1m을 다양한 경쇄와 회합시켜 작성한 항체-유사 분자의, 인간 IL6R에 대한 결합을 평가한 결과를 나타내는 도면이다. 항원이 고상화된 센서와 항체-유사 분자의 작용을 개시한 시간이 가로축의 개시점이다.

도 11의 (A)는 IL6R90-G1m의 VHH와 정상 영역의 경계 부근에 프로테아제 절단 서열을 삽입함으로써 작성한 항체

-유사 분자의 모델을 나타내는 도면이다. (B)는 작성한 각 항체 중쇄의 이름, 아미노산 서열을 삽입한 부위, 삽입한 아미노산 서열을 나타내는 도면이다. 삽입 부위를 [insert]로 나타낸다.

도 12a는 IL6R90-G1m 또는 IL6R90-G1m의 VHH와 정상 영역의 경계 부근에 프로테아제 절단 서열을 삽입함으로써 작성한 항체-유사 분자를 프로테아제(MT-SP1) 처리 후, 절단의 정도를 환원 SDS-PAGE로 평가한 결과를 나타내는 도면이다. 프로테아제 처리에 의해 생긴 2개의 새로운 밴드 중, 25 kDa 이하에 생긴 밴드가 VHH에서 유래하는 밴드이며, 25-50 kDa의 위치에 나타난 밴드가 정상 영역에서 유래하는 밴드이다.

도 12b는 도 12a의 계속을 나타내는 도면이다.

도 13은 IL6R90-G1m 또는 IL6R90-G1m의 VHH와 정상 영역의 경계 부근에 프로테아제 절단 서열을 삽입함으로써 작성한 항체-유사 분자 또는 그것들을 프로테아제(MT-SP1) 처리한 후의 샘플과 인간 IL6R의 결합을 평가한 결과를 나타내는 도면이다. Protease-가 프로테아제 미처리 항체-유사 분자와 항원의 결합을 평가한 센서그램이며, Protease+가 프로테아제 처리 항체-유사 분자와 항원의 결합을 평가한 센서그램이다. 항원이 고상화된 센서와 항체-유사 분자의 작용을 개시하기 30초 전이 가로축의 개시점이다.

도 14는 항인간 IL6R VHH(20A11)를 인간 IgG1의 정상 영역(CH1-hinge-CH2-CH3)에 융합한 20A11-G1m을 다양한 경쇄와 회합시켜 작성한 항체-유사 분자의, 인간 IL6R에 대한 결합을 평가한 결과를 나타내는 도면이다. 항원이 고상화된 센서와 항체-유사 분자의 작용을 개시하는 시간의 30초 전이 가로축의 개시점이다.

도 15는 20A11-G1m 또는 20A11의 VL과의 계면에 존재하는 아미노산에 변이를 도입하여 작성한 20A11hu를 인간 IgG1의 정상 영역(CH1-hinge-CH2-CH3)에 융합한 20A11hu-G1m을 다양한 경쇄와 회합시켜 작성한 항체-유사 분자의, 인간 IL6R에 대한 결합을 평가한 결과를 나타내는 도면이다. 항원이 고상화된 센서와 항체-유사 분자의 작용을 개시하는 시간의 60초 전이 가로축의 개시점이다.

도 16은 20A11-G1m 또는 20A11hu-G1m의 20A11hu와 정상 영역의 경계 부근에 프로테아제 절단 서열을 삽입하여 제작한 4종류의 항체-유사 분자를 프로테아제(MT-SP1) 처리 후, 절단의 정도를 환원 SDS-PAGE로 평가한 결과를 나타내는 도면이다. 프로테아제 처리에 의해 생긴 2개의 새로운 밴드 중, 25 kDa 이하에 생긴 밴드가 VHH에서 유래하는 밴드이며, 25-50 kDa의 위치에 나타난 밴드가 정상 영역에서 유래하는 밴드이다.

도 17은 20A11-G1m 또는 20A11hu-G1m의 VHH와 정상 영역의 경계 부근에 프로테아제 절단 서열을 삽입함으로써 작성한 항체-유사 분자 또는 그것들을 프로테아제(MT-SP1) 처리한 후의 샘플과 인간 IL6R의 결합을 평가한 결과를 나타내는 도면이다. Protease-가 프로테아제 미처리 항체-유사 분자와 항원의 결합을 평가한 센서그램이며, Protease+가 프로테아제 처리 항체-유사 분자와 항원의 결합을 평가한 센서그램이다. 항원이 고상화된 센서와 항체의 작용을 개시하기 60초 전이 가로축의 개시점이다. not tested라고 기재된 샘플은 미측정인 것을 나타낸다.

도 18은 항인간 CD3 VHH를 중쇄 가변 영역에 가지고, VHH와 중쇄 정상 영역의 경계 부근에 프로테아제 절단 서열을 삽입함으로써 제작한 항체-유사 분자를 프로테아제(MT-SP1) 처리 후, 환원 SDS-PAGE로 영동하고, CBB로 검출하는 것에 의해 절단의 정도를 평가한 결과를 나타내는 도면이다. 프로테아제 처리에 의해 생긴 2개의 새로운 밴드 중, 10-15 kDa 부근에 생긴 밴드가 VHH에서 유래하는 밴드이며, 37 kDa 부근에 생긴 밴드가 중쇄 정상 영역에서 유래하는 밴드이다.

도 19는 항인간 CD3 VHH를 중쇄 가변 영역에 가지고, VHH와 중쇄 정상 영역의 경계 부근에 프로테아제 절단 서열을 삽입함으로써 제작한 항체-유사 분자를 프로테아제(MT-SP1) 처리한 후의 샘플과 인간 CD3ed-Fc의 결합을 평가한 결과를 나타내는 도면이다. Protease-가 프로테아제 미처리 항체-유사 분자와 항원의 결합을 평가한 센서그램이며, Protease+가 프로테아제 처리 항체-유사 분자와 항원의 결합을 평가한 센서그램이다. 항원이 고상화된 센서와 항체-유사 분자의 작용을 개시한 30초 전이 가로축의 개시점이다. 항원을 결합하기 전의 결합량(리스폰스)을 0으로 하고, 항체를 작용시키기 전의 결합량을 100으로 했을 때의 결합을 나타낸다. 항체를 작용시키기 30초 전부터 표시되어 있다.

도 20은 IL6R90-G1m을 중쇄로 하고, Vk1-39-kOMT를 경쇄로 하는 분자, 또는 IL6R90-G1m을 중쇄로 하고, Vk1-39-kOMT를 경쇄로 하는 분자의 경쇄 가변 영역과 경쇄 정상 영역의 경계 부근에 프로테아제 절단 서열을 삽입함으로써 제작한 항체-유사 분자를 프로테아제(MT-SP1) 처리 후, 환원 SDS-PAGE로 영동하고, CBB로 검출하는 것에 의해 절단의 정도를 평가한 결과를 나타내는 도면이다. 프로테아제 처리에 의해 경쇄 유래의 2개의 밴드가 생기고, 경쇄가 프로테아제에 의해 절단되어 있다.

도 21은 IL6R90-G1m을 중쇄로 하고, Vk1-39-kOMT를 경쇄로 하는 분자, 또는 IL6R90-G1m을 중쇄로 하고, Vk1-39-kOMT를 경쇄로 하는 분자의 경쇄 가변 영역과 경쇄 정상 영역의 경계 부근에 프로테아제 절단 서열을 삽입함으로써 제작한 항체-유사 분자를 프로테아제(MT-SP1) 처리한 후의 샘플과 인간 IL6R의 결합을 평가한 결과를 나타내는 도면이다. Protease-가 프로테아제 미처리 항체-유사 분자와 항원의 결합을 평가한 센서그램이며, Protease+가 프로테아제 처리 항체-유사 분자와 항원의 결합을 평가한 센서그램이다. IL6R에 결합하는 것이 확인되고 있는 항체(MRA)를 포지티브 컨트롤로서 사용한다. 항원이 고상화된 센서와 항체-유사 분자의 작용을 개시했을 때가 가로축의 개시점이다.

도 22는 인간 PlexinA1 결합 VHH가 짜넣어진 IgG 항체-유사 분자의 프로테아제 절단을 평가한 SDS-PAGE 결과를 나타내는 도면이다. Protease(+) lane은 프로테아제 절단 처리를 행한 샘플이며, protease(-) lane는 프로테아제 절단 처리를 받고 있지 않은 네거티브 컨트롤의 샘플이다.

도 23은 인간 PlexinA1 결합 VHH가 짜넣어진 IgG 항체-유사 분자가 프로테아제 절단에 의해 VHH를 유리시키고, 유리된 VHH와 인간 PlexinA1의 결합을 평가한 Octet 센서그램을 나타내는 도면이다. Protease+는 프로테아제 절단 처리를 행한 샘플이며, protease-는 프로테아제 절단 처리를 받고 있지 않은 샘플이다. 사용한 IgG 항체-유사 분자의 농도는 도면의 좌측에 기재되어 있다.

도 24는 이중 특이성 VHH-VHH 함유 폴리펩티드의 프로테아제 절단을 평가한 SDS-PAGE 결과를 나타내는 도면이다.

도 25는 프로테아제 절단 전후의 루시페라제 활성을 나타내는 도면이다. 파선은 프로테아제 처리 없음의 샘플, 실선은 프로테아제 처리 있음의 샘플이다.

도 26은 프로테아제 절단 전후의 루시페라제 활성을 나타내는 도면이다. 파선은 프로테아제 처리 없음의 샘플, 실선은 프로테아제 처리 있음의 샘플이다.

도 27은 항인간 IL6R VHH 함유 IgG 항체-유사 분자의 프로테아제에 의한 절단을 SDS-PAGE로 평가한 도면이다.

도 28은 경쇄에 프로테아제 절단 서열을 도입한 IgG 항체-유사 분자의 프로테아제 절단의 평가를 나타내는 도면이다.

도 29는 경쇄에 프로테아제 절단 서열을 도입한 IgG-유사 항체 분자의, 프로테아제 처리의 유무에 의한 활성화의 정도의 평가를 나타내는 도면이다.

도 30a는 중쇄에 프로테아제 절단 서열을 도입한 IgG 항체-유사 분자의 프로테아제 절단의 평가를 나타내는 도면이다.

도 30b는 중쇄에 프로테아제 절단 서열을 도입한 IgG 항체-유사 분자의 프로테아제 절단의 평가를 나타내는 도면이다. 프로테아제에 의한 절단을 assay buffer(MMP Activity Assay Kit (Fluorometric - Green) (ab112146), Component C: Assay Buffer)로 실시했다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0275] 본 발명에 있어서의 폴리펩티드란, 통상, 4 아미노산 정도 이상의 길이를 갖는 펩티드, 및 단백질을 가리킨다. 또한, 본 발명에 있어서의 폴리펩티드는 통상, 인공적으로 설계된 서열로 이루어지는 폴리펩티드이지만, 특별히 한정되지 않고, 예를 들어, 생물 유래의 폴리펩티드여도 된다. 또한, 천연 폴리펩티드, 혹은 합성 폴리펩티드, 재조합 폴리펩티드 등의 어느 것이어도 된다. 더욱이, 상기의 폴리펩티드의 단편도 또한, 본 발명의 폴리펩티드에 포함된다.

[0276] 본 명세서에 있어서, 예를 들어, Ala/A, Leu/L, Arg/R, Lys/K, Asn/N, Met/M, Asp/D, Phe/F, Cys/C, Pro/P, Gln/Q, Ser/S, Glu/E, Thr/T, Gly/G, Trp/W, His/H, Tyr/Y, Ile/I, Val/V로 표시되듯이, 아미노산은 1문자 코드 또는 3문자 코드, 또는 그 양방으로 표기되고 있다. 특정한 위치에 있는 아미노산을 표현할 때, 특정한 위치를 나타내는 숫자와 아미노산의 1문자 코드 또는 3문자 코드를 병기한 표현이 적절히 사용될 수 있다. 예를 들어, 단도메인 항체에 포함되는 아미노산인 37V라고 하는 아미노산은, Kabat 넘버링으로 표시되는 37위의 위치에 있는 Val을 나타낸다.

[0277] 폴리펩티드의 아미노산 서열 중의 아미노산의 개변을 위해서는, 부위 특이적 변이 유발법(Kunkel 등(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492))이나 Overlap extension PCR 등의 공지된 방법이 적절히 채용될 수

있다. 또한, 천연의 아미노산 이외의 아미노산으로 치환하는 아미노산의 개변 방법으로서, 복수의 공지된 방법도 또한 채용될 수 있다(Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006) 35, 225-249, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (11), 6353-6357). 예를 들어, 종지 코돈의 하나인 UAG 코돈(암버 코돈)의 상보적 암버 서프레서 tRNA에 비천연 아미노산이 결합된 tRNA가 포함되는 무세포 번역계 시스템(Clover Direct(Protein Express)) 등도 적합하게 이용된다. 본 명세서에 있어서는, 개변으로서 치환을 들 수 있지만 이것으로 한정되지 않는다.

[0278] 본 명세서에 있어서, 아미노산의 개변 부위를 나타낼 때에 이용되는 「및/또는」의 용어의 의미는, 「및」과 「또는」이 적절히 조합된 모든 조합을 포함한다. 구체적으로는, 예를 들어 「37번, 45번, 및/또는 47번의 아미노산이 치환되어 있다」란 이하의 아미노산의 개변의 배리에이션이 포함된다;

[0279] (a) 37번, (b) 45번, (c) 47번, (d) 37번 및 45번, (e) 37번 및 47번, (f) 45번 및 47번, (g) 37번 및 45번 및 47번.

[0280] 본 명세서에 있어서, 또한, 아미노산의 개변을 나타내는 표현으로서, 특정한 위치를 나타내는 숫자의 전후에 개변 전과 개변 후의 아미노산의 1문자 코드 또는 3문자 코드를 병기한 표현이 적절히 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체 가변 영역 또는 단도메인 항체에 포함되는 아미노산의 치환을 가할 때에 이용되는 F37V 또는 Phe37Val라고 하는 개변은, Kabat 넘버링으로 표시되는 37위의 Phe의 Val로의 치환을 나타낸다. 즉, 숫자는 Kabat 넘버링으로 표시되는 아미노산의 위치를 나타내고, 그 전에 기재되는 아미노산의 1문자 코드 또는 3문자 코드는 치환 전의 아미노산, 그 후에 기재되는 아미노산의 1문자 코드 또는 3문자 코드는 치환 후의 아미노산을 나타낸다. 마찬가지로, 항체 정상 영역에 포함되는 Fc 영역에 아미노산의 치환을 가할 때에 이용되는 P238A 또는 Pro238Ala라고 하는 개변은, EU 넘버링으로 표시되는 238위의 Pro의Ala에의 치환을 나타낸다. 즉, 숫자는 EU 넘버링으로 표시되는 아미노산의 위치를 나타내고, 그 전에 기재되는 아미노산의 1문자 코드 또는 3문자 코드는 치환 전의 아미노산, 그 후에 기재되는 아미노산의 1문자 코드 또는 3문자 코드는 치환 후의 아미노산을 나타낸다.

[0281] 본 명세서에서 용어 「항체」는, 가장 넓은 의미로 사용되고, 원하는 항원 결합 활성을 나타내는 한은, 그것만으로 한정되는 것은 아니지만, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중 특이성 항체(예를 들어, 이중 특이성 항체), 단도메인 항체, 및 항체 단편을 포함하는, 여러 가지 항체 구조를 포함한다.

[0282] 「항체 단편」은, 완전 항체가 결합하는 항원에 결합하는 당해 완전 항체의 일부분을 포함하는, 당해 완전 항체 이외의 분자를 말한다. 항체 단편의 예는, 그것만으로 한정되는 것은 아니지만, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, 다이아보디, 선상 항체, 단쇄 항체 분자(예를 들어, scFv), 및 항체 단편으로부터 형성된 다중 특이성 항체를 포함한다.

[0283] 용어 「전장 항체」, 「완전 항체」, 및 「전부 항체」는, 본 명세서에서는 서로 교환 가능하게 이용되고, 천연형 항체 구조에 실질적으로 유사한 구조를 갖는, 또는 본 명세서에서 정의하는 Fc 영역을 포함하는 중쇄를 갖는 항체를 말한다.

[0284] 용어 「가변 영역」 또는 「가변 도메인」은, 항체를 항원으로 결합시키는 것에 관여하는, 항체의 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 말한다. 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인(각각 VH 및 VL)은, 통상, 각 도메인이 4개의 보존된 프레임워크 영역(FR) 및 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는, 유사한 구조를 갖는다. (예를 들어, Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007) 참조.) 1개의 VH 또는 VL 도메인으로, 항원 결합 특이성을 부여하는 데 충분할 것이다.

[0285] 본 명세서에서 이용되는 용어 「상보성 결정 영역」 또는 「CDR」은, 서열에 있어서 초가변인, 및/또는 구조적으로 정해진 루프(「초가변 루프」)를 형성하는, 및/또는 항원 접촉 잔기(「항원 접촉」), 항체의 가변 도메인의 각 영역을 말한다. 통상, 항체는 6개의 CDR을 포함한다: VH에 3개(H1, H2, H3), 및 VL에 3개(L1, L2, L3)이다. 본 명세서에서의 예시적인 CDR은, 이하의 것을 포함한다:

[0286] (a) 아미노산 잔기 26-32(L1), 50-52(L2), 91-96(L3), 26-32(H1), 53-55(H2), 및 96-101(H3)에서 생기는 초가변 루프(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987));

[0287] (b) 아미노산 잔기 24-34(L1), 50-56(L2), 89-97(L3), 31-35b(H1), 50-65(H2), 및 95-102(H3)에서 생기는 CDR(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

- [0288] (c) 아미노산 잔기 27c-36(L1), 46-55(L2), 89-96(L3), 30-35b(H1), 47-58(H2), 및 93-101(H3)에서 생기는 항원 접촉(MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)); 및,
- [0289] (d) HVR 아미노산 잔기 46-56(L2), 47-56(L2), 48-56(L2), 49-56(L2), 26-35(H1), 26-35b(H1), 49-65(H2), 93-102(H3), 및 94-102(H3)를 포함하는, (a), (b), 및/또는 (c)의 조합.
- [0290] 특별히 나타내지 않는 한, CDR 잔기 및 가변 도메인 중의 다른 잔기(예를 들어, FR 잔기)는, 본 명세서에서는 상기의 Kabat 등에 따라 번호 붙여진다.
- [0291] 「프레임워크」 또는 「FR」은, 상보성 결정 영역(CDR) 잔기 이외의, 가변 도메인 잔기를 말한다. 가변 도메인의 FR은, 통상 4개의 FR 도메인: FR1, FR2, FR3, 및 FR4로 이루어진다. 그에 따라, CDR 및 FR의 서열은, 통상 다음의 순서로 VH(또는 VL)에 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.
- [0292] 본 명세서에서 용어 「정상 영역」 또는 「정상 도메인」은, 항체의 가변 영역 이외의 부분을 말한다. 예를 들어, IgG 항체는, 다이설파이드 결합하고 있는 2개의 동일한 경쇄와 2개의 동일한 중쇄로부터 구성되는 약 150,000 돌턴의 헤테로 사량체 당단백질이며, N말단으로부터 C말단을 향해, 각 중쇄는, 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인이라고도 불리는 가변 영역(VH)을 갖고, CH1 도메인, 힌지 영역, CH2 도메인, CH3 도메인을 포함하는 중쇄 정상 영역(CH)이 계속된다. 마찬가지로, N말단으로부터 C말단을 향해, 각 경쇄는, 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인이라고도 불리는 가변 영역(VL)을 갖고, 추가로 정상 경쇄(CL) 도메인이 계속된다. 천연형 항체의 경쇄는, 그 정상 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 카파(κ) 및 람다(λ)로 불리는, 2개의 타입 중 하나에 귀속되어도 된다.
- [0293] 본 명세서에서 용어 「Fc 영역」은, 적어도 정상 영역의 일부분을 포함하는 면역글로불린 중쇄의 C말단 영역을 정의하기 위해서 이용된다. 이 용어는, 천연형 서열의 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. 일 실시태양에 있어서, 인간 IgG1의 경우, 중쇄 Fc 영역은 Cys226으로부터, 또는 Pro230으로부터, 중쇄의 카복실 말단까지 연장된다. 단, Fc 영역의 C말단의 리신(Lys447) 또는 글리신-리신(Gly446-Lys447)은, 존재하고 있어도 하고 있지 않아도 된다. 본 명세서에서는 특별히 특정하지 않는 한, Fc 영역 또는 정상 영역 중의 아미노산 잔기의 번호 붙이기는, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD 1991에 기재된, EU 넘버링 시스템(EU 인텍스라고도 불림)에 따른다.
- [0294] 항체의 「클래스」는, 항체의 중쇄에 구비되는 정상 도메인 또는 정상 영역의 타입을 말한다. 항체에는 5개의 주요한 클래스가 있다: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이다. 그리고, 이 중 어느 것인가는 추가로 서브클래스(아이소타입)로 나뉘어져도 된다. 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2이다. 상이한 클래스의 면역글로불린에 대응하는 중쇄 정상 도메인을, 각각, α , δ , ϵ , γ , 및 μ 라고 부른다.
- [0295] 본 명세서에 있어서, 「항원 결합 도메인」은 목적으로 하는 항원에 결합하는 것만으로 제한된다. 항원 결합 도메인은, 목적으로 하는 항원에 결합하는 한 어떠한 구조의 도메인도 사용될 수 있다. 그와 같은 도메인의 예로서, 그것만으로 한정하는 것은 아니지만, 예를 들어, 항체의 중쇄 가변 영역(VH) 및 항체의 경쇄 가변 영역(VL), 단도메인 항체(sdAb), 생체 내에 존재하는 세포막 단백질인 Avimer에 포함되는 35 아미노산 정도의 A 도메인으로 불리는 모듈(국제 공개 W02004/044011, W02005/040229), 세포막에 발현하는 당단백질인 fibronectin 중의 단백질에 결합하는 도메인인 10Fn3 도메인을 포함하는 Adnectin(국제 공개 W02002/032925), ProteinA의 58 아미노산으로 이루어지는 3개의 헬릭스의 다발(bundle)을 구성하는 IgG 결합 도메인을 scaffold로 하는 Affibody(국제 공개 W01995/001937), 33 아미노산 잔기를 포함하는 턴과 2개의 역평행 헬릭스 및 루프의 서브유닛이 반복하여 겹쳐 쌓인 구조를 갖는 안키린 반복(ankyrin repeat: AR)의 분자 표면에 노출하는 영역인 DARPins(Designed Ankyrin Repeat proteins)(국제 공개 W02002/020565), 호중구 젤라티나제 결합 리포칼린(neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL)) 등의 리포칼린 분자에 있어서 고도로 보존된 8개의 역평행 스트랜드가 중앙 방향으로 비틀린 배럴 구조의 편측을 지탱하는 4개의 루프 영역인 Anticalin 등(국제 공개 W02003/029462), 칠성장어, 떡장어 등 무악류의 획득 면역 시스템으로서 이뮤노글로불린의 구조를 갖지 않는 가변성 림프구 수용체(variable lymphocyte receptor(VLR))의 류신 잔기가 풍부한 리피트(leucine-rich-repeat(LRR)) 모듈이 반복하여 겹쳐 쌓인 말굽형의 구조의 내부의 평행형 시트 구조의 오목한 영역(국제 공개 W02008/016854)을 들 수 있다.
- [0296] 본 발명의 항원 결합 도메인의 적합한 예로서, 당해 항원 결합 도메인만으로 구성되는 분자로 항원 결합 기능을 발휘할 수 있는 항원 결합 도메인, 연결되어 있는 다른 펩티드로부터 유리된 후에 단독으로 항원 결합 기능을

발휘할 수 있는 항원 결합 도메인 등을 들 수 있다. 그와 같은 항원 결합 도메인의 예로서, 그것만으로 한정되지 않지만, 단도메인 항체, scFv, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 등을 들 수 있다.

- [0297] 본 발명의 항원 결합 도메인의 적합한 예의 하나로서, 분자량 60 kDa 이하의 항원 결합 도메인을 들 수 있다. 그와 같은 항원 결합 도메인의 예로서, 그것만으로 한정되지 않지만, 단도메인 항체, scFv, Fab, Fab'를 들 수 있다. 분자량이 60 kDa 이하인 항원 결합 도메인은 통상, 단량체로서 혈중에 존재할 때, 신장(腎臟)에 의한 클리어런스가 발생할 가능성이 높다(J Biol Chem. 1988 Oct 15;263(29):15064-70 참조).
- [0298] 다른 면에서 봐서, 본 발명의 항원 결합 도메인의 적합한 예의 하나로서, 혈중반감기가 12시간 이하인 항원 결합 도메인을 들 수 있다. 그와 같은 항원 결합 도메인의 예로서, 그것만으로 한정되지 않지만, 단도메인 항체, scFv, Fab, Fab' 등을 들 수 있다.
- [0299] 본 발명의 항원 결합 도메인의 적합한 예의 하나로서, 단도메인 항체(sdAb)를 들 수 있다.
- [0300] 본 명세서에서 용어 「단도메인 항체」는, 그 도메인 단독으로 항원 결합 활성을 발휘할 수 있는 한 그 구조는 한정되지 않는다. IgG 항체 등으로 예시되는 통상의 항체는, VH와 VL의 페어링에 의해 가변 영역이 형성된 상태에서는 항원 결합 활성을 나타내는데 반해, 단도메인 항체는 다른 도메인과 페어링하지 않고서, 단도메인 항체 자신의 도메인 구조 단독으로 항원 결합 활성을 발휘할 수 있다고 알려져 있다. 단도메인 항체는 통상 비교적 저분자량을 가져, 단량체의 형태로 존재한다.
- [0301] 단도메인 항체의 예로서, 그것만으로 한정되지 않지만, 예를 들어, 낙타과의 동물의 V_HH, 상어의 V_{NAR}과 같은, 선천적으로 경쇄를 결여하는 항원 결합 분자, 또는 항체의 VH도메인의 모두 혹은 일부분 또는 VL 도메인의 모두 혹은 일부분을 포함하는 항체 단편을 들 수 있다. 항체의 VH/VL 도메인의 모두 혹은 일부분을 포함하는 항체 단편인 단도메인 항체의 예로서, 그것만으로 한정되지 않지만, 예를 들어, 미국 특허 제6,248,516호 B1 등에 기재되어 있는 바와 같은 인간 항체 VH 또는 인간 항체 VL로부터 출발하여 인공적으로 제작된 단도메인 항체를 들 수 있다. 본 발명의 몇 가지 실시태양에 있어서, 1개의 단도메인 항체는 3개의 CDR(CDR1, CDR2 및 CDR3)를 갖는다.
- [0302] 단도메인 항체는, 단도메인 항체를 산생할 수 있는 동물로부터, 또는 단도메인 항체를 산생할 수 있는 동물을 면역하는 것에 의해 취득할 수 있다. 단도메인 항체를 산생할 수 있는 동물의 예로서, 그것만으로 한정되지 않지만, 예를 들어, 낙타과 동물, 단도메인 항체를 산생할 수 있는 유전자가 도입된 유전자 도입 동물(transgenic animals)을 들 수 있다. 낙타과 동물은 낙타, 라마, 알파카, 단봉낙타 및 과나코 등을 포함한다. 단도메인 항체를 산생할 수 있는 유전자가 도입된 유전자 도입 동물의 예로서, 그것만으로 한정되지 않지만, 국제 공개 WO2015/143414호, 미국 특허 공개 US2011/0123527호 A1에 기재된 유전자 도입 동물을 들 수 있다. 동물로부터 취득한 단도메인 항체의 프레임워크 서열을 인간 점라인(Germline) 서열 혹은 그것에 유사한 서열로 함으로써, 인간화한 단도메인 항체를 취득할 수도 있다. 인간화한 단도메인 항체(예를 들어, 인간화 V_HH)는 또한, 본 발명의 단도메인 항체의 일 실시태양이다.
- [0303] 또한, 단도메인 항체는, 단도메인 항체를 포함하는 폴리펩티드 라이브러리로부터, ELISA, 패닝 등에 의해 취득할 수 있다. 단도메인 항체를 포함하는 폴리펩티드 라이브러리의 예로서, 그것만으로 한정되지 않지만, 예를 들어, 각종 동물 혹은 인간으로부터 취득한 나이브 항체 라이브러리(예: Methods in Molecular Biology 2012 911 (65-78), Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics 2006 1764:8 (1307-1319)), 각종 동물을 면역함으로써 취득한 항체 라이브러리(예: Journal of Applied Microbiology 2014 117:2 (528-536)), 또는 각종 동물 혹은 인간의 항체 유전자로부터 작성한 합성 항체 라이브러리(예: Journal of Biomolecular Screening 2016 21:1 (35-43), Journal of Biological Chemistry 2016 291:24 (12641-12657), AIDS 2016 30:11 (1691-1701))를 들 수 있다.
- [0304] 본 명세서에 있어서, 「항원」은 항원 결합 도메인이 결합하는 에피토프를 포함하는 것만으로 제한된다. 항원의 적합한 예로서, 그것만으로 한정되지 않지만, 예를 들어, 동물 또는 인간 유래의 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 등을 들 수 있다. 표적 조직에 기인하는 질환을 치료하기 위해서 이용되는 항원의 적합한 예로서, 그것만으로 한정되지 않지만, 예를 들어, 표적 세포(예: 암세포, 염증 세포)의 표면에 발현하는 분자나, 표적 세포를 포함하는 조직 중의 다른 세포 표면에 발현하는 분자, 표적 세포와 표적 세포를 포함하는 조직에 대해서 면역학적 역할을 갖는 세포의 표면에 발현하는 분자, 표적 세포를 포함하는 조직의 간질 중에 존재하는 대분자 등을 들 수 있다.
- [0305] 항원으로서의 하기와 같은 분자: 17-1A, 4-1BB, 4Dc, 6-케토-PGF1a, 8-ISO-PGF2a, 8-옥소-dG, A1 아데노신 수

용체, A33, ACE, ACE-2, 액티빈, 액티빈 A, 액티빈 AB, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 RIA, 액티빈 RIA ALK-2, 액티빈 RIB ALK-4, 액티빈 RIIA, 액티빈 RIIB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, 어드레신, aFGF, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, 알파-1-안티트립신, 알파-V/베타-1 안 타고니스트, ANG, Ang, APAF-1, APE, APJ, APP, APRIL, AR, ARC, ART, 아르테민, 항Id, ASPARTIC, 심방성 나트륨 이노 인자, av/b3 인테그린, Ax1, b2M, B7-1, B7-2, B7-H, B-림프구 자극 인자(BlyS), BACE, BACE-1, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bcl, BCMA, BDNF, b-ECGF, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, BMP, BMP-2 BMP-2 a, BMP-3 오스테오게닌(Osteogenin), BMP-4 BMP-2b, BMP-5, BMP-6 Vgr-1, BMP-7(OP-1), BMP-8(BMP-8a, OP-2), BMPR, BMPR-IA(ALK-3), BMPR-IB(ALK-6), BRK-2, RPK-1, BMPR-II(BRK-3), BMP, b-NGF, BOK, 봄베신, 골(骨)유래 신경 영양 인자, BPDE, BPDE-DNA, BTC, 보체 인자 3(C3), C3a, C4, C5, C5a, C10, CA125, CAD-8, 칼시토닌, cAMP, 암태아성 항원(CEA), 암관련 항원, 카텡신 A, 카텡신 B, 카텡신 C/DPPI, 카텡신 D, 카텡신 E, 카텡신 H, 카텡신 L, 카텡신 O, 카텡신 S, 카텡신 V, 카텡신 X/Z/P, CBL, CCI, CCK2, CCL, CCL1, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCR, CCR1, CCR10, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27L, CD28, CD29, CD30, CD30L, CD32, CD33(p67 단백질), CD34, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD49a, CD52, CD54, CD55, CD56, CD61, CD64, CD66e, CD74, CD80(B7-1), CD89, CD95, CD123, CD137, CD138, CD140a, CD146, CD147, CD148, CD152, CD164, CEACAM5, CFTR, cGMP, CINC, 보툴리누스균 독소, 웰슈균 독소, CKb8-1, CLC, CMV, CMV UL, CNTF, CNTN-1, COX, C-Ret, CRG-2, CT-1, CTACK, CTGF, CTLA-4, PD1, PDL1, LAG3, TIM3, galectin-9, CX3CL1, CX3CR1, CXCL, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, 사이토케라틴 종양 관련 항원, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, 보체 제어 인자(Decay accelerating factor), des(1-3)-IGF-I(뇌IGF-1), Dhh, 디곡신, DNAM-1, Dnase, Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR(ErbB-1), EMA, EMMPRIN, ENA, endothelin 수용체, 엔케파리나제, eNOS, Eot, 에오타신 1, EpCAM, 에프린 B2/EphB4, EPO, ERCC, E-셀렉틴, ET-1, 팩터 IIa, 팩터 VII, 팩터 VIIIc, 팩터 IX, 섬유아세포 활성화 단백질(FAP), Fas, FcR1, FEN-1, 페리틴, FGF, FGF-19, FGF-2, FGF3, FGF-8, FGFR, FGFR-3, 피브린, FL, FLIP, F1t-3, F1t-4, 난포 자극 호르몬, 프랙탈카인, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, G250, Gas6, GCP-2, GCSF, GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-3(Vgr-2), GDF-5(BMP-14, CDMP-1), GDF-6(BMP-13, CDMP-2), GDF-7(BMP-12, CDMP-3), GDF-8(미오스타틴), GDF-9, GDF-15(MIC-1), GDNF, GDNF, GFAP, GFRa-1, GFR-알파 1, GFR-알파 2, GFR-알파 3, GITR, 글루카곤, Glut4, 당단백질 IIb/IIIa(GPIIb/IIIa), GM-CSF, gp130, gp72, GRO, 성장 호르몬 방출 인자, 하프텐(NP-cap 또는 NIP-cap), HB-EGF, HCC, HCMV gB 엔벨로프 당단백질, HCMV gH 엔벨로프 당단백질, HCMV UL, 조혈 성장 인자(HGF), Hep B gp120, 헤파라나제, Her2, Her2/neu(ErbB-2), Her3(ErbB-3), Her4(ErbB-4), 단순 포진 바이러스(HSV) gB 당단백질, HSV gD 당단백질, HGFA, 고분자량 흑색종 관련 항원(HMW-MAA), HIV gp120, HIV IIIB gp 120 V3루프, HLA, HLA-DR, HM1. 24, HMF G PEM, HRG, Hrk, 인간 심장 미오신, 인간 사이토메갈로바이러스(HCMV), 인간 성장 호르몬(HGH), HVEM, I-309, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-3, ICE, ICOS, IFNg, Ig, IgA 수용체, IgE, IGF, IGF 결합 단백질, IGF-1R, IGFBP, IGF-I, IGF-II, IL, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-5R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-18 R, IL-21, IL-23, IL-27, 인터페론(INF)-알파, INF-베타, INF-감마, 인히 빈, iNOS, 인슐린 A쇄, 인슐린 B쇄, 인슐린-유사 증식 인자 1, 인테그린 알파 2, 인테그린 알파 3, 인테그린 알파 4, 인테그린 알파 4/베타 1, 인테그린 알파 4/베타 7, 인테그린 알파 5(알파 V), 인테그린 알파 5/베타 1, 인테그린 알파 5/베타 3, 인테그린 알파 6, 인테그린 베타 1, 인테그린 베타 2, 인터페론 감마, IP-10, I-TAC, JE, 칼리크레인 2, 칼리크레인 5, 칼리크레인 6, 칼리크레인 11, 칼리크레인 12, 칼리크레인 14, 칼리크레인 15, 칼리크레인 L1, 칼리크레인 L2, 칼리크레인 L3, 칼리크레인 L4, KC, KDR, 케라티노사이트 증식 인자(KGF), 라미닌 5, LAMP, LAP, LAP(TGF-1), 잠재적 TGF-1, 잠재적 TGF-1 bp1, LBP, LDGF, LECT2, 레프티, 루이스-Y 항원, 루이스-Y 관련 항원, LFA-1, LFA-3, Lfo, LIF, LIGHT, 리포단백질, LIX, LKN, Lptn, L-셀렉틴, LT-a, LT-b, LTb4, LTBP-1, 폐 표면, 황체 형성 호르몬, 림포톡신 베타 수용체, Mac-1, MAdCAM, MAG, MAP2, MARC, MCAM, MCAM, MCK-2, MCP, M-CSF, MDC, Mer, METALLOPROTEASES, MGDF 수용체, MGMT, MHC(HLA-DR), MIF, MIG, MIP, MIP-1-알파, MK, MMAC1, MMP, MMP-1, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-2, MMP-24, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MPlF, Mpo, MSK, MSP, 무틴(Muc1), MUC18, 뮐러관 억제 물질, Mug, MuSK, NAIP, NAP, NCAD, N-C 아드헤린, NCA 90, NCAM, NCAM, 네프리라인, 뉴로트로핀-3, -4, 또는 -6, 뉴르투린, 신경 성장 인자(NGF), NGFR, NGF-베타, nNOS, NO, NOS, Npn, NRG-3, NT, NTN, OB, OGG1, OPG, OPN, OSM, OX40L,

OX40R, p150, p95, PADPr, 부갑상선 호르몬, PARC, PARP, PBR, PBSF, PCAD, P-카드헤린, PCNA, PDGF, PDK-1, PECAM, PEM, PF4, PGE, PGF, PGI2, PGJ2, PIN, PLA2, 태반성 알칼리포스파타제(PLAP), PIGF, PLP, PP14, 프로인슐린, 프로렐렉신, 프로테인 C, PS, PSA, PSCA, 전립선 특이적 막항원(PSMA), PTEN, PTHrp, Ptk, PTN, R51, RANK, RANKL, RANTES, RANTES, 렐렉신 A쇄, 렐렉신 B쇄, 레닌, 호흡기 다핵체 바이러스(RSV) F, RSV Fgp, Ret, 리우마이드 인자, RLIP76, RPA2, RSK, S100, SCF/KL, SDF-1, SERINE, 혈청알부민, sFRP-3, Shh, SIGIRR, SK-1, SLAM, SLPI, SMAC, SMDF, SMOH, SOD, SPARC, Stat, STEAP, STEAP-II, TACE, TACI, TAG-72(종양 관련 당단백질-72), TARC, TCA-3, T 세포 수용체(예를 들어, T 세포 수용체 알파/베타), TdT, TECK, TEM1, TEM5, TEM7, TEM8, TERT, 고환 PLAP-유사 알칼리포스파타제, Tfr, TGF, TGF-알파, TGF-베타, TGF-베타 Pan Specific, TGF-베타 RI(ALK-5), TGF-베타 RII, TGF-베타 RIIb, TGF-베타 RIII, TGF-베타 1, TGF-베타 2, TGF-베타 3, TGF-베타 4, TGF-베타 5, 트롬빈, 흉선 Ck-1, 갑상선 자극 호르몬, Tie, TIMP, TIQ, 조직 인자, TMEFF2, Tmpo, TMRSS2, TNF, TNF-알파, TNF-알파 베타, TNF-베타 2, TNFc, TNF-RI, TNF-RII, TNFRSF10A(TRAIL R1 Apo-2, DR4), TNFRSF10B(TRAIL R2 DR5, KILLER, TRICK-2 A, TRICK-B), TNFRSF10C(TRAIL R3 DcR1, LIT, TRID), TNFRSF10D(TRAIL R4 DcR2, TRUNDD), TNFRSF11A(RANK ODF R, TRANCE R), TNFRSF11B(OPG OCIF, TR1), TNFRSF12(TWEAK R FN14), TNFRSF13B(TAC1), TNFRSF13C(BAFF R), TNFRSF14(HVEM ATAR, HveA, LIGHT R, TR2), TNFRSF16(NGFR p75NTR), TNFRSF17(BCMA), TNFRSF18(GITR AITR), TNFRSF19(TROY TAJ, TRADE), TNFRSF19L(RELT), TNFRSF1A(TNF RI CD120a, p55-60), TNFRSF1B(TNF RII CD120b, p75-80), TNFRSF26(TNFRH3), TNFRSF3(LTbR TNF RIII, TNFC R), TNFRSF4(OX40 ACT35, TXGP1 R), TNFRSF5(CD40 p50), TNFRSF6(Fas Apo-1, APT1, CD95), TNFRSF6B(DcR3 M68, TR6), TNFRSF7(CD27), TNFRSF8(CD30), TNFRSF9(4-1BB CD137, ILA), TNFRSF21(DR6), TNFRSF22(DcTRAIL R2 TNFRH2), TNFRST23(DcTRAIL R1 TNFRH1), TNFRSF25(DR3 Apo-3, LARD, TR-3, TRAMP, WSL-1), TNFSF10(TRAIL Apo-2 리간드, TL2), TNFSF11(TRANCE/RANK 리간드 ODF, OPG 리간드), TNFSF12(TWEAK Apo-3 리간드, DR3 리간드), TNFSF13(APRIL TALL2), TNFSF13B(BAFF BLYS, TALL1, THANK, TNFSF20), TNFSF14(LIGHT HVEM 리간드, LTg), TNFSF15(TL1A/VEGI), TNFSF18(GITR 리간드 AITR 리간드, TL6), TNFSF1A(TNF-a 코넥틴(Conectin), DIF, TNFSF2), TNFSF1B(TNF-b LTa, TNFSF1), TNFSF3(LTb TNFC, p33), TNFSF4(OX40 리간드 gp34, TXGP1), TNFSF5(CD40 리간드 CD154, gp39, HIGM1, IMD3, TRAP), TNFSF6(Fas 리간드 Apo-1 리간드, APT1 리간드), TNFSF7(CD27 리간드 CD70), TNFSF8(CD30 리간드 CD153), TNFSF9(4-1BB 리간드 CD137 리간드), TP-1, t-PA, Tpo, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANCE, 트랜스페린 수용체, TRF, Trk, TROP-2, TLR(Toll-like receptor) 1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TSG, TSLP, 종양 관련 항원 CA125, 종양 관련 항원 발현 루이스 Y 관련 탄수화물, TWEAK, TXB2, Ung, uPAR, uPAR-1, 유로키나제, VCAM, VCAM-1, VECAD, VE-Cadherin, VE-cadherin-2, VEGFR-1(flt-1), VEGF, VEGFR, VEGFR-3(flt-4), VEGI, VIM, 바이러스 항원, VLA, VLA-1, VLA-4, VNR 인테그린, 폰 빌레브란트 인자, WIF-1, WNT1, WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, XCL1, XCL2, XCR1, XCR1, XEDAR, XIAP, XPD, HMGB1, IgA, Aβ, CD81, CD97, CD98, DDR1, DKK1, EREG, Hsp90, IL-17/IL-17R, IL-20/IL-20R, 산화 LDL, PCSK9, prekallikrein, RON, TMEM16F, SOD1, Chromogranin A, Chromogranin B, tau, VAP1, 고분자 키니노젠, IL-31, IL-31R, Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9, EPCR, C1, C1q, C1r, C1s, C2, C2a, C2b, C3, C3a, C3b, C4, C4a, C4b, C5, C5a, C5b, C6, C7, C8, C9, factor B, factor D, factor H, properdin, sclerostin, fibrinogen, fibrin, prothrombin, thrombin, 조직 인자, factor V, factor Va, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor VIIa, factor IX, factor IXa, factor X, factor Xa, factor XI, factor XIa, factor XII, factor XIIa, factor XIII, factor XIIIa, TFPI, antithrombin III, EPCR, 트롬보모듈린, TAPI, tPA, plasminogen, plasmin, PAI-1, PAI-2, GPC3, Syndecan-1, Syndecan-2, Syndecan-3, Syndecan-4, LPA, S1P 및 호르몬 및 성장 인자를 위한 수용체가 예시될 수 있다.

[0306] 상기의 항원의 예시에는 수용체도 기재되지만, 이들 수용체가 생체액 중에 가용형으로 존재하는 경우에도, 본 발명의 항원 결합 도메인이 결합하는 항원으로서 사용될 수 있다. 그와 같은 가용형 수용체의 비한정적인 일 태양으로서, 예를 들어, Mullberg 등(J. Immunol. (1994) 152 (10), 4958-4968)에 의해 기재되어 있는 바와 같은 가용형 IL-6R인, 서열 번호: 35로 표시되는 단백질이 예시될 수 있다.

[0307] 상기 항원의 예시에는, 세포막에 발현하는 막형 분자, 및 세포로부터 세포 외로 분비되는 가용형 분자가 포함된다. 본 발명의 항원 결합 도메인이 세포로부터 분비된 가용형 분자에 결합하는 경우, 당해 항원 결합 도메인으로는 중화 활성을 갖고 있는 것이 적합하다.

[0308] 가용형 분자가 존재하는 용액에 한정은 없고 생체액, 즉 생체 내의 맥관 또는 조직·세포의 사이를 채우는 모든 액체에 본 가용형 분자는 존재할 수 있다. 비한정적인 일 태양에서는, 본 발명의 항원 결합 도메인이 결합하는

가용형 분자는, 세포외액에 존재할 수 있다. 세포외액이란, 척추동물에서는 혈장, 조직간액, 림프액, 조밀한 결합 조직, 뇌척수액, 골수액, 천자액, 또는 관절액 등의 골 및 연골 중의 성분, 폐포액(기관지 폐포 세정액), 복수, 흉수, 심낭수, 낭포액, 또는 안방수(방수) 등의 세포 투과액(세포의 능동 수송·분비 활동의 결과 생긴 각종 선장 내의 액, 및 소화관강 그 외의 체강내액)의 총칭을 말한다.

[0309] 항원 중에 존재하는 항원 결정기를 의미하는 에피토프는, 본 명세서에 있어서 개시되는 항원 결합 도메인이 결합하는 항원 상의 부위를 의미한다. 따라서, 예를 들어, 에피토프는, 그 구조에 의해 정의될 수 있다. 또한, 당해 에피토프를 인식하는 항원 결합 도메인 중의 항원에 대한 결합 활성에 의해서도 당해 에피토프가 정의될 수 있다. 항원이 펩티드 또는 폴리펩티드인 경우에는, 에피토프를 구성하는 아미노산 잔기에 의해 에피토프를 특정하는 것도 가능하다. 또한, 에피토프가 당쇄인 경우에는, 특정한 당쇄 구조에 의해 에피토프를 특정하는 것도 가능하다.

[0310] 선상 에피토프는, 아미노산 1차 서열이 인식된 에피토프를 포함하는 에피토프이다. 선상 에피토프는, 전형적으로는, 적어도 3개, 및 가장 보통으로는 적어도 5개, 예를 들어 약 8 내지 약 10개, 6 내지 20개의 아미노산이 고유의 서열에 있어서 포함된다.

[0311] 입체 에피토프는, 선상 에피토프와는 대조적으로, 에피토프를 포함하는 아미노산의 1차 서열이, 인식된 에피토프의 단일한 규정 성분이 아닌 에피토프(예를 들어, 아미노산의 1차 서열이, 반드시 에피토프를 규정하는 항체에 의해 인식되지 않는 에피토프)이다. 입체 에피토프는, 선상 에피토프에 대해서 증대한 수의 아미노산을 포함할지도 모른다. 입체 에피토프의 인식에 관해서, 항원 결합 도메인은, 펩티드 또는 단백질의 삼차원 구조를 인식한다. 예를 들어, 단백질 분자가 작게 접혀 삼차원 구조를 형성하는 경우에는, 입체 에피토프를 형성하는 어떤 아미노산 및/또는 폴리펩티드 주쇄는, 병렬이 되어, 항체가 에피토프를 인식하는 것을 가능하게 한다. 에피토프의 입체 구조를 결정하는 방법에는, 예를 들어 X선 결정학, 2차원 핵자기 공명 분광학 및 부위 특이적인 스핀 표지 및 전자 상자성 공명 분광학이 포함되지만, 이것들로는 한정되지 않는다. 예를 들어, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology (1996), 제66권, Morris(편)를 참조.

[0312] 에피토프에 결합하는 항원 결합 도메인의 구조는 파라토프로 불린다. 에피토프와 파라토프 사이에 작용하는, 수소 결합, 정전기력, 반데르발스력, 소수 결합 등에 의해 에피토프와 파라토프는 안정되게 결합한다. 이 에피토프와 파라토프 사이의 결합력은 어피니티(affinity)로 불린다. 복수의 항원과 복수의 항원 결합 도메인이 결합할 때의 결합력의 총합은 어비디티(avidity)로 불린다. 복수의 항원 결합 도메인을 포함하는(즉 다가의) 항체 등이 복수의 에피토프에 결합하려면, 결합력(affinity)이 상승적으로 작용하기 때문에, 어비디티는 어피니티보다 높아진다.

[0313] 특정한 실시태양에 있어서, 본 명세서에서 제공되는 항원 결합 도메인은, $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100\text{nM}$, $\leq 10\text{nM}$, $\leq 1\text{nM}$, $\leq 0.1\text{nM}$, $\leq 0.01\text{nM}$ 또는 $\leq 0.001\text{nM}$ (예를 들어, 10^{-8}M 이하, 예를 들어 $10^{-8}\text{M} \sim 10^{-13}\text{M}$, 예를 들어 $10^{-9}\text{M} \sim 10^{-13}\text{M}$)의 해리 상수(Kd)를 갖는다.

[0314] 이하에 IL-6R에 대한 항원 결합 도메인, 또는 항원 결합 도메인을 포함하는 폴리펩티드에 의한 에피토프로의 결합의 확인 방법이 예시되지만, IL-6R 이외의 항원에 대한 항원 결합 도메인, 또는 항원 결합 도메인을 포함하는 폴리펩티드에 의한 에피토프로의 결합의 확인 방법도 이하의 예시에 준하여 적절히 실시될 수 있다.

[0315] 예를 들어, IL-6R에 대한 항원 결합 도메인이, IL-6R 분자 중에 존재하는 선상 에피토프를 인식하는 것은, 예를 들어 다음과 같이 하여 확인할 수 있다. 상기의 목적을 위해서 IL-6R의 세포외 도메인을 구성하는 아미노산 서열로 이루어지는 선상의 펩티드가 합성된다. 당해 펩티드는, 화학적으로 합성될 수 있다. 혹은, IL-6R의 cDNA 중의, 세포외 도메인에 상당하는 아미노산 서열을 코딩하는 영역을 이용하여, 유전자 공학적 수법에 의해 얻어진다. 다음에, 세포외 도메인을 구성하는 아미노산 서열로 이루어지는 선상 펩티드와, IL-6R에 대한 항원 결합 도메인의 결합 활성이 평가된다. 예를 들어, 고정화된 선상 펩티드를 항원으로 하는 ELISA에 의해, 당해 펩티드에 대한 당해 항원 결합 도메인의 결합 활성이 평가될 수 있다. 혹은, IL-6R 발현 세포에 대한 당해 항원 결합 도메인의 결합에 있어서의, 선상 펩티드에 의한 저해의 레벨에 기초하여, 선상 펩티드에 대한 결합 활성이 밝혀질 수 있다. 이들 시험에 의해, 선상 펩티드에 대한 당해 항원 결합 도메인의 결합 활성이 밝혀질 수 있다.

[0316] 또한, IL-6R에 대한 항원 결합 도메인이 입체 에피토프를 인식하는 것은, 다음과 같이 하여 확인할 수 있다. 상기의 목적을 위해서, IL-6R을 발현하는 세포가 조제된다. IL-6R에 대한 항원 결합 도메인이 IL-6R 발현 세포에 접촉했을 때에 당해 세포에 강하게 결합하는 한편으로, 당해 항원 결합 도메인이 고정화된 IL-6R의 세포외

도메인을 구성하는 아미노산 서열로 이루어지는 선상 펩티드에 대해서, 또는 당해 항원 결합 도메인이 구아니딘 등의 일반적인 변성제를 이용하여 변성된 IL-6R의 세포외 도메인을 구성하는 아미노산 서열로 이루어지는 선상 펩티드에 대해서 실질적으로 결합하지 않을 때 등을 들 수 있다. 여기에서, 실질적으로 결합하지 않는다면, 인간 IL-6R 발현 세포에 대한 결합 활성의 80% 이하, 통상 50% 이하, 바람직하게는 30% 이하, 특히 바람직하게는 15% 이하의 결합 활성을 말한다.

[0317] 또한, 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 확인하는 방법으로서, 예를 들어, 방사성 표지 항원 결합 측정법 (radiolabeled antigen binding assay: RIA)에 의해 Kd치를 측정하는 방법이 있다. 일 실시태양에 있어서, RIA는, 목적하는 항원 결합 도메인 및 그 항원을 이용하여 실시된다. 예를 들어, 항원에 대한 항원 결합 도메인의 용액 중 결합 어피니티는, 비표지 항원의 점증량 계열의 존재하에서 최소 농도의 (125I) 표지 항원에 의해 항원 결합 도메인을 평형화시키고, 그 다음에 결합한 항원을 항원 결합 도메인으로 코팅된 플레이트에 의해 포착하는 것에 의해 측정된다. (예를 들어, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)을 참조).

[0318] 다른 실시태양에 의하면, Kd는, BIACORE(등록상표)를 이용한 표면 플라즈몬 공명법으로 측정된다. 예를 들어, BIACORE(등록상표)-2000 또는 BIACORE(등록상표)-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)을 이용하는 측정법이, 대략 10 반응 단위(response unit: RU)의 항원이 고정된 CM5 칩을 이용하여 25°C에서 실시된다. 일 실시태양에 있어서, 카복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩(CM5, BIACORE, Inc.)은, 공급원의 지시에 따라 N-에틸-N'-(3-다이메틸아미노프로필)-카보다이이미드 하이드로클로라이드(EDC) 및 N-하이드록시석신이미드(NHS)를 이용하여 활성화된다. 항원은, 대략 10 반응 단위(RU)의 단백질의 결합을 달성하도록, 5 μl/분의 유속으로 주입되기 전에, 10mM 아세트산 나트륨, pH 4.8을 이용하여 5 μg/ml(대략 0.2 μM)로 희석된다. 항원의 주입 후, 미반응기를 블로킹하기 위해서 1M 에탄올 아민이 주입된다. 키네틱스의 측정을 위해서, 25°C, 대략 25 μl/분의 유속으로, 0.05% 폴리스อร์베이트 20(TWEEN-20(상표)) 계면활성제 함유 PBS(PBST) 중의 항원 결합 도메인의 2배 단계 희석물(0.78nM~500nM)이 주입된다. 결합 속도(kon) 및 해리 속도(koff)는, 단순한 1대1 랭뮤어 결합 모델(BIACORE(등록상표) 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 이용하여, 결합 및 해리의 센서그램을 동시에 피팅하는 것에 의해 계산된다. 평형 해리 상수(Kd)는, koff/kon비로서 계산된다. 더욱이, 평형법 해석을 이용함으로써, 겔보기 해리 상수(Kd)를 구하는 것도 가능하다. 이들 방법은 BIACORE(등록상표)에 부속되어 있는 프로토콜을 참조한다. 예를 들어, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)이나 Methods Enzymol. 2000:323:325-40.을 참조. 또한, 표면 플라즈몬 공명 어세이에 있어서, 고상화되는 단백질량이나 반응에 이용하는 단백질량, 온도, 용액 조성은 당업자이면 어떻게든 바꿀 수 있다. 상기의 표면 플라즈몬 공명 어세이에 의해 온 속도가 10⁶ M⁻¹ s⁻¹를 넘는 경우, 온 속도는, 분광계(예를 들어 스톱 플로식 분광 광도계(Aviv Instruments) 또는 교반 큐벳을 이용하는 8000 시리즈의 SLM-AMINCO(상표) 분광광도계(ThermoSpectronic))에 있어서 측정되는, 점증 농도의 항원의 존재하에서의 PBS, pH 7.2 중 20nM의 항원 결합 도메인의 25°C에서의 형광 발광 강도(여기=295nm; 발광=340nm, 밴드 패스 16nm)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 소광 기술을 이용하는 것에 의해 결정될 수 있다.

[0319] 더욱이, 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성은, 전기화학발광법 등, 기지의 분자간 상호작용의 측정 방법으로도 측정할 수 있다.

[0320] IL-6R에 대한 항원 결합 도메인의 IL-6R 발현 세포에 대한 결합 활성을 측정하는 방법으로서, 예를 들어, Antibodies A Laboratory Manual 기재의 방법(Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) 359-420)을 들 수 있다. 즉 IL-6R 발현 세포를 항원으로 하는 ELISA나 FACS(fluorescence activated cell sorting)의 원리에 의해 평가될 수 있다.

[0321] ELISA 포맷에 있어서, IL-6R에 대한 항원 결합 도메인의 IL-6R 발현 세포에 대한 결합 활성은, 효소 반응에 의해 생성되는 시그널 레벨을 비교하는 것에 의해 정량적으로 평가된다. 즉, IL-6R 발현 세포를 고정화한 ELISA 플레이트에 피험 폴리펩티드 회합체를 가하고, 세포에 결합한 피험 항원 결합 도메인이, 피험 항원 결합 도메인을 인식하는 효소 표지 항체를 이용하여 검출된다. 혹은 FACS에 있어서는, 피험 항원 결합 도메인의 희석 계열을 작성하고, IL-6R 발현 세포에 대한 항체 결합 역가(titer)를 결정하는 것에 의해, IL-6R 발현 세포에 대한 피험 항원 결합 도메인의 결합 활성이 비교될 수 있다.

[0322] 완충액 등으로 현탁한 세포 표면 상에 발현하고 있는 항원에 대한 피험 항원 결합 도메인의 결합은, 플로 사이토미터에 의해 검출할 수 있다. 플로 사이토미터로서는, 예를 들어, 다음과 같은 장치가 알려져 있다.

[0323] FACSCanto™ II

- [0324] FACSria™
- [0325] FACSArray™
- [0326] FACSvantage™ SE
- [0327] FACSCalibur™ (모두 BD Biosciences사의 상품명)
- [0328] EPICS ALTRA HyPerSort
- [0329] Cytomics FC 500
- [0330] EPICS XL-MCL ADC EPICS XL ADC
- [0331] Cell Lab Quanta / Cell Lab Quanta SC(모두 Beckman Coulter사의 상품명)
- [0332] 예를 들어, IL-6R에 대한 항원 결합 도메인의 항원에 대한 결합 활성의 적합한 측정 방법의 일례로서, 다음의 방법을 들 수 있다. 우선, IL-6R을 발현하는 세포와 반응시킨 피험 항원 결합 도메인을 인식하는 FITC 표지한 2차 항체로 염색한다. 피험 항원 결합 도메인을 적절히 적합한 완충액에 의해 희석하는 것에 의해, 당해 항원 결합 도메인이 원하는 농도로 조제하여 이용된다. 예를 들어, 10 µg/ml로부터 10ng/ml까지의 사이의 어느 것인가의 농도로 사용될 수 있다. 다음에, FACSCalibur(BD사)에 의해 형광 강도와 세포수가 측정된다. 당해 세포에 대한 항원 결합 도메인의 결합량은, CELL QUEST Software(BD사)를 이용하여 해석하는 것에 의해 얻어진 형광 강도, 즉 Geometric Mean의 값에 반영된다. 즉, 당해 Geometric Mean의 값을 얻는 것에 의해, 피험 항원 결합 도메인의 결합량에 의해 표시되는 피험 항원 결합 도메인의 결합 활성이 측정될 수 있다.
- [0333] IL-6R에 대한 항원 결합 도메인이, 어느 항원 결합 도메인과 에피토프를 공유하는 것은, 양자의 동일한 에피토프에 대한 경합에 의해 확인될 수 있다. 항원 결합 도메인간의 경합은, 교차 블로킹 어세이 등에 의해 검출된다. 예를 들어 경합 ELISA 어세이는, 바람직한 교차 블로킹 어세이이다.
- [0334] 구체적으로는, 교차 블로킹 어세이에 있어서는, 마이크로타이터 플레이트의 웰 상에 코팅한 IL-6R 단백질이, 후보가 되는 경합 항원 결합 도메인의 존재하, 또는 비존재하에서 프레인큐베이트된 후에, 피험 항원 결합 도메인이 첨가된다. 웰 중의 IL-6R 단백질에 결합한 피험 항원 결합 도메인의 양은, 동일한 에피토프의 결합에 대해서 경합하는 후보가 되는 경합 항원 결합 도메인의 결합능에 간접적으로 상관하고 있다. 즉 동일 에피토프에 대한 경합 항원 결합 도메인의 친화성이 커지면 커질수록, 피험 항원 결합 도메인의 IL-6R 단백질을 코팅한 웰로의 결합 활성은 저하된다.
- [0335] IL-6R 단백질을 개재시켜 웰에 결합한 피험 항원 결합 도메인의 양은, 미리 항원 결합 도메인을 표지해 두는 것에 의해, 용이하게 측정될 수 있다. 예를 들어, 비오틴 표지된 항원 결합 도메인은, 아비딘 퍼옥시다제 퀴즈게이트와 적절한 기질을 사용하는 것에 의해 측정된다. 퍼옥시다제 등의 효소 표지를 이용한 교차 블로킹 어세이는, 특히 경합 ELISA 어세이라고 한다. 항원 결합 도메인은, 검출 혹은 측정이 가능한 다른 표지 물질로 표시될 수 있다. 구체적으로는, 방사 표지 혹은 형광 표지 등이 공지이다.
- [0336] 후보인 경합 항원 결합 도메인 회합체의 비존재하에서 실시되는 컨트롤 시험에 있어서 얻어지는 결합 활성과 비교하여, 경합 항원 결합 도메인이, IL-6R에 대한 항원 결합 도메인의 결합을 적어도 20%, 바람직하게는 적어도 20-50%, 더욱 바람직하게는 적어도 50% 블로킹할 수 있다면, 당해 피험 항원 결합 도메인은 경합 항원 결합 도메인과 실질적으로 동일한 에피토프에 결합하거나, 또는 동일한 에피토프의 결합에 대해서 경합하는 항원 결합 도메인이다.
- [0337] IL-6R에 대한 항원 결합 도메인이 결합하는 에피토프의 구조가 동정되어 있는 경우에는, 피험 항원 결합 도메인과 대조 항원 결합 도메인이 에피토프를 공유하는 것은, 당해 에피토프를 구성하는 펩티드에 아미노산 변이를 도입한 펩티드 혹은 폴리펩티드에 대한 양자의 항원 결합 도메인의 결합 활성을 비교하는 것에 의해 평가될 수 있다.
- [0338] 이러한 결합 활성을 측정하는 방법으로서, 예를 들어, 상기의 ELISA 포맷에 있어서 변이를 도입한 선상의 펩티드에 대한 피험 항원 결합 도메인 및 대조 항원 결합 도메인의 결합 활성을 비교하는 것에 의해 측정될 수 있다. ELISA 이외의 방법으로서, 컬럼에 결합한 당해 변이 펩티드에 대한 결합 활성을, 당해 컬럼에 피검항원 결합 도메인과 대조 항원 결합 도메인을 유하(流下)시킨 후에 용출액 중에 용출되는 항원 결합 도메인을 정량하는 것에 의해서도 측정될 수 있다. 변이 펩티드를 예를 들어 GST와의 융합 펩티드로서 컬럼에 흡착시키는 방법

은 공지이다.

- [0339] 또한, 동정된 에피토프가 입체 에피토프인 경우에는, 피험 항원 결합 도메인과 대조 항원 결합 도메인이 에피토프를 공유하는 것은, 다음의 방법으로 평가될 수 있다. 우선, IL-6R을 발현하는 세포와 에피토프에 변이가 도입된 IL-6R을 발현하는 세포가 조제된다. 이들 세포가 PBS 등의 적절한 완충액에 현탁된 세포 현탁액에 대해서 피험 항원 결합 도메인과 대조 항원 결합 도메인이 첨가된다. 그 다음에, 적절히 완충액으로 세정된 세포 현탁액에 대해서, 피험 항원 결합 도메인과 대조 항원 결합 도메인을 인식할 수 있는 FITC 표지된 항체가 첨가된다. 표지 항체에 의해 염색된 세포의 형광 강도와 세포수가 FACSCalibur(BD사)에 의해 측정된다. 피험 항원 결합 도메인과 대조 항원 결합 도메인의 농도는 적절한 완충액에 의해 적절히 희석하는 것에 의해 원하는 농도로 조제하여 이용된다. 예를 들어, 10 μg/ml로부터 10ng/ml까지의 사이의 어느 것인가의 농도로 사용된다. 당해 세포에 대한 표지 항체의 결합량은, CELL QUEST Software(BD사)를 이용하여 해석하는 것에 의해 얻어진 형광 강도, 즉 Geometric Mean의 값에 반영된다. 즉, 당해 Geometric Mean의 값을 얻는 것에 의해, 표지 항체의 결합량에 의해 표시되는 피험 항원 결합 도메인과 대조 항원 결합 도메인의 결합 활성을 측정할 수 있다.
- [0340] 더욱이, 항원 결합 도메인이 다른 항원 결합 도메인과 동일 에피토프에 대한 결합의 확인은, 상기의 ELISANA FACS 이외에, 방사성 표지 항원 결합 측정법 (radiolabeled antigen binding assay: RIA), BIACORE(등록상표) 표면 플라즈몬 공명 어레이, 전기 화학 발광법 등을 이용할 수도 있다.
- [0341] 본 방법에 있어서, 예를 들어 「변이 IL-6R 발현 세포에 실질적으로 결합하지 않는다」는 것은, 이하의 방법에 의해 판단할 수 있다. 우선, 변이 IL-6R을 발현하는 세포에 대해서 결합한 피험 항원 결합 도메인과 대조 항원 결합 도메인이, 표지 항체로 염색된다. 그 다음에 세포의 형광 강도가 검출된다. 형광 검출에 플로 사이토메트리로서 FACSCalibur를 이용했을 경우, 얻어진 형광 강도는 CELL QUEST Software를 이용하여 해석될 수 있다. 폴리펩티드 회합체 존재하 및 비존재하에서의 Geometric Mean의 값으로부터, 이 비교치(ΔGeo-Mean)를 하기의 식 1에 기초하여 산출하는 것에 의해, 항원 결합 도메인의 결합에 의한 형광 강도의 증가 비율을 구할 수 있다.
- [0342] (식 1)
- [0343] $\Delta\text{Geo-Mean} = \text{Geo-Mean}(\text{폴리펩티드 회합체 존재하}) / \text{Geo-Mean}(\text{폴리펩티드 회합체 비존재하})$
- [0344] 해석에 의해 얻어지는 피험 항원 결합 도메인의 변이 IL-6R 발현 세포에 대한 결합량이 반영된 Geometric Mean 비교치(변이 IL-6R 분자 ΔGeo-Mean치)를, 피험 항원 결합 도메인의 IL-6R 발현 세포에 대한 결합량이 반영된 ΔGeo-Mean 비교치와 비교한다. 이 경우에 있어서, 변이 IL-6R 발현 세포 및 IL-6R 발현 세포에 대한 ΔGeo-Mean 비교치를 구할 때에 사용하는 피험 항원 결합 도메인의 농도는 서로 동일 또는 실질적으로 동일한 농도로 조제되는 것이 특히 바람직하다. 미리 IL-6R 중의 에피토프를 인식하고 있음이 확인된 항원 결합 도메인이, 대조 항원 결합 도메인으로서 이용된다.
- [0345] 피험 항원 결합 도메인의 변이 IL-6R 발현 세포에 대한 ΔGeo-Mean 비교치가, 피험 항원 결합 도메인의 IL-6R 발현 세포에 대한 ΔGeo-Mean 비교치의, 적어도 80%, 바람직하게는 50%, 더욱 바람직하게는 30%, 특히 바람직하게는 15%보다 작으면, 「변이 IL-6R 발현 세포에 실질적으로 결합하지 않는다」 것으로 한다. Geo-Mean치(Geometric Mean)를 구하는 계산식은, CELL QUEST Software User's Guide(BD biosciences사)에 기재되어 있다. 비교치를 비교하는 것에 의해 그것이 실질적으로 동일시킬 수 있을 정도이면, 피험 항원 결합 도메인과 대조 항원 결합 도메인의 에피토프는 동일하다고 평가될 수 있다.
- [0346] 본 명세서에서 용어 「운반 부분」은, 폴리펩티드 중의 항원 결합 도메인 이외의 부분을 말한다. 본 발명의 운반 부분은 통상, 아미노산에 의해 구성된 펩티드 또는 폴리펩티드이며, 구체적인 일 실시태양으로서, 폴리펩티드 중의 운반 부분은 절단 사이트를 개재시켜 항원 결합 도메인과 연결되어 있다. 본 발명의 운반 부분은, 아미드 결합에 의해 연결된 일련의 펩티드 혹은 폴리펩티드여도 되고, 복수의 펩티드 혹은 폴리펩티드가 다이실라이드 결합 등의 공유 결합 혹은 수소 결합, 소수성 상호작용 등의 비공유 결합에 의해 형성된 복합체여도 된다.
- [0347] 본 발명의 운반 부분은, 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 억제하는 억제 도메인을 갖는다. 본 명세서에 있어서 용어 「억제 도메인」은, 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 억제하는 것으로 제한된다. 억제 도메인은, 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 억제할 수 있는 한 어떠한 구조의 도메인도 사용될 수 있다. 그와 같은 억제 도메인의 예로서, 그것만으로 한정하는 것은 아니지만, 예를 들어, 항체의 중쇄 가변 영역(VH), 항체의 경쇄 가변 영역(VL), 프리B 세포 리셉터, 및 단도메인 항체를 들 수 있다. 억제 도메인은, 운반 부분의 전부에 의해 구성되어도, 운반 부분의 일부에 의해 구성되어도 된다.

- [0348] 본 발명의 몇 가지 실시태양에 있어서, 항원 결합 도메인이 폴리펩티드로부터 유리됨으로써, 항원 결합 활성이 유리 전보다 높아진다. 바꾸어 말하면, 항원 결합 도메인이 폴리펩티드로부터 유리되어 있지 않은 상태에서는, 그 항원 결합 활성은 억제 도메인에 의해 억제된 상태에 있다. 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성이 억제 도메인에 의해 억제되는 것을 확인하는 방법으로서, FACS(fluorescence activated cell sorting), ELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), ECL(electrogenenerated chemiluminescence, 전기 화학 발광법), SPR(Surface Plasmon Resonance, 표면 플라즈몬 공명)법(Biacore), BLI(Bio-Layer Interferometry)법(Octet) 등의 방법이 있다. 본 발명의 몇 가지 실시태양에 있어서, 항원 결합 도메인이 폴리펩티드로부터 유리되어 있지 않은 상태에 있어서의 결합 활성에 비해, 항원 결합 도메인이 폴리펩티드로부터 유리된 상태에 있어서의 항원 결합 활성은, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 600배, 700배, 800배, 900배, 1000배, 2000배, 또는 3000배 이상의 값이 된다. 본 발명의 보다 구체적인 몇 가지 실시태양에 있어서, 유리 전의 항원 결합 도메인은, 상기 방법 중에서 선택되는 하나의 방법으로 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성의 측정을 행할 때, 항원 결합 도메인과 항원의 결합이 보이지 않는다.
- [0349] 본 발명의 몇 가지 태양에 있어서, 절단 사이트가 절단되는 것에 의해 항원 결합 도메인이 폴리펩티드로부터 유리 가능하게 되므로, 이와 같은 태양에 있어서의 항원 결합 활성의 비교는, 폴리펩티드의 절단 전후의 항원 결합 활성을 비교하는 것에 의해 행할 수 있다. 즉, 미절단의 폴리펩티드를 이용하여 측정된 항원 결합 활성에 비해, 절단 후의 폴리펩티드를 이용하여 측정된 항원 결합 활성은, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 600배, 700배, 800배, 900배, 1000배, 2000배, 또는 3000배 이상의 값이 된다. 보다 구체적인 몇 가지 실시태양에 있어서, 미절단의 폴리펩티드는, 상기 방법 중에서 선택되는 하나의 방법으로 항원 결합 활성의 측정을 행할 때, 항원 결합 도메인과 항원의 결합이 보이지 않는다.
- [0350] 본 발명의 몇 가지 태양에 있어서, 절단 사이트는 프로테아제에 의해 절단되므로, 이와 같은 태양에 있어서의 항원 결합 활성의 비교는, 폴리펩티드의 프로테아제 처리 전후의 항원 결합 활성을 비교하는 것에 의해 행할 수 있다. 즉, 프로테아제 처리를 행하지 않은 폴리펩티드를 이용하여 측정된 항원 결합 활성에 비해, 프로테아제 처리 후의 폴리펩티드를 이용하여 측정된 항원 결합 활성은, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 600배, 700배, 800배, 900배, 1000배, 2000배, 또는 3000배 이상의 값이 된다. 보다 구체적인 몇 가지 실시태양에 있어서, 프로테아제 미처리의 폴리펩티드는, 상기 방법 중에서 선택되는 하나의 방법으로 항원 결합 활성의 측정을 행할 때, 항원 결합 도메인과 항원의 결합이 보이지 않는다.
- [0351] 본 발명에 있어서, 단독으로 존재하고 있는 항원 결합 도메인에 비해, 항원 결합 도메인과 운반 부분을 포함하는 폴리펩티드는 보다 긴 혈중반감기를 갖는다. 폴리펩티드의 반감기를 보다 길게 하기 위해서, 본 발명의 몇 가지 실시태양에 있어서, 운반 부분은 보다 긴 혈중반감기를 갖도록 설계되고 있다. 운반 부분의 혈중반감기를 연장하는 실시태양의 예로서, 그것만으로 한정되지 않지만, 운반 부분의 분자량이 큰 것, 또는 운반 부분이 FcRn 결합성을 갖는 것, 또는 운반 부분이 알부민 결합성을 갖는 것, 또는 운반 부분이 PEG화되고 있는 것을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 몇 가지 실시태양에 있어서, 운반 부분은 항원 결합 도메인보다 긴 혈중반감기(바꾸어 말하면, 항원 결합 도메인은 운반 부분보다 짧은 혈중반감기)를 갖는다.
- [0352] 본 발명에 있어서, 항원 결합 도메인 단독과 폴리펩티드의 반감기 비교, 또는 항원 결합 도메인과 운반 부분의 혈중반감기 비교는, 인간에 있어서의 혈중반감기에서 비교하는 것이 바람직하다. 인간에서의 혈중반감기를 측정하는 것이 곤란한 경우에는, 마우스(예를 들어, 정상 마우스, 인간 항원 발현 트랜스제닉 마우스, 인간 FcRn 발현 트랜스제닉 마우스 등) 또는 원숭이(예를 들어, 필리핀원숭이 등)에서의 혈중반감기를 기초로, 인간에서의 혈중반감기를 예측할 수 있다.
- [0353] 운반 부분의 혈중반감기를 연장하는 일 실시태양으로서, 운반 부분의 분자량이 큰 것을 들 수 있다. 운반 부분의 혈중반감기를 항원 결합 도메인의 혈중반감기보다 길게 하는 일 실시태양으로서, 운반 부분의 분자량을 항원 결합 도메인의 분자량보다 크게 하는 것을 들 수 있다.
- [0354] 운반 부분의 혈중반감기를 연장하는 일 실시태양으로서, 운반 부분에 FcRn 결합성을 갖게 하는 것을 들 수 있다. 운반 부분에 FcRn 결합성을 갖게 하려면, 통상, 운반 부분 중에 FcRn 결합 영역을 마련하는 방법이 있다. FcRn 결합 영역이란, FcRn에 결합성을 가지는 영역을 말하고, FcRn에의 결합성을 가지는 한 어떤 구조라도 사용 가능하다.

- [0355] FcRn 결합 영역을 포함하는 운반 부분은, FcRn의 셀비지 경로에 의해 세포 내에 받아들여진 후에 다시 혈장 중으로 되돌아가는 것이 가능하다. 예를 들어, IgG 분자의 혈장중체류성이 비교적 긴(소실이 늦는) 것은, IgG 분자의 셀비지 리셉터로서 알려져 있는 FcRn이 기능하고 있기 때문이다. 피노사이토시스에 의해 엔도솜에 받아들여진 IgG 분자는, 엔도솜 내의 산성 조건하에 있어서 엔도솜 내에 발현하고 있는 FcRn에 결합한다. FcRn에 결합할 수 없었던 IgG 분자는 라이소솜으로 진행되어 거기서 분해되지만, FcRn에 결합한 IgG 분자는 세포 표면으로 이행하여 혈장 중의 중성 조건하에 있어서 FcRn으로부터 해리됨으로써 다시 혈장 중으로 되돌아간다.
- [0356] FcRn 결합 영역은, 직접 FcRn과 결합하는 영역인 것이 바람직하다. FcRn 결합 영역의 바람직한 예로서, 항체의 Fc 영역을 들 수 있다. 그렇지만, 알부민이나 IgG 등의 FcRn과의 결합능을 갖는 폴리펩티드에 결합 가능한 영역은, 알부민이나 IgG 등을 개재시켜 간접적으로 FcRn과 결합하는 것이 가능하므로, 본 발명에 있어서의 FcRn 결합 영역은 그와 같은 FcRn과의 결합능을 갖는 폴리펩티드에 결합하는 영역이어도 된다.
- [0357] 본 발명에 있어서의 FcRn 결합 영역의 FcRn, 특히 인간 FcRn에 대한 결합 활성은, 상기 결합 활성의 항에서 기술되고 있듯이, 당업자에게 공지된 방법에 의해 측정하는 것이 가능하고, 조건에 대해서는 당업자가 적절히 결정하는 것이 가능하다. 인간 FcRn으로의 결합 활성은, KD(Dissociation constant: 해리 상수), 겔보기 KD(Apparent dissociation constant: 겔보기 해리 상수), 해리 속도인 kd(Dissociation rate: 해리 속도), 또는 겔보기 kd(Apparent dissociation: 겔보기 해리 속도) 등으로서 평가될 수 있다. 이것들은 당업자 공지의 방법으로 측정될 수 있다. 예를 들어 Biacore(GE healthcare), 스캐처드 플롯, 플로 사이토미터 등을 사용할 수 있다.
- [0358] FcRn 결합 영역의 FcRn에 대한 결합 활성을 측정할 때의 조건은 당업자가 적절히 선택하는 것이 가능하고, 특별히 한정되지 않는다. 예를 들어, WO2009/125825에 기재되어 있듯이 MES 버퍼, 37°C의 조건에 있어서 측정될 수 있다. 또한, 본 발명의 FcRn 결합 영역의 FcRn에 대한 결합 활성의 측정은 당업자 공지의 방법에 의해 행하는 것이 가능하고, 예를 들어, Biacore(GE Healthcare) 등을 이용하여 측정될 수 있다. FcRn 결합 영역과 FcRn의 결합 활성의 측정은, FcRn 결합 영역 또는 FcRn 결합 영역을 포함하는 운반 부분 혹은 FcRn를 고정화한 칩에, 각각 FcRn 혹은 FcRn 결합 영역 또는 FcRn 결합 영역을 포함하는 운반 부분을 애닐라이트로서 흐르게 하는 것에 의해 평가될 수 있다.
- [0359] 측정 조건에 사용되는 pH로서, FcRn 결합 영역과 FcRn의 결합 어피니티는, pH 4.0~pH 6.5의 임의의 pH에서 평가해도 된다. 바람직하게는, FcRn 결합 영역과 인간 FcRn의 결합 어피니티를 결정하기 위해서, 생체 내의 조기 엔도솜 내의 pH에 가까운 pH 5.8~pH 6.0의 pH가 사용된다. 측정 조건에 사용되는 온도로서, FcRn 결합 영역과 FcRn의 결합 어피니티는, 10°C~50°C의 임의의 온도에서 평가해도 된다. 바람직하게는, FcRn 결합 영역과 인간 FcRn의 결합 어피니티를 결정하기 위해서, 15°C~40°C의 온도가 사용된다. 보다 바람직하게는, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 및 35°C의 어느 하나와 같은 20°C에서 35°C까지의 임의의 온도도 마찬가지로, FcRn 결합 영역과 FcRn의 결합 어피니티를 결정하기 위해서 사용된다. 25°C라고 하는 온도는 본 발명의 태양의 비한정적인 일례이다.
- [0360] FcRn 결합 영역의 하나의 예로서, 그것만으로 한정되지 않지만, 예를 들어, IgG 항체 Fc 영역을 들 수 있다. IgG 항체의 Fc 영역을 이용하는 경우, 그 종류는 한정되지 않고, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 등의 Fc 영역을 이용하는 것이 가능하다. 예를 들어, 서열 번호: 21, 22, 23, 24로 나타나는 아미노산 서열로부터 선택되는 하나의 서열을 포함하는 Fc 영역을 이용하는 것이 가능하다.
- [0361] 또한, 천연형 IgG 항체의 Fc 영역은 물론, FcRn 결합성을 갖는 한, 1개 또는 그 이상의 아미노산이 치환된 개변 Fc 영역도 사용 가능하다.
- [0362] 예를 들어, IgG 항체 Fc 영역에 있어서의 EU 넘버링 237번째, 238번째, 239번째, 248번째, 250번째, 252번째, 254번째, 255번째, 256번째, 257번째, 258번째, 265번째, 270번째, 286번째, 289번째, 297번째, 298번째, 303번째, 305번째, 307번째, 308번째, 309번째, 311번째, 312번째, 314번째, 315번째, 317번째, 325번째, 332번째, 334번째, 360번째, 376번째, 380번째, 382번째, 384번째, 385번째, 386번째, 387번째, 389번째, 424번째, 428번째, 433번째, 434번째 및 436번째로부터 선택되는 적어도 1개의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 아미노산 서열을 포함하는 개변 Fc 영역을 사용하는 것은 가능하다.
- [0363] 보다 구체적으로는, IgG 항체 Fc 영역에 있어서의 EU 넘버링
- [0364] 237번째의 Gly를 Met로 치환하는 아미노산 치환,

- [0365] 238번째의 Pro를 Ala로 치환하는 아미노산 치환,
- [0366] 239번째의 Ser를 Lys로 치환하는 아미노산 치환,
- [0367] 248번째의 Lys를 Ile로 치환하는 아미노산 치환,
- [0368] 250번째의 Thr를 Ala, Phe, Ile, Met, Gln, Ser, Val, Trp, 또는 Tyr로 치환하는 아미노산 치환,
- [0369] 252번째의 Met를 Phe, Trp, 또는 Tyr로 치환하는 아미노산 치환,
- [0370] 254번째의 Ser를 Thr로 치환하는 아미노산 치환,
- [0371] 255번째의 Arg를 Glu로 치환하는 아미노산 치환,
- [0372] 256번째의 Thr를 Asp, Glu, 또는 Gln으로 치환하는 아미노산 치환,
- [0373] 257번째의 Pro를 Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, 또는 Val로 치환하는 아미노산 치환,
- [0374] 258번째의 Glu를 His로 치환하는 아미노산 치환,
- [0375] 265번째의 Asp를 Ala로 치환하는 아미노산 치환,
- [0376] 270번째의 Asp를 Phe로 치환하는 아미노산 치환,
- [0377] 286번째의 Asn를 Ala 또는 Glu로 치환하는 아미노산 치환,
- [0378] 289번째의 Thr를 His로 치환하는 아미노산 치환,
- [0379] 297번째의 Asn를 Ala로 치환하는 아미노산 치환,
- [0380] 298번째의 Ser를 Gly로 치환하는 아미노산 치환,
- [0381] 303번째의 Val를 Ala로 치환하는 아미노산 치환,
- [0382] 305번째의 Val를 Ala로 치환하는 아미노산 치환,
- [0383] 307번째의 Thr를 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp, 또는 Tyr로 치환하는 아미노산 치환,
- [0384] 308번째의 Val를 Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Gln, 또는 Thr로 치환하는 아미노산 치환,
- [0385] 309번째의 Leu 또는 Val를 Ala, Asp, Glu, Pro, 또는 Arg로 치환하는 아미노산 치환,
- [0386] 311번째의 Gln를 Ala, His, 또는 Ile로 치환하는 아미노산 치환,
- [0387] 312번째의 Asp를 Ala 또는 His로 치환하는 아미노산 치환,
- [0388] 314번째의 Leu를 Lys 또는 Arg로 치환하는 아미노산 치환,
- [0389] 315번째의 Asn를 Ala 또는 His로 치환하는 아미노산 치환,
- [0390] 317번째의 Lys를 Ala로 치환하는 아미노산 치환,
- [0391] 325번째의 Asn를 Gly로 치환하는 아미노산 치환,
- [0392] 332번째의 Ile를 Val로 치환하는 아미노산 치환,
- [0393] 334번째의 Lys를 Leu로 치환하는 아미노산 치환,
- [0394] 360번째의 Lys를 His로 치환하는 아미노산 치환,
- [0395] 376번째의 Asp를 Ala로 치환하는 아미노산 치환,
- [0396] 380번째의 Glu를 Ala로 치환하는 아미노산 치환,
- [0397] 382번째의 Glu를 Ala로 치환하는 아미노산 치환,
- [0398] 384번째의 Asn 또는 Ser를 Ala로 치환하는 아미노산 치환,
- [0399] 385번째의 Gly를 Asp 또는 His로 치환하는 아미노산 치환,

- [0400] 386번째의 Gln를 Pro로 치환하는 아미노산 치환,
- [0401] 387번째의 Pro를 Glu로 치환하는 아미노산 치환,
- [0402] 389번째의 Asn를 Ala 또는 Ser로 치환하는 아미노산 치환,
- [0403] 424번째의 Ser를 Ala로 치환하는 아미노산 치환,
- [0404] 428번째의 Met를 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp, 또는 Tyr로 치환하는 아미노산 치환,
- [0405] 433번째의 His를 Lys로 치환하는 아미노산 치환,
- [0406] 434번째의 Asn를 Ala, Phe, His, Ser, Trp, 또는 Tyr로 치환하는 아미노산 치환, 및
- [0407] 436번째의 Tyr 또는 Phe를 His로 치환하는 아미노산 치환
- [0408] 으로부터 선택되는 적어도 1개의 아미노산 치환을 포함하는, 개변 Fc 영역을 사용하는 것은 가능하다.
- [0409] 다른 면에서 보면, IgG 항체 Fc 영역에 있어서의, EU 넘버링
- [0410] 237번째의 아미노산에 있어서의 Met,
- [0411] 238번째의 아미노산에 있어서의 Ala,
- [0412] 239번째의 아미노산에 있어서의 Lys,
- [0413] 248번째의 아미노산에 있어서의 Ile,
- [0414] 250번째의 아미노산에 있어서의 Ala, Phe, Ile, Met, Gln, Ser, Val, Trp, 또는 Tyr,
- [0415] 252번째의 아미노산에 있어서의 Phe, Trp, 또는 Tyr,
- [0416] 254번째의 아미노산에 있어서의 Thr,
- [0417] 255번째의 아미노산에 있어서의 Glu,
- [0418] 256번째의 아미노산에 있어서의 Asp, Glu, 또는 Gln,
- [0419] 257번째의 아미노산에 있어서의 Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, 또는 Val,
- [0420] 258번째의 아미노산에 있어서의 His,
- [0421] 265번째의 아미노산에 있어서의 Ala,
- [0422] 270번째의 아미노산에 있어서의 Phe,
- [0423] 286번째의 아미노산에 있어서의 Ala 또는 Glu,
- [0424] 289번째의 아미노산에 있어서의 His,
- [0425] 297번째의 아미노산에 있어서의 Ala,
- [0426] 298번째의 아미노산에 있어서의 Gly,
- [0427] 303번째의 아미노산에 있어서의 Ala,
- [0428] 305번째의 아미노산에 있어서의 Ala,
- [0429] 307번째의 아미노산에 있어서의 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp, 또는 Tyr,
- [0430] 308번째의 아미노산에 있어서의 Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Gln, 또는 Thr,
- [0431] 309번째의 아미노산에 있어서의 Ala, Asp, Glu, Pro, 또는 Arg,
- [0432] 311번째의 아미노산에 있어서의 Ala, His, 또는 Ile,
- [0433] 312번째의 아미노산에 있어서의 Ala 또는 His,

- [0434] 314번째의 아미노산에 있어서의 Lys 또는 Arg,
- [0435] 315번째의 아미노산에 있어서의 Ala 또는 His,
- [0436] 317번째의 아미노산에 있어서의 Ala,
- [0437] 325번째의 아미노산에 있어서의 Gly,
- [0438] 332번째의 아미노산에 있어서의 Val,
- [0439] 334번째의 아미노산에 있어서의 Leu,
- [0440] 360번째의 아미노산에 있어서의 His,
- [0441] 376번째의 아미노산에 있어서의 Ala,
- [0442] 380번째의 아미노산에 있어서의 Ala,
- [0443] 382번째의 아미노산에 있어서의 Ala,
- [0444] 384번째의 아미노산에 있어서의 Ala,
- [0445] 385번째의 아미노산에 있어서의 Asp 또는 His,
- [0446] 386번째의 아미노산에 있어서의 Pro,
- [0447] 387번째의 아미노산에 있어서의 Glu,
- [0448] 389번째의 아미노산에 있어서의 Ala 또는 Ser,
- [0449] 424번째의 아미노산에 있어서의 Ala,
- [0450] 428번째의 아미노산에 있어서의 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp, 또는 Tyr,
- [0451] 433번째의 아미노산에 있어서의 Lys,
- [0452] 434번째의 아미노산에 있어서의 Ala, Phe, His, Ser, Trp, 또는 Tyr, 및
- [0453] 436번째의 아미노산에 있어서의 His
- [0454] 로부터 선택되는 적어도 1개의 아미노산을 포함하는 Fc 영역을 사용하는 것은 가능하다.
- [0455] 운반 부분에 FcRn 결합성을 갖게 하는 것은, 항원 결합 도메인에 FcRn 결합성을 갖게 하지 않는 것을 의미하는 것은 아니다. 운반 부분의 혈중반감기를 항원 결합 도메인의 혈중반감기보다 길게 하는 실시태양으로서, 항원 결합 도메인이 FcRn 결합성을 갖지 않는 것은 물론, 항원 결합 도메인이 FcRn 결합성을 갖고 있어도, 운반 부분에 보다 약한 FcRn 결합성을 가지면 된다.
- [0456] 또한, 운반 부분의 혈중반감기를 연장하는 일 실시태양으로서, 운반 부분과 알부민을 결합시키는 방법이 있다. 알부민은 신장 배설을 받지 않고, 또한 FcRn 결합성을 갖기 때문에, 혈중반감기가 17~19일로 길다(J Clin Invest. 1953 Aug; 32(8): 746-768.). 그 때문에 알부민과 결합하고 있는 단백질은 부피가 커지고, 또한 간접적으로 FcRn과 결합하는 것이 가능해지기 때문에, 혈중반감기가 증가함이 보고되어 있다(Antibodies 2015, 4(3), 141-156).
- [0457] 더욱이, 운반 부분의 혈중반감기를 연장하는 일 실시태양으로서, 운반 부분을 PEG화하는 방법이 있다. 단백질을 PEG화함으로써 단백질을 부피가 커지게 하고, 동시에 혈중의 프로테아제에 의한 분해를 억제함으로써, 단백질의 혈중반감기가 연장된다고 생각되고 있다(J Pharm Sci. 2008 Oct;97(10):4167-83.).
- [0458] 본 발명의 몇 가지 실시태양에 있어서, 운반 부분은 항체 Fc 영역을 포함한다. 구체적인 일 실시태양으로서, 운반 부분은 인간 IgG 항체의 CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함한다. 구체적인 일 실시태양으로서, 운반 부분은, 인간 IgG1 항체 중쇄 Cys226으로부터, 또는 Pro230으로부터, 중쇄의 카복실 말단까지 성장하는 부분을 포함한다. 단, Fc 영역의 C말단의 리신(Lys447) 또는 글리신-리신(Gly446-Lys447)은, 존재하고 있어도 하고 있지 않아도 된다.
- [0459] 본 발명의 몇 가지 실시태양에 있어서, 운반 부분은 항체 정상 영역을 포함한다. 보다 바람직한 실시태양에 있

어서, 운반 부분은 IgG 항체 정상 영역을 포함한다. 보다 바람직한 실시태양에 있어서, 운반 부분은 인간 IgG 항체 정상 영역을 포함한다.

- [0460] 추가적인 본 발명의 몇 가지 실시태양에 있어서, 운반 부분은 항체 중쇄 정상 영역과 실질적으로 유사한 구조를 갖는 영역과, 당해 영역과 다이설파이드 결합 등의 공유 결합 또는 수소 결합, 소수성 상호작용 등의 비공유 결합에 의해 결합되고 있는, 항체 경쇄와 실질적으로 유사한 구조를 갖는 영역을 포함한다.
- [0461] 본 명세서에 있어서, 「항원 결합 도메인과 운반 부분을 포함하는 폴리펩티드」는, 통상, 아마이드 결합에 의해 연결된 일련의 폴리펩티드, 또는 아마이드 결합에 의해 연결된 일련의 폴리펩티드를 복수 포함하는 단백질이다.
- [0462] 본 발명의 몇 가지 실시태양에 있어서, 항원 결합 도메인은 폴리펩티드로부터 유리 가능하고, 항원 결합 도메인이 폴리펩티드로부터 유리됨으로써, 항원 결합 활성이 높아진다. 본 명세서에 있어서, 용어 「유리」는, 폴리펩티드의 2개의 부분이 서로 떨어지는 것을 말한다. 항원 결합 도메인이 폴리펩티드로부터 유리되는 것은, 항원 결합 도메인과 운반 부분간의 상호작용이 해소되는 것에 기인할 수 있다. 폴리펩티드에 짜넣어진 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성이 억제되기 때문에, 항원 결합 도메인이 폴리펩티드로부터 유리되고 있는 것의 확인은, 대상물의 항원 결합 활성을 측정하여, 폴리펩티드에 짜넣어진 상태의 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성과 비교함으로써 행할 수 있다.
- [0463] 몇 가지 실시태양에 있어서, 폴리펩티드가 절단 사이트를 포함하고 있고, 당해 절단 사이트가 절단됨으로써 항원 결합 도메인이 폴리펩티드로부터 유리된다. 절단 사이트는, 예를 들어 효소에 의해 절단될 수 있거나, 또는 환원제에 의해 환원될 수 있거나, 또는 광분해될 수 있다. 절단 사이트는, 항원 결합 도메인을 유리시킬 수 있고, 또한 유리 후의 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 상실시키지 않으면, 폴리펩티드 중의 어느 위치에 배치되어도 된다. 또한, 항원 결합 도메인을 유리시키기 위한 절단 사이트와 별도로, 다른 절단 사이트가 추가로 폴리펩티드에 포함되어 있어도 된다. 본 발명의 일 실시태양에 있어서, 절단 사이트는 프로테아제 절단 서열을 포함하고, 프로테아제에 의해 절단될 수 있다.
- [0464] 본 명세서에 있어서, 용어 「절단되었다」는, 프로테아제에 의한 절단 사이트의 개변 및/또는 절단 사이트의 시스테인-시스테인 다이설파이드 결합의 환원 및/또는 광활성화 후의, 항원 결합 도메인과 운반 부분이 분단된 상태를 말한다. 본 명세서에 있어서, 용어 「절단되어 있지 않다」는, 프로테아제에 의한 절단 사이트의 절단의 비존재 및/또는 절단 사이트의 시스테인-시스테인 다이설파이드 결합의 환원의 비존재 및/또는 광의 비존재 하에 있어서의, 항원 결합 도메인과 운반 부분이 연결되어 있는 상태를 말한다.
- [0465] 절단 사이트의 절단은, 절단 사이트 함유 폴리펩티드를 포함하는 용액을 SDS-PAGE(폴리아크릴아마이드 겔 전기영동)에 제공하여, 단편의 분자량을 측정하거나, 혹은 절단 전후의 분자량의 변화를 검출하는 것에 의해 검출할 수 있다.
- [0466] 절단 사이트는, 약제(즉, 프로테아제, 환원제, 광)에 의해, 약 $0.001 \sim 1500 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{S}^{-1}$ 또는 적어도 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1250, 혹은 $1500 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{S}^{-1}$ 의 속도로 특이적으로 수식될(절단, 환원 또는 광분해) 수 있다.
- [0467] 프로테아제에 의한 특이적 절단에는, 프로테아제와 절단 사이트 혹은 절단 사이트를 포함하는 분자와의 사이의 접촉을 행하게 한다. 충분한 효소 활성의 존재하에 있는 경우, 절단 사이트를 절단할 수 있다. 충분한 효소 활성이란, 절단 사이트와 접촉하여 절단을 초래하는, 효소의 능력을 말할 수 있다.
- [0468] 본 명세서에 있어서, 용어 「프로테아제」는, 펩티드 결합을 가수분해하는 엔도펩티다제 또는 엑소펩티다제 등의 효소, 통상은 엔도펩티다제를 말한다. 본 발명에 이용되는 프로테아제는, 프로테아제 절단 서열을 절단할 수 있는 것에만 의해 제한되고, 그 종류는 특별히 한정되지 않는다. 몇 가지 실시태양에 있어서, 표적 조직 특이적 프로테아제가 사용된다. 표적 조직 특이적 프로테아제는, 예를 들어,
 - [0469] (1) 표적 조직에서 정상 조직보다 고레벨로 발현하는 프로테아제,
 - [0470] (2) 표적 조직에서 정상 조직보다 높은 활성을 갖는 프로테아제,
 - [0471] (3) 표적 세포에서 정상 세포보다 고레벨로 발현하는 프로테아제,
 - [0472] (4) 표적 세포에서 정상 세포보다 높은 활성을 갖는 프로테아제
 의 어느 하나를 가리킬 수 있다.
- [0473]

- [0474] 보다 구체적인 실시태양에 있어서, 암조직 특이적 프로테아제 또는 염증 조직 특이적 프로테아제가 사용된다.
- [0475] 본 명세서에서 용어 「표적 조직」은, 적어도 하나의 표적 세포를 포함하는 조직을 의미한다. 본 발명의 몇 가지 실시태양에 있어서는, 표적 조직은 암조직이다. 본 발명의 몇 가지 실시태양에 있어서는, 표적 조직은 염증 조직이다.
- [0476] 용어 「암조직」이란, 적어도 하나의 암세포를 포함하는 조직을 의미한다. 따라서, 예를 들어 암조직이 암세포와 혈관을 포함하고 있듯이, 암세포 및 내피 세포를 포함하는 종류(腫瘍; tumor mass)의 형성에 기여하는 모든 세포형을 말한다. 본 명세서에 있어서, 종류란 종양 조직소(a foci of tumor tissue)를 말한다. 「종양」이라고 하는 용어는, 일반적으로, 양성 신생물 또는 악성 신생물을 의미하기 위해서 이용된다.
- [0477] 본 명세서에 있어서, 「염증 조직」이란, 예를 들어, 이하를 예시적으로 들 수 있다.
- [0478] · 관절 류머티즘이나 변형성 관절증에 있어서의 관절
- [0479] · 기관지 천식이나 COPD에 있어서의 폐(폐포)
- [0480] · 염증성 장질환이나 크론병이나 궤양성 대장염에 있어서의 소화 기관
- [0481] · 간장, 신장, 폐에 있어서의 섬유화증에 있어서의 섬유화 조직
- [0482] · 장기 이식에 있어서의 거절 반응이 일어나고 있는 조직
- [0483] · 동맥 경화나 심부전에 있어서의 혈관, 심장(심근)
- [0484] · 메타볼릭 증후군에 있어서의 내장 지방
- [0485] · 아토피성 피부염 그 외 피부염에 있어서의 피부 조직
- [0486] · 추간판 헤르니아나 만성 요통에 있어서의 척수 신경
- [0487] 몇 가지 종류의 표적 조직에 있어서, 특이적으로 발현하거나 혹은 특이적으로 활성화되는 프로테아제 또는 표적 조직의 질환 상태와 관련된다고 생각되는 프로테아제(표적 조직 특이적 프로테아제)가 알려져 있다. 예를 들어, 국제 공개 W02013/128194호, 국제 공개 W02010/081173호, 국제 공개 W02009/025846호 등에서 암조직에 특이적으로 발현하는 프로테아제가 개시되어 있다. 또한, J Inflamm (Lond). 2010; 7: 45., Nat Rev Immunol. 2006 Jul;6(7):541-50., Nat Rev Drug Discov. 2014 Dec;13(12):904-27., Respir Res. 2016 Mar 4;17:23., Dis Model Mech. 2014 Feb;7(2):193-203., Biochim Biophys Acta. 2012 Jan;1824(1):133-45. 그리고 염증과 관련된다고 생각되는 프로테아제가 개시되어 있다.
- [0488] 표적 조직에서 특이적으로 발현하는 프로테아제 이외에, 표적 조직에서 특이적으로 활성화되는 프로테아제도 존재한다. 예를 들어, 프로테아제는 불활성형으로 발현하고, 그 후 활성형이 되는 경우가 있으며, 많은 조직에서는 활성형 프로테아제를 저해하는 물질이 존재하여, 활성화의 프로세스와 저해제의 존재에 의해 활성이 컨트롤되고 있다(Nat Rev Cancer. 2003 Jul;3(7):489-501.). 표적 조직에 있어서, 활성형 프로테아제가 저해로부터 피하여, 특이적으로 활성화되는 경우가 있다.
- [0489] 활성형 프로테아제의 측정 방법은, 활성화형의 프로테아제를 인식하는 항체를 이용하는 방법(PNAS 2013 Jan 2; 110(1): 93-98.)이나 프로테아제가 인식하는 펩티드를 형광 표지하여, 절단 전은 소광(쿠엔치)하고 있지만, 절단 후에 발광하는 방법(Nat Rev Drug Discov. 2010 Sep;9(9):690-701. doi: 10.1038/nrd3053.)을 이용하여 측정될 수 있다.
- [0490] 하나의 시점에서, 용어 「표적 조직 특이적 프로테아제」는,
- [0491] (i) 표적 조직에서 정상 조직보다 고레벨로 발현하는 프로테아제,
- [0492] (ii) 표적 조직에서 정상 조직보다 높은 활성을 갖는 프로테아제,
- [0493] (iii) 표적 세포에서 정상 세포보다 고레벨로 발현하는 프로테아제,
- [0494] (iv) 표적 세포에서 정상 세포보다 높은 활성을 갖는 프로테아제
- [0495] 의 어느 하나를 가리킬 수 있다.
- [0496] 한정하여 해석되는 것은 아니지만, 구체적인 프로테아제로서는, 시스템인프로테아제(카텝신 패밀리 B, L, S 등

을 포함한다), 아스파틸프로테아제(카텝신 D, E, K, O 등), 세린프로테아제(마트립타제(MT-SP1을 포함한다), 카텝신 A 및 G, 트롬빈, 플라스민, 유로키나제(uPA), 조직 플라스미노겐 활성화 인자(tPA), 엘라스타제, 프로테이나제 3, 트롬빈, 칼리크레인, 트립타제, 키마제를 포함한다), 메탈로프로테아제(막결합형(MMP14-17 및 MMP24-25) 및 분비형(MMP1-13 및 MMP18-23 및 MMP26-28)의 양방을 포함하는 메탈로프로테아제(MMP1-28), 프로테아제의 A 디스인테그린 및 메탈로프로테아제(ADAM), A 디스인테그린 또는 트롬보스폰딘 모티프를 가지는 메탈로프로테아제(ADAMTS), 메프린(메프린 α(mepirin alpha), 메프린 β(mepirin beta))), CD10(CALLA), 및 전립선 특이적 항원(PSA), 레구마인, TMPRSS3, TMPRSS4, 호중구 엘라스타제(HNE), 베타 세크레타제(BACE), 섬유아세포 활성화 단백질 알파(FAP), 그란자임 B, 구아니디노벤조아타제(GB), 헵신, 네프리라이신, NS3/4A, HCV-NS3/4, 칼파인, ADAMDEC1, 레닌, 카텝신 C, 카텝신 V/L2, 카텝신 X/Z/P, 크루지파인, 오토바인 2, 칼리크레인 관련 펩티다제(KLKs(KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK10, KLK11, KLK13, KLK14)), 골형성 단백질 1(BMP-1), 활성화 프로테인 C, 혈액 응고 관련 프로테아제(Factor VIIa, Factor IXa, Factor Xa, Factor XIa, Factor XIIa), HtrA1, 락토페린, 마랍신, PACE4, DESC1, 다이펩티딜펩티다제 4(DPP-4), TMPRSS2, 카텝신 F, 카텝신 H, 카텝신 L2, 카텝신 O, 카텝신 S, 그란자임 A, Gepsin 칼파인 2, 글루타민산 카복시펩티다제 2, AMSh-Like Proteases, AMSh, 감마 세크레타제, A 항플라스민 절단 효소(APCE), Decysin 1, N-Acetylated Alpha-Linked Acidic Dipeptidase-Like 1(NAALADL1), 퓨린(furin) 등을 들 수 있다.

- [0497] 다른 시점에서, 표적 조직 특이적 프로테아제는, 암조직 특이적 프로테아제 또는 염증 조직 특이적 프로테아제를 가리킬 수 있다.
- [0498] 암조직 특이적 프로테아제로서는, 예를 들어, 국제 공개 W02013/128194호, 국제 공개 W02010/081173호, 국제 공개 W02009/025846호 등에서 개시되는 암조직에 특이적으로 발현하는 프로테아제를 들 수 있다.
- [0499] 암조직 특이적 프로테아제의 종류는, 치료 대상의 암조직에서의 발현의 특이성이 높을수록, 부작용 저감 효과가 얻어진다. 암조직 특이적 프로테아제는, 암조직에 있어서의 농도가 정상 조직에 있어서의 농도의 5배 이상 높은 것이 바람직하고, 10배 이상 높은 것이 보다 바람직하고, 100배 이상 높은 것이 더욱 바람직하고, 500배 이상 높은 것이 특히 바람직하고, 1000배 이상 높은 것이 가장 바람직하다. 또한, 암조직 특이적 프로테아제는, 암조직에 있어서의 활성이 정상 조직에 있어서의 활성의 2배 이상 높은 것이 바람직하고, 3배 이상 높은 것, 4배 이상 높은 것, 5배 이상 높은 것, 10배 이상 높은 것이 보다 바람직하고, 100배 이상 높은 것이 더욱 바람직하고, 500배 이상 높은 것이 특히 바람직하고, 1000배 이상 높은 것이 가장 바람직하다.
- [0500] 또한, 암조직 특이적 프로테아제는, 암세포의 세포막에 결합하고 있는 것이어도 되고, 세포막에 결합하고 있지 않고 세포 외로 분비되는 것이어도 된다. 암조직 특이적 프로테아제가 암세포의 세포막에 결합하고 있지 않은 경우, 면역 세포에 의한 세포 상해가 암세포에 특이적이기 위해서는, 암조직 특이적 프로테아제는 암조직의 내부 또는 근방에 존재하는 것인 것이 바람직하다. 본 명세서에서 「암조직의 근방」이란, 암조직 특이적 프로테아제 절단 서열이 절단되어, 항원 결합 도메인이 항원 결합 활성을 발휘하는 범위 내인 것을 의미한다. 단, 가능한 한 정상 세포를 상해하지 않는 범위인 것이 바람직하다.
- [0501] 다른 시점에서, 암조직 특이적 프로테아제는,
- [0502] (i) 암조직에서 정상 조직보다 고레벨로 발현하는 프로테아제,
- [0503] (ii) 암조직에서 정상 조직보다 높은 활성을 갖는 프로테아제,
- [0504] (iii) 암세포에서 정상 세포보다 고레벨로 발현하는 프로테아제,
- [0505] (iv) 암세포에서 정상 세포보다 높은 활성을 갖는 프로테아제,
- [0506] 의 어느 것이다.
- [0507] 암조직 특이적 프로테아제는, 1종 단독이어도 되고, 2종 이상을 배합할 수 있어도 된다. 암조직 특이적 프로테아제의 종류수는, 치료 대상의 암종을 고려하여, 당업자가 적절히 설정할 수 있다.
- [0508] 이상의 관점에서, 암조직 특이적 프로테아제로서는, 상기 예시한 프로테아제 중에서도, 세린프로테아제와 메탈로프로테아제가 바람직하고, 마트립타제(MT-SP1를 포함한다), 유로키나제(uPA)와 메탈로프로테아제가 보다 바람직하고, MT-SP1, uPA, MMP2, MMP9가 더욱 바람직하다.
- [0509] 염증 조직 특이적 프로테아제의 종류는, 치료 대상의 염증 조직에서의 발현의 특이성이 높을수록, 부작용 저감 효과가 얻어진다. 염증 조직 특이적 프로테아제는, 염증 조직에 있어서의 농도가 정상 조직에 있어서의 농도의

5배 이상 높은 것이 바람직하고, 10배 이상 높은 것이 보다 바람직하고, 100배 이상 높은 것이 더욱 바람직하고, 500배 이상 높은 것이 특히 바람직하고, 1000배 이상 높은 것이 가장 바람직하다. 또한, 염증 조직 특이적 프로테아제는, 염증 조직에 있어서의 활성이 정상 조직에 있어서의 활성의 2배 이상 높은 것이 바람직하고, 3배 이상 높은 것, 4배 이상 높은 것, 5배 이상 높은 것, 10배 이상 높은 것이 보다 바람직하고, 100배 이상 높은 것이 더욱 바람직하고, 500배 이상 높은 것이 특히 바람직하고, 1000배 이상 높은 것이 가장 바람직하다.

- [0510] 또한, 염증 조직 특이적 프로테아제는, 염증 세포의 세포막에 결합하고 있는 것이어도 되고, 세포막에 결합하고 있지 않고 세포외에 분비되는 것이어도 된다. 염증 조직 특이적 프로테아제가 염증 세포의 세포막에 결합하고 있지 않는 경우, 면역 세포에 의한 세포 상해가 염증 세포에 특이적이기 위해서는, 염증 조직 특이적 프로테아제는 염증 조직의 내부 또는 근방에 존재하는 것인 것이 바람직하다. 본 명세서에서 「염증 조직의 근방」이란, 염증 조직 특이적 프로테아제 절단 서열이 절단되어, 항원 결합 도메인이 항원 결합 활성을 발휘하는 범위 내인 것을 의미한다. 단, 가능한 한 정상 세포를 상해하지 않는 범위인 것이 바람직하다.
- [0511] 다른 시점에서, 염증 조직 특이적 프로테아제는,
- [0512] (i) 염증 조직에서 정상 조직보다 고레벨로 발현하는 프로테아제,
- [0513] (ii) 염증 조직에서 정상 조직보다 높은 활성을 갖는 프로테아제,
- [0514] (iii) 염증 세포에서 정상 세포보다 고레벨로 발현하는 프로테아제,
- [0515] (iv) 염증 세포에서 정상 세포보다 높은 활성을 갖는 프로테아제,
- [0516] 의 어느 것이다.
- [0517] 염증 조직 특이적 프로테아제는, 1종 단독이어도 되고, 2종 이상을 배합할 수 있어도 된다. 염증 조직 특이적 프로테아제의 종류수는, 치료 대상의 병상을 고려하여, 당업자가 적절히 설정할 수 있다.
- [0518] 이상의 관점에서, 염증 조직 특이적 프로테아제로서는, 상기 예시한 프로테아제 중에서도, 메탈로프로테아제가 바람직하고, 메탈로프로테아제 중에서도, ADAMTS5, MMP2, MMP7, MMP9, MMP13이 보다 바람직하다.
- [0519] 프로테아제 절단 서열은, 수용액 중에서 폴리펩티드가 표적 조직 특이적 프로테아제에 의해 가수분해를 받을 때에, 해당 표적 조직 특이적 프로테아제에 의해 특이적으로 인식되는 특정한 아미노산 서열이다.
- [0520] 프로테아제 절단 서열은, 부작용 저감의 점에서, 치료 대상의 표적 조직/세포에 있어서 보다 특이적으로 발현하고 있는, 혹은 치료 대상의 표적 조직/세포에 있어서 보다 특이적으로 활성화되고 있는 표적 조직 특이적 프로테아제에 의해, 높은 특이성으로 가수분해되는 아미노산 서열인 것이 바람직하다.
- [0521] 구체적인 프로테아제 절단 서열로서는, 예를 들어, 국제 공개 W02013/128194호, 국제 공개 W02010/081173호, 국제 공개 W02009/025846호 등에서 개시되어 있는 상기에서 예시한 암조직에 특이적으로 발현하는 프로테아제, 염증 조직 특이적 프로테아제 등에 의해 특이적으로 가수분해되는 표적 서열을 들 수 있다. 기지의 프로테아제에 의해 특이적으로 가수분해되는 표적 서열에, 적당한 아미노산 변이를 도입하는 등, 인공적으로 개변한 서열도 사용할 수 있다. 또한, 프로테아제 절단 서열은, Nature Biotechnology 19, 661 - 667 (2001)에 기재와 같은 당업자 공지的方法으로 동정한 것을 이용해도 된다.
- [0522] 더욱이, 천연에 존재하는 프로테아제 절단 서열을 이용해도 된다. 예를 들어, TGFβ가 프로테아제의 절단을 받음으로써 잠재형으로 변화하도록, 프로테아제의 절단을 받음으로써 분자형이 바뀌는 단백질 중의 프로테아제 절단을 받는 서열을 사용할 수도 있다.
- [0523] 프로테아제 절단 서열의 예로서, 그것만으로 한정되지 않지만, 국제 공개 W02015/116933호, 국제 공개 W02015/048329호, 국제 공개 W02016/118629호, 국제 공개 W02016/179257호, 국제 공개 W02016/179285호, 국제 공개 W02016/179335호, 국제 공개 W02016/179003호, 국제 공개 W02016/046778호, 국제 공개 W02016/014974호, 미국 특허 공개 US2016/0289324호, 미국 특허 공개 US2016/0311903호, PNAS (2000) 97: 7754-7759., Biochemical Journal (2010) 426: 219-228., Beilstein J Nanotechnol. (2016) 7: 364-373. 중에서 나타난 서열을 이용할 수 있다.
- [0524] 프로테아제 절단 서열은, 전술한 바와 같이, 적합한 표적 조직 특이적 프로테아제에 의해 특이적으로 가수분해되는 아미노산 서열인 것이 보다 바람직하다. 표적 조직 특이적 프로테아제에 의해 특이적으로 가수분해되는

아미노산 서열 중에서도, 이하의 아미노산 서열을 포함하는 서열이 바람직하다.

- [0525] LSGRSDNH(서열 번호: 12, MT-SP1, uPA에 의해 절단 가능)
- [0526] PLALAG(서열 번호: 25, MMP2, MMP9에 의해 절단 가능)
- [0527] VPLSLTMG(서열 번호: 26, MMP7에 의해 절단 가능)
- [0528] 프로테아제 절단 서열로서, 이하의 서열을 이용할 수도 있다.
- [0529] TSTSGRSANPRG(서열 번호: 74, MT-SP1, uPA에 의해 절단 가능)
- [0530] ISSGLLSGRSDNH(서열 번호: 75, MT-SP1, uPA에 의해 절단 가능)
- [0531] AVGLLAPPGGLSGRSDNH(서열 번호: 76, MT-SP1, uPA에 의해 절단 가능)
- [0532] GAGVPMSMRGGAG(서열 번호: 77, MMP1에 의해 절단 가능)
- [0533] GAGIPVLSRSGAG(서열 번호: 78, MMP2에 의해 절단 가능)
- [0534] GPLGIAGQ(서열 번호: 79, MMP2에 의해 절단 가능)
- [0535] GGPLGMLSQS(서열 번호: 80, MMP2에 의해 절단 가능)
- [0536] PLGLWA(서열 번호: 81, MMP2에 의해 절단 가능)
- [0537] GAGRPFMSIMGAG(서열 번호: 82, MMP3에 의해 절단 가능)
- [0538] GAGVPLSLTMGAG(서열 번호: 83, MMP7에 의해 절단 가능)
- [0539] GAGVPLSLYSGAG(서열 번호: 84, MMP9에 의해 절단 가능)
- [0540] AANLRN(서열 번호: 85, MMP11에 의해 절단 가능)
- [0541] AQAYVK(서열 번호: 86, MMP11에 의해 절단 가능)
- [0542] AANYMR(서열 번호: 87, MMP11에 의해 절단 가능)
- [0543] AAALTR(서열 번호: 88, MMP11에 의해 절단 가능)
- [0544] AQNLMR(서열 번호: 89, MMP11에 의해 절단 가능)
- [0545] AANYTK(서열 번호: 90, MMP11에 의해 절단 가능)
- [0546] GAGPQGLAGQRGIVAG(서열 번호: 91, MMP13에 의해 절단 가능)
- [0547] PRFKIIGG(서열 번호: 92, pro-유로키나제에 의해 절단 가능)
- [0548] PRFRIIGG(서열 번호: 93, pro-유로키나제에 의해 절단 가능)
- [0549] GAGSGRSAG(서열 번호: 94, uPA에 의해 절단 가능)
- [0550] SGRSA(서열 번호: 95, uPA에 의해 절단 가능)
- [0551] GSGRSA(서열 번호: 96, uPA에 의해 절단 가능)
- [0552] SGKSA(서열 번호: 97, uPA에 의해 절단 가능)
- [0553] SGRSS(서열 번호: 98, uPA에 의해 절단 가능)
- [0554] SGRRA(서열 번호: 99, uPA에 의해 절단 가능)
- [0555] SGRNA(서열 번호: 100, uPA에 의해 절단 가능)
- [0556] SGRKA(서열 번호: 101, uPA에 의해 절단 가능)
- [0557] QRGRSA(서열 번호: 102, tPA에 의해 절단 가능)
- [0558] GAGSLLKSRMVPNFNAG(서열 번호: 103, 카텝신 B에 의해 절단 가능)
- [0559] TQGAAA(서열 번호: 104, 카텝신 B에 의해 절단 가능)

- [0560] GAAAAA(서열 번호: 105, 카텡신 B에 의해 절단 가능)
- [0561] GAGAAG(서열 번호: 106, 카텡신 B에 의해 절단 가능)
- [0562] AAAAAAG(서열 번호: 107, 카텡신 B에 의해 절단 가능)
- [0563] LCGAAI(서열 번호: 108, 카텡신 B에 의해 절단 가능)
- [0564] FAQALG(서열 번호: 109, 카텡신 B에 의해 절단 가능)
- [0565] LLQANP(서열 번호: 110, 카텡신 B에 의해 절단 가능)
- [0566] LAAANP(서열 번호: 111, 카텡신 B에 의해 절단 가능)
- [0567] LYGAQF(서열 번호: 112, 카텡신 B에 의해 절단 가능)
- [0568] LSQAQG(서열 번호: 113, 카텡신 B에 의해 절단 가능)
- [0569] ASAASG(서열 번호: 114, 카텡신 B에 의해 절단 가능)
- [0570] FLGASL(서열 번호: 115, 카텡신 B에 의해 절단 가능)
- [0571] AYGATG(서열 번호: 116, 카텡신 B에 의해 절단 가능)
- [0572] LAQATG(서열 번호: 117, 카텡신 B에 의해 절단 가능)
- [0573] GAGSGVVIATVIVITAG(서열 번호: 118, 카텡신 L에 의해 절단 가능)
- [0574] APMAEGGG(서열 번호: 119, 메프린 α , 메프린 β 에 의해 절단 가능)
- [0575] EAQGDKII(서열 번호: 120, 메프린 α , 메프린 β 에 의해 절단 가능)
- [0576] LAFSDAGP(서열 번호: 121, 메프린 α , 메프린 β 에 의해 절단 가능)
- [0577] YVADAPK(서열 번호: 122, 메프린 α , 메프린 β 에 의해 절단 가능)
- [0578] RRRRRR(서열 번호: 123, 퓨린에 의해 절단 가능)
- [0579] RRRRRR(서열 번호: 124, 퓨린에 의해 절단 가능)
- [0580] GQSSRHRRAL(서열 번호: 125, 퓨린에 의해 절단 가능)
- [0581] SSRHRRALD(서열 번호: 126)
- [0582] RKSSIIIRMRDVVL(서열 번호: 127, 플라스미노젠(Plasminogen)에 의해 절단 가능)
- [0583] SSSFDKGYKKGDDA(서열 번호: 128, Staphylokinase에 의해 절단 가능)
- [0584] SSSFDKGYKRGDDA(서열 번호: 129, Staphylokinase에 의해 절단 가능)
- [0585] IEGR(서열 번호: 130, Factor Xa에 의해 절단 가능)
- [0586] IDGR(서열 번호: 131, Factor Xa에 의해 절단 가능)
- [0587] GGSIDGR(서열 번호: 132, Factor Xa에 의해 절단 가능)
- [0588] GPQGIAGQ(서열 번호: 133, Collagenase에 의해 절단 가능)
- [0589] GPQGLLGA(서열 번호: 134, Collagenase에 의해 절단 가능)
- [0590] GIAGQ(서열 번호: 135, Collagenase에 의해 절단 가능)
- [0591] GPLGIAG(서열 번호: 136, Collagenase에 의해 절단 가능)
- [0592] GPEGLRVG(서열 번호: 137, Collagenase에 의해 절단 가능)
- [0593] YGAGLGVV(서열 번호: 138, Collagenase에 의해 절단 가능)
- [0594] AGLGVVER(서열 번호: 139, Collagenase에 의해 절단 가능)
- [0595] AGLGISST(서열 번호: 140, Collagenase에 의해 절단 가능)

- [0596] EPQALAMS(서열 번호: 141, Collagenase에 의해 절단 가능)
- [0597] QALAMSAI(서열 번호: 142, Collagenase에 의해 절단 가능)
- [0598] AAYHLVSQ(서열 번호: 143, Collagenase에 의해 절단 가능)
- [0599] MDAFLESS(서열 번호: 144, Collagenase에 의해 절단 가능)
- [0600] ESLPVAV(서열 번호: 145, Collagenase에 의해 절단 가능)
- [0601] SAPAVESE(서열 번호: 146, Collagenase에 의해 절단 가능)
- [0602] DVAQFVLT(서열 번호: 147, Collagenase에 의해 절단 가능)
- [0603] VAQFVLTE(서열 번호: 148, Collagenase에 의해 절단 가능)
- [0604] AQFVLTEG(서열 번호: 149, Collagenase에 의해 절단 가능)
- [0605] PVQPIGPQ(서열 번호: 150, Collagenase에 의해 절단 가능)
- [0606] LVPRGS(서열 번호: 151, Thrombin에 의해 절단 가능)
- [0607] TSTSGRSANPRG(서열 번호: 178, uPA 및 MT-SP1에 의해 절단 가능)
- [0608] 본 발명의 일 실시태양에 있어서, 프로테아제 절단 서열의 어느 일단 또는 양단에, 가동 링커를 추가로 추가하고 있다. 프로테아제 절단 서열의 일단의 가동 링커를 제 1 가동 링커라고 호칭할 수 있고, 타단의 가동 링커를 제 2 가동 링커라고 호칭할 수 있다. 특정한 실시형태에서는, 프로테아제 절단 서열과 가동 링커는 이하의 식 중 하나를 포함한다.
- [0609] (프로테아제 절단 서열)
- [0610] (제 1 가동 링커)-(프로테아제 절단 서열)
- [0611] (프로테아제 절단 서열)-(제 2 가동 링커)
- [0612] (제 1 가동 링커)-(프로테아제 절단 서열)-(제 2 가동 링커)
- [0613] 본 실시 태양에 있어서의 가동 링커는 펩티드 링커가 바람직하다. 제 1 가동 링커와 제 2 가동 링커는, 각각 독립적으로 또한 임의적으로 존재하고, 적어도 1개의 플렉시블 아미노산(Gly 등)을 포함하는 동일 또는 상이한 가동 링커이다. 예를 들어, 프로테아제 절단 서열이 원하는 프로테아제 억제성이 얻어질 정도의 충분한 수의 잔기(Arg, Ile, Gln, Glu, Cys, Tyr, Trp, Thr, Val, His, Phe, Pro, Met, Lys, Gly, Ser, Asp, Asn, Ala 등으로부터 임의로 선택되는 아미노산, 특히 Gly, Ser, Asp, Asn, Ala, 특히 Gly 및 Ser, 특히 Gly 등)가 포함된다.
- [0614] 프로테아제 절단 서열의 양단에서 사용하는 데 적합한 가동 링커는 통상, 프로테아제 절단 서열로의 프로테아제의 억제를 향상시켜, 프로테아제의 절단 효율을 상승시키는 것이다. 적합한 가동 링커는 용이하게 선택 가능하고, 1 아미노산(Gly 등) 내지 20 아미노산, 2 아미노산 내지 15 아미노산, 혹은, 4 아미노산 내지 10 아미노산, 5 아미노산 내지 9 아미노산, 6 아미노산 내지 8 아미노산 또는 7 아미노산 내지 8 아미노산을 비롯하여 3 아미노산 내지 12 아미노산 등, 상이한 길이 중으로부터의 적합한 것을 선택할 수 있다. 본 발명의 몇 가지 실시태양에 있어서는, 가동 링커는 1 내지 7 아미노산의 펩티드 링커이다.
- [0615] 가동 링커의 예로서, 그것만으로 한정되지 않지만, 예를 들어, 글리신 폴리머(G)_n, 글리신-세린 폴리머(예를 들어, (GS)_n, (GSGGS: 서열 번호: 27)_n 및 (GGGS: 서열 번호: 28)_n을 포함하고, n은 적어도 1의 정수이다), 글리신-알라닌 폴리머, 알라닌-세린 폴리머, 종래 기술에 있어서 주지의 다른 가동 링커를 들 수 있다.
- [0616] 이 중 글리신 및 글리신-세린 폴리머가 주목받고 있지만, 이들 아미노산이 비교적 구조화되지 않고, 성분간의 중성 테더로서 기능하기 쉬운 것이 그 이유이다.
- [0617] 글리신-세린 폴리머로 이루어지는 가동 링커의 예로서, 그것만으로 한정되지 않지만, 예를 들어,
- [0618] Ser
- [0619] Gly · Ser (GS)

- [0620] Ser · Gly(SG)
- [0621] Gly · Gly · Ser(GGS)
- [0622] Gly · Ser · Gly(GSG)
- [0623] Ser · Gly · Gly(SGG)
- [0624] Gly · Ser · Ser(GSS)
- [0625] Ser · Ser · Gly(SSG)
- [0626] Ser · Gly · Ser(SGS)
- [0627] Gly · Gly · Gly · Ser(GGGS, 서열 번호: 28)
- [0628] Gly · Gly · Ser · Gly(GGSG, 서열 번호: 29)
- [0629] Gly · Ser · Gly · Gly(GSGG, 서열 번호: 46)
- [0630] Ser · Gly · Gly · Gly(SGGG, 서열 번호: 47)
- [0631] Gly · Ser · Ser · Gly(GSSG, 서열 번호: 48)
- [0632] Gly · Gly · Gly · Gly · Ser(GGGGS, 서열 번호: 49)
- [0633] Gly · Gly · Gly · Ser · Gly(GGGSG, 서열 번호: 33)
- [0634] Gly · Gly · Ser · Gly · Gly(GGSGG, 서열 번호: 30)
- [0635] Gly · Ser · Gly · Gly · Gly(GSGGG, 서열 번호: 32)
- [0636] Gly · Ser · Gly · Gly · Ser(GSGGS, 서열 번호: 27)
- [0637] Ser · Gly · Gly · Gly · Gly(SGGGG, 서열 번호: 51)
- [0638] Gly · Ser · Ser · Gly · Gly(GSSGG, 서열 번호: 52)
- [0639] Gly · Ser · Gly · Ser · Gly(GSGSG, 서열 번호: 31)
- [0640] Ser · Gly · Gly · Ser · Gly(SGGSG, 서열 번호: 53)
- [0641] Gly · Ser · Ser · Ser · Gly(GSSSG, 서열 번호: 34)
- [0642] Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser(GGGGGS, 서열 번호: 50)
- [0643] Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly(SGGGGG, 서열 번호: 54)
- [0644] Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser(GGGGGGS, 서열 번호: 55)
- [0645] Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly(SGGGGGG, 서열 번호: 56)
- [0646] (Gly · Gly · Gly · Gly · Ser(GGGGS, 서열 번호: 49))_n
- [0647] (Ser · Gly · Gly · Gly · Gly(SGGGG, 서열 번호: 51))_n
- [0648] 등을 들 수 있다.
- [0649] 본 명세서에 있어서의 「회합」이란, 예를 들어, 2 이상의 폴리펩티드 영역이 상호작용하는 상태를 가리키는 것이라고 환언할 수 있다. 일반적으로, 대상이 되는 폴리펩티드 영역 사이에, 수소 결합, 수소 결합, 이온 결합 등이 만들어져 회합체가 형성된다. 자주 보는 회합의 하나의 예로서, 천연형 항체를 대표로 하는 항체에 있어서는, 중쇄 가변 영역(VH)과 경쇄 가변 영역(VL)이 양자 사이의 비공유 결합 등에 의해 페어링 구조를 유지하는 것이 알려져 있다.
- [0650] 본 발명의 몇 가지 실시태양에 있어서, 운반 부분의 억제 도메인은 항원 결합 도메인과 회합한다. 억제 도메인은 운반 부분의 일부여도, 운반 부분의 전부여도 된다. 다른 시점에서, 운반 부분 중의, 항원 결합 도메인과 회합하는 부분을 억제 도메인이라고 바꿔 말할 수도 있다.
- [0651] 보다 구체적인 실시태양으로서, 단도메인 항체인 항원 결합 도메인과, VL 혹은 VH 혹은 VHH인 억제 도메인이,

항체 VH와 항체 VL과 같은 회합을 형성한다. 더욱 구체적인 실시태양으로서, 단도메인 항체인 항원 결합 도메인과 VL 혹은 VH 혹은 VHH인 억제 도메인이, 항체 VH와 항체 VL과 같은 회합을 형성하고, 당해 회합이 형성된 상태에 있어서는, 억제 도메인이, 항원 결합 도메인과 항원의 결합을 입체 구조적으로 저해함으로써, 또는 항원 결합 도메인의 항원 결합 부위의 입체 구조를 변화시킴으로써, 당해 단도메인 항체의 항원 결합 활성이 당해 VL 혹은 VH 혹은 VHH에 의해 억제된다. 단도메인 항체로서 VHH를 이용하는 실시태양에 있어서는, VHH의 주된 항원 결합 부위인 CDR3 또는 그 근방의 부위가 억제 도메인과 회합하는 계면에 존재하면, 억제 도메인에 의해 VHH와 항원의 결합이 입체 구조적으로 저해된다고 생각된다.

[0652] 또한, 억제 도메인과 항원 결합 도메인의 회합은, 예를 들어 절단 사이트를 절단하는 것에 의해 해소 가능하다. 회합의 해소란, 예를 들어, 2 이상의 폴리펩티드 영역의 상호작용 상태가 해소된다고 환언할 수 있다. 2 이상의 폴리펩티드 영역의 상호작용이 전부 해소되어도, 2 이상의 폴리펩티드 영역의 상호작용 중의 일부가 해소되어도 된다.

[0653] 본 명세서에 있어서의 「계면」이란, 통상, 회합(상호작용)할 때의 회합면을 가리키고, 계면을 형성하는 아미노산 잔기란, 통상, 그 회합에 제공되는 폴리펩티드 영역에 포함되는 1 또는 복수의 아미노산 잔기이며, 보다 바람직하게는, 회합 시에 접근하여 상호작용에 관여하는 아미노산 잔기를 말한다. 해당 상호작용에는, 구체적으로는, 회합 시에 접근하는 아미노산 잔기끼리가 수소 결합, 정전적 상호작용, 염교를 형성하고 있는 경우 등의 비공유 결합이 포함된다.

[0654] 본 명세서에 있어서의 「계면을 형성하는 아미노산 잔기」란, 상술하면, 계면을 구성하는 폴리펩티드 영역에 있어서, 해당 폴리펩티드 영역에 포함되는 아미노산 잔기를 말한다. 계면을 구성하는 폴리펩티드 영역이란, 일례를 나타내면, 항체, 리간드, 리셉터, 기질 등에 있어서, 그 분자 내, 또는 분자간에 있어서 선택적인 결합을 담당하는 폴리펩티드 영역을 가리킨다. 구체적으로는, 항체에 있어서는, 중쇄 가변 영역, 경쇄 가변 영역 등을 예시할 수 있고, 본 발명의 몇 가지 실시태양에 있어서는, 항원 결합 도메인과 억제 도메인을 예시할 수 있다.

[0655] 계면을 형성하는 아미노산 잔기의 예로서, 그것만으로 한정되지 않지만, 예를 들어, 회합 시에 접근하는 아미노산 잔기를 들 수 있다. 회합 시에 접근하는 아미노산 잔기는, 예를 들어, 폴리펩티드의 입체 구조를 해석하여, 해당 폴리펩티드의 회합 시에 계면을 형성하는 폴리펩티드 영역의 아미노산 서열을 조사하는 것에 의해 발견할 수 있다.

[0656] 본 발명의 몇 가지 실시태양에 있어서, 항원 결합 도메인과 억제 도메인의 회합을 촉진하기 위해서, 항원 결합 도메인 중의 회합에 관여하는 아미노산 잔기, 또는 억제 도메인 중의 회합에 관여하는 아미노산 잔기를 개변할 수 있다. 더욱 구체적인 실시태양으로서, 항원 결합 도메인 중의, 억제 도메인과의 계면을 형성하는 아미노산 잔기, 또는 억제 도메인 중의, 항원 결합 도메인과의 계면을 형성하는 아미노산 잔기를 개변할 수 있다. 바람직한 실시태양에 있어서, 계면을 형성하는 아미노산 잔기의 개변이, 계면을 형성하는 2 잔기 이상의 아미노산 잔기가 이종의 전하가 되도록 해당 계면에 아미노산 잔기의 변이를 도입하는 방법이다. 이종의 전하가 되는 아미노산 잔기의 개변은, 양의 전하를 갖는 아미노산 잔기로부터 음의 전하를 갖는 아미노산 잔기 또는 전하를 갖지 않는 아미노산 잔기로의 개변, 음의 전하를 갖는 아미노산 잔기로부터 양의 전하를 갖는 아미노산 잔기 또는 전하를 갖지 않는 아미노산 잔기로의 개변, 및 전하를 갖지 않는 아미노산 잔기로부터 양 또는 음의 전하를 갖는 아미노산 잔기로의 개변을 포함한다. 그와 같은 아미노산 개변은, 회합을 촉진시키기 위해서이며, 회합 촉진의 목적을 달성할 수 있는 한 아미노산 개변의 위치나 아미노산의 종류는 한정되지 않는다. 개변으로서는 치환을 들 수 있지만 이것으로 한정되지 않는다.

[0657] 본 발명의 몇 가지 실시태양에 있어서, 항원 결합 도메인인 VHH가 억제 도메인인 VL과 회합하고 있다. VHH 중의, VL과의 회합에 관여하는 아미노산 잔기의 예로서, VHH와 VL의 계면을 형성하는 아미노산 잔기를 가리킬 수 있다. 또한, VHH 중의, VL과의 회합에 관여하는 아미노산 잔기의 예로서, 그것만으로 한정되지 않지만, 예를 들어, 37위, 44위, 45위, 47위의 아미노산 잔기를 들 수 있다(J. Mol. Biol. (2005) 350, 112-125.). VHH와 VL의 회합이 촉진되는 것에 의해, VHH의 활성이 억제된다. 동시에, VL 중의, VHH와의 회합에 관여하는 아미노산 잔기의 예로서, VHH와 VL의 계면을 형성하는 아미노산 잔기를 가리킬 수 있다.

[0658] VHH와 VL의 회합을 촉진하기 위해서, VHH 중의 VL과의 회합에 관여하는 아미노산 잔기를 개변할 수 있다. 이와 같은 아미노산 치환의 예로서, 그것만으로 한정되지 않지만, F37V, Y37V, E44G, Q44G, R45L, H45L, G47W, F47W, L47W, T47W, 또는/및 S47W를 들 수 있다. 더욱이, VHH 중의 각 잔기에 대해서 개변을 하지 않고, 최초부터 37V, 44G, 45L, 또는/및 47W의 아미노산 잔기를 갖는 VHH를 사용할 수도 있다.

- [0659] 더욱이, VHH와 VL의 회합을 촉진하는 목적을 달성할 수 있는 한, VHH 중의 아미노산은 아닌, VL 중의 VHH와의 회합에 관여하는 아미노산 잔기를 개변하는 것이 가능하고, 더욱이 VHH와 VL의 양방에 아미노산 개변을 도입하는 것도 가능하다.
- [0660] 본 발명의 다른 몇 가지 실시태양에 있어서, 항원 결합 도메인으로서 VHH를 사용하고, 억제 도메인으로서 VH 또는 VHH를 사용하여, 항원 결합 도메인과 억제 도메인을 회합시킬 수 있다. 항원 결합 도메인인 VHH와 억제 도메인인 VH 또는 VHH의 회합을 촉진하기 위해서, 항원 결합 도메인인 VHH 중의, 억제 도메인인 VH 또는 VHH와의 회합에 관여하는 아미노산 잔기를 특정하고, 이들 아미노산 잔기를 개변할 수 있다. 또한, 억제 도메인인 VH 또는 VHH 중의, 항원 결합 도메인인 VHH 중과의 회합에 관여하는 아미노산 잔기를 특정하여, 이들 아미노산 잔기를 개변할 수 있다.
- [0661] 또한, 항원 결합 도메인으로서 VHH 이외의 단도메인 항체를 사용할 때도, 마찬가지로 항원 결합 도메인 혹은 억제 도메인 중의, 회합에 관여하는 아미노산 잔기를 특정하고, 이들 아미노산 잔기에 대해서 개변할 수 있다.
- [0662] 본 발명의 몇 가지 실시태양으로서, 운반 부분과 항원 결합 도메인은 링커를 개재시켜 융합되어 있다. 보다 구체적인 실시태양으로서, 운반 부분과 항원 결합 도메인은, 절단 사이트를 포함하는 링커를 개재시켜 융합되어 있다. 다른 구체적인 실시태양으로서, 운반 부분과 항원 결합 도메인은, 링커를 개재시켜 융합되어 있고, 융합 후의 융합 단백질에는 절단 사이트가 포함되어 있다.
- [0663] 본 발명의 다른 일 실시태양으로서, 운반 부분과 항원 결합 도메인은 링커를 개재시키지 않고 융합되어 있다. 보다 구체적인 실시태양으로서, 운반 부분의 N말단 아미노산과 항원 결합 도메인의 C말단 아미노산의 사이에 아미노 결합을 형성시켜, 융합 단백질을 형성시키고 있다. 형성된 융합 단백질에는 절단 사이트가 포함되어 있다. 특정한 실시태양에 있어서는, 운반 부분의 N말단의 1 아미노산~수 아미노산 또는/및 항원 결합 도메인 C말단의 1 아미노산~수 아미노산을 개변하고, 운반 부분의 N말단과 항원 결합 도메인의 C말단을 융합시킴으로써, 융합 위치 부근에 절단 사이트를 형성시킨다. 보다 구체적으로, 예를 들어, 항원 결합 도메인 C말단의 4개의 아미노산을 LSGR 서열로 하고, 운반 부분의 N말단의 4개의 아미노산을 SDNH 서열로 하여 절단 사이트를 형성시킬 수 있다.
- [0664] 본 발명의 몇 가지 실시태양에 있어서, 운반 부분과 항원 결합 도메인을 포함하는 폴리펩티드의 절단 사이트는, 프로테아제 절단 서열을 포함한다. 프로테아제 절단 서열은, 프로테아제의 절단을 받았을 때, 항원 결합 도메인을 유리시키고, 또한 유리 후의 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 상실시키지 않는 한, 폴리펩티드의 어느 부분에 배치해도 된다.
- [0665] 본 발명의 몇 가지 실시태양에 있어서, 운반 부분은 항체 정상 영역을 포함하고, 당해 항체 정상 영역의 N말단과 항원 결합 도메인의 C말단이 링커를 개재시켜 또는 링커를 개재시키지 않고 융합되어 있다.
- [0666] 특정한 실시태양에 있어서, 프로테아제 절단 서열은 운반 부분에 포함되는 항체 정상 영역 내에 위치한다. 이 경우, 프로테아제 절단 서열은, 프로테아제의 절단을 받았을 때, 항원 결합 도메인을 유리당하도록 항체 정상 영역 내에 위치하면 된다. 구체적인 실시태양에 있어서, 프로테아제 절단 서열은 운반 부분에 포함되는 항체 중쇄 정상 영역 내에 위치하고, 보다 구체적으로는, 항체 중쇄 정상 영역 중의 140번(EU 넘버링) 아미노산보다 항원 결합 도메인측, 바람직하게는, 항체 중쇄 정상 영역 중의 122번(EU 넘버링) 아미노산보다 항원 결합 도메인측에 위치한다. 다른 구체적인 실시태양에 있어서, 프로테아제 절단 서열은 운반 부분에 포함되는 항체 경쇄 정상 영역 내에 위치하고, 보다 구체적으로는, 항체 경쇄 정상 영역 중의 130번(EU 넘버링)(Kabat 넘버링 130번) 아미노산보다 항원 결합 도메인측, 바람직하게는, 항체 경쇄 정상 영역 중의 113번(EU 넘버링)(Kabat 넘버링 113번) 아미노산보다 항원 결합 도메인측에 위치한다.
- [0667] 본 발명의 몇 가지 실시태양에 있어서, 항원 결합 도메인은 단도메인 항체이며, 당해 단도메인 항체의 C말단과 운반 부분의 N말단이 링커를 개재시켜 또는 링커를 개재시키지 않고 융합되어 있다.
- [0668] 특정한 실시태양에 있어서, 프로테아제 절단 서열은 단도메인 항체 내에 위치한다. 보다 구체적인 실시태양에 있어서, 단도메인 항체는 VH로부터 작성된 단도메인 항체 또는 VHH이며, 프로테아제 절단 서열은 당해 단도메인 항체의 35b번(Kabat 넘버링) 아미노산보다 운반 부분측, 바람직하게는, 당해 단도메인 항체의 95번(Kabat 넘버링) 아미노산보다 운반 부분측, 보다 바람직하게는, 당해 단도메인 항체의 109번(Kabat 넘버링) 아미노산보다 운반 부분측에 위치한다. 다른 구체적인 실시태양에 있어서, 단도메인 항체는 VL로부터 작성된 단도메인 항체이며, 프로테아제 절단 서열은 당해 단도메인 항체의 32번(Kabat 넘버링) 아미노산보다 운반 부분측, 바람직하게는, 당해 단도메인 항체의 91번(Kabat 넘버링) 아미노산보다 운반 부분측, 보다 바람직하게는, 당해 단도메인

항체의 104번(Kabat 넘버링) 아미노산보다 운반 부분측에 위치한다.

- [0669] 본 발명의 몇 가지 실시태양에 있어서, 운반 부분은 항체 정상 영역을 포함하고, 항원 결합 도메인은 단도메인 항체이며, 당해 항체 정상 영역과 당해 단도메인 항체가 링커를 개재시켜 또는 링커를 개재시키지 않고 융합되어 있다. 보다 구체적인 일 실시태양에 있어서, 항체 정상 영역의 N말단과 당해 단도메인 항체의 C말단이 링커를 개재시켜 또는 링커를 개재시키지 않고 융합되어 있다. 다른 구체적인 일 실시태양에 있어서, 항체 정상 영역의 C말단과 당해 단도메인 항체의 N말단이 링커를 개재시켜 또는 링커를 개재시키지 않고 융합되어 있다.
- [0670] 특정한 실시태양에 있어서, 프로테아제 절단 서열은 운반 부분에 포함되는 항체 정상 영역 내에 위치한다. 보다 구체적인 실시태양에 있어서, 프로테아제 절단 서열은, 항체 중쇄 정상 영역 중의 140번(EU 넘버링) 아미노산보다 단도메인 항체측, 바람직하게는, 항체 중쇄 정상 영역 중의 122번(EU 넘버링) 아미노산보다 단도메인 항체 측에 위치한다. 다른 구체적인 실시태양에 있어서, 프로테아제 절단 서열은 항체 경쇄 정상 영역 중의 130번(EU 넘버링)(Kabat 넘버링 130번) 아미노산보다 항원 결합 도메인측, 바람직하게는, 항체 경쇄 정상 영역 중의 113번(EU 넘버링)(Kabat 넘버링 113번) 아미노산보다 항원 결합 도메인측에 위치한다.
- [0671] 특정한 실시태양에 있어서, 프로테아제 절단 서열은 단도메인 내에 위치한다. 보다 구체적인 실시태양에 있어서, 단도메인 항체는 VH로부터 작성된 단도메인 항체 또는 VHH이며, 프로테아제 절단 서열은 당해 단도메인 항체의 35b번(Kabat 넘버링) 아미노산보다 항체 정상 영역측, 바람직하게는, 당해 단도메인 항체의 95번(Kabat 넘버링) 아미노산보다 항체 정상 영역측, 보다 바람직하게는, 당해 단도메인 항체의 109번(Kabat 넘버링) 아미노산보다 항체 정상 영역측에 위치한다. 다른 구체적인 실시태양에 있어서, 단도메인 항체는 VL로부터 작성된 단도메인 항체이며, 프로테아제 절단 서열은 당해 단도메인 항체의 32번(Kabat 넘버링) 아미노산보다 항체 정상 영역측, 바람직하게는, 당해 단도메인 항체의 91번(Kabat 넘버링) 아미노산보다 항체 정상 영역측, 보다 바람직하게는, 당해 단도메인 항체의 104번(Kabat 넘버링) 아미노산보다 항체 정상 영역측에 위치한다.
- [0672] 특정한 실시태양에 있어서, 프로테아제 절단 서열은 항원 결합 도메인과 운반 부분의 경계 부근에 위치한다. 항원 결합 도메인과 운반 부분의 경계 부근이란, 항원 결합 도메인과 운반 부분이 연결되고 있는 부위의 전후에서, 항원 결합 도메인의 2차 구조에 크게 영향을 주지 않는 부분을 말한다.
- [0673] 보다 구체적인 실시태양에 있어서, 항원 결합 도메인은 운반 부분 중에 포함되어 있는 항체 정상 영역과 연결되어 있고, 프로테아제 절단 서열은 항원 결합 도메인과 항체 정상 영역의 경계 부근에 위치한다. 항원 결합 도메인과 항체 정상 영역의 경계 부근은, 항원 결합 도메인과 항체 중쇄 정상 영역의 경계 부근, 또는 항원 결합 도메인과 항체 경쇄 정상 영역의 경계 부근을 가리킬 수 있다. 항원 결합 도메인이 VH로부터 작성된 단도메인 항체 또는 VHH이며, 항체 중쇄 정상 영역과 연결되어 있는 경우, 항원 결합 도메인과 항체 정상 영역의 경계 부근이란, 단도메인 항체 101번(Kabat 넘버링)의 아미노산으로부터 항체 중쇄 정상 영역 140번(EU 넘버링)의 아미노산의 사이를 가리킬 수 있고, 바람직하게는 단도메인 항체 109번(Kabat 넘버링)의 아미노산으로부터 항체 중쇄 정상 영역 122번(EU 넘버링)의 아미노산의 사이를 가리킬 수 있다. 항원 결합 도메인이 VH로부터 작성된 단도메인 항체 또는 VHH이며, 항체 경쇄 정상 영역과 연결되어 있는 경우, 항원 결합 도메인과 항체 경쇄 정상 영역의 경계 부근이란, 단도메인 항체 101번(Kabat 넘버링)의 아미노산으로부터 항체 경쇄 정상 영역 130번(EU 넘버링)(Kabat 넘버링 130번)의 아미노산의 사이를 가리킬 수 있고, 바람직하게는 단도메인 항체 109번(Kabat 넘버링)의 아미노산으로부터 항체 경쇄 정상 영역 113번(EU 넘버링)(Kabat 넘버링 113번)의 아미노산의 사이를 가리킬 수 있다. 항원 결합 도메인이 VL로부터 작성된 단도메인 항체의 경우, 항원 결합 도메인과 항체 정상 영역의 경계 부근이란, 단도메인 항체 96번(Kabat 넘버링)으로부터, 바람직하게는 단도메인 항체 104번(Kabat 넘버링)으로부터이다.
- [0674] 본 발명의 몇 가지 실시태양에 있어서, 폴리펩티드는 IgG 항체-유사 분자이다. 이와 같은 실시태양의 예로서, 그것만으로 한정되지 않지만, 예를 들어, 운반 부분이 IgG 항체 정상 영역을 포함하고, 항원 결합 도메인인 단도메인 항체가 IgG 항체의 VH를 대신하여 취하여, VL에 의해 항원 결합 활성이 억제되는 실시태양, 또는 운반 부분이 IgG 항체 정상 영역을 포함하고, 항원 결합 도메인인 단도메인 항체가 IgG 항체의 VL을 대신하여 취하여, VH에 의해 항원 결합 활성이 억제되는 실시태양, 또는 운반 부분이 IgG 항체 정상 영역을 포함하고, 항원 결합 도메인인 단도메인 항체가 IgG 항체의 VH/VL의 한쪽을 대신하여 취하고, 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 억제하는 다른 단도메인 항체가 IgG 항체의 VH/VL의 다른 쪽을 대신하여 취하는 실시태양 등을 들 수 있다.
- [0675] 본 명세서에서 이용되는 용어 「IgG 항체-유사 분자」는, IgG 항체와 같은 정상 도메인 또는 정상 영역의 구조와 실질적으로 유사한 부분과, IgG 항체와 같은 가변 도메인 또는 가변 영역의 구조와 실질적으로 유사한 부분

을 갖고, IgG 항체와 실질적으로 유사한 입체 구조를 가지는 분자를 정의하기 위해서 이용된다. 단, 본 명세서의 「IgG 항체-유사 분자」는, IgG 항체와 유사한 구조를 유지한 채로 항원 결합 활성을 발휘하는 것에 한정되지 않는다.

[0676] 폴리펩티드 중에 포함되는 항원 결합 도메인은, 1개여도 복수여도 된다. 복수의 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 각각 억제하는 억제 도메인도, 1개여도 복수여도 된다. 복수의 항원 결합 도메인이 각각 억제 도메인과 회합을 형성하고 있어도 된다. 복수의 항원 결합 도메인이 각각 운반 부분과 융합하고 있어도 된다. 복수의 항원 결합 도메인이 각각 폴리펩티드로부터 유리되는 것이 가능해도 된다. 복수의 항원 결합 도메인을 유리시키기 위한 절단 사이트는, 각 항원 결합 도메인과 대응하여 복수여도 된다.

[0677] 폴리펩티드가 IgG 항체-유사 분자인 경우, 도 7에 나타난 바와 같은, IgG 항체의 2개의 가변 영역에 상당하는 부분에 각각 항원 결합 도메인을 마련하는 실시태양은, 본 발명에 접한 당업자이면 이해할 수 있는 실시태양일 것이다. 그 양팔에 짜넣어진 항원 결합 도메인은, 마찬가지로의 항원 결합 특이성을 가지고 있어도, 상이한 항원 결합 특이성을 가지고 있어도, 본 발명에 접한 당업자이면 당연히 이해할 수 있는 실시태양이며, 본 발명의 범위에서 일탈하고 있지 않은 것은 분명하다.

[0678] 본 발명의 몇 가지 실시태양에 있어서, 항원 결합 도메인이 추가로 제 2 항원 결합 도메인과 연결되어 있다. 제 2 항원 결합 도메인의 예로서, 그것만으로 한정되지 않지만, 예를 들어, 단도메인 항체, 항체 단편, 생체 내에 존재하는 세포막 단백질 Avimer에 포함되는 35 아미노산 정도의 A 도메인으로 불리는 모듈(국제 공개 WO2004/044011, WO2005/040229), 세포막에 발현하는 당단백질인 fibronectin 중의 단백질에 결합하는 도메인인 10Fn3 도메인을 포함하는 Adnectin(국제 공개 WO2002/032925), ProteinA의 58 아미노산으로 이루어지는 3개의 헬릭스의 다발(bundle)을 구성하는 IgG 결합 도메인을 scaffold로 하는 Affibody(국제 공개 WO1995/001937), 33 아미노산 잔기를 포함하는 턴과 2개의 역평행 헬릭스 및 루프의 서브유닛이 반복하여 겹쳐 쌓인 구조를 가지는 안키린 반복(ankyrin repeat: AR)의 분자 표면에 노출되는 영역인 DARPins(Designed Ankyrin Repeat proteins)(국제 공개 WO2002/020565), 호중구 젤라티나제 결합 리포칼린(neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL)) 등의 리포칼린 분자에 있어서 고도로 보존된 8개의 역평행 스트랜드가 중앙 방향으로 비틀린 배럴 구조의 편측을 지탱하는 4개의 루프 영역인 Anticalin 등(국제 공개 WO2003/029462), 칠성장어, 떡장어 등 무악류의 획득 면역 시스템으로서 이뮤노글로불린의 구조를 갖지 않는 가변성 림프구 수용체(variable lymphocyte receptor(VLR))의 류신 잔기가 풍부한 리피트(leucine-rich-repeat(LRR)) 모듈이 반복하여 겹쳐 쌓인 말굽형의 구조의 내부의 평행형 시트 구조의 오목한 영역(국제 공개 WO2008/016854) 등을 들 수 있다. 바람직한 실시태양에 있어서는, 제 2 항원 결합 도메인은, 항원 결합 도메인과 상이한 항원 결합 특이성을 갖는다. 바람직한 실시태양에 있어서는, 연결된 항원 결합 도메인과 제 2 항원 결합 도메인의 분자량은 60 kDa 이하이다.

[0679] 보다 구체적인 몇 가지 실시태양에 있어서, 항원 결합 도메인과 제 2 항원 결합 도메인은 각각 상이한 항원 결합 특이성을 갖는 단도메인 항체이며, 연결된 항원 결합 도메인과 제 2 항원 결합 도메인은 폴리펩티드로부터 유리 가능하고, 유리 후의 항원 결합 도메인과 제 2 항원 결합 도메인이 이중 특이적 항원 결합 분자를 형성하고 있다. 이와 같은 이중 특이적 항원 결합 분자의 예로서, 그것만으로 한정되지 않지만, 예를 들어, 항원 결합 도메인이 표적 세포 표면 항원에 특이적으로 결합하고, 제 2 항원 결합 도메인은 면역 세포 표면 항원에 특이적으로 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자, 항원 결합 도메인과 제 2 항원 결합 도메인이 동일 항원의 상이한 서브유닛에 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자, 항원 결합 도메인과 제 2 항원 결합 도메인이 동일 항원 중의 상이한 에피토프에 결합하는 이중 특이적 항원 결합 분자 등을 들 수 있다. 이와 같은 이중 특이적 항원 결합 분자는, 표적 세포에 기인하는 질환의 치료에 있어서, 면역 세포를 표적 세포의 근방까지 리크루팅할 수 있어 유용하다고 생각된다.

[0680] 제 2 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성은, 운반 부분에 의해 억제되고 있어도, 운반 부분에 의해 억제되고 있지 않아도 된다. 또한, 제 2 항원 결합 도메인은, 운반 부분의 일부 구조와 회합을 형성하고 있어도, 형성하고 있지 않아도 된다. 특히, 항원 결합 도메인과 제 2 항원 결합 도메인이 상이한 항원 결합 특이성을 갖는 경우, 예를 들어, 도 8에 나타내듯이, 제 2 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성이 억제되어 있지 않아도, 또한 제 2 항원 결합 도메인이 운반 부분의 일부 구조와 회합을 형성하고 있지 않아도, 항원 결합 도메인이 유리되지 않는 상태에 있어서, 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 발휘하지 못하여, 항원 결합 도메인과 제 2 항원 결합 도메인이 연결되어 있는 이중 특이적 항원 결합 분자는, 이중 특이적으로 2종류의 항원에 결합하는 기능을 발휘할 수 없다.

- [0681] 도 8에 있어서, 항원 결합 도메인이 추가로 제 2 항원 결합 도메인과 연결되고 있는 일 태양을 예시하고 있다.
- [0682] 본 명세서에 있어서, 용어 「특이성」이란, 특이적으로 결합하는 분자의 한쪽의 분자가 그 1 또는 복수의 결합하는 상대방의 분자 이외의 분자에 대해서는 실질적으로 결합하지 않는 성질을 말한다. 항원 결합 도메인이 특정한 항원 중에 포함되는 에피토프에 특이성을 갖는 경우에도 이용된다. 또한, 항원 결합 도메인이 어떤 항원 중에 포함되는 복수의 에피토프 중 특정한 에피토프에 대해서 특이성을 갖는 경우에도 이용된다. 여기에서, 실질적으로 결합하지 않는다면 결합 활성의 향에서 기재되는 방법에 준하여 결정되고, 상기 상대방 이외의 분자에 대한 특이적 결합 분자의 결합 활성이, 상기 상대방의 분자에 대한 결합 활성의 80% 이하, 통상 50% 이하, 바람직하게는 30% 이하, 특히 바람직하게는 15% 이하의 결합 활성을 나타내는 것을 말한다.
- [0683] 또한 본 발명은, 본 발명의 폴리펩티드 및 의약적으로 허용되는 담체를 포함하는 의약 조성물(약제)에 관한 것이다.
- [0684] 본 명세서에서 이용되는 「치료」(및, 그 문법상의 파생어, 예를 들어 「치료한다」, 「치료하는 것」 등)는, 치료되는 개체의 자연 경과를 개변하는 것을 기도한 임상적 개입을 의미하고, 예방을 위해서도, 임상적 병태의 경과 동안에도 실시될 수 있다. 치료의 바람직한 효과는, 그것만으로 한정되는 것은 아니지만, 질환의 발생 또는 재발의 방지, 증상의 경감, 질환에 의한 임의의 직접적 또는 간접적인 병리적 영향의 감약, 전이의 방지, 질환의 진행 속도의 저감, 질환 상태의 회복 또는 완화, 및 관해(寬解) 또는 개선된 예후를 포함한다. 몇 가지 실시태양에 있어서, 본 발명의 폴리펩티드는, 질환의 발증을 늦추거나, 또는 질환의 진행을 느리게 하기 위해서 이용된다.
- [0685] 본 발명에 있어서 의약 조성물이란, 통상, 질환의 치료 혹은 예방, 혹은 검사·진단을 위한 약제를 말한다. 또한, 본 발명에 있어서, 「폴리펩티드를 포함하는 의약 조성물」이라는 용어는, 「폴리펩티드를 치료 대상으로 투여하는 것을 포함하는 질환의 치료 방법」이라고 바꾸어 말하는 것도 가능하고, 「질환을 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서의 폴리펩티드의 사용」이라고 바꾸어 말하는 것도 가능하다. 또한, 「폴리펩티드를 포함하는 의약 조성물」이라는 용어를, 「질환을 치료하기 위한 폴리펩티드의 사용」이라고 바꾸어 말하는 것도 가능하다.
- [0686] 본 발명의 의약 조성물은, 당업자에게 공지된 방법을 이용하여 제제화될 수 있다. 예를 들어, 물 혹은 그 이외의 약학적으로 허용할 수 있는 액과의 무균성 용액, 또는 현탁액제의 주사제의 형태로 비경구적으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 약리학상 허용되는 담체 혹은 매체, 구체적으로는, 멸균수나 생리 식염수, 식물유, 유화제, 현탁제, 계면활성제, 안정제, 향미제, 부형제, 비히클, 방부제, 결합제 등과 적절히 조합하여, 일반적으로 인정된 제약 실시예에 요구되는 단위 용량 형태로 혼화하는 것에 의해 제제화될 수 있다. 이들 제제에 있어서의 유효 성분량은, 지시받은 범위의 적당한 용량이 얻어지도록 설정된다.
- [0687] 주사를 위한 무균 조성물은 주사용 증류수와 같은 비히클을 이용하여 통상의 제제 실시예에 따라 처방될 수 있다. 주사용의 수용액으로서, 예를 들어 생리 식염수, 포도당이나 그 외의 보조약(예를 들어 D-소르비톨, D-만노스, D-만니톨, 염화 나트륨)을 포함하는 등장액을 들 수 있다. 적절한 용해 보조제, 예를 들어 알코올(에탄올 등), 폴리알코올(프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 비이온성 계면활성제(폴리소르베이트 80(TM), HCO-50 등)가 병용될 수 있다.
- [0688] 유성액으로서의 참기름, 대두유를 들 수 있고, 용해 보조제로서 벤조산 벤질 및/또는 벤질알코올도 병용될 수 있다. 또한, 완충제(예를 들어, 인산염 완충액 및 아세트산 나트륨 완충액), 무통화제(예를 들어, 염산 프로카인), 안정제(예를 들어, 벤질알코올 및 페놀), 산화 방지제와 배합될 수 있다. 조제된 주사액은 통상, 적절한 앰플에 충전된다.
- [0689] 본 발명의 의약 조성물은, 바람직하게는 비경구 투여에 의해 투여된다. 예를 들어, 주사제형, 경비투여제형, 경피투여제형, 경피투여형의 조성물이 투여된다. 예를 들어, 정맥내 주사, 근육내 주사, 복강내 주사, 피하 주사 등에 의해 전신 또는 국부적으로 투여될 수 있다.
- [0690] 투여 방법은, 환자의 연령, 증상에 따라 적절히 선택될 수 있다. 폴리펩티드를 함유하는 의약 조성물의 투여량은, 예를 들어, 1회에 대해 체중 1kg당 0.0001mg에서 1000mg의 범위로 설정될 수 있다. 또는, 예를 들어, 환자당 0.001~100000mg의 투여량이 설정될 수 있지만, 본 발명은 이들 수치에 반드시 제한되는 것은 아니다. 투여량 및 투여 방법은, 환자의 체중, 연령, 증상 등에 따라 변동하지만, 당업자이면 그들 조건을 고려하여 적당한 투여량 및 투여 방법을 설정하는 것이 가능하다.

- [0691] 또한, 본 발명은, 억제 도메인을 갖는 운반 부분과 항원 결합 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 제조하는 방법에도 관한 것이다.
- [0692] 본 발명의 폴리펩티드를 제조하는 하나의 방법으로서, 항원 결합 활성을 갖는 항원 결합 도메인을 취득하고, 당해 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성이 억제 도메인에 의해 억제되도록, 항원 결합 도메인과 운반 부분을 연결시켜 폴리펩티드 전구체를 형성시키고, 당해 폴리펩티드 전구체에 추가로 절단 사이트를 삽입, 혹은 당해 폴리펩티드 전구체의 일부를 절단 사이트로 개변하는 방법이 있다. 폴리펩티드 전구체에 절단 사이트를 도입할 수 있으면 되고, 절단 사이트의 도입 방법은, 절단 사이트의 삽입과 폴리펩티드 전구체의 일부의 개변의 어느 것이어도 된다. 더욱이, 양방의 수단을 합쳐, 폴리펩티드 전구체에 개변 사이트를 도입할 수도 있는 것에 대하여는, 본 명세서에 접한 당업자이면 분명하고, 본 발명의 범위를 일탈하지 않을 것이다.
- [0693] 또한, 본 발명의 폴리펩티드를 제조하는 다른 방법으로서, 항원 결합 활성을 갖는 항원 결합 도메인을 취득하고, 당해 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성이 억제 도메인에 의해 억제되도록, 항원 결합 도메인과 운반 부분을 절단 사이트를 개재시켜 연결시켜 폴리펩티드를 형성시키는 방법도 있다. 항원 결합 도메인과 운반 부분을 절단 사이트를 개재시켜 연결시킬 때, 항원 결합 도메인과 운반 부분 사이에 절단 사이트가 끼워지는 형태여도 되고, 항원 결합 도메인의 일부 또는/및 운반 부분의 일부를 개변하여 절단 사이트의 일부로서 사용하는 형태여도 된다.
- [0694] 항원 결합 도메인으로서 단도메인 항체를 사용하고, 절단 사이트로서 프로테아제 절단 서열을 사용하는 실시태양에 대해, 이하의 폴리펩티드 제조 방법을 기재한다.
- [0695] 본 발명의 일 실시태양에 있어서, 억제 도메인을 갖는 운반 부분과 항원 결합 도메인을 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법은, 이하의 공정:
- [0696] (a) 표적 항원에 결합하는 단도메인 항체를 취득하는 공정;
- [0697] (b) (a) 공정에서 취득한 단도메인 항체의 항원 결합 활성이 운반 부분의 억제 도메인에 억제되도록, 당해 단도메인 항체와 당해 운반 부분을 연결시켜 폴리펩티드 전구체를 형성시키는 공정;
- [0698] (c) 상기 폴리펩티드 전구체에 프로테아제 절단 서열을 도입하는 공정;
- [0699] 을 포함하는 제조 방법이다.
- [0700] 본 발명의 일 실시태양에 있어서, 억제 도메인을 갖는 운반 부분과 항원 결합 도메인을 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법은, 이하의 공정:
- [0701] (a) 표적 항원에 결합하는 단도메인 항체를 취득하는 공정;
- [0702] (b) (a) 공정에서 취득한 단도메인 항체의 항원 결합 활성이 운반 부분의 억제 도메인에 억제되도록, 당해 단도메인 항체와 당해 운반 부분을 연결시켜 폴리펩티드 전구체를 형성시키는 공정;
- [0703] (c) 상기 단도메인 항체와 상기 운반 부분의 경계 부근에 프로테아제 절단 서열을 도입하는 공정;
- [0704] 을 포함하는 제조 방법이다.
- [0705] 본 발명의 일 실시태양에 있어서, 억제 도메인을 갖는 운반 부분과 항원 결합 도메인을 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법은, 이하의 공정:
- [0706] (a) 표적 항원에 결합하는 단도메인 항체를 취득하는 공정;
- [0707] (b) (a) 공정에서 취득한 단도메인 항체의 항원 결합 활성이 운반 부분의 억제 도메인에 억제되도록, 당해 단도메인 항체를, 프로테아제 절단 서열을 개재시켜 당해 운반 부분과 연결시켜 폴리펩티드를 형성시키는 공정;
- [0708] 을 포함하는 제조 방법이다.
- [0709] 특정한 실시태양에 있어서, 억제 도메인을 갖는 운반 부분과 항원 결합 도메인을 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법은, 추가로 이하의 공정:
- [0710] (d) 상기 폴리펩티드 또는 상기 폴리펩티드 전구체 내에 짜넣어진 상기 단도메인 항체의 상기 표적 항원에 대한 결합 활성이 약해지거나 혹은 상실되어 있음을 확인하는 공정;
- [0711] 을 포함하는 제조 방법이다. 본 발명에 있어서 「결합 활성이 약해진다」라는 것은, 연결 전과 비교하여 표적

항원에 대한 결합 활성이 감소하고 있는 것을 의미하고, 감소의 정도는 묻지 않는다.

- [0712] 특정한 실시태양에 있어서, 억제 도메인을 갖는 운반 부분과 항원 결합 도메인을 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법은, 추가로 이하의 공정:
- [0713] (e) 상기 프로테아제 절단 서열을 프로테아제로 절단함으로써 상기 단도메인 항체를 유리시켜, 유리의 단도메인 항체가 항원에 결합하는 것을 확인하는 공정;
- [0714] 을 포함하는 제조 방법이다.
- [0715] 본 발명의 일 실시태양에 있어서, 억제 도메인을 갖는 운반 부분과 항원 결합 도메인을 포함하는 IgG 항체-유사 분자인 폴리펩티드의 제조 방법은, 이하의 공정:
- [0716] (a) 표적 항원에 결합하는 단도메인 항체를 취득하는 공정;
- [0717] (b) (a) 공정에서 취득한 단도메인 항체의 항원 결합 활성이 억제되도록, 당해 단도메인 항체를 IgG 항체의 VH의 대신으로서 VL과 회합시키거나, 또는 당해 단도메인 항체를 IgG 항체의 VL의 대신으로서 VH와 회합시키는 것에 의해, 상기 단도메인 항체가 도입된 IgG 항체-유사 분자 전구체를 형성시키는 공정;
- [0718] (c) 상기 단도메인 항체가 도입된 IgG 항체-유사 분자 전구체에 프로테아제 절단 서열을 도입하는 공정;
- [0719] 을 포함하는 제조 방법이다.
- [0720] 본 발명의 일 실시태양에 있어서, 억제 도메인을 갖는 운반 부분과 항원 결합 도메인을 포함하는 IgG 항체-유사 분자인 폴리펩티드의 제조 방법은, 이하의 공정:
- [0721] (a) 표적 항원에 결합하는 단도메인 항체를 취득하는 공정;
- [0722] (b) (a) 공정에서 취득한 단도메인 항체의 항원 결합 활성이 억제되도록, 당해 단도메인 항체를 IgG 항체의 VH의 대신으로서 VL과 회합시키거나, 또는 당해 단도메인 항체를 IgG 항체의 VL의 대신으로서 VH와 회합시키는 것에 의해, 상기 단도메인 항체가 도입된 IgG 항체-유사 분자 전구체를 형성시키는 공정;
- [0723] (c) 상기 단도메인 항체와 상기 IgG 항체-유사 분자 전구체 내의 항체 정상 영역의 경계 부근에 프로테아제 절단 서열을 도입하는 공정;
- [0724] 을 포함하는 제조 방법이다.
- [0725] 본 발명의 일 실시태양에 있어서, 억제 도메인을 갖는 운반 부분과 항원 결합 도메인을 포함하는 IgG 항체-유사 분자인 폴리펩티드의 제조 방법은, 이하의 공정:
- [0726] (a) 표적 항원에 결합하는 단도메인 항체를 취득하는 공정;
- [0727] (b) (a) 공정에서 취득한 단도메인 항체의 항원 결합 활성이 억제되도록, 당해 단도메인 항체를 IgG 항체 VH 또는 VL의 대신으로서 프로테아제 절단 서열을 개재시켜 IgG 항체의 중쇄 정상 영역 또는 경쇄 정상 영역과 연결시켜, 상기 단도메인 항체가 도입된 IgG 항체-유사 분자를 형성시키는 공정;
- [0728] 을 포함하는 제조 방법이다.
- [0729] 특정한 실시태양에 있어서, 억제 도메인을 갖는 운반 부분과 항원 결합 도메인을 포함하는 IgG 항체-유사 분자인 폴리펩티드의 제조 방법은, 추가로 이하의 공정:
- [0730] (d) 상기 IgG 항체-유사 분자 또는 상기 IgG 항체-유사 분자 전구체에 도입된 상기 단도메인 항체의 상기 표적 항원에 대한 결합 활성이 약해지거나 혹은 상실되어 있음을 확인하는 공정;
- [0731] 을 포함하는 제조 방법이다. 본 발명에 있어서 「결합 활성이 약해진다」라는 것은, 회합 전 또는 연결 전과 비교하여 표적 항원에 대한 결합 활성이 감소하고 있는 것을 의미하고, 감소의 정도는 묻지 않는다.
- [0732] 특정한 실시태양에 있어서, 억제 도메인을 갖는 운반 부분과 항원 결합 도메인을 포함하는 IgG 항체-유사 분자인 폴리펩티드의 제조 방법은, 추가로 이하의 공정:
- [0733] (e) 상기 프로테아제 절단 서열을 프로테아제로 절단함으로써 상기 단도메인 항체를 유리시켜, 유리의 단도메인 항체가 상기 표적 항원에 결합하는 것을 확인하는 공정;
- [0734] 을 포함하는 제조 방법이다.

- [0735] 억제 도메인으로서 VH/VL/VHH를 사용하는 경우, 단도메인 항체의 항원 결합 활성을 운반 부분의 억제 도메인으로 억제시키는 방법으로서, 단도메인 항체와 VH/VL/VHH를 회합시키는 방법이 있다. 준비한 단도메인 항체의 항원 결합 활성을 억제하는 VH/VL/VHH는, 기지의 VH/VL/VHH를 당해 단도메인 항체와 회합시키고, 회합 전후의 단도메인 항체의 항원 결합 활성을 비교함으로써 스크리닝할 수 있다.
- [0736] 또한, 단도메인 항체의 항원 결합 활성을 특정한 VH/VL/VHH로 억제시키는 다른 방법으로서, 단도메인 항체 중의, VH/VL/VHH와의 회합에 관여하고 있는 아미노산 잔기를 치환하여 회합을 촉진하는 것, 혹은 그들 아미노산 잔기가 최초부터 회합을 촉진할 수 있는 아미노산인 단도메인 항체를 사용하는 것에 의해, 회합 전후의 항원 결합 활성의 차이가 원하는 레벨에 있는 단도메인 항체/억제 도메인 페어를 준비할 수도 있다.
- [0737] 본 발명의 일 실시태양에 있어서, 억제 도메인을 갖는 운반 부분과 항원 결합 도메인을 포함하는 IgG 항체-유사 분자 폴리펩티드의 제조 방법은, 이하의 공정:
- [0738] (a) 단도메인 항체 중의, 항체 VH와의 회합에 관여하는 아미노산 잔기를 치환하거나, 또는 단도메인 항체 중의, 항체 VL과의 회합에 관여하는 아미노산 잔기를 치환하여, 당해 단도메인 항체의 표적 항원에 대한 결합 활성을 유지하는 개변 단도메인 항체를 제작하는 공정;
- [0739] (b) (a) 공정에서 제작한 개변 단도메인 항체의 항원 결합 활성을 억제하도록, 당해 개변 단도메인 항체를 항체 VL과 회합시키거나, 또는 당해 개변 단도메인 항체를 항체 VH와 회합시키는 것에 의해, 당해 개변 단도메인 항체가 도입된 IgG 항체-유사 분자 전구체를 형성시키는 공정;
- [0740] (c) 상기 개변 단도메인 항체가 도입된 IgG 항체-유사 분자 전구체에 프로테아제 절단 서열을 도입하는 공정;
- [0741] 을 포함하는 제조 방법이다.
- [0742] 본 발명의 일 실시태양에 있어서, 억제 도메인을 갖는 운반 부분과 항원 결합 도메인을 포함하는 IgG 항체-유사 분자인 폴리펩티드의 제조 방법은, 이하의 공정:
- [0743] (a) 단도메인 항체 중의, 항체 VH와의 회합에 관여하는 아미노산 잔기를 치환하거나, 또는 단도메인 항체 중의, 항체 VL과의 회합에 관여하는 아미노산 잔기를 치환하여, 당해 단도메인 항체의 표적 항원에 대한 결합 활성을 유지하는 개변 단도메인 항체를 제작하는 공정;
- [0744] (b) (a) 공정에서 제작한 개변 단도메인 항체의 항원 결합 활성을 억제하도록, 당해 개변 단도메인 항체를 항체 VL과 회합시키거나, 또는 당해 개변 단도메인 항체를 항체 VH와 회합시키는 것에 의해, 당해 개변 단도메인 항체가 도입된 IgG 항체-유사 분자 전구체를 형성시키는 공정;
- [0745] (c) 상기 개변 단도메인 항체와 상기 IgG 항체-유사 분자 전구체의 정상 영역의 경계 부근에 프로테아제 절단 서열을 도입하는 공정;
- [0746] 을 포함하는 제조 방법이다.
- [0747] 본 발명의 일 실시태양에 있어서, 억제 도메인을 갖는 운반 부분과 항원 결합 도메인을 포함하는 IgG 항체-유사 분자인 폴리펩티드의 제조 방법은, 이하의 공정:
- [0748] (a) 단도메인 항체 중의, 항체 VH와의 회합에 관여하는 아미노산 잔기를 치환하거나, 또는 단도메인 항체 중의, 항체 VL과의 회합에 관여하는 아미노산 잔기를 치환하여, 당해 단도메인 항체의 표적 항원에 대한 결합 활성을 유지하는 개변 단도메인 항체를 제작하는 공정;
- [0749] (b) (a) 공정에서 제작한 개변 단도메인 항체의 항원 결합 활성을 억제하도록, 당해 개변 단도메인 항체를 프로테아제 절단 서열을 개재시켜 IgG 항체의 중쇄 정상 영역과 연결시키거나, 또는 당해 개변 단도메인 항체를 프로테아제 절단 서열을 개재시켜 IgG 항체의 경쇄 정상 영역과 연결시켜, 당해 개변 단도메인 항체가 도입된 IgG 항체-유사 분자를 형성시키는 공정;
- [0750] 을 포함하는 제조 방법이다.
- [0751] 특정한 실시태양에 있어서, 억제 도메인을 갖는 운반 부분과 항원 결합 도메인을 포함하는 IgG 항체-유사 분자인 폴리펩티드의 제조 방법은, 추가로 이하의 공정:
- [0752] (d) 상기 IgG 항체-유사 분자 또는 상기 IgG 항체-유사 분자 전구체에 도입된 상기 개변 단도메인 항체의 상기 표적 항원에 대한 결합 활성이 약해지거나 혹은 상실되어 있음을 확인하는 공정;

- [0753] 을 포함하는 제조 방법이다. 본 발명에 있어서 「결합 활성이 약해진다」라는 것은, 회합 전 또는 연결 전과 비교하여 표적 항원에 대한 결합 활성이 감소하고 있는 것을 의미하고, 감소의 정도는 묻지 않는다.
- [0754] 특정한 실시태양에 있어서, 억제 도메인을 갖는 운반 부분과 항원 결합 도메인을 포함하는 IgG 항체-유사 분자인 폴리펩티드의 제조 방법은, 추가로 이하의 공정:
- [0755] (e) 상기 프로테아제 절단 서열을 프로테아제로 절단함으로써 상기 개변 단도메인 항체를 유리시키고, 유리된 개변 단도메인 항체가 상기 표적 항원에 결합하는 것을 확인하는 공정;
- [0756] 을 포함하는 제조 방법이다.
- [0757] 또한, 본 발명은, 억제 도메인을 갖는 운반 부분과 항원 결합 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에도 관한 것이다.
- [0758] 본 발명에 있어서의 폴리뉴클레오티드는, 통상, 적당한 벡터에 담지(삽입)되어, 숙주 세포에 도입된다. 해당 벡터로서는, 삽입한 핵산을 안정되게 유지하는 것이면 특별히 제한되지 않고, 예를 들어 숙주에 대장균을 이용한다면, 클로닝용 벡터로서는 pBluescript 벡터(Stratagene사제) 등이 바람직하지만, 시판되는 여러 가지 벡터를 이용할 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드를 생산하는 목적에 있어서 벡터를 이용하는 경우에는, 특히 발현 벡터가 유용하다. 발현 벡터로서는, 시험관 내, 대장균 내, 배양 세포 내, 생물 개체 내에서 폴리펩티드를 발현하는 벡터이면 특별히 제한되지 않지만, 예를 들어, 시험관 자연 발현이면 pBEST 벡터(프로메가사제), 대장균이면 pET 벡터(Invitrogen사제), 배양 세포이면 pME18S-FL3 벡터(GenBank Accession No. AB009864), 생물 개체이면 pME18S 벡터(Mol Cell Biol. 8:466-472(1988)) 등이 바람직하다. 벡터로의 본 발명의 DNA의 삽입은, 통상적 방법에 의해, 예를 들어, 제한 효소 사이트를 이용한 리가제 반응에 의해 행할 수 있다(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11. 11).
- [0759] 상기 숙주 세포로서는 특별히 제한은 없고, 목적에 따라 여러 가지 숙주 세포가 이용된다. 폴리펩티드를 발현시키기 위한 세포로서는, 예를 들어, 세균 세포(예: 스트렙토코커스, 스타필로코커스, 대장균, 스트렙토미세스, 고초균), 진균류 세포(예: 효모, 아스페르길루스), 곤충 세포(예: 드로소필라 S2, 스포뎀테라 SF9), 동물 세포(예: CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK293, Bowes 멜라노마 세포) 및 식물 세포를 예시할 수 있다. 숙주 세포로의 벡터 도입은, 예를 들어, 인산 칼슘 침전법, 전기 펄스 천공법(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9. 9), 리포펙타민법(GIBCO-BRL사제), 마이크로인젝션법 등의 공지된 방법으로 행하는 것이 가능하다.
- [0760] 숙주 세포에 있어서 발현한 폴리펩티드를 세포체의 내강에, 세포 주변강에, 또는 세포 외의 환경에 분비시키기 위해서, 적당한 분비 시그널을 목적하는 폴리펩티드에 짜넣을 수 있다. 이들 시그널은 목적하는 폴리펩티드에 대해서 내인성이어도, 이종 시그널이어도 된다.
- [0761] 상기 제조 방법에 있어서의 폴리펩티드의 회수는, 본 발명의 폴리펩티드가 배지에 분비되는 경우는, 배지를 회수한다. 본 발명의 폴리펩티드가 세포 내에 생성되는 경우는, 그 세포를 우선 용해하고, 그 후에 폴리펩티드를 회수한다.
- [0762] 제조할 세포 배양물로부터 본 발명의 폴리펩티드를 회수하여 정제하려면, 황산 암모늄 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 어피타이 크로마토그래피, 하이드록실 아파타이트 크로마토그래피 및 렉틴 크로마토그래피를 포함하는 공지된 방법을 이용할 수 있다.
- [0763] 또한, 본 발명의 몇 가지 실시태양에 이용되는 항원 결합 도메인으로서 단도메인 항체를 들 수 있고, 그들의 실시태양에 있어서, 당해 단도메인 항체는, 특정한 VL과 회합함으로써, 혹은 특정한 VH와 회합함으로써, 혹은 특정한 VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제된다. 본 발명은 또한, 그와 같은 단도메인 항체를 스크리닝하는 방법에도 관한 것이다.
- [0764] 단도메인 항체의 항원 결합 활성을 억제하는 VL/VH/VHH로서, 서열 기지의 VL/VH/VHH, 예를 들어 서열이 IMGT나 Kabat 데이터베이스에 등록되어 있는 것을 사용할 수 있다. 또한, 새롭게 VL/VH/VHH를 인간 항체 라이브러리 등으로부터 동정한 서열도 사용할 수 있다. 이들 서열을 조합하여 단백질을 조제하고, 상기의 방법을 이용하여 결합 활성을 측정함으로써, 단도메인 항체의 결합 활성을 억제하는 VL/VH/VHH를 선정할 수 있다.
- [0765] 본 발명의 몇 가지 실시태양에 있어서, 단도메인 항체의 항원 결합 활성을 억제하는 VL/VH/VHH로서, 인간 항체 접라인 서열을 갖는 것을 사용할 수 있다. 예를 들어, 억제 도메인으로서 VL을 사용하는 경우, kappa쇄의 프레

임워크 서열을 갖는 VL, lamda쇄의 프레임워크 서열을 갖는 VL을 사용할 수 있다. 또한, kappa쇄의 프레임워크 서열과 lamda쇄의 프레임워크 서열을 조합한 프레임워크 서열과 같은, 개변된 프레임워크 서열을 갖는 VL을 사용할 수도 있다.

- [0766] 본 발명의 일 실시태양에 있어서, 이하의 공정:
- [0767] (a) 표적 항원 결합 활성을 갖는 단도메인 항체를 취득하는 공정;
- [0768] (b) (a) 공정에서 취득한 단도메인 항체를 특정한 VL과 회합시키는 공정;
- [0769] (c) (b) 공정에서 특정한 VL과 회합시킨 상기 단도메인 항체의 상기 항원에 대한 결합 활성이 약해지거나 혹은 상실되어 있음을 확인하는 공정;
- [0770] 을 포함하는, 특정한 VL과 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단도메인 항체를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 본 발명에 있어서 「결합 활성이 약해진다」라는 것은, 회합 전과 비교하여 표적 항원에 대한 결합 활성이 감소하고 있는 것을 의미하고, 감소의 정도는 묻지 않는다.
- [0771] 본 발명의 일 실시태양에 있어서, 이하의 공정:
- [0772] (a) 표적 항원 결합 활성을 갖는 단도메인 항체를 취득하는 공정;
- [0773] (b) (a) 공정에서 취득한 단도메인 항체를 특정한 VH와 회합시키는 공정;
- [0774] (c) (b) 공정에서 특정한 VH와 회합시킨 상기 단도메인 항체의 상기 항원에 대한 결합 활성이 약해지거나 혹은 상실되어 있음을 확인하는 공정;
- [0775] 을 포함하는, 특정한 VH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단도메인 항체를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 본 발명에 있어서 「결합 활성이 약해진다」라는 것은, 회합 전과 비교하여 표적 항원에 대한 결합 활성이 감소하고 있는 것을 의미하고, 감소의 정도는 묻지 않는다.
- [0776] 본 발명의 일 실시태양에 있어서, 이하의 공정:
- [0777] (a) 표적 항원 결합 활성을 갖는 단도메인 항체를 취득하는 공정;
- [0778] (b) (a) 공정에서 취득한 단도메인 항체를 특정한 VHH와 회합시키는 공정;
- [0779] (c) (b) 공정에서 특정한 VHH와 회합시킨 상기 단도메인 항체의 상기 항원에 대한 결합 활성이 약해지거나 혹은 상실되어 있음을 확인하는 공정;
- [0780] 을 포함하는, 특정한 VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단도메인 항체를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 본 발명에 있어서 「결합 활성이 약해진다」라는 것은, 회합 전과 비교하여 표적 항원에 대한 결합 활성이 감소하고 있는 것을 의미하고, 감소의 정도는 묻지 않는다.
- [0781] 단도메인 항체와 특정한 VL/VH/VHH를 회합시키는 방법의 예로서, 완전 항체, Fab, Fab', (Fab)₂ 등 VH와 VL 양방을 포함하는 항체 또는 항체 단편 중의, VH와 VL 중 한쪽의 서열 대신에 단도메인 항체의 서열을 사용하는 분자를 설계하고, 당해 서열을 갖는 폴리펩티드를 발현시키는 방법을 들 수 있다.
- [0782] 또한, 본 발명은, 특정한 VL과 회합함으로써, 혹은 특정한 VH와 회합함으로써, 혹은 특정한 VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단도메인 항체를 스크리닝하는 것에 더하여, 단도메인 항체와 특정한 VL/VH/VHH의 회합을 촉진함으로써, 특정한 VL과의 회합을 촉진함으로써, 혹은 특정한 VH와의 회합을 촉진함으로써, 혹은 특정한 VHH와의 회합을 촉진함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단도메인 항체를 제조하는 방법에도 관한 것이다.
- [0783] 본 발명의 일 실시태양에 있어서, 이하의 공정:
- [0784] (a) 단도메인 항체 중의, 항체 VL과의 회합에 관여하는 아미노산 잔기를 치환하여, 당해 단도메인 항체의 표적 항원에 대한 결합 활성을 유지하는 개변 단도메인 항체를 제작하는 공정;
- [0785] 을 포함하는, 특정한 VL과 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단도메인 항체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0786] 특정한 실시태양에 있어서, 추가로 이하의 공정:

- [0787] (b) (a) 공정에서 제작된 개변 단도메인 항체를 특정한 VL과 회합시키는 공정;
- [0788] (c) 당해 VL과 회합시킨 상기 개변 단도메인 항체의 항원 결합 활성이 약해지거나 혹은 상실되어 있음을 확인하는 공정;
- [0789] 을 포함하는, 특정한 VL과 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단도메인 항체를 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명에 있어서 「결합 활성이 약해진다」라는 것은, 회합 전과 비교하여 표적 항원에 대한 결합 활성이 감소하고 있는 것을 의미하고, 감소의 정도는 묻지 않는다.
- [0790] 본 발명의 일 실시태양에 있어서, 이하의 공정:
- [0791] (a) 단도메인 항체 중의, 항체 VH와의 회합에 관여하는 아미노산 잔기를 치환하여, 당해 단도메인 항체의 표적 항원에 대한 결합 활성을 유지하는 개변 단도메인 항체를 제작하는 공정;
- [0792] 을 포함하는, 특정한 VH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단도메인 항체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0793] 특정한 실시태양에 있어서, 추가로 이하의 공정:
- [0794] (b) (a) 공정에서 제작된 개변 단도메인 항체를 특정한 VH와 회합시키는 공정;
- [0795] (c) 당해 VH와 회합시킨 상기 개변 단도메인 항체의 항원 결합 활성이 약해지거나 혹은 상실되어 있음을 확인하는 공정;
- [0796] 을 포함하는, 특정한 VH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단도메인 항체를 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명에 있어서 「결합 활성이 약해진다」라는 것은, 회합 전과 비교하여 표적 항원에 대한 결합 활성이 감소하고 있는 것을 의미하고, 감소의 정도는 묻지 않는다.
- [0797] 본 발명의 일 실시태양에 있어서, 이하의 공정:
- [0798] (a) 단도메인 항체 중의, VHH와의 회합에 관여하는 아미노산 잔기를 치환하여, 당해 단도메인 항체의 표적 항원에 대한 결합 활성을 유지하는 개변 단도메인 항체를 제작하는 공정;
- [0799] 을 포함하는, 특정한 VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단도메인 항체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0800] 특정한 실시태양에 있어서, 추가로 이하의 공정:
- [0801] (b) (a) 공정에서 제작된 개변 단도메인 항체를 특정한 VHH와 회합시키는 공정;
- [0802] (c) 당해 VHH와 회합시킨 상기 개변 단도메인 항체의 항원 결합 활성이 약해지거나 혹은 상실되어 있음을 확인하는 공정;
- [0803] 을 포함하는, 특정한 VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단도메인 항체를 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명에 있어서 「결합 활성이 약해진다」라는 것은, 회합 전과 비교하여 표적 항원에 대한 결합 활성이 감소하고 있는 것을 의미하고, 감소의 정도는 묻지 않는다.
- [0804] 단도메인 항체를 특정한 VL/VH/VHH와 회합시키는 공정은, 완전 항체, Fab, Fab', (Fab)₂ 등 VH와 VL 양방을 포함하는 항체 또는 항체 단편 중의, VH와 VL 중 한쪽의 서열 대신에 단도메인 항체의 서열을 사용하는 것을 설계하고, 당해 서열을 갖는 폴리펩티드를 발현시키는 방법에 의해 행해진다.
- [0805] 본 발명의 어떤 일 실시태양에 의하면, 본 발명의 특정한 VL/VH/VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체는, 단도메인 항체와 제 1 회합 지지 도메인을 연결시킨 융합 폴리펩티드를 복수 포함하는 라이브러리로부터 취득될 수 있다.
- [0806] 본 명세서에 있어서의 「라이브러리」의 실시태양으로서, 특정한 VL/VH/VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체를 효율적으로 취득할 수 있는 라이브러리를 제공할 수 있다.
- [0807] 본 명세서에 있어서 「라이브러리」란 각각 다른 서열을 갖는 복수의 융합 폴리펩티드, 또는 이들 융합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 혹은 폴리뉴클레오티드의 세트를 말한다. 라이브러리 중에 포함되는 복수의 융합 폴리펩티드는 단일한 서열은 아니고, 서로 서열이 상이한 융합 폴리펩티드이다.
- [0808] 본 명세서에 있어서는, 서로 서열이 상이한 복수의 융합 폴리펩티드라고 하는 기재에 있어서의 「서로 서열이

상이하다」는 용어는, 라이브러리 중의 개개의 융합 폴리펩티드의 서열이 서로 상이한 것을 의미한다. 보다 바람직하게는, 라이브러리 중의 개개의 융합 폴리펩티드 중의 단도메인 항체 부분의 서열이 상이한 것을 의미한다. 즉, 라이브러리 중에 있어서의 서로 상이한 서열의 수는, 라이브러리 중의 서열이 상이한 독립 클론의 수가 반영되어, 「라이브러리 사이즈」라고 지칭되는 경우도 있다. 통상의 파지 디스플레이 라이브러리에서는 10^6 내지 10^{12} 이며, 리보솜 디스플레이법 등의 공지된 기술을 적용하는 것에 의해 라이브러리 사이즈를 10^{14} 까지 확대하는 것이 가능하다. 그렇지만, 파지 라이브러리의 패닝 선택 시에 사용되는 파지 입자의 실제의 수는, 통상, 라이브러리 사이즈보다 10 내지 10,000배 크다. 이 파징 배수는, 「라이브러리 당량수」라고도 불리지만, 동일한 아미노산 서열을 갖는 개개의 클론이 10 내지 10,000 존재할 수 있음을 나타낸다. 따라서 본 발명에 있어서의 「서로 서열이 상이하다」라는 용어는 라이브러리 당량수가 제외된 라이브러리 중의 개개의 폴리펩티드의 서열이 서로 상이한 것, 보다 구체적으로는 서로 서열이 상이한 폴리펩티드가 10^6 내지 10^{14} 분자, 바람직하게는 10^7 내지 10^{12} 분자 존재하는 것을 의미한다.

[0809] 또한, 본 발명의, 복수의 융합 폴리펩티드로 주로 이루어지는 라이브러리라고 하는 기재에 있어서의 「복수의」라는 용어는, 예를 들어 본 발명의 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 분자, 벡터 또는 바이러스는, 통상, 그 물질의 2개 이상의 종류의 집합을 가리킨다. 예를 들어, 어느 2개 이상의 물질이 특정한 형질에 관해서 서로 상이하다면, 그 물질에는 2종류 이상이 존재하는 것을 나타낸다. 예로서는, 아미노산 서열 중의 특정한 아미노산 위치에서 관찰되는 변이체 아미노산을 들 수 있다. 예를 들어, 표면에 노출된 매우 다양한 아미노산 위치의 특정한 변이체 아미노산 이외에는 실질적으로 동일한, 바람직하게는 동일한 서열인 본 발명의 2개 이상의 폴리펩티드가 있는 경우, 본 발명의 폴리펩티드는 복수개 존재한다. 다른 예에서는, 표면에 노출된 매우 다양한 아미노산 위치의 특정한 변이체 아미노산을 코딩하는 염기 이외는 실질적으로 동일한, 바람직하게는 동일한 서열인 본 발명의 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 분자가 있다면, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 분자는 복수개 존재한다.

[0810] 결합 활성을 지표로 하는 융합 폴리펩티드의 스크리닝 방법으로서, 파지 벡터를 이용한 패닝법도 적합하게 이용된다. 단도메인 항체를 코딩하는 유전자와 IgG 항체 CH1 도메인 혹은 경쇄 정상 영역을 코딩하는 유전자는, 적당한 실시태양으로 연결하는 것에 의해 융합 폴리펩티드를 형성할 수 있다. 융합 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 파지 벡터에 삽입하는 것에 의해, 융합 폴리펩티드를 표면에 발현하는 파지가 취득될 수 있다. 이 파지와 원하는 항원의 접촉 후에, 항원에 결합한 파지를 회수하는 것에 의해, 목적하는 결합 활성을 갖는 융합 폴리펩티드를 코딩하는 DNA가 회수될 수 있다. 이 조작을 필요에 따라서 반복함으로써, 원하는 결합 활성을 갖는 융합 폴리펩티드가 농축될 수 있다.

[0811] 파지 디스플레이법 이외에도, 라이브러리를 이용하여, 패닝에 의해 융합 폴리펩티드를 취득하는 기술로서, 무세포 번역계를 사용하는 기술, 세포 또는 바이러스 표면에 융합 폴리펩티드를 제시하는 기술, 에멀션을 사용하는 기술 등이 알려져 있다. 예를 들어, 무세포 번역계를 사용하는 기술로서는, 중지 코돈의 제거 등에 의해 리보솜을 개재시켜 mRNA와 번역된 단백질의 복합체를 형성시키는 리보솜 디스플레이법, 퓨로마이신 등의 화합물을 이용하여 유전자 서열과 번역된 단백질을 공유 결합시키는 cDNA 디스플레이법, mRNA 디스플레이법이나, 핵산에 대한 결합 단백질을 이용하여 유전자와 번역된 단백질의 복합체를 형성시키는 CIS 디스플레이법 등이 사용될 수 있다. 또한, 세포 또는 바이러스 표면에 융합 폴리펩티드를 제시하는 기술로서는, 파지 디스플레이법 이외에도, E. coli 디스플레이법, 그람 양성균 디스플레이법, 효모 디스플레이법, 포유류 세포 디스플레이법, 바이러스 디스플레이법 등이 사용될 수 있다. 에멀션을 사용하는 기술로서는, 에멀션 중에 유전자 및 번역 관련 분자를 내포시키는 것에 의한, 인비트로 바이러스 디스플레이법 등이 사용될 수 있다. 이들 방법은 이미 공지이다(Nat Biotechnol. 2000 Dec;18(12):1287-92, Nucleic Acids Res. 2006;34(19):e127, Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Mar 2;101(9):2806-10, Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 22;101(25):9193-8, Protein Eng Des Sel. 2008 Apr;21(4):247-55, Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Sep 26;97(20):10701-5, MAbs. 2010 Sep-Oct;2(5):508-18, Methods Mol Biol. 2012;911:183-98).

[0812] 단도메인 항체와 제 1 회합 지지 도메인을 연결시킨 융합 폴리펩티드를 복수 포함하는 라이브러리로부터, 목적으로 하는 단도메인 항체를 취득하는 방법으로서, 억제 도메인과 제 2 회합 지지 도메인을 연결시킨 회합 파트너를 이용할 수 있다.

[0813] 본 명세서에 있어서 「제 1 회합 지지 도메인」, 「제 2 회합 지지 도메인」이란, 서로 소수 결합, 수소 결합, 이온 결합 등의 결합으로 상호작용하여, 회합체를 형성할 수 있는 도메인을 말한다. 제 1 회합 지지 도메인과 제 2 회합 지지 도메인의 적합한 예로서, 그것만으로 한정되지 않지만, 예를 들어, 항체의 경쇄 정상 영역(CL)

과 중쇄 정상 영역의 CH1 도메인을 들 수 있다.

- [0814] 제 1 회합 지지 도메인과 제 2 회합 지지 도메인은 상호작용하는 것으로, 단도메인 항체와 억제 도메인의 회합성의 정도에 관계 없이, 융합 폴리펩티드와 회합 파트너가 회합을 형성할 수 있는 것이다.
- [0815] 본 발명의 다른 실시태양에 있어서, 단도메인 항체와 IgG 항체 경쇄 정상 영역을 연결시킨 융합 폴리펩티드를 복수 포함하는 라이브러리로서, 상기 단도메인 항체 중에는, 특정한 VL/VH/VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체를 포함하는 라이브러리, 및 당해 라이브러리로부터 특정한 VL/VH/VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체를 스크리닝하는 방법이 제공된다.
- [0816] 구체적인 일 실시태양에서는, 도 9a의 (1) (2) (3), 도 9b, 도 9c에 나타내듯이,
- [0817] (1) 단도메인 항체와 제 1 회합 지지 도메인을 연결시킨 융합 폴리펩티드를, 파지 디스플레이 등의 디스플레이 방법으로 파지 등의 표면에 디스플레이시킨다;
- [0818] (2) 억제 도메인과 제 2 회합 지지 도메인을 연결시킨 회합 파트너를 준비하고, 융합 폴리펩티드와 회합 파트너를 회합시킨다. 이 융합 폴리펩티드와 회합 파트너가 회합하고 있는 상태에 있어서, 표적 항원에 결합하지 않거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이하인 융합 폴리펩티드를 선택한다;
- [0819] (3) (2)에서 선택한 융합 폴리펩티드 중의 단도메인 항체와 회합 파트너 중의 억제 도메인의 회합을 해소시키고, 단도메인 항체가 억제 도메인과 회합하지 않은 상태에서, 표적 항원과 결합하거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이상인 융합 폴리펩티드를 선택한다.
- [0820] 여기에서, 단도메인 항체와 억제 도메인의 회합을 해소하는 방법으로서, 도 9b에 나타내는 회합 파트너의 억제 도메인과 제 2 회합 지지 도메인의 경계 부근을 절단하는 방법, 도 9c에 나타내는 융합 폴리펩티드의 단도메인 항체와 제 1 회합 지지 도메인의 경계 부근을 절단하는 방법 등을 사용할 수 있다.
- [0821] 본 발명의 추가적인 실시태양에 있어서는, 도 9a로부터 도 9c에 나타나는 단도메인 항체와 억제 도메인의 회합 해소/비해소 상태에 있어서의 단도메인 항체의 결합 활성의 차이를 비교하는 대신에, 도 9d로 나타나듯이, 단도메인 항체와 억제 도메인을 동시 발현시킬 때/억제 도메인을 동시에 발현시키지 않는 상태에서 단도메인 항체를 발현시킬 때의, 단도메인 항체의 결합 활성의 차이를 비교하는 방법이 제공된다.
- [0822] 도 9d의 (1)에서 나타나듯이, 단도메인 항체와 억제 도메인을 동시에 발현시켜 회합을 형성시켜, 당해 상태에 있어서 항원과 결합하지 않거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이하인 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드를 선택하고, 도 9d의 (2)/(2')/(2'')에서 나타나듯이, 억제 도메인을 동시에 발현시키지 않는 상태에서 단도메인 항체를 발현시키고, 당해 상태에 있어서 항원과 결합하거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이상인 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드를 선택함으로써, 단도메인 항체와 제 1 회합 지지 도메인을 연결시킨 융합 폴리펩티드를 복수 포함하는 라이브러리로부터, 특정한 억제 도메인, 예를 들어 VH/VL/VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체를 스크리닝하는 것이 가능하다. 억제 도메인을 동시에 발현시키지 않는 상태에서 단도메인 항체를 발현시키고, 당해 상태에 있어서 항원과 결합하거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이상인 단도메인 항체를 포함하는 폴리펩티드를 선택하고, 그 후 단도메인 항체와 억제 도메인을 동시에 발현시켜 회합을 형성시키고, 당해 상태에 있어서 항원과 결합하지 않거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이하인 단도메인 항체를 포함하는 폴리펩티드를 선택하는 방법에서도, 단도메인 항체와 제 1 회합 지지 도메인을 연결시킨 융합 폴리펩티드를 복수 포함하는 라이브러리로부터, 특정한 억제 도메인, 예를 들어 VH/VL/VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체를 스크리닝하는 것이 가능하다. 또한, 도 9d의 (2)/(2')/(2'')에서 나타나는 바와 같은, 억제 도메인을 동시에 발현시키지 않는 상태에서 단도메인 항체를 발현시키고(단도메인 항체만을 발현시키거나, 또는 단도메인 항체와 제 1 회합 지지 도메인과 포함하는 융합 폴리펩티드만을 발현시키거나, 또는 단도메인 항체와 제 1 회합 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드를 제 2 회합 지지 도메인과만 회합시킨다), 당해 상태에 있어서 항원과 결합하거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이상인 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드를 선택하고, 선택된 융합 폴리펩티드로부터, 도 9d의 (1)에서 나타나는 바와 같은, 단도메인 항체와 억제 도메인을 동시에 발현시켜 회합을 형성시키고, 당해 상태에 있어서 항원과 결합하지 않거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이하인 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드를 선택하는 것도, 단도메인 항체와 제 1 회합 지지 도메인을 연결시킨 융합 폴리펩티드를 복수 포함하는 라이브러리로부터, 특정한 억제 도메인, 예를 들어 VH/VL/VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체를 스크리닝하는 것이 가능하다.

- [0823] 「항원 결합 활성이 일정치 이하」란, 예를 들어, 본원 명세서에서 예시되는 방법으로 항원 결합 활성을 측정했을 때, 일정한 기준을 하회하는 항원 결합 활성을 가리킬 수 있다. 「항원 결합 활성이 일정치 이상」이란, 마찬가지로, 예를 들어, 본원 명세서에서 예시되는 방법으로 항원 결합 활성을 측정했을 때, 일정한 기준을 상회하는 항원 결합 활성을 가리킬 수 있다. 항원 결합 활성이 일정치 이상인 융합 폴리펩티드는, 항원 결합 활성이 일정치 이하인 융합 폴리펩티드보다 항원에 강하게 결합한다.
- [0824] 상기 (3)에서 선택한 융합 폴리펩티드는, 억제 도메인과 회합하는 상태에서 항원 결합 활성이 없거나 혹은 약하고, 억제 도메인과 회합하지 않은 상태에서 항원 결합 활성이 있거나 혹은 강한 단도메인 항체를 포함한다. 이와 같은 방법으로 선택한 융합 폴리펩티드의 서열을 해석하면, 그 중에 포함되는 단도메인 항체의 서열도 해명할 수 있어, 당해 단도메인 항체를 제조할 수 있다.
- [0825] 융합 폴리펩티드와 회합 파트너를 사용하여, 목적으로 하는 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드를 스크리닝하는 방법에서 중요한 것은, 단도메인 항체의 억제 도메인과 회합/비회합 상태에서의 항원 결합 활성을 비교하는 것이다. 도 9a의 (2')(3')에 나타내듯이, 디스플레이된 융합 폴리펩티드의 항원 결합 활성을 먼저 확인하여, 항원과 결합하거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이상인 융합 폴리펩티드를 선택하고 나서, 그들의 융합 폴리펩티드와 회합 파트너와 회합시켜, 회합 상태에서 항원과 결합하지 않거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이하인 융합 폴리펩티드를 선택하는 방법으로도, 목적으로 하는 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드를 취득할 수 있다.
- [0826] 이하, 제 1 회합 지지 도메인으로서 IgG 항체 CH1 도메인을 사용하고, 제 2 회합 지지 도메인으로서 IgG 항체 CL을 사용하는 몇 가지 실시태양에 대해 설명한다.
- [0827] 단도메인 항체와 IgG 항체 CH1 도메인을 연결시킨 융합 폴리펩티드를 복수 포함하는 라이브러리로부터 목적으로 하는 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드를 스크리닝할 수 있다.
- [0828] 본 발명의 몇 가지 실시태양에 있어서, 단도메인 항체와 IgG 항체 CH1 도메인을 연결시킨 융합 폴리펩티드를 복수 포함하는 라이브러리로서, 상기 단도메인 항체 중에는, 특정한 VL/VH/VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체를 포함하는 라이브러리, 및 당해 라이브러리로부터 특정한 VL/VH/VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드를 스크리닝하는 방법이 제공된다.
- [0829] 특정한 실시태양에 있어서, 단도메인 항체와 IgG 항체 CH1 도메인을 연결시킨 융합 폴리펩티드를 복수 포함하는 라이브러리로부터, 특정한 VL과 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드를 스크리닝하는 방법이 제공된다. 구체적으로, 이하의 공정:
- [0830] (a) 본 발명에 있어서의 라이브러리의 융합 폴리펩티드를 인비트로 디스플레이시키는 공정;
- [0831] (b) 특정한 VL과 IgG 항체 경쇄 정상 영역을 융합한 회합 파트너를 준비하는 공정;
- [0832] (c) (a) 공정에서 디스플레이된 융합 폴리펩티드와 (b) 공정에서 준비한 회합 파트너를 회합시켜, 단도메인 항체와 상기 VL이 회합하는 상태에서 항원과 결합하지 않거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이하인 융합 폴리펩티드를 선택하는 공정;
- [0833] (d) (c) 공정에서 선택된 융합 폴리펩티드에 포함되는 단도메인 항체가 상기 VL이 회합하지 않은 상태에서 항원과 결합하거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이상인 융합 폴리펩티드를 선택하는 공정;
- [0834] 을 포함하는 단도메인 항체의 스크리닝 방법이 제공된다.
- [0835] 상기 (b) 공정에서 준비된 회합 파트너는 프로테아제 절단 서열을 추가로 포함하고, 상기 (d) 공정에서는, 프로테아제 처리에 의해 상기 단도메인 항체와 상기 VL의 회합을 해소시켜, 단도메인 항체와 VL가 회합하지 않은 상태에서 단도메인 항체의 항원 결합 활성을 확인하는 것이 가능하다. 회합 파트너 중의 프로테아제 절단 서열은, 절단 시에 단도메인 항체와 VL의 회합이 해소되는 한, 그 위치는 한정되지 않는다. 프로테아제 절단 서열의 위치의 예로서, 예를 들어, 회합 파트너의 VL과 IgG 항체 경쇄 정상 영역의 경계 부근, 바람직하게는 VL의 96번(Kabat 넘버링) 아미노산으로부터 항체 경쇄 정상 영역 130번(EU 넘버링)(Kabat 넘버링 130번) 아미노산의 사이, 보다 바람직하게는 VL의 104번(Kabat 넘버링) 아미노산으로부터 항체 경쇄 정상 영역 113번(EU 넘버링)(Kabat 넘버링 113번) 아미노산의 사이에 위치하는 것이 가능하다.
- [0836] 또한, 프로테아제 절단 서열을 포함하는 회합 파트너를 사용하는 대신에, 라이브러리 중의 융합 폴리펩티드에

프로테아제 절단 서열을 도입하고, 융합 폴리펩티드가 프로테아제에 절단됨으로써 단도메인 항체와 VL의 회합을 해소시키는 것도 가능하다. 융합 폴리펩티드 중의 프로테아제 절단 서열은, 절단 시에 단도메인 항체와 VL의 회합이 해소되고, 또한 절단 후에도 단도메인 항체의 항원 결합 활성이 유지되는 한, 그 위치는 한정되지 않는다. 프로테아제 절단 서열의 위치의 예로서, 예를 들어, 융합 폴리펩티드 중의 단도메인 항체와 IgG 항체 CH1 도메인의 경계 부근에 위치하는 것이 가능하다.

[0837] 더욱이, 상기 (d) 공정에서는, (c) 공정에서 선택한 융합 폴리펩티드의 전장 혹은 단도메인 항체를 포함하는 부분을 재차 디스플레이시켜, 단도메인 항체와 VL가 회합하지 않은 상태에서 단도메인 항체의 항원 결합 활성을 확인하는 것도 가능하다.

[0838] 특정한 실시태양에 있어서, 단도메인 항체와 IgG 항체 경쇄 정상 영역을 연결시킨 융합 폴리펩티드를 복수 포함하는 라이브러리로부터, 특정한 VH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되거나 혹은 상실되는 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드를 스크리닝하는 방법이 제공된다. 구체적으로, 이하의 공정:

[0839] (a) 본 발명에 있어서의 라이브러리의 융합 폴리펩티드를 인비트로 디스플레이시키는 공정;

[0840] (b) 특정한 VH와 IgG 항체 CH1 도메인을 융합한 회합 파트너를 준비하는 공정;

[0841] (c) (a) 공정에서 디스플레이된 융합 폴리펩티드와, (b) 공정에서 준비한 회합 파트너를 회합시켜, 단도메인 항체와 상기 VH가 회합하는 상태에서 항원과 결합하지 않거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이하인 융합 폴리펩티드를 선택하는 공정;

[0842] (d) (c) 공정에서 선택된 융합 폴리펩티드에 포함되는 단도메인 항체가 상기 VH와 회합하지 않은 상태에서 항원과 결합하거나, 혹은 항원 결합 활성이 일정치 이상인 융합 폴리펩티드를 선택하는 공정;

[0843] 을 포함하는 단도메인 항체를 포함하는 융합 폴리펩티드의 스크리닝 방법이 제공된다.

[0844] 상기 (b) 공정에서 준비된 회합 파트너는 프로테아제 절단 서열을 추가로 포함하고, 상기 (d) 공정에서는, 프로테아제 처리에 의해 상기 단도메인 항체와 상기 VH의 회합을 해소시켜, 단도메인 항체와 VH가 회합하지 않은 상태에서 단도메인 항체의 항원 결합 활성을 확인하는 것이 가능하다. 회합 파트너 중의 프로테아제 절단 서열은, 절단 시에 단도메인 항체와 VH의 회합이 해소되는 한, 그 위치는 한정되지 않는다. 프로테아제 절단 서열의 위치의 예로서, 예를 들어, 회합 파트너의 VH와 IgG 항체 CH1 도메인의 경계 부근, 바람직하게는 VH의 101번(Kabat 넘버링) 아미노산으로부터 항체 중쇄 정상 영역 140번(EU 넘버링) 아미노산의 사이, 더욱 바람직하게는 VH의 109번(Kabat 넘버링) 아미노산으로부터 항체 중쇄 정상 영역 122번(EU 넘버링) 아미노산의 사이에 위치하는 것이 가능하다.

[0845] 또한, 프로테아제 절단 서열을 포함하는 회합 파트너를 사용하는 대신에, 라이브러리 중의 융합 폴리펩티드에 프로테아제 절단 서열을 도입하고, 융합 폴리펩티드가 프로테아제에 절단됨으로써 단도메인 항체와 VH의 회합을 해소시키는 것도 가능하다. 융합 폴리펩티드 중의 프로테아제 절단 서열은, 절단 시에 단도메인 항체와 VH의 회합이 해소되고, 또한 절단 후에도 단도메인 항체의 항원 결합 활성이 유지되는 한, 그 위치는 한정되지 않는다. 프로테아제 절단 서열의 위치의 예로서, 예를 들어, 융합 폴리펩티드 중의 단도메인 항체와 IgG 항체 경쇄 정상 영역의 경계 부근에 위치하는 것이 가능하다.

[0846] 더욱이, 상기 (d) 공정에서는, (c) 공정에서 선택한 융합 폴리펩티드의 전장 혹은 단도메인 항체를 포함하는 부분을 재차 디스플레이시켜, 단도메인 항체와 VH가 회합하지 않은 상태에서 단도메인 항체의 항원 결합 활성을 확인하는 것도 가능하다.

[0847] 본 발명에 기재하는 아미노산 서열에 포함되는 아미노산은 번역 후에 수식(예를 들어, N말단의 글루타민의 피로글루타미화에 의한 피로글루타민산으로의 수식은 당업자에게 잘 알려진 수식이다)을 받는 경우도 있지만, 그와 같이 아미노산이 번역 후 수식되었을 경우에도 당연하게도 본 발명에 기재하는 아미노산 서열에 포함된다.

[0848] 본 명세서에 기재된 1 또는 복수의 실시태양을 임의로 조합한 것도, 당업자의 기술 상식에 기초하여 기술적으로 모순되지 않는 한 본 발명에 포함됨이 당업자에게는 당연하게 이해된다.

[0849] **실시예**

[0850] 이하는, 본 발명의 방법 및 조성물의 실시예이다. 전술한 일반적인 기재에 비추어, 여러 가지 다른 실시태양이 실시될 수 있음이 이해될 것이다.

- [0851] 실시예 1 기존의 프로테아제 활성화 항체의 과제
- [0852] 암조직이나 염증성 조직과 같은 병변 부위에서 발현하는 프로테아제로 절단되는 것에 의해, 비로소 항원 결합 활성을 발휘하는 항체를 제작하는 방법이 보고되어 있다. Probody로 불리는 동 항체는, 도 1에 나타내듯이 항체의 항원 결합 부위를 마스킹하는 펩티드를 병변 부위에서 발현하는 프로테아제로 절단되는 링커로 항체와 연결함으로써 항체의 항원 결합 활성을 저해한 항체 분자이다(비특허문헌 18). Probody를 구성하는 링커가 표적의 병태 부위에 있어서 발현하는 프로테아제에 의해 절단됨으로써 마스크 펩티드가 해리되어, 항원 결합 활성이 회복된 항체 분자가 생성되어, 표적의 병태 조직에 있어서 항원에 결합하는 것이 가능해진다.
- [0853] Probody는 전술과 같은 메커니즘에 의해 표적의 병태 부위에서 선택적으로 항원에 결합함으로써 therapeutic window를 확대할 수 있다고 생각된다. 그렇지만, Probody에 있어서의 프로테아제에 의한 항체의 절단은 불가역적이기 때문에, 병태 부위에서 절단된 항체는, 병태 부위로부터 다시 혈중으로 되돌아가는 것이 가능하고, 혈류를 타고 정상 조직에 분포하여, 정상 조직에 발현하는 항원에 결합할 가능성이 있다고 생각된다. 프로테아제로 활성화된 Probody는, 활성화 전의 Probody와 마찬가지로 Fc 영역을 보유하기 때문에 긴 혈중 체류성을 보유한다. 그 때문에, 병태 부위에 발현하는 프로테아제로 활성화된 항체는 길게 혈중에 체류할 가능성이 있다. 또한, 병태 부위에서 발현이 상승하고 있는 프로테아제여도, 그러한 프로테아제는 정상 조직에도 낮은 레벨로 발현되고 있고, 또한 병태 부위에서 산생된 유리형 프로테아제가 혈중에 누출하고 있는 경우도 있기 때문에(The Chinese-German Journal of Clinical Oncology Jun. 2004, Vol. 3, No. 2 P78-P80), 그와 같은 유리형 프로테아제로 Probody는 활성화될 수 있다. 그 때문에, Probody는 병태 부위 이외에서도 활성화될 가능성이 생각되고, 그와 같이 활성화된 Probody도 마찬가지로 길게 혈중에 체류한다. 이와 같이 병태 부위, 정상 조직, 혈중에 있어서 계속적으로 Probody는 활성화되고, 활성화된 Probody는 긴 혈중 체류성을 가지면, 혈중에 축적될 가능성이 있다. 혈중에 축적된 활성화된 Probody는 정상 조직에 발현되는 항원에 결합함으로써 부작용을 발휘해 버릴 가능성이 있다(도 2).
- [0854] Probody는 링커에 의해 항체와 연결된 마스크 펩티드에 의해 그 항원 결합 활성이 저해되고 있지만, 항원 결합 활성은 완전하게 저해되고 있는 것은 아니다. Probody는, 링커에 의해 연결된 마스크 펩티드가 항원 결합 부위에 결합한 상태와 해리된 상태의 평형 상태에 있고, 해리된 상태의 분자는 항원에 결합하는 것이 가능해진다(도 3). 실제, 비특허문헌 17에 기재되어 있는 항EGFR Probody는, 프로테아제에 의한 링커의 절단 전에도 EGFR에 대한 결합 활성을 갖는다. 프로테아제에 의한 링커의 절단에 의해 30-100배의 결합 활성 상승이 나타나지만, 활성화되기 전의 Probody도 활성화된 Probody의 1/30-1/100의 결합 활성을 가지므로, 활성화되기 전의 Probody가 높은 농도로 존재하면, 정상 조직에 발현하는 항원에 결합함으로써 부작용을 발휘해 버릴 가능성이 있다.
- [0855] 또한, Probody는 항체의 항원 결합 부위를 마스킹하기 위해서 인공적인 펩티드를 사용한다. 인공 펩티드는 천연 인간 단백질에 존재하지 않는 서열을 갖기 때문에, 인간에 있어서 면역원성을 가질 가능성이 있다. 면역원성은 항약물 항체를 유도함으로써, 항체 의약의 작용을 감소시킴이 알려져 있다(Blood. 2016 Mar 31;127(13):1633-41.).
- [0856] 더욱이 Probody에 대한 항약물 항체로서, 항체와 마스크 펩티드의 복합체(활성화되기 전의 Probody)에 대한 항약물 항체, 마스크 펩티드가 해리된 항체(활성화된 Probody)에 대한 항약물 항체, 마스크 펩티드(활성화된 Probody로부터 해리된 마스크 펩티드)에 대한 항약물 항체 등이 생각된다. 이 중, 마스크 펩티드에 대한 항약물 항체(항마스크 펩티드 항체)는, 활성화되기 전의 Probody의 마스크 펩티드에 결합함으로써, 프로테아제에 의한 절단이 일어나지 않아도 Probody를 활성화해 버릴 가능성이 있다(도 4). 항마스크 펩티드 항체에 의해 활성화된 Probody는 정상 조직에 발현하는 항원에 결합함으로써 부작용을 발휘해 버릴 가능성이 있다.
- [0857] 실시예 2 단도메인 항체를 이용한 프로테아제 활성화 폴리펩티드의 컨셉
- [0858] 실시예 1에 나타낸 바와 같이 Probody 기술에는 이하의 과제가 있다.
- [0859] 1. 프로테아제에 의한 절단으로 활성화된 Probody가 긴 혈중 체류성을 갖는다
- [0860] 2. 프로테아제에 의한 절단 전의 Probody여도 항원에 대한 결합 활성을 갖는다
- [0861] 3. 마스크 펩티드가 인공적인 비인간 서열이며, 항마스크 펩티드 항체를 유도할 수 있다
- [0862] 이들 과제를 해결한, 병태 부위에서 활성을 발휘하는 항체 의약을 제공하기 위해서는 이하의 조건을 만족시키는 것이 유용하다고 생각했다.

- [0863] 1. 프로테아제에 의한 절단으로 활성화된 항원 결합 도메인이 짧은 혈중반감기를 갖는다
- [0864] 2. 프로테아제에 의한 절단 전의 분자의 항원 결합 활성을 최소화한다
- [0865] 3. 인공적인 비인간 서열을 갖는 마스크 펩티드를 사용하지 않는다
- [0866] 상기 조건을 만족시키는 폴리펩티드의 일례로서 도 5에 나타내는 분자를 고안했다. 항원 결합 도메인과 운반 부분이 연결된 상태의 폴리펩티드는 긴 반감기를 갖고, 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성이 억제되고 있어, 항원에 결합하지 않는다(A). 항원 결합 도메인이 유리 후, 항원 결합 활성이 회복되고, 반감기도 짧다(B).
- [0867] 도 5에 나타내는 폴리펩티드는 다양한 배리에이션을 갖지만, IgG 항체-유사 분자를 사용하는 경우, 도 6에 예시 되는 바와 같은 제조 방법으로 제조하는 것이 가능하다. 우선 표적의 항원에 결합하는 단도메인 항체(예: VH 혹은 VHH)를 취득한다(A). 얻어진 단도메인 항체를, 점라인 서열을 갖는 IgG 항체의 VH와 VL 중 한쪽에 바꿔 넣고, VH와 VL 중 다른 쪽과 회합시켜, IgG 항체-유사 분자를 형성시킨다(B). IgG 항체-유사 분자 중에 프로테아제 절단 서열을 도입한다(C). 도입 위치의 예로서, 도입한 단도메인 항체(VH 혹은 VHH)와 정상 영역(CH1 또는 CL)의 경계 부근을 들 수 있다.
- [0868] 단도메인 항체는 단도메인으로 존재하는 경우에 있어서 항원 결합 활성을 갖지만, VL/VH/VHH 등과 가변 영역을 형성하면 항원 결합 활성을 상실한다. VL/VH는 점라인 서열을 갖는 천연의 인간 항체 서열이므로 면역원성의 리스크는 낮아, 동 VL/VH를 인식하는 항약물 항체가 유도될 가능성은 극히 낮다. 또한, VHH를 사용하여 단도메인 항체와 가변 영역을 형성하는 경우, VHH를 인간화하는 것에 의해, 면역원성의 리스크를 저감하여, 동 인간화 VHH를 인식하는 항약물 항체가 유도될 가능성을 저하시킬 수 있다. IgG 항체-유사 분자에 삽입된 프로테아제 절단 서열이 프로테아제로 절단되는 것에 의해, 단도메인 항체가 유리된다. 유리된 단도메인 항체는 항원 결합 활성을 갖는다. 프로테아제에 의한 절단 전의 IgG 항체-유사 분자는 일반적인 IgG 분자와 유사한 구조이므로 긴 혈중 체류성을 갖는데 반해, 프로테아제에 의한 절단으로 유리된 단도메인 항체는, Fc 영역을 보유하지 않고, 분자량이 약 13 kDa 정도이므로 신장 배설에 의해 신속하게 소실된다. 실제, 전장 IgG의 반감기는 2~3 주간 정도인데 반해(Blood. 2016 Mar 31;127(13):1633-41.), 단도메인 항체의 반감기는 약 2시간이다(Antibodies 2015, 4(3), 141-156). 그 때문에 프로테아제에 의해 활성화된 항원 결합 분자는 혈중 반감기가 짧아, 정상 조직의 항원에 결합할 가능성은 낮아진다.
- [0869] 단도메인 항체가 VL인 경우는, 프로테아제 절단 서열을, 예를 들어 VL과 CL의 경계 부근에 도입함으로써 마찬가지로의 컨셉을 달성 가능하다.
- [0870] 실시예 3 IL6R에 결합하는 VHH를 이용한 프로테아제 활성화 폴리펩티드의 제작
- [0871] 3-1 IL6R에 결합하는 VHH를 짜넣은 폴리펩티드의 조제
- [0872] 국제 공개 W02010/115998호에 기재되어 있는, 인간 IL6R에 대해서 결합 및 중화 활성을 갖는 VHH인 IL6R90(서열 번호: 1)을 인간 IgG1의 정상 영역(CH1-hinge-CH2-CH3)에 융합한 IL6R90-G1m(서열 번호: 2)을 코딩하는 발현 벡터를 당업자 공지 방법으로 조제했다.
- [0873] 인간 점라인 서열을 갖는 다양한 서브클래스의 경쇄(가변 영역-정상 영역)로서 VK1-39-kOMT(서열 번호: 3), VK2-28-kOMT(서열 번호: 4), VK3-20-kOMT(서열 번호: 5), VL1-40-lamL(서열 번호: 6), VL1-44-lamL(서열 번호: 7), VL2-14-lamL(서열 번호: 8), VL3-21-lamL(서열 번호: 9), k0(서열 번호: 10), lamL(서열 번호: 11)을 코딩하는 발현 벡터를 당업자 공지 방법으로 조제했다.
- [0874] IgG 항체-유사 분자인 IL6R90-G1m/VK1-39-kOMT(중쇄 서열 번호: 2, 경쇄 서열 번호: 3), IL6R90-G1m/VK2-28-kOMT(중쇄 서열 번호: 2, 경쇄 서열 번호: 4), IL6R90-G1m/VK3-20-kOMT(중쇄 서열 번호: 2, 경쇄 서열 번호: 5), IL6R90-G1m/VL1-40-lamL(중쇄 서열 번호: 2, 경쇄 서열 번호: 6), IL6R90-G1m/VL1-44-lamL(중쇄 서열 번호: 2, 경쇄 서열 번호: 7), IL6R90-G1m/VL2-14-lamL(중쇄 서열 번호: 2, 경쇄 서열 번호: 8), IL6R90-G1m/VL3-21-lamL(중쇄 서열 번호: 2, 경쇄 서열 번호: 9), IL6R90-G1m/k0(중쇄 서열 번호: 2, 경쇄 서열 번호: 10), IL6R90-G1m/lamL(중쇄 서열 번호: 2, 경쇄 서열 번호: 11)을 당업자 공지 방법으로 FreeStyle293 세포(Invitrogen)를 이용한 일과성 발현에 의해 발현하고, 프로테인 A를 이용한 당업자 공지 방법으로 정제를 행했다.
- [0875] 3-2 인간 IL6R에 결합하는 VHH를 짜넣은 폴리펩티드의 IL6R 결합 평가
- [0876] IL6R90-G1m/VK1-39-kOMT, IL6R90-G1m/VK2-28-kOMT, IL6R90-G1m/VK3-20-kOMT, IL6R90-G1m/VL1-40-lamL,

IL6R90-G1m/VL1-44-1amL, IL6R90-G1m/VL2-14-1amL, IL6R90-G1m/VL3-21-1amL, IL6R90-G1m/k0, IL6R90-G1m/1amL 의 인간 IL6R에 대한 결합 활성을 이하의 방법으로 평가했다.

- [0877] 항원으로서 이용한 재조합 인간 IL6R은 이하와 같이 조제했다. J. Immunol. 152, 4958-4968 (1994)에서 보고 되어 있는 N말단측 1번째로부터 357번째의 아미노산 서열로 이루어지는 가용형 인간 IL-6R(이하, hsIL-6R, IL6R 혹은 IL-6R로도 부름)의 CHO 정상 발현주를 당업자 공지 방법으로 구축하고, 배양하여, hsIL-6R을 발현시켰다. 얻어진 배양 상청으로부터, Blue Sepharose 6 FF 컬럼 크로마토그래피, 겔 여과 컬럼 크로마토그래피의 2공정에 의해 hsIL-6R을 정제했다. 최종 공정에 있어서 메인 피크로서 용출된 획분을 최종 정제품으로 했다.
- [0878] 각 분자와 hsIL6R의 결합 평가를, OctetHTX(ForteBio)를 이용하여 행했다. 구체적으로는, Biosensor/Protein A(ProA)(ForteBio, 18-5013)에 각 분자를 결합시키고, hsIL-6R을 작용시켜, 30℃에 있어서의 결합을 평가했다. OctetHTX로 측정된 계시적인 결합량을 나타내는 센서그램을 도 10에 나타냈다. VL이 결손된 IL6R90-G1m/k0와 IL6R90-G1m/1amL은 hsIL-6R에 결합했지만, VL과 가변 영역을 형성한 IL6R90-G1m/VK1-39-kOMT, IL6R90-G1m/VK2-28-kOMT, IL6R90-G1m/VK3-20-kOMT, IL6R90-G1m/VL1-40-1amL, IL6R90-G1m/VL1-44-1amL, IL6R90-G1m/VL2-14-1amL은 hsIL-6R과 결합하지 못함이 나타났다. 이로부터, 인간 IL6R에 대해서 결합 활성을 갖는 VHH를 VL과 회합시켜 가변 영역을 형성함으로써 IL6R 결합 활성을 상실시킬 수 있음이 발견되었다.
- [0879] 3-3 IL6R에 결합하는 VHH를 짜넣은 폴리펩티드로의 프로테아제 절단 서열의 도입
- [0880] 항인간 IL6R VHH인 IL6R90와 CH1의 경계 부근에 프로테아제 절단 서열을 삽입하는 검토를 행했다. 암투이적으로 발현하고 있는 유로키나제(uPA) 및 MT-SP1로 절단됨이 보고되어 있는 서열인 펩티드 서열 A(서열 번호: 12)를 IL6R90과 CH1의 경계 부근의 3개소에 글리신-세린 링커의 유무로 삽입한 도 11에 나타내는 6종류의 중쇄를 설계했다. IL6R90H1001(서열 번호: 13), IL6R90H1002(서열 번호: 14), IL6R90H1003(서열 번호: 15), IL6R90H1004(서열 번호: 16), IL6R90H1005(서열 번호: 17), IL6R90H1006(서열 번호: 18)를 코딩하는 발현 벡터를 당업자 공지 방법으로 제작했다.
- [0881] 이들 중쇄와, 경쇄로서 VK1-39-kOMT(서열 번호: 3)를 이용하여, IgG 항체-유사 분자인 IL6R90H1001/VK1-39-kOMT(중쇄 서열 번호: 13, 경쇄 서열 번호: 3), IL6R90H1002/VK1-39-kOMT(중쇄 서열 번호: 14, 경쇄 서열 번호: 3), IL6R90H1003/VK1-39-kOMT(중쇄 서열 번호: 15, 경쇄 서열 번호: 3), IL6R90H1004/VK1-39-kOMT(중쇄 서열 번호: 16, 경쇄 서열 번호: 3), IL6R90H1005/VK1-39-kOMT(중쇄 서열 번호: 17, 경쇄 서열 번호: 3), IL6R90H1006/VK1-39-kOMT(중쇄 서열 번호: 18, 경쇄 서열 번호: 3)를 당업자 공지 방법으로 FreeStyle293 세포(Invitrogen)를 이용한 일과성 발현에 의해 발현하고, 프로테인 A를 이용한 당업자 공지 방법에 의해 정제를 행했다.
- [0882] 3-4 프로테아제 절단 서열을 도입한 폴리펩티드의 프로테아제 절단에 의한 활성화
- [0883] IL6R90H1001/VK1-39-kOMT, IL6R90H1002/VK1-39-kOMT, IL6R90H1003/VK1-39-kOMT, IL6R90H1004/VK1-39-kOMT, IL6R90H1005/VK1-39-kOMT, IL6R90H1006/VK1-39-kOMT를 프로테아제에 의해 절단하여, IL6R에의 결합 활성을 갖는 VHH가 유리한지 여부를 검증했다.
- [0884] 가용형 인간 IL6R는 당업자 공지 방법으로 조제했다. 조제한 가용형 인간 IL6R을 당업자 공지 방법으로 비오틴화했다.
- [0885] 가용형 인간 IL-6R(hsIL-6R 혹은 가용형 인간 IL6R이라고도 부르는, 서열 번호: 35)의 C말단에 비오틴을 부가할 목적으로, hsIL-6R을 코딩하는 유전자 단편의 하류에, 비오틴 리가제에 의해 비오틴이 부가되는 특이적인 서열(AviTag 서열, 서열 번호: 36)을 코딩하는 유전자 단편을 링커를 개재시켜 연결시켰다. hsIL-6R과 AviTag 서열이 연결된 단백질(hsIL6R-Avitag, 서열 번호: 37)을 코딩하는 유전자 단편을 동물 세포 발현용 벡터에 짜넣고, 구축된 핵외 유전자 벡터를 293Fectin(Invitrogen)을 이용하여 FreeStyle293 세포(Invitrogen)에 도입했다. 이 때 EBNA1(서열 번호: 57)을 발현하는 유전자 및 비오틴 리가제(BirA, 서열 번호: 58)를 발현하는 유전자를 동시에 도입하고, 추가로 hsIL-6R-Avitag를 비오틴 표지할 목적으로 비오틴을 첨가했다. 전술한 순서에 따라 유전자가 도입된 세포를 37℃, 8% CO₂로 배양하여, 목적하는 단백질(hsIL-6R-BAP1)을 배양 상청 중에 분비시켰다. 이 세포 배양액을 0.22 μm 보틀 탑 필터로 여과하여, 배양 상청을 얻었다.
- [0886] 메이커의 프로토콜에 따라 HiTrap NHS-activated HP(GE헬스케어)에, 항인간 IL-6R 항체를 고정화한 컬럼(항인간 IL-6R 항체 컬럼)을 제작했다. TBS로 평형화한 항인간 IL-6R 항체 컬럼에 배양 상청을 어플라이하고, 2M

Arginine, pH 4.0으로 흡착된 hsIL-6R을 용출시켰다. 다음에, TBS로 평형화된 SoftLink Avidin 컬럼(Promega)에, 동 완충액으로 희석한 항인간 IL-6R 항체 컬럼 용출액을 어플라이하고, 5mM 비오틴, 50mM Tris-HCl, pH 8.0 및 2M Arginine, pH 4.0으로 hsIL-6R-BAP1을 용출했다. 이 용출액을, Superdex200(GE헬스케어)를 이용한 겔 여과 크로마토그래피에 의해, hsIL-6R-BAP1의 회합체를 제거하여, 버퍼가 D-PBS, 0.05% CHAPS로 치환된 정제 hsIL-6R-BAP1을 얻었다.

[0887] 프로테아제로서 리컴비넌트 인간 매트립타제/ST14 촉매 도메인(R&D Systems, 3946-SE-010)을 이용하여 프로테아제 12.5nM, IgG 항체-유사 분자 100 ug/mL, PBS, 37°C의 조건하에서 20시간 반응시킨 후에, 프로테아제에 의한 절단을 환원 SDS-PAGE에 의해 평가한 결과를 도 12에 나타낸다. 그 결과, IL6R90H1002/VK1-39-kOMT, IL6R90H1004/VK1-39-kOMT, IL6R90H1005/VK1-39-kOMT, IL6R90H1006/VK1-39-kOMT에 있어서, 프로테아제 절단 서열이 VHH와 중쇄 정상 영역의 경계 부근에서 프로테아제에 의해 절단됨이 확인되었다.

[0888] 다음에, 프로테아제 처리에 의해 유리된 VHH와 IL6R의 결합 평가를, OctetHTX(ForteBio)를 이용하여 행했다. 구체적으로는, 스트랩트아비딘 센서(ForteBio, 18-5021)에 hsIL-6R-BAP1을 결합시키고, 절단한 IgG 항체-유사 분자를 작용시켜, 30°C에 있어서의 결합을 평가했다. OctetHTX로 측정할 계시적인 결합량을 나타내는 센서그램을 도 13에 나타낸다. 그 결과, IL6R90H1002/VK1-39-kOMT, IL6R90H1004/VK1-39-kOMT, IL6R90H1005/VK1-39-kOMT, IL6R90H1006/VK1-39-kOMT에 있어서 결합이 확인되었다. IL6R90-G1m/k0, IL6R90-G1m/1amL은 2가로 결합하기 때문에 avidity로 결합하는데 반해, 유리되는 VHH는 affinity로 결합하기 때문에, 프로테아제 처리한 IL6R90H1002/VK1-39-kOMT, IL6R90H1004/VK1-39-kOMT, IL6R90H1005/VK1-39-kOMT, IL6R90H1006/VK1-39-kOMT는 IL6R90-G1m/k0, IL6R90-G1m/1amL과 비교하여 IL6R로부터의 빠른 해리 속도를 나타냈다. 또한, VHH는 IL6R90-G1m/k0, IL6R90-G1m/1amL과 비교하여 분자량이 작기 때문에, 그 만큼 결합량(반응)이 낮아지고 있다.

[0889] 이들 결과로부터, IL6R90H1002/VK1-39-kOMT, IL6R90H1004/VK1-39-kOMT, IL6R90H1005/VK1-39-kOMT, IL6R90H1006/VK1-39-kOMT는, 그대로는 IL6R에 대해서 결합 활성을 나타내지 않지만, 프로테아제 처리에 의해 VHH와 중쇄 정상 영역의 경계 부근에 삽입한 펩티드 서열 A가 절단되어, 그 결과로서 VHH 도메인이 유리되고, 유리된 VHH는 IL6R에 대해서 결합할 수 있음이 확인되었다. 이로부터 실시예 2에 기재된 컨셉의 분자를 실제로 제작할 수 있었다고 말할 수 있다.

[0890] 실시예 4 개변에 의한 IL6R에 결합하는 VHH를 이용한 프로테아제 활성화 폴리펩티드의 제작

[0891] 4-1 IL6R에 결합하는 VHH를 짜넣은 폴리펩티드의 IL6R 결합 평가

[0892] 국제 공개 WO2010/115998호에 기재되어 있는 IL6R에 대해서 결합 및 중화 활성을 갖는 VHH인 20A11(서열 번호: 19)을, 실시예 3과 마찬가지로 하여 인간 IgG1의 정상 영역(CH1-hinge-CH2-CH3)에 융합한 20A11-G1m(서열 번호: 38)을 코딩하는 발현 벡터를 당업자 공지 방법으로 조제했다.

[0893] 이 중쇄와, 경쇄로서 VK1-39-kOMT(서열 번호: 3), VK2-28-kOMT(서열 번호: 4), VK3-20-kOMT(서열 번호: 5), VL1-40-1amL(서열 번호: 6), VL1-44-1amL(서열 번호: 7), VL2-14-1amL(서열 번호: 8), VL3-21-1amL(서열 번호: 9)을 이용하여, 실시예 3과 마찬가지로의 방법에 의해 폴리펩티드 20A11-G1m/VK1-39-kOMT, 20A11-G1m/VK2-28-kOMT, 20A11-G1m/VK3-20-kOMT, 20A11-G1m/VL1-40-1amL, 20A11-G1m/VL1-44-1amL, 20A11-G1m/VL2-14-1amL, 20A11-G1m/VL3-21-1amL의 발현·정제를 행했다.

[0894] 실시예 3과 마찬가지로의 방법으로, 얻어진 20A11-G1m/VK1-39-kOMT(중쇄 서열 번호: 38, 경쇄 서열 번호: 3), 20A11-G1m/VK2-28-kOMT(중쇄 서열 번호: 38, 경쇄 서열 번호: 4), 20A11-G1m/VK3-20-kOMT(중쇄 서열 번호: 38, 경쇄 서열 번호: 5), 20A11-G1m/VL1-40-1amL(중쇄 서열 번호: 38, 경쇄 서열 번호: 6), 20A11-G1m/VL1-44-1amL(중쇄 서열 번호: 38, 경쇄 서열 번호: 7), 20A11-G1m/VL2-14-1amL(중쇄 서열 번호: 38, 경쇄 서열 번호: 8), 20A11-G1m/VL3-21-1amL(중쇄 서열 번호: 38, 경쇄 서열 번호: 9)의 IL6R에 대한 결합을 평가한 결과를 도 14에 나타낸다. 그 결과, 본 실시예에서 사용한 경쇄 중에서, 20A11과 인간 점라인 IgG1의 정상 영역(CH1-hinge-CH2-CH3)과 융합시킨 중쇄와 회합함으로써 20A11의 IL6R 결합 활성을 상실시키는 것은 없었다.

[0895] 이 이유로서, 20A11과 본 실시예에서 사용한 VL이 안정된 가변 영역을 형성하고 있지 않는 것이 생각되었다.

[0896] 4-2 항원 결합이 상실되지 않는 VHH를 짜넣은 폴리펩티드에 있어서의, VHH와 VL의 계면 부위의 아미노산 개변의 도입

[0897] 20A11과 VL을 안정된 가변 영역을 형성시키기 위해서, 20A11의 VL의 계면에 존재하는 아미노산에 변이를 도입했다. 20A11에 대해서 37번째의 F를 V로(F37V), 45번째의 R을 L로, 47번째의 G를 W로(모두 Kabat 넘버링) 치환

하는 변이를 도입한 20A11hu(서열 번호: 20)를 실시예 3과 마찬가지로 하여 인간 IgG1의 정상 영역(CH1-hinge-CH2-CH3)에 융합한 20A11hu-G1m(서열 번호: 39)을 코딩하는 발현 벡터를 당업자 공지 방법으로 조제했다.

- [0898] 이 중쇄와, 경쇄로서 VK1-39-kOMT(서열 번호: 3), VK2-28-kOMT(서열 번호: 4), VK3-20-kOMT(서열 번호: 5), VL1-40-1amL(서열 번호: 6), VL1-44-1amL(서열 번호: 7), VL2-14-1amL(서열 번호: 8), VL3-21-1amL(서열 번호: 9)을 이용하여, 폴리펩티드의 20A11hu-G1m/VK1-39-kOMT(중쇄 서열 번호: 39, 경쇄 서열 번호: 3), 20A11hu-G1m/VK2-28-kOMT(중쇄 서열 번호: 39, 경쇄 서열 번호: 4), 20A11hu-G1m/VK3-20-kOMT(중쇄 서열 번호: 39, 경쇄 서열 번호: 5), 20A11hu-G1m/VL1-40-1amL(중쇄 서열 번호: 39, 경쇄 서열 번호: 6), 20A11hu-G1m/VL1-44-1amL(중쇄 서열 번호: 39, 경쇄 서열 번호: 7), 20A11hu-G1m/VL2-14-1amL(중쇄 서열 번호: 39, 경쇄 서열 번호: 8), 20A11hu-G1m/VL3-21-1amL(중쇄 서열 번호: 39, 경쇄 서열 번호: 9)의 발현·정제를 실시예 3과 마찬가지로의 방법에 의해 행했다.
- [0899] 4-3 VHH와 VL의 계면 부위로의 아미노산 개변을 도입한 VHH를 짜넣은 폴리펩티드의 IL6R 결합 평가
- [0900] 얻어진 20A11hu-G1m/VK1-39-kOMT, 20A11hu-G1m/VK2-28-kOMT, 20A11hu-G1m/VK3-20-kOMT, 20A11hu-G1m/VL1-40-1amL, 20A11hu-G1m/VL1-44-1amL, 20A11hu-G1m/VL2-14-1amL, 20A11hu-G1m/VL3-21-1amL의 IL6R에 대한 30℃ 또는 25℃에 있어서의 결합을 실시예 3과 마찬가지로의 방법으로 평가한 결과를 도 15에 나타낸다.
- [0901] 그 결과, 20A11hu-G1m/VK1-39-kOMT, 20A11hu-G1m/VK2-28-kOMT, 20A11hu-G1m/VK3-20-kOMT, 20A11hu-G1m/VL1-40-1amL, 20A11hu-G1m/VL1-44-1amL, 20A11hu-G1m/VL2-14-1amL은 IL6R과 결합할 수 없음이 나타났다.
- [0902] 이들 결과로부터, 실시예 3에서 사용한 VL과 회합시켜도 IL6R 결합 활성을 상실하지 않았던 20A11에, VHH와 VL의 계면 부위에 존재하는 아미노산을, 37V, 45L, 47W(Kabat 넘버링)로 하여, 20A11hu로 개변함으로써, VHH와 VL을 안정된 가변 영역을 형성시킬 수 있어, VHH의 IL6R 결합 활성을 상실시킬 수 있음이 나타났다.
- [0903] 4-4 VL 계면 부위로의 아미노산 개변을 도입한 VHH를 짜넣은 폴리펩티드로의 프로테아제 절단 서열의 도입
- [0904] 실시예 3과 마찬가지로의 방법으로, 20A11hu와 CH1의 경계 부근에 프로테아제 절단 서열(서열 번호: 12) 또는 가동 링커와 연결된 프로테아제 절단 서열(서열 번호: 44)을 삽입한 중쇄 20A11huH1001(서열 번호: 40), 20A11huH1002(서열 번호: 41), 20A11huH1004(서열 번호: 42), 20A11huH1006(서열 번호: 43)을 제작했다.
- [0905] 이들 중쇄와, 경쇄로서 VK1-39-kOMT(서열 번호: 3)를 이용하여, 폴리펩티드 20A11huH1001/VK1-39-kOMT(중쇄 서열 번호: 40, 경쇄 서열 번호: 3), 20A11huH1002/VK1-39-kOMT(중쇄 서열 번호: 41, 경쇄 서열 번호: 3), 20A11huH1004/VK1-39-kOMT(중쇄 서열 번호: 42, 경쇄 서열 번호: 3), 20A11huH1006/VK1-39-kOMT(중쇄 서열 번호: 43, 경쇄 서열 번호: 3)의 발현·정제를 실시예 3과 마찬가지로의 방법에 의해 행했다.
- [0906] 4-5 프로테아제 절단 서열을 도입한 폴리펩티드의 프로테아제 절단에 의한 활성화
- [0907] 20A11huH1001/VK1-39-kOMT, 20A11huH1002/VK1-39-kOMT, 20A11huH1004/VK1-39-kOMT, 20A11huH1006/VK1-39-kOMT를 실시예 3과 마찬가지로의 방법으로 프로테아제에 의해 절단하여, 절단의 정도를 환원 SDS-PAGE에 의해 평가한 결과를 도 16에 나타낸다.
- [0908] 그 결과, 20A11huH1002/VK1-39-kOMT, 20A11huH1004/VK1-39-kOMT, 20A11huH1006/VK1-39-kOMT에 있어서, VHH와 CH1의 경계 부근이 프로테아제에 의해 절단됨이 확인되었다.
- [0909] 다음에, 프로테아제 처리에 의해 유리된 VHH와 IL6R의 30℃ 또는 25℃에 있어서의 결합 평가를 실시예 3과 마찬가지로의 방법으로 행했다. Octet의 센서그램을 도 17에 나타낸다.
- [0910] 그 결과, 프로테아제 처리에 의해 VHH와 CH1의 경계 부근의 절단이 확인된 20A11huH1002/VK1-39-kOMT, 20A11huH1004/VK1-39-kOMT, 20A11huH1006/VK1-39-kOMT에 있어서 IL6R과의 결합이 확인되었다.
- [0911] 이들 결과로부터, VHH를 짜넣은 폴리펩티드에 있어서, 특정한 VL과 회합시킬 때에 즉시 항원 결합 활성이 상실되지 않는 경우에도, VHH의 VL의 계면에 존재하는 아미노산에 회합 촉진의 변이를 도입함으로써 항원 결합 활성을 상실시킬 수 있음이 확인되었다.
- [0912] 이 결과로부터, 실시예 3과 같이 미리 떨어져 있는 VHH를 경쇄와 조합하는 방법 이외에, 경쇄와의 회합에 관여하는 아미노산을 치환한 VHH를 경쇄와 조합하는 방법에 의해서도, 실시예 2에 기재된 컨셉의 분자를 제작할 수 있음이 나타났다.
- [0913] 실시예 5 면역 알파카 유래 VHH를 이용한 프로테아제 활성화 폴리펩티드의 제작

[0914] 5-1 면역 알파카 유래 VHH의 취득

[0915] 당업자 공지의 방법으로 IL6R, CD3 및 PlexinA1을 알파카에게 면역하고, 4 및 8주 후에 PBMC를 회수했다. 회수한 PBMC로부터 J. Immunol. Methods (2007) 324, 13에 기재된 방법을 참고로 VHH 유전자를 증폭했다. 증폭된 VHH 유전자 단편은, gene3 유전자와 접속하여 파지미드벡터에 삽입했다. VHH 단편이 삽입된 파지미드벡터를 대장균에 일렉트로포레이션법으로 도입하고, 당업자 기지의 방법으로 VHH를 제시하는 파지를 얻었다. 얻어진 파지를 이용하여, ELISA법으로 IL6R, CD3 또는 PlexinA1에 대한 결합을 평가하고, 결합하는 클론의 서열을 당업자 공지의 방법으로 해석하여 항원에 결합하는 VHH를 동정했다.

[0916] 5-2 CD3에 결합하는 VHH의 농축

[0917] 실시예 5-1에서 구축된 VHH 라이브러리로부터 인간 CD3에 결합하는 VHH를 동정했다. 항원으로서, 비오틴 표지된 인간 CD3ε 및 인간 CD3δ를 인간 항체 정상 영역에 연결한 단백질(인간 CD3ed-Fc)을 이용하여, 인간 CD3에 대해서 결합능을 가지는 VHH의 농축을 행했다. 인간 CD3ed-Fc는 이하와 같이 조제되었다. 서열 번호: 59로 나타내는 아미노산 서열을 코딩하는 유전자와 서열 번호: 60으로 나타내는 아미노산 서열을 코딩하는 유전자 및 BirA(서열 번호: 58)를 코딩하는 유전자를 가진 동물 세포 발현 벡터를 FreeStyle293 세포(Invitrogen)에 도입했다. 도입 후 L-비오틴을 가하여 비오틴화를 배양액 중에서 실시하고, 세포 배양은 프로토콜에 따라 37°C에서 진탕 배양하여, 4 내지 5일 후에 상청을 회수했다. 상청으로부터 ProteinA 컬럼(Eshmuno A(Merck))을 이용하여, 항체의 정상 영역이 융합하고 있는 단백질을 얻었다. 추가로 CD3εδ 헤테로다이머만을 취득할 목적으로 Anti-FLAG M2 컬럼을 이용하여, 항체의 정상 영역이 융합하고 있는 CD3εδ 헤테로다이머(인간 CD3ed-Fc라고 부른다)를 분획했다. 계속하여, 겔 여과 크로마토그래피(Superdex200, GE Healthcare)를 실시하여 목적하는 CD3εδ 헤테로다이머(인간 CD3ed-Fc라고 부른다)를 분취했다.

[0918] 구축된 파지 디스플레이용 파지미드를 보지한 대장균으로부터 파지 산생이 행해졌다. 파지 산생이 행해진 대장균의 배양액에 2.5M NaCl/10% PEG를 첨가하는 것에 의해 집진시킨 파지의 집단을 TBS로 희석하는 것에 의해 파지 라이브러리액이 얻어졌다. 다음에, 파지 라이브러리액에 중농도 4% BSA가 되도록 BSA가 첨가되었다. 패닝 방법으로서, 일반적인 방법인 자기 비즈에 고정화한 항원을 이용한 패닝 방법이 참조되었다(J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9, J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203, Biotechnol. Prog. (2002) 18 (2) 212-20, Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9). 자기 비즈로서, NeutrAvidin coated beads(FG beads NeutrAvidin) 혹은 Streptavidin coated beads(Dynabeads MyOne Streptavidin T1)가 이용되었다.

[0919] 구체적으로는, 조제된 파지 라이브러리액에 100pmol의 비오틴 표지 항원을 가하는 것에 의해, 당해 파지 라이브러리액을 실온에서 60분간 항원과 접촉시켰다. BSA로 블로킹된 자기 비즈가 가해지고, 항원과 파지의 복합체를 자기 비즈와 실온에서 15분간 결합시켰다. 비즈는 0.5mL의 TBST(0.1% Tween20을 함유하는 TBS, TBS는 TaKaRa 사제)로 2회 세정된 후, 0.5mL의 TBS로 추가로 1회 세정되었다. 그 후, 0.5mL의 1mg/mL의 트립신이 가해진 비즈는 실온에서 15분 현탁된 후, 즉석에서 자기 스탠드를 이용하여 비즈가 분리되어 파지 용액이 회수되었다. 회수된 파지 용액이, 대수(對數) 증식기(OD600가 0.4-0.5)가 된 20mL의 대장균주 ER2738에 첨가되었다. 37°C에서 1시간 완만하게 상기 대장균의 교반 배양을 행하는 것에 의해, 파지를 대장균에 감염시켰다. 감염시킨 대장균은, 225mm x 225mm의 플레이트에 과중되었다. 다음에, 과중된 대장균의 배양액으로부터 파지를 회수하는 것에 의해, 파지 라이브러리액이 조제되었다. 이 사이클을 패닝이라고 부르고, 전부 2회 반복했다. 또한 2회째의 패닝에서는, 비즈의 세정은 TBST로 3회, 계속하여 TBS로 2회 행해졌다. 또한, 인간 CD3ed-Fc와 파지의 결합 시에는 4nmol의 인간 Fc가 가해졌다.

[0920] 5-3 CD3에 결합하는 VHH를 짜넣은 프로테아제 활성화 IgG 항체-유사 분자의 조제

[0921] 실시예 5-1 또는 5-2로부터 얻어진 인간 CD3 결합 클론의 VHH 서열(표 1)을 코딩하는 염기 서열을 실시예 3에 기재된 방법으로, 프로테아제 절단 사이트 및 정상 영역을 코딩하는 염기 서열에 접속하고, 동물 세포 발현 벡터에 삽입하여, IgG 항체-유사 분자의 증쇄로서 사용했다.

표 1

인간 CD3 결합 VHH

VHH	서열 번호
bC3edL1R1N160H01	61
bC3edL1R1N161H01	62
bC3edL1R1N164H01	63

[0922]

[0923]

이하 표 2에서 나타내는 프로테아제 활성화 IgG 항체-유사 분자를, 당업자 공지 방법으로 FreeStyle293 세포 (Invitrogen)를 이용한 일과성 발현에 의해 발현하고, 프로테인 A를 이용한 당업자 공지 방법에 의해 정제를 행했다.

표 2

CD3에 결합하는 VHH를 짜넣은 프로테아제 활성화 IgG 항체-유사 분자

IgG 항체-유사 분자	중쇄 서열 번호	경쇄 서열 번호
bC3edL1R1N160H01-G1mISHI01/VK1-39-kOMT	64	3
bC3edL1R1N161H01-G1mISHI01/VK1-39-kOMT	65	
bC3edL1R1N164H01-G1mISHI01/VK1-39-kOMT	66	

[0924]

[0925]

5-4 프로테아제 활성화 IgG 항체-유사 분자의 프로테아제 절단에 의한 활성화

[0926]

실시에 5-3에서 조제한 IgG 항체-유사 분자를 실시에 3과 마찬가지로의 방법으로 프로테아제에 의해 절단하고, 절단의 정도를 환원 SDS-PAGE에 의해 평가한 결과를 도 18에 나타낸다. 또한 프로테아제 농도는 25nM로 실시하고, 측정에는 OctetRED(ForteBio)를 이용했다.

[0927]

그 결과, IgG 항체-유사 분자 중의 프로테아제 절단 서열이 프로테아제에 의해 절단됨이 확인되었다.

[0928]

다음에, 프로테아제 처리에 의해 유리된 VHH와 CD3의 결합 평가를 실시에 3과 마찬가지로의 방법으로 행했다. Octet의 센서그램을 도 19에 나타낸다.

[0929]

그 결과, bC3edL1R1N160H01-G1mISHI01/VK1-39-kOMT, bC3edL1R1N161H01-G1mISHI01/VK1-39-kOMT, bC3edL1R1N164H01-G1mISHI01/VK1-39-kOMT에 있어서, 프로테아제 처리 전의 IgG 항체-유사 분자는 항원 결합을 나타내지 않는데 반해, 프로테아제 처리 후에 항원 결합이 확인되었다. 또한, 표 1에 기재된 VHH와 마찬가지로의 방법으로 얻어진 복수의 CD3에 대해서 결합하는 VHH도, 표 2에 기재된 IgG 항체-유사 분자와 마찬가지로의 프로테아제 절단 사이트를 포함하는 IgG-유사 분자를 제작한 바, 프로테아제 처리에 의해 항원과의 결합이 확인되었다. 이들 결과로부터, 실시에 3, 4에서 나타난 폴리펩티드 이외에도, 프로테아제 절단 서열을 짜넣음으로써, 프로테아제 처리에 의해 프로테아제 절단 서열이 절단되어, 항원 결합 도메인이 유리되고, 유리된 항원 결합 도메인이 항원에 결합할 수 있는 IgG 항체-유사 분자가 나타났다.

[0930]

실시에 6 경쇄에 프로테아제 절단 서열을 도입한 폴리펩티드

[0931]

실시에 3과 마찬가지로 경쇄의 각 위치에 프로테아제 절단 서열을 짜넣은 VK1-39P-2-PkOMT(서열 번호: 67), VK1-39P-1-PkOMT(서열 번호: 68), VK1-39P-PkOMT(서열 번호: 69), VK1-39P+2-PkOMT(서열 번호: 70), VK1-39P+3-PkOMT(서열 번호: 71), VK1-39P+4-PkOMT(서열 번호: 72), 및 VK1-39P+5-PkOMT(서열 번호: 73)를 제작했다.

[0932]

이들 경쇄와, 중쇄로서 IL6R90-G1m(서열 번호: 2)을 이용한 IgG 항체-유사 분자의 발현·정제를 실시에 3과 마찬가지로의 방법에 의해 행했다. 또한 프로테아제 농도는 25nM로 실시했다. 절단 서열이 도입되어 있지 않은 IgG 항체-유사 분자로서, IL6R90-G1m/VK1-39-kOMT(중쇄 서열 번호: 2, 경쇄 서열 번호: 3)를 이용했다.

[0933]

계속하여 조제한 IgG 항체-유사 분자를 실시에 3과 마찬가지로의 방법으로 프로테아제에 의해 절단하고, 절단의

정도를 환원 SDS-PAGE에 의해 평가한 결과를 도 20에 나타낸다. 그 결과, VK1-39P+2-PkOMT(서열 번호: 70), VK1-39P+3-PkOMT(서열 번호: 71), VK1-39P+4-PkOMT(서열 번호: 72), 및 VK1-39P+5-PkOMT(서열 번호: 73)에 있어서, 프로테아제 절단 서열이 프로테아제에 의해 절단됨이 확인되었다. 추가로 프로테아제 처리에 의해 노출된 VHH와 IL6R의 결합 평가를 실시예 3과 마찬가지로 방법으로 행했다. Octet의 센서그램을 도 21에 나타낸다. 그 결과, 경쇄에 절단 서열을 도입했을 경우에도, 프로테아제 처리에 의해 결합이 확인되고, 경쇄에 프로테아제 절단 서열을 도입하여 경쇄를 프로테아제로 절단했을 때에, 항원 결합 도메인이 노출되어 항원 결합능을 나타내는, 프로테아제 활성화 폴리펩티드를 취득 가능성이 나타났다.

[0934] 실시예 7 항원 결합 도메인을 갖는 중쇄와 프로테아제 절단 서열이 도입된 경쇄를 포함하는 라이브러리, 및 당해 라이브러리로부터 파지 디스플레이법에 따르는 프로테아제 활성화 폴리펩티드의 취득

[0935] 실시예 6에서 확인된 바와 같이, 프로테아제 활성화 폴리펩티드의 경쇄에 프로테아제 절단 서열을 도입했을 경우에도, 경쇄 절단 후에 항원 결합 도메인이 노출되어, 항원에 결합한다.

[0936] 그래서, 단도메인 항체 등의 항원 결합 도메인을 포함하는 중쇄와 프로테아제 절단 서열을 도입한 경쇄를 파지미드에 짜넣어, 파지에 제시시킨다. 상이한 종류의 항원 결합 도메인을 포함하는 복수의 파지 디스플레이용 파지미드가 구축되고, 그들의 파지미드를 보지한 대장균으로부터 파지 산생이 행해진다. 파지 산생이 행해진 대장균의 배양액에 2.5M NaCl/10% PEG를 첨가하는 것에 의해 침전시킨 파지의 집단을 TBS로 희석하는 것에 의해 파지 라이브러리액이 얻어진다. 파지 라이브러리액에, 중농도 4% BSA가 되도록 BSA가 첨가된다.

[0937] 상기와 같이 제작된 파지 라이브러리로부터 프로테아제 활성화 폴리펩티드를 패닝에 의해 취득한다. 패닝 방법으로서, 일반적인 방법인 자기 비즈에 고정화한 항원을 이용한 패닝 방법이 참조되고(J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9, J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203, Biotechnol. Prog. (2002) 18 (2) 212-20, Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9), 프로테아제 첨가 전에는 항원이 고정되어 있는 자기 비즈에 결합하지 않았던 파지를 회수하고, 프로테아제 첨가 후에 항원이 고정되어 있는 자기 비즈에 결합한 파지를 회수한다. 자기 비즈로서, NeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated, FG beads NeutrAvidin) 혹은 Streptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)가 이용된다. 회수한 파지로부터 전향에서 기재된 파지 ELISA로 항원과 결합하는 클론을 선정해도 되고, 혹은 항체 유전자를 동물 발현용 벡터로 서브클로닝을 행하여 동물 세포를 이용하여 발현하고, 프로테아제 처리 전후의 결합 활성을 비교하여, 결합 클론을 선정한다.

[0938] 실시예 8 항원 결합 도메인을 갖는 중쇄와 경쇄를 포함하는 라이브러리, 및 당해 라이브러리로부터 파지 디스플레이법에 따르는 경쇄에 의해 항원 결합능이 제어되는 중쇄의 취득

[0939] 실시예 3에서 확인된 바와 같이, 경쇄의 회합에 의해 항원 결합 도메인을 포함하는 중쇄의 항원 결합능이 제어된다. 그래서, 경쇄와 회합했을 때에 항원 결합능을 상실하고, 중쇄만 또는 중쇄와 경쇄 정상 영역을 제시했을 때에 항원 결합능을 나타내는 중쇄를 파지 디스플레이법에 의해 취득한다.

[0940] 단도메인 항체 등의 항원 결합 도메인을 포함하는 중쇄를 파지미드에 짜넣어, 파지에 제시시킨다. 상이한 종류의 항원 결합 도메인을 포함하는 복수의 파지 디스플레이용 파지미드가 구축되고, 그들의 파지미드를 보지한 대장균으로부터 파지 산생이 행해진다. 파지 산생이 행해진 대장균의 배양액에 2.5M NaCl/10% PEG를 첨가하는 것에 의해 침전시킨 파지의 집단을 TBS로 희석하는 것에 의해 파지 라이브러리액이 얻어진다. 파지 라이브러리액에, 중농도 4% BSA가 되도록 BSA가 첨가된다.

[0941] 상기와 같이 제작된 파지 라이브러리로부터 중쇄만 또는 중쇄와 경쇄 정상 영역을 제시하고 있을 때 항원 결합능을 나타내고, 중쇄가 경쇄 가변 영역과 회합했을 때에 항원 결합능이 상실되는 중쇄를 패닝에 의해 취득한다. 패닝 방법으로서, 실시예 5에 기재된 자기 비즈에 고정화한 항원을 이용한 패닝 방법이 참조된다. 중쇄 또는 중쇄와 경쇄 정상 영역을 제시한 파지 라이브러리로부터, 항원이 고정되어 있는 자기 비즈에 결합한 파지를 회수한다. 회수한 파지를 대장균에 감염시키고, 경쇄를 발현하는 헬퍼 파지를 이용하여 중쇄와 경쇄를 제시하는 파지를 산생한다. 파지 산생이 행해진 대장균의 배양액으로부터 전술한 방법으로 항원 결합 도메인을 포함하는 중쇄와 경쇄를 제시한 파지가 얻어진다. 중쇄와 경쇄를 제시한 파지의 집단으로부터, 항원이 고정되어 있는 자기 비즈에 결합하지 않는 파지를 회수한다.

[0942] 한편, 도 9d에 나타난 바와 같이 패닝은, 항원이 고정되어 있는 자기 비즈에 결합하는 중쇄만 또는 중쇄와 경쇄 정상 영역을 제시한 파지 집단의 회수, 및 항원이 고정되어 있는 자기 비즈에 결합하지 않는 중쇄와 경쇄를 제시한 파지 집단의 회수의 순서를 바꿔 넣어 실시하는 경우도 있다. 한편, 헬퍼 파지를 이용하여 경쇄를 발현하

는 방법 이외에, 통상대로 중쇄와 동일한 파지미드에 경쇄를 코딩하는 영역을 짜넣고, 패닝마다 경쇄 정상 영역만 혹은 경쇄 전장을 코딩하는 유전자를 짜넣어 이용하는 경우도 있다.

- [0943] 회수한 파지로부터 전향에서 기재된 파지 ELISA로 항원과 결합하는 클론을 선정해도 되고, 혹은 항체 유전자를 동물 발현용 벡터로 서브클로닝을 행하여 동물 세포를 이용하여 발현하고, 프로테아제 처리 전후의 결합 활성을 비교하여, 결합 클론을 선정한다.
- [0944] 실시예 9 파지 디스플레이법을 이용하여 경쇄에 의해 항원 결합능이 제어되는 VHH의 취득 및 그것을 포함하는 IgG 항체-유사 분자의 제작
- [0945] 실시예 3에서, 경쇄와의 회합에 의해 중쇄에 VH의 대신으로서 포함되는 VHH의 항원 결합능이 제어됨이 확인되었다. 그래서, 특정한 경쇄와 회합했을 때에 항원 결합능을 상실하고, 중쇄만 또는 중쇄와 경쇄 정상 영역을 제시했을 때, 즉 경쇄 가변 영역과 회합하고 있지 않을 때에 항원 결합능을 나타내는 VHH를, 면역 알파카 PBMC 아래의 VHH와 CH1를 연결한 것을 제시시킨 파지 라이브러리로부터 취득하여, 당해 VHH를 포함하는 IgG 항체-유사 분자를 제작했다.
- [0946] 9-1 경쇄 발현 유닛을 짜넣은 경쇄 발현 헬퍼 파지의 구축
- [0947] 국제 공개 공보 W02015/046554호에 기재된 방법에 기초하여, 헬퍼 파지의 게놈에, 프로모터, 시그널 서열, 항체 경쇄 가변 영역 및 경쇄 정상 영역의 유전자, 또는 경쇄 정상 영역의 유전자 등을 짜넣는 것에 의해, 경쇄 발현 헬퍼 파지의 구축을 행했다. 본 헬퍼 파지가 감염한 대장균으로부터는 항체 경쇄 가변 영역 및 경쇄 정상 영역, 또는 경쇄 정상 영역만의 발현이 가능해진다.
- [0948] 구체적으로는 국제 공개 공보 W02015/046554호에 기재된 방법으로 구축한 헬퍼 파지 M13K07TC의 게놈 추출을 행하고, 경쇄 발현 유닛을 도입했다. 도입하는 경쇄 유전자로서, 경쇄 가변 영역 및 경쇄 정상 영역(Vk1-39-kOMTdc, 서열 번호: 152)을 코딩하는 유전자, 또는 경쇄 정상 영역(kOMTdc, 서열 번호: 153)을 코딩하는 유전자를 이용했다. lac 프로모터-pe1B 시그널 서열-경쇄 유전자를 상기 방법으로 M13K07TC/SacI에 삽입하고, 대장균주 ER2738에 일렉트로포레이션법에 의해 도입했다.
- [0949] 얻어진 대장균을 배양하고, 배양 상청에 2.5M NaCl/10% PEG를 첨가하여 PEG 침전법에 의해 헬퍼 파지를 정제했다. 얻어진 헬퍼 파지 M13K07TC-Vk1-39-kOMTdc 및 M13K07TC-kOMTdc의 타이터를 일반적인 플라크 형성법으로 확인했다.
- [0950] 9-2 VHH-CH1을 복수 포함하는 라이브러리의 조제
- [0951] 당업자 공지인 방법으로, 인간 IL6R의 세포외 도메인, 인간 CD3εγ 헤테로다имер, 원숭이 CD3εγ 헤테로다имер 및 인간 PlexinA1의 세포 외도메인의 4종류를 면역원으로 하여, 알파카에게 면역하고, 4주일 후에 PBMC를 회수했다. CD3εγ 헤테로다имер는 Journal of Molecular Biology (2000) 302:899-916.을 참고하여 조제했다. 회수한 PBMC로부터 J. Immunol. Methods (2007) 324, 13에 기재된 방법을 참고하여 VHH 유전자를 증폭했다. 증폭한 VHH 유전자 단편은, CH1-gene3 유전자와 접촉하여 파지미드 벡터에 삽입하여, VHH와 CH1을 연결시킨 VHH-CH1을 복수 포함하는 라이브러리를 조제했다.
- [0952] 9-3 VHH-CH1/전장 경쇄, 또는 VHH-CH1/경쇄 정상 영역을 제시하는 파지 집단의 제작 방법
- [0953] VHH-CH1을 코딩하는 유전자가 삽입된 파지미드 벡터를 대장균에 일렉트로포레이션법으로 도입하고, 얻어진 대장균을 배양하고, 실시예 9-1에서 조제한 헬퍼 파지 M13K07TC-Vk1-39-kOMTdc를 감염시킴으로써, 파지미드 벡터로부터 발현하는 VHH-CH1과 헬퍼 파지로부터 발현하는 전장 경쇄가 Fab 구조를 형성하여, VHH-CH1을 코딩하는 유전자가 포함되는 파지미드의 표면에, VHH-CH1/전장 경쇄(VHH-CH1/Vk1-39-kOMTdc)를 제시하는 파지 집단을 제작할 수 있다. 또한, VHH-CH1을 코딩하는 유전자가 삽입된 파지미드 벡터가 도입된 대장균을 배양하고, 실시예 9-1에서 조제한 헬퍼 파지 M13K07TC-kOMTdc를 감염시킴으로써, 파지미드 벡터로부터 발현하는 VHH-CH1과 헬퍼 파지로부터 발현하는 경쇄 정상 영역이 VHH-CH1과 CL이 회합한 구조를 형성하여, VHH-CH1/경쇄 정상 영역(VHH-CH1/kOMTdc)을 제시하는 파지 집단을 제작할 수 있다. 배양 상청에 2.5M NaCl/10% PEG를 첨가하여 PEG 침전법에 의해 파지를 정제할 수 있다. 얻어진 파지의 타이터를 일반적인 플라크 형성법으로 확인할 수 있다.
- [0954] 9-4 VHH-CH1 파지 라이브러리로부터, 경쇄 가변 영역과의 회합에서 항원 결합이 저해되고, 경쇄 가변 영역이 없을 때에 항원 결합능을 나타내는 PlexinA1 VHH를 포함하는 VHH-CH1의 취득
- [0955] 실시예 9-2에서 제작된 VHH-CH1 라이브러리로부터, 경쇄 가변 영역과의 회합에서 항원 결합이 저해되고, 경쇄

가변 영역이 없을 때에 항원 결합능을 나타내는 VHH를 포함하는 VHH-CH1을 패닝에 의해 취득했다.

[0956] 항원으로서, 참고 실시예에서 제작한 비오틴 표지된 인간 PlexinA1을 이용했다.

[0957] 패닝 방법으로서, 이하의 스텝:

[0958] (1) 실시예 9-2에서 제작된 VHH-CH1 파지 라이브러리에 대해, 실시예 9-3 방법으로 VHH-CH1/경쇄 정상 영역 (VHH-CH1/kOMTdC)을 제시하는 파지 집단을 제작하고, 안으로부터 항원이 고정되어 있는 자기 비즈에 결합한 파지를 회수한다

[0959] (2) 회수한 파지에 대해서 실시예 9-3 방법으로 VHH-CH1/전장 경쇄(VHH-CH1/Vk1-39-kOMTdC)를 제시하는 파지 집단을 제작하고, 안으로부터 항원이 고정되어 있는 자기 비즈에 결합하지 않는 파지를 회수한다;

[0960] (3) 회수한 파지에 대해서, 스텝(1)과 (2)를 반복하고, 원하는 파지를 회수한다;

[0961] 에 따라 행했다. 패닝의 결과, 경쇄 Vk1-39-kOMTdC와의 회합에서 PlexinA1에 대한 결합이 저해되고, 경쇄 가변 영역이 없을 때에 PlexinA1에 대한 결합능을 나타내는 VHH-CH1을 복수개 선택할 수 있었다.

[0962] 또한, 다른 패닝 방법으로서, 이하의 스텝:

[0963] (1) 실시예 9-2에서 제작된 VHH-CH1 파지 라이브러리에 대해, 실시예 9-3 방법으로 VHH-CH1/경쇄 정상 영역 (VHH-CH1/kOMTdC)을 제시하는 파지 집단을 제작하고, 안으로부터 항원이 고정되어 있는 자기 비즈에 결합한 파지를 회수한다;

[0964] (2) 회수한 파지에 대해서 실시예 9-3 방법으로 VHH-CH1/전장 경쇄(VHH-CH1/Vk1-39-kOMTdC)를 제시하는 파지 집단을 제작하고, 안으로부터 항원이 고정되어 있는 자기 비즈에 결합하지 않는 파지를 회수하고, 회수한 파지로부터 추가로, 항경쇄 항체(EY Laboratories, Cat. BAT-2107-2)가 고정된 자기 비즈에 대해서 결합하는 파지를 회수한다;

[0965] (3) 회수한 파지에 대해서, 스텝(1)과 (2)를 반복하고, 원하는 파지를 회수한다;

[0966] 에 따라 행했다. 패닝의 결과, 경쇄 Vk1-39-kOMTdC와의 회합에서 PlexinA1에 대한 결합이 저해되고, 경쇄 가변 영역이 없을 때에 PlexinA1에 대한 결합능을 나타내는 VHH-CH1을 복수개 선택할 수 있었다.

[0967] 패닝에 의해 선택된 VHH-CH1 중의 VHH는, IgG 항체-유사 분자의 제작에 사용할 수 있다.

[0968] 9-5 PlexinA1에 결합하는 VHH를 짜넣은 프로테아제 활성화 IgG 항체-유사 분자의 제작

[0969] 실시예 9-4에서 선택된 VHH-CH1에 포함되는 VHH를 코딩하는 염기 서열을 실시예 3에 기재된 방법으로, 프로테아제 절단 사이트 및 중쇄 정상 영역을 코딩하는 염기 서열에 접속하여 IgG 항체-유사 분자의 중쇄로서 사용하고, 전장 경쇄VK1-39-kOMT(서열 번호: 3)와 조합하여, 당업자 공지 방법으로 FreeStyle293 세포(Invitrogen)를 이용한 일과성 발현에 의해 발현하고, 프로테인 A를 이용한 당업자 공지 방법에 의해 정제를 행했다.

[0970] 제작된 IgG 항체-유사 분자는 표 3에 나타낸다.

표 3

인간 PlexinA1 결합 VHH를 함유하는 IgG 항체-유사 분자

IgG 항체-유사 분자	중쇄		경쇄	
	명칭	서열 번호	명칭	서열 번호
PX02-R2_001-G1mISHI01 /VK1-39-kOMT	PX02-R2_001- G1mISHI01	154	VK1-39-kOMT	3
PX02-R4_004-G1mISHI01 /VK1-39-kOMT	PX02-R4_004- G1mISHI01	155		
PX02-R4_017-G1mISHI01 /VK1-39-kOMT	PX02-R4_017- G1mISHI01	156		
PX03-R2_006-G1mISHI01 /VK1-39-kOMT	PX03-R2_006- G1mISHI01	157		
PX03-R4_009-G1mISHI01 /VK1-39-kOMT	PX03-R4_009- G1mISHI01	158		

[0971]

[0972]

9-6 프로테아제 활성화 IgG 항체-유사 분자의 프로테아제 절단에 의한 활성화

[0973]

실시에 9-4에서 조제한 IgG 항체-유사 분자를 실시에 3과 마찬가지로의 방법으로 프로테아제에 의해 절단하고, 절단의 정도를 환원 SDS-PAGE에 의해 평가한 결과를 도 22에 나타낸다. 한편, 프로테아제 농도는 25nM로 실시했다.

[0974]

그 결과, 제작한 각 IgG 항체-유사 분자 중의 프로테아제 절단 서열이 프로테아제에 의해 절단됨이 확인되었다.

[0975]

다음에, 프로테아제 처리에 의해 유리된 VHH와 인간 PlexinA1의 결합 평가를 실시에 3과 마찬가지로의 방법으로 행했다. Octet의 센서그램을 도 23에 나타낸다.

[0976]

그 결과, 제작한 각 IgG 항체-유사 분자에 있어서, 프로테아제 처리 전의 IgG 항체-유사 분자는 항원 결합을 나타내지 않는데 반해, 프로테아제 처리 후에 유리 VHH에 의한 항원 결합이 확인되었다.

[0977]

실시에 10 이중 특이성 VHH-VHH 함유 폴리펩티드

[0978]

10-1 압항원과 CD3에 결합하는 이중 특이성 VHH-VHH 및 이중 특이성 VHH-VHH 함유 폴리펩티드의 제작

[0979]

도 8에 나타난 바와 같이, 프로테아제에 의해 활성화되는 항원 결합 도메인은 제 2 항원 결합 도메인과 이중 특이적 항원 결합 분자를 형성해도 된다.

[0980]

인간 글리피칸 3을 인식하는 VHHHN3(서열 번호: 159)과 CD3을 인식하는 VHHG03(서열 번호: 160)을 글리신과 세린으로 구성되는 링커를 개재시켜 접속하여, 이중 특이적 VHH-VHHHN3G03을 제작하고, 추가로 프로테아제 절단 서열을 개재시켜 서열 번호: 161에 나타내는 항체 중쇄 정상 영역을 접속한 이중 특이적 VHH-VHH 함유 중쇄 HN3G03-cF760mnHIF(서열 번호: 162)를 동물 발현용 벡터에 삽입했다.

[0981]

Her2를 인식하는 VHHHerF07(서열 번호: 163)과 CD3을 인식하는 VHHG03(서열 번호: 160)을 글리신과 세린으로 구성되는 링커를 개재시켜 접속하여, 이중 특이적 VHH-VHHHerF07G03을 제작하고, 추가로 프로테아제 절단 서열을 개재시켜 서열 번호: 161에 나타내는 항체 중쇄 정상 영역을 접속한 이중 특이적 VHH-VHH 함유 중쇄 HerF07G03-cF760mnHIF(서열 번호: 164)를 동물 발현용 벡터에 삽입했다.

[0982]

각각의 이중 특이적 VHH-VHH 함유 중쇄를, 경쇄 VK1.39-kOMT(서열 번호: 3)와, 힌지 영역으로부터 C말단까지의 인간 정상 영역 서열 Vhn-Kn010dGK(서열 번호: 166)가 각각 삽입되어 있는 동물 발현용 벡터와 함께 Expi293 세포(Life technologies)에 도입하여, 이중 특이성 VHH-VHH 함유 폴리펩티드를 발현했다. 그 후, 당업자 공지的方法으로 MonoSpin ProA 96웰 플레이트 타입(GL science, Cat No.:7510-11312)을 이용하여 이중 특이성 VHH-VHH 함유 폴리펩티드를 정제했다. 이중 특이적 VHH-VHHHN3G03을 포함하는 폴리펩티드는 HN3G03-cF760mnHIF/VHn-Kn010dGK/VK1.39-kOMT이며, 이중 특이적 VHH-VHHHerF07G03을 포함하는 폴리펩티드는 HerF07G03-cF760mnHIF/VHn-Kn010dGK/VK1.39-kOMT이다.

- [0983] 다음에, 프로테아제 처리로서, 정제한 이중 특이성 VHH-VHH 함유 폴리펩티드 40 μg에 중농도 25nM가 되도록 uPA(Recombinant Human u-Plasminogen Activator, R&D systems)를 가하고 20시간 이상 37°C에서 보온했다. 프로테아제를 처리하지 않는 샘플은, 프로테아제 대신에 PBS를 프로테아제의 양과 동일한 양 가하고 보온했다. 프로테아제 절단을 실시한 이중 특이성 VHH-VHH 함유 폴리펩티드가 목적대로 절단되고 있는지를 환원 SDS-PAGE로 확인한 결과를 도 24에 나타낸다. 도 24에 나타내는 대로, 프로테아제 절단에 의해 이중 특이적 VHH-VHH가 전체로부터 분리되었음이 시사되었다.
- [0984] 10-2 GPC3과 CD3의 이중 특이적 VHH-VHH 함유 폴리펩티드의 프로테아제 절단에 의한 CD3 활성화 평가
- [0985] CD3으로의 아고니스트 활성화는 Jurkat-NFAT 리포터 세포(NFAT luc2_jurkat cell)를 이용하여 평가되었다. Jurkat-NFAT 리포터 세포는, CD3을 발현하고 있는 인간 급성 T세포성 백혈병 유래 세포에 NFAT 응답 엘리먼트와 루시페라제(luc2P)가 융합하고 있는 셀 라인이며, CD3의 하류의 시그널이 활성화되면 루시페라제가 발현한다. 표적 세포로서, GPC3을 이용한 항체는 인간 간암 유래 세포주의 SK-HEP-1에 human GPC3을 강제 발현시켜 수립한 SK-pca60 세포주를 사용했다. White-bottomed, 96-well assay plate(Costar, 3917)의 각 웰에, 1.25E+04 cells /well, 7.50E+04 cells/well이 되도록 Target cell과 Effector cell을 각각 가하고, 당해 well에 프로테아제 처리 있음 혹은 프로테아제 처리 없음의 HN3G03-cF760mnHIF/VHn-Kn010dGK/VK1.39-kOMT의 중농도가 1, 10, 100nM가 되도록 첨가했다. 5% CO₂ 존재하에서 37°C, 24 hours incubate한 후, Luciferase 효소 활성을 Bio-Glo luciferase assay system(Promega, G7940)을 사용하여 첨부된 protocol에 따라 발광량을 측정했다. 검출에는 2104 EnVision을 사용했다. 그 결과를 도 25에 나타낸다. 프로테아제 처리 없음의 샘플의 경우 루시페라제 활성이 상승되지 않았는데 반해, 프로테아제 처리 있음의 HN3G03-cF760mnHIF/VHn-Kn010dGK/VK1.39-kOMT에서는 루시페라제 활성이 상승됨이 나타났다. 즉, 프로테아제 처리 있음의 HN3G03-cF760mnHIF/VHn-Kn010dGK/VK1.39-kOMT의 경우, CD3에 대한 아고니스트 활성을 확인할 수 있고, 프로테아제 절단에 의해 HN3G03-cF760mnHIF/VHn-Kn010dGK/VK1.39-kOMT로부터 GPC3과 CD3의 이중 특이적 VHH-VHH가 유리되어, 미절단 시에 저해된 CD3 결합 활성을 발휘했다.
- [0986] 10-3 Her2와 CD3의 이중 특이적 VHH-VHH 함유 폴리펩티드의 프로테아제 절단에 의한 CD3 활성화 평가
- [0987] CD3에의 아고니스트 활성화는 Jurkat-NFAT 리포터 세포(NFAT luc2_jurkat cell)를 이용하여 평가되었다. Jurkat-NFAT 리포터 세포(Effector cell)는, CD3을 발현하고 있는 인간 급성 T 세포성 백혈병 유래 세포에 NFAT 응답 엘리먼트와 루시페라제(luc2P)가 융합하고 있는 셀 라인이며, CD3의 하류의 시그널이 활성화되면 루시페라제가 발현한다. 표적 세포(Target cell)로서 LS1034 세포주를 사용했다. White-bottomed, 96-well assay plate(Costar, 3917)의 각 웰에, 2.50E+04 cells /well, 7.50E+04 cells/well이 되도록 Target cell과 Effector cell을 각각 가하고, 당해 well에 프로테아제 처리 있음 혹은 프로테아제 처리 없음의 HerF07G03-cF760mnHIF/VHn-Kn010dGK/VK1.39-kOMT의 중농도가 0.01, 0.1, 1nM가 되도록 첨가했다. 5% CO₂ 존재하에서 37°C, 24 hours incubate한 후, Luciferase 효소 활성을 Bio-Glo luciferase assay system(Promega, G7940)을 사용하여 첨부된 protocol에 따라 발광량을 측정했다. 검출에는 2104 EnVision을 사용했다. 그 결과를 도 26에 나타낸다. 프로테아제 처리 없음의 샘플의 경우 루시페라제 활성이 상승되지 않았는데 반해, 프로테아제 처리 있음의 HerF07G03-cF760mnHIF/VHn-Kn010dGK/VK1.39-kOMT에서는 루시페라제 활성이 상승함이 나타났다. 즉, 프로테아제 처리 있음의 HerF07G03-cF760mnHIF/VHn-Kn010dGK/VK1.39-kOMT의 경우, CD3에 대한 아고니스트 활성을 확인할 수 있고, 프로테아제 절단에 의해 HerF07G03-cF760mnHIF/VHn-Kn010dGK/VK1.39-kOMT로부터 Her2와 CD3의 이중 특이적 VHH-VHH가 유리되어, 미절단 시에 저해된 CD3 결합 활성을 발휘했다.
- [0988] 실시에 11 VHH를 짜넣은 폴리펩티드로의 프로테아제 절단 사이트의 도입
- [0989] 11-1. IL6R에 결합하는 VHH를 짜넣은 폴리펩티드에의 프로테아제 절단 서열의 도입
- [0990] 국제 공개 W02010/115998호에 기재되어 있는, 인간 IL6R에 대해서 결합 및 중화 활성을 갖는 VHH인 IL6R90(서열 번호: 1)을 인간 IgG1의 정상 영역(CH1-hinge-CH2-CH3)에 융합한 IL6R90-G1T4(서열 번호: 167)를 코딩하는 발현 벡터를 당업자 공지 방법으로 조제했다. IgG 항체-유사 분자인 IL6R90-G1T4/VK1-39-kOMT(중쇄 서열 번호: 167, 경쇄 서열 번호: 3)를 당업자 공지 방법으로 FreeStyle293 세포(Invitrogen) 혹은 Expi293 세포(Life technologies)를 이용한 일과성 발현에 의해 발현하고, 단백질 A를 이용한 당업자 공지 방법으로 정제를 행했다.
- [0991] IL6R90-G1T4/VK1-39-kOMT의 중쇄의 VHH와 CH1의 경계 부근에, 서열 번호: 178로 나타내는 프로테아제 절단 서열을 삽입하여, 프로테아제 절단 서열이 삽입된 VHH 함유 중쇄 IL6R90. 12 aa-G1T4(서열 번호: 189)를

제작했다. IL6R90.12aa-G1T4의 발현 백터를, 당업자 공지 방법으로 제작했다.

- [0992] IL6R90.12aa-G1T4와 서열 번호: 3으로 나타내는 경쇄를 조합하여, VHH와 CH1의 경계 부근에 프로테아제 절단 서열을 삽입한 IgG1 항체-유사 분자 IL6R90.12aa-G1T4/VK1-39-kOMT를 당업자 공지 방법으로 FreeStyle293 세포 (Invitrogen) 혹은 Expi293 세포(Life technologies)를 이용한 일과성 발현에 의해 발현하고, 프로테인 A를 이용한 당업자 공지 방법에 의해 정제를 행했다.
- [0993] 11-2 프로테아제 절단 서열을 중쇄 영역에 도입한 항인간 IL6R VHH 함유 IgG 항체-유사 분자의 프로테아제에 의한 절단의 평가
- [0994] 실시예 11-1에서 조제한 IgG 항체-유사 분자가 프로테아제에 의해 절단되는지 여부를 검증했다. 프로테아제로서 리컴비넨트 인간 마트립타제/ST14 촉매 도메인(MT-SP1)(R&D Systems, 3946-SE-010)을 이용하여, 프로테아제 10nM, 항체 50 µg/mL, PBS, 37°C의 조건하에서 20시간 반응시킨 후에, 프로테아제에 의한 절단을 환원 SDS-PAGE에 의해 평가한 결과를 도 27에 나타낸다. 그 결과, IgG 항체-유사 분자 IL6R90.12aa는, 프로테아제 처리에 의해 37kDa 부근에 새로운 밴드가 생겼다. 즉, IgG 항체-유사 분자 VHH와 CH1의 경계 부근에 삽입된, 서열 번호: 178로 나타내는 프로테아제 절단 서열이 프로테아제에 의해 절단됨이 확인되었다. 또한, 유사한 방법으로, 서열 번호: 178로 나타내는 프로테아제 절단 서열은 IgG 항체에 짜넣어질 때 human uPA, mouse uPA로 절단됨도 확인되었다.
- [0995] 실시예 12 프로테아제 절단 서열을 경쇄에 도입한 IgG 항체-유사 분자의 프로테아제 절단에 의한 활성화의 정도의 평가
- [0996] 국제 공개 W02010/115998호에 기재되어 있는, 인간 IL6R에 대해서 결합 및 중화 활성을 갖는 VHH인 IL6R75(서열 번호: 190)를 인간 IgG1의 정상 영역(CH1-hinge-CH2-CH3)에 융합한 IL6R75-G1m(서열 번호: 191)를 코딩하는 발현 백터를 당업자 공지 방법으로 조제한. 실시예 4-2와 마찬가지로 VHH와 VL의 계면부위에 아미노산 개변을 도입한 IL6R75hu-G1m(서열 번호: 192)을 작성했다. 프로테아제 절단 서열을 짜넣은 경쇄 VK1-39P+4-PkOMT(서열 번호: 72)와, 중쇄로서 IL6R90-G1m(서열 번호: 2), 20A11hu-G1m(서열 번호: 39), IL6R75hu-G1m(서열 번호: 192)을 이용한 IgG 항체-유사 분자 IL6R90-G1m/VK1-39P+4-PkOMT(중쇄 서열 번호: 2, 경쇄 서열 번호: 72), 20A11hu-G1m/VK1-39P+4-PkOMT(중쇄 서열 번호: 39, 경쇄 서열 번호: 72), IL6R75hu-G1m/VK1-39P+4-PkOMT(중쇄 서열 번호: 192, 경쇄 서열 번호: 72)의 발현·정제를 실시예 3과 마찬가지로 방법에 의해 행했다.
- [0997] IL6R90-G1m/VK1-39P+4-PkOMT, 20A11hu-G1m/VK1-39P+4-PkOMT, IL6R75hu-G1m/VK1-39P+4-PkOMT를 실시예 3과 마찬가지로 방법으로 프로테아제에 의해 절단하고, 절단의 정도를 평가한 결과를 도 28에 나타낸다. 구체적으로는, 프로테아제로서 리컴비넨트 인간 마트립타제/ST14 촉매 도메인(R&D Systems, 3946-SE-010)을 이용하여, 프로테아제 50nM, IgG 항체-유사 분자 50 µg/mL, PBS, 37°C의 조건하에서 20시간 반응시킨 후에, 프로테아제에 의한 절단을 환원 SDS-PAGE에 의해 평가했다. 그 결과, IL6R90-G1m/VK1-39P+4-PkOMT, 20A11hu-G1m/VK1-39P+4-PkOMT, IL6R75hu-G1m/VK1-39P+4-PkOMT에 있어서, VL과 CL의 경계 부근이 프로테아제에 의해 절단됨이 확인되었다.
- [0998] 다음에, 프로테아제 처리에 의해 노출된 VHH와 IL6R의 결합을 ELISA로 평가했다. 구체적으로는, 스트랩트아비딘 코트 384웰 플레이트(Greiner, 781990)에 실시예 3에서 사용한 hsIL-6R-BAP1을 고상하고, 절단한 IgG 항체-유사 분자를 실온에서 결합시켰다. 30분간의 반응 후, HRP 표지 항인간 IgG 항체(Sigma, SAB3701362-2MG)를 실온에서 10분간 작용시키고, TMB Chromogen Solution(life technologies, 002023)을 반응시켰다. 실온에서 30분 반응시킨 후, 황산으로 반응을 정지시키고, Synergy HTX 멀티 모드 리더(BioTek)로 450nm 흡광도를 측정했다. 항원을 고상한 웰로 하지 않았던 웰의 흡광도의 비를 산출하여, S/N비로 했다. ELISA의 S/N비(평균치)를 세로축, 각 IgG 항체-유사 분자의 농도를 가로축에, 결과를 도 29에 나타낸다. 이 결과로부터, 경쇄에 절단 서열을 도입한 IgG 항체-유사 분자 20A11hu-G1m/VK1-39P+4-PkOMT의 프로테아제 처리 다음에는, 프로테아제 미처리의 IgG 항체-유사 분자와 비교하여 IL6R로의 결합 활성이 10배 이상이 되고, IgG 항체-유사 분자 IL6R90-G1m/VK1-39P+4-PkOMT의 경우, 프로테아제 처리에 의해 IL6R로의 결합 활성이 1000배 이상이 되었음이 나타났다.
- [0999] 실시예 13 다양한 프로테아제 절단 서열이 도입된 IgG 항체-유사 분자의 제작과 평가
- [1000] 13-1 다양한 프로테아제 절단 서열이 도입된 폴리펩티드의 제작
- [1001] 유로키나제나 마트립타제 이외의 프로테아제의 인식 서열을 이용하여, 실시예 3과 마찬가지로 IgG 항체-유사 분자를 제작했다. IL6R90-G1m의 가변 영역과 정상 영역의 경계 부근에, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-13으로 절단됨이 알려져 있는 각종 펩티드 서열 및 그들 절단 서열의 근방에 글리신-세린 폴리머로 이루어지는 가동 링커를

포함하는 펩티드 서열을 삽입했다. 삽입한 서열은 표 4에 나타낸다.

표 4

각종 삽입 서열

프로테아제	삽입 서열	서열 번호
MMP-2 MMP-9	PLGLAG	34
MMP-2	GAGIPVSLRSGAG	70
MMP-2	GPLGIAGQ	71
MMP-2	GGPLGMLSQS	72
MMP-2	PLGLWA	73
MMP-7	VPLSLTMG	35
MMP-7	GAGVPLSLTMGAG	75
MMP-9	GAGVPLSLYSGAG	76
MMP-13	GAGPQGLAGQRGIVAG	91
MMP-2 MMP-9	GGGGSPLGLAGGGGS	193
MMP-2	GGGGSGLGIAGGGGGGS	194
MMP-9	GGGGSAGVPLSLYSGAGGGGGGS	195

[1002]

[1003]

이들 서열을 IL6R90-G1m의 가변 영역과 정상 영역의 경계 부근에 삽입한 중쇄를 설계했다. 중쇄 개변체인 6R90EIVHEMP2.1-6R90EICHEMP2.1G1m(서열 번호: 165), 6R90EIVHEMP2.2-6R90EICHEMP2.2G1m(서열 번호: 202), 6R90EIVHEMP2.3-6R90EICHEMP2.3G1m(서열 번호: 203), 6R90EIVHEMP2.4-6R90EICHEMP2.4G1m(서열 번호: 204), 6R90EIVHEMP7.1-6R90EICHEMP7.1G1m(서열 번호: 205), 6R90EIVHEMP7.2-6R90EICHEMP7.2G1m(서열 번호: 206), 6R90EIVHEMP13-6R90EICHEMP13G1m(서열 번호: 207), 6R90EIVHEG4SMP2MP9G4S-6R90EICHEG4SMP2MP9G4SG1m(서열 번호: 196), 6R90EIVHEG4SMP2.2G4S-6R90EIVHEG4SMP2.2G4SG1m(서열 번호: 197), 6R90EIVHEG4SMP9G4S-6R90EIVHEG4SMP9G4SG1m(서열 번호: 198)을 코딩하는 발현 벡터를 당업자 공지 방법으로 제작했다.

[1004]

이들 중쇄 개변체와 경쇄를 조합하여, 중쇄의 가변 영역과 정상 영역의 경계 부근에 프로테아제 절단 서열을 삽입한 IgG 항체-유사 분자를 표 5에 나타낸다. 이들 IgG 항체-유사 분자를 당업자 공지 방법으로 FreeStyle293 세포(Invitrogen) 혹은 Expi293 세포(Life technologies)를 이용한 일과성 발현에 의해 발현하고, 프로테인 A를 이용한 당업자 공지 방법에 의해 정제를 행했다.

표 5

IgG 항체-유사 분자

프로테아제	IgG 항체-유사 분자	중쇄 서열 번호	경쇄 서열 번호
MMP-2	6R90EIVHEMP2.1-6R90EICHEMP2.1G1m /VK1-39-kOMT	165	3
MMP-2	6R90EIVHEMP2.2-6R90EICHEMP2.2G1m /VK1-39-kOMT,	202	3
MMP-2	6R90EIVHEMP2.3-6R90EICHEMP2.3G1m /VK1-39-kOMT,	203	3
MMP-2	6R90EIVHEMP2.4-6R90EICHEMP2.4G1m /VK1-39-kOMT,	204	3
MMP-7	6R90EIVHEMP7.1-6R90EICHEMP7.1G1m /VK1-39-kOMT,	205	3
MMP-7	6R90EIVHEMP7.2-6R90EICHEMP7.2G1m /VK1-39-kOMT	206	3
MMP-13	6R90EIVHEMP13-6R90EICHEMP13G1m /VK1-39-kOMT	207	3
MMP-2 MMP-9	6R90EIVHEG4SMP2MP9G4S-6R90EICHEG4SMP2MP9G4SG1m /VK1-39-kOMT	196	3
MMP-2	6R90EIVHEG4SMP2.2G4S-6R90EICHEG4SMP2.2G4SG1m /VK1-39-kOMT	197	3
MMP-9	6R90EIVHEG4SMP9G4S-6R90EICHEG4SMP9G4SG1m /VK1-39-kOMT	198	3

[1005]

[1006]

13-2 다양한 프로테아제 절단 서열이 도입된 IgG 항체-유사 분자의 프로테아제에 의한 절단의 평가

[1007]

실시에 13-1에서 조제한 IgG 항체-유사 분자가 프로테아제에 의해 절단되는지 여부를 검증했다. 프로테아제로서 리컴비넌트 인간 MMP-2(R&D Systems, 902-MP-010), 리컴비넌트 인간 MMP-7(R&D Systems, 907-MP-010), 리컴비넌트 인간 MMP-9(R&D Systems, 911-MP-010), 리컴비넌트 인간 MMP-13(R&D Systems, 511-MM-010)을 이용했다. 한편, MMP-2, MMP-7, MMP-9와 MMP-13은 1 MMP-aminophenylmercuric acetate(APMA; abcam, ab112146)와 혼합하고 37°C에서 각각 1 또는 24시간 활성화시키고 나서 사용했다. 프로테아제 50nM, 100nM, 또는 500nM, IgG 항체-유사 분자 50 µg/mL 또는 100 µg/mL, PBS 또는 20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, pH 7.2(이하, Tris), 37°C의 조건하에서 20시간 반응시킨 후에, 프로테아제에 의한 절단을 환원 SDS-PAGE에 의해 평가한 결과를 도 30a와 도 30b에 나타낸다. 도 30b에서는 프로테아제에 의한 절단을 assay buffer(MMP Activity Assay Kit(Fluorometric - Green)(ab112146), Component C: Assay Buffer)에서 실시했다.

[1008]

그 결과, MMP-2에서는 6R90EIVHEMP2.1-6R90EICHEMP2.1G1m/VK1-39-kOMT, 6R90EIVHEMP2.2-6R90EICHEMP2.2G1m/VK1-39-kOMT, 6R90EIVHEMP2.3-6R90EICHEMP2.3G1m/VK1-39-kOMT, 6R90EIVHEMP2.4-6R90EICHEMP2.4G1m/VK1-39-kOMT, 6R90EIVHEG4SMP2MP9G4S-6R90EICHEG4SMP2MP9G4SG1m/VK1-39-kOMT, 6R90EIVHEG4SMP2.2G4S-6R90EICHEG4SMP2.2G4SG1m/VK1-39-kOMT가, MMP-7에서는 6R90EIVHEMP7.1-6R90EICHEMP7.1G1m/VK1-39-kOMT, 6R90EIVHEMP7.2-6R90EICHEMP7.2G1m/VK1-39-kOMT, MMP-9에서는 6R90EIVHEG4SMP2MP9G4S-6R90EICHEG4SMP2MP9G4SG1m/VK1-39-kOMT, 6R90EIVHEG4SMP9G4S-6R90EICHEG4SMP9G4SG1m/VK1-39-kOMT, MMP-13에서는 6R90EIVHEMP13-6R90EICHEMP13G1m/VK1-39-kOMT가 절단됨이 확인되었다.

[1009]

참고 실시예 1 비오틴화 플렉신 A1의 조제

[1010]

비오틴화 플렉신 A1(비오틴 표지된 인간 PlexinA1이라고도 부른다)은 당업자 공지 방법으로 조제했다. 구체적으로는, 플렉신 A1의 세포의 영역을 코딩하는 유전자 단편의 하류에 비오틴 리가제에 의해 비오틴이 추가되는 특이적인 서열(AviTag 서열, 서열 번호: 36)을 코딩하는 유전자 단편과 FLAG 태그 서열(서열 번호: 199,

DYKDDDDK)을 코딩하는 유전자 단편을 글리신과 세린으로 구성되는 링커를 코딩하는 유전자 단편을 개재시켜 연결했다. 플렉신 A1과 AviTag 서열 및 FLAG 태그 서열이 연결된 단백질(서열 번호: 200)을 코딩하는 유전자 단편을 동물 세포 발현용 벡터에 짜넣고, 구축된 핵외 유전자 벡터 293 팩틴(Invitrogen)을 이용하여 FreeStyle293 세포(Invitrogen)에 도입했다. 이 때 EBNA1(서열 번호: 57)을 발현하는 유전자 및 비오틴 리가제(BirA, 서열 번호: 201)를 발현하는 유전자를 동시에 도입하고, 추가로 플렉신 A1을 비오틴 표지할 목적으로 비오틴을 첨가했다. 전술한 순서에 따라 유전자가 도입된 세포를 37°C, 8% CO₂로 배양하여, 목적하는 단백질(비오틴화 플렉신 A1)을 배양 상청 중에 분비시켰다. 이 세포 배양액을 0.22 μm 보틀 탑 필터로 여과하여, 배양 상청을 얻었다.

[1011] Anti FLAG M2 agarose(Sigma-Aldrich, #A2220)를 컬럼에 채워, FLAG 컬럼을 제작했다. FLAG 컬럼을 미리 D-PBS(-)로 평형화하고, 배양 상청을 어플라이하고, 비오틴화 플렉신 A1을 컬럼에 결합시켰다. 계속하여, D-PBS(-)에 용해한 FLAG 펩티드로 비오틴화 플렉신 A1을 용출했다. 이 용출액을, HiLoad 26/600 Superdex 200 pg, 320mL(GE healthcare, 28-9893-36)를 이용한 겔 여과 크로마토그래피에 의해, 회합체를 제거하여, 정제 비오틴화 플렉신 A1을 얻었다.

[1012] 전술한 발명은, 명확한 이해를 도울 목적 아래, 실례 및 예시를 이용하여 상세하게 기재했지만, 본 명세서에 있어서의 기재 및 예시는, 본 발명의 범위를 한정하는 것이라고 해석되어서는 안 된다. 본 명세서에서 인용한 모든 특허문헌 및 과학 문헌의 개시는, 그 전체에 걸쳐서, 참조에 의해 명시적으로 본 명세서에 인용된다.

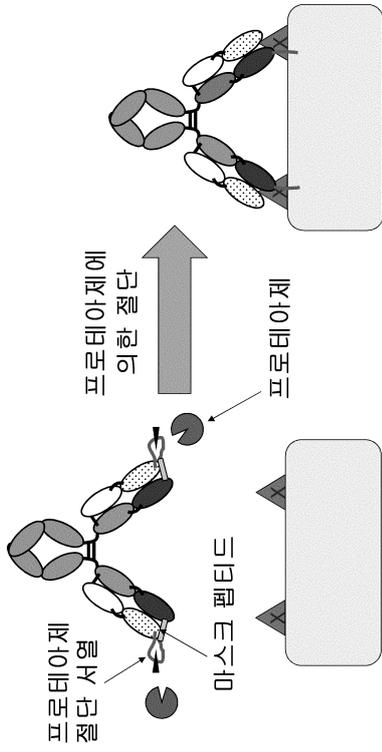
산업상 이용가능성

[1013] 본 발명의 항원 결합 도메인과 항원 결합 도메인보다 긴 혈중반감기를 갖고 또한 항원 결합 도메인의 결합 활성을 억제하는 억제 도메인을 갖는 운반 부분을 포함하는 폴리펩티드, 및 이것을 포함하는 의약 조성물은, 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 억제한 채로, 항원 결합 도메인을 혈중에서 운반할 수 있다. 또한, 본 발명의 폴리펩티드를 사용함으로써, 항원 결합 도메인의 항원 결합 활성을 질환 부위에서 특이적으로 발휘시킬 수 있다. 더욱이, 항원 결합 활성을 발휘 시에는, 운반 시보다 짧은 반감기를 가지므로, 전신적으로 작용해 버릴 우려가 감소하여, 질환의 치료에 극히 유용하다.

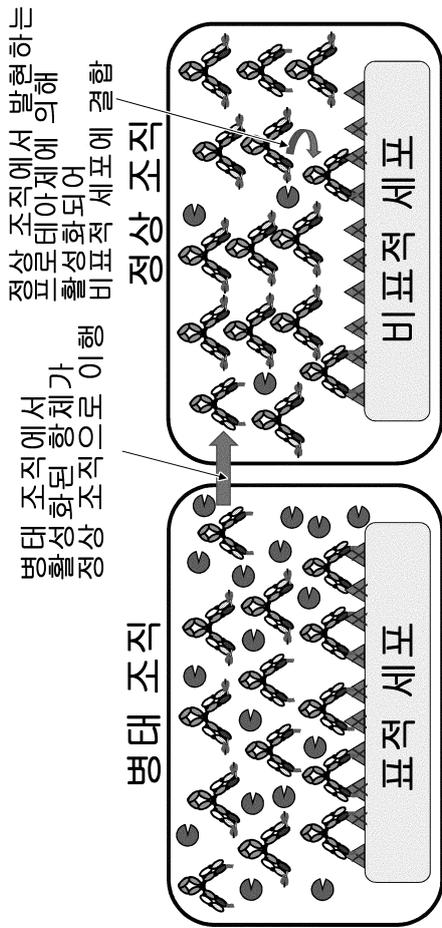
[1014] 또한, 항원 결합 도메인의 일레인 특정한 VL 혹은 VH 혹은 VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단도메인 항체를 스크리닝 또는 제조함으로써, 본 발명의 폴리펩티드를 효율적으로 제조하는 것이 가능하다. 더욱이, 본 발명의 폴리펩티드에 사용할 수 있는 항원 결합 도메인의 일레인 특정한 VL 혹은 VH 혹은 VHH와 회합함으로써 항원 결합 활성이 억제되는 단도메인 항체를 포함하는 라이브러리를 이용하면, 전술한 폴리펩티드를 제작할 경우에 필요로 하는 항원 결합 도메인을, 효율적으로 취득하는 것이 가능하다.

도면

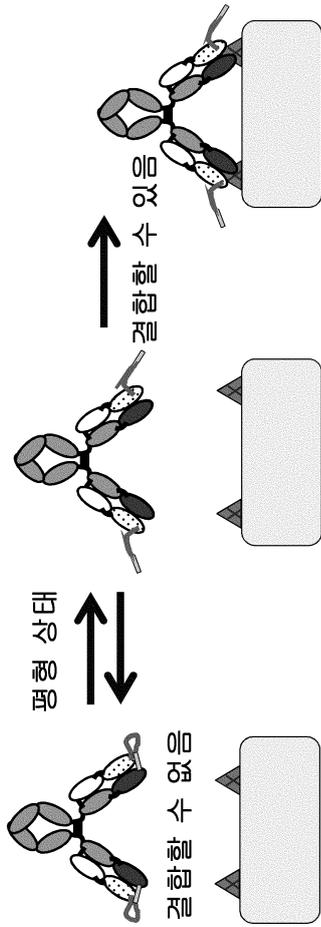
도면1



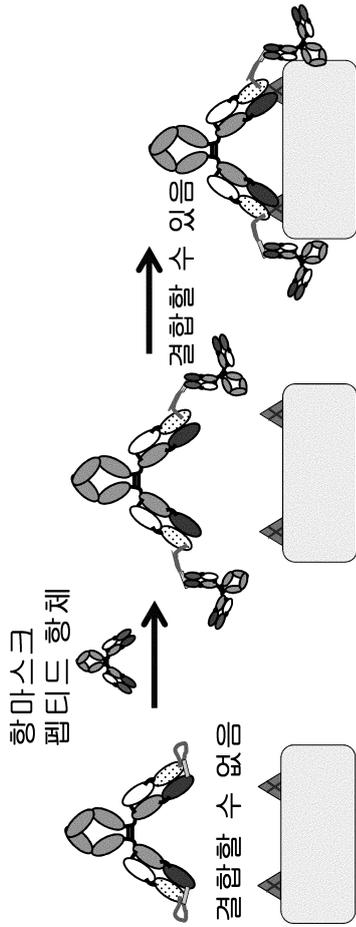
도면2



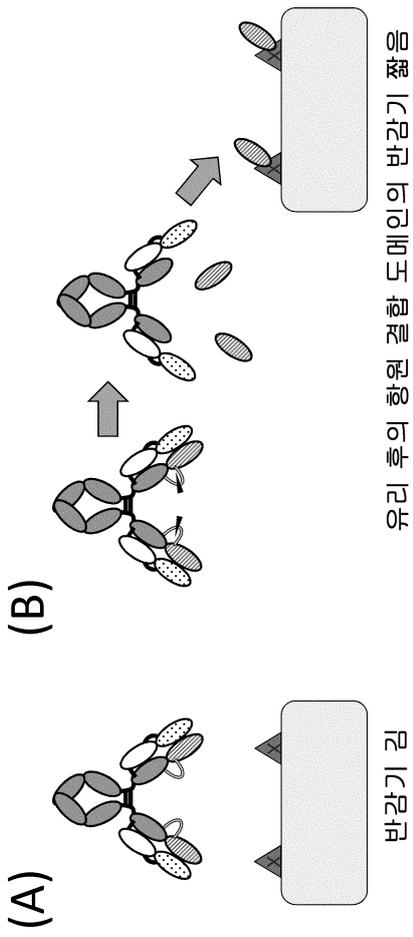
도면3



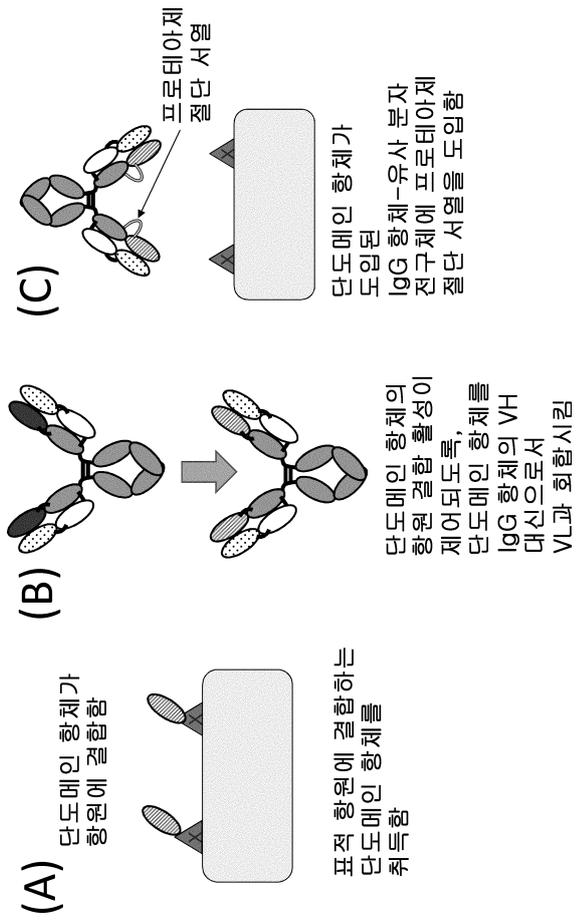
도면4



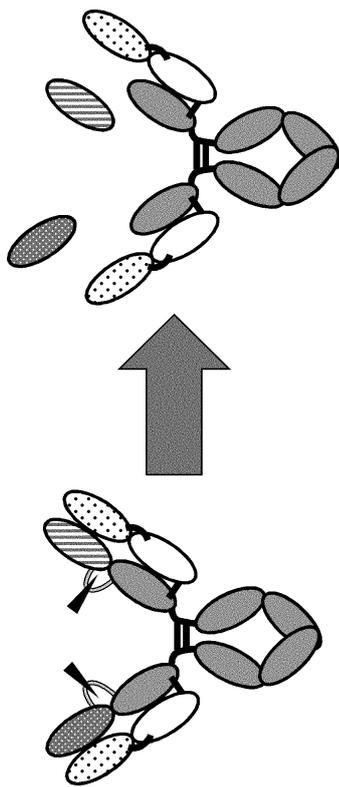
도면5



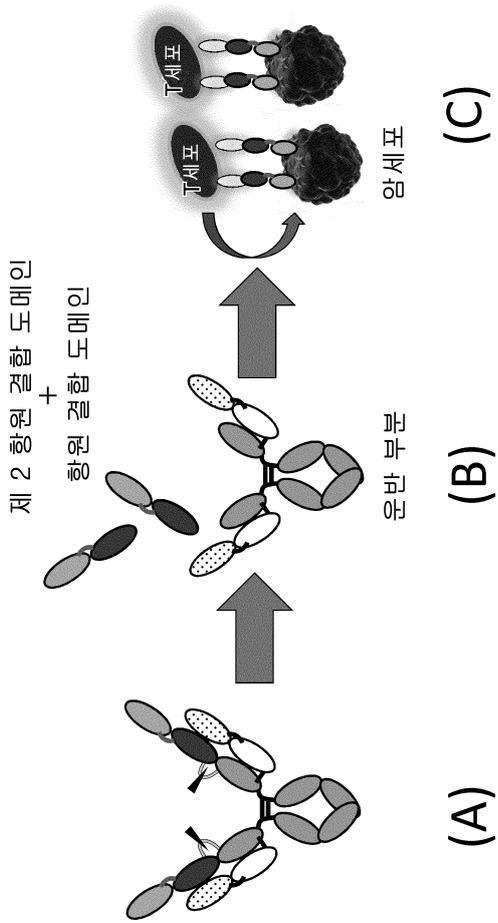
도면6



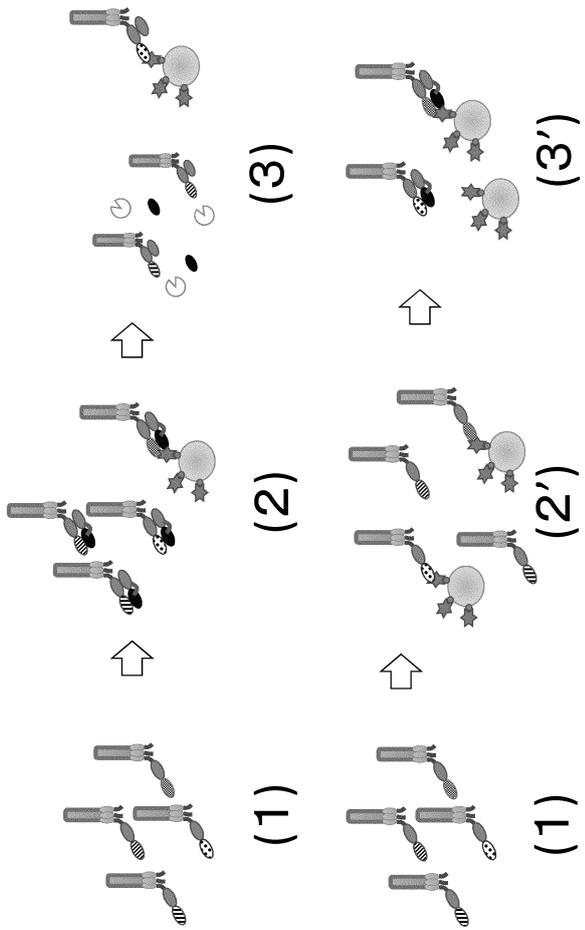
도면7



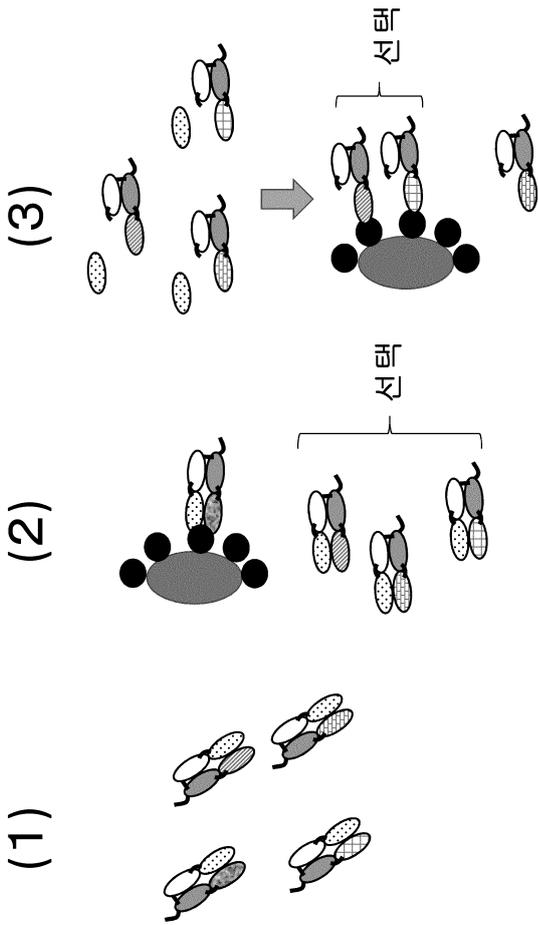
도면8



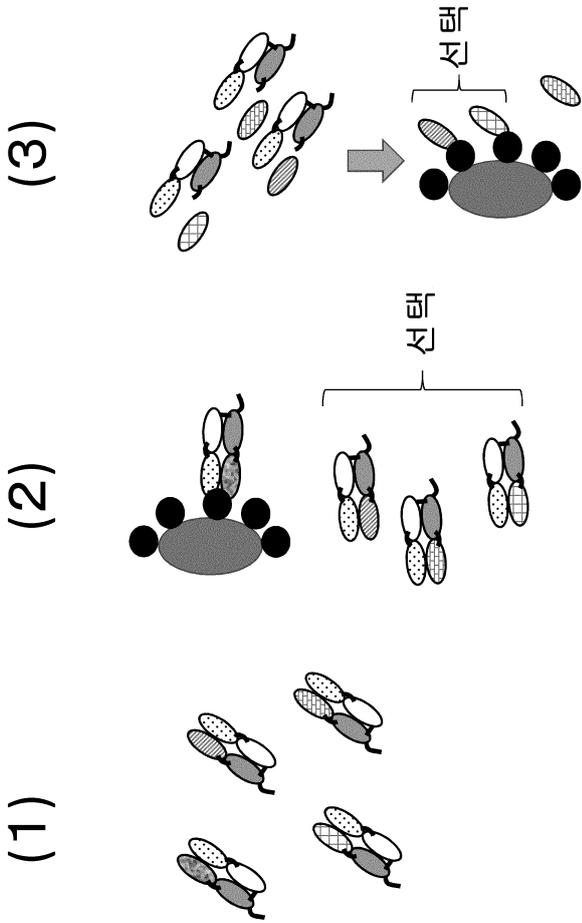
도면9a



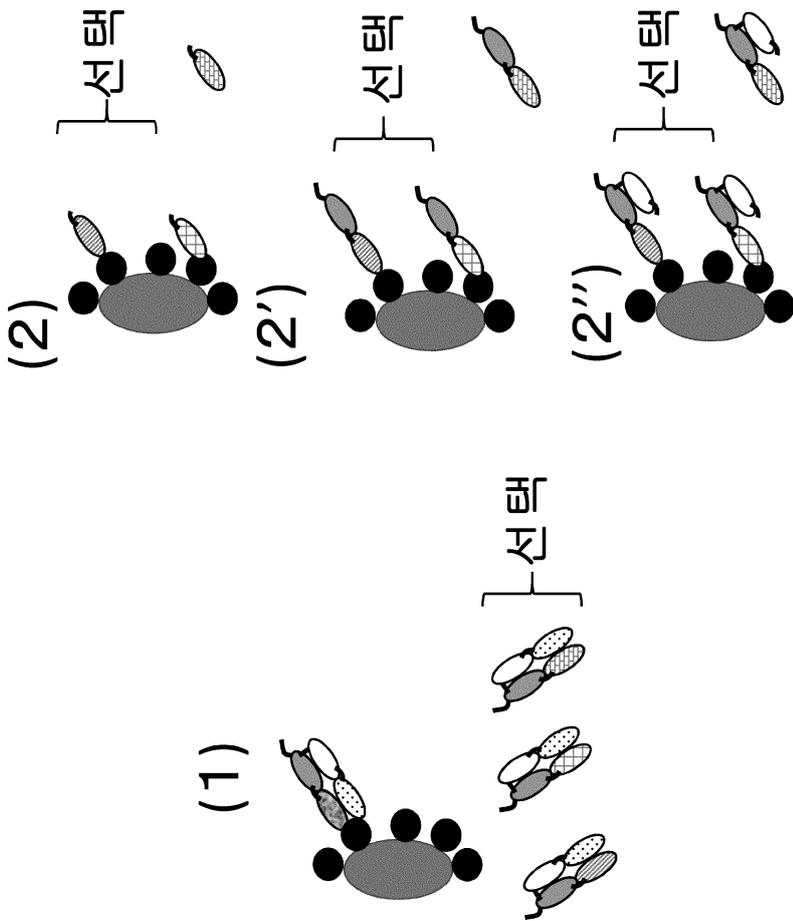
도면9b



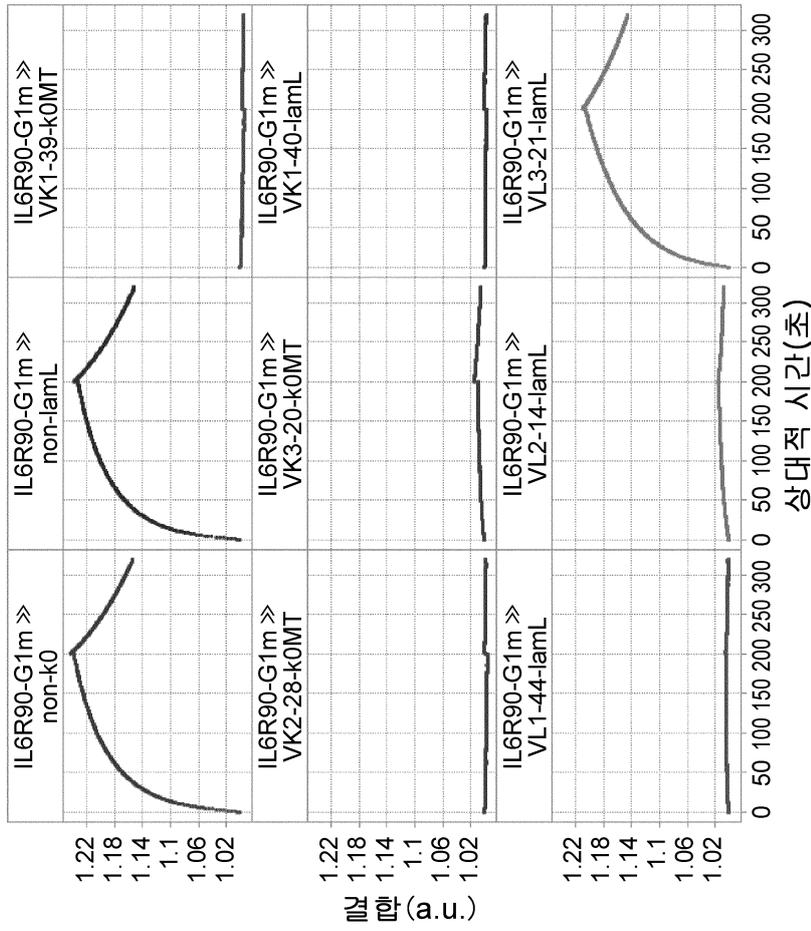
도면9c



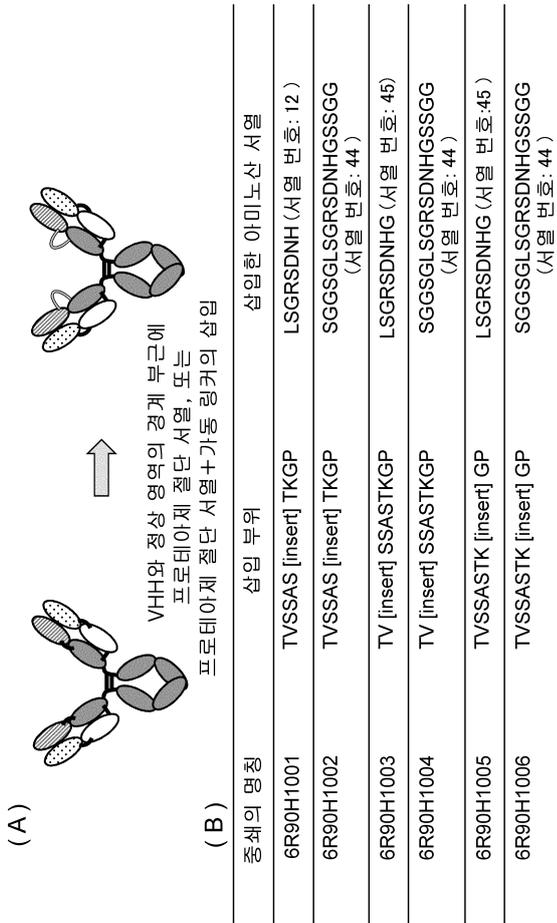
도면9d



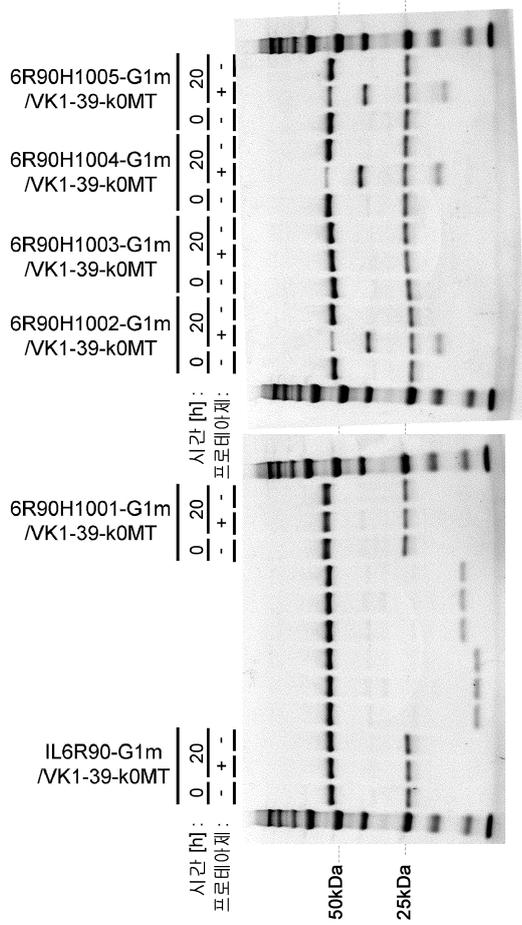
도면10



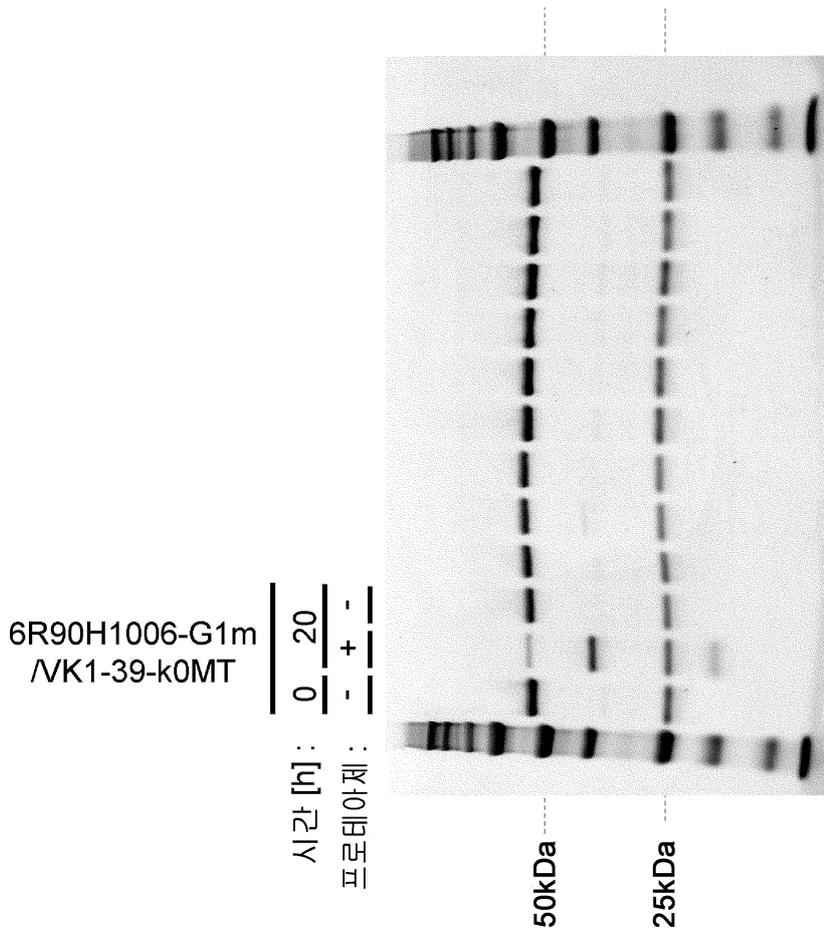
도면11



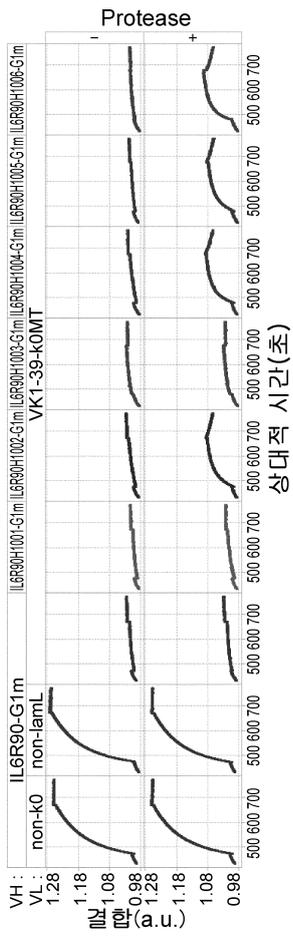
도면12a



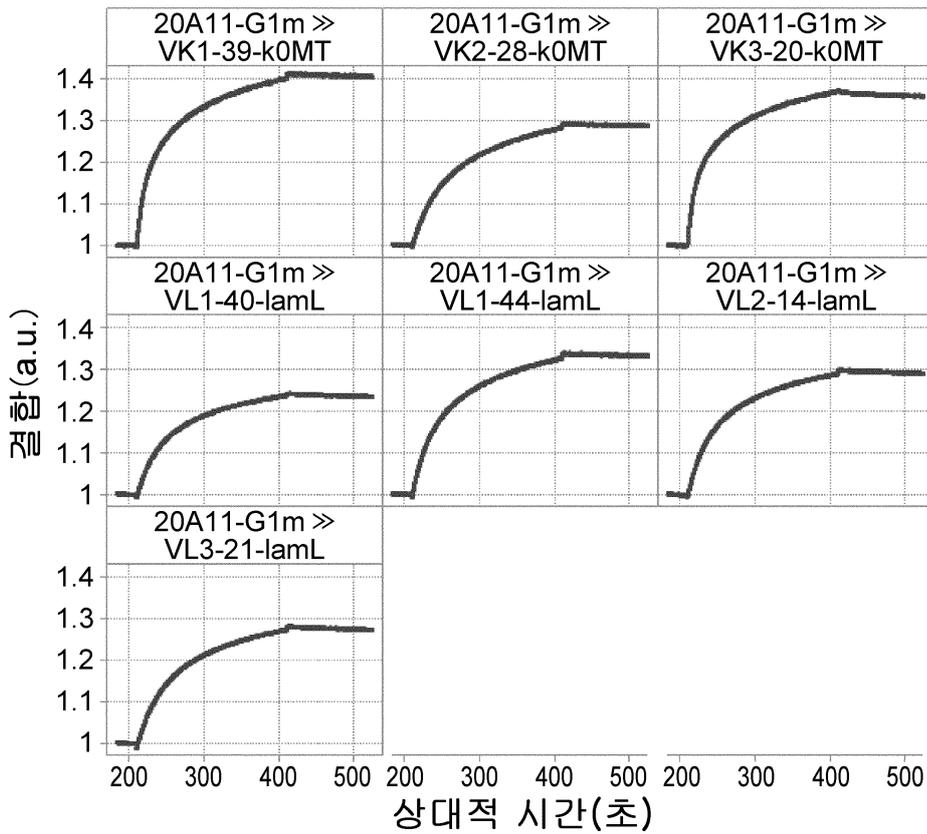
도면12b



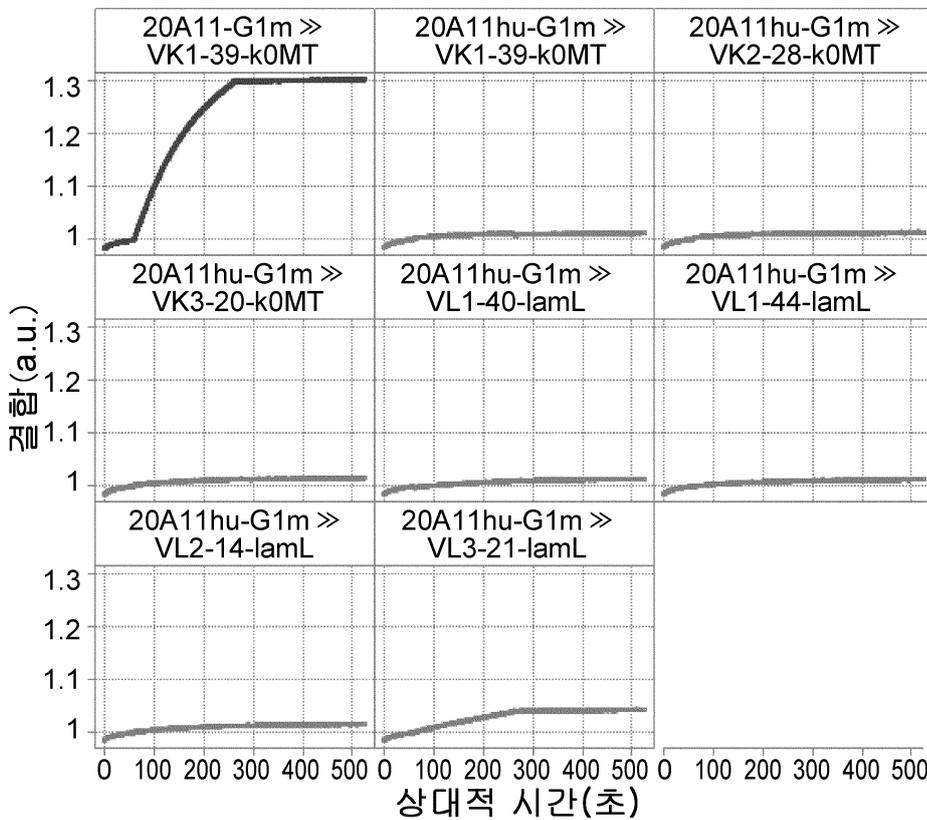
도면13



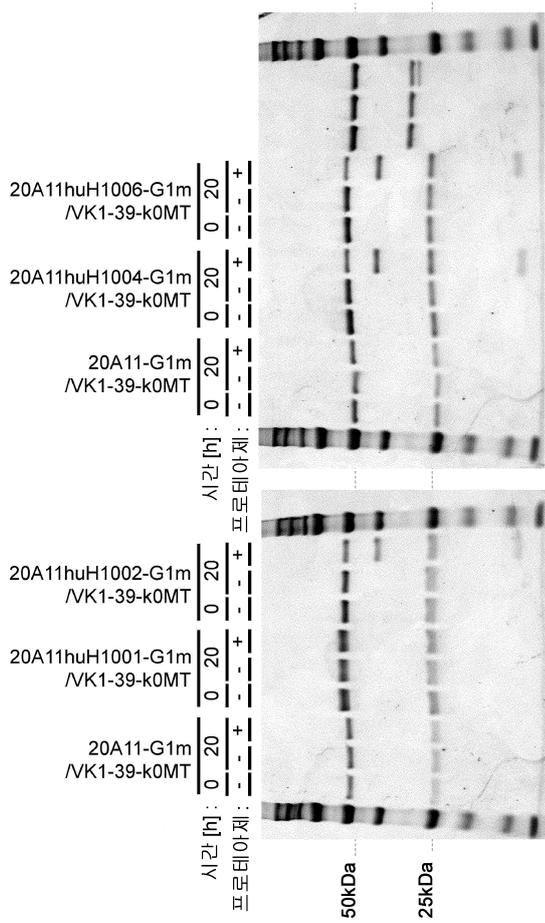
도면14



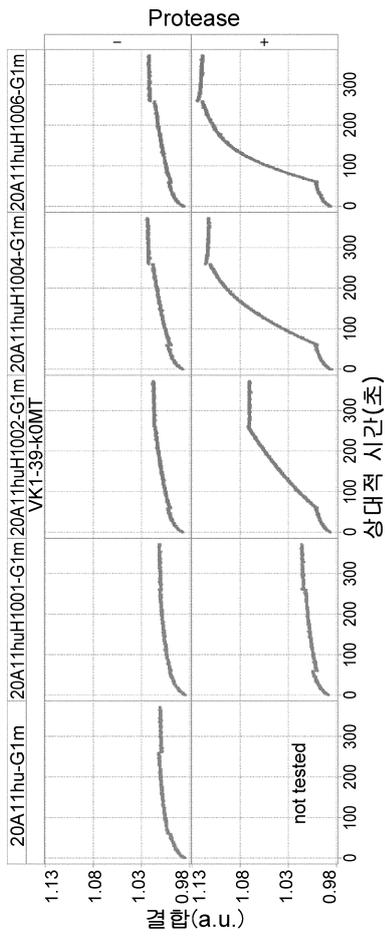
도면15



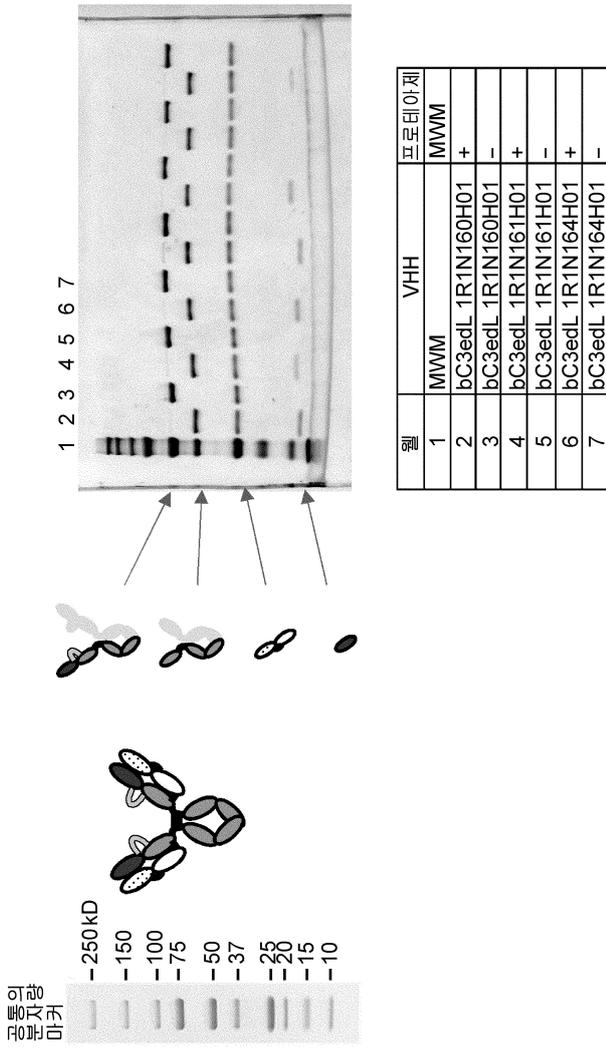
도면16



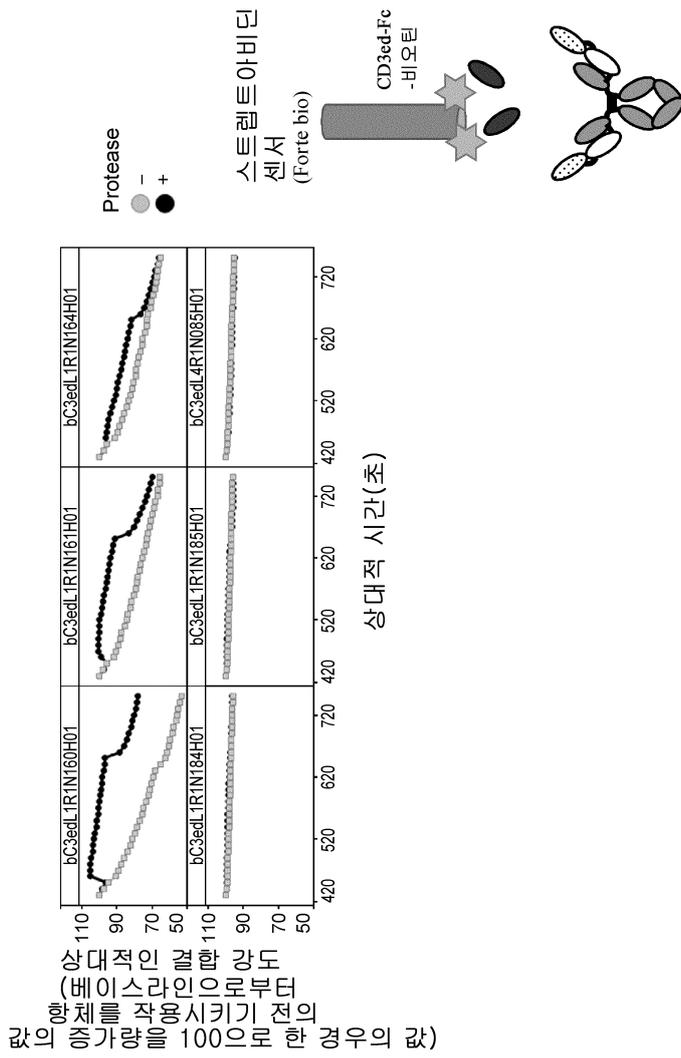
도면17



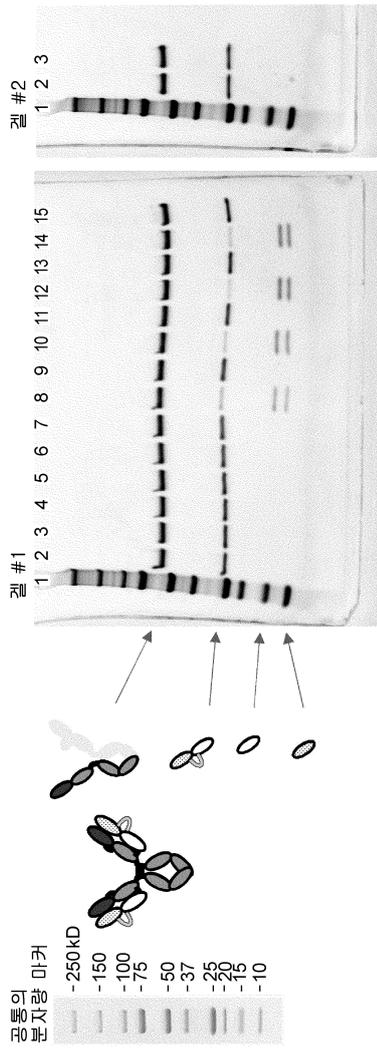
도면18



도면19

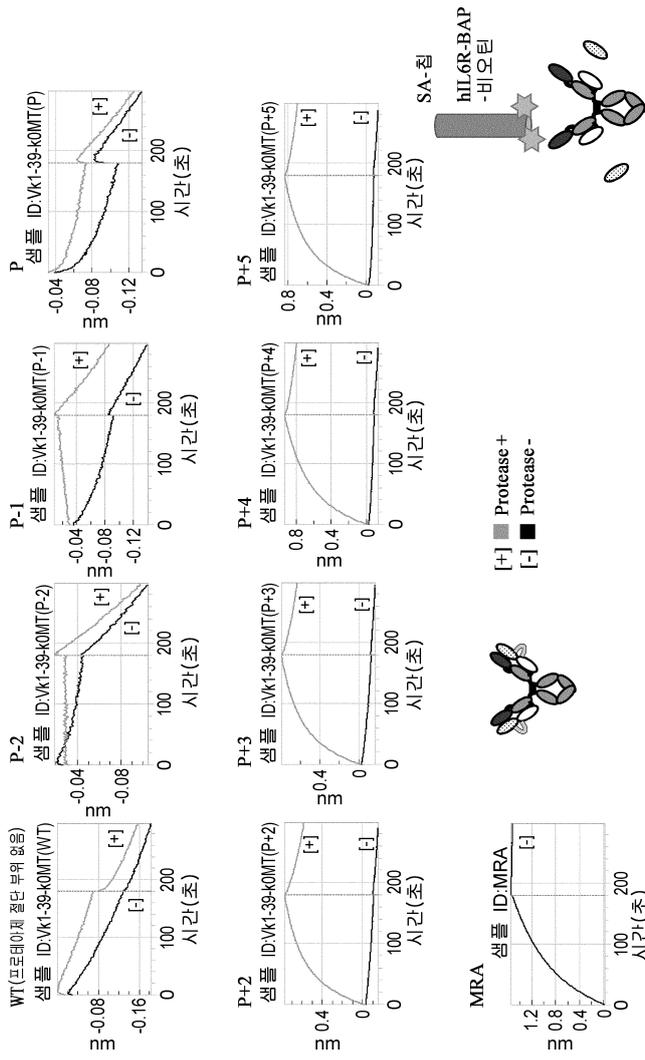


도면20

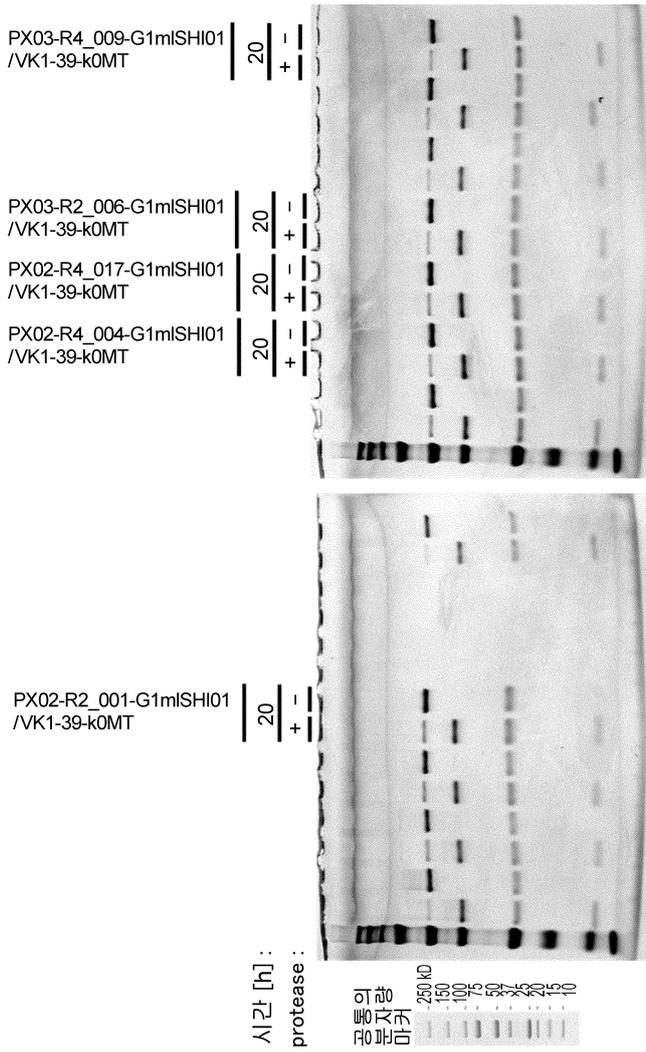


밴드	번호	MWM	변형체	프로테아제 처리	프로테아제 처리 후 MMT-SP1에 대한 반응성
1	1	MWM			
	2	-	VP_IL6R90-G1m/VK1-39P-2-PK0MT	VE ⁺ IKRTVAAPS	-
	3	-	VP_IL6R90-G1m/VK1-39P-1-PK0MT	VEI ⁺ KRTVAAPS	-
	4	-	VP_IL6R90-G1m/VK1-39P-1-PK0MT	VEIK ⁺ RTVAAPS	-
	5	-	VP_IL6R90-G1m/VK1-39P-1-PK0MT	VEIKRT ⁺ VAAAPS	+
	6	-	VP_IL6R90-G1m/VK1-39P-1-PK0MT	VEIKRTV ⁺ AAPS	+
	7	-	VP_IL6R90-G1m/VK1-39P-1-PK0MT	VEIKRTVA ⁺ APS	+
	8	-	VP_IL6R90-G1m/VK1-39P-2-PK0MT	VEIKRTVAA ⁺ PS	+
	9	-	VP_IL6R90-G1m/VK1-39P-2-PK0MT	VEIKRTVAAPS	+
	10	-	VP_IL6R90-G1m/VK1-39P+3-PK0MT	VEIKRTVAAPS	+
	11	-	VP_IL6R90-G1m/VK1-39P+3-PK0MT	VEIKRTVAAPS	+
	12	-	VP_IL6R90-G1m/VK1-39P+4-PK0MT	VEIKRTVAAPS	+
	13	-	VP_IL6R90-G1m/VK1-39P+4-PK0MT	VEIKRTVAAPS	+
	14	-	VP_IL6R90-G1m/VK1-39P+5-PK0MT	VEIKRTVAAPS	+
	15	-	VP_IL6R90-G1m/VK1-39P+5-PK0MT	VEIKRTVAAPS	+
2	2	-	VP_IL6R90-G1m/VK1-39P-K0MT	VEIKRTVAAPS	-
	3	-	VP_IL6R90-G1m/VK1-39P-K0MT	VEIKRTVAAPS	-
	3	-	VP_IL6R90-G1m/VK1-39P-K0MT	VEIKRTVAAPS	-

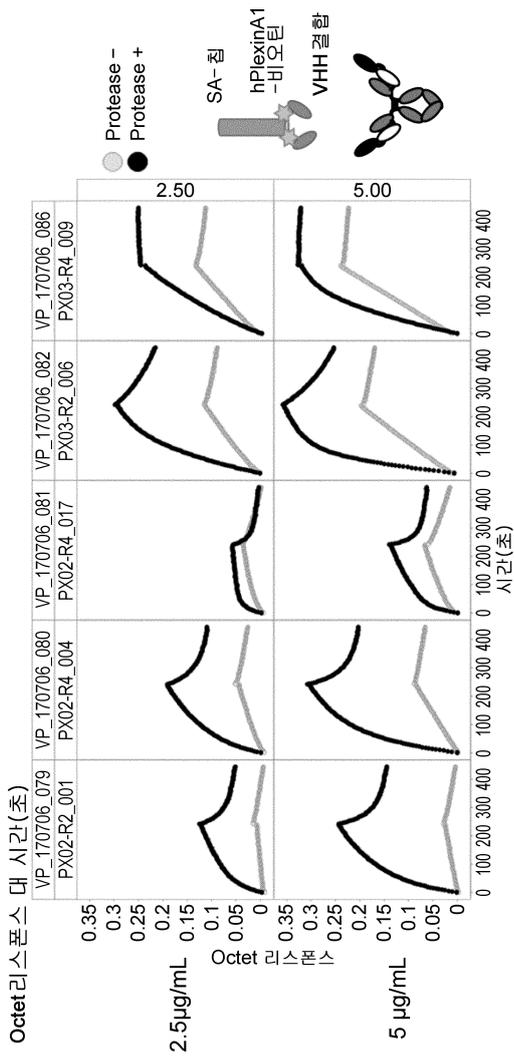
도면21



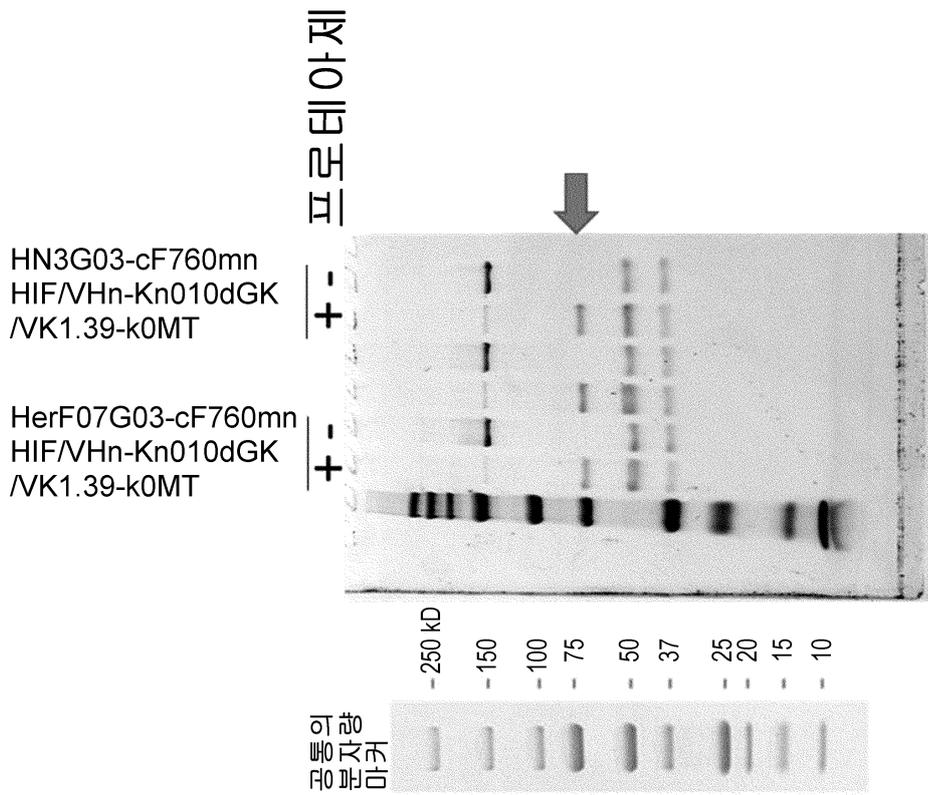
도면22



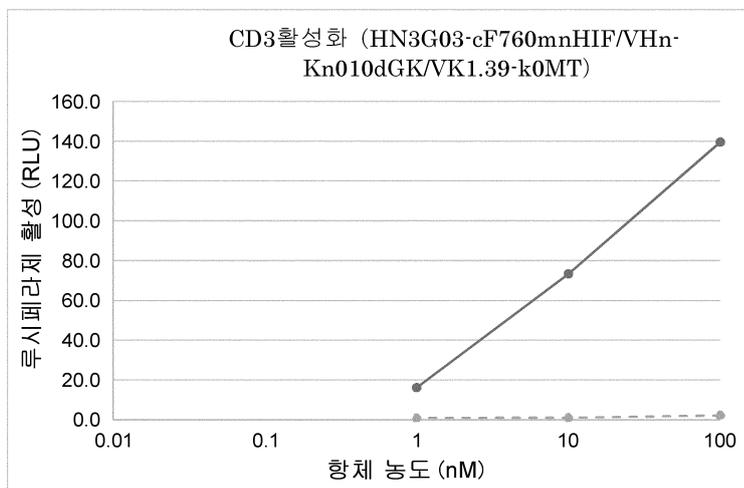
도면23



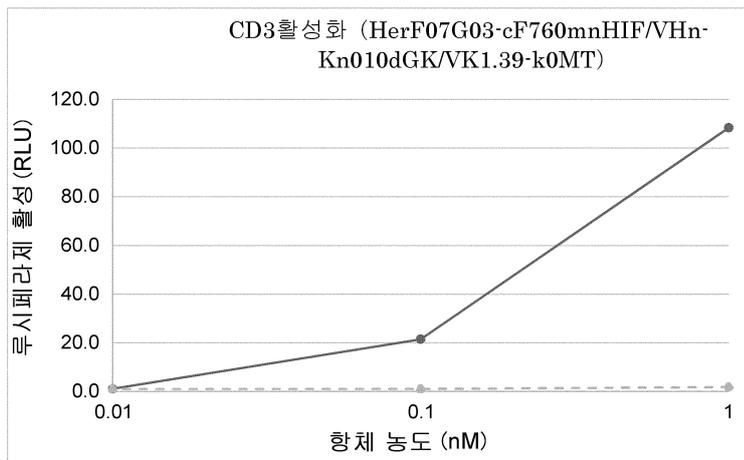
도면24



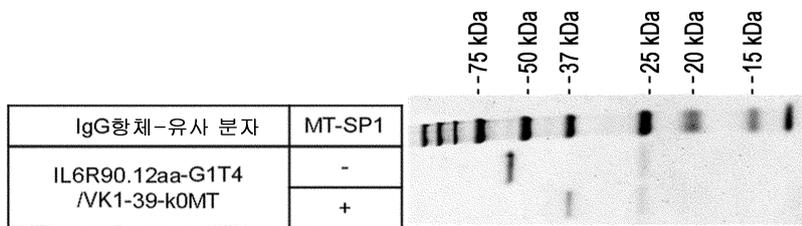
도면25



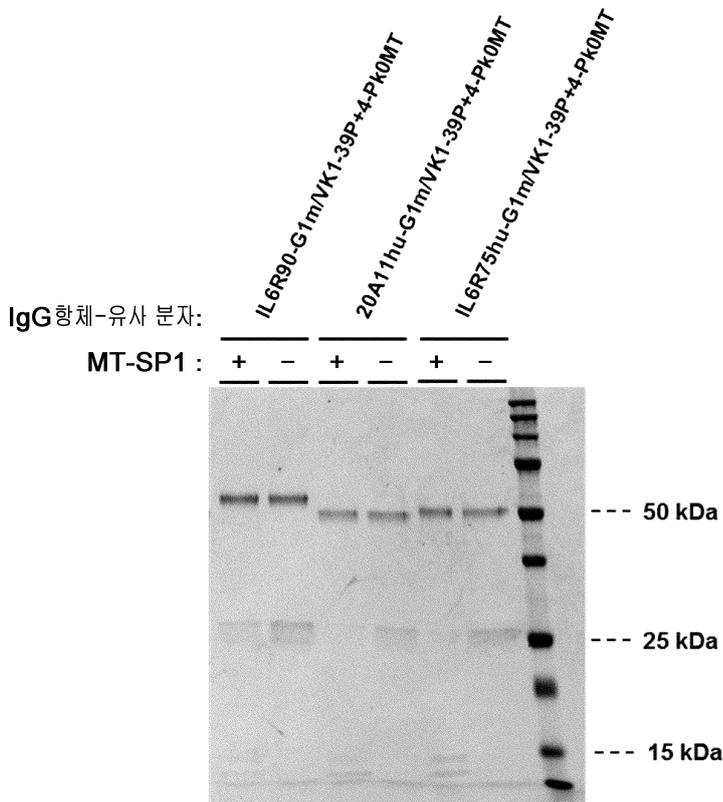
도면26



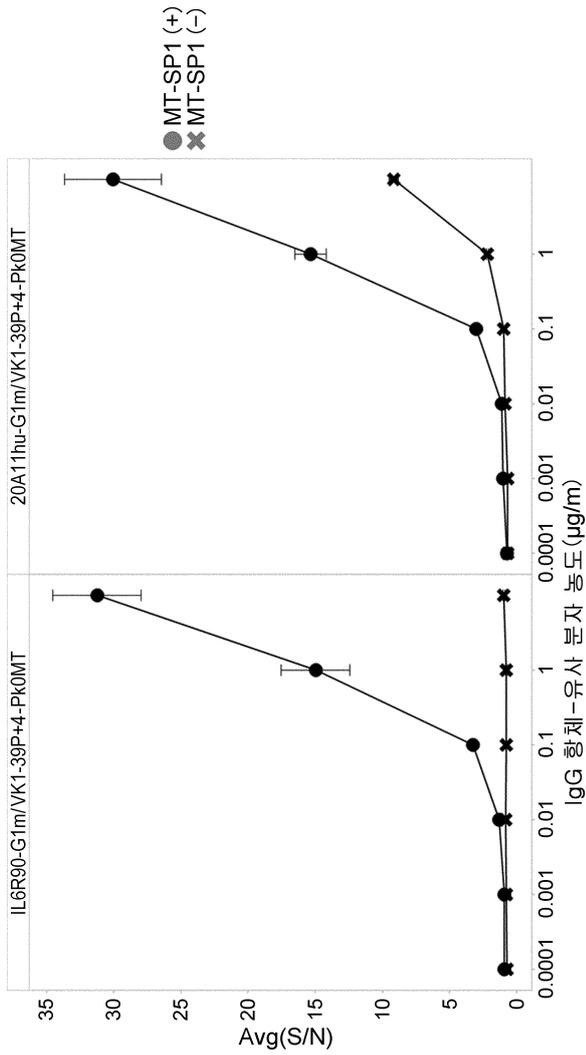
도면27



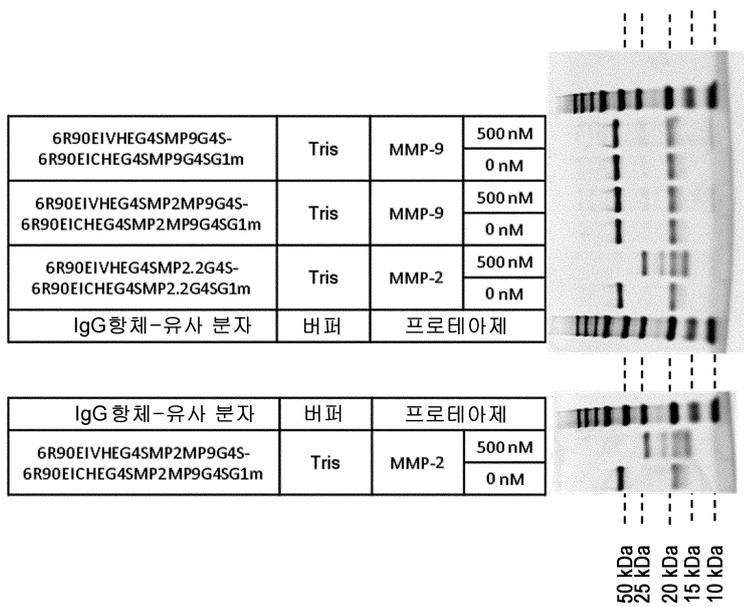
도면28



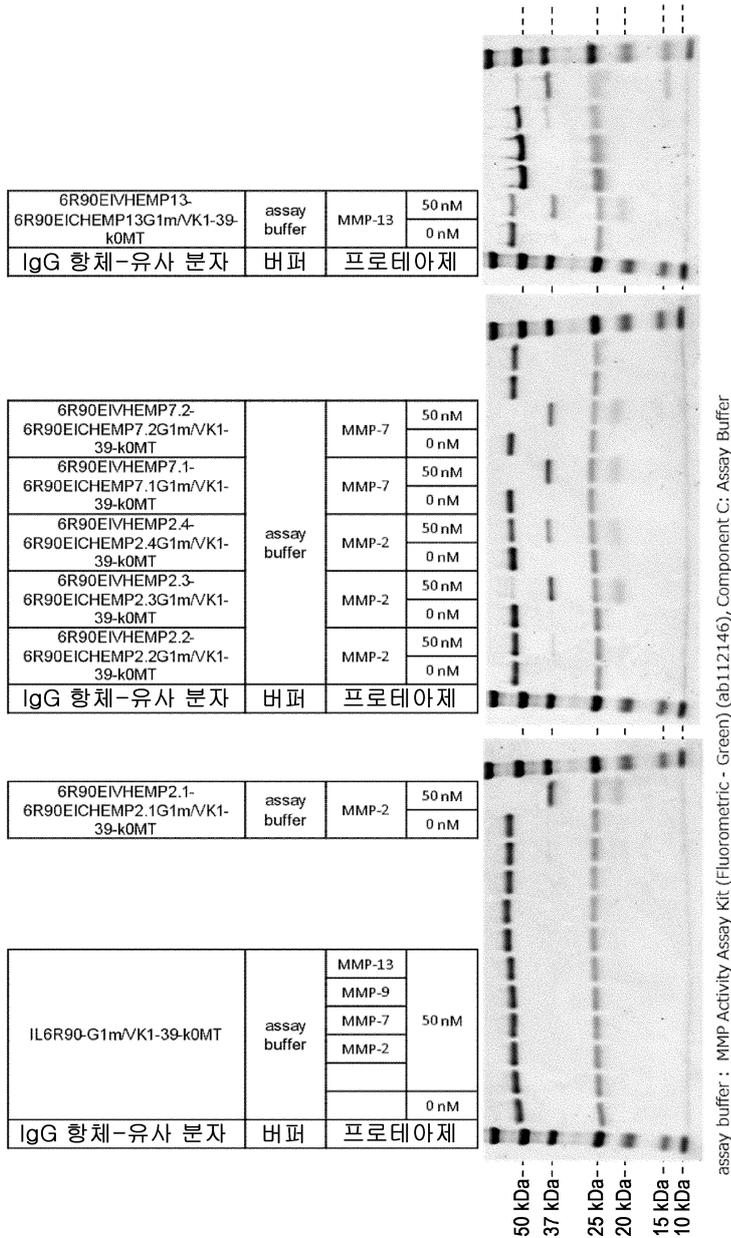
도면29



도면30a



도면30b



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
- <120> Polypeptide comprising antigen-binding domain and carrying part
- <130> C1-A1614P
- <150> JP 2016-229794
- <151> 2016-11-28
- <160> 207
- <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Trp Asn Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Thr Glu Ser Met
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Val Lys Gly Ser Thr Ala Ile Val Gly Val Pro Pro Thr Tyr Pro Asp
 100 105 110

Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 2

<211> 455

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400>

2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Trp Asn Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Thr Glu Ser Met
 50 55 60

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

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

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

 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 260 265 270
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

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

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

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

 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 4
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized sequence
 <400> 4

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

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

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

 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 5
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Pro

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 6

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 6

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
 20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 7

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Gly Gly Val

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 8

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Met Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

145 150 155 160
 Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser
 165 170 175
 Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr

 180 185 190
 Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala
 195 200 205
 Pro Thr Glu Cys Ser
 210
 <210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

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

 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105
 <210> 11
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

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

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 12

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His
 1 5

<210> 13

<211> 463

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 13

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

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

275 280 285

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

<210> 14

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 14

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

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

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

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

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

 245 250 255

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

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

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

 435 440 445
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 450 455 460
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 465 470
 <210> 15
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Trp Asn Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Thr Glu Ser Met
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Val Lys Gly Ser Thr Ala Ile Val Gly Val Pro Pro Thr Tyr Pro Asp
 100 105 110

Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Leu Ser Gly
 115 120 125

Arg Ser Asp Asn His Gly Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 130 135 140

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 195 200 205

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 210 215 220

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

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

 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 275 280 285
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335

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

 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 420 425 430
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460

<210> 16

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 16

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

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

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

 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 180 185 190
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 195 200 205
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 210 215 220

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 225 230 235 240

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 245 250 255

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 260 265 270

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 275 280 285

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 290 295 300

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 305 310 315 320

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 325 330 335

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 340 345 350

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 355 360 365

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 370 375 380

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 385 390 395 400

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 405 410 415

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 420 425 430

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 435 440 445

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 450 455 460

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

465 470

<210> 17

<211> 464

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 17

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

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Val

35 40 45
Ser Ala Ile Ser Trp Asn Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Thr Glu Ser Met

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

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Val Lys Gly Ser Thr Ala Ile Val Gly Val Pro Pro Thr Tyr Pro Asp

100 105 110
Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

115 120 125
Ser Thr Lys Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Gly Pro Ser Val

130 135 140
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

145 150 155 160
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

165 170 175
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

180 185 190

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

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

420 425 430
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

435 440 445
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
450 455 460

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
465 470

<210> 19

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 19

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Val Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Gly Ile Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Phe Ile Thr Thr Glu Ser Asp Tyr Asp Leu Gly Arg Arg Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 20

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Val Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Phe Ile Thr Thr Glu Ser Asp Tyr Asp Leu Gly Arg Arg Tyr Trp Gly

 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

 115 120

<210> 21

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 22
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325
 <210> 23
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 325 330 335
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
 340 345 350
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
 355 360 365
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375
 <210> 24
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

260 265 270

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

275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser

290 295 300

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

305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400

> 25

Pro Leu Gly Leu Ala Gly

1 5
<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> an artificially synthesized sequence
<400> 26
Val Pro Leu Ser Leu Thr Met Gly

1 5
<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> an artificially synthesized sequence
<400> 27
Gly Ser Gly Gly Ser

1 5
<210> 28
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 28
Gly Gly Gly Ser

1
<210> 29
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> an artificially synthesized sequence
<400> 29
Gly Gly Ser Gly

1
<210> 30

<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> an artificially synthesized sequence
<400> 30

Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 31
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> an artificially synthesized sequence
<400> 31

Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> an artificially synthesized sequence
<400> 32

Gly Ser Gly Gly Gly
1 5

<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> an artificially synthesized sequence
<400> 33

Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 34
<211> 5
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 34

Gly Ser Ser Ser Gly

1 5

<210> 35

<211> 338

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys Pro Ala Ala

35 40 45

Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg Leu Leu Leu

50 55 60

Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys Tyr Arg Ala

65 70 75 80

Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val Pro Pro Glu

85 90 95

Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser Asn Val Val

100 105 110

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

115 120 125

Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp Phe Gln Glu

130 135 140

Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys Gln Leu Ala

145 150 155 160

Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met Cys Val Ala

165 170 175

Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe Gln Gly Cys

180 185 190

Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val Thr Ala Val

195 200 205

Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp Pro His Ser

210 215 220

Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg Tyr Arg Ala

225 230 235 240

Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp Leu Gln His

245 250 255

His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His Val Val Gln

260 265 270

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

275 280 285

Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser Pro Pro Ala

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

Val Gln

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 36

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu

1 5 10 15

<210> 37

<211> 358

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 37

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys Pro Ala Ala

 35 40 45

Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg Leu Leu Leu

 50 55 60

Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys Tyr Arg Ala

65 70 75 80

Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val Pro Pro Glu

 85 90 95

Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser Asn Val Val

 100 105 110

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

 115 120 125

Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp Phe Gln Glu

 130 135 140

Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys Gln Leu Ala

145 150 155 160

Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met Cys Val Ala

 165 170 175

Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe Gln Gly Cys

 180 185 190

Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val Thr Ala Val

 195 200 205

Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp Pro His Ser
 210 215 220

Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg Tyr Arg Ala
 225 230 235 240

Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp Leu Gln His
 245 250 255

His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His Val Val Gln
 260 265 270

Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser Glu Trp Ser
 275 280 285

Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser Pro Pro Ala
 290 295 300

Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Gln Ala Leu Thr Thr Asn Lys Asp
 305 310 315 320

Asp Asp Asn Ile Leu Phe Arg Asp Ser Ala Asn Ala Thr Ser Leu Pro
 325 330 335

Val Gln Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln
 340 345 350

Lys Ile Glu Trp His Glu
 355

<210> 38

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

Val Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Gly Ile Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Phe Ile Thr Thr Glu Ser Asp Tyr Asp Leu Gly Arg Arg Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

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

340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

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

405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435 440 445
 Pro

<210> 39

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 39

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

Val Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gly Ile Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Phe Ile Thr Thr Glu Ser Asp Tyr Asp Leu Gly Arg Arg Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

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

260 265 270
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn

275 280 285
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg

290 295 300
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys

340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu

355 360 365
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

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

420 425 430
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455

<210> 41

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 41

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

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

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

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

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 42

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Phe Ile Thr Thr Glu Ser Asp Tyr Asp Leu Gly Arg Arg Tyr Trp Gly

 100 105 110

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

 115 120 125

Ser Asp Asn His Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

 180 185 190

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

 195 200 205

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

Leu Ser Pro

465

<210> 43

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 43

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Phe Ile Thr Thr Glu Ser Asp Tyr Asp Leu Gly Arg Arg Tyr Trp Gly

 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Ser Gly Gly

 115 120 125

Ser Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Ser Ser Gly Gly Gly

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460

Leu Ser Pro
 465

<210> 44

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 44

Ser Gly Gly Ser Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Ser Ser
 1 5 10 15

Gly Gly

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> an artificially synthesized sequence

<400> 45

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly

1 5

<210> 46

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 46

Gly Ser Gly Gly

1

<210> 47

<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> an artificially synthesized sequence
<400> 47

Ser Gly Gly Gly

1

<210> 48

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 48

Gly Ser Ser Gly

1

<210> 49

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 49

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 50

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 50

Gly Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 51

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 51

Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 52

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 52

Gly Ser Ser Gly Gly

1 5

<210> 53

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 53

Ser Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 54

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 54

Ser Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 55

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 56

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 57

<211> 641

<212> PRT

<213> Human herpesvirus 4

<400> 57

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

1 5 10 15

Lys Gly Asp Thr Ser Gly Pro Glu Gly Ser Gly Gly Ser Gly Pro Gln

20 25 30

Arg Arg Gly Gly Asp Asn His Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly

35 40 45

Arg Gly Gly Gly Arg Pro Gly Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ser Gly Pro

50 55 60

Arg His Arg Asp Gly Val Arg Arg Pro Gln Lys Arg Pro Ser Cys Ile

65 70 75 80

Gly Cys Lys Gly Thr His Gly Gly Thr Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly

85 90 95

Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly

100 105 110

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly

Ala Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Glu Lys Arg Pro Arg Ser Pro
 370 375 380
 Ser Ser Gln Ser Ser Ser Ser Gly Ser Pro Pro Arg Arg Pro Pro Pro
 385 390 395 400
 Gly Arg Arg Pro Phe Phe His Pro Val Gly Glu Ala Asp Tyr Phe Glu
 405 410 415
 Tyr His Gln Glu Gly Gly Pro Asp Gly Glu Pro Asp Val Pro Pro Gly
 420 425 430
 Ala Ile Glu Gln Gly Pro Ala Asp Asp Pro Gly Glu Gly Pro Ser Thr
 435 440 445
 Gly Pro Arg Gly Gln Gly Asp Gly Gly Arg Arg Lys Lys Gly Gly Trp
 450 455 460
 Phe Gly Lys His Arg Gly Gln Gly Gly Ser Asn Pro Lys Phe Glu Asn
 465 470 475 480
 Ile Ala Glu Gly Leu Arg Ala Leu Leu Ala Arg Ser His Val Glu Arg
 485 490 495
 Thr Thr Asp Glu Gly Thr Trp Val Ala Gly Val Phe Val Tyr Gly Gly
 500 505 510
 Ser Lys Thr Ser Leu Tyr Asn Leu Arg Arg Gly Thr Ala Leu Ala Ile
 515 520 525
 Pro Gln Cys Arg Leu Thr Pro Leu Ser Arg Leu Pro Phe Gly Met Ala
 530 535 540
 Pro Gly Pro Gly Pro Gln Pro Gly Pro Leu Arg Glu Ser Ile Val Cys
 545 550 555 560
 Tyr Phe Met Val Phe Leu Gln Thr His Ile Phe Ala Glu Val Leu Lys
 565 570 575
 Asp Ala Ile Lys Asp Leu Val Met Thr Lys Pro Ala Pro Thr Cys Asn
 580 585 590
 Ile Arg Val Thr Val Cys Ser Phe Asp Asp Gly Val Asp Leu Pro Pro
 595 600 605
 Trp Phe Pro Pro Met Val Glu Gly Ala Ala Ala Glu Gly Asp Asp Gly

165 170 175

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

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

Ile Ile Lys Pro Trp Met Gly Gly Glu Ile Ser Leu Arg Ser Ala Glu
 305 310 315 320
 Lys

<210> 59

<211> 373

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 59

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

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

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

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

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

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 100 105 110

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 115 120 125

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 130 135 140

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 165 170 175

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 180 185 190

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 195 200 205

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 210 215 220

Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys
 225 230 235 240

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 260 265 270

Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 275 280 285

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 290 295 300

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp
 305 310 315 320

Asp Asp Lys

<210> 61

<211> 123

<212> PRT

<213> Vicugna pacos

<400> 61

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Val Ile Asn Thr Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Gly

115 120

<210> 62

<211> 121

<212> PRT

<213> Vicugna pacos

<400> 62

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Asp Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Met

50 55 60

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

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

85 90 95

Ala Lys Glu Pro Arg Val Tyr Tyr Ser Gly Ser Pro Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Gly

115 120

<210> 63

<211> 118

<212> PRT

<213> Vicugna pacos

<400> 63

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg His Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Thr Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Met

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Phe Ala Pro Trp Asp Gly Asp Met Glu Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Gly

115

<210> 64

<211> 469

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 64

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Val Ile Asn Thr Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Trp Ala Pro Leu Val Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Gly Gly Ser Gly Leu Ser
 115 120 125

Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 225 230 235 240
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270

 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

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

 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

 Leu Ser Leu Ser Pro

465

<210> 65

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 65

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Asp Asn Tyr

 20 25 30

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

 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Met

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Lys Glu Pro Arg Val Tyr Tyr Ser Gly Ser Pro Asp Tyr Trp Gly

 100 105 110

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

 115 120 125

Ser Asp Asn His Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

 180 185 190

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

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460

Leu Ser Pro
 465

<210> 66

<211> 464

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 66

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

Gly Met Ser Trp Val Arg His Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Thr Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Met
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Phe Ala Pro Trp Asp Gly Asp Met Glu Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Gly Gly Ser Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn
 115 120 125

His Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 130 135 140

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 195 200 205

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

 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 275 280 285
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335

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

 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

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

<210> 67

<211> 222

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 67

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

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

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

165 170 175

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

180 185 190

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly

195 200 205

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

210 215 220

<210> 68

<211> 222

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 68

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Asn His Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 195 200 205
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 69

<211> 222

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 69

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Phe Asp Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95

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

Asp Asn His Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 115 120 125

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 130 135 140

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 145 150 155 160

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 165 170 175

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 180 185 190

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

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 70

<211> 222

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 70

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Phe Asp Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95

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

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

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

<210> 71

<211> 222

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 71

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

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

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

Gly Arg Ser Asp Asn His Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 115 120 125

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 130 135 140

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 145 150 155 160

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 165 170 175

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 180 185 190

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

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 72

<211> 222

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 72

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220
 <210> 74
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized sequence
 <400> 74
 Thr Ser Thr Ser Gly Arg Ser Ala Asn Pro Arg Gly
 1 5 10
 <210> 75
 <211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 75

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His

1 5 10

<210> 76

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 76

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

1 5 10 15

Asn His

<210> 77

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 77

Gly Ala Gly Val Pro Met Ser Met Arg Gly Gly Ala Gly

1 5 10

<210> 78

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 78

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

1 5 10

<210> 79

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 79

Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Gln

1 5

<210> 80

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 80

Gly Gly Pro Leu Gly Met Leu Ser Gln Ser

1 5 10

<210> 81

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 81

Pro Leu Gly Leu Trp Ala

1 5

<210> 82

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 82

Gly Ala Gly Arg Pro Phe Ser Met Ile Met Gly Ala Gly

1 5 10

<210> 83

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 83

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

1 5 10

<210> 84

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 84

Gly Ala Gly Val Pro Leu Ser Leu Tyr Ser Gly Ala Gly

1 5 10

<210> 85

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 85

Ala Ala Asn Leu Arg Asn

1 5

<210> 86

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 86

Ala Gln Ala Tyr Val Lys

1 5

<210> 87

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 87

Ala Ala Asn Tyr Met Arg

1 5

<210> 88

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 88

Ala Ala Ala Leu Thr Arg

1 5

<210> 89

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 89

Ala Gln Asn Leu Met Arg

1 5

<210> 90

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 90

Ala Ala Asn Tyr Thr Lys

1 5

<210> 91

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 91

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

1 5 10 15

<210> 92

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 92

Pro Arg Phe Lys Ile Ile Gly Gly

1 5

<

210> 93

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 93

Pro Arg Phe Arg Ile Ile Gly Gly

1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 94

Gly Ala Gly Ser Gly Arg Ser Ala Gly

1 5

<210> 95

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 95

Ser Gly Arg Ser Ala

1 5

<210> 96

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 96

Gly Ser Gly Arg Ser Ala

1 5

<210> 97

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 97

Ser Gly Lys Ser Ala

1 5

<210> 98

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 98

Ser Gly Arg Ser Ser

1 5

<210> 99

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 99

Ser Gly Arg Arg Ala

1 5

<210> 100
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized sequence
 <400> 100

Ser Gly Arg Asn Ala

1 5

<210> 101
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 101

Ser Gly Arg Lys Ala

1 5

<210> 102
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 102

Gln Arg Gly Arg Ser Ala

1 5

<210> 103
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 103

Gly Ala Gly Ser Leu Leu Lys Ser Arg Met Val Pro Asn Phe Asn Ala

1 5 10 15

Gly

<210> 104

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 104

Thr Gln Gly Ala Ala Ala

1 5

<210> 105

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 105

Gly Ala Ala Ala Ala Ala

1 5

<210> 106

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 106

Gly Ala Gly Ala Ala Gly

1 5

<210> 107

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 107

Ala Ala Ala Ala Ala Gly

1 5

<210> 108

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 108

Leu Cys Gly Ala Ala Ile

1 5

<210> 109

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400>

> 109

Phe Ala Gln Ala Leu Gly

1 5

<210> 110

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 110

Leu Leu Gln Ala Asn Pro

1 5

<210> 111

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 111

Leu Ala Ala Ala Asn Pro

1 5

<210> 112

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 112

Leu Tyr Gly Ala Gln Phe

1 5

<210> 113

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 113

Leu Ser Gln Ala Gln Gly

1 5

<210> 114

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 114

Ala Ser Ala Ala Ser Gly

1 5

<210> 115

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 115

Phe Leu Gly Ala Ser Leu

1 5

<210> 116

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 116

Ala Tyr Gly Ala Thr Gly

1 5

<210> 117

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 117

Leu Ala Gln Ala Thr Gly

1 5

<210> 118

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 118

Gly Ala Gly Ser Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Ala

1 5 10 15

Gly

<210> 119

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 119

Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly

1 5

<210> 120

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 120

Glu Ala Gln Gly Asp Lys Ile Ile

1 5

<210> 121

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 121

Leu Ala Phe Ser Asp Ala Gly Pro

1 5

<210> 122

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 122

Tyr Val Ala Asp Ala Pro Lys

1 5

<210> 123

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 123

Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 124

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 124

Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 125

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 125

Gly Gln Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu

1 5 10

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 126

Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp

1 5

<210> 127

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 127

Arg Lys Ser Ser Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu

1 5 10

<210> 128

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 128

Ser Ser Ser Phe Asp Lys Gly Lys Tyr Lys Lys Gly Asp Asp Ala

1 5 10 15

<210> 129

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 129

Ser Ser Ser Phe Asp Lys Gly Lys Tyr Lys Arg Gly Asp Asp Ala

1 5 10 15

<210> 130

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 130

Ile Glu Gly Arg

1

<210> 131

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 131

Ile Asp Gly Arg

1

<210> 132

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 132

Gly Gly Ser Ile Asp Gly Arg

1 5

<210> 133

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 133

Gly Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln

1 5

<210> 134

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 134

Gly Pro Gln Gly Leu Leu Gly Ala

1 5

<210> 135

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 135

Gly Ile Ala Gly Gln

1 5

<210> 136

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 136

Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly

1 5
<210> 137
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> an artificially synthesized sequence
<400> 137
Gly Pro Glu Gly Leu Arg Val Gly

1 5
<210> 138
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> an artificially synthesized sequence
<400> 138
Tyr Gly Ala Gly Leu Gly Val Val

1 5
<210> 139
<211> 8
<212> PRT
<213>
> Artificial Sequence
<220><223> an artificially synthesized sequence
<400> 139

Ala Gly Leu Gly Val Val Glu Arg
1 5
<210> 140
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> an artificially synthesized sequence
<400> 140

Ala Gly Leu Gly Ile Ser Ser Thr
1 5
<210> 141

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 141

Glu Pro Gln Ala Leu Ala Met Ser

1 5

<210> 142

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 142

Gln Ala Leu Ala Met Ser Ala Ile

1 5

<210> 143

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 143

Ala Ala Tyr His Leu Val Ser Gln

1 5

<210> 144

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 144

Met Asp Ala Phe Leu Glu Ser Ser

1 5

<210> 145

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 145

Glu Ser Leu Pro Val Val Ala Val

1 5

<210> 146

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 146

Ser Ala Pro Ala Val Glu Ser Glu

1 5

<210> 147

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 147

Asp Val Ala Gln Phe Val Leu Thr

1 5

<210> 148

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 148

Val Ala Gln Phe Val Leu Thr Glu

1 5

<210> 149

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 149

Ala Gln Phe Val Leu Thr Glu Gly

1 5

<210> 150

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 150

Pro Val Gln Pro Ile Gly Pro Gln

1 5

<210> 151

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 151

Leu Val Pro Arg Gly Ser

1 5

<210> 152

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 152

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

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

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Ala
 210

<210> 153
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized sequence
 <400> 153

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Ala
 100 105
 <210> 154
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized sequence
 <400> 154
 Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Ile Ser Phe Ser Ile Ser
 20 25 30

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

 Thr Lys Phe Pro Trp Ser Thr Asp Trp Asp Ser Arg Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Gln Val Thr Val Ser Gly Gly Ser Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn
 115 120 125

His Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 130 135 140
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 145 150 155 160

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

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

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

 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

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

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

 <210> 155
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized sequence

 <400> 155
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Ile Ser Phe Ser Ile Ser
 20 25 30
 Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Glu Ala Tyr Tyr Ala Asn Ser Met Lys
 50 55 60

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

115 120 125
 His Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 130 135 140
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 145 150 155 160
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190

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

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

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460

<210> 156

<211> 464

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 156

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Ile Ser Phe Ser Ile Ser
 20 25 30

Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45

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

Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
 85 90 95

Thr Lys Phe Pro Trp Ser Thr Asp Trp Asn Ala Arg Gly Gln Gly Thr

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460

<210> 157
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 157

Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Ile Ser Phe Ser Ile Ser
 20 25 30

Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ala Ser Gly Gly Glu Ala Tyr Tyr Ala Asn Ser Val Lys
 50 55 60

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

Gln Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
 85 90 95

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

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

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

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

 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

	85	90	95
Thr Lys Phe Pro Trp Ser Thr Asp Trp Asn Ala Arg Gly Gln Gly Thr			
	100	105	110
Gln Val Thr Val Ser Gly Gly Ser Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn			
	115	120	125
His Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val			
	130	135	140
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala			
145	150	155	160
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser			
	165	170	175
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val			
	180	185	190
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro			
	195	200	205
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys			
	210	215	220
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
225	230	235	240
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
	245	250	255
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
	260	265	270
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
	275	280	285
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
	290	295	300
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
305	310	315	320
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
	325	330	335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460

<210> 159

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 159

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Tyr Phe Asp Phe Asp Ser Tyr
 20 25 30

Glu Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

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

<210> 160

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> an artificially synthesized sequence

<400> 160

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

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

 115 120

<210> 161

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 161

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

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

225 230 235 240

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

245 250 255

Cys Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly

260 265 270

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

275 280 285

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

290 295 300

Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

305 310 315 320

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

325 330 335

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp

340 345 350

Asp Lys

<210> 162

<211> 629

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 162

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Tyr Phe Asp Phe Asp Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

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

305 310 315 320

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

 325 330 335

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

 340 345 350

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

 355 360 365

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

 370 375 380

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

385 390 395 400

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

 405 410 415

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

 420 425 430

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

 435 440 445

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

 450 455 460

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

465 470 475 480

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

 485 490 495

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

 500 505 510

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

 515 520 525

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

 530 535 540

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

545 550 555 560
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

 565 570 575
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

 580 585 590
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

 595 600 605
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys

 610 615 620
 Asp Asp Asp Asp Lys

625

<210

> 163

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 163

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 164

<211> 631

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 164

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Ser Gly Arg Thr Tyr Arg Gly Tyr Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln

180 185 190

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Val Trp Ser Gly
 195 200 205

Gly Asn Thr Tyr Tyr Glu Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 210 215 220

Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr Leu Gln Met Thr Ser Leu Lys
 225 230 235 240

Pro Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala Lys Ile Arg Pro Tyr
 245 250 255

Ile Phe Lys Ile Ala Gly Gln Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 260 265 270

Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His
 275 280 285

Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 290 295 300

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

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 325 330 335

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 340 345 350

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 355 360 365

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 370 375 380

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 385 390 395 400

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Arg Gly Gly Pro
 405 410 415

Lys Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 420 425 430

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

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

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

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

 610 615 620
 Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 625 630
 <210> 165
 <211> 468
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized sequence
 <400> 165
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

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

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

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

 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 225 230 235 240
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

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

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

 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460
 Ser Leu Ser Pro
 465
 <210> 166
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223

> an artificially synthesized sequence

<400> 166

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

225 230
 <210> 167
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized sequence
 <400> 167

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

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

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

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

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

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

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

435

440

445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

450

455

<210> 168

<400> 168

000

<210> 169

<400> 169

000

<210> 170

<400> 170

000

<210> 171

<400> 171

000

<210> 172

<400> 172

000

<210> 173

<400> 173

000

<210> 174

<400> 174

000

<210> 175

<400> 175

000

<210> 176

<400> 176

000

<210> 177

<400> 177

000

<210> 178

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 178

Thr Ser Thr Ser Gly Arg Ser Ala Asn Pro Arg Gly

1 5 10

<210> 179

<400> 179

000

<210> 180

<400> 180

000

<210> 181

<400> 181

000

<210> 182

<400> 182

000

<210> 183

<400> 183

000

<210> 184

<400> 184

000

<210> 185

<400> 185

000

<210> 186

<400> 186

000

<210> 187

<400> 187

000

<210> 188

<400> 188

000

<210> 189

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 189

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

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Val

 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Trp Asn Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Thr Glu Ser Met

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

65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95
 Val Lys Gly Ser Thr Ala Ile Val Gly Val Pro Pro Thr Tyr Pro Asp

 100 105 110
 Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr

 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Arg Ser Ala Asn Pro Arg Gly Ala Ser Thr Lys Gly

 130 135 140
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly

145 150 155 160
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val

 165 170 175
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

180 185 190
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val

195 200 205
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val

210 215 220
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys

225 230 235 240
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

245 250 255
 Arg Arg Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

260 265 270
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

275 280 285
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

290 295 300
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser

305 310 315 320
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

325 330 335
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser

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

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

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

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

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

420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460

Leu Ser Pro

465

<210> 190

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 190

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Gly Val

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Ser Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ala Glu Pro Pro Asp Ser Ser Trp Tyr Leu Asp Gly Ser Pro Glu

100 105 110

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

115 120 125

<210> 191

<211> 455

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 191

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Gly Val

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Ser Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ala Glu Pro Pro Asp Ser Ser Trp Tyr Leu Asp Gly Ser Pro Glu

100 105 110

Phe Phe Lys Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys

210 215 220

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

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<

400> 192

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Ser Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Ala Glu Pro Pro Asp Ser Ser Trp Tyr Leu Asp Gly Ser Pro Glu

 100 105 110

Phe Phe Lys Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly

 165 170 175

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

 180 185 190

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

 195 200 205

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys

 210 215 220

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 225 230 235 240

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 245 250 255

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 260 265 270

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 275 280 285

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 290 295 300

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315 320

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 325 330 335

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 340 345 350

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 355 360 365

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 370 375 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 385 390 395 400

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

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 420 425 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 435 440 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455

<210> 193

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 193

Gly Gly Gly Gly Ser Pro Leu Gly Leu Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 194

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 194

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Gln Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly Ser

<210> 195

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 195

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Gly Val Pro Leu Ser Leu Tyr Ser Gly

1 5 10 15

Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser

20

<210> 196

<211> 471

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 196

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

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

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

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

290 295 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

305 310 315 320

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

325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

340 345 350

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

355 360 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met

370 375 380

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

385 390 395 400

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

405 410 415

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

420 425 430

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

435 440 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

450 455 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

465 470

<210> 197

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 197

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

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

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

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

465

470

<210> 198

<211> 478

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 198

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Trp Asn Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Thr Glu Ser Met

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

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

 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Gly Val Pro Leu Ser Leu Tyr Ser Gly

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

 180 185 190

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 195 200 205

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 210 215 220

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 225 230 235 240

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 245 250 255

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 260 265 270

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 275 280 285

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 290 295 300

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 305 310 315 320

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 325 330 335

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 340 345 350

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 355 360 365

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 370 375 380

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 385 390 395 400

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 405 410 415

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 420 425 430

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

435 440 445
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

450 455 460
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

465 470 475

<210> 199

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 199

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 200

<211> 1267

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 200

Met Trp Trp Arg Leu Trp Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Pro Met Val Trp Ala Glu Ala Gly Leu Pro Arg Ala Gly Gly Gly Ser

20 25 30

Gln Pro Pro Phe Arg Thr Phe Ser Ala Ser Asp Trp Gly Leu Thr His

35 40 45

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

50 55 60

Arg Ile Tyr Lys Leu Ser Gly Asn Leu Thr Leu Leu Arg Ala His Val

65 70 75 80

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

85 90 95

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

Cys Leu Phe Thr Leu Arg Ala Ile Lys Glu Lys Ile Lys Glu Arg Ile

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Phe Cys Gly Gln Asp Phe Asn Gln Pro Leu Gly Gly Thr Val Thr Ile

405 410 415

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

420 425 430

Ala Ala Tyr Asp Tyr Arg Gly Arg Thr Val Val Phe Ala Gly Thr Arg

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Ile Leu Arg Asp Leu Val Leu Ser Pro Asn His Gln Tyr Leu Tyr Ala

485 490 495

Met Thr Glu Lys Gln Val Thr Arg Val Pro Val Glu Ser Cys Val Gln

500 505 510

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

515 520 525

Trp Cys Val Leu His Ser Ile Cys Ser Arg Arg Asp Ala Cys Glu Arg

530 535 540

Ala Asp Glu Pro Gln Arg Phe Ala Ala Asp Leu Leu Gln Cys Val Gln

545 550 555 560

Leu Thr Val Gln Pro Arg Asn Val Ser Val Thr Met Ser Gln Val Pro

565 570 575

Leu Val Leu Gln Ala Trp Asn Val Pro Asp Leu Ser Ala Gly Val Asn

580 585 590

Cys Ser Phe Glu Asp Phe Thr Glu Ser Glu Ser Val Leu Glu Asp Gly

Ala Arg His Gly Ser Ser Arg Cys Thr Asp Pro Lys Ile Leu Lys Leu
 850 855 860
 Ser Pro Glu Thr Gly Pro Arg Gln Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Thr
 865 870 875 880
 Gly Glu Asn Leu Gly Leu Arg Phe Glu Asp Val Arg Leu Gly Val Arg
 885 890 895
 Val Gly Lys Val Leu Cys Ser Pro Val Glu Ser Glu Tyr Ile Ser Ala
 900 905 910
 Glu Gln Ile Val Cys Glu Ile Gly Asp Ala Ser Ser Val Arg Ala His
 915 920 925
 Asp Ala Leu Val Glu Val Cys Val Arg Asp Cys Ser Pro His Tyr Arg
 930 935 940
 Ala Leu Ser Pro Lys Arg Phe Thr Phe Val Thr Pro Thr Phe Tyr Arg
 945 950 955 960
 Val Ser Pro Ser Arg Gly Pro Leu Ser Gly Gly Thr Trp Ile Gly Ile
 965 970 975
 Glu Gly Ser His Leu Asn Ala Gly Ser Asp Val Ala Val Ser Val Gly
 980 985 990
 Gly Arg Pro Cys Ser Phe Ser Trp Arg Asn Ser Arg Glu Ile Arg Cys
 995 1000 1005
 Leu Thr Pro Pro Gly Gln Ser Pro Gly Ser Ala Pro Ile Ile Ile
 1010 1015 1020
 Asn Ile Asn Arg Ala Gln Leu Thr Asn Pro Glu Val Lys Tyr Asn
 1025 1030 1035
 Tyr Thr Glu Asp Pro Thr Ile Leu Arg Ile Asp Pro Glu Trp Ser
 1040 1045 1050
 Ile Asn Ser Gly Gly Thr Leu Leu Thr Val Thr Gly Thr Asn Leu
 1055 1060 1065
 Ala Thr Val Arg Glu Pro Arg Ile Arg Ala Lys Tyr Gly Gly Ile
 1070 1075 1080
 Glu Arg Glu Asn Gly Cys Leu Val Tyr Asn Asp Thr Thr Met Val

1 5 10 15
 Leu Leu Met Leu Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Lys Asp Asn Thr Val

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

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

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

 210 215 220
 Ala Gln Ile Val Ile Gly Ala Gly Ile Asn Met Ala Met Arg Arg Val
 225 230 235 240
 Glu Glu Ser Val Val Asn Gln Gly Trp Ile Thr Leu Gln Glu Ala Gly
 245 250 255

Ile Asn Leu Asp Arg Asn Thr Leu Ala Ala Met Leu Ile Arg Glu Leu
 260 265 270
 Arg Ala Ala Leu Glu Leu Phe Glu Gln Glu Gly Leu Ala Pro Tyr Leu
 275 280 285
 Ser Arg Trp Glu Lys Leu Asp Asn Phe Ile Asn Arg Pro Val Lys Leu
 290 295 300
 Ile Ile Gly Asp Lys Glu Ile Phe Gly Ile Ser Arg Gly Ile Asp Lys
 305 310 315 320
 Gln Gly Ala Leu Leu Leu Glu Gln Asp Gly Ile Ile Lys Pro Trp Met
 325 330 335
 Gly Gly Glu Ile Ser Leu Arg Ser Ala Glu Lys
 340 345

<210> 202

<211> 463

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 202

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

100	105	110
Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala		
115	120	125
Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Gln Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
130	135	140
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
145	150	155
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
165	170	175
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
180	185	190
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
195	200	205
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
210	215	220
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
225	230	235
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
245	250	255
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
260	265	270
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
275	280	285
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
290	295	300
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
305	310	315
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
325	330	335
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
340	345	350

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 355 360 365

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460

<210> 203

<211> 465

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> an artificially synthesized sequence

<400> 203

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Trp Asn Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Thr Glu Ser Met
 50 55 60

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

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

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

 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

 Pro
 465
 <210> 204
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> an artificially synthesized sequence
 <400> 204
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Ser Ala Ile Ser Trp Asn Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Thr Glu Ser Met
 50 55 60

Ser Ala Ile Ser Trp Asn Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Thr Glu Ser Met
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Lys Gly Ser Thr Ala Ile Val Gly Val Pro Pro Thr Tyr Pro Asp
 100 105 110
 Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120 125
 Gly Ala Gly Val Pro Leu Ser Leu Thr Met Gly Ala Gly Ser Thr Lys
 130 135 140
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 225 230 235 240
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

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

260 265 270
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

275 280 285
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

290 295 300
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 305 310 315 320

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 325 330 335
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

340 345 350
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln

355 360 365
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 370 375 380

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 385 390 395 400
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

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

420 425 430
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 435 440 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 450 455 460
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

465 470